

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 799**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01B 9/02 (2006.01)

G01B 11/06 (2006.01)

G02B 21/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2014 PCT/US2014/039418**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14190303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2014 E 14801181 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3004373**

54 Título: **Identificación de linfocitos T deseables por cambio en respuestas de masa**

30 Prioridad:

24.05.2013 US 201361827378 P

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

08.06.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**TEITELL, MICHAEL A.;
ZANGLE, THOMAS A.;
WITTE, OWEN N. y
LINTON, DAINA BURNES**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 671 799 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).

Identificación de linfocitos T deseables por cambio en respuestas de masa**Descripción****5 REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de USSN 61/827.378, presentada el 24 de mayo de 2013, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos los fines.

10 DECLARACIÓN DE APOYO GUBERNAMENTAL

[0002] Este trabajo fue apoyado por N^{os} de concesión: T32CA009120 y K25CA157940 de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

15 ANTECEDENTES

[0003] La citotoxicidad mediada por los linfocitos CD8⁺ T es un componente importante de la respuesta inmune adaptativa frente a virus y cánceres, y también está implicada en la autoinmunidad (Kalinski et al. (2006) *Immunol Res.*, 36: 137-146; Tuma y Pamer (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 348 - 353). La citotoxicidad mediada por células T se mide típicamente por muerte celular diana o marcadores sustitutos de la capacidad citotóxica de la célula efectora. Los ensayos canónicos son el ensayo de liberación ⁵¹Cr y ELISPOT, ambos de los cuales proporcionan mediciones a granel de respuestas de población total o sub-población de linfocitos (Hobeika et al. (2005) *J. Immunother.* 28: 63-72; Malyguine et al. (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 601: 273 - 284). La introducción de tetrámeros de péptido-MHC y plataformas microfluídicas ha permitido medidas sustitutivas de citotoxicidad mediante el análisis de la especificidad del antígeno de las células T y la secreción de citocinas (Hobeika et al., (2005) *J. Immunother.*, 28: 63-72; Kwong et al. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* 131: 9695 - 9703; Ma et al. (2011) *Nat. Med.* 17: 738 - 743). El seguimiento directo de la citotoxicidad mediada por linfocitos T a nivel de célula individual es ventajoso para analizar células T citotóxicas (CTL) en una población mixta, lo que es de particular relevancia para evaluar el reconocimiento de células T frente a células cancerosas. Los CTL viables pueden potencialmente cultivarse y expandirse más, o los correspondientes receptores de células T (TCR) que tienen especificidad óptima hacia péptidos inmunogénicos pueden clonarse molecularmente para su utilización en un entorno clínico (Rosenberg y otros (2008) *Nat. Rev. Cancer*, 8: 299 - 308).

[0004] La microscopía óptica permite la identificación directa y el seguimiento de los CTL en el contexto completo de reconocimiento de células diana y matanza. Se han explorado métodos de imágenes ópticas como epifluorescencia, microscopía confocal, fluorescencia de reflexión interna total y microscopía de barrido con láser de dos fotones para el estudio de la activación de linfocitos, pero normalmente requieren el etiquetado de anticuerpos o proteína conjugada para rastrear y cuantificar las células (Balagopalan et al. (2011) *Nat. Rev. Immunol.* 11: 21 - 33; Delon y otros (2002) *Immunol. Rev.* 189: 51 - 63). Esto limita la aplicabilidad a los estudios de los linfocitos T debido a las ineficiencias de transducción asociadas con diversos fenotipos, así como la diferenciación progresiva hacia el agotamiento o la senescencia durante el cultivo *in vitro*, como se requiere para las técnicas típicas de marcaje de fluorescencia (Sauce et al. (2002) *J. Hematother. Stem Cell Res.* 11: 929-940; Tran et al. (2008) *J. Immunother.* 31: 742 -751). El documento WO 2013/019984 describe un método de interferometría de célula viva (LCI) para la cuantificación rápida en tiempo real de la masa celular en células expuestas a un entorno cambiante.

45 RESUMEN

[0005] Se proporcionan métodos para la identificación de linfocitos T útiles que responden a antígenos de células diana específicas por 1) el aumento de su masa a través de la activación celular; y/o 2) aumentar su tasa de acumulación de masa a través de la activación; y/o 3) disminuir la masa de células diana a través de la muerte de la célula diana. Los cambios en la masa de las células T y/o las células diana (portadores de antígenos diana) se identifican utilizando técnicas ópticas de imagen sin marca (por ejemplo, LSI, interferometría de cizallamiento lateral, microscopía holográfica digital, y similares).

[0006] Por consiguiente, en diversos aspectos, los métodos contemplados en este documento pueden incluir, pero no tienen por qué limitarse a, una cualquiera o más de las siguientes realizaciones:

Realización 1: Un método para identificar receptores de células T que responden a antígenos de células diana específicos, incluyendo dicho método: proporcionar un sustrato que porta una pluralidad de células diana; poner en contacto dichas células diana en dicho sustrato con células T CD8⁺; y el uso de imágenes ópticas sin etiquetas para identificar un aumento en la masa de una célula T y/o una disminución en la masa de una célula diana, donde un aumento en la masa de una célula T y/o una disminución en la masa de una célula diana es un indicador de que dicha célula T porta un receptor de células T activado por antígenos presentados en dicha célula diana.

Realización 2: El método de la realización 1, en el que se detecta un aumento en la masa de una célula T e

indica que dicha célula T porta un receptor de célula T activado por antígenos presentados en dicha célula diana.

5 Realización 3: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que una disminución en la masa de células diana indica que la célula T en contacto porta un receptor de células T activado por antígenos presentados en dicha célula diana.

Realización 4: El método de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 3, en el que la muerte de las células diana se controla de forma cualitativa usando microscopía óptica.

10 Realización 5: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-4, que incluye además seleccionar y/o aislar las células T que están activadas.

15 Realización 6: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-5, que incluye además seleccionar y cultivar o almacenar células T que están activadas.

Realización 7: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 5-6, en el que dicho método incluye seleccionar células T activadas usando un micromanipulador.

20 Realización 8: De acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 5-7, que incluye además la clonación de receptores de células T de células T que se seleccionan.

Realización 9: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-8, en el que dichas células diana están en medios estáticos.

25 Realización 10: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-8, en el que dichas células diana están dispuestas en un microcanal.

Realización 11: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-8, en el que dichas células diana están dispuestas en micropocillos sobre un sustrato.

30 Realización 12: El método de la realización 11, en el que dicho sustrato incluye al menos 10 micropocillos.

Realización 13: El método de la realización 11, en el que dicho sustrato incluye al menos 100 micropocillos.

35 Realización 14: El método de la realización 11, en el que dicho sustrato incluye al menos 1000 micropocillos.

Realización 15: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 11-14, en el que dichas células T se introducen en dichos micropocillos.

40 Realización 16: El método de la realización 15, en el que los micropocillos contienen en promedio de aproximadamente 1 célula T por pocillo.

45 Realización 17: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 11-16, en el que dichos micropocillos se fabrican a partir de un polímero.

Realización 18: El método de la realización 17, en el que dichos micropocillos se fabrican a partir de un polímero con un índice de refracción aproximadamente igual al del agua (por ejemplo, MY133, un polímero curable por UV de polímeros MY).

50 Realización 19: El método de la realización 17, en el que dichos micropocillos se fabrican a partir de PDMS.

Realización 20: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 11-16, en el que dichos micropocillos se graban en un sustrato de silicio.

55 Realización 21: El método según cualquiera de las realizaciones 1-20, en donde dicho sustrato es reflectante.

Realización 22: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-21, donde dicho uso de imágenes ópticas sin etiquetas incluye detectar un desplazamiento de fase en la luz que pasa a través de dicha(s) célula(s) causado por el cambio en la masa de células T y/o masa celular

60 Realización 23: El método de la realización 22, en el que dicha formación de imágenes ópticas sin etiquetas incluye una microscopía de imágenes de fase cuantitativa.

65 Realización 24: El método de la realización 23, en el que dicha formación de imágenes ópticas sin etiquetas incluye un método seleccionado del grupo que consiste en interferometría de células vivas (LCI), holografía digital e interferometría de cizallamiento lateral.

- 5 Realización 25: El método de la realización 24, donde dicha formación de imágenes ópticas sin etiquetas incluye interferometría de células vivas que incluye: proporcionar dicho sustrato en una cámara de observación de un microscopio de interferencia adaptado para medir un desplazamiento de fase fraccional entre un haz de luz de prueba y un haz de luz de referencia; exponer la célula a un haz de luz de prueba a una longitud de onda de iluminación; medir el desplazamiento de fase fraccional entre el haz de luz de prueba que pasa a través de la célula y el haz de luz de referencia; y usar dicho desplazamiento de fase fraccional o un parámetro derivado del mismo como una medida del aumento en la masa de la célula T y/o la disminución en la masa de la célula diana.
- 10 Realización 26: El método de la realización 25, en el que dicho desplazamiento de fase fraccional está integrado sustancialmente en el área proyectada de la célula cuyo cambio de masa se está determinando.
- 15 Realización 27: El método de la realización 25, donde dicha medida del aumento de la masa de la célula T y/o la disminución de la masa de la célula diana se calcula como el parámetro $m = \frac{\Delta \phi}{\lambda} A$ donde $\Delta \phi$ es el desplazamiento de fase fraccional medido, λ es la longitud de onda de iluminación, y la integración se realiza en un área de célula completa cruzada, A .
- 20 Realización 28: El método de la realización 25, en el que dicha medida del aumento de la masa de la célula T y/o la disminución de la masa de la célula diana se calcula como $m = k \Delta \phi A$ donde m es la masa seca de la célula, $\Delta \phi$ es el cambio de fase medido, k es un factor de conversión en masa tomado como $5,56 \text{ pg}/\mu\text{m}^3$, y A es el área proyectada.
- 25 Realización 29: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 25-28, en el que el método se realiza usando un sistema de interferometría de células vivas, incluyendo: un detector acoplado operativamente a un microscopio; una cámara de muestra (cámara de formación de imágenes de perfusión) que contiene dicho sustrato que incluye una pluralidad de mirilla; y un interferómetro que incluye un divisor de haz, un espejo de referencia y una cámara de fluido de referencia que compensa la longitud del camino óptico a través de la cámara de muestra.
- 30 Realización 30: El método de la realización 29, en el que la cámara de muestra incluye al menos un conducto de perfusión adaptado para hacer circular un medio celular dentro de la cámara.
- 35 Realización 31: El método de la realización 16, en el que el sistema de interferometría de células vivas incluye un elemento de procesador y un elemento de almacenamiento de memoria adaptado para procesar y almacenar una o más imágenes de células.
- 40 Realización 32: El método de la realización 24, en el que dicha formación de imágenes ópticas sin etiquetas incluye interferometría de cizallamiento lateral usando un interferómetro de cizallamiento lateral de cuatro bandas montado en un microscopio de luz blanca de transmisión.
- 45 Realización 33: El método según una cualquiera de las realizaciones 1-32, en el que la masa de la(s) célula(s) se observa una pluralidad de veces para observar cómo cambia la masa de la(s) célula(s) durante un período de tiempo.
- 50 Realización 34: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-33, en donde el método se usa para cuantificar masas de una pluralidad de células.
- 55 Realización 35: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-34, en donde el método se usa para cuantificar masas de al menos 1.000 células diferentes.
- 60 Realización 36: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-34, en el que el método se usa para cuantificar masas de al menos 10.000 células diferentes.
- 65 Realización 37: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-36, en el que dichas células diana comprenden células cancerosas.
- Realización 38: El método de la realización 37, en el que dichas células diana comprenden células de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), carcinoma adrenocortical, cáncer relacionado con el SIDA (*p. ej.*, sarcoma de Kaposi, linfoma), cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoideo/rabdoideo atípico, cáncer de vías biliares, cáncer extrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de hueso (*p. ej.*, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, histiocitoma fibrosa maligna), glioma de tronco encefálico, tumores cerebrales (*p. ej.*, astrocitomas, tumores cerebrales y de la médula espinal, glioma de tronco cerebral, tumor teratoideo/rabdoideo atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, tumores de células germinales del sistema nervioso central, craneofaringioma,ependimoma, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma burkitt, tumores carcinoides (*p. ej.*, infancia, gastrointestinal), tumores cardíacos, cáncer cervical, cordoma, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (LMC), trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal,

craneofaringioma, cáncer cutáneo, linfoma de células, cánceres de conductos, por ejemplo (bilis, extrahepática), carcinoma ductal *in situ* (DCIS), tumores embrionarios, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, estesioneuroblastoma, tumor de células germinales extracraneales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo (por ejemplo, melanoma intraocular, retinoblastoma), histiocitoma fibroso de hueso, maligno y osteosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumores estromales gastrointestinales (GIST), tumores de células germinales (*p. ej.*, cáncer ovárico, cáncer testicular, cánceres extracraneales, cánceres extragonadales, sistema nervioso central), tumor trofoblástico gestacional, cáncer de tronco encefálico, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular (hígado), histiocitosis, cáncer de células de Langerhans, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, tumores de células de islotes, tumores neuroendocrinos pancreáticos, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (por ejemplo, células renales, Tumor de Wilm y otros tumores renales), histiocitosis de células de Langerhans, cáncer laríngeo, leucemia, linfoblástica aguda (ALL), mieloides aguda (AML), linfocítica crónica (LLC), mielógena crónica (CML), células peludas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado (primario), carcinoma lobular *in situ* (LCIS), cáncer de pulmón (*p. ej.*, infancia, célula no pequeña, célula pequeña), linfoma (*p. ej.*, relacionado con el SIDA, Burkitt (*p. ej.*, linfoma no Hodgkin), células T cutáneas (*p. ej.*, micosis fungoide, síndrome de Sezary), Hodgkin, no Hodgkin, sistema nervioso central (SNC) primario, macroglobulinemia, Waldenström, cáncer de mama masculino, histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma, melanoma (*p. ej.*, infancia, intraocular (ojo)), carcinoma de célula Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico, carcinoma de la línea media, cáncer de boca, neoplasias de neoplasia endocrina múltiple, neoplasia de mieloglias/células plasmáticas múltiples, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, leucemia mielógena crónica (LMC), mieloma múltiple, cáncer de cavidad nasal y seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral, cáncer de labio y orofaringe, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, tumores neuroendocrinos pancreáticos (tumores de células de islotes), papilomatosis, paraganglioma, paranasal cáncer de cavidad nasal y sinusal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central (SNC), cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (riñón), pelvis renal y uréter, cáncer de células transicionales, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma (*p. ej.*, Ewing Kaposi, osteosarcoma, radomiosarcoma, tejido blando, uterino), síndrome de Sezary, cáncer de piel (*p. ej.*, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de células basales, no melanoma), cáncer de intestino delgado, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso con cáncer ocular primario gástrico (gástrico), cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico, cáncer de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer de endometrio, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilm.

Realización 39: El método de la realización 37, donde dichas células diana comprenden células de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer testicular, cáncer ovárico, leucemia, un linfoma, un melanoma, un sarcoma de tejido blando, cáncer testicular y cáncer de tiroides.

Realización 40: El método de la realización 37, en el que dichas células diana comprenden células madre cancerosas.

Realización 41: El método de la realización 37, en el que dichas células diana comprenden células metastásicas.

Realización 42: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-36, en el que dichas células diana comprenden células infectadas con un patógeno.

Realización 43: El método de la realización 42, en el que dichas células diana comprenden células infectadas con un patógeno seleccionado del grupo que consiste en una bacteria, un hongo y un virus.

Realización 44: El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-36, en el que dichas células diana comprenden células recombinantes transfectadas con una construcción que expresa una proteína o péptido heterólogo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0007]

La Figura 1 ilustra esquemáticamente una realización de un interferómetro de célula viva (LCI). En esta realización ilustrativa, pero no limitativa, el LCI comprende un microscopio de interferencia de tipo Michelson que compara el espesor óptico de una célula de referencia con el espesor óptico de las muestras colocadas en la cámara de observación. Suspendido en la cámara de observación es un sustrato reflejado, lo que permite que el LCI haga mediciones de espesor óptico en células transparentes. La posición relativa del objetivo del microscopio y la cámara de observación pueden controlarse por computadora y pueden trasladarse en tres dimensiones, lo que permite una adquisición rápida y automatizada de la imagen. El interferómetro de células

vivas es capaz de medir la masa de células adherentes y no adherentes.

