

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 633**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2017** **E 22150892 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023** **EP 4039800**

54 Título: **Sistema multicomponente modificado por ingeniería para la identificación y caracterización de receptores de linfocitos T y antígenos de linfocitos T**

30 Prioridad:

07.11.2016 DK PA201670872

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.05.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 968 633 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

Sistema multicomponente modificado por ingeniería para la identificación y caracterización de receptores de linfocitos T y antígenos de linfocitos T

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la construcción, el ensamblaje y uso de un sistema multicomponente, que se compone de al menos tres componentes, una célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería (eAPC), un sitio de receptor genómico modificado por ingeniería y un vector donante genético coincidente. La presente invención se usa para la generación rápida y de alto rendimiento de células derivadas estables que presentan diversas formas de moléculas antigénicas para la identificación y caracterización de estos antígenos y secuencias de TCR relacionadas.

10

15 Introducción a la invención

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

20

25

30

Receptor de linfocitos T (TCR)

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

35

40

45 Diversidad de cadenas del TCR

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

50

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

55

60

Cada TCR recombinado presenta un potencial de especificidad de ligando única, determinado por la estructura del sitio de unión a ligando formado por las cadenas α y β en el caso de los linfocitos T $\alpha\beta$ o las cadenas γ y δ en el caso de los linfocitos T $\gamma\delta$. La diversidad estructural de los TCR está limitada principalmente a tres bucles en

65

horquilla cortos en cada cadena, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Tres CDR proceden de cada cadena del par de cadenas del receptor y, colectivamente, estos seis bucles CDR se asientan en el extremo distal a la membrana del dominio extracelular del TCR para formar el sitio de unión al antígeno.

5

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

10

15 *Complejo TCR:CD3*

Los pares de cadenas de TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ maduros se presentan en la superficie celular en un complejo con varias subunidades de CDR3 accesorias, denominadas ϵ , γ , δ y ζ . Estas subunidades se asocian con los TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ en forma de tres dímeros ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, ζ). Este complejo TCR:CD3 forma la unidad para la iniciación de respuestas de señalización celular después del acoplamiento de un TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ con el antígeno relacionado. Las CD3 accesorias asociadas como complejo TCR:CD3 contribuyen a motivos de señalización denominados motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM). CD3 ϵ , CD3 γ y CD3 δ contribuyen cada uno a un único ITAM mientras que el homodímero de CD3 ζ contiene 3 ITAM. Los tres dímeros de CD3 ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$) que se ensamblan con el TCR contribuyen, por tanto, con 10 ITAM. Tras la unión del TCR con el antígeno relacionado, la fosforilación de los restos de tirosina en tándem crea sitios de acoplamiento emparejados para proteínas que contienen dominios de homología Src 2 (SH2), tales como la crucial proteína asociada a la cadena ζ de 70 kDa (ZAP-70). El reclutamiento de tales proteínas inicia la formación de complejos de señalización TCR:CD3 que son responsables, en última instancia, de la activación y diferenciación de los linfocitos T.

20

25

30 *Linfocitos T $\alpha\beta$*

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

35

40

45 *Linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales*

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

50

55

HLA de clase I y II

Existen dos formas de complejos clásicos de HLA: HLA de clase I (HLAI) y HLA de clase II (HLAII). Existen tres genes de HLAI clásicos: *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*. Estos genes codifican una cadena α transmembrana, que se asocia con una cadena invariante de β 2-micro-globulina (β 2M). La cadena α de HLAI se compone de tres dominios con un pliegue de inmunoglobulina: α 1, α 2 y α 3. El dominio α 3 es proximal a la membrana y en gran medida invariante, mientras que los dominios α 1 y α 2 forman juntos la hendidura de unión a antígeno distal a la membrana polimórfica. Existen seis genes de HLAII clásicos: *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRA* y *HLA-DRB1*. Estos genes codifican complejos DP, DQ y DR heterodiméricos de HLA que comprenden

60

65

una cadena α y una cadena β . Cada cadena tiene dos dominios estructurales principales con un plegamiento de inmunoglobulina, donde los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ comprenden módulos próximos a la membrana y en gran medida invariantes similares a los del dominio $\alpha 3$ de HLA I. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ de HLA II forman juntos la hendidura de unión a antígeno distal a la membrana y son regiones de elevado polimorfismo.

5

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

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

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

35 *Selección tímica de los TCR $\alpha\beta$*

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

45

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

60

Linfocitos T $\alpha\beta$ no convencionales

Las formas no restringidas por HLA, o 'no convencionales', de linfocitos T $\alpha\beta$ tienen dianas de antígeno molecular muy diferentes. Estos linfocitos T $\alpha\beta$ no convencionales no se acoplan a los complejos de HLA clásicos, sino que se acoplan a proteínas similares a HLA conservadas tales como la familia de CD1 o MR1. La familia de CD1 comprende cuatro formas implicadas en la presentación de manera cruzada de antígenos (CD1a,b,c y d). Estos complejos de superficie celular tienen una cadena α que se asemeja a HLA-I, que forma heterodímeros con β 2-M. Una cavidad hidrófoba pequeña presentada en la superficie distal a la membrana de la cadena α forma un sitio de unión para antígenos basados en lípidos derivados de patógenos. Los linfocitos T citotóxicos naturales de tipo innato (linfocitos T iNK) son el ejemplo que mejor se entiende de reconocimiento de la familia de lípidos/CD1, representando los linfocitos T GEM otro ejemplo destacado. Se sabe que los linfocitos T iNK 'tipo I' interactúan fuertemente con el lípido α -GalCer en el contexto de CD1d. Estos linfocitos T iNK muestran una diversidad de TCR muy limitada con una cadena α de TCR fijada (V α 10/J α 18) y un número limitado de cadenas β (con un uso restringido de $\nu\beta$) y se han asimilado a receptores de reconocimiento de patrones moleculares innatos asociados a patógenos (PAMPS) tales como los receptores de tipo Toll y Nod. Por el contrario, los linfocitos T NK 'tipo II' presentan un repertorio de TCR más diverso, y parecen tener un modo más diverso de acoplamiento al complejo CD1d-lípido. Los linfocitos T GEM reconocen los glicolípidos derivados de micobacterias presentados por CD1b, sin embargo, solo están empezando a comprenderse los detalles moleculares de la presentación de antígenos por CD1a, b y c así como su reconocimiento de linfocitos T.

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

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

Linfocitos T $\gamma\delta$

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

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

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

caracterizado algunas dianas antigénicas de los linfocitos T $\gamma\delta$ y el marco molecular subyacente sólo se entiende escasamente.

5 La baja frecuencia de los linfocitos T $\gamma\delta$ periféricos y la dificultad para estudiar los linfocitos T residentes en tejidos de seres humanos han limitado el conocimiento de cómo este tipo importante y diverso de linfocitos T participan en las respuestas inmunitarias adaptativas. Esta área emergente de investigación requeriría tecnologías más fiables con las que capturar y caracterizar linfocitos T $\gamma\delta$ poco comunes, aislar sus pares de TCR e identificar sus antígenos relacionados.

10 *Antígenos y células presentadoras de antígeno*

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

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

Uso terapéutico de los TCR

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

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

presentados por HLA I en células cancerosas, y un desafío fundamental de este enfoque es la necesidad de que los antígenos sean específicos de células cancerosas.

5 Se ha considerado que dado que la interacción TCR-pHLA tiene afinidad relativamente baja, es probable que los TCR nativos sean subóptimos para terapias de linfocitos T con TCR manipulados genéticamente. Se han diseñado varios enfoques para TCR madurados por afinidad in vitro, de forma muy parecida a la maduración por afinidad de anticuerpos monocatenarios. Estos enfoques de maduración por afinidad de los TCR también utilizan de forma general formatos monocatenarios, en donde la región V de una cadena se fusiona a la región V de otra cadena para producir una construcción polipeptídica única. Tales polipéptidos individuales pueden usarse luego
10 en sistemas de exposición en fago o levaduras adaptados a partir de flujos de trabajo para la ingeniería de anticuerpos y que se hacen pasar por rondas de selección basándose en la unión a la diana. Existen dos limitaciones inherentes en dicho enfoque del TCR monocatenario en términos de producir pares funcionales de cadenas del TCR. En primer lugar, la selección se basa en la afinidad de unión a la diana. Sin embargo, se ha documentado bien que la afinidad del TCR no siempre está correlacionada con la intensidad o la competencia de la salida de señalización del TCR. En segundo lugar, la selección de construcciones monocatenarias basada en afinidad no siempre se traduce en afinidades equivalentes una vez que se reconstituyen como receptores de longitud completa.

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

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

Detección del repertorio de TCR en el diagnóstico clínico

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

Uso terapéutico y de diagnóstico de antígenos de linfocitos T

60 El punto fuerte fundamental de aprovechar las respuestas inmunitarias adaptativas se traduce en un desafío técnico fundamental ya que la exquisita especificidad de la interacción TCR-antígeno requiere un conocimiento detallado de los antígenos asociados específicamente a cada patógeno, célula cancerosa o enfermedad
65 autoinmune. Además, cada antígeno puede presentarse mediante un complejo presentador de antígeno específico, o alelo del mismo, de forma que el descubrimiento del antígeno debe hacerse para cada gen HLA y

- alelo correspondientes. Para varias enfermedades infecciosas como el VIH, la gripe y el CMV que están asociadas con respuestas inmunitarias adaptativas fuertes y que muestran generalmente jerarquías de respuesta de epítomos conservadas, se han cartografiado los epítomos más importantes en el contexto de algunos HLA comunes. De forma similar, se han hecho esfuerzos crecientes y sistemáticos en los campos del cáncer, de la
- 5 alergia y de la autoinmunidad para mapear los antígenos asociados a linfocitos T. Sin embargo, son procedimientos complicados y los esfuerzos para describir de forma sistemática los antígenos de linfocitos T asociados a distintos contextos clínicos se ven obstaculizados por la ausencia de protocolos eficientes, sólidos, rápidos y escalables.
- 10 Específicamente, las células cancerosas suponen un aspecto importante y difícil, ya que la mayoría de los péptidos presentados en la superficie de las células cancerosas son antígenos propios o muy similares a los propios. Por lo tanto, la selección tímica habrá eliminado los TCR que podrían reconocer fuertemente estos péptidos, al tiempo que el tumor evoluciona para evadir el reconocimiento inmunitario. Esto significa que las
- 15 respuestas inmunitarias potentes contra tumores establecidos son relativamente poco frecuentes y dianas difíciles de predecir o descubrir. Sin embargo, estas respuestas existen y, lo que es importante, se asocian generalmente con un mejor resultado. En la mayoría de casos, los antígenos asociados a tumores (TAA) tendrán características distintivas de los antígenos propios y se derivarán de proteínas que se sobreexpresan durante el desarrollo del cáncer, que de lo contrario estarían ausentes del tipo celular en esta etapa del desarrollo o alteradas específicamente por mutación genética o modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación.
- 20 Cuando está disponible, el conocimiento de dichos epítomos permite interrogar la respuesta de los linfocitos T asociados para realizar descubrimientos fundamentales, con fines de diagnóstico y, por ejemplo, como una prueba de eficacia de una vacuna. Es importante destacar que también proporcionan dianas muy específicas para la tolerización de linfocitos T en alergia y autoinmunidad y, de forma crucial, apuntan a dianas valiosas para
- 25 inmunoterapia específica y contra células cancerosas. Las neoplasias representan una diana especialmente valiosa ya que la promesa de inmunoterapias celulares y el progreso en las manipulaciones de linfocitos T se ven ralentizadas por una falta de TAA diana validadas más allá de los pocos casos donde se dispone de marcadores específicos para el tipo de cáncer.
- 30 A la vista del potencial de terapia celular y de la falta de dianas validadas, la identificación de antígenos de TCR prometedores sigue siendo uno de los cuellos de botella más acuciantes de la inmunoterapia basada en TCR, particularmente en el esfuerzo para tratar el cáncer.

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

- 35 En general, el desarrollo de terapias basadas en TCR sigue estando en sus primeras etapas y el éxito ha sido limitado. Los enfoques de diagnóstico, si bien tienen un inmenso potencial, rara vez se han aplicado en estudios clínicos controlados que pretendan evaluar patologías o respuestas a terapia en pacientes. Unas técnicas no desarrolladas suficientemente para la captura fiable de pares de cadenas de TCR nativas y el análisis
- 40 sistemático de interacciones TCR-antígeno con elevado rendimiento y en un contexto funcional de comunicación intercelular, ha sido el principal obstáculo para el desarrollo de terapias y diagnóstico basados en TCR.
- Los enfoques de secuenciación profunda han llevado a una mejor comprensión de la diversidad de los receptores de los linfocitos T en la salud y en la enfermedad. Sin embargo, estos enfoques se han centrado
- 45 generalmente en tramos cortos que abarcan las regiones CDR3, principalmente de la cadena β de TCR. La mayoría de los estudios han ignorado la contribución de la cadena α del TCR, y pocos han buscado analizar las cadenas $\alpha\beta$ emparejadas así como la especificidad de antígeno de los TCR considerados de interés. Los flujos de trabajo recientes utilizando encapsulación de células únicas y codificación genética ha permitido el emparejamiento de pares de cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ del TCR nativo y el análisis de secuencias de longitud completa;
- 50 sin embargo, dichos flujos de trabajo siguen siendo experimentales.
- Los pares de cadenas del TCR aislados pueden analizarse en términos de especificidad de antígeno en modos 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 tanto la generación de
- 55 todos los TCR individuales así como de los complejos pHLA relacionados. Esto supone un desafío técnico muy considerable, lento y con muy bajo rendimiento. Además, dicho análisis solo proporcionaría afinidades de interacción, que no están bien correlacionadas con características funcionales de formas predecibles.
- Hasta hace poco, el análisis funcional detallado de secuencias del TCR aisladas en un contexto celular se ha
- 60 limitado a laboriosos protocolos de transfección de pares de cadenas del TCR analito a linfocitos T primarios o a líneas de linfocitos T inmortales, y la detección de respuestas celulares mediante análisis por citometría de flujo tradicional de la activación celular, o detección de factores secretados desde células transfectadas en la exposición con antígeno. En una publicación reciente de Guo *et al.*, se comunicó la clonación rápida, expresión y caracterización funcional de cadenas de TCR emparejadas procedentes de células individuales (Molecular
- 65 Therapy – Methods and clinical development (2016) 3:15054). En este estudio, se expresaron pares de TCR $\alpha\beta$

humanos analito en una línea celular indicadora que carecía de expresión de TCR $\alpha\beta$, y que contenía un sistema indicador de proteína fluorescente verde (GFP) unido al promotor Nur77 que se activa tras la estimulación del TCR. Este sistema sigue siendo ineficiente debido a la falta de integración estandarizada del TCR en el genoma de la línea celular indicadora, y no proporciona una forma sistemática para la exposición con antígeno unido a células por un elemento APC.

De forma similar a los flujos de trabajo para identificar los TCR contra antígenos de linfocitos T conocidos, el descubrimiento de novo de antígenos de linfocitos T novedosos para la salud y la enfermedad sigue suponiendo un desafío considerable. La mayoría de los enfoques siguen siendo de naturaleza biofísica, y tienen como propósito producir antígenos candidatos que puedan ensayarse en protocolos de inmunización, o a través de la identificación de TCR afines como se ha tratado anteriormente. Existe poca o ninguna estandarización en el campo del descubrimiento de antígenos de linfocitos T, y el campo está restringido en gran medida al estudio académico.

Con el interés creciente en los TCR y su análogo para uso tanto terapéutico como de diagnóstico, y con la aparición de medios para capturar cantidades significativas de pares de cadenas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ nativas de TCR, todavía se carece de tecnologías fiables de alto rendimiento y estandarizadas para el análisis sistemático de interacciones TCR-antígeno. Debe señalarse que existe una falta de sistemas estandarizados para el análisis funcional de pares de cadenas de TCR en el contexto nativo de la comunicación celular en donde tanto el TCR como el antígeno son presentados por una célula viable. Además, existe una falta de medios sistemáticos para presentar grandes bibliotecas de antígenos candidatos a reactivos o células que portan TCR analito.

Uso terapéutico de antígenos de linfocitos T

Con el conocimiento en rápida expansión de la biología de los linfocitos T, existe un interés en expansión en el uso de antígenos de linfocitos T dentro de formulaciones terapéuticas. Predominantemente esto adopta la forma de una estrategia de inmunización de cierto tipo. De la manera más predominante, el uso de enfoques de secuenciación de próxima generación puede identificar un gran número de secuencias mutagenizadas de este modo en células tumorales. Tales secuencias pueden representar posibles antígenos de linfocitos T únicos para la célula cancerosa y, por tanto, pueden representar inmunógenos para vacunas terapéuticas personalizadas contra el tumor secuenciado. Sin embargo, con el gran número de mutaciones genéticas observables, no existe una manera de alto rendimiento de analizar estos posibles antígenos de linfocitos T para determinar su capacidad de presentarse por el repertorio de HLA del paciente, ni si estos antígenos son inmunogénicos. En la actualidad, las predicciones de unión a péptidos mutantes se realizan de manera computacional a través de un número muy pequeño de alelos de HLA. Estos modelos predictivos informan aproximadamente sobre si una secuencia peptídica dada se unirá a un HLA, y generalmente no predice la posible inmunogenicidad del antígeno unido. Además, tales modelos computacionales no son fiables para antígenos que no presentan residuos de 'anclaje' canónicos en relación con el alelo de HLA contra el que van a analizarse. Otros enfoques de inmunización requirieron el conocimiento detallado de los antígenos de linfocitos T, incluyendo, por ejemplo, terapias de tolerización para alergia y síndromes autoinmunitarios, y vacunación profiláctica contra patógenos. En este último caso de vacunas profilácticas, todavía existe un conocimiento sorprendentemente escaso sobre los antígenos de linfocitos T de patógenos comunes en todos, excepto en unos pocos alelos de HLA. Existe la necesidad de enfoques sistemáticos para expandir este conocimiento para desarrollar vacunas eficaces para patógenos comunes y emergentes.

DUPONT J *ET AL*: "Artificial antigen-presenting cells transduced with telomerase efficiently expand epitope-specific, human leukocyte antigen-restricted cytotoxic T cells", *CANCER RESEARCH*, 2006, 65(12):5417-5427 dan a conocer una APC artificial obtenida transduciendo fibroblastos NIH 3T3 murinos en primer lugar con HLA-A2, CD80, CD54, CD58, beta2-microglobulina y posteriormente con un antígeno tumoral T.

MARCUS O. BUTLER *ET AL*: "A panel of human cell-based artificial APC enables the expansion of long-lived antigen-specific CD4+ T cells restricted by prevalent HLA-DR alleles", *INTERNATIONAL IMMUNOLOGY*, 2010, 22(11):863-873 dan a conocer una APC artificial obtenida transduciendo células K562 deficientes en HLA de clase I y II con HLA-DRB1, CD80 y CD83. Estas células se cargaron con péptido para estimular los linfocitos T CD4+.

Descripción detallada de la invención

La presente invención aborda las necesidades anteriormente mencionadas. En particular, la presente invención se refiere a la construcción, el ensamblaje y uso de un sistema multicomponente, que se compone de al menos tres componentes, una célula presentadora de antígeno (eAPC) modificada por ingeniería, un sitio de receptor genómico modificado por ingeniería y un vector donante genético coincidente. La presente invención se usa para la generación rápida y de alto rendimiento de células derivadas estables que presentan diversas formas de moléculas antigénicas para la identificación y caracterización de estos antígenos y secuencias de TCR relacionadas. Específicamente, la eAPC se modifica por ingeniería mediante edición genómica para hacer que la APC sea nula para la presentación en la superficie celular de moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA),

moléculas similares a HLA y formas distintas de moléculas presentadoras de antígeno y moléculas antigénicas. Además, la eAPC como parte del sistema multicomponente contiene sitios de receptor genómico para la inserción de marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican moléculas presentadoras de antígeno, y opcionalmente la inserción de antígenos analito codificados genéticamente. El sistema comprende además
 5 vectores donantes genéticos diseñados para seleccionar como diana los sitios de receptor genómico de la APC para suministrar rápidamente los ORF que codifican complejos presentadores de antígeno y/o moléculas de antígeno analito. El sistema multicomponente puede usarse como sistema analítico en inmunodiagnóstico clínico. Además, la presente invención se refiere al uso del sistema multicomponente para identificar y caracterizar
 10 antígenos de linfocitos T y TCR relacionados para la producción de agentes inmunoterápicos y de inmunodiagnóstico.

La presente invención permite un sistema altamente estandarizado para el ensamblaje de diversas formas de eAPC analito en una manera sistematizada. Esta estandarización y sistematización se logran a través de integración genómica altamente definida y controlable del ORF del complejo presentador de antígeno y de la
 15 molécula antigénica con subsistemas de sitio de receptor genómico/vector donante coincidente. Este sistema controlable y predecible proporciona una eficiencia significativa al procedimiento que genera poblaciones de eAPC, reducción del tiempo de ciclo y costes para un procedimiento de este tipo. Los sistemas anteriores se han basado en integración aleatoria usando enfoques virales y/o integración genómica no guiada. Además, el diseño del sistema es en parte para asegurar el número de copias controlable del ORF integrado, habitualmente una
 20 única copia, lo que permite un control estricto sobre los niveles de expresión que pueden alcanzarse del producto de ORF integrado. Más importante aún, la capacidad de la integración de una única copia del ORF a partir de una agrupación de vectores permite la denominada "integración al azar", en donde cada célula integrada con un vector donante sólo puede recibir un único ORF de una biblioteca de vectores, que codifica posiblemente una población diversa de ORF. Esto permite la conversión de bibliotecas de ORF codificadas en vectores donantes,
 25 para dar bibliotecas de eAPC que expresan un único ORF analito deseado por subpoblación clonal de eAPC; representando esencialmente un sistema de alineamiento basado en células similar a un sistema de presentación en bacteriófago o levadura. Tales sistemas de alineamiento pueden facilitar la identificación de secuencias de antígeno analito desconocidas dentro de una biblioteca de secuencias, basándose en su TCR u otra reactividad de reactivo de afinidad cuando se presentan por una eAPC, y luego la recuperación de la
 30 secuencia "reactiva" desconocida de la eAPC portadora. Además, la integración al azar permite la producción eficiente de cada antígeno analito dentro de las células diana. Cuando se compara con la transfección transitoria de un gran agrupamiento de secuencias de antígeno analito, lo que daría como resultado niveles mínimos de transcrito disponibles para cualquier antígeno analito dado, cada célula en una biblioteca de eAPC generada por la integración al azar expresaría de manera robusta un único analito para la presentación en la superficie por una
 35 eAPC, facilitando la identificación de dicho antígeno analito por diversos medios.

La presente invención se refiere a la provisión de un sistema multicomponente modificado por ingeniería, cuyos componentes se usan para preparar una o más eAPC analito. Estas eAPC analito se combinan luego con uno o más TCR analito (colectivamente el sistema eAPC:TCR, eAPC:T) para obtener una o más salidas, en donde el
 40 TCR analito puede proporcionarse como reactivos solubles o inmovilizados, presentarse en la superficie de células o presentarse por partículas no basadas en células (NCBP). Las eAPC presentan antígenos analito candidatos al TCR analito.

La invención se define mediante las reivindicaciones.

La forma mínima del sistema multicomponente que comprende un primer componente como una eAPC, designada como componente A, que contiene un segundo componente como un sitio de receptor genómico
 50 componente B, y un tercer componente es un vector donante genético, designado como componente C (figura 1).

Una eAPC representa el componente base del sistema multicomponente, con el que están relacionados los demás componentes del sistema. Por tanto, la eAPC contiene determinadas características, que son nativas o modificadas por ingeniería, que hacen que la eAPC sea adecuada para su uso para crear poblaciones de eAPC
 55 analito, y su uso.

En el presente contexto, la eAPC, componente A

i. carece de expresión en superficie endógena de al menos una familia de complejo presentador de antígeno (aAPX) y/o molécula antigénica analito (aAM) y
 60

ii. contiene al menos un sitio de receptor genómico, designado como componente B

en donde i) puede obtenerse mediante la selección de una población celular que se produce de manera natural que carece de dicha expresión de aAPX y/o aAM, o puede modificarse por ingeniería para carecer de tal
 65 expresión, y ii) que es sintético y que puede introducirse por medio de integración genómica dirigida o no dirigida.

La selección de una célula eAPC candidata que carezca de expresión de aAPX y/o aAM de poblaciones celulares que se producen de manera natural puede lograrse mediante métodos que se conocen bien en la técnica. Esto puede lograrse directamente mediante la tinción de células diana con reactivos de afinidad específicamente para el aAPX y/o la aAM que se desea que carezcan de la eAPC, y la selección de células que carecen de la expresión de aAPX y/o aAM diana.

La modificación por ingeniería de células para carecer de expresión de aAPX y/o aAM puede lograrse mediante medios no dirigidos y dirigidos. La mutagénesis no dirigida de la célula puede lograrse proporcionando un mutágeno químico, radiológico u otro a la célula y, luego, seleccionando células que carecen de expresión de aAPX y/o aAM diana. La mutación dirigida de los loci genómicos puede lograrse por diversos medios que incluyen, aunque no de forma limitativa, mutagénesis dirigida mediante

i. nucleasas de dedos de cinc

15 ii. direccionamiento mediado por CRISPR/Cas9

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

20 en donde dichas nucleasas dirigidas al sitio inducen mutagénesis de error de reparación de ADN específica de sitio en locus diana, después de lo cual las células mutadas se obtienen seleccionando células que carecen de expresión de aAPX y/o aAM diana.

25 El componente A, eAPC, puede incluir opcionalmente correceptores de estimulación de linfocitos T adicionales, en donde tales características permiten formas robustas o variables de comunicación de la eAPC analito con las células presentadoras de TCR analito (TC analito), en donde la comunicación ajustable sea relevante para la identificación o caracterización de TCR analito y/o antígenos analito específicos. En el presente contexto, pueden fomentarse diferentes formas de ligamiento a CD28 en la TC analito mediante la inclusión de uno o más de CD80, CD 86 y/o adicionalmente proteínas de la familia de B7.

30 El componente A, eAPC, puede incluir opcionalmente de manera adicional componentes introducidos de molécula de adhesión a la superficie celular o la eliminación de moléculas de adhesión a la superficie celular endógenas, para fomentar el acoplamiento de la eAPC con la TC analito y la formación de la sinapsis inmunológica, o para evitar la unión estrecha y la formación de agrupamientos celulares perjudiciales dentro del sistema eAPC:T combinado, respectivamente. Tales moléculas de adhesión que pueden introducirse como ORF adicionales en el componente A, o extirparse genéticamente de A, pueden seleccionarse de la familia de integrinas de proteínas de adhesión.

40 Una eAPC puede presentar opcionalmente la capacidad de procesar y cargar el antígeno como carga en aAPX, designado como aAPX:aAM, mediante la maquinaria nativa de procesamiento y carga. Una eAPC que presenta la capacidad de procesar y cargar el antígeno como carga en un aAPX mediante la maquinaria de procesamiento y carga nativa, también procesará y cargará moléculas de carga (CM) que son intrínsecas a la eAPC o al sistema de cultivo en donde está contenida, en donde aAPX que está cargado con una CM se designa como complejo aAPX:CM (figura 17).

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

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

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

60 En una forma expandida del sistema multicomponente, el componente A eAPC puede contener además un segundo sitio de receptor genómico, un componente designado como D, que se acopla a un segundo vector donante genómico, designado como componente E, que también se añade al sistema (figura 2). Un sistema multicomponente puede comprender además una o más parejas de integración adicionales.

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

- i. eAPC-p
- ii. eAPC-a
- iii. eAPC-pa

5 en donde cada vector donante genético puede contener uno o más ORF que codifican uno o más aAPX y/o una aAM, para integrar dichos ORF en los sitios de receptor genómico acoplados, de tal manera que i) expresa al menos un aAPX, ii) expresa al menos una aAM y iii) expresa al menos un aAPX y al menos una aAM (figura 3).

10 El vector donante genético y los sitios de receptor genómico funcionan como un subsistema de pareja de integración del sistema multicomponente. Un vector donante genético debe combinarse primero con los ORF diana, de tal manera que el vector donante de base ahora codifica esos ORF diana. El vector donante cebado ensamblado se introduce luego en la eAPC diana para intercambiar el/los ORF diana al sitio de receptor genómico, integrando de ese modo los ORF diana en el sitio de receptor acoplado de la célula diana (figura 4).

15 Un sistema multicomponente que comprende vectores donantes genéticos, el componente C y/o E, puede combinarse con al menos un ORF que codifica al menos un aAPX y/o una aAM para obtener el componente C' y/o E', en donde la combinación se define como el ligamiento de material genético en lo(s) marcos(s) de codificación correcto(s) y en la(s) orientación/orientaciones correcta(s) del vector donante genético.

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

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

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

en donde la biblioteca discreta puede combinarse con el componente A múltiples veces para obtener una biblioteca discreta de eAPC con ORF únicos que codifican un aAPX y/o una aAM únicos, o una biblioteca agrupada puede combinarse con el componente A como un único evento para obtener una biblioteca agrupada de eAPC, cada una con ORF únicos que codifican un aAPX y/o una aAM únicos.

30 La integración eficiente de un número de copias predecible de uno o más ORF en el sitio de receptor genómico es muy ventajosa para el funcionamiento de una eAPC estandarizada, donde las poblaciones de eAPC analito pueden prepararse y caracterizarse rápidamente. Por tanto, el uno o más sitios de receptor genómico y el uno o más vectores donantes acoplados son críticos para la función de la eAPC. Además, se desea enormemente disponer de una eAPC en donde los componentes B y D están aislados entre sí, de tal manera que el componente C del vector donante no pueda integrarse en el componente B, y viceversa. Además, también se desea que el componente B y/o el componente D sean adecuados para un método de preparación de una eAPC, en donde la introducción de un único constructo que contiene aAPX y/o aAM definido es rápida, repetible, con una alta probabilidad de integración correcta y suministro sólo de un único analito.

El sitio de receptor genómico puede seleccionarse de los siguientes

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

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

50 iii. un sitio genómico nativo para la recombinación homóloga dirigida al sitio

en donde se prefiere i). El método de RMCE puede emplear sitios heteroespecíficos seleccionados que son específicos para enzimas recombinasas individuales, de tal manera que cada componente B y D tenga especificidad aislada.

55 Los sitios de receptor genómico, el componente B y/o el componente D, comprenden al menos uno de los siguientes elementos genéticos

i. Sitios de recombinasa heteroespecíficos

60 ii. Brazos homólogos

iii. Promotor eucariota

iv. Elemento regulador condicional eucariota

65 v. Terminador eucariota

- vi. Marcador de selección
- 5 vii. Sitio aceptor de corte y empalme
- viii. Sitio donante de corte y empalme
- ix. Gen no codificante de proteínas
- 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 de Kozak.

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

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

en donde

- 30 A) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible
- B) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1
- 35 C) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak
- D) es el elemento vi) un marcador proteínico codificado compatible con FACS y/o MACS
- E) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2
- 40 F) es el elemento v) terminador eucariota

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

45 5' -[A] [B] [C] [D] [E] [F] [G] [H] [I]- 3'

en donde

- 50 A) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible
- B) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 1
- C) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak
- 55 D) es el elemento vi) un marcador proteínico codificado 1 compatible con FACS y/o MACS
- E) es el elemento v) un terminador de la transcripción bidireccional eucariota
- 60 F) es el elemento vi) un marcador proteínico codificado 2 compatible con FACS y/o MACS
- G) es el elemento xv) una secuencia de consenso de Kozak
- H) es el elemento i) sitio de recombinasa heteroespecífico 2
- 65 I) es el elemento iii) un promotor eucariota constitutivo o inducible además,

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

Los componentes C y/o E comprenden al menos uno de los siguientes elementos genéticos

- 5
- i. Sitios de recombinasa heteroespecíficos
 - ii. Brazos homólogos
 - 10 iii. Promotor eucariota
 - iv. Elemento regulador condicional eucariota
 - v. Terminador eucariota
 - 15 vi. Marcador de selección
 - vii. Sitio aceptor de corte y empalme
 - 20 viii. Sitio donante de corte y empalme
 - ix. Gen no codificante de proteínas
 - x. Aislante
 - 25 xi. Elemento genético móvil
 - xii. Sitio de reconocimiento de meganucleasa
 - 30 xiii. Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)
 - xiv. Elemento f viral autoescindible
 - xv. Una secuencia de consenso de Kozak
 - 35 xvi. Marcador de selección de integración
 - xvii. Un casete de resistencia a antibióticos
 - 40 xviii. Origen de replicación bacteriano
 - xix. Origen de replicación de levadura
 - 45 xx. Un sitio de clonación

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

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

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

55 en donde

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

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

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

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

- 65 E) es el elemento xvii) un casete de resistencia a antibióticos y el elemento xviii) un origen de replicación

bacteriano, sin orientación específica

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

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

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

10 en donde

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

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

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

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

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

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

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

30 *Preparación de eAPC analito usando el sistema multicomponente*

El sistema multicomponente descrito anteriormente puede usarse de múltiples maneras para preparar distintas formas de eAPC analito, o bibliotecas de la misma, que sirven para presentar aAPX, aAM, aAPX:aAM y aAPX:CM analito al TCR analito dentro del sistema eAPC:T combinado en funcionamiento (véase la figura 27).

- 35 El sistema multicomponente que comprende una única pareja de integración puede usarse para preparar una eAPC-p a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con un ORF para un aAPX, de tal manera que este aAPX se integra en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado, y se presenta en la superficie celular (figura 5).

40 Puede usarse un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-p a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con un ORF para un aAPX, de tal manera que este aAPX se integra en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado, y se presenta en la superficie celular. La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración en el sentido de 3' (figura 6).

45 Puede usarse un sistema multicomponente que comprende una única pareja de integración para preparar una eAPC-a a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con un ORF para una aAM, de tal manera que esta aAM se integra en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa la aAM proporcionada, y se presenta en la superficie celular o se retiene de manera intracelular (figura 7).

50 Puede usarse un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-a a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con un ORF para una aAM, de tal manera que esta aAM se integra en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa la aAM proporcionada, y se presenta en la superficie celular o se retiene de manera intracelular. La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración en el sentido de 3' (figura 8).

55 Puede usarse un sistema multicomponente que comprende una única pareja de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con dos ORF, uno que codifica aAPX y el otro una aAM, de tal manera que tanto aAPX como aAM se integran en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa los aAPX y aAM proporcionados, y puede presentar un aAPX:aAM en la superficie celular (figura 9).

65 Puede usarse un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente A en una etapa, proporcionando el componente C' combinado con dos ORF, uno que codifica aAPX y el otro una aAM, de tal manera que tanto aAPX como aAM se integran en el sitio B, para crear

B'. La línea celular resultante expresa los aAPX y aAM proporcionados, y puede presentar un aAPX:aAM en la superficie celular. La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificar y puede usarse para etapas de integración en el sentido de 3' (figura 10).

5 Puede usarse un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente A en una etapa, proporcionando los componentes C' y E' combinados cada uno con un ORF que codifica un aAPX o una aAM, de tal manera que tanto aAPX como aAM se integran en el sitio B o D, para crear B' y D'. La línea celular resultante expresa los aAPX y aAM proporcionados, y puede presentar un aAPX:aAM en la superficie celular (figura 11).

10 Puede usarse un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente A en dos etapas, proporcionando el componente C' combinado con un ORF que codifica para un aAPX, de tal manera que este aAPX se integra en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado, y se presenta en la superficie celular (producto intermedio de eAPC-p).
 15 p). La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificar. En la segunda etapa se proporciona E' en donde el vector donante se combina con un ORF que codifica una aAM de manera que esta aAM se integra en el sitio E, para crear E'. La línea celular resultante expresa la aAM proporcionada, y esto puede procesarse y cargarse como carga en el aAPX para formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular (figura 12).

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

30 En los ejemplos mencionados anteriormente para preparar poblaciones de eAPC-p, eAPC-a y eAPC-pa analito a partir de eAPC, se usa el sistema multicomponente para proporcionar candidatos conocidos de aAPX y aAM de una manera definida para preparar poblaciones discretas de eAPC analito que expresan los aAPX y/o aAM definidos. Un procedimiento de este tipo puede repetirse muchas veces para construir bibliotecas de eAPC-p,
 35 eAPC-a y eAPC-pa para proporcionar al sistema eAPC:T combinado en el funcionamiento del sistema. Un enfoque alternativo es tomar bibliotecas agrupadas de ORF de aAPX y/o aAM candidatos combinados con vectores donantes genéticos, e integrar estos en una única reacción para obtener bibliotecas agrupadas de eAPC-p, eAPC-a o eAPC-pa analito que expresan múltiples aAPX, aAM y/o aAPX:aAM. Este procedimiento de conversión de una agrupación de vectores en una agrupación de eAPC-p, -a y/o -pa se denominará integración al azar. Esto es particularmente útil cuando se analizan grandes bibliotecas de aAM candidatas contra un aAPX
 40 fijado, o viceversa.

Puede usarse un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-pa a partir del componente A en dos etapas, proporcionando el componente C' combinado con un ORF que
 45 codifica para un aAPX, de tal manera que este aAPX se integra en el sitio B, para crear B'. La línea celular resultante expresa el aAPX proporcionado en la superficie celular (producto intermedio de eAPC-p). La segunda pareja de integración D/E permanece sin modificar. En la segunda etapa, se proporciona una biblioteca de múltiples E' en donde la biblioteca de vectores donantes comprende una agrupación de vectores, combinados cada uno con un único ORF que codifica una aAM de tal manera que cada aAM se integra en el sitio E, para
 50 crear E', dentro de células individuales. La agrupación resultante de células contiene una colección de células, en donde cada célula ha integrado un único ORF de aAM al azar de la agrupación original de vectores. La aAM integrada en la segunda etapa puede procesarse y cargarse como carga en el aAPX integrado en la primera etapa para formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular (figura 14).

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

65 Puede usarse un sistema multicomponente que comprende dos parejas de integración para preparar una eAPC-

pa a partir del componente A en una etapa, proporcionando los componentes C' y E' combinados cada uno con una biblioteca de ORF que codifican o bien una biblioteca de aAPX o bien una biblioteca de aAM, de tal manera que tanto aAPX como aAM se integran al sitio B o D, para crear B' y D'. La agrupación resultante de células contiene una colección de células, en donde cada célula ha integrado un único ORF de aAPX al azar y un único

5

ORF de aAM al azar de la agrupación original de vectores. Dentro de cada célula en la biblioteca agrupada, una aAM integrada puede procesarse y cargarse como carga en el aAPX integrado en la misma célula para formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular. Una biblioteca agrupada de este tipo contendría todas las combinaciones posibles de aAPX:aAM a partir del conjunto de aAPX y aAM proporcionados (figura 16).

10

En los métodos de integración al azar mencionados anteriormente para proporcionar bibliotecas agrupadas de eAPC-pa, la robustez del sistema se basa en una única copia del sitio de receptor genómico. Esto es para garantizar que sólo pueda introducirse un único analito en cada célula a través de la pareja de integración. Este sitio de receptor genómico de una única copia es un aspecto opcional de una eAPCS, ya que múltiples copias del mismo sitio de receptor genómico pueden ser beneficiosas al proporcionar etapas de integración en donde

15

múltiples 'alelos' de una biblioteca de vectores proporcionados pueden obtenerse en la eAPC preparada.

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

20

i. uno o más miembros de HLA de clase I

ii. uno o más miembros de HLA de clase II

iii. uno o más complejos presentadores de antígeno distintos de HLA.

25

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

i. un polipéptido o complejo de polipéptidos proporcionado como antígeno analito

30

ii. un péptido derivado de un polipéptido proporcionado como antígeno analito

iii. un péptido proporcionado como antígeno analito

iv. un metabolito proporcionado como antígeno analito

35

v. un polipéptido o complejo de polipéptidos traducido a partir del/de los ORF de la molécula antigénica analito

vi. un péptido derivado de un polipéptido traducido a partir del/de los ORF de la molécula antigénica analito

40

vii. un péptido derivado a partir de la alteración del proteoma del componente A

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

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

45

Puesta en contacto de la eAPC analito con TC analito

La presente invención se refiere a la provisión de un sistema multicomponente modificado por ingeniería. El componente A y uno o más componentes C' y/o uno o más componentes E' se usan para preparar una o más poblaciones de eAPC analito. Estas eAPC analito se combinan luego con uno o más TCR analito para compilar un sistema analítico eAPC:TCR (eAPC:T) para obtener una o más salidas (figura 27), en donde en la eAPC se proporciona el antígeno analito y en donde el TCR analito puede representarse mediante:

50

i. una molécula de TCR y/o

55

ii. una molécula con afinidad por el antígeno analito, y

en donde el TCR analito pueden presentarse a la eAPC de diferentes modos dentro de un sistema eAPC:T, representado como;

60

i. una célula presentadora de TCR analito (TC) y/o

ii. un reactivo de afinidad soluble o inmovilizado y/o

65

iii. una partícula no basada en células (NCBP),

en donde i) una célula presentadora de TCR analito (TC) se considera cualquier TC que pueda presentar un TCR

- analito a la eAPC; ii) un reactivo de afinidad se considera cualquier reactivo que se prepara como analito para estudiar mediante sonda la unión a TCR y/o la estimulación en la superficie celular de la eAPC en un sistema eAPC:T. Tales reactivos representarán a menudo un reactivo de multímero de TCR analito (por ejemplo, 'tetrámeros' de TCR) usados para teñir eAPC. Los reactivos de afinidad en este contexto también podrían
- 5 representar anticuerpos o entidades similares; iii) una partícula no basada en células (NCBP) actúa de manera similar a un reactivo de afinidad, en tanto que la partícula presenta un TCR analito u otra entidad que va a evaluarse para determinar el acoplamiento del antígeno analito en la superficie de una eAPC dentro de un sistema eAPC:T. Sin embargo, se considera que una NCBP es una entidad más grande que también puede
- 10 portar información genética u otra que actúe como identificador, o bien directamente o bien mediante un representante, del TCR analito presentado u otra entidad de unión. Un ejemplo típico de una NCBP sería un bacteriófago en un escenario de presentación en fago, en donde el fago puede presentar unión al antígeno del fragmento de anticuerpo (FAB). La eAPC marcada positivamente puede recuperarse junto con el fago y secuenciarse para identificar FAB específicos para el antígeno analito en la superficie de una eAPC.
- 15 Además, la presentación celular del TCR analito puede ser en forma de cualquiera de los siguientes
- i. un linfocito T primario
 - ii. un linfocito T recombinante
 - 20 iii. una célula presentadora de TCR modificada por ingeniería
 - iv. una célula modificada por ingeniería que presenta una molécula con afinidad por el antígeno analito denominados colectivamente TC analito.
- 25 Un sistema analítico eAPC:T se compone de una selección de una o más poblaciones de eAPC analito y más TCR analito (figura 27). Las poblaciones de eAPC analito se preparan usando el sistema multicomponente tal como se describió anteriormente (figuras 3 a 16). El sistema eAPC:T se proporciona en un formato que permite el contacto físico entre la eAPC analito y el TCR analito, en donde tal contacto es permisivo en cuanto a la
- 30 formación de complejos entre uno o más antígenos analito presentados por la eAPC analito y el TCR analito.
- Un antígeno analito representa cualquier entidad con la que supuestamente puede acoplarse un TCR analito en el sistema eAPC:T, y puede representarse mediante;
- 35 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
 - 40 iv. CM (una molécula de carga no analito) y/o
 - v. aAPX:CM (complejo presentador de antígeno analito que presenta una molécula de carga)
- 45 en donde un aAPX representa un complejo que puede presentar una aAM; una aAM es cualquier molécula que se reconoce 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 puede cargarse en el aAPX, pero que no es un analito, por tanto puede derivarse de una célula presentadora de antígeno (APC) analito o el propio sistema de ensayo; aAPX:CM es un aAPX con una CM cargada.
- 50 En el presente contexto, un sistema eAPC:T comprende:
- i. una entrada de una única eAPC analito; o
 - 55 ii. una entrada de una biblioteca agrupada de eAPC analito y combinada con una de las siguientes:
 - iii. una entrada de una única TC analito; o
 - iv. una entrada de un único reactivo de afinidad de afinidad analito; o
 - 60 v. una entrada de una única NCBP analito; o
 - v. una entrada de una biblioteca agrupada de TC analito; o
 - 65 vii. una entrada de una biblioteca agrupada de un reactivo de afinidad analito o

viii. una entrada de una biblioteca agrupada de NCBP analito

Puesta en contacto en un sistema de tampón

5 Se realiza un contacto entre una eAPC analito y la TC analito en un sistema de cultivo celular permisivo o medios tamponados, en donde dicho sistema comprende medios que son permisivos para la función tanto de eAPC analito como de células TC analito o reactivo de afinidad analito, o NCBP analito.

10 Puede realizarse un contacto entre un TCR analito soluble, un TCR analito inmovilizado y/o NCBP analito y una eAPC analito en un sistema tamponado permisivo, en donde dicho sistema comprende un medio tamponado que es permisivo para la función tanto del TCR analito como de las células eAPC analito.

Marcaje de eAPC con reactivos de afinidad o NCBP

15 Puede usarse una eAPC analito obtenida a partir del sistema multicomponente para la caracterización de un antígeno analito presentado por la eAPC. Tal caracterización puede realizarse de una manera en donde la eAPC analito se pone en contacto con una NCBP o un reactivo de afinidad inmovilizado o soluble de tal manera que se marca la eAPC (figura 24).

20 Puede considerarse que el marcaje que va a detectarse mediante observación directa del marcador a través de métodos tales como citometría de flujo, microscopía, espectrometría o luminometría o, de manera alternativa, por medio de captura con una NCBP o un reactivo de afinidad inmovilizado, para la identificación del antígeno analito.

25 *Definición de respuestas de señal*

30 Se usa una eAPC analito preparada a partir del sistema multicomponente para la caracterización de una respuesta de señal de la eAPC analito a TCR analito, en donde una respuesta de señal de este tipo puede ser binaria o graduada, y puede medirse como intrínseca a intrínseca a la eAPC (figura 21) y/o la TC analito, si se incluye (figura 20). Dichas señales pueden detectarse por métodos tales como citometría de flujo, microscopía, espectrometría o luminometría u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Método general - selección de una eAPC

35 El método para seleccionar una o más eAPC analito a partir de una eAPC analito de entrada o una biblioteca de eAPC analito, a partir del sistema eAPC:T combinado para obtener una o más eAPC analito, en donde el antígeno analito expresado se une a uno o más TCR analito comprende

40 i. combinar una o más eAPC analito con uno o más TCR analito dando lugar a un contacto entre un antígeno analito y el TCR analito y al menos uno de

ii. medir la formación, si la hay, de un complejo entre uno o más antígenos analito con uno o más TCR analito y/o

45 iii. medir una señal de un TCR analito marcado y/o

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

50 v. medir una respuesta de señal por la TC analito, si la hay, inducida por la formación de un complejo entre uno o más antígenos analito con uno o más TCR analito y/o y

vi. seleccionar una o más eAPC analito basándose en las etapas ii, iii, iv y/o v, en donde se realiza la selección mediante una medición positiva y/o negativa

55 en donde i, iv y vi o i, v y vi comprenden la disposición preferida.

Método general - selección de un TCR analito

60 El método para seleccionar uno o más TCR analito a partir de un TCR analito de entrada o de una biblioteca de TCR analito para obtener uno o más TCR analito, en donde el antígeno analito expresado se une a uno o más TCR analito comprende

65 i. combinar una o más APC analito con uno o más TCR analito, dando lugar a un contacto entre un antígeno analito presentado por la APC analito con uno o más TCR analito y

ii. medir la formación, si la hay, de un complejo entre uno o más antígenos analito con uno o más TCR analito y/o

iii. medir una señal de un TCR analito marcado y/o

5 iv. medir una respuesta de señal en la una o más TC analito, si la hay, inducida por la formación de un complejo entre el TCR analito con el antígeno analito y/o

v. medir una respuesta de señal, si la hay, por la APC analito inducida por la formación de un complejo entre uno o más TCR analito con uno o más antígenos analito y

10 vi. seleccionar una o más APC analito en las etapas ii, iii, iv y/o v, en donde se realiza la selección mediante una medición positiva y/o negativa

en donde i, iv y v comprenden la disposición preferida.

