

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 535**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2017** **PCT/EP2017/078474**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2018** **WO18083339**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2017** **E 17801380 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** **EP 3535290**

54 Título: **Dispositivo celular de dos partes modificado por ingeniería para el descubrimiento y la caracterización de una interacción de receptor de linfocitos T con antígeno relacionado**

30 Prioridad:

07.11.2016 DK PA201670874

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2024

73 Titular/es:

GENOVIE AB (100.0%)
Forskargatan 20 C
151 36 Södertälje, SE

72 Inventor/es:

JARVIS, REAGAN MICHEAL;
HILL, RYAN EDWARD y
PASE, LUKE BENJAMIN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 970 535 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

Dispositivo celular de dos partes modificado por ingeniería para el descubrimiento y la caracterización de una interacción de receptor de linfocitos T con antígeno relacionado

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, la ciencia médica y las interacciones del receptor de linfocitos T con antígenos. Específicamente, la presente invención se refiere a un sistema celular modificado por ingeniería que comprende dos partes, en el que cada parte comprende un sistema celular modificado por ingeniería distinto que se hacen interaccionar entre sí durante el funcionamiento del sistema.

Antecedentes de la invención

La vigilancia inmunitaria por linfocitos T (linfocitos T) es una función básica de la inmunidad adaptativa de todos los vertebrados provistos de mandíbulas. La vigilancia inmunitaria de los linfocitos T se logra a través de una rica diversidad funcional entre subtipos de linfocitos T, que sirve para eliminar células neoplásicas e infectadas por patógenos y coordinan respuestas inmunitarias adaptativas a patógenos invasores, microorganismos comensales, factores no propios comensales, tales como componentes moleculares de productos alimenticios e incluso mantener la autotolerancia inmunitaria. Para responder a diversos factores foráneos y factores propios, los linfocitos T deben poder detectar específicamente constituyentes moleculares de estos factores foráneos y factores propios. Por tanto, los linfocitos T deben poder detectar una parte importante de moléculas propias y foráneas con la que una persona se encuentre, con especificidad suficiente para desencadenar respuestas eficientes contra organismos patógenos y células propias enfermas, al tiempo que se evita desencadenar tales respuestas contra células propias sanas. La naturaleza altamente compleja de esta tarea resulta evidente cuando se considera la diversidad prácticamente ilimitada de moléculas tanto foráneas como propias, y considerando que tales organismos patógenos están bajo presión evolutiva para evadir la detección por parte de los linfocitos T.

Receptor de linfocitos T (TCR)

Los linfocitos T se definen principalmente por la expresión de un receptor de linfocitos T (TCR). El TCR es el componente del linfocito T que es responsable de interaccionar con, y detectar, las dianas de la inmunidad adaptativa de los linfocitos T. En términos generales, el TCR se compone de un complejo proteico heterodimérico presentado en la superficie celular. Cada una de las dos cadenas de TCR se compone de dos dominios extracelulares, que son la región variable (V) y la región constante (C), perteneciendo ambas al dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), y formando láminas β antiparalelas. Estos se anclan a la membrana celular mediante un dominio transmembrana tipo I, que es contiguo a una cola citoplasmática corta. La cualidad de los linfocitos T para adaptarse y detectar diversos constituyentes moleculares surge de la variación en las cadenas de TCR que se genera durante la génesis de los linfocitos T. Esta variación se genera por recombinación somática de manera similar a la génesis de anticuerpos en los linfocitos B.

Diversidad de cadenas de TCR

La agrupación de linfocitos T consiste en varias subpoblaciones heterogéneas funcionalmente y a nivel fenotípico. Sin embargo, los linfocitos T pueden clasificarse a grandes rasgos como $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ según la forma del TCR reordenado somáticamente que expresan en su superficie. Existen dos formas de pares de cadenas de TCR; pares de TCR alfa (TRA) y TCR beta (TRB); y pares de TCR gamma (TRG) y TCR delta (TRD). Los linfocitos T que expresan pares TRA:TRB se denominan linfocitos T $\alpha\beta$, mientras que los linfocitos T que expresan pares TRG:TRD se denominan a menudo linfocitos T $\gamma\delta$.

Los TCR de ambas formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ son responsables del reconocimiento de diversos ligandos, o 'antígenos', y cada linfocito T genera cadenas del receptor $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ *de novo* durante la maduración de los linfocitos T. Estos pares de cadenas *de novo* del TCR logran diversidad de reconocimiento a través de la generación de diversidad de secuencias del receptor en un proceso denominado recombinación somática V(D)J tras el cual cada linfocito T expresa copias de un único TCR reordenado de manera distinta. En los loci de TRA y TRG, hay disponibles varios segmentos génicos variables (V) y funcionales (J) distintos para su recombinación y yuxtapuestos a segmentos génicos constantes (C) que, por tanto, se designa como recombinación VJ. La recombinación en los loci de TRB y TRD incluye de manera adicional un segmento génico de diversidad (D), y esto se denomina recombinación VDJ.

Cada TCR recombinado presenta un potencial de especificidad de ligando única, determinado por la estructura del sitio de unión a ligando formado por las cadenas α y β en el caso de los linfocitos T $\alpha\beta$ o las cadenas γ y δ en el caso de los linfocitos T $\gamma\delta$. La diversidad estructural de los TCR está limitada principalmente a tres bucles en horquilla cortos en cada cadena, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Tres CDR proceden de cada cadena del par de cadenas del receptor y, en conjunto, estos seis bucles CDR se asientan en el extremo distal a la membrana del dominio extracelular del TCR para formar el sitio de unión a antígeno.

La diversidad de secuencias de cada cadena de TCR se obtiene de dos formas. En primer lugar, la selección aleatoria de segmentos génicos para recombinación proporciona diversidad inicial de secuencias. Por ejemplo, la recombinación de TRB se produce entre 47 segmentos génicos V únicos, 2 segmentos génicos D únicos y 13 segmentos génicos J únicos de la línea germinal. En general, el segmento génico V contribuye a los bucles de CDR1 y CDR2 y, por tanto, están codificados por la línea germinal. El segundo modo para generar diversidad de secuencia se produce dentro de los bucles de CDR3 hipervariables, que se generan mediante delección al azar de nucleótidos molde y adición de nucleótidos no molde en las uniones entre los segmentos génicos V, (D) y J de recombinación.

Complejo TCR:CD3

Los pares de cadenas de TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ maduros se presentan en la superficie celular en un complejo con varias subunidades de CD3 auxiliares, denominadas ϵ , γ , δ y ζ . Estas subunidades se asocian con los TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ en forma de tres dímeros ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, ζ). Este complejo TCR:CD3 forma la unidad para la iniciación de respuestas de señalización celular después del acoplamiento de un TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ con el antígeno relacionado. Las CD3 auxiliares asociadas como complejo TCR:CD3 contribuyen a motivos de señalización denominados motivos de activación del inmunoceptor basados en tirosina (ITAM). CD3 ϵ , CD3 γ y CD3 δ contribuyen cada uno a un único ITAM mientras que el homodímero de CD3 ζ contiene 3 ITAM. Los tres dímeros de CD3 ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$) que se ensamblan con el TCR contribuyen, por tanto, con 10 ITAM. Tras la unión del TCR con el antígeno relacionado, la fosforilación de los residuos de tirosina en tándem crea sitios de acoplamiento emparejados para proteínas que contienen dominios de homología Src 2 (SH2), tales como la crucial proteína asociada a la cadena ζ de 70 kDa (ZAP-70). El reclutamiento de tales proteínas inicia la formación de complejos de señalización TCR:CD3 que son responsables, en última instancia, de la activación y diferenciación de los linfocitos T.

Linfocitos T $\alpha\beta$

Los linfocitos T $\alpha\beta$ son generalmente más abundantes en los seres humanos que sus homólogos los linfocitos T $\gamma\delta$. La mayoría de los linfocitos T $\alpha\beta$ interactúan con antígenos peptídicos presentados por complejos de HLA en la superficie celular. Estos linfocitos T que reconocen el péptido-HLA (pHLA) fueron los primeros en describirse y, con diferencia son los mejor caracterizados. También se han descrito formas menos frecuentes de linfocitos T $\alpha\beta$. Los linfocitos T invariantes asociados a la mucosa (MAIT) parecen tener una diversidad de cadenas α y β relativamente limitada, y reconocen metabolitos bacterianos en vez de fragmentos de proteína. Los linfocitos T citotóxicos naturales invariantes (linfocitos T iNK) y los linfocitos T reactivos a micobacterias codificados por la línea germinal (linfocitos T GEM) se restringen al reconocimiento de glicolípidos presentados de manera cruzada por moléculas distintas de HLA. Se considera que los linfocitos T iNK interactúan en gran medida con glicolípidos presentados por CD1d, mientras que los linfocitos T GEM interactúan con glicolípidos presentados por CD1b. Se cree que formas adicionales de linfocitos T interactúan con glicolípidos en el contexto de CD1a y CD1c; sin embargo, tales células aún deben caracterizarse con un detalle significativo.

Linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales

La característica clave de la mayoría de los linfocitos T $\alpha\beta$ es el reconocimiento de antígenos peptídicos en el contexto de moléculas de HLA. Se denominan con frecuencia linfocitos T $\alpha\beta$ 'convencionales'. En un individuo, las moléculas propias de HLA presentan péptidos de proteínas propias y foráneas a los linfocitos T, proporcionando la base esencial de la inmunidad adaptativa contra neoplasias malignas y patógenos foráneos, tolerancia adaptativa hacia organismos comensales, productos alimenticios y el propio organismo. El locus de HLA que codifica para las proteínas de HLA es la región más polimórfica y de mayor densidad génica del genoma humano, y se han descrito más de 12.000 alelos en seres humanos. El alto grado de polimorfismo en el locus del HLA garantiza una diversidad de presentación de antígenos peptídicos entre individuos, que es importante para la inmunidad a nivel de población.

HLA de clase I y II

Existen dos formas de complejos clásicos de HLA: HLA de clase I (HLAI) y HLA de clase II (HLAII). Existen tres genes de HLAI clásicos: *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*. Estos genes codifican para una cadena α transmembrana, que se asocia con una cadena invariante de β 2-microglobulina (β 2M). La cadena α de HLAI se compone de tres dominios con un pliegue de inmunoglobulina: α 1, α 2 y α 3. El dominio α 3 es proximal a la membrana y en gran medida invariante, mientras que los dominios α 1 y α 2 forman juntos la hendidura de unión a antígeno distal a la membrana polimórfica. Existen seis genes de HLAII clásicos: *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRA* y *HLA-DRB1*. Estos genes codifican para complejos DP, DQ y DR heterodiméricos de HLA que comprenden una cadena α y una cadena β . Cada cadena tiene dos dominios estructurales principales con un plegamiento de inmunoglobulina, donde los dominios α 2 y β 2 comprenden módulos proximales a la membrana y en gran medida invariantes similares a los del dominio α 3 de HLAI. Los dominios α 2 y β 2 de HLAII forman juntos la hendidura de unión a antígeno distal a la membrana y son regiones de alto polimorfismo.

La hendidura de unión a antígeno de HLA I y HLA II comprende dos hélices α antiparalelas sobre una plataforma de ocho láminas β antiparalelas. En esta hendidura, el antígeno peptídico se une y presenta en una conformación extendida. Los residuos de contacto con péptidos en HLA I y HLA II son el lugar de la mayor parte del polimorfismo de secuencias, que constituye la base molecular de los diversos repertorios de péptidos presentados por distintos alelos de HLA. El péptido tiene un amplio contacto con la hendidura de unión a antígeno y, como resultado, cada alelo de HLA impone restricciones y preferencias de secuencia distintas sobre los péptidos presentados. Por tanto, un péptido dado se unirá únicamente a un número limitado de HLA y, a la inversa, cada alelo admite únicamente una fracción particular de la colección de péptidos de una proteína dada. La agrupación de alelos de HLA I y HLA II que está presente en cada individuo se denomina haplotipo de HLA. El polimorfismo de los genes de HLA I y HLA II y la expresión codominante de alelos heredados conducen a una diversidad muy grande de haplotipos de HLA en la población humana, que cuando se une a la enorme diversidad de secuencias de los TCR $\alpha\beta$, presenta grandes obstáculos para la normalización del análisis de estas interacciones HLA-antígeno-TCR.

Acoplamiento del TCR $\alpha\beta$ de HLA I y HLA II

Los TCR $\alpha\beta$ reconocen péptidos como parte de una interfase de unión a pHLA mixta formada por residuos tanto del HLA como del antígeno peptídico (autoalterado). Los complejos de HLA I se presentan en la superficie de casi todas las células nucleadas y generalmente se considera que presentan péptidos derivados de proteínas endógenas. Por tanto, los linfocitos T pueden interrogar el proteoma celular endógeno de una célula presentadora de HLA I mediante el muestreo de los complejos de pHLA I de una célula interaccionante. El acoplamiento de HLA I requiere la expresión del correceptor de TCR, CD8, por el linfocito T interaccionante; por tanto, el muestreo de HLA I se restringe a los linfocitos T $\alpha\beta$ CD8⁺. Por el contrario, la presentación en superficie de los complejos de HLA II está restringida en gran medida a la APC profesional y de manera general se considera que presentan péptidos derivados de proteínas exógenas a la célula presentadora. Por tanto, un linfocito T interaccionante puede interrogar al proteoma del microentorno extracelular en el que reside la célula presentadora. El acoplamiento de HLA II requiere la expresión del correceptor de TCR, CD4, por el linfocito T interaccionante; por tanto, el muestreo de HLA II se restringe a los linfocitos T $\alpha\beta$ CD4⁺.

Selección tímica de los TCR $\alpha\beta$

El papel de los TCR $\alpha\beta$, tal como se ha descrito anteriormente, es la detección de complejos de pHLA, de manera que el linfocito T presentador de TCR pueda generar respuestas relacionadas con el papel de dicho linfocito T en el establecimiento de inmunidad. Debe tenerse en cuenta que el repertorio de TCR $\alpha\beta$ generado dentro de un individuo debe dar cuenta de la inmensa e imprevista diversidad de todos los antígenos foráneos que probablemente se encuentren en el contexto de un haplotipo específico y antes de su aparición real. Este resultado se logra en un entorno en el que se generan numerosos TCR $\alpha\beta$ extremadamente diversos de una forma casi aleatorizada con el potencial de reconocer complejos de pHLA no especificados al tiempo que sólo se instruyen específicamente para evitar interacciones intensas con los pHLA propios. Esto se coordina cuidadosamente durante la maduración de los linfocitos T en un proceso denominado selección tímica de los linfocitos.

Durante la primera etapa de maduración de linfocitos T en el timo, los linfocitos T que portan TCR $\alpha\beta$ que no pueden interaccionar con complejos de auto-pHLA con suficiente afinidad, son despojados de una señal de supervivencia y se eliminan. Esta etapa, denominada selección positiva, garantiza que los linfocitos T supervivientes porten un repertorio de TCR que sea al menos potencialmente capaz de reconocer péptidos foráneos o alterados presentados en el contexto correcto de HLA. Posteriormente, los TCR $\alpha\beta$ que interaccionan intensamente con pHLA propios y, por tanto, tienen el potencial de activar la autoinmunidad se eliminan activamente a través de un proceso de selección negativa. Esta combinación de selección positiva y negativa da lugar a que sólo sean los linfocitos T los que portan TCR $\alpha\beta$ con baja afinidad por el pHLA propio que puebla la periferia. Esto establece un repertorio de linfocitos T $\alpha\beta$ que está autorrestringido pero que no es autorreactivo. Esta naturaleza altamente individualizada de la génesis de linfocitos T frente al haplotipo de HLA subraya las dificultades existentes en el análisis normalizado de las interacciones TCR $\alpha\beta$ -antígeno-HLA. Además, forma la base tanto del rechazo de injertos como de la enfermedad de injerto contra huésped, y del principio general de que los TCR $\alpha\beta$ identificados en un individuo pueden tener un efecto completamente diferente en un segundo individuo, lo que tiene claras implicaciones para estrategias terapéuticas y de diagnóstico basadas en TCR y basadas en linfocitos T que surgen en la práctica clínica.

Linfocitos T $\alpha\beta$ no convencionales

Las formas no restringidas por HLA, o 'no convencionales', de linfocitos T $\alpha\beta$ tienen dianas de antígeno molecular muy diferentes. Estos linfocitos T $\alpha\beta$ no convencionales no se acoplan a los complejos de HLA clásicos, sino que se acoplan a proteínas similares a HLA conservadas tales como la familia de CD1 o MR1. La familia de CD1 comprende cuatro formas implicadas en la presentación de manera cruzada de antígenos (CD1a,b,c y d). Estos complejos de superficie celular tienen una cadena α que se asemeja a HLA I, que forma heterodímeros con β 2-M.

Una cavidad hidrófoba pequeña presentada en la superficie distal a la membrana de la cadena α forma un sitio de unión para antígenos basados en lípidos derivados de patógenos. Los linfocitos T citotóxicos naturales de tipo innato (linfocitos T iNK) son el ejemplo que mejor se entiende de reconocimiento de la familia de lípidos/CD1, representando los linfocitos T GEM otro ejemplo destacado. Se sabe que los linfocitos T iNK 'tipo I' interaccionan intensamente con el lípido α -GalCer en el contexto de CD1d. Estos linfocitos T iNK muestran una diversidad de TCR muy limitada con una cadena α de TCR fijada ($V\alpha 10/J\alpha 18$) y un número limitado de cadenas β (con un uso restringido de $v\beta$) y se han asimilado a receptores de reconocimiento de patrones moleculares innatos asociados a patógenos (PAMPS) tales como los receptores de tipo Toll y Nod. Por el contrario, los linfocitos T NK 'tipo II' presentan un repertorio de TCR más diverso, y parecen tener un modo más diverso de acoplamiento al complejo CD1d-lípido. Los linfocitos T GEM reconocen los glicolípidos derivados de micobacterias presentados por CD1b, sin embargo, sólo están empezando a comprenderse los detalles moleculares de la presentación de antígenos por CD1a, b y c así como su reconocimiento de linfocitos T.

Las células MAIT expresan principalmente una cadena α invariante de TCR (TRAV1-2 ligado a TRAJ33, TRAJ20 o TRAJ12), que puede emparejarse con una serie de cadenas β de TCR. En vez de péptidos o lípidos, los TCR de MAIT pueden unirse a metabolitos basados en folato y riboflavina derivados de patógenos presentados por la molécula similar a HLA, MR1. La diversidad limitada pero significativa en los TCR observados en los TCR de MAIT parece permitir el reconocimiento de metabolitos diversos pero relacionados en el contexto de MR1 conservada.

No se entiende bien cómo se seleccionan en el timo los TCR de linfocitos T $\alpha\beta$ no clásicos restringidos por HLA durante la maduración. Sin embargo, parece probable que se siga aplicando el proceso fundamental de selección negativa y positiva descrito anteriormente y algunas pruebas sugieren que esto se produce en nichos especializados dentro del timo.

Linfocitos T $\gamma\delta$

Al contrario que la comprensión mecanística detallada de la génesis de los TCR $\alpha\beta$ y del acoplamiento a pHLA, se sabe relativamente poco acerca de las dianas antigénicas y el contexto de sus homólogos de linfocitos T $\gamma\delta$. Esto se debe en parte a su abundancia relativamente baja en el compartimiento de linfocitos T circulantes. Sin embargo, se considera en general que los linfocitos T $\gamma\delta$ no están restringidos estrictamente por HLA y parecen reconocer el antígeno de superficie más libremente de manera no muy distinta a la de los anticuerpos. De manera adicional, se ha apreciado más recientemente que los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden dominar el compartimiento de linfocitos T residente de tejidos epiteliales, el sitio de interacción principal del sistema inmunitario con el antígeno foráneo. Además, están empezando a aparecer en la bibliografía diversos mecanismos de inmunovigilancia de tumores y de vigilancia de otras formas de células propias desreguladas para linfocitos T $\gamma\delta$. Las dianas de antígeno específicas de los linfocitos T $\gamma\delta$ de tipo tanto innato como adaptativo siguen estando poco definidas, pero la distribución en los tejidos y el reconocimiento rápido de los PAMP sugieren un papel fundamental de los linfocitos T $\gamma\delta$ tanto en la respuesta temprana a antígenos foráneos como también temprano en la vida cuando el sistema inmunitario adaptativo aún está madurando.

Las diversas funciones de los linfocitos T $\gamma\delta$ parecen basarse en el uso de diferentes segmentos génicos $V\gamma$ $V\delta$, y pueden clasificarse a grandes rasgos en dos categorías principales en las que los linfocitos T $\gamma\delta$ con TCR en gran medida invariantes median en el reconocimiento de tipo innato de PAMP de manera muy temprana durante la infección. Además de los PAMP, se cree que este tipo de linfocitos T $\gamma\delta$ reconocen además moléculas propias, incluidos fosfoantígenos que podrían proporcionar señales muy tempranas de estrés celular, infección y desarrollo potencialmente neoplásico. El reconocimiento de los PAMP y los denominados patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs), así como las grandes cantidades de linfocitos T $\gamma\delta$ de tipo innato restringidos a tejidos sugieren fuertemente que estos linfocitos son adecuados para responder rápidamente a la exposición de antígenos sin necesidad de activación, migración selectiva y expansión clonal previas.

Se considera que una segunda forma de linfocitos T $\gamma\delta$ son de naturaleza más adaptativa, con un repertorio de TCR $\gamma\delta$ muy diverso y la capacidad de circular periféricamente y de acceder a los tejidos linfoides directamente. Se han descrito tales linfocitos T $\gamma\delta$ específicos de antígeno para patógenos humanos comunes tales como el CMV, y parecen constituir una respuesta con memoria. Sin embargo, también se ha observado que los linfocitos T $\gamma\delta$ muestran únicamente proliferación clonal relativamente limitada después de la activación y hay pocos datos disponibles sobre el grado de diversidad del TCR y las respuestas específicas de los linfocitos T $\gamma\delta$ en circulación periférica, o en tejidos. Además, aunque se considera generalmente que los TCR $\gamma\delta$ no interaccionan con los complejos de pHLA y, por tanto, no se acoplan a los antígenos peptídicos en este contexto, sólo se han caracterizado algunas dianas antigénicas de los linfocitos T $\gamma\delta$ y el marco molecular subyacente sólo se entiende escasamente.

La baja frecuencia de los linfocitos T $\gamma\delta$ periféricos y la dificultad para estudiar los linfocitos T residentes en tejidos de seres humanos han limitado el conocimiento de cómo este tipo importante y diverso de linfocitos T participan en las respuestas inmunitarias adaptativas. Esta área emergente de investigación requeriría tecnologías más fiables con

las que capturar y caracterizar linfocitos T $\gamma\delta$ poco comunes, aislar sus pares de TCR e identificar sus antígenos relacionados.

Antígenos y células presentadoras de antígeno

En el contexto de los linfocitos T y los TCR, los antígenos pueden definirse como cualquier molécula que puede unirse a un TCR dando lugar a una señal que se transduce dentro del linfocito T. Los antígenos de linfocitos T mejor caracterizados son péptidos presentados en un complejo con HLA I y HLA II y que se unen a linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales. Sin embargo, en los últimos años se ha vuelto evidente que pueden acoplarse linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T $\alpha\beta$ no convencionales a una amplia variedad de biomoléculas como antígenos, incluyendo lípidos, lipopéptidos, glicopéptidos, glicolípidos y varios metabolitos y catabolitos. Además, se ha observado que los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden acoplarse a proteínas completamente plegadas directamente de modo similar a los anticuerpos. Por tanto, el punto de vista de que los antígenos de linfocitos T están restringidos en gran medida a péptidos presentados por HLA se ha ampliado a lo largo de las dos últimas décadas para incluir casi cualquier biomolécula. Teniendo en cuenta este concepto, es relevante definir qué puede considerarse una célula presentadora de antígeno (APC).

Tal como se ha definido en las secciones anteriores, HLA I y HLA II tienen perfiles de expresión dispares entre los diversos tipos de células. Se acepta ampliamente que casi todas las células nucleadas presentan complejos de HLA I en la superficie celular y, por tanto, son competentes para presentar antígenos peptídicos para el muestreo de linfocitos T. Sin embargo, el HLA II tiene un perfil de expresión restringido, y al menos en condiciones de estado estacionario se expresa únicamente en la superficie de células que tienen una función especializada de presentación de antígenos, incluyendo células dendríticas (DC), macrófagos y linfocitos B. Estos tipos de células especializadas se denominan frecuentemente APC profesionales. Para los propósitos de este documento, el término APC se usa para describir cualquier célula nucleada con capacidad de presentar un antígeno para el muestreo de linfocitos T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Tales antígenos no se limitan a los presentados como 'carga' en complejos presentadores de antígeno específicos, tales como moléculas de HLA y similares a HLA, sino que también pueden incluir cualquier resto presentado en la superficie celular que pueda acoplarse a una célula que porta TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$.

Uso terapéutico de los TCR

Se realizó un ensayo sobre transferencia adoptiva de linfocitos T primarios por primera vez en un entorno clínico a principios de los años 1990, partiendo de linfocitos T expandidos *ex vivo* polarizados hacia antígenos virales para conferir inmunidad viral en pacientes inmunodeprimidos. Se han realizado ensayos sobre enfoques similares usando linfocitos T primarios expandidos *ex vivo* contra antígenos de cáncer específicos poco después para el tratamiento de neoplasias malignas. Una limitación en estos enfoques tempranos que sigue constituyendo un desafío hoy día es no comprender la naturaleza y diversidad de linfocitos T enfrentados a la necesidad de optimizar con precisión su composición en el producto terapéutico. Actualmente, el uso de linfocitos T primarios expandidos *ex vivo* se ha abandonado en gran medida por la industria farmacéutica con excepción de unas pocas iniciativas que usan linfocitos T primarios con especificidad por antígenos virales.

En los últimos años, la capacidad de introducir material genético de manera fiable en células humanas primarias ha sido testigo del surgimiento de una serie de agentes terapéuticos de linfocitos T experimentales modificados genéticamente. Tales productos celulares terapéuticos tienen como propósito aprovechar la potencia de las respuestas de linfocitos T y redirigir la especificidad de los linfocitos T hacia una diana antigénica asociada a enfermedad, por ejemplo, un antígeno expresado de manera única por células cancerosas. Estos han dependido en gran medida de la transferencia de un receptor de antígeno quimérico (CAR) a linfocitos T de receptor, en vez de pares de cadenas de TCR reales. Un CAR representa un resto de direccionamiento (con la mayor frecuencia, un elemento de anticuerpo de cadena sencilla que selecciona como diana una proteína expresada en la superficie de células cancerosas) injertado en elementos receptores de señales tales como la cadena ζ del complejo de CD3, para producir un receptor quimérico sintético que imita la función de CD3-TCR. Estos denominados productos de linfocitos T CAR (CAR-T) han tenido un éxito mixto en ensayos clínicos hasta la fecha y a pesar de su potencial no es fácil llevarlos más allá de tumores con dianas moleculares únicas inherentes tales como neoplasias malignas de linfocitos B. De manera alternativa, la transferencia del par de cadenas de TCR de longitud completa a los linfocitos T presenta un interés creciente. Actualmente, dichos agentes terapéuticos de linfocitos T con TCR modificado por ingeniería están limitados por procesos de fabricación complicados y, como sucede con los productos de CAR-T, por una escasez de antígenos diana y de constructos de direccionamiento validados. Hasta la fecha se ha centrado en el uso de los TCR $\alpha\beta$ para el reconocimiento de antígenos peptídicos presentados por HLA I en células cancerosas, y un desafío fundamental de este enfoque es la necesidad de que los antígenos sean específicos de células cancerosas.

Se ha considerado que dado que la interacción TCR-pHLA tiene una afinidad relativamente baja, es probable que los TCR nativos sean subóptimos para terapias de linfocitos T con TCR modificados por ingeniería. Se han diseñado varios enfoques para TCR madurados por afinidad *in vitro*, de manera muy parecida a la maduración por afinidad de anticuerpos de cadena sencilla. Estos enfoques de maduración por afinidad de los TCR también utilizan de manera

general formatos de cadena sencilla, en los que la región V de una cadena se fusiona a la región V de otra cadena para producir un constructo polipeptídico individual. Tales polipéptidos individuales pueden usarse luego en sistemas de presentación en fagos o levaduras adaptados a partir de flujos de trabajo para la modificación por ingeniería de anticuerpos y que se hacen pasar por tandas de selección basándose en la unión a la diana. Existen dos limitaciones inherentes en tal enfoque del TCR de cadena sencilla en cuanto a la producción de pares funcionales de cadenas de TCR. En primer lugar, la selección se basa en la afinidad de unión a la diana. Sin embargo, se ha documentado bien que la afinidad del TCR no siempre está correlacionada con la intensidad o la competencia de la salida de señalización del TCR. En segundo lugar, la selección de constructos de cadena sencilla basada en afinidad no siempre se traduce en afinidades equivalentes una vez que se reconstituyen como receptores de longitud completa.

En un contexto terapéutico, existe una limitación adicional y fundamental en los pares de TCR madurados por afinidad. Es decir, considerando que sus secuencias se han alterado, los constructos resultantes por definición ya no están sometidos a selección tímica, en la que los TCR que reaccionan intensamente con los antígenos propios se eliminan del repertorio. Por tanto, estos TCR modificados conllevan el riesgo inherente de ser autorreactivos, lo que es muy difícil de descartar *in vitro* usando los métodos actuales. Por la misma razón, debe individualizarse cualquier TCR seleccionado o modificado por ingeniería para la aplicación terapéutica. Si los TCR son TCR modificados por ingeniería artificialmente o TCR nativos aplicados entre individuos, deben descartarse las reactividades cruzadas basándose en el haplotipo de HLA y el repertorio de péptidos presentado de cada individuo específico para evitar una autoinmunidad potencialmente letal. Esto se debe al hecho de que la selección tímica se realiza en un fondo de todas las moléculas de HLA disponibles específicas únicamente para dicho individuo dado. La probabilidad de tal reactividad cruzada no está clara. Sin embargo, la capacidad del presente repertorio de TCR para reconocer los complejos de pHLA de otros individuos de la misma especie como foráneos es una propiedad fundamental de la inmunidad adaptativa y respalda el rechazo de injertos y la enfermedad de injerto contra huésped. Ensayos clínicos recientes que usan un par de cadenas de TCR maduras frente al antígeno asociado a melanoma específico de cáncer (MAGE) señalaban el problema potencial de evitar la selección tímica. Cuando los linfocitos T autólogos que contenían los TCR madurados se volvieron a infundir a dos pacientes con cáncer, estos pacientes desarrollaron rápidamente una cardiopatía mortal. Estudios posteriores determinaron que los TCR madurados específicos de MAGE tuvieron reactividad cruzada con un péptido presentado por HLA-I de la proteína cardíaca, titina. Esto sugiere intensamente que la reactividad cruzada es una posibilidad clara en el uso terapéutico de los TCR.

Una vía distinta de utilizar los TCR con fines terapéuticos es su uso como reactivos de afinidad de una manera muy parecida a las sustancias terapéuticas de anticuerpos. Se han utilizado moléculas de TCR de cadena sencilla en ensayos clínicos para administrar sustancias de fármacos conjugados a poblaciones celulares que expresan antígenos específicos de HLA. Este enfoque se considera en general más seguro que los agentes terapéuticos de linfocitos T CAR o con TCR modificados por ingeniería, ya que la administración de la sustancia farmacológica puede simplemente retirarse. Sin embargo, el potencial de reactividad cruzada y los efectos no buscados que son difíciles de prever siguen suponiendo una limitación potencial en este escenario.

Detección del repertorio de TCR en el diagnóstico clínico

En un aspecto relacionado, existe un interés creciente en usar la detección de la abundancia de secuencias específicas de TCR con fines de diagnóstico clínico. Con el aumento de los métodos de secuenciación profunda en particular, es posible capturar de manera global toda la diversidad del TCR en un individuo y de pares $\alpha\beta$ coincidentes en contextos específicos. Esto supone potencialmente un medio para diagnosticar dolencias y patologías específicas simplemente detectando la abundancia de clones de linfocitos T expandidos, como lectura indirecta de la respuesta inmunitaria establecida contra un antígeno asociado a enfermedad en el paciente. Sin embargo, tales enfoques globales están limitados actualmente a respuestas inmunitarias muy intensas con puntos temporales clínicos establecidos y presentan la dificultad subyacente de identificar el antígeno diana específico de cualquier TCR particular identificado mediante secuenciación.

Uso terapéutico y de diagnóstico de antígenos de linfocitos T

El punto fuerte fundamental de aprovechar las respuestas inmunitarias adaptativas se traduce en un desafío técnico fundamental ya que la exquisita especificidad de la interacción TCR-antígeno requiere un conocimiento detallado de los antígenos asociados específicamente a cada patógeno, célula cancerosa o enfermedad autoinmunitaria. Además, cada antígeno puede presentarse por un complejo presentador de antígeno específico, o alelo del mismo, de tal manera que el descubrimiento del antígeno debe hacerse para cada gen de HLA y alelo correspondientes. Para varias enfermedades infecciosas como el VIH, la gripe y el CMV que están asociadas con respuestas inmunitarias adaptativas intensas y que muestran generalmente jerarquías de respuesta a epítomos conservadas, se han mapeado los epítomos más importantes en el contexto de algunos HLA comunes. De manera similar, se han realizado esfuerzos crecientes y sistemáticos en los campos del cáncer, de la alergia y de la autoinmunidad para mapear los antígenos asociados a linfocitos T. Sin embargo, son procedimientos complicados y los esfuerzos para describir de manera sistemática los antígenos de linfocitos T asociados a distintos contextos clínicos se ven obstaculizados por la ausencia de protocolos eficientes, sólidos, rápidos y escalables.

Específicamente, las células cancerosas suponen un aspecto importante y difícil, ya que la mayoría de los péptidos presentados en la superficie de las células cancerosas son antígenos propios o muy similares a los propios. Por tanto, la selección tímica habrá eliminado los TCR que podrían reconocer intensamente estos péptidos, al tiempo que el tumor evoluciona para evadir el reconocimiento inmunitario. Esto significa que las respuestas inmunitarias potentes contra tumores establecidos son relativamente poco frecuentes y dianas difíciles de predecir o descubrir. Sin embargo, estas respuestas existen y, lo que es importante, se asocian generalmente con un mejor desenlace. En la mayoría de casos, la diana de tales respuestas, los antígenos asociados a tumores (TAA) tendrán características distintivas de los antígenos propios y se derivarán de proteínas que se sobreexpresan durante el desarrollo del cáncer, que de lo contrario estarían ausentes del tipo celular en esta etapa del desarrollo o alteradas específicamente por mutación genética o modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación.

Cuando está disponible, el conocimiento de tales epítomos permite interrogar la respuesta de los linfocitos T asociados para realizar descubrimientos fundamentales, con fines de diagnóstico y, por ejemplo, como una prueba de eficacia de una vacuna. Es importante destacar que también proporcionan dianas muy específicas para la tolerización de linfocitos T en alergia y autoinmunidad y, de manera crucial, apuntan a dianas valiosas para inmunoterapia específica y contra células cancerosas. Las neoplasias malignas representan una diana especialmente valiosa ya que la promesa de inmunoterapias celulares y el progreso en las manipulaciones de linfocitos T se ven ralentizadas por una falta de TAA diana validadas más allá de los pocos casos en los que se dispone de marcadores específicos para el tipo de cáncer.

A la vista del potencial de terapia celular y de la falta de dianas validadas, la identificación de antígenos de TCR prometedores sigue siendo uno de los cuellos de botella más acuciantes de la inmunoterapia basada en TCR, particularmente en el esfuerzo para tratar el cáncer.

Aspectos tecnológicos de los análisis de TCR y antígenos de linfocitos T

En general, el desarrollo de terapias basadas en TCR sigue estando en sus primeras etapas y el éxito ha sido limitado. Los enfoques de diagnóstico, aunque tienen un inmenso potencial, rara vez se han aplicado en estudios clínicos controlados que pretendan evaluar patologías o respuestas a terapia en pacientes. Unas técnicas no desarrolladas suficientemente para la captura fiable de pares de cadenas de TCR nativas y el análisis sistemático de interacciones TCR-antígeno con alto rendimiento y en un contexto funcional de comunicación intercelular, ha sido el principal obstáculo para el desarrollo de terapias y diagnóstico basados en TCR.

Los enfoques de secuenciación profunda han llevado a una mejor comprensión de la diversidad de los receptores de los linfocitos T en la salud y en la enfermedad. Sin embargo, estos enfoques se han centrado generalmente en tramos cortos que abarcan las regiones CDR3, principalmente de la cadena β de TCR. La mayoría de los estudios han ignorado la contribución de la cadena α del TCR, y pocos han tratado de analizar las cadenas $\alpha\beta$ emparejadas así como la especificidad de antígeno de los TCR considerados de interés. Los flujos de trabajo recientes usando encapsulación de células únicas y codificación genética ha permitido el emparejamiento de pares de cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ del TCR nativo y el análisis de secuencias de longitud completa; sin embargo, dichos flujos de trabajo siguen siendo experimentales.

Los pares de cadenas de TCR aislados pueden analizarse en cuanto a especificidad de antígeno en modos o bien biofísico o bien funcional. El análisis biofísico requiere la producción recombinante tanto del TCR como del antígeno analito en forma soluble. En el caso de los TCR restringidos por HLA, esto requeriría por tanto la generación de todos los TCR individuales así como de los complejos de pHLA relacionados. Esto supone un desafío técnico muy considerable, lento y con muy bajo rendimiento. Además, tal análisis sólo proporcionaría afinidades de interacción, que no están bien correlacionadas con características funcionales de modos predecibles.

Hasta hace poco, el análisis funcional detallado de secuencias de TCR aisladas en un contexto celular se ha limitado a laboriosos protocolos de transfección de pares de cadenas de TCR analito a linfocitos T primarios o a líneas de linfocitos T inmortales, y la detección de respuestas celulares mediante análisis por citometría de flujo tradicional de la activación celular, o detección de factores secretados desde linfocitos transfectados en la exposición a antígeno. En una publicación reciente de Guo *et al.*, se comunicó la clonación rápida, expresión y caracterización funcional de cadenas de TCR emparejadas procedentes de células individuales (Molecular Therapy – Methods and clinical development (2016) 3:15054). En este estudio, se expresaron pares de TCR $\alpha\beta$ humanos analito en una línea celular indicadora que carecía de expresión de TCR $\alpha\beta$, y que contenía un sistema indicador de proteína fluorescente verde (GFP) unido al promotor Nur77 que se activa tras la estimulación del TCR. Este sistema sigue siendo ineficiente debido a la falta de integración normalizada del TCR en el genoma de la línea celular indicadora, y no proporciona una manera sistemática para la exposición a antígeno unido a células por un elemento de APC.

De manera similar a los flujos de trabajo para identificar los TCR contra antígenos de linfocitos T conocidos, el descubrimiento *de novo* de antígenos de linfocitos T novedosos para la salud y la enfermedad sigue suponiendo un desafío considerable. La mayoría de los enfoques siguen siendo de naturaleza biofísica, y tienen como propósito producir antígenos candidatos que puedan someterse a ensayo en protocolos de inmunización, o a través de la

identificación de TCR relacionados tal como se ha tratado anteriormente. Existe poca o ninguna normalización en el campo del descubrimiento de antígenos de linfocitos T, y el campo está restringido en gran medida al estudio académico.

- 5 Con el interés creciente en los TCR y sus antígenos relacionados para uso tanto terapéutico como de diagnóstico, y con la aparición de medios para capturar cantidades significativas de pares de cadenas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ nativas de TCR, todavía se carece de tecnologías fiables de alto rendimiento y normalizadas para el análisis sistemático de interacciones TCR-antígeno. De manera importante, debe señalarse que existe una falta de sistemas normalizados para el análisis funcional de pares de cadenas de TCR en el contexto nativo de la comunicación celular en el que tanto el TCR como el antígeno se presentan por una célula viable. Además, faltan sistemas que puedan lograr la selección de candidatos de TCR y/o la maduración de la afinidad de los pares de cadenas de TCR, en el contexto relevante de la comunicación celular.

- 15 Tal como se describe, actualmente faltan tecnologías normalizadas para la generación de alto rendimiento de células con pares de TCR expresados en un contexto celular nativo. Es muy deseable disponer de un sistema en el que puedan insertarse pares de TCR de longitud completa como copias individuales en el genoma de una célula presentadora de TCR de tal manera que dichos TCR se presenten en un complejo de superficie celular CD3 nativo para su análisis y selección. Un par de TCR presentado por complejo de CD3 garantiza que los análisis de afinidad reflejen la composición real de TCR nativo, lo que no es el caso del TCR de cadena sencilla y otras tecnologías de presentación de TCR no nativos. Además, la presentación de pares de TCR en un complejo de CD3 en una célula viable es un requisito absoluto para el análisis funcional de pares de TCR. El análisis funcional, es decir, el análisis de la salida de señalización de TCR, es de importancia crítica en los flujos de trabajo de modificación por ingeniería y selección de TCR en los que la salida de señal es el parámetro que generalmente es de mayor importancia para su uso en el contexto de los agentes terapéuticos celulares y no está bien correlacionado con la afinidad de un TCR con antígeno/HLA relacionado tal como se determina en otras plataformas de presentación.

Hamana *et al*, Biochem Biophys Res Comm (2016), vol. 474, páginas 709-714, dan a conocer un método para clonar receptores de linfocitos T funcionales específicos de antígeno a partir de linfocitos T murinos y humanos.

- 30 Xi-zhi Guo *et al*, Molecular Therapy - Methods and Clinical Development (2016), vol. 3, página 15054, dan a conocer la expresión transgénica de genes TCR en una línea celular TCR α - β derivada de Jurkat 76 transfectada con un sistema indicador de GFP, en el que TCR $\alpha\beta$ específico para un antígeno de la gripe aislado de ratones infectados se transfecta en dicha línea celular mediante un vector retroviral.
- 35 Yi Zhang *et al*, PLOS Pathogens (2010), vol. 6, página e1001018 dan a conocer la transducción de un TCR reactivo con el virus de la hepatitis C restringido a HLA-A2 aislado en células Jurkat negativas para TCR usando un vector retroviral, así como la transducción retroviral de células HepG2 con un epítipo del VHC, seguido por la incubación conjunta de las eTPC y eAPC resultantes.

40 **Sumario de la invención**

- En un primer aspecto, la presente invención proporciona un sistema de dos partes que forma un sistema analítico eAPC:eTPC combinado, en el que una primera parte es un sistema de células presentadoras de antígeno modificado por ingeniería (eAPCS) y una segunda parte es un sistema de células presentadoras de TCR modificado por ingeniería (eTPCS), en el que dicho eAPCS comprende

- 50 un primer componente que es una célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería (eAPC), designada como el componente 1A, en el que el componente 1A carece de expresión endógena en superficie de al menos una familia de complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) y/o moléculas antigénicas analito (aAM) y contiene un segundo componente designado como el componente 1B, un sitio de receptor genómico sintético, para la integración de intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE) de uno o dos ORF que codifican para un aAPX y/o una aAM, y

- 55 un tercer componente que es un vector donante genético designado como el componente 1C, para el suministro y la integración en 1B de al menos un ORF que codifica para al menos un aAPX y/o al menos una aAM, en el que el componente 1C se aparea con el componente 1B, y en el que el componente 1C está diseñado para suministrar uno o dos ORF que codifican para uno o más aAPX y/o una o más aAM, de tal manera que el aAPX y/o la aAM puedan expresarse por el componente 1A, y

- 60 en el que dicho eTPCS comprende:

- 65 un primer componente, que es una célula presentadora de TCR modificada por ingeniería (eTPC), designada como el componente 2A, en el que el componente 2A carece de expresión endógena en superficie de al menos una familia de complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) y/o molécula antigénica analito (aAM), carece de expresión endógena de las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR, y expresa proteínas CD3 que se presentan de manera condicional en la superficie de la célula sólo

cuando la célula expresa un par complementario de cadenas de TCR y contiene un segundo componente designado como 2B, un sitio de receptor genómico para la integración de intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE) de un único ORF que codifica para al menos una cadena alfa, beta, delta o gamma de TCR analito, y/o dos ORF que codifican para un par de cadenas de TCR analito, y

un tercer componente es un vector donante genético, designado como el componente 2C, para el suministro de ORF que codifica para cadenas de TCR analito, en el que el componente 2C se aparea con el componente 2B, y en el que el componente 2C está diseñado para suministrar al menos uno de

a. un único ORF que codifica para al menos una cadena alfa, beta, delta o gamma de TCR analito, o

b. dos ORF que codifican para un par de cadenas de TCR analito,

de tal manera que las cadenas de TCR analito puedan expresarse como proteína de superficie de TCR en complejo con CD3 (TCRsp) en el componente A.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un uso del sistema de dos partes de la invención para combinar una o más eAPC analito con una o más eTPC analito.

En una realización, la combinación da como resultado un contacto entre una TCRsp analito y un antígeno analito, en el que el contacto da como resultado una respuesta de señal.

Descripción detallada de la invención

La presente invención aborda las necesidades mencionadas anteriormente. En particular, la presente invención se refiere a la construcción y el uso de un sistema celular de dos partes modificado por ingeniería para el descubrimiento y la caracterización de TCR y antígenos de linfocitos T. Las dos partes del sistema celular general (dispositivo) se componen de distintos tipos de células modificadas por ingeniería que entran en contacto entre sí durante el funcionamiento del sistema. El sistema se usa para el análisis funcional normalizado de la capacidad de respuesta de los TCR analito hacia los antígenos analito. La lectura de tal capacidad de respuesta se usa para la identificación y selección de TCR, antígenos de linfocitos T y la caracterización funcional detallada de las interacciones TCR/antígeno. El sistema presenta antígenos analito a través de una primera población de células, la célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería (eAPC) que se prepara usando el sistema de eAPC (eAPCS). El sistema presenta TCR analito a través de una segunda población de células, la célula presentadora de TCR modificada por ingeniería (eTPC) que se prepara usando el sistema de eTPC (eTPCS).

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un sistema de dos partes que forma un sistema analítico eAPC:eTPC combinado, en el que una primera parte es un sistema de células presentadoras de antígeno modificado por ingeniería (eAPCS) y una segunda parte es un sistema de células presentadoras de TCR modificado por ingeniería (eTPCS),

en el que dicho eAPCS comprende

un primer componente que es una célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería (eAPC), designada como el componente 1A, en el que el componente 1A carece de expresión endógena en superficie de al menos una familia de complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) y/o moléculas antigénicas analito (aAM) y contiene un segundo componente designado como el componente 1B, un sitio de receptor genómico sintético, para la integración de intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE) de uno o dos ORF que codifican para un aAPX y/o una aAM, y

un tercer componente que es un vector donante genético designado como el componente 1C, para el suministro y la integración en 1B de ORF que codifica dicho aAPX y/o dicha aAM, en el que dicho aAPX y/o dicha aAM pertenecen a al menos una familia de aAPX y/o aAM para la que el componente 1A carece de expresión endógena en superficie, en el que el componente 1C se aparea con el componente 1B, y en el que el componente 1C está modificado por ingeniería para suministrar uno o dos ORF que codifican para un aAPX y/o una aAM, de tal manera que el aAPX y/o la aAM puedan expresarse por el componente 1A, y

en el que dicho eTPCS comprende:

un primer componente, que es una célula presentadora de TCR modificada por ingeniería (eTPC), designada como el componente 2A, en el que el componente 2A carece de expresión endógena en superficie de al menos una familia de complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) y/o molécula antigénica analito (aAM), carece de expresión endógena de las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR, y expresa proteínas CD3 que se presentan de manera condicional en la superficie de la célula sólo cuando la célula expresa un par complementario de cadenas de TCR y contiene un segundo componente

designado como 2B, un sitio de receptor genómico para la integración de intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE) de un único ORF que codifica para al menos una cadena alfa, beta, delta o gamma de TCR analito, y/o dos ORF que codifican para un par de cadenas de TCR analito, y

un tercer componente es un vector donante genético, designado como el componente 2C, para el suministro de ORF que codifica para cadenas de TCR analito, en el que el componente 2C se aparea con el componente 2B, y en el que el componente 2C está diseñado para suministrar al menos uno de

c. Un único ORF que codifica para al menos una cadena alfa, beta, delta o gamma de TCR analito, o

d. Dos ORF que codifican para un par de cadenas de TCR analito,

de tal manera que las cadenas de TCR analito puedan expresarse como proteína de superficie de TCR en complejo con CD3 (TCRsp) en el componente A.

El sistema de dos partes de la invención contiene características que permiten un alto grado de normalización y reproducibilidad y restringen de manera crítica la complejidad de las colecciones de antígenos de linfocitos T y TCR analito. Principalmente, esta normalización se logra mediante la integración definida y altamente controlada de antígenos y complejos presentadores de antígenos analito en el genoma de eAPC, y TCR en el genoma de eTPC. Esto permite tiempos de ciclo rápidos para generar poblaciones celulares analito y reduce en gran medida los costes de las plataformas actuales de vectores virales y de integración aleatoria. Además, la presente invención permite la generación de alineamientos de entidades analito basadas en células de manera centrada tanto en eAPC como en eTPC, lo que significa que pueden integrarse grandes bibliotecas de vectores en cualquiera de las poblaciones celulares y someterse a ensayo como bibliotecas de células que expresan unas entidades analito individuales por célula. Los sitios de receptor genómico de una única copia que están diseñándose en el genoma de eAPC y eTPC logran esto, de tal manera que cuando se proporciona mediante un ORF (para HLA, antígeno o cadena de TCR) dentro de los vectores donantes apareados, sólo puede integrarse una única copia de un ORF de la agrupación de vectores. Esto significa que si la agrupación de vectores comprende ORF de identificación mixta, cada célula integrada sólo integrará una única identidad; creando esencialmente alineamientos basados en células similares a otras plataformas de presentación como los bacteriófagos. Este alto nivel de normalización y reducción de la complejidad contrasta con los métodos actuales que usan cultivos de células primarias o inmortales y respuestas endógenas de singularización y sobrecrecimiento extendido para lograr salidas, o en una sistematización parcial de entradas centradas en APC o linfocitos T. Es importante destacar que el sistema celular modificado por ingeniería de dos partes que representa la presente invención logra la normalización de respuestas funcionales relevantes en el contexto de la comunicación celular. Esto es fundamental para reducir el tiempo y los costes de descubrimiento y pruebas clínicas de nuevos candidatos a antígenos de linfocitos T y TCR al aumentar la previsibilidad de sus efectos *in vivo*.

En general, el sistema de la presente invención representa un sistema analítico multicelular compuesto por dos tipos distintos de células humanas modificadas por ingeniería para análisis funcionales del reconocimiento por TCR de antígenos de linfocitos T. Las salidas primarias de este sistema son células que expresan antígeno analito o TCR analito, que posteriormente pueden usarse para determinar las salidas terminales del sistema como secuencias de TCR o antígenos de linfocitos T específicos, respectivamente (figura 1).

El sistema de dos partes funciona en dos fases que comprenden

i. Fase 1, la preparación de poblaciones celulares que portan de antígeno analito y TCR analito y su ensamblaje para dar un sistema combinado que pone en contacto dos poblaciones celulares analito.

ii. Fase 2, la lectura de las respuestas intrínsecas a cualquiera de las poblaciones celulares puestas en contacto del sistema combinado para obtener las salidas del sistema,

en el que el eAPCS y el eTPCS proporcionan los medios para preparar poblaciones de eAPC y eTPC analito, respectivamente, para ensamblarlas en el sistema eAPC:eTPC combinado (figura 1, etapas i y ii).

El eAPCS se define como un sistema para preparar diversas formas de poblaciones de eAPC analito que se proporcionan al sistema eAPC:eTPC combinado, en el que las poblaciones de eAPC analito se definen como una de las siguientes

i. una eAPC-p

ii. una eAPC-a

iii. una eAPC-pa

iv. Bibliotecas de las mismas

en el que la selección de la población de eAPC analito de entrada al sistema eAPC:eTPC combinado está determinada por la naturaleza de los antígenos que son objeto del funcionamiento del sistema. Es decir, la población de eAPC requerida combinada en el sistema eAPC:eTPC está definida por la salida primaria requerida del sistema y/o la salida terminal requerida del sistema (figura 1, etapa i).

El eTPCS se define como un sistema para preparar poblaciones de eTPC analito que se proporcionan al sistema eAPC:eTPC combinado, en el que las poblaciones de eTPC analito se definen como una de las siguientes

i. una eTPC-t

ii. Bibliotecas de eTPC-t

en el que la selección de poblaciones de eTPC analito de entrada al sistema eAPC:eTPC combinado está determinada por la naturaleza de los TCR que son objeto del funcionamiento del sistema. Es decir, la población de eTPC requerida combinada en el sistema eAPC:eTPC está definida por la salida primaria requerida del sistema y/o la salida terminal requerida del sistema (figura 1, etapa ii).

Las salidas primarias del sistema son poblaciones celulares seleccionadas, que han respondido o no al analito presentado por la célula recíproca proporcionada en el sistema eAPC:eTPC. Es decir, tal salida primaria puede representarse como una célula individual, o una agrupación de células, que se han seleccionado basándose en la presencia o ausencia de una respuesta notificada dentro del sistema eAPC:eTPC combinado (figura 1, etapa v). Una respuesta dentro de una eAPC analito sólo se provoca mediante el acoplamiento de un TCR relacionado presentado por una eTPC que se pone en contacto. Una respuesta dentro de una eTPC analito sólo se provoca mediante el acoplamiento de un antígeno relacionado presentado por una eTPC que se pone en contacto (figura 1, etapa iv).

Puede realizarse una selección de eAPC analito y/o eTPC analito del sistema eAPC:eTPC combinado basándose en una respuesta en la célula que se pone en contacto. Es decir, puede seleccionarse una eAPC analito basándose en una respuesta notificada, o la falta de la misma, en la eTPC analito que se pone en contacto. Por el contrario, puede seleccionarse una eTPC analito basándose en una respuesta notificada, o la falta de la misma, en la eAPC analito que se pone en contacto.

Las salidas primarias de eAPC del sistema son células seleccionadas, en las que se realiza la selección basándose en la presencia o ausencia de una respuesta de señal notificada, y estas células pueden comprender una o más de

i. una eAPC-p

ii. una eAPC-a

iii. una eAPC-pa

en las que las células seleccionadas pueden comprender una célula individual, una agrupación de células de la misma identidad, una agrupación de células de identidades diferentes (figura 1, etapa v).

Las salidas primarias de eTPC del sistema son células seleccionadas, en las que se realiza la selección basándose en la presencia o ausencia de una respuesta de señal notificada, y estas células comprenden eTPC-t, en las que las células seleccionadas pueden comprender una célula individual, una agrupación de células de la misma identidad, una agrupación de células de identidades diferentes (figura 1, etapa v).

Cuando se hace funcionar el sistema celular de dos partes, la selección de poblaciones celulares analito para preparar y combinarse en un sistema eAPC:eTPC está determinada por la naturaleza del analito que presenta cada una de las poblaciones de eAPC y eTPC.

Una eAPC-p se define como la expresión de un complejo presentador de antígeno (aAPX) en la superficie celular. Un aAPX puede tener una molécula de carga (CM) cargada como carga de antígeno. Un aAPX cargado con carga de antígeno se define como un complejo aAPX:CM.

Una eAPC-a se define como la expresión de una molécula antigénica analito (aAM). Tal aAM puede presentarse en la superficie celular y/o expresarse o procesarse de manera intracelular de tal manera que represente una carga de aAM que puede cargarse en un aAPX.

Una eAPC-pa se define como la expresión tanto de un aAPX como de una aAM. La aAM puede expresarse o procesarse de manera intracelular de tal manera que represente una carga aAM que puede cargarse en un aAPX. Por tanto, eAPC-pa expresa un aAPX en la superficie celular y también puede expresar aAM cargada como carga en dicho aAPX, que se define como un complejo aAPX:aAM. Es posible que una eAPC-pa no cargue aAM como carga en un aAPX para formar el complejo aAPX:aAM. Además, debido a la naturaleza de los sistemas biológicos, es

inevitable que los complejos aAPX:CM también estén presentes en aAPC-pa.

Una eTPC-t se define como que presenta un par de cadenas de TCR analito que se expresan como proteínas de superficie de TCR en complejo con CD3 (TCRsp), en la que CD3 representa el complejo de superficie en el que se presenta un par heterodimérico de TCR y se define como que presenta subunidades ϵ , γ , δ y ζ que se asocian con un par de cadenas de TCR complementarias como tres dímeros ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$). La expresión de CD3 y un par de cadenas de TCR complementarias es necesaria para la presentación en la superficie celular, por tanto, la ausencia de expresión de TCR o CD3 impedirá que el recíproco se presente en la superficie celular. En la preparación de una eTPC-t, se usa la expresión de un par de TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ y/o CD3 como selección positiva. Por tanto, independientemente de la naturaleza de las combinaciones de cadenas α , β , γ o δ de TCR usadas para preparar la eTPC-t, sólo las células con un par de cadenas de TCR complementarias presentadas en la superficie de la célula en complejo con CD3 se designan como eTPC-t.

Todas las salidas primarias anteriores representan poblaciones celulares que se derivan de una selección realizada según su respuesta notificada en el sistema eAPC:eTPC combinado. Cada eAPC analito presenta un conjunto de antígenos analito potenciales, moléculas de carga intrínsecas y/o complejos presentadores de antígeno analito, mientras que la eTPC presenta TCRsp analito. Es a partir de las células seleccionadas de donde pueden obtenerse las moléculas analito seleccionadas, como salidas terminales del sistema (figura 1, etapa vi).

Una eAPC-p se define como que presenta un aAPX en la superficie celular y puede presentar un complejo aAPX:CM en la superficie celular. Por tanto, puede usarse una eAPC-p que se selecciona del sistema eAPC:eTPC combinado basándose en una respuesta notificada, para determinar las salidas terminales del sistema aAPX, CM y/o aAPC:CM, en el que estas identidades de salida se han seleccionado según la capacidad del antígeno analito determinado para formar un complejo con, y/o notificar una respuesta de señal estimulada por, una TCRsp analito presentada por la eTPC-t analito que se pone en contacto con la eAPC-p seleccionada en el sistema eAPC:eTPC combinado.

Una eAPC-a se define como que presenta una aAM en la superficie celular o de manera intracelular. Por tanto, puede usarse una eAPC-a que se selecciona del sistema eAPC:eTPC combinado basándose en una respuesta notificada, para determinar una salida terminal del sistema aAM, en el que esta identidad de salida se selecciona según la capacidad del analito determinado para formar un complejo con y/o notificar una respuesta de señal estimulada por una TCRsp analito presentada por la eTPC-t analito puesta en contacto con la eAPC-a seleccionada en el sistema eAPC:eTPC combinado.

Una eAPC-pa se define como que presenta un aAPX, una aAM, un aAPX, aAPX:aM o aAPX:CM en la superficie celular. Por tanto, puede usarse una eAPC-pa que se selecciona del sistema eAPC:eTPC combinado basándose en una respuesta notificada, para determinar las salidas terminales del sistema aAM, aAPX, aAPX:aM y/o aAPX:CM, en el que se selecciona esta identidad de salida según la capacidad del analito determinado para formar un complejo con, y/o notificar una respuesta de señal estimulada por, una TCRsp analito presentada por la eTPC-t analito puesta en contacto con la eAPC-pa seleccionada en el sistema eAPC:eTPC combinado.

Tal como se abordó anteriormente, la selección de la eAPC analito puede realizarse basándose en una respuesta notificada en una eTPC que se pone en contacto. Por tanto, puede usarse cualquiera de eAPC-p, eAPC-a y eAPC-pa para obtener indirectamente la salida de TCRsp, si la(s) entrada(s) de TCRsp a la eTPCS se conoce(n) antes de la preparación de la eTPC-t analito.

En el presente contexto, una eTPC-t se define como presentadora de TCRsp. Por tanto, puede usarse una eTPC-t que se selecciona del sistema eAPC:eTPC combinado basándose en una respuesta notificada, para determinar las salidas terminales del sistema TCRsp, en el que esta identidad de salida se selecciona basándose en la capacidad del analito determinado TCRsp para formar un complejo con y/o notificar una respuesta de señal estimulada por un antígeno analito presentado por la eAPC analito que se pone en contacto con la eTPC seleccionada en el sistema eAPC:eTPC combinado.

Tal como se abordó anteriormente, la selección de la eTPC analito puede realizarse basándose en una respuesta notificada en una eAPC que se pone en contacto. Por tanto, puede usarse una eTPC para obtener indirectamente cualquiera de las salidas de antígeno analito, aAM, aAPX, aAPX:aM y/o aAPX:CM, si esa(s) entrada(s) de antígeno analito a la eAPCS se conoce(n) antes de la preparación de la eAPC analito.

Descripción del eAPCS

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a la provisión de un sistema celular de dos partes, en el que cada parte es un sistema celular modificado por ingeniería. El primer sistema celular modificado por ingeniería es un eAPCS multicomponente modificado por ingeniería que se usa para preparar la eAPC analito para combinarla en un sistema eAPC:eTPC de dos partes dentro del sistema.

La forma mínima de eAPCS es un sistema multicomponente en el que un primer componente es una eAPC, designada como el componente 1A, que contiene un segundo componente como el componente B de sitio de

receptor genómico, y un tercer componente como vector donante genético, designado como el componente 1C (figura 2).

Una eAPC representa el componente básico del eAPCS, con el que se relacionan todos los demás componentes del sistema. Por tanto, la eAPC contiene determinadas características, que son nativas o modificadas por ingeniería, que la hacen adecuado para su uso tanto en el eAPCS como en el sistema combinado de dos partes.

En el contexto actual la eAPC, el componente 1a

i. carece de expresión endógena en superficie de al menos una familia de aAPX y/o aAM y

ii. contiene al menos un sitio de receptor genómico, designado como el componente 1B, en el que i) puede obtenerse mediante selección de una población celular que se produce de manera natural que carece de dicha expresión de aAPX y/o aAM, o puede modificarse por ingeniería para que carezca de dicha expresión, y ii) que es sintética y que puede introducirse mediante integración genómica dirigida o no dirigida.

La selección de una candidata celular a eAPC que carece de la expresión deseada de aAPX y/o aAM a partir de poblaciones celulares que se producen de manera natural puede lograrse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Esto puede lograrse directamente mediante la tinción de células diana con reactivos de afinidad específicamente para el aAPX y/o la aAM que se desea que falten en la eAPC, y selección de células que carecen de expresión de aAPX y/o aAM diana.

La modificación por ingeniería de células para que carezcan de expresión de aAPX y/o aAM puede lograrse mediante medios dirigidos y no dirigidos. La mutagénesis no dirigida de la célula puede lograrse proporcionando un mutágeno químico, radiológico u otro a la célula, y luego seleccionando células que carecen de expresión de aAPX y/o aAM diana. La mutación dirigida de los loci genómicos puede lograrse mediante diferentes medios, incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio mediante

i. nucleasas con dedos de zinc

ii. direccionamiento mediado por CRISPR/Cas9

iii. nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) sintéticas

en los que dichas nucleasas dirigidas al sitio inducen mutagénesis por error de reparación de ADN específica del sitio (también conocida como unión de extremos no homólogos) en loci diana, después de lo cual se obtienen células mutadas seleccionando células que carecen de expresión de aAPX y/o aAM diana.

El componente 1A, eAPC, puede incluir opcionalmente receptores de coestimulación de linfocitos T adicionales, en el que tales características permiten formas robustas o variables de comunicación de la eAPC analito con la eTPC analito, en el que la comunicación ajustable es relevante para la identificación o caracterización de TCRsp analito y/o antígenos analito específicos. En el presente contexto, pueden fomentarse diferentes formas de ligamiento de CD28 en la eTPC mediante la inclusión de una o más de CD80, CD86 y/o otras proteínas de la familia de B7.

El componente 1A, eAPC, puede incluir opcionalmente además componentes de moléculas de adhesión a la superficie celular introducidos, o ablación de moléculas de adhesión a la superficie celular endógenas, para fomentar el acoplamiento de eAPC con la eTPC analito y la formación de la sinapsis inmunológica, o para evitar una unión estrecha y la agrupación de células nocivas dentro del sistema eAPC:eTPC combinado, respectivamente. Tales moléculas de adhesión que pueden introducirse como ORF adicionales en el componente 1A, o eliminarse genéticamente de 1A, pueden seleccionarse de la familia de proteínas de adhesión de las integrinas.

Opcionalmente, una eAPC puede tener la capacidad de procesar y cargar antígeno como carga en aAPX mediante maquinaria de carga y procesamiento nativa. Una eAPC que tiene la capacidad de procesar y cargar antígeno como carga en aAPX mediante maquinaria de carga y procesamiento nativa, también procesará y cargará moléculas de carga (CM) que son intrínsecas a la eAPC o al sistema de cultivo en el que está contenida, en el que aAPX que está cargado con una CM se designa como complejo aAPX:CM.

El segundo componente del eAPCS multicomponente mínimo es un vector donante genético, el componente 1C, que se usa para la integración de al menos un ORF que codifica para al menos un aAPX y/o una aAM (figura 2).

El componente 1C es un vector donante genético que se acopla en el sitio de receptor genómico del componente 1B contenido dentro del genoma de la eAPC, el componente 1A. El componente 1C está diseñado para la integración de uno o más ORF que codifican para un aAPX y/o una aAM, codificados en el vector donante genético, en el sitio de receptor genómico, 1B, en el que la integración da como resultado la expresión de aAPX y/o una aAM por la eAPC diana.

En el presente contexto, un vector donante genético y un sitio de receptor genómico emparejados se describen como una pareja de integración.

