

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE
INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL BASADAS EN LA
SECRECIÓN *IN VIVO* DE
ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS**

Marta Compte Grau

Madrid, 2012

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE
INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL BASADAS EN LA
SECRECIÓN *IN VIVO* DE
ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS**

Marta Compte Grau
Licenciada en Medicina y Cirugía

DIRECTORES: Dr. LUIS ÁLVAREZ VALLINA
Dra. LAURA SANZ ALCOBER
HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA de HIERRO-MAJADAHONDA

El Dr. LUIS ÁLVAREZ VALLINA, Jefe Adjunto del Servicio de Inmunología y Jefe de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda y la Dra. LAURA SANZ ALCOBER, Investigadora de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda,

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado **Desarrollo de Nuevas Estrategias de Inmunoterapia Antitumoral Basadas en la Secreción *in vivo* de Anticuerpos Biespecíficos**, que presenta MARTA COMPTE GRAU para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda (Madrid) y reúne las condiciones de calidad, contenido y formales exigibles para ser presentado ante el tribunal correspondiente. Para que conste a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Madrid a 30 de octubre de 2012.

Dr. Luis Álvarez Vallina
Director de Tesis

Dra. Laura Sanz Alcober
Directora de Tesis

Esta tesis doctoral, realizada en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/1144), por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM GR/SAL/0214/2004) y por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BIO2005-04794).

Marta Compte Grau ha disfrutado de un contrato post Formación Sanitaria Especializada Río Hortega en el marco de las ayudas de la Acción Estratégica de Salud del Instituto de Salud Carlos III (CM06/0005).

ÍNDICE

ÍNDICE	9
ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	19
1. INMUNIDAD Y CÁNCER	21
2. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER	22
2.1. INMUNOTERAPIA NO ESPECÍFICA	23
2.1.1. <i>Inmunostimuladores sintéticos o derivados de patógenos</i>	23
2.1.2. <i>Citoquinas</i>	23
2.2. INMUNOTERAPIA ANTÍGENO ESPECÍFICA	23
2.2.1. <i>Inmunoterapia activa</i>	23
2.2.2. <i>Inmunoterapia pasiva</i>	25
3. ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS	31
3.1. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS	31
3.2. EFICACIA TERAPÉUTICA	32
4. PRODUCCIÓN <i>IN SITU</i> DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES	34
4.1. TERAPIA GÉNICA	35
4.1.1. <i>Terapia génica in vivo: administración directa</i>	37
4.1.2. <i>Terapia génica ex vivo: vehículos celulares</i>	38
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. ANTICUERPOS	47
2. LÍNEAS CELULARES	48
3. AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS MADURAS	48
3.1. CÉLULAS PRIMARIAS HEMATOPOYÉTICAS: LINFOCITOS T	48
3.2. CÉLULAS PRIMARIAS NO HEMATOPOYÉTICAS: CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA VENA DEL CORDÓN UMBILICAL	49
4. AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS	49
4.1. CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS	49

4.2.	CÉLULAS PROGENITORAS MESENQUIMALES	49
5.	ESTUDIOS FENOTÍPICOS	50
6.	CONSTRUCCIONES GENÉTICAS	50
7.	GENERACIÓN Y TITULACIÓN DE SOBRENADANTES LENTIVIRALES	51
8.	TRANSFECCIONES	52
9.	TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS HUMANAS	52
9.1.	LÍNEAS CELULARES HUMANAS	52
9.2.	CÉLULAS PRIMARIAS MADURAS: LINFOCITOS T Y HUVEC	53
9.3.	CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES: HSC Y MSC	53
10.	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS EUCARIOTAS	53
11.	ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA)	54
11.1.	ELISA PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO P-24 DEL VIH-1	54
11.2.	ELISA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUQUINA-2	54
11.3.	ELISA PARA LA DETECCIÓN DE <i>DIABODY</i> ACEA X ACD3 EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO CELULAR O EN SUERO DE RATÓN.	54
12.	TRANSFERENCIA <i>WESTERN</i>	54
13.	ESTUDIOS FUNCIONALES	55
13.1.	ENSAYOS DE ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN	55
13.1.1.	<i>Ensayos de activación y proliferación específica de linfocitos T</i>	55
13.1.2.	<i>Efecto inmunomodulador de las MSCs sobre la proliferación de linfocitos T</i>	55
13.2.	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	55
13.3.	ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN TUMORAL	56
14.	ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	56
14.1.	ANESTESIA	56
14.2.	ENSAYOS DE IMPLANTACIÓN TUMORAL: XENOTRASPLANTE	56
14.3.	ENSAYOS DE IMAGEN MOLECULAR	57
14.4.	ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL POR ANTICUERPOS RECOMBINANTES BIESPECÍFICOS SECRETADOS A NIVEL LOCAL (SECRECIÓN INTRATUMORAL)	57

14.4.1. Efecto de los linfocitos T transducidos sobre el crecimiento tumoral	57
14.4.2. Efecto de las células progenitoras mesenquimales transducidas sobre el crecimiento tumoral	58
14.5. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL POR ANTICUERPOS RECOMBINANTES BIESPECÍFICOS SECRETADOS A DISTANCIA (SECRECIÓN SISTÉMICA)	58
14.5.1. Generación y establecimiento de organoides	58
14.5.2. Generación y establecimiento de implantes vasculares	58
14.5.3. Ensayos de imagen molecular in vivo para el seguimiento de la viabilidad de los organoides e implantes vasculares	59
14.6. RECUPERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS DE TEJIDOS MURINOS	59
14.6.1. Identificación de linfocitos T humanos circulantes	59
14.6.2. Identificación de linfocitos T humanos infiltrantes	59
15. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	60
15.1. INMUNOHISTOQUÍMICA	60
15.2. ANÁLISIS DE LA DENSIDAD VASCULAR	60
RESULTADOS	61
ARTÍCULO N° 1: <i>INHIBITION OF TUMOR GROWTH IN VIVO BY IN SITU SECRETION OF BISPECIFIC ANTI-CEA X ANTI-CD3 DIABODIES FROM LENTIVIRALLY TRANSDUCED HUMAN LYMPHOCYTES. CANCER GENE THERAPY (2007) 14, 380–388.</i>	63
ARTÍCULO N°2: <i>TUMOR IMMUNOTHERAPY USING GENE-MODIFIED HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS LOADED INTO SYNTHETIC EXTRACELLULAR MATRIX SCAFFOLDS. STEM CELLS. (2009) 27:753-760.</i>	65
ARTÍCULO N° 3: <i>FACTORY NEOVESSELS: ENGINEERED HUMAN BLOOD VESSELS SECRETING THERAPEUTIC PROTEINS AS A NEW DRUG DELIVERY SYSTEM. GENE THERAPY. (2010) 17, 745–751.</i>	67
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXO	101

ABREVIATURAS

AAT	Antígeno Asociado a Tumor
Ac	Anticuerpo
AcBis	Anticuerpo Biespecífico
AcBisR	Anticuerpo Biespecífico Recombinante
AcHz	Anticuerpo Humanizado
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
AcQ	Anticuerpo Quimérico
ACT	Terapia Celular Adoptiva (del inglés <i>Adoptive Cell Therapy</i>)
ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo (del inglés, <i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>)
Ag	Antígeno
BCR	Receptor de células B (del inglés, <i>B Cell Receptor</i>)
CAR	Receptor de Antígeno Quimérico (del inglés, <i>Chimeric Antigen Receptor</i>)
CDC	Citotoxicidad Dependiente del Sistema del Complemento (del inglés, <i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>)
CDRs	Regiones Hipervariables o Regiones Determinantes de Complementariedad (del inglés <i>Complementary Determining Regions</i>)
CEA	Antígeno Carcinoembrionario (del inglés, <i>Carcinoembryonic Antigen</i>)
C _H	Dominio Constante de la cadena Pesada de la inmunoglobulina
C _L	Dominio Constante de la cadena Ligera de la inmunoglobulina
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
CTL	Linfocito T Citotóxico (del inglés, <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
dAb	<i>diabody</i>
DC	Célula Dendrítica (del inglés, <i>Dendritic Cell</i>)
EC	Célula Endotelial (del inglés, <i>Endothelial Cell</i>)
ECM	Matriz Extracelular (del inglés, <i>Extracellular Matrix</i>)
EGFP	Proteína Verde Fluorescente (del inglés, <i>Enhanced Green Fluorescein Protein</i>)
EPC	Célula Progenitora Endotelial (del inglés, <i>Endothelial Stem Cell</i>)
Fab	Fragmento de unión al antígeno (del inglés, <i>Antigenbinding Fragment</i>)
Fc	Fragmento cristalizabile (del inglés, <i>crystallizable Fragment</i>)
FR	Regiones Marco o de Entramado (del inglés, <i>Framework Regions</i>)
HSC	Célula Progenitora Hematopoyética (del inglés, <i>Hematopoietic Stem Cell</i>)
HUVEC	Célula Endotelial de la Vena del Cordón Umbilical (del inglés, <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina

i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratumoral
i.v.	Intravenosa
IRES	Secuencia de Entrada al Ribosoma (del inglés, <i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
Luc	Luciferasa
LV	Vector Lentiviral (del inglés, <i>Lentiviral Vector</i>)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MSC	Célula Progenitora Mesenquimal (del inglés, <i>Mesenchymal Stem Cell</i>)
NSC	Célula Progenitora Neural (del inglés <i>Neural Stem Cell</i>)
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica (del inglés, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
s.c.	Subcutáneo/a
scFv	Fragmento variable de anticuerpo de cadena única (del inglés, <i>single chain Fv</i>)
TCR	Receptor de Células T (del inglés, <i>T Cell Receptor</i>)
TILS	Linfocitos Infiltrantes de Tumor (del inglés, <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>)
TG	Terapia Génica
Tregs	Células T reguladoras
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
V _H	Región Variable de la Cadena Pesada de la Inmunoglobulina
V _L	Región Variable de la Cadena Ligera de la Inmunoglobulina

INTRODUCCIÓN

1. INMUNIDAD Y CÁNCER

Desde el inicio de la inmunología como disciplina científica ha existido un gran interés por la relación entre el sistema inmune y las células tumorales. En 1909 Paul Ehrlich postuló que las células tumorales se originaban con frecuencia y que normalmente eran eliminadas por el sistema inmune del huésped. Medio siglo después, Lewis Thomas y Frank Macfarlane Burnet acuñaron el término *vigilancia inmunológica* [1], para describir la capacidad del sistema inmune para reconocer y destruir células tumorales en estados incipientes, así como de eliminar tumores establecidos. Según esta hipótesis la progresión del cáncer sería un suceso infrecuente en el que el tumor escapa al control ejercido por el sistema inmune.

Sin embargo, la hipótesis de la *vigilancia inmunológica* ha sido y es muy cuestionada. Uno de los principales obstáculos para validar esta teoría ha sido la dificultad para identificar antígenos (Ag) tumorales específicos, puesto que la mayoría de los Ag expresados en las células tumorales son moléculas propias, por lo que son ignoradas por el sistema inmune. En los últimos años, gracias al desarrollo de nuevas metodologías se han identificado nuevos Ag tumorales que son reconocidos específicamente por células del sistema inmune. Estos se denominan antígenos asociados a tumor (AAT), y se pueden clasificar en cinco grupos según su estructura molecular y su origen.

Un primer grupo está formado por AAT que son producto de mutaciones que afectan a protooncogenes celulares o a genes supresores de tumor para formar oncogenes, también pueden ser producidos por la mutación de otros genes celulares no relacionados con la tumorigénesis. Un segundo grupo está constituido por proteínas normales sobreexpresadas en las células tumorales debido a la activación aberrante de sus promotores. Un grupo importante lo constituyen los Ag oncofetales que se expresan en los tejidos en desarrollo, pero no en las células de individuos adultos. El Ag carcinoembrionario (CEA, del inglés *Carcinoembryonic Antigen*) y la α -fetoproteína son los dos Ag oncofetales mejor caracterizados. Las proteínas de algunos virus oncogénicos (virus del papiloma humano, virus de Epstein-Barr) constituyen otro grupo de interés y actúan como AAT que provocan una respuesta inmune adaptativa capaz de prevenir el crecimiento tumoral. Un último grupo lo constituyen los Ag de diferenciación específicos de tejidos, como son los idiotipos de las inmunoglobulinas (Ig) de superficie de las neoplasias de linfocitos B (BCR, del inglés *B Cell Receptor*), o del receptor de linfocitos T (TCR, del inglés *T Cell Receptor*) en los linfomas, frente a los que es posible desarrollar estrategias de inmunoterapia antitumoral.

El reconocimiento de los AAT por el sistema inmune puede tener un papel importante en el control del crecimiento tumoral aunque, en determinadas situaciones, la activación del sistema inmune supone una respuesta efectiva, ni suficiente, para la eliminación de los tumores. Esto, en parte es debido a que las células tumorales disponen de mecanismos de evasión a la respuesta inmune. Pueden modular la expresión de algunos Ag de superficie o de los mecanismos

implicados en la presentación antigénica, como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) [2]. Además, los tumores disponen de mecanismos capaces de inhibir la activación linfocitaria e inducir una inmunosupresión generalizada no Ag específica.

La teoría de la *inmunoección del cáncer* [3, 4] propone la interacción del tumor y del sistema inmune como un proceso de 3 fases: *eliminación*, basada en el reconocimiento y destrucción de las células tumorales por el sistema inmune; *equilibrio*, proceso de selección de variantes tumorales con capacidad para sobrevivir al control inmunológico, y *escape*, caracterizada por el desarrollo de mecanismos de resistencia que permitan a las células tumorales evadir la respuesta inmune. Las nuevas estrategias de inmunoterapia del cáncer tienen como objetivos principales promover y potenciar la activación de los distintos componentes del sistema inmune frente a las células tumorales.

2. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER

La inmunoterapia del cáncer se basa en la manipulación o en la utilización de componentes del sistema inmune [5, 6] para potenciar su respuesta con el fin de vencer los mecanismos de escape a la vigilancia inmunológica y establecer una respuesta antitumoral efectiva (Figura 1). Con este objetivo, se han utilizado diferentes estrategias:

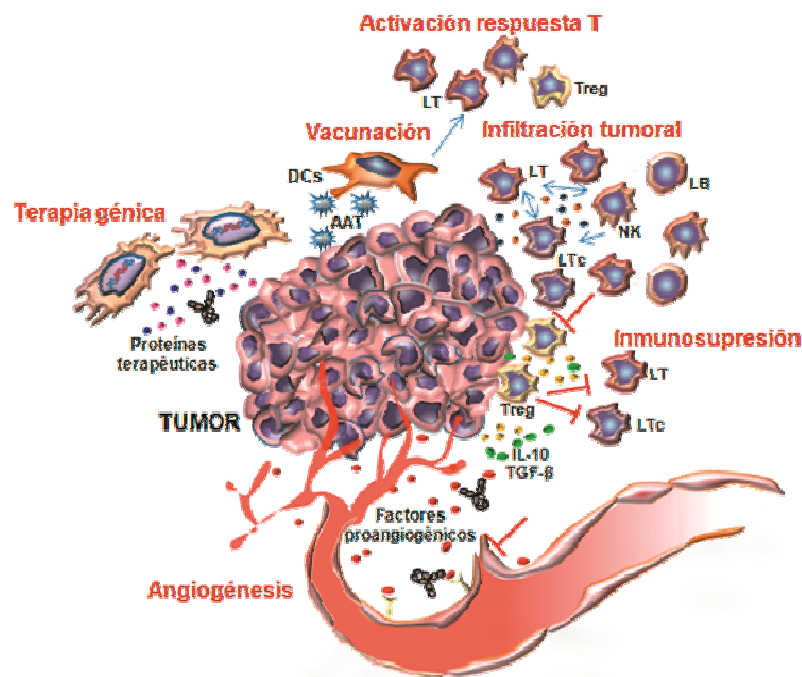


Figura 1. Aproximaciones terapéuticas para promover la respuesta inmune antitumoral. Estrategias de terapia génica para la liberación de proteínas terapéuticas (citoquinas inflamatorias, anticuerpos) dirigidas a la activación de la respuesta inmune. Estrategias de vacunación para modificar DC y promover la presentación antigénica, potenciar la activación específica de la respuesta mediada por los linfocitos T y dirigir la lisis tumoral mediada por la infiltración de células con actividad citotóxica (linfocitos T citotóxicos y células NK). Estrategias para inhibir la actividad inmunosupresora de células presentes en el microambiente tumoral (Treg) e inhibir los procesos angiogénicos derivados del crecimiento tumoral.

2.1. Inmunoterapia no específica

2.1.1. Inmunoestimuladores sintéticos o derivados de patógenos

Esta estrategia está basada en la administración de agentes con capacidad para generar una respuesta inmune inespecífica de carácter inflamatorio frente a las células tumorales. Entre estos agentes destaca los de origen bacteriano, como el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) [7] o el *Corynebacterium parvum* [8]. Otro grupo de compuestos incluye agentes como levamisol, bropirimina y cimetidina. En el año 1990, el levamisol y el BCG recibieron la aprobación de la agencia reguladora norteamericana FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) para el tratamiento adyuvante del cáncer colorectal [9] y del cáncer de vejiga [10-12], respectivamente.

El mecanismo de acción del BCG se basa en la inducción de una respuesta inflamatoria mediada por la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, INF- γ y GM-CSF) y el reclutamiento de macrófagos y células polimorfonucleares [13, 14].

Sin embargo, la estimulación inespecífica del sistema inmune ha demostrado ser completamente eficaz como tratamiento del cáncer y la combinación de estos agentes con terapias tradicionales (quimioterapia, radioterapia, etc) supone una alternativa interesante.

2.1.2. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas solubles producidas por las células mononucleares del sistema inmune (linfocitos o monocitos) con actividad reguladora de la respuesta inmune. La administración sistémica de citoquinas para el tratamiento del cáncer se ha empleado en la práctica clínica. Así, la interleucina 2 (IL-2) se ha utilizado en el tratamiento del melanoma metastásico y del carcinoma renal [15-17] para estimular la proliferación de linfocitos T citotóxicos (CTLs, del inglés *Cytotoxic T Lymphocytes*) capaces de lisar las células tumorales.

Los interferones (IFN) se han utilizado para tratar varios trastornos inflamatorios crónicos y algunos tipos de tumores [18]. El potencial terapéutico de la familia del IFN tipo I se debe a su efecto antiproliferativo y apoptótico, y a su capacidad para modular una respuesta inmune mediada específicamente a través de la activación de macrófagos, células dendríticas (DCs, del inglés *Dendritic Cells*) y células NK (del inglés, *Natural Killer*) [18, 19].

2.2. Inmunoterapia antígeno específica

2.2.1. Inmunoterapia activa

La identificación de los Ag tumorales descritos anteriormente ha permitido el desarrollo de protocolos específicos de vacunación. La primera generación de vacunas antitumorales consistía en la administración de células tumorales autólogas (irradiadas o lisadas) junto con adyuvantes, para favorecer la liberación y la presentación de los Ag tumorales por parte de las células presentadoras de Ag (CPA) del huésped e inducir una respuesta linfocitaria policlonal eficiente [20]. Sin embargo, este tipo de vacunas personalizadas son difíciles de

obtener y los resultados obtenidos en la mayoría de los ensayos clínicos no demostraron una respuesta antitumoral efectiva [21].

Posteriormente, se utilizaron vacunas compuestas por células tumorales autólogas o alogénicas, modificadas genéticamente para la expresión de citoquinas inmunoestimuladoras (IL-2, INF- γ , GM-CSF) [22, 23] o moléculas coestimuladoras de superficie (CD80, B7.1), que proporcionan señales de activación a las células efectoras a través del reclutamiento y presentación antigénica mediada por las CPA.

La vacunación con péptidos representa la forma más simple de inmunoterapia activa [24, 25]. Los péptidos derivados de los Ag tumorales pueden sintetizarse fácilmente y pueden administrarse junto a sustancias adyuvantes. Sin embargo, este tipo de vacunación sólo es eficaz en aquellos pacientes que expresen la molécula de MHC capaz de presentar el péptido de manera específica [26].

Las vacunas de ADN desnudo consisten en vectores plasmídicos en los que se ha clonado el gen de un Ag tumoral de interés. El Ag producido por la célula modificada genéticamente (ej. miocitos o fibroblastos, dependiendo de la vía de administración) es captado por las CPA, procesado, y presentado a las células del sistema inmune en los ganglios linfáticos locoregionales [27-29]. Como alternativa al ADN plasmídico, las secuencias codificantes de los Ags tumorales pueden insertarse en vectores virales no replicativos (adenovirus, retrovirus oncolíticos) [30, 31]. La infección viral y el daño tisular resultante pueden atraer a las CPA y generar una respuesta inmuneeficiente. El potencial inmunogénico de los vectores virales puede incrementarse mediante la coexpresión de moléculas coestimuladoras o citoquinas. Algunas de estas aproximaciones están en fase de ensayo clínico [32].

En las neoplasias hematológicas de células B, como los linfomas [33] o mielomas [34], las células tumorales expresan una Ig de superficie, cuyo idiotipo constituye en sí mismo un Ag tumoral. Mediante vacunas que incluyan dicho idiotipo, se puede inducir una respuesta inmunecon capacidad para destruir las células B tumorales[35-37].

Las DCs desempeñan un papel clave en las fases iniciales de la respuesta inmune y son células muy atractivas para su aplicación en protocolos de inmunoterapia del cáncer. Se han utilizado diferentes procedimientos para favorecer el procesamiento y la presentación antigénica mediada por las DC [38]. Las DC pueden “pulsarse” directamente con Ags tumorales completos o péptidosderivados de ellos; con Ags tumorales no caracterizadosobtenidos de lisados celulares o de células tumorales apoptóticas [39]; pueden modificarse genéticamente con vectores (virales o plasmídicos) que codifican para un Ag tumoral concretoo con ARNm obtenido de células tumorales [40]. Finalmente, las DC pueden fusionarse a las células tumorales y generar híbridos DC/tumor [41, 42].Recientemente, la FDA ha aprobado el uso de una vacuna de DC autólogas, *Sipuleucel-T*, para el tratamiento del cáncer metastásico de próstata [43]. Aunque no se conoce

exactamente su mecanismo de acción, se ha podido demostrar un incremento de aproximadamente 4 meses en la supervivencia.

Uno de los objetivos a largo plazo de la inmunoterapia activa es el diseño de vacunas profilácticas para el tratamiento de individuos con alto riesgo de desarrollar cáncer.

2.2.2. Inmunoterapia pasiva La inmunoterapia pasiva consiste en la transferencia a pacientes portadores de tumores, de células del sistema inmune o anticuerpos (Ac) con actividad antitumoral.

2.2.2.1. Terapia celular adoptiva

La terapia celular adoptiva (ACT, del inglés *Adoptive Cell Therapy*) consiste en la administración de células inmunes específicas con actividad antitumoral, expandidas y manipuladas previamente *ex vivo* [44-46].

Entre las múltiples formas de inmunoterapia celular [47], la ACT de linfocitos T ha sido la que ha obtenido mejores resultados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Las células efectoras pueden obtenerse a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) o pueden aislarse del propio tumor (TIL, del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocyte*) [48, 49].

Diferentes ensayos clínicos han demostrado que la ACT puede generar una respuesta inmune eficaz que promueve la regresión tumoral e incrementa de manera significativa la supervivencia de los pacientes tratados. En este sentido, la ACT con TIL es uno de los tratamientos más efectivos en pacientes con melanoma metastásico. Algunos trabajos han demostrado una regresión tumoral significativa en el 50% de los pacientes tratados [50]. Sin embargo, existen importantes limitaciones para la universalización de este tipo de terapias, como son la dificultad para la obtención y expansión de un número suficiente de células efectoras específicas [51, 52], y/o la capacidad inmunomoduladora de los tumores [53]. Los protocolos, basados en la eliminación de las células T reguladoras (Treg) inmunosupresoras [54] o de citoquinas presentes en el estroma peritumoral (IL-5, IL-7) [55] pueden potenciar el efecto terapéutico de la ACT.

En los últimos años, se han desarrollado protocolos de modificación genética de linfocitos T con cadenas TCR $\alpha\beta$ con capacidad para reconocer específicamente un Ag tumoral. Este tipo de terapias han demostrado su utilidad en diversos ensayos clínicos [56], aunque presentan una serie de desventajas debidas al reducido número de Ag tumorales conocidos y a la dificultad para obtener células T que expresen TCR con afinidad intermedia/alta. Una alternativa a este tipo de aproximación, es el desarrollo de estrategias de ingeniería genética que permiten la obtención de hibridomas de células T que expresan cadenas TCR α y β exógenas, reordenadas al azar, que permiten la formación de TCR *de novo* capaces de reconocer cualquier Ag humano [57]. Sin embargo, la activación de los linfocitos T implica el reconocimiento antigénico en el contexto de una molécula de MHC específica. De forma, que la aplicación de

este tipo de terapias se ve dificultada por la pérdida de expresión de moléculas MHC en muchas células tumorales [2], la diversidad alélica poblacional, así como, el riesgo de recombinación con cadenas endógenas.

