

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 787**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6881 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2018** **PCT/US2018/015819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2018** **WO18144410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2018** **E 18707780 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 3577234**

54 Título: **Métodos mejorados de secuenciación de receptores de células inmunitarias**

30 Prioridad:

31.01.2017 US 201762452409 P

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

30.08.2024

73 Titular/es:

**LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
LTD. (100.0%)
666 Third Avenue 28th Floor
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

GENOLET, RAPHAEL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 977 787 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

Métodos mejorados de secuenciación de receptores de células inmunitarias

Campo

- 5 La divulgación se refiere a métodos, sistemas y kits para secuenciar repertorios de receptores de células inmunitarias a partir de células inmunitarias, tales como células T o células B.

Antecedentes

- Los repertorios de células inmunitarias, tales como los de células B o T, consisten de millones de linfocitos, cada uno de los cuales expresa un complejo proteico diferente que permite el reconocimiento específico de un único antígeno. Las células T CD4 y CD8 positivas expresan los llamados receptores de células T (TCR). Estos receptores heterodiméricos reconocen péptidos derivados de antígenos mostrados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células que presentan antígenos, como se describe en Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. Cómo se unen los TCR a MHC, péptidos y correceptores. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:419-66. Los TCR se componen de dos subunidades, más comúnmente de una cadena α y una cadena β . Un tipo menos común de TCR contiene una cadena γ y una cadena δ .
- 15 Las cadenas alfa (α) consisten en una región V (variable), una de unión (J) y una constante (C), mientras que las cadenas beta (β) contienen una región de diversidad (D) adicional entre las regiones V y J (ver Figura 1), como se describe en Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Selección positiva y negativa de células T. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139-76. Cada una de estas regiones TCR está codificada en varias piezas, los llamados segmentos genéticos, que están segregados espacialmente en la línea germinal. En humanos, el locus del gen TCR α contiene 54 segmentos de genes V diferentes y 61 segmentos de genes J. El locus de la cadena β del TCR humano comprende segmentos de 65 V, 2 D y 14 J. La gran diversidad estructural de los TCR se logra mediante la recombinación somática de estos segmentos del gen TCR durante el desarrollo de los linfocitos en el timo. Durante este proceso, se seleccionan aleatoriamente varios segmentos de genes de cada tipo de región y se unen para formar un locus TCR reordenado. Se crea diversidad de unión adicional mediante la adición o eliminación de nucleótidos en los sitios de recombinación, como se describe en Krangel MS. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol.* 2009 abril;21(2):133-9. El proceso de unión de V(D)J desempeña un papel fundamental en la configuración de los terceros bucles hipervariables (también llamados regiones determinantes complementarias, CDR3) de las cadenas α y β de TCR. Estas regiones se unen a antígenos y son esenciales para proporcionar la alta especificidad de reconocimiento de antígenos que exhiben los TCR.
- 20 De manera similar al TCR $\alpha\beta$, los segmentos TCR gamma (γ) y delta (δ) sufren un reordenamiento V(D)J durante el desarrollo del timo. Ambos loci se recombinan en la etapa doble negativa (DN) del desarrollo de las células T. La diferenciación hacia el linaje $\gamma\delta$ o $\alpha\beta$ depende de la capacidad de la célula para producir TCR $\gamma\delta$ o $\alpha\beta$ funcional. El locus δ está incrustado dentro del locus α . Los segmentos D δ , J δ y C δ están ubicados entre los segmentos V y J del locus α . Los segmentos V δ son los mismos que los segmentos V α pero sólo una fracción de los segmentos V α se usa para la cadena TCR δ .
- 25 En general, la recombinación V(D)J es capaz de generar millones de secuencias de TCR diferentes y desempeña un papel fundamental en la capacidad de un organismo para eliminar infecciones o células transformadas. No es sorprendente que los repertorios de TCR afecten a una amplia gama de enfermedades, incluidas enfermedades malignas, trastornos autoinmunes y enfermedades infecciosas. La secuenciación de TCR ha sido fundamental para comprender cómo evoluciona el repertorio de TCR durante la infección o después del tratamiento (por ejemplo, después de un trasplante de células madre hematopoyéticas, una infección viral crónica, una inmunoterapia). Además, la identificación de TCR en linfocitos infiltrantes de tumores y otras células T que se dirigen a epítomos específicos del cáncer no sólo ha ampliado nuestro conocimiento sobre las enfermedades malignas, sino que también ha dado lugar a nuevas terapias para el cáncer, como la transferencia adoptiva de células T o las vacunas para el cáncer.
- 30 Debido a la gran diversidad de secuencias, determinar los repertorios de TCR ha sido un desafío en la práctica. En los últimos años, la secuenciación de próxima generación (NGS) ha abierto nuevas oportunidades para evaluar de manera integral la extrema diversidad de repertorios de TCR, como se describe en Genolet R, Stevenson BJ, Farinelli L, Osterås M, Luescher IF. El repertorio altamente diverso de cadenas TCR α de células T CD8+ preinmunes revela nuevos conocimientos sobre la recombinación de genes. *EMBO J.* 4 de abril de 2012; 31 (7): 1666-78; Robins HS, Campreggher PV, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Kahsai O, Riddell SR, Warren EH, Carlson CS. Evaluación integral de la diversidad de la cadena beta del receptor de células T en células T alfa beta. *Blood.* 2009 Nov. 5; 114(19):4099-107; Linnemann C, Heemskerk B, Kvistborg P, Kluijn RJ, Bolotin DA, Chen X, Bresser K, Nieuwland M, Schotte R, Michels S, Gomez-Eerland R, Jahn L, Hombrink P, Legrand N, Shu CJ, Mamedov IZ, Velds A, Blank CU, Haanen JB, Turchaninova MA, Kerkhoven RM, Spits H, Hadrup SR, Heemskerk MH, Blankenstein T, Chudakov DM, Bendle GM, Schumacher TN. High-throughput identification of antigen specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med.* 2013 nov.;19(11):1534-41; Turchaninova MA, Britanova OV, Bolotin DA, Shugay M, Putintseva EV, Staroverov DB, Sharonov G, Shcherbo D, Zvyagin IV, Mamedov IZ, Linnemann C, Schumacher TN, Chudakov DM. Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol.* 2013 sep;43(9):2507-15.

Dado que la mayoría de las técnicas actuales de secuenciación de TCR requieren el enriquecimiento de los genes de TCR para la secuenciación, la mayoría de los métodos incluyen una etapa de amplificación, en la que se amplifican los ácidos nucleicos que codifican los TCR individuales. Por lo tanto, uno de los desafíos de la secuenciación de TCR se relaciona con la capacidad de la tecnología para mantener la proporción de cada TCR durante la amplificación. Por lo tanto, la forma en que se preparan las bibliotecas TCR tiene un fuerte impacto en la calidad y confiabilidad de los resultados de secuenciación obtenidos y en las conclusiones que se pueden extraer de los datos. En el pasado se han utilizado varios enfoques para amplificar y secuenciar repertorios de TCR, cada método con su propio conjunto de problemas.

Un método frecuentemente empleado para la secuenciación de TCR se basa en una etapa de PCR múltiple, en el que todos los cebadores para los segmentos V y J se mezclan entre sí para amplificar todos los posibles reordenamientos/combinaciones de V(D)J, como se describe en Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Kahsai O, Riddell SR, Warren EH, Carlson CS. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alpha beta T cells. *Blood*. 2009 nov. 5; 114(19):4099-107. El principal inconveniente de esta tecnología es que la amplificación no es cuantitativa: Debido a que la eficacia de cada par de cebadores varía, algunas secuencias de TCR están representadas preferentemente en la biblioteca.

Otro método de secuenciación de TCR utiliza un proceso llamado "captura de gen de ADN" para aislar fragmentos de ADN que codifican TCR, como se describe en el presente documento. Linnemann C, Heemskerk B, Kvistborg P, Kluijn RJ, Bolotin DA, Chen X, Bresser K, Nieuwland M, Schotte R, Michels S, Gomez-Eerland R, Jahn L, Hombrink P, Legrand N, Shu CJ, Mamedov IZ, Velds A, Blank CU, Haanen JB, Turchaninova MA, Kerkhoven RM, Spits H, Hadrup SR, Heemskerk MH, Blankenstein T, Chudakov DM, Bendle GM, Schumacher TN. High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat. Med.* 2013 Nov.;19(11):1534-41. Sin embargo, dado que este método utiliza ADN en lugar de ARN, también aislará los segmentos V y J que aún no han experimentado un reordenamiento somático. Como consecuencia, muchos de los datos de secuenciación obtenidos no son informativos para la identificación del gen TCR, ya que no contienen la región V(D)J del locus del gen TCR reordenado. Además, el uso de ADN en lugar de ARN para el análisis del gen TCR puede sobreestimar la diversidad del repertorio de TCR, ya que las células T expresan solo una de las dos cadenas β , mientras que el otro gen está silenciado (exclusión alélica).

Un tercer método de amplificación de TCR se basa en la tecnología 5'-Race PCR (SMARTer® Kit de perfiles humanos TCR a/b, Takara-Clontech). En este método, se añade un adaptador de ácido nucleico al extremo 5' del ADNc durante la etapa de transcripción inversa. Como resultado, los productos de TCR se pueden amplificar posteriormente con un único par de cebadores, uniéndose un cebador al adaptador en el extremo 5' del ADNc y el segundo cebador uniéndose a la región constante cerca del extremo 3' del ADNc. Una de las desventajas de esta técnica es que la etapa de amplificación generará fragmentos de PCR que oscilan entre 500 y 600 pb. Como la longitud del segmento V supera los 400 pb, en realidad no es posible secuenciar la unión V(D)J comenzando desde el extremo 5' usando tecnología de secuenciación Illumina®, que puede generar lecturas de secuenciación de hasta 300 pb únicamente. Por lo tanto, la secuenciación de la unión V/J se realiza habitualmente desde la región constante, cruzando el segmento J, la región CDR3 y parte del segmento V. Sin embargo, los errores de secuenciación aumentan con la longitud de la lectura de secuenciación y, por lo tanto, se introducen con mayor frecuencia en los segmentos V, la región más difícil de asignar correctamente debido a la alta homología entre los diferentes segmentos V. En consecuencia, la secuenciación a partir de la región constante puede conducir a una reducción en el número de segmentos V que pueden identificarse sin ambigüedades. Si bien esta advertencia puede evitarse mediante la secuenciación de extremos pares, dicha modificación del protocolo aumentará significativamente la duración y el coste asociados con este método.

Resumen

Dado que cada uno de los métodos actuales presenta deficiencias importantes, existe una necesidad considerable de una tecnología de secuenciación de TCR que proporcione datos del repertorio de TCR con alta sensibilidad y confiabilidad.

En el presente documento se divulgan métodos para secuenciar repertorios de receptores de células T y otros repertorios de células inmunitarias, tales como repertorios de células B, con alta sensibilidad y confiabilidad.

Las realizaciones de la invención en el presente documento también se denominan método SEQTR (Secuenciación de receptores de células T).

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para secuenciar genes de receptores de células inmunitarias, que comprende: (1) proporcionar ARN de células inmunitarias; (2) transcribir el ARN en ARN complementario (ARNc), seguido de transcripción inversa del ARNc en ADN complementario (ADNc) usando uno o más cebadores que comprenden una primera secuencia adaptadora, en el que cada extremo 5' del ADNc producido mediante transcripción inversa contiene la primera secuencia de adaptador; (3) amplificar el ADNc para producir un primer producto de amplificación usando un primer par de cebadores que comprende un primer cebador que se hibrida con la primera secuencia adaptadora y un segundo cebador que se hibrida con una región constante del gen del receptor de células inmunitarias; (4) amplificar el primer producto de amplificación para producir un segundo producto de amplificación usando un segundo par de cebadores, en el que (i) un primer cebador del segundo par de cebadores

se une a la secuencia adaptadora en el extremo 5' del primer producto de amplificación, (ii) el segundo cebador del segundo par de cebadores se une a la región constante del gen del receptor de células inmunitarias en el primer producto de amplificación, y (iii) el primer y segundo cebadores comprenden secuencias adaptadoras para secuenciación; y (5) secuenciar el segundo producto de amplificación.

- 5 En algunas realizaciones, la etapa de transcripción inversa da como resultado productos de PCR que varían de 150 a 600 pb. En algunas realizaciones, los genes del receptor de células inmunitarias son genes del receptor de células T (TCR) o genes del receptor de células B (BCR).

En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) se hibridan con segmentos V de la cadena α de TCR.

- 10 En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) comprenden una o más de las SEQ ID NO: 1-50 o SEQ ID NO: 261-310.

En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) se hibridan con segmentos V de la cadena β de TCR.

- 15 En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) comprenden una o más de las SEQ ID NO: 51-100 o SEQ ID NO: 311-360.

En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) se hibridan con segmentos V de la cadena γ de TCR.

En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) se hibridan con segmentos V de la cadena δ de TCR.

- 20 En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) se hibridan con segmentos V de la cadena pesada de BCR.

En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) o la síntesis de ADNc de segunda cadena (etapa (2)(b)) se hibridan con segmentos V de cadena ligera de BCR.

- 25 En algunas realizaciones, uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) contienen una secuencia de código de barras de nucleótidos.

En algunas realizaciones, el código de barras de nucleótidos comprende de 6 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, el código de barras de nucleótidos consiste de 9 nucleótidos. En algunas realizaciones, el código de barras de nucleótidos consiste de la secuencia NNNNTNNNN, NNNNANNNN o HHHHHNNNN.

- 30 En algunas realizaciones, la primera secuencia adaptadora de uno o más cebadores usados para la transcripción inversa (etapa (2)) comprende un adaptador T7.

En algunas realizaciones, las células inmunitarias son células T y en las que el segundo cebador del primer par de cebadores se hibrida con la región constante de un gen TCR.

En algunas realizaciones, las células inmunitarias son células B y en las que el segundo cebador del primer par de cebadores se hibrida con la región constante de un gen BCR.

- 35 En algunas realizaciones, la secuenciación es una secuenciación de próxima generación.

En algunas realizaciones, el ARN de las células inmunitarias se obtiene mezclando células inmunitarias con células portadoras antes de la extracción del ARN.

En algunas realizaciones, las células inmunitarias son linfocitos infiltrantes de tumores.

En algunas realizaciones, las células inmunitarias son células T CD4 o CD8 positivas.

- 40 En algunas realizaciones, las células inmunitarias se purifican a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes de la extracción del ARN.

En algunas realizaciones, las células inmunitarias son parte de una mezcla de PBMC.

En algunas realizaciones, las células inmunitarias se derivan de un mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un humano o un ratón.

- 45 Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 muestra la disposición de las regiones V (variable), diversidad (D), unión (J) y regiones constantes (C) en las cadenas α y β de los receptores de células T. Figura tomada de Murphy, K., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. (2012). Janeway's Immunobiology. Nueva York: Garland Science.

5 Figura 2 Esta es una ilustración de tres técnicas diferentes de secuenciación de TCR que se han empleado en el pasado.

Figura 3 proporciona una descripción general del método SEQTR, utilizando las cadenas α de TCR como ejemplo. Cada barra representa un gen de la cadena α de TCR. En las moléculas de ARN y ARNc, el orden de los segmentos es, de izquierda a derecha: Segmentos V, segmentos J y región constante. Las regiones de códigos de barras se agregan en la molécula de ADNc a la izquierda de los segmentos V; y las regiones adaptadoras T7 se agregan a la izquierda de los códigos de barras (también indicadas por la amplificación del cebador T7 en las etapas PCR1 y PCR2). Los adaptadores de secuenciación Illumina® se agregan en la etapa PCR2 a los extremos 5' y 3' de las moléculas, como se muestra en el último conjunto de moléculas.

10 Figura 4 ilustra la sensibilidad del método SEQTR. 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 de 0 células T CD8 positivas, respectivamente, se mezclaron con 5×10^4 Células 3T3. El ARN se extrajo y se sometió a transcripción, transcripción inversa y una ronda de amplificación (etapas 2 a 4, ver descripción detallada). Los productos de la PCR resultantes se separaron en geles de agarosa y se visualizaron con bromuro de etidio.

Figura 5 ilustra la especificidad del método SEQTR. 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 o 0 células T CD8 positivas, respectivamente, se mezclaron con 5×10^4 Células 3T3. El ARN fue extraído y sometido al método SEQTR. Se indican los porcentajes de lecturas de secuenciación que estaban o no asociadas, respectivamente, con genes TCR reales.

20 Figura 6 ilustra la identificación inequívoca de genes TCR como una característica del método SEQTR. 5×10^4 células 3T3 se mezclaron con 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 o 0 células T CD8 positivas, respectivamente. El ARN de cada mezcla fue aislado y sometido al método SEQTR. Las lecturas que no estaban asociadas con genes TCR se eliminaron del conjunto de datos. Para las lecturas restantes, se indican los porcentajes de lecturas que podrían o no, respectivamente, asignarse sin ambigüedades a segmentos V o J específicos.

25 Figura 7 ilustra la linealidad del método SEQTR. Una cantidad fija de ADN que codifica una secuencia de TCR conocida se diluyó en diferentes concentraciones en una mezcla de ADN que representa un repertorio de células T CD8 vírgenes. Los repertorios de TCR de las mezclas individuales se secuenciaron utilizando el método SEQTR. La frecuencia observada de la secuencia de TCR conocida en todo el repertorio se representó frente a la dilución del gen TCR respectivo.

30 Figura 8 ilustra la reproducibilidad del método SEQTR. Los repertorios de TCR se secuenciaron utilizando el método SEQTR de una muestra biológica en dos réplicas técnicas independientes. Las frecuencias para cada reordenamiento/combinación de V-J en las cadenas β de TCR se determinaron y compararon entre las dos réplicas. Cada esfera representa un único reordenamiento de V-J y el tamaño de una esfera indica la frecuencia relativa de la recombinación V-J específica. Las esferas grises representan reordenamientos para los cuales las frecuencias relativas detectadas en las dos réplicas diferían en menos del doble. Las esferas negras representan reordenamientos para los cuales las frecuencias relativas detectadas en las dos réplicas diferían en más del doble.

35 Figuras 9A-9C ilustra la diversidad de tres conjuntos de datos de secuenciación del repertorio TCR diferentes utilizando el método SEQTR. Figura 9A Se aislaron células T CD8 positivas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), Figura 9B purificado adicionalmente usando tetrámeros conjugados con neoepítipo TEDYMIHII (SEQ ID NO:236) o Figura 9C purificado adicionalmente usando tetrámero conjugado con neoepítipo (igual que en la Figura 9B) y posteriormente expandido in vitro. Los repertorios de TCR de las muestras respectivas se secuenciaron utilizando el método SEQTR y se representaron las frecuencias relativas de todos los reordenamientos/combinaciones V/J observados.

45 Figuras 10A-10C ilustran la superposición de los TCR identificados utilizando un método de clonación de células individuales y los TCR identificados mediante el método SEQTR. Figura 10A: Se aislaron células T de PBMC y se sometieron a una ronda adicional de purificación usando tetrámeros conjugados con el neoepítipo TEDYMIHII (SEQ ID NO: 236). Luego, la población de células resultante se clasificó mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). La mitad de las células clasificadas se sometieron al método SEQTR para secuenciar el repertorio de TCR. Para la otra mitad de las células, se aislaron y expandieron clones de células T individuales. in vitro (clonación unicelular). Una vez establecidos los clones, los genes TCR de cada clon de células T se amplificaron y secuenciaron utilizando la secuenciación clásica de Sanger. Figura 10B: La tabla muestra los seis TCR identificados mediante el método de clonación de células individuales. Las secuencias corresponden a las SEQ ID NO: 237 a 242 de arriba a abajo, respectivamente. Figura 10C: La tabla muestra los ocho TCR más frecuentes identificados mediante el método SEQTR. Las secuencias corresponden a las SEQ ID NO: 243 a 250 de arriba a abajo, respectivamente.

55 Figura 11 ilustra el número de lecturas para diferentes muestras obtenidas utilizando el servicio de secuenciación TCR "immunoSEQ®" ofrecido por Biotecnología Adaptativa. El número solicitado de lecturas por muestra fue de 200,000 lecturas. El número en el eje x representa el análisis de muestras de 16 pacientes diferentes. Las columnas, de izquierda a derecha, para cada muestra representan el número de lecturas de: el tumor; el estroma (tejido que rodea

el tumor); TIL (linfocito infiltrante de tumores) específico de epítipo teñido con tetrámero y clasificado por FACS a partir de la muestra de tumor (TET); y TIL separado por tetrámero de una parte del tumor que se ha injertado en ratones (mTET).