- 5 En una forma expandida del eAPCS multicomponente, el componente 1A eAPC puede contener además un segundo sitio de receptor genómico, designado como el componente 1D, que se acopla a un segundo vector donante genómico, designado como el componente 1E, que también se añade al sistema (figura 3).).

Un eAPCS multicomponente puede comprender además una o más parejas de integración adicionales.

- 10 Se usa un eAPCS multicomponente, que comprende una eAPC y o bien una o bien dos parejas de integración, para la preparación de las formas de eAPC derivadas

i. eAPC-p

- 15 ii. eAPC-a

iii. eAPC-pa

- 20 en el que cada vector donante genético puede contener uno o más ORF que codifican para uno o más aAPX y/o una aAM, para integrar dichos ORF en los sitios de receptor genómico acoplados, de tal manera que i) exprese al menos un aAPX, ii) exprese al menos una aAM y iii) exprese al menos un aAPX y al menos una aAM (figura 4).

- 25 El vector donante genético y los sitios de receptor genómico funcionan como un subsistema de pareja de integración del eAPCS. En primer lugar, debe combinarse un vector donante genético con los ORF diana, de tal manera que el vector donante de base codifique ahora para esos ORF diana. Luego, el vector donante preparado ensamblado se introduce en la eAPC diana para intercambiar el/los ORF diana en el sitio de receptor genómico, integrando de ese modo los ORF diana en el sitio de receptor acoplado de la célula diana (figura 5).

- 30 Un eAPCS multicomponente que comprende vectores donantes genéticos, el componente 1C y/o 1E, se combina con al menos un ORF que codifica para al menos un aAPX y/o una aAM para obtener el componente 1C' y/o 1E', en el que la combinación se define como el ligamiento de material genético en el/los marco(s) de codificación correcto(s) y en la(s) orientación/orientaciones correcta(s) del vector donante genético.

- 35 La combinación de uno o más ORF en vectores donantes genéticos 1C y/o 1E puede realizarse varias veces con una biblioteca de ORF únicos como

i. reacciones discretas individuales para obtener una biblioteca discreta de vectores 1C' y/o 1E' que codifican para múltiples ORF

- 40 ii. una reacción individual para obtener una biblioteca agrupada de vectores 1C' y/o 1E' que codifican para múltiples ORF

- 45 en las que la biblioteca discreta puede combinarse con el componente 1A varias veces para obtener una biblioteca discreta de eAPC con ORF únicos que codifican para aAPX y/o aAM únicos, o puede combinarse una biblioteca agrupada con el componente 1A como un evento individual para obtener una biblioteca agrupada de eAPC, cada una con ORF únicos que codifican para aAPX y/o aAM únicos.

- 50 La integración eficiente de un número de copias predecible de uno o más ORF en el sitio de receptor genómico es muy ventajosa para el funcionamiento de una eAPC normalizada, donde las poblaciones de eAPC analito pueden prepararse y caracterizarse rápidamente. Por tanto, el/los sitio(s) de receptor genómico y el/los vector(es) donante(s) acoplado(s) son críticos para la función de la eAPC. Además, es muy deseable tener una eAPC en la que los componentes 1B y 1D estén aislados entre sí, de tal manera que el componente de vector donante 1C no pueda integrarse en el componente 1B, y viceversa. Además, también es deseable que el componente 1B y/o el componente 1D sean susceptibles de un método de preparación de una eAPC en el que la introducción de un
- 55 antígeno analito sea rápida, repetible, con una alta probabilidad de integración y suministro correctos del número deseado de copias de aAPX y/o aAM.

El sitio de receptor genómico puede seleccionarse de los siguientes

- 60 i. un constructo sintético diseñado para el intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE)

ii. un constructo sintético diseñado para la recombinación homóloga dirigida al sitio

- 65 iii. un sitio genómico nativo para recombinación homóloga dirigida al sitio

en el que se prefiere i). El método de RMCE puede emplear sitios heteroespecíficos seleccionados que son

específicos para enzimas recombinasas individuales, de tal manera que cada componente 1B y 1D tenga especificidad aislada.

En el presente contexto, el sitio de receptor genómico, el componente 1B y/o el componente 1D comprende al menos uno de los siguientes elementos genéticos.

i. sitios de recombinasa heteroespecíficos

ii. brazos homólogos

iii. promotor eucariota

iv. elemento regulador condicional eucariota

v. terminador eucariota

vi. marcador de selección

vii. sitio aceptor de corte y empalme

viii. sitio donante de corte y empalme

ix. gen no codificante de proteínas

x. aislante

xi. elemento genético móvil

xii. sitio de reconocimiento de meganucleasa

xiii. sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)

xiv. elemento peptídico viral autoescindible

xv. una secuencia de consenso de Kozak.

El sitio de receptor genómico preferido comprendería dos disposiciones diferentes usando los siguientes elementos seleccionados de la lista mencionada previamente de elementos. La primera disposición es para recibir un único ORF que codifica para uno o más aAPX y/o una o más aAM y/o un marcador de selección de integración, a través de la integración por RMCE, en la que la disposición es

5' -[A] [B] [C] [D] [E] [F]- 3'

en la que

A) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible

B) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1

C) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak

D) es el elemento vi) un marcador proteico codificado compatible con FACS y/o MACS

E) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2

F) es el elemento v) terminador eucariota

La segunda disposición es para recibir dos ORF que codifican para uno o más aAPX y/o una o más aAM y/o un marcador de selección de integración, a través de la integración por RMCE, en la que la disposición es

5' -[A] [B] [C] [D] [E] [F] [G] [H] [I]- 3' en la que

A) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible

B) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1

C) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak

D) es el elemento vi) un marcador proteico codificado 1 compatible con FACS y/o MACS

5 E) es el elemento v) un terminador de la transcripción bidireccional eucariota

F) es el elemento vi) un marcador proteico codificado 2 compatible con FACS y/o MACS

G) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak

10 H) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2

I) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible además, en esta segunda disposición, los elementos F, G, e I están codificados en la dirección antisentido.

15 El componente 1C y/o 1E comprende al menos uno de los siguientes elementos genéticos

i. sitios de recombinasa heteroespecíficos

20 ii. brazos homólogos

iii. promotor eucariota

iv. elemento regulador condicional eucariota

25 v. terminador eucariota

vi. marcador de selección

30 vii. sitio aceptor de corte y empalme

viii. sitio donante de corte y empalme

35 ix. gen no codificante de proteínas

x. aislante

xi. elemento genético móvil

40 xii. sitio de reconocimiento de meganucleasa

xiii. sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)

45 xiv. elemento peptídico viral autoescindible

xv. una secuencia de consenso de Kozak

xvi. marcador de selección de integración

50 xvii. un casete de resistencia a antibióticos

xviii. un origen de replicación bacteriano

55 xix. un origen de replicación de levadura

xx. un sitio de clonación

60 En una realización preferida del vector donante genético preferido, el componente 1C y/o el componente 1E, comprenderían dos posibles disposiciones diferentes que usan los siguientes elementos seleccionados de la lista mencionada previamente de elementos.

La primera disposición es para suministrar un único ORF que codifica para uno o más aAPX y/o una o más aAM y/o un marcador de selección de integración, a través de la integración por RMCE, en la que la disposición es

65 5' - [A] [B] [C] [D] [E] - 3' en la que

A) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1

B) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak

5 C) es el elemento xx) un sitio de clonación de un único ORF que codifica para uno o más aAPX y/o una o más aAM y/o el elemento xvi) un marcador de selección de integración

D) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2

10 E) es el elemento xvii) un casete de resistencia a antibióticos y el elemento xviii) un origen de replicación bacteriano, sin orientación específica

además, los elementos viii y/o xiv pueden usarse para ligar múltiples aAPX y/o una o más aAM y/o el elemento xvi entre sí.

15 La segunda disposición es para suministrar dos ORF que codifican para uno o más aAPX y/o aAM y/o un marcador de selección de integración, a través de la integración por RMCE, en la que la disposición es

5' - [A] [B] [C] [D] [E] [F]- 3'

20 en la que

A) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1

25 B) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak

C) es el elemento xx) un sitio de clonación para la introducción de dos o más ORF, con terminadores eucariotas, que codifican para uno o más aAPX y/o una o más aAM y/o el elemento xvi) un marcador de selección de integración

30 D) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak (dirección antisentido)

E) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2

35 F) es el elemento xvii) un casete de resistencia a antibióticos y el elemento xviii) un origen de replicación bacteriano, sin orientación específica

además, los elementos viii y/o xiv pueden usarse para ligar múltiples aAPX y/o aAM y/o el elemento xvi entre sí dentro de cada ORF.

40 *Preparación de poblaciones de eAPC analito en el eAPCS*

El sistema eAPCS descrito anteriormente puede usarse de múltiples maneras para preparar distintas formas de eAPC analito, o bibliotecas de las mismas, que sirven para presentar aAPX, aAM, aAPX:aAM y aAPX:CM analito a la eTPC dentro del sistema eAPC:eTPC combinado durante el funcionamiento del sistema de dos partes.

45 Puede usarse un eAPCS que comprende una única pareja de integración para preparar una eAPC-p a partir del componente 1A en una única etapa, proporcionando el componente 1C' combinado con un ORF para un aAPX, de tal manera que este aAPX se integre en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado y se presenta en la superficie celular (figura 6).

50 Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-p a partir del componente 1A en una única etapa, proporcionando el componente 1C' combinado con un ORF para un aAPX, de tal manera que este aAPX se integre en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado y se presenta en la superficie celular. La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración posteriores (figura 7).

60 Puede usarse un eAPCS que comprende una única pareja de integración para preparar una eAPC-a a partir del componente 1A en una única etapa, proporcionando el componente 1C' combinado con un ORF para una aAM, de tal manera que esta aAM se integre en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa la aAM proporcionada y, o bien se presenta en la superficie celular o bien se retiene de manera intracelular (figura 8).

65 Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-a a partir del componente 1A en una única etapa, proporcionando el componente 1C' combinado con un ORF para una aAM, de tal manera que esta aAM se integre en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa la aAM proporcionada y, o bien se presenta en la superficie celular o bien se retiene de manera intracelular. La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración posteriores (figura

9).

Puede usarse un eAPCS que comprende una única pareja de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente 1A en una única etapa, proporcionando el componente 1C' combinado con dos ORF, uno que codifica para un aAPX y el otro para una aAM, de tal manera que tanto aAPX como aAM se integren en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa el aAPX y la aAM proporcionados, y puede presentar un aAPX:aAM en la superficie celular (figura 10).

Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente 1A en una única etapa, proporcionando el componente 1C' combinado con dos ORF, uno que codifica para un aAPX y el otro para una aAM, de tal manera que tanto aAPX como aAM se integren en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa el aAPX y la aAM proporcionados, y puede presentar un aAPX:aAM en la superficie celular. La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración posteriores (figura 11).

Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente 1A en una única etapa, proporcionando los componentes 1C' y 1E' cada uno combinado con un ORF que codifica o bien para un aAPX o bien para una aAM, de tal manera que tanto aAPX como aAM se integren en el sitio 1B o 1D, para crear 1B' y 1D'. La línea celular resultante expresa el aAPX y la aAM proporcionados, y puede presentar un aAPX:aAM en la superficie celular (figura 12).

Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente 1A en dos etapas, proporcionando en primer lugar el componente 1C' combinado con un ORF que codifica para un aAPX de tal manera que este aAPX se integre en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado y se presenta en la superficie celular. La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar. En la segunda etapa, se proporciona 1E' en el que el vector donante se combina con un ORF que codifica para una aAM de tal manera que esta aAM se integra en el sitio 1E, para crear 1E'. La línea celular resultante expresa la aAM proporcionada, y esta puede procesarse y cargarse como carga en el aAPX para formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular (figura 13).

Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente 1A en dos etapas, proporcionando en primer lugar el componente 1C' combinado con un ORF que codifica para una aAM de tal manera que esta aAM se integre en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa la aAM proporcionada (producto intermedio de eAPC-a). La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar. En la segunda etapa, se proporciona 1E' en el que el vector donante se combina con un ORF que codifica para un aAPX de tal manera que este aAPX se integre en el sitio 1E, para crear 1E'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado, que se presenta en la superficie celular. La aAM integrada en la primera etapa puede procesarse y cargarse como carga en el aAPX para formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular (figura 14).

En los ejemplos mencionados anteriormente de preparación de poblaciones de eAPC-p, eAPC-a y eAPC-pa analito a partir de eAPC, se usa el sistema eAPCS para proporcionar candidatos conocidos de aAPX y aAM de una manera definida para preparar poblaciones discretas de eAPC analito que expresan aAPX y/o aAM definidos. Dicho procedimiento puede repetirse muchas veces para construir bibliotecas de eAPC-p, eAPC-a y eAPC-pa para proporcionarlas al sistema eAPC:eTPC combinado durante el funcionamiento del sistema. Un enfoque alternativo es tomar bibliotecas agrupadas de ORF de aAPX y/o aAM candidatos combinadas con vectores donantes genéticos e integrarlas en una única reacción para obtener bibliotecas agrupadas de eAPC-p, eAPC-a o eAPC-pa analito que expresan múltiples aAPX, aAM y/o aAPX:aAM. Este procedimiento de convertir una agrupación de vectores en una agrupación de eAPC-p, -a y/o -pa se denominará integración al azar. Esto es particularmente útil cuando se analizan bibliotecas grandes de aAM candidatas frente a un aAPX fijo, o viceversa.

Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente 1A en dos etapas, proporcionando en primer lugar el componente 1C' combinado con un ORF que codifica para un aAPX de tal manera que este aAPX se integre en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado en la superficie celular (producto intermedio de eAPC-p). La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar. En la segunda etapa, se proporciona una biblioteca de múltiples 1E' en la que la biblioteca de vectores donantes comprende una agrupación de vectores, cada uno de ellos combinado con un único ORF que codifica para una aAM de tal manera que cada aAM se integra en el sitio 1E, para crear 1E', dentro de células individuales. La agrupación de células resultante contiene una colección de células, en la que cada célula ha integrado un único ORF de aAM aleatorio de la agrupación original de vectores. La aAM integrada en la segunda etapa puede procesarse y cargarse como carga en el aAPX integrado en la primera etapa para formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular (figura 15).

Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente 1A en dos etapas, proporcionando en primer lugar el componente 1C' combinado con un ORF que codifica para una aAM de tal manera que esta aAM se integre en el sitio 1B, para crear 1B'. La línea celular

resultante expresa la aAM proporcionada (producto intermedio de eAPC-a). La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar. En la segunda etapa, se proporciona una biblioteca de múltiples 1E' en la que la biblioteca de vectores donantes comprende una agrupación de vectores, cada uno de ellos combinado con un único ORF que codifica para un aAPX de tal manera que cada aAPX se integra en el sitio 1E, para crear 1E', dentro de células

- 5 individuales. La agrupación de células resultante contiene una colección de células, en la que cada célula ha integrado un único ORF de aAPX aleatorio de la agrupación original de vectores. La aAM integrada en la primera etapa puede procesarse y cargarse como carga en el aAPX integrado en la segunda etapa para formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular (figura 16).
- 10 Puede usarse un eAPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente 1A en una única etapa, proporcionando los componentes 1C' y 1E', cada uno combinado con una biblioteca de ORF que codifica para o bien una biblioteca de aAPX o bien una biblioteca de aAM, de tal manera que tanto aAPX como aAM se integren en el sitio 1B o 1D, para crear 1B' y 1D'. La agrupación de células resultante contiene una colección de células en la que cada célula ha integrado un único ORF de aAPX aleatorio y un único
- 15 ORF de aAM aleatorio de la agrupación original de vectores. Dentro de cada célula en la biblioteca agrupada, puede procesarse una aAM integrada y cargarse como carga en la aAPX integrada en la misma célula para formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular. Una biblioteca agrupada de este tipo contendría todas las combinaciones posibles de aAPX:aAM a partir del conjunto de aAPX y aAM proporcionado (figura 17).
- 20 En los métodos de integración al azar mencionados anteriormente para proporcionar bibliotecas agrupadas de eAPC-pa, la robustez del sistema depende de una única copia del sitio de receptor genómico. Esto es para garantizar que sólo pueda introducirse un único analito en cada célula a través de la pareja de integración. Este sitio de receptor genómico de una única copia es un aspecto opcional de un eAPCS, ya que múltiples copias del mismo sitio de receptor genómico²⁵ pueden ser beneficiosas al proporcionar etapas de integración en las que pueden obtenerse múltiples "alelos" de una biblioteca de vectores proporcionados en la eAPC preparada.
- 25

En el presente contexto, puede seleccionarse un aAPX de uno de los siguientes

- 30 i. uno o más miembros de HLA de clase I.
- ii. uno o más miembros de HLA de clase II
- iii. uno o más complejos presentadores de antígenos no HLA
- 35 Puede seleccionarse un aAPX de uno de los siguientes
- i. un polipéptido o complejo de polipéptidos proporcionado como antígeno analito
- 40 ii. un péptido derivado de un polipéptido proporcionado como antígeno analito
- iii. un péptido proporcionado como antígeno analito
- iv. un metabolito proporcionado como antígeno analito
- 45 v. un polipéptido o complejo de polipéptidos traducido a partir del/de los ORF de la molécula antigénica analito
- vi. un péptido derivado de un polipéptido traducido a partir del/de los ORF de la molécula antigénica analito
- vii. un péptido derivado a partir de la alteración del proteoma del componente A
- 50 viii. un polipéptido derivado a partir de la alteración del proteoma del componente A
- ix. un metabolito derivado a partir de la alteración del metaboloma del componente A

55 *Descripción del eTPCS*

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a la provisión de un sistema celular de dos partes, en el que cada parte es un sistema celular modificado por ingeniería. El primer sistema celular modificado por ingeniería es el eAPCS tal como se describió anteriormente. El segundo sistema celular modificado por ingeniería es un eTPCS multicomponente modificado por ingeniería que se usa para preparar la eTPC analito para su combinación en un sistema eACP:eTPC de dos partes dentro del sistema.

60

La forma mínima de eTPCS es un sistema multicomponente en el que un primer componente es una eTPC, designada como el componente 2A, y un segundo componente es un vector donante genético, designado como el componente 2C (figura 18).

65

Una eTPC representa el componente de base del eTPCS, con el que se relacionan todos los demás componentes del sistema. Por tanto, la eTPC contiene determinadas características, que son nativas o modificadas por ingeniería, que hacen que la eTPC sea adecuada para su uso tanto en el eTPCS como en el sistema combinado de dos partes.

- 5 La eTPC, el componente 2A,
 - i. carece de expresión endógena de las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR, y
 - 10 ii. expresa proteínas CD3 que se presentan de manera condicional en la superficie de la célula sólo cuando la célula expresa un par complementario de cadenas de TCR y
 - 15 iii. contiene un componente adicional designado como 2B, un sitio de receptor genómico para la integración de un único ORF que codifica para al menos una cadena alfa, beta, delta o gamma de TCR analito, y/o dos ORF que codifican para un par de cadenas de TCR analito.
- 20 en la que i puede obtenerse mediante selección de una población celular que se produce de manera natural que carece de dicha expresión, o puede modificarse por ingeniería para que carezca de dicha expresión; ii puede obtenerse mediante selección de una población celular que se produce de manera natural que comprende dicha expresión, o puede modificarse por ingeniería para que comprenda dicha expresión; iii puede ser o introducirse en el genoma mediante ingeniería genética.
- 25 La selección de una célula candidata a eTPC que carece de las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR a partir de poblaciones celulares que se producen de manera natural puede lograrse mediante métodos bien conocidos en la técnica. La tinción de células diana con reactivos de afinidad específicamente para las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR, y la selección de células con cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR, pueden lograr esto directamente.
- 30 La modificación por ingeniería de eTPC para que carezca de expresión de las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR puede lograrse mediante medios específicos y no específicos. La mutagénesis no dirigida de la célula puede lograrse proporcionando un mutágeno químico, radiológico u otro a la célula, y luego seleccionando células que carecen de expresión de aAPX y/o aAM diana. La mutación dirigida de los loci genómicos puede lograrse mediante diferentes medios, incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio mediante
 - 35 i. nucleasas con dedos de zinc
 - ii. direccionamiento mediado por CRISPR/Cas9 (correcto y acrónimo)
 - iii. nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) sintéticas
- 40 en la que dichas nucleasas dirigidas al sitio inducen mutagénesis por error de reparación de ADN específica del sitio en loci diana, después de lo cual se obtienen células mutadas seleccionando células que carecen de expresión de alfa, beta, delta y gamma de TCR.
- 45 Los expertos habituales en la técnica conocen bien opciones para la integración de CD3 y los componentes B y/o D, pero pueden incluir métodos de recombinación dirigida por homología (HDR) y/o de integración aleatoria, en los que puede fomentarse HDR mediante mutación dirigida de los loci genómicos en los que se producirá HDR, y puede lograrse a través de diferentes medios, incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio mediante
 - 50 i. nucleasas con dedos de zinc
 - ii. direccionamiento mediado por CRISPR/Cas9
 - iii. nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) sintéticas,
- 55 en las que dichas nucleasas dirigidas al sitio inducen la reparación de ADN específica del sitio a través de HDR en los loci diana. Después de tales eventos, una proporción de células habrá incorporado el vector de HDR, y puede seleccionarse y/o determinarse mediante cualquier combinación de lo siguiente:
 - 60 iv. análisis de expresión fonotípica no destructivo.
 - v. análisis de expresión fonotípica destructivo
 - vi. análisis genético
- 65 en los que iv y vi son los métodos preferidos para la selección y determinación de eventos de integración genómica con éxito.

Alternativamente, podrían usarse vectores virales para suministrar los componentes requeridos de manera dirigida o no dirigida al sitio.

5 Considerando que el componente 2A, eTPC está diseñado para usarse junto con el componente 1A de eAPC descrito anteriormente, dentro de un sistema eAPC:eTPC combinado, con el propósito de análisis de interacciones de TCR y antígeno de linfocitos T (figura 1), en el aspecto preferido, la eTPC contiene características que minimizan los factores de presentación en eTPC que interferirían en tales análisis.

10 El componente 2A, eTPC opcionalmente carece de expresión endógena en superficie de al menos una familia de aAPX y/o aAM, en el que la falta de expresión en superficie se selecciona para minimizar la interferencia en análisis coincidentes de antígenos analito diana.

La familia de aAPX puede ser cualquiera de los siguientes

- 15 i. HLA de clase I
ii. HLA de clase II

20 iii. complejo presentador de antígeno distinto de HLA.

Una aAM se selecciona de

- 25 i. un polipéptido o complejo de polipéptidos traducido a partir del/de los ORF de la molécula antigénica analito
ii. un péptido derivado de un polipéptido traducido a partir del/de los ORF de la molécula antigénica analito
iii. un péptido derivado a partir de la alteración del proteoma del componente A

30 iv. un polipéptido derivado a partir de la alteración del proteoma del componente A

v. un metabolito derivado a partir de la alteración del metaboloma del componente A

35 El componente 2A, eTPC puede incluir opcionalmente además correceptores de linfocitos T, en el que tales características permiten formas robustas o variables de comunicación de la eTPC analito con la eAPC analito, en el que la comunicación ajustable es relevante para la identificación o caracterización de TCRsp analito y/o antígenos analito específicos.

40 El componente 2A, eTPC puede expresar opcionalmente CD4 y/o CD8, en el que la expresión de CD4 o CD8 restringe eTPC para acoplarse aAPX de tipo HLAII y HLAI, respectivamente.

45 En el presente contexto, el componente 2A, eTPC puede expresar opcionalmente CD28 y/o CD45, en el que CD28 y CD45 contribuyen a la sensibilidad de la señal a través de efectos de anticipación positiva sobre la señalización, mientras que también pueden contribuir a la especificidad de la señal a través de efectos de anticipación negativa sobre la señalización, en lo que se refiere a la señalización a través de una TCRsp expresada analito.

50 El componente 2A, eTPC puede incluir opcionalmente además componentes introducidos de moléculas de adhesión a la superficie celular, o eliminación de moléculas endógenas de adhesión a la superficie celular, para fomentar la acoplamiento de eTPC con la eAPC analito y la formación de la sinapsis inmunológica, o para evitar una unión estrecha y la formación de agrupaciones celulares nocivas dentro del sistema eAPC:eTPC combinado, respectivamente.

55 Tales moléculas de adhesión que pueden introducirse como ORF adicionales en el componente 2A, o eliminarse genéticamente del 2A, pueden seleccionarse de la familia de proteínas de adhesión de las integrinas.

El segundo componente del multicomponente mínimo es un vector donante genético, el componente 2C, que se usa para la integración de al menos un ORF que codifica para al menos una cadena de TCR analito (figura 18).

60 El componente 2C es un vector donante genético que se acopla en el sitio de receptor genómico de 2B, contenido dentro del genoma de la eTPC, el componente 2A. El componente 2C está diseñado para la integración de uno o más ORF que codifican para una cadena de TCR analito, codificada en el vector donante genético, en el sitio de receptor genómico, 2B, en el que la integración da como resultado la expresión de cadenas de TCR analito por la eTPC diana.

65 Un vector donante genético y un sitio de receptor genómico emparejados se describen como una pareja de integración.

Una eTPC está diseñado para responder a la estimulación de un antígeno relacionado, tal como lo presenta la eAPC dentro del sistema eAPC:eTCP combinado. Por tanto, es deseable tener una lectura de indicador normalizada para señalar la respuesta a la estimulación de la TCRsp expresada.

5 En el presente contexto, el componente 2A, eTPC contiene además un componente designado como 2F, un elemento de respuesta a la estimulación de TCR genómico sintético seleccionado de

10 i. un constructo sintético de un único componente que contiene al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador

ii. un constructo sintético multicomponente diseñado con al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador

15 en el que la activación de i y/o ii depende de al menos una ruta de transducción de señales seleccionada de una ruta sintética, una ruta nativa o una combinación de las mismas.

Una eTPC está diseñada para analizar el acoplamiento de la TCRsp presentada con un antígeno analito. La lectura del acoplamiento puede lograrse mediante la inducción de un elemento indicador sintético que responda al acoplamiento de TCRsp. Por tanto, la eTPC puede contener además un componente designado como 2F, un elemento de respuesta a la estimulación de TCR genómico sintético seleccionado de

20 i. un constructo sintético de un único componente que contiene al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador

25 ii. un constructo sintético multicomponente diseñado con al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador

30 en el que la activación de i y/o ii depende de al menos una ruta de transducción de señales seleccionada de una ruta sintética, una ruta nativa o una combinación de las mismas.

Es menos probable que los elementos sintéticos de respuesta a la estimulación de TCR (el componente 2F), con promotores sintéticos en lugar de nativos, imiten una respuesta a la estimulación de TCR natural y, por tanto, representan una aproximación más lejana a la estimulación natural de linfocitos T. Sin embargo, los promotores sintéticos proporcionan una mayor flexibilidad para ajustar y ajustar con precisión la respuesta del indicador para la identificación robusta de eTPC-t que presentan TCRsp que interaccionan de manera productiva con el antígeno analito.

40 Los constructos sintéticos de un único componente proporcionan un espacio limitado para la amplificación o modulación de la respuesta del indicador de señales, pero son más sencillos de implementar y predecir el resultado. Los constructos multicomponente tienen la ventaja de tener un espacio prácticamente ilimitado para construir redes de respuesta complejas; sin embargo, esto tiene el coste de ser más difíciles de implementar y predecir. Una red también proporciona instancias para iniciar bucles de retroalimentación, represión y activación de indicadores de respuesta secundaria.

45 Los promotores sintéticos pueden ligarse a componentes de señalización sintéticos artificiales, que pueden o bien estar de manera posterior en la ruta de señalización de TCR natural inicial o bien sustituirla. En tal caso, el complejo de CD3 puede acoplarse parcial o totalmente a una ruta de señalización sintética artificial y a una red de respuesta. Tales rutas artificiales ofrecen la ventaja de ser muy modulares y adaptables, para un mayor ajuste de precisión fino o una mayor variedad de respuestas.

50 La realización preferida utiliza un constructo sintético multicomponente con promotores sintéticos y al menos una ruta de señalización sintética parcial. Esto proporciona el medio más robusto para garantizar una respuesta limitada de señal en estado de reposo pero con una alta señal indicadora acoplada cuando se produce el ligamiento del antígeno analito a la TCRsp.

Independientemente de la arquitectura exacta de acoplamiento de la estimulación de TCRsp a un componente 2F, el resultado final deseado es un indicador detectable. En la realización preferida, se desea un indicador que sea susceptible de métodos de detección fluorescente (es decir, FACS) y/o de selección física tales como la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS). Alternativamente, el indicador podría ser una molécula secretada o intracelular para la detección mediante ensayos espectrométricos, fluorescentes o luminiscentes, preferiblemente de naturaleza no destructiva, en el que las poblaciones pueden seleccionarse posteriormente basándose en la presencia o ausencia de la molécula indicadora. Además, la respuesta no se limita a un único tipo de indicador, sino que podría ser una combinación de uno o más indicadores diferentes.

65 En un contexto, un constructo sintético multicomponente con promotores sintéticos y una ruta de señalización

sintética parcial (controlador-activador/represor + amplificador-indicador) comprendería:

Controlador-activador/represor:

- 5 a) un promotor sintético
- b) una secuencia de Kozak
- c) un factor de transcripción,
- 10 d) un primer terminador

Amplificador-indicador

- 15 e) un segundo promotor sintético
- f) una secuencia de Kozak
- g) un indicador
- 20 h) un segundo terminador

en los que; a) representa un promotor sintético (controlador, *driver*) que está diseñado para acoplarse a la ruta de señalización natural inicial generada por el ligamiento de TCRsp al antígeno analito. Un controlador mínimo comprende uno o más sitios de unión de factor de transcripción y un promotor central, en el que el promotor central comprende, como mínimo, una caja TATA, un elemento iniciador (Inr) y un sitio de inicio de la transcripción; b) representa una secuencia de Kozak para el inicio de la traducción eficiente del factor de transcripción; c) representa un ORF que codifica para un factor de transcripción (activador o represor) sintético o natural, que puede unirse a la secuencia de ADN del segundo promotor sintético; d) representa un terminador de la transcripción para una transcripción y poliadenilación eficientes del transcrito de ARNm del factor de transcripción, y opcionalmente uno o más elemento(s) genético(s) en 3' no traducido(s). Estos elementos genéticos pueden incluir, pero no se limitan a, elementos de estabilización o desestabilización de transcritos, y secuencias identificadoras únicas; e) representa un segundo promotor sintético (amplificador), que codifica para uno o más sitios de reconocimiento para la unión del factor de transcripción c) y un promotor central, en el que el promotor central comprende, como mínimo, una caja TATA, Inr y un sitio de inicio de la transcripción; f) representa una secuencia de Kozak para el inicio de la traducción eficiente del indicador; g) representa un ORF que codifica para una proteína indicadora; h) representa un terminador de la transcripción para la transcripción y poliadenilación eficientes del transcrito de ARNm indicador, y opcionalmente uno o más elemento(s) genético(s) en 3' no traducido(s). Estos elementos genéticos pueden incluir, pero no se limitan a, elementos de estabilización o desestabilización de la transcripción y secuencias identificadoras únicas.

Es importante reconocer que el paradigma controlador-activador/represor acoplado a amplificador-indicador puede ampliarse para incluir pares controlador-activador/represor y amplificador-indicador adicionales y/o unidades amplificador-indicador adicionales. Además, los activadores pueden reemplazarse por represores para apagar unidades amplificador-indicador y/o unidades controlador-activador/represor, para métodos de selección negativa y/o bucles de anticipación negativa.

En un segundo contexto, un constructo sintético de un único componente con promotores sintéticos (controlador-indicador) comprendería:

- 50 a) un promotor sintético
- b) una secuencia de Kozak
- 55 c) un indicador
- d) un terminador

en el que; a) representa un promotor sintético (controlador) que está diseñado para acoplarse a la ruta de señalización natural inicial generada por el ligamiento de TCRsp al antígeno analito. Un controlador mínimo comprende uno o más sitios de unión de factor de transcripción y un promotor central, en el que el promotor central comprende, como mínimo, una caja TATA, Inr y un sitio de inicio de la transcripción; b) representa una secuencia de Kozak para el inicio de la traducción eficiente del indicador; c) representa un ORF que codifica para una proteína indicadora; d) representa un terminador de la transcripción para una transcripción y poliadenilación eficientes del transcrito de ARNm indicador, y opcionalmente uno o más elemento(s) genético(s) en 3' no traducido(s).

Estos elementos genéticos pueden incluir, pero no se limitan a, elementos de estabilización o desestabilización de transcritos y secuencias identificadoras únicas.

En una forma expandida del eTPCS multicomponente, el componente 2A, eTPC puede contener además un segundo sitio de receptor genómico, designado como el componente 2D, que se acopla a un segundo vector donante genómico, designado como el componente 2E, que también se añade al sistema (figura 19).

Un componente 2A, eTPCS puede comprender además una o más parejas de integración adicionales.

Se usa un eTPCS, que comprende una eTPC y o bien una o bien dos parejas de integración, para la preparación de la eTPC-t usada para el ensamblaje del sistema eAPC:eTPC combinado.

Puede prepararse una eTPC-t mediante la integración de dos cadenas de TCR complementarias para formar una TCRsp o, alternativamente, puede prepararse mediante dos etapas proporcionando cada cadena complementaria de manera secuencial (figura 20).

El vector donante genético y los sitios de receptor genómico funcionan como un subsistema de pareja de integración del eTPCS. En primer lugar, debe combinarse un vector donante genético con los ORF diana, de tal manera que el vector donante de base codifique ahora para esos ORF diana. Luego, el vector donante preparado ensamblado se introduce en la eTPC diana para intercambiar el/los ORF diana en el sitio de receptor genómico, integrando de ese modo los ORF diana en el sitio de receptor acoplado de la célula diana (figura 21).

Una eTPCS que comprende vectores donantes genéticos, el componente 2C y/o 2E, se combina con al menos un ORF que codifica para al menos una cadena de TCR analito para obtener el componente 2C' y/o 2E', en el que la combinación se define como el ligamiento de material genético en el/los marco(s) de codificación correcto(s) y en la(s) orientación/orientaciones correcta(s) del vector genético donante.

La combinación de uno o más ORF en vectores donantes genéticos 2C y/o 2E puede realizarse varias veces con una biblioteca de ORF únicos como

i. reacciones discretas únicas para obtener una biblioteca discreta de vectores 2C' y/o 2E' que codifican para múltiples ORF

ii. una reacción única para obtener una biblioteca agrupada de vectores 2C' y/o 2E' que codifican para múltiples ORF

en la que una biblioteca discreta puede combinarse con el componente 2A varias veces para obtener una biblioteca discreta de eTPC con ORF únicos que codifican para cadenas de TCR individuales, o una biblioteca agrupada puede combinarse con el componente 2A una o más veces para obtener una biblioteca agrupada de eTPC-t en la que cada eTPC-t integra un ORF aleatorizado que codifica para cadenas de TCR analito derivadas de la agrupación original de vectores, de tal manera que cada eTPC-t expresa una sola TCRsp aleatoria única.

La integración eficiente de un número de copias predecible de uno o más ORF en el sitio de receptor genómico es muy ventajosa para el funcionamiento de una eTPC normalizada, donde las poblaciones de eTPC analito pueden prepararse y caracterizarse rápidamente. Por tanto, el/los sitio(s) de receptor genómico y el/los vector(es) donante(s) acoplado(s) son críticos para la función de la eTPC. Además, es muy deseable tener una eTPC en la que los componentes 2B y 2D estén aislados entre sí, de tal manera que el componente 2C del vector donante no pueda integrarse en el componente 2B, y viceversa. Además, también es deseable que el componente 2B y/o el componente 2D sean susceptibles de un método de preparación de una eTPC-t en el que la introducción de un único par de cadenas de TCR complementarias sea rápida, repetible y con una alta probabilidad de integración y suministro correctos de un único par.

El sitio de receptor genómico puede seleccionarse de los siguientes

i. un constructo sintético diseñado para el intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE)

ii. un constructo sintético diseñado para la recombinación homóloga dirigida al sitio

en el que i) es la forma preferida de un sitio de receptor genómico para RCME. El método de RMCE puede emplear sitios heteroespecíficos seleccionados que son específicos para enzimas recombinasas individuales, de tal manera que cada componente 2B y 2D tenga especificidad aislada.

El sitio de receptor genómico, el componente 2B y/o el componente 2D, comprenden al menos uno de los siguientes elementos genéticos

i. sitios de recombinasa heteroespecíficos

- ii. brazos homólogos
 - iii. promotor eucariota
 - 5 iv. elemento regulador condicional eucariota
 - v. terminador eucariota
 - vi. marcador de selección
 - 10 vii. sitio aceptor de corte y empalme
 - viii. sitio donante de corte y empalme
 - 15 ix. gen no codificante de proteínas
 - x. aislante
 - xi. elemento genético móvil
 - 20 xii. sitio de reconocimiento de meganucleasa
 - xiii. sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) elemento peptídico viral autoescindible
 - 25 xiv. una secuencia de consenso de Kozak.
- Un sitio de receptor genómico preferido comprendería dos disposiciones diferentes usando los siguientes elementos seleccionados de la lista de elementos indicada anteriormente.
- 30 La primera disposición es para recibir un único ORF que codifica para una o más cadenas de TCR y/o una marca de selección de integración, mediante integración por RMCE en la que la disposición es
- 5' -[A] [B] [C] [D] [E] [F] - 3'
- 35 en la que
- A) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible
 - B) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1
 - 40 C) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak
 - D) es el elemento vi) un marcador proteico codificado compatible con FACS y/o MACS
 - 45 E) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2
 - F) es el elemento v) terminador eucariota
- La segunda disposición es para recibir dos ORF que codifican para una o más cadenas de TCR y/o un marcador de selección de integración, a través de la integración por RMCE, en la que la disposición es
- 50 5' -[A] [B] [C] [D] [E] [F] [G] [H] [I] - 3'
- en la que
- 55 A) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible
 - B) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1
 - 60 C) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak
 - D) es el elemento vi) un marcador proteico codificado 1 compatible con FACS y/o MACS
 - E) es el elemento v) un terminador de la transcripción bidireccional eucariota
 - 65 F) es el elemento vi) un marcador proteico codificado 2 compatible con FACS y/o MACS

G) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak

H) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2

5 I) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible además, en esta segunda disposición, los elementos F, G, e I están codificados en la dirección antisentido.

El componente 2C y/o 2E comprende al menos uno de los siguientes elementos genéticos

- 10 i. sitios de recombinasa heteroespecíficos
- ii. brazos homólogos
- 15 iii. promotor eucariota
- iv. elemento regulador condicional eucariota
- v. terminador eucariota
- 20 vi. marcador de selección
- vii. sitio aceptor de corte y empalme
- 25 viii. sitio donante de corte y empalme
- ix. gen no codificante de proteínas
- x. aislante
- 30 xi. elemento genético móvil
- xii. sitio de reconocimiento de meganucleasa
- 35 xiii. sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)
- xiv. elemento peptídico viral autoescindible
- xv. una secuencia de consenso de Kozak
- 40 xvi. marcador de selección de integración
- xvii. un casete de resistencia a antibióticos
- 45 xviii. un origen de replicación bacteriano
- xix. un origen de replicación de levadura
- 50 xx. un sitio de clonación

En una realización preferida del vector donante genético preferido, el componente C y/o el componente E, comprenderían dos posibles disposiciones diferentes que usan los siguientes elementos seleccionados de la lista mencionada previamente de elementos.

55 La primera disposición es para suministrar un único ORF que codifica para una o más cadenas de TCR y/o un marcador de selección de integración, a través de la integración por RMCE, en la que la disposición es

5' - [A] [B] [C] [D] [E] - 3'

60 en la que

A) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1

B) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak

65 C) es el elemento xx) un sitio de clonación de un único ORF que codifica para una o más cadenas de TCR y/o el

elemento xvi) un marcador de selección de integración

D) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2

- 5 E) es el elemento xvii) un casete de resistencia a antibióticos y el elemento xviii) un origen de replicación bacteriano, sin orientación específica

además, los elementos viii y/o xiv pueden usarse para ligar múltiples cadenas de TCR y/o el elemento xvi entre sí.

10 5' - [A] [B] [C] [D] [E] [F]- 3'

en la que

A) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1

- 15 B) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak

C) es el elemento xx) un sitio de clonación para la introducción de dos o más ORF, con terminadores eucariotas, que codifican para una o más cadenas de TCR y/o el elemento xvi) un marcador de selección de integración

- 20 D) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak (dirección antisentido)

E) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2

- 25 F) es el elemento xvii) un casete de resistencia a antibióticos y el elemento xviii) un origen de replicación bacteriano, sin orientación específica

además, los elementos viii y/o xiv pueden usarse para ligar múltiples cadenas de TCR y/o el elemento xvi entre sí dentro de cada ORF.

- 30 *Preparación de poblaciones de eTPC analito en el eTPCS*

El sistema eTPCS descrito anteriormente puede usarse de múltiples maneras para preparar distintas formas de poblaciones de eTPC analito, o bibliotecas de las mismas, que sirven para presentar la TCRsp analito a la eAPC dentro del sistema eAPC:eTPC combinado durante el funcionamiento del sistema de dos partes.

- 35 Las poblaciones de eTPC-t que se crean necesitan derivar cadenas de TCR analito de determinadas fuentes con las que analizar antígenos candidatos.

- 40 Las fuentes de secuencias que codifican para cadenas de TCR analito pueden derivarse de

i. clonación emparejada de secuencia(s) de ORF de cadena de TCR de linfocitos T primarios

ii. clonación no emparejada de secuencias de ORF de cadena de TCR de linfocitos T primarios

- 45 iii. secuencia(s) de ORF de cadena de TCR sintética(s)

en las que i es preferible para el descubrimiento de TCRsp nativas que generalmente no es probable que tengan reactividad cruzada contra el aAPX propio y/o la carga de aAPX debido a selección tímica; ii puede usarse para identificar reactivos de afinidad de TCR candidatos; puede usarse en la maduración por afinidad de reactivos de afinidad de TCR.

- 50 Puede usarse un eTPCS que comprende una única pareja de integración para preparar una eTPC-t a partir del componente 2A en una única etapa, proporcionando el componente 2C' combinado con un ORF para el par complementario de cadenas de TCR, de tal manera que este par de TCR analito se integre en el sitio 2B, para crear 2B'. La línea celular resultante expresa el par de TCR proporcionado y se presenta en la superficie celular como una TCRsp (figura 21).

- 60 Puede usarse un eTPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eTPC-t a partir del componente 2A en una única etapa, proporcionando el componente 2C' combinado con un ORF para el par complementario de cadenas de TCR, de tal manera que este par de TCR analito se integre en el sitio 2B, para crear 2B'. La línea celular resultante expresa el par de TCR proporcionado y se presenta en la superficie celular como una TCRsp. La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración posteriores (figura 22).

- 65 Puede usarse un eTPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eTPC-t a partir del

componente 2A en una única etapa, proporcionando los componentes 2C' y 2E' cada uno combinado con un ORF que codifica para una cadena de un par complementario de cadenas de TCR, de tal manera que ambas cadenas de TCR analito se integren en el sitio 2B o 2D, para crear 2B' y 2D'. La línea celular resultante expresa el par de TCR proporcionado y se presenta en la superficie celular como una TCRsp. (figura 23).

Puede usarse un eTPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eTPC-x a partir del componente 2A en una única etapa, proporcionando el componente 2C' combinado con un ORF para una cadena de TCR analito individual, de tal manera que esta cadena de TCR analito se integre en el sitio 2B para crear 2B'. La línea celular resultante expresa la cadena de TCR proporcionada, pero carece de una cadena complementaria y, por tanto, no expresa ningún TCR de superficie. La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración posteriores (figura 24).

Puede usarse un eTPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una eTPC-t a partir del componente 2A en dos etapas, proporcionando en primer lugar el componente 2C' combinado con un ORF para una cadena de TCR analito individual, de tal manera que esta cadena de TCR analito se integre en el sitio 2B, para crear 2B'. La línea celular resultante expresa la cadena de TCR proporcionada, pero carece de una cadena complementaria y, por tanto, no expresa ningún TCR de superficie (producto intermedio de eTPC-x). La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar. En la segunda etapa se proporciona 2E', en el que el vector se combina con un ORF para una segunda cadena de TCR analito única, complementaria a la cadena de TCR integrada previamente, de tal manera que esta segunda cadena de TCR analito complementaria se integra en el sitio 2D, para crear 2D'. La línea celular resultante expresa el par complementario de cadenas de TCR analito proporcionado y se presenta en la superficie celular como una TCRsp. (figura 25).

En los ejemplos mencionados anteriormente de preparación de poblaciones de eTPC-x y/o eTPC-t analito a partir de eTPC, se usa el sistema eTPCS para proporcionar cadenas de TCR analito conocidas de una manera definida para preparar poblaciones discretas de eTPC analito que expresan TCRsp definidas. Dicho proceso puede repetirse muchas veces para construir bibliotecas de eTCP-x y/o eTCP-t para proporcionarlas al sistema eAPC:eTPC combinado durante el funcionamiento del sistema. Un enfoque alternativo es tomar bibliotecas agrupadas de eTPC-t analito, en las que cada eTPC-t integra un único par aleatorio de ORF de TCR de la agrupación original de vectores y, por tanto, cada eTPC-t expresa una única TCRsp aleatoria, pero en conjunto la agrupación codifica para múltiples especies de TCRsp representadas en la agrupación original de vectores. Puede aplicarse el mismo principio al azar para crear agrupaciones de eTPC-x. Esto es particularmente útil cuando se analizan grandes bibliotecas de TCRsp candidatas frente a antígenos analito.

Puede usarse un eTPCS que comprende una pareja de integración para preparar una agrupación de eTPC-t a partir del componente 2A en una única etapa, proporcionando el componente 2C' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican para un analito de la agrupación de pares de TCR analito, de tal manera que un par se integre en el sitio B, para crear B', dentro de cada célula y en el que cada eTPC-t integra un único par aleatorio de ORF de TCR de la agrupación original de vectores y, por tanto, cada eTPC-t expresa una única TCRsp aleatoria, pero en conjunto la agrupación codifica para múltiples especies de TCRsp representadas en la agrupación original de vectores. La agrupación de células resultante contiene una colección de células que expresan en conjunto múltiples TCRsp analito (figura 26).

Puede usarse un eTPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una agrupación de eTPC-t a partir del componente 2A en una única etapa, proporcionando el componente 2C' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican para una agrupación de pares de TCR analito, de tal manera que un par se integre a sitio B, para crear B', dentro de cada célula y en el que cada eTPC integra un único par aleatorio de ORF de TCR de la agrupación original de vectores y, por tanto, cada eTPC-t expresa una única TCRsp aleatoria, pero en conjunto la agrupación codifica para múltiples especies de TCRsp representadas en la agrupación original de vectores. La agrupación de células resultante contiene una colección de células que expresan en conjunto múltiples TCRsp analito. La segunda pareja de integración 1D/1E permanece sin modificar (figura 27).

Puede usarse un eTPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una agrupación de eTPC-t a partir del componente 2A en una única etapa, proporcionando el componente 2C' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican para una agrupación de cadenas de TCR analito individuales de tal manera que cada eTPC integre un único ORF de cadena de TCR aleatoria codificada en el componente 2C' en el sitio 2B, para crear 2B'. Simultáneamente, proporcionar el componente 2E' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican para una agrupación de cadenas de TCR analito individuales complementarias a la primera biblioteca proporcionada en 2C', de tal manera que cada eTPC-t integre un único ORF de cadena de TCR complementaria aleatoria codificada en el componente 2E' en sitio 2D, para crear 2D'. Cada célula resultante en la agrupación de eTPC-t tiene un único par de ORF de cadena de TCR complementaria aleatoria, de tal manera que cada célula de la agrupación expresa una TCRsp aleatoria. Una biblioteca agrupada de este tipo contendría todas las combinaciones posibles de cadenas de TCR complementarias proporcionadas a partir de los conjuntos que proceden de los componentes 2C' y 2E' (figura 28).

En el presente contexto, puede usarse un eTPCS que comprende dos parejas de integración para preparar una

agrupación de eTPC-t a partir de una e-TPC-x obtenida previamente en una única etapa, en el que el sitio 2B se ha convertido en 2B' y contiene la cadena de TCR analito individual. Se prepara una eTPC-t proporcionando el componente 2E' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican para una agrupación de cadenas de TCR analito individuales complementarias a la cadena ya integrada, de tal manera que cada eTPC-t integre un único ORF de cadena de TCR aleatorizada de la biblioteca de 2E' proporcionada en el sitio 2D, para crear 2D'. Cada célula resultante en la agrupación de eTPC-t tiene la cadena de TCR analito proporcionada por la eTPC-x inicial y una selección de cada cadena de TCR analito complementaria individual, de tal manera que cada célula en la agrupación expresa un par aleatorio de ORF como una TCRsp. Este enfoque se usa cuando se analiza el efecto de variar una única cadena frente a una cadena fija en un par de cadenas de TCR complementarias (figura 29).

Puede prepararse una eTPC-x a partir de una eTPC-t proporcionando uno de otros vectores de integración, los componentes 2Y o 2Z, que codifican para marcadores de integración o ningún ORF. La combinación del componente 2Y o 2Z con una eTPC-t intercambiaría cualquiera de los sitios para obtener una cadena de TCR individual que expresa eTPC-x.

Un vector de integración genética preferido, el componente 2Y y el componente 2Z, para la conversión de eTPC-t en eTPC-x comprendería los mismos requisitos de vector de integración que los componentes 2C y 2E anteriores, aunque no codifica para ningún ORF de cadena de TCR, y preferiblemente codifica para un marcador de integración.

Puesta en contacto de eAPC y eTPC analito

La presente invención se refiere a la provisión de un sistema celular de dos partes modificado por ingeniería. Las dos partes del sistema, eAPCS y eTPCS, se usan para ensamblar eAPC analito y eTPC analito, respectivamente. Estas poblaciones celulares analito se ensamblan luego en un sistema eAPC:eTPC combinado a partir del que pueden obtenerse las salidas del sistema. El sistema eAPC:eTPC se compone de una selección de una o más poblaciones de eAPC analito, y una o más poblaciones de eTPC (figura 1) que se preparan tal como se describió anteriormente (figuras 4 a 29). El sistema eAPC:eTPC se proporciona en un formato que permite el contacto físico entre las poblaciones de eAPC analito y eTPC analito, en el que tal contacto permite la formación de complejos entre uno o más antígenos y TCRsp analito de una o más eTPC-t analito, en el que el antígeno analito es cualquiera de los siguientes

- i. aAPX y/o
- ii. aAM y/o
- iii. aAPX:aAM y/o
- iv. CM y/o
- v. aAPX:CM

presentado por la eAPC analito, con una TCRsp analito presentada por la eTPC analito, de tal manera que la formación de complejos puede conducir a la estabilización de tal complejo y en el que notificarse y medirse la inducción de señalización dentro de la eAPC analito y/o la eTPC analito puede.

Se realiza un contacto entre una eAPC analito y una eTPC en un sistema de cultivo celular permisivo, en el que dicho sistema comprende medios de cultivo celular que son permisivos para la función tanto de células eAPC como eTPC.

Una eTPC analito obtenida del sistema eAPC:eTPC combinado se usa para la caracterización de una respuesta de señal de la eTPC analito, que expresa la TCRsp analito, a un antígeno analito presentado por la eAPC analito, en la que dicha respuesta de señal puede ser o bien binaria o bien graduada y puede medirse como intrínseca a la eTPC (figura 30) o intrínseca a la eAPC (figura 31).

El método para seleccionar una o más eTPC analito de una eTPC analito de entrada o una biblioteca de eTPC analito, del sistema eAPC:eTPC combinado, para obtener una o más eTPC analito en el que la TCRsp expresada se une a uno o más antígenos analito presentados por la eAPC analito comprende

- i. combinar una o más eTPC analito con una o más eAPC analito dando como resultado un contacto entre una TCRsp analito con un antígeno analito y al menos uno de
- ii. medir la formación, si la hubiera, de un complejo entre una o más TCRsp analito con uno o más antígenos analito y/o
- iii. medir una respuesta de señal por parte de la eTPC analito, si la hubiera, inducida por la formación de un complejo

entre una o más TCRsp analito con uno o más antígenos analito y/o

iv. medir una respuesta de señal por parte de la eAPC analito, si la hubiera, inducida por la formación de un complejo entre una o más TCRsp analito con uno o más antígenos analito y

v. seleccionar una o más eTPC analito basándose en las etapas b, c y/o d, en el que se realiza la selección mediante una medición positiva y/o negativa.

en el que i, iii y v comprenden la disposición preferida.

Una eAPC analito obtenida del sistema eAPC:eTPC combinado se usa para la caracterización de una respuesta de señal de la eAPC analito, que expresa el antígeno analito, a una TCRsp presentada por la eTPC analito, en la que dicha respuesta de señal puede ser o bien binaria o bien graduada, y puede medirse como intrínseca a la eTPC (figura 30) o intrínseca a la eAPC (figura 31).

El método para seleccionar una o más eAPC analito de una eAPC analito de entrada o una biblioteca de eAPC analito, del sistema eAPC:eTPC combinado, para obtener una o más eAPC analito en el que el antígeno analito expresado se une a una o más TCRsp analito presentadas por la eTPC analito comprende

i. combinar una o más eAPC analito con una o más eTPC analito, lo que da como resultado un contacto entre un antígeno analito presentado por la eAPC analito con la TCRsp analito de una o más eTPC analito y

ii. medir la formación, si la hubiera, de un complejo entre uno o más antígenos analito con una o más TCRsp analito y/o

iii. medir una respuesta de señal en una o más eTPC analito, si la hubiera, inducida por la formación de un complejo entre la TCRsp analito con el antígeno analito y/o

iv. medir una respuesta de señal, si la hubiera, por parte de la eAPC analito inducida por la formación de un complejo entre una o más TCRsp analito con uno o más antígenos analito y

v. seleccionar una o más eAPC analito de las etapas b, c y/o d, en el que se realiza la selección mediante una medición positiva y/o negativa.

en el que i, iii y v comprenden la disposición preferida.

La selección de eTPC o eAPC puede ser de un sistema eAPC:eTPC que comprende un sistema de cultivo binario en el que se proporciona una población de eAPC analito preparada individual y una población de eTPC analito preparada individual, y la eAPC o eTPC que responde se seleccionan basándose en una respuesta binaria o graduada dentro de la eTPC (figura 30) y/o la eAPC (figura 31).

Un sistema eAPC:eTPC puede comprender una entrada de eAPC analito preparada individual y una biblioteca agrupada preparada de eTPC (figura 32).

Un sistema eAPC:eTPC puede comprender una entrada eTPC analito preparada individual y una biblioteca agrupada preparada de eAPC (figura 33).

Dentro del sistema eAPC:eTPC combinado, medir una respuesta de señal en una o más eTPC analito o en una o más eAPC, si la hubiera, que puede inducirse por la formación de un complejo entre la TCRsp analito con el antígeno analito es crítico para la selección de salidas primarias del sistema, en el que las salidas primarias del sistema son células individuales o agrupaciones de células de una o más de los siguientes

i. eAPC-p

ii. eAPC-a

iii. eAPC-pa

iv. eTPC-t

en el que puede realizarse la selección de células basándose en la presencia o ausencia de una respuesta de señal notificada en cualquiera de las células eAPC analito o eTPC analito puestas en contacto, o ambas.

En el presente contexto, un método para seleccionar eTPC analito y/o eAPC analito del sistema eAPC:eTPC combinado basándose en una respuesta de señal notificada dentro de la eTPC comprende

i. determinar una respuesta de señalización nativa y/o

ii. determinar una respuesta de señalización sintética, si la eTPC contiene el componente 2F y si la eAPC contiene un elemento indicador sintético equivalente.

5 Una respuesta de señal inducida nativa o sintética que es intrínseca a eAPC y/o eTPC se mide detectando un aumento o una disminución de uno o más de los siguientes

i. una biomolécula secretada

10 ii. una sustancia química secretada

iii. una biomolécula intracelular

15 iv. una sustancia química intracelular

v. una biomolécula expresada en superficie

20 vi. una acción citotóxica de la eTPC analito sobre la eAPC analito

vii. una acción paracrina de la eTPC analito sobre la eAPC analito de tal manera que se induce una respuesta de señal en la eAPC analito y se determina detectando un aumento o una disminución de cualquiera de a a e

viii. una proliferación de la eTPC analito

25 ix. una sinapsis inmunológica entre la eTPC analito y la eAPC analito en la que dichas respuestas de señal detectadas se comparan con el estado de respuesta de señal no inducida intrínseco a la eAPC analito y/o eTPC analito antes del ensamblaje del sistema eAPC:eTPC combinado y/o un sistema combinado ensamblado paralelo en el que la eAPC analito y/o la eTPC analito pueden presentar un antígeno analito de control y/o especie de TCR analito que se sabe que no inducen una respuesta de señal dentro del sistema eAPC:eTPC combinado en uso.

Obtención de salidas primarias del sistema a partir del sistema eAPC:eTPC

35 La presente invención se refiere a la provisión de un sistema celular de dos partes modificado por ingeniería. Las dos partes del sistema, eAPCS y eTPCS, se usan para ensamblar eAPC analito y eTPC analito, respectivamente. Estas poblaciones celulares analito se ensamblan luego en un sistema eAPC:eTPC combinado a partir del cual pueden obtenerse las salidas del sistema. El sistema eAPC:eTPC se compone de una selección de una o más poblaciones de eAPC analito, y una o más poblaciones de eTPC (figura 1) que se preparan tal como se describió anteriormente (figuras 4 a 29). El sistema eAPC:eTPC se proporciona en un formato que permite el contacto físico

40 entre las poblaciones de eAPC analito y eTPC analito, en el que tal contacto permite la formación de complejos entre uno o más antígenos y TCRsp analito de una o más eTPC-t analito, en el que el antígeno analito es cualquiera de los siguientes

i. aAPX y/o

45 ii. aAM y/o

iii. aAPX:aAM y/o

50 iv. CM y/o

v. aAPX:CM

55 presentado por la eAPC analito, con una TCRsp analito presentada por la eTPC analito, de tal manera que la formación de complejos puede conducir a la estabilización de tal complejo y en el que puede notificarse y medirse la inducción de señalización dentro de la eAPC analito y/o la eTPC analito.

Los modos de notificación de respuesta de señal inducida se describen anteriormente, y son estas respuestas notificadas las que deben medirse para obtener la salida primaria del sistema de dos partes.

60 Las salidas primarias del sistema son poblaciones celulares seleccionadas, que han respondido o no al analito presentado por la célula recíproca proporcionada en el sistema eAPC:eTPC. Es decir, tal salida primaria puede representarse como una célula individual, o una agrupación de células, que se han seleccionado basándose en la presencia o ausencia de una respuesta notificada dentro del sistema eAPC:eTPC combinado (figura 1, etapa v). Una respuesta dentro de una eAPC analito sólo se provoca mediante el acoplamiento de un TCR relacionado presentado por una eTPC que se pone en contacto. Una respuesta dentro de una eTPC analito sólo se provoca mediante el

acoplamiento de un antígeno relacionado presentado por una eAPC que se pone en contacto (figura 1, etapa iv).

Puede realizarse una selección de eAPC analito y/o eTPC analito del sistema eAPC:eTPC combinado basándose en una respuesta en la célula que se pone en contacto. Es decir, puede seleccionarse una eAPC analito basándose en una respuesta notificada, o la falta de la misma, en la eTPC analito que se pone en contacto. Por el contrario, puede seleccionarse una eTPC analito basándose en una respuesta notificada, o la falta de la misma, en la eAPC analito que se pone en contacto.

En el presente contexto, las salidas primarias de eAPC del sistema son células seleccionadas, en las que se realiza la selección basándose en la presencia o ausencia de una respuesta de señal notificada, y estas células pueden comprender una o más de

i. una eAPC-p

ii. una eAPC-a

iii. una eAPC-pa

en las que las células seleccionadas pueden comprender una célula individual, una agrupación de células de la misma identidad, una agrupación de células de identidades diferentes (figura 1, etapa v).

Las salidas primarias de eTPC del sistema son células seleccionadas, en las que se realiza la selección basándose en la presencia o ausencia de una respuesta de señal notificada, y estas células comprenden eTPC-t, en las que las células seleccionadas pueden comprender una célula individual, una agrupación de células de la misma identidad, una agrupación de células de identidades diferentes (figura 1, etapa v).

Las señales notificadas en la eAPC analito y/o eTPC analito en un sistema eAPC:eTPC combinado se usan para seleccionar poblaciones celulares analito para proporcionar las salidas primarias.

Puede lograrse una salida primaria de los tipos eAPC y/o eTPC en un caso en el que el sistema eAPC:eTPC combinado sea de naturaleza de cultivo binario (por ejemplo, la figura 30 y la figura 31) seleccionando la población de eAPC analito y/o eTPC analito deseada del sistema binario.

Puede lograrse una salida primaria de los tipos eAPC y/o eTPC a partir de un caso en el que el sistema eAPC:eTPC combinado sea de naturaleza de eAPC fija y eTPC analito de biblioteca agrupada (por ejemplo, la figura 32), o de un caso en el que el sistema eAPC:eTPC combinado es de naturaleza de eTPC fija y eAPC analito de biblioteca agrupada (por ejemplo, la figura 33) seleccionando la población de eAPC analito y/o eTPC analito deseada del sistema de cultivo combinado.

Hay varios modos distintos en los que pueden obtenerse las salidas primarias, en los que cada modo conlleva una etapa de clasificación de células. La clasificación de células puede lograrse mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) y/o clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) y/o distintos métodos de clasificación de células activadas por afinidad.

Las células eAPC y/o eTPC de salida primaria pueden obtenerse mediante clasificación de células individuales para obtener una célula individual y/o clasificación de células en una agrupación para obtener una agrupación de células.

Las células eAPC y/o eTPC de salida primaria pueden obtenerse mediante clasificación de células individuales para obtener una célula individual, y posterior sobrecrecimiento de las células individuales para obtener una agrupación monoclonal de células eAPC o eTPC seleccionadas.

Las células eAPC y/o eTPC de salida primaria pueden obtenerse mediante clasificación de células en una agrupación para obtener una agrupación de células, y posterior sobrecrecimiento de la agrupación de células para obtener una agrupación de células eAPC y/o eTPC seleccionadas.

Obtención de salidas terminales del sistema a partir del sistema eAPC:eTPC

Después de los métodos descritos anteriormente de obtención de salidas primarias, en los que las salidas primarias son células eAPC y/o eTPC analito seleccionadas que se seleccionan basándose en una respuesta de señal medida, las salidas terminales del sistema celular de dos partes pueden obtenerse a través de procesamiento adicional de las salidas primarias de eAPC y/o eTPC seleccionadas.

Las salidas terminales del sistema celular de dos partes son las identidades de

i. aAPX y/o

ii. aAM y/o

iii. aAPX:aAM y/o

5 iv. CM y/o

v. aAPX:CM y/o

vi. TCRsp

10 presentados por la eAPC analito (i a v) o la eTPC analito (vi), y obtenidos como salidas primarias del sistema de dos partes mediante su selección del sistema eAPC:eTPC combinado.

15 Dentro del sistema celular de dos partes, suele suceder que las moléculas analito presentadas por la eAPC analito y la eTPC analito estén codificadas genéticamente. Por tanto, para identificar las moléculas analito presentadas por la eAPC o eTPC analito, puede realizarse la secuenciación genética de las moléculas analito preparadas a partir de eAPC o eTPC.

20 La eAPC puede procesarse de tal manera que se obtenga la secuencia genética para el componente 1B' y/o el componente 1D' de las células eAPC-p, eAPC-a o eAPC-pa clasificadas y/o expandidas para determinar la identidad de

i. aAPX y/o

25 ii. aAM y/o

iii. aAPX:aAM

en la que las identidades obtenidas representan salidas terminales del sistema celular de dos partes.

30 La eAPC puede procesarse de tal manera que se obtenga la secuencia genética para el genoma de las células eAPC-p, eAPC-a o eAPC-pa clasificadas y/o expandidas para determinar la identidad de

i. aAPX y/o

35 ii. aAM y/o

iii. aAPX:aAM

40 iv. CM y/o

v. aAPX:CM

en la que las identidades obtenidas representan salidas terminales del sistema celular de dos partes.

45 La eTPC puede procesarse de tal manera que se obtenga la secuencia genética para el componente 2B' y/o el componente 2D' de las células eTPC-t clasificadas y/o expandidas para determinar la identidad de TCRsp, en el que la identidad obtenida de TCRsp representa una salida terminal de la Sistema celular de dos partes.

50 La eTPC puede procesarse de tal manera que se obtenga una secuencia genética para el genoma de las células eTPC-t clasificadas y/o expandidas para determinar la identidad de TCRsp, en la que la identificación obtenida de TCRsp representa una salida terminal del sistema celular de dos partes.

55 La secuenciación genética puede lograrse mediante diversos modos y a partir de fuentes ordenadas de material genético, con y sin procesamiento específico.

En el presente contexto, la etapa de secuenciación puede estar precedida por

i. extracción de ADN genómico y/o

60 ii. extracción de transcrito de ARN de los componentes 1B' y/o 1D' y/o 2B' y/o 2D' y/o

iii. amplificación mediante PCR y/o RT-PCR del transcrito de ADN y/o ARN del componente 1B' y/o 1D' y/o 2B' y/o 2D'.

65 La etapa de secuenciación puede ser destructiva para la eAPC o eTPC, o la agrupación de las mismas, obtenidas

como salidas primarias del sistema de dos partes.