Las Figuras 2A y 2B ilustran que LCI mide la masa de T y las células diana. Figura 2A: Flujo de trabajo para experimentos de medición de masa de células T donantes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se transducen con el F5 TCR específico de MART1 y se enriquecen para las células T CD8+. Un subconjunto de estas células T se analiza mediante citometría de flujo para confirmar una eficacia de transducción superior al 50%. Las células restantes se muestran en el LCI con células diana M202 que expresan MART1, con compatibilidad HLA (o control no coincidente). Figura 2B: datos de LCI de muestra que muestran el desplazamiento de fase y las distribuciones de masa en una célula T CD8+ activada, transducida con F5, varias células T que no responden, y una célula diana moribunda.

La Figura 3, paneles AE, ilustra la transducción de PBMC enriquecidas con CD8+. (A) Datos de citometría de flujo de células T transducidas que muestran la eficacia de transducción típica de PBMC donantes. (Panel B) Citometría de flujo de población enriquecida en CD8+ que muestra la eficacia del enriquecimiento de células T CD8+. (Panel C) Ensayo de liberación de IFN γ que valida la activación de células T enriquecidas con CD8+ transducidas por F5 después del cocultivo con células M202 que expresan MART1 compatible con HLA. Las células M207 de control negativo expresan MART1, pero están mal adaptadas a HLA. (Panel D) Masa vs. tiempo de la célula M202 saludable mostrada en (Panel E), que demuestra la capacidad de las células diana en la etapa del interferómetro.

La Figura 4, paneles A-M, ilustra el seguimiento de LCI de la muerte de la célula diana durante la citotoxicidad mediada por células T. Paneles A-H: imágenes de un solo evento citotóxico que ocurre inmediatamente después del inicio de la formación de imágenes ($t = 0$ es aproximadamente 30 minutos después de colocar CTL en las células diana). Paneles A-D: imágenes de intensidad en $t = 0$ y 5 h de imágenes que demuestran la destrucción de células diana mediadas por CTL. Las casillas en el panel A y el panel C indican la subregión en el panel de imágenes B y el panel D. Las flechas en el panel B y el panel D indican la célula diana rastreada por el perfil de masa en (paneles E-I). Panel E: perfil de masa de LCI de la célula diana seleccionada después del inicio del contacto persistente con una célula diana al comienzo de la imagen. Paneles F-H: perfil de masa de LCI de la célula diana moribunda. Panel I: masa total medida vs. tiempo para la célula diana mostrada en paneles E-H. Panel J: masa normalizada de células diana muertas frente a sanas con el tiempo. La masa normalizada es la masa dividida por la masa inicial. Las células sanas muestran aproximadamente un 15% de aumento en la masa normalizada durante 4 h (la línea azul indica una media de células M202 sanas $n = 311$), la región gris indica +/- DE). Las células diana muertas (líneas rojas) muestran una disminución en la masa de 20 a 60% durante 1-4 h. Panel K: imagen de intensidad de la ubicación del escenario mostrada en el panel A y el panel C después de 18 h de formación de imágenes, que muestra la muerte casi completa de las células diana. Panel L: imagen de intensidad de la etapa después de 18 h de formación de imágenes de células M202 sembradas con células T CD8+ no transducidas (F5-) que muestran la viabilidad de células diana sembradas con células T no específicas. Panel M: masa normalizada frente al tiempo para $n = 2058$ células M202 sanas tratadas con CTL de control no traducidas, que muestran aproximadamente un 15% de incremento en la masa durante 4 h.

La Figura 5, paneles A-F, ilustra la medición de LCI de la masa de CTL y la tasa de acumulación de masa durante la citotoxicidad mediada por células T. Panel A: Masa versus tiempo de un CTL activado y la célula diana correspondiente. $t = 0$ h es el punto en el que la célula diana se separa del sustrato al comienzo de la muerte celular. La célula diana CTL+ se refiere a la masa total de ambas células en cuadros donde no se pudieron medir por separado. Panel B: masa normalizada versus tiempo de 10 eventos de citotoxicidad mediados por CTL. La masa de CTL se normaliza con relación a la masa en el momento del cambio de morfología de la célula diana, que se usa como el punto $t = 0$ h para todos los rastros. Las líneas grises muestran las mejores líneas de ajuste utilizadas para determinar las tasas de acumulación masiva. Panel C: Tasa promedio de acumulación de CTL antes de un evento citotóxico, durante los primeros 100 minutos de un evento citotóxico y después de los primeros 100 minutos de un evento citotóxico que demuestre un aumento de aproximadamente 4 veces en la acumulación de masa durante los primeros 100 minutos de un evento citotóxico. Panel D: imagen de LCI de 9 células T insensibles y 1 célula T citotóxica que ilustra una diferencia de aproximadamente 3 veces en la masa. La flecha blanca indica la célula T activada, determinada por el seguimiento de esta célula después del contacto persistente con la célula diana y la posterior muerte de la célula diana. Panel E: la masa promedio de 116 CTL activados es aproximadamente 2,8 veces mayor que la masa promedio de controles que no responden. Panel F: el área promedio de los CTL activados es solo aproximadamente 1,4 veces mayor que los controles no activados y no significativos al 95% del nivel de confianza, lo que ilustra la utilidad de las mediciones masivas de LCI para determinar la activación de los CTL. Las barras de error en C muestran intervalos de confianza del 95%. Barras de error en E y F muestran +/- DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 10^{-3}$. acto = activado/citotóxico, 116 células, $n = 3$ experimentos. inact = inactivo/no responde, 359 células, $n = 3$ experimentos. F5- = no transducido, experimento de control negativo F5, 530 células, $n = 2$ experimentos. PC3 = PC3 célula, control de antígeno irrelevante HLA-discordante, 3015 células, $n = 3$ experimentos.

Las Figuras 6A-6F muestran imágenes de un video de cuatro paneles que muestran imágenes de intensidad, imágenes de distribución de masa y masa frente al tiempo de una célula M202 diana muerta por una célula T citotóxica (CD8+, F5 TCR transducido) en el transcurso de 5 horas de observación por parte de LCI. Figura 6A:

tiempo 0; Figura 6B: tiempo 1 hora; Figura 6C: tiempo 2 horas; Figura 6D: tiempo 3 horas; Figura 6E: tiempo 4 horas; Figura 6F: tiempo 5 horas.

La Figura 7, paneles A-D, muestra diagramas de masa normalizada versus gráficos de tiempo para las condiciones de crecimiento de células diana de control que muestran un crecimiento robusto en la etapa de LCI, y especificidad de la citotoxicidad mediada por células T. Panel A: células M202 no afectadas ($n = 632$) durante el tratamiento con células T CD8+ transducidas con F5 TCR. Panel B: células M202 ($n = 117$) antes del tratamiento con células T CD8+ transducidas con F5 TCR. Panel C: células M202 ($n = 2058$) tratadas con células T CD8+ negativas para F5 TCR. Panel D: células de cáncer de próstata PC-3 irrelevantes para antígenos ($n = 1006$) tratadas con células T CD8+ transducidas con F5 TCR. La línea muestra la masa media normalizada frente al tiempo (normalizada con relación a la masa en el primer punto de tiempo). La región sombreada muestra la media +/- DE.

La Figura 8, paneles A-C, muestra la masa normalizada promediada frente al tiempo para las células T que no responden, mostrando un crecimiento constante en la etapa de LCI. Panel A: células T CD8+ transducidas F5 TCR irrelevantes ($n = 101$) agrupadas con células diana M202. Panel B: células T CD8+ no transducidas ($n = 146$) sembradas con células diana M202. Panel C: células T CD8+ transducidas con F5 TCR ($n = 950$) revestidas con células diana de cáncer de próstata PC-3 irrelevantes para antígenos.

La Figura 9, paneles A-H, muestra imágenes de intensidad de las células en la etapa del interferómetro después de 18 h de formación de imágenes que muestran condiciones típicas de células diana. La columna izquierda muestra el fotograma completo de la imagen, la columna derecha muestra un subconjunto del fotograma completo. Paneles A-D: células diana M202 sembradas con T5 TCR transducidas con F5, células T CD8+ que muestran la muerte casi completa de las células diana. Por comparación, (paneles A y B) muestran el mismo campo de visión que en la Figura 3, paneles A-F. Los paneles C y D muestran una única célula viva. Paneles E y F: células diana M202 sembradas con células T CD8+ no transducidas que muestran la viabilidad en la etapa después de 18 h de imágenes y el requisito de TCR relacionado para la citotoxicidad mediada por células T. Paneles G y H: Antígeno - células diana de cáncer de próstata PC-3 irrelevantes sembradas con células T CD8+ transducidas con F5 TCR que muestran la especificidad del F5 TCR.

La Figura 10, paneles A-J, muestra gráficas de masa frente a tiempo para CTL y células diana correspondientes, como en la Figura 5, panel A. $t = 0h$ es el punto en el que la célula diana se separa del sustrato al comienzo de la muerte celular. CTL + célula diana se refiere a la masa total de ambas células en marcos en los que no se podían medir individualmente, normalmente debido a la superposición entre el CTL y la célula diana.

Figura 11A masa y Figura 11B histogramas de área para células T activadas y que no responden, en relación con experimentos de control. Activado = células T transducidas F5 TCR activadas/citotóxicas, 116 células, $n = 3$ experimentos. Sin activar = células T transducidas F5 TCR sin activar/sin respuesta, 359 células, $n = 3$ experimentos. F5neg = células T negativas F5 TCR no transducidas revestidas con células diana M202, 530 células T, $n = 2$ experimentos. PC3 = células T transducidas F5 TCR sembradas con células de cáncer de próstata PC-3 irrelevantes con antígeno HLA, 3.015 células T, $n = 3$ experimentos

La Figura 12 muestra una ilustración esquemática de una pluralidad de micropocillos en un sustrato para uso en el aislamiento de células T.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0008] La identificación de receptores de células T (TCR) contra antígenos conocidos o desconocidos es un importante cuello de botella en el desarrollo de terapias inmunológicas de cáncer para una variedad de razones, incluyendo la baja frecuencia de los TCR dirigidos contra autoantígenos, la baja afinidad de TCR deseados, y la pequeña cantidad de tejido disponible por paciente. Los enfoques existentes para medir las respuestas de células T se basan en ensayos a granel o sustitutos, no determinan directamente la eficacia de la citotoxicidad mediada por células T, y son ineficientes y propensos a errores para el aislamiento de estas células T raras.

[0009] Los métodos mejorados para la identificación, de forma aislada, y caracterización de linfocitos T deseables con especificidad hacia antígenos deseados descritos aquí. En diversas realizaciones, los métodos utilizan imágenes ópticas sin etiqueta para identificar cambios en la masa de células (por ejemplo, un aumento en la masa de una célula T y/o una disminución en la masa de una célula diana) como un indicador de la activación de las células T cuando las células T se presentan con células diana que portan un antígeno relacionado.

[0010] En diversas realizaciones, se proporciona un sustrato sobre el que están dispuestas una pluralidad de células diana (por ejemplo, células cancerosas, células infectadas con un patógeno, las células que expresan un marcador característico, las células transfectadas con un constructo para expresar recombinantemente una proteína o péptido, etc.). Las células diana se ponen en contacto con linfocitos T citotóxicos (CTL) y aquellos CTL formando rebabas a un receptor de células T que reconoce/es activado por un antígeno presente por la(s) célula(s) dianas aumentan su masa. A medida que la célula diana muere, esa célula muestra una disminución en la masa. Por lo tanto, un

aumento en la masa de una célula T y/o una disminución en la masa de una célula diana es un indicador de que la célula T porta un receptor de célula T activado por antígenos presentados en la célula diana.

[0011] Mediante el seguimiento de cambios de masa de células T y diana usando métodos de imagen óptica libre de la etiqueta, p. ej., como se describe en el presente documento, los métodos permiten mediciones directas de la diana y de responder las células T durante la citotoxicidad medida por células T para facilitar la clonación de TCR para uso en inmunoterapia adoptiva contra el cáncer. Estos métodos pueden usarse de manera similar para identificar células T que son activadas por células infectadas con patógenos (p. ej., Células infectadas con virus, bacterias, hongos, etc.), para identificar células que expresan (p. ej., expresan recombinantemente) péptidos o proteínas particulares, y similares.

[0012] Más específicamente, en diversas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden ser explotados para identificar linfocitos T útiles que responden a antígenos de células diana específicas por 1) aumentar su masa a través de activación celular; y/o 2) aumentar su tasa de acumulación de masa a través de la activación; y/o 3) disminuir la masa de células diana a través de la muerte de la célula diana. Esto es una mejora sobre el arte existente en que cuantifica directamente la respuesta de linfocitos T citotóxicos en una población compleja a nivel de célula individual.

[0013] En diversas realizaciones, el cambio en la masa celular se determina usando diversas técnicas de formación de imágenes de microscopía de fase interferométrica y/o cuantitativa. Los métodos de imagen ilustrativa pero no limitante incluyen, entre otros, interferometría de células vivas (LCI), holográfica digital e interferometría de cizallamiento lateral. Sin embargo, muchos sistemas y métodos de microscopía pueden adaptarse para su uso con los métodos descritos en este documento. En consecuencia, ciertas realizaciones pueden usar microscopios ópticos de exploración, microscopios confocales y similares. Una lista ilustrativa y no limitativa de publicaciones que describen métodos y materiales de perfil óptico que pueden adaptarse para su uso con los métodos descritos en este documento incluyen, pero no están limitados a la Solicitud de Patente de EE.UU. N^{os}: 2010/0284016; 2005/0248770; 2005/0225769; 2005/0200856; 2005/0195405; 2005/0122527; 2005/0088663; 2004/0252310; 2005/0117165; 2003/0234936; 2004/0066520; 2008/0018966; 2005/0167578, y similares.

[0014] la interferometría de células vivas (u otra técnica de obtención de imágenes de fase cuantitativa, incluyendo microscopio digital holográfico, una cámara interferométrica de cizallamiento lateral conectada a un microscopio ordinario con capacidad de imágenes de células vivas, y similares) se pueden utilizar para perfilar ópticamente la respuesta en masa de un cocultivo de células diana y CTL candidatos. En ciertas realizaciones, el cribado se realiza en células diana dispuestas sobre un sustrato. En ciertas realizaciones, el cribado puede realizarse en micropocillos de matriz (por ejemplo, matrices que comprenden más de 100, o más de 1.000, o más de 10.000 micropocillos) fabricados por ataque químico en un sustrato o formación en un polímero (por ejemplo, PDMS, un polímero con un índice de refracción aproximadamente igual al del agua tal como MY133, un polímero curable por UV de MY polímeros, y similares). En ciertas realizaciones, el rastreo se realiza en una matriz de aproximadamente 1.000 o 5.000, o de 10.000 a 15.000, o 20.000, o 25.000 micropocillos microfabricados en PDMS o MY133 (véase, por ejemplo, la Figura 12).

[0015] En ciertas realizaciones para LCI, las células diana (o los micropocillos que contienen las células diana) están dispuestas sobre un sustrato reflectante (por ejemplo, un sustrato de silicio reflectante). Las células diana pueden cultivarse en este sustrato y/o en los micropocillos. Entonces se pueden agregar células T (por ejemplo, células T CD8+) (p. ej., sembrar en el dispositivo a una densidad de aproximadamente una célula CD8+ por pocillo).

[0016] La estructura de micropocillo permite la perfusión de medios en las células sin permitir que las células T floten fuera del campo de microscopio de vista. En ciertas realizaciones, como se indicó anteriormente, los micropocillos se pueden omitir particularmente cuando se cultivan las células en medios estáticos.

[0017] En ciertas realizaciones la pantalla para las células diana puede comprender uno o más de los tres pasos siguientes para reducir los falsos positivos que impondrían una carga innecesaria sobre los esfuerzos de clonación de TCR:

1. Monitorear la muerte de las células diana cualitativamente usando imágenes de intensidad del microscopio; y/o
2. Averiguar la cinética de disminución de masa de la célula diana para confirmar que es consistente con un evento citotóxico; y/o
3. Averiguar la cinética de aumento de masa de la célula T activada para confirmar que su comportamiento es consistente con el de una célula T activada.

[0018] En ciertas realizaciones CTLS diana identificados por este método de detección se pueden retirar de los micropocillos, por ejemplo, usando un micromanipulador, y se almacenan para clonación TCR o análisis de aguas abajo, y/o se pueden registrar en una base de datos.

Interferometría de células vivas.

