

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 900**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

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/EP2017/078377**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2018 WO18083317**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2017 E 17801375 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3535289**

54 Título: **Un sistema multicomponente modificado para la identificación y caracterización de receptores de células T, antígenos de células T y su interacción funcional**

30 Prioridad:

07.11.2016 DK PA201670875

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2024

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:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 984 900 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

Un sistema multicomponente modificado para la identificación y caracterización de receptores de células T, antígenos de células T y su interacción funcional

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la construcción, ensamblaje y uso de un sistema multicomponente, compuesto por al menos tres componentes que son una célula presentadora de receptor de células T (TCR) genomodificada (eTPC), un sitio de recepción genómica genomodificado y un vector donador genético de emparejamiento. La presente invención se utiliza para la generación rápida de alto rendimiento de células derivadas estables que presentan pares de TCR de longitud completa (eTPC-t) para la identificación y caracterización de las proteínas del par de TCR para el antígeno analito. Específicamente, la eTPC expresa constitutivamente todos los componentes del complejo CD3, pero carece de expresión endógena de las cadenas alfa, beta, gamma y delta del TCR. La eTPC también carece de expresión de los principales complejos presentadores de antígenos, para eliminar posibles antecedentes de autopresentación de antígeno por la eTPC en los flujos de trabajo analíticos. Además, la eTPC contiene al menos dos sitios de recepción genómica modificados. Los sitios se utilizan para la integración rápida y estable de material genético que codifica pares de TCR, suministrado mediante un vector donador genético de emparejamiento. La eTPC también puede incluir un componente opcional, un elemento de respuesta a la estimulación del TCR, para la detección de la estimulación del TCR. El sistema multicomponente se puede utilizar como sistema analítico en inmunodiagnóstico clínico. Además, la presente invención se refiere al uso del sistema multicomponente para identificar y caracterizar antígenos de células T y TCR cognados para diagnóstico, medicina, cosmética e investigación y desarrollo.

25

Antecedentes de la invención

La vigilancia inmunitaria por los linfocitos T (células T) es una función central en la inmunidad adaptativa de todos los vertebrados mandibulados. La vigilancia inmunitaria por las células T se logra a través de una rica diversidad funcional entre los subtipos de células T, que sirven para eliminar células neoplásicas e infectadas por patógenos y orquestar respuestas inmunitarias adaptativas contra patógenos invasores, microorganismos comensales, factores comensales no propios, tales como componentes moleculares de alimentos, e incluso mantener la tolerancia inmunitaria de uno mismo. Con el fin de responder a diversos factores propios y extraños, las células T deben poder detectar específicamente los constituyentes moleculares de estos factores propios y extraños. Por lo tanto, las células T deben poder detectar una gran muestra representativa de las moléculas propias y no propias que encuentra un individuo, con suficiente especificidad para generar respuestas eficientes contra organismos patógenos y la propia enfermedad, evitando al mismo tiempo la generación de tales respuestas contra la propia salud. La naturaleza altamente compleja de esta tarea queda clara al considerar la diversidad prácticamente ilimitada de moléculas tanto propias como extrañas, y que los organismos patógenos están bajo presión evolutiva para evadir la detección por las células T.

40

El receptor de células T (TCR)

Las células T se definen principalmente por la expresión de un receptor de células T (TCR). El TCR es el componente de la célula T que es responsable de interactuar y detectar los objetivos de la inmunidad adaptativa de las células T. En términos generales, el TCR está compuesto por un complejo de proteína heterodimérico presentado en la superficie celular. Cada una de las dos cadenas del TCR está compuesta por dos dominios extracelulares, que son tanto la región variable (V) como la región constante (C) del dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), que forman láminas β antiparalelas. Estas están anclados en la membrana celular por un dominio transmembrana de tipo I, que está junto a una cola citoplasmática corta. La característica de las células T para adaptarse y detectar diversos constituyentes moleculares surge de la variación en las cadenas de TCR que se genera durante la génesis de las células T. Esta variación se genera por recombinación somática de manera similar a la génesis de anticuerpos en las células B.

55

Diversidad de las cadenas del TCR

El conjunto de células T consiste en varias subpoblaciones funcional y fenotípicamente heterogéneas. Sin embargo, las células T pueden clasificarse ampliamente como $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ según la forma del TCR somáticamente reordenado que expresan en su superficie. Existen dos formas de pares de cadenas de TCR; pares TCR alfa (TRA) y TCR beta (TRB); y pares TCR gamma (TRG) y TCR delta (TRD). Las células T que expresan pares TRA:TRB se denominan células T $\alpha\beta$, mientras que las células T que expresan pares TRG:TRD a menudo se denominan células T $\gamma\delta$.

60

Los TCR tanto de las formas $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ son responsables del reconocimiento de diversos ligandos o "antígenos", y cada célula T genera cadenas de receptores $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ nuevas durante la maduración de las células T. Estos pares de cadenas de TCR nuevas logran diversidad de reconocimiento mediante la generación

65

de diversidad de secuencias de receptores en un proceso llamado recombinación somática V(D)J, después del cual cada célula T expresa copias de un único TCR reordenado distintamente. En los locus de TRA y TRG, están disponibles varios segmentos de genes variables (V) y funcionales (J) discretos para recombinación y yuxtapuestos a segmentos génicos constantes (C), denominados así recombinación VJ. La recombinación en los locus de TRB y TRD incluye además un segmento génico de diversidad (D) y se denomina recombinación VDJ.

Cada TCR recombinado tiene potencial para especificidad de ligando única, determinada por la estructura del sitio de unión del ligando formado por las cadenas α y β en el caso de las células T $\alpha\beta$ o las cadenas γ y δ en el caso de las células T $\gamma\delta$. La diversidad estructural de los TCR se limita en gran medida a tres bucles en horquilla cortos en cada cadena, llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Cada cadena del par de cadenas del receptor contribuye con tres CDR y, colectivamente, estos seis bucles de CDR se asientan en el extremo distal a la membrana del dominio extracelular del TCR para formar el sitio de unión al antígeno.

La diversidad de secuencias en cada cadena de TCR se logra de dos modos. Primero, la selección aleatoria de segmentos génicos para la recombinación proporciona diversidad de secuencia basal. Por ejemplo, la recombinación de TRB se produce entre 47 segmentos génicos V únicos, 2 D únicos y 13 J únicos de la línea germinal. En general, el segmento génico V contribuye con los bucles tanto CDR1 como CDR2 y, por lo tanto, está codificado en la línea germinal. El segundo modo para generar diversidad de secuencia ocurre dentro de los bucles CDR3 hipervariables, que se generan por delección aleatoria de nucleótidos molde y la adición de nucleótidos que no son molde, en las uniones entre los segmentos génicos V, (D) y J recombinantes.

Complejo TCR:CD3

Los pares de cadenas del TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ maduros son presentados en la superficie celular en un complejo con varias subunidades 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 ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$). Este complejo TCR:CD3 forma la unidad para el inicio de respuestas de señalización celular tras la interacción de un TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ con un antígeno cognado. Los CD3 auxiliares asociados como un complejo TCR:CD3 contribuyen con motivos de señalización llamados motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM). CD3 ϵ , CD3 γ y CD3 δ aportan cada uno un único ITAM, mientras que el homodímero CD3 ζ contiene 3 ITAM. Los tres dímeros de CD3 ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$) que se ensamblan con el TCR aportan por lo tanto 10 ITAM. Tras el ligado del TCR con un antígeno cognado, la fosforilación de los restos de tirosina en tándem crea sitios de acoplamiento emparejados para proteínas que contienen dominios de homología Src 2 (SH2), tales como la proteína crítica asociada a la cadena ζ de 70 kDa (ZAP-70). El reclutamiento de dichas proteínas inicia la formación de complejos de señalización TCR:CD3 que son, en última instancia, responsables de la activación y diferenciación de las células T.

Células T $\alpha\beta$

Las células T $\alpha\beta$ son generalmente más abundantes en seres humanos que sus homólogas las células T $\gamma\delta$. La mayoría de las células T $\alpha\beta$ interactúan con antígenos peptídicos que son presentados por complejos HLA en la superficie celular. Estas células T que reconocen el péptido-HLA (pHLA) fueron las primeras en describirse y son, con diferencia, las mejor caracterizadas. También se han descrito formas más raras de células T $\alpha\beta$. Las células T invariantes asociadas a mucosa (MAIT) parecen tener una diversidad de cadenas α y β relativamente limitada y reconocen metabolitos bacterianos en lugar de fragmentos de proteínas. Las células T citotóxicas naturales invariantes (células T iNK) y las células T reactivas a micobacteria codificadas por la línea germinal (células T GEM) están restringidas al reconocimiento de glicolípidos que son presentados de forma cruzada por moléculas que no son HLA. Se considera en gran medida que las células T iNK interactúan con los glicolípidos presentados por CD1d, mientras que las células T GEM interactúan con los glicolípidos presentados por CD1b. Se cree que otras formas de células T interactúan con los glicolípidos en el contexto de CD1a y CD1c; sin embargo, dichas células todavía tienen que caracterizarse con gran detalle.

Células T $\alpha\beta$ convencionales

La característica clave de la mayoría de las células T $\alpha\beta$ es el reconocimiento de antígenos peptídicos en el contexto de moléculas HLA. A menudo estas se denominan células T $\alpha\beta$ "convencionales". Dentro de un individuo, las moléculas propias de HLA presentan péptidos de proteínas propias y extrañas a las células T, proporcionando la base esencial para la inmunidad adaptativa contra neoplasias malignas y patógenos extraños, y la tolerancia adaptativa hacia organismos comensales, alimentos y hacia uno mismo. El locus de HLA que codifica las proteínas HLA es la región polimórfica y con mayor densidad de genes del genoma humano, y hay más de 12.000 alelos descritos en humanos. El alto grado de polimorfismo en el locus de HLA asegura una diversidad de presentación de antígenos peptídicos entre individuos, lo cual es importante para la inmunidad a nivel poblacional.

HLA de clase I y II

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

La hendidura de unión al antígeno de HLAI y HLAII comprende dos hélices α antiparalelas en una plataforma de ocho láminas β antiparalelas. En esta hendidura se une el antígeno peptídico y es presentado en una conformación extendida. Los restos que entran en contacto con los péptidos en HLAI y HLAII son la ubicación de la mayor parte del polimorfismo de secuencia, que constituye la base molecular de los diversos repertorios de péptidos presentados por diferentes alelos de HLA. El péptido establece contactos extensos con la hendidura de unión al antígeno y, como resultado, cada alelo HLA impone distintas restricciones de secuencia y preferencias en los péptidos presentados. Por lo tanto, un péptido determinado solo se unirá a un número limitado de HLA y, recíprocamente, cada alelo solo acomoda una fracción particular de la colección de péptidos de una proteína determinada. El conjunto de alelos HLAI y HLAII que está presente en cada individuo se denomina haplotipo HLA. El polimorfismo de los genes HLAI y HLAII y la expresión codominante de alelos heredados genera una gran diversidad de haplotipos HLA en toda la población humana, que cuando se combina con la enorme diversidad de secuencias de los TCR $\alpha\beta$, presenta grandes obstáculos para la estandarización del análisis de estas interacciones HLA-antígeno-TCR.

Acoplamiento a TCR $\alpha\beta$ de HLAI y HLAII

Los TCR $\alpha\beta$ reconocen péptidos como parte de una interfase de unión mixta de pHLA formada por restos tanto del HLA como del antígeno peptídico (autoalterado). Los complejos HLAI se presentan en la superficie de casi todas las células nucleadas y generalmente se considera que presentan péptidos derivados de proteínas endógenas. De este modo, las células T pueden interrogar el proteoma celular endógeno de una célula presentadora de HLAI tomando muestras de complejos pHLAI de una célula que interacciona. La participación de HLAI requiere la expresión del correceptor de TCR CD8 por la célula T que interacciona, por lo que la toma de muestra de HLAI está restringida a células T $\alpha\beta$ CD8⁺. Por el contrario, la presentación en la superficie de los complejos HLAII está restringida en gran medida a las APC profesionales y, en general, se considera que presentan péptidos derivados de proteínas exógenas a la célula presentadora. Por lo tanto, una célula T que interacciona puede interrogar al proteoma del microambiente extracelular en el que reside la célula presentadora. La participación de HLAII requiere la expresión del correceptor de TCR CD4 por la célula T que interacciona, por lo que la toma de muestra de HLAII está restringida a células T $\alpha\beta$ CD4⁺.

Selección tímica de los TCR $\alpha\beta$

La función de los TCR $\alpha\beta$ como se describió anteriormente es la detección de complejos pHLA, de modo que la célula T presentadora de TCR puede generar respuestas relacionadas con la función de esa célula T en el establecimiento de la inmunidad. Se debe considerar que el repertorio de TCR $\alpha\beta$ generado dentro de un individuo debe tener en cuenta la diversidad inmensa e imprevista de todos los antígenos extraños que probablemente se encuentren en el contexto de un haplotipo específico y antes de su aparición real. Este resultado se logra en un contexto en el que se generan TCR $\alpha\beta$ extremadamente diversos y numerosos de manera casi aleatoria con el potencial de reconocer complejos pHLA no especificados mientras solo se les instruye específicamente para evitar interacciones fuertes con el pHLA propio. Esto se orquesta cuidadosamente durante la maduración de las células T en un proceso llamado selección tímica.

Durante la primera etapa de la maduración de las células T en el timo, las células T que portan TCR $\alpha\beta$ que son incapaces de interactuar con complejos pHLA propios con suficiente afinidad, se ven privadas de una señal de supervivencia y son eliminadas. Este etapa llamada selección positiva asegura que las células T supervivientes lleven un repertorio de TCR que sea al menos potencialmente capaz de reconocer péptidos extraños o alterados presentados en el contexto de HLA correcto. Posteriormente, los TCR $\alpha\beta$ que interactúan fuertemente con pHLA propio y, por lo tanto, tienen el potencial de promover la autoinmunidad son eliminados activamente mediante un proceso de selección negativa. Esta combinación de selección positiva y negativa da como resultado que solo las células T que llevan TCR $\alpha\beta$ con baja afinidad por el pHLA propio pueblan la periferia. Esto establece un repertorio de células T $\alpha\beta$ que es autorrestringido pero no autorreactivo. Esta naturaleza altamente individualizada de la génesis de las células T contra el haplotipo HLA subraya los desafíos en el análisis estandarizado de las interacciones TCR $\alpha\beta$ -antígeno-HLA. Además, forma la base tanto del rechazo del injerto como de la enfermedad de injerto contra huésped y del principio general

de que los TCR $\alpha\beta$ identificados en un individuo pueden tener efectos completamente diferentes en un segundo individuo, lo que tiene claras implicaciones para las estrategias terapéuticas y de diagnóstico basadas en TCR y células T emergentes en la práctica clínica.

5 Células T $\alpha\beta$ no convencionales

Las formas no restringidas a HLA o "no convencionales" de células T $\alpha\beta$ tienen objetivos de antígenos moleculares muy diferentes. Estas células T $\alpha\beta$ no convencionales no se acoplan con complejos HLA clásicos, sino que se acoplan con proteínas similares a HLA conservadas, tales como la familia CD1 o MR1. La familia CD1 comprende cuatro formas implicadas en la presentación 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. Un pequeño bolsillo hidrófobo presentado en la superficie distal de la membrana de la cadena α forma un sitio de unión para antígenos basados en lípidos derivados de patógenos. Las células T NK tipo innatas (células T iNK) forman el ejemplo mejor comprendido de reconocimiento de la familia de lípidos/CD1 y las células T GEM representan otro ejemplo destacado. Se sabe que las células T iNK "tipo I" interaccionan fuertemente con el lípido α -GalCer en el contexto de CD1d. Estas células T iNK muestran una diversidad de TCR muy limitada con una cadena α de TCR fija (V α 10/J α 18) y un número limitado de cadenas β (con uso restringido de v β) y se han comparado con receptores de reconocimiento de patrones moleculares innatos asociados a patógenos (PAMPS) innatos tales como los receptores tipo Toll y tipo Nod. Por el contrario, las células T NK "tipo II" presentan un repertorio de TCR más diverso y parecen tener un modo más diverso de acoplamiento con el complejo CD1d-lípido. Las células T GEM reconocen los glicolípidos derivados de micobacterias presentados por CD1b; sin embargo, los detalles moleculares de la presentación del antígeno por CD1a, b y c, así como su reconocimiento por células T apenas están comenzando a comprenderse.

Las células MAIT expresan en gran medida una cadena α de TCR invariante (TRAV1-2 ligada a TRAJ33, TRAJ20 o TRAJ12), que es capaz de emparejarse con una serie de cadenas β de TCR. En lugar 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-I, MR1. La diversidad limitada pero significativa en los TCR observada en los TCR de MAIT parece permitir el reconocimiento de metabolitos diversos pero relacionados en el contexto del MR1 conservado.

No se comprende bien cómo son seleccionados en el timo los TCR de células T $\alpha\beta$ no clásicos restringidos por HLA durante la maduración. Sin embargo, parece probable que todavía se aplique el proceso fundamental de selección negativa y positiva descrito anteriormente y alguna evidencia sugiere que esto ocurre en nichos especializados dentro del timo.

Células T $\gamma\delta$

En contraste con la comprensión mecanística detallada de la génesis de TCR $\alpha\beta$ y el acoplamiento de pHLA, se sabe relativamente poco sobre los objetivos de antígenos y el contexto de sus homologas las células T $\gamma\delta$. Esto se debe en parte a su abundancia relativamente baja en el compartimento de células T circulantes. Sin embargo, se considera ampliamente que las células T $\gamma\delta$ no están estrictamente restringidas por HLA y parece que reconocen el antígeno de superficie con mayor libertad, a diferencia de los anticuerpos. Además, más recientemente se ha apreciado que las células T $\gamma\delta$ pueden dominar el compartimento de células T residentes de los tejidos epiteliales, el principal sitio de interacción del sistema inmunitario con antígenos extraños. Además, están comenzando a surgir en la bibliografía diversos mecanismos para la inmunovigilancia de tumores de células T $\gamma\delta$ y la vigilancia de otras formas de autodesregulación. Los objetivos antigénicos específicos de células T $\gamma\delta$ tanto innatas como adaptativas siguen estando mal definidos, pero la distribución tisular y el rápido reconocimiento de los PAMP sugiere un papel fundamental para las células T $\gamma\delta$ tanto en las respuestas tempranas a antígenos extraños así como en las primeras etapas de la vida cuando el sistema inmunitario adaptativo aún está madurando.

Las diversas funciones de las células T $\gamma\delta$ parecen basarse en el diferente uso de los segmentos génicos V γ y V δ y pueden entenderse ampliamente en dos categorías principales en las que las células T $\gamma\delta$ con TCR en gran medida invariantes median el reconocimiento de tipo innato de los PAMP muy pronto durante la infección. Además de los PAMP, se cree que además este tipo de células T $\gamma\delta$ reconocen moléculas propias, incluyendo fosfoantígenos, que podrían proporcionar señales muy tempranas de estrés celular, infección y desarrollo potencialmente neoplásico. El reconocimiento de los PAMP y los llamados patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs), así como de la gran cantidad de células T $\gamma\delta$ de tipo innato restringidas a tejido, sugieren fuertemente que estas células están preparadas para responder rápidamente al desafío antigénico sin la necesidad de una activación previa, movimiento dirigido y expansión clonal.

Se considera que una segunda forma de células T $\gamma\delta$ es de naturaleza más adaptativa, con un repertorio de TCR $\gamma\delta$ muy diverso y la capacidad de circular periféricamente y acceder directamente a los tejidos linfoides. Se han descrito dichas células T $\gamma\delta$ específicas de antígeno para patógenos humanos comunes tales como CMV y parecen formar una respuesta de memoria. Sin embargo, también se ha observado que las células T

5 $\gamma\delta$ muestran proliferación clonal sólo relativamente limitada después de la activación y hay pocos datos disponibles sobre el grado de diversidad de TCR y respuestas específicas de las células T $\gamma\delta$ en la circulación periférica o en los tejidos. Además, si bien generalmente se considera que los TCR $\gamma\delta$ no interactúan con los complejos pHLA y, por lo tanto, no se acoplan con los antígenos peptídicos, en este contexto solo se han caracterizado unos pocos objetivos antígenicos de las células T $\gamma\delta$ y el marco molecular subyacente se conoce poco.

10 La baja frecuencia de las células T $\gamma\delta$ periféricas y la dificultad para estudiar las células T residentes en los tejidos en seres humanos ha limitado nuestro conocimiento sobre cómo este importante y diverso tipo de células T participa en las respuestas inmunitarias adaptativas. Este campo emergente de investigación requeriría tecnologías más confiables con las que capturar y caracterizar células T $\gamma\delta$ raras, aislar sus pares TCR e identificar sus antígenos cognados.

15 Antígenos y células presentadoras de antígeno

En el contexto de las células T y los TCR, los antígenos pueden definirse como cualquier molécula que puede acoplarse con un TCR y dar como resultado la transducción de una señal dentro de la célula T. Los antígenos de células T mejor caracterizados son los péptidos presentados en un complejo HLA I y HLA II, y con los que se acoplan células T $\alpha\beta$ convencionales. Sin embargo, en los últimos años se ha hecho evidente que las células 20 T $\alpha\beta$ y las células T $\gamma\delta$ no convencionales son capaces de acoplarse con una amplia gama de biomoléculas tales como antígenos, incluidos lípidos, lipopéptidos, glicopéptidos, glicolípidos y una variedad de metabolitos y catabolitos. Además, se ha descubierto que las células T $\gamma\delta$ pueden acoplarse directamente con proteínas completamente plegadas de forma similar a los anticuerpos. Por lo tanto, la visión de que los antígenos de células T están restringidos en gran medida a péptidos presentados por HLA se ha ampliado en las últimas 25 dos décadas para incluir prácticamente cualquier biomolécula. Teniendo en cuenta este concepto, resulta relevante definir lo que se puede considerar una célula presentadora de antígeno (APC).

Como se define en las secciones anteriores, HLA I y HLA II tienen perfiles de expresión dispares entre los tipos de células. Está ampliamente aceptado que casi todas las células nucleadas presentan complejos HLA I en la 30 superficie celular y, por lo tanto, son competentes para presentar antígenos peptídicos para la toma de muestras de células T. Por el contrario, HLA II tiene un perfil de expresión restringido y, al menos en condiciones de estado estacionario, solo se expresa en la superficie de las células que tienen un papel especializado en la presentación de antígenos, que incluyen células dendríticas (DC), macrófagos y células B. Estos tipos de células especializadas a menudo se denominan APC profesionales. Para los fines de este documento, el 35 término APC se utiliza para describir cualquier célula nucleada que sea capaz de presentar un antígeno para el muestreo por células T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Dichos antígenos no se limitan a los presentados como "carga" en complejos presentadores de antígenos específicos, tales como HLA y moléculas similares a HLA, sino que también pueden incluir cualquier grupo presentado en la superficie celular que sea capaz de acoplar una célula que lleve TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$.

40 Uso terapéutico de los TCR

La transferencia adoptiva de células T primarias se ensayó por primera vez en un entorno clínico a principios de la década de 1990, comenzando con células T expandidas ex vivo polarizadas hacia antígenos virales para 45 conferir inmunidad viral en pacientes inmunocomprometidos. Poco después se ensayaron enfoques similares en el tratamiento de tumores malignos utilizando células T primarias expandidas ex vivo contra antígenos cancerosos específicos. Una limitación de estos primeros enfoques que sigue siendo un desafío hoy en día es la falta de comprensión de la naturaleza y diversidad de las células T, que choca con la necesidad de optimizar con precisión su composición en el producto terapéutico. En la actualidad, la industria farmacéutica ha 50 abandonado en gran medida el uso de células T primarias expandidas ex vivo, con la excepción de un puñado de iniciativas que utilizan células T primarias con especificidad por antígenos virales.

En los últimos años, la capacidad de introducir de manera fiable material genético en células humanas primarias ha dado lugar al surgimiento de una variedad de terapias experimentales de células T genéticamente 55 modificadas. Dichos productos celulares terapéuticos tienen como objetivo aprovechar el poder de las respuestas de las células T y redirigir la especificidad de las células T hacia un antígeno objetivo asociado a una enfermedad, por ejemplo, un antígeno expresado únicamente por células malignas. Estos se han basado en gran medida en la transferencia de un receptor de antígeno quimérico (CAR) a las células T receptoras, en lugar de pares de cadenas de los TCR reales. Un CAR representa un grupo de direccionamiento (lo más a menudo un elemento de anticuerpo monocatenario dirigido a una proteína expresada en la superficie de células 60 malignas) injertado en elementos receptores de señales tales como la cadena ζ del complejo CD3, para producir un receptor quimérico sintético que imita la función de CD3-TCR. Estos productos llamados células T con CAR (CAR-T) han tenido un éxito desigual en los ensayos clínicos hasta la fecha y, a pesar de su potencial, no son fáciles de trasladar más allá de tumores con objetivos moleculares únicos inherentes tales como las 65 neoplasias malignas de células B. Alternativamente, la transferencia de ORF de pares de cadenas de TCR de longitud completa a células T es de creciente interés. Estos medicamentos de células T modificadas con TCR

están actualmente limitadas por procedimientos de fabricación desafiantes y, al igual que los productos CAR-T, por la escasez de objetivos antigénicos validados y construcciones de direccionamiento. Hasta la fecha, esto se ha centrado en el uso de los TCR $\alpha\beta$ para el reconocimiento de antígenos peptídicos presentados por HLA en células malignas y un desafío fundamental de este enfoque es la necesidad de antígenos que sean

5

Se ha considerado que, dado que la interacción TCR-pHLA tiene una afinidad relativamente baja, es probable que los TCR nativos sean subóptimos para las terapias con células T modificadas con TCR. Se han ideado varios enfoques para la maduración de la afinidad de los TCR in vitro, de forma muy similar a la maduración de la afinidad de los anticuerpos monocatenarios. Estos enfoques de maduración de la afinidad de TCR generalmente también utilizan formatos de cadena única, en donde la región V de una cadena se fusiona con la región V de otra cadena para formar una construcción polipeptídica única. Dichos polipéptidos individuales pueden luego usarse en sistemas de presentación en fagos o levaduras adaptados de flujos de trabajo de modificación de anticuerpos y pasar por rondas de selección basadas en la unión al objetivo. Existen dos limitaciones inherentes en dicho enfoque de TCR de cadena única en términos de producir pares de cadenas de TCR funcionales. En primer lugar, la selección se basa en la afinidad de unión al objetivo. Sin embargo, está bien documentado que la afinidad del TCR no siempre se correlaciona con la fuerza o competencia de la salida de señalización del TCR. En segundo lugar, la selección de construcciones monocatenarias basadas en la afinidad no siempre se traduce en afinidades equivalentes una vez que se reconstituyen como receptores de longitud completa.

10

15

20

En un contexto terapéutico, existe una limitación adicional y crucial en los pares de TCR de afinidad madurada. Es decir, considerando que sus secuencias han sido alteradas, las construcciones resultantes, por definición, ya no han estado sujetas a la selección tímica, en donde los TCR que reaccionan fuertemente contra los autoantígenos se eliminan del repertorio. Por tanto, estos TCR modificados conllevan un riesgo inherente de ser autorreactivos, lo que es muy difícil de descartar in vitro utilizando los métodos actuales. Por la misma razón, cualquier TCR seleccionado o modificado para aplicación terapéutica debe ser individualizado. Si los TCR se modifican artificialmente o se aplican TCR nativos entre individuos, se deben descartar reactividades cruzadas basándose en el haplotipo de HLA y el repertorio de péptidos presentado de cada individuo específico con el fin de evitar la autoinmunidad potencialmente catastrófica. Esto se debe al hecho de que la selección tímica se lleva a cabo en un contexto de todas las moléculas HLA disponibles que son específicas únicamente de ese individuo. La probabilidad de tal reactividad cruzada no está clara. Sin embargo, la capacidad de nuestro repertorio de TCR para reconocer complejos pHLA de otros individuos de la misma especie como extraños es una propiedad fundamental de la inmunidad adaptativa y respalda el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped. Ensayos clínicos recientes que usaban un par de cadenas de TCR maduras contra el antígeno asociado a melanoma específico de cáncer (MAGE) resaltaron el problema potencial de evitar la selección tímica. Cuando se volvieron a infundir las células T autólogas que albergaban los TCR maduros a dos pacientes con cáncer, estos pacientes desarrollaron rápidamente una enfermedad cardíaca mortal. Estudios posteriores determinaron que los TCR maduros específicos de MAGE tenían reactividad cruzada con un péptido presentado por HLA de la proteína titina del corazón. Esto sugiere fuertemente que la reactividad cruzada es una clara posibilidad en el uso terapéutico de los TCR.

25

30

35

40

Una manera distinta de utilización de TCR con fines terapéuticos es su uso como reactivos de afinidad de la misma manera que las sustancias terapéuticas de anticuerpos. Se han ensayado moléculas de TCR monocatenarias para la administración de principios activos conjugados a poblaciones celulares específicas que expresan HLA-antígeno. Dicho enfoque generalmente se considera más seguro que los medicamentos de CAR-T o células T modificadas con TCR, ya que la administración del principio activo puede simplemente suspenderse. Sin embargo, la posibilidad de reactividad cruzada y efectos fuera del objetivo que son difíciles de predecir sigue siendo una potencial limitación en este contexto.

45

50

Detección del repertorio de TCR en diagnóstico clínico.

En un aspecto relacionado, hay un interés emergente en el uso de la detección de la abundancia de secuencias de TCR específicas para fines de diagnóstico clínico. En particular, con el auge de los métodos de secuenciación profunda, es posible capturar toda la diversidad de TCR dentro de un individuo de forma global y para pares $\alpha\beta$ coincidentes en contextos específicos. Esto representa potencialmente un medio para diagnosticar afecciones y estados patológicos específicos simplemente detectando la abundancia de clones de células T expandidas, como lectura representante de la respuesta inmunitaria establecida contra un antígeno asociado a la enfermedad en el paciente. Sin embargo, dichos enfoques globales se limitan actualmente a respuestas inmunitarias muy fuertes con puntos temporales clínicos establecidos y adolecen de la dificultad subyacente de identificar el objetivo antigénico específico de cualquier TCR particular identificado mediante secuenciación.

55

60

Uso terapéutico y de diagnóstico de antígenos de células T

65

La fortaleza fundamental de aprovechar las respuestas inmunitarias adaptativas se traduce en un desafío

técnico central en cuanto que la exquisita especificidad de la interacción TCR-antígeno requiere un conocimiento detallado de los antígenos específicamente asociados con cada patógeno, célula cancerosa o enfermedad autoinmunitaria. Además, cada antígeno puede ser presentado por un complejo presentador de antígeno específico, o alelo del mismo, de modo que el descubrimiento de antígeno se haya realizado para cada gen HLA y alelo relevante. Para varias enfermedades infecciosas como el VIH, gripe y CMV que están asociadas con fuertes respuestas inmunitarias adaptativas y generalmente muestran jerarquías de respuesta de epítomos conservadas, los epítomos más importantes se han mapeado en el contexto de algunos HLA comunes. De manera similar, en los campos del cáncer, la alergia y la autoinmunidad se han realizado esfuerzos cada vez mayores y sistemáticos para mapear los antígenos de células T asociados. Sin embargo, estos son procedimientos desafiantes y los esfuerzos para describir sistemáticamente los antígenos de células T asociados con diferentes contextos clínicos se ven obstaculizados por la ausencia de protocolos eficientes, sólidos, rápidos y escalables.

Específicamente, las células cancerosas representan un aspecto desafiante e importante ya que la mayoría de los péptidos presentados en la superficie de células malignas son autoantígenos o muy similares a autoantígenos. Por lo tanto, la selección tímica habrá eliminado los TCR que podrían reconocer fuertemente estos péptidos, mientras que al mismo tiempo el tumor habrá evolucionado para evadir el reconocimiento inmunológico. Esto significa que las respuestas inmunitarias potentes contra tumores establecidos son relativamente raras y los objetivos son difíciles de predecir o descubrir. Sin embargo, estas respuestas existen y, lo que es más importante, generalmente están asociadas con mejores resultados. El objetivo de dichas respuestas, los antígenos asociados a tumores (TAA), en la mayoría de los casos tendrán características distintivas de sí mismos y se derivarán de proteínas que se sobreexpresan durante el desarrollo del cáncer, que de otro modo estarían ausentes del tipo de célula en esta etapa de desarrollo o específicamente alteradas mediante mutación genética o modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación.

Cuando está disponible, el conocimiento de dichos epítomos permite interrogar la respuesta de las células T asociadas con fines de descubrimiento fundamental, diagnóstico y, por ejemplo, como prueba de la eficacia de una vacuna. Es importante que también proporciona objetivos muy específicos para la tolerización de las células T en alergias y autoinmunidad y, lo que es más importante, apuntan hacia objetivos valiosos para la inmunoterapia específica y contra células malignas. Las neoplasias malignas representan un objetivo particularmente valioso, ya que la promesa de las inmunoterapias celulares y el progreso en las manipulaciones de las células T se ven frenados por la falta de TAA objetivo validados que vayan más allá de los pocos casos en los que se encuentran disponibles marcadores específicos para el tipo de cáncer.

A la luz del potencial de la terapia celular y la falta de objetivos validados, la identificación de antígenos de TCR prometedores sigue siendo uno de los obstáculos más apremiantes de la inmunoterapia basada en TCR, particularmente en el esfuerzo por tratar el cáncer.

Aspectos tecnológicos de los análisis de antígenos de células T y TCR.

En general, el desarrollo de terapias basadas en TCR se encuentra todavía en sus primeras etapas y el éxito ha sido limitado. Los enfoques de diagnóstico, si bien tienen un inmenso potencial, rara vez se han implementado en estudios clínicos controlados cuyo objetivo sea evaluar estados patológicos de los pacientes o la respuesta a la terapia. Las técnicas poco desarrolladas para la captura fiable de pares de cadenas de TCR nativas y el análisis sistemático de las interacciones TCR-antígeno de alto productividad y en un contexto funcional de comunicación célula-célula, han sido el principal obstáculo para el desarrollo de terapias y diagnósticos basados en TCR.

Los enfoques de secuenciación profunda han llevado a una mejor comprensión de la diversidad de receptores de células T en la salud y la enfermedad. Sin embargo, estos enfoques generalmente se han centrado en tramos cortos que abarcan las regiones CDR3, principalmente de la cadena β del 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 antigénica de los TCR que se consideran de interés. Los flujos de trabajo recientes que utilizan encapsulación de células individuales y códigos de barras genéticos han permitido el emparejamiento de pares de cadenas de TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ nativas 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 términos de especificidad de antígeno en modo biofísico o 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 lo tanto la generación de todos los TCR individuales, así como de los complejos de pHLA cognados. Esto es técnicamente muy desafiante, lento y de muy baja productividad. Además, dicho análisis sólo proporcionaría afinidades de interacción, que no están bien correlacionadas con las características funcionales de manera predecible.

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 analitos en células T primarias

o líneas de células T inmortales, y a la detección de respuestas celulares mediante análisis de citometría de flujo tradicional de activación celular, o detección de factores secretados de las células transfectadas tras la exposición al antígeno. En una publicación reciente de Guo et al, se describía la rápida clonación, expresión y caracterización funcional de cadenas de TCR emparejadas de células individuales (Molecular Therapy – Methods and Clinical Development (2016) 3:15054). En este estudio, los pares de TCR $\alpha\beta$ humano analitos se expresaron en una línea celular indicadora que carecía de expresión de TCR $\alpha\beta$ y que contenía un sistema indicador de proteína fluorescente verde (GFP) ligado al promotor Nur77 que se activa tras la estimulación con TCR. Este sistema sigue siendo ineficiente debido a la falta de integración estandarizada de TCR en el genoma de la línea celular indicadora y no proporciona una manera sistemática para la exposición al antígeno unido a células por un elemento de APC.

De manera similar a los flujos de trabajo para la identificación de TCR contra antígenos de células T conocidos, el nuevo descubrimiento de nuevos antígenos de células T en la salud y la enfermedad sigue siendo un gran desafío. La mayoría de los enfoques siguen siendo de naturaleza biofísica y tienen como objetivo producir antígenos candidatos que puedan ensayarse en protocolos de inmunización o mediante la identificación de TCR cognados como se mencionó anteriormente. Existe poca o ninguna estandarización en el campo del descubrimiento de antígenos de células T, y el campo está restringido en gran medida al estudio académico.

Con el interés creciente en los TCR y sus cognados tanto en uso terapéutico como de diagnóstico, y la aparición de medios para capturar un número significativo de pares de cadenas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ de TCR nativos, sigue existiendo una falta de tecnologías estandarizadas y de alta productividad fiables para el análisis sistemático de las interacciones antígeno-TCR. Es importante destacar que faltan sistemas estandarizados para el análisis funcional de pares de cadenas de TCR en el contexto nativo de comunicación célula-célula en donde tanto el TCR como el antígeno son presentados 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 célula-célula.

Como se describe, actualmente faltan tecnologías estandarizadas para la generación de células de alta productividad con pares de TCR expresados en un contexto celular nativo. Es muy deseable poseer un sistema en el que se puedan insertar pares de TCR de longitud completa como copias individuales en el genoma de una célula presentadora de TCR de manera que dichos TCR sean presentados en un complejo de superficie celular CD3 nativo para análisis y selección. Un par de TCR presentado en complejo CD3 garantiza que los análisis de afinidad reflejen la composición real de TCR nativo, lo que no es el caso del TCR monocatenario y otras tecnologías de presentación de TCR no nativos. Además, la presentación de pares de TCR en un complejo 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 y selección de TCR donde la salida de la señal es el parámetro que generalmente es de mayor importancia para usar en el contexto de medicamentos celulares y no está bien correlacionado con la afinidad de un TCR con antígeno cognado/HLA como se determina en otras plataformas de presentación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención aborda las necesidades mencionadas anteriormente. En particular, la presente invención se refiere a la construcción y uso de un sistema celular multicomponente modificado usado para el descubrimiento y caracterización de TCR y antígenos de células T. El sistema multicomponente, está compuesto por al menos tres componentes que son una célula presentadora de receptor de células T (TCR) genomodificada (eTPC), dos sitios de recepción genómica genomodificados y un vector donador genético de emparejamiento. La presente invención se utiliza para la generación rápida y de alto rendimiento de células derivadas estables que presentan pares de TCR de longitud completa (eTPC-t). La eTPC contiene al menos dos sitios de recepción genómica genomodificados. El sitio se utiliza para la integración rápida y estable de material genético que codifica pares de TCR, suministrado mediante un vector donador genético de emparejamiento. La eTPC también puede incluir un componente opcional, un elemento de respuesta a la estimulación del TCR, para la detección in vitro de la estimulación del TCR. El sistema multicomponente se puede utilizar para compilar elementos clave centrados en TCR de sistemas analíticos en inmunodiagnóstico clínico. Además, la presente invención se refiere al uso de dichas secuencias de pares de TCR identificadas y caracterizadas para la producción de productos inmunoterapéuticos y de inmunodiagnóstico.

La presente invención permite un sistema altamente estandarizado para el ensamblaje de diversas formas de eTPC analitos de manera sistematizada. Esta estandarización y sistematización se logra mediante la integración en el genoma altamente definida y controlable del ORF de la cadena de TCR con subsistemas de vector donador coincidente / sitio de recepción genómica. Este sistema controlable y predecible proporciona una eficiencia significativa al procedimiento que genera poblaciones de eTPC analíticas que expresan el TCR analito en su superficie celular, lo que reduce el tiempo del ciclo y los costes de dicho procedimiento, en comparación con sistemas anteriores que se han basado en la integración aleatoria usando integración genómica no guiada y/o enfoques virales. Además, el diseño del sistema es en parte para garantizar un número

- de copias controlable del ORF del TCR integrado, generalmente una única copia de cada cadena, lo que permite un control estricto sobre los niveles de expresión del TCR integrado expresado en superficie. Este es un aspecto importante para el análisis de la afinidad relativa o la salida de señalización de colecciones de pares de TCR. Además, la capacidad de integración de una sola copia del ORF del TCR a partir de un conjunto de
- 5 vectores permite la llamada "integración de escopeta", en donde cada célula integrada con un vector donador sólo puede recibir un único ORF de una biblioteca de vectores, que potencialmente codifica una población diversa de ORF de TCR. Esto permite la conversión de bibliotecas de ORF de TCR codificadas en vectores donadores, en bibliotecas de eTPC que expresan un único par de TCR analito deseado en la superficie celular; que representa esencialmente un sistema de matriz basado en células similar a un sistema de presentación
- 10 en bacteriófago o levadura. Dichos sistemas de matriz pueden facilitar la identificación de secuencias de TCR contra antígenos específicos y/o identificar las especificidades del antígeno contenidas dentro de una biblioteca de secuencias de TCR al garantizar que se expresa un único par de TCR analito en una única célula que pueda recuperarse para una identificación basada en secuenciación.
- 15 Otro aspecto clave de una eTPC es la falta de expresión de complejos presentadores de antígenos. Generalmente, la eTPC debe modificarse para que carezca al menos de expresión de HLA de clase I. Esta es una característica importante, ya que elimina la posibilidad de autopresentación de antígenos por la eTPC-t, para TCR expresado por y para la eTPC-t. Esto reducirá la tasa de falsos positivos en la detección de respuestas específicas de antígeno en flujos de trabajo que utilizan la adición de antígeno libre exógeno.
- 20 Además, esto permite flujos de trabajo analíticos de cultivo mixto, donde las células APC analitos que presentan HLA particular se pueden premezclar con eTPC-t y se puede añadir antígeno exógeno directamente al sistema de cultivo mixto sin la posibilidad de que la eTPC-t autopresente el antígeno analito. Esto mejora enormemente la flexibilidad y eficiencia del producto de eTPC-t.
- 25 La presente invención se refiere a proporcionar un sistema multicomponente modificado cuyos componentes se utilizan para preparar una o más eTPC-t analitos. Estas eTPC-t analitos luego se combinan con uno o más antígenos analitos (colectivamente el sistema eTPC:antígeno, eTPC:A) para obtener uno o más resultados. El antígeno analito es proporcionado por células presentadoras de antígeno (APC) analitos y/o como antígeno analito soluble o inmovilizado y/o presentado en partículas no basadas en células (NCBP).
- 30 La forma mínima del sistema multicomponente comprende un primer componente eTPC, denominado componente A, y un segundo componente es un vector donador genético, denominado componente C (Figura 1).
- 35 Una eTPC representa el componente base del sistema multicomponente, con el que se asocian todos los demás componentes del sistema. Por lo tanto, la eTPC contiene ciertas características, que son nativas o modificadas, que hacen que la eTPC sea adecuada para usar para crear poblaciones de eTPC-t analitos y su uso.
- 40 La eTPC, componente A,
- i. Carece de expresión endógena de las cadenas de TCR alfa, beta, delta y gamma, y
 - ii. Expresa proteínas CD3 que son presentadas condicionalmente en la superficie de la célula solo
 - 45 cuando la célula expresa un par de cadenas de TCR complementarias y
 - iii. Contiene un componente adicional, denominado B y D, dos sitios de recepción genómica para la integración de un único ORF que codifica al menos una cadena de alfa, beta, delta o gamma de TCR analito, y/o dos ORF que codifican un par de cadenas de TCR analitos.
- 50 en donde i) puede obtenerse por selección de una población de células naturales que carecen de dicha expresión, o puede modificarse para carecer de dicha expresión; ii) puede obtenerse mediante selección de una población de células naturales que comprenden dicha expresión, o puede genomodificarse para que comprenda dicha expresión; iii) se puede introducir o se introduce en el genoma mediante ingeniería genética.
- 55 En las Figuras 31 a 37 se presentan métodos que detallan los diferentes medios con los que se obtiene dicha célula.
- La selección de una célula eTPC candidata que carece de cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR a partir de poblaciones de células naturales se puede lograr mediante métodos bien conocidos en la técnica. La tinción
- 60 de células objetivo 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.
- La genomodificación de una eTPC para que carezca de expresión de las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR se puede lograr mediante medios dirigidos y no dirigidos. La mutagénesis no dirigida de la célula se
- 65 puede lograr proporcionando a la célula un mutágeno químico, radiológico u otro, y luego seleccionando las células que carecen de expresión de las cadenas alfa, beta, delta y gamma de TCR objetivo. La mutación

dirigida de los locus genómicos se puede lograr mediante diferentes medios, que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio mediante

- 5 i. nucleasas de dedos de cinc
- ii. direccionamiento mediado por CRISPR/Cas9
- iii. nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN) sintéticas

10 en donde dichas nucleasas dirigidas al sitio inducen mutagénesis de error de reparación de ADN específica de un sitio en los locus objetivo, después de lo cual se obtienen células mutadas seleccionando células que carecen de expresión de TCR alfa, beta, delta y gamma.

15 Las opciones para la integración de CD3 y los componentes B y/o D son bien conocidas por los expertos en la técnica, pero pueden incluir recombinación dirigida por homología (HDR) y/o métodos de integración aleatoria, en donde la HDR se puede promover por mutación dirigida de los locus genómicos en los que se va a producir la HDR, y se puede lograr a través de diferentes medios, incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio mediante

- 20 i. nucleasas de dedos de cinc
- ii. direccionamiento mediado por CRISPR/Cas9
- iii. nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN) sintéticas

25 en donde dichas nucleasas dirigidas al sitio inducen la reparación del ADN específico del sitio por HDR en los locus objetivo. Después de dichos sucesos, una proporción de células tendrá incorporado el vector de HDR, y puede seleccionarse y/o determinarse mediante cualquier combinación de los siguientes,

- 30 iv. Análisis de expresión fenotípica no destructivo
- v. Análisis de expresión fenotípica destructivo
- vi. Análisis genético

35 En donde iv y vi son los métodos preferidos para la selección y determinación de sucesos de integración genómica exitosos.

40 Alternativamente, se podrían usar vectores virales para suministrar los componentes requeridos de una manera dirigida al sitio o no dirigida.

Teniendo en cuenta que el componente A eTPC está diseñado para usarse junto con los antígenos analitos dentro de los flujos de trabajo analíticos, en el aspecto preferido la eTPC contiene características que minimizan los factores de presentación de eTPC que interferirían en dichos análisis.

45 El componente A eTPC opcionalmente carece de expresión de superficie endógena de al menos una familia de complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) y/o moléculas antigénicas analitos (aAM), en donde la falta de expresión de superficie se selecciona para minimizar la interferencia en análisis coincidentes de antígenos analitos objetivo.

50 La familia de aAPX puede ser cualquiera de las siguientes

- i. HLA de clase I
- 55 ii. HLA de clase II
- iii. complejo presentador de antígeno no HLA.

Una aAM se selecciona de

- 60 i. un polipéptido o complejo de polipéptidos traducido del(de los) ORF(s) de la molécula antigénica analito
- ii. un péptido derivado de un polipéptido traducido del(de los) ORF(s) de la molécula antigénica analito
- 65 iii. un péptido derivado de la alteración del proteoma del componente A

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

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

5

El componente A eTPC puede incluir adicionalmente opcionalmente correceptores de células T, en donde dichas características permiten formas robustas o variables de comunicación de la eTPC analito a la APC analito, en donde la comunicación ajustable es relevante para la identificación o caracterización de TCRsp analito específico y/ o antígenos analitos.

10

En el presente contexto, el componente A eTPC puede expresar opcionalmente CD4 y/o CD8, donde la expresión de CD4 o CD8 restringe a la eTPC para acoplarse con aAPX de tipo HLAII y HLAI, respectivamente.

15

El componente A eTPC puede expresar opcionalmente CD28 y/o CD45, en donde CD28 y CD45 contribuyen a la sensibilidad de la señal a través de efectos de realimentación positivos en la señalización, mientras que también pueden contribuir a la especificidad de la señal a través de efectos negativos de retroalimentación en la señalización, en lo que se refiere a la señalización a través de un TCRsp analito expresado.

20

El componente A eTPC puede incluir adicionalmente opcionalmente componentes de moléculas de adhesión de superficie celular introducidos, o la supresión de moléculas endógenas de adhesión de superficie celular, para promover el acoplamiento de eTPC con APC analito y la formación de la sinapsis inmunológica, o para evitar una unión estrecha y la formación de agrupaciones celulares nocivas dentro de los flujos de trabajo analíticos que implican APC, respectivamente.

25

Dichas moléculas de adhesión que pueden introducirse como ORF adicionales en el componente A, o suprimirse genéticamente de A, pueden seleccionarse de la familia de integrinas de las proteínas de adhesión.

30

El segundo componente del multicomponente mínimo es un vector donador genético, componente C, que se usa para la integración de al menos un ORF que codifica al menos una cadena de TCR analito (Figura 1).

35

El componente C es un vector donador genético que se acopla con el sitio de recepción genómica de B, contenido dentro del genoma de la eTPC, Componente A. El componente C está diseñado para la integración de uno o más ORF que codifican una cadena de TCR analito, codificada en el vector donador genético, en el sitio de recepción genómica, B, en donde la integración da como resultado la expresión de cadenas de TCR analitos por la eTPC objetivo.

Un vector donador genético y un sitio de recepción genómica emparejados se describen como una pareja de integración.

40

Una eTPC está diseñada para responder a la estimulación por un antígeno cognado, dentro de flujos de trabajo analíticos que utilizan el sistema eTPC:A. Por lo tanto, es deseable tener una lectura de indicador normalizada para la señalización de respuesta de la estimulación del TCRsp expresado.

45

El componente A eTPC contiene además un componente denominado componente F, un elemento de respuesta a la estimulación de TCR genómico sintético seleccionado de

i. Una construcción sintética de un solo componente que contiene al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador

50

ii. Una construcción sintética multicomponente diseñada con al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador

en donde 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.

55

Una eTPC está diseñada para analizar el acoplamiento del TCRsp presentado con un antígeno analito. La lectura del acoplamiento se puede lograr mediante la inducción de un elemento indicador sintético que responde al acoplamiento del TCRsp. Por lo tanto, la eTPC puede contener además un componente denominado F, un elemento de respuesta a la estimulación de TCR genómico sintético seleccionado de

60

iii. Una construcción sintética de un solo componente que contiene al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador

65

iv. Una construcción sintética multicomponente diseñada con al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador

en donde 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.

5 Es menos probable que los elementos sintéticos de respuesta a la estimulación de TCR (componente F), con promotores sintéticos en lugar de nativos, imiten una respuesta de estimulación de TCR natural y, por lo tanto, representan una aproximación más distante a la estimulación natural de células T. Sin embargo, los promotores sintéticos proporcionan una mayor flexibilidad para sintonizar y ajustar la respuesta del indicador para la identificación robusta de eTPC-t que presentan TCRsp que acoplan productivamente el antígeno analito.

10 Las construcciones sintéticas de un solo componente proporcionan un espacio limitado para la amplificación o modulación de la señal de respuesta del indicador, pero son más sencillas de implementar y predecir el resultado. Las construcciones multicomponente tienen la ventaja de tener un espacio prácticamente ilimitado para construir redes de respuestas complejas; sin embargo, esto tiene el coste de ser más difíciles de implementar y predecir. Una red también proporciona casos para iniciar ciclos de retroalimentación, represión y activación de indicadores de respuesta secundaria.

15 Los promotores sintéticos se pueden ligar a componentes de señalización sintéticos artificiales, que pueden estar situados más abajo de la ruta de señalización natural inicial del TCR o sustituirla. En tal caso, el complejo CD3 puede acoplarse parcial o totalmente a una ruta de señalización sintética artificial y a una red de respuestas. Estas rutas artificiales ofrecen la ventaja de ser muy modulares y adaptables, para un mayor ajuste o una mayor variedad de respuestas.

20 La realización preferida utiliza una construcción sintética multicomponente con promotores sintéticos y al menos una ruta de señalización sintética parcial. Esto proporciona el medio más consistente para asegurar una señal de respuesta en estado de reposo limitada pero con una señal indicadora acoplada alta cuando se produce el ligado del antígeno analito al TCRsp.

25 Independientemente de la arquitectura exacta de acoplamiento de la estimulación de TCRsp a un componente F, el resultado final deseado es un indicador detectable. En la realización preferida, se desea un indicador que sea susceptible a la detección fluorescente (es decir, FACS) y/o a métodos de selección física tales como la separación 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 donde las poblaciones pueden seleccionarse posteriormente basándose en la presencia o ausencia de la molécula indicadora. Además, la respuesta no se limita a un solo tipo de indicador, sino que podría ser una combinación de uno o más indicadores diferentes.

En un contexto, una construcción sintética multicomponente con promotores sintéticos y una ruta de señalización sintética parcial (Controlador-Activador/Represor + Amplificador-Indicador) comprendería:

40 Conductor-Activador/Represor:

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

50 Amplificador-Indicador

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

60 en donde; a) Representa un promotor sintético (Controlador) que está diseñado para acoplarse a la ruta de señalización natural inicial generada por el ligado del TCRsp al antígeno analito. Un controlador mínimo comprende uno o más sitios de unión de factores de transcripción y un promotor central, en donde 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 Kozak para el inicio eficiente de la traducción del factor de transcripción; c) Representa un ORF que codifica un factor de transcripción sintético o natural (activador o represor), 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 uno o más elementos genéticos 3' no traducidos opcionales. Estos elementos genéticos pueden incluir, pero no se limitan a, elementos estabilizadores o desestabilizadores del transcrito y secuencias identificadoras únicas; e) Representa un segundo promotor sintético (Amplificador), que codifica uno o más sitios de reconocimiento para la unión del c) factor de transcripción y un promotor central, en donde el promotor central comprende, como mínimo, una caja TATA, Inr y el sitio de inicio transcripcional; f) Representa una secuencia Kozak para el inicio de la traducción eficiente del indicador; g) Representa un ORF que codifica una proteína indicadora; h) Representa un terminador transcripcional para la transcripción y poliadenilación eficientes del transcrito de ARNm indicador, y uno o más elementos genéticos 3' no traducidos opcionales. Estos elementos genéticos pueden incluir, pero no se limitan a, elementos estabilizadores o desestabilizadores del transcrito y secuencias identificadoras únicas.