15 *Método general para la respuesta de señal*

Un método para seleccionar eAPC analito y/o TC analito y/o reactivos de afinidad y/o NCBP del sistema eAPC:T combinado basándose en una respuesta de señal notificada comprende

20 i. determinar una respuesta de señalización nativa y/o

ii. determinar una respuesta de señalización sintética, si la eAPC contiene un circuito de respuesta de este tipo, y/o si la TC analito contiene un circuito indicador sintético equivalente.

25 Se mide una respuesta de señal nativa o sintética inducida que es intrínseca de la APC y/o la TC analito mediante la detección de un aumento o una disminución de uno o más de los siguientes

i. una biomolécula secretada

30 ii. un producto químico secretado

iii. una biomolécula intracelular

35 iv. un producto químico intracelular

v. una biomolécula expresada en la superficie

vi. una acción citotóxica de la TC analito sobre la eAPC analito

40 vii. una acción paracrina de la TC analito sobre la eAPC analito de tal manera que se induce una respuesta de señal en la APC analito y se determina mediante la detección de un aumento o una disminución de uno cualquiera de los puntos i a v

viii. una proliferación de la TC analito

45

ix. una sinapsis inmunológica entre la TC analito y la eAPC analito

en donde dichas respuestas de señal detectadas se comparan con el estado de respuesta de señal no inducida intrínseca a la eAPC analito y/o la TC analito antes de ensamblar el sistema eAPC:T combinado y/o un sistema combinado ensamblado paralelo, en donde la eAPC analito y/o la TC analito pueden presentar un antígeno analito de control y/o especies de TCR analito y/o antígeno analito soluble que se sabe que no inducen una respuesta de señal dentro del sistema eAPC:T combinado en uso.

50

Método de selección por marcaje y/o respuesta de señal

55

Un método para seleccionar una eAPC analito y/o reactivos de afinidad analito y/o NCBP analito del sistema eAPC:T combinado basándose en un marcaje medible de una eAPC por dicho reactivo de afinidad o NCBP comprende;

60 i. Determinar un marcaje de la eAPC con un reactivo de afinidad o NCBP y también puede comprender

ii. Determinar una respuesta de señalización nativa y/o

iii. Determinar una respuesta de señalización sintética, si la eAPC contiene un circuito de respuesta de este tipo.

65

en donde seleccionar una eAPC y/o reactivo de afinidad y/o NCBP detectando el marcaje de la eAPC puede

comprender la detección del marcaje en superficie de la eAPC por un reactivo de afinidad y/o NCBP incluyendo un marcador detectable en el reactivo de afinidad y/o NCBP. Dichas marcas detectables pueden ser restos fluorescentes, luminiscentes, espectrométricos, químicos, radioquímicos o de afinidad. Por tanto, tal selección de eAPC puede realizarse basándose en metodologías de FACS, MACS o de selección y cribado de alto rendimiento equivalentes.

Resumen

Dentro del sistema eAPC:T combinado, es crítico medir una respuesta de señal en la una o más eAPC analito o en la una o más TC analito o el marcaje de una eAPC, que puede estar mediado por la formación de un complejo entre el antígeno analito con el TCR analito (figura 27, etapa iv) para la selección de salidas primarias del sistema (figura 27, etapa v), en donde las salidas primarias del sistema son células individuales o agrupaciones de células, y/o un único reactivo de afinidad o agrupaciones de reactivos de afinidad y/o una NCBP o agrupaciones de NCBP. La selección de células o reactivos puede realizarse en presencia o ausencia de una respuesta de señal notificada en cualquiera y/o ambas de las células de eAPC analito o de TC analito puestas en contacto, o mediante el marcaje medible de eAPC con un reactivo de afinidad o NCBP.

Obtención de salidas primarias del sistema a partir de la eAPC. Sistema T

La presente invención se refiere a la provisión de un sistema multicomponente modificado por ingeniería. El componente A y uno o más componentes C' y/o uno o más componentes E' se usan para preparar una o más poblaciones de eAPC analito. Estas eAPC analito se combinan luego con uno o más TCR analito a través del sistema eAPC:T para obtener una o más salidas. El TCR analito se proporciona como reactivos solubles o inmovilizados, presentados en la superficie de las células o se presentan por partículas no basadas en células (NCBP). La presentación celular del TCR analito puede ser en forma de cualquiera de los siguientes

i. un linfocito T primario

ii. un linfocito T recombinante

iii. una célula presentadora de TCR modificada por ingeniería

iv. una célula modificada por ingeniería que presenta una molécula con afinidad por el antígeno analito denominados colectivamente TC analito.

El sistema se compone de una selección de una o más poblaciones de eAPC analito y más de TCR analito (figura 27). Las poblaciones de eAPC analito se preparan usando el sistema multicomponente tal como se describió anteriormente (figuras 3 a 16). El sistema eAPC:T se proporciona en un formato que permite el contacto físico entre la eAPC analito y el TCR analito, en donde tal contacto es permisivo con respecto a la formación de complejos entre uno o más antígenos analito y la eAPC analito y TCR analito, en donde el antígeno analito es cualquiera de los siguientes

i. aAPX y/o

ii. aAM y/o

iii. aAPX:aAM y/o

iv. CM y/o v. aAPX:CM

y en donde el TCR analito se proporciona tal como se presenta por una TC analito, o bien se presenta por un reactivo de afinidad analito soluble o inmovilizado, o bien se presenta por una NCBP analito, para el posible acoplamiento con antígenos analito presentados por una eAPC analito, de tal manera que la formación de complejos puede conducir a la estabilización de un complejo de este tipo y en donde conduce al marcaje de la eAPC y/o a la inducción de señalización dentro de la eAPC analito y/o la TC analito, puede comunicarse y medirse.

Los modos de notificación de la respuesta de señal inducida y/o marcaje de la eAPC se han descrito anteriormente, y son estas respuestas y/o marcaje notificados los que deben medirse en la obtención de la salida primaria del sistema multicomponente compilado como un sistema eAPC:T.

Las salidas primarias del sistema eAPC:T son poblaciones de células seleccionadas y/o reactivos de afinidad seleccionados o NCBP seleccionadas, en donde se realiza la selección basándose en;

i. un marcaje medible de eAPC mediante un reactivo de afinidad o NCBP y/o

- ii. una respuesta de señal detectada en una eAPC y/o
- iii. falta de una respuesta de señal detectada en una eAPC y/o

5 iv. una respuesta de señal detectada en una TC analito y/o

v. una falta de respuesta de señal detectada en una TC analito;

10 en donde una salida primaria puede representarse como una célula individual, o una agrupación de células y/o NCBP o uno o más reactivos de afinidad asociados a eAPC.

15 Una selección del reactivo de afinidad analito, NCBP o TC analito y/o eAPC analito del sistema de eAPC:T combinado puede realizarse basándose en una respuesta en la célula que se pone en contacto. Es decir, puede seleccionarse una TC analito basándose en una respuesta notificada, o la falta de la misma, en la eAPC analito que se pone en contacto. Por el contrario, una eAPC analito puede seleccionarse basándose en una respuesta notificada, o la falta de la misma, en el TCR analito que se pone en contacto, o en el caso en donde la TC analito es un reactivo de afinidad o NCBP analito, el reactivo de afinidad o NCBP analito puede seleccionarse de la respuesta de eAPC.

20 Las salidas primarias de eAPC y/o TC analito del sistema son células seleccionadas, en donde se realiza la selección basándose en la presencia o ausencia de una respuesta de señal notificada en la eAPC o TC analito, y estas células pueden comprender una o más eAPC y/o una o más TC analito, en donde las células seleccionadas pueden comprender una célula individual, una agrupación de células de la misma identidad, una agrupación de células de diferentes identidades (figura 27, etapa v).

25 Las salidas primarias de reactivos de afinidad o NCBP analito del sistema son células seleccionadas con o sin reactivo de afinidad o NCBP asociados, en donde se realiza la selección basándose en la presencia o ausencia de un marcaje o una respuesta de señal notificada por la eAPC analito, en donde el reactivo de afinidad o NCBP seleccionados puede comprender un único reactivo de afinidad o NCBP, una agrupación de reactivos de afinidad o NCBP de la misma identidad, una agrupación de reactivos de afinidad o NCBP de identidades distintas (figura 30 27, etapa v).

Salidas de la composición binaria

35 Las señales notificadas en la eAPC analito y/o TC analito en un sistema eAPC:T combinado pueden usarse para seleccionar poblaciones de células analito para proporcionar las salidas primarias. En el presente contexto, una salida primaria de una eAPC analito puede lograrse en un caso en donde el sistema de eAPC:T combinado es de composición binaria de una o más eAPC analito con un TCR analito (por ejemplo, figura 24) seleccionando la población de eAPC analito deseada que está marcada con el TCR analito del sistema binario.

40 Puede obtenerse una salida primaria de un reactivo de afinidad analito o NCBP analito en un caso en donde el sistema eAPC:T combinado es de composición binaria de una o más eAPC analito con un reactivo de afinidad analito o NCBP analito (por ejemplo, figura 24) seleccionando la población de eAPC analito deseada que se ha marcado con el reactivo de afinidad analito o NCBP analito del sistema binario.

45 Una salida primaria de tipos de eAPC y/o TC analito puede lograrse a partir de un caso en donde el sistema eAPC:T combinado es de eAPC analito fijada y la naturaleza de la TC analito de biblioteca agrupada (por ejemplo, figura 22), o a partir de un caso en donde el sistema eAPC:T combinado es de TC analito fijada y la naturaleza de la eAPC analito de biblioteca agrupada (por ejemplo, figura 23) seleccionando la población de APC analito y/o TC analito deseada del sistema de cultivo combinado.

50 Una salida primaria de una eAPC analito puede lograrse a partir de un caso en donde el sistema de eAPC:T combinado es de TCR analito fijado y la naturaleza de la eAPC analito de biblioteca agrupada (por ejemplo, figura 24), o a partir de un caso en donde el sistema eAPC:T combinado es de eAPC fijada y la biblioteca agrupada de la naturaleza de NCBP o reactivo de afinidad analito soluble seleccionando la población de eAPC analito deseada del sistema de cultivo combinado.

55 Una salida primaria de un reactivo de afinidad analito o NCBP analito puede lograrse a partir de un ejemplo en donde el sistema de eAPC:T combinado es de NCBP analito o reactivo de afinidad analito soluble fijado y la naturaleza de la eAPC analito de biblioteca agrupada (por ejemplo, figura 24), o de un caso en donde el sistema de eAPC:T combinado es de la eAPC fijada y la biblioteca agrupada de la naturaleza de NCBP analito o reactivo de afinidad analito seleccionando la población deseada de reactivo de afinidad analito o NCBP analito del sistema de cultivo combinado.

65

Modos de obtención de salidas

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

5 Puede obtenerse una salida primaria de células TC analito y/o eAPC y/o de NCBP o reactivos de afinidad asociados con eAPC, clasificando células individuales para obtener una célula individual y/o clasificando células en una agrupación para obtener una agrupación de células.

10 Puede obtenerse una salida primaria de células TC analito y/o eAPC mediante clasificación de células individuales, y opcionalmente el sobrecrecimiento posterior de las células individuales para obtener una agrupación monoclonal de células TC analito o eAPC seleccionadas.

15 También puede obtenerse una salida primaria de células TC analito y/o eAPC clasificando las células en una agrupación para obtener una agrupación de células, y opcionalmente el sobrecrecimiento posterior de la agrupación de células para obtener una agrupación de células TC y/o eAPC seleccionadas.

Obtención de salidas del sistema terminales a partir de la eAPC. Sistema T

20 Con posterioridad a los métodos anteriormente descritos de obtención de salidas primarias, en donde las salidas primarias son eAPC analito y/o TC analito y/o NCBP analito seleccionadas, que se seleccionan basándose en una respuesta de señal medida o la formación de complejos estable, de tal manera que pueden obtenerse las salidas terminales del sistema eAPC:T a través de procesamiento adicional de las salidas primarias de eAPC y/o TC analito y/o NCBP seleccionadas (figura 27, etapa vi).

25 Las salidas terminales del sistema multicomponente son las identidades de

i. aAPX y/o

30 ii. aAM y/o

iii. aAPX:aAM y/o

35 iv. CM y/o

v. aAPX:CM y/o

vi. TCR

40 presentados por la APC analito o TC analito o un reactivo de afinidad analito o NCBP analito, y obtenidas como salidas primarias a partir del sistema multicomponente por su selección del sistema eAPC:T combinado.

45 Dentro del sistema eAPC:T, se da a menudo el caso de que las moléculas analito que se presentan por la APC analito y la TC analito están codificadas genéticamente. También puede darse el caso de que una NCBP analito tenga una identidad codificada genéticamente, por ejemplo, en el caso de que NCBP sea un bacteriófago. Por tanto, para identificar las moléculas analito presentadas por la eAPC analito o la TC analito o NCBP analito, puede realizarse la secuenciación genética de la eAPC, TC y NCBP analito preparadas.

50 Las salidas primarias seleccionadas pueden procesarse de tal manera que se obtenga la secuencia genética para el genoma o transcriptoma de las células clasificadas y/o expandidas para determinar la identidad de

i. aAPX y/o

55 ii. aAM y/o

iii. aAPX:aAM

iv. CM y/o

60 v. aAPX:CM y/o

vi. TCR analito

65 en donde las identidades obtenidas representan salidas terminales del sistema eAPC:T. La NCBP analito que presenta un componente genético puede procesarse de tal manera que se obtenga la secuencia genética para el genoma o transcriptoma de la NCBP clasificada para determinar la identidad del TCR analito, en donde las

identidades obtenidas representan las salidas terminales del sistema eAPC:T.

5 Puede procesarse eAPC de tal manera que se obtenga la secuencia genética para el componente B' y/o el componente D' de las células TC clasificadas y/o expandidas para determinar la identidad del antígeno analito, en donde la identificación obtenida del antígeno analito representa una salida terminal del sistema eAPC:T.

10 Puede procesarse TC analito de tal manera que se obtenga la secuencia genética para el genoma o transcriptoma de las células TC clasificadas y/o expandidas para determinar la identidad del TCR analito, en donde la identificación obtenida representa una salida terminal del sistema eAPC:T.

La secuenciación genética puede lograrse mediante una variedad de modos, y a partir de fuentes de material genético de disposición, con y sin procesamiento específico. La etapa de secuenciación puede estar precedida por

15 i. extraer el ADN genómico y/o

ii. extraer el transcrito de ARN de los componentes B' y/o D' y/o

20 iii. amplificar por una PCR y/o una RT-PCR el transcrito de ADN y/o ARN del componente B' y/o D'

La etapa de secuenciación puede ser destructiva para la eAPC o TC o NCBp, o una agrupación de las mismas, obtenidas como salidas primarias del sistema multicomponente.

25 Si se desean obtener salidas primarias del sistema eAPC:T en donde la etapa de secuenciación ha sido destructiva para la eAPC de salida primaria, la información de secuencia obtenida como salida terminal del sistema multicomponente puede usarse para preparar una eAPC de salida equivalente como eAPC analito.

30 En los escenarios descritos anteriormente de moléculas de analito codificadas genéticamente, pueden obtenerse las salidas terminales del sistema eAPC:T obteniendo información de secuencia a partir del componente B' y/o D' y/o a partir del genoma y/o transcriptoma de las células. Sin embargo, en algunas realizaciones, la información del antígeno no estará codificada genéticamente. Los antígenos modificados de manera postraduccional, antígenos proporcionados al sistema eAPC:T combinado a través de medios no genéticos, antígenos que surgen de un estado inducido o modificado del proteoma o metabolito de la eAPC analito, CM intrínseca al sistema eAPC:T, pueden no identificarse razonablemente a través de medios de secuenciación genética.

35 En el caso importante de una aAM que puede proporcionarse al sistema eAPC:T por medios no genéticos, existen dos modos distintos mediante los que 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 al aAPX y formar un complejo aAPX:aAM en la superficie celular (figura 18). Un ejemplo de sistema eTPC:dicha aAM sería un antígeno peptídico de un complejo HLA. En el segundo escenario, la aAM se proporciona en una forma que puede ser captada por la APC analito y procesarse de tal manera que se carga como carga en el aAPX y forma un complejo aAPX:aAM en la superficie celular (figura 19).

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

i. aislar un aAPX:aAM o un aAPX:CM o la aM de carga o la CM de carga e

50 ii. identificar la carga cargada

en donde la carga cargada identificada (CM o aAM) representa salidas terminales del sistema multicomponente.

55 De forma general hay dos modos mediante los que puede identificarse una molécula de carga a partir de una APC seleccionada. Primero, una liberación forzada de la carga del aAPX:aAM o aAPX:CM da como resultado un aislamiento de la aAM o CM que queda disponible para su posterior identificación (figura 25). Un ejemplo de esto sería el lavado con ácido de la eAPC para liberar la aAM peptídica de los complejos de HLA. En segundo lugar, la captura del aAPX:aAM o aAPX:CM, por ejemplo, mediante métodos de liberación del complejo y de aislamiento por inmunofinidad, da como resultado el aislamiento de los complejos aAPX:aAM o aAPX:CM, de tal manera que pueda identificarse la aAM o CM (figura 26).

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

65

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

en donde las identidades de aAM y/o CM contenidas son salidas terminales del sistema multicomponente.

5 *Determinar la afinidad del TCR analito por el antígeno analito usando el sistema eAPC: T*

Con posterioridad a los métodos descritos anteriormente para obtener salidas primarias, en donde las salidas primarias son células eAPC analito seleccionadas que se seleccionan basándose en una respuesta de señal medida, las salidas primarias de eAPC pueden someterse a un análisis de afinidad para determinar la afinidad del antígeno analito con un TCR analito relacionado en donde el antígeno analito es cualquiera de los siguientes

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

y en donde el TCR analito o bien se proporciona como reactivo de afinidad soluble o bien se presenta por una TC analito, o NCBP analito de tal manera que la afinidad del antígeno analito se determina según el siguiente método

- i. marcar la eAPC analito seleccionada con el TCR analito en el intervalo de concentraciones
- ii. realizar un análisis de FACS de las eAPC analito teñidas de la etapa a
- iii. determinar la intensidad del marcaje fluorescente de las eAPC analito en el intervalo de concentraciones del TCR analito
- iv. calcular la afinidad del antígeno analito por el TCR analito

En el presente contexto, la afinidad del antígeno analito también puede determinarse mediante el método descrito previamente, pero en donde también puede incluirse una referencia marcada, de tal manera que la afinidad se calcula usando la razón entre la intensidad de fluorescencia del antígeno analito con respecto a la intensidad de fluorescencia de referencia, en donde la referencia marcada se selecciona de

- i. la eAPC analito marcada con un reactivo de afinidad con respecto a uno del antígeno analito
- ii. una célula o partícula que presenta un antígeno analito de referencia marcado.

Leyendas de las figuras

La invención se ilustra adicionalmente en las siguientes figuras no limitativas.

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

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

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

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

Figura 3 - Preparación de diferentes eAPC presentadoras de antígeno analito

5 El MCS comienza con la eAPC y usa un(os) vector(es) donante(s) para crear células que expresan un complejo presentador de antígeno analito (aAPX), y/o molécula antigénica analito (aAM) en la superficie celular. Una eAPC que presenta aAPX solo se denomina eAPC-p, y puede crearse mediante la introducción de ORF(s) que codifica(n) aAPX en la eAPC (etapa i). Una eAPC que expresa aAM sola se denomina eAPC-a, en donde aAM puede expresarse en la superficie celular y estar disponible para el acoplamiento de TCR, o requerir procesamiento y carga como carga en un aAPX como el complejo aAPC:aAM. Una eAPC A puede crearse
10 mediante la introducción de ORF(s) que codifica(n) aAM en la eAPC (etapa ii). Una eAPC que presenta una aAM como carga en un aAPX se denomina eAPC-pa. Una eAPC-pa se ha producido mediante cualquiera de; la introducción de ORF(s) que codifica(n) aAM y aAPX en una eAPC simultáneamente (etapa iii); la introducción de ORF(s) que codifica(n) aAM en una eAPC-p (etapa iv); la introducción de ORF(s) que codifica(n) aAPX en una eAPC-a (etapa v).

15 Figura 4 - Funcionamiento de la pareja de integración de vector donante genético y sitio de receptor genómico

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

Figura 5 - Ejemplo de preparación de una eAPC-p en una etapa con una pareja de integración

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

35 Figura 6 - Ejemplo de preparación de una eAPC-p en una etapa con una pareja de integración y un sitio de integración sin usar

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

Figura 7 - Ejemplo de preparación de una eAPC-a en una etapa con una pareja de integración

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

50 Figura 8 - Ejemplo de preparación de una eAPC-a en una etapa con una pareja de integración y un sitio de integración sin usar

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

60 Figura 9 - Ejemplo de preparación de una eAPC-pa en una etapa con una pareja de integración

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

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

aAM como carga en el aAPX en la formación del complejo aAPX:aAM en la superficie celular.

Figura 10 - Ejemplo de preparación de una eAPC-pa en una etapa con una pareja de integración y un sitio de integración sin usar

5

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

10

Figura 11 - Ejemplo de preparación de una eAPC-pa en una etapa con dos parejas de integración

15

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

20

Figura 12 - Ejemplo de preparación de una eAPC-pa en dos etapas con dos parejas de integración a través de eAPC-p

25

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

30

35

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

40

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

45

50

Figura 14 - Preparación al azar de una agrupación de eAPC-pa a partir de una eAPC-p

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

55

60

Figura 15 - Preparación al azar de una agrupación de eAPC-pa a partir de una eAPC-a

La eAPC-a contiene el sitio de receptor genómico intercambiado B' que expresa una aAM y el sitio de receptor genómico distinto D. La agrupación de vectores donantes genéticos E' i-iii se acoplan a D. Los vectores donantes E' i-iii codifican cada uno un único gen de aAPX. La eAPC-a se combina con los vectores donantes E' i, E' ii, E' iii

65

simultáneamente. La agrupación de células resultante tiene cualquiera de los insertos E' i-iii intercambiado por el sitio de receptor genómico D en múltiples casos independientes para crear sitios D' i-iii suministrando cada uno un único ORF para un gen de aAPX. La agrupación de células de eAPC-pa resultante comprende una población mixta de tres cohortes celulares distintas que expresan cada una combinación discreta de la aAM codificada en B' y cualquiera de los genes de aAPX contenidos en la biblioteca de vectores inicial.

Figura 16 - Preparación al azar de bibliotecas de eAPC-pa agrupadas a partir de eAPC que contienen emparejamiento combinatorio de genes de aAM y aAPX

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

Figura 17 - Generación de eAPC-p:CM a partir de eAPC-p que expresa CM de carga intrínseca

En ausencia de la expresión de una aAM a partir de un sitio de recombinación genómica, la molécula de aAPX en una eAPC-p puede presentar una molécula de carga intrínseca CM en la superficie como un complejo aAPX:CM.

Figura 18 - Generación de una eAPC-p + aAM a partir de una eAPC-p y la adición de una aAM de antígeno soluble, presentable

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

Figura 19 - Generación de una eAPC-p + aAM de una eAPC-p y aAM eAPC-p soluble contiene el sitio de receptor genómico intercambiado B' que expresa un aAPX. Una aAM de antígeno soluble se combina con la eAPC-p, esto da como resultado la expresión del aAPX en la superficie celular, la presencia de aAM de manera intracelular y, por tanto, la carga de la aAM como carga en el aAPX en la formación del complejo aAPX:aAM en la superficie celular y la generación de un eAPC-p + aAM.

Figura 20 Funcionamiento de un sistema eAPC:T combinado que muestra posibles estados de salida de TC analito

La eAPC analito contiene sitios C' y E' integrados con un ORF cada uno para codificar un aAPX y una aAM, con la aAM cargado como carga en aAPX en la superficie celular. La TC analito expresa una TCRsp en la superficie. Cuando las poblaciones de TC y eAPC-pa analito se ponen en contacto, pueden lograrse cuatro estados de respuesta de TC analito, uno negativo y tres positivos. El estado negativo es el estado de reposo de la TC analito, con ausencia de intensidad de señal que indica el fracaso del complejo eAPC aAPX:aAM para estimular la TCRsp presentada por la TC analito. Tres estados positivos muestran una intensidad de señal creciente *, ** y *** indican una intensidad de señal baja, media y alta, respectivamente, como también se indica con un sombreado más oscuro de las células. Esto indica una respuesta graduada de la TCRsp analito expresada por la población de TC analito hacia aAPX:aAM analito presentado por la eAPC-pa.

Figura 21 Funcionamiento de un sistema eAPC:T combinado que muestra posibles estados de salida de eAPC-pa

La eAPC-pa analito contiene sitios C' y E' integrados con un ORF cada uno para codificar un aAPX y una aAM, con la aAM cargada como carga en aAPX en la superficie celular. La TC analito expresa una TCRsp en la superficie. Cuando las poblaciones de TC y eAPC-pa se ponen en contacto, pueden lograrse cuatro estados de respuesta de eAPC, uno negativo y tres positivos. El estado negativo es el estado de reposo de la eAPC analito, que indica el fracaso del par de cadenas de TCRsp para estimular el complejo aAPX:aAM presentado por la eAPC analito. Los tres estados positivos muestran una intensidad de señal creciente procedente del aAPX:aAM puesto en contacto. Tres estados positivos muestran una intensidad de señal creciente *, ** y *** indican una intensidad de señal baja, media y alta, respectivamente, como también se indica con un sombreado más oscuro de las células. Esto indica una respuesta graduada del aAPX:aAM analito hacia la TCRsp analito presentada por la TC analito.

Figura 22 Funcionamiento combinado de un sistema eAPC:T combinado para identificar pares de cadenas de TCR reactivos con aAPX:aAM analito a partir de una biblioteca de TC analito que expresa TCRsp analito discreta

5 La agrupación de TC analito expresa TCRsp variadas en la superficie. La eAPC-pa analito contiene sitios C' y E' integrados con un conjunto distinto de ORF para codificar un aAPX y una aAM, con la aAM cargada como carga en aAPX en la superficie celular. En el presente ejemplo, sólo la TCRsp expresada a partir de TC analito i es específica para aAPX:aAM presentado por la eAPC-pa, analito de tal manera que cuando la agrupación de TC analito y la población de eAPC- pa analito se ponen en contacto, sólo la cohorte celular de la TC analito expresa acoplamiento con TCRsp i.

Figura 23 Funcionamiento combinado de un sistema eAPC:T combinado para identificar aAM reactiva con TC analito a partir de una biblioteca de eAPC-pa analito que expresa complejos aAPX:aAM analito discretos

15 La eAPC analito contiene sitios C' y E' integrados con un conjunto distinto de ORF cada uno para codificar un aAPX y una aAM, con la aAM cargada como carga en aAPX en la superficie celular. La TC analito expresa una TCRsp definida en la superficie. En el presente ejemplo, sólo el complejo aAPX:aAM i es específico para la TCRsp presentada por la TC analito, de tal manera que cuando la agrupación de eAPC analito y la población de TC analito se ponen en contacto, sólo la cohorte de células que expresa aAM i expresa una señal *distinta.

Figura 24 - Funcionamiento de un sistema eAPC:T combinado para identificar el complejo aAPX:aAM reactivo con un TCR analito específico

25 La agrupación de eAPC-pa analito contiene sitios C' y E' integrados con un conjunto distinto de ORF cada uno para codificar un aAPX y una aAM i-iii, con la aAM cargada como carga en aAPX en la superficie celular. Un TCR analito, en forma de soluble, inmovilizado o NCBP presentado específico para un complejo aAPX:aAM distinto expresado por una subpoblación de la agrupación de eAPC-pa analito se pone en contacto con la agrupación de la eAPC-pa analito. En el presente ejemplo, sólo el aAPX:aAM i se formó a partir de la TCR analito de tal manera que sólo la cohorte celular de la agrupación de eAPC-pa analito que porta aAM i responde al TCR analito (gris oscuro).

Figura 25 - Identificación de la aAM presentada por un eAPC-p + aAM a través de la liberación forzada de la aAM

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

Figura 26 - Identificación de la aAM presentada por un eAPC-p + aAM a través de la captura del complejo aAPX:aAM

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

Figura 27 - Funcionamiento del sistema multicomponente para preparar eAPC analito para el ensamblaje de un sistema eAPC:T combinado

50 El sistema global en el que funciona el sistema celular multicomponente modificado por ingeniería (MCS) comprende poner en contacto células presentadoras de antígeno analito modificadas por ingeniería (eAPC) preparadas con diversos TCR analito en el ensamblaje del sistema eAPC:T combinado. Del sistema eAPC:T combinado se derivan salidas primarias, y de estas salidas primarias se derivan salidas terminales. El funcionamiento del sistema global comprende dos fases, la fase de preparación y la fase analítica. En un aspecto de la fase 1, se prepara el sistema multicomponente para preparar eAPC analito, y tales poblaciones analito pueden comprender eAPC-p, eAPC-a y/o eAPC-pa. Tales eAPC analito presentan diversas formas de restos antigénicos; complejos presentadores de antígeno analito (aAPX); moléculas antigénicas analito (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 analito representan aquellos que van a someterse a prueba para determinar la afinidad o la inducción de señal contra el TCR analito (etapa i). En otro aspecto de la fase 1, se preparan células (TC analito), partículas no basadas en células, reactivos solubles, reactivos inmovilizados que presentan pares de cadenas de TCR analito, u otros reactivos de afinidad con especificidad para el antígeno analito que se denominan conjuntamente TCR analito (etapa ii). La fase 2 del sistema global es la puesta en contacto de poblaciones de eAPC analito y TCR analito que se preparan en la fase 1, lo que da como resultado el ensamblaje de un sistema eAPC:T combinado (etapa iii). La eAPC analito puesta en contacto se une potencialmente a TCR analito en donde tal unión puede dar como resultado una formación de complejos estable. La formación de un complejo estable puede inducir una respuesta de señal en las entidades de eAPC analito y/o TC analito, y/o el complejo estable puede seleccionarse directamente. Dentro del sistema eAPC:T combinado, las salidas de las eAPC

analito o las TC analito pueden cambiar su estado de señal (indicado con *, y sombreado más oscuro) de modo que puedan identificarse aquellas especies sensibles (etapa iv). El estado alterado también puede ser en forma de selección directa de eAPC que forma un complejo estable con el TCR analito. Basándose en estados de señal alterados dentro del sistema eAPC:T, eAPC analito y/o TC analito específicas pueden seleccionarse según su capacidad para inducir respuesta entre sí, o seleccionarse basándose en el fracaso para inducir una respuesta de este tipo, y/o en la selección directa del propio complejo estable. La selección basada en esta capacidad de respuesta o complejo estables proporciona las salidas primarias del sistema eAPC:T combinado (etapa v). Al obtener las células analito o TCR analito de la etapa v, los aAPX, aAM, aAPX:aAM, CM, aAPX:CM y/o TCR analito presentados y/u otros reactivos de afinidad con especificidad para el antígeno analito, pueden identificarse como la salida terminal del funcionamiento del dispositivo (etapa vi).

Figura 28 - Selección de células con mutagénesis dirigida de los loci de HLA-A, HLA-B y HLA-C en la línea celular HEK293

- 15 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 que seleccionan como diana los loci de HLA-A, HLA-B y HLA-C (histograma de color gris) en comparación con células de control HEK293 (histograma de línea discontinua). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la ventana del subconjunto de GFP se clasificaron como una población policlonal, b) La señal de HLA-ABC en la superficie celular observada en las dos poblaciones policlonales clasificadas cuando se marcan con un anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 (histograma de color gris). Las células individuales que mostraron una baja señal de anticuerpo anti-HLA-ABC con PE-Cy5 y se presentaron visualmente dentro de la ventana de clasificación se clasificaron para establecer monoclonales. Las células HEK293 no marcadas (histograma de línea discontinua) y las células HEK293 marcadas con anticuerpo anti-HLA-ABC con PE-Cy5 (histograma de línea de color completamente negro) sirvieron como controles.

Figura 29 - Análisis fenotípico de monoclonales de HLA-ABC^{nulo}: Se tiñeron poblaciones de monoclonales con el anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5, y se analizaron mediante citometría de flujo (histograma de color gris). Las células HEK293 no marcadas (histograma de línea discontinua) y células HEK293 marcadas con anticuerpo anti-HLA-ABC con PE-Cy5 (histograma de línea de color completamente negro) sirvieron como controles. Las tres líneas monoclonales mostraron una señal fluorescente que coincide con controles no marcados que demuestra que cada línea carecía de expresión en superficie de HLA-ABC.

Figura 30 - Caracterización genética de una selección de monoclonales que carecen de expresión de HLA-ABC en superficie que demuestra una delección genómica en los alelos de HLA seleccionados como diana. Se generaron amplicones de PCR con cebadores que abarcaban los sitios diana genómicos de ARNg de alelos de HLA específicos y se determinó su tamaño mediante electroforesis. El tamaño esperado del amplicón de HLA-A de tipo natural es de 1067 pb, el amplicón de HLA-B es de 717 pb y el amplicón de HLA-C es de 1221 pb.

Figura 31 - Selección de células con integración genómica dirigida del componente B sintético con o sin el componente D sintético

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

Figura 32 - Análisis fenotípico de monoclonales de eAPC

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

Figura 33 - Caracterización genética de una selección de monoclonales para la integración del componente B o los componentes B y D en el locus AAVS1.

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

10 Figura 34 - Selección de células con integración genómica dirigida del componente C' en el componente B

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

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

25 Figura 35 - Análisis fenotípico de monoclonales de eAPC-p que expresan la proteína de HLA de clase I en la superficie celular

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

35 Figura 36 - Caracterización genética de una selección de monoclonales que demuestra que sus genomas integraron el componente C', y que la integración se produjo en el sitio de receptor genómico de AAVS1, generando el componente B'

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

45 Figura 37 - Selección de células con integración genómica dirigida del componente C' en el componente B

50 a) Señal de fluorescencia de GFP 48 horas después de la transfección con plásmidos que codifican Cas9- P2A-GFP, ARNg que seleccionan como diana el locus AAVS1 y el componente C' ^{HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*01:01} (panel izquierdo) o el componente C' ^{HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01} (panel derecho). Las células que tenían una señal de GFP dentro de la ventana de GFP+ se clasificaron como una población policlonal.

55 b) Expresión en superficie de la célula de HLA analito observada en las dos poblaciones policlonales clasificadas cuando se marcan con un anticuerpo anti-HLA-DR,DP,DQ conjugado con Alexa647 (histograma de color gris). Las células individuales que mostraron una alta señal de anticuerpo anti-HLA-ABC con Alexa 647 y se presentaron dentro de la ventana de clasificación derecha se clasificaron para establecer monoclonales. La señal detectada a partir de ACL-128 marcada con anticuerpo anti-HLA-ABC con Alexa 647 (línea celular de eAPC HLA-ABC ^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ ^{nulo}) (histograma de línea discontinua) y la línea celular de tipo natural ARH (histograma de línea de color completamente negro) sirvió como controles

60 Figura 38 - Análisis fenotípico de monoclonales de eAPC-p que expresan la proteína de HLA de clase II en la superficie celular

65 Se tiñeron poblaciones monoclonales con un anticuerpo anti-HLA-DR,DP,DQ conjugado con Alexa 647, y se analizaron mediante citometría de flujo (histograma de color gris). La línea celular ACL-128 (línea celular de eAPC HLA-ABC ^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ ^{nulo}) (histograma de línea discontinua) y la línea celular de tipo natural ARH (histograma de línea de color completamente negro) sirvió como controles. Las líneas celulares monoclonales

ACL-341 y ACL-350 mostraron una señal fluorescente más intensa en comparación con el control de la línea celular de eAPC HLA- ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo}, lo que demuestra que cada línea expresó su aAPX, HLA-DRA*01:01 /HLA-DRB1*01:01 o HLA- DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01 analito, respectivamente y, por tanto, son líneas celulares de eAPC-p.

5 Figura 39 - Monoclonos de eAPC-p generados por la integración de RMCE de proteína de HLA de clase I analito

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

15 b) Las poblaciones monoclonales de eAPC-p ACL-421 y ACL-422 ganaron expresión de HLA-A*02:01 cuando se tiñeron con el anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con PE-Cy5 (histograma de color gris). Su línea celular de eAPC original ACL-385 HLA-ABC^{nulo} y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} (histograma de línea discontinua) y la línea celular de tipo natural ARH (histograma de línea de color completamente negro) sirvió como control de marcaje con anticuerpo anti-HLA-ABC con PE-Cy5 positivo y negativo, respectivamente.

20 Estos resultados indicaron fuertemente que se produjo un RMCE con éxito entre el ORF de BFP y el ORF de HLA-A*02:01 tanto en las líneas celulares ACL-421 como ACL-422.

Figura 40 - La caracterización genética de una selección de monoclonos confirmó la integración de HLA-A*02:01 por RMCE

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

Figura 41 - Análisis fenotípico de monoclonos de eAPC-pa que expresan la proteína de HLA de clase I analito en la superficie celular y aAM

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

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

45 Figura 43 - Una eACP-p construida en una etapa en donde el componente C' codifica un único ORF de HLA1.

Se creó una eAPC-p a través de RMCE mediante electroporación de la línea celular ACL-402 con el plásmido que codifica la expresión de la Tyr-recombinasa, Flp (V4.1.8), junto con un plásmido del componente C' que codifica un aAPX, seleccionado de o bien HLA-A*02:01 (V4.H.5 o bien HLA-A*24:02 (V4.H.6). A los 10 días después tras la electroporación, se clasificaron células individuales positivas para la expresión en superficie de HLA1 y señal disminuida de proteína fluorescente, RFP, codificada por el marcador de selección del componente B . Las líneas monoclonales de eAPC-p resultantes se analizaron mediante citometría de flujo en paralelo con la línea de eAPC parental, y se presentan dos ejemplos a) Las líneas monoclonales sobrecrecidas individuales (ACL-900 y ACL- 963) se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la pérdida de RFP, presencia de BFP y ganancia de HLA-ABC (aAPX). Los gráficos de la izquierda presentan visualmente BFP frente a RFP, la célula parental tiene tanto BFP como RFP (Q2, gráfico superior, 99,2 %), mientras que ACL-900 (Q3, gráfico central, 99,7 %) y ACL-963 (Q3, gráfico inferior, 99,9 %) ambas carecen de señal de RFP, lo que indica que se ha producido una pareja de integración entre los componentes B/C'. Los gráficos de la derecha muestran BFP frente a HLA-ABC (aAPX), en donde tanto ACL-900 (Q2, gráfico superior, 99,2 %) como ACL-963 (Q2, gráfico inferior, 99,2 %) muestran una señal intensa para HLA-ABC (aAPX), reforzando adicionalmente esa integración B/C'. Tanto ACL-900 como ACL-963 tienen una intensa señal de BFP, lo que indica que el componente D permanece abierto y aislado de la pareja de integración de los componentes B/C', b) Para caracterizar adicionalmente ACL-900 y ACL-963 y una tercera eAPC-p no presentada en a) ACL-907, se extrajo ADN genómico y se llevó a cabo PCR usando cebadores que se dirigen de manera adyacente e interna al componente B' (tabla 5, 8.B.3, 15.H.2), amplificando de ese modo selectivamente sólo los eventos de pareja de integración con éxito. Se realiza una comparación con una línea parental no modificada, ACL-3 en donde falta el

componente B. Se produjeron productos de amplicón específicos para el componente B' para los tres monoclonos de eAPC-p, mientras que no se detectó ningún producto en la reacción de ACL-3, lo que confirmó que se había producido el evento de pareja de integración específico entre el componente B y el componente C'.

- 5 Figura 44 - Una eAPC-pa construida a partir de eAPC-p en una etapa, en donde el componente D' codifica un único ORF de molécula de antígeno analito (aAM).

Se construyeron múltiples eAPC-pa a partir de una eAPC-p parental (ACL-905) en paralelo, en donde el sitio de receptor genómico, el componente D, se selecciona como diana para la integración por un vector donante genético cebado, el componente E', que comprende un único ORF que codifica una aAM. La eAPC-p (ACL-900, ejemplo 8) se combinó independientemente con un vector que codifica la expresión de la enzima recombinasa RMCE (Flp, V4.1.8) y cada componente E' de cualquiera de V9.E.6, V9.E.7, o V9.E.8 mediante electroporación. En los 10 días posteriores a la electroporación, se seleccionaron eAPC-pa individuales y se clasificaron en células individuales (monoclonos) basándose en una señal disminuida del marcador de selección de la integración, BFP, codificado por el componente D. Las líneas monoclonales de eAPC-pa resultantes se analizaron mediante citometría de flujo en paralelo con la línea de eAPC parental y se presentan tres ejemplos. Además, los monoclonos resultantes también se caracterizaron genéticamente para confirmar el evento de pareja de integración, a) se analizaron los monoclonos para eAPC-pa, ACL-1219, ACL-1227 y ACL-1233, y se seleccionaron mediante citometría de flujo para determinar la pérdida de la señal de BFP y la retención de la señal de HLA-ABC. Los gráficos de BFP frente a SSC se presentan visualmente con una ventana BFP-. Se observa un aumento del número de eventos de BFP- en comparación con la eAPC-p parental, lo que indica que se ha producido una pareja de integración entre los componentes D/E'. Se seleccionaron células individuales de la ventana BFP-, se clasificaron y se sometieron a sobrecrecimiento, b) se analizaron monoclonos seleccionados de ACL-1219, ACL-1227, ACL-1233 mediante citometría de flujo para confirmar la pérdida de BFP y la retención de señales de HLA-ABC. Se presentan gráficos de BFP frente a HLA-ABC, en donde pueden observarse tres monoclonos que han perdido la señal de BFP en comparación con la eAPC-p parental (gráfico más a la derecha), lo que indica un evento de pareja de integración con éxito, c) para demostrar que los monoclonos contenían el tamaño correcto del fragmento para el ORF de aAM, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa, utilizando cebadores que seleccionan como diana el ORF de aAM (tablas 5, 10.D.1, 15.H.4) y se presenta un gel de agarosa representativo. Se muestran los resultados de dos monoclonos que representan cada ORF de aAM. Carril 1: Marcador de ADN 2 _log, carriles 2-3: pp28 ORF (tamaño esperado 0,8 kb), carril 4: Marcador de ADN 2 _log, carriles 5-6: pp52 ORF (tamaño esperado 1,5 kb), carril 7: 2 _log marcador de ADN, carriles 8-9: pp65 ORF (tamaño esperado 1,9 kb), carril 10: 2 _log de marcador de ADN. Todos los monoclonos analizados tenían el tamaño de amplicón esperado para la aAM respectiva, lo que indica adicionalmente que se había producido la pareja de integración.

Figura 45 - Integración al azar de múltiples antígenos en eAPC-p para crear una biblioteca de eAPC-pa agrupada en una única etapa

Se generó una biblioteca agrupada de eAPC-pa a partir de una agrupación de vectores del componente E cebados (componente E') que codifican en conjunto múltiples ORF de aAM (HCMVpp28, HCMVpp52 y HCMVpp65) mediante la integración en una única etapa en la eAPC-p parental, en donde cada célula individual integra un único ORF de antígeno analito aleatorio derivado de la agrupación original de vectores, en el componente D', de tal manera que cada eAPC-pa generada expresa una aAM aleatoria individual, pero en conjunto la biblioteca agrupada de eAPC-pa representa la totalidad del ORF de aAM codificado en la biblioteca agrupada original de vectores. Se generó la biblioteca de eAPC-pa mediante electroporación combinando la eAPC-p (ACL-905, aAPX: HLA-A*02:01) con una biblioteca de vectores agrupada que se compone de vectores individuales que codifican un ORF para uno de HCMVpp28, HCMVpp52 o HCMVpp65 (V9.E.6, V9.E.7, y V9.E.8), y se mezcla a una razón molecular de 1:1:1. Las poblaciones de eAPC-pa resultantes se analizaron y se seleccionaron mediante citometría de flujo, en paralelo con la línea de eAPC-p parental, a) A los 10 días tras la electroporación, se analizaron supuestas células eAPC-pa (transfectantes) y se seleccionaron mediante citometría de flujo, en comparación con la línea parental (ACL-905). Los gráficos presentan visualmente BFP frente a SSC, seleccionados para poblaciones BFP-, en donde se observa un aumento de células BFP- en la ventana BFP- en comparación con la línea parental. Las células en masa se clasificaron a partir de los transfectantes basándose en la ventana BFP-, indicada como ACL-1050. b) Después del sobrecrecimiento, las células ACL-1050 se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la pérdida de BFP. Los gráficos presentados visualmente son BFP frente a SSC, en donde ACL-1050 se ha enriquecido hasta el 96,4 % de BFP- en comparación con la línea parental ~4 % de BFP-. Posteriormente, las células individuales se clasificaron a partir de la contaminación por BFP- de ACL-1050. c) Para demostrar que el policlón ACL-1050 se componía de una mezcla de células que codifican HCMVpp28, hMVpp52 y HCMVpp65, se seleccionaron 12 monoclonos al azar, se sometieron a sobrecrecimiento y se usaron para la caracterización genética. Las células se caracterizaron mediante PCR utilizando cebadores dirigidos al ORF de aAM (componente D') (tablas 5, 10.D.1, 15.H.4), para amplificar y detectar aAM integrada. Los 12 monoclonos cribados mediante PCR tienen amplicones detectables que son del tamaño esperado para uno de pp28 (0,8 kb), pp52 (1,5 kb) o pp65 (1,9 kb). Además, las 3 aAM se representaron a través de los 12 monoclonos. En comparación, los amplicones de tres monoclonos discretos, en donde se conocía la aAM, se amplificaron en paralelo como controles; los tres controles produjeron los

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

5 Figura 46 - eAPC-pa indujo el sobrecrecimiento específico de antígeno de células CD8 primarias

Se compilaron siete sistemas eAPC:T diferentes usando linfocitos T CD8+ como TC analito y tres líneas celulares de eAPC diferentes, ACL-191 (eAPC-p, aAPX: HLA-A*02:01), ACL-390 (eAPC-pa, aAPX:aAM: HLA-A*02:01, HCMVpp65) o ACL-128 (eAPC, nulo para HLA-I, es decir, sin aAPX). Además, los sistemas eAPC:T que comprenden ACL-191 o ACL-128, cuando fue aplicable usados de manera exógena, proporcionaron aAM (como péptido NLVPMVATV soluble). Se compilaron sistemas tal como se describe a continuación, y después de 10 9 días de cocultivo, se analizaron las células para determinar la tinción específica con el tetrámero CMV-A.0201-NLVP (aAPX:aAM) para detectar el sobrecrecimiento de linfocitos T específicos de antígeno mediante citometría de flujo, a) se compilaron cuatro sistemas eAPC:T que comprendían la TC analito (linfocitos T CD8+), y 1) ACL-15 191 sin aAM (no pulsada), 2) ACL-191 pulsada con aAM, 3) ACL-128 no pulsada, o 4) ACL-128 pulsada con aAM. Se proporcionó a los sistemas con aAM el péptido NLVPMVATV (aAM), derivado de la proteína HCMVpp65, a una concentración de péptido de 1 μ M durante 4 horas tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Los gráficos de citometría de flujo de CD8 frente a CMV- A.0201-NLVP se presentan visualmente, en donde los gráficos representan datos para el sistema eAPC:T (de izquierda a derecha) 1), 2), 3), 20 4). Se observa una población evidente (27 %) de células CD8+CMV-A.0201-NLVP+ (separadas) en el gráfico 2 (ACL-191 pulsada con aAM), en contraste con todos los demás sistemas eAPC:T, los gráficos 1, 3, 4 que carecen o bien de aAPX o bien de aAM o bien de ambos, tienen células positivas de entre el 0,02-0,12 %. Por tanto, la TC analito específica puede someterse a sobrecrecimiento de manera dependiente de antígeno mediante un aAPX:aAM presentado por células eAPC-p cuando se le proporciona aAM exógena. b) Se 25 compilaron tres sistemas eAPC:T que comprendían la TC analito (linfocitos T CD8+), y 1) ACL-128 (eAPC), 2) ACL-191 (eAPC-p), o 3) ACL-390 (eAPC-pa), y en donde no se proporciona aAM exógena. ACL-390 tiene un ORF de aAM integrado, HCMVpp65. Los gráficos de citometría de flujo de CD8 frente a CMV-A.0201-NLVP se presentan visualmente, en donde los gráficos representan datos para el sistema eAPC:T (de izquierda a 30 derecha) 1), 2), 3). Una población evidente (4,89 %) de células CD8+CMV-A.0201-NLVP+ (separadas) se observa en el gráfico 3 (ACL-390 con aAM endógena), en contraste con los otros sistemas eAPC:T, careciendo los gráficos 1 y 2 de o bien aAM o bien aAPX y aAM, tienen células positivas de entre el 0,02-0,12 %. Por tanto, estos datos respaldan que las eAPC-pa pueden procesar ORF de aAM endógena en aAM mediante la maquinaria celular nativa, y presentar la aAM en complejo con aAPX, de tal manera que pueda estimular un sobrecrecimiento específico de antígeno de TC analito.

