

SUMINISTRO INTRACELULAR DE BIOMOLÉCULAS PARA MODIFICAR
RESPUESTAS INMUNES

REFERENCIA CRUZADA SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad correspondiente a la Solicitud Provisional de
5 EE. UU. N.º 62/641.987, presentada el 12 de marzo de 2018, de la Solicitud
Provisional de EE. UU. N.º 62/738.941, presentada el 28 de septiembre de 2018,
de la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 62/794.516, presentada el 18 de enero
2019; que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La presente divulgación se refiere en términos generales a células T que
comprenden un antígeno y/o un adyuvante, métodos para fabricar tales células T,
y métodos para utilizar tales células T, tales como para la modulación de una
respuesta inmune en un individuo.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inmunoterapia puede dividirse 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, anticuerpos terapéuticos
20 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 DCs
autólogas como vehículos para la administración de antígenos tumorales e infusión
25 de moduladores del punto de control inmunitario. Véase Papaioannou, Nikos E., et
al. *Annals of translational medicine* 4.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ y las células T (Th) helper CD4⁺ estimuladas por antígenos asociados a la enfermedad tienen el potencial de atacar y destruir las células enfermas; sin embargo, los métodos actuales para inducir respuestas de células T endógenas se han encontrado con problemas.

- 5 Todas las referencias mencionadas en la presente, inclusive solicitudes de patente y publicaciones, se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

- En algunos aspectos, la invención proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno es exógeno con
10 respecto a la célula T modificada y comprende un epítipo inmunogénico, y donde el adyuvante se halla presente intracelularmente. En algunas formas de realización, la invención proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID NO: 18–25.
- 15 En algunos aspectos, la invención proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, preparado mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada a través de una constricción de deformación celular, en donde un
20 diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada en la suspensión, con lo cual se ocasiona perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para hacer que el antígeno y el adyuvante pasen de manera de formar una célula T ingresada perturbada; y b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el antígeno y el adyuvante durante un
25 tiempo suficiente para permitir que el antígeno y el adyuvante ingresen en la célula T ingresada perturbada; con lo cual se genera la célula T modificada y que comprende el antígeno y el adyuvante. En algunas formas de realización, la

concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM y/o la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la relación entre el antígeno y el adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 10000:1 a aproximadamente 1:10000.

En algunos aspectos, la invención proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, preparado mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada 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 T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que el antígeno siga de manera de formar una célula T perturbada; y b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera la célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

En algunos aspectos, la invención proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, preparado mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada que comprende el antígeno a través de una constricción deformadora

- de las células, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que el adyuvante pase de manera de formar una célula T ingresada perturbada; y b)
- 5 someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera la célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante. En algunas formas de realización, la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de
- 10 entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.
- En algunas formas de realización, se aplica una fuerza deformadora a la célula T ingresada a medida que pasa a través de la constricción, con lo cual se ocasionan las perturbaciones en la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el procesos incluye además la etapa de someter a incubación la célula T ingresada
- 15 y/o la célula T modificada con un agente que refuerce la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con la correspondiente célula T modificada, preparada sin la etapa de incubación adicional. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que refuerza la endocitosis, o actúa como un agente de estabilización o un cofactor. En algunas formas de realización, el diámetro de la
- 20 constricción es inferior al diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente 99% del diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente 60% del diámetro de la célula T ingresada.
- 25 En algunas formas de realización, el antígeno y/o el adyuvante se hallan presentes en el citosol y/o en una vesícula de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la vesícula es un endosoma. En algunas formas de realización, el

antígeno y/o el adyuvante se hallan presentes en múltiples compartimientos de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el antígeno o el epítipo inmunogénico están unidos a la superficie de la célula T modificada.

En algunas formas de realización, el adyuvante es un oligodesoxinucleótido CpG (ODN), IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I, o poli I:C. En algunas formas de realización, el adyuvante es un CpG ODN. En algunas formas de realización, el CpG ODN es un CpG ODN de Clase A, ASE, un CpG ODN de Clase B, o un C CpG ODN de Clase C.

En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de péptidos o ARNm aislado a partir de una célula enferma. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un no autoantígeno. En algunas formas de realización, en donde el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno de tumor, antígeno viral, antígeno bacteriano, o antígeno fúngico. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno de papilomavirus humano (HPV, human papillomavirus). En algunas formas de realización, el HPV es HPV-16 o HPV-18. En algunas formas de realización, el antígeno comprende un péptido HLA-A2-restringido del derivado de HPV E6 y/o E7. En algunas formas de realización, el péptido restringido en HLA-A2 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-4. En algunas formas de realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18-25. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende una pluralidad de antígenos que comprende una pluralidad de epítipos inmunogénicos. En algunas formas de realización, después de haber administrado a un individuo la célula T modificada que comprende la pluralidad de antígenos que comprende la pluralidad de epítipos inmunogénicos, ninguno de entre la pluralidad de epítipos inmunogénicos disminuye una respuesta

inmune en el individuo con respecto a cualquiera de los otros epítomos
 inmunogénicos. En algunas formas de realización, el antígeno es un polipéptido y
 el epítomo inmunogénico es un epítomo de péptido inmunogénico. En algunas
 formas de realización, el epítomo de péptido inmunogénico está fusionado a un
 5 polipéptido que flanquea una terminal N y/o un polipéptido que flanquea una
 terminal C. En algunas formas de realización, el antígeno es un polipéptido que
 comprende un epítomo péptido inmunogénico y una o más secuencias péptidas
 heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno es un polipéptido que
 comprende un epítomo péptido inmunogénico que está flanqueado en el terminal N
 10 y en el terminal por secuencias péptido heterólogas. En algunas formas de
 realización, las secuencias péptido heterólogas flanqueantes derivan de péptidos
 inmunogénicos asociados la enfermedad. En algunas formas de realización, el
 polipéptido que flanquea el terminal N comprende la secuencia de aminoácidos de
 cualquiera de las SEQ ID NOs: 5–10 y/o el polipéptido que flanquea una terminal C
 15 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 11–17.
 En algunas formas de realización, el antígeno es apto para ser procesado de
 manera de obtener un péptido restringido de MHC de clase I y/o un péptido
 restringido de MHC de clase II.
 En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el adyuvante
 20 en una concentración de entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.
 En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el antígeno en
 una concentración de entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.
 En algunas formas de realización, la relación entre el antígeno y el adyuvante es
 de entre aproximadamente 10000:1 a aproximadamente 1:10000. En algunas
 25 formas de realización, la célula T modificada comprende un complejo que
 comprende: a) el antígeno, b) el antígeno y por lo menos otro antígeno, y/o c) el
 antígeno y el adyuvante.

En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende además un agente que refuerza la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una correspondiente célula T modificada que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que refuerza la endocitosis, un agente de estabilización o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la albúmina es de ratón, de bovino o humana. En algunas formas de realización, el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, sacarosa-D, PEG1500, arginina-L, glutamina-L, o EDTA. En algunas formas de realización, el agent comprende albúmina de suero de ratón (MSA).

En algunas formas de realización, las células son además modificadas para incrementar la expresión de una o más 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 resulta en la expresión incrementada de las una o más moléculas coestimuladoras. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de Clase I. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de Clase II.

En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de la célula T modificadas se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de correspondiente células T modificadas que no comprenden la modificación adicional. En algunas formas de realización, la semivida circulante de la célula T

modificadas en un individuo al que se administraron se incrementa en comparación con la semivida circulante de las correspondientes células T modificadas que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que fueron suministrados.

En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las siguientes: células T helper, células T citotóxicas, células T de la memoria, o células killer naturales. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las siguientes células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, Células T CD35RO, o células gamma delta-T.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente. En algunos aspectos, detención proporciona una composición farmacéutica que comprende la célula T modificada descrita en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende administrar al individuo la célula T modificada descrita en la presente, una composición descrita en la presente, o una composición farmacéutica descrita en la presente.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) administrar al individuo una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25; y b) administrar un adyuvante al individuo.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan

perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un antígeno y un adyuvante pasen para formar una célula T ingresada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno y el adyuvante ingresen en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM y/o la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la relación entre el antígeno y el adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 10000:1 a aproximadamente 1:10000.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada que comprende un 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 T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un antígeno siga de manera de formar una célula T ingresada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al

individuo. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

- En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una
- 5 respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada que comprende un antígeno a través de una constricción de deformación celular, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se
- 10 causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un adyuvante pase para formar una célula T ingresada perturbada; b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que comprende el
- 15 antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo. En algunas formas de realización, la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el antígeno en una concentración de entre
- 20 aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el adyuvante en una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM. En algunas formas de realización, la relación entre el antígeno y el adyuvante presente en la célula T modificada es de entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.
- 25 En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende un complejo que comprende: a) el antígeno, b) el antígeno y por lo menos otro antígeno, y/o c) el antígeno y el adyuvante.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un antígeno siga de manera de formar una célula T ingresada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que comprende el antígeno; c) administrar la célula T modificada al individuo; y d) administrar un adyuvante al individuo. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

En algunas formas de realización, se aplica una fuerza deformadora a la célula T ingresada a medida que pasa a través de la constricción, con lo cual se ocasionan las perturbaciones en la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el método comprende además una etapa consistente en someter a incubación la célula T ingresada y/o la célula T modificada junto con un agente que refuerza la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con la correspondiente célula T modificada, preparada sin la etapa de incubación adicional. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que refuerza la endocitosis, un agente de estabilización, o un cofactor. En algunas formas de realización de los métodos, la respuesta inmune se refuerza. En algunas formas de realización, la respuesta inmune reforzada está orientada al antígeno. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es inferior al diámetro de la

célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 60% del diámetro de la

5 célula T ingresada.

En algunas formas de realización, el antígeno y/o el adyuvante se hallan presentes en el citosol y/o en una vesícula de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la vesícula es un endosoma. En algunas formas de realización, el antígeno y/o el adyuvante se hallan presentes en múltiples compartimientos de la

10 célula T modificada. En algunas formas de realización, el antígeno o el epítipo inmunogénico están unidos a la superficie de la célula T modificada.

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

15 CpG ODN de Clase A, un CpG ODN de clase B, o un CpG ODN de clase C.

En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de péptidos o ARNm aislado a partir de una célula enferma. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un no autoantígeno. En

20 algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno de tumor, antígeno viral, antígeno bacteriano, o antígeno fúngico. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno de papilomavirus humano (HPV, human papillomavirus). En algunas formas de realización, el HPV es HPV-16 o HPV-18. En algunas formas de realización, el antígeno comprende

25 un péptido HLA-A2-restringido derivado de HPV E6 y/o E7. En algunas formas de realización, el péptido restringido en HLA-A2 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-4. En algunas formas de

realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende una pluralidad de antígenos que comprende una pluralidad de epítopos inmunogénicos. En algunas formas de realización, ninguno de entre la pluralidad de epítopos inmunogénicos disminuye una respuesta inmune en el individuo con respecto a cualquiera de los otros epítopos inmunogénicos. En algunas formas de realización, el antígeno es un polipéptido y el epítipo inmunogénico es un epítipo de péptido inmunogénico. En algunas formas de realización, el epítipo de péptido inmunogénico está fusionado a un polipéptido que flanquea una terminal N y/o un polipéptido que flanquea una terminal C. En algunas formas de realización, el polipéptido que flanquea una terminal C y/o el polipéptido que flanquea una terminal C es una secuencia de presentación no natural. En algunas formas de realización, los polipéptidos que flanquean el terminal N y el terminal C derivan de un péptido sintético largo (SLP, synthetic long peptide) inmunogénico. En algunas formas de realización, los polipéptidos que flanquean el terminal N y el terminal C derivan de un SLP inmunogénico asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, el polipéptido que flanquea el terminal N comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 5–10 y/o el polipéptido que flanquea una terminal C comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 11–17. En algunas formas de realización, el antígeno es apto para ser procesado de manera de obtener un péptido restringido de MHC de clase I y/o un péptido restringido de MHC de clase II.

En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende además un agente que refuerza la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una correspondiente célula T modificada que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que refuerza la endocitosis, un agente de estabilización o un cofactor. En algunas formas de

realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la albúmina es de ratón, de bovino o humana. En algunas formas de realización, el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, sacarosa-D, PEG1500, arginina-L, glutamina-L, o EDTA. En algunas formas de realización,

5 la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de Clase I. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de Clase II.

En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en el individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de la célula T

10 modificada se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de correspondiente células T modificadas que no comprenden la modificación adicional. En algunas formas de realización, la semivida circulante de las célula T modificadas en un individuo al que se administraron se incrementa en comparación

15 con la semivida circulante de las correspondientes células T modificadas que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que fueron suministradas.

En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye uno más de las siguientes: células T helper, células T citotóxicas, células T de la memoria, o células killer naturales. En algunas formas de realización, las células T modificadas

20 incluyen una o más de las siguientes: Células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, Células T CD35RO, o células T γ - δ . En algunas formas de realización, la célula T modificada es alogénico con respecto al individuo. En algunas formas de realización, la célula T modificada es autóloga con respecto al individuo. En algunas formas de realización, el individuo ha sido preconditionado

25 para modular la inflamación y/o una respuesta inmune.

En algunas formas de realización, el método comprende además administrar al individuo un segundo adyuvante. En algunas formas de realización, el segundo

adyuvante es IFN- α o un CpG ODN. En algunas formas de realización, la célula T modificada y el segundo adyuvante se aplican conjuntamente o simultáneamente. En algunas formas de realización, la célula T modificada y el segundo adyuvante se administran secuencialmente. En algunas formas de realización, la célula T modificada se administra antes de administrar el segundo adyuvante. En algunas formas de realización, la célula T modificada se administra después de la administración del segundo adyuvante.

En algunas formas de realización, la célula T modificada se administra antes de, simultáneamente con, o después la administración de un inhibidor punto de control inmune. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto está dirigido hacia uno de los siguientes PD-1, PD-L1, CTLA-4, y TIM-3. En algunas formas de realización, la administración de la célula T modificada al individuo tiene como resultado la activación y/o expansión de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos para el antígeno. En algunas formas de realización, la administración de la célula T modificada al individuo tiene como resultado la activación y/o expansión de células helper T(Th) específicas para el antígeno. En algunas formas de realización, la cantidad de células T modificadas administradas al individuo es de entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células.

En algunas formas de realización, el método comprende múltiples administraciones de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el intervalo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de la célula T modificada es de entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 30 días.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: administrar al individuo una célula T modificada asociada a un antígeno, en donde la célula T modificada se prepara mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:

- a) someter a incubación una célula T ingresada junto con un antígeno y/o un adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno se asocie a la superficie celular de la célula T ingresada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, con lo cual se genera una célula T modificada asociada al antígeno; y b) administrar la célula T modificada al individuo. En algunas formas de realización, el antígeno de HPV comprende una secuencia de aminoácidos con una similitud de por lo menos el 90% con respecto al cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno de HPV 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Figura 1A muestra un diagrama esquemático representativa de los grupos de tratamiento y de la programación. La Figura 1B muestra el crecimiento de los tumores, medido mediante la fórmula $((\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2)$ comparado entre ratones del grupo sin tratar (sin transferencia adoptiva de células T) y los grupos de tratamiento B–E señalados en la Figura 1A.

- La Figura 2A muestra un esquema representativo para evaluar los antígenos E7. La Figura 2B muestra el impacto de una secuencia de SLP sobre las células T CD8+productoras de IFN–gamma generadas en respuesta con una vacunación de T_{APC} .

- La Figura 3 es un gráfico que muestra la capacidad de los SLPs E6 de inducir una respuesta inmune específica para antígeno en células T que responden a E6 en un modelo humano *in vitro*.

La Figura 4 muestra la capacidad de los SLPs E7 de inducir una respuesta inmune específica para antígeno en células T que responden a E7_{11–20}, como también el

impacto de una secuencia de SLP sobre la activación APC (T_{apc}) de células T SQZ en un modelo humano *in vitro*.

La Figura 5 muestra los resultados de un estudio para evaluar la dosis de antígeno para APCs de células T SQZ en un modelo humano *in vitro*.

- 5 La Figura 6 muestra los resultados de un estudio para determinar la variabilidad de los donantes para los APCs de células T SQZ T en un modelo humano *in vitro*.

La Figura 7A es un diagrama esquemático de un experimento para comparar la robustez de respuestas inmunes en el que utilizaron diferentes adyuvantes. La Figura 7B muestra los resultados del experimento para comparar la robustez de las

- 10 respuestas inmunes en el que se utilizó poli I: C y un CpG ODN.

La Figura 8A es una representación de un experimento en el que se evalúa el efecto de la concentración de CpG ODN sobre respuestas inmunes. La Figura 8B muestra los resultados del experimento en el que se evalúa el efecto de la concentración del CpG ODN sobre las respuestas inmunes.

- 15 La Figura 9A es una representación esquemática de un experimento en el que se evalúa la programación de la dosificación del CpG ODN sobre las respuestas inmunes. La Figura 9B muestras los resultados del experimento en el que se evalúa el programa de dosificación del CpG ODN sobre las respuestas inmunes.

- 20 La Figura 10A es la representación esquemática de un experimento para evaluar la combinación de administración intracelular y de administración sistémica de adyuvante para la función antitumorales T_{APC} . La Figura 10B muestran las respuestas de las células T para cada grupo experimental y la Figura 10C muestra el crecimiento de los tumores para cada grupo experimental. La Figura 10D muestra el crecimiento de los tumores después de nueva exposición en animales tratados con SQZ (E7+CpG) en comparación con animales no tratados.

La Figura 11A es la representación esquemática de un experimento para evaluar el efecto de combinar múltiples antígenos de HPV para la función antitumoral de T_{APC} .

La Figura 11B muestra las respuestas de las células T para cada grupo experimental y la Figura 11C muestra el crecimiento de los tumores para cada grupo experimental.

La Figura 12A muestra los resultados de un experimento para evaluar la importancia de la vía de administración del adyuvante CpG para el efecto antitumorales T_{APC} específico para E7. El programa de dosificación ha sido provisto. En la Figura 12B se muestra el volumen de los tumores a lo largo del tiempo para ratones individuales dentro de cada grupo de tratamiento.

La Figura 13 muestra una representación esquemática de un experimento para evaluar la capacidad de adyuvantes coadministrados para llevar a cabo la infiltración de células tumorales T específicas para E7. Las respuestas de las células T se muestran en el panel inferior.

La Figura 14A es una representación esquemática de un experimento para determinar un programa de vacunación tanto para cebar como para reforzar los T_{APC} cargados con un péptido sintético largo tipo E7 (SLP) + CpG. La Figura 14B muestra el crecimiento de los tumores para cada grupo experimental.

La Figura 15 muestra los resultados de un experimento para mostrar que los SQZ'd T_{APC} SQZdos pueden presentar directamente en antígeno.

La Figura 16 muestra que el suministro por SQZ de un adyuvante no altera significativamente los niveles de citoquinas de células T *in vitro*.

La Figura 17 muestra que el suministro por SQZ de antígeno +/- adyuvante no altera significativamente los niveles de citoquinas del suero *in vivo*.

La Figura 18A muestra histogramas que representan poblaciones de células con una cantidad de relativa de epítipo mínimo presentado sobre MHC-I. La Figura 18B muestra la cantidad de presentación de antígeno por célula, medida mediante intensidad media de la fluorescencia.

La Figura 19 muestra de la capacidad de células T cargadas con antígeno CMV pp65 para inducir una respuesta inmune específica para antígeno en células T que responden a p65 en un modelo *in vitrol*.

La Figura 20 muestra las cantidades relativas del reclutamiento de linfocitos que infiltran los tumores (TIL, tumor infiltrating lymphocyte) en los tumores a los que se administró T_{APC} SQZ–cargado con HPV16 E7 SLP, con o sin administración conjunta de adyuvante.

La Figura 21 muestra el volumen de los tumores a lo largo del tiempo en un experimento para determinar la capacidad de las células T cargadas con SQZ para actuar como APCs para el tratamiento preventivo de los tumores asociados con HPV, tanto para protección a término más breve (tumor de flanco derecho, inyectado en el día 0) como también para protección al término más prolongado (tumor de flanco derecho, inyectado el día 60).

La Figura 22 muestra el volumen de los tumores a lo largo del tiempo en un experimento para determinar el efecto de una dosis de células T, de la administración conjunta de adyuvante como también del número de administraciones (cebado vs refuerzo) sobre la capacidad de las células T cargadas con SQZ para actuar como APCs para el tratamiento terapéutico para tumores asociados con HPV. “P” indica cebado, y “B” indica refuerzo en la Figura 22.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las células presentadoras de antígeno (APC, antigen presenting cells) desempeñan un papel clave en la inducción de la activación endógena de los CTL. En este trabajo, se describe la implementación de la plataforma CellSqueeze® para diseñar APCs de células T (T_{APC}) para su uso en la modulación de una respuesta inmune a diversas indicaciones, que incluyen cáncer y enfermedades infecciosas. Por el hecho de permitir la administración citosólica eficaz de antígenos y/o

adyuvante diana a las células T, esta plataforma ha demostrado la capacidad de inducir la presentación efectiva de MHC-I de los antígenos diana y la estimulación de los CTLs *in vivo*.

En algunos aspectos, la presente solicitud proporciona células T modificadas que
5 comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, y en donde el adyuvante se halla presente intracelularmente. En algunas formas de realización, las células T modificadas se preparan como sigue: a) hacer pasar una célula T ingresada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una
10 función de un diámetro de la célula T ingresada, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que el antígeno y el adyuvante pasan de manera de formar una célula T ingresada perturbada; y b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno
15 y el adyuvante ingresen en la célula T ingresada perturbada; con lo cual se genera la célula T modificada que comprende el antígeno y adyuvante. También se proporcionan métodos para utilizar las células T modificadas para modular una respuesta inmune en un individuo, por ejemplo, para reforzar una respuesta inmune en el individuo. En algunas formas de realización, la respuesta inmune reforzada
20 está orientada hacia el antígeno. En algunas formas de realización, la constricción de deformación celular está contenida en un canal microfluídico, tal como cualquiera de los canales microfluídicos descritos en la presente.

En otros aspectos, se proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende administrar al individuo: a) una célula T modificada
25 que comprende un antígeno, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; y b) un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula T modificada se prepara como sigue: a) se hace pasar una célula T ingresada a través

de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que el antígeno siga de manera de formar una célula T perturbada y b) se somete a incubación la célula T ingresada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T ingresada perturbada; con lo cual se genera la célula T modificada que comprende el antígeno. En algunas formas de realización, se refuerza la respuesta inmune. En algunas formas de realización, la respuesta inmune reforzada está orientada al antígeno. En algunas formas de realización, la constricción de deformación celular está contenida en un canal microfluídico, tal como cualquiera de los canales microfluídicos descritos en la presente.

Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos en la presente o a las cuales se haga referencia son por lo general bien conocidos y de uso común mediante metodología convencional por los expertos de 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 y Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley y 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 y P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell y Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993–8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987);
- 5 *PCR: The Polimerase 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.
- 10 Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles y Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

15

Definiciones

Para los fines de interpretar esta memoria descriptiva, regirán las siguientes definiciones y cuando sea adecuado los términos utilizados en singular también incluirán la forma plural e inversamente. En el caso de que alguna definición

20 establecida en lo que sigue se halle en conflicto con cualquier documento incorporado en la presente como referencia, prevalecerá la definición establecida. Tal como se utiliza en la presente, la forma singular “un”, “una” incluye referencias en plural a menos que se indique otra cosa.

Se da por entendido que los aspectos y formas de realización de la invención

25 descritos en la presente incluyen “que comprende,” “consistente”, y “consiste esencialmente de” en los aspectos y formas de realización.

El término “aproximadamente”, tal como se utiliza en la presente se refiere al intervalo de error usual fácilmente conocido del experto en este campo técnico. Las referencia a “aproximadamente” un valor o parámetro mencionados en la presente incluyen (y describen) formas de realización que están orientados a dicho valor o parámetro como tal.

El término “poro”, utilizado en la presente se refiere a una abertura, lo que incluye sin limitación un orificio, desgarramiento, cavidad, abertura, rotura, huelgo o perforación dentro de un material. En algunos ejemplos (cuando se indique) el término se refiere a un poro dentro de una superficie de la presente divulgación. En otros ejemplos (cuando se indique) el término “poro” puede referirse a un poro en una membrana de célula.

El término “membrana” utilizado en la presente se refiere a una barrera o lámina selectivas que contiene poros. El término incluye una estructura similar a lámina, plegable, que actúa como un límite o revestimiento interior. En algunos ejemplos, el término se refiere a una superficie o filtro que contiene poros. El término es distinto de la expresión “membrana de célula”.

El término “filtro” utilizado en la presente se refiere a un artículo 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” tal como se utiliza en la presente se refiere a algo que está mezclado o tiene una estructura o composición no uniforme. En algunos ejemplos, el término se refiere a poros que tienen tamaños, formas o distribuciones, variadas, dentro de una superficie dada.

El término “homogéneo”, tal como se utiliza en la presente se refiere a algo cuya masa tiene una estructura o composición constante o uniforme. En algunos ejemplos, el término se refiere a poros que tienen tamaños, formas o distribución constantes dentro de una superficie dada.

