

MÉTODOS PARA TRATAR LAS ENFERMEDADES ASOCIADAS AL VPH

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de los EE. UU. N.º 62/641.988, presentada el 12 de marzo de 2018, Solicitud Provisional de los EE. UU. N.º 62/794.517, presentada el 18 de enero de 2019, Solicitud Provisional de los EE. UU. N.º 62/812,225, presentada el 28 de febrero, 2019 y solicitud de patente EP N.º 19161964.2, presentada el 11 de marzo de 2019; que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

10 CAMPO DE LA INVENCION

- La presente descripción se refiere en general a células inmunes que comprenden un antígeno y un adyuvante, métodos para fabricar tales células inmunes modificadas y métodos para usar dichas células inmunes modificadas para tratar una enfermedad asociada al VPH, prevenir una enfermedad asociada al VPH y para la modulación de una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Los papilomavirus son pequeños virus de ADN no envueltos con un tamaño de virión de ~55 nm de diámetro. Más de 100 genotipos de VPH están completamente caracterizados, y se presume que existe un número mayor. El VPH es una causa conocida de cáncer cervical, así como algunos cánceres vulvar, vaginal, pene, orofaríngeo, anal y rectal. Aunque la mayoría de las infecciones por VPH son asintomáticas y se eliminan espontáneamente, las infecciones persistentes con uno de los tipos de VPH oncogénicos pueden progresar a precáncer o cáncer. Otras enfermedades asociadas al VPH pueden incluir verrugas comunes, verrugas plantares, verrugas planas, verrugas

anogenitales, lesiones anales, epidermodisplasia, hiperplasia epitelial focal, papilomas bucales, quistes verrugosos, papilomatosis laríngea, lesiones intraepiteliales escamosas (CIE), neoplasia intraepitelial cervical (CIN), neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) y neoplasia intraepitelial vaginal (VAIN).

- 5 Muchos de los tipos conocidos de virus del papiloma humano (VPH) causan lesiones benignas con un subconjunto que es oncogénico. En función de las relaciones epidemiológicas y filogenéticas, los tipos de VPH se clasifican en quince "tipos de alto riesgo" (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) y tres "tipos probables de alto riesgo" (VPH 26, 53 y 66), que en
- 10 conjunto se manifiestan como cambios y cánceres cervicales de grado bajo y alto, así como otros cánceres anogénicos, como vulva, vaginal, pene, anal, y cáncer perianal, así como cánceres de cabeza y cuello. Recientemente, también se describió la asociación de los tipos de alto riesgo VPH 16 y 18 con cáncer de mama. Se sabe que once tipos de VPH clasificados como "tipos de bajo riesgo"
- 15 (VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81) se manifiestan como cambios cervicales benignos de bajo grado, verrugas genitales y papilomatosis respiratoria recurrente. Los tipos de VPH cutáneos 5, 8 y 92 están asociados con el cáncer de piel. En algunos cánceres asociados con el VPH, el sistema inmunológico está deprimido y, en consecuencia, la respuesta antitumoral se ve afectada
- 20 significativamente. Ver Suresh y Burtness Am J Hematol Oncol 13 (6): 20–27 (2017).

La inmunoterapia se puede dividir en dos tipos principales de intervenciones, ya sean pasivas o activas. Los protocolos pasivos incluyen la administración de células preactivadas y/o modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células

25 CAR T), anticuerpos terapéuticos específicos de la enfermedad y/o citoquinas. Las estrategias de inmunoterapia activa están dirigidas a estimular las funciones efectoras del sistema inmune in vivo. Varios protocolos activos actuales incluyen

estrategias de vacunación con péptidos, lisados o células completas alogénicas asociadas a la enfermedad, infusión de DC autólogas como vehículos para la administración de antígeno tumoral e infusión de moduladores del punto de control inmune. Ver Papaioannou, Nikos E., et al. Anales de medicina traslacional 4.14 (2016). La inmunoterapia adoptiva puede emplearse para modular la respuesta inmune, mejorar la actividad antitumoral y lograr el objetivo de tratar o prevenir los cánceres asociados al VPH.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ y las células T helper (Th) CD4+ estimuladas por antígenos asociados a la enfermedad tienen el potencial de atacar y destruir las células enfermas. Los métodos descritos en este documento se utilizan para generar células inmunes modificadas de novo con un alto rendimiento y de manera eficiente, lo que induce una respuesta robusta de las células T a los antígenos del VPH.

Todas las referencias citadas en este documento, incluidas las solicitudes de patentes y publicaciones, se incorporan como referencia en su totalidad. Las publicaciones de patente WO 2017041050, WO 2016070136 se incorporan aquí expresamente como referencia en su totalidad.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad asociada con el virus del papiloma humano (VPH) en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde el sistema inmunitario modificado las células comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el adyuvante se presenta intracelularmente. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para prevenir una enfermedad asociada con el VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar

- al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno del VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para
- 5 modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el adyuvante se presenta intracelularmente.
- 10 En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad asociada con VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el
- 15 adyuvante se presenta intracelularmente; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así que perturbaciones de la célula de entrada sean lo suficientemente grandes para que el antígeno y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En
- 20 algunas formas de realización, la invención proporciona un método para prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende
- 25

células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula de entrada sean lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el adyuvante se presenta intracelularmente; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada que comprende un antígeno de VPH a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, por lo tanto causando perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grande para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así

las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% al 99% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, la constricción está en un canal. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas. En algunas formas de realización, el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en el exterior de la célula. En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la proporción de antígeno de VPH a adyuvante incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

En algunas formas de realización, la respuesta inmune está mejorada. En algunas formas de realización, se mejora la respuesta inmune al antígeno de VPH.

En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C. En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN. En algunas formas de realización, el CpG ODN es CpG

ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes
5 antígenos de VPH.

En algunas formas de realización, un antígeno en el conjunto de antígenos múltiples no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de antígenos múltiples. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de VPH y una o más
10 secuencias peptídicas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH se forma junto con otros antígenos o con el adyuvante. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un antígeno de VPH-16 o de VPH-18. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH está compuesto por un epítipo específico de HLA-A2. En algunas formas de realización, el antígeno de
15 VPH es un antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende un antígeno E6 de VPH y un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas. En
20 algunas formas de realización, el péptido restringido por HLA-A2 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4. En algunas formas de realización, el polipéptido flanqueante N-terminal comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 5-10 y/o el polipéptido flanqueante C-terminal comprende la secuencia de aminoácidos de
25 cualquiera de las SEQ ID NOs: 11- 17. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18-26. En algunas formas de

realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido a clase I de MHC. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.

En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana. En algunas formas de realización, el agente es un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina o EDTA. En algunas formas de realización, el agente comprende albúmina de suero de ratón (MSA). En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es B7-H2, B7-1, B7-2, CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4-1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155, o

CD112. En algunas formas de realización, la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

5 En algunas formas de realización, la célula inmune es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, basófilos, o una célula precursora hematopoyética. En algunas formas de realización, la célula inmune no es una célula B.

10 En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de

15 clase II. En algunas formas de realización, la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNhc, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En algunas

20 formas de realización, la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico. En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta

25 inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional. En algunas formas de realización, la vida

media en circulación de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media en circulación de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo para el que fueron administrados En algunas formas de

5 realización, la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK y las células T natural killer. En algunas formas de realización, la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$. En algunas formas de realización, la célula

10 modificada es alogénica al individuo. En algunas formas de realización, la célula modificada es autóloga para el individuo. En algunas formas de realización, el individuo está preconditionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.

En algunas formas de realización, los métodos comprenden además administrar

15 al individuo un adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante es IFN α o CpG ODN. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran

20 secuencialmente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el adyuvante. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante.

25 En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra en combinación con la administración de un inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, la

composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran secuencialmente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM-3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA.

En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH. En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno.

En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el método comprende administraciones múltiples de la composición que comprende las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el método comprende una primera administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas, seguida de una segunda administración de la composición que

comprende las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, la segunda administración es aproximadamente un mes después de la primera administración.

En algunas formas de realización, la enfermedad asociada a VPH es un cáncer asociado a VPH. En algunas formas de realización, el cáncer asociado al VPH es cáncer cervical, cáncer anal, cáncer orofaríngeo, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de piel o cáncer de cabeza y cuello. En algunas formas de realización, la enfermedad asociada al VPH es una enfermedad infecciosa asociada al VPH.

- 10 En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad relacionada con el virus del papiloma humano (VPH) en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde el sistema inmunitario modificado las células comprenden un antígeno de VPH que
- 15 comprende un aminoácido con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para prevenir una enfermedad asociada con el VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células
- 20 inmunes modificadas comprenden un antígeno del VPH que comprende un aminoácido con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad
- 25 efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con

cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula de entrada sea lo suficientemente grande para que el antígeno pase a través de ella y forme una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para prevenir una enfermedad asociada al VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con

cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada

5 en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula de entrada sean lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH pase a través de ella y forme una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las

10 células inmunes modificadas. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que

15 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada

20 en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula de entrada sean lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH pase a través de ella y forme una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las

25 células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas

formas de realización, las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% al 99% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, la constricción está en un canal. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa a través de la constricción.

En algunas formas de realización, el método comprende además administrar al individuo un adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante es IFN α o CpG ODN. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran secuencialmente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el adyuvante. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula inmune perturbada de la etapa b se incuba con el antígeno de VPH y un adyuvante. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.

En algunas formas de realización, el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula. En algunas formas de realización, la célula

inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en el exterior de la célula.

En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la proporción de antígeno de VPH a adyuvante incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

En algunas formas de realización, la respuesta inmune está mejorada. En algunas formas de realización, se mejora la respuesta inmune al antígeno de VPH.

En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C. En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN. En algunas formas de realización, el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra el mismo y/o diferentes antígenos de VPH. En algunas formas de realización, un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de VPH y una o más secuencias peptídicas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH se forma junto con otros antígenos o con el adyuvante. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un antígeno de VPH-16 o de VPH-18. En algunas formas de realización, el antígeno

de VPH está compuesto por un epítipo específico de HLA-A2. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende un antígeno E6 de VPH y un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido a clase I de MHC. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.

En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana. En algunas formas de realización, el agente es un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina o EDTA. En algunas formas de realización, el agente comprende albúmina de suero

de ratón (MSA). En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es B7–H2, B7–1, B7–2, CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4–
5 1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155, o CD112. En algunas formas de realización, la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

En algunas formas de realización, la célula inmune es una célula T, una célula
10 dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, basófilos, o una célula precursora hematopoyética. En algunas formas de realización, la célula inmune no es una célula B.

En algunas formas de realización, la célula inmune es una célula T. En algunas
15 formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de
20 clase II. En algunas formas de realización, la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNh_c, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En algunas
25 formas de realización, la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico. En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un

individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional. En algunas formas de realización, la vida media en circulación de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media en circulación de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo para el que fueron administrados. En algunas formas de realización, la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK y las células T natural killer. En algunas formas de realización, la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$. En algunas formas de realización, la célula modificada es alogénica al individuo. En algunas formas de realización, la célula modificada es autóloga para el individuo. En algunas formas de realización, el individuo está preconditionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.

En algunas formas de realización, los métodos comprenden además administrar al individuo un adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante es IFN α o CpG ODN. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran secuencialmente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el adyuvante. En algunas formas de realización, la composición que comprende las

células inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra en combinación con la administración de un inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran secuencialmente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM-3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA.

En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH. En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno.

En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células

inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el método comprende administraciones múltiples de la composición que comprende las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el método comprende una primera administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas, seguida de una segunda administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, la segunda administración es aproximadamente un mes después de la primera administración.

En algunas formas de realización, la enfermedad asociada a VPH es un cáncer asociado a VPH. En algunas formas de realización, el cáncer asociado al VPH es cáncer cervical, cáncer anal, cáncer orofaríngeo, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de piel o cáncer de cabeza y cuello. En algunas formas de realización, la enfermedad asociada al VPH es una enfermedad infecciosa asociada al VPH.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende células inmunes modificadas, en la que las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un CpG ODN y un antígeno de VPH con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un CpG ODN y un antígeno de VPH en donde el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través

de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el ODN CpG pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el ODN CpG durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el ODN CpG entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, la constricción está en un canal. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción. En algunas formas de realización, la composición comprende además un adyuvante. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH y/o el ODN de CpG están presentes en el citosol y/o endosomas. En algunas formas de realización, el antígeno y/o el ODN CpG están presentes en múltiples compartimentos de la célula. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un ODN CpG en la superficie de la célula. En algunas formas de realización, la concentración de ODN CpG incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1

mM. En algunas formas de realización, la proporción de antígeno de VPH a ODN CpG incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante comprende CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra el mismo y/o diferentes antígenos de VPH. En algunas formas de realización, un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de VPH y una o más secuencias peptídicas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH se forma junto con otros antígenos, con un adyuvante o con el CpG ODN. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH está compuesto por un epítipo específico de HLA-A2. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas.

En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el ODN CpG a una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la relación del antígeno de VPH a la ODN CpG está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

En algunos aspectos, la invención comprende una composición que comprende células inmunes modificadas, en la que las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH, en donde el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas se preparan al: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes como para que el antígeno del VPH pase a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, la constricción está en un canal. En algunas formas de realización,

se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción.

En algunas formas de realización, la composición comprende además un adyuvante. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas. En algunas formas de realización, el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en la superficie de la célula. En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la proporción de antígeno de VPH a adyuvante incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C. En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN. En algunas formas de realización, el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH. En algunas formas de realización, un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo

antigénico de VPH y una o más secuencias peptídicas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH se forma junto con otros antígenos o con el adyuvante. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH está compuesto por un epítipo específico de HLA–A2. En algunas formas de

5 realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la relación del

10 antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido a clase I de MHC. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.

15 En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente. En algunas formas de realización,

El agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizador o

20 un cofactor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana. En algunas formas de realización, el agente es un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D–sacarosa, PEG1500, L–arginina, L–glutamina o EDTA. En algunas formas de realización, el agente comprende MSA. En

25 algunas formas de realización, las células se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es B7–H2 (ICOSL),

B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4-1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112. En algunas formas de realización, la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

- 5 En algunas formas de realización, la célula inmune es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, basófilos, o una célula precursora hematopoyética. En algunas formas de realización, la célula inmune no es una célula B. En algunas formas de
- 10 realización, la célula inmune es una célula T. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para
- 15 reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En algunas formas de realización, la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNhc, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de
- 20 MHC de clase I y/o MHC de clase II. En algunas formas de realización, la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico. En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas
- 25 adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación

adicional. En algunas formas de realización, la vida media en circulación de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media en circulación de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un
5 individuo para el que fueron administrados.

En algunas formas de realización, las células T incluyen una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK y las células T natural killer. En algunas formas de realización, la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las
10 células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$. En algunas formas de realización, la célula modificada es alogénica a un individuo. En algunas formas de realización, la célula modificada es autóloga para un individuo. En algunas formas de realización, un individuo está precondicionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.

15 En algunas formas de realización, la composición comprende además un inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM-3, LAG3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA. En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las
20 células inmunes modificadas a un resultado individual en la activación y/o expansión de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH. En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a un individuo da como resultado la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno.

25 En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el antígeno comprende

una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunas formas de realización, la célula inmune es una célula T, una célula
5 dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, basófilos, o una célula precursora hematopoyética. En algunas formas de realización, la célula inmune no es una célula B. En algunas formas de realización, la célula inmune es una célula T. En algunas formas de realización, la
10 célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En algunas formas de
15 realización, la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNh_c, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En algunas formas de realización, la
20 modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico. En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada
25 en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional. En algunas formas de realización, la vida media en circulación de las

células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media en circulación de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo para el que fueron administrados.

- 5 En algunas formas de realización, las células T incluyen una o más células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria, células CIK y células T natural killer. En algunas formas de realización, la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$. En algunas formas de
- 10 realización, la célula modificada es alogénica a un individuo. En algunas formas de realización, la célula modificada es autóloga para un individuo. En algunas formas de realización, un individuo está precondicionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.

- En algunas formas de realización, la composición comprende además un inhibidor
- 15 del punto de control inmune. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a un resultado individual en la activación y/o expansión de los linfocitos T citotóxicos (CTL)
- 20 específicos para el antígeno de VPH. En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a un individuo da como resultado la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno.

- En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de la composición
- 25 comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el antígeno comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID

NO: 23. En algunas formas de realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende

5 administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el adyuvante se presenta intracelularmente; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de

10 entrada que comprende un antígeno de VPH a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, por lo tanto causando perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grande para que el antígeno y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada

15 perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante entre en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al

20 individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el adyuvante se presenta intracelularmente; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada que

25 comprende el adyuvante a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada

lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH pase a través de ellas para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las
5 células inmunes modificadas.

En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la
10 constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, la constricción está en un canal. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH y/o el adyuvante están
15 presentes en el citosol y/o endosomas. En algunas formas de realización, el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula. En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de
20 antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C. En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN. En algunas formas de realización, el CpG ODN es CpG
25 ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un antígeno de VPH-16 o de VPH-18. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un

- antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.
- 10 En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo que comprende administrar al individuo una célula inmune modificada asociada con un antígeno de VPH, en donde la célula inmune modificada se prepara mediante un proceso que comprende los pasos de: a) incubar una célula de entrada con el antígeno del VPH y/o un adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH se asocie con la célula de entrada; generando así la célula inmune modificada asociada con el antígeno. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN. En algunas formas de realización, el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Fig. 1A muestra un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa. La Fig. 1B muestra el crecimiento del tumor, medido por la fórmula

$((\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2)$ en comparación con los ratones del grupo no tratado (sin transferencia adoptiva de células T) y los grupos de tratamiento B–E descritos en la Fig. 1A.

La Fig. 2A muestra un esquema representativo para evaluar antígenos E7. La Fig.

5 2B muestra que el impacto de la secuencia de SLP en las células T CD8+ productoras de IFN- γ generadas en respuesta a la vacunación con T_{APC}.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la capacidad de los SLP de E6 para inducir una respuesta inmune específica de antígenos en células T respondedoras de E6 en un modelo humano in vitro.

10 La Fig. 4 muestra la capacidad de los SLP de E7 para inducir una respuesta inmune específica de antígeno en células T respondedoras E711–20, así como el impacto de la secuencia de SLP en la activación de APC (Tapc) de células T de SQZ en un modelo humano in vitro.

La Fig. 5 muestra los resultados de un estudio para evaluar la dosis de antígeno
15 para APC de células T SQZ en un modelo humano in vitro.

La Fig. 6 muestra los resultados de un estudio para determinar la variabilidad del donante para las APC de células T SQZ en un modelo humano in vitro.

La Fig. 7A es un esquema de un experimento para comparar la robustez de las respuestas inmunes usando diferentes adyuvantes. La Fig. 7B muestra los
20 resultados del experimento para comparar la robustez de las respuestas inmunes utilizando poli I:C y un CpG ODN.

La Fig. 8A es un esquema de un experimento que evalúa el efecto de la concentración de CpG ODN en las respuestas inmunes. La Fig. 8B muestra los resultados del experimento que evalúa el efecto de la concentración de CpG ODN
25 en las respuestas inmunes.

La Fig. 9A es un esquema de un experimento que evalúa el programa de dosificación de CpG ODN en respuestas inmunes. La Fig. 9B muestra los

resultados del experimento que evalúa el programa de dosificación de CpG ODN en las respuestas inmunes.

La Fig. 10A es un esquema de un experimento para evaluar la combinación de administración adyuvante intracelular y sistémica para la función antitumoral de T_{APC} . La Fig. 10B muestra las respuestas de las células T para cada grupo experimental y la Fig. 10C muestra el crecimiento de tumores para cada grupo experimental. La Fig. 10D muestra el crecimiento del tumor después de la recarga en animales tratados con SQZ (E7 + CpG) en relación con los animales no tratados.

La Fig. 11A es un esquema de un experimento para evaluar el efecto de combinar múltiples antígenos de VPH para la función antitumoral de T_{APC} . La Fig. 11B muestra las respuestas de las células T para cada grupo experimental y la Fig. 11C muestra el crecimiento de tumores para cada grupo experimental.

La Fig. 12A muestra los resultados de un experimento que evalúa la importancia de la vía de administración del adyuvante CpG para el efecto antitumoral de T_{APC} específico de E7. Se proporciona el horario de dosificación. La Fig. 12B muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo para ratones individuales dentro de cada grupo de tratamiento.

La Fig. 13 muestra un esquema de un experimento para evaluar la capacidad de los adyuvantes coadministrados para conducir a la infiltración de tumores de células T específicas de E7. Las respuestas de las células T se muestran en el panel inferior.

La Fig. 14A es un esquema de un experimento para determinar un programa de vacunación para el cebado y el refuerzo de T_{APC} s cargadas con un péptido largo sintético E7 (SLP) + CpG. La Fig. 14B muestra el crecimiento de tumores para cada grupo experimental.

La Fig. 15 muestra los resultados de un experimento para mostrar que T_{APC} S sometidas a SQZ puede presentar antígeno directamente.

La Fig. 16 muestra que la administración de SQZ de un adyuvante no altera significativamente los niveles de citoquinas de células T in vitro.

- 5 La Fig. 17 muestra que el suministro de SQZ de antígeno +/- adyuvante no altera significativamente los niveles de citoquinas en suero in vivo.

- La Fig. 18 muestra que el suministro de SQZ de lisados celulares que contienen VPH-E7 en células dendríticas (como APC), seguido de cocultivo de las células dendríticas sometidas a SQZ con respondedores de células T CD8 conduce a una
10 respuesta de células T más robusta en comparación a la entrega de los mismos lisados en células dendríticas por endocitosis.

- La Fig. 19A muestra un esquema representativo de un experimento para evaluar la capacidad de las células B como APC para inducir una respuesta endógena. La Fig. 19B muestra los niveles de linfocitos T CD8+ positivos para IFN- γ inducidos
15 por la exposición a B9-23, generados en respuesta a la vacunación con BAPC cargada con OVA. La Fig. 19C muestra los niveles de células T CD8+ positivas para IFN- γ inducidas por la exposición a E7, generadas en respuesta a la vacunación con BAPC cargada con E7.

- La Fig. 20A muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en un experimento
20 para determinar la capacidad de las células B cargadas con SQZ para actuar como APC para el tratamiento profiláctico de los tumores asociados con el VPH. La Fig. 20B muestra los datos de supervivencia correspondientes a lo largo del tiempo del tratamiento profiláctico con APC de células B para tumores asociados al VPH.

- 25 La Fig. 21A muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en un experimento para determinar la capacidad de las células B cargadas con SQZ para actuar como APC para el tratamiento terapéutico de los tumores asociados con el VPH.

La Fig. 21B muestra los datos de supervivencia correspondientes a lo largo del tiempo del tratamiento terapéutico APC de células B para tumores asociados al VPH.

La Fig. 22A muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en un experimento
5 para determinar la capacidad de las células B cargadas con SQZ para actuar como APC para el tratamiento terapéutico para los tumores asociados con el VPH. La Fig. 22B muestra los perfiles y porcentajes de diversos fenotipos de células infiltrantes de tumores que se reclutaron para los tumores.

La Fig. 23 muestra la secreción de IFN- γ por los respondedores E7, como una
10 respuesta in vitro específica de antígeno a BAPC SQZ cargada con VPH16 E7 SLP.

La Fig. 24 muestra las cantidades relativas de reclutamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en tumores administrados con T_{APC} SQZ cargados con VPH16 E7 SLP, con o sin coadministración de adyuvante.

La Fig. 25 muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en un experimento
15 para determinar la capacidad de las células T cargadas con SQZ para actuar como APC para el tratamiento profiláctico para los tumores asociados al VPH, para ambos a corto plazo (tumor en el flanco derecho, inyectado el Día 0) así como protección a más largo plazo (tumor en el flanco izquierdo, inyectado el Día
20 60).

La Fig. 26 muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en un experimento para determinar el efecto de la dosis de células T, la administración conjunta de adyuvante y el número de administraciones (cebado vs. cebado/refuerzo) en la capacidad de SQZ cargado Las células T actúan como APC para el tratamiento
25 terapéutico de los tumores asociados al VPH. “P” indica cebado, y “B” indica refuerzo en la Fig. 26.

La Fig. 27A muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en un experimento para determinar la capacidad de las células B cargadas con SQZ para actuar como APC para el tratamiento terapéutico para los tumores asociados al VPH, en comparación con las células B electroporadas, y una vacuna peptídica en dosis alta (SC SLP). La Fig. 27B muestra los datos de supervivencia correspondientes a lo largo del tiempo del tratamiento terapéutico APC de células B para los tumores asociados al VPH, en comparación con las células B electroporadas, y una vacuna peptídica de alta dosis.

La Fig. 28A muestra un esquema representativo de un experimento para evaluar la capacidad de los esplenocitos como APC para inducir una respuesta endógena. La Fig. 28B muestra los niveles de linfocitos T CD8+ positivos para IFN- γ inducidos por la exposición a B9-23, generados en respuesta a la vacunación con SplenocyteAPC cargada con OVA. La Fig. 28C muestra los niveles de células T CD8+ positivas para IFN- γ inducidas por la exposición a E7, generadas en respuesta a la vacunación con esplenocitos_{APC} cargada con E7.

La Fig. 29A muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en un experimento para determinar la capacidad de los esplenocitos cargados de SQZ para actuar como APC para el tratamiento terapéutico de los tumores asociados con el VPH. La Fig. 29B muestra los datos de supervivencia correspondientes a lo largo del tiempo del tratamiento terapéutico de APC con esplenocitos para tumores asociados al VPH.

La Fig. 30 muestra la secreción de IFN- γ por los respondedores E7, como una respuesta in vitro específica de antígeno a PBMCAPC SQZ cargado con VPH16 E7 SLP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En algunos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar y prevenir una enfermedad asociada al VPH, y/o modular la respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH que comprende administrar al

5 individuo una composición que comprende células inmunes modificadas, en el que las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar y prevenir una enfermedad asociada al

10 VPH, y/o modular la respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan pasando primero una suspensión celular que comprende

15 una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula de entrada sean lo suficientemente grandes para que el antígeno y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y luego

20 incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para generar una composición que comprende células inmunes modificadas, en

25 donde una célula inmune pasa a través de una constricción, en donde la constricción deforma la célula, causando así una perturbación de la célula tal que

un antígeno de VPH y/o un adyuvante entra en la célula inmune para ser modificado.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar y prevenir una enfermedad asociada al VPH, y/o modular la respuesta inmune en

- 5 un individuo con una enfermedad asociada al VPH que comprende administrar al individuo una composición que comprende células inmunes modificadas, en el que las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH. En algunos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar y prevenir una enfermedad asociada al VPH, y/o modular la respuesta
- 10 inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH, en donde las células inmunes modificadas se preparan pasando primero una
- 15 suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno pase a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y
- 20 luego incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para generar una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde una célula
- 25 inmune pasa a través de una constricción, en donde la constricción deforma la célula, causando así una perturbación de la célula de modo tal que un antígeno de VPH ingresa a la célula inmune para ser modificado. En algunas formas de

realización adicionales, el método para tratar y prevenir una enfermedad asociada a VPH, y/o modular la respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada a VPH comprende además administrar un adyuvante al individuo. En algunas formas de realización, la composición de células inmunes modificadas comprende además un adyuvante (por ejemplo, un oligonucleótido CpG (CpG ODN) o IFN α . En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas además comprenden intracelularmente un adyuvante, tal como un CpG ODN.

Técnicas generales

- 10 Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en este documento generalmente se entienden bien y se emplean comúnmente utilizando una metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993–8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987);

PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Immunobiology* (C.A. Janeway et al., 2004); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988–1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

Definiciones

Para los fines de interpretar esta especificación, se aplicarán las siguientes definiciones y siempre que sea apropiado, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición establecida a continuación entre en conflicto con cualquier documento incorporado aquí como referencia, prevalecerá la definición establecida.

Como se usa en este documento, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluye referencias en plural a menos que se indique lo contrario.

Se entiende que los aspectos y formas de realización de la invención descrita en este documento incluyen aspectos que comprenden "que comprende", "que consiste" y "que consiste esencialmente en" aspectos y formas de realización.

El término "aproximadamente", como se usa en este documento, se refiere al rango de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en este documento incluye (y describe) formas de realización que se dirigen a ese valor o parámetro en sí.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. El "tratamiento", como se usa en este documento, cubre cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para la enfermedad en un mamífero, incluido un ser humano. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, uno o más de: alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, prevención o retraso de la diseminación (por ejemplo, metástasis, por ejemplo, metástasis) al pulmón o al ganglio linfático) de la enfermedad, previniendo o retrasando la recurrencia de la enfermedad, retrasando o disminuyendo la progresión de la enfermedad, mejorando el estado de la enfermedad, inhibiendo la enfermedad o la progresión de la enfermedad, inhibiendo o retardando la enfermedad o su progresión, deteniendo su desarrollo, y remisión (ya sea parcial o total). También abarca el "tratamiento" una reducción de las consecuencias patológicas de una enfermedad proliferativa. Los métodos de la invención contemplan uno o más de estos aspectos del tratamiento.

En el contexto del cáncer, el término "tratar" incluye cualquiera o todos los siguientes: inhibir el crecimiento de las células cancerosas, inhibir la replicación de las células cancerosas, disminuir la carga tumoral total y mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

El término "poro", como se usa en el presente documento, se refiere a una abertura, que incluye sin limitación, un orificio, rasgadura, cavidad, abertura, rotura, espacio o perforación dentro de un material. En algunos ejemplos, (cuando se indica) el término se refiere a un poro dentro de una superficie de la presente divulgación. En otros ejemplos, (donde se indique) un poro puede referirse a un poro en una membrana celular.

El término "membrana", como se usa en el presente documento, se refiere a una barrera selectiva u hoja que contiene poros. El término incluye una estructura de

lámina flexible que actúa como un límite o revestimiento. En algunos ejemplos, el término se refiere a una superficie o filtro que contiene poros. Este término es distinto del término "membrana celular".

El término "filtro", como se usa en el presente documento, se refiere a un artículo
5 poroso que permite el paso selectivo a través de los poros. En algunos ejemplos, el término se refiere a una superficie o membrana que contiene poros.

El término "heterogéneo", como se usa en el presente documento, se refiere a algo que está mezclado o no es uniforme en su estructura o composición. En algunos ejemplos, el término se refiere a poros que tienen tamaños, formas o
10 distribuciones variadas dentro de una superficie dada.

El término "homogéneo", como se usa en el presente documento, se refiere a algo que es consistente o uniforme en su estructura o composición. En algunos ejemplos, el término se refiere a poros que tienen tamaños, formas o distribución consistentes dentro de una superficie dada.

15 El término "homólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que se deriva del mismo organismo. En algunos ejemplos, el término se refiere a un ácido nucleico o proteína que normalmente se encuentra o expresa dentro del organismo dado.

El término "heterólogo" en lo que se refiere a secuencias de ácido nucleico tales
20 como secuencias de codificación y secuencias de control, denota secuencias que normalmente no están unidas y/o no están normalmente asociadas con una célula en particular. Por lo tanto, una región "heteróloga" de una construcción de ácido nucleico o un vector es un segmento de ácido nucleico dentro o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra
25 molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una construcción de ácido nucleico podría incluir una secuencia de codificación flanqueada por secuencias no encontradas en asociación con la secuencia de

codificación en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia de codificación heteróloga es una construcción en la que la secuencia de codificación en sí no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con una construcción que normalmente no está presente en la célula se consideraría heteróloga para los fines de esta invención. La variación alélica o los eventos mutacionales que ocurren naturalmente no dan lugar a ADN heterólogo, como se usa en este documento.

El término "heterólogo" en lo que se refiere a secuencias de aminoácidos tales como secuencias peptídicas y secuencias polipeptídicas, denota secuencias que normalmente no están unidas, y/o no están normalmente asociadas con una célula particular. Por lo tanto, una región "heteróloga" de una secuencia peptídica es un segmento de aminoácidos dentro o unidos a otra molécula de aminoácido que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una construcción peptídica podría incluir la secuencia de aminoácidos del péptido flanqueada por secuencias no encontradas en asociación con la secuencia de aminoácidos del péptido en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia peptídica heteróloga es una construcción en la que la propia secuencia peptídica no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen aminoácidos diferentes según la codificación del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con un vector que expresa una construcción de aminoácido que normalmente no está presente en la célula se consideraría heteróloga para los fines de esta invención. La variación alélica o los eventos mutacionales que ocurren naturalmente no dan lugar a péptidos heterólogos, como se usa en este documento.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibir" puede referirse al acto de bloquear, reducir, eliminar o antagonizar de otro modo la presencia o una

actividad de un objetivo particular. La inhibición puede referirse a la inhibición parcial o la inhibición completa. Por ejemplo, inhibir una respuesta inmune puede referirse a cualquier acto que lleve a un bloqueo, reducción, eliminación o cualquier otro antagonismo de una respuesta inmune. En otros ejemplos, la inhibición de la expresión de un ácido nucleico puede incluir, entre otros, la reducción en la transcripción de un ácido nucleico, la reducción de la abundancia del ARNm (por ejemplo, silenciar la transcripción del ARNm), la degradación del ARNm, la inhibición de la traducción del ARNm, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "suprimir" puede referirse al acto de disminuir, reducir, prohibir, limitar, disminuir o disminuir de otro modo la presencia o actividad de un objetivo particular. La supresión puede referirse a la supresión parcial o la supresión completa. Por ejemplo, suprimir una respuesta inmune puede referirse a cualquier acto que conduzca a disminuir, reducir, prohibir, limitar, disminuir o disminuir de alguna otra manera una respuesta inmune. En otros ejemplos, la supresión de la expresión de un ácido nucleico puede incluir, entre otros, la reducción en la transcripción de un ácido nucleico, la reducción de la abundancia del ARNm (por ejemplo, silenciar la transcripción del ARNm), la degradación del ARNm, la inhibición de la traducción del ARNm, etc.

Como se usa en este documento, el término "potenciar" puede referirse al acto de mejorar, potenciar, aumentar o aumentar de otro modo la presencia o actividad de un objetivo en particular. Por ejemplo, mejorar una respuesta inmune puede referirse a cualquier acto que lleve a mejorar, reforzar, elevar o aumentar de otro modo una respuesta inmune. En un ejemplo de ejemplo, potenciar una respuesta inmune puede referirse a emplear un antígeno y/o adyuvante para mejorar, potenciar, aumentar o aumentar de otro modo una respuesta inmune. En otros ejemplos, mejorar la expresión de un ácido nucleico puede incluir, entre otros, un aumento en la transcripción de un ácido nucleico, un aumento en la abundancia

de ARNm (por ejemplo, aumento de la transcripción de ARNm), una disminución en la degradación del ARNm, un aumento en la traducción de ARNm, etc.

- Como se usa en el presente documento, el término "modular" puede referirse al acto de cambiar, alterar, variar, o modificar de otro modo la presencia, o una actividad de un objetivo particular. Por ejemplo, modular una respuesta inmune puede referirse a cualquier acto que lleve a cambiar, alterar, variar o modificar de otro modo una respuesta inmune. En algunos ejemplos, "modular" se refiere a mejorar la presencia o actividad de un objetivo en particular. En algunos ejemplos, "modular" se refiere a la supresión de la presencia o actividad de un objetivo en particular. En otros ejemplos, la modulación de la expresión de un ácido nucleico puede incluir, entre otros, un cambio en la transcripción de un ácido nucleico, un cambio en la abundancia del ARNm (por ejemplo, un aumento de la transcripción del ARNm), un cambio correspondiente en la degradación del ARNm, un cambio en la traducción de ARNm, etc.
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "inducir" puede referirse al acto de iniciar, solicitar, estimular, establecer o, de lo contrario, producir un resultado. Por ejemplo, inducir una respuesta inmune puede referirse a cualquier acto que lleve a iniciar, solicitar, estimular, establecer o, de lo contrario, producir una respuesta inmune deseada. En otros ejemplos, la inducción de la expresión de un ácido nucleico puede incluir, entre otros, el inicio de la transcripción de un ácido nucleico, el inicio de la traducción de ARNm, etc.