35 Figura 47 - eAPC-p y aAM exógena indujeron un sobrecrecimiento específico de antígeno de células CD4 primarias

Se compilaron dos sistemas de eAPC:T diferentes usando linfocitos T CD4+ primarios como TC analito, y una 40 línea celular de eAPC-p, ACL-341 (aAPX: HLA-DRB1*01:01). Además, cuando fue aplicable, también se proporcionaba al sistema aAM (como péptido PKYVKQNTLKLAT, SEQ ID NO:1) de manera exógena. Se compilaron sistemas tal como se describe a continuación, y después de 9 días de cocultivo, se analizaron las células para determinar una tinción específica con el tetrámero INFL- DRB1*01:01-PKYV (aAPX:aAM, SEQ ID NO:2) para detectar el sobrecrecimiento de linfocitos T específicos de antígeno mediante citometría de flujo. Se 45 compilaron dos sistemas eAPC:T que comprendían la TC analito (linfocitos T CD4+), y 1) ACL- 341 sin aAM (no pulsada), 2) ACL-341 pulsada con el péptido PKYVKQNTLKLAT (aAM, SEQ ID NO: 1), a una concentración de péptido de 1 μ M durante 2 horas tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Los gráficos de citometría de flujo de CD4 frente a INFL-DRB1*01:01-PKYV se presentan visualmente, en donde los gráficos representan datos para el sistema eAPC:T (de izquierda a derecha) 1) y 2). Se observa una población evidente 50 (12 %) de células CD4+/INFL-DRB1*01:01-PKYV+ (separadas) en el gráfico 2 (ACL-341 pulsada con aAM), en contraste con los sistemas eAPC:T de control, los gráficos 1, que carecen o bien de aAM, tienen células positivas de entre el 0,06 %. Por tanto, las células CD4+ de TC analito específicas pueden someterse a sobrecrecimiento de manera dependiente de antígeno mediante aAPX:aAM presentado por las células eAPC-p cuando se le proporciona aAM exógena.

55 Figura 48 - Citotoxicidad específica de antígeno de células eAPC-pa sometidas a cocultivo con células CD8 primarias

Se compilaron siete sistemas eAPC:T diferentes usando linfocitos T CD8+ como TC analito y tres líneas 60 celulares de eAPC diferentes, ACL-191 (eAPC-p, aAPX: HLA-A*02:01), ACL-390 (eAPC-pa, aAPX:aAM: HLA-A*02:01, HCMVpp65) o ACL-128 (eAPC, nulo para HLA-I, es decir, sin aAPX). Además, los sistemas eAPC:T que comprendían ACL-191 o ACL-128, cuando fue aplicable usados de manera exógena, proporcionaron aAM (como péptido NLVPMVATV, SEQ ID NO: 3). Se compilaron sistemas tal como se describe a continuación, y se analizó el cocultivo de las células para determinar la acción citotóxica contra eAPC-p o -pa mediante tinción con 65 anexina V y PI para detectar células muertas mediante citometría de flujo, a) Se compilaron cuatro sistemas eAPC:T que comprendían la TC analito (linfocitos T CD8+), y 1) ACL-128 no pulsada, 2) ACL-128 pulsada con

aAM, 3) ACL-191 sin aAM (no pulsada), 4) ACL-191 pulsada con aAM. Se proporcionó a los sistemas con aAM el péptido NLVPMVATV (aAM), derivado de la proteína HCMVpp65, a una concentración de péptido de 1 μ M durante 2 horas tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Además, Se compilaron sistemas con razones de eAPC:CD8 de 1:0, 1:1 y 1:8. Se representa un gráfico de barras del porcentaje de células eAPC muertas detectadas mediante citometría de flujo (CD80+anexina+PI+). Se observa una clara destrucción de las células eAPC-p sólo en el sistema 4 (ACL-191 +péptido) que se compone tanto de células eAPC como CD8+, razones 1:1 o 1:8 (eAPC:CD8). No se observa un aumento significativo de muerte por encima del fondo en los sistemas 1, 2 y 3 que carecen o bien de aAPX, aAM o bien de ambos. Por tanto, la eAPC-p pulsada con aAM exógena puede usarse para estimular una acción citotóxica específica de antígeno en linfocitos T CD8+ (TC analito). b) Se compilaron tres sistemas eAPC:T que comprendían la TC analito (linfocitos T CD8+), y 1) ACL-128 (eAPC), 2) ACL-191 (eAPC-p), o 3) ACL-390 (eAPC-pa), y en donde no se proporciona aAM exógena. ACL-390 tiene un ORF de aAM integrado, HCMVpp65. Se representa un gráfico de barras del porcentaje de células eAPC muertas detectadas mediante citometría de flujo (CD80+anexina+PI+). Se observa una clara destrucción de las células eAPC-p sólo en el sistema 3 (ACL-390), que se componía tanto de células eAPC como CD8+, en razones de 1:1 o 1:8 (eAPC:CD8). No se observa un aumento significativo de muerte por encima del fondo en los sistemas 1 y 2 que carecen o bien de aAM o bien de aAPX:aAM. Por tanto, estos datos respaldan que las eAPC-pa pueden procesar ORF de aAM endógena en aAM mediante la maquinaria celular nativa, y presentar la aAM en complejo con aAPX, de tal manera que pueda estimular una acción citotóxica específica de antígeno mediante linfocitos T CD8+ (TC analito).

Figura 49 - Identificación de moléculas de antígeno analito a partir de células eAPC-pa mediante espectrometría de masas

Los resultados de espectrometría de masas se presentan para fracciones peptídicas derivadas de los siguientes procedimientos. Dos líneas de eAPC-p, ACL-900 (aAPX: HLA-A*02:01) y ACL-963 (aAPX: HLA-A*24:02) se pulsaron con péptidos antigénicos conocidos, en donde para cada eAPC-p se realizaron cuatro pulsos discretos, que consistían en una de las siguientes aAM como péptidos; NLVPMVATV (APD-2, SEQ ID NO: 3), NLGPMVAGV (APD-21, SEQ ID NO: 4), o VYALPLKML (APD-11, SEQ ID NO: 5), o ningún péptido. Se sabe que APD-2 se compleja con HLA-A*02:01, APD-11 con HLA-A*24:02, y APD-21 es un triple mutante (V3G, T8G, V6A) de APD-2 en donde estas mutaciones alteran la capacidad del péptido para complejarse con HLA-A*02:01. Las células pulsadas se recogieron y se lisaron. Se mezcló el lisado aclarado con resina de níquel y agarosa y se precipitaron los HLA usando captura con 6x-His. La fracción unida se eluyó en ácido acético al 10 % y se sometió a ultrafiltración en columnas de 3 kD. La fracción peptídica se sometió a extracción en fase líquida y la retirada de la fase orgánica se sometió a extracción en fase sólida. La fracción del péptido eluido se sometió a espectrometría de masas. Los péptidos NLVPMVATV (SEQ ID NO: 3), VYALPLKML (SEQ ID NO: 5) y NLGPMVAGV (SEQ ID NO: 4) se identificaron con éxito en su respectivo experimento pulsado (ID 2, 3, 11) y no se identificaron en ninguna otra muestra. Los péptidos de apareamiento erróneo NLVPMVATV (ID 12, HLA-A*24:02, SEQ ID NO: 3) y VYALPLKML (ID 13, HLA-A*02:01, SEQ ID NO: 5) y el triple mutante NLGPAAGV (SEQ ID NO: 4) no se identificaron. Por tanto, la captura y el enriquecimiento de los complejos aAPX:aAM de células eAPC-p pueden usarse para identificar, confirmar y/o determinar la presentación restringida por HLA de una molécula de antígeno analito en complejos que presentan antígenos.

Materiales y métodos

Electroporación de células ARH-77

Por reacción, se sometieron a electroporación 4×10^6 células en 500 μ l de RPMI 1640 con Glutamax-I (Life Technologies) usando Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad) con el siguiente ajuste onda cuadrada de 285 V, longitud de pulso de 12,5 ms y 2 pulsos con un intervalo de 1 s. La concentración de ADN usada para el plásmido Cas9 V1.A.8 fue de 10 μ g/ml y de 7,5 μ g/ml para el ARNg que selecciona como diana el sitio de integración (V2.I.10 y V2.J.1 para la integración en el locus endógeno de HLA y V2.J.6 para seleccionar como diana el sitio de AAVS1) (tabla 3).

Los vectores de integración se sometieron a electroporación a una concentración de 7,5 μ g/ μ l. Para la integración por HDR en el locus de HLA, se usaron plásmidos de HLA de clase V1 .C.6 y V1 .C.9. Para la integración por HDR en el locus AAVS1, HLA de clase I V1.F.8 y V1.F.10 y HLA de clase II V1.I.5 y V1.I.7. Se integraron variantes de ORF de pp65 en líneas monoalélicas de HLA creadas previamente. Se usaron para este propósito los plásmidos V1.G.9 y V1.H.1 que contenían una forma de pp65 ligada con un marcador de GFP. Para generar una línea nula para HLA ARH-77 con un sitio de RMCE, se usaron plásmidos con sitios de recombinasa heteroespecíficos que flanqueaban a un marcador, V4.B.2 para RFP y V4.B.3 para BFP. Los mismos plásmidos se sometieron a electroporación conjuntamente para producir una línea estable que contenía dos sitios de RMCE. También se creó una línea de HLA monoalélica usando RMCE, donde el vector V4.D.2 se sometió a electroporación 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, el 5 % de CO₂) durante dos días, antes del análisis.

Transfección de células HEK293

Un día antes de la transfección, las células se sembraron a una densidad de $1,2-1,4 \times 10^6$ células/placa de 60 mm en DMEM al 90 % + glutamina 2 mM + HI-FBS al 10 % (Life Technologies). Al día siguiente, las células con un 5
65 % de confluencia se transfectaron con una cantidad total de 5 ug de ADN y jetPEI® (reactivo de transfección Polypplus, Life Technologies) a una razón N/P de 6. El medio se sustituyó antes de la transfección. Las disoluciones madre de ADN y jetPEI® se diluyeron en NaCl 1 M y NaCl 150 mM estériles, respectivamente. El volumen final de cada disolución fue equivalente al 50 % del volumen total de mezcla. Entonces, se añadió la disolución de PEI al ADN diluido y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, las 10 mezclas de ADN/PEI se añadieron a las placas de 60 mm, con cuidado de no alterar la película celular.

Las células se incubaron durante 48 horas a (37 °C, el 5 % de CO₂, el 95 % de humedad relativa) antes del análisis de expresión de GFP. Para la delección de genes de HLA de clase I, las células se transfectaron con 0,42 ug de vectores de ADN que codifican el Cas9_GFP (V1.A.8), ARNg que seleccionan como diana HLA-A, B y C (V2.A.1, V2.A.7 y V2.B.3, respectivamente) y un vector vacío (V1.C.2). Para la integración de los sitios de RMCE en el locus AAVS1, las células se transfectaron con 0,5 ug de V1.A.8; se usaron 0,625 ug de ARNg V2.J.6 y 0,75 ug 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 ug de ADN.

20 Clasificación de células policlonales que expresan GFP

Se clasificaron células sometidas a electroporación o transfectadas con Cas9-P2A-GFP (V1.A.8) o con un plásmido que codifica un marcador de selección de GFP (V1 .A.4) para la expresión transitoria de GFP, usando el clasificador de células FACSJazz™ (BD Biosciences). Se recogieron células HEK 293 con tripsina TrypLE™ Express (ThermoFisher Scientific) y se resuspendieron en un volumen adecuado de DPBS 1X (Life Technologies) antes de la clasificación celular, en medio DMEM 1X que contenía HI-FBS al 20 % y anti-anti (antibiótico-antimicótico) 100X (Life Technologies). Se lavaron las células ARH-77 y se resuspendieron en un volumen adecuado de DPBS antes de la clasificación en RPMI 1640 con Glutamax-I con HI-FBS al 20 % y anti-anti (antibiótico-antimicótico)100 X (Life Technologies).

30

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

Para obtener una población de células que expresan de manera constitutiva la proteína o el marcador integrado, las células se clasificaron de 7 a 15 días después de la primera selección de GFP+. Para las células que se espera que expresen una proteína de superficie, la tinción con anticuerpos se realizó antes de la clasificación. Para los genes de HLA de clase I, se usó el anticuerpo de ratón anti-HLA-ABC humano con pE-Cy™ 5(BD Biosciences). La tinción de HLA-DR y HLA-DP se realizó con anticuerpo de ratón anti-HLA-DR, DP, DQ humano con Alexa Fluor® 647 (BD Biosciences). En el caso de las líneas celulares derivadas de HEK 293, las células se recogieron con tripsina TrypLE™ Express (ThermoFisher Scientific) y se lavaron en un volumen adecuado de DPBS 1X (Life Technologies) antes de la clasificación celular en medio DMEM 1X que contenía HI-FBS al 20 % y anti-anti (antibiótico-antimicótico) 100X (Life Technologies). Se lavaron las líneas celulares derivadas de ARH-77 en un volumen adecuado de DPBS antes de clasificarlas en RPMI 1640 con Glutamax-I con HI-FBS al 20 % y anti-anti (antibiótico-antimicótico)100X (Life Technologies).

40

Tabla 3: 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 + Exon2/3-HA-L+R
V1.C.9	HLA-B 35:01 6xHis + Exon2/3-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.G.9	AAVS1-I_GFP_HCMVpp65 ANET
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	AAVSI_sg-sp-opti_3
V4.B.2	AAVS_Efla-intronF14 RFPnls F15
V4.B.3	AAVS_Efla-intron_FRT_BFPnls_F3
V4.D.2	pMA_FRT_HLA-A*02:01-6xHis_F3
V4.H.5	pMA_F14_HLA-A*02:01-6xHis_F15
V4.H.6	pMA_F14_HLA-A*24:02-6xHis_F15
V4.H.7	pMA_F14_HLA-B*07:02-6xHis_F15
V4.H.8	pMA_F14_HLA-B*35:01-6xHis_F15
V4.1.8	CMVpro_FLPo Sv40pA V2
V9.E.6	FRT_HCMVpp28-3xMYC_F3
V9.E.7	FRT_HCMVpp52-3xMYC_F3
V9.E.8	FRT_HCMVpp52-3xMYC_F3

Para la desactivación 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 de RMCE integrados se clasificaron basándose en la expresión de los marcadores de BFP y RFP, y los monoclonales de HLA con mutantes pp65 integrados se clasificaron según la expresión de GFP (tabla 4). La clasificación monoclonal de las células que expresan el gen de interés se realizó en placas de 96 pocillos que contenían 200 ul de medio de crecimiento. Se clasificaron de una a dos placas por muestra. La clasificación policlonal de las células restantes se realizó inmediatamente después, en tubos para FACS, usando el ajuste de clasificación bidireccional en el clasificador de células Influx™ (BD Biosciences).

5

10

Cribado fenotípico de poblaciones monoclonales

Se transfirió una muestra de 20.000 células de la población de monoclonales sometida a sobrecrecimiento a placas de microtitulación para su análisis, las células se resuspendieron en 250 ul de DPBS 1X (Life Technologies) y se analizaron en el aparato LRSFortessa™ (BD Biosciences). Se detectó la expresión de BFP y RFP usando los PMT para BV421 y un fluoróforo de PE-rojo Texas, respectivamente. Para proteínas con expresión en superficie, las células se tiñeron en primer lugar usando anticuerpo de ratón anti-HLA-ABC humano con PE- Cy™5 (BD Biosciences) o anticuerpo anti-HLA-DR, DP, DQ humano con Alexa Fluor® 647 (BD Biosciences). Se preparó la disolución de tinción usando el volumen de anticuerpo recomendado diluido en 100 ul de tampón de tinción (DPBS + FBS al 2 %). Las células se incubaron durante 1 hora a 4 °C y luego se lavaron dos veces con 500 ul de tampón de tinción, antes del análisis. Los monoclonales seleccionados se mantuvieron en medio de crecimiento normal. Las células HEK239 crecen en DMEM+ glutamina 2 mL+HI-FBS al 10 % (Life Technologies) y las células ARH-7 crecen en RPMI 1640 con Glutamax-I + HI- FBS al 10 %. La confluencia de las células se monitorizó cada día, hasta que alcanzaron $10\text{-}12 \times 10^6$. Se extrajo ADN a partir de 5×10^6 células usando el minikit de ADN QIAamp (Qiagen). Las células restantes se expandieron y se crioconservaron adicionalmente a una densidad de 3×10^6 células/ml, en el 70 % de medio de crecimiento + el 20 % de HI-FBS + el 10 % de DMSO.

15

20

25

Tabla 4: FACSJazz y filtros de flujo de entrada

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
HLA-ABC (proteína YG72)	PE-Cy7	561-750LP
Myc (proteína R43)	Alexa647	640-670/30
Fosfatidilserina (teñida con anexina V)	BV711	405-710/50
CD80 APC	APC	640-670/30
CD8APC-H7	APC-H7	640-780/60
CD8	APC-H7	640-750/LP
ADN (teñido con yoduro de propidio)	Yoduro de propidio	561-585/15
CD3	APC	640-670/30
CD3	FITC	488-530/40
CD8	PerCP-Cy5.5	488-710/50
CD8	PerCP-Cy5.5	488-695/40
CD4	BV510	405-520/35
CD4	BV421	405-460/50
CD25	PE	561-585/29
CMV-A. 02:01-NLVP	PE	561-585/15
INFL-DRB1-0101-PKYV (SEQ ID NO: 2)	PE	561-585/15
Marcador de células muertas	APC-H7	640-780/60

Confirmación de la integración en la ubicación genómica correcta

- 5 Se cribaron monoclonos con las características fenotípicas deseadas y se evaluaron a nivel molecular, esto se realizó mediante PCR usando ADN polimerasa de alta fidelidad y arranque en caliente Q5® (NBE), en reacciones de 20 µl, usando los componentes y volúmenes recomendados por el fabricante. Para determinar si los ORF de HLA I estaban integrados en el locus de HLA, se usaron los cebadores 9.C.4 and 9.D.6; se indicó la recombinación correcta del brazo homólogo derecho mediante amplicones de 1 kb (tabla 5). Para la integración de HLA en el locus AAVS1, se usaron 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 de
- 10 brazo homólogo derecho (660 pb), 1.C.5 y 9.C.5 para amplificar el promotor de CMV del constructo interno (810 pb), y 1.C.2 y 9.C.10 para obtener un amplicón para el terminador SV40 pA del constructo interno (380 pb). Se

realizó la evaluación de la integración del sitio de RMCE en líneas HEK293 y ARH-77 nulas para HLA usando los conjuntos de cebadores 2 y 4. Para confirmar la delección de HLA de clase I en células HEK293, se usaron cebadores de HLA específicos de la siguiente manera: 4.A.3 y 4.A.4 que seleccionan como diana 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 de arranque en caliente Q5®, cebadores directo e inverso, 100 ng de molde de ADN y H₂O). Las reacciones de PCR se ejecutaron usando el ciclador térmico C1000 Touch™ (Bio-Rad). Se ejecutaron los productos de PCR sobre un gel de agarosa al 1 % en tampón 1XTAE, usando PowerPac Basic (Bio-Rad), se tiñeron con una dilución 10.000 de Sybersafe y se analizaron con Fusion SL (Vilber Lourmat).

10

Tabla 5: 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	
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-Exon3_HA-RE-BgIII_F1	GGTTAGATCTGGGAAGGAGACGCTGCAG
8.A.1	HLA-C-04-GT-Rg1	GATCCCATTTTCTCCCCTC
8.B.2	CMV-pA-HLA-Ex3_Probe_F1	ATGTCTGGATCTGCGGATCAGCGCAGC
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-intron4_GT_R1	GCTAAAGGTCAGAGAGGCTC
9.D.7	sv40pA-GT-F2	CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTGTC
9.D.9	AAVS1_GT_R6	
9.J.2	sv40pA-AAVS1-probe-FAM-F1	TGCGGATCAGGATTGGTGACAGAA
10.A.9	TRAC_TCRA-ex1_R1	GACTTGTCACTGGATTTAGAGTCTCT
10.A.10	TRAC_TCRA-promoter_F1	CTGATCCTCTTGTCCCACAGATA
10.B.6	TRAC_probe (HEX)	ATCCAGAACCCTGACCCTGCCG
8.B.3	Pan-HLA_GT_F1	AAGGAGGGAGCTACTCTCAG
15.H.2	SV40pA_GT_R1	CCTCTACAGATGTGATATGGCTTG

10.C.4	3xMyc_OE_R1	GGAGAACAAAAGCTCATCTCTGAGGAG
10.D.1	CtermCysLink_OE_R1	AGATCCAGATCCACCGGATGTAGAGCAAC
15.H.4	Ef1a_intron_GT_F2	TGGGTGGAGACTGAAGTTAG

Identificación del número de copias del gen

5 El ADN de los monoclonos seleccionados se analizó usando cebadores específicos que seleccionaban como diana el gen de interés y una sonda que reconocía un fragmento del gen integrado y que se extendía hasta el brazo homólogo. Para la integración de HLA de clase I en el locus de HLA, los cebadores 4.1.9 y 9.C.4 se usaron para amplificar el gen de interés y 8.B.2 se usó como sonda, conjugado con FAM. Para constructos integrados en el locus AAVS1, se usaron los cebadores 9.D.6 y 9.D.7 y la sonda 9.J.2, también conjugada con FAM. En todos los casos, un gen de referencia (TRAC) se cribó simultáneamente para determinar los números de copias, usando los cebadores 10.A.9 y 10.A.10 junto con la sonda fluorescente 10.B.6 conjugada con HEX. El número de copias de integración consideró que las células ARH-77 son diploides y las células HEK293 son triploides para el gen de referencia (TRAC). Antes de la PCR de gotícula digital (PCRdd), el ADN se digirió con MfeI (NEB) para separar integraciones en tándem. La configuración de la reacción y las condiciones de ciclado se siguieron según el protocolo para sondas ddPCR™ Supermix (sin dUTP) (Bio-Rad), usando el lector de gotículas y el generador de gotícula QX200™ y el ciclador térmico para pocillos profundos C1000 Touch™ (Bio-Rad). Los datos se obtuvieron mediante el software QuantaSoft™, usando Ch1 para detectar FAM y Ch2 para HEX.

Tabla 6: Cebadores/sondas de ddPCR

ID	Nombre	Secuencia
21.I.1	HCMVpp65_GT_F2	TCGACGCCCAAAAAGCAC
21.I.2	HCMVpp28_GT_F1	TGCCTCCTTGCCCTTTG
21.I.3	HCMVpp52_GT_F1	CGTCCCTAACACCAAGAAG
20.H.10	Myc-Tag_GT_R1	AAGGTCTCCTCAGAGATG
20.H.9	Linker-Myc_Probe_Fam	CTTTTGTCTCCAGATCCAGATCCACC
10.A.9	TRAC-TCRA-ex1-F1	CTGATCCTCTTGCCACAGATA
10.A.10	TRAC-TCRA-ex1-F1	GACTTGTCACTGGATTTAGAGTCTCT
10.B.6	TRAC-probe (HEX)	ATCCAGAACCCTGACCCTGCCG

Tabla 7: Resumen de las líneas celulares de ACL, componentes asociados y, si fuera aplicable, el aAPX y/o la aAM integrados en los componentes B/B' y los componentes D/D'

ID	Componentes	aAPX (B')	aAM (D')	Designación
ACL-3	Ninguno	Tipo natural	-	-
ACL-128	Ninguno	Ninguno	-	-
ACL-402	B, D		-	eAPC
ACL-900	B', D	HLA-A*02:01	-	eAPC-p
ACL-963	B', D	HLA-A*24:02	-	eAPC-p
ACL-905	B', D	HLA-A*02:01	-	eAPC-p
ACL-1219	B', D'	HLA-A*02:01	ORF de pp28	eAPC-pa
ACL-1227	B', D'	HLA-A*02:01	ORF de pp52	eAPC-pa

ACL-1233	B', D'	HLA-A*02:01	ORF de pp65	eAPC-pa
ACL-1050	B', D'	HLA-A*02:01	pp28, pp52, pp65	eAPC-pa
ACL-1043	B', D'	HLA-A*02:01	ORF de pp28	eAPC-pa
ACL-1044	B', D'	HLA-A*02:01	ORF de pp52	eAPC-pa
ACL-1046	B', D'	HLA-A*02:01	ORF de pp65	eAPC-pa
ACL-191	B', D	HLA-A*02:01		eAPC-p
ACL-390	B', D'	HLA-A*02:01	ORF de pp65	eAPC-pa
ACL-341	B', D	HLA-DRB1*01.01		eAPC-p

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

5 Se sometieron células eAPC a electroporación con vectores que codifican Flp, ADN que codifica un marcador para rastrear el suministro (vector que codifica GFP) y un vector que contiene HLA-A*02:01. La secuencia de HLA-A*02:01 también codificaba un ligador y una etiqueta 3xMyc- en el extremo 3'. Las condiciones de electroporación usadas fueron 258 V, 12,5 ms, 2 pulsos, 1 intervalo entre pulsos.

10 La razón entre cada vector de integración y el vector Flp fue de 1:3. Las células sometidas a electroporación sólo con el vector de GFP y las células no sometidas a electroporación se usaron como controles, respectivamente, para establecer las ventanas para la clasificación de GFP después de dos días. Al día siguiente (2 días después de la electroporación), se analizaron las células y se clasificaron basándose en la expresión de GFP. Las células se clasificaron usando el clasificador de células BD Influx.

15 3 días después de la electroporación, se realizó una clasificación basándose en la expresión de GFP para enriquecer las células sometidas a electroporación. 7-8 días después de la electroporación, las células se recogieron y se tificaron en superficie para determinar la expresión de HLA-ABC. Se sometieron las células BFP+ RFP- HLA+ a clasificación celular individual para determinar monoclonales.

20 Para genotipar las células, se usaron 100 ng de ADN como molde para ejecutar una reacción de PCR para verificar si se habían producido integraciones en el sitio de integración esperado. Se usó un cebador directo que selecciona como diana los casetes de integración (Pan_HLA_GT_F1 (insertar SEQ ID NO)) y un cebador inverso (SV40pA_GT_R1 insertar SEQ ID NO) que se dirige justo al exterior del sitio de integración y se ejecutó el producto de PCR en un gel de agarosa al 1 %.

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

30 Se sometieron células eAPC-p a electroporación con vectores que codifican Flp, ADN que codifica un marcador para rastrear el suministro (vector que codifica GFP) y vectores que contenían ORF de aAM de HCMV pp28, pp52 o pp65. Las secuencias de ORF de HCMV también codificaron un ligador y una etiqueta 3xMyc- en el extremo 3'. Las condiciones de electroporación usadas fueron 258 V, 12,5 ms, 2 pulsos, 1 intervalo entre pulsos.

35 La razón entre cada vector de integración y el vector Flp fue de 1:3. Las células sometidas a electroporación sólo con el vector de GFP y las células no sometidas a electroporación se usaron como controles, respectivamente, para establecer las ventanas para la clasificación de GFP después de dos días. Al día siguiente (2 días después de la electroporación), se analizaron las células y se clasificaron basándose en la expresión de GFP. Las células se clasificaron usando el clasificador de células BD Influx.

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

Se sometieron células eAPC-p a electroporación con vectores que codifican Flp, ADN que codifica un marcador para rastrear el suministro (vector que codifica GFP) y vectores que contenían ORF de aAM de HCMV pp28, pp52 o pp65. Las secuencias de ORF de HCMV también codificaron un ligador y una etiqueta 3xMyc- en el extremo 3'. Las condiciones de electroporación usadas fueron 258 V, 12,5 ms, 2 pulsos, 1 intervalo entre pulsos.

45 Para la integración al azar, los vectores que contenían ORF de HCMV se agruparon en una razón de 1:1:1 y la mezcla se sometió a electroporación en la célula eAPC-p. Las células eAPC-pa resultantes fueron policlonales. Las células monoclonales individuales se clasificaron y se caracterizaron genéticamente para demostrar que el policlón estaba constituido por células que contenían los tres ORF de HCMV.

50 Reacciones de PCR para evaluar la integración por RMCE de los ORF de HCMV en el componente D

Se usaron cebadores para evaluar la integración del ORF de HCMV hibridado con el ligador (cebador directo 10.D.1 (insertar SEQ ID) y promotor Ef1alfa (cebador inverso 15.H.4). El tamaño esperado fue de 0,8 kb para pp28, 1,5 kb para pp52, 1,9 kb para pp65.

5

Tabla 8: Reactivos de PCR para evaluar la integración del ORF de aAM

Componente de reacción	Volumen por reacción
tampón 5xPhusion	4 ul
DNTPs	0,2 ul
ADN polimerasa Phusion	0,15 ul
10.D.1	0,5 ul
15.H.4	0,5 ul
H2O	hasta 20 ul
ADN (100 ng)	1 ul (100 ng/ul)
DMSO al 3 %	0,6 ul

Tabla 9: 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

Se ejecutaron los productos de PCR sobre un gel de agarosa al 1 % en tampón 1XTAE, usando PowerPac Basic (Bio-Rad), se tiñeron con una dilución 10.000 de Sybersafe y se analizaron con Fusion SL (Vilber Lourmat).

10 Sobrecrecimiento de células CD8+ específicas de antígeno

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante de sangre sano que se sabía que tenía linfocitos T CD8+ específicos para CMV-A.0201-NLVP, usando Ficoll Paque Plus (GE Healthcare). Las células se tiñeron con anticuerpos de superficie contra marcadores de CD. Las poblaciones específicas de linfocitos T se clasificaron usando un clasificador de células BD Influx, se sedimentaron y se resuspendieron hasta 200 000 células/ml en medio OSG + HS al 10 %.

15

Pulsación de eAPC con multímero peptídico

20 Se pulsaron las eAPC HLA-A*02:01 con péptido 1 μM (NLVPMVATV (SEQ ID NO: 3) o en medio OSG completo + HS al 10 %) durante 4 horas. Las células se lavaron 3 veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron hasta 100 000 células/ml en medio OSG + suero humano (HS) al 10 %.

25

Cocultivo de células CD8+ específicas de antígeno con las eAPC

Se sometieron a cocultivo células CD8+ con las eAPC en placas de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos (wp) en una razón de 1:1, es decir, 5000 células de cada tipo de célula, en total 10000 células por pocillo en un volumen de cultivo de 100 μl. Se realizó reestimulación el día 9 de cultivo de tal manera que se mantuvieron 150 μl de los cultivos y se reestimularon con 5000 células eAPC recién pulsadas a un volumen de 50 μl por pocillo.

30

En un experimento paralelo se sometieron a cocultivo linfocitos T CD8+ con la línea celular eAPC-pa, que expresa de manera estable pp65, en una placa de fondo redondo de 96 wp a una razón de 1:1, 5.000 células de cada tipo de célula = > 10.000 células por pocillo en 100 μl de volumen de cultivo. Se incluyeron como controles células nulas para HLA no pulsada y células eAPC-pa. No se realizó reestimulación.

35

Fenotipado

5 El fenotipado se realizó el día 14. Cinco réplicas y una agrupación de 20 pocillos se fenotiparon por condición. Las células se tiñeron por separado con DCM diluido 100x (Zombie NIR) seguido de tinción con multímero diluido 50x (tabla 4) durante 10 min y después de eso la adición de marcadores de superficie (tabla 4) en 25 µl por muestra durante 30-60 min. Las células se resuspendieron en tampón de tinción (PBS+FBS al 2 %) y los datos se adquirieron en LSRFortessa y se analizaron en FlowJo.

Sobrecrecimiento de células CD4+ específicas de antígeno

10 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante de sangre sano que se sabía que tenía linfocitos T CD4+ específicos para INFL-DRB1*01:01-PKYV, usando Ficoll Paque Plus (GE Healthcare). Las células se tiñeron con anticuerpos de superficie contra marcadores de CD. Las poblaciones específicas de linfocitos T se clasificaron usando el clasificador de células BD Influx, se sedimentaron y se resuspendieron hasta 100000 ó 400000 células/ml en medio OSG + HS al 10 %.

15 Pulsación de eAPC con multímero peptídico

20 Se pulsaron las eAPC HLA DRB1*01:01 con péptido 1 µM (PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 1) o en medio OSG completo + HS al 10 %) durante 2 horas. Las células se lavaron 3 veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron hasta 5000 células/ml en medio OSG + suero humano (HS) al 10 %.

Cocultivo de células CD4+ específicas de antígeno con las eAPC

25 Se sometieron a cocultivo células CD4+ con eAPC en placas de fondo redondo de 96 wp, es decir, 250 eAPC y 5.000 frente a 20.000 células CD4+ en un volumen de cultivo de 100 µl. Los cultivos se mantuvieron en OSG+HS al 10 %. A algunos cultivos se les dosificaron 100 U/ml de IL-2 el día 1. A los cultivos sin adición de IL-2 se les dosificaron medios. Los cultivos expandidos durante 14 días tuvieron una dosis adicional de IL-2 el día 7.

Fenotipado

30 El fenotipado se realizó el día 14. Cinco réplicas y una agrupación de 20 pocillos se fenotiparon por condición. Las células se tiñeron por separado con DCM diluido 100x (Zombie NIR) seguido de tinción con multímero diluido 50x (tabla 4) durante 10 min y después de eso la adición de marcadores de superficie (tabla 4) en 25 pl por muestra durante 30-60 min. Las células se resuspendieron en tampón de tinción (PBS+FBS al 2 %) y los datos se adquirieron en LSRFortessa y se analizaron en FlowJo.

35 Ensayo citotóxico

Pulsación de eAPC con péptidos

40 Se pulsaron 2 x 10⁶ células con péptido NLVPMVATV (SEQ ID NO: 3) 1 µM en 2 ml de medio completo de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) durante la noche, se recogieron, se lavaron 3x con PBS y se resuspendieron en RPMI completo.

45 Preparación de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno

50 Los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno se derivaron de PBMC de un donante sano. Las células se tiñeron con anticuerpos de superficie contra marcadores de CD. Las poblaciones específicas de linfocitos T se clasificaron usando un clasificador de células BD Influx, se contaron y se almacenaron en nitrógeno líquido. Un día antes del experimento, las células se descongelaron y se dejaron en reposo durante la noche en medio OSG completo. Las células se contaron y se resuspendieron en medio OSG completo.

Cocultivo de eAPC y células CD8+ específicas de antígenos

55 Las eAPC pulsadas con péptidos y no pulsadas se sometieron a cocultivo con linfocitos T CD8+ citotóxicos. Se sembraron 10 000 eAPC por pocillo en una placa de 96 pocillos (en 50 µl de RPMI completo). Las eAPC se sometieron a cocultivo con los linfocitos T CD8+ en razones crecientes. Las razones sometidas a prueba fueron eAPC solas 1:0 (eAPC:CD8+), 1:1 (eAPC:CD8+), 1:8 (eAPC:CD8+) en un volumen total de 100 ul. Las células se sometieron a cocultivo durante 4-5 horas.

60 Tinción

65 Se transfirieron las células de los pocillos a microtubos (un pocillo -> un microtubo), se añadieron 400 µl de RPMI por tubo. Las células se centrifugaron durante 3 min a 400 g, se aspiró el sobrenadante y los sedimentos celulares se resuspendieron en 25 µl de mezcla de tinción o RPMI (controles no teñidos) (mezcla de tinción: Anexina V BV711 + CD80 APC + CD8 APC-H7) y se incubaron durante 20 min a TA y 450 rpm. La tinción finalizó mediante la adición de 400 µl de RPMI por tubo, posterior centrifugación y retirada del sobrenadante. Las

tinciones se describen en la tabla 4. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 150 μ l de RPMI que contenía yoduro de propidio 1 μ g/ml (muestras teñidas) o 150 μ l de RPMI (muestras no teñidas) y las muestras se transfirieron a placas de 96 pocillos para la adquisición con Fortessa.

5 Cromatografía de afinidad de metales

Se adquirieron los péptidos usados para los experimentos de pulsación de Genscript Biotech. APD-2: NLVPMVATV (SEQ ID NO: 3) pp65 es un péptido de tipo natural y restringido a la unión a HLA-A*02:01, APD-21: NLGPMMAAGV (SEQ ID NO: 4) pp65 V3G.T8G, V6Un péptido triple mutante de ADP-2 NLVPMVATV (SEQ ID NO:3) pp65, APD-11: VYALPLKML (SEQ ID NO: 5) es un péptido de tipo natural restringido a la unión a HLA-A*24:02

Las células se cultivaron en RPMI complementado con FBS al 10 % a 37 °C y el 5 % de CO₂. El día del experimento, las células se recogieron, se lavaron dos veces en PBS caliente 1x, se sembraron de nuevo a 2x10⁶ células/ml y se pulsaron con péptidos 1 μ M durante 2 horas. Se recogieron las células pulsadas, se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo y se lisaron en tampón de lisis enfriado con hielo (cloruro de sodio (NaCl 150 mM), Tris 50 mM pH 8, 1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio] (CHAPS) al 1 %, imidazol 5 mM, yodoacetamida 0,2 mM y cóctel inhibidor de proteasas Halt 1x (Thermo Scientific)), se agitaron en vórtex y se incubaron a 4 °C durante 20 minutos.

Se mezcló el lisado aclarado con resina de níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) de HisPur™ (Thermo Scientific) y se hizo rotar durante 2 horas a 4 °C. Después de la retirada de la fracción no unida del lisado, se lavó dos veces la resina con tampón de alto contenido en sal (NaCl 250 mM, Tris 50 mM pH 8, imidazol 25 mM) y dos veces con tampón de bajo contenido en sal (NaCl 50 mM, Tris 50 mM pH 8). Se recogieron las perlas lavadas en tampón de lavado de bajo contenido en sal y se transfirieron a columnas de centrifugación (Thermo Scientific). La fracción unida se eluyó en ácido acético al 10 % y se sometió a ultrafiltración en columnas de 3kD Nanosep Omega (Pall). Se sometió la fracción peptídica a extracción en fase líquida mediante mezclado 1:1 con acetato de etilo saturado en agua, agitación en vórtex prolongada y retirada de la fase orgánica. La extracción en fase sólida posterior se realizó en puntas Stage (Stop and Go Extraction) ensambladas con discos de 47 mm de matriz de 2 capas de estireno-divinilbenceno-sulfonato de fase inversa Empore (SDB-RPS) (3M). La membrana de SDB-RPS se activó con acetonitrilo y se equilibró con tampón de lavado de SDB (TFA al 0,2 %, mili-Q, pH \leq 2) antes de cargar la muestra. Entonces, la membrana de SDB se lavó dos veces antes de la elución de la fracción peptídica absorbida en tampón de elución (acetonitrilo (ACN) al 80 %, NH₃ al 1 %, mili-Q, pH \geq 10). Las muestras se transfirieron a viales de vidrio para HPLC, se secaron a vacío y se almacenaron a -20 °C antes del análisis de CL-EM/EM.

Espectrometría de masas

Los péptidos se resuspendieron en 10 μ l de disolvente A (ACN al 3 %, ácido fórmico (FA) al 0,1 %, MQ) antes del análisis de CL-EM/EM. Cada muestra se analizó en un sistema Q Exactive HF (Thermo Fisher, Alemania) conectado a un sistema Dionex nano-UHPLC (Thermo Fisher Scientific) inyectando 8 μ l de cada vial de muestra. El UHPLC se equipó con una columna trampa (Acclaim PepMap 100, 75 μ m x 2 cm, nanoviper, C18, 3 μ m, 100 Å; Thermo Fisher Scientific) y una columna analítica (PepMap RSLC C18, 2 μ m, 100 Å, 50 μ m x 50 cm; Thermo Fisher Scientific) calentada hasta 50 °C. Los tampones de fase móvil para la separación mediante nCL consistieron en disolvente A y disolvente B (ACN al 95 %, FA al 0,1 %, MQ). Los péptidos se eluyeron durante un gradiente de 30 min y se pulverizaron directamente en el espectrómetro de masas. La velocidad de flujo se ajustó a 400 nl/min, y el gradiente de CL fue el siguiente: el 2-5 % de disolvente B en el plazo de 5 min, el 5-40 % de disolvente B en el plazo de 30 min, el 40-47 % de disolvente B en el plazo 5 min, el 47- 100 % de disolvente B en el plazo de 5 min y el 100 % de B durante 8 min y el 2 % de disolvente B durante 5 min. La nanopulverización se logró con un voltaje aplicado de 1,8 kV.

El espectrómetro de masas se programó en un modo de adquisición dependiente de datos (DDA) (los 10 picos más intensos) y se configuró para realizar un barrido exploratorio por transformada de Fourier desde 400 hasta 1600 m/z (resolución 60.000 a 200 m/z), diana AGC 1e6, tiempo máximo de inyección 250 ms. Los barridos de MS2 se adquirieron en los 10 iones de MS1 más abundantes del estado de carga 1-7 usando una ventana de aislamiento de cuadrupolo de 1,2 m/z para la fragmentación por HCD y la exclusión dinámica a los 30 s.

Análisis de datos

Se hizo una búsqueda en los archivos de EM sin procesar usando MaxQuant (versión 1.5.6.5) frente a un archivo de péptidos FASTA que incluía los péptidos usados en el experimento, complementado con una lista de contaminantes comunes de CL-EM/EM. La especificidad de digestión se estableció como inespecífica y las modificaciones de la variable peptídica se establecieron para permitir la oxidación (M), la primera tolerancia de búsqueda se estableció a 20 ppm y la FDR se estableció al 1 %

Ejemplos

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

5 En el presente documento se describe cómo se logró la mutagénesis dirigida de una familia de genes que codificaban complejos presentadores de antígeno (APX) para producir el primer rasgo de una célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería (eAPC). Dicho rasgo es la falta de expresión en superficie de al menos un miembro de la familia APX.

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

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

20 Se transfectaron un plásmido que codificaba los ARNg óptimos que seleccionan como diana los loci de HLA-A, HLA-B y HLA-C, junto con un plásmido que codificaba Cas9-P2A-GFP en células HEK293 tal como se describe en los métodos. Se clasificaron por FAC células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después de la transfección (figura 28a). Las células clasificadas por GFP se expandieron adicionalmente durante más de 5 días para permitir que pasara el tiempo suficiente para que se produjesen eventos de edición de genes, y en el caso de una mutación perjudicial, para perder la expresión de la proteína de HLA endógena residual. Después de este periodo de crecimiento, las células se tiñeron con un pan-anticuerpo anti-HLA-ABC, dando como resultado la identificación de células con expresión reducida de HLA-ABC en su superficie (figura 28b). La ausencia de tinción con pan-anticuerpos anti-HLA-ABC implica que cada alelo de HLA-A, HLA-B y HLA-C estaba mutado. Las células negativas para HLA-ABC individuales se clasificaron y se expandieron para representar una colección de monoclonos.

25 Se confirmaron los monoclonos por la falta de expresión en superficie de HLA-ABC. Se demostró que un subconjunto de monoclonos carecía de expresión en superficie de HLA- ABC, de los cuales tres monoclonos a modo de ejemplo, ACL-414, ACL-415 y ACL-416 se representan en la figura 29. La caracterización genética adicional de los monoclonos que carecían de expresión en superficie de HLA se realizó determinando que las líneas celulares presentaban una mutación genética subyacente en todos los alelos de los genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C (figura 30). Se realizó caracterización genética mediante PCR con cebadores que abarcaban los sitios diana genómicos de ARNg, para la detección de cambios de tamaño de amplicón y/o se usaron como molde para la secuenciación. La figura 30 muestra una selección de monoclonos de HLA-ABC^{nulo} que contenían una deleción genética en los alelos de los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C detectados por un amplicón de PCR más corto en comparación con el tamaño del amplicón de la línea celular fundadora (por ejemplo, ACL-414).

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

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

35 En el presente documento se describe cómo el componente B se integró de manera estable en la línea monoclonal ACL-414 para producir el segundo rasgo de una eAPC. Dicho segundo rasgo contenía al menos un sitio de receptor genómico para la integración de al menos un ORF, en donde el sitio de receptor genómico era un constructo sintético diseñado para el intercambio de casetes mediado por recombinasa (RMCE).

40 En este ejemplo, el sitio de integración genómica, el componente B, se compone de elementos genéticos seleccionados. Dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3, que flanqueaban a un ORF que codificaba el marcador de selección, proteína fluorescente azul (BFP). El extremo 5' codificado del sitio FRT era un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F3 era un terminador de señal de poliadenilación de SV40. El beneficio de colocar los elementos reguladores en cis no codificantes en el exterior de los sitios de recombinasa heteroespecíficos fue que no se requirieron en el vector donante genético coincidente, el componente C. Por tanto, después del suministro celular del vector donante genético, no se observaría expresión transitoria del ORF codificado. Esto hizo que la selección de RMCE exitoso sea más fiable ya que la expresión celular del ORF del

vector donante genético probablemente se produciría sólo después de la integración correcta en el componente B, ya que ahora contenía los elementos reguladores en cis apropiados (véase el ejemplo 6).

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

10 Se logró la integración estable del componente B mediante el proceso de recombinación dirigida por homología (HDR) en el locus de refugio seguro genómico, AAVS1. Se transfectó la línea celular ACL-414 con plásmido que codificaba los ARNg óptimos que seleccionan como diana el locus AAVS1, plásmido que codificaba Cas9-P2 A-GFP y plásmido que codificaba los elementos genéticos del componente B flanqueados por brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1. Se clasificaron por FAC células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2-A-GFP basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después de la transfección (figura 31a). Las células
15 clasificadas por GFP se expandieron adicionalmente durante más de 7 días permitiendo que pasara un tiempo suficiente para que se produjese HDR y para perder la expresión transitoria del marcador de selección, BFP. Después de este periodo de crecimiento, se analizaron las células en una máquina de FACS y las células positivas para BFP individuales se clasificaron y se expandieron para representar una colección de monoclonas (figura 31c).