Otra aproximación terapéutica consiste en modificar linfocitos humanos para la expresión de receptores de Ag quiméricos (CARs, del inglés *Chimeric Antigen Receptor*) [58-61]. Los CAR son proteínas de fusión formadas por una región de unión a Ag, generalmente un fragmento de cadena única o scFv (del inglés, *single chain Fv*) y por la porción citoplasmática de una cadena del complejo TCR/CD3 del linfocito T, que aporta la capacidad de señalización necesaria para la activación de las células efectoras. Se ha demostrado que tras la interacción con el Ag, los CAR transducen señales de activación similares a las observadas tras la interacción mediada por el complejo TCR/CD3 [62]. Esta interacción Ag específica es independiente del MHC y puede mediar la lisis de las células diana que expresan el Ag reconocido por el CAR [63]. El hecho de que la activación sea independiente del MHC aporta una ventaja fundamental frente al uso de los TCR, ya que los linfocitos T modificados pueden ejercer sus funciones efectoras incluso en ausencia de moléculas de MHC de clase I en la célula tumoral. Con el objetivo de incrementar la eficacia de los CAR, se han incorporado dominios de señalización de moléculas co-estimuladoras como el CD28 (B7-1), CD134 (OX40) y CD137 (4-1BB). Las señales coestimuladoras favorecen la supervivencia y proliferación de los linfocitos T activados a través del CAR. Diferentes formatos de CAR [64-67] se han utilizado con éxito en el tratamiento de procesos hematológicos malignos [68-71], tumores sólidos [72-74] e incluso en terapias antiangiogénicas [75].

2.2.2.2. Anticuerpos Monoclonales

Los Acs o Igs son las moléculas efectoras de la rama humoral del sistema inmune adaptativo. Los Acs constituyen la parte específica del denominado complejo receptor de células B (BCR) que reconoce al Ag a nivel de la membrana del linfocito B, y son a la vez secretados por las células plasmáticas procedentes de la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B [76].

Los Ac poseen una estructura básica simétrica, con un peso molecular aproximado de 150 kDa (Figura 2a). Cada molécula está formada por dos cadenas polipeptídicas pesadas (H, del inglés *Heavy*) idénticas, de peso molecular entre 55 y 70 kDa, unidas por puentes disulfuro, y dos cadenas ligeras (L, del inglés *Light*), de 25 kDa, igualmente idénticas entre sí, que se unen individualmente a cada una de las cadenas H mediante interacciones covalentes y no covalentes. Tanto las cadenas H como las cadenas L están formadas por dominios estructurales de aproximadamente 110 aminoácidos, conocidos como plegamientos o dominios de Ig. Cada dominio contiene toda la información estructural y funcional necesaria para realizar una función específica. Existen 2 tipos de cadenas L: kappa (κ) y lambda (λ); y

cinco tipos de cadenas H: mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) y epsilon (ϵ). Su combinación da lugar a las cinco clases de Ig existentes: IgM, IgD, IgG, IgA y IgE, respectivamente. Las cadenas H y L se componen de regiones aminoterminales variables (V) y de regiones carboxiterminales constantes (C). Cada cadena H está formada por un dominio variable (V_H) y tres o cuatro dominios constantes ($C_{H1}-C_{H4}$) y cada cadena L está formada por dos dominios, uno variable (V_L) y otro constante (C_L).

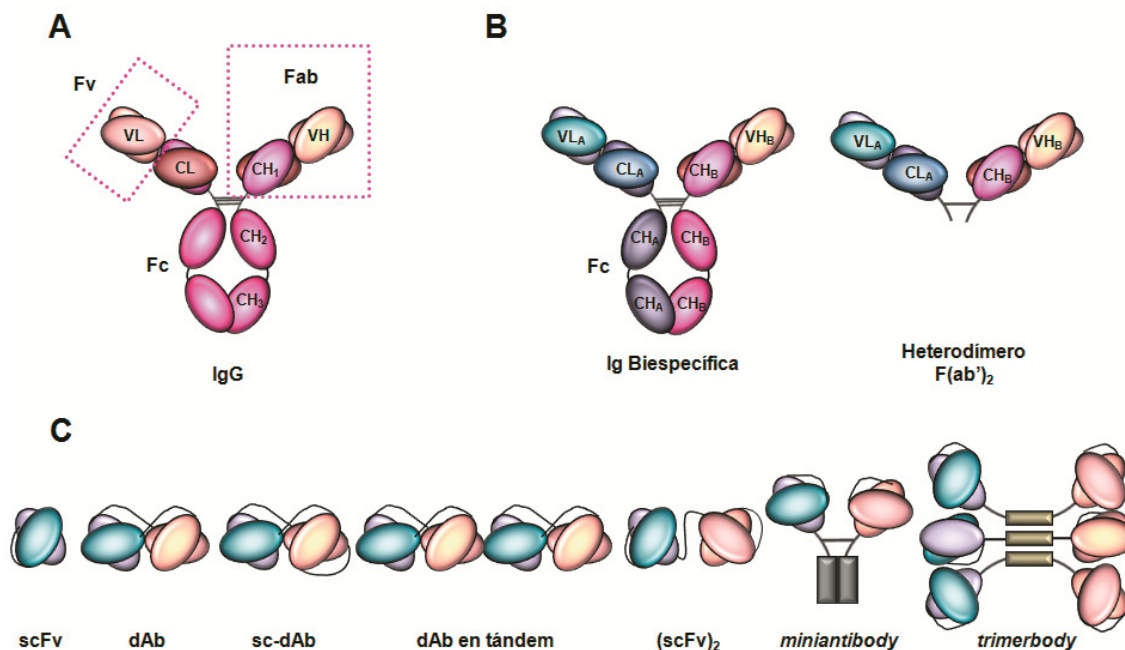


Figura 2. Representación esquemática (A) de una molécula de IgG1 humana. Se indican las regiones variables (V) y constantes (C) de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L). Se indican las regiones Fv, Fab y Fc. (B) Representación esquemática de los AcBis de primera generación. (C) Representación esquemática de los AcBis recombinantes derivados de fragmentos Fv.

La molécula de Ac está constituida por un fragmento Fab (del inglés, *Antigenbinding Fragment*) formado por la unión de una cadena L con los dominios V_H y C_{H1} de la cadena H, y un fragmento Fc (del inglés, *crystallizable Fragment*) formado por la asociación de los dominios C de ambas cadenas H. Las dos cadenas H están unidas entre sí mediante puentes disulfuro a nivel de la región bisagra, que confiere flexibilidad a la molécula de Ac y permite la unión a diferentes estructuras antigénicas (Figura 2a).

En la molécula de Ig, el sitio de unión al Ag está formado por la asociación de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera (V_H y V_L) que conforman el fragmento Fv (Figura 2a). La zona de unión al Ag está formada por tres segmentos peptídicos no colineales pertenecientes al dominio V_H y tres al dominio V_L , que se yuxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátipo) donde se aloja la región del Ag reconocida por el Ac (epítipo). El parátipo conforma una imagen especular del epítipo, y los seis segmentos que lo forman reciben por ello el nombre de regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR, del inglés *Complementary Determining Regions*). Las regiones

situadas entre las regiones hipervariables, que comprenden el resto del dominio V, presentan menor variabilidad y reciben el nombre de regiones marco o de entramado (FR, del inglés *Framework Regions*). Estas regiones FR proporcionan soporte estructural al parátipo. Los dominios presentan gran variabilidad de secuencias entre las diferentes moléculas de Ac y determinan su especificidad antigénica

Los dominios carboxiterminales de ambas cadenas H constituyen la región Fc responsable de las funciones efectoras de la molécula de Ac, que convierten la unión inicial parátipo-epítipo en una reacción biológica en la que participan otras células y moléculas solubles. Los mecanismos de acción incluyen la capacidad de desencadenar citotoxicidad dependiente de la activación del sistema del complemento (CDC, del inglés *Complement-Dependent Cytotoxicity*) y la activación de la citotoxicidad celular mediada por Ac (ADCC, del inglés *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*), a través de la unión de la región Fc del Ac a receptores específicos expresados en la membrana de diferentes células del sistema inmune (monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos y células NK) [77-79].

Hasta el desarrollo de los Ac monoclonales (AcMo), el uso de los Ac con fines diagnósticos y/o terapéuticos se basaba únicamente en la utilización de antiseros obtenidos a partir de diferentes especies animales tras la inmunización repetida con el Ag de interés. Los antiseros contienen una mezcla de Ac procedentes de la activación de distintos clones de linfocitos B por lo que se denominan Ac policlonales con capacidad para reconocer el Ag inmunizante (inmunógeno) pero con distinta especificidad y afinidad.

El desarrollo de la tecnología del hibridoma para la producción de AcMo en el año 1975 por George Köhler y César Milstein [80] supuso una verdadera revolución en todos los campos de la biomedicina. El hibridoma es el resultado de la fusión de un linfocito B, procedente del bazo de un ratón inmunizado, con una célula de mieloma, que aporta al hibridoma la capacidad de dividirse indefinidamente. Los AcMo derivan de un único clon de células B son por tanto homogéneos, específicos de epítopos únicos y se pueden producir en grandes cantidades, lo que les convierte en reactivos perfectamente estandarizados.

La obtención de AcMo murinos es un procedimiento estándar que ha experimentado pocos cambios desde su descripción original [80] y son numerosos los AcMo que se han generado a partir de cepas de ratones normales dirigidos frente a diferentes Ag diana. Sin embargo, su uso clínico presenta importantes limitaciones que derivan de su origen no humano: corta vida media sérica, ineficiente reclutamiento de funciones efectoras y problemas inmunológicos. Una proporción importante de los pacientes tratados con AcMo murinos pueden desarrollar una respuesta inmunodirigida frente a las IgG murinas (HAMA, del inglés *Human Anti-Mouse Antibodies*) que puede llegar a ser potencialmente grave [77].

Con el fin de solucionar las limitaciones que presentan los AcMos murinos y con el objetivo de generar AcMo humanos, se desarrollaron nuevas técnicas moleculares que dieron lugar a los AcMo de segunda generación o Ac recombinantes: Acquiméricos (AcQ), Achumanizados (AcHz) y fragmentos de Ac. El desarrollo de estas tecnologías fue posible gracias al conocimiento de la estructura molecular y de la organización genética de las Ig; a los avances en los procedimientos de clonación y transferencia génica; y a la disponibilidad de vectores de expresión para células procariontas y eucariotas.

El aislamiento y clonación de los genes V representa el primer objetivo en cualquier proyecto de ingeniería de Ac. Las razones para el aislamiento pueden ser: (1) *terapéuticas*, para la obtención de AcQ o AcHz con actividad biológica en modelos preclínicos, (2) *estratégicas*, dado que para algunas aplicaciones es necesario modificar la estructura (formato) del Ac y generar fragmentos recombinantes, o (3) *prácticas*, debido a la inestabilidad y reducida capacidad de secreción de algunos hibridomas. La estrategia de aislamiento más utilizada se basa en la amplificación de las regiones V mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos cebadores que hibridan en los extremos relativamente conservados de las regiones V. Una vez aislados, los genes se clonan en vectores de expresión, se combinan de forma adecuada y se añaden secuencias señal, secuencias espaciadoras flexibles (*linkers*), dominios de oligomerización y/o etiquetas (*tags*) para su posterior detección y purificación. Estos vectores de expresión se introducen en bacterias o células eucariotas para la producción del Ac y su posterior purificación.

En la década de los 80 se publicaron varios trabajos que demostraron la producción en *E. coli* de un fragmento recombinante Fv, formado por un dominio V_H y un dominio V_L unidos por un *linker* de 15-20 aminoácidos formado por una repetición de residuos de glicina y serina (Gly₄Ser)₃ que proporcionan flexibilidad y solubilidad. Este *linker* permite el apareamiento intramolecular de ambos dominios para formar un sitio funcional de unión al Ag [81, 82]. Estas construcciones se conocen como fragmentos variables de cadena única o scFv y pueden expresarse en bacterias, levaduras, células de insecto y células de mamífero [83]. El formato scFv es uno de los más utilizados para generar Ac recombinantes y proteínas de fusión, así como para la construcción de repertorios de Ac.

La ingeniería de anticuerpos ha permitido el diseño de nuevos formatos y la posibilidad de obtener AcMo dirigidos frente a diferentes Ag tumorales para extender su aplicación en investigación, diagnóstico y terapia clínica [84]. En la actualidad existen más de 30 AcMo aprobados para su uso en clínica humana, otros cientos se encuentran en fase de ensayo clínico y aproximadamente, unos 25 se encontraban en ensayos clínicos fase III a finales del año 2011. (<http://www.fda.gov>; <http://www.ema.europa.eu>) (Tabla I).

Tabla I: Anticuerpos monoclonales aprobados para uso terapéutico

Nombre	Tipo	Antígeno	Indicaciones	Aprobado
Muromonab* /OrthocloneOKT3®	Mu* IgG2a	CD3	Tratamiento rechazo agudo trasplantes	1986(FDA)** 1986 (EMA)
Abciximab / ReoPro®	Qui IgG1Fab	GPIIb/IIIa (CD41/CD6)	Anti-trombótico en cirugía coronaria y angioplastias	1994 (FDA)
Capromab Pendetide / ProstaScint®	Mu IgG ₁ (conjugado ¹¹¹ I)	PSA	Diagnóstico cáncer de próstata	1996 (FDA)
Nofetumomab merpentan/Verluma	Mu IgG2b Fab	GP	Detección de tumores	1996 (FDA)
Rituximab / Rituxan®, Mabthera®	Qui IgG1	CD20	Linfoma no Hodgkin	1997 (FDA); 1998 (EMA)
Daclizumab / Zenapax®	Hu IgG1	IL2R(CD25)	Prevención rechazo agudo en transplante renal	1997 (FDA) 1999 (EMA)
Basiliximab / Simulect®	Qui IgG1	IL2R(CD25)	Prevención rechazo agudo; angina refractaria inestable.	1998 (FDA) 1998 (EMA)
Trastuzumab / Herceptin®	Hu IgG1	HER ₂ /neu	Cáncer de mama metastásico	1998 (FDA) 2000 (EMA)
Palivizumab / Synagis®	Hu IgG1	VSR (proteína F)	Profilaxis de la enfermedad causada por el VRS en niños	1998 (FDA)1999 (EMA)
Infliximab/ Remicade®	Qui IgG1	TNF α	Enfermedad de Crohn; artritis reumatoide	1998 (FDA) 1999 (EMA)
Alemtuzumab/Campath®	Hu IgG1	CD52	Leucemia linfoide crónica B	2001 (FDA) 2001 (EMA)
Ibritumomab tiuxetan / Zevalin®	Mu IgG1 (conjugado ⁹⁰ Y)	CD20	Linfoma no Hodgkin	2002 (FDA) 2004 (EMA)
Adali.mumab / Humira®	Hu IgG1	TNF- α	Enfermedad de Crohn; artritis reumatoide, psoriasis	2002 (FDA)2003 (EMA)
Tositumomab / Bexxar®	Mu IgG2a (conjugado ¹³¹ I)	CD20	Linfoma no Hodgkin	2003 (FDA)
Omalizumab / Xolair®	Hu IgG1	IgE	Asma de origen alérgico	2003 (FDA)2005 (EMA)
Cetuximab / Erbitux®	Qui IgG1	VEGFR	Cáncer colorrectal	2004 (FDA)2004 (EMA)
Bevacizumab / Avastin®	Hu IgG1	VEGF	Cáncer colorrectal	2004 (FDA)2005 (EMA)
Natalizumab / Tysabri®	Hu IgG4	Integrina α 4 (CD49d)	Esclerosis múltiple Enfermedad de Crohn	2004 (FDA)2006 (EMA)
Ranibizumab / Lucentis®	Hu IgG1 Fab	VEGF	Degeneración macular húmeda	2006 (FDA)2007 (EMA)
Panitumumab / Vectibix®	IgG2 humano	EGFR	Cáncer colorrectal	2006 (FDA)2007 (EMA)
Eculizumab / Soliris®	Hu IgG2/4	C5	Hemoglobinuria paroxística nocturna	2007 (FDA)2007 (EMA)
Certolizumab pegol / Cimzia®	Hu Fab (PEGilado)	TNF α	Enfermedad de Crohn	2008 (FDA)
Golimumab / Simponi®	Hu IgG1	TNF α	Artritis reumatoide y psoriásica, espondilitis anquilosante	2009 (FDA)2009 (EMA)
Canakinumab / Ilaris®	Humano IgG1	IL-1b	Síndrome de Muckle-Wells	2009 (FDA)2009 (EMA)
Ustekinumab / Stelara®	Humano IgG1	IL-12/23	Psoriasis	2009 (FDA)2008 (EMA)
Ofatumumab/Arzerra Humax-CD20®	Humano IgG1	CD20	Leucemia linfática crónica	2009 (FDA)2010 (EMA)
Besilesomab / Scintimun®	Mu IgG1 (conjugado ^{99m} Tc)	CEA	Metástasis inflamación	2009 (EMA)
Catumaxomab / Removab®	Mu-rata Bis	EpCAM/CD3	Ascitis maligna	2009 (EMA)
Tocilizumab / Actemra®	Hu IgG1	IL-6R	Artritis reumatoide	2010 (FDA) 2009 (EMA)
Denosumab / Prolia®	Humano IgG2	RANKL	Prevención de fracturas en mujeres con osteoporosis	2010 (FDA)2010 (EMA)
Belimumab / Benlysta®	Humano IgG1	BAFF	Lupus Eritematoso Sistémico	2011 (FDA)2011 (EMA)
Ipilimumab / Yervoy®	Humano IgG1	CTLA-4	Melanoma metastásico	2011 (FDA)2011 (EMA)
Brentuximab vedotin / Adcetris®	Qui IgG1 (conjugadoMMAE)	CD30	Tratamiento de rescate para el linfoma Hodgkin	2011 (FDA)

* Los AcMo murinos se designan en la tabla como "Mu", los quiméricos como "Qui", los humanizados como "Hu" y los biespecíficos como Bis. ** En esta tabla no aparecen aquellos AcMo que han sido suspendidos o retirados para su uso terapéutico.
Fuente: modificado de <http://www.antibodysociety.org>; <http://www.fda.gov>; <http://www.ema.europa.eu>

3. ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS

Los anticuerpos biespecíficos (AcBis) son moléculas de Ig no naturales, con dos sitios de unión al Ag con especificidades diferentes y pueden clasificarse en dos grupos [76, 85]: (1) AcBis diseñados para dirigir toxinas, radionúclidos, enzimas, Ag, citoquinas y drogas citotóxicas hacia las células tumorales, y (2) AcBis que reconocen un Ag tumoralexpresado en la célula tumoral y una molécula estimuladora presente en una célula efectora del sistema inmune. Las moléculas efectoras más utilizadas son las cadenas del complejo TCR/CD3 del linfocito T y los receptores de la región Fc (CD16, CD64, y CD89) para el reclutamiento y activación de otras células del sistema inmune (células NK, macrófagos y neutrófilos) [86-88].

3.1. Generación de anticuerpos biespecíficos

Los AcBis de primera generación eran moléculas de Ig completas o fragmentos (Fab')₂ obtenidos por un método de conjugación química a partir de dos AcMo distintos [89] o mediante la técnica de los hibridomas híbridos [90] (Figura 2b). El potencial terapéutico de estos AcBis se confirmó en diferentes modelos, tanto *in vitro* como *in vivo* [91, 92]. Sin embargo, las dificultades en su producción y purificación, los problemas derivados de la presencia de secuencias murinas (inmunogenicidad) y de la porción Fc (activación inespecífica), así como su baja capacidad de penetración en los tumores sólidos, fueron y son factores limitantes para su aplicación clínica.

El desarrollo de las técnicas de ingeniería de anticuerpos ha permitido superar las limitaciones que presentaban los AcBis de 1ª generación para generar AcBis recombinantes (AcBisR) o Ac de diseño mediante la fusión directa, a nivel génico, de dos sitios de unión al Ag. Existen diferentes formatos de AcBisR pero, hoy en día, los más utilizados son los derivados de fragmentos Fv [93] (Figura 2c). A través de estrategias de multimerización [84, 94] es posible obtener una amplia variedad de AcBisR, de un tamaño entre los 50-100 kDa, mediante la asociación de dos dominios de unión al Ag a través de *linkers* de longitud variable [85].

Como se ha descrito anteriormente, los dominios V_H y V_L de los fragmentos scFv están unidos físicamente por un *linker* de 15-20 aminoácidos. Cuando se utilizan *linkers* más cortos, 5 o 10 aminoácidos, se impide el apareamiento intramolecular entre los dominios de una misma cadena, por lo que se produce un apareamiento de los dominios V_H y V_L de dos cadenas distintas, creando dos sitios de unión al Ag. A partir de dos AcMo distintos, se pueden unir en la misma cadena polipeptídica el dominio V_H de uno de los anticuerpos y el dominio V_L del otro anticuerpo viceversa. Mediante esta unión se obtienen dos cadenas que al coexpresarse en la misma célula, se ensamblan para formar dímeros con dos sitios de unión al Ag con distinta especificidad. Este formato de AcBis se conoce como *diabody* (dAb) [95] (Figura 2c). Existen variaciones en los formatos de *diabody*: se pueden unir las dos cadenas del *diabody* con un *linker*, dando lugar a un *diabody* de cadena única (*sc-diabody*), si es un linker largo; o a una

molécula tetravalente (*diabody* en tándem o *tandab*), si es un linker corto[96]. Es posible combinar dos scFvs introduciendo un *linker* adicional entre el extremo C-terminal del primer scFv y el extremo N-terminal del segundo scFv, obteniéndose fragmentos (scFv)₂ o AcBis de cadena única. En este contexto, se denomina BiTE (del inglés, *Bispecific T cell Engager*) a un AcBis con formato (scFv)₂ con especificidad frente a un Ag tumoral y frente a la molécula activadora CD3 expresada en las células T [97].

Es importante destacar que, la modificación de la longitud del *linker* no es el único promotor de la multimerización. En 1989 se demostró que los dominios de dimerización ricos en leucina (*zipper* o cremalleras de leucina) presentaban excelentes propiedades para promover la formación de complejos oligoméricos[98]. Peter Pack y Andreas Plückthun [99] describieron el *miniantibody* que se forma al dimerizar dos fragmentos scFv mediante la introducción de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun. (Figura 2c). Este diseño permite recuperar la bivalencia de las Ig, reduciendo su peso molecular.

Recientemente, nuestro grupo ha diseñado, desarrollado y caracterizado una novedosa estrategia de multimerización que se basa en la unión de un Ac recombinante con formato scFv, mediante un *linker* peptídico flexible, a la región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XVIII murino (scFv-NC1). De este modo es posible generar un anticuerpo trimérico o *Trimerbody*, mono o biespecífico, con propiedades funcionales y físicoquímicas superiores a las del scFv monomérico[94, 100-102].

En general los AcBisR derivados de los fragmentos scFv, ofrecen una serie de ventajas respecto a los AcMo nativos y a los AcBis de primer generación: (1) son fáciles de producir en sistemas bacterianos y en células eucariotas; (2) extravasan de forma más eficaz; y (3) tienen una mayor capacidad de penetración tisular. Estas características convierten a los AcBisR en una herramienta altamente eficaz en diferentes estrategias antitumorales. Algunos de estos AcBis están en fase de desarrollo clínico como se muestra en la Tabla II.

3.2. Eficacia terapéutica

Hace más de veinte años que empezaron a utilizarse los AcBis para redirigir la actividad citolítica de las células efectoras del sistema inmune específicamente hacia los AAT[103]. Una amplia variedad de AAT han sido objeto de estudio como los Ag asociados a neoplasias hematológicas (CD19, CD20), y otros asociados a tumores sólidos [CEA; receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR2 o HER2/neu); molécula de adhesión Celular epitelial (EpCAM), etc].

Los AcBis de primer generación han sido evaluados en varios ensayos clínicos. Se ha demostrado que la administración de un AcBis α HER2/neu x α CD64 (MDX-H210) concitoquinas y factores de crecimiento [104], promueve la activación y el reclutamiento de

neutrófilos y monocitos al depósito tumoral, aunque sólo algunos de los pacientes participantes presentaron signos de estabilización de la enfermedad[105].

Otros AcBis en formato nativo son el ertumaxomab (α HER2/neu x α CD3), que ha sido probado en ensayos clínicos fase I para pacientes con cáncer de mama metastásico[106], y el catumaxomab (α EpCAM x α CD3) para el tratamiento de la ascitis maligna en pacientes con cáncer de ovario[107, 108]. Este AcBis fue aprobado en el año 2009 por la Agencia Europea del Medicamento EMA (del inglés, *European Medicines Agency*).

Las principales limitaciones que presentan los AcBis de primera generación se deben a posibles reacciones adversas severas como consecuencia de la liberación de citoquinas y a la inmunogenicidad derivada de su formato.