Es importante reconocer que el paradigma Controlador-Activador/Represor acoplado al Amplificador-Indicador se puede ampliar para incluir pares de Controlador-Activador/Represor y Amplificador-Indicador adicionales y/o unidades de Amplificador-Indicador adicionales. Además, los activadores se pueden reemplazar con represores para suspender unidades de amplificador-indicador y/o unidades controlador-activador/represor, para métodos de selección negativa y/o bucles de retroalimentación negativa.

En un segundo contexto, una construcción sintética de un solo componente con promotores sintéticos (Controlador-Indicador) comprendería:

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

en donde;

a) Representa un promotor sintético (Controlador) que está diseñado para acoplarse a la ruta de señalización natural inicial generada por el ligado del TCRsp al antígeno analito. Un controlador mínimo comprende uno o más sitios de unión de factores de transcripción y un promotor central, en donde el promotor central comprende, como mínimo, una caja TATA, Inr y sitio de inicio de la transcripción; b) Representa una secuencia Kozak para el inicio eficiente de la traducción del indicador; c) Representa un ORF que codifica una proteína indicadora; d) Representa un terminador transcripcional para la transcripción y poliadenilación eficientes del transcrito de ARNm indicador, y uno o más elementos genéticos 3' no traducidos opcionales. Estos elementos genéticos pueden incluir, pero no se limitan a, elementos estabilizadores o desestabilizadores del transcrito y secuencias identificadoras únicas

El componente A eTPC contiene además un segundo sitio de recepción genómica, denominado componente D, que se acopla con un segundo vector donador genómico, denominado componente E, que también se añade al sistema (Figura 2). En las Figuras 37 a 38 se presentan métodos que detallan los diferentes medios con los que se obtiene dicha célula.

El componente A del sistema multicomponente puede comprender además una o más parejas de integración adicionales.

El sistema multicomponente, que comprende una eTPC y una o dos parejas de integración, se utiliza para la preparación de la eTPC-t utilizada en flujos de trabajo analíticos o preparativos.

Se puede preparar una eTPC-t mediante la integración de dos cadenas de TCR complementarias para formar un TCRsp o, alternativamente, se puede preparar mediante dos etapas proporcionando cada cadena complementaria de forma secuencial (Figura 3).

El vector donador genético y los sitios de recepción genómica operan como un subsistema de pareja de integración del sistema multicomponente. Primero se debe combinar un vector donador genético con los ORF objetivo, de modo que el vector donador base codifique ahora esos ORF objetivo. Luego, el vector donador con cebador ensamblado se introduce en la eTPC objetivo para intercambiar el(los) ORF objetivo con el sitio de recepción genómica, integrando así los ORF objetivo en el sitio de recepción acoplado de la célula objetivo (Figura 4).

Un sistema multicomponente que comprende vectores donadores genéticos, componente C y/o E, se combina con al menos un ORF que codifica al menos una cadena de TCR analito para obtener el componente C' y/o E', en donde la combinación se define como el ligado de material genético en el(los) marco(s) codificante(s)

correcto(s) y en la(s) orientación(s) correcta(s) del vector donador genético.

La combinación de uno o más ORF en vectores donadores genéticos C y/o E se puede realizar varias veces con una biblioteca de ORF únicos como

- 5 i. reacciones discretas únicas para obtener una biblioteca discreta de vectores C' y/o E' que codifican múltiples ORF
- 10 ii. una única reacción para obtener una biblioteca agrupada de vectores C' y/o E' que codifican múltiples ORF

15 en donde una biblioteca discreta se puede combinar con el componente A múltiples veces para obtener así una biblioteca discreta de eTPC-t con ORF únicos que codifican cadenas de TCR únicas, o una biblioteca agrupada se puede combinar con el componente A una o más veces para obtener una o más bibliotecas agrupadas de la eTPC-t en donde cada eTPC-t integra uno o más ORF aleatorizados que codifican cadenas de TCR analito derivadas del conjunto de vectores original, de modo que cada eTPC-t expresa un solo TCRsp aleatorio único.

20 La integración eficiente de un número de copias predecible de uno o más ORF en el sitio de recepción genómica es muy ventajosa para el funcionamiento de una eTPC normalizada, donde las poblaciones de eTPC analitos pueden prepararse y caracterizarse rápidamente. Por lo tanto, el(los) sitio(s) de recepción genómica y el(los) vector(es) donador(es) acoplado(s) son críticos para la función de la eTPC. Además, es muy deseable tener una eTPC en donde los componentes B y D estén aislados entre sí, de modo que el componente C vector donador no pueda integrarse en el componente B, y viceversa. Además, también es deseable que el

25 componente B y/o el componente D sean sensibles a un método de preparación de una eTPC-t en donde la introducción de un único par de cadenas de TCR complementarias sea rápida, repetible y con una alta probabilidad de correcta integración y suministro de solo un único par.

30 El sitio de recepción genómica puede seleccionarse de los siguientes

- 30 i. Una construcción sintética diseñada para el intercambio de casetes mediado por recombinasa (RMCE)
- 35 ii. Una construcción sintética diseñada para recombinación homóloga dirigida al sitio

en donde i) es la forma preferida de un sitio de recepción genómica para RCME. El método de RMCE puede emplear sitios heteroespecíficos seleccionados que son específicos para enzimas recombinasas individuales, de modo que cada componente B y D posea especificidad aislada.

40 El sitio de recepción genómica, componente B y/o componente D, comprende al menos uno de los siguientes elementos genéticos

- i. Sitios de recombinasa heteroespecíficos
- 45 ii. Brazos homólogos
- iii. Promotor eucariota
- iv. Elemento regulador condicional eucariota
- 50 v. Terminador eucariota
- vi. Marcador de selección
- 55 vii. Sitio aceptador de corte y empalme
- viii. Sitio donador de corte y empalme
- ix. Gen codificante de no proteína
- 60 x. Aislante
- xi. Elemento genético móvil
- 65 xii. Sitio de reconocimiento de meganucleasa

xiii. Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)

xiv. Elemento peptídico viral autoescindible

5 xv. Una secuencia de consenso Kozak

Un sitio de recepción genómica preferido comprendería dos disposiciones diferentes utilizando los siguientes elementos seleccionados de la lista de elementos indicada previamente.

10 La primera disposición es para recibir un solo ORF que codifica una o más cadenas de TCR y/o una marca de selección de integración, mediante integración de RMCE en donde la disposición es

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

15 en donde

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

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

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

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

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

F) es el elemento v) terminador eucariota

30 La segunda disposición es para recibir dos ORF que codifican una o más cadenas de TCR y/o una marca de selección de integración, mediante integración de RMCE en donde la disposición es

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

en donde

35 A) es el elemento iii) un promotor eucariótico constitutivo o inducible

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

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

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

45 E) es el elemento v) un terminador transcripcional bidireccional eucariota

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

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

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

I) es el elemento iii) un promotor eucariótico constitutivo o inducible

además, en esta segunda disposición los elementos F, G e I están codificados en dirección antisentido.

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

i. Sitios de recombinasa heteroespecíficos

60 ii. Brazos homólogos

iii. Promotor eucariota

65 iv. Elemento regulador condicional eucariota

v. Terminador eucariota

- vi. Marcador de selección
- 5 vii. Sitio aceptador de corte y empalme
- viii. Sitio donador de corte y empalme
- ix. Gen codificante de no proteína
- 10 x. Aislante
- xi. Elemento genético móvil
- xii. Sitio de reconocimiento de meganucleasa
- 15 xiii. Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)
- xiv. Elemento peptídico viral autoescindible
- 20 xv. Una secuencia de consenso Kozak
- xvi. Marcador de selección de integración
- xvii. Un casete de resistencia a antibiótico
- 25 xviii. Un origen de replicación bacteriano
- xix. Un origen de replicación de levadura
- 30 xx. Un sitio de clonación

Un vector donador genético preferido, componente C y/o componente E, comprendería dos posibles disposiciones diferentes utilizando los siguientes elementos seleccionados de la lista de elementos previamente indicada.

- 35 La primera disposición es para suministrar un solo ORF que codifica una o más cadenas de TCR y/o una marca de selección de integración, mediante integración de RMCE en donde la disposición es

40 5' - [A] [B] [C] [D] [E] - 3'
en donde

- A) es el elemento i) sitio 1 de recombinasa heteroespecífico
- 45 B) es el elemento xv) una secuencia Kozak de consenso
- C) es el elemento xx) un sitio de clonación de un solo ORF que codifica una o más cadenas de TCR y/o el elemento xvi) un marcador de selección de integración
- 50 D) es el elemento i) sitio 2 de recombinasa heteroespecífico
- E) es el elemento xvii) un casete de resistencia a antibiótico y el elemento xviii) un origen de replicación bacteriano, sin orientación específica

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

La segunda disposición es para suministrar dos ORF que codifican una o más cadenas de TCR y/o una marca de selección de integración, mediante integración de RMCE en donde la disposición es

60 5' - [A] [B] [C] [D] [E] [F] - 3'
en donde

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

- B) es el elemento xv) una secuencia Kozak de consenso
- C) es el elemento xx) un sitio de clonación para la introducción de dos o más ORF, con terminadores eucariotas, que codifican una o más cadenas de TCR y/o el elemento xvi) un marcador de selección de integración
- 5 D) es el elemento xv) una secuencia Kozak de consenso (dirección antisentido)
- E) es el elemento i) sitio 2 de recombinasa heteroespecífico
- 10 F) es el elemento xvii) un casete de resistencia a antibiótico y el elemento xviii) un origen de replicación bacteriano, sin orientación específica
- además, los elementos viii y/o xiv pueden usarse para unir múltiples cadenas de TCR y/o el elemento xvi entre sí dentro de cada ORF.
- 15 Preparación de poblaciones de eTPC-t analito
- El sistema multicomponente descrito anteriormente se puede usar de múltiples maneras para preparar distintas formas de poblaciones de eTPC analito, o bibliotecas de las mismas, que sirven para presentar el TCRsp analito al antígeno analito dentro de los flujos de trabajo analíticos o preparativos del sistema eTPC:A.
- 20 Las poblaciones de eTPC-t que se crean necesitan derivar cadenas de TCR analito de determinadas fuentes con las que analizar antígenos candidatos.
- 25 Las fuentes de secuencias que codifican cadenas de TCR analito pueden derivarse de
- i. Clonación emparejada de secuencia(s) de ORF de la cadena de TCR de células T primarias
 - 30 ii. Clonación no emparejada de secuencia(s) de ORF de la cadena de TCR de células T primarias
 - iii. Secuencia(s) ORF de cadena de TCR sintética(s)
- en donde i) es preferible para el descubrimiento de TCRsp nativos que no sea probable que tengan de forma general reactividad cruzada contra aAPX propios y/o la carga de aAPX debido a la selección tímica; ii) se puede usar para identificar reactivos de afinidad por TCR candidatos; iii) se puede usar en la maduración de la afinidad de reactivos de afinidad por TCR.
- 35 Se puede usar un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eTPC-t a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con un ORF para el par de cadenas de TCR complementarias, de modo que este par de TCR analito es integrado en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa el par de TCR proporcionado y es presentado en la superficie celular como un TCRsp. La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración situadas más abajo (Figura 6).
- 40 45 Se puede usar un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eTPC-t a partir del componente A en una etapa, proporcionando los componentes C' y E' cada uno combinado con un ORF que codifica una cadena de un par de cadenas de TCR complementarias, de modo que ambas cadenas de TCR analitos son integradas en el sitio B o D, para crear B' y D'. La línea celular resultante expresa el par de TCR proporcionado y es presentado en la superficie celular como un TCRsp. (Figura 7).
- 50 Se puede usar un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eTPC-x a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con un ORF para una sola cadena de TCR analito, de modo que esta cadena de TCR analito sea integrada en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa la cadena de TCR proporcionada, pero carece de una cadena complementaria y, por lo tanto, no expresa ningún TCR de superficie. La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración secuencia abajo (Figura 8).
- 55 Se puede usar un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eTPC-t a partir del componente A en dos etapas, proporcionando primero el componente C' combinado con un ORF para una sola cadena de TCR analito, de modo que esta cadena de TCR analito sea integrada en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa la cadena de TCR proporcionada, pero carece de una cadena complementaria y, por lo tanto, no expresa ningún TCR de superficie (eTPC-x intermedio). La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificaciones. En la segunda etapa se proporciona E', en donde el vector se combina con un ORF para una segunda cadena de TCR analito única, complementaria de la cadena de TCR previamente integrada, de modo que esta segunda cadena de TCR analito complementaria es
- 60 65

integrada en el sitio D, para crear D'. La línea celular resultante expresa el par de cadenas de TCR analito complementarias proporcionado y es presentado en la superficie celular como un TCRsp. (Figura 9).

5 En los ejemplos mencionados anteriormente de preparación de poblaciones de eTPC-x y/o eTPC-t analitos a partir de eTPC, el sistema multicomponente se usa para proporcionar cadenas de TCR analito conocidas de una manera definida para preparar poblaciones discretas de eTPC analito que expresan TCRsp definidos. Dicho procedimiento se puede repetir muchas veces para crear bibliotecas de eTCP-x y/o eTCP-t para proporcionar flujos de trabajo analíticos o preparativos. Un enfoque alternativo es tomar bibliotecas agrupadas de cadenas de TCR analito combinadas con vectores de donadores genéticos e integrarlas en modo escopeta para obtener bibliotecas agrupadas de eTPC-t analito, en donde cada eTPC-t integra un único par aleatorio de ORF de TCR del conjunto de vectores original y, por lo tanto, cada eTPC-t expresa un único TCRsp aleatorio, pero colectivamente el conjunto codifica múltiples especies de TCRsp representadas en el conjunto de vectores original. Se puede aplicar el mismo principio de escopeta para crear grupos de eTPC-x. Esto es particularmente útil cuando se analizan bibliotecas grandes de TCRsp candidatos frente a antígenos analitos.

15 Se puede usar un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar un conjunto de eTPC-t a partir del componente A en una sola etapa, proporcionando el componente C' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican un conjunto de pares de TCR analito, de modo que un par es integrado en el sitio B, para crear B', dentro de cada célula y en donde cada eTPC integra un único par aleatorio de ORF de TCR del conjunto de vectores original y, por lo tanto, cada eTPC-t expresa un único TCRsp aleatorio, pero colectivamente el conjunto codifica múltiples especies de TCRsp representadas en el conjunto de vectores original. El conjunto de células resultante contiene una colección de células que expresan colectivamente múltiples TCRsp analitos. La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificaciones. (Figura 11).

25 Se puede usar un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar un conjunto de eTPC-t a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican un conjunto de cadenas de TCR analito único de modo que cada eTPC integra un ORF de cadena de TCR aleatoria única codificada en el componente C' en el sitio B, para crear B'. Simultáneamente, proporcionar el componente E' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican un conjunto de cadenas de TCR analito únicas complementarias de la primera biblioteca proporcionada en C', de modo que cada eTPC-t integra un ORF de cadena de TCR complementaria aleatorizada única codificada en el componente E' en sitio D, para crear D'. Cada célula resultante en el conjunto de eTPC-t tiene un único par de ORF de cadenas de TCR complementarias aleatorizadas, de modo que cada célula del conjunto expresa un TCRsp aleatorizado. Dicha biblioteca agrupada contendría todas las combinaciones posibles de cadenas de TCR complementarias proporcionadas de los conjuntos que proceden de los componentes C' y E' (Figura 12).

40 Se puede usar un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar un conjunto de eTPC-t a partir de una e-TPC-x obtenida previamente en una etapa, en donde el sitio B se ha convertido en B' y contiene la cadena de TCR analito única. Se prepara una eTPC-t proporcionando el componente E' combinado con una biblioteca de múltiples ORF que codifican un conjunto de cadenas de TCR analito únicas complementarias de la cadena ya integrada, de modo que cada eTPC-t integra un único ORF de cadena de TCR aleatorizada de la biblioteca de E' proporcionada en el sitio D, para crear D'. Cada célula resultante en el conjunto de eTPC-t tiene la cadena del TCR analito proporcionada por la eTPC-x inicial y una selección de cada cadena de TCR analito complementaria única, de modo que cada célula en el conjunto expresa un par aleatorio de ORF como un TCRsp. Este enfoque se utiliza cuando se analiza el efecto de variar una única cadena frente a una cadena fija en un par de cadenas de TCR complementarias (Figura 13).

50 Se puede preparar una eTPC-x a partir de una eTPC-t que comprende dos parejas de integración proporcionando uno de los vectores de integración adicionales, componentes Y o Z, que codifican marcadores de integración o ningún ORF. La combinación del componente Y o Z con una eTPC-t intercambiaría cualquiera de los sitios para obtener eTPC-x que expresa una única cadena de TCR (Figura 14).

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

60 Se puede usar una eTPC-x, o bibliotecas de la misma, para la transfección transitoria de un ORF de cadena de TCR que es complementario del ORF de cadena de TCR integrado en B' o D' en la eTPC-x, con el fin de cribar rápidamente derivados de TCRsp en un ensayo objetivo.

Contacto de la eTPC-t analito con el antígeno analito

65 La presente invención se refiere a proporcionar un sistema multicomponente modificado. El componente A y uno o más componentes C' y/o uno o más componentes E' se utilizan para ensamblar una o más eTPC-t

analitos. Las poblaciones de eTPC-t analitos para la compilación de dispositivos analíticos que se denominan colectivamente sistemas eTPC:Antígeno (eTPC:A) (Figura 24). Dentro del sistema multicomponente, uno o más componentes C' y/o uno o más componentes E' se combinan con el componente A para generar diversas formas de eTPC-t analito. Estas eTPC-t analitos luego se combinan con uno o más antígenos analitos dentro de un sistema eTPC:A analítico para obtener uno o más resultados. El antígeno analito es proporcionado por células presentadoras de antígeno analito (APC) y/o como reactivo de afinidad soluble o inmovilizado y/o presentado en partículas no basadas en células (NCBP).

Un antígeno analito representa cualquier entidad con la que un TCR supuestamente puede acoplarse en el sistema eTPC:A, y puede estar representado por;

- i. aAPX (complejo presentador de antígeno analito) y/o
- ii. aAM (molécula antigénica analito) y/o
- iii. aAPX:aAM (complejo presentador de antígeno analito que presenta una molécula antigénica analito) y/o
- iv. CM (una molécula de carga no analito) y/o
- v. aAPX:CM (complejo presentador de antígeno analito que presenta una molécula de carga)

en donde un aAPX representa un complejo que es capaz de presentar una aAM; una aAM es cualquier molécula que es reconocida directamente por un TCR o cuando se carga en un aAPX; un aAPX:aAM es un aAPX con una aAM cargada; una CM es una molécula de carga que se puede cargar en el aAPX, pero que no es un analito, por lo tanto se puede derivar de una célula presentadora de antígeno (APC) analito o del propio sistema de ensayo; aAPX:CM es un aAPX con una CM cargada.

Estas formas de antígenos analitos pueden presentarse a la eTPC en diferentes modos dentro de un sistema eTPC:A, representado como;

- i. una célula presentadora de antígeno (APC) analito y/o
- ii. un reactivo de afinidad soluble o inmovilizado y/o
- iii. una partícula no basada en célula (NCBP),

en donde una célula presentadora de antígeno (APC) analito se considera cualquier APC que sea capaz de presentar un antígeno a la eTPC-t; se considera un reactivo de afinidad a cualquier reactivo que se prepara como analito para detectar la unión de TCRsp y/o estimulación en la superficie celular de la eTPC-t en un sistema eTPC:A. Dichos reactivos a menudo representarán moléculas antigénicas analitos (aAM), complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) o aAPX cargado con aAM (aAPX:aAM). Un ejemplo típico de un aAPX:aAM es un reactivo multímero de pHLA (p. ej., "tetrámeros") utilizado para teñir los TCR. Los reactivos de afinidad en este contexto también podrían representar anticuerpos o entidades similares; una partícula no basada en célula (NCBP) actúa de manera similar a un reactivo de afinidad, en la medida en que la partícula presenta un antígeno analito u otra entidad en la que se va a evaluar el acoplamiento del TCRsp en la superficie de una eTPC-t dentro de un sistema eTPC:A. Sin embargo, una NCBP se considera como una entidad más grande que puede transportar además información genética o de otro tipo que va a actuar como identificador, ya sea directamente o por representación, del antígeno analito presentado u otra entidad de unión. Un ejemplo típico de una NCBP sería un bacteriófago en un escenario de presentación en fagos, en donde el fago puede presentar fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (FAB). La eTPC-t marcada positivamente puede recuperarse junto con el fago y secuenciarse para identificar los FAB específicos para el TCRsp en la superficie de una eTPC-t.

Un sistema analítico eTPC:A está compuesto de una selección de uno o más antígenos analitos con una o más poblaciones de eTPC-t (Figura 24). Las poblaciones de eTPC-t analito se preparan utilizando el sistema multicomponente como se describe anteriormente (Figuras 1 a 14). El sistema eTPC:A se proporciona en un formato que permite el contacto físico entre los antígenos analitos y las poblaciones de eTPC-t analitos, en donde dicho contacto permite la formación de complejos entre uno o más antígenos analitos y TCRsp de una o más eTPC-t analitos, en donde el antígeno analito es cualquiera de los siguientes

- i. aAPX (complejo presentador de antígeno analito) y/o
- ii. aAM (molécula antigénica analito) y/o
- iii. aAPX:aAM (complejo presentador de antígeno analito que presenta una molécula antigénica analito)

y/o

iv. CM (una molécula de carga no analito) y/o

5 v. aAPX:CM (complejo presentador de antígeno analito que presenta una molécula de carga)

10 en donde el antígeno analito se proporciona como presentado por una APC analito, o presentado por un reactivo de afinidad soluble y/o inmovilizado, o NCBP de manera que la formación de complejo puede conducir a la estabilización de dicho complejo y en donde dicha formación de complejos conduce a un marcaje observable de la eTPC-t y/o la inducción de señalización dentro de la eTPC analito a través del componente F, si está incluido y/o una señal observable en la APC analito que puede medirse.

En el presente contexto, un sistema eTPC:A comprende:

15 i. una entrada de una única eTPC-t analito; o

ii. una entrada de una biblioteca agrupada de eTPC-t analito

y combinado con uno de los siguientes:

20 iii. una entrada de una única APC analito; o

iv. una entrada de un único reactivo de afinidad analito; o

25 v. una entrada de una única NCBP analito; o

vi. una entrada de una biblioteca agrupada de APC analito; o

30 vii. una entrada de una biblioteca agrupada de reactivo de afinidad analito; o

viii. una entrada de una biblioteca agrupada de NCBP analito

Contacto en un sistema tampón

35 Un contacto entre una APC analito y una eTPC-t analito se realiza en un cultivo celular permisivo o sistema tampón, en donde dicho sistema comprende medios que son permisivos para la función tanto de la APC analito como de las células eTPC-t analito.

40 Un contacto entre un reactivo de afinidad analito soluble, de afinidad inmovilizado y/o una NCBP analito y una eTPC-t analito se realiza en un sistema tamponado permisivo, en donde dicho sistema comprende un medio tamponado que es permisivo para la función tanto del antígeno analito como de las células eTPC-t analito.

Marcado de eTPC-t con reactivos de afinidad o NCBP

45 Se puede utilizar una eTPC-t analito obtenida del dispositivo de dos partes para caracterizar un TCRsp presentado por la eTPC-t. Dicha caracterización se puede realizar de manera que la eTPC-t analito se pone en contacto con un reactivo de afinidad soluble o inmovilizado o una partícula no basada en célula (NCBP) de tal manera que se marque la eTPC-t (Figura 15).

50 Se puede considerar que el marcado se detecta por observación directa del marcador mediante métodos tales como citometría de flujo, microscopía, espectrometría o luminometría o, alternativamente, mediante captura con un reactivo de afinidad inmovilizado o NCBP. De manera similar, el reactivo de afinidad o NCBP puede estimular el elemento indicador, componente F, si está incluido. La estimulación del componente F permitiría la selección de eTPC-t y/o reactivo de afinidad o NCBP para la identificación (Figura 16).

55 Definición de señales de respuesta

60 Una eTPC-t analito obtenida del dispositivo de dos partes se usa para caracterizar una señal de respuesta de la eTPC-t analito, que expresa el TCRsp analito, a un antígeno analito, en donde dicha señal de respuesta puede ser binaria o graduada, y puede medirse como intrínseca a la eTPC-t (Figuras 15, 16 y 17) y/o intrínseca a la APC, si se incluye (Figura 18). Dichas señales pueden detectarse mediante métodos tales como citometría de flujo, microscopía, espectrometría o luminometría u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Contacto con una APC con señales de respuesta

65 También se puede poner en contacto una APC analito con la eTPC-t dentro de un sistema eTPC:A.

Generalmente, la respuesta se medirá mediante la señal registrada dentro de la eTPC-t (Figura 17), pero también se puede medir mediante la señal registrada dentro de la APC (Figura 18).

Método general - Selección de una eTPC-t

5

El método para seleccionar una o más eTPC-t analitos de una entrada de eTPC-t analitos o una biblioteca de eTPC-t analitos, del sistema combinado eTPC:A, para obtener una o más eTPC-t analitos en donde el TCRsp expresado se une a uno o más antígenos analitos comprende

- 10 i. Combinar una o más eTPC-t analitos con uno o más antígenos analitos dando como resultado un contacto entre un TCRsp analito con un antígeno analito y al menos uno de
- ii. Medir una formación, si la hubiera, de un complejo entre uno o más TCRsp analitos con uno o más antígenos analitos y/o
- 15 iii. Medir una señal de un antígeno analito marcado y/o
- iv. Medir una señal de respuesta por la eTPC-t analito, si hubiera, inducida por la formación de un complejo entre uno o más TCRsp analitos con uno o más antígenos analitos y/o
- 20 v. Medir una señal de respuesta por la APC analito, si hubiera, inducida por la formación de un complejo entre uno o más TCRsp analitos con uno o más antígenos analitos y
- vi. Seleccionar una o más eTPC-t analitos basándose en las etapas ii, iii, iv y/o v, en donde la selección se realiza mediante una medición positiva y/o negativa
- 25

en donde i, iv y vi o i, v y vi comprenden las disposiciones preferidas.

Método general: selección de un antígeno analito

30

El método para seleccionar uno o más antígenos analitos a partir de una entrada de antígenos analitos o una biblioteca de antígenos analitos, para obtener uno o más antígenos analitos en donde el antígeno analito expresado se une a uno o más TCRsp analitos presentado por la eTPC-t analito comprende

- 35 i. Combinar uno o más antígenos analitos con una o más eTPC-t analitos, dando como resultado un contacto entre un antígeno analito presentado por el antígeno analito con el TCRsp analito de una o más eTPC-t analitos y
- ii. Medir una formación, si hubiera, de un complejo entre uno o más antígenos analitos con uno o más TCRsp analitos y/o
- 40 iii. Medir una señal de un antígeno analito marcado y/o
- iv. Medir una señal de respuesta en la una o más eTPC-t analitos, si hubiera, inducida por la formación de un complejo entre el TCRsp analito con uno o más antígenos analitos y/o
- 45 v. Medir una señal de respuesta, si hubiera, por la APC analito inducida por la formación de un complejo entre uno o más TCRsp analitos con uno o más antígenos analitos y
- vi. Seleccionar una o más antígenos analitos de las etapas ii, iii, iv y/o v, en donde la selección se realiza mediante una medición positiva y/o negativa
- 50

en donde i, iv y vi o i, v y vi comprenden las disposiciones preferidas.

Método general - Selección por señalización

55

Un método para seleccionar la eTPC-t analito y/o APC analito y/o reactivos de afinidad y/o NCBP del sistema eTPC:A combinado basándose en una señal de respuesta registrada comprende

- 60 i. Determinar una señalización de respuesta nativa y/o
- ii. Determinar una señalización de respuesta sintética, si la eTPC-t contiene el componente F y/o si la APC contiene un elemento indicador sintético equivalente.
- 65 Una señal de respuesta nativa o sintética inducida que es intrínseca a la APC y/o eTPC-t se mide detectando un aumento o disminución en uno o más de los siguientes

- i. una biomolécula secretada
- 5 ii. una sustancia química secretada
- iii. una biomolécula intracelular
- iv. una sustancia química intracelular
- 10 v. una biomolécula expresada en superficie
- vi. una acción citotóxica de la eTPC-t analito sobre la APC analito
- vii. una acción paracrina de la eTPC-t analito sobre la APC analito de modo que se induce una señal de
15 respuesta en la APC analito y se determina detectando un aumento o disminución de cualquiera de a a e
- viii. una proliferación de las eTPC-t analitos
- ix. una sinapsis inmunológica entre la eTPC-t analito y la APC analito

20 en donde dichas señales de respuesta detectadas se comparan con el estado de la señal de respuesta no inducida intrínseca a la APC analito y/o eTPC-t analito antes del ensamblado del sistema eTPC:A combinado y/o un sistema combinado ensamblado en paralelo en donde la APC analito y/o la eTPC-t analito puede presentar antígeno analito de control y/o especies de TCR analito y/o antígeno analito soluble que se sabe que
25 no inducen una señal de respuesta dentro del sistema eTPC:A combinado en uso.

Método de selección por marcado y/o señal de respuesta

30 Un método para seleccionar la eTPC-t analito y/o reactivos de afinidad analitos y/o la NCBP analito del sistema combinado eTPC:A basado en un marcado medible de una eTPC-t por dicho reactivo de afinidad o NCBP comprende;

- i. Determinar un marcado de la eTPC-t por un reactivo de afinidad o NCBP y también puede comprender
- 35 ii. Determinar una señalización de respuesta nativa y/o
- iii. Determinar una señalización de respuesta sintética, si la eTPC-t contiene el componente F.

40 en donde seleccionar una eTPC-t y/o reactivo de afinidad y/o NCBP mediante la detección del marcado de la eTPC-t puede comprender la detección del marcado de superficie de la eTPC-t por un reactivo de afinidad y/o NCBP mediante la inclusión de un marcador detectable en el reactivo de afinidad y/o NCBP. Dichos marcadores detectables pueden ser grupos fluorescentes, luminiscentes, espectrométricos, químicos, radioquímicos o de afinidad. Por lo tanto, dicha selección de eTPC-t puede realizarse a partir de FACS, MACS o metodologías equivalentes de cribado y selección de alto rendimiento.

45 Compendio

Dentro del sistema eTPC:A combinado, medir una señal de respuesta en una o más eTPC-t analitos o una o más APC analitos, o el marcaje de una eTPC-t, que puede ser mediado por la formación de un complejo entre
50 el TCRsp analito con el antígeno analito es crítico para la selección de los resultados del sistema primarios (Figura 24 etapa v), en donde los resultados del sistema primarios son células individuales o conjuntos de células, y/o o reactivo de afinidad único o conjuntos de reactivos de afinidad y/o o NCBP o grupos de NCBP. En donde la selección de células o reactivos se puede hacer en la presencia o ausencia de una señal de respuesta registrada en uno y/o ambos de las células APC analitos o eTPC-t analitos puestos en contacto, o
55 mediante el marcaje medible de eTPC-t con un reactivo de afinidad o NCBP.

Obtención de resultados del sistema primario del sistema eTPC:A

60 La presente invención se refiere a proporcionar un dispositivo de dos partes del cual se derivan las eTPC-t analitos. Estas eTPC-t analitos luego se combinan con uno o más antígenos analitos a través del sistema eTPC:A como se describió previamente para obtener uno o más resultados. El antígeno analito es proporcionado por células presentadoras de antígeno (APC) analitos y/o como antígeno analito soluble o inmovilizado y/o presentado en partículas no basadas en células (NCBP). El sistema está compuesto de una selección de uno o más antígenos analitos con una o más poblaciones de eTPC-t (Figura 24). El sistema
65 eTPC:A se proporciona en un formato que permite el contacto físico entre los antígenos analitos y las poblaciones de eTPC-t analitos, en donde dicho contacto permite la formación de complejos entre uno o más

antígenos analitos y TCRsp de una o más eTPC-t analitos, en donde el antígeno analito es cualquiera de los siguientes

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

15 en donde el antígeno analito se proporciona como presentado por una APC analito, o presentado por un reactivo de afinidad analito soluble y/o inmovilizado, o NCBP analito de manera que la formación de complejo puede conducir a la estabilización de dicho complejo y en donde conduce al marcaje de la eTPC-t y/o la inducción de señalización dentro de la eTPC analito, si está incluido y/o la APC analito y puede registrarse y medirse.

20 Los modos de registro de señal de respuesta inducida y/o marcaje de eTPC-t se describen anteriormente, y son estas respuestas registradas y/o el marcaje los que deben medirse para obtener el resultado primario del dispositivo de dos partes compilado en un sistema eTPC:A.

25 Los resultados primarios del sistema eTPC:A son poblaciones de células seleccionadas y/o reactivos de afinidad seleccionados o NCBP seleccionadas, en donde la selección se hace basándose en;

- i. un marcaje medible de eTPC-t mediante reactivo de afinidad o NCBP y/o
- 30 ii. una señal de respuesta detectada en una eTPC-t y/o
- iii. falta de una señal de respuesta detectada en una eTPC-t y/o
- iv. una señal de respuesta detectada en una APC analito y/o
- 35 v. una falta de señal de respuesta detectada en una APC analito;

en donde un resultado primario puede representarse como una sola célula, o un conjunto de células y/o uno o más reactivos de afinidad asociados con eTPC-t o NCBP.

40 Se puede hacer una selección del reactivo de afinidad analito, NCBP o APC analito y/o eTPC-t analito del sistema eTPC:A combinado basándose en una respuesta en la célula de contacto. Es decir, se puede seleccionar una APC analito basándose en una respuesta obtenida, o la falta de la misma, en el contacto con la eTPC-t analito. Por el contrario, se puede seleccionar una eTPC-t analito basándose en una respuesta obtenida, o la falta de la misma, en el contacto con el antígeno analito, o en el caso en donde el antígeno analito es un reactivo de afinidad o NCBP analito, el reactivo de afinidad o NCBP analito se puede seleccionar a partir de la respuesta de la eTPC-t.

50 Los resultados primarios de APC del sistema son células seleccionadas, en donde la selección se hace basada en la presencia o ausencia de una señal de respuesta obtenida en la APC o eTPC-t analito, y estas células pueden comprender una o más de APC y/o eTPC-t en donde las células seleccionadas pueden comprender una sola célula, un conjunto de células de la misma identidad, un conjunto de células de diferentes identidades (Figura 24, etapa v).

55 Los resultados primarios de eTPC-t del sistema son células seleccionadas, en donde la selección se hace basada en la presencia o ausencia de una señal de respuesta obtenida, y estas células comprenden eTPC-t, en donde las células seleccionadas pueden comprender una sola célula, un conjunto de células de la misma identidad, un conjunto de células de diferentes identidades (Figura 24, etapa v).

60 Los resultados primarios de reactivos de afinidad analitos o de NCBP del sistema son células seleccionadas con o sin reactivo de afinidad asociado o NCBP, en donde la selección se realiza basándose en la presencia o ausencia de un marcaje o señal de respuesta obtenida por la eTPC-t analito, en donde el reactivo de afinidad o NCBP seleccionado puede comprender un solo reactivo de afinidad o NCBP, un conjunto de reactivos de afinidad o NCBP de la misma identidad, un conjunto de reactivos de afinidad o NCBP de diferentes identidades (Figura 24 etapa v).

65 Las señales obtenidas en la APC analito y/o eTPC-t analito en un sistema eTPC:A combinado se pueden usar

para seleccionar poblaciones de células analitos o reactivos de afinidad analitos o NCBP para proporcionar los resultados primarios.

5 Se puede lograr un resultado primario de los tipos APC y/o eTPC-t en un caso en donde el sistema eTPC:A combinado es de naturaleza de cultivo binario (p. ej., Figuras 15 a 18) seleccionando la población de APC analitos y/o eTPC-t analitos del sistema binario.

10 Se puede lograr un resultado primario de una eTPC-t en un caso en donde el sistema eTPC:A combinado tiene una composición binaria de una o más eTPC-t analitos con un antígeno analito (p. ej., Figuras 19 a 21) seleccionando la población de eTPC-t analitos deseada que está marcada con el reactivo de afinidad analito o NCBP, o activada por el reactivo de afinidad o NCBP analito o la APC analito dentro del sistema eTPC:A.

15 Se puede lograr un resultado primario de un reactivo de afinidad analito o NCBP en un caso en donde el sistema eTPC:A combinado es una composición binaria de una o más eTPC-t analitos con un reactivo de afinidad analito o NCBP (p. ej., Figura 21) seleccionando la población de eTPC-t analitos deseada que está marcada con, y/o tiene una señal inducida por, el reactivo de afinidad o NCBP analito del sistema eTPC:A.

20 Se puede lograr un resultado primario de APC a partir de un caso en donde el sistema eTPC:A combinado es una eTPC-t analito fijada y biblioteca agrupada de APC analitos (p. ej. Figura 22) seleccionando la APC analito basándose en una detección de una respuesta, o falta de la misma, dentro de la APC analito.

25 Hay varios modos distintos en los que se pueden obtener los resultados primarios, en donde cada modo implica una etapa de separación. La separación se puede lograr mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y/o separación de células activadas magnéticamente (MACS) y/o distintos métodos de separación de células activadas por afinidad.

30 Los resultados primarios de células APC y/o eTPC-t, y/o reactivos de afinidad asociados con eTPC o NCBP, pueden obtenerse mediante separación de células individuales para obtener una célula individual y/o separación de células en un conjunto para obtener un conjunto de células.

Los resultados primarios de células APC y/o eTPC-t se pueden obtener mediante separación de células individuales para obtener una célula individual y, opcionalmente, crecimiento posterior de las células individuales para obtener un conjunto monoclonal de células APC o eTPC-t seleccionadas.

35 Los resultados primarios de células APC y/o eTPC-t se pueden obtener mediante separación de células en un conjunto para obtener un conjunto de células y, opcionalmente, crecimiento posterior del conjunto de células para obtener un conjunto de células APC y/o eTPC-t seleccionadas.

Obtención de resultados del sistema terminales del sistema eTPC:A

40 Posteriormente a los métodos descritos anteriormente para obtener resultados primarios, en donde los resultados primarios son APC analitos y/o eTPC-t analitos seleccionadas que se seleccionan basándose en una señal de respuesta medida, o formación de complejo estable, de modo que los resultados terminales del sistema eTPC:A se puede obtener mediante el procesamiento adicional de los resultados primarios de APC y/o eTPC seleccionadas.

En el presente contexto, los resultados terminales del sistema multicomponente son las identidades de

- 50 i. aAPX y/o
- ii. aAM y/o
- iii. aAPX:aAM y/o
- 55 iv. CM y/o
- v. aAPX:CM y/o
- 60 vi. TCRsp

presentado por la APC analito o eTPC-t analito o un reactivo de afinidad o NCBP analito, y obtenidos como resultados primarios del sistema multicomponente mediante su selección del sistema eTPC:A combinado.

65 Dentro del sistema eTPC:A, a menudo se da el caso de que las moléculas analitos que son presentadas por la APC analito y la eTPC-t analito están codificadas genéticamente. También puede darse el caso de que una NCBP analito tenga una identidad codificada genéticamente, en el caso de NCBP presentada en bacteriófagos,

por ejemplo. Por lo tanto, para identificar las moléculas analito presentadas por la APC analito o la eTPC-t analito, se puede realizar la secuenciación genética de la APC analito, eTPC-t y NCBP analito preparadas.

5 Las APC pueden procesarse de manera que se obtenga la secuencia genética para el genoma o transcriptoma de las células APC separadas y/o expandidas para determinar la identidad de

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

en donde las identidades obtenidas representan resultados terminales del sistema eTPC:A.

20 En el presente contexto, la NCBP analito que tiene un componente genético puede procesarse de manera que se obtenga la secuencia genética para el genoma o transcriptoma de la NCBP analito separada y/o expandida para determinar la identidad de la NCBP analito, en donde las identidades obtenidas representan resultados terminales del sistema eTPC:A.

25 Se puede procesar una eTPC-t de manera que se obtenga la secuencia genética para el componente B' y/o el componente D' de las células eTPC-t separadas y/o expandidas para determinar la identidad del TCRsp, en donde la identificación obtenida del TCRsp representa un resultado terminal del sistema eTPC:A.

30 Se puede procesar una eTPC de manera que se obtenga la secuencia genética para el genoma o transcriptoma de las células eTPC-t separadas y/o expandidas para determinar la identidad del TCRsp, en donde la identificación obtenida del TCRsp representa un resultado terminal del sistema eTPC:A.

La secuenciación genética se puede lograr mediante una variedad de modos y a partir de una variedad de fuentes de material genético, con y sin procesamiento específico.

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

- i. Extracción de ADN genómico y/o
- 40 ii. Extracción del transcrito de ARN de los componentes B' y/o D' y/o
- iii. Amplificación por una PCR y/o RT-PCR del transcrito de ADN y/o ARN del componente B' y/o D'.

45 La etapa de secuenciación puede ser destructiva para la APC o eTPC-t o NCBP analito, o conjunto de las mismas, obtenidas como resultados primarios del sistema multicomponente.

Si es deseable obtener resultados primarios del sistema eTPC:A en donde la etapa de secuenciación ha sido destructiva para la eTPC-t del resultado primario, la información de secuencia obtenida como resultado terminal del dispositivo de dos partes se puede usar para preparar un resultado equivalente de eTPC-t como eTPC-t analito.

50 En los escenarios descritos anteriormente de moléculas analitos codificadas genéticamente, los resultados terminales del sistema eTPC:A se pueden obtener obteniendo información de secuencia del componente B' y/o D', y/o del genoma celular y/o transcriptoma. Sin embargo, en algunas realizaciones la información del antígeno no estará codificada genéticamente. Los antígenos modificados postraduccionalmente, antígenos proporcionados al sistema eTPC:A combinado a través de medios no genéticos, antígenos que emergen de un estado inducido o modificado del proteoma o metabolito de la APC analito, CM intrínseca al sistema eTPC:A y reactivos de afinidad o NCBP sin un elemento genético, no pueden identificarse razonablemente mediante medios de secuenciación genética.

60 En el importante caso de aAM que puede proporcionarse al sistema eTPC:A por medios no genéticos, existen dos modos distintos a través de los cuales una APC 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 la aAPX y forma un complejo aAPX:aAM en la superficie de las células. Un ejemplo de dicha aAM sería un antígeno peptídico para un complejo HLA. En el segundo escenario, la aAM se proporciona en una forma que puede ser captada por la APC analito y procesada de modo que se cargue como carga en el aAPX y forme un complejo aAPX:aAM en la superficie de las células.

Un método para seleccionar e identificar una carga aAM o una carga CM, en donde la carga es un metabolito y/o un péptido, que se carga en un aAPX de una APC seleccionada y obtenida como resultado primario del sistema multicomponente, comprende

- 5 i. aislar un aAPX:aAM o un aAPX:CM o la carga aAM o la carga CM e
- ii. identificar la carga cargada

10 en donde la carga cargada identificada (CM o aAM) representa resultados terminales del dispositivo de dos partes.

Generalmente existen dos modos a través de los cuales se puede identificar una molécula de carga a partir de una APC 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. Un ejemplo de esto es el lavado con ácido de la APC para liberar la aAM peptídica de los complejos HLA. En segundo lugar, la captura de aAPX:aAM o aAPX:CM, por ejemplo, mediante la liberación del complejo y métodos de aislamiento por inmunofinidad, da como resultado el aislamiento de los complejos aAPX:aAM o aAPX:CM, de modo que se pueden identificar la aAM o CM.

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

- 25 i. Análisis de espectrometría de masas
- ii. Análisis de secuenciación de péptidos

en donde las identidades de aAM y/o CM que contienen son resultados terminales del dispositivo de dos partes.

30 Determinación de la afinidad del TCRsp por el antígeno analito usando el dispositivo de dos partes como un sistema eTPC:A

Después de los métodos descritos anteriormente para obtener resultados primarios, en donde los resultados primarios son células eTPC-t analitos seleccionadas que se seleccionan basándose en una señal de respuesta medida, los resultados primarios de eTPC-t pueden someterse a un análisis de afinidad para determinar la afinidad del TCRsp por un antígeno analito cognado en donde el antígeno analito es cualquiera de los siguientes

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

50 y en donde el antígeno analito se proporciona como un reactivo soluble o presentado por una APC analito, o una NCBP analito de manera que la afinidad del TCRsp analito se determina según el siguiente método

- i. Marcaje de la eTPC-t analito seleccionada con el antígeno analito en un intervalo de concentraciones
- 55 ii. Realización de análisis FACS en la eTPC-t analito teñida de la etapa a
- iii. Determinación de la intensidad del marcaje fluorescente de la eTPC-t analito en el intervalo de concentraciones del antígeno analito
- 60 iv. Cálculo de la afinidad del TCRsp por el antígeno analito

La afinidad del TCRsp analito también puede determinarse mediante el método descrito anteriormente, pero en donde también se puede incluir una referencia marcada, de modo que la afinidad se calcula usando la relación de la intensidad de fluorescencia del antígeno analito a la intensidad de fluorescencia de referencia en donde la referencia marcada se selecciona de

- 65 i. La eTPC-t analito marcada con un reactivo de afinidad para una de las cadenas de TCR analito o con

ambas cadenas del TCR analito.

- ii. La eTPC-t analito marcada con un reactivo de afinidad con una o más de las proteínas CD3
- 5 iii. una célula o partícula que presenta una única cadena de TCR de referencia marcada o un par de cadenas de TCR de referencia marcadas

Uso de eTPC-t como patrones de ensayo.

- 10 La presente invención se refiere a proporcionar un sistema multicomponente modificado, cuyos componentes se usan para preparar una o más eTPC-t analitos, y al uso de la eTPC-t preparada en un sistema analítico eTPC:A, que es se utiliza para determinar la especificidad del antígeno analito del TCRsp presentado por la eTPC-t analito y, si se desea, la selección de la eTPC-t con o sin afinidad hacia el antígeno analito.
- 15 Este sistema es el más adecuado para generar rápidamente patrones que presentan TCR para su uso en el control y calibración de ensayos que detectan la presencia de células portadoras de TCR (véase el Ejemplo 9), o para el desarrollo y/o control en la fabricación de reactivos de afinidad y/o NCBP dirigidos a detectar pares de TCR de especificidades seleccionadas.
- 20 Durante las últimas dos décadas, los reactivos HLA multímeros han sido una parte clave de la investigación de células T, utilizándose para marcar células T (y otros tipos de células) que presentan TCR particulares, como se emplea en los ejemplos anteriores. Originalmente concebidos como reactivos tetramerizados basándose en la biotinylación de la molécula HLA y la multimerización con estreptavidina, estos reactivos ahora adoptan diversas formas con diferentes grados de multimerización. La multimerización generalmente se considera clave
- 25 para la función fiable de los reactivos multímeros de HLA, ya que la interacción TCR-antígeno-HLA es relativamente débil y, por lo tanto, el estado multimérico de la molécula de HLA-antígeno estabiliza la interacción con el TCR cognado. Un ensayo típico implica el contacto del reactivo multímero de HLA con muestras de sangre periférica preparadas y la detección de células T marcadas dentro de la muestra mediante el uso de citometría de flujo.
- 30 Teniendo en cuenta la naturaleza relativamente compleja de estos reactivos, a diferencia de la producción y el uso consistente de reactivos de anticuerpos, su uso en el diagnóstico clínico ha tenido poca aceptación. Un desafío clave para la integración en el diagnóstico clínico rutinario es un medio para controlar los falsos positivos y la detección de señales falsas negativas, en el contexto de un analito de células T de baja frecuencia
- 35 en muestras biológicas complejas, utilizando reactivos relativamente complejos e inestables. A menudo se observan falsos positivos en el caso de reactivos de multímero de HLA degradados, lo que puede dar como resultado mayor unión no específica a células T. La degradación del reactivo también puede anular la unión específica del TCR, conduciendo a lecturas que son falsos negativos. Un desafío relacionado es la cuestión de que cualquier población de células T específica de antígeno probablemente represente solo una pequeña fracción de células en una muestra de paciente y, por lo tanto, el marcaje de multímeros de HLA a menudo se acerca al límite práctico si se detecta mediante ensayos de citometría de flujo. Por lo tanto, a menudo no está claro si la falta de marcado de células T observada en una muestra dada representa un resultado verdadero negativo o falso negativo. Esta ambigüedad se ve amplificada aún más por la naturaleza relativamente inestable de los propios reactivos y su sensibilidad a la preparación correcta de las muestras.
- 40 Para superar la naturaleza poco fiable de los ensayos de reactivos de multímeros de HLA, se requiere un estándar de ensayo sólido y altamente definido. Es posible producir TC recombinantes en varios formatos que podrían funcionalizarse en micropelotas compatibles con citometría de flujo. Sin embargo, dicha producción no es fiable y, a menudo, resulta poco práctico producir ciertos pares en cantidades significativas. En lugar de un reactivo patrón de TCR de proteína recombinante, la eTPC-t representa un reactivo patrón de células recombinantes que puede expresar cualquier TCR humano y puede producirse rápidamente en masa en sistemas simples de cultivo de células de mamíferos. Además, el TCR en una eTPC-t se presenta en el contexto del complejo CD3 nativo en la superficie celular, por lo que refleja de manera fiable la misma conformación del TCR dentro de la población de células T primarias analitos (u otra población de células). Un
- 45 aspecto clave en el uso de eTPC-t para patrones de ensayo fiables es la estabilidad y la distribución práctica del reactivo eTPC-t, ya que los cultivos de células viables son muy poco prácticos para el uso de diagnóstico clínico, o incluso para el uso de investigación rutinaria.
- 50 Por lo tanto, un sistema eTPC:A como se describe anteriormente se puede usar para seleccionar y caracterizar una o más eTPC-t portadoras de TCRsp de especificidad e intensidad de tinción definidas mediante el reactivo de afinidad portador del antígeno deseado, NCBP u otro reactivo de detección.
- 55 Se pueden usar eTPC-t seleccionadas, o eTPC-t generadas con pares de TCR seleccionados independientemente, como reactivos patrón para el control de reactivos de afinidad portadores de antígeno, NCBP u otros reactivos de detección en ensayos diseñados para detectar la presencia de pares de TCR específicos. Dicho ensayo puede comprender,
- 60
- 65

a) Un ensayo citométrico para determinar la presencia de células T con especificidad de TCR seleccionada en una muestra clínica;

5 b) Un ensayo citométrico para determinar la presencia de células portadoras de TCR específico en la fabricación de productos terapéuticos celulares de células T primarias que expresan TCR;

c) Un ensayo citométrico para determinar la presencia de células portadoras de TCR específico en la fabricación de productos terapéuticos celulares de células T modificadas que expresan TCR;

10 d) Un ensayo para determinar la especificidad y/o la calidad de detección de un reactivo de afinidad dado, NCBP u otro reactivo diseñado para detectar un par de TCR específico;

15 en donde; dicho ensayo puede representar un ensayo de citometría de flujo o unión estática utilizando reactivos marcados o no marcados.

Una eTPC-t para usar en dichos ensayos se puede preparar como

20 a) Una célula viable

b) Una célula criopreservada

c) Una célula químicamente fijada

25 d) Una célula irradiada

en donde; a) y b) pueden combinarse; b) y c) pueden combinarse; b) y d) pueden combinarse.

Leyendas de las figuras

30 La invención se ilustra en las siguientes figuras no limitantes.

Figura 1 - Descripción de los componentes de un sistema multicomponente de una sola pareja de integración

35 Un ejemplo de un sistema celular multicomponente (MCS) que no se reivindica y que comprende cuatro componentes. El primer componente A es la propia línea eTPC con todas las características de modificadas necesarias de esa célula. La eTPC A contiene un segundo componente, B, que es un sitio de integración genómica para la integración de un par de ORF de cadenas de TCR analito complementarias. Un tercer componente incluido en la eTPC, A, es una construcción indicadora sintética que es inducida tras la ligación del TCR, F. Un componente independiente adicional, C, representa vectores de donadores genéticos para la integración dirigida al sitio de los ORF en el sitio B, donde la flecha indica especificidad acoplada.

Figura 2 - Descripción de los componentes de un sistema multicomponente de una doble pareja de integración

45 Un ejemplo de un sistema celular multicomponente (MCS) que comprende seis componentes. El primer componente A es la propia línea eTPC con todas las características de modificadas necesarias de esa célula. La eTPC A contiene tres componentes adicionales, dos de los cuales son B y D, que son sitios de integración genómica para la integración de un par de cadenas de TCR analito. Un tercer componente incluido en la eTPC, A, es una construcción indicadora sintética que es inducida tras la ligación del TCR, F. Dos componentes independientes adicionales, C y E, representan vectores donadores genéticos para la integración dirigida al sitio de los ORF en los sitios B y D, respectivamente, donde las flechas indican especificidad de acoplamiento. Cada pareja de sitio de integración/vector donador emparejados puede formatearse para integrar un solo ORF o un par de ORF para introducir la expresión del par de cadenas del TCR analito por diferentes medios.

55 Figura 3 - Compilación de diferentes eTPC que presentan TCRsp analitos

La operación del sistema celular multicomponente (MCS) para preparar poblaciones de eTPC analitos comienza con la eTPC y utiliza un vector(es) donador(es) para crear células que expresan TCRsp analito o cadenas de TCR analito individuales. Un eTPC que presenta TCRsp se denomina eTPC - t y puede crearse mediante la introducción de dos ORF que codifican cadenas de TCR complementarias en la eTPC (etapa i). Una eTPC que expresa una única cadena de TCR analito sola se denomina eTPC -x y puede crearse introduciendo un único ORF que codifica la cadena de TCR en la eTPC (etapa ii). Alternativamente, se puede crear un eTPC - t a partir de una eTPC-x, en donde se introduce un segundo ORF que codifica la cadena de TCR complementaria en una eTPC -x existente (etapa iii). En algunos casos, se puede crear una eTPC-x a partir de una eTPC-t eliminando una única cadena de TCR analito (etapa iv)

Figura 4 - Funcionamiento de la pareja de integración de vector donador genético y sitio de recepción genómica

Un vector donador genético y el sitio de recepción genómica forman una pareja de integración, en donde uno o más ORF codificados dentro del vector donador genético pueden integrarse específicamente en su sitio de recepción genómica acoplado. La etapa 1 en la operación de la pareja de integración es introducir uno o más ORF objetivo en el vector donador. El vector donador inicial se denomina X y se modifica a un vector donador cebado X', mediante la introducción de ORF(s) objetivo. La etapa 2 implica la combinación del vector donador cebado, X', con una célula que alberga un sitio de recepción genómica, Y. La introducción del ORF codificado por el vector donador cebado en el sitio de recepción da como resultado la creación de una célula que alberga un sitio integrado, Y'.