- Como se usa en el presente documento, "células mononucleares de sangre periférica" o "PBMC" se refiere a una población heterogénea de células sanguíneas que tienen un núcleo redondo. Los ejemplos de células que pueden encontrarse en una población de PBMC incluyen linfocitos tales como células T, células B, células NK (incluidas células NKT y células CIK) y monocitos tales como macrófagos y células dendríticas. Una "pluralidad de PBMC" como se usa
- 25

en el presente documento se refiere a una preparación de PBMC que comprende células de al menos dos tipos de células sanguíneas. En algunas formas de realización, una pluralidad de PBMC comprende dos o más de células T, células B, células NK, macrófagos o células dendríticas. En algunas formas de
5 realización, una pluralidad de PBMC comprende tres o más de células T, células B, células NK, macrófagos o células dendríticas. En algunas formas de realización, una pluralidad de PBMC comprende cuatro o más de células T, células B, células NK, macrófagos o células dendríticas. En algunas formas de realización, una pluralidad de PBMC comprende células T, células B, células NK,
10 macrófagos y células dendríticas.

Las PBMC se pueden aislar por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, las PBMC se pueden derivar de la sangre periférica de un individuo en función de la densidad de las PBMC en comparación con otras células sanguíneas. En algunas formas de realización, las PBMC se derivan de la sangre periférica de un individuo
15 utilizando Ficoll (por ejemplo, un gradiente de Ficoll). En algunas formas de realización, las PBMC se derivan de la sangre periférica de un individuo utilizando el sistema de separación de células ELUTRA®.

En algunas formas de realización, una población de PBMC se aísla de un individuo. En algunas formas de realización, una pluralidad de PBMC es una
20 población autóloga de PBMC en donde la población se deriva de un individuo particular, manipulada por cualquiera de los métodos descritos en este documento, y devuelta al individuo particular. En algunas formas de realización, una pluralidad de PBMC es una población alogénica de PBMC en la que la población se deriva de un individuo, se manipula mediante cualquiera de los
25 métodos descritos en este documento y se administra a un segundo individuo.

En algunas formas de realización, una población de PBMC se aísla de un individuo. En algunas formas de realización, una pluralidad de PBMC es una

población autóloga de PBMC en donde la población se deriva de un individuo particular, manipulada por cualquiera de los métodos descritos en este documento, y devuelta al individuo particular. En algunas formas de realización, una pluralidad de PBMC es una población alogénica de PBMC en la que la
5 población se deriva de un individuo, se manipula mediante cualquiera de los métodos descritos en este documento y se administra a un segundo individuo.

En algunas formas de realización, una pluralidad de PBMC es una preparación reconstituida de PBMC. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC puede generarse mezclando células que se encuentran típicamente en una
10 población de PBMC; por ejemplo, mezclando poblaciones de dos o más de células T, células B, células NK o monocitos.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este
15 término incluye, pero no se limita a, ADN o ARN de cadena simple, doble o múltiple, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras sustancias naturales, químicamente o Bases de nucleótidos modificadas bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. El esqueleto del polinucleótido puede comprender azúcares y
20 grupos fosfato (como se puede encontrar típicamente en ARN o ADN), o azúcar o grupos fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, el esqueleto del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y fosforotioatos, y por lo tanto puede ser un oligodesoxinucleósido fosforamidato (P-NH₂), un oligómero mixto de
25 fosforotioato-fosfodiéster, o un oligómero mixto de fosforamidato-fosfodiéster. Además, se puede obtener un polinucleótido bicatenario a partir del producto de polinucleótido monocatenario de síntesis química, ya sea sintetizando la cadena

complementaria y recociendo las cadenas en condiciones apropiadas, o sintetizando la cadena complementaria de novo utilizando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

- Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no están limitados a una longitud mínima. Tales polímeros de residuos de aminoácidos pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, entre otros, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de la mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.
- Como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a una sustancia que modula y/o engendra una respuesta inmune. En general, el adyuvante se administra junto con un antígeno para efectuar la mejora de una respuesta inmune al antígeno en comparación con el antígeno solo. En el presente documento se describen diversos adyuvantes.
- Los términos "oligodesoxinucleótido CpG" y "CpG ODN" en este documento se refieren a moléculas de ADN de 10 a 30 nucleótidos de longitud que contienen un dinucleótido de citosina y guanina separados por un fosfato (también conocido

aquí como un dinucleótido "CpG" "CpG"). Los ODN de CpG de la presente divulgación contienen al menos un dinucleótido CpG no metilado. Es decir, la citosina en el dinucleótido CpG no está metilada (es decir, no es 5-metilcitosina). Los ODN de CpG pueden tener un esqueleto de fosforotioato (PS) parcial o
5 completo.

Como se usa en este documento, "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente compatible" se refiere a un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, por ejemplo, el material puede incorporarse a una composición farmacéutica administrada a un paciente sin
10 causar ningún efecto biológico indeseable significativo o interactuar de forma perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición en la que está contenida. Los portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables han cumplido preferiblemente con los estándares requeridos de pruebas toxicológicas y de fabricación y/o están incluidos en la Guía de ingredientes inactivos preparada
15 por la U.S. Food and Drug administration.

Para cualquiera de las características estructurales y funcionales descritas en el presente documento, los métodos para determinar estas características son conocidos en la técnica.

20 Sistemas de microfluidos y sus componentes

Canales microfluídicos para proporcionar constricciones de deformación celular.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar y prevenir una enfermedad asociada al VPH, y/o modular la respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método
25 comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e

intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan pasando primero una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada

5 en la suspensión, causando así perturbaciones de la entrada célula lo suficientemente grande para que el antígeno y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y luego incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula

10 de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, la constricción está contenida dentro de un canal microfluídico. En algunas formas de realización, se pueden colocar múltiples constricciones en paralelo y/o en serie dentro del canal microfluídico. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada

15 a medida que pasa a través de la constricción. Los ejemplos de canales microfluídicos que contienen constricciones de deformación celular para usar en los métodos descritos en este documento se describen en el documento WO 2013059343. Las superficies ejemplares que tienen poros para usar en los métodos descritos en este documento se describen en el documento WO

20 2017041050.

En algunas formas de realización, el canal microfluídico incluye un lumen y está configurado de tal manera que una célula inmune suspendida en un tampón puede pasar a través, en donde el canal microfluídico incluye una constricción. El canal microfluídico puede estar hecho de uno cualquiera de varios materiales,

25 incluyendo silicio, metal (por ejemplo, acero inoxidable), plástico (por ejemplo, poliestireno), cerámica, vidrio, sustratos cristalinos, sustratos amorfos o polímeros (por ejemplo, Poli metacrilato de metilo (PMMA), PDMS, copolímero de olefina

cíclica (COC), etc.). La fabricación del canal microfluídico se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, incluido el grabado en seco, el grabado en húmedo, la fotolitografía, el moldeo por inyección, la ablación con láser o las máscaras SU-8.

- 5 En algunas formas de realización, la constricción dentro del canal microfluídico incluye una parte de entrada, un punto central y una parte de salida. En algunas formas de realización, la longitud, profundidad y anchura de la constricción dentro del canal microfluídico puede variar. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción dentro del canal microfluídico es una función del diámetro de la
- 10 célula inmune. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción dentro del canal microfluídico es de aproximadamente el 20%, a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula inmune. En algunas formas de realización, el tamaño de la constricción es de aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%,
- 15 aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 99% del diámetro de las células inmunes. En algunas formas de realización, el tamaño de la constricción es aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%,
- 20 aproximadamente 80%, aproximadamente 90% o aproximadamente 99% de la sección transversal mínima Distancia de la célula inmune. En algunas formas de realización, el canal comprende un ancho de constricción de entre aproximadamente 2 μm y aproximadamente 10 μm o cualquier ancho o rango de anchos entre ellos. Por ejemplo, el ancho de la constricción puede ser de
- 25 aproximadamente 2 μm , aproximadamente 3 μm , aproximadamente 4 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 6 μm , o aproximadamente 7 μm . En algunas formas de realización, el canal comprende una longitud de constricción

de aproximadamente 10 μm y un ancho de constricción de aproximadamente 4 μm . La sección transversal del canal, la parte de entrada, el punto central y la parte de salida también pueden variar. Por ejemplo, las secciones transversales pueden ser circulares, elípticas, con una hendidura alargada, cuadradas, hexagonales o triangulares. La parte de entrada define un ángulo de constricción, en el que el ángulo de constricción se optimiza para reducir la obstrucción del canal y se optimiza para un mejor suministro de un compuesto a la célula inmunitaria. El ángulo de la porción de salida también puede variar. Por ejemplo, el ángulo de la parte de salida está configurado para reducir la probabilidad de turbulencia que puede resultar en un flujo no laminar. En algunas formas de realización, las paredes de la parte de entrada y/o la parte de salida son lineales. En otras formas de realización, las paredes de la parte de entrada y/o la parte de salida están curvadas. El caudal a través del canal también se puede ajustar. En algunas formas de realización, la velocidad de flujo a través del canal está entre aproximadamente 0,001 $\text{ml}/\text{cm}^2/\text{seg}$ a aproximadamente 100 $\text{L}/\text{cm}^2/\text{seg}$ o cualquier velocidad o rango de velocidades entre ellos.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, el diámetro de la constricción es una función de un diámetro de las PBMC, tal como el diámetro medio de un pluralidad de PBMC, o un diámetro medio de una subpoblación dentro de la pluralidad de las PBMC. En algunas formas de realización, el diámetro de una célula se mide por la distancia de sección transversal mínima de la célula (por ejemplo, una célula dentro de la pluralidad de PBMC).

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, el diámetro de la constricción es de

- aproximadamente 10% a aproximadamente 99% del diámetro medio de la pluralidad de entradas. PBMCs. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 10% a aproximadamente 90%, aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, aproximadamente 10% a
- 5 aproximadamente 70%, aproximadamente 20% a aproximadamente 60%, aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, o aproximadamente 30% a aproximadamente 45% del diámetro medio de la pluralidad de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, aproximadamente 20% a
- 10 aproximadamente 30%, aproximadamente 30% a aproximadamente 40%, aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 60% a aproximadamente 70%, aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% a aproximadamente 99% del
- 15 diámetro medio de la pluralidad de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% del diámetro medio de la pluralidad de PBMC de entrada.
- 20 En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 10% a aproximadamente 99% del diámetro medio de una subpoblación de células teniendo el diámetro más pequeño dentro de la pluralidad
- 25 de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 10% a aproximadamente 90%, aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, aproximadamente 10% a

aproximadamente 70%, aproximadamente 20% a aproximadamente 60%,
aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, aproximadamente 30% a
aproximadamente 45%, aproximadamente 50% a aproximadamente 99%,
aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, aproximadamente 50% a
5 aproximadamente 80%, aproximadamente 50% a aproximadamente 70%,
aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, aproximadamente 60% a
aproximadamente 80%, o aproximadamente 60% a aproximadamente 70% del
diámetro medio de una subpoblación de células que tienen el diámetro más
pequeño dentro de la pluralidad de PBMC de entrada. En algunas formas de
10 realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 10%
a aproximadamente 20%, aproximadamente 20% a aproximadamente 30%,
aproximadamente 30% a aproximadamente 40%, aproximadamente 40% a
aproximadamente 50%, aproximadamente 50% a aproximadamente 60%,
aproximadamente 60% a aproximadamente 70%, aproximadamente 70% a
15 aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, o
aproximadamente 90% a aproximadamente 99% del diámetro medio de una
subpoblación de células que tienen el diámetro más pequeño dentro del pluralidad
de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, el diámetro de la
constricción es cualquiera de aproximadamente el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%,
20 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%
del diámetro medio de una subpoblación de células que tienen el diámetro más
pequeño dentro de la pluralidad de PBMC de entrada. En algunas formas de
realización, la subpoblación de células que tienen el diámetro medio más pequeño
dentro de la pluralidad de PBMC de entrada es una población de linfocitos, en
25 donde el diámetro de la población de linfocitos es de aproximadamente 6 μm a
aproximadamente 10 μm . En algunas formas de realización, el diámetro medio de
la población de linfocitos es de aproximadamente 7 μm . En algunas formas de

realización, la población de linfocitos es una población de células T. En algunas formas de realización, los linfocitos son células T. En algunas formas de realización, la subpoblación de células que tienen el diámetro medio más pequeño dentro de la pluralidad de PBMC de entrada son células T.

- 5 En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 10% a aproximadamente 99% del diámetro medio de una subpoblación de células teniendo el diámetro más grande dentro de la pluralidad
- 10 de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 10% a aproximadamente 90%, aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, aproximadamente 10% a aproximadamente 70%, aproximadamente 20% a aproximadamente 60%, aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, aproximadamente 30% a
- 15 aproximadamente 45%, aproximadamente 15% a aproximadamente 30%, aproximadamente 15% a aproximadamente 20%, aproximadamente 20% a aproximadamente 25%, aproximadamente 25% a aproximadamente 30%, aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, aproximadamente del 30% a aproximadamente el 70%, o aproximadamente del 30% a aproximadamente el
- 20 60% del diámetro medio de una subpoblación de células que tienen el mayor diámetro dentro de la pluralidad de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, aproximadamente 30% a
- 25 aproximadamente 40%, aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 60% a aproximadamente 70%, aproximadamente 70% a aproximadamente 80%,

aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% a aproximadamente 99% del diámetro medio de una subpoblación de células que tienen el mayor diámetro dentro de la pluralidad de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de

5 aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% del diámetro medio de una subpoblación de células que tienen el mayor diámetro dentro de la pluralidad de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, la subpoblación de células que tienen el mayor diámetro medio dentro de la pluralidad de PBMC de entrada

10 es una población de monocitos, en donde el diámetro de la población de monocitos es de aproximadamente 15 μm a aproximadamente 25 μm . En algunas formas de realización, el diámetro medio de la población de monocitos es de aproximadamente 20 μm . En algunas formas de realización, la subpoblación de células que tienen el mayor diámetro medio dentro de la pluralidad de PBMC de

15 entrada son monocitos.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritas en el presente documento, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 15 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 3 μm

20 a aproximadamente 10 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 4 μm a aproximadamente 10 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 4,2 μm a aproximadamente 6 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 4,2 μm a aproximadamente 4,8 μm . En

25 algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 14 μm , aproximadamente 4 μm a aproximadamente 12 μm , aproximadamente 6 μm a aproximadamente 9 μm ,

- aproximadamente 4 μm a aproximadamente 6 μm , aproximadamente 4 μm a aproximadamente 5 μm , aproximadamente 3.5 μm a aproximadamente 7 μm , aproximadamente 3.5 μm a aproximadamente 6.3 μm , aproximadamente 3.5 μm a aproximadamente 5.6 μm , aproximadamente 3.5 μm a aproximadamente 4.9 μm ,
5 aproximadamente 4.2 μm a aproximadamente 6.3 μm , de aproximadamente 4,2 μm a aproximadamente 5,6 μm , o de aproximadamente 4,2 μm a aproximadamente 4,9 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 2 μm , 2.5 μm , 3 μm , 3.5 μm , 4 μm , 4.5 μm , 5 μm , 5.5 μm , 6 μm , 6.5 μm , 7 μm , 7.5 μm , 8 μm , 8.5 μm , 9 μm , 9.5
10 μm , 10 μm , 10.5 μm , 11 μm , 11.5 μm , 12 μm , 12.5 μm , 13 μm , 13.5 μm , 14 μm , 14.5 μm o 15 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente 4.0 μm , 4.1 μm , 4.2 μm , 4.3 μm , 4.4 μm , 4.5 μm , 4.6 μm , 4.7 μm , 4.8 μm , 4.9 μm o 5.0 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de unos 4.5 μm .
- 15 En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, la célula inmune de entrada pasa a través de la constricción a un caudal entre aproximadamente 0,001 ml/min y aproximadamente 200 ml/min o cualquier tasa o rango de tasas entre ellos. En algunas formas de realización, el caudal está entre aproximadamente 0,001
20 ml/min y aproximadamente 175 ml/min, aproximadamente 0,001 ml/min a aproximadamente 150 ml/min, aproximadamente 0,001 ml/min a aproximadamente 125 ml/min, aproximadamente 0,001 ml/min a aproximadamente 100 ml/min, aproximadamente 0,001 ml/min a aproximadamente 50 ml/min, aproximadamente 0,001 ml/min a aproximadamente
25 25 ml/min, aproximadamente 0,001 ml/min a aproximadamente 10 ml/min, aproximadamente 0,001 ml/min a aproximadamente 7.5 mL/min, aproximadamente 0.001 mL/min a aproximadamente 5.0 mL/min,

aproximadamente 0.001 mL/min a aproximadamente 2.5 mL/min, aproximadamente 0.001 mL/min a aproximadamente 1 mL/min, aproximadamente 0.001 mL/min a aproximadamente 0.1 mL/min o aproximadamente 0,001 ml/min a aproximadamente 0,01 ml/min. En algunas formas de realización, el caudal está

5 entre aproximadamente 0,001 ml/min y aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 0,01 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 0,1 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 1 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 50 ml/min a aproximadamente 200 ml/min,

10 aproximadamente 75 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 100 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 150 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 0,5 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 1 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 2,5 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 5

15 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 7.5 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, aproximadamente 25 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, o aproximadamente 175 ml/min hasta aproximadamente 200 ml/min. En algunas formas de realización, la célula inmune de entrada pasa a través de la

20 constricción a un caudal entre aproximadamente 10 ml/min y aproximadamente 200 ml/min. En algunas formas de realización, la célula inmune de entrada pasa a través de la constricción a un caudal de aproximadamente 100 ml/min.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, la constricción puede tener

25 cualquier forma conocida en la técnica; por ejemplo, una forma tridimensional o una forma bidimensional. La forma bidimensional, tal como la forma transversal, de la constricción puede ser, sin limitación, circular, elíptica, redonda, cuadrada,

cuadrada, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal u octagonal. La forma tridimensional de la constricción puede ser, sin limitación, cilíndrica, cónica o cuboidal. En algunas formas de realización, la forma de la sección transversal de la constricción es un rectángulo. En algunas formas de realización,

5 la forma de la sección transversal de la constricción es una hendidura. En algunas formas de realización, la forma de la sección transversal de la constricción es una ranura que comprende un ancho de aproximadamente 4 μm a aproximadamente 10 μm y/o una profundidad de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 200 μm . En algunas formas de realización, la forma de la sección transversal de la

10 constricción es una ranura que comprende un ancho de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 6 μm y/o una profundidad de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 120 μm . En algunas formas de realización, la forma de la sección transversal de la constricción es una hendidura que comprende un ancho de aproximadamente 4,2 μm a aproximadamente 6 μm y/o una profundidad de

15 aproximadamente 20 μm a aproximadamente 120 μm . En algunas formas de realización, la forma de la sección transversal de la constricción es una ranura que comprende un ancho de aproximadamente 4,2 μm a aproximadamente 6 μm y/o una profundidad de aproximadamente 40 μm a aproximadamente 120 μm . En algunas formas de realización, la forma de la sección transversal de la

20 constricción es una hendidura que comprende un ancho de aproximadamente 4,2 μm a aproximadamente 6 μm y/o una profundidad de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 80 μm . En algunas formas de realización, la forma de la sección transversal de la constricción es una hendidura que comprende un ancho de aproximadamente 4,5 μm y/o una profundidad de aproximadamente 80 μm . En

25 algunas formas de realización, la ranura comprende una longitud de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 50 μm . En algunas formas de realización, la ranura comprende una longitud de aproximadamente 10 μm a

aproximadamente 30 μm . En algunas formas de realización, la ranura comprende una longitud de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 50 μm . En algunas formas de realización, la hendidura comprende una longitud de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 5 μm , aproximadamente 5 μm a aproximadamente 10 μm , aproximadamente 10 μm a aproximadamente 15 μm , aproximadamente 15 μm a aproximadamente 20 μm , aproximadamente 20 μm a aproximadamente 25 μm , aproximadamente 25 μm a aproximadamente 30 μm , aproximadamente 30 μm a aproximadamente 35 μm , aproximadamente 35 μm a aproximadamente 40 μm , aproximadamente 40 μm a aproximadamente 45 μm , o aproximadamente 45 μm a aproximadamente 50 μm . En algunas formas de realización, la hendidura comprende una longitud de aproximadamente 10 μm .

Superficie que tiene poros para proporcionar constricciones de deformación celular

En algunos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar y prevenir una enfermedad asociada al VPH, y/o mejorar la respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, el método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en la que las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH y un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan pasando primero una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando perturbaciones de la célula de entrada grande suficiente para que el antígeno y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y luego incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un

tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción. En algunas formas de
5 realización, la constricción es un poro o está contenida dentro de un poro. En algunas formas de realización, el poro está contenido en una superficie. Las superficies ejemplares que tienen poros para usar en los métodos descritos en este documento se describen en el documento WO 2017041050.

Las superficies como se describen en el presente documento pueden estar
10 hechas de uno cualquiera de una serie de materiales y tomar una cualquiera de varias formas. En algunas formas de realización, la superficie es un filtro. En algunas formas de realización, la superficie es una membrana. En algunas formas de realización, el filtro es un filtro de flujo tangencial. En algunas formas de realización, la superficie es una esponja o matriz similar a una esponja. En
15 algunas formas de realización, la superficie es una matriz.

En algunas formas de realización, la superficie es una superficie de trayectoria tortuosa. En algunas formas de realización, la superficie de la trayectoria tortuosa comprende acetato de celulosa. En algunas formas de realización, la superficie comprende un material seleccionado de, sin limitación, polímeros sintéticos o
20 naturales, policarbonato, silicio, vidrio, metal, aleación, nitrato de celulosa, plata, acetato de celulosa, nailon, poliéster, polietersulfona, poliacrilonitrilo (PAN), polipropileno, PVDF, politetrafluoretileno, éster mixto de celulosa, porcelana y cerámica.

La superficie descrita en este documento puede tener cualquier forma conocida
25 en la técnica; por ejemplo, Una forma tridimensional. La forma bidimensional de la superficie puede ser, sin limitación, circular, elíptica, redonda, cuadrada, en forma de estrella, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal u octogonal.

En algunas formas de realización, la superficie es de forma redonda. En algunas formas de realización, la forma tridimensional de la superficie es cilíndrica, cónica o cuboide.

La superficie puede tener varios anchos y espesores de sección transversal. En
5 algunas formas de realización, el ancho de la sección transversal de la superficie está entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 1 m, o cualquier ancho o intervalo de sección transversal de los anchos de la sección transversal entre ellos. En algunas formas de realización, la superficie tiene un espesor definido. En algunas formas de realización, el espesor de la superficie es uniforme. En algunas
10 formas de realización, el espesor de la superficie es variable. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las porciones de la superficie son más gruesas o más delgadas que otras porciones de la superficie. En algunas formas de realización, el espesor de la superficie varía de aproximadamente 1% a aproximadamente 90% o cualquier porcentaje o intervalo de porcentajes entre
15 ellos. En algunas formas de realización, la superficie tiene entre aproximadamente 0,01 μm y aproximadamente 5 mm de espesor o cualquier espesor o intervalo de espesores entre ellos.

En algunas formas de realización, la constricción es un poro o está contenida dentro de un poro. El ancho de la sección transversal de los poros se relaciona
20 con el tipo de célula inmune a tratar. En algunas formas de realización, el tamaño de poro es una función del diámetro de la célula inmune o grupo de células inmunes a tratar. En algunas formas de realización, el tamaño de poro es tal que una célula inmune se perturba al pasar a través del poro. En algunas formas de realización, el tamaño de los poros es menor que el diámetro de la célula inmune.
25 En algunas formas de realización, el tamaño de poro es de aproximadamente 10% a aproximadamente 99% del diámetro de la célula inmune. En algunas formas de realización, el tamaño de los poros es aproximadamente 10%,

aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%,
aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%,
aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, o
aproximadamente 99% del diámetro de las células inmunes. El tamaño óptimo de
5 los poros o el ancho de la sección transversal de los poros puede variar según la
aplicación y/o el tipo de célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el
tamaño de poro es de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 14 μm . En
algunas formas de realización, el tamaño de poro es de aproximadamente 2 μm ,
aproximadamente 3 μm , aproximadamente 4 μm , aproximadamente 5 μm ,
10 aproximadamente 8 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 12 μm o
aproximadamente 14 μm . En algunas formas de realización, el ancho de la
sección transversal es de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 14 μm . En
algunas formas de realización, la sección transversal de los poros es de
aproximadamente 2 μm , aproximadamente 3 μm , aproximadamente 4 μm ,
15 aproximadamente 5 μm , aproximadamente 8 μm , aproximadamente 10 μm ,
aproximadamente 12 μm o aproximadamente 14 μm .

Las entradas y salidas del paso de poro pueden tener una variedad de ángulos. El
ángulo del poro se puede seleccionar para minimizar la obstrucción del poro
mientras las células inmunes pasan. Por ejemplo, el ángulo de la parte de entrada
20 o salida puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 90 grados. En
algunas formas de realización, la parte de entrada o salida puede ser mayor que
90 grados. En algunas formas de realización, los poros tienen ángulos de entrada
y salida idénticos. En algunas formas de realización, los poros tienen diferentes
ángulos de entrada y salida. En algunas formas de realización, el borde del poro
25 es liso, por ejemplo. Redondeado o curvo. Un borde de poro liso tiene una
superficie continua, plana y uniforme, sin bultos, crestas o partes desiguales. En
algunas formas de realización, el borde del poro es agudo. Un borde de poro

afilado tiene un borde delgado que es puntiagudo o en un ángulo agudo. En algunas formas de realización, el paso de los poros es recto. Un pasaje de poro recto no contiene curvas, curvas, ángulos u otras irregularidades. En algunas formas de realización, el paso de los poros es curvo. Un pasaje de poro curvo se
5 dobla o se desvía de una línea recta. En algunas formas de realización, el paso de poros tiene múltiples curvas, por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más curvas. El caudal a través del poro también se puede ajustar. En algunas formas de realización, la velocidad de flujo a través del poro está entre aproximadamente 0,001 ml/cm²/seg a aproximadamente 100 L/cm²/seg o
10 cualquier tasa o rango de velocidades entre ellos.

Los poros pueden tener cualquier forma conocida en la técnica, incluyendo una forma bidimensional o tridimensional. La forma del poro (por ejemplo, la forma de la sección transversal) puede ser, sin limitación, circular, elíptica, redonda, cuadrada, en forma de estrella, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal,
15 heptagonal y octagonal. En algunas formas de realización, la sección transversal del poro es de forma redonda. En algunas formas de realización, la forma tridimensional del poro es cilíndrica o cónica. En algunas formas de realización, el poro tiene una forma de entrada y salida estriadas. En algunas formas de realización, la forma de los poros es homogénea (es decir, consistente o regular)
20 entre los poros dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, la forma de los poros es heterogénea (es decir, mezclada o variada) entre poros dentro de una superficie dada.

Las superficies descritas en este documento pueden tener un rango de números de poros totales. En algunas formas de realización, los poros abarcan
25 aproximadamente del 10% a aproximadamente el 80% del área de superficie total. En algunas formas de realización, la superficie contiene de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{30}$ poros totales o cualquier

número o rango de números entre ellos. En algunas formas de realización, la superficie comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$ poros/mm² de superficie.

- Los poros se pueden distribuir de numerosas maneras dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, los poros se distribuyen en paralelo dentro de una superficie dada. En uno de estos ejemplos, los poros se distribuyen uno al lado del otro en la misma dirección y están separados por la misma distancia dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, la distribución de poros es ordenada u homogénea. En uno de estos ejemplos, los poros se distribuyen en un patrón regular y sistemático o se encuentran a la misma distancia dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, la distribución de poros es aleatoria o heterogénea. En uno de estos ejemplos, los poros se distribuyen en un patrón irregular y desordenado o están a diferentes distancias dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, las superficies múltiples se distribuyen en serie. Las superficies múltiples pueden ser homogéneas o heterogéneas en tamaño de superficie, forma y/o rugosidad. Las múltiples superficies pueden contener además poros con tamaño, forma y/o número de poros homogéneos o heterogéneos, lo que permite la administración simultánea de una gama de compuestos en diferentes tipos de células inmunes.
- En algunas formas de realización, un poro individual tiene una dimensión de ancho uniforme (es decir, un ancho constante a lo largo de la longitud del paso de poro). En algunas formas de realización, un poro individual tiene un ancho variable (es decir, que aumenta o disminuye el ancho a lo largo de la longitud del paso del poro). En algunas formas de realización, los poros dentro de una superficie dada tienen las mismas profundidades de poros individuales. En algunas formas de realización, los poros dentro de una superficie dada tienen diferentes profundidades de poros individuales. En algunas formas de realización,

los poros están inmediatamente adyacentes entre sí. En algunas formas de realización, los poros están separados entre sí por una distancia. En algunas formas de realización, los poros están separados entre sí por una distancia de aproximadamente 0,001 μm a aproximadamente 30 mm o cualquier distancia o
5 rango de distancias entre ellos.

En algunas formas de realización, la superficie está recubierta con un material. El material se puede seleccionar de cualquier material conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, teflón, un recubrimiento adhesivo, tensioactivos, proteínas, moléculas de adhesión, anticuerpos, anticoagulantes, factores que modulan la
10 función celular, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos o proteínas transmembrana. En algunas formas de realización, la superficie está recubierta con polivinilpirrolidona (PVP). En algunas formas de realización, el material está unido covalentemente a la superficie. En algunas formas de realización, el material está unido de forma no covalente o adsorbido a la superficie. En algunas
15 formas de realización, las moléculas de superficie se liberan a medida que las células inmunes pasan a través de los poros.

En algunas formas de realización, la superficie tiene propiedades químicas modificadas. En algunas formas de realización, la superficie es polar. En algunas formas de realización, la superficie es hidrófila. En algunas formas de realización, la superficie es no polar. En algunas formas de realización, la superficie es hidrófoba. En algunas formas de realización, la superficie está cargada. En algunas formas de realización, la superficie está cargada positiva y/o negativamente. En algunas formas de realización, la superficie puede estar cargada positivamente en algunas regiones y cargada negativamente en otras
20 regiones. En algunas formas de realización, la superficie tiene una carga global positiva o negativa global. En algunas formas de realización, la superficie puede ser cualquiera de lisa, electropulida, rugosa o tratada con plasma. En algunas
25

formas de realización, la superficie comprende un zwitterión o compuesto dipolar. En algunas formas de realización, la superficie es tratada con plasma.

- En algunas formas de realización, la superficie está contenida dentro de un módulo más grande. En algunas formas de realización, la superficie está
- 5 contenida dentro de una jeringa, tal como una jeringa de plástico o de vidrio. En algunas formas de realización, la superficie está contenida dentro de un soporte de filtro de plástico. En algunas formas de realización, la superficie está contenida dentro de una punta de pipeta.

10 Perturbaciones celulares

- En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para modular una respuesta inmune pasando una suspensión celular que comprende una célula inmune a través de una constricción, causando así una perturbación de la célula inmune tal que un antígeno y/o adyuvante ingresa a la célula inmune, en donde la
- 15 perturbación en la célula inmune hay una brecha en la célula inmune que permite que el material que se encuentra fuera de la célula inmune se mueva hacia la célula inmune (por ejemplo, un orificio, desgarró, cavidad, abertura, poro, rotura, brecha, perforación). En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción.
- 20 La deformación puede ser causada, por ejemplo, por esfuerzos mecánicos y/o fuerzas de corte. En algunas formas de realización, la perturbación es una perturbación dentro de la membrana de la célula inmune. En algunas formas de realización, la perturbación es transitoria. En algunas formas de realización, la perturbación de las células inmunes dura de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos
- 25 a aproximadamente 2 horas, o en cualquier momento o intervalo de tiempo entre ellas. En algunas formas de realización, la perturbación de las células inmunes dura aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 1 segundo,

aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora. En algunas formas de realización, la perturbación de las células inmunes dura entre cualquiera de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$, o aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a unos $1,0 \times 10^{-8}$ segundos. En alguna forma de forma de realización, la perturbación de las células inmunes dura de aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, o aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ segundos. Las perturbaciones de las células inmunes (por ejemplo, poros o agujeros) creadas por los métodos descritos aquí no se forman como resultado del ensamblaje de subunidades de proteínas para formar una estructura de poros multimérica tal como la creada por hemolisinas de complemento o bacterianas.

A medida que la célula inmune pasa a través de la constricción, la constricción imparte temporalmente una lesión a la membrana de la célula inmune que permite la difusión pasiva del material a través de la perturbación. En algunas formas de realización, la célula inmunitaria solo se deforma durante un breve período de tiempo, del orden de 100 μ s para minimizar la posibilidad de activar las vías apoptóticas a través de los mecanismos de señalización celular, aunque son posibles otras duraciones (por ejemplo, desde nanosegundos hasta horas). En

algunas formas de realización, la célula inmunitaria se deforma durante aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 2 horas, o en cualquier momento o intervalo de tiempo entre ellas. En algunas formas de realización, la célula inmunitaria se deforma durante aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a

5 aproximadamente 1 segundo, aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora. En algunas formas de realización, la célula inmune se deforma entre cualquiera de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a

10 aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$, o aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ segundos. En alguna forma de realización, la célula

15 inmunitaria está deformada por cualquiera de aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ a

20 aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, o aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ segundos. En algunas formas de realización, la deformación de la célula inmunitaria incluye la deformación de la célula inmunitaria durante un tiempo que va desde, sin limitación, aproximadamente 1 μ s hasta al menos aproximadamente 750 μ s, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 μ s, 10 μ s, 50 μ s, 100 μ s, 500

25 μ s, o 750 μ s.

En algunas formas de realización, el paso del antígeno y/o adyuvante a la célula inmune ocurre simultáneamente con la célula inmune pasando a través de la

constricción y/o la perturbación de la célula inmune. En algunas formas de realización, el paso del compuesto a la célula inmune ocurre después de que la célula inmune pase a través de la constricción. En algunas formas de realización, el paso del compuesto a la célula inmune se produce en el orden de minutos después de que la célula inmune pase a través de la constricción. En algunas formas de realización, el paso del compuesto a la célula inmune ocurre desde aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos hasta al menos aproximadamente 30 minutos después de que la célula inmune pase a través de la constricción. Por ejemplo, el paso del compuesto a la célula inmune ocurre desde aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos hasta aproximadamente 1 segundo, aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 1 minuto, o aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 30 minutos después de que la célula inmune pase por la constricción. En algunas formas de realización, el paso del compuesto a la célula inmune se produce entre $1,0 \times 10^{-2}$ segundos y aproximadamente 10 minutos, entre $1,0 \times 10^{-2}$ segundos y aproximadamente 5 minutos, entre $1,0 \times 10^{-2}$ segundos y aproximadamente 1 minuto, aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 50 segundos, aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 30 segundos, aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 10 segundos, aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, o aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 0.1 segundo después de que la célula inmune pase por la constricción. En algunas formas de realización, el paso del compuesto a la célula inmune se produce entre $1,0 \times 10^{-1}$ segundos y aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 50 segundos a aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10

minutos, o aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos después de que la célula inmune pase por la constricción. En algunas formas de realización, una perturbación en la célula inmune después de que pasa a través de la constricción se corrige en el orden de aproximadamente cinco minutos después de que la célula inmune pasa a través de la constricción.

En algunas formas de realización, la viabilidad celular después de pasar a través de una constricción es de aproximadamente 5% a aproximadamente 100%. En algunas formas de realización, la viabilidad celular después de pasar por la constricción es al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90 %, 95%, o 99%. En algunas formas de realización, la viabilidad celular se mide desde aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos hasta al menos aproximadamente 10 días después de que la célula inmune pase por la constricción. Por ejemplo, la viabilidad celular se mide de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos, o aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas después de que la célula inmune pasa. La constricción. En algunas formas de realización, la viabilidad celular se mide de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 2 horas, de $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 hora, de $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 30 minutos, de $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 minuto, aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 30 segundos, aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, o aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 0.1 segundos después de que la célula inmune pase por la constricción. En algunas formas de realización, la viabilidad celular se mide de aproximadamente 1,5 horas a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 30 minutos a

aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 horas, aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 2 horas, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 horas después de que la célula inmune pase por la constricción. En algunas formas de realización, la viabilidad celular se mide de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 5 horas, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas.

10 Parámetros de entrega

Una serie de parámetros pueden influir en la administración de un compuesto a una célula inmunitaria para modular una respuesta inmune mediante los métodos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, la suspensión celular se pone en contacto con el compuesto antes, simultáneamente o después de pasar por la constricción. La célula inmunitaria puede pasar a través de la constricción suspendida en una solución que incluye el compuesto a administrar, aunque el compuesto se puede agregar a la suspensión celular después de que las células inmunes pasen a través de la constricción. En algunas formas de realización, el compuesto que se va a suministrar está revestido en la constricción.