Si es deseable obtener salidas primarias del sistema de dos partes en el que la etapa de secuenciación ha sido destructiva para la eAPC o eTPC como salida primaria, la información de secuencia obtenida como salida terminal del sistema de dos partes puede usarse para preparar eAPC y eTPC como salida equivalente, como eAPC analito o eTPC analito mediante el uso de eAPCS y eTPCS, respectivamente.

En los escenarios descritos anteriormente de moléculas analito codificadas genéticamente, pueden obtenerse las salidas terminales del sistema de dos partes obteniendo información de secuencia del componente 1B' y/o 1D' y/o 2B' y/o 2D', y/ o del genoma celular. Sin embargo, en algunas realizaciones la información de antígeno no estará codificada genéticamente. Los antígenos modificados de manera postraducciona, los antígenos proporcionados al sistema eAPC:eTPC combinado a través de medios no genéticos, antígenos que emergen de un estado inducido o modificado del proteoma o metabolito de la eAPC analito, y la CM intrínseca al sistema eAPC:eTPC, pueden no puede identificarse razonablemente a través de medios genéticos.

En el caso importante de aAM que puede proporcionarse al sistema eAPC:eTPC por medios no genéticos, existen dos modos distintos a través de los cuales una eAPC-p o eAPC-pa puede presentar una aAM proporcionada como un complejo aAPX:aAM. En el primer escenario, la aAM se proporciona en una forma que puede unirse directamente a aAPX y forma un complejo aAPX:aAM en la superficie de las células (figura 34). Un ejemplo de tal aAM sería un antígeno peptídico para un complejo de HLA. En el segundo escenario, la aAM se proporciona en una forma que puede captarse por la eAPC analito y procesarse de tal manera que se cargue como carga en el aAPX y forme un complejo aAPX:aAM en la superficie de las células (figura 35). En el presente contexto, un método para seleccionar e identificar una carga de aAM o una carga de CM, en el que la carga es un metabolito y/o un péptido, que se carga en un aAPX de una eAPC seleccionada y obtenida como salida primaria de la sistema de dos partes, comprende

i. aislar un aAPX:aAM o un aAPX:CM o la carga aAM o la carga CM y

ii. identificar la carga que se ha cargado

en el que la carga que se ha cargado identificada representa salidas terminales del sistema de dos partes.

Generalmente existen dos modos a través de los cuales puede identificarse una molécula de carga a partir de una eAPC seleccionada. En primer lugar, una liberación forzada de la carga del aAPX:aAM o aAPX:CM da como resultado el aislamiento de la aAM o CM que está disponible para su posterior identificación (figura 36). Un ejemplo de esto sería el lavado con ácido de la eAPC para liberar el aAM peptídica de los complejos de HLA. En segundo lugar, la captura de aAPX:aAM o aAPX:CM, por ejemplo, mediante la liberación del complejo y métodos de aislamiento por inmutafinidad, da como resultado el aislamiento de los complejos aAPX:aAM o aAPX:CM, de tal manera que pueden identificarse aAM o CM (figura 37).

Los métodos para identificar aAM y/o CM aisladas directamente, o a partir de los complejos aAPX:aAM o aAPX:CM aislados, pueden comprender

i. análisis de espectrometría de masas.

ii. análisis de secuenciación de péptidos.

en el que las identidades de aAM y/o CM obtenidas son salidas terminales del sistema celular de dos partes.

Leyendas de figuras

La invención se ilustra en las siguientes figuras no limitativas.

Figura 1 - Funcionamiento del sistema de dos partes compuesto por sistemas los eAPC y eTPC.

El sistema celular modificado por ingeniería de dos partes se compone de dos sistemas de células multicomponente, el eAPCS y el eTPCS, que se ponen en contacto como un sistema eAPC:eTPC combinado. El funcionamiento del sistema general comprende dos fases, la fase de preparación y la fase analítica. En un aspecto de la fase 1, se usa el sistema eAPCS para preparar células que expresan el complejo presentador de antígeno analito (aAPX) y/o la molécula antigénica analito (aAM) en la superficie celular (etapa i). Una eAPC que presenta aAPX solo se denomina eAPC-p. Una eAPC que presenta aAM sola se denomina eAPC-a. Una eAPC que presenta una aAM presentada como carga en un aAPX se denomina eAPC-pa. Estos analitos se denominan en conjunto antígeno analito. En un aspecto independiente de la fase 1, se usa el sistema eTPCS para preparar células que expresan pares de cadenas de TCR analito (TCRsp) en la superficie celular (etapa ii). Una eTPC que presenta una TCRsp en la superficie celular se denomina eTPC-t. La fase 2 del sistema general es la puesta en contacto de las células que portan analito preparadas en la fase 1, para formar el sistema eAPC:eTPC combinado (etapa iii). La eAPC analito puesta en contacto presenta antígenos analito a la eTPC analito. Dentro del sistema eAPC:eTPC combinado, la capacidad de

respuesta del par de cadenas de TCR analito hacia el antígeno analito proporcionado se determina mediante la lectura de una respuesta de eAPC y/o eTPC analito dependiente de contacto, tal como se indica mediante * y el recuadro sombreado representa un estado de señal alterado de estas células analito indicadoras (etapa iv). Como salida del sistema eAPC:eTPC, pueden seleccionarse eAPC y/o eTPC-t específicas basándose en su respuesta y/o su capacidad para controlar una respuesta en la otra célula analito que se pone en contacto. Por tanto, se seleccionan células individuales, o poblaciones celulares, del tipo eAPC-p, eAPC-a, eAPC-pa y/o eTPC-t que son las salidas primarias del funcionamiento del sistema (etapa v). Al obtener las células analito de la etapa v, pueden identificarse aAPX, aAM, aAPX:aAM, CM, aAPX:CM y/o TCRsp analito presentados a partir de estas células como la salida terminal del funcionamiento del sistema (etapa vi).

Figura 2 - Descripción de los componentes de un eAPCS de una única pareja de integración.

Un ejemplo de un eAPCS que comprende tres componentes. El primer componente 1A es la propia línea de eAPC con todas las características modificadas por ingeniería requeridas de esa célula. La eAPC 1A contiene un componente adicional 1B, que es un sitio de integración genómica para la integración de aAPX y/o aAM. Un componente adicional, 1C, representa un vector donante genético para la integración dirigida al sitio de ORF en los sitios 1B, en el que la flecha indica especificidad acoplada. La pareja sitio de integración/vector donante emparejados puede formarse para integrar un único ORF o un par de ORF para introducir la expresión de aAPX y/o aAM.

Figura 3 - Descripción de los componentes de un eAPCS de pareja de integración dual.

Un ejemplo de un eAPCS que comprende cinco componentes. El primer componente 1A es la propia línea de eAPC con todas las características modificadas por ingeniería requeridas de esa célula. La eAPC 1A contiene dos componentes adicionales, 1B y 1D, que son sitios de integración genómica para la integración de aAPX y/o aAM. Dos componentes adicionales, 1C y 1E, representan vectores donantes genéticos para la integración dirigida al sitio de ORF en los sitios 1B y 1D, respectivamente, donde las flechas indican especificidad emparejada. Cada pareja de sitio de integración/vector donante emparejados puede formarse para integrar un único ORF o un par de ORF para introducir la expresión de aAPX y/o aAM.

Figura 4. Compilación de diferentes eAPC que presentan antígeno analito.

El sistema eAPCS comienza con la eAPC y usa uno o más vectores donantes para crear células que expresan el complejo presentador de antígeno analito (aAPX) y/o la molécula antigénica analito (aAM) en la superficie celular. Una eAPC que presenta aAPX solo se denomina eAPC-p y puede crearse mediante la introducción de ORF que codifica(n) para aAPX en la eAPC (etapa i). Una eAPC que expresa aAM sola se denomina eAPC-a, en la que aAM puede expresarse en la superficie celular y estar disponible para el acoplamiento con TCR, o requerir procesamiento y carga como carga en un aAPX como el complejo aAPX:aAM. Puede crearse una eAPC 1A mediante la introducción de ORF que codifica(n) para aAM en la eAPC (etapa ii). Una eAPC que presenta una aAM como carga en un aAPX se denomina eAPC-pa. Puede producirse una eAPC-pa mediante cualquiera de; introducción de ORF que codifican para aAM y aAPX en una eAPC simultáneamente (etapa iii); introducción de ORF que codifica(n) para aAM en una eAPC-p (etapa iv); introducción de ORF que codifica(n) para aAPX en una eAPC-a (etapa v).

Figura 5 - Funcionamiento de la pareja de integración del vector donante genético y el sitio de receptor genómico.

Un vector donante genético y el sitio de receptor genómico forman una pareja de integración, en la que uno o más ORF codificados dentro del vector donante genético pueden integrarse específicamente en su sitio de receptor genómico acoplado. La ETAPA 1 en el funcionamiento de la pareja de integración es introducir uno o más ORF diana en el vector donante. El vector donante inicial se denomina X, y se modifica a un vector donante preparado X', mediante la introducción de ORF diana. La ETAPA 2 conlleva la combinación del vector donante preparado, X', con una célula que alberga un sitio de receptor genómico, Y. La introducción del ORF codificado por el vector donante preparado en el sitio de receptor da como resultado la creación de una célula que alberga un sitio integrado, Y'.

Figura 6 - Ejemplo de compilación de una eAPC-p en una etapa con una pareja de integración.

La APC 1A contiene el sitio de receptor genómico 1B. El vector donante genético preparado 1C' se acopla a 1B y codifica para un aAPX. Cuando la eAPC 1A se combina con el vector donante 1C', la célula resultante tiene el ORF de 1C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' e introducir la expresión de aAPX. Esto da como resultado la expresión de aAPX en la superficie celular y la creación de una eAPC-p.

Figura 7 - Ejemplo de compilación de una eAPC-p en una etapa con una pareja de integración y un sitio de integración sin usar

La eAPC 1A contiene los sitios de receptor genómico 1B y 1D. El vector donante genético preparado 1C' se acopla a 1B y codifica para un aAPX. Cuando la eAPC 1A se combina con el vector donante 1C', la célula resultante tiene el ORF de 1C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' e introducir la expresión de

aAPX. Esto da como resultado la expresión de aAPX en la superficie celular y la creación de una eAPC-p. El sitio de receptor genómico 1D permanece sin usar.

Figura 8 - Ejemplo de compilación de una eAPC-a en una etapa con una pareja de integración.

La APC 1A contiene el sitio de receptor genómico 1B. El vector donante genético preparado 1C' se acopla a 1B y codifica para una aAM. Cuando la eAPC 1A se combina con el vector donante 1C', la célula resultante tiene el ORF de 1C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' e introducir la expresión de aAM. Esto da como resultado una de dos formas de eAPC-a, que expresa aAM en la superficie celular o de manera intracelular.

Figura 9 - Ejemplo de compilación de una eAPC-a en una etapa con una pareja de integración y un sitio de integración sin usar.

La eAPC 1A contiene los sitios de receptor genómico 1B y 1D. El vector donante genético preparado 1C' se acopla a 1B y codifica para una aAM. Cuando la eAPC 1A se combina con el vector donante 1C', la célula resultante tiene el ORF de 1C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' e introducir la expresión de aAM. Esto da como resultado una de dos formas de eAPC-a, que expresa aAM en la superficie celular o de manera intracelular. El sitio de receptor genómico 1D permanece sin usar.

Figura 10 - Ejemplo de compilación de una eAPC-pa en una etapa con una pareja de integración.

La APC 1A contiene el sitio de receptor genómico 1B. El vector donante genético 1C' se acopla a 1B. El vector donante 1C' codifica para un aAPX así como una aAM.

La eAPC 1A se combina con los vectores donantes 1C'. La célula resultante tiene los ORF 1C' intercambiados en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' y suministrar un ORF para un aAPX y una aAM. Esto da como resultado la expresión de aAPX en la superficie celular, aAM de manera intracelular y, por tanto, la carga de aAM como carga en aAPX en la formación del complejo aAPX:aAM en la superficie celular.

Figura 11 - Ejemplo de compilación de una eAPC-pa en una etapa con una pareja de integración y un sitio de integración sin usar.

La eAPC 1A contiene sitios de receptor genómico distintos 1B y 1D. El vector donante genético 1C' se acopla a 1B. El vector donante 1C' codifica para un aAPX así como una aAM. La eAPC 1A se combina con los vectores donantes 1C'. La célula resultante tiene los ORF 1C' intercambiados en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' y suministrar un ORF para un aAPX y una aAM. El sitio de receptor genómico 1D permanece sin usar. Esto da como resultado la expresión de aAPX en la superficie celular, aAM de manera intracelular y, por tanto, la carga de aAM como carga en aAPX en la formación del complejo aAPX:aAM en la superficie celular. Esto crea una línea celular de eAPC-pa. El sitio de receptor genómico 1D permanece sin usar.

Figura 12 - Ejemplo de compilación de una eAPC-pa en una etapa con dos parejas de integración.

La APC 1A contiene sitios de receptor genómico distintos 1B y 1D. Los vectores donantes genéticos distintos 1C' y 1E' se acoplan independientemente a 1B y 1D, respectivamente. El vector donante 1C' codifica para un aAPX y el vector donante 1E' codifica para una aAM. La eAPC 1A se combina con los vectores donantes 1C' y 1E' simultáneamente, la célula resultante tiene el ORF 1C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' y suministrar un ORF para un aAPX. Simultáneamente, el ORF de 1E' se intercambió en el sitio de receptor genómico 1D para crear el sitio 1D' y suministrar un ORF para una aAM. Esto da como resultado la expresión de aAPX en la superficie celular, aAM de manera intracelular y, por tanto, la carga de aAM como carga en aAPX en la formación del complejo aAPX:aAM en la superficie celular. Esto crea una línea celular de eAPC-pa.

Figura 13 - Ejemplo de compilación de una eAPC-pa en dos etapas con dos parejas de integración a través de eAPC-p.

La eAPC 1A contiene sitios de receptor genómico distintos 1B y 1D. Los vectores donantes genéticos distintos 1C' y 1E' se acoplan independientemente a 1B y 1D, respectivamente. El vector donante 1C' codifica para un aAPX y el vector donante 1E' codifica para una aAM. En la ETAPA 1, la eAPC 1A se combina con el vector donante 1C'. La célula resultante tiene el inserto 1C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' y suministrar un ORF para un aAPX. Esto da como resultado la expresión de aAPX en la superficie celular y la creación de una eAPC-p. El sitio de receptor genómico 1D permanece sin usar. En la ETAPA 2, la eAPC-p creada en la ETAPA 1 se combina con el vector donante 1E', la célula resultante tiene el inserto 1E' intercambiado en el sitio de receptor genómico 1D para crear el sitio 1D' y suministrar un ORF para una aAM. Esto da como resultado la expresión de aAM en la superficie celular como carga del aAPX expresado y la creación de una eAPC-pa.

Figura 14 - Ejemplo de compilación de una eAPC-pa en dos etapas con dos parejas de integración a través de

eAPC-a.

La eAPC 1A contiene sitios de receptor genómico distintos 1B y 1D. Los vectores donantes genéticos distintos 1C' y 1E' se acoplan independientemente a 1B y 1D, respectivamente. El vector donante 1C' codifica para una aAM y el vector donante 1E' codifica para un aAPX. En la ETAPA 1, la eAPC 1A se combina con el vector donante 1C'. La célula resultante tiene el inserto 1C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 1B para crear el sitio 1B' y suministrar un ORF para una aAM. Esto da como resultado la expresión de aAM en la superficie celular y la creación de una eAPC-a. El sitio de receptor genómico 1D permanece sin usar. En la ETAPA 2, la eAPC-a creada en la ETAPA 1 se combina con el vector donante 1E'. La célula resultante ha intercambiado el inserto 1E' en el sitio de receptor genómico 1D para crear el sitio 1D' y suministrar un ORF para un aAPX. Esto da como resultado la expresión del aAPX en la superficie celular con aAM como carga y la creación de una eAPC-pa.

Figura 15. Compilación al azar de una agrupación de eAPC-pa a partir de una eAPC-p.

La eAPC-p contiene el sitio de receptor genómico intercambiado 1B' que expresa un aAPX y el sitio de receptor genómico distinto 1D. La agrupación de vectores donantes genéticos 1E' i-iii se acopla a 1D. Los vectores donantes 1E' i-iii codifican, cada uno, para un único gen de aAM. La eAPC-p se combina con los vectores donantes 1E' i, 1E' ii, 1E' iii simultáneamente. La agrupación de células resultante tiene cualquiera de los insertos 1E' i-iii intercambiados en el sitio de receptor genómico 1D en múltiples casos independientes para crear los sitios 1D' i-iii, cada uno de los cuales suministra un único ORF para un gen de aAM. La agrupación de células eAPC-pa resultante comprende una población mixta de tres cohortes celulares distintas, cada una de las cuales expresa una combinación discreta de 1B' que presenta como aAPX:aAM cualquiera de los genes de aAM contenidos en la biblioteca inicial de vectores.

Figura 16. Compilación al azar de una agrupación de eAPC-pa a partir de una eAPC-a.

La eAPC-a contiene el sitio de receptor genómico intercambiado 1B' que expresa una aAM y el sitio de receptor genómico distinto 1D. La agrupación de vectores donantes genéticos 1E' i-iii se acoplan a 1D. Los vectores donantes 1E' i-iii codifican, cada uno, para un único gen de aAPX. La eAPC-a se combina con los vectores donantes 1E' i, 1E' ii, 1E' iii simultáneamente. La agrupación de células resultante tiene cualquiera de los insertos 1E' i-iii intercambiados en el sitio de receptor genómico 1D en múltiples casos independientes para crear los sitios 1D' i-iii, cada uno de los cuales suministra un único ORF para un gen de aAPX. La agrupación de células eAPC-pa resultante comprende una población mixta de tres cohortes celulares distintas, cada una de las cuales expresa una combinación discreta de aAM codificada en 1B' y cualquiera de los genes de aAPX contenidos en la biblioteca inicial de vectores.

Figura 17 - Compilación al azar de bibliotecas de eAPC-pa agrupadas a partir de eAPC que contienen emparejamiento combinatorio de genes de aAM y aAPX.

La APC 1A contiene sitios de receptor genómico distintos 1B y 1D. Los vectores donantes genéticos distintos 1C' y 1E' se acoplan a 1B y 1D, respectivamente. Los vectores donantes 1C' i y 1C' ii codifican, cada uno, para un único gen de aAM, y los vectores donantes 1E' i y 1E' ii codifican, cada uno, para un único gen de aAPX. La eAPC 1A se combina con los vectores donantes 1C' i, 1C' ii, 1E' i y 1E' ii simultáneamente. La agrupación de células resultante tiene el inserto 1C' i o 1C' ii intercambiado en el sitio de receptor genómico 1B en múltiples casos independientes para crear los sitios 1B' i y 1B' ii, cada uno de los cuales suministra un único ORF para una aAM. La agrupación de células resultante tiene además el inserto 1E' i o 1E' ii intercambiado en el sitio de receptor genómico 1D en múltiples casos independientes para crear los sitios 1E' i y 1E' ii, cada uno de los cuales suministra un único ORF para un gen de APX. La agrupación de células eAPC-pa resultante comprende una población mixta de cuatro cohortes celulares distintas, cada una de las cuales expresa un par aAPX:aAM aleatorizado discreto en la superficie compuesto por uno de cada gen contenido en la biblioteca inicial de vectores.

Figura 18 - Descripción de los componentes de una única pareja de integración eTPCS.

Un ejemplo de un eAPCS que comprende cuatro componentes. El primer componente 2A es la propia línea de eTPC con todas las características modificadas por ingeniería requeridas de esa célula. La eTPC 2A contiene un segundo componente, 2B, que es un sitio de integración genómica para la integración de un par de ORF de cadena de TCR analito complementaria. Un tercer componente incluido en la eTPC, 2A, es un constructo indicador sintético que se induce tras el ligamiento de TCR, 2F. Un componente independiente adicional, 2C, representa vectores donantes genéticos para la integración dirigida al sitio de ORF en el sitio 2B, donde la flecha indica especificidad acoplada.

Figura 19 - Descripción de los componentes de un eTPCS de pareja de integración dual.

Un ejemplo de un eAPCS que comprende seis componentes. El primer componente 2A es la propia línea de eTPC con todas las características modificadas por ingeniería requeridas de esa célula. La eTPC 2A contiene tres componentes adicionales, dos de los cuales son 2B y 2D, que son sitios de integración genómica para la integración de un par de cadenas de TCR analito. Un tercer componente incluido en la eTPC, 2A, es un constructo indicador

sintético que se induce tras el ligamiento de TCR, 2F. Dos componentes independientes adicionales, 2C y 2E, representan vectores donantes genéticos para la integración dirigida al sitio de ORF en los sitios 2B y 2D, respectivamente, donde las flechas indican especificidad acoplada. Cada pareja de sitio de integración/vector donante emparejados puede formatearse para integrar un único ORF o un par de ORF para introducir la expresión del par de cadenas de TCR analito por diferentes medios.

Figura 20 - Compilación de diferentes TCRsp analito que presentan eTPC.

El eTPCS comienza con la eTPC y usa uno o más vectores donantes para crear células que expresan la TCRsp analito o cadenas de TCR analito individuales. Una eTPC que presenta TCRsp se denomina eTPC-t y puede crearse mediante la introducción de dos ORF complementarios que codifican para la cadena de TCR en la eTPC (etapa i). Una eTPC que expresa una cadena de TCR analito individual sola se denomina eTPC-x, en la que a, y puede crearse mediante la introducción de uno o más ORF que codifican para cadena de TCR individual en la eTPC (etapa ii). Alternativamente, puede crearse una eTPC-t a partir de una eTPCx, en el que se introduce un segundo ORF que codifica para cadena de TCR complementaria en una eTPC-x existente (etapa iii).

Figura 21 - Compilación de un sistema de eTPC con un formato de una etapa y un vector.

La eTPC 2A contiene un sitio de receptor genómico distinto. Los vectores donantes genéticos 2C se acoplan a 2D. El vector donante 2C codifica para un par de cadenas de TCR. La eTPC 2A contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. La eTPC 2A se combina con el vector donante 2C. La célula resultante ha intercambiado el inserto 2C en el sitio de receptor genómico 2B para crear el sitio 2C' y suministrar los dos ORF para un par de cadenas de TCR. Esta célula es capaz de presentar una TCRsp en la superficie y, por tanto, se designa como eTPC-t.

Figura 22 - Compilación de una eTPC-t en una etapa con un vector y un sitio de receptor sin usar.

La eTPC 2A contiene sitios de receptor genómico distintos 2B y 2D. Los vectores donantes genéticos 2C' se acoplan a 2D. El vector donante 2C' codifica para un par de cadenas de TCR. La eTPC 2A contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. La eTPC 2A se combina con el vector donante 2C'. La célula resultante ha intercambiado el inserto 2C' en el sitio de receptor genómico 2B para crear el sitio 2B' y suministrar los dos ORF para un par de cadenas de TCR. El sitio de receptor genómico 2D permanece sin usar. Esta célula es capaz de presentar una TCRsp en la superficie y, por tanto, se designa como una eTPC-t.

Figura 23 - Compilación de una eTPC-t en una etapa con dos vectores y dos parejas de integración.

La eTPC 2A contiene sitios de receptor genómico distintos 2B y 2D. La eTPC 2A contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. Los vectores donantes genéticos distintos 2C' y 2E' se acoplan independientemente a 2B y 2D, respectivamente. El vector donante 2C' codifica para una cadena de TCR individual y el vector donante 2E' codifica para una segunda cadena de TCR recíproca. La eTPC 2A se combina con los vectores donantes 2C' y 2E'. La célula resultante tiene el inserto 2C intercambiado en el sitio de receptor genómico 2B para crear el sitio 2B' y suministrar un ORF para una primera cadena de TCR. Además, la línea celular resultante tiene el inserto 2E' intercambiado en el sitio de receptor genómico 2D para crear el sitio 2D' y suministrar un ORF para una segunda cadena de TCR. Esta célula es capaz de presentar una TCRsp en la superficie y, por tanto, se designa como eTPC-t.

Figura 24 - Compilación de una eTPC-x en una única etapa con un vector y un sitio de receptor sin usar.

La eTPC 2A contiene sitios de receptor genómico distintos 2B y 2D. Los vectores donantes genéticos 2C' se acoplan a 2D. El vector donante 2C' codifica para una cadena de TCR individual. La eTPC 2A contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. La eTPC 2A se combina con el vector donante 2C'. La célula resultante tiene el inserto 2C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 2B para crear el sitio 2B' y suministrar un ORF de cadena de TCR individual. El sitio de receptor genómico 2D permanece sin usar. Esta célula expresa sólo una cadena de TCR individual y, por tanto, se designa como eTPC-x.

Figura 25 - Compilación de una eTPC-t en dos etapas con dos vectores.

La eTPC 2A contiene sitios de receptor genómico distintos 2B y 2D. La eTPC 2A contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. Los vectores donantes genéticos distintos 2C' y 2E' se acoplan independientemente a 2B y 2D, respectivamente. El vector donante 2C' codifica para una cadena de TCR individual y el vector donante 2E' codifica para una segunda cadena de TCR recíproca. En la ETAPA 1, se combina una eTPC 2A con el vector donante 2C'. La célula resultante tiene el inserto 2C' intercambiado en el sitio de receptor genómico 2B para crear el sitio 2B' y suministrar un ORF para una primera cadena de TCR. Esta célula expresa sólo una cadena de TCR individual y, por tanto, se designa como eTPC-x. El sitio de receptor genómico 2D permanece sin usar. En la ETAPA 2, la eTPC-x se combina con el vector donante 2E'. La célula resultante tiene el inserto 2E' intercambiado en el sitio de receptor genómico 2D para crear el sitio 2D' y suministrar un ORF para una segunda cadena de TCR

complementaria. Esta célula es capaz de presentar una TCRsp en la superficie y, por tanto, se designa como eTPC-t.

Figura 26 - Compilación al azar de una agrupación de eTPC-t a partir de una eTPC con cadenas de TCR analito emparejadas en un vector replicado individual para expresar pares de cadenas de TCR discretos de una biblioteca de pares de cadenas de TCR seleccionados.

La eTPC 2A contiene un sitio de receptor genómico 2B. Los vectores donantes genéticos 2C' se acoplan a 2B. Los vectores donantes 2C' i, 2C' ii y 2C' iii codifican para un par de cadenas de TCR distinto y constituyen una biblioteca de vectores mixtos de pares de cadenas de TCR discretos. La eTPC 2A contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. La eTPC 2A se combina con los vectores donantes 2C' i, 2C' ii y 2C' iii simultáneamente. La agrupación de células resultante tiene el inserto 2C intercambiado en el sitio de receptor genómico 2B en múltiples casos independientes para crear los sitios 2B' i, 2B' ii y 2B' iii que suministran dos ORF para cada par de cadenas de TCR discreto contenido en la biblioteca inicial de vectores. esta agrupación de células eTPC-t comprende una población mixta de tres clones celulares distintos, cada uno de los cuales expresa pares de cadenas de TCR distintos, designados como TCRsp i, ii y iii, que forman una biblioteca agrupada de eTPC-t.

Figura 27 - Compilación al azar de una agrupación de eTPC-t a partir de una eTPC con cadenas de TCR analito emparejadas en un vector replicado individual para expresar pares de cadenas de TCR discretos de una biblioteca de pares de cadenas de TCR seleccionados y un sitio de receptor sin usar.

La eTPC 2A contiene sitios de receptor genómico distintos 2B y 2D. Los vectores donantes genéticos 2C' se acoplan a 2B. Los vectores donantes 2C' i, 2C' ii y 2C' iii codifican para un par de cadenas de TCR distinto y constituyen una biblioteca de vectores mixtos de pares de cadenas de TCR discretos. La eTPC 2A contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. La eTPC 2A se combina con los vectores donantes 2C' i, 2C' ii y 2C' iii simultáneamente. La agrupación de células resultante tiene el inserto 2C intercambiado en el sitio de receptor genómico 2B en múltiples casos independientes para crear los sitios 2B' i, 2B' ii y 2B' iii que suministran dos ORF para cada par de cadenas de TCR discreto contenido en la biblioteca inicial de vectores. Esta agrupación de células eTPC-t comprende una población mixta de tres clones celulares distintos, cada uno de los cuales expresa pares de cadenas de TCR distintos, designados como TCRsp i, ii y iii, que forman una biblioteca agrupada de eTPC-t. El sitio de receptor genómico 2D permanece sin usar.

Figura 28 - Compilación al azar de una agrupación de eTPC-t a partir de una eTPC con dos vectores para expresar combinaciones aleatorias de pares de cadenas de TCR emparejadas de una única biblioteca de cadenas de TCR seleccionadas.

La eTPC 2A contiene sitios de receptor genómico distintos 2B y 2D. Los vectores donantes genéticos distintos 2C' y 2E' se acoplan independientemente a 2B y 2D, respectivamente. Los vectores donantes 2C' i y 2C' ii codifican, cada uno, para una cadena de TCR individual, y los vectores donantes 2E' i y 2E' ii codifican, cada uno, para una cadena de TCR individual recíproca. La eTPC 2A contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. La eTPC 2A se combina con los vectores donantes 2C' i, 2C' ii, 2E' i y 2E' ii simultáneamente. La agrupación de células resultante tiene el inserto 2C' i o 2C' ii intercambiado en el sitio de receptor genómico 2B en múltiples casos independientes para crear los sitios 2B' i y 2B' ii, cada uno de los cuales suministra un único ORF para una cadena de TCR. La agrupación de células resultante tiene además el inserto 2E' i o 2E' ii intercambiado en el sitio de receptor genómico 2D en múltiples casos independientes para crear los sitios 2E' i y 2E' ii, cada uno de los cuales suministra un único ORF para una cadena de TCR recíproco a los de los sitios 2C' i y 2C' ii. La agrupación de células eTPC-t resultante comprende una población mixta de cuatro cohortes celulares distintas, cada una de las cuales expresa una TCRsp aleatoria discreta en la superficie compuesta por una de cada cadena de TCR recíproca contenida en la biblioteca inicial de vectores.

Figura 29 - Compilación al azar de una agrupación de eTPC-t a partir de una eTPC-x con cadenas de TCR analito no emparejadas para expresar combinaciones aleatorias de pares de cadenas de TCR emparejadas de una biblioteca de cadenas de TCR individuales seleccionadas.

La eTPC-x contiene el sitio de receptor genómico intercambiado 2B' que expresa una cadena de TCR individual y el sitio de receptor genómico distinto 2D. Los vectores donantes genéticos distintos 2E' i y 2E' ii se acoplan a 2D, respectivamente. Los vectores donantes 2E' i y 2E' ii codifican, cada uno, para una cadena de TCR individual. La eTPC-x contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. La eTPC-x se combina con los vectores donantes 2E' i y 2E' ii simultáneamente. La agrupación de células resultante tiene el inserto 2E' i o 2E' ii intercambiado en el sitio de receptor genómico 2D en múltiples casos independientes para crear los sitios 2E' i y 2E' ii, cada uno de los cuales suministra un único ORF para una cadena de TCR. La agrupación de células eTPC-t resultante comprende una población mixta de 2 cohortes celulares distintas que expresan una TCRsp discreta en la superficie compuesta por la cadena de TCR expresada a partir de 2B' emparejada con una de cada cadena de TCR contenida en la biblioteca inicial de vectores.

Figura 30 - Funcionamiento de un sistema eAPC:eTPC combinado que muestra posibles estados de salida de

eTPC-t.

La eAPC analito contiene los sitios 1C' y 1E' integrados con un ORF cada uno para codificar para un aAPX y una aAM, con la aAM cargada como carga en aAPX en la superficie celular. La eTPC analito contiene los sitios 2C' y 2E', cada uno integrado con un ORF que codifica para una TCRsp recíproca en la superficie. La eTPC-t contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. Cuando se ponen en contacto las poblaciones de eTPC-t y eAPC-pa, pueden lograrse cuatro estados de respuesta de eTPC-t, uno negativo y tres positivos. El estado negativo es el estado de reposo de la eTPC-t, sin intensidad de señal en el elemento 2F, lo que indica un fracaso del complejo de eAPC aAPX:aAM para estimular el par de cadenas presentado por eTPC-t. Tres estados positivos muestran una intensidad de señal cada vez mayor del 2F. Los estados 2F'+, 2F'++ y 2F'+++ indican intensidad de señal baja, media y alta, respectivamente. El producto genético de 2F, indicado como hexágonos, se acumula para notificar la intensidad de señal de cada estado celular, tal como se indica mediante el sombreado más oscuro de las celdas. Esto indica una respuesta gradual de la TCRsp analito expresada por la población de eTPC-t hacia el aAPX:aAM analito presentado por la eAPC-pa.

Figura 31 - Funcionamiento de un sistema eAPC:eTPC combinado que muestra posibles estados de salida de eAPC-pa.

La eAPC-pa analito contiene los sitios 1C' y 1E' integrados con un ORF cada uno para codificar para un aAPX y una aAM, con la aAM cargada como carga en aAPX en la superficie celular. La eTPC analito contiene los sitios 2C' y 2E', cada uno integrado con un ORF que codifica para una TCRsp recíproca en la superficie. La eTPC-t contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. Cuando se ponen en contacto las poblaciones de eTPC y eAPC-pa analito, pueden lograrse cuatro estados de respuesta de eAPC, uno negativo y tres positivos. El estado negativo es el estado de reposo de la eAPC analito, lo que indica un fracaso del par de cadenas de TCRsp para estimular el complejo aAPX:aAM presentado por la eAPC analito. Tres estados positivos muestran una intensidad de señal cada vez mayor del aAPX:aAM puesto en contacto. La intensidad de la señal notificada de cada estado celular se indica con *, ** y ***, y también se indica con un sombreado más oscuro de las celdas. Esto indica una respuesta gradual de aAPX:aAM analito hacia el par de cadenas de TCRsp analito.

Figura 32 - Funcionamiento combinado del sistema APC:eTPC analito de dos partes para identificar pares de cadenas de TCR reactivos con el aAPX:aAM analito de una biblioteca de eTPC-t que expresa pares de cadenas de TCR analito discretos.

La agrupación de eTPC-t contiene células que albergan sitios 2C' i, ii o iii, en los que cada uno se integra con dos ORF que codifican para un par de cadenas de TCR recíprocas y, por tanto, cada cohorte de células en la población expresa una TCRsp discreta en la superficie. La eTPC-t contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. La eAPC analito contiene los sitios 1C' y 1E' integrados con un conjunto distinto de ORF para codificar para un aAPX y una aAM, con la aAM cargada como carga en aAPX en la superficie celular. En el presente ejemplo, sólo el par de cadenas TRC expresado a partir de 2C' i es específico para aAPX:aAM presentado por la APC analito, de tal manera que cuando se ponen en contacto la agrupación de eTPC-t y la población de APC analito, sólo la cohorte de células de la eTPC-t que porta 2C' i notifica el acoplamiento de TCRsp a través del estado 2F'.

Figura 33 - Funcionamiento combinado del sistema eAPC:eTPC de dos partes para identificar aAM reactiva con eTPC analito de una biblioteca de eAPC analito que expresa complejos aAPX:aAM analito discretos.

La eAPC analito contiene los sitios 1C' y 1E' integrados con un conjunto distinto de ORF, cada uno para codificar para un aAPX y una aAM, con la aAM cargada como carga en aAPX en la superficie celular. La eTPC analito contiene el sitio de receptor genómico intercambiado 2C' que expresa una TCRsp en la superficie. Contiene además un elemento de respuesta de señal de TCR 2F. En el presente ejemplo, sólo el complejo aAPX:aAM i es específico para el TCR presentado por la eTPC analito, de tal manera que cuando se ponen en contacto la agrupación de eAPC analito y la población de eTPC analito, sólo la cohorte de células que expresa aAM i expresa una señal distinta *.

Figura 34 - Generación de una eAPC-p + aAM a partir de una eAPC-p y la adición de un antígeno presentable y soluble aAM.

La eAPC-p contiene el sitio de receptor genómico intercambiado 1B' que expresa un aAPX. Un antígeno soluble y directamente presentable aAM se combina con la eAPC-p. Esto da como resultado la formación del complejo aAPX:aAM en la superficie celular y la generación de una eAPC-p + aAM.

Figura 35 - Generación de una eAPC-p + aAM a partir de una eAPC-p y una aAM.

La eAPC-p soluble contiene el sitio de receptor genómico intercambiado 1B' que expresa un aAPX. Se combina un antígeno soluble aAM con la eAPC-p, lo que da como resultado la expresión del aAPX en la superficie celular, la presencia de aAM de manera intracelular y, por tanto, la carga de la aAM como carga en el aAPX en la formación del complejo aAPX:aAM en la superficie celular y la generación de una eAPC-p + aAM.

Figura 36 - Identificación de la aAM presentada por una eAPC-p + aAM mediante la liberación forzada de la aAM.

eAPC-p + aAM contiene el sitio de receptor genómico intercambiado 1B' que expresa un aAPX así como una aAM internalizada que se presenta en la superficie como complejo aAPX:aAM. La aAM se libera del complejo de superficie aAPX:aAM mediante incubación y la aAM liberada está disponible para su identificación.

Figura 37 - Identificación de la aAM presentada por una eAPC-p + aAM mediante la captura del complejo aAPX:aAM.

eAPC-p + aAM contiene el sitio de receptor genómico intercambiado 1B' que expresa un aAPX así como una aAM internalizada que se presenta en la superficie como complejo aAPX:aAM. El complejo de superficie aAPX:aAM se captura para la identificación de la aAM cargada.

Figura 38 - Selección de células con mutagénesis dirigida de los loci de HLA-A, HLA-B y HLA-C en la línea celular HEK293.

a) Señal de fluorescencia de GFP en dos poblaciones celulares independientes 48 horas después de la transfección con plásmidos que codifican para Cas9-P2A-GFP y ARNg que seleccionan como diana los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C (histograma de color gris) en comparación con las células de control HEK293 (histograma de línea discontinua). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la ventana del subconjunto de GFP se clasificaron como una población policlonal. b) Señal de HLA-ABC en superficie celular observada en las dos poblaciones policlonales clasificadas cuando se marcan con un anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 (histograma de color gris). Las células individuales que mostraban una señal baja de anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 y que se visualizaron dentro de la ventana de clasificación, se clasificaron para establecer monoclonos. Las células HEK293 no marcadas (histograma de línea discontinua) y las células HEK293 marcadas con anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 (histograma de línea de color completamente negro) sirvieron como controles.

Figura 39 - Análisis fenotípico de monoclonos HLA-ABC^{nulo}: Se tiñeron poblaciones monoclonales con el anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 y se analizaron mediante citometría de flujo (histograma de color gris). Las células HEK293 no marcadas (histograma de línea discontinua) y las células HEK293 marcadas con anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 (histograma de línea de color completamente negro) sirvieron como controles. Las tres líneas monoclonales mostraron una señal fluorescente que coincidía con los controles no marcados, lo que demuestra que cada línea carecía de expresión en superficie de HLA-ABC.

Figura 40 - Caracterización genética de una selección de monoclonos que carecen de expresión de HLA-ABC en superficie que demuestra una delección genómica en los alelos de HLA diana. Se generaron amplicones de PCR con cebadores que abarcaban los sitios diana genómicos de ARNg de alelos de HLA específicos y se determinó su tamaño mediante electroforesis. El tamaño esperado del amplicón de HLA-A de tipo natural es de 1067 pb, el amplicón de HLA-B es de 717 pb y el amplicón de HLA-C es de 1221 pb.

Figura 41 - Selección de células con integración genómica dirigida del componente B sintético con o sin el componente D sintético.

a) Señal de fluorescencia de GFP 48 horas después de la transfección con plásmidos que codifican para Cas9-P2A-GFP, ARNg que seleccionan como diana el locus AAVS1 y elementos genéticos del componente B flanqueados por brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1 (histograma de color gris). Las células HEK293 sirvieron como control negativo de GFP (histograma de línea discontinua). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la ventana GFP+ se clasificaron como una población policlonal. b) Señal de fluorescencia de GFP 48 horas después de la transfección con plásmidos que codifican para Cas9-P2A-GFP, ARNg que seleccionan como diana el locus AAVS1 y a los componentes B y D, ambos flanqueados por los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1 (histograma de color gris). Servidor de células HEK293 como control negativo de GFP (histograma de línea discontinua). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la ventana GFP+ se clasificaron como una población policlonal c) señal de BFP mantenida pero de RFP no detectable observada en la población policlonal clasificada como D1. Las células individuales que mostraron una señal alta de BFP en el cuadrante Q3 se clasificaron para establecer eAPC que contenía monoclonos del componente B sintético. d) Señal de BFP y RFP mantenida observada en la población policlonal clasificada como D2. Las células individuales que mostraron señales altas de BFP y RFP en el cuadrante Q2 se clasificaron para establecer monoclonos de eAPC que contenían el componente B sintético y el componente D sintético.

Figura 42 - Análisis fenotípico de monoclonos de eAPC.

a y b) Las poblaciones monoclonales que presentan expresión mantenida de BFP sugieren la integración del componente B sintético. c) Las poblaciones monoclonales que muestran expresión mantenida de BFP y RFP sugieren la integración tanto del componente B sintético como del componente D sintético.

Figura 43 - Caracterización genética de una selección de monoclonos para la integración del componente B o de los componentes B y D en el locus AAVS1.

a) Se generaron amplicones de PCR con cebadores que se ceban dentro del componente B y/o D y se determinó el tamaño mediante electroforesis. El tamaño esperado de un amplicón positivo es de 380 pb, lo que indica una integración estable del componente B y/o D. b) Se generaron amplicones de PCR con cebadores que se ceban en la secuencia genómica de AAVS1 distal a la región codificada por los brazos homólogos y el terminador pA de SV40 codificado por el componente B y/o D y se determinó el tamaño por electroforesis. El tamaño esperado de un amplicón positivo es de 660 pb, lo que indica que se produjo la integración del componente B y/o D en el sitio de AAVS1.

Figura 44 - Selección de células con integración genómica dirigida del componente C' en el componente B

a) Señal de fluorescencia de GFP 48 horas después de la transfección con plásmidos que codifican para Cas9-P2A-GFP, ARNg que seleccionan como diana el locus AAVS1 y el componente C'^{HLA-A*24:02} (panel izquierdo) o el componente C'^{HLA-B*07:02} (panel derecho). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la ventana GFP+ se clasificaron como una población policlonal ACL-303 o ACL-305.

b) Expresión en superficie celular de HLA analito observada en las dos poblaciones policlonales clasificadas cuando se marcan con un anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 (histograma de color gris). Las células individuales que mostraron una señal alta de anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 y se visualizaron dentro de la ventana de clasificación derecha, se clasificaron para establecer monoclonos. La señal detectada a partir de ACL-128 marcada con anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5, la línea celular de eAPC HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} (histograma de línea discontinua) sirvieron como controles.

Figura 45 - Análisis fenotípico de monoclonos de eAPC-p que expresan la proteína de HLA de clase I analito en la superficie celular. Se tiñeron poblaciones monoclonales con el anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 y se analizaron mediante citometría de flujo (histograma de color gris). ACL-128, la línea celular HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} eAPC (histograma de línea discontinua) sirvieron como controles. Las líneas celulares monoclonales ACL-321 y ACL-331 mostraron una señal fluorescente más intensa en comparación con el control de líneas celulares HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} eAPC, lo que demuestra que cada línea expresa su ORF de aAPX, HLA-A*24:02 o HLA-B*07:02 analito, respectivamente y, por tanto, son líneas celulares de eAPC-p.

Figura 46 - Caracterización genética de una selección de monoclonos que demuestra que sus genomas integraron el componente C', y que la integración se produjo en el sitio de receptor genómico de AAVS1, generando el componente B'

a) Los amplicones de PCR confirman la presencia del inserto de HLA, una banda de 810 pb indicó el amplicón del promotor de CMV correcto y 380 pb es el amplicón generado a partir del terminador pA de SV40. b) Se generaron amplicones de PCR con dos conjuntos de cebadores que se cebaron en la secuencia genómica de AAVS1 distal a la región codificada por los brazos homólogos y un cebador que es único para el terminador pA de SV40 ligado al ORF de HLA analito. El tamaño esperado de un amplicón positivo de 1 kb y 1,1 kb indica la generación del componente B'.

Figura 47 - Selección de células con integración genómica dirigida del componente C' al componente B

a) Señal de fluorescencia de GFP 48 horas después de la transfección con plásmidos que codifican para Cas9-P2A-GFP, ARNg que seleccionan como diana el locus AAVS1 y el componente C'^{HLA-DRA*01:01/HLA-DRS1*01:01} (panel izquierdo) o el componente C'^{HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01} (panel derecho). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la ventana GFP+ se clasificaron como una población policlonal.

b) Expresión en superficie celular de HLA analito observada en las dos poblaciones policlonales clasificadas cuando se marcan con un anticuerpo anti-HLA-DR,DP,DQ conjugado con Alexa 647 (histograma de color gris). Las células individuales que mostraron una señal alta de anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con Alexa 647 y se visualizaron dentro de la ventana de clasificación derecha, se clasificaron para establecer monoclonos. La señal detectada a partir de ACL-128 marcada anticuerpo anti-HLA-ABC con Alexa 647 (línea celular HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} eAPC) (histograma de línea discontinua) y la línea celular ARH de tipo natural (histograma de línea de color completamente negro) sirvió como controles

Figura 48 - Análisis fenotípico de monoclonos eAPC-p que expresan la proteína de HLA de clase II analito en la superficie celular. Se tiñeron poblaciones monoclonales con un anticuerpo anti-HLA-DR,DP,DQ conjugado con Alexa 647 y se analizaron mediante citometría de flujo (histograma de color gris). ACL-128 (línea celular de eAPC HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo}) (histograma de línea discontinua) y la línea celular de tipo natural ARH (histograma de línea de color completamente negro) sirvieron como controles. Las líneas celulares monoclonales ACL-341 y ACL-350 mostraron una señal fluorescente más intensa en comparación con el control de líneas celulares de eAPC HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo}, lo que demuestra que cada línea expresaba su aAPX, HLA-DRA*01:01. /HLA-

DRB1*01:01 o HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01 analito, respectivamente y, por tanto, son líneas celulares de eAPC-p.

Figura 49 - Monoclonos de eAPC-p generados por la integración por RMCE de la proteína de HLA de clase I analito

a) Las poblaciones monoclonales de eAPC-p ACL-421 y ACL-422 perdieron la fluorescencia de BFP (histograma de color gris). Su línea celular de eAPC parental ACL-385 (histograma de línea de color completamente negro) y la línea celular de tipo natural ARH negativa para BFP (histograma de línea discontinua) sirvieron como control.

b) Las poblaciones monoclonales de eAPC-p ACL-421 y ACL-422 ganaron la expresión de HLA-A*02:01 cuando se tiñeron con el anticuerpo anti-HLA-ABC con PE-Cy5 (histograma de color gris). Su línea celular de eAPC parental ACL-385 HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} (histograma de línea discontinua) y la línea celular de tipo natural ARH (histograma de línea de color completamente negro) sirvieron como controles de marcaje con anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 negativo y positivo, respectivamente. Estos resultados indicaron firmemente que se produjo un RMCE con éxito entre ORF de BFP y ORF de HLA-A*02:01 en ambas líneas celulares ACL-421 y ACL-422.

Figura 50. La caracterización genética de una selección de monoclonos confirmó la integración de HLA-A*02:01 mediante RMCE.

Un amplicón de 630 pb indicó la presencia de HLA-A2 en los monoclonos ACL-421 y 422, pero no en la línea de control, ACL-128.

Figura 51 - Análisis fenotípico de monoclonos de eAPC-pa que expresan la proteína de HLA de clase I analito en la superficie celular y aAM

a) Se tiñeron poblaciones monoclonales de eAPC-p con el anticuerpo anti-HLA-ABC con PE-Cy5 y se analizaron mediante citometría de flujo (histograma de color gris). La línea celular de eAPC ACL-128, HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} (histograma de línea discontinua) sirvieron como control. Las líneas celulares monoclonales ACL-321 y ACL-331 mostraron una señal fluorescente más intensa en comparación con los controles, lo que demuestra que cada línea expresaba su ORF de aAPX, HLA-A*02:01 o HLA-B*35:01 analito, respectivamente y, por tanto, eran líneas celulares de eAPC-p.

b) Se evaluó la fluorescencia de GFP en poblaciones monoclonales de eAPC-pa mediante citometría de flujo (histograma de color gris). La línea celular de eAPC, ACL-128, HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} (histograma de línea discontinua) sirvió como control. Las líneas celulares monoclonales ACL-391 y ACL-395 mostraron una señal fluorescente más intensa en comparación con los controles, lo que demuestra que cada línea expresa el marcador de selección de aAM analito y, por tanto, infiere la expresión de aAM, en una línea celular que también expresa ORF de HLA-LA-A*02:01 o HLA-B*35:01, respectivamente. Por tanto, ACL-391 y ACL-395 eran líneas de eAPC-pa.

Figura 52 - Caracterización genética de monoclonos que contienen los componentes 1D y/o 1B.

Se presentan dos tablas que resumen la caracterización genética de las eAPC generadas para contener el componente 1B, o los componentes 1B y 1D, respectivamente.

Figura 53 - Una eACP-p construida en una etapa en la que el componente 1C' codificaba para un único ORF de HLAI.

Se creó una eAPC-p a través de RMCE mediante electroporación de la línea celular ACL-402 con el plásmido que codifica para la expresión de la Tyr-recombinasa, Flp (V4.1.8), junto con un plásmido del componente 1C' que codifica para un aAPX, seleccionado de cualquiera de HLA-A*02:01 (V4.H.5 o HLA-A*24:02 (V4.H.6). En los 10 días posteriores a la electroporación, se clasificaron las células individuales positivas para la expresión en superficie de HLAI y la señal de proteína fluorescente disminuida, RFP, codificada por el marcador de selección del componente 1B. Se analizaron las líneas monoclonales de eAPC-p resultantes mediante citometría de flujo en paralelo con la línea de eAPC parental, y se presentan dos ejemplos. a) Las líneas monoclonales sobrecrecidas individuales (ACL-900 y ACL-963) se analizaron mediante citometría de flujo para detectar pérdida de RFP, presencia de BFP y ganancia de HLA-ABC (aAPX). Los gráficos de la izquierda presentan visualmente BFP frente a RFP, la célula parental tiene tanto BFP como RFP (Q2, gráfico superior, 99,2%), mientras que ACL-900 (Q3, gráfico central, 99,7%) y ACL-963 (Q3, gráfico inferior, 99,9%) carecen ambas de señal de RFP, lo que indica que se ha producido una pareja de integración entre el componente 1B/1C'. Los gráficos de la derecha presentan visualmente BFP frente a HLA-ABC (aAPX), donde tanto ACL-900 (Q2, gráfico superior, 99,2%) como ACL-963 (Q2, gráfico inferior, 99,2%) muestran una señal intensa para HLA-ABC (aAPX), reforzando aún más esa integración de 1B/1C. Fundamentalmente, tanto ACL-900 como el ACL-963 tienen una intensa señal de BFP, lo que indica que el componente 1D permanece abierto y aislado de la pareja de integración del componente 1B/1C. b) Para caracterizar adicionalmente ACL-900 y ACL-963, y una tercera eAPC-p no presentada en a) ACL-907, se extrajo ADN genómico y se realizó la PCR usando cebadores que se dirigen de manera adyacente e interna al componente 1B' (tabla 5, 8.

B.3, 15.H.2), amplificando selectivamente de ese modo sólo los eventos de pareja de integración con éxito. Se realiza la comparación con una línea parental no modificada, ACL-3, en la que falta el componente 1B. Se produjeron productos de amplicón específicos para el componente 1B' para los tres monoclonos de eAPC-p, mientras que no se detectó ningún producto en la reacción de ACL-3, lo que confirma que se había producido el evento de pareja de integración específico entre el componente 1B y el componente 1C'.

Figura 54 - Una eAPC-pa construida a partir de eAPC-p en una única etapa, en la que el componente 1D' codifica para un ORF de molécula antigénica analito individual (aAM).

Se construyeron múltiples eAPC-pa a partir de una eAPC-p parental (ACL-905) en paralelo, en las que el sitio de receptor genómico, el componente 1D, se selecciona como diana para la integración por un vector donante genético preparado, el componente 1E', que comprende un único ORF que codifica para una aAM. La eAPC-p (ACL-900, ejemplo 8) se combinó independientemente con un vector que codifica para la expresión de la enzima recombinasa RMCE (Flp, V4.1.8) y cada componente 1E' de cualquiera de V9.E.6, V9.E.7 o V9.E.8 mediante electroporación. En los 10 días posteriores a la electroporación, se seleccionaron eAPC-pa individuales y se clasificaron en células individuales (monoclonos) basándose en una señal disminuida del marcador de selección de la integración, BFP, codificado por el componente 1D. Las líneas monoclonales de eAPC-pa resultantes se analizaron mediante citometría de flujo en paralelo con la línea de eAPC parental y se presentan tres ejemplos. Además, los monoclonos resultantes también se caracterizaron genéticamente para confirmar el evento de pareja de integración. a) Se analizaron los monoclonos para eAPC-pa, ACL-1219, ACL-1227 y ACL-1233, y se seleccionaron mediante citometría de flujo para determinar la pérdida de la señal de BFP y la retención de la señal de HLA-ABC. Los gráficos de BFP frente a SSC se presentan visualmente con una ventana BFP-. Se observa un aumento del número de eventos de BFP- en comparación con la eAPC-p parental, lo que indica que se ha producido una pareja de integración entre los componentes 1D/1E'. Se seleccionaron células individuales de la ventana BFP-, se clasificaron y se sometieron a sobrecrecimiento. b) Se analizaron monoclonos seleccionados de ACL-1219, ACL-1227, ACL-1233 mediante citometría de flujo para confirmar la pérdida de BFP y la retención de señales de HLA-ABC. Se presentan gráficos de BFP frente a HLA-ABC, en los que pueden observarse tres monoclonos que han perdido la señal de BFP en comparación con la eAPC-p parental (gráfico más a la derecha), lo que indica un evento de pareja de integración con éxito. c) Para demostrar que los monoclonos contenían el tamaño correcto del fragmento para el ORF de aAM, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa, utilizando cebadores que seleccionan como diana el ORF de aAM y se presenta un gel de agarosa representativo. Se muestran los resultados de dos monoclonos que representan cada ORF de aAM. Carril 1: marcador de ADN 2_log, carriles 2-3: ORF de pp28 (tamaño esperado de 0,8 kb), carril 4: marcador de ADN 2_log, carriles 5-6: ORF de pp52 (tamaño esperado de 1,5 kb), carril 7: marcador de ADN 2_log, carriles 8-9: ORF de pp65 (tamaño esperado de 1,9 kb), carril 10: marcador de ADN 2_log. Todos los monoclonos analizados tenían el tamaño de amplicón esperado para la aAM respectiva, lo que indica adicionalmente que se había producido la pareja de integración.

Figura 55 - Integración al azar de múltiples antígenos en eAPC-p para crear una biblioteca de eAPC-pa agrupada en una única etapa

Se generó una biblioteca agrupada de eAPC-pa a partir de una agrupación de vectores del componente 1E preparados (el componente 1E') que codifican en conjunto múltiples ORF de aAM (HCMVpp28, HCMVpp52 y HCMVpp65) mediante la integración en una única etapa en la eAPC-p parental, en la que cada célula individual integra un único ORF de antígeno analito aleatorio derivado de la agrupación original de vectores, en el componente 1D', de tal manera que cada eAPC-pa generada expresa una aAM aleatoria individual, pero en conjunto la biblioteca agrupada de eAPC-pa representa la totalidad del ORF de aAM codificado en la biblioteca agrupada original de vectores. Se generó la biblioteca de eAPC-pa mediante electroporación combinando la eAPC-p (ACL-905, aAPX: HLA-A*02:01) con una biblioteca de vectores agrupada que se compone de vectores individuales que codifican para un ORF para uno de HCMVpp28, HCMVpp52 o HCMVpp65 (V9.E.6, V9.E.7, y V9.E.8), y que se mezcla a una razón molecular de 1:1:1. Se analizaron las poblaciones de eAPC-pa resultantes y se seleccionaron mediante citometría de flujo, en paralelo con la línea de eAPC-p parental. a) A los 10 días tras la electroporación, se analizaron supuestas células eAPC-pa (transfectantes) y se seleccionaron mediante citometría de flujo, en comparación con la línea parental (ACL-905). Los gráficos presentan visualmente BFP frente a SSC, seleccionados para poblaciones BFP-, en los que se observa un aumento de células BFP- en la ventana BFP- en comparación con la línea parental. Las células en masa se clasificaron a partir de los transfectantes basándose en la ventana BFP-, indicada como ACL-1050. b) Después del sobrecrecimiento, se analizaron las células ACL-1050 mediante citometría de flujo para determinar la pérdida de BFP. Los gráficos presentados visualmente son BFP frente a SSC, en los que ACL-1050 se ha enriquecido hasta el 96,4 % de BFP- en comparación con la línea parental ~4 % de BFP-. Posteriormente, las células individuales se clasificaron a partir de la contaminación por BFP- de ACL-1050. c) Para demostrar que el policlón ACL-1050 se componía de una mezcla de células que codifican para HCMVpp28, HCMVpp52 y HCMVpp65, se seleccionaron 12 monoclonos al azar, se sometieron a sobrecrecimiento y se usaron para la caracterización genética. Las células se caracterizaron mediante PCR utilizando cebadores dirigidos al ORF de aAM (el componente 1D') para amplificar y detectar aAM integrada. Los 12 monoclonos cribados mediante PCR tienen amplicones detectables que son del tamaño esperado para uno de pp28 (0,8 kb), pp52 (1,5 kb) o pp65 (1,9 kb). Además, las 3 aAM se representaron a través de los 12 monoclonos. En comparación, los amplicones de tres monoclonos discretos, en los que se conocía la aAM, se amplificaron en paralelo como controles; los tres controles produjeron

los amplicones de tamaño correcto de pp28 (0,8 kb), pp52 (1,5 kb) y pp65 (1,9 kb). Por tanto, se confirma que la agrupación se compone de eAPC-pa en la que cada célula tiene una única aAM seleccionada aleatoriamente de la agrupación original de tres vectores

5 Figura 56 - Demostración de la generación de eTPC-t a partir de eTPC parental

Se seleccionó un par alfa/beta de TCR modelo (JG9-TCR), que tiene una especificidad conocida por un antígeno de CMVH presentado en HLA-A*02:01 que se seleccionó para su integración en una línea parental de eTPC. Se donó el ORF de JG9-TCR-alfa en un contexto del componente 2E' y JG9-TCR-beta en un contexto de 2C'. Se creó una eTPC-t a través de RMCE mediante la transfección de los plásmidos de los componentes 2C' y 2E' y un constructo que codifica para la recombinasa flp en la línea de eTPC ACL-488, que alberga dos sitios de integración genómica, 2B y 2D, que codifican para los indicadores BFP y RFP, respectivamente. En los 10 días posteriores a la transfección, las células individuales disminuidas para las señales de BFP y RFP, codificadas por los marcadores de selección de los componentes 2B y 2D, se clasificaron como células individuales. La eTPC-t monoclonal resultante ACL-851 se analizó en paralelo con la eTPC parental y se presentó un único ejemplo. a) y b) La línea celular de eTPC parental ACL-488 y una monoclonal de ejemplo se analizaron mediante citometría de flujo para determinar señales de BFP y RFP. El gráfico muestra células individuales vivas como BFP frente a RFP, lo que muestra que la línea celular de eTPC es positiva para los marcadores de selección presentes en los componentes 2B y 2D (a), y el monoclon resultante ha perdido estos marcadores tal como se esperaba para los eventos de pareja de integración entre 2B/2C y 2D/2E (b). Los valores porcentuales representan el porcentaje de células doblemente positivas en a) y de células doblemente negativas en b). c) a f) eTPC ACL-488 y el monoclon eTPC-t ACL-851 se tiñeron con anticuerpos para CD3 y TCR alfa/beta (TCRab) y reactivo multimérico de HLA específico para JG9-TCR (Dex HLA-A*02:01 -NLVP) y se analizaron mediante citometría de flujo y se seleccionaron para células individuales vivas. La línea de eTPC parental no mostró tinción positiva para CD3 o TCR en la superficie celular (c), y también fue negativa para la tinción con reactivo multimérico de HLA (d). Por el contrario, el monoclon resultante mostró tinción positiva tanto para CD3 como para TCR en la superficie celular (e) y mostró tinción positiva con el reactivo multimérico específico para JG9-TCR expresado. Los valores porcentuales representan el porcentaje de células doblemente positivas para CD3/TCRab en c) y e), y células doblemente positivas para CD3/multimero de HLA en d) y f). g) Se preparó ADN genómico a partir de eTPC-t monoclonal ACL-851 y se sometió a PCR con cebadores específicos para cadena alfa de JG9-TCR codificado por el componente 2D', o cadena beta de JG9-TCR codificado por el componente 2B'. se resolvieron los productos de la PCR mediante gel de agarosa y se observaron con el tamaño de banda esperado. h) Se preparó ADN genómico a partir de eTPC-t monoclonal ACL-851 y se sometió a PCR digital basada en gotas con cebadores y sondas específicas para JG9-cadena alfa de TCR codificado por el componente 2D', o cadena beta de JG9-TCR codificado por el componente 2B'. Se incluyó un par cebador/sonda de amplicón de referencia para un intrón de la región constante de TCR alfa (TRAC). La tabla presenta razones de referencia para TCR alfa y TCR beta. Una razón cercana a 0,33 indica que una única copia de cada cadena alfa y beta de TCR está presente en la línea de eTPC-t ACL-851, que es una línea triploide.

Figura 57 - Demostración de la reversión de eTPC-x a partir de eTPC-t

Se revirtió una línea celular de eTPC-t parental ACL-851, que expresa una cadena alfa y beta de TCR en los sitios 2D' y 2B', respectivamente, a una línea de eTPC-x mediante el intercambio de componentes 2D' por un vector donante que codifica para GFP (el componente 2Z). El componente 2Z contenía sitios F14/F15 heteroespecíficos de recombinasa que flanqueaban el ORF de GFP y, por tanto, era compatible con el componente 2D'. Se transfectó la línea de eTPC-t ACL-851 con el componente 2Z junto con un constructo que codifica para la recombinasa flp. A los 7 días después de la transfección, se clasificaron las células individuales positivas para señales de GFP y se hicieron como monoclonas. Las líneas monoclonales de eTPC-x resultantes se analizaron mediante citometría de flujo en paralelo con la eTPC-t parental y se presentó un único ejemplo. a) y b) El monoclon eTPC-x (ACL-987) derivado de la eTPC-t parental ACL-851 se analizó mediante citometría de flujo para determinar la expresión de GFP junto con la línea parental. Los gráficos muestran los parámetros SSC frente a GFP de células individuales vivas seleccionadas. La línea celular parental no tiene expresión de GFP (a), mientras que el monoclon ACL-987 ha ganado GFP tal como se esperaba (b), lo que indica un intercambio del ORF de TCR alfa por un ORF de GFP. c) y d) El monoclon eTPC-x ACL-987 derivado de ACL-851 parental junto con la eTPC-t parental ACL-851 se tiñeron con anticuerpos para CD3 y TCRab y se analizaron mediante citometría de flujo. Los gráficos muestran los parámetros de CD3 frente a TCRab seleccionados en células individuales vivas. La célula parental mostró tinción positiva tanto para CD3 como para TCRab (c), mientras que el monoclon derivado mostró tinción negativa para ambos (d); confirmando la pérdida de ORF de TCR alfa en la línea de eTPC-x derivada.

Figura 58 - Demostración de la integración al azar em eTPC-x para crear una agrupación de eTPC-t.

Se creó una agrupación de eTPC-t a partir de una línea parental de eTPC-x que expresa una única cadena beta de TCR en el componente 2B'. La línea de eTPC-x expresó GFP como indicador en el sitio 2D disponible. Se construyó una agrupación de 64 cadenas alfa de TCR variantes, incluyendo la cadena parental. El par de cadenas de TCR parental representa el JG9-TCR con especificidad conocida por un antígeno de CMVH presentado en HLA-A*02:01. La agrupación del componente 2E se transfectó en la eTPC-x parental ACL-987 junto con un constructo que codifica para la recombinasa flp. Se seleccionó una línea policlonal clasificando las células positivas para GFP 10 días

después de la transfección. La eTPC-t policlonal ACL-988 resultante se clasificó posteriormente basándose en la tinción negativa para GFP y la tinción positiva o negativa para el reactivo multimérico de HLA (DEX HLA-A*02:01-NLVP). Las células individuales recuperadas se secuenciaron para identificar las cadenas alfa de TCR codificadas y se compararon con un análisis en paralelo de cada una de las variantes de la cadena alfa de TCR emparejadas con la cadena beta de TCR nativa en cuanto a tinción con un reactivo multimérico de HLA específico para el par de cadenas de TCR parental. a) y b) La línea de eTPC-x parental ACL-987 y la línea de eTPC-t policlonal resultante ACL-988 se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de GFP. Los gráficos presentan visualmente los parámetros de SSC frente a GFP de células individuales vivas. La línea celular parental muestra una señal positiva para GFP, lo que indica que está intacto el componente 2D (a). La línea policlonal derivada muestra una mitad positiva y otra mitad negativa para GFP (b), lo que indica que la mitad de las células de la población policlonal han intercambiado potencialmente el ORF de GFP en D por el ORF de TCR alfa para formar el componente 2D', c) y d) la línea de eTPC-x parental ACL-987 y la línea de eTPC-t policlonal resultante ACL-988 se tiñeron con un anticuerpo para CD3 y un multímero de HLA con especificidad por el JG9-TCR parental (DEX HLA-A*02:01-NLVP) y se analizaron mediante citometría de flujo. Los gráficos presentan visualmente los parámetros multiméricos de CD3 frente a HLA de células individuales vivas. La línea celular parental es negativa para la tinción de multímeros de CD3 y HLA (c). El panel izquierdo de d) presenta visualmente eventos negativos para GFP seleccionados y el panel derecho eventos positivos para GFP. Sólo los eventos negativos para GFP, en los que el componente 2D se convierte en D', muestran tinción positiva para CD3, de los cuales un subconjunto muestra tinción positiva para el multímero de HLA. Se clasificaron células individuales de la ventana positiva y negativa del multímero de HLA seleccionado y se secuenció el ORF integrado en el componente 2D' para determinar la identidad del ORF de TCR alfa. e) Las 64 variantes de JG9-TCR-alfa se clonaron en un constructo de expresión que permitió que cada una se transfectara de manera independiente a eTPC-x parental (ACL-987). Para cada uno se determinaron las unidades de tinción relativas (RSU, *relative staining units*) frente al reactivo tetramérico HLA-A*02:01-NLVP. RSU se calculan como la razón de la intensidad de fluorescencia media (MFI, *mean fluorescence intensity*) de la señal del tetrámero HLA-A*02:01-NLVP para la población positiva para CD3 con respecto a la población negativa para CD3, y es indicativo de la fuerza de unión de cada variante del par de cadenas de TCR al reactivo multimérico de HLA. Cada punto representado gráficamente en la figura e) representa las RSU observadas para cada 64 variantes. Los círculos en blanco se correlacionan con las células secuenciadas recuperadas de la ventana positiva para el multímero de HLA/ negativa para GFP. Los triángulos en blanco se correlacionan con las células secuenciadas recuperadas de la ventana negativa para GFP/negativa para multímero de HLA.