Figura 5 – Compilación no reivindicada de un sistema eTPC con formato de un etapa y un vector

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

Figura 6: Compilación de una eTPC-t en una etapa con un vector y un sitio receptor no usado

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

Figura 7 - Compilación de una eTPC-t en una etapa con dos vectores y dos parejas de integración

La eTPC A contiene distintos sitios de recepción genómica B y D. La eTPC A contiene además un elemento de señal de respuesta de TCR F. Los distintos vectores donadores genéticos C' y E' se acoplan independientemente a B y D, respectivamente. El vector donador C' codifica una única cadena de TCR, y el vector donador E' codifica una segunda cadena de TCR recíproca. La eTPC A se combina con vectores donadores C' y E'. La célula resultante ha intercambiado el inserto C con el sitio de recepción genómica B para crear el sitio B' y suministrar un ORF para una primera cadena de TCR. Además, la línea celular resultante tiene el inserto E' intercambiado al sitio de recepción genómica D para crear el sitio D' y suministrar un ORF para una segunda cadena de TCR. Esta célula es capaz de presentar un TCRsp en la superficie y, por lo tanto, se denomina una eTPC-t.

Figura 8: Compilación de una eTPC-x en una etapa con un vector y un sitio de recepción no usado

La eTPC A contiene sitios de recepción genómica distintos B y D. Los vectores donadores genéticos C' se acoplan con D. El vector donador C' codifica una sola cadena de TCR. La eTPC A contiene además un elemento de señal de respuesta del TCR F. La eTPC A se combina con el vector donador C'. La célula resultante ha intercambiado el inserto C' con el sitio de recepción genómica B para crear el sitio B' y suministrar un solo ORF de cadena de TCR. El sitio de recepción genómica D permanece sin usar. Esta célula expresa solo una única cadena de TCR y, por lo tanto, se denomina una eTPC-x.

Figura 9 - Compilación de una eTPC-t en dos etapas con dos vectores

La eTPC A contiene distintos sitios de recepción genómica B y D. La eTPC A contiene además un elemento de señal de respuesta de TCR F. Los distintos vectores donadores genéticos C' y E' se acoplan independientemente a B y D, respectivamente. El vector donador C' codifica una única cadena de TCR, y el vector donador E' codifica una segunda cadena de TCR recíproca. En la etapa 1, una eTPC A se combina con el vector donador C'. La célula resultante ha intercambiado el inserto C' con el sitio de recepción genómica B para crear el sitio B' y suministrar un ORF para una primera cadena de TCR. Esta célula expresa solo una única cadena de TCR y, por lo tanto, se denomina una eTPC-x. El sitio de recepción genómica D permanece sin usar. En la etapa 2, la eTPC-x se combina con el vector donador E'. La célula resultante ha intercambiado el inserto E' con el sitio de recepción genómica D para crear el sitio D' y suministrar un ORF para una segunda cadena de TCR complementaria. Esta célula es capaz de presentar un TCRsp en la superficie y, por lo tanto, se denomina una eTPC-t.

Figura 10: Compilación de escopeta de un conjunto de eTPC-t a partir de una eTPC con cadenas de TCR analito emparejadas en un vector de replicación único para expresar pares de cadenas de TCR discretos a

partir de una biblioteca de pares de cadenas de TCR seleccionados

La eTPC A contiene un sitio de recepción genómica B. Los vectores donadores genéticos C' se acoplan con B. El vector donador C' i, C' ii y C' iii codifica un par de cadenas de TCR distinto y constituye una biblioteca de
 5 vectores mixtos de pares de cadenas de TCR discretos. La eTPC A contiene además un elemento de señal de respuesta del TCR F. La eTPC A se combina con los vectores donadores C' i, C' ii y C' iii simultáneamente. El conjunto de células resultante tiene el inserto C intercambiado al sitio de recepción genómica B en múltiples casos independientes para crear el sitio B' i, B' ii y B' iii, que suministran dos ORF para cada par de cadenas de TCR discretas contenidas en la biblioteca de vectores inicial. Este conjunto de células eTPC-t comprende
 10 una población mixta de tres clones de células distintas, cada uno de los cuales expresa un par de cadenas de TCR distinto, denominados TCRsp i, ii y iii, que forman una biblioteca agrupada de eTPC-t.

Figura 11 - Compilación de escopeta de un conjunto de eTPC-t a partir de una eTPC con cadenas de TCR analito emparejadas en un vector de replicación único para expresar pares de cadenas de TCR discretos a
 15 partir de una biblioteca de pares de cadenas de TCR seleccionados y un sitio de recepción no usado

La eTPC A contiene sitios de recepción genómica distintos B y D. Los vectores donadores genéticos C' se acoplan con B. El vector donador C' i, C' ii y C' iii codifica un par de cadenas de TCR distinto y constituye una biblioteca de vectores mixtos de pares de cadenas de TCR discretos. La eTPC A contiene además un elemento
 20 de señal de respuesta del TCR F. La eTPC A se combina con los vectores donadores C' i, C' ii y C' iii simultáneamente. El conjunto de células resultante tiene el inserto C intercambiado al sitio de recepción genómica B en múltiples casos independientes para crear el sitio B' i, B' ii y B' iii, que suministran dos ORF para cada par de cadenas de TCR discretas contenidas en la biblioteca de vectores inicial. Este conjunto de células eTPC-t comprende una población mixta de tres clones de células distintas, cada uno de los cuales
 25 expresa un par de cadenas de TCR distinto, denominados TCRsp i, ii y iii, que forman una biblioteca agrupada de eTPC-t. El sitio de recepción genómica D permanece sin usar.

Figura 12: Compilación de escopeta de un conjunto de eTPC-t a partir de una eTPC con dos vectores para
 30 expresar combinaciones aleatorias de pares de cadenas de TCR emparejadas de una biblioteca de cadenas individuales de TCR seleccionada

La eTPC A contiene sitios de recepción genómica distintos B y D. Los distintos vectores donadores genéticos C' y E' se acoplan independientemente a B y D, respectivamente. Los vectores donadores C' i y C' ii codifican cada uno una única cadena de TCR, y los vectores donadores E' i y E' ii codifican cada uno una única cadena de TCR recíproca. La eTPC A contiene además un elemento de señal de respuesta del TCR F. La eTPC A se
 35 combina con los vectores donadores C' i, C' ii, E' i y E' ii simultáneamente. El conjunto de células resultante tiene el inserto C' i o C' ii intercambiado al sitio de recepción genómica B en múltiples casos independientes para crear los sitios B' i y B' ii, suministrando cada uno un único ORF para una cadena de TCR. El conjunto de células resultante además tiene el inserto E' i o E' ii intercambiado al sitio de recepción genómica D en múltiples casos independientes para crear los sitios E' i y E' ii, suministrando cada uno un único ORF para una cadena de TCR recíproca a las de los sitios C' i y C' ii. El conjunto de células eTPC-t resultante comprende una población mixta de cuatro cohortes de células distintas, expresando cada una un TCRsp aleatorio discreto en la superficie compuesta por una de cada cadena de TCR recíproca contenida en la biblioteca de vectores
 40 inicial.

Figura 13 - Compilación de escopeta de un conjunto 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 a
 45 partir de una biblioteca de cadenas de TCR individuales seleccionada

La eTPC-x contiene el sitio de recepción genómica B' intercambiado que expresa una única cadena de TCR y el sitio de recepción genómica distinto D. Los vectores de donadores genéticos E' i y E' ii distintos se acoplan con D, respectivamente. Los vectores donadores E' i y E' ii codifican cada uno una única cadena de TCR. La eTPC-x contiene además un elemento de señal de respuesta del TCR F. La eTPC-x se combina con los
 50 vectores donadores E' i y E' ii simultáneamente. El conjunto de células resultante tiene el inserto E' i o E' ii intercambiado al sitio de recepción genómica D en múltiples casos independientes para crear los sitios E' i y E' ii, suministrando cada uno un único ORF para una cadena de TCR. El conjunto de células eTPC-t resultante comprende una población mixta de 2 cohortes de células distintas que expresan un TCRsp discreto en la superficie compuesta por la cadena de TCR expresada a partir de B' emparejada con una de cada cadena de TCR contenida en la biblioteca de vectores inicial.

Figura 14 - Reversión de una eTPC-t a una eTPC-x
 60

La célula representada en el panel superior es capaz de presentar un TCRsp en la superficie y, por lo tanto, se denomina eTPC-t. Esta eTPC-t tiene sitios de recepción genómica B y D ocupados por los ORF de TCR, lo
 65 que los convierte en las formas B' y D'. Vectores donadores genéticos que albergan marcador(es) de sitios de recepción genómica y están acoplados a los sitios B' o D', denominados Y y Z. La adición de Y o Z a la eTPC-

t intercambiará el marcador del sitio de recepción genómica por la cadena de TCR codificada por B' o D'. La célula resultante expresa sólo una única cadena de TCR y, por lo tanto, se denomina eTPC-x.

Figura 15 - Funcionamiento de un sistema eTPC:A analito combinado que muestra posibles estados de resultados de eTPC-t unida a NCBP o reactivo de afinidad analito

La eTPC-t analito contiene los sitios B' y D', cada uno integrado con un ORF que codifica un TCRsp recíproco en la superficie. Cuando se ponen en contacto la eTPC-t analito y el reactivo de afinidad analito o NCBP, se pueden lograr diferentes estados de marcaje de eTPC-t; en este ejemplo uno negativo y tres positivos. El estado negativo es el estado de reposo de la eTPC-t de entrada, sin unión detectable del reactivo de afinidad analito o NCBP, lo que denota un fallo del reactivo de afinidad analito o NCBP para formar un complejo estable con el TCRsp presentado por eTPC-t. Tres estados positivos muestran un intervalo hipotético del grado de unión del reactivo de afinidad analito o NCBP, indicado por el sombreado más oscuro de las células. Esto indica una unión escalonada del reactivo de afinidad analito o NCBP analito al TCRsp expresado por la población de eTPC-t.

Figura 16 - Funcionamiento de un sistema eTPC:A analito combinado que muestra posibles estados de salida de eTPC-t comunicados por señal en respuesta al reactivo de afinidad analito o NCBP

La eTPC-t analito contiene los sitios B' y D', cada uno de ellos integrado con un ORF que codifica un TCRsp recíproco en la superficie. La eTPC-t contiene además un elemento de señal de respuesta de TCR F. Cuando se ponen en contacto la eTPC-t analito y el reactivo de afinidad o NCBP analito, se pueden lograr diferentes estados de respuesta de eTPC-t, en este ejemplo uno negativo y tres positivos. El estado negativo es el estado de reposo de la eTPC-t, sin intensidad de señal en el elemento F, lo que indica un fallo del reactivo de afinidad o NCBP analito para formar un complejo y estimular el TCRsp presentado por la eTPC-t. Tres estados positivos muestran una intensidad de señal cada vez mayor desde F. Los estados F⁺, F⁺⁺ y F⁺⁺⁺ indican intensidad de señal baja, media y alta, respectivamente. El producto génico de F se indica como hexágonos que se acumulan para comunicar la intensidad de la señal de cada estado celular, como lo indica el sombreado más oscuro de las células. Esto indica una respuesta escalonada del TCRsp analito expresado por la población de eTPC-t hacia el reactivo de afinidad o NCBP analito, que da como resultado la transducción de señal al elemento F.

Figura 17 - Funcionamiento de un sistema eTPC:A analito combinado que muestra posibles estados de salida de eTPC-t comunicados por señal en respuesta a la APC analito

La eTPC-t analito contiene los sitios B' y D', cada uno de ellos integrado con un ORF que codifica un TCRsp recíproco en la superficie. La eTPC-t contiene además un elemento de señal de respuesta de TCR F. Cuando se ponen en contacto las poblaciones de eTPC-t analitos y APC analitos, se pueden lograr diferentes estados de respuesta de eTPC-t, en este ejemplo uno negativo y tres positivos. El estado negativo es el estado de reposo de la eTPC-t, sin intensidad de señal en el elemento F, lo que indica fallo de aAPX:aAM/CM o aAM presentado por APC analito para estimular el TCRsp presentado por eTPC-t. Tres estados positivos muestran una intensidad de señal cada vez mayor desde F. Los estados F⁺, F⁺⁺ y F⁺⁺⁺ indican intensidad de señal baja, media y alta, respectivamente. El producto génico de F se indica como hexágonos que se acumulan para comunicar la intensidad de la señal de cada estado celular, como lo indica el sombreado más oscuro de las células. Esto indica una respuesta escalonada del TCRsp analito expresada por la población de eTPC-t hacia aAPX:aAM/CM o aAM analito presentado por la APC analito.

Figura 18 - Funcionamiento de un sistema eTPC:A analito combinado que muestra posibles estados de salida de APC analito

La eTPC-t analito contiene los sitios B' y D', cada uno de ellos integrado con un ORF que codifica un TCRsp recíproco en la superficie. La eTPC-t contiene además un elemento de señal de respuesta de TCR F. Cuando se ponen en contacto las poblaciones de eTPC-t analitos y APC analitos, se pueden lograr diferentes estados de respuesta de APC, en este ejemplo uno negativo y tres positivos. El estado negativo es el estado de reposo de la APC analito, que un fallo del par de cadenas del TCRsp para estimular el complejo aAPX:aAM/CM o aAM presentado por la APC analito. Tres estados positivos muestran una intensidad de señal creciente del aAPX:aAM/CM o aAM. La intensidad de la señal comunicada de cada estado de célula se indica con *, **, ***y también indicado por sombreado más oscuro de las células. Esto indica una respuesta escalonada del aAPX:aAM/CM o aAM analito hacia el par de cadenas del TCRsp analito presentado por la eTPC-t analito.

Figura 19 - Funcionamiento de un eTPC:A combinado para identificar pares de cadenas de TCRsp que se unen con el reactivo de afinidad o NCBP analito de un conjunto de eTPC-t

El conjunto de eTPC-t contiene células que albergan los sitios B' i, ii o iii y D' i, ii o iii, en donde cada eTPC-t está integrada con un par de ORF que codifican un par de cadenas de TCR complementarias y, por lo tanto, cada cohorte de células en la población expresa un TCRsp discreto en la superficie. Se pone en contacto un

reactivo de afinidad o NCBP analito con el conjunto de eTPC-t analitos. En el presente ejemplo, solo el par de cadenas de TCR expresadas a partir de B' i/D' i (TCRsp i) es específico para el reactivo de afinidad o NCBP analito, de modo que solo la cohorte de células de la eTPC-t que lleva TCRsp i (eTPC-t*) es capaz de unir de forma detectable el antígeno analito o NCBP (*). La eTPC-t* unida al reactivo de afinidad o NCBP analito se puede seleccionar del conjunto en función del marcaje del reactivo de afinidad o NCBP. Posteriormente, los ORF que codifican los TCRsp analitos de la eTPC-t* seleccionada y aislada se pueden identificar mediante la secuenciación del ADN de B' y D' directa o indirectamente mediante PCR con transcriptasa inversa de los transcritos expresados de B' y D'.

Figura 20 - Funcionamiento de un sistema eTPC:A combinado para identificar pares de cadenas de TCRsp de un conjunto de eTPC-t mediante la inducción de una señal de comunicación de respuesta mediante estimulación con reactivo de afinidad o NCBP analito

El conjunto de eTPC-t contiene células que albergan los sitios B' i, ii o iii y D' i, ii o iii, en donde cada eTPC-t está integrada con un par de ORF que codifican un par de cadenas de TCR complementarias y, por lo tanto, cada cohorte de células en la población expresa un TCRsp discreto en la superficie. La eTPC-t contiene además un elemento de señal de respuesta del TCR F. Un antígeno analito o NCBP se pone en contacto con el conjunto de eTPC-t analitos. En el presente ejemplo, solo el par de cadenas de TCR expresadas a partir de B' i/D' i (TCRsp i) es específico para el reactivo de afinidad o NCBP analito, de modo que solo la cohorte de células de la eTPC-t que lleva el TCRsp i (eTPC-t*) es capaz de inducir una respuesta comunicada por señal a través del elemento F (*). La eTPC-t* unida al reactivo de afinidad o NCBP analito se puede seleccionar del conjunto de eTPC-t basado en el marcaje del reactivo de afinidad o NCBP. Posteriormente, los ORF que codifican los TCRsp analitos de la eTPC-t* seleccionada y aislada se pueden identificar mediante secuenciación del ADN de B' y D' directa o indirectamente mediante PCR con transcriptasa inversa de los transcritos expresados de B' y D'.

Figura 21 - Funcionamiento de un sistema eTPC:A combinado para identificar pares de cadenas de TCRsp de un conjunto de eTPC-t mediante inducción de una señal de comunicación de respuesta mediante estimulación con APC analito

El conjunto de eTPC-t contiene células que albergan los sitios B' i, ii o iii y D' i, ii o iii, en donde cada eTPC-t está integrada con un par de ORF que codifican un par de cadenas de TCR recíprocas y, por lo tanto, cada cohorte de células en la población expresa un TCRsp discreto en la superficie. La eTPC-t contiene además un elemento de señal de respuesta del TCR F. La APC analito expresa en la superficie un aAPX:aAM/CM o aAM. En el presente ejemplo, solo el par de cadenas de TRC expresado a partir de B' i/D' i (TCRsp i) es específico para aAPX:aAM/CM o aAM presentado por la APC analito, de modo que cuando se ponen en contacto el conjunto de eTPC-t y población de APC analito, solo la cohorte de células de la eTPC-t que lleva el TCRsp i (eTPC-t*) comunica el acoplamiento de TCRsp a través del estado F'. La eTPC-t* estimulada por la APC analito se puede seleccionar del conjunto basándose en la respuesta comunicada con la señal. Posteriormente, los ORF que codifican los TCRsp analitos de la eTPC-t* seleccionada y aislada se pueden identificar mediante secuenciación del ADN de B' y D' directa o indirectamente mediante PCR con transcriptasa inversa de los transcritos expresados de B' y D'.

Figura 22 - Funcionamiento de un sistema eTPC:A combinado para identificar antígenos analitos presentados por APC analito, mediante inducción de una respuesta comunicada con señal centrada en APC

El conjunto de APC analitos contiene células que expresan aAPX:aAM/CM o aAM variados en su superficie. La eTPC-t analito contiene el sitio de recepción genómica intercambiado B' y D' que dirige la expresión de un TCRsp en la superficie. En el presente ejemplo, solo el complejo aAPX:aAM/CM o aAM i es específico para el TCRsp presentado por la eTPC-t analito, de modo que cuando se ponen en contacto el conjunto de APC analitos y la población de eTPC-t analitos, solo responde la cohorte de células que expresa aAPX:aAM/CM i(*). Esta respuesta puede ser una señal de respuesta intrínseca al acoplamiento de eTPC-t, como un cambio en el fenotipo de la superficie, abundancia de transcritos o muerte celular. La APC analito que responde puede seleccionarse para determinar el aAPX:aAM/CM o aAM con el que se ha puesto en contacto el TCRsp analito presentado por la eTPC-t analito.

Figura 23 - Funcionamiento de un sistema eTPC:A combinado para identificar el reactivo de afinidad o NCBP de un conjunto de dichas entidades mediante la captura del reactivo de afinidad o reactivo NCBP por una eTPC-t

La eTPC-t analito contiene el sitio de recepción genómica intercambiado B' y D' que dirige la expresión de un TCRsp en la superficie. Un conjunto de reactivos de afinidad o NCBP se pone en contacto con la eTPC-t analito, lo que permite la unión del reactivo de afinidad o NCBP analito específico para el TCRsp presentado por la eTPC-t analito. En la presente representación, el TCRsp se une específicamente solo al reactivo de afinidad o NCBP i y, por lo tanto, la eTPC-t analito es marcada solo con el reactivo de afinidad o NCBP i. Por lo tanto, se puede seleccionar un reactivo de afinidad o NCBP del conjunto mediante asociación con la eTPC-

t, para identificar aquellos reactivos de afinidad o NCBP específicos para el TCRsp analito presentado por la eTPC-t analito.

5 **Figura 24 - Funcionamiento del sistema multicomponente para preparar eTPC-t para el montaje de un sistema eTPC:A combinado**

10 El sistema general en el que el sistema celular multicomponente (MCS) modificado comprende poner en contacto células presentadoras de TCR genomodificadas (eTPC) analitos preparadas con varios antígenos analitos en un sistema eTPC:A combinado. Es del sistema eTPC:A combinado de donde se derivan los resultados primarios, y de estos resultados primarios se derivan los resultados terminales. El funcionamiento del sistema general comprende dos fases, la fase de preparación y la fase analítica.

15 En un aspecto de la Fase 1, se preparan antígenos analitos. Dichos antígenos analitos expresan antígenos en diversas formas de restos antigénicos; complejos presentadores de antígeno analito (aAPX); moléculas antigénicas analitos (aAM); aAPX con carga de aAM cargada (aAPX:aAM); una molécula de carga (CM); un aAPX cargado con CM (aAPX:CM); en donde los antígenos analitos representan aquellos en los que se va a ensayar la afinidad o inducción de señal contra la eTPC-t analito (etapa i) y en donde los antígenos analitos pueden tomar la forma de al menos uno de los siguientes, reactivos solubles, reactivos inmovilizados, presentados por partículas no basadas en células (NCBP) o presentados en la superficie de las células (APC).
20 En otro aspecto de la Fase 1, el sistema multicomponente se usa para preparar células que expresan pares de cadenas de TCR analitos (TCRsp) en la superficie celular (etapa ii). Una eTPC que presenta un TCRsp en la superficie celular se denomina eTPC-t, en donde la eTPC-t presenta el TCRsp a antígenos analitos para ensayar la afinidad o inducción de señales contra los antígenos analitos. El contacto de la eTPC-t y los antígenos analitos da como resultado el ensamblaje de un sistema eTPC:A combinado (etapa iii).

25 La fase 2 del sistema general es el contacto de la eTPC-t y los antígenos analitos preparados en la Fase 1, que da como resultado el ensamblaje de un sistema eTPC:A combinado (etapa iii). Los antígenos analitos puestos en contacto presentan restos del analito a la eTPC-t analito y potencialmente se unen a la eTPC-t para formar un complejo estable con el TCRsp presentado. Dentro del sistema eTPC:A combinado, los resultados de los antígenos analitos o de la eTPC-t analito pueden cambiar su estado de señal o el complejo estable puede identificarse directamente (indicado con * y el sombreado más oscuro) de modo que aquellos que responden o especies establemente complejadas se pueden identificar (etapa iv). Basándose en los estados de señal alterados dentro del sistema eTPC:A, se pueden seleccionar antígenos analitos específicos según su capacidad para inducir una respuesta en una eTPC-t, o formar un complejo estable con el TCRsp, o la capacidad de una eTPC-t para inducir una respuesta en el antígeno analito, si corresponde. De manera similar, se puede seleccionar una eTPC-t analito según su capacidad para inducir una respuesta en los antígenos analitos puestos en contacto, o para que esos analitos induzcan una señal de respuesta en la eTPC-t, o para que el antígeno analito forme un complejo estable con el TCRsp. La selección basada en esta capacidad de respuesta o complejo estable produce los resultados primarios del sistema combinado eTPC:A (etapa v). Al obtener las células analito y/o los antígenos analitos de la etapa v, el aAPX, aAM, aAPX:aAM, CM, aAPX:CM y/o TCRsp analitos presentados pueden identificarse como la respuesta terminal del funcionamiento del sistema (etapa vi).
40

45 **Figura 25 - Selección de células con mutagénesis dirigida de los locus 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 Cas9-P2A-GFP y ARNg dirigidos a los locus de HLA-A, HLA-B y HLA-C (histograma gris) en comparación con las células de control HEK293 (histograma con líneas discontinuas). Las células que tenían una señal de GFP dentro del subconjunto de GFP delimitado se separaron como una población policlonal. b) Señal de HLA-ABC de superficie celular observada en las dos poblaciones policlonales separadas cuando se marcan con un anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 (histograma gris). Las células individuales que mostraban una señal baja de anti-HLA-ABC PE-Cy5 y que se mostraban dentro de la delimitación de separación se separaron para establecer monoclonos. Las células HEK293 no marcadas (histograma de línea discontinua) y las células HEK293 marcadas con anti-HLA-ABC PE-Cy5 (histograma de línea completamente negra) sirvieron como controles.
50
55

Figura 26 - Análisis fenotípico de monoclonos de HLA-ABC^{nulo}: Las poblaciones de monoclonos se tiñeron con el anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 y se analizaron por citometría de flujo (histograma gris). Las células HEK293 no marcadas (histograma de línea discontinua) y las células HEK293 marcadas con anti-HLA-ABC PE-Cy5 (histograma de línea completamente negra) sirvieron como controles. Las tres líneas de monoclonos mostraron una señal fluorescente que coincidía con los controles no marcados, lo que demuestra que cada línea carecía de expresión de superficie de HLA-ABC.
60

Figura 27 - Caracterización genética de una selección de monoclonos que carecen de expresión de HLA-ABC de superficie que demuestra una delección genómica en los alelos de HLA objetivo. Los amplicones de PCR se
65

generaron con cebadores que abarcaban los sitios genómicos objetivo del ARNg de alelos de HLA específicos y su tamaño se determinó por 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.

5 Figura 28 - Selección de células con integración genómica dirigida del Componente B sintético con o sin Componente D sintético

10 a) Señal de fluorescencia de GFP 48 horas después de la transfección con plásmidos que codifican Cas9-P2A-GFP, ARNg dirigidos al locus de AAVS1 y elementos genéticos del componente B flanqueados por brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1 (histograma gris). Las células HEK293 servían como control negativo de GFP (histograma de línea discontinua). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la delimitación de GFP+ se separaron como una población policlonal. b) Señal de fluorescencia de GFP 48 horas después de la transfección con plásmidos que codifican Cas9-P2A-GFP, ARNg dirigidos al locus de AAVS1 y los componentes B y D, ambos flanqueados por brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1 (histograma gris). Las células HEK293 servían como control negativo de GFP (histograma de línea discontinua). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la delimitación de GFP+ se separaron como una población policlonal. c) Se observó señal mantenida de BFP mantenida pero no de RFP detectable en la población policlonal separada D1. Las células individuales que mostraban una señal alta de BFP en el cuadrante Q3 se separaron para establecer eTPC que contenía monoclonos del componente B sintético. d) Se observó señal de BFP y RFP mantenidas en la población policlonal separada D2. Las células individuales que mostraban señales altas de BFP y RFP en el cuadrante Q2 se separaron para establecer monoclonos de eTPC que contenían el componente sintético B y el componente sintético D.

25 Figura 29 - Análisis fenotípico de monoclonos de eTPC: a y b) Las poblaciones de monoclonos que muestran expresión mantenida de BFP sugieren la integración del componente sintético B. c) Las poblaciones de monoclonos que muestran expresión mantenida de BFP y RFP sugieren la integración tanto del componente sintético B como del componente sintético D.

30 Figura 30 - Caracterización genética de una selección de monoclonos para la integración del Componente B o de los Componentes B y D en el locus de AAVS1. a) Los amplicones de PCR se generaron con cebadores que se ceban dentro del componente B y/o D y el tamaño se determinó por electroforesis. El tamaño esperado de un amplicón positivo es de 380 pb que indica una integración estable del componente B y/o D. b) Los amplicones de PCR se generaron con cebadores que se ceban en la secuencia genómica de AAVS1 distal a la región codificada por los brazos homólogos y el pA de SV40 terminador codificado por el componente B y/o D y tamaño determinado por electroforesis. El tamaño esperado de un amplicón positivo es de 660 pb, que indica que se produjo la integración del componente B y/o D en el sitio de AAVS1.

40 La Figura 31 ilustra la identificación de la célula base objetivo y los métodos según la invención para obtener una eTPC o variante de la misma.

Un método para genomodificar y obtener una eTPC y/o una eTPC+F a partir de una célula base objetivo en donde el método comprende:

- 45 • La etapa a es seleccionar una célula base objetivo
- La etapa b es identificar y seleccionar una célula base competente para TCRsp, definida como una célula base objetivo que es competente para expresar en la superficie de la célula un par de cadenas de TCR complementarias como proteínas en complejo con CD3 (TCRsp).
- 50 • La etapa c es identificar y seleccionar una célula base confirmada, definida como una célula base competente para TCRsp que contiene un CD3 codificado genómicamente, ya sea de forma nativa o genéticamente modificada, pero que se expresa condicionalmente en la superficie cuando a la célula se le proporcionan ácidos nucleicos que codifican una par de cadenas de TCR complementarias
- 55 • La etapa d es genomodificar y seleccionar una eTPC putativa, definida como una célula base confirmada que se ha genomodificado para contener un componente B y/o un componente D genómicamente integrado, pero en donde no se ha determinado el número exacto de copias ni la ubicación
- 60 • La etapa e es confirmar y seleccionar una eTPC, definida como una eTPC putativa que se ha confirmado que tiene solo una copia única de cada componente B y/o D. Opcionalmente, el componente B y/o el componente D se ensayan y son capaces de integrar al menos un ORF codificado dentro del componente C' y/o E'
- La etapa f es genomodificar y seleccionar una eTPC+F putativa, definida como una eTPC que ha sido genomodificado para contener un componente F genómicamente integrado, pero en donde la célula no se ha ensayado para confirmar que la célula puede producir una señal de respuesta a través del componente F.

- La etapa g es confirmar y seleccionar una eTPC+F, definida como una eTPC+F putativa que se ha ensayado y se ha confirmado que es capaz de producir una señal de respuesta a través del componente F por estimulación con un antígeno cognado de un par de cadenas de TCR complementarias. Opcionalmente, se determina la ubicación genómica y el número de copias del componente F.

Es posible crear una eTPC+F directamente desde la célula base objetivo sin la necesidad de crear una eTPC previamente, en donde el método comprende las etapas a a c, y comprende además

- La etapa h es genomodificar y seleccionar una célula base putativa+F, definida como una célula base confirmada que se ha genomodificado para contener un componente F genómicamente integrado, pero en donde la célula no se ha ensayado para confirmar que la célula puede producir una señal de respuesta a través del componente F.
- La etapa i es confirmar y seleccionar una célula base+F, definida como una célula base+F putativa que se ha ensayado y se ha confirmado que es capaz de producir una señal de respuesta a través del componente F por estimulación con un antígeno cognado de un par de cadenas de TCR complementarias. Opcionalmente, se determina la ubicación genómica y el número de copias del componente F.
- La etapa j es genomodificar y seleccionar una eTPC+F putativa, definida como una célula base+F que se ha genomodificado para contener un componente B y/o un componente D genómicamente integrado, pero en donde no se ha determinado el número exacto de copias ni la ubicación
- La etapa g es confirmar y seleccionar una eTPC+F, definida como una eTPC+F putativa que se ha confirmado que tiene solo una copia única de cada componente B y/o D. Opcionalmente, el componente B y/o el componente D se ensayan y son capaces de integrar al menos un ORF codificado dentro del componente C' y/o E'

Figura 32 - Un método para identificar y seleccionar una célula base competente para TCRsp

Un método para identificar y seleccionar una célula base objetivo que sea competente para expresar un par de cadenas de TCR en complejo con CD3 (TCRsp) en la superficie de la célula, denominada célula base competente para TCRsp, como el primer procedimiento en la genomodificación de una eTPC.

- La etapa a es seleccionar una célula base objetivo
- La etapa b es teñir con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3
- La etapa c es identificar si la célula carece de expresión de superficie de TCRsp y CD3.
- La etapa d es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de un par de cadenas de TCR complementarias (pTCR) y proteínas CD3.
- La etapa e es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3.
- La etapa f es identificar la célula con expresión de superficie de TCRsp y CD3 para confirmar que la célula es competente para la expresión de TCRsp.
- La etapa g es seleccionar la célula identificada en la etapa f como una célula base competente para TCRsp.

Figura 33 - Un primer método para identificar y seleccionar una célula base confirmada a partir de una célula base competente para TCRsp

Un primer método mediante el cual una célula base competente para TCRsp se puede identificar y seleccionar como una célula base confirmada, en donde una célula base confirmada es una célula capaz de TCRsp y también codifica genómicamente la expresión de CD3.

En donde el método comprende

- La etapa g es seleccionar la célula base competente para TCRsp (de la Figura 31)
- La etapa h es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de un par de cadenas de TCR complementarias (pTCR).
- La etapa i es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de CD3.

- La etapa j es identificar la célula con la expresión de superficie de CD3, confirmando que la célula es capaz de expresar CD3 cuando se le proporcionan ácidos nucleicos que codifican un TCRsp.

5 • La etapa k es seleccionar la célula identificada como se define en la etapa j, como una célula base confirmada

Figura 34 - Un segundo método para identificar, genomodificar y seleccionar una célula base confirmada a partir de una célula base competente para TCRsp

10 Un segundo método mediante el cual una célula base competente para TCRsp se puede identificar, genomodificar y seleccionar como una célula base confirmada, en donde una célula base confirmada es una célula capaz de TCRsp y también codifica genómicamente la expresión de CD3.

En donde el método comprende

- 15
- La etapa g es seleccionar la célula base competente para TCRsp (de la Figura 31)
 - La etapa h es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de un par de cadenas de TCR complementarias (pTCR) y también la transfección independientemente con ácidos nucleicos que codifican la expresión de CD3
 - La etapa i es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y/o CD3
 - La etapa j es identificar la célula que carece de expresión de TCRsp y/o CD3, en ambas transfecciones independientes
 - La etapa k es integrar ácidos nucleicos que codifican la expresión de CD3 en el genoma de la célula
 - La etapa l es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de un par de cadenas de TCR complementarias (pTCR)
 - La etapa m es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3
 - La etapa n es seleccionar la célula que expresa TCRsp y CD3 en la superficie de la célula
 - La etapa o es seleccionar la célula genomodificada de la etapa n como célula base confirmada
- 25
- 30
- 35

Figura 35 - Un tercer método para identificar, genomodificar y seleccionar una célula base confirmada a partir de una célula base competente para TCRsp

40 Un tercer método mediante el cual una célula base competente para TCRsp se puede identificar, genomodificar y seleccionar como una célula base confirmada, en donde una célula base confirmada es una célula capaz de TCRsp y también codifica genómicamente la expresión de CD3.

45 En donde el método comprende

- La etapa g es seleccionar la célula base competente para TCRsp (de la Figura 31)
 - La etapa h es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de CD3
 - La etapa i es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3
 - La etapa j es identificar la célula con expresión de superficie de TCRsp y CD3
 - La etapa k es integrar ácidos nucleicos que codifican la expresión de CD3 en el genoma de la célula
 - La etapa l es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3
 - La etapa m es seleccionar la célula que expresa TCRsp y/o CD3 en la superficie de la célula
 - La etapa n es la mutación dirigida de los locus genómicos del TCR
 - La etapa o es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y/o CD3
- 50
- 55
- 60

- La etapa p es seleccionar la célula que carece de expresión de TCRsp y/o CD3 en la superficie de la célula
- La etapa q es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de una cadena única de un par de cadenas de TCR complementarias (TCRc1)
- 5 • La etapa r es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y/o CD3
- La etapa s es seleccionar la célula que carece de expresión de TCRsp y/o CD3 en la superficie de la célula
- 10 • La etapa t es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de una cadena única de un par de cadenas de TCR complementarias (TCRc2), que es el par cognado de TCRc1 en la etapa q
- La etapa u es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y/o CD3
- 15 • La etapa v es seleccionar la célula que carece de expresión de TCRsp y/o CD3 en la superficie de la célula
- La etapa w es seleccionar la célula genomodificada de la etapa v como célula base confirmada

Figura 36 - Un método para identificar, genomodificar y seleccionar una célula base confirmada a partir de una célula base objetivo

Un método mediante el cual una célula base objetivo se puede identificar, genomodificar y seleccionar como una célula base confirmada, y en donde la célula base confirmada es una célula capaz de TCRsp y también codifica genómicamente la expresión de CD3. La selección de una célula base confirmada es el segundo procedimiento en la genomodificación de una eTPC.

El método comprende

- La etapa a es seleccionar una célula base objetivo
- 30 • La etapa b es teñir con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3
- La etapa c es identificar la expresión de superficie de TCRsp y CD3
- 35 • La etapa d es seleccionar la célula base competente para TCRsp como se determina en la etapa c
- La etapa e es la mutación dirigida de los locus genómicos del TCR
- La etapa f es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3
- 40 • La etapa g es seleccionar la célula que carece de expresión de TCRsp y CD3 en la superficie de la célula
- La etapa h es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de una cadena única de un par de cadenas de TCR complementarias (TCRc1)
- 45 • La etapa i es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3
- La etapa j es seleccionar la célula que carece de expresión de TCRsp y CD3 en la superficie de la célula
- 50 • La etapa k es la transfección de la célula con ácidos nucleicos que codifican la expresión de una cadena única de un par de cadenas de TCR complementarias (TCRc2), que es el par cognado de TCRc1 en la etapa q
- La etapa l es la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y CD3
- 55 • La etapa m es seleccionar la célula que carece de expresión de TCRsp y CD3 en la superficie de la célula
- La etapa n es seleccionar la célula genomodificada de la etapa v como una célula base confirmada

Figura 37 - Un método para genomodificar y seleccionar una eTPC o una eTPC+F a partir de una célula base confirmada

Un método para genomodificar y seleccionar una eTPC, en donde una célula base confirmada se genomodifica para que contenga un componente B y/o componente D genómicamente integrado para obtener una eTPC

putativa, y en donde luego se confirma que la eTPC putativa tiene solo una única copia de cada uno del componente B y/o D. Opcionalmente, el componente B y/o el componente D se ensayan y se encuentra que son capaces de integrar al menos un ORF codificado dentro del componente C' y/o E'.

5 El método comprende

- La etapa a es seleccionar una célula base confirmada, utilizando cualquiera de los métodos definidos en las Figuras 32 a 36

10 • La etapa b es integrar el componente B y/o el componente B en el genoma de la célula

- La etapa c es seleccionar una célula con el componente B y/o C integrado seleccionando la expresión del(de los) marcador(es) de selección del componente B y/o componente D

15 • La etapa d es obtener una eTPC putativa según la etapa c

- La etapa e es confirmar la ubicación del componente B y/o D dentro del genoma y que solo una copia de cada uno está presente dentro del genoma

20 • La etapa f es opcionalmente transfectar la célula con componente C' y/o E' junto con factores de integración

- La etapa g es opcionalmente la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y/o CD3

25 • La etapa h es opcionalmente identificar la célula con expresión de superficie de TCRsp y/o CD3

- La etapa i es opcionalmente identificar la pérdida del(de los) marcador(es) de selección del componente B y/o D

30 • La etapa j es opcionalmente identificar la ganancia del marcador de selección de integración del componente C' y/o componente E'

- La etapa k es la confirmación de la eTPC putativa como una eTPC, en donde la confirmación se determinada por la etapa e, y/o cualquiera de las etapas f, i, j y/o g y h

35 La flecha discontinua de la etapa d a la etapa k indica que se confirma que la eTPC putativa es una eTPC mediante la confirmación mínima como se define en la etapa e. La flecha discontinua de la etapa e a la f indica que este procedimiento es opcional, y el cuadro de puntos que describe las etapas h, i y j indica que se debe realizar al menos una de h, i o j. La línea discontinua desde el cuadro de puntos a la etapa k indica la confirmación adicional y caracterización de la eTPC, según se determina en las etapas h, i y/o j

40 El método también puede sustituir la etapa a, etapa d y etapa k con lo siguiente para obtener una eTPC+F

- La etapa a es seleccionar una Una célula base+F, utilizando el método sustituido definido en la Figura 38

45 • La etapa d es obtener una eTPC+F putativa según la etapa c

- La etapa k es la confirmación de la eTPC+F putativa como una eTPC+F, en donde la confirmación se determinada por la etapa e, y/o cualquiera de las etapas f, i, j y/o g y h

50 Figura 38 - Un método para genomodificar y seleccionar una eTPC+F o eTPC a partir de una célula base confirmada

55 Un método para genomodificar y seleccionar una eTPC+F, en donde una eTPC se genomodifica para que contenga un componente F genómicamente integrado para obtener una eTPC+F putativa, y en donde luego se ensaya la eTPC+F putativa para confirmar que la célula y el componente F son capaces de producir una señal de respuesta a través del componente F por estimulación con un antígeno cognado de un par de cadenas de TCR complementarias. Opcionalmente, se determina la ubicación genómica y el número de copias del componente F, en donde

60 El método comprende

- La etapa a es seleccionar una eTPC, utilizando el método definido en la Figura 37

- La etapa b es integrar el componente F en el genoma de la célula

65

• La etapa c es seleccionar una célula con el componente F integrado seleccionando la expresión del marcador de selección de integración del componente F

5 • La etapa d es obtener una eTPC+F putativa según la etapa c

• La etapa e es opcionalmente confirmar la ubicación del componente F dentro del genoma y el número de copias presentes dentro del genoma de la célula

10 • La etapa f es transfectar la célula con el componente C' y/o E' junto con factores de integración

• La etapa g es opcionalmente la tinción de la célula con reactivos de afinidad específicos de TCRsp y/o CD3

• La etapa h es opcionalmente seleccionar la célula con expresión de superficie de TCRsp y/o CD3

15 • La etapa i es seleccionar la pérdida del(de los) los marcador(es) de selección del componente B y/o D

• La etapa j es seleccionar la ganancia del marcador de selección de integración del componente C' y/o componente E'

20 • La etapa k es estimular el TCRsp de la célula seleccionada, como se selecciona por al menos una de las etapas h, i y/o j, con el antígeno cognado para el TCRsp.

• Etapa l detectar una señal de respuesta inducida por la estimulación de la etapa k, en donde la respuesta es una comunicada por el componente F

25 • La etapa m es la confirmación de la eTPC+F putativa como una eTPC+F, en donde la confirmación se determina por la etapa l y, opcionalmente la etapa e

30 La flecha discontinua de la etapa d a la etapa m indica que se confirma que la eTPC+F putativa es una eTPC+F mediante la confirmación mínima como se define en la etapa l. El cuadro de puntos que describe las etapas h, i y j indica que se debe realizar al menos una de h, i o j con el fin de seleccionar una célula para la etapa k

El método también puede sustituir las etapas a, d, f y m con lo siguiente

35 • La etapa a es seleccionar una célula base confirmada, utilizando cualquiera de los métodos definidos en las Figuras 32 a 36.

• La etapa d es obtener una Una célula base putativa+F según la etapa c

40 • La etapa f es la transfección transitoria de ácidos nucleicos que codifican la expresión de un par de cadenas de TCR complementarias.

• La etapa m es la confirmación de la célula base+F putativa como una célula base+F, en donde la confirmación se determina por la etapa l y, opcionalmente la etapa e

45 Figura 39 - Análisis FACS de la célula base objetivo, en donde las células se habían teñido con anti-TCR-alfa-beta y anti-CD3.

50 Los gráficos demuestran claramente que la célula base objetivo carece de expresión de superficie de CD3 y TCRsp. No existe una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las teñidas (línea negra, relleno gris) y las no teñidas (línea discontinua, sin relleno).

Figura 40 - Análisis FACS de la célula base objetivo

55 Las células se transfectaron con plásmidos que codifican la expresión transitoria de CD3 y pTCR, y posteriormente se tiñeron con anti-TCR-alfa-beta y anti-CD3 y dexA2-NLV-PE, un antígeno soluble (un aAPX:aM). Se utilizaron dos pTCR diferentes, se sabe que el primer pTCR (A) es incapaz de unirse a dexA2-NLV-PE, mientras que se sabe que el segundo pTCR (B) se une a dexA2-NLV-PE como un antígeno cognado. Como control, la célula base objetivo se había transfectado con un plásmido que no codificaba expresión, denominado control de vector vacío (C). Todos los gráficos tienen la intensidad de fluorescencia de anti-CD3 como el eje y, y los paneles de la izquierda el eje x como intensidad de fluorescencia de anti-TCR-alfa-beta, y los paneles de la derecha el eje x como intensidad de fluorescencia de dexA2-NLV-PE. El valor dentro de cada gráfico, en la esquina superior derecha, es el porcentaje de células positivas para CD3+TCRsp+ o CD3+dexA2-NLV-PE+.

65

Los gráficos demuestran claramente que la célula base objetivo es capaz de expresar CD3 y TCRsp cuando está provista de los ácidos nucleicos que codifican la expresión de CD3 y TCRsp. Además, el TCRsp codificado por el pTCR con unión conocida a dexA2-NLV-PE (B) muestra una unión clara al antígeno soluble, lo que indica que el TCRsp conserva su función biológica. Por el contrario, el TCRsp (B), que se sabe que es incapaz de unirse a dexA2-NLV-PE, no mostró unión.

Figura 41 - Identificación de la falta de expresión de superficie de CD3 y TCRsp de una célula base competente para TCRsp

Identificación de la falta de expresión de superficie de CD3 y TCRsp de una célula base competente para TCRsp que había sido transfectada con plásmidos que codificaban la expresión de TCR-alfa (A), TCR-beta (B) o control de vector vacío (C). No se observó ninguna diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia de las células que habían sido transfectadas con plásmidos de TCRalfa o TCRbeta en comparación con el control de vector vacío, lo que indica una falta de expresión endógena de cualquier cadena de TCR complementaria. Además, no se mostró expresión de superficie de CD3, lo que confirma aún más que la célula no expresaba CD3 endógeno ni ninguna cadena de TCR.

Figura 42 - Transfección transitoria de la célula base competente para TCRsp para integrar CD3

Transfección transitoria de la célula base competente para TCRsp para integrar CD3 en el genoma. La célula base competente para TCRsp había sido transfectada con dos plásmidos que codificaban la expresión de los dos factores de integración, Cas9-2A-GFP y ARNguía, además de un tercer plásmido que codificaba CD3 en un plásmido de recombinación homóloga dirigida al sitio, dirigido al locus de HLA-A. Se había llevado a cabo una transfección de control en donde se usó el vector vacío que no codificaba expresión, a modo de comparación. Las células que mostraban expresión de GFP y que posteriormente contenidas en la población de células integradas, se seleccionaron mediante separación de células.

Figura 43 - Transfección transitoria de las células separadas para la primera selección

Transfección transitoria de las células separadas de la Figura 42. Las células separadas se habían transfectado (B) con tres plásmidos, el primero codificaba la expresión de GFP y se utilizó como un control de transfección. El segundo y el tercer plásmido codificaban cada uno una cadena de TCR-alfa (V3.C.3) o una cadena de TCR-beta. Se había llevado a cabo una transfección de control en donde no se proporcionó a la célula plásmidos que codificaban TCRsp (A). Las células se tiñeron con anti-CD3, seleccionándose y separándose las células que mostraban expresión de superficie de CD3.

Figura 44 - Transfección transitoria de las células separadas para la segunda selección

Transfección transitoria de las células separadas de la Figura 43. Las células separadas se habían transfectado (B) con tres plásmidos, el primero codificaba la expresión de GFP y se utilizó como un control de transfección. El segundo y el tercer plásmido codificaban cada uno una cadena de TCR-alfa (V3.C.3) o una cadena de TCR-beta. Se había llevado a cabo una transfección de control en donde no se proporcionó a la célula plásmidos que codificaban TCRsp (A). Las células se tiñeron con anti-CD3, seleccionándose y separándose las células que mostraban expresión de superficie de CD3.

Figura 45 - Transfección transitoria de las células separadas para la tercera selección

Transfección transitoria de las células separadas de la Figura 44. Las células separadas se habían transfectado (B) con tres plásmidos, el primero codificaba la expresión de GFP y se utilizó como un control de transfección. El segundo y el tercer plásmido codificaban cada uno una cadena de TCR-alfa (V3.C.3) o una cadena de TCR-beta. Se había llevado a cabo una transfección de control en donde no se proporcionó a la célula plásmidos que codificaban TCRsp (A). Las células se tiñeron con anti-CD3, con 96 células que mostraban alta expresión de superficie de CD3 seleccionadas y separadas para monoclonación (cuadro de selección de monoclon de CD3), y las células CD3+ restantes separadas como un conjunto para crioconservación.

Figura 46 - Caracterización de eTPC

Identificación y selección de un monoclon de la Figura 45 que había mostrado expresión de superficie de CD3 y TCRsp. La célula se había transfectado transitoriamente con dos plásmidos que codificaban un TCRsp complementario y un tercero que codificaba la expresión de GFP (A). Se había llevado a cabo una transfección de control (B) en donde las células se transfectaron utilizando únicamente el plásmido de GFP. El análisis FAC de las dos transfecciones, delimitado para células GFP+, indicaba claramente que el monoclon mostraba expresión de CD3 condicionada a la provisión de material genético que codificaba la expresión de un TCRsp. Posteriormente, el monoclon se seleccionó como célula base confirmada.

Figura 47 - Caracterización genética de monoclonos que contienen componentes D y/o B

Se presentan dos tablas que resumen la caracterización genética de las células generadas en los ejemplos 2 y 3, para contener el Componente B, o el Componente B y D, respectivamente.

5 Figura 48: Demostración de la generación de eTPC-t a partir de eTPC parental

Se seleccionó un par de TCR alfa/beta modelo (JG9-TCR), que tiene una especificidad conocida por un antígeno HCMV presentado en HLA-A*02:01 para su integración en una línea parental de eTPC. El ORF de JG9-TCR-alfa se clonó en un contexto de componente E' y JG9-TCR-beta en un contexto de C'. Se creó una eTPC-t a través de RMCE mediante la transfección de los plásmidos de los componentes C' y E' y una construcción que codifica la recombinasa flp en la línea de eTPC ACL-488, que alberga dos sitios de integración genómica, B y D, que codifican los indicadores BFP y RFP, respectivamente. 10 días después de la transfección, las células individuales disminuidas para las señales BFP y RFP, codificadas por los marcadores de selección de los componentes B y D, se separaron como células individuales. La eTPC-t ACL-851 monoclonal resultante se analizó en paralelo con la eTPC parental y se presentó un único ejemplo.

a) y b) La línea celular eTPC parental ACL-488 y un ejemplo monoclonal se analizaron por citometría de flujo para señales de BFP y RFP. El gráfico muestra células individuales vivas como BFP frente a RFP, lo que muestra que la línea celular eTPC es positiva para los marcadores de selección presentes en los componentes B y D (a), y el monoclon resultante ha perdido estos marcadores como se esperaba para los sucesos de pareja de integración entre B/C y D/E (b). Los valores porcentuales representan el porcentaje de células doble positivas en a) y de células doble 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 multímero de HLA específico para JG9-TCR (Dex HLA-A*02:01-NLVP) y se analizó por citometría de flujo y se delimitó para células individuales vivas. La línea eTPC parental no mostró tinción positiva para CD3 o TCR en la superficie celular (c), y también era negativa para la tinción con reactivo multímero 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 multímero específico para el JG9-TCR expresado. Los valores porcentuales representan el porcentaje de células doble positivas para CD3/TCRab en c) y e), y células doble positivas para CD3/HLA-multímero en d) y f).

g) Se preparó ADN genómico a partir de eTPC-t ACL-851 monoclonal y se sometió a PCR con cebadores específicos para la cadena JG9-TCR-alfa codificada por el componente D', o la cadena JG9-TCR-beta codificada por el componente B'. Los productos de la PCR se resolvieron mediante gel de agarosa y se observaron con el tamaño de banda esperado. h) Se preparó ADN genómico a partir de eTPC-t ACL-851 monoclonal y se sometió a PCR de gota digital con cebadores y sondas específicas para la cadena JG9-TCR-alfa codificada por el componente D', o la cadena JG9-TCR-beta codificada por el componente B'. Se incluyó un par cebador/sonda amplicón de referencia para un intrón de la constante alfa de TCR (TRAC). La tabla presenta relaciones de referencia para TCR alfa y TCR beta. Una relación cercana a 0,33 indica que está presente una única copia de cada cadena alfa y beta de TCR en la línea de eTPC-t ACL-851, que es una línea triploide.

45 Figura 49 - Demostración de la reversión a eTPC-x desde eTPC-t

Una línea celular eTPC-t parental ACL-851, que expresa una cadena alfa y beta de TCR en los sitios D' y B', respectivamente, se revirtió a una línea eTPC-x intercambiando el componente D' con un vector donador que codifica GFP (Componente Z). El componente Z contenía sitios F14/F15 heteroespecíficos de recombinasa que flanqueaban el ORF de GFP y, por lo tanto, era compatible con el componente D'. La línea eTPC-t ACL-851 se transfectó con el componente Z junto con una construcción que codifica la recombinasa flp. 7 días después de la transfección, las células individuales positivas para señales de GFP se separaron y cultivaron como monoclonas. Las líneas eTPC-x monoclonales resultantes se analizaron por citometría de flujo en paralelo con la eTPC-t parental y se presentó un único ejemplo. a) y b) La eTPC-x ACL-987 monoclon derivada de eTPC-t ACL-851 parental se analizó por citometría de flujo para determinar la expresión de GFP junto con la línea parental. Los gráficos muestran los parámetros de SSC frente a GFP de células individuales vivas delimitadas. La línea celular parental no tiene expresión de GFP (a), mientras que el monoclon ACL-987 ha ganado GFP como se esperaba (b), lo que indica el intercambio del ORF de TCR alfa por un ORF de GFP. c) y d) La eTPC-x ACL-987 monoclon derivada de ACL-851 parental junto con la eTPC-t ACL-851 parental se tiñeron con anticuerpos para CD3 y TCRab y se analizaron por citometría de flujo. Los gráficos muestran los parámetros CD3 frente a TCRab delimitados 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 del ORF de TCR alfa en la línea eTPC-x derivada.