Los ejemplos de parámetros que pueden influir en el suministro del compuesto en la célula inmune incluyen, entre otros, las dimensiones de la constricción, el ángulo de entrada de la constricción, las propiedades de la superficie de las constricciones (por ejemplo, rugosidad, modificación química, hidrófila, hidrófoba, etc.), las velocidades de flujo operativo (por ejemplo, el tiempo de tránsito celular a través de la constricción), la concentración de células inmunes, la concentración del compuesto en la suspensión celular y la cantidad de tiempo que la célula

inmunitaria la recuperación o incubación después de pasar por las constricciones puede afectar el paso del compuesto administrado a la célula inmunitaria. Los parámetros adicionales que influyen en el suministro del compuesto en la célula inmunitaria pueden incluir la velocidad de la célula inmunitaria en la constricción, la velocidad de corte en la constricción, la viscosidad de la suspensión celular, el componente de velocidad que es perpendicular a la velocidad del flujo y el tiempo en la constricción. Dichos parámetros pueden diseñarse para controlar el suministro del compuesto. En algunas formas de realización, la concentración de células inmunes varía de aproximadamente 10 a al menos aproximadamente 10^{12} células/ml o cualquier concentración o intervalo de concentraciones entre ellas. En algunas formas de realización, las concentraciones de compuestos de administración pueden variar desde aproximadamente 10 ng/ml hasta aproximadamente 1 g/ml o cualquier concentración o intervalo de concentraciones entre ellos. En algunas formas de realización, las concentraciones de compuestos de administración pueden variar desde aproximadamente 1 pM hasta al menos aproximadamente 2 M o cualquier concentración o intervalo de concentraciones entre ellas.

La temperatura usada en los métodos de la presente divulgación se puede ajustar para afectar el suministro de compuesto y la viabilidad celular. En algunas formas de realización, el método se realiza entre aproximadamente -5°C y aproximadamente 45°C . Por ejemplo, los métodos pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20°C), temperatura fisiológica (por ejemplo, aproximadamente 37°C), más alta que la temperatura fisiológica (por ejemplo, mayor que aproximadamente 37°C a 45°C o más), o temperatura reducida (por ejemplo, aproximadamente -5°C a aproximadamente 4°C), o temperaturas entre estas temperaturas de ejemplo.

Se pueden utilizar varios métodos para conducir las células inmunes a través de las constricciones. Por ejemplo, se puede aplicar presión con una bomba en el lado de entrada (por ejemplo, un compresor), se puede aplicar vacío con una bomba de vacío en el lado de salida, se puede aplicar la acción capilar a través de un tubo y/o el sistema puede ser alimentado por gravedad. También se pueden usar sistemas de flujo basados en el desplazamiento (por ejemplo, bomba de jeringa, bomba peristáltica, jeringa o pipeta manual, pistones, etc.). En algunas formas de realización, las células inmunes pasan a través de las constricciones por presión positiva o presión negativa. En algunas formas de realización, las células inmunes pasan a través de las constricciones por presión constante o presión variable. En algunas formas de realización, la presión se aplica utilizando una jeringa. En algunas formas de realización, la presión se aplica utilizando un cilindro de gas. En algunas formas de realización, la presión se aplica utilizando el método de presión positiva del cilindro de gas. En algunas formas de realización, la presión se aplica utilizando una bomba. En algunas formas de realización, la bomba es una bomba peristáltica o una bomba de diafragma. En algunas formas de realización, la presión se aplica utilizando un vacío. En algunas formas de realización, las células inmunes pasan a través de las constricciones por fuerza g. En algunas formas de realización, las células inmunes pasan a través de las constricciones por la fuerza centrífuga. En algunas formas de realización, las células inmunes pasan a través de las constricciones por presión capilar.

En algunas formas de realización, el flujo de fluido dirige las células inmunes a través de las constricciones. En algunas formas de realización, el flujo de fluido es un flujo turbulento antes de que las células inmunes pasen a través de la constricción. El flujo turbulento es un flujo de fluido en el cual la velocidad en un punto dado varía erráticamente en magnitud y dirección. En algunas formas de realización, el flujo de fluido a través de la constricción es un flujo laminar. El flujo

laminar implica un flujo ininterrumpido en un fluido cerca de un límite sólido en el que la dirección del flujo en cada punto permanece constante. En algunas formas de realización, el flujo de fluido es un flujo turbulento después de que las células inmunes pasan a través de la constricción. La velocidad a la que las células

5 inmunes pasan a través de las constricciones puede variar. En algunas formas de realización, las células inmunes pasan a través de las constricciones a una velocidad celular uniforme. En algunas formas de realización, las células inmunes pasan a través de las constricciones a una velocidad celular fluctuante.

En otras formas de realización, se usa un tratamiento de combinación para

10 modular una respuesta inmune pasando una suspensión celular que comprende una célula inmune a través de una constricción, en donde la constricción deforma la célula inmune causando así una perturbación de la célula inmune tal que un antígeno y/o el adyuvante ingresa a la célula inmunitaria, por ejemplo, los métodos descritos aquí, seguido de la exposición a un campo eléctrico corriente

15 abajo de la constricción. En algunas formas de realización, la célula inmune pasa a través de un campo eléctrico generado por al menos un electrodo después de pasar a través de la constricción. En algunas formas de realización, el campo eléctrico ayuda a suministrar compuestos a una segunda ubicación dentro de la célula inmune, tal como el núcleo de la célula inmune. Por ejemplo, la

20 combinación de una constricción de deformación celular y un campo eléctrico libera un plásmido que codifica un anticuerpo en la célula inmune (por ejemplo, el núcleo celular), lo que resulta en la producción de novo de anticuerpo. En algunas formas de realización, uno o más electrodos están cerca de la constricción de deformación celular para generar un campo eléctrico. En algunas formas de

25 realización, el campo eléctrico está entre aproximadamente 0,1 kV/m a aproximadamente 100 MV/m, o cualquier número o rango de números entre ellos. En algunas formas de realización, se usa un circuito integrado para proporcionar

una señal eléctrica para accionar los electrodos. En algunas formas de realización, las células inmunes están expuestas al campo eléctrico para un ancho de pulso de entre aproximadamente 1 ns a aproximadamente 1 s y un período de entre aproximadamente 100 ns a aproximadamente 10 s y cualquier
5 tiempo o intervalo de tiempo entre ellas.

Suspensiones celulares para el suministro a células inmunes.

La suspensión celular puede ser una población mixta o purificada de células inmunes. En algunas formas de realización, la suspensión celular es una
10 población celular mixta, como sangre total o PBMC. En formas de realización adicionales, la población celular mixta es una mezcla de poblaciones definidas o purificadas. En algunas formas de realización, la suspensión celular es una población celular purificada, tal como una población purificada de células inmunes.

15 La composición de la suspensión celular (por ejemplo, osmolaridad, concentración de sal, contenido en suero, concentración de células, pH, etc.) puede influir en el suministro del compuesto para modular una respuesta inmune. En algunas formas de realización, la suspensión comprende sangre entera. Alternativamente, la suspensión celular es una mezcla de células en una solución salina fisiológica o
20 un medio fisiológico distinto de la sangre. En algunas formas de realización, la suspensión celular comprende una solución acuosa. En algunas formas de realización, la solución acuosa comprende medio de cultivo celular, (salina tamponada con fosfato), PBS, sales, iones metálicos, azúcares, factores de crecimiento, productos derivados de animales, materiales de carga, tensioactivos,
25 lubricantes, lípidos, vitaminas, aminoácidos, proteínas, inhibidores del ciclo celular y/o un agente que impacta la polimerización de la actina. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular es X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, DMEM,

Opti-MEM®, IMDM o RPMI. Además, el tampón de solución puede incluir uno o más lubricantes (pluronic u otros tensioactivos) que pueden diseñarse, por ejemplo, para reducir o eliminar la obstrucción de la constricción y mejorar la viabilidad celular. Los tensioactivos ejemplares incluyen, sin limitación, poloxámero, polisorbato, azúcares o alcoholes de azúcares tales como manitol, sorbitol, suero derivado de animales y proteína de albúmina.

En algunas configuraciones con ciertos tipos de células inmunes, las células inmunes pueden incubarse en una o más soluciones que ayudan a la administración del compuesto al interior de la célula inmune. En algunas formas de realización, la solución acuosa comprende un agente que impacta la polimerización de la actina. En algunas formas de realización, el agente que afecta a la polimerización de la actina es la latrunculina A, la citocalasina y/o la colchicina. Por ejemplo, las células inmunes pueden incubarse en una solución de despolimerización tal como Lantrunculin A (0,1 µg/mL) durante 1 hora antes del suministro para despolimerizar el citoesqueleto de actina. Como ejemplo adicional, las células inmunes pueden incubarse en Colchicina 10 µM (Sigma) durante 2 horas antes del suministro para despolimerizar la red de microtúbulos.

En algunas formas de realización, la población celular se enriquece antes de su uso en los métodos descritos. Por ejemplo, las células se obtienen de un fluido corporal, por ejemplo, sangre periférica, y opcionalmente se enriquecen o se purifican para concentrar células inmunes. Las células pueden enriquecerse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, separación magnética de células, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o centrifugación en gradiente de densidad.

La viscosidad de la suspensión celular también puede afectar los métodos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, la viscosidad de la suspensión celular varía de aproximadamente 8.9×10^{-4} Pa · s a

aproximadamente $4.0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ o cualquier valor o rango de valores entre ellos. En algunas formas de realización, la viscosidad varía entre cualquiera de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ y cualquier valor o rango de valores entre ellos. En algunas formas de realización, la

5 viscosidad varía entre $8,9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ a aproximadamente $4,0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$, aproximadamente $8,9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ a aproximadamente $3,0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$, aproximadamente $8,9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ a aproximadamente $2,0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$, o aproximadamente $8,9 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$. En algunas formas de realización, la viscosidad varía entre aproximadamente 0,89 cP

10 a aproximadamente 4,0 cP, aproximadamente 0,89 cP a aproximadamente 3,0 cP, aproximadamente 0,89 cP a aproximadamente 2,0 cP, o aproximadamente 0,89 cP a aproximadamente 1,0 cP. En algunas formas de realización, se observa un efecto de adelgazamiento por cizallamiento, en el que la viscosidad de la suspensión celular disminuye en condiciones de tensión de cizallamiento. La

15 viscosidad se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, viscosímetros, como un viscosímetro capilar de vidrio o reómetros. Un viscosímetro mide la viscosidad bajo una condición de flujo, mientras que un reómetro se usa para medir viscosidades que varían con las condiciones de flujo. En algunas formas de realización, la viscosidad se mide para

20 una solución de adelgazamiento por cizallamiento, tal como sangre. En algunas formas de realización, la viscosidad se mide entre aproximadamente -5°C y aproximadamente 45°C . Por ejemplo, la viscosidad se mide a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20°C), temperatura fisiológica (por ejemplo, aproximadamente 37°C), más alta que la temperatura fisiológica (por

25 ejemplo, mayor que aproximadamente 37°C a 45°C o más), temperatura reducida (por ejemplo, aproximadamente -5°C a aproximadamente 4°C), o temperaturas entre estas temperaturas ejemplares.

Antígenos y adyuvantes para potenciar una respuesta inmune.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar a un paciente introduciendo las células inmunes modificadas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento a un paciente. En algunas formas de realización, las células inmunes son para usar en inmunoterapia. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad relacionada con el virus del papiloma humano (VPH) en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada con VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión causando así perturbaciones de la entrada célula lo suficientemente grande para que el antígeno y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En

algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad asociada al VPH en un individuo, en donde el método comprende

- 5 administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método
- 10 comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de
- 15 entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula de entrada sean lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar
- 20 la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción.

- 25 En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una

composición que comprende células inmunes modificadas, en donde el sistema inmunitario modificado las células comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una

5 enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión

10 celular que comprende una célula de entrada que comprende un antígeno de VPH a través de un canal microfluídico que incluye una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el

15 adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de

20 deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción. En algunas formas de realización, la respuesta inmune está mejorada. En algunas formas de realización, se mejora la respuesta inmune al antígeno de VPH.

Algunos aspectos de la invención proporcionan el suministro de antígenos a un individuo con una enfermedad asociada al VPH para potenciar una respuesta

25 inmune al antígeno, administrando una célula inmunitaria que comprende un antígeno intracelular en el que el antígeno es administrado a la célula por cualquiera de Los métodos aquí descritos. En algunas formas de realización, el

- antígeno es un antígeno único. En algunas formas de realización, el antígeno es una mezcla de antígenos. Un antígeno es una sustancia que estimula una respuesta inmune específica, como una célula o una respuesta inmune mediada por anticuerpos. Los antígenos se unen a los receptores expresados por las
- 5 células inmunes, como los receptores de células T (TCR), que son específicos de un antígeno particular. La unión antígeno–receptor desencadena posteriormente vías de señalización intracelular que conducen a vías efectoras inmunes posteriores, como la activación celular, la producción de citoquinas, la migración celular, la secreción del factor citotóxico y la producción de anticuerpos.
- 10 En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada que comprende un antígeno de VPH a través de una constricción, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en el suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo
- 15 suficientemente grandes como para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En formas
- 20 de realización adicionales, el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es más pequeño que el diámetro de las células inmunes. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula. En algunas formas de
- 25 realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de aproximadamente

el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente 99% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, el diámetro de la

5 constricción es de entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 30%, entre aproximadamente el 30% y aproximadamente el 40%, entre aproximadamente el 40% y aproximadamente el 50%, entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 60%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 70%, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 80%,

10 entre aproximadamente 80% y aproximadamente 90%, entre aproximadamente 90% y aproximadamente 95%, o entre aproximadamente 95% y aproximadamente 99% del diámetro de la célula. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción. En algunas formas de realización, la

15 constricción está en un canal. En algunas formas de realización, la constricción está contenida en un canal microfluídico. En algunas formas de realización, la constricción está contenida dentro de un filtro. En otras formas de realización, la constricción es un poro en un filtro.

En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas comprenden

20 un antígeno de VPH intracelular y un adyuvante. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas. En algunas formas de realización, el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula. En formas de realización adicionales, el antígeno y/o adyuvante están presentes en compartimentos de la

25 célula que incluyen uno o más del retículo endoplásmico (ER), aparato de Golgi, lisosoma o exosomas. En algunas formas de realización, el antígeno y el adyuvante están en el mismo compartimento. En algunas formas de realización, el

antígeno y el adyuvante están en compartimientos diferentes entre sí. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el antígeno está presente en el citosol, mientras que el adyuvante está presente en el endosoma. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en el exterior de la célula.

En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada es de menos de aproximadamente 0,01 μM , aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada es mayor que aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada es cualquiera entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 0,1 μM , entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 μM , entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 10 μM , entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 100 μM , entre aproximadamente 100 μM y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.

En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada

es de menos de aproximadamente 0,01 μM , aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada es mayor que aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada es entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 0,1 μM , entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 μM , entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 10 μM , entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 100 μM , entre aproximadamente 100 μM y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.

En algunas formas de realización, la relación molar de antígeno de VPH a adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada es cualquiera entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la relación molar de antígeno de VPH a adyuvante incubada con la célula de entrada perturbada es aproximadamente 10000:1, aproximadamente 1000:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1000 o aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, la relación molar de antígeno de VPH a adyuvante incubada con la célula de entrada perturbada es cualquiera entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1000:1, entre aproximadamente 1000:1 y aproximadamente 100:1, entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 10:1, entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:1, entre aproximadamente 1:1 y

aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100, entre aproximadamente 1:100 y aproximadamente 1:1000, entre aproximadamente 1:1000 y aproximadamente de 1:10000.

- En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el
- 5 adyuvante en una concentración entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula inmunitaria comprende el adyuvante a una concentración de menos de aproximadamente 0,01 μM , aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 mM o
- 10 aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune comprende el adyuvante a una concentración mayor que aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmunitaria comprende el adyuvante a una concentración de entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 μM , entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 10 μM ,
- 15 entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 100 μM , entre aproximadamente 100 μM y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.
- 20 En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH en la célula inmune modificada está entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH en la célula inmune modificada es inferior a aproximadamente 0,01 μM , aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 1 μM ,
- 25 aproximadamente 10 μM , aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH en la célula inmune modificada es mayor que aproximadamente

10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH en la célula inmune modificada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 μ M, entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 10 μ M, entre aproximadamente 10 μ M y aproximadamente 100 μ M, entre
5 aproximadamente 100 μ M y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno de VPH en la célula inmune modificada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

En algunas formas de realización, la relación molar de antígeno de VPH a
10 adyuvante en la célula inmune modificada es cualquiera entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la relación molar de antígeno de VPH a adyuvante en la célula inmune modificada es aproximadamente 10000:1, aproximadamente 1000:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1,
15 aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1000, o aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, la relación molar de antígeno de VPH a adyuvante en la célula inmune modificada es entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1000:1, entre aproximadamente 1000:1 y aproximadamente 100:1, entre aproximadamente 100:1 y
20 aproximadamente 10 : 1, entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:1, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100, entre aproximadamente 1:100 y aproximadamente 1:1000, entre aproximadamente 1:1000 y aproximadamente 1:10000.

25 En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno polipeptídico. En algunas formas de realización, el antígeno se modifica con un lípido. En algunas formas de realización, el antígeno modificado se modifica con un polisacárido o un

resto de carbohidrato. En algunas formas de realización, el antígeno está asociado con un virus. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno viral. Los antígenos víricos ejemplares incluyen antígenos de VPH. En formas de realización adicionales, el antígeno es un antígeno de VPH. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH consiste en una selección del grupo de: VPH-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 son tipos de alto riesgo para causar cáncer mientras que VPH-26, 53 y 66 son "probablemente tipos de alto riesgo" en causar cáncer. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de VPH y una o más secuencias peptídicas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno de VPH-16 o un antígeno de VPH-18. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH está compuesto por un epítipo específico de HLA-A2. Los genes E6 y E7 de VPH son los oncogenes del virus y la expresión de estos genes es necesaria para la transformación maligna. Las proteínas E6 y E7 se dirigen a varios reguladores negativos del ciclo celular, principalmente p105Rb y p53, respectivamente, y por lo tanto interfieren con la regulación del ciclo celular. En formas de realización adicionales, el antígeno de VPH es un antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas comprenden un antígeno E6 de VPH y un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo inmunogénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un epítipo E7 de VPH flanqueado por secuencias del polipéptido E6 de VPH (E7.6). En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18-26. En

algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la

5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunas formas de realización, el antígeno se deriva de un lisado celular, tal como un lisado de células enfermas. En algunas formas de realización, el antígeno está en un lisado celular. En algunas formas de realización, el antígeno se deriva de un lisado tumoral. En algunos casos, el antígeno se deriva de un

10 lisado de células cancerosas asociadas al VPH. En algunas formas de realización, el cáncer asociado con el VPH es uno de cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de vulva, cáncer de vagina, cáncer de pene, cáncer de ano, cáncer perianal, cáncer anogenital, cáncer oral o cáncer de saliva.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para tratar un cáncer

15 relacionado con el virus del papiloma humano (VPH) en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO:

20 18–26. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada con VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos

25 con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de

- deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno pase a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula
- 5 de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción.
- 10 En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad asociada al VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos
- 15 con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas
- 20 comprenden un antígeno de VPH, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de
- 25 deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula de entrada sean lo suficientemente grandes para que

el antígeno del VPH pase a través de ella y forme una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En
5 algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una
10 composición que comprende células inmunes modificadas, en donde el sistema inmunitario modificado las células comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26. En algún aspecto, la divulgación se refiere a un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una
15 enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26; en donde las células
20 inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula de entrada sean lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH
25 pase a través de ella y forme una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada;

generando así las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción. En algunas formas de realización, la respuesta inmune está mejorada. En algunas formas de realización, se mejora la
5 respuesta inmune al antígeno de VPH.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH. En algunas formas de realización, los antígenos comprendidos en un conjunto de múltiples antígenos no disminuyen la respuesta inmune dirigida
10 hacia los otros antígenos. Por ejemplo, cuando se usa un conjunto de antígenos E6 y E7 del VPH, las respuestas inmunitarias respectivas dirigidas hacia los antígenos E6 y E7 del VPH serían comparables a usar el V6 E6 solo o usar el E7 solo como antígeno, respectivamente.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que
15 comprende un epítipo de VPH inmunogénico y una o más secuencias de péptidos heterólogos. En algunas formas de realización, el uno o más complejos de antígenos de VPH consigo mismo, con otros antígenos o con el adyuvante.

Como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a una sustancia que modula y/o engendra, directa o indirectamente, una respuesta
20 inmune. En general, el adyuvante se administra junto con un antígeno para efectuar la mejora de una respuesta inmune al antígeno en comparación con el antígeno solo. Por lo tanto, se pueden usar adyuvantes para estimular la provocación de una respuesta de las células inmunes (por ejemplo, la respuesta de las células T) a un antígeno. En algunas formas de realización, la invención
25 proporciona células inmunes modificadas para comprender intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunas formas de realización, las células inmunes perturbadas como se describe en el presente

documento se incuban tanto con el antígeno de VPH como con un adyuvante. Los adyuvantes intracelulares ejemplares incluyen, sin limitación, CpG ODN, interferón- α (IFN- α), agonistas de los genes del interferón (STING) y agonistas del gen I (RIG-I) del ácido retinoico y poliinosínico: policitidílico (poli I:C). En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C. En formas de realización particulares, el adyuvante es un polinucleótido ODN CpG. En algunas formas de realización, el adyuvante CpG ODN comprende una selección del grupo de CpG ODN 1018, CpG ODN 1585, CpG ODN 2216, CpG ODN 2336, CpG ODN 1668, CpG ODN 1826, CPG ODN 2006, CpG ODN 2007, CpG ODN BW006, CpG ODN D-SL01, CpG ODN 2395, CpG ODN M362, CpG ODN D-SL03. En algunas formas de realización, el adyuvante CpG ODN es oligonucleótido CpG ODN 1826 (SEQ: TCCATGACGTTCTGACGTT) o CpG ODN 2006 (también conocido como CpG ODN 7909) (SEQ: TCGTCGTTTGGGTTTGTCGTT). En algunas formas de realización, el agonista de RIG-I comprende poliinosínico:ácido policitidílico (poli I:C). También se pueden usar múltiples adyuvantes junto con antígenos para mejorar la provocación de la respuesta inmune. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante. También se pueden usar múltiples adyuvantes junto con antígenos para mejorar la provocación de la respuesta inmune. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende cualquier combinación de los adyuvantes CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C. Los adyuvantes ejemplares incluyen, sin limitación, CpG ODN, interferón- α (IFN- α), poliinosínico: poli (ácido citididílico) (poli I:C), imiquimod (R837), resiquimod (R848) o lipopolisacárido (LPS). En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN, LPS, IFN- α , agonistas STING, agonistas RIG-I, poli I:C, R837,

R848, un agonista de TLR3, un agonista de TLR4 o un agonista de TLR9. En formas de realización particulares, el adyuvante es un CpG ODN. En algunas formas de realización, el adyuvante es un CpG ODN. En algunas formas de realización, el ODN CpG es un ODN CpG de Clase A, un ODN CpG de Clase B, o un ODN CpG de Clase C. En algunas formas de realización, el adyuvante CpG ODN comprende una selección del grupo de CpG ODN 1018, CpG ODN 1585, CpG ODN 2216, CpG ODN 2336, CpG ODN 1668, CpG ODN 1826, CPG ODN 2006, CpG ODN 2007, CpG ODN BW006, CpG ODN D-SL01, CpG ODN 2395, CpG ODN M362, CpG ODN D-SL03. En algunas formas de realización, el adyuvante CpG ODN es oligonucleótido CpG ODN 1826 (SEQ: TCCATGACGTTCTGACGTT) o CpG ODN 2006 (también conocido como CpG ODN 7909) (SEQ: TCGTCGTTTGGGTTTGTCGTT). En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN 7909. En algunas formas de realización, el agonista de RIG-I comprende poliinosínico: policitidílico (poli I:C). También se pueden usar múltiples adyuvantes junto con antígenos para mejorar la provocación de la respuesta inmune. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante. También se pueden usar múltiples adyuvantes junto con antígenos para mejorar la provocación de la respuesta inmune. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende cualquier combinación de los adyuvantes CpG ODN, LPS, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I, poli I:C, R837, R848, un agonista de TLR3, un agonista de TLR4 o un agonista de TLR 9.

En cualquiera de las formas de realización descritas en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, el adyuvante puede referirse a (a) un adyuvante que se incubó con y pasa a través de una célula inmune de entrada

perturbada, (b) un adyuvante incubado con PBMC para acondicionar las PBMC, (c) un adyuvante coadministrado con células inmunes modificadas a un individuo. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente estabilizante está complejoado con el antígeno de VPH y/o el adyuvante. En algunas formas de realización, el agente estabilizante aumenta la solubilidad y/o la semivida de la solución del antígeno de VPH y/o el adyuvante. En algunas formas de realización, la pluralidad de células inmunes modificadas tiene mayor viabilidad que las correspondientes células inmunes modificadas que no comprenden el agente estabilizante. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En formas de realización adicionales, la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana. En formas de realización adicionales, el agente es un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina o EDTA. En algunas formas de realización, el catión de metal divalente es uno más de Mg^{2+} , Zn^{2+} o Ca^{2+} . En algunas formas de realización, el agente comprende MSA.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una pluralidad correspondiente de la célula inmune modificada. Eso no comprende el agente. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en el ciclo de

congelación–descongelación en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un agente de conservación y/o un agente de conservación hipotérmico. En algunas formas de forma de realización, el agente de conservación y el agente de conservación hipotérmico causan más del 10% o 20% de muerte celular en la célula inmunitaria modificada que comprende el agente en comparación con una célula inmunitaria modificada correspondiente que no comprende el agente antes de cualquier ciclo de congelación–descongelación. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 90% de las células inmunes modificadas son viables después de hasta 1, 2, 3, 4, 5 ciclos de congelación y descongelación. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana. En algunas formas de realización, el agente es albúmina humana. En algunas formas de realización, el agente es uno o más de: un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D–sacarosa, PEG1500, L–arginina, L–glutamina o EDTA. En algunas formas de realización, el catión de metal divalente es uno más de Mg^{2+} , Zn^{2+} o Ca^{2+} . En algunas formas de realización, el agente es uno o más de: piruvato de sodio, adenina, trehalosa, dextrosa, manosa, sacarosa, albúmina de suero humano (HSA), DMSO, HEPES, glicerol, glutatión, inosina, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, iones de sodio metálico, iones de potasio metálico, iones de magnesio metálico, cloruro, acetato, gluconato, sacarosa, hidróxido de potasio o hidróxido de sodio. En algunas formas de realización, el agente es uno o más de: piruvato de sodio, adenina, Rejuvesol®, trehalosa, dextrosa, manosa, sacarosa, albúmina de suero humano

(HSA), PlasmaLyte®, DMSO, Cryostor® CS2, Cryostor® CS5, Cryostor® CS10, Cryostor® CS15, HEPES, glicerol, glutatión, HypoThermosol®.

En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras. En otras formas de realización, la molécula coestimuladora es B7-H2 (ICOSL), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4-1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112. En algunas formas de realización, la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

En algunas formas de realización, la célula inmunitaria es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, basófilos, o una célula precursora hematopoyética. En algunas formas de realización, la célula inmune no es una célula B. En algunas formas de realización, la célula inmune es una célula T. En algunas formas de realización, la célula inmune es distinta de una célula B. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK o las células T natural killer.

En algunas formas de realización, las células T incluyen una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$. La expresión de MHC en las células T alogénicas puede dar lugar a un innato La respuesta inmune montada en un individuo en respuesta a sus administraciones, y resultará en una vida media acortada de tales células T. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación

adicional para modular la expresión de MHC de clase II. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En formas de realización particulares, la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de

5 clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNhc, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En formas de realización particulares, la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o

10 MHC de clase II utilizando ARNm, ADN de plásmido o ADNc. En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto

15 alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional. En algunas formas de realización, la vida media en circulación de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron aumenta en comparación con la vida media en circulación de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación

20 adicional en un individuo para el que fueron administrados. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK o las células T natural killer. En algunas formas de realización, la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T

25 CD45RA+, las células T CD45RO+ o las células T $\gamma\delta$.

Las células inmunes y otras células pueden usarse como fuente de células autólogas o alogénicas. En algunas formas de realización, la célula inmune

modificada es alogénica al individuo. En otras formas de realización, la célula inmune modificada es autóloga para el individuo. En algunas formas de realización, el individuo a tratar está condicionado previamente para modular la inflamación.

- 5 Los adyuvantes se pueden emplear para mejorar aún más la respuesta inmune a los antígenos de VPH. En algunas formas de realización, el método para tratar adicionalmente comprende administrar al individuo un adyuvante. Los adyuvantes ejemplares incluyen, sin limitación, IFN- α , CpG ODN, agonistas de STING, agonistas de RIG-I y poli I:C. En algunas formas de realización, el adyuvante es
- 10 IFN- α o CpG ODN. En algunas formas de realización, el adyuvante es IFN- α , CpG ODN, agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C. En algunas formas de realización, el adyuvante comprende cualquier combinación de IFN- α , CpG ODN, agonistas STING, agonistas RIG-I o poli I:C.

- En algunas formas de realización, el método comprende múltiples
- 15 administraciones de las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el método comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 administraciones de las células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, el método comprende aproximadamente una cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 administraciones de las células inmunes
- 20 modificadas. En algunas formas de realización, el método comprende administraciones continuas de las células inmunes modificadas según sea necesario. En algunas formas de realización, el intervalo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de células inmunes modificadas está entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 30 días. En algunas formas de
- 25 realización, el intervalo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de las células inmunes modificadas es de aproximadamente 21 días. En algunas formas de realización, el intervalo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de las

- células inmunes modificadas es aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 ó 150 días. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas son una pluralidad de PBMC modificadas. En algunas formas de realización, las células
- 5 inmunes modificadas son una pluralidad condicionada de PBMC modificadas.
- En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran secuencialmente.
- 10 En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el adyuvante. Por ejemplo, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 1 semana antes de la administración del adyuvante. Por ejemplo, en algunas formas de
- 15 realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente
- 20 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días antes de la administración del adyuvante. En
- 25 algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3

horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas, entre
aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6
horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y
aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente
5 12 horas, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 14 horas, entre
aproximadamente 14 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente
16 horas y aproximadamente 18 horas, entre aproximadamente 18 horas y
aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente
24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 30 horas, entre
10 aproximadamente 30 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente
36 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 42 horas y
aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente
60 horas, entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 3 días, entre
aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 4
15 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 5 días y
aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 7
días antes de la administración del adyuvante.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células
inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante.
20 Por ejemplo, la composición que comprende las células inmunes modificadas se
administra desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 1 semana
después de la administración del adyuvante. Por ejemplo, en algunas formas de
realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se
administra aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas,
25 aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas,
aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12
horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente

18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días después de la administración del adyuvante. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 12 horas, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 14 horas, entre aproximadamente 14 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente 16 horas y aproximadamente 18 horas, entre aproximadamente 18 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 7 días después de la administración del adyuvante.

Los puntos de control inmunitarios son reguladores del sistema inmunitario y mantienen bajo control las respuestas inmunitarias. Los inhibidores del punto de

control inmune pueden emplearse para facilitar la mejora de la respuesta inmune. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra en combinación con la administración de un inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, la

5 composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran secuencialmente.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células

10 inmunes modificadas se administra antes de la administración del inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del inhibidor del punto de control inmune. Por ejemplo, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra

15 desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 1 semana antes de la administración del inhibidor del punto de control inmune. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas,

20 aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente

25 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días antes de la administración del inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, la composición que

comprende las células inmunes modificadas se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6
5 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 12 horas, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 14 horas, entre aproximadamente 14 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente 16 horas y aproximadamente 18 horas, entre
10 aproximadamente 18 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente
15 48 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 7 días antes de la administración del inhibidor del punto
20 de control inmune.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del inhibidor del punto de control inmune. Por ejemplo, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra desde aproximadamente 1 hora hasta
25 aproximadamente 1 semana después de la administración del inhibidor del punto de control inmune. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra aproximadamente

1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días después de la administración del inhibidor del punto de control inmune. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 12 horas, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 14 horas, entre aproximadamente 14 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente 16 horas y aproximadamente 18 horas, entre aproximadamente 18 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 5 días y

aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 7 días después de la administración del inhibidor del punto de control inmune.

En algunas formas de realización, el método comprende la administración múltiple de la composición que comprende las células inmunes modificadas y/o la

5 administración múltiple del inhibidor del punto de control. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el método comprende dos administraciones, tres administraciones, cuatro administraciones, cinco administraciones, seis administraciones, siete administraciones, ocho administraciones, nueve administraciones, diez administraciones, once administraciones, doce
10 administraciones, trece administraciones, catorce administraciones, o quince administraciones de la composición que comprenden las células inmunes modificadas y/o el inhibidor del punto de control. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el método comprende menos de cinco administraciones, menos de diez administraciones, menos de quince administraciones, menos de veinte
15 administraciones, menos de veinticinco administraciones, menos de treinta administraciones, menos de cincuenta administraciones, menos de setenta y cinco administraciones, menos de cien o menos de doscientas administraciones de la composición que comprende las células inmunes modificadas y/o el inhibidor del punto de control.

20 El inhibidor de punto de control inmune ejemplar está dirigido, sin limitación, a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune es uno o más de: un anticuerpo que se une a PD-1, un
25 anticuerpo que se une a PD-L1, un anticuerpo que se une a CTLA-4, un anticuerpo que se une a LAG3, o un anticuerpo que se une a TIM-3. En formas de realización adicionales, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud

- completa o cualquier variante, por ejemplo, pero sin limitación, un fragmento de anticuerpo, un fragmento variable de cadena única (ScFv), o un fragmento de unión a antígeno (Fab). En formas de realización adicionales, el anticuerpo puede ser biespecífico, triespecífico o multiespecífico. En algunas formas de realización,
- 5 el inhibidor del punto de control inmune es uno o más compuestos químicos que se unen y/o inhiben uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune es uno o más péptidos que se unen y/o inhiben uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3.
- 10 Otro inhibidor de punto de control inmune ejemplar está dirigido, sin limitación, a TIGIT, VISTA, TIM1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de TIGIT, VISTA, TIM1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune es uno o más de: un anticuerpo que se une
- 15 a TIGIT, un anticuerpo que se une a VISTA, un anticuerpo que se une a TIM1, un anticuerpo que se une a B7-H4 (VTCN1) o un anticuerpo que se une a BTLA. En formas de realización adicionales, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o cualquier variante, por ejemplo, pero sin limitación, un fragmento de anticuerpo, un fragmento variable de cadena única (ScFv), o un
- 20 fragmento de unión a antígeno (Fab). En formas de realización adicionales, el anticuerpo puede ser biespecífico, triespecífico o multiespecífico. En algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune es uno o más compuestos químicos que se unen y/o inhiben uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM-3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7 -H4 (VTCN1) o BTLA. En
- 25 algunas formas de realización, el inhibidor del punto de control inmune es uno o más péptidos que se unen y/o inhiben uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM-3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7- H4 (VTCN1) o BTLA.

La quimioterapia o la radioterapia pueden usarse en combinación con cualquiera de las células inmunes modificadas descritas en este documento para lograr efectos aditivos o sinérgicos contra los cánceres, por ejemplo, los cánceres asociados al VPH. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra en combinación con la administración de una quimioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran secuencialmente.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de la administración de la quimioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración de la quimioterapia. Por ejemplo, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 1 semana antes de la administración de la quimioterapia. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días antes de la

administración de la quimioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 12 horas, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 14 horas, entre aproximadamente 14 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente 16 horas y aproximadamente 18 horas, entre aproximadamente 18 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 7 días antes de la administración de la quimioterapia.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración de la quimioterapia. Por ejemplo, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 1 semana después de la administración de la quimioterapia. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra aproximadamente 1 hora,

aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días después de la administración de la quimioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 12 horas, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 14 horas, entre aproximadamente 14 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente 16 horas y aproximadamente 18 horas, entre aproximadamente 18 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 48 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5 días, entre

aproximadamente 5 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 7 días después de la administración de la quimioterapia. En algunas formas de realización, el método comprende la administración múltiple de la composición que comprende las células inmunes modificadas y/o la

5 administración múltiple de la quimioterapia. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el método comprende dos administraciones, tres administraciones, cuatro administraciones, cinco administraciones, seis administraciones, siete administraciones, ocho administraciones, nueve administraciones, diez administraciones, once administraciones, doce administraciones, trece

10 administraciones, catorce administraciones, o quince administraciones de la composición que comprenden las células inmunes modificadas y/o la quimioterapia. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el método comprende menos de cinco administraciones, menos de diez administraciones, menos de quince administraciones, menos de veinte administraciones, menos de

15 veinticinco administraciones, menos de treinta administraciones, menos de cincuenta administraciones, menos de setenta y cinco administraciones, menos de cien o menos de doscientas administraciones de la composición que comprende las células inmunes modificadas y/o la quimioterapia.