El término “heterólogo”, por referirse a secuencias de ácido nucleicos tales como secuencia de codificación y secuencias de control, designa secuencias que normalmente no están unidas entre sí y/o no se hallan normalmente asociados dentro de una célula particular. Por lo tanto, una región “heteróloga” de un

5 constructo de ácido nucleico o de un vector es un segmento de ácido nucleico dentro, o fijado a, otra molécula de ácido nucleico que en la naturaleza no se encuentra asociada con la otra molécula. Por ejemplo, una región heteróloga de un constructo de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificadora flanqueada por secuencias que en la naturaleza no se encuentran asociadas con la secuencia

10 codificadora. Otro ejemplo de secuencia codificadora heteróloga es un constructo en el que la secuencia codificadora como tal no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con un constructo que no se encuentra normalmente presente en la célula sería considerada como heteróloga para los

15 fines de esta invención. La variación alélica o los eventos mutacionales de origen natural no dan origen a ADN heterólogo, como se utiliza en la presente.

El término “heterólogo”, por el hecho de referirse a secuencias de aminoácidos tales como secuencias peptídicas y secuencias polipeptídicas, designa secuencias que no se encuentran normalmente unidas entre sí, y/o que no se encuentran

20 normalmente asociadas con una célula en particular. Por lo tanto, una región “heteróloga” de una secuencia peptídica es un segmento de aminoácidos dentro de, o fijada a, otra molécula de ácido nucleico que en la naturaleza no se encuentra asociada con la otra molécula. Por ejemplo, una región heteróloga de un constructo péptido podría incluir las secuencias de aminoácidos del péptido flanqueadas por

25 secuencias que en la naturaleza no se encuentran asociadas con la secuencia de aminoácidos del péptido. Otro ejemplo de una secuencia de péptidos heteróloga se refiere a un constructo en el que la secuencia de péptidos como tal no se encuentra

en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen aminoácidos diferentes de los codificados a partir del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con un vector que expresa un constructo de aminoácido que no se halla normalmente presente en la célula sería considerada como heteróloga para los fines de esta invención. La variación alélica o los eventos mutacionales representación natural no dan origen a péptidos heterólogos tal como se utiliza en el presente.

El término “exógeno” cuando se utiliza con referencia a un agente, tal como un antígeno o un adyuvante, con relación a una célula se refiere a un agente suministrado desde fuera de la célula (es decir, desde fuera de la célula). La célula puede tener o no el agente ya presente, y puede producir o no el agente después de haberse suministrado el agente exógeno.

Como se utiliza en la presente, el término “inhibe” puede referirse al acto de bloquear, reducir, eliminar o de alguna otra manera antagonizar la presencia, o una actividad de, una diana en particular. El término “inhibición” puede referirse a la inhibición parcial o a la inhibición completa. Por ejemplo, la inhibición de una respuesta inmune puede referirse a cualquier acto que conduzca a un bloqueo, producción, eliminación, o cualquier otro antagonismo de una respuesta inmune. En otros ejemplos, la inhibición de la expresión de un ácido nucleico puede incluir sin limitación la reducción de la transcripción de un ácido nucleico, la reducción de la abundancia de ARNm (por ejemplo, el silenciado de la transcripción de ARNm), la degradación del ARNm, la inhibición de la traducción de ARNm, y así seguido.

Como se utiliza en la presente, el término “suprimir” puede referirse al acto de disminuir, reducir, prohibir, limitar, empequeñecer o de alguna otra manera reducir la presencia, o una actividad de, una diana en particular. El término “supresión” puede referirse a una supresión parcial o a una supresión completa. Por ejemplo, la expresión “suprimir una respuesta inmune” puede referirse a cualquier acto que

conduzca a la disminución, reducción, prohibición, limitación o de alguna otra manera un empequeñecimiento de una respuesta inmune. En otros ejemplos, la supresión de la expresión de un ácido nucleico puede incluir sin limitación la reducción en la transcripción de un ácido nucleico, la reducción de la abundancia de ARNm (por ejemplo, el silenciamiento de la transcripción de ARNm), la inhibición de la traducción de ARNm, etc.

Como se utiliza en la presente, el término “reforzar” puede referirse al acto de mejorar, reforzar, elevar, o de alguna otra manera incrementar la presencia o una actividad de, una diana en particular. Por ejemplo, la expresión “reforzar una respuesta inmune” puede referirse a cualquier acto que conduzca a mejorar, reforzar, elevar, o de alguna otra manera incrementar una respuesta inmune. En un ejemplo, la expresión “reforzar una respuesta inmune” puede referirse a la utilización de un antígeno y/o adyuvante para mejorar, reforzar, elevar o de alguna otra manera incrementar una respuesta inmune. En otros ejemplos, el refuerzo de la expresión de un ácido nucleico puede incluir sin limitación un aumento en la transcripción de un ácido nucleico, un incremento en la abundancia de ARNm (por ejemplo, un *incremento en la transcripción de ARNm*), una disminución de la degradación de ARNm, un incremento en la traducción de ARNm, etc.

Como se utiliza en la presente, el término “modular” puede referirse al acto de cambiar, alterar, variar, o de alguna otra manera modificar la presencia o una actividad de una diana en particular. Por ejemplo, la expresión “modular una respuesta inmune” puede referirse a cualquier acto que conduzca a un cambio, alteración, variación o de alguna otra manera una modificación de una respuesta inmune. En otros ejemplos, la modulación de la expresión de un ácido nucleico puede incluir sin limitación un cambio en la transcripción de un ácido nucleico, un cambio en la abundancia del ARNm (por ejemplo, un incremento en la transcripción

de ARNm), un correspondiente cambio en la degradación del ARNm, un cambio en la traducción de ARNm, etc.

Como se utiliza en la presente, el término “induce” puede referirse al acto de iniciar, instar, estimular, establecer o de alguna otra manera producir un resultado. Por ejemplo, la expresión “inducir una respuesta inmune” puede referirse a cualquier acto que conduzca a iniciar, instar, estimular establecer, o de alguna otra manera producir una respuesta inmune deseada. En otros ejemplos, la inducción de la expresión de un ácido nucleico puede incluir sin limitación la iniciación de la transcripción de un ácido nucleico, iniciación de la traducción de ARNm, etc.

- 10 El término “homologo” como se utiliza en la presente se refiere a una molécula derivada del mismo organismo. En algunos ejemplos el término se refiere a un ácido nucleico o a una proteína que se encuentra o expresa normalmente dentro del organismo dado.

- 15 Las expresiones “polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se utiliza en la presente, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye sin limitación, ADN o ARN monocatenario, bicatenario, o policatenario, ADN, ADNc, híbridos ADN–ARN, o un polímero que comprende bases de purina y de pirimidina, u otras bases de nucleótidos naturales, química o dio químicamente modificadas, no naturales, o derivadas. La estructura básica del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (los que pueden típicamente encontrarse en ARN o ADN), o grupos azúcar o fosfato, modificados o sustituidos. Como alternativa, la estructura básica del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y fosforotioatos, y por lo tanto puede ser un fosforamidato (P–NH₂) o un oligómero fósforo–fosfodiéster. Además, es posible obtener un polinucleótido bicatenario a partir del producto polinucleótido monocatenario de síntesis química mediante la sinterización de la cadena
- 20
- 25

complementaria y fusionando las cadenas bajo condiciones adecuadas o sintetizando la cadena complementaria de *nov*o utilizando una ADN polimerasa con cebador adecuado.

- Los términos “polipéptido” y “proteína” se utilizan de manera intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no están limitados a ninguna longitud mínima. Tales polímeros de residuos de aminoácidos pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen sin limitación, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros, y multímeros de residuos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como sus fragmentos están abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones posexpresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, para los fines de la presente invención, el término “polipéptido” se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones, y sustituciones (por lo general de una naturaleza conservadora), en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser impresionables, como por ejemplo mediante mutagénesis dirigida a sitio, o pueden ser accidentales tales como por medio de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debido a una amplificación de PCR.
- Como se utiliza en la presente, el término “adyuvante” se refiere a una sustancia que de manera directa o indirecta modula y/o genera una respuesta inmune. En términos generales, el adyuvante se administra en conjunción con un antígeno para llevar a cabo el refuerzo de una respuesta inmune al antígeno en comparación con antígeno solamente. En la presente se describen diversos adyuvantes.
- La expresiones “oligodesoxinucleótido de CpG” y “CpG ODN” se refieren a moléculas de AND que contienen un dinucleótido de citosina y guanina separados por un fosfato (tiene presente también recibe la denominación de dinucleótido

“CpG” o de “CpG”). Los CpG ODNs de la presente divulgación contienen por lo menos un dinucleótido CpG no metilado. Es decir, la citosina en el dinucleótido CpG no está metilado (es decir, no es 5–metilcitosina). Los CpG ODNs pueden tener una estructura básica parcial o completa de fosforotioato (PS).

- 5 Como se utiliza en la presente, las expresiones “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente compatible” se refieren a un material que no es indeseable desde el punto de vista biológico ni desde ningún otro punto de vista, por ejemplo, el material puede ser incorporado en una composición farmacéutica administrado al paciente sin ocasionar ningún efecto biológico indeseable significativo ni
- 10 interactuar de una manera perjudicial de una manera perjudicial con alguno de los otros componentes de la composición en la cual se halla contenido. Es preferible que los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables hayan cumplido con las normas requeridos de ensayos toxicológicos y de fabricación estándar y/o que se hallen incluidos en la Guía de Ingredientes Inactivos (Inactive Ingredient Guide)
- 15 preparado por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos.

Para cualquiera de las características estructurales y funcionales descritas en el presente, en la técnica se conocen métodos para determinar estas características.

Células T Modificadas

- En determinados aspectos, se proporciona una célula T modificada que comprende
- 20 un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno es exógeno con respecto a la célula T modificada y comprende un epítipo inmunogénico, y en donde el adyuvante se halla presente intracelularmente. Los antígenos exógenos son uno o más antígenos procedente de una fuente externa a la célula T introducida en una célula T por modificar, e incluyen antígenos que pueden hallarse presentes en
 - 25 hacer una T (es decir, son endógenos), sea antes o después de la introducción del antígeno exógeno, y como tales pueden ser por lo tanto producidos por la célula T (por ejemplo, codificados por el genoma de la célula T). Por ejemplo, en algunas

formas de realización, la célula T modificada comprende dos recolecciones de un antígeno, una primera recolección que comprende una fuente endógena del antígeno, y una segunda recolección que comprende una fuente exógena del antígeno producido fuera de, e introducida en, la célula T a modificar. En algunas

5 formas de realización, el antígeno se expresa o sobre expresa ectópicamente en una célula de enfermedad en un individuo, y la célula T modificada se deriva del individuo y comprende una fuente exógena del antígeno, o un epítipo inmunogénico contenido en éste, producido fuera de, e introducida en, la célula T a modificar. En algunas formas de realización, el antígeno es un neoantígeno (por

10 ejemplo, una proteína autoalterada o porción de ella) que comprende un neoepítipo, y la célula T modificada comprende una fuente exógena del antígeno, o un fragmento del mismo que comprende el neoepítipo, producido fuera de, e introducido en, la célula T a modificar. En algunas formas de realización, el adyuvante es exógeno con respecto a la célula T modificada. En algunas formas

15 de realización, el antígeno y/o el adyuvante se hallan presentes en múltiples compartimientos de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el antígeno y/o el adyuvante se hallan presentes en el citosol y/o en una vesícula de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la vesícula es un endosoma. En algunas formas de realización, el antígeno o el epítipo

20 inmunogénico están unidos a la superficie de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una más de las siguientes: células T helper, células T citotóxicas, células T de la memoria, o células killer naturales. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las siguientes: células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T

25 CD45RA+, células T CD35RO, o células gamma delta-T.

En determinados aspectos, se proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ

ID NOs: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno se halla presente en múltiples compartimentos de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el antígeno se halla presente en el citosol y/o una vesícula de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la vesícula es un endosoma. En algunas formas de realización, el antígeno o un epítipo inmunogénico contenido en éste están unidos a la superficie de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye uno más de las siguientes: células T helper, células T citotóxicas, células T de la memoria, y células T natural killer. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las siguientes: células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, células T CD45RO, y células T $\gamma\delta$. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende además un adyuvante.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente, la célula T modificada comprende un adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante es un oligodesoxinucleótido (ODN) CpG, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I, o poli I: C. En algunas formas de realización, el adyuvante es un CpG ODN. En algunas formas de realización, el CpG ODN no es mayor de aproximadamente 50 (tales no mayor de cualquiera de los siguientes: 45, 40, 35, 30, 25, 20, o menos) nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, el CpG ODN es un CpG ODN de Clase A, un CpG ODN de Clase B, o un CpG ODN de Clase C. En algunas formas de realización, el CpG ODN comprende la secuencia de nucleótidos del cualquiera de las SEQ ID NOs: 26–37. En algunas formas de realización, el CpG ODN comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 30. En algunas formas de realización, el CpG ODN comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 31. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende una pluralidad de CpG ODNs diferentes. Por ejemplo, en algunas

formas de realización, la célula T modificada comprende una pluralidad de CpG ODNs diferentes seleccionados pG ODNs de Clase A, Clase B, y Clase C.

- En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN, LPS, IFN- α , agonista de STING, Agonistas de RIG-I, poli I: C, R837, R848, un agonista de
- 5 TLR3, un agonista de TLR4 o un agonista de TLR 9. 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 CpG ODN es un CpG ODN de Clase A, un CpG ODN de Clase B, o un CpG ODN de Clase C. En algunas formas de realización, el CpG ODN adyuvante comprende una selección
- 10 de entre el grupo consistente en los oligonucleótidos 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 CpG ODN adyuvante es CpG ODN 1826 (SEQ: TCCATGACGTTCTGACGTT) o
- 15 CpG ODN 2006 (también conocido como CpG ODN 7909) (SEQ: TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT). En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN 7909. En algunas formas de realización, el agonista de RIG-I comprende ácido poliinosínico: policitidílico (poli I: C). También es posible utilizar múltiples adyuvantes en conjunción con antígenos para reforzar la
- 20 suscitación de una respuesta inmune. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende más de un adyuvante. También es posible utilizar múltiples adyuvantes en conjunción con antígenos para reforzar la suscitación de una respuesta inmune. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende más de un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula T
- 25 modificada comprende cualquier combinación de 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 algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente, la célula T modificada comprende un antígeno que comprende un epítipo inmunogénico. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de péptidos o de ARNm aislado a partir de una célula enferma. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de una proteína ectópicamente expresada o sobreexpresada en una célula enferma. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un neoantígeno, por ejemplo, un neoantígeno asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico comprende un neoepítipo, por ejemplo, un neoepítipo asociado a cáncer. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un no autoantígeno. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un autoantígeno o de alguna otra manera alterado. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno de tumor, antígeno viral, antígeno bacteriano, o antígeno fúngico. En algunas formas de realización, el antígeno comprende un epítipo inmunogénico fusionado a secuencias péptido heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno comprende una pluralidad de epítipos inmunogénicos. En algunas formas de realización, algunos de entre la pluralidad de epítipos inmunogénicos se derivan de la misma fuente. Por ejemplo, en algunas formas de realización, algunos de entre la pluralidad de epítipos inmunogénicos se derivan del mismo antígeno viral. En algunas formas de realización, la totalidad de la pluralidad de epítipos inmunogénicos se derivan de la misma fuente. En algunas formas de realización, ninguno de entre la pluralidad de epítipos inmunogénicos se deriva de la misma fuente. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende una pluralidad de anticuerpos diferentes.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los antígenos que comprende un epítipo inmunogénico descrito en la presente, el antígeno es un polipéptido y el epítipo inmunogénico es un epítipo de péptido inmunogénico. En algunas formas de realización, el epítipo de péptido inmunogénico está fusionado a un polipéptido que flanquea una terminal N y/o a un polipéptido que flanquea una terminal C. En algunas formas de realización, el epítipo péptido inmunogénico fusionado al polipéptido que flanquea el terminal N y/o el polipéptido que flanquea una terminal C es una secuencia de presentación no natural. En algunas formas de realización, los polipéptidos que flanquean el terminal N y el terminal C derivan de un péptido sintético largo (SLP, synthetic long peptide) inmunogénico. En algunas formas de realización, los polipéptidos que flanquean el terminal N y el terminal C derivan de un SLP inmunogénico asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, el polipéptido que flanquea el terminal N comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 5–10 y/o el polipéptido que flanquea una terminal C comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 11–17.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los antígenos que comprende un epítipo inmunogénico descrito en la presente, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de un antígeno de papilomavirus humano (HPV). En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de cualquiera de los siguientes: HPV–16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, y 82. En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de un antígeno de HPV–16 o un antígeno de HPV–18. En otras formas de realización, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de un antígeno de HPV E6 (por ejemplo, un antígeno de HPV –16 o de HPV–18 E6) o un antígeno de HPV E7 (por ejemplo, un antígeno de HPV–16 o de HPV–18 E7). En

algunas formas de realización, el antígeno comprende un péptido HLA-A2-restringido derivado de HPV E6 y/o E7. En algunas formas de realización, el antígeno comprende un fragmento de una proteína HPV-16 E6 entre los residuos 29 y 38 (es decir, HPV-16 E6₂₉₋₃₈). En algunas formas de realización, el antígeno

5 comprende un fragmento de una proteína HPV-16 E6 entre los residuos 48 y 57 (es decir, HPV-16 E6₄₈₋₅₇). En algunas formas de realización, el antígeno comprende un fragmento de una proteína HPV-16 E7 entre los residuos 11 y 20 (es decir, HPV-16 E7₁₁₋₂₀). En algunas formas de realización, el antígeno comprende un fragmento de una proteína HPV-16 E7 entre los residuos 49 y 57

10 (es decir, HPV-16 E7₄₉₋₅₇). En algunas formas de realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-4. En algunas formas de realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-4 flanqueado con un polipéptido N-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ

15 ID NOs: 5-10 y un polipéptido C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 11-17. En algunas formas de realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18-25.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los antígenos que

20 comprende un epítipo inmunogénico descrito en la presente, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de un antígeno de citomegalovirus humano (HCMV). En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de cualquiera de los siguientes: las cepas Merlin, Toledo, Davis, Esp, Kerr, Smith, TB40E, TB40F, AD169 o Towne

25 HCMV. En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de un antígeno de la cepa AD169 HCMV o un antígeno de la cepa Merlin HCMV. En otras formas de realización, el antígeno o epítipo

inmunogénico contenido en éste se deriva de pUL48, pUL47, pUL32, pUL82, pUL83, y pUL99, pUL69, pUL25, pUL56, pUL94, pUL97, pUL144 o pUL128. En algunas formas de realización, el antígeno comprende un péptido HLA–A2–restringido derivado de HCMV pUL83.

- 5 En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los antígenos que comprende un epítipo inmunogénico descrito en la presente, el antígeno es apto para ser procesado de manera de obtener un péptido restringido de MHC de clase I y/o un péptido restringido de MHC de clase II. En algunas formas de realización, el antígeno es apto para ser procesado de manera de obtener un péptido restringido
- 10 de MHC de clase I. En algunas formas de realización, el antígeno es capaz de ser procesado obteniéndose un péptido restringido de MHC de clase II. En algunas formas de realización, el antígeno comprende una pluralidad de epítopos inmunogénicos, y es apto para ser procesado de manera de obtener un péptido restringido de MHC de clase I y un péptido restringido de MHC de clase II. En
- 15 algunas formas de realización, algunos de entre la pluralidad de epítopos inmunogénicos se derivan de la misma fuente. En algunas formas de realización, la totalidad de la pluralidad de epítopos inmunogénicos se derivan de la misma fuente. En algunas formas de realización, ninguno de entre la pluralidad de epítopos inmunogénicos se deriva de la misma fuente.
- 20 En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente, la célula T modificada comprende una pluralidad de antígenos que comprende una pluralidad de epítopos inmunogénicos. En algunas formas de realización, después de haberse administrado a un individuo la célula T modificada que comprende la pluralidad de antígenos que comprende la
- 25 pluralidad de epítopos inmunogénicos, ninguno de entre la pluralidad de epítopos inmunogénicos disminuye una respuesta inmune en el individuo con respecto a cualquiera de los otros epítopos inmunogénicos.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente, la célula T modificada comprende un antígeno y un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el adyuvante en una concentración de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el adyuvante en una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración de adyuvante presente en la célula T modificada es cualquiera inferior a aproximadamente 1 pM, a aproximadamente 10 pM, a aproximadamente 100 pM, a aproximadamente 1 nM, a aproximadamente 10 nM, a aproximadamente 100 nM, a aproximadamente 1 μ M, a aproximadamente 10 μ M, a aproximadamente 100 μ M, a aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante presente en la célula T modificada es mayor a aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno en la célula T modificada puede ser cualquiera entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 pM, entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y aproximadamente 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 100 nM 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 de entre 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la relación molar entre antígenos y adyuvante presentes en la célula T modificada es cualquiera de entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la relación molar entre el antígeno y el adyuvante presentes en la célula T modificada es aproximadamente cualquiera de 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 molar entre el antígeno y el adyuvante
 5 presentes en la célula T modificada es cualquiera de 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,
 10 entre aproximadamente 1:100 y aproximadamente 1:1000, entre aproximadamente 1:1000 y aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende un complejo que comprende: a) el antígeno, b) el antígeno y por lo menos otro antígeno, y/o c) el antígeno y el adyuvante.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de las células T
 15 modificadas descritas en la presente, la célula T modificada comprende además un agente que refuerza la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una correspondiente célula T modificada que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un agente de estabilización o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas
 20 formas de realización, la albúmina es de ratón, de bovino o humana. En algunas formas de realización, el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, sacarosa-D, PEG1500, arginina-L, glutamina-L, o EDTA.

En algunas formas de realización de acuerdo con cualquiera de los métodos o
 25 composiciones descritos en la presente, la célula T modificada comprende además un agente que refuerza la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una correspondiente pluralidad de células T modificada que no

comprenden el agente. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende además un agente que refuerza la viabilidad y/o la función de la célula T modificada al tener lugar un ciclo de congelación–descongelación en comparación con una correspondiente célula T modificada que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un agente de crioconservación y/o un agente de conservación hipotérmico. En algunas formas de realización, ni el agente de crioconservación ni el agente de conservación hipotérmico causan más de un 10 ó 20 % de muertes celulares en la célula T modificada que comprende el agente en comparación con una correspondiente célula T modificada que no comprende el agente antes de cualquiera de los ciclos de congelación–descongelación. En algunas formas de realización, por lo menos aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 90% de las células T modificadas son viables después de hasta 1, 2, 3, 4, 5 ciclos de congelación–descongelación. En algunas formas de realización, el agente es un compuesto que refuerza la endocitosis, un agente de estabilización o un cofactor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la albúmina es de ratón, de bovino o humana. En algunas formas de realización, el agente es albúmina humana. En algunas formas de realización, el agente es uno o más de los siguientes: un catión de metal divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, sacarosa–D, PEG1500, arginina–L, glutamina–L, o EDTA. En algunas formas de realización, el catión de metal divalente es uno más de los siguientes Mg^{2+} , Zn^{2+} o Ca^{2+} . En algunas formas de realización, el agente es uno o más de los siguientes: piruvato de sodio, adenina, trehalosa, dextrosa, mannososa, sacarosa, albúmina de suero humano (HSA), DMSO, HEPES, glicerol, glutatión, inosina, fosfato sódico dibásico, fosfato de sodio modo básico, iones metálicos de sodio, iones de metal potasio, iones de metal magnesio, cloruro, acetato, gluconato, sacarosa, hidróxido de potasio o hidróxido de sodio. En algunas

formas de realización, el agente es uno o más de los siguientes: piruvato de sodio, adenina, Rejuvesol®, trehalosa, dextrosa, mannososa, sacarosa, albúmina de suero humano (HSA), PlasmaLyte®, DMSO, Cryostor® CS2, Cryostor® CS5, Cryostor® CS10, Cryostor® CS15, HEPES, glicerol, glutatión, HypoTherosol®.

- 5 En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente, la célula T modificada comprende otra modificación. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de Clase I. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para disminuir
- 10 la expresión de MHC de Clase I. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para incrementar la expresión de MHC de Clase I. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de Clase II. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para i disminuir la
- 15 expresión de MHC de Clase II. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para incrementar la expresión de MHC de Clase II. En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de la célula T modificadas se reduce en comparación con una respuesta inmune innata
- 20 montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de correspondiente células T modificadas que no comprenden la modificación adicional. En algunas formas de realización, la semivida circulante de la célula T modificadas en un individuo al que se administraron se incrementa en comparación con la semivida circulante de las correspondientes células T
- 25 modificadas que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que fueron suministrados.

En determinados aspectos, se proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25. En algunas formas de realización, el antígeno se halla presente en múltiples compartimentos de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el antígeno se halla presente en el citosol y/o en una vesícula de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la vesícula es un endosoma. En algunas formas de realización, el antígeno o un epítipo inmunogénico contenido en éste están unidos a la superficie de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye uno más de las siguientes: células T helper, células T citotóxicas, células T de la memoria, o células killer naturales. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye una o más de las siguientes células: células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, células T CD35RO, o células gamma delta–T. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende además un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula T modificada se prepara mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresadas suficientemente grandes para que el antígeno siga de manera de formar una célula T perturbada; y b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T ingresada perturbada; con lo cual se genera la célula T modificada que comprende el antígeno. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM.

En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende además un adyuvante, tal como cualquiera de los adyuvantes descritos en la presente.