65 Figura 50: Demostración de la integración de escopeta en eTPC-x para crear el conjunto de eTPC-t

Se creó un conjunto de eTPC-t a partir de una línea parental de eTPC-x que expresa una única cadena de

TCR beta en el componente B'. La línea eTPC-x expresaba GFP como indicador en el sitio D disponible. Se construyó un conjunto de 64 cadenas de TCR alfa variantes que incluía la cadena parental. El par de cadenas del TCR parental representa el JG9-TCR con especificidad conocida por un antígeno de HCMV presentado en HLA-A*02:01. El conjunto del componente E se transfeció en la eTPC-x ACL-987 parental junto con una construcción que codifica la recombinasa flp. Se seleccionó una línea policlonal separando las células positivas para GFP 10 días después de la transfección. La eTPC-t policlonal ACL-988 resultante se separó posteriormente basándose en la tinción negativa para GFP y la tinción positiva o negativa para el reactivo multímero de HLA (DEX HLA-A*02:01-NLVP). Las células individuales recuperadas se secuenciaron para identificar las cadenas de TCR-alfa codificadas y se compararon con un análisis paralelo de cada una de las variantes de la cadena de TCR-alfa emparejadas con la cadena de TCR-beta nativa en términos de tinción con un reactivo multímero de HLA específico para el par de cadenas de TCR parental.

a) y b) La línea eTPC-x ACL-987 parental y la línea eTPC-t ACL-988 policlonal resultante se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de GFP. Los gráficos muestran los parámetros de SSC frente a GFP de células individuales vivas. La línea celular parental muestra una señal positiva para GFP, que indica el componente D intacto (a). La línea policlonal derivada muestra la mitad positiva y la mitad negativa para GFP (b), indicando 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 D'.

c) y d) La línea parental eTPC-x ACL-987 y la línea eTPC-t ACL-988 policlonal resultante se tiñeron con un anticuerpo para CD3 y un multímero de HLA con especificidad para el JG9-TCR parental (DEX HLA-A*02:01-NLVP), y se analizaron por citometría de flujo. Los gráficos muestran los parámetros de CD3 frente a multímero de HLA de células individuales vivas. La línea celular parental es negativa para la tinción tanto de CD3 como de multímeros de HLA (c). El panel izquierdo de d) muestra sucesos negativos para GFP delimitados, y el panel derecho sucesos positivos para GFP. Sólo los sucesos negativos para GFP, donde el componente D se convierte en D', muestran tinción positiva para CD3, de los cuales un subconjunto muestra tinción positiva para el multímero de HLA. Se separaron células individuales de la delimitación positiva y negativa del multímero de HLA delimitado y se secuenció el ORF integrado en el componente D' para determinar la identidad del ORF de TCR alfa.

e) Las 64 variantes de JG9-TCR-alfa se clonaron en una construcción de expresión que permitía que cada una se transfecara de forma independiente a eTPC-x parental (ACL-987). Para cada uno se determinaron las unidades de tinción relativas (RSU) frente al reactivo tetrámero HLA-A*02:01-NLVP. La RSU se calcula como la relación de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la señal del tetrámero HLA-A*02:01-NLVP para la población CD3 positiva respecto a la población CD3 negativa, y es indicativo de la fuerza de unión de cada variante de par de cadenas de TCR al reactivo multímero de HLA. Cada punto trazado en la Figura e) representa la RSU observada para cada una de las 64 variantes. Los círculos blancos se correlacionan con las células secuenciadas recuperadas de la delimitación de GFP-negativa/multímero de HLA-positiva. Los triángulos blancos se correlacionan con las células secuenciadas recuperadas de la delimitación de GFP-negativa/multímero de HLA-negativa.

Figura 51 - Demostración funcional del componente F

La línea celular eTPC-t que lleva un componente F (ACL-1277), en donde las cadenas de TCR en los componentes B' y D' codifican un par de TCR que es específico para el péptido antigénico de HCMV NLVPMVATV presentado en HLA-A*02:01. El indicador del componente F era RFP. Esta eTPC-t se puso en contacto durante 24 horas con varias líneas de APC de diferentes características de HLA en presencia y ausencia de antígenos peptídicos modelo, y los cultivos del contacto se analizaron por citometría de flujo. Los gráficos de histograma de citometría de flujo muestran recuentos de sucesos frente a la señal de RFP de células T individuales viables identificadas mediante tinción con anticuerpos para un marcador de superficie específico que no era presentado por las APC. a) y b) Se pulsaron células APC que expresaban solo HLA-A*02:01 (ACL-209) con los péptidos NLVPMVATV (a) o VYALPLKML (b) y posteriormente se cocultivaron con eTPC-t durante 24 h. c) y d) Se pulsaron células APC que expresaban solo HLA-A*24:02 (ACL-963) con los péptidos NLVPMVATV (c) o VYALPLKML (d) y posteriormente se cocultivaron con eTPC-t durante 24 h. e) Las células APC que expresaban solo HLA-A*02:01 (ACL-209) se dejaron sin pulsación de péptidos y posteriormente se cocultivaron con eTPC-t durante 24 h. f) Las células APC que no expresan HLA en la superficie celular (ACL-128) se pulsaron con NLVPMVATV y posteriormente se cocultivaron con eTPC-t durante 24 h. La señal de RFP aumentó significativamente en la eTPC-t ACL-1277 solo en presencia de células que expresaban HLA-A*02:01 pulsadas con NLVPMVATV, que representan el objetivo conocido del TCR expresado. Las delimitaciones y los valores del histograma reflejan el porcentaje de sucesos en las delimitaciones de RFP positivas y RFP negativas. Esto indica la respuesta específica del componente F al acoplamiento de TCRsp expresada por eTPC-t con HLA/antígeno cognado (aAPX:aAM).

Figura 52 - El uso de eTPC como patrón de TCR

La línea celular eTPC-t que expresa TCR, específica del péptido NLVPMVATV del CMV presentado en HLA-

A*02:01 (ACL-852) se comparó con una eTPC que carece de expresión de TCR (ACL-442). Las células se recogieron y se dejaron sin fijar o se fijaron con PFA. a) Las células eTPC-t y eTPC se tiñeron con reactivo multímero de HLA específico para el TCR presentado por eTPC-t (ACL-852) y se analizaron por citometría de flujo. Las células individuales delimitadas se muestran como gráficos de histograma. ACL-442 se muestra en los paneles superiores, mientras que ACL-852 en los paneles inferiores. Solo las células ACL-852 mostraron tinción con reactivo multímero de HLA, donde las células no fijadas (panel izquierdo) mostraron tinción equivalente a las fijadas (panel derecho). b) Las células eTPC-t se tiñeron con un anticuerpo contra CD58 y luego se añadieron a PBMC aisladas. Luego un conjunto de PBMC sin eTPC-t y un conjunto de PBMC enriquecidas con eTPC-t se tiñó con un reactivo multímero de HLA específico para el TCR presentado por eTPC-t (ACL-852, CMV-HLA-A*02:01 -NLVPM-pp65). El panel izquierdo muestra PBMC solas y el panel derecho PBMC y eTPC-t, delimitadas como células individuales y parámetros de CD58 frente a multímero de HLA. Las PBMC con marcaje específico (células T CD8) se pueden ver como células positivas para multímero en ambas muestras, mientras que las eTPC-t se pueden visualizar fácilmente como células doble positivas para CD58/multímero de HLA (panel derecho).

15 Materiales y métodos

Electroporación de células ARH-77.

20 Por reacción, se electroporaron 4×10^6 células en 500 μ l de RPMI 1640 con Glutamax-I (Life Technologies) usando Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad) con la siguiente configuración Onda cuadrada 285 V, longitud de pulso 12,5 ms y 2 pulsos con intervalo de 1 s.

25 La concentración de ADN utilizada para el plásmido Cas9 V1.A.8 era 10 μ g/ml y de 7,5 μ g/ml para el ARNg dirigido al sitio de integración (V2.I.10 y V2.J.1 para la integración en el locus endógeno de HLA y V2.J.6 para dirigirse al sitio AAVS1) (Tabla 1). Los vectores de integración se electroporaron en una concentración de 7,5 μ g/ μ l.

30 Para la integración de HDR en el locus de HLA, se utilizaron los plásmidos de HLA de clase I V1.C.6 y V1.C.9. Para la integración HDR en el locus de AAVS1, HLA de clase I V1.F.8 y V1.F.10 y HLA de clase II V1.I.5 y V1.I.7.

35 Se integraron variantes de ORF de pp65 en líneas monoalélicas de HLA creadas previamente. Para este fin se utilizaron los plásmidos V1.G.9 y V1.H.1 que contienen una forma de pp65 unida con un marcador GFP.

Para generar una línea ARH-77 HLA-nula con un sitio de RMCE, se utilizaron plásmidos con sitios de recombinasa heteroespecíficos que flanquean un marcador, V4.B.2 para RFP y V4.B.3 para BFP. Los mismos plásmidos se coelectroporaron para producir una línea estable que contenía dos sitios de RMCE.

40 También se creó una línea de HLA monoalélica utilizando RMCE, donde el vector V4.D.2 se electroporó en una célula que contenía un sitio de RMCE.

Después de la electroporación, las células se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 con Glutamax-I + FBS al 10% (37°C, CO₂ al 5%) durante dos días, antes del análisis.

45 Transfección de células HEK293.

Un día antes de la transfección, se sembraron células a una densidad de $1,2-1,4 \times 10^6$ células/placa de 60 mm en 90% de DMEM + L-glutamina 2 mM + 10% de HI-FBS (Life Technologies).

50 Al día siguiente, se transfectaron células con 65% de confluencia con una cantidad total de 5 μ g de ADN y jetPEI® (reactivo de transfección Polyplus, Life Technologies) en una relación N/P de 6. El medio se reemplazó antes de la transfección.

55 Para la eliminación de genes HLA de clase I, las células se transfectaron con 0,42 μ g de vectores de ADN que codifican Cas9_GFP (V1.A.8), ARNg dirigidos a HLA-A, B y C (V2.A.1, V2.A.7 y V2.B.3 respectivamente) y un vector vacío (V1.C.2).

60 Para la integración de sitios de RMCE en el locus AAVS1, las células se transfectaron con 0,5 μ g de V1.A.8; 0,625 μ g de ARNg V2.J.6 y 0,75 μ g de plásmidos que codifican dos marcadores flanqueados por sitios de RMCE (V4.B.2 para RFP y V4.B.3 para BFP), se usó el vector vacío V1.C.2 para completar 5 μ g de ADN.

65 Se diluyeron soluciones madre de ADN y jetPEI® en NaCl 1 M y NaCl 150 mM estériles, respectivamente. El volumen final de cada solución era equivalente a 50% del volumen total de la mezcla. Luego se añadió solución de PEI al ADN diluido y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se añadieron las mezclas de ADN/PEI a las placas de 60 mm, teniendo cuidado de no alterar la película celular. Las células

se incubaron durante 48 horas a (37 °C, 5% de CO₂, 95% de humedad relativa) antes del análisis de expresión de GFP.

RMCE entre una pareja de integración emparejada

5

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

10

Tabla 1: Vectores

ID	Nombre
V1.A.4	pcDNA3.1_GFP
V1.A.8	SpCas9-2A-GFP
V1.C.2	pMA-SV40pA
V1.C.6	HLA-A 02:01 6xHis + Exón2/3-HA-L+R
V1.C.9	HLA-B 35:01 6xHis + Exón2/3-HA-L+R
V1.F.8	AAVS1-S_A24_6xH
V1.F.10	AAVS1-L_B07_6xH
V1.G.10	AAVS1-I_GFP_HCMVpp65
V1.H.1	AAVS1-I_GFP_HCMVpp65 AIN
V1.I.5	AAVS1_DRA_Flag-DRB1_6xHis
V1.I.7	AAVS1_DPA1_Flag-DPB1_6xHis
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	AAVS1_sg-sp-opti_3
V4.B.2	AAVS_Efla-intrón_F14_RFPnls_F15
V4.B.3	AAVS_Efla-intrón_FRT_BFPnls_F3
V4.D.2	pMA_FRT_HLA-A*02:01-6xHis_F3
V4.I.8	CMVpro-Flpo-sv40pA-V2
V1.A.4	pcDNA3.1_GFP
V1.A.6	pcDNA3.1_RFP
V3.C.5	pMA-CS-JG9-TCRbeta
V4.H9	pMA-F14-GFP-F15
V7.A.3	pMA-F14-TCR-JG9-alfa-F15
V7.A.4	pMA-FRT-TCR-JG9-beta-F3
V8.F.8	F14-TCRaF15 CDR3degen.64mix
VP.7751.RC1	
(A1->H8	64 vectores individuales, conjunto de 64 variantes JG9-TRA CDR3

15

Expresión transitoria de pares de cadenas de TCR para caracterizar su unidad de tinción relativa (RSU)

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

25

Separación celular activada por fluorescencia (FACS)

Las células electroporadas o transfectadas con Cas9-P2A-GFP (V1.A.8) o con un plásmido que codificaba un marcador de selección de GFP (V1.A.4) se separaron para la expresión de GFP transitoria, usando el separador de células FACSJazz™ (BD Biosciences).

30

Se recogieron células HEK 293 con TrypLE™ Express Trypsin (ThermoFisher Scientific) y se resuspendieron en un volumen adecuado de DPBS 1X (Life Technologies) antes de la separación celular, en medio DMEM 1X que contenía HI-FBS al 20% y Anti-Anti 100X (Life Technologies).

Las células ARH-77 se lavaron y se resuspendieron en un volumen adecuado de DPBS antes de separación en RPMI 1640 con Glutamax-I con HI-FBS al 20% y Anti-Anti 100X (Life Technologies).

5 Extracción de ADN genómico para caracterización genética

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

10 Confirmación de la integración en el lugar genómica correcto

Los monoclonos con las características fenotípicas deseadas se cribaron y evaluaron a nivel molecular, esto se realizó por PCR utilizando ADN Polimerasa de Alta Fidelidad (NBE) Q5® Hot Start, en reacciones de 20 µl, utilizando los componentes y volúmenes recomendados por el fabricante.

15

Para determinar si los ORF de HLA I estaban integrados en el locus HLA, se utilizaron los cebadores 9.C.4 y 9.D.6; la recombinación correcta del brazo homólogo derecho era indicada por amplicones de 1 kb (tabla 2).

20

Para la integración de HLA en el locus AAVS1, se utilizaron cuatro conjuntos de cebadores: 9.C.3 y 9.C.8 para evaluar la recombinación correcta del brazo homólogo izquierdo (1,1 kb), 9.C.4 y 9.D.1 para evaluar la recombinación del brazo homólogo derecho (660 pb), 1.C.5 y 9.C.5 para amplificar el promotor CMV de la construcción interna (810 pb), 1.C.2 y 9.C.10 para obtener un amplicón para el terminador SV40pA de la construcción interna (380 pb). La evaluación de la integración del sitio RMCE en las líneas HLA-nulas HEK293 y ARH-77 se hizo utilizando los conjuntos de cebadores 2 y 4.

25

Para confirmar la eliminación de HLA de clase I en células HEK293, se utilizaron cebadores de HLA específicos de la siguiente manera: 4.A.3 y 4.A.4 dirigidos a HLA-A, 4.A.7 y 4.B.1 para HLA-B y 4.B.5 y 8.A.1 para HLA-C. Inicialmente, se preparó una mezcla maestra de PCR con todos los componentes (tampón de reacción Q5®, dNTP, ADN polimerasa Q5® Hot-Start, cebadores directo e inverso, 100 ng de molde de ADN y H₂O). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Ciclador Térmico C1000 Touch™ (Bio-Rad). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% en tampón 1XTAE, usando el PowerPac Basic (Bio-Rad), se tiñeron con una dilución 10.000 de sybersafe y se analizaron con Fusion SL (Vilber Lourmat).

30

Tabla 2: Cebadores

ID	Nombre	Secuencia
1.C.2	pMA-sv40_OE_F1	CCTGATCATAATCAAGCCATATCAC
1.C.3	pMA-sv40_OE_R1	GTGATATGGCTTGATTATGATCAGG
1.C.5	pMA-CMV_OE_R1	GTACCTGATCTGACGGTTCAC
4.A.3	HLA-A-GT-Rg3	TCCCGTTCTCCAGGTATCTG
4.A.4	HLA-A-GT-Fg2	GTGTCGGGTTTCCAGAGAAG
4.A.7	HLA-B-GT-Fg2	GGGTCCCAGTTCTAAAGTCC
4.B.1	HLA-B-GT-Rg2	GGGGATTTTGGCCTCAACTG
4.B.5	HLA-C-GT-Fg2	TCTTCCTGAATACTCATGACG
4.I.9	HLA-A-02_GT_Rg4	GGAGATCTACAGGCGATCAG
6.I.9	HLA-A-Exón3_HA-RE-BgIII_F1	GGTTAGATCTGGGAAGGAGACGCTGCAG
8.A.1	HLA-C-04-GT-Rg1	GATCCCATTTTCTCCCCTC
8.B.2	CMV-pA-HLA-Ex3_Sonda_F1	ATGTCTGGATCTGCGGATCAGCGCACG
9.C.3	CMV-pro_GT_R1	ATGGGCTATGAACTAATGACC
9.C.4	sv40pA_GT_F1	CATTCTAGTTGTGGTTTGTCC
9.C.5	AAVS1_GT_F1	CTTACCTCTCTAGTCTGTGC
9.C.7	AAVS1_GT_F3	CCATTGTCACTTTGCGCTG
9.C.8	AAVS1_GT_F4	TCCTGGACTTTGTCTCCTTC
9.C.10	AAVS1_GT_R2	AGAGATGGCTCCAGGAAATG
9.D.1	AAVS1_GT_R3	AAGAGAAAGGGAGTAGAGGC
9.D.2	AAVS1_GT_R4	CCCGAAGAGTGAGTTTGC
9.D.6	HLA-A-intrón4_GT_R1	GCTAAAGGTCAGAGAGGCTC
9.D.7	sv40pA-GT-F2	CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTG
9.D.9	AAVS1_GT_R6	TAGGAAGGAGGAGGCCTAAG
9.J.2	sv40pA-AAVS1-sonda-FAM-F1	TGCGGATCAGGATTGGTGACAGAA
10.A.9	TRAC_TCRA-ex1_R1	GACTTGTCAGTGGATTTAGAGTCTCT
10.A.10	TRAC_TCRA-promotor_F1	CTGATCCTCTTGTCCACAGATA
10.B.6	TRAC_sonda (HEX)	ATCCAGAACCCTGACCCTGCCG
1.F.7	TRAC-GT-F1	ATGTGCAAACGCCTTCAAC
15.H.2	sv40pA GT-R1	CCTCTACAGATGTGATATGGCTTG
1.F.9	TRBC2-GT-F1	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACG
3.J.5	tGFP-Cterm-Out_SQ_F1	GAAGAGGACCACAGCAACAC

Separación de células policlonales y monoclonales con expresión estable del componente de interés

5 Para obtener una población de células que expresan constitutivamente la proteína o marcador integrado, las células se separaron de 7 a 15 días después de la primera selección de GFP+.

10 Para las células que se espera que expresen una proteína de superficie, se realizó la tinción con anticuerpos antes de la separación. Para los genes HLA de clase I, se utilizó el anticuerpo de ratón anti-HLA-ABC humano PE-CyTM5 (BD Biosciences). La tinción de HLA-DR y HLA-DP se realizó con anticuerpo de ratón anti-HLA-DR, DP, DQ humano Alexa Fluor® 647 (BD Biosciences).

15 En el caso de líneas celulares derivadas de HEK 293, las células se recogieron con TrypLETM Express Trypsin (ThermoFisher Scientific) y se lavaron en un volumen adecuado de DPBS 1X (Life Technologies) antes de la separación celular en medio DMEM 1X que contenía HI-FBS al 20% y Anti-Anti 100X (Life Technologies).

Las líneas celulares derivadas de ARH-77 se lavaron en un volumen adecuado de DPBS antes de separación en RPMI 1640 con Glutamax-I con HI-FBS al 20% y Anti-Anti 100X (Life Technologies).

20 Para la inactivación génica o integración de HLA, la selección de células se realizó basándose en la pérdida o ganancia de expresión de HLA, respectivamente. Las células con sitios RMCE integrados se separaron basándose en la expresión de los marcadores BFP y RFP, y los monoclonos de HLA con mutantes pp65 integrados se separaron según la expresión de GFP (Tabla 3).

25 La separación monoclonal de las células que expresan el gen de interés se hizo en placas de 96 pocillos que contenían 200 µl de medio de crecimiento. Se separaron de una a dos placas por muestra. La separación policlonal de las células restantes se hizo inmediatamente después, en tubos FACS, utilizando la configuración de separación de doble vía en el separador de células InfluxTM (BD Biosciences).

30 Cribado fenotípico de poblaciones monoclonales

20.000 células de la población de monoclonos crecidos se transfirió a placas de microtitulación para su análisis, las células se resuspendieron en 250 µl de DPBS 1X (Life Technologies) y se analizaron en la LRSFortessaTM (BD Biosciences).

35 La expresión de BFP y RFP se detectó utilizando los PMT para los fluorocromos BV421 y PE-rojo Texas, respectivamente.

Tabla 3: Filtros de FACSJazz e Influx

Proteína	Fluorocromo	Filtro
Cas9/GFP	GFP	488-513/17
Cas9/GFP	GFP	488-530/40
HLA-A, B, C	PE-Cy5	561-670/30
HLA-DR,DP,DQ	Alexa 647	640-670/30
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
Anti-CD8	BV510	405-525/50
Anti-CD3	FITC	488-530/30
Anti-CD58	Alexa fluor 647	640-670/30
CMV-A.02:01-NLVPM-pp65	PE	561-585/15

40 Para las proteínas con expresión de superficie, las células se tiñeron primero con el anticuerpo de ratón anti-HLA-ABC humano PE-CyTM5 (BD Biosciences) o de ratón anti-HLA-DR, DP, DQ humano Alexa Fluor® 647 (BD Biosciences). La solución de tinción se preparó usando el volumen de anticuerpo recomendado diluido en 100 µl de tampón de tinción (DPBS + FBS al 2%). Las células se incubaron durante 1 hora a 4°C y después se lavaron dos veces con 500 µl de tampón de tinción, antes del análisis.

45 Los monoclonos seleccionados se mantuvieron en medio de crecimiento normal. Las células HEK239 crecen en DMEM+L-glutamina 2 mM+HI-FBS al 10% (Life Technologies) y las células ARH-7 crecen en RPMI 1640 con Glutamax-I + HI-FBS al 10%.

50 La confluencia de las células se vigiló todos los días, hasta alcanzar 10-12 x10⁶. Se extrajo el ADN de 5x10⁶ células usando el minikit de ADN QIAamp (Qiagen). Las células restantes se expandieron adicionalmente y se

crioconservaron a una densidad de 3×10^6 células/ml, en medio de crecimiento al 70% + HI-FBS al 20% + DMSO al 10%.

Separación de células eTPC-t

La separación de células individuales o de policlones se logró mediante metodologías de separación de células convencionales utilizando un instrumento *BDInflux*. Brevemente, se recogieron células ACL con TrypLE™ Express Trypsin (ThermoFisher Scientific) y se resuspendieron en un volumen adecuado de DPBS 1X (Life Technologies) antes de la separación celular, en medio DMEM 1X que contenía HI-FBS al 20% y Anti-Anti 100X (Life Technologies).

Las células se tiñeron con reactivo multímero 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 3.

Separación de células individuales para la generación monoclonal, las células que mostraban el fenotipo de interés se depositaron en placas de 96 pocillos que contenían 200 µl de medio de crecimiento. Se separaron de una a dos placas por muestra. Las separaciones de células policlonales se dirigieron a tubos FACS que contenían medios, utilizando la configuración de separación de doble vía en el separador de células *Influx™* (BD Biosciences).

Las separaciones de células individuales para la caracterización molecular de su variante JG9-TCR-alfa se separaron en placas de PCR precargadas con 5 µl de agua exenta de nucleasas. Las muestras se congelaron rápidamente hasta su posterior procesamiento.

Extracción de ADN genómico para caracterización genética

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

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

Cebadores utilizados para evaluar la integración de TRA-ORF, reasociados con el segmento TRA-C (cebador directo 1.F.7) y el terminador sv40pA (cebador inverso 15.H.2) que es una parte preexistente de los sitios de recepción genómicos. Tamaño esperado 566 pb

Cebadores utilizados para evaluar la integración de TRB-ORF, reasociados con el segmento TRB-C (cebador directo 1.F.9) y el terminador sv40pA (cebador inverso 15.H.2) que es una parte preexistente de los sitios de recepción genómicos. Los productos de PCR del tamaño esperado de 610 pb se analizaron en un gel de agarosa al 1% en tampón 1XTAE, usando el PowerPac Basic (Bio-Rad), se tiñeron con una dilución 10.000 de sybersafe y se analizaron con Fusion SL (Vilber Lourmat).

Tabla 4: Reactivos de PCR para evaluar la integración de ORF que codifica TCR-alfa y TCR-beta

Componente de reacción (TCR-alfa)	Volumen por reacción
Tampón 5xPhusion	4 µl
DNTP	0,2 µl
ADN polimerasa Phusion	0,15 µl
1.F.7: TRAC-GT-F1	0,5 µl
15.H.2: sv40pA-GT-R1	0,5 µl
H2O	hasta 20 µl
ADN (100 ng)	1 µl (100 ng/µl)
Componente de reacción (TCR Beta)	Volumen por reacción
Tampón 5xPhusion	4 µl
DNTP	0,2 µl
ADN polimerasa Phusion	0,15 µl
1.F.9: TRBC2-GT-F1	0,5 µl
15.H.2: sv40pA-GT-R1	0,5 µl
H2O	hasta 20 µl
ADN (100 ng)	1 µl (100 ng/µl)

Tabla 5: 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
Extensión final		

Reacciones de ddPCR para evaluar el número de copias de TRA-ORF y TRB-ORF 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 hibridaron dirigidos al segmento de interés TCR_ORF C.

Cebadores y sonda utilizados para evaluar el número de copias de ORF de TCR-alfa, reasociados con el segmento TRAC (cebador directo 1.F.7, cebador inverso 1.F.8 y sonda 1.G.1)

10

Cebadores y sonda utilizados para evaluar el número de copias de ORF de TCR-beta, reasociados con el segmento TRBC (cebador directo 1.F.9, cebador inverso 1.F.10 y sonda 1.G.2)

- 15 En todos los casos, se cribó simultáneamente un gen de referencia (TRAC) para determinar el número de copias del cromosoma, utilizando 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 tenía en cuenta que las células HEK293 son triploides para el gen de referencia (TRAC).

- 20 Antes de la PCR de Droplet digital, el ADN se digirió con MfeI (NEB) para separar las integraciones en tándem. La configuración de la reacción y las condiciones de los ciclos se siguieron de acuerdo con el protocolo para ddPCR™ Supermix para Sondas (Sin dUTP) (Bio-Rad), usando el lector Droplet y generador Droplet QX200™ y el ciclador térmico de pocillo profundo C1000 Touch™ (Bio-Rad). Los datos se adquirieron utilizando el software QuantaSoft™, utilizando Ch1 para detectar FAM y Ch2 para HEX.

- 25 Tabla 6: Condiciones de ddPCR

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10 min
40 ciclos	98°C	30 s
	60°C	60 s
Extensión final	72°C	10 min
(Opción) Enfriamiento	8°C	∞

Tabla 7: Cebadores/sondas de ddPCR

ID	Nombre	Secuencia
1.F.7	TRAC-GT-F1	ATGTGCAAACGCCTTCAAC
1.F.8	TRAC-GT-R1	TTCGGAACCCAATCACTGAC
1.G.1	TRAC-sonda-FAM	TTTCTCGACCAGCTTGACATCACAGG
1.F.9	TRBC2-GT-F1	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACG
1.F.10	TRBC2-GT-R1	CTTGCTGGTAAGACTCGGAG
1.G.2	TRBC2-sonda-FAM	CAAACCCGTCACCCAGATCGTCA
10.A.9	TRAC-TCRA-ex1-F1	CTGATCCTCTTGTCACACAGATA
10.A.10	TRAC-TCRA-ex1-F1	GACTTGTCAGTGGATTTAGAGTCTCT
10.B.6	TRAC-sonda(HEX)	ATCCAGAACCCTGACCCTGCCG

Tabla 8: Líneas celulares ACL

ID	Componentes	Secuencia
ACL-128		APC, HLA-ABC nulo
ACL-209		APC, que expresa HLA-A*02:01
ACL-488	B, D	eTPC, B codifica BFP, D codifica RFP
ACL-851	B', D'	eTPC-t, B' codifica JG9-TC-beta, D' codifica JG9-TCR-alfa

ACL-963		APC, que expresa HLA-A*24:02 eTPC-x,
ACL-987	B', D	B' codifica JG9-TCR-beta, D' codifica GFP
ACL-988	B', D'	eTPC-t (conjunto), B' codifica wtJG9-TCR-beta, D' codifica 1 de 64x variantes de JG9-TCR-alfa
ACL-1063	B, D, F	eTPC con elemento de respuesta de dos componentes, B y D codifican marcadores de selección
ACL-1277	B', D', F	eTPC-t con elemento de respuesta de dos componentes, B' codifica TCR-alfa D' codifica TCR-beta

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

- 5 Las células eTPC-t individuales separadas por FACS se sometieron a un procedimiento de amplificación de dos etapas que implica la recolección de cebadores específicos de la región V para cada TCR-alfa y TCR-beta, seguido de reacciones de PCR anidadas pareadas que crean amplicones de TCR-alfa y TCR-beta para análisis de secuencia. Este procedimiento se ha descrito anteriormente (Han et. al. Nat Biotechnol. 2014 32(7): 684-692). En los procedimientos descritos se utilizaron los siguientes materiales:

10 Tabla 9: RT-PCR de células individuales y reactivos de PCR anidada

Tabla 9: RT-PCR de células individuales y reactivos de PCR anidada

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

Demostración del componente funcional F

- 15 Las células eTPC-t y APC se cultivaron de forma rutinaria en RPMI+suero fetal bovino al 10% inactivado por calor (medio completo) entre $0,2 \times 10^6$ – $1,5 \times 10^6$ células/ml, a 37 °C, 90% de humedad relativa y 5% CO₂. Los péptidos NLVPMVATV y VYALPLKML fueron sintetizados por Genescript y se recibieron liofilizados. Se suspendieron soluciones madre primarias de péptidos en DMSO al 10% y se separaron a -80°C. Las soluciones madre de trabajo se prepararon en el momento de la administración, a 50 µM en medio completo (concentrado 50x). Se utilizaron las siguientes APC que presentaban HLA-A*02:01 (ACL-209) o HLA-A*24:02 (ACL-963) o
- 20 HLA-nulo (ACL-128). La línea celular eTPC-t (ACL-1277, Componente A) se genomodificó con dos sitios de recepción genómica únicos (Componentes B, D), genomodificada para ser HLA-nulas, utilizando expresión nativa de CD3 y albergando un elemento de respuesta sintético de dos componentes (componente F). Además, ACL-1277 tenía los componentes B, D convertidos en B'/D' con la integración de ORF de TCR alfa/beta que codifica un TCRsp específico para pHLA: HLA-A*02:01-NLVPMVATV (véase Ejemplo 8).

25 Procedimiento de pulsado de antígeno

- 30 Se suspendieron cultivos de células APC en crecimiento activo ($0,5$ - $1,0 \times 10^6$ 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 de suspensión en medio completo con péptido 1 µM o sin péptido a una concentración celular entre 1 y 2×10^6 células/ml. Las células se incubaron durante 2 h en condiciones de cultivo convencionales, en una placa de cultivo de 24 pocillos. Después de 2 h, las células se recogieron, se sedimentaron por centrifugación (400 rcf, 3 min), seguido de lavados con DPBS 3×10 ml. Posteriormente, las células se suspendieron a $0,2 \times 10^6$
- 35 células/ml en medio completo.

Recolección de eTPC-t

Se suspendieron cultivos de células eTPC-t en crecimiento activo ($0,5-1,0 \times 10^6$ células/ml), se tomaron muestras y se contaron para determinar la concentración celular. Las células se recogieron, se lavaron una vez con PBS y luego se suspendieron a una concentración de $0,6 \times 10^6$ células/ml en medio completo.

Contacto de eTPC-t y APC en un sistema eTPC:A

A cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se añadieron 50 µl de medio completo, 50 µl de APC, seguido de 50 µl de eTPC-t. Esto equivalía a aproximadamente 10.000 APC y 30.000 eTPC-t para una relación 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.

Tinción y análisis

Después de 24 horas de incubación, las células se recogieron y se trasplantaron a tubos Micronic con fondo en V de 0,75 ml, se lavaron una vez con 500 µl 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 µl de solución de tinción, las células se suspendieron mediante mezcla y luego se incubaron durante 15-20 min. La solución de tinción comprendía 0,5 µl de DCM-APC-H7 por 100 µl de solución de tinción. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con 500 µl de DPBS+FCS al 2% (tampón de lavado). Luego, las células se tiñeron para los marcadores de superficie exclusivos de la eTPC-t; a cada pocillo se le añadieron 30 µl de solución de tinción, las células se suspendieron mediante mezcla y luego se incubaron durante 30-45 min. La solución de tinción comprendía 2,5 µl de anti-myc-AF647 por 100 µl de solución de tinción (clon 9E10, Santa Cruz Biotech). Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con 500 µl de tampón de lavado, luego se suspendieron en 200 µl de tampón de lavado y luego se analizaron por FACS en un LSRFortessa (BD Biosciences).

El uso de eTPC como patrón

Preparación de células

Las líneas celulares eTPC con TCR, específicas para el péptido NLVP del virus CMV, se recogieron y se agruparon en un tubo de 50 ml. Las células se sedimentaron a 400 g durante 5 min y se lavaron una vez con PBS. Las eTPC se resuspendieron en 3 ml de PBS y se contaron. Se distribuyeron cuatro millones de células en cada tubo de 15 ml para la fijación.

Fijación

La solución de fijación se preparó nueva antes de su uso, diluyendo Cell fix (que contiene paraformaldehído al 10% (PFA)) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) hasta una concentración final de 2% de PFA. Se añadió 1 ml de solución de fijación al sedimento celular y las células se mezclaron pipeteando varias veces. Para el control no tratado, se añadió 1 ml de PBS en lugar de solución de fijación. Las células se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, luego se lavaron añadiendo 3 ml de PBS y se sedimentaron a 400 g durante 5 min. Luego, las células se resuspendieron en 500 µl de PBS y luego se transfirieron a tubos micrónicos para teñirlas.

Tinción

Las células se tiñeron primero con multímeros durante 10 min a temperatura ambiente, luego se añadieron anticuerpos anti-CD3 y las muestras se incubaron adicionalmente a 4°C durante 30 min adicionales. Las células se adquirieron en LSRFortessa.

Ensayo de enriquecimiento

Las líneas celulares eTPC con TCR, específicas para el péptido NLVP del virus CMV, se recogieron y se agruparon en un tubo de 50 ml. Las células se lavaron una vez con PBS y se sedimentaron a 400 g durante 5 min. Luego, las células se resuspendieron en 5 ml de PBS, luego se separaron en citómetro de flujo Influx, como células individuales en tubos FACS de 5 ml que contenían 300 µl de tampón de tinción.

La separación se basó únicamente en la dispersión de las células. Selección: SSC frente a FSC -> selección de células vivas a partir del diagrama de dispersión; las células vivas se representaron FSC-W frente a FSC -> selección de células individuales que se separaron. Las células se sedimentaron a 400 g durante 5 min, se contaron, se tiñeron con Alexa 647-CD58 durante 30 min a 4°C, se lavaron y luego se usaron en un ensayo de enriquecimiento.

Las PBMC congeladas de un donante de sangre sano, previamente aisladas usando separación en gradiente de Ficoll en tubos de 50 ml y positivas para el péptido de CMV (NLVP), se descongelaron, se contaron y luego se usaron para el enriquecimiento en el experimento.

- 5 Para el ensayo de enriquecimiento, se mezclaron 2×10^6 PBMC en tubos micrónicos sin eTPC o con 50.000 eTPC. Las células se tiñeron primero con multímeros durante 10 min a temperatura ambiente, luego se añadieron anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 y las muestras se incubaron a 4°C durante 30 min adicionales. Las células se adquirieron en Fortessa.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Eliminación de una familia de genes APX por mutagénesis dirigida

- 15 En el presente documento se describe cómo se logró la mutagénesis dirigida de una familia de genes que codifican el complejo presentador de antígeno (APX) para producir un rasgo de una célula presentadora de TCR genomodificada (eTPC). Dicho rasgo es la falta de expresión de superficie de al menos un miembro de la familia APX.

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

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

- 35 El plásmido que codificaba los ARNg óptimos dirigidos a los locus HLA-A, HLA-B y HLA-C, junto con un plásmido que codificaba Cas9-P2A-GFP, se transfectaron en células HEK293 como se describe en los métodos. Las células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP fueron separadas por FAC basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después (figura 25a). Las células separadas con GFP se expandieron adicionalmente durante más de 5 días para permitir tiempo suficiente para que ocurrieran los sucesos 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 período de crecimiento, las células se tiñeron con un anticuerpo pan-HLA-ABC, lo que dio como resultado la identificación de células con expresión reducida de HLA-ABC en su superficie (figura 25b). La ausencia de tinción con anticuerpos pan-HLA-ABC implicaba que cada alelo HLA-A, HLA-B y HLA-C estaba mutado. Las células HLA-ABC negativas individuales se separaron y expandieron para representar una colección de monoclonos.

- 45 Los monoclonos con HLA-ABC^{nulo} se confirmaron por la falta de expresión de superficie de HLA-ABC. Se demostró que un subconjunto de monoclonos carecía de expresión de superficie de HLA-ABC, de los cuales tres monoclonos de ejemplo, ACL-414, ACL-415 y ACL-416 se representan en la figura 26. Se realizó una caracterización genética adicional de los monoclonos que carecían de expresión de superficie de HLA-ABC determinando que las líneas celulares tenían una mutación genética subyacente en todos los alelos de los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C (figura 27). La caracterización genética se realizó por PCR con cebadores que abarcaban los sitios genómicos objetivo del ARNg, para la detección de cambios de tamaño de los amplicones y/o se usaron como plantilla para la secuenciación. La Figura 27 muestra una selección de monoclonos con HLA-ABC^{nulo} que contenían delección genética en los alelos de los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C detectados mediante un amplicón de PCR más corto en comparación con el tamaño de amplicones de la línea celular fundadora (p. ej., ACL-414).

En conclusión, se demostró que las líneas celulares HEK293 modificadas genéticamente, incluyendo ACL-414, ACL-415 y ACL-416, carecían de expresión de superficie de HLA-ABC y, por lo tanto, tenían un rasgo de una célula presentadora de TCR genomodificada (eTPC).

- 60 Ejemplo 2: Generación de un HLA-ABC^{nulo} que contiene el componente B

- 65 En el presente documento se describe cómo el componente B se integraba de manera estable en la línea de monoclón HLA-ABC^{nulo} ACL-414 para producir el segundo rasgo de una eTPC. Dicho segundo rasgo contenía al menos un sitio de recepción genómica para la integración de al menos un ORF, en donde el sitio de recepción genómica era una construcción sintética diseñada para el intercambio de casetes mediado por recombinasa

(RMCE).

En este ejemplo, el sitio de integración genómica, componente B, estaba compuesto por elementos genéticos seleccionados. Dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3, que flanqueaban un ORF que codificaba el marcador de selección, la proteína fluorescente azul (BFP). El 5' codificado del sitio FRT era un promotor EF1a y el 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 era que no son necesarios en el vector donador genético coincidente, componente C. Por lo tanto, después del suministro celular del vector donador genético, no se observaría expresión transitoria del ORF codificado. Esto hizo que la selección del RMCE correcto fuera más fiable ya que la expresión celular del ORF del vector donador genético probablemente ocurriría solo después de la integración correcta en el componente B, ya que ahora contenía los elementos reguladores en cis apropiados (véase el ejemplo 6).

Para promover la integración genómica estable del componente B en el locus de puerto seguro genómico, AAVS1, se construyó un plásmido, en donde los elementos de ADN del componente B estaban flanqueados con brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1. Cada brazo comprendía >500 pb de secuencia homóloga al locus genómico de AAVS1.

La integración estable del componente B se logró a través del proceso de recombinación dirigida por homología (HDR) en el locus de sitio seguro genómico, AAVS1. La línea celular ACL-414 se transfectó con plásmido que codificaba los ARNg óptimos dirigidos al locus AAVS1, plásmido que codificaba Cas9-P2A-GFP y el plásmido que codificaba los elementos genéticos del componente B flanqueados por los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1. Las células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP se separaron por FAC basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después (figura 28a). Las células separadas con GFP se expandieron adicionalmente durante más de 7 días, lo que permitió tiempo suficiente para que se produjera la HDR y se perdiera la expresión transitoria del marcador de selección, BFP. Después de este período de crecimiento, las células se analizaron en una máquina FACS y las células positivas para BFP individuales se separaron y expandieron para representar una colección de monoclonos (figura 28c).

Se seleccionaron líneas de monoclonos individuales basándose en su expresión de BFP mantenida y para una integración única del componente B en la ubicación genómica de AAVS1 deseada. Las líneas celulares ACL-469 y ACL-470 representaban monoclonos con expresión de BFP mantenida (figura 29a y b). La caracterización genética se realizó en ADN extraído de los monoclonos ACL-469 y ACL-470 y demostró que sus genomas integraban el componente B, y que el componente B se había integrado en el sitio AAVS1 (figura 30). La confirmación de la integración genómica se determinó mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado que utilizaba cebadores específicos para el componente B (figura 30a). La confirmación de que el componente B estaba integrado en el sitio AAVS1 se determinó mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado que utilizaba cebadores diseñados contra la secuencia genómica de AAVS1 distal a la región codificada por los brazos homólogos y un cebador que es exclusivo del terminador pA de SV40 codificado por el componente B (Figura 30b). El número de copias del componente B se determinó mediante PCR de gota digital, en la que se midió el número de moléculas de ADN del componente B y del gen de referencia y se calculó la relación (tabla 1). Los monoclonos ACL-469 y ACL-470 contenían una relación de 1 molécula del componente B por 3 moléculas del gen de referencia. Cuando se tiene en cuenta que la línea celular fundadora HEK293 tiene un cariotipo casi triploide, esto demostraba una integración única del componente B en las líneas celulares ACL-469 y ACL-470.

En conclusión, las líneas celulares ACL-469 y ACL-470 genéticamente modificadas eran HLA-ABC^{nulo} y contenían una única copia de un sitio de recepción genómica sintético diseñado para RMCE y, por lo tanto, demostraba la creación de líneas celulares que comprenden dos rasgos que pueden modificarse adicionalmente en una eTPC.

Ejemplo 3: Generación de una célula HLA-ABC^{nulo} que contiene el componente B y el componente D

En el presente documento se describe cómo el componente B y el componente D se integraban de manera estable en la línea de monoclon HLA-ABC^{nulo} ACL-414 para producir el segundo rasgo de una eTPC. Dicho segundo rasgo contiene dos sitios de recepción genómica para la integración de al menos un ORF, en donde el sitio de recepción genómica era una construcción sintética diseñada para el intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE).

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

pb de secuencia homóloga al locus genómico de AAVS1.

El componente B y el componente D se integraron en el AAVS1 como se describe en el ejemplo 2 pero con la adición del plásmido que codificaba los elementos del componente D, a la mezcla de transfección. Las células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP se separaron por FAC basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después (figura 28b). Las células separadas con GFP se expandieron aún más durante más de 7 días, después de lo cual, las células se analizaron en una máquina FACS y las células individuales positivas para BFP y RFP se separaron y expandieron para representar una colección de monoclonos (figura 28d).

Se seleccionaron líneas de monoclonos individuales basándose en su expresión de BFP y RFP mantenida y para una integración única del componente B y una integración única del componente D en diferentes alelos de AAVS1. La línea celular ACL-472 era un monoclon representativo con expresión mantenida de BFP y RFP (figura 29c). Como se describe en el ejemplo 2, la caracterización genética se realizó en ADN extraído del monoclon ACL-472 y demostró que sus genomas integraban el componente B y el componente D, y que ambos componentes se integraban en el sitio AAVS1 (figura 30). El número de copias tanto del componente B como D se determinó mediante PCR de gota digital, en la que se midió el número de moléculas de ADN del componente B, D y del gen de referencia y se calculó la relación. El monoclon ACL-472 contenía una relación de 2 moléculas de componentes B y D a 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 demostraba una integración única del componente B y una integración única del componente D en la línea celular ACL-472.

En conclusión, la línea celular ACL-472 genéticamente modificadas era HLA-ABC^{nulo} y contenía una única copia de un sitio de recepción genómica sintético de componente B y componente D, diseñado para RMCE y, por lo tanto, demostraba la creación de una línea celular que comprende múltiples rasgos que pueden modificarse adicionalmente en una eTPC.

Ejemplo 4: Integración de CD3 en una célula aAPX que carece de TCR y CD3

En el presente documento se presenta un ejemplo de los flujos de trabajo de las Figuras 32 y Figura 34, en donde primero se identifica una célula base objetivo como una célula base competente para TCRsp adecuada, seguido de la genomodificación de la célula base competente para TCRsp mediante la integración en el material genético del genoma la codificación de la expresión de CD3 como un único ORF que codifica las cuatro proteínas de CD3, que son CD3 gamma, delta, épsilon y zeta. Las cuatro proteínas codificadas están unidas a través de un péptido P2A viral autoescindible, de modo que durante la traducción del transcrito la acción de cada péptido P2A produce la separación y liberación de las 4 proteínas individuales. Una vez que se produce la traducción y separación, las proteínas CD3 quedan libres para asociarse y ensamblarse en el complejo CD3. Sin embargo, el ensamblaje y la exportación a la superficie de la célula sólo se produce en presencia de un par traducido de cadenas de TCR complementarias.

El análisis FAC se realizó utilizando un instrumento BD LSRFortessa, con un inyector de alto rendimiento. La separación por FAC se realizó utilizando un separador de células BD Influx o un separador BD FACSJazz. La transfección de ACL-5 y células derivadas se realizó usando transfección química mediante el método PEI, con una relación NP de 6, concentración final de ADN de 200 ng/μl por reacción de PEI y 3,33 μg de ADN total por 1 millón de células. Las células se tiñeron usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos marcados con fluorescencia con afinidad hacia CD3 y TCR-alfa-beta se adquirieron de BD, con el anti-CD3 conjugado con FITC o PE-CF5486, y anti-TCR-alfa-beta conjugado con BV786 o APC. El reactivo soluble aAPX:aAM se adquirió de Immudex, específicamente el dextrámero HLA-A*0201, cargado con NLVPMVATV como carga, conjugado con el fluoróforo PE, denominado A2-NLV-PE. Los plásmidos usados se obtuvieron usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Identificación y selección de una célula base competente para TCRsp

Se seleccionaron células derivadas de HEK293, ACL-5, como célula base objetivo (Figura 32, etapa a) y se tiñeron con anti-TCR-alfa-beta y anti-CD3, seguido de análisis FACS para identificar la falta de expresión en superficie de TCRsp y CD3 (Figura 32, etapa b). Como comparación, también se analizó la tinción de células de control. No se detectó expresión de superficie (Figura 32, etapa c) como es evidente en la Figura 39. Además, la falta de expresión de CD3 también indicaba que la célula base objetivo también carecía de expresión de TCR-gamma-delta en virtud de que CD3 no puede expresarse en la superficie en ausencia de expresión de un par de cadenas de TCR complementarias.

Posteriormente, las células base objetivo se transfectaron químicamente con tres plásmidos de expresión transitoria; el primero codificaba las cuatro proteínas CD3 como un único ORF unido por péptidos virales P2A (V3.C.6). El segundo y tercer plásmidos codificaban un par de cadenas de TCR complementarias (pTCR), en donde cada plásmido codificaba la expresión transitoria de una cadena de TCRalfa o una cadena de TCRbeta (Figura 32, etapa d). Se transfectaron dos pares TCRalfa-beta diferentes, un par codificaba un TCRsp

específico para HLA-A*02:01 cargado con el péptido NLVPMVATV (V3.C.3, V3.C.5, A2-NLV^{pos}), y el otro par codificaba un TCRsp que no era específico (V3.C.2, V3.C.4, A2-NLV^{neg}).

Después de 2 días de crecimiento, las células transfectadas se tiñeron con anti-TCR-alfa-beta y anti-CD3 (Figura 32, etapa e), además, también se usó un aAPX:aM soluble (dexA2-NLV-PE) para teñir las células, que era el antígeno cognado del par de TCRab A2-NLV^{pos}. Las células teñidas se analizaron posteriormente por FACS y mostraron que eran competentes para la expresión de superficie de CD3 y TCRsp (Figura 40). Además, las células transfectadas con A2-NLV^{pos} mostraron unión a dexA2-NLV-PE, mientras que las células transfectadas con A2-NLV^{neg} no mostraron unión a dexA2-NLV-PE (Figura 40). Esto indicaba que las células eran competentes para expresar TCRsp (Figura 32, etapa f) y posteriormente se seleccionó la célula base objetivo como una célula base competente para TCRsp adecuada.

Luego, la célula base competente para TCRsp se sometió a mutación dirigida de la familia de HLA de clase I de aAPX, para producir la célula que carecía de expresión de la familia de HLA clase I de aAPX. La célula mutada se obtuvo usando el procedimiento ejemplar del Ejemplo 1. Además, la célula base competente para TCRsp también carecía naturalmente de expresión de la familia de HLA de clase II de aAPX, por lo tanto, la célula base competente para TCRsp obtenida carecía de expresión de dos familias de aAPX.

Identificación, genomodificación y selección de una célula base confirmada

La célula base competente para TCRsp (que carece de expresión de dos familias de aAPX) se transfectó químicamente con dos plásmidos de expresión transitoria, el primero que codifica CD3 como se describió anteriormente (V3.C.6) y TCRalfa (V3.C.2, V3.C. 3) o TCRbeta (V3.C.4, V3.C.5), que era una versión modificada de la Figura 34, etapa h. Después de 2 días de crecimiento, las células transfectadas se tiñeron con anti-TCR-alfa-beta y anti-CD3 (Figura 34, etapa i) y posteriormente se analizaron por FACS (Figura 41) y se identificó que carecían de expresión de superficie de TCRsp y CD3 (Figura 34, etapa i) confirmando que ni CD3 ni TCR alfa o TCR beta se expresaban endógenamente.

El CD3 se integró en la célula base competente para TCRsp (Figura 34, etapa k). Con el fin de lograr la integración, la célula se transfectó transitoriamente con tres plásmidos, el primero que codificaba la expresión del primer factor de integración, Cas9-2A-GFP (V1.A.8) y el segundo que codificaba la expresión del segundo factor de integración, un ARN guía dirigido a los locus HLA-A (V2.A.2). El tercer plásmido era para la recombinación homóloga dirigida al sitio, dirigido a los locus HLA-A y codificaba la expresión de proteínas CD3 a través del promotor EF1a-Largo humano y el terminador SV40pA, como un único ORF unido por péptidos virales P2A (V4.I.7).

2 días después de la transfección, las células se recogieron y separaron basándose en la expresión de GFP para enriquecerlas en células que expresaban Cas9, de las cuales una proporción tenía integrada la secuencia codificante de CD3 en los locus HLA-A (Figura 42).

Las células separadas crecieron durante 3 días, después de lo cual las células se cotransfectaron con tres plásmidos, el primero codificaba la expresión de GFP y se usó como un control de transfección. El segundo y tercer plásmidos, cada uno codificaba una cadena de TCR-alfa (V3.C.3) o una cadena de TCR-beta (V3.C.5) de un pTCR (A2-NLV^{pos}) (Figura 34, etapa l). Las células transfectadas se dejaron crecer 2 días y posteriormente se tiñeron con anti-anti-CD3 (Figura 34, etapa m). Luego se seleccionaron las células por la expresión de superficie de CD3 (Figura 34, etapa n), en donde la selección se realizó mediante separación por FAC como una población policlonal (Figura 43).

Las células separadas se dejaron crecer durante 11 días y luego se sometieron a otra ronda de transfección (Figura 34, etapa l), tinción (Figura 34, etapa m) y selección (Figura 34, etapa n) como se describió previamente (Figura 44). Las células separadas se dejaron crecer y posteriormente se transfectaron y tiñeron por tercera vez. Luego se seleccionaron las células teñidas por la expresión de TCRsp y se seleccionaron 96 células individuales mediante separación de células individuales para la monoclonación (Figura 45). Las células teñidas restantes se seleccionaron en consecuencia, se separaron policlonalmente y se crioconservaron a -80°C.

Los clones unicelulares se dejaron crecer hasta que había suficiente cantidad disponible para la crioconservación, análisis genómico y fenotípico mediante PCR, ddPCR y análisis FACS. De los 96 tipos de células individuales, 20 sobrevivieron para el análisis y 8 de 20 clones eran positivos para la integración genómica correcta y también eran positivos por análisis de gota digital. Los 8 monoclonos positivos se transfectaron con dos plásmidos, que codificaban una cadena de TCR-alfa (V3.C.2) o una cadena de TCR-beta (V3.C.4) de un pTCR (A2-NLV^{neg}) y un tercer plásmido adicional que codificaba la expresión de GFP como control de transfección (V1.A.4). Luego, las células se tiñeron con anti-CD3 y anti-TCR-alfa-beta y se analizó la expresión de superficie de TCRsp y CD3 (Figura 34, etapa n). Dos de las 8 líneas eran positivas para la expresión de superficie, mostrando una línea un alto porcentaje de expresión (Figura 46) que posteriormente se seleccionó como la célula base confirmada.

