

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

~~1. — Una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden intracelularmente un CpG ODN y un antígeno de VPH con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18–25.~~

~~2. — La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 187, en la que las células inmunes modificadas se preparan por~~

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

~~b) incubar la célula de entrada perturbada con el antígeno de VPH y el ODN CpG durante un tiempo suficiente para permitir que el antígeno de VPH y el ODN CpG ingresen en la célula de entrada perturbada;~~

~~generando así las células inmunes modificadas.~~

~~3. — La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el diámetro de la constricción es menor que el diámetro de la célula.~~

4. — ~~La composición de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 99% del diámetro de la célula.~~
5. — ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-190, en la que el diámetro de la constricción es de aproximadamente el 20% a menos de aproximadamente el 60% del diámetro de la célula.~~
6. — ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en la que la constricción está en un canal.~~
7. — ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en la que se aplica una fuerza de deformación a la célula de entrada cuando pasa a través de la constricción,~~
8. — ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la composición comprende además un adyuvante.~~
9. — ~~La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el antígeno de VPH y/o el CpG ODN están presentes en el citosol y/o endosomas.~~
10. — ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el antígeno y/o el CpG ODN están presentes en múltiples compartimentos de la célula.~~
11. — ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la célula inmune modificada comprende además un antígeno de VPH y/o un ODN CpG en la superficie de la célula.~~
12. — ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en la que la concentración de ODN CpG incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.~~

~~13.—La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2–12, en la que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 1 mM.~~

~~14.—La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2–13, en la que la relación de antígeno de VPH a CpG ODN incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.~~

~~15.—La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–14, en la que CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.~~

~~16.—La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–15, en la que la célula inmune modificada comprende más de un adyuvante.~~

~~17.—La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el adyuvante comprende CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.~~

~~18.—La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1–17, en la que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.~~

~~19.—La composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.~~

~~20.—La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–19, en la que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico de VPH y una o más secuencias de péptidos heterólogos.~~

~~21.—La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–20, en donde el antígeno de VPH se compleja con él mismo, con otros antígenos, con un adyuvante o con el CpG ODN.~~

~~22.— La composición de acuerdo con la reivindicación 1-21, en la que el antígeno de VPH comprende un epítipo específico de HLA-A2.~~

~~23.— La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en la que el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo antigénico que está flanqueado en el extremo N y/o el extremo C por una o más secuencias peptídicas heterólogas.~~

~~24.— La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en la que la célula inmune modificada comprende el ODN CpG en una concentración entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 1 mM.~~

~~25.— La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde la célula inmune modificada comprende el antígeno de VPH en una concentración entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 1 mM.~~

~~26. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en la que la relación del antígeno de VPH a la ODN de CpG está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.~~

27.1. Una composición que comprende células inmunes modificadas, en donde las células inmunes modificadas comprenden un antígeno de VPH, en donde el antígeno de VPH no es una proteína de longitud completa y comprende la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, ~~comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con cualquiera de las SEQ ID NO: 18-25.~~

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antígeno de VPH comprende la secuencia de la secuencia de aminoácidos definida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 18-25.

28.3. La composición de acuerdo con la reivindicación 27, en la que el antígeno de VPH comprende la secuencia de aminoácidos ~~con al menos un 90% de similitud con~~definida en la SEQ ID NO: 23.

29.4. La composición de acuerdo con ~~cualquiera de las~~ reivindicaciones ~~127 a 328~~, ~~donde el antígeno del VPH se administró intracelularmente a las células inmunitarias de entrada para producir en la que~~ las células inmunes modificadas ~~se preparan mediante~~

~~a) pasar una suspensión celular que comprende el pasaje de una las células inmunes~~ de entrada a través de una constricción de deformación celular, ~~en donde un diámetro de la constricción es una función de un diámetro de la célula de entrada en la suspensión,~~ causando así perturbaciones de ~~las células inmunes~~ de entrada ~~lo suficientemente grandes de tal manera que para que~~ el antígeno del VPH logre entrar en las células inmunitarias de entrada a través de las perturbaciones cuando se pone en contacto con las células inmunitarias de entrada, pase para formar una célula de entrada perturbada; y

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

~~generando así las células inmunes modificadas.~~

30.5. La composición de acuerdo con la reivindicación ~~429~~, en la que el diámetro de la constricción de deformación celular es menor que el diámetro de ~~las~~ células inmunes de entrada.

31.6. La composición de acuerdo con ~~cualquiera de las~~ reivindicaciones ~~529-30~~, en la que el diámetro de la constricción de deformación celular es ~~de~~ aproximadamente el 20% al aproximadamente el 99% del diámetro de ~~las~~ células inmunes de entrada.

~~32.7.~~ La composición de acuerdo con ~~cualquiera de las reivindicaciones 5 o 629-31~~, en la que el diámetro de la constricción de deformación celular es de ~~aproximadamente el 20% a menos del aproximadamente el 60%~~ del diámetro de las células inmunes de entrada.

~~33.8.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 729-32, en la que la constricción de deformación celular está en un canal.