[0019] En ciertas realizaciones los cambios de masa de la(s) célula(s) T y/o célula(s) diana se detectan usando interferometría de células vivas (LCI). La interferometría de células vivas (LCI) es una técnica de microscopía de fase cuantitativa y sin etiquetas que cuantifica la respuesta de la masa de células enteras en varias horas y es especialmente adecuada para trabajar con muestras de pacientes para identificar TCR contra antígenos conocidos o desconocidos. Brevemente, la interacción de la luz con la materia ralentiza la luz a medida que pasa a través de una célula, lo que da como resultado un cambio medible en la fase. Al cuantificar este cambio de fase en toda la célula, la masa de la célula se puede determinar con mucha precisión. Se ha demostrado que el LCI puede usarse para perfilar la respuesta de masa o la tasa de acumulación masiva de cientos o miles de células simultáneamente en condiciones de cultivo controladas (véase, por ejemplo, publicación PCT N° WO2013019984 A1 (PCT/US2012/049388)). Aquí, utilizamos el LCI como una plataforma para interrogar a miles de células diana cuando actúan sobre las células T citotóxicas candidatas (CTL). Como se muestra en las Figuras 2-5, la sensibilidad del LCI permite la identificación de CTL sobre la base de su efecto sobre la masa de la célula diana (disminución de la masa de la célula diana a medida que muere) y la masa del CTL durante la activación (aumento masivo). La naturaleza de alto rendimiento de LCI permite la identificación de CTL individuales como objetivos para la clonación de TCR.

[0020] Este enfoque ilumina fundamentos de citotoxicidad mediada por células T, incluyendo la cinética y la variabilidad de la acumulación de la masa de células T durante la respuesta de célula T y la cinética y la variabilidad de la disminución de la masa de células diana debido a la citotoxicidad mediada por células T.

[0021] Este enfoque también proporciona una plataforma generalizada para identificar directamente los CTL sin el uso de ensayos sustitutos. Midiendo directamente la respuesta de masa de los linfocitos durante la activación, el sistema proporciona una plataforma para identificar y seleccionar de manera amplia los linfocitos de interés en función de parámetros biofísicos clave, como el aumento de masa durante la activación.

[0022] La interferometría de células vivas (LCI) es una técnica de microscopía óptica sin etiquetas que mide respuestas de células enteras. En ciertas realizaciones, LCI usa un interferómetro de tipo Michelson para comparar el espesor óptico de las células vivas en una cámara de muestra con el espesor óptico del fluido en una cámara de referencia y también cuantifica la diferencia de espesor óptico entre una célula y sus medios circundantes (Reed et al. (2011) *Biophys. J.* 101: 1025-1031; Reed et al. (2008) *ACS Nano*, 2: 841-846) (véase, p. ej., Figura 1). La diferencia de espesor óptico debido a la interacción de la luz con la biomasa celular es linealmente proporcional a la densidad del material de una célula (Ross (1967). *Microscopio de contraste de fase y de interferencia para los biólogos celulares*. Londres: Edward Arnold, xxi, 238 pp.) En función de esta interacción, la masa celular puede relacionarse con el retraso de la fase medida de la luz que pasa a través de cada célula con una precisión del 2% en la masa celular total (Reed y otros (2011) *Biophys. J.* 101: 1025-1031; et al. (2008) *ACS Nano*, 2: 841-846; Ross (1967) *Microscopio de contraste de fase y de interferencia para biólogos celulares*. Londres: Edward Arnold, xxi, 238 pp.). Prácticamente, LCI produce mediciones de masa y acumulación de masa o tasas de pérdida de 100-400 células simultáneamente por ubicación de imagen dentro de 1-5 h de formación de imágenes (Reed y otros (2011) *Biophys. J.* 101: 1025-1031). Con mediciones automatizadas cada 2-5 minutos para permitir el seguimiento preciso y la determinación de la masa durante los eventos citotóxicos en 20-50 ubicaciones de imágenes, esta técnica puede cuantificar la masa de 2.000 a 20.000 células.

[0023] Como se ilustra en los ejemplos, en LCI, tras colección de imágenes, los datos de cambio de fase ligera pueden corregir errores de envoltura de fase que son causados por la ambigüedad de longitud de onda número entero inherente en imagen de fase cuantitativa (Ghiglia y Pritt, (1998) *Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms, and Software*: John Wiley y Sons). El resultado es un mapa de desplazamientos de fase a través de cada célula que se puede convertir en un mapa de densidad de masa seca local (Figura 2B). La masa seca total de una célula se puede cuantificar como la suma de las densidades locales (Reed y otros (2011) *Biophys. J.* 101: 1025-1031; Ross (1967). *Microscopio de contraste de fase y de interferencia para los biólogos de células*. Londres: Edward Arnold. xxi, 238 páginas, Mir et al. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 108: 13124-13129):

$$m = k \int \phi \lambda dA, \quad (1)$$

donde m es la masa seca de la célula, $\phi \lambda$ es el desplazamiento de fase medido, k es el factor de conversión de masa, y A es el área proyectada. En ciertas realizaciones, el factor de conversión de masa (Barer (1952) *Nature* 169: 366 - 367; Mir et al. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 108: 13124-13129), que es una medida del cambio en la densidad por unidad de cambio en el índice de refracción ($\Delta\rho/\Delta n$), puede tomarse como $k = 5,56 \text{ pg}/\mu\text{m}^3$ (Ross (1967) *Microscopio de contraste de fase y de interferencia para biólogos celulares* Londres: Edward Arnold, xxi, 238 pp.). Este parámetro, k , puede medirse como un cambio en el índice de refracción relativo al índice de refracción del agua, por lo tanto, la masa celular medida de esta manera es la masa seca celular o la masa de todo dentro de la célula distinta del agua.

[0024] Se reconocerá, sin embargo, que la masa (m) de las células no tiene que ser calculada. Simplemente una

detección del cambio en la masa puede proporcionar una lectura suficiente para los métodos descritos en este documento. En ciertas realizaciones, esto puede proporcionarse simplemente mediante una medida del desplazamiento de fase, el desplazamiento de fase integrado sobre el área proyectada de la célula (A), o como uno o más parámetros derivados de cualquiera de estas mediciones.

5 **[0025]** Los enfoques descritos en este documento rastrean directamente la citotoxicidad mediada por linfocitos T en el nivel de células individuales sin etiquetado mediante la cuantificación de la masa de CTL individuales y sus células diana afines. Los eventos citotóxicos únicos se identifican y evalúan a lo largo del tiempo en una población mixta, utilizando los datos de masa para confirmar eventos de citotoxicidad mediados por células T individuales. Como una prueba de concepto, demostramos el seguimiento de hasta 2.000 CTL individuales con especificidad hacia el antígeno melanocítico reconocido por linfocitos T (MART1) que responden contra las células diana MART1 + del antígeno leucocitario humano (HLA) (Johnson et al., (2006) J Immunol. 177: 6548 - 6559) (véase, Ejemplo 1). Las células diana son creadas por el LCI para establecer una tasa de acumulación de masa de línea de base. Los CTL luego se colocan en placas en las células diana y los eventos citotóxicos individuales se identifican como una disminución característica en la masa de células diana después del contacto con una célula T correspondiente.

10 **[0026]** Está bien establecido que las células T aumentan de tamaño durante la activación (Rathmell et al. (2000) Mol Cell., 6: 683-692). Este aumento de tamaño previamente observado puede ser el resultado de un cambio en la concentración de soluto u osmolalidad dentro de la célula en comparación con un aumento en la biomasa (Tzur et al. (2011) PLoS One, 6: e16053). Hasta ahora, esta ambigüedad no se ha resuelto, pero este resultado proporciona información valiosa sobre el mecanismo de activación de un solo CTL. Usando el enfoque descrito en este documento, se determinó que el aumento de tamaño en los CTL que responden a las células diana se debe a un aumento en la biomasa y que las mediciones de biomasa proporcionan una identificación robusta de las células T activadas. La capacidad de medir la masa de un solo CTL abre varias aplicaciones potenciales aguas abajo que incluyen estudios biológicos de células T pertenecientes a estados metabólicos o de diferenciación, además del análisis de CTL para uso potencial en protocolos de inmunoterapia adoptiva.

15 **[0027]** En realizaciones típicas, el método LCI se puede realizar usando un sistema de interferometría de células vivas que comprende un detector acoplado operativamente al microscopio, un conjunto de muestra que comprende una cámara de observación adaptada para contener la célula, un conjunto de referencia que comprende una cámara de referencia adaptada para contener la célula de referencia y un divisor de haz para dividir un haz de luz de una fuente de luz en un haz de prueba y haz de referencia. En ciertas realizaciones, la cámara de observación comprende al menos un conducto de perfusión adaptado para circular un medio celular dentro de la cámara. En algunas realizaciones, el sistema de interferometría de células vivas comprende un elemento de procesador y un elemento de almacenamiento de memoria adaptado para procesar y almacenar una o más imágenes de la célula. En realizaciones, la masa de una o más células se determina en una pluralidad de veces para observar cómo cambian las células de masa durante un período de tiempo y, opcionalmente, proporcionar cinéticas para tales cambios. Opcionalmente, por ejemplo, los cambios en la propiedad de masa de la célula se observan a lo largo del tiempo para observar un perfil de masa temporal (por ejemplo, la forma específica en que la masa de la célula cambia durante un período de tiempo). Algunas formas de realización incluyen los pasos de comparar un perfil de masa temporal observado a una base de datos de perfiles de masa temporal, seleccionándose la base de datos de perfiles de masa temporal para incluir perfiles de masa temporal que son característicos de la activación de células T y/o célula diana asesina.

45 **Interferometría de cizallamiento lateral.**

[0028] En ciertas realizaciones, el cambio en el tamaño celular (por ejemplo, el desplazamiento de fase óptica introducida por cambios en el tamaño celular) puede determinarse usando interferometría de cizallamiento lateral. La interferometría de cizallamiento lateral es una técnica utilizada para medir los gradientes de fase en una dirección. El frente de onda incidente se replica en dos frentes de onda idénticos pero inclinados. Después de la propagación, su patrón de interferencia mutua se registra, por ejemplo, con una cámara CCD. Los gradientes de fase se recuperan de la deformación marginal, por medio de una deconvolución de Fourier alrededor de la frecuencia marginal del interferograma.

55 **[0029]** La interferometría de ondas múltiples (Primot y Sogno (1995) J. Opt. Soc. Am. A, 12 (12): 2679) extiende este principio a más de una dirección de gradiente. En la interferometría de cizallamiento lateral de cuatro ondas (QWLSI) se crean cuatro réplicas mediante una rejilla de difracción 2D específica. En este caso, dos gradientes a lo largo de dos direcciones perpendiculares se miden y luego se integran para determinar la intensidad del campo y la fase (Primot y Guérineau (2000) Appl. Opt. 39 (31), 5715-5720). La deformación del interferograma se puede interpretar utilizando la óptica de ondas o geométrica. Los métodos de uso de la interferometría de cizallamiento lateral de cuatro bandas para el microscopio de fase cuantitativa de las células vivas son descritos por Bon et al. (2009) Optics Express 17 (15): 13080-13094). Además, los dispositivos para implementar QWLSI en un microscopio convencional están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, el SID4bio® de Phasics SA, Marsella, Francia).

65 **Microscopía holográfica digital**

[0030] La microscopía holográfica digital proporciona una medición cuantitativa de la distribución de longitud del camino óptico que permite células vivas que se describirá con una resolución transversal de difracción limitada y una precisión axial de sub-longitud de onda (véase, por ejemplo, Marquet et al. (2005) Opt. Lett. 30 (5): 468 - 470). La microscopía holográfica digital, como método cuantitativo de imagen de contraste de fase, es un tipo de interferometría óptica que detecta el retardo de fase relacionado con la luz que pasa a través del objeto analizado. Al pasar a través de una muestra relativamente transparente, la intensidad de la luz cambia muy poco, mientras que la luz a través de la muestra se acelera o ralentiza y trae un cambio de fase correspondiente. El retraso o avance de fase depende de la relación del índice de refracción entre la muestra y el entorno circundante. Al ser la información de fase proporcional a la longitud del camino óptico (espesor óptico), se puede calcular un perfil de profundidad y/o tamaño/masa de muestra. Por lo tanto, la holografía digital es particularmente adecuada para medir el objeto de fase, como las células vivas y los elementos microópticos.

[0031] En DHM, la información de frente de onda luz que se origina desde el objeto se registra digitalmente como un holograma, de la que un ordenador calcula la imagen del objeto usando un algoritmo de reconstrucción numérica.

[0032] Para crear el patrón de interferencia, es decir, el holograma, en DHM, la(s) célula(s) se ilumina(n) utilizando una fuente de luz coherente (monocromática), por ejemplo, un láser. La luz del láser se divide en un haz de objeto y un haz de referencia. El haz de objeto expandido ilumina la muestra para crear el frente de onda del objeto. Después de que el objetivo de la onda del objeto es recogido por un objetivo de microscopio, el objeto y los frentes de onda de referencia se unen mediante un divisor de haz para interferir y crear el holograma. Usando el holograma grabado digitalmente, una computadora actúa como una lente digital y calcula una imagen visible o información derivada de ella (por ejemplo, masa celular).

[0033] Métodos DHM adecuados incluyen, pero no están limitados a Fresnel DHM fuera de eje, Fourier DHM, DHM de plano de imagen, DHM en línea, Gabor DHM y holografía digital de desplazamiento de fase.

[0034] La microscopía holografía digital de células se describe, por ejemplo, por Pan et al. (2012) Optics Express, 20 (10): 11496-11505, 2012; Zhang et al. (2011) Chinese Physics Letters, 28 (11): 114209; Kemper et al. (2006) Biophotonics y New Therapy Frontiers, 6191: 61910T-1-8; y Wang et al. (2013) Computational and Mathematic Methods in Medicine 2013, Artículo ID 715843.

EJEMPLOS

[0035] Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Cuantificación de los cambios en la biomasa de células T individuales CD8+ durante la citotoxicidad específica del antígeno

[0036] Los enfoques existentes que cuantifican las respuestas de células T citotóxicas se basan en mediciones a granel o sustitutos que impiden la identificación directa de las células T activadas individuales de interés. Las metodologías de microscopía de células individuales o citometría de flujo típicamente se basan en el etiquetado fluorescente, que limita la aplicabilidad a las células primarias, como los linfocitos T derivados de humanos. Aquí, presentamos un método cuantitativo para rastrear eventos citotóxicos mediados por linfocitos T individuales dentro de una población mixta de células usando interferometría de células vivas (LCI), una técnica de microscopía libre de etiquetas que mantiene la viabilidad celular. LCI cuantifica la distribución de la masa dentro de las células individuales midiendo el desplazamiento de fase causado por la interacción de la luz con la biomasa intracelular. Usando LCI, obtuvimos imágenes de células T citotóxicas que mataban a las células diana análogas. Además de una disminución característica de la masa celular diana de 20-60% durante 1-4 h después del ataque de una célula T, hubo un aumento significativo de 2-3 veces en la masa de células T con respecto a la masa de células T que no respondieron. La medición directa y sin marca de cambios de masa de células T CD8+ y diana proporciona una evaluación cinética y cuantitativa de la activación de células T y un enfoque relativamente rápido para identificar células T derivadas del paciente activadas específicas para aplicaciones en inmunoterapia del cáncer.

Materiales y métodos

Líneas celulares y PBMC.

[0037] M202, M207, (Sondergaard et al. (2010) J. Med. traslacional. 8: 39). PC-3, PG13, y células 293T (ATCC) se mantuvieron rutinariamente a 37°C en 8% de CO₂, utilizando cualquiera de los medios DMEM o RPMI1640 suplementados con FBS al 5%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 2 mmol/l-glutamina. PBMC HLA A2.1 + derivadas de donantes sanos anonimizados se obtuvieron del Centro de Virología del Laboratorio de Virología del SIDA en la UCLA y se congelaron después de la recolección. Las PBMC descongeladas se revivieron en medio completo (CM) más perlas anti CD3/2/28 durante 4 días antes de la infección retroviral. El CM consistió en medio AIM-V (Invitrogen, EE.UU.) complementado con HEPES 25 mmol/L, 5,5 X 10⁻⁵ mol/L de [beta]-

mercaptoetanol y 300 IU/ml de IL-2. Las PBMC estaban en cultivo durante un total de 7-10 d antes de todos los experimentos de imagen. Las células se mantuvieron en medios completos en la plataforma de imágenes de LCI.

Generación de células T CD8+ específicas de MART1.

[0038] El retrovirus F5 se recogió de células PG13 modificadas para producir un vector retroviral que consiste en el F5 TCR con especificidad hacia el fragmento del péptido MART1 ELAGIGLTV, que se expresa mediante las líneas celulares M202 y M207 utilizadas en los experimentos de citotoxicidad. Brevemente, las células 293T se transfectaron con el vector de empaquetamiento pCL-Eco y el vector retroviral basado en MSCV RV-MSCV-F5MART1 TCR. Los sobrenadantes resultantes se usaron para transducir la línea celular de empaquetamiento de retrovirus PG13 murino para la generación de pseudotipo de envoltura del virus de la leucemia del mono de Gibbon (GaLV). Las PBMC se infectaron con el retrovirus que contenía el sobrenadante de PG13 en presencia de Retronectina (Takara, Japón) de acuerdo con el protocolo del fabricante. 48-72 h después de la infección, las células se tiñeron con tetrámero específico de MART1 (Beckman Coulter, EE.UU.) y se analizaron mediante citometría de flujo (FACSCanto, BD Biosciences, EE.UU.). Las células T CD8+ se aislaron mediante enriquecimiento negativo (Stem Cell Technologies, EE.UU.) y la eficacia de enriquecimiento se verificó mediante citometría de flujo.