- 5 Figura 12 ilustra la amplificación de genes TCR de células T que forman parte de una mezcla de PBMC (panel superior) o de células T positivas para CD4 aisladas (panel inferior), utilizando las etapas 2 a 4 del método SEQTR.

Descripción detallada

A la luz de las deficiencias de las técnicas existentes para secuenciar TCR, se determinó que una tecnología de secuenciación de TCR que proporcione los datos del repertorio de TCR más confiables incluye las siguientes características:

- 10 1) La amplificación de genes TCR es lineal y no emplea PCR multiplex, evitando así la sobrerrepresentación artificial de determinadas secuencias de TCR.
- 2) El método se basa en ARN y no en ADN, por lo que solo proporciona datos de secuencias de TCR que han sufrido una reordenación y que realmente se expresan en células T.
- 15 3) Los genes TCR se secuencian desde el extremo 5', lo que proporciona datos de secuenciación de alta calidad y, por lo tanto, maximiza la identificación fiable e inequívoca de los segmentos V altamente homólogos.
- 4) Los datos de secuenciación incluyen la región CDR3 altamente variable, lo que facilita la identificación inequívoca de secuencias de TCR.

Los métodos, sistemas y kits divulgados cumplen todos estos criterios. Estas mismas características son útiles para secuenciar receptores de otras células inmunitarias, como las células B.

- 20 Los métodos de secuenciación de receptores de células inmunitarias pueden comprender las siguientes etapas:

- (1) Proporcionar ARN total (ARN) como material de partida;
- (2) Transcribir el ARN en ARN complementario (ARNc) seguido de transcripción inversa del ARNc en ADNc, utilizando cebadores que introducen un adaptador común en el extremo 5' de los productos de ADNc;
- (3) Amplificar los productos de ADNc usando un único par de cebadores;
- 25 (4) Amplificar los productos de PCR de la etapa 4 usando un único par de cebadores, en el que:
- i. los cebadores introducen adaptadores para la secuenciación de próxima generación, y
- ii. el primer cebador se une a la región adaptadora común en el extremo 5' de los productos de la PCR, y
- iii. el segundo cebador se une a una región de los productos de la PCR que constituye la región constante del TCR a secuenciar; y

- 30 (5) Secuenciar los productos de PCR generados en la etapa 4.

Información genética a secuenciar.

- La información genética que se va a secuenciar son los genes de los receptores de células inmunitarias. En algunas realizaciones de la invención, la información genética que se va a secuenciar comprende genes de receptores de células T. En algunas realizaciones, los genes de TCR que se secuencian codifican cadenas α de TCR o cadenas β de TCR. En otras realizaciones, los genes de TCR que se secuencian codifican cadenas δ de TCR o cadenas γ de TCR.
- 35

En otras realizaciones de la invención, la información genética que se va a secuenciar comprende genes del receptor de células B (BCR).

Material de partida (etapa 1)

- 40 El ARN se aísla de las células inmunitarias y se utiliza para generar ARN complementario (ARNc) mediante transcripción in vitro. Esto contrasta con las técnicas de secuenciación de TCR existentes que utilizan ADN o ADN complementario (ADNc) como material genético de partida.

- En algunas realizaciones, las células inmunitarias de las que se obtiene el ARN se aíslan de células mononucleares de sangre periférica antes de la extracción del ARN. Las células inmunitarias son, en algunas realizaciones, células T o células B.
- 45

En algunas realizaciones, las células T de las que se obtiene el ARN expresan CD4 o CD8.

Generación de ARNc mediante transcripción (etapa (2)(a))

El ARN complementario (ARNc) se genera mediante transcripción in vitro. Cualquier método para realizar la transcripción in vitro conocida por aquellos expertos en biología molecular se puede utilizar. En algunas realizaciones, la transcripción in vitro en la etapa 2 se realiza utilizando kits disponibles comercialmente, tales como los kits AMBION™ disponibles en Thermo Fisher Scientific.

Transcripción inversa (etapa (2)(a))

La transcripción inversa del ARNc se realiza para generar ADN complementario (ADNc). Se utilizan métodos conocidos por los expertos en biología molecular para la transcripción inversa de ARNc en ADNc. Normalmente, tales métodos incluyen la hibridación de un cebador con el extremo 3' de la molécula de ARNc y la producción de ADN comenzando en el cebador hibridado usando una enzima transcriptasa inversa y nucleótidos, sales y tampones apropiados.

La elección de los cebadores utilizados en la reacción de transcripción inversa es importante para la capacidad de diferenciar entre secuencias de receptores de células inmunitarias homólogas, aunque distintas, con un alto grado de certeza y permite el acortamiento de los segmentos V desde el extremo 5', generando productos de PCR con un tamaño de 250-300 pb. Este rango de tamaños de productos de PCR es óptimo para la secuenciación de próxima generación.

En algunas realizaciones, los cebadores utilizados para la transcripción inversa están diseñados para unirse dentro de los segmentos V de los genes TCR (ver Figura 3). Por ejemplo, los cebadores de transcripción inversa están diseñados para unirse lo suficientemente cerca de la unión V(D)J para que los datos de secuenciación resultantes cubran la CDR3 del segmento V y el segmento J, pero lo suficientemente lejos de la unión V(D)J para permitir la diferenciación entre diferentes regiones V.

En algunas realizaciones de la invención, se utiliza un conjunto de cebadores preferidos (véanse, por ejemplo, las secuencias en la Tabla 2 y la Tabla 4, y la Tabla 8 y la Tabla 9). Debido al alto grado de homología entre diferentes segmentos V, algunos de los cebadores descritos en la Tabla 2 y la Tabla 4 (y la Tabla 8 y la Tabla 9) se unen a más de un segmento V (ver en la Tabla 3 y la Tabla 5; los sitios de unión en sus respectivos segmentos V para los cebadores SEQ ID NO: 1-100 y SEQ ID NO: 261-360 se indican en la Tabla 15 y Tabla 16). Sin embargo, el diseño de los cebadores presentados en la Tabla 2 y la Tabla 4 (asimismo la Tabla 8 y la Tabla 9) todavía permite la asignación/identificación inequívoca de los respectivos segmentos V en función de las diferencias entre los segmentos V aguas abajo del sitio de unión del cebador. En una realización alternativa de la invención, sólo un subconjunto de los cebadores preferidos SEQ ID NO: 1-100 y SEQ ID NO: 261-360 se puede utilizar para la transcripción inversa.

En otra realización más de la invención, se pueden usar conjuntos de cebadores que se unen a diferentes regiones en los segmentos V en comparación con los cebadores que tienen SEQ ID NO: 1-100 y SEQ ID NO: 261-360. Por ejemplo, el sitio de unión de uno o más cebadores puede moverse hacia la región CDR3 del gen TCR. Debido al alto grado de homología entre los segmentos V, cuanto más se mueva el sitio de unión del cebador en dirección a la región CDR3 del gen TCR, mayor será la probabilidad de que los datos de secuenciación resultantes sean consistentes con la presencia de más de un segmento V. Si bien, en estos casos, los respectivos segmentos V no pueden asignarse o identificarse de manera inequívoca, el número de segmentos V/J posiblemente presentes en la muestra a menudo puede reducirse a un pequeño subconjunto. Dependiendo de la aplicación, esta información limitada ya puede resultar valiosa para el experimentador.

En otra realización de la invención, el sitio de unión de uno o más cebadores se puede mover hacia el extremo 5' del segmento V en comparación con los sitios de unión de los cebadores SEQ ID NO: 1-100 y SEQ ID NO: 261-360. Muchas tecnologías de secuenciación de próxima generación generan lecturas de secuenciación de 150 pb de longitud. Por lo tanto, cuanto más se mueva el sitio de unión del cebador hacia el extremo 5' del segmento V, mayor será la probabilidad de que el segmento J respectivo (que se puede encontrar en el extremo 3' de la lectura de secuenciación resultante) no pueda identificarse sin ambigüedades. Sin embargo, este problema se puede evitar mediante el uso de tecnologías de secuenciación alternativas que generen lecturas > 150 pb.

En algunas realizaciones, los cebadores utilizados en la etapa (2) contienen adicionalmente un código de barras único. Dicho código de barras de cada molécula de ARN antes de la amplificación se puede utilizar para corregir los resultados de secuenciación obtenidos para la PCR y los errores de secuenciación.

En algunas realizaciones, los cebadores para esta etapa de transcripción inversa introducen un adaptador T7 común en el extremo 5' de los productos de PCR resultantes. Sin embargo, son posibles secuencias de adaptadores alternativas, incluidas, pero no limitadas a, adaptadores Illumina® y secuencias presentadas en la Tabla 1.

Tabla 1 Ejemplos de adaptadores de nucleótidos alternativos que se pueden utilizar en lugar de una secuencia adaptadora T7

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')
-----------	--------------------	---------------------------------

251	Eberwine T7 original	AAACGACGGCCAGTGATTGTAATACGACTCACTATAGGCGCT
252	Affymetrix T7	GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGT
253	Invitrogen T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGT
254	Ambión T7	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGAGT
255	Agilent T7	AATTAATACGACTCACTATAGGGAGAT

Transcripción inversa (etapa (2)(b))

5 La transcripción inversa del ARN se realiza para generar ADN complementario (ADNc). Para la transcripción inversa de ARN a ADNc se utilizan métodos conocidos por los expertos en biología molecular. Normalmente, tales métodos incluyen la hibridación de un cebador con el extremo 3' de la molécula de ARN y la producción de ADN comenzando en el cebador hibridado usando una enzima transcriptasa inversa y nucleótidos, sales y tampones apropiados.

Transcribir el ADNc en ADNc de segunda cadena (etapa (2)(b))

10 Después de la generación del ADNc, se sintetiza el ADNc de la segunda cadena usando métodos conocidos por los expertos en biología molecular. Normalmente, tales métodos incluyen la hibridación de un cebador con el extremo 3' de la molécula de ADNc y la producción de ADNc de segunda cadena comenzando en el cebador hibridado usando una enzima polimerasa y nucleótidos, sales y tampones apropiados.

15 La elección de los cebadores utilizados en la reacción de síntesis de la segunda cadena en la etapa (2)(b) es como se describió anteriormente para la transcripción inversa en la etapa (2)(a). La elección de los cebadores es importante para la capacidad de diferenciar entre secuencias de receptores de células inmunitarias homólogas, pero distintas, con un alto grado de certeza y permite el acortamiento de los segmentos V desde el extremo 5', generando productos de PCR con un tamaño de 250-300 pb. Este rango de tamaños de productos de PCR es óptimo para la secuenciación de próxima generación.

Amplificación (etapa 3)

20 La amplificación del ADNc se realiza mediante cualquiera de las reacciones de amplificación conocidas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizan métodos conocidos por los expertos en la técnica de la biología molecular para amplificar el ADNc o una porción del mismo (por ejemplo, como se representa en la Figura 3). Normalmente, tales métodos incluyen la hibridación de un par de cebadores con la molécula de ADNc y la amplificación de la secuencia de ADN entre los cebadores hibridados usando una enzima polimerasa y nucleótidos, sales y tampones apropiados.

25 En algunas realizaciones, el primer cebador de un par de cebadores usado en una etapa de amplificación se une a la región adaptadora común de los productos de ADNc producidos en la etapa 3 y el segundo cebador del par de cebadores se une a una región de los productos de ADNc que constituye la región constante del TCR que se va a secuenciar (ver Figura 3).

30 Es de destacar que no todos los cebadores inversos diseñados para apuntar a la región constante del gen TCR funcionan igual de bien en esta reacción. Por ejemplo, los cebadores enumerados en la Tabla 7 ninguno logró proporcionar una buena amplificación con el adaptador T7 de 5' seleccionado. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los cebadores listados en la Tabla 6 se utilizan en esta etapa de amplificación.

Amplificación (etapa 4)

35 Se realiza una segunda etapa de amplificación para agregar secuencias adicionales a las moléculas amplificadas, tales como secuencias que son útiles en reacciones de secuenciación de ADN posteriores. En algunas realizaciones de la presente invención, los cebadores utilizados en esta etapa añaden adaptadores apropiados para la secuenciación de Illumina®.

Secuenciación (etapa 5)

40 Se utilizan diversos métodos de secuenciación adecuados descritos en el presente documento o conocidos en la técnica para obtener información de secuencia a partir de las secuencias amplificadas de las moléculas de ácido nucleico dentro de una muestra. Por ejemplo, las metodologías de secuenciación que se pueden usar en los métodos divulgados en el presente documento incluyen: secuenciación de Sanger clásica, secuenciación masiva paralela, secuenciación de próxima generación, secuenciación polony, pirosecuenciación 454, secuenciación Illumina®, secuenciación Solexa® secuenciación SOLiD™, secuenciación de semiconductores de iones, secuenciación de nanobolas de ADN, secuenciación de molécula única en heliscopio, secuenciación en tiempo real de molécula única, secuenciación de ADN de nanoporos, Secuenciación de ADN de corrientes de túnel, secuenciación por hibridación,

secuenciación con espectrometría de masas, secuenciación de Sanger con microfluidos, secuenciación basada en microscopía, secuenciación de ARN polimerasa, secuenciación in vitro de virus de alto rendimiento, secuenciación de Maxam-Gilbert, secuenciación de un solo extremo, secuenciación de extremos emparejados, secuenciación profunda y/o secuenciación ultraprofunda.

5 Definiciones

Como se describe en el presente documento, se proporcionan un número de rangos de valores. Se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese rango también se divulga específicamente. Cada rango más pequeño entre cualquier valor declarado o valor intermedio en un rango establecido y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese rango establecido está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el rango, y cada rango en el que uno, ninguno o ambos límites están incluidos en los rangos más pequeños también está abarcado dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, también se incluyen en la invención rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos.

Como se usa en el presente documento, un "cebador" es una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una cadena de polinucleótido complementaria (incluyendo parcialmente complementaria). Los cebadores pueden ser moléculas de ADN, moléculas de ARN o análogos de ADN o ARN. Los análogos de ADN o ARN se pueden sintetizar a partir de análogos de nucleótidos.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Protocolo ejemplar para el método SEQTR utilizando adaptadores T7 y TrueSeq

Los genes de las cadenas α y β de TCR se secuenciaron en dos reacciones independientes.

1) Material de partida y extracción de ARN

Para obtener cantidades suficientes de ARN en la extracción, se utilizaron como material de partida un mínimo de 500.000 células T. Alternativamente, y especialmente en los casos en los que había menos células T disponibles, las células T se mezclaron con 50.000 células 3T3 de ratón que sirvieron como portador. El ARN de células T se extrajo utilizando RNeasy® Micro Kit de Qiagen Inc. de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la siguiente modificación: La elución se realizó con 20 μ l de agua precalentada a 50 °C. La calidad y cantidad de ARN se verificaron utilizando un analizador de fragmentos.

2) síntesis de ARNc por transcripción in vitro (IVT):

La transcripción in vitro del ARN aislado se realizó utilizando el Kit de amplificación de ARN MessageAmp™ II de Ambion® (Thermo Fisher Scientific), que contiene enzimas, tampones y nucleótidos necesarios para realizar la primera y segunda cadena de ADNc y la transcripción in vitro. El kit también proporciona todas las columnas y reactivos necesarios para las purificaciones de ADNc y ARNc. La amplificación del ARN se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

1) Entre 0.5 y 1 μ g de ARN total como se utilizó como material de partida. 2) La IVT se realizó en un volumen final de 40 μ l y se incubó a 37 °C durante 16 h. El ARNc purificado se cuantificó mediante absorbancia utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

3) síntesis de ADNc por transcripción inversa:

La transcripción inversa del ARNc se realizó con el SuperScript® III de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). El kit proporciona la enzima, el tampón y el ditiotretitol (DTT) necesarios para la reacción. Desoxinucleótidos (dNTP) y los inhibidores de ribonucleasa RNAsin® se adquirieron de Promega. Las secuencias de los cebadores utilizados para la transcripción inversa se pueden encontrar en Tabla 2 (cebadores para secuenciar genes de la cadena α de TCR) y Tabla 4 (cebadores para secuenciar genes de la cadena β de TCR).

Como material de partida para la transcripción inversa se utilizaron 500 ng de ARNc. El ARNc se mezcló con 1 μ l de mezcla de cebadores hTRAV o hTRBV (2 μ M cada uno) y 1 μ l de dNTP (25 mM) en un volumen final de 13 μ l. La mezcla se incubó primero a 70 °C durante 10 min y luego a 50 °C durante 30 s. 4 μ l de tampón 5x, 1 μ l de DTT (100 mM), 1 μ l de SuperScript III y 1 μ l de RNAsin® fueron agregados a la mezcla. Posteriormente, las muestras se incubaron a 55 °C durante 1 h y luego a 85 °C durante 5 min. Después de la síntesis de ADNc, se añadió 1 μ g de RNasa libre de DNasa (Roche) al ADNc y se incubó a 37 °C durante 30 minutos para eliminar el ARNc.

4) Amplificación del gen TCR:

La amplificación del gen TCR se realizó utilizando un ADN polimerasa Phusion® de alta fidelidad (New England Biolabs) en las siguientes condiciones:

Mezcla de PCR: 1 µl de ADNc de la etapa 3, 1 µl de dNTP (25 mM), 1 µl de mezcla de cebadores (10 µM cada uno, ver Tabla 5), 5 µl de tampón 5x y 0.2 µl de enzima Phusion® en un volumen total de 25 µl.

Condiciones de la PCR:

- 94 °C durante 5 min

5 - 20 a 30 ciclos de

- 98 °C durante 10 s
- 55 °C durante 30 s
- 72 °C durante 30 s

- 72 °C durante 2 min

10 Los productos de la PCR se purificaron a partir de geles de agarosa (usando un kit de extracción de gel Qiaquick de Qiagen) o usando un Kit de limpieza de productos de ExoSAP-IT® PCR (Affymetrix) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5) Adición de adaptadores de secuenciación de próxima generación:

15 Los adaptadores de secuenciación iluminar® se agregaron mediante PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs). Un tercio del producto de PCR purificado obtenido en la etapa 4 se mezcló con 0.5 µl de dNTP (25 mM), 1 µl de mezcla de cebadores (10 µM cada uno, ver Tabla 8), 5 µl de tampón 5x y 0.2 µl de enzima Phusion® en un volumen total de 25 µl.

Condiciones de la PCR:

- 94 °C durante 5 min

20 - realizar 12 ciclos de:

- 98 °C durante 10 s
- 55 °C durante 30 s
- 72 °C durante 30 s

- 72 °C durante 2 min

25 6) Purificación de la biblioteca TCR:

Se purificaron 10 µl del producto de PCR de la etapa 5 utilizando un Kit de limpieza de productos ExoSAP-ET® de PCR (Affymetrix) o perlas Ampure XP (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, las muestras podrían usarse directamente para la secuenciación de Illumina®.

30 Tabla 2 Secuencias de cebadores preferidas para la amplificación de segmentos V de la cadena α de TCR. N puede ser cualquier nucleótido. Las secuencias de los cebadores presentadas en esta tabla consisten de tres partes (enumeradas de 5' a 3'): Adaptador T7, código de barras y segmento V de cadena α TCR.