La quimioterapia ejemplar puede ser dependiente del ciclo celular o independiente

20 del ciclo celular. En algunas formas de realización, la quimioterapia comprende uno o más agentes quimioterapéuticos. En algunas formas de realización, un agente quimioterapéutico puede dirigirse a uno o más de división celular, ADN o metabolismo en el cáncer. En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es un agente basado en platino, tal como, entre otros,

25 cisplatino, oxaliplatino o carboplatino. En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es un taxano (tal como docetaxel o paclitaxel). En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es 5-fluorouracilo,

doxorubicina o irinotecán. En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es uno o más de: un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico antitumoral, un inhibidor de topoisomerasa o un inhibidor mitótico. En algunas formas de realización, la quimioterapia comprende cisplatino. En algunas formas de realización, una o más de las quimioterapias o los inhibidores del punto de control inmune pueden combinarse con una cualquiera de las células inmunes modificadas descritas en el presente documento para tratar o prevenir una enfermedad asociada al VPH.

La radioterapia se puede usar en combinación con cualquiera de las células T modificadas descritas en este documento para lograr efectos aditivos o sinérgicos contra los cánceres, por ejemplo, los cánceres asociados al VPH. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra en combinación con la administración de una radioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas y la radioterapia se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas y la radioterapia se administran secuencialmente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra en combinación con la administración de una radioterapia, en combinación con una quimioterapia y/o en combinación con un inhibidor del punto de control inmune.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra antes de la administración de la radioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra después de la administración de la radioterapia. Por ejemplo, la composición que comprende las células T modificadas se administra desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 1 semana antes de la administración de la radioterapia. Por ejemplo, en algunas formas de realización,

la composición que comprende las células T modificadas se administra aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14
5 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7
10 días antes de la administración de la radioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y
15 aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 12 horas, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 14 horas, entre aproximadamente 14 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente 16 horas y aproximadamente
20 18 horas, entre aproximadamente 18 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 30 horas y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente 42 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre
25 aproximadamente 48 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 60 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, de entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5

días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 7 días antes de la administración de la radioterapia.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra después de la administración de la radioterapia. Por ejemplo, la composición que comprende las células T modificadas se administra desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 1 semana después de la administración de la radioterapia. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días después de la administración de la radioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 10 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 12 horas, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 14 horas, entre aproximadamente 14 horas y aproximadamente 16 horas, entre aproximadamente 16 horas y aproximadamente

18 horas, entre aproximadamente 18 horas y aproximadamente 20 horas, entre
aproximadamente 20 horas y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente
24 horas y aproximadamente 30 horas, entre aproximadamente 30 horas y
aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 36 horas y aproximadamente
5 42 horas, entre aproximadamente 42 horas y aproximadamente 48 horas, entre
aproximadamente 48 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente
60 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y
aproximadamente 4 días, de entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5
días, de entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 6 días, de
10 aproximadamente 6 días y aproximadamente 7 días después de la administración
de la radioterapia.

En algunas formas de realización, el método comprende la administración múltiple
de la composición que comprende las células T modificadas y/o la administración
múltiple de la radioterapia. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el
15 método comprende dos administraciones, tres administraciones, cuatro
administraciones, cinco administraciones, seis administraciones, siete
administraciones, ocho administraciones, nueve administraciones, diez
administraciones, once administraciones, doce administraciones, trece
administraciones, catorce administraciones, o quince administraciones de la
20 composición que comprenden las células T modificadas y/o la radioterapia. Por
ejemplo, en algunas formas de realización, el método comprende menos de cinco
administraciones, menos de diez administraciones, menos de quince
administraciones, menos de veinte administraciones, menos de veinticinco
administraciones, menos de treinta administraciones, menos de cincuenta
25 administraciones, menos de setenta y cinco administraciones, menos de cien o
menos de doscientas administraciones de la composición que comprende las
células T modificadas y/o la radioterapia.

Cuando los antígenos de VPH se procesan y se presentan en MHC a células inmunes, se puede activar o mejorar una respuesta inmune contra el epítipo de VPH presentado. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido de MHC de clase I. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II. En algunas formas de realización, la respuesta inmune está mejorada. En formas de realización adicionales, se mejora la respuesta inmune al antígeno de VPH. En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH. En algunas formas de realización, la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno.

En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, la cantidad efectiva de la composición comprende cualquiera de aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , o aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas. En algunas formas de realización, la cantidad efectiva de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^7 , entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^8 , entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^9 , entre aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{10} , entre aproximadamente 1×10^{10} y aproximadamente 1×10^{11} , o entre aproximadamente 1×10^{11} y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas.

En algunas formas de realización, el método comprende administraciones múltiples de la composición que comprende las células inmunes modificadas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el método comprende dos administraciones, tres administraciones, cuatro administraciones, cinco administraciones, seis administraciones, siete administraciones, ocho administraciones, nueve administraciones, diez administraciones, once administraciones, doce administraciones, trece administraciones, catorce administraciones, o quince administraciones de la composición que comprenden las células inmunes modificadas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el método comprende menos de cinco administraciones, menos de diez administraciones, menos de quince administraciones, menos de veinte administraciones, menos de veinticinco administraciones, menos de treinta administraciones, menos de cincuenta administraciones, menos de setenta y cinco administraciones, menos de cien o menos de doscientas administraciones de la composición que comprende las células inmunes modificadas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el método comprende una primera administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas, seguida de una segunda administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas. El tiempo de la administración también se puede modificar para lograr los resultados deseados. En algunas formas de realización, la primera administración de la composición al individuo se produce antes de la segunda administración de la composición. En algunas formas de realización, la primera administración se introduce al individuo más de aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses,

aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 18 meses o aproximadamente 24 meses antes de la introducción de la segunda administración.

- 5 En algunas formas de realización, el método comprende múltiples administraciones de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el método comprende cualquiera de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de aproximadamente 10 administraciones. En algunas formas de realización, el intervalo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de la célula T
- 10 modificada está entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 1 mes. En algunas formas de realización, la administración es diaria, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente. En algunas formas de realización, las administraciones sucesivas se dan hasta un año o más.
- 15 En ciertos aspectos, la composición que comprende células modificadas se puede usar para tratar, prevenir una enfermedad asociada con el VPH y/o modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada con el VPH. En algunas formas de realización, la enfermedad asociada al VPH es un cáncer asociado al VPH. En algunas formas de realización, el cáncer asociado al VPH es
- 20 enfermedad cervical, enfermedad anal, enfermedad orofaríngea, enfermedad vaginal, enfermedad vulvar, enfermedad del pene, enfermedad de la piel o enfermedad de cabeza y diablos. En algunas formas de realización, la enfermedad asociada al VPH es una enfermedad infecciosa asociada al VPH. Otras enfermedades asociadas al VPH pueden incluir verrugas comunes,
- 25 verrugas plantares, verrugas planas, verrugas anogenitales, lesiones anales, epidermodisplasia, hiperplasia epitelial focal, papilomas bucales, quistes verrugosos y papilomatosis laríngea.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere al uso de células inmunes modificadas para tratar una enfermedad asociada al VPH, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunos aspectos, la divulgación se refiere al

5 uso de células inmunes modificadas para tratar una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se

10 preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, de tal manera que una fuerza de deformación se aplica a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción, causando así

15 perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así

20 las células inmunes modificadas.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a una composición que comprende células inmunes modificadas para la fabricación de un medicamento utilizado para tratar una enfermedad asociada al VPH, en la que las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e

25 intracelularmente un adyuvante. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a una composición que comprende células inmunes modificadas para la fabricación de un medicamento utilizado para tratar una enfermedad asociada al VPH, el

- método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando
- 5 una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, de tal manera que una fuerza de deformación se aplica a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción, causando así perturbaciones de la célula de
- 10 entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas.
- 15 En algunos aspectos, la descripción se refiere a una composición que comprende células inmunes modificadas para usar en un método de tratamiento médico, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a una composición que comprende células inmunes
- 20 modificadas para su uso en un método de tratamiento médico, el método que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un VPH antígeno e intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando
- 25 una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, de tal

manera que una fuerza de deformación se aplica a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar

5 la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere a una composición que comprende células inmunes modificadas para usar en un método para tratar el cáncer, una

10 enfermedad infecciosa o una enfermedad asociada a virus, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a una composición que comprende células inmunes modificadas para usar en el tratamiento de una enfermedad asociada al VPH, el método que comprende

15 administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante; en donde las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una

20 constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, de tal manera que una fuerza de deformación se aplica a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen a través de ella para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar

25 la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un

tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas.

En algunos aspectos, esta divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada al VPH en un individuo que comprende

- 5 administrar al individuo una célula inmune modificada asociada con un antígeno de VPH, en donde la célula inmune modificada se prepara mediante un proceso que comprende los pasos de: a) incubar una célula de entrada con el antígeno de VPH y/o un adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH se asocie con la superficie celular de la célula de entrada; generando así
- 10 la célula inmune modificada asociada con el antígeno.

En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas de la invención no inducen tolerancia en un individuo. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas no suprimen una respuesta inmune en un individuo. En algunas formas de realización, las células inmunes

15 modificadas no comprenden un factor tolerogénico. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas no se administran en combinación con un factor tolerogénico. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas no se administran antes, simultáneamente con, o después de la administración de un factor tolerogénico.

20

Composiciones

En ciertos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende células inmunes modificadas, en la que las células inmunes modificadas comprenden antígeno de VPH intracelular y un CpG ODN intracelular. En otros

25 aspectos, la divulgación se refiere a una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH, en donde el antígeno de VPH comprende

una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH

5 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas se preparan a) pasando una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando

10 así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH pase a través de ellas para formar una célula de entrada perturbada; y b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH entre en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas. En

15 formas de realización adicionales, se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción. En algunas formas de realización, la composición comprende además un adyuvante intracelular.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol o endosomas. En algunas formas de realización, el

20 antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula. En formas de realización adicionales, el antígeno y/o adyuvante están presentes en compartimentos de la célula que comprenden el rectículo endoplásmico (ER), el aparato de Golgi, el lisosoma, los exosomas, la superficie celular o la membrana celular. En algunas formas de realización, el antígeno y el adyuvante

25 están en el mismo compartimento. En algunas formas de realización, el antígeno y el adyuvante están en compartimentos diferentes entre sí. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el antígeno está presente en el citosol, mientras

que el adyuvante está presente en el endosoma. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en el exterior de la célula.

En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno polipeptídico. En

- 5 algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno modificado. Por ejemplo, los antígenos pueden fusionarse con agentes terapéuticos o péptidos dirigidos. En algunas formas de realización, el antígeno modificado se fusiona con un polipéptido. En algunas formas de realización, el antígeno se modifica con un lípido. En algunas formas de realización, el antígeno se modifica con un
- 10 polisacárido o un resto de carbohidrato. En algunas formas de realización, el antígeno está asociado con un virus. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno viral. Los antígenos víricos ejemplares incluyen antígenos de VPH. En formas de realización adicionales, el antígeno es un antígeno de VPH. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH consiste
- 15 en una selección del grupo de: VPH-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 son tipos de alto riesgo para causar cáncer mientras que VPH-26, 53 y 66 son "probablemente tipos de alto riesgo" en causar cáncer. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno de VPH-16 o un antígeno de VPH-18. En
- 20 algunas formas de realización, el antígeno de VPH está compuesto por un epítipo específico de HLA-A2. Los genes E6 y E7 de VPH son los oncogenes del virus y la expresión de estos genes es necesaria para la transformación maligna. Las proteínas E6 y E7 se dirigen a varios reguladores negativos del ciclo celular, principalmente p105Rb y p53, respectivamente, y por lo tanto interfieren con la
- 25 regulación del ciclo celular. En formas de realización adicionales, el antígeno de VPH es un antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas comprenden un antígeno E6 de VPH

- y un antígeno E7 de VPH. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo inmunogénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH es un epítipo E7 de VPH flanqueado por secuencias del polipéptido E6 de VPH. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende un amino acid con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26. En algunas formas de realización, el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.
- 10 Un adyuvante, cuando se agrega a un agente inmunogénico, aumenta o potencia de manera no específica una respuesta inmune al agente en el huésped receptor tras la exposición a la mezcla. Por lo tanto, se pueden usar adyuvantes para estimular la provocación de una respuesta de las células inmunes (por ejemplo, la respuesta de las células T) a un antígeno. En algunas formas de realización, las
- 15 células perturbadas se incuban tanto con el antígeno de VPH como con un adyuvante. Los adyuvantes intracelulares ejemplares incluyen, sin limitación, CpG ODN, interferón- α (IFN- α), agonistas de los genes del interferón (STING), agonistas del gen I (RIG-I) inducidos por ácido retinoico y poliinosínico: policitidílico (poli I:C).). En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG
- 20 ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C. En formas de realización particulares, el adyuvante es un polinucleótido ODN CpG. En algunas formas de realización, el adyuvante CpG ODN comprende una selección del grupo de CpG ODN 1585, CpG ODN2216, CpG ODN 2336, CpG ODN 1668, CpG ODN 1826, CPG ODN 2006, CpG ODN 2007, CpG ODN BW006, CpG ODN D –
- 25 SL01, CpG ODN 2395, CpG ODN M362, CpG ODN D–SL03 (InvivoGen). En algunas formas de realización, el adyuvante CpG ODN es oligonucleótido CpG ODN 1826 (SEQ: TCCATGACGTTCCTGACGTT) o CpG ODN 2006 (también

conocido como CpG ODN 7909) (SEQ: TCGTCGTTTGGGTTTGTCGTT).

También se pueden usar múltiples adyuvantes junto con antígenos para mejorar la provocación de la respuesta inmune. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende cualquier combinación de los adyuvantes CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I y poli I:C.

En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración entre aproximadamente 0,01 μ M y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración de menos de aproximadamente 0,01 μ M, aproximadamente 0,1 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 100 μ M, aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración de más de aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración inferior a cualquiera de aproximadamente 0,01 μ M, aproximadamente 0,1 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 100 μ M, aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración mayor que cualquiera de aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 μ M, entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 10 μ M, entre aproximadamente 10 μ M y aproximadamente 100 μ M, entre aproximadamente 100 μ M y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM.

En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración de menos de aproximadamente 0,01 μM , aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración de más de aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración menor que cualquiera de aproximadamente 0,01 μM , aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración mayor que cualquiera de aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende el antígeno del VPH a una concentración de entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 μM , entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 10 μM , entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 100 μM , entre aproximadamente 100 μM y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM.

En algunas formas de realización, la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la proporción de antígeno de VPH con respecto al adyuvante es cualquiera de aproximadamente 10000:1, aproximadamente 1000:1, aproximadamente 200:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1000, o aproximadamente 1:10000. En algunas formas de

realización, la relación de antígeno de VPH al adyuvante entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1000:1, entre aproximadamente 1000:1 y aproximadamente 100:1, entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 10:1, entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:1, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100, entre aproximadamente 1:100 y aproximadamente 1:1000, entre aproximadamente 1:1000 y aproximadamente 1:10000.

En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente estabilizante está complejoado con el antígeno de VPH y/o el adyuvante. En algunas formas de realización, el agente estabilizante aumenta la solubilidad y/o la semivida de la solución del antígeno de VPH y/o el adyuvante. En algunas formas de realización, la pluralidad de células inmunes modificadas tiene mayor viabilidad que las correspondientes células inmunes modificadas que no comprenden el agente estabilizante. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En formas de realización adicionales, la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana. En formas de realización adicionales, el agente es un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina o EDTA. En algunas formas de realización, el catión de metal divalente es uno más de Mg^{2+} , Zn^{2+} o Ca^{2+} . En algunas formas de realización, el agente comprende MSA.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, la célula inmune modificada

comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una pluralidad correspondiente de la célula inmune modificada. Eso no comprende el agente. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada comprende además un agente que

5 mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en el ciclo de congelación–descongelación en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un agente de conservación y/o un agente de conservación hipotérmico. En algunas formas de realización, el agente de conservación o el

10 agente de conservación hipotérmico no causa más del 10% o 20% de muerte celular en una célula inmunitaria modificada que comprende el agente en comparación con una célula inmunitaria modificada correspondiente que no comprende el agente antes de la congelación. – ciclos de descongelación. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 70%,

15 aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 90% de las células inmunes modificadas son viables después de hasta 1, 2, 3, 4, 5 ciclos de congelación y descongelación. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la

20 albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana. En algunas formas de realización, el agente es albúmina humana. En algunas formas de realización, el agente es uno o más de: un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D–sacarosa, PEG1500, L–arginina, L–glutamina o EDTA. En algunas formas de realización, el catión de metal divalente es uno más de Mg^{2+} ,

25 Zn^{2+} o Ca^{2+} . En algunas formas de realización, el agente es uno o más de: piruvato de sodio, adenina, trehalosa, dextrosa, manosa, sacarosa, albúmina de suero humano (HSA), DMSO, HEPES, glicerol, glutatión, inosina, fosfato de sodio

dibásico, fosfato de sodio monobásico, iones de sodio metálico, iones de potasio metálico, iones de magnesio metálico, cloruro, acetato, gluconato, sacarosa, hidróxido de potasio o hidróxido de sodio. En algunas formas de realización, el agente es uno o más de: piruvato de sodio, adenina, Rejuvesol®, trehalosa, dextrosa, manosa, sacarosa, albúmina de suero humano (HSA), PlasmaLyte®, DMSO, Cryostor® CS2, Cryostor® CS5, Cryostor® CS10, Cryostor® CS15, HEPES, glicerol, glutatión, HypoThermosol®.

En algunas formas de realización, las células inmunes modificadas se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras. En otras formas de realización, la molécula coestimuladora es B7-H2 (ICOSL), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4-1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112. En algunas formas de realización, la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

En algunas formas de realización, la célula inmunitaria es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, basófilos, o una célula precursora hematopoyética. En algunas formas de realización, la célula inmune no es una célula B. En algunas formas de realización, la célula inmune es una célula T. En algunas formas de realización, la célula inmune es distinta de una célula B. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK o las células T natural killer. En algunas formas de realización, las células T incluyen una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$. La expresión de MHC en las células T

allogénicas puede dar lugar a un innato La respuesta inmune montada en un individuo en respuesta a sus administraciones, y resultará en una vida media acortada de tales células T. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En formas de realización particulares, la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNhc, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa. En algunas formas de realización, la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En formas de realización particulares, la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNm, ADN de plásmido o ADNc. En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto allogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto allogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional. En algunas formas de realización, la vida media en circulación de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron aumenta en comparación con la vida media en circulación de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo para el que fueron administrados En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK o las células T

natural killer. En algunas formas de realización, la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ o las células T $\gamma\delta$.

5 Las células inmunes y otras células pueden usarse como fuente de células autólogas o alogénicas. En algunas formas de realización, la célula inmune modificada es alogénica al individuo. En otras formas de realización, la célula inmune modificada es autóloga para el individuo. En algunas formas de realización, el individuo a tratar está preconditionado para tener una inflamación disminuida o una respuesta inmune modulada.

10

Composición PBMC

Como se usa en el presente documento, las PBMC pueden aislarse mediante leucoféresis a partir de sangre completa obtenida de un individuo. También se proporcionan las composiciones de PBMC que se reconstituyen mezclando
15 diferentes grupos de PBMC del mismo individuo o individuos diferentes. En otros ejemplos, las PBMC también pueden reconstituirse mezclando diferentes poblaciones de células en una composición celular mixta con un perfil generado. En algunas formas de realización, las poblaciones de células utilizadas para reconstituir las PBMC son poblaciones mixtas de células (como una mezcla de
20 una o más de células T, células B, células NK o monocitos). En algunas formas de realización, las poblaciones de células utilizadas para reconstituir las PBMC son poblaciones de células purificadas (tales como células T purificadas, células B, células NK o monocitos). En ejemplos adicionales, las diferentes poblaciones de células utilizadas para reconstituir una composición de PBMC pueden aislarse del
25 mismo individuo (por ejemplo, autóloga) o aislarse de diferentes individuos (por ejemplo, alogénica y/o heteróloga).

Por lo tanto, en algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, la pluralidad de PBMC de entrada comprende una o más de células T, células B, células NK, monocitos, Células dendríticas o células NK–T. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada comprende células T, células B, células NK, monocitos, células dendríticas o células NK–T. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada comprende una o más de células T CD3+, células B CD20+, monocitos CD14+, células NK CD56+. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada comprende células T, células B, células NK y monocitos, y la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en la pluralidad de PBMC de entrada es esencialmente la igual que la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en sangre total. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada comprende células T, células B, células NK y monocitos, y la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en la pluralidad de PBMC de entrada es esencialmente la Igual que la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en un producto de leucoféresis de sangre total. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada comprende células T, células B, células NK y monocitos, y la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en la pluralidad de PBMC de entrada no se diferencia por más del 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% o 50% de la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto a Número total de PBMC en sangre total. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada comprende células T, células B, células NK y monocitos, y la

proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en la pluralidad de PBMC de entrada no se diferencia por más del 10% de la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en sangre total. En algunas formas de
5 realización, la pluralidad de PBMC de entrada comprende células T, células B, células NK y monocitos, y la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en la pluralidad de PBMC de entrada no se diferencia por más del 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% o 50% de la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con
10 respecto al número total de PBMC en un producto de leucoféresis de sangre total. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada comprende células T, células B, células NK y monocitos, y la proporción de células T, células B, células NK y monocitos con respecto al número total de PBMC en la pluralidad de PBMC de entrada no se diferencia por más del 10% de la proporción de
15 células T, células B, células NK y monocitos respecto al número total de PBMC en un producto de leucoféresis de sangre total.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritas en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, aproximadamente 25% a aproximadamente 70% de
20 las PBMC modificadas son células T. En algunas formas de realización, aproximadamente del 2,5% a aproximadamente el 14% de las PBMC modificadas son células B. En algunas formas de realización, aproximadamente del 3,5% a aproximadamente el 35% de las PBMC modificadas son células NK. En algunas formas de realización, aproximadamente del 4% a aproximadamente el 25% de
25 las PBMC modificadas son células NK. En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritas en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, al

- menos aproximadamente 90% a aproximadamente 99% de las PBMC de entrada consisten en células T, células B, células NK y monocitos. En algunas formas de realización, al menos una cualquiera de aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%,
- 5 aproximadamente 90% a aproximadamente 95% o aproximadamente 95% a aproximadamente 99% de las PBMC de entrada consisten en células T, células B, células NK y monocitos. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente uno de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las PBMC de
- 10 entrada consisten en células T, células B, células NK y monocitos. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 90% de las PBMC de entrada consisten en células T, células B, células NK y monocitos. En algunas formas de realización, las PBMC de entrada consisten en células T, células B, células NK y monocitos.
- 15 En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, al menos aproximadamente 90% a aproximadamente 99% de las PBMC modificadas consisten en células T, células B, células NK y monocitos. En algunas formas de realización, al menos una cualquiera de
- 20 aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90% a aproximadamente 95% o aproximadamente 95% a aproximadamente 99% de las PBMC modificadas consiste en células T, células B, células NK y monocitos. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente uno de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%,
- 25 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las PBMC modificadas consisten en células T, células B, células NK y monocitos. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 90%

de las PBMC modificadas consisten en células T, células B, células NK y monocitos. En algunas formas de realización, las PBMC modificadas consisten en células T, células B, células NK y monocitos.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos
5 o composiciones descritos en el presente documento, en el que la célula inmune es una pluralidad de PBMC, al menos aproximadamente uno de 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40 %, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75% de las PBMC de entrada son células T. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 25% de las PBMC de entrada son células T. En algunas
10 formas de realización, al menos aproximadamente uno de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 7,5%, 8%, 9%, 10 %, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, o 30% de las PBMC de entrada son células B. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 2,5% de las PBMC de entrada son células B. En algunas formas de realización, al menos
15 aproximadamente uno de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 7,5%, 8%, 9%, 10 %, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25% o 30% de las PBMC de entrada son células NK. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 3,5% de las PBMC de entrada son células NK. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente uno de
20 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18 %, 20%, 25%, 30%, 35% o 40% de las PBMC de entrada son monocitos. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 4% de las PBMC de entrada son monocitos. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 25% de las PBMC de entrada son células T; al menos aproximadamente el 2,5% de las
25 PBMC de entrada son células B; al menos aproximadamente el 3,5% de las PBMC de entrada son células NK; y al menos aproximadamente el 4% de las PBMC de entrada son monocitos.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en el que la célula inmune es una pluralidad de PBMC, al menos aproximadamente uno de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35 %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, o 70% de las PBMC modificadas son células T. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 20% de las PBMC modificadas son células T. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente uno de 0,25%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 7,5%, 8%, 9 %, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25% o 30% de las PBMC modificadas son células B. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 2% de las PBMC modificadas son células B. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente uno de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 7,5%, 8%, 9%, 10 %, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25% o 30% de las PBMC modificadas son células NK. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 3% de las PBMC modificadas son células NK. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente uno de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18 %, 20%, 25%, 30%, 35% o 40% de las PBMC modificadas son monocitos. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 3% de las PBMC modificadas son monocitos. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente el 20% de las PBMC modificadas son células T; al menos aproximadamente el 2% de las PBMC modificadas son células B; al menos aproximadamente el 3% de las PBMC modificadas son células NK; y al menos aproximadamente el 3% de las PBMC modificadas son monocitos.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritas en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, no más de aproximadamente cualquiera de 40%,

- 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% de las PBMC de entrada son células T. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 70% de las PBMC de entrada son células T. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 25%, 30%, 35%, 40% o 50%. De las PBMC de entrada son las células B. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 14% de las PBMC de entrada son células B. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o 60% de las PBMC de entrada son células NK. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 35% de las PBMC de entrada son células NK. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 25%, 30%, 35%, 40% o 50%. De las PBMC de entrada son monocitos. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 4% de las PBMC de entrada son monocitos. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 25% de las PBMC de entrada son células T; no más de aproximadamente el 2,5% de las PBMC de entrada son células B; no más de aproximadamente el 3,5% de las PBMC de entrada son células NK; y no más de aproximadamente el 4% de las PBMC de entrada son monocitos.
- En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en el que la célula inmune es una pluralidad de PBMC, no más de aproximadamente uno del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% o 70% de las PBMC modificadas son células T. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 20% de las PBMC modificadas son células T. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente uno de 0,25%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 7,5%, 8%, El 9%, 10%, 11%, 12%, 13%,

14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25% o 30% de las PBMC modificadas son células B. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 2% de las PBMC modificadas son células B. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente uno de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 7,5%, 8%, 9%, El 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25% o 30% de las PBMC modificadas son células NK. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 3% de las PBMC modificadas son células NK. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 14%, 16%, El 18%, 20%, 25%, 30%, 35% o 40% de las PBMC modificadas son monocitos. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 3% de las PBMC modificadas son monocitos. En algunas formas de realización, no más de aproximadamente el 20% de las PBMC modificadas son células T; no más de aproximadamente el 2% de las PBMC modificadas son células B; no más de aproximadamente el 3% de las PBMC modificadas son células NK; y no más de aproximadamente el 3% de las PBMC modificadas son monocitos.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en el que la célula inmune es una pluralidad de PBMC, aproximadamente del 20% al 25%, del 25% al 30%, del 30% al 35%, 35% a 40%, 40% a 45%, 45% a 50%, 50% a 55%, 55% a 60%, 60% a 65%, 65% a 70%, o 70% a 75% de las PBMC modificadas son células T. En algunas formas de realización, aproximadamente del 25% a aproximadamente el 70% de las PBMC modificadas son células T. En algunas formas de realización, aproximadamente del 1% al 2,5%, del 2,5% al 4%, del 4% al 6%, del 6% al 8%, del 8% al 10%, del 10% al 12%, del 12% al 14%, 14% a 16%, 16% a 20% o 20% a 25% de las PBMC modificadas son células B. En algunas formas de realización, aproximadamente del 2,5% a aproximadamente el 14% de las PBMC modificadas

son células B. En algunas formas de realización, aproximadamente del 1% al 2%, del 2% al 3,5%, del 3,5% al 5%, del 5% al 8%, del 8% al 10%, del 10% al 12%, del 12% al 14%, 14% a 16%, 16% a 20% o 20% a 25% de las PBMC modificadas son células B. En algunas formas de realización, aproximadamente del 3,5% a 5 aproximadamente el 35% de las PBMC modificadas son células NK. En algunas formas de realización, aproximadamente del 2% al 4%, del 4% al 6%, del 6% al 8%, del 8% al 10%, del 10% al 12%, del 12% al 14%, del 14% al 16%, 16% a 20%, 20% a 25%, 25% a 30%, 30% a 35%, o 35% a 40% de las PBMC modificadas son monocitos. En algunas formas de realización, aproximadamente 10 4% a aproximadamente 25% de las PBMC modificadas son monocitos.

Como se usa en el presente documento, también se pueden generar PBMC después de manipular la composición de una población de células mixtas de células sanguíneas mononucleares (tales como linfocitos y monocitos). En algunos casos, las PBMC de entrada se generan después de reducir (como 15 agotar) ciertas subpoblaciones (como las células B) dentro de una población de células mixtas de células sanguíneas mononucleares. La composición en una población celular mixta de células sanguíneas mononucleares en un individuo puede manipularse para hacer que la población de células se parezca más a un producto de leucoféresis de sangre completa en el mismo individuo. En otros 20 ejemplos, la composición en una población celular mixta de células sanguíneas mononucleares (por ejemplo, esplenocitos de ratón) también se puede manipular para que la población celular se parezca más a PBMC humanas aisladas de un producto de leucoféresis de sangre humana completa.

En algunas formas de realización, la administración mediada por la construcción 25 no modula de manera diferencial la viabilidad de diferentes subpoblaciones (como las células B, las células T, las células NK o los monocitos) dentro de las PBMC de manera significativa. En algunas formas de realización, el proceso de

acondicionamiento no modula diferencialmente la viabilidad de diferentes subpoblaciones dentro de PBMC de una manera significativa. En algunas formas de realización, la adición adicional de agentes (incluidos, entre otros, agentes de biopreservación o agentes que mejoran la función y/o la viabilidad de las PBMC)

5 no modula de manera significativa la viabilidad de varias subpoblaciones dentro de las PBMC de manera significativa. Por lo tanto, en algunas formas de realización de acuerdo con cualquiera de los métodos o composiciones descritas en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, el porcentaje de células T dentro de la pluralidad de PBMC modificadas y el

10 porcentaje de células T dentro de la pluralidad de PBMC de entrada son diferentes por no más de aproximadamente el 10% en número. En algunas formas de realización, el porcentaje de células T dentro de la pluralidad de PBMC modificadas y el porcentaje de células T dentro de la pluralidad de PBMC de entrada no difieren en más de aproximadamente 5%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%,

15 18% o 20% por número. En algunas formas de realización, el porcentaje de células B dentro de la pluralidad de PBMC modificadas y el porcentaje de células B dentro de la pluralidad de PBMC de entrada difieren en no más de aproximadamente el 10% en número. En algunas formas de realización, el porcentaje de células B dentro de la pluralidad de PBMC modificadas y el

20 porcentaje de células B dentro de la pluralidad de PBMC de entrada no difieren en más de aproximadamente cualquiera de 5%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% o 20% por número. En algunas formas de realización, el porcentaje de células NK dentro de la pluralidad de PBMC modificadas y el porcentaje de células NK dentro de la pluralidad de PBMC de entrada difieren en no más de aproximadamente el

25 10% en número. En algunas formas de realización, el porcentaje de células NK dentro de la pluralidad de PBMC modificadas y el porcentaje de células NK dentro de la pluralidad de PBMC de entrada no difieren en más de aproximadamente

cualquiera de 5%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% o 20% por número. En algunas formas de realización, el porcentaje de monocitos dentro de la pluralidad de PBMC modificadas y el porcentaje de monocitos dentro de la pluralidad de PBMC de entrada difieren en no más de aproximadamente el 10% en número. En

5 algunas formas de realización, el porcentaje de monocitos dentro de la pluralidad de PBMC modificadas y el porcentaje de monocitos dentro de la pluralidad de PBMC de entrada no difieren en más de aproximadamente uno de 5%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16 %, 18% o 20% por número.

10 Acondicionamiento de PBMCs

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, la pluralidad de PBMC modificadas está condicionada. En formas de realización adicionales, la pluralidad de PBMC

15 modificadas se madura. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC está condicionada después de la liberación mediada por la constricción. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el proceso de preparación de la pluralidad de PBMC modificadas comprende además incubar la pluralidad de PBMC modificadas que comprenden el antígeno y/o adyuvante con un segundo

20 adyuvante durante un tiempo suficiente para que las PBMC modificadas comprendan el antígeno a acondicionar, generando así la pluralidad condicionada de PBMC modificadas que comprenden el antígeno y/o el adyuvante. En algunas formas de realización, el proceso comprende además aislar la pluralidad de PBMC modificadas que comprenden el antígeno y/o el adyuvante de la

25 suspensión celular antes de la incubación con el adyuvante para acondicionar las PBMC modificadas.

En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC modificadas está entre aproximadamente 0,01 μ M y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC modificadas es inferior a aproximadamente 0,01 μ M, aproximadamente 0,1 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 100 μ M, aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC modificadas es mayor que aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC modificadas es de entre aproximadamente 0,01 μ M y aproximadamente 0,1 μ M, entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 μ M, entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 10 μ M, entre aproximadamente 10 μ M y aproximadamente 100 μ M μ M, entre aproximadamente 100 μ M y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC modificadas está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC modificadas está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 10 μ M. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC modificadas es de 1 μ M.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, la pluralidad de PBMC modificadas se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas para que las PBMC modificadas condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC modificadas se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 2 a aproximadamente 10 horas para que las PBMC modificadas se condicionen. En

- algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC modificadas se incubaba con el adyuvante durante aproximadamente 3 a aproximadamente 6 horas para que las PBMC modificadas se condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC modificadas se incubaba con el adyuvante durante
- 5 aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 3.5 horas, 4 horas, 4.5 horas, 5 horas, 5.5 horas, 6 horas, 8 horas, 12 Horas, 16 horas, 20 horas o 24 horas para que las PBMC modificadas condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC modificadas se incubaba con el adyuvante durante aproximadamente 4 horas para que las PBMC modificadas se condicionen.
- 10 En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, la pluralidad de PBMC se condiciona antes de la administración mediada por la constricción. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el proceso de preparación de la pluralidad de PBMC modificadas
- 15 comprende además incubar una pluralidad de PBMC de entrada con un adyuvante durante un tiempo suficiente para que las PBMC de entrada condicionen, generando así una pluralidad condicionada de PBMC de entrada. En algunas formas de realización, se proporciona una pluralidad condicionada de PBMC modificadas que comprenden un antígeno, preparada por un proceso que
- 20 comprende los pasos de: a) incubar una pluralidad de PBMC de entrada con un adyuvante durante un tiempo suficiente para que las PBMC de entrada condicionen, generando así una pluralidad condicionada de PBMC de entrada; b) pasar una suspensión celular que comprende la pluralidad condicionada de PBMC de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde
- 25 un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de las PBMC de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de las PBMC de entrada lo suficientemente grandes para el antígeno que se pasa para formar una

pluralidad condicionada de PBMC de entrada perturbada; y c) incubar la pluralidad condicionada de PBMC de entrada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno entre en las PBMC de entrada perturbada, generando así la pluralidad condicionada de PBMC modificadas que comprenden el antígeno. En algunas formas de realización, el proceso comprende además aislar la pluralidad condicionada de PBMC de entrada del adyuvante de acondicionamiento antes de pasar la pluralidad condicionada de PBMC de entrada a través de una constricción de deformación celular.

En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC de entrada está entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC de entrada es inferior a aproximadamente 0,01 μM , aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 100 μM , aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM.