20 Se seleccionaron líneas monoclonales individuales como eAPC basándose en su expresión de BFP mantenida y para una única integración del componente B en la ubicación genómica de AAVS1 deseada. Las líneas celulares ACL-469 y ACL-470 representaron monoclonas con expresión de BFP mantenida (figuras 32a y b). Se realizó caracterización genética en ADN extraído de los monoclonas ACL-469 y ACL-470 y demostró que sus genomas integraron el componente B, y ese componente B se ha integrado en el sitio de AAVS1 (figura 33). La confirmación de la integración genómica se determinó mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño
25 esperado que utilizó cebadores específicos para el componente B (figura 33a). La confirmación de que el componente B se integró en el sitio de AAVS1 se determinó mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado que utilizó cebadores diseñados contra la secuencia genómica de AAVS1 distal a la región codificada por los brazos homólogos y un cebador que es único para el terminador SV40 pA codificado por el componente B (figura 33b). El número de copias del componente B se determinó mediante PCR de gota digital, en donde se midió el número de moléculas de ADN del componente B y del gen de referencia y se calculó la razón (tabla 1). Los monoclonas ACL- 469 y ACL-470 contenían una razón de 1 molécula del componente B por 3 moléculas del gen de referencia. Cuando se tuvo en cuenta que la línea celular HEK293 fundadora tiene un cariotipo casi triploide, esto demostró una única integración del componente B en las líneas celulares ACL-469 y
35 ACL-470.

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

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

45 En el presente documento se describe cómo el componente B y el componente D se integraron de manera estable en la línea monoclonal ACL- 414, para producir el segundo rasgo de una eAPC. Dicho segundo rasgo contiene dos sitios de receptor genómico para la integración de al menos un ORF, en donde el sitio de receptor genómico era un constructo sintético diseñado para el intercambio de casetes mediado por recombinasa (RMCE).

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

60 El componente B y el componente D se integraron en el AAVS1 tal como se describe en el ejemplo 2 pero con la adición del plásmido que codificaba elementos del componente D, a la mezcla de transfección. Se clasificaron por FAC células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2-A-GFP basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después de la transfección (figura 31a). Las células clasificadas por GFP se expandieron adicionalmente durante más de 7 días, después de lo cual, se analizaron las células en una máquina de FACS y se clasificaron las células positivas para BFP y RFP individuales y se expandieron para representar una
65 colección de monoclonas (figura 31b).

Se seleccionaron líneas monoclonales individuales como eAPC basándose en su expresión de BFP y RFP mantenida y para una única integración del componente B y una única integración del componente D en diferentes alelos de AAVS1. La línea celular ACL-472 era un monoclon representativo con expresión de BFP y RFP mantenida (figura 32c). Tal como se describe en el ejemplo 2, se realizó caracterización genética 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 integraron en el sitio de AAVS1 (figura 33). El número de copias tanto del componente B como D se determinó mediante PCR de gota digital, en donde se midió el número de moléculas de ADN de referencia y los componentes B, D y se calculó la razón. El monoclon ACL-472 contenía una razón de 2 moléculas de componentes B y D con respecto a 3 moléculas de genes de referencia (tabla 2). Cuando se tuvo en cuenta que la línea celular HEK293 fundadora tiene un cariotipo casi triploide, esto demostró una única integración del componente B y una única integración del componente D en la línea celular ACL-472

En conclusión, la línea celular ACL-472 modificada genéticamente era y contenía una única copia del componente B y el componente D del sitio de receptor genómico sintético, diseñado para RMCE y, por tanto, demostró la creación de una eAPC con dos sitios de receptor de integración sintéticos únicos.

Ejemplo 4: Una eAPC-p construida en una etapa con una pareja de integración en donde el componente C' codifica un único ORF de HLAI

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

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

Se generó la línea celular de HLA-DR,DP,DQ^{nulo} ACL-128 mediante mutagénesis dirigida a CRISPR/cas9 con ARNg que selecciona como diana las familias de genes HLA-A, HLA-B y HLA-C y HLA-DRA, HLA-DRB, HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-DPA y HLA-DPB usando el método descrito en el ejemplo 1. El marcaje de superficie con un pan-anticuerpo anti-HLA-ABC o pan-anticuerpo anti-HLA-DR,DP,DQ confirmó que ACL-128 carecía de expresión en superficie de ambas familias de APX, figura 34b y 35y figura 37b, respectivamente.

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

El procedimiento para construir una eAPC-p se realizó mediante la integración inducida por HDR del componente C' en el componente B para producir el componente B'. La línea celular ACL-128 se sometió a electroporación con plásmidos que codificaban los ARNg óptimos que seleccionaban como diana los loci AAVS1, Cas9-P2A-GFP y el componente C'. Se clasificaron por FAC células positivas para la captación del plásmido Cas9-P2A-GFP basándose en la fluorescencia de GFP, 2 días después de la electroporación (figura 34a). Las células clasificadas por GFP se expandieron adicionalmente durante más de 7 días permitiendo que pasara un tiempo suficiente para que se produjese HDR y perdiese la expresión transitoria del aAPX. Después de este periodo de crecimiento, las células se tiñeron con un pan-anticuerpo anti-HLA-ABC, dando como resultado la identificación de células que ganaron la expresión de un HLA analito en su superficie (figura 34b). La presencia de tinción con pan-anticuerpos anti-HLA-ABC implica que el ORF de HLA analito codificado en el componente C' se había integrado en el genoma. Se clasificaron las células teñidas positivas para HLA-ABC individuales y se expandieron para representar una colección de monoclonales de eAPC-p.

Se seleccionaron líneas monoclonales individuales como una eAPC-p basándose en su expresión en superficie de HLA analito mantenida y la integración del ORF analito en el sitio de receptor genómico, creando el componente B'. Las líneas celulares ACL-321 y ACL-331 eran monoclonales representativas con expresión en superficie de HLA analito mantenida de HLA- A*24:02 o HLA-B*07:02 respectivamente (figura 35). Se realizó caracterización genética en ADN extraído de monoclonales seleccionados ACL-321, ACL-327, ACL-331 y ACL-332

y demostró que sus genomas integraron el componente C', y que la integración se produjo en el sitio de receptor genómico de AAVS1, generando el componente B' (figura 36). La confirmación de la integración genómica se determinó mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado usando cebadores específicos para el componente C' (figura 36a). La presencia del componente B' se confirmó mediante la detección de un amplicón de PCR del tamaño esperado usando cebadores diseñados contra la secuencia genómica de AAVS1 distal a la región codificada por los brazos homólogos y un cebador único para el terminador SV40 pA unido al ORF de HLA analito (figura 36b).

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

Ejemplo 5: Una eAPC-p construida en una etapa con una pareja de integración, en donde el componente C' codificaba un ORF de HLAII emparejado

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

Este ejemplo usó eAPC, ACL-128, y el componente B, ambos definidos en el ejemplo 4. Sin embargo, el componente C' se componía de un único ORF que codificaba un alelo de HLA-DRA*01:01 ligado a un alelo de HLA-DRB1*01:01 mediante un elemento peptídico viral autoescindible, o alelo de HLA-DPA1*01:03 ligado a un alelo de HLA-DPB1*04:01 por un elemento peptídico viral autoescindible, denominado componente C'^{HLA-DRA*01:01/HLA-DRS1*01:01} y el componente C'^{HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01} respectivamente. El elemento peptídico viral autoescindible codificaba una secuencia peptídica, que cuando se transcribió dio como resultado la autoescisión del péptido sintetizado y produjo dos polipéptidos que definen cada cadena de HLA.

Dentro del ejemplo 4, se describió el procedimiento para construir una eAPC-p con la excepción de que la identificación de células que ganaron la expresión de un HLA analito en su superficie se evaluó mediante el marcaje de la superficie celular con un pan-anticuerpo anti-HLA-DR,DP,DQ (figura 37). La presencia de tinción con pan-anticuerpo anti-HLA-DR,DP,DQ implica que el ORF de HLA analito codificado en el componente C' se había integrado en el genoma. Se clasificaron las células teñidas con HLA-DR,DP,DQ individuales y se expandieron para representar una colección de monoclonos de eAPC-p.

Se seleccionaron líneas monoclonales individuales como una eAPC-p basándose en su expresión en superficie de HLA analito mantenida y la integración del ORF analito en el sitio de receptor genómico, creando el componente B' tal como se describe en el ejemplo 4. Las líneas celulares ACL-341 y ACL-350 fueron los monoclonos representativos con expresión en superficie de HLA analito mantenida de HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*01:01 o HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01 (figura 38).

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

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

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

En este ejemplo, el sitio de integración genómica, el componente B, se compone de elementos genéticos seleccionados. Dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3, que flanqueaban al ORF que codificaba el marcador de selección, proteína fluorescente azul (BFP). El extremo 5' codificado del sitio FRT era un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F3 era un terminador de señal de poliadenilación de SV40. Los elementos genéticos del componente B, se integraron en la línea celular ACL-128 mediante electroporación con los mismos plásmidos que se describen en el ejemplo 2. Se seleccionaron líneas monoclonales individuales basándose en su expresión de BFP mantenida y se caracterizaron genéticamente para contener una única integración del componente B en la ubicación genómica de AAVS1 deseada tal como se describe en el ejemplo 2 (figura 39a). La línea celular eAPC resultante, ACL-385, era y HLA-DR,DP,DQ^{nulo} y contenía una única copia de un sitio de receptor genómico sintético, el componente B, diseñado para RMCE

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

Se creó una eAPC-p a través de RMCE mediante electroporación de la línea celular ACL-385 con plásmido que codificaba la Tyr-recombinasa, Flp, junto con el componente C'^{FRT:HLA-A*02:01:F3} 4.10 días después de la electroporación, se clasificaron las células individuales positivas para la expresión en superficie de HLA-I y negativas/reducidas para el marcador de proteína fluorescente, BFP, codificado por el marcador de selección del componente B. Se seleccionaron líneas monoclonales sobrecrecidas individuales basándose en su expresión mantenida del alelo de HLA-I y la pérdida de fluorescencia de BFP, lo que indicó que se produjo el RMCE esperado. Para identificar tales monoclonas, se realizaron pruebas tanto fenotípicas como genéticas. En primer lugar, se cribaron todas las líneas celulares monoclonales para determinar la expresión de HLA-ABC en la superficie celular y la ausencia de fluorescencia de BFP (figura 39). Se extrajo ADN genómico de dichas líneas celulares, por ejemplo, ACL-421 y ACL-422, y se confirmó la integración del componente C' en el componente B que generó el componente B', mediante la detección de un producto de PCR específico para el componente B' (figura 40).

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

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

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

En este ejemplo, se realizó la etapa 1, en donde, la eAPC era ACL-128, el sitio de receptor genómico, el componente B, era el sitio genómico del alelo de HLA-A mutado, designado como HLA-A^{nu10}, y se logró la integración dirigida a través de HDR. El vector donante genético, el componente C, se apareó con el componente B, por el componente C que codifica los brazos de homología izquierdo y derecho de HLA-A^{nu10}, que se componían cada uno de >500 pb de secuencia homóloga al locus genómico de HLA-A^{nu10}. Entre los brazos de homología izquierdo y derecho de HLA-A^{nu10}, el plásmido codificaba un promotor de CMV y un terminador de SV40. El aAPX de interés se clonó entre el promotor y el terminador, generando el componente C'. En este ejemplo, el componente C' se componía de un único ORF que codificaba un aAPX, el HLA-A*02:01 o HLA-B*35:01, indicados como el componente C'^{HLA-A*02:01} y el componente C'^{HLA-S*35:01}, respectivamente.

La integración del componente C' en el componente B y la selección de líneas celulares de eAPC-p monoclonales fue tal como se describió en el ejemplo 4, con la excepción de que se usó un ARNg que seleccionaba como diana el locus genómico de HLA-A^{nu10} para fomentar la integración por HDR del componente C' en el componente B. Las eAPC-p monoclonales ACL-191 y ACL-286 expresaron HLA-A*02:01 o HLA-B*35:01 en la superficie celular, respectivamente (figura 41a).

En este ejemplo, se realizó la etapa 2, en donde, el sitio de receptor genómico, el componente D, era el sitio genómico de AAVS1 nativo y se logró la integración dirigida a través de HDR. El vector donante genético, el componente E, se apareó con el componente D, por el componente E que codificaba los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1, que se componían cada uno de >500 pb de secuencia homóloga al locus genómico AAVS1. Entre los brazos de homología izquierdo y derecho de AAVS1, el plásmido codificaba un promotor de CMV y un terminador de SV40. La aAM de interés se clonó entre el promotor y el terminador, generando el componente E'. En este ejemplo, el componente E' se componía de un único ORF que codificaba el marcador de selección, GFP, unido al ORF de aAM, que codifica hCMV-pp65, indicado como el componente E'^{GFP:2A:pp63}. El elemento peptídico viral autoescindible codificaba una secuencia peptídica, que cuando se transcribió dio como resultado la autoescisión del péptido sintetizado y produjo dos polipéptidos, GFP y la proteína hCMV-pp65 intracelular.

La integración del componente E' en el componente D fue tal como se describió en el ejemplo 4. Se seleccionaron líneas monoclonales individuales, ACL-391 y ACL-395, como eAPC-pa basándose en su expresión mantenida de marcador de selección GFP (figura 41b).

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

Ejemplo 8: Una eACP-p construida en una etapa en donde el componente C' codificaba un único ORF de HLAI.

En el presente documento se describe la conversión de una eAPC en una eAPC-p en una etapa, a través de un único evento de pareja de integración, para integrar un único ORF de HLAI que codificaba el complejo presentador de antígeno analito (aAPX), y en donde la eAPC contiene dos sitios de receptor genómico sintéticos, el componente B y el componente D, diseñados para la integración genómica basada en RMCE. La eAPC-p creada tiene un sitio de receptor genómico ocupado por el ORF de HLAI (componente B'), mientras que el componente D restante está disponible para un evento de pareja de integración adicional (figura 6).

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

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

La eAPC (ACL-402) se combinó independientemente con el vector que codifica la expresión de la enzima recombinasa RMCE (Flp,V4.1.8) y cada componente C' de cualquiera de V4.H.5 o V4.H.6 por electroporación. Las células se cultivaron durante 4-10 días, tras lo cual las células se seleccionaron y clasificaron basándose en la pérdida del marcador de selección de integración, RFP, y la ganancia de HLAI en la superficie de la célula. Posteriormente, las líneas monoclonales sobrecrecidas individuales se caracterizaron, confirmaron y seleccionaron basándose en la ganancia de la expresión en superficie de HLAI y la pérdida de fluorescencia de RFP, lo que indicó que se había producido la conversión esperada del componente B en B'. Los monoclonos de eAPC-p seleccionados, ACL-900 (V4.H.5, HLA-A*02:01) y ACL-963 (V4.H.6, HLA-A*24:02), son negativos para RFP en comparación con la línea celular ACL-402 parental y mantienen la expresión en superficie de HLAI (figura 43a). Además, ambos monoclonos retienen la expresión del marcador de selección BFP, lo que indica que el componente D permanece sin acoplar y aislado de los eventos de pareja de integración del componente B. Para caracterizar adicionalmente los monoclonos de eAPC-p, se extrajo ADN genómico de las células, y la confirmación de la pareja de integración entre el componente C' y el componente B, generando el componente B', se llevó a cabo mediante la detección de un producto de PCR específico para el componente B' (figura 43b, la tabla 5 enumera los cebadores usados para el genotipado). Los cebadores se diseñaron para seleccionar como diana una región adyacente al sitio de receptor genómico (ID de cebador 8.B.3) y una región dentro del evento de pareja de integración (ID de cebador 15.H.2). Sólo se produjo amplificación en casos de integración específica, mientras que no se generó producto a partir del control (ACL-3) o a partir de recombinación inespecífica.

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

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

El presente ejemplo describe cómo se construyen múltiples eAPC-pa a partir de una eAPC-p parental (descrita en el ejemplo 8) en paralelo, en donde el sitio de receptor genómico, el componente D, se selecciona como diana para la integración por un vector donante genético cebado, el componente E', que se compone de un único ORF que codifica una aAM.

En el presente ejemplo, la línea de eAPC-p parental usada fue ACL-900, que expresa un único aAPX (HLA-A*02:01) que está integrado en el componente B' (descrito en el ejemplo 8). El componente D de eAPC-p permanece abierto y se compone de dos sitios de recombinasa heteroespecíficos únicos, FRT y F3, que flanquean al ORF que codifica el marcador de selección, proteína fluorescente azul (BFP). El extremo 5' codificado del sitio FRT es un promotor EF1a y el extremo 3' del sitio F15 es un terminador de señal de poliadenilación de SV40. En este ejemplo se usó el vector donante genético, el componente E, y comprende dos sitios de recombinasa heteroespecíficos, F14 y F15, apareándose de ese modo con el componente D. En este ejemplo, el componente E se cebó adicionalmente con un ORF de aAM de interés seleccionado de HCMVpp28 (V9.E.6), HCMVpp52 (V9.E.7) o HCMVpp65 (V9.E.8), que también codifican cada uno una etiqueta c-myc C-terminal. Además, cada componente E' comprende además una secuencia de Kozak y un codón de iniciación inmediatamente en 5' al ORF de aAM. Por tanto, se creó una pequeña biblioteca discreta del componente E', que se componía de tres vectores.

La eAPC-p (ACL-900, ejemplo 8) se combinó independientemente con un vector que codifica la expresión de la enzima recombinasa RMCE (Flp,V4.1.8) y cada componente E' de cualquiera de V9.E.6, V9.E.7 o V9.E.8 por electroporación. Las células se incubaron durante 4-10 días para permitir que se produjera la pareja de integración, tras lo cual, se seleccionaron eAPC-pa individuales y se clasificaron en células individuales (monoclonos) basándose en una señal disminuida del marcador de selección de integración, BFP, codificado por el componente D (figura 44a). Posteriormente, las eAPC-pa monoclonales sobrecrecidas individuales, ACL-1219 (pp28), ACL-1227 (pp52) y ACL-1233 (pp65), se caracterizaron, confirmaron y seleccionaron basándose en la pérdida de expresión de BFP y la expresión en superficie mantenida de HLA I (aAPX en el componente B') (figura 44b), lo que indicó que se había producido la conversión esperada del componente D en D'. Además, la expresión en superficie mantenida del aAPX indicó que el componente B' no se veía afectado y estaba aislado del evento de pareja de integración entre el componente D y el componente E'. Para caracterizar adicionalmente las eAPC-pa monoclonales seleccionadas, se extrajo ADN genómico y se llevó a cabo la confirmación de la pareja de integración entre el componente E' y el componente D, generando el componente D', mediante la detección de un producto de amplicón de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específico para el componente D'. En la figura 44c se muestran dos monoclonos que representan cada una de las tres eAPC-pa, en donde se observan los productos de amplicón del tamaño esperado para el ORF de aAM pp28 (0,8 kb), pp52 (1,5 kb) y pp65 (1,9 kb), confirmando adicionalmente que se ha producido el evento de integración esperado. En resumen, este ejemplo demuestra tres ejemplos específicos de conversión de una eAPC-p en una eAPC-pa, usando el sistema multicomponente, en donde se suministran individualmente tres aAM diferentes (componente E') y se integran en un único sitio de receptor genómico (componente D) mediante el método de integración genómica por RMCE, creando posteriormente una pequeña biblioteca de tres eAPC-pa discretas que portan tres ORF de aAM diferentes. Además, se demostró que el segundo sitio de receptor genómico cargado (componente B') estaba aislado y no se veía afectado por la pareja de integración componente D/componente E'.

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

En el presente documento se describe cómo una agrupación de vectores de componente E (componente E') cebados que codifican colectivamente múltiples ORF de aAM (HCMVpp28, HCMVpp52 y HCMVpp65) se integró en una única etapa en la eAPC-p parental (descrita en el ejemplo 8) para crear una biblioteca de eAPC-pa agrupada, en donde cada célula individual integra un único ORF de antígeno analito aleatorio derivado de la agrupación original de vectores, en el componente D', de tal manera que cada eAPC-pa expresa una aAM aleatoria única, pero colectivamente la biblioteca agrupada de eAPC-pa representa todo el ORF de aAM codificado en la biblioteca agrupada original de vectores. Este método para crear una agrupación de eAPC-pa que expresan cada una un único ORF aleatorio de una agrupación de vectores se denomina integración al azar.

En este ejemplo, la línea de eAPC-p parental usada fue ACL-905 que expresa un aAPX (HLA-A*02:01) en la superficie celular (la construcción de la línea celular se describe en el ejemplo 8), el componente D y el componente E' fueron tal como se describieron en el ejemplo 9. En este ejemplo, los vectores de componente E' individuales del ejemplo 9, V9.E.6, V9.E.7 y V9.E.8, que se componen de los ORF de aAM que codifican HCMVpp28, HCMVpp52 y HCMVpp65, respectivamente, se mezclaron entre sí en una razón molar de 1:1:1 para crear una agrupación de vectores. La eAPC-p (ACL-905) se combinó con la agrupación de vectores y un vector que codificaba la expresión de la enzima recombinasa RMCE (Flp,V4.1.8) por electroporación. Las células se incubaron durante 4-10 días, tras lo cual, las células se clasificaron en masa basándose en la tenencia de una señal disminuida para el marcador de selección de integración, BFP, codificado por el componente D (figura 45a) que genera la población celular agrupada ACL-1050 (figura 45b).

Para confirmar que la agrupación de eAPC-pa ACL-1050 se componía de una mezcla de eAPC-pa que codifican cada una uno de HCMVpp28, HCMVpp52 o HCMVpp65 en el componente D', las células individuales se clasificaron en células individuales a partir de la población policlonal y se seleccionaron 12 al azar para la caracterización genética. La amplificación del componente D' se realizó usando cebadores que abarcan cada aAM (tabla 5, figura 45c). En la figura 45c, se presentan los amplicones generados para las 12 células, con controles, en donde para todas y cada una de las 12 células se observa un único producto de amplicón que

concuera con el tamaño esperado para uno del ORF de aAM, pp28 (0,8 kb), pp52 (1,5 kb) y pp65 (1,9 kb). Además, cada ORF de aAM se identifica al menos una vez, lo que indica que la agrupación de eAPC-pa se compone de una eAPC-pa mixta en donde cada eAPC-pa en la agrupación ha integrado un único ORF de aAM aleatorio de la agrupación original de tres vectores.

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

15 Ejemplo 11: Demostración de dos sistemas eAPC:T para el sobrecrecimiento específico de antígeno inducido por eAPC-pa de células CD8 primarias

20 El presente ejemplo describe la compilación y el uso de dos sistemas eAPC:T diferentes, en donde el primer sistema se compone de una eAPC-p, una aAM proporcionada de manera exógena (para crear un aAPX:aAM presentado por las eAPC-p) y linfocitos T primarios analito (TC analito). El segundo sistema se compone de una eAPC-pa que presenta un aAPX:aAM y linfocitos T primarios analito (TC analito). Los sistemas eAPC:T se usaron para identificar y seleccionar TC analito que portan un TCR que permite una respuesta al antígeno analito (aAPX:aAM) mediante la detección de la proliferación y el sobrecrecimiento de TC analito específicas.

25 En este ejemplo, se monitorizó el sobrecrecimiento inducido de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno a partir de una población de linfocitos T CD8+, en donde el aAPX es HLA-A*02:01 (HLA de clase I) y la aAM es el péptido NLVPMVATV. En el sistema que se compone de eAPC-p, la aAM se proporciona de manera exógena, y en el sistema que se compone de eAPC-pa, la aAM se procesa de manera nativa a partir del ORF de antígeno analito integrado (HCMVpp65). Las líneas celulares usadas son eAPC-p (ACL-191) y eAPC-pa (ACL-390), que se describen en los ejemplos 8 y 9, respectivamente. Se aislaron las TC analito, linfocitos T CD8+, de un donante de sangre sano que se sabía que tenía linfocitos T CD8+ específicos para el péptido NLVPMVATV tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

35 En el primer sistema eAPC:T, las eAPC-p (ACL-191) se pulsaron con un péptido NLVPMVATV (SEQ ID NO: 3) exógeno a una concentración de péptido de 1 μ M durante 4 horas tal como se describió en la sección de materiales y métodos. A continuación, se compiló el sistema eAPC:T combinando las células eAPC-p pulsadas con TC analito (linfocitos T CD8+ clasificados en masa) y se sometieron a cocultivo en condiciones convencionales. Después de 9 días de cocultivo, se analizaron las células para determinar las células que formaron complejos cooperativos entre el antígeno analito y el TCR analito, mediante tinción específica con el tetrámero CMV-A.0201-NLVP (aAPX:aAM como reactivo soluble) para detectar el sobrecrecimiento de linfocitos T específicos de antígeno por citometría de flujo. Se realizó una comparación con sistemas eAPC:T que comprendían células ACL-191 no pulsadas (sin aAM) o células ACL-128 nulas para HLA pulsadas (sin aAPX) o células ACL-128 nulas para HLA no pulsadas (sin aAPX:aAM). Sólo se observa un sobrecrecimiento significativo de TC analito (linfocitos T CD8+) que se confirma que son específicas para el péptido NLVPMVATV (SEQ ID NO: 45 3) por tinción con el tetrámero HLA-A*02:01-NLVP en el sistema eAPC:T que comprende células eAPC-p pulsadas con NLVPMVATV (figura 46a).

50 Se compiló el segundo sistema eAPC:T combinando las células eAPC-pa (ACL-390) con las TC analito (linfocitos T CD8+ clasificados en masa) y se sometieron a cocultivo en condiciones convencionales (véase la sección de materiales y métodos). Al igual que con el primer sistema, se recogieron las células sometidas a cocultivo y se analizaron para determinar las células que fueron inducidas por el antígeno analito y el TCR analito, mediante tinción específica con el tetrámero CMV-A.0201-NLVP (aAPX:aAM como reactivo soluble). La figura 46b demuestra el sobrecrecimiento específico de antígeno de linfocitos T CD8+ sometidos a cocultivo con células eAPC-pa (ACL-390) con expresión estable del ORF de pp65 (aAM) y aAPX (HLA-A*02:01) y, por tanto, presentan un aAPX:aAM. Se realizó una comparación con otros dos sistemas eAPC:T con células eAPC-p (ACL-191) sin expresión estable del ORF de pp65 y con células ACL-128 nulas para HLA. Se identificó el sobrecrecimiento de linfocitos T CD8+ específicos para aAPX:aAM presentes por eAPC-pa mediante tinción con el tetrámero CMV-A.0201-NLVP sólo en el sistema eAPC:T con eAPC-pa (ACL- 390)

60 En resumen, este ejemplo demostró que el uso de células eAPC-p y eAPC-pa en los sistemas eAPC-T compilados que pueden someter a sobrecrecimiento selectivamente TC analito (linfocitos T CD8+) para la identificación y selección de TC analito que portan un TCR analito, permite la estimulación de linfocitos T por el antígeno analito presentado (aAPX:aAM). Además, los dos sistemas de eAPC:T demostraron el uso de diferentes formas de aAPX:aAM en donde en un sistema la aAM se proporciona de manera exógena y en el segundo sistema la aAM se proporciona a partir del ORF de antígeno analito integrado expresado de la eAPC-pa a través del procesamiento por la maquinaria celular nativa.

Ejemplo 12: Demostración de un sistema eAPC:T para el sobrecrecimiento específico de antígeno inducido por eAPC-pa de células CD4 primarias

5 El presente ejemplo describe la compilación y el uso de un sistema eAPC:T, en donde el sistema se compone de una eAPC-p, una aAM proporcionada de manera exógena (para crear un aAPX:aAM presentado por las eAPC-p) y linfocitos T primarios analito (TC analito). El sistema eAPC:T se usó para identificar y seleccionar TC analito que portan un TCR que permite una respuesta al antígeno analito (aAPX:aAM) y TCR analito, mediante la detección de la proliferación y el sobrecrecimiento de TC analito específicas.

10

En este ejemplo, se monitorizó el sobrecrecimiento inducido de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno a partir de una población de linfocitos T CD4+ por un aAPX:aAM específico, en donde el aAPX es HLA-DRB1*01:01 (HLA de clase II) y la aAM es el péptido PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 1), proporcionada de manera exógena. La línea celular usada fue eAPC-p (ACL-341) construida de manera similar a la descrita en los ejemplos 8 y 9. Se aislaron las TC analito, linfocitos T CD4+, de un donante de sangre sano que se sabía que tenía linfocitos T CD4+ específicos para el péptido PKYVKQNTLKLAT tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

15

20

En este ejemplo, las eAPC-p (ACL-341) se pulsaron con un péptido PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 1) exógeno a una concentración de péptido de 1 μ M durante 2 horas tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Se compiló el sistema eAPC:T combinando las células eAPC-p pulsadas con TC analito (linfocitos T CD4+ clasificados en masa) y se sometieron a cocultivo en condiciones convencionales. Después de 7 días de cocultivo, se analizaron las células para determinar las células que fueron inducidas por el aAPX-aAM presentado, mediante tinción específica con el tetrámero INFL-DRB1*01:01-PKYV (aAPX-aAM como reactivo soluble) para detectar el sobrecrecimiento de linfocitos T específicos de antígeno por citometría de flujo. Se realizó una comparación con un sistema eAPC:T que comprendía células ACL-341 no pulsadas (aAPX:CM). Sólo se observa un sobrecrecimiento significativo de TC analito (linfocitos T CD4+) que se confirma que son específicas para el péptido PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 1) por tinción con el tetrámero CMV-A.0201-NLVP en el sistema eAPC:T que comprende células eAPC-p pulsadas con PKYVKQNTLKLAT (figura 47)

25

30

En conclusión, este ejemplo demostró el uso de eAPC-p de base de HLA de clase II compiladas en sistemas eAPC:T que pueden someter a sobrecrecimiento selectivamente TC analito (linfocitos T CD4+) para la identificación y selección de TC analito que portan TCR analito que forman complejos cooperativos con el antígeno analito presentado (aAPX:aAM).

35

Ejemplo 13: Demostración de un eAPC:T para la acción citotóxica específica de antígeno inducida por eAPC-pa por células CD8 primarias sometidas a cocultivo

40

El presente ejemplo describe la compilación y el uso de dos sistemas eAPC:T diferentes, en donde el primer sistema se compone de una eAPC-p, una aAM proporcionada de manera exógena (para crear un aAPX:aAM presentado por las eAPC-p) y linfocitos T primarios analito (TC analito). El segundo sistema se compone de una eAPC-pa que presenta un aAPX:aAM y linfocitos T primarios analito (TC analito). Los sistemas eAPC:T se usaron para confirmar la especificidad de TC analito para el antígeno analito presentado (aAPX:aAM) mediante la detección de la acción citotóxica contra las eAPC-p o eAPC-pa por parte de las TC analito.

45

50

En este ejemplo, se demuestra la acción citotóxica de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno de una población de linfocitos T CD8+ que forman complejos cooperativos entre el TCR analito y aAPX:aAM, en donde el aAPX es HLA-A*02:01 (HLA de clase I) y la aAM es el péptido NLVPMVATV (SEQ ID NO: 3). En el sistema que se compone de eAPC-p, la aAM se proporciona de manera exógena, y en el sistema que se compone de eAPC-pa, la aAM se procesa de manera nativa a partir del ORF de antígeno analito integrado (HCMVpp65). Las líneas celulares usadas son eAPC-p (ACL-191) y eAPC-pa (ACL-390) descritas en los ejemplos 8 y 9. Se aislaron las TC analito, linfocitos T CD8+, de un donante de sangre sano que se sabía que tenía linfocitos T CD8+ específicos para el péptido NLVPMVATV tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

55

60

En el primer sistema eAPC:T, las eAPC-p (ACL-191) se pulsaron con un péptido NLVPMVATV exógeno a una concentración de péptido de 1 μ M durante 2 horas tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Luego, se compiló el sistema eAPC:T combinando las células eAPC-p pulsadas con TC analito (linfocitos T CD8+ clasificados en masa) y se sometieron a cocultivo en condiciones convencionales. Se analizó el cocultivo de las células para determinar complejos cooperativos entre el antígeno analito y el TCR analito, evaluando la destrucción de las células eAPC-p mediante tinción con anexina V y PI y citometría de flujo. Se realizó la comparación con sistemas eAPC:T que comprendían células ACL-128 nulas para HLA pulsadas (sin aAPX) o células ACL-128 nulas para HLA no pulsadas (sin aAPX:aAM). Sólo se confirma una acción citotóxica significativa por parte de TC analito (linfocitos T CD8+) en el sistema eAPC:T que comprendía células eAPC-p pulsadas con NLVPMVATV (figura 48a).

65

Se compiló el segundo sistema eAPC:T combinando las células eAPC-pa (ACL-390) con TC analito (linfocitos T

CD8+ clasificados en masa) y se sometieron a cocultivo en condiciones convencionales. Al igual que con el primer sistema, las células sometidas a cocultivo se recogieron y analizaron para determinar complejos cooperativos entre el antígeno analito y el TCR analito, evaluando la destrucción de las células eAPC-pa mediante tinción con anexina V y PI y citometría de flujo. La figura 48b demuestra la acción citotóxica específica de antígeno de linfocitos T CD8+ sometidos a cocultivo con células eAPC-pa (ACL-390) con expresión estable del ORF de pp65 (aAM, componente D') y aAPX (HLA-A*02:01, componente B'), y, por tanto, que presentan un aAPX:aAM. Se realizó una comparación con otros dos sistemas eAPC:T con células eAPC-p (ACL-191) sin expresión estable del ORF de pp65 (sin aAM) y con células ACL-128 nulas para HLA (sin aAPX:aAM). Sólo se observó una acción citotóxica específica de antígeno de los linfocitos T CD8+ específicos para el aAPX:aAM presentes por las eAPC-pa en el sistema eAPC:T con eAPC-pa (ACL-390).

En conclusión, este ejemplo demostró el uso de las células eAPC-p y eAPC-pa en los sistemas eAPC-T compilados que pueden inducir selectivamente una acción citotóxica por parte de TC analito (linfocitos T CD8+) para la identificación y selección de TC analito que portan TCR analito que forman complejos cooperativos con el antígeno analito presentado (aAPX:aAM). Además, los dos sistemas de eAPC:T demostraron el uso de diferentes formas de aAPX:aAM en donde en un sistema la aAM se proporciona de manera exógena y en el segundo sistema la aAM se proporciona a partir del ORF de antígeno analito integrado expresado de la eAPC-pa a través del procesamiento por la maquinaria celular nativa.

20 Ejemplo 14: Identificación de aAM cargada en eAPC-p mediante espectrometría de masas

El presente ejemplo describe el uso de eAPC-p administradas con moléculas de antígeno analito (aAM) exógenas, en donde los complejos aAPX:aAM se capturan posteriormente por cromatografía de afinidad de metales y la carga de aAM se identifica por espectrometría de masas. De este modo, se identifica el contexto aAPX:aAM de la aAM, es decir, la presentación restringida por HLA de péptidos antigénicos.

Este ejemplo usa líneas celulares eAPC-p del ejemplo 8, en donde las eAPC-p tienen un aAPX integrado en el componente B', ACL-900 (HLA-A*02:01) y ACL-963 (HLA-A*24:02). El ORF de aAPX también codificaba una etiqueta de 6xhistidinas C-terminal para la captura por cromatografía de afinidad de metales. Las eAPC-p se combinaron con una aAM exógena, que se pulsaron durante 2 horas a una concentración de 1 μ M, en donde se llevaron a cabo cuatro pulsos discretos, que consistieron en una de las siguientes aAM como péptidos; NLVPMVATV (APD-2, SEQ ID NO: 3), NLGPMAAGV (APD-21, SEQ ID NO: 4) o VYALPLKML (APD-11, SEQ ID NO: 5), o sin péptido.

Después de la pulsación, se recogieron las eAPC-p, se lisaron y posteriormente se capturó el aAPX:aAM por cromatografía de afinidad de metales tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Una vez capturados los péptidos (aAM y CM), se aislaron del aAPX excepto para el lavado con ácido y la filtración. Posteriormente, se sometió la fracción peptídica a extracción en fase líquida y retirada de la fase orgánica, seguido de extracción en fase sólida y envío a espectrometría de masas para la identificación de la fracción peptídica.

La figura 49 presenta una tabla que resume los resultados de espectrometría de masas de las diferentes combinaciones de pulsación eAPC-p/aAM. Los resultados identifican que el péptido NLVPMVATV se une a y forma un complejo con el aAPX HLA-A*02:01, y VYALPLKML se compleja con el aAPX HLA-A*24:01, mientras que todas las demás combinaciones de aAPX:aAM indicaron que no se formó ningún complejo aAPX:aAM detectable. Estos resultados están de acuerdo con las afinidades de unión péptido-HLA conocidas de los tres péptidos.

En conclusión, este ejemplo demostró que pueden usarse eAPC-p para identificar la unión selectiva de aAM a aAPX mediante la captura del aAPX:aAM y posterior liberación y enriquecimiento de la aAM para la identificación por espectrometría de masas. Por tanto, esto demuestra que pueden usarse eAPC-p para determinar la presentación restringida por HLA de moléculas antigénicas analito.

LISTA DE SECUENCIAS

55 <110> Genovie AB

<120> Sistema multicomponente modificado por ingeniería para la identificación y caracterización de receptores de linfocitos T y antígenos de linfocitos T

60 <130> P018243PCT1

<160> 72

65 <170> BISSAP 1.3

- <210> 1
<223> Molécula antigénica analito
- 5 <210> 2
<223> Molécula antigénica analito
- <210>3
<223> Molécula antigénica analito, APD-2
- 10 <210> 4
<223> Molécula antigénica analito, APD-21
- <210>5
<223> Molécula antigénica analito, APD-11
- 15 <210> 6
<223> V1.A.4 pcDNA3.1_GFP
- <210>7
<223> vector SpCas9-2A-GFP, V1.A.8
- 20 <210>8
<223> vector pMA-SV40pA, V1.C.2
- <210> 9
<223> vector HLA-A 02:01 6xHis + Exon2/3-HA-L+R, V1.C.6
- 25 <210> 10
<223> vector HLA-B 35:01 6xHis + Exon2/3-HA-L+R, V1.C.9
- 30 <210> 11
<223> vector AAVS1 -S_A24_6xH, V1.F.8
- <210> 12
<223> vector AAVS1-L_B07_6xH, V1.F.10
- 35 <210> 13
<223> vector AAVS1-I_GFP_HCMVpp65_WT, V1.G.10
- <210> 14
<223> vector AAVS1-I_GFP_HCMVpp65 ANET, V1.G.9
- 40 <210> 15
<223> vector AAVS1-I_GFP_HCMVpp65 AIN, V1.H.1
- 45 <210> 16
<223> vector AAVS1_DRA_Flag-DRB1_6xHis, V1.I.5
- <210> 17
<223> vector AAVS1_DPA1_Flag-DPB1_6xHis, V1.I.7
- 50 <210> 18
<223> vector HLA-A-sg-sp-opti1, V2.A.1
- <210> 19
<223> vector HLA-B-sg-sp-3, V2.A.7
- 55 <210> 20
<223> vector HLA-C-sg-sp-4, V2.B.3
- 60 <210> 21
<223> vector HLA-A-ex2-3_sg-sp-opti_1, V2.1.10
- <210> 22
<223> vector HLA-A-ex2-3_sg-sp-opti_2, V2.J.1
- 65

ES 2 968 633 T3

- <210> 23
<223> vector AAVSI_sg-sp-opti_3, V2.J.6
- 5 <210> 24
<223> vector AAVS_Efla-intron_F14_RFPnls_F 15, V4.B.2
- <210> 25
<223> vector AAVS_Efla-intron_FRT_BFPnls_F3, V4.B.3
- 10 <210> 26
<223> vector pMA_FRT_HLA-A*02:01-6xHis_F3, V4.D.2
- <210> 27
<223> vector pMA_F14_HLA-A*02:01-6xHis_F15, V4.H.5
- 15 <210> 28
<223> vector pMA_F14_HLA-A*24:02-6xHis_F15, V4.H.6
- <210> 29
<223> vector pMA_F14_HLA-B*07:02-6xHis_F15, V4.H.7
- 20 <210> 30
<223> vector pMA_F14_HLA-B*35:01-6xHis_F15, V4.H.8
- <210> 31
<223> vector CMVpro_FLP_Sv40pA_V2, V4.1.8
- 25 <210> 32
<223> vector FRT_HCMVpp28-3xMYC_F3, V9.E.6
- 30 <210> 33
<223> vector FRT_HCMVpp52-3xMYC_F3, V9.E.7
- <210> 34
<223> vector FRT_HCMVpp52-3xMYC_F3, V9.E.8
- 35 <210> 35
<223> cebador pMA-sv40 OE_F1, 1.C.2
- <210> 36
<223> cebador pMA-sv40 OE_R1, 1.C.3
- 40 <210> 37
<223> cebador HLA-A-GT-Rg3, 4.A.3 1
- 45 <210> 38
<223> cebador HLA-A-GT-Fg2, 4.A.4
- <210> 39
<223> cebador HLA-B-GT-Fg2, 4.A.7
- 50 <210> 40
<223> cebador HLA-B-GT-Rg2, 4.B.1
- <210> 41
<223> cebador HLA-C-GT-Fg2, 4.B.5
- 55 <210> 42
<223> cebador HLA-A-02_GT_Rg4, 4.I.9
- 60 <210> 43
<223> cebador HLA-A-Exon3_HA-RE-BgIII_F1, 6.I.9
- <210> 44
<223> cebador HLA-C-04-GT-Rg1, 8.A.1
- 65

- <210> 45
<223> cebador CMV-pA-HLA-Ex3_Probe_F1, 8.B.2
- 5 <210> 46
<223> cebador CMV-pro_GT_R1, 9.C.3
- <210> 47
<223> cebador sv40pA_GT_F1, 9.C.4
- 10 <210> 48
<223> cebador AAVS1_GT_F1, 9.C.5
- <210> 49
<223> cebador AAVS1_GT_F3, 9.C.7
- 15 <210> 50
<223> cebador AAVS1_GT_F4, 9.C.8
- <210> 51
<223> cebador AAVS1_GT_R2, 9.C.10
- 20 <210> 52
<223> cebador AAVS1_GT_R3, 9.D.1
- <210> 53
<223> cebador AAVS1_GT_R4, 9.D.2
- 25 <210> 54
<223> cebador HLA-A-intron4_GT_R1, 9.D.6
- 30 <210> 55
<223> cebador sv40pA-GT, 9.D.7
- <210> 56
<223> cebador sv40pA-AAVS1-probe-FAM-F1, 9.J.2
- 35 <210> 57
<223> cebador TRAC_TCRA-ex1_R1, 10.A.9
- <210> 58
<223> cebador TRAC_TCRA-promoter_F1, 10.A.10
- 40 <210> 59
<223> cebador TRAC_probe (HEX), 10.B.6
- 45 <210> 60
<223> cebador Pan-HLA_GT_F1, 8.B.3
- <210> 61
<223> cebador SV40pA_GT_R 1, 15.H.2
- 50 <210> 62
<223> cebador 3xMyc_OE_R1, 10.C.4
- <210> 63
<223> cebador CtermCysLink_OE_R1, 10.D.1
- 55 <210> 64
<223> cebador Ef1a_intron_GT_F2, 15.H.4
- 60 <210> 65
<223> cebador/sonda de ddPCR HCMVpp65_GT_F2, 21.I.1
- <210> 66
<223> cebador/sonda de ddPCR HCMVpp28_GT_F 1, 21.I.2
- 65

<210> 67
<223> cebador/sonda de ddPCR HCMVpp52_GT_F 1, 21.I.3

5 <210> 68
<223> cebador/sonda de ddPCR Myc-Tag_GT_R1, 20.H.10

<210> 69
<223> cebador/sonda de ddPCR Linker-Myc_Probe_Fam, 20.H.9

10 <210> 70
<223> cebador/sonda de ddPCR TRAC-TCRA-ex1-F1, 10.A.9

<210> 71
<223> cebador/sonda de ddPCR TRAC-TCRA-ex1-F1

15 <210> 72
<223> cebador/sonda de ddPCR TRAC-probe (HEX)

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 azul
CAR-T	Linfocitos T CAR
CM	Moléculas de carga
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas
ARNg	ARN guía de Cas9
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CDR	Regiones determinantes de la complementariedad
Región C	Región constante
CMV	Citomegalovirus
DAMPS	Patrones moleculares asociados a peligro
DC	Células dendríticas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Región D	Región de diversidad
eAPC	Célula presentadora de antígeno diseñada por ingeniería genética
eAPC-p	Célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería que presenta un complejo presentador de antígeno analito
eAPC-pa	Célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería que presenta un complejo presentador de antígeno analito y una molécula antigénica analito
eAPC-a	Célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería que expresa una molécula antigénica analito
eAPC:T	Sistema eAPC:TCR, en donde se combinan eAPC analito con TCR analito
FACS	Clasificación celular activada por fluorescencia
Linfocitos T GEM	Linfocitos T reactivos a micolilo codificados por la línea germinal
GFP	Proteína fluorescente verde
HLAI	HLA de clase I

HLAII	HLA de clase II
HDR	Recombinación dirigida por homología
HLA	Antígeno leucocitario humano
IgSF	Superfamilia de inmunoglobulinas
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
Linfocitos T iNK	Linfocitos T citotóxicos naturales invariantes
Región J	Región de unión
MACS	Clasificación celular activada magnéticamente
MAGE	Antígeno asociado a melanoma
MAIT	Linfocitos T invariantes asociados a la mucosa
NCBP	Partícula no basada en células
ORF	Marco de lectura abierto
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RMCE	Intercambio de casete mediado por recombinasa
RFP	Proteína fluorescente roja
ADN	Ácido ribonucleico
SH2	Homología a Src 2
Linfocitos T (células T)	Linfocitos T
TC	Células presentadoras de TCR o de reactivo de afinidad que imita a TCR
TCR	Receptor de linfocitos T
TRA	TCR alfa
TRB	TCR beta
TRD	TCR delta
TCRsp	Proteínas de superficie de TCR en complejo con CD3
TALEN	Nucleasas efectoras similares a activador de la transcripción
TRG	TCR gamma
TAA	Antígenos asociados a tumor
Región V	Región variable
β2M	β2-microglobulina
ZAP-70	Proteína asociada a la cadena ζ de 70 kDa

Definiciones

- 5 Par de cadenas complementarias del TCR: dos cadenas del TCR en donde las proteínas traducidas pueden formar una TCRsp en la superficie de una célula presentadora de TCR
- Afinidad: Parámetro cinético o de equilibrio de la interacción entre dos o más moléculas o proteínas
- 10 Reactivo de afinidad: Cualquier reactivo diseñado con afinidad específica por un analito. A menudo se usa en el contexto de afinidad por el complejo HLA-antígeno
- Alelo: Forma variante de un gen específico
- 15 AM: Molécula antigénica analito. De forma general, una proteína, pero también podría ser un metabolito que expresa una célula a partir de su ADN genómico y/o una secuencia genética introducida específica. La AM se expresa en la célula y a continuación un APX puede presentar un fragmento en la superficie celular como carga o por sí solo. Ya sea como carga o no, la AM puede ser entonces diana de células que llevan el receptor de linfocitos T o reactivos de afinidad relacionados.
- 20 Amplicón: un fragmento de ADN o ARN que es la fuente y/o el producto de la amplificación artificial usando

diversos métodos, incluyendo la PCR.

Analito: una entidad que es de interés que va a identificarse y/o medirse y/o investigarse en el sistema combinado.

5 TC analito: célula analito que presenta en la superficie un TCR analito, en donde la célula puede ser un linfocito T primario, un linfocito T recombinante o una célula presentadora de TCR modificada por ingeniería.

10 TCR analito: una TCRsp o un reactivo de afinidad que imita a TCR proporcionado en forma de reactivo soluble, reactivo inmovilizado, presentado por una NCBP o presentado en la superficie de una célula.

Antígeno: cualquier molécula que puede acoplarse por un TCR y da como resultado una señal que se transduce dentro del linfocito T, a menudo presentada por un complejo presentador de antígeno.

15 Antígeno analito: colectivamente el sistema eAPC:T que representa cualquier entidad que presenta un antígeno para su determinación analítica.