Los AcBisR en formato *diabody* o *sc-diabody* también han demostrado su eficacia en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, un *diabody* α PSMA x α CD3 es capaz de inducir la actividad citolítica de los linfocitos T humanos en un modelo de cáncer de próstata[109]. La administración simultánea de un *diabody* α CD19 x α CD3 con un AcMo anti-CD28 inhibió el crecimiento tumoral de manera estadísticamente significativa aumentando la supervivencia en modelos experimentales de linfoma de células B [110, 111].

En la actualidad, los estudios con AcBisR han experimentado un gran impulso y especialmente el uso de los denominados BiTE, descritos anteriormente. Los primeros resultados obtenidos en modelos murinos inmunodeficientes e inmunocompetentes[112-114] fueron muy prometedores. Posteriormente, su potencial terapéutico ha sido confirmado por los resultados obtenidos en diferentes ensayos clínicos realizados con MT103 o blinatumomab (α CD19 x α CD3), para el tratamiento del linfoma noHodgkin. Los resultados publicados [115] demostraron la remisión parcial, y en algunos casos la remisión completa en pacientes tratados con bajas dosis (0.005 mg/m²/día) de blinatumomab. Diferentes ensayos clínicos posteriores han confirmado la eficacia y seguridad de este tipo de anticuerpos [114, 116] (Tabla II).

Tabla II. Ensayos clínicos con Anticuerpos Biespecíficos

Nombre	Formato	Especificidad	Fase	Indicaciones	Identificación
CD20Bi	Qui-Mu IgG	CD20 / CD3	I	Mieloma Múltiple	NCT00938626
MT110	BiTE	EpCAM/CD3	I	Cáncer pulmonar y gastrointestinal	NCT00635596
TF2	Tri-Fab	CEA / HSG	I	Cáncer colorrectal	NCT00860860
			I / II	Cáncer de pulmón	NCT01221675
MM-111	(scFv) ₂ -HSA	Her2 / Her3	I	Cáncer colorrectal	NCT01273402
			I	Cáncer de mama	NCT01097460
			I	Tumores HER2 ⁺	NCT00911898; NCT00274742
Blinatumomab (MT103)	BiTE	CD19 / CD3	I	Linfoma noHodgkin	NCT01209286; NCT01466179
			II	Leucemia linfoblástica	
Ertumaxomab	Mu-rata IgG	HER2 / CD3	II	Cáncer de mama	EudraCT:200600501736
Catumaxomab	Mu-rata IgG	EpCAM / CD3	I	Cáncer epitelial	NCT01320020
			II	Adenoca. gástrico	EudraCT:200600272716
			II	Carcino. peritoneal	EudraCT201002281026
			II	Cáncer de ovario	NCT01246440;
			III	Ascitis maligna	NCT00563836

Fuente: Modificado de Müller D. and Kontermann R.E. (Biodrugs 2010; 24: 89-98); <http://clinicaltrials.gov>; <https://www.clinicaltrialsregister.eu>

4. PRODUCCIÓN *in situ* DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Durante décadas, las proteínas recombinantes (citoquinas, anticuerpos, factores de coagulación) se han administrado por vía sistémica en distintos modelos experimentales y en la práctica clínica. Actualmente, el tratamiento con AcMo aprobados para uso clínico se realiza mediante administración sistémica de la proteína purificada (Figura 3a). Dado que su vida media es limitada y presentan una escasa capacidad de penetración tisular, la administración debe ser repetida y prolongada en el tiempo, a fin de conseguir unos niveles terapéuticos lo más estables posibles. Los diferentes formatos de Ac recombinantes pretenden solventar estas limitaciones, aunque existen problemas asociados a diferentes patrones de glicosilación, que pueden afectar a la eficacia y estabilidad de los AcMo, y que están directamente relacionados con los sistemas de expresión y producción de las proteínas terapéuticas. Además, este tipo de terapias tienen un coste económico muy elevado [117, 118].

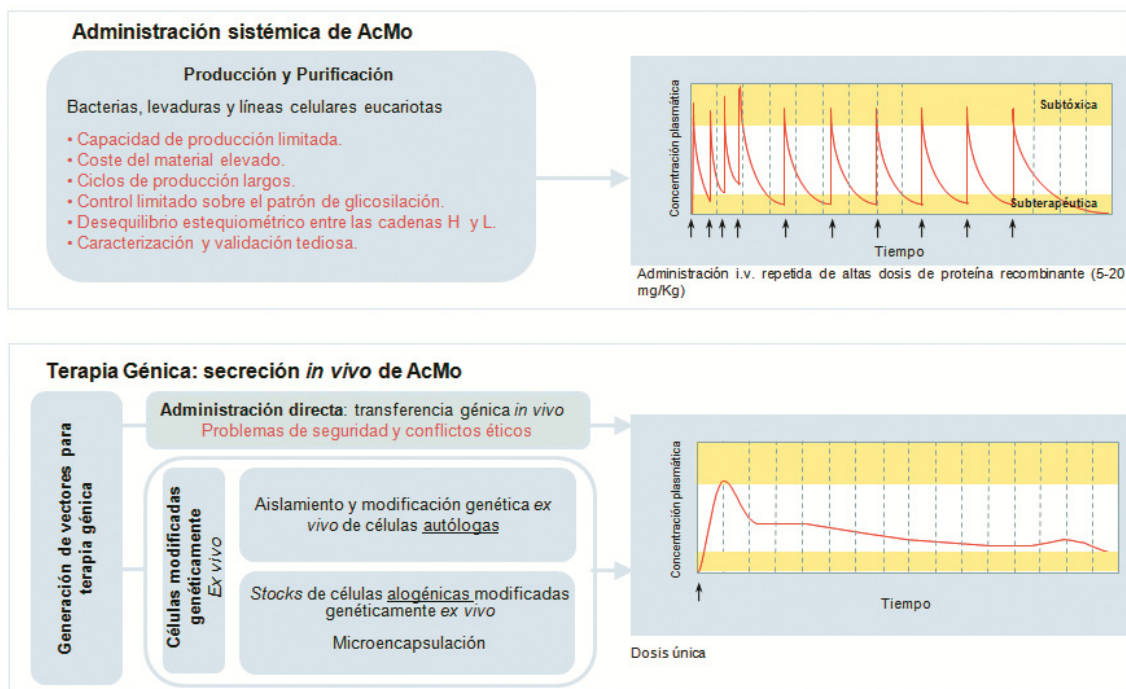


Figura 3. (A) Diagrama esquemático de algunas limitaciones asociadas a la producción y la administración de los AcMo de uso clínico y una simulación del perfil farmacocinético de los niveles de AcMo en suero después de varias dosis. (B) Diagrama esquemático de diferentes estrategias de terapia génica para la secreción de AcMo *in vivo* y una simulación del perfil farmacocinético de los niveles de AcMo en suero después de una sola inyección de células humanas modificadas genéticamente *ex vivo*.

Fuente: modificado de Sánchez-Martín, *et al.* 2011; COBIOT 22:1–7.

Como alternativa se han propuesto estrategias de terapia génica *in vivo* para la producción y posterior liberación de proteínas terapéuticas basadas en: (1) la administración directa de los genes de interés mediante vectores no virales o vectores virales, (2) administración de células modificadas genéticamente *ex vivo* (autólogas o alogénicas) (Figura 3b).

En la última década, diferentes trabajos han demostrado la capacidad de las células humanas modificadas genéticamente para secretar fragmentos de Ac en cantidades apreciables y en forma funcionalmente activa [88]. Además, las células eucariotas han adquirido especial relevancia como vehículos terapéuticos [117, 119] ya que éstas, pueden compensar algunas limitaciones asociadas a la administración sistémica de proteínas, como la toxicidad, la corta vida media sérica y la escasa especificidad tisular.

4.1. Terapia génica

El concepto de terapia génica (TG) implica la transferencia de material genético a células, tejidos u órganos, para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función (Figura 4). Hasta la fecha se han aprobado alrededor de 1.843 ensayos clínicos, la mayoría de ellos (89,7%) dirigidos al tratamiento del cáncer (64,6%), enfermedades vasculares (8,4%), enfermedades infecciosas (8%) y enfermedades hereditarias (8.7%) (www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

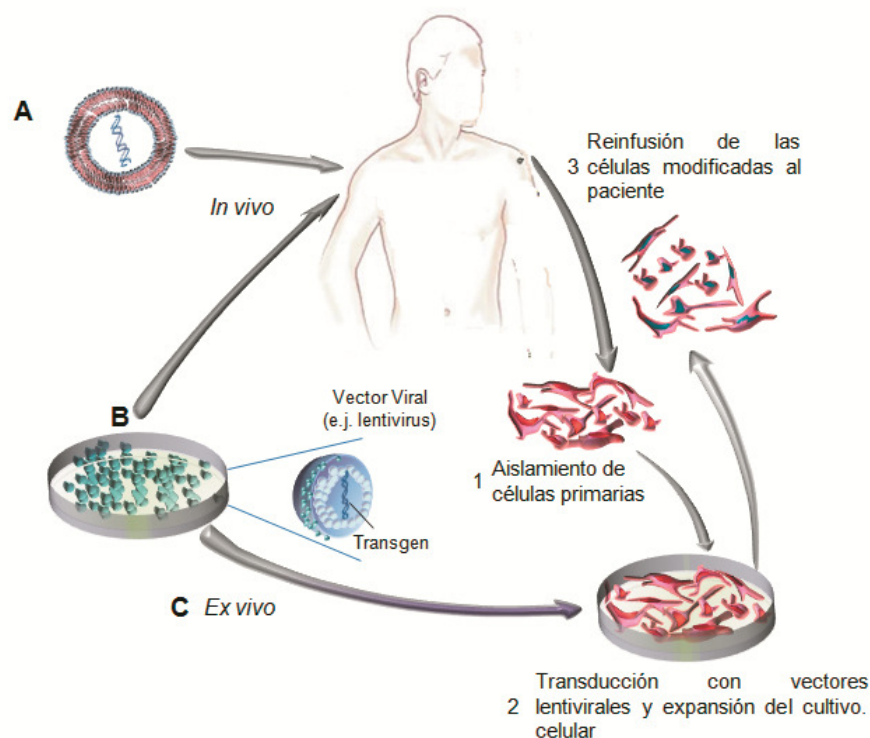


Figura 4. Terapia génica. Representación esquemática de diferentes vías de transferencia génica (A) Inyección de fragmentos de ADN asociados a liposomas, (B) Inyección de vectores virales. (C) Transferencia génica *ex vivo* utilizando células humanas como vehículos celulares.

Fuente: Imagen modificada

de http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=2010_Lecture_22

Uno de los objetivos principales de este tipo de terapias es el desarrollo de una tecnología de transferencia genética eficiente y precisa, para la expresión persistente y regulada

del gen de interés. Las principales limitaciones que se plantean para la aplicación de este tipo de terapias son la elección de la vía de administración y el diseño de vectores seguros y eficaces para garantizar la expresión del transgen a largo plazo. Los vectores que se han utilizado para terapia génica se agrupan en dos categorías: vectores virales y no virales.

Los vectores no virales suelen implicar vectores plasmídicos que se introducen en las células mediante métodos químicos (p.ej. fosfato cálcico, liposomas) o físicos (p.ej. electroporación, microinyección) para introducir el ADN en las células. Este tipo de vectores pueden producirse en grandes cantidades, presentan mínima toxicidad y carecen de antigenicidad, por lo que pueden ser administrados repetidamente. Sin embargo, la transferencia genética suele ser ineficiente y la expresión del gen es transitoria.

Los vectores virales derivan de virus modificados que mantienen la capacidad para insertar el gen terapéutico en el material genético de la célula a la que infectan, para garantizar la expresión permanente del transgén. Los vectores virales utilizados con mayor frecuencia en protocolos de TG son los siguientes: retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus herpes simple.

Las características más relevantes de los diferentes vectores utilizados en TG aparecen descritas en la Tabla III.

Tabla III. Ventajas y desventajas de los vectores virales.

Tipo de Vector	Ventajas	Desventajas
Retrovirus	Integración estable No inmunogénicos Transducción eficiente	Posible mutación insercional Dependientes de división celular
Adenovirus	Vectores episomales Capacidad para genes largos Independientes de división celular	Altamente inmunogénicos Expresión génica transitoria
Virus Adenoasociados	Integración específica No inmunogénicos, no patogénicos Independientes de división	Limitaciones en tamaño del transgen Difíciles de producir
Herpes Simple	Células en reposo Gran capacidad para genes largos Eficientes para el SNC	Patogénicos Expresión génica transitoria

Fuente: Modificado de Verma I.M. and Weitzman M.D. (Annu. Rev. Biochem. 2005. 74:711–38)

Los vectores lentivirales (LV, del inglés *Lentiviral Vector*), derivan del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) [120, 121] y son una alternativa al uso de vectores

retrovirales convencionales [122, 123]. Los LV permiten la expresión génica a largo plazo, son capaces de integrarse al azar a lo largo de todo el genoma [124] disminuyendo el riesgo de mutagénesis insercional, y son capaces de transducir células progenitoras del sistema hematopoyético y células en reposo. En las últimas décadas, se han desarrollado varias generaciones de LV con el fin de obtener vectores más seguros, no replicativos, pero igualmente eficaces, como son los LV que presentan deleciones en las secuencias LTR (del inglés, *Long Terminal Repeat*), que se conocen como vectores-SIN (del inglés, *Self-Inactivating vectors*). En la actualidad, están en marcha alrededor de 55 ensayos clínicos con LV.

4.1.1. Terapia génica *in vivo*: administración directa

La secreción *in vivo* de AcMo se ha descrito usando tanto vectores virales como no virales. Los vectores no virales han demostrado su eficacia en la producción *in vivo* de Ac recombinantes. En un modelo murino, la inyección intratumoral (i.t) de un plásmido que codifica para un scFv dirigido frente a un componente (laminina) clave de la matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular Matrix*), con actividad antiangiogénica, produjo la inhibición del crecimiento de tumores sólidos [125]. Sin embargo, los problemas derivados del uso de estos vectores se deben principalmente a la baja eficiencia de la transducción del gen de interés y como consecuencia, los niveles de expresión de la proteína terapéutica son muy bajos y se mantienen durante periodos muy cortos de tiempo.

Los vectores virales pueden usarse en protocolos de TG como vehículos para la liberación sostenida de proteínas recombinantes terapéuticas. Aunque no están exentos de riesgos, la optimización de las diferentes construcciones virales ha permitido demostrar la eficacia de este sistema para la producción de AcMo *in vivo* en diferentes modelos tumorales. El grupo de Noel *et al.*, demostró que con la administración de vectores adenovirales (AV, del inglés *Adenoviral Vector*), que codifican para los genes correspondientes a un AcMo anti-tiroglobulina, era posible conseguir un incremento entre 100 y 200 veces de los niveles de Ac circulante [126]. Trabajos posteriores permitieron demostrar el efecto terapéutico de los AcMo producidos *in vivo*. Afanasieva *et al.*, demostraron que la administración sistémica de un adenovirus que codificaba para un scFv anti-VEGF (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*) retrasaba el crecimiento tumoral [127] y concluyeron que una única inyección del adenovirus tenía el mismo efecto terapéutico que la administración sistémica repetida de altas dosis del scFv recombinante.

Recientemente, se demostró que la administración intratraqueal de un vector adeno-asociado (rAAV, del inglés *recombinant Adeno-Associated Virus*) que codifica para un AcMo anti-VEGF (tipo IgG1) mantenía niveles terapéuticos del Ac durante 40 semanas, era capaz de reducir el crecimiento tumoral, de incrementar la supervivencia y de reducir el número de metástasis en un modelo de xenotrasplante de carcinoma metastásico de pulmón [128]. Por otra parte, se han descrito niveles terapéuticos de un Ac anti-HER2 después de una única dosis

(i.v.) de un rAAV administrado a ratones portadores de un xenotrasplante de carcinoma de pulmón de células pequeñas [129]. En un modelo murino de carcinoma gástrico, la administración i.t de un AV se utilizó como vehículo para la liberación de una inmunotoxina asociada a un Ac recombinante con formato scFv frente a células tumorales HER2⁺[130]. Una aproximación terapéutica diferente fue la planteada por el grupo de Vigna *et al*, en la que utilizaban un LV para la producción de un AcMo (IgG2a) dirigido frente a la región extracelular del receptor humano Met [131].

En un interesante trabajo publicado recientemente se ha descrito el potencial de los rAAV como una alternativa a los protocolos de inmunización. En este trabajo demostraron que, tras la administración de una única dosis intramuscular de un AAV, era posible mantener la secreción de altas concentraciones de un AcMo neutralizante frente a la proteína gp-120 del VIH. Los autores describen esta nueva aproximación terapéutica como *vector immunoprophylaxis* (VIP)[132] y representa una interesante alternativa a la administración tradicional de anticuerpos para terapia antitumoral.

La eficacia de los vectores virales ha sido analizada y descrita en un elevado número de ensayos clínicos, sin embargo, siguen existiendo serias limitaciones en su uso en la práctica clínica, debido al riesgo que supone la generación de una respuesta inmune dirigida frente al vector y/o al transgen.

4.1.2 Terapia génica *ex vivo*: vehículos celulares

Como alternativa a la TG con vectores virales se ha propuesto el uso de células (autólogas o alogénicas) como vehículos para la liberación de diferentes proteínas terapéuticas, entre ellas Ac recombinantes. Su modificación genética *ex vivo* permite la eliminación de partículas virales residuales reduciendo el riesgo de diseminación, pudiendo cuantificarse los niveles de secreción de proteínas *in vitro*. Además, pueden seleccionarse y expandirse aquellos clones que tengan mayor capacidad de secreción, y la respuesta inmune frente a células autólogas, debería ser limitada o inexistente. Los vehículos celulares pueden estar dotados (natural o artificialmente) de la capacidad de migrar hacia las células diana, e incluso, en función de la estrategia utilizada para su administración, pueden retirarse una vez alcanzado el efecto terapéutico deseado.

Para la generación de vehículos celulares mediante estrategias de TG se han utilizado células fáciles de aislar, expandir y modificar *ex vivo*. Noel *et al*. [133] publicaron el primer trabajo donde se demostraba la capacidad de diferentes tipos celulares (fibroblastos cutáneos, hepatocitos, mioblastos) para ser transducidos *ex vivo* con vectores virales. Estas células eran capaces de expresar un AcMo *in vivo* durante periodos prolongados de tiempo aunque los niveles séricos se mantuvieron muy bajos. Otra estrategia fue la encapsulación de hibridomas para proteger las células de la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, el sistema presentaba limitaciones debidas a los bajos niveles de secreción del AcMo y a la escasa

capacidad de división celular de las células implantadas [134]. Cinco años más tarde, nuestro grupo publicó un trabajo en el que se demostraba la estabilidad y funcionalidad de un *diabody* biespecífico α CEA x α CD3 secretado por una línea celular humana (293 HEK). En un modelo de xenotrasplante de adenocarcinoma de colon la co-implantación de las células productoras de *diabody*, retrasó de manera significativa el crecimiento tumoral tras la administración i.t. de linfocitos T humanos [93].

En los protocolos de TG se han utilizado diferentes tipos celulares (neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos) con capacidad de migración hacia determinados tejidos [135], y de liberar moléculas terapéuticas en procesos inflamatorios o tumorales. En concreto, los linfocitos presentan un gran atractivo terapéutico por su capacidad para infiltrar tumores y por mediar una respuesta antitumoral citotóxica específica. Sin embargo, existen diferentes factores en el microambiente tumoral que pueden impedir la infiltración, activación y funcionalidad linfocitaria [136, 137]. Además, la obtención y posterior modificación y expansión de una población linfocitaria Ag-específica, es un proceso que presenta importantes limitaciones.

En la última década, la mayoría de los protocolos de TG *ex vivo* se han centrado en el uso de células progenitoras mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*). Las MSC presentan importantes ventajas como vehículos terapéuticos [138]: tienen una gran capacidad proliferativa, son células indiferenciadas, pueden aislarse, expandirse y transducirse con facilidad, cuando se administran por vía sistémica parecen presentar cierto tropismo hacia los depósitos tumorales y son muy poco inmunogénicas [139]. Al igual que las MSC, las células progenitoras neurales (NSC, del inglés *Neural Stem Cells*) y las células progenitoras endoteliales (EPC, del inglés *Endothelial Stem Cells*) presentan cierto tropismo por las células tumorales y han demostrado su eficacia terapéutica como vehículos celulares tras la administración local (i.t.) o sistémica (i.v.). Frankl *et al.* [140] utilizaron el tropismo tumoral de las NSCs, modificadas *ex vivo* con un AV, para la expresión *in situ* de un AcMo anti-HER2 en un modelo de cáncer de mama metastásico.

A pesar del interés suscitado por las MSC, algunos estudios han demostrado su efecto inmunomodulador y proangiogénico [141, 142] e incluso, se ha descrito su papel promotor en el crecimiento tumoral y la generación de metástasis [143]. Estos datos sugieren, que la administración de MSC como vehículos celulares podría suponer un riesgo en terapias antitumorales. Para evitar la diseminación celular o la implantación directa en los tejidos diana, las células utilizadas como vehículos celulares pueden inmovilizarse en soportes artificiales o en una matriz extracelular de membrana basal (Matrigel), e implantarse a nivel subcutáneo (s.c.), para que actúen como “glándulas artificiales” u “organoides terapéuticos”, que podrían retirarse una vez alcanzado el efecto terapéutico deseado. De este modo, las células quedan

anatómicamente localizadas pero la proteína liberada al torrente sanguíneo puede actuar localmente y/o distalmente.

Varios ensayos *in vivo* han demostrado la utilidad de estos organoides terapéuticos para la liberación sistémica y sostenida de diferentes proteínas. Los trabajos publicados por Eliopoulos *et al.* [144-146] demostraron que la liberación sostenida de eritropoyetina por MSC modificadas genéticamente, embebidas en una preparación de sECM (del inglés *synthetic Extracellular Matrix*), permitía restaurar los niveles de hematocrito de manera estable en un modelo murino de insuficiencia renal crónica. La producción localizada de proteínas con efecto terapéutico sistémico, también ha demostrado su eficacia en el contexto de la terapia antitumoral. Por ejemplo, la liberación sostenida de un receptor soluble truncado para IGF-1 alcanzó niveles terapéuticos en plasma e inhibió la generación de metástasis en un modelo de metástasis hepáticas [147], y la producción localizada de citoquinas, IL-2 o IL-12, permitió inhibir de manera significativa el crecimiento tumoral y aumentar la supervivencia en un modelo de melanoma murino y de metástasis hepáticas respectivamente [148, 149].

Son muchas las evidencias científicas que demuestran la eficacia y utilidad de las células como vehículos para la liberación de agentes terapéuticos. Sin embargo, es necesario definir las características de los distintos tipos celulares, conocer los mecanismos específicos de migración hacia los tumores, mejorar las estrategias para redirigir los agentes terapéuticos a los tejidos diana y utilizar los soportes biológicos o las vías de administración adecuados, para aprovechar al máximo el potencial terapéutico de las terapias celulares e impulsar la investigación clínica y traslacional.

OBJETIVOS

En este trabajo, se describe el diseño y desarrollo de nuevas estrategias de inmunoterapia antitumoral basadas en la generación de “factorías celulares”, para la secreción estable y mantenida de un AcBisR. Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Generación de un sistema de transferencia génica para la expresión de un AcBisR con formato *diabody* de doble cadena.
- II. Modificación genética de líneas celulares humanas, hematopoyéticas y no hematopoyéticas, para la expresión de un *diabody* biespecífico. Estudiar los niveles de secreción y la funcionalidad del anticuerpo producido.
- III. Modificación genética de células humanas primarias maduras, para la expresión de un *diabody* biespecífico con utilidad terapéutica. Estudiar los niveles de secreción y la funcionalidad del anticuerpo producido.
- IV. Valoración de la actividad antitumoral del *diabody* biespecífico secretado localmente por células humanas primarias maduras, en un modelo de xenotrasplante.
- V. Modificación genética de células progenitoras mesenquimales (MSC) adultas para la expresión de un *diabody* biespecífico con utilidad terapéutica. Estudiar los niveles de secreción y la funcionalidad del anticuerpo producido. Valoración de la actividad inmunomoduladora y del efecto tumoral de las MSC.
- VI. Generación de un organoide terapéutico constituido por MSC, inmovilizadas en un soporte o matriz artificial, para la liberación sistémica y mantenida de un *diabody* biespecífico. Estudiar la viabilidad y funcionalidad del organoide terapéutico.
- VII. Valoración de la actividad antitumoral del *diabody* biespecífico secretado, por un organoide terapéutico a nivel sistémico, en un modelo de xenotrasplante.
- VIII. Modificación genética de células endoteliales (EC) para la expresión de un *diabody* biespecífico con utilidad terapéutica. Estudiar los niveles de secreción y la funcionalidad del anticuerpo producido.
- IX. Generación de implantes vasculares terapéuticos, constituidos por EC inmovilizadas sobre Matrigel, para la liberación sistémica y continuada de un *diabody* biespecífico. Estudiar la viabilidad y funcionalidad de los vasos terapéuticos generados.
- X. Valoración de la actividad antitumoral del *diabody* biespecífico secretado, por un implante vascular terapéutico a nivel sistémico, en un modelo de xenotrasplante.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANTICUERPOS

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se resumen en las tablas IV y V.