En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC de entrada es mayor que aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC de entrada es de entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 0,1 μM , entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 μM , entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 10 μM , entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 100 μM , entre aproximadamente 100 μM y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC de entrada está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC de entrada está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 10 μM . En algunas formas de

realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC de entrada es de 1 μ M.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, la pluralidad de PBMC de entrada se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas para que las PBMC de entrada condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 2 a aproximadamente 10 horas para que las PBMC de entrada condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 3 a aproximadamente 6 horas para que las PBMC de entrada condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 3.5 horas, 4 horas, 4.5 horas, 5 horas, 5.5 horas, 6 horas, 8 horas, 12 Horas, 16 horas, 20 horas o 24 horas para que las PBMC de entrada condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC de entrada se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 4 horas para que las PBMC de entrada condicionen.

En algunas formas de realización, se proporciona una pluralidad condicionada de PBMC que comprende un antígeno, preparada incubando la pluralidad de PBMC que comprenden el antígeno con un adyuvante durante un tiempo suficiente para que las PBMC condicionen, generando así la pluralidad condicionada de PBMC que comprende el antígeno. En algunas formas de realización, se proporciona una pluralidad condicionada de PBMC que comprende un antígeno, preparado incubando la pluralidad de PBMC con un adyuvante durante un tiempo suficiente para que las PBMC se acondicionen antes de introducir el antígeno en las PBMC, generando así la pluralidad condicionada de PBMC que comprenden el antígeno.

En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, la concentración de antígeno incubado con las PBMC está entre aproximadamente 0,01 μ M y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en

5 algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC es menor que aproximadamente 0,01 μ M, aproximadamente 0,1 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 100 μ M, aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC es mayor que

10 aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC es de entre aproximadamente 0,01 μ M y aproximadamente 0,1 μ M, entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 μ M, entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 10 μ M, entre aproximadamente 10 μ M y aproximadamente 100 μ M, entre aproximadamente

15 100 μ M y aproximadamente 1 mM, o entre 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 10 μ M. En

20 algunas formas de realización, la concentración de antígeno incubado con las PBMC es 1 μ M.

[0253] En algunas formas de realización de acuerdo con uno cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, en donde la célula inmune es una pluralidad de PBMC, la pluralidad de PBMC se incuba con el

25 adyuvante durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas para que las PBMC condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 2 a aproximadamente 10

- horas para que las PBMC condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 3 a aproximadamente 6 horas para que las PBMC condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC se incuba con el adyuvante durante una de
- 5 aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 3.5 horas, 4 horas, 4.5 horas, 5 horas, 5.5 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 20 horas o 24 horas para que las PBMC condicionen. En algunas formas de realización, la pluralidad de PBMC se incuba con el adyuvante durante aproximadamente 4 horas para que las PBMC condicionen.
- 10 En algunas formas de realización, una o más moléculas coestimuladoras están reguladas al alza en la pluralidad condicionada de PBMC modificadas en comparación con una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas. En algunas formas de realización, una o más moléculas coestimuladoras están reguladas al alza en una subpoblación de células en la pluralidad condicionada de
- 15 PBMC modificadas en comparación con la subpoblación de células en una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas. En algunas formas de realización, una o más moléculas coestimuladoras están reguladas al alza en las células B de la pluralidad condicionada de PBMC modificadas en comparación con las células B en una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas. En
- 20 algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es CD80 y/o CD86. En algunas formas de realización, la molécula coestimuladora es CD86. En algunas formas de realización, el CD80 y/o CD86 se regulan al alza en las células B de la pluralidad condicionada de PBMC modificadas en aproximadamente 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, o más de 10
- 25 veces en comparación con las células B en una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas. En algunas formas de realización, el CD80 y/o CD86 se regulan al alza en las células B de la pluralidad condicionada de PBMC

modificadas por cualquiera de aproximadamente 1,2 veces a aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,5 veces a aproximadamente 1,8 veces, aproximadamente 1,8 veces a aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 8 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 20 veces a aproximadamente 50 veces, aproximadamente 50 veces a aproximadamente 100 veces, aproximadamente 100 veces a aproximadamente 200 veces, aproximadamente 200 veces a aproximadamente 500 veces, o más de aproximadamente 500 veces en comparación con las células B en una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas. En algunas formas de realización, la expresión de uno o más de IFN- γ , IL-6, MCP-1, MIP-1 β , IP-10 o TNF- α aumenta en la pluralidad condicionada de PBMC modificadas en comparación con una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas. En algunas formas de realización, la expresión de uno o más de IFN- γ , IL-6, MCP-1, MIP-1 β , IP-10 o TNF- α incrementa una subpoblación de células en la pluralidad condicionada en comparación con la subpoblación de células en una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas. En algunas formas de realización, la expresión de uno o más de IFN- γ , IL-6, MCP-1, MIP-1 β , IP-10 o TNF- α se incrementa en aproximadamente 1.2 veces, 1.5 veces, 1.8 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces o más de 10 veces en la pluralidad condicionada de PBMC modificadas en comparación con una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas. En algunas formas de realización, la expresión de uno o más de IFN- γ , IL-6, MCP-1, MIP-1 β , IP-10 o TNF- α se incrementa en cualquiera de aproximadamente 1,2 veces a aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,5

veces a aproximadamente 1,8 veces, aproximadamente 1,8 veces a aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3 veces a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 5 veces a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 8 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente 20 veces a aproximadamente 50 veces, aproximadamente 50 veces a aproximadamente 100 veces, aproximadamente 100 veces a aproximadamente 200 veces, aproximadamente 200 veces a aproximadamente 500 veces, o más de aproximadamente 500 veces en la pluralidad condicionada de PBMC modificadas en comparación con una pluralidad no condicionada de PBMC modificadas.

Aplicaciones

En algunos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar y prevenir una enfermedad asociada a VPH, y/o modular la respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada a VPH que comprende administrar al individuo una composición que comprende células inmunes modificadas, en el que las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula se aísla de un paciente, se modifica de acuerdo con los métodos descritos y se introduce de nuevo en el paciente. Por ejemplo, una población de células inmunes se aísla de un paciente, se pasa a través de la constricción para lograr el suministro de antígeno y adyuvante de VPH, y luego se vuelve a infundir en el paciente para aumentar una respuesta inmune terapéutica al antígeno de VPH. En algunas formas de realización, la célula se aísla de un individuo con enfermedad asociada al VPH, se modifica de acuerdo con los métodos descritos y

se introduce de nuevo en el individuo. Por ejemplo, se aísla una población de células inmunes de un individuo con enfermedad asociada al VPH, se pasa a través de la constricción para lograr el suministro de antígeno y adyuvante del VPH y luego se vuelve a infundir en el paciente para inducir o mejorar la
5 respuesta inmune al antígeno del VPH en el individuo.

En algunas formas de realización, el antígeno de VPH y/o adyuvante para administrar se purifican. En algunas formas de realización, el compuesto es al menos aproximadamente el 60% en peso (peso seco) del compuesto de interés. En algunas formas de realización, el compuesto purificado es al menos
10 aproximadamente el 75%, 90% o 99% del compuesto de interés. En algunas formas de realización, el compuesto purificado es al menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99% o 100% (p/p) del compuesto de interés. La pureza se determina mediante cualquier método conocido, que incluye, sin limitación, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, análisis por
15 HPLC, RMN, espectrometría de masas o SDS–PAGE. El ADN o ARN purificado se define como ADN o ARN que está libre de ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos exógenos.

En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para tratar a un individuo con una enfermedad asociada al VPH mediante la introducción de la
20 célula, modificada al pasar a través de una constricción tal que un antígeno del VPH y un adyuvante ingresa a la célula, al individuo. En algunas formas de realización, la célula es una célula autóloga. Por ejemplo, la célula inmune se aísla de un individuo (por ejemplo, un paciente), se modifica de acuerdo con los métodos descritos y se introduce de nuevo en el individuo. En algunas formas de
25 realización, la célula inmune se aísla de un individuo, se modifica de acuerdo con los métodos descritos y se introduce de nuevo en el mismo individuo. En algunas formas de realización, la célula es una célula alogénica. Por ejemplo, la célula se

aísla de un individuo diferente, se modifica de acuerdo con los métodos descritos y se introduce en el primer individuo (por ejemplo, el paciente). En algunas formas de realización, la célula se aísla de un individuo, se modifica de acuerdo con los métodos descritos y se introduce en un individuo diferente.

- 5 Cualquiera de los métodos descritos anteriormente se llevan a cabo in vitro, ex vivo o in vivo. Para aplicaciones in vivo, el dispositivo puede implantarse en un lumen vascular, por ejemplo, un stent en línea en una arteria o vena. En algunas formas de realización, los métodos se usan como parte de un sistema de cabecera para el tratamiento ex vivo de células del paciente y la reintroducción
- 10 inmediata de las células en el paciente. En algunas formas de realización, el método puede implementarse en un laboratorio hospitalario típico con un técnico mínimamente capacitado. En algunas formas de realización, se puede usar un sistema de tratamiento operado por el paciente.

15 Sistemas y kits

- En algunos aspectos, la invención proporciona un sistema que comprende uno o más de la constricción, una suspensión de células inmunes, antígenos de VPH o adyuvantes para usar en los métodos descritos en el presente documento. El sistema puede incluir cualquier forma de realización descrita para los métodos
- 20 descritos anteriormente, incluidos los canales microfluídicos o una superficie que tiene poros para proporcionar constricciones de deformación celular, suspensiones celulares, perturbaciones celulares, parámetros de suministro, compuestos y/o aplicaciones, etc. En alguna forma de realización, Las constricciones de deformación celular están dimensionadas para ser
- 25 administradas a células inmunes. En algunas formas de realización, los parámetros de administración, como las velocidades de flujo operativo, la concentración de células y compuestos, la velocidad de la célula en la

constricción y la composición de la suspensión celular (por ejemplo, osmolaridad, concentración de sal, contenido en suero, concentración de célula, pH, etc.) están optimizados para la respuesta máxima de un compuesto para suprimir una respuesta inmune o inducir tolerancia.

- 5 También se proporcionan kits o artículos de fabricación para usar en el tratamiento de individuos con una enfermedad asociada al VPH. En algunas formas de realización, el kit comprende una célula inmune modificada que comprende intracelularmente un antígeno de VPH e intracelularmente un adyuvante. En algunas formas de realización, el kit comprende uno o más de la
- 10 constricción, una suspensión de células inmunes, antígenos de VPH o adyuvantes para usar en la generación de células inmunes modificadas para usar en el tratamiento de un individuo con una enfermedad asociada al VPH. En algunas formas de realización, los kits comprenden las composiciones descritas en este documento (por ejemplo, un canal o superficie microfluídica que contiene poros,
- 15 suspensiones celulares y/o compuestos) en un embalaje adecuado. Los materiales de embalaje adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, viales (tales como viales sellados), recipientes, ampollas, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, Mylar sellado o bolsas de plástico), y similares. Estos artículos de fabricación pueden además esterilizarse y/o sellarse.
- 20 La invención también proporciona kits que comprenden componentes de los métodos descritos en el presente documento y puede comprender además instrucciones para realizar dichos métodos para tratar a un individuo con una enfermedad asociada al VPH y/o instrucciones para introducir un antígeno del VPH y un adyuvante en una célula inmunitaria. Los kits descritos en el presente
- 25 documento pueden incluir además otros materiales, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones para realizar cualquier método descrito en este documento; por ejemplo, instrucciones

para tratar a un individuo con una enfermedad asociada con el VPH o instrucciones para modificar una célula inmunitaria para que contenga intracelularmente un antígeno del VPH e intracelularmente un adyuvante.

5 FORMAS DE REALIZACIÓN DE EJEMPLO

Forma de realización 1. Un método para tratar una enfermedad asociada con el virus del papiloma humano (VPH) en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes
10 modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el adyuvante se presenta intracelularmente.

Forma de realización 2. Un método para prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas,
15 en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente.

Forma de realización 3. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende
20 células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el adyuvante se presenta intracelularmente.

Forma de realización 4. Un método para tratar una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una
25 cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente;

en el que las células inmunes modificadas se preparan al

- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno y el adyuvante pasen para formar una célula de entrada perturbada; y
 - b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada;
- generando así las células inmunes modificadas.

Forma de realización 5. Un método para prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente;

en el que las células inmunes modificadas se preparan al

- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen para formar una célula de entrada perturbada; y
 - b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada;
- generando así las células inmunes modificadas.

Forma de realización 6. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas
5 comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en el que el adyuvante se presenta intracelularmente;

en el que las células inmunes modificadas se preparan al

a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada que comprende un antígeno de VPH a través de una constricción de deformación
10 celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen para formar una célula de entrada perturbada; y

b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante
15 un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada;

generando así las células inmunes modificadas.

Forma de realización 7. El método de cualquiera de las formas de realización 4 a 6, en el que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.

20 Forma de realización 8. El método de cualquiera de las formas de realización 4–7, en el que el diámetro de la constricción es aproximadamente del 20% al 99% del diámetro de la célula.

Forma de realización 9. El método de cualquiera de las formas de realización 4–8, en el que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos
25 de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.

Forma de realización 10. El método de cualquiera de las formas de realización 4–9, en el que la constricción es en un canal.

Forma de realización 11. El método de cualquiera de las formas de realización 4–10, en el que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción.

Forma de realización 12. El método de cualquiera de las formas de realización 1–11, en el que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.

Forma de realización 13. El método de cualquiera de las formas de realización 1–12, en el que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula.

10 Forma de realización 14. El método de cualquiera de las formas de realización 1–13, en el que la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en el exterior de la célula.

Forma de realización 15. El método de cualquiera de las formas de realización 1–14, en el que la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 16. El método de cualquiera de las formas de realización 1–15, en el que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

20 Forma de realización 17. El método de cualquiera de las formas de realización 4–16, en el que la relación de antígeno de VPH a adyuvante incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 18. El método de la forma de realización 3 ó 6, en el que se mejora la respuesta inmune.

Forma de realización 19. El método de la forma de realización 18, en el que se mejora la respuesta inmune al antígeno de VPH.

Forma de realización 20. El método de cualquiera de las formas de realización 1–19, en el que el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.

Forma de realización 21. El método de la forma de realización 20, en el que el
5 adyuvante es CpG ODN.

Forma de realización 22. El método de la forma de realización 21, en el que CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

Forma de realización 23. El método de cualquiera de las formas de realización 1–22, en el que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.

10 Forma de realización 24. El método de cualquiera de las formas de realización 1–23, en el que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.

Forma de realización 25. El método de la forma de realización 24, en el que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune
15 dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.

Forma de realización 26. El método de cualquiera de las formas de realización 1–25, en el que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de VPH y una o más secuencias de péptidos heterólogas.

Forma de realización 27. El método de cualquiera de las formas de realización 1–
20 26, en el que el antígeno de VPH se engloba consigo mismo, con otros antígenos o con el adyuvante.

Forma de realización 28. El método de cualquiera de las formas de realización 1–27, en el que el VPH es un antígeno se deriva de un lisado celular.

Forma de realización 29. El método de cualquiera de las formas de realización 1–
25 28, en el que el antígeno de VPH es un antígeno de VPH-16 o de VPH-18.

Forma de realización 30. El método de la forma de realización 29, en el que el antígeno de VPH comprende un epítipo específico de HLA-A2.

Forma de realización 31. El método de cualquiera de las formas de realización 1–30, en el que el antígeno de VPH es un antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH.

5 Forma de realización 32. El método de cualquiera de las formas de realización 1–31, en el que la célula inmune modificada comprende un antígeno E6 de VPH y un antígeno E7 de VPH.

Forma de realización 33. El método de cualquiera de las formas de realización 1–32, en el que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más
10 secuencias peptídicas heterólogas.

Forma de realización 34. El método de la forma de realización 33, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26.

Forma de realización 35. El método de la forma de realización 34, en el que el
15 antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.

Forma de realización 36. El método de cualquiera de las formas de realización 1–35, en el que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de la clase I.

20 Forma de realización 37. El método de cualquiera de las formas de realización 1–36, en el que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.

Forma de realización 38. El método de cualquiera de las formas de realización 1–37, en el que la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una
25 concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 39. El método de cualquiera de las formas de realización 1–38, en el que la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 40. El método de cualquiera de las formas de realización 1–39, en el que la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 41. El método de cualquiera de las formas de realización 1–40, en el que la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente.

Forma de realización 42. El método de la forma de realización 41, en el que el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor.

Forma de realización 43. El método de la forma de realización 41, en el que el agente es albúmina.

Forma de realización 44. El método de la forma de realización 43, en el que la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana.

Forma de realización 45. El método de la forma de realización 41, en el que el agente es un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D–sacarosa, PEG1500, L–arginina, L–glutamina o EDTA.

Forma de realización 46. El método de las formas de realización 41, en el que el agente comprende albúmina de suero de ratón (MSA).

Forma de realización 47. El método de cualquiera de las formas de realización 1–46, en el que las células inmunes modificadas se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras.

Forma de realización 48. El método de la forma de realización 47, en el que la molécula coestimuladora es B7–H2, B7–1, B7–2, CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4–

1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112.

Forma de realización 49. El método de las formas de realización 47 o 48, en el que la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

Forma de realización 50. El método de cualquiera de las formas de realización 1–49, en el que la célula inmune es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, un basófilo o una célula precursora hematopoyética.

Forma de realización 51. El método de cualquiera de las formas de realización 1–50, en el que la célula inmune no es una célula B.

Forma de realización 52. El método de cualquiera de las formas de realización 1–50, en el que la célula inmune es una célula B.

Forma de realización 53. El método de cualquiera de las formas de realización 1–51, en el que la célula inmune es una célula T.

Forma de realización 54. El método de cualquiera de las formas de realización 1–49, en el que las células inmunes son una población de células mixtas.

Forma de realización 55. El método de la forma de realización 54, en el que las células inmunes son una pluralidad de PBMC.

Forma de realización 56. El método de la forma de realización 53, en el que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I.

Forma de realización 57. El método de la forma de realización 53, en el que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II.

Forma de realización 58. El método de la forma de realización 56 ó 57, en el que la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

Forma de realización 59. El método de la forma de realización 56 ó 57, en el que
5 la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNh_c, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa.

Forma de realización 60. El método de la forma de realización 56 ó 57, en el que
10 la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

Forma de realización 61. El método de la forma de realización 56 ó 57, en el que la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico.

Forma de realización 62. El método de cualquiera de las formas de realización 53
15 y 56–59, en el que una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con un innato respuesta inmune montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la
20 modificación adicional.

Forma de realización 63. El método de cualquiera de las formas de realización 53
y 56–59, en el que la vida media en circulación de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media en circulación de las correspondientes células T modificadas
25 que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que se administraron.

- Forma de realización 64. El método de cualquiera de las formas de realización 53 y 56–63, en el que la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria, células CIK y células T natural killer.
- Forma de realización 65. El método de cualquiera de las formas de realización 53 y 56–63, en el que la célula T incluye una o más de células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, células T CD45RO+ y células T $\gamma\delta$.
- Forma de realización 66. El método de cualquiera de las formas de realización 1–65, en el que la célula modificada es alogénica al individuo.
- Forma de realización 57. El método de la forma de realización 53, en el que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II.
- Forma de realización 58. El método de la forma de realización 56 ó 57, en el que la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.
- Forma de realización 59. El método de la forma de realización 56 ó 57, en el que la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNhc, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa.
- Forma de realización 60. El método de la forma de realización 56 ó 57, en el que la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.
- Forma de realización 61. El método de la forma de realización 56 ó 57, en el que la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico.
- Forma de realización 62. El método de cualquiera de las formas de realización 53 y 56–59, en el que una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T

modificadas adicionales se reduce en comparación con un innato respuesta inmune montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional.

- 5 Forma de realización 63. El método de cualquiera de las formas de realización 53 y 56–59, en el que la vida media en circulación de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media en circulación de las correspondientes células T modificadas que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que se
10 administraron.

Forma de realización 64. El método de cualquiera de las formas de realización 53 y 56–63, en el que la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria, células CIK y células T natural killer.

- Forma de realización 65. El método de cualquiera de las formas de realización 53 y 56–63, en el que la célula T incluye una o más de células T CD3+, células T
15 CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, células T CD45RO+ y células T $\gamma\delta$.

Forma de realización 66. El método de cualquiera de las formas de realización 1–65, en el que la célula modificada es alogénica al individuo.

- Forma de realización 67. El método de cualquiera de las formas de realización 1–
20 65, en el que la célula modificada es autóloga para el individuo.

Forma de realización 68. El método de cualquiera de las formas de realización 1–67, en el que el individuo está preconditionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.

- Forma de realización 69. El método de cualquiera de las formas de realización 1–
25 68, que comprende además administrar al individuo un adyuvante.

Forma de realización 70. El método de la forma de realización 69, en el que el adyuvante es IFN α o CpG ODN.

Forma de realización 71. El método de la forma de realización 69 ó 70, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran simultáneamente.

5 Forma de realización 72. El método de la forma de realización 69 ó 70, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran secuencialmente.

Forma de realización 73. El método de la forma de realización 72, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el adyuvante.

10 Forma de realización 74. El método de la forma de realización 72, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante.

Forma de realización 75. El método de cualquiera de las formas de realización 1–74, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se
15 administra en combinación con la administración de un inhibidor del punto de control inmune.

Forma de realización 76. El método de la forma de realización 75, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran simultáneamente.

20 Forma de realización 77. El método de la forma de realización 75, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran secuencialmente.

Forma de realización 78. El método de la forma de realización 77, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes
25 de administrar el inhibidor del punto de control inmune.

Forma de realización 79. El método de la forma de realización 77, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del inhibidor del punto de control inmune.

Forma de realización 80. El método de cualquiera de las formas de realización 5 75–79, en el que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD–1, PD–L1, CTLA–4, LAG3, TIM–3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7–H4 (VTCN1) o BTLA.

Forma de realización 81. El método de cualquiera de las formas de realización 1–80, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se 10 administra en combinación con la administración de una quimioterapia.

Forma de realización 82. El método de la forma de realización 81, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran simultáneamente.

Forma de realización 83. El método de la forma de realización 81, en el que la 15 composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran secuencialmente.

Forma de realización 84. El método de la forma de realización 83, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar la quimioterapia.

20 Forma de realización 85. El método de la forma de realización 83, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración de la quimioterapia.

Forma de realización 86. El método de cualquiera de las formas de realización 81 a 85, en el que la quimioterapia comprende un agente a base de platino.

25 Forma de realización 87. El método de cualquiera de las formas de realización 81 a 86, en el que la quimioterapia comprende cisplatino.

Forma de realización 88. El método de cualquiera de las formas de realización 1–87, en el que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH.

- 5 Forma de realización 89. El método de cualquiera de las formas de realización 1–87, en el que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno.

- Forma de realización 90. El método de cualquiera de las formas de realización 1–
10 89, en el que la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas.

- Forma de realización 91. El método de cualquiera de las formas de realización 1–90, en el que el método comprende múltiples administraciones de la composición
15 que comprende las células inmunes modificadas.

Forma de realización 92. El método de la forma de realización 91, en el que el método comprende una primera administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas, seguida por una segunda administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas.

- 20 Forma de realización 93. El método de la forma de realización 92, en el que la segunda administración es aproximadamente un mes después de la primera administración.

Forma de realización 94. El método de cualquiera de las formas de realización 1–93, en el que la enfermedad asociada al VPH es un cáncer asociado al VPH.

- 25 Forma de realización 95. El método de la forma de realización 94, en el que el cáncer asociado al VPH es cáncer cervical, cáncer anal, cáncer orofaríngeo,

cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de piel o cáncer de cabeza y cuello.

Forma de realización 96. El método de cualquiera de las formas de realización 1–95, en el que la enfermedad asociada a VPH es una enfermedad infecciosa
5 asociada a VPH.

Forma de realización 97. Un método para tratar una enfermedad relacionada con el virus del papiloma humano (VPH) en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes
10 modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende un aminoácido con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.

Forma de realización 98. Un método para prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas,
15 en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende un aminoácido secuencia con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.

Forma de realización 99. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende
20 administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.

Forma de realización 100. Un método para tratar una enfermedad asociada a
25 VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que

comprende un aminoácido secuencia con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25; en el que las células inmunes modificadas se preparan al

- 5 a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno pase para formar una célula de entrada perturbada; y
- 10 b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;
generando así las células inmunes modificadas.

Forma de realización 101. Un método para prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una
15 cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH, en donde las células inmunes comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25;

- 20 en el que las células inmunes modificadas se preparan al
- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el
25 antígeno del VPH pase para formar una célula de entrada perturbada; y

b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;

generando así las células inmunes modificadas.

- 5 Forma de realización 102. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos
- 10 con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25; en el que las células inmunes modificadas se preparan al
- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando
- 15 así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH pase para formar una célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;
- 20 generando así las células inmunes modificadas.

Forma de realización 103. El método de cualquiera de las formas de realización 100–102, en el que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.

- Forma de realización 104. El método de cualquiera de las formas de realización
- 25 100–103, en el que el diámetro de la constricción es aproximadamente del 20% al 99% del diámetro de la célula.

Forma de realización 105. El método de cualquiera de las formas de realización 100–104, en el que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.

5 Forma de realización 106. El método de cualquiera de las formas de realización 100–105, en el que la constricción está en un canal.

Forma de realización 107. El método de cualquiera de las formas de realización 100–106, en el que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa a través de la constricción.

10 Forma de realización 108. El método de cualquiera de las formas de realización 86–107, que comprende además administrar al individuo un adyuvante.

Forma de realización 109. El método de la forma de realización 108, en el que el adyuvante es IFN α o CpG ODN.

15 Forma de realización 110. El método de la forma de realización 108 o 109, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran simultáneamente.

Forma de realización 111. El método de la forma de realización 108 o 109, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran secuencialmente.

20 Forma de realización 112. El método de la forma de realización 111, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el adyuvante.

Forma de realización 113. El método de la forma de realización 111, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante.

25 Forma de realización 114. El método de cualquiera de las formas de realización 97–113, en el que la célula inmune modificada comprende además un adyuvante.

Forma de realización 115. El método de cualquiera de las formas de realización 100–113, en el que la célula inmune perturbada de la etapa b se incuba con el antígeno de VPH y un adyuvante.

5 Forma de realización 116. El método de la forma de realización 114 ó 115, en el que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.

Forma de realización 107. El método de cualquiera de las formas de realización 100–106, en el que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción,

10 Forma de realización 108. El método de cualquiera de las formas de realización 86–107, que comprende además administrar al individuo un adyuvante.

Forma de realización 109. El método de la forma de realización 108, en el que el adyuvante es IFN α o CpG ODN.

15 Forma de realización 110. El método de la forma de realización 108 o 109, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran simultáneamente.

Forma de realización 111. El método de la forma de realización 108 o 109, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran secuencialmente.

20 Forma de realización 112. El método de la forma de realización 111, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el adyuvante.

25 Forma de realización 113. El método de la forma de realización 111, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante.

Forma de realización 114. El método de cualquiera de las formas de realización 97–113, en el que la célula inmune modificada comprende además un adyuvante.

Forma de realización 115. El método de cualquiera de las formas de realización 100–113, en el que la célula inmune perturbada de la etapa b se incubaba con el antígeno de VPH y un adyuvante.

5 Forma de realización 116. El método de la forma de realización 114 ó 115, en el que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.

Forma de realización 117. El método de cualquiera de las formas de realización 114–116, en el que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula.

10 Forma de realización 118. El método de cualquiera de las formas de realización 114–117, en el que la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en el exterior de la célula.

Forma de realización 119. El método de cualquiera de las formas de realización 115–118, en el que la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 120. El método de cualquiera de las formas de realización 115–119, en el que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 121. El método de cualquiera de las formas de realización 115–120, en el que la proporción de antígeno de VPH a adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

25 Forma de realización 122. El método de la forma de realización 99 ó 102, en el que se mejora la respuesta inmune.

Forma de realización 123. El método de la forma de realización 122, en el que se mejora la respuesta inmune al antígeno VPH.

Forma de realización 124. El método de cualquiera de las formas de realización 114–123, en el que el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, 5 agonistas de RIG-I o poli I:C.

Forma de realización 125. El método de la forma de realización 124, en el que el adyuvante es CpG ODN.

Forma de realización 126. El método de la forma de realización 125, en el que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

10 Forma de realización 127. El método de cualquiera de las formas de realización 114–126, en el que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.

Forma de realización 128. El método de cualquiera de las formas de realización 97–127, en el que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.

15 Forma de realización 129. El método de la forma de realización 128, en el que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.

Forma de realización 130. El método de cualquiera de las formas de realización 97–129, en el que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un 20 epítipo de VPH antigénico y una o más secuencias peptídicas heterólogas.

Forma de realización 131. El método de cualquiera de las formas de realización 97–130, en el que el antígeno de VPH se engloba consigo mismo, con otros antígenos o con el adyuvante.

Forma de realización 132. El método de cualquiera de las formas de realización 25 97–131, en el que el antígeno de VPH comprende un epítipo específico de HLA-A2.

Forma de realización 133. El método de cualquiera de las formas de realización 97–132, en el que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de la clase I.

5 Forma de realización 134. El método de cualquiera de las formas de realización 97–133, en el que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.

Forma de realización 135. El método de cualquiera de las formas de realización 114–134, en el que la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

10 Forma de realización 136. El método de cualquiera de las formas de realización 97–135, en el que la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 137. El método de cualquiera de las formas de realización 114–136, en el que la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre
15 aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 138. El método de cualquiera de las formas de realización 97–137, en el que la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente.

20 Forma de realización 139. El método de la forma de realización 138, en el que el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor.

Forma de realización 140. El método de la forma de realización 138, en el que el agente es albúmina.

25 Forma de realización 141. El método de la forma de realización 140, en el que la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana.

Forma de realización 142. El método de la forma de realización 138, en el que el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina o EDTA.

5 Forma de realización 143. El método de la forma de realización 138, en el que el agente comprende MSA.

Forma de realización 144. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 97-143, en la que las células se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras.

10 Forma de realización 145. La célula T modificada de la forma de realización 144, en la que la molécula coestimuladora es B7-H2 (ICOSL), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4-1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112.

15 Forma de realización 146. La célula T modificada de las formas de realización 144 o 145, en la que la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

20 Forma de realización 147. El método de cualquiera de las formas de realización 97-146, en el que la célula inmune es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mielóide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfóide innata, un basófilo o una célula precursora hematopoyética.

Forma de realización 148. El método de cualquiera de las formas de realización 97-147, en el que la célula inmune no es una célula B.

Forma de realización 149. El método de cualquiera de las formas de realización 97-148, en el que la célula inmune es una célula B.

25 Forma de realización 150. El método de cualquiera de las formas de realización 97-148, en el que la célula inmune es una célula T.

Forma de realización 151. El método de cualquiera de las formas de realización 97–148, en el que la célula inmune es una población de células mixtas.

Forma de realización 152. El método de la forma de realización 151, en el que la célula inmune es una pluralidad de PBMC.

- 5 Forma de realización 153 El método de la forma de realización 150, en el que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I.

- Forma de realización 154. El método de la forma de realización 150, en el que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC
10 de clase II.

Forma de realización 155. El método de la forma de realización 153 ó 154, en el que la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

- Forma de realización 156. El método de la forma de realización 153 ó 154, en el
15 que la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II usando ARNip, shRNA, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa.

- Forma de realización 157. El método de la forma de realización 153 ó 154, en el que la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión
20 de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

Forma de realización 158. El método de la forma de realización 153 ó 154, en el que la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico.

- Forma de realización 159. El método de cualquiera de las formas de realización
25 150 y 153–156, en el que una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con un innato respuesta

inmune montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional.

5 Forma de realización 160. El método de cualquiera de las formas de realización 150 y 153–156, en el que la vida media circulante de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media circulante de células T modificadas que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que se administraron.

10 Forma de realización 161. El método de cualquiera de las formas de realización 150 y 153–160, en el que la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria, células CIK y células T natural killer.

Forma de realización 162. El método de cualquiera de las formas de realización 150 y 153–160, en el que la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T
15 CD45RO+ y células T $\gamma\delta$.

Forma de realización 163. El método de cualquiera de las formas de realización 97–162, en el que la célula modificada es alogénica para el individuo.

Forma de realización 164. El método de cualquiera de las formas de realización 97–162, en el que la célula modificada es autóloga para el individuo.

20 Forma de realización 165. El método de cualquiera de las formas de realización 97–164, en el que el individuo está preconditionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.

Forma de realización 166. El método de cualquiera de las formas de realización 97–165, en el que la composición que comprende las células inmunes
25 modificadas se administra en combinación con la administración de un inhibidor del punto de control inmune.

Forma de realización 167. El método de la forma de realización 166, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran simultáneamente.

5 Forma de realización 168. El método de la forma de realización 166, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran secuencialmente.

Forma de realización 169. El método de la forma de realización 168, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el inhibidor del punto de control inmune.

10 Forma de realización 170. El método de la forma de realización 168, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del inhibidor del punto de control inmune.

Forma de realización 171. El método de cualquiera de las formas de realización 152–156, en el que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o
15 más de PD–1, PD–L1, CTLA–4, LAG3, TIM–3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7–H4 (VTCN1) o BTLA.

Forma de realización 172. El método de cualquiera de las formas de realización 97–171, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra en combinación con la administración de una
20 quimioterapia.

Forma de realización 173. El método de la forma de realización 172, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran simultáneamente.

Forma de realización 174. El método de la forma de realización 172, en el que la
25 composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran secuencialmente.

Forma de realización 175. El método de la forma de realización 174, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar la quimioterapia.

5 Forma de realización 176. El método de la forma de realización 174, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración de la quimioterapia.

Forma de realización 177. El método de cualquiera de las formas de realización 172 a 176, en el que la quimioterapia comprende cisplatino.

10 Forma de realización 178. El método de cualquiera de las formas de realización 97–177, en el que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH.

15 Forma de realización 179. El método de cualquiera de las formas de realización 97–177, en el que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a los resultados individuales en la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno de VPH.

20 Forma de realización 180. El método de cualquiera de las formas de realización 97–179, en el que la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas.

Forma de realización 181. El método de cualquiera de las formas de realización 97–180, en el que el método comprende múltiples administraciones de la composición que comprende las células inmunes modificadas.

25 Forma de realización 182. El método de la forma de realización 181, en el que el método comprende una primera administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas, seguida de una segunda administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas.

Forma de realización 183. El método de la forma de realización 182, en el que la segunda administración es aproximadamente un mes después de la primera administración.

- Forma de realización 184. El método de cualquiera de las formas de realización 5 97–183, en el que la enfermedad asociada a VPH es un cáncer asociado a VPH.

Forma de realización 185. El método de la forma de realización 184, en el que el cáncer asociado a VPH es cáncer cervical, cáncer anal, cáncer orofaríngeo, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de piel o cáncer de cabeza y cuello.

- 10 Forma de realización 186. Una composición que comprende células inmunes modificadas, en la que las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un ODN CpG y un antígeno de VPH con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.

- Forma de realización 187. La composición en la forma de realización 166, en la 15 que el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.

Forma de realización 188. La composición en la forma de realización 186 ó 187, en la que las células inmunes modificadas se preparan mediante

- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de 20 una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el CpG ODN pasen para formar una célula de entrada perturbada; y
- 25 b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el ODN CpG durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el ODN CpG ingresen en la célula de entrada perturbada;

generando así las células inmunes modificadas.

Forma de realización 189. La composición en la forma de realización 188, en la que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.

Forma de realización 190. La composición de la forma de realización 188 o 189,
5 en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula.

Forma de realización 191. La composición de cualquiera de las formas de realización 188–190, en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de
10 la célula.

Forma de realización 192. La composición de cualquiera de las formas de realización 188–191, en la que la constricción está en un canal.

Forma de realización 193. La composición de cualquiera de las formas de realización 188–192, en la que se aplica una fuerza de deformación a la célula de
15 entrada cuando pasa a través de la constricción,

Forma de realización 194. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–193, en la que la composición comprende además un adyuvante.

Forma de realización 195. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–194, en la que el antígeno de VPH y/o el ODN CpG están
20 presentes en el citosol y/o endosomas.

Forma de realización 196. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–195, en la que el antígeno y/o el ODN CpG están presentes en múltiples compartimentos de la célula.

Forma de realización 197. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–196, en la que la célula inmune modificada comprende además
25 un antígeno de VPH y/o un ODN CpG en la superficie de la célula.