~~34.9.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 829-33, en la que se aplica una fuerza de deformación a las células inmunes de entrada cuando pasan a través de la constricción de deformación celular.

~~35.10.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 927-34, ~~que en donde la composición~~ comprende además un adyuvante.

~~36.11.~~ La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1027-35, en la que el antígeno de VPH y/o el adyuvante están presentes en el citosol y/o endosomas de las células inmunes modificadas.

~~37.12.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1127-36, en la que el antígeno y/o adyuvante están presentes en múltiples compartimentos de las células inmunes modificadas.

~~38.13.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1227-37, en la que las células inmunes modificadas comprenden además el un antígeno de VPH y/o el un adyuvante en la superficie ~~de la célula~~.

~~39.~~ ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-38, en la que la concentración de adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 1 mM.~~

~~40.~~ ~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-39, en la que la concentración de antígeno de VPH incubada con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 1 mM.~~

~~41. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-40, en la que la relación de antígeno de VPH a adyuvante incubado con la célula de entrada perturbada está entre aproximadamente 10000:1 y aproximadamente 1:10000.~~

42.14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 1327-41, en donde el adyuvante escomprende un CpG ODN, IFN- α , agonistas de STING, agonistas de RIG-I o poli I:C.

43.15. La composición de acuerdo con la reivindicación 1442, en la que el adyuvante es CpG ODN.

44.16. La composición de acuerdo con la reivindicación 1543, en la que el CpG ODN es CpG ODN 1018, CpG ODN 1826 o CpG ODN 2006.

45.17. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1627-44, en la que las células inmunes modificadas comprenden más de un adyuvante.

46.18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1727-45, en la que el antígeno de VPH es un conjunto de múltiples polipéptidos que provocan una respuesta contra los mismos y diferentes antígenos de VPH.

47.19. La composición de acuerdo con la reivindicación 1846, en la que un antígeno en el conjunto de múltiples antígenos no disminuye la respuesta inmune dirigida hacia otros antígenos en el conjunto de múltiples antígenos.

48.20. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 1927-47, en donde el antígeno de VPH es un polipéptido que comprende un epítipo de VPH antigénico y una o más secuencias de péptidos heterólogos.

49.21. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2027-48, en donde el antígeno de VPH se compleja con él mismo, con otros antígenos, o con el adyuvante.

~~50.22.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21-27-49, en la que el antígeno de VPH comprende un epítipo específico de HLA-A2.

~~51.23.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22-27-50, en la que las células inmunes modificadas comprenden el adyuvante en una concentración entre ~~aproximadamente~~ 0,1 µM y ~~aproximadamente~~ 1 mM.

~~52.24.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23-27-51, en la que las células inmunes modificadas comprenden el antígeno de VPH en una concentración entre ~~aproximadamente~~ 0,1 µM y ~~aproximadamente~~ 1 mM.

~~53.25.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24-27-52, en la que la relación del antígeno de VPH al adyuvante presente en las células inmunes modificadas está entre ~~aproximadamente~~ 10000:1 y ~~aproximadamente~~ 1:10000.

~~54.26.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a-25-53, en la que el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido de clase I de MHC.

~~55.27.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26-54, en donde el antígeno de VPH es capaz de procesarse en un péptido restringido por MHC de clase II.

~~56.28.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27-55, en donde las células inmunes modificadas comprenden además un agente que mejora la viabilidad y/o función de la célula inmune modificada en comparación con ~~las~~ una células inmunes modificadas correspondientes que no comprende el agente.

57.29. La composición de acuerdo con la reivindicación 2856, en la que el agente es un compuesto que mejora la endocitosis, un agente estabilizante o un cofactor.

58.30. La composición de acuerdo con la reivindicación 2856, en la que el agente es albúmina.

59.31. La composición de acuerdo con la reivindicación 3058, en la que la albúmina es albúmina de ratón, bovina o humana.

60.32. La composición de acuerdo con la reivindicación 2856, en la que el agente es un catión metálico divalente, glucosa, ATP, potasio, glicerol, trehalosa, D-sacarosa, PEG1500, L-arginina, L-glutamina o EDTA.

61.33. La composición de acuerdo con la reivindicación 2856, en la que el agente comprende MSA.

62.34. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3361, en la que las células inmunes modificadas se modifican adicionalmente para aumentar la expresión de una o más de las moléculas coestimuladoras.

63.35. La composición de acuerdo con la reivindicación 3462, en la que la molécula coestimuladora es B7-H2 (ICOSL), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD70, LIGHT, HVEM, CD40, 4-1BBL, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD155 o CD112.

64.36. La composición de las reivindicaciones 3462 o 3563, en la que las células inmunes modificadas comprenden un ácido nucleico que da como resultado un aumento de la expresión de una o más moléculas coestimuladoras.

65.37. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36-64, en la que las células inmunes modificadas se seleccionan del grupo dees una células T, una-células dendrítica, un-monocitos, un-macrófagos, una-células mieloide, un-granulocitos, un-neutrófilos, un-mastocitos, una células natural killer,

~~una~~ células linfóide innata, ~~un~~ basófilos o ~~una~~ células precursora hematopoyética.