Tabla IV: Anticuerpos monoclonales

Antígeno	Clon	Especie	Isotipo	Conjugación	Proveedor
CD3ε humano	OKT3	ratón	IgG _{2a}	-	Ortho Biotech
CD28 humano	L293	ratón	IgG ₁	-	BD Biosciences
CD66e humano	85A12	ratón	IgG ₁	-	Serotec
c-myc	9E10	ratón	IgG ₁	-	Sigma-Aldrich
MHC-I	W6/32	ratón	IgG _{2a}	-	eBioscience
Proteína p-24 VIH-1	BDI690	ratón	IgG ₁	-	Abcam
CD3ε humano	UCHT1	ratón	IgG ₁	RD1	Beckman-Coulter
CD3ε humano	UCHT1	ratón	IgG ₁	PC5	Beckman-Coulter
CD4 humano	SFC112T4D11	ratón	IgG ₁	RD1	Beckman-Coulter
CD8 humano	SFCI21Thy2D3	ratón	IgG ₁	ECD	Beckman-Coulter
CD8 humano	B9.11	ratón	IgG ₁	RD1	Beckman-Coulter
CD13 humano	L138	ratón	IgG ₁	PE	BD Biosciences
CD14 humano	116	ratón	IgM	FITC	Beckman-Coulter
CD14 humano	UCHM-1	ratón	IgG _{2a}	FITC	Sigma-Aldrich
CD14 humano	116	ratón	IgM	RD1	Beckman-Coulter
CD20 humano	H299	ratón	IgG _{2a}	RD1	Beckman-Coulter
CD31 humano	5.6E	ratón	IgG ₁	FITC	Beckman-Coulter
CD34 humano	581	ratón	IgG ₁	PC5	Beckman-Coulter
CD38 humano	HIT2	ratón	IgG ₁	FITC	Immunotools
CD45 humano	J.33	ratón	IgG ₁	ECD	Beckman-Coulter
CD45 humano	B3821F4A	ratón	IgG _{2b}	FITC	Beckman-Coulter
CD56 humano	NCAM16.2	ratón	IgG _{2b}	PE	BD Biosciences
CD73 humano	AD2	ratón	IgG ₁	PE	BD Biosciences
CD90 humano	Thy1/310	ratón	IgG ₁	PE	Beckman-Coulter
CD105 humano	SN6	ratón	IgG ₁	PE	eBioscience
CD133 humano	AC133	ratón	IgG ₁	PE	Milteny Biotec
MHC-I	W6/32	ratón	IgG _{2a}	FITC	Sigma-Aldrich

ECD, ficoeritrina-rojo Texas; FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PC5, ficoeritrina-cianina 5; RD, rodamina.

Tabla V: Anticuerpos policlonales

Antígeno	Especie	Conjugación	Proveedor
IgG ratón (Fc)	cabra	HRP	Sigma-Aldrich
IgG ratón (Fab') ₂	cabra	PE	Jackson Immuno Research
IgG ratón	oveja	HRP	Amersham Biosciences
Proteína p-24 VIH-1	cabra	Biotina	Abcam

HRP, peroxidasa de rábano.

2. LÍNEAS CELULARES

En la tabla VI se indican las líneas celulares utilizadas en este trabajo y las condiciones de cultivo.

Tabla VI: Líneas celulares

Línea celular	Proveedor (referencia)	Tipo Celular	Especie	Medio cultivo	Suplementos
HEK-293	ATCC(CRL-1573)	Fibroblasto de riñón embrionario	Humano	DMEM-C DMEM-L	-
293T	ATCC(CRL11268)	Fibroblasto de riñón embrionario	Humano	DMEM-C	-
HeLa	ATCC(CCL-2)	Carcinoma de cérvix	Humano	DMEM-C	-
HeLa ^{CEA}	P. Holliger[150]	Carcinoma de cérvix	Humano	DMEM-C	G-418(750µg/ml)
U937	ATCC(CRL1593.2)	Linfoma histiocítico	Humano	RPMI-C	-
K562	ATCC(CCL-243)	Leucemia mieloide crónica	Humano	RPMI-C	-
Daudi	ATCC(CCL-213)	Linfoma de Burkitt	Humano	RPMI-C	-
T7527	M.R. de Pablo[151]	Célula B linfoblastoidea	Humano	RPMI-C	-
Jurkat (E6.1)	ATCC(TIB-152)	Leucemia T	Humano	RPMI-C	-
MT-2	ECACC(93121518)	Leucemia T	Humano	RPMI-C	-
NK-92	ATCC(CRL-2407)	Linfoma no-Hodgkin	Humano	RPMI-C	IL-2(150 UI/ml)
NKL	E. Martínez-Naves[152]	Leucemia de linfocitos grandes granulados	Humano	RPMI-C	IL-2(150 UI/ml)
HCT-116	ATCC(CCL-247)	Carcinoma colorrectal	Humano	RPMI-C	-
IMR-90	ATCC(CCL186)	Fibroblastos primarios de pulmón	Humano	DMEM-C	-

ATCC, *American Type Culture Collection*; DMEM-C (DMEM-Completo), medio DMEM suplementado con un 10% (vol/vol) de FCS (suero fetal bovino), 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina; DMEM-L (DMEM Libre de Suero): medio DMEM suplementado con un 0,1% (vol/vol) de FCS, 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina; ECACC, *European Collection of Cell Cultures*, G-418, Neomicina; RPMI-C, medio RPMI suplementado con un 10% (vol/vol) de FCS, 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

Dr. P. Holliger, *Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council (MRC)*, Cambridge, Reino Unido

Dr. E. Martínez-Naves, Departamento de Inmunología, Universidad Complutense, Madrid

Dra. M.R. de Pablo, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid.

Las células se cultivaron a 37°C, 95% humedad y 5% CO₂, y se analizaron por PCR de forma rutinaria para descartar la contaminación por micoplasma utilizando el sistema “*Mycoplasma Plus TM Primer Set*” (Stratagen). Los medios de cultivo y la mayoría de suplementos usados se obtuvieron de Life Technologies. Otros suplementos como G-418 e interleuquina-2 (IL-2) se obtuvieron de Promega y de Sigma Aldrich, respectivamente.

3. AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS MADURAS

3.1. Células primarias hematopoyéticas: linfocitos T

Las PBMC se obtuvieron de donantes sanos, mediante centrifugación (800g, 20 minutos, 22°C) en gradiente de densidad sobre Lymphoprep (1,077 g/ml). La suspensión celular resultante se lavó dos veces con medio completo. La viabilidad celular determinada mediante la

técnica de exclusión con azul tripán, fue siempre superior al 95%. La suspensión celular se ajustó a una concentración de 1×10^6 células/ml para el cultivo y expansión *in vitro* mediante estimulación con un AcMo anti-CD3 inmovilizado sobre plástico (10 µg/ml) y un AcMo anti-CD28 en solución (1 µg/ml), en un volumen final de 200 µl de medio completo suplementado con IL-2 (100 UI/ml) durante 72 horas. Las células se mantuvieron en cultivo en medio completo y presencia de IL-2 (100 UI/ml). El fenotipo de los PBMC fue analizado mediante citometría de flujo (CF).

3.2. Células primarias no hematopoyéticas: células endoteliales de la vena del cordón umbilical

Las células endoteliales aisladas de la vena del cordón umbilical (HUVEC, del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) fueron proporcionadas por la Dra. M. Feijóo (Hospital Universitario de La Princesa, Madrid), y se cultivaron en medio EGM-2 suplementado con un 2% (vol/vol) de FCS y con un cóctel de factores de crecimiento endotelial (Cambrex).

4. AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS

4.1. Células progenitoras hematopoyéticas

Las células progenitoras hematopoyéticas (HSC; del inglés *Hematopoietic Stem Cells*) se obtuvieron de sangre de cordón umbilical, previo consentimiento informado. Las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad. Para la purificación de la subpoblación CD34⁺, se empleó un sistema de selección positiva basado en la tecnología *Multisort MicroBeads* de Milteny Biotech. Las células se incubaron con bolas magnéticas conjugadas con un AcMo anti-CD34 humano y se purificaron mediante una columna magnética. El grado de enriquecimiento fue superior al 95% y se determinó mediante CF.

Para la expansión y el mantenimiento de las HSC se utilizó el medio StemSpan SFEM suplementado con un cóctel de citoquinas recombinantes humanas: trombopoyetina (50 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), factor de células progenitoras (SCF, del inglés *Stem Cell Factor*) (50 ng/ml) y ligando flk-2/flt3 (50 ng/ml) (PeproTech Ec Ltd.).

4.2. Células progenitoras mesenquimales

Las MSC se obtuvieron de médula ósea procedente de donantes sanos, previo consentimiento informado. Para su aislamiento se utilizó un protocolo previamente descrito [153], y fueron cedidas por el Dr. J.L. Vicario (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Madrid). Las células mononucleares de médula ósea se aislaron mediante

centrifugación en gradiente de densidad, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo MEM- α suplementado con Glutamax (Invitrogen) y 10% (vol/vol) FCS. Las células se seleccionaron por adherencia a plástico a una concentración de 1×10^6 células/ml durante 48 horas a 37 °C y 5% CO₂. Para la expansión de las MSC, el medio de cultivo se suplementó con 10ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (PeproTech Ec Ltd.).

Para el mantenimiento de las MSC se renovó el 50% del medio de cultivo cada 3-4 días hasta conseguir una confluencia aproximada de un 70%. El fenotipo de las MSC se analizó a diferentes pases del cultivo mediante CF.

5. ESTUDIOS FENOTÍPICOS

El análisis fenotípico para el estudio de la expresión de moléculas de superficie celular en PBMC, HSC y MSC se realizó mediante inmunofluorescencia directa (IFD) con AcMo conjugados con diferentes fluorocromos (Tabla I). La expresión del AgCEA (CEACAM5) en las líneas tumorales HeLa, HeLa^{CEA} y HCT-116 se estudió por inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando el AcMo anti-CEA humano, clon 85A12 (Tabla I), y un segundo Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con PE (Tabla II). La unión del *diabody* α CEA x α CD3 a la superficie de células CD3⁺ y células CEA⁺ se estudió por IFI, mediante la incubación con el *diabody* α CEA x α CD3 recombinante purificado [10 μ g/ml], que posee en su extremo carboxilo-terminal las etiquetas peptídicas His6/myc. Las moléculas de *diabody* unidas a la superficie celular se detectaron mediante el AcMo anti-c-myc, clon 9E10 (Tabla I) y un segundo Ac de cabra anti-IgG F(ab')₂ de ratón conjugado con PE (Tabla II).

Las células fueron incubadas con las diluciones apropiadas para cada Ac durante periodos de 30 minutos a 4°C. En todos los casos se utilizaron los controles de isotipo adecuados. Los estudios se realizaron en un citómetro EPICS XL (Beckman Coulter) equipado con un láser de argón (488 nm).

6. CONSTRUCCIONES GENÉTICAS

Para propagar y clonar los vectores se utilizaron en función del tipo de plásmido bacterias *E. coli* TOP-10 o *E. coli* Stbl3 (Life Technologies). Las bacterias transformadas con los distintos plásmidos se cultivaron a 37 °C en medio sólido TYE o en medio líquido 2xYT (ambos de Life Technologies), suplementados con 50 μ g/mL de ampicilina (Life Technologies). Todas las técnicas generales de ADN recombinante se llevaron a cabo según métodos estándar (Sambrook & Russell, 2006). Las enzimas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs. El ADN plasmídico se purificó empleando los kits de aislamiento *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) y *Qiagen Midi-Prep kit* (Qiagen). Las construcciones genéticas se revisaron por secuenciación usando el método de los dideoxinucleótidos y un secuenciador de ADN automático ABI-PRISM (Perkin Elmer).

Los vectores empleados y los vectores generados en este trabajo aparecen detallados en la Tabla VII.

Tabla VII: Vectores de expresión en células eucarióticas

Vector	Vector de origen	Inserto	Características	Proveedor (referencia)
pCEP4	-	-	Origen de replicación y gen EBNA-1	Life Technologies
pdAb3	pCEP4	dAb(α CEA x α CD3)	Promotor CMV Resistencia a Higromicina	L.Álvarez-Vallina[93]
pMD.G	-	proteína G del VSV	Promotor CMV	D. Trono [154]
pMDLg/pRRE	-	gag y gag/pol VIH-1	Promotor CMV Elemento RRE	D. Trono
pRRL-dAb-IRES-EGFP	pRRL-IRES-EGFP	dAb-EGFP	Promotor CMV Secuencia IRES	Este trabajo
pRRL-IRES-EGFP	-	EGFP	LTR 5', LTR 3' Señal ψ de empaquetamiento	D. Trono
pRRL-Luc-IRES-EGFP	pRRL-IRES-EGFP	Luciferasa/ <i>P.piralis</i>	Elemento RRE	L.Álvarez-Vallina[142]
pRSVrev	-	Rev VIH-1	Promotor CMV	D. Trono

CMV, citomegalovirus; dAb, *diabody*; EGFP, del inglés *Enhanced Green Fluorescence Protein*; IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*, LTR, del inglés *Long Terminal Repeat*; VIH-1, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1; VSV-G, proteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular.

Dr. L. Álvarez-Vallina: Servicio de Inmunología. Unidad de Inmunología Molecular. Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda

Dr. D. Trono, École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), Lausana, Suiza

El vector lentiviral pRRL-dAb-IRES-EGFP se generó mediante la inserción de un fragmento derivado del plásmido pdAb3 con las enzimas *BglII-XhoI*, en el vector pRRL-IRES-EGFP digerido con las enzimas *BamHI-XhoI*.

7. GENERACIÓN Y TITULACIÓN DE SOBRENADANTES LENTIVIRALES

Para la generación de sobrenadantes lentivirales utilizamos células 293T como células empaquetadoras, y un sistema de vectores lentivirales de tercera generación derivados del VIH-1 sin capacidad de generar virus replicativos. El sistema lentiviral utilizado, proporcionado por el Dr. D. Trono, está compuesto por cuatro vectores: dos vectores empaquetadores pMDLg/RRE y pRSVrev, para la expresión de los genes *gag*, *pol* y *rev*, el vector pMD.G para la expresión de la proteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), y un vector de transferencia genética. En este trabajo hemos utilizado los siguientes vectores de transferencia (Tabla VIII): pRRL.IRES.EGFP, pRRL.dAb.IRES.EGFP y pRRL.Luc.IRES.EGFP.

Para la obtención de los sobrenadantes lentivirales se transfectaron células 293T en placas de 100 mm (5×10^6 células/placa) mediante precipitación con fosfato cálcico. Las cantidades de ADN plasmídico necesarias por placa fueron: 14,1 μ g del vector de transferencia (Tabla IV), 9 μ g del vector pMDLg/pRRE, 3,45 μ g del vector pRSVrev y 4,71 μ g del vector

pMD.G. Tras 8 horas de incubación se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS y se añadió medio completo fresco. A las 48 horas se recogió el sobrenadante que contiene las partículas lentivirales, se filtró (0,45 μm) y se concentró aproximadamente 100 veces por ultracentrifugación (24.500 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 horas). El *pellet* viral se resuspendió en PBS y se almacenó a -80 $^{\circ}\text{C}$. Se utilizaron diferentes métodos para la titulación de las preparaciones lentivirales:

1.-Titulación enzimática: medición de la actividad de la enzima transcriptasa reversa en el sobrenadante lentiviral, mediante el sistema *HS-Lenti Kit-RT assay* (Cavidi Tech AB).

2.-Titulación de las partículas físicas (PF/mL) presentes en el sobrenadante lentiviral, mediante ELISA indirecto para la detección de la proteína p24 de la cápside viral (Endogen).

3.-Titulación biológica de partículas infectivas (Unidades transductoras, UT/mL) mediante la transducción de células HeLa, en placas de 24 pocillos ($2,5 \times 10^5$ células/pocillo), con diluciones seriadas de las preparaciones virales. A las 48 horas de la transducción, se determinó mediante CF el porcentaje de células que expresaban la proteína verde fluorescente (EGFP, del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*). El título en UT/mL se calculó mediante la siguiente fórmula: (porcentaje de células EGFP positivas/100) x factor de dilución.

Tabla VIII: Vectores de transferencia genética y preparaciones lentivirales

Vector de transferencia	Lentivirus
pRRL.IRES.EGFP	LV ^{EGFP}
pRRL.dAb.IRES.EGFP	LV ^{dAb}
pRRL.Luc.IRES.EGFP	LV ^{Luc}

8. TRANSFECCIONES

La línea celular HEK-293 se transfectó con el vector de expresión pdAb3 utilizando *Lipofectamine Plus Reagent* según las recomendaciones del fabricante (Life Technologies). Para la obtención del transfectante estable HEK-293^{dAb}, las células HEK-293 se seleccionaron en DMEM-C suplementado con 150 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B (Life Technologies).

9. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS HUMANAS

9.1. Líneas celulares humanas

Para la transducción de líneas celulares humanas, tanto hematopoyéticas (MT-2, Jurkat, U937, K562, NKL, NK-92, Daudi, T7527) como no hematopoyéticas (HeLa, HeLa^{CEA}, 293T), se incubaron $2,5 \times 10^5$ células en crecimiento exponencial durante toda la noche en placas de 24

pocillos (BD Biosciences), con distintas diluciones de las preparaciones lentivirales concentradas (Tabla V), en un volumen final de medio de 1 ml. Se utilizaron multiplicidades de infección (MDI) variables entre 0,25 y 40. A continuación, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en cultivo durante 48 horas. Posteriormente, se analizó el porcentaje de células transducidas que expresaban EGFP mediante CF.

9.2. Células primarias maduras: linfocitos T y HUVEC

Para la transducción de linfocitos T humanos se utilizaron placas de 96 pocillos (BD Biosciences) pretratadas con el fragmento recombinante de fibronectina humana CH-296 retronectina (Takara), a una concentración de 10 µg/ml. Los linfocitos T (10^5 células/pocillo) se incubaron con las preparaciones lentivirales (LV^{dAb} o LV^{EGFP}) a una MDI de 20 durante 4 horas a 37 °C y 5% CO₂. Tras este periodo de incubación, la mitad del medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco y las células se incubaron toda la noche a 37 °C y 5% CO₂. A las 24 horas se repitió el mismo procedimiento de transducción. Posteriormente, los linfocitos T se expandieron y activaron como se ha indicado en el apartado 3.1. El estudio fenotípico de los PBMC se realizó antes y después de la transducción lentiviral mediante citometría de flujo.

Las células HUVEC se sembraron a una densidad de $7,5 \times 10^3$ células/cm² en placas de 6 pocillos (BD Biosciences) en 2 ml de medio de cultivo y se incubaron con las preparaciones lentivirales (LV^{dAb} o LV^{Luc}) a una MDI de 10 durante toda la noche. A continuación, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en cultivo durante un periodo adicional de 48 horas. Posteriormente, se analizó mediante CF el porcentaje de células transducidas que expresaban EGFP.

9.3. Células progenitoras adultas multipotentes: HSC y MSC

Las células HSC y MSC se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración inicial de 10^5 células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo. Las células se incubaron con las preparaciones lentivirales (LV^{EGFP}, LV^{dAb} o LV^{Luc}) a una MDI de 15, durante 16 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en cultivo durante 48 horas. El análisis de la expresión de EGFP se realizó mediante CF.

10. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS EUCARIOTAS

Para la expresión de proteínas recombinantes a partir de medio condicionado de células eucariotas, se generó un transfectante estable en células HEK-293 (HEK-293^{dAb}) y se transdujeron células 293T con el vector lentiviral LV^{dAb} (293T^{dAb}). Las células se cultivaron en DMEM-L y el medio condicionado libre de suero (CM, del inglés *Conditioned Medium*) fue recogido, centrifugado y filtrado (0,45 µm). Las proteínas recombinantes se purificaron

mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando columnas HisTrap HP (GE Healthcare). Las proteínas se dializaron frente a PBS (pH 7,4) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Todas las proteínas purificadas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y ELISA.

11. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA)

11.1. ELISA para la detección del antígeno p-24 del VIH-1

La detección del Agp-24, principal proteína de la nucleocápside del VIH-1, se realizó mediante ELISA indirecto (Endogen) según las instrucciones del proveedor. La proteína p-24 recombinante purificada (Jena Biosciences) se utilizó para diseñar la curva patrón siguiendo las indicaciones del fabricante.

11.2. ELISA para la detección y cuantificación de Interleuquina-2

La detección y cuantificación de IL-2, en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos T activados, se realizó mediante ELISA comercial *Human IL-2 Eli pair* (Diacclone, Gene Probe) siguiendo las instrucciones del fabricante.

11.3. ELISA para la detección de *diabody* α CEA x α CD3 en el sobrenadantedecultivo celular o en suero de ratón.

El antígenoCEA humano purificado (ProspecTany) se inmovilizó sobre placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) mediante incubación de 16 horas a 4 °C en PBS (2 μ g/ml). Posteriormente las placas se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS-4% BSA durante 2 horas a 37 °C. Después de tres lavados con PBS-0,05% Tween₂₀, se añadieron los sobrenadantes de cultivo eucariótico filtrados o los sueros de ratón diluidos con PBS-3% BSA. Como curva de calibración se utilizaron diluciones seriadas de *diabody* α CEA x α CD3 purificado. La unión del *diabody* α CEA x α CD3 al antígeno CEA se detectó mediante un AcMo anti-c-myc, clon 9E10, (5 μ g/ml) y posteriormente con un Ac de cabra anti-IgG de ratón (dilución 1/500) conjugado con HRP (Tablas I y II). La lectura colorimétrica se realizó a 450 nm, tras la adición de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich).

12. TRANSFERENCIA WESTERN

Las muestras (*diabody* α CEA x α CD3 recombinante purificado o medio condicionado de células eucarióticas) se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%. A continuación, las proteínas fueron transferidas por *electroblotting* a una membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane 0,45 μ m, Millipore). La membrana fué bloqueada con PBS-0,05% Tween₂₀-5% leche en polvo desnatada (LPD), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas se

detectaron mediante con el AcMo anti-c-myc (1 $\mu\text{g/ml}$) diluido en PBS-5% LPD durante 2 horas. Tras varios lavados con PBS-0,05% Tween₂₀, la membrana se incubó con un Ac de oveja anti-IgG de ratón (dilución 1/8000) conjugado con HRP (Amersham). Tras lavar la membrana con PBS, las bandas se visualizaron mediante un sistema de detección por quimioluminiscencia (GE Healthcare).

13. ESTUDIOS FUNCIONALES

13.1. Ensayos de activación y proliferación

13.1.1. Ensayos de activación y proliferación específica de linfocitos T

Los linfocitos T humanos (5×10^4 células/pocillo) transducidos con LV^{EGFP} (linfocitos T^{EGFP}) o con LV^{dAb} (linfocitos T^{dAb}) se co-cultivaron por triplicado en placas de 96 pocillos con células tumorales CEA⁻ (HeLa) o CEA⁺ (HeLa^{CEA}), previamente inactivadas mediante radiación con cobalto (25 Gys), a diferentes relaciones efector:diana (E:D). Como control positivo del ensayo las células efectoras se estimularon con un AcMo anti-CD3 humano (Tabla I) inmovilizado en placa (10 $\mu\text{g/ml}$). A las 72 horas, se determinó la proliferación celular mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). La cantidad de IL-2 presente en el sobrenadante de cultivo se determinó por ELISA (apartado 11.2).

13.1.2. Efecto inmunomodulador de las MSCs sobre la proliferación de linfocitos T

Para estudiar el efecto inmunomodulador de las MSC, se estimularon linfocitos T procedentes de sangre periférica de donantes sanos (10^5 células/pocillo) por triplicado con un AcMo anti-CD3 humano (Tabla I) inmovilizado (10 $\mu\text{g/ml}$) en placa de 96 pocillos de fondo plano (BD Biosciences). A las 24 horas, se añadió al cultivo 100 μl de medio fresco o CM procedente de cultivos de MSC (CM-MS) o células HEK-293 (CM-293). A las 72 horas, se midió la proliferación celular mediante el sistema MTT. Para estudiar el efecto inmunomodulador de las MSC sobre la proliferación específica de linfocitos T mediada por el *diabody* $\alpha\text{CEA} \times \alpha\text{CD3}$, las células efectoras (10^5 células/pocillo) se cocultivaron por triplicado en placas de 96 pocillos con células tumorales (HeLa o HeLa^{CEA}) previamente irradiadas (25 Gys), en una relación E:D de 5:1. A las 24 horas se añadió 100 μl de MC de cultivos de 48 horas de MSC transducidas con vectores lentivirales (CM-MS^{EGFP} o CM-MS^{dAb}) o CM de cultivos de 48 horas de células HEK-293 transducidas con vectores lentivirales (CM-293^{EGFP} o CM-293^{dAb}). A las 72 horas, se midió la proliferación celular mediante el sistema MTT.