20 Anticuerpo: Molécula de afinidad expresada por células especializadas del sistema inmunitario denominadas linfocitos B y que contiene dos cadenas. Los linfocitos B expresan un repertorio muy grande y muy diverso de anticuerpos que generalmente no se unen a proteínas propias, pero que pueden unir y neutralizar patógenos o toxinas que pudieran suponer una amenaza para el hospedador. Los anticuerpos naturales o modificados por ingeniería artificialmente se usan a menudo como reactivos de afinidad.

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

APX: Complejo presentador de antígeno Una proteína que se expresa y presenta en la superficie celular de células nucleadas a partir de genes/ORF que codifican ADN genómico y/o una secuencia genética introducida específica. El APX presenta una carga que puede ser tanto un péptido como otras moléculas de metabolitos.

30 Región C: Región constante. Uno de los segmentos génicos que se usa para ensamblar el receptor de linfocitos T. La región c es un segmento distinto que en vez de dirigir la diversidad del TCR, define su función general en el sistema inmunitario.

35 Maquinaria de soporte de carga: Conjunto de proteínas celulares que generan y cargan moléculas de carga en APX procedentes de proteínas u otras moléculas presentadas que se encuentran en la célula.

40 CDR: Regiones determinantes de la complementariedad. Secuencias cortas en el extremo orientado hacia el antígeno de los TCR y anticuerpos que desempeñan la mayor parte de la función de unión a dianas. Cada anticuerpo y TCR contiene seis CDR y generalmente son la parte más variable de las moléculas, que permiten la detección de un gran número de diversas moléculas diana.

45 CM: Metabolito, péptido o moléculas de carga que se presentan 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, introducirse en el medio de cultivo o expresarse a partir de una secuencia genética introducida específicamente.

Número de copia: El número total de apariciones de una secuencia definida codificada dentro del genoma de una célula.

50 Citogenética: El estudio de herencia en relación con la estructura y función de los cromosomas, es decir, determinar el cariotipo de una célula

Citotóxico/citotoxicidad: Proceso en el cual un linfocito T libera factores que dañan directa y específicamente una célula diana.

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

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

Sistema eAPC:TCR: eTPC:T, el sistema en donde se combinan eAPC analito con TCR analito para obtener salidas primarias y terminales

65 Endógeno: Sustancia que se origina dentro de una célula

Célula diseñada: Una célula donde el genoma se ha diseñado mediante modificación genética.

Elemento regulador condicional eucariota: Secuencia de ADN que puede alterar la actividad de un promotor, que puede inducirse o reprimirse bajo condiciones definidas.

5

Promotor eucariota: Una secuencia de ADN que codifica un sitio de unión a ARN polimerasa y elementos de respuesta. La secuencia de la región promotora controla la unión de la ARN polimerasa y de los factores de transcripción, por tanto, los promotores desempeñan un papel importante en la determinación del lugar y el momento en que se expresará el gen de interés.

10

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

15

FACS/citometría de flujo: Clasificación de células activadas por fluorescencia. Técnica analítica por la cual pueden analizarse células individuales para determinar la expresión de marcadores intracelulares y de superficie celular específicos. Una variación de esa técnica, la clasificación celular, permite recuperar las células que llevan un conjunto definido de marcadores para un análisis posterior.

20

Familia de APX: Un conjunto de varios genes similares que codifican proteínas funcionalmente relacionadas que constituyen un complejo de presentación de antígeno

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

25

Vector donante genético: Un vector de base genética para el suministro de material genético al sitio de receptor genómico.

30

Sitio del receptor genómico: Un sitio dentro del genoma para la integración dirigida de material genético donante codificado dentro de un vector donante genético.

Sitios de recombinasa heteroespecíficos: Una secuencia de ADN reconocida por una enzima recombinasa para fomentar el sobrecruzamiento de dos moléculas de ADN.

35

HLA I: Antígeno leucocitario humano de clase I. Un gen que se expresa en todas las células nucleadas humanas y se exporta a la superficie celular donde presenta como carga fragmentos cortos, péptidos o proteínas internas a los receptores de linfocitos T. De este modo presenta fragmentos de infecciones potenciales en curso junto con proteínas intrínsecas. El HLA I puede presentarse además en forma de péptidos de carga que se añaden al medio de cultivo, generados a partir de proteínas expresadas a partir de elementos génicos introducidos o generados a partir de proteínas captadas por la célula. Los genes HLA de clase I son polimórficos, lo que significa que es probable que diferentes individuos tengan variaciones en el mismo gen, dando lugar a una variación en la presentación. Relacionado con el HLA de clase II.

40

HLA II: Antígeno leucocitario humano de clase II. Gen que se expresa en células específicas humanas que coordinan y ayudan a la respuesta inmune adaptativa, por ejemplo, en células dendríticas. Relacionado con el HLA de clase I. Las proteínas HLA de clase II se exportan a la superficie celular, donde presenta como carga fragmentos cortos, péptidos, proteínas externas a receptores de linfocitos T. De este modo presenta fragmentos de infecciones potenciales en curso junto con proteínas intrínsecas. El HLA II puede presentarse además en forma de péptidos de carga que se añaden al medio de cultivo, generados a partir de proteínas expresadas a partir de elementos génicos introducidos o generados a partir de proteínas captadas por la célula. Los genes HLA de clase II son polimórficos, lo que significa que es probable que diferentes individuos tengan variaciones en el mismo gen, dando lugar a una variación en la presentación.

45

50

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

55

Vigilancia inmunitaria: Proceso en el que el sistema inmunitario detecta, y es activado por, infecciones, neoplasias malignas u otras alteraciones potencialmente patógenas.

60

Aislante: Secuencia de ADN que evita que un gen se vea influido por la activación o represión de genes cercanos. Los aislantes también impiden la descondensación de la heterocromatina de un gen silenciado a un gen transcrito activamente.

65

Integración: Ligación física de una secuencia de ADN en un cromosoma de una célula

- Pareja de integración: Un vector donante genético y un sitio de receptor genómico emparejados.
- Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES): Secuencia de ADN que, una vez transcrita, codifica un elemento de ARN que permite el inicio de la traducción de una forma independiente de la protección
- 5 Región J: Región de unión. Uno de los segmentos génicos que se usa para ensamblar el receptor de linfocitos T. Cada individuo tiene un gran número de variaciones diferentes de estas regiones, lo que permite armar linfocitos T con una variedad muy grande de TCR diferentes.
- 10 Cariotipo: La composición cromosómica de una célula.
- Secuencia de Kozak: Secuencia corta requerida para la iniciación eficiente de la traducción
- HLA principal de clase I: Una familia de APX que comprende los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C.
- 15 Coincidente: Cuando dos componentes codifican elementos genéticos que dirigen y restringen la interacción entre los componentes complementados
- Sitio de reconocimiento de meganucleasa: Una secuencia de ADN reconocida por una endodesoxirribonucleasa, denominada habitualmente meganucleasa.
- 20 Metabolito: Una molécula creada o alterada en las rutas metabólicas de la célula
- Elemento genético móvil: Una secuencia de ADN que puede permitir la integración de ADN con la actividad de enzimas transposasas
- 25 Línea celular monoclonal: Grupo definido de células producidas a partir de una sola célula ancestral por replicación celular repetida
- 30 Nativo: una entidad que se produce de manera natural en la célula.
- Gen no codificante: Una secuencia de ADN que no codifica proteínas que se transcribe a moléculas de ARN funcionales no codificantes
- 35 ORF: Marco de lectura abierto. Extensión de material genético que codifica un marco de traducción para la síntesis de una proteína (polipéptido) por el ribosoma
- Paracrina: Señalización a través de factores solubles que actúan directamente sobre células vecinas.
- 40 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en la cual una molécula de ADN diana específica se amplifica exponencialmente
- Péptido: cadena corta de aminoácidos de entre 6 - 30 aminoácidos de longitud.
- 45 Análisis fenotípico: Análisis de las características observables de una célula.
- Polimórfico: Presente en formas diferentes en individuos de la misma especie por la presencia de alelos diferentes del mismo gen.
- 50 Polipéptido: Proteína que consiste en una tira de péptidos que forman una estructura tridimensional.
- Salidas primarias: Células eAPC, células TC analito, NCBP u otras formas de TCR analito a partir de las cuales pueden derivarse y/o determinarse las salidas terminales.
- 55 Cebador: Secuencia de ADN corta que permite el reconocimiento específico de una secuencia de ADN diana, por ejemplo, durante una PCR.
- Promotor: Elemento de ADN regulador para la iniciación controlada de la expresión génica.
- 60 Marcador seleccionable: Una secuencia de ADN que transmite un rasgo adecuado para métodos de selección artificial
- Integración al azar: El proceso por el cual se introduce una biblioteca de vectores en una población de células, por lo que sólo puede integrarse una única copia de cualquier inserto de vector dado en el genoma de cada célula individual. Se usa para referirse a la integración de vectores agrupados en una población de células dada a través de una pareja de integración.
- 65

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

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

Sintético: una entidad generada artificialmente e introducida en una célula.

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

15 TCR: Receptor de linfocitos T. Molécula de afinidad expresada por un subgrupo de linfocitos denominados linfocitos T.

Reactivo de afinidad que imita a TCR: Una proteína o molécula que puede interactuar y unirse con un antígeno analito en imitación a una TCRsp natural

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

25 Salidas terminales: Secuencias de TCR y antígeno analito, en forma de AM, APX, APX:CM, APX:AM, TCRsp o reactivos de afinidad que imitan a TCR.

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Sistema multicomponente en donde un primer componente es una célula presentadora de antígeno modificada por ingeniería (eAPC) designada como componente A y un segundo componente es un vector donante genético designado como componente C, para el suministro de uno o más ORF que codifican un complejo presentador de antígeno analito (aAPX) y/o una molécula antigénica analito (aAM), en donde el componente A
- 5 a. carece de expresión en superficie endógena de al menos una familia de aAPX y/o aAM y
- 10 b. contiene al menos un sitio de receptor genómico designado como componente B para la integración de al menos un ORF que codifica al menos un aAPX y/o una aAM, en donde el sitio de receptor genómico, componente B, es un constructo sintético diseñado para la recombinación homóloga dirigida al sitio.
2. Sistema multicomponente según la reivindicación 1, en donde el componente A comprende además un componente D, en donde el componente D es un sitio de receptor genómico para la integración de uno o más ORF que codifican al menos un aAPX y/o una aAM.
- 15 3. Sistema multicomponente según la reivindicación 2, en donde el componente D es un constructo sintético diseñado para la recombinación homóloga dirigida al sitio.
- 20 4. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente C se aparea con el componente B, y en donde el componente C está diseñado para suministrar
- 25 a. un único ORF que codifica al menos uno de dicho aAPX y/o dicha aAM y/o
- b. dos o más ORF que codifican al menos uno de dicho aAPX y/o dicha aAM
- y en donde a. y/o b. codifica(n) opcionalmente un marcador de selección de integración de tal manera que dicho(s) ORF puede(n) integrarse de manera estable en el sitio de receptor genómico componente B y se expresan dicho aAPX y/o dicha aAM.
- 30 5. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sistema multicomponente comprende además un componente E, en donde el componente E es un vector genético apareado con el componente D, en donde el componente E está diseñado para suministrar
- 35 a. un único ORF que codifica al menos uno de dicho aAPX y/o dicha aAM o
- b. dos o más ORF que codifican al menos uno de dicho aAPX y/o dicha aAM
- 40 y en donde a. y/o b. codifica(n) opcionalmente un marcador de selección de integración de tal manera que dicho(s) ORF puede(n) integrarse de manera estable en el sitio de receptor genómico componente D y se expresan dicho aAPX y/o dicha aAM.
- 45 6. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde uno o más sitios de receptor genómico adicionales y el vector donante genético coincidente se añaden como componentes adicionales del sistema.
7. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aAPX puede ser cualquiera de los siguientes
- 50 a. uno o más miembros de HLA de clase I
- b. uno o más miembros de HLA de clase II
- 55 c. uno o más complejos presentadores de antígeno distintos de HLA
- d. o una combinación de a, b y/o c.
8. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la aAM se selecciona de
- 60 a. un polipéptido o complejo de polipéptidos proporcionado como antígeno analito
- b. un péptido derivado de un polipéptido proporcionado como antígeno analito
- 65 c. un péptido proporcionado como antígeno analito

- d. un metabolito proporcionado como antígeno analito
- 5 e. un polipéptido o complejo de polipéptidos traducido a partir del/de los ORF(s) de la molécula antigénica analito
- f. un péptido derivado de un polipéptido traducido a partir del/de los ORF(s) de la molécula antigénica analito
- g. un péptido derivado a partir de la alteración del proteoma del componente A
- 10 h. un polipéptido derivado a partir de la alteración del proteoma del componente A
- i. un metabolito derivado a partir de la alteración del metaboloma del componente A y/o una combinación de los mismos.
- 15 9. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente B y/o el componente D se incluye y se compone de al menos uno de los siguientes elementos genéticos
- a. brazos homólogos
- 20 b. promotor eucariota
- c. elemento regulador condicional eucariota
- d. terminador eucariota
- 25 e. marcador de selección
- f. sitio aceptor de corte y empalme
- 30 g. sitio donante de corte y empalme
- h. gen no codificante de proteínas
- i. aislante
- 35 j. elemento genético móvil
- k. sitio de reconocimiento de meganucleasa
- 40 l. sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)
- m. elemento peptídico viral autoescindible
- n. una secuencia de consenso de Kozak
- 45 10. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente C y/o el componente E se incluye y se compone de al menos uno de los siguientes elementos genéticos
- a. brazos homólogos
- 50 b. promotor eucariota
- c. elemento regulador condicional eucariota
- 55 d. terminador eucariota
- e. marcador de selección
- f. marcador de selección de integración
- 60 g. sitio aceptor de corte y empalme
- h. sitio donante de corte y empalme
- 65 i. gen no codificante de proteínas

- j. aislante
- k. elemento genético móvil
- 5 l. sitio de reconocimiento de meganucleasa
- m. elemento peptídico viral autoescindible
- n. casete de resistencia a antibióticos
- 10 o. origen de replicación bacteriano
- p. origen de replicación de levadura
- 15 q. sitio de clonación
- r. una secuencia de consenso de Kozak
- s. sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)
- 20 11. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente B y/o el componente D se incluye y es para la recombinación homóloga dirigida de un único ORF y comprende:
 - a. un promotor eucariota
 - 25 b. un par de brazos homólogos
 - c. una secuencia de consenso de Kozak
 - 30 d. un marcador de selección
 - e. un terminador eucariota.
- 35 12. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente B y/o el componente D se incluye y es para la recombinación homóloga dirigida de dos o más ORF y comprende los siguientes elementos genéticos:
 - a. un promotor eucariota
 - 40 b. un par de brazos homólogos
 - c. dos o más secuencias de consenso de Kozak
 - d. un marcador de selección
 - 45 e. un terminador eucariota
 - f. un segundo promotor eucariota
 - 50 g. un segundo marcador de selección
 - h. un segundo terminador eucariota.
- 55 13. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente C y/o el componente E está presente y es para la recombinación homóloga dirigida de un único ORF y comprende los siguientes elementos genéticos:
 - a. un par de brazos homólogos
 - 60 b. una secuencia de consenso de Kozak
 - c. un casete de resistencia a antibióticos
 - d. un origen de replicación bacteriano
 - 65 e. un sitio de clonación para la introducción de un único ORF que codifica uno o más aAPX y/o aAM y/o

marcadores de selección de integración.

- 5 14. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente C y/o el componente E está presente y es para la recombinación homóloga dirigida de dos o más ORF y comprende lo siguiente:
- a. un par de brazos homólogos
 - 10 b. dos o más secuencias de consenso de Kozak
 - c. un casete de resistencia a antibióticos
 - d. un origen de replicación bacteriano o de levadura
 - 15 e. un sitio de clonación para la introducción de dos o más ORF, con terminadores eucariotas, que codifica uno o más aAPX y/o aAM y/o marcadores de selección de integración.
- 20 15. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente C y/o el componente E comprende adicionalmente al menos un ORF que codifica al menos un aAPX y/o una aAM para formar el componente C' y/o el componente E'.
- 25 16. Sistema multicomponente según la reivindicación 15, que comprende una biblioteca del componente C' y/o el componente E'.
- 30 17. Sistema multicomponente según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde uno o más de dicho componente C' y/o componente E' puede(n) combinarse con el componente A, para integrar uno o más ORF de aAPX codificados en el componente C' y/o el componente E', en los componentes B y/o el componente D, para obtener una célula, designada como eAPC-p, en donde los componentes B y/o el componente D se convierten en los componentes B' y/o el componente D' de tal manera que las eAPC-p expresan un aAPX en la superficie celular.
- 35 18. Sistema multicomponente según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde uno o más de dicho componente C' y/o componente E' puede(n) combinarse con el componente A, para integrar uno o más ORF de aAM codificados en el componente C' y/o el componente E', en los componentes B y/o el componente D, para obtener una célula, designada como eAPC-a, en donde los componentes B y/o los componentes D se convierten en los componentes B' y/o los componentes D' de tal manera que las eAPC-a expresan una aAM en la superficie celular o de manera intracelular.
- 40 19. Sistema multicomponente según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde uno o más de dicho componente C' y/o componente E' puede(n) combinarse con el componente A, para integrar uno o más ORF de aAPX y/o una o más aAM codificados en el componente C' y/o el componente E', en los componentes B y/o el componente D, para obtener una célula, designada como eAPC-pa, en donde los componentes B y/o el componente D se convierten en los componentes B' y/o el componente D' de tal manera que las eAPC-pa expresan un aAPX y una aAM y/o un aAPX:aAM.
- 45 20. Sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde uno o más de dicho componente C' o componente E' puede(n) combinarse con una eAPC-p, para integrar uno o más ORF de aAM codificados en el componente C' o el componente E', en los componentes B o el componente D, para obtener una célula, designada como eAPC-pa, en donde los componentes B o el componente D se convierten en los componentes B' o el componente D' de tal manera que expresa un aAPX y una aAM y/o un aAPX:aAM.
- 50 21. Sistema multicomponente según una cualquiera de la reivindicación 15, 16 ó 17, en donde uno o más de dicho componente C' o componente E' puede(n) combinarse con una eAPC-a, para integrar uno o más ORF de aAPX codificados en el componente C' o el componente E', en los componentes B o el componente D, para obtener una célula, designada como eAPC-pa, en donde los componentes B o el componente D se convierten en los componentes B' o el componente D' de tal manera que expresa un aAPX y una aAM y/o un aAPX:aAM.
- 55 22. Uso de un sistema multicomponente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para generar una o más eAPC analito seleccionadas de eAPC-p, eAPC-a y eAPC-pa.
- 60 23. Método para preparar una eAPC-p según la reivindicación 17, comprendiendo el método
- a. combinar el componente A, con al menos uno del componente C' o el componente E', en donde el uno o más del componente C' o el componente E' codifica(n) uno o más aAPX, y combinar con factores de integración y al
 - 65 menos uno de

- b. seleccionar por la pérdida de marcador(es) de selección del sitio de receptor genómico
- c. seleccionar por la ganancia de una expresión en superficie de uno o más aAPX
- 5 d. seleccionar por la ganancia de uno o más de un marcador de selección de integración.
24. Método según la reivindicación 23, en donde se incluyen b, c y d.
25. Método para preparar una eAPC-a según la reivindicación 18, comprendiendo el método
- 10 a. combinar el componente A, con al menos uno del componente C' o el componente E', en donde el uno o más del componente C' o el componente E' codifica(n) una o más aAM, y combinar con factores de integración y al menos uno de
- 15 b. seleccionar por la pérdida de marcador(es) de selección del sitio de receptor genómico
- c. seleccionar por la ganancia de una expresión en superficie de una o más aAM
- d. seleccionar por la ganancia de uno o más de un marcador de selección de integración.
- 20 26. Método según la reivindicación 25, en donde se incluyen b y d.
27. Método para preparar una eAPC-pa según la reivindicación 21, comprendiendo el método
- 25 a. usar el sistema multicomponente según la reivindicación 15 para combinar una eAPC-a según la reivindicación 18, con al menos uno del componente C' o el componente E', en donde uno o más del componente C' o el componente E' codifica(n) uno o más ORF de aAPX, y combinar con factores de integración y al menos uno de
- 30 b. seleccionar por la pérdida de marcador(es) de selección del sitio de receptor genómico
- c. seleccionar por la ganancia de una expresión en superficie de uno o más aAPX
- d. seleccionar por la ganancia de uno o más de un marcador de selección de integración.
- 35 28. Método según la reivindicación 27, en donde se incluyen b, c y d.
29. Método para preparar una eAPC-pa según la reivindicación 20, comprendiendo el método
- 40 a. usar el sistema multicomponente según la reivindicación 15 para combinar una eAPC-a según la reivindicación 17, con al menos uno del componente C' o el componente E', en donde el uno o más del componente C' o el componente E' codifica(n) uno o más ORF de aAM, y combinar con factores de integración y al menos uno de
- b. seleccionar por la pérdida de marcador(es) de selección del sitio de receptor genómico
- 45 c. seleccionar por la ganancia de una expresión en superficie de una o más aAM
- d. seleccionar por la ganancia de uno o más de un marcador de selección de integración.
- 50 30. Método según la reivindicación 29, en donde se incluyen b y d.
31. Método para preparar una eAPC-pa según la reivindicación 19, comprendiendo el método
- a. usar el sistema multicomponente según la reivindicación 15 para combinar una eAPC, con al menos uno del componente C' o el componente E', en donde el uno o más del componente C' o el componente E' codifica(n)
- 55 uno o más ORF de aAM y uno o más ORF de aAPX, y combinar con factores de integración y al menos uno de
- b. seleccionar por la pérdida de marcador(es) de selección del sitio de receptor genómico
- c. seleccionar por la ganancia de una expresión en superficie de una o más aAM y/o expresión en superficie de uno o más aAPX
- 60 d. seleccionar por la ganancia de uno o más de un marcador de selección de integración.
- 65 32. Método según la reivindicación 31, en donde se incluyen b, c y d.