Figura 59 - Demostración funcional del componente 2F en el sistema eAPC:eTPC usando eAPC-p y aAM exógena.

La línea celular de eTPC-t que porta un componente 2F (ACL-1277), en la que las cadenas de TCR en los componentes 2B' y 2D' codifican para un par de TCR que es específico para el péptido antigénico NLVPMVATV del CMVH presentado en HLA-A*02:01. El indicador del componente 2F fue RFP. Esta eTPC-t se puso en contacto durante 24 horas con varias líneas de eAPC de diferentes características -p en presencia y ausencia de antígenos peptídicos modelo, y los cultivos de contacto se analizaron mediante citometría de flujo. Los gráficos de histograma de citometría de flujo muestran cuentas de eventos frente a la señal de RFP de linfocitos T individuales viables identificados mediante tinción con anticuerpos para un marcador de superficie específico que no fue presentado por la eAPC. a) y b) se pulsaron células eAPC-p que expresaban sólo HLA-A*02:01 (ACL-209) con los péptidos NLVPMVATV (a) o VYALPLKML (b) y posteriormente se cultivaron conjuntamente con eTPC-t durante 24 horas. c) y d) se pulsaron células eAPC-p que expresaban sólo HLA-A*24:02 (ACL-963) con los péptidos NLVPMVATV (c) o VYALPLKML (d) y posteriormente se cultivaron conjuntamente con eTPC-t durante 24 horas. e) Las células eAPC-p que expresaban sólo HLA-A*02:01 (ACL-209) se dejaron sin pulsaciones de péptidos y posteriormente se cultivaron conjuntamente con eTPC-t durante 24 horas. f) Las células parentales de eAPC que no expresan HLA en la superficie celular (ACL-128) se pulsaron con NLVPMVATV y posteriormente se cultivaron conjuntamente con eTPC-t durante 24 horas. La señal de RFP aumentó significativamente en la eTPC-t ACL-1277 sólo en presencia de HLA-A*02:01 que expresa eAPC-p pulsado con NLVPMVATV, que representa la diana conocida del TCR expresado. Las ventanas y los valores del histograma reflejan el porcentaje de eventos en las ventanas positiva para RFP y negativa para RFP. Esto indica la respuesta específica del componente 2F al acoplamiento de TCRsp expresada por eTPC-t con HLA/antígeno relacionado (aAPX:aAM).

Figura 60 - Demostración funcional del componente 2F en el sistema eAPC:eTPC usando eAPC-pa con aAM integrada

La línea celular de eTPC-t que porta un componente 2F (ACL-1150), en la que las cadenas de TCR en los componentes 2B' y 2D' codifican para un par de TCR que es específico para el péptido antigénico NLVPMVATV del CMVH presentado en HLA-A*02:01. El indicador del componente 2F fue RFP. Esta eTPC-t se puso en contacto durante 24 horas con diversas líneas de eAPC de diferentes características -pa en ausencia de antígeno exógeno. a) Línea de eAPC-pa (ACL-1044) que expresa HLA-A*02:01 y el ORF de longitud completa para la proteína pp52 del CMVH. pp52 no contiene secuencias antigénicas reconocidas por el JG9-TCR. b) línea de eAPC-pa (ACL-1046) que expresa HLA-A*02:01 y el ORF de longitud completa para la proteína pp65 de CMVH. pp65 contiene una secuencia antigénica reconocida por el JG9-TCR, cuando se presenta en HLA-A*02:01. c) línea de eAPC-pa (ACL-1045) que expresa HLA-B*07:02 y el ORF de longitud completa para la proteína pp52 de CMVH. pp52 no contiene secuencias antigénicas reconocidas por el JG9-TCR. d) línea de eAPC-pa (ACL-1048) que expresa HLA-B*07:02 y el ORF de

longitud completa para la proteína pp65 de CMVH. pp65 contiene una secuencia antigénica reconocida por el JG9-TCR, cuando se presenta en HLA-A*02:01. Después del cultivo conjunto independiente de cada línea de eAPC-pa con eTPC-t durante 48 horas, se determinó la expresión de RFP en eTPC-t mediante citometría de flujo. La señal de RFP aumentó significativamente en la eTPC-t ACL-1150 sólo cuando se puso en contacto con la eAPC-pa ACL-1046. Esta fue la única eAPC-pa con la secuencia peptídica antigénica reconocida codificada por el ORF de aAM integrado y la restricción de HLA correcta. Las ventanas y los valores del histograma reflejan el porcentaje de eventos en las ventanas positiva para RFP y negativa para RFP. Esto indica la respuesta específica del componente 2F al acoplamiento de TCRsp expresada por eTPC-t con HLA/antígeno relacionado (aAPX:aAM).

10 Materiales y métodos

Todas las líneas celulares usadas en esta solicitud están en el contexto de ARH o HEK293. Se indican con ACL seguido por un número. En la tabla 1 se presenta un resumen de las líneas celulares usadas en esta solicitud.

15 Transfección de células

Un día antes de la transfección/electroporación, se sembraron las células a una densidad de $1,2-1,4 \times 10^6$ células/placa de 60 mm en DMEM al 90 % + glutamina 2 mM + HI-FBS al 10 % (Life Technologies). Al día siguiente, se transfectaron células con el 65 % de confluencia con una cantidad total de 5 ug de ADN y jetPEI® (reactivo de transfección Polyplus, Life Technologies) en una razón N/P de 6. Se diluyeron disoluciones madre de ADN y jetPEI® en NaCl 1 M y NaCl 150 mM estériles, respectivamente. El volumen final de cada disolución fue equivalente al 50% del volumen total de la mezcla. Luego se añadió la disolución de PEI al ADN diluido y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se añadieron las mezclas de ADN/PEI a las placas de 60 mm, teniendo cuidado de no alterar la película celular. Se incubaron las células durante 48 horas a (37 °C, 5 % de CO₂, 95 % de humedad relativa) antes del análisis de expresión de marcadores de suministro de ADN. Se reemplazó el medio antes de la transfección.

Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

La clasificación de células individuales o de policlones se logró mediante metodologías de clasificación de células convencionales usando un instrumento BDInflux. En resumen, se recogieron las células de ACL con Try-pLE™ Express Trypsin (ThermoFisher Scientific) y se resuspendieron en un volumen adecuado de DPBS 1X (Life Technologies) antes de la clasificación celular, en medio DMEM 1X que contenía el 20 % de HI-FBS y Anti-Anti 100X (Tecnologías de la vida). La tabla 2 resume los anticuerpos y multímeros usados en esta solicitud para FACS.

Tabla 2: Filtros BD Influx

Proteína	Fluorocromo	Filtro
Cas9/GFP	GFP	488-530/40
HLA-A, B, C	PE-Cy5	561-670/30
BFP	BFP	405-460/50
RFP	RFP	561-585/29
TCRab (R63)	APC	640-670/30
CD3 (R78)	APC-H7	640-750LP
CD3 (R71)	APC	640-760/30
DEX HLA-A*02:01-NLVP	PE	561-585/29

Tabla 1: Tabla de líneas celulares ACL, componentes y, si es aplicable, ORF integrado en el componente 1B/1B' o 2B/2B' y el componente 1D/1D' o 2D/2D'

ID	Componentes	Gen de interés (B o B')	Gen de interés (D o D')	Designación
ACL-3	Ninguno	NA	NA	-
ACL-128	Ninguno	NA	NA	-
ACL-191	1B', 1D	HLA-A*02:01		eAPC-p
ACL-209	1B', 1D	HLA-A*02:01		eAPC-p

ACL-341	1B', 1D	HLA-DRB1*01:01		eAPC-p
ACL-390	1B', 1D'	HLA-A*02:01	ORF de pp65	eAPC-pa
ACL-402	1B, 1D	RFP	BFP	eAPC
ACL-488	1B, 1D	BFP	RFP	
ACL-851	1B', 1D'	JG9-TCR-beta	JG9-TCR-alfa	eTPC-t
ACL-900	1B', 1D	HLA-A*02:01	BFP	eAPC-p
ACL-905	1B', 1D	HLA-A*02:01	BFP	eAPC-p
ACL-963	1B', 1D	HLA-A*24:02	BFP	eAPC-p
ACL-987	1B', 1D	JG9-TCR-beta	GFP	eTPC-x
ACL-988	1B', 1D'	JG9-TCR-beta	64x variantes de JG9-TCR-alfa	eTPC-t (agrupación)
ACL-1050	1B', 1D'	HLA-A*02:01	pp28, pp52, pp65	eAPC-pa (agrupación)
ACL-1043	1B', 1D'	HLA-A*02:01	ORF de pp28	eAPC-pa
ACL-1044	1B', 1D'	HLA-A*02:01	ORF de pp52	eAPC-pa
ACL-1045	1B', 1D'	HLA-B*07:02	ORF de pp52	eAPC-pa
ACL-1046	1B', 1D'	HLA-A*02:01	ORF de pp65	eAPC-pa
ACL-1048	1B', 1D'	HLA-B*07:02	ORF de pp65	eAPC-pa
ACL-1063	2B, 2D, 2F	Marcador de selección 1	Marcador de selección 2	eTPC con elemento de respuesta
ACL-1150	2B', 2D', 2F	TCR-alfa	TCR-beta	eTPC-t, con elemento de respuesta
ACL-1219	1B', 1D'	HLA-A*02:01	ORF de pp28	eAPC-pa
ACL-1227	1B', 1D'	HLA-A*02:01	ORF de pp52	eAPC-pa
ACL-1233	1B', 1D'	HLA-A*02:01	ORF de pp65	eAPC-pa
ACL-1277	2B', 2D', F	TCR-alfa	TCR-beta	eAPC-t, con elemento de respuesta

Integración mediada por Flp de secuencias HLA-A*02:01 en la línea celular de eAPC

- 5 Se sometieron a electroporación células eAPC con vectores que codifican para Flp, ADN que codifica para un marcador para seguir la pista del suministro (vector que codifica para GFP) y un vector que contiene HLA-A*02:01. La secuencia HLA-A*02:01 también codificaba para un ligador y una etiqueta 3xMyc en el extremo 3'. Las condiciones de electroporación usadas fueron 258 V, 12,5 ms, 2 pulsos, 1 intervalo de pulso. La razón entre cada vector de integración y el vector Flp fue de 1:3. Se usaron células sometidas a electroporación sólo con vector de GFP y sin células sometidas a electroporación como controles, respectivamente, para establecer las ventanas para la clasificación de GFP después de dos días. Al día siguiente (2 días después de la electroporación), se analizaron las células y clasificaron según la expresión de GFP. Se clasificaron las células usando el clasificador de células BD Influx.
- 10
- 15 A los 3 días después de la electroporación, se realizó una clasificación basada en la expresión de GFP para enriquecer las células sometidas a electroporación. A los 7-8 días después de la electroporación, se recogieron las células y se tiñeron en superficie para determinar la expresión de HLA-ABC. Las células positivas para BFP, negativas para y positivas para HLA se clasificaron como células individuales para monoclonales.
- 20 Para genotipar las células, se usaron 100 ng de ADN como molde para ejecutar una reacción de PCR para verificar si se habían producido integraciones en el sitio de integración esperado. Se utilizó un cebador directo dirigido a los casetes de integración (Pan_HLA_GT_F1) y un cebador inverso (SV40pA_GT_R1) dirigido justo fuera del sitio de integración y se hizo correr el producto de PCR en un gel de agarosa al 1 %.

Integración mediada por Flp de secuencias de ORF de CMVH en la línea celular de eAPC-p

- 5 Se sometieron células de eAPC-p a electroporación con vectores que codifican para Flp, ADN que codifica para un marcador para seguir la pista del suministro (vector que codifica para GFP) y vectores que contienen ORF de pp28, pp52 o pp65 aAM de CMVH. Las secuencias de ORF de CMVH también codificaban para un ligador y una etiqueta 3xMyc en el extremo 3'. Las condiciones de electroporación usadas fueron 258 V, 12,5 ms, 2 pulsos, 1 intervalo de pulso. La razón entre cada vector de integración y el vector Flp fue de 1:3. Las células sometidas a electroporación sólo con vector de GFP y sin células sometidas a electroporación se usaron como controles, respectivamente, para
- 10 establecer las ventanas para la clasificación de GFP después de dos días. Al día siguiente (2 días después de la electroporación), se analizaron las células y se clasificaron según la expresión de GFP. Se clasificaron las células usando el clasificador de células BD Influx.

Integración al azar mediada por Flp de 3 secuencias de ORF de CMVH en la línea celular de eAPC-p.

- 15 Se sometieron a electroporación células eAPC-p con vectores que codifican para Flp, ADN que codifica para un marcador para seguir la pista del suministro (vector que codifica para GFP) y vectores que contienen ORF de pp28, pp52 o pp65 aAM de CMVH. Las secuencias de ORF de CMVH también codificaban para un ligador y una etiqueta 3xMyc en el extremo 3'. Las condiciones de electroporación usadas fueron 258 V, 12,5 ms, 2 pulsos, 1 intervalo de pulso. Para la integración al azar, se agruparon los vectores que contenían ORF de CMVH en una razón de 1:1:1 y se sometió la mezcla a electroporación en la célula eAPC-p. Las células eAPC-pa resultantes eran policlonales. Se clasificaron y caracterizaron genéticamente células monoclonales individuales para demostrar que el policlón se componía de células que contenían los tres ORF de CMVH.
- 20
- 25 Caracterización genética de los monoclonos.

Reacciones de PCR para evaluar la integración por RMCE de los ORF del CMVH en el componente D

- 30 Se usaron cebadores para evaluar la integración del ORF del CMVH hibridado con el ligador (cebador directo 10.D.1) y el promotor EF1alfa (cebador inverso 15.H.4). El tamaño esperado era de 0,8 kb para pp28, 1,5 kb para pp52 y 1,9 kb para pp65. Se procesaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1 % en tampón 1XTAE, usando PowerPac Basic (Bio-Rad), se tiñeron con una dilución 10.000 de Sybersafe y se analizaron con Fusion SL (Vilber Lourmat).

Tabla 3: Reactivos de PCR para evaluar la integración del ORF de aAM	
Componente de reacción	Volumen por reacción
Tampón 5xPhusion	4 ul
DNTP	0,2 ul
ADN polimerasa Phusion	0,15 ul
10.D.1	0,5 ul
15.H.4	0,5 ul
H2O	hasta 20 ul
ADN (100 ng)	1 ul (100 ng/ul)
DMSO 3%	0,6 ul

Tabla 4: Condiciones del ciclo de PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s
30 ciclos	98 °C	10 s
	60 °C	10 s
	72 °C	15 s
Extensión final	72 °C	10 min

RMCE entre una pareja de integración emparejada

- 5 Para la integración por RMCE, se transfectaron células con 0,6 µg de vectores de ADN que codifican para FLP (V4.I.8), 2 µg del componente C/Y, 2 µg del componente E/Z, 0,4 µg de ADN que codifica para un marcador para seguir la pista del suministro de ADN. A los 2 días después de la transfección, se clasificaron mediante FACS las células positivas para el marcador de suministro de ADN, o bien positivas para GFP o bien para RFP. A los 4-10 días después de la transfección, se clasificaron mediante FACS las células individuales que presentaban una señal de proteína fluorescente disminuida, codificada por los marcadores de selección de los componentes D y B. La excepción fue la generación de ACL-987, donde clasificaron mediante FACS las células individuales que presentaban positividad para GFP.

Expresión transitoria de pares de cadenas de TCR para caracterización de sus RSU

- 15 Para la expresión transitoria, se transfectaron células con vectores de ADN que codifican para FLP (V4.I.8), variante de JG9-TCR-alfa (VP.7751.RC1.A1 a VP.7751.RC1.H8), cadena beta de JG9-TCR WT (V3.C.5) y vehículo de vector de ADN (V1.C.2). A los 2 días después de la transfección, se tiñeron todas las células con tetrámero HLA-A*02:01-NLVP y anticuerpos anti-CD3. Se calcularon las RSU como la razón de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la señal del tetrámero HLA-A*02:01-NLVP para la población positiva para CD3 con respecto a la población negativa para CD3, y fue indicativa de la fuerza de unión de cada variante de par de cadenas de TCR.

Tinción multimérica de HLA

- 25 Se tiñeron las células con reactivo multimérico de HLA en hielo durante 10 min, luego con anticuerpos para CD3 y/o TCRab. La detección de propiedades fluorescentes celulares específicas mediante el instrumento BDInflux se define en la tabla 6.

- 30 Se clasificaron células individuales para la generación monoclonal; se depositaron las células que presentaban el fenotipo de interés en placas de 96 pocillos que contenían 200 µl de medio de crecimiento. Se clasificaron de una a dos placas por muestra. Las clasificaciones de células policlonales se dirigieron a tubos de FACS que contenían medios, usando la configuración de clasificación bidireccional en el clasificador de células Influx™ (BD Biosciences).

- 35 Se clasificaron las clases de células individuales para la caracterización molecular de su variante de JG9-TCR-alfa en placas de PCR precargadas con 5 µl de agua libre de nucleasas. Se congelaron rápidamente muestras hasta su posterior procesamiento.

Extracción de ADN genómico para caracterización genética

- 40 Se extrajo ADN de 5×10^6 células usando el minikit de ADN QIAamp (Qiagen). Se almacenó el ADN en 1xTE (Tris 10 mM, pH 8,0 y EDTA 0,1 mM).

Tabla 5: Vectores

ID	Nombre
V1.A.4	pcDNA3.1_GFP
V1.A.6	pcDNA3.1_RFP
V1.C.2	pMA-SV40pA
V3.C.5	pMA-CS-JG9-TCRbeta

V4. H9	pMA-F14-TurboGFP-F15
V7.A.3	pMA-F14-TCR-JG9D-F15
V7.A.4	pMA-FRT-TCR-JG9D-F3
V8. F. 8	F14-TCRaF15 CDR3degen.64mix
V4.I.8	CMVpro-Flp-pA de sv40-V2
VP.7751.RC 1-A1 a H8	64 vectores individuales, cada uno codifica para un miembro diferente del conjunto de 64 variantes de CDR3 de JG9-TRA
V4. H.5	pMA_F14_HLA-A*02:01-6xHis_F15
V4. H.6	pMA_F14_HLA-A*24:02-6xHis_F15
V4.H.7	pMA_F14_HLA-B*07:02-6xHis_F15
V4.H.8	pMA_F14_HLA-B*35:01-6xHis_F15
V9. E.6	FRT_HCMVpp28-3xMYC_F3
V9.E.7	FRT_HCMVpp52-3xMYC_F3
V9.E.8	FRT_HCMVpp52-3xMYC_F3
V1.A.8	SpCas9-2A-GFP
V2.A.1	HLA-A-sg-sp-opti1
V2.A.7	HLA-B-sg-sp-3
V2. B.3	HLA-C-sg-sp-4
V2.I.10	HLA-A-ex2-3_sg-sp-opti_1
V2.J.1	HLA-A-ex2-3_sg-sp-opti_2
V2.J.6	AAVSI_sg-sp-opti_3

Reacciones de PCR para evaluar la integración por RMCE del ORF de TRA y ORF de TRB en el componente 2B o 2D.

- 5 Se usaron cebadores para evaluar la integración del TCR-alfa, se hibridaron con el segmento TRAC (cebador directo 1.F.7) y el terminador pA de sv40 (cebador inverso 15.H.2) que es una parte preexistente de los sitios de receptor genómico. Tamaño esperado de 566 pb. Se usaron cebadores para evaluar la integración del TCR-beta, se hibridaron con el segmento TRBC (cebador directo 1.F.9) y el terminador pA de sv40 (cebador inverso 15.H.2) que es una parte preexistente de los sitios de receptor genómico. Tamaño esperado de 610 pb. Se hicieron correr los
- 10 productos de PCR en un gel de agarosa al 1% en tampón 1XTAE, usando PowerPac Basic (Bio-Rad), se tiñeron con una dilución 10.000 de Sybersafe y se analizaron con Fusion SL (Vilber Lourmat).

Tabla 6: Reactivos de PCR para evaluar la integración de ORF que codifica para TCR-alfa y TCR-beta

Tabla 6: Reactivos de PCR para evaluar la integración de ORF que codifica para TCR-alfa y TCR-beta	
Componente de reacción (TCR-alfa)	Volumen por reacción
Tampón 5xPhusion	4 ul
DNTP	0,2 ul
ADN polimerasa Phusion	0,15 ul
1.F.7: TRAC-GT-F1	0,5 ul
15.H.2: sv40pA-GT-R1	0,5 ul
H2O	hasta 20 ul

ADN (100 ng)	1 ul (100 ng/ul)
Componente de reacción (TCR-alfa)	Volumen por reacción
Tampón 5xPhusion	4 ul
DNTP	0,2 ul
ADN polimerasa Phusion	0,15 ul
1.F.9: TRBC2-GT-F1	0,5 ul
15.H.2: sv40pA-GT-R1	0,5 ul
H2O	hasta 20 ul
ADN (100 ng)	1 ul (100 ng/ul)

Tabla 7: condiciones del ciclo de PCR		
Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s
30 ciclos	98 °C	10 s
	60 °C	10 s
	72 °C	15 s
	72 °C	10 min

Reacciones de ddPCR para evaluar el número de copias de ORF de TRA y ORF de TRB en el genoma después del suministro de ADN

5 Se analizó el ADN de monoclonos ACL-851 seleccionados mediante el uso de cebadores específicos y se trataron con sonda dirigidos al segmento C de ORF de TCR (TRAC) de interés. Se usaron cebadores y sonda para evaluar el número de copias de ORF de TRA, se hibridaron con el segmento TRAC (cebador directo 1.F.7, cebador inverso 1.F.8 y sonda 1.G.1). Se usaron cebadores y sonda para evaluar el número de copias de ORF de TRB, se hibridaron con el segmento TRB-C (cebador directo 1.F.9, cebador inverso 1.F.10 y sonda 1.G.2)

15 En todos los casos, se cribó simultáneamente en cromosoma un gen de referencia (TRAC) para determinar el número de copias, usando los cebadores 10.A.9 y 10.A.10 junto con la sonda fluorescente 10.B.6 conjugada con HEX. El número de copias de integración consideró que las células HEK293 son triploides para el gen de referencia (TRAC). Antes de la PCR digital basada en gotas, se digirió el ADN con MfeI (NEB) para separar las integraciones en tándem. Se siguieron las condiciones de ciclado y configuración de reacción de acuerdo con el protocolo para ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad), usando el lector de gotas y el generador de gotas QX200™ y el termociclador de pocillo profundo C1000 Touch™ (Bio-Rad). Se adquirieron los datos usando el software QuantaSoft™, usando Ch1 para detectar FAM y Ch2 para HEX.

Tabla 8: condiciones de ddPCR		
Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min
40 ciclos	98 °C	30 s
	60 °C	60 s
	72 °C	10 min
Extensión final	72 °C	10 min
Enfriamiento (opcional)	8 °C	∞

Tabla 9: Cebadores y sondas de ddPCR		
ID	Nombre	Secuencia
1.F.7	TRAC-GT-F1	ATGTGCAAACGCCTTCAAC
1.F.8	TRAC-GT-R1	TTCGGAACCCAATCACTGAC
1.G.1	TRAC-probe-FAM	TTTCTCGACCAGCTTGACATCACAGG
1.F.9	TRBC2-GT-F1	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACG
1.F.10	TRBC2-GT-R1	CTTGCTGGTAAGACTCGGAG
1.G.2	TRBC2-probe-FAM	CAAACCCGTCACCCAGATCGTCA
10.A.9	TRAC-TCRA-ex1-F1	CTGATCCTCTTGTCCCACAGATA
10.A.10	TRAC-TCRA-ex1-F1	GACTTGTCACTGGATTTAGAGTCTCT
10.B.6	TRAC-probe(HEX)	ATCCAGAACCCTGACCCTGCCG
21.I.1	HCMVpp65_GT_F2	TCGACGCCCAAAAAGCAC
21.I.2	HCMVpp28_GT_F1	TGCCTCCTTGCCCTTTG
21.I.3	HCMVpp52_GT_F1	CGTCCCTAACACCAAGAAG
20.h.10	Etiqueta Myc_GT_R1	AAGGTCCTCCTCAGAGATG
20.h.9	Ligador-Myc_probe_Fam	CTTTTGTCTCCAGATCCAGATCCACC

Secuenciación de cadenas alfa y beta de TCR a partir de linfocitos T individuales

- 5 Se sometieron linfocitos T de eTPC clasificados por FACS individuales a un proceso de amplificación en dos etapas que implica una colección de cebadores específicos de la región V para cada TRA y TRB, seguido por reacciones de PCR anidadas emparejadas que crean amplicones de TRA y TRB para el análisis de secuencia. Este procedimiento se describió anteriormente (Han *et. al.* Nat Biotechnol. 2014 32(7): 684-692). En los procedimientos descritos se usaron los siguientes materiales:

10

Tabla 10: reactivos de RT-PCR de células individuales y PCR anidada

Producto	Proveedor	Número de proveedor
Mezcla de reacción 2x	Thermo Scientific	12574035
dNTP de tampón 5X Phusion HF	Thermo Scientific Fisher	F-549S
	Thermo Scientific Fisher	10297018
Agua libre de nucleasas	Qiagen	129114
ADN polimerasa Phusion Hot Start II	Thermo Scientific Fisher	F-549S
Sistema de RT-PCR SuperScript® III One-Step con ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum® Taq	Thermo Scientific	12574035

Demostración funcional del componente F

- 15 Se cultivaron células eTPC-t y eAPC de manera rutinaria en RPMI + suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (medio completo) entre $0,2 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^6$ células/ml, a 37 °C, 90 % de humedad relativa y 5% de CO₂. Se sintetizó el péptido NLVPMVATV por Genescript y se recibió liofilizado. Se suspendieron disoluciones madre primarias de péptidos en DMSO al 10% y se clasificaron a -80 °C. Se prepararon disoluciones madre de trabajo en el momento de la administración, a 50 µM en medio completo (concentrado 50x). Se usaron la siguiente eAPC-p

presenta HLA-A*02:01 (ACL-900) o HLA-B*07:02 (ACL-906) o eAPC-pa con aAPX y aAM exógena, HLA-A*02:01+HCMVpp52 (ACL-1044) o HLA-A*02:01+HCMVpp65 (ACL-1046) o HLA-B*07:02+HCMVpp52 (ACL-1045) o HLA-B*07:02+HCMVpp65 (ACL-1048), o eAPC parental (ACL-128). Se usaron dos líneas celulares de eTPC-t diferentes; la primera eTPC-t, ACL-1277, (el componente A) se modificó por ingeniería con dos sitios de receptor genómico únicos, utilizando la expresión de CD3 nativa y que albergaba un elemento de respuesta sintético genómico de dos componentes (el componente F, indicador RFP) (véase el ejemplo 14). La segunda eTPC-t, ACL-1150, (el componente A) se modificó por ingeniería con dos sitios de receptor genómico únicos, usando la expresión de CD3 nativa y que albergaba un elemento de respuesta sintético genómico de un componente (el componente F, indicador RFP) (véase el ejemplo 15). Se cargaron ambas eTPC-t con el ORF de cadena de TCR en los componentes 2B' y 2E' que codifican para un par de TCR que es específico para el complejo de HLA-péptido (HLA), HLA-A*02:01-NLVPMAVTV.

Procedimiento de pulsación de antígeno

Se suspendieron cultivos en crecimiento activo de células eAPC ($0,4-1,0 \times 10^6$ células/ml), se tomaron muestras y se contaron para determinar la concentración celular. Posteriormente, se recogieron 1 millón de células, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Gibco) seguido por suspensión en medio completo con $1 \mu\text{M}$ de péptido o sin péptido a una concentración celular de entre 1 y 2×10^6 células/ml. Se incubaron las células durante 2 h en condiciones de cultivo convencionales, en una placa de cultivo de 24 pocillos. Después de 2 h, se recogieron las células, se sedimentaron mediante centrifugación (400 rcf , 3 min), seguido por 3 lavados de 10 ml con DPBS. Posteriormente, se suspendieron las células a $0,2 \times 10^6$ células/ml en medio completo.

Recogida de eTPC-t

Se suspendieron cultivos en crecimiento activo de células eTPC-t ($0,4-1,0 \times 10^6$ células/ml), se tomaron muestras y se contaron para determinar la concentración celular. Se recogieron las células, se lavaron una vez con DPBS y luego se suspendieron a una concentración de $0,4 \times 10^6$ (para ensayos endógenos) o $0,6 \times 10^6$ células/ml (o ensayos exógenos) en medio completo.

Puesta en contacto de eTPC-t y eAPC en un sistema eTPC:eAPC con moléculas antigénicas exógenas

A cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se le añadieron $50 \mu\text{l}$ de medio completo, $50 \mu\text{l}$ de eAPC, seguido por $50 \mu\text{l}$ de eTPC-t. Esto equivalía a aproximadamente 10.000 eAPC y 30.000 eTPC-t para una razón de 1:3, a una concentración celular total de aproximadamente $0,27 \times 10^6$ células/ml. Luego se incubó la mezcla celular durante aproximadamente 24 horas en condiciones de cultivo convencionales.

Puesta en contacto de eTPC-t y eAPC en un sistema eTPC:eAPC con moléculas antigénicas endógenas

A cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se le añadieron $50 \mu\text{l}$ de medio completo, $50 \mu\text{l}$ de eAPC, seguido por $50 \mu\text{l}$ de eTPC-t. Esto equivalía a aproximadamente 10.000 eAPC y 20.000 eTPC-t para una razón de 1:2, a una concentración celular total de aproximadamente $0,2 \times 10^6$ células/ml. Luego se incubó la mezcla celular durante aproximadamente 48 horas en condiciones de cultivo convencionales.

Tinción y análisis

Después de 24 ó 48 horas de incubación, se recogieron las células y se trasplantaron a tubos Micronic con fondo en V de $0,75 \text{ ml}$, se lavaron una vez con $500 \mu\text{l}$ de DPBS y posteriormente se tiñeron con marcador de células muertas (DCM-APC-H7) de la siguiente manera; a cada pocillo se le añadieron $25 \mu\text{l}$ de disolución de tinción, se suspendieron las células mediante mezclado y luego se incubaron durante 15-20 min. La disolución de tinción se componía de $0,5 \mu\text{l}$ de DCM-APC-H7 por $100 \mu\text{l}$ de disolución de tinción. Después de la incubación, se lavaron las células dos veces con $500 \mu\text{l}$ de DPBS + FCS al 2 % (tampón de lavado). Luego, se tiñeron las células para detectar marcadores de superficie únicos para la eTPC-t; A cada pocillo se le añadieron $30 \mu\text{l}$ de disolución de tinción, se suspendieron las células mediante mezclado y luego se incubaron durante 30-45 min. La disolución de tinción se componía de $2,5 \mu\text{l}$ de anticuerpo anti-myc-AF647 por $100 \mu\text{l}$ de disolución de tinción (clon 9E10, Santa Cruz Biotech). Después de la incubación, se lavaron las células dos veces con $500 \mu\text{l}$ de tampón de lavado, se suspendieron en $200 \mu\text{l}$ de tampón de lavado y luego se analizaron mediante FACS en un equipo LSRFor-tessa (BD Biosciences).

Ejemplos

Ejemplo 1: Deleción de una familia de genes de APX mediante mutagénesis dirigida

En este documento se describe cómo se logró la mutagénesis dirigida de una familia de genes que codifican para complejo presentador de antígeno (APX) para producir el primer rasgo de una célula presentadora de antígeno

modificada por ingeniería (eAPC). Dicho rasgo es la falta de expresión en superficie de al menos un miembro de la familia de APX.

En este ejemplo, el APX seleccionado como diana comprendía los tres miembros de la familia de HLA de clase I principal, HLA-A, HLA-B y HLA-C en la línea celular HEK293. Las células HEK293 se derivaron de células de riñón embrionario humano que mostraron expresión endógena en superficie de HLA-ABC. El análisis citogenético demostró que la línea celular tiene un cariotipo casi triploide, por lo que las células HEK293 codificaban para tres alelos de cada gen de HLA-A, HLA-B y HLA-C.

Se realizó mutagénesis dirigida de los genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C usando un sistema CRISPR/Cas9 modificado por ingeniería, en el que se dirigió la actividad de la nucleasa Cas9 a los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C mediante ARN guía (ARNg) sintéticos. Se diseñaron de 4 a 5 ARNg únicos para seleccionar como diana secuencias de nucleótidos conservadas para cada locus del gen de HLA y los sitios seleccionados como diana estaban sesgados hacia el inicio de la secuencia codificante del gen, ya que era más probable que generara un alelo nulo. Se determinó la eficiencia de los ARNg para inducir una mutación en sus loci seleccionados como diana y se seleccionaron los ARNg más eficientes para generar la línea celular HEK293 nula para HLA-A, HLA-B y HLA-C (HLA-ABC^{nulo}).

Se transfectaron el plásmido que codificaba para los ARNg óptimos que seleccionaban como diana los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C, junto con un plásmido que codificaba para Cas9-P2A-GFP, en células HEK293 tal como se describe en los métodos. Se clasificaron por FAC las células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después de la transfección (figura 38a). Se expandieron adicionalmente las células clasificadas según GFP durante más de 5 días para dar tiempo suficiente para que produjesen eventos de edición de genes y, en el caso de una mutación perjudicial, para que se perdiera la expresión de la proteína HLA endógena residual. Después de este periodo de crecimiento, se tiñeron las células con un anticuerpo pan-HLA-ABC, dando como resultado la identificación de células con HLA-ABC expresado reducido en su superficie (figura 38b). La ausencia de tinción con anticuerpos pan-HLA-ABC implicó que cada alelo de HLA-A, HLA-B y HLA-C estaba mutado. Se clasificaron y expandieron células individuales negativas para HLA-ABC para representar una colección de monoclonos.

Se confirmaron los monoclonos HLA-ABC^{nulo} por la falta de expresión en superficie de HLA-ABC. Se demostró que un subconjunto de monoclonos carecía de expresión en superficie de HLA-ABC, de los cuales se representan tres monoclonos de ejemplo, ACL-414, ACL-415 y ACL-416 en la figura 39. Se realizó una caracterización genética adicional de los monoclonos que carecían de expresión en superficie de HLA-ABC determinando que las líneas celulares tenían una mutación genética subyacente en todos los alelos de los genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C (figura 40). Se realizó caracterización genética mediante PCR con cebadores que abarcaban los sitios diana genómicos del ARNg, para la detección de cambios en el tamaño de los amplicones y/o se usaron como molde para la secuenciación. La figura 40 muestra una selección de monoclonos HLA-ABC^{nulo} que contenían delección genética en los alelos de los genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C detectados mediante un amplicón de PCR más corto en comparación con el tamaño de amplicón de la línea celular fundadora (por ejemplo, ACL-414).

En conclusión, se demostró que las líneas celulares HEK293 modificadas genéticamente, incluyendo ACL-414, ACL-415 y ACL-416, carecían de expresión en superficie de HLA-ABC y, por tanto, tenían el primer rasgo de una célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería (eAPC).

Ejemplo 2: Generación de una eAPC que contiene el componente 1B

Se describe en el presente documento cómo se integró el componente 1B de manera estable en la línea monoclonal HLA-ABC^{nulo} ACL-414 para producir el segundo rasgo de una eAPC. Dicho segundo rasgo contenía al menos un sitio de receptor genómico para la integración de al menos un ORF, en el que el sitio de receptor genómico era un constructo sintético diseñado para el intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE).

En este ejemplo, el sitio de integración genómica, el componente 1B, se componía de elementos genéticos seleccionados. Dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3, que flanqueaban un ORF que codificaba para el marcador de selección, la proteína fluorescente azul (BFP). El extremo 5' codificado del sitio FRT era un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F3 era un terminador de señal de poliadenilación de SV40. El beneficio de colocar los elementos reguladores en cis no codificantes en el exterior de los sitios de recombinasa heteroespecíficos fue que no se requieren en el vector donante genético apareado, el componente 1C. Por tanto, después del suministro celular del vector donante genético, no se observaría expresión transitoria del ORF codificado. Esto hizo que la selección de RMCE con éxito fuera más fiable ya que la expresión celular del ORF a partir del vector donante genético probablemente sólo se produciría después de la integración correcta en el componente 1B, ya que ahora contenía los elementos reguladores en cis apropiados (véase el ejemplo 6).

Para fomentar la integración genómica estable del componente 1B en el locus seguro genómico, AAVS1, se construyó un plásmido, en el que; los elementos de ADN del componente 1B estaban flanqueados por brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1. Cada brazo se componía de >500 pb de secuencia homóloga al locus

genómico AAVS1.

Se logró la integración estable del componente 1B mediante el proceso de recombinación dirigida por homología (HDR) en el locus seguro genómico, AAVS1. Se transfectó la línea celular ACL-414 con un plásmido que codificaba para los ARNg óptimos que seleccionaban como diana el locus AAVS1, un plásmido que codificaba para Cas9-P2A-GFP y el plásmido que codificaba para los elementos genéticos del componente 1B flanqueados por los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1. Se clasificaron por FAC las células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después de la transfección (figura 41a). Se expandieron adicionalmente las células clasificadas según GFP durante más de 7 días, lo que dejó tiempo suficiente para que se produjera HDR y perdiera la expresión transitoria del marcador de selección, BFP. Después de este periodo de crecimiento, se analizaron las células en una máquina FACS y se clasificaron y expandieron las células positivas para BFP individuales para representar una colección de monoclonos (figura 41c).

Se seleccionaron líneas monoclonales individuales como eAPC basándose en su expresión mantenida de BFP y para una integración individual del componente 1B en la ubicación genómica de AAVS1 deseada. Las líneas celulares ACL-469 y ACL-470 representaron monoclonos con expresión mantenida de BFP (figuras 42a y b). Se realizó caracterización genética con ADN extraído de los monoclonos ACL-469 y ACL-470 y se demostró que sus genomas integraban el componente 1B, y que el componente 1B se ha integrado en el sitio de AAVS1 (figura 43). Se determinó la confirmación de la integración genómica mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado que utilizó cebadores específicos para el componente 1B (figura 43a). Se determinó la confirmación de que el componente 1B se integró en el sitio de AAVS1 mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado que utilizó cebadores diseñados contra la secuencia genómica de AAVS1 distal a la región codificada por los brazos homólogos y un cebador que es único para el terminador pA de SV40 codificado por el componente 1B (figura 43b). Se determinó el número de copias del componente 1B mediante PCR digital basada en gotas, en el que se midió el número de moléculas de ADN del componente 1B y del gen de referencia y se calculó la razón (tabla 1). Los monoclonos ACL-469 y ACL-470 contenían una razón de 1 molécula del componente 1B por 3 moléculas del gen de referencia. Cuando se tiene en cuenta que la línea celular HEK293 fundadora tiene un cariotipo casi triploide, esto demostró una integración individual del componente 1B en las líneas celulares ACL-469 y ACL-470.

En conclusión, las líneas celulares ACL-469 y ACL-470 modificadas genéticamente eran HLA-ABC^{nulo} y contenían una única copia de un sitio de receptor genómico sintético diseñado para RMCE y, por tanto, se demostró la creación de una eAPC con un único sitio de receptor de integración sintético.

Ejemplo 3: Generación de una eAPC que contiene el componente 1B y el componente 1D

Se describe en el presente documento cómo se integraron el componente 1B y el componente 1D de manera estable en la línea monoclonal HLA-ABC^{nulo} ACL-414 para producir el segundo rasgo de una eAPC. Dicho segundo rasgo contiene dos sitios de receptor genómico para la integración de al menos un ORF, en el que el sitio de receptor genómico era un constructo sintético diseñado para el intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE).

Este ejemplo usa los mismos métodos y componentes que se describen en el ejemplo 2 pero con la adición de un segundo sitio de receptor genómico, el componente 1D. Los elementos genéticos del componente 1D se componían de dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, F14 y F15, que eran diferentes al componente 1B. Estos sitios flanqueaban el ORF que codificaba para el marcador de selección, la proteína fluorescente roja (RFP). El extremo 5' codificado del sitio F14 era un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F15 era un terminador de señal de poliadenilación de SV40. Como en el ejemplo 2, los elementos genéticos del componente 1D estaban flanqueados por brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1, que se componía cada uno de >500 pb de secuencia homóloga al locus genómico AAVS1.

El componente 1B y el componente 1D se integraron en el AAVS1 tal como se describe en el ejemplo 2 pero con la adición del plásmido que codificaba para los elementos del componente 1D, a la mezcla de transfección. Se clasificaron por FAC las células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después de la transfección (figura 41b). Se expandieron adicionalmente las células clasificadas según GFP durante más de 7 días, después de lo cual, se analizaron las células en una máquina FACS y se clasificaron y expandieron las células individuales positivas para BFP y RFP para representar una colección de monoclonos (figura 41d).

Se seleccionaron líneas monoclonales individuales como eAPC basándose en su expresión mantenida de BFP y RFP y para una integración individual del componente 1B y una integración individual del componente 1D en diferentes alelos de AAVS1. La línea celular ACL-472 era un monoclon representativo con expresión mantenida de BFP y RFP (figura 42c). Tal como se describe en el ejemplo 2, se realizó caracterización genética con ADN extraído del monoclon ACL-472 y se demostró que sus genomas integraban el componente 1B y el componente 1D, y que ambos componentes se integraron en el sitio de AAVS1 (figura 43). Se determinó el número de copias de los componentes 1B y D mediante PCR digital basada en gotas, en la que se midió el número de moléculas de ADN de los componentes 1B, D y del gen de referencia y se calculó la razón. El monoclon ACL-472 contenía una razón de 2

moléculas de los componentes 1B y D por 3 moléculas del gen de referencia (tabla 2). Cuando se tiene en cuenta que la línea celular HEK293 fundadora tiene un cariotipo casi triploide, esto demostró una integración individual del componente 1B y una integración individual del componente 1D en la línea celular ACL-472.

- 5 En conclusión, la línea celular ACL-472 modificada genéticamente era HLA-ABC^{nulo} y contenía una única copia del componente 1B y del componente 1D del sitio de receptor genómico sintético, diseñada para RMCE y, por tanto, demostró la creación de una eAPC con dos sitios de receptor de integración sintéticos únicos.

10 Ejemplo 4: Una eAPC-p construida en una etapa con una pareja de integración en la que el componente 1C' codificaba para un único ORF de HLA

15 Se describe en el presente documento cómo se construyó una eAPC-p en una etapa con una pareja de integración, en la que el sitio de receptor genómico, el componente 1B, es un sitio genómico nativo y el vector donante genético, el componente 1C', comprendía un único ORF que codificaba para un complejo presentador de antígeno analito (aAPX).

20 En este ejemplo, la eAPC era una línea celular ARH-77 modificada genéticamente, designada como ACL-128, en la que se mutaron dos familias de APX, la familia de HLA de clase I y HLA de clase II principal. La línea celular fundadora, ARH-77, es un linfoblasto B derivado de una leucemia de células plasmáticas que mostró una intensa expresión en la superficie celular de HLA-A,B,C y HLA-DR,DP,DQ. El análisis citogenético demostró que la línea celular fundadora ARH-77 tiene un cariotipo casi diploide, pero también presenta una delección cromosómica 6p21, la región que codifica para el locus de HLA. La secuenciación de ADN del locus de ARH-77 confirmó que ARH-77 codificaba sólo para un alelo individual de las familias de genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C y HLA-DRA, HLA-DRB, HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-DPA y HLA-DPB.

25 Se generó la línea celular HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} ACL-128 mediante mutagénesis dirigida a CRISPR/cas9 con ARNg que selecciona como diana las familias de genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C y HLA-DRA, HLA-DRB, HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-DPA y HLA-DPB usando el método descrito en el ejemplo 1. El marcaje en superficie con anticuerpo pan-anti-HLA-ABC o pan-anti-HLA-DR,DP,DQ confirmó que ACL-128 carecía de expresión en superficie de ambas familias de APX, figuras 44b y 45 y figura 47b, respectivamente.

30 En este ejemplo, el sitio de receptor genómico, el componente 1B, era el sitio genómico nativo de AAVS1 y se logró la integración seleccionada como diana a través de HDR. Se apareó el vector donante genético, el componente 1C', con el componente 1B, mediante el componente 1C' que codifica para los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1, que se componía cada uno de >500 pb de secuencia homóloga al locus genómico AAVS1. Entre los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1, el plásmido codificaba para un promotor de CMV y un terminador de SV40. Se clonó el aAPX de interés entre el promotor y el terminador, generando el componente 1C'. En este ejemplo, el componente 1C' comprendía un único ORF que codificaba para un aAPX, el HLA-A*24:02 o HLA-B*07:02, designado como el componente 1C'^{HLA-A*24:02} y el componente 1C'^{HLA-B*07:02}, respectivamente.

40 Se realizó el proceso para construir una eAPC-p mediante integración inducida por HDR del componente 1C' en el componente 1B para producir el componente 1B'. Se sometió a electroporación la línea celular ACL-128 con plásmidos que codificaban para los ARNg óptimos que seleccionaban como diana los loci AAVS1, Cas9-P2A-GFP y el componente 1C'. Se clasificaron por FAC las células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después de la electroporación (figura 44a). Se expandieron adicionalmente las células clasificadas según GFP durante más de 7 días, lo que dejó tiempo suficiente para que se produjera HDR y se perdiera la expresión transitoria de aAPX. Después de este periodo de crecimiento, se teñieron las células con un anticuerpo pan-HLA-ABC, lo que dio como resultado la identificación de células que ganaron la expresión de un HLA analito en su superficie (figura 44b). La presencia de tinción con anticuerpo para pan-HLA-ABC implicaba que el ORF de HLA analito codificado en el componente 1C' se había integrado en el genoma. Se clasificaron y expandieron las células teñidas positivas para HLA-ABC individuales para representar una colección de monoclonos de eAPC-p.

55 Se seleccionaron líneas monoclonales individuales como eAPC-p basándose en su expresión en superficie mantenida de HLA analito y la integración del ORF analito en el sitio de receptor genómico, creando el componente 1B'. Las líneas celulares ACL-321 y ACL-331 eran monoclonos representativos con expresión en superficie mantenida de HLA analito de HLA-A*24:02 o HLA-B*07:02 respectivamente (figura 45). Se realizó caracterización genética con ADN extraído de monoclonos seleccionados ACL-321, ACL-327, ACL-331 y ACL-332 y se demostró que sus genomas integraban el componente 1C', y que la integración se producía en el sitio de receptor genómico de AAVS1, generando el componente 1B' (figura 46). Se determinó la confirmación de la integración genómica mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado usando cebadores específicos para el componente 1C' (figura 46a). Se confirmó la presencia del componente 1B' mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado usando cebadores diseñados contra la secuencia genómica de AAVS1 distal a la región codificada por los brazos homólogos y un cebador único para el terminador pA de SV40 ligado al ORF de HLA analito (figura 46b).

En conclusión, la generación de las líneas celulares ACL-321 y ACL-331 modificadas genéticamente, que contenían una copia del ORF de aAPX HLA-A*24:02 o HLA-B*07:02, respectivamente, dentro del sitio de receptor genómico, el componente 1B', dio como resultado que dicho aAPX analito fuera el único miembro de HLA de clase I principal expresado en la superficie celular. Por tanto, esto demostró la creación de dos líneas celulares de eAPC-p definidas usando el sistema multicomponente.

Ejemplo 5: Una eAPC-p construida en una etapa con una pareja de integración, en la que el componente 1C' codificaba para un ORF de HLAI emperejado

Se describe en el presente documento cómo se construyó una eAPC-p en una etapa con una pareja de integración, en la que el sitio de receptor genómico, el componente 1B, era un sitio genómico nativo y el vector donante genético, el componente 1C', comprendía un único ORF que codificaba para dos cadenas de aAPX.

Este ejemplo usó eAPC, ACL-128 y el componente 1B, que se definen ambos en el ejemplo 4. Sin embargo, el componente 1C' comprendía un único ORF que codificaba para un alelo de HLA-DRA*01:01 ligado a un alelo de HLA-DRB1*01:01 mediante un elemento peptídico de autoescisión viral, o un alelo de HLA-DPA1*01:03 ligado a un alelo de HLA-DPB1*04:01 por un elemento peptídico de autoescisión viral, designado como el componente 1C'^{HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*01:01} y el componente 1C'^{HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01}, respectivamente. El elemento peptídico de autoescisión viral codificaba para una secuencia peptídica que, cuando se transcribía, daba como resultado la autoescisión del péptido sintetizado y producía dos polipéptidos que definían cada cadena de HLA.

En el ejemplo 4, se describió el proceso para construir una eAPC-p con la excepción de que se evaluó la identificación de las células que ganaron la expresión de un HLA analito en su superficie, mediante marcaje en la superficie celular con un anticuerpo pan-anti-HLA-DR,DP,DQ. (figura 47). La presencia de tinción con anticuerpos pan-anti-HLA-DR,DP,DQ implicaba que el ORF de HLA analito codificado en el componente 1C' se había integrado en el genoma. se clasificaron y expandieron las células teñidas positivas para HLA-DR,DP,DQ para representar una colección de monoclonos de eAPC-p.

Se seleccionaron líneas monoclonales individuales como eAPC-p basándose en su expresión en superficie mantenida de HLA analito y la integración del ORF analito en el sitio de receptor genómico, creando el componente 1B' tal como se describe en el ejemplo 4. Las líneas celulares ACL-341 y ACL-350 fueron los monoclonos representativos con expresión en superficie mantenida de HLA analito de HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*01:01 o HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01 (figura 48).

En conclusión, la generación de las líneas celulares ACL-341 y ACL-350 modificadas genéticamente, que contenían una copia del ORF de aAPX HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*01:01 o HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01, respectivamente, dentro del sitio de receptor genómico, el componente 1B', dio como resultado que dicho aAPX analito fuera el único miembro de HLA de clase II principal expresado en la superficie celular. Por tanto, esto demostró la creación de dos líneas celulares de eAPC-p definidas usando el sistema multicomponente.

Ejemplo 6: Una eAPC-p construida en una etapa con una pareja de integración en la que el componente 1B era un constructo sintético

Se describe en el presente documento cómo se construyó una eAPC-p en una etapa con una pareja de integración, en la que el sitio de receptor genómico, el componente 1B, era un constructo sintético diseñado para el sitio genómico de RMCE y el vector donante genético, el componente 1C', comprendía un único ORF que codificaba para un aAPX.

En este ejemplo, el sitio de integración genómica, el componente 1B, se componía de elementos genéticos seleccionados. Dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3, que flanqueaban el ORF que codificaba para el marcador de selección, la proteína fluorescente azul (BFP). El extremo 5' codificado del sitio FRT era un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F3 era un terminador de señal de poliadenilación de SV40. Los elementos genéticos del componente 1B se integraron en la línea celular ACL-128 mediante electroporación con los mismos plásmidos que se describen en el ejemplo 2. Se seleccionaron líneas monoclonales individuales basándose en su expresión mantenida de BFP y se caracterizaron genéticamente para contener una integración individual del componente 1B en la ubicación genómica de AAVS1 deseada tal como se describe en el ejemplo 2 (figura 49a). La línea celular de eAPC resultante, ACL-385, era HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} y contenía una única copia de un sitio de receptor genómico sintético, el componente 1B, diseñado para RMCE.

Se apareó el donante genético, el componente 1C, con el componente 1B, ya que el componente 1C codificaba para los mismos sitios de recombinasa heteroespecíficos, FRT y F3. Se clonó el ORF de aAPX de interés, que codificaba además para una secuencia de Kozak justo antes del codón de iniciación, entre los dos sitios de recombinasa heteroespecíficos y se generó el componente 1C'. En este ejemplo, el componente 1C' comprendía un único ORF que codificaba para un aAPX, el HLA-A*02:01, designado como el componente 1C'^{FRT:HLA-A*02:01:F3}.

Se creó una eAPC-p a través de RMCE mediante electroporación de la línea celular ACL-385 con un plásmido que

codificaba para la Tyr-recombinasa, Flp, junto con el componente 1C'^{FRT:HLA-A*02:01:F3}. A los 4-10 días después de la electroporación, se clasificaron las células individuales positivas para la expresión en superficie de HLA-I y negativas/reducidas para el marcador de proteína fluorescente, BFP, codificado por el marcador de selección del componente 1B. Se seleccionaron líneas monoclonales individuales sobrecrecidas basándose en su expresión mantenida del alelo de HLA-I y la pérdida de fluorescencia de BFP, lo que indicó que se produjo el RMCE esperado. Para identificar dichos monoclonos, se realizaron pruebas tanto fenotípicas como genéticas. En primer lugar, se cribaron todas las líneas celulares monoclonales para determinar la expresión de HLA-ABC en la superficie celular y la falta de fluorescencia de BFP (figura 49). Se extrajo ADN genómico de tales líneas celulares, por ejemplo ACL-421 y ACL-422, y se confirmó la integración del componente 1C' en el componente 1B que generó el componente 1B' mediante la detección de un producto de PCR específico para el componente 1B' (figura 50).

En conclusión, la generación de las líneas celulares ACL-421 y ACL-422 modificadas genéticamente, que contenían una copia del ORF de aAPX HLA-A*02:01, respectivamente, dentro del sitio de receptor genómico sintético, el componente 1B', dio como resultado que dicho aAPX analito es el único miembro de HLA de clase I principal expresado en la superficie celular. Por tanto, esto demostró la creación de dos líneas celulares de eAPC-p definidas usando el sistema multicomponente.

Ejemplo 7: Una eAPC-pa construida en dos etapas con dos parejas de integración

Se describe en el presente documento cómo se construyó una eAPC-pa en dos etapas. Etapa 1, en la que el sitio de receptor genómico, el componente 1B, era el sitio genómico nativo y el vector donante genético, el componente 1C', comprendía un único ORF que codificaba para un aAPX. Etapa 2, el sitio de receptor genómico, el componente 1D, era un segundo sitio genómico nativo y el vector donante genético, el componente 1E', comprendía un único ORF que codificaba para una molécula antigénica analito (aAM).

En este ejemplo, se realizó la etapa 1, en la que la eAPC era ACL-128, el sitio de receptor genómico, el componente 1B, era el sitio genómico del alelo de HLA-A mutado, designado como HLA-A^{nulo}, y se logró la integración dirigida a través de HDR. Se apareó el vector donante genético, el componente 1C, con el componente 1B, mediante el componente 1C que codificaba para los brazos de homología izquierdo y derecho de HLA-A^{nulo}, que se componía cada uno de >500 pb de secuencia homóloga al locus genómico de HLA-A^{nulo}. Entre los brazos de homología izquierdo y derecho de HLA-A^{nulo}, el plásmido codificaba para un promotor de CMV y un terminador de SV40. Se clonó el aAPX de interés entre el promotor y el terminador, generando el componente 1C'. En este ejemplo, el componente 1C' comprendía un único ORF que codificaba para un aAPX, el HLA-A*02:01 o HLA-B*35:01, designado como el componente 1C'^{HLA-A*02:01}, el componente 1C'^{HLA-B*35:01}, respectivamente.

La integración del componente 1C' en el componente 1B y la selección de líneas celulares de eAPC-p monoclonales fue tal como se describe en el ejemplo 4, con la excepción de que se usó un ARNg que selecciona como diana el locus genómico HLA-A^{nulo} para fomentar la integración de HDR del componente 1C' en componente 1B. Los monoclonos de eAPC-p ACL-191 y ACL-286 expresaron HLA-A*02:01 o HLA-B*35:01 en la superficie celular, respectivamente (figura 51a).

En este ejemplo, se realizó la etapa 2, en la que el sitio de receptor genómico, el componente 1D, era el sitio genómico de AAVS1 nativo y se logró la integración dirigida a través de HDR. Se apareó el vector donante genético, el componente 1E, con el componente 1D, mediante el componente 1E que codificaba para los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1, que se componía cada uno de >500 pb de secuencia homóloga al locus genómico AAVS1. Entre los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1, el plásmido codificaba para un promotor de CMV y un terminador de SV40. Se clonó la aAM de interés entre el promotor y el terminador, generando el componente 1E'. En este ejemplo, el componente 1E' comprendía un único ORF que codificaba para el marcador de selección, GFP, ligado al ORF de aAM, que codificaba para hCMV-pp65, designado como el componente 1E'^{GFP-2A:pp65}. El elemento peptídico de autoescisión viral codificaba para una secuencia peptídica que, cuando se transcribía, daba como resultado la autoescisión del péptido sintetizado y producía dos polipéptidos, GFP y la proteína intracelular hCMV-pp65.

La integración del componente 1E' en el componente 1D fue tal como se describe en el ejemplo 4. Se seleccionaron líneas monoclonales individuales, ACL-391 y ACL-395, como eAPC-pa basándose en su expresión mantenida de marcador de selección GFP (figura 51b).

En conclusión, las líneas celulares ACL-391 y ACL-395 modificadas genéticamente, que contenían una copia del ORF de aAPX HLA-A*02:01 o HLA-B*35:01, respectivamente, dentro del sitio de receptor genómico, se generaron el componente 1B', y ORF de aAM pp65 dentro del componente 1D' del sitio de receptor genómico. Estas modificaciones genéticas dieron como resultado que dicho aAPX fuera el único miembro de HLA de clase I principal expresado en la superficie celular de una célula que también expresaba dicha aAM. Por tanto, esto demostró la creación de dos líneas celulares de eAPC-pa definidas usando el sistema multicomponente.

Ejemplo 8: Un eACP-p construida en una etapa en la que el componente 1C' codificaba para un único ORF de HLA-I.

Se describe en el presente documento la conversión de una eAPC en una eAPC-p en una etapa, a través de un único evento de pareja de integración, para integrar un único ORF de HLA-I que codifica para el complejo presentador de antígeno analito (aAPX), y en el que la eAPC contiene dos sitios de receptor genómico sintéticos, el componente 1B y el componente 1D diseñados para la integración genómica basada en RMCE. La eAPC-p creada

Este ejemplo usó la eAPC generada en el ejemplo 3 (ACL-402) que contiene los componentes 1B y 1D, en la que el componente 1B comprende dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, F14 y F15, que flanquean el ORF que codifica para el marcador de selección, la proteína fluorescente roja (RFP). El extremo 5' codificado del sitio F14 es un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F15 es un terminador de señal de poliadenilación de SV40. El componente 1D se compone de dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3, que flanquean el ORF que codifica para el marcador de selección, la proteína fluorescente azul (BFP). El extremo 5' codificado del sitio FRT es un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F15 es un terminador de señal de poliadenilación de SV40.

Este ejemplo utiliza un vector donante genético del componente 1C, que comprende sitios de recombinasa heteroespecíficos, F14 y F15 y, por tanto, se aparea con el componente 1B. Se generaron dos componentes 1C' independientes a partir del componente 1C, en los que un vector (V4.H.5) comprende una secuencia de Kozak, un codón de iniciación y un ORF de APX que codifica para HLA-A*02:01 entre los sitios F14/F15, y en los que el segundo vector (V4.H.6) comprende una secuencia de Kozak, un codón de iniciación y un ORF de APX que codifica para HLA-A*24:02 entre los sitios F14/F15.

La eAPC (ACL-402) se combinó de manera independiente con el vector que codifica para la expresión de la enzima recombinasa RMCE (Flp, V4.1.8) y cada componente 1C' de cualquiera de V4.H.5 o V4.H.6 mediante electroporación. Se cultivaron las células durante 4 a 10 días, tras lo cual se seleccionaron y clasificaron las células basándose en la pérdida del marcador de selección de integración, RFP y la ganancia de HLA-I en la superficie de la célula. Posteriormente, se caracterizaron, confirmaron y seleccionaron líneas monoclonales individuales sobrecrecidas basándose en la ganancia de expresión en superficie de HLA-I y la pérdida de fluorescencia de RFP, lo que indicó que se había producido la conversión esperada del componente 1B a 1B'. Monoclonos de eAPC-p seleccionados ACL-900 (V4.H.5, HLA-A*02:01) y ACL-963 (V4.H.6, HLA-A*24:02) son negativos para RFP en comparación con la línea celular ACL-402 parental y mantienen la expresión en superficie de HLA-I (figura 53a). Además, ambos monoclonos conservan la expresión del marcador de selección de integración BFP, lo que indica que el componente 1D permanece desacoplado y aislado de los eventos de pareja de integración del componente 1B. Para caracterizar adicionalmente los monoclonos de eAPC-p, se extrajo ADN genómico de las células y se realizó la confirmación de la pareja de integración entre el componente 1C' y el componente 1B, generando el componente 1B', mediante la detección de un producto de PCR específico para el componente 1B' (figura 53b). Los cebadores se diseñaron para seleccionar como diana una región adyacente al sitio de receptor genómico (cebador ID 8.B.3), y una región dentro del evento de pareja de integración (cebador ID 15.H.2). Sólo se produjo amplificación en casos de integración específica, mientras que no se generó ningún producto a partir del control (ACL-3) o a partir de recombinación fuera de la diana.

En resumen, este ejemplo demuestra dos ejemplos específicos de conversión de una eAPC en una eAPC-p, usando el sistema multicomponente, en los que se suministran individualmente dos aAPX diferentes (el componente 1C') y se integran en un único sitio de receptor genómico (el componente 1B) mediante el método de integración genómica por RMCE, creando posteriormente una biblioteca limitada que comprende dos eAPC-p discretas. Además, se demostró que el segundo sitio de receptor genómico (el componente 1D) estaba aislado y no se veía afectado por la pareja de integración componente 1B/componente 1C'.

Ejemplo 9: Una eAPC-pa construida a partir de eAPC-p en una etapa, en la que el componente 1D' codifica para un único ORF de molécula antigénica analito (aAM).

El presente ejemplo describe cómo se construyen múltiples eAPC-pa a partir de una eAPC-p parental (descrita en el ejemplo 8) en paralelo, en las que el sitio de receptor genómico, el componente 1D, está dirigido a la integración mediante un vector donante genético preparado, el componente 1E', que se compone de un único ORF que codifica para una aAM.

En el presente ejemplo, la línea de eAPC-p parental usada fue ACL-900, que expresa un único aAPX (HLA-A*02:01) que se integra en el componente 1B' (descrito en el ejemplo 8). El componente 1D de eAPC-p permanece abierto y se compone de dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3, que flanquean el ORF que codifica para el marcador de selección, la proteína fluorescente azul (BFP). El extremo 5' codificado del sitio FRT es un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F15 es un terminador de señal de poliadenilación de SV40. En este ejemplo se usó el vector donante genético, el componente 1E, que se compone de dos sitios de recombinasa heteroespecíficos, F14 y F15, por lo que se aparea con el componente 1D. En este ejemplo, el componente 1E se preparó adicionalmente con un ORF de aAM de interés seleccionado de HCMVpp28 (V9.E.6), HCMVpp52 (V9.E.7) o HCMVpp65 (V9.E.8), que también codifican, cada uno, para un ligador rico en glicina-serina C-terminal y una etiqueta c-myc. Además, cada componente 1E' comprende además una secuencia de Kozak y un codón de

iniciación inmediatamente en 5' del ORF de aAM. Así, se creó una pequeña biblioteca discreta del componente 1E', que se compone de tres vectores.

La eAPC-p (ACL-900) se combinó de manera independiente con un vector que codifica para la expresión de la enzima recombinasa RMCE (Flp, V4.1.8) y cada componente 1E' de cualquiera de V9.E.6, V9.E.7 o V9.E.8 mediante electroporación. Se incubaron las células durante 4 a 10 días para permitir que se produjera la pareja de integración, tras lo cual, se seleccionaron eAPC-pa individuales y se clasificaron células individuales (monoclonos) basándose en la señal disminuida del marcador de selección de integración BFP, codificado por el componente 1D (figura 54a). Posteriormente, se caracterizaron la eAPC-pa monoclonal sobrecrecida individual, ACL-1219 (pp28), ACL-1227 (pp52) y ACL-1233 (pp65), se confirmaron y seleccionaron basándose en la pérdida de expresión de BFP y la expresión en superficie mantenida de HLA-I (aAPX en el componente 1B') (figura 54b), lo que indicó que se había producido la conversión esperada del componente 1D a 1D'. Además, la expresión en superficie mantenida de aAPX indicó que el componente 1B' no se vio afectado y se aisló del evento de pareja de integración entre el componente 1D y el componente 1E'. Para caracterizar adicionalmente los monoclonos de eAPC-pa seleccionados, se extrajo ADN genómico y se realizó la confirmación de la pareja de integración entre el componente 1E' y el componente 1D, generando el componente 1D' mediante la detección de un producto de amplicón de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específico para el componente 1D' (10.D.1, 15.H.4). En la figura 54c se muestran dos monoclonos que representan cada una de los tres eAPC-pa en las que se observan productos de amplicón del tamaño esperado para el ORF de aAM pp28 (0,8 kb), pp52 (1,5 kb) y pp65 (1,9 kb), lo que confirma adicionalmente que se ha producido el evento de integración esperado.