13.2. Ensayos de citotoxicidad

Para los ensayos de citotoxicidad específica mediada por el *diabody* $\alpha\text{CEA} \times \alpha\text{CD3}$ se establecieron monocapas de células tumorales (HeLa o HeLa^{CEA}) en placas de 24 pocillos. A las

24 horas, se añadieron linfocitos T humanos previamente transducidos con vectores lentivirales (Linfocitos T^{EGFP} o Linfocitos T^{dAb}). A las 96 horas del cultivo, las células no adherentes se eliminaron mediante lavados con PBS, y las células adherentes se fijaron con glutaraldehído al 1% en PBS, se tiñeron con cristal violeta al 0,1% y la viabilidad celular se determinó mediante examen microscópico.

13.3. Ensayos de proliferación tumoral

Para determinar el efecto del CM-MSC o del CM de fibroblastos humanos IMR-90 (CM-IMR-90) sobre la proliferación de células tumorales *in vitro*, las células IMR-90 y MSC se cultivaron tal y como se describe en la Tabla III y en el apartado 4.2, respectivamente. Después de 48 horas de cultivo, el CM fue recogido y filtrado. Células tumorales HCT-116 ($1,4 \times 10^4$ células/pocillo) se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas en cultivo, se retiró el medio y se añadieron 100 μ l de CM-MSC, CM-IMR-90 o medio fresco, como control. Todos los medios fueron suplementados con 10% FCS. La proliferación celular se determinó mediante el sistema MTT a las 4, 24, 48 y 72 horas.

14. ENSAYOS *in vivo*

Los protocolos utilizados para la manipulación de animales, que a continuación se detallan, han sido aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.

14.1. Anestesia

Los ratones utilizados en este trabajo se anestesiaron por vía inhalatoria con isoflurano (Abbott Laboratories) vaporizado en oxígeno y se mantuvieron en ambiente estéril para la realización de los protocolos de implantación de tumores por vía subcutánea (s.c.), inyecciones vía intramuscular (i.t.) e intravenosa (i.v.), y sangrados retroorbitales. Tras la anestesia inhalatoria se indujo anestesia a largo plazo para la realización de los ensayos de imagen molecular, mediante la inyección s.c. de una solución salina con ketamina (97,5 μ g/g de peso), atropina (8 ng/g de peso) y diazepam (7,5 μ g/g de peso). En este trabajo se utilizaron ratones atímicos desnudos (Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu) hembra de cinco semanas de edad (Harlan Ibérica).

14.2. Ensayos de implantación tumoral: xenotrasplante

Las células tumorales de adenocarcinoma de colon humano, HCT-116 (CEA⁺), no transducidas o transducidas con el vector lentiviral LV^{Luc} (HCT-116^{Luc}), se resuspendieron en PBS con un 20% de una preparación de matriz extracelular (MatrigelTM BM Matrix, BD

Biosciences), y se implantaron (2×10^6) vía s.c. en la zona dorsal. Para la obtención de una respuesta terapéutica, los ratones recibieron 1 o 2 inyecciones por vía i.v. de linfocitos T humanos preactivados *in vitro* con un AcMo anti-CD3 inmovilizado (1 $\mu\text{g/ml}$), un AcMo anti-CD28 soluble (1 $\mu\text{g/ml}$) e IL-2 (100 UI/ml), a distintos tiempos, según el protocolo. En todos los ensayos realizados, los tumores se midieron cada dos días y el volumen tumoral se determinó según la fórmula: ancho² x largo x 0,52 (tomándose la medida más pequeña como ancho). El análisis estadístico de las medidas de crecimiento tumoral entre los diferentes grupos se realizó utilizando la prueba t-Student. El nivel de significación estadística se situó en $p \leq 0,05$.

14.3. Ensayos de imagen molecular

Las imágenes de bioluminiscencia (Bioluminescence Imaging, BLI) *in vivo* se obtuvieron a diferentes días tras la implantación de las célulastransducidas con el vector lentiviral LV^{Luc}, utilizando un sistema Hamamatsu dotado de una cámara digital de alta resolución con dispositivos de cargas acopladas (CCD) ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics). Para el análisis y procesamiento de las imágenes se empleó el software Wasabi (Hamamatsu Photonics). La sal de potasio D-Luciferina (Promega), sustrato de la luciferasa de *Photinus pyralis* (FLuc), se disolvió en PBS a una concentración de 17,5 mg/mL, y se inoculó por vía intraperitoneal(i.p.) 10 minutos antes de la adquisición de las imágenes de BLI, a una dosis de 125 mg/kg (150-200 $\mu\text{L/ratón}$). En un ensayo típico se adquiere primero una imagen de BLI con un tiempo de exposición de 1 minuto. La imagen se recoge con una ganancia media y un agrupamiento de píxeles (binning) en formato de 8 x 8. A continuación se toma una imagen con luz visible y un tiempo de exposición de 20 milisegundos, recogiendo la imagen con una ganancia media y un agrupamiento de píxeles en formato de 1x1. Por último, se mezclan las imágenes para obtener la composición final. El procesamiento incluye una escala de colores siguiendo un perfil de intensidad de señal. Para la cuantificación de la señal, las regiones de interés son acotadas y la intensidad media de luz (intensidad total/superficie) es cuantificada y registrada. En todas las representaciones gráficas se muestran las medias de las intensidades y el error estándar del grupo. Fueron realizadas una media de 6 adquisiciones de BLI por animal y día tras la inoculación del sustrato para determinar el pico de emisión de fotones.

14.4. Ensayos de inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpos recombinantes biespecíficos secretados a nivel local (secreción intratumoral)

14.4.1. Efecto de los linfocitos T transducidos sobre el crecimiento tumoral

Las células tumorales HCT-116 (2×10^6) se mezclaron en una proporción 1:1 con linfocitos T humanos transducidos para la expresión de EGFP (linfocitos T^{EGFP}) o para la

expresión de dAb (linfocitos T^{dAb}), y preactivados *in vitro* con un AcMo anti-CD3 inmovilizado (1 µg/ml), un AcMo anti-CD28 soluble (1 µg/ml) e IL-2 (100 UI/ml). Las células se resuspendieron como se describe anteriormente y se implantaron vía s.c. en la zona dorsal de ratones atímicos desnudos. La inhibición del crecimiento tumoral se controló según la medición del volumen tumoral.

14.4.2. Efecto de las células progenitoras mesenquimales transducidas sobre el crecimiento tumoral

Las células tumorales HCT-116 (2×10^6) se mezclaron con células MSC transducidas con el vector lentiviral LV^{Luc} (MSC^{Luc}) en una proporción 4:1. Un grupo control recibió únicamente células tumorales HCT-116. Las células se resuspendieron como se indica en el apartado anterior y se inocularon vía s.c en la zona dorsal de ratones atímicos desnudos, comparándose la cinética de crecimiento de los tumores HCT-116 con el crecimiento de los tumores HCT-116+MSC^{Luc}.

14.5. Ensayos de inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpos recombinantes biespecíficos secretados a distancia (secreción sistémica)

14.5.1. Generación y establecimiento de organoides

Para la generación de los organoides terapéuticos u organoides control, las células MSC (10^6 células) modificadas genéticamente, MSC^{dAb} o MSC^{Luc}, se resuspendieron en PBS y fueron embebidas en dos soluciones de un hidrogel sintético al 90%, Extracel-X o Extracel-HP (Glycosan BioSystems). Ambos organoides fueron suplementados con 128 U/ml de heparina (Sigma-Aldrich), 50 ng/ml de factor de crecimiento endotelial (VEGF) humano y 150 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) humano (ambos de Peprotech). Los organoides fueron implantados vía s.c. en el área ventral de ratones atímicos desnudos. La funcionalidad de los organoides se analizó mediante ELISA, cuantificando la cantidad de *diabody* αCEA x αCD3 funcional en suero.

14.5.2. Generación y establecimiento de implantes vasculares

Para la generación de los implantes vasculares terapéuticos o control, células HUVEC (3×10^5) modificadas genéticamente, HUVEC^{dAb} o HUVEC^{Luc}, se mezclaron con células MSC ($7,5 \times 10^5$) y se resuspendieron en 200 µl de Matrigel diluido en PBS (8 mg/ml) (BD Biosciences) y suplementado con 128 U/ml de heparina, 50 ng/ml VEGF y con 150 ng/ml de bFGF. Ambos implantes vasculares fueron inoculados vía s.c. en el área ventral de ratones atímicos desnudos, en flancos opuestos. La funcionalidad de los implantes vasculares se analizó mediante ELISA, cuantificando la cantidad de *diabody*αCEA x αCD3 funcional en suero.

14.5.3. Ensayos de imagen molecular *in vivo* para el seguimiento de la viabilidad de los organoides e implantes vasculares

Los organoides e implantes vasculares (terapéuticos y control) fueron inoculados vía s.c., en el área ventral de ratones atímicos desnudos, 5 días después de la implantación s.c de las células tumorales (HCT-116) en el área dorsal. El estudio de la viabilidad de los organoides control (MSC^{Luc}) y de los implantes vasculares control (HUVEC^{Luc}) se realizó mediante ensayos de imagen molecular, a distintos tiempos post-implantación. La captura de imágenes y el análisis de las mismas se describen en el apartado 14.3.

14.6. Recuperación y caracterización de las células obtenidas de tejidos murinos

14.6.1. Identificación de linfocitos T humanos circulantes

Para la identificación de linfocitos T humanos circulantes se obtuvieron muestras de sangre (100 µl) por vía retroorbital, antes y después (días 1 y 7) de la inyección por vía i.v. de linfocitos T humanos preactivados. Las muestras de sangre se recogieron en EDTA y se lisaron los hematíes mediante procesamiento de la muestra en *TQ-Prep workstation* (Coulter Electronics). Las muestras fueron analizadas por CF (EPICS XL, Coulter Electronics). Los linfocitos T humanos circulantes se identificaron con los AcMos: anti-CD45-FITC, anti-CD4-RD1, anti-CD8-ECD y anti-CD3-PC5 (Tabla I.).

14.6.2. Identificación de linfocitos T humanos infiltrantes

A los tiempos indicados, los ratones se sacrificaron y se procedió a la extracción de los tumores, pulmones, hígado y bazo. Los diferentes tejidos se disgregaron y homogeneizaron mediante *MagNA Lyser Green Beads* (Roche Diagnostics) para la extracción del ARN con el RNeasy Micro Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). El cDNA se sintetizó a partir de 0,5 µg de ARN total mediante el sistema *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) se utilizó el sistema *LightCycler Fast Start PLUS DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics) en un equipo LightCycler 480 de Roche Diagnostics). La expresión de ARN mensajero (ARNm) en cada muestra fue normalizada frente al gen de la succinato deshidrogenasa, subunidad A (SDHA). Se diseñó una curva patrón a partir de diluciones seriadas de cDNA para el cálculo de la concentración relativa de los genes diana y normalizadores en cada tejido. La curva patrón utilizada para la cuantificación de CD3 humano (hCD3) en tumores se diseñó mezclando diferentes porcentajes de ARN de linfocitos T humanos preactivados *in vitro* y ARN de los tumores de ratones que no habían recibido linfocitos T humanos. Las muestras se analizaron por duplicado. En la tabla IX se indican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Se utilizó el programa informático Primer Express software (Applied Biosystems) para su diseño.

TABLA IX: Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
hCD3 (F)	CTACCCCAGAGGAAGCAAACC
hCD3 (R)	GACATCACATCCATCTCCATGC
hSDHA (F)	TGGGAACAAGAGGGCATCTG
hSDHA (R)	CCACCACTGCATCAAATTCATG
mSDHA (F)	GCAGTTTCGAGGCTTCTTCG
mSDHA(R)	AAGTGAAAGCCGCAGGTCTG

15. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Las muestras tumorales se extrajeron, se fijaron con formalina y se embebieron en parafina. Los cortes histológicos procedentes de cada tumor se tiñeron con hematoxilina y eosina y se visualizaron (x5) para identificar estructuras vasculares.

15.1. Inmunohistoquímica

Para la caracterización inmunohistoquímica (IHC), se procedió a desenmascarar los antígenos mediante tratamiento con calor en una olla a presión durante 4 minutos, en una solución de tampón citrato a pH 6,0 (*Target Retrieval Solution*, Dako). La actividad peroxidasa endógena se bloqueó durante 5 minutos, utilizando una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. El infiltrado de linfocitos T humanos se identificó con el AcMo anti-CD3 humano, clon F7.2.38 (Dako) utilizando el kit *Mouse on Mouse* (M.O.M.TM) *peroxidase* de Vector Laboratories. Como sustrato cromogénico en ambos casos se utilizó DAB (Vector Laboratories) seguido de contratinción con hematoxilina.

15.2. Análisis de la densidad vascular

Los vasos funcionales o maduros se definieron como estructuras vasculares que contenían eritrocitos en su interior. La cuantificación se realizó analizando las áreas de densidad vascular alta (*hot spots*) a pequeño aumento (x50), y contando los vasos maduros en cuatro campos visuales, elegidos al azar, en 10 secciones por ratón teñidas con hematoxilina y eosina. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Se realizaron tests biparamétricos y el nivel de significación estadística se situó en $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Artículo N° 1: Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA x anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. Cancer Gene Therapy (2007) 14, 380–388.

Resumen

Los linfocitos T humanos intratumorales (TIL) localizados en diferentes tipos de tumores sólidos, presentan en general, una actividad antitumoral muy limitada como consecuencia de la capacidad inmunomoduladora de las células tumorales. En trabajos previos, hemos demostrado una activación policlonal antígenoespecífica de los TIL mediante la secreción de un AcBisR con formato *diabody* por una línea celular humana no hematopoyética, previamente transfectada con el transgen de interés. El *diabody* biespecífico de doble cadena presenta especificidad frente a la cadena ϵ del complejo TCR-CD3 humano y frente al CEA humano (α CEA x α CD3).

El objetivo principal de este trabajo es diseñar una nueva estrategia antitumoral para conseguir la activación intratumoral específica de linfocitos T humanos a través de la secreción local de un *diabody* α CEA x α CD3. Para ello diseñamos un sistema de transferencia génica basado en vectores lentivirales derivados del VIH-1, que permitiera modificar *ex vivo* células primarias humanas. Como prueba de concepto, varias líneas celulares humanas de origen hematopoyético fueron modificadas genéticamente *ex vivo* para la producción del *diabody* α CEA x α CD3. Las líneas celulares linfocitarias T (CD3⁺) fueron las que secretaron de forma más eficiente el *diabody* α CEA x α CD3 en una forma funcionalmente activa. A continuación, linfocitos T humanos primarios, aislados de sangre periférica, fueron transducidos eficientemente y secretaron altos niveles de *diabody* funcional. En un modelo *in vivo*, los linfocitos T transducidos fueron coimplantados a nivel subcutáneo con una línea de carcinoma de colon humana CEA⁺ (HCT-116) y se observó una reducción significativa del crecimiento tumoral.

En resumen, estos resultados demuestran por primera vez el efecto terapéutico de linfocitos T humanos transducidos con un sistema de vectores lentivirales para la expresión sostenida de un AcBisR. Esta estrategia antitumoral constituye una alternativa prometedora a los protocolos de terapia génica para el tratamiento de tumores sólidos.

ORIGINAL ARTICLE

Inhibition of tumor growth *in vivo* by *in situ* secretion of bispecific anti-CEA × anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes

M Compte¹, B Blanco¹, F Serrano², ÁM Cuesta¹, L Sanz¹, A Bernad³, P Holliger⁴ and L Álvarez-Vallina¹

¹Molecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ²Tissue Bioengineering Multidisciplinary Unit, Fundación Hospital de Alcorcón, Madrid, Spain; ³Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain and ⁴Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

Infiltrating T lymphocytes are found in many malignancies, but they appear to be mostly anergic and do not attack the tumor, presumably because of defective T-cell activation events. Recently, we described a strategy for the tumor-specific polyclonal activation of tumor-resident T lymphocytes based on the *in situ* production of recombinant bispecific antibodies (bsAbs) by transfected nonhematological cell lines. Here, we have constructed a novel HIV-1-based lentiviral vector for efficient gene transduction into various human hematopoietic cell types. Several myelomonocytic and lymphocytic cell lines secreted the anti-carcinoembryonic antigen (CEA) × anti-CD3 diabody in a functionally active form with CD3⁺ T-cell lines being the most efficient secretors. Furthermore, primary human peripheral blood lymphocytes (PBLs) were also efficiently transduced and secreted high levels of functional diabody. Importantly gene-modified PBLs significantly reduced *in vivo* tumor growth rates in xenograft studies. These results demonstrate, for the first time, the utility of lentiviral vectors for sustained expression of recombinant bsAbs in human T lymphocytes. Such T lymphocytes, transduced *ex vivo* to secrete the activating diabody in autocrine fashion, may provide a promising route for a gene therapy strategy for solid human tumors.

Cancer Gene Therapy (2007) 14, 380–388. doi:10.1038/sj.cgt.7701021; published online 12 January 2007

Keywords: recombinant antibodies; T lymphocytes; tumor immunity

Introduction

The cellular arm of the immune system is the principal defense mechanism by which the body rejects foreign, infected or transformed tissue.¹ However, cell-based immunotherapy approaches have limitations. Most of the infiltrating lymphocytes are not prepared to confront the tumor as tumor cells themselves generally provide poor targets for immunological responses. In many cases, surface expression of major histocompatibility complex (MHC) molecules is downregulated or lost altogether and changes in peptide transporter or proteasome functions² provide for poor peptide display on the MHC. These observations have led to new approaches to try to redirect T-cell responses to important native antigens (Ags) expressed on the tumor cell surface. These include the

genetic manipulation of the recognition specificity of T lymphocytes by grafting the recognition specificity of an antibody (Ab) onto the signaling components of the TCR/CD3 complex to create a chimeric immune receptor (CIR)³ and the use of bispecific antibodies (bsAbs).⁴

BsAbs are nonnatural immunoglobulin-based molecules that contain two distinct binding specificities.⁴ BsAbs redirect or enhance effector activity of lymphocytes or phagocytes towards target cells by binding to cell activation molecules with one domain and to specific surface Ags on target cells with the other.⁵ The potential of bsAbs in cancer therapy has been extensively proved in a variety of *in vitro* and *in vivo* models, and several different bsAbs have been tested in clinical trials.⁴ Nevertheless, the therapeutic potential of exogenously administered bsAbs is limited by their short half-life and their poor accessibility to tumor sites. Moreover, systemic administration of bsAbs can also lead to serious side effects owing to the acute release of cytokines.⁶

These problems can be bypassed by the *in situ* production of bsAb molecules at the tumor site by cells that have preferential tumor-targeting properties.⁵ In fact, we have demonstrated proof-of-principle for a novel

Correspondence: Dr L Álvarez-Vallina, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro, San Martín de Porres 4, 28035 Madrid, Spain.

E-mail: lalvarezv.hpth@salud.madrid.org

Received 3 June 2006; revised 25 September 2006; accepted 18 November 2006; published online 12 January 2007

genetic strategy of T-cell activation by paracrine secretion of recombinant bsAbs.⁷ Bispecific α CEA (carcinoembryonic antigen) × α CD3 diabodies were secreted at high levels by transfected nonhematopoietic cell lines and were able to efficiently activate peripheral blood lymphocytes (PBLs) to proliferate and eliminate CEA-expressing tumor cells.

However, a strategy of autocrine secretion of recombinant antitumor diabodies by PBLs themselves would be preferable for clinical application. Such 'self-arming' T lymphocytes might be generated *ex vivo* but this will require a system for gene transduction that allows long-term, nontoxic gene expression in hematopoietic cells with tumor-homing ability. Here, we demonstrate that the diabody gene can be efficiently transduced into human PBLs by a lentiviral vector and that the gene modified lymphocytes secrete the α CEA × α CD3 diabody causing T-cell activation and tumor growth inhibition *in vivo*.

Materials and methods

Antibodies and reagents

The monoclonal antibodies (mAbs) used included: OKT3 (antihuman CD3 ϵ , Ortho Biotech, Bridgewater, NJ) Leu-28 (antihuman CD28, Beckton-Dickinson, San José, CA); 85A12 (antihuman CD66e; Serotec, Oxford, UK); and 9E10 (anti-myc, Sigma Biosciences, St Louis, MO). For direct staining, the following PE- or electron coupled dye (ECD)-conjugated antihuman CD3 ϵ (UCHT1), CD4 (SFC112T4D11), CD8 (B9.11), CD14 (RM052), CD19 (J4.119) and CD56 (NKH-1) mAbs (Beckman Coulter, Miami, FL) were used. Horse radish peroxidase-conjugated goat antimouse immunoglobulin (Ig)G (Fc specific) polyclonal Ab and human interleukin-2 (IL-2) were from Sigma Biosciences. Recombinant human fibronectin CH-296 fragment (Retronectin) was from Takara Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan).

Cells and culture conditions

HEK-293 (CRL-1573), 293T (CRL-11268) and HCT-116 (CCL-247) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum (FCS), (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD), referred as to DMEM complete medium (DCM). HeLa (CCL-2), Jurkat clone E6-1 (TIB-152), U937 (CRL-1593.2), Daudi (CCL-213) and K562 (CCL-243) cells were maintained in Rosewell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 (Invitrogen Life Technologies) supplemented with heat-inactivated 10% FCS, referred as to RPMI complete medium (RCM). The natural killer (NK)-92 cell line (CRL-2407) was cultured in RCM supplemented with IL-2 (150 UI/ml). All of these cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). HeLa^{CEA} cells¹⁹ were grown in RCM supplemented with 750 mg/ml G418 (Invitrogen Life Technologies). The human T-cell line MT-2 was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC 93121518) and was cultured in RCM. The Epstein-Barr virus-transformed human B cell T7527 was obtained from MR de Pablo (Department of Immunology, Hospital Universitario

Puerta de Hierro, Madrid, Spain) and was cultured in RCM. The NKL cell line²⁰ was obtained from E Martínez-Naves (Department of Immunology, Universidad Complutense, Madrid, Spain) and was cultured in RCM supplemented with 5% IL-2 (150 UI/ml).

Vector construction and preparation of lentiviral vector stocks

A HIV-derived four-plasmid system was kindly provided by D Trono (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Switzerland). The pMDLg/rev-responsive element (pRRE) plasmid encodes the HIV-1 *gag* and *pol* genes. The pRSVrev plasmid encodes the HIV-1 *rev* gene. The pMD.G plasmid encodes the vesicular stomatitis virus (VSV) G envelope protein. The transfer vector pRRL. Internal ribosomal entry site (IRES). Enhanced-green fluorescent protein (EGFP) contains a cytomegalovirus (CMV) promoter that drives an EGFP expression cassette. To construct this vector, the plasmid pRRLsin18.cPPT.hCMV.EGFP.Wpre²¹ was digested with *Bam*HI and *Sal*I to introduce an oligonucleotide pair (oligonucleotide 5'-GATCCGAATTCGGCCCG-3' and 5'-TCGACGGGCCCGAATTCG-3') carrying *Eco*RI and *Bsp*120I sites. The resulting plasmid pRRLsin.LINK was digested with *Bam*HI and *Bsp*120I to introduce the *Bam*HI/*Not*I fragment from plasmid pLZR.IRES.EGFP.²² To construct the plasmid pRRL.dAb.IRES.EGFP, the *Bgl*II-*Xho*I fragment derived from the plasmid pBEL3⁷ was ligated into the *Bam*HI/*Xho*I digested backbone of plasmid pRRL.IRES.EGFP. Lentiviral particles were produced by cotransfection of 293T cells through calcium phosphate precipitation. The cells (6×10^6) were transfected with 14.1 μ g of transducing vector (pRRL.IRES.EGFP or pRRL.dAb.IRES.EGFP), 9 μ g of pMDLg/pRRE, 3.45 μ g of pRSVrev and 4.71 μ g of pMD.G in the presence of 25 μ M chloroquine (Sigma Biosciences). The medium was replaced 8 h after transfection and then every 24 h for 2 days. Conditioned-medium was collected, passed through a 0.45 μ m-pore filter, ultracentrifugated (24,500 r.p.m. for 2 h), aliquoted and immediately frozen at -80°C .

Determination of vector titers

Biological titration of lentiviral vector preparations was performed in triplicate by serial dilutions of the vector stocks on 2.5×10^5 HeLa cells in 24-well plates. Forty-eight hours after transduction, the proportion of EGFP⁺ cells was determined flowcytometrically. The titers (transducing units, TU/ml), determined on the basis of fluorescence increase owing to the expression of EGFP as ((%positive cells × number of cells at the time of infection/100) × dilution factor), were in the range of 0.5×10^8 – 3×10^8 . Reverse-transcriptase activity in cell-free supernatant (SN) of infected cells was determined by HS-Lenti Kit-RT assay (Cavidi Tech AB, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's specifications.