DIBUJOS

Figura 1

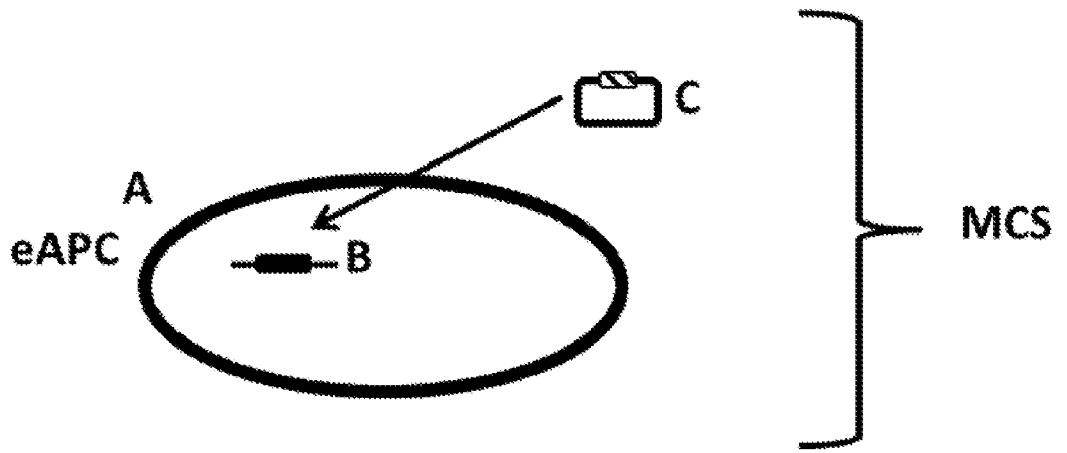


Figura 2

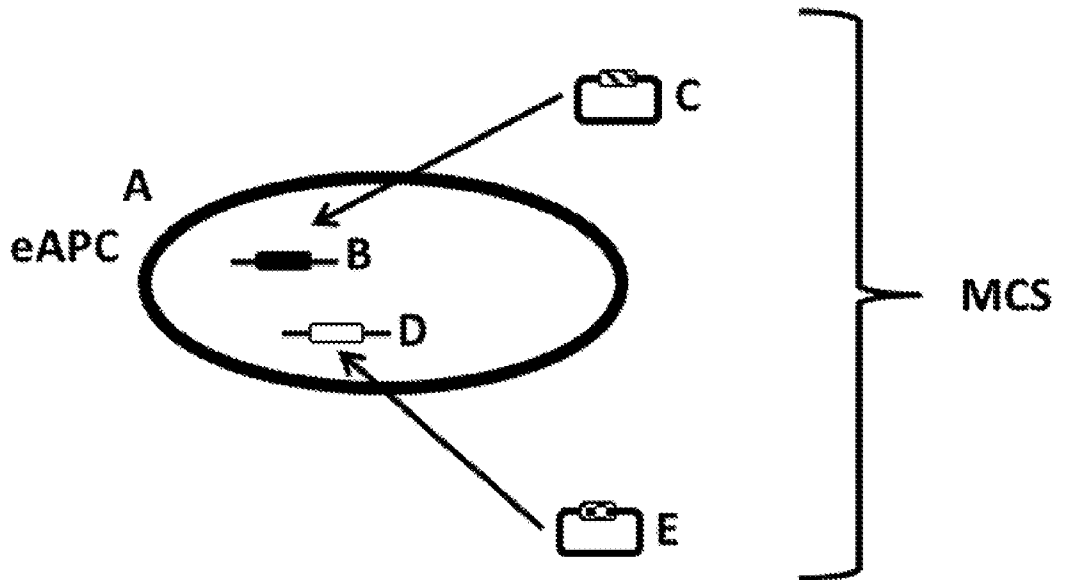


Figura 3

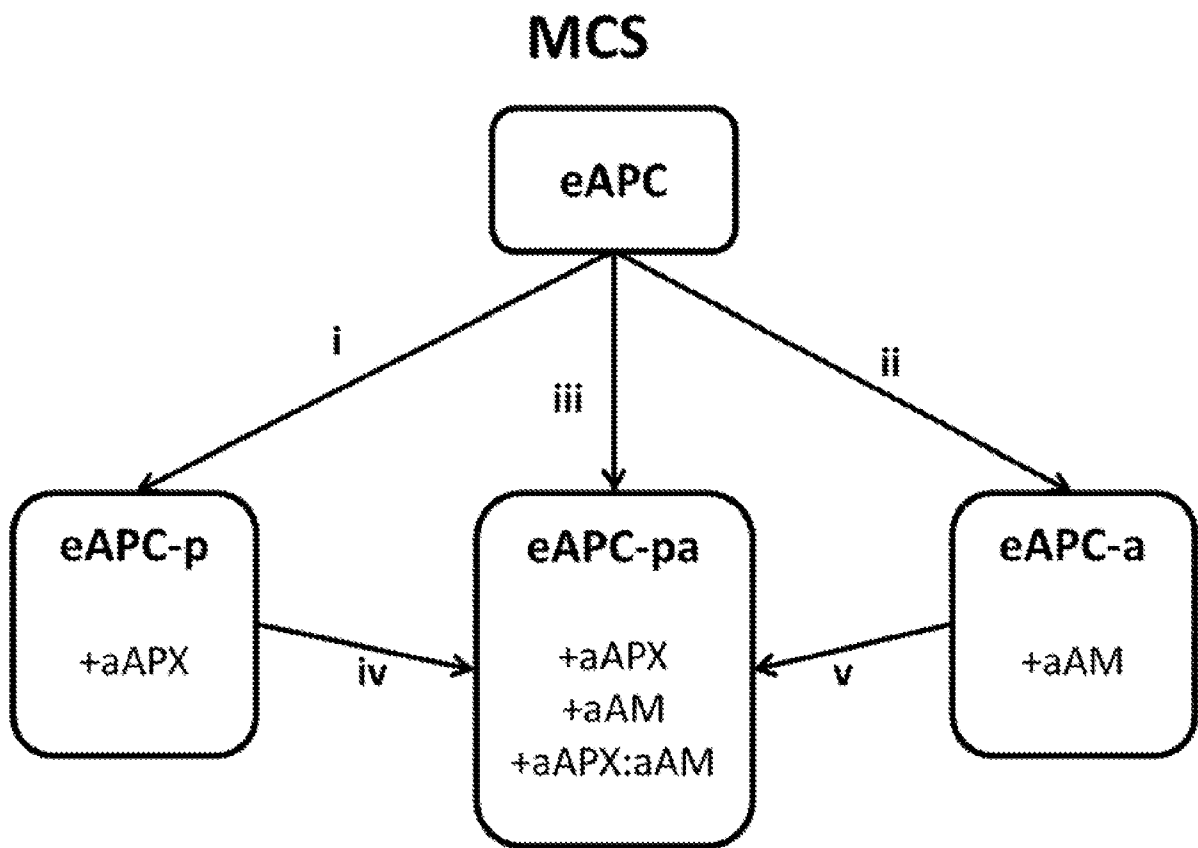


Figura 4

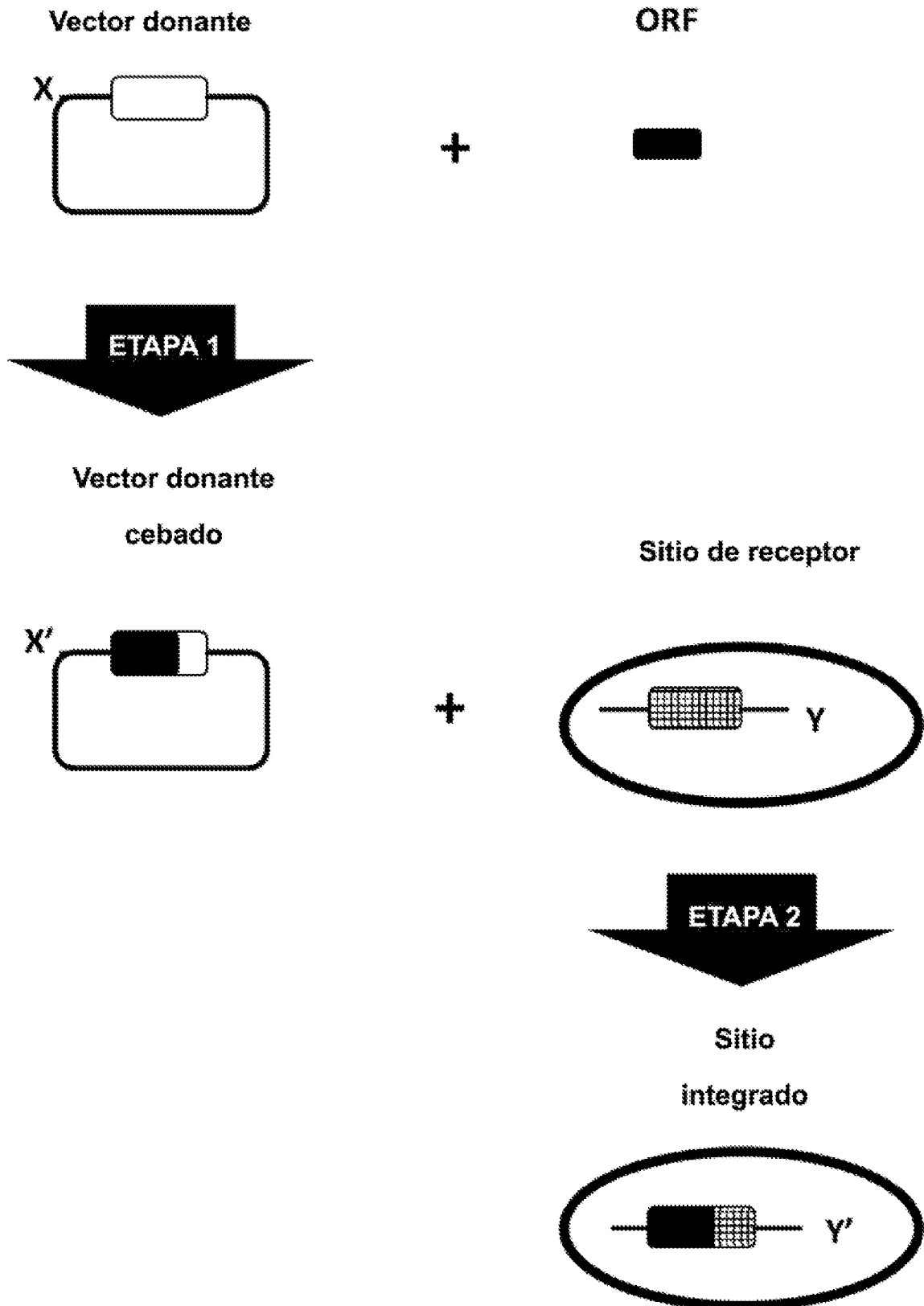


Figura 5

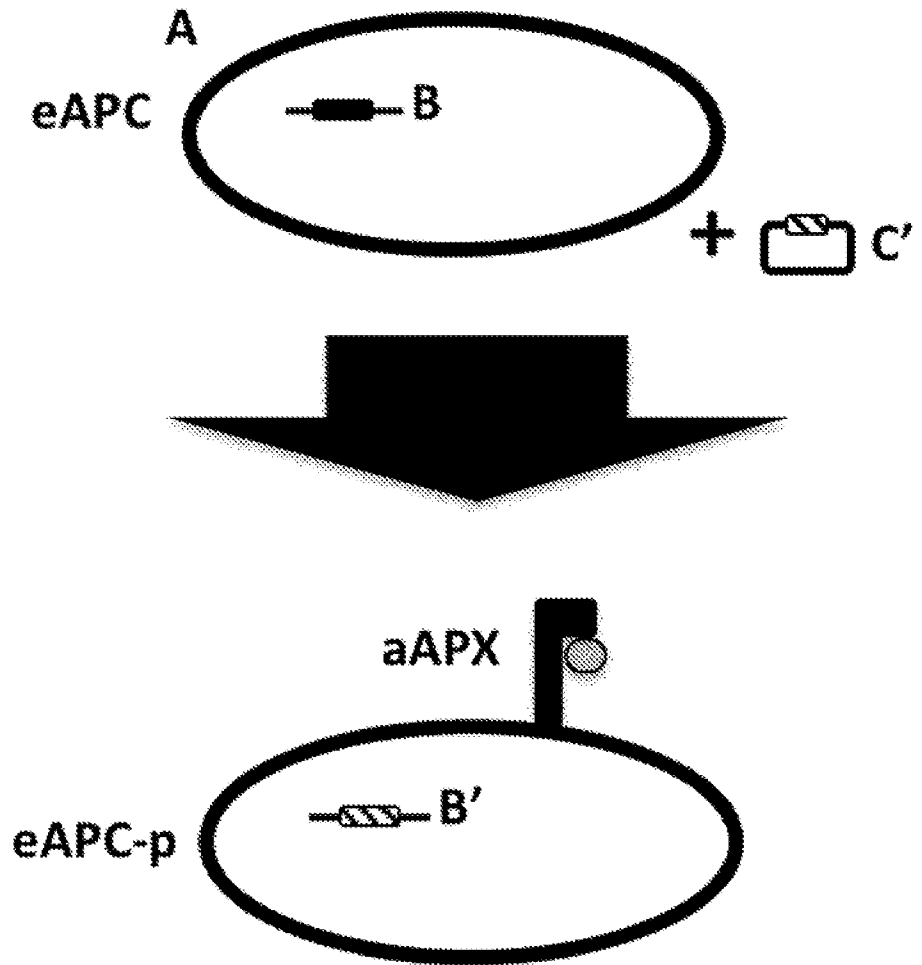


Figura 6

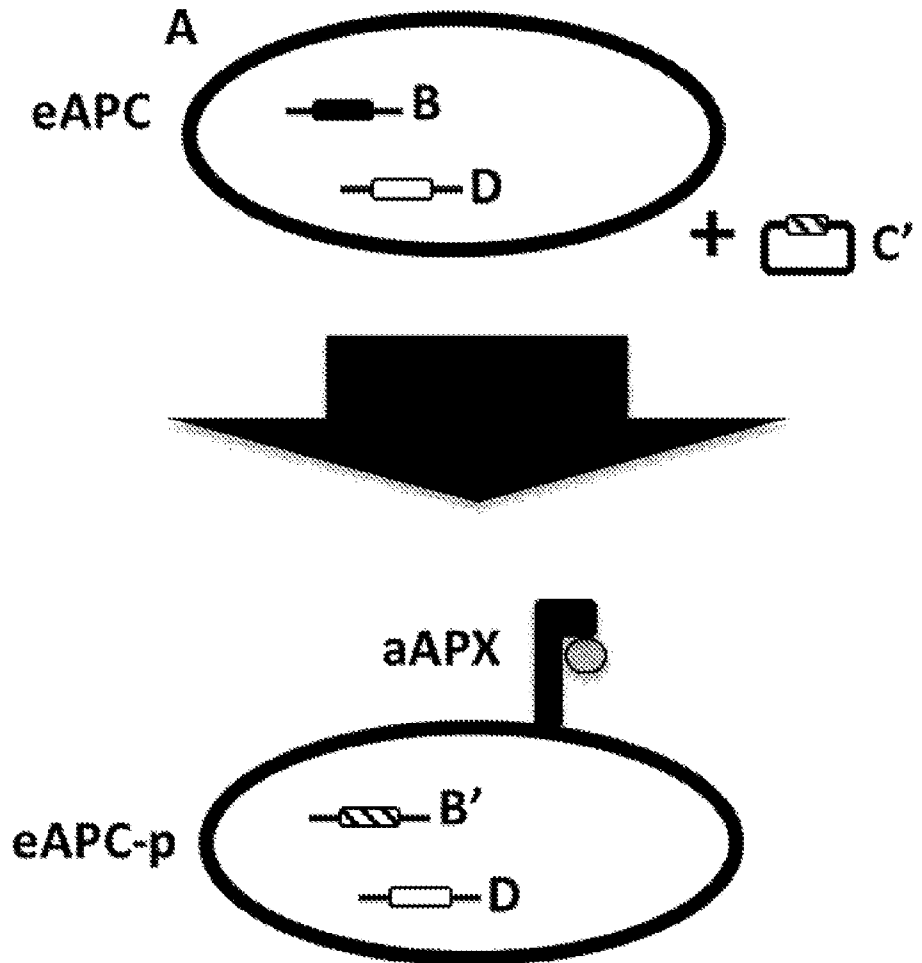


Figura 7

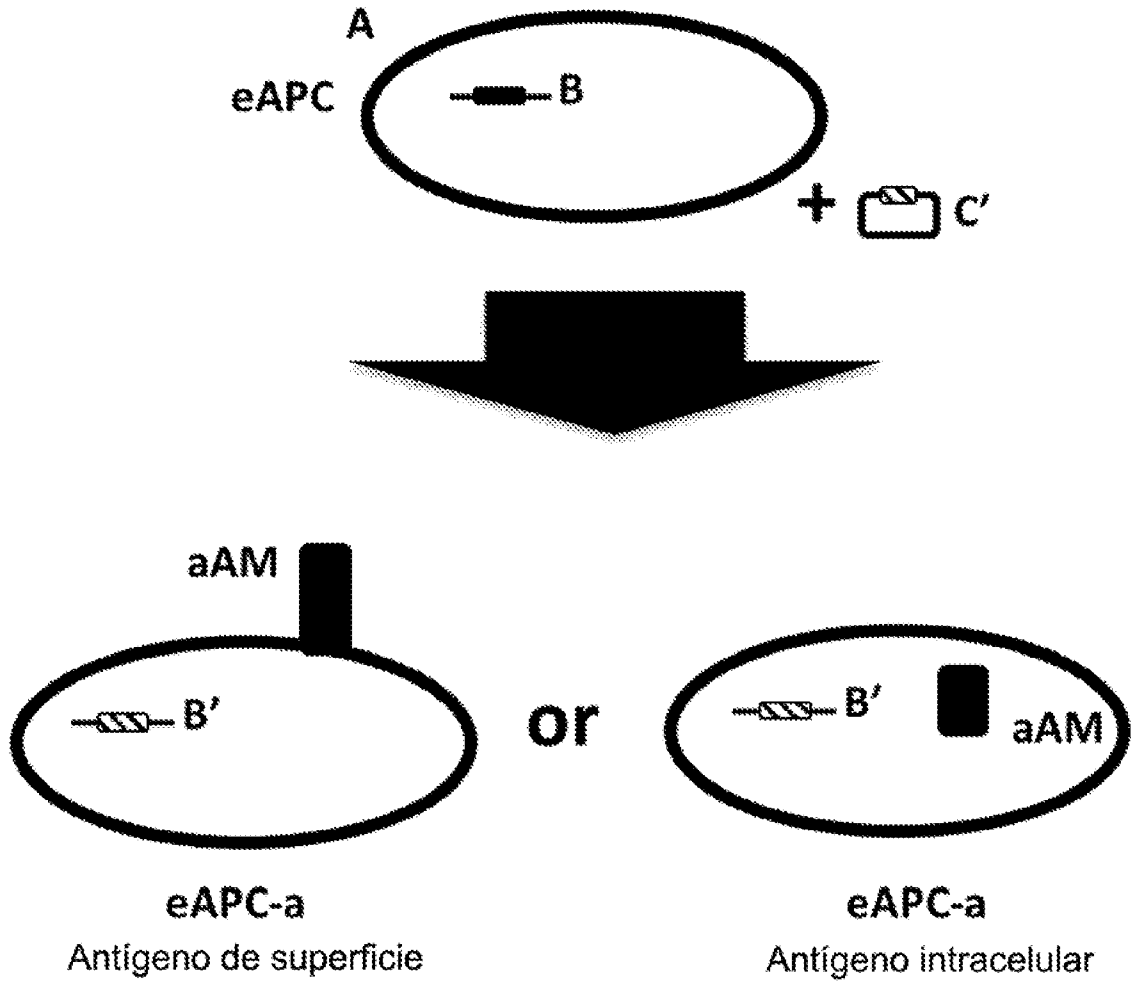


Figura 8

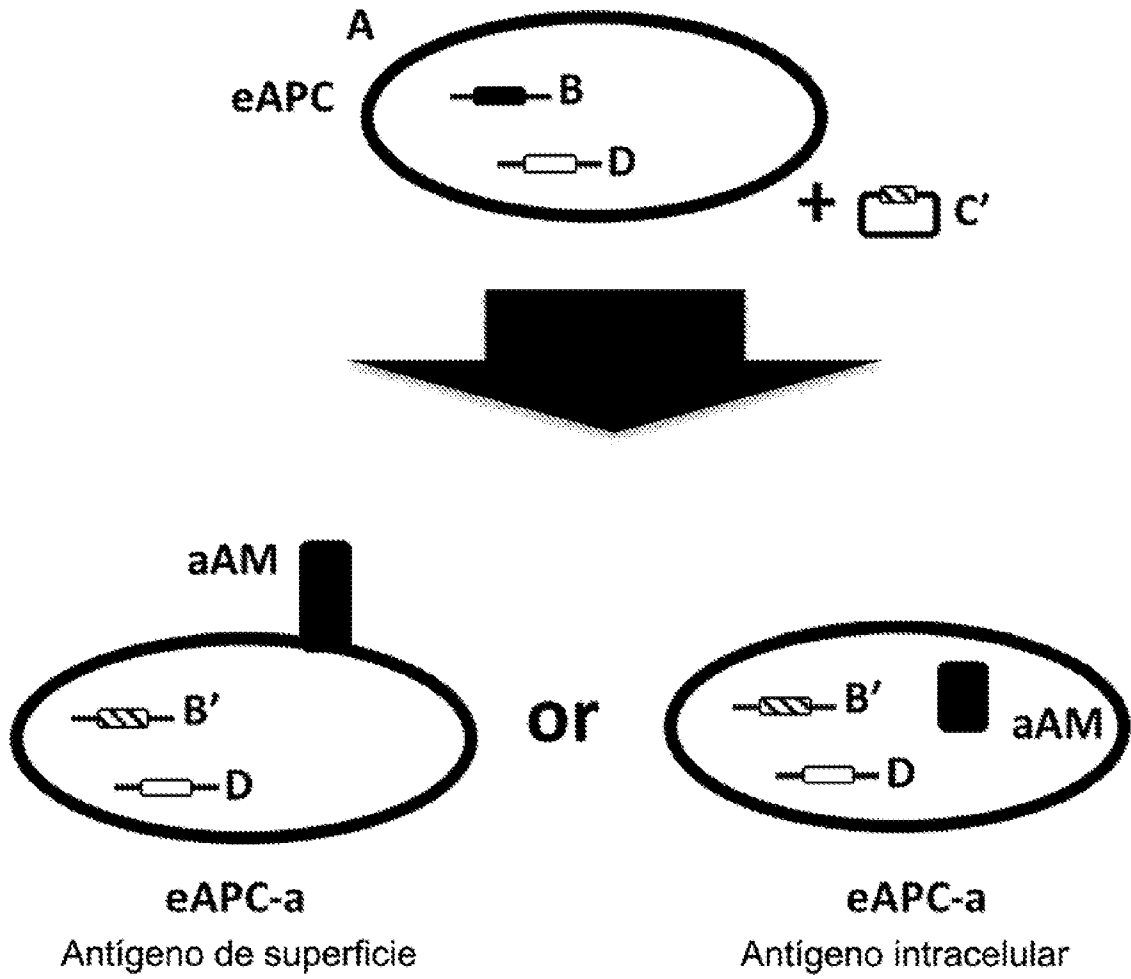


Figura 9

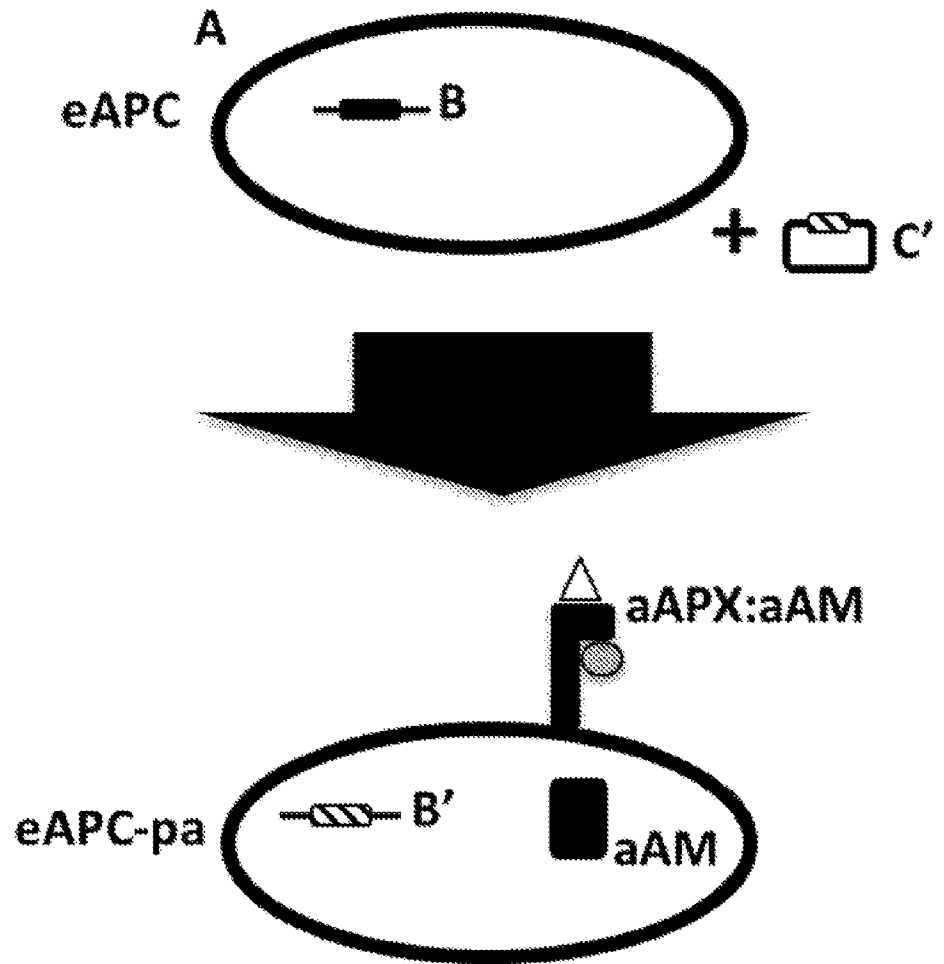


Figura 10

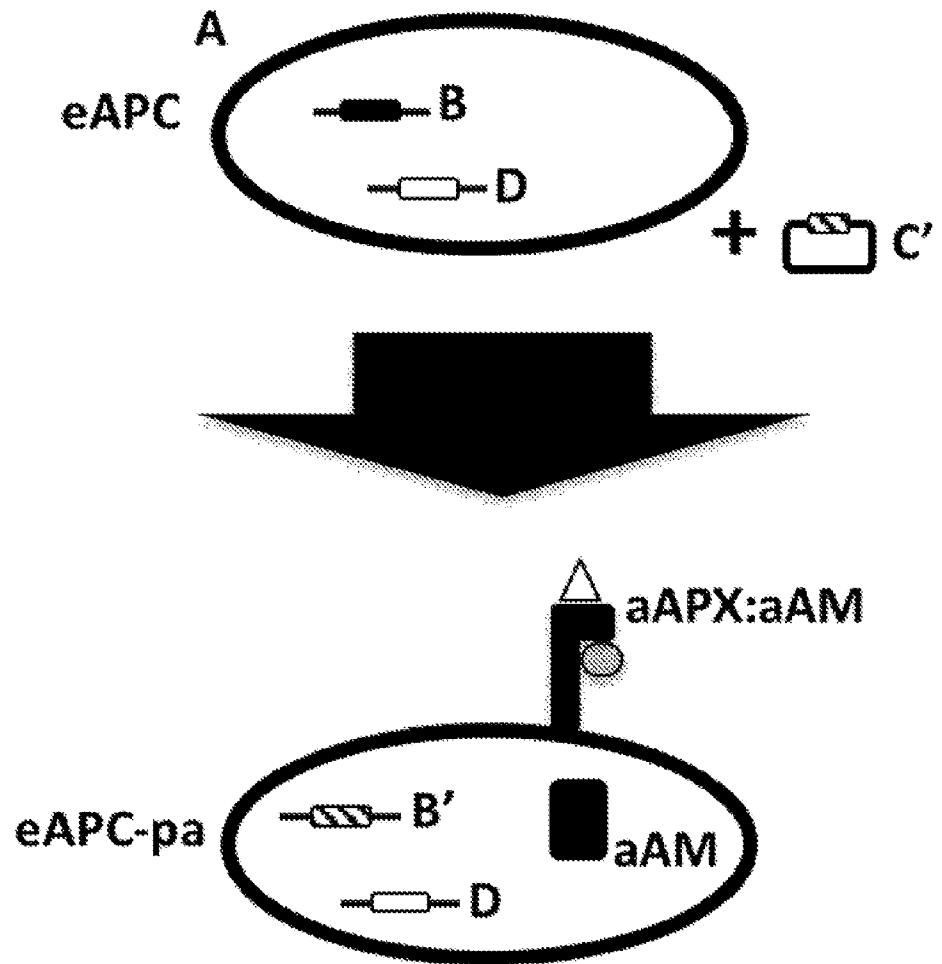


Figura 11

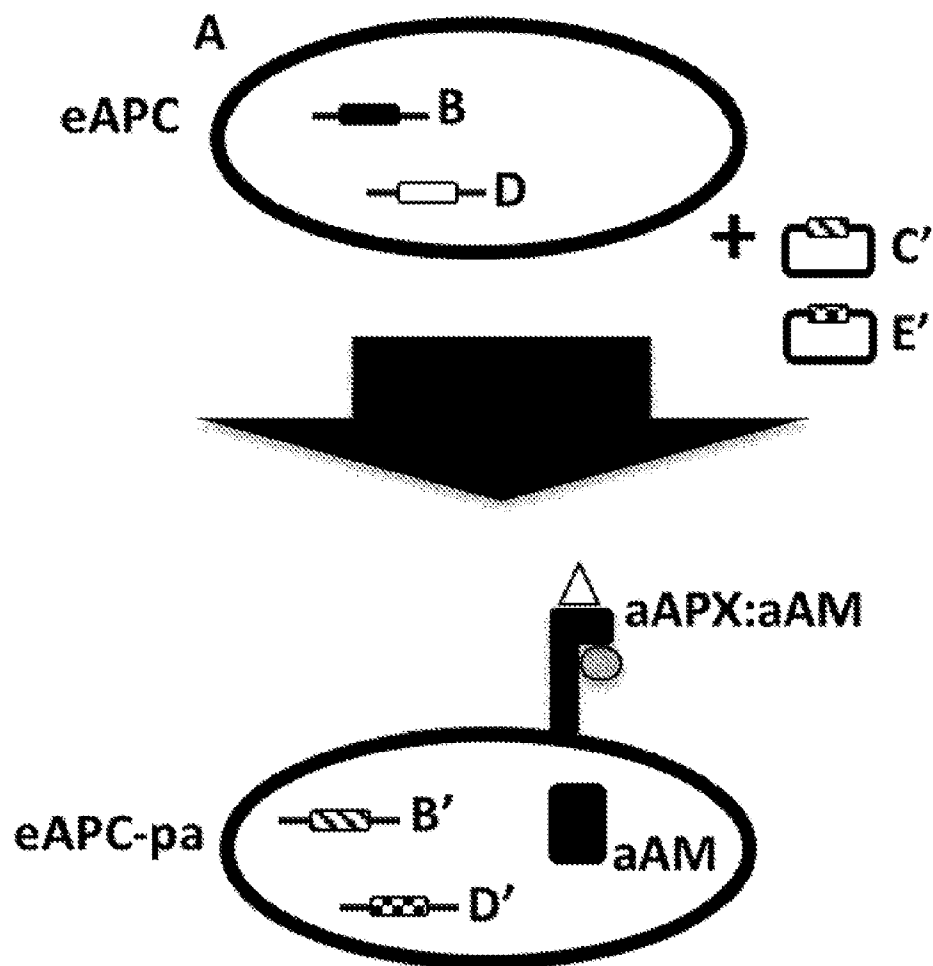


Figura 12

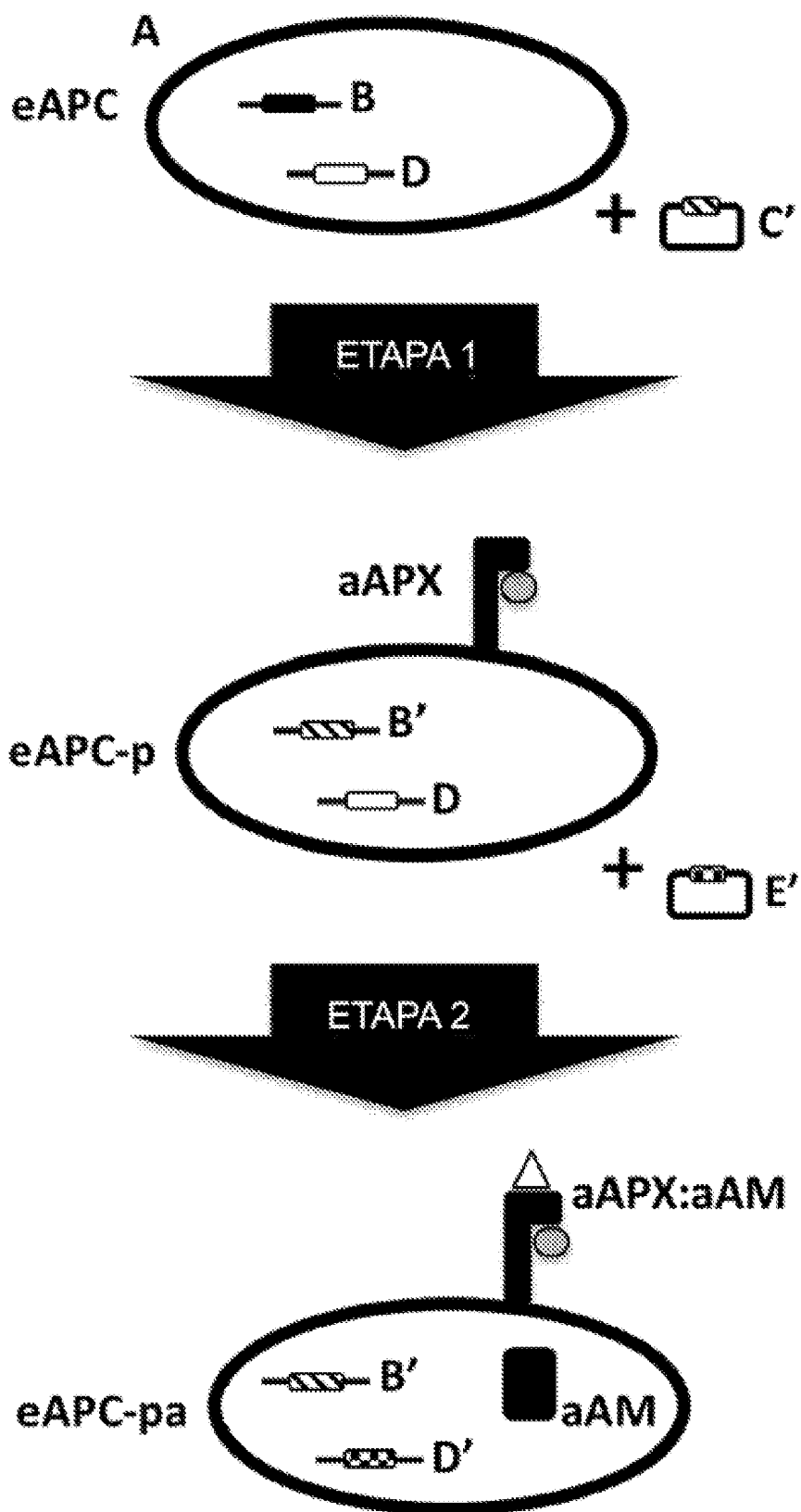


Figura 13

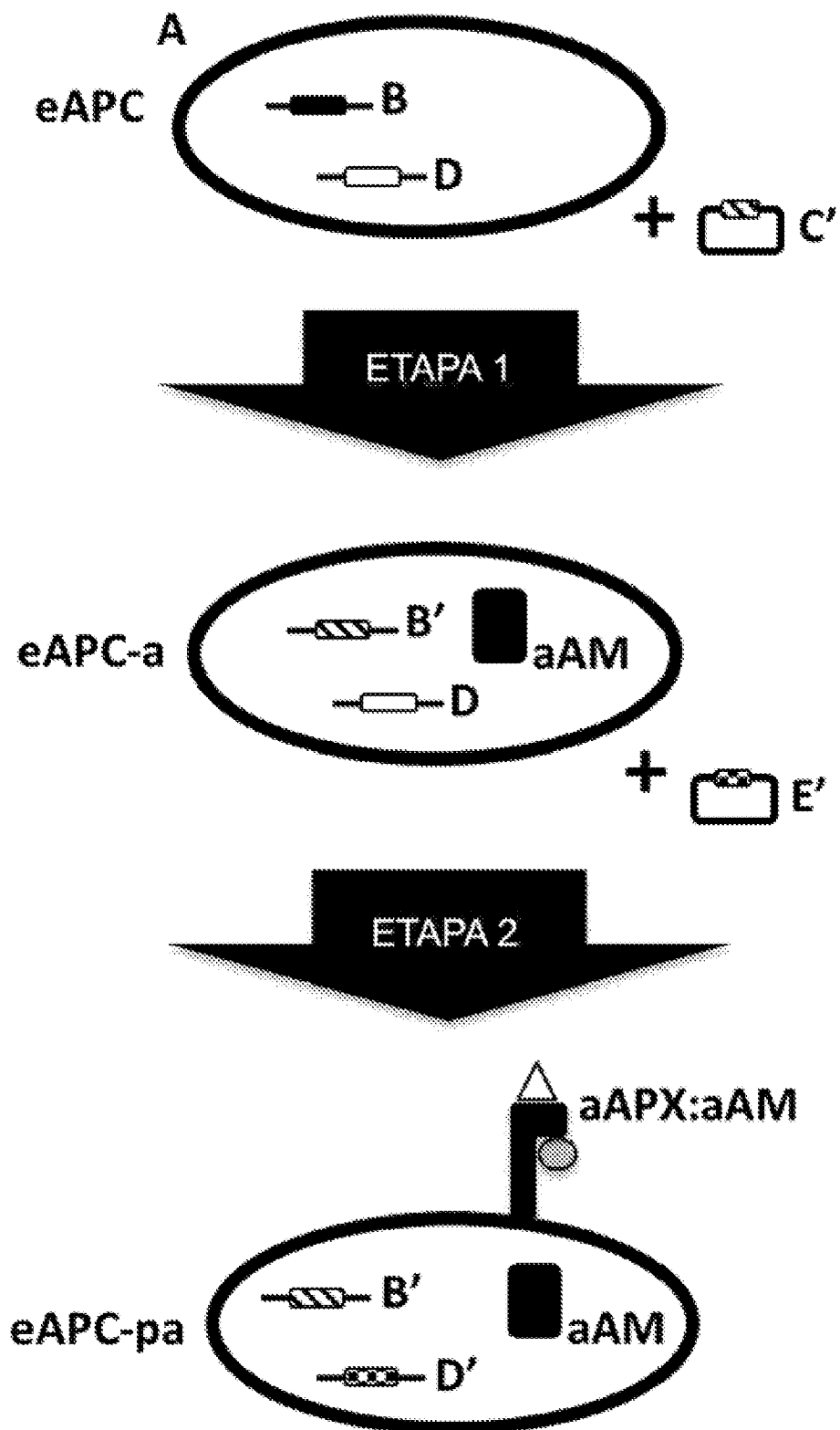


Figura 14

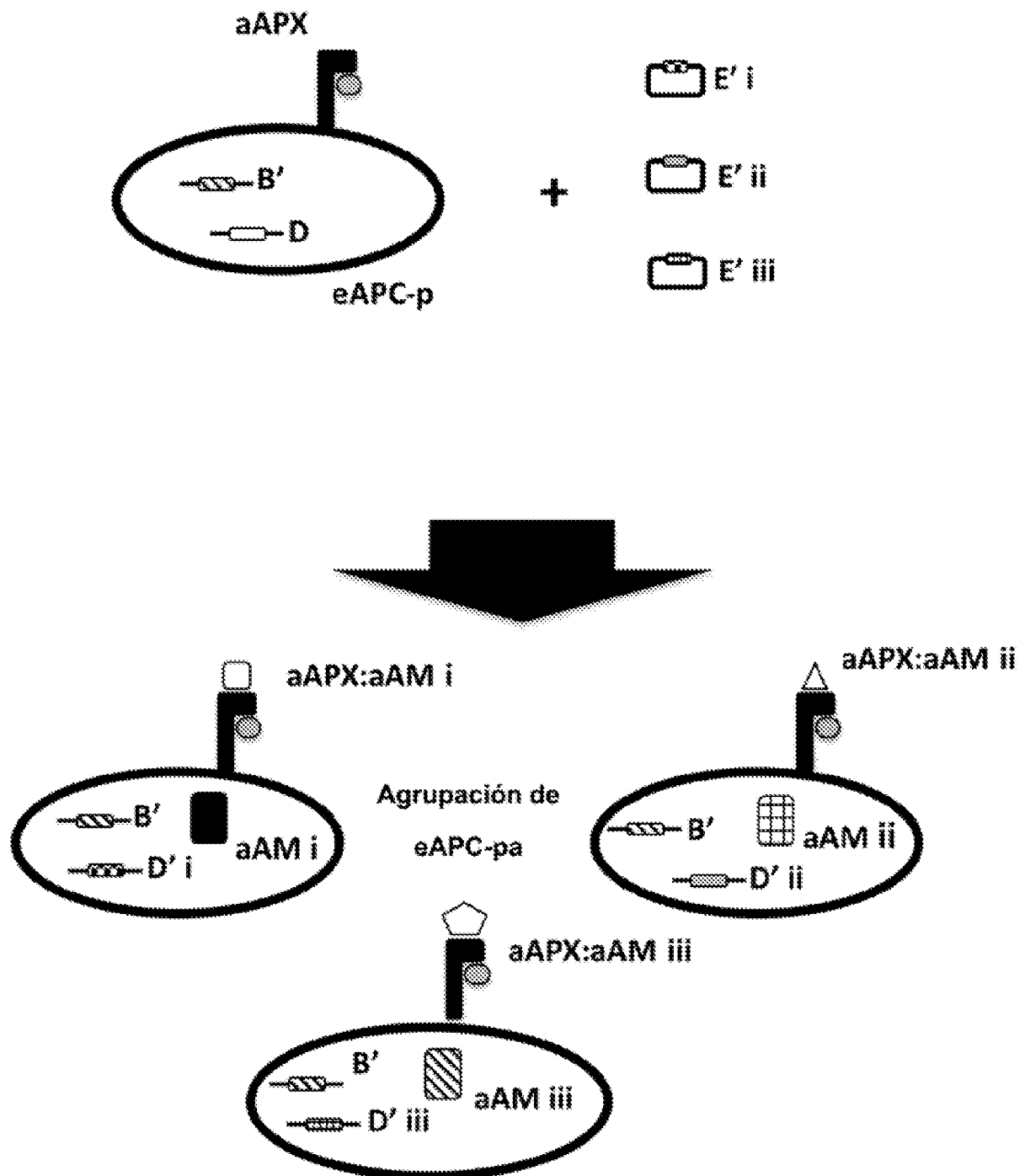


Figura 15

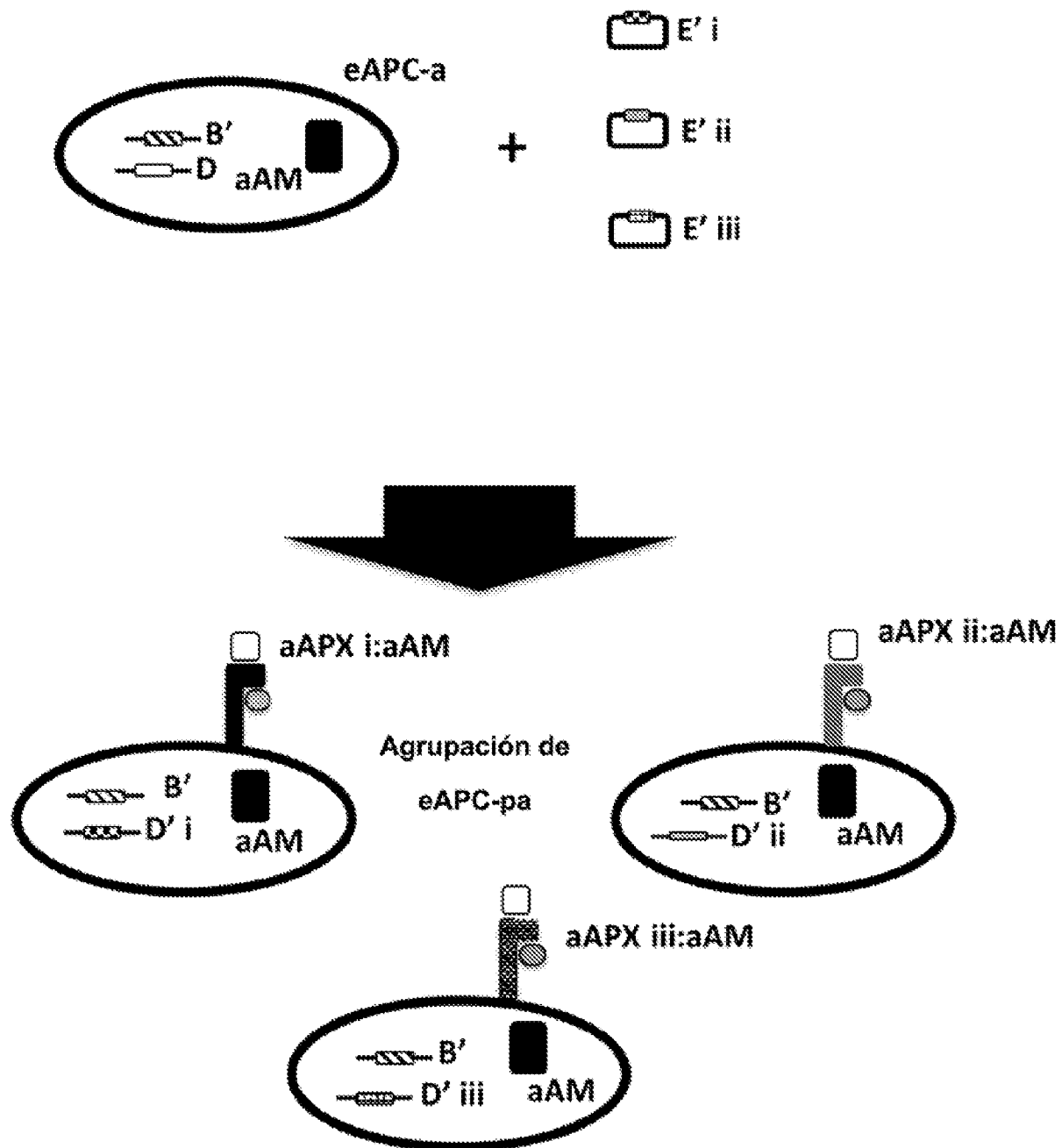


Figura 16

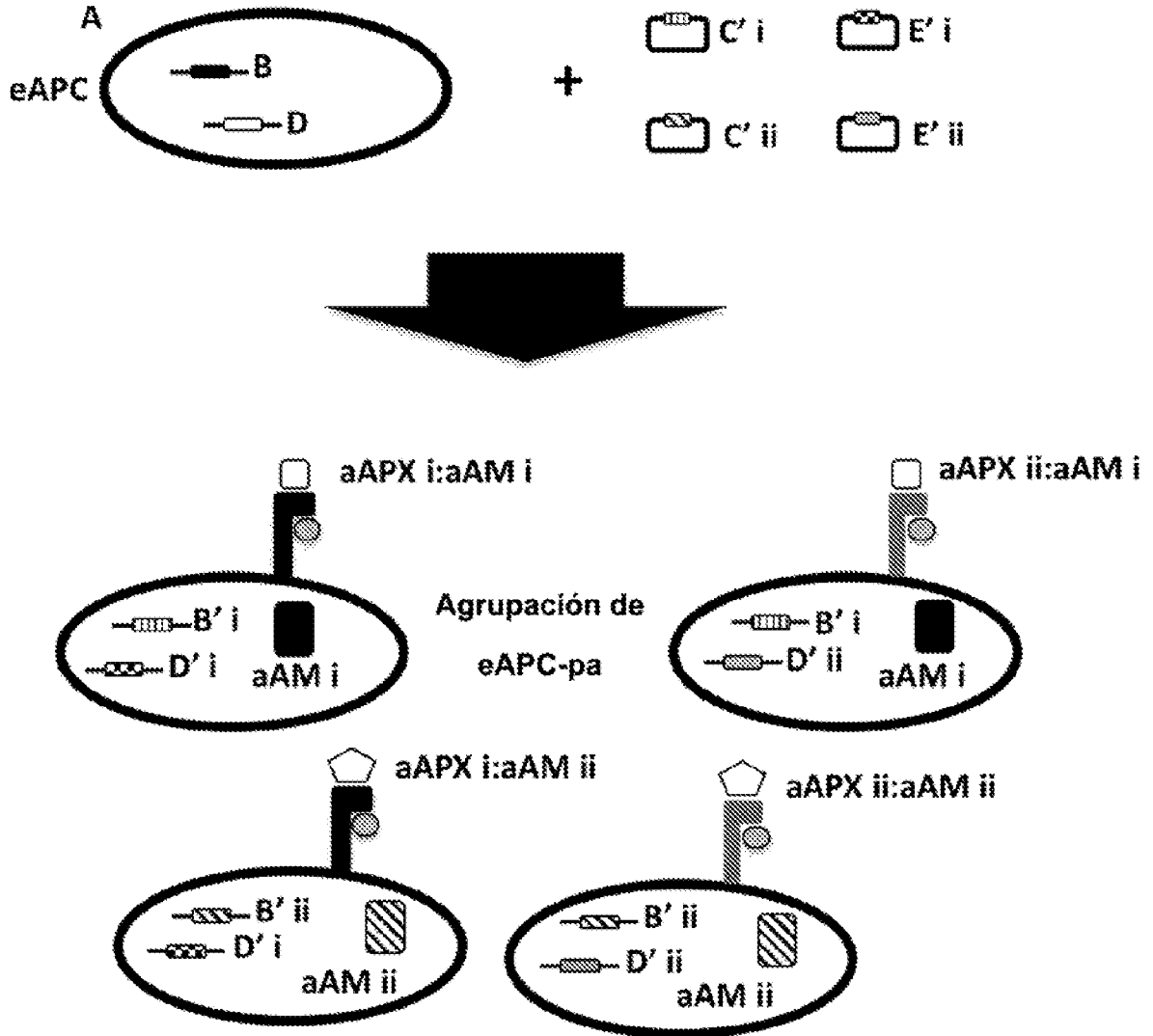


Figura 17

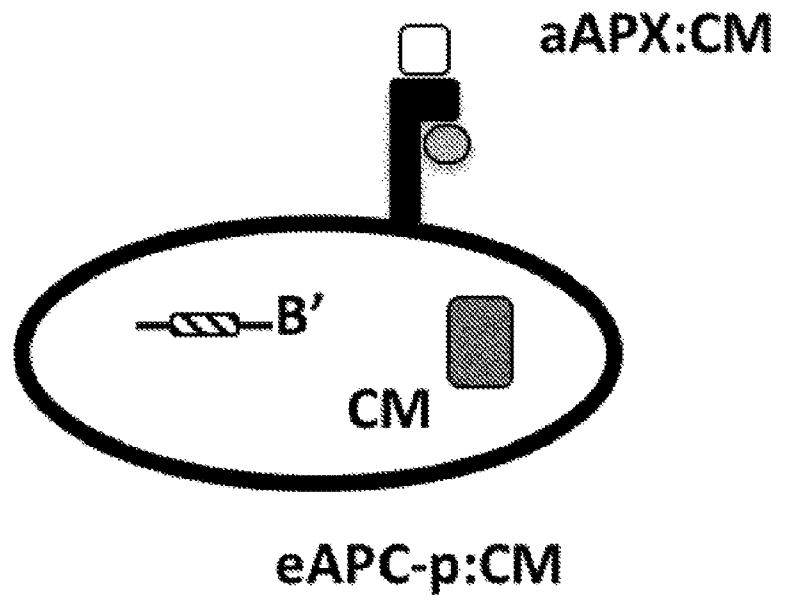


Figura 18

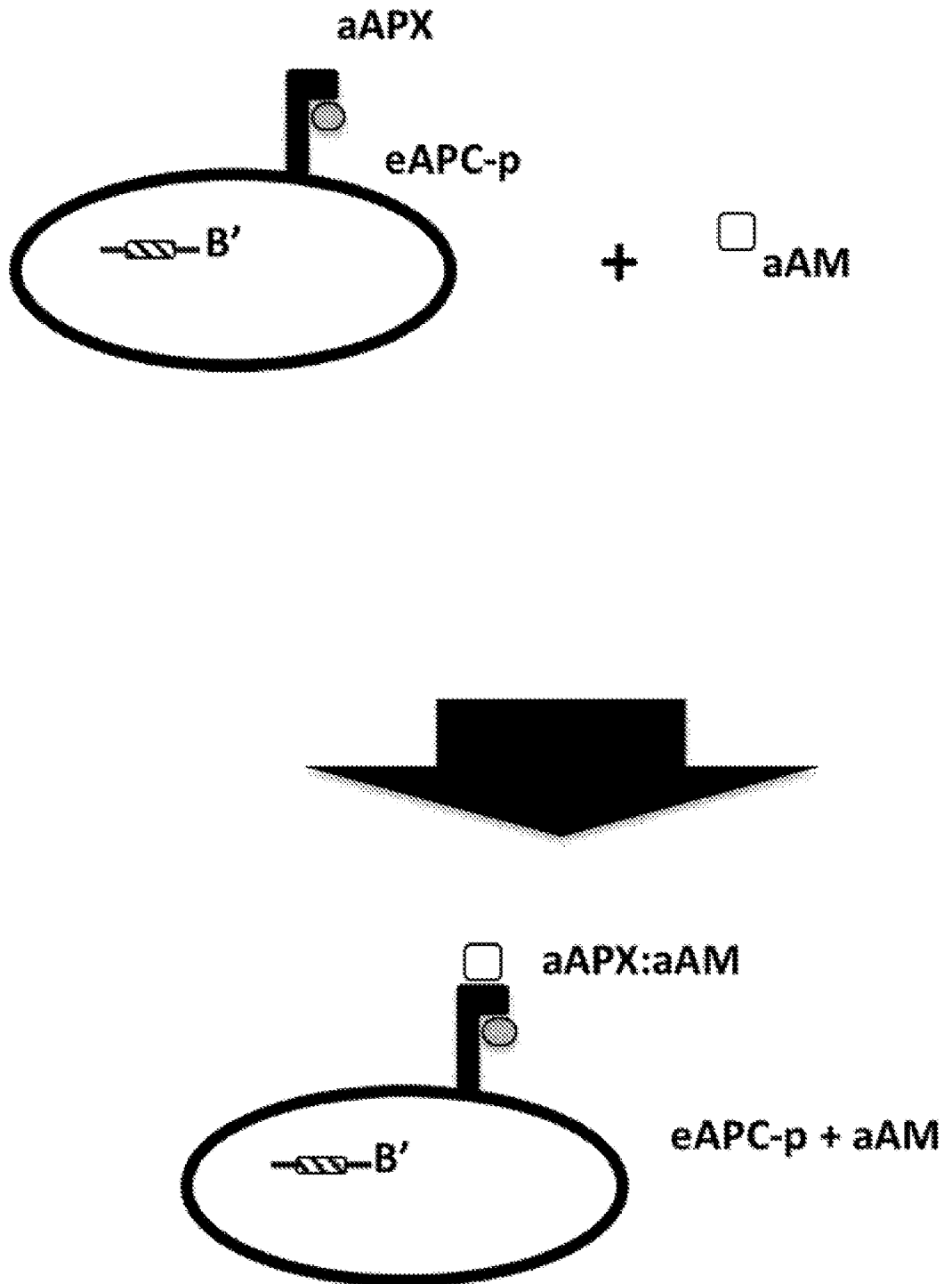


Figura 19

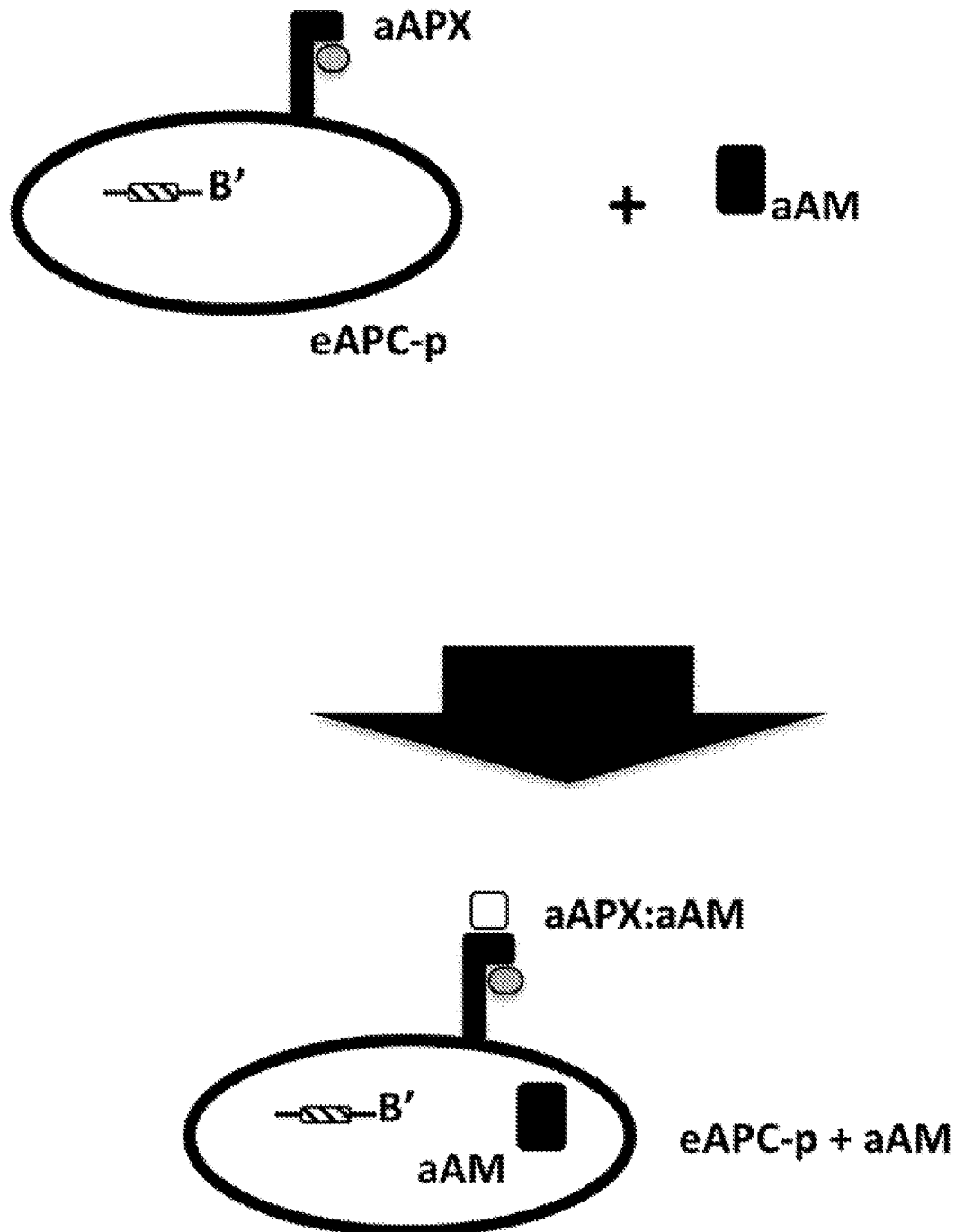


Figura 20

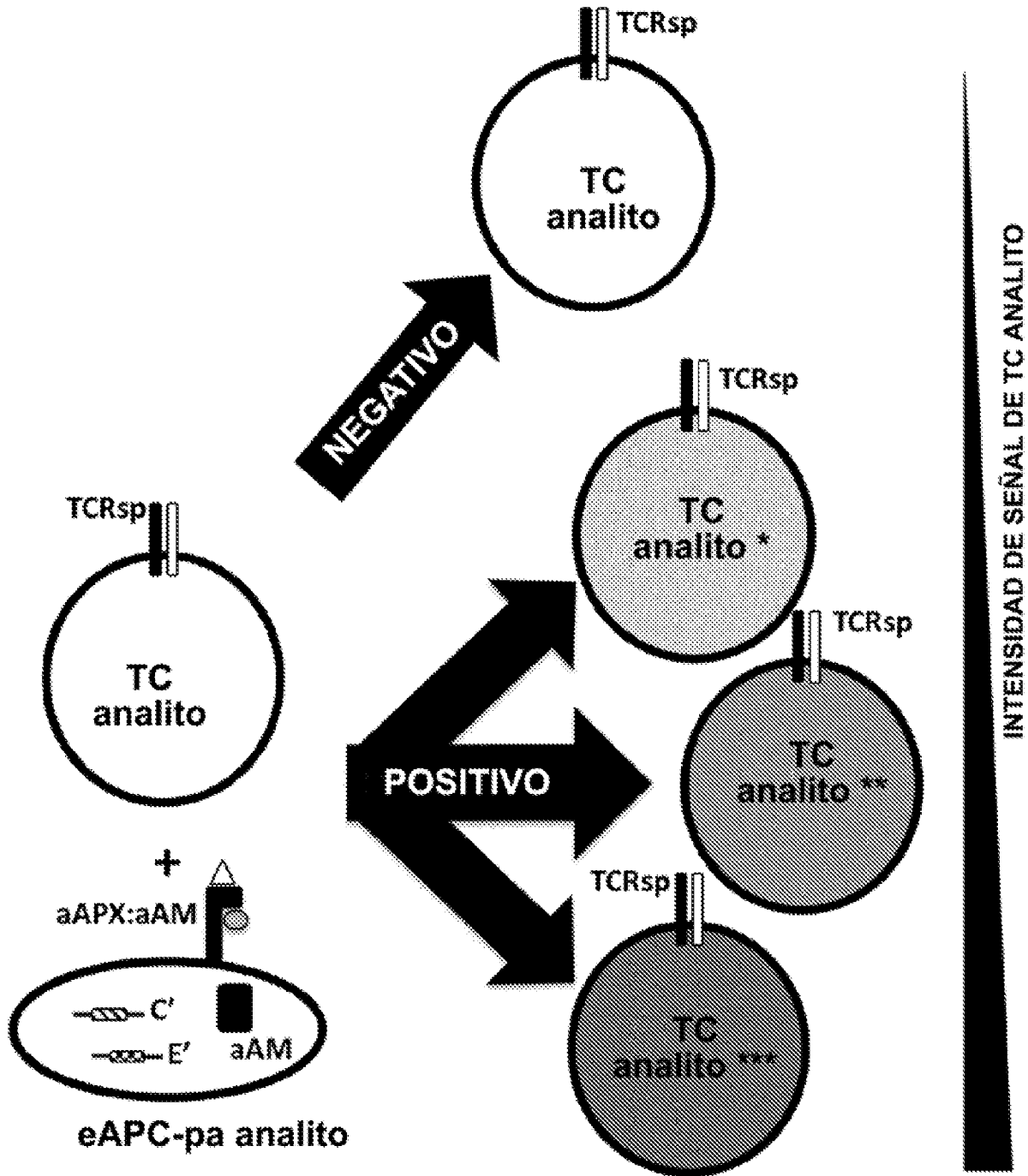


Figura 21

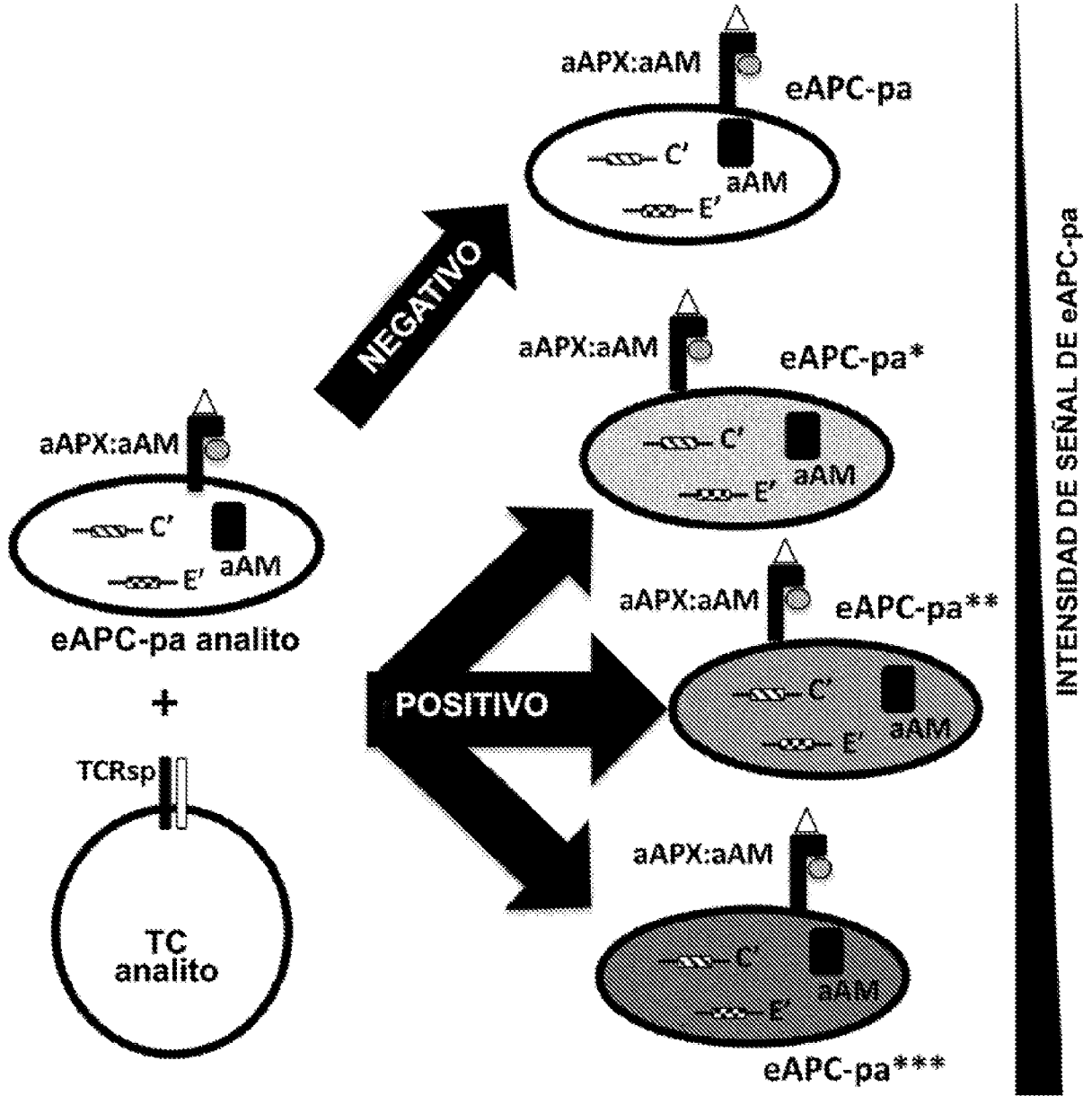


Figura 22

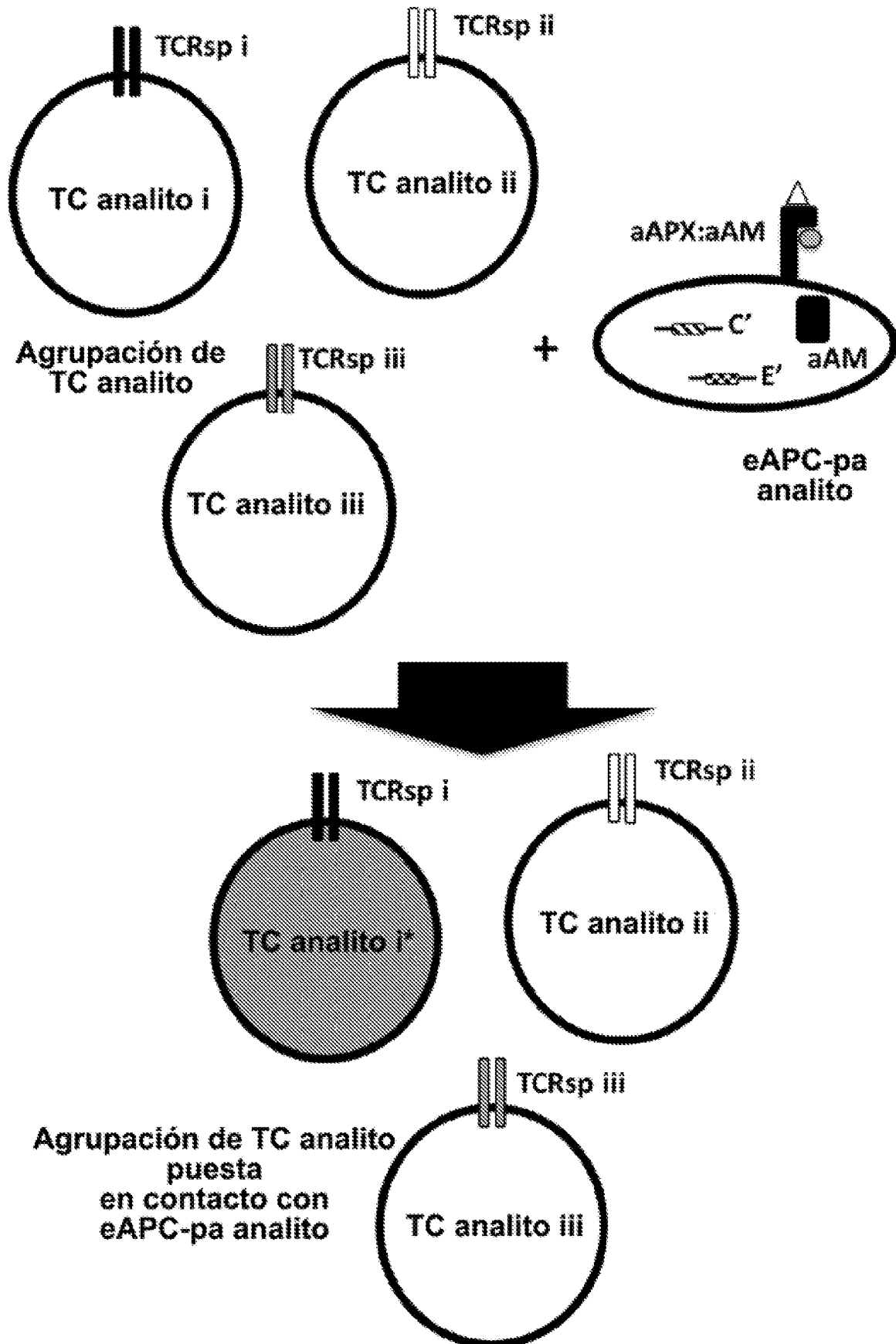


Figura 23

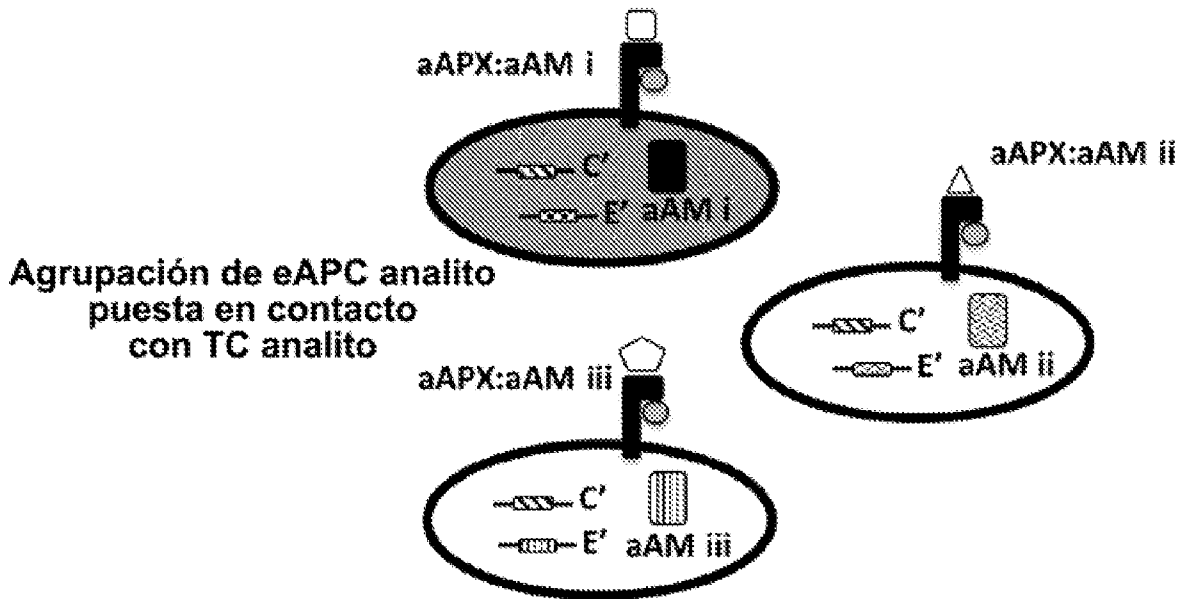
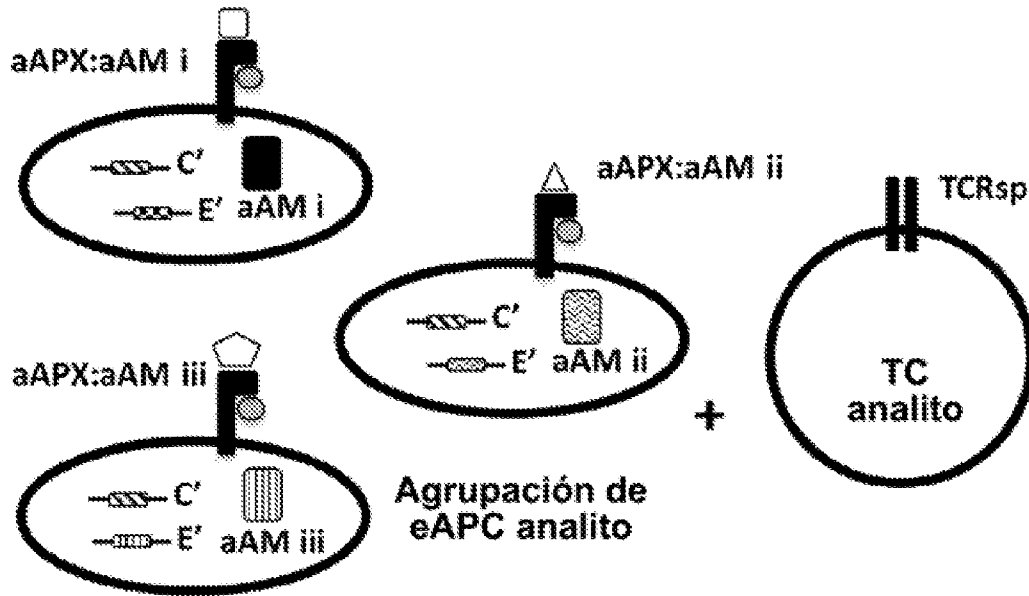