En determinados aspectos, se proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo
5 inmunogénico, preparado mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada
10 suficientemente grandes para que el antígeno y el adyuvante pasan para formar una célula T ingresada perturbada; y b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno y el adyuvante ingresen en la célula T ingresada perturbada; con lo cual se genera la célula T modificada que comprende el antígeno y adyuvante. En
15 algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM y/o la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto
20 con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M–10 mM y/o la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M –10 mM. En algunas formas de realización, la relación entre el antígeno y el adyuvante sometidos a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente
25 10000:1 a aproximadamente 1:10000.

En determinados aspectos, se proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo

- inmunogénico, preparado mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada 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
- 5 T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresadas suficientemente grandes para que el antígeno siga de manera de formar una célula T perturbada; y b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera la célula
- 10 T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM.

- En determinados aspectos, se proporciona una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo
- 15 inmunogénico, preparado mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada que comprende el antígeno a través de una constricción deformadora de las células, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan
- 20 perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que el adyuvante pase de manera de formar una célula T ingresada perturbada; y b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera la célula T modificada que comprende
- 25 el antígeno y el adyuvante. En algunas formas de realización, la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM.

En algunas formas de realización, las células T modificadas descrita en la presente son preparadas mediante un proceso en el que se utiliza una constricción deformadora de las células a través de la cual se hace pasar una célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es inferior al diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 60% del diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, la constricción de deformación celular está contenida en un canal microfluídico, tal como cualquiera de los canales microfluídicos descritos en la presente. El canal microfluídico puede estar contenido en cualquiera de los dispositivos microfluídicos descritos en la presente en la presente, tales como los distritos en el capítulo siguiente titulado Dispositivos Microfluídicos. Por lo tanto, en algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente una constricción de deformación celular a través de la cual se hace pasar una célula T ingresada, el proceso comprende hacer pasar la célula T ingresada a través de un canal microfluídico que incluye una constricción de deformación celular contenido en cualquiera de los sistemas microfluídicos descritos en la presente. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza deformadora a la célula T ingresada a medida que pasa a través de la constricción, con lo cual se ocasionan las perturbaciones en la célula T ingresada.

Las células T ingresadas pueden obtenerse derivadas de una número de fuentes, que incluye las células T mononucleares de sangre periférica, médula de los huesos , ejido de nodos linfáticos, sangre de cordón, tejido de timo, tejido derivado de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido de bazo, y tumores. En algunas formas de realización de la presente invención, puede utilizarse cualquier número

de líneas de células T disponibles en la técnica. En algunas formas de realización de la presente invención, las células T pueden obtenerse derivadas de una unidad de sangre recolectada derivada de un sujeto para lo cual se utiliza cualquier cantidad técnicas conocidas del experto en la especialidad, tales como la

5 separación de Ficoll™. En algunas formas de realización, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis. Típicamente, el producto de la aféresis contiene linfocitos, lo que incluye células T, monocitos, granulocitos, células B, otras células sanguíneas blancas nucleasas, células de sangre roja, y plaquetas. En algunas formas de realización, las células recolectadas por aféresis

10 pueden ser lavadas para remover la fracción de plasma y para poner las células en un tampón o medio adecuados para las etapas de procesamiento subsiguientes. En algunas formas de realización, las células son lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfate buffered saline). En algunas formas de realización, la solución lavada carece de calcio y puede carecer de magnesio o

15 puede carecer de muchos cationes divalentes o de la totalidad de ellos. Como comprenderán fácilmente los expertos de la técnica, es posible implementar una etapa de lavado mediante métodos conocidos de los expertos en la técnica, tales como mediante la utilización de una centrifugadora semiautomática de tipo “flujo pasante” (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate, o

20 el Haemonetics Cell Saver 5), para lo cual se siguen las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células pueden ser resuspendidas en una variedad de tampones biocompatibles, tales como soluciones libres de Ca^{2+} , PBS libre de Mg^{2+} , PlasmaLyte A, u otras soluciones salinas con o sin un tampón. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden ser removidos y

25 células se resuspenden en el medio de cultivo.

En algunas formas de realización, las células T son aisladas a partir de linfocitos de sangre periférica para lo cual se lisan las células de sangre rojas de la sangre y se

agotan los monocitos, por ejemplo, por centrifugación utilizándose un gradiente PERCOLL™ o mediante elución centrífuga de contra flujo. Una subpoblación específica de células T, tales como células T CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, CD45RO⁺ T , y/o de células $\gamma\delta$ -T, puede ser objeto de la aislación adicional

5 mediante técnicas de selección positivas o negativas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células T son aisladas por incubación con un anti-CD3/anti-CD28 (*es decir*, 3×28)-perlas conjugadas, tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un intervalo de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En algunas formas de realización, el período de

10 tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En algunas formas de realización, el período de tiempo es de 30 minutos o 36 horas o más y todos los valores de número entero intermedios. En algunas formas de realización, el período de tiempo es de por lo menos, 2, 3, 4, 5 ó 6 horas. En algunas formas de realización, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En algunas formas de realización, el período de tiempo

15 es de 24 horas. Para aislar células T de pacientes con leucemia, la utilización de tiempos de incubación más prolongados, tales como de 24 horas, puede incrementar el rendimiento en células. Los tiempo de incubación más prolongados pueden utilizarse para aislar células T en cualquier situación en la que hay pocas células T en comparación con otros tipos de células, tales como en la aislación de

20 los linfocitos que se infiltran en los tumores (TIL) obtenidos de tejido tumoral o de pacientes de inmunidad comprometida. Además, la utilización de períodos de incubación más prolongados puede incrementar la eficiencia de la captura de células T CD8⁺. Por lo tanto, mediante el simple acortamiento o extensión del tiempo durante el que se permite que las células T se unan a las perlas de

25 CD3/CD28 y/o mediante el incremento o disminución de la relación entre las perlas y las células T, es posible seleccionar de manera preferible subpoblaciones de células T para o en contra la iniciación de un cultivo o en otros instantes de tiempo

durante el proceso. Adicionalmente, mediante el incremento o disminución de la relación entre los anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 sobre las perlas sobre otra superficie, es posible seleccionar de manera preferencial subpoblaciones de células T para o contra de la iniciación del cultivo o otros instantes de tiempo
5 deseados. El experto en la técnica reconocería que en el contexto de esta invención también es posible utilizar múltiples rondas de selección. En algunas formas de realización, puede ser deseable llevar a cabo el procedimiento de la selección y utilizar las células “no seleccionadas” en el proceso de activación y expansión (selección negativa). Las células “no seleccionadas” también pueden ser sometidas
10 a otras rondas de selección.

El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa puede llevarse a cabo mediante una selección de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células negativamente seleccionadas. Un método consiste en la clasificación y/o selección de células mediante
15 inmunoadherencia magnética negativa o mediante citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpo monoclonales dirigidos hacia los marcadores de la superficie de las células presentes sobre las células negativamente seleccionadas. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales contiene típicamente anticuerpos con respecto a CD
20 14, CD20, CD11b, CD 16, HLA-DR, y CD8. En algunas formas de realización, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente células T reguladores que típicamente expresan CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺, y FoxP3⁺. Como alternativa, en algunas formas de realización, se agotan las células T reguladoras mediante perlas conjugadas con anti-CD25 o con otros métodos de selección
25 similares.

Para la aislación de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, es posible variar la concentración de células y de partículas de

superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas). En algunas formas de realización, puede ser deseable disminuir de manera significativa el volumen en el que las perlas y las células se mezclan entre sí (*es decir*, Incrementar la concentración de células), para asegurar un máximo contacto entre células y perlas.

- 5 Por ejemplo, en algunas formas de realización, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/mL. En algunas formas de realización, se utiliza una concentración de aproximadamente mil millones de células/mL. En algunas formas de realización, se utiliza una concentración superior aproximadamente 100 millones de células/mL. En algunas formas de realización,
- 10 se utiliza una concentración de aproximadamente cualquiera de los siguientes: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 millones de células/mL. En algunas formas de realización, se utiliza una concentración de aproximadamente cualquiera de los siguientes: 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 millones de células/mL. En algunas formas de realización, se utiliza una concentración de 125 o de aproximadamente 150
- 15 millones de células/mL. La utilización de concentraciones elevadas puede resultar en un aumento del rendimiento en células, activación de las células y expansión de las células. Además, la utilización de elevadas concentraciones de células permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como células T CD28–negativas, o de muestras en las que
- 20 hay pocas células tumorales (*es decir*, sangre leucémica, tejido tumoral, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener un valor terapéutico y su obtención sería deseable. Por ejemplo, la utilización de elevadas concentraciones de células permite una selección más eficiente de células T CD8⁺ que normalmente tiene una expresión más débil de CD28.

Composiciones

En determinados aspectos, se proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende una célula T modificada que comprende
 5 un antígeno y un adyuvante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización descritas en la presente. En algunas formas de realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende la célula T modificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Métodos para modular una respuesta inmune

En determinados aspectos, se proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende administrar al individuo una célula T modificada de acuerdo con cualquiera de las formas de realización descritas en la presente, una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización
 15 descritas en la presente, o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización descritas en la presente.

En determinados aspectos, se proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada a través de una constricción de deformación
 20 celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un antígeno y un adyuvante pasen para formar una célula T ingresada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) someter a incubación
 25 la célula T ingresada perturbada junto con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno y el adyuvante ingresen en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que

comprende el antígeno y adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM y/o la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM. En algunas formas de realización, la relación entre el antígeno y el adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración de adyuvante sometida a incubación junto con la célula T perturbada es cualquiera concentración inferior a aproximadamente 1 pM, a aproximadamente 10 pM, a aproximadamente 100 pM, a aproximadamente 1 nM, a aproximadamente 10 nM, a aproximadamente 100 nM, a aproximadamente 1 μ m, a aproximadamente 10 μ m, a aproximadamente 100 μ m, a aproximadamente 1 mM o a aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante sometido a acumulación junto con la célula T perturbada es mayor a aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometida a incubación junto con la célula T perturbada es cualquiera concentración de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 pM, entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y aproximadamente 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 100 nM 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 de entre

- aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la relación molar entre antígenos y adyuvante presentes sometidos a incubación junto con la célula T perturbada es cualquiera de entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, en algunas
- 5 formas de realización, la relación molar entre antígeno y adyuvante sometidos a incubación junto con la célula T perturbada es aproximadamente cualquiera de los siguientes: 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
- 10 aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, la relación molar entre antígeno y adyuvante sometidos a incubación junto con la célula T perturbada es cualquiera de 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
- 15 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, el antígeno y/o adyuvante están encapsulados en una nanopartícula.
- 20 En determinados aspectos, se proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada que comprende un 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 T ingresada presente en la suspensión, con lo
- 25 cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un antígeno siga de manera de formar una célula T ingresada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) someter a

incubación la célula T ingresada perturbada junto con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM. En algunas formas de realización, el antígeno está encapsulado en una nanopartícula. En determinados aspectos, se proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada que comprende un antígeno a través de una constricción de deformación celular, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un adyuvante pase a su través de manera de formar una célula T ingresada perturbada; b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo. En algunas formas de realización, la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM. En algunas formas de realización, el adyuvante está encapsulado en una nanopartícula.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en los que se utiliza una célula T modificada, la célula T modificada comprende un antígeno y un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el antígeno en una concentración de

entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el adyuvante en una concentración de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la relación entre el antígeno y el adyuvante presente en la célula T modificada es de entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende un complejo que comprende: a) el antígeno, b) el antígeno y por lo menos otro antígeno, y/o c) el antígeno y el adyuvante.

En determinados aspectos, se proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) administrar una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25 al individuo; y b) administrar un adyuvante al individuo. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra junto con o simultáneamente con la célula T modificada. En algunas formas de realización, el adyuvante y la célula T modificada se administran consecutivamente. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra antes de la administración de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra después de la administración de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra sistémicamente, por ejemplo, por vía intravenosa. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra localmente, por ejemplo, en el tumor. En algunas formas de realización, el adyuvante no se halla contenido en una célula, por ejemplo, el adyuvante se halla libre en solución. En algunas formas de realización, el adyuvante se halla contenido en una célula, tal como una célula T. En algunas formas de realización, el adyuvante se suministra en la célula T de acuerdo con cualquiera de los métodos de suministro intracelular descritos en la presente. En algunas formas de realización, la célula T modificada que comprende el antígeno se prepara mediante un proceso que

comprende las siguientes etapas: c) hacer pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresadas suficientemente grandes para que el antígeno siga de manera de formar una célula T perturbada; y d) someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera la célula T modificada que comprende el antígeno. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM. En algunas formas de realización, el antígeno está encapsulado en una nanopartícula. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende además un adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante contenido en la célula T modificada y el adyuvante de la etapa b) son el mismo compuesto. En algunas formas de realización, el adyuvante contenido en la célula T modificada y el adyuvante de la etapa b) son compuestos diferentes.

En determinados aspectos, se proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un antígeno siga de manera de formar una célula T ingresada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en célula T ingresada perturbada, con lo cual se

- genera una célula T modificada que comprende el antígeno; c) administrar la célula T modificada al individuo; y d) administrar un adyuvante al individuo. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra junto con o simultáneamente con la célula T modificada. En algunas formas de realización, el adyuvante y la célula T
- 5 modificada se administran consecutivamente. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra antes de la administración de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra después de la administración de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el adyuvante se administra sistémicamente, por ejemplo, por vía intravenosa. En
- 10 algunas formas de realización, el adyuvante se administra localmente, por ejemplo, en el tumor. En algunas formas de realización, el adyuvante no se halla contenido en una célula, por ejemplo, el adyuvante se halla libre en solución. En algunas formas de realización, el adyuvante se halla contenido en una célula, tal como una célula T. En algunas formas de realización, el adyuvante se suministra en la célula
- 15 T de acuerdo con cualquiera de los métodos de suministro intracelular descritos en la presente. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM. En algunas formas de realización, el antígeno está encapsulado en una nanopartícula.
- 20 En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descrito en la presente, se refuerza la respuesta inmune. En algunas formas de realización, la respuesta inmune reforzada está orientada al antígeno.
- En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para
- 25 modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente, en el método se utiliza una constricción de deformación celular a través de la cual se hace pasar una célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro

- de la constricción es inferior al diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a
- 5 aproximadamente el 60% del diámetro de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, la constricción de deformación celular está contenida en un canal microfluídico, tal como cualquiera de los canales microfluídicos descritos en la presente. El canal microfluídico puede estar contenido en cualquiera de los dispositivos microfluídicos descritos en la presente, tales como descritos en el
- 10 siguiente capítulo titulado Dispositivos Microfluídicos. Por lo tanto, en algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente en los que se utiliza un canal microfluídico, lo que incluye una constricción de deformación celular a través de la cual se hace pasar una célula T ingresada, el método comprende hacer pasar
- 15 la célula T ingresada a través de un canal microfluídico que incluye una constricción de deformación celular contenido en cualquiera de los sistemas microfluídicos descritos en la presente. En algunas formas de realización, se aplica una fuerza deformadora a la célula T ingresada a medida que pasa a través de la constricción, con lo cual se ocasionan las perturbaciones en la célula T ingresada.
- 20 En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente, en el método se utiliza una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante. En algunas formas de realización, el antígeno y/o el adyuvante se hallan presentes en el citosol y/o en una vesícula de la célula T modificada. En algunas
- 25 formas de realización, la vesícula es un endosoma. En algunas formas de realización, el antígeno y/o el adyuvante se hallan presentes en múltiples compartimientos de la célula T modificada. En algunas formas de realización, el

antígeno o el epítipo inmunogénico están unidos a la superficie de la célula T modificada. En algunas formas de realización, la célula T modificada incluye uno más de las siguientes: células T helper, células T citotóxicas, células T de la memoria, o células killer naturales. En algunas formas de realización, la célula T

5 modificada incluye una o más de las siguientes: células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, células T CD35RO, o células gamma delta-T.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente, en el

10 método se utiliza una célula T modificada que comprende un adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante es un oligodesoxinucleótido CpG (ODN), IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I, o poli I:C. En algunas formas de realización, el adyuvante es un CpG ODN. En algunas formas de realización, el adyuvante es un CpG ODN. En algunas formas de realización, el CpG ODN no es

15 mayor de aproximadamente 50 (tales no mayor de cualquiera de los siguientes: 45, 40, 35, 30, 25, 20, o menos) nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, el CpG ODN es un CpG ODN de Clase A, un CpG ODN de Clase B, o un CpG ODN de Clase C. En algunas formas de realización, el CpG ODN comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 26–37.

20 En algunas formas de realización, el CpG ODN comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 30. En algunas formas de realización, el CpG ODN comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 31. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende una pluralidad de CpG ODNs diferentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula T modificada

25 comprende una pluralidad de CpG ODNs diferentes seleccionados entre los CPcs de Clase A, Clase B y Clase C.

Los ejemplos de adyuvante incluyen sin limitación, agonistas de los simuladores de genes de interferón (STING), agonistas del gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), y agonistas para TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y/o TLR9. Los ejemplos de adyuvante incluyen sin limitación, CpG ODN, interferón- α (IFN- α), ácido poliinosínico: policitidílico (poli I:C), imiquimod (R837), resiquimod (R848), o lipopolisacárido (LPS). En algunas formas de realización, el adyuvante es 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 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 CpG ODN es un CpG ODN de Clase A, un CpG ODN de Clase B, o un CpG ODN de Clase C. En algunas formas de realización, el adyuvante CpG ODN comprende una selección de entre el grupo consistente en 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 CpG ODN adyuvante es un oligonucleótido CpG ODN 1826 (SEQ: TCCATGACGTTCTGACGTT) o CpG ODN 2006 (también conocido como CpG ODN 7909) (SEQ: TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT). En algunas formas de realización, el adyuvante es CpG ODN 7909. En algunas formas de realización, el agonista de RIG-I comprende ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C). También es posible utilizar múltiples adyuvantes en conjunción con antígenos para reforzar la suscitación de una respuesta inmune. En algunas formas de realización, los PBMC modificados comprenden más de un adyuvante. También es posible utilizar múltiples adyuvantes en conjunción con antígenos para reforzar la suscitación de una respuesta inmune. En algunas formas de realización, los PBMC modificados comprenden más de un adyuvante. En algunas formas de realización, los PBMC

modificados comprenden cualquier combinación de 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.

El cualquiera de las formas de realización descritas en la presente, y a menos que
5 se indique otra cosa, el término “adyuvante” puede referirse a: (a) un adyuvante que es sometido e incubación junto con, y pasa a través de, una célula T perturbada, o (b) un adyuvante administrado conjuntamente con células T a un individuo.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente, en el
10 método se utiliza una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende un epítipo inmunogénico. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de péptidos o ARNm aislado a partir de una célula enferma. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico
15 deriva de una proteína expresada o sobreexpresada ectotópicamente en una célula de enfermedad. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un neoantígeno, por ejemplo, un neoantígeno asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico comprende un neoepítipo, por ejemplo, un neoepítipo asociado a cáncer. En algunas formas de realización,
20 el epítipo inmunogénico deriva de un no autoantígeno. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un self antígeno mutado o de alguna otra manera alterado. En algunas formas de realización, el epítipo inmunogénico deriva de un antígeno de tumor, antígeno viral, antígeno bacteriano, o antígeno fúngico. En algunas formas de realización, el antígeno comprende una pluralidad
25 de epítipos inmunogénicos. En algunas formas de realización, algunos de entre la pluralidad de epítipos inmunogénicos se derivan de la misma fuente. Por ejemplo, en algunas formas de realización, algunos de entre la pluralidad de epítipos

inmunogénicos se derivan del mismo antígeno viral. En algunas formas de realización, la totalidad de la pluralidad de epítomos inmunogénicos se derivan de la misma fuente. En algunas formas de realización, ninguno de entre la pluralidad de epítomos inmunogénicos se deriva de la misma fuente. En algunas formas de
5 realización, la célula T modificada comprende una pluralidad de antígenos diferentes.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente que utilizan una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende un epítomo
10 inmunogénico, el antígeno es un polipéptido y el epítomo inmunogénico es un epítomo de péptido inmunogénico. En algunas formas de realización, el epítomo de péptido inmunogénico está fusionado a un polipéptido que flanquea una terminal N y/o un polipéptido que flanquea una terminal C. En algunas formas de realización, el epítomo péptido inmunogénico fusionado al polipéptido que flanquea el terminal
15 N y/o el polipéptido que flanquea una terminal C es una secuencia de presentación no natural. En algunas formas de realización, los polipéptidos que flanquean el terminal N y el terminal C derivan de un péptido sintético largo (SLP, synthetic long peptide) inmunogénico. En algunas formas de realización, los polipéptidos que flanquean el terminal N y el terminal C derivan de un SLP inmunogénico asociado
20 a enfermedad. En algunas formas de realización, el polipéptido que flanquea el terminal N comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 5–10 y/o el polipéptido que flanquea una terminal C comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 11–17.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para
25 modular una respuesta inmune en un individuo descrito en la presente que utilizan una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende un epítomo inmunogénico, el antígeno o epítomo inmunogénico contenido en éste se deriva de

un antígeno de papilomavirus humano (HPV). En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de cualquiera de los siguientes: HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, y 82. En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo inmunogénico

5 contenido en éste se deriva de un antígeno de HPV-16 o un antígeno de HPV-18. En otras formas de realización, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de un antígeno de HPV E6 (por ejemplo, un antígeno de HPV -16 o de HPV-18 E6) o un antígeno de HPV E7 (por ejemplo, un antígeno de HPV-16 o de HPV-18 E7). En algunas formas de realización, el antígeno comprende un

10 péptido HLA-A2-restringido derivado de HPV E6 y/o E7. En algunas formas de realización, el antígeno comprende un fragmento de una proteína HPV-16 E6 entre los residuos 29 y 38 (es decir, HPV-16 E6₂₉₋₃₈). En algunas formas de realización, el antígeno comprende un fragmento de una proteína HPV-16 E6 entre los residuos 48 y 57 (es decir, HPV-16 E6₄₈₋₅₇). En algunas formas de realización, el antígeno

15 comprende un fragmento de una proteína HPV-16 E7 entre los residuos 11 y 20 (es decir, HPV-16 E7₁₁₋₂₀). En algunas formas de realización, el antígeno comprende un fragmento de una proteína HPV-16 E7 entre los residuos 49 y 57 (es decir, HPV-16 E7₄₉₋₅₇). En algunas formas de realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-4.

20 En algunas formas de realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-4 flanqueado con un polipéptido N-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 5-10 y un polipéptido C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 11-17. En algunas formas de

25 realización, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18-25.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente que utilizan una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende un epítipo inmunogénico, el antígeno o epítipo inmunogénico contenido en éste se deriva de un antígeno de citomegalovirus humano (HCMV). En algunas formas de realización, el HCMV es la cepa AD169 o la cepa Merlin HCMV. En algunas formas de realización, el antígeno comprende un péptido HLA-A2-restringido derivado de HCMV pUL83. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende una pluralidad de antígenos que comprende una pluralidad de epítipos inmunogénicos. En algunas formas de realización, después de la administración a un individuo de la célula T modificada que comprende la pluralidad de antígenos que comprende la pluralidad de epítipos inmunogénicos, ninguno de entre la pluralidad de epítipos inmunogénicos disminuye una respuesta inmune en el individuo con respecto a cualquiera de los otros epítipos inmunogénicos. En algunas formas de realización, el antígeno es un polipéptido y el epítipo inmunogénico es un epítipo de péptido inmunogénico. En algunas formas de realización, el epítipo de péptido inmunogénico está fusionado a un polipéptido que flanquea una terminal N y/o un polipéptido que flanquea una terminal C. En algunas formas de realización, el antígeno es un polipéptido que comprende un epítipo péptido inmunogénico y una o más secuencias péptidas heterólogas. En algunas formas de realización, el antígeno es un polipéptido que comprende un epítipo péptido inmunogénico que está flanqueado en el terminal N y en el terminal por secuencias péptido heterólogas. En algunas formas de realización, las secuencias péptido heterólogas flanqueantes se derivan de péptidos inmunogénicos asociados a enfermedad.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente que utilizan

una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende un epítopo inmunogénico, el antígeno es apto para ser procesado de manera de obtener un péptido restringido de MHC de clase I y/o un péptido restringido de MHC de clase II. En algunas formas de realización, el antígeno es apto para ser procesado de manera de obtener un péptido restringido de MHC de clase I. En algunas formas de realización, el antígeno es capaz de ser procesado obteniéndose un péptido restringido de MHC de clase II. En algunas formas de realización, el antígeno comprende una pluralidad de epítomos inmunogénicos, y es apto para ser procesado de manera de obtener un péptido restringido de MHC de clase I y un péptido restringido de MHC de clase II. En algunas formas de realización, algunos de entre la pluralidad de epítomos inmunogénicos se derivan de la misma fuente. En algunas formas de realización, la totalidad de la pluralidad de epítomos inmunogénicos se derivan de la misma fuente. En algunas formas de realización, ninguno de entre la pluralidad de epítomos inmunogénicos se deriva de la misma fuente.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente en los que se utiliza una célula T modificada, la célula T modificada comprende una pluralidad de antígenos que comprende una pluralidad de epítomos inmunogénicos. En algunas formas de realización, ninguno de entre la pluralidad de epítomos inmunogénicos disminuye una respuesta inmune en el individuo con respecto a cualquiera de los otros epítomos inmunogénicos.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente en los que se utiliza una célula T modificada, la célula T modificada comprende un antígeno y un adyuvante. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende el adyuvante en una concentración de entre aproximadamente 1 pM y

aproximadamente 10 mM. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración de adyuvante presente en la célula T modificada es cualquier concentración inferior a aproximadamente 1 pM, a aproximadamente 10 pM, a aproximadamente 100 pM, a aproximadamente 1 nM, a aproximadamente 10 nM, a aproximadamente 100 nM, a aproximadamente 1 μ M, a aproximadamente 10 μ M, a aproximadamente 100 μ M, a aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 mM.