Ejemplo 5: Demostración de la generación de eTPC-t en una etapa

El presente ejemplo describe la generación de eTPC-t de una manera estandarizada, en donde la eTPC parental contiene distintos sitios de recepción genómica sintéticos, componentes B y D. Los vectores donadores genéticos, componentes C' y E', 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 (HCMV pp65) cuando se presenta en alelos de HLA-A2. Los componentes C' y E' están diseñados para el RMCE y se derivan de los componentes C y E parentales.

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

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

Se creó una eTPC-t por medio de RMCE por electroporación de ACL-488 (eTPC). De cuatro a diez días después de la electroporación, las células individuales que mostraban una señal de proteína fluorescente disminuida, BFP y RFP, codificadas por los marcadores de selección de los componentes D y B, se separaron por FACS. Los monoclonos individuales se dejaron crecer y luego se evaluaron fenotípicamente. El monoclon resultante, ACL-851, era negativo para BFP y RFP (figura 48 a y b). ACL-851 también mostraba expresión de superficie de TCR y CD3, mientras que la línea celular parental no (figura 48 c y e). Además, el JG9-TCR introducido mostraba tinción específica con el tetrámero HLA-A*02:01-NLVP, que indicaba que es un TCRsp funcional en la superficie de la eTPC-t (figura 48 d a f). Se confirmó por PCR que ACL-851 contenía TCRsp codificado por el Componente B' y el Componente D' integrados en el genoma (figura 48 g y h).

En resumen, una eTPC se convirtió en una eTPC-t, mediante el uso de un método de integración basado en RMCE para integrar el ORF de TCR suministrado en los componentes C' y E', de modo que los componentes B y D se convirtieron en los componentes B' y D' y donde mediante esto la eTPC-t expresaba un TCRsp funcional en la superficie de la célula. Además, este ejemplo demuestra el funcionamiento de un sistema eTPC:A simple, donde se combinaba 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-NLVPMVATV).

Ejemplo 6: Demostración de la conversión de eTPC-t a una eTPC-x

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

En este ejemplo, se usó la línea celular eTPC-t parental ACL-851 generada en el ejemplo 5. El componente Z es un vector plasmídico compuesto por dos sitios de recombinasa heteroespecíficos, F14/F15 coincidentes con el componente D', una secuencia de Kozak, codón de inicio y un ORF que codifica una proteína fluorescente verde (GFP) como marcador de selección de integración. La eTPC-t se combinó con el Componente Z y un vector que codifica la enzima recombinasa de RMCE mediante electroporación, después de lo cual las células se seleccionaron posteriormente según la pérdida de presentación de CD3 y ganancia del marcador de integración de selección de GFP. El monoclon ACL-987 se caracterizó fenotípicamente por FACS, y se observó que ACL-987 ganó GFP y perdió CD3 y TCRab (Figura 49b, d), lo que indica un intercambio exitoso de JG9-TCR-alfa con el ORF de GFP y la conversión del componente D' al componente D y, por lo tanto, la generación de una eTPC-x. En comparación, la eTPC-t parental, ACL-851, carece de expresión de GFP y tiene expresión de superficie de CD3 y TCRab (Figura 49 a a c).

En resumen, este ejemplo demuestra la conversión de una eTPC-t a una eTPC-x, con la eliminación del ORF

de TCR JG9-TCR-alfa en el componente D' a cambio del marcador de selección de integración GFP, creando así el componente D, para sucesos de acoplamiento de integración adicionales de ORF de cadena de TCR complementaria alternativa. Esta conversión se realizó utilizando el método RMCE para la integración genómica.

5

Ejemplo 7: Demostración de la integración de escopeta en eTPC-x para crear el conjunto de eTPC-t

El presente ejemplo describe cómo se integraba un conjunto de vectores que codifican 64 variantes únicas de JG9-TCR-alfa (como Componente E') como una etapa en una línea celular eTPC-x parental (descrita en el ejemplo 6) para crear una biblioteca de eTPC-t agrupadas en donde cada célula individual integraba un único ORF de TCR aleatorio que codifica la cadena alfa del conjunto original de vectores, de modo que cada eTPC-t expresa un único par aleatorio de ORF de TCR como TCRsp. Combinados entre sí, la eTPC-t individual comprende una biblioteca agrupada de eTPC-t en donde el conjunto de células representa potencialmente todas las combinaciones posibles de 64 TCR-alfa emparejados con la cadena beta de TCR original constante (véase el esquema de la figura 12). Este método se conoce ahora como integración de "escopeta". Las 64 variantes de JG9-TCR-alfa se crearon modificando la secuencia CDR3 que se encuentra en la unión de los fragmentos V y J.

En este ejemplo, se usó la línea celular eTPC-x parental ACL-987 (véase el ejemplo 6), con JG9-TCR-beta (componente B') y complejo CD3 no expresados en la superficie. El Componente D codifica GFP, un marcador de selección, como se describe en el ejemplo 6. En este ejemplo, los 64 fragmentos variantes de JG9-TCR-alfa se clonaron en el vector donador del componente E, creando el componente E', flanqueado por sitios F14/F15, coincidentes con el componente D. Los 64 vectores se combinaron posteriormente en un único conjunto de vectores.

25

Se creó un conjunto de eTPC-t mediante integración genómica basada en RMCE, en donde el vector de recombinasa eTPC-x (ACL-987) y 64 componentes E' y RMCE se combinaron por electroporación. Los policlones se seleccionaron basándose en la expresión de GFP. El policlón resultante, ACL-988, comprendía tanto poblaciones de células positivas para GFP como negativas para GFP, a diferencia de la línea parental que comprendía solo células positivas para GFP (figura 50 a y b). Sin embargo, solo la población negativa para GFP mostró una expresión de CD3 consistentemente fuerte, lo que indicaba la conversión exitosa del componente D en el componente D' y, por lo tanto, la eTPC-x se ha convertido en un conjunto de eTPC-t (figura 50 c y d). Además, las poblaciones negativas para GFP ACL-988 mostraban dos intensidades distintas cuando se teñían con el reactivo multímero específico de JG9-TCR (DEX HLA-A*02:01-NLVP), lo que sugería que esta población comprende células que expresan variantes de TCR con diferente eficiencia de unión.

En paralelo, las 64 variantes de JG9-TCR-alfa se clonaron en una construcción de expresión que permitía la transfección transitoria en una eTPC-x parental (ACL-987) y se determinaron las unidades de tinción relativas (RSU) contra el reactivo multímero HLA-A*02:01-NLVP respecto a una referencia para cada par de TCR presentado en las eTPC-t agrupadas que expresan la variante JG9-TCR descrita anteriormente. Las RSU se calcularon como la relación de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la señal del multímero de HLA para la población CD3 positiva respecto a la población CD3 negativa, y era indicativo de la fuerza de unión de cada variante de par de cadenas de TCR. Después de la transfección independiente de la línea parental ACL-987 con cada variante de JG9-TCR-alfa, las células se teñieron con anticuerpos contra CD3 y con el reactivo multímero de HLA y se analizaron por citometría de flujo. Cada punto representado en la Figura 51e representa la RSU observada para cada una de las 64 variantes.

Las células individuales del conjunto de ACL-988 se separaron de forma individual, de la población positiva para el multímero de HLA y de la población negativa para el multímero de HLA. El componente D' que codifica el ORF de la variante JG9-TCR-alfa para cada célula individual se amplificó y secuenció y se comparó con los resultados de las expresiones transitorias de las unidades RSU descritas anteriormente (Figura 50e). De hecho, las células ACL-988 individuales que eran positivas para el multímero de HLA codificaban variantes de JG9-TCR-alfa que mostraban predominantemente resultados altos de RSU en las variantes ensayadas individualmente (Figura 51e, círculos blancos). Además, las células ACL-988 individuales que eran negativas para el multímero de pHLA codificaban variantes de JG9-TCR-alfa que mostraban predominantemente resultados bajos de RSU (figura 51e, triángulos blancos).

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

Ejemplo 8: Demostración funcional del componente F

En el presente documento se describe una línea celular eTPC (ACL-1277, componente A) genomodificada con dos sitios de recepción genómica únicos (componentes B, D), genomodificada para ser HLA-nula, utilizando expresión de CD3 nativo y albergando un elemento de respuesta sintético de dos componentes genómicos genomodificado (componente F).

Los elementos de respuesta comprendían un componente Controlador-Activador y un componente Amplificador-Indicador, en donde ambas unidades utilizaban promotores sintéticos. El controlador es un promotor sintético que responde a las rutas de señalización del TCR nativo y codifica tres conjuntos de sitios de unión del factor de transcripción en tándem para NFAT-AP1-NFkB (3xNF-AP-NB). Tras la activación transcripcional, el controlador induce la expresión de la proteína activadora, un factor de transcripción diseñado sintético derivado por 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 y C (NV16G4N), en los que la secuencia de reconocimiento de ADN cognado está presente 6 veces en tándem en el promotor amplificador. Tanto los promotores del controlador como del amplificador utilizaban 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 HCMV, inmediatamente 3' de los respectivos sitios de unión del factor de transcripción. El amplificador, tras la activación transcripcional, dirige la expresión del indicador, la proteína fluorescente roja (RFP).

En este ejemplo, la línea celular eTPC se convirtió en una línea celular eTPC-t como se describió previamente en el ejemplo 5, en donde el ORF de la cadena de TCR en los componentes B' y E' codifica un par de TCR que es específico para el complejo HLA-péptido (HLA), HLA-A*02:01-NLVPMVATV.

Luego, la línea celular eTPC-t se expuso frente a las APC que presentaban HLA-A*02:01 (ACL-209) o HLA-A*24:02 (ACL-963) o era HLA-nula (ACL-128). En donde las APC analitos se prepararon por pulsos de las APC con antígeno analito de péptido NLVPMVATV o VYALPLKML o sin péptido. Posteriormente, se compilaron una eTPC-t y una APC analito en un sistema eTPC:A que consiste en 30.000 eTPC-t cocultivadas con 10.000 APC durante 24 h. Después de 24 h, las células se recogieron, se lavaron, se tiñeron con marcadores específicos para eTPC-t y APC analito para distinguir las poblaciones, y se analizaron por citometría de flujo utilizando técnicas conocidas por el experto en la técnica. Solo se observó una fuerte activación del componente F de eTPC-t (expresión de RFP+ >80%) en eTPC-t expuestas a APC analito que presenta el complejo de antígeno pHLA cognado conocido, es decir, la APC con A*02:01-NLVPMATV (Figura 51a). Por el contrario, solo se observó expresión de RFP en estado de reposo en compilaciones de eTPC:A que comprendían APC analito no específico (Figura 51b, c, d) o APC analito de control que carece de HLA o péptido.

En conclusión, se genomodificó una línea celular eTPC que contenía un componente funcional F y posteriormente se utilizó para crear una eTPC-t. Tras la interacción de la eTPC-t con la APC analito que presenta su antígeno de células T objetivo cognado, se pudo medir una respuesta como un aumento en la expresión de RFP. Por el contrario, cuando se puso en contacto con APC analito que presenta un antígeno de células T no cognado y HLA, o ningún HLA, la eTPC-t no mostró ningún aumento medible en la expresión de RFP por encima del fondo. Además, este ejemplo demuestra un sistema eTPC:A en donde la APC analito y la eTPC-t analito se compilan en composiciones binarias discretas y la respuesta de eTPC-t se utiliza para identificar tanto la APC analito como la eTPC-t en donde se forma un complejo cooperativo entre las TCRsp y el antígeno analito.

Ejemplo 9: Uso de eTPC-t como patrones de citometría de flujo portadores de TCR

En el presente documento se describe la ejemplificación de una eTPC-t creada y seleccionada utilizando el sistema multicomponente y el sistema eTPC:A compilado posteriormente, para su uso como patrón de ensayo basado en FACS in vitro. El presente ejemplo demuestra la fijación química y crioconservación de una eTPC-t confirmada y seleccionada (ACL-851, ejemplo 5) que expresa un TCRsp específico para un antígeno (APX:AM), que comprende un complejo presentador de antígeno HLA-A*02:01 (APX) cargado con la molécula antigénica (AM), el péptido NLVPMVATV derivado de HCMV-pp65. El TCRsp mantenía el marcaje de multímero de pHLA (APX:AM) cuando se recuperaba del almacenamiento (Figura 52a). Además, estas células podrían "añadirse como enriquecimiento" a una preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana y detectarse junto con células T primarias específicas de HCMV dentro de la misma muestra por citometría de flujo (Figura 52b). Las eTPC-t se tiñeron previamente con un anticuerpo CD58 antes de añadirlas como enriquecimiento a la mezcla de PBMC y teñirlas posteriormente con reactivo tetrámero. El parámetro CD58 se utilizó para distinguir la eTPC-t de las células T primarias específicas para el péptido NLVPMVATV presentado en HLA-A*02:01. Esto demuestra que eTPC-t que expresa pares de cadenas de TCRsp específicos se pueden usar como reactivos de control que presentan TCR en ensayos de citometría de flujo que detectan células T específicas de antígeno.

ES 2 984 900 T3

Lista de secuencias

- <110> Genovie AB
- <120> Un sistema multicomponente genomodificado para la identificación y caracterización de receptores de células T, antígenos de células T y su interacción funcional
- 5 <130> ANO9
- <160> 134
- 10 <170> BiSSAP 1.3
- <210> 1 <223> Antígeno HCMV
- 15 <210> 2 <223> Péptido antigénico analito
- <210> 3 <223> Péptido antigénico analito
- <210> 4 <223> pcDNA3.1_GFP vector V1.A.4
- 20 <210> 5 <223> pcDNA3.1_RFP vector V1.A.6
- <210> 6 <223> SpCas9-2A-GFP vector V1.A.8
- <210> 7 <223> pMA-SV40pA vector V1.C.2
- 25 <210> 8 <223> HLA-A 02:01 6xHis + Exón2/3-HA-L+R vector V1.C.6
- <210> 9 <223> HLA-B 35:01 6xHis + Exón2/3-HA-L+R vector V1.C.9
- 30 <210> 10 <223> AAVS1-L_B07_6xH vector V1.F.10
- <210> 11 <223> AAVS1-S_A24_6xH vector V1.F.8
- <210> 12 <223> AAVS1-I_GFP_HCMVpp65 vector V1.G.10
- 35 <210> 13 <223> AAVS1-I_GFP_HCMVpp65 ANET vector V1.G.9
- <210> 14 <223> AAVS1-I_GFP_HCMVpp65 AIN vector V1.H.1
- 40 <210> 15 <223> AAVS1_DRA_Flag-DRB1_6xHis vector V1.I.5
- <210> 16 <223> AAVS1_DPA1_Flag-DPB1_6xHis vector V1.I.7
- <210> 17 <223> HLA-A-sg-sp-opti1 vector V2.A.1
- 45 <210> 18 <223> HLA-B-sg-sp-3 vector V2.A.7
- <210> 19 <223> HLA-C-sg-sp-4 vector V2.B.3
- 50 <210> 20 <223> HLA-A-ex2-3_sg-sp-opti_1 vector V2.I.10
- <210> 21 <223> HLA-A-ex2-3_sg-sp-opti_2 vector V2.J.1
- <210> 22 <223> AAVSI_sg-sp-opti_3 vector V2.J.6
- 55 <210> 23 <223> pMA-CS-JG9-TCRbeta vector V3.C.5
- <210> 24 <223> AAVS_Efla-intrón_F14_RFPnls_F15 vector V4.B.2
- 60 <210> 25 <223> AAVS_Efla-intrón_FRT_BFPnls_F3 vector V4.B.3
- <210> 26 <223> pMA_FRT_HLA-A*02:01-6xHis_F3 vector V4.D.2
- <210> 27 <223> pMA-F14-GFP-F15 vector V4.H9
- 65 <210> 28 <223> CMVpro-Flp-sv40pA-V2 vector V4.I.8

<210> 29 <223> pMA-F14-TCR-JG9-alfa-F15 vector V7.A.3
 <210> 30 <223> pMA-FRT-TCR-JG9-beta-F3 vector V7.A.4
 5 <210> 31 <223> F14-TCRaF15 CDR3degen.64mix vector V8.F.8
 <210> 32 <223> JG9-TRA CDR3 64 vectores variantes de cadena principal VP.7751.RC1-A1 a H8
 10 <210> 33 <223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_A1
 <210> 34 <223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_A2
 <210> 35 <223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_A3
 15 <210> 36 <223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_A4
 <210> 37 <223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_A5
 20 <210> 38 <223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_A6
 <210> 39 <223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_A7
 <210> 40<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_A8
 25 <210> 41<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_B1
 <210> 42<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_B2
 30 <210> 43<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_B3
 <210> 44<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_B4
 <210> 45<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_B5
 35 <210> 46<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_B6
 <210> 47<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_B7
 40 <210> 48<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_B8
 <210> 49<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_C1
 <210> 50<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_C2
 45 <210> 51<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_C3
 <210> 52<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_C4
 50 <210> 53<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_C5
 <210> 54<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_C6
 <210> 55<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_C7
 55 <210> 56<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_D1
 <210> 57<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_D2
 60 <210> 58<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_D3
 <210> 59<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_D4
 <210> 60<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_D5
 65 <210> 61<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_D6

<210> 62<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_D7
 5 <210> 63<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_D8
 <210> 64<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_E1
 <210> 65<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_E2
 10 <210> 66<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_E3
 <210> 67<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_E4
 <210> 68<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_E5
 15 <210> 69<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_E6
 <210> 70<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_E7
 20 <210> 71<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_E8
 <210> 72<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_F1
 <210> 73<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_F2
 25 <210> 74 <223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_F3
 <210> 75<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_F4
 30 <210> 76<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_F5
 <210> 77<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_F6
 <210> 78<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_F7
 35 <210> 79<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_F8
 <210> 80<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_G1
 40 <210> 81<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_G2
 <210> 82<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_G3
 <210> 83<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_G4
 45 <210> 84<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_G5
 <210> 85<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_G6
 50 <210> 86<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_G7
 <210> 87<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_G8
 <210> 88<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_H1
 55 <210> 89<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_H2
 <210> 90<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_H3
 60 <210> 91<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_H4
 <210> 92<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_H5
 <210> 93<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_H6
 65 <210> 94<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_H7

<210> 95<223> Secuencia de CDR3 de una variante de JG9-TRA 64 VP.7751.RC1_H8

5 <210> 96 <223> pMA-sv40_OE_F1 cebador 1.C.2

<210> 97 <223> pMA-sv40_OE_R1 cebador 1.C.3

<210> 98 <223> pMA-CMV_OE_R1 cebador 1.C.5

10 <210> 99 <223> HLA-A-GT-Rg3 cebador 4.A.3

<210> 100 <223> HLA-A-GT-Fg2 cebador 4.A.4

<210> 101 <223> HLA-B-GT-Fg2 cebador 4.A.7

15 <210> 102 <223> HLA-B-GT-Rg2 cebador 4.B.1

<210> 103 <223> HLA-C-GT-Fg2 cebador 4.B.5

20 <210> 104 <223> HLA-A-02_GT_Rg4 cebador 4.I.9

<210> 105 <223> HLA-A-Exón3_HA-RE-BgIII_F1 cebador 6.I.9

<210> 106 <223> HLA-C-04-GT-Rg1 cebador 8.A.1

25 <210> 107 <223> CMV-pA-HLA-Ex3_Sonda_F1 cebador 8.B.2

<210> 108 <223> CMV-pro_GT_R1 cebador 9.C.3

30 <210> 109 <223> sv40pA_GT_F1 cebador 9.C.4

<210> 110 <223> AAVS1_GT_F1 cebador 9.C.5

<210> 111 <223> AAVS1_GT_F3 cebador 9.C.7

35 <210> 112 <223> AAVS1_GT_F4 cebador 9.C.8

<210> 113 <223> AAVS1_GT_R2 cebador 9.C.10

40 <210> 114 <223> AAVS1_GT_R3 promer 9.D.1

<210> 115 <223> AAVS1_GT_R4 cebador 9.D.2

<210> 116 <223> HLA-A-intrón4_GT_R1 cebador 9.D.6

45 <210> 117 <223> sv40pA-GT-F2 cebador 9.D.7

<210> 118 <223> sv40pA-AAVS1-sonda-FAM-F1 cebador 9.J.2

50 <210> 119 <223> TRAC_TCRA-ex1_R1 cebador 10.A.9

<210> 120 <223> TRAC_TCRA-promotor_F1 cebador 10.A.10

<210> 121 <223> TRAC_sonda (HEX) cebador 10.B.6

55 <210> 122 <223> TRAC-GT-F1 cebador 1.F.7

<210> 123 <223> sv40pA GT-R1 cebador 15.H.2

60 <210> 124 <223> TRBC2-GT-F1 cebador 1.F.9

<210> 125 <223> tGFP-Cterm-Out_SQ_F1 cebador 3.J.5

<210> 126 <223> TRAC-GT-F1 ddPCR cebador/sonda

65 <210> 127 <223> TRAC-GT-R1 ddPCR cebador/sonda1.F.8

- 5 <210> 128 <223> TRAC-sonda-FAM ddPCR cebador/sonda
- <210> 129 <223> TRBC2-GT-F1 ddPCR cebador/sonda 1.F.9
- <210> 130 <223> TRBC2-GT-R1 ddPCR cebador/sonda 1.F.10
- <210> 131 <223> TRBC2-probe-FAM ddPCR cebador/sonda 1.G.2
- 10 <210> 132 <223> TRAC-TCRA-ex1-F1 ddPCR cebador/sonda 10.A.9
- <210> 133 <223> TRAC-TCRA-ex1-F1 ddPCR cebador/sonda 10.A.10
- <210> 134 <223> TRAC-probe(HEX) ddPCR cebador/sonda 10.B.6

15

Lista de abreviaturas

aAPX	Complejo presentador de antígeno analito
aAM	Molécula antigénica analito
APC	Célula presentadora de antígeno
APX	Complejo presentador de antígeno
BFP	Proteína fluorescente roja
CAR-T	Célula T CAR
CM	Moléculas de carga
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespariadas
ARNg	ARN guía Cas9
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
Región C	Región constante
CMV	Citomegalovirus
DAMPS	Patrones moleculares asociados al peligro
DC	Células dendríticas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Región D	Región de diversidad
eTPC	Célula presentadora de TCR genomodificada
eTPC:A	eTPC:sistema de antígeno, en donde la eTPC-t analito se combina con el antígeno analito
eTPC-t	Célula presentadora de TCR genomodificada que presenta pares de TCR de longitud completa
FACS	Separación de células activadas por fluorescencia
Células T GEM	Células T reactivas a micolilo codificadas por la línea germinal
GFP	Proteína verde fluorescente
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
células T iNK	Células T citolíticas naturales invariables
Región J	Región de unión
MACS	Separación celular activada por magnetismo
MAGE	Antígeno asociado a melanoma

MAIT	T invariante asociado a mucosas
NCBP	Partículas no basadas 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 2 de src
Células T	Linfocitos T
TCR	Receptor de células T
TRA	TCR alfa
TRB	TCR beta
TRD	TCR delta
TCRsp	Proteínas de superficie TCR en complejo con CD3
TALEN	Nucleasa efectora de tipo activador de transcripción
TRG	TRC gamma
TAA	Antígenos asociados a tumores
Región V	Región variable
β2M	β2-microglobulina
ZAP-70	Proteína asociada a la cadena ζ de 70 kDa

Definiciones

- 5 Un par de cadenas de TCR complementarias: dos cadenas de TCR en donde las proteínas traducidas son capaces de formar un TCRsp en la superficie de una célula presentadora de TCR.

Afinidad: Parámetro cinético o de equilibrio de una interacción entre dos o más moléculas o proteínas.

- 10 Reactivo de afinidad: Cualquier reactivo modificado con afinidad específica por un analito. A menudo se utiliza en el contexto de afinidad por TCRsp.

Alelo: Forma variante de un gen dado

- 15 AM: Molécula antigénica analito Generalmente, una proteína, pero también podría ser un metabolito que es expresado por una célula a partir de su ADN genómico y/o una secuencia genética específica introducida. La AM se expresa en la célula y luego un APX puede presentar un fragmento en la superficie celular como carga o por sí mismo. Ya sea como carga o no, la AM puede ser el objetivo de células portadoras de receptores de células T o reactivos de afinidad relacionados.

- 20 Amplicón: un trozo de ADN o ARN que es la fuente y/o producto de amplificación artificial usando varios métodos incluyendo PCR.

Analito: una entidad que es de interés para ser identificada y/o medida y/o consultada en el sistema combinado

- 25 Antígeno analito: un antígeno que comprende uno, al menos uno de los siguientes, AM, APX, APX:CM, APX:AM, proporcionado en forma de un reactivo soluble, reactivo inmovilizado, presentado por una NCBP, presentado en la superficie de una célula.

- 30 APC analito: una célula analito que presenta un antígeno analito

Anticuerpo: Molécula de afinidad que es expresada por células especializadas del sistema inmunitario llamadas células B y que contiene dos cadenas. Las células B expresan un repertorio muy grande y muy diverso de anticuerpos que generalmente no se unen a proteínas propias, pero que pueden unirse y neutralizar patógenos o toxinas que amenazarían al hospedante. Los anticuerpos naturales o genomodificados artificialmente se usan

- 35

a menudo como reactivos de afinidad.

Antígeno: cualquier molécula con la que puede acoplarse un TCR y da como resultado una señal que es transducida dentro de la célula T, a menudo presentada por un complejo presentador de antígeno.

5

APC: Célula presentadora de antígeno. Una célula que lleva en la superficie de la célula una AM, APX, APX

APX: Complejo presentador de antígeno. Una proteína que es expresada y presentada en la superficie celular por células nucleadas a partir de genes/ADN genómico que codifica ORF y/o una secuencia genética introducida específica. El APX presenta una carga, ya sea un péptido u otras moléculas metabolitos.

10

Región C: Región constante. Uno de los segmentos de genes que se utiliza para ensamblar el receptor de células T. La región c es un segmento distinto que, más que promover la diversidad del TCR, define su función general en el sistema inmunitario.

15

Maquinaria de cargamento de carga: Conjunto celular de proteínas que generan y cargan moléculas de carga en APX a partir de proteínas u otras moléculas presentadas que se encuentran en la célula.

CDR: Regiones determinantes de complementariedad. Secuencias cortas en el extremo orientado al antígeno de los TCR y anticuerpos que realizan la mayor parte de la función de unión al objetivo. Cada anticuerpo y TCR contiene seis CDR y generalmente son la parte más variable de las moléculas que permite la detección de una gran cantidad de moléculas objetivo diversas.

20

CM: Moléculas de carga. péptido o metabolito que es presentado por un complejo presentador de antígeno, por ejemplo un HLA I o HLA II. La CM puede ser expresada por la célula intrínsecamente a partir del ADN genómico, introducida en el medio de cultivo o expresada a partir de una secuencia genética introducida específicamente.

25

Número de copias: El número entero de aparición de una secuencia definida codificada dentro del genoma de una célula.

30

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 que las células T liberan factores que dañan directa y específicamente una célula objetivo.

35

Región D: Región de diversidad. Uno de los segmentos de genes que se utiliza para ensamblar el receptor de células T. Cada individuo tiene una gran cantidad de variaciones diferentes de estas regiones, lo que hace posible que cada individuo arme a las células T con una gran variedad de TCR diferentes.

40

ADN: ácido desoxirribonucleico. Nombre químico de la molécula que forma el material genético que codifica genes y proteínas.

Endógeno: Sustancia que se originó dentro de una célula.

45

Célula genomificada: Una célula en la que el genoma se ha genomificado a través de modificación genética modificada.

Elemento regulador condicional eucariota: una secuencia de ADN que puede influir en la actividad de un promotor, que puede inducirse o reprimirse en condiciones definidas

50

Promotor eucariota: una secuencia de ADN que codifica un sitio de unión a la ARN polimerasa y elementos de respuesta La secuencia de la región promotora controla la unión de la ARN polimerasa y los factores de transcripción, por lo tanto, los promotores juegan un papel importante en la determinación de dónde y cuándo se expresará su gen de interés.

55

Terminador eucariota/Terminador de señal: una secuencia de ADN que es reconocida por factores proteicos que se asocian con la ARN polimerasa II y que desencadenan el proceso de terminación de la transcripción. También codifica la señal poli-A

60

eTPC:sistema de antígeno: eTPC:A, el sistema en el que las eTPC-t analito se combinan con el antígeno analito

FACS/Citometría de flujo: Separación de células activadas por fluorescencia. Técnica analítica mediante la cual las células individuales pueden analizarse para determinar la expresión de marcadores específicos

65

intracelulares y de la superficie celular. Una variación de esa técnica, la separación de células, permite que las células que llevan un conjunto definido de marcadores sean recuperadas para su posterior análisis.

5 Familia de APX: Un conjunto de varios genes similares que codifican proteínas funcionalmente relacionadas, que constituyen un complejo de presión antigénica.

Marcador fluorescente (proteína): Molécula que tiene características de extinción y emisión específicas y se puede detectar por microscopía, FACS y técnicas relacionadas.

10 Vector de donador genético: Un vector de base genética para el suministro de material genético al sitio de recepción genómica.

Sitio de recepción genómica: Un sitio dentro del genoma para la integración dirigida del material genético donador codificado dentro de un vector donador genético.

15 Sitios de recombinasa heteroespecíficos: Una secuencia de ADN que es reconocida por una enzima recombinasa para promover el entrecruzamiento de dos moléculas de ADN

20 HLA I: Antígeno leucocitario humano de clase I. Un gen que se expresa en seres humanos en todas las células nucleadas y es exportado a la superficie celular donde es presentado como fragmentos cortos de carga, péptidos, de proteínas internas a los receptores de células T. Así pues, presenta fragmentos de posibles infecciones en curso junto con proteínas intrínsecas. El HLA I también puede presentarse como péptidos de carga que se añaden al medio de cultivo, generados a partir de proteínas expresadas a partir de elementos genéticos introducidos o generados a partir de proteínas que son absorbidas por la célula. Los genes HLA de
25 clase I son polimórficos, lo que significa que es probable que diferentes individuos tengan variaciones en el mismo gen, lo que conduce a una variación en la presentación. Relacionado con HLA de clase II.

HLA II: Antígeno leucocitario humano de Clase II. Un gen que se expresa en seres humanos en células específicas que coordinan y ayudan a la respuesta inmunitaria adaptativa, por ejemplo, las células dendríticas.
30 Relacionadas con el HLA de clase I. Las proteínas HLA de clase II son exportadas a la superficie celular donde se presentan como fragmentos cortos de carga, péptidos, de proteínas externas a los receptores de células T. Así pues, presenta fragmentos de posibles infecciones en curso junto con proteínas intrínsecas. El HLA II también puede presentarse como péptidos de carga que se añaden al medio de cultivo, generados a partir de proteínas expresadas a partir de elementos genéticos introducidos o generados a partir de proteínas que son
35 absorbidas por la célula. Los genes HLA de clase II son polimórficos, lo que significa que es probable que diferentes individuos tengan variaciones en el mismo gen, lo que conduce a una variación en la presentación.

Brazos homólogos: una cadena de ADN que tiene identidad de secuencia casi idéntica a un brazo homólogo del complemento y, por lo tanto, promueve el intercambio de dos moléculas de ADN por el proceso celular,
40 reparación dirigida por homología.

Vigilancia inmunitaria: Proceso en el que el sistema inmunitario detecta y se activa ante infecciones, tumores malignos u otras alteraciones potencialmente patógenas.

45 Aislante: una secuencia de ADN que evita que un gen sea influenciado por la activación o represión de genes cercanos. Los aislantes también previenen la propagación de heterocromatina desde un gen silenciado a un gen transcrito activamente.

Integración: La ligadura física de una secuencia de ADN en un cromosoma de una célula

50 Pareja de integración: Un vector donador genético y un sitio de recepción genómica emparejados

Sitio interno de entrada ribosomal (IRES): una secuencia de ADN que, una vez transcrita, codifica un elemento de ARN que permite el inicio de la traducción de una manera independiente de la caperuza

55 Región J: Región de unión. Uno de los segmentos de genes que se utiliza para ensamblar el receptor de células T. Cada individuo tiene una gran cantidad de variaciones diferentes de estas regiones, lo que hace posible que cada individuo arme a las células T con una gran variedad de TCR diferentes.

60 Cariotipo: La composición cromosómica de una célula.

Secuencia de Kozak: Secuencia corta requerida para el inicio eficiente de la traducción

65 HLA principal de clase I: Una familia de APX que comprende los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C.

De emparejamiento: Cuando dos componentes codifican elementos genéticos que dirigen y restringen la

interacción entre los componentes complementados

Sitio de reconocimiento de meganucleasa: Secuencia de ADN que es reconocida por una endonoxirribonucleasa, comúnmente denominada meganucleasa.

5

Metabolito: Una molécula creada o alterada a través de rutas metabólicas de la célula.

Elemento genético móvil: Una secuencia de ADN que puede permitir la integración del ADN con la actividad de enzimas transposasas.

10

Línea celular de monoclon: Un grupo definido de células producidas a partir de una única célula ancestral mediante replicación celular repetida.

Nativo: Una entidad que se encuentra de forma natural en la célula

15

Gen no codificante: Una secuencia de ADN no codificante de proteína que se transcribe en moléculas de ARN no codificantes funcionales

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

20

Paracrino: Señalización a través de factores solubles que actúan directamente sobre las células vecinas.

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

25

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

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

30

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

Polipéptido: Proteína que consiste en una tramo de péptidos, que forma una estructura tridimensional.

35

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

Resultados primarios: células eETP-t, células APC analito, NCBP u otras formas de antígeno analito a partir de las cuales se pueden derivar y/o determinar los resultados terminales.

40

Promotor: Elemento de ADN regulador para el inicio controlado de la expresión génica

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

45

Integración de escopeta: El procedimiento mediante el cual se introduce una biblioteca de vectores en una población de células, mediante el cual solo una copia de cualquier inserto de vector determinado puede ser integrado en el genoma de cada célula individual. Se utiliza para referirse a la integración de vectores agrupados en una población celular determinada por medio de un par de integración.

50

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

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

55

Sintético: Una entidad que se genera artificialmente y se introduce en una célula

Célula T: Linfocito T. Glóbulo blanco que expresa un receptor de células T en su superficie. Seleccionados por el sistema inmunitario para no reaccionar con el propio cuerpo, pero tienen el potencial de reconocer infecciones y tumores malignos, así como rechazar injertos de la mayoría de los miembros de la misma especie.

60

TCR: Receptor de células T. Molécula de afinidad expresada por un subgrupo de linfocitos llamados linfocitos T. En seres humanos, el TCR reconoce la carga presentada por APX CM o APX AM, incluidos fragmentos de virus o infecciones bacterianas o células cancerosas. Por tanto, el reconocimiento del TCR es una parte integral del sistema inmunitario adaptativo. El TCR consiste en dos cadenas que están emparejadas en la superficie

65

celular. El TCR expresado en la superficie de cada célula se ensambla al azar a partir de un gran conjunto de genes variados (las regiones v,d,j y c) y, por lo tanto, cada individuo tiene un conjunto de células T que expresan un repertorio muy grande y diverso de diferentes TCR.

- 5 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 un reactivo soluble, un reactivo inmovilizado o presentadas por NCBP.

- 10 Resultados terminales: antígeno analito y secuencias de TCR, en forma de AM, APX, APX:CM, APX:AM, reactivos de afinidad o TCRsp

- 15 TRA: Locus que codifica el TCR alfa. Uno de los cuatro locus diferentes que codifican genes que pueden formar una cadena de TCR recombinada por VDJ. Las proteínas de la cadena alfa de TCR traducidas normalmente se emparejan con las proteínas de la cadena beta de TCR traducidas para formar el TCRsp alfa/beta.

- 15 TRB: Locus que codifica el TCR beta. Uno de los cuatro locus diferentes que codifican genes que pueden formar una cadena de TCR recombinada por VDJ. Las proteínas de la cadena beta de TCR traducidas normalmente se emparejan con las proteínas de la cadena alfa de TCR para formar el TCRsp alfa/beta.

- 20 TRD: Locus que codifica TCR delta. Uno de los cuatro locus diferentes que codifican genes que pueden formar una cadena de TCR recombinada por VDJ. Las proteínas de la cadena delta de TCR traducidas normalmente se emparejan con las proteínas de la cadena gamma de TCR traducidas para formar el TCRsp gamma/delta.

- 25 TRG: Locus que codifica TCR gamma. Uno de los cuatro locus diferentes que codifican genes que pueden formar una cadena de TCR recombinada por VDJ. Las proteínas de la cadena gamma de TCR traducidas normalmente se emparejan con las proteínas de la cadena delta de TCR traducidas para formar el TCRsp gamma/delta.

- 30 Región V: Región variable. Uno de los segmentos de genes que se utiliza para ensamblar el receptor de células T. Cada individuo tiene una gran cantidad de variaciones diferentes de estas regiones, lo que hace posible que cada individuo arme a las células T con una gran variedad de TCR diferentes.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema multicomponente para generar una población de células presentadoras de TCR genomodificadas (eTPC-t), para usar en el descubrimiento y caracterización de TCR y antígenos de células T
- 5 que comprende
- un primer componente que es una célula presentadora de TCR genomodificada (eTPC), denominada componente A, en donde el componente A carece de expresión de superficie endógena de al menos una familia
- 10 de complejos presentadores de antígeno analito (aAPX) y/o molécula antigénica analito (aAM) en donde la falta de expresión de superficie se selecciona para minimizar la interferencia en análisis de emparejamiento de antígenos analitos objetivo, carece de expresión endógena de las cadenas de TCR alfa, beta, delta y gamma, y expresa proteínas CD3 y contiene dos componentes individuales adicionales denominados B y D, que son diferentes y cada uno es respectivamente un sitio de recepción genómica para la integración de un único ORF
- 15 que codifica al menos una cadena de TCR analito alfa, beta, delta o gamma, y/o dos ORF que codifican un par de cadenas de TCR analito, y en donde los sitios de recepción genómica B y D se seleccionan cada uno de
- a. Una construcción sintética diseñada para el intercambio de casetes mediado por recombinasa (RMCE)
- 20 b. Una construcción sintética diseñada para recombinación homóloga dirigida al sitio;
- y
- un segundo componente es un vector donador genético, denominado componente C, para la integración
- 25 dirigida al sitio del ORF que codifica cadenas de TCR analito, en donde el componente C se empareja con el componente B, y en donde el componente C está diseñado para suministrar
- c. Un único ORF que codifica al menos una cadena de TCR analito alfa, beta, delta y/o gamma y/o
- 30 d. Dos ORF que codifican un par de cadenas de TCR analito
- y en donde c y/o d codifican opcionalmente un marcador de selección de integración, de modo que las cadenas de TCR analito pueden ser expresadas como proteína de superficie TCR en complejo con CD3 (TCRsp) en el
- 35 componente A.
2. Un sistema multicomponente según la reivindicación 1, en donde la familia de aAPX puede ser cualquiera de los siguientes
- a. HLA de clase I
- 40 b. HLA clase II
- c. complejo presentador de antígeno no HLA.
- 45 3. Un sistema multicomponente según las reivindicaciones 1 o 2, en donde un componente adicional denominado E es un vector genético de emparejamiento con D, en donde el componente E está diseñado para suministrar un único ORF que codifica una cadena de TCR analito alfa, beta, delta o gamma, de modo que cuando un ORF que codifica la cadena alfa, beta, delta o gamma de TCR analito emparejada complementaria se integra en el componente B, se expresa como TCRsp en el componente A y, opcionalmente, en donde el
- 50 componente E codifica un marcador de selección de integración.
4. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el componente A, contiene además un componente denominado F, un elemento de respuesta de estimulación de TCR genómico sintético seleccionado de
- 55 a. Una construcción sintética de un solo componente que contiene al menos un promotor nativo y/o al menos un promotor sintético y al menos un indicador
- b. Una construcción sintética multicomponente diseñada con al menos un promotor nativo y/o al menos un
- 60 promotor sintético y al menos un indicador
- y en donde la activación de a y/o b depende de al menos una ruta de transducción de señales seleccionada de una ruta sintética, una ruta nativa o una combinación de las mismas.
- 65 5. Un sistema multicomponente según la reivindicación 1, en donde los sitios de recepción genómica B y D están incluidos y ambos son una construcción sintética diseñada para el intercambio de casete mediado por

recombinasa (RMCE).

6. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la aAM se selecciona de

5

a. un polipéptido o complejo de polipéptidos traducido del(de los) ORF(s) de la molécula antigénica analito

b. un péptido derivado de un polipéptido traducido del(de los) ORF(s) de la molécula antigénica analito

10

c. un péptido derivado de la alteración del proteoma del componente A

d. un polipéptido derivado de la alteración del proteoma del componente A

15

e. un metabolito derivado de la alteración del metaboloma del componente A.

7. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el componente A expresa CD4 y/o CD8.

20

8. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el componente A expresa correceptores TCR adicionales.

9. Un sistema multicomponente según la reivindicación 8, en donde el componente A expresa CD28 y/o CD45.

25

10. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el componente B y/o D está incluido y comprende al menos uno de los siguientes elementos genéticos

a. Sitios de recombinasa heteroespecíficos

30

b. Brazos homólogos

c. Promotor eucariota

d. Elemento regulador condicional eucariota

35

e. Terminador eucariota

f. Marcador de selección

g. Sitio aceptador de corte y empalme

40

h. Sitio donador de corte y empalme

i. Gen codificante de no proteína

45

j. Aislante

k. Elemento genético móvil

50

l. Sitio de reconocimiento de meganucleasa

m. Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)

n. Elemento peptídico viral autoescindible.

55

o. Una secuencia de consenso Kozak

11. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el componente C y/o E está incluido y comprende al menos uno de los siguientes elementos genéticos

60

a. Sitios de recombinasa heteroespecíficos

b. Brazos homólogos

c. Promotor eucariota

65

d. Elemento regulador condicional eucariota

- e. Terminador eucariota
- 5 f. Marcador de selección
- g. Marcador de selección de integración
- h. Sitio aceptador de corte y empalme
- 10 i. Sitio donador de corte y empalme
- j. Gen codificante de no proteína
- k. Aislante
- 15 l. Elemento genético móvil
- m. Sitio de reconocimiento de meganucleasa
- 20 n. Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)
- o. Un elemento peptídico viral autoescindible
- p. Un casete de resistencia a antibiótico
- 25 q. Un origen de replicación bacteriano
- r. Un origen de replicación de levadura
- 30 s. Un sitio de clonación.
- t. Una secuencia Kozak de consenso
- 35 12. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el componente B y/o D está incluido y es para la integración por RMCE de un único ORF y comprende:
 - a. Un promotor eucariota
 - b. Un par de sitios de recombinasa heteroespecíficos
 - 40 c. Una secuencia de consenso Kozak
 - d. Un marcador de selección
 - 45 e. Un terminador eucariota.
- 50 13. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el componente C y/o E está presente es para la integración por RMCE de un único ORF y comprende los siguientes elementos genéticos:
 - a. Un par de sitios de recombinasa heteroespecíficos
 - b. Una secuencia de consenso Kozak
 - 55 c. Un casete de resistencia a antibiótico
 - d. Un origen de replicación bacteriano
 - e. Un sitio de clonación para la introducción de un único ORF que codifica una o más cadenas de TCR y/o un
 - 60 marcador de selección de integración.
- 65 14. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el componente C y/o E está incluido y es capaz de ser combinado con al menos un ORF que codifica al menos una cadena de TCR analito para obtener el componente C' y/o E'.
- 15. Un sistema multicomponente según la reivindicación 14, en donde la combinación se puede realizar

múltiples veces para obtener una biblioteca del componente C' y/o E'.

16. Un sistema multicomponente según la reivindicación 14 o 15, en donde las secuencias que codifican la cadena de TCR analito se derivan de

5

a. Clonación emparejada de secuencia(s) de ORF de cadena de TCR de células T primarias

b. Clonación no emparejada de secuencia(s) de ORF de cadena de TCR de células T primarias

10 c. Secuencia(s) ORF de cadena de TCR sintética(s)

17. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde uno o más componentes C' y/o E' se pueden combinar con el componente A, para integrar dos cadenas de TCR analito complementarias codificadas en el componente C' y/o E', en los componentes B y/o D, para obtener una célula, denominada eTPC-t, en donde los componentes B y/o D se convierten en componentes B' y/o D' de manera que expresa un TCRsp en la superficie del componente A.

15

18. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, en donde uno del componente C' o E' se puede combinar con el componente A, para integrar una cadena de TCR analito codificada en el componente C' o E', en los componentes B o D, para obtener una célula, denominada eTPC-x, en donde los componentes B o D se convierten en componentes B' o D' de modo que la eTPC-x expresa una única cadena de TCR.

20

19. Un sistema multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en donde uno del componente C' o E' se puede combinar con una eTPC-x, para integrar una cadena de TCR analito codificada en el componente C' o E', que es complementaria de la cadena de TCR expresada en la eTPC-x, en los componentes B o D, de la eTPC-x, para obtener una eTPC-t, en donde los componentes B o D se convierten en componentes B' o D' de modo que expresa un TCRsp en la superficie de la eTPC-t.

25

20. Un método para preparar una eTPC-t como se define en la reivindicación 17, comprendiendo el método

30

a. Proporcionar el sistema multicomponente según la reivindicación 1,

b. Combinar el componente A, con al menos uno de los componentes C' y/o E', en donde el uno o más componentes C' y/o E' codifican uno o más pares de cadenas de TCR analito complementarias, y combinar con factores de integración y al menos uno de

35

c. Seleccionar según la pérdida de marcador(s) de selección del sitio de recepción genómica

d. Seleccionar según la ganancia de una expresión de superficie de TCRsp y/o una o más proteínas CD3

40

e. Seleccionar según la ganancia de uno o más de un marcador de selección de integración.

21. Un método según la reivindicación 20, en donde el uno o más componentes C' y/o E' codifican un único par de cadenas de TCR complementarias en la etapa b.

45

22. Un método según la reivindicación 21, en donde el método se lleva a cabo múltiples veces en donde cada vez la etapa b se realiza usando un único par de cadenas de TCR complementarias distinto, de manera que se obtiene una eTPC-t distinta, para obtener una biblioteca de eTPC-t discretas y definidas.

50

23. Un método según la reivindicación 21-22, en donde el uno o más componentes C' y/o E' codifican un conjunto mixto de dos o más pares de cadenas de TCR complementarias distintas en la etapa b de la reivindicación 22, para obtener una biblioteca, en donde la biblioteca está compuesta por una población mixta de eTPC-t, en donde cada eTPC-t expresa un único TCRsp derivado del conjunto utilizado en la etapa b de la reivindicación 23.

55

24. Un método para preparar una eTPC-x como se define en la reivindicación 18, comprendiendo el método

a. Proporcionar el sistema multicomponente según la reivindicación 1,

60

b. Combinar el componente A, con uno o más del componente C' o uno o más componentes E', en donde uno o más componentes C' o uno o más componentes E' codifican una cadena de TCR analito, y combinar con factores de integración y al menos uno de

c. Seleccionar según la pérdida de marcador(s) de selección del sitio de recepción genómica

65

- d. Seleccionar según la ganancia de uno o más de un marcador de selección de integración.
25. Un método según la reivindicación 24, en donde un componente C' o un componente E' codifica una única cadena de TCR analito en la etapa b.
- 5 26. Un método según la reivindicación 25, en donde el método se lleva a cabo múltiples veces en donde cada vez la etapa b se realiza usando una cadena de TCR analito distinta, de manera que se obtiene una eTPC-x distinta, para obtener una biblioteca de eTPC-x discretas y definidas.
- 10 27. Un método según la reivindicación 25 o 26, en donde uno o más componentes C' o uno o más componentes E' codifican un conjunto mixto de dos o más cadenas de TCR analito únicas en la etapa b, para obtener una biblioteca, en donde la biblioteca está compuesta por una población mixta de eTPC-x, en donde cada eTPC-x expresa una única cadena de TCR analito derivada del conjunto utilizado en la etapa b.
- 15 28. Un método para preparar una eTPC-t como se define en la reivindicación 18, comprendiendo el método
- a. Proporcionar el sistema multicomponente según la reivindicación 1,
- b. Combinar una eTPC-x, con uno o más componentes C' o uno o más componentes E', en donde uno o más componentes C' o uno o más E' codifican una cadena de TCR analito que es complementaria a la cadena de TCR analito integrada en la eTPC-x, y combinar con factores de integración y al menos uno de
- 20 c. Seleccionar según la pérdida de marcador(s) de selección del sitio de recepción genómica
- 25 d. Seleccionar según la ganancia de una expresión de superficie de TCRsp y/o una o más proteínas CD3
- e. Seleccionar según la ganancia de uno o más de un marcador de selección de integración.
29. Un método según la reivindicación 28, en donde un componente C' o un componente E' codifica una única cadena de TCR analito en la etapa b.
- 30 30. Un método según la reivindicación 29, en donde el método se lleva a cabo múltiples veces, en donde cada vez la etapa b se realiza usando una cadena de TCR analito distinta, de manera que se obtiene una eTPC-t distinta que expresa un TCRsp, para obtener una biblioteca de eTPC-t discretas y definidas.
- 35 31. Un método según la reivindicación 28-29, en donde uno o más componentes C' o uno o más componentes E' codifican un conjunto mixto de dos o más cadenas de TCR analito únicas en la etapa b, para obtener una biblioteca, en donde la biblioteca está compuesta por una población mixta de eTPC-t, en donde cada eTPC-t expresa un único TCRsp derivado del conjunto utilizado en la etapa b.
- 40 32. Una eTPC-t obtenida a partir del método de la reivindicación 20, para usar en un dispositivo analítico eTPC:A para la caracterización de
- a. especificidad del TCRsp analito expresado para un antígeno analito y/o
- 45 b. afinidad del TCRsp analito expresado para un antígeno analito y/o
- c. una señal de respuesta del TCRsp analito expresado a un antígeno analito.
- 50 en donde un antígeno analito se selecciona de un aAPX:aAM y/o aAM y/o aAPX y/o aAPX:CM y/o reactivo de afinidad, en donde el antígeno analito está en la forma de al menos los siguientes, un reactivo soluble, un reactivo inmovilizado, presentado por una partícula no basada en células (NCBP), presentada en la superficie de una célula (APC analito), en donde el aAPX:CM es un aAPX que está cargado con una molécula de carga (CM), y en donde el aAPX:aAM es un aAPX cargado con una aAM como CM.
- 55 33. Una eTPC analito que se puede obtener a partir del sistema multicomponente definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-19, caracterizado porque
- a. Contiene 2 sitios de recepción genómica, denominados B y D, cada uno de los cuales puede comprender un único ORF que codifica al menos una cadena de TCR analito alfa, beta, delta o gamma, y/o dos ORF que codifican un par de cadenas de TCR analito.
- 60 b. Expresa proteínas CD3
- 65 c. No expresa ninguna otra cadena de TCR distinta a las comprendidas en B y D,

y en donde los sitios de recepción genómica B y D se seleccionan cada uno de

- a. Una construcción sintética diseñada para el intercambio de casete mediado por recombinasa (RMCE)
- 5 b. Una construcción sintética diseñada para recombinación homóloga dirigida al sitio

y en donde la eTPC analito se ha combinado con al menos uno de C' y/o E' como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 de modo que al menos uno del componentes B y D se ha convertido en el componente B' y/o D', en donde la integración da como resultado la expresión de cadenas de TCR analito por

10 la eTPC objetivo.