Medición de IFN γ por citometría de flujo.

[0039] Para verificar la especificidad funcional de las células T CD8+ DMF5 transducidas, un total de 1×10^5 células T fueron co-cultivadas con 1×10^5 células diana (M202 o M207) en una placa de 96 pocillos plana con 200 μ L de medio completo en una incubadora humidificada a 37°C y 8% de CO₂ durante 18 h. La concentración de IFN-gamma en el sobrenadante se determinó mediante citometría de flujo usando el kit Human IFN γ Flow-Cytomix Simplex siguiendo el protocolo del fabricante (eBioscience, EE.UU. Cat N° BMS8228FF).

Mediciones de masa LCI.

[0040] Las células diana se cultivaron en portaobjetos de silicio de 20 mm x 20 mm tratados con una solución de 0,01% de poli-lisina (Sigma) a una densidad de aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células/cm² y se dejaron crecer en una incubadora de cultivo celular durante 48 h antes del inicio de los experimentos de imagen. Se colocó un portaobjetos de silicona con células diana unidas en una cámara de formación de imágenes de células vivas basada en perfusión controlada a temperatura y CO₂ a medida y se obtuvieron imágenes durante aproximadamente 1,5 h antes de la adición de células T. El co-cultivo de la célula diana de la célula T se formató continuamente durante 18 h. Se eligieron 30 ubicaciones de imagen en base a la densidad adecuada de las células diana en el sustrato de silicio y las imágenes recogidas aproximadamente una vez cada 3 a 4 min. La obtención de imágenes se realizó utilizando un generador de perfiles ópticos GT-X8 modificado (Bruker) con una ampliación de 20x (apertura numérica 0,28) con una lente de desvanecimiento de 0,55x para aumentar el campo de visión sin perder la resolución. Se generaron franjas de interferencia usando un interferómetro de tipo Michelson que consiste en un divisor de haz, espejo de referencia y una cámara de fluido de referencia que compensa la longitud del camino óptico a través de la cámara de muestra. Las imágenes se adquirieron utilizando el método de interferometría de desplazamiento de fase (PSI) y la iluminación de un LED acoplado a fibra de 530 nm (Thorlabs). Las imágenes de intensidad representan la intensidad promedio de la imagen sin las franjas de interferencia necesarias para la imagen de fase de Michelson.

Desenvoltura de fase.

[0041] Para eliminar ambigüedades de fase de número entero-longitud de onda inherentes en imágenes de fase cuantitativa (Ghiglia y Pritt, (1998) Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms, and Software: John Wiley & Sons), se realizó el desenvolvimiento de fase usando un script personalizado implementado en Matlab (Mathworks). Primero, realizamos el desenvolvimiento según el método de discontinuidad mínima de Flynn (*Id.*). A continuación, se construyó un conjunto de datos de entrenamiento aplicando manualmente correcciones de longitud de onda única a aproximadamente 200 subimágenes de los datos de fase, seleccionados para la aparición de las células T y de destino de interés. Este conjunto de datos de entrenamiento se utilizó en un análisis discriminante lineal (LDA) para identificar los píxeles que se encuentran en el límite de las regiones envueltas en fase, en base a 16 conjuntos de estadísticas de imágenes, incluida la imagen en bruto, la imagen de intensidad calculada, y los resultados de varios filtros de detección de bordes aplicados a la imagen de fase envuelta. LDA fue seguido por la optimización genética para refinar los resultados de LDA y los umbrales del algoritmo de cuencas hidrográficas utilizados para determinar los límites de las regiones envueltas en fase. Las regiones dentro de los límites determinados por el algoritmo de cuenca hidrográfica aplicado al resultado final de LDA se desplazaron (corrigieron) mediante un desplazamiento de fase de una longitud de onda y una mediana filtrada con un tamaño de núcleo de 3.

Seguimiento masivo.

[0042] Las mediciones de masa de célula individual se realizaron utilizando un script personalizado implementado en Matlab (Mathworks). Brevemente, las imágenes corregidas de fase fueron filtrados en paso bajo gaussiano antes de la segmentación de imágenes basada en la umbralización de Otsu. Finalmente, los objetos identificados por la segmentación de imágenes fueron rastreados utilizando el código de seguimiento de partículas adaptado para

Matlab por Daniel Blair y Eric Dufresne, basado en el algoritmo de rastreo de partículas de Crocker y Grier (1996) Science 179:12. El área celular se determinó usando un umbral basado en un vecindario de 200 píxeles en la imagen de fase cuantitativa.

5 **Estadística.**

[0043] El análisis estadístico se realizó utilizando una de dos colas de prueba T de Student de Welch con varianzas desiguales y tamaños de muestra.

10 **Resultados**

LCI para imágenes cuantitativas de citotoxicidad mediada por células T

15 [0044] Se desarrolló un sistema modelo para el análisis de los eventos de citotoxicidad mediante el establecimiento de la especificidad de linfocitos enriquecidos por donante humano saludable CD8+ contra líneas de células diana emparejadas por HLA. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se transdujeron con un F5 anti-MART1 TCR, que es un TCR de alta afinidad con especificidad hacia MART1 (Johnson et al. (2006) J. Immunol. 177: 6548-6559). Las células diana que expresan MART1 y las células T enriquecidas con CD8+ definidas en antígeno se cocultivaron en una cámara de observación de células vivas en la etapa de LCI y se obtuvieron imágenes durante un período de 18 horas. (Figura 2A). La cámara de observación fue de temperatura controlada y se mantiene el pH por perfusión continua de medios de comunicación en 8% de CO₂. Tras la recopilación de imágenes, los datos de cambio de fase ligera se corrigieron por errores de envoltura de fase causados por la ambigüedad de longitud de onda inherente a la imagen de fase cuantitativa (Ghiglia y Pritt, 1998). Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms, and Software John Wiley & Sons.). El resultado es un mapa de desplazamientos de fase a través de cada célula que se puede convertir en un mapa de densidad de masa seca local (Figura 2B). La masa seca total de una célula se cuantifica como la suma de las densidades locales (Reed y otros (2011) Biophys. J. 101: 1025-1031; Ross (1967) Phase contrast and interference microscopy for cell biologists. Londres,: Edward Arnold, xxi, 238 páginas, Mir et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 108: 13124-13129):

30

$$m = k \int \phi \lambda dA, \quad (1)$$

35

donde m es la masa seca de la célula, $\phi \lambda$ es el desplazamiento de fase medido, k es el factor de conversión de masa, y A es el área proyectada. El factor de conversión en masa (Barer (1952) Nature 169: 366-367; Mir y otros (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 108: 13124-13129), que es una medida del cambio en la densidad por unidad de cambio en el índice de refracción ($\Delta\rho/\Delta n$), se toma como $k = 5,56 \text{ pg}/\mu\text{m}^3$ (Ross (1967) Phase contrast and interference microscopy for cell biologists. Londres, : Edwards Arnold, xxi, 238 pp). Este parámetro, k, se mide como un cambio en el índice de refracción relativo al índice de refracción del agua. Por lo tanto, la masa celular medida de esta manera es la masa seca celular o la masa de todo dentro de la célula distinta del agua. Con esta ecuación, la masa seca medida de la célula T activada en (Figura 2B) es de 240 pg, la masa de la célula diana es de 840 pg y las células T no activadas tienen una masa seca promedio de 65 pg.

40

45

Células T específicas de antígeno y mantenimiento de la viabilidad en la plataforma de imágenes

[0045] Para generar CTL antígeno definido, se infectaron HLA A2.1 + PBMCs de donantes sanos con el F5 TCR por transducción retroviral y enriquecida para las células CD8+ por separación magnética para eliminar magnéticamente células CD8+ no marcadas (Figura 3, paneles A-B). Aunque las células T CD8+ tienen TCRs endógenos, la expresión ectópica del F5 anti-MART1 TCR da como resultado la sobreexpresión de las cadenas alfa y beta exógenas para permitir el emparejamiento preferencial y la expresión de la superficie. La mayoría de las células aisladas fueron CD8+ con el 75% que expresa el F5 TCR en la superficie, según lo determinado por las tinciones del tetrámero péptido MART1 antes de la formación de imágenes. Medimos la acumulación de interferón gamma (IFN γ) en el sobrenadante después de un periodo de cocultivo de 18 h para verificar que las células T CD8+ redirigidas F5 eran específicas para las células diana afines. Los resultados de un inmunoensayo basado en perlas analizadas por citometría de flujo indicaron una liberación de IFN γ significativa, 3,5 veces mayor de los CTL transducidos con F5 tras el cocultivo con células diana MART1 + M202 compatibles con HLA en comparación con el cocultivo con una línea celular de control de HLA no coincidente (Figura 3, panel C).

50

55

60

[0046] Se obtuvieron imágenes de las células diana en medios de cultivo estándar durante 1,5 h antes del inicio de cada experimento para confirmar que la plataforma de formación de imágenes de cultivos celulares vivos mantiene la viabilidad de las células diana en ausencia de CTL. Las células diana M202 mostraron una tasa de acumulación de masa positiva, lo que indica una población sana y el mantenimiento de la viabilidad celular. (Figura 3, paneles D-E; Figura 7, panel B). Los experimentos de control demostraron el mantenimiento de la viabilidad tanto de T como de la célula diana durante periodos de formación de imágenes extendidos (Figuras 7 y 8).

65

Disminución masiva de células diana muertas

[0047] Después de 1,5 h de mediciones de control de la célula diana, se añadieron CTL reactivos por F5 MART1 (Figura 3, paneles A-B) a la cámara de imágenes de células vivas y la imagen de forma continua durante 18 h. La duración de este experimento es similar al período de tiempo típicamente requerido para la medición de la actividad de células T por ELISPOT (Hobeika y otros (2005) J. Immunherher 28: 63-72). Los CTL individuales que matan las células diana individuales se identifican a través del análisis cualitativo de los datos de imagen de intensidad como un cambio en la apariencia de la célula diana después de un contacto prolongado con un CTL (Figura 4, paneles A-D). Los eventos citotóxicos son detectables a pesar de la presencia de células T inespecíficas o que no responden dentro de la población en general. LCI proporciona mapas cuantitativos de la distribución de masa dentro de las células diana durante los eventos citotóxicos mediados por células T (Figura 4, paneles E-H). Estas distribuciones de masa de cuadros de imagen sucesivos se pueden integrar para obtener mediciones de la masa de células diana a lo largo del tiempo (Ecuación 1 y Figura 4, panel I). Los eventos citotóxicos individuales debidos al reconocimiento de CTL se confirman por una disminución característica en la masa de células diana después del contacto prolongado (30 m a 2 h) con un CTL correspondiente (Figura 4, panel I y película, imágenes de las cuales se muestran en 6A-6F).

[0048] La masa celular diana disminuyó en un 20 a 60% durante un período de 1-4 h cuando se atacó con éxito mediante un CTL, en comparación con un aumento en la masa total de células diana del 15% durante 4 h cuando no se destruyeron con CTL (Figura 4, paneles I-J). A pesar del contacto entre las células T y las células diana, no hubo respuesta en los experimentos de control utilizando células diana irrelevantes incompatibles con HLA (que carecen de MART1) o células T inespecíficas (Figura 4, paneles K-M, Figuras 7, paneles C-D y 9, paneles C-D). Esto indica que la muerte de la célula diana se debió a la presencia de CTL específicos de antígeno y que la velocidad y el grado de disminución de la masa de células diana debido a la citotoxicidad mediada por células T es directamente cuantificable usando LCI. La citotoxicidad mediada por células T es evidente en los primeros 30 min y se confirma en las primeras 2-4 h después de la adición de CTL, que indica la velocidad del enfoque de LCI en la medición de la citotoxicidad mediada por células T (figuras de película 6A-6F). Se estima que el 95% de las células diana estaban muertas a las 18 h después de la adición de CTL, mientras que más del 95% de las células diana de control parecían sanas a las 18 h (Figura 4, paneles K-L, Figura 9).

Aumento masivo de CTL activados

[0049] En paralelo con la disminución de la masa de células diana, las CTL activadas individuales aumentaron de tamaño en general por el final de un evento citotóxico (Figura 5). Las CTL individuales y las masas de células diana pueden rastrearse a lo largo de la duración de sus interacciones (Figura 5, panel A, Figura 10). Los datos de masa de CTL frente a tiempo para 10 de estos eventos se resumen en la Figura 5, panel B, con masa de CTL normalizada en relación con la masa cuando la célula diana cambió drásticamente la morfología ("bola") al comienzo de un evento de muerte, que es definido como $t = 0$ h. En un rastro típico, la célula diana muestra inicialmente un aumento en la masa consistente con la tasa de crecimiento de una célula sana (Figura 4, panel M). Durante este período ($t < 0$ h), las CTL muestran una tasa de crecimiento relativamente lenta (Figura 5, panel C). A continuación, la célula diana se "lanza hacia arriba" y se separa del sustrato, inmediatamente antes de una pérdida de masa muy rápida durante las primeras 1-2 horas. Durante este período inicial (aproximadamente 100 min), la tasa de acumulación de masa de células T aumenta significativamente (Figura 5, panel C). A medida que la célula diana pierde masa y el cuerpo celular central se condensa durante las siguientes 2-5 horas, la célula T continúa aumentando en masa, a un ritmo más lento que durante el período inicial (Figura 5, panel C).

[0050] Este cambio en la tasa de acumulación de masa resultó en una mayor masa celular significativa 2 a 4 veces que rodea las células T que no responden (Figura 5, panel D). La masa celular total de 116 CTL en el punto final de cada evento citotóxico se comparó con la masa de 3.900 células T de control que no mataron a las dianas durante el transcurso del experimento. En promedio, las CTL tenían una masa 2,8 veces mayor en comparación con sus equivalentes no específicos o no reactivos (Figura 5, panel E, Figura 11, panel A). Este aumento de masa persistió durante hasta 4 h, una duración que está limitada por el período de observación promedio antes de que la célula T activada se elimine por lavado debido a la perfusión continua de los medios a través de la cámara de observación.

[0051] El área de dos dimensiones (2D) de células T que responden frente a las que no responden se calculó para determinar si había una diferencia significativa en relación con el tamaño total. El aumento de 1,4 veces observado en el área 2D fue menor que la diferencia de 2,8 veces en la masa celular total y no alcanzó significación estadística al nivel de $p < 0,05$ en comparación con los controles (Figura 5, panel F, Figura 11, panel B). Estos resultados muestran que el cambio en masa de las células T CD8+ es un indicador de actividad más sólido que el cambio en el área celular. Además, para las células T esféricas, el aumento observado de 1,4 veces en la masa corresponde a un aumento de 1,7 veces en el volumen, que es sustancialmente menor que el aumento de la masa de 2,8 veces observado. Estos resultados, por tanto, sugieren que también hay un aumento en la densidad de células T durante la activación, aunque la cuantificación de la densidad no es posible con la configuración actual de las mediciones de LCI.

Discusión

[0052] El LCI proporciona un ensayo de citotoxicidad sin etiquetas cuantitativo a través de mediciones de biomasa sensibles de células T efectoras individuales y sus células diana afectadas durante los eventos citotóxicos (Figura 2). La masa de células diana muertas se puede rastrear a lo largo del tiempo para confirmar una disminución del 20 al 60% en la masa durante 1 a 4 h, lo que concuerda con un insulto citotóxico (Figura 4). Encontramos un incremento promedio significativo de 2,8 veces en la masa total de células T efectoras después del reconocimiento y la muerte de las células diana afines (Figura 5). Se descubrió que el cambio de masa de las células T es un indicador más significativo del estado de activación de las células T que las mediciones de los cambios 2D en el área sola.