En algunas formas de realización, la concentración de adyuvante presente en la célula T modificada es mayor a aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización, la concentración del antígeno en la célula T modificada puede ser cualquiera de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 10 pM, entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y aproximadamente 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 100 nM 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 relación molar entre antígeno y adyuvante presentes en la célula T modificada es cualquiera de entre aproximadamente 10000:1 a aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la relación molar entre el antígeno y el adyuvante presentes en la célula T modificada es aproximadamente cualquiera de los siguientes: 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 entre el antígeno y el adyuvante presentes en la célula T modificada es cualquiera de 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 T modificada comprende un complejo que comprende: a) el antígeno, b) el antígeno y por lo menos otro antígeno, y/o c) el antígeno y el adyuvante.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente en los que se utiliza una célula T modificada, la célula T modificada comprende además un agente que refuerza la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una correspondiente célula T modificada que no comprende el agente. En algunas formas de realización, el agente es un agente de estabilización o un co-factor. En algunas formas de realización, el agente es albúmina. En algunas formas de realización, la albúmina es de ratón, de bovino o humana. En algunas formas de realización, el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, sacarosa-D, PEG1500, arginina-L, glutamina-L, o EDTA.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo descritos en la presente en los que se utiliza una célula T modificada, la célula T modificada comprende otra modificación. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de Clase I. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para disminuir la expresión de MHC de Clase I. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para incrementar la expresión de MHC de Clase I. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra

- modificación para modular la expresión de MHC de Clase II. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para disminuir la expresión de MHC de Clase II. En algunas formas de realización, la célula T modificada comprende otra modificación para incrementar la expresión de MHC de
- 5 Clase II. En algunas formas de realización, una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de la célula T modificada se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de correspondiente células T modificadas que no comprenden la
- 10 modificación adicional. En algunas formas de realización, la semivida circulante de la célula T modificadas en un individuo al que se administraron se incrementa en comparación con la semivida circulante de las correspondientes células T modificadas que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que fueron suministrados.
- 15 En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo que utilizan una célula T modificada, descritos en la presente, el método comprende administrar la célula T modificada al individuo. En algunas formas de realización, la célula T modificada es alogénico con respecto al individuo. En algunas formas de realización, la célula T modificada
- 20 es autóloga con respecto al individuo. En algunas formas de realización, el individuo ha sido preconditionado para modular la inflamación y/o una respuesta inmune. En algunas formas de realización, el individuo ha sido preconditionado para disminuir una inflamación y/o una respuesta inmune. En algunas formas de realización, el individuo ha sido preconditionado para incrementar una inflamación y/o una
- 25 respuesta inmune. En algunas formas de realización, la administración de la célula T modificada al individuo tiene como resultado la activación y/o expansión de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos para el antígeno. En algunas formas de

realización, la administración de la célula T modificada al individuo tiene como resultado la activación y/o expansión de células helper T (Th) específicas para el antígeno. En algunas formas de realización, la cantidad de células T modificadas administradas al individuo es de entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células. En algunas formas de realización, la cantidad de células T modificadas administradas al individuo es inferior a aproximadamente cualquiera de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} y aproximadamente 1×10^{12} células. En algunas formas de realización, la cantidad de células T modificadas administradas al individuo es de entre aproximadamente cualquiera de los siguientes: 1×10^6 y 1×10^7 , 1×10^7 y 1×10^8 , 1×10^8 y 1×10^9 , 1×10^9 y 1×10^{10} , 1×10^{10} y 1×10^{11} y 1×10^{11} y 1×10^{12} células. 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, administraciones, o más de aproximadamente 10 administraciones. En algunas formas de realización, el intervalo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de la célula T modificada es de entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 1 mes. En algunas formas de realización, la administración es diaria, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanalmente, y semanalmente, o mensualmente. En algunas formas de realización, las administraciones sucesivas se aplican durante hace un año o más.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo que utilizan una célula T modificada descrito en la presente, el método comprende además administrar al individuo un segundo adyuvante. En algunas formas de realización, el segundo adyuvante se administra sistémicamente, por ejemplo, por vía intravenosa. En algunas formas de realización, el segundo adyuvante se administra localmente, por ejemplo, en el

tumor. En algunas formas de realización, el segundo adyuvante no se halla contenido en una célula, por ejemplo, el segundo adyuvante se halla libre en solución. En algunas formas de realización, el segundo adyuvante es IFN- α o un CpG ODN. En algunas formas de realización, el adyuvante contenido en la célula

5 T modificada y el segundo adyuvante son el mismo compuesto. Por ejemplo, en las formas de realización, la célula T modificada comprende un CpG ODN, y el segundo adyuvante es también el CpG ODN. En algunas formas de realización, el adyuvante contenido en la célula T modificada y el segundo adyuvante son compuestos diferentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula T modificada

10 comprende un CpG ODN, y el segundo adyuvante es IFN- α . En algunas formas de realización, la célula T modificada y el segundo adyuvante se aplican conjuntamente o simultáneamente. En algunas formas de realización, la célula T modificada y el segundo adyuvante se administran secuencialmente. En algunas formas de realización, la célula T modificada se administra antes de administrar el

15 segundo adyuvante. En algunas formas de realización, la célula T modificada se administra después de la administración del segundo adyuvante.

En algunas formas de realización, de acuerdo con cualquiera de los métodos para modular una respuesta inmune en un individuo que utilizan una célula T modificada descritos en la presente, el método comprende además administrar un inhibidor de

20 punto de verificación inmune al individuo. En algunas formas de realización, la célula T modificada y el inhibidor de punto de verificación inmune se administran al individuo simultáneamente. En algunas formas de realización, la célula T modificada y el inhibidor de punto de verificación inmune se administran al individuo al mismo tiempo. En algunas formas de realización, la célula T modificada y el

25 inhibidor de punto de verificación inmune se administran al individuo consecutivamente. En algunas formas de realización, la célula T modificada se administran al individuo después de la administración del inhibidor de punto de

verificación inmune. En algunas formas de realización, la célula T modificada se administra al individuo antes de la administración del inhibidor de punto de verificación inmune. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto está dirigido hacia uno de los siguientes: PD-1, PD-L1, CTLA-4, y TIM-3. Los ejemplos

5 de inhibidores de punto de dedicación inmune al que el inhibidor está dirigido incluyen sin invitación PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de verificación inmune está dirigido a uno más de los siguientes: PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de verificación inmune es uno o más de los

10 siguientes: un anticuerpo que se une a PD-1, un 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 otras formas de realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o cualesquiera variantes, por ejemplo, sin limitación, un fragmento de anticuerpo, un fragmento variable de cadena simple

15 (ScFv, single chain variable fragment, o un fragmento de vinculación de a antígeno (Fab, fragment antigen-binding). En otras formas de realización, el anticuerpo puede ser específico, biespecífico o multiespecífico. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de verificación inmune consiste en uno o más compuestos químicos que se unen a y/o inhiben uno o más de los siguientes: PD-

20 1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de verificación inmune consiste en uno o más péptidos que se unen a y/o inhiben uno o más de los siguientes: PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 o TIM-3.

Otro ejemplo de inhibidor de punto de verificación inmune está dirigido a, sin limitación: TIGIT, VISTA, TIM1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA. En algunas formas de

25 realización, el inhibidor de punto de verificación inmune está dirigido a uno o más de los siguientes: TIGIT, VISTA, TIMd1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de verificación inmune es uno o más de

los siguientes: un anticuerpo que se une 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 otras formas de realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o cualesquiera variantes, por ejemplo sin limitación, un fragmento de anticuerpo, un scFv, un Fab). En otras formas de realización, el anticuerpo puede ser específico, biespecífico o multiespecífico. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de verificación inmune consiste en uno o más compuestos químicos que se unen a y/o inhiben, uno o más de los siguientes PD–1, PD–L1, CTLA–4, LAG3, TIM–3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7–H4 (VTCN1) o BTLA. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de verificación inmune consiste en uno o más péptidos que se unen a y/o inhiben uno o más de los siguientes PD–1, PD–L1, CTLA–4, LAG3, TIM–3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7–H4 (VTCN1) o BTLA.

Puede utilizarse la quimioterapia en combinación con cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente para lograr efectos aditivos o sinérgicos contra cánceres, por ejemplo, cánceres asociados con HPV. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administran en combinación con la administración de una quimioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas y la quimioterapia se administra simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas y la quimioterapia se administran consecutivamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra en combinación con la administración de una quimioterapia y en combinación con un inhibidor del punto de verificación inmune.

En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas se administra antes de la administración de la quimioterapia. En

algunas formas de realización, la composición que comprende las células T se administra después de la administración de la quimioterapia. Por ejemplo, la composición que comprende las células T modificadas se administra aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana antes de la administración de la quimioterapia. 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, antes de la administración de la quimioterapia. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T 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
5 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 T modificadas se administra después de la administración de la quimioterapia. Por
10 ejemplo, la composición que comprende las células T modificadas se administra de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana después de la administración de la quimioterapia. 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,
15 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
20 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 T modificadas se administra
entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas, entre
25 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 T modificadas y/o múltiples administraciones 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 administraciones, catorce administraciones, o quince administraciones de la composición que comprende las células T 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 veinticinco

administraciones, menos de treinta administraciones, menos de cincuenta administraciones, menos de setenta y cinco administraciones, menos de cien, o menos de doscientos administraciones de la composición que comprende las células T modificadas y/o la quimioterapia.

- 5 Los ejemplos de quimioterapia pueden ser dependientes del ciclo de las células o ser independientes del ciclo de las células. En algunas formas de realización, la quimioterapia comprende uno o más agentes quimioterapéuticos. En algunas formas de realización, un agente quimioterapéutico puede apuntar a uno más de los siguientes: división de las células, ADN, o metabolismo, en el cáncer. En
- 10 algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es un agente basado en platino, tales como sin limitación: cisplatino, oxalilplatino o carboplatino. En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es un taxano (tales como docetaxel o paclitaxel). En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es 5-fluorouracilo, doxorrubicina, o irinotecano. En algunas
- 15 formas de realización, el agente quimioterapéutico es uno o más de los siguientes: un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico antitumoral, un inhibidor de la topoisomerasa o un inhibidor mitótico. En algunas formas de realización, la quimioterapia comprende cisplatino.

- Puede utilizarse la radioterapia en combinación con cualquiera de las células T
- 20 modificadas descritas en la presente para lograr efectos aditivos o sinérgicos contra cánceres, por ejemplo, cánceres asociados con el HPV. 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
- 25 radioterapia se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la composición que comprende las células T modificadas y la radioterapia se administran consecutivamente. 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 verificación 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 entre aproximadamente 1 hora y 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 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 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
5 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
10 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
15 ejemplo, la composición que comprende las células T modificadas se administra
entre aproximadamente 1 hora a 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,
20 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
25 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

5 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

10 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

15 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

20 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 método comprende dos administraciones, tres administraciones, cuatro

25 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 comprende las células T y/o de 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 administraciones, menos de setenta y cinco administraciones, menos de cien, o menos de doscientos administraciones de la composición que comprende las células T modificadas y/o la radioterapia.
- 5 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 doscientos administraciones de la composición que comprende las células T modificadas y/o la radioterapia.
- 10 En determinados aspectos, se proporciona un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: administrar al individuo una célula T modificada asociada a un antígeno, en donde la célula T modificada se prepara mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) someter a incubación una célula T ingresada junto con i) un antígeno, o ii) y un antígeno y un
- 15 adyuvante, durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno se asocie a la superficie celular de la célula T ingresada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, con lo cual se genera una célula T modificada asociada al antígeno; y b) administrar la célula T modificada al individuo .
- En determinados aspectos, se proporciona una célula T modificada para ser
- 20 utilizada en un método de tratamiento médico, comprendiendo dicho método: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada que comprende un antígeno a través de una constricción de deformación celular, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en
- 25 la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un adyuvante pase a su través de manera de formar una célula T ingresada perturbada; b) someter a incubación la célula T

ingresada perturbada junto con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo . En algunas formas de realización, la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM. En algunas formas de realización, el adyuvante está encapsulado en una nanopartícula.

En determinados aspectos, se proporciona una célula T modificada para ser utilizada en el tratamiento del cáncer, de una Enfermedad infecciosa o de una enfermedad viral en un individuo, comprendiendo dicho método: a) pasar una suspensión de células que comprende una célula T ingresada que comprende un antígeno a través de una constricción de deformación celular, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T ingresada presente en la suspensión, con lo cual se causan perturbaciones en la célula T ingresada suficientemente grandes para que un adyuvante pase a su través de manera de formar una célula T ingresada perturbada; b) someter a incubación la célula T ingresada perturbada junto con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante ingrese en la célula T ingresada perturbada, con lo cual se genera una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo . En algunas formas de realización, el antígeno está asociado a un cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad viral. En algunas formas de realización, la concentración del adyuvante sometido a incubación junto con la célula T ingresada perturbada es de entre aproximadamente 1 pM y 10 mM. En algunas formas de realización, el adyuvante está encapsulado en una nanopartícula.

En algunas formas de realización, las células T modificadas de la invención no inducen una tolerancia en un individuo. En algunas formas de realización, las células T modificadas no suprimen una respuesta inmune en un individuo. En algunas formas de realización, las células T modificadas no comprenden un factor tolerogénico. En algunas formas de realización, las células T modificadas no se administran combinados con un factor tolerogénico. En algunas formas de realización, las células T modificadas no se administran antes, simultáneamente con, ni después, de la administración de un factor tolerogénico.

10 Antígenos

En algunas formas de realización la invención utiliza el suministro de antígenos para modular una respuesta inmune, en donde el antígeno es suministrado a una célula T por medio de cualquiera de los métodos descritos en la presente. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno individual. En algunas formas de realización, el antígeno es una mezcla de antígenos. Un antígeno es una sustancia que estimula una respuesta inmune específica, tal como una respuesta inmune mediada por célula o anticuerpo. Los antígenos se ligan a receptores expresados por inmunocélulas, tales como los receptores de células T (TCRs, receptores de células T) que son específicos con respecto a un antígeno en particular. La ligación entre antígeno y receptor desencadena subsiguientemente vías de señalización intracelular que conducen a vías efectoras inmunes situadas corriente abajo, tales como la activación de las células, la producción de citoquinas, la migración de las células, la secreción del factor citotóxico, y la producción de anticuerpos.

En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno polipeptídico. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno asociado a enfermedad. En algunas formas de realización, los antígenos derivan de fuentes extrañas, tales como bacterias, hongos, virus o alérgenos. En algunas formas de realización, los

antígenos derivan de fuentes internas, tales como autoproteínas (es decir, autoantígenos) o una porción de una autoproteína. En algunas formas de realización, el antígeno es un autoantígeno mutado o de alguna otra manera alterado. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno de tumor.

- 5 En algunas formas de realización, el antígeno se halla en un lisato de células. Los autoantígenos son antígenos presentes sobre o en las células propias de un organismo. Normalmente, los autoantígenos no estimulan una respuesta inmune, pero en el contexto de enfermedades autoinmunes, tales como la Diabetes de Tipo I o artritis reumatoide, o cuando se sobreexpresan o expresan de manera
- 10 aberrante/ectópicamente.

En algunas formas de realización, el antígeno está asociado con un virus. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno viral. Los ejemplos de antígenos virales incluyen antígenos de HPV, antígenos de HCMV, antígenos de SARS-CoV, y antígenos de influenza.

- 15 En algunas formas de realización, el antígeno está asociado con un microorganismo, por ejemplo, una bacteria. En algunas formas de realización, la respuesta inmune modulada comprende una respuesta inmune patológica incrementada al microorganismo, por ejemplo, una bacteria.

- En determinados aspectos, la invención utiliza métodos para suministrar un
- 20 antígeno en una célula T, comprendiendo el método hacer pasar una suspensión de células que comprende la célula T a través de una constricción, en donde dicha constricción deforma la célula T, con lo cual se causa una perturbación de la célula de manera tal que el antígeno ingresa en la célula, en donde dicha suspensión de células entra en contacto con el antígeno. En algunas formas de realización, el
- 25 antígeno se suministra a la célula T *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*.

En algunas formas de realización, el antígeno por suministrar es sometido a purificación. En algunas formas de realización, el antígeno representa por lo menos

aproximadamente el 60% en peso (peso seco) del antígeno de interés. En algunas formas de realización, el antígeno purificado representa por lo menos aproximadamente el 75%, 90%, o 99% del antígeno de interés. En algunas formas de realización, el antígeno purificado es de por lo menos aproximadamente el 90%,
5 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99%, o 100% (peso/peso) del antígeno de interés. La pureza se determina mediante cualquier método conocido, lo que incluye, sin limitación, la cromatografía de columna, la cromatografía de capa delgada (TLC, thin layer chromatography), la cromatografía líquida de elevada performance (HPLC, high-performance liquid chromatography), la espectroscopia
10 de resonancia magnética nuclear (NMR, nuclear magnetic resonance, la espectrometría de masa, o la electroforesis en gel SDS-PAGE. El ADN o ARN purificado se definen como ADN o ARN que se halla libre de ácidos nucleicos exógenos, carbohidratos y lípidos.

15 Adyuvantes

Los adyuvantes pueden utilizarse para reforzar una respuesta inmune de las células (por ejemplo una respuesta de células T), tales como una respuesta inmune a un antígeno. También es posible utilizar múltiples adyuvantes para reforzar una respuesta inmune, y puede utilizarse en conjunción con antígenos, por ejemplo,
20 para reforzar una respuesta inmune a los antígenos en comparación con una respuesta inmune a los antígenos solamente. En algunas formas de realización, la invención utiliza el suministro de adyuvantes para reforzar una respuesta inmune, en donde el adyuvante es suministrado a una célula T por medio de cualquiera de los métodos descritos en la presente. En algunas formas de realización, el
25 adyuvante refuerza una respuesta inmune a un antígeno. Por ejemplo, el adyuvante puede promover la presentación inmunogénica del antígeno por una célula que presente un antígeno. En algunas formas de realización, el adyuvante se introduce

simultáneamente con el antígeno. En algunas formas de realización, el adyuvante y antígeno se introducen consecutivamente. En algunas formas de realización, el adyuvante se introduce antes de la introducción del antígeno. En algunas formas de realización, el adyuvante se introduce después de la introducción del antígeno.

- 5 En algunas formas de realización, el adyuvante altera el homing de la célula T (por ejemplo, el homing de la célula a un tejido diana, tales como un tumor) en comparación con el homing de la célula T en ausencia del adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante incrementa la proliferación de las células T a diferencia de la proliferación de las células T en la ausencia del adyuvante.
- 10 En determinados aspectos, la invención emplea métodos para generar una célula T que presenta un antígeno inmunogénico que comprende un antígeno procedente de una célula T ingresada, en donde la célula T ingresada se hace pasar a través de una constricción , en donde dicha construcción deforma la célula T ingresada con lo cual se causa una perturbación de la célula de manera tal que un antígeno
- 15 ingresa en la célula T ingresada, con lo cual se genera la célula T que presenta el antígeno inmunogénico que comprende el antígeno.

- En determinados aspectos, la invención utiliza métodos para suministrar un adyuvante en una célula T, comprendiendo el método hacer pasar una suspensión de células que comprende la célula T a través de una constricción, en donde dicha
- 20 constricción deforma la célula T, con lo cual se ocasiona una perturbación de la célula T de manera tal que el adyuvante ingresa en la célula, en donde dicha suspensión de células entra en contacto con el adyuvante. En algunas formas de realización, el adyuvante se suministra en la célula T *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*.

Sistemas microfluídicos y sus componentes

Canales microfluídicos para proporcionar una constricción de deformación celular

En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para modular
 5 una respuesta inmune para lo cual se hace pasar una suspensión de células que
 comprende una célula T a través de una constricción, en donde la constricción
 deforma la célula T con lo cual se ocasiona una perturbación de la célula T de
 manera tal que un antígeno y/o adyuvante ingresa en la célula T, en donde la
 constricción está contenida dentro de un canal microfluídico. En algunas formas de
 10 realización, es posible colocar múltiples construcciones en paralelo y/o en serie
 dentro del canal microfluídico. Ejemplos de canales microfluídicos que contienen
 constricciones deformadoras de células para ser utilizados en los métodos
 divulgados en la presente se describen en el documento WO2013059343. Ejemplos
 de superficie que tienen poros para ser utilizados en los métodos divulgados en la
 15 presente se describen en el documento WO2017041050.

En algunas formas de realización, el canal microfluídico incluye un lumen y está
 configurado de manera tal que una célula T en suspensión en un tampón puede
 pasar a su través, en donde el canal microfluídico incluye una constricción. El canal
 microfluídico puede ser hecho de cualquiera dentro de un número de materiales
 20 que incluyen silicona, metal (por ejemplo, acero inoxidable), material plástico (por
 ejemplo, poliestireno), materiales cerámicos, vidrio, sustratos cristalinos, sustratos
 amorfos o polímeros (por ejemplo, poli-metil metacrilato (PMMA), PDMS,
 copolímero de olefina cíclico (COC, Cyclic Olefin Copolymer), etc.). La fabricación
 del canal microfluídico puede llevarse a cabo mediante cualquier conocido en la
 25 especialidad, lo que incluye grabado en seco, grabado en húmedo, fotolitografía,
 moldeo por inyección, ablación mediante láser, o máscaras de SU-8.

En algunas formas de realización, la constricción dentro del canal microfluídico incluye una porción de entrada, un punto central, y una porción de salida. En algunas formas de realización, la longitud, profundidad y ancho 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 célula T. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción dentro del canal microfluídico es de aproximadamente el 20%, a de aproximadamente el 99% de diámetro de la célula T. En algunas formas de realización, el tamaño de la constricción es de aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 30%, de aproximadamente el 40%, de aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 60%, de aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 90%, o de aproximadamente el 99% del diámetro de la célula T. En algunas formas de realización, el tamaño de la constricción es de aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 30%, de aproximadamente el 40%, de aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 60%, de aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 90%, o de aproximadamente el 99% de la distancia en sección transversal mínima de la célula T. En algunas formas de realización, el canal comprende un ancho de construcción de entre aproximadamente 2 μm y aproximadamente 10 μm o cualquier ancho o intervalo de anchos entre estos valores. Por ejemplo, el ancho de la constricción puede ser cualquiera de los siguientes: aproximadamente 2 μm , aproximadamente 3 μm , aproximadamente 4 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 6 μm , 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 porción de entrada, el punto central, y el punto de salida, también pueden variar. Por ejemplo, las secciones transversales pueden

tener una configuración circular, elíptica, de una hendidura alargada, cuadrada, hexagonal, o triangular. La porción de entrada define un ángulo de constricción, en donde el ángulo de constricción está optimizado para evitar el taponamiento del canal y optimizado para un suministro reforzado de un compuesto en la célula T. El

5 ángulo de la porción de salida también puede variar. Por ejemplo, el ángulo de la porción de salida está configurado para reducir la probabilidad de una turbulencia que podría resultar en un flujo no laminar. En algunas formas de realización, las paredes de la porción de entrada y de la porción de salida son lineales. En otras formas de realización, las paredes de la porción de entrada y/o de la porción de

10 salida están curvadas.

En algunas formas de realización de acuerdo con cualquiera de los métodos o composiciones descritos en la presente, el diámetro de la constricción es una función del diámetro de la célula T. En algunas formas de realización, el diámetro de una célula T se mide por la distancia mínima en sección transversal de la célula

15 T.

En algunas formas de realización de acuerdo con cualquiera de los métodos o composiciones descritos en la presente, el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 99% del diámetro medio de las células T ingresadas. En algunas formas de realización, el diámetro de la

20 constricción es cualquiera de entre los siguientes: de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 90%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 60%, de aproximadamente 40% a aproximadamente el 60%, o de aproximadamente el 30% a aproximadamente el

25 45% del diámetro medio de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de entre los siguientes: de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 20%

a aproximadamente el 30%, de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 40%, de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 60%, de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%, o de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 99% del diámetro medio de la célula T ingresada. En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de entre los siguientes: 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 célula T ingresada.

En algunas formas de realización de acuerdo con cualquiera de los métodos o composiciones descritos en la presente, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 1,5 μm a aproximadamente 10 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 8 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 2,5 μm a aproximadamente 6 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 5 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 4 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de entre los siguientes: de aproximadamente 1,5 μm a aproximadamente 10 μm , de aproximadamente 1.75 μm a aproximadamente 9 μm , de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 8 μm , de aproximadamente 2.25 μm a aproximadamente 7 μm , de aproximadamente 2,5 μm a aproximadamente 6 μm , de aproximadamente 2.75 μm a aproximadamente 5,5 μm , de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 5 μm , de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 4 μm , de aproximadamente 3,1 μm a aproximadamente 3,9 μm , de aproximadamente el 3,2 μm a aproximadamente

3,8 μm , de aproximadamente 3,3 μm a aproximadamente 3,7 μm , o de aproximadamente 3,4 μm a aproximadamente 3,6 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de entre los siguientes: aproximadamente 1,0 μm , 1,2 μm , 1,4 μm , 1,6 μm , 1,8 μm , 2,0 μm , 2,2 μm , 2,4 μm ,
 5 2,6 μm , 2,8 μm , 3,0 μm , 3,2 μm , 3,4 μm , 3,6 μm , 3,8 μm , 4,0 μm , 4,2 μm , 4,4 μm , 4,6 μm , 4,8 μm , 5,0 μm , 5,5 μm , 6,0 μm , 6,5 μm , 7,0 μm , 8,0 μm , 9,0 μm o aproximadamente 10,0 μm . En algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es de aproximadamente 3,5 μm .