Figura 1

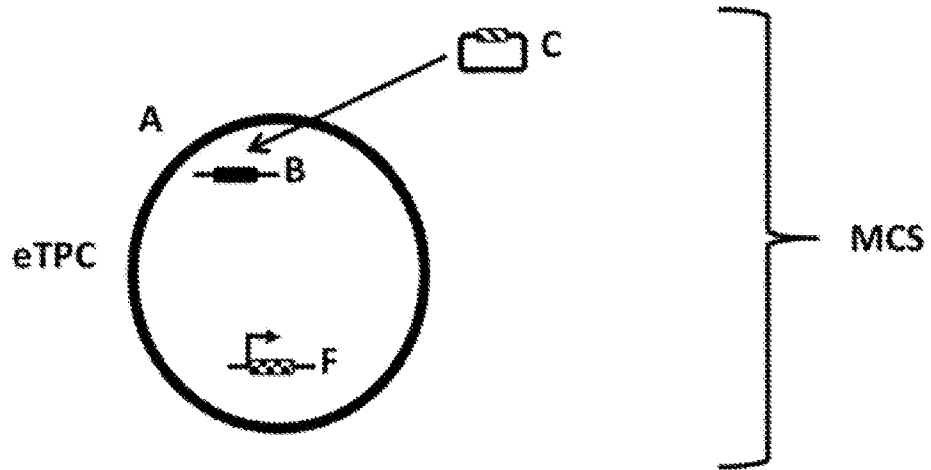


Figura 2

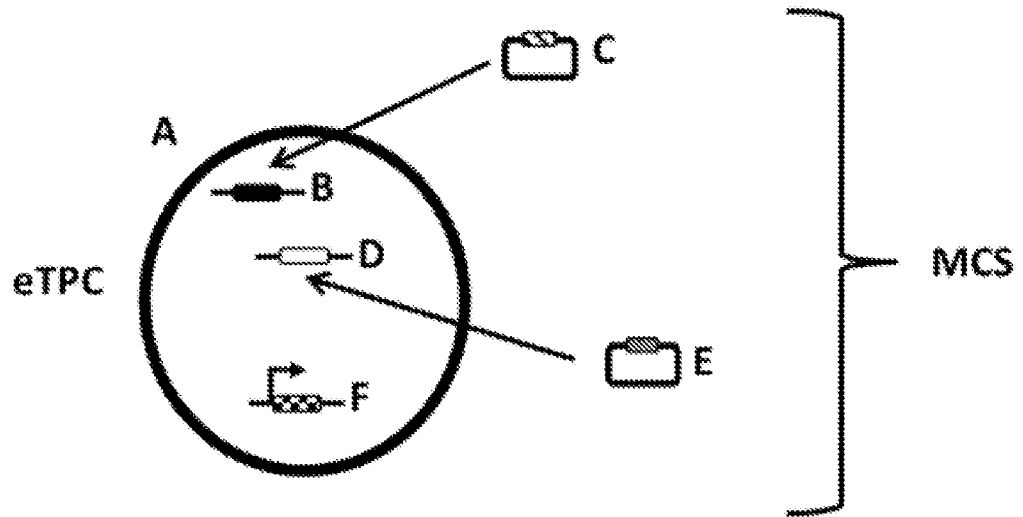


Figura 3

Ensamblaje de eTPCS

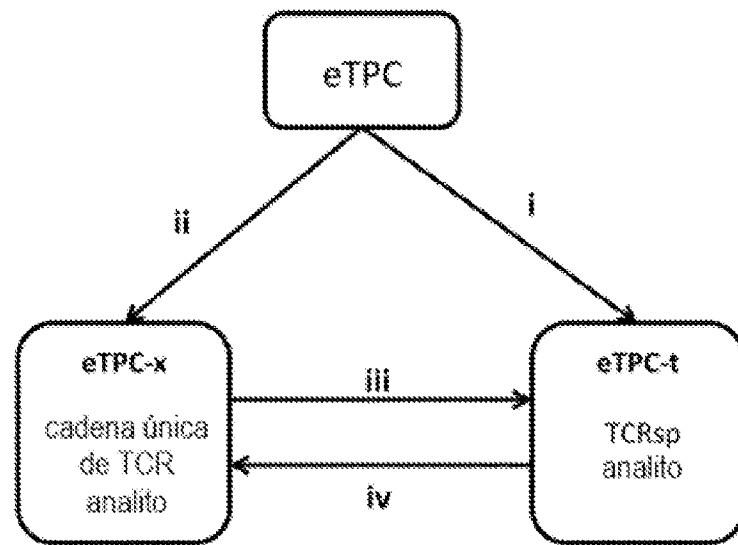


Figura 4

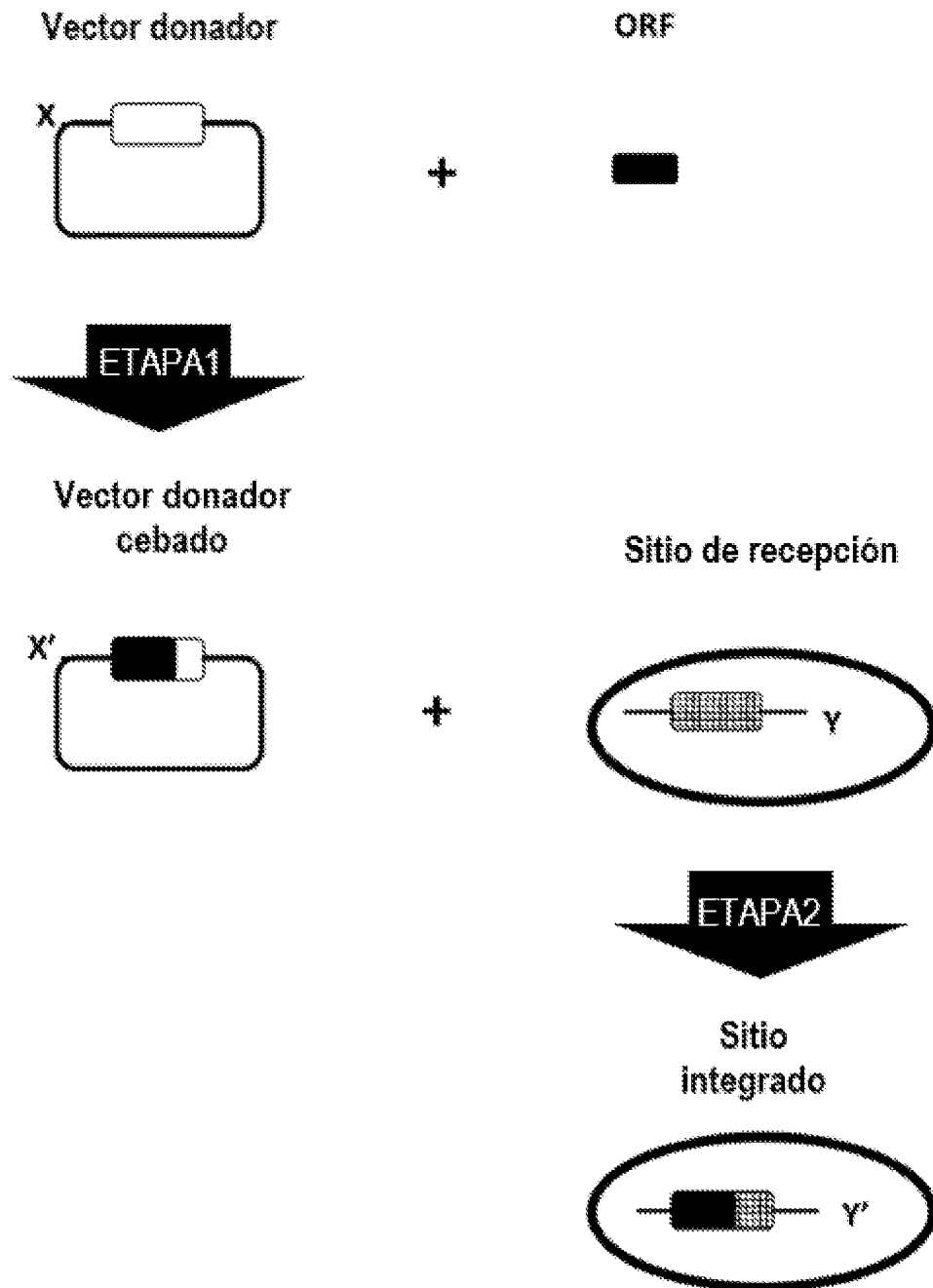


Figura 5

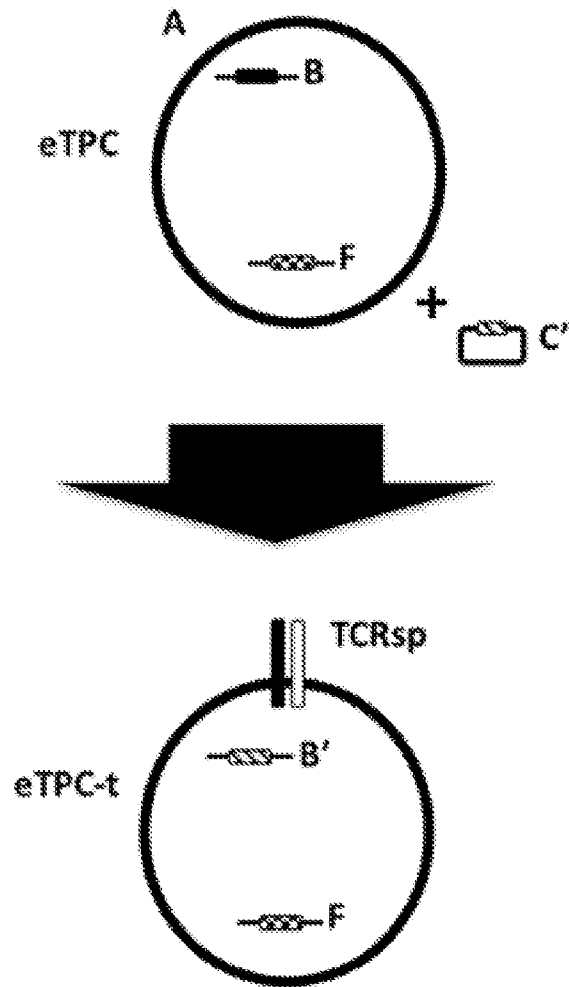


Figura 6

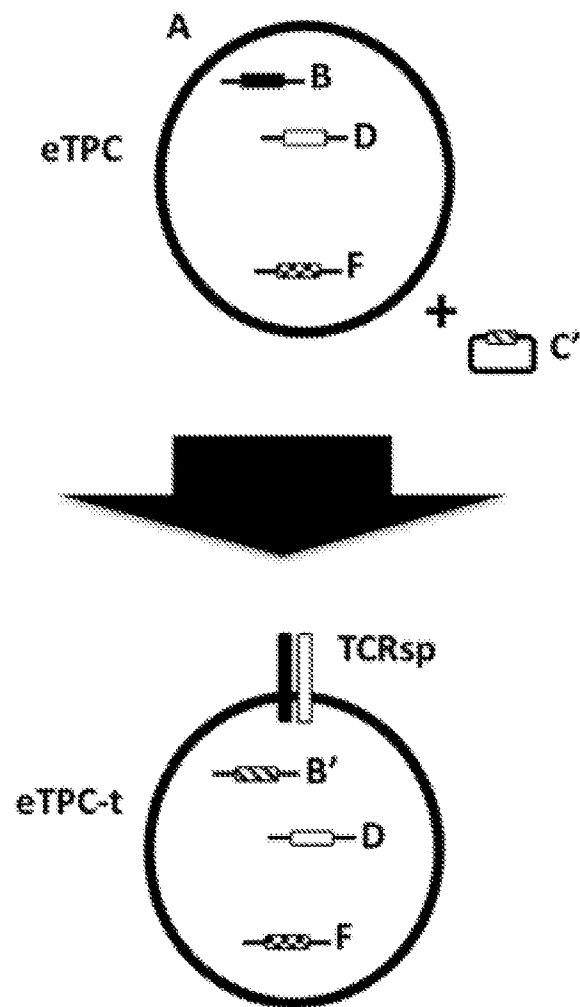


Figura 7

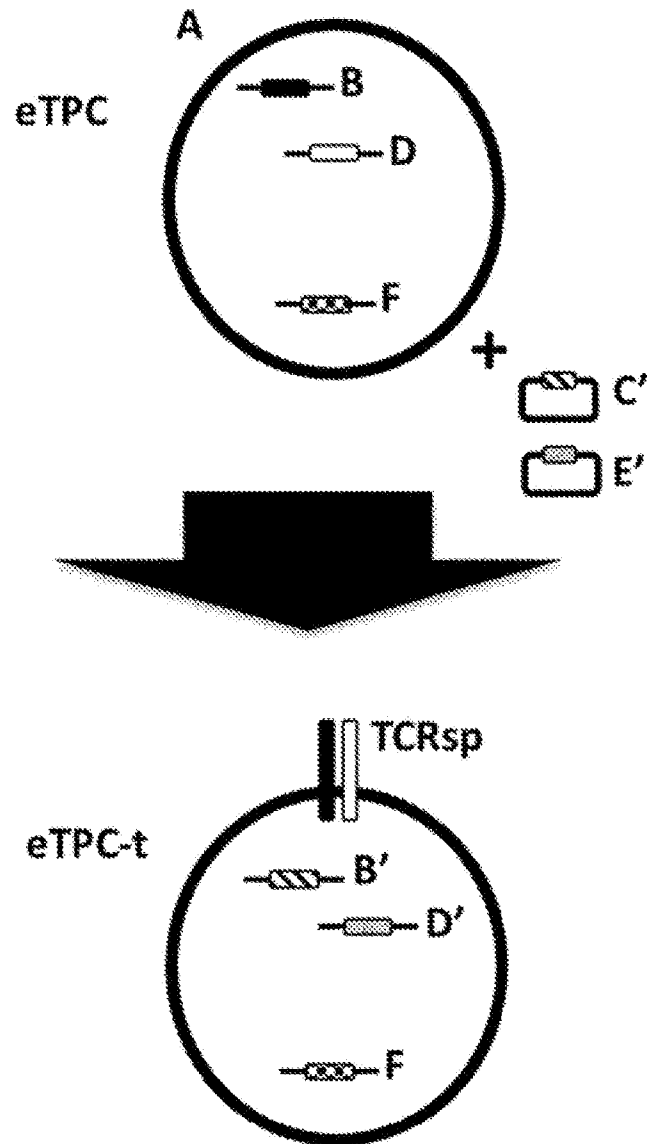


Figura 8

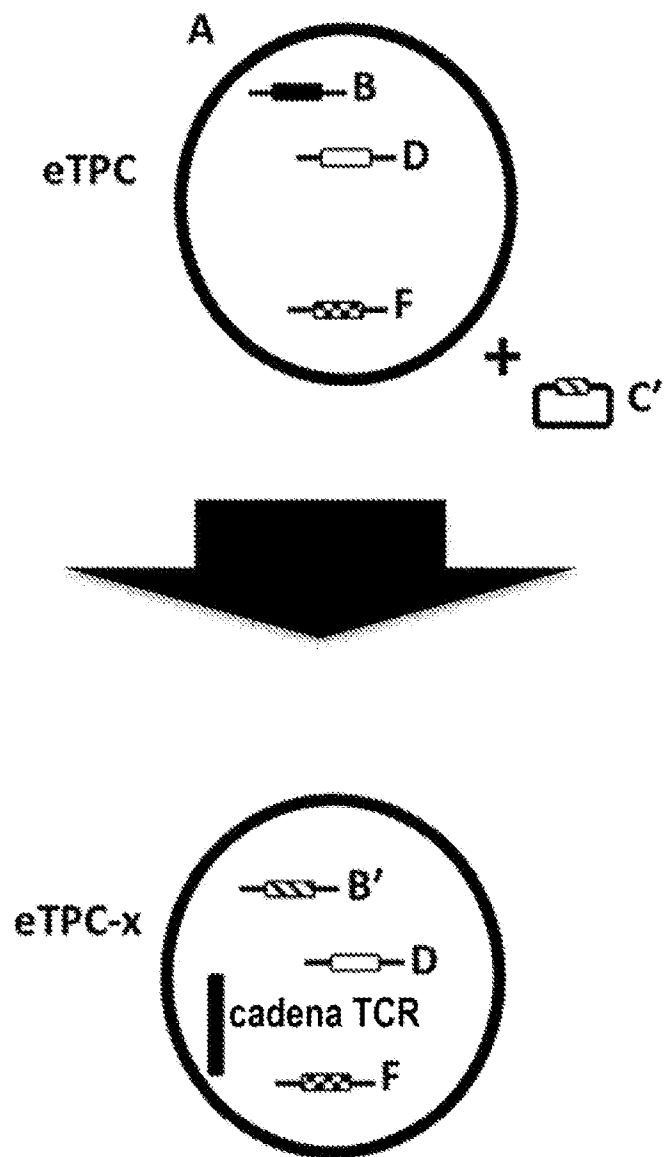


Figura 9

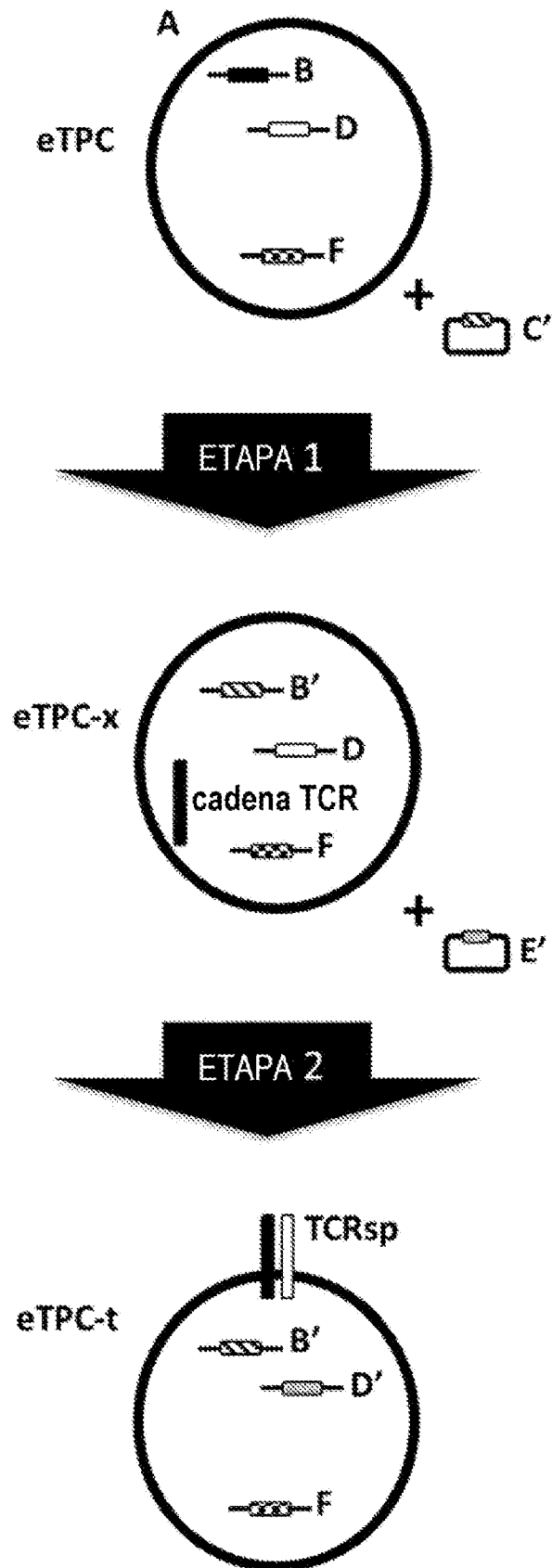


Figura 10

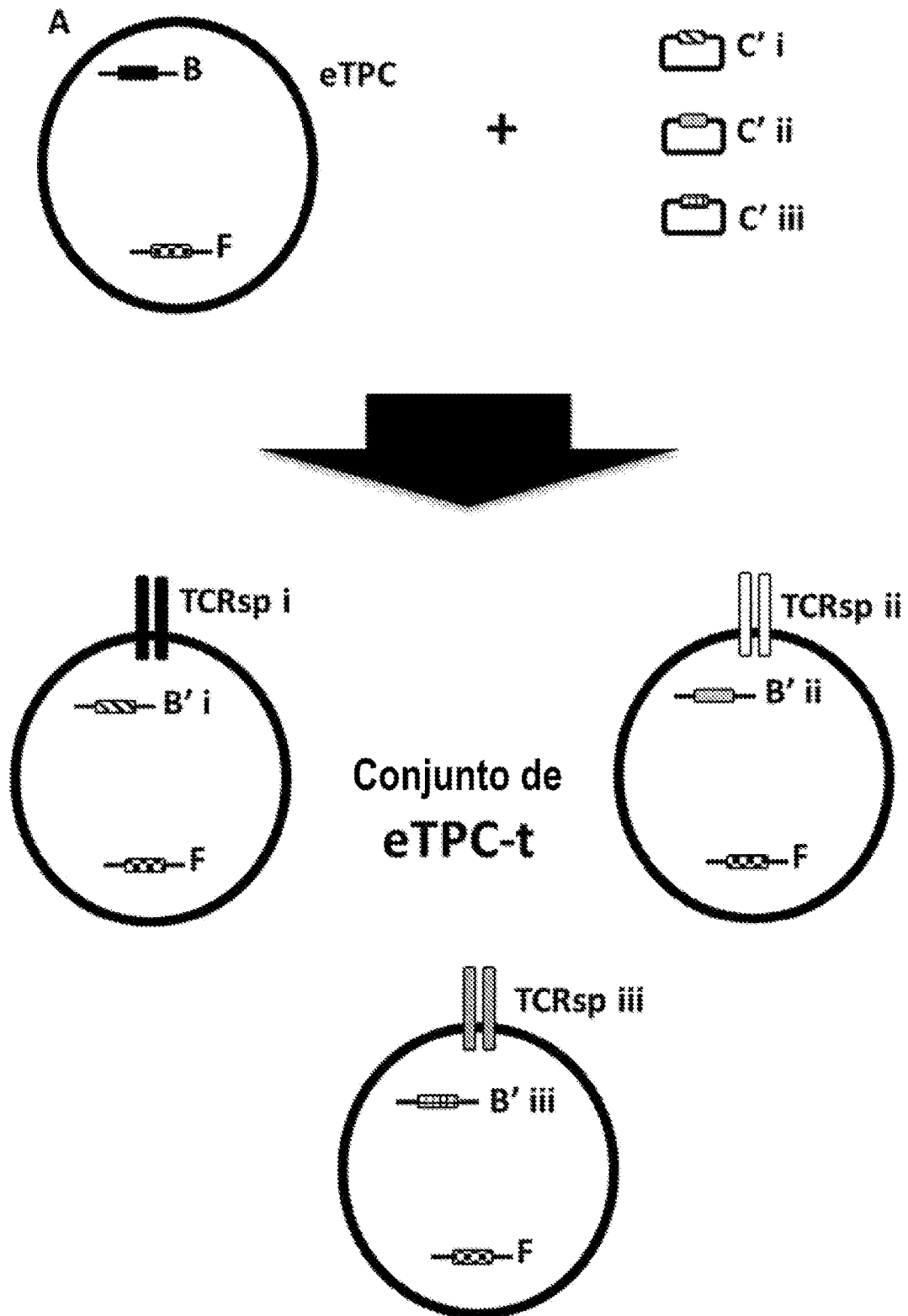


Figura 11

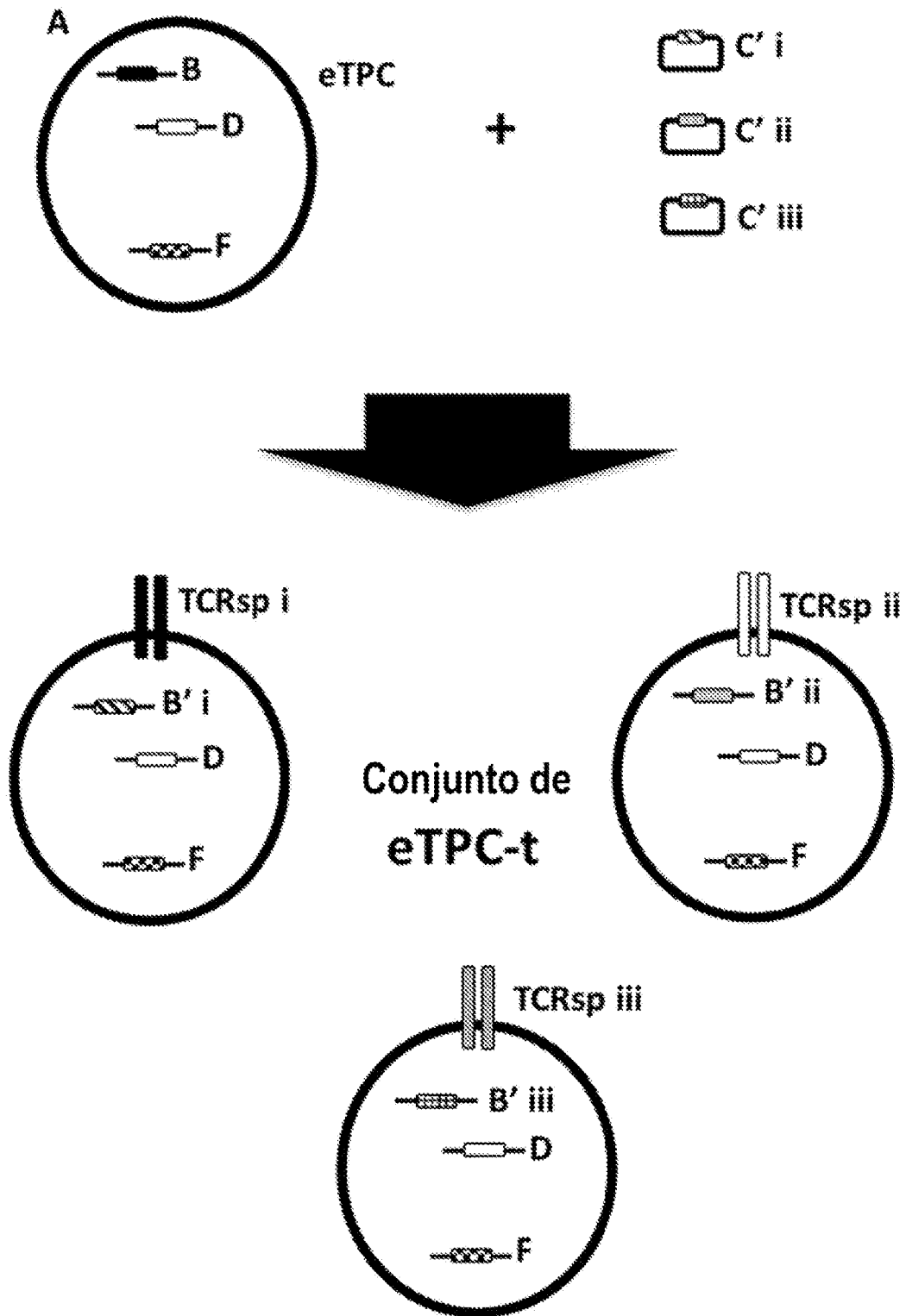


Figura 12

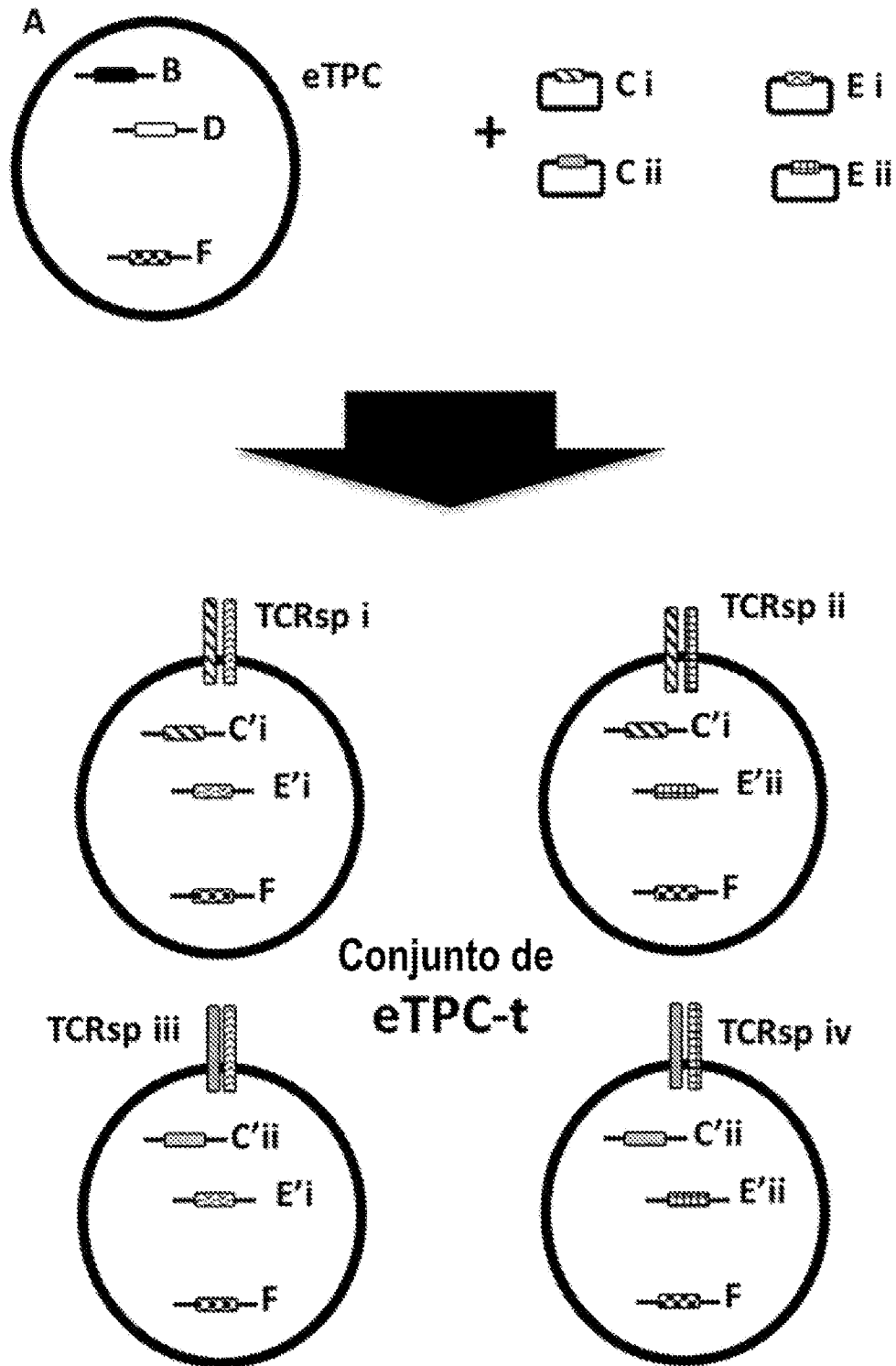


Figura 13

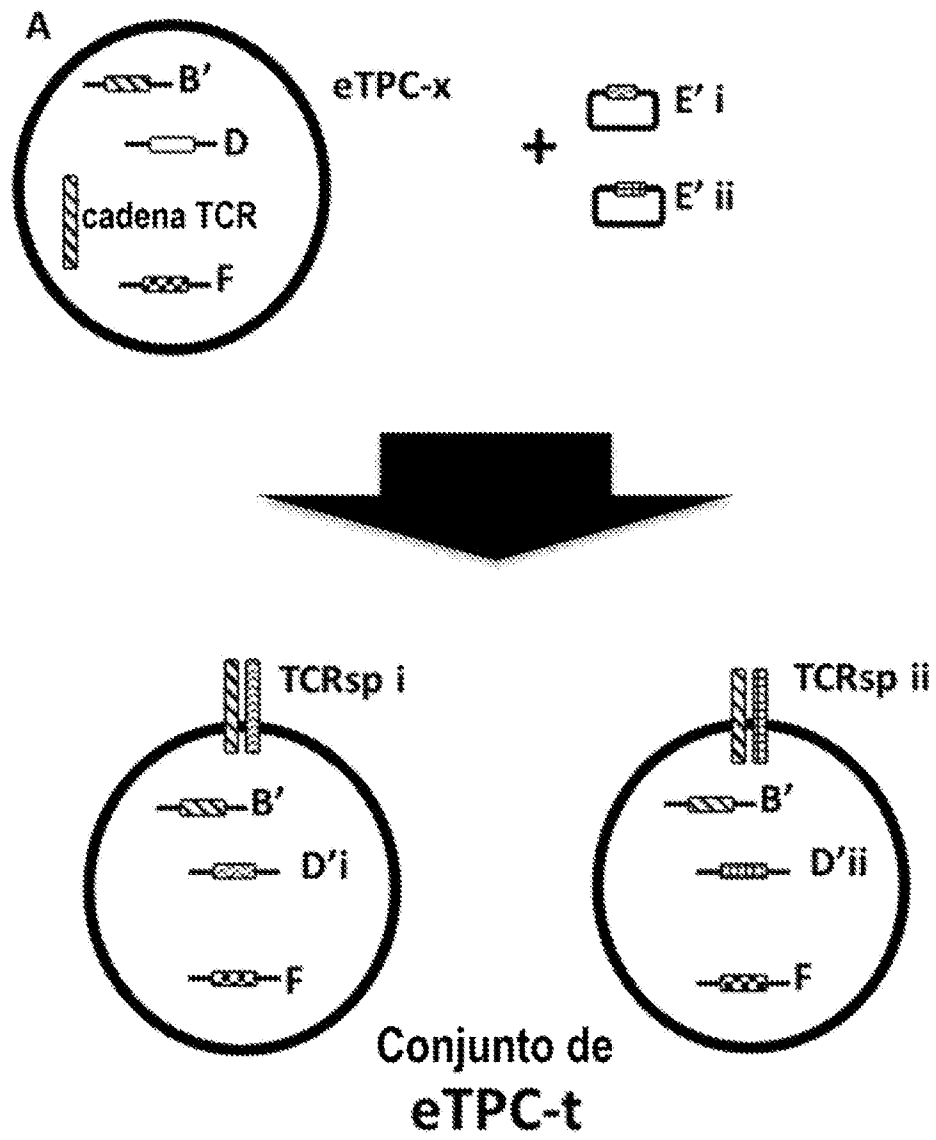


Figura 14

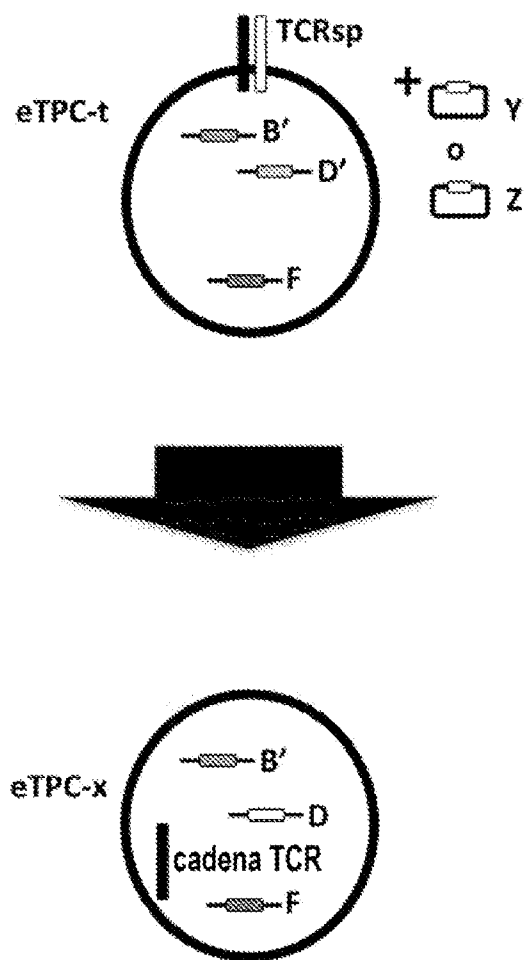


Figura 15

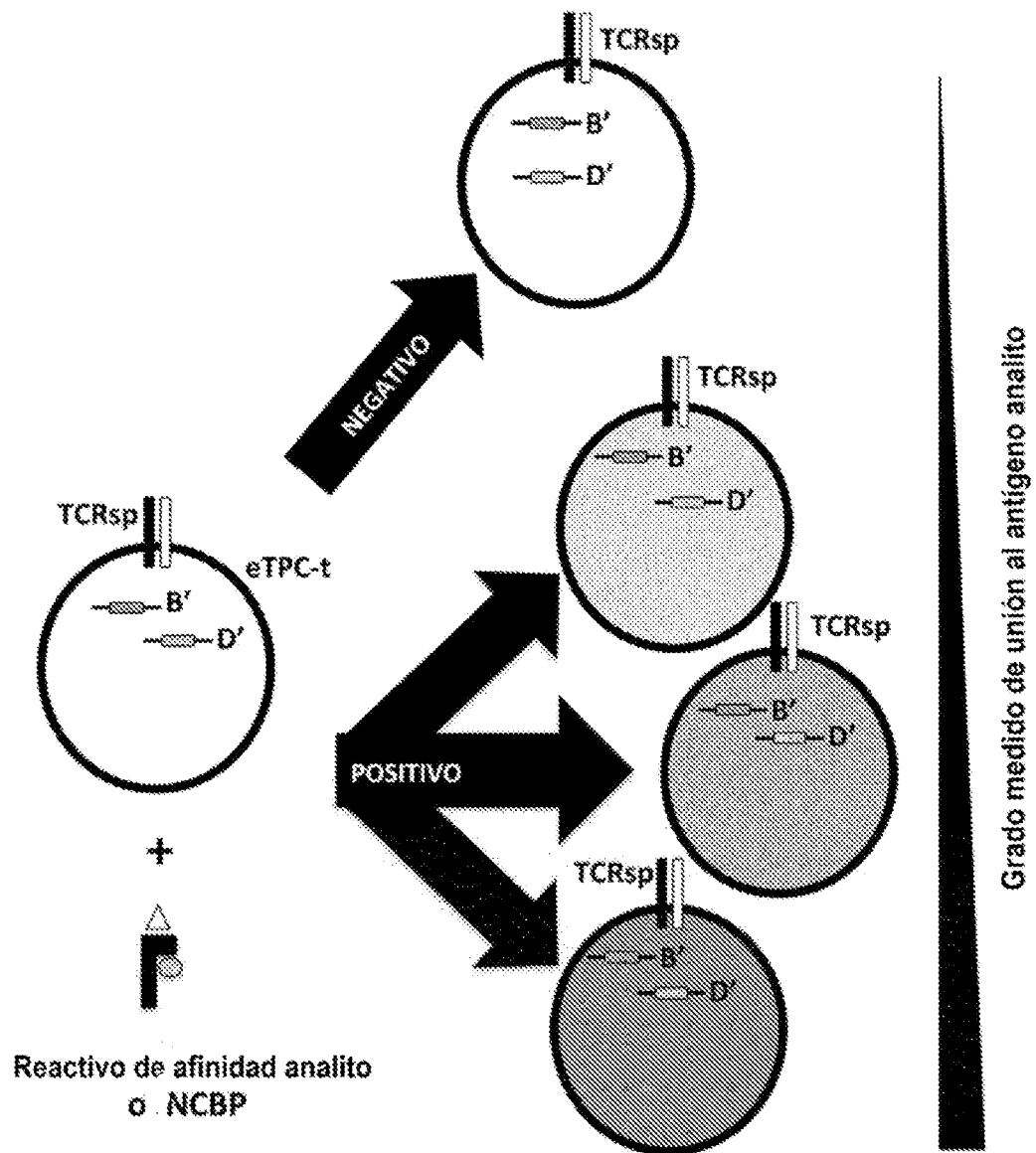


Figura 16