[0053] El aumento de la masa que hemos observado en CTL activado es probablemente acompañado por un aumento en biosíntesis impulsada por los cambios metabólicos. Se ha demostrado que las células T usan glucosa y glutamina como sus principales fuentes de energía. Los linfocitos activados generan energía para cumplir las demandas de síntesis de proteínas al aumentar significativamente la absorción de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos del entorno extracelular (Fox et al., (2005) Nat. Rev. Immunol., 5: 844-852). Los estudios de privación de glucosa han demostrado que las células T activadas requieren glucosa para la proliferación y la supervivencia incluso en presencia de niveles adecuados de glutamina (Michalek y Rathmell (2010) Immunol. Rev. 236: 190-202). La señalización de TCR juega un papel crítico en la regulación de la transcripción del transportador de glucosa Glut1, permitiendo una captación mejorada de glucosa con activación (Maciver et al. (2008) J. Leukoc. Biol. 84: 949-957). Los estudios han demostrado que los agonistas de TCR tales como los anticuerpos anti-CD3 o los compuestos que causan la reticulación de las proteínas CD3 dan como resultado una inducción rápida y máxima de la expresión de Glut1 (Michalek y Rathmell (2010) Immunol. Rev. 236: 190 -202; Maciver y otros (2008) J. Leukoc. Biol. 84: 949-957).

[0054] Una aplicación potencial de la técnica LCI presentada aquí es para la identificación y aislamiento de los CTL únicos y potencialmente raros. Un creciente cuerpo de trabajo se ha centrado en la identificación de linfocitos T infiltrantes de tumor (TIL) que llevan el reconocimiento de TCR de células tumorales autólogas (Rosenberg et al., (2008) Nat. Rev. Cancer, 8:299-308; Cheever et al. (2009) Clin. Cancer Res. 15:5323-5371). Estudios recientes han indicado que estos CTL se producen a frecuencias relativamente bajas, lo que hace difícil emplear ensayos de citotoxicidad a granel o sustitutos para confirmar su existencia y aislamiento de una población mixta (Elkord et al. (2006) Clin. Immunol. 120:91-98; Whiteside (2004) Dev. Biol. (Basel) 116:219-228; discusión 229-236). El enfoque de LCI utiliza la interacción citotóxica entre los CTL y las células diana como un amplificador natural del evento de reconocimiento de péptido-MHC-TCR subyacente que evita falsos positivos debido a la unión inespecífica. La plataforma de imágenes de LCI es fundamentalmente compatible con un sistema de cultivo segmentado que permitirá el aislamiento de células raras que pueden perderse en el sistema de cultivo de células de perfusión abierto actual. Por lo tanto, LCI puede proporcionar una alternativa viable para la identificación y el aislamiento de células T efectoras raras que matan células tumorales autólogas o líneas celulares de cáncer adaptadas a HLA.

[0055] Se prevén generalmente células T contra antígenos asociados con el cáncer se anticipan generalmente para soportar los TCR de afinidad inferior si se alzan contra un autoantígeno y presumiblemente escapan selección tímica y la inducción de tolerancia (Wooldridge et al. (2009) Immunology 126:147-164). Se considera que la afinidad entre el TCR y el péptido-MHC juega un papel crucial en el resultado de la estimulación de las células T (Stone et al., (2009) Immunology 126:165-176). El método clásico para evaluar la afinidad de TCR-péptido-MHC implica la medición de las tasas de activación y desactivación utilizando la resonancia de plasmón superficial. La interacción péptido-MHC-TCR unida a superficie no imita con precisión las interacciones mediadas por múltiples receptores que se producen durante el reconocimiento de una célula diana por un CTL. La evidencia sugiere que estas mediciones proporcionan información limitada con respecto a la función efectora de linfocitos (Stone et al. (2009) Immunology 126:165-176; Edwards y Evavold (2011) Immunol. Res. 50:39-48). En un sistema de transfección, los TCR diseñados con mayor afinidad por ligandos MHC peptídicos afines en comparación con sus contrapartes de tipo salvaje mostraron una actividad aumentada de CTL (Edwards y Evavold (2011) Immunol. Res. 50:39-48). Un modelo de afinidad sugiere que la activación de las células T está relacionada con la cantidad de receptores comprometidos. Las interacciones de afinidad más altas requieren menos interacciones de TCR-péptido-MHC para activar una célula T en un estado citotóxico (Tian et col. (2007) J. Immunol. 179:2952-2960). Es concebible que las interacciones de TCR-péptido-MHC de mayor afinidad conduzcan a una respuesta más rápida que su contraparte de menor afinidad, y el enfoque de LCI también puede potencialmente discriminar entre estas interacciones.

Agradecimientos

[0056] Agradecemos el laboratorio del Dr. Ribas (UCLA) por suministrar las líneas celulares y Dian Huang (UCLA) por su asistencia con el análisis de datos. Este trabajo no sería posible sin el UCLA Center for AIDS Research Virology Core Lab y sus donantes que suministran PBMC saludables HLA A2.1+.

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un método para identificar receptores de células T que responden a antígenos específicos de células diana, comprendiendo dicho método:
- 10 proporcionar un sustrato que lleva una pluralidad de células diana;
poner en contacto dichas células diana sobre dicho sustrato con células T CD8 +; y
utilizar imágenes ópticas sin etiquetas para identificar un aumento en la masa de una célula T y/o una
disminución en la masa de una célula diana, donde un aumento en la masa de una célula T y/o una disminución
en la masa de una célula diana es un indicador de que dicha célula T porta un receptor de células T activado por
antígenos presentados en dicha célula diana.
- 15 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde:
- (a) se detecta un aumento en la masa de una célula T e indica que dicha célula T porta un receptor de célula T
activado por antígenos presentados en dicha célula diana; y/o
(b) una disminución en la masa de células diana indica que las células T en contacto portan un receptor de
células T activado por antígenos presentados en dicha célula diana.
- 20 **3.** El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende además:
- (a) seleccionar y/o aislar células T que están activadas; y/o
(b) seleccionar y cultivar o almacenar células T que están activadas.
- 25 **4.** El método de la reivindicación 3, que comprende además clonar receptores de células T a partir de células T que
se seleccionan.
- 30 **5.** El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que:
- (a) dichas células diana están en medios estáticos;
(b) dichas células diana están dispuestas en un microcanal; y/o
(c) dichas células diana están dispuestas en micropocillos sobre un sustrato, en donde opcionalmente:
- 35 (i) dicho sustrato comprende al menos 10 micropocillos, o al menos 100 micropocillos, o al menos 1000
micropocillos; y/o
(ii) los micropocillos contienen en promedio aproximadamente 1 célula T por pocillo.
- 40 **6.** El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha imagen óptica sin etiquetas comprende
detectar un desplazamiento de fase en la luz que pasa a través de dicha(s) célula(s) causado por el cambio en la
masa de células T y/o célula diana masa.
- 45 **7.** El método de la reivindicación 6, en el que dicha formación de imágenes ópticas sin marcaje comprende
microscopía de formación de imágenes de fase cuantitativa.
- 50 **8.** El método de la reivindicación 7, en el que dicha formación de imágenes ópticas sin etiquetas comprende un
método seleccionado del grupo que consiste en interferometría de células vivas (LCI), holografía digital e
interferometría de cizallamiento lateral.
- 9.** El método de la reivindicación 8, en el que dicha obtención de imágenes ópticas sin etiquetas comprende
interferometría de células vivas que comprende:
- 55 proporcionar dicho sustrato en una cámara de observación de un microscopio de interferencia adaptado para
medir un desplazamiento de fase fraccional entre un haz de luz de prueba y un haz de luz de referencia;
exponer la célula a un haz de luz de prueba a una longitud de onda de iluminación;
medir el desplazamiento de fase fraccional entre el haz de luz de prueba que se propaga a través de la célula y
el haz de luz de referencia; y
usar dicho desplazamiento de fase fraccional o un parámetro derivado del mismo como una medida del aumento
en la masa de la célula T y/o la disminución en la masa de la célula diana.
- 60 **10.** El método de la reivindicación 9, en el que dicho desplazamiento de fase fraccional está integrado a través de
sustancialmente todo el área proyectada de la célula cuyo cambio de masa se está determinando.
- 65 **11.** El método de la reivindicación 9, en el que dicha medida del aumento en la masa de la célula T y/o la
disminución en la masa de la célula diana se calcula como el parámetro m:

5

$$m \propto \int \phi \lambda dA$$

10

donde ϕ es el desplazamiento de fase fraccional medido, λ es la longitud de onda de iluminación, y la integración se realiza en toda el área de la célula, A .

12. El método de la reivindicación 9, en el que dicha medida del aumento en la masa de la célula T y/o la disminución en la masa de la célula diana se calcula como

15

$$m = k \int \phi \lambda dA$$

20

donde m es la masa seca de la célula, $\lambda\phi$ es la medida de la fase, k es un factor de conversión en masa tomado como $5.56 \text{ pg}/\mu\text{m}^3$, y A es el área proyectada.

25

13. El método de la reivindicación 7, en el que dicha formación de imágenes ópticas sin etiquetas comprende interferometría de cizallamiento lateral usando un interferómetro de cizallamiento lateral de cuatro bandas montado en un microscopio de luz blanca de transmisión.

30

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la masa de la(s) célula(s) se observa una pluralidad de veces para observar cómo la masa de la(s) célula(s) cambia durante un período de tiempo.

15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que:

35

- (a) dichas células diana comprenden células cancerosas, opcionalmente en las que dichas células diana comprenden células madre de cáncer y/o células metastásicas;
- (b) dichas células diana comprenden células infectadas con un patógeno; o
- (c) dichas células diana comprenden células recombinantes transfectadas con una construcción que expresa una proteína o péptido heterólogo.