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia de la porción adaptadora T7 del cebador	Secuencia de la porción del código de barras del cebador	Secuencia del segmento V de la cadena α del TCR del cebador
1	hTRAV1-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CTTCTACAGGAGCTCCAGATGAAAG
2	hTRAV1-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CTTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAG
3	hTRAV2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TGCTCATCCTCCAGGTGGCGGGA
4	hTRAV3	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	GAGAACCATCTGCCCTTGTGA
5	hTRAV4	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CCTGCCCCGGGTTTCCCTGAGCGAC
6	hTRAV5	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCTCTGCGCATTGCAGACACCCA
7	hTRAV6	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TTTGTTTCATATCACAGCCTCCCA
8	hTRAV7	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	GCTTGTACATTACAGCCGTGCA

ES 2 977 787 T3

9	hTRAV8-1/8-3	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	ATCTGAGGAAACCCCTCTGTGCA
10	hTRAV8-2/8-4	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	ACCTGACGAAACCCCTCAGCCCAT
11	hTRAV8-5	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CCTATGCCTGTCTTTAACTTTAATC
12	hTRAV8-6	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CTTGAGAAACCCCTCAGTCCATAT
13	hTRAV8-7	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	GAAACCATCAACCCATGTGAGGTGA
14	hTRAV9-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNNNNN	ACTTTGGAGAAAGACTCAGTTCAA
15	hTRAV9-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNNNNN	ACTTGGAGAAAGGCTCAGTTCAA
16	hTRAV10	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CTGCACATCACAGCCTCCCA
17	hTRAV11	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNNNNN	GTTTGGAATATCGCAGCCTCTCAT
18	hTRAV12-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CCCTGCTCATCAGAGACTCCAAG
19	hTRAV12-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CTCTGCTCATCAGAGACTCCCAG
20	hTRAV12-3	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CCTTGTTTCATCAGAGACTCACAG
21	hTRAV13-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCCCTGCACATCACAGAGACCCAA
22	hTRAV13-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCCTGCAAATTGCAGCTACTCAA
23	hTRAV14	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TTTGTCATCTCCGCTTCACAACTGG
24	hTRAV15	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	GTTTTGAATATGCTGGTCTCTCAT
25	hTRAV16	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNNNNN	CCTGAAAGAAACCATTTGCTCAAGA
26	hTRAV17	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCCTTGTTGATCACGGCTTCCCGG
27	hTRAV18	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	ACCTGGAGAAGCCCTCGGTGCA
28	hTRAV19	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNNNNN	CACCATCACAGCCTCACAAGTCGT
29	hTRAV20	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TTTCTGCACATCACAGCCCCTA
30	hTRAV21	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CTTTATACATTGCAGCTTCTCAGCC
31	hTRAV22	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	GTACATTTCTCTTCCCAGACCAC
32	hTRAV23	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CATTGCATATCATGGATTCCCAGC
33	hTRAV24	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	GCTATTTGTACATCAAAGGATCCC
34	hTRAV25	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CAGCTCCCTGCACATCACAGCCA
35	hTRAV26-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TTGATCCTGCCCCACGCTACGCTGA
36	hTRAV26-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TTGATCCTGCACCGTGCTACCTTGA
37	hTRAV27	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	GTTCTCTCCACATCACTGCAGCC
38	hTRAV28	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	GCCACCTATACATCAGATTCCCA

ES 2 977 787 T3

39	hTRAV29	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCTCTGCACATTGTGCCCTCCCA
40	hTRAV30	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CCCTGTACCTTACGGCTCCCAGCT
41	hTRAV31	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNNNNN	CTTATCATATCATCATCACAGCCA
42	hTRAV32	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCCCTGCATATTACAGCCACCCAA
43	hTRAV33	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	ACCTCACCATCAATTCTTAAAC
44	hTRAV34	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCCCTGCATATCACAGCCTCCCAG
45	hTRAV35	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CTTCCTGAATATCTCAGCATCCAT
46	hTRAV36	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCCTGAACATCACAGCCACCCAG
47	hTRAV37	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	TCCCTGCACATACAGGATTCCCAG
48	hTRAV38	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CAAGATCTCAGACTCACAGCTGG
49	hTRAV39	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CCGTCTCAGCACCCCTCCACATCA
50	hTRAV40	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNTNNNN	CCATTGTGAAATATTAGTCCAGG

Tabla 3 Segmentos V objetivo por cada cebador utilizado para la amplificación de los segmentos V de la cadena α de TCR.

SEQ ID NO	Cebador	Segmento(s) V objetivo
1	hTRAV1-1	hTRAV01-1
2	hTRAV1-2	hTRAV01-2
3	hTRAV2	hTRAV02
4	hTRAV3	hTRAV03
5	hTRAV4	hTRAV04
6	hTRAV5	hTRAV05
7	hTRAV6	hTRAV06
8	hTRAV7	hTRAV07
9	hTRAV8-1/8-3	hTRAV08-1, hTRAV08-3
10	hTRAV8-2/8-4	hTRAV08-2, hTRAV08-4
11	hTRAV8-5	hTRAV08-5
12	hTRAV8-6	hTRAV08-6
13	hTRAV8-7	hTRAV08-7
14	hTRAV9-1	hTRAV09-1
15	hTRAV9-2	hTRAV09-2
16	hTRAV10	hTRAV10, hTRAV41
17	hTRAV11	hTRAV11
18	hTRAV12-1	hTRAV12-1
19	hTRAV12-2	hTRAV12-2
20	hTRAV12-3	hTRAV12-3

21	hTRAV13-1	hTRAV13-1
22	hTRAV13-2	hTRAV13-2
23	hTRAV14	hTRAV14
24	hTRAV15	hTRAV15
25	hTRAV16	hTRAV16
26	hTRAV17	hTRAV17
27	hTRAV18	hTRAV18
28	hTRAV19	hTRAV19
29	hTRAV20	hTRAV20
30	hTRAV21	hTRAV21
31	hTRAV22	hTRAV22
32	hTRAV23	hTRAV23
33	hTRAV24	hTRAV24
34	hTRAV25	hTRAV25
35	hTRAV26-1	hTRAV26-1
36	hTRAV26-2	hTRAV26-2
37	hTRAV27	hTRAV27
38	hTRAV28	hTRAV28
39	hTRAV29	hTRAV29
40	hTRAV30	hTRAV30
41	hTRAV31	hTRAV31
42	hTRAV32	hTRAV32
43	hTRAV33	hTRAV33
44	hTRAV34	hTRAV34
45	hTRAV35	hTRAV35
46	hTRAV36	hTRAV36
47	hTRAV37	hTRAV37
48	hTRAV38	hTRAV38-1, hTRAV38-2
49	hTRAV39	hTRAV39
50	hTRAV40	hTRAV40

Tabla 4 Secuencias de cebadores preferidas para la amplificación de segmentos V de la cadena β de TCR. N puede ser cualquier nucleótido. Las secuencias de los cebadores presentadas en esta tabla consisten de tres partes (enumeradas de 5' a 3'): Adaptador T7, código de barras y segmento V de la cadena β de TCR.

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia de la porción adaptadora T7 del cebador	Secuencia de la porción del código	Secuencia de la porción del segmento V de la cadena β del TCR del cebador
-----------	--------------------	---	------------------------------------	---

ES 2 977 787 T3

			de barras del cebadador	
51	hTRBV1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GTGGTCGCACTGCAGCAAGAAGA
52	hTRBV2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GATCCGGTCCACAAAGCTGGAGGA
53	hTRBV3-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CATCAATTCCCTGGAGCTTGGTGA
54	hTRBV4-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TTCACCTACACGCCCTGCAGCCAG
55	hTRBV4-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TTCACCTACACAACCCTGCAGCCAG
56	hTRBV5-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAATGTGAGCACCTTGGAGCTGG
57	hTRBV5-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TACTGAGTCAAACACGGAGCTAGG
58	hTRBV5-3	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GCCTTGAGATGAATGTGAGTGCCT
59	hTRBV5-4	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CTGAGCTGAATGTGAACGCCTT
60	hTRBV6-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAGTTCTCGCTCAGGCTGGAGT
61	hTRBV6-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CTGGGGTTGGAGTCGGCTGCTC
62	hTRBV6-4	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CCCCTCACGTTGGCGTCTGCTG
63	hTRBV6-5	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TCCCGCTCAGGCTGCTGTCTGGC
64	hTRBV6-6	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GATTTCCTCGCTCAGGCTGGAGT
65	hTRBV6-7	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TCCCCCTCAAGCTGGAGTCAGCT
66	hTRBV6-8	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TCCCACTCAGGCTGGTGTCTGGC
67	hTRBV7-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CTCTGAAGTTCCAGCGCACACA
68	hTRBV7-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GATCCAGCGCACACAGCAGGAG
69	hTRBV7-3	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	ACTCTGAAGATCCAGCGCACAGA
70	hTRBV7-5	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	AGATCCAGCGCACAGAGCAAGG
71	hTRBV7-6	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CAGCGCACAGAGGCAGCGGGACT
72	hTRBV7-9	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAGATCCAGCGCACAGAGCAGG
73	hTRBV8-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CCCTCAACCCTGGAGCTACTA
74	hTRBV8-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TCCCCAATCCTGGCATCCACCA
75	hTRBV9	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CTAAACCTGAGCTCTGGAGCT
76	hTRBV10-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CCCTCACTCTGGAGCTGCTGC
77	hTRBV10-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CCCTCACTCTGGAGTCAGCTAC
78	hTRBV10-3	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TCCTCACTCTGGAGTCCGCTAC
79	hTRBV11-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CCACTCTCAAGATCCAGCCTGCA
80	hTRBV12-1	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAGGATCCAGCCCATGGAACCCA

81	hTRBV12-2	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CTGAAGATCCAGCCTGCAGAGC
82	hTRBV12-3	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CAGCCCCTCAGAACCCAGGGACT
83	hTRBV13	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAGCTCCTTGGAGCTGGGGGACT
84	hTRBV14	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GGTGCAGCCTGCAGAACTGGAG
85	hTRBV15	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GACATCCGCTCACCAGGCCTGG
86	hTRBV16	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	TGAGATCCAGGCTACGAAGCTT
87	hTRBV17	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAAGATCCATCCCGCAGAGCCG
88	hTRBV18	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GGATCCAGCAGGGTAGTGCGAGG
89	hTRBV19	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CACTGTGACATCGGCCCAAG
90	hTRBV20	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CTGACAGTGACCAGTGCCCATC
91	hTRBV21	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAGATCCAGTCCACGGAGTCAG
92	hTRBV22	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GTGAAGTTGGCCACACCAGCCA
93	hTRBV23	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	CCTGGCAATCCTGTCTCAGAA
94	hTRBV24	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAGTCTGCCATCCCCAACCAGA
95	hTRBV25	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GGAGTCTGCCAGGCCCTCACA
96	hTRBV26	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAAGTCTGCCAGCACCAACCAG
97	hTRBV27	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GGAGTCGCCAGCCCCAACCAG
98	hTRBV28	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GGAGTCCGCCAGCACCAACCAG
99	hTRBV29	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GTGAGCAACATGAGCCCTGAAGA
100	hTRBV30	TGTAATACGACTCACTATAG	NNNNANNNN	GAGTTCTAAAGAAGCTCCTTCTCA

Tabla 5 Segmentos V objetivo por cada cebador utilizado para la amplificación de segmentos V de la cadena β de TCR.

SEQ ID NO	Nombre del segmento V de la cadena β del TCR	Segmento(s) V objetivo
51	hTRBV1	hTRBV01
52	hTRBV2	hTRBV02
53	hTRBV3-1	hTRBV03-1, hTRBV03-2
54	hTRBV4-1	hTRBV04-1
55	hTRBV4-2	hTRBV04-2, hTRBV04-3
56	hTRBV5-1	hTRBV05-1
57	hTRBV5-2	hTRBV05-2
58	hTRBV5-3	hTRBV05-3
59	hTRBV5-4	hTRBV05-4, hTRBV05-5, hTRBV05-6, hTRBV05-7, hTRBV05-8

ES 2 977 787 T3

60	hTRBV6-1	hTRB V06-1
61	hTRBV6-2	hTRBV06-2, hTRBV06-3
62	hTRBV6-4	hTRBV06-4
63	hTRBV6-5	hTRBV06-5
64	hTRBV6-6	hTRBV06-6, hTRBV06-9
65	hTRBV6-7	hTRBV06-7
66	hTRBV6-8	hTRBV06-8
67	hTRBV7-1	hTRB V07-1
68	hTRBV7-2	hTRBV07-2, hTRBV07-8
69	hTRBV7-3	hTRBV07-3, hTRBV07-4
70	hTRBV7-5	hTRBV07-5
71	hTRBV7-6	hTRBV07-6, hTRBV07-7
72	hTRBV7-9	hTRBV07-9
73	hTRBV8-1	hTRB V08-1
74	hTRBV8-2	hTRBV08-2
75	hTRBV9	hTRBV09
76	hTRBV10-1	hTRBV10-1
77	hTRBV10-2	hTRBV10-2
78	hTRBV10-3	hTRBV10-3
79	hTRBV11-1	hTRBV11-1, hTRBV11-2, hTRBV11-3
80	hTRBV12-1	hTRBV12-1
81	hTRBV12-2	hTRBV12-2
82	hTRBV12-3	hTRBV12-3, hTRBV12-4, hTRBV12-5
83	hTRBV13	hTRBV13
84	hTRBV14	hTRBV14
85	hTRBV15	hTRBV15
86	hTRBV16	hTRBV16
87	hTRBV17	hTRBV17
88	hTRBV18	hTRBV18
89	hTRBV19	hTRBV19
90	hTRBV20	hTRBV20
91	hTRBV21	hTRBV21
92	hTRBV22	hTRBV22
93	hTRBV23	hTRBV23
94	hTRBV24	hTRBV24

95	hTRBV25	hTRBV25
96	hTRBV26	hTRBV26
97	hTRBV27	hTRBV27
98	hTRBV28	hTRBV28
99	hTRBV29	hTRBV29
100	hTRBV30	hTRBV30

Tabla 6 Cebadores para la amplificación del gen TCR. Par de cebadores para la secuenciación de genes α de TCR: SEQ ID NO 101 y 102. Par de cebadores para la secuenciación de genes β de TCR: SEQ ID NO 101 y 103.

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia de cebadores	cadena de TCR
101	Cebador delantero T7 TRAV/TRBV	TGTAATACGACTCACTATAG	α y β
102	Cebador inverso PCR 1 TRAV	GGCCACAGCACTGTTGCTCTTGAAG	α
103	Cebador inverso PCR 1 TRABV	CCACTGTGCACCTCCTTCCCATTC	β

5 Tabla 7 Cebadores inversos para la amplificación del gen TCR que no dieron como resultado una amplificación exitosa de los productos de PCR.

SEQ ID NO	Secuencia de cebadores	cadena de TCR
104	TCGACCAGCTTGACATCACAGG	α
105	CAGATTTGTTGCTCCAGGCCACAG	α
106	TCTGTGATATACACATCAGAATC	α
107	GAATCAAAATCGGTGAATAGGCAG	α
108	GGCAGACAGACTTGTCCTGCTGATT	α
109	TAGGACACCGAGGTAAAGCCAC	β
110	CTGGGGTGACGGGTTTGGCCCTAT	β
111	TTGACAGCGGAAGTGTTGC	β
112	GGCTGCTCAGGCAGTATCTGGAGTC	β
113	GCCAGGCACACCAAGTGTGGCCTTTT	β

10 Tabla 8 Cebadores para la adición de adaptadores de secuenciación de próxima generación. La porción de cebador correspondiente a los adaptadores Illumina® (directo e inverso) están subrayados en los cebadores directos e inversos que se muestran a continuación. Par de cebadores para la secuenciación de genes TCR α : SEQ ID NOS: 114 y 115. Par de cebadores para la secuenciación de genes β de TCR: SEQ ID NOS: 114 y 116.

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia de cebadores	Cadena de TCR
114	Cebador directo Illumina_T7 TRAV/TRBV	<u>AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</u> TGTAATACGACTCACTATAG	α y β
115	Cebador inverso PCR 2 TRAC	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTAAGTGAAGTCAGAGTCAGACGATCTTCCGATCT</u> TGTAATACGACTCACTATAG	α

116	Cebador inverso PCR 2 TRBC	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTCAGAC</u> <u>GTGTGCTCTTCCGATCAAAACACAGCGACCTCGGGTGGGAAC</u>	β
-----	-------------------------------	---	---------

Ejemplo 2: Protocolo ejemplar para el método SEQTR usando adaptadores Nextera

Los genes de las cadenas α y β de TCR se secuenciaron en dos reacciones independientes.

1) Material de partida y extracción de ARN

- 5 Para obtener cantidades suficientes de ARN en la extracción, se utilizaron como material de partida un mínimo de 500.000 células T. Alternativamente, y especialmente en los casos en los que había menos células T disponibles, las células T se mezclaron con 50.000 células 3T3 de ratón que sirvieron como portador. El ARN de células T se extrajo utilizando RNeasy® Micro Kit de Qiagen Inc. de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la siguiente modificación: La elución se realizó con 20 μ l de agua precalentada a 50 °C. La calidad y cantidad de ARN se verificó utilizando un analizador de fragmentos.

2) Síntesis de ARNc por transcripción in vitro (IVT):

- 15 La transcripción in vitro del ARN aislado se realizó utilizando el kit de amplificación de ARN MessageAmp™ II de Ambion® (Thermo Fisher Scientific), que contiene enzimas, tampones y nucleótidos necesarios para realizar la primera y segunda cadena de ADNc y la transcripción in vitro. El kit también proporciona todas las columnas y reactivos necesarios para las purificaciones de ADNc y ARNc. La amplificación del ARN se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

1) Entre 0.5 y 1 μ g de ARN total como se utilizó como material de partida. 2) La IVT se realizó en un volumen final de 40 μ l y se incubó a 37 °C durante 16 h.

- 20 El ARNc purificado se cuantificó mediante absorbancia utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

3) Síntesis de ADNc por transcripción inversa:

- 25 La transcripción inversa del ARNc se realizó con el SuperScript® III de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). El kit proporciona la enzima, el tampón y el ditiotritol (DTT) necesarios para la reacción. Los desoxinucleótidos (dNTP) y los inhibidores de ribonucleasa RNAsin® se adquirieron de Promega. Las secuencias de los cebadores utilizados para la transcripción inversa se pueden encontrar en la Tabla 9 (cebadores para secuenciar genes de la cadena α de TCR) y Tabla 10 (cebadores para secuenciar genes de la cadena β de TCR).

- 30 Como material de partida para la transcripción inversa se utilizaron 500 ng de ARNc. El ARNc se mezcló con 1 μ l de mezcla de cebadores hTRAV o hTRBV (2 μ M cada uno) y 1 μ l de dNTP (25 mM) en un volumen final de 13 μ l. La mezcla se incubó primero a 70 °C durante 10 min y luego a 50 °C durante 30 s. 4 μ l de tampón 5x, 1 μ l de DTT (100 mM), 1 μ l de SuperScript III y 1 μ l de RNAsin® fueron agregados a la mezcla. Posteriormente, las muestras se incubaron a 55 °C durante 1 h y luego a 85 °C durante 5 min. Después de la síntesis de ADNc, se añadió 1 μ g de ARNasa libre de DNasa (Roche) al ADNc y se incubó a 37 °C durante 30 min para eliminar el ARNc.

4) Amplificación del gen TCR:

- 35 La amplificación del gen TCR se realizó utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) en las siguientes condiciones:

Mezcla de PCR: 1 μ l de ADNc de la etapa 3, 0.4 μ l de dNTP (10 mM), 0.4 μ l de mezcla de cebadores (Nextera5', 20 μ M, cebador inverso PCR 1 TRAV 10 μ M o cebador inverso PCR1 TRBV 2.5 μ M, consulte Tabla 11), 2 μ l de tampón 5x y 0.2 μ l de enzima Phusion® en un volumen total de 10 μ l.

Condiciones de la PCR:

- 40 - 94 °C durante 5 min
- 20 ciclos de
 ○ 98 °C durante 10 s
 ○ 55 °C durante 30 s
 ○ 72 °C durante 30 s
45 - 72 °C durante 2 min

Los productos de PCR se purificaron utilizando 1 μ l del Kit de limpieza de productos ExoSAP-IT® de PCR (Affymetrix) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5) Adición de adaptadores de secuenciación de próxima generación:

Los adaptadores de secuenciación de Illumina® se agregaron mediante PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs). Se añadió la siguiente mezcla a los 11 µl de PCR1: 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de mezcla de cebador (1.25 µM cada uno, ver Tabla 12), 3 µl de tampón 5x y 0.2 µl de enzima Phusion® y 9.8 µl de H₂O.

Condiciones de la PCR:

- 94 °C durante 5 min

- realizar 25 ciclos de:

- 98 °C durante 10 s
- 55 °C durante 30 s
- 72 °C durante 30 s

- 72 °C durante 2 min

6) Purificación de la biblioteca TCR:

Se purificaron 10 µl del producto de PCR de la etapa 5 utilizando perlas AMPURE XP (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, las muestras podrían usarse directamente para la secuenciación de Illumina®.

Tabla 9 Secuencias de cebadores preferidas para la amplificación de segmentos V de la cadena α de TCR. N puede ser cualquier nucleótido. Las secuencias de los cebadores presentadas en esta tabla consisten de tres partes (enumeradas de 5' a 3'): Adaptador T7, código de barras y segmento V de cadena α de TCR.