Lentiviral transduction of human cell lines

Exponentially growing hematopoietic (MT-2, Jurkat, U937, K562, NKL, NK-92, Daudi and T7527) and nonhematopoietic (HeLa and 293T) target cells

(2.5×10^5) were incubated overnight in 24-well plates, with dilutions of vector stocks to give the indicated multiplicity of infection (MOI) in a final volume of 1 ml of their appropriate medium. Then the cells were washed and further cultured for 48 h. Cells were analyzed for expression of EGFP and supernatants were analyzed for α CEA \times α CD3 diabody by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fluorescence-activated cell sorting (FACS) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and Western blotting using anti-myc mAb. Recombinant α CEA \times α CD3 diabody was purified, as described,²³ from conditioned-medium from HEK 293 cells, stably transfected with an expression plasmid⁷ or from 293T cells transduced with dAb.EGFP-encoding lentiviral vector. A protease inhibitors cocktail (Sigma Biosciences) was added to the medium in order to reduce proteolysis. The medium was concentrated ($10 \times$) with a 10 000 MWCO Vivaflow 50 filter (Vivascience AG, Germany), dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and loaded onto a HisTrap HP 1 ml column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Lentiviral transduction of human primary PBLs

Human PBLs were isolated from the buffy coat fraction of healthy volunteers' peripheral blood by density-gradient centrifugation. Cells were stimulated with plastic immobilized anti-CD3 (100 ng/ml) and anti-CD28 (1 μ g/ml) mAbs in the presence of 50 U/ml IL-2, for 2–3 days. Afterwards, cells were placed in wells coated with Retronectin (10 μ g/cm²) and infected with EGFP or dAb-EGFP viral stocks (MOI = 20) for 4 h at 37°C and 5% CO₂. Half the medium was then replaced with fresh medium and cultures were incubated overnight at 37°C and 5% CO₂. The same procedure was repeated once again. After 48 h the cells were expanded for 3 additional days under the same conditions and then with 50 U/ml IL-2 for additional 7 days. The 3-day anti-CD3/anti-CD28 stimulation cycle was repeated every 7 days. The phenotype of PBLs before and after culture was determined by flow cytometry.

Flow cytometry

For phenotypic analysis cells were treated with appropriate dilutions of PE- and ECD-conjugated mAbs for 30 min at 4°C. Treatment with the relevant nonspecific PE- and ECD-conjugated Ab served as staining control. The expression of CD66e on HeLa, and HeLa^{CEA} cells and the binding of the secreted α CEA \times α CD3 diabody to CD3⁺ cells was studied as previously described.²⁴ As second-step reagents, anti-myc antibodies and fluorescein isothiocyanate-labeled goat antimouse IgG antibodies (Sigma BioSciences) were used. All samples were fixed in 2% formaldehyde and analyzed using an EPICS XL flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Acquisition was set for 10000 events per sample. Forward and side scatter are used to exclude debris and dead cells.

T-cell proliferation assay

Human PBLs infected with either EGFP (PBL^{EGFP}) or dAb.EGFP (PBL^{dAb.EGFP}) lentiviral vector stocks were

stimulated in triplicate at different effector/target (E/T) ratios either with CEA-negative (HeLa) or CEA-positive (HeLa^{CEA}) cells. Proliferation was analyzed by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Promega, Madison, WI).

Cytotoxicity assay

Pre-established monolayers of HeLa or HeLa^{CEA} target cells were cocultured with human PBLs infected with either EGFP (PBL^{EGFP}) or dAb.EGFP (PBL^{dAb.EGFP}) lentivirus. After 96 h the nonadherent cells were removed by washing with PBS. Adherent cells were fixed in 1% glutaraldehyde in PBS, stained with 0.1% crystal violet and examined under the microscope.

Animal studies

HCT-116 tumor cells (2×10^6 per animal) and EGFP or dAb-EGFP infected PBLs were mixed in a proportion of 1:1. The cells were mixed 2:1 (vol/vol) with Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA) and injected subcutaneously into the dorsal space of 5-week-old female athymic nude mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain). Tumor volumes were determined at various time-points; the formula: width² \times length \times 0.52 for approximating the volume of a spheroid was applied. All mice were handled in accordance with the guidelines of the Department of Health and Human Services.

Results

Construction of a tricistronic lentiviral vector for the expression of a bispecific α CEA \times α CD3 diabody

We generated the HIV-1-based lentiviral vector pRRL.dAb.IRES.EGFP (abbreviated as dAb.EGFP; Figure 1a) containing a bispecific α CEA \times α CD3 two-chain diabody.⁸ The genes of the tricistronic cassette (diabody chain 1 (VH_{MF23}-VL_{OKT3}), diabody chain 2 (VH_{OKT3}-VL_{MF23}.His6myc) and EGFP) were linked by two IRES sequences from the encephalomyocarditis virus (EMCV) and expression of the cassette was driven by the CMV promoter. The vector was pseudotyped by the VSV G envelope protein (VSV-G). It was found that dAb.EGFP can be packaged into lentiviral particles as efficiently as the control vector pRRL.IRES.EGFP (Figure 1b), as demonstrated by the high-titer vector preparations obtained for these vectors. The dAb.EGFP particles have RT-specific activity (435 pg/ml) comparable to that of EGFP virions (421 pg/ml).

Non-hematopoietic human 293T (data not show) and HeLa (Figure 2) cells were transduced (MOI = 10) with a single round of infection resulting in an increase in fluorescence and in the secretion of functional α CEA \times α CD3 diabody, as determined after 5 days by flow cytometry and ELISA. Large upstream open reading frames tended generally to reduce downstream gene expression,⁹ as seen by the lower EGFP expression (Figure 2a) in cells transduced with the two EMCV IRES vector (dAb.EGFP). Purified diabody from conditioned-medium from 293T cells transduced with dAb.EGFP was

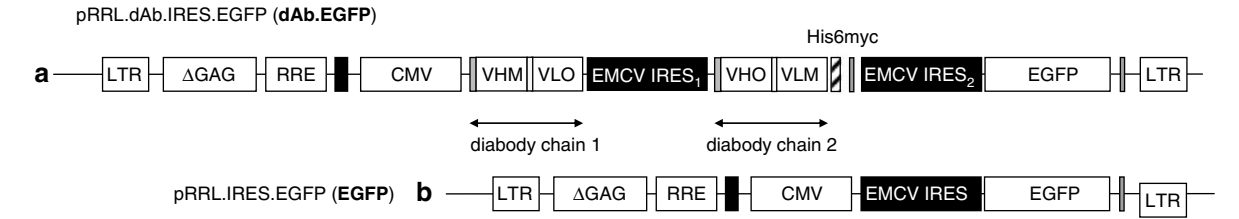


Figure 1 Schematic representation of lentiviral vector constructs. **(a)** Tricistronic vector (dAb.EGFP) containing both diabody chains 1 (VH_{MFE23}-VL_{Okt3}) and 2 (VH_{Okt3}-VL_{MFE23}), EGFP gene and two EMCV IRES sequences. **(b)** Control monocistronic vector containing only the EGFP sequence. His6myc tag appended for immunodetection. LTR, long terminal repeat; Δ GAG, ATG-deleted group-specific antigen; RRE, CMV promoter; EMCV IRES, encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site; EGFP, enhanced-green fluorescent protein.

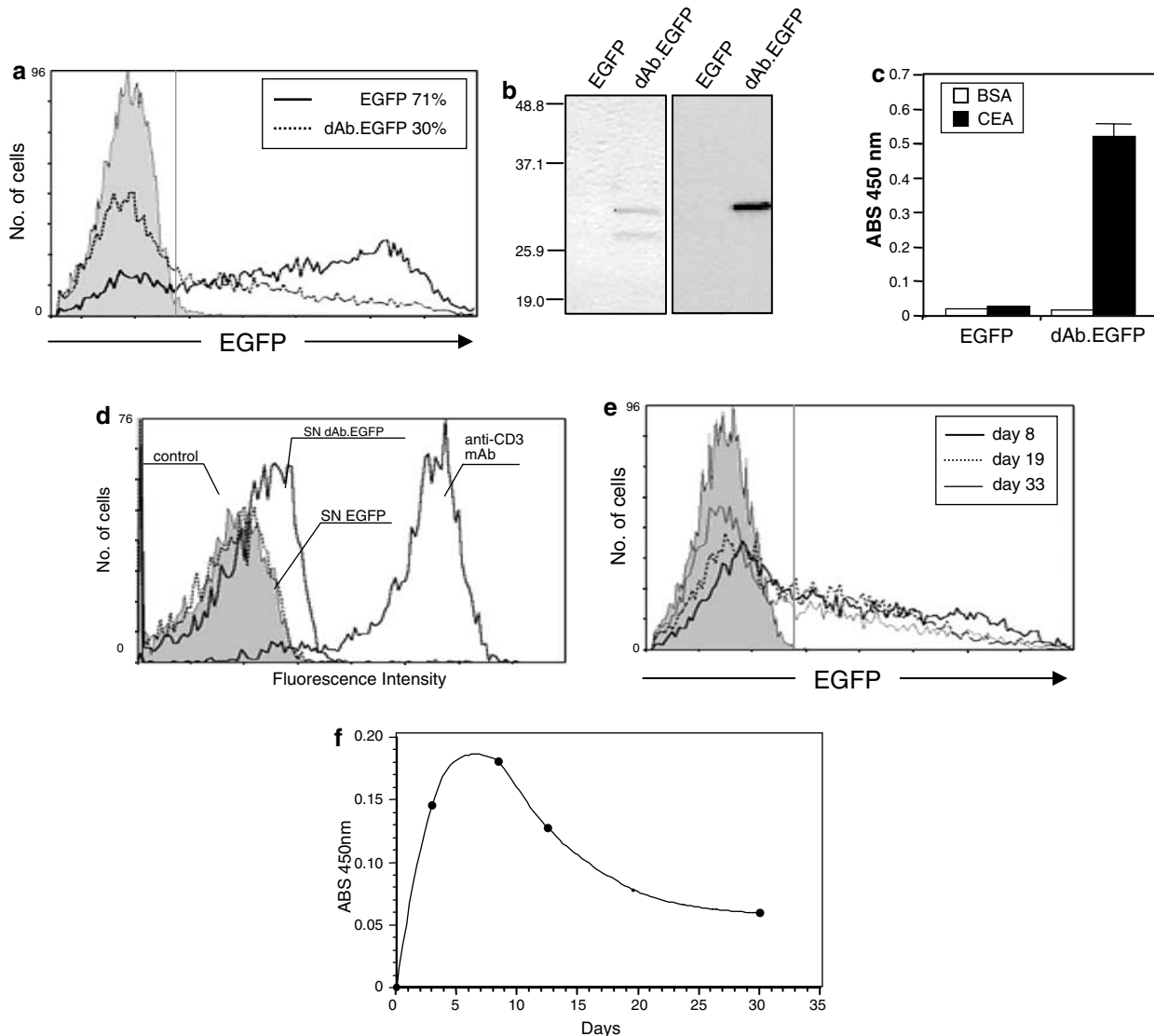


Figure 2 Transduction of human nonhematopoietic HeLa cells with EGFP and dAb.EGFP-encoding lentiviral vectors at a MOI of 10. **(a)** Analysis of EGFP expression and **(b-d)** secretion of α CEA \times α CD3 diabody into the cell culture SN 5 days after transduction. **(b)** Immobilized metal ion affinity chromatography-purified diabody was separated electrophoretically on a 12% polyacrylamide gel and either stained with Coomassie (left panel) or transferred to a membrane and detected with monoclonal anti-myc mAb (right panel). The functionality of secreted diabody was demonstrated by ELISA against plastic immobilized human CEA **(c)** and by FACS on CD3⁺ Jurkat cells **(d)**. Transgene expression stability in HeLa cells after infection with dAb.EGFP: analysis of EGFP expression **(e)** and secretion of α CEA \times α CD3 diabody **(f)**. One representative experiment out of three is shown.

analyzed by electrophoresis on 12% SDS-PAGE. Under these conditions, the diabody was resolved into two protein bands corresponding to the calculated Mr of 28 300 for chain 1 and 31 100 for chain 2 (Figure 2b, left panel). In the Western blot analysis, the anti-myc mAb detected the 31.1 kDa band corresponding to the myc-tagged chain 2 (Figure 2b right panel). Similar bands were found in conditioned-medium from HEK 293 cells stably transfected with an expression plasmid⁷ containing the α CEA \times α CD3 diabody (data not shown). In the cell culture supernatant of EGFP-transduced cells, no proteins were detected (Figure 2b). The secreted diabody recognized immobilized CEA, as determined by ELISA (Figure 2c) and bound specifically to the surface of CD3⁺ cells, as assessed by flow cytometry (Figure 2d).

The percentage of transduced cells and the level of diabody secretion decreased in both cell lines with decreasing MOI (data not shown). Reductions in the levels of EGFP expression (Figure 2e) and diabody secretion (Figure 2f) between days 8 and 15 were observed. The reduction was not associated with cell death, suggesting that toxicity is not a major cause for the

loss in transduced cells. Haas *et al.* showed that after transduction with HIV-1 vectors, the contribution of episomal, nonintegrated vector forms and pseudotransduction of EGFP positivity was undetectable by 14 days post-transduction.¹⁰ Functional diabody was detectable in conditioned-medium from cells grown for several weeks with little difference between days 15 and 30 (Figure 2f).

Transduction of human hematopoietic cell lines

We compared a panel of hematopoietic cell lines for efficiency of transduction by the dAb.EGFP lentiviral vector. At a MOI of 10, after one single round of infection, the erythromyeloid cell line K562, the myeloid cell line U937, the B cell lines Daudi and T7527 (EBV-LCL), the NK cell lines NKL and NK-92 and the T-cell lines Jurkat and MT-2 were transduced, at levels ranging from 7 to 71% EGFP⁺ cells (Figure 3a). Secretion of α CEA \times α CD3 diabody into the cell culture supernatant was assayed 5 days after transduction. Diabody activity was detectable in the conditioned-culture supernatant of all cell lines tested, with the highest level obtained in T-cell

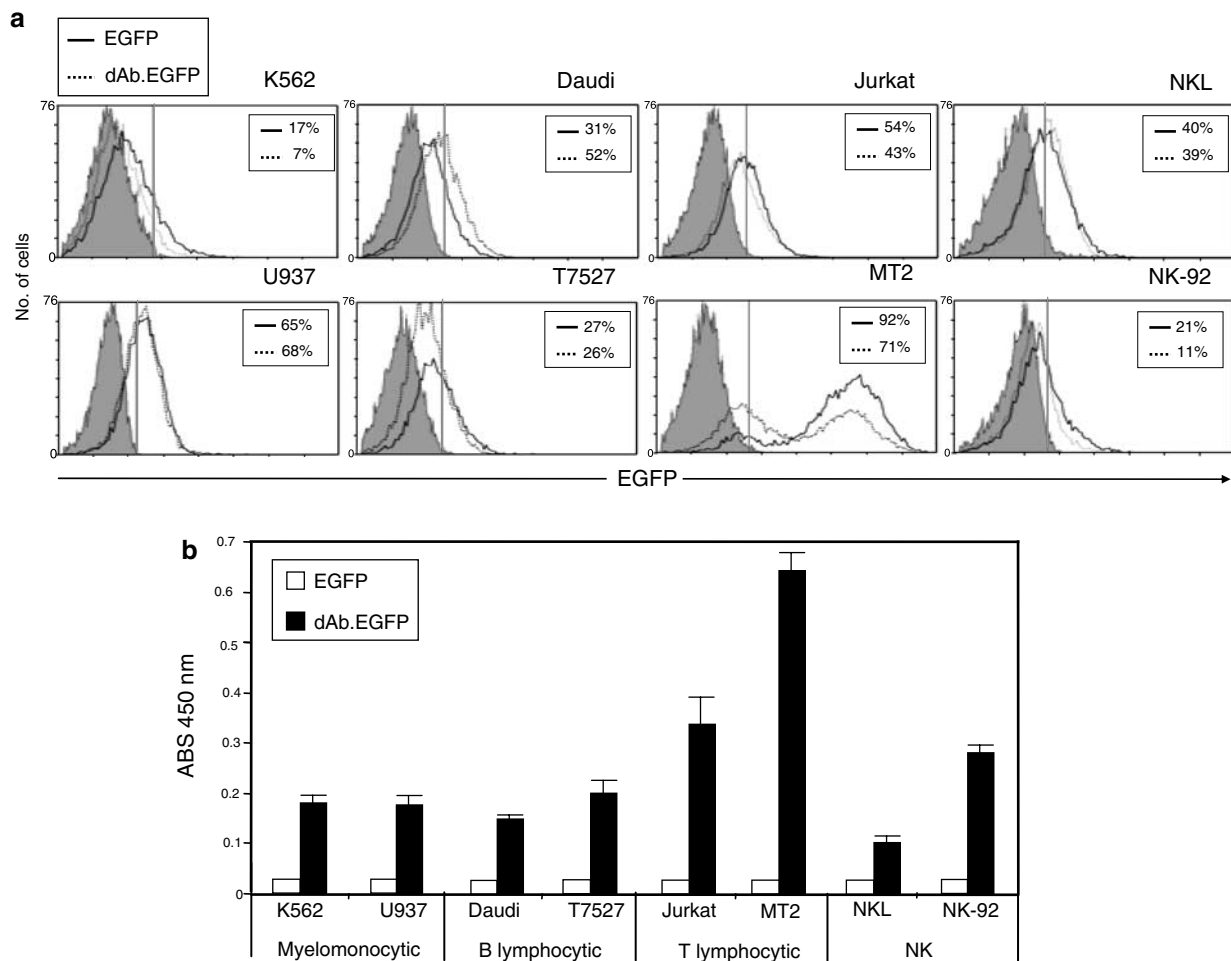


Figure 3 Transduction of human hematopoietic cell lines with EGFP and dAb.EGFP lentivirus at a MOI of 10. (a) Analysis of EGFP expression and (b) secretion of α CEA \times α CD3 diabody into the cell culture supernatant 5 days after infection.

lines (Figure 3b). These results are not concordant with our previous observations in T-cell lines stably transfected with plasmid DNA,⁷ where no α CEA \times α CD3 activity was detected in conditioned-culture supernatant. The difference could be attributable to variations in the relative levels of diabody gene expression obtained with viral and nonviral systems. Cells transfected with EGFP vectors did not produce any detectable α CEA \times α CD3 diabody lines (Figure 3b). The gene-modified T-cell lines produced biologically active diabody in a dose-dependent (MOI) manner (data not shown) and the expression was stable for several weeks (data not shown).

Transduction of human PBLs

Human PBLs obtained from healthy donors were cultured in the presence of anti-CD3 mAb, anti-CD28 mAb and IL-2, and either mock-transduced or transduced with EGFP or dAb.EGFP lentivirus at an MOI of 20. Flow cytometric analysis (Figure 4) revealed a mean of 25% (range 16–35%) of EGFP⁺ cells. Interestingly, most EGFP fluorescence was associated with

CD3⁺CD4⁺CD56⁻ cells. The number of EGFP⁺CD8⁺ lymphocytes was significantly lower. EGFP expression was maintained for at least 30 days in culture (Figure 4c). Functional α CEA \times α CD3 diabody was detected in conditioned-medium from PBLs infected with dAb.EGFP (Figure 4d and e), ranging from 1 μ g/ml \times 10⁵ cells/72 h at day 7 to 0.6 μ g/ml \times 10⁵ cells/72 h at day 30. The secreted α CEA \times α CD3 diabody had the expected molecular weight (Figure 4f) and showed high stability under physiological conditions (data not shown).

Lymphocyte activation and induction of cytotoxicity

To assess the effectiveness of locally secreted α CEA \times α CD3 diabody in providing activation signals from cellular antigen to primary T lymphocytes, PBLs infected with either EGFP (PBL^{EGFP}) or dAb.EGFP (PBL^{dAb.EGFP}) lentiviral vectors were cocultured with CEA⁻ (HeLa; Figure 5a, inset) or CEA⁺ (HeLa^{CEA}; Figure 5b, inset) cells. In an MTT proliferation assay, the secreted α CEA \times α CD3 diabody induced proliferation of T cells only in the presence of CEA-expressing cancer cells

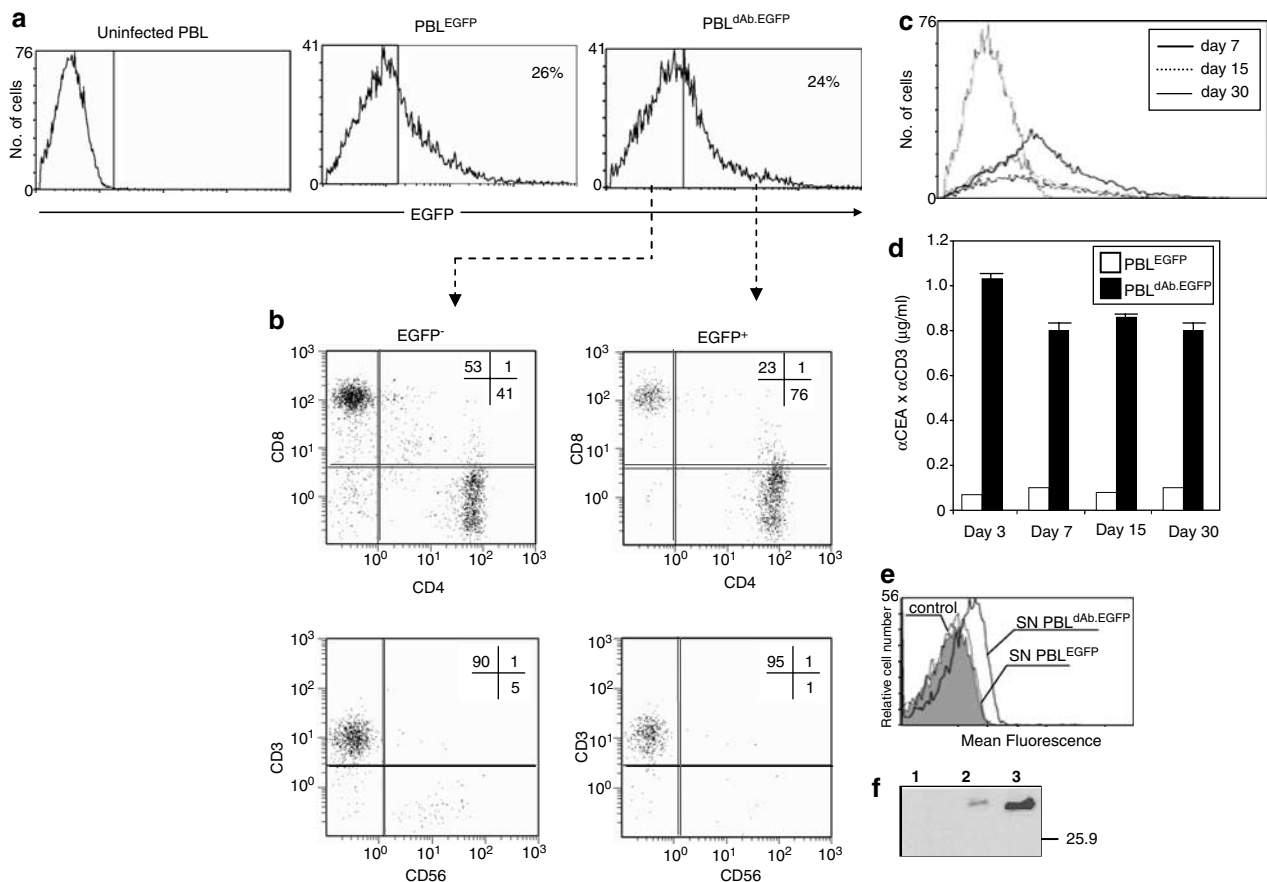


Figure 4 Transduction of human PBLs with EGFP and dAb.EGFP lentivirus. (a) Analysis of EGFP expression 7 days after mock, EGFP or dAb.EGFP transduction at a MOI of 20. (b) Phenotypic analysis on PBLs infected with dAb.EGFP. Cells were gated on EGFP⁻ or gated on EGFP⁺. (c,d) Transgene expression stability in PBLs after infection with dAb.EGFP: analysis of EGFP expression (c) and secretion of α CEA \times α CD3 diabody (d,e). The functionality of secreted diabody was demonstrated by ELISA against plastic immobilized human CEA (d) and by FACS analysis of CD3⁺ Jurkat cells (e). Western blot analysis of secreted α CEA \times α CD3 diabody (f) either by EGFP - (1) or dAb.EGFP-infected (2) PBLs. Lane 3, recombinant diabody purified from conditioned-SN from HEK 293 cells. The blot was developed with an anti-myc mAb.