En algunas formas de realización de acuerdo con cualquiera de los métodos o
 10 composiciones descritos en la presente, 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 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
 15 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 algunas formas de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de entre los siguientes: de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 14 μm , de
 20 aproximadamente 4 μm a aproximadamente 12 μm , de aproximadamente 6 μm a aproximadamente 9 μm , de aproximadamente 4 μm a aproximadamente 6 μm , de aproximadamente 4 μm a aproximadamente 5 μm , de aproximadamente 3,5 μm a aproximadamente 7 μm , de aproximadamente 3,5 μm a aproximadamente 6,3 μm ,
 , de aproximadamente 3,5 μm a aproximadamente 5,6 μm , de aproximadamente
 25 3,5 μm a aproximadamente 4,9 μm , de 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 entre los siguientes: 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 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

- 5 de realización, el diámetro de la constricción es cualquiera de entre los siguientes: 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 aproximadamente 4,5 μm .

- En algunas formas de realización de acuerdo con cualquiera de los métodos o
- 10 composiciones descritos en la presente, se hacen pasar las células T ingresadas a través de la constricción con un caudal de flujo de entre aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 200 mL/min o cualesquiera uno o más valores en dicho intervalo. En algunas formas de realización, el caudal de flujo es de entre
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 175 mL/min, de
- 15 aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 150 mL/min, de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 125 mL/min, de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 100 mL/min, de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 50 mL/min, de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 25 mL/min, de
- 20 aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 10 mL/min, de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 7,5 mL/min, de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 5,0 mL/min, de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 2,5 mL/min, de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 1 mL/min, de
- 25 aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 0,1 mL/min o de
- aproximadamente 0,001 mL/min a aproximadamente 0,01 mL/min. En algunas formas de realización, el caudal de flujo es de entre aproximadamente 0,001

mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 0,01 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 0.1mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 1 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 10 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 50 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 75 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 100 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 150 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 0,5 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 1 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente el 2,5 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente el 5 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 7,5 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 10 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, de aproximadamente 25 mL/min a aproximadamente 200 mL/min, o aproximadamente 175 mL/min a aproximadamente 200 mL/min. En algunas formas de realización, se hacen pasar las células T ingresadas a través de la constricción con un caudal de flujo de entre aproximadamente 10 mL/min a aproximadamente 200 mL/min. En algunas formas de realización, se hacen pasar las células T ingresadas a través de la constricción con un caudal de flujo de aproximadamente 100 mL/min.

En algunas formas de realización de acuerdo con cualquiera de los métodos o composiciones descritos en la presente, la constricción puede tener cualquier configuración conocida en la técnica; por ejemplo una forma tridimensional o una forma bidimensional. La forma bidimensional, tal como la forma en sección transversal, de la constricción puede ser, sin limitación, circular, elíptica, redonda, de forma de estrella, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, u octagonal. La forma tridimensional de la constricción puede ser, sin limitación,

cilíndrica, cónica, o cuboide. En algunas formas de realización, la forma en sección transversal de la constricción es un rectángulo. En algunas formas de realización, la forma en sección transversal de la constricción es una hendidura. En algunas formas de realización, la forma en sección transversal de la constricción es una hendidura que comprende un ancho de aproximadamente 2,5 μm a aproximadamente 10 μm y/o una profundidad de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 200 μm . En algunas formas de realización, la forma en sección transversal de la constricción es una hendidura que comprende un ancho de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 6 μm y/o una profundidad de aproximadamente 40 μm a aproximadamente 120 μm . En algunas formas de realización, la forma en sección transversal de la constricción es una hendidura que comprende un ancho de aproximadamente 3,2 μm a aproximadamente 4 μm y/o una profundidad de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 80 μm . En algunas formas de realización, la forma en sección transversal de la constricción es una hendidura que comprende un ancho de aproximadamente 3,5 μm y/o una profundidad de aproximadamente 80 μm . En otras formas de realización, la forma en sección transversal de la constricción es una hendidura 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 en 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 aproximadamente 40 μm a aproximadamente 120 μm . En algunas formas de realización, la forma en 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 aproximadamente 20 μm a aproximadamente 80 μm . En algunas formas de realización, la forma en 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 algunas formas de realización, la hendidura comprende una longitud aproximadamente 10 μm a aproximadamente 30 μm . En algunas formas de realización, la hendidura comprende una longitud aproximadamente 2 μm a

5 aproximadamente 50 μm . En algunas formas de realización, la hendidura comprende una longitud cualquiera de entre los siguientes: de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 5 μm , de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 10 μm , de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 15 μm , de aproximadamente 15 μm a aproximadamente 20 μm , de aproximadamente 20 μm a aproximadamente

10 25 μm , de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 30 μm , a aproximadamente 30 μm de aproximadamente 35 μm , a aproximadamente 35 μm a aproximadamente 40 μm , de 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 .

15 Superficies que tienen poros para proporcionar constricciones deformadoras de las células

En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para modular una respuesta inmune para lo cual se hace pasar una suspensión de células que comprende una célula T a través de una constricción, en donde la constricción

20 deforma la célula T con lo cual se ocasiona una perturbación de la célula T de manera tal que un antígeno y/o adyuvante ingresa en la célula T, en donde la constricción es un poro o se halla contenido dentro de un poro. En algunas formas de realización, el poro se halla contenido en una superficie. Ejemplos de superficies que tienen poros para ser utilizados en los métodos divulgados en la presente se

25 describen en el documento WO 2017041050.

Las superficies divulgadas en la presente pueden hacerse de cualquiera de entre un número de materiales y tomar cualquiera de entre el número de 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, el filtro es una esponja o una matriz similar a esponja. En algunas formas de realización, la superficie es una matriz.

En algunas formas de realización la superficie es una superficie de vía tortuosa. En algunas formas de realización, la superficie de vía tortuosa comprende acetato de celulosa. En algunas formas de realización, la superficie comprende un material seleccionado entre, sin limitación: polímeros sintéticos o naturales, policarbonato, silicona, vidrio, metal, aleación, nitrato de celulosa, plata, acetato de celulosa, nylon, poliéster, polietersulfona, poliacrilonitrilo (PAN), polipropileno, PVDF, politetrafluoroetileno, éster de celulosa mixto, porcelana y material cerámico.

La superficie divulgada en la presente puede tener cualquier forma conocida en la técnica; por ejemplo, una forma tridimensional. La forma bidimensional de la superficie puede ser, sin limitación, circular, elíptica, redonda, cuadrada, de forma de estrella, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, u octagonal. En algunas formas de realización, la superficie tiene una forma redonda. En algunas formas de realización, la forma tridimensional de la síntesis y cilíndrica, cónica o cuboide.

La superficie puede tener varios anchos y espesores en sección transversal. En algunas formas de realización, el ancho en sección transversal de superficie es de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 1 m o cualquier ancho en sección transversal o gama de anchos de sección transversal en el intervalo mencionado. 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 formas de realización, el espesor de superficie es variable. Por ejemplo, en algunas formas de realización, 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 en aproximadamente el 1% y aproximadamente el 90% o cualquier porcentaje o gama de porcentajes intermedios. En algunas formas de realización, la superficie tiene un espesor de entre aproximadamente 0.01 μm y

5 aproximadamente 5 mm o cualquier espesor o intervalo de espesores intermedios. En algunas formas de realización, la constricción es un poro o se halla contenido dentro de un poro. El ancho en sección transversal de los poros está relacionado con el tipo de células T por tratar. El tamaño es una función del diámetro del cluster de células T por tratar. En algunas formas de realización, el tamaño de los poros es

10 tal que una célula que pase por el poro experimenta una perturbación. En algunas formas de realización, el tamaño de los poros es inferior al diámetro de las células T. En algunas formas de realización, el tamaño de los poros es de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 99% de diámetro de la célula T. En algunas formas de realización, el tamaño de los poros es de aproximadamente

15 el 0%, de aproximadamente el 15%, de aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 30%, de aproximadamente el 40%, de aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 60%, de aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 90%, o de aproximadamente el 99% del diámetro de la célula T. El tamaño óptimo los o el ancho óptimo de su

20 sección transversal de en base a la aplicación y/o del tipo de células. T. En algunas formas de realización, el tamaño de los poros es de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 14 μm . En algunas formas de realización, el tamaño de los poros es de aproximadamente 2 μm , de aproximadamente 3 μm , de aproximadamente 4 μm , de aproximadamente 5 μm , de aproximadamente 8 μm , de aproximadamente

25 10 μm , de aproximadamente 12 μm , o de aproximadamente 14 μm . En algunas formas de realización, el ancho en sección transversal es de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 14 μm . En algunas formas de realización, el ancho en

sección transversal del poro es de aproximadamente 2 μm , de aproximadamente 3 μm , de aproximadamente 4 μm , de aproximadamente 5 μm , de aproximadamente 8 μm , de aproximadamente 10 μm , de aproximadamente 12 μm , o de aproximadamente 14 μm .

- 5 Las entradas y salidas del pasadizo de los poros pueden tener una variedad de ángulos. El ancho de los poros puede seleccionarse de manera de minimizar el atascamiento del poro mientras las células T están pasando por ellos. En algunas formas de realización el caudal de flujo a través de la superficie es de entre aproximadamente 0,001 mL/cm²/seg a aproximadamente 100 L/cm²/seg o
- 10 cualesquiera uno o más valores en dicho intervalo. Por ejemplo, el ángulo de la porción de entrada o de salida puede ser de entre aproximadamente 0 y aproximadamente 90 grados. En algunas formas de realización, la porción de entrada o de salida puede ser superior a 90 grados. En algunas formas de realización, los ángulos de entrada y de salida de los poros son idénticos. En
- 15 algunas formas de realización, los poros tienen ángulos de entrada y de salida diferentes. En algunas formas de realización, el borde del poro es liso, por ejemplo redondeado o curvado. Un borde liso de poro tiene una superficie continua, plana y uniforme sin protuberancias, crestas, ni partes desiguales. En algunas formas de realización, el borde del poro es filoso. Un borde de poro filoso tiene un borde
- 20 delgado que termina en punto o en un ángulo agudo. En algunas formas de realización, el pasadizo del poro es lineal. Un pasadizo de poro lineal no contiene curvas, curvaturas, ángulos y otras irregularidades. En algunas formas de realización, el pasadizo del poro está curvado. Un pasadizo de poro curvado está curvado o se desvía de una línea rectilínea. En algunas formas de realización, el
- 25 pasadizo del poro tiene muchas curvas; por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más curvas.

Los poros pueden tener cualquier forma conocida en la técnica, lo que incluye una forma bidimensional o tridimensional. La forma del poro (por ejemplo, su forma en sección transversal) puede ser, sin limitación, circular, elíptica, redonda, cuadrada, de forma de estrella, triangular, poligonal, pentagonal, hexagonal, heptagonal, y octagonal. En algunas formas de realización, la sección transversal del poro tiene una 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 de salida abocinada. En algunas formas de realización, la forma del poro es homogénea (es decir constante o regular) entre los poros dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, la forma del poro es heterogénea (es decir mixta o variada) entre los poros dentro de una superficie dada

Las superficies descritas en la presente pueden tener un intervalo de número total de poros. En algunas formas de realización, los poros abarcan de aproximadamente 10% al 80% del área de superficie total. En algunas formas de realización, la superficie contiene de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{30}$ el total de poros o cualquier número un intervalo de números entre los mencionados. En algunas formas de realización, la superficie comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente $1,0 \times 10^{15}$ poros/mm² de área de superficie.

Los poros pueden estar distribuidos de diversas maneras dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, los poros están distribuidos en paralelo dentro de una superficie dada. En uno de estos ejemplos, los poros están distribuidos lado a lado en la misma dirección y se hallan separados entre sí a la misma distancia dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, la distribución de los poros es ordenada u homogénea. En un ejemplo como este, los poros están distribuidos en un patrón sistemático regular o se hallan separados entre sí en una misma distancia dentro de una superficie dada. En algunas formas

de realización, la distribución de los poros es aleatoria o heterogénea. En un ejemplo como este, los poros están distribuidos en un patrón no ordenado, irregular, o se encuentran separados a diferentes distancias dentro de una superficie dada. En algunas formas de realización, múltiples superficies están distribuidas en serie.

- 5 Las múltiples superficies pueden ser homogéneas o heterogéneas en cuanto al tamaño, forma y número de los poros, con lo cual permiten el suministro simultáneo de una gama de compuestos en diferentes tipos de células T.

En algunas formas de realización, un poro individual tiene una dimensión uniforme en ancho (es decir, constante a lo largo de la longitud del pasadizo del poro). En

- 10 algunas formas de realización, un poro individual tiene un ancho variable (es decir, su ancho aumenta o disminuye a lo largo de la longitud del pasadizo del poro). En algunas formas de realización, los poros dentro de una superficie dada tienen las mismas profundidades individuales. En algunas formas de realización, los poros dentro de una superficie dada tienen diferentes profundidades individuales. En
- 15 algunas formas de realización, los poros son inmediatamente adyacentes entre sí. En algunas formas de realización, los poros están separados entre sí en una distancia. En algunas formas de realización, los poros están separados entre sí en una distancia de aproximadamente 0.001 μm a aproximadamente 30 mm o cualquier distancia o intervalos de distancias entre ellos.

- 20 En algunas formas de realización, la superficie está recubierta con un material. El material puede seleccionarse entre cualquier material conocido en la técnica, lo que incluye sin limitación, teflón, un recubrimiento adhesivo, agentes tensioactivos, proteínas, moléculas de adhesión, anticuerpos, anticoagulantes, factores que modulan la función celular, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, o proteínas de
- 25 transmembrana. En algunas formas de realización, la superficie esté recubierta con polivinilpirrolidona (PVP). En algunas formas de realización, el material está fijado de manera covalente a la superficie. En algunas formas de realización, el material

está fijado o adsorbido de manera no covalente a la superficie. En algunas formas de realización, las moléculas de superficie se liberan a medida que las células T pasan a través de los poros.

- En algunas formas de realización, la superficie tiene propiedades químicas
- 5 modificadas. En algunas formas de realización, la superficie es polar. En algunas formas de realización, la superficie es hidrofílica. En algunas formas de realización, la superficie no es polar. En algunas formas de realización, la superficie es hidrofóbica. En algunas formas de realización, la superficie está cargada. En algunas formas de realización, la superficie tiene carga positiva y/o negativa. En
- 10 algunas formas de realización, la superficie puede estar cargada positivamente en algunas regiones y cargada negativamente en otras regiones. En algunas formas de realización, la superficie tiene una carga global positiva o una carga global negativa. En algunas formas de realización, la superficie puede ser cualquiera de entre los siguientes: lisa, electropulida, rugosa, o haber sido tratada con láser. En
- 15 algunas formas de realización, la superficie comprende un zwitterión o un compuesto dipolar. En algunas formas de realización, la superficie ha sido tratada con plasma.

- En algunas formas de realización, la superficie se halla contenida dentro de un módulo más grande. En algunas formas de realización, la superficie está contenida
- 20 dentro de una jeringa, tal como una jeringa de material plástico o de vidrio. En algunas formas de realización, la superficie se halla contenido dentro de un portafiltro de material plástico. En algunas formas de realización, la superficie se halla contenida dentro de la punta de una pipeta

Perturbaciones de la célula

- 25 En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para modular una respuesta inmune para lo cual se hace pasar una suspensión de células que comprende una célula T a través de una constricción, en donde la constricción

deforma la célula T con lo cual se ocasiona una perturbación de la célula T de manera tal que un antígeno y/o adyuvante ingresa en la célula T, en donde la perturbación en la célula T es una ruptura en la célula T que permite que el material procedente del exterior de la célula T se mueve hacia dentro de la célula T (por ejemplo, un orificio, desgarramiento, cavidad, apertura, poro, ruptura, huelgo, perforación). La deformación puede ser causada, por ejemplo, por ejemplo por sollicitaciones mecánicas y/o fuerzas de cizallamiento. En algunas formas de realización, la perturbación es una perturbación dentro de la membrana de la célula T. En algunas formas de realización, la perturbación es transitoria. En algunas formas de realización, la perturbación de la célula T dura de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 2 horas, o cualquier intervalo de tiempo o gama de intervalo de tiempo entre estos valores. En algunas formas de realización, la perturbación de las células T durante de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora. En algunas formas de realización, la perturbación de las células T dura entre cualquiera de entre los siguientes valores: de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ segundos. En alguna forma de realización, la perturbación de las células T dura durante cualquiera de los siguientes intervalos de tiempo: de aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de

aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ segundos. Las perturbaciones en la célula T (por ejemplo, poros u orificios) creadas por los métodos descritos en la presente no se forman como resultado del ensamble de subunidades de proteínas de manera de formar una estructura de poros multimérica tal como la creada por hemolisinas complementarias o bacterianas.

A medida que la célula T pasa a través de la constricción, la constricción imparte temporalmente una lesión a la membrana de la célula T que permite la difusión pasiva de material a través de la perturbación. En algunas formas de realización, la célula T se deforma solamente durante un breve intervalo de tiempo, del orden de 100 μ s para minimizar la posibilidad de la activación de vías apoptóticas por intermedio de mecanismos de señalización de la célula, a pesar de lo cual son posibles otras duraciones (por ejemplo, en el intervalo de nanosegundos a horas). En algunas formas de realización, la célula T se deforma durante aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundos a aproximadamente 2 horas, o cualquier período o intervalo de tiempos entre estos valores. En algunas formas de realización, la célula T se deforma durante aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ segundo a aproximadamente 1 segundo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora. En algunas formas de realización, la célula T se deforma durante cualquiera de entre los siguientes valores: de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$, de aproximadamente el $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$, de aproximadamente el $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$, de

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 T se deforma durante cualquiera de entre los siguientes valores: de aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-5}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente el $1,0 \times 10^{-4}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ segundos. En algunas formas de realización, la deformación de la célula T influye deformatar una célula T durante un intervalo de tiempo de, sin limitación, de aproximadamente $1 \mu\text{s}$ a por lo menos aproximadamente $750 \mu\text{s}$, por ejemplo, por lo menos aproximadamente $1 \mu\text{s}$, $10 \mu\text{s}$, $50 \mu\text{s}$, $100 \mu\text{s}$, $500 \mu\text{s}$, o $750 \mu\text{s}$.

En algunas formas de realización, el paso del antígeno y/o adyuvante en la célula T tiene lugar simultáneamente el paso de la célula T a través de la constricción y/o de la perturbación de la célula T. En algunas formas de realización, el paso del compuesto en la célula T tiene lugar después de que la célula T haya pasado a través de la constricción. En algunas formas de realización, el paso del compuesto la célula T tiene lugar en el orden de los minutos después de que la célula T haya pasado a través de la constricción. En algunas formas de realización, el paso del compuesto en la célula T tiene lugar de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a por lo menos aproximadamente 30 minutos después de que la célula T haya pasado a través de la constricción. Por ejemplo, el paso del antígeno en la célula T tiene lugar de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos después de que la célula haya pasado a través de la constricción. En algunas formas de realización, el paso del compuesto

en la célula T tiene lugar a los aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 5 minutos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a

5 aproximadamente 30 segundos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 10 segundos, de 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 T haya pasado a través de la constricción. En algunas formas de realización, el paso del compuesto tiene

10 lugar aproximadamente $1,0 \times 10^{-1}$ segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 50 segundos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, o aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos después de que la célula T haya pasado por la constricción. En algunas formas de

15 realización, una perturbación en la célula T después de su paso a través de la constricción se corrige en el orden de aproximadamente cinco minutos después de que la célula T haya pasado a través de la constricción.

En algunas formas de realización, la viabilidad de las células después de haber

20 pasado a través de una constricción es aproximadamente el 5% a aproximadamente el 100%. En algunas formas de realización, la viabilidad de las células después de haber pasado por la constricción es de por lo menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%. En algunas formas de realización, la viabilidad de las células se

25 mide de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a por lo menos aproximadamente 10 días después de que la célula haya pasado a través de la constricción. Por ejemplo, la viabilidad de las células se mide de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a

aproximadamente 1 segundo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas después del que la célula T haya pasado a través de la constricción. En algunas formas de realización,

5 la viabilidad de las células se mide a aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a

10 aproximadamente 30 segundos, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 1 segundo, o de aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ segundos a aproximadamente 0.1 segundo después de que la célula T haya pasado a través de la constricción. En algunas formas de realización, la viabilidad de las células se mide a de aproximadamente 1.5 horas a aproximadamente 2 horas, de

15 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, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 2 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 horas después de que la célula

20 T haya pasado a través de la constricción. En algunas formas de realización, la viabilidad de las células se mide de a aproximadamente 2 horas a aproximadamente 5 horas, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 10 después de que la célula T haya

25 atravesado la constricción.

Parámetros de suministro

- Un número de parámetros pueden influir sobre la entrega de un compuesto a una célula T para modular mediante los métodos descritos en la presente. En algunas formas de realización, la suspensión de las células es puesta en contacto con el compuesto antes, simultáneamente con, o después de haber pasado a través de la
- 5 constricción. La célula T puede pasar a través de la constricción suspendida en una solución que incluye el compuesto por entregar, si bien el compuesto puede añadirse a la suspensión de células después de que las células T hayan atravesado la constricción. En algunas formas de realización, el compuesto por suministrar es recubierto sobre la constricción.
- 10 Los ejemplos de parámetros que pueden influir sobre el suministro del compuesto en la célula T incluyen sin limitación, las dimensiones de la constricción, el ángulo de entrada de la constricción, las propiedades de superficie de las constricciones (por ejemplo, rugosidad, modificación química, carácter hidrofílico, hidrofóbico, etc.), las velocidades de flujo operativas (por ejemplo, el tiempo para el tránsito de
- 15 las células a través de la constricción), la concentración de las células T, la concentración del compuesto en la suspensión de las células, y la de duración en que la célula T se recupera o se somete a incubación después de haber pasado a través de las constricciones puede influir sobre el paso del compuesto suministrado en la célula T. Los parámetros adicionales que influyen sobre el suministro del
- 20 compuesto en la célula T pueden incluir la velocidad de la célula T en la constricción, el coeficiente de cizallamiento en la constricción, la viscosidad de la suspensión de células, el componente velocidad es perpendicular con respecto a la velocidad de flujo, y la permanencia en la constricción. Tales parámetros pueden diseñarse para controlar el suministro del compuesto. En algunas formas de
- 25 realización, la concentración de las células T varía entre aproximadamente 10^6 a por lo menos aproximadamente 10^{12} células/mL o cualquier concentración o intervalo de concentraciones entre estos valores. En algunas formas de realización, las

concentraciones del compuesto de suministro pueden variar entre aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 1 g/mL o cualquier concentración o intervalo de concentraciones entre estos valores. En algunas formas de realización, las concentraciones del compuesto suministro pueden variar entre

5 aproximadamente 1 pM a por lo menos aproximadamente 2 M o cualquier concentración en un intervalo de concentraciones entre los valores indicados.

La temperatura utilizada en los métodos de la presente divulgación puede ajustarse para influir sobre los compuestos y sobre la viabilidad de las células. En algunas formas de realización, el método se lleva a cabo entre aproximadamente -5°C y

10 aproximadamente 45°C . Por ejemplo, los métodos pueden implementarse a temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 20°C), temperatura fisiológica (por ejemplo, ejemplo, de aproximadamente 37°C), temperaturas superiores a la temperatura fisiológica (por ejemplo, mayor a aproximadamente 37°C a 45°C o más), o a temperatura reducida (por ejemplo, de aproximadamente el

15 -5°C a aproximadamente 4°C), o a temperaturas entre estas temperaturas dadas como ejemplo.