Figura 24

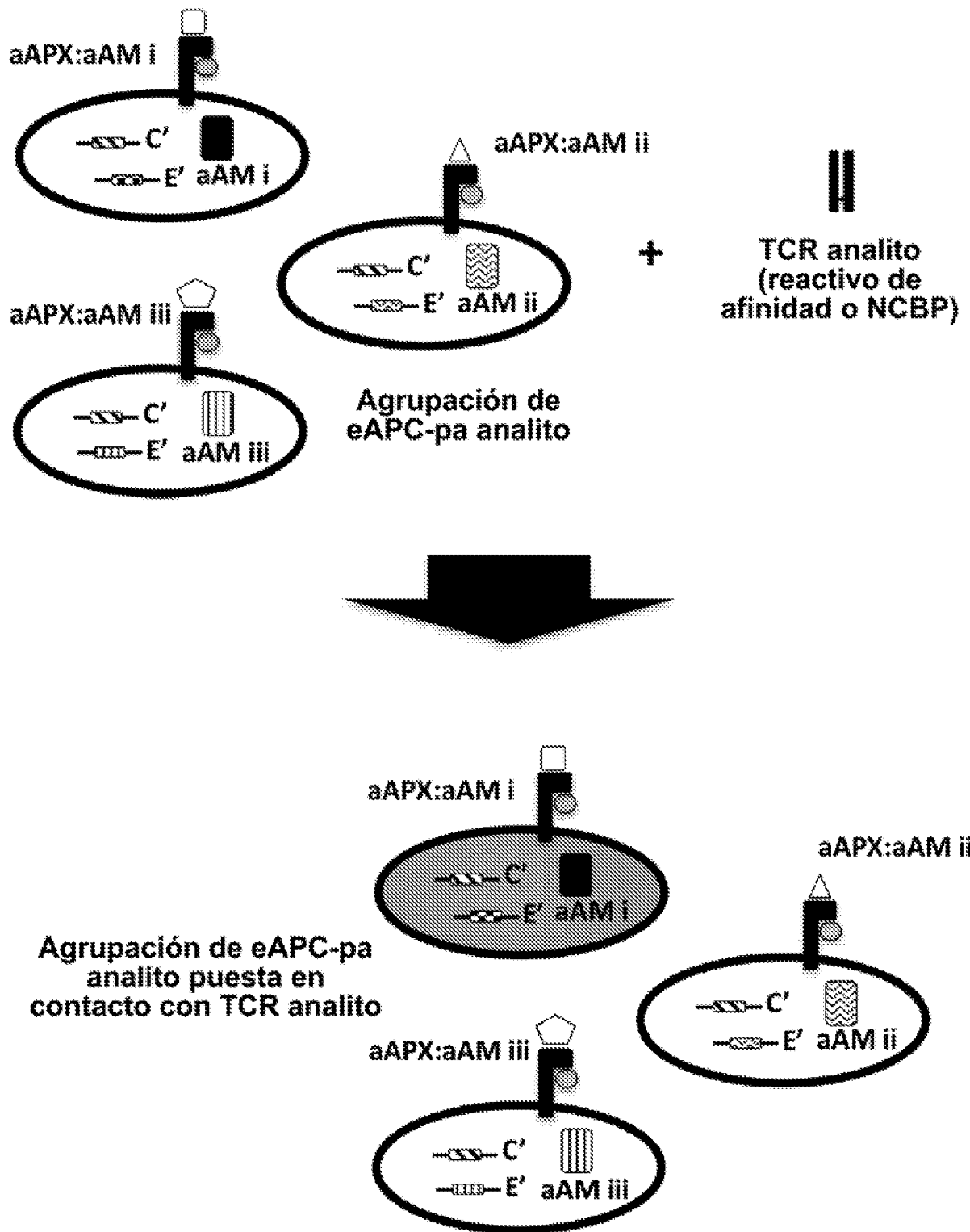


Figura 25

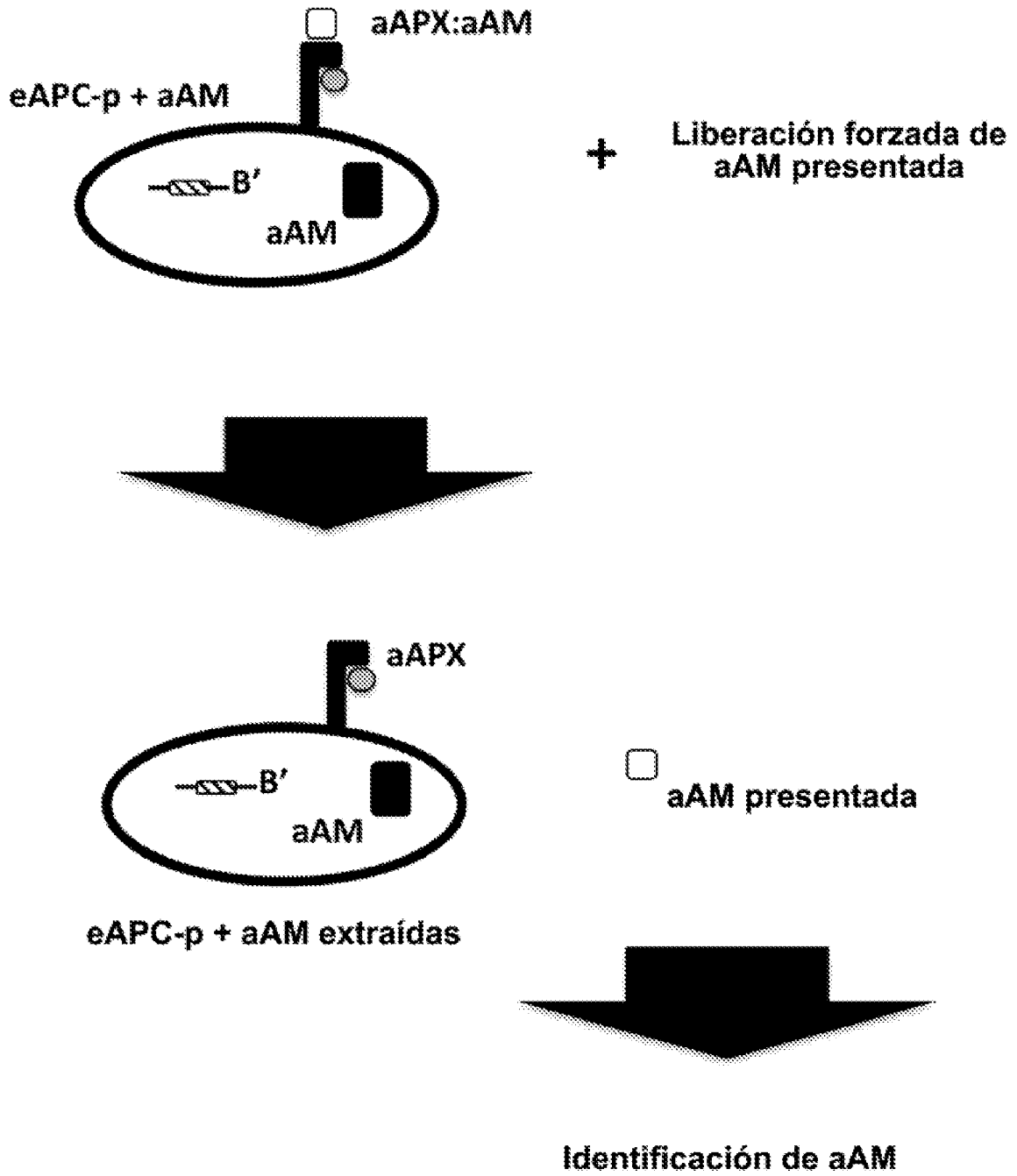


Figura 26

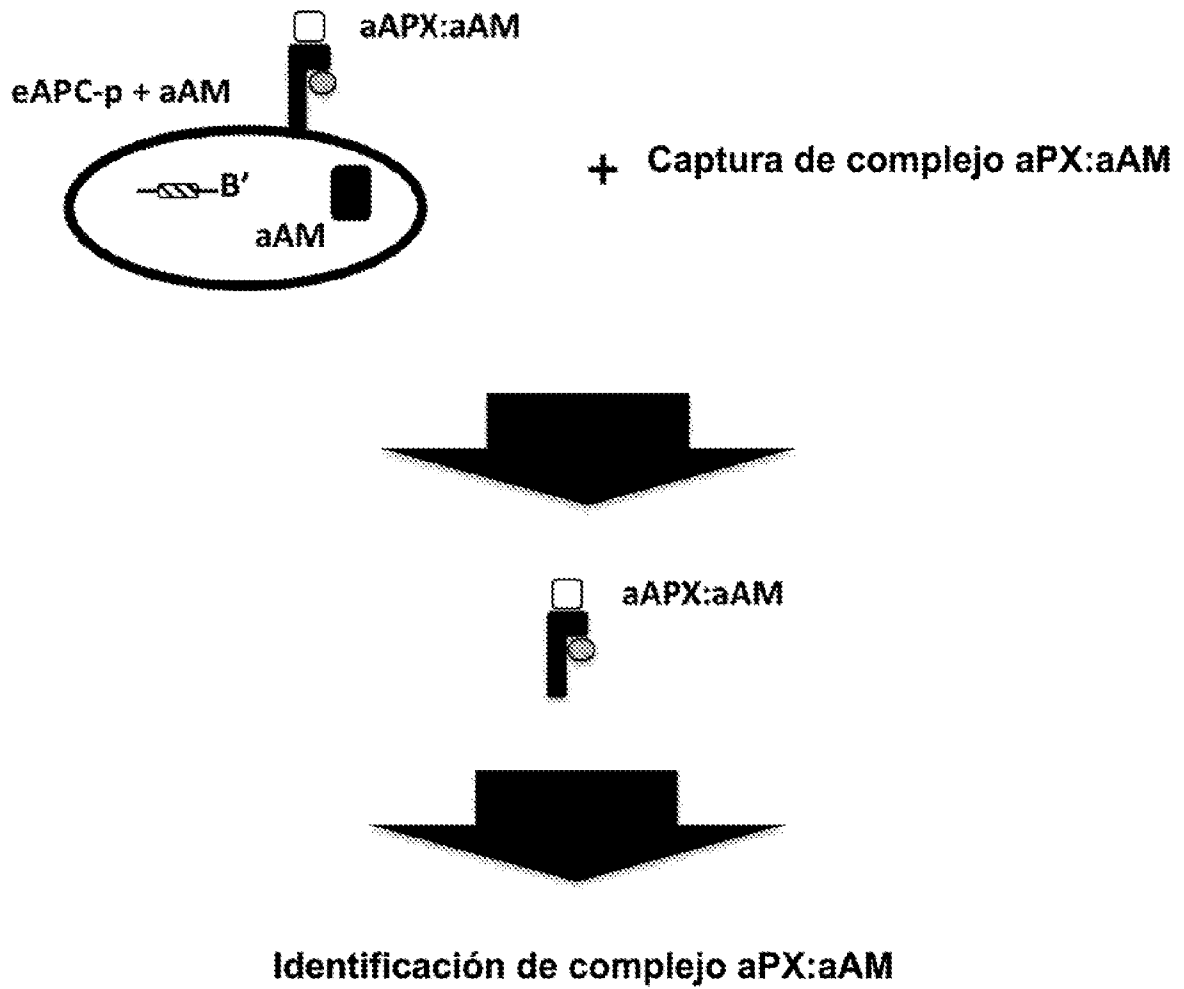


Figura 27

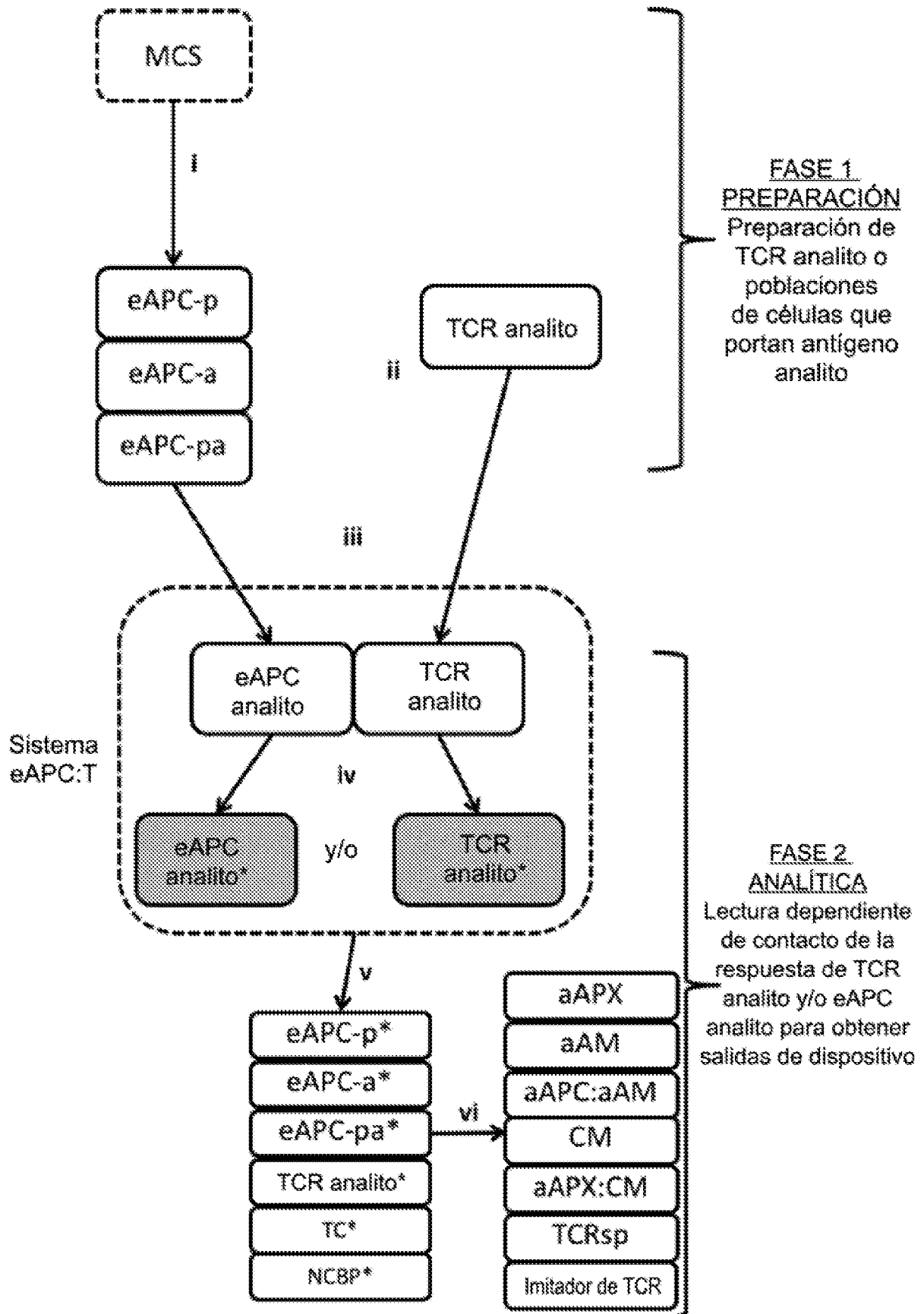


Figura 28

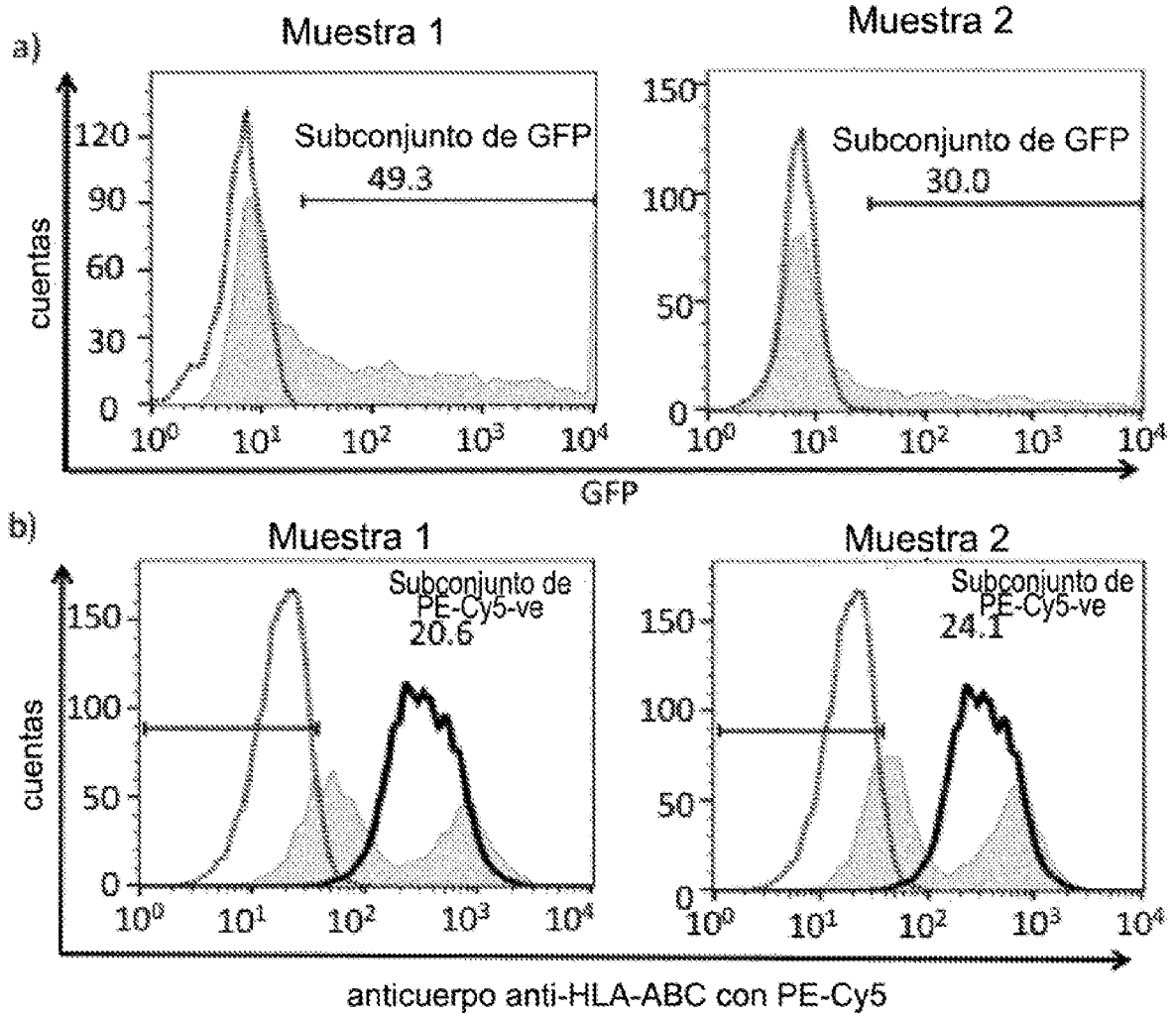


Figura 29

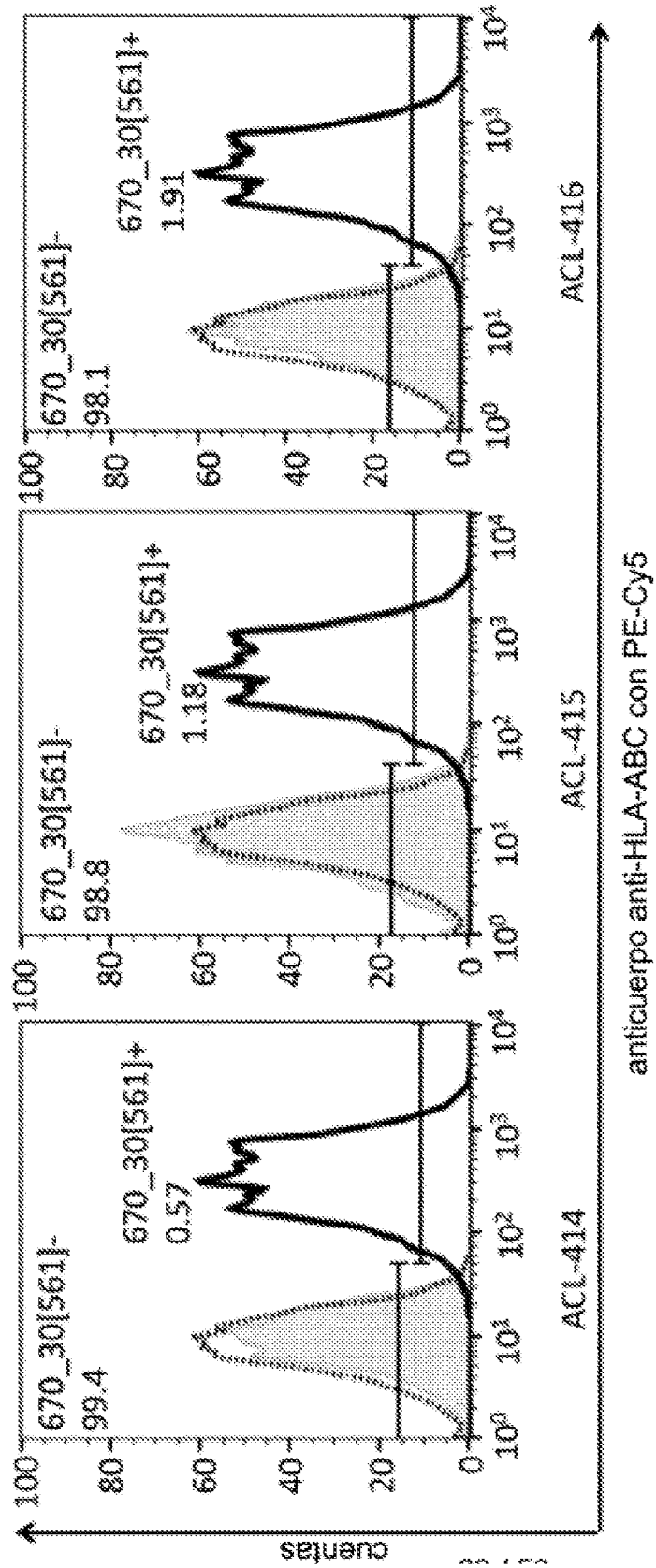


Figura 30

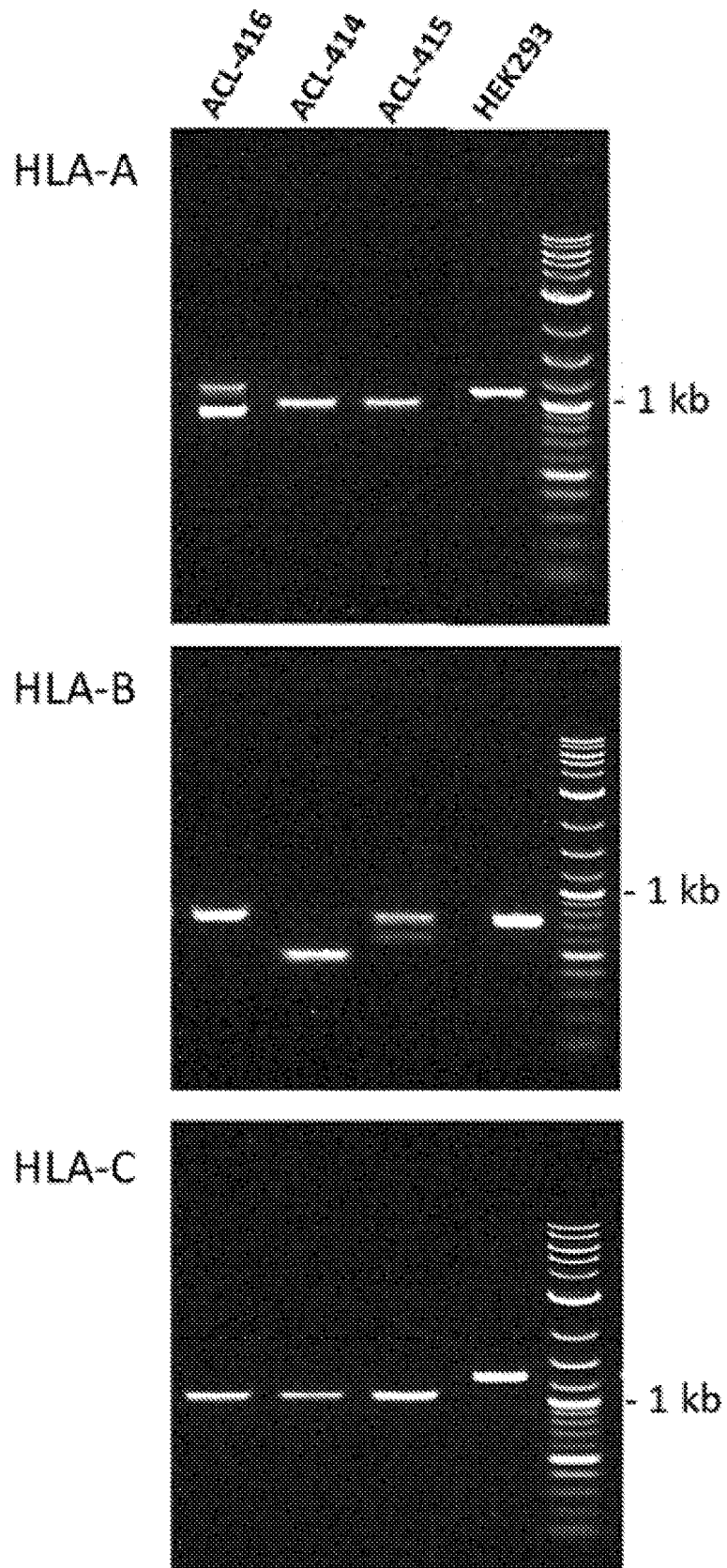


Figura 31

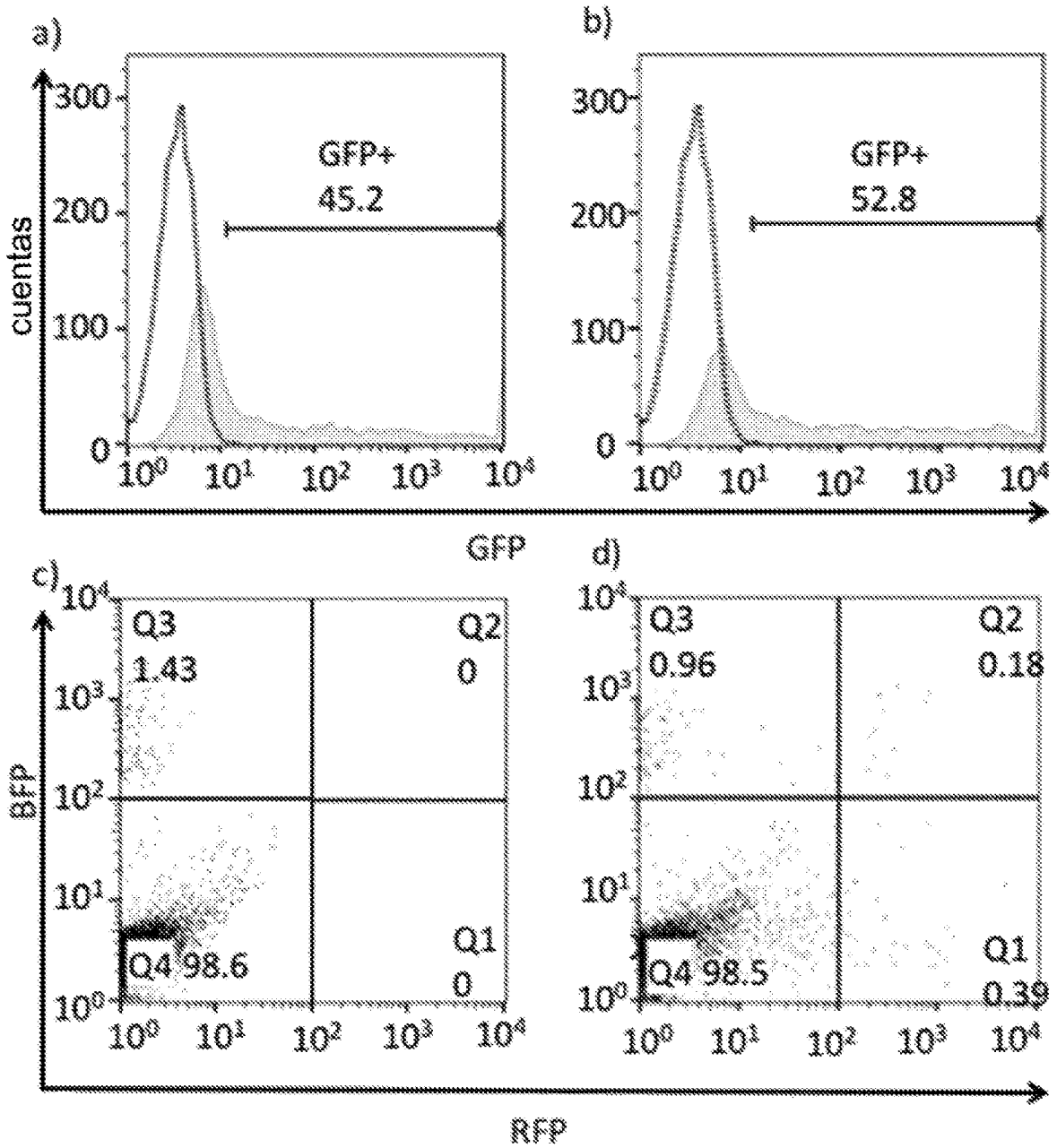


Figura 32

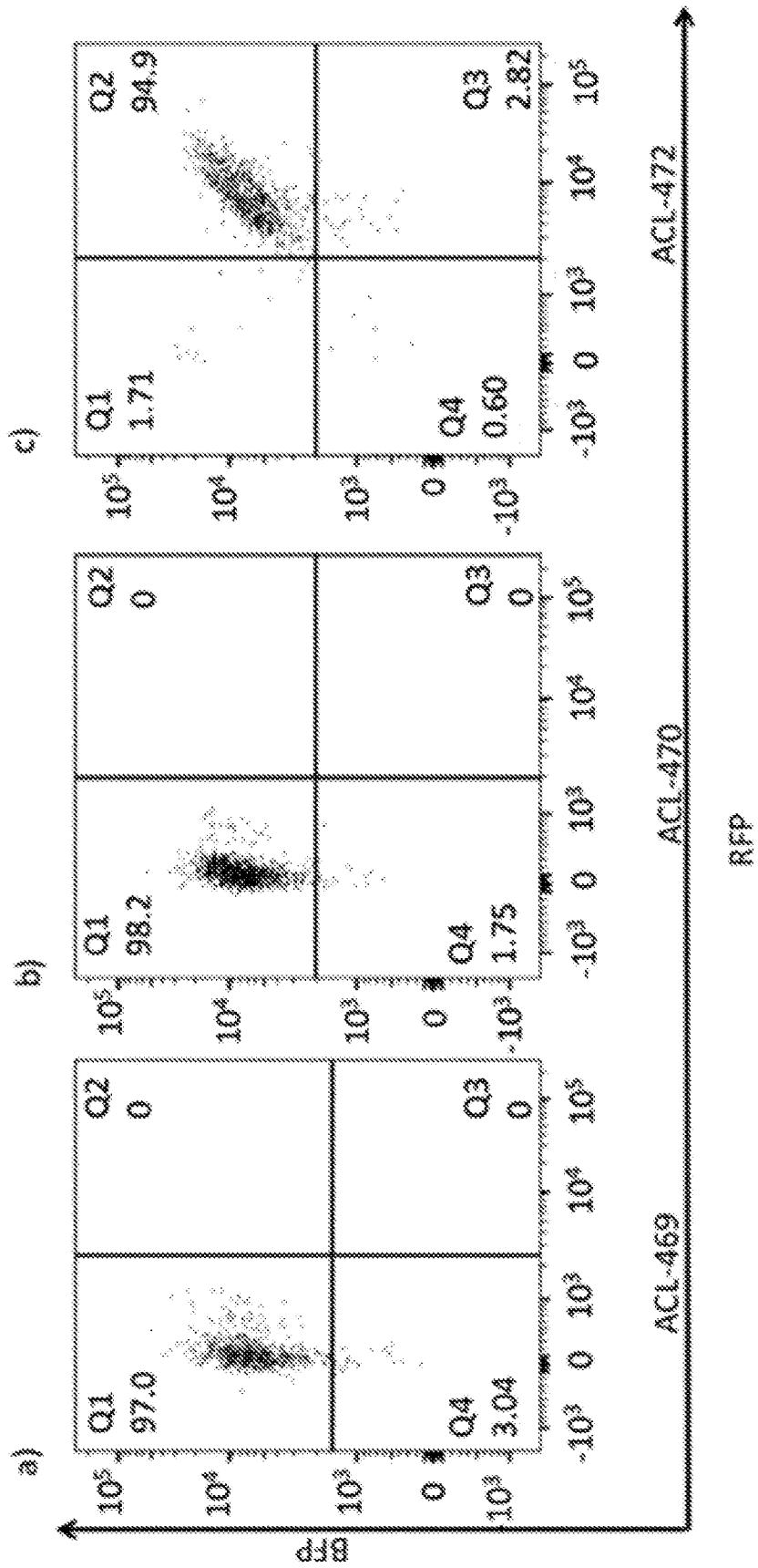


Figura 33

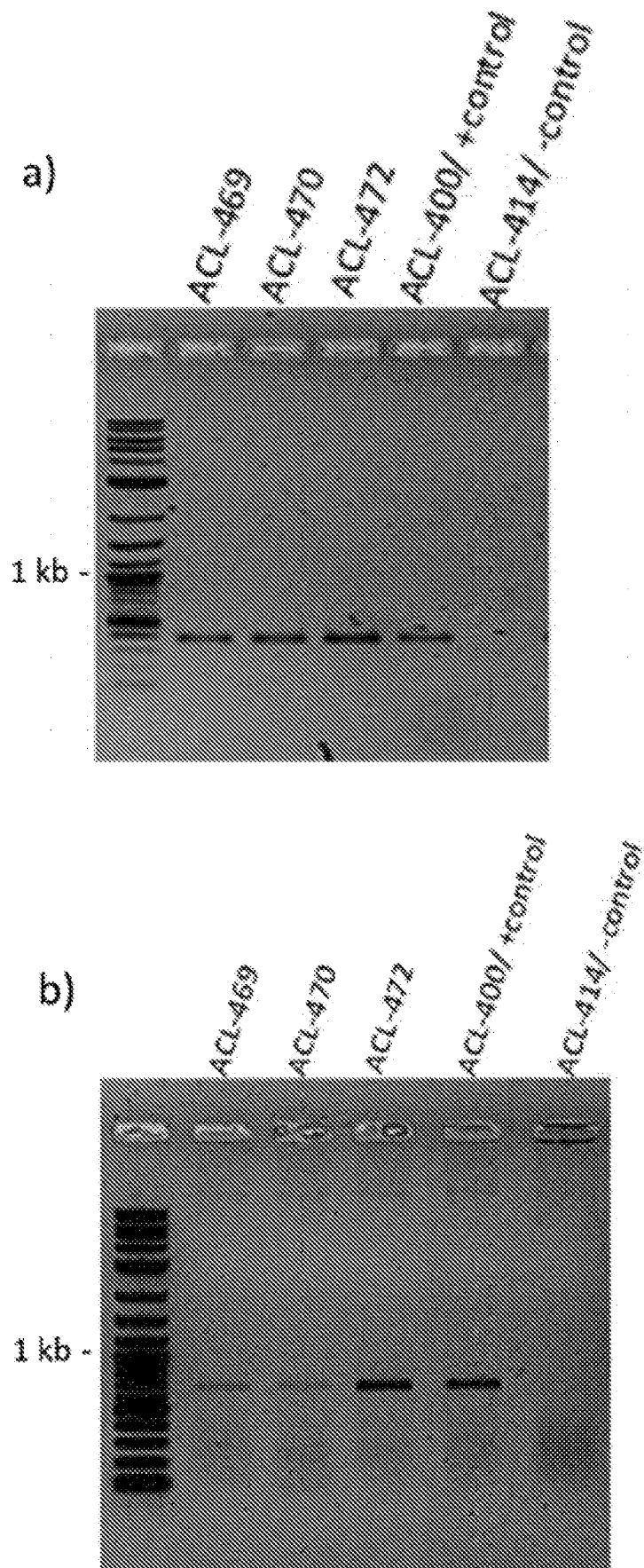


Figura 34

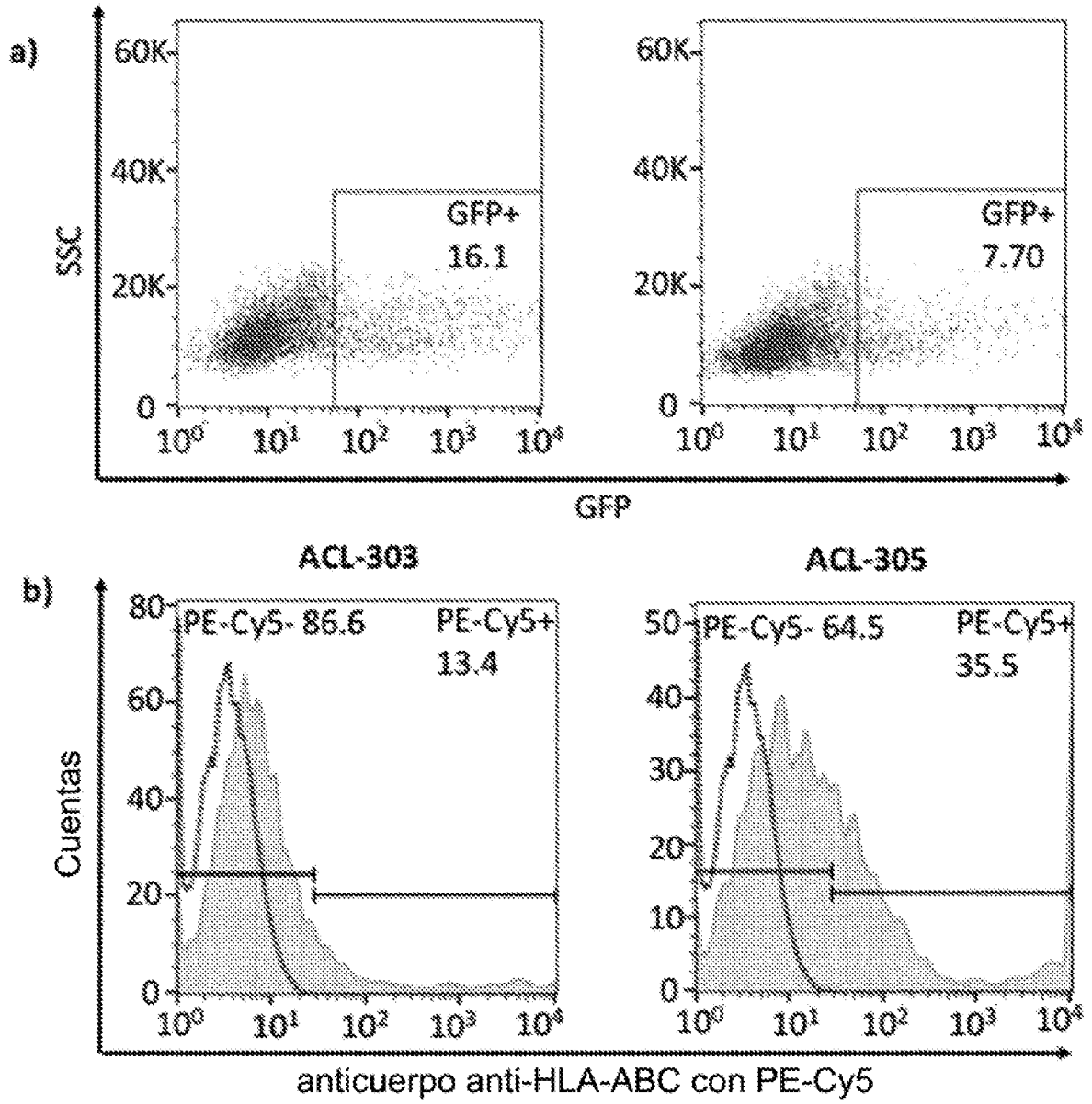


Figura 35

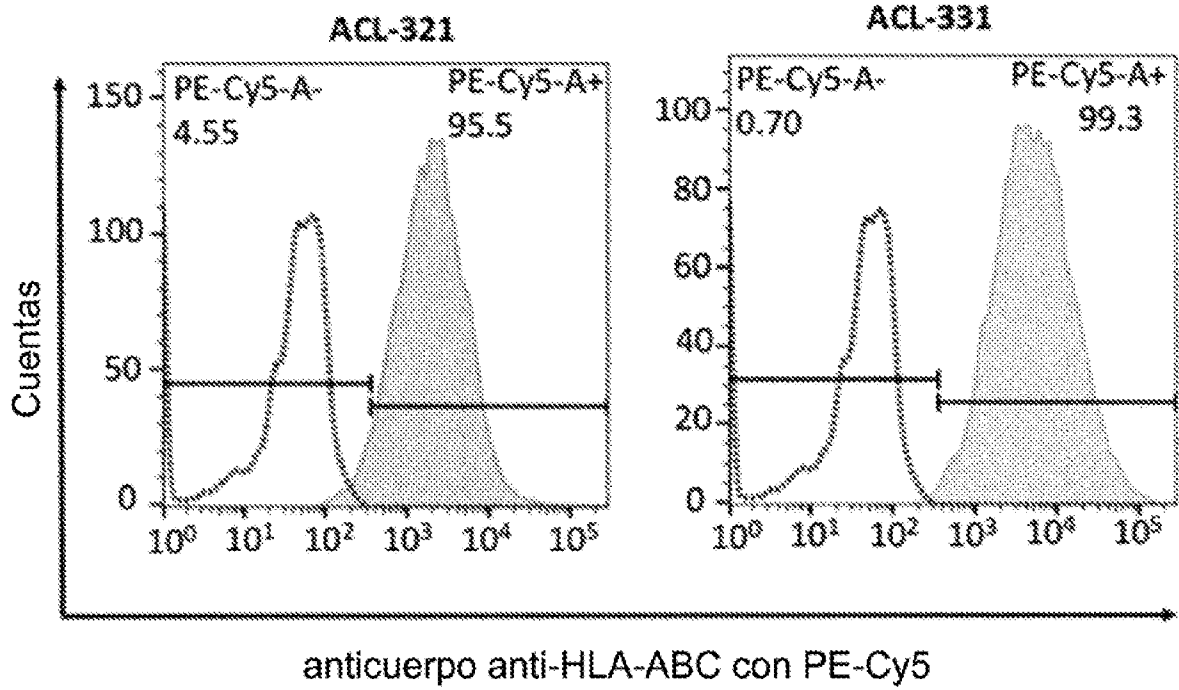


Figura 36

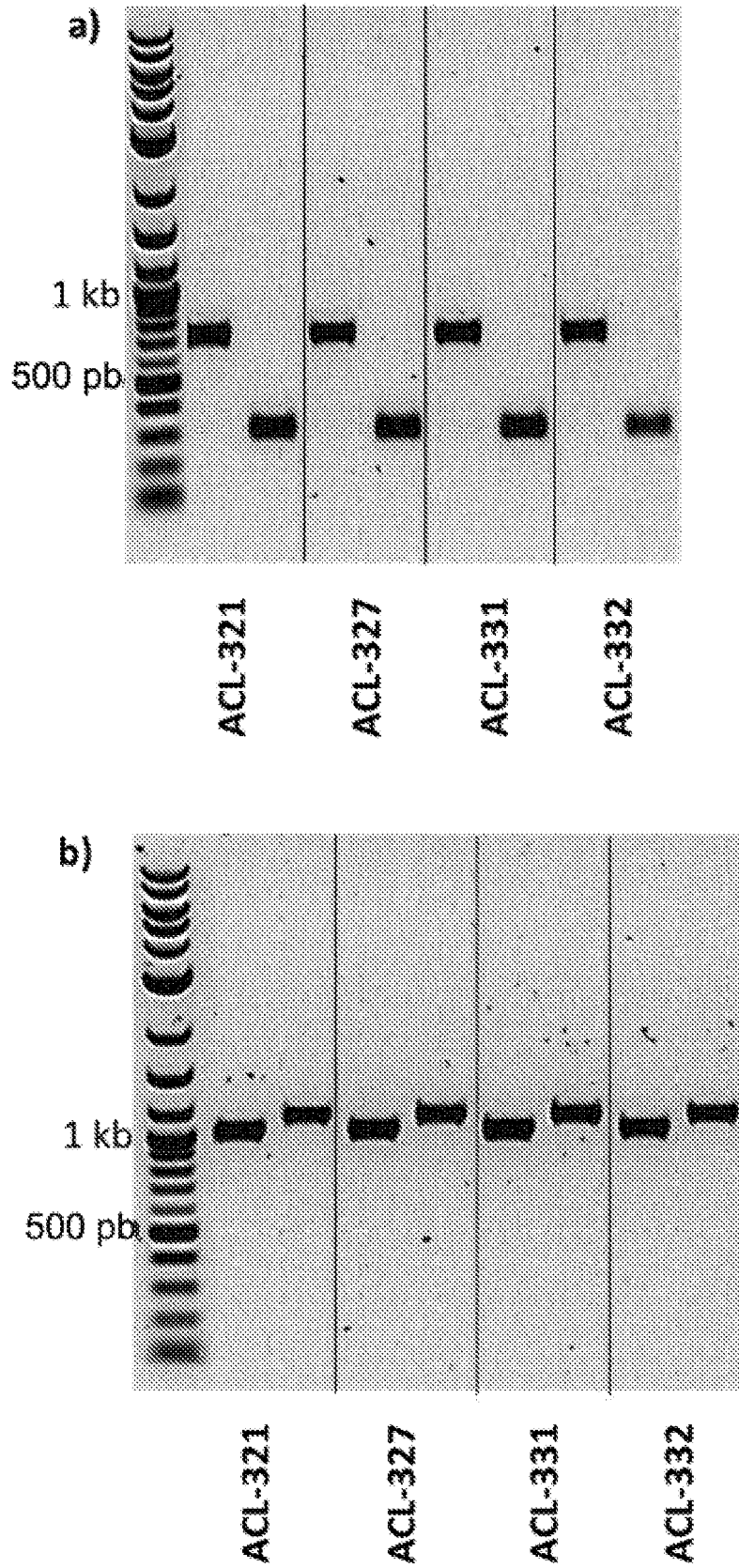


Figura 37

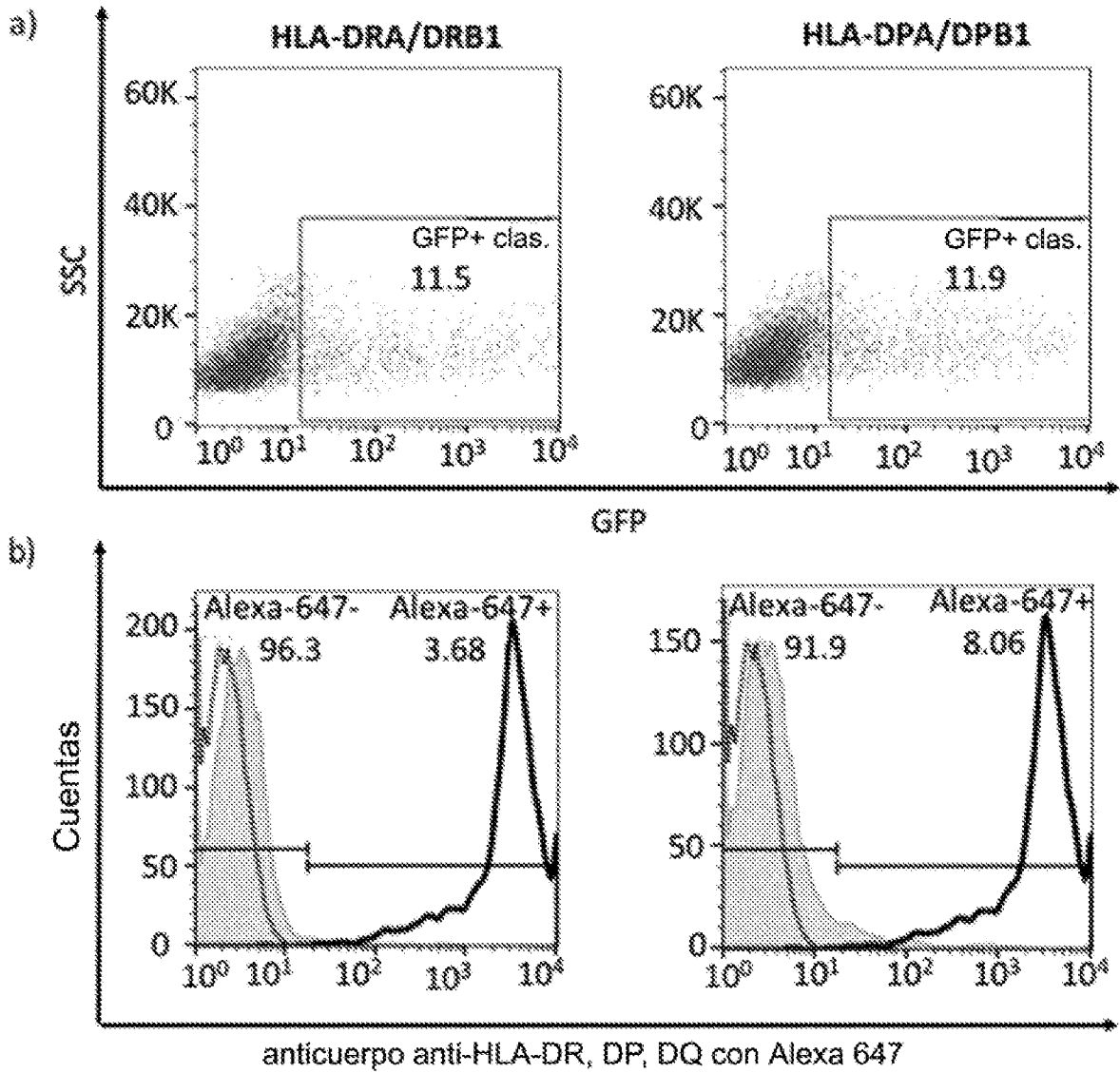
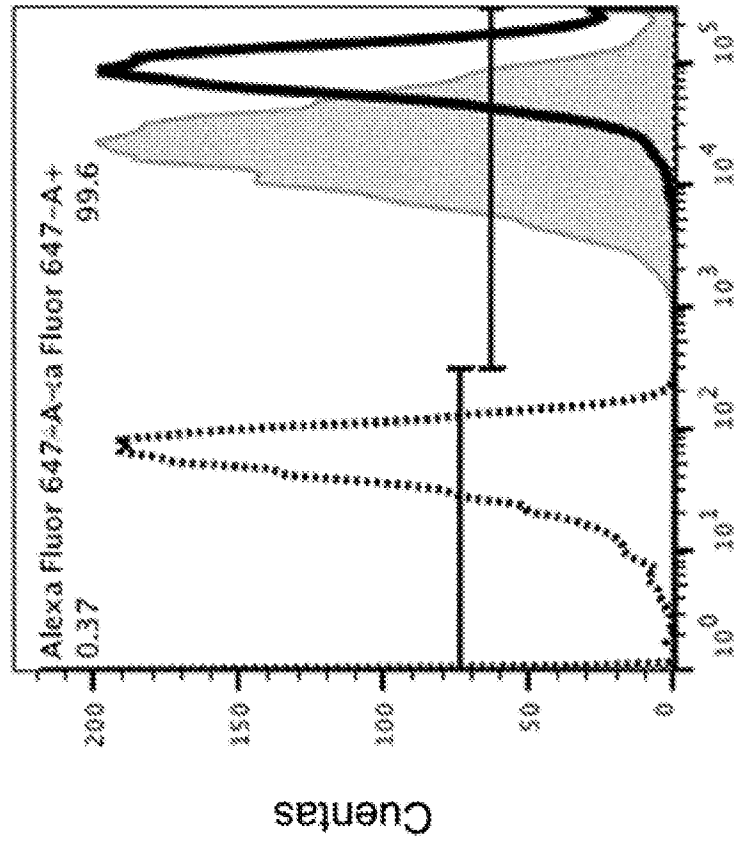
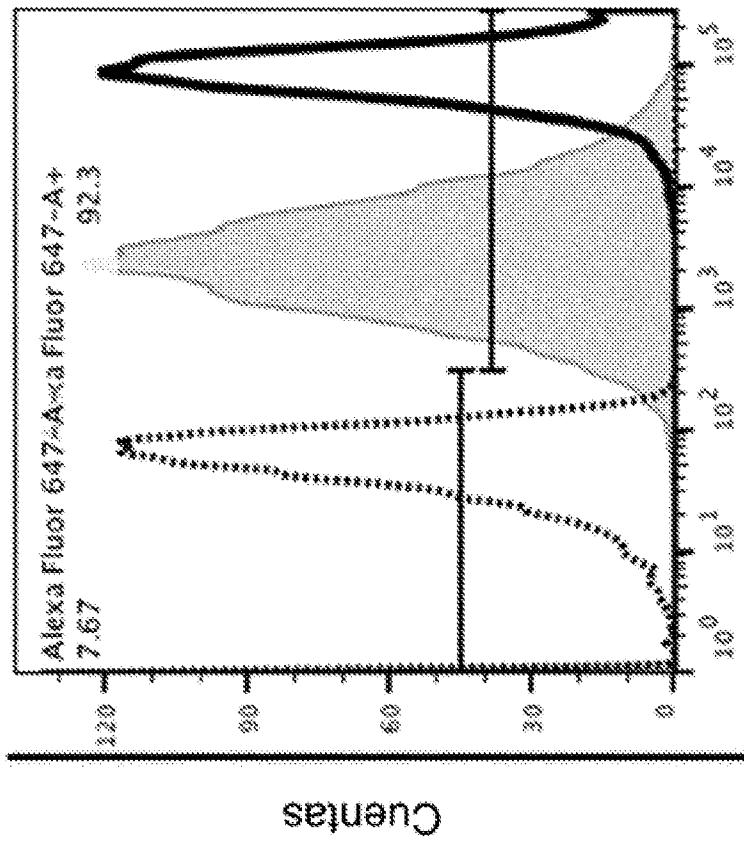


Figura 38

ACL-350



ACL-341



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

Figura 39

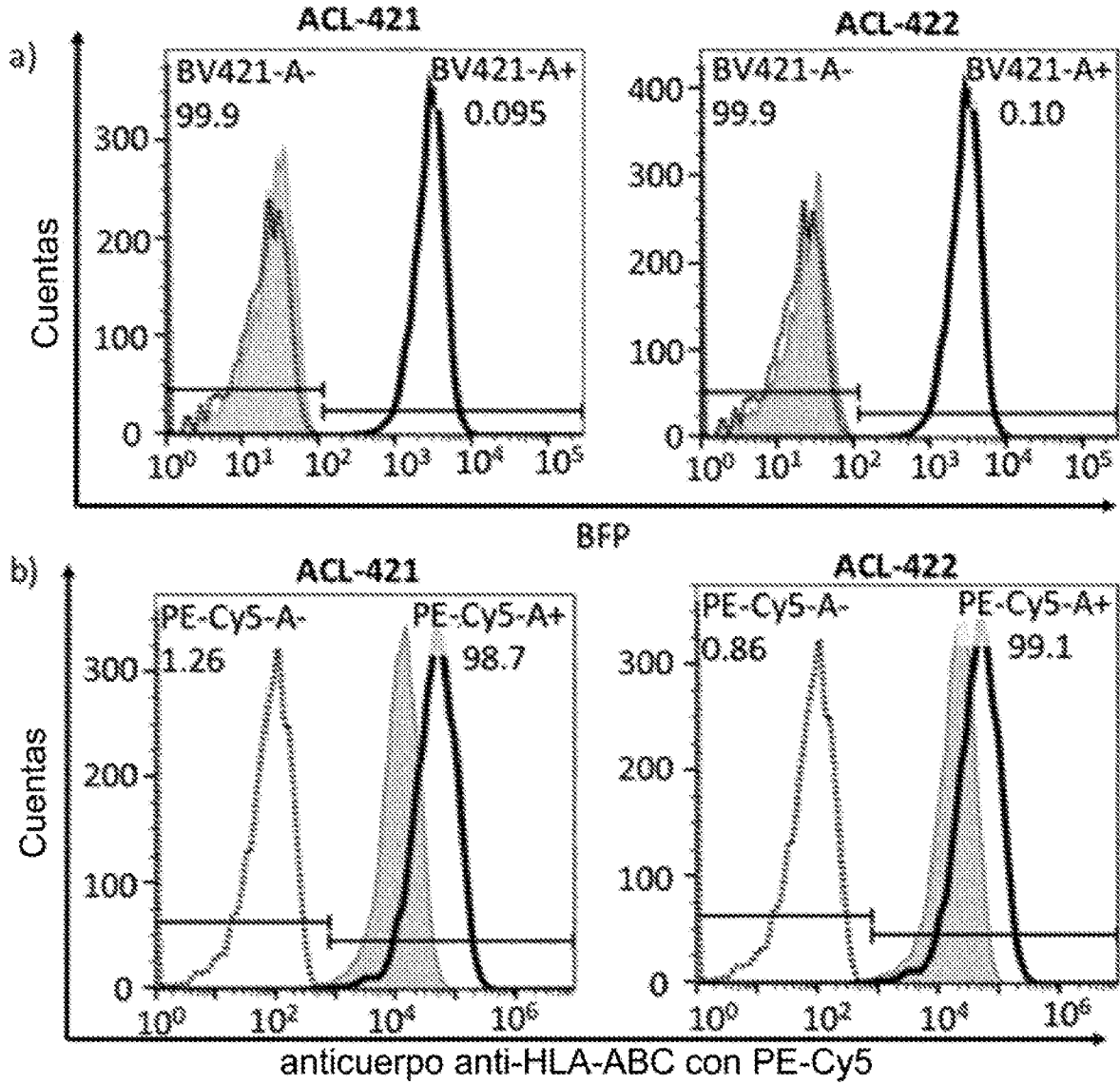


Figura 40

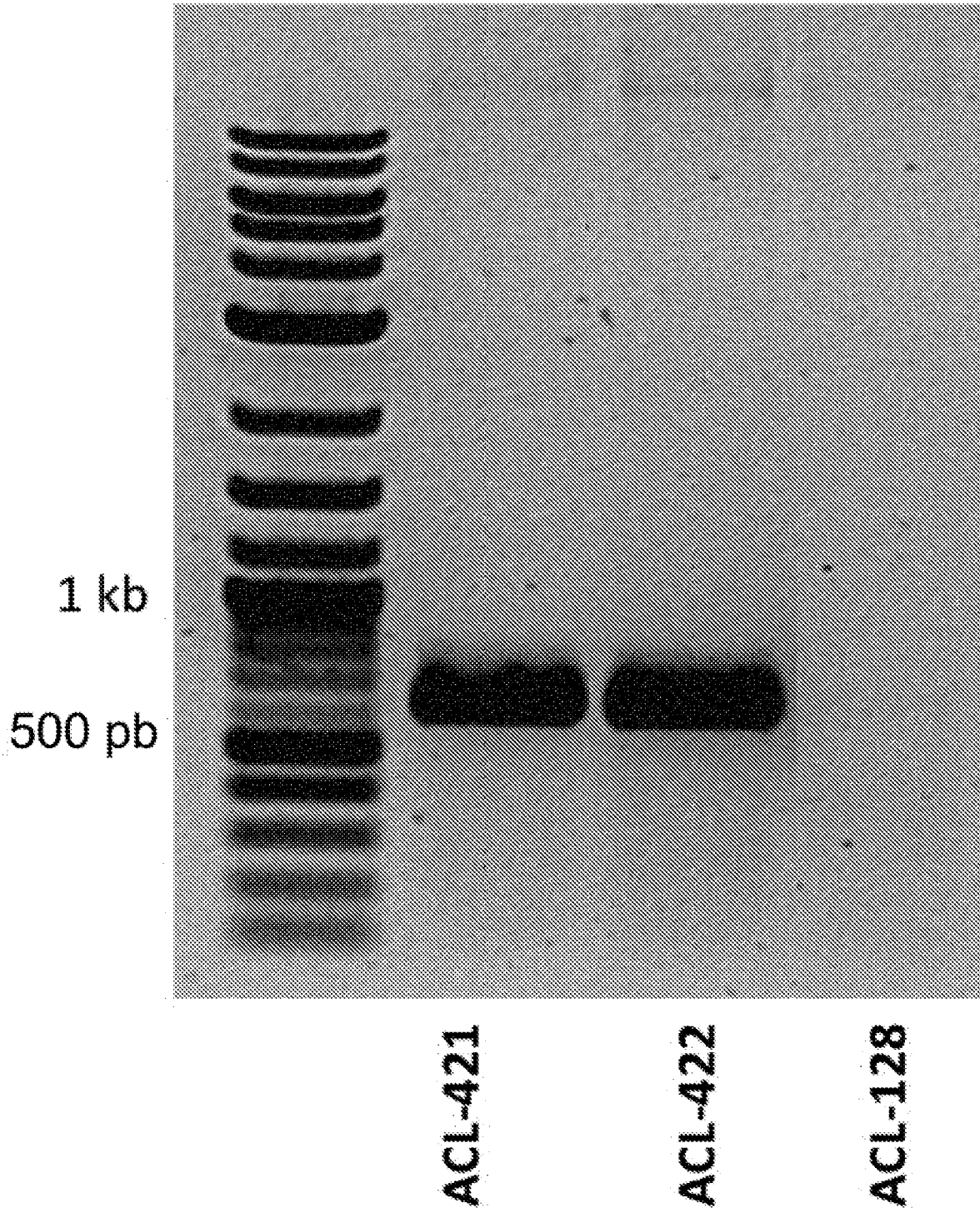


Figura 41

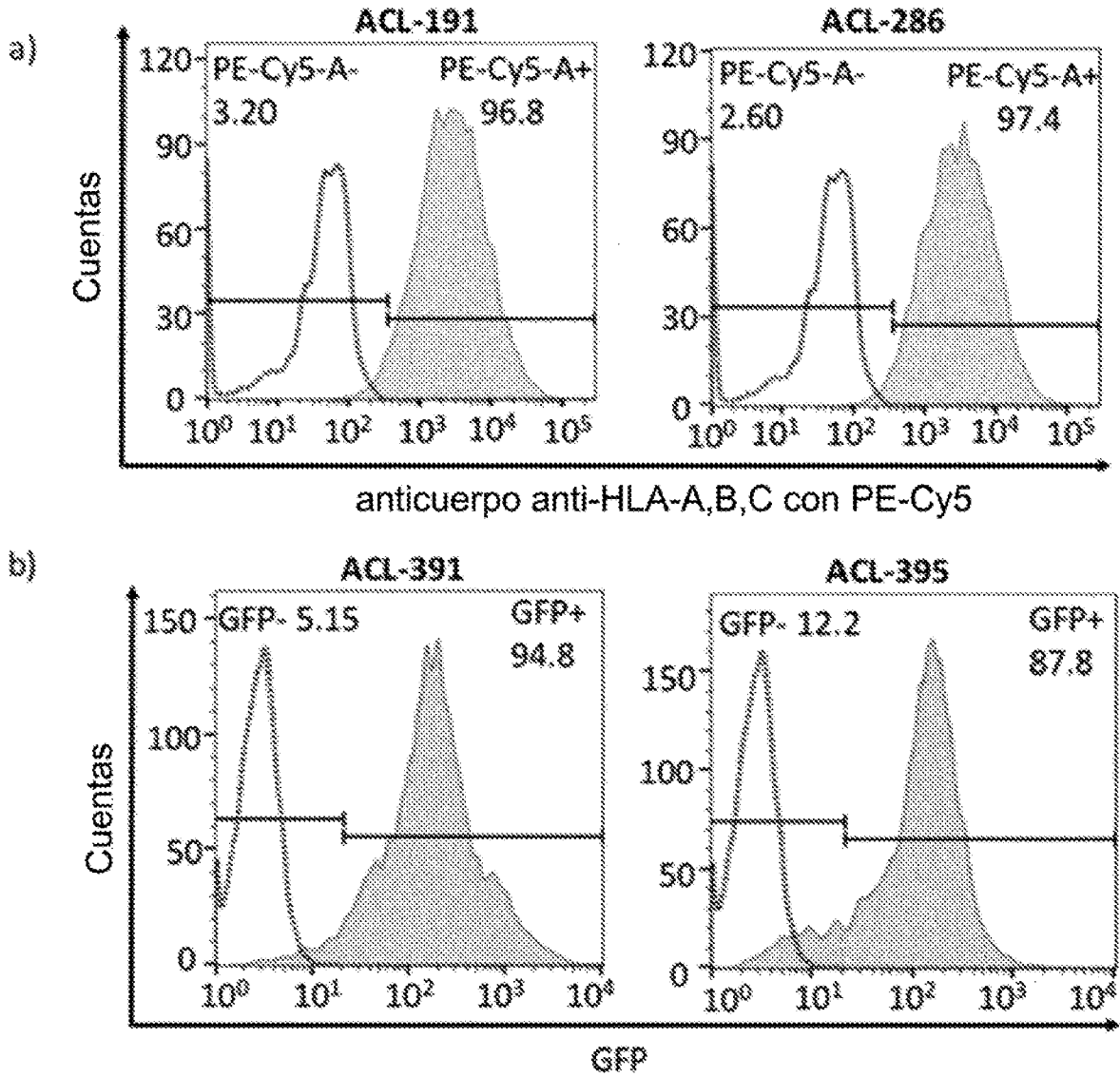


Figura 42

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

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