40

45

50

55

60

65

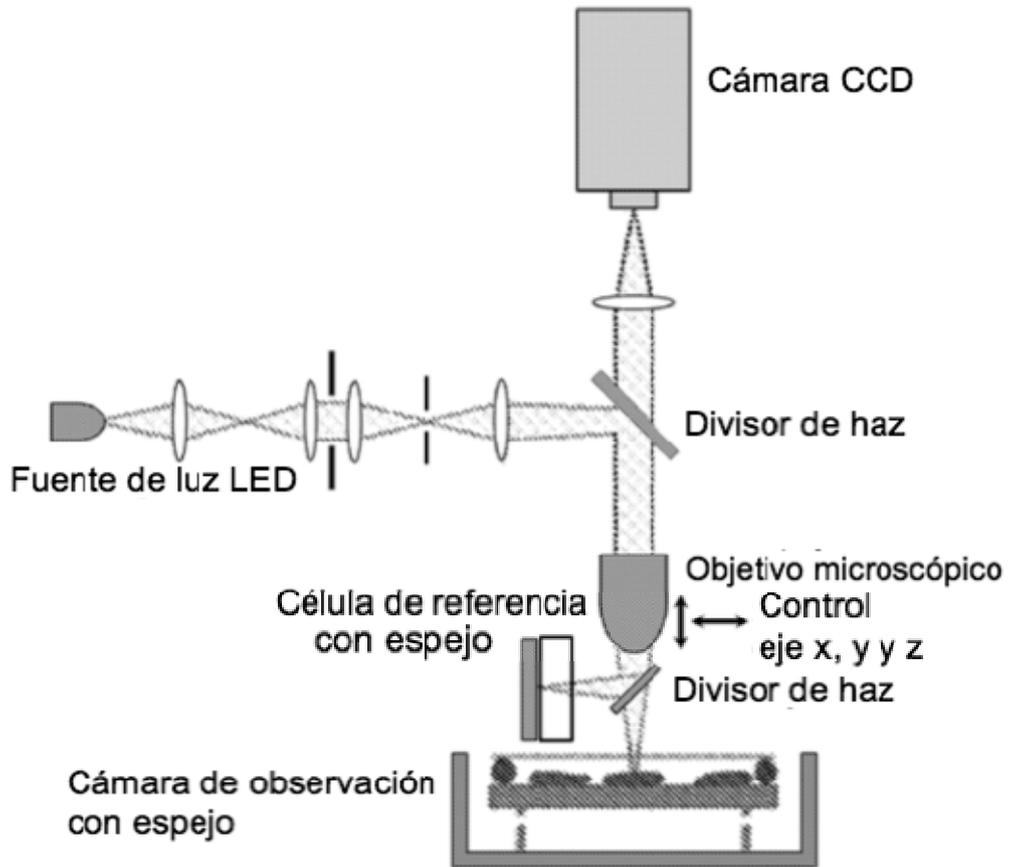


Fig. 1

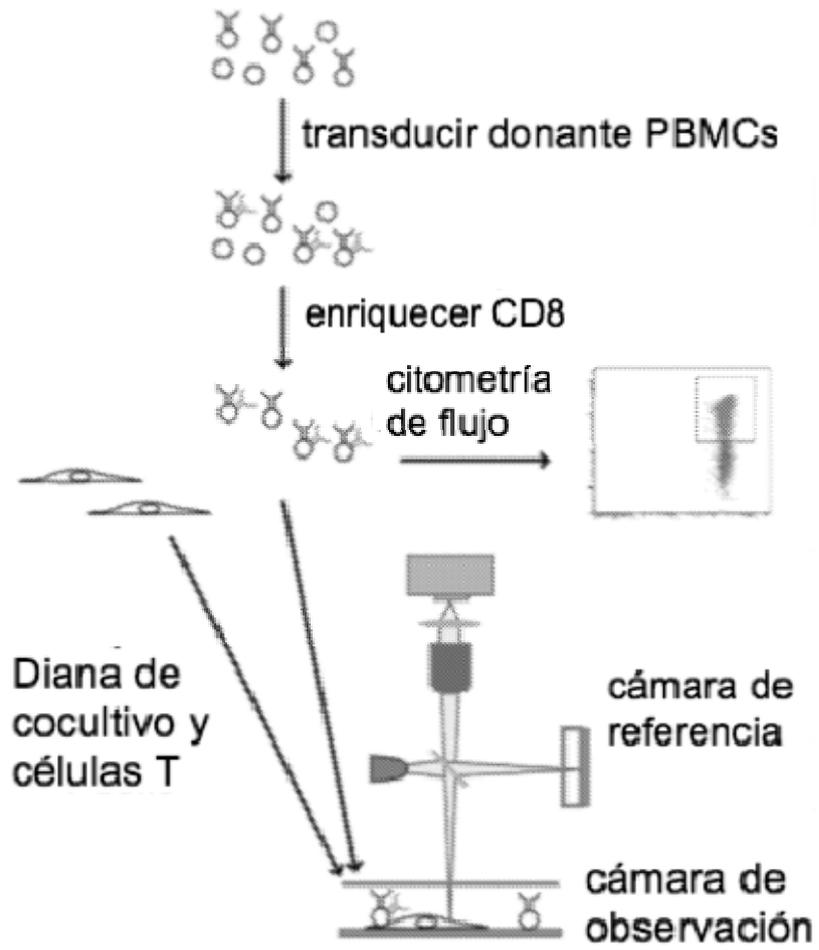


Fig. 2A

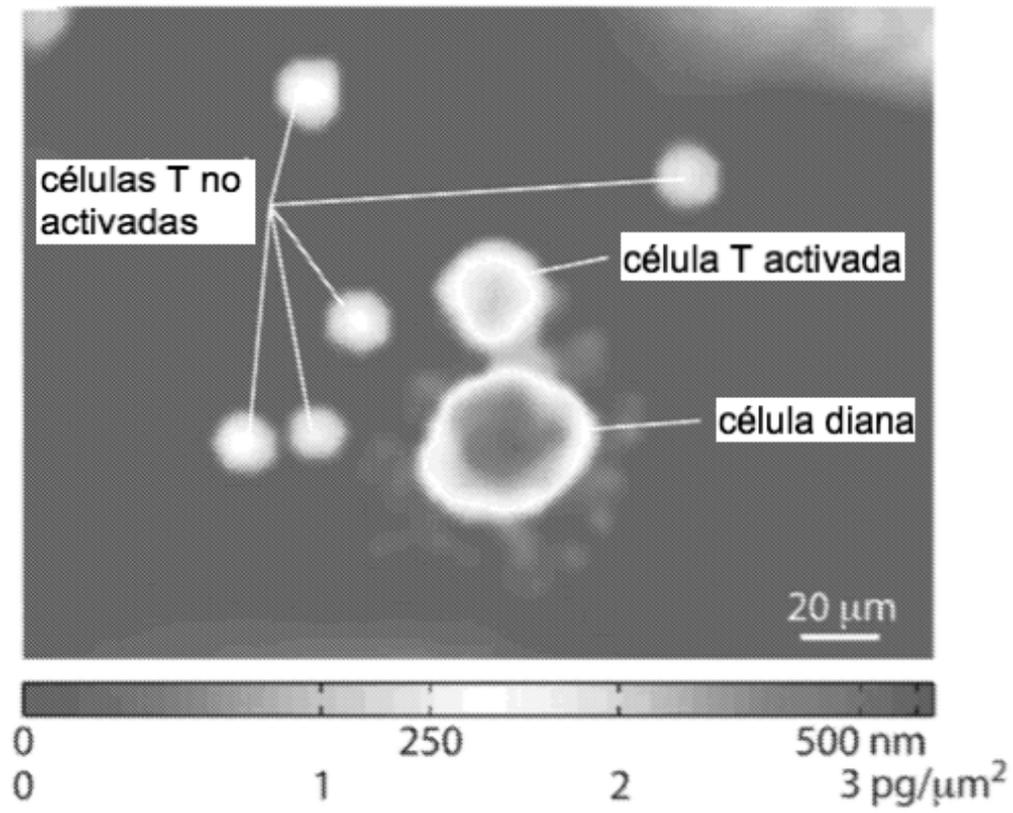


Fig. 2B

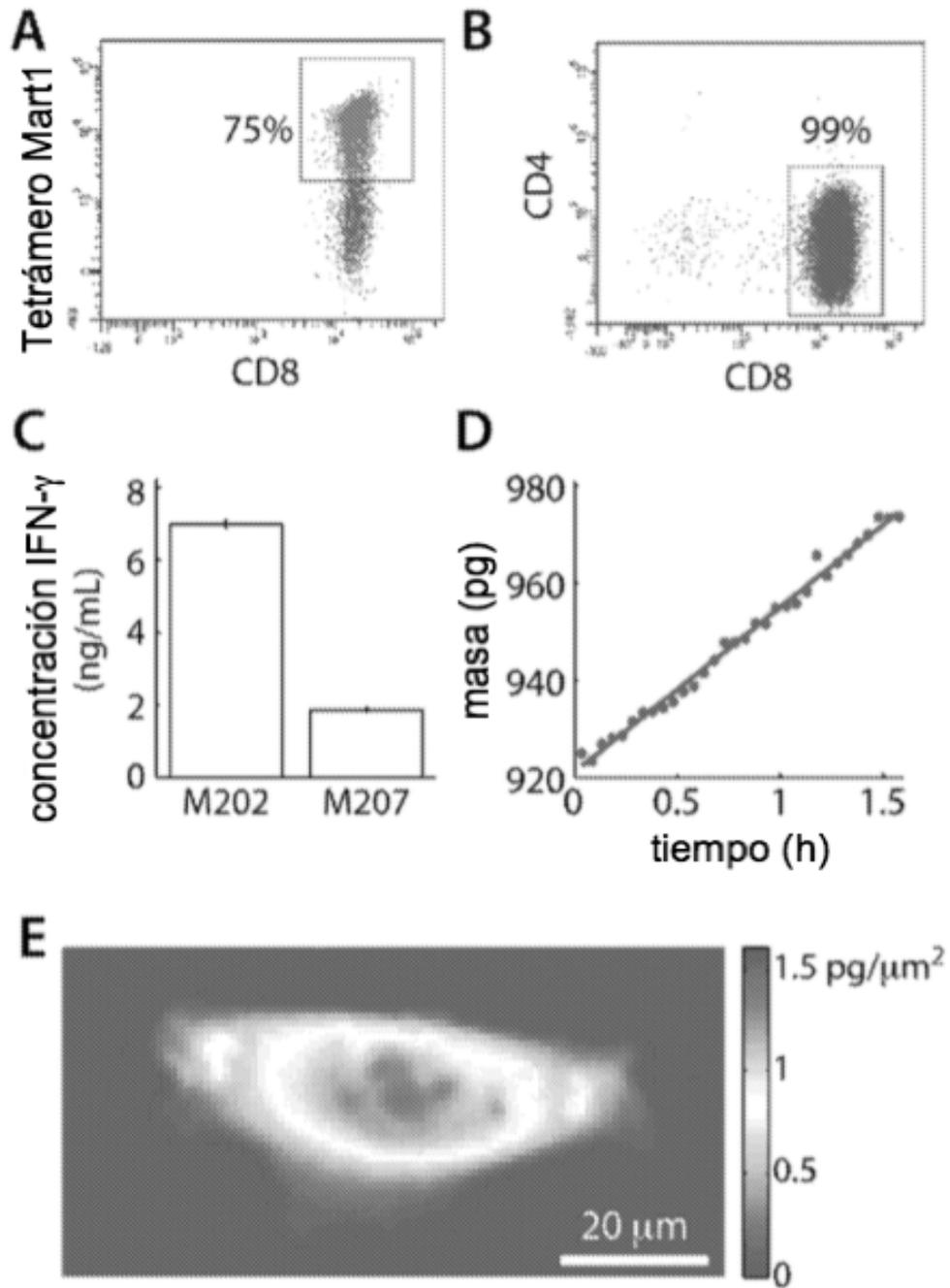


Fig. 3

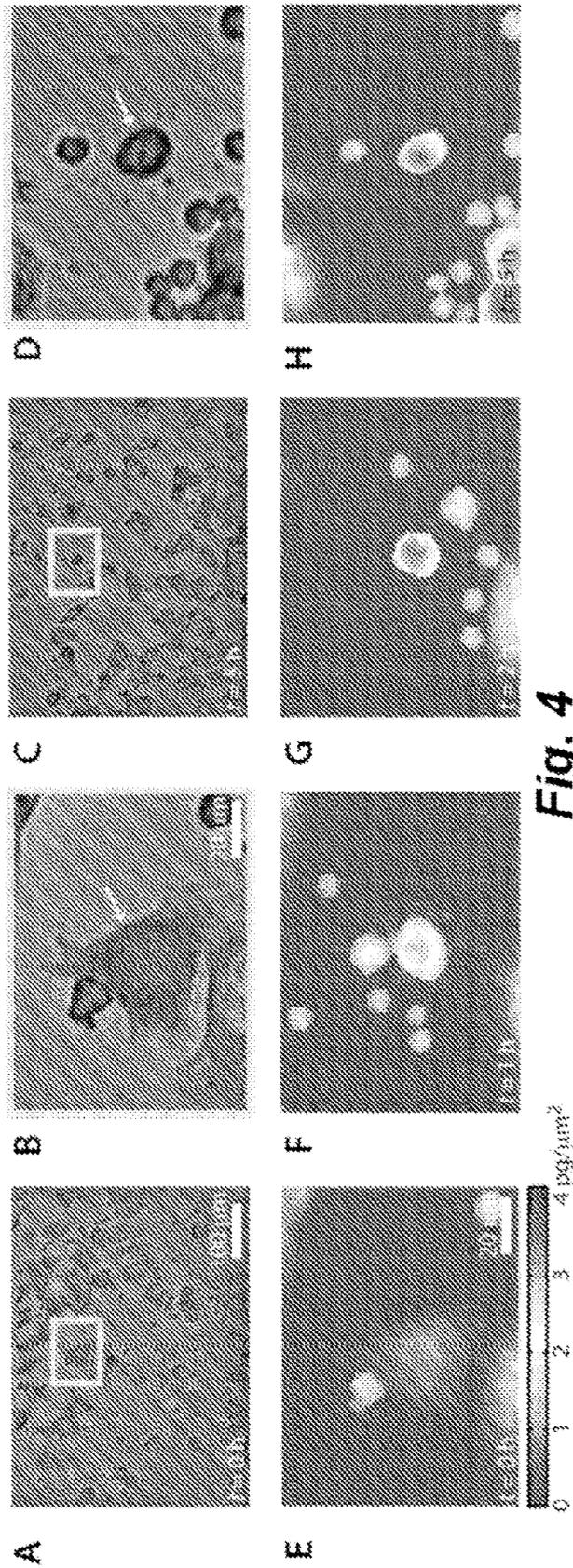


Fig. 4

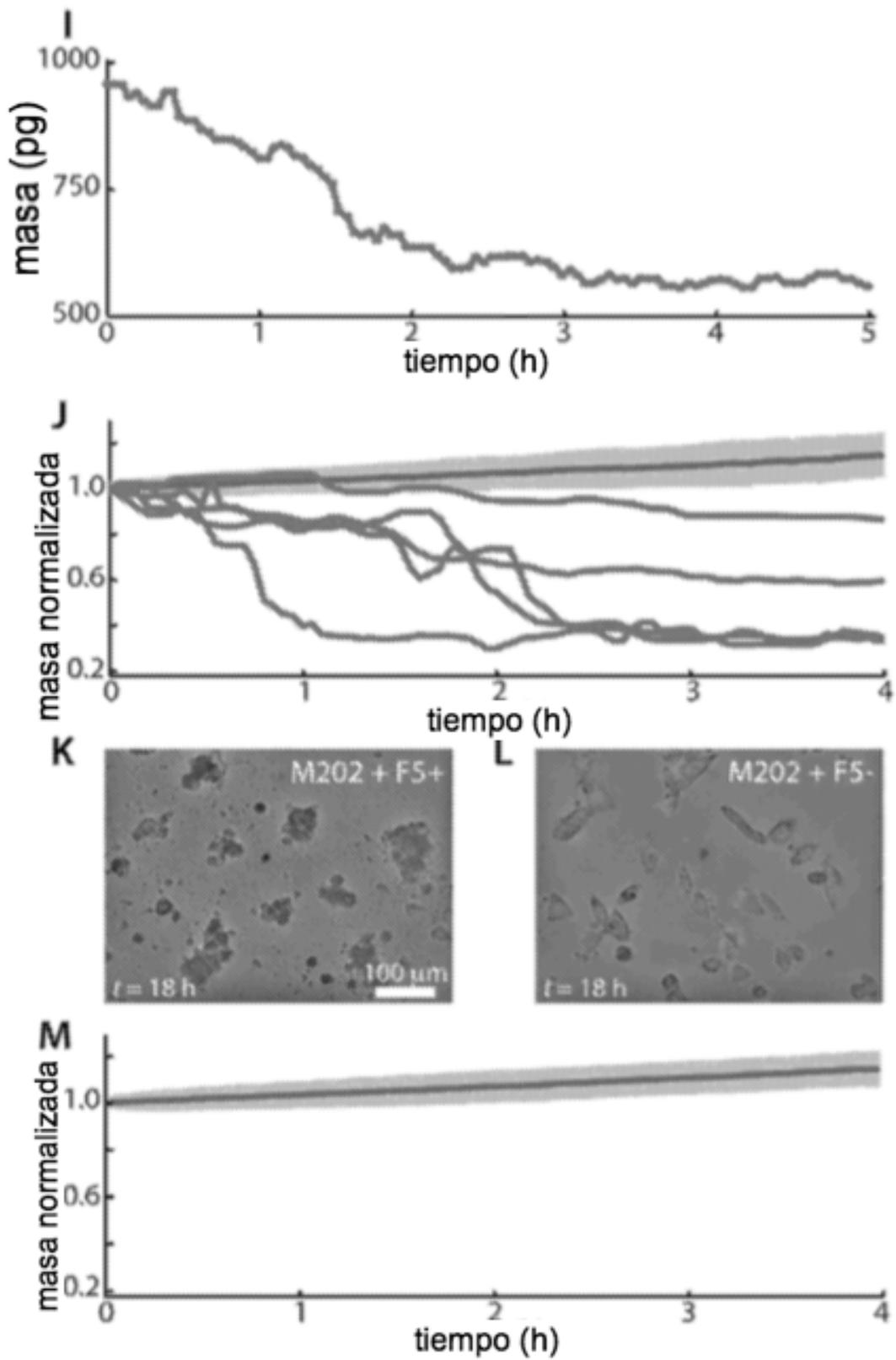
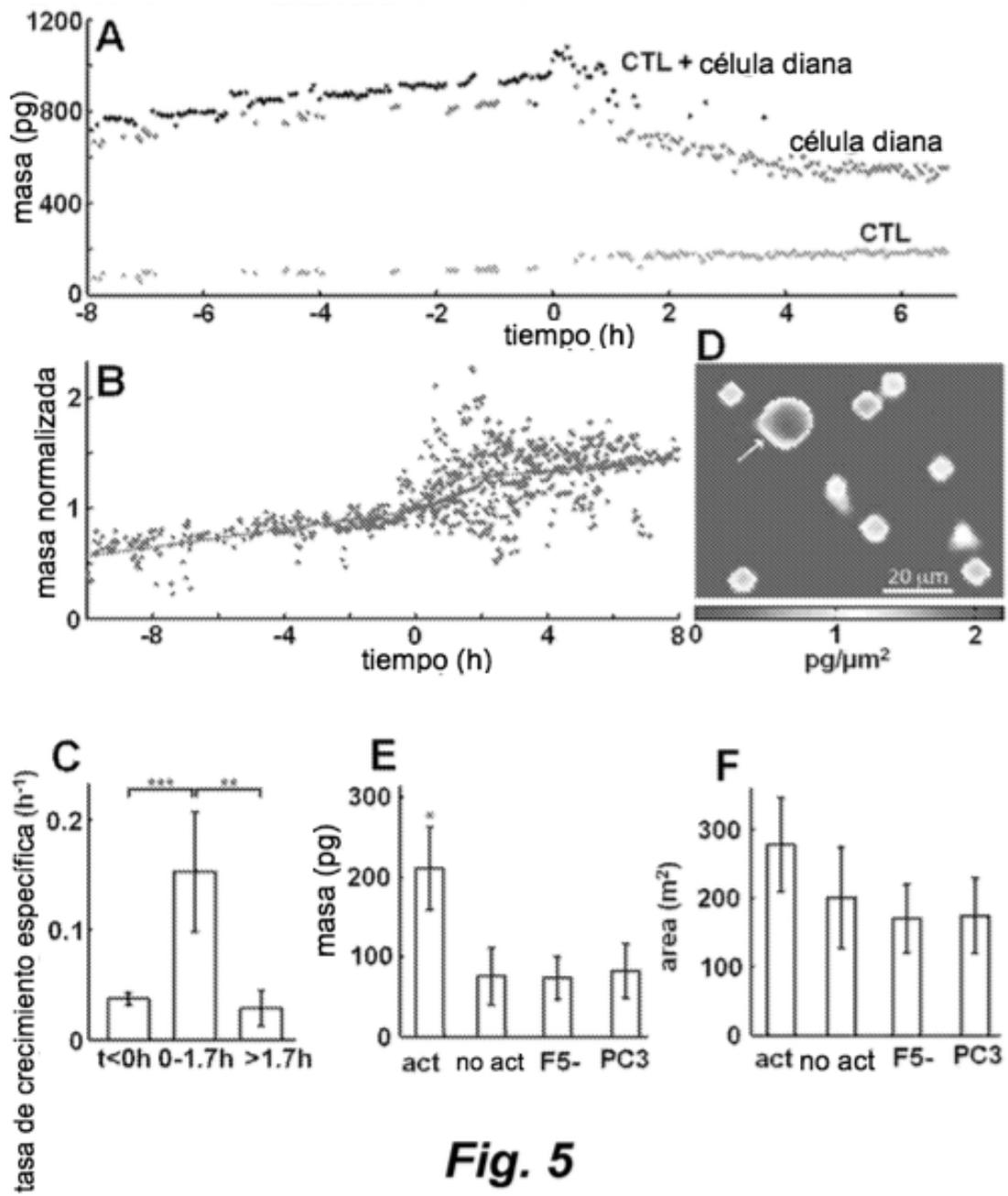


Fig. 4, cont.