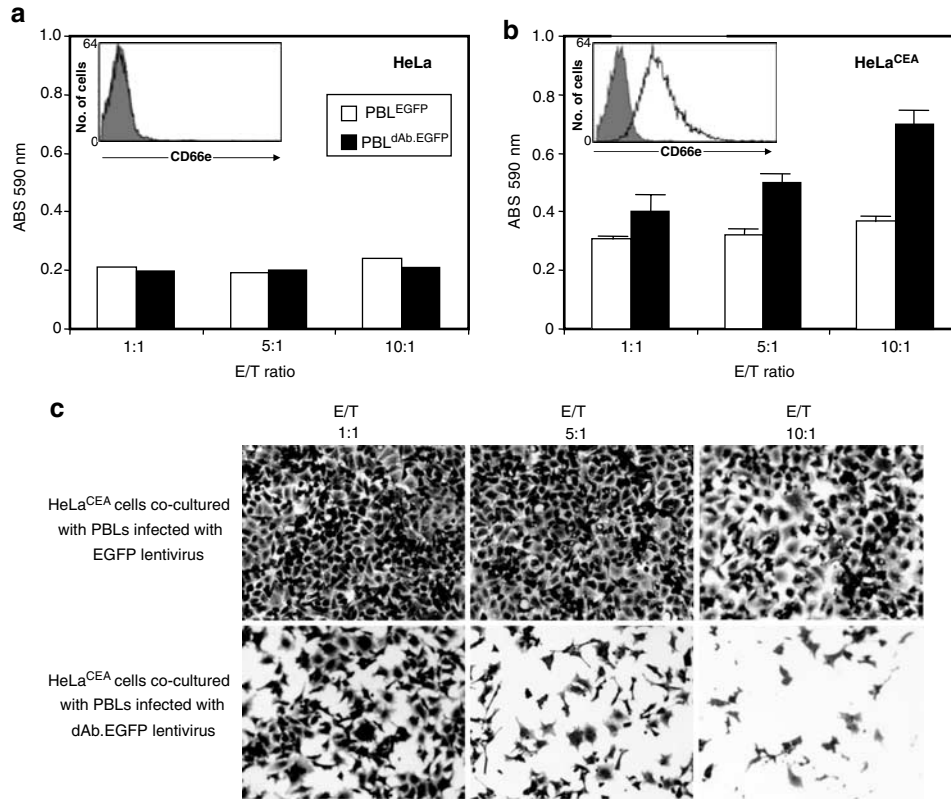


Figure 5 Induction of T-cell proliferation and target cell lysis by secreted α CEA \times α CD3 diabody. (a,b) Standard MTT assay for cell proliferation with human PBLs infected with either EGFP (PBL^{EGFP}) or dAb.EGFP (PBL^{dAb.EGFP}) lentivirus cocultured at different effector/target E/T ratios either with CEA-negative HeLa (a) or CEA-positive HeLa^{CEA} (b) cells. Cell surface expression of CEA (CD66e) on HeLa (inset Figure 5a) and HeLa^{CEA} (inset Figure 5b) cells. Specific target-cell lysis by human PBLs infected with either EGFP (PBL^{EGFP}) or dAb.EGFP (PBL^{dAb.EGFP}) lentivirus cocultured at different E/T ratios with HeLa^{CEA} cells (c) After 96 h, adherent cells were fixed, stained with crystal violet and photographed.

(Figure 5b). In the presence of CEA⁻ cells, the secreted diabody exerted no proliferative stimulus (Figure 5a). In order to investigate the ability of α CEA \times α CD3 diabody to induce tumor cell lysis, CEA⁻ or CEA⁺ target cells were cocultivated with either PBL^{EGFP} or PBL^{dAb.EGFP} cells. PBLs infected with dAb.EGFP cells exhibited strong cytotoxic activity to CEA⁺ cells. No cytotoxic activity was achieved after cocultivation with PBL^{EGFP} cells or when nonexpressing CEA cell lines were used as targets (Figure 5c).

Antitumor effect of locally produced α CEA \times α CD3 diabody

To study the *in vivo* antitumor activity of diabody molecules secreted by PBLs infected with dAb.EGFP lentivirus, we established a xenotransplant model of the human colon carcinoma CEA⁺ cell line HCT-116. Mice were injected in the subcutaneous dorsal space with a mixture (1:1) of tumor cells and PBL^{EGFP} or PBL^{dAb.EGFP}. A control group received only HCT-116 cells and PBS instead of lymphocytes. Tumor cells mixed with α CEA \times α CD3 diabody-producing PBLs exhibited consistently slower growth rate and showed statistically significant difference in tumor volume compare to the

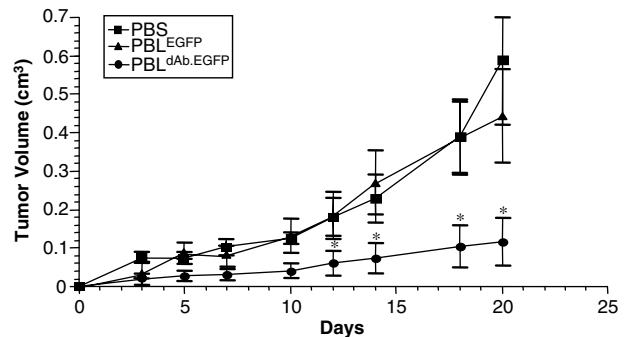


Figure 6 Inhibition of tumor growth by locally produced α CEA \times α CD3 diabody. Groups of four athymic nude mice were subcutaneously injected with a mixture of 2×10^6 human colon carcinoma HCT-116 cells and 2×10^6 human PBLs infected with either EGFP (PBL^{EGFP}) or dAb.EGFP (PBL^{dAb.EGFP}) lentiviral vector stocks at an MOI of 20. Mean tumor volume and s.e.m. are shown for each time. The statistical significance of differences between groups was computed using the Student's *t*-test ($*P \leq 0.05$).

other groups (Figure 6). On the other hand, PBLs infected with EGFP lentiviral vectors demonstrated no therapeutic effect (Figure 6).

Discussion

In vivo production of therapeutic Abs by genetically engineered cells may advantageously replace injection of purified Abs in cancer treatment.⁶ *In situ* expression potentially circumvents problems of tumor penetration, short serum half-life and even poor specificity. The feasibility of *in vivo* production and systemic delivery of Abs by different cells has now been demonstrated using different techniques, such as *ex vivo* genetically modified autologous cells and *in vivo* gene transfer using viral vectors.⁵ Indeed, *in vivo* secretion of either single-chain Ab fragments (scFv) or bispecific diabodies reduced tumor growth in mice.^{7,11,12} We have shown that human cells can be genetically modified to secrete functionally active α CEA \times α CD3 diabody enabling primary T lymphocytes to proliferate and kill CEA-expressing human cancer cells.⁷

This study was designed to evaluate lentiviral gene transfer for long-term stable expression of a bispecific diabody in primary human hematopoietic cells. Lentiviral vectors can deliver large transgene sequences to a variety of dividing and nondividing cells, including early progenitors and terminally differentiated cells such as macrophages and lymphocytes.¹³ In addition, lentiviral vectors promise to be of lower risk for insertional oncogenesis than conventional oncoretroviral vectors.¹⁴ Therefore, we constructed a polycistronic HIV-1-based vector expressing an α CEA \times α CD3 two-chain diabody and the EGFP via IRESs. We first transduced different hematopoietic cell lines with the diabody-encoding vector. In all hematopoietic cell lines tested, secretion of functional diabody was detected. Interestingly, T-cell lines were shown to secrete the highest levels of α CEA \times α CD3 diabody. The differences in diabody secretion between transduced hematopoietic cell lines appeared to depend more on the transduction efficacy than on factors related to the cell lineage.

The transduction efficiency of PBLs with the VSV-G pseudotyped HIV vector increased linearly with increasing MOIs to a maximum of approximately 35% at an MOI of 20. VSV-G pseudotyped lentivirus present significant advantages in that VSV-G receptor is ubiquitously expressed, giving the vector a broad host-cell range.^{15–18} However, we found that most transduced EGFP-positive cells were CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes the primary hosts for HIV. Functional α CEA \times α CD3 diabodies were detectable in conditioned-medium from lentivirus infected PBL grown for several weeks. The level reached was sufficient to efficiently activate primary T cells to proliferate and eliminate CEA-expressing tumor cells *in vivo*. Intratumoral secretion of α CEA \times α CD3 diabodies by gene-modified PBLs significantly reduced the disease burden in an antigen-specific manner. This result is encouraging as it suggest that fewer cells may be required in a clinical situation.

In addition to representing one-step treatment, this approach represent an attractive method for easy, inexpensive and efficient long-term *in vivo* production of the activating diabody. Furthermore, the highly tumor-

site-restricted activation and induction of T-cell cytotoxicity would decrease toxicity inherent to systemic T-cell activation and increase tumoricidal activity by focusing it on the tumor site. Autocrine secretion of tumor-specific diabodies by tumor-infiltrating T lymphocytes offers advantages over current antigen-selective strategies (e.g. systemic administration of purified BsAb and the grafting of T lymphocytes with CIR genes). Prolonged *in situ* expression of diabody molecules would provide time for tumor-resident T lymphocytes to proliferate and attack the tumor. Recruitment is not restricted to gene-modified cells (e.g. in the CIR approach). The recruitment of both gene-modified (*cis*-recruitment) and nonmodified (*trans*-recruitment) targeted effectors, present at the tumor site, would amplify the effector response.

In conclusion, in this study we demonstrate for the first time the usefulness of HIV-1-based lentiviral vectors for sustained expression of recombinant bispecific diabody in human primary peripheral blood T lymphocytes and open the way for a new cancer gene therapy strategy. The use of a single-cell population as producer and effector will significantly simplify their development and bodes well for an application in a clinical setting.

Acknowledgements

We thank Eduardo Martinez-Naves (Universidad Complutense de Madrid), Rosario de Pablo (Hospital Universitario Puerta de Hierro) and Didier Trono (University of Geneva) for providing reagents, and Isabel Millán (Hospital Universitario Puerta de Hierro) for statistical analysis. This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (02/1144), the Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0214/2004) and the Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-04794) to LA-V. BB was supported by a Comunidad Autónoma de Madrid training grant 01/0369/2000. LS is investigator from the Ramon y Cajal Program (Ministerio de Educación y Ciencia).

References

- 1 Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Rieber EP. Advances in cancer immunotherapy. *Immunol Today* 1999; **20**: 63–65.
- 2 Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 1995; **16**: 487–494.
- 3 Alvarez-Vallina L, Hawkins RE. Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 2304–2309.
- 4 Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1999; **11**: 558–562.
- 5 Sanz L, Blanco B, Alvarez-Vallina L. Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol* 2004; **25**: 85–91.
- 6 Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005; **23**: 1126–1136.

- 7 Blanco B, Holliger P, Vile RG, Alvarez-Vallina L. Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells. *J Immunol* 2003; **171**: 1070–1077.
- 8 Holliger P, Manzke O, Span M, Hawkins R, Fleischmann B, Qinghua L *et al*. Carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell activation in colon carcinoma induced by anti-CD3 × anti-CEA bispecific diabodies and B7 × anti-CEA bispecific fusion proteins. *Cancer Res* 1999; **59**: 2909–2916.
- 9 Coleman HM, Brierley I, Stevenson PG. An internal ribosome entry site directs translation of the murine gammaherpesvirus 68 MK3 open reading frame. *J Virol* 2003; **77**: 13093–13105.
- 10 Haas DL, Case SS, Crooks GM, Kohn DB. Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000; **2**: 71–80.
- 11 Afanasieva TA, Wittmer M, Vitaliti A, Ajmo M, Neri D, Klemenz R. Single-chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther* 2003; **10**: 1850–1859.
- 12 Sanz L, Kristensen P, Blanco B, Facticeau S, Russell SJ, Winter G *et al*. Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by *in situ* production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Therapy* 2002; **9**: 1049–1053.
- 13 Ailles LE, Naldini L. HIV-1-derived lentiviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; **261**: 31–52.
- 14 Lu X, Humeau L, Slepushkin V, Binder G, Yu Q, Slepushkina T *et al*. Safe two-plasmid production for the first clinical lentivirus vector that achieves >99% transduction in primary cells using a one-step protocol. *J Gene Med* 2004; **6**: 963–973.
- 15 Schlegel R, Tralka TS, Willingham MC, Pastan I. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 1983; **32**: 639–646.
- 16 Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS. High-efficiency gene transfer into CD34⁺ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 1996; **70**: 2581–2585.
- 17 Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH *et al*. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; **272**: 263–267.
- 18 Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M. Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 15266–15271.
- 19 Hefta LJ, Chen FS, Ronk M, Sauter SL, Sarin V, Oikawa S *et al*. Expression of carcinoembryonic antigen and its predicted immunoglobulin-like domains in HeLa cells for epitope analysis. *Cancer Res* 1992; **52**: 5647–5655.
- 20 Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* 1996; **24**: 406–415.
- 21 Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D *et al*. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998; **72**: 8463–8471.
- 22 Larcher F, Del Rio M, Serrano F, Segovia JC, Ramirez A, Meana A *et al*. A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts. *FASEB J* 2001; **15**: 1529–1538.
- 23 Sanchez-Arevalo LV, Cuesta AM, Sanz L, Compte M, Garcia P, Prieto J *et al*. Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. *Int J Cancer* 2006; **119**: 455–462.
- 24 Blanco B, Holliger P, Alvarez-Vallina L. Autocrine costimulation: tumor-specific CD28-mediated costimulation of T cells by *in situ* production of a bifunctional B7-anti-CEA diabody fusion protein. *Cancer Gene Therapy* 2002; **9**: 275–281.

Reproduced with permission of the copyright owner. Further reproduction prohibited without permission.

Artículo N°2: Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds. Stem Cells. (2009) 27:753-760.

Resumen

Las células progenitoras MSC tienen un gran potencial como vehículos celulares en terapia génica debido a la gran facilidad con la que se expanden y transducen. Sin embargo, el uso de MSC localizadas en la proximidad del área tumoral puede plantear ciertos riesgos debido a su capacidad inmunomoduladora y a sus propiedades proangiogénicas. Por esta razón, hemos diseñado estrategias basadas en el confinamiento de las MSC en localizaciones distantes al depósito tumoral, generando lo que denominamos *organoides*. En este modelo, la proteína terapéutica secretada a nivel local por las MSC, previamente modificadas, debería alcanzar el torrente circulatorio para poder actuar sobre el tumor.

Para comprobar la viabilidad de las MSC confinadas en los *organoides*, las células fueron modificadas genéticamente para la expresión del gen reportero de la luciferasa (MSC^{Luc}), y embebidas en una matriz extracelular sintética (sECM) de consistencia hidrogel para la generación de un *organoide control* o *centinela*. Dicho *organoide* fue implantado vía subcutánea en el área ventral de ratones inmunodeficientes y su viabilidad evaluada mediante ensayos de bioluminiscencia *in vivo* durante más de 40 días. A continuación, MSC modificadas genéticamente para la expresión de un *diabody* α CEA x α CD3 (MSC^{dAb}) fueron embebidas en la sECM para la generación de un *organoide terapéutico* e implantadas en el área ventral contralateral al *organoide centinela*. La funcionalidad del *organoide terapéutico* se demostró comprobando los niveles séricos de *diabody* α CEA x α CD3.

El efecto terapéutico del *diabody* producido por el *organoide terapéutico* se estudió en un modelo de xenotrasplante humano en el que ratones inmunodeficientes fueron inoculados por vía subcutánea con células de carcinoma de colon humano CEA⁺ (HCT-116). Tras la administración intravenosa de linfocitos T humanos primarios, se comprobó que el *diabody* α CEA x α CD3 era capaz de activar específicamente los linfocitos T humanos e inducir la lisis de las células tumorales. Como consecuencia, en el grupo de ratones que recibió el *organoide terapéutico* se observó una disminución del crecimiento tumoral estadísticamente significativa con respecto al del grupo control, que únicamente recibió el *organoide centinela*.

En resumen, demostramos por primera vez que MSC humanas modificadas genéticamente para la secreción de un *diabody* biespecífico, embebidas en una sECM para la generación de un *organoide terapéutico* e implantadas en una localización distante del tumor, inducen una respuesta antitumoral eficiente.

Tumor Immunotherapy Using Gene-Modified Human Mesenchymal Stem Cells Loaded into Synthetic Extracellular Matrix Scaffolds

MARTA COMPTE,^a ÁNGEL M. CUESTA,^a DAVID SÁNCHEZ-MARTÍN,^a VANESA ALONSO-CAMINO,^a JOSÉ LUÍS VICARIO,^b LAURA SANZ,^a LUÍS ÁLVAREZ-VALLINA^a

^aMolecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ^bHistocompatibility Department, Centro de Transfusión, Madrid, Spain

Key Words. Mesenchymal stem cell • Cancer • Immunotherapy • Gene therapy

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are appealing as gene therapy cell vehicles given their ease of expansion and transduction. However, MSCs exhibit immunomodulatory and proangiogenic properties that may pose a risk in their use in anticancer therapy. For this reason, we looked for a strategy to confine MSCs to a determined location, compatible with a clinical application. Human MSCs genetically modified to express luciferase (MSC^{luc}), seeded in a synthetic extracellular matrix (sECM) scaffold (sentinel scaffold) and injected subcutaneously in immunodeficient mice, persisted for more than 40 days, as assessed by bioluminescence imaging in vivo. MSCs modified to express a bispecific α -carcinoembryonic antigen (α CEA)/ α CD3 diabody (MSC^{dAb}) and seeded in an sECM scaffold (therapeutic scaffolds) supported the release

of functional diabody into the bloodstream at detectable levels for at least 6 weeks after implantation. Furthermore, when therapeutic scaffolds were implanted into CEA-positive human colon cancer xenograft-bearing mice and human T lymphocytes were subsequently transferred, circulating α CEA/ α CD3 diabody activated T cells and promoted tumor cell lysis. Reduction of tumor growth in MSC^{dAb}-treated mice was statistically significant compared with animals that only received MSC^{luc}. In summary, we report here for the first time that human MSCs genetically engineered to secrete a bispecific diabody, seeded in an sECM scaffold and implanted in a location distant from the primary tumor, induce an effective antitumor response and tumor regression. *STEM CELLS* 2009;27:753–760

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent adult stem cells of mesodermal origin localized within the bone marrow compartment. MSCs have generated a great deal of interest for their potential use in regenerative medicine and tissue engineering because of the ease of their isolation and their extensive expansion rate and differentiation potential. MSCs have been used for tissue repair, including cerebral and spinal cord injury, bone damage, myocardial ischemia/infarction, and muscular dystrophy; in the engraftment of hematopoietic stem cells (HSCs); and in the reduction of graft-versus-host disease [1, 2].

Furthermore, MSCs can be easily transduced with viral vectors to be used as cellular vehicles in gene therapy protocols [3]. The extended life span of MSCs makes them especially interesting as cell factories for the production of therapeutic proteins. In cancer therapy approaches, MSCs have been used for tumor delivery of immunostimulatory cytokines

and chemokines (interferon [IFN]- α [4], IFN- β [5–8], interleukin [IL]-2 [9], IL-12 [10, 11], and CX3CL1 [12]), suicide genes (thymidine kinase [13] and cytosine deaminase [14]), growth factor antagonists (NK4) [15], and oncolytic viruses [16, 17] after systemic administration, taking advantage of their tumor-homing capacities, or by intratumoral inoculation.

However, recent evidence also suggests that they could play a role in tumor growth and metastasis [18]. The immunosuppressive [19–22] and proangiogenic properties [23] of MSCs may be responsible, at least in part, for their effects on cancer development. This implies a potential risk in the use of MSCs in cell-based anticancer therapies [24], especially when MSCs are inoculated in the vicinity of tumor cells or allowed to migrate toward them.

In fact, for strategies where cells are used as therapeutic factories, their ability to disseminate throughout the body is not required, or is even undesirable. Producer cells can be confined to scaffolds that keep cells at the implantation site, although the therapeutic protein may act at distance if secreted into circulation [25]. Subcutaneous delivery of MSCs

Author contributions: M.C.: collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; Á.M.C., D.S.-M., and V.A.C.: collection and/or assembly of data; J.L.V.: provision of study material or patients; L.S.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing; L.Á.-V.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, final approval of manuscript.

Correspondence: Luí́s Álvarez-Vallina, M.D., Ph.D., Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Joaquín Rodrigo 2, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain. Telephone/Fax: 34-911916764; e-mail: lalvarezv.hpth@salud.madrid.org; or Laura Sanz, M.D., Ph.D., Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Joaquín Rodrigo 2, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain. Telephone/Fax: 34-911917764; e-mail: lsanz.hpth@salud.madrid.org Received August 28, 2008; accepted for publication November 28, 2008; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* December 18, 2008. © AlphaMed Press 1066-5099/2009/\$30.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2008-0831

would provide an easily accessible implant that could be retrieved once the therapeutic effect is fulfilled. It has been reported that matrix-embedded MSCs, genetically modified to produce erythropoietin (EPO) and subcutaneously inoculated in a mouse model of anemia, supported the release of the protein into the bloodstream for a sustained pharmacological effect [26, 27].

Recently, this approach was used in a breast cancer model for the delivery of IL-12 by murine MSCs embedded in a bovine collagen-based matrix [28]. Interestingly, even though plasma of mice that received the IL-12 MSC-containing subcutaneous implants showed increased levels of IL-12, there was no therapeutic effect when IL-12 MSCs were not administered in the same location as tumor cells. This requirement poses a clear limitation for the translation of this approach to a clinical setting and implies the risk of potential MSC contribution to tumor growth.

In previous works we have demonstrated the antitumoral effect of a bispecific anticarcinoembryonic antigen (α -CEA) \times anti-CD3 (α CD3) diabody secreted in autocrine fashion by gene modified human primary T lymphocytes. Secreted α CEA/ α CD3 diabody on tumor site induced T-cell activation and tumor growth inhibition *in vivo* [29, 30]. However, the short life span of activated human T lymphocytes and their inefficient transduction constitute important drawbacks for their application in cancer therapy. Alternatively, we decided to explore the potential of human MSCs as diabody producer cells in a human tumor xenograft. First, we studied the immunomodulatory properties of MSCs in our model to rule out any counterproductive effect. Conditioned medium from MSCs inhibited T-cell proliferation *in vitro*, and what is more, coimplantation of tumor cells and MSCs significantly promoted tumor growth *in vivo*. To avoid any contact with immune effectors or tumor cells, diabody-producing MSCs were embedded in a nonimmunogenic synthetic extracellular matrix (sECM) scaffold and inoculated in the ventral subcutaneous space of nude mice. Diabody was released into the bloodstream at detectable levels and inhibited the growth of human cancer cells subcutaneously inoculated in the dorsal region in the presence of systemically administered human T lymphocytes. In summary, we report here for the first time the use of human MSCs genetically engineered for the production of a bispecific diabody, seeded in an sECM scaffold and subcutaneously implanted in immunodeficient mice, to demonstrate the systemic antitumoral effect of a therapeutic antibody locally produced.

MATERIALS AND METHODS

Human Mesenchymal Stem Cells Isolation and Culture Conditions

Human MSCs were obtained from bone marrow samples from healthy donors after informed consent. MSCs were purified and expanded as previously described [21]. Purity of MSCs was tested by flow cytometry on a Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter, Hialeah, FL, <http://www.beckmancoulter.com>) using the following monoclonal antibodies (mAbs): CD45-ECD (clone J33), CD31-fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone 5.6E), CD34-PC5 (clone 581), CD90-PE (clone Thy1/310) (Beckman Coulter), major histocompatibility complex (MHC)-class I-FITC (clone W6/32), CD14-FITC (clone UCHM-1) (both from Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>), CD13-PE (clone L138), CD73-PE (clone AD2) (both from BD Biosciences, Erembodegen, Belgium, <http://www.bdbiosciences.com>), and CD105-PE (clone SN6) (eBioscience Inc., San Diego, [\[www.ebioscience.com\]\(http://www.ebioscience.com\)\). MSCs were used for experiments between the third and fourth passages.](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Human Hematopoietic Stem Cells Isolation and Culture Conditions

Human HSCs were obtained from umbilical cord blood with informed consent and processed within 24 hours. Mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation. CD34⁺ cell subpopulation was isolated using the MultiSort MicroBeads conjugated to anti-human CD34 mAb (clone QBEND/10) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, <http://www.miltenyibiotec.com>) according to the manufacturer's instructions. Cells were stained with the following mAbs: CD38-FITC (clone HIT2) (Immunotools, Friesoythe, Germany), CD133-PE (clone AC133) (Miltenyi Biotec), CD45-ECD (clone J33), and CD34-PC5 (clone 581) (both obtained from Immunotech), and analyzed by flow cytometry. Approximately 5×10^4 HSCs were cultured in 24-well plates with StemSpan SFEM Medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada, <http://www.stemcell.com>) supplemented with a cytokine cocktail consisting of 50 ng/ml thrombopoietin, 20 ng/ml interleukin-6, 50 ng/ml stem cell factor, and 50 ng/ml flk-2/flt3 ligand (all recombinant human cytokines were from Peprotech, London, <http://www.peprotech.com>).

Human Primary Peripheral Blood Lymphocytes Isolation and In Vitro Expansion

Human peripheral blood lymphocytes (PBLs) were isolated from healthy donors peripheral blood by density gradient centrifugation. Cells were expanded with Dynabeads CD3/CD28 (DynaL Biotech, Oslo, Norway, <http://www.invitrogen.com/dynal>) according to the manufacturer's instructions, in the presence of 100 U/ml interleukin-2 (Sigma-Aldrich). The phenotype of PBLs before and after culture was determined by flow cytometry using the following mAbs: CD45-FITC (clone B3821F4A), CD4-RD1 (clone SFC112T4D11), CD8-ECD (clone SFC121Thy2D3), CD3PC5 (clone UCHT1) (Beckman Coulter), and CD56-PE (clone NCAM16.2) (BD Biosciences).