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia de la porción adaptadora de Nextera del cebador	Secuencia de la porción del código de barras del cebador	Secuencia del segmento V de la cadena α del TCR del cebador
261	hTRAV1-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTTCTACAGGAGCTCCAGATGAAAG
262	hTRAV1-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAG
263	hTRAV2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TGCTCATCCTCCAGGTGGCGGGA
264	hTRAV3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAGAACCATCTGCCCTTGTGA
265	hTRAV4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCTGCCCGGGTTTCCCTGAGCGAC
266	hTRAV5	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCTCTGCGCATTGCAGACACCCA
267	hTRAV6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TTTGTTCATATCACAGCCTCCCA
268	hTRAV7	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GCTTGTACATTACAGCCGTGCA
269	hTRAV 8-1/8-3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	ATCTGAGGAAACCCTCTGTGCA
270	hTRAV 8-2/8-4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	ACCTGACGAAACCCTCAGCCCAT
271	hTRAV8-5	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCTATGCCTGTCTTTAACTTTAATC
272	hTRAV8-6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTTGAGAAACCCTCAGTCCATAT
273	hTRAV8-7	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAAACCATCAACCCATGTGAGGTGA

ES 2 977 787 T3

274	hTRAV9-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	ACTTTGGAGAAAGACTCAGTTCAA
275	hTRAV9-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	ACTTGGAGAAAGGCTCAGTTCAA
276	hTRAV10	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTGCACATCACAGCCTCCCA
277	hTRAV11	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GTTTGAATATCGCAGCCTCTCAT
278	hTRAV 12-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCCTGCTCATCAGAGACTCCAAG
279	hTRAV12- 2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTCTGCTCATCAGAGACTCCCAG
280	hTRAV12- 3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCTTGTTTCATCAGAGACTCACAG
281	hTRAV 13-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCCTGCACATCACAGAGACCCAA
282	hTRAV13- 2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCTGCAAATTGCAGCTACTCAA
283	hTRAV14	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TTTGTCTCTCCGCTTCACAACCTGG
284	hTRAV15	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GTTTTGAATATGCTGGTCTCTCAT
285	hTRAV16	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCTGAAAGAAACCATTTGCTCAAGA
286	hTRAV17	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCTTGTTGATCACGGCTTCCCGG
287	hTRAV18	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	ACCTGGAGAAGCCCTCGGTGCA
288	hTRAV19	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CACCATCACAGCCTCACAAGTCGT
289	hTRAV20	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TTTCTGCACATCACAGCCCCTA
290	hTRAV21	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTTTATACATTGCAGCTTCTCAGCC
291	hTRAV22	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GTACATTTCTCTTCCCAGACCAC
292	hTRAV23	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CATTGCATATCATGGATTCCCAGC
293	hTRAV24	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GCTATTTGTACATCAAAGGATCCC
294	hTRAV25	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CAGCTCCCTGCACATCACAGCCA
295	hTRAV26- 1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TTGATCCTGCCCCACGCTACGCTGA
296	hTRAV26- 2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TTGATCCTGCACCGTGCTACCTTGA
297	hTRAV27	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GTTCTCTCCACATCACTGCAGCC
298	hTRAV28	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GCCACCTATACATCAGATTCCCA

299	hTRAV29	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCTCTGCACATTGTGCCCCCTCCCA
300	hTRAV30	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCCTGTACCTTACGGCCTCCCAGCT
301	hTRAV31	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTTATCATATCATCATCACAGCCA
302	hTRAV32	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCCTGCATATTACAGCCACCCAA
303	hTRAV33	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	ACCTCACCATCAATTCCTTAAAC
304	hTRAV34	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCCTGCATATCACAGCCTCCCAG
305	hTRAV35	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTTCCTGAATATCTCAGCATCCAT
306	hTRAV36	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCTGAACATCACAGCCACCCAG
307	hTRAV37	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCCTGCACATACAGGATTCCCAG
308	hTRAV38	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CAAGATCTCAGACTCACAGCTGG
309	hTRAV39	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCGTCTCAGCACCCCTCCACATCA
310	hTRAV40	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCATTGTGAAATATTCAGTCCAGG

Tabla 10 Secuencias de cebadores preferidas para la amplificación de segmentos V de la cadena β de TCR. N puede ser cualquier nucleótido. Las secuencias de los cebadores presentadas en esta tabla consisten de tres partes (enumeradas de 5' a 3'): Adaptador T7, código de barras y segmento V de cadena β de TCR.

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia de la porción adaptadora T7 del cebador	Secuencia de la porción del código de barras del cebador	Secuencia de la porción del segmento V de la cadena β del TCR del cebador
311	hTRBV1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GTGGTCGCACTGCAGCAAGAAGA
312	hTRBV2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GATCCGGTCCACAAAGCTGGAGGA
313	hTRBV3-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CATCAATTCCTGGAGCTTGGTGA
314	hTRBV4-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TTCACCTACACGCCCTGCAGCCAG
315	hTRBV4-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TTCACCTACACAACCCTGCAGCCAG
316	hTRBV5-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAATGTGAGCACCTTGGAGCTGG
317	hTRBV5-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TACTGAGTCAAACACGGAGCTAGG
318	hTRBV5-3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GCCTTGAGATGAATGTGAGTGCCT
319	hTRBV5-4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTGAGCTGAATGTGAACGCCTT

320	hTRBV6-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAGTTCTCGCTCAGGCTGGAGT
321	hTRBV6-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTGGGGTTGGAGTCGGCTGCTC
322	hTRBV6-4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCCCTCACGTTGGCGTCTGCTG
323	hTRBV6-5	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCCGCTCAGGCTGCTGTCGGC
324	hTRBV6-6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GATTTCCCGCTCAGGCTGGAGT
325	hTRBV6-7	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCCCCTCAAGCTGGAGTCAGCT
326	hTRBV6-8	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCCACTCAGGCTGGTGTCCGGC
327	hTRBV7-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTCTGAAGTTCCAGCGCACACA
328	hTRBV7-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GATCCAGCGCACACAGCAGGAG
329	hTRBV7-3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	ACTCTGAAGATCCAGCGCACAGA
330	hTRBV7-5	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	AGATCCAGCGCACAGAGCAAGG
331	hTRBV7-6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CAGCGCACAGAGGCAGCGGGACT
332	hTRBV7-9	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAGATCCAGCGCACAGAGCAGG
333	hTRBV8-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCCTCAACCCTGGAGCTACTA
334	hTRBV8-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCCCAATCCTGGCATCCACCA
335	hTRBV9	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTAAACCTGAGCTCTGGAGCT
336	hTRBV 10-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCCTCACTCTGGAGTCTGCTGC
337	hTRSV10-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCCTCACTCTGGAGTCAGCTAC
338	hTRBV10-3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TCCTCACTCTGGAGTCCGCTAC
339	hTRBV11-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCACTCTCAAGATCCAGCCTGCA
340	hTRBV12-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAGGATCCAGCCCATGGAACCCA
341	hTRBV12-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTGAAGATCCAGCCTGCAGAGC
342	hTRBV12-3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CAGCCCCTCAGAACCCAGGGACT
343	hTRBV13	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAGCTCCTTGGAGCTGGGGGACT

344	hTRBV14	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GGTGCAGCCTGCAGAACTGGAG
345	hTRBV15	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GACATCCGCTCACCAGGCCTGG
346	hTRBV16	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	TGAGATCCAGGCTACGAAGCTT
347	hTRBV17	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAAGATCCATCCCGCAGAGCCG
348	hTRBV18	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GGATCCAGCAGGGTAGTGCGAGG
349	hTRBV19	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CACTGTGACATCGGCCCAAG
350	hTRBV20	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CTGACAGTGACCAGTGCCCATC
351	hTRBV21	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAGATCCAGTCCACGGAGTCAG
352	hTRBV22	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GTGAAGTTGGCCCACACCAGCCA
353	hTRBV23	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	CCTGGCAATCCTGTCTCAGAA
354	hTRBV24	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAGTCTGCCATCCCCAACCAGA
355	hTRBV25	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GGAGTCTGCCAGGCCCTCACA
356	hTRBV26	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAAGTCTGCCAGCACCAACCAG
357	hTRBV27	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GGAGTCGCCAGCCCCAACCAG
358	hTRBV28	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GGAGTCCGCCAGCACCAACCAG
359	hTRBV29	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GTGAGCAACATGAGCCCTGAAGA
360	hTRBV30	TCGTCGGCAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAG	HHHHHNNNN	GAGTTCTAAGAAGCTCCTTCTCA

Tabla 11 Cebadores para la amplificación del gen TCR. Par de cebadores para la secuenciación de genes α de TCR: SEQ ID NO: 256 y 257. Par de cebadores para la secuenciación de genes β de TCR: SEQ ID NO: 256 y 258. La porción del cebador correspondiente a los adaptadores Illumina® (directo e inverso) está subrayada en los cebadores inversos que se muestran a continuación.

5

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia de cebadores	Cadena de TCR
256	Cebador directo Nextera 5'	TCGTCGGCAGCGTC	α y β
257	Cebador inverso PCR 1 TRAV	<u>GTC</u> <u>TCGTCGGCTCGGAGATG</u> <u>GTATAA</u> <u>GAGACAGGAATCAAAATCGGTGAATA</u> GGCAG	α
258	Cebador inverso PCR 1 TRBV	<u>GTC</u> <u>TCGTCGGCTCGGAGATG</u> <u>GTATAA</u> <u>GAGACAGGCCAGGCACACCAAGTGTGG</u> CTTTT	β

Tabla 12 Cebadores utilizados para agregar la secuencia completa de Nextera tanto a TCR α como a TCR β .

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia de cebadores	Cadena de TCR
259	Índice Lectura 1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTC	α y β
260	Índice Lectura 2	AATGATACGCGACCAACGAGATCTACAC [i5] TCGTCCGCAGCG	α

Ejemplo 3: Protocolo ejemplar para el método SEQTR sin transcripción in vitro

Los genes de las cadenas α y β de TCR se secuenciaron en dos reacciones independientes.

1) Material de partida y extracción de ARN

- 5 Para obtener cantidades suficientes de ARN en la extracción, se utilizaron como material de partida un mínimo de 500.000 células T. Alternativamente, y especialmente en los casos en los que había menos células T disponibles, las células T se mezclaron con 50.000 células 3T3 de ratón que sirvieron como portador. El ARN de células T se extrajo utilizando el MicroKit RNeasy® de Qiagen Inc. de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la siguiente modificación: La elución se realizó con 20 μ l de agua precalentada a 50 °C. La calidad y cantidad de ARN se verificó utilizando un analizador de fragmentos.

2) síntesis de ADNc por transcripción inversa:

La transcripción inversa del ARN se realizó con el SuperScript® III de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) y oligo d(T). El kit proporciona la enzima, el tampón y el ditiotreitól (DTT) necesarios para la reacción. Los desoxinucleótidos (dNTP), oligo d(T) y el inhibidor de ribonucleasa RNAsin® se adquirieron de Promega.

- 15 Como material de partida para la transcripción inversa se utilizaron 500 ng de ARN. El ARN se mezcló con 1 μ l de oligo d(T) y 1 μ l de dNTP (25 mM) en un volumen final de 13 μ l. La mezcla se incubó primero a 70 °C durante 10 min y luego a 50 °C durante 30 s. 4 μ l de tampón 5x, 1 μ l de DTT (100 mM), 1 μ l de SuperScript III y 1 μ l de RNAsin® fueron agregados a la mezcla. Posteriormente, las muestras se incubaron a 55 °C durante 1 h y luego a 85 °C durante 5 min.

20 3) Síntesis de ADNc de segunda cadena:

Luego se usó ADNc para sintetizar la segunda cadena, realizada utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) en las siguientes condiciones:

Mezcla: 20 μ l de ADNc de la etapa 2, 4 μ l de dNTP (10 mM), 2 μ l de mezcla de cebador TRAV (Tabla 9), 2 μ l de mezcla de cebadores TRBV (Tabla 10), 20 μ l de tampón 5x, 1 μ l de enzima Phusion® en un volumen total de 100 μ l.

25 Condiciones de síntesis:

- 98 °C durante 5 min
- 40 °C durante 30 s
- 72 °C durante 5 min

4) purificación de ADNc:

- 30 Se purificaron 100 μ l del producto de ADNc de la etapa 3 utilizando perlas AMPURE XP (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5) Amplificación del gen TCR:

La amplificación del gen TCR se realizó utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) en las siguientes condiciones:

- 35 Mezcla de PCR: 7 μ l de ADNc de la etapa 4, 0.4 μ l de dNTP (10 mM), 0.4 μ l de mezcla de cebadores (Nextera5' 20 μ M, cebador inverso PCR 1 TRAV 10 μ M o cebador inverso PCR1 TRBV 2.5 μ M, consulte Tabla 11), 2 μ l de tampón 5x y 0.2 μ l de enzima Phusion® en un volumen total de 10 μ l.

Condiciones de la PCR:

- 94 °C durante 5 min
- 40 - 20 ciclos de

- 98 °C durante 10 s
- 55 °C durante 30 s
- 72 °C durante 30 s

- 72 °C durante 2 min

- 5 Los productos de PCR se purificaron utilizando 1 µl del Kit de limpieza de productos de PCR ExoSAP-IT® (Affymetrix) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6) Adición de adaptadores de secuenciación de próxima generación:

- 10 Los adaptadores de secuenciación Illumina® se agregaron mediante PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs). Se añadió la siguiente mezcla a los 11 µl de PCR1: 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de mezcla de cebador (1.25 µM cada uno, ver Tabla 12), 3 µl de tampón 5x y 0.2 µl de enzima Phusion® y 9.8 µl de H₂O.

Condiciones de la PCR:

- 94 °C durante 5 min

- realizar 25 ciclos de:

- 15
- 98 °C durante 10 s
 - 55 °C durante 30 s
 - 72 °C durante 30 s

- 72 °C durante 2 min

7) Purificación de la biblioteca TCR:

- 20 Se purificaron 10 µl del producto de PCR de la etapa 5 utilizando perlas AMPURE XP (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, las muestras podrían usarse directamente para la secuenciación de Illumina®.

Ejemplo 4: Sensibilidad del método de secuenciación TCR

- 25 Uno de los desafíos de la secuenciación de TCR son las pequeñas cantidades de material genético para cada clon de células T. En muchos casos, la cantidad de células T que se pueden recuperar de un experimento determinado es demasiado pequeña para que los investigadores extraigan directamente cantidades suficientes de ARN para una amplificación posterior de los genes de TCR. En tales casos, las células T de interés se pueden mezclar con células de ratón 3T3, que sirven como portador.

- 30 5×10⁴ células 3T3 se mezclaron con 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ o 0 células T CD8 positivas, respectivamente. El ARN de cada mezcla se aisló y se sometió a las etapas 2 a 4 del método SEQTR descrito anteriormente (ver descripción detallada de la invención). Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa y se visualizaron.

- 35 No se observaron productos de PCR específicos de TCR en muestras que solo contenían células 3T3 (ver Figura 4). Sin embargo, se detectaron bandas específicas de TCR en todas las demás muestras: Cantidades crecientes de células T CD8 positivas en las muestras se correlacionaron con cantidades crecientes de productos de PCR específicos de TCR y una intensidad decreciente de la banda del cebador dímero inespecífico. Estos datos demuestran que el método SEQTR es lo suficientemente sensible como para amplificar genes TCR de tan solo 1000 células T, sin ninguna señal de fondo detectable de las células portadoras 3T3.

Ejemplo 5: Especificidad del método SEQTR

- 40 Otro desafío de la secuenciación de TCR es la falta de amplificación específica de genes de TCR a partir de muestras complejas. Las tecnologías de secuenciación de TCR competidoras, como los servicios ofrecidos por Adaptive Biotechnology, se caracterizan por hasta un 90 % de amplificación inespecífica. Como resultado, sólo un 10 % de todos los datos de secuenciación son informativos para la determinación del repertorio de TCR, lo que aumenta el coste y la duración de cualquier proyecto que tenga como objetivo secuenciar repertorios de TCR.

- 45 5×10⁴ células 3T3 se mezclaron con 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ o 0 células T CD8 positivas, respectivamente. Los repertorios de TCR para las muestras individuales se secuenciaron utilizando el método SEQTR y se determinó el porcentaje de lecturas que correspondían a secuencias TCR o no TCR, respectivamente. Como se muestra en la Figura 5, 93-97 % de todas las lecturas de secuenciación correspondieron a genes TCR, independientemente de la cantidad de células T utilizadas como material de partida. En resumen, estos datos muestran que la amplificación de TCR utilizando el método SEQTR es altamente específica incluso cuando se utilizan tan solo 1000 células T como material de partida.

- 50 Ejemplo 6: Identificación inequívoca de genes TCR

En humanos, el locus TCR comprende 54 segmentos V diferentes para la cadena α de TCR y 65 segmentos V diferentes para la cadena β de TCR. Sin embargo, muchos de estos segmentos en V son altamente homólogos. En consecuencia, uno de los grandes desafíos de la secuenciación de TCR es diferenciar con éxito entre dos o más segmentos del gen TCR con altos grados de homología. Por ejemplo, dependiendo de la elección del cebador utilizado en la amplificación del gen TCR y la longitud del producto de PCR generado, los datos de secuenciación resultantes podrían ser compatibles con más de un segmento V o J (en otras palabras, dos o más segmentos TCR). Los segmentos V o J muestran 100 % de homología en la región secuenciada. En estos casos, el gen TCR para una lectura específica no se puede asignar/identificar de manera inequívoca.

5×10^4 células 3T3 se mezclaron con 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 o 0 células T CD8 positivas, respectivamente. El ARN de cada mezcla fue aislado y sometido al método de secuenciación de TCR. De todas las lecturas de secuenciación identificadas como genes de TCR, se evaluó si los segmentos V o J podían identificarse sin ambigüedades. Los datos muestran que entre el 95 % y el 97 % de todas las lecturas de secuenciación de TCR podrían asignarse a un segmento de TCR específico, incluso cuando se utilizan tan solo 1000 células T como material de partida genético (consulte la Figura 6). En resumen, los datos demuestran la solidez del método SEQTR, ya que del 90 al 93 % de todas las lecturas se pueden utilizar para identificar secuencias de TCR una vez que se han eliminado las secuencias inespecíficas y las secuencias de TCR ambiguas.

Debido a la homología entre los segmentos V, a veces puede resultar difícil identificar claramente la secuencia del TCR. hTRBV6-2 y hTRBV6-3 no se pueden diferenciar ya que tienen un 100 % de homología y, por lo tanto, codificarán el mismo TCR. Debido a sus secuencias, hTRBV12-3 y hTRBV12-4 no se pueden diferenciar con el método divulgado en el presente documento. Sólo la secuenciación de extremos emparejados que capte el extremo 5' del segmento V puede discriminar estas dos secuencias. Así, hTRBV12-3 y hTRBV12-4 se consideraron como una secuencia única para el análisis del repertorio.

Ejemplo 7: Linealidad de la amplificación del gen de TCR

Debido a que la amplificación no lineal de secuencias de TCR individuales puede conducir a una representación excesiva o insuficiente incorrecta de los genes de TCR afectados en el repertorio final de TCR, la linealidad de la amplificación es un determinante crítico de la confiabilidad y calidad de los datos de secuenciación de TCR.

Para probar la linealidad de la amplificación del gen TCR en nuestro sistema, se diluyó una cantidad fija de ADN que codifica una secuencia de TCR conocida en diferentes concentraciones en un conjunto de ADN que representa un repertorio de CD8 no diferenciado. Posteriormente, se analizó el repertorio TCR de cada muestra con SEQTR.

Luego se secuenció la frecuencia observada de la secuencia de TCR conocida en todo el repertorio de TCR para cada dilución y se comparó con la frecuencia esperada. El diagrama de dispersión de la Figura 7 muestra una excelente correlación ($R^2=0.99$) entre la dilución y la frecuencia de la secuencia TCR conocida en el repertorio observado después de la secuenciación. Estos datos confirman la linealidad de la amplificación y sugieren que los resultados obtenidos utilizando la técnica SEQTR son cuantitativos.

Ejemplo 8: Reproducibilidad del método SEQTR

La reproducibilidad del método se probó realizando dos réplicas técnicas independientes a partir de la misma muestra. Las frecuencias para cada reordenamiento V-J en las cadenas β de TCR se determinaron y compararon entre las dos réplicas, como se ilustra en la Figura 8. Cada esfera representa un único reordenamiento V-J que se detectó en ambas réplicas. Cada esfera representa un único reordenamiento de V-J y el tamaño de una esfera indica la frecuencia relativa de la recombinación V-J específica. Las esferas grises representan reordenamientos para los cuales las frecuencias relativas detectadas en las dos réplicas diferían en menos del doble. Las esferas negras representan reordenamientos para los cuales las frecuencias relativas detectadas en las dos réplicas diferían en más del doble. De acuerdo con la práctica común en el análisis de datos de expresión genética, las diferencias entre reemplazos de menos de 2 veces no se consideran significativas.