Puede utilizarse diversos métodos para impulsar las células T a través de las constricciones. Por ejemplo, es posible aplicar una presión mediante una bomba sobre el lado de entrada (por ejemplo, mediante un compresor), es posible aplicar

20 un vacío mediante una bomba de vacío en el lado de salida, es posible aplicar una acción capilar por entre medio de un tubo, y es posible alimentar el sistema por gravedad. También es posible utilizar sistemas de flujo basados en desplazamiento (por ejemplo, bomba de jeringa, bomba peristáltica, jeringa manual o pipeta, pistones, etc.). En algunas formas de realización, las células T se hacen pasar a

25 través de las constricciones mediante presión positiva o presión negativa. En algunas formas de realización, las células T se hacen pasar a través de las constricciones mediante presión constante o presión variable. En algunas formas

de realización, la presión se aplica mediante una jeringa. En algunas formas de realización, la presión es una presión positiva que se aplica mediante un gas (por ejemplo, deriva de un cilindro de gas). En algunas formas de realización, la presión se aplica mediante una bomba. En algunas formas de realización, la bomba es una

5 bomba peristáltica o una bomba de diafragma. En algunas formas de realización, la presión se aplica mediante un vacío. En algunas formas de realización, las células T se hacen pasar a través de las constricciones mediante la fuerza g. En algunas formas de realización, las células se hacen pasar a través de las constricciones mediante fuerza centrífuga. En algunas formas de realización, las

10 células T se hacen pasar a través de las constricciones mediante fuerza capilar. En algunas formas de realización, el flujo de fluido dirige las células T a través de las constricciones. En algunas formas de realización, el flujo del fluido es turbulento ante que las células T pasen a través de la constricción. El flujo turbulento es un flujo de fluido en el que la velocidad en un punto dado varía erráticamente en

15 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 se mantiene constante. En algunas formas de realización, el flujo del fluido es turbulento después de que las células T hayan atravesado la constricción. La

20 velocidad con la cual las células T pasen a través de las constricciones puede variar. En algunas formas de realización, las células T pasan a través de las construcciones con una velocidad uniforme de las células. E otros casos, las células pasan a través de las constricciones con una velocidad variable

En otras formas de realización, se utiliza un tratamiento combinado para modular

25 una respuesta inmune, para lo cual se hace pasar una suspensión de células que comprende una célula T a través de una constricción, en donde la constricción deforma la célula T con lo cual se ocasiona una perturbación de la célula T de

manera tal que un antígeno y/o adyuvante ingresan en la célula T, por ejemplo, los métodos descritos en la presente, seguido por la exposición a un campo eléctrico corriente abajo de la constricción. En algunas formas de realización, la célula T se hace pasar a través de un arco eléctrico generado por al menos un electrodo

5 después de haber pasado a través de la constricción. En algunas formas de realización, el campo eléctrico ayuda al suministro de los compuestos en una segunda ubicación dentro de la célula T tal como el núcleo de la célula T. Por ejemplo, la combinación de una constricción de deformación celular y un campo eléctrico suministrar un plásmido que codifica un anticuerpo en la célula T (por

10 ejemplo, el núcleo de la célula), siendo el resultado una producción *de novo* de anticuerpo. En algunas formas de realización, uno o más electrodos se hallan en la proximidad de la constricción de deformación celular para generar un campo eléctrico. En algunas formas de realización, el campo eléctrico es de entre aproximadamente 0.1 kV/m a aproximadamente 100 MV/m, o cualquier número o

15 intervalo entre los números indicados. En algunas formas de realización, se utiliza un circuito integrado para proporcionar una señal eléctrica para accionar los electrodos. En algunas formas de realización, se exponen las células T al campo eléctrico durante un ancho de pulso de entre aproximadamente 1 ns a aproximadamente 1 s y durante un periodo de entre aproximadamente 100 ns a

20 aproximadamente 10 s o cualquier período o intervalo de tiempos entre estos valores.

Suspensiones de células para suministro a células T

La suspensión de células puede ser una población mixta o purificada de células T.

25 En algunas formas de realización, la suspensión de células es una población mixta de células, tal como sangre entera. En algunas formas de realización, la suspensión

de células es una población de células purificada, tal como una población purificada de células T.

La composición de la suspensión de células (por ejemplo, osmolaridad, concentración de sales, contenido de suero, concentración de células, pH, etc.)

- 5 puede incidir sobre el suministro del compuesto para modular una respuesta inmune. En algunas formas de realización, la suspensión comprende sangre entera. Como alternativa, la suspensión de células es una mezcla de células en una solución salina fisiológica o en un medio fisiológico distinto de la sangre. En algunas formas de realización, la suspensión de las células comprende una solución
- 10 acuosa. En algunas formas de realización, la solución acuosa comprende un medio para el cultivo de células, solución salina tamponada con fosfato (PBS), sales, iones metálicos, azúcares, factores de crecimiento, productos suministrados de origen animal, materiales de abultamiento, agentes tensioactivos, lubricantes, lípidos, vitaminas, aminoácidos, proteínas, inhibidores del ciclo de las células, y/o un
- 15 agente que incide sobre la polimerización de la actina. En algunas formas de realización, el medio utilizado para el cultivo de las células es DMEM, Opti-MEM®, IMDM, RPMI, X-Vivo 10, y X-Vivo 15. Adicionalmente, el tampón en solución pueden incluir uno o más lubricantes (pluronicos u otros agentes tensioactivos) que pueden diseñarse, por ejemplo, para reducir o eliminar el atascamiento de la
- 20 constricción o de los poros y para mejorar la viabilidad de las células. Los ejemplos de agentes tensioactivos incluyen sin limitación, poloxámeros, polisorbatos, azúcares o alcoholes de azúcar tales como manitol, sorbitol, suero derivado de animales, y proteína de albúmina.

- En algunas configuraciones con determinados tipos de células T, es posible incubar
- 25 las células T en una o más soluciones que ayuden en el suministro del compuesto en el interior de la célula T. En algunas formas de realización, la solución acuosa comprende un agente que incide sobre la polimerización de la actina. En algunas

formas de realización, el agente que incide sobre la polimerización de la actina es Latrunculina A, Citochalasina, y/o Colchicina. Por ejemplo, es posible someter a incubación las células T en una solución de depolimerización tal como Lantrunculina A (0,1 µg/mL) durante una hora antes de la entrega para
 5 despolimerizar el citoesqueleto de la actina. Como ejemplo adicional, es posible someter las células T en Colchicina (Sigma) 10 µM durante dos horas antes del suministro para despolimerizar la red de los microtúbulos.

En algunas formas de realización, se procede a enriquecer la población de células antes de su utilización de los métodos divulgados. Por ejemplo, se obtienen células
 10 derivados de un fluido corporal, por ejemplo, sangre periférica, y opcionalmente se enriquece o purifica para concentrar las células T. Las células pueden ser enriquecidas mediante cualquier método conocido en la técnica, lo que incluye sin limitación, la separación magnética de células, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, fluorescent activated cell sorting), o centrifugación por
 15 gradiente de densidad.

La viscosidad de la suspensión de células también puede incidir sobre los métodos divulgados en la presente. En algunas formas de realización, la viscosidad de la suspensión de células varía entre aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa·s y aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}$ Pa·s o cualquier valor o intervalo de valores entre los
 20 números indicados. En algunas formas de realización, la viscosidad varía entre cualquiera de los siguientes valores: aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa·s a aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}$ Pa·s, de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa·s a aproximadamente $3,0 \times 10^{-3}$ Pa·s, de aproximadamente $8,9 \times 10^{-4}$ Pa·s a aproximadamente $2,0 \times 10^{-3}$ Pa·s, o aproximadamente $8,9 \times 10^{-3}$ Pa·s a
 25 aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ Pa·s. En algunas formas de realización, la viscosidad varía entre cualquiera de entre los siguientes valores: de 0.89 cP a aproximadamente 4.0 cP, de aproximadamente 0.89 cP a aproximadamente 3.0

cP, de aproximadamente 0.89 cP a aproximadamente 2.0 cP, o de aproximadamente 0.89 cP a aproximadamente 1.0 cP. En algunas formas de realización, se observa un efecto de dilución por cizallamiento, en el que la viscosidad de las células disminuye en condiciones de tensión por cizallamiento. La viscosidad puede medirse mediante cualquier método conocido la técnica, lo que incluye sin limitación, los viscosímetros, tales como un viscosímetro capilar de vidrio, o los reómetros. Un viscosímetro mide la viscosidad en una condición de flujo, mientras que se utiliza un reómetro para medir velocidades que varían con las condiciones de flujo. En algunas formas de realización, la viscosidad se mide para una solución de dilución por cizallamiento tales como la 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, de aproximadamente 20°C), temperatura fisiológica (por ejemplo, de aproximadamente 37°C), temperaturas superiores a la temperatura fisiológica (por ejemplo, mayores de aproximadamente 37°C a 45°C o mas), temperatura reducida (por ejemplo, de aproximadamente -5°C a aproximadamente 4°C), o temperaturas entre estas temperaturas indicadas como ejemplo.

Sistemas y kits

En algunos aspectos, la invención proporciona un sistema que comprende uno o más de lo siguiente: una constricción, una suspensión de células T, antígenos o adyuvantes de acuerdo con cualquiera de las formas de realización descritas en la presente, tales como para ser utilizado en cualquiera de los métodos descritos en la presente. El sistema puede incluir cualquier forma de realización descrita para las composiciones de material y métodos divulgados en la presente, inclusive aquellos divulgados en el capítulo precedente titulado “sistemas microfluídicos y sus componentes”. En alguna forma de realización, las constricciones

deformadoras de células están dimensionadas a suministrar a células T. En algunas formas de realización, los parámetros de suministro, tales como las velocidades operativas del flujo, concentración de células y del compuesto, temperatura, velocidad de la célula en la constricción, y la composición de la suspensión de células (por ejemplo, osmolaridad, concentración de sales, contenido de suero, concentración de células, pH, etc.) se optimizan para una respuesta máximo de un compuesto para modular una respuesta inmune.

También se proporcionan kits o artículos de manufactura destinados a ser utilizados para modular una respuesta inmune en un individuo. En algunas formas de realización, el kit comprende una célula T modificada que comprende un antígeno y/o un adyuvante, lo que incluye cualquiera de las células T modificadas descritas en la presente. En algunas formas de realización, el kit comprende uno o más de los siguientes: una constricción, una suspensión de células T, antígenos o adyuvantes para ser utilizados en la generación de células T modificadas para ser utilizadas en la modulación de una respuesta inmune en un individuo. En algunas formas de realización, los kits comprenden componentes descritos en la presente (por ejemplo a canal microfluídico o superficie que contiene poros, suspensiones de células, y/o compuestos) en envases adecuados. Los envases adecuados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ampollas (tales como ampollas selladas), recipientes, frascos, botellas, jarras, envases flexibles (por ejemplo, bolsas selladas de Mylar o de material plástico), y similares. Estos artículos de manufactura pueden ser esterilizados y/o sellados.

La invención también proporciona kits que comprenden componentes de los métodos descritos en la presente y pueden además comprender instrucciones para implementar dichos métodos para modular una respuesta inmune en un individuo y/o instrucciones para introducir un antígeno y/o un adyuvante en una célula T. Los kits descritos en la presente pueden además incluir otros materiales, que incluyen

tampones, filtros, agujas, jeringas, e insertos de envase con instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos descrito en la presente; por ejemplo, instrucciones para modular una respuesta inmune en un individuo o instrucciones para modificar una célula T para que contenga un antígeno y/o un
 5 adyuvante.

Formas de realización de ejemplo

Forma de realización 1. Una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno es exógeno a la célula T modificada y
 10 comprende un epítipo inmunogénico, y en donde el adyuvante está presente en forma intracelular.

Forma de realización 2. Una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25.

15 Forma de realización 3. Una célula T modificada que comprende un antígeno y un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, preparada por un proceso que comprende las etapas de: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un
 20 diámetro de la célula T de entrada en la suspensión, causando así perturbaciones de la célula T de entrada suficientemente grandes para que el antígeno y el adyuvante pasen a través para formar una célula T de entrada perturbada; y b) incubar la célula T de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno y el adyuvante ingresen en la
 25 célula T de entrada perturbada; generando así la célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante.

Forma de realización 4. La célula T modificada de la forma de realización 3, en donde la concentración del antígeno incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM y/o la concentración del adyuvante incubado con la célula T de entrada perturbada está entre
5 aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 5. La célula T modificada de la forma de realización 3 ó 4, en donde la relación del antígeno al adyuvante incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 6. Una célula T modificada que comprende un antígeno y
10 un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, preparada por un proceso que comprende las etapas de: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T 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 T de entrada en la
15 suspensión, causando así perturbaciones de la célula T de entrada suficientemente grandes para que el antígeno pasen a través para formar una célula T de entrada perturbada; y b) incubar la célula T de entrada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T de entrada perturbada, generando así la célula T modificada que comprende el antígeno y el
20 adyuvante.

Forma de realización 7. La célula T modificada de la forma de realización 6, en donde la concentración del antígeno incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 8. Una célula T modificada que comprende un antígeno y
25 un adyuvante, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, preparada por un proceso que comprende las etapas de: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T de entrada que comprende el antígeno a través

de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T de entrada en la suspensión, causando así que las perturbaciones de la célula T de entrada sean suficientemente grandes para el adyuvante para que pasen a través para formar una célula T de entrada perturbada; y b) incubar la célula T de entrada perturbada con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante ingrese en la célula T de entrada perturbada, generando así la célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante.

Forma de realización 9. La célula T modificada de la forma de realización 8, en donde la concentración del adyuvante incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 10. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 3–9, en donde una fuerza de deformación se aplica a la célula T de entrada a medida que pasa a través de la constricción, causando así las perturbaciones de la célula T de entrada.

Forma de realización 11. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 3–10, en donde el proceso también comprende una etapa de incubación de la célula T de entrada y/o la célula T modificada con un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una célula T modificada correspondiente preparada sin la ulterior etapa de incubación.

Forma de realización 12. La célula T modificada de la forma de realización 11, en donde el agente es un compuesto que mejora endocitosis, o actúa como un agente estabilizante o un cofactor.

Forma de realización 13. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 3–12, en donde el diámetro de la constricción es inferior al diámetro de la célula T de entrada.

Forma de realización 14. La célula T modificada de la forma de realización 13, en donde el diámetro de la constricción es aproximadamente el 20% y aproximadamente el 99% del diámetro de la célula T de entrada.

5 Forma de realización 15. La célula T modificada de la forma de realización 14, en donde el diámetro de la constricción es aproximadamente 20% y aproximadamente 60% del diámetro de la célula T de entrada.

Forma de realización 16. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–15, en donde el antígeno y/o adyuvante están presentes en el citosol y/o una vesícula de la célula T modificada.

10 Forma de realización 17. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–16, en donde la vesícula es un endosoma.

Forma de realización 18. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–17, en donde el antígeno y/o el adyuvante están presentes en múltiples compartimientos de la célula T modificada.

15 Forma de realización 19. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–18, en donde el antígeno o epítipo inmunogénico se une con la superficie de la célula T modificada.

Forma de realización 20. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–19, en donde el adyuvante es un oligodesoxinucleótido CpG (ODN),

20 IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I, poli I:C, imiquimod, resiquimod, o lipopolisacárido (LPS)

Forma de realización 21. La célula T modificada de la forma de realización 20, en donde el adyuvante es un CpG ODN.

Forma de realización 22. La célula T modificada de la forma de realización 21, en
25 donde el CpG ODN es un CpG ODN de Clase A, un CpG ODN de Clase B, o un CpG ODN de Clase C.

Forma de realización 23. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–22, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de un antígeno asociado con la enfermedad.

5 Forma de realización 24. La célula T modificada de la forma de realización 23, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de péptidos o ARNm aislado de una célula enferma.

Forma de realización 25. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–24, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de un no autoantígeno.

10 Forma de realización 26. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–25, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de un antígeno tumoral, antígeno viral, antígeno bacteriano, o antígeno fúngico.

Forma de realización 27. La célula T modificada de la forma de realización 26, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de un antígeno de papilomavirus humano
15 (HPV).

Forma de realización 28. La célula T modificada de la forma de realización 27, en donde el HPV es HPV–16 o HPV–18.

Forma de realización 29. La célula T modificada de la forma de realización 27 o 28, en donde el antígeno comprende un péptido restringido en HLA–A2 derivado
20 de HPV E6 y/o E7.

Forma de realización 30. La célula T modificada de la forma de realización 29, en donde el péptido restringido en HLA–A2 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1–4.

Forma de realización 31. La célula T modificada de la forma de realización 30, en donde el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las
25 SEQ ID NOs: 18–25.

Forma de realización 32. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–30, en donde la célula T modificada comprende una pluralidad de antígenos que comprenden una pluralidad de epítomos inmunogénicos.

Forma de realización 33. La célula T modificada de la forma de realización 32, en donde después de la administración a un individuo de la célula T modificada que comprende la pluralidad de antígenos que comprenden la pluralidad de epítomos inmunogénicos, ninguno de la pluralidad de epítomos inmunogénicos reduce una respuesta inmune en el individuo a cualquiera de los otros epítomos inmunogénicos.

Forma de realización 34. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–33, en donde el antígeno es un polipéptido y el epítomo inmunogénico es un epítomo de péptido inmunogénico.

Forma de realización 35. La célula T modificada de la forma de realización 30, en donde el epítomo de péptido inmunogénico se fusiona con un polipéptido flanqueante N-terminal y/o un polipéptido flanqueante C-terminal.

Forma de realización 36. La célula T modificada de la forma de realización 30, en donde el antígeno es un polipéptido que comprende un epítomo de péptido inmunogénico y una o más secuencias peptídicas heterólogas.

Forma de realización 37. La célula T modificada de la forma de realización 34, en donde el antígeno es un polipéptido que comprende un epítomo de péptido inmunogénico que está flanqueado en el término N y/o el término C por secuencias peptídicas heterólogas

Forma de realización 38. La célula T modificada de la forma de realización 35, en donde las secuencias peptídicas heterólogas flanqueantes se derivan de un péptido inmunogénico asociado con la enfermedad.

Forma de realización 39. La célula T modificada de la forma de realización 35, en donde 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 cualquiera de las SEQ ID NOs: 11–17.

5 Forma de realización 40. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–39, en donde el antígeno es capaz de ser procesado en un péptido restringido por MHC de clase I y/o un péptido restringido por MHC de clase II.

Forma de realización 41. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–40, en donde la célula T modificada comprende el adyuvante en una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

10 Forma de realización 42. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–41, en donde la célula T modificada comprende el antígeno en una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 43. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–42, en donde la relación del antígeno al adyuvante está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

15 Forma de realización 44. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–43, en donde la célula T modificada comprende un complejo que comprende: a) el antígeno, b) el antígeno y al menos otro antígeno, y/o c) el antígeno y el adyuvante.

20 Forma de realización 45. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–44, en donde la célula T modificada también comprende un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una célula T modificada correspondiente que no comprende en agente.

25 Forma de realización 46. La célula T modificada de la forma de realización 45, en donde el agente es un compuesto que mejora endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor.

Forma de realización 47. La célula T modificada de la forma de realización 45, en donde el agente es albúmina.

Forma de realización 48. La célula T modificada de la forma de realización 47, en donde la albúmina es albúmina de ratón, de bovino o de humano.

Forma de realización 49. La célula T modificada de la forma de realización 45, en donde el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina, o EDTA.

Forma de realización 50. La célula T modificada de la forma de realización 49, en donde el agente comprende albúmina de suero murino (MSA).

Forma de realización 51. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1-50, en donde las células se modifican luego para incrementar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras.

Forma de realización 52. La célula T modificada de la forma de realización 51, 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 53. La célula T modificada de las formas de realización 51 ó 52, en donde la célula comprende un ácido nucleico que resulta en la expresión incrementada de las una o más moléculas coestimuladoras.

Forma de realización 54. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1-53, en donde la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de clase I.

Forma de realización 55. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1-54, en donde la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de clase II.

Forma de realización 56. La célula T modificada de la forma de realización 54, en donde una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de la célula T modificadas se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en

respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las correspondientes células T modificadas que no comprenden la ulterior modificación.

- Forma de realización 57. La célula T modificada de la forma de realización 54 o 56, en donde la vida media en circulación de la célula T modificada en un individuo al que se administraron se incrementa en comparación con la vida media en circulación de las correspondientes células T modificadas que no comprenden la ulterior modificación en un individuo al que se administraron.

- Forma de realización 58. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–57, en donde la célula T modificada incluye una o más de células T helper, células T citotóxicas, células T de memoria, o células T natural killer.

Forma de realización 59. La célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–58, en donde la célula T modificada incluye una o más de células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, células T CD45RO+, o células T $\gamma\delta$.

- Forma de realización 60. Una composición que comprende la célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–59.

Forma de realización 61. Una composición farmacéutica que comprende la célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–59 y un portador farmacéuticamente aceptable.

- Forma de realización 62. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende la administración al individuo de la célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–59, la composición de la forma de realización 60, o la composición farmacéutica de la forma de realización 62.

- Forma de realización 63. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) administrar una célula T modificada que comprende un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25 al individuo; y b) administrar un adyuvante al individuo.

Forma de realización 64. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T 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 T de entrada en la suspensión, causando así que perturbaciones de la célula T de entrada suficientemente grandes para un antígeno y un adyuvante pasen a través para formar una célula T de entrada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) incubar la célula T de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno y el adyuvante ingresen en la célula T de entrada perturbada, generando así una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo.

Forma de realización 65. El método de la forma de realización 64, en donde la concentración del antígeno incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM y/o la concentración del adyuvante incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 66. El método de la forma de realización 64 o 65, en donde la relación del antígeno al adyuvante incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 67. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T de entrada que comprende un 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 T de entrada en la suspensión, causando así que perturbaciones de la célula T de entrada suficientemente grandes para un antígeno pasen a través para formar una célula T de entrada perturbada, en donde el

antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) incubar la célula T de entrada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T de entrada perturbada, generando así una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo.

Forma de realización 68. El método de la forma de realización 67, en donde la concentración del antígeno incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 69. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T de entrada que comprende un antígeno a través de una constricción de deformación celular, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico, en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula T de entrada en la suspensión, causando así que perturbaciones de la célula T de entrada suficientemente grandes para un antígeno pasen a través para formar una célula T de entrada perturbada; b) incubar la célula T de entrada perturbada con el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el adyuvante ingrese en la célula T de entrada perturbada, generando así una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante; y c) administrar la célula T modificada al individuo.

Forma de realización 70. El método de la forma de realización 69, en donde la concentración del adyuvante incubado con la célula T de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 71. El método de cualquiera de las formas de realización 64–70, en donde la célula T modificada comprende el antígeno en una concentración de entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 72. El método de cualquiera de las formas de realización 64–71, en donde la célula T modificada comprende el adyuvante en una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

5 Forma de realización 73. El método de cualquiera de las formas de realización 64–72, en donde la relación del antígeno al adyuvante en la célula T modificada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.

Forma de realización 74. El método de cualquiera de las formas de realización 64–73, en donde la célula T modificada comprende un complejo que comprende:
a) el antígeno, b) el antígeno y al menos otro antígeno, y/o c) el antígeno y el
10 adyuvante.

Forma de realización 75. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T 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 T de
15 entrada en la suspensión, causando así que perturbaciones de la célula T de entrada suficientemente grandes para un antígeno pasen a través para formar una célula T de entrada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) incubar la célula T de entrada perturbada con el antígeno durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno ingrese en la célula T de entrada
20 perturbada, generando así una célula T modificada que comprende el antígeno; c) administrar la célula T modificada al individuo; y d) administrar un adyuvante al individuo.

Forma de realización 76. El método de la forma de realización 75, en donde la concentración del antígeno incubado con la célula T de entrada perturbada está
25 entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.

Forma de realización 77. El método de cualquiera de las formas de realización 64–76, en donde una fuerza de deformación se aplica a la célula T de entrada a

medida que pasa a través de la constricción, causando así las perturbaciones de la célula T de entrada.

Forma de realización 78. El método de cualquiera de las formas de realización 64–77, que comprende, además, una etapa de incubación de la célula T de entrada y/o célula T modificada con un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una célula T modificada correspondiente preparada sin la ulterior etapa de incubación.

Forma de realización 79. El método de la forma de realización 78, en donde el agente es un compuesto que mejora endocitosis, un agente estabilizante, o un cofactor.

Forma de realización 80. El método de cualquiera de las formas de realización 64–79, en donde la respuesta inmune se mejora.

Forma de realización 81. El método de la forma de realización 80, en donde la respuesta inmune mejorada se dirige hacia el antígeno.

Forma de realización 82. El método de cualquiera de las formas de realización 64–81, en donde el diámetro de la constricción es inferior al diámetro de la célula T de entrada.

Forma de realización 83. El método de la forma de realización 82, en donde el diámetro de la constricción es aproximadamente el 20% y aproximadamente el 99% del diámetro de la célula T de entrada.

Forma de realización 84. El método de la forma de realización 83, en donde el diámetro de la constricción es aproximadamente 20% y aproximadamente 60% del diámetro de la célula T de entrada.

Forma de realización 85. El método de cualquiera de las formas de realización 64–84, en donde el antígeno y/o adyuvante están presentes en el citosol y/o una vesícula de la célula T modificada.

Forma de realización 86. El método de cualquiera de las formas de realización 64–85, en donde la vesícula es un endosoma.

Forma de realización 87. El método de cualquiera de las formas de realización 64–86, en donde el antígeno y/o el adyuvante están presentes en múltiples
5 compartimientos de la célula T modificada.

Forma de realización 88. El método de cualquiera de las formas de realización 64–87, en donde el antígeno o epítipo inmunogénico se une con la superficie de la célula T modificada.

Forma de realización 89. El método de cualquiera de las formas de realización
10 64–88, en donde el adyuvante es un CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I, poli I:C, imiquimod, resiquimod, y/o lipopolisacárido (LPS).

Forma de realización 90. El método de la forma de realización 89, en donde el adyuvante es un CpG ODN.

Forma de realización 91. El método de la forma de realización 90, en donde el
15 CpG ODN es un CpG ODN de Clase A, un CpG ODN de Clase B, o un CpG ODN de Clase C.

Forma de realización 92. El método de cualquiera de las formas de realización 64–91, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de un antígeno asociado con la enfermedad.

20 Forma de realización 93. El método de la forma de realización 92, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de péptidos o ARNm aislado de una célula enferma.

Forma de realización 94. El método de cualquiera de las formas de realización 64–93, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de un no autoantígeno.

25 Forma de realización 95. El método de cualquiera de las formas de realización 64–94, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de un antígeno tumoral, antígeno viral, antígeno bacteriano, o antígeno fúngico.

Forma de realización 96. El método de la forma de realización 95, en donde el epítipo inmunogénico se deriva de un antígeno de papilomavirus humano (HPV).