En resumen, este ejemplo demuestra tres ejemplos específicos de conversión de una eAPC-p en una eAPC-pa, usando el sistema multicomponente, en los que se suministran individualmente tres aAM diferentes (el componente 1E') y se integran en un único sitio de receptor genómico (el componente 1D) mediante el método de integración genómica por RMCE, creando posteriormente una pequeña biblioteca de tres eAPC-pa discretas que portan tres ORF de aAM diferentes. Además, se demostró que el segundo sitio de receptor genómico cargado previamente (el componente 1B') estaba aislado y no se veía afectado por la pareja de integración componente 1D/componente 1E'.

Ejemplo 10: Integración al azar de ORF de molécula antigénica analito múltiple en eAPC-p para crear una biblioteca eAPC-pa agrupada en una única etapa

Se describe en el presente documento cómo se integraron en una única etapa una agrupación de vectores del componente 1E preparados (el componente 1E') que codifican en conjunto para múltiples ORF de aAM (HCMVpp28, HCMVpp52 y HCMVpp65) en la eAPC-p parental (descrito en el ejemplo 8) para crear una biblioteca de eAPC-pa agrupada, en la que cada célula individual integra un único ORF de antígeno analito aleatorio derivado de la agrupación original de vectores, en el componente 1D', de tal manera que cada eAPC-pa expresa una única aAM aleatoria, pero en conjunto la biblioteca agrupada de eAPC-pa representa la totalidad de ORF de aAM codificado en la biblioteca agrupada original de vectores. Este método de crear una agrupación de eAPC-pa, cada una de las cuales expresa un único ORF aleatorio a partir de una agrupación de vectores, se denomina integración al azar.

En este ejemplo, la línea de eAPC-p parental usada fue ACL-905 que expresa un aAPX (HLA-A*02:01) en la superficie celular (la construcción de la línea celular se describe en el ejemplo 8), el componente 1D y el componente 1E' fueron tal como se describe en el ejemplo 9. En este ejemplo, se mezclaron los vectores individuales del componente 1E' del ejemplo 9, V9.E.6, V9.E.7 y V9.E.8, que comprenden ORF de aAM que codifican para HCMVpp28, HCMVpp52 y HCMVpp65, respectivamente, en una razón molar de 1:1:1 para crear una agrupación de vectores. La eAPC-p (ACL-905) se combinó con la agrupación de vectores y un vector que codifica para la expresión de la enzima recombinasa RMCE (Flp, V4.1.8) mediante electroporación. Se incubaron las células durante 4-10 días, después de lo cual, se clasificaron las células en masa basándose en que tenían una señal disminuida para el marcador de selección de integración, BFP, codificado por el componente 1D (figura 55a) generando la población celular combinada ACL-1050 (figura 55b).

Para confirmar que la agrupación de eAPC-pa ACL-1050 se componía de una mezcla de eAPC-pa, cada una de las cuales codificaba para uno de HCMVpp28, HCMVpp52 o HCMVpp65 en el componente 1D', se clasificaron las células individuales como células individuales de la población policlonal y se seleccionaron 12 al azar para la caracterización genética. Se realizó la amplificación del componente 1D' usando cebadores que abarcan cada aAM (10.D.1 y 15.H.4). En la figura 55c, se presentan los amplicones generados para las 12 células, con controles, en los que para las 12 células se observa un único producto de amplicón que concuerda con el tamaño esperado para uno de los ORF de aAM, pp28 (0,8 kb), pp52 (1,5 kb) y pp65 (1,9kb). Además, se identifica cada ORF de aAM al menos una vez, lo que indica que la agrupación de eAPC-pa se compone de una mezcla de eAPC-pa en la que cada eAPC-pa de la agrupación ha integrado un único ORF de aAM aleatorio de la agrupación original de tres vectores.

En conclusión, este ejemplo demuestra el uso del sistema multicomponente para la conversión de una eAPC-p en una biblioteca agrupada de eAPC-pa en una única etapa, combinando la eAPC-p con una biblioteca agrupada de tres vectores que codifican para tres moléculas antigénicas analito diferentes (el componente 1E') y utilizando un enfoque de integración al azar basado en RMCE. Además, este ejemplo demuestra que cada eAPC-pa dentro de la agrupación generada de eAPC-pa ha integrado un único ORF de aAM aleatorio de la agrupación original de vectores

mediante un evento de pareja de integración entre el componente 1D y el componente 1E', y que los tres ORF de aAM están representados dentro de la biblioteca de eAPC-pa agrupada generada.

Ejemplo 11: Demostración de la generación de eTPC-t en una etapa

El presente ejemplo describe la generación de eTPC-t de una manera normalizada, en la que la eTPC parental contiene sitios de receptor genómico distintos sintéticos, los componentes 2B y 2D. Todas las líneas parentales de eTPC descritas en este ejemplo y todos los ejemplos adicionales se generaron con las mismas técnicas que las líneas de eAPC presentadas en los ejemplos anteriores. Los vectores donantes genéticos, los componentes 2C' y 2E', comprendían una única cadena de un par de TCR (JG9-TCR) que se sabe que se acopla con el péptido antigénico NLVPMVATV (NLVP) derivado del polipéptido 65 del citomegalovirus humano (pp65 de CMVH) cuando se presenta en alelos HLA-A*02. Los componentes C' y E' están diseñados para RMCE y se derivan de los componentes 2C y 2E parentales.

Este ejemplo usa una línea celular de eTPC parental ACL-488, que es nula para TCR, nula para HLA, nula para CD4 y nula para CD8, y contiene además los componentes 2B y 2D. El componente 2B comprende dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3 que flanquean una secuencia de Kozak y ORF que codifica para el marcador de selección, la proteína fluorescente azul (BFP). El extremo 5' codificado del sitio FRT es un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F3 es un terminador de señal de poliadenilación de SV40. El componente 2D comprende dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, F14 y F15, que eran diferentes del componente 2B. Estos sitios flanquean una secuencia de Kozak y un ORF que codifica para el marcador de selección, la proteína fluorescente roja (RFP). El extremo 5' codificado del sitio F14 es un promotor EF1a, y el extremo 3' del sitio F15 es un terminador de señal de poliadenilación de SV40.

Este ejemplo usa vectores donantes genéticos, el componente 2C' y el componente 2E', cada uno de los cuales comprende dos sitios de recombinasa heteroespecíficos, FRT/F3 (2C') y F14/F15 (2E'), apareándose así con los componentes 2B y 2D, respectivamente. El componente 2C' comprende además, entre los sitios FRT/F3, una secuencia de Kozak, un codón de iniciación y un ORF de TCR que codifica para la cadena beta de JG9-TCR. El componente 2E' comprende además, entre los sitios F14/F15, una secuencia de Kozak, un codón de iniciación y un ORF de TCR que codifica para la cadena alfa de JG9-TCR.

Se creó una eTPC-t a través de RMCE mediante electroporación ACL-488 (eTPC). De cuatro a 10 días después de la electroporación, se clasificaron por FACS las células individuales que presentaban una señal de proteína fluorescente disminuida, BFP y RFP, codificadas por los marcadores de selección de los componentes 2D y 2B. Los monoclonos individuales sobrecrecieron y luego se sometieron a evaluación fenotípica. El monoclon resultante, ACL-851, fue negativo para BFP y RFP (figuras 56 a y b). ACL-851 también mostró expresión en superficie de TCR y CD3, mientras que la línea celular parental no (figuras 56 c y e). Además, el JG9-TCR introducido mostró tinción específica con el tetrámero HLA-A*02:01-NLVP, lo que indica que es una TCRsp funcional en la superficie de la eTPC-t (figuras 56 d a f). Se confirmó mediante PCR que ACL-851 contenía la TCRsp codificada por el componente 2B' y el componente 2D' integrados en el genoma (figuras 56 g y h).

En resumen, se convirtió una eTPC en una eTPC-t, mediante el uso de un método de integración basado en RMCE para integrar ORF de TCR suministrado en los componentes 2C' y 2E', de tal manera que se convirtieron los componentes 2B y 2D en los componentes 2B' y 2D' y donde mediante esta eTPC-t expresó una TCRsp funcional en la superficie de la célula. Además, este ejemplo demuestra el funcionamiento de un sistema eTPC:A simple, donde se combinó una composición binaria de una eTPC-t y un antígeno analito y se seleccionó la eTPC-t basándose en una formación de complejo entre el antígeno analito soluble (multímero de HLA: HLA-A*02:01-NLVPVATV).

Ejemplo 12: Demostración de la conversión de eTPC-t en eTPC-x

El presente ejemplo describe la conversión de una eTPC-t en una eTPC-x, en la que la eTPC-x tiene el componente 2B' que codifica para un ORF de cadena de TCR y el componente 2D está disponible para la integración de ORF de cadena de TCR complementaria. La conversión del componente 2D' de la eTPC-t en el componente 2D de la eTPC-x se logra mediante el uso de un vector donante genético (el componente 2Z) apareado al componente 2D'.

En este ejemplo, se usó la línea celular de eTPC-t parental ACL-851 generada en el ejemplo 11. El componente 2Z es un vector plasmídico que se compone de dos sitios de recombinasa heteroespecíficos, F14/F15 apareados al componente 2D', una secuencia de Kozak, un codón de iniciación y un ORF que codifica para una proteína fluorescente verde (GFP) como marcador de selección de integración. Se combinó la eTPC-t con el componente 2Z y un vector que codifica para la enzima recombinasa RMCE mediante electroporación, después de lo cual se seleccionaron las células posteriormente por la pérdida de presentación de CD3 y ganancia del marcador de integración de selección GFP. Se caracterizó de manera fenotípica ACL-987 monoclonal por FACS, y se observó que la ACL-987 ganó GFP y perdió CD3 y TCRab (figuras 57b, d), lo que indica un intercambio con éxito de JG9-TCR-alfa con el ORF de GFP y la conversión del componente 2D' en el componente 2D y, por tanto, la generación de una eTPC-x. En comparación, la eTPC-t parental, ACL-851, carece de expresión de GFP y tiene expresión en

superficie de CD3 y TCRab (figuras 57 a, c).

En resumen, este ejemplo demuestra la conversión de una eTPC-t en una eTPC-x, con la eliminación del ORF de TCR JG9-TCR-alfa en el componente 2D' a cambio del marcador de selección de integración GFP, creando de ese modo el componente 2D, para eventos de acoplamiento de integración adicionales de ORF de cadena de TCR complementaria alternativa. Esta conversión se realizó usando el método de RMCE para la integración genómica.

Ejemplo 13: Demostración de la integración al azar en eTPC-x para crear una agrupación de eTPC-t

El presente ejemplo describe cómo se integró una agrupación de vectores que codifican para 64 variantes de JG9-TCR-alfa individuales (como el componente 2E') como una única etapa en una línea celular de eTPC-x parental (descrita en el ejemplo 12) para crear una biblioteca de eTPC-t agrupada en la que cada célula individual integró un único ORF de TCR aleatorio que codifica para la cadena alfa de la agrupación original de vectores, de tal manera que cada eTPC-t expresa un único par aleatorio de ORF de TCR como TCRsp. Combinados, la eTPC-t individual comprende una biblioteca agrupada de eTPC-t en la que la agrupación de células representa potencialmente todas las combinaciones posibles de 64 TCR-alfa apareados con la cadena beta de TCR original constante. Tal método se denomina ahora como integración "al azar". Las 64 variantes de JG9-TCR-alfa se crearon modificando la secuencia de CDR3 que se encuentra en la unión de los fragmentos V y J.

En este ejemplo, se usó la línea celular de eTPC-x parental ACL-987 (véase el ejemplo 12), con JG9-TCR-beta no expresado en superficie (el componente 2B') y complejo de CD3. El componente 2D codifica para GFP, un marcador de selección, tal como se describe en el ejemplo 12. En este ejemplo, los 64 fragmentos de la variante de JG9-TCR-alfa se clonaron en el vector donante del componente 2E, creando el componente 2E', flanqueado por sitios F14/F15, que se aparean con el componente 2D. Posteriormente, se combinaron los 64 vectores en una única agrupación de vectores.

Se creó una agrupación de eTPC-t mediante integración genómica basada en RMCE, en la que se combinaron el vector de recombinasa RMCE y 64 componentes 2E' y eTPC-x (ACL-987) mediante electroporación. Los policlones se seleccionaron basándose en la expresión de GFP. El policlón resultante, ACL-988, se componía de poblaciones celulares positivas para GFP y negativas para GFP, a diferencia de la línea parental que se componía únicamente de células positivas para GFP (figuras 58 a y b). Sin embargo, sólo la población negativa para GFP mostró una expresión de CD3 intensa de manera constante, lo que indica una conversión con éxito del componente 2D en el componente 2D' y, por tanto, la eTPC-x se ha convertido en una agrupación de eTPC-t (figuras 58 c y d). Además, las poblaciones negativas para GFP de ACL-988 mostraron dos intensidades distintas cuando se tiñeron con el reactivo multimérico específico de JG9-TCR (DEX HLA-A*02:01-NLVP), lo que sugiere que esta población se compone de células que expresan variantes de TCR con eficiencia de unión variable.

En paralelo, se clonaron las 64 variantes de JG9-TCR-alfa en un constructo de expresión que permitió la transfección transitoria a una eTPC-x parental (ACL-987) y se determinaron las unidades de tinción relativas (RSU) contra el reactivo multimérico HLA-A*02:01-NLVP con una referencia para cada par de TCR presentado en la variante de JG9-TCR que expresa eTPC-t agrupada descrita anteriormente. Se calcularon las RSU como la razón de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la señal del multímero de HLA para la población positiva para CD3 con respecto a la población negativa para CD3, y fue indicativa de la fuerza de unión de cada variante del par de cadenas de TCR. Después de la transfección independiente de la línea parental ACL-987 con cada variante de JG9-TCR-alfa, se tiñeron las células con anticuerpos contra CD3 y con el reactivo multimérico de HLA y se analizaron mediante citometría de flujo. Cada punto representado gráficamente en la figura 58e representa las RSU observadas para cada una de las 64 variantes.

Las células individuales de la agrupación de ACL-988 se clasificaron de manera individual, a partir de la población positiva para multímero de HLA y de la población negativa para multímero de HLA. Se amplificó y secuenció el componente 2D' que codifica para la variante de ORF de JG9-TCR-alfa para cada célula individual y se comparó con los resultados de las unidades RSU de expresiones transitorias descritas anteriormente (figura 58e). De hecho, las células ACL-988 individuales que eran positivas para el multímero de HLA codificaban para variantes de JG9-TCR-alfa que mostraban predominantemente resultados altos de RSU en las variantes sometidas a prueba individualmente (figura 58e, círculos en blanco). Además, las células ACL-988 individuales que eran negativas para el multímero de pHLA codificaban para variantes de JG9-TCR-alfa que mostraban predominantemente resultados bajos de RSU (figura 58e, triángulos en blanco).

En conclusión, este ejemplo demuestra el uso del sistema multicomponente para la conversión de una eTPC-x y una biblioteca agrupada de vectores (el componente 2E') en una biblioteca agrupada de eTPC-t que contiene múltiples TCRsp diferentes. Esto se logró en una única etapa mediante la integración al azar. Además, este ejemplo demostró que la agrupación de eTPC-t se combinó con un antígeno analito (como reactivo de afinidad soluble) en un sistema eTPC-A, en el que se demostró que las células individuales de la agrupación podrían seleccionarse basándose en la formación de complejos con el antígeno analito (multímero de HLA) y en el que se extrajo el ORF de cadena de TCR posterior codificado en el componente 2D' y se obtuvieron las secuencias de ADN.

Ejemplo 14: Demostración funcional del componente 2F en un sistema eAPC:eTPC combinado con aAM exógena

Se describe en el presente documento una línea celular de eTPC (ACL-1063, el componente 2A) modificada por ingeniería con dos sitios de receptor genómico únicos (los componentes 2B, 2D), modificada por ingeniería para ser nula para HLA, utilizando expresión de CD3 nativa y que alberga un elemento de respuesta sintético, genómico de dos componentes modificado por ingeniería (el componente 2F). En este ejemplo, la línea celular de eTPC se convirtió en una línea celular de eTPC-t (ACL-1277) tal como se describió previamente en el ejemplo 11, en la que el ORF de cadena de TCR en los componentes 2B' y 2E' codifica para un par de TCR que es específico para el complejo HLA-péptido (HLA), HLA-A*02:01-NLVPMVATV. Esta eTPC-t se combinó con la eAPC-p descrita anteriormente en presencia de aAM exógena en forma de péptido soluble para ensamblar sistemas eAPC:eTPC. La lectura de estos sistemas combinados fue una señal de RFP dentro de la eTPC-t, que era el indicador del componente 2F.

Los elementos de respuesta definidos como el componente 2F comprendían un componente controlador-activador y un componente amplificador-indicador, en los que ambas unidades utilizaban promotores sintéticos. El controlador es un promotor sintético que responde a las rutas de señalización de TCR nativas y codifica para tres conjuntos de sitios de unión de factor de transcripción en tándem para NFAT-AP1-NFkB (3xNF-AP-NB). Tras la activación de la transcripción, el controlador induce la expresión de la proteína activadora, un factor de transcripción diseñado sintético derivado de la fusión del dominio de activación VP16 del herpes, el dominio de unión al ADN GAL4 y dos señales de localización nuclear en los extremos N-terminal y C-terminal (NV16G4N) en la que la secuencia de reconocimiento de ADN relacionada está presente 6 veces en tándem en el promotor amplificador. Tanto los promotores de controlador como de amplificador utilizaron la secuencia del promotor central (elemento de reconocimiento B (BRE), caja TATA, iniciador (INR) y sitio de inicio de la transcripción) del promotor IE1 de CMVH, inmediatamente en 3' de los respectivos sitios de unión de factor de transcripción. El amplificador, tras la activación de la transcripción, impulsa la expresión del indicador, la proteína fluorescente roja (RFP).

Luego, se expuso la línea celular de eTPC-t frente a eAPC-p que presentaba HLA-A*02:01 (ACL-209) o HLA-A*24:02 (ACL-963) o era una eAPC parental nula para HLA (ACL-128). Cuando se prepararon eAPC-pa analito pulsando eAPC-p con el antígeno analito de cualquiera del péptido NLVPMVATV o VYALPLKML, o ningún péptido. Posteriormente, se compilaban una eTPC-t y una eAPC-pa analito en un sistema eAPC:eTPC que consistía en 30.000 eTPC-t cultivadas conjuntamente con 10.000 eAPC-pa durante 24 h. Después de 24 h, se recogieron las células, se lavaron, se tiñeron con marcadores específicos para eTPC-t y eAPC-pa analito para distinguir las poblaciones y se analizaron mediante citometría de flujo. La fuerte activación de eTPC-t, el componente 2F (sólo se observó en eTPC-t expuesta a la eAPC-pa analito que presenta el complejo de pHLA de antígeno relacionado conocido, es decir, eAPC-pa con HLA-A*02:01 y NLVPMVATV (figura 59a). Por el contrario, sólo se observó expresión de RFP en estado de reposo en compilaciones eAPC:eTPC compuestas por eAPC-pa analito no específico (figuras 59b, c, d) o eAPC parental de control que carece de HLA (figura 59f) o eAPC-p que carece de péptido de aAM exógeno (figura 59e).

En conclusión, se diseñó una línea celular de eTPC-t que contenía un componente funcional 2F y posteriormente se usó para crear una eTPC-t. Tras la interacción de eTPC-t con la eAPC-pa analito que presenta su antígeno de linfocitos T diana relacionado, proporcionado como aAM exógena soluble, pudo medirse una respuesta como un aumento de la expresión de RFP. Por el contrario, cuando se puso en contacto con eAPC o eAPC-p o eAPC-pa analito que no presenta un antígeno de linfocitos T relacionado y HLA, o sin HLA, la eTPC-t no mostró ningún aumento medible de la expresión de RFP por encima del fondo. Además, este ejemplo demuestra un sistema eAPC:eTPC en el que se compilan la eAPC-pa analito y la eTPC-t analito en composiciones binarias discretas y se usa la respuesta de eTPC-t para identificar tanto eTPC-t como eAPC-pa analito en las que se produce un complejo cooperativo entre la TCRsp y el antígeno analito.

Ejemplo 15: Demostración funcional del componente 2F en un sistema eAPC:eTPC combinado con ORF de aAM integrado al estado de eAPC-pa

El presente ejemplo describe el uso de una eTPC-t (ACL-1150), (el componente 2A) modificada por ingeniería con dos sitios de receptor genómico únicos, cargada con el ORF de cadena de TCR en los componentes 2B' y 2E' que codifica para un par de TCR que es específico para el complejo de HLA-péptido (HLA), HLA-A*02:01-NLVPMVATV, que utiliza expresión de CD3 nativa y que alberga un elemento de respuesta sintético, genómico de un componente (el componente 2F), compilado en un sistema eAPC:eTPC con eAPC-pa que se generaron mediante la integración con el ORF que codifica para aAM integrado en el sitio 1D'. En este ejemplo, se ensamblaron cuatro variantes de eAPC- diferentes pa con dos alelos de HLA diferentes y dos ORF de aAM diferentes derivados del genoma de CMVH; generando cuatro líneas de eAPC-pa distintas.

Los elementos de respuesta definidos como el componente 2F se componían de un componente controlador-indicador. El controlador es un promotor sintético que responde a las rutas de señalización de TCR nativas, codifica para seis conjuntos de sitios de unión de factor de transcripción en tándem para NFAT-AP1 (6xNF-AP) y utiliza la secuencia del promotor central (elemento de reconocimiento B (BRE), caja TATA, iniciador (INR) y sitio de inicio de la transcripción) del promotor IE1 del CMVH, inmediatamente en 3' de los respectivos sitios de unión de factor de

transcripción. Tras la activación de la transcripción, el controlador induce la expresión del indicador, la proteína fluorescente roja (RFP).

La primera línea de eAPC-pa (ACL-1046) expresa HLA-A*02:01 y el ORF de longitud completa para la proteína pp65 de CMVH, en la que pp65 contiene el péptido antigénico reconocido por TCRsp de eTPC-t, cuando se presenta en HLA-A. *02:01. La segunda línea de eAPC-pa (ACL-1044) expresa HLA-A*02:01 y el ORF completo para la proteína pp52 del CMVH. La tercera línea de eAPC-pa, ACL-1045, expresa HLA-B*07:02 y el ORF completo para la proteína pp65 del CMVH. La cuarta línea de eAPC-pa (ACL-1048) expresa HLA-B*07:02 y el ORF completo para la proteína pp65 del CMVH. La segunda, tercera y cuarta eAPC-pa expresan complejos aAPX:aAM no reconocidos por la TCRsp de eTPC-t.

La línea celular de eTPC-t ACL-1150 se compiló en un sistema eAPC:eTPC independiente con cada una de las cuatro eAPC-pa tal como se describió anteriormente. Después de 48 h, se recogieron las células, se lavaron, se tiñeron con marcadores específicos para eTPC-t y la eAPC-pa analito para distinguir las poblaciones y se analizaron mediante citometría de flujo. Sólo se observó una fuerte activación de eTPC-t, el componente 2F, en eTPC-t expuesta a la eAPC-pa analito que presenta el complejo de pHLA de antígeno relacionado conocido, es decir, eAPC-pa con HLA-A*02:01 y pp65 (figura 60b). Por el contrario, sólo se observó expresión de RFP en estado de reposo en compilaciones eAPC:eTPC compuestas por la eAPC-pa analito no específica (figuras 60a, c, d).

En conclusión, se modificó por ingeniería una línea celular de eTPC-t que contenía un componente funcional 2F y posteriormente se usó para crear una eTPC-t. Tras la interacción de eTPC-t con la eAPC-pa analito que presenta su antígeno de linfocitos T diana relacionado, proporcionado como ORF de aAM endógeno mediante integración, pudo medirse una respuesta como un aumento de la expresión de RFP. Por el contrario, cuando se puso en contacto con eAPC-pa analito que no presenta un antígeno de linfocitos T relacionado y HLA, la eTPC-t no mostró ningún aumento medible de la expresión de RFP por encima del fondo. Además, este ejemplo demuestra un sistema eAPC:eTPC en el que se compilan eAPC-pa analito y eTPC-t analito en composiciones binarias discretas y se usa la respuesta de eTPC-t para identificar tanto eTPC-t como eAPC-pa analito en la que se produce un complejo cooperativo entre la TCRsp y el antígeno analito.

Lista de secuencias

<110> Genovie AB

<120> Sistema celular de dos partes modificado por ingeniería para el descubrimiento y la caracterización de una interacción de receptor de linfocitos T con antígeno relacionado

<130> ANO15

<160> 104

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1 <223> Péptido antigénico analito

<210> 2 <223> Péptido antigénico analito

<210> 3 <223> Antígeno de CMVH

<210> 4 <223> Antígeno de CMVH

<210> 5 <223> vector pcDNA3.1_GFP, V1.A.4

<210> 6 <223> vector pcDNA3.1_RFP, V1.A.6

<210> 7 <223> vector pMA-SV40pA, V1.C.2

<210> 8 <223> vector pMA-CS-JG9-TCRbeta, V3.C.5

<210> 9 <223> vector pMA-F14-GFP-F15, V4.H9

<210> 10 <223> vector pMA-F14-TCR-JG9-alpha-F15, V7.A.3

<210> 11 <223> vector pMA-FRT-TCR-JG9-beta-F3, V7.A.4

<210> 12 <223> vector F14-TCRaF15 CDR3degen.64mix, V8.F.8

<210> 13 <223> vector CMVpro-Flp-pA de sv40-V2, V4.I.8

<210> 14 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_A1

5 <210> 15 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_A2

<210> 16 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_A3

<210> 17 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_A4

10 <210> 18 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_A5

<210> 19 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_A6

15 <210> 20 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_A7

<210> 21 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_A8

<210> 22 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_B1

20 <210> 23 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_B2

<210> 24 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_B3

25 <210> 25 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_B4

<210> 26 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_B5

<210> 27 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_B6

30 <210> 28 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_B7

<210> 29 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_B8

35 <210> 30 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_C1

<210> 31 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_C2

<210> 32 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_C3

40 <210> 33 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_C4

<210> 34 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_C5

45 <210> 35 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_C6

<210> 36 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_C7

<210> 37 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_D1

50 <210> 38 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_D2

<210> 39 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_D3

55 <210> 40 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_D4

<210> 41 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_D5

<210> 42 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_D6

60 <210> 43 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_D7

<210> 44 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_D8

65 <210> 45 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_E1

<210> 46 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_E2
 <210> 47 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_E3
 5 <210> 48 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_E4
 <210> 49 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_E5
 <210> 50 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_E6
 10 <210> 51 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_E7
 <210> 52 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_E8
 15 <210> 53 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_F1
 <210> 54 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_F2
 <210> 55 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_F3
 20 <210> 56 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_F4
 <210> 57 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_F5
 25 <210> 58 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_F6
 <210> 59 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_F7
 <210> 60 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_F8
 30 <210> 61 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_G1
 <210> 62 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_G2
 35 <210> 63 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_G3
 <210> 64 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_G4
 <210> 65 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_G5
 40 <210> 66 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_G6
 <210> 67 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_G7
 45 <210> 68 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_G8
 <210> 69 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_H1
 <210> 70 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_H2
 50 <210> 71 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_H3
 <210> 72 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_H4
 55 <210> 73 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_H5
 <210> 74 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_H6
 <210> 75 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_H7
 60 <210> 76 <223> Secuencia de CDR3 de una de las 64 variantes de JG9-TRA, VP.7751.RC1_H8
 <210> 77 <223> vector pMA_F14_HLA-A*02:01-6xHis_F15, V4.H.5
 65 <210> 78 <223> vector pMA_F14_HLA-A*24:02-6xHis_F15, V4.H.6

- <210> 79 <223> vector pMA_F14_HLA-B*07:02-6xHis_F15, V4.H.7
- <210> 80 <223> vector pMA_F14_HLA-B*35:01-6xHis_F15, V4.H.8
- 5 <210> 81 <223> vector FRT_HCMVpp28-3xMYC_F3, V9.E.6
- <210> 82 <223> vector FRT_HCMVpp52-3xMYC_F3, V9.E.7
- <210> 83 <223> vector FRT_HCMVpp52-3xMYC_F3, V9.E.8
- 10 <210> 84 <223> Vector SpCas9-2A-GFP, V1.A.8
- <210> 85 <223> vector HLA-A-sg-sp-opti1, V2.A.1
- 15 <210> 86 <223> vector HLA-B-sg-sp-3, V2.A.7
- <210> 87 <223> vector HLA-C-sg-sp-4, V2.B.3
- <210> 88 <223> vector HLA-A-ex2-3_sg-sp-opti_1, V2.I.10
- 20 <210> 89 <223> vector HLA-A-ex2-3_sg-sp-opti_2, V2.J.1
- <210> 90 <223> vector AAVSI_sg-sp-opti_3, V2.J.6
- 25 <210> 91 <223> cebador/sonda para ddPCR TRAC-GT-F1
- <210> 92 <223> cebador/sonda para ddPCR TRAC-GT-R1, 1.F.8
- <210> 93 <223> cebador/sonda para ddPCR TRAC-probe-FAM
- 30 <210> 94 <223> cebador/sonda para ddPCR TRBC2-GT-F1, 1.F.9
- <210> 95 <223> cebador/sonda para ddPCR TRBC2-GT-R1, 1.F.10
- 35 <210> 96 <223> cebador/sonda para ddPCR TRBC2-probe-FAM, 1.G.2
- <210> 97 <223> cebador/sonda para ddPCR TRAC-TCRA-ex1-F1, 10.A.9
- <210> 98 <223> cebador/sonda para ddPCR TRAC-TCRA-ex1-F1, 10.A.10
- 40 <210> 99 <223> cebador/sonda para ddPCR TRAC-probe(HEX), 10.B.6
- <210> 100 <223> cebador/sonda para ddPCR HCMVpp65_GT_F2, 21.1.1
- 45 <210> 101 <223> cebador/sonda para ddPCR HCMVpp28_GT_F1, 21.I.2
- <210> 102 <223> cebador/sonda para ddPCR HCMVpp52_GT_F1, 21.I.3
- <210> 103 <223> cebador/sonda para ddPCR Myc-Tag_GT_R1, 20.H.10
- 50 <210> 104 <223> cebador/sonda para ddPCR Linker-Myc_Probe_Fam, 20.H.9

Lista de abreviaturas

aAPX	Complejo presentador de antígeno analito
aAM	Molécula antigénica analito
aCT	TCR analito
APC	Célula presentadora de antígeno
APX	Complejo presentador de antígeno
BFP	Proteína fluorescente azul
CAR-T	Linfocitos T CAR
CM	Moléculas de carga

CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas
ARNg	ARN guía de Cas9
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CDR	Regiones determinantes de la complementariedad
Región C	Región constante
CMV	Citomegalovirus
DAMPS	Patrones moleculares asociados a peligro
DC	Células dendríticas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Región D	Región de diversidad
eAPC	Célula presentadora de antígeno por ingeniería genética
eAPC-p	Célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería que presenta un complejo presentador de antígeno analito
eAPC-pa	Célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería que presenta un complejo presentador de antígeno analito y una molécula antigénica analito
eAPC-a	Célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería que expresa una molécula antigénica analito
eAPCS	Sistema de células presentadoras de antígeno modificado por ingeniería
eTPC	Célula presentadora de TCR modificada por ingeniería
eTPCS	Sistema de células presentadoras de TCR modificado por ingeniería
eTPC-t	Célula presentadora de TCR modificada por ingeniería que presenta pares de TCR de longitud completa
FACS	Clasificación celular activada por fluorescencia
Linfocitos T GEM	Linfocitos T reactivos a micolilo codificados por la línea germinal
GFP	Proteína fluorescente verde
HLAI	HLA de clase I
HLAII	HLA de clase II
HDR	Recombinación dirigida por homología
HLA	Antígeno leucocitario humano
IgSF	Superfamilia de inmunoglobulinas
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
Linfocitos T iNK	Linfocitos T citotóxicos naturales invariantes
Región J	Región de unión
MACS	Clasificación celular activada magnéticamente
MAGE	Antígeno asociado a melanoma
MAIT	Linfocitos T invariantes asociados a la mucosa
NCBP	Partícula no basada en células
ORF	Marco de lectura abierto
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RMCE	Intercambio de casete mediado por recombinasa
RFP	Proteína fluorescente roja
ADN	Ácido ribonucleico
SH2	Homología a Src 2
Linfocitos (células T)	^T Linfocitos T
TCR	Receptor de linfocitos T
TRA	TCR alfa

TRB	TCR beta
TRD	TCR delta
TCRsp	Proteínas de superficie de TCR en complejo con CD3
TALEN	Nucleasas efectoras similares a activador de la transcripción
TRG	TCR gamma
TAA	Antígenos asociados a tumor
Región V	Región variable
β2M	β2-microglobulina
ZAP-70	Proteína asociada a la cadena ζ de 70 kDa

Definiciones

- 5 Par de cadenas complementarias de TCR: dos cadenas de TCR en el que las proteínas traducidas pueden formar una TCRsp en la superficie de una célula presentadora de TCR
- Afinidad: Parámetro cinético o de equilibrio de la interacción entre dos o más moléculas o proteínas
- 10 Reactivo de afinidad: Cualquier reactivo diseñado con afinidad específica por un analito. A menudo se usa en el contexto de afinidad por el complejo de HLA-antígeno
- Alelo: Forma variante de un gen específico
- 15 AM: Molécula antigénica analito. De manera general, una proteína, pero también podría ser un metabolito que expresa una célula a partir de su ADN genómico y/o una secuencia genética introducida específica. La AM se expresa en la célula y luego un APX puede presentar un fragmento en la superficie celular como carga o por sí solo. Ya sea como carga o no, la AM puede ser entonces diana de células que portan el receptor de linfocitos T o reactivos de afinidad relacionados.
- 20 Amplicón: un fragmento de ADN o ARN que es la fuente y/o el producto de la amplificación artificial usando diversos métodos, incluyendo la PCR.
- Analito: una entidad que es de interés que va a identificarse y/o medirse y/o investigarse en el sistema combinado.
- 25 Anticuerpo: Molécula de afinidad expresada por células especializadas del sistema inmunitario denominadas linfocitos B y que contiene dos cadenas. Los linfocitos B expresan un repertorio muy grande y muy diverso de anticuerpos que generalmente no se unen a proteínas propias, pero que pueden unir y neutralizar patógenos o toxinas que pudieran suponer una amenaza para el huésped. Los anticuerpos naturales o modificados por ingeniería artificialmente se usan a menudo como reactivos de afinidad.
- 30 Antígeno: cualquier molécula que puede acoplarse por un TCR y da como resultado una señal que se transduce dentro del linfocito T, a menudo presentada por un complejo presentador de antígeno.
- Antígeno analito: en conjunto el sistema eAPC:T que representa cualquier entidad que presenta un antígeno para su determinación analítica.
- 35 APC: Célula presentadora de antígeno. Una célula que porta en la superficie de la célula una AM, un APX, APX.
- 40 APX: Complejo presentador de antígeno Una proteína que se expresa y presenta en la superficie celular de células nucleadas a partir de genes/ORF que codifican para ADN genómico y/o una secuencia genética introducida específica. El APX presenta una carga que puede ser tanto un péptido como otras moléculas de metabolitos.
- Región C: Región constante. Uno de los segmentos génicos que se usa para ensamblar el receptor de linfocitos T. La región c es un segmento distinto que en vez de dirigir la diversidad del TCR, define su función general en el sistema inmunitario.
- 45 Maquinaria de soporte de carga: Conjunto de proteínas celulares que generan y cargan moléculas de carga en APX procedentes de proteínas u otras moléculas presentadas que se encuentran en la célula.
- 50 CDR: Regiones determinantes de la complementariedad. Secuencias cortas en el extremo orientado hacia el antígeno de los TCR y anticuerpos que desempeñan la mayor parte de la función de unión a dianas. Cada anticuerpo y TCR contiene seis CDR y generalmente son la parte más variable de las moléculas, que permiten la detección de un gran número de diversas moléculas diana.

- CM: Moléculas de carga. Péptido o metabolito que se presenta por un complejo presentador de antígeno, por ejemplo, un HLA I o HLA II. La CM puede expresarse por la célula de manera intrínseca a partir del ADN genómico, introducirse en el medio de cultivo o expresarse a partir de una secuencia genética introducida específicamente.
- 5 Número de copias: El número total de apariciones de una secuencia definida codificada dentro del genoma de una célula.
- 10 Citogenética: El estudio de la herencia en relación con la estructura y función de los cromosomas, es decir, determinar el cariotipo de una célula
- Citotóxico/citotoxicidad: Proceso en el cual un linfocito T libera factores que dañan directa y específicamente una célula diana.
- 15 Región D: Región de diversidad. Uno de los segmentos génicos que se usa para ensamblar el receptor de linfocitos T. Cada individuo tiene un gran número de variaciones diferentes de estas regiones, lo que permite armar linfocitos T con una variedad muy grande de TCR diferentes.
- 20 ADN: Ácido desoxirribonucleico. Nombre químico de la molécula que forma el material genético que codifica para genes y proteínas.
- Sistema de eAPC: eAPCS, el sistema mediante el que se preparan células eAPC-pa, eAPC-p y eAPC-a, o bibliotecas de las mismas, para su combinación en el sistema eAPC:eTPC.
- 25 Sistema de eTPC: eTPCS, el sistema mediante el que se preparan células eTPC-t, o bibliotecas de las mismas, para su combinación en el sistema eAPC:eTPC
- Sistema eAPC:eTPC: el sistema mediante el que se combinan antígeno analito presentado por eAPC y TCR analito presentado por eTPC
- 30 Endógeno: Sustancia que se origina dentro de una célula
- Célula modificada por ingeniería: Una célula donde el genoma se ha modificado por ingeniería mediante modificación genética.
- 35 Elemento regulador condicional eucariota: Secuencia de ADN que puede alterar la actividad de un promotor, que puede inducirse o reprimirse en condiciones definidas.
- 40 Promotor eucariota: Una secuencia de ADN que codifica para un sitio de unión a ARN polimerasa y elementos de respuesta. La secuencia de la región promotora controla la unión de la ARN polimerasa y de los factores de transcripción, por tanto, los promotores desempeñan un papel importante en la determinación del lugar y el momento en que se expresará el gen de interés.
- 45 Terminador eucariota/terminador de señal: Secuencia de ADN reconocida por factores proteicos que se asocian con la ARN polimerasa II y que desencadenan el proceso de terminación de la transcripción. También codifica para la señal poli-A
- FACS/citometría de flujo: Clasificación de células activadas por fluorescencia. Técnica analítica mediante la cual pueden analizarse células individuales para determinar la expresión de marcadores intracelulares y de superficie celular específicos. Una variación de esa técnica, la clasificación celular, permite recuperar las células que portan un conjunto definido de marcadores para un análisis posterior.
- 50 Familia de APX: Un conjunto de varios genes similares que codifican para proteínas funcionalmente relacionadas que constituyen un complejo de presentación de antígeno
- 55 Marcador fluorescente (proteína): Molécula que tiene características específicas de extinción y emisión y puede detectarse por microscopía, FACS y técnicas relacionadas.
- 60 Vector donante genético: Un vector de base genética para el suministro de material genético al sitio de receptor genómico.
- Sitio de receptor genómico: Un sitio dentro del genoma para la integración dirigida de material genético donante codificado dentro de un vector donante genético.
- 65 Sitios de recombinasa heteroespecíficos: Una secuencia de ADN reconocida por una enzima recombinasa para fomentar el sobrecruzamiento de dos moléculas de ADN.

- HLA I: Antígeno leucocitario humano de clase I. Un gen que se expresa en todas las células nucleadas humanas y se exporta a la superficie celular donde presenta como carga fragmentos cortos, péptidos o proteínas internas a los receptores de linfocitos T. De este modo presenta fragmentos de infecciones potenciales en curso junto con proteínas intrínsecas. El HLA I puede presentarse además en forma de péptidos de carga que se añaden al medio de cultivo, generados a partir de proteínas expresadas a partir de elementos génicos introducidos o generados a partir de proteínas captadas por la célula. Los genes de HLA de clase I son polimórficos, lo que significa que es probable que diferentes individuos tengan variaciones en el mismo gen, dando lugar a una variación en la presentación. Relacionado con el HLA de clase II.
- HLA II: Antígeno leucocitario humano de clase II. Gen que se expresa en células específicas humanas que coordinan y ayudan a la respuesta inmunitaria adaptativa, por ejemplo, en células dendríticas. Relacionado con el HLA de clase I. Las proteínas HLA de clase II se exportan a la superficie celular, donde presenta como carga fragmentos cortos, péptidos, proteínas externas a receptores de linfocitos T. De este modo presenta fragmentos de infecciones potenciales en curso junto con proteínas intrínsecas. El HLA II puede presentarse además en forma de péptidos de carga que se añaden al medio de cultivo, generados a partir de proteínas expresadas a partir de elementos génicos introducidos o generados a partir de proteínas captadas por la célula. Los genes de HLA de clase II son polimórficos, lo que significa que es probable que diferentes individuos tengan variaciones en el mismo gen, dando lugar a una variación en la presentación.
- Brazos homólogos: Tramo de ADN que tiene una identidad de secuencia casi idéntica a un brazo homólogo del complemento y que, por tanto, favorece el intercambio de dos moléculas de ADN por el proceso celular de la reparación dirigida por homología.
- Vigilancia inmunitaria: Proceso en el que el sistema inmunitario detecta, y es activado por, infecciones, neoplasias malignas u otras alteraciones potencialmente patógenas.
- Aislante: Secuencia de ADN que impide que un gen se vea influido por la activación o represión de genes cercanos. Los aislantes también impiden la descondensación de la heterocromatina de un gen silenciado a un gen transcrito activamente.
- Integración: Ligamiento físico de una secuencia de ADN en un cromosoma de una célula
- Pareja de integración: Un vector donante genético y un sitio de receptor genómico emparejados.
- Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES): Secuencia de ADN que, una vez transcrita, codifica para un elemento de ARN que permite el inicio de la traducción de manera independiente de la caperuza
- Región J: Región de unión. Uno de los segmentos génicos que se usa para ensamblar el receptor de linfocitos T. Cada individuo tiene un gran número de variaciones diferentes de estas regiones, lo que permite armar linfocitos T con una variedad muy grande de TCR diferentes.
- Cariotipo: La composición cromosómica de una célula.
- Secuencia de Kozak: Secuencia corta requerida para la iniciación eficiente de la traducción
- HLA de clase I principal: Una familia de APX que comprende los genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C.
- Apareado: Cuando dos componentes codifican para elementos genéticos que dirigen y restringen la interacción entre los componentes complementados
- Sitio de reconocimiento de meganucleasa: Una secuencia de ADN reconocida por una endodesoxirribonucleasa, denominada habitualmente meganucleasa.
- Metabolito: Una molécula creada o alterada en las rutas metabólicas de la célula
- Elemento genético móvil: Una secuencia de ADN que puede permitir la integración de ADN con la actividad de enzimas transposasas
- Línea celular monoclonal: Grupo definido de células producidas a partir de una célula individual ancestral por replicación celular repetida
- Nativa: una entidad que se produce de manera natural en la célula.
- Gen no codificante: Una secuencia de ADN que no codifica para proteínas que se transcribe a moléculas de ARN funcionales no codificantes

ORF: Marco de lectura abierto. Tramo de material genético que codifica para un marco de traducción para la síntesis de una proteína (polipéptido) por el ribosoma

- 5 Paracrina: Señalización a través de factores solubles que actúan directamente sobre células vecinas.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en la que una molécula de ADN diana específica se amplifica exponencialmente

- 10 Péptido: cadena corta de aminoácidos de entre 6 - 30 aminoácidos de longitud.

Análisis fenotípico: Análisis de las características observables de una célula.

- 15 Polimórfico: Presente en formas diferentes en individuos de la misma especie por la presencia de alelos diferentes del mismo gen.

Polipéptido: Proteína que consiste en un tramo de péptidos que forman una estructura tridimensional.

- 20 Salidas primarias: Células eAPC y células eTPC a partir de las cuales pueden derivarse y/o determinarse las salidas terminales.

Cebador: Secuencia de ADN corta que permite el reconocimiento específico de una secuencia de ADN diana, por ejemplo, durante una PCR.

- 25 Promotor: Elemento de ADN regulador para la iniciación controlada de la expresión génica.

Marcador seleccionable: Una secuencia de ADN que transmite un rasgo adecuado para métodos de selección artificial

- 30 Integración al azar: El proceso mediante el cual se introduce una biblioteca de vectores en una población de células, por lo que sólo puede integrarse una única copia de cualquier inserto de vector dado en el genoma de cada célula individual. Se usa para referirse a la integración de vectores agrupados en una población de células dada a través de una pareja de integración.

- 35 Sitio aceptor de corte y empalme: Una secuencia de ADN en el extremo 3' del intrón, AM, APX, CM o reactivo de afinidad para la interacción con células con TCRsp en la superficie, o reactivos basados en TCRsp.

Sitio donante de corte y empalme: Una secuencia de ADN en el extremo 5' del intrón.

- 40 Sintética: una entidad generada artificialmente e introducida en una célula.

Célula T: Linfocito T. Leucocito que expresa un receptor de linfocitos T en su superficie. Seleccionado por el sistema inmunitario para no reaccionar con el propio organismo, pero que tiene el potencial de reconocer infecciones y neoplasias malignas, así como de rechazar injertos procedentes de la mayoría de los miembros de la misma especie.

- 50 TCR: Receptor de linfocitos T. Molécula de afinidad expresada por un subgrupo de linfocitos denominados linfocitos T. En seres humanos, el TCR reconoce carga presentada por CM de APX o AM de APX, incluyendo fragmentos de infecciones víricas o bacterianas o células cancerosas. Por tanto, el reconocimiento de TCR forma parte integral del sistema inmunitario adaptativo. El TCR consiste en dos cadenas que se emparejan en la superficie celular. El TCR expresado en la superficie de cada célula se ensambla al azar a partir de una gran agrupación de genes variados (las regiones ν , d , j y c) y, por tanto, cada individuo tiene una agrupación de linfocitos T que expresan un repertorio muy grande y diverso de TCR diferentes.

- 55 TCRsp: Un par de cadenas de TCR complementarias que se expresan como proteínas de superficie en complejo con CD3 o un par de cadenas de TCR complementarias expresadas como proteínas en forma de reactivo soluble, reactivo inmovilizado o presentes por NCBP.

Salidas terminales: Secuencias de TCR y antígeno analito, en forma de AM, APX, APX:CM, APX:AM o TCRsp

- 60 TRA: Locus que codifica para TCR alfa. Uno de los cuatro loci distintos que codifican para genes que pueden formar una cadena de TCR recombinada VDJ. Las proteínas de la cadena alfa del TCR traducidas se emparejan normalmente con las proteínas de la cadena beta del TCR traducidas para formar TCRsp alfa/beta.

- 65 TRB: Locus que codifica para TCR beta. Uno de los cuatro loci distintos que codifican para genes que pueden formar una cadena de TCR recombinada VDJ. Las proteínas de la cadena beta del TCR traducidas se emparejan

normalmente con las proteínas de la cadena alfa del TCR para formar TCRsp alfa/beta.

5 TRD: Locus que codifica para TCR delta. Uno de los cuatro loci distintos que codifican para genes que pueden formar una cadena de TCR recombinada VDJ. Las proteínas de la cadena delta del TCR traducidas normalmente se emparejan con las proteínas de la cadena gamma del TCR traducidas para formar TCRsp gamma/delta.

10 TRG: Locus que codifica para TCR gamma. Uno de los cuatro loci distintos que codifican para genes que pueden formar una cadena de TCR recombinada VDJ. Las proteínas de la cadena gamma del TCR traducidas se emparejan normalmente con las proteínas de la cadena delta del TCR traducidas para formar TCRsp gamma/delta.

Región V: Región variable. Uno de los segmentos génicos que se usa para ensamblar el receptor de linfocitos T. Cada individuo tiene un gran número de variaciones diferentes de estas regiones, lo que permite armar linfocitos T con una variedad muy grande de TCR diferentes.

15

REIVINDICACIONES

1. Sistema de dos partes que forma un sistema analítico eAPC:eTPC combinado, en el que una primera parte es un sistema de células presentadoras de antígeno modificado por ingeniería (eAPCS), y una segunda parte es un sistema de células presentadoras de TCR modificado por ingeniería (eTPCS),
en el que dicho eAPCS comprende un primer componente que es una célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería (eAPC), designado como el componente 1A, en el que el componente 1A carece de expresión endógena en superficie de al menos una familia de complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) y/o moléculas antigénicas analito (aAM), y contiene un segundo componente designado como el componente 1B, un sitio de receptor genómico sintético, para la integración de intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE) de uno o dos ORF que codifican para uno o más aAPX y/o una o más aAM, y
un tercer componente que es un vector donante genético designado como el componente 1C, para el suministro y la integración en 1B de al menos un ORF que codifica para al menos un aAPX y/o al menos una aAM, en el que el componente 1C se aparea con el componente 1B, y en el que el componente 1C está diseñado para suministrar uno o dos ORF que codifican para uno o más aAPX y/o una o más aAM, de tal manera que el aAPX y/o la aAM puedan expresarse por el componente 1A, y en el que dicho eTPCS comprende:
un primer componente, que es una célula presentadora de TCR modificada por ingeniería (eTPC), designado como el componente 2A, en el que el componente 2A carece de expresión endógena en superficie de al menos una familia de complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) y/o molécula antigénica analito (aAM), carece de expresión endógena de las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR, y expresa proteínas CD3 que se presentan de manera condicional en la superficie de la célula sólo cuando la célula expresa un par complementario de cadenas de TCR y contiene un segundo componente designado como 2B, un sitio de receptor genómico para la integración de intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE) de un único ORF que codifica para al menos una cadena alfa, beta, delta o gamma de TCR analito, y/o dos ORF que codifican para un par de cadenas de TCR analito, y
un tercer componente es un vector donante genético, designado como el componente 2C, para el suministro de ORF que codifica para cadenas de TCR analito, en el que el componente 2C se aparea con el componente 2B, y en el que el componente 2C está diseñado para suministrar al menos uno de
a. Un único ORF que codifica para al menos una cadena alfa, beta, delta o gamma de TCR analito, o
b. Dos ORF que codifican para un par de cadenas de TCR analito,
de tal manera que el par de cadenas de TCR analito pueda expresarse como proteínas de superficie de TCR en complejo con CD3 (TCRsp) en el componente A.
2. Sistema de dos partes según la reivindicación 1, para su uso en la preparación de una o más eAPC analito seleccionadas de
a. eAPC-p,
b. eAPC-a,
c. eAPC-pa, y
d. una biblioteca de a, b o c.
3. Sistema de dos partes para su uso según la reivindicación 2, en el que una eAPC-p, eAPC-a o eAPC-pa puede expresar un antígeno analito seleccionado de
e. un aAPX,
f. una aAM,
g. un aAPX:aAM,
h. un aAPX:CM, y

- i. una combinación de los mismos.
- 4. Sistema de dos partes según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en la preparación de una o más eTPC analito seleccionadas de
 - a. eTPC-t y
 - b. una biblioteca de la misma.
- 5. Sistema de dos partes para su uso según la reivindicación 4, que comprende una eTPC analito que puede expresar un par de cadenas de TCR analito como proteínas de superficie de TCR en complejo con CD3 (TCRsp analito).
- 6. Sistema de dos partes para su uso según la reivindicación 5, en el que la eTPC contiene un componente 2F, que representa un elemento de respuesta de señal de TCR sintético modificado por ingeniería con respecto al genoma de la eTPC, y que se usa para notificar la formación de complejo entre la TCRsp analito y un antígeno analito presentado por eAPC-p, -a o -pa, y que da como resultado una respuesta de señal en la eTPC.
- 7. Uso de un sistema de dos partes según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para combinar una o más eAPC analito con una o más eTPC analito.
- 8. Uso según la reivindicación 7, en el que la combinación da como resultado un contacto entre una TCRsp analito y un antígeno analito según la reivindicación 3, en el que el contacto da como resultado una respuesta de señal.
- 9. Uso según la reivindicación 8, en el que el contacto da como resultado la formación de un complejo entre la TCRsp analito y el antígeno analito.
- 10. Uso según la reivindicación 9, en el que la formación del complejo induce una respuesta de señal en la eTPC analito o la eAPC analito.
- 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para seleccionar una eTPC analito o una agrupación de eTPC analito con o sin respuesta de señal, y/o una eAPC analito o una agrupación de eAPC analito con o sin respuesta de señal.