Los datos muestran que sólo el 13 % de todos los reordenamientos de V-J mostraron una diferencia de frecuencia significativa de más del doble entre las dos réplicas técnicas (consulte el recuadro superior de la Figura 8). Sin embargo, como se ilustra en la Figura 8, las recombinaciones V-J que fueron significativamente diferentes entre las réplicas técnicas se expresaron bastante mal, como lo indican los pequeños tamaños de las esferas negras. Por lo tanto, si se tienen en cuenta las frecuencias del reordenamiento V-J individual, solo el 0.5 % de las secuencias mostraron una diferencia de más del doble entre las réplicas (consulte el recuadro inferior de la Figura 8), lo que demuestra que el método SEQTR es muy reproducible.

Ejemplo 9: Secuenciación de repertorios de ejemplo utilizando el método SEQTR

El método SEQTR se probó en tres tipos diferentes de células T CD8 positivas:

(1) Población de células T 1: Células T CD8 positivas aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

(2) Población de células T 2: Las células T CD8 positivas como en la población 1 se clasificaron mediante FACS utilizando tetrámeros. Los tetrámeros son moléculas del MHC que presentan un péptido específico, unido a un tinte fluorescente. Los tetrámeros se unen a las células T que expresan un TCR que reconoce específicamente el péptido. El tinte fluorescente permite clasificar las células T deseadas mediante FACS.

- 5 (3) Población de células T 3: Células T CD8 positivas como en la población 2 que posteriormente se expandieron in vitro.

Las frecuencias relativas de cada reordenamiento de V-J se determinaron utilizando el método SEQTR (ver Figura 9). Como era de esperar, el repertorio no diferenciado de TCR derivado de PBMC (población 1) es muy diverso (ver Figura 9A). Casi todos los posibles reordenamientos de V-J están representados en la muestra, y ningún reordenamiento de V-J muestra una frecuencia superior al 11 %. El repertorio del subconjunto 2 de células T CD8 positivas ordenadas con tetrámero (consulte la Figura 9B) es menos diverso en comparación con el no diferenciado. No sólo hay menos reordenamientos de V-J presentes en el repertorio en general. Además, dos reordenamientos V-J son claramente dominantes y exhiben frecuencias superiores al 20 %. Estos reordenamientos V-J representan las pocas células T que reconocen el epítipo TEDYMIHII (SEQ ID NO: 236) conjugados con el tetrámero y que se enriquecieron durante la etapa de purificación del tetrámero. Finalmente, la rápida expansión clonal (población 3) de las células T purificadas con tetrámero aumenta el sesgo del repertorio de TCR hacia los clones de células T que ya dominan el subconjunto 2. En consecuencia, parte de los reordenamientos V-J de baja frecuencia se pierden y ya no se detectan (ver Figura 9C). En resumen, estos datos ilustran que el método SEQTR es muy adecuado para diferenciar entre repertorios de TCR con diferentes grados de diversidad.

20 Ejemplo 10: Comparación del método SEQTR con la clonación de células individuales de bajo rendimiento

Para determinar qué tan precisos fueron los datos del repertorio de TCR obtenidos utilizando el método SEQTR en comparación con el verdadero repertorio de TCR presente en una población de células T determinada, comparamos nuestros resultados con los datos obtenidos mediante secuenciación de células individuales.

25 Los CD8 específicos de tetrámero se separaron de PBMC mediante FACS. La población de células recuperadas se dividió en dos. La mitad de las células se sometieron al método SEQTR para secuenciar el repertorio de TCR. Para la otra mitad de las células, se aislaron y expandieron clones de células T individuales in vitro (clonación célula única). Una vez establecidos los clones, los genes TCR de cada clon de células T se amplificaron y secuenciaron utilizando la secuenciación clásica de Sanger (ver Figura 10A).

30 Entre los 42 clones individuales probados usando el método de célula única, se identificaron seis TCR diferentes (ver Figura 10B). Utilizando el método SEQTR, se encontraron 116 genes TCR diferentes (los ocho reordenamientos V-J observados con mayor frecuencia se muestran en la Figura 10C, consulte también la Tabla 13 y la Tabla 14). De hecho, los cinco TCR observados con mayor frecuencia con la técnica de clonación célula única también corresponden a los cinco clones observados con mayor frecuencia al aplicar el método SEQTR. En general, los seis clones de TCR identificados con secuenciación de células individuales están representados entre los ocho TCR con las frecuencias más altas observadas en el método SEQTR. En resumen, estos datos sugieren que el método SEQTR produce una representación real del repertorio TCR real de una población de células T determinada.

Tabla 13 Regiones CDR3 de clones de TCR identificadas mediante el método de secuenciación de células individuales.

SEQ ID NO	Región CDR3
237	CASSRHVGGVPEAFFG
238	CASSIRGSEQYFG
239	CASSDVLSGEAFGG
240	CASQGHKNTEAFFG
241	CASSLGPGGVKTNEKLFFG
242	CASSLGPGGVKTNEKLFFG

40 Tabla 14 Ocho reordenamientos V-J observados con mayor frecuencia de los 116 genes de TCR diferentes identificados mediante el método SEQTR.

SEQ ID NO	Región CDR3
243	CASSDVLSGEAFGG

244	CASQGHKNTEAFFG
245	CASSLGPGGVKTNEKLFFG
246	CASSIRGSEQYFG
247	CASSRHVGGVPEAFFG
248	CASSASKGQPQHFG
249	CASQGHKNTEAFFG
250	CASSLGPGGVKTNEKLFFG

Ejemplo 11: Los servicios de secuenciación de TCR ofrecidos por Adaptive Biotechnology proporcionan datos de secuenciación que pueden reflejar hasta un 90 % de amplificación de TCR inespecífica.

- 5 Se recogieron muestras de tumores de 16 pacientes y las células tumorales se separaron del tejido circundante (estroma). Además, FACS clasificó TIL específicos de epítipo de las muestras de tumores mediante tinción con tetrámero (TET). Finalmente, las células tumorales se injertaron en ratones humanizados. Después de algún tiempo, se recogió el tumor y FACS clasificó los TIL específicos del epítipo.

Se realizó extracción de ADN para cada muestra. El ADN se envió a Adaptive Biotechnology para la secuenciación de TCR (método immunoSEQ®, protocolo de encuesta 200.000-300.000 lecturas por muestra).

- 10 En el 80 % de las muestras, el método immunoSEQ® no logró generar 200.000 lecturas por muestra, lo que sugiere que el método immunoSEQ® no logra generar repertorios de TCR con confiabilidad significativa.

Ejemplo 12: Amplificación de genes de TCR de células T positivas de PBMC y CD4

- 15 Se aisló ARN de 10^6 PBMC o 10^6 Células T CD4 positivas, respectivamente, de tres muestras independientes. Luego, el ARN se sometió a las etapas 2 a 4 del método SEQTR descrito anteriormente (ver Descripción detallada de la invención). Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa y se visualizaron (ver Figura 12). Sólo se observan bandas específicas de TCR, lo que sugiere que el método SEQTR no sólo puede usarse para células T CD8 positivas (ver Ejemplo 7), sino también para células T CD4 positivas e incluso para células T que forman parte de una mezcla compleja de otras PBMC.

- 20 Los ejemplos anteriores y la descripción de las realizaciones deben tomarse como ilustrativos, en lugar de limitantes, de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

- 25 Cuando en el presente documento se hace referencia a un método que comprende dos o más etapas definidas, las etapas definidas se pueden llevar a cabo en cualquier orden o simultáneamente (excepto cuando el contexto excluya esa posibilidad), y el método puede incluir una o más etapas que se llevan a cabo antes de cualquiera de las etapas definidas, entre dos de las etapas definidas o después de todas las etapas definidas (excepto cuando el contexto excluya esa posibilidad).

Tabla 15 Segmentos V de la cadena α de TCR y sitios de unión para cebadores presentados en la Tabla 2 y la Tabla 9. La secuencia para cada segmento V presentado en esta tabla consiste de tres partes (enumeradas de 5' a 3'): Secuencia aguas arriba del sitio de unión del cebador, secuencia del sitio de unión del cebador, secuencia aguas abajo del sitio de unión del cebador.

[illegible]

[illegible]

hTRAV12-3	hTRAV12-3	138	TCCAGTCTCTCTGGTACAGACAATAATCTGGGAAAGCCCGAGTTGATAATATGTTCAATAATATCTCAATGGT GACAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCAGAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTT	CCCAGTGAATCA GCCACCTACCTC TGTGCAATGAGC GCACAG	CCCTGTGCA TCAGAGACT CACAG	CCCTGAAGACTCG GCTGTCTACTCT GTGCAGCAAGTA
hTRAV13-1	hTRAV13-1	139	ATGACATCCATCTGAGCGTATTTATATCTCTGGCTGCGAGCTGGACCTGGTGAATGGAGAGAACTGTGGAGCAG CATCTCTCAACCTTGAGTCTCAGAGAGGAGACAGCGCTGTATACAGTGTATCTATTCAGACAGTGTCTCAAC TACTCTCCCTGGTATTAAGCAAGAAGCTTGAAAGAGGACTCAGCTATTATAGACAATCGTTTCAAAATGTGGGGGAA AAGAAAGCAACGAAATGCTGTATACATTAAGCAAGAGCAGCCAAACATTC	TCCTGTGCAC ATGCAGAG ACCCAA	TCCTGTGCAC ATGCAGAG ACCCAA	ATGCAGAGACTCG GCTGTCTACTCT GTGCAGCAAGTA
hTRAV13-2	hTRAV13-2	140	ATGCGAGCATCTGAGCTTATTTATGTAATCTGTGGCTGCGAGCTGGAGACAGAGGAGAGAGTGTGGG GCCTGATCTTCTACCTGAGTGTCCAGAGGGTGTACAACCTATATACAACCTGTGTATATCAACACAGCCCTC AGACTCTTCATTTGGTACAAAGCAATCTGGAAAGAGGCTCAATTAATATAGACATCTGTTCAAATATGGA CAAAATGCCAAGGCCAAAGAGTCAACCTTTATATGAAATAGAGCAGTGAACATCTC	TCTGTGCA ATTCAGCT ACTCAA	TCTGTGCA ATTCAGCT ACTCAA	CCCTGGAGACTCA GCTGTCTACTCT GTGCAGAGATA
hTRAV14	hTRAV14	141	ATGTCACTTTTAGCTCTGTGAAGGTGTGCACAGCTTCACTGTGGCTAGGACCTGGCATGTGCCAGAGAATAACT CAAAACCAACCAAGTAATGTCTGTGCGAGGAAAGAGGGGTGACCTGTGACTGTGCACATATGACACCCAGTGA AAGTTAAGGCTATCTGTGATACAGCAGCTCAGCAGTGGAGATGATATTTCTTATTAATCAGGGGCTTATGA CGAGCAAAATGCACAGAGCTGCTACTCATTTGAATTTCCAGAGGCAAGAAATCCGCAACC	TGTCTGAA CCGCTTCAC AACGTG	TGTCTGAA CCGCTTCAC AACGTG	GGGACTCAGCAA TGATTTCTGTGC AATGAGAGAGGG
hTRAV15	hTRAV15	142	ATGTATAGTATGTAAACAACCTGCGGTGTGTGACATGTACCTTAGAACGGGTGAACAGCCCTCATATCTGGGA GTAGAGCTCTTCACTTCACTCTGAGATTCGGGAGGGAATGCACACATCTTAATGTGACTTATGAGGAGAGAA CGTCTCTTAACCTTCTACTGTCTGTGCGAGGGCTGTGAAAGGACATGTGTCTTGTGACCTTAATTCATCAAGCCA GATGAGGAGGAGAGACAACATTTAAAGAAGCGCTTGGAAAGAGAGATTTATAGT	GTCTTGAAT ATGCTGGTC TCTCAT	GTCTTGAAT ATGCTGGTC TCTCAT	CCCTGGAGATCA GGCAGCTACTCT TGTGCTTGTGAG
hTRAV16	hTRAV16	143	ATGAAGCCACCTCATCTCAGTGTGTGATATATATATATCTAGAGGAACAAAGAGCCAGAGAGTGACTCA GCCGAGAGGCTCTCTCTGTCTTAAAGGGGCCCTCAGTGGAGCTGAAAGTCAACTATCTCTATCTGGGGATCT TGAATCTCTGTGTATGCTCAGTCTCAGACAAAGCCCTCAGTCTCTGTGACACATCTCTAGAGAGAGAGCAT CAAAGGCTCTCACTGTGTGACTTAAACAAGGCGAGACATCTTTCCA	CCCTGAAGAA ACCAATTCG TCAAGA	CCCTGAAGAA ACCAATTCG TCAAGA	GGAGAGCTCAGC CATGTATTACTG TGTCTTAAAGTGG
hTRAV17	hTRAV17	144	ATGGAACCTCTCTGGGAGTGTCTTGGTGTATCTATGTGCTTCAACTGTGCTAGGGTGAACAGTCAACAGGGAGAA GAGGATCTTCAGGCTTTCAGCATCCAGGAGGTGAAATGTGCCCACTGAGCTTGCAGTCAAAAACCTAGTATAAA CAATTTACAGTGTATAGACAATAATCAGGTAGAGGGCTTGTCCCAATGTCCCACTTAATTTAATACGTCTCAAATGAAAGAGA GAAACACAGTGGGAAGATTAAAGATCAGCTTGTACACTTCCAAAGAAAGGAGT	TCTCTGTGT ATCAGCGCT TCCCGG	TCTCTGTGT ATCAGCGCT TCCCGG	GCAGTCAAGACT GCTCTTACTCTCT GTGCTACGGAGC
hTRAV18	hTRAV18	145	ATGTGTCTGTCTCTGTGAGGCTGTGTGATCTGTGTGATATTCAGAGGACAGTGGAGACTCTGGTATCCCTAG ACAGAAGGCCAGTATACCCCTCCGTGAGAGGCGAGCTTCAGCATTAACATGACATATCAGTCCAGCTATCTAACCT TTCTTATCTGGTATGTCCAGTATCTAAACAAGAGCTGTAGCTCTCTCGAAAGGTTCAGAAACCTAAGAGAGCG GACAGCAGAGGTTTTCAGGCCAGTCTTATCAAGATGTGACATCTCTC	ACCTGTGAGA AGCCCTCGG TGCA	ACCTGTGAGA AGCCCTCGG TGCA	GCTGTGTGAGCT TGCCGTGTACTA CTGCGCTCTGAG A
hTRAV19	hTRAV19	146	ATGTGTGACTGCGAGCCCTGTGAGGCGAGTCAAGCTTCACTGTGTGTGTATCCAGCAATGCTCAGAAAGGTAACT CAAGCGAGCTGAAATTTCTGTGTGTGAGAGGAGGATGTGACTTGGAGCTGTGTGTATGAAACCCGTGTATAC TACTTATCTATCTGTGTACACCAACACCAAGTGGAGAAATGTGTTTCTCTATCTGTGGAATCTTTTGTAT GAGCAAAATGAATAAAGTGTGTGTATCTGTGGAATCTTCCAGAAATCCACCTAGTCTCTTCAACT	CACCATCAC AGCCTACA AGTCTG	CACCATCAC AGCCTACA AGTCTG	GGACTCAGCAGT ATACTCTGTGCT CTGAGTGTGAGC
hTRAV20	hTRAV20	147	ACCGAGATCTCCAGGCCCTGTGAGACTCCAGAGGGAGAGAGTACAGTCTTAATCTGAGCTTACACAGTCAAGCG TTTAAGAAGGCTGTCTGTGTATGAGCAAGATCTCGGAAAGAGCCCTGAAATCTCTTCACTCCCTGTATTCAGCTGG GGAAGAAAGGAGAAAGAGGCTTAAAGCCATTAACAAAGAGGAAAGC	TTCTGTGAC ATCAGAGCC CCTA	TTCTGTGAC ATCAGAGCC CCTA	AACCTGAAGACT CAGCCACTTATC TCTGTGCTGTGC AGG
hTRAV21	hTRAV21	148	ATGGAGACCTCTGTGGCTCTGCTTATCTTTTGGCTGAGCTGCAATGGGTGAGCGCAACACAGGAGGTGAGCGCA GATCTCTGAGCTCTGAGTGTCCAGAGAGAGAAACTTGGTCTTCACTGTGAGTCTAGTATAGGCTATTA CAACCTCAGTGTGTATGAGCAGGACCCCTGGGAAAGGCTTCACTCTCTGTGTGTATTCAGTCAAGTACAGAGAGA GCAACACAGTGTGAATCTTAATCTCTGTGATTAATCAATCAATCAAGGAACTGTA	CTTTATACA TTGCAAGCTT CTCAGCC	CTTTATACA TTGCAAGCTT CTCAGCC	TGGTGACTCAGC CACTACTCTCTG TGTGTGTGAGG

[illegible]

Tabla 13 Segmentos V de la cadena β de TCR y sitios de unión para cebadores presentados en LA Tabla 4 y LA Tabla 10. La secuencia para cada segmento V presentados en esta tabla consiste de tres partes (enumeradas de 5' a 3'). La secuencia aguas arriba del sitio de unión del cebador, secuencia del sitio de unión del cebador y secuencia aguas abajo del sitio de unión del cebador.

[illegible]