Forma de realización 198. La composición de cualquiera de las formas de realización 188–197, en la que la concentración de CpG ODN incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

- 5 Forma de realización 199. La composición de cualquiera de las formas de realización 188–198, en la que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

- Forma de realización 200. La composición de cualquiera de las formas de
10 realización 188–199, en la que la relación de antígeno de VPH a CpG ODN incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

- Forma de realización 201. La composición de cualquiera de las formas de
realización 186–200, en la que CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o
15 CpG ODN 2006.

Forma de realización 202. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–201, en la que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.

- Forma de realización 203. La composición de la forma de realización 202, en
20 donde el adyuvante comprende CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.

- Forma de realización 204. La composición de cualquiera de las formas de
realización 186–203, en la que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples
polipéptidos que provoca una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos
25 de VPH.

Forma de realización 205. La composición de la forma de realización 204, en la que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.

Forma de realización 206. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–205, en la que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de VPH y una o más secuencias de péptidos heterólogos.

Forma de realización 207. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–206, en la que el antígeno de VPH se engloba consigo mismo, con otros antígenos, con un adyuvante o con el CpG ODN.

Forma de realización 208. La composición de la forma de realización 186–207, en la que el antígeno de VPH está compuesto por un epítipo específico de HLA–A2.

Forma de realización 209. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–208, en la que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas.

Forma de realización 210. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–209, en la que la célula inmune modificada comprende el ODN CpG a una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 212. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–211, en la que la relación del antígeno de VPH a la ODN CpG está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 213. Una composición que comprende células inmunes modificadas, en la que las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH, en la que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.

Forma de realización 214. La composición en la forma de realización 213, en la que el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.

- Forma de realización 215. La composición en la forma de realización 213 o 214,
- 5 en la que las células inmunes modificadas se preparan al
- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el
- 10 antígeno del VPH pase para formar una célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;
- generando así las células inmunes modificadas.

- 15 Forma de realización 216. La composición en la forma de realización 215, en la que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.

Forma de realización 217. La composición de cualquiera de las formas de realización 215–216, en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula.

- 20 Forma de realización 218. La composición de cualquiera de las formas de realización 215–217, en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.

- Forma de realización 219. La composición de cualquiera de las formas de
- 25 realización 215–218, en la que la constricción está en un canal.

Forma de realización 220. La composición de cualquiera de las formas de realización 215–219, en la que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada a medida que pasa a través de la constricción.

Forma de realización 221. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–220, en la que la composición comprende además un adyuvante.

Forma de realización 222. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–221, en la que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.

Forma de realización 223. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–222, en la que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula.

Forma de realización 224. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–223, en la que la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en la superficie de la célula.

Forma de realización 225. La composición de cualquiera de las formas de realización 215–224, en la que la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 226. La composición de cualquiera de las formas de realización 215–225, en la que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 227. La composición de cualquiera de las formas de realización 215–226, en la que la relación de antígeno de VPH a adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 228. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–227, en la que el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.

5 Forma de realización 229. La composición de la forma de realización 228, en la que el adyuvante es CpG ODN.

Forma de realización 230. La composición de la forma de realización 229, en la que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

10 Forma de realización 231. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–230, en la que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.

Forma de realización 232. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–231, en la que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.

15 Forma de realización 233. La composición de la forma de realización 232, en la que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.

20 Forma de realización 234. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–233, en la que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítopo de VPH antigénico y una o más secuencias peptídicas heterólogas.

Forma de realización 235. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–234, en la que el antígeno de VPH se engloba consigo mismo, con otros antígenos o con el adyuvante.

25 Forma de realización 236. La composición de la forma de realización 213–235, en la que el antígeno de VPH está compuesto por un epítopo específico de HLA-A2.

Forma de realización 237. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–236, en la que la célula inmune modificada comprende el adyuvante en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

- 5 Forma de realización 238. La composición de cualquiera de las formas de realización 213–237, en la que la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

- Forma de realización 239. La composición de cualquiera de las formas de
10 realización 213–238, en la que la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 240. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–239, en la que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de la clase I.

- 15 Forma de realización 241. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–240, en la que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.

- Forma de realización 242. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–241, en la que la célula inmune modificada comprende además
20 un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente.

- Forma de realización 243. La composición de la forma de realización 242, en la que el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante
25 o un cofactor.

Forma de realización 244. La composición de la forma de realización 242, en la que el agente es albúmina.

Forma de realización 245. La composición de la forma de realización 244, en la que la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana.

Forma de realización 246. La composición de la forma de realización 242, en la que el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina o EDTA.

Forma de realización 247. La composición de la forma de realización 242, en la que el agente comprende MSA.

Forma de realización 248. La composición de cualquiera de las formas de realización 186-247, en la que las células se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras.

Forma de realización 249. La composición de la forma de realización 248, en donde la molécula coestimuladora es B7-H2 (ICOSL), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4-1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112.

Forma de realización 250. La composición de las formas de realización 248 o 249, en la que la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

Forma de realización 251. La composición de cualquiera de las formas de realización 186-250, en la que la célula inmune es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, un basófilo o una célula precursora hematopoyética.

Forma de realización 252. La composición de cualquiera de las formas de realización 186-251, en la que la célula inmune no es una célula B.

Forma de realización 253. La composición de cualquiera de las formas de realización 186-252, en la que la célula inmune es una célula T.

Forma de realización 254. La composición de la forma de realización 253, en la que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I.

5 Forma de realización 255. La composición de la forma de realización 253, en la que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II.

Forma de realización 256. La composición de la forma de realización 254 ó 255, en la que la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

10 Forma de realización 257. La composición de la forma de realización 254 ó 255, en la que la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNsh, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa.

15 Forma de realización 258. La composición de la forma de realización 254 ó 255, en la que la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

Forma de realización 259. La composición de la forma de realización 254 ó 255, en la que la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico.

20 Forma de realización 260. La composición de cualquiera de las formas de realización 253–257, en la que una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montados en un individuo en respuesta a la administración, en un
25 contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional.

Forma de realización 261. La composición de cualquiera de las formas de realización 253–257, en la que la vida media circulante de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media circulante de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que se administraron.

Forma de realización 262. La composición de cualquiera de las formas de realización 253–261, en la que la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK y las células T natural killer.

Forma de realización 263. La composición de cualquiera de las formas de realización 253–261, en la que la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$.

Forma de realización 264. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–263, en la que la célula modificada es alogénica para un individuo.

Forma de realización 265. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–263, en la que la célula modificada es autóloga para un individuo.

Forma de realización 266. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–265, en la que un individuo está preconditionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.

Forma de realización 267. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–266, en la que la composición comprende además un inhibidor del punto de control inmune.

Forma de realización 268. La composición de la forma de realización 267, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD – 1,

PD – L1, CTLA – 4, LAG3, TIM – 3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7 – H4 (VTCN1) o BTLA.

Forma de realización 269. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–268, en la que la administración de la composición que
5 comprende las células inmunes modificadas a un individuo da como resultado la activación y/o expansión de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno VPH.

Forma de realización 270. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–268, en la que la administración de la composición que
10 comprende las células inmunes modificadas a un individuo da como resultado la activación y/o expansión de células T (Th) auxiliares específicas para el antígeno.

Forma de realización 271. La composición de cualquiera de las formas de realización 186–270, en la que la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes
15 modificadas.

Forma de realización 272. Una composición que comprende un antígeno, en la que el antígeno comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.

Forma de realización 273. La composición de la forma de realización 272, en la
20 que el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

Forma de realización 274. Un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un
25 antígeno VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente;

en el que las células inmunes modificadas se preparan al

- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada que comprende un antígeno VPH a través de una constricción que deforma la célula, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno y el adyuvante pasen para formar una célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante entre en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas.
- 10 Forma de realización 275. Un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta
- 15 intracelularmente;
- en el que las células inmunes modificadas se preparan al
- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada que comprende el adyuvante a través de una constricción que deforma la célula, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para el antígeno VPH para pasar a través de formar una célula de entrada perturbada; y
- 20 b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno VPH entre en la célula de entrada perturbada;
- 25 generando así las células inmunes modificadas.

Forma de realización 276. El método de la forma de realización 274 ó 275, en el que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.

Forma de realización 277. El método de cualquiera de las formas de realización 274–276, en el que el diámetro de la constricción es aproximadamente del 20% al
5 99% del diámetro de la célula.

Forma de realización 278. El método de cualquiera de las formas de realización 274–277, en el que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.

Forma de realización 279. El método de cualquiera de las formas de realización
10 274–278, en el que la constricción está en un canal.

Forma de realización 280. El método de cualquiera de las formas de realización 274–279, en el que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa a través de la constricción.

Forma de realización 281. El método de cualquiera de las formas de realización
15 274–280, en el que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.

Forma de realización 282. El método de cualquiera de las formas de realización 274–281, en el que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula.

20 Forma de realización 283. El método de la forma de realización 274, en el que la concentración de adyuvante incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM

Forma de realización 284. El método de la forma de realización 275, en el que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada
25 está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 285. El método de cualquiera de las formas de realización 274–285, en el que el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.

5 Forma de realización 286. El método de la forma de realización 285, en el que el adyuvante es CpG ODN.

Forma de realización 287. El método de la forma de realización 286, en el que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

Forma de realización 288. El método de cualquiera de las formas de realización 274–287, en el que el antígeno de VPH se deriva de un lisado celular.

10 Forma de realización 289. El método de cualquiera de las formas de realización 274–288, en el que el antígeno de VPH es un antígeno de VPH–16 o de VPH–18.

Forma de realización 290. El método de cualquiera de las formas de realización 274–289, en el que el antígeno de VPH es un antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH.

15 Forma de realización 291. El método de la forma de realización 290, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.

Forma de realización 292. El método de la forma de realización 289, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las
20 SEQ ID NO: 18–25.

Forma de realización 293. El método de la forma de realización 290, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.

Forma de realización 294. El método de la forma de realización 290, en el que el
25 antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

- Forma de realización 295. Un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo que comprende administrar al individuo una célula inmune modificada asociada con un antígeno de VPH, en donde la célula inmune modificada se prepara mediante un proceso que comprende las etapas de:
- 5 de:
- a) incubar una célula de entrada con el antígeno de VPH y/o un adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH se asocie con la célula de entrada;
- generando así la célula inmune modificada asociada con el antígeno.
- 10 Forma de realización 296. El método en la forma de realización 295, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.
- Forma de realización 297. El método en la forma de realización 296, en el que el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.
- 15 Forma de realización 298. El método en cualquiera de las formas de realización 295–297, en donde el adyuvante es CpG ODN.
- Forma de realización 299. El método de la forma de realización 298, en el que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.
- Forma de realización 300. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de cualquiera de las formas de realización 186–273 para uso como
- 20 un medicamento.
- Forma de realización 301. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de cualquiera de las formas de realización 186–273 para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía, terapia o
- 25 diagnóstico.
- Forma de realización 302. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de cualquiera de las formas de realización 186–273 para usar en el

tratamiento de un cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad asociada a virus.

Forma de realización 303. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de cualquiera de las formas de realización 186–273, en donde el
5 cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer vulvar, cáncer vaginal, cáncer de pene, cáncer anal, cáncer perianal, cáncer anogenital, cáncer oral o cáncer de saliva.

Forma de realización 304. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de cualquiera de las formas de realización 300–303, en la que las
10 PBMC modificadas se administran antes, al mismo tiempo o después de la administración de un inhibidor del punto de control inmune.

Forma de realización 305. La composición de la forma de realización 304, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a cualquiera de PD–1, PD–L1, CTLA–4, LAG3, VISTA y TIM–3.

15 Forma de realización 306. La composición de la forma de realización 305, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a PD–1.

Forma de realización 307. La composición de la forma de realización 305, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a PD–L1.

Forma de realización 308. La composición de cualquiera de las formas de
20 realización 300–307, en la que las PBMC modificadas se administran antes, simultáneamente o después de la administración de un agente terapéutico.

Forma de realización 309. La composición de la forma de realización 308, en la que el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

Forma de realización 310. La composición de la forma de realización 309, en la
25 que la enfermedad infecciosa está asociada con VIH, VPH, EBV, MCV, HBV o HCV.

EJEMPLOS

Los expertos en la técnica reconocerán que son posibles varias formas de realización dentro del alcance y espíritu de esta invención. La invención se describirá ahora con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos. Los siguientes ejemplos ilustran más la invención pero, por supuesto, no deben interpretarse como limitantes de ningún modo de su alcance.

Ejemplo 1

Con el fin de determinar la dosis celular mínima efectiva de T_{APC} necesaria para conducir a la inhibición del crecimiento tumoral en un entorno terapéutico, se probaron cuatro dosis diferentes de T_{APC} cebado/refuerzo en un modelo de tumor TC1, con el área de los tumores trazados contra hora.

Ratones hembra C57BL/6J se inyectaron en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón) en el Día 0. En los días 4 (cebado) y 7 (refuerzo), células T de C57BL/6J ratones donantes hembras se aislaron y cargaron utilizando SQZ con 200 μ g/ml de CpG ODN 1826 y E7 SLP 40 μ M pre-complejado (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 40 albúmina sérica de ratón (MSA). A los animales (10 ratones/grupo) se les inyectó por vía intravenosa la dosis relevante de células T cargadas con E7 + MSA + CpG (50 M de células/ml) y se midió el crecimiento del tumor TC-1 comenzando 1 semana después de la implantación del tumor dos veces por semana y se comparó al crecimiento tumoral en ratones no tratados. En la Fig. 1A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.

El crecimiento del tumor, medido por la fórmula $((\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2)$, se comparó entre ratones del grupo no tratado (sin transferencia adoptiva de células T) y los grupos de tratamiento BE descritos en la Fig. 1A se muestran en Fig. 1B. Todas las condiciones de tratamiento llevaron a una reducción completa del tumor, lo

que indica que la dosis celular más baja probada (2.5M células de cebado, 1M células de refuerzo) aún era capaz de lograr la misma reducción tumoral que las dosis celulares más altas, cada una de las cuales alcanzó significación estadística en relación con el tratamiento del Día 18 (#P <0.0001).

5 Ejemplo 2

Para determinar el diseño del E7 SLP, dos SLP E7 diferentes, el SLP E7 nativo y uno en el que la secuencia nativa tiene todas las cisteínas reemplazadas con serina, se sometió a SQZ en T APCs junto con la administración conjunta de CpG, y cada condición Se evaluó la producción de IFN- γ por ICS.

10 Se aislaron células T de ratones hembras C57BL/6J y se cargaron utilizando SQZ con dosis variables (Izquierda – 200 μ g/mL, Derecha – 25 μ g/mL) CpG ODN 1826 y SLP nativo o clásico pre-complejado de E7 40 μ M + 40 μ M de suero de ratón albúmina (MSA) o células T se incubaron con las mismas condiciones en ausencia de SQZ como control negativo (Endo – Grupos B y D). Los animales (5
15 ratones/grupo) se inyectaron por vía intravenosa con 5M de células T cargadas o incubadas en un volumen de 100 μ L (50M de células/mL). El día 8, se recogieron los bazos y se cuantificó el porcentaje de células T CD8+ productoras de IFN- γ mediante ICS. En la Fig. 2A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.

20 El % de células T CD8+ productoras de IFN- γ fue mayor en el grupo de control endo usando cE7, que no fue significativamente diferente de SQZ con cE7 o Endo con nE7. Inesperadamente, no hubo beneficio para SQZ frente a Endo, pero hubo una disminución notable en el% de células T CD8+ productoras de IFN- γ en la condición SQZ nE7 en relación con todas las demás. Estos datos muestran que la
25 secuencia de SLP tiene un impacto en el% de células T CD8+ productoras de IFN- γ generadas en respuesta a la vacunación con T APC, particularmente cuando el antígeno se carga en la célula T utilizando SQZ.

Ejemplo 3

Para determinar la capacidad de las SLP de E6 para inducir una respuesta inmune específica de antígenos en células T respondedoras de E6 en un modelo humano in vitro, se cargaron células T humanas primarias con una SLP de E6 y se midió la secreción de IFN- γ de células respondedoras mediante ELISA.

Se aislaron células T humanas de las PBMC de los donantes HLA-A02 + (10M células/ml) y 50 μ M E6 SLP que contenía el epítipo E629–38 mínimo restringido a HLA-A02 (LPQLSTELQTTIHDIILECVYSKQQLLRREVYDFAF) se entregó en el teléfono de IFN- γ , medido por ELISA, se comparó entre las condiciones de SQZ y un control en el que el E6 SLP se incubaba con las T_{APC} en ausencia de SQZing (Endo). Las T_{APC} se cocultivaron luego con células respondedoras CD8+ específicas de E6 en una proporción de 1:1 estimulador: efector y se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/mL). Después de 18 h, se extrajo el sobrenadante de cada condición y se evaluó el nivel de producción de IFN- γ mediante ELISA de IFN- γ (Biolegend).

El E6 SLP probado, cuando se administró intracelularmente usando SQZ, llevó a un aumento > 10 veces mayor en la producción de IFN- γ cuando se cocultivó con células T CD8+ respondedoras E6 (#P <0.0001) como se muestra en la Fig. 3. Estos hallazgos muestran la capacidad de las APC de T para provocar una respuesta inmune específica de antígeno a múltiples antígenos de VPH (E6 y E7).

Ejemplo 4

Para determinar la capacidad de los SLP E7 para inducir una respuesta inmune específica de antígeno en células T respondedoras E711–20, así como el impacto de la secuencia SLP en la activación de APC (Tapc) de células T SQZ en un modelo humano in vitro, Las células T humanas primarias de múltiples donantes se cargaron con diferentes SLP de E7 y la secreción de IFN- γ de las células respondedoras se midió mediante ELISA.

- Se aislaron células T humanas de las PBMC de los donantes HLA-A02 + (10M células/mL) y OL-E71-35 50 μ M (MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLQLLLPG). El IFN- γ , medido por ELISA, se comparó entre las condiciones de SQZ y un control en el que el E7 SLP se incubó con Tapcs en ausencia de SQZ (Endo). Las T_{APC} luego se cocultivaron con células respondedoras CD8+ específicas de E711-20 en una proporción de estimulador 4: 1: efector y se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/mL). Después de 24 h, se extrajo el sobrenadante de cada condición y se evaluó el nivel de producción de IFN- γ mediante ELISA de IFN- γ (Biolegend).
- El OL-E7₁₋₃₅ SLP nativo provocó una respuesta mínima de IFN- γ cuando se administró utilizando SQZ en comparación con Endo (Fig. 4). Sin embargo, el E7.6, que comprende el epítipo mínimo E7 (YMLDLQPETT) insertado entre las regiones flanqueantes de otra SLP reactiva (E621-45 – QLCTELQTXXXXXXXXXXYCKQQLL), indujo una mayor respuesta de IFN- γ con respecto al control endo correspondiente en todos los tres los donantes probaron en comparación con los controles Endo (* P <0.05, ** P <0.01; # P <0.0001). Este hallazgo resalta la importancia de la secuencia de la región flanqueante en la inmunogenicidad de la SLP y proporciona el apoyo de que las regiones flanqueantes de otras SLP, que se sabe que son reactivas, se pueden usar junto con epítopos mínimos ortogonales para lograr un aumento de las respuestas inmunitarias.

Ejemplo 5

- Para evaluar la dosis de antígeno para APC de células T SQZ en un modelo humano in vitro, las células T humanas primarias se cargaron con un E7 SLP en dosis variables y se evaluaron para IFN- γ mediante ELISA.
- Se aislaron células T humanas de las PBMC de los donantes HLA-A02 + (10M células/ml) y se administraron intracelularmente dosis diferentes (50 y 100 μ M) de

E7 SLP (QLCTELQTYMLDLQPETTYCKQQLL) por SQZ y el nivel de IFN- γ , como medidos por ELISA, se compararon entre las condiciones de SQZ y un control en el que el E7 SLP se incubaba con las T APC en ausencia de SQZing (Endo). Las T APC se cocultivaron luego con células respondedoras CD8⁺ específicas de E711-20 en una proporción de 4: 1 estimulador: efector y se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/ml). Después de 24 h, se extrajo el sobrenadante de cada condición y se evaluó el nivel de producción de IFN- γ mediante ELISA de IFN- γ (Biolegend). Además, se empleó un control positivo de pulso peptídico en el que las células B-LCL se incubaron en presencia del epítipo E7 mínimo (YMLDLQPETT) durante 1 h antes del ELISA.

En los tres donantes probados, se producen aumentos constantes en IFN- γ con todas las condiciones de SQZ en relación con el control comparable (Endo) donde la SLP se incubaba con la célula T en ausencia de SQZ (Fig. 5). Los donantes 1 y 3 mostraron aumentos estadísticamente significativos con 50 μ M de E7 SLP (8668 – * P <0.05; 8299 – # P <0.0001), y una tendencia hacia la importancia a la mayor de 100 μ M de E7 SLP. Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas entre 50 y 100 μ M para ningún donante, hubo una respuesta de IFN- γ consistentemente igual o mayor con 50 μ M de E7 SLP.

Ejemplo 6

Para determinar la variabilidad del donante para APC de células T SQZ en un modelo humano in vitro, junto con identificar combinaciones y dosis óptimas de SLP E6 y E7 que inducen una respuesta inmune significativa contra E7 en células T humanas primarias de múltiples HLA-A02⁺ los donantes se cargaron con un SLP E6 y E7 y se evaluaron para IFN- γ mediante ELISA.

Las células T humanas se aislaron de las PBMC de los donantes HLA-A02⁺ (10M células/ml) y E6 SLP de 25 o 50 μ M (QLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLL) y se incluyó en el cuadro – γ , medido por ELISA, se compararon entre las

- condiciones de SQZ y un control en el que las SLP se incuban con las T_{APC} en ausencia de SQZing (Endo). Se empleó un control positivo de pulso peptídico en el que las células B–LCL se incubaron en presencia del epítipo E7 mínimo (YMLDLQPETT) al mismo tiempo que la generación de T_{APC}. Las T_{APC} y el control
- 5 positivo luego se cocultivaron con células respondedoras CD8⁺ específicas de E7_{11–20} en una proporción de estimulador 4: 1: efector y se cultivaron en presencia de IL–2 (100 U/mL). Después de 24 h, se extrajo el sobrenadante de cada condición y se evaluó el nivel de producción de IFN– γ mediante ELISA de IFN– γ (Biolegend).
- 10 Cinco de los siete donantes mostrados mostraron aumentos consistentes en IFN– γ cuando se trataron con SLP SQZ E6+ E7 en relación con un control comparable (Endo) donde la SLP se incubaba con la célula T en ausencia de SQZ (Donantes 1–3), 5–6: * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.005) como se muestra en la Fig. 6. De los dos donantes que no tuvieron incrementos estadísticamente significativos cuando
- 15 se trataron con APC con SQZ T relativa para los controles Endo, ambos donantes (Donantes 4 y 7) tuvieron condiciones en las que hubo aumentos detectables con una dosis de APC T SQZ probadas (Donante 4 – 50 μ M, Donante 7 – 25 μ M), tendiendo a ser significativo. En conjunto, estos datos muestran que, si bien las APC de diferentes donantes tienen una actividad inmunoestimuladora diferencial,
- 20 podemos ver un aumento constante en la producción de IFN– γ en múltiples donantes y que la respuesta inmune específica del E7 aún es significativa cuando se combina con múltiples antígenos/SLP. En este caso, el antígeno E6 específico del VPH.

Ejemplo 7

- 25 Para ayudar a determinar el adyuvante que conduce a la respuesta inmune más robusta, probamos el efecto de dos adyuvantes que actúan en diferentes vías sobre la capacidad de las APC de T para inducir una respuesta específica de

antígeno in vivo. Este efecto se cuantificó mediante tetrámero y tinción con ICS mediante citometría de flujo.

Se aislaron células T de ratones hembras C57BL/6J y se cargaron utilizando SQZ con 400 µg/ml de Ova + varias concentraciones de poli I:C de alto y bajo peso molecular (10, 30, 100, 300, 1000 µg/mL) y en comparación con las células T incubadas con las mismas condiciones en ausencia de SQZ como control negativo (Endo – Grupos C y E). Se usaron células T SQZ con Ova + 200 µg/ml de CpG como control positivo (Grupo F). En el día 0, los ratones (5/grupo, 3 no tratados) se inyectaron con células T 5M cargadas o incubadas en 100 µl de volumen (50M células/ml). En el día 7, se recolectaron los bazos y se cuantificaron las células T específicas de Ova mediante tinción con tetrámero usando citometría de flujo, mientras que algunos esplenocitos se permeabilizaron y se fijaron durante la noche. Al día siguiente (día 8), los niveles de IFN-γ se determinaron mediante ICS, con PMA/ionomicina actuando como control positivo.

En la Fig. 7A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.

El porcentaje de células T CD8⁺ productoras de tetrámero o IFN-γ fue mayor en el grupo adyuvado con CpG, mientras que todas las condiciones adyuvadas con LMW o HMW poli I:C no aumentaron el porcentaje de Ova específico o IFN y produciendo células T CD8⁺ sin tratar (Fig. 7B). Dado que poli I:C es un agonista de TLR3 y CpG es un agonista de TLR9, estos datos respaldan la superioridad de CpG sobre poli I:C como adyuvante con la vacuna T APC, mientras que sugiere que la activación de TLR3 puede no ser beneficiosa en este contexto.

Ejemplo 8

Para ayudar a determinar la concentración de adyuvante CpG que conduce a la respuesta inmune más robusta, probamos el efecto de dosis múltiples de CpG en la capacidad de las APC de T para inducir una respuesta específica de antígeno

in vivo. Este efecto se cuantificó mediante tetramero y tinción con ICS mediante citometría de flujo.

- Se aislaron células T de ratones hembras C57BL/6J y se cargaron utilizando SQZ con 400 µg/ml de Ova + diversas concentraciones de CpG1826 (50, 100, 200 µg/ml) y se compararon con células T incubadas con las mismas condiciones en ausencia de SQZ como control negativo (Endo – Grupos B, D y F). En el día 0, los ratones (5/grupo, 3 no tratados) se inyectaron con células T 5M cargadas o incubadas en 100 µl de volumen (50M células/ml). En el día 7, se recolectaron los bazo y se cuantificaron las células T específicas de Ova mediante tinción con tetramero usando citometría de flujo, mientras que algunos esplenocitos se permeabilizaron y se fijaron durante la noche. Al día siguiente (día 8), los niveles de IFN-γ se determinaron mediante ICS, con PMA/ionomicina actuando como control positivo. En la Fig. 8A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.
- El porcentaje de células T CD8+ productoras de tetramer o IFN-γ fue mayor en el grupo con 200 µg/mL de CpG y fue significativamente diferente del control endo relacionado (* P <0.05 para tetramer, #P <0.0001 para IFN -γ) para el péptido de Clase I/MHC-I, mientras que todas las demás condiciones no provocaron una respuesta significativa sobre los controles Endo no tratados o sus respectivos controles Endo (Fig. 8B). La activación de células T específicas de Ova solo se observó con el péptido de Clase I, lo que apoya la presentación directa de antígenos Ova para efectuar una respuesta de células T CD8+.

Ejemplo 9

- Para ayudar a evaluar el programa para la administración de adyuvante de CpG que conduce a una respuesta inmune robusta, probamos el efecto de múltiples programas de dosificación de CpG sobre la capacidad de las APC de T para

inducir una respuesta específica de antígeno in vivo. Este efecto se cuantificó mediante tetrámero y tinción con ICS mediante citometría de flujo.

Se aislaron células T de ratones hembras C57BL/6J y se cargaron utilizando SQZ con 400 µg/ml de Ova y los ratones (5/grupo, 3 no tratados) se inyectaron con células T cargadas o incubadas 5M en 100 µL de volumen (células 50M/mL). La administración conjunta de CpG1826 (25 µg/ml) de ratones donantes se realizó al mismo tiempo que la T APC prime (día 0) o 1 ó 2 días después de la prime (día 1 ó 2, respectivamente) y se comparó con la T células incubadas con las mismas condiciones en ausencia de SQZ como control negativo (Grupos B, D y F). Las células T SQZ con (Ova + 200 µg/mL CpG) se utilizaron como control positivo (Grupo H). En el día 7, se recolectaron los bazo y se cuantificaron las células T específicas de Ova mediante tinción con tetrámero usando citometría de flujo, mientras que algunos esplenocitos se permeabilizaron y se fijaron durante la noche. Al día siguiente (día 8), los niveles de IFN-γ se determinaron mediante ICS, con PMA/ionomicina actuando como control positivo. En la Fig. 9A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa. El % de tetrámero o células T CD8+ productoras de IFN-γ fue mayor en el grupo en el que Ova y CpG se administraron conjuntamente a T APC, mientras que la co-administración el mismo día que prime (Grupo B) fue el único grupo CpG coadministrado para mostrar algún nivel de activación específica de Ova, tendiendo hacia el significado (Fig. 9B). Sin embargo, estos datos respaldan la observación de que la administración conjunta de antígeno + CpG puede conducir a la mayor activación de las células T CD8+ específicas de Ova, mientras que el retraso de la administración sistémica de CpG conduce a respuestas más bajas en comparación con la administración simultánea y la administración conjunta de adyuvante.

Ejemplo 10

Para determinar una combinación de administración adyuvante intracelular y del sistema para la función antitumoral de APP T, se compararon múltiples rutas de administración de CpG frente a IFN- α junto con nuestra APC T específica de E7 en un ratón profiláctico TC-1 modelo de tumor. Las respuestas de células T específicas de antígeno se midieron mediante tinción con tetrámero y citometría de flujo, mientras que el efecto antitumoral se midió mediante la prevención del crecimiento tumoral.

En los días -14 (cebado) y -7 (refuerzo), las células T de ratones hembras C57BL/6J se aislaron y se cargaron utilizando SQZ con E7 SLP 40 μ M precomplejada (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 40 μ M albúmina de suero de ratón (40 MSA) (Grupos B y C) o E7 SLP + MSA + 200 μ g/ml CpG ODN 1826 (Grupos D, E y F). A los ratones hembras receptores C57BL/6J (10 ratones/grupo) se les inyectaron por vía intravenosa 100 μ L de células T cargadas (células 5M/animal), mientras que los animales de los grupos B y E también recibieron CpG intravenosa (25 μ g) y los grupos C y F recibieron IV IFN- α (10k IU). En los días -8 y -3, se recogieron 100 μ L de sangre murina y se cuantificó el porcentaje de células T CD8+ específicas de E7 mediante tinción con tetrámero y citometría de flujo. En el día 0, los ratones receptores se inyectaron en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (100 k células/ratón) y el crecimiento del tumor TC-1 se midió dos veces por semana a partir del día 11 y se comparó con el crecimiento del tumor en ratones no tratados. En la Fig. 10A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.

El porcentaje de células T específicas para E7 se midió en ratones mediante tinción con tetrámero E7 después de cebado (Día -8) y refuerzo (Día -3) con E7 + MSA o E7 + MSA + células T CpG SQZ +/- la administración conjunta de CpG o IFN- α (Fig. 10B). La mayor proporción relativa de células T específicas de E7 se observó en los grupos de administración conjunta SQZ E7 + CpG y en los grupos

de administración conjunta SQZ (E7 + CpG) + IFN- α . El número relativo de células T CD8+ post-prime específicas de E7 fue sorprendentemente menor en la co-administración de SQZ (E7 + CpG) + de CpG en comparación con la co-administración de SQZ E7 + de CpG (* P <0.05), mientras que la coadministración de IFN- α con células T SQZ (E7 + CpG) condujo a un número significativamente mayor de células T específicas para E7 que la administración conjunta de CpG con células T SQZ (E7 + CpG) (* P <0.05). Después del refuerzo (Día -3), se observó una tendencia similar cuando los grupos de administración conjunta SQZ E7 + CpG y los grupos de administración conjunta SQZ (E7 + CpG) + IFN- α condujeron al% más alto de células T específicas para E7. Sin embargo, la respuesta más alta provino del grupo de administración conjunta SQZ (E7 + CpG) + IFN- α , que fue significativamente mayor que la administración conjunta SQZ E7 + IFN- α y la administración conjunta de SQZ (E7 + CpG) + de CpG, lo que demuestra que la coadministración de IFN- α conduce a un mayor porcentaje de células T específicas de antígeno cuando se usan en combinación con células T SQZ (E7 + CpG). El crecimiento del tumor, medido por la fórmula ((longitud x ancho²)/2), se comparó entre los ratones del grupo no tratado (sin transferencia adoptiva de células T) y los grupos de tratamiento B-F descritos en la Fig. 10C. La alta reducción del crecimiento tumoral y la ventaja de supervivencia del grupo de administración conjunta SQZ (E7 + CpG) + IFN- α se corresponde bien con la tinción de tetramer, lo que muestra que la mayor inducción de células T específicas de E7 condujo a la mejor actividad antitumoral. Curiosamente, a pesar del bajo porcentaje de células T específicas de E7 en el grupo SQZ (E7 + CpG), este tratamiento también produjo un nivel muy alto de actividad antitumoral, siendo este el único otro grupo (además de SQZ (E7 + CpG) + coadministración de IFN- α) que prolongó la supervivencia de todos los ratones durante 60 días. Mientras que fue ligeramente más bajo que los grupos D y F mencionados

anteriormente, hubo una extensión de supervivencia perceptible e inhibición del crecimiento tumoral en los grupos C y E. En el día 78, los 7 ratones libres de tumores del grupo D se recuperaron con 50 k de células en el lado opuesto (izquierda).) flanquean y se comparan con animales no tratados de la misma edad (10 ratones) (Fig. 10D). Los ratones del Grupo D tuvieron una reducción significativa en el crecimiento del tumor después de la exposición, en comparación con los ratones no tratados que recibieron su primer estimulación (** P <0,005), lo que proporciona el respaldo de que este efecto antitumoral es duradero después de 2 meses.

10 Ejemplo 11

Para determinar el efecto de la combinación de múltiples antígenos de VPH para la función antitumoral T APC, los péptidos largos sintéticos (SLP) E6 y E7 solos y en combinación con nuestras APC específicas para E7 en un modelo de tumor murino TC-1 profiláctico. Las respuestas de las células T específicas de E7 se midieron mediante tinción de tetramero y citometría de flujo, mientras que el efecto antitumoral se midió mediante la prevención del crecimiento tumoral.

En los días -14 (cebado) y -8 (refuerzo), las células T de ratones hembras C57BL/6J se aislaron y se cargaron usando SQZ con albúmina de suero de ratón (MSA) 20 µM pre-complejada + E6 de 20 µM (VYSKQQLLRREYDFAFRDLSIVYRDGNPYAVSDK) y/o E7 SLP (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) o la combinación de ambos +/- 200 µg/ml CpG ODN 1826 según la Tabla XX. Las células T incubadas con las mismas condiciones que el Grupo B en ausencia de SQZ se utilizaron como control negativo (Grupo C). Se inyectaron por vía intravenosa ratones receptores hembra C57BL/6J (5-10 ratones/grupo) con 100 µl de células T cargadas (células 5M/animal). En el día 3, se recogieron 100 µl de sangre murina y se cuantificó el porcentaje de células T CD8+ específicas de E7 mediante tinción con tetramero y

citometría de flujo. En el día 0, los ratones receptores se inyectaron en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (100 k células/ratón) y el crecimiento del tumor TC-1 se midió dos veces por semana a partir del día 11 y se comparó con el crecimiento del tumor en ratones no tratados. En la Fig. 11A se describe un
5 esquema representativo de los grupos de tratamiento y el cronograma.

El porcentaje de células T específicas de E7 se midió en ratones mediante tinción con tetrámero E7 después del refuerzo (Día -3), observándose el mayor efecto con las APC CQG + E7 SQZ (Grupo B) como se muestra en la Fig. 11B. Curiosamente, las respuestas del Grupo B fueron significativamente más altas
10 que las no tratadas y la combinación de E7 y E6 (Grupo F – #P <0,0001), proporcionando evidencia de que la adición de la SLP E6 mitiga la respuesta específica de E7. El Grupo B fue significativamente diferente de los otros grupos de tratamiento, con la notable excepción del control endo (Grupo C), en el que el Grupo B fue notablemente más alto y con tendencia a la significación estadística.
15 Como se muestra en la Fig. 11C, el crecimiento del tumor, medido por la fórmula $((\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2)$, se comparó entre los ratones del grupo no tratado (sin transferencia adoptiva de células T) y los grupos de tratamiento BG descritos en la Fig. 11A. La alta prevención del crecimiento tumoral se produjo en grupos con células T SQZ con E7 + CpG, así como células T que se incubaron en presencia
20 de E7 + CpG en ausencia de SQZ. Los Grupos D–F mostraron algún nivel de inhibición del crecimiento tumoral en relación con las células T no tratadas (Grupo A) y E6 + CpG SQZ (Grupo G), pero todas fueron menos efectivas que los Grupos B y C.