Figura 1

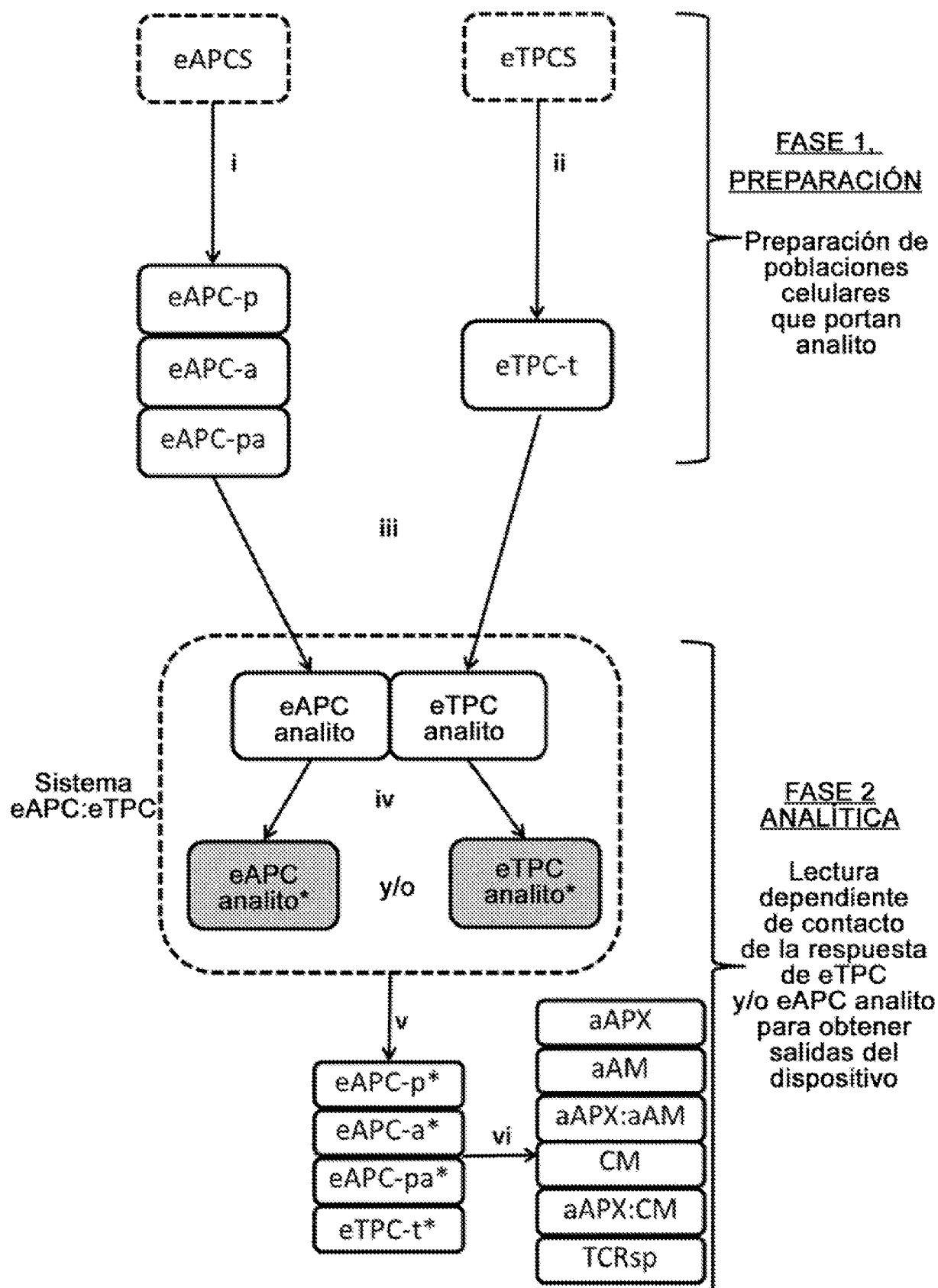


Figura 2

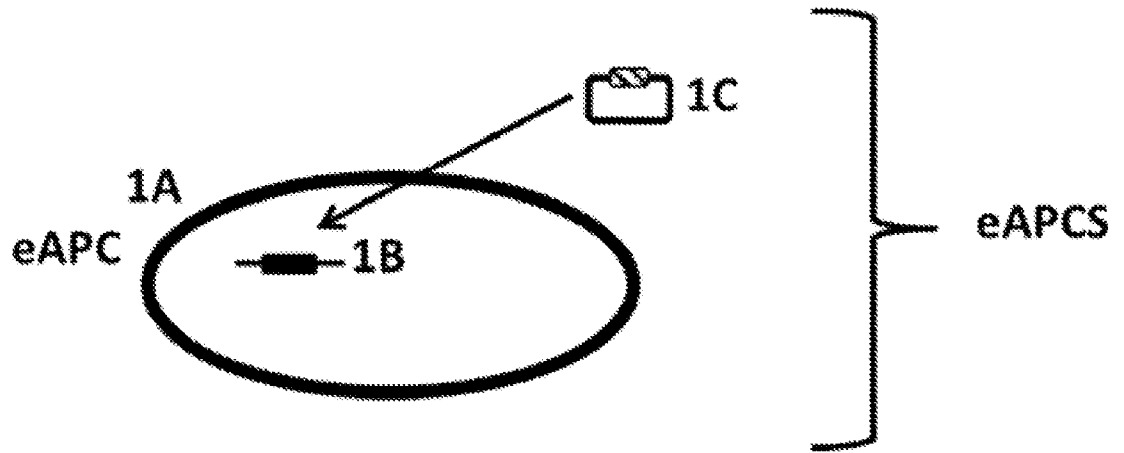


Figura 3

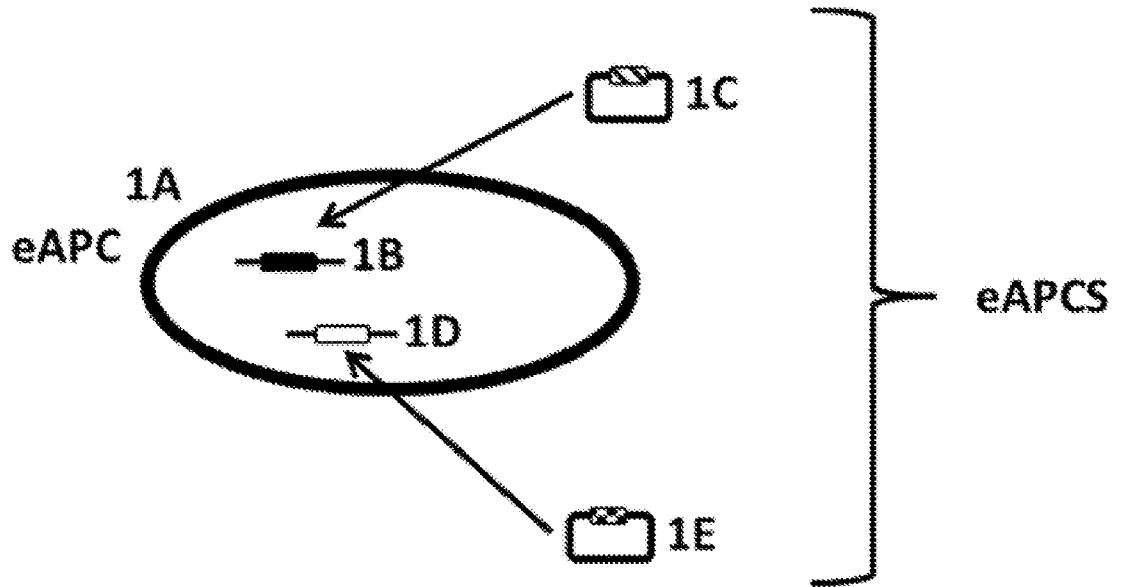


Figura 4

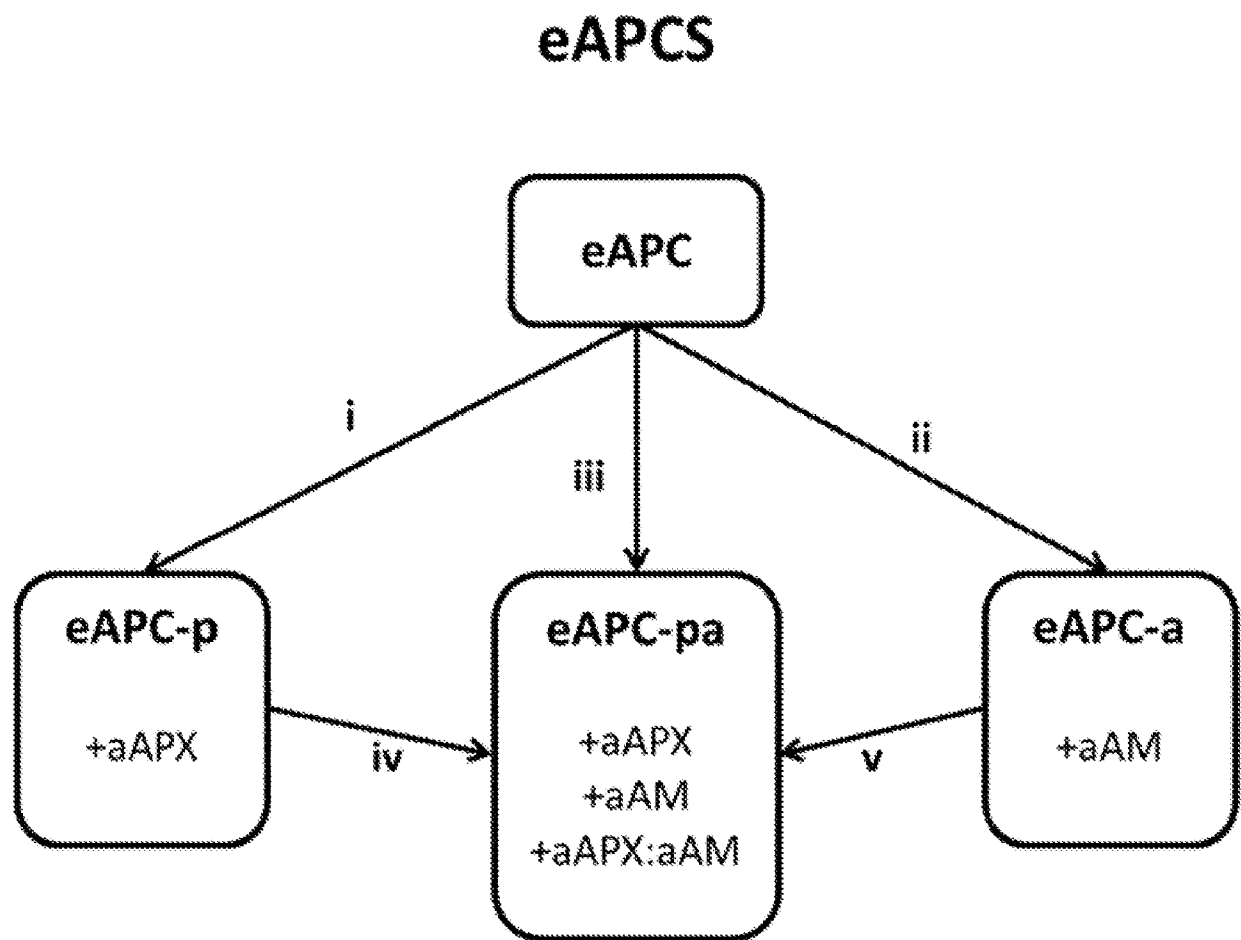


Figura 5

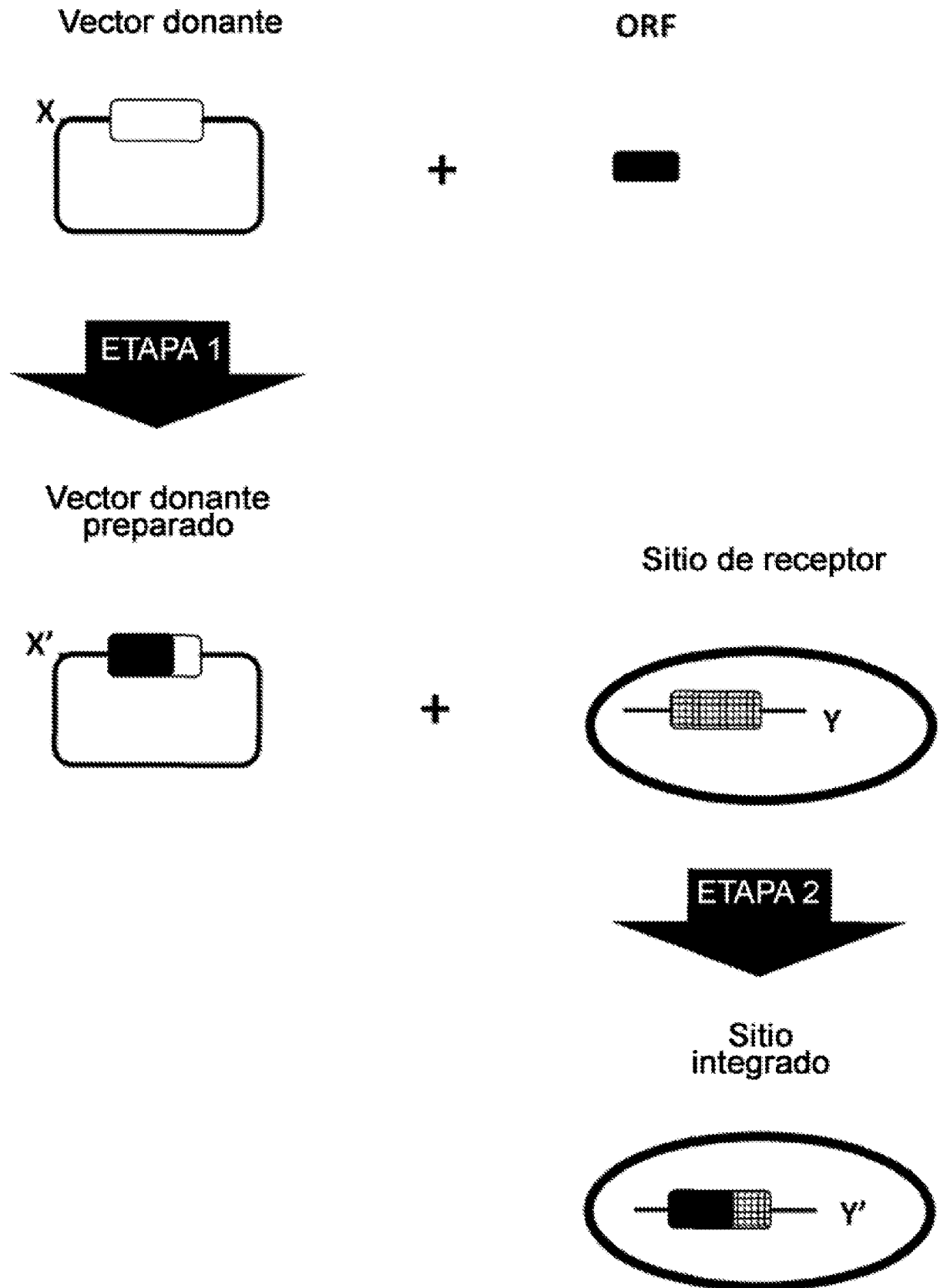


Figura 6

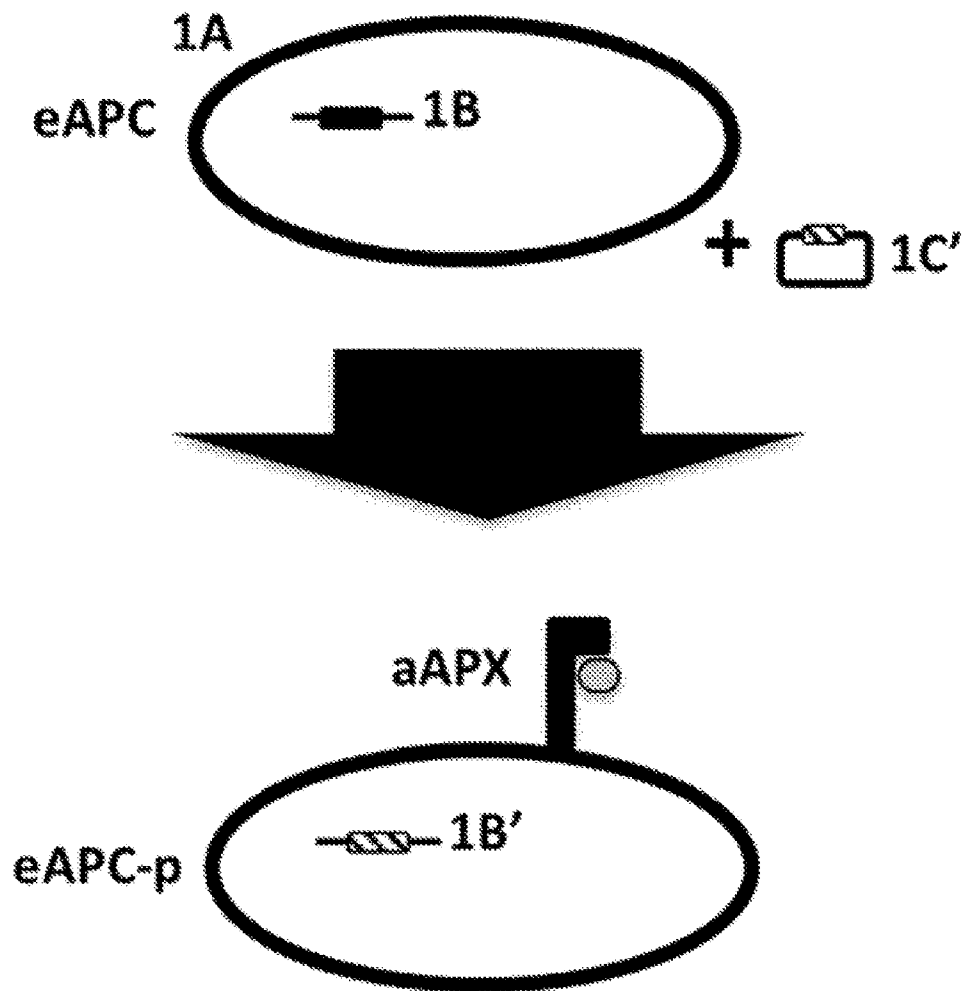


Figura 7

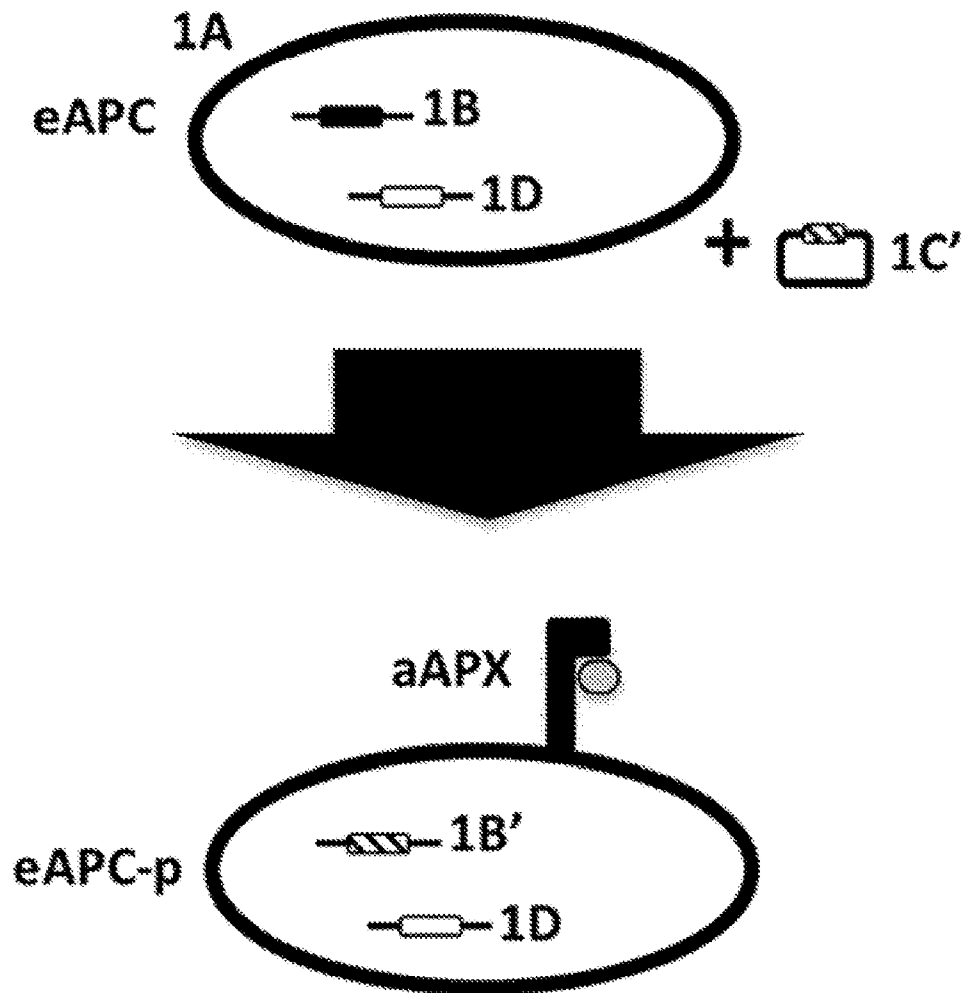


Figura 8

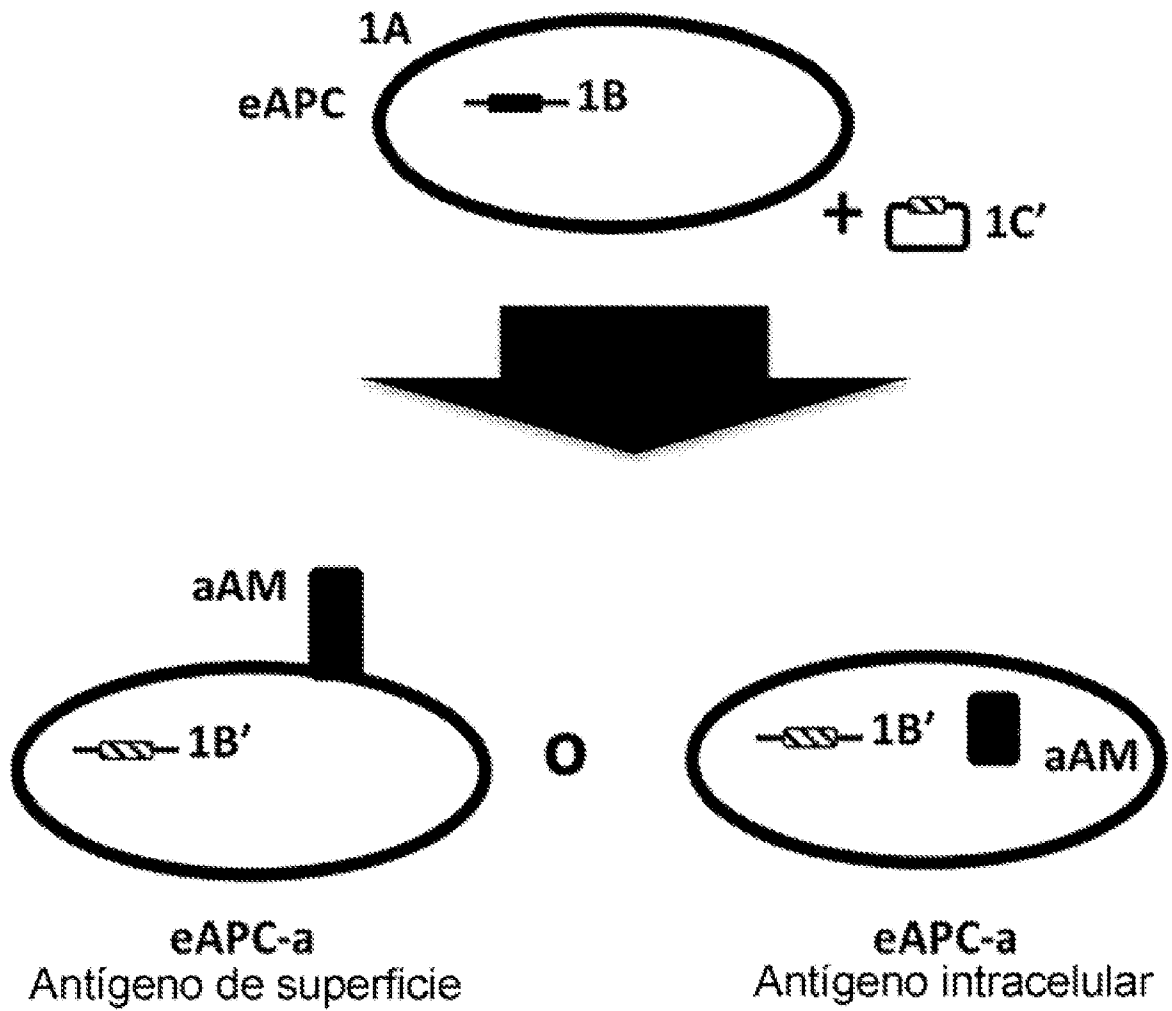


Figura 9

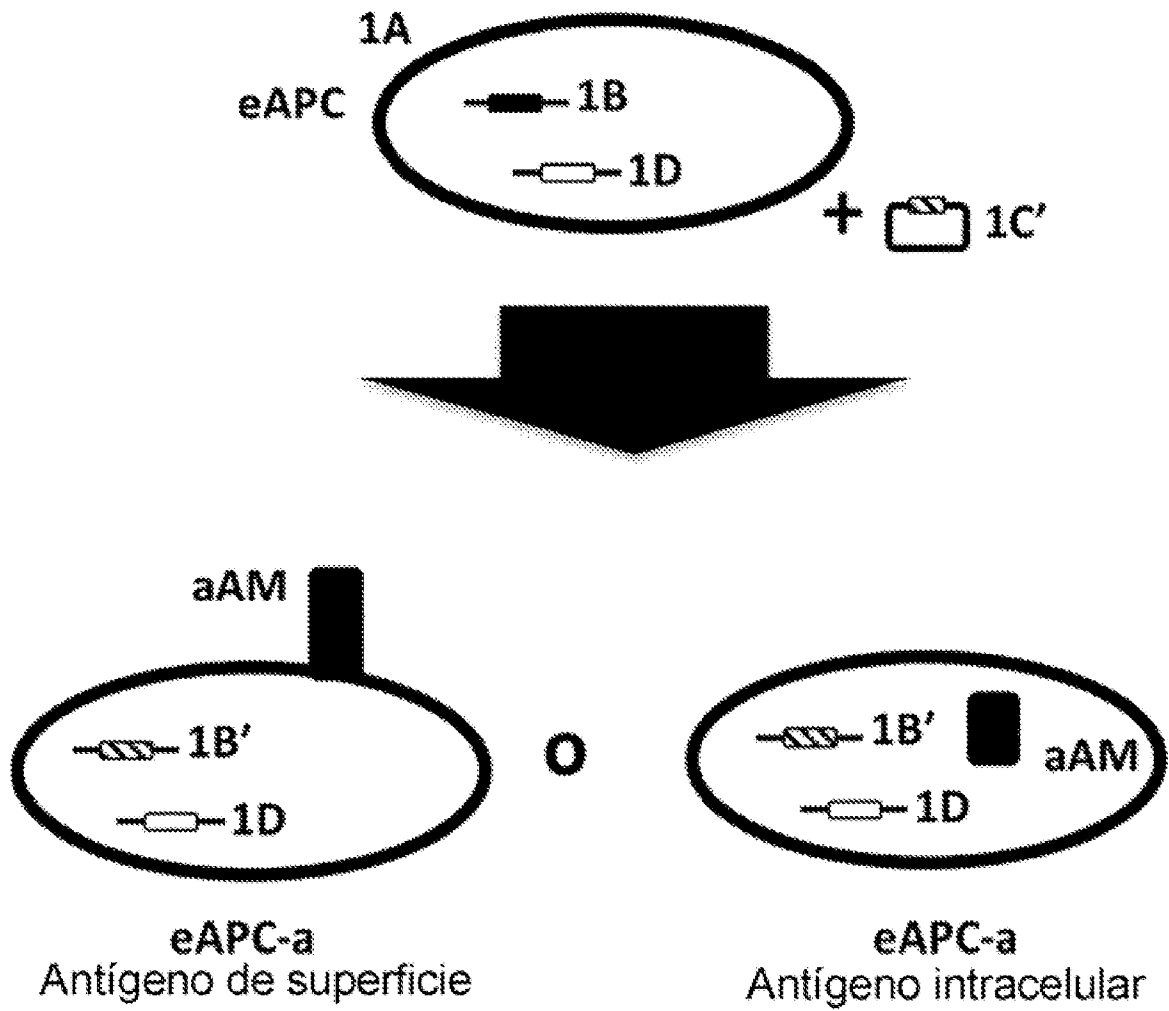


Figura 10

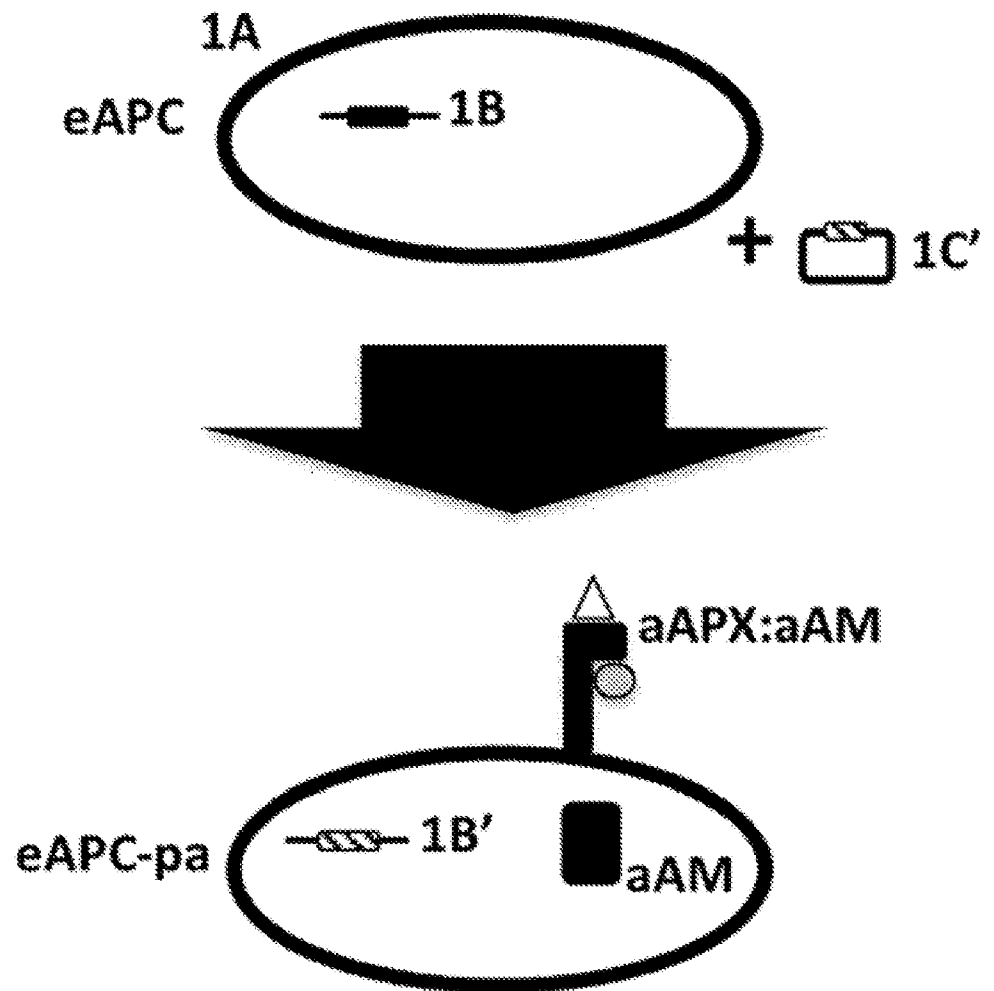


Figura 11

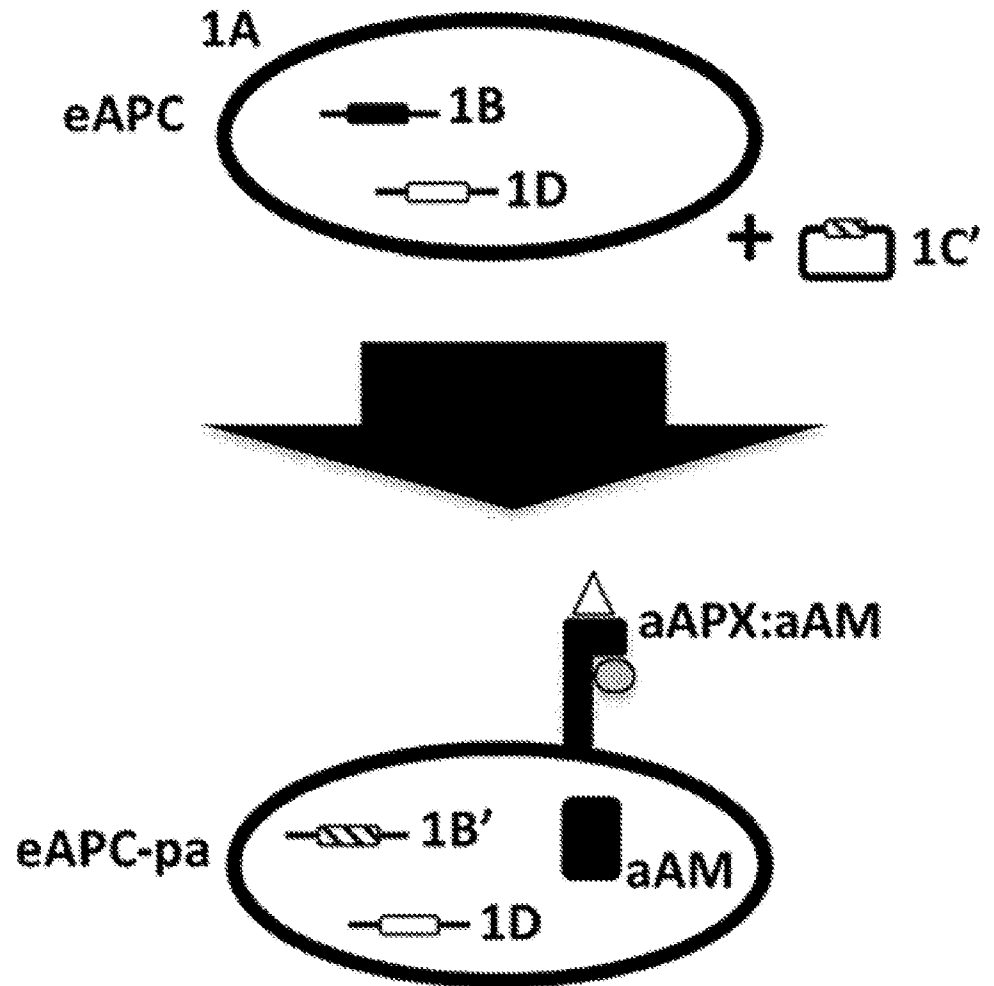


Figura 12

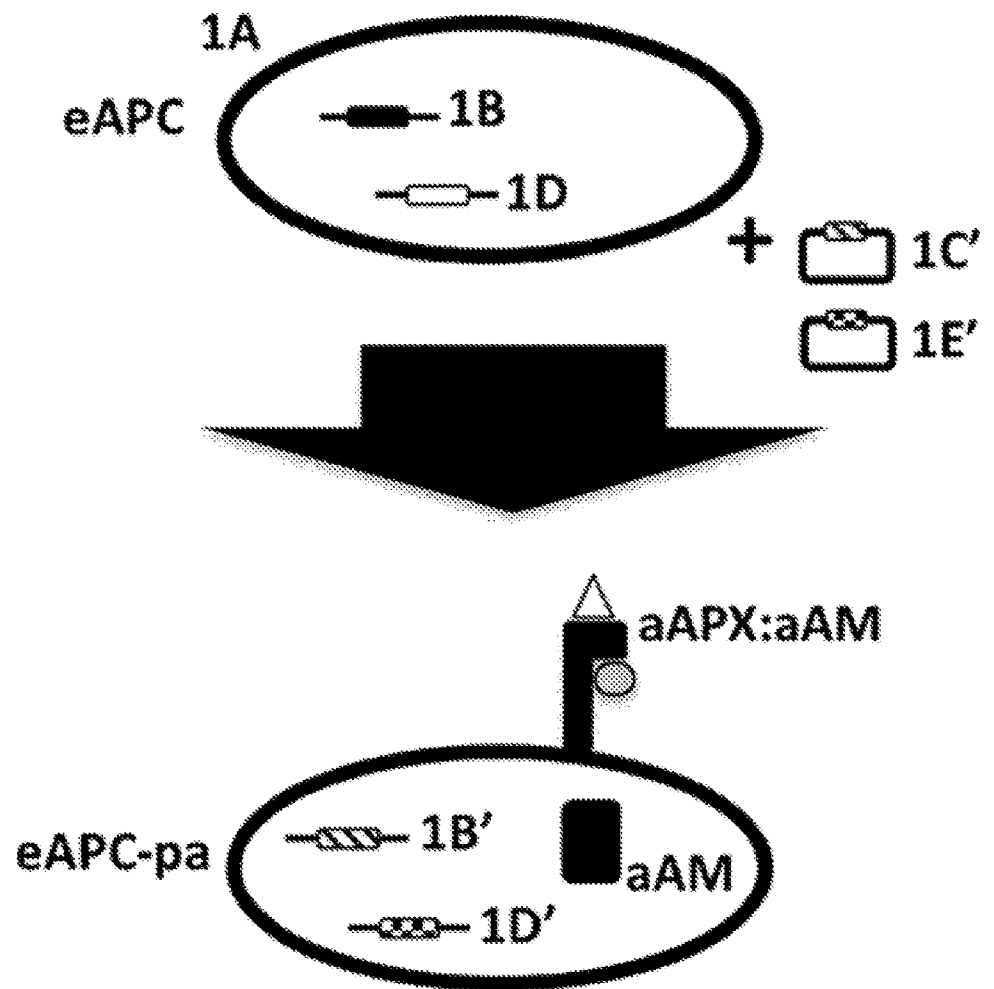


Figura 13

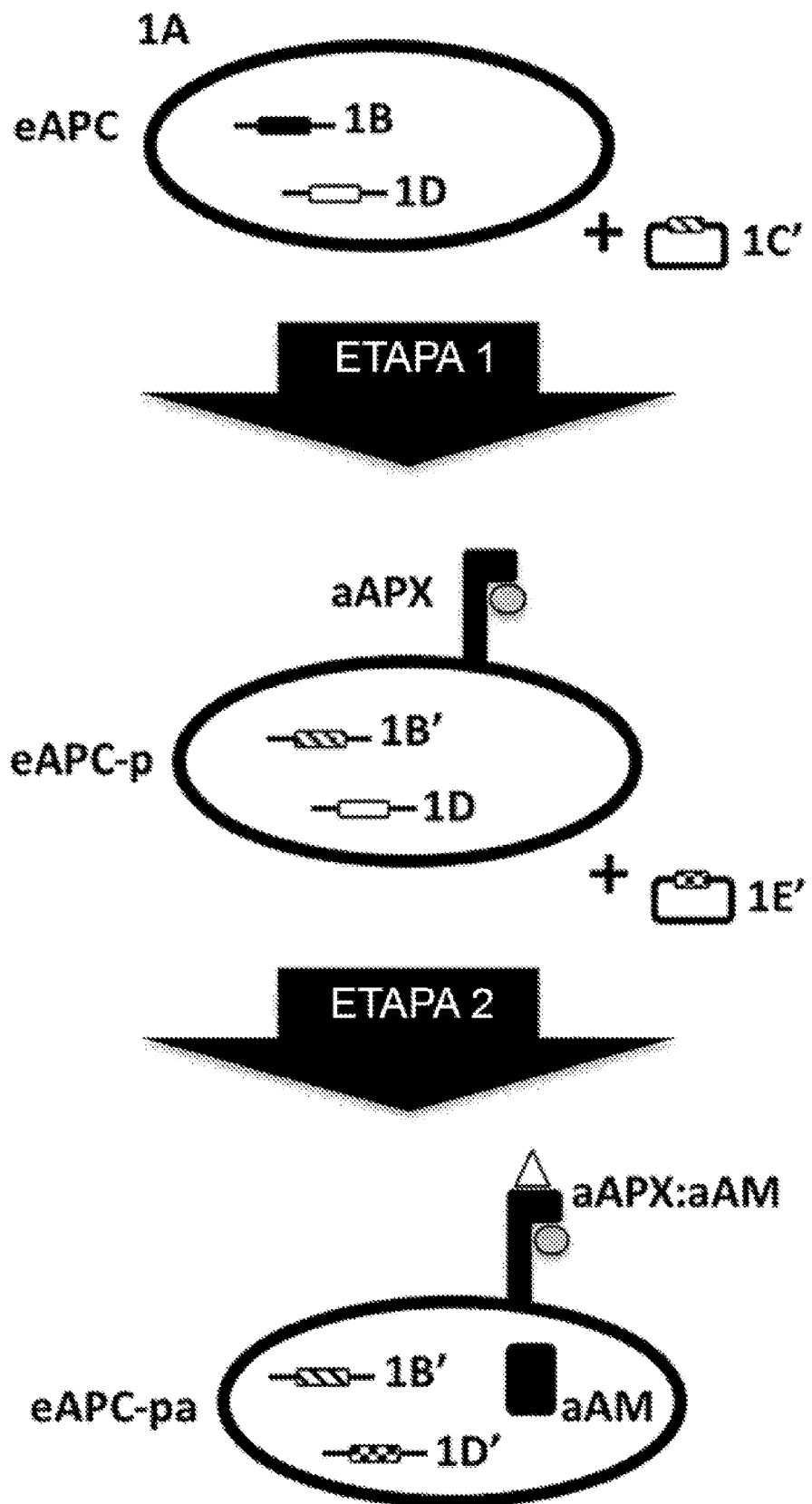


Figura 14

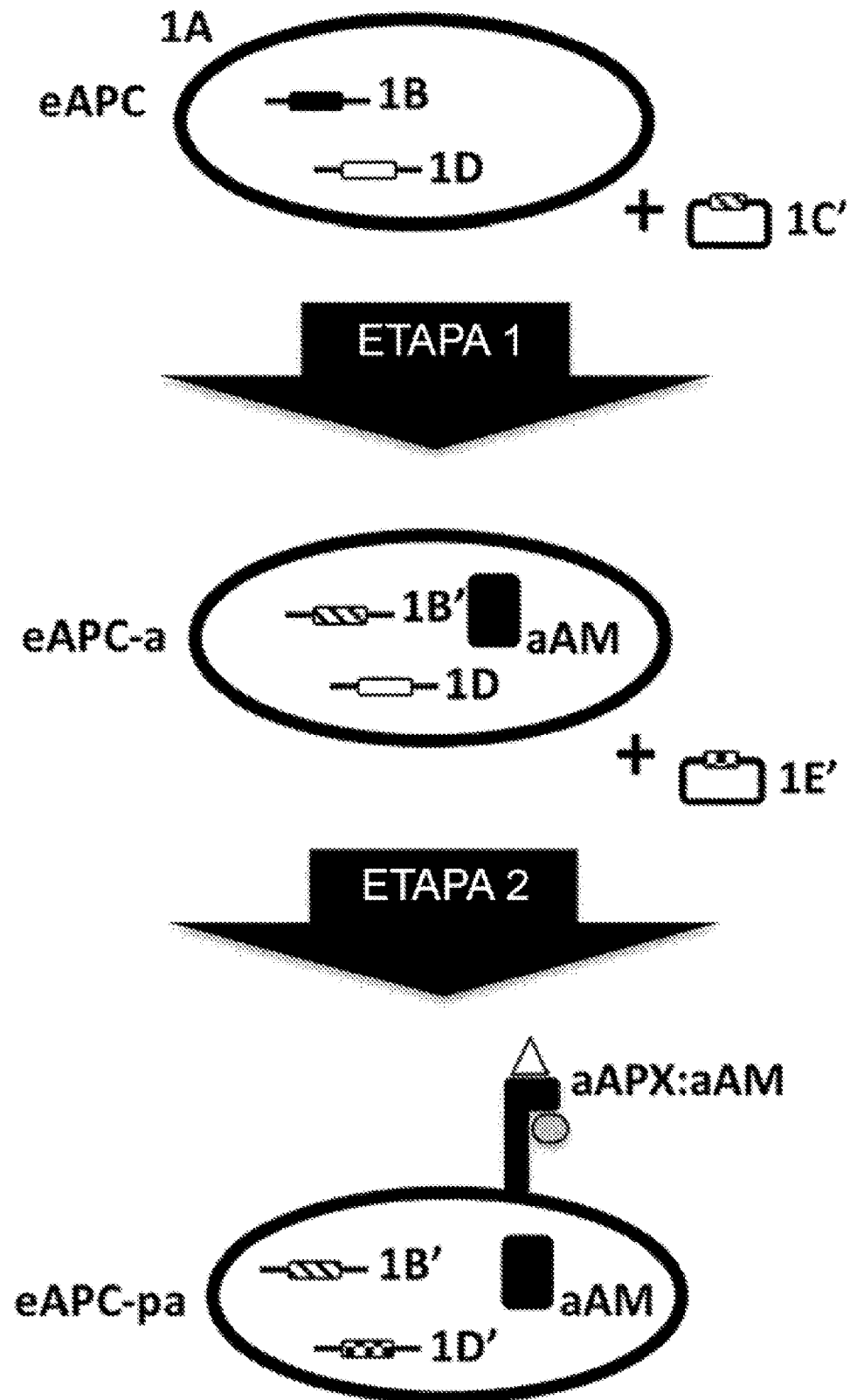


Figura 15

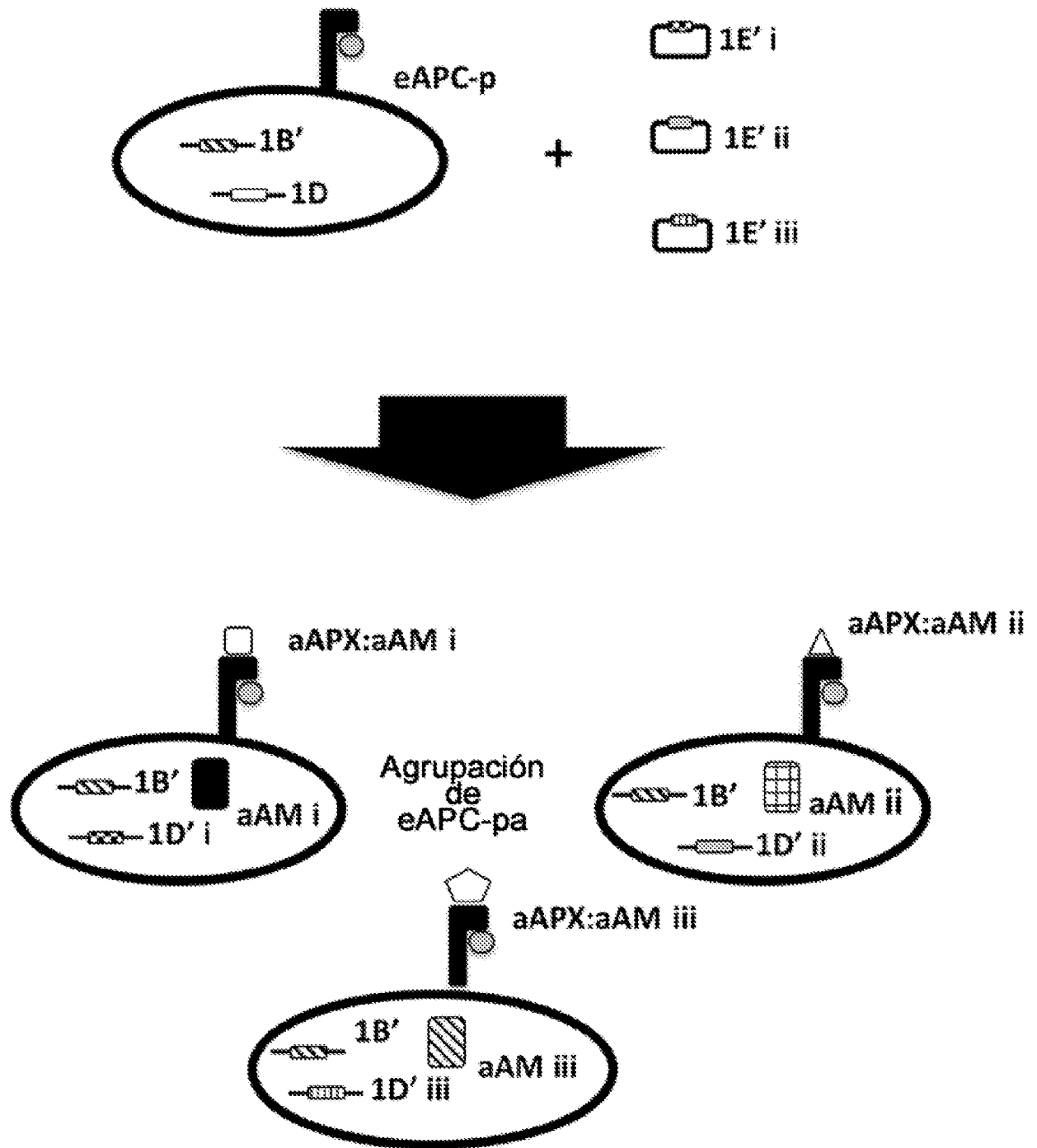


Figura 16

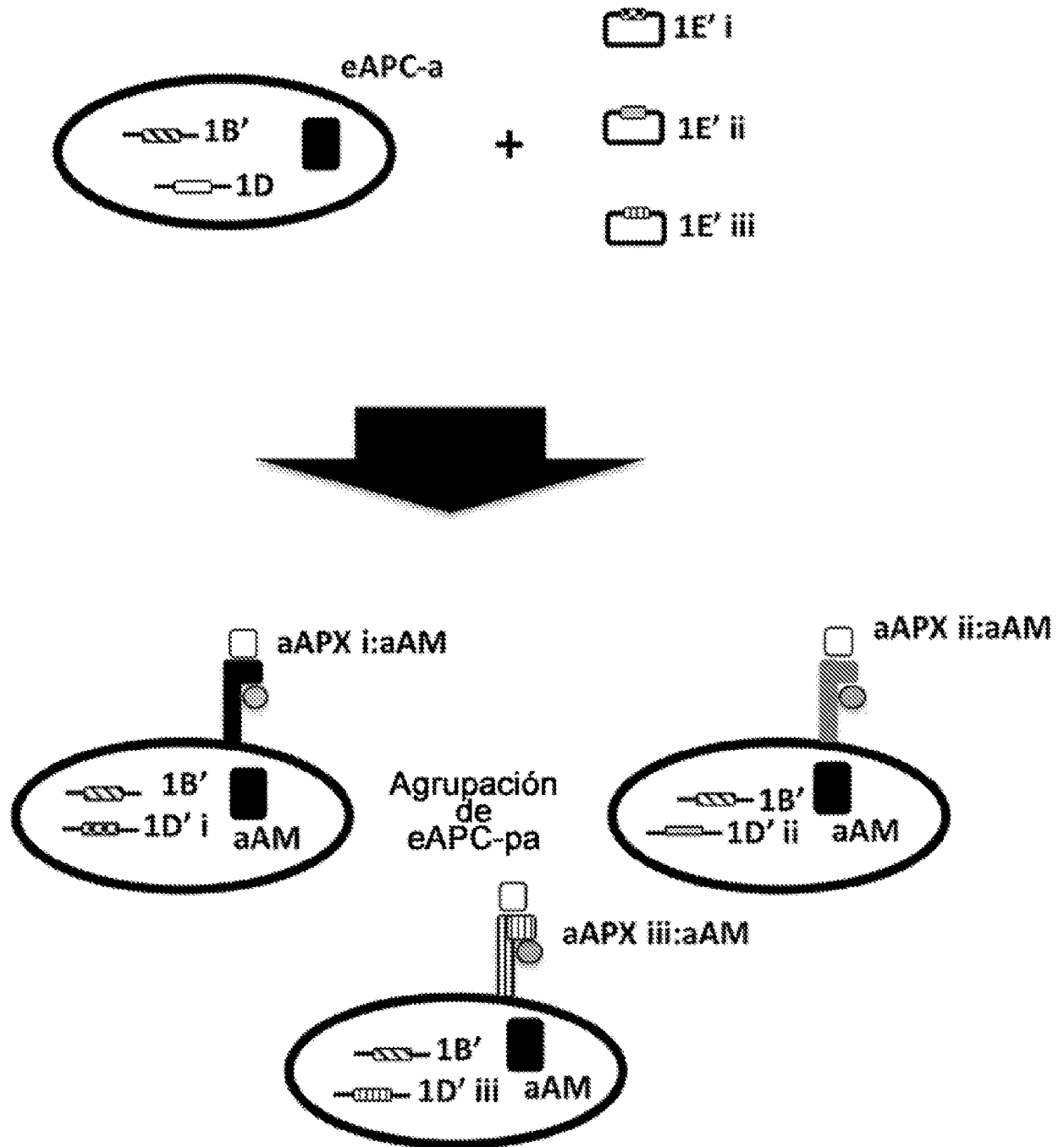


Figura 17

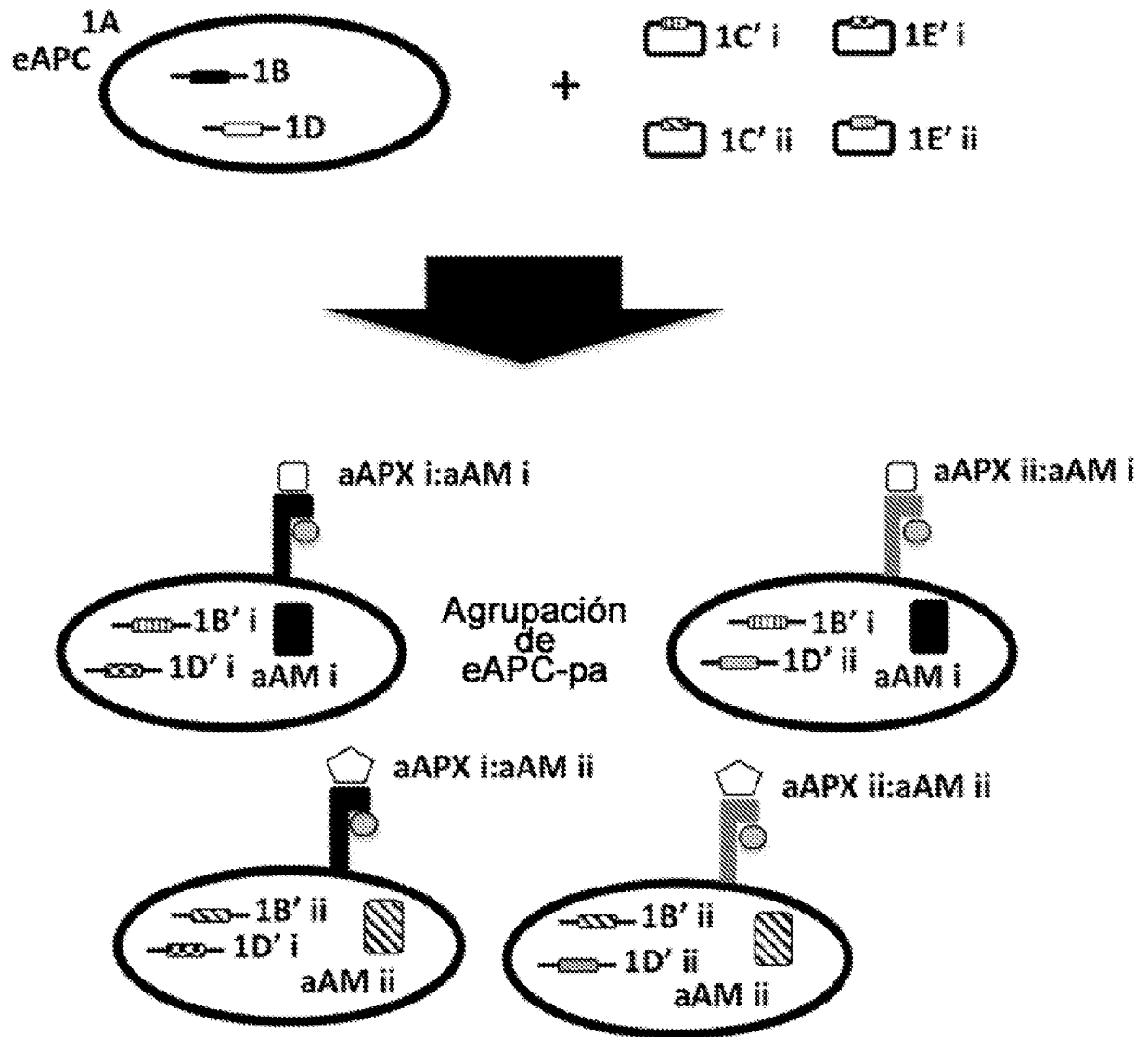


Figura 18

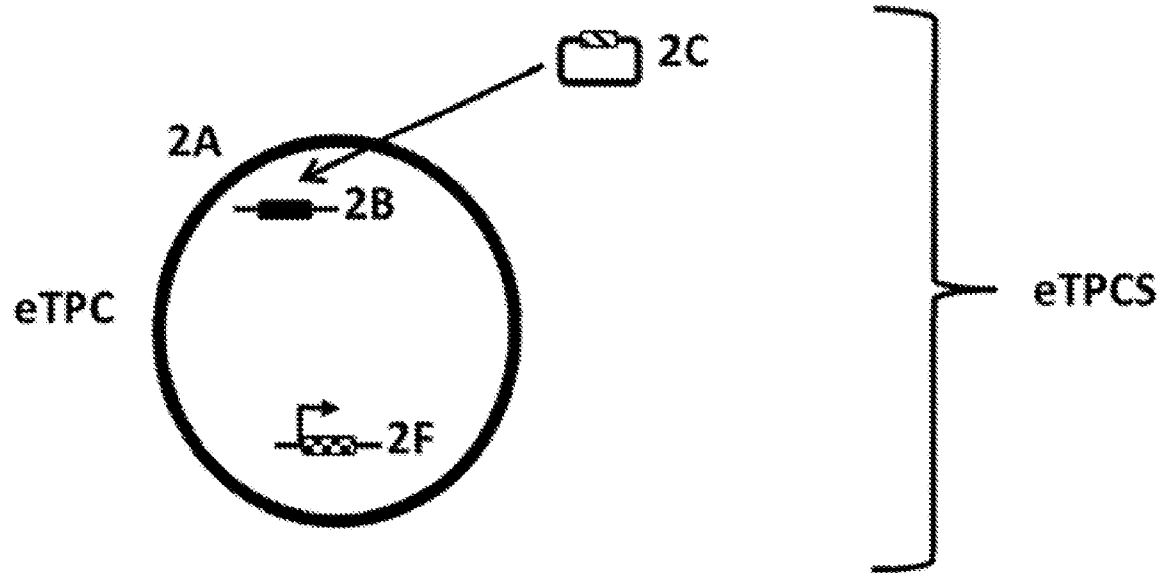


Figura 19

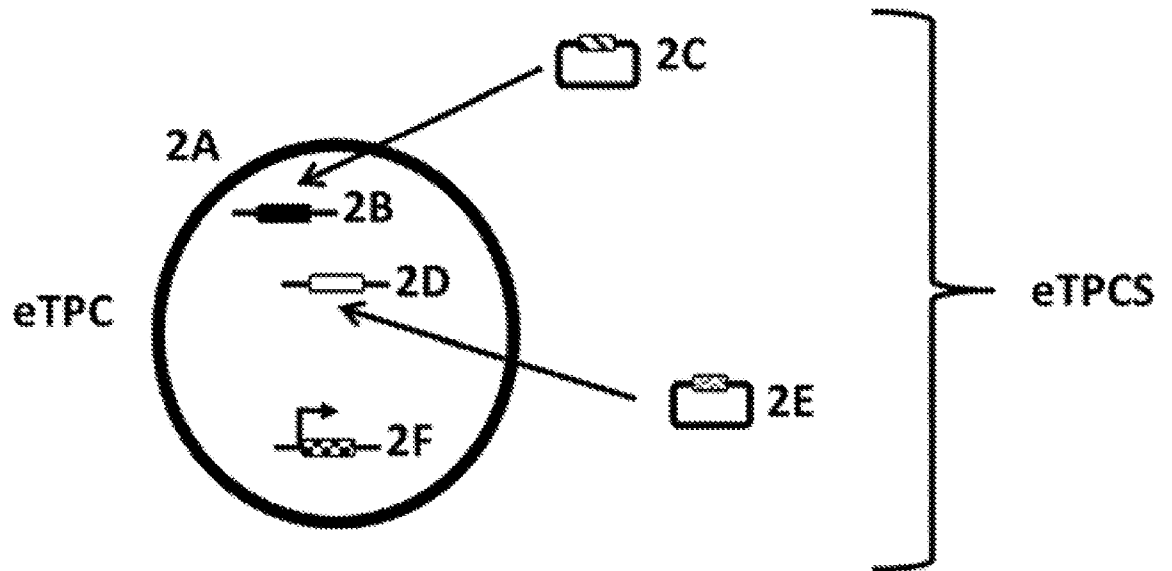


Figura 20

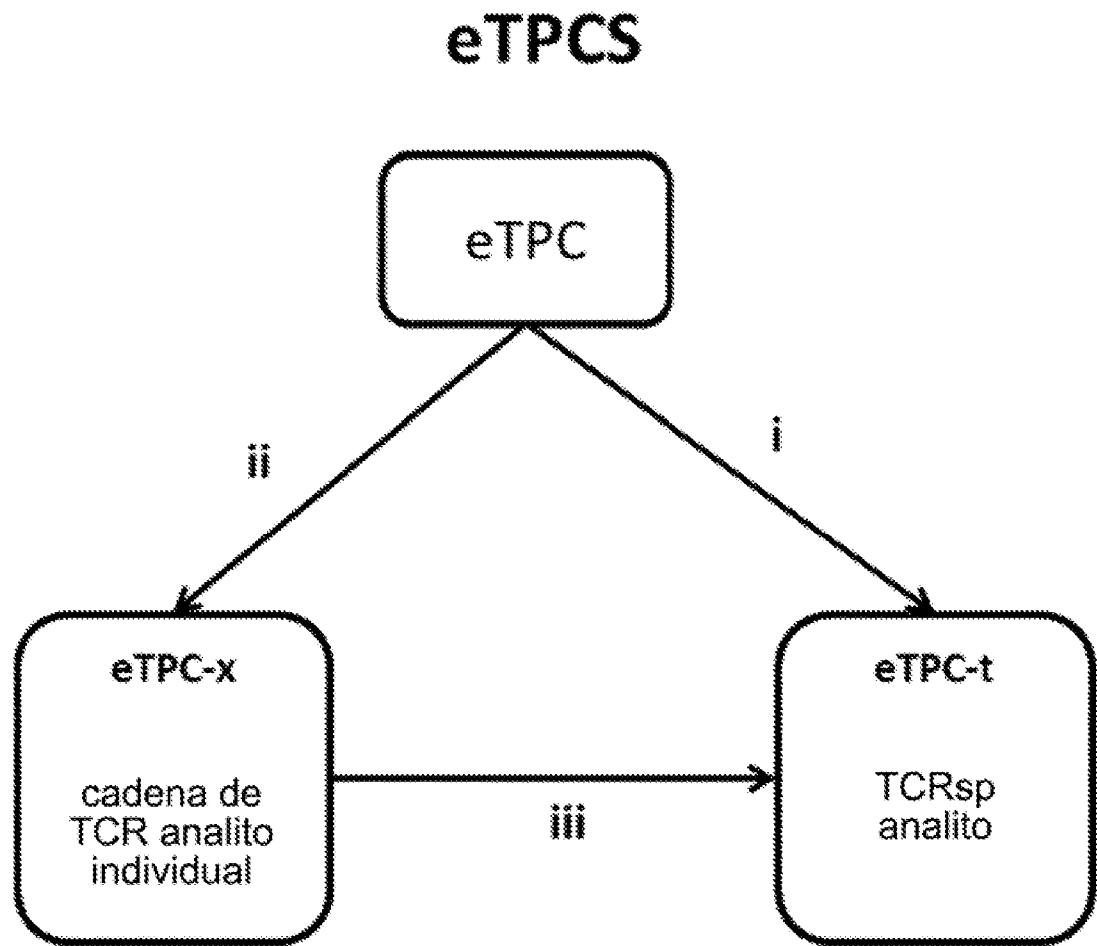


Figura 21

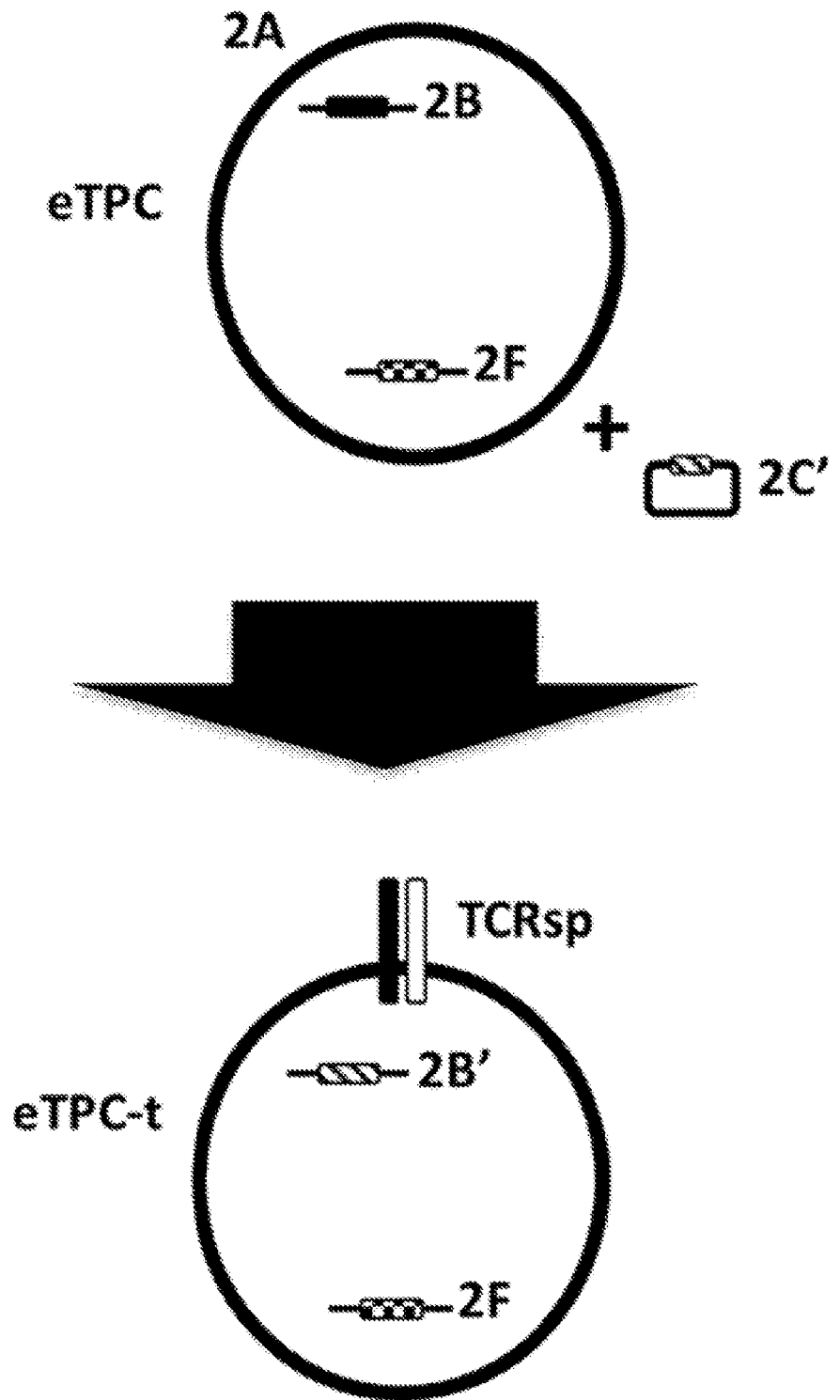


Figura 22

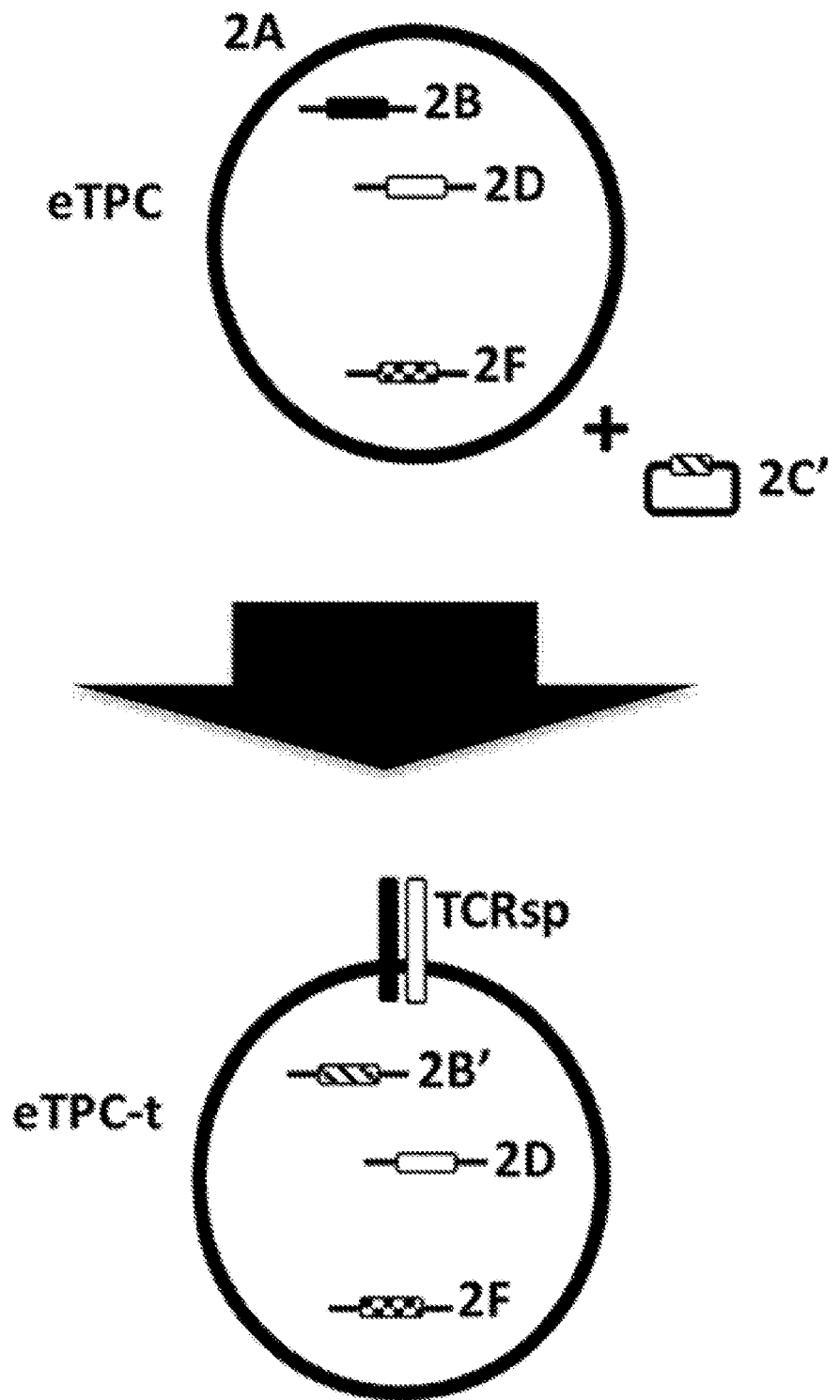