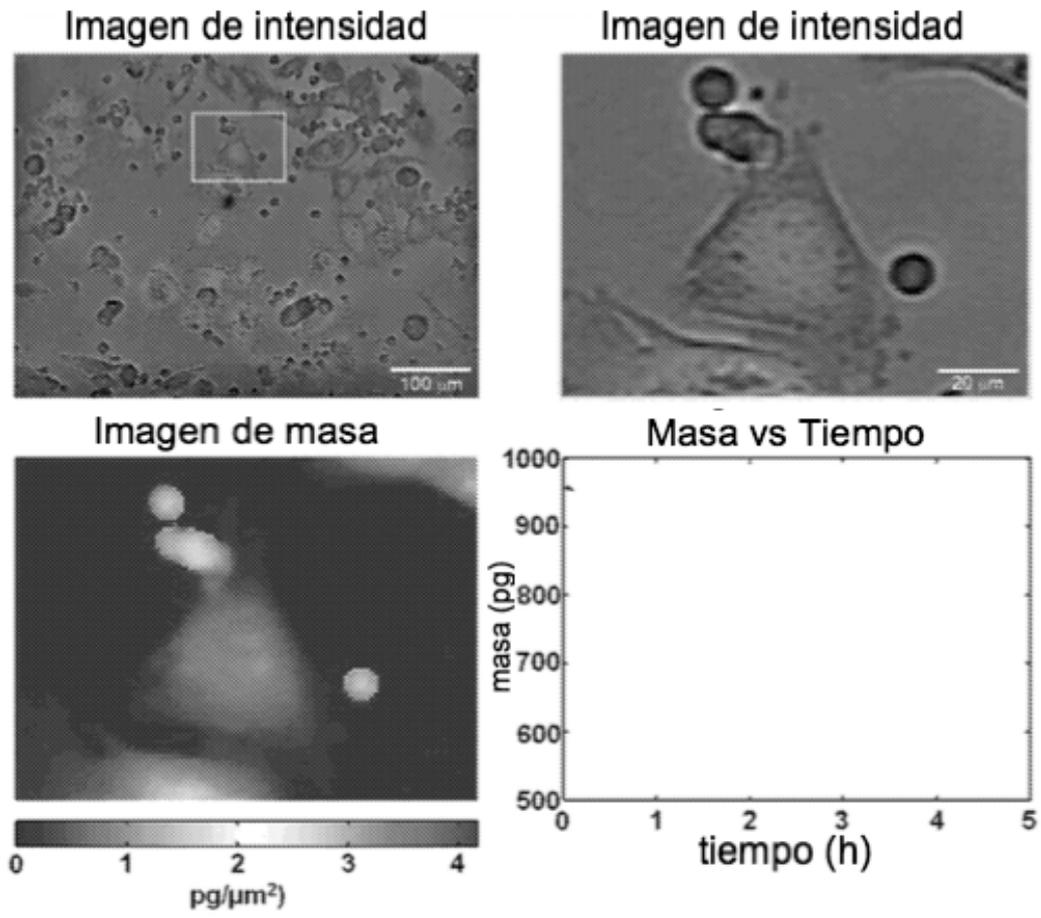


Fig. 6A

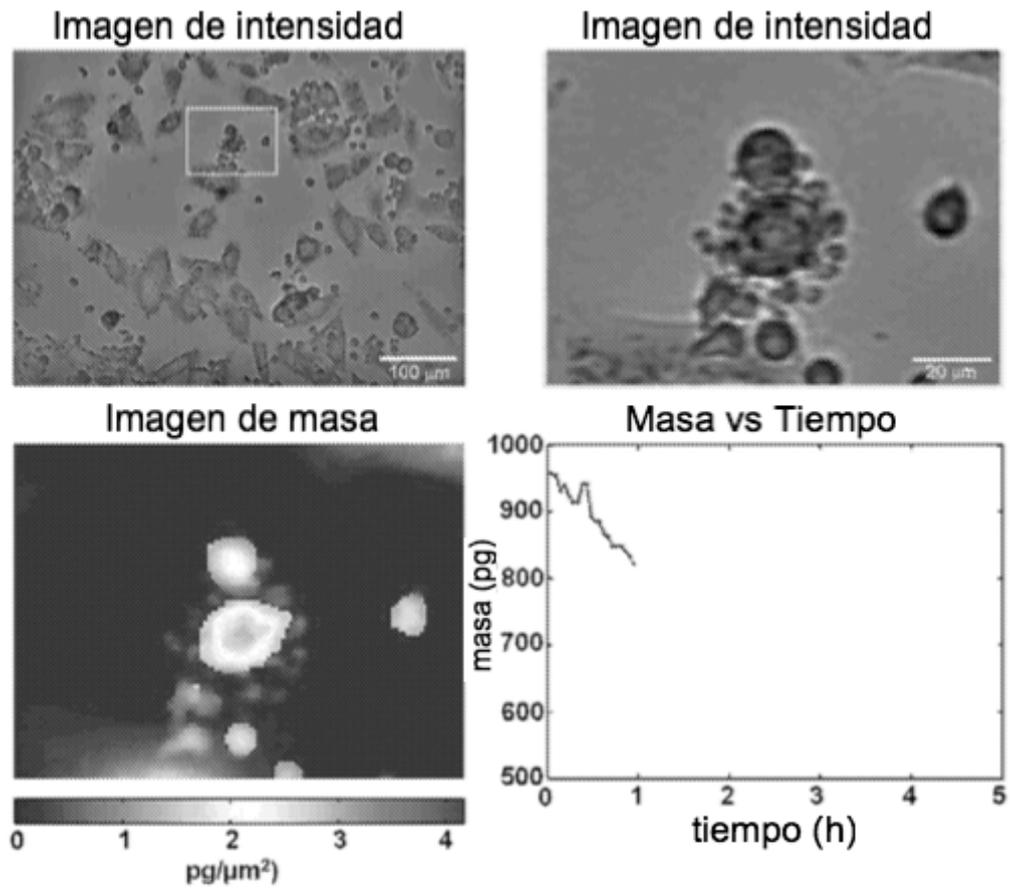


Fig. 6B

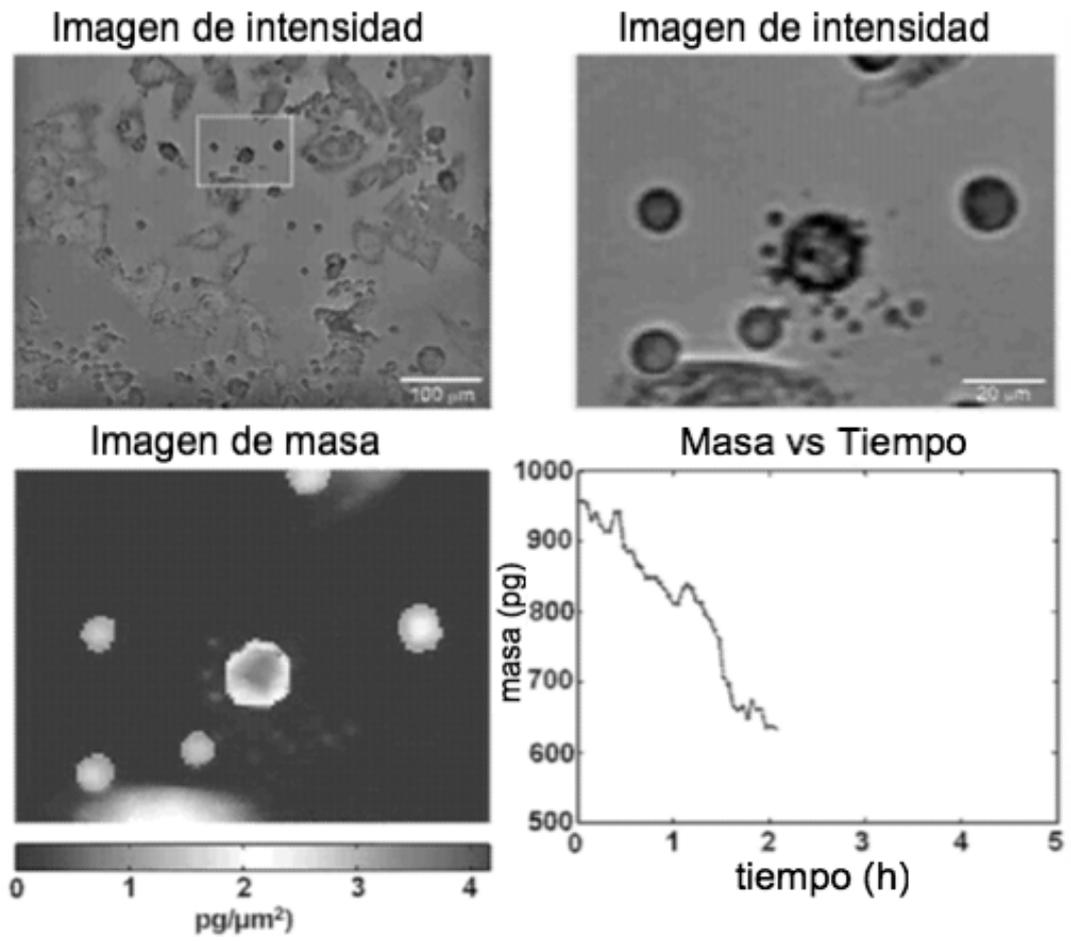


Fig. 6C

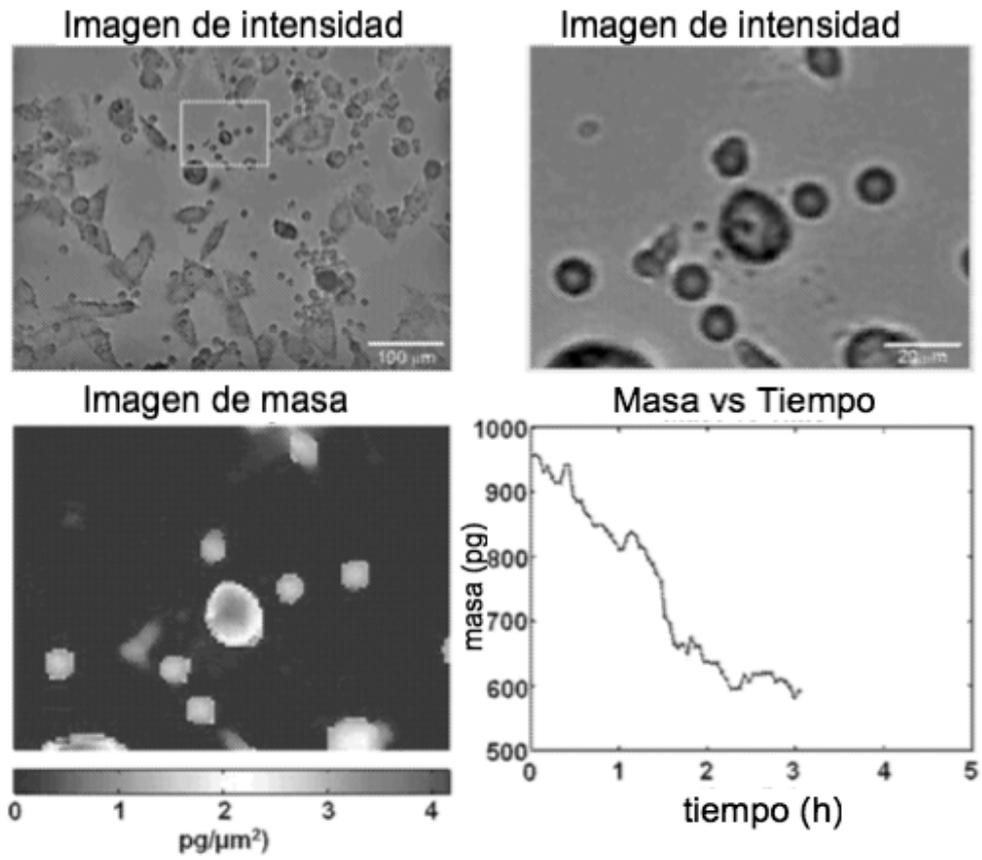


Fig. 6D

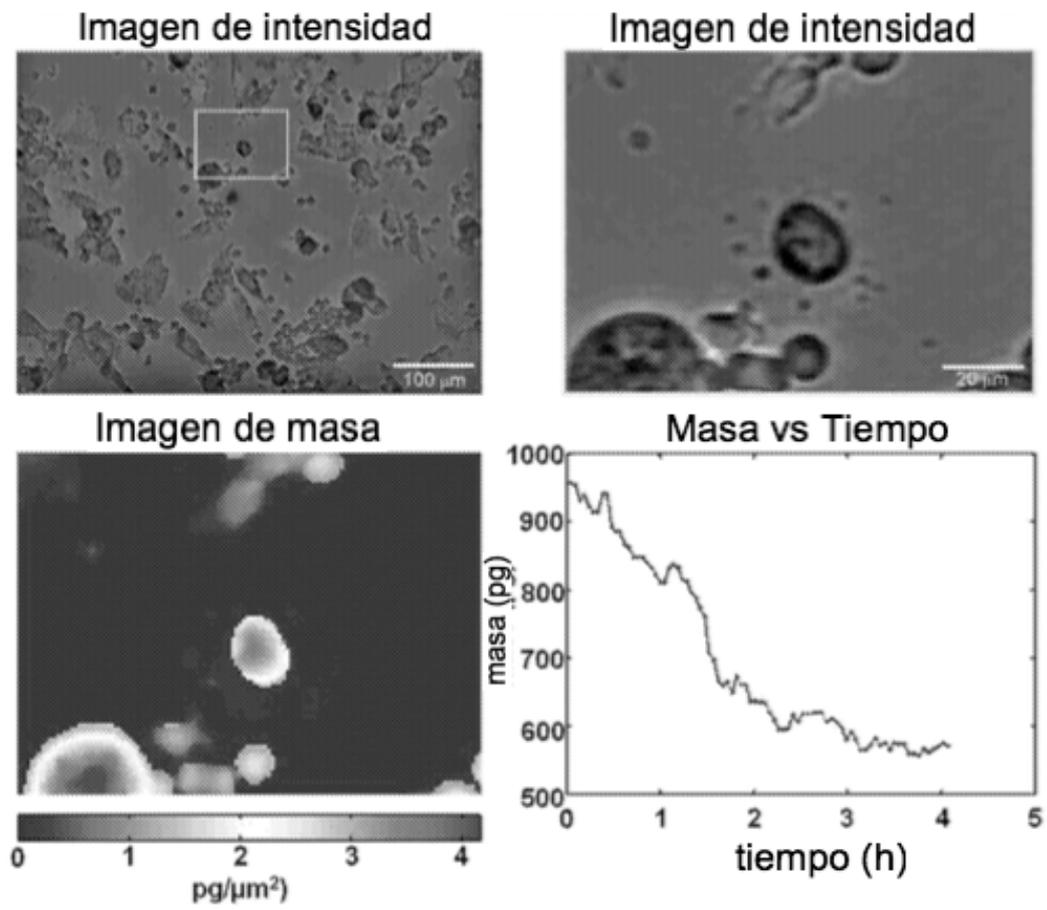


Fig. 6E

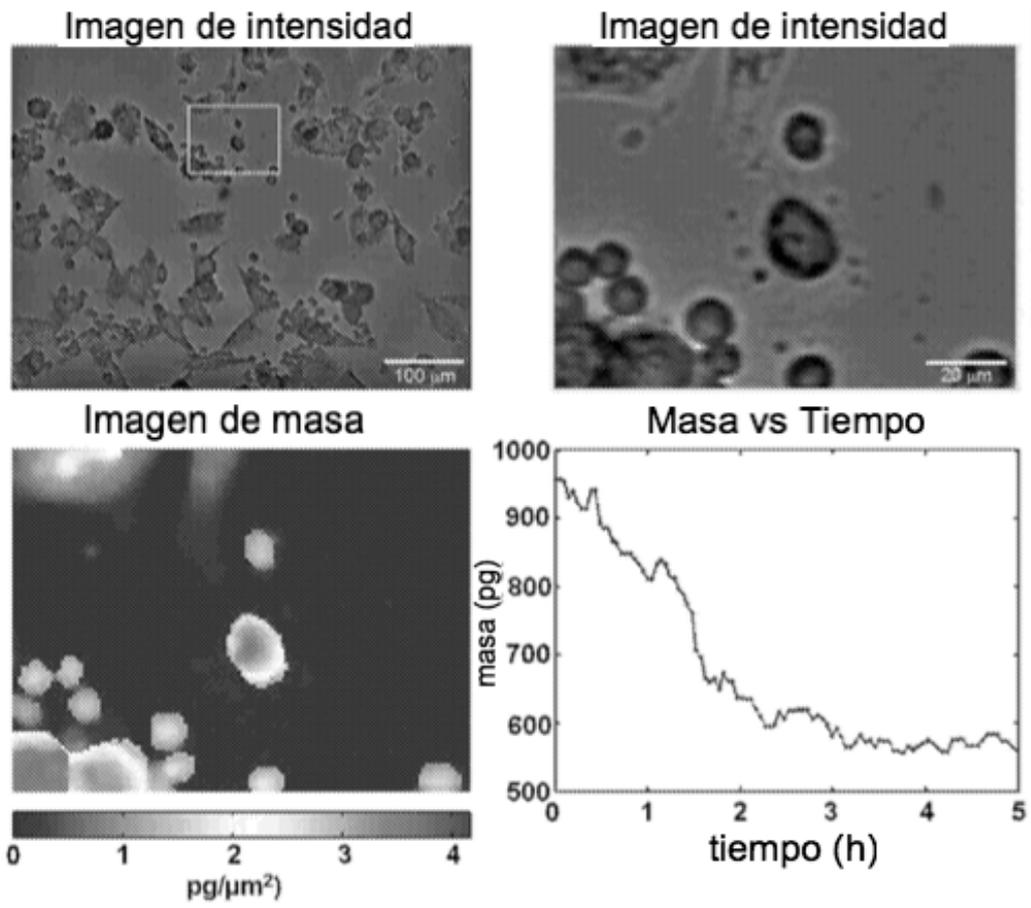


Fig. 6F

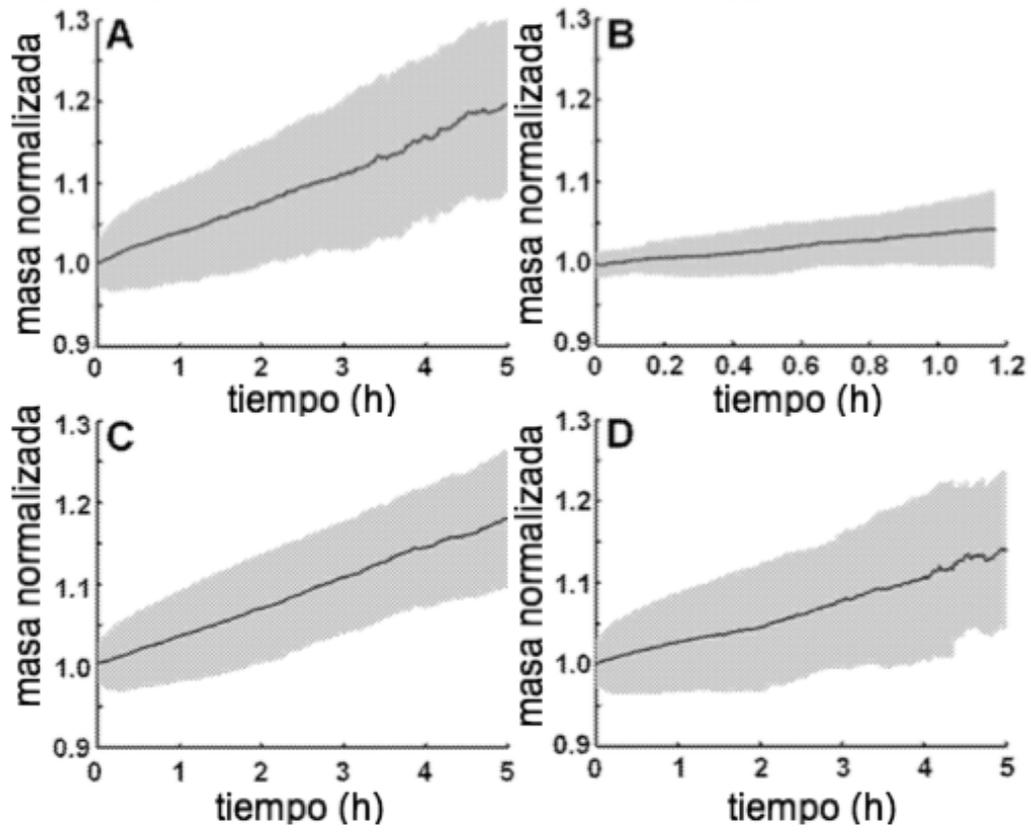