Ejemplo 12

25 Con el fin de determinar la importancia de la vía de administración del adyuvante CpG para el efecto antitumoral APC T específico de E7, se administró un SLP E7 a células T en combinación con CpG, ya sea administrado a la célula T

sistémicamente coadministrado al animal receptor y el efecto antitumoral se midió por inhibición del crecimiento tumoral.

- En el día 0, los ratones receptores se inyectaron en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón). En los días 10 (cebado) y 20 (refuerzo), las células T de ratones hembras C57BL/6J se aislaron y se cargaron usando SQZ con albúmina de suero de ratón 20 μ M (MSA) precomplejada + E7 20 μ M (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) y ODN 1826 coadministrado (Grupo D) por SQZ a 200 μ g/mL o administrado a los animales sistémicamente a 25 μ g/ratón (Grupo C) y comparado con no tratado (Grupo A) y administración sistémica de CpG solo (Grupo B). Los ratones receptores (8–10 ratones/grupo) se trataron con 100 μ L de células T cargadas (5M células/animal). El crecimiento del tumor TC–1 se midió dos veces por semana a partir del Día 10. En la Figura 12A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.
- En un modelo terapéutico de cáncer asociado al VPH (TC–1), las APC que se sometió a SQZ con E7 SLP condujeron a una reducción significativa en la carga tumoral en relación con la inyección de CpG sin tratar y solo (Día 17: Grupo C – P <0.05; Día 20: Grupos C y D – P <0.0001) (Fig. 12B). Estos datos muestran que, en un entorno terapéutico, tanto la administración conjunta como la administración intracelular del adyuvante CpG producen una reducción significativa de la carga tumoral en relación con el tratamiento o el adyuvante solo.

Ejemplo 13

- Con el fin de evaluar la capacidad de los adyuvantes coadministrados para conducir a la infiltración de tumores de células T específicas de E7, se compararon CpG frente a IFN– α en combinación con nuestra APC T específica de E7 en un tumor terapéutico TC–1 murino modelo. Las respuestas de células T

específicas de antígeno se midieron en linfocitos de infiltración tumoral mediante tinción con tetrámero y citometría de flujo.

En el día 0, los ratones receptores se inyectaron en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón). En el día 10, se aislaron células T de ratones hembras C57BL/6J y se cargaron utilizando SQZ con E7 SLP 20 μ M pre-complejado (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 20 μ M de albúmina de suero de ratón (MSA). Las células T cargadas con SQZ (células 5M/animal) se administraron solas (Grupo C), con CpG ODN 1826 (25 μ g/ratón – Grupo D), o IFN- α (10k IU/ratón – Grupo E) y se inyectaron por vía intravenosa en 100 μ l de volumen total. Los ratones también se inyectaron con CpG sistémico (25 μ g – Grupo A) o IFN- α solo (10k IU – Grupo B). En el día 17, se recogieron los tumores y se aislaron células T infiltrantes de tumores CD8+ y se evaluó la reactividad específica de E7 mediante tinción con tetrámero. En la Fig. 13 se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el cronograma.

El porcentaje de células T CD8+ específicas de E7 se midió en ratones mediante tinción con tetrámero E7 7 días después del cebado (Día 17) y se muestra un ejemplo representativo del porcentaje de células T específicas de E7 de las células CD8+ en la panel inferior de la Fig. 13. Mientras que la inyección de adyuvantes solo no generó una cantidad apreciable de células T específicas de E7, la administración por SQZ de una E7 SLP produjo un aumento del 40% en las células T específicas de E7 y las células T entregadas con E7 en combinación con CpG e IFN- α condujeron a porcentajes aún mayores de células T específicas de antígeno (70 y 80%, respectivamente). Estos datos muestran que se genera una respuesta de células T específica de E7 más robusta cuando las células T cargadas con SLP de E7 se administran en combinación con adyuvantes sistémicos como CpG o IFN- α .

Ejemplo 14

Con el fin de determinar un programa de vacunación tanto para el cebado como para el refuerzo de las APC T cargadas con un péptido largo sintético E7 (SLP) + CpG, utilizamos un modelo terapéutico de tumor murino TC-1 tratado con nuestra
5 vacuna T APC en diferentes momentos Puntos y con número diferencial de refuerzos. El efecto antitumoral se midió por inhibición del crecimiento tumoral.

En el día 0, los ratones receptores se inyectaron en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón) y el crecimiento del tumor TC-1 se midió dos veces por semana a partir del día 11 y se comparó con el crecimiento
10 tumoral en ratones no tratados. En los días 3 ó 6, las células T de ratones hembras C57BL/6J se aislaron y se cargaron usando SQZ con albúmina de suero de ratón 20 μ M (MSA) precomplejada + E7 SLP (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 200 μ g/mL de CpG ODN 1826 según a la Tabla XX, seguido de una inyección intravenosa de ratones
15 receptores con 100 μ L de células T cargadas (5M células/animal). En la Fig. 14A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.

La inhibición del crecimiento tumoral se produjo en todos los grupos con células T SQZ con E7 + CpG, con significación estadística en el día 20 (Día 20 – Todos los
20 grupos $P < 0,05$; Día 24 – Todos los grupos $P < 0,0001$). Estos datos muestran que el programa de dosificación con la vacuna T APC puede funcionar igual de bien al cebarse en el Día 6 en comparación con el Día 3 y no hubo un beneficio perceptible al agregar un segundo refuerzo en el Día 21.

Ejemplo 15

25 Con el fin de comprender mejor el mecanismo de presentación de antígeno por parte de células T que han tenido el suministro de antígeno intracelular mediante SQZ, Ova se administró o se incubó en ausencia de SQZ con células T de tipo

salvaje inyectadas en un ratón de tipo salvaje o en ratones knockout MHC-I. Los bazos se recogieron y la cantidad de proliferación de células T específicas de Ova (OT-I) se cuantificó mediante tinción con CFSE.

En el día 0, se aislaron células T de ratones donadores hembra OT-I y se
5 marcaron con CFSE 2 μ M y se inyectaron células 2.5M retroorbitalmente (RO) en 100 μ L de PBS en una inactivación de tipo salvaje o MHC-I ratones. También en el día 0, se cargaron 400 μ g/ml de Ova o se incubaron con células T aisladas de ratones donantes CD45.1 (4 ratones/grupo), y se inyectaron 5M de células T RO. El día 3, se recogieron los bazos y se evaluó el nivel de proliferación de células T
10 específicas de Ova mediante tinción con CFSE.

La cantidad de proliferación de células T específicas de Ova se evaluó mediante el marcaje CFSE de células T CD8+ OT-I sensibles a Ova. Para determinar el mecanismo de presentación de las T_{APC} cargadas con antígeno, se utilizaron ratones deficientes en MHC-I como ratones receptores. Esto excluiría la
15 presentación de antígenos Ova por APC murinas endógenas debido a la captación indirecta de antígeno al morir las células T SQZ y la presentación cruzada en MHC-I a células OT-I transferidas de forma adoptiva. Se encontró que cuando los ratones receptores carecen de MHC-I, todavía existía proliferación de células OT-I específicas de Ova, lo que proporciona evidencia de
20 que las APC de T de SQZd presentan el antígeno directamente (Fig. 15). Estos datos apoyan la presentación directa del antígeno administrado intracelularmente mediado por SQZ.

Ejemplo 16

Con el fin de evaluar la propensión de SQZ para alterar la producción de
25 citoquinas, las células T se entregaron con CpG y se evaluó la capacidad de alterar los niveles de citoquinas de células T en un modelo murino in vitro. Los

niveles de citoquinas en el sobrenadante se perfilaron utilizando un kit de citoquinas múltiplex.

Los ratones receptores hembra C57BL/6J se cebaron con células T de ratones donantes hembra C57BL/6J se aislaron y SQZd con 200 µg/ml CpG y los
5 sobrenadantes se recogieron después de 24 h (N = 2). El sobrenadante se evaluó para determinar los niveles de citoquinas por el kit de citoquinas Millipore Milliplex multiplex y se expresó como una diferencia de cambio en relación con las células T no tratadas.

No hubo cambios significativos entre los niveles de citoquinas en el sobrenadante
10 de células T cargadas con CpG a través de SQZ en relación con las células no tratadas (Fig. 16). Estos datos muestran que el suministro de SQZ de un adyuvante no altera significativamente los niveles de citoquinas de células T in vitro.

Ejemplo 17

15 Con el fin de evaluar la propensión de SQZ a alterar la producción de citoquinas, las células T SQZ entregadas con Ova u Ova + CpG se evaluaron para determinar la capacidad de alterar los niveles de citoquinas en suero en un modelo murino in vivo. Las citoquinas séricas se perfilaron utilizando un kit de citoquinas múltiplex.

20 Los ratones receptores hembra C57BL/6J se cebaron con células T de ratones donantes hembra C57BL/6J se aislaron y SQZ con 400 µg/ml de Ova u Ova + 200 µg/ml de CpG y se extrajo sangre de la vena de la cola a las 6h y mediante punción cardíaca a las 24h post-cebado. El suero se evaluó para determinar los niveles de citoquinas mediante el kit de citoquinas Millipore Milliplex multiplex y se
25 expresó como un cambio en comparación con las células T no tratadas.

No hubo cambios significativos entre los niveles de citoquinas en el suero de ratones cebados con células T cargadas con Ova u Ova + CpG a través de SQZ

(Fig. 17). Además, no se observaron diferencias significativas entre las 6 y las 24 horas después del cebado. Estos datos muestran que el suministro de SQZ de antígeno +/- adyuvante no altera significativamente los niveles de citoquinas en suero in vivo.

5 Ejemplo 18

Con el fin de determinar la capacidad de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos primarios (MoDC) para provocar una respuesta inmune específica de VPH E7 en células T respondedoras E7 utilizando lisado de células tumorales (TCL) como fuente de antígeno en un humano in vitro En el modelo, las
10 MoDC humanas primarias se cargaron con lisado de células tumorales CaSki y se midió la expresión por ciento 4-1BB mediante citometría de flujo.

Se aislaron monocitos humanos de las PBMC de los donantes HLA-A02 + y se generaron MoDC inmaduros mediante la adición de rhIL-4 (1000 U/mL) y rhGM-CSF (800 U/mL) durante 4-6 días, llenando el Medios que contienen citoquinas
15 después de 3 días. La línea celular de cáncer de cérvix CaSki se usó como una fuente de antígeno y TCL de células CaSki (23 mg/ml) se administró intracelularmente a MoDC (1×10^6 células/mL) por SQZ o CaSki TCL se incubaba con los MoDC en ausencia de SQZing (Endo). Además, se empleó un control pulsado peptídico, en el que las MoDC se incubaron en presencia de un epítipo
20 E7 reactivo conocido (YMLDLQPETT - 0,1 μ M - Ctrl positivo). Todas las condiciones se cultivaron durante 1 h con LPS (60 EU/mL) y rhIFN- γ (20000 IU/mL) para activar los MoDC, seguidos de 16-24h de incubación en 60 EU/mL de LPS que contienen medios (sin IFN- γ). Los MoDC se cocultivaron durante 16-24 h con células T reactivas con E7 (Astarte) en una proporción de estimulador:
25 respondedor de 3: 1. Después del cocultivo, el% de la expresión de 4-1BB en células T CD8+ reactivas con E7 se midió mediante citometría de flujo.

El lisado de CaSki, derivado de una línea celular de cáncer cervical VPH positivo que expresa altamente el antígeno E7 del VPH, cuando se administra intracelularmente utilizando SQZ, llevó a un aumento del 20% en el porcentaje de células T CD8+ reactivas a E7 que expresan 4-1BB, un marcador de activación específica de antígeno, en comparación con el control endo no tratado y el correspondiente (#P <0.0001). Estos hallazgos muestran la capacidad del TCL intracelular por SQZ para inducir una respuesta inmune específica de antígeno al antígeno E7 del VPH en las MoDC humanas primarias, lo que brinda soporte para el uso de TCL como una fuente de antígeno compleja para una indicación adicional de que los antígenos oncogénicos pueden ser desconocidos.

Ejemplo 19

Con el fin de determinar la respuesta endógena a las células presentadoras de antígeno (APC) que se han cargado con antígeno mediante SQZ, las células B se cargaron en SQZ y los niveles de citoquinas inflamatorias se midieron mediante tinción intracelular de citoquinas (ICS).

Se aislaron células B murinas (BAPC) de ratones C56BL/6J y se cargaron en SQZ con 400 µg/ml de proteína Ova o con péptido VPH 16 E7 20 µM, luego se inyectaron en ratones donantes junto con CpG1826 1 µM (5 ratones/grupo). En el día 7, se recogieron esplenocitos de ratones no tratados, así como ratones tratados con BAPC cargados con SQZ, se volvieron a estimular con péptido Ins B9-23 y, posteriormente, se realizó una tinción de citocina intracelular (ICS) para IFN-γ y se midió mediante citometría de flujo (Fig. 19A).

Tanto para el antígeno modelo Ova (Fig. 19B) como para el VPH E7 relevante para la enfermedad (Fig. 19C), los resultados mostraron que los esplenocitos de ratones tratados con BAPC cargados con SQZ mostraron aumentos estadísticamente significativos en la producción de IFN-γ cuando –estimulados con Ova o VPH E7 respectivamente (P <0,005, ambos), en comparación con los

esplenocitos recogidos de ratones no tratados. Tomados en conjunto, estos datos muestran que las células B pueden diseñarse para obtener respuestas específicas de antígenos a múltiples antígenos in vivo.

Ejemplo 20

- 5 Con el fin de determinar la capacidad de las células B cargadas con SQZ para actuar como células presentadoras de antígenos (BAPC) para el tratamiento profiláctico de tumores, los ratones se trataron con BQG SQZ cargados con antígenos, seguido de inyección con células tumorales TC-1. La inhibición del crecimiento tumoral se midió para evaluar la eficacia de la vacuna profiláctica in vivo.

- 10 Para probar la capacidad de una vacuna profiláctica basada en antígeno de VPH basada en células B, es decir, BAPC SQZ cargada con antígenos VPH, para controlar el crecimiento del tumor TC-1, una E7 SLP se administró mediante SQZ en células B y se inyectó en ratones antes a la implantación del tumor.
- 15 Específicamente, en el día 7, se aislaron células B murinas (BAPC) de ratones C56BL/6J y se cargaron en SQZ con péptido VPH 16 E7, luego se inyectaron en ratones donantes junto con CpG1826 1 μ M (10 ratones/grupo). El día 0, se implantaron células tumorales TC-1 (1E6 células/ml en 100 μ l) por vía subcutánea en el flanco posterior de cada ratón. TC-1 es una línea celular
- 20 tumoral conocida por expresar los antígenos E6 y E7 del VPH. Los volúmenes de tumores se midieron a lo largo del tiempo y los ratones se sacrificaron en el día 48 o cuando sus tumores alcanzaron $> 1500 \text{ mm}^3$, lo que ocurriera primero.

- El crecimiento del tumor se inhibió drásticamente en los ratones que recibieron BAPC cargados con E7, con 8 de cada 10 ratones en el grupo de tratamiento que
- 25 permanecieron libres de tumor (TF) durante toda la duración del estudio, en comparación con 0 de cada 10 ratones en el control grupo (fig. 20a). La vacuna BAPC también condujo a mejoras estadísticamente significativas ($P < 0,0001$) en

la supervivencia de ratones inmunizados con BAPC en relación con el control, con una supervivencia media para el grupo de tratamiento > 60 días, en comparación con 32 días para el grupo control (Fig. 20B) Tomados juntos, estos datos muestran que las células B cargadas con antígeno a través de SQZ pueden
5 actuar como una potente vacuna basada en APC para un tratamiento profiláctico de tumores específico para el antígeno.

Ejemplo 21

Con el fin de determinar la capacidad de las células B cargadas con SQZ para actuar como células presentadoras de antígeno (BAPCs) para el tratamiento
10 terapéutico de tumores, a los ratones se les implantaron células tumorales TC-1, seguido de inmunización terapéutica con BAPCs cargadas con antígenos La inhibición del crecimiento tumoral se midió para evaluar la eficacia de la vacuna terapéutica in vivo.

Para probar la capacidad de una vacuna de células B basada en el antígeno del
15 VPH terapéutico, es decir, BAPC SQZ cargada con antígenos del VPH, para controlar el crecimiento del tumor TC-1, una E7 SLP se administró mediante SQZ en las células B y se inyectó en ratones después Implantación tumoral. Específicamente, en el día 0, las células tumorales TC-1 (50 k células/ratón) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones C56BL/6J (10
20 ratones/grupo). TC-1 es una línea celular tumoral conocida por expresar los antígenos E6 y E7 del VPH. El día 9, los ratones se dejaron sin tratar o se cebaron con células 1M/ratón de células B murinas (BAPC) cargadas con SQZ con E7 SLP. Los volúmenes de tumores se midieron a lo largo del tiempo y los ratones se sacrificaron en el día 48 o cuando sus tumores alcanzaron > 1500
25 mm³, lo que ocurriera primero.

El crecimiento tumoral se inhibió drásticamente en los ratones que recibieron BAPC cargados con E7, con el volumen tumoral promedio restante <500 mm³

durante la duración del estudio (Figura 21A). La supervivencia de los ratones tratados con BAPC cargados con E7 también aumentó significativamente ($P < 0,0001$), con una supervivencia media para el grupo de tratamiento > 60 días, en comparación con los 38 días para el grupo de control. En conjunto, estos datos

5 muestran que las células B cargadas con antígeno a través de SQZ pueden actuar como una potente vacuna basada en APC para un tratamiento terapéutico de tumores específico para el antígeno.

Ejemplo 22

Con el fin de determinar la capacidad de las células B cargadas con SQZ para

10 promover el reclutamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en tumores, los ratones portadores de tumores se trataron con APC de células B cargadas (cebado y refuerzo), y se midió la inhibición del crecimiento tumoral, además del análisis de tumores para los números y porcentajes relativos de células T específicas de antígeno mediante citometría de flujo

15 En el día 0, las células tumorales TC-1 (50 k células/ratón) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones C56BL/6J (20 ratones/grupo). El día 14, los ratones se cebaron con (i) 150 μg /ratón de E7 SLP + 50 μg de CpG1826 inyectados por vía subcutánea (SC SLP), (ii) células B murinas pulsadas con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de epítipo E7 mínimo + 1 μM CpG (Min. Epi.) Inyectado

20 retroorbitalmente, o (iii) células B cargadas (SQZ) con E7 SLP (20 μM) + 1 μM CpG (5M células/ratón) inyectadas retroorbitalmente. Los volúmenes de los tumores se midieron a lo largo del tiempo hasta alcanzar $> 1500 \text{ mm}^3$ o en el día 34, lo que ocurriera primero. El día 27, se sacrificó un subconjunto de animales (5 ratones/grupo), donde se resecaron los tumores y se aislaron las células T y se

25 analizaron mediante citometría de flujo.

En el entorno de tratamiento terapéutico descrito, solo los tratamientos con S.C. SLP y SQZ condujeron a una inhibición apreciable del crecimiento del tumor, y

solo el tratamiento con SQZ condujo a la regresión del tumor en relación con el volumen máximo observado el Día 19 (Fig. 22A). El análisis del reclutamiento de TIL en el tumor, así como el fenotipo relativo de estas células T mostró que la vacuna de células B cargadas con SQZ (SQZ) produjo un aumento significativo en el porcentaje de células T infiltrantes en el tumor, así como una mayor Número de células normalizadas a 100 mg de peso tumoral. Además del número total de células T infiltrantes, se observó que tanto las células T CD8+ como las células T CD8+ específicas de E7 en el tratamiento con SQZ aumentaron más significativamente como porcentaje de células CD45 +, en comparación con SC SLP y Min. EP., y esta tendencia también se observó cuando se normalizó al peso del tumor también (Fig. 22B). Todas las comparaciones entre SQZ y todos los otros grupos de tratamiento fueron estadísticamente significativas ($P < 0,001$). En conjunto, estos datos apoyan el descubrimiento de que la vacuna BAPC cargada con SQZ conduce a la regresión del tumor debido a la promoción de la infiltración de células T en el tumor, específicamente células T citotóxicas CD8+ específicas de antígeno.

Ejemplo 23

Con el fin de determinar la respuesta específica de antígeno in vitro a células presentadoras de antígeno humano (APC) que se han cargado con antígeno por SQZ, las células B se cargaron en SQZ y los niveles de secreción de citoquinas inflamatorias inducidas se midieron por ELISA.

Específicamente, se aislaron células B humanas de donantes HLA-A2 + y se incubó con VPH 16 E7 SLP (50 μ M) con células B (Endo), o se administró a células B mediante SQZ (SQZ). Las células Endo o SQZ B (60k células/pocillo) se incubaron luego con células T respondedoras E7 (30k células/pocillo) en una proporción de 2:1, y se cultivaron conjuntamente en presencia de IL-2 (100 U/mL)

y CpG 2006 (1 μ M) durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se analizaron para determinar la secreción de IFN- γ mediante ELISA.

- Los resultados muestran que las células B cargadas con SQZ pueden actuar como células presentadoras de antígeno (BAPC) para estimular una respuesta específica del antígeno E7 del VPH in vitro. Las APC de células B que estaban
- 5 cargadas con antígeno estimularon las células respondedoras específicas del E7 para segregar IFN- γ a niveles significativamente más altos que las células que se incubaron con antígeno ($P < 0.005$).

Ejemplo 24

- 10 Con el fin de evaluar la importancia del adyuvante en la capacidad de una vacuna cargada con SQZ para inducir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) específicos de antígeno, las células se cargaron con un antígeno modelo, se maduraron con adyuvante y se inyectaron en ratones portadores de tumores. El porcentaje relativo de células T específicas de antígeno reclutadas en el tumor se midió
- 15 mediante citometría de flujo.

- Se inyectaron ratones hembras C57BL/6J en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón) en el día 0. En el día 15 (principal), se obtuvieron células T murinas de bazo de ratones donadores C57BL/6J hembra y se
- se cargaron con 5 μ M E7 SLP
- 20 (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 5 μ M de albúmina de suero de ratón (MSA) a través de SQZ (40 psi, 3,5 μ m constricción, temperatura ambiente) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Ratones receptores C57BL/6J hembra (10/grupo) se inyectaron retroorbitalmente en el día 15 con 100 μ L de vehículo (PBS – No tratado) o células T cargadas con E7 (células 1M/ratón) +/-
- 25 CpG 1826 (25 μ g) /ratón). En el día 25, se recogieron los tumores y se midió la cantidad de TIL específicos de E7 mediante citometría de flujo.

Los TPC cargados con SQZ solo produjeron un aumento pequeño (~ 15%) pero estadísticamente insignificante en el número de TIL específicos de E7, pero cuando se inyectaron conjuntamente con CpG, hubo un aumento mayor y significativo en el número de TIL (~ 55%, ** P <0,01 en comparación con T APC solo; *** P <0,0005 en comparación con no tratado). Estos datos muestran que la coinyección de CpG junto con el T7 cargado con E7 conduce a un reclutamiento mucho mayor de TIL en comparación con el T APC solo.

Ejemplo 25

Con el fin de evaluar la durabilidad de la vacuna adyuvante T APC + en un entorno profiláctico, los ratones tratados con T APC se compararon con ratones no tratados para el crecimiento tumoral de un modelo de tumor TC1 que expresaba VPH E7, tanto para la respuesta inicial, así como una nueva exposición 60 días después, con el área de los tumores trazados en función del tiempo.

En el día -14, se recogieron esplenocitos de ratones donantes hembras C57BL/6J y se aislaron células T mediante separación inmunomagnética. A continuación, las células T murinas se cargaron con E7 SLP 20 µM precomplejada (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 20 µM de albúmina de suero de ratón (MSA) a través de SQZ (45 psi; 3,5 µm constricción) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Ratones receptores C57BL/6J hembra (10 ratones/grupo, excepto la cohorte I no tratada, que fue de 20 ratones/grupo) se inyectaron retroorbitalmente con 100 µL de vehículo (PBS – No tratado) o células T cargadas con E7 (células 1M/ratón) + CpG 1826 (25 µg/ratón) [cebado]. En el día -7, los bazo se recogieron de ratones hembras C57BL/6J y las células T se aislaron y SQZ se inyectaron en ratones receptores exactamente como en el día -14 [refuerzo]. En el día 0, se inyectaron ratones hembra C57BL/6J en el flanco posterior derecho (excepto en las 10 cohortes 2 no tratadas que no se

implantaron con células tumorales hasta el día 64 con células tumorales TC1 (50 k células/ratón). El crecimiento del tumor TC-1 fue se midió desde la primera semana después de la implantación del tumor dos veces por semana y se comparó con el crecimiento del tumor en ratones no tratados hasta por 120 días.

- 5 El crecimiento del tumor, medido por la fórmula $((\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2)$, se comparó entre los ratones del grupo no tratado y el grupo tratado con T APC desafiado con células tumorales en el día 0, y mientras todos los ratones alcanzaron el punto final humanitario en el grupo no tratado en el día 47, hubo un retraso significativo en el crecimiento del tumor para el grupo T APC en todos menos 2 de los ratones
- 10 T APC, y el resto de los ratones (8) permanecieron libres de tumor hasta que se volvieron a desafiar con tumores. Curiosamente, cuando los ratones no tratados se implantaron con tumores en el Día 64 y se compararon con los ratones tratados con APC que tenían tumores reimplantados en su flanco opuesto, todavía había un retraso en el crecimiento del tumor, con 3 de los ratones que
- 15 nunca crecieron tumores medibles, Incluso después de la estimulación tumoral secundaria. Estos datos sugieren que el tratamiento con adyuvantes T APC + cargados con E7 puede no solo conducir a una inhibición del crecimiento tumoral específico de antígeno, sino también a la prevención de tumores que incluso puede durar más de 100 días a pesar de una estimulación tumoral secundaria.

20 Ejemplo 26

- Con el fin de evaluar el impacto de la diferente concentración de T APC, así como los programas de estimulación de cebado en un entorno de vacuna terapéutica, se compararon ratones tratados con T APC (concentraciones múltiples y programas de estimulación de cebado) con ratones no tratados para el
- 25 crecimiento tumoral de un modelo de tumor TC1 que expresa VPH E7, con el área de los tumores trazados frente al tiempo.

En el día 0, se inyectaron ratones hembra C57BL/6J en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón). En el día 10 (primo), se obtuvieron células T murinas de bazo de ratones hembra C57BL/6J donadores mediante separación inmunomagnética y se cargaron con E7 SLP (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR precomplejada) (20AM) albúmina de suero de ratón (MSA) a través de S albúm 45 psi; constricción de 3.5 μ m) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Luego, los ratones hembras C57BL/6J receptores (10/grupo) se inyectaron retroorbitalmente con 100 μ L de vehículo (PBS) o T APC (0,25 o 1M células/ratón) + CpG 1826 (25 μ g/ratón). En el día 17, el grupo cebado/refuerzo recibió una segunda inyección con T APC de manera idéntica al día 10. El crecimiento del tumor TC–1 se midió comenzando 1 semana después de la implantación del tumor dos veces por semana y se comparó con el crecimiento del tumor en ratones no tratados Hasta 66 días.

El crecimiento del tumor, medido por la fórmula $((\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2)$ y el grupo APC de dosis baja (células 0.25M/ratón) + CpG (cebado solamente) solo produjo un ligero retraso en la tasa de crecimiento del tumor en comparación con no tratado. La inclusión de un refuerzo en el Día 17 con la dosis baja de T APC + CpG (cebado/refuerzo de 0,25 M) vio un aumento de la inhibición del crecimiento tumoral en relación con la misma condición de concentración y una inhibición mucho mayor en comparación con el tratamiento no tratado. El aumento de la dosis de APC cargadas con antígeno a 1M/ratón (cebado solamente) condujo a una leve inhibición del crecimiento tumoral en relación con la dosis más baja T APC + CpG (cebado solamente). Curiosamente, el uso de la dosis alta de T APC + CpG (cebado solamente) condujo a la mejor protección contra el crecimiento del tumor, con regresión del tumor entre los Días 20–40 y el nivel más alto de inhibición del crecimiento de cualquiera de los grupos observados. Tomados en conjunto, estos datos resaltan que el aumento de la dosis celular, la inclusión de

adyuvantes o los programas de dosificación cebado + refuerzo pueden mejorar la eficacia de una vacuna T APC.

Ejemplo 27

- Para comparar la eficacia de una vacuna peptídica de dosis alta versus células B
- 5 incubadas o cargadas con SQZ con péptido, los ratones se trataron con péptido E7, células B incubadas con E7 (células B pulsadas) o cargadas con E7 B APC después de la estimulación con el modelo de tumor TC1 que expresa VPH E7 en un entorno terapéutico, con el área de los tumores y la supervivencia trazada a lo largo del tiempo.
- 10 En el día 0, se inyectaron ratones hembra C57BL/6J en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón). En el día 13 (cebado), se obtuvieron células B de bazo de ratones dadores C57BL/6J hembras por separación inmunomagnética, y se incubaron (10 µg/ml) o se cargaron con E7 SLP 20 µM (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 20 µM ratón
- 15 albúmina sérica (MSA) a través de SQZ (60 psi; constricción de 4 µm, temperatura ambiente) e incubada con CpG 1826 (1 µM) durante 16 horas. En el día 14, se inyectaron ratones hembras C57BL/6J receptores (10/grupo) retroorbitalmente con 100 µL de cualquiera de los vehículos (PBS), APC B incubadas con E7 (células 5M/ratón), APC B cargadas con E7 (células
- 20 5M)/mouse) o se inyecta por vía subcutánea en el flanco posterior izquierdo con E7 SLP (450 µg/mouse) + CpG (50 µg/ratón). En el día 28, los ratones con péptido solo se reforzaron con péptido subcutáneo de manera idéntica al día 14 (refuerzo). El crecimiento y la supervivencia del tumor TC-1 se midieron comenzando 1 semana después de la implantación del tumor dos veces por
- 25 semana y se compararon con el crecimiento del tumor en ratones no tratados durante hasta 80 días.

El crecimiento del tumor, medido por la fórmula $((\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2)$, no se vio afectado por el tratamiento con APC B pulsadas con péptidos en comparación con ratones no tratados (Fig. 27A). Curiosamente, los ratones tratados con APC B cargados con SQZ mostraron una inhibición del crecimiento del tumor rígido en comparación con las células B no tratadas y pulsadas con péptidos. Este efecto fue similar al efecto de la vacuna peptídica (SC SLP), a pesar del hecho de que la cantidad de péptido administrado a los ratones es mucho mayor que las APC B cargadas, y que el grupo de vacuna peptídica recibió un cebado y un impulso de la vacuna peptídica, mientras que el grupo SQZ B APC solo recibió una única dosis primaria. Las tendencias observadas con el crecimiento tumoral se correlacionaron con la supervivencia general, con los grupos de células B no tratados y pulsados con péptidos que tienen una supervivencia mediana equivalente (~ 36 días – derecha). Tanto la vacuna peptídica de dosis alta como las APC B cargadas con E7 tuvieron casi el doble de la supervivencia media con respecto a los otros dos grupos (60 [péptido] frente a 65,5 días [SQZ B APC]) (Fig. 27B). Estos datos muestran que las APC B cargadas por SQZ pueden inducir la regresión del tumor en un modelo terapéutico de cáncer asociado al VPH y que es igual o más efectiva que una dosis mucho más alta de una vacuna peptídica clásica.

20 Ejemplo 28

Con el fin de determinar la respuesta endógena a las células presentadoras de antígeno (APC) que se han cargado con antígeno mediante SQZ, los esplenocitos elaborados se cargaron con SQZ y los niveles de citoquinas inflamatorias se midieron mediante tinción intracelular de citoquinas (ICS).

25 Se aislaron esplenocitos murinos (Spleno APC) de ratones C56BL/6J y SQZ con 400 µg/ml de proteína Ova (Fig. 28B) o péptido VPH 16 E7 (20 µM – Fig. 28C), luego se inyectaron en los ratones donantes junto con 1 µM de CpG1826 (5

ratones/grupo). En el día 7, los esplenocitos se recogieron, se volvieron a estimular con Ins B9–23 y se realizó una tinción intracelular de citoquinas (ICS) para IFN- γ e IL–2 mediante citometría de flujo y se comparó con ratones no tratados.

- 5 Tanto para el antígeno modelo Ova (Fig. 28B) como para el VPH E7 relevante para la enfermedad (Fig. 28C), se encontró que los ratones tratados con Spleno APC exhibieron aumentos estadísticamente significativos tanto en IFN- γ como en IL–2 cuando –estimulado con Ova o E7 ($P < 0,005$ para todas las condiciones de APC en comparación con sus respectivas condiciones no tratadas). En conjunto,
- 10 estos datos muestran que los esplenocitos mixtos pueden diseñarse para obtener respuestas específicas de antígenos a múltiples antígenos in vivo.

Ejemplo 29

- Con el fin de determinar la capacidad de las células B cargadas con SQZ o de los esplenocitos mixtos para actuar como células presentadoras de antígeno (APC)
- 15 para el tratamiento terapéutico de los tumores, los ratones se trataron con APC cargados de esplenocitos, seguido de una inyección con TC–1 células tumorales. La inhibición del crecimiento tumoral se midió para evaluar la eficacia de la vacuna in vivo.

- En el día 0, las células tumorales TC–1 (50 k células/ratón) se inyectaron
- 20 subcutáneamente en el flanco derecho de ratones C56BL/6J (10 ratones/grupo). En el Día 9, los ratones se cebaron con células 1M/ratón de esplenocitos (Figura 28, SplenoAPC), los volúmenes de tumores se midieron a lo largo del tiempo y los ratones se sacrificaron en el Día 48 o cuando sus tumores alcanzaron > 1500 mm³, lo que ocurriera primero.

- 25 La capacidad de una vacuna de esplenocitos basada en el antígeno del VPH terapéutico para controlar el crecimiento del tumor TC–1, una línea conocida por expresar los antígenos del VPH E6 y E7, se probó cargando un SLP E7 en células

B o esplenocitos 9 días después de la implantación del tumor. El crecimiento del tumor se inhibió drásticamente en ambos ratones tratados con SplenoAPC, y el volumen promedio del tumor permaneció $<500 \text{ mm}^3$ durante la duración del estudio (Fig. 29A). La supervivencia de los ratones tratados con cualquiera de las APC también aumentó significativamente ($P < 0,0001$), y ninguno de los ratones tratados con SplenoAPC alcanzó el punto final humanitario antes del final del estudio (Fig. 29B). En conjunto, estos datos muestran que los esplenocitos cargados con antígeno a través de SQZ pueden actuar como una potente vacuna basada en APC para el tratamiento de tumores específicos para el antígeno.

10 Ejemplo 30

Con el fin de determinar la respuesta específica de antígeno in vitro a células presentadoras de antígeno humano (APC) que se han cargado con antígeno por SQZ, las células B o PBMC se cargaron con SQZ y los niveles de citoquinas inflamatorias se midieron por intracelular Tinción de citoquinas (ICS).

15 Se aislaron PBMC humanas de donantes HLA-A2+ y se incubó una HPP 16 E7 SLP (50 μM) con PBMC (Endo), o se administró mediante SQZ (SQZ). Las PBMC cargadas (60k células/pocillo) se cocultivaron luego con células T respondedoras Astarte E7 (30k células/pocillo) en una proporción de 2:1, y se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/mL) y CpG. 2006 (1 μM) durante 24h. Los sobrenadantes se recogieron y se analizaron para detectar IFN- γ mediante ELISA.

Las PBMC se probaron como APC para estimular una respuesta específica de antígeno de VPH E7 in vitro. Las APC de PBMC que estaban cargadas con antígeno estimularon las células respondedoras específicas de E7 para secretar IFN- γ a niveles mucho más altos que las células que se incubaron con antígeno ($P < 0,005$).

Tomados juntos, estos datos muestran que las PBMC humanas pueden actuar como APC eficientes para estimular las respuestas específicas de antígeno relevantes para la enfermedad in vitro.