hTRBV05-3	hTRBV05-3	180	ATGGGCCCCGGGCTCTCTGCTGGGAACCTGGCTTTATCTCTCTGGGAGCAGGCCAGTGGAGGCTGGAGTACCCCAA AGTCCACACACCTTGATCAAAACAGAGAGGACAGCAAGTGAATCTCCATCTCTGGGCACAGCAG TGTGTCTGTGTACCAACAGGCCCGGGTACAGGGGCCAGTTTATCTTGAATATCTTAATGAGTTAAGGAGATC AGAAGAAACTTCCCTAACTCAAGTCTCAGGGCGCCAGTTCACATGACATTT	GCTGTGAGA TGAATGTGA GTGCTT	TGGAGCTGGGG ACTCGGCCCTGT ATCTCTGTGCCA GAAGCTTGG
hTRBV05-4	hTRBV05-4	181	ATGGGCTCTGGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACACACCTTGATCAAAACAGAGAGGACAGCAAGTGAATCTCTAGTCTGGGCACAAACAC TGTGTCTGTGTACCAACAGGCCCGGGTACAGGGGCCAGTGTATCTTCACTTATAGGGAGGAAGAGAATGG CAGAGAAACTTCCCTCTAGATCTCAGGCTCTCAGTTCCTCTAAATATAGCT	CTGAGCTGA ATGTGAACG CCCT	GRAGCTGGACGA CTCGGCCCTGTA TCTCTGTGCCAG CAGCTTGG
hTRBV05-5	hTRBV05-4	182	ATGGGCTCTGGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACACACCTTGATCAAAACAGAGAGGACAGCAAGTGAATCTCTAGTCTGGGCACAAACAC TGTGTCTGTGTACCAACAGGCCCGGGTACAGGGGCCAGTGTATCTTCACTTATAGGGAGGAAGAGAATGG GAAGAGAAACTTCCCTCTAGATCTCAGGCTCTCAGTTCCTCTAAATATAGCT	CTGAGCTGA ATGTGAACG CCCT	GTGCTGTGGGGA CTCGGCCCTGTA TCTCTGTGCCAG CAGCTTGG
hTRBV05-6	hTRBV05-4	183	ATGGGCTCTGGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACACACCTTGATCAAAACAGAGAGGACAGCAAGTGAATCTCTAGTCTGGGCACAAACAC TGTGTCTGTGTACCAACAGGCCCGGGTACAGGGGCCAGTGTATCTTCACTTATAGGGAGGAAGAGAATGG AGAGAGCAACTTCCCTCTAGATCTCAGGCTCTCAGTTCCTCTAAATATAGCT	CTGAGCTGA ATGTGAACG CCCT	GTGCTGTGGGGA CTCGGCCCTGTA TCTCTGTGCCAG CAGCTTGG
hTRBV05-7	hTRBV05-4	184	ATGGGCTCTGGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACACACCTTGATCAAAACAGAGAGGACAGCAAGTGAATCTCTAGTCTGGGCACAAACAC TGTGTCTGTGTACCAACAGGCCCGGGTACAGGGGCCAGTGTATCTTCACTTATAGGGAGGAAGAGAATGG GAAGAGAAACTTCCCTCTAGATCTCAGGCTCTCAGTTCCTCTAAATATAGCT	CTGAGCTGA ATGTGAACG CCCT	GTGCTGTGGGGA CTCGGCCCTGTA TCTCTGTGCCAG CAGCTTGG
hTRBV05-8	hTRBV05-4	185	ATGGGCTCTGGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACACACCTTGATCAAAACAGAGAGGACAGCAAGTGAATCTCTAGTCTGGGCACAAACAC TGTGTCTGTGTACCAACAGGCCCGGGTACAGGGGCCAGTGTATCTTCACTTATAGGGAGGAAGAGAATGG CAGAGAAACTTCCCTCTAGATCTCAGGCTCTCAGTTCCTCTAAATATAGCT	CTGAGCTGA ATGTGAACG CCCT	GGAGCTGGAGGA CTCGGCCCTGTA TCTCTGTGCCAG CAGCTTGG
hTRBV06-1	hTRBV06-1	186	ATGAGCATCGGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACAAATTCAGGCTCTGGAAGACAGGAGAGGACATGACACTGCTGTGTGCCAGGATATGAACCATGAATC CATGTACTGGTATCGACAAAGACCCAGGCAATGGAGCTGAGGCTGATTTATTTACTCAGCTTCTGAGGGTACCACTGA CAAAGGAGAGTCCCAATGGCTACAAATGCTTCCAGATTAACAAACAGG	GAGTCTCAG CTCAGAGCTG GAGT	GGGCTGCTCCCT CCCAGACATCTG TGTACTTCTGTGC CAGCAGTGAAGCT CTCCCAAACAT CTGHTACTTCTG TGCACGAGTTA CTC
hTRBV06-2	hTRBV06-2	187	ATGAGCTCTGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACAAATTCAGGCTCTGGAAGACAGGAGAGGACATGACACTGCTGTGTGCCAGGATATGAACCATGAATC CATGTACTGGTATCGACAAAGACCCAGGCAATGGAGCTGAGGCTGATTTATTTACTCAGCTTCTGAGGGTACCACTGA CAAAGGAGAGTCCCAATGGCTACAAATGCTTCCAGATTAACAAACAGG	CTGGGCTG GAGTGGCT CCCTC	CTCCCAAACAT CTGHTACTTCTG TGCACGAGTTA CTC
hTRBV06-3	hTRBV06-2	188	ATGAGCTCTGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACAAATTCAGGCTCTGGAAGACAGGAGAGGACATGACACTGCTGTGTGCCAGGATATGAACCATGAATC CATGTACTGGTATCGACAAAGACCCAGGCAATGGAGCTGAGGCTGATTTATTTACTCAGCTTCTGAGGGTACCACTGA CAAAGGAGAGTCCCAATGGCTACAAATGCTTCCAGATTAACAAACAGG	CTGGGCTG GAGTGGCT CCCTC	CTCCCAAACAT CTGHTACTTCTG TGCACGAGTTA CTC
hTRBV06-4	hTRBV06-4	189	ATGAGATCAGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACAAATTCAGGCTCTGGAAGACAGGAGAGGACATGACACTGAGATGATCCAGGATATGAACCATGAATC CATGTACTGGTATAGACAAAGATCAGGACTGGGGCTAAGGCTCAATTCATTTACTCAGTGTGGTACCACTGG CAAAGGAGAGTCCCAATGGCTACAAATGCTTCCAGATTAACAAACAGG	CCCTCAG TTCGGCT GCTG	TACCTCTCAGA CACTCTGTACTT CTGHTACTTCTG TGCACGAGTTA CTC
hTRBV06-5	hTRBV06-5	190	ATGAGATCAGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACAAATTCAGGCTCTGGAAGACAGGAGAGGACATGACACTGAGATGATCCAGGATATGAACCATGAATC CATGTACTGGTATCGACAAAGATCAGGACTGGGGCTAAGGCTCAATTCATTTACTCAGTGTGGTACCACTGG CAAAGGAGAGTCCCAATGGCTACAAATGCTTCCAGATTAACAAACAGG	TCCGCTCA GGCTGCTGT CGGC	TGCTCTCTCCA GACATCTGTGA CTCTGTGCCAG CAGTACTC
hTRBV06-6	hTRBV06-6	191	ATGAGATCAGGCTCTCTGCTGGGTTGCTGCTTGTCTCTCTGGGAGCAGGCTAGTGGAGATGAGTCACTCAA AGTCCACAAATTCAGGCTCTGGAAGATAGGACAGGAGGACATGACACTGAGATGATCCAGGATATGAACCATGAATC CATGTACTGGTATCGACAAAGATCAGGACTGGGGCTAAGGCTCAATTTATTTACTCAGTGTGGTACCACTGG TAAAGGAGAGTCCCAATGGCTACAAAGCTTCCAGATTAACCAAGAG	GATTTCCG CTCAGGCTG GAGT	TGGCTGCTCCCT CCCAGACATCTG TGTACTCTGTGC CAGCAGTACTC

[illegible]

[illegible]

[illegible]

hIRBV22	hIRBV22	227	ATGGGGAGCTGGGTCCTCTGCTATGGACCCCTGGCTCTCTGGGAGCAGGACCCCTTGGATGGCTGACATCTATACAG ATCCCAATCCAGCTCCTGGGGCTGGATGGGATGTGACATCTGGAGTGGAAACCGGAATTTGAGACACAAATGACAT GTACTGCTAGGTGACTGGCAGGACCCAAAGCAGAAATCTGAGACTGATCTATCTACTCAAGGCTTGGAAAGGAA TTCAGAGAGGATCTAATCAGAGGCTACCTGGCTGCTCCAAAGAGGAGGAGGCTATCTCTTCAGG	GTGAAGTTG GCCACACC AGCCA	AACAGCTTGTGA CTTCTGTCTTGG GAGCGCAC
hIRBV23	hIRBV23	228	ATGGGACACAGGCTCTCGGCTGTGGACCTGTGTCTCTCTGGGAGCAGACTCTTTTCATGTGCAAAAGTGCACACAG ACTCCAGGACATTTGGTCAAGGAAAGAGCAGAAAGAAATGATGATGTACCTCCGAAAGAGGACATGACTTT TGTATTATGGTATCAACAGAAATACAGAAATAAGAGTTATGCTTTTGAATCTCCCTCAGAAATGAACAAGTCTTCAA GAAACGGAGATGCACAAAGAGCGATCTCTCATCTCAARRCCCCAAGAAGCGACCCCTGCAG	CCTGGCAAT CCTGTCTCTC AGAA	CCGGGAGACACG GCACGTATCTC TGGCCAGCAGT CAATC
hIRBV24	hIRBV24	229	ATGGCTCTCCCTGCTCTCTCTGTGGGCTCTTATCTCTCTGGGAACAGGGGCTCATGGATGTGATGTATACCCAGA CCCCAAGGATATAGGATCAACAAGACAGGAAGAGGATATGTCTGGAATGTCTCAGATAGGCTATGATATAGA ATGTACTGGTATCAGACAAGCCAGGACCTGGGCTCAGGTGTATCTATCTCTGTGATGTCAAGATATATAAC AAAGGAGAGATCTCTGATGGATACAGTGTCTCTGACAGGACAGAGCTAAATCTCTCCCTGTCTCTA	GAGTCTGCC ATCCCCAAC CAGA	CAGCTCTTACTT CTGTGCCACCAG TGAATTG
hIRBV25	hIRBV25	230	ATGACTATCAGGCTCTCTCTCTACATGGGCTTTTATTTCTGGGGGAGGCTCATGGAACTGACATCTACCAG ACCCCAAGATACCTTGTATAGGGACAGGAAGAGAATCACTCTGGAAATGTCTCAAAACATGGGCAATGACAA AATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACTACACTCTCACTATCTCTATCTCTATGGAGTAAATCTCCACAGA GAAGGGAGATCTCTCTCTGAGTCAACAGTCTCCAGAAATGAAGACGGAGCATTTCTCCCTGAGCCCT	GGAGTCTGC CAGGCCCTC ACA	TACCTCTCAGTA CCTCTGTGCCAG CAGTGAATA
hIRBV26	hIRBV26	231	ATGAGCAACAGGCTCTCTCTCTGTGTGATCATTTGCTCTCAAGGACAGGCTTCAAGGATGTGTAGTATACATAA TCTCCAAAGACACAGAAATCATTTGGACAGGAAGGAATCTATCTACAGTCTCCAGAAATGATGATGTATACA ATGTACTGGTATCAGACAGGACCCAGGACTTGGACTGAAGCTGGTCTATATCTACCTGGCACTGGGAGGACTGAA AAAGGAGATCTCTGAGGGGTATCATCTCTTGAAATACATAGCACTTTCTCCCTGAGCCCT	GAAGTCTGC CAGCACCAA CCAG	ACAATCTGTGAT CTCTAUGCCAGC AGTTCACTC
hIRBV27	hIRBV27	232	ATGGGCCCCAGCTCTCTGGCTATGTGGTCTCTCTCTCTAGGACAGGCTCCCTCTGGAAAGCCCAAGTGAACCCAG AATCCCAAGATACCTGATCAGATGACTGGAAAGAAAGATGTACAGTGAATGTCTGATGATGAACATGAACTGATGA TATGTCTGGTATCTGACAAAGACCCAGGCTGGGCTTAAGGCAGATCTACTATCTCAATGAATGTGAGGTGACTGA TAAGGGAGATGTCTTGAAGGTGACAAAGTCTCTGAAAGAGGAGGAGGAAATTTCCCTGATCTCT	GGAGTCTGC CAGCCCCAA CCAG	ACCCTCTGTACT TCTGTGCCAGCA GTTTATC
hIRBV28	hIRBV28	233	ATUGGAAATCAGGCTCTCTCTGTGTGGGCTTTTGTCTCTGGCTCTGAGGCCCTGTAGATGTGAAGTAAACCCAG AGCTCAGATATCTAGTCAAAAGAGCCGGGAGAGAAGGTTTCTTGGAAATGTGTCCAGGATATGGACATGAATA TATGTCTGGTATCTGACAAAGACCCAGGCTGGGCTACCGCTGATCTATCTCTCATATGATGTATAAATGAAGA AAAGGAGATATCTCTGAGGGGTACAGTGTCTCTGAGAGAGAGAAGGAGCTCTCTCCCTGATCTCT	GGAGTCTGC CAGCACCAA CCAG	ACAATCTGTACT CTCTGTGCCAGC AGTTTATG
hIRBV29	hIRBV29	234	ATCTCTGAGTCTCTCTCTCTGGGACTAGGCTGTGTGTCTGAGTGTGCTCATCTCTCAAAAGCCAGCAGGGG ATATCTGTCAACGTGGAAACCTCCCTGACGATCCAGTGTCAAGTGTATAGCAAGTCAACCATGATGTCTTGGTACC GTACGCAACTTGGACAGAGCCCTGACATCTGACCACTGAGGCTGATCTATCTCTCATATGATGTATAAATGAAGA TTTGTCAATGACAAGTTTCTCCATCAGCCGCCAAACCTTACATCTCAACTCTGACT	GTGAGCAAC ATGAGCCCT GAAGA	CAGCAGCATATA TCTCTGCAGCT TGAAGA
hIRBV30	hIRBV30	235	ATGTCTGTGCTCTCTCTCTGGGCTCTCTCTCTGGGCTCTGATCTGAGACTATATCTCAATATCTCAAAATGGCCAG CGACCTCTGGTGGAGCTGTGGGAGGCCCTCTCTCTGTGGATGGACATGTGGAGGGAACATCAAAACCCCAACCTAT ACTGTGACCGACAGGCTGACAGGAGGGGCTCCAGTGTCTCTCTCTCTCTGATTTGGCCAGATCAGTCTCTG AGGTGGCCCGAGAACTCTCTCAGCTCCAGACCCCGAGGAGCCGCACTTCACTCT	GAGTCTTAA GAAGCTCT TCTCA	GTGACTCTTGCT TCTATCTCTGTG CTGGAGTGT

REIVINDICACIONES

1. Un método para secuenciar genes de receptores de células inmunitarias, que comprende
 - (1) proporcionar ARN de células inmunitarias;
 - (2) transcribir el ARN en ARN complementario (ARNc), seguido de transcripción inversa del ARNc en ADN complementario (ADNc) usando uno o más cebadores que comprenden una primera secuencia adaptadora, en el que cada extremo 5' del ADNc producido mediante transcripción inversa contiene la primera secuencia adaptadora;
 - (3) amplificar el ADNc para producir un primer producto de amplificación usando un primer par de cebadores que comprende un primer cebador que se hibrida con la primera secuencia adaptadora y un segundo cebador que se hibrida con una región constante del gen del receptor de células inmunitarias;
 - (4) amplificar el primer producto de amplificación para producir un segundo producto de amplificación usando un segundo par de cebadores, en el que
 - i. un primer cebador del segundo par de cebadores se une a la secuencia adaptadora en el extremo 5' del primer producto de amplificación,
 - ii. el segundo cebador del segundo par de cebadores se une a la región constante del gen del receptor de células inmunitarias en el primer producto de amplificación, y
 - iii. el primer y segundo cebadores comprenden secuencias adaptadoras para secuenciación; y
 - (5) secuenciar el segundo producto de amplificación.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de transcripción inversa da como resultado productos de PCR que oscilan entre 150 y 600 pb.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los genes del receptor de células inmunitarias son genes del receptor de células T (TCR) o genes del receptor de células B (BCR).
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno o más cebadores usados para la transcripción inversa se hibridan con segmentos V de la cadena α de TCR; preferiblemente en el que uno o más cebadores usados para la transcripción inversa comprenden una o más de las SEQ ID NO: 1-50 o SEQ ID NO: 261-310.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno o más cebadores usados para la transcripción inversa se hibridan con segmentos V de la cadena β de TCR; preferiblemente en el que uno o más cebadores usados para la transcripción inversa comprenden una o más de las SEQ ID NO: 51-100 o SEQ ID NO: 311-360.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno o más cebadores usados para la transcripción inversa se hibridan con segmentos V de la cadena γ de TCR; preferiblemente en el que uno o más cebadores usados para la transcripción inversa se hibridan con segmentos V de la cadena δ de TCR.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno o más cebadores usados para la transcripción inversa se hibridan con segmentos V de cadena pesada de BCR o segmentos V de cadena ligera de BCR.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que uno o más cebadores usados para la transcripción inversa contienen una secuencia de código de barras de nucleótidos; preferentemente en el que el código de barras de nucleótidos comprende de 6 a 20 nucleótidos, o en el que el código de barras de nucleótidos consiste de 9 nucleótidos; más preferiblemente en el que el código de barras de nucleótidos consiste en la secuencia NNNNTNNNN, NNNNANNNN o HHHHHNNNN.
9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la primera secuencia adaptadora de uno o más cebadores usados para la transcripción inversa comprende un adaptador T7.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8 o 9, en el que las células inmunitarias son células T y en el que el segundo cebador del primer par de cebadores se hibrida con la región constante de un gen TCR.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7 a 9, en el que las células inmunitarias son células B y en el que el segundo cebador del primer par de cebadores se hibrida con la región constante de un gen BCR.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ARN de las células inmunitarias se obtiene mezclando células inmunitarias con células portadoras antes de la extracción del ARN.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 12, en el que las células inmunitarias son células T positivas de linfocitos CD4 o CD8 infiltrantes de tumor.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células inmunitarias son: (a) purificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes de la extracción de ARN; (b) parte de una mezcla de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