~~66.38.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ~~a 37-~~ ~~65~~, en la que las células inmunes s modificadas no ~~sones una~~ células B.

~~67.39.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ~~a 38-~~ ~~66~~, en la que las células inmunes s modificadas ~~sones una~~ células T.

~~68.40.~~ La composición de acuerdo con la reivindicación ~~39~~67, en la que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase I.

~~69.41.~~ La composición de acuerdo con la reivindicación ~~39~~67, en la que la célula T comprende una modificación adicional para modular la expresión de MHC de clase II.

~~70.42.~~ La composición de acuerdo con las ~~reivindicación~~reivindicaciones ~~40~~68 ó ~~41~~69, en la que la célula T comprende una modificación adicional para reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

~~71.43.~~ La composición de acuerdo con la reivindicación ~~40~~68 ó ~~41~~69, en donde la modificación adicional comprende reducir la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARNsi, ARNsh, CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, Cre recombinasa o una meganucleasa.

~~72.44.~~ La composición de acuerdo con la reivindicación ~~40~~68 ó ~~41~~69, en la que la célula T comprende una modificación adicional para aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

~~73.45.~~ La composición de acuerdo con la reivindicación ~~40~~68 ó ~~41~~69, en donde la modificación adicional comprende aumentar la expresión de MHC de clase I y/o MHC de clase II utilizando ARN o ADN plasmídico.

~~74.— La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67–71, en la que una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de las células T modificadas adicionales se reduce en comparación con una respuesta inmune innata montada en un individuo en respuesta a la administración, en un contexto alogénico, de células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional.~~

~~75. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67–71, en la que la vida media circulante de las células T modificadas adicionales en un individuo al que se administraron está modulada en comparación con la vida media circulante de las células T modificadas correspondientes que no comprenden la modificación adicional en un individuo al que fueron administrados.~~

~~76.46.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 45~~67–75~~, en la que la célula T incluye una o más de las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T de memoria, las células CIK y las células T natural killer.

~~77.47.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 45~~67–75~~, en la que la célula T incluye una o más de las células T CD3+, las células T CD4+, las células T CD8+, las células T CD45RA+, las células T CD45RO+ y las células T $\gamma\delta$.

~~78.48.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 47–77, en la que las células inmunes modificadas son es alogénicas para un individuo.

~~79.49.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 47–77, en la que las células inmunes modificadas son es autólogas para un individuo.

~~80. — La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-79, en la que un individuo está precondicionado para tener una inflamación modulada y/o una respuesta inmune modulada.~~

~~81-50.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49- ~~80~~, en donde la composición comprende además un inhibidor del punto de control inmune.

~~82-51.~~ La composición de acuerdo con la reivindicación ~~50~~81, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM-3, TIGIT, VISTA, TIM1, B7-H4 (VTCN1) o BTLA.

~~83. — La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-82, en la que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a un individuo da como resultado la activación y/o expansión de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para el antígeno de VPH.~~

~~84. — La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-82, en la que la administración de la composición que comprende las células inmunes modificadas a un individuo da como resultado la activación y/o expansión de células T helper (Th) específicas para el antígeno.~~

~~85-52.~~ La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51- ~~84~~, en la que la cantidad eficaz de la composición la cual comprende entre ~~aproximadamente~~ 1×10^6 y ~~aproximadamente~~ 1×10^{12} células inmunes modificadas.

~~86. — Una composición que comprende un antígeno, en donde el antígeno comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de similitud con la SEQ ID NO: 23.~~

~~87. — La composición de acuerdo con la reivindicación 86, en donde el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.~~

~~88.—Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-87 para uso como un medicamento.~~

~~89.—Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-87 para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía, terapia o diagnóstico.~~

~~90.—Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-87 para usar en el tratamiento de un cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad asociada a virus.~~

~~91.—Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-87, en donde el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer vulvar, cáncer vaginal, cáncer de pene, cáncer anal, cáncer perianal, cáncer anogenital, cáncer oral o cáncer de saliva.~~

~~92.—Una composición que comprende las células inmunes modificadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 300-91, en la que las PBMC modificadas se administran antes, simultáneamente o después de la administración de un inhibidor del punto de control inmune.~~

~~93.—La composición de acuerdo con la reivindicación 92, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a uno cualquiera de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, VISTA y TIM-3.~~

~~94.—La composición de acuerdo con la reivindicación 93, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a PD-1.~~

~~95.—La composición de acuerdo con la reivindicación 93, en la que el inhibidor del punto de control inmune está dirigido a PD-L1.~~

96.—~~La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 88-95, en la que las PBMC modificadas se administran antes, simultáneamente o después de la administración de un agente terapéutico.~~

97.—~~La composición de acuerdo con la reivindicación 96, en la que el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.~~

98.—~~La composición de acuerdo con la reivindicación 97, en la que la enfermedad infecciosa está asociada con VIH, VPH, EBV, MCV, HBV o HCV.~~