Listado de secuencias

SEQ ID NO	Secuencia	Descripción
1	TIHDIILECV	VPH16–E6(29–38), epítopo humano
2	EVYDFAFRDL	VPH16–E6(48–57), epítopo murino
3	YMLDLQPETT	VPH16–E7(11–20), epítopo humano
4	RAHYNIVTF	VPH16–E7(49–57), epítopo murino
5	LPQL <u>S</u> TELQT	VPH16–E6(19–28) N– polipéptido terminal, humano
6	QLCTELQT	VPH16–E6(21–28) N– polipéptido terminal, humano
7	KQQLRR	VPH16–E6(41–47) N– polipéptido terminal, nativo murino
8	VYSKQQLRR	VPH16–E6(38–47) N– polipéptido terminal, murino clásico
9	MHGDPTLHE	VPH16–E7(1–10) N– polipéptido terminal,

		humano
10	GQAEPD	VPH16–E7(43–48) N– polipéptido terminal, murino
11	Y <u>S</u> KQQLLRREVYDFAF	VPH16–E6(39–54) C– polipéptido terminal, humano
12	YCKQQLL	VPH16–E6(39–45) C– polipéptido terminal, humano
13	CIVYRDGN	VPH16–E6(58–65) C– polipéptido terminal, nativo murino
14	SIVYRDGNPYAVSDK	VPH16–E6(58–72) C– polipéptido terminal, murino clásico
15	DLYCYEQLNDSSEEE	VPH16–E7(21–35) C– polipéptido terminal, humano
16	CCKCDSTLRLCVQSTHVDIR	VPH16–E7(58–77) C– polipéptido terminal, nativo murino
17	SSKSDSTLRLSVQSTHVDIR	VPH16–E7(58–77) C– polipéptido terminal, murino clásico
18	LPQLSTELQTTIHDIILECVYSKQQLLRREVYDFAF	VPH16–E6(19–54) SLP, humano

19	QLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLL	VPH16–E6(21–45) SLP, humano
20	KQQLLRREYDFAFRDLCIVYRDGN	VPH16–E6(41–65) SLP, nativo murino
21	VYSKQQLLRREYDFAFRDLSIVYRDGNPYAVSDK	VPH16–E6(38–72) SLP, murino clásico
22	MHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEE	VPH16–E7(1–35) SLP, humano
23	QLCTELQTYMLDLQPETTYCKQQLL	VPH16–E7.6 SLP, humano
24	GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR	VPH16–E7(43–77) SLP, nativo murino
25	GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR	VPH16–E7(43–77) SLP, murino clásico
26	ggGGTCAACGTTGAgggggg Bases mostradas en letras mayúsculas son fosfodiéster, y aquellas en letras minúsculas son fosforotioato	ODN 1585 (Clase A, específico de ratón)
27	ggGGGACGA:TCGTCggggggg Bases mostradas en letras mayúsculas son fosfodiéster, y aquellas en letras minúsculas son fosforotioato	ODN 2216 (Clase A, selectivo de humano)
28	gggGACGAC:GTCGTGggggggg Bases mostradas en letras mayúsculas son fosfodiéster, y aquellas en letras minúsculas son fosforotioato	ODN 2336 (Clase A, preferido humano)

29	tccatgacgttctctgatgct Bases mostradas en letras mayúsculas son fosfodiéster, y aquellas en letras minúsculas son fosforotioato	ODN 1668 (Clase B, específico de ratón)
30	tccatgacgttctctgacgtt Bases son fosforotioato	ODN 1826 (Clase B, específico de ratón)
31	tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt Bases son fosforotioato	ODN 2006 (Clase B, human selective)
32	tcg tcg ttg tcg ttt tgt cgt t Bases son fosforotioato	ODN 2007 (Clase B, bovino/porcino)
33	tcg acg ttc gtc gtt cgt cgt tc Bases son fosforotioato	ODN BW006 (Clase B, humano y ratón)
34	tcg cga cgt tcg ccc gac gtt cgg ta Bases son fosforotioato	ODN D–SL01 (Clase B, multiespecie)
35	tcgtcgttttcggcgc:gcgccg Bases son fosforotioato	ODN 2395 (Clase C, humano/ratón)
36	tcgtcgtcgttc:gaacgacgttgat Bases son fosforotioato	ODN M362 (Clase C, humano/ratón)
37	tcg cga acg ttc gcc gcg ttc gaa cgc gg Bases son fosforotioato	ODN D–SL03 (Clase C, multiespecie)
38	MHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEE	E7
39	LYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVT	E7
40	GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR	E7
41	TLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP	E7
42	MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHD	E6

43	LPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVY	E6
44	KQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGN	E6
45	RDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKI	E6
46	DKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTL	E6
47	HYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIR	E6
48	YGTTLLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEK	E6
49	RCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWT	E6
50	DKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL	E6

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> SQZ Biotechnologies Company
 <120> MÉTODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES ASOCIADAS CON VHP
 <130> 75032-20016.40
 10 <160> 51
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 15 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 20 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 <400> 1
 Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
 1 5 10
 25 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 35 <400> 2
 Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu
 1 5 10
 40 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 45 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 <400> 3
 Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
 50 1 5 10
 <210> 4
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 60 <400> 4
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 1 5
 65 <210> 5

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 5
 10 Leu Pro Gln Leu Ser Thr Glu Leu Gln Thr
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 20 <400> 6
 Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr
 1 5
 25 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 30 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 <400> 7
 35 Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg
 1 5
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Constructo sintético
 <400> 8
 Val Tyr Ser Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg
 1 5 10
 50 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 60 <400> 9
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
 1 5 10
 65 <210> 10
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Desconocido

 5 <220>
 <223> Virus de papiloma humano

 <400> 10
 Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 1 5
 10

 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Constructo sintético

 20 <400> 11
 Tyr Ser Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
 1 5 10 15

 25 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 30 <220>
 <223> Virus de papiloma humano

 <400> 12
 Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
 35 1 5

 <210> 13
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 45
 <400> 13
 Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn
 1 5

 50
 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Constructo sintético

 <400> 14
 60 Ser Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Ser Asp Lys
 1 5 10 15

 65 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Desconocido
 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 5
 <400> 15
 Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 10
 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 15
 <220>
 <223> Virus de papiloma humano
 <400> 16
 20 Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His
 1 5 10 15
 Val Asp Ile Arg
 20
 25
 <210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 17
 35 Ser Ser Lys Ser Asp Ser Thr Leu Arg Leu Ser Val Gln Ser Thr His
 1 5 10 15
 Val Asp Ile Arg
 20
 40
 <210> 18
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 18
 50 Leu Pro Gln Leu Ser Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile
 1 5 10 15
 Leu Glu Cys Val Tyr Ser Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr
 20 25 30
 Asp Phe Ala Phe
 35
 55
 <210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 60
 <400> 19
 65

Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu
 1 5 10 15
 Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
 20 25
 5
 <210> 20
 <211> 25
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 20
 Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp
 1 5 10 15
 Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn
 20 25
 20
 <210> 21
 <211> 35
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 30 <400> 21
 Val Tyr Ser Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala
 1 5 10 15
 Phe Arg Asp Leu Ser Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val
 20 25 30
 35 Ser Asp Lys
 35
 40 <210> 22
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Constructo sintético
 <400> 22
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 50 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30
 Glu Glu Glu
 35
 55
 <210> 23
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 23
 65 Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
 1 5 10 15

Thr Thr Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
20 25

5 <210> 24
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 24
Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
1 5 10 15
Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
20 25 30
Asp Ile Arg
35

20

<210> 25
<211> 35
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

30 <400> 25
Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Ser
1 5 10 15
Ser Lys Ser Asp Ser Thr Leu Arg Leu Ser Val Gln Ser Thr His Val
20 25 30
35 Asp Ile Arg
35

40 <210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 26
ggggtcaacg ttgagggggg 20

50 <210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 27
gggggacgat cgtcgggggg 20

60 <210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>

	<223> Constructo sintético	
	<400> 28	
5	ggggacgacg tcgtgggggg g	21
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Constructo sintético	
	<400> 29	
15	tccatgacgt tcctgatgct	20
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Constructo sintético	
	<400> 30	
25	tccatgacgt tcctgacgtt	20
	<210> 31	
	<211> 24	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Constructo sintético	
35	<400> 31	
	tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt	24
	<210> 32	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Constructo sintético	
	<400> 32	
	tcgtcgttgt cgttttgtcg tt	22
50	<210> 33	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Constructo sintético	
	<400> 33	
60	tcgacgttcg tcgttcgtcg ttc	23
	<210> 34	
	<211> 26	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223> Constructo sintético
 <400> 34
 5 tcgcgacgtt cgcccgacgt tcggta 26
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 35
 15 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22
 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 36
 25 tcgtcgtcgt tcgaacgacg ttgat 25
 <210> 37
 <211> 29
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 35 <400> 37
 tcgcgaacgt tcgccgcgtt cgaacgcgg 29
 <210> 38
 40 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Constructo sintético
 <400> 38
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 50 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30
 Glu Glu Glu
 35
 55 <210> 39
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 39
 65 Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu
 1 5 10 15

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Constructo sintético

 <400> 48
 Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu
 1 5 10 15
 10 Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys
 20 25 30

 <210> 49
 15 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Constructo sintético

 <400> 49
 Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg
 1 5 10 15
 25 His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr
 20 25 30

 <210> 50
 30 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Constructo sintético

 <400> 50
 Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg
 1 5 10 15
 40 Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 20 25 30

 <210> 51
 45 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Constructo sintético

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
 55 <223> Xaa = cualquier aminoácido

 <400> 51
 Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 60 Xaa Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
 20

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

- 5 1. Un método para tratar una enfermedad asociada con el virus del papiloma humano (VPH) en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno del VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente.
- 10 2. Un método para prevenir una enfermedad asociada al VPH en un individuo, el método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante es presentado intracelularmente.
- 15 3. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno del VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta
20 intracelularmente.
- 25 4. Un método para tratar una enfermedad asociada a VPH en un individuo, el método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante es presentado intracelularmente;
en el que las células inmunes modificadas se preparan al

- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el
- 5 antígeno y el adyuvante pasen para formar una célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada;
- generando así las células inmunes modificadas.
- 10 5. Un método para prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, el método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante es presentado intracelularmente;
- 15 en el que las células inmunes modificadas se preparan al
- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el
- 20 antígeno del VPH y el adyuvante pasen para formar una célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada;
- 25 generando así las células inmunes modificadas.
6. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al

individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno del VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente;

- 5 en el que las células inmunes modificadas se preparan al
 - a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada que comprende un antígeno de VPH a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula
 - 10 de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el adyuvante pasen para formar una célula de entrada perturbada; y
 - b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH y el adyuvante entren en la célula de entrada perturbada;
- 15 generando así las células inmunes modificadas.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4–7, en el que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% al 99% del diámetro
- 20 de la célula.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4–8, en el que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4–9, en el que la
- 25 constricción está en un canal.

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4–10, en el que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa a través de la constricción.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1–11, en el que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–12, en el que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–13, en el que la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en el exterior de la célula.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–14, en el que la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–15, en el que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4–16, en el que la relación de antígeno de VPH a adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 3 ó 6, en el que se mejora la respuesta inmune.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que se mejora la respuesta inmune al antígeno de VPH.
20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–19, en el que el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el adyuvante es CpG ODN.
22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.
- 5 23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–22, en el que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1–23, en el que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.
- 10 25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.
26. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–25, en el que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de
- 15 VPH y una o más secuencias de péptidos heterólogos.
27. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–26, en el que el antígeno de VPH se compleja consigo mismo, con otros antígenos, o con el adyuvante.
28. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–27, en el que
- 20 el VPH es antígeno se deriva de un lisado celular.
29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–28, en el que el antígeno de VPH es un antígeno de VPH–16 o de VPH–18.
30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en el que el antígeno de VPH comprende un epítipo específico de HLA–A2.
- 25 31. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–30, en el que el antígeno de VPH es un antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH.

32. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–31, en el que la célula inmune modificada comprende un antígeno E6 de VPH y un antígeno E7 de VPH.
- 5 33. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–32, en el que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas.
34. El método de acuerdo con la reivindicación 33, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con
10 cualquiera de las SEQ ID NO: 18–26.
35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.
36. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–35, en el que
15 el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido de clase I de MHC.
37. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–36, en el que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.
- 20 38. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–37, en el que la célula inmune modificada comprende el adyuvante en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
39. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–38, en el que la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración
25 entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

40. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–39, en el que la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.
41. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–40, en el que
5 la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente.
42. El método de acuerdo con la reivindicación 41, en el que el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor.
- 10 43. El método de acuerdo con la reivindicación 41, en el que el agente es albúmina.
44. El método de acuerdo con la reivindicación 43, en el que la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana.
45. El método de acuerdo con la reivindicación 41, en el que el agente es un
15 catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D–sacarosa, PEG1500, L–arginina, L–glutamina o EDTA.
46. El método de acuerdo con la reivindicación 41, en el que el agente comprende albúmina de suero de ratón (MSA).
47. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–46, en el que
20 las células inmunes modificadas se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras.
48. Método según la reivindicación 47, en el que la molécula coestimuladora es B7–H2, B7–1, B7–2, CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4–1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112.
- 25 49. El método de las reivindicaciones 47 o 48, en el que la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1–49, en el que la célula inmune es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, un basófilo o una célula precursora hematopoyética.
51. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–50, en el que la célula inmune no es una célula B.
52. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–50, en el que la célula inmune es una célula B.
53. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–51, en el que la célula inmune es una célula T.
54. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–49, en el que las células inmunes son una población de células mixtas.
55. El método de acuerdo con la reivindicación 54, en el que las células inmunes son una pluralidad de PBMC.
56. El método de acuerdo con la reivindicación 53, en el que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I.
57. El método de acuerdo con la reivindicación 53, en el que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II.
58. El método de acuerdo con la reivindicación 56 ó 57, en el que la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.
59. El método de acuerdo con la reivindicación 56 ó 57, en el que la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II

utilizando ARNsi, ARNhc, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa.

60. El método de acuerdo con la reivindicación 56 ó 57, en el que la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

61. El método de acuerdo con la reivindicación 56 ó 57, en el que la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II usando ARN o ADN plasmídico.

62. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 53 y 56–59, en el que una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional.

63. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 53 y 56–59, en el que la vida media circulante de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media circulante de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que fueron administrados.

64. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 53 y 56–63, en el que la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria, células CIK y células T natural killer.

65. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 53 y 56–63, en el que la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$.

66. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–65, en el que la célula modificada es alogénica para el individuo.
67. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–65, en el que la célula modificada es autóloga para el individuo.
- 5 68. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–67, en el que el individuo está precondicionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.
69. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–68, que comprende además administrar al individuo un adyuvante.
- 10 70. El método de acuerdo con la reivindicación 69, en el que el adyuvante es IFN α o CpG ODN.
71. El método de acuerdo con la reivindicación 69 ó 70, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran simultáneamente.
- 15 72. El método de acuerdo con la reivindicación 69 ó 70, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran secuencialmente.
73. El método de acuerdo con la reivindicación 72, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el
- 20 adyuvante.
74. El método de acuerdo con la reivindicación 72, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante.
75. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–74, en el que
- 25 la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra en combinación con la administración de un inhibidor del punto de control inmune.

76. El método de acuerdo con la reivindicación 75, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran simultáneamente.
77. El método de acuerdo con la reivindicación 75, en el que la composición que
5 comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran secuencialmente.
78. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el inhibidor del punto de control inmune.
- 10 79. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del inhibidor del punto de control inmune.
80. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 75–79, en el que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD–1, PD–
15 L1, CTLA–4, LAG3, TIM–3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7–H4 (VTCN1) o BTLA.
81. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–80, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra en combinación con la administración de una quimioterapia.
82. El método de acuerdo con la reivindicación 81, en el que la composición que
20 comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran simultáneamente.
83. El método de acuerdo con la reivindicación 81, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran secuencialmente.
- 25 84. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar la quimioterapia.

85. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración de la quimioterapia.
- 5 86. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 81 a 85, en el que la quimioterapia comprende un agente basado en platino.
87. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 81 a 86, en el que la quimioterapia comprende cisplatino.
88. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–87, en el que la administración de la composición que comprende las células inmunes
10 modificadas al individuo da como resultado la activación y/o expansión de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH.
89. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–87, en el que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas al individuo da como resultado la activación y/o expansión de células
15 T helper (Th) específicas para el antígeno.
90. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–89, en el que la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas.
91. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–90, en el que
20 el método comprende múltiples administraciones de la composición que comprende las células inmunes modificadas.
92. El método de acuerdo con la reivindicación 91, en el que el método comprende una primera administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas, seguida de una segunda administración de la
25 composición que comprende las células inmunes modificadas.

93. El método de acuerdo con la reivindicación 92, en el que la segunda administración es aproximadamente un mes después de la primera administración.
94. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–93, en el que
5 la enfermedad asociada a VPH es un cáncer asociado a VPH.
95. El método de acuerdo con la reivindicación 94, en el que el cáncer asociado al VPH es cáncer cervical, cáncer anal, cáncer orofaríngeo, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de piel o cáncer de cabeza y cuello.
96. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–95, en el que
10 la enfermedad asociada a VPH es una enfermedad infecciosa asociada a VPH.
97. Un método para tratar una enfermedad relacionada con el virus del papiloma humano (VPH) en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno del VPH que
15 comprende un amino ácido con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.
98. Un método para prevenir una enfermedad asociada al VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las
20 células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25.
99. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al
25 individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un

antígeno del VPH que comprende un aminoácido secuencia con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.

100. Un método para tratar una enfermedad asociada con VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25;

en el que las células inmunes modificadas se preparan al

- 10 a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno pase para formar una célula de entrada perturbada; y
 - 15 b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;
- generando así las células inmunes modificadas.

101. Un método para prevenir una enfermedad asociada al VPH en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25;

en el que las células inmunes modificadas se preparan al

- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el
- 5 antígeno del VPH pase para formar una célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;
- generando así las células inmunes modificadas.
- 10 102. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno del VPH que comprende un aminoácido secuencia con al menos un 90%
- 15 de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25;
- en el que las células inmunes modificadas se preparan al
- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando
- 20 así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH pase para formar una célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;
- 25 generando así las células inmunes modificadas.
103. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100–102, en el que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.

104. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100–103, en el que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% al 99% del diámetro de la célula.
105. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100–104, en el
5 que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.
106. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100–105, en el que la constricción está en un canal.
107. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100–106, en el
10 que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa a través de la constricción,
108. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 86–107, que además comprende administrar al individuo un adyuvante.
109. El método de acuerdo con la reivindicación 108, en el que el adyuvante es
15 IFN α o CpG ODN.
110. El método de acuerdo con la reivindicación 108 o 109, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administra simultáneamente.
111. El método de acuerdo con la reivindicación 108 o 109, en el que la
20 composición que comprende las células inmunes modificadas y el adyuvante se administran secuencialmente.
112. El método de acuerdo con la reivindicación 111, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el adyuvante.
- 25 113. El método de acuerdo con la reivindicación 111, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del adyuvante.

114. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–113, en el que la célula inmune modificada comprende además un adyuvante.
115. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100–113, en el que la célula inmune perturbada de la etapa b se incuba con el antígeno de VPH y un adyuvante.
116. El método de acuerdo con la reivindicación 114 ó 115, en el que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.
117. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 114–116, en el que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula.
118. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 114–117, en el que la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en el exterior de la célula.
119. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 115–118, en el que la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
120. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 115–119, en el que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
121. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 115–120, en el que la relación de antígeno de VPH a adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.
122. El método de acuerdo con la reivindicación 99 ó 102, en el que se mejora la respuesta inmune.
123. El método de acuerdo con la reivindicación 122, en el que se mejora la respuesta inmune al antígeno de VPH.

124. El método de cualquiera de las reivindicaciones 114–123, en donde el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.
125. El método de acuerdo con la reivindicación 124, en el que el adyuvante es
5 CpG ODN.
126. El método de acuerdo con la reivindicación 125, en el que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.
127. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 114–126, en el que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.
- 10 128. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–127, en el que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.
129. El método de acuerdo con la reivindicación 128, en el que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia
15 otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.
130. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–129, en el que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo de VPH antigénico y una o más secuencias de péptidos heterólogos.
131. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–130, en el
20 que el antígeno de VPH se compleja con él mismo, con otros antígenos, o con el adyuvante.
132. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–131, en el que el antígeno de VPH está compuesto por un epítipo específico de HLA-A2.
133. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–132, en el
25 que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido de clase I de MHC.

134. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–133, en el que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.
135. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 114–134, en el
5 que la célula inmune modificada comprende el adyuvante a una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
136. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–135, en el que la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
- 10 137. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 114–136, en el que la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.
138. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–137, en el que la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la
15 viabilidad y/o la función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente.
139. El método de acuerdo con la reivindicación 138, en el que el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor.
140. El método de acuerdo con la reivindicación 138, en el que el agente es
20 albúmina.
141. El método de acuerdo con la reivindicación 140, en el que la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana.
142. El método de acuerdo con la reivindicación 138, en donde el agente es un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D–sacarosa,
25 PEG1500, L–arginina, L–glutamina o EDTA.
143. El método de acuerdo con la reivindicación 138, en el que el agente comprende MSA.

144. La célula T modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–143, en la que las células se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras.
145. La célula T modificada de acuerdo con la reivindicación 144, en la que la
5 molécula coestimuladora es B7–H2 (ICOSL), B7–1 (CD80), B7–2 (CD86), CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4–1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112.
146. La célula T modificada de las reivindicaciones 144 ó 145, en la que la célula comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión
10 de una o más moléculas coestimuladoras.
147. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–146, en el que la célula inmune es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, un basófilo o una célula precursora
15 hematopoyética.
148. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–147, en el que la célula inmune no es una célula B.
149. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–148, en el que la célula inmune es una célula B.
- 20 150. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–148, en el que la célula inmune es una célula T.
151. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–148, en el que la célula inmune es una población de células mixtas.
152. El método de acuerdo con la reivindicación 151, en el que la célula inmune
25 es una pluralidad de PBMC.

- 153 El método de acuerdo con la reivindicación 150, en el que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I.
154. El método de acuerdo con la reivindicación 150, en el que la célula T
5 comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II.
155. El método de acuerdo con la reivindicación 153 ó 154, en el que la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de clase I y/o clase II de MHC.
- 10 156. El método de acuerdo con la reivindicación 153 ó 154, en el que la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNh_c, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una megafliceasa.
157. El método de acuerdo con la reivindicación 153 ó 154, en el que la célula T
15 comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.
158. El método de acuerdo con la reivindicación 153 ó 154, en el que la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II usando ARN o ADN plasmídico.
- 20 159. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150 y 153–156, en el que una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T
25 modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional.
160. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150 y 153–156, en el que la vida media circulante de las células T modificadas adicionales en un

individuo al que se administraron se modula en comparación con la vida media circulante de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que fueron administrados.

5 161. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150 y 153–160, en el que la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK y las células T natural killer.

162. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150 y 153–160, en el que la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las
10 células T $\gamma\delta$.

163. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–162, en el que la célula modificada es alogénica para el individuo.

164. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–162, en el que la célula modificada es autóloga para el individuo.

15 165. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–164, en el que el individuo está preconditionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.

166. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–165, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se
20 administra en combinación con la administración de un inhibidor del punto de control inmune.

167. El método de acuerdo con la reivindicación 166, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran simultáneamente.

25 168. El método de acuerdo con la reivindicación 166, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y el inhibidor del punto de control inmune se administran secuencialmente.

169. El método de acuerdo con la reivindicación 168, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar el inhibidor del punto de control inmune.
170. El método de acuerdo con la reivindicación 168, en el que la composición
5 que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración del inhibidor del punto de control inmune.
171. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 152–156, en el que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD–1, PD–L1, CTLA–4, LAG3, TIM–3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7 –H4 (VTCN1) o BTLA.
- 10 172. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–171, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra en combinación con la administración de una quimioterapia.
173. El método de acuerdo con la reivindicación 172, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran
15 simultáneamente.
174. El método de acuerdo con la reivindicación 172, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas y la quimioterapia se administran secuencialmente.
175. El método de acuerdo con la reivindicación 174, en el que la composición
20 que comprende las células inmunes modificadas se administra antes de administrar la quimioterapia.
176. El método de acuerdo con la reivindicación 174, en el que la composición que comprende las células inmunes modificadas se administra después de la administración de la quimioterapia.
- 25 177. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 172 a 176, en el que la quimioterapia comprende cisplatino.

178. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–177, en el que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas al individuo da como resultado la activación y/o expansión de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH.
- 5 179. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–177, en el que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas al individuo da como resultado la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno de VPH.
180. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–179, en el
10 que la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas.
181. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–180, en el que el método comprende múltiples administraciones de la composición que comprende las células inmunes modificadas.
- 15 182. El método de acuerdo con la reivindicación 181, en el que el método comprende una primera administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas, seguida de una segunda administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas.
183. El método de acuerdo con la reivindicación 182, en el que la segunda
20 administración es aproximadamente un mes después de la primera administración.
184. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 97–183, en el que la enfermedad asociada al VPH es un cáncer asociado al VPH.
185. El método de acuerdo con la reivindicación 184, en el que el cáncer asociado
25 con VPH es cáncer cervical, cáncer anal, cáncer orofaríngeo, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de pene, cáncer de piel o cáncer de cabeza y cuello.

186. Una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un CpG ODN y un antígeno de VPH con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.
- 5 187. La composición de acuerdo con la reivindicación 166, en la que el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.
188. La composición de acuerdo con la reivindicación 186 ó 187, en la que las células inmunes modificadas se preparan por
- 10 a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH y el CpG ODN pasen para formar una célula de entrada
- 15 perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el ODN CpG durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el ODN CpG ingresen en la célula de entrada perturbada; generando así las células inmunes modificadas.
- 20 189. La composición de acuerdo con la reivindicación 188, en la que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.
190. La composición de acuerdo con la reivindicación 188 ó 189, en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula.
- 25 191. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 188–190, en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.

192. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 188–191, en la que la constricción está en un canal.
193. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 188–192, en la que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa
5 a través de la constricción,
194. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–193, en donde la composición comprende además un adyuvante.
195. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 186–194, en la que el antígeno de VPH y/o el CpG ODN están presentes en el citosol y/o endosomas.
- 10 196. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–195, en la que el antígeno y/o el CpG ODN están presentes en múltiples compartimentos de la célula.
197. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–196, en la que la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH
15 y/o un ODN CpG en la superficie de la célula.
198. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 188–197, en la que la concentración de ODN CpG incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
199. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 188–198,
20 en la que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
200. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 188–199, en la que la relación de antígeno de VPH a CpG ODN incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente
25 1:10000.
201. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–200, en la que CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

202. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–201, en la que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.
203. La composición de acuerdo con la reivindicación 202, en la que el adyuvante comprende CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.
- 5 204. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 186–203, en la que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.
205. La composición de acuerdo con la reivindicación 204, en la que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida
- 10 hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.
206. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–205, en la que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de VPH y una o más secuencias de péptidos heterólogos.
207. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–206,
- 15 en donde el antígeno de VPH se compleja con él mismo, con otros antígenos, con un adyuvante o con el CpG ODN.
208. La composición de acuerdo con la reivindicación 186–207, en la que el antígeno de VPH comprende un epítipo específico de HLA-A2.
209. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–208,
- 20 en la que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas.
210. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–209, en la que la célula inmune modificada comprende el ODN CpG en una
- 25 concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

211. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–210, en donde la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
212. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–211,
5 en la que la relación del antígeno de VPH a la ODN de CpG está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.
213. Una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH, en donde el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un
10 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.
214. La composición de acuerdo con la reivindicación 213, en la que el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.
215. La composición de acuerdo con la reivindicación 213 o 214, en la que las
15 células inmunes modificadas se preparan mediante
- a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el
20 antígeno del VPH pase para formar una célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;
generando así las células inmunes modificadas.
- 25 216. La composición de acuerdo con la reivindicación 215, en la que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.

217. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 215–216, en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula.
- 218 La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 215–217,
5 en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.
219. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 215–218, en la que la constricción está en un canal.
220. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 215–219,
10 en la que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa a través de la constricción.
221. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–220, en donde la composición comprende además un adyuvante.
222. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 213–221, en la que el
15 antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.
223. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–222, en la que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la célula.
224. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–223,
20 en la que la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un adyuvante en la superficie de la célula.
225. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 215–224, en la que la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
- 25 226. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 215–225, en la que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

227. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 215–226, en la que la relación de antígeno de VPH a adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.
- 5 228. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–227, en donde el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.
229. La composición de acuerdo con la reivindicación 228, en la que el adyuvante es CpG ODN.
- 10 230. La composición de acuerdo con la reivindicación 229, en la que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.
231. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–230, en la que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.
232. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 213–231, en la que el
- 15 antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.
233. La composición de acuerdo con la reivindicación 232, en la que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.
- 20 234. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–233, en donde el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo de VPH antigénico y una o más secuencias de péptidos heterólogos.
235. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–234, en donde el antígeno de VPH se compleja con él mismo, con otros antígenos, o
- 25 con el adyuvante.
236. La composición de acuerdo con la reivindicación 213–235, en la que el antígeno de VPH comprende un epítipo específico de HLA-A2.

237. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–236, en la que la célula inmune modificada comprende el adyuvante en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
238. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–237,
5 en la que la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
239. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 213–238, en la que la relación del antígeno de VPH al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.
- 10 240. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–239, en la que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido de clase I de MHC.
241. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–240, en donde el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido
15 por MHC de clase II.
242. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–241, en donde la célula inmune modificada comprende además un agente que mejora la viabilidad y/o función de la célula inmune modificada en comparación con una célula inmune modificada correspondiente que no comprende el agente.
- 20 243. La composición de acuerdo con la reivindicación 242, en la que el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor.
244. La composición de acuerdo con la reivindicación 242, en la que el agente es albúmina.
245. La composición de acuerdo con la reivindicación 244, en la que la albúmina
25 es albúmina de ratón, bovina o humana.

246. La composición de acuerdo con la reivindicación 242, en la que el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina o EDTA.
247. La composición de acuerdo con la reivindicación 242, en la que el agente
5 comprende MSA.
248. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186-247, en la que las células se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras.
249. La composición de acuerdo con la reivindicación 248, en la que la molécula
10 coestimuladora es B7-H2 (ICOSL), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4-1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112.
250. La composición de las reivindicaciones 248 o 249, en la que la célula
15 comprende un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.
251. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186-250, en la que la célula inmune es una célula T, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago, una célula mieloide, un granulocito, un neutrófilo, un mastocito, una célula natural killer, una célula linfoide innata, un basófilo o una célula precursora
20 hematopoyética.
252. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186-251, en la que la célula inmune no es una célula B.
253. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186-252, en la que la célula inmune es una célula T.
254. La composición de acuerdo con la reivindicación 253, en la que la célula T
25 comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I.

255. La composición de acuerdo con la reivindicación 253, en la que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II.
- 5 256. La composición de acuerdo con la reivindicación 254 ó 255, en la que la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.
- 10 257. La composición de acuerdo con la reivindicación 254 ó 255, en donde la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNsh, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa.
258. La composición de acuerdo con la reivindicación 254 ó 255, en la que la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.
- 15 259. La composición de acuerdo con la reivindicación 254 ó 255, en donde la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico.
- 20 260. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 253–257, en la que una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional.
- 25 261. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 253–257, en la que la vida media circulante de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron está modulada en comparación con la vida media circulante de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que fueron administrados.

262. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 253–261, en la que la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK y las células T natural killer.
263. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 253–261,
5 en la que la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$.
264. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–263, en la que la célula modificada es alogénica para un individuo.
- 10 265. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–263, en la que la célula modificada es autóloga para un individuo.
266. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–265, en la que un individuo está preconditionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.
- 15 267. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–266, en donde la composición comprende además un inhibidor del punto de control inmune.
268. La composición de acuerdo con la reivindicación 267, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD–1, PD–L1, CTLA–4,
20 LAG3, TIM–3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7–H4 (VTCN1) o BTLA.
269. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–268, en la que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a un individuo da como resultado la activación y/o expansión de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH.
- 25 270. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–268, en la que la administración de la composición que comprende las células inmunes

modificadas a un individuo da como resultado la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno.

271. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–270, en la que la cantidad eficaz de la composición comprende entre aproximadamente
5 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células inmunes modificadas.

272. Una composición que comprende un antígeno, en donde el antígeno comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.

273. La composición de acuerdo con la reivindicación 272, en donde el antígeno
10 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

274. Un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada al VPH en un individuo, el método que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante,
15 en donde el adyuvante se presenta intracelularmente;

en el que las células inmunes modificadas se preparan al

a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada que comprende un antígeno de VPH a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de
20 la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno y el adyuvante pasen para formar una célula de entrada perturbada; y

b) incubar la célula de entrada perturbada con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante entre en la célula de entrada perturbada;
25 generando así las células inmunes modificadas.

275. Un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a VPH en un individuo, el método que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz

de una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH y un adyuvante, en donde el adyuvante se presenta intracelularmente;

en el que las células inmunes modificadas se preparan al

- 5 a) pasar una suspensión celular que comprende una célula de entrada que comprende el adyuvante a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula de entrada lo suficientemente grandes para que el antígeno del VPH pase para formar una
- 10 célula de entrada perturbada; y
- b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno del VPH durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno del VPH ingrese en la célula de entrada perturbada;
- generando así las células inmunes modificadas.
- 15 276. El método de acuerdo con la reivindicación 274 ó 275, en el que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.
277. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–276, en el que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% al 99% del diámetro de la célula.
- 20 278. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–277, en el que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.
279. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–278, en el que la constricción está en un canal.
- 25 280. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–279, en el que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa a través de la constricción.

281. El método de cualquiera de las reivindicaciones 274–280, en el que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas.
282. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–281, en el que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de la
5 célula.
283. El método de acuerdo con la reivindicación 274, en el que la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
284. El método de acuerdo con la reivindicación 275, en el que la concentración
10 de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
285. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–285, en el que el adyuvante es CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.
- 15 286. El método de acuerdo con la reivindicación 285, en el que el adyuvante es CpG ODN.
287. El método de acuerdo con la reivindicación 286, en el que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.
288. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–287, en el
20 que el antígeno de VPH se deriva de un lisado celular.
289. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–288, en el que el antígeno de VPH es un antígeno de VPH–16 o de VPH–18.
290. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 274–289, en el que el antígeno de VPH es un antígeno E6 de VPH o un antígeno E7 de VPH.
- 25 291. El método de acuerdo con la reivindicación 290, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.

292. El método de acuerdo con la reivindicación 289, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.
293. El método de acuerdo con la reivindicación 290, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.
294. El método de acuerdo con la reivindicación 290, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.
295. Un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con el VPH en un individuo que comprende administrar al individuo una célula inmune modificada asociada con un antígeno del VPH, en donde la célula inmune modificada se prepara mediante un proceso que comprende los pasos de:
- a) incubar una célula de entrada con el antígeno de VPH y/o un adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH se asocie con la célula de entrada;
- generando así la célula inmune modificada asociada con el antígeno.
296. El método de acuerdo con la reivindicación 295, en el que el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.
297. El método de acuerdo con la reivindicación 296, en el que el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.
298. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 295–297, en el que el adyuvante es CpG ODN.
299. El método de acuerdo con la reivindicación 298, en el que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

300. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–273 para uso como un medicamento.
- 5 301. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–273 para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía, terapia o diagnóstico.
- 10 302. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–273 para usar en el tratamiento de un cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad asociada a virus.
- 15 303. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186–273, en donde el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer vulvar, cáncer vaginal, cáncer de pene, cáncer anal, cáncer perianal, cáncer anogenital, cáncer oral o cáncer de saliva.
- 20 304. Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 300–303, en la que las PBMC modificadas se administran antes, simultáneamente o después de la administración de un inhibidor del punto de control inmune.
305. La composición de acuerdo con la reivindicación 304, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno cualquiera de PD–1, PD–L1, CTLA–4, LAG3, VISTA y TIM–3.
- 25 306. La composición de acuerdo con la reivindicación 305, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a PD–1.
307. La composición de acuerdo con la reivindicación 305, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a PD–L1.

308. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 300–307, en la que las PBMC modificadas se administran antes, simultáneamente o después de la administración de un agente terapéutico.

309. La composición de acuerdo con la reivindicación 308, en la que el agente
5 terapéutico es un agente quimioterapéutico.

310. La composición de acuerdo con la reivindicación 309, en la que la enfermedad infecciosa está asociada con VIH, VPH, EBV, MCV, HBV o HCV.

p.p.: SQZ BIOTECHNOLOGIES COMPANY

RESUMEN

La presente solicitud proporciona células inmunes que comprenden un antígeno del VPH y un adyuvante, métodos para fabricar dichas células inmunes modificadas y métodos para usar dichas células inmunes modificadas para tratar una enfermedad asociada al VPH, prevenir una enfermedad asociada al VPH y/o para modular una respuesta inmune en un individuo con una enfermedad asociada al VPH.