Figura 23

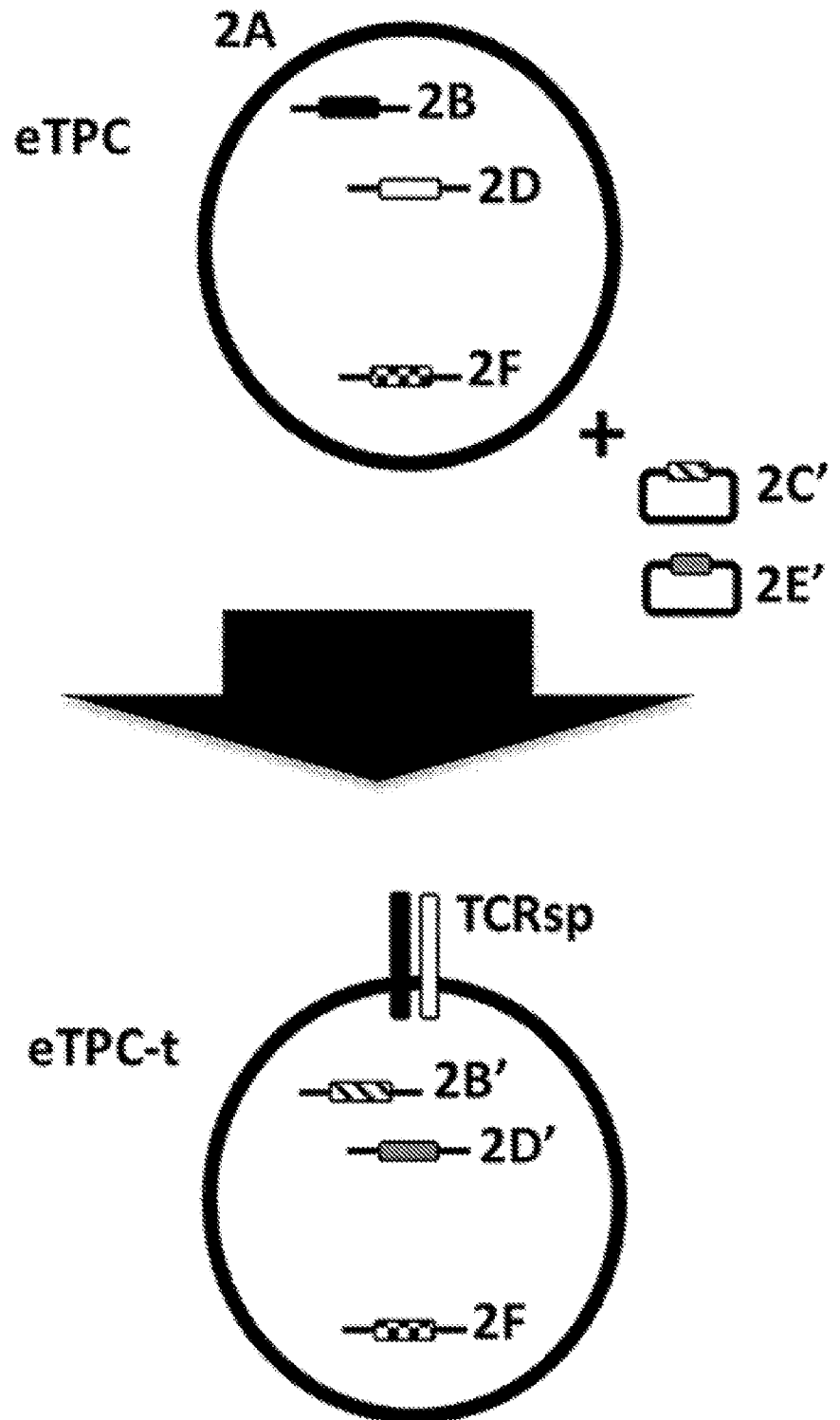


Figura 24

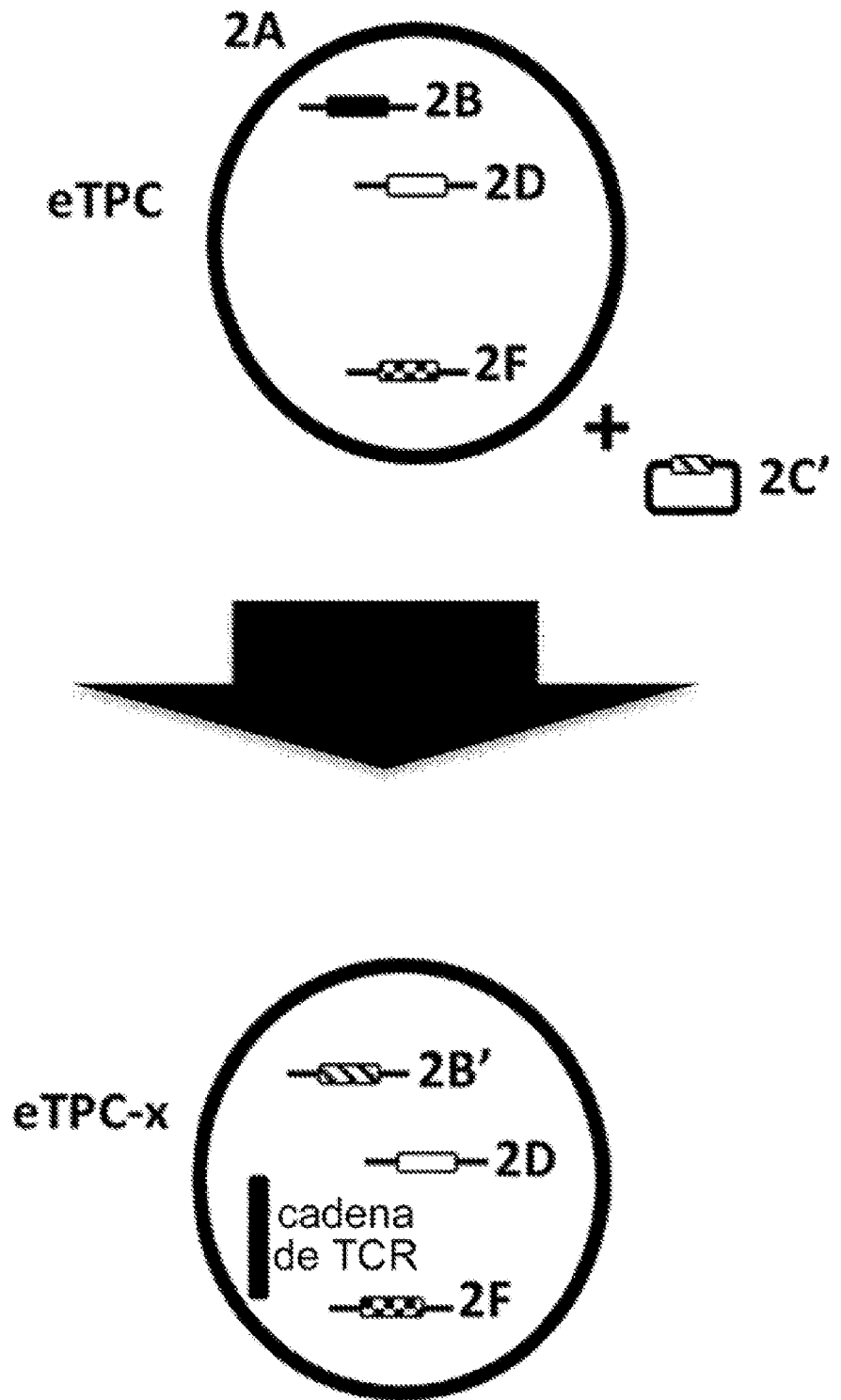


Figura 25

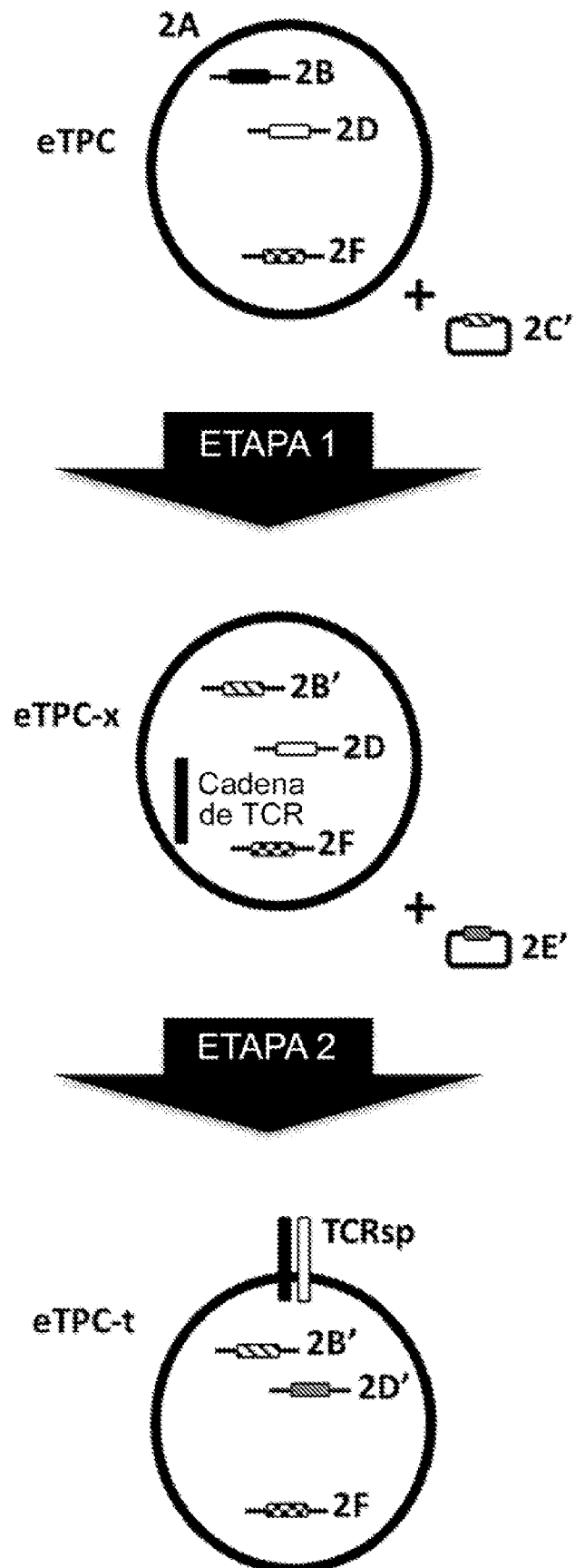


Figura 26

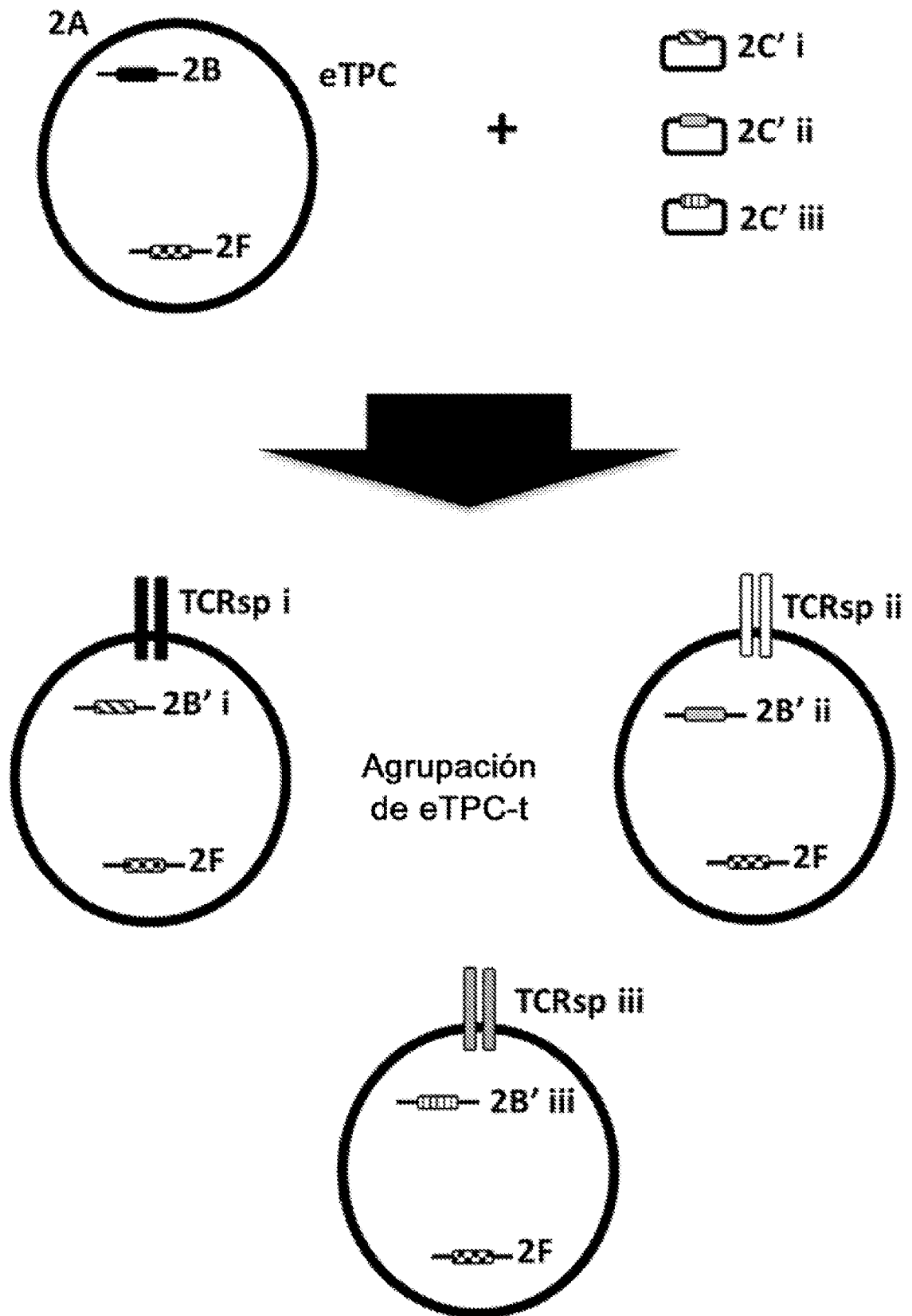


Figura 27

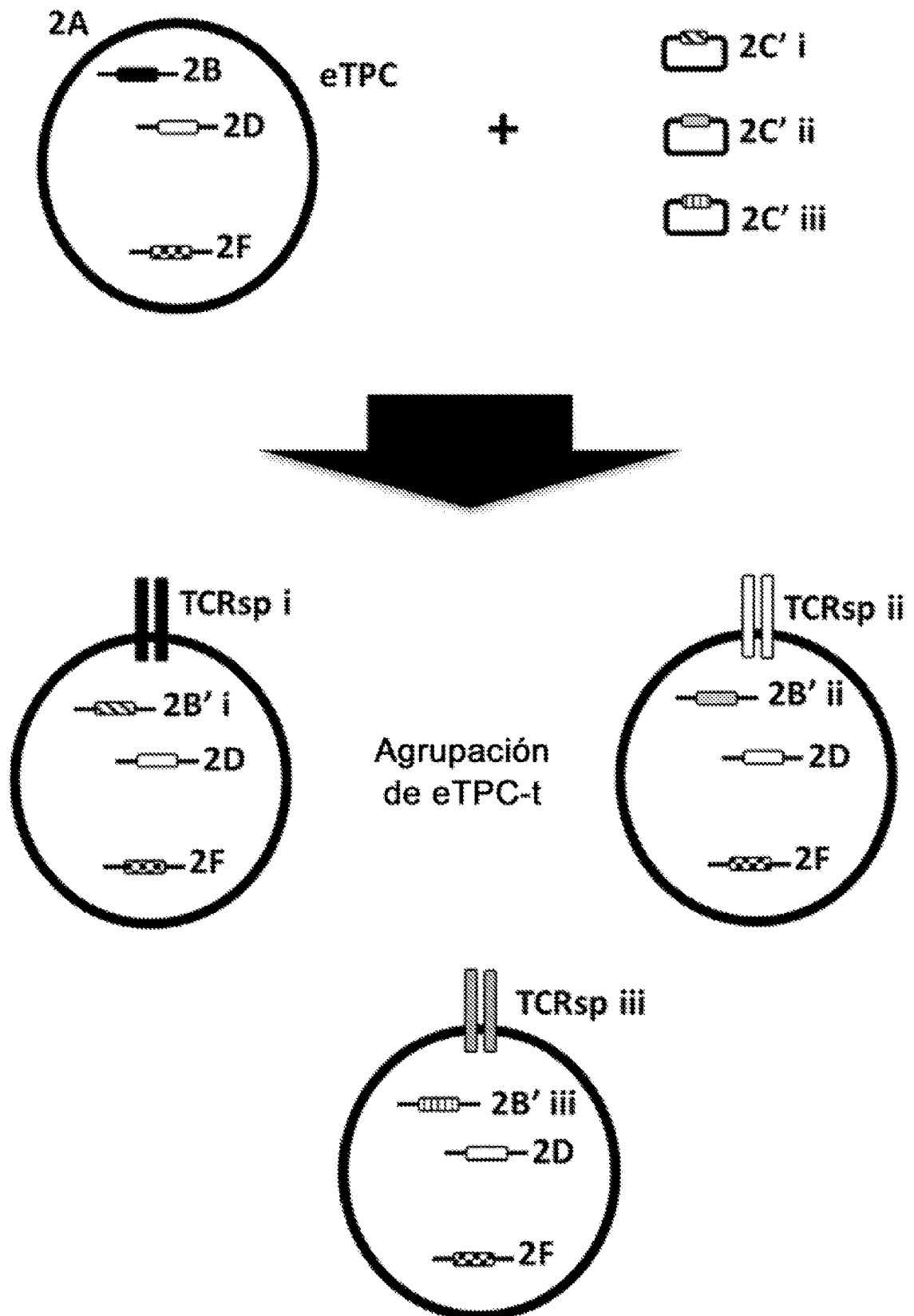


Figura 28

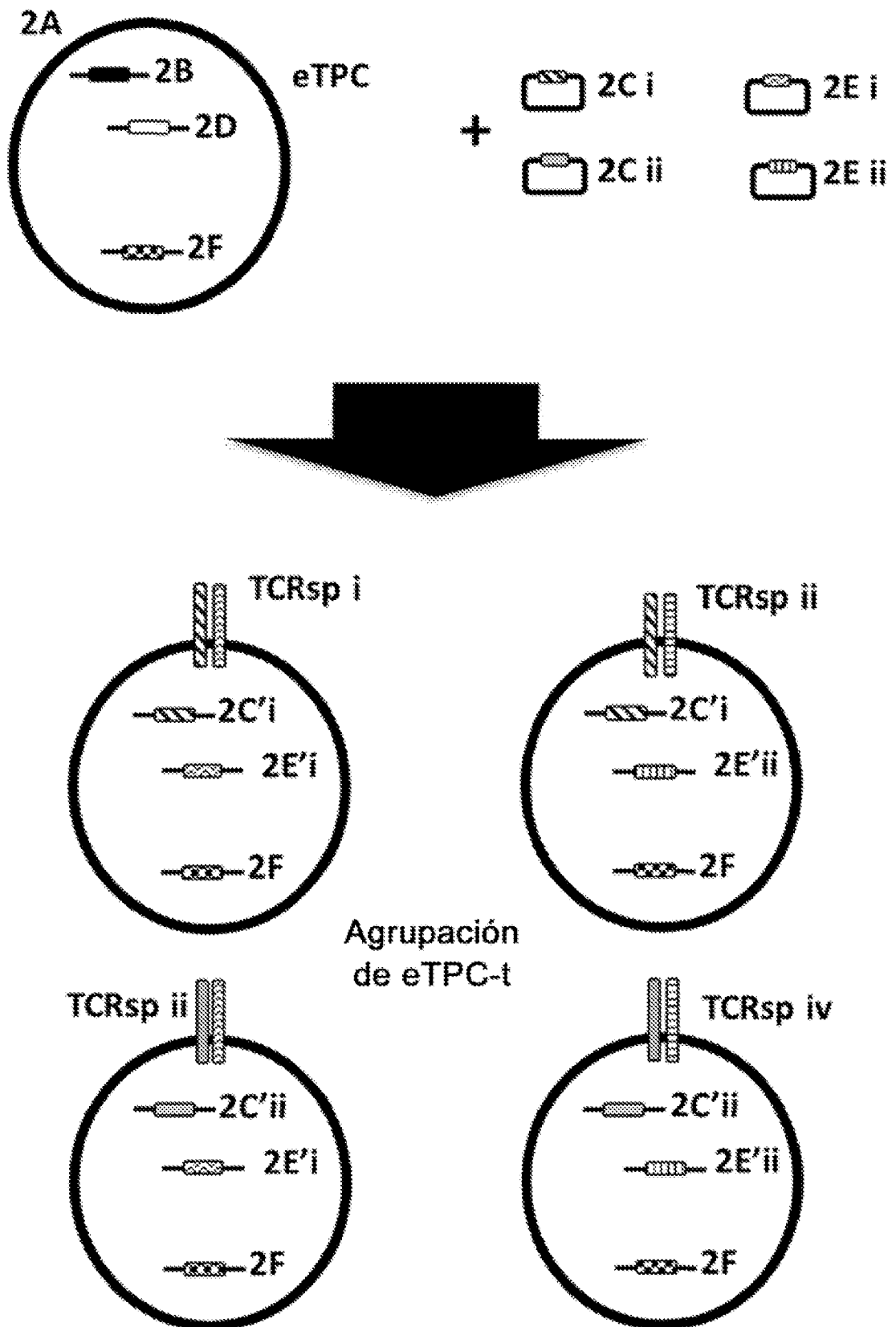


Figura 29

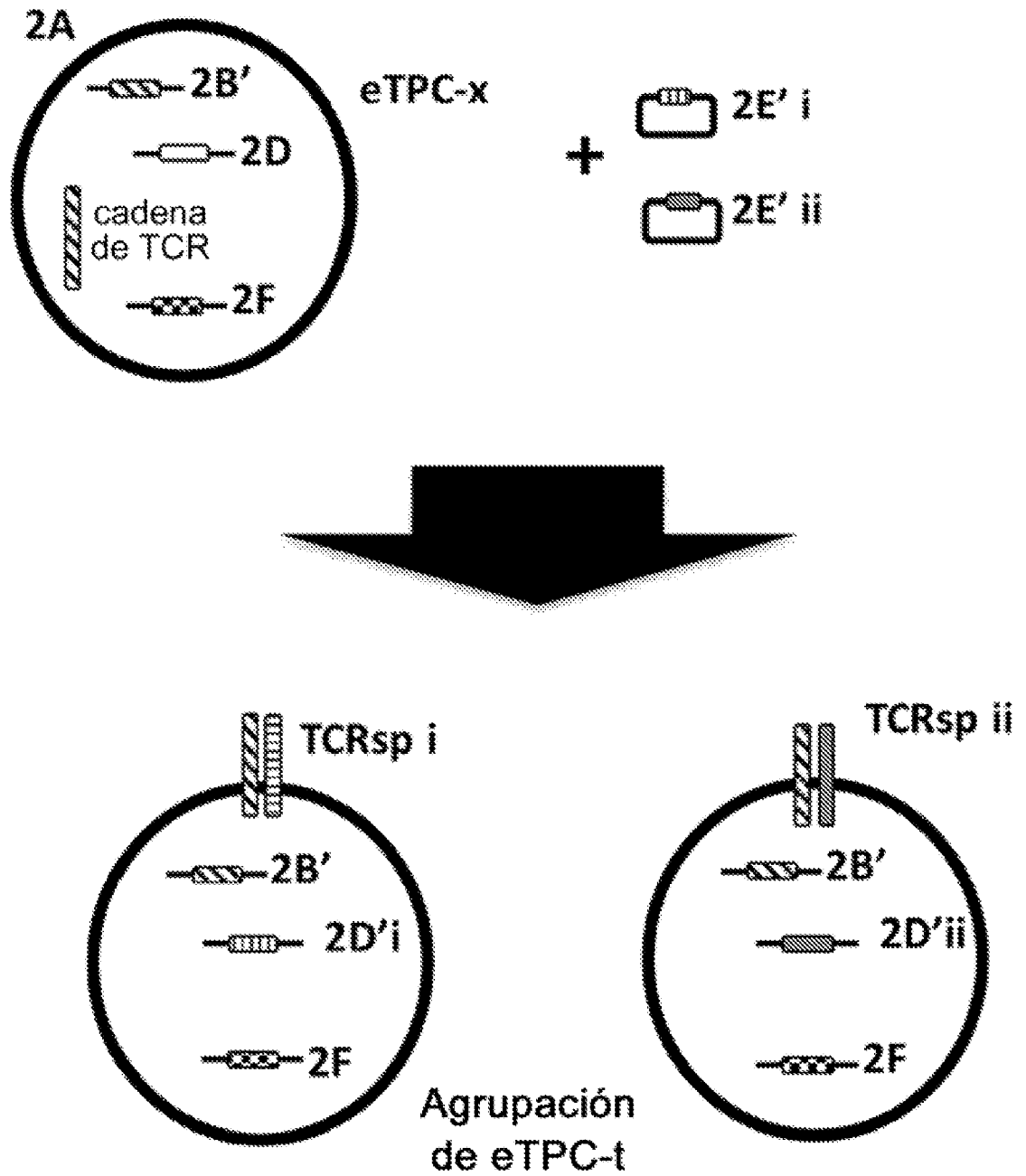


Figura 30

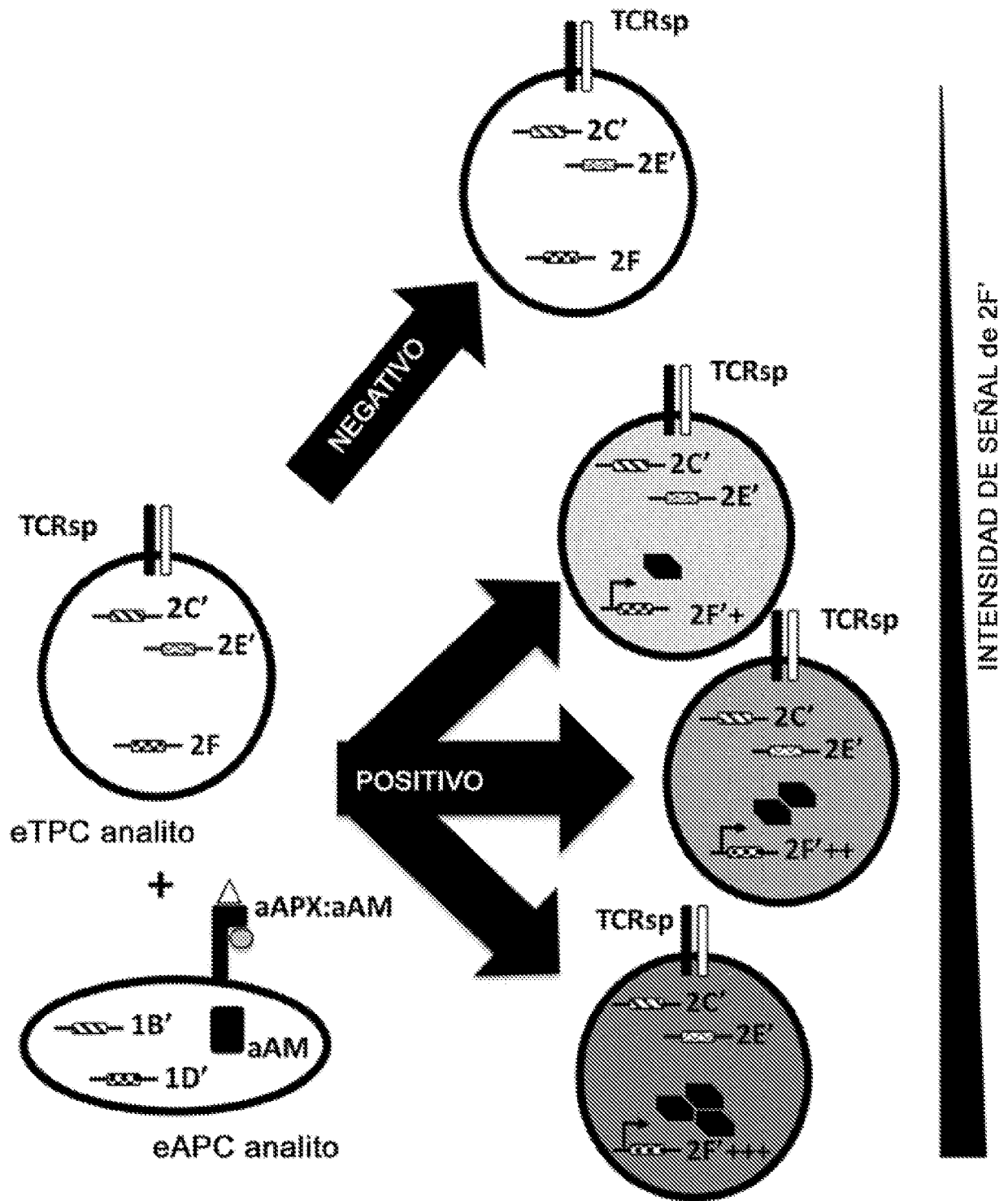


Figura 31

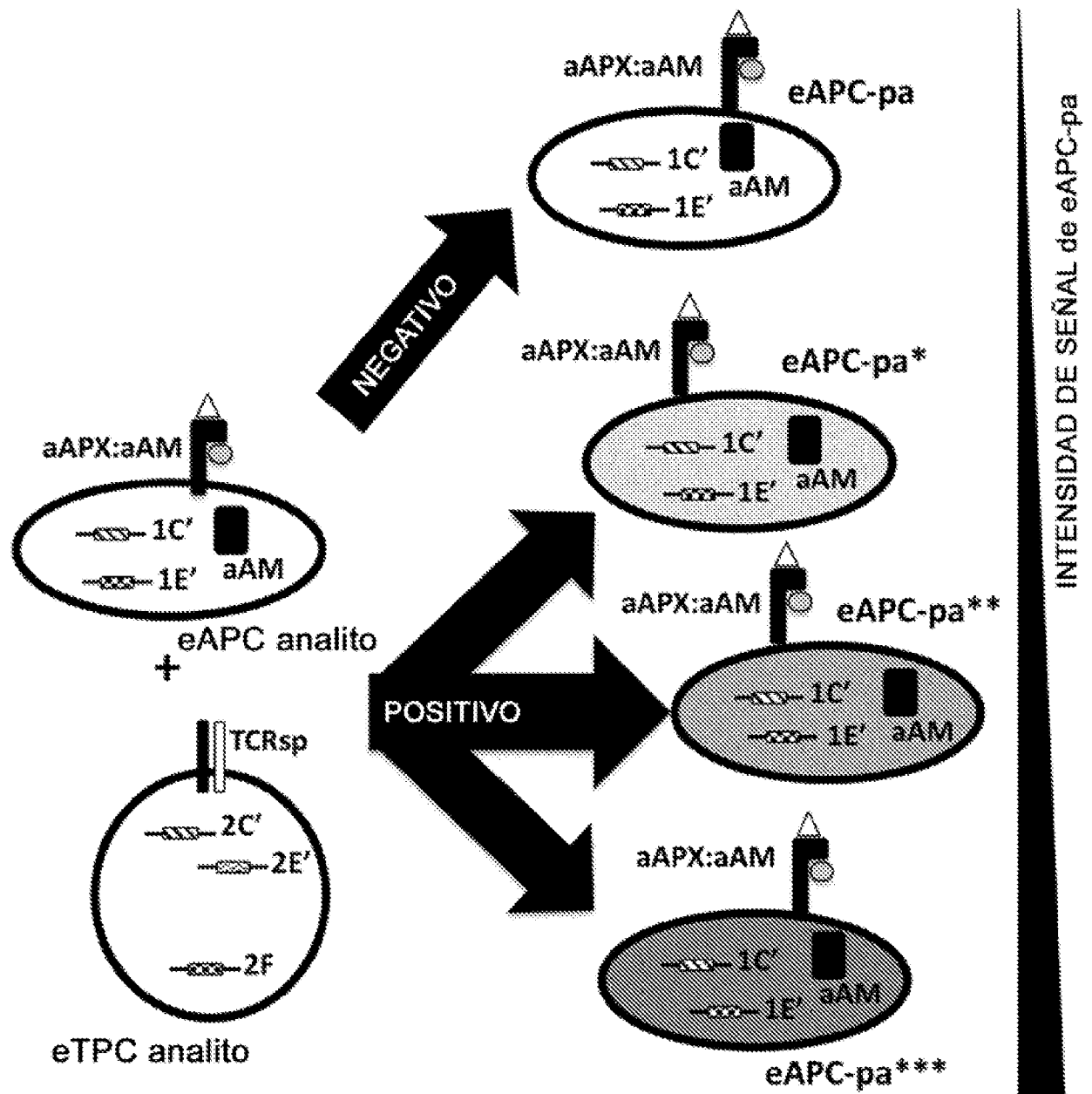


Figura 32

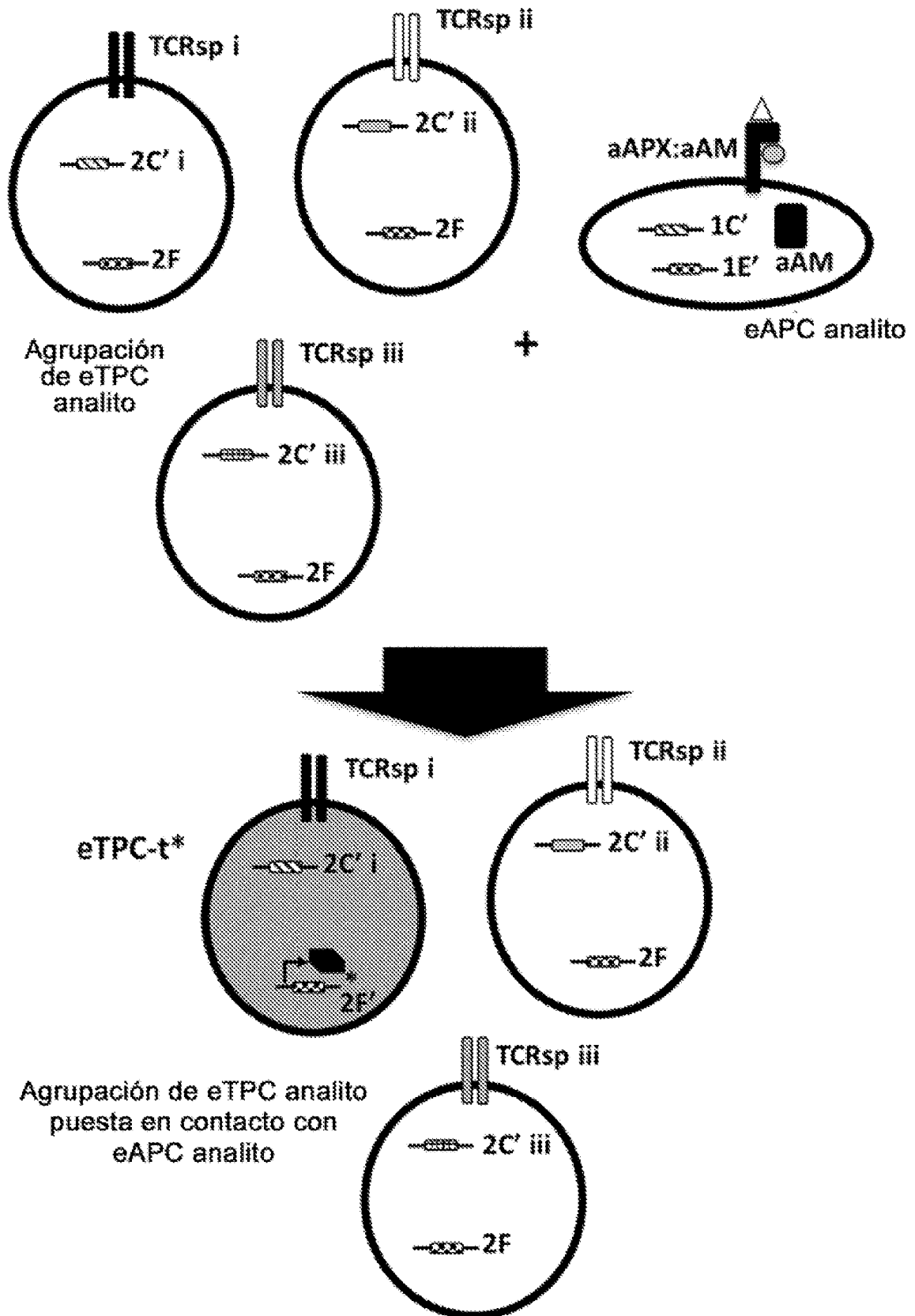


Figura 33

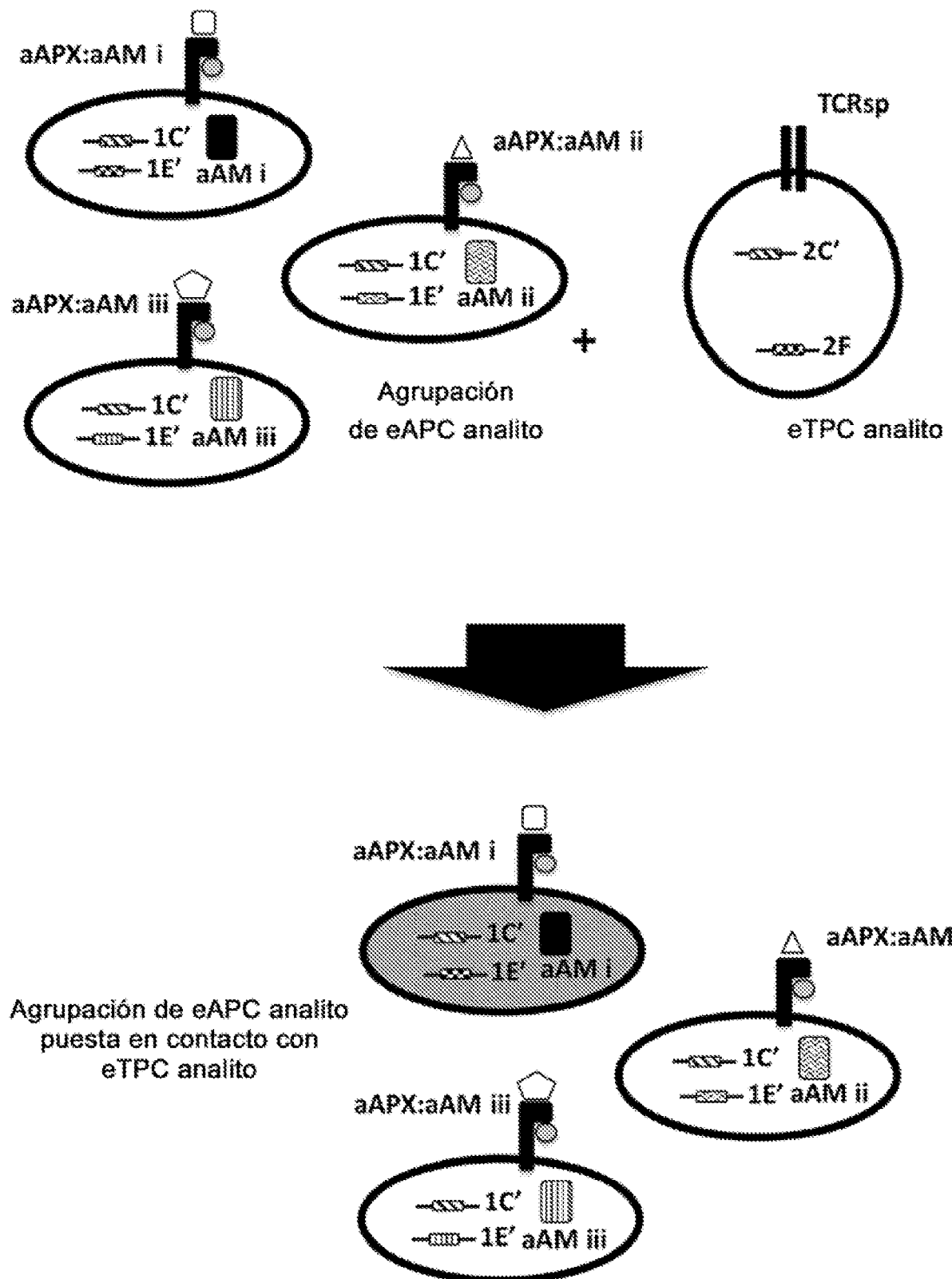


Figura 34

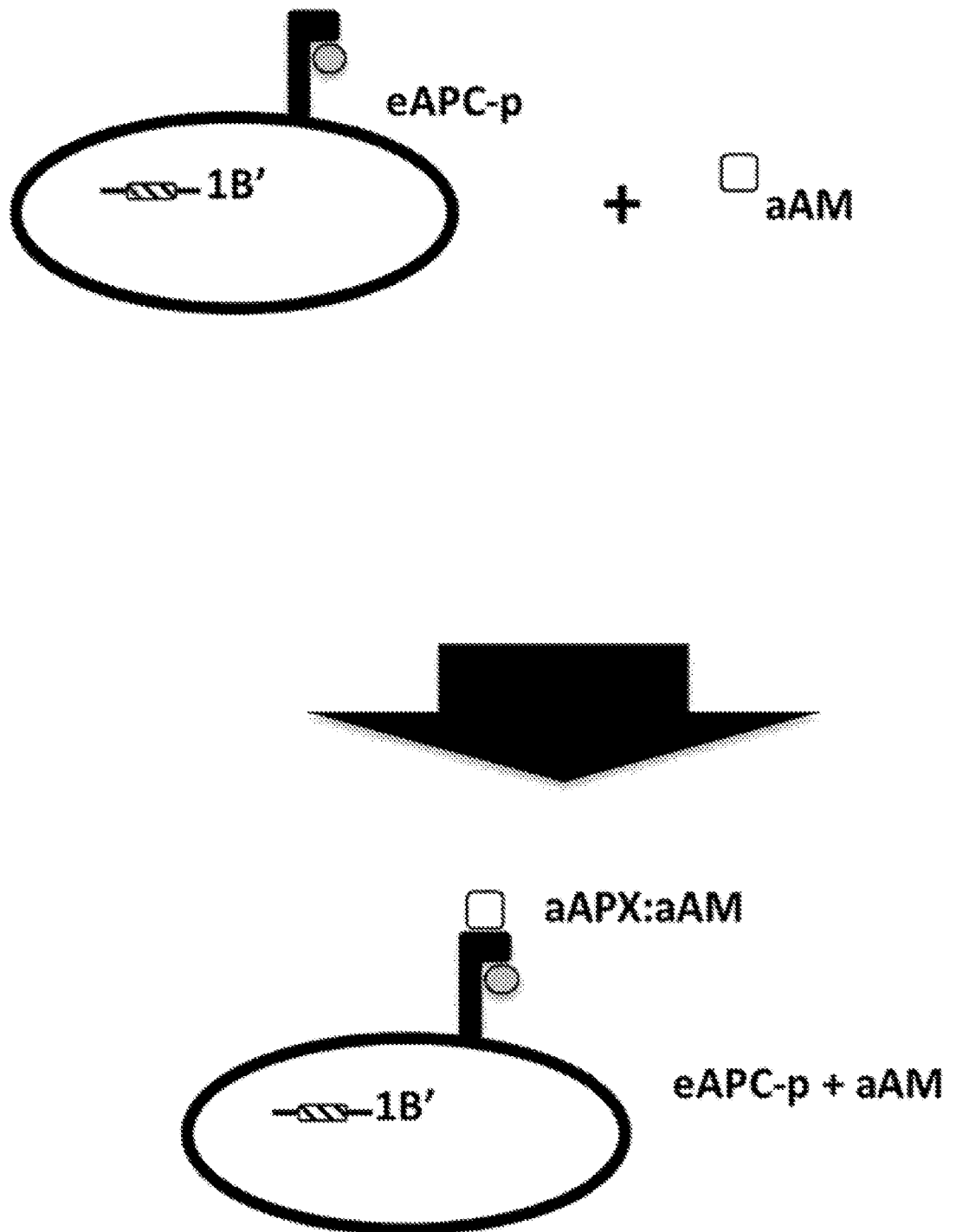


Figura 35

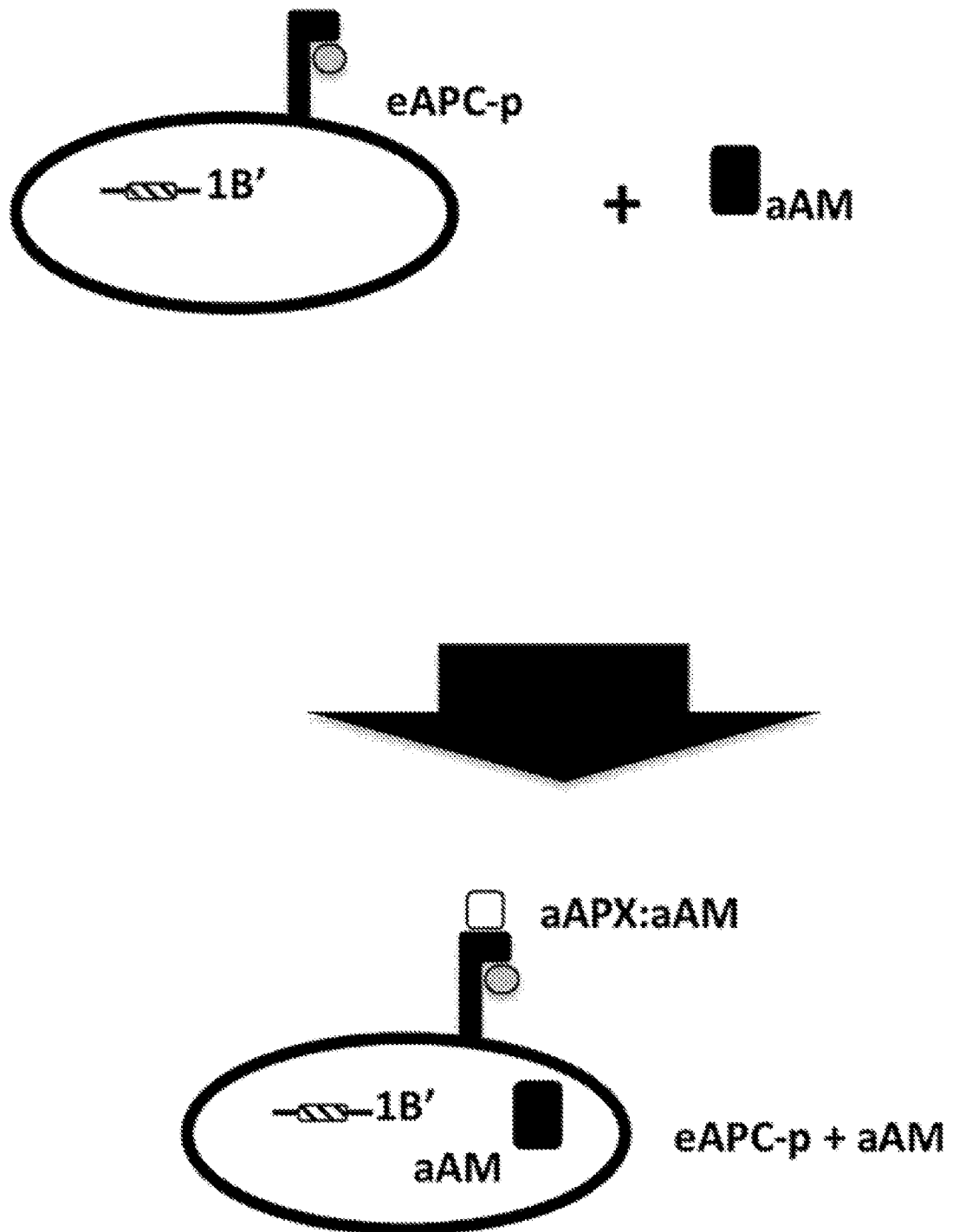


Figura 36

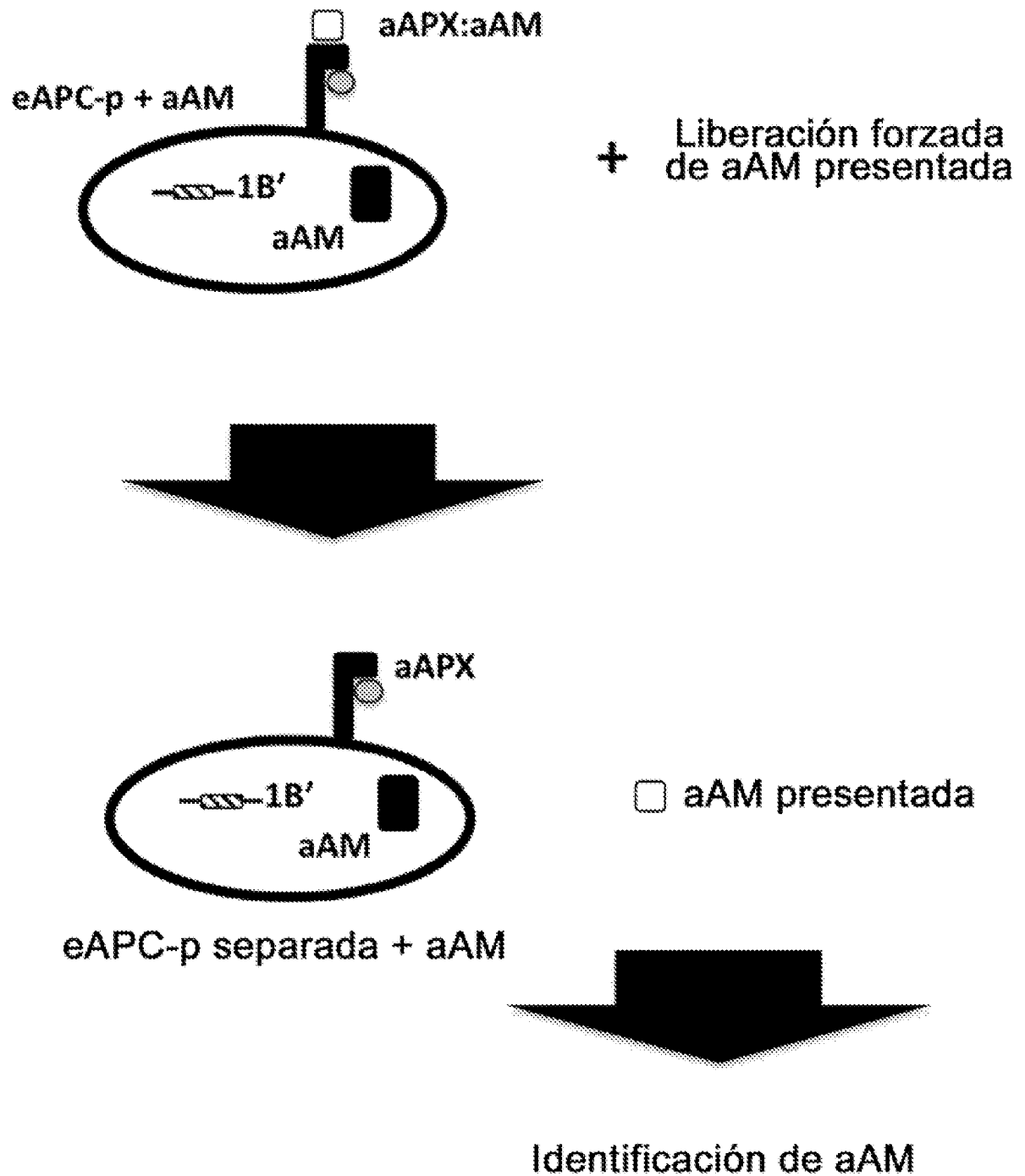


Figura 37

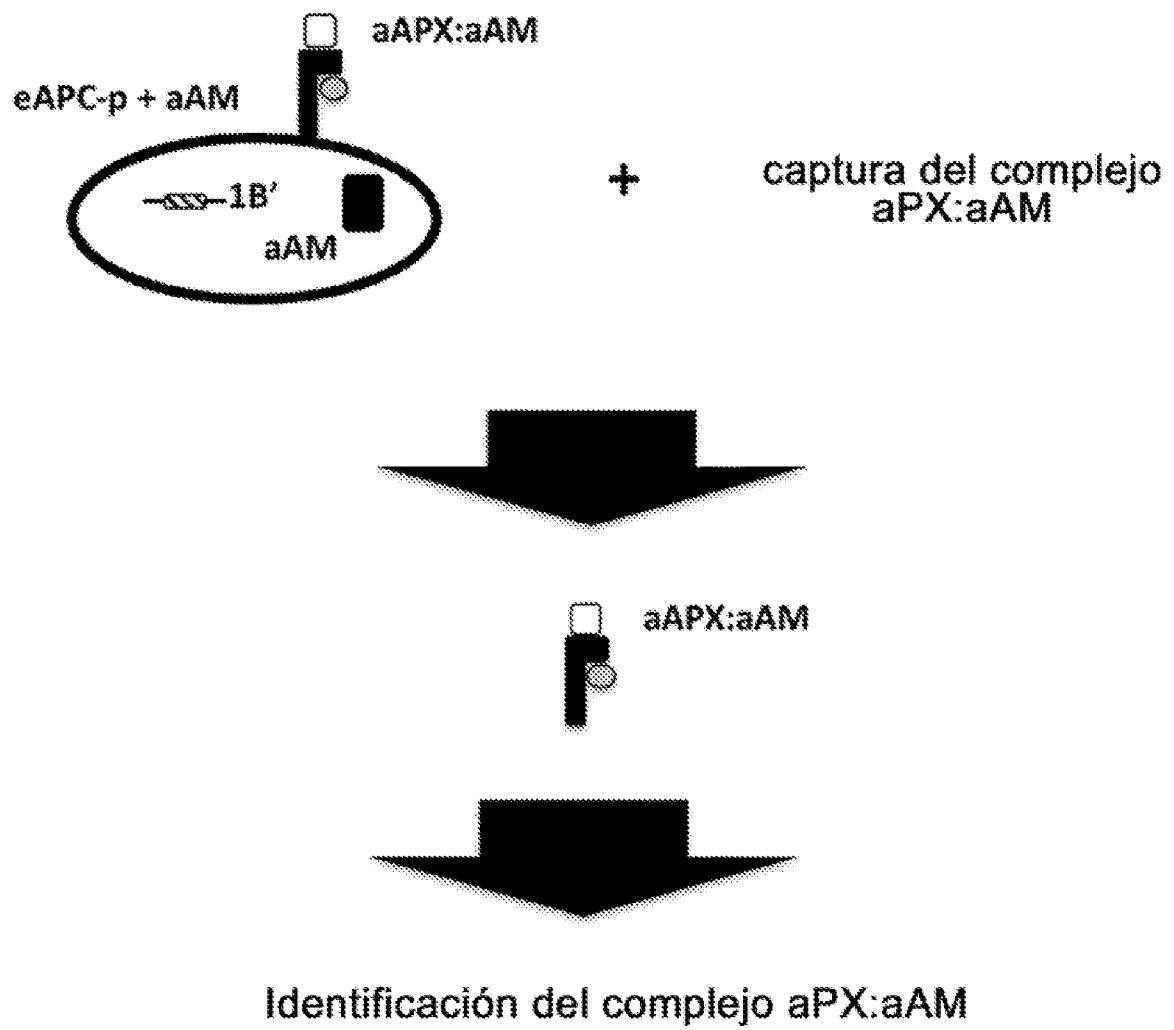


Figura 38

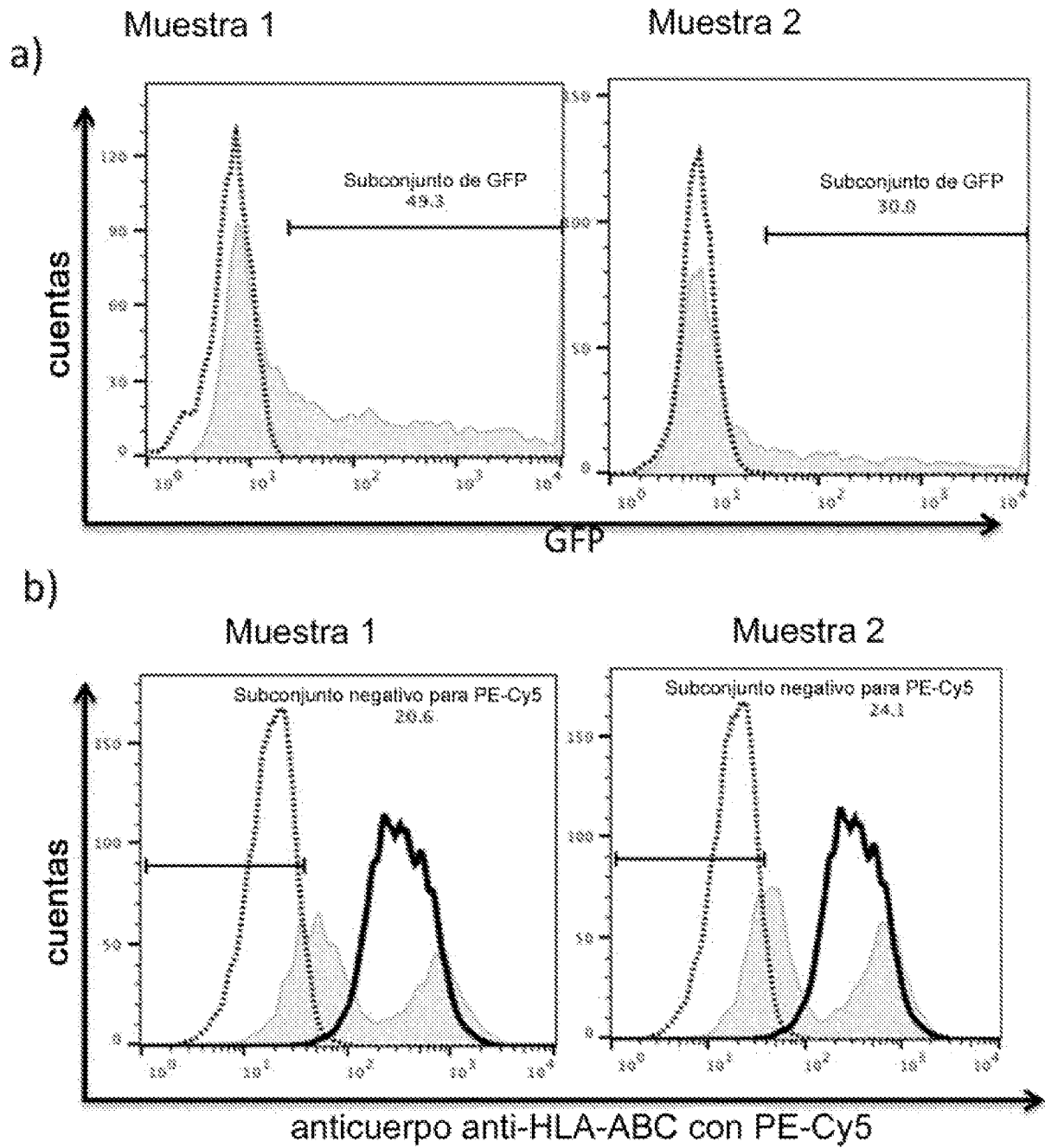


Figura 39

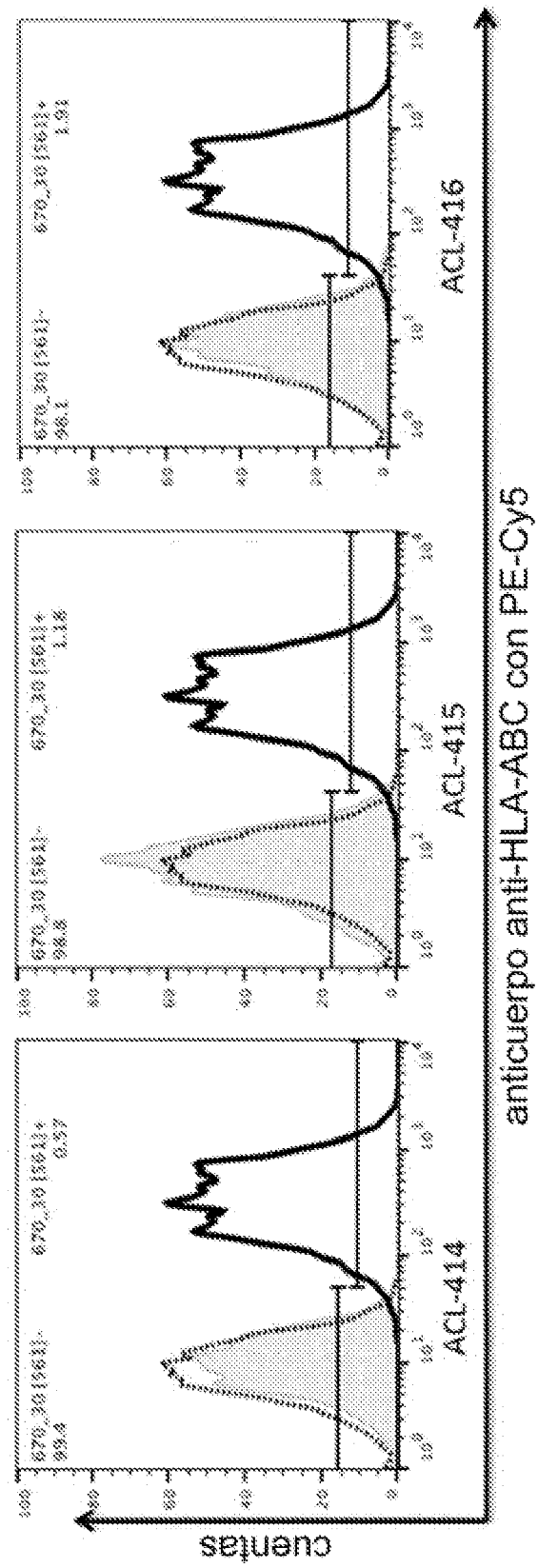


Figura 40

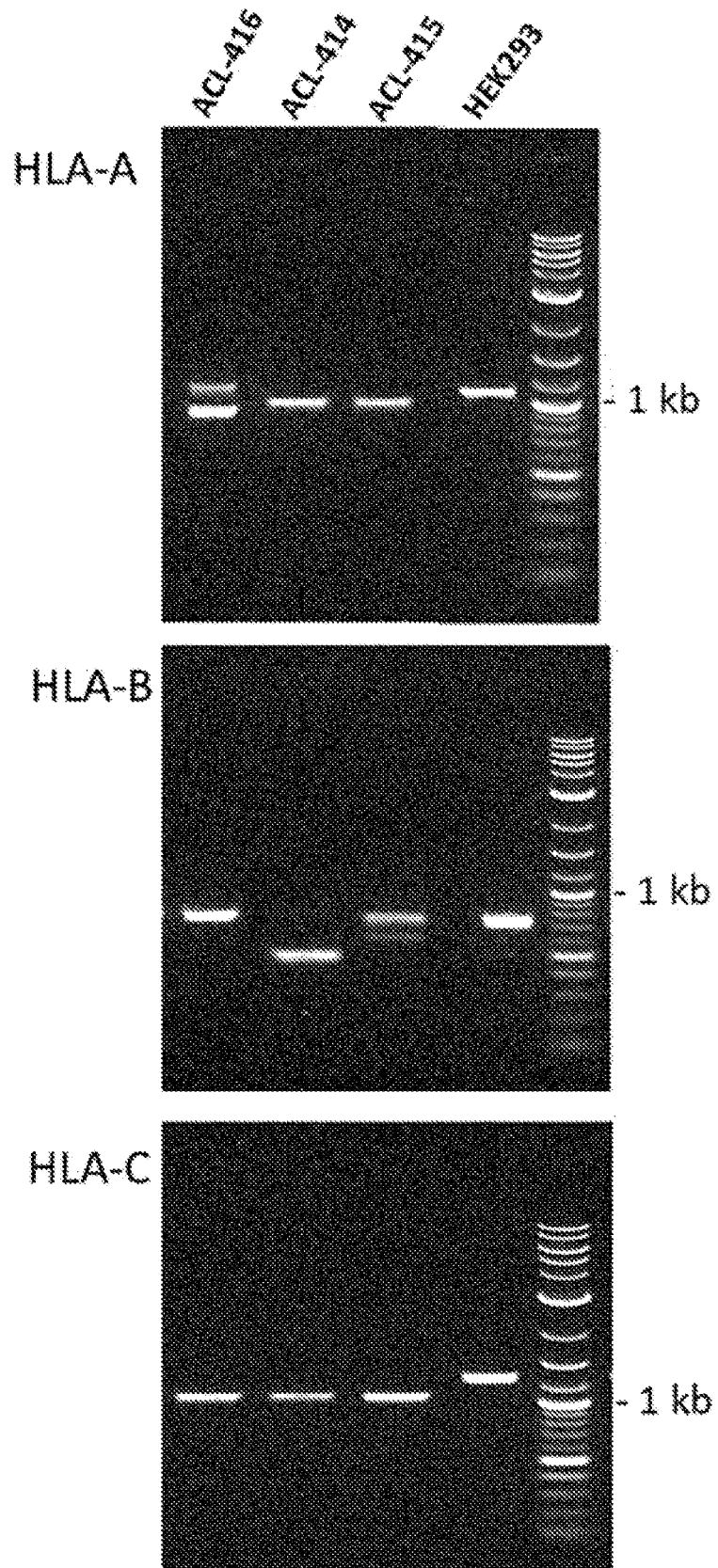


Figura 41

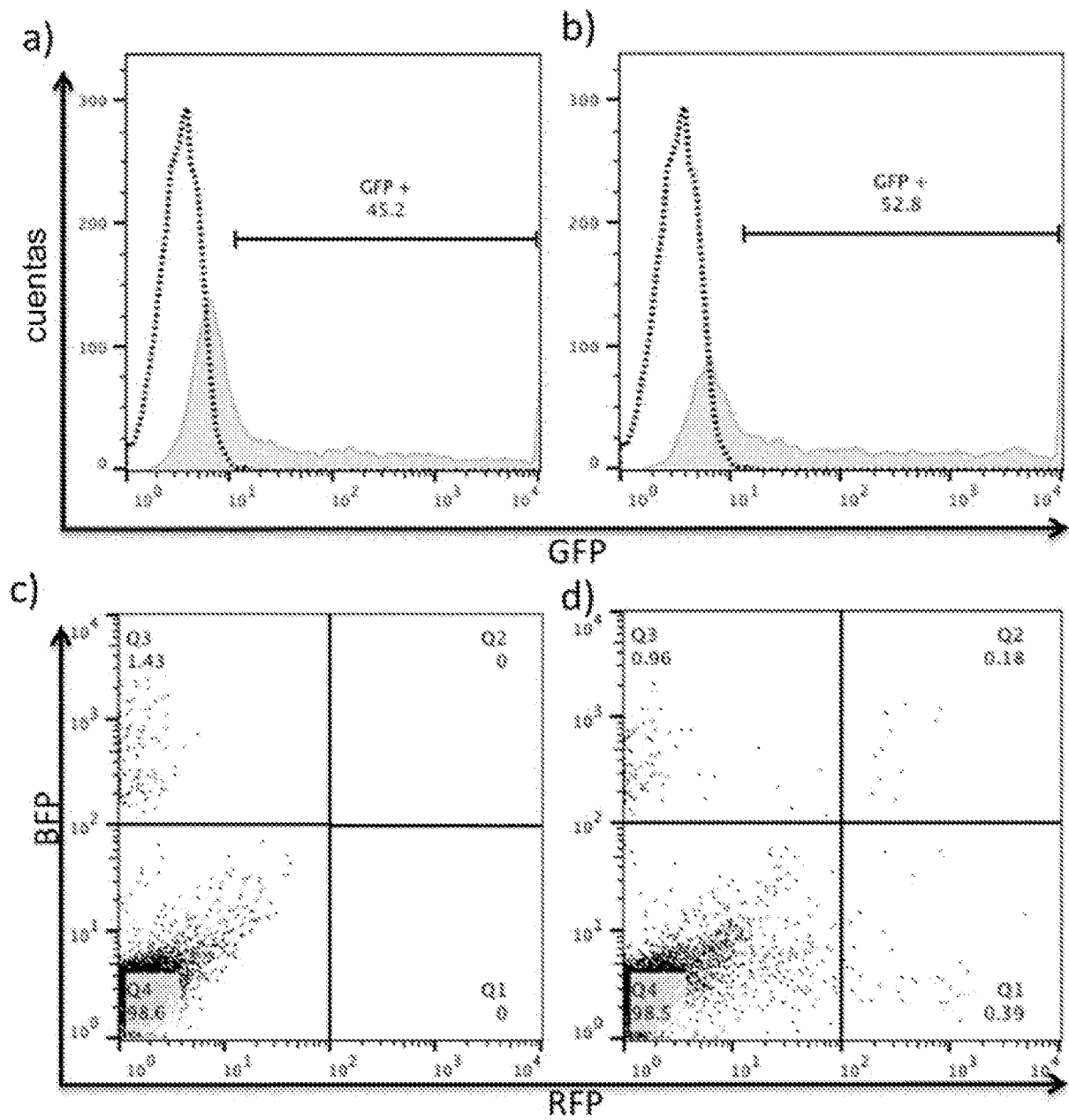


Figura 42

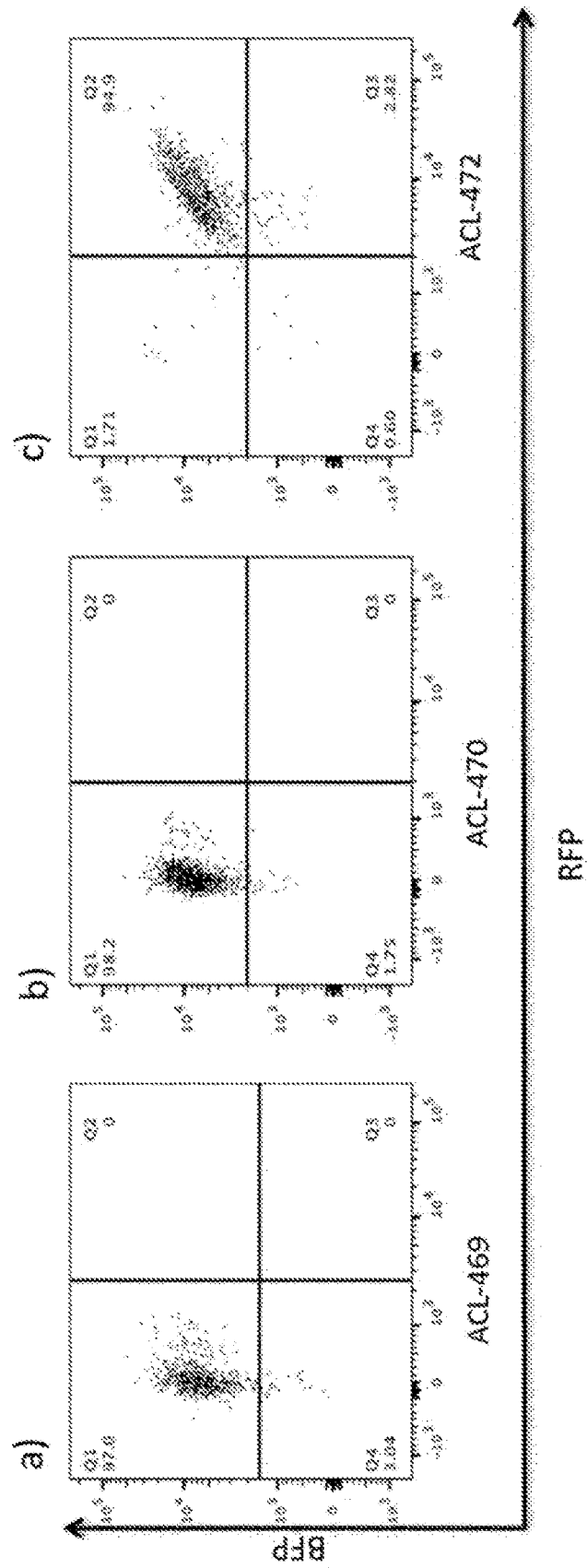


Figura 43

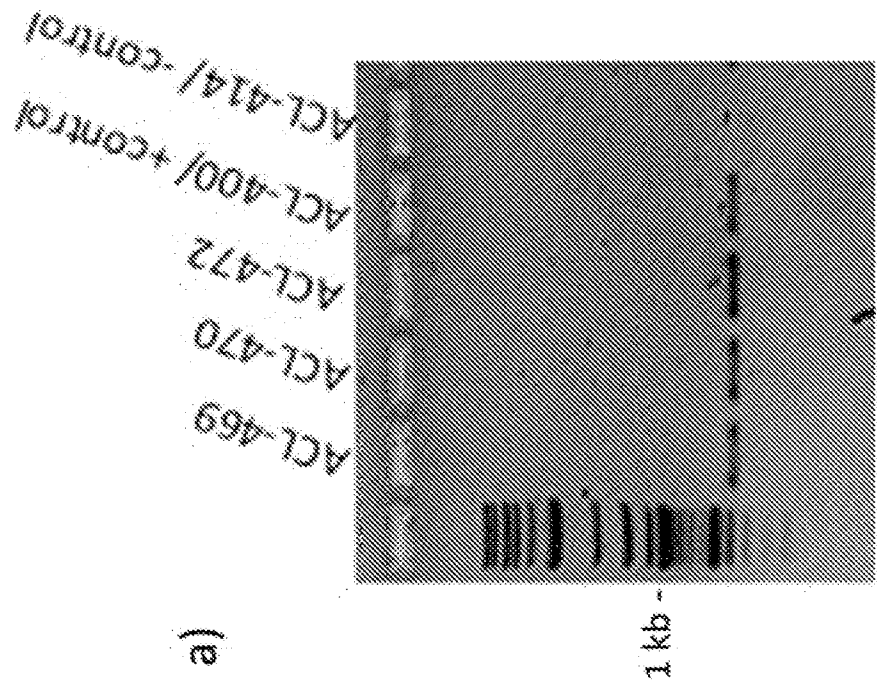
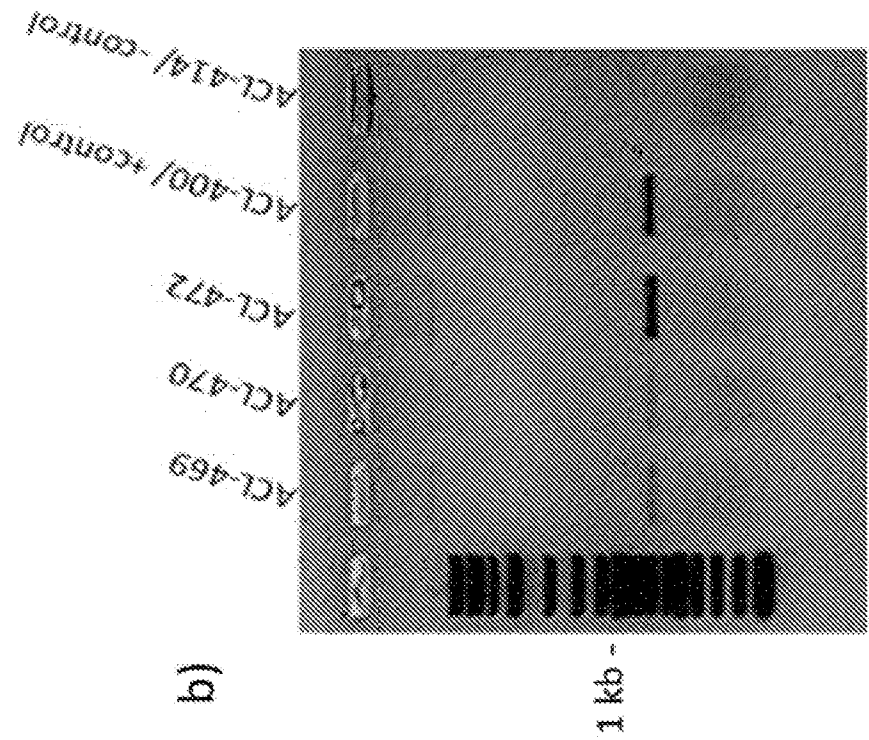