Forma de realización 97. El método de la forma de realización 96, en donde el HPV es HPV-16 o HPV-18.

- 5 Forma de realización 98. El método de la forma de realización 96 ó 97, en donde el antígeno comprende un péptido restringido en HLA-A2 derivado de HPV E6 y/o E7.

Forma de realización 99. El método de la forma de realización 98, en donde el péptido restringido en HLA-A2 comprende la secuencia de aminoácidos de

- 10 cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-4.

Forma de realización 100. El método de la forma de realización 99, en donde el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18-25.

Forma de realización 101. El método de cualquiera de las formas de realización

- 15 64-100, en donde la célula T modificada comprende una pluralidad de antígenos que comprenden una pluralidad de epítopos inmunogénicos.

Forma de realización 102. El método de la forma de realización 64-101, en donde ninguno de la pluralidad de epítopos inmunogénicos reduce una respuesta inmune en el individuo a cualquiera de los otros epítopos inmunogénicos.

- 20 Forma de realización 103. El método de cualquiera de las formas de realización 64-102, en donde el antígeno es un polipéptido y el epítipo inmunogénico es un epítipo de péptido inmunogénico.

Forma de realización 104. El método de la forma de realización 103, en donde el epítipo de péptido inmunogénico se fusiona con un polipéptido flanqueante N-

- 25 terminal y/o un polipéptido flanqueante C-terminal.

Forma de realización 105. La célula T modificada de la forma de realización 104, en donde el epítipo de péptido inmunogénico fusionado con el polipéptido

flanqueante N-terminal y/o el polipéptido flanqueante C-terminal es una secuencia no natural.

Forma de realización 106. El método de la forma de realización 105, en donde los polipéptidos flanqueantes N-terminales y/o C-terminales se derivan de un péptido
5 largo sintético inmunogénico (SLP).

Forma de realización 107. El método de la forma de realización 105, en donde los polipéptidos flanqueantes N-terminales y/o C-terminales se derivan de un SLP inmunogénico asociado con una enfermedad.

Forma de realización 108. El método de la forma de realización 105, en donde el
10 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 cualquiera de las SEQ ID NOs: 11-17.

Forma de realización 109. El método de cualquiera de las formas de realización 64-108, en donde el antígeno es capaz de ser procesado en un péptido restringido
15 por MHC de clase I y/o un péptido restringido por MHC de clase II.

Forma de realización 110. El método de cualquiera de las formas de realización 64-109, en donde la célula T modificada también comprende un agente que mejora la viabilidad y/o la función de la célula T modificada en comparación con una célula T modificada correspondiente que no comprende en agente.

20 Forma de realización 111. La célula T modificada de la forma de realización 110, en donde el agente es un compuesto que mejora endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor.

Forma de realización 112. La célula T modificada de la forma de realización 111, en donde el agente es albúmina.

25 Forma de realización 113. La célula T modificada de la forma de realización 112, en donde la albúmina es albúmina de ratón, de bovino o de humano.

Forma de realización 114. La célula T modificada de la forma de realización 110, en donde el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D–sacarosa, PEG1500, L–arginina, L–glutamina, o EDTA.

Forma de realización 115. El método de cualquiera de las formas de realización 5 64–114, en donde la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de clase I.

Forma de realización 116. El método de cualquiera de las formas de realización 64–115, en donde la célula T modificada comprende otra modificación para modular la expresión de MHC de clase II.

10 Forma de realización 117. El método de la forma de realización 115, en donde una respuesta inmune innata montada en el individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de la célula T modificadas se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las correspondientes células T 15 modificadas que no comprenden la ulterior modificación.

Forma de realización 118. El método de la forma de realización 115 ó 117, en donde la vida media en circulación de la célula T modificada en un individuo al que se administraron se incrementa en comparación con la vida media en circulación de las correspondientes células T modificadas que no comprenden la ulterior 20 modificación en un individuo al que se administraron.

Forma de realización 119. El método de cualquiera de las formas de realización 64–118, en donde la célula T modificada incluye una o más de células T helper, células T citotóxicas, células T de memoria, o células T natural killer.

Forma de realización 120. El método de cualquiera de las formas de realización 25 64–119, en donde la célula T modificada incluye una o más de células T CD3+, células T CD4+, células T CD8+, células T CD45RA+, células T CD45RO+, o células T $\gamma\delta$.

Forma de realización 121. El método de cualquiera de las formas de realización 64–120, en donde la célula T modificada es alogénica al individuo.

Forma de realización 122. El método de cualquiera de las formas de realización 64–121, en donde la célula T modificada es autóloga al individuo.

- 5 Forma de realización 123. El método de cualquiera de las formas de realización 64–122, en donde el individuo está preconditionado para modular inflamación y/o una respuesta inmune.

- Forma de realización 124. El método de cualquiera de las formas de realización 64–123, que comprende, además, la administración al individuo de un segundo
10 adyuvante.

Forma de realización 125. El método de la forma de realización 124, en donde el segundo adyuvante es IFN- α , LPS o a CpG ODN.

- Forma de realización 126. El método de la forma de realización 124 ó 125, en donde la célula T modificada y el segundo adyuvante se administran en forma
15 concurrente o simultánea.

Forma de realización 127. El método de la forma de realización 124 ó 125, en donde la célula T modificada y el segundo adyuvante se administran en forma secuencial.

- Forma de realización 128. El método de las formas de realización 124–127, en donde la célula T modificada se administra antes de administrar el segundo
20 adyuvante.

Forma de realización 129. El método de las formas de realización 124–128, en donde la célula T modificada se administra después de la administración del segundo adyuvante.

- 25 Forma de realización 130. El método de las formas de realización 64–129, en donde la célula T modificada se administra antes, junto o después de la administración de un inhibidor del punto de control inmune.

Forma de realización 131. El método de la forma de realización 130, en donde el inhibidor del punto de control inmune se dirige a cualquiera de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, VISTA, TIM1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA.

5 Forma de realización 132. El método de las formas de realización 64-131, en donde la célula T modificada se administra antes, junto o después de la administración de una quimioterapia.

Forma de realización 133. El método de la forma de realización 132, en donde la quimioterapia comprende cisplatino.

10 Forma de realización 134. El método de cualquiera de las formas de realización 64-133, en donde la administración de la célula T modificada al individuo da como resultado la activación y/o la expansión de linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos del antígeno.

15 Forma de realización 135. El método de cualquiera de las formas de realización 64-134 en donde la administración de la célula T modificada al individuo da como resultado la activación y/o la expansión de células T helper (Th) específicas del antígeno.

Forma de realización 136. El método de cualquiera de las formas de realización 64-135, en donde la cantidad de la célula T modificada administrada al individuo está entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} células.

20 Forma de realización 137. El método de cualquiera de las formas de realización 64-136, en donde el método comprende múltiples administraciones de la célula T modificada.

25 Forma de realización 138. El método de la forma de realización 137, en donde el intervalo de tiempo entre dos administraciones sucesivas de la célula T modificada está entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 30 días.

Forma de realización 139. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo, que comprende: administrar al individuo una célula T modificada

asociada con un antígeno, en donde la célula T modificada se prepara por un proceso que comprende las etapas de: a) incubar una célula T de entrada con un antígeno y/o un adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno se asocie con la superficie celular de la célula T de entrada, en donde el
5 antígeno comprende un epítipo inmunogénico, generando así una célula T modificada asociada con el antígeno; y b) administrar la célula T modificada al individuo.

Forma de realización 140. El método de la forma de realización 139, en donde el antígeno de VPH comprende una secuencia de aminoácido con al menos 90% de
10 similitud con cualquiera de las SEQ ID NOs:18–25.

Forma de realización 141. El método de la forma de realización 140, en donde el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23.

Forma de realización 142. El método de cualquiera de las formas de realización 139–141, en donde el adyuvante es CpG ODN o LPS.

15 Forma de realización 143. El método de la forma de realización 142, en donde el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

Forma de realización 144. Una composición que comprende la célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–59 para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía, terapia o diagnóstico.

20 Forma de realización 145. Una composición que comprende la célula T modificada de cualquiera de las formas de realización 1–59 para usar en un método para modular una respuesta inmune en un individuo, el método que comprende la administración al individuo de la célula T modificada.

Forma de realización 146. Una composición que comprende la célula T modificada
25 para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía, terapia o diagnóstico, en donde la célula T modificada que comprende un antígeno

que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25.

- Forma de realización 147. Una composición que comprende la célula T modificada para usar en un método de modulación de una respuesta inmune en un individuo,
- 5 en donde la célula T modificada que comprende un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18–25.

- Forma de realización 148. Una composición que comprende la célula T modificada para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía, terapia o diagnóstico, en donde la célula T modificada se prepara por el método que
- 10 comprende: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T 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 T de entrada en la suspensión, causando así que perturbaciones de la célula T de entrada
- 15 suficientemente grandes para un antígeno y un adyuvante pasen a través para formar una célula T de entrada perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) incubar la célula T de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno y el adyuvante ingresen en la célula T de entrada perturbada, generando así una célula T modificada que comprende el antígeno y el adyuvante.

- 20 Forma de realización 148. Una composición que comprende la célula T modificada para usar en un método de modulación de una respuesta inmune en un individuo, en donde la célula T modificada se prepara por el método que comprende: a) pasar una suspensión celular que comprende una célula T de entrada a través de una constricción de deformación celular, en donde un diámetro de la constricción es una
- 25 función de un diámetro de la célula T de entrada en la suspensión, causando así que perturbaciones de la célula T de entrada suficientemente grandes para un antígeno y un adyuvante pasen a través para formar una célula T de entrada

perturbada, en donde el antígeno comprende un epítipo inmunogénico; b) incubar la célula T de entrada perturbada con el antígeno y el adyuvante durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno y el adyuvante ingresen en la célula T de entrada perturbada, generando así una célula T modificada que comprende el
 5 antígeno y el adyuvante.

EJEMPLOS

Los expertos en la materia reconocerán que son posibles varias realizaciones dentro del alcance y espíritu de la presente invención. La invención se describirá
 10 ahora con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos. Los siguientes ejemplos ilustran más la invención pero, naturalmente, 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
 15 lograr la inhibición del crecimiento tumoral en un entorno terapéutico, se probaron cuatro dosis diferentes de T_{APC} de cebado/estimulación en un modelo de tumor TC1, con el área de los tumores trazados frente al tiempo.

Ratones hembra C57BL/6J fueron inyectados en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón) en el día 0. En los días 4 (cebado) y 7
 20 (estimulación), se aislaron las células T de ratones hembra C57BL/6J donante y se cargaron utilizando SQZ con 200 $\mu\text{g/ml}$ de CpG ODN 1826 y SLP E7 40 μM pre-complejado (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + albúmina de suero de ratón 40 μM (MSA). Los animales (10 ratones/grupo) fueron inyectados por vía intravenosa con la dosis relevante de células T cargadas con E7 + MSA +
 25 CpG (50 M 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

con el 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 tumoral, medido por la fórmula $((\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2)$, se comparó entre los ratones del grupo no tratado (sin transferencia adoptiva de células T) y los grupos de tratamiento B–E 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 estimulación) aún era capaz de lograr la misma reducción tumoral que las dosis de células más altas, cada una de las cuales alcanzó significación estadística en relación con el tratamiento del Día 18 ($\#P<0,0001$).

Ejemplo 2

Para determinar el diseño de SLP E7, dos SLP E7, SLP E7 nativo, y uno en el que la secuencia nativa tenía todas las cisteínas reemplazadas con serina, se sometieron a SQZ en TAPC junto con la administración conjunta de CpG, y cada condición se evaluó en cuanto a la producción de IFN- γ mediante ICS.

Las células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y cargaron usando SQZ con dosis variables (Izquierda – 200 $\mu\text{g/ml}$, Derecha – 25 $\mu\text{g/ml}$) CpG ODN 1826 y SLP nativo o clásico con E7 pre-complejado 40 μM + albúmina de suero de ratón 40 μM (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 ratones/grupo) fueron inyectados por vía intravenosa con 5M de células T cargadas o incubadas en un volumen de 100 μl (50M células/ml). El día 8, se recogieron los bazo 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.

El % de células T CD8 + productoras de IFN- γ fue más alto 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 secuencia de SLP tiene un impacto en el % de células T CD8+ productoras de IFN- γ y generadas en respuesta a la vacunación con T APC, particularmente cuando el antígeno se carga en la célula T utilizando SQZ.

Ejemplo 3

Con el fin de determinar la capacidad de SLP E6 de inducir una respuesta inmune específica de antígenos en células T respondedoras E6 en un modelo humano *in vitro*, se cargaron células T humanas primarias con SLP E6 y se midió la secreción de IFN- γ de las células respondedoras mediante ELISA.

Se aislaron células T humanas de las PBMC de los donantes HLA-A02+ (10M células/ml) y se administró SLP E6 50 μ M que contenía el epítopo E6₂₉₋₃₈ mínimo restringido por HLA-A02 (LPQLSTELQ**TTIHDI**LECVYSKQQLLRREVDFAF) intracelularmente por SQZ y el nivel de IFN- γ , medido por ELISA, se comparó entre las condiciones de SQZ y un control en el que SLP E6 se incubaba con las T_{APC} en ausencia de SQZing (Endo). Luego se cocultivaron T_{APC} con células respondedoras CD8 + específicas de E6 en una proporción 1: 1 de estimulador: efector y se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/ml). Después de 18 horas, se extrajo el sobrenadante de cada condición y se evaluó el nivel de producción de IFN- γ mediante ELISA de IFN- γ (Biolegend).

SLP E6 probado, cuando se administró intracelularmente usando SQZ, llevó a un aumento > 10 veces en la producción de IFN- γ cuando se co-cultivó con células T CD8 + respondedoras E6 (#P <0,0001) como se muestra en la Fig. 3. Estos hallazgos muestran la capacidad de las T APC para provocar una respuesta inmune específica del antígeno a múltiples antígenos de HPV (E6 y E7).

Ejemplo 4

Con el fin de determinar la capacidad de SLP E7 de inducir una respuesta inmune específica del antígeno en células T respondedoras E7₁₁₋₂₀, así como el impacto de la secuencia SLP en la activación de APC (T_{apc}) de células T SQZ en un modelo humano in vitro, las células T humanas primarias de múltiples donantes se cargaron con diferentes SLP E7 y se midió la secreción de IFN- γ de células respondedoras mediante ELISA.

Las células T humanas se aislaron de las PBMC de los donantes HLA-A02 + (10M células/ml) y SLP OL-E7₁₋₃₅ 50 μ M (MHGDTPTLHEY**YMLDLQPET**TDLYCYEQLNDSSEEE) o E7.6 (QLCTELQ**TYMLDLQPET**TYCKQQLL) fueron administrados intracelularmente por SQZ y el nivel de IFN- γ , medido por ELISA, se comparó entre las condiciones de SQZ y un control en el que SLP E7 se incubó con T_{apc} en ausencia de SQZing (Endo). Las T_{APC} luego se cocultivaron con células respondedoras CD8 + específicas de E7₁₁₋₂₀ en una proporción 4: 1 de estimulador: efector y se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/ml). Después de 24 horas, se extrajo el sobrenadante de cada condición y se evaluó el nivel de producción de IFN- γ mediante ELISA de IFN- γ (Biolegend).

SLP OL-E7₁₋₃₅ nativo provocó una respuesta mínima de IFN- γ cuando se administró utilizando SQZ en comparación con Endo (Fig. 4). Sin embargo, E7.6, que comprende el epítipo mínimo E7 (YMLDLQPETT) insertado entre las regiones flanqueantes de otro SLP reactivo (E6₂₁₋₄₅ – QLCTELQXXXXXXXXXXYCKQQLL), indujo una mayor respuesta de IFN- γ con respecto al control Endo correspondiente en todos los tres los donantes probados 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 SLP y respaldan que las regiones flanqueantes de otros SLP, que se sabe que son reactivos, se pueden

usar junto con epítomos mínimos ortogonales para lograr un aumento de las respuestas inmunes.

Ejemplo 5

Para evaluar la dosis de antígeno para APC de células T SQZ en un modelo humano in vitro, se cargaron células T humanas primarias con un SLP E7 en dosis variables y se evaluaron en cuanto a IFN- γ mediante ELISA.

Las células T humanas se aislaron de las PBMC de los donantes HLA-A02 + (10M células/ml) y se administraron dosis variables (50 y 100 μ M) de SLP E7 (QLCTELQTY**MLDLQP**ETTYCKQQLL) intracelularmente por SQZ y el nivel de IFN- γ , medido por ELISA, se comparó entre las condiciones de SQZ y un control en el que SLP E7 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 4: 1 de estimulador: efector y se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/ml). Después de 24 horas, 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 epítomo E7 mínimo (YMLDLQPETT) durante 1 hora antes de ELISA.

Entre los tres donantes probados, se producen aumentos consistentes en IFN- γ con todas las condiciones de SQZ en relación con el control comparable (Endo) donde SLP se incubaba con la célula T en ausencia de SQZ (Fig. 5). Los donantes 1 y 3 mostraron aumentos estadísticamente significativos con SLP E7 50 μ M (8668 – * P <0,05; 8299 – # P <0,0001), y una tendencia a ser significativos en SLP E7 100 μ M superior. 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 SLP E7 50 μ M.

Ejemplo 6

Para determinar la variabilidad del donante para APC de células T SQZ en un modelo humano in vitro, sumado a identificar combinaciones y dosis óptimas de SLP E6 y E7 que inducen una respuesta inmune significativa frente a E7 en células T humanas primarias de múltiples donantes de HLA-A02 + se cargaron con SLP E6 y E7 y se evaluaron en cuanto a IFN- γ mediante ELISA.

Se aislaron células T humanas de las PBMC de los donantes HLA-A02 + (10M células/ml) y se administraron SLP E6.6 (QLCTELQ**TTIHDI**LECVYCKQQLL) y SLP E7.6 (QLCTELQTY**MLDLQ**PETTYCKQQLL) intracelularmente mediante SQZ y los niveles de IFN- 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 SQZ (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 positivo se cocultivaron luego con células respondedoras CD8 + específicas de E7₁₁₋₂₀ en una proporción 4: 1 de estimulador: efector y se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/ml). Después de 24 horas, se extrajo el sobrenadante de cada condición y se evaluó el nivel de producción de IFN- γ mediante ELISA de IFN- γ (Biolegend).

Cinco de los siete donantes mostrados exhibieron aumentos consistentes en IFN- γ cuando se trataron con SLP E6 + E7 SQZ en relación con un control comparable (Endo) donde 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 se trataron con T APC sometidas a SQZ con respecto a los controles Endo, ambos donantes (Donantes 4 y 7) tuvieron condiciones en las que hubo aumentos detectables con una dosis de T APC sometidas a 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 T de diferentes donantes tienen una actividad

inmunoestimuladora diferencial, podemos ver un aumento constante en la producción de IFN- γ en múltiples donantes y que la respuesta inmune específica de E7 aún es significativa cuando se combina con múltiples antígenos/SLP, en este caso, el antígeno E6 específico de HPV.

5 Ejemplo 7

Para ayudar a determinar el adyuvante que lleva a la respuesta inmunitaria más robusta, probamos el efecto de dos adyuvantes que actúan en diferentes vías sobre la capacidad de las T APC para inducir una respuesta específica de antígeno in vivo. Este efecto se cuantificó mediante tinción con tetrámero e ICS mediante citometría de flujo.

Las células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se cargaron usando SQZ con 400 $\mu\text{g/ml}$ de Ova + varias concentraciones de poli I: C de alto y bajo peso molecular (10, 30, 100, 300, 1000 $\mu\text{g/ml}$) y se compararon 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 sometidas a SQZ con Ova + 200 $\mu\text{g/ml}$ de CpG como control positivo (Grupo F). En el día 0, los ratones (5/grupo, 3 no tratados) fueron inyectados 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 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 % de células T CD8 + productoras de IFN- γ o tetrámero fue mayor en el grupo adyuvado con CpG, mientras que todas las condiciones adyuvadas con poli I: C LMW o HMW no aumentaron el porcentaje de células T CD8 + productoras de IFN

y o específicas de Ova respecto de las no tratadas (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.

5 Ejemplo 8

Para ayudar a determinar la concentración de adyuvante CpG que lleva a la respuesta inmune más robusta, probamos el efecto de dosis múltiples de CpG sobre la capacidad de las T APC para inducir una respuesta específica de antígeno in vivo. Este efecto se cuantificó mediante tinción con tetrámero e ICS mediante
10 citometría de flujo.

Las células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se cargaron utilizando SQZ con 400 µg/ml de Ova + varias concentraciones de CpG 1826 (50, 100, 200 µg/ml) y se compararon con las células T incubadas con las mismas condiciones en ausencia de SQZ como control negativo (Endo – Grupos B, D & F).

15 En el día 0, los ratones (5/grupo, 3 no tratados) fueron inyectados con células T incubadas o cargadas 5M 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 tetrámero utilizando citometría de flujo, mientras que algunos esplenocitos fueron permeabilizados y fijados durante la noche. Al día siguiente (día
20 8), los niveles de IFN-γ se determinaron mediante ICS, con PMA/ionomicina como control positivo. En la Fig. 8A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.

El % de células T CD8 + productoras de IFN-γ o tetrámero fue mayor en el grupo con 200 µg/ml de CpG y fue significativamente diferente del control Endo
25 relacionado (* P <0,05 para tetrámero, #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 respalda la presentación directa de antígenos Ova para lograr una respuesta de células T CD8 + T.

Ejemplo 9

- 5 Para ayudar a evaluar el programa de administración de adyuvante CpG que lleva a una respuesta inmune robusta, probamos el efecto de los programas de dosificación múltiple de CpG sobre la capacidad de T APC para inducir una respuesta específica de antígeno in vivo. Este efecto se cuantificó mediante tinción con tetrámero e ICS mediante citometría de flujo.
- 10 Las células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se cargaron utilizando SQZ con 400 µg/ml de Ova y los ratones (5/grupo, 3 no tratados) fueron inyectados con células T incubadas o cargadas 5M en 100 µl de volumen (50M células/ml). La administración conjunta sistémica de CpG 1826 (25 µg/ml) de ratones donantes se realizó al mismo tiempo que el cebado con T APC (Día 0), o 1
- 15 o 2 días después del cebado (Día 1 o 2, respectivamente) y se compararon con las células T incubadas con las mismas condiciones en ausencia de SQZ como control negativo (Grupos B, D & F). Las células T sometidas a 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
- 20 tetrámero utilizando citometría de flujo, mientras que algunos esplenocitos fueron permeabilizados y fijados 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.
- 25 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 administración conjunta el mismo día que el cebado (Grupo B) fue el único grupo

CpG administrado conjuntamente que mostró algún nivel de activación específica de Ova, con tendencia a significativo (Fig. 9B). Sin embargo, estos datos respaldan la observación de que la administración conjunta de antígeno + CpG puede llevar a la mayor activación de las células T CD8 + específicas de Ova, mientras que el

5 retraso de la administración sistémica de CpG lleva a respuestas inferiores en comparación con el cebado simultáneo y administración conjunta de adyuvante.

Ejemplo 10

Con el fin de determinar una combinación de administración intracelular y adyuvante del sistema para la función antitumoral de T APC, se compararon

10 múltiples vías de administración de CpG frente a IFN- α junto con nuestra T APC específica de E7 en un modelo de tumor murino profiláctico TC-1. 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.

15 En los días 14 (cebado) y 7 (estímulo), las células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se cargaron utilizando SQZ con SLP E7 40 μ M precomplejado (GQAEPD**RAHYNIVTF**SSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + albúmina de suero de ratón 40 μ M (MSA) (Grupos B y C) o SLP E7 + MSA + 200 μ g/ml CpG ODN 1826 (Grupos D, E y F). Los ratones hembras C57BL/6J receptores (10

20 ratones/grupo) fueron inyectados por vía intravenosa con 100 μ l de células T cargadas (5M células/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 IFN- α IV (10k UI). 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

25 citometría de flujo. En el día 0, los ratones receptores fueron inyectados en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (100k células/ratón) y el crecimiento tumoral TC-1 se midió dos veces por semana a partir del día 11 y se comparó con

el crecimiento tumoral 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 de E7 se midió en ratones mediante tinción con tetrámero E7 después del cebado (Día 8) y estímulo (Día 3) con células T
 5 sometidas a SQZ con E7 + MSA o E7 + MSA + CpG +/- 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 de SQZ E7 + CpG y los grupos de administración conjunta de SQZ (E7 + CpG) + IFN- α . El número relativo de células T CD8 + posterior al cebado específicas de E7 fue sorprendentemente
 10 menor en la coadministración de SQZ (E7 + CpG) + de CpG respecto de la coadministración de SQZ E7 + de CpG (* P <0,05), mientras que la administración conjunta de IFN- α con células T SQZ (E7 + CpG) condujo a un número significativamente mayor de células T específicas de E7 que la administración conjunta de CpG con células T SQZ (E7 + CpG) (* P <0,05). Después del estímulo
 15 (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 de SQZ (E7 + CpG) + IFN- α , que fue significativamente mayor que la administración conjunta de
 20 SQZ E7 + IFN- α y la administración conjunta de SQZ (E7 + CpG) + de CpG, lo que demuestra que la administración conjunta 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 tumoral, medido por la fórmula ((longitud x ancho²)/2), se comparó entre ratones del grupo no tratado (sin transferencia
 25 adoptiva de células T) y los grupos de tratamiento B-F descritos en la Fig. 10C. La reducción tumoral de alto crecimiento y la ventaja de supervivencia del grupo de administración conjunta SQZ (E7 + CpG) + IFN- α se corresponde bien con la

tinción de tetrámero, lo que muestra que la mayor inducción de células T específicas de E7 condujo a la mejor actividad antitumoral. De manera interesante, a pesar del bajo % 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 la administración conjunta de SQZ (E7 + CpG) + IFN- α) que prolongó la supervivencia de todos los ratones durante 60 días. Aunque 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 fueron sometidos a provocación nuevamente con 50 k de células en el flanco opuesto (izquierdo) y se compararon con animales no tratados de la misma edad (10 ratones) (Fig. 10D). Los ratones del Grupo D tuvieron una reducción significativa en el crecimiento tumoral después de la reexposición, en comparación con los ratones no tratados que recibieron su primer provocación (***) P <0,005), respaldando que este efecto antitumoral es duradero después de 2 meses.