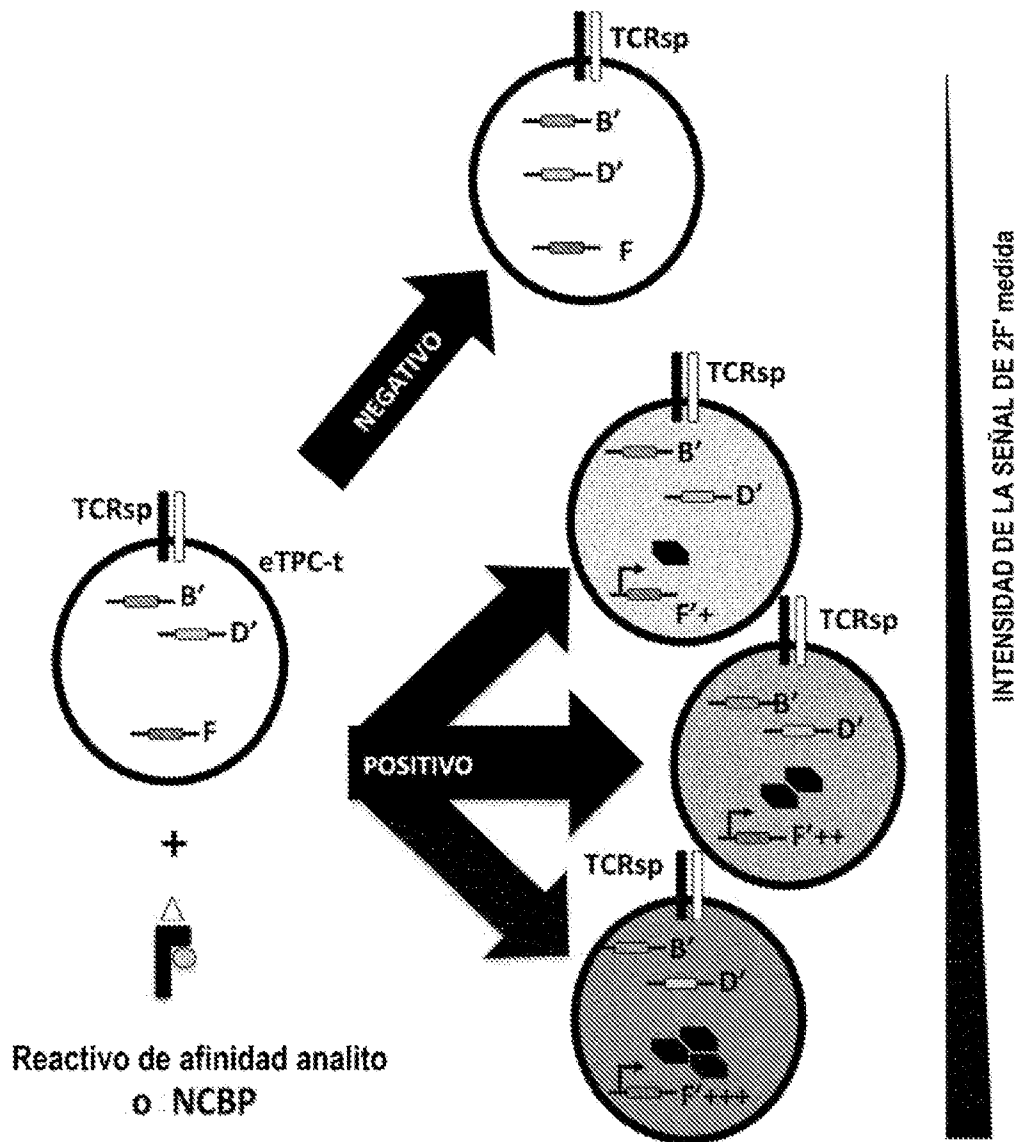


Figura 17

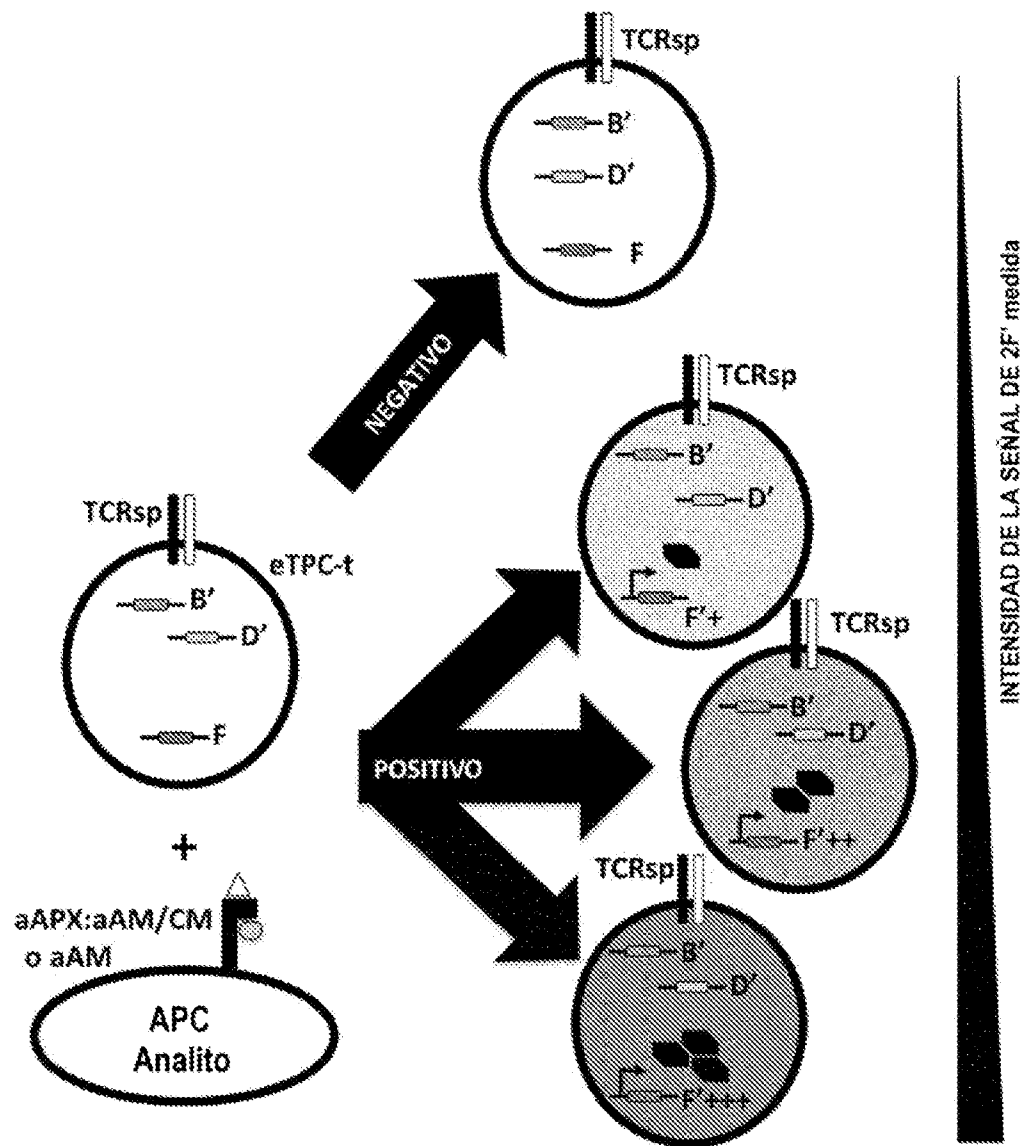


Figura 18

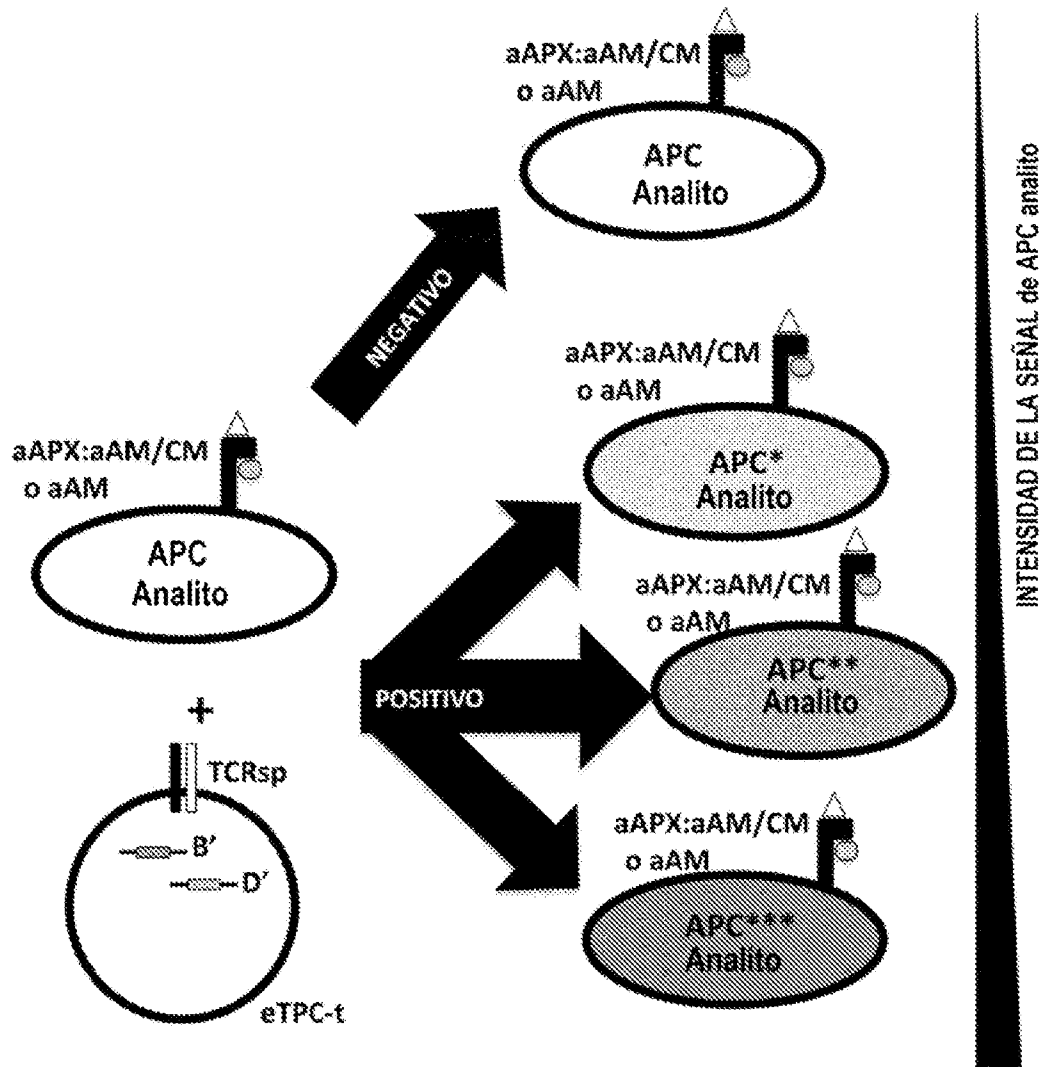


Figura 19

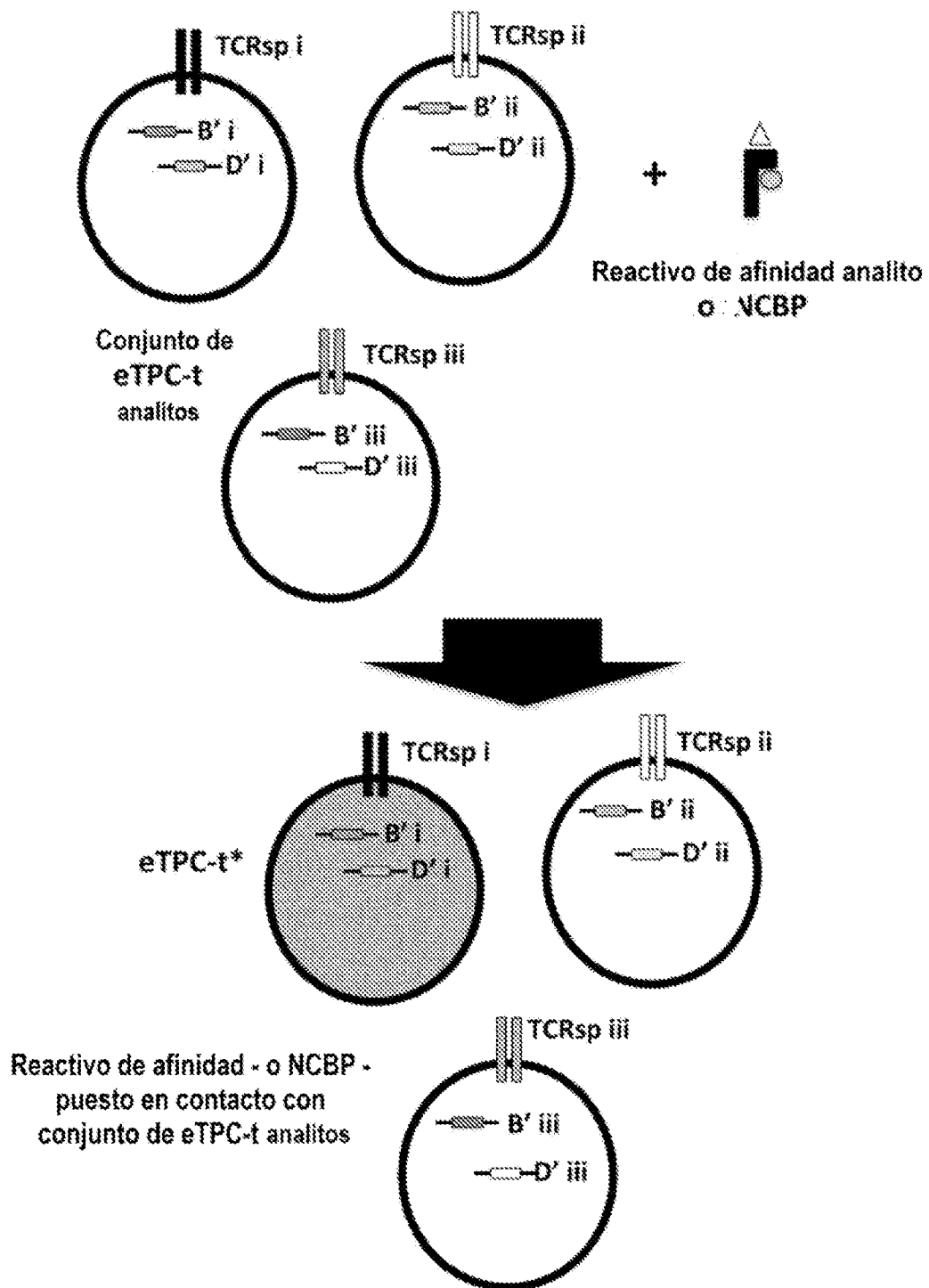


Figura 20

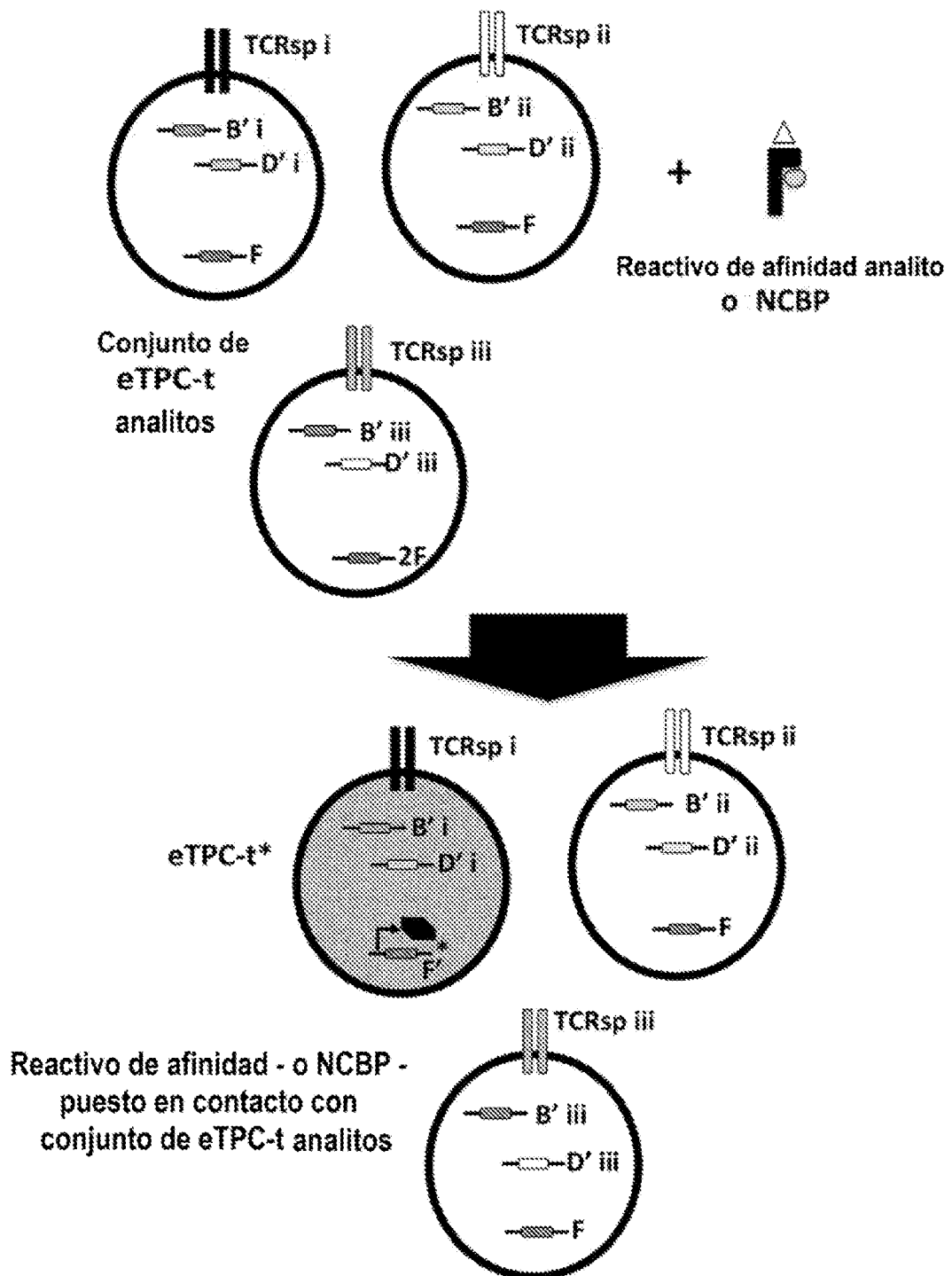


Figura 21

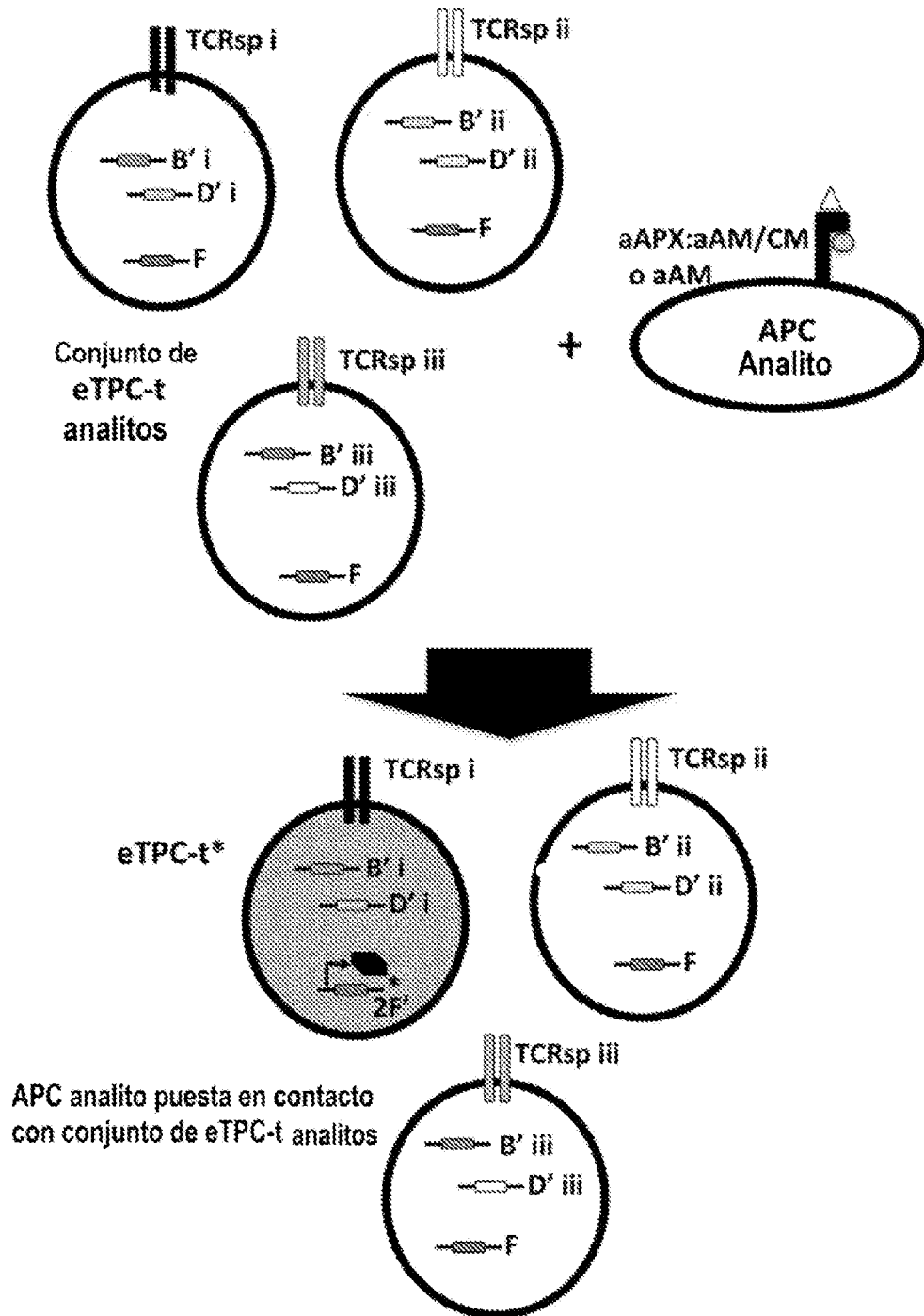


Figura 22

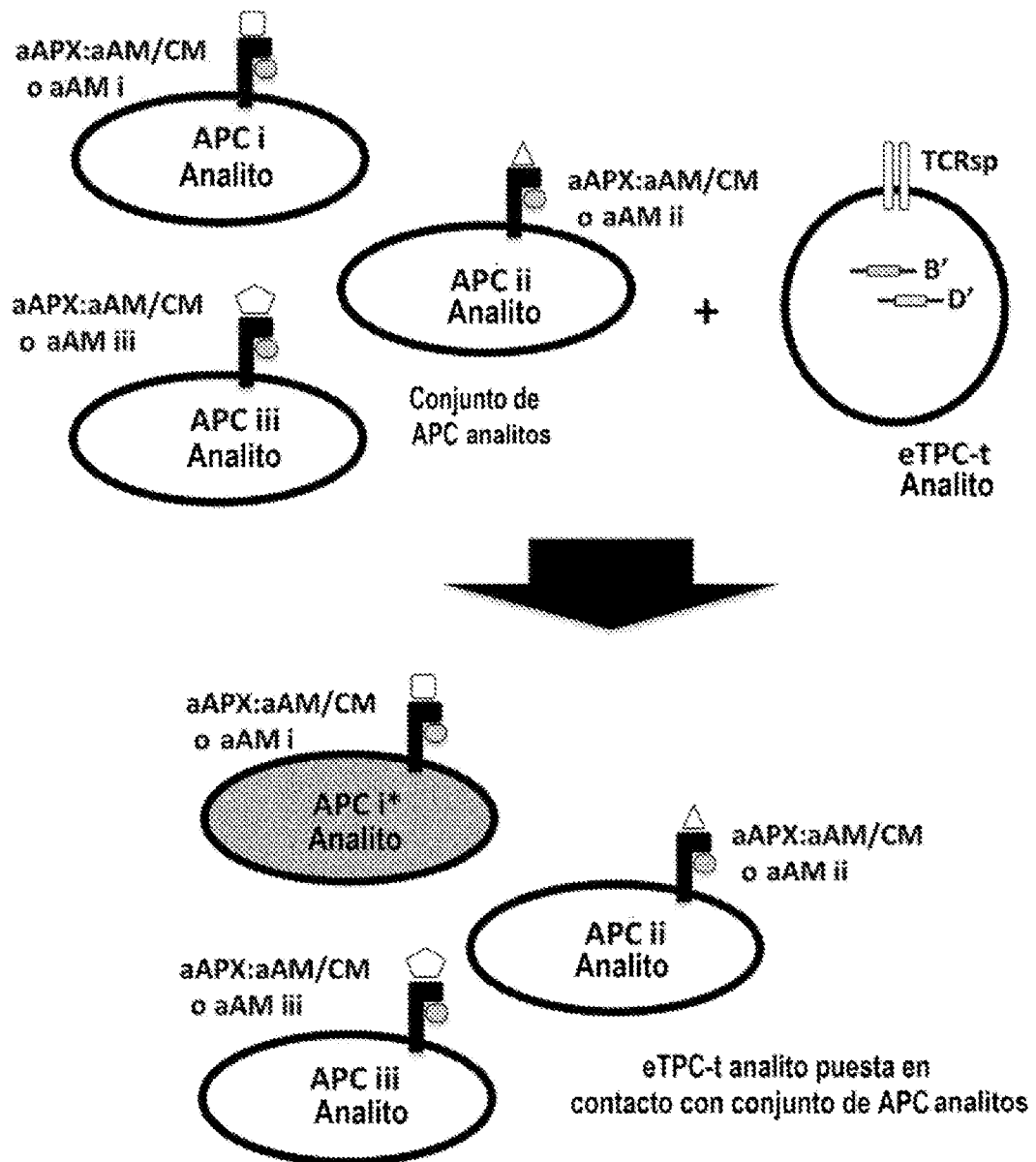


Figura 23

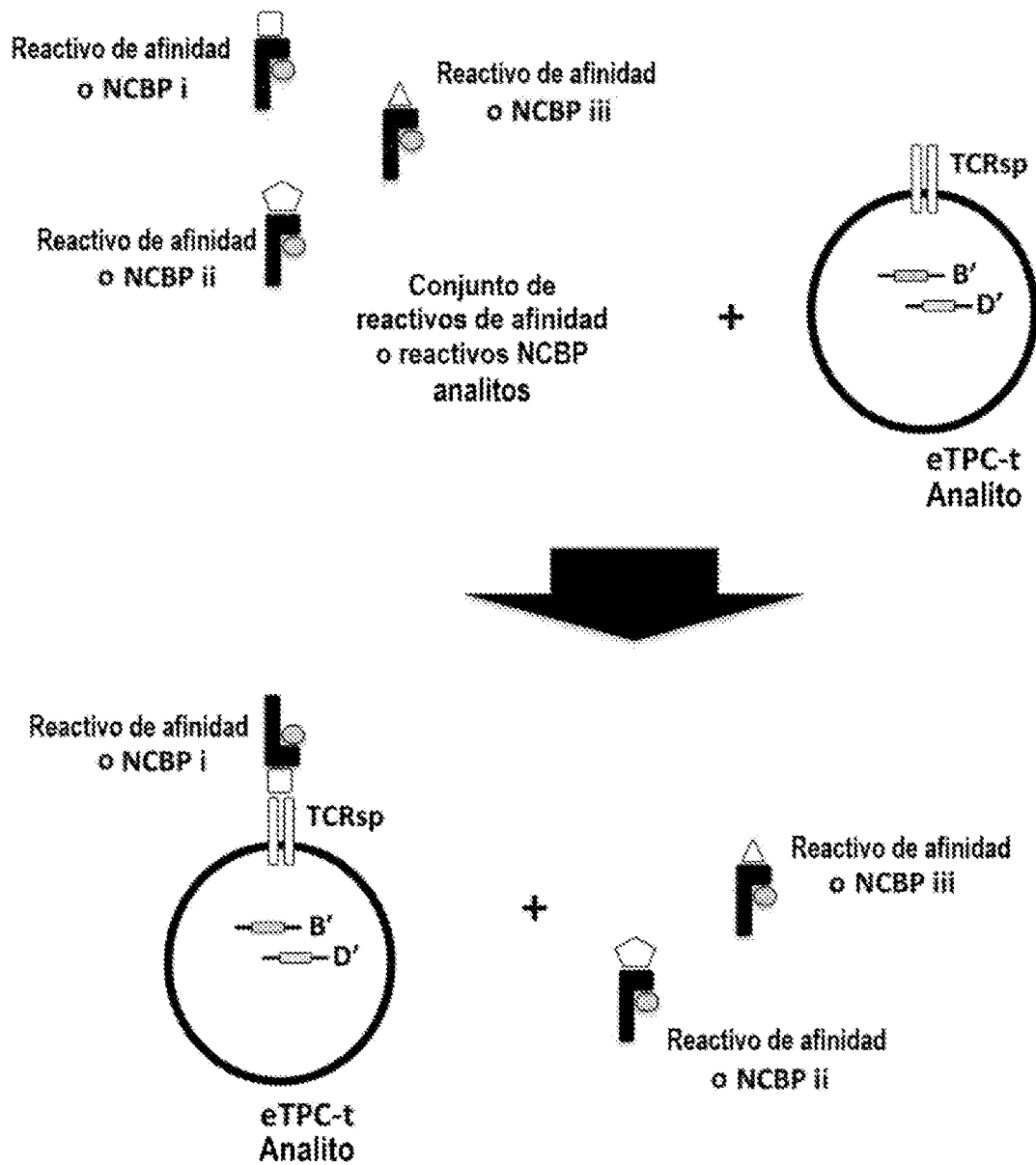


Figura 24

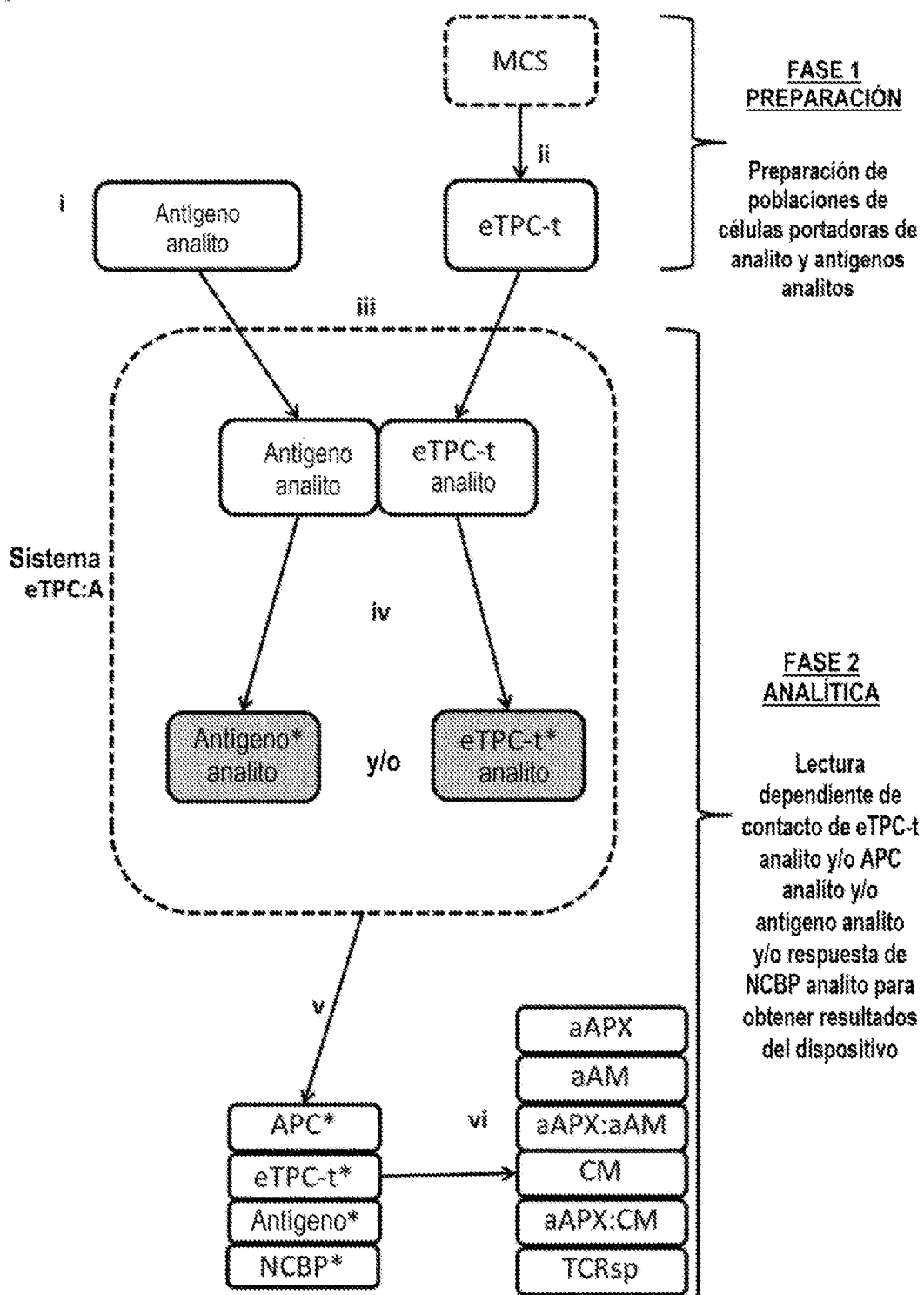


Figura 25

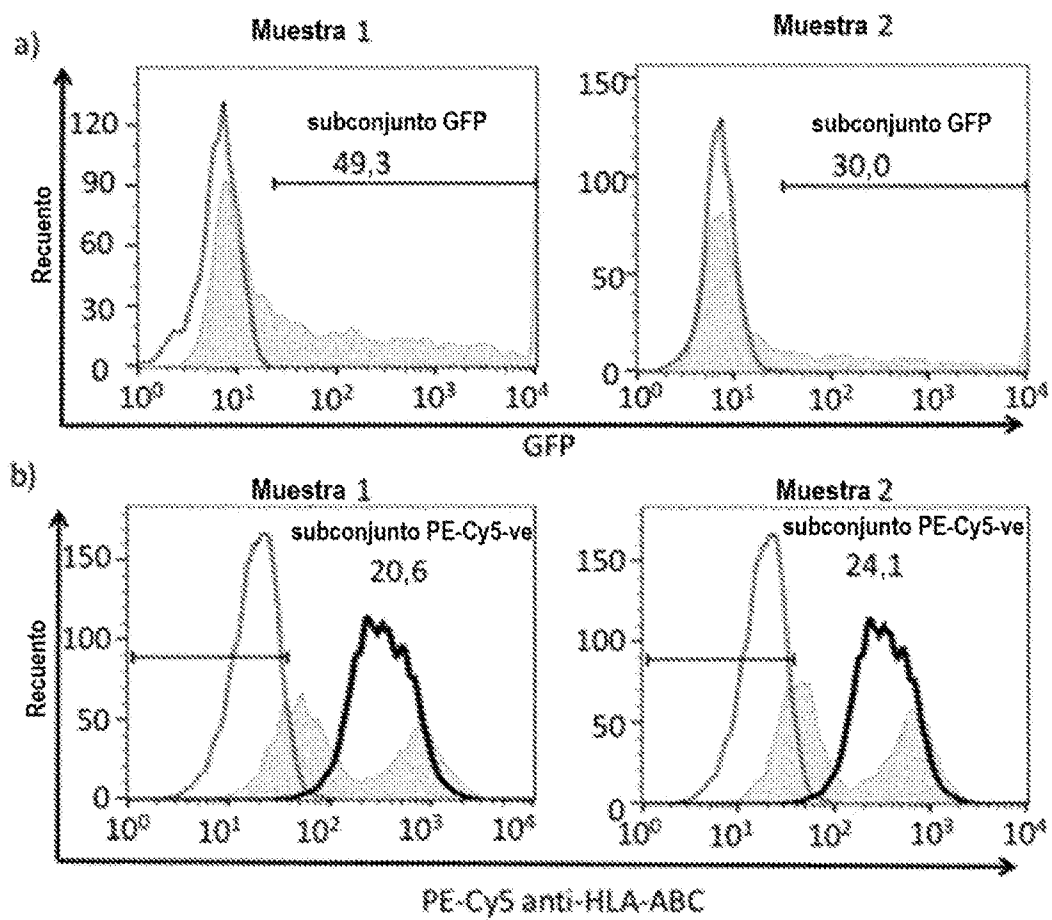


Figura 26

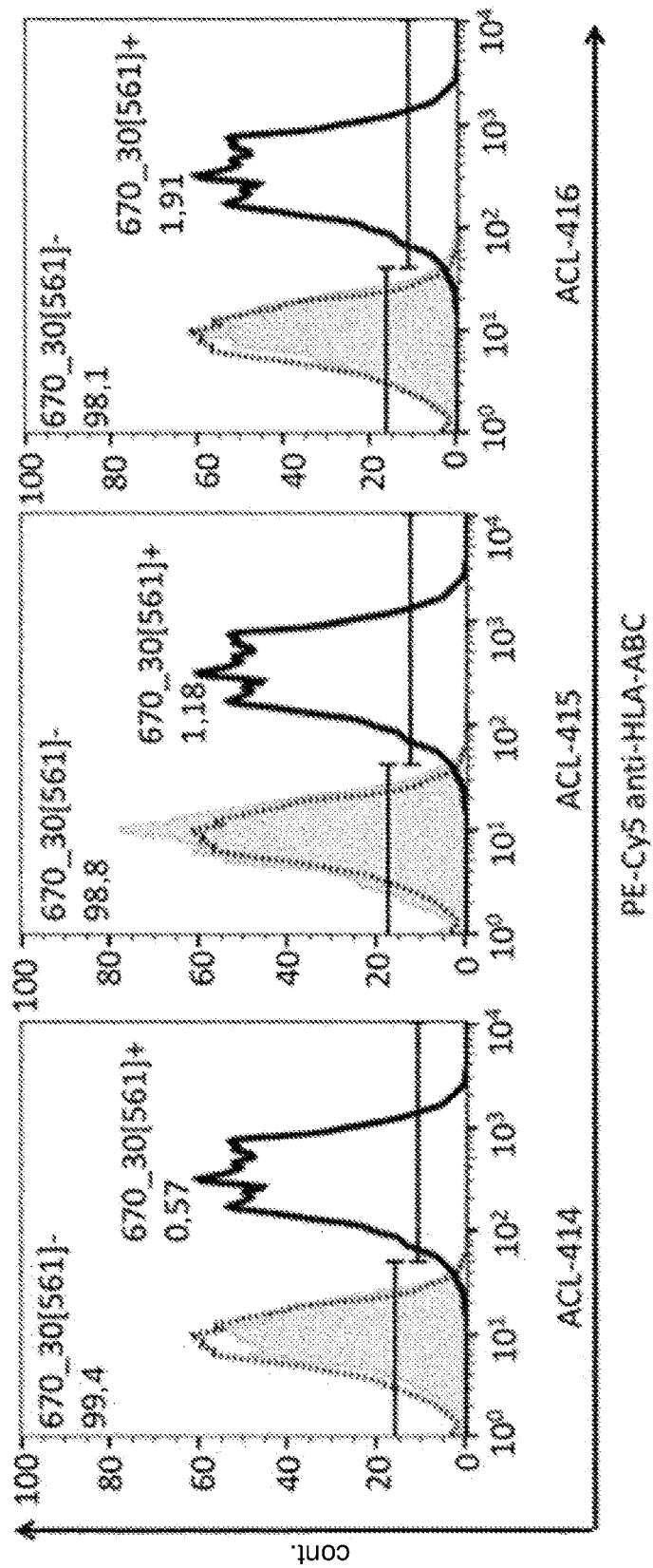


Figura 27

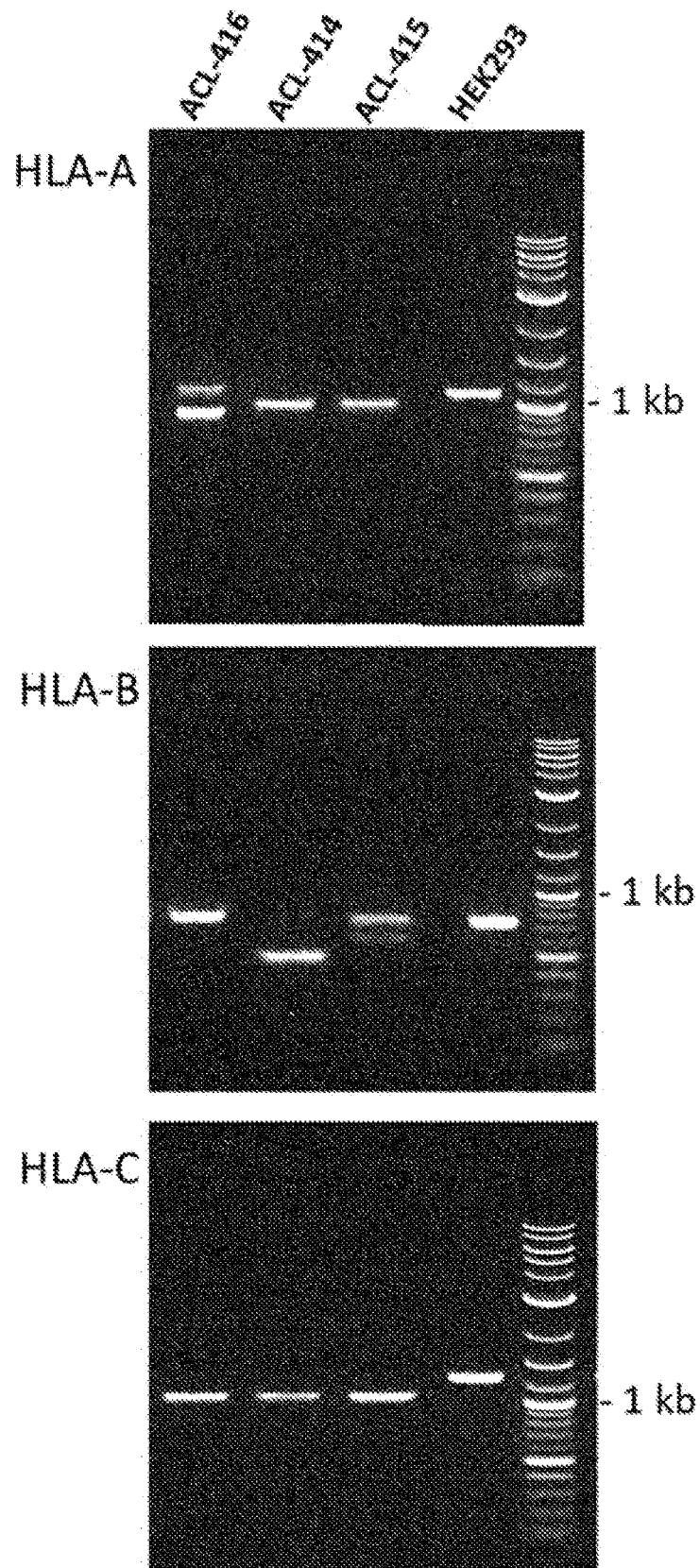


Figura 28

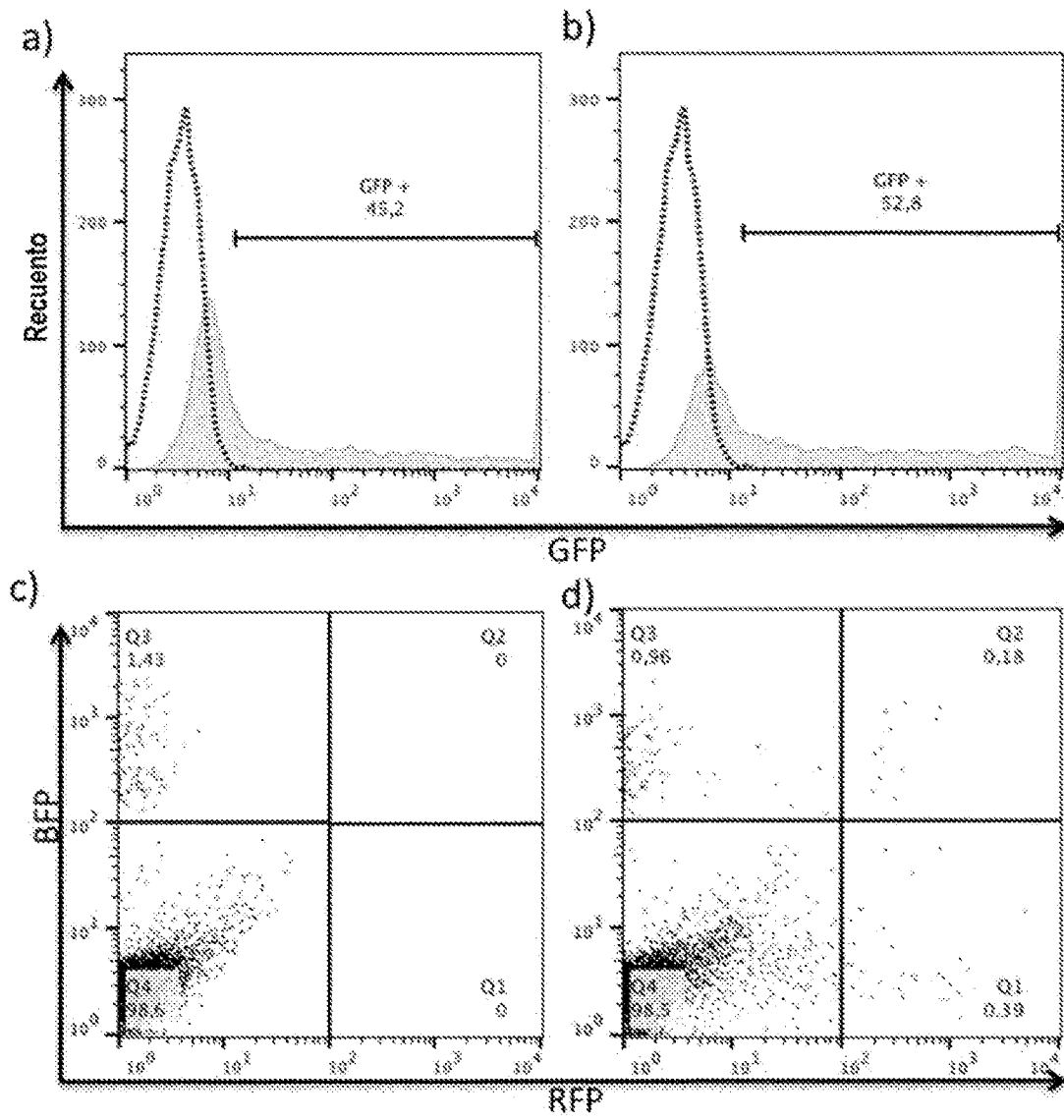


Figura 29

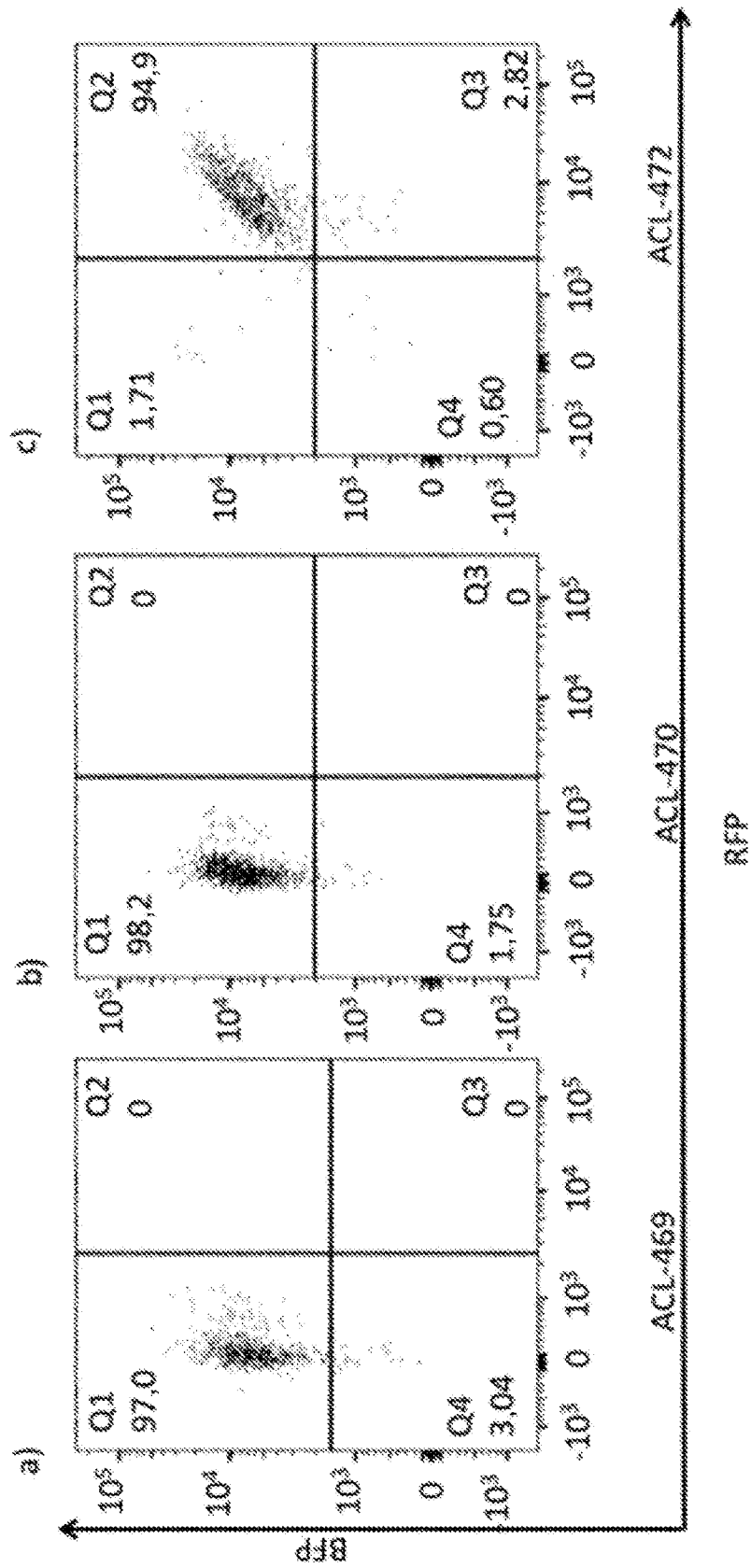


Figura 30

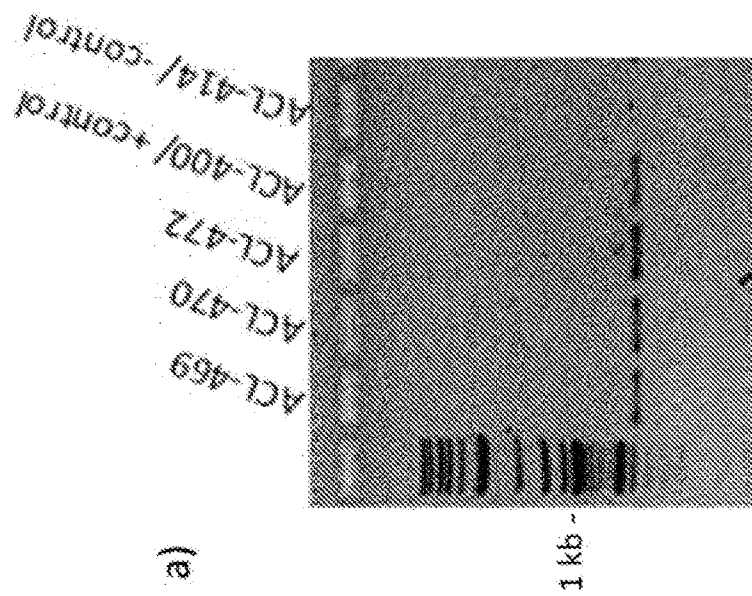
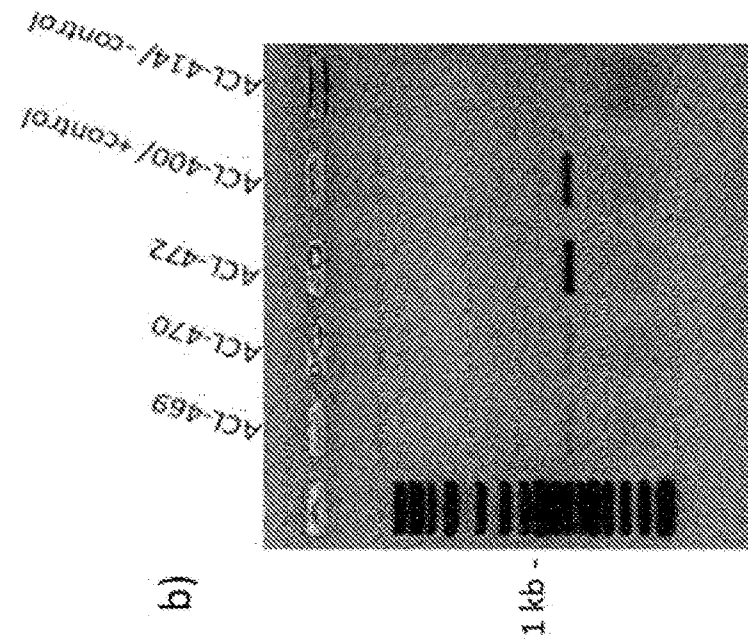