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

Línea celular	Ubicación genómica		Número de copias de los componentes B y D integrados			
	Integrada en el genoma	Integrada en el sitio de integración genómica (AAVS1)	Copias del gen de referencia/ul	Copias de componentes B y D/ul	Razón observada	Razón esperada para una única integración de componentes B y D
ACL-472	Sí	Sí	183	124	0,675	0,56

Figura 43

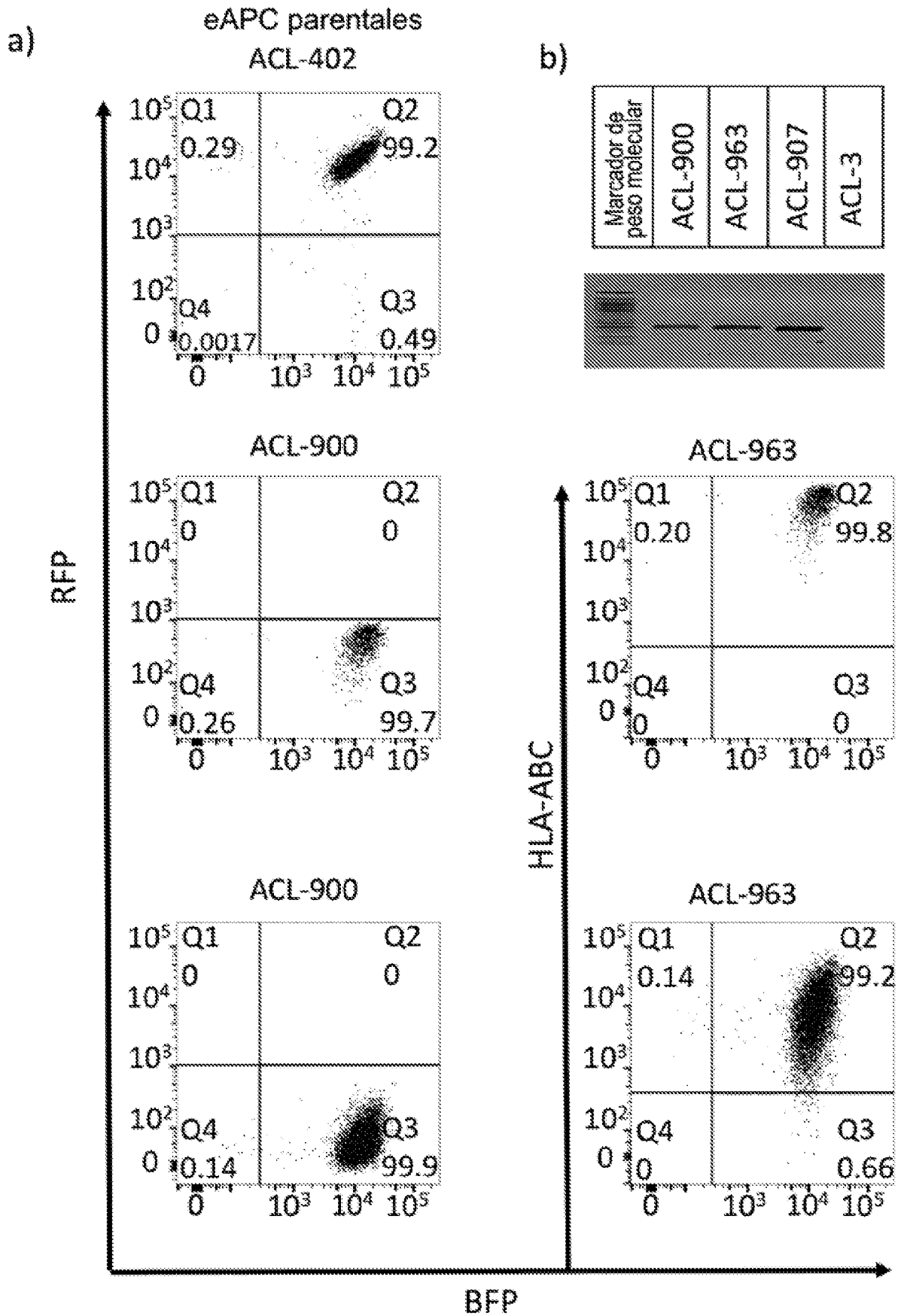


Figura 44

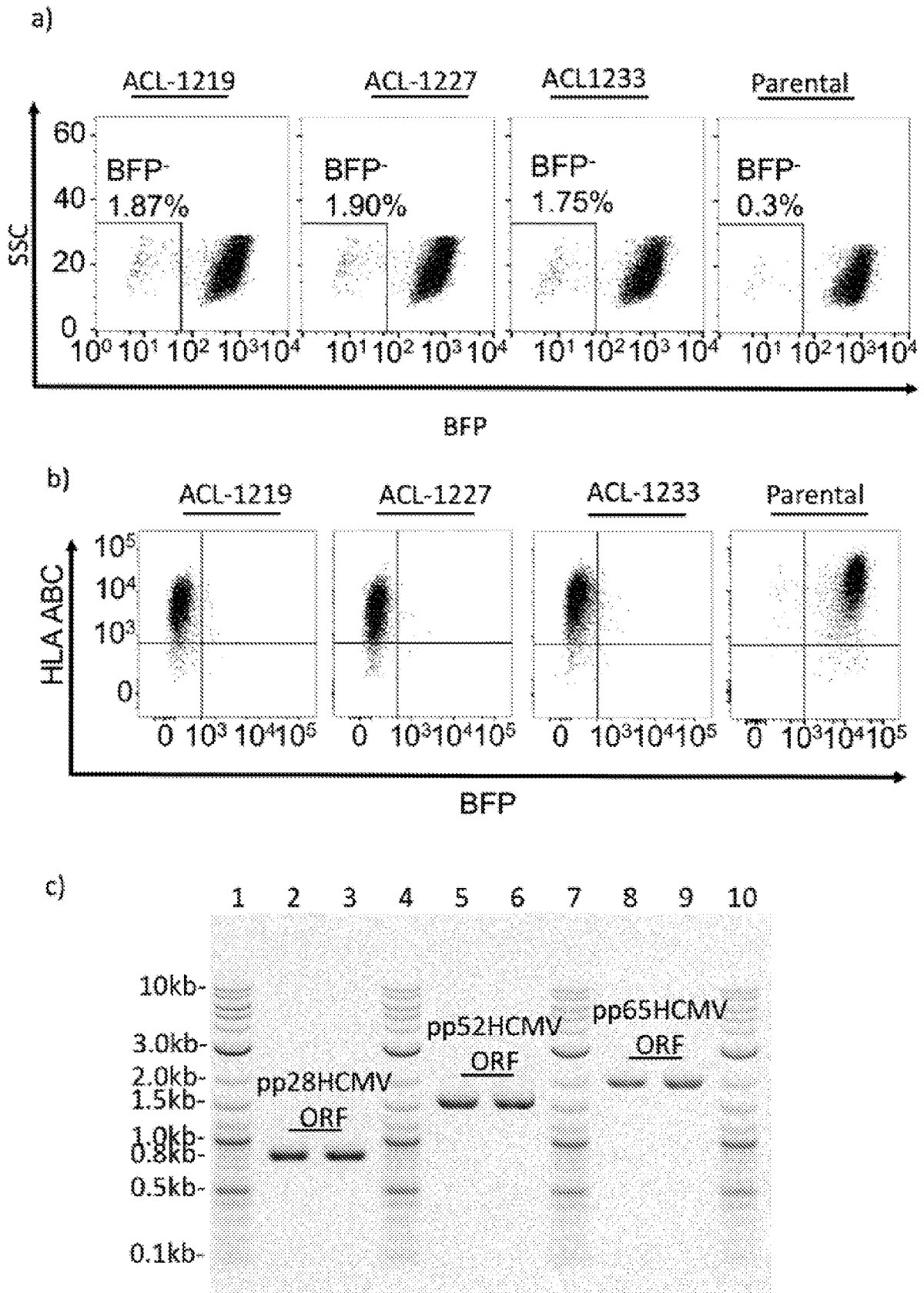


Figura 45

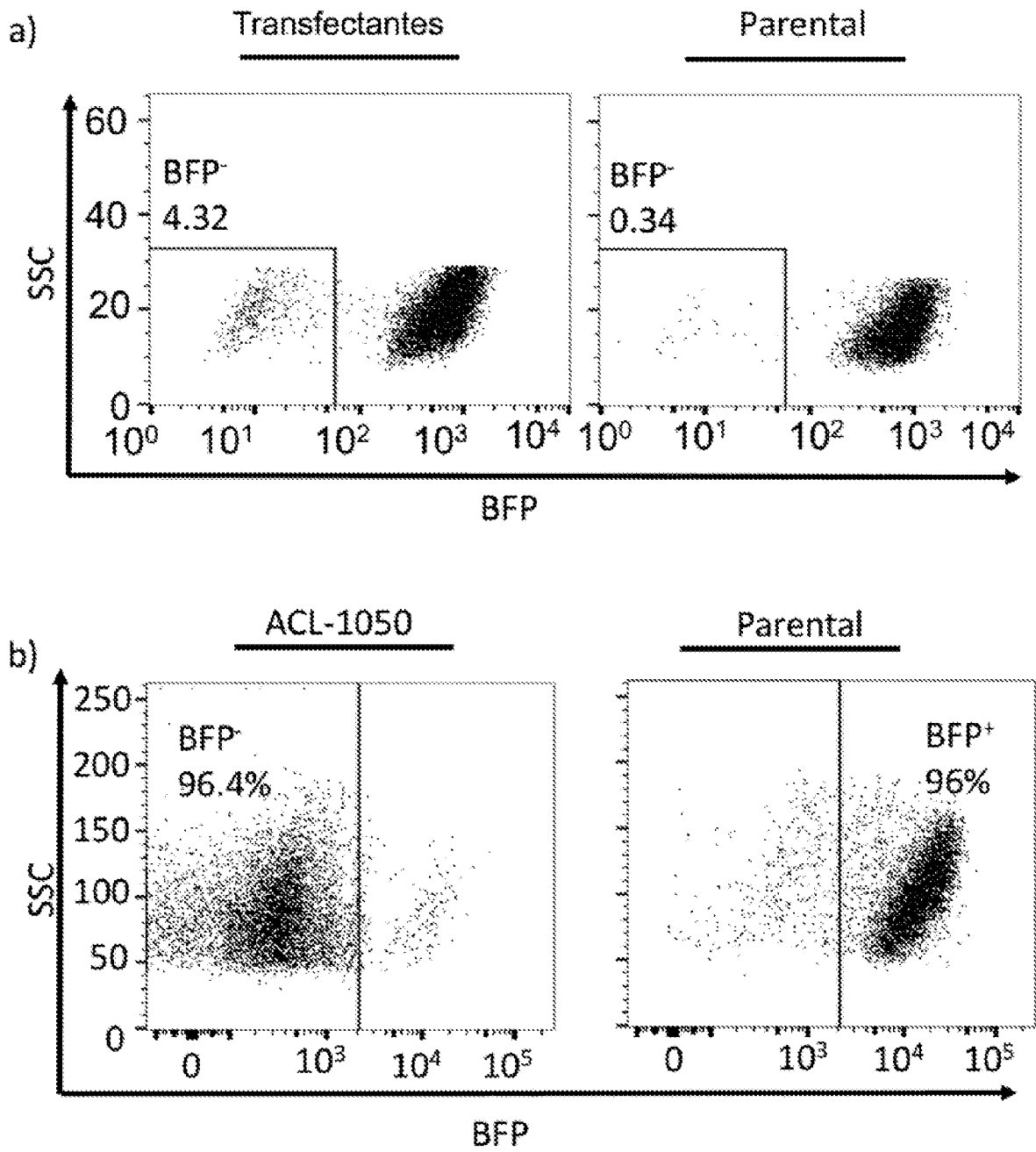


Figura 45

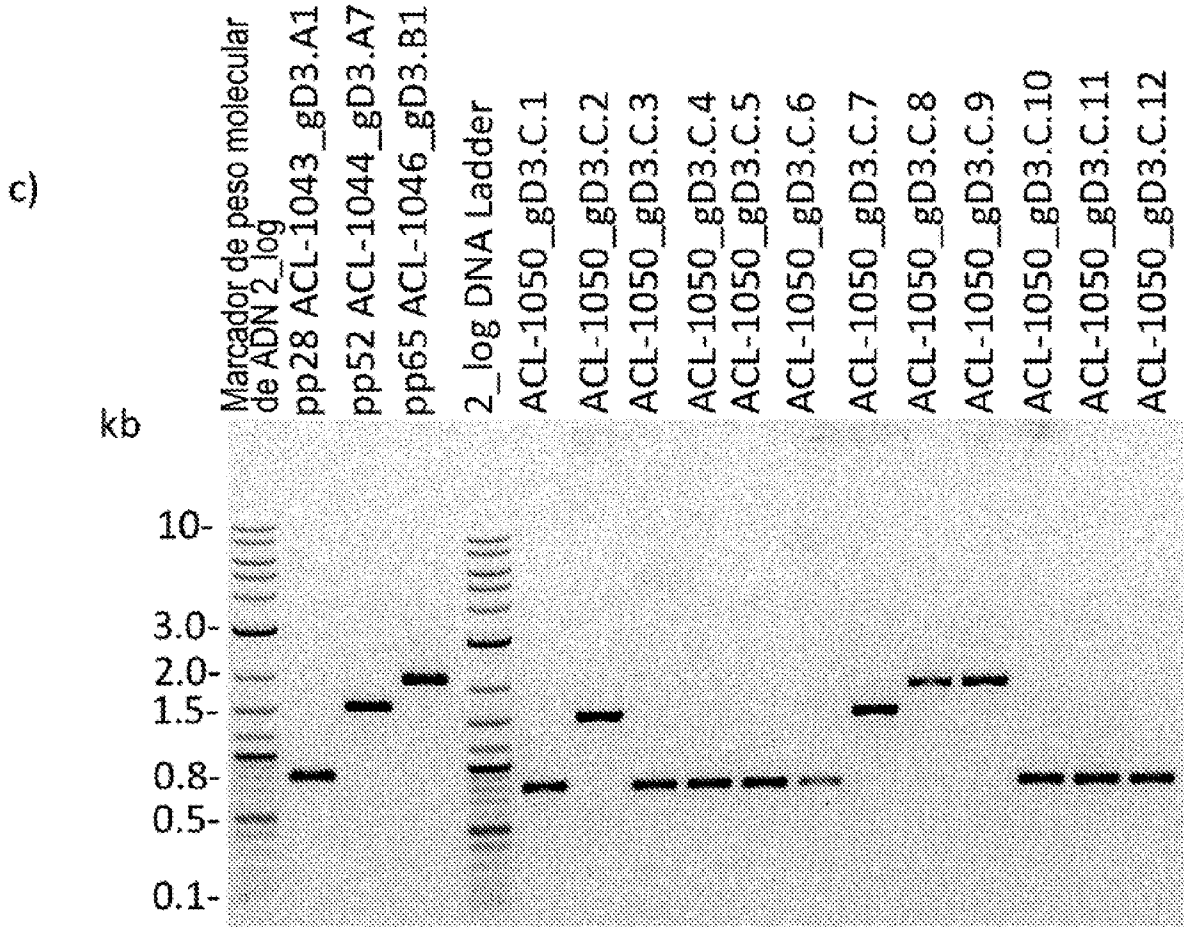


Figura 46

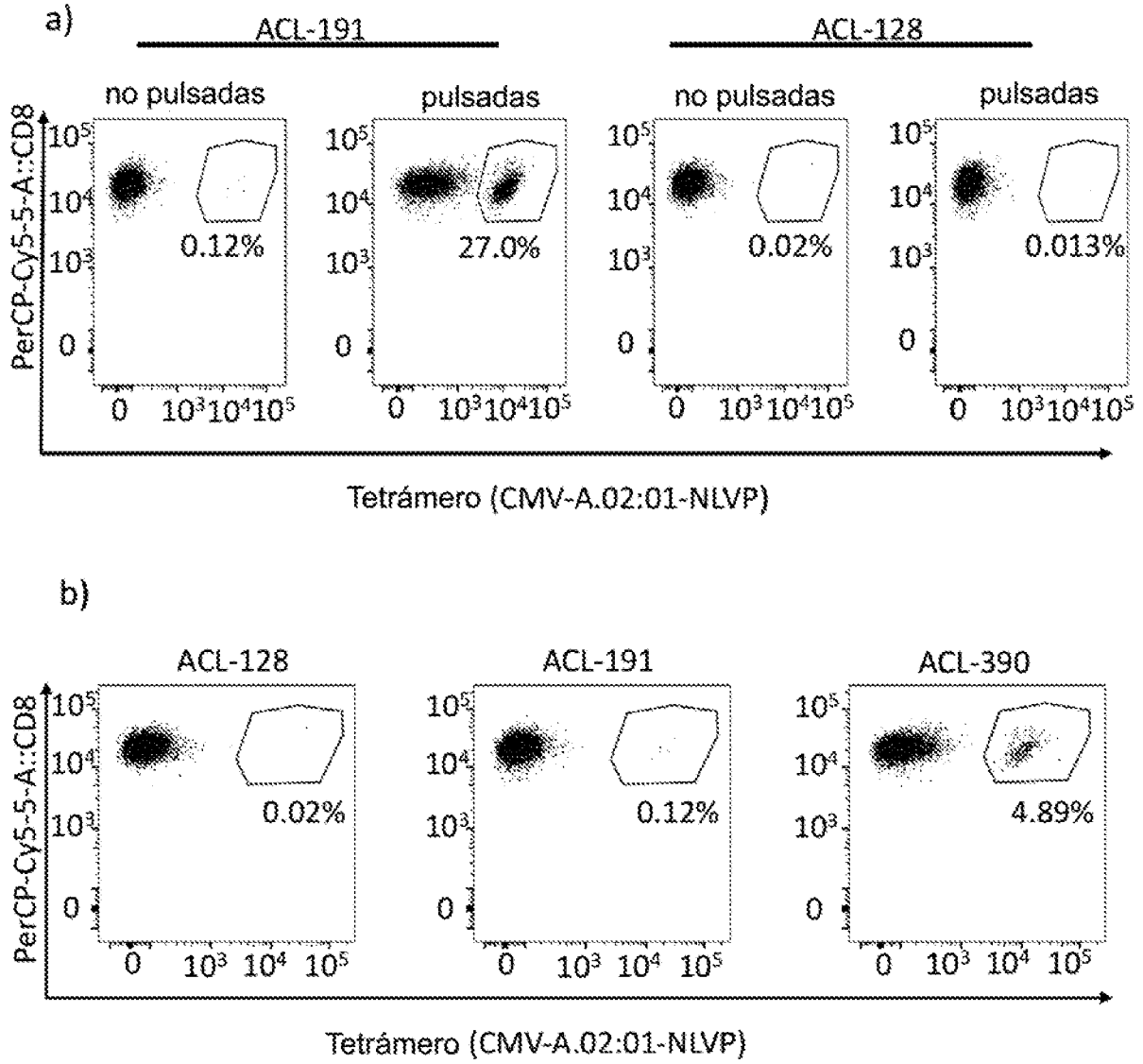


Figura 47

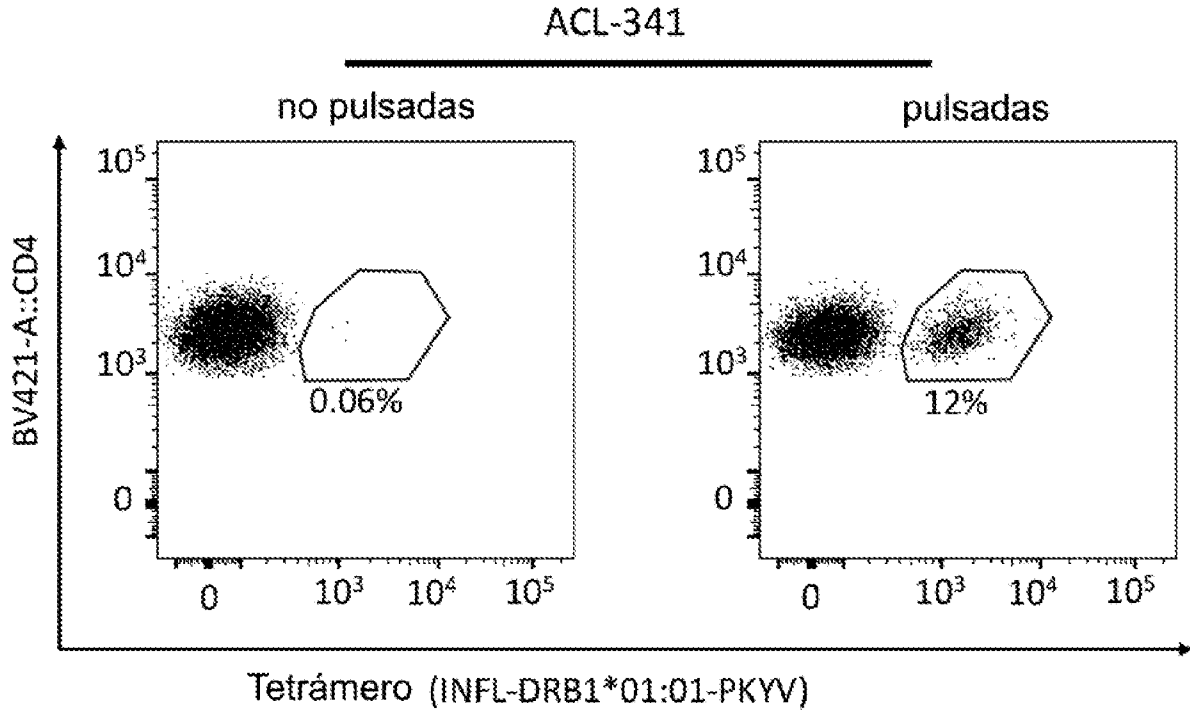


Figura 48

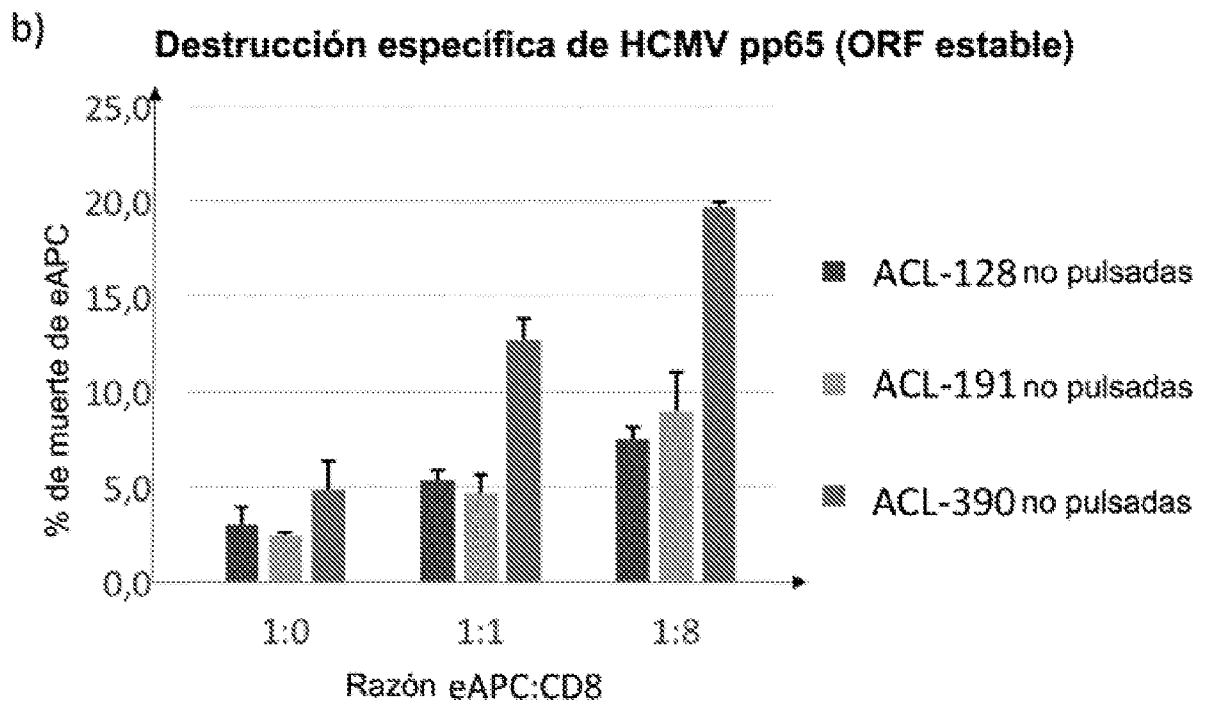
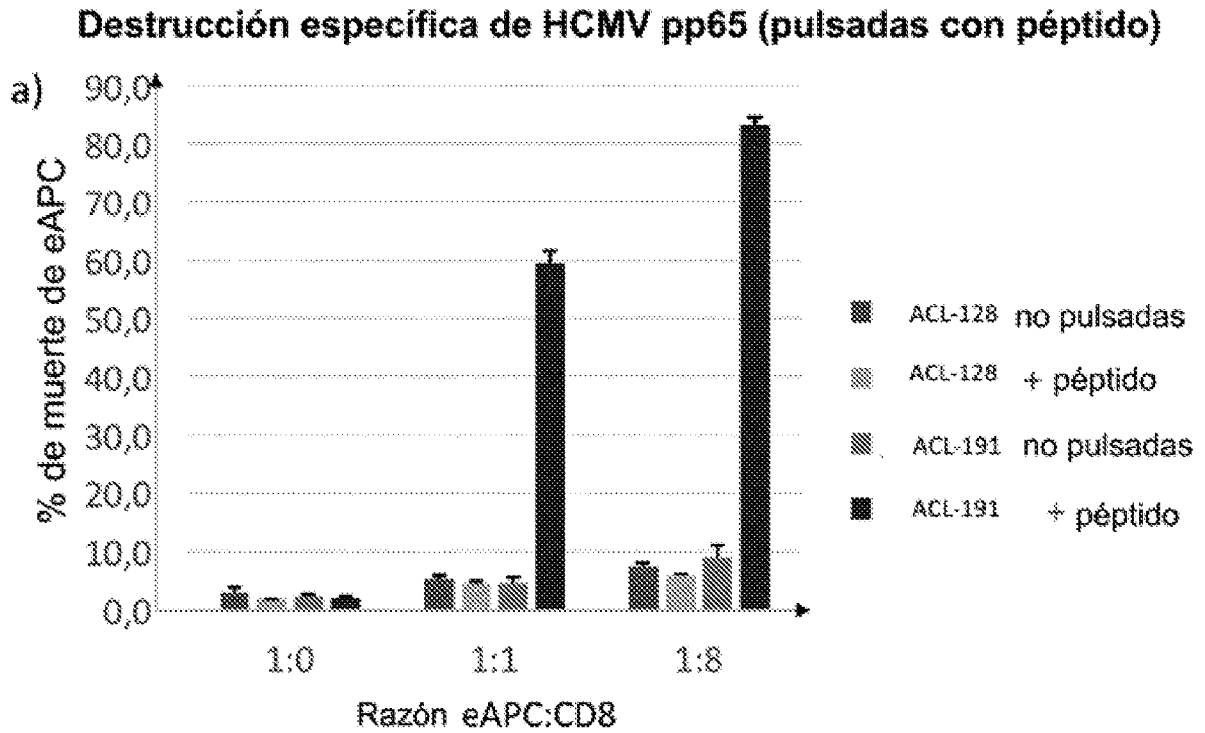


Figura 49

ID	ID de línea de eAPC	alelo de eAPC	Secuencia peptídica	Péptidos identificados	Intensidad	Puntuación de PEP
1	ACL-900	HLA-A*02:01	NA	NA	0	0
2	ACL-900	HLA-A*02:01	NLVPMVATV	NLVPMVATV	3.4E+07	6.55E-07
4	ACL-900	HLA-A*02:01	NLGPMAGV	NA	0	0
10	ACL-963	HLA-A*24:02	NA	NA	0	0
11	ACL-963	HLA-A*24:02	VYALPLKML	VYALPLKML	7.9E+06	0.026368
12	ACL-963	HLA-A*24:02	NLVPMVATV	NA	0	0
13	ACL-900	HLA-A*02:01	VYALPLKML	NA	0	0