Ejemplo 11

Para determinar el efecto de la combinación de múltiples antígenos de HPV para la función antitumoral de T APC, péptidos largos sintéticos (SLP) E6 y E7 solos y en combinación con nuestras T APC específicas de E7 en un modelo de tumor murino TC-1 profiláctico. Las respuestas de las células T específicas de E7 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 8 (estímulo), la células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se cargaron utilizando SQZ con albúmina de suero de ratón 20 μ M precomplejada (MSA) + 20 μ M E6 (VYSKQQLLRREVDFAFRDLSIVYRDGNPYAVSDK) y/o SLP E7

(GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) o la combinación de ambos +/- 200 µg/ml CpG ODN 1826 de acuerdo a 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). Los ratones hembra C57BL/6J receptores (5–10
 5 ratones/grupo) fueron inyectados por vía intravenosa 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 tetrámero y citometría de flujo. En el día 0, a los ratones receptores se les inyectaron en el flanco posterior derecho células tumorales TC1 (100k
 10 células/ratón) y el crecimiento tumoral TC–1 se midió dos veces por semana a partir del día 11 y se comparó con el crecimiento tumoral en ratones no tratados. En la Fig. 11A se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.

El porcentaje de células T específicas de E7 se midió en ratones mediante tinción
 15 con tetrámero E7 después del estímulo (Día –3), observándose el mayor efecto con T APC CpG+E7 SQZ (Grupo B) como se muestra en la Fig. 11B. De manera interesante, las respuestas del Grupo B fueron significativamente más altas que las no tratadas y la combinación de E7 y E6 (Grupo F – #P <0,0001), proporcionando evidencia de que la adición de SLP E6 mitiga la respuesta específica de E7. El
 20 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 estadística significativa. Como se muestra en la Fig. 11C, se comparó el crecimiento tumoral, medido por la fórmula ((longitud x ancho²)/2) entre ratones del grupo no tratado (sin transferencia adoptiva de
 25 células T) y los grupos de tratamiento B–G descritos en la Fig. 11A. . La prevención del alto crecimiento tumoral se produjo en grupos con células T sometidas a SQZ con E7 + CpG, así como células T que se incubaron en presencia de E7 + CpG en

ausencia de SQZ. Los Grupos D–F mostraron algún nivel de inhibición del crecimiento tumoral en relación con las no tratadas (Grupo A) y células T sometidas a SQZ E6 + CpG (Grupo G), pero todas fueron menos efectivas que los Grupos B y C.

5 Ejemplo 12

Con el fin de determinar la importancia de la vía de administración del adyuvante CpG para el efecto antitumoral de T APC específicas de E7, se administró un SLP E7 a las células T en combinación con CpG, ya sea administrado a las células T o sistémicamente administrado conjuntamente al animal receptor y el efecto antitumoral se midió por inhibición del crecimiento tumoral.

En el día 0, los ratones receptores fueron inyectados en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón). En los días 10 (cebado) y 20 (estímulo), las células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se cargaron utilizando SQZ con albúmina de suero de ratón pre-complejada 20 μ M (MSA) + E7 20 μ M (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRSLVQSTHVDIR) y ODN 1826 se administró conjuntamente (Grupo D) por SQZ a 200 μ g/ml o se administró conjuntamente a los animales sistémicamente a 25 μ g/ratón (Grupo C) y se comparó con la administración sistémica y no tratada (Grupo A) de GpG 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 tumoral de 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 HPV (TC–1), las T APC que se sometieron a SQZ con SLP E7 condujeron a una reducción significativa en la carga tumoral en relación con la inyección de CpG no tratado 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 no tratado o adyuvante solo.

Ejemplo 13

- Con el fin de evaluar la capacidad de los adyuvantes coadministrados para conducir
- 5 a la infiltración de tumores de células T específicas de E7, se compararon CpG frente a IFN- α en combinación con nuestra T APC específica de E7 en un modelo terapéutico de tumor murino TC-1. Las respuestas de células T específicas de antígeno se midieron en linfocitos de infiltración tumoral mediante tinción con tetrámero y citometría de flujo.
- 10 En el día 0, los ratones receptores fueron inyectados en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón). En el día 10, las células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se cargaron utilizando SQZ con SLP E7
- 20 μ M precomplejado (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + albúmina de suero de ratón (MSA) 20 μ M. Las células T cargadas con SQZ (células
- 15 5M/animal) se administraron solas (Grupo C), con CpG ODN 1826 (25 μ g/ratón – Grupo D), o IFN- α (10k UI/ratón – Grupo E) y se inyectaron por vía intravenosa en 100 μ l de volumen total. Los ratones también fueron inyectados con CpG sistémico (25 μ g – Grupo A) o IFN- α solo (10k UI – Grupo B). En el día 17, se recogieron los tumores y se aislaron células T infiltrantes de tumores CD8 + y se evaluó la
- 20 reactividad específica de E7 mediante tinción con tetrámero. En la Fig. 13 se describe un esquema representativo de los grupos de tratamiento y el programa.
- 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 fuera de las
- 25 células CD8 + en el panel inferior de la Fig. 13. Mientras que la inyección de adyuvantes solos no generó una cantidad apreciable de células T específicas de E7, la administración por SQZ de un SLP E7 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 E7 se administran en combinación con adyuvantes sistémicos tal como CpG o IFN - α .

Ejemplo 14

Con el fin de determinar un programa de vacunación tanto para el cebado como para el estímulo de T APC cargadas con un péptido largo sintético E7 (SLP) + CpG, utilizamos un modelo terapéutico de tumor murino TC-1 tratado con nuestra vacuna T APC en diferentes puntos de tiempo y con número diferencial de estímulos. El efecto antitumoral se midió por inhibición del crecimiento tumoral.

En el día 0, ratones receptores fueron inyectados en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón) y el crecimiento tumoral TC-1 se midió dos veces por semana a partir del día 11 y se comparó con el crecimiento tumoral en ratones no tratados. En los días 3 o 6, las células T de ratones hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se cargaron utilizando SQZ con albúmina de suero de ratón 20 μ M precomplejada (MSA) + 20 μ M SLP E7 (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 200 μ g/ml de CpG ODN 1826 de acuerdo a la Tabla XX, seguido de una inyección intravenosa de ratones receptores con 100 μ l de células T cargadas (células 5M/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 sometidas a SQZ con E7 + CpG, con significación estadística con respecto al no tratado produciéndose el Día 20 (Día 20 – Todos los 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 estímulo en el Día 21.

Ejemplo 15

Con el fin de comprender mejor el mecanismo de presentación de antígenos por parte de las células T que han recibido 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. Se recolectaron los bazos y la cantidad de proliferación de células T específicas de Ova (OT-I) se cuantificó mediante tinción con CFSE.

- 5 En el día 0, se aislaron células T de ratones hembra OT-I donadores y se marcaron con CFSE 2 μ M y se inyectaron células 2,5M por vía retroorbital (RO) en 100 μ l de PBS en ratones knockout MHC-I o de tipo salvaje. 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 células T 5M RO. El día 3, se evaluaron los niveles de proliferación de células T específicas de Ova mediante tinción con CFSE.

- La cantidad de proliferación de células T específicas de Ova se evaluó mediante el marcado con 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 presentación de antígenos Ova por APC murinas endógenas debido a la captación indirecta de antígeno al morir las células T sometidas a SQZ y la presentación cruzada en MHC-I a células OT-I transferidas de forma adoptiva. Se descubrió que cuando los ratones receptores carecen de MHC-I, todavía existía proliferación de células OT-I específicas de Ova, lo que proporciona evidencia de que las T APC sometidas a SQZ presentan el antígeno directamente (Fig. 15). Estos datos

respaldan la presentación directa del antígeno administrado intracelularmente mediado por SQZ.

Ejemplo 16

Para evaluar la propensión de SQZ de alterar la producción de citoquinas, las
5 células T se administraron con CpG y se evaluó en cuanto a 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 hembras C57BL/6J receptores se cebaron con las células T de ratones
hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se sometieron a SQZ con 200 µg/ml de
10 CpG y se recogieron los sobrenadantes después de 24 horas (N = 2). El
sobrenadante se evaluó para determinar los niveles de citoquinas mediante el kit
de citoquinas multiplex Millipore Milliplex y se expresó como una diferencia de nivel
de cambio en relación con las células T no tratadas.

No hubo cambios significativos entre los niveles de citoquinas en el sobrenadante
15 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

Para evaluar la propensión de SQZ a alterar la producción de citoquinas, se evaluó
20 la capacidad de las células T SQZ administradas con Ova u Ova + CpG para alterar
los niveles séricos de citoquinas en un modelo murino in vivo. Las citoquinas séricas
se perfilaron utilizando un kit de citoquinas múltiplex.

Los ratones hembra C57BL/6J receptores se cebaron con las células T de ratones
hembras C57BL/6J donantes se aislaron y se sometieron a SQZ con 400 µg/ml de
25 Ova u Ova + 200 µg/ml de CpG y se extrajo sangre de la vena de la cola a las 6
horas y mediante punción cardíaca 24 horas después del cebado. El suero se
evaluó para determinar los niveles de citoquinas mediante el kit de citoquinas

Millipore Milliplex multiplex y se 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*.

Ejemplo 18

- Este ejemplo demuestra, en parte, que los antígenos introducidos en las células T (T-APC) se procesan rápidamente y se presentan directamente.

- Para determinar la cinética de la presentación del antígeno de las células T como células presentadoras de antígeno (T-APC), el antígeno se administró a la célula T mediante SQZ, y la presencia del péptido mínimo unido a MHC-I se evaluó a lo largo del tiempo mediante inmunotinción y citometría de flujo.

- Específicamente, se aislaron células T murinas de ratones C56BL/6J y se aislaron y procesaron con SQZ sin carga útil (SQZ: sin antígeno) o con 200 µg/ml de proteína Ova cargada por SQZ (SQZ: Ovalbúmina – N = 3 réplicas técnicas). En varios puntos de tiempo entre 2 y 24 horas, las células T tratadas se tiñeron con un anticuerpo (25-D1.16) que reconocía específicamente el epítipo mínimo de Ova (SIINFEKL), seguido de citometría de flujo. Cualquier epítipo mínimo que haya sido procesado a partir de la proteína OVA y presentado en MHC-I se detectaría mediante inmunotinción y la cantidad de presentación de antígeno se determinó mediante citometría de flujo.

- Las poblaciones relativas de células que presentan diversos niveles de SIINFEKL en MHC-I se representaron mediante los histogramas (el gris oscuro representa SQZ: sin antígeno; el gris claro representa SQZ: ovalbúmina) superpuesto a las 0,

- 2, 4 y 24 h (Fig. 56). 18A). El desplazamiento hacia la derecha en el histograma que representa SQZ: Ovalbúmina indicó poblaciones con mayor tinción con SIINFEKL y, por lo tanto, un aumento de una población de células que presentan el antígeno procesado en MHC-I; en comparación con el SQZ: control sin antígeno.
- 5 El cambio descrito en las T-APC cargadas con antígeno fue evidente a las 2 horas, con pequeñas disminuciones en la presentación del antígeno observadas solo después de 24 horas. La cantidad relativa de presentación de SIINFEKL en MHC-I por célula a lo largo del tiempo se midió mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células (Fig. 18B). SQZ: Las poblaciones de ovoalbúmina
- 10 mostraron una presentación apreciable de SIINFEKL después de 2 horas, con la presentación máxima observada a las 4 horas, seguida de una ligera disminución en el tiempo observada entre 4 y 24 horas. En el transcurso del tiempo medido, no se observaron diferencias en la presentación del antígeno para el control SQZ: sin antígeno. En conjunto, estos datos respaldan que la carga de antígeno mediada
- 15 por SQZ en las células T condujo a una presentación rápida del antígeno (2-4 horas).

Ejemplo 19

- Este ejemplo demuestra, en parte, que las células T que han sido cargadas con SQZ con un antígeno relevante para la enfermedad (T-APC) estimulan eficazmente
- 20 las respuestas de células T específicas para el antígeno in vitro.

- Con el fin de determinar la capacidad de células T humanas que han sido cargadas con SQZ con un antígeno relevante para la enfermedad (T-APC) para estimular una respuesta de células T específica para el antígeno, las células T fueron cargadas con SQZ con un antígeno asociado al CMV, co-cultivadas con células T
- 25 respondedoras específicas de un antígeno y los niveles de secreción de citoquinas inflamatorias se midieron mediante ELISA.

Específicamente, se aislaron células T humanas de donantes HLA-A2 + y se incubaron un CMV pp65 SLP (50 μ M) con células T (Endo), o se administró a células T mediante SQZ (SQZ). Luego se incubaron células T Endo o células T SQZ (60k células/pocillo) con células T respondedoras pp65 (30k células/pocillo) en una
 5 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 analizaron mediante ELISA para determinar los niveles de secreción de IFN- γ , lo que indica la cantidad de estimulación inmune específica de antígeno in vitro.

Cuando se compararon con las células T que se incubaron con la SLP pp65 (Endo),
 10 hubo un aumento considerable y estadísticamente significativo en la estimulación de respondedores específicos de pp65 por parte de las células T cargadas con SQZ, según lo medido por ELISA de IFN- γ ($P < 0,005$). Estos datos muestran que mediante la carga con SQZ de antígenos relevantes para la enfermedad, las células T humanas podrían modificarse para convertirse en APC eficientes en la
 15 estimulación de las respuestas de células T específicas de antígeno relevantes para la enfermedad in vitro.

Ejemplo 20

Con el fin de evaluar la importancia del adyuvante sobre la capacidad de una vacuna cargada con SQZ para inducir linfocitos infiltrantes de tumores (TIL)
 20 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 mediante citometría de flujo.

Ratones hembra C57BL/6J fueron inyectados en el flanco posterior derecho con
 25 células tumorales TC1 (50 k células/ratón) en el día 0. En el día 15 (cebado), se obtuvieron células T murinas de bazo de ratones hembra C57BL/6J donantes y se cargaron con SLP E7 pre-complejado 5 μ M

(GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + 5 μ M de albúmina de suero de ratón (MSA) a través de SQZ (40 psi, constricción 3,5 μ m, temperatura ambiente) y se incubó durante 1 hora a 37 ° C. Ratones hembra C57BL/6J receptores (10/grupo) fueron inyectados por vía retroorbital en el día 15 con 100 μ l de vehículo

5 (PBS – No tratado) o células T cargadas con E7 (1M células/ratón) +/- 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.

Las T APC cargadas con SQZ solo produjeron un aumento pequeño (~ 15%) pero estadísticamente insignificante en el número de TIL específicos de E7, pero cuando

10 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 sola; *** P <0,0005 en comparación con no tratado). Estos datos muestran que la co-inyección de CpG junto con T APC cargada con E7 conduce a un reclutamiento mucho mayor de TIL en comparación con el T APC sola.

15 Ejemplo 21

Con el fin de evaluar la durabilidad de la vacuna T APC + adyuvante en un entorno profiláctico, los ratones tratados con T APC se compararon con ratones no tratados en cuanto al crecimiento tumoral de un modelo de tumor TC1 que expresaba HPV E7, tanto para la respuesta inicial, así como una nueva provocación 60 días

20 después, con el área de los tumores trazados en función del tiempo.

En el día 14, se recogieron esplenocitos de ratones hembras C57BL/6J y se aislaron las células T mediante separación inmunomagnética. A continuación, las células T murinas se cargaron con SLP E7 20 μ M pre-complejado (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + albúmina de suero de ratón

25 20 μ M (MSA) a través de SQZ (45 psi; 3,5 μ m constricción) y se incubaron durante 1 hora a 37 ° C. Ratones hembra C57BL/6J receptores (10 ratones/grupo, excepto la cohorte I no tratada, que fue de 20 ratones/grupo) se inyectaron por vía

retroorbital con 100 µl de vehículo (PBS – No tratado) o células T cargadas con E7 (1M células/ratón) + CpG 1826 (25 µg/ratón) [Cebado]. En el día 7, se recogieron los bazo de ratones hembras C57BL/6J y las células T se aislaron y se sometieron a SQZ y se inyectaron en ratones receptores exactamente como en el día 14 [Estímulo]. En el día 0, ratones hembra C57BL/6J fueron inyectados 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 tumoral TC-1 se midió comenzando 1 semana después de la implantación del tumor dos veces por semana y se comparó con el crecimiento tumoral en ratones no tratados hasta por 120 días.

El crecimiento tumoral, medido por la fórmula $((\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2)$, se comparó entre ratones del grupo no tratado y el grupo tratado con T APC provocado con células tumorales en el día 0, y mientras todos los ratones alcanzaron el criterio de valoración humano en el grupo no tratado en el día 47, hubo un retraso significativo en el crecimiento tumoral para el grupo T APC en todos menos 2 de los ratones T APC, y el resto de los ratones (8) permanecieron libres de tumor hasta que se fueron provocados nuevamente con los tumores. De manera interesante, cuando se implantaron tumores en los ratones no tratados en el día 64 y se compararon con los ratones tratados con T APC que tuvieron tumores reimplantados en su flanco opuesto, todavía hubo un retraso del crecimiento tumoral, donde en 3 ratones nunca crecieron tumores medibles, incluso después de la provocación tumoral secundaria. Estos datos sugieren que el tratamiento con T APC cargado con E7 + adyuvante puede no solo llevar a una inhibición del crecimiento tumoral específica del antígeno, sino también a la prevención de tumores que incluso puede durar hasta más de 100 días a pesar de una provocación tumoral secundaria.

Ejemplo 22

Con el fin de evaluar el impacto de las diferentes concentraciones de T APC, así como los programas de cebado–estimulación en un entorno de vacuna terapéutica, se compararon ratones tratados con T APC (concentraciones múltiples y programas de cebado–estimulación) con ratones no tratados para el crecimiento tumoral de un modelo de tumor TC1 que expresa HPV E7, con el área de los tumores trazados frente al tiempo.

En el día 0, ratones hembra C57BL/6J fueron inyectados en el flanco posterior derecho con células tumorales TC1 (50 k células/ratón). En el día 10 (cebado), se obtuvieron células T murinas de bazos de ratones hembra C57BL/6J donadores mediante separación inmunomagnética y se cargaron con SLP E7 precomplejado 20 μ M (GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR) + de albúmina de suero de ratón 20 μ M (MSA) a través de SQZ (45 psi; 3,5 μ m de constricción) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Luego, ratones hembras C57BL/6J receptores (10/grupo) fueron inyectados por vía retroorbital 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 de cebado/estímulo recibió una segunda inyección con T APC de manera idéntica al día 10. El crecimiento tumoral TC–1 se midió comenzando 1 semana después de la implantación del tumor dos veces por semana y se comparó con el crecimiento tumoral en ratones no tratados por hasta 66 días.

El crecimiento tumoral, medido por la fórmula $((\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2)$ y el grupo APC de dosis baja (0,25M células/ratón) + CpG (cebado solamente) solo provocó un ligero retraso en la tasa de crecimiento tumoral en comparación con la no tratada. La inclusión de una estimulación en el Día 17 con la dosis baja de T APC + CpG (0,25 M cebado/estímulo) vio una mejora de la inhibición del crecimiento tumoral con respecto a la condición misma concentración de cebado solamente y una inhibición mucho mayor que la no tratada. El aumento de la dosis de T APC cargadas con antígeno a 1M/ratón (cebado solamente) condujo a una ligera

- inhibición tumoral en relación con la dosis más baja T APC + CpG (cebado solamente). De manera interesante, el uso de la dosis alta de T APC + CpG (cebado solamente) condujo a la mejor protección contra el crecimiento tumoral, con regresión tumoral entre los Días 20–40 y el nivel más alto de inhibición del
- 5 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 de cebado + estimulación pueden mejorar la eficacia de una vacuna T APC.

Listado de secuencias

SEC ID NO	Secuencia	Descripción
1	TIHDIILECV	HPV16–E6(29–38), epítipo humano
2	EVYDFAFRDL	HPV16–E6(48–57), epítipo murino
3	YMLDLQPETT	HPV16–E7(11–20), epítipo humano
4	RAHYNIVTF	HPV16–E7(49–57), epítipo murino
5	LPQL <u>S</u> TELQT	HPV16–E6(19–28) Polipéptido N– terminal, humano
6	QLCTELQT	HPV16–E6(21–28) Polipéptido N– terminal, humano

7	KQQLRR	HPV16–E6(41–47) Polipéptido N– terminal, nativo murino
8	VYSKQQLRR	HPV16–E6(38–47) Polipéptido N– terminal, clásico murino
9	MHGDPTLHE	HPV16–E7(1–10) Polipéptido N– terminal, humano
10	GQAEPD	HPV16–E7(43–48) Polipéptido N– terminal, murino
11	Y <u>S</u> KQQLLRREVDFAF	HPV16–E6(39–54) Polipéptido C– terminal, humano
12	YCKQQL	HPV16–E6(39–45) Polipéptido C– terminal, humano
13	CIVYRDGN	HPV16–E6(58–65) Polipéptido C– terminal, nativo murino
14	SIVYRDGNPYAVSDK	HPV16–E6(58–72) Polipéptido C– terminal, clásico murino

15	DLYCYEQLNDSSEEE	HPV16–E7(21–35) Polipéptido C– terminal, humano
16	CCKCDSTLRRCVQSTHVDIR	HPV16–E7(58–77) Polipéptido C– terminal, nativo murino
17	SSKSDSTLRSLVQSTHVDIR	HPV16–E7(58–77) Polipéptido C– terminal, clásico murino
18	LPQLSTELQTTIHDIILECVYSKQQLRREVVDF AF	HPV16–E6(19–54) SLP, humano
19	QLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLL	HPV16–E6(21–45) SLP, humano
20	KQQLRREVVDFAFRDLCIVYRDGN	HPV16–E6(41–65) SLP, nativo murino
21	VYSKQQLRREVVDFAFRDLSIVYRDGNPYAV SDK	HPV16–E6(38–72) SLP, clásico murino
22	MHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDS SEEE	HPV16–E7(1–35) SLP, humano
23	QLCTELQTYMLDLQPETTYCKQQLL	HPV16–E7.6 SLP, humano
24	GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRCVQSTHV DIR	HPV16–E7(43–77) SLP, nativo murino
25	GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRSLVQSTHV DIR	HPV16–E7(43–77) SLP, clásico murino

26	ggGGTCAACGTTGAgggggg Las bases que se muestran en letras mayúsculas son fosfodiéster, y las que están en letras minúsculas son fosforotioato	ODN 1585 (Clase A, específico de ratón)
27	ggGGGACGA:TCGTCggggggg Las bases que se muestran en letras mayúsculas son fosfodiéster, y las que están en letras minúsculas son fosforotioato	ODN 2216 (Clase A, selectivo humano)
28	gggGACGAC:GTCGTGggggggg Las bases que se muestran en letras mayúsculas son fosfodiéster, y las que están en letras minúsculas son fosforotioato	ODN 2336 (Clase A, preferente humano)
29	tccatgacgttctgatgct Las bases que se muestran en letras mayúsculas son fosfodiéster, y las que están en letras minúsculas son fosforotioato	ODN 1668 (Clase B, específico de ratón)
30	tccatgacgttctgacgtt Las bases son fosforotioato	ODN 1826 (Clase B, específico de ratón)
31	tcgtcgtttgcgttttgcgtt Las bases son fosforotioato	ODN 2006 (Clase B, selectivo humano)
32	tcg tcg ttg tcg ttt tgt cgt t Las bases son fosforotioato	ODN 2007 (Clase B, bovino/porcino)
33	tcg acg ttc gtc gtt cgt cgt tc Las bases son fosforotioato	ODN BW006 (Clase B, humano & ratón)
34	tcg cga cgt tcg ccc gac gtt cgg ta Las bases son fosforotioato	ODN D–SL01 (Clase B, múltiples especies)

35	tcgtcgttttcggcgc:gcgccg Las bases son fosforotioato	ODN 2395 (Clase C, humano/ratón)
36	tcgtcgtcgttc:gaacgacgttgat Las bases son fosforotioato	ODN M362 (Clase C, humano/ratón)
37	tcg cga acg ttc gcc gcg ttc gaa cgc gg Las bases son fosforotioato	ODN D-SL03 (Clase C, múltiples especies)
38	MHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDS SEEE	E7
39	LYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHY NIVT	E7
40	GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRCVQSTHV DIR	E7
41	TLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICSQ KP	E7
42	MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIH D	E6
43	LPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVY	E6
44	KQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGN	E6
45	RDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKI	E6
46	DKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTL	E6
47	HYCYSLYGTTLQYQYNKPLCDLLIR	E6
48	YGTTLQYQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEK	E6
49	RCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRW T	E6
50	DKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRET QL	E6