Figura 44

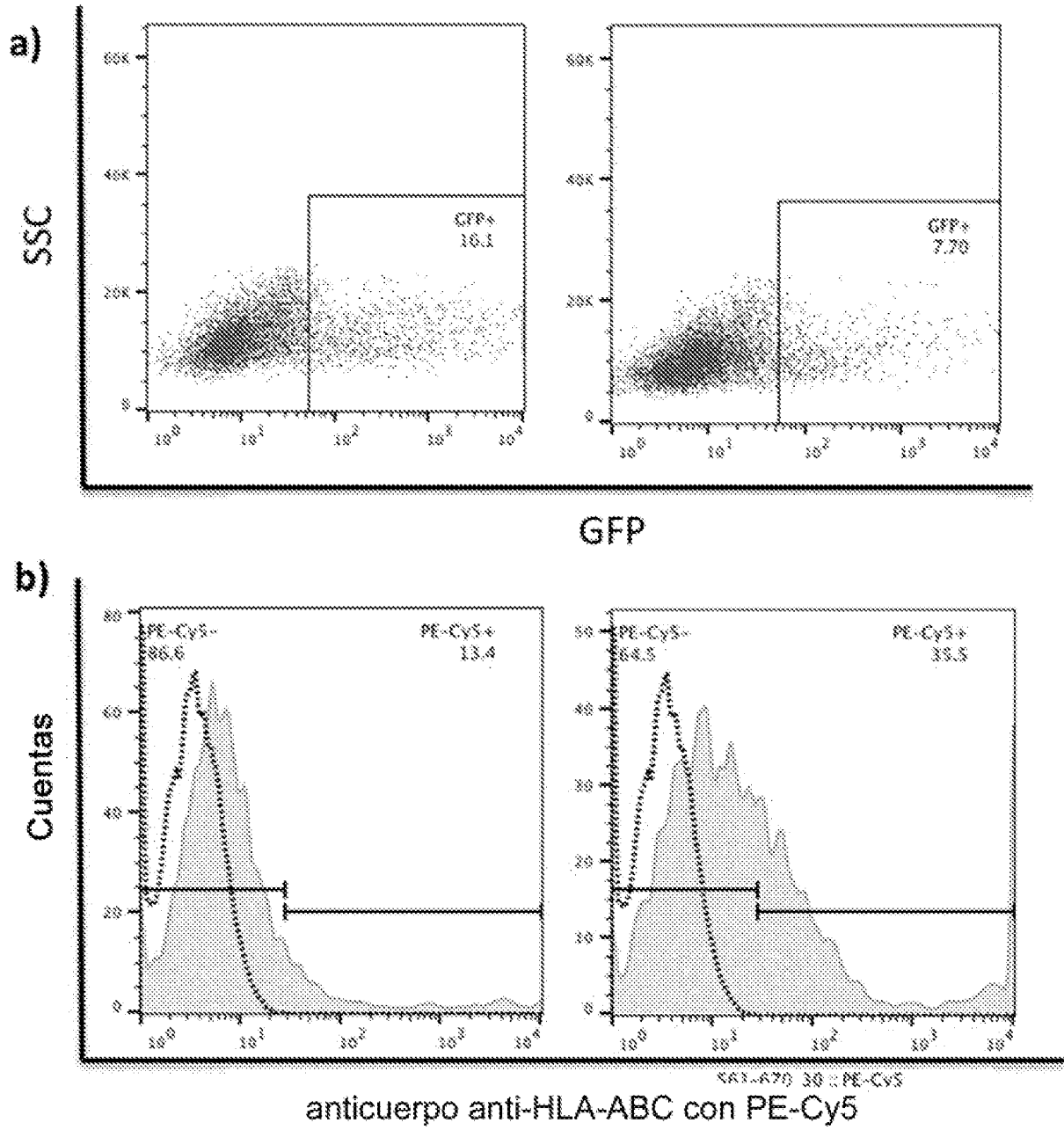
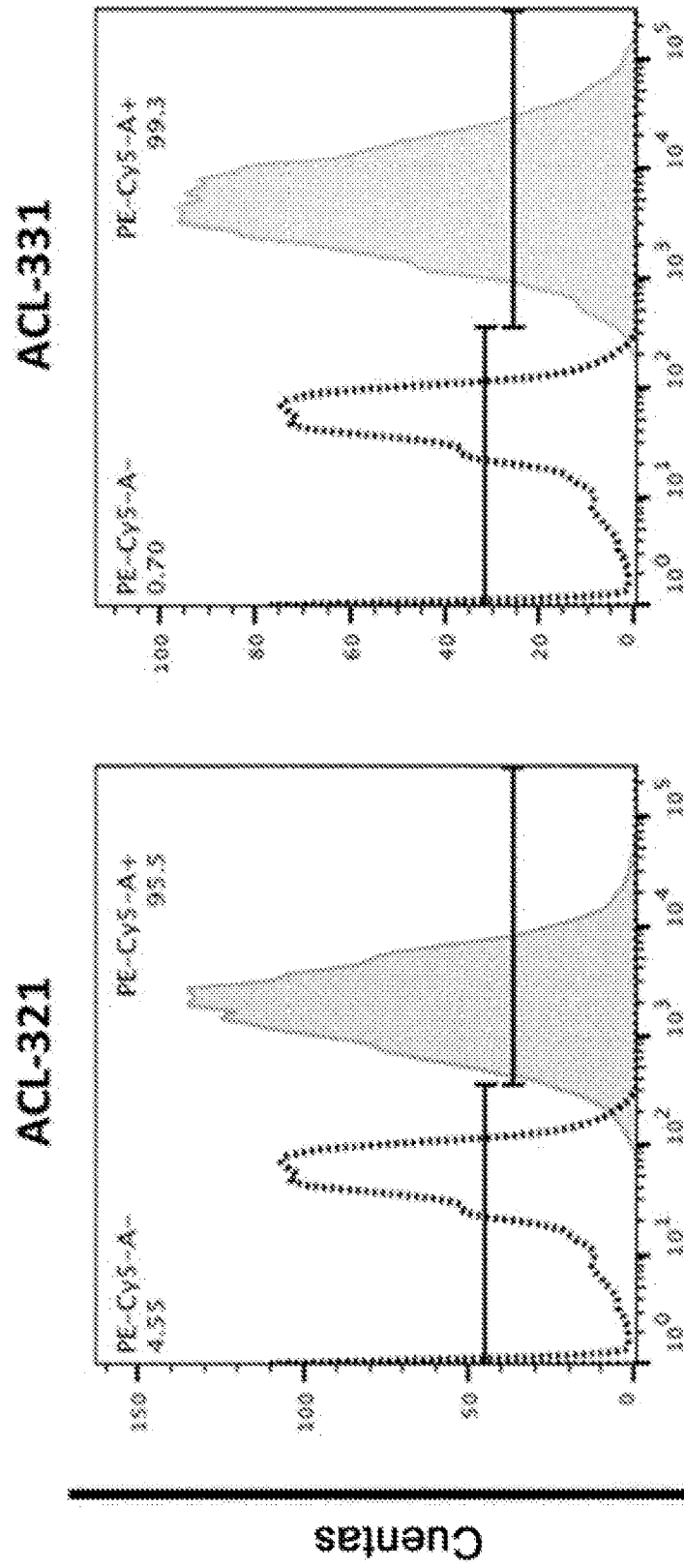


Figura 45



anticuerpo anti-HLA-ABC con PE-Cy5

Figura 46

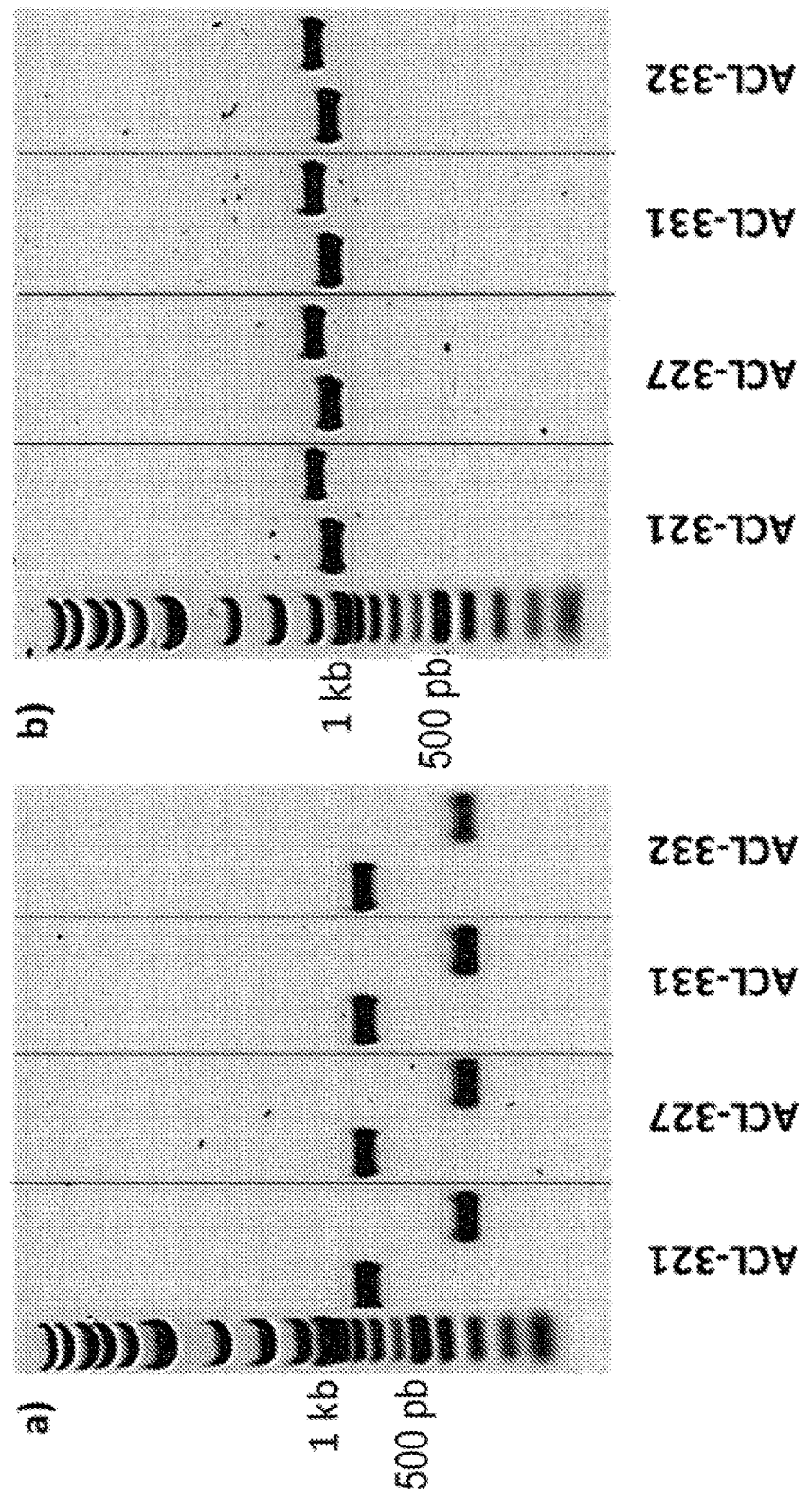


Figura 47

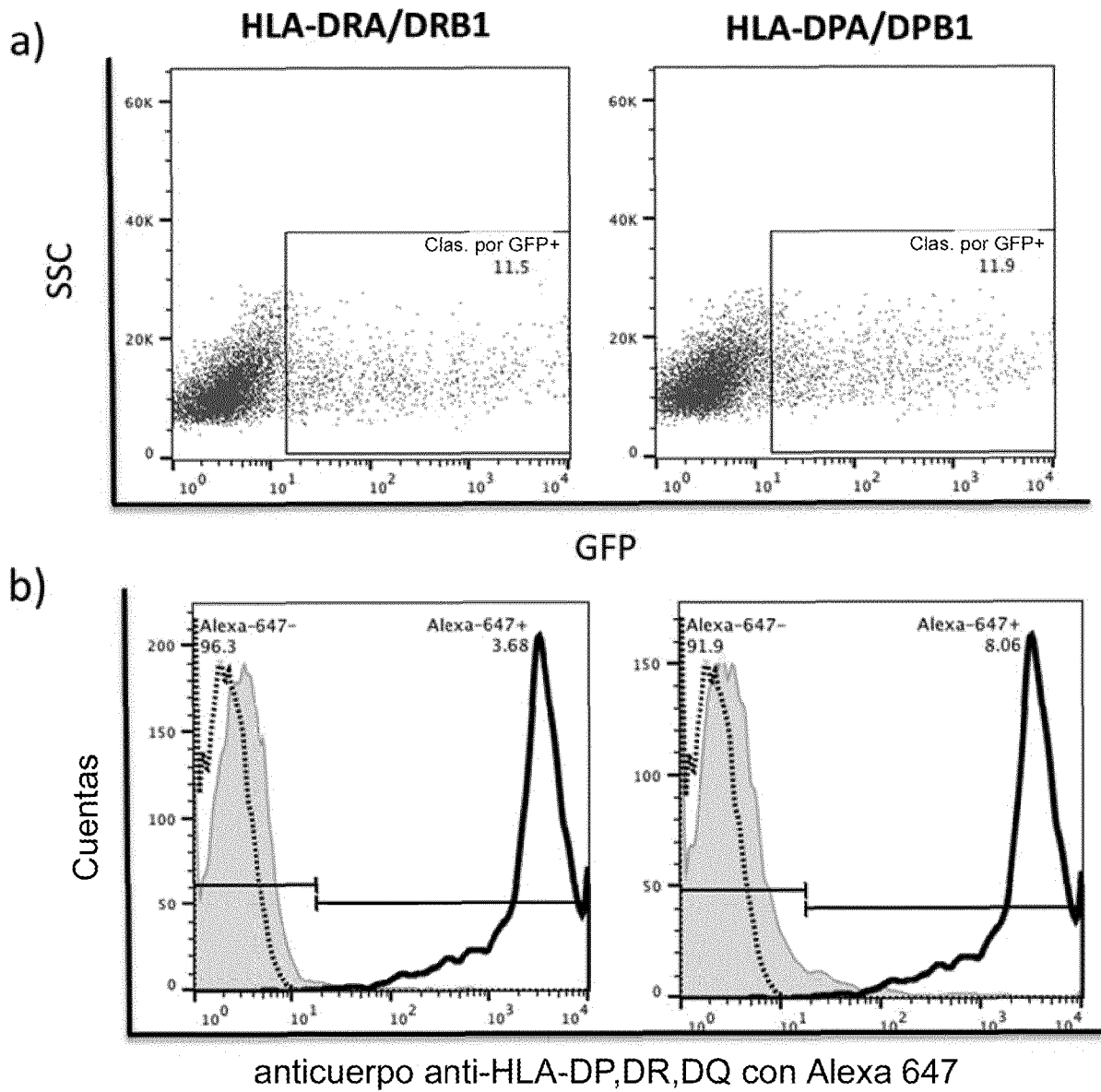
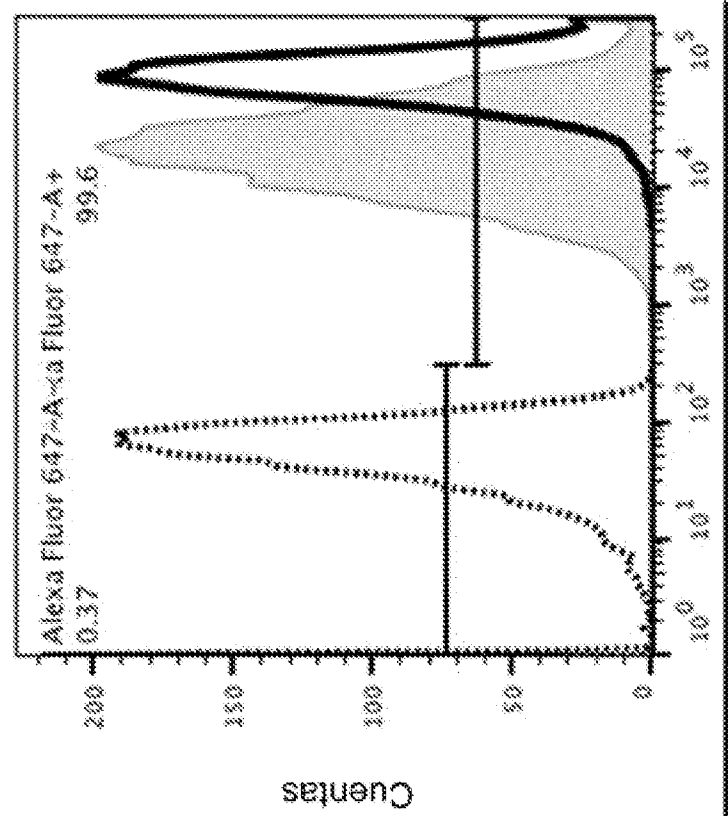
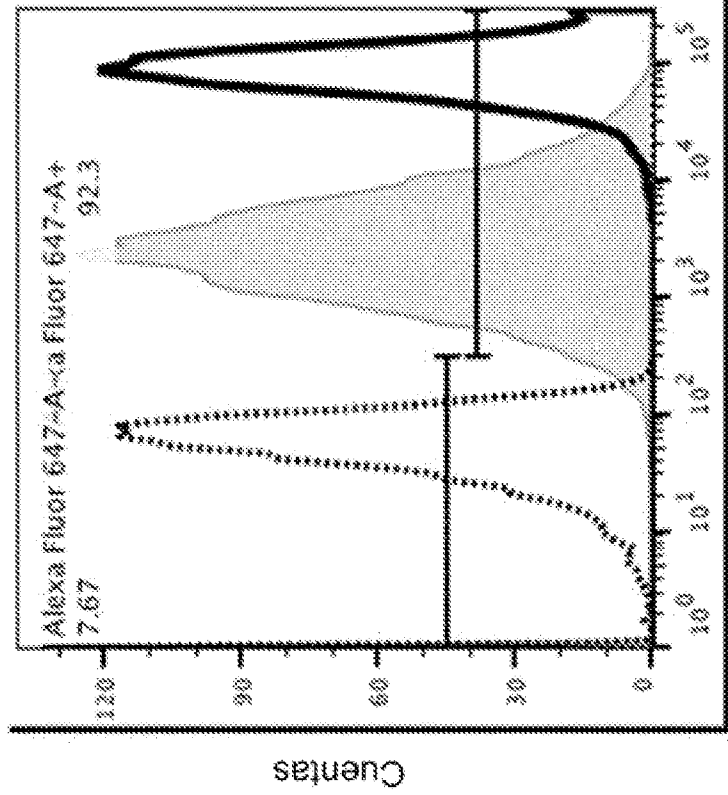


Figura 48

ACL-350



ACL-341



anticuerpo anti-HLA-DR, DP, DQ con Alexa 647

Figura 49

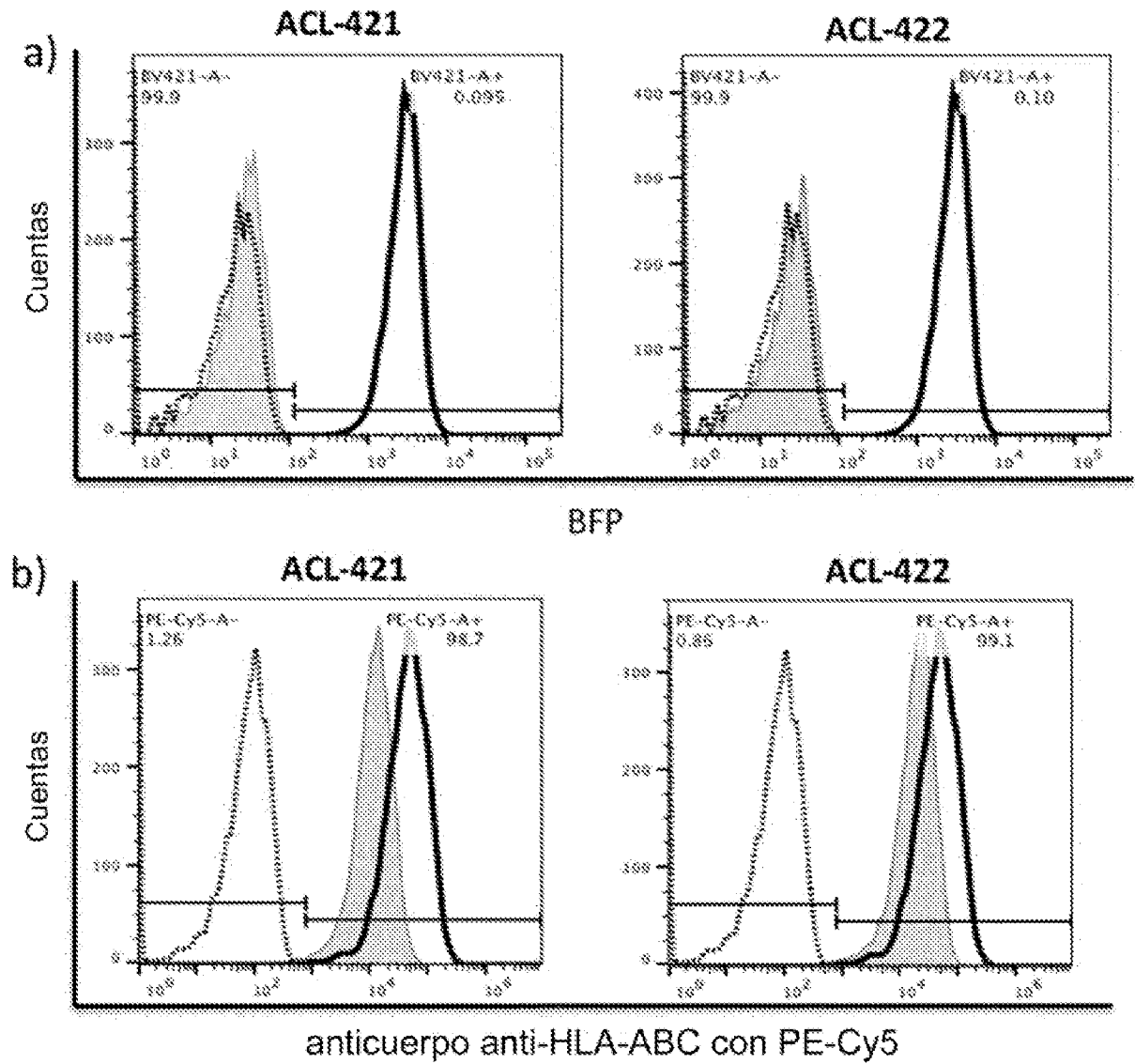


Figura 50

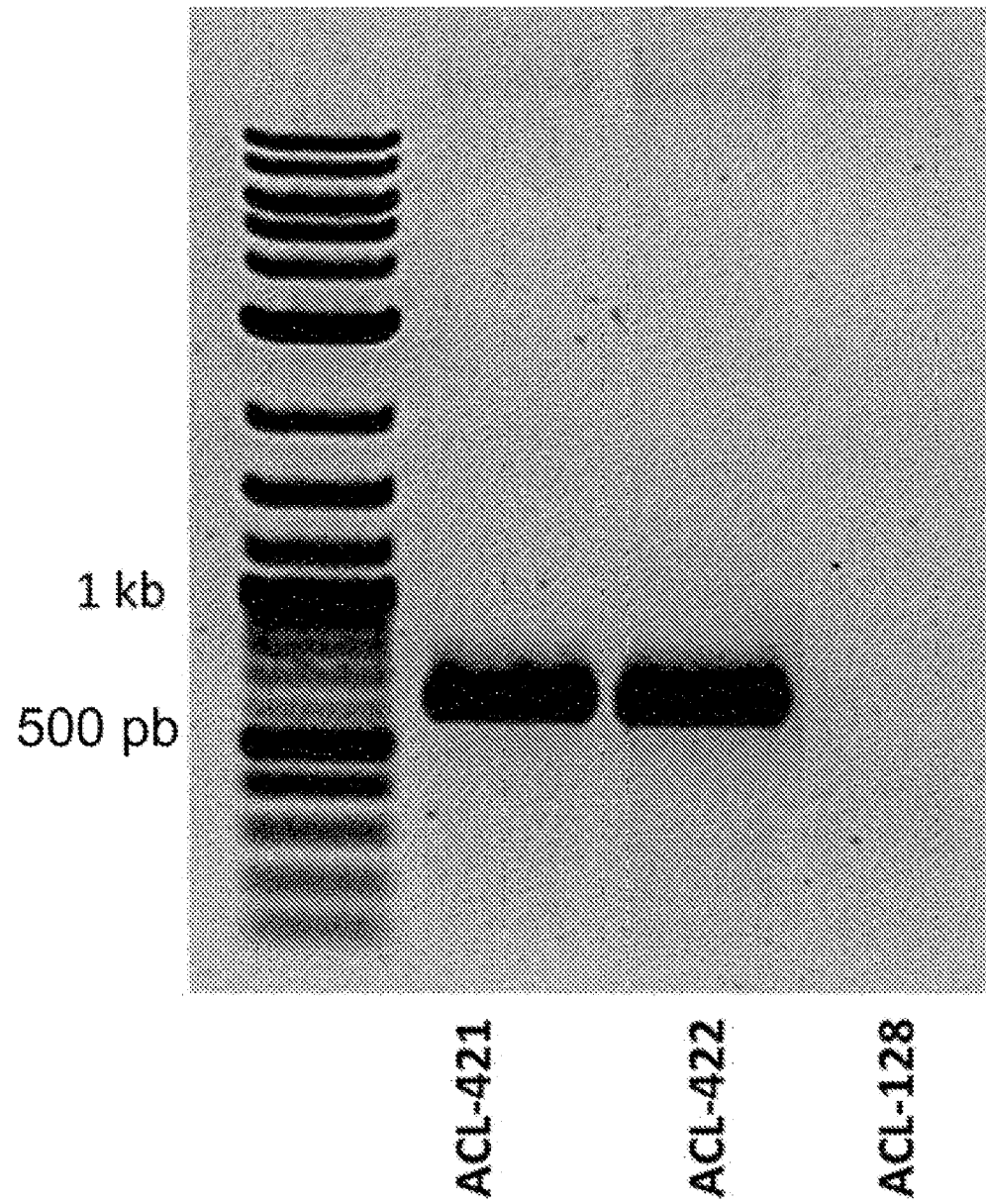


Figura 51

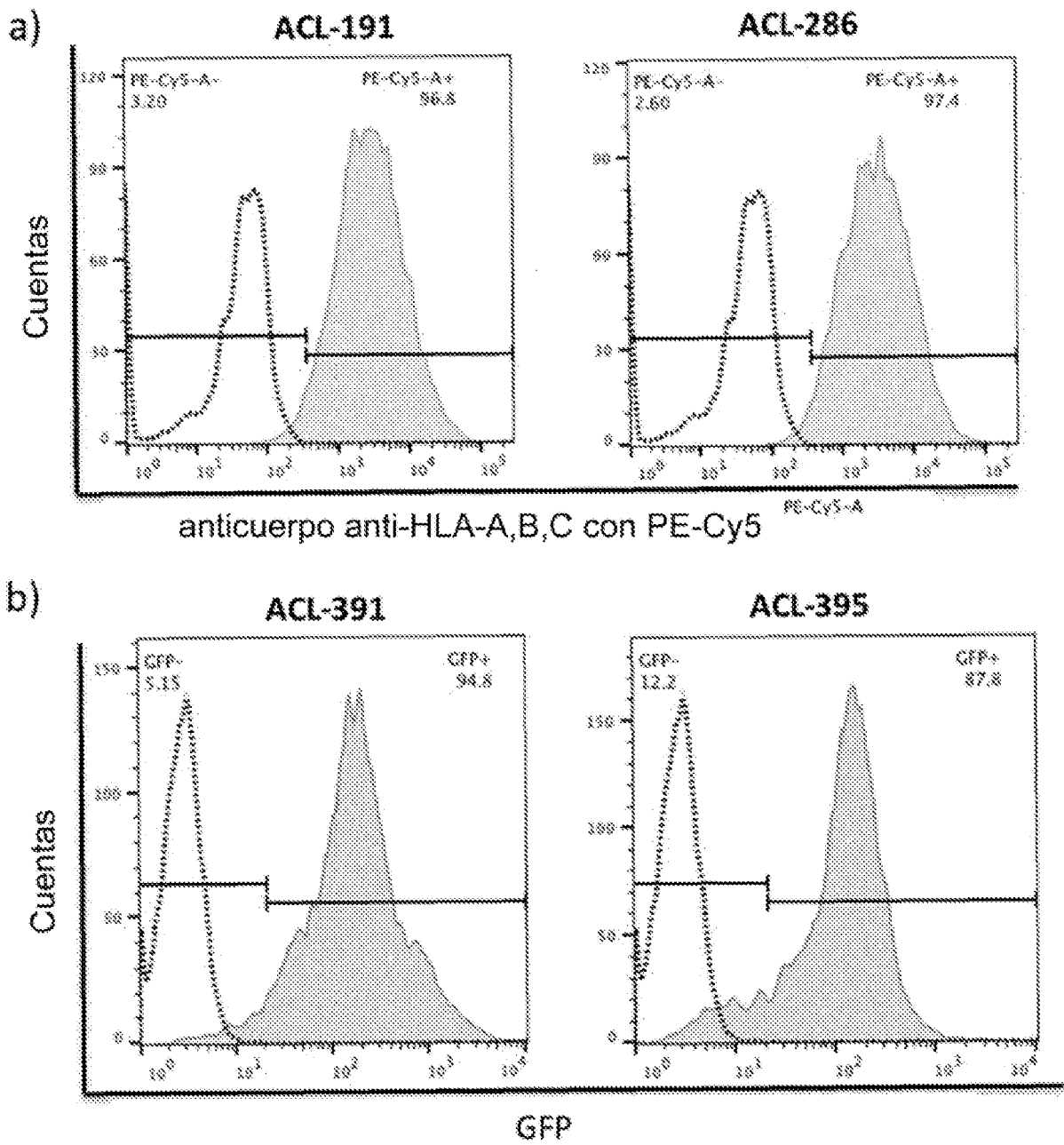


Figura 52

Tabla 1: Caracterización genética de monoclonos que contienen el componente B

Línea celular	Ubicación genómica		Número de copias del componente B integrado		
	Integrado en el genoma	Integrado en el sitio de integración genómica (AAVS1)	Copias de gen de referencia/ul	Copias del comp. B/ul	Razón esperada para una única integración del componente B
ACL-469	Si	Si	151	51.8	0,343
ACL-470	Si	Si	166	56.8	0,342
					0,33

Tabla 2: Caracterización genética de monoclonos que contienen los componentes B y D

Línea celular	Ubicación genómica		Número de copias de los componentes B y D integrados		
	Integrado en el genoma	Integrado en el sitio de integración genómica (AAVS1)	Copias de gen de referencia/ul	Copias de los comp. B y D/ul	Razón esperada para una única integración de los componentes B y D
ACL-472	Si	Si	183	124	0,675
					0,66

Figura 53

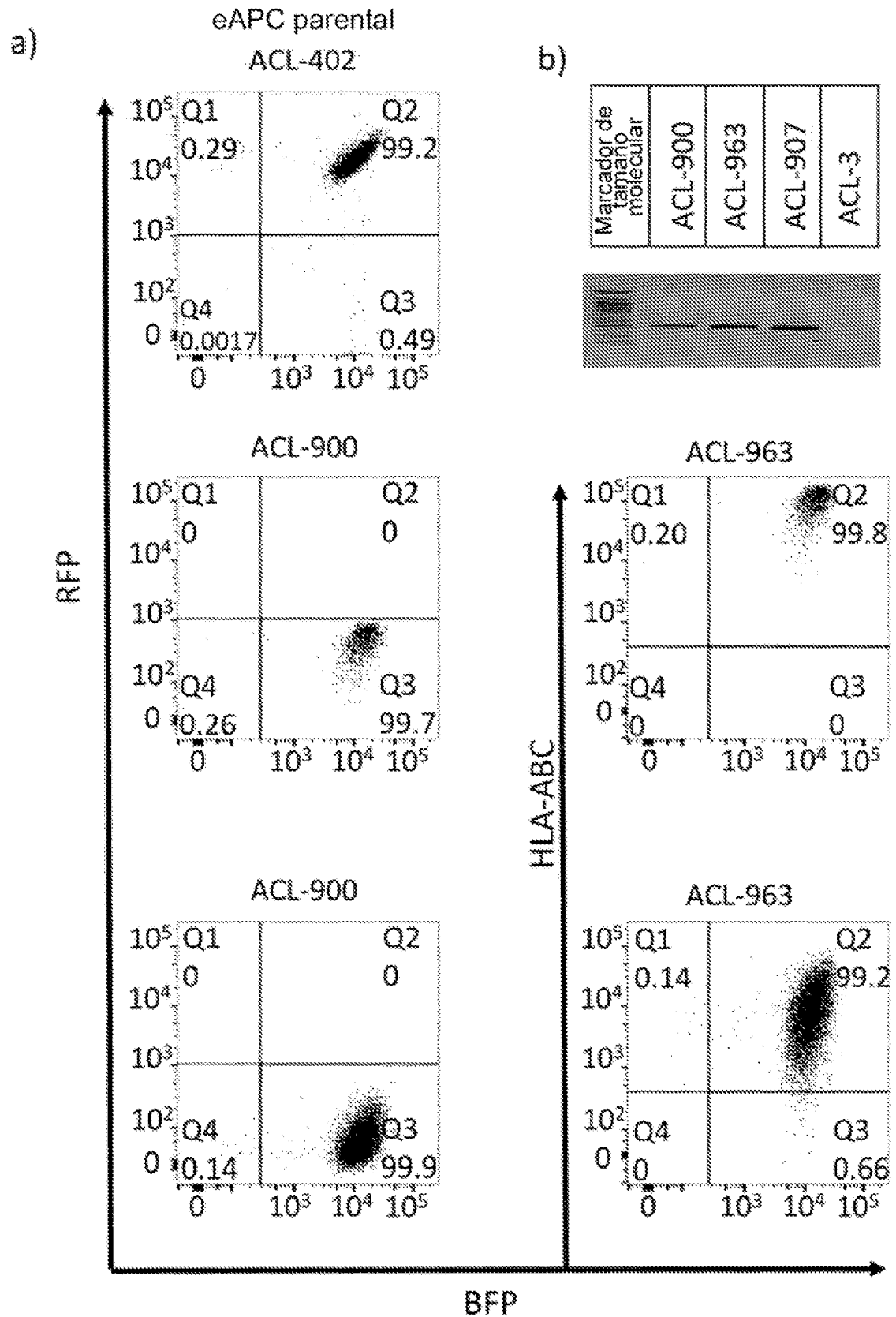


Figura 54

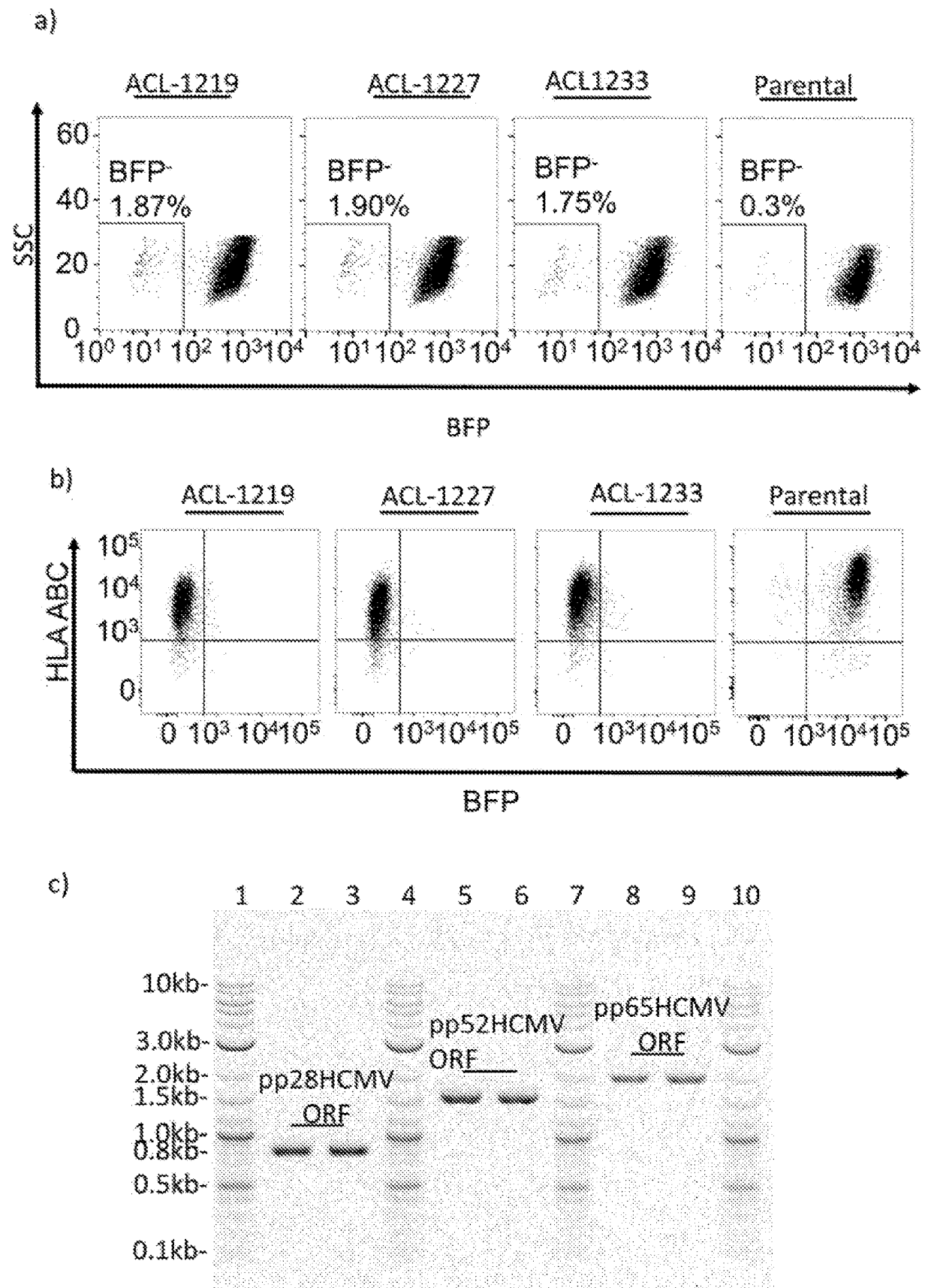


Figura 55

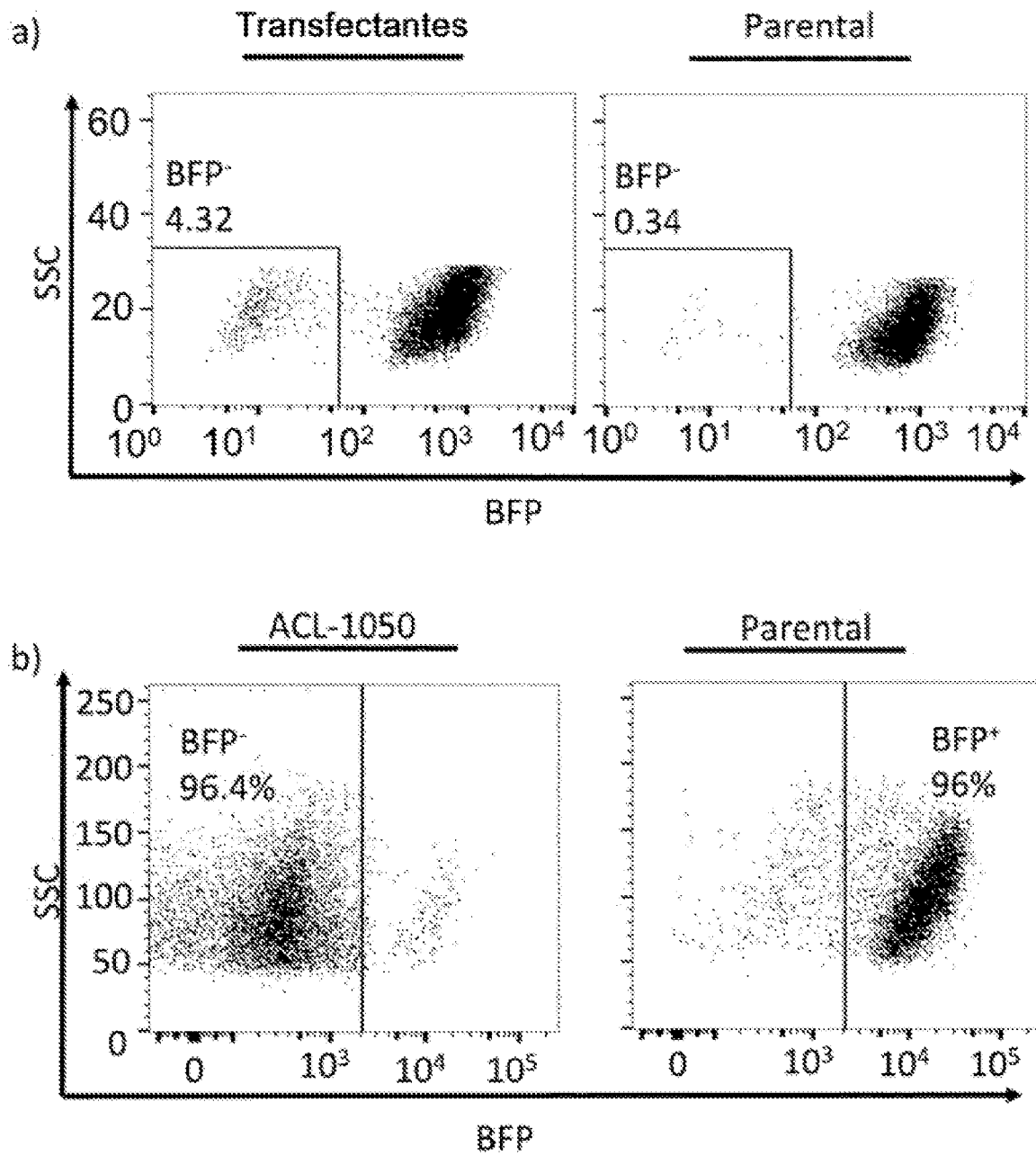


Figura 55

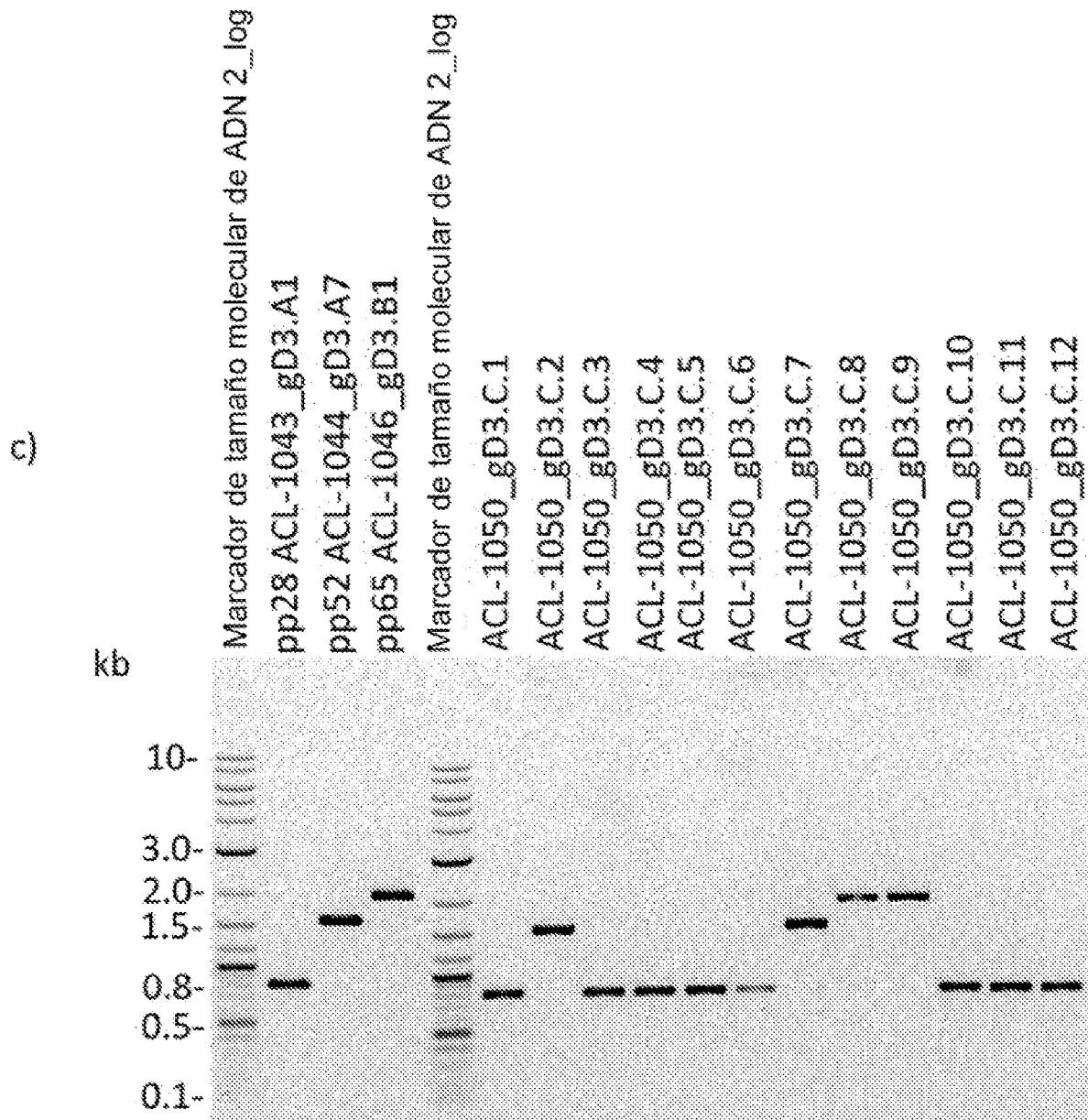
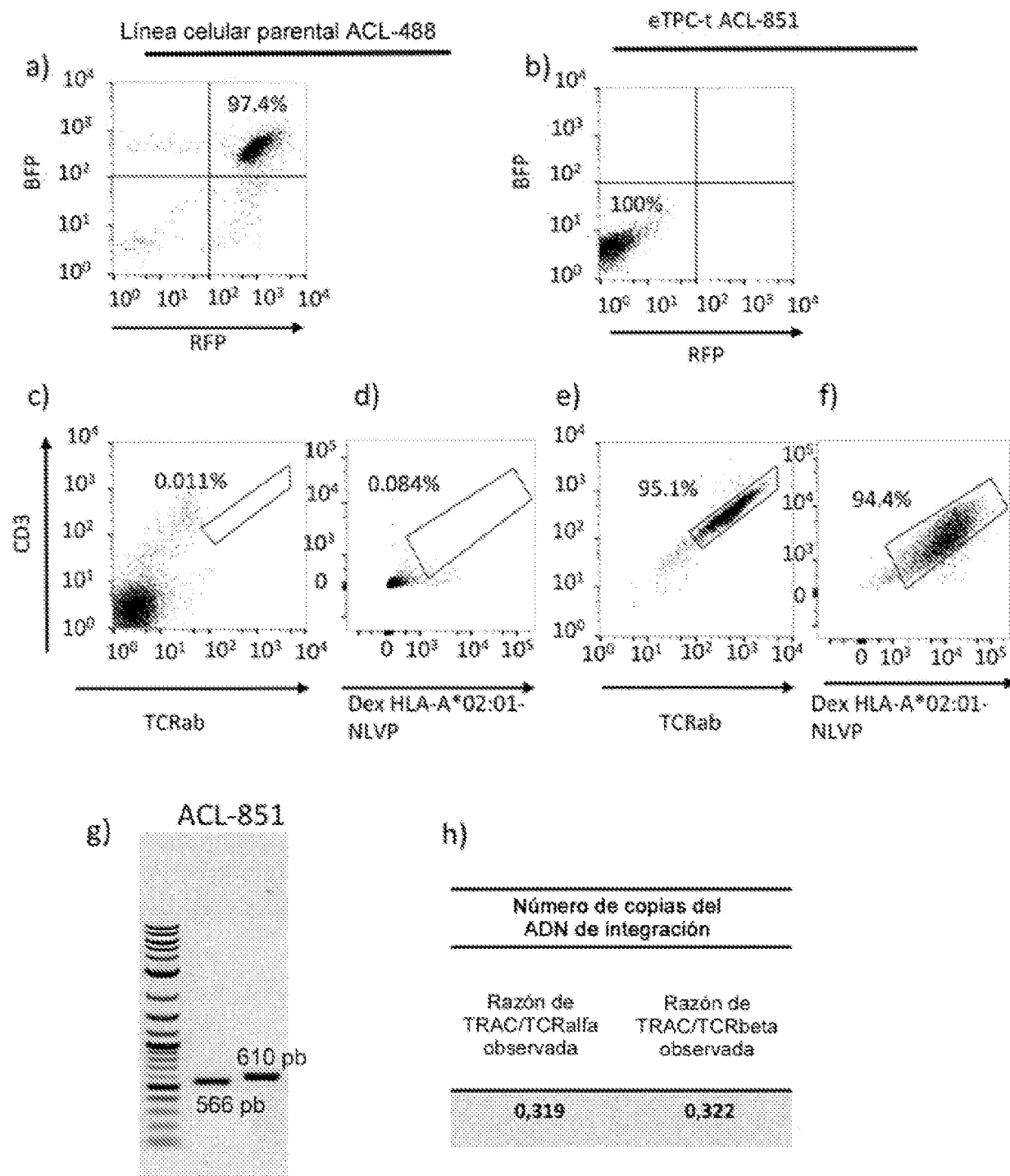


Figura 56



Tamaño esperado de TCRa: 566 pb

Tamaño esperado de TCRb: 610 pb

Figura 57

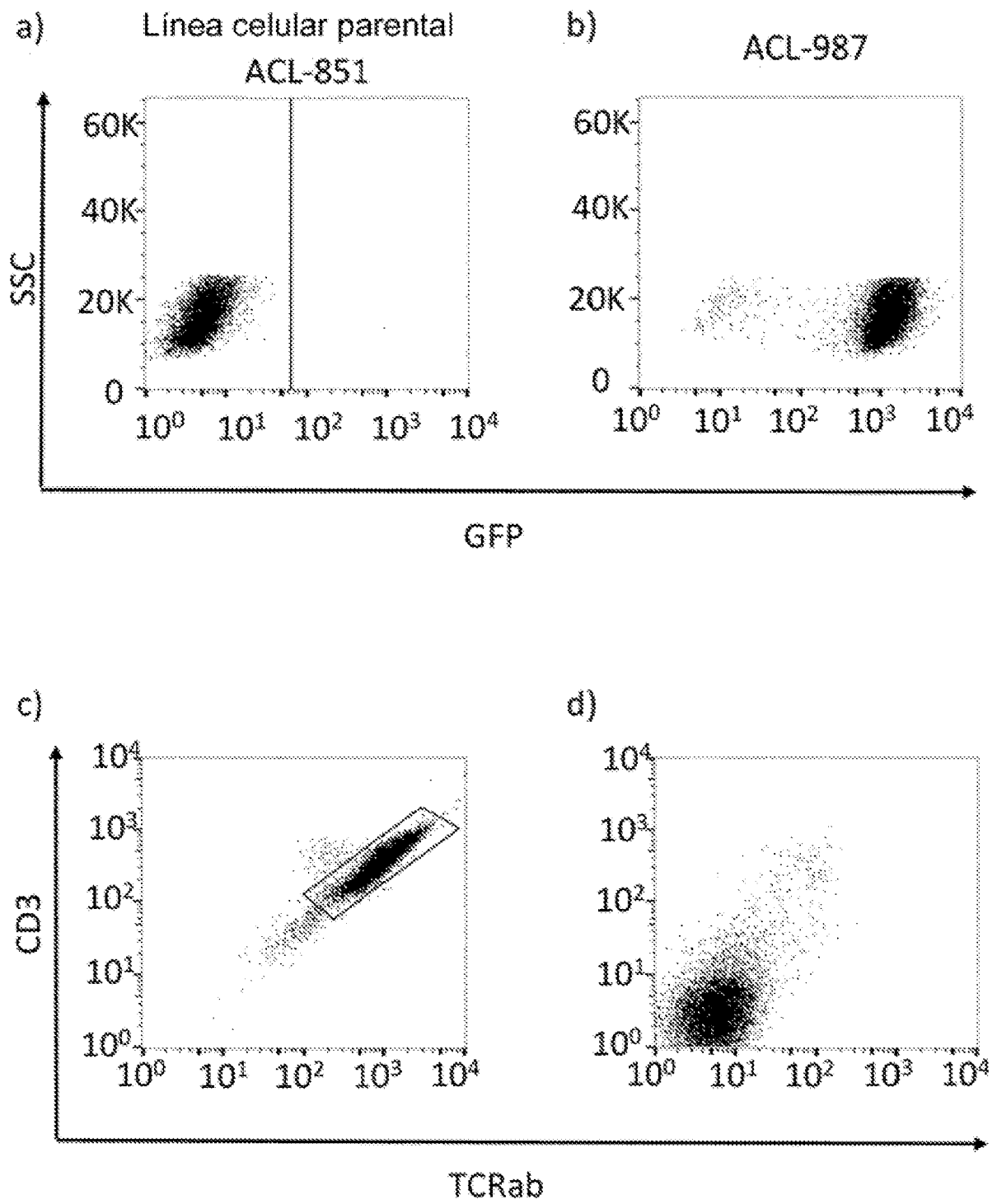


Figura 58

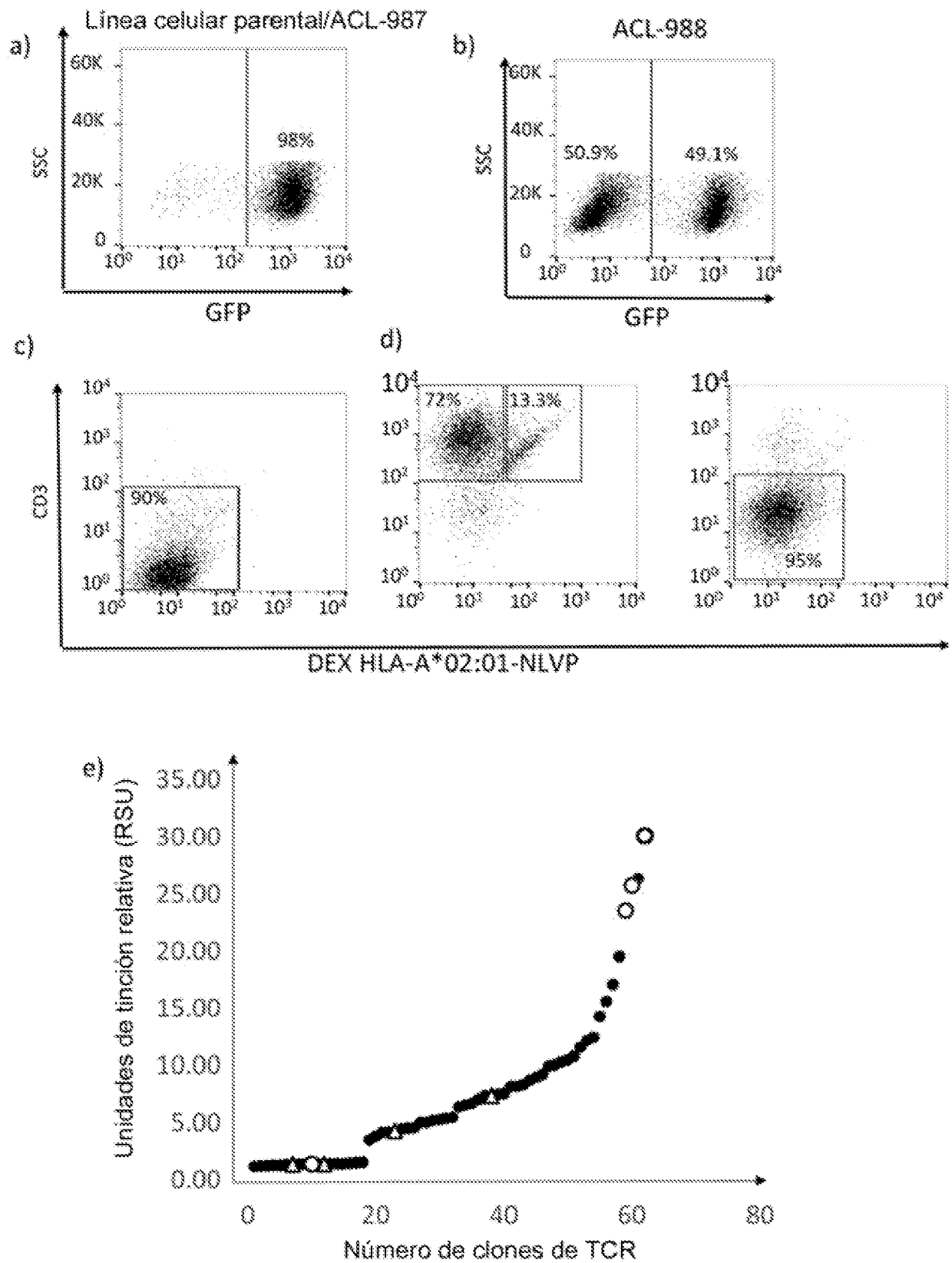


Figura 59

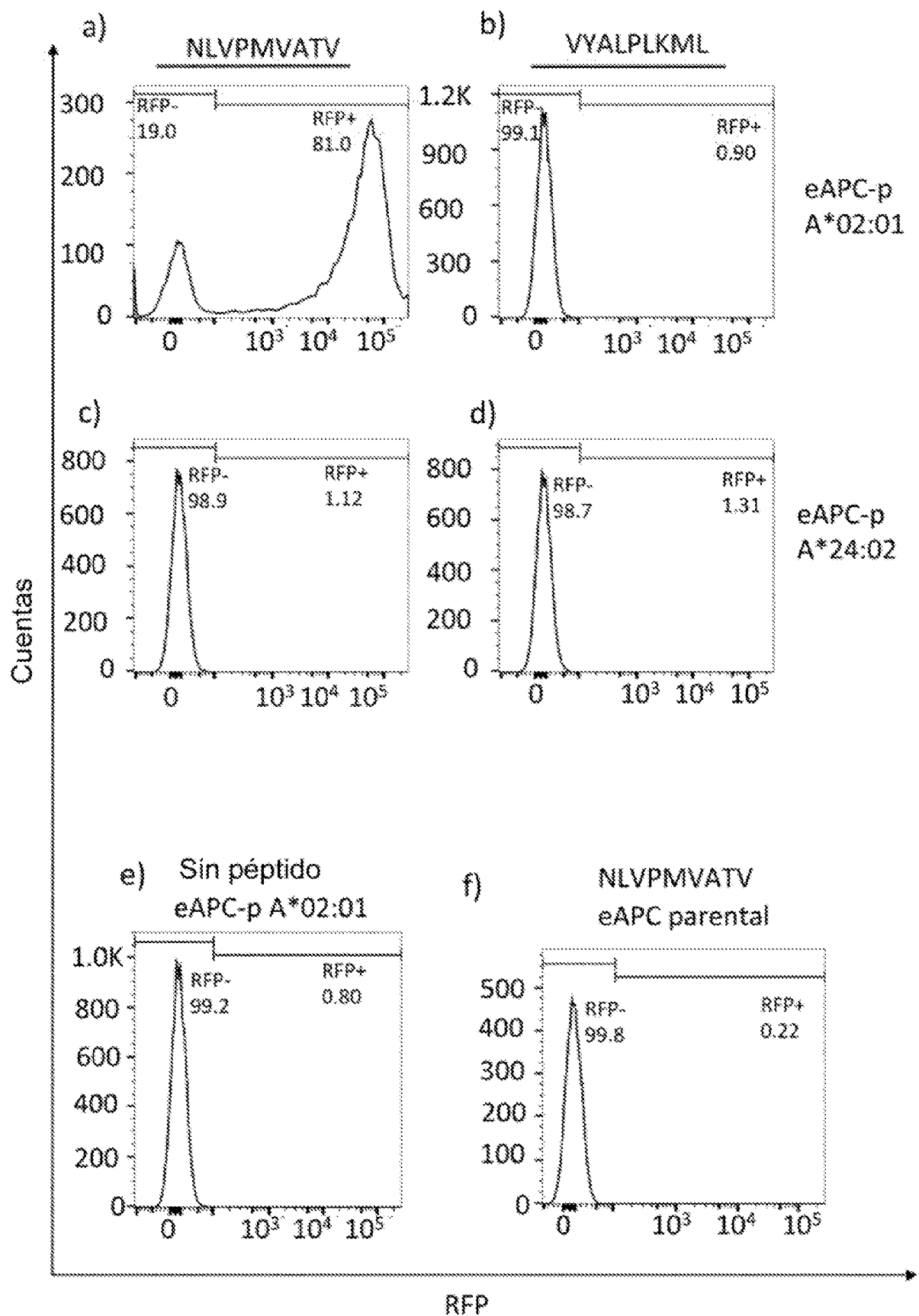


Figura 60