5

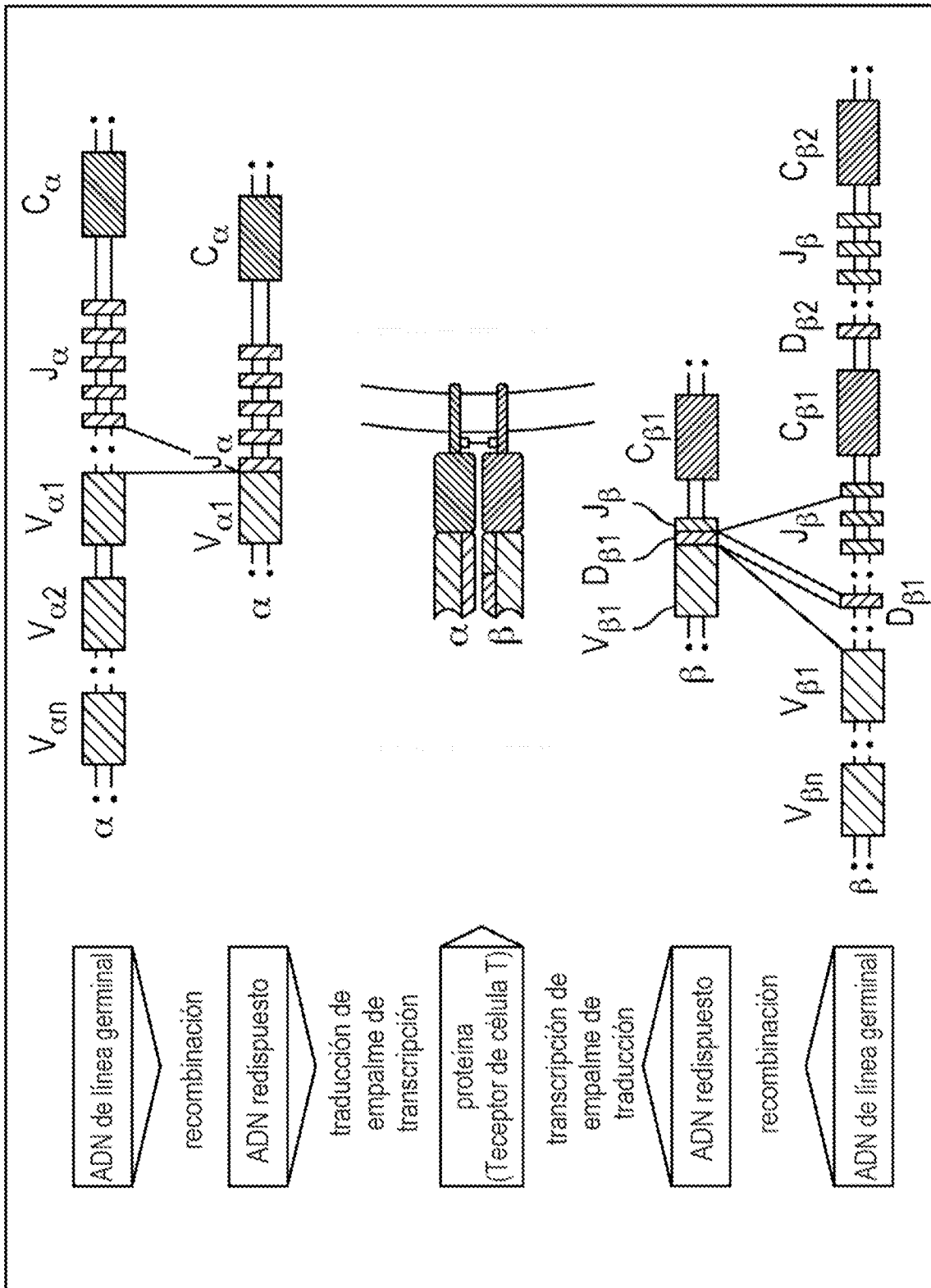


Figura 1

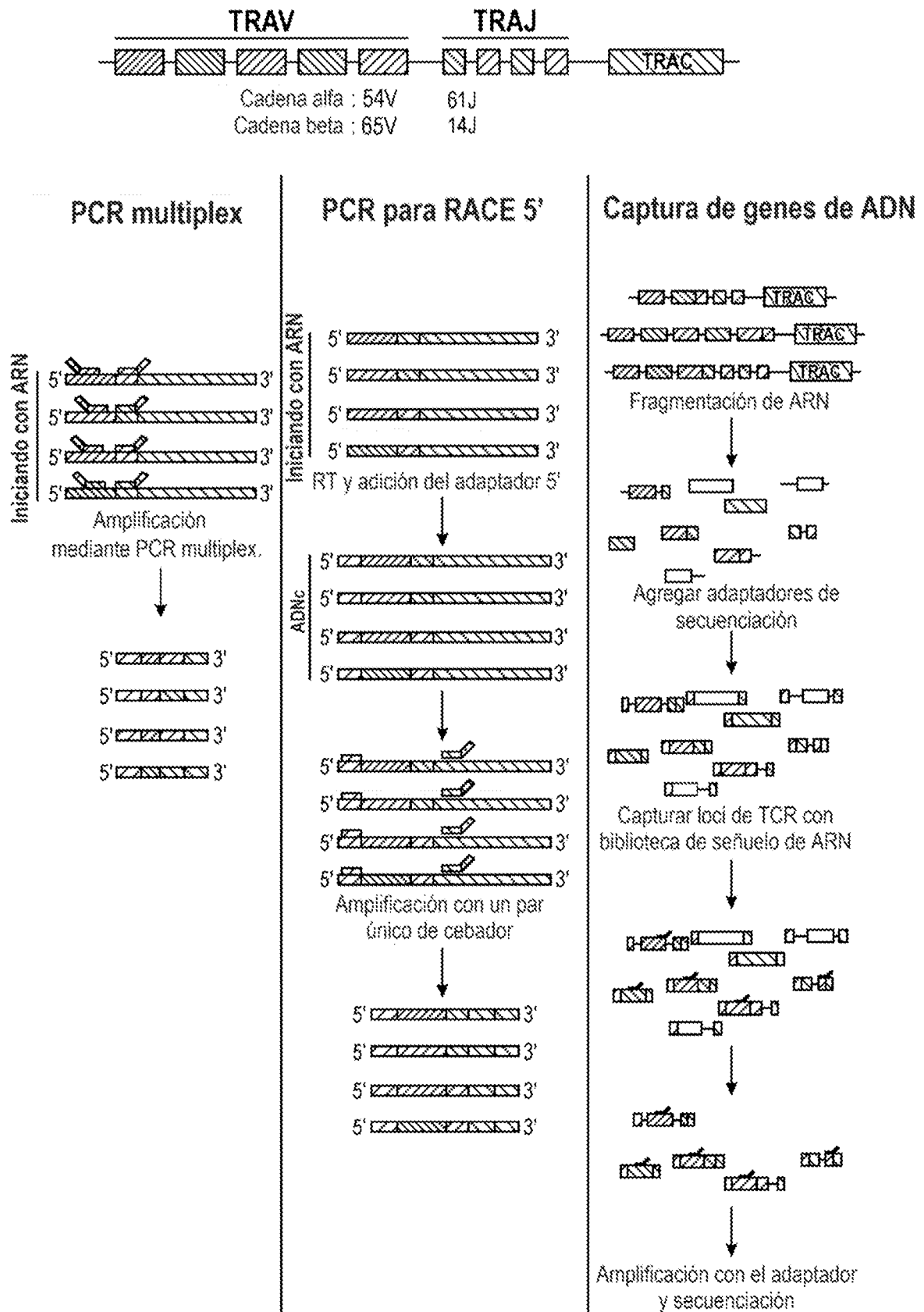


Figura 2

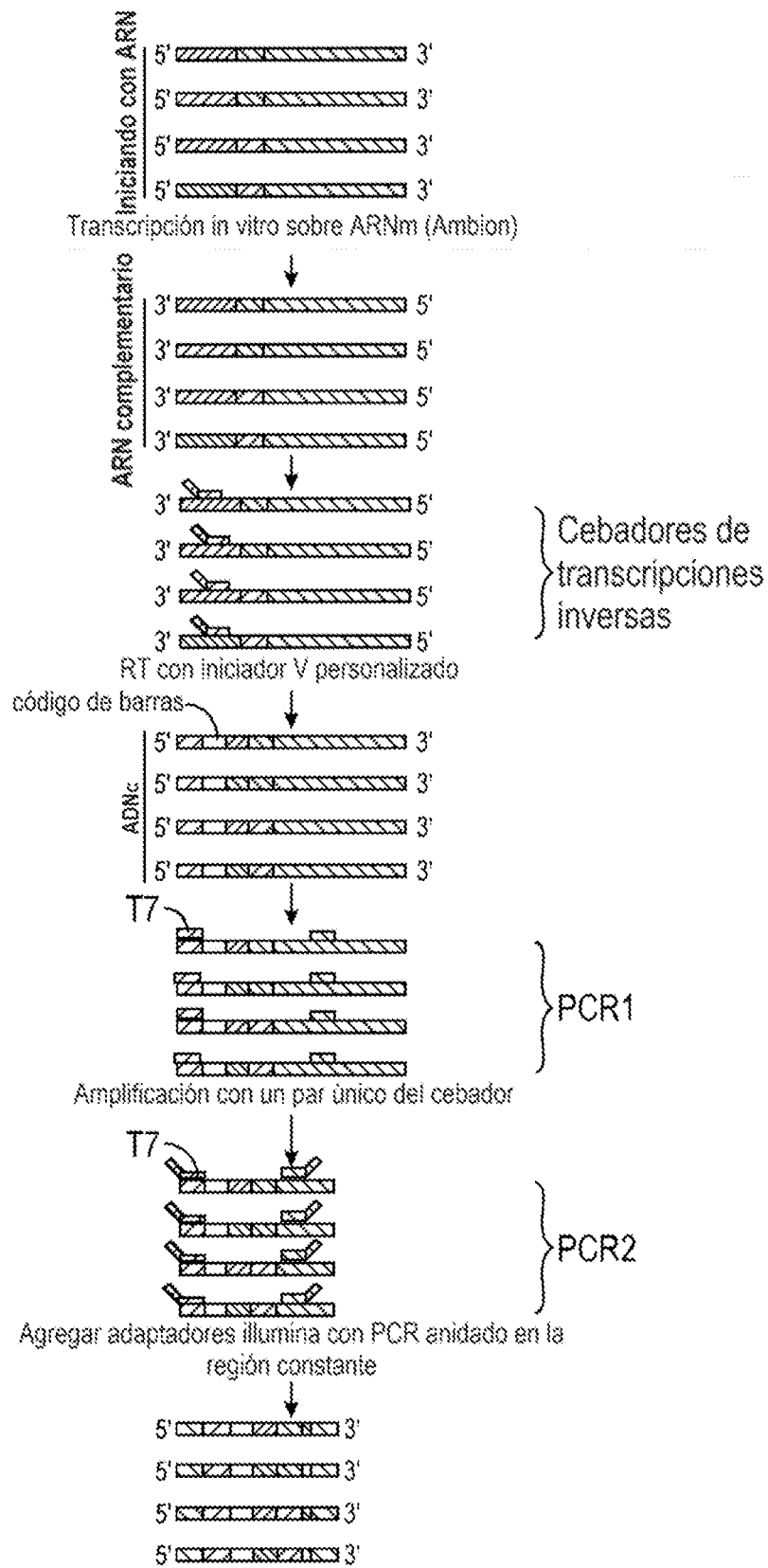


Figura 3

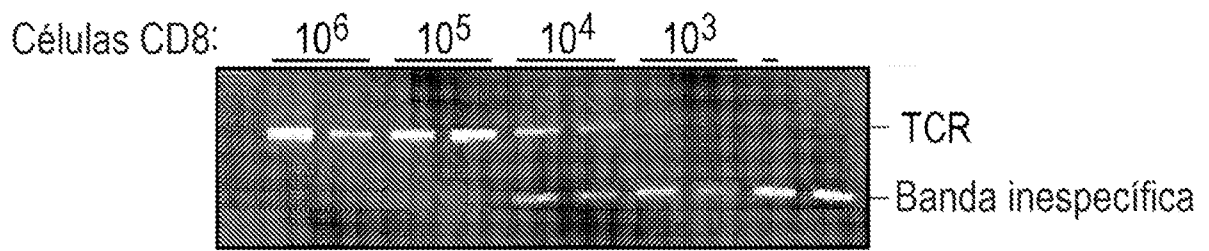


Figura 4

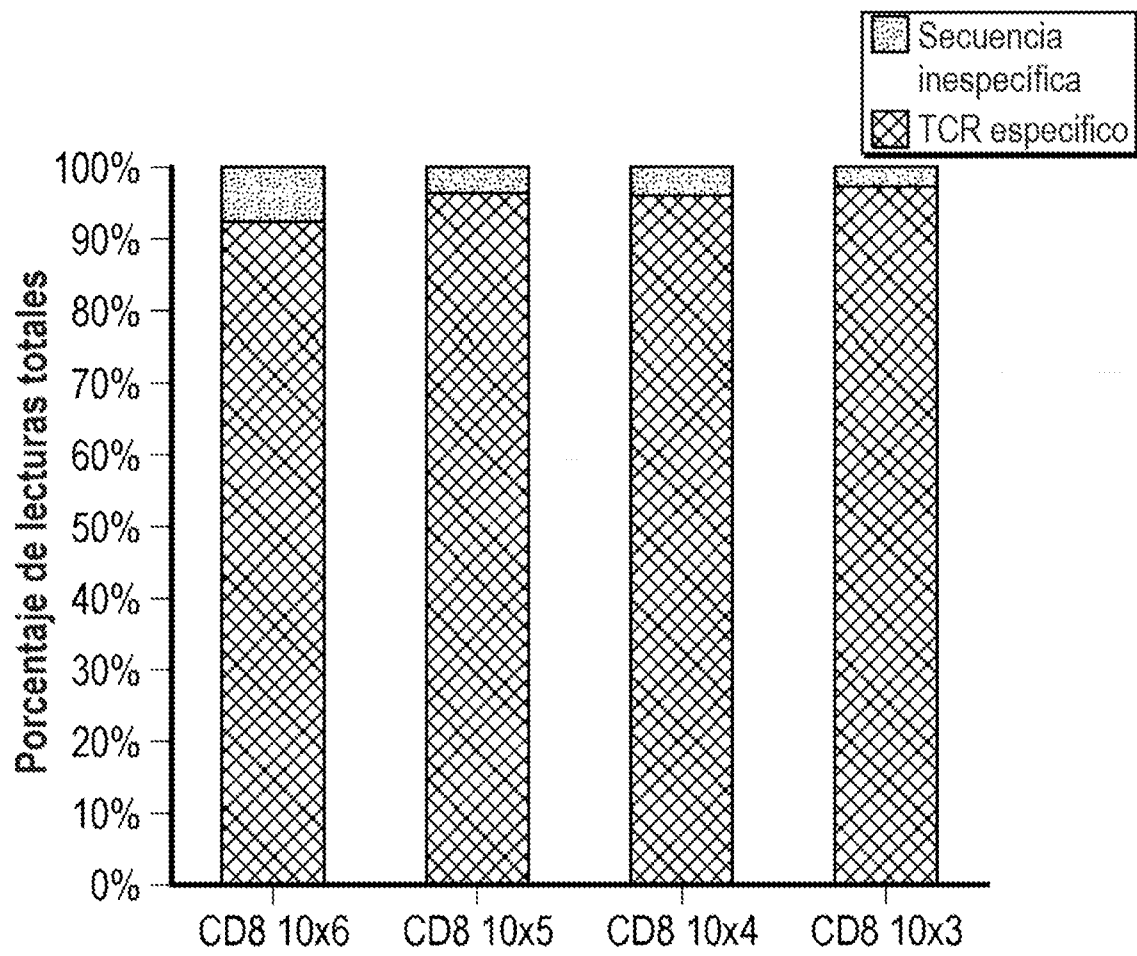


Figura 5

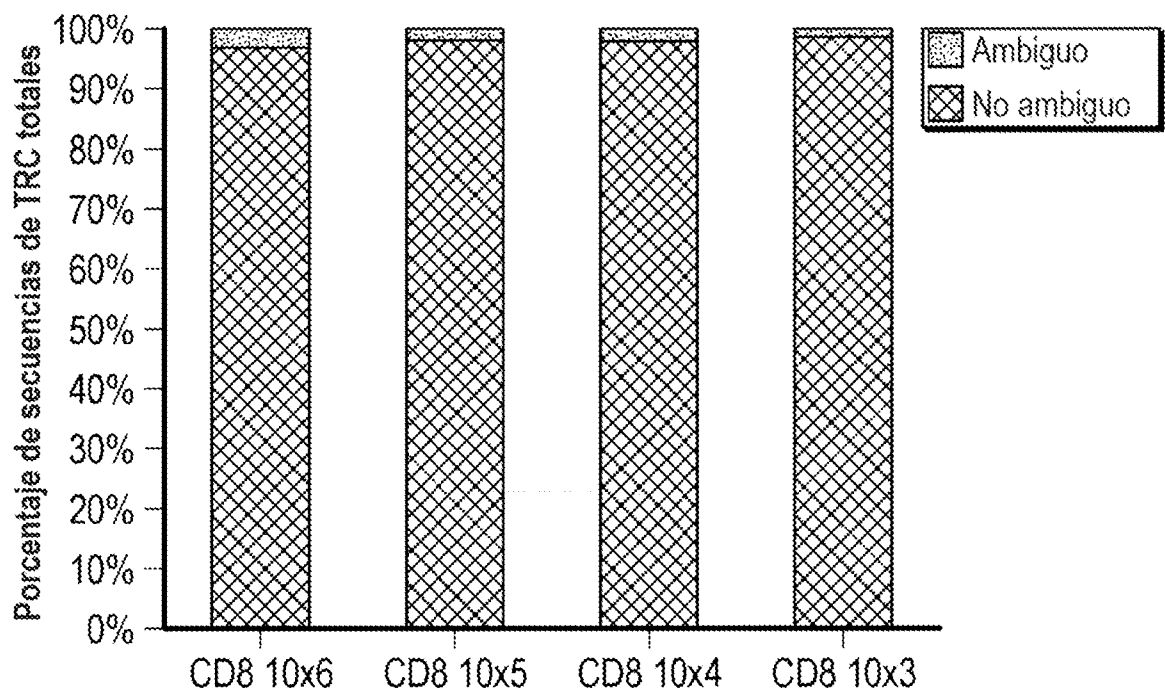


Figura 6

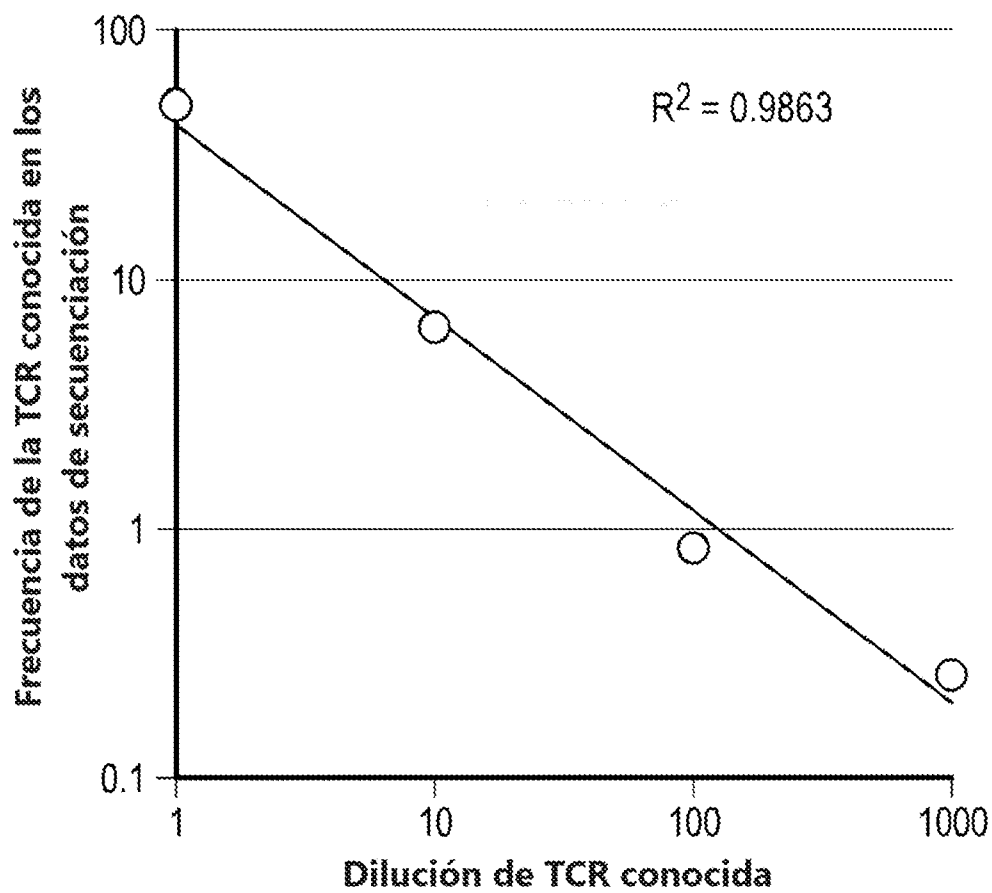


Figura 7

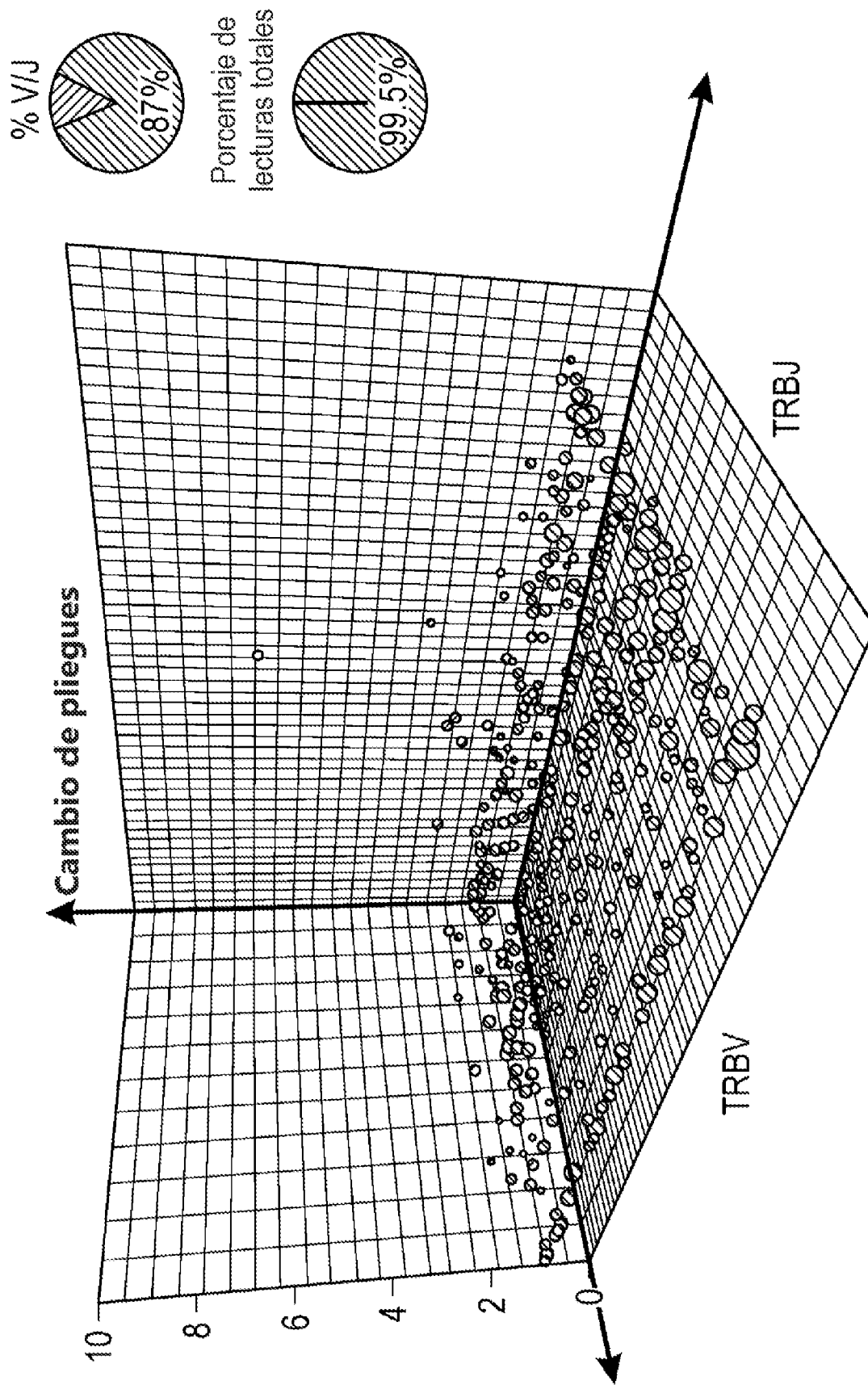


Figura 8

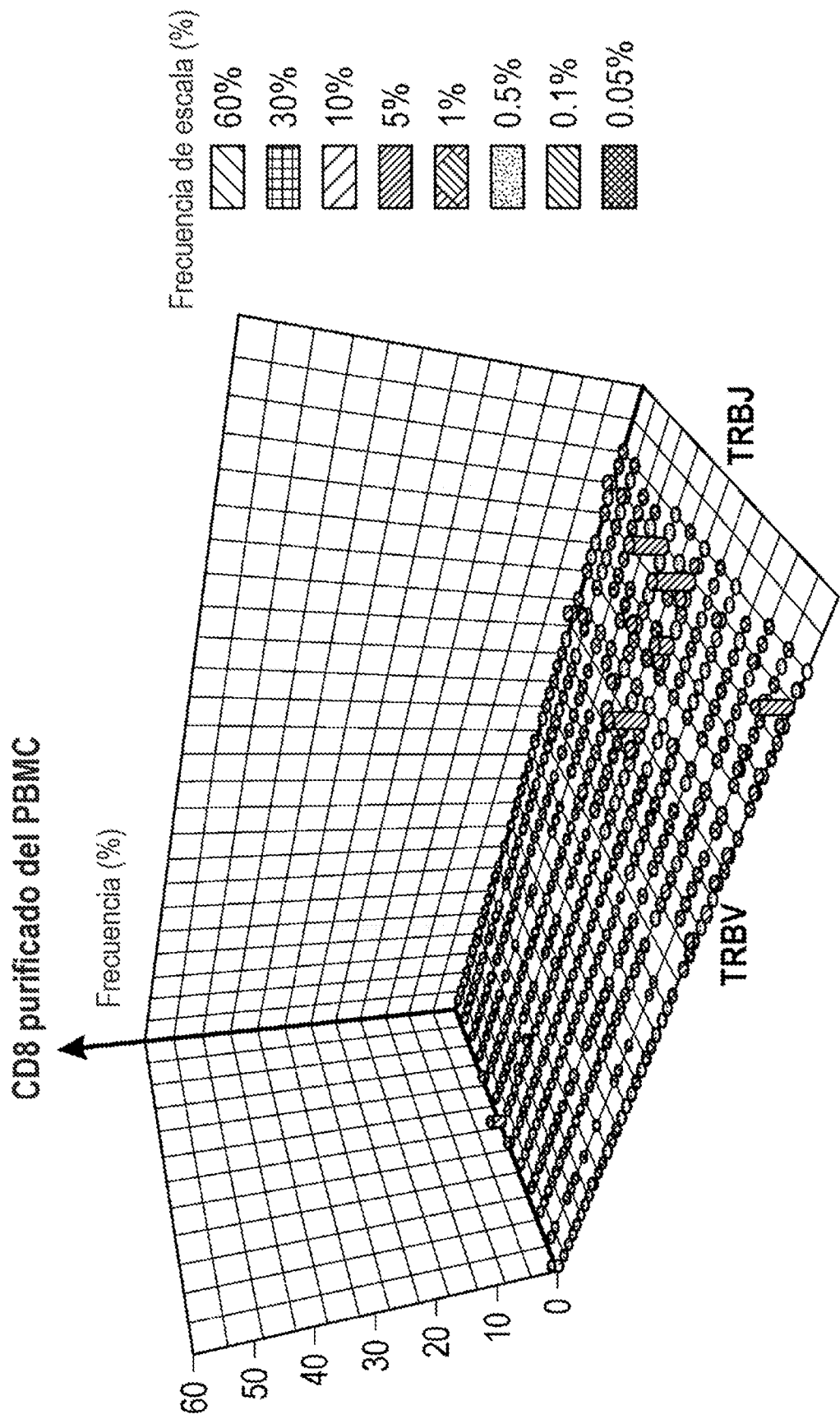


Figura 9A

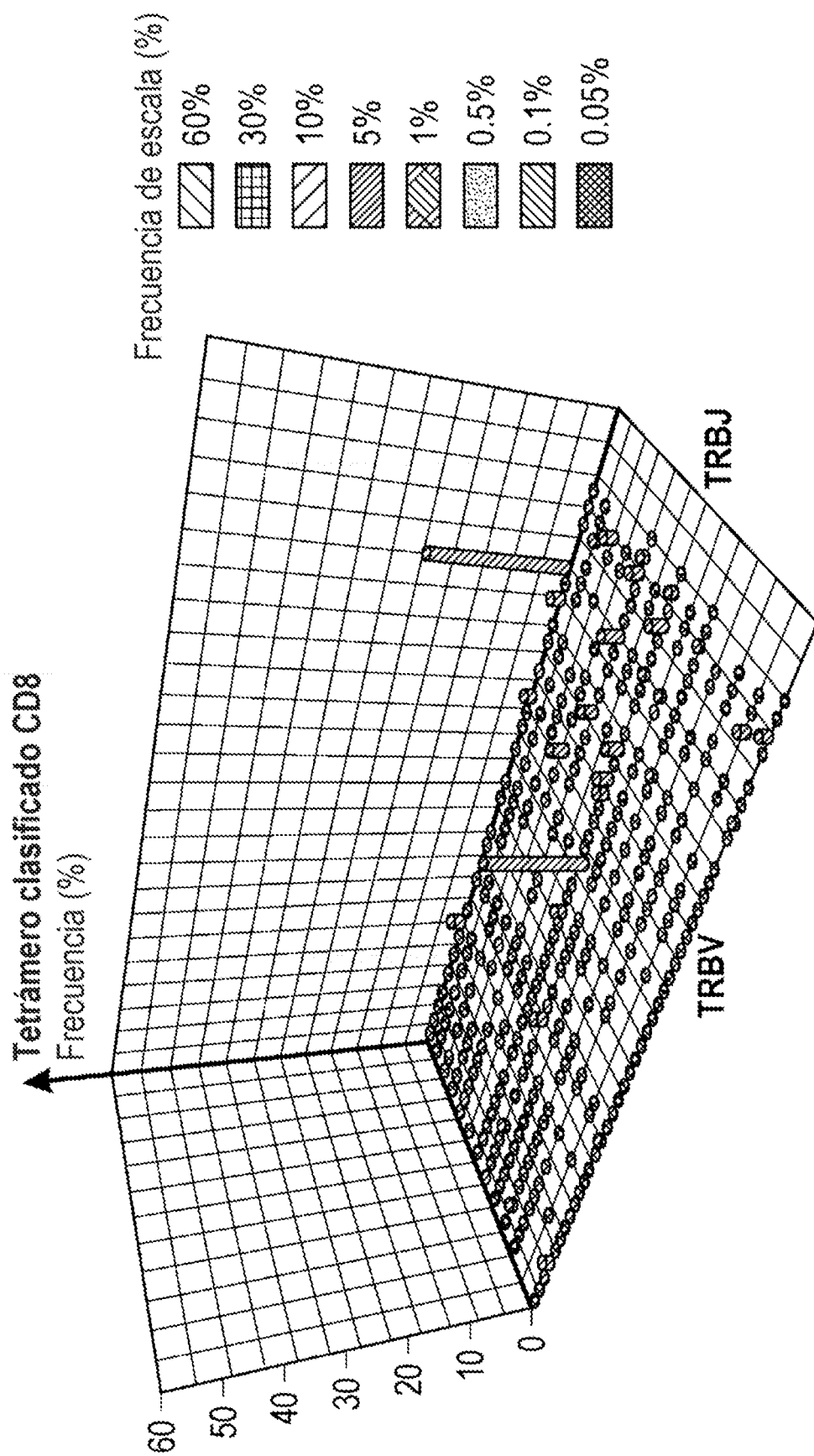


Figura 9B

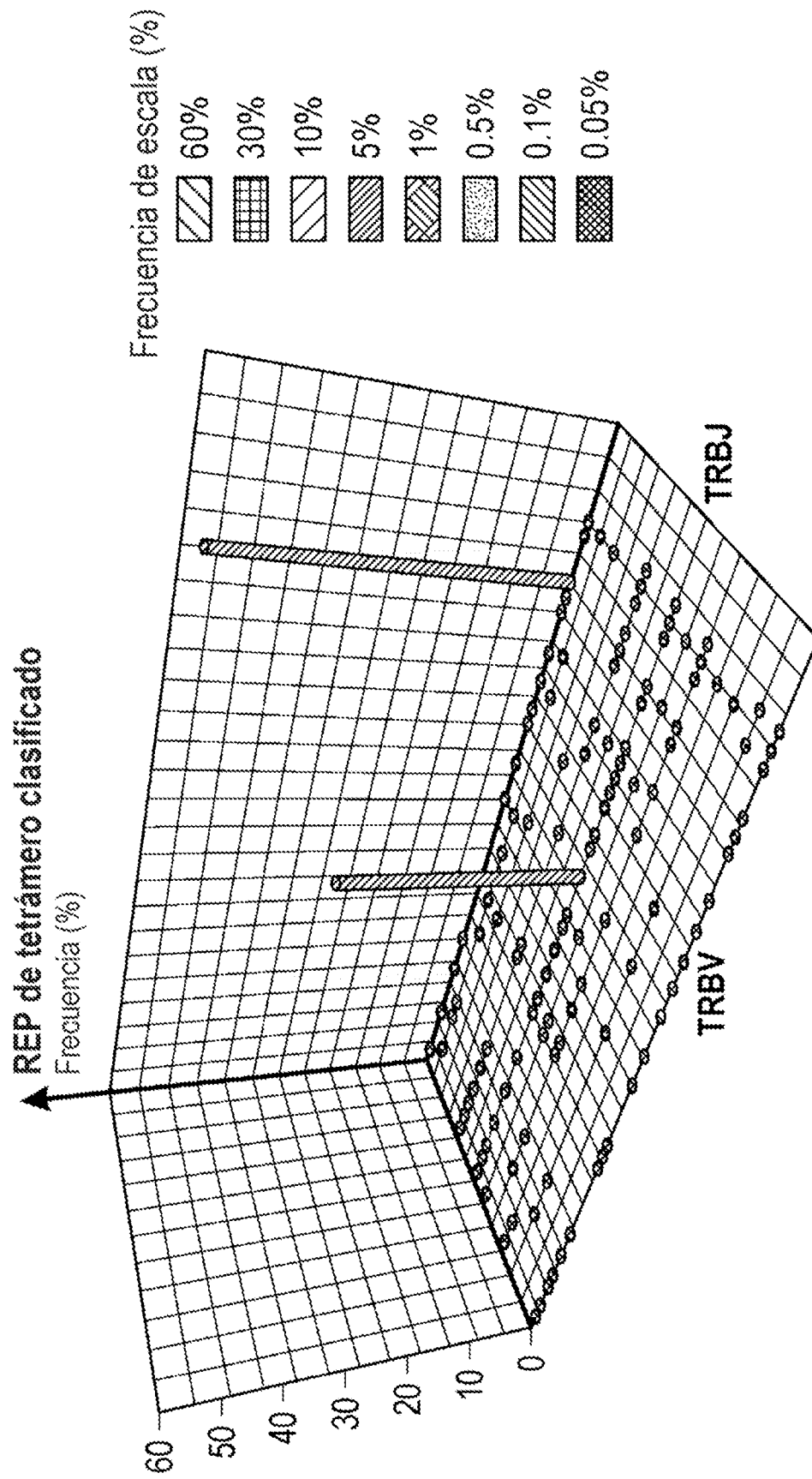
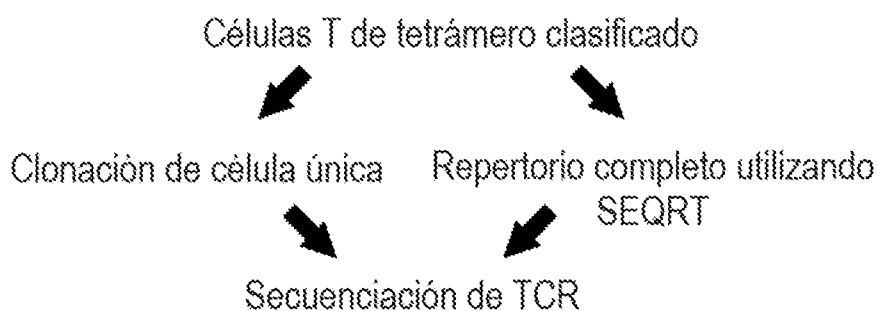


Figura 9C

**Figura 10A****Clones**

25	hTRBV04-1	hTRBJ01-1	IN	CASSRHVGGVPEAFFG