Figura 31

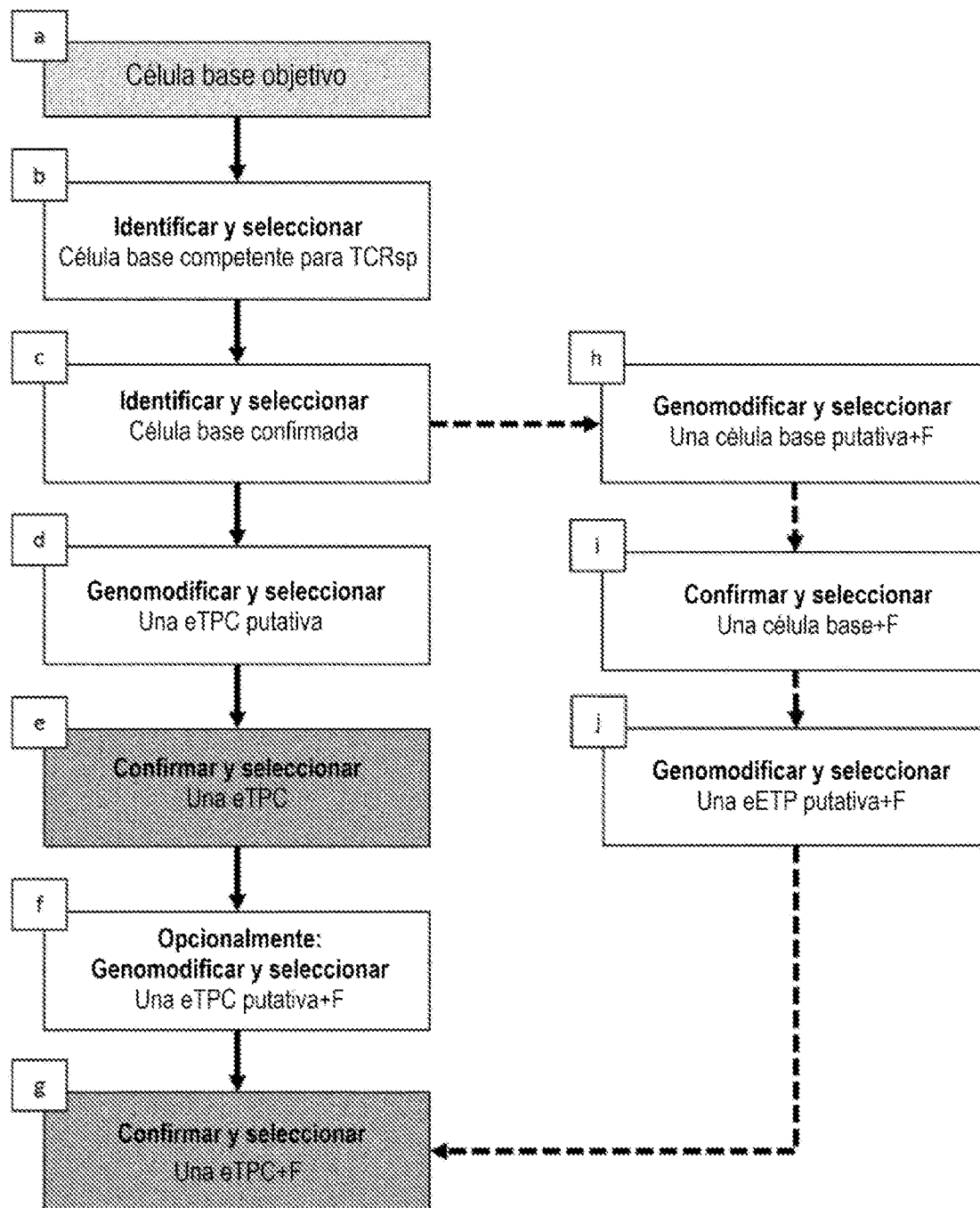


Figura 32

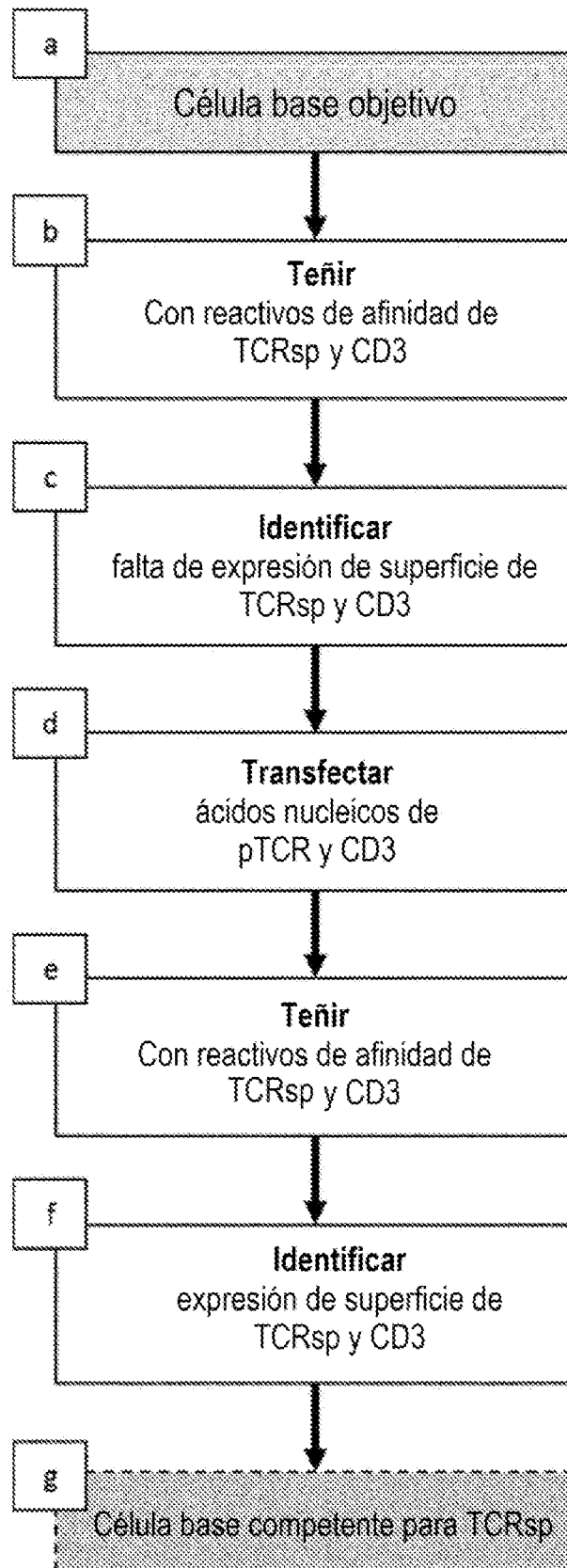


Figure 33

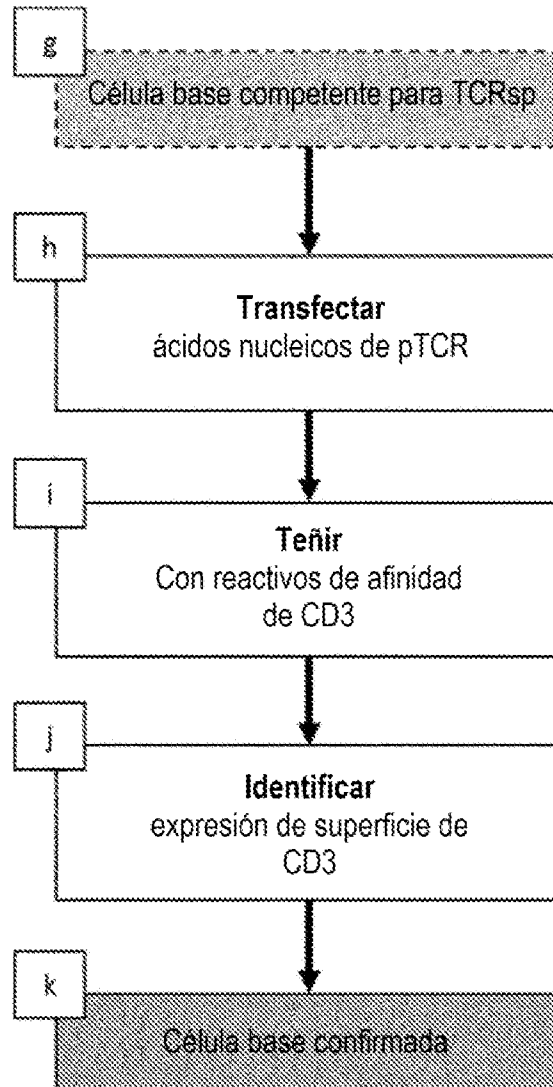


Figura 34

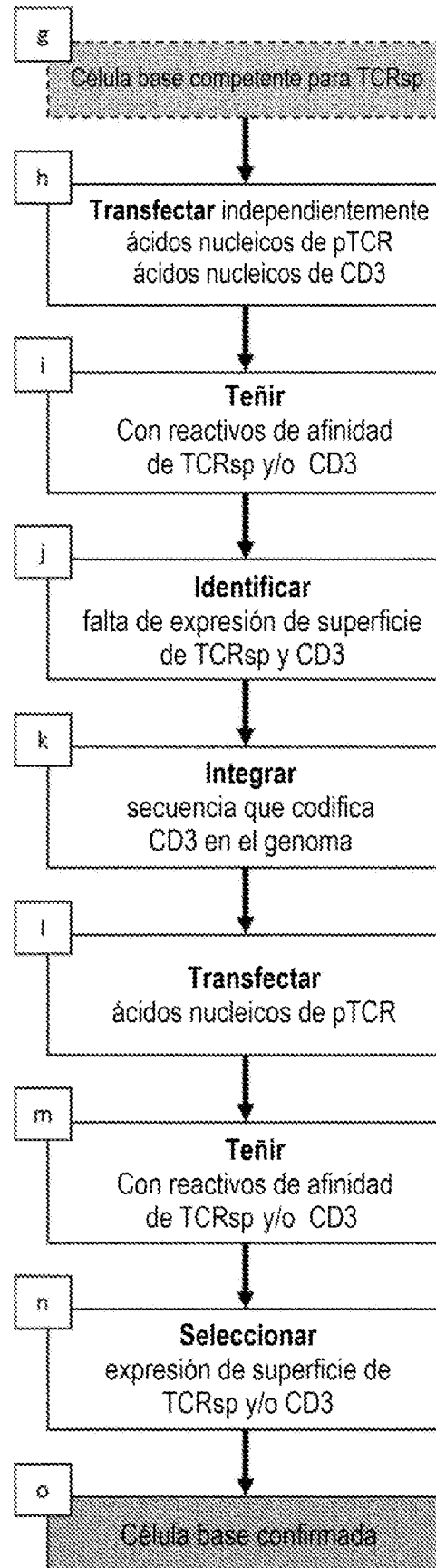


Figura 35

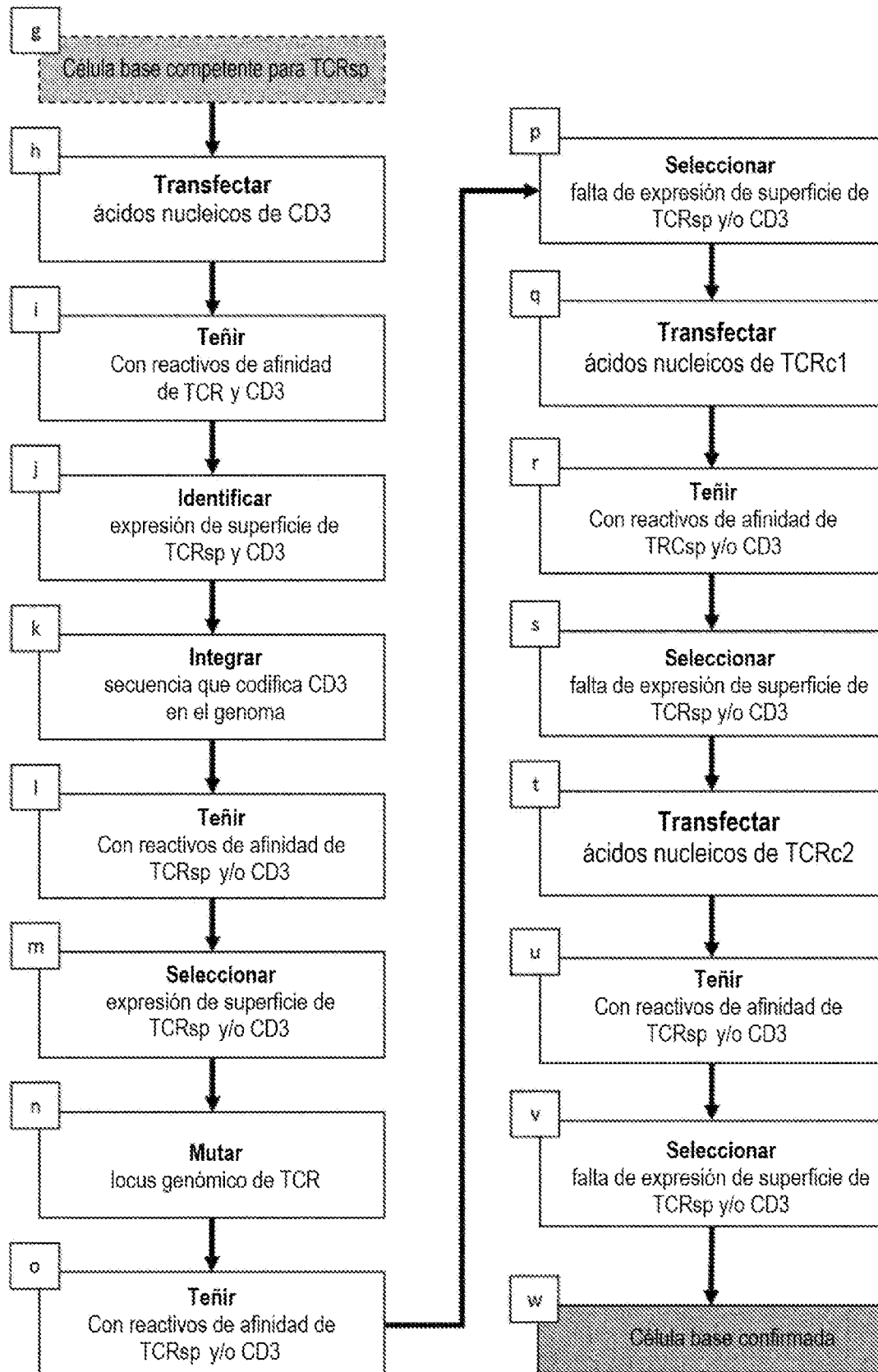


Figure 36

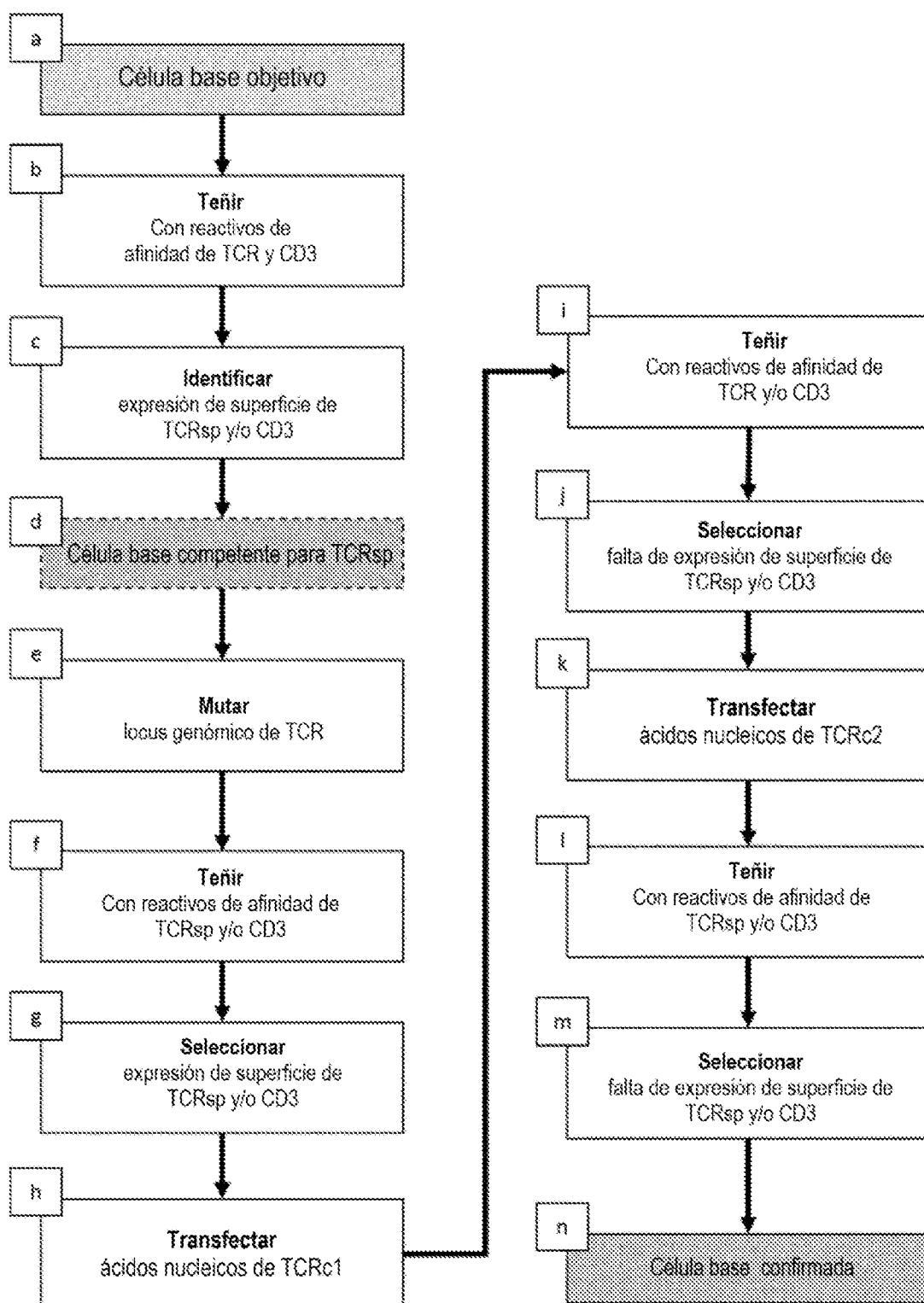


Figura 37

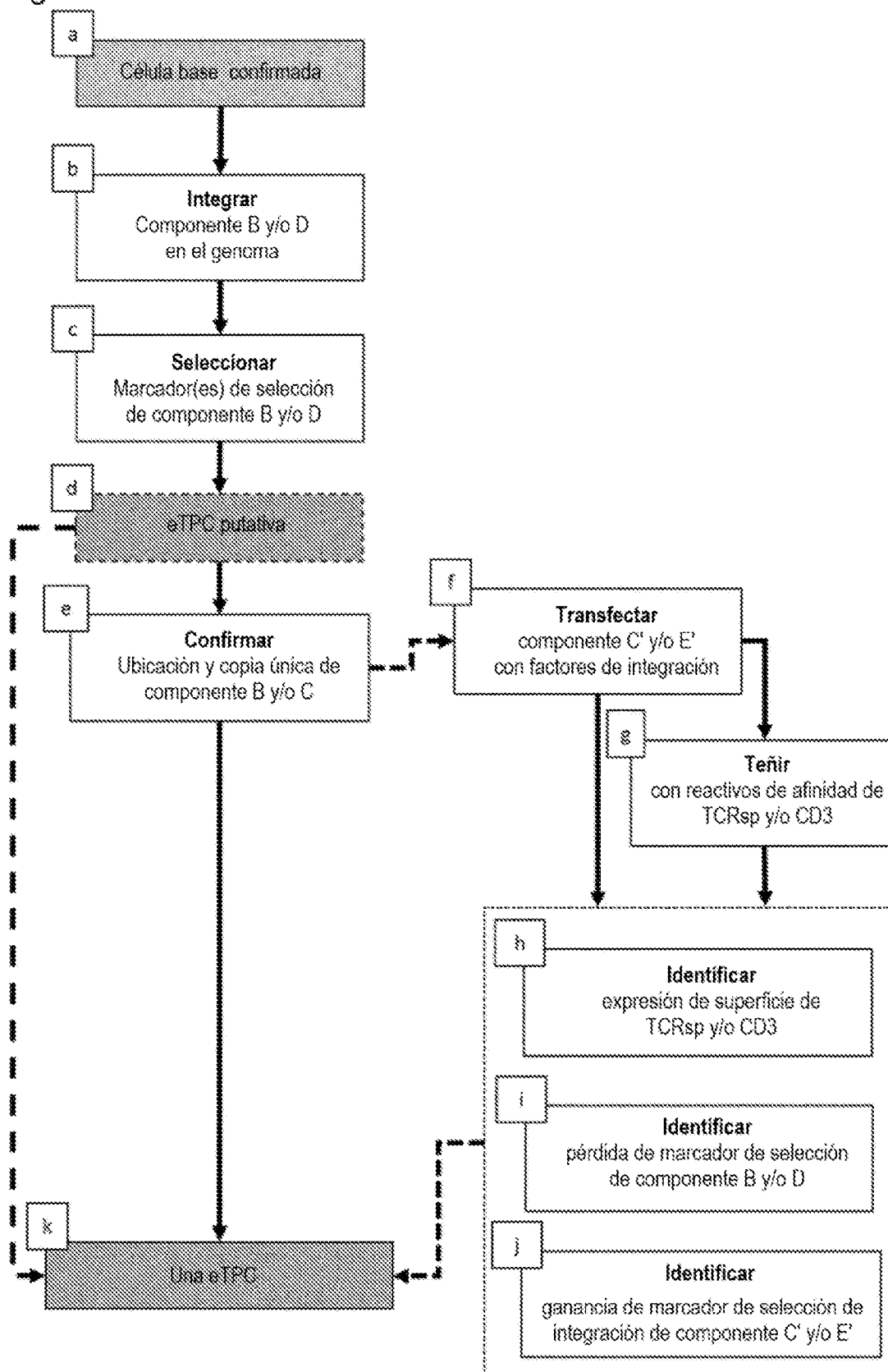


Figura 38

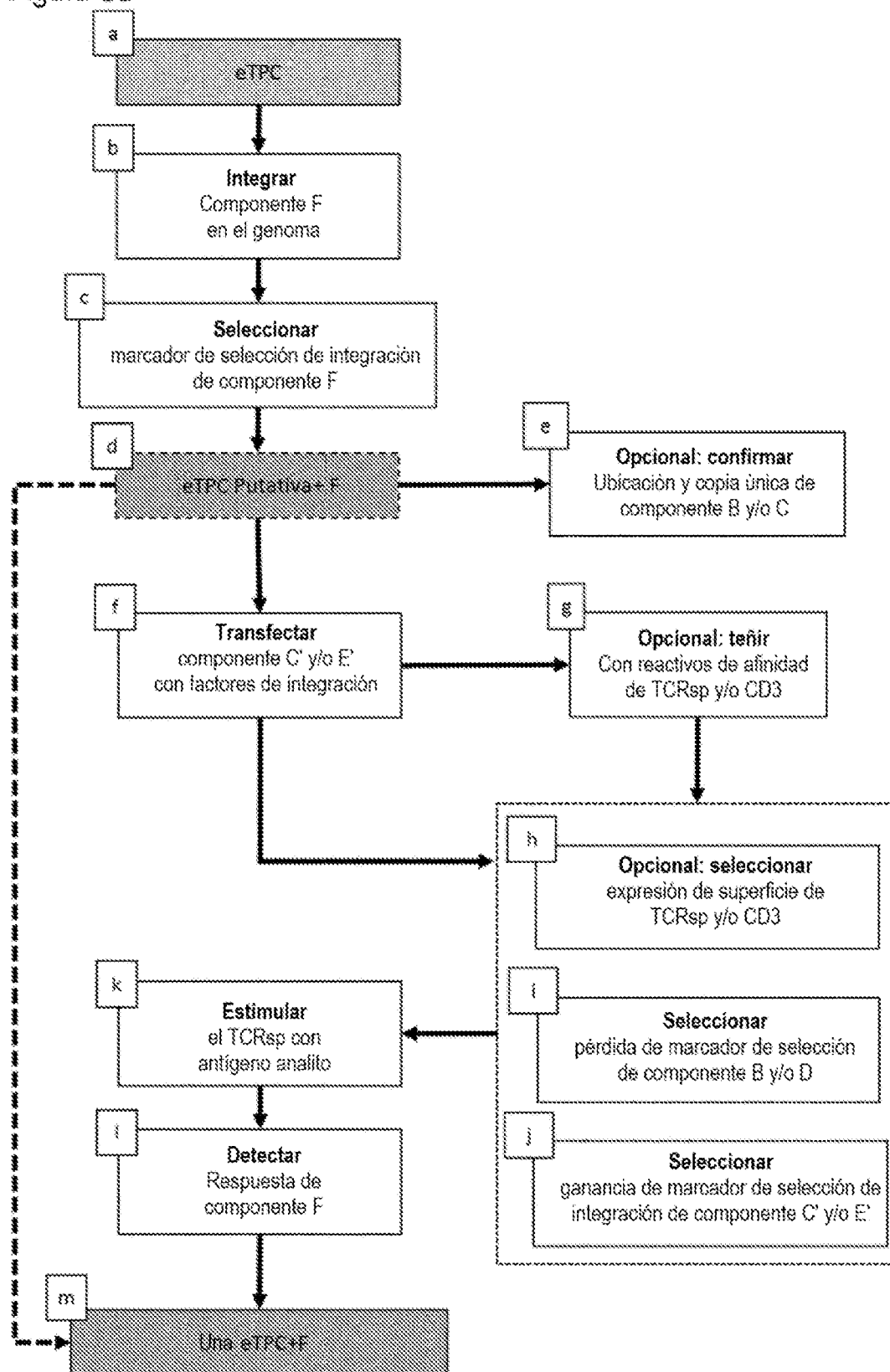


Figura 39

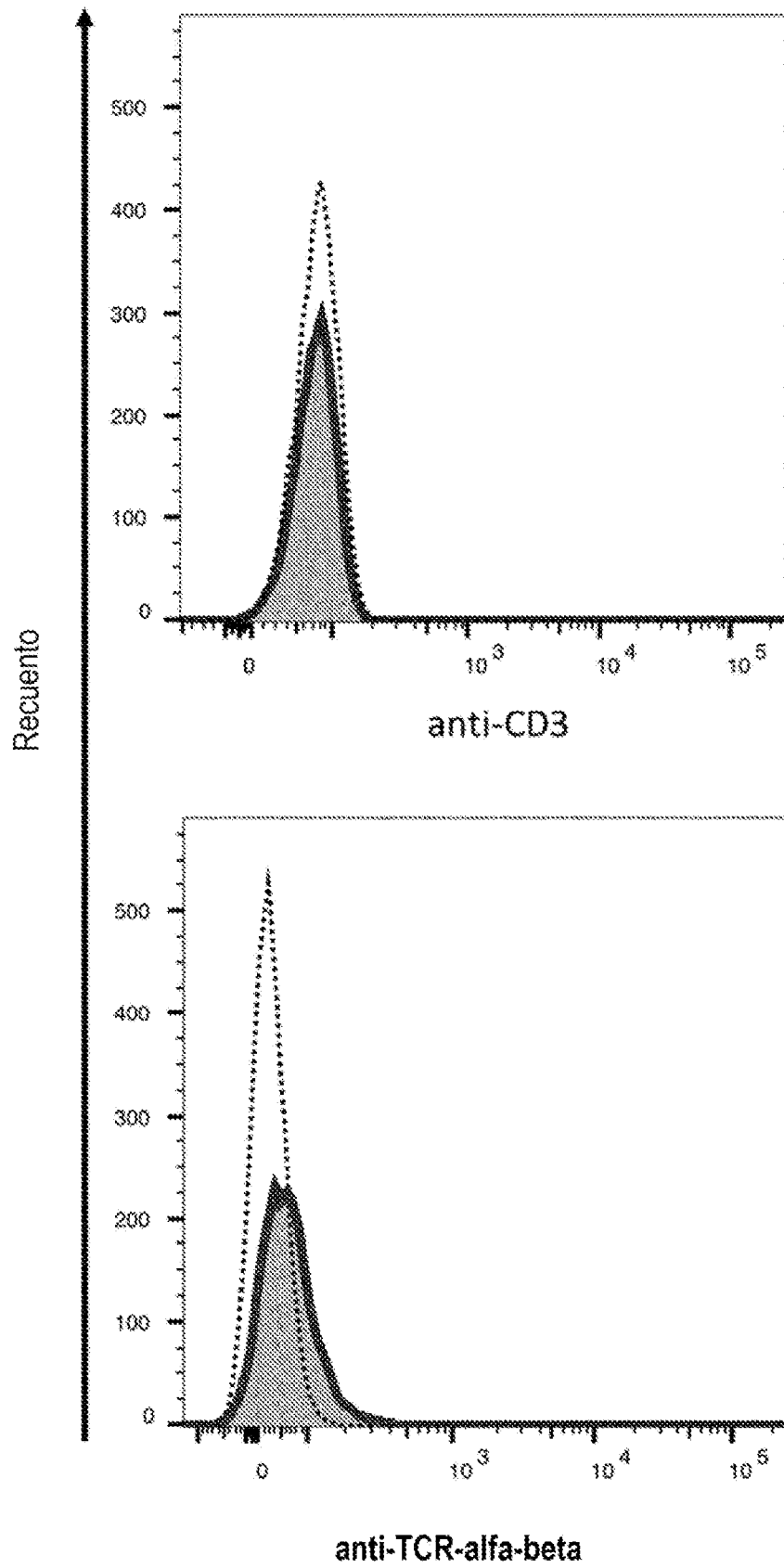


Figura 40

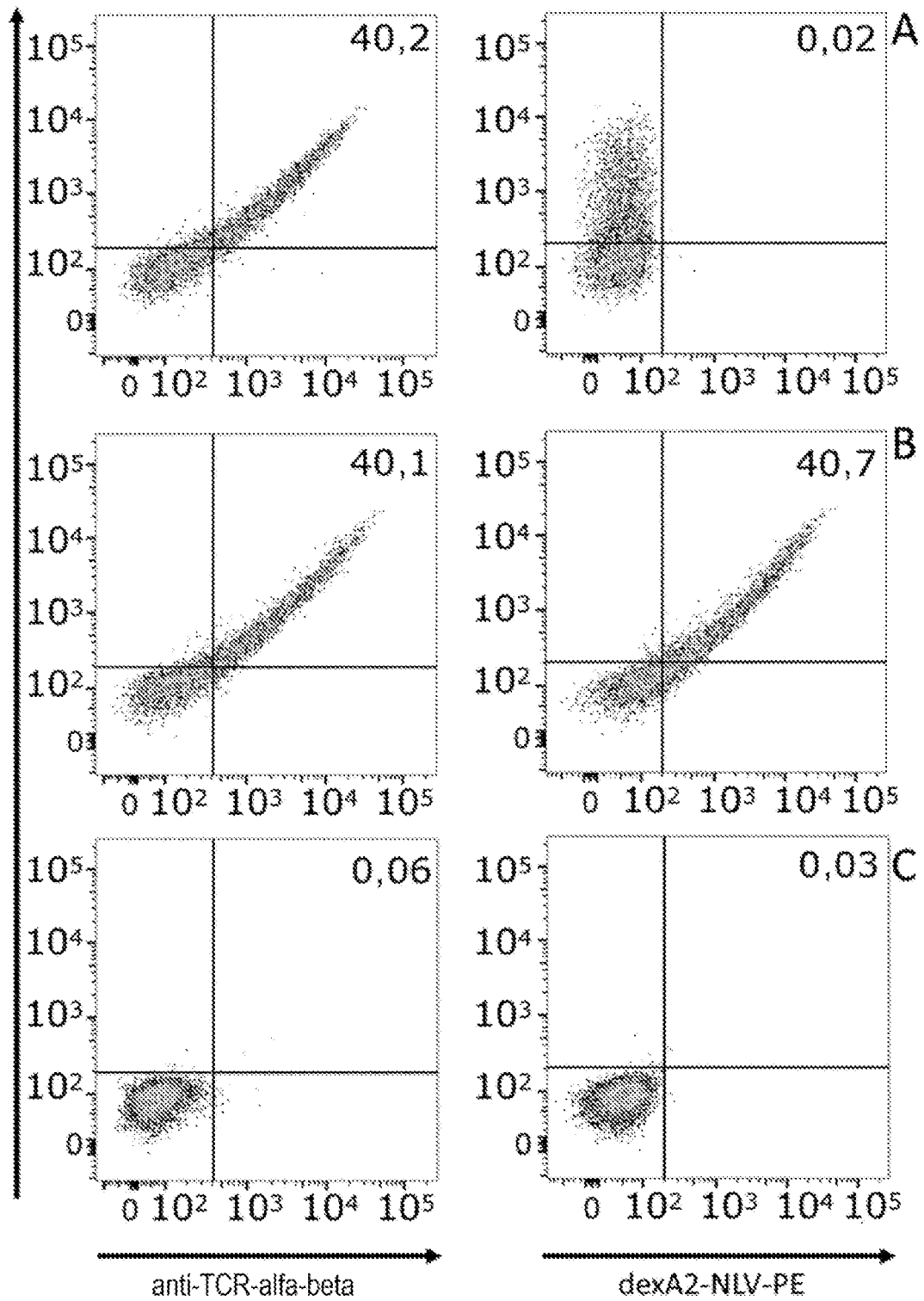


Figura 41

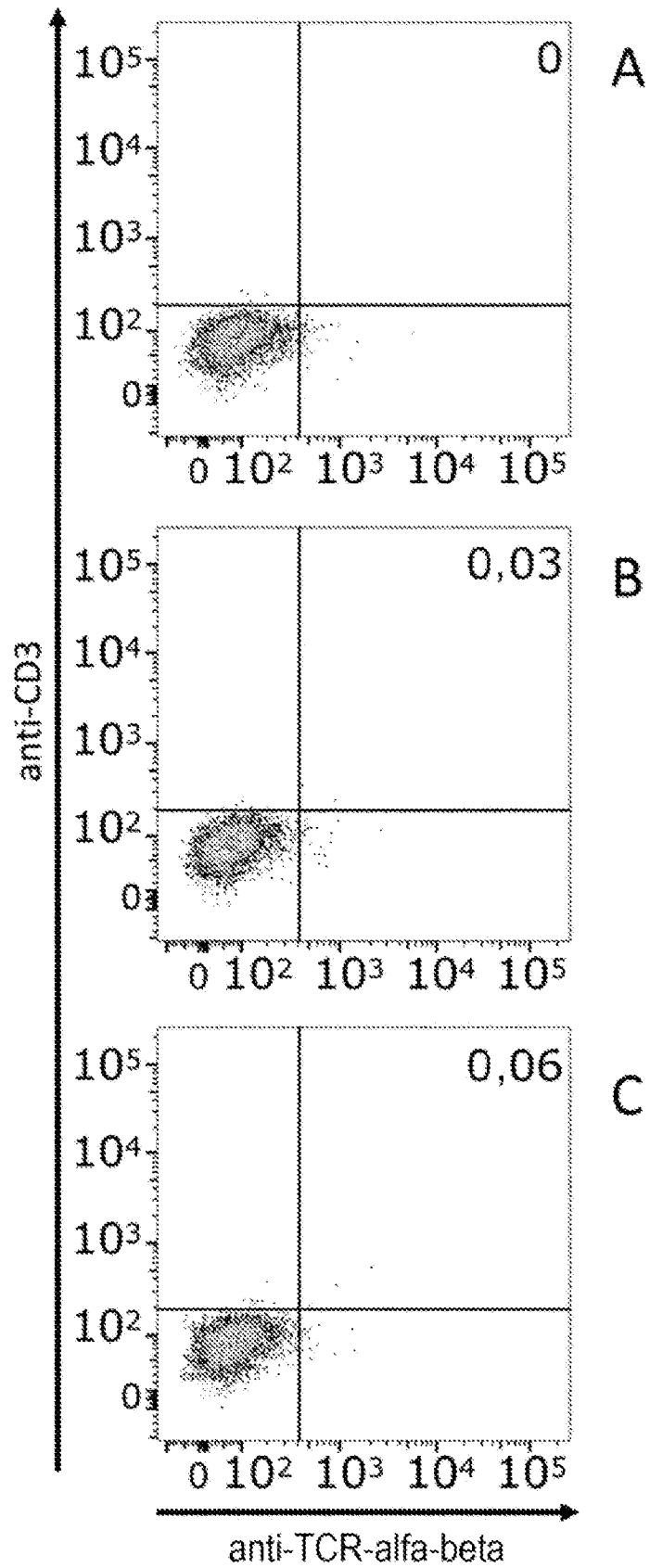


Figura 42

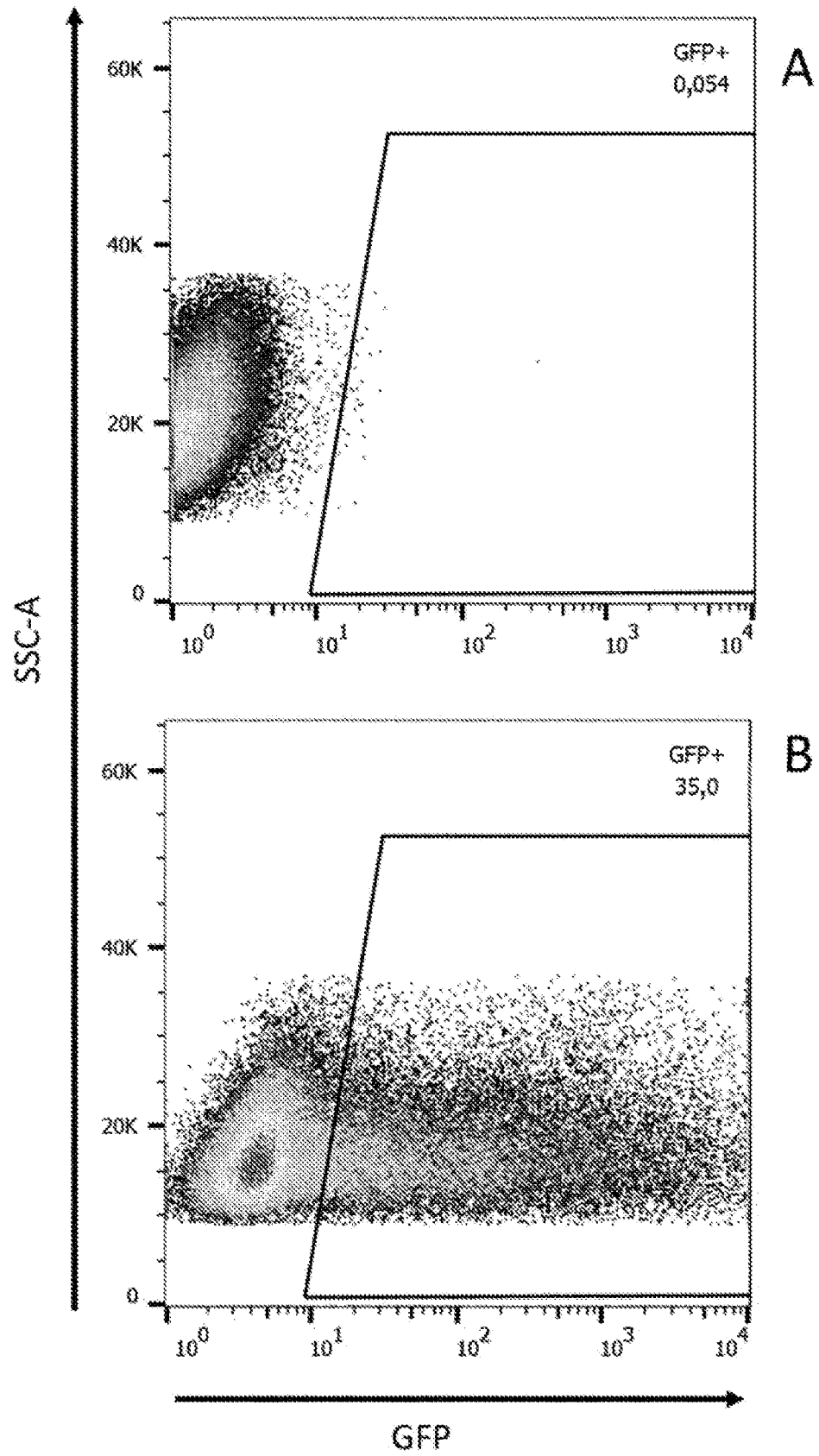


Figura 43

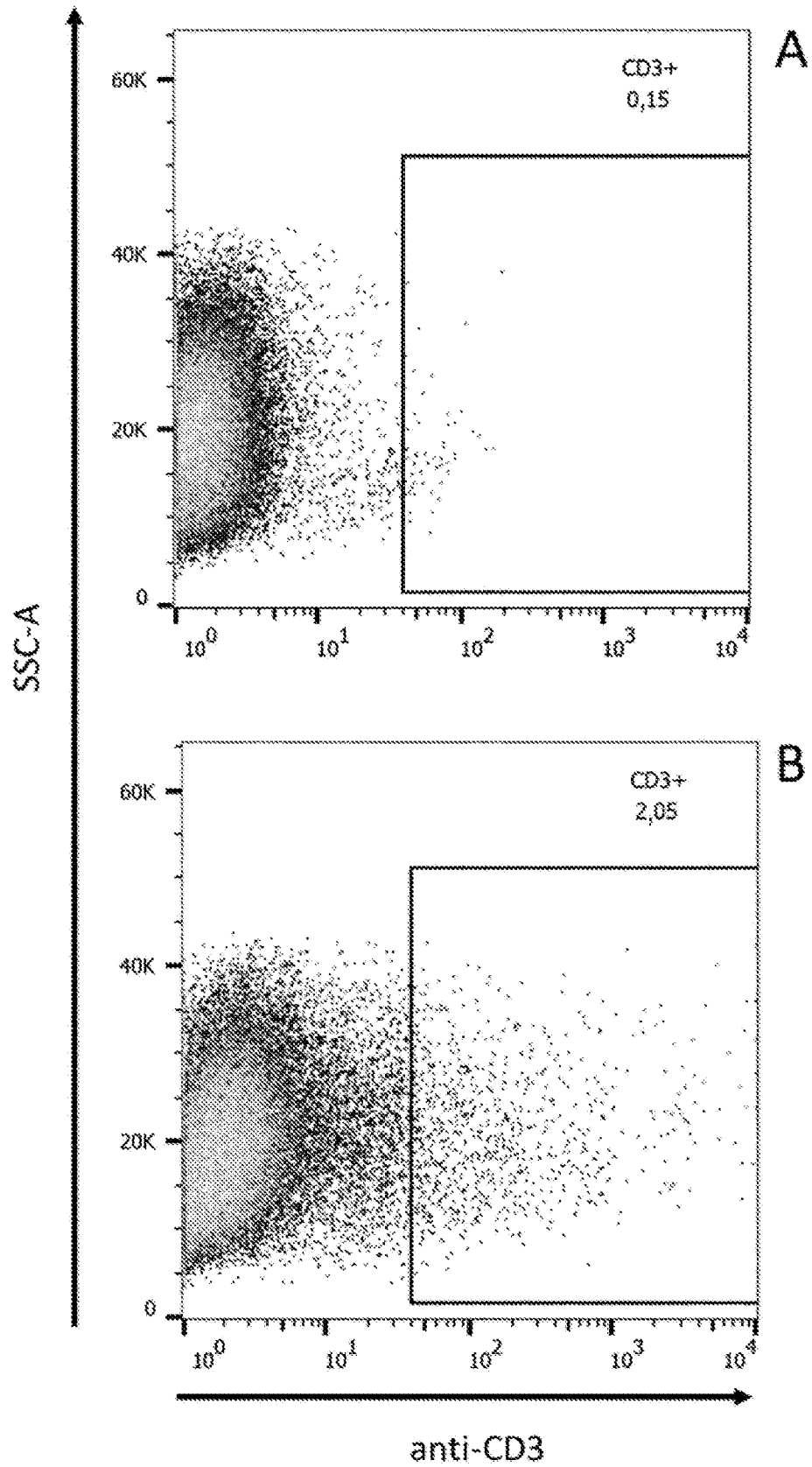


Figura 44

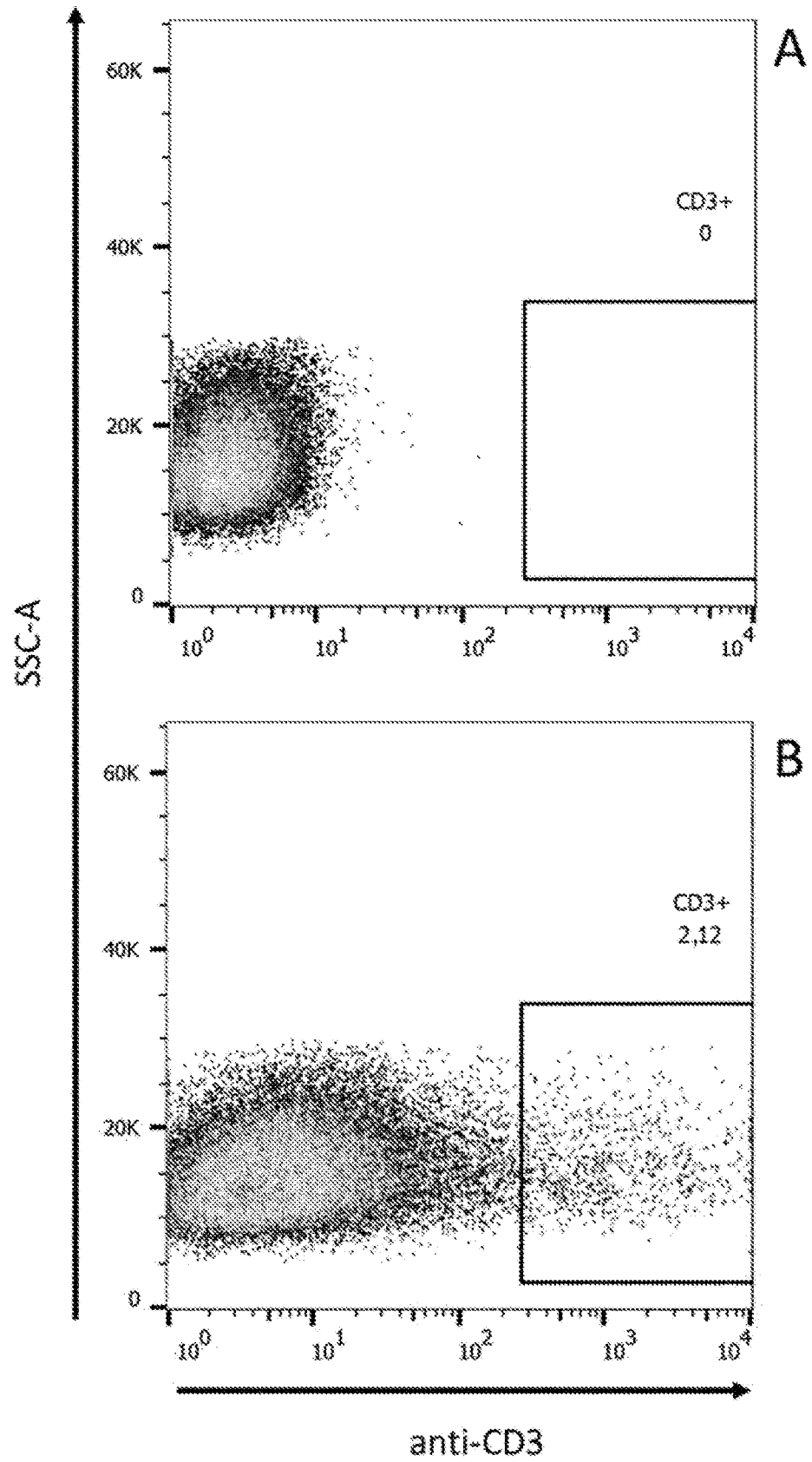


Figura 45

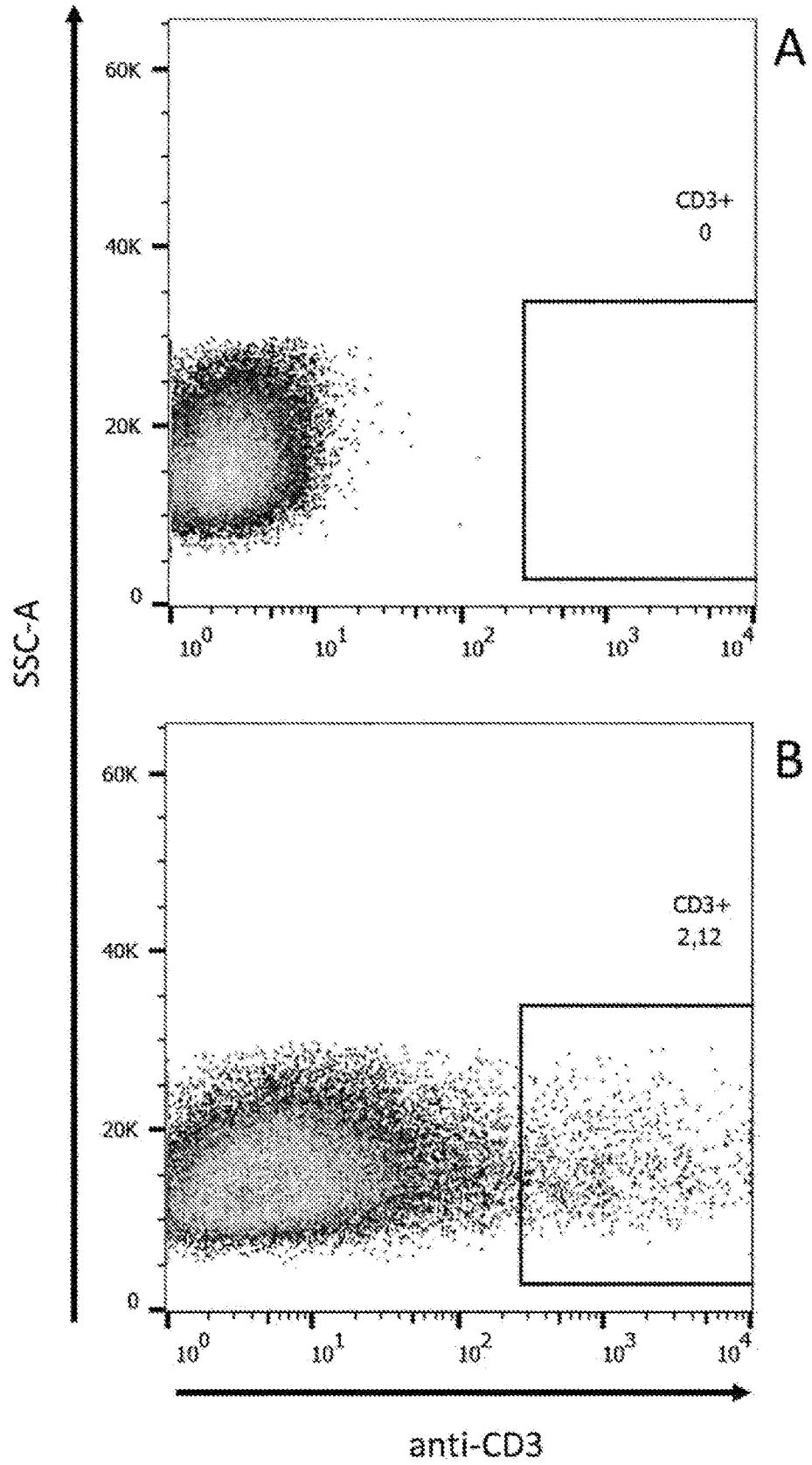


Figura 46

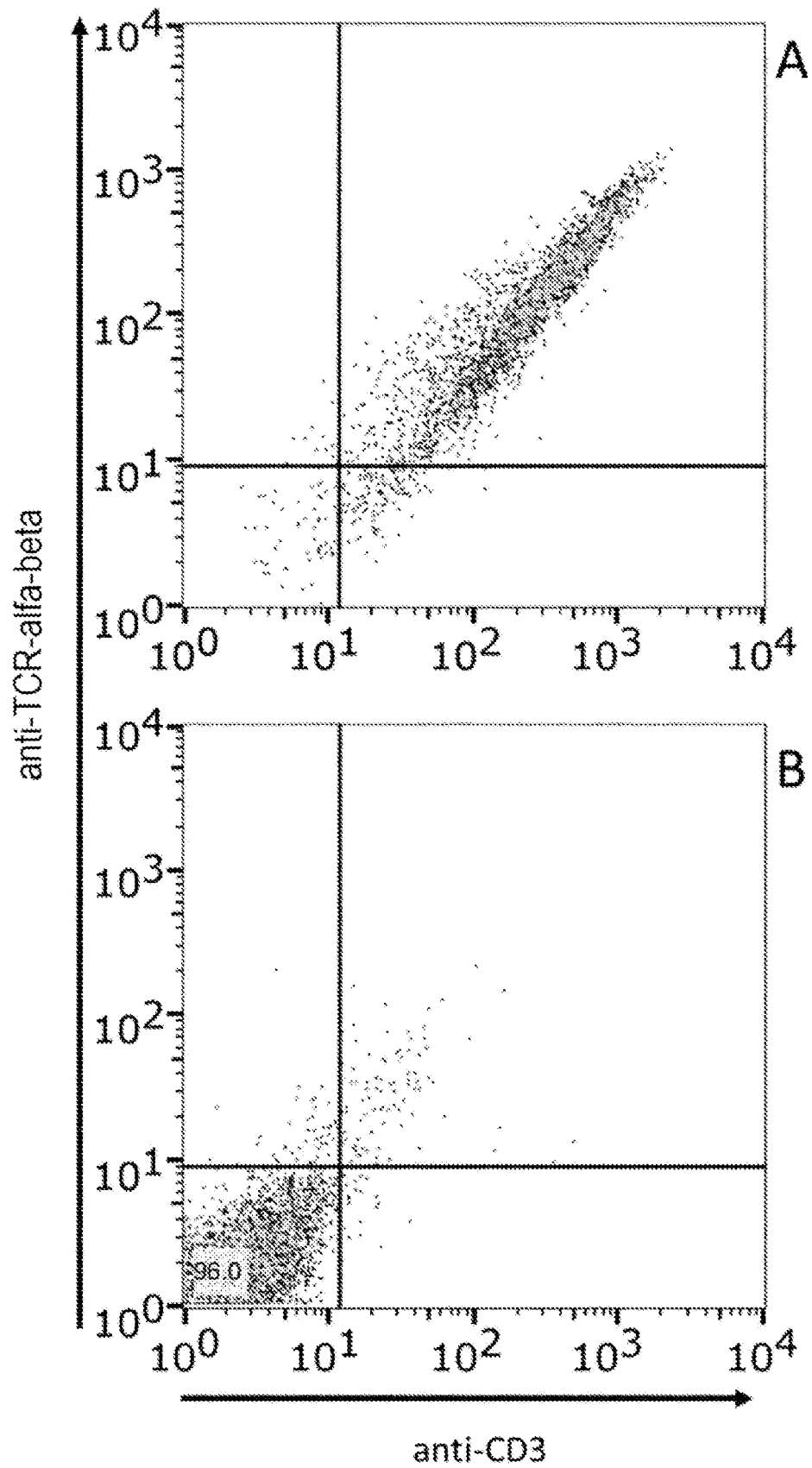


Figura 47

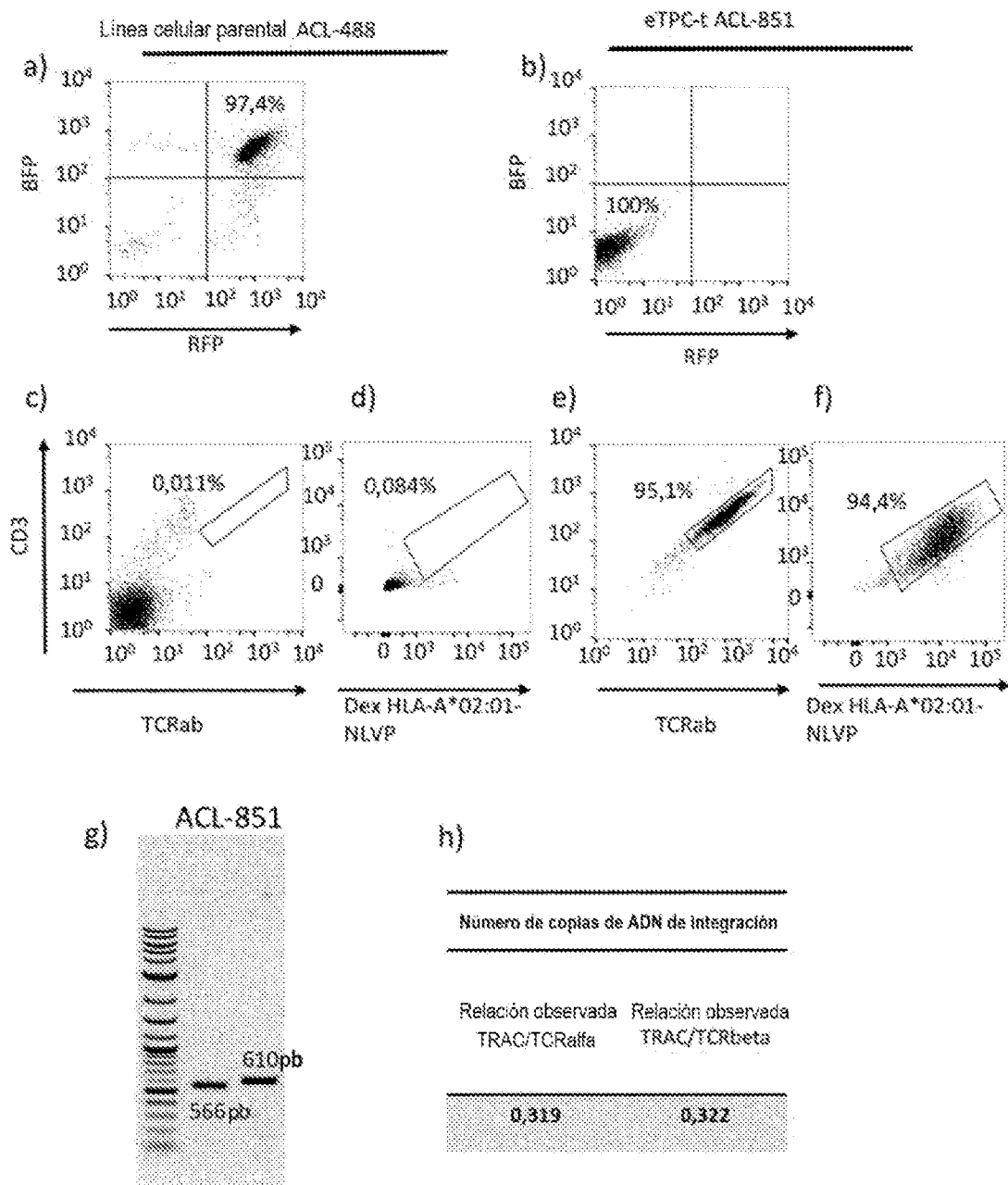
Tabla 1. Caracterización genética de monoclonos que contienen componente B

Línea celular	Ubicación genómica		Número de copias de componente B integrado			
	Integrado en el genoma	Integrado en el sitio de integración genómico {AAVS1}	Copias de gen de referencia/tul	Copias de componente B/tul	Relación observada	Relación esperada para una única integración del componente B
ACL-469	Si	Si	151	51.8	0,343	0,33
ACL-470	Si	Si	166	56.8	0,342	0,33

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

Línea celular	Ubicación genómica		Número de copias de componente B y D integrados			
	Integrado en el genoma	Integrado en el sitio de integración genómico {AAVS1}	Copias de gen de referencia/tul	Copias de componente B y D/tul	Relación observada	Relación esperada para una única integración del componente B y D
ACL-472	Si	Si	183	124	0,675	0,66

Figura 48



Tamaño esperado de TCRa: 566 pb

Tamaño esperado de TCRb: 610 pb

Figura 49

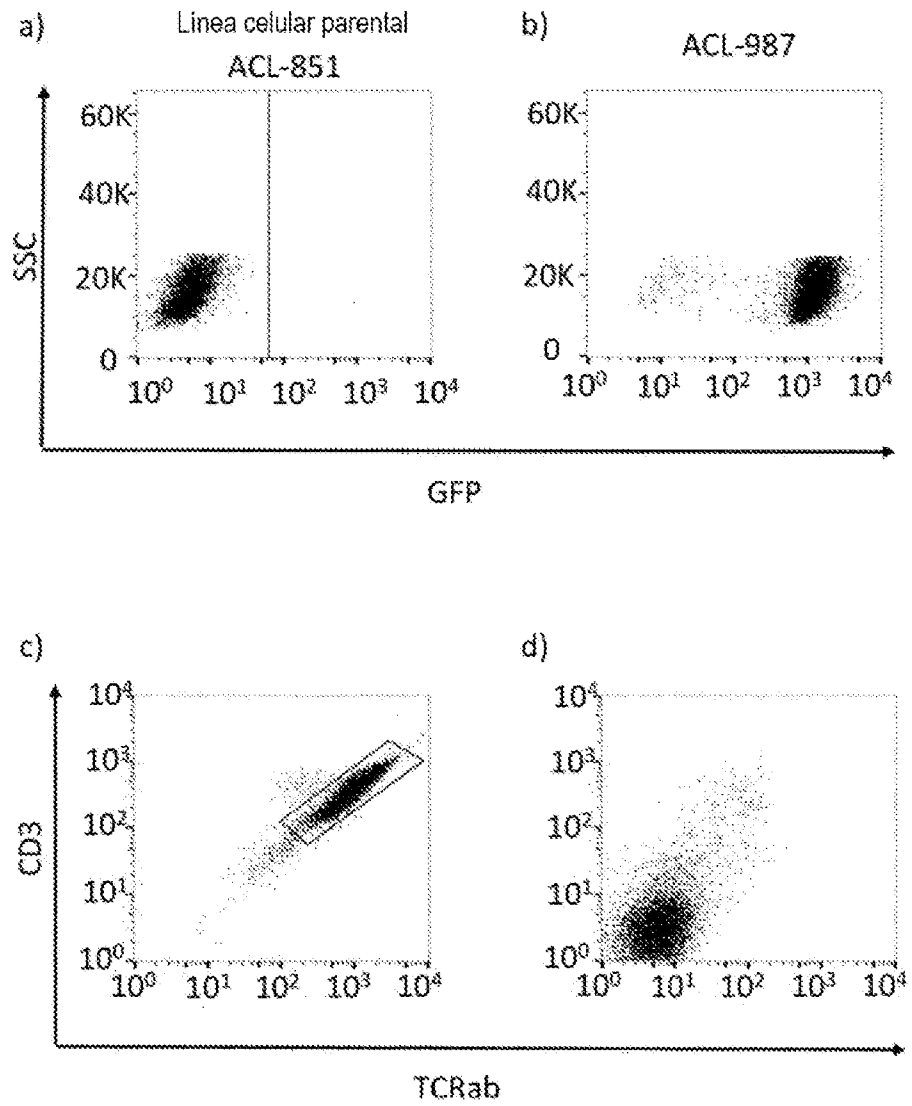


Figura 50

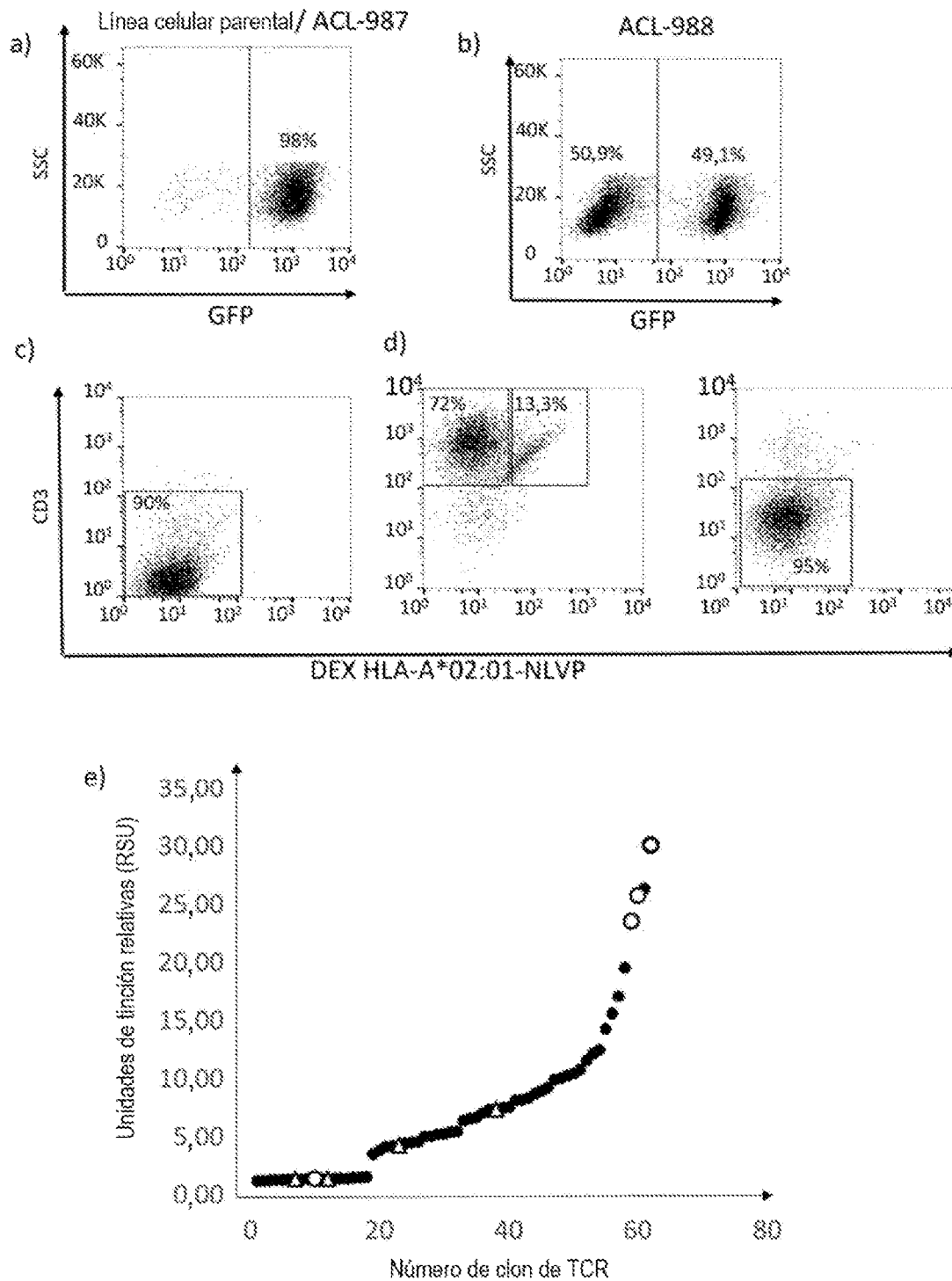


Figura 51

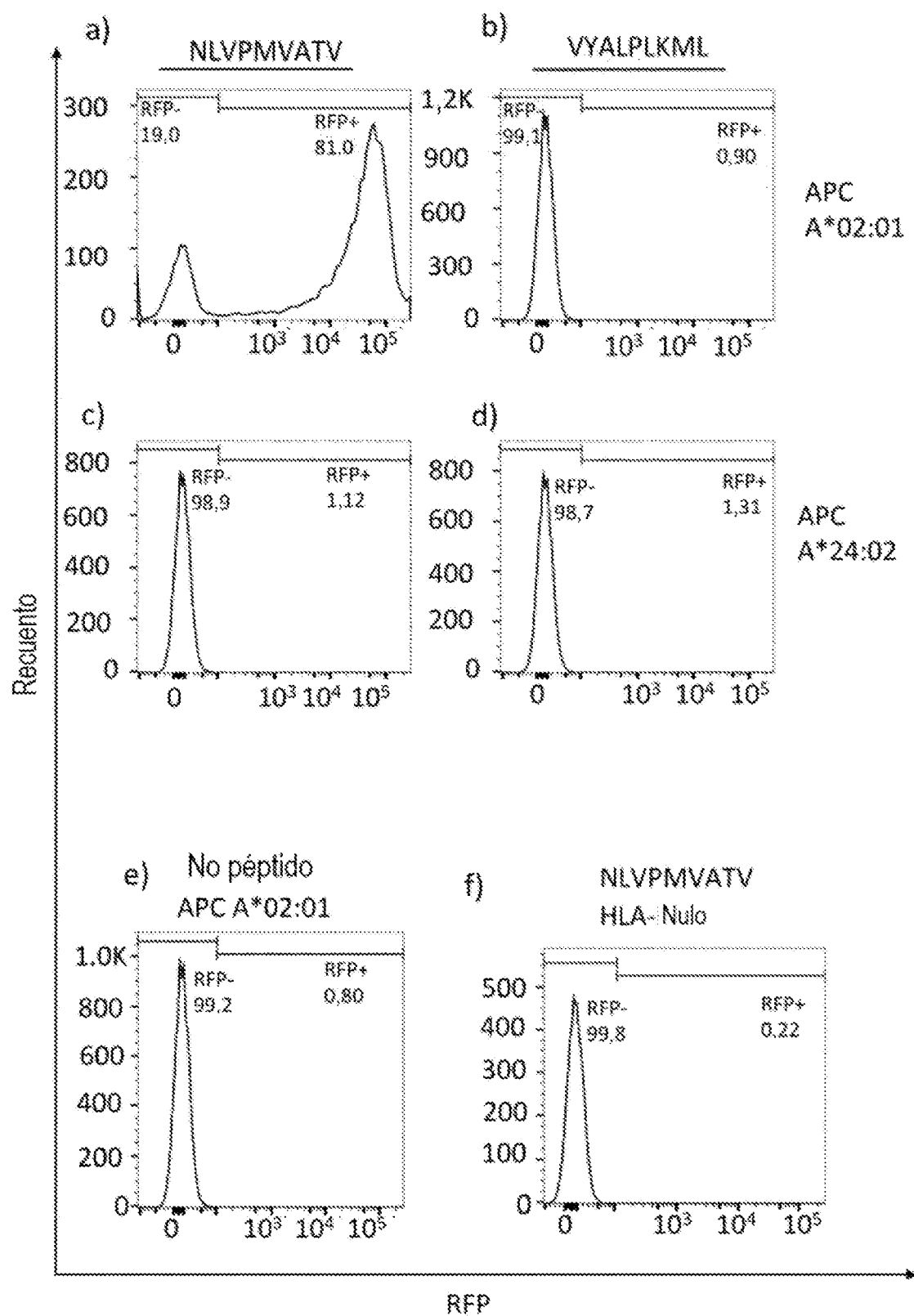


Figura 52