Fig. 7

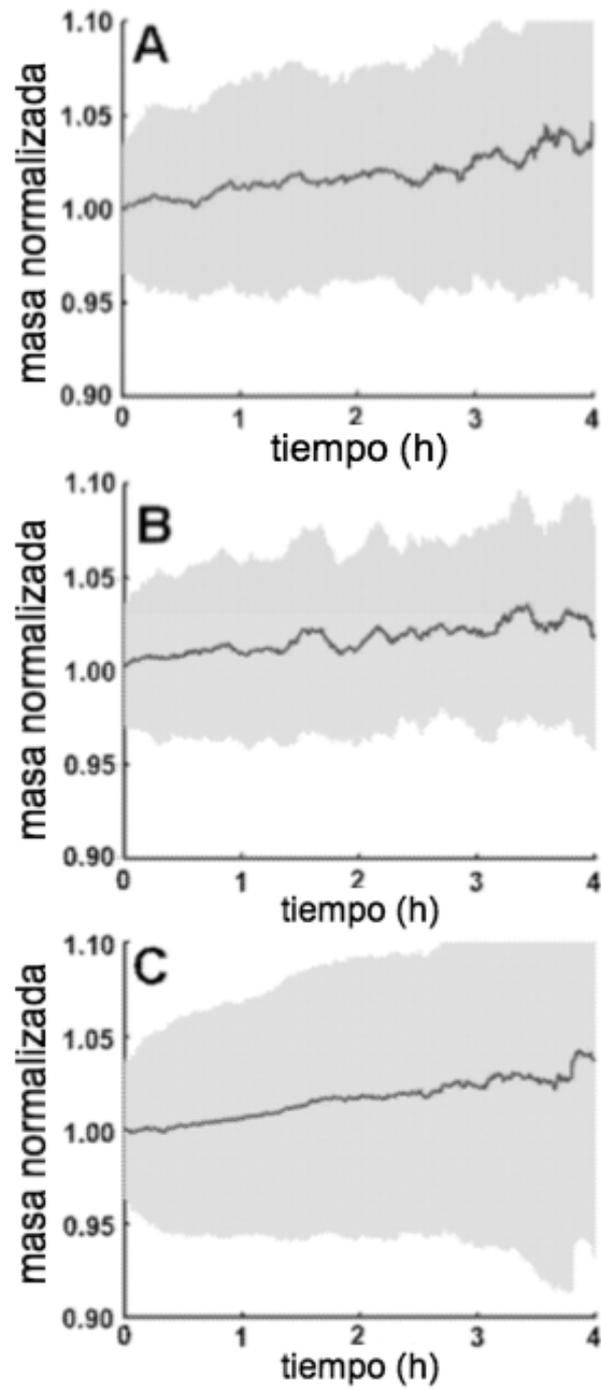


Fig. 8

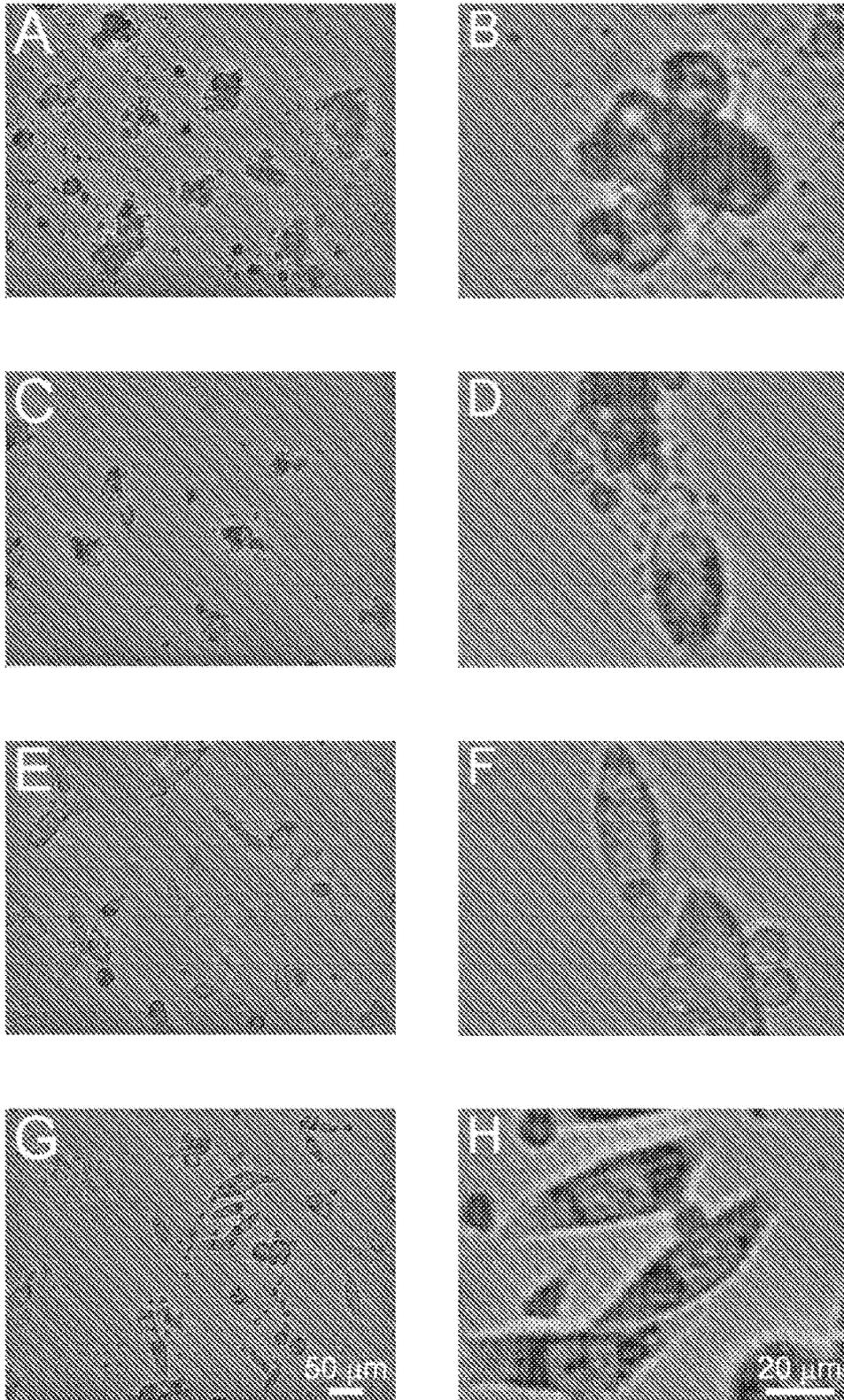


Fig. 9

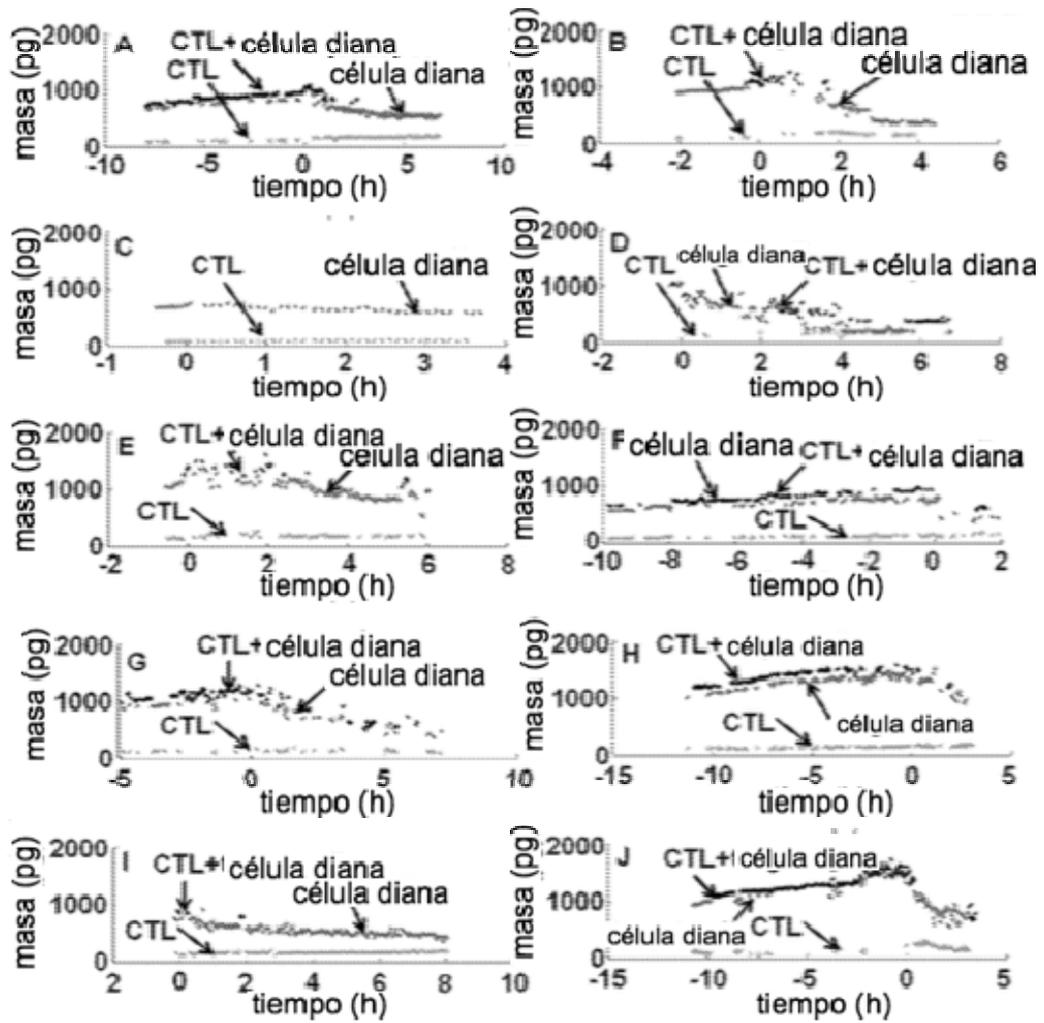


Fig. 10

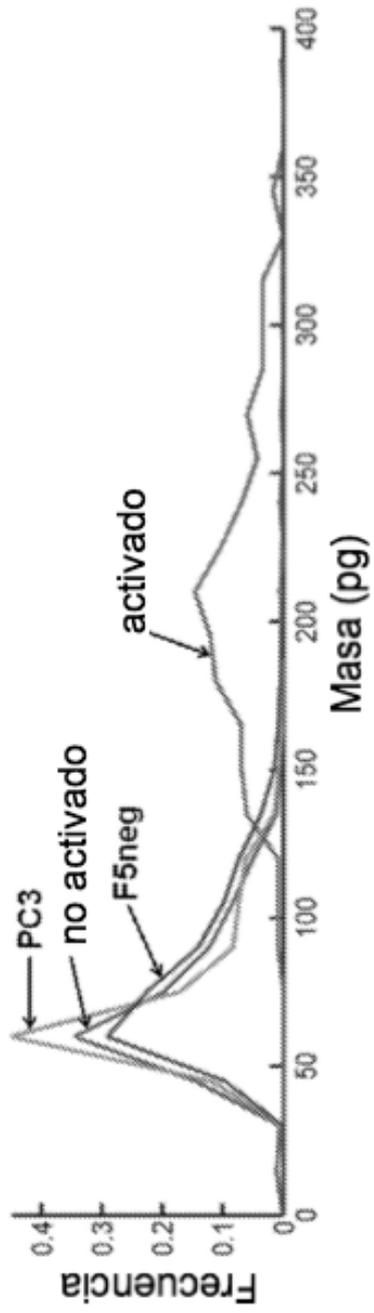


Fig. 11A

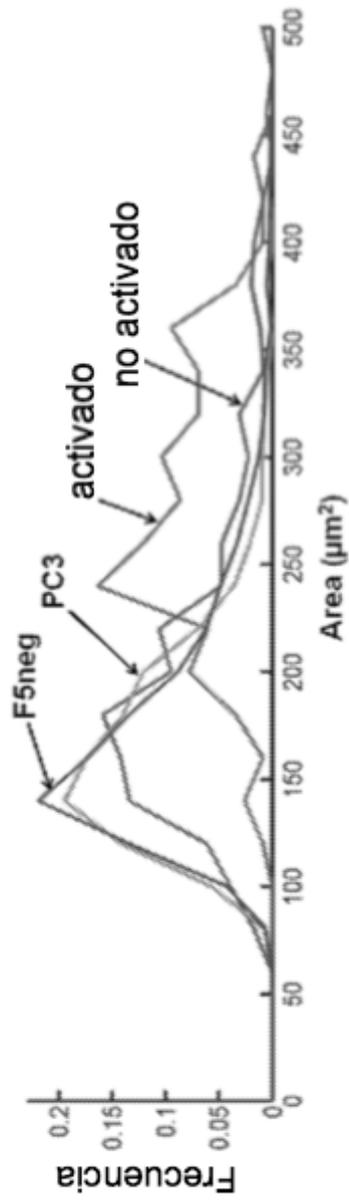


Fig. 11B

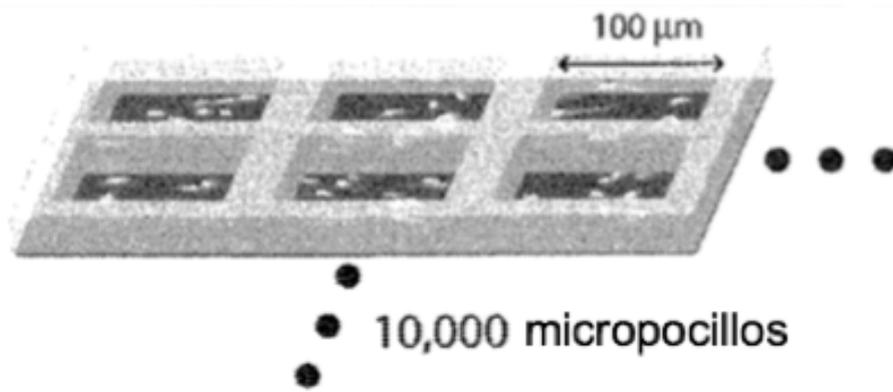


Fig. 12