8	hTRBV19	hTRBJ02-7	IN	CASSIGRGSEQYFG
3	hTRBV06-4	hTRBJ01-1	IN	CASSDVLSGEAFFG
2	hTRBV04-3	hTRBJ01-1	IN	CASQGHKNTEAFFG
2	hTRBV07-6	hTRBJ01-4	IN	CASSLGPGGVKTNEKLFFG
2	hTRBV07-9	hTRBJ01-4	IN	CASSLGPGGVKTNEKLFFG

42

Figura 10B**Repertorio**

149038	hTRBV06-4	hTRBJ01-1	IN	CASSDVLSGEAFFG
83723	hTRBV04-3	hTRBJ01-1	IN	CASQGHKNTEAFFG
82575	hTRBV07-6	hTRBJ01-4	IN	CASSLGPGGVKTNEKLFFG
35271	hTRBV19	hTRBJ02-7	IN	CASSIGRGSEQYFG
18022	hTRBV04-1	hTRBJ01-1	IN	CASSRHVGGVPEAFFG
2983	hTRBV19	hTRBJ01-5	IN	CASSASKGQPQHFG
974	hTRBV04-1	hTRBJ01-1	IN	CASQGHKNTEAFFG
780	hTRBV07-9	hTRBJ01-4	IN	CASSLGPGGVKTNEKLFFG

Figura 10C

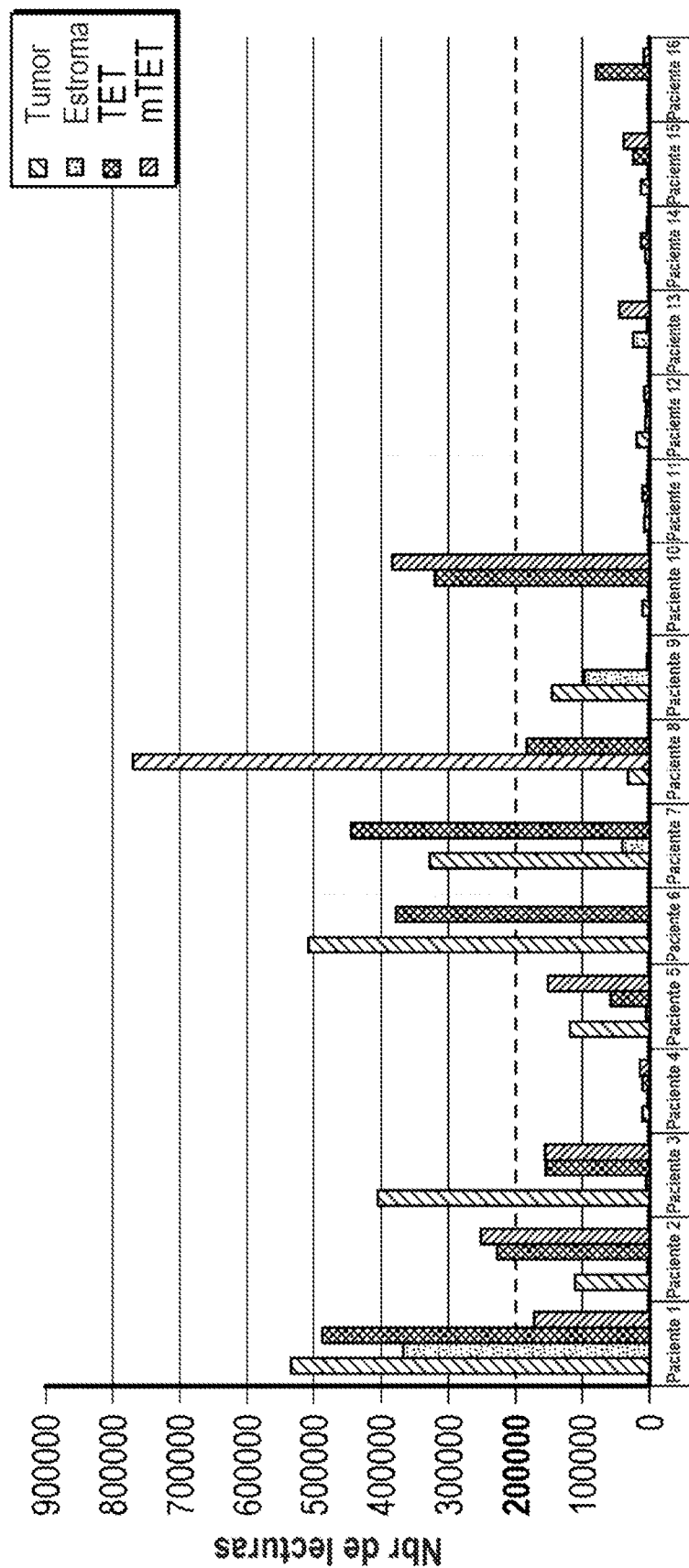


Figura 11

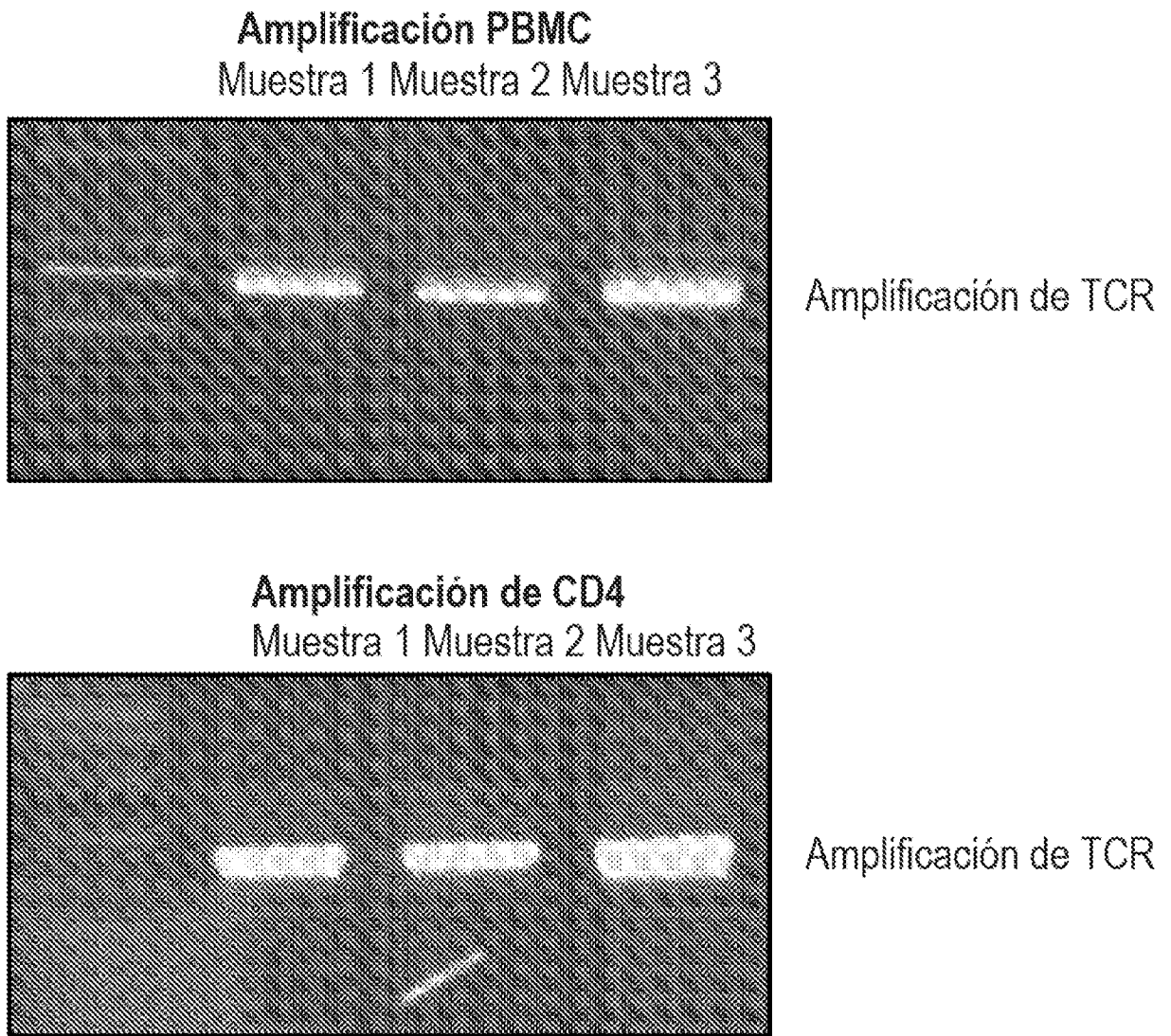


Figura 12