Cell Lines

HEK-293 (human embryo kidney epithelia; CRL-1573) and its derivative 293T (CRL-11268) cells, HCT-116 (human colon carcinoma; CCL-247), HeLa (human cervix adenocarcinoma; CCL-2), and IMR90 (human lung fibroblast; CCL-186) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, and penicillin/streptomycin (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>). All of these cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, <http://www.atcc.org>). The HeLa^{CEA} cell line [31] was cultured in medium containing 750 μ g/ml G418 (Promega, Madison, WI, <http://www.promega.com>).

Lentiviral Vectors and Cell Transduction

The transfer vector pRRL-IRES-EGFP contains a cytomegalovirus promoter that drives an enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression cassette, the vector pRRL.dAb.EGFP drives the expression of a bispecific α CEA/ α CD3 diabody and EGFP, and the vector pRRL-Luc-IRES-EGFP drives the expression of luciferase and EGFP [23, 29, 30]. Lentiviral particles were produced by cotransfection of 293T cells through the calcium phosphate precipitation method [30]. Human stem cells (MSCs and HSCs), HCT-116 cells, and HEK-293 cells (1×10^5) were seeded in six-well plates and infected overnight with lentivirus stocks (Lenti^{EGFP}, Lenti^{dAb}, or Lenti^{Luc}) at a final multiplicity of infection (MOI) of 15. After 16 hours medium was replaced, and cells were cultured for 48 hours. EGFP transgene expression was monitored by flow cytometry. Conditioned media from either HSCs, MSCs, or HEK-293 cells transduced with Lenti^{dAb} (HSC^{dAb}, MSC^{dAb}, or 293^{dAb}) were analyzed for α CEA/ α CD3

diabody secretion by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described [30].

T Lymphocyte Proliferation Assays

Human PBLs (10^5 cells per well) were plated in triplicate in 100 μ l of complete medium in flat bottom 96-well plates, precoated (10 μ g/ml) with anti-CD3 mAb (clone UCHT1; BD Biosciences). Then 100 μ l of fresh medium or cell-free conditioned medium (CM) from 48-hour cultures of either MSCs (CM-MSc) or HEK-293 cells (CM-293) was added. After 72 hours cell proliferation was analyzed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay (Promega). Diabody-induced T lymphocyte proliferation assays were performed in triplicate in flat bottom 96-well plates. Human T lymphocytes (10^5 cells per well) were cocultured with previously irradiated target cells [29] (HeLa or HeLa^{CEA}) at an effector/target ratio of 5:1 in the presence of fresh medium or CM from 48-hour cultures of either lentivirally transduced HEK-293 cells or MSCs (293^{EGFP} or MSC^{dAb}). After 72 hours, proliferation was analyzed by the MTT assay.

In Vivo Bioluminescence Imaging

Mice were imaged using the ORCA-2BT high-resolution, charge-coupled device cooled digital camera (Hamamatsu Photonics France, Massy, France, <http://www.hamamatsu.com>) and Wasabi software (Hamamatsu Photonics). Animals were injected intraperitoneally (i.p.) with 125 mg/kg (150–200 μ l) D-luciferin (Promega) 10 minutes prior to imaging. Bioluminescence imaging (BLI) was collected with a 1-minute integration time, and pseudocolor representations of light intensity were superimposed over the grayscale reference image acquired at low light (exposure time, 20 milliseconds). An average of six kinetic BLI acquisitions were collected after substrate injection to confirm a peak of photon emission. For quantification of the detected light, regions of interest were drawn, and the light emitted from each region was assessed by recording the total number of photons per second (total flux) after background subtraction.

In Vivo Effect of MSCs on Tumor Growth

We established a xenograft model in which HCT-116 tumor cells (2×10^6) were mixed, in a proportion of 4:1, with luciferase-expressing human MSCs (MSCs^{Luc}) and injected subcutaneously (s.c.) into the dorsal space of 5-week-old female athymic nude mice (Hsd: athymic Nude/Nude; Harlan IBERICA, Barcelona, Spain, <http://www.harlan.com>). The growth kinetics of the MSC-containing HCT-116 tumors was compared with those of HCT-116 injected alone. Tumor volumes were determined at various time points using the formula $\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.52$. All mice were handled in accordance with the guidelines of Institutional Animal Care and Use Committee and performed in accordance with Spanish legislation.

Tumor Cell Proliferation In Vitro

To determine the effect of CM from MSCs or normal human IMR90 fibroblasts on tumor cell proliferation in vitro, MSCs and IMR90 cells were cultured as described previously, and after 48 hours, the medium was collected and filtered. DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS was used as control. HCT-116 cells (1.4×10^4) were plated in triplicate in a 96-well plate and permitted to adhere, after which the culture medium was exchanged with CM containing 10% FCS. Proliferation was measured by an MTT assay at 4, 24, 48, and 72 hours.

MSC-Seeded Scaffold Implantation

Either MSC^{dAb} or MSC^{Luc} (1×10^6) were seeded in two different 90% synthetic hydrogel solutions, Extracel-X [32, 33] or Extracel-HP [34] (Glycosan BioSystems, Salt Lake City, <http://www.glycosan.com>), to obtain either MSC^{dAb}- or MSC^{Luc}-seeded scaffolds. MSC-seeded scaffolds were supplemented with 128 U/ml heparin (Sigma-Aldrich), 50 ng/ml human vascular endothelial growth factor, and 150 ng/ml human basic fibroblast growth fac-

tor (both from Peptotech) and were contralaterally implanted s.c. in the ventral area. To assess the secretion of diabody by MSC^{dAb}, mice were bled by retro-orbital puncture at regular time points, and plasma concentration was determined by ELISA [30].

Antitumoral Effect of MSC^{dAb}-Seeded Scaffolds In Vivo

Luciferase-expressing HCT-116 tumor cells (HCT-116^{Luc}) were inoculated s.c. into the dorsal space of nude mice as described above. Five days after tumor implantation, one group of mice received MSCs^{Luc}-seeded scaffolds (sentinel scaffold) and MSC^{dAb}-seeded scaffolds (therapeutic scaffold) injected s.c. in opposite flanks in the ventral area. Another group (control group) received only the MSC^{Luc}-seeded scaffolds. Two days later, mice received i.v. injection (i.v.) of human T lymphocytes (2×10^6). MSC-seeded scaffolds and tumors were retrieved, fixed with 10% formalin, and paraffin-embedded. Sections were stained with hematoxylin and eosin.

Statistical Analysis

The SPSS v.14.0 software program (SPSS, Chicago, <http://www.spss.com>) was used for statistical analysis. The analysis of variance repeated measures model was used for compute the statistical significance of differences between groups. All *p* values were two-sided, and values of .05 or less were considered to indicate statistical significance.

Quantitative Analyses of Tumor Vascularization

Tumors were excised at day of sacrifice and were formalin-fixed and paraffin-embedded. A histological section from each xenograft was stained with hematoxylin and eosin according to standard protocols. Sections were first scanned at low magnification ($\times 5$) to identify vascular structures. Areas of vessel density were then examined under higher magnification ($\times 40$) and counted [35]. Vascularization was quantified by enumerating the mature vessels in four randomly chosen fields and expressing the mean \pm SD obtained for each condition.

RESULTS

Comparison of Human Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Transduced with a Lentiviral Vector Encoding a Bispecific α CEA/ α CD3 Diabody

The extended life span of stem cells makes them attractive as cell factories for the production of therapeutic antibodies. We wanted to compare the potential as antibody producer cells of lentivirally transduced human HSCs and MSCs. HSCs were isolated from human umbilical cord blood using human CD34 microbeads and characterized by flow cytometry analysis. More than 90% of purified HSCs exhibited the phenotype CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD45^{low} (supporting information Fig. 1A). MSCs, obtained from human bone marrow as previously described [23], displayed a characteristic phenotype, with prominent expression of CD13, CD73, CD90, CD105, and MHC-class I, whereas CD31, CD34, and CD45 were absent (supporting information Fig. 1B).

We transduced both human HSCs and MSCs with a VSV-G pseudotyped lentiviral vector encoding an α CEA/ α CD3 diabody (Lenti^{dAb}) [30] at an MOI of 10 to produce, respectively, HSC^{dAb} and MSC^{dAb}. Flow cytometry analysis (Fig. 1A) revealed that the expression of EGFP was remarkably higher in MSCs than in HSCs. Secretion of α CEA/ α CD3 diabody into the cell culture supernatant was assessed by ELISA, 72 hours after stem cell transduction (Fig. 1B). The level of functional diabody secreted by MSC^{dAb} ($110 \text{ ng/ml} \times 10^5$

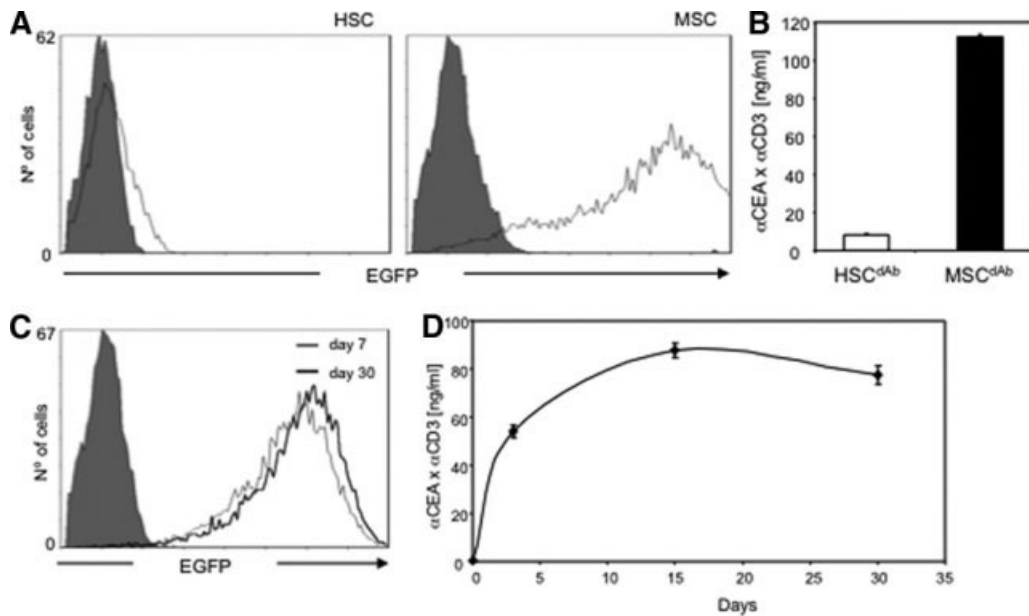


Figure 1. Transduction of HSCs and mesenchymal stem cells (MSCs) with dAb.EGFP-encoding lentivirus (Lenti^{dAb}) at a multiplicity of infection of 10. (A, B): Analysis of EGFP expression (A) and secretion of α -CEA/ α CD3 diabody into the cell culture supernatant (B) 72 hours after transduction. (C, D): Transgene expression stability in MSCs (MSC^{dAb}): expression of EGFP (C) and secretion of α -CEA/ α CD3 dAb (D). Abbreviations: α -CEA, α -carcinoembryonic antigen; dAb, diabody; EGFP, enhanced green fluorescent protein; HSC, hematopoietic stem cells; MSC, mesenchymal stem cell; MSC^{dAb}, mesenchymal stem cells after infection with Lenti^{dAb}.

cells per 72 hours) was 10-fold higher than the observed in HSCs^{dAb} (Fig. 1B). Given that MSCs are markedly more permissive to lentiviral transduction, we decide to use MSC^{dAb} as diabody producer cells in our immunotherapeutic approach for cancer therapy.

Next, we evaluated the persistence of transgene expression by MSC^{dAb} over time post-transduction. Overall, the percentage of MSCs expressing EGFP was maintained, between 80% and 90%, for 30 days (Fig. 1C). More importantly, the secretion of functional α CEA/ α CD3 diabody remained stable during this period, with levels of $81 \text{ ng/ml} \times 10^5$ cells per 72 hours at day 30 (Fig. 1D).

Immunomodulatory Effect of MSCs on T-Cell Proliferation

To assess the immunomodulatory effect of MSCs, human PBLs were stimulated by plastic-immobilized anti-CD3 mAb in the presence of fresh medium or cell-free CM-293 or CM-MSC. The polyclonal proliferation of T lymphocytes was roughly two times lower in the presence of CM-MSC than in the presence of either CM-293 or medium alone (Fig. 2A). As we have previously demonstrated, locally produced α CEA/ α CD3 diabody is capable of acting as an efficient activating molecule for T lymphocytes in the presence of CEA-expressing tumor cells [28]. Therefore, we performed different cocultures of T lymphocytes with either CEA-positive (HeLa^{CEA}) or CEA-negative (HeLa) tumor cells. CM from cultures of either HEK-293 or MSCs cells, transduced with Lenti^{dAb} or Lenti^{EGFP}, was added. Diabody-induced T lymphocyte proliferation, in cocultures with HeLa^{CEA} cells, was approximately 2.5 times lower in the presence of CM-MSC^{dAb} than in the presence of CM-293^{dAb} (Fig. 2B). This difference is not attributable to a higher production of α CEA/ α CD3 diabody by HEK-293 cells, given that levels were comparable in both CM as assessed by ELISA (data not shown). T lymphocytes cocultured with HeLa cells did not proliferate, independently

of the source of CM (Fig. 3B). CM from EGFP-transduced cells had no effect on T-cell proliferation rate.

Effect of MSCs on Tumor Growth

To investigate whether MSCs could exert an effect on tumor growth in vivo, we compared the growth kinetics of HCT-116 cells (a human colon carcinoma CEA-positive cell line) s.c. implanted alone (control group) or along with MSCs (ratio 4:1) in nude mice. MSCs had been previously transduced with luciferase-encoding lentiviral vector (MSCs^{Luc}) to monitor in vivo their fate within tumors by BLI. Photon emission, indicating the presence of viable MSCs, was detectable until day 15 postinoculation (Fig. 3B). The subsequent loss of luciferase activity signal can be attributed to a dispersion effect due to increasing tumor volume, and not to a decrease in MSCs^{Luc} viability.

In fact, tumor growth in MSC-containing tumors (HCT-116 + MSCs^{Luc}) was remarkably higher than in control mice (HCT-116 alone); the difference was statistically significant from day 17 postimplantation until the end of the experiment. At day 40, mean tumor volume in the MSCs^{Luc} group was nearly 2.5 times the tumor volume of the control group ($p = .001$) (Fig. 3A). These results strongly suggested a tumor-promoting effect of MSCs and discouraged us from taking advantage of their tumor-tropic properties. MSCs were still appealing as diabody producer cells, but special care should be taken to avoid close contact with tumor cells.

To understand the mechanism underlying the in vivo promotion of tumor growth by MSCs in our model, we studied the proliferation of tumor cells in the presence of CM-MSCs. No significant difference in cell numbers could be detected when compared with HCT-116 cells incubated with fresh medium or CM from human fibroblasts (CM-IMR90) (supporting information Fig. 2A). Then, we analyzed the effect of MSCs coimplantation on tumor angiogenesis in vivo. Quantification of microvessels in tumor sections yielded a significant increase in tumors coimplanted with MSCs (supporting

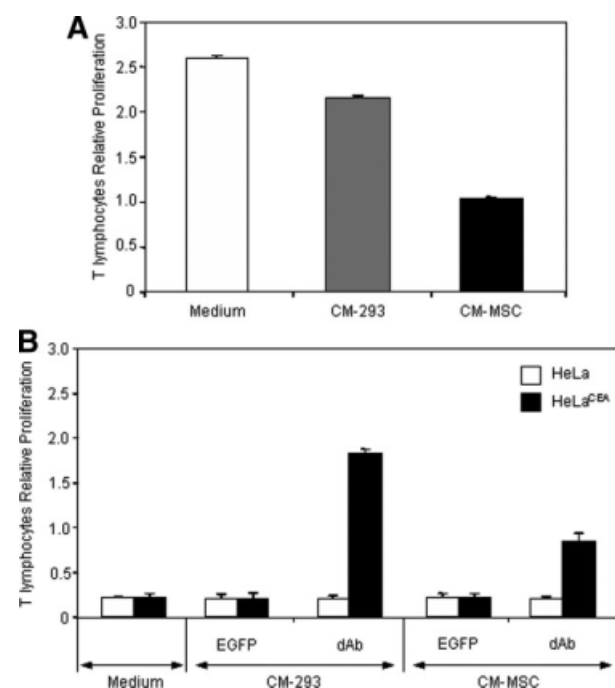


Figure 2. Inhibitory effect of MSCs on T lymphocyte proliferation. (A): CM-MSC inhibits the proliferation of human T lymphocytes following polyclonal stimuli. (B): CM-MSC^{dAb} inhibits the specific proliferation of T lymphocytes induced by α CEA/ α CD3 diabody in presence of CEA-positive cells. Approximately 10^5 human T lymphocytes were stimulated (effector/target ratio = 5:1) with irradiated CEA-negative (HeLa) or CEA-positive (HeLa^{CEA}) target cells in the presence of medium or cell-free conditioned medium from cultures of HEK-293 or MSCs transduced with either Lenti^{EGFP} or Lenti^{dAb}. As controls, effector and target cells were cultured alone (data not shown). Proliferation was analyzed after 72 hours of culture. Abbreviations: CEA, carcinoembryonic antigen; CM-293, conditioned medium from HEK-293 cells; CM-MSC, conditioned medium from mesenchymal stem cells; CM-MSC^{dAb}, CM from mesenchymal stem cells transduced with Lenti^{dAb}; dAb, diabody; EGFP, enhanced green fluorescent protein.

information Fig. 2B). Given that no evidence of MSC malignant transformation could be detected *in vivo*, we can assume that the observed enhancement of tumor growth by MSCs in our model is due to increased tumor angiogenesis.

Establishment of MSCs-Seeded Scaffolds and Systemic Release of α CEA/ α CD3 Diabody

The enhancement of tumor growth and the immunomodulatory effect mediated by MSCs are important disadvantages for their use as therapeutic factories at the tumor site. To overcome these limitations, MSCs were confined to locations distant from tumor sites using injectable synthetic hydrogel scaffolds. Two different commercially available hydrogel formulations were tested for their ability to support MSC survival and engraftment: Extracel-X and Extracel-HP. At day 15 postimplantation of 10^6 cells in nude mice, luciferase activity of MSC^{Luc} seeded in Extracel-X scaffolds was approximately twofold higher than that of MSC^{Luc} seeded in Extracel-HP (supporting information Fig. 3A). More interestingly, systemic diabody levels were three times higher in mice that received MSC^{dAb}-seeded Extracel-X scaffolds (supporting information Fig. 3B). Therefore, Extracel-X was chosen for long-term studies of MSC-seeded scaffolds.

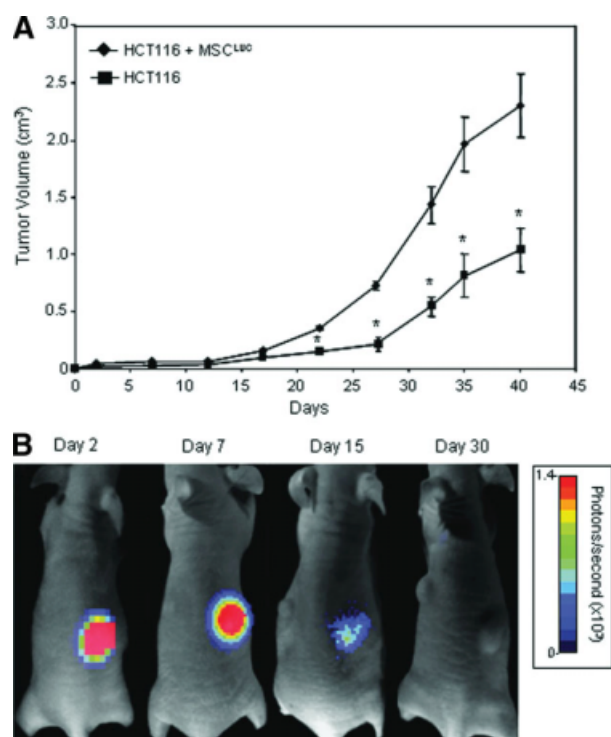


Figure 3. Effect of intratumoral MSCs on human colorectal carcinoma xenograft growth. (A): Tumor volume measurements of HCT-116 cells (2×10^6) injected s.c. into nude mice ($n = 4$ mice per group) with or without 5×10^5 MSC^{Luc}. (B): The persistence of viable functional MSC^{Luc} in the tumors was assessed by bioluminescence imaging (BLI). BLI of a representative mouse is shown 2, 7, 15, and 30 days after implantation of HCT-116 and MSC^{Luc} cells. Abbreviation: MSC^{Luc}, mesenchymal stem cells infected with luciferase-encoding lentivirus.

MSC^{dAb}-seeded Extracel-X scaffolds (therapeutic scaffolds) were inoculated s.c. in the left ventral area of immunodeficient mice. Scaffolds containing the same amount of MSC^{Luc} (sentinel scaffolds) were implanted contralaterally for the monitoring of MSC engraftment and persistence by BLI. As shown in Figure 4A, MSC^{Luc}-seeded scaffolds exhibited stable luciferase activity, with a slight decrease by day 42. Plasma levels of α CEA/ α CD3 diabody were determined by ELISA, yielding concentrations ranging from 145 ng/ml at day 7 to 30 ng/ml 6 weeks after implantation (Fig. 4B). Histological study of MSC^{Luc}-seeded scaffolds resected 42 days after implantation revealed the presence of viable cell embedded in a dense, hematoxylin-stained matrix with no clearly differentiated architecture (data not shown).

Antitumor Effect of MSCs^{dAb}-Seeded Scaffolds in a Human Colon Carcinoma Xenograft Model

To assess the *in vivo* effect of α CEA/ α CD3 diabody secreted by MSC^{dAb} on tumor growth, we established xenografts of the CEA-positive human colon carcinoma cell line HCT-116, previously transduced with the Lenti^{Luc} (HCT-116^{Luc}), through s.c. inoculation of 10^6 cells in the dorsal region of nude mice. Five days after tumor cell implantation, two MSC-seeded scaffolds containing, respectively, MSC^{Luc} and MSC^{dAb} were implanted in opposite flanks in the ventral area of the same animals. A control group received only the sentinel scaffold. One week after tumor implantation the two groups of mice received an i.v. injection of 2×10^6

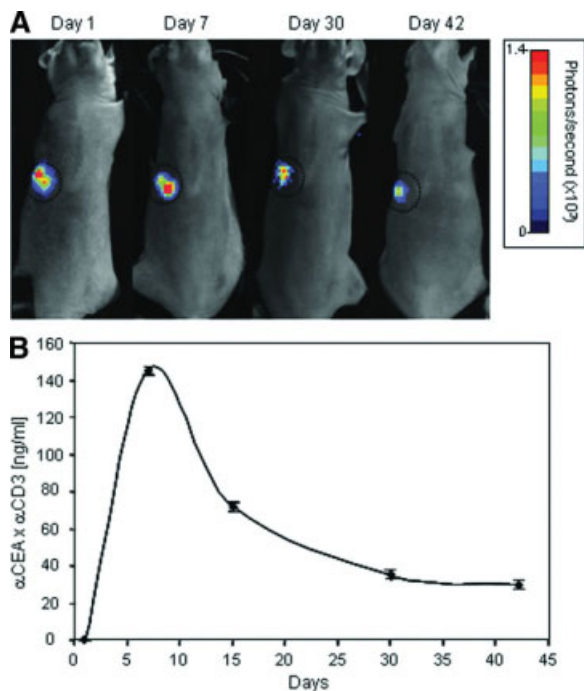


Figure 4. Establishment and characterization of MSCs-seeded Extracel-X scaffolds. (A): The persistence of viable functional MSC^{Luc} in the scaffolds was assessed by bioluminescence imaging (BLI) 1, 7, 30, and 42 days after implantation. Shown is BLI of a representative mouse (total, $n = 3$ mice per group). (B): Plasma concentration of $\alpha\text{CEA}/\alpha\text{CD3}$ diabody in mice implanted with MSC^{dAb}-embedded scaffolds. Abbreviation: αCEA , α -carcinoembryonic antigen.

unfractionated human PBLs. Approximately 90% of injected lymphocytes were CD3⁺; 44% CD3⁺CD4⁺ and 46% CD3⁺CD8⁺ (data not shown).

Tumor volumes (Fig. 5A) were measured over time, and luciferase activity of HCT-116^{Luc} (dorsal) and MSCs^{Luc} (ventral) was monitored by BLI (Fig. 5B and data not shown). Mice bearing therapeutic scaffolds exhibited consistently slower tumor growth and showed a statistically significant difference in tumor volume when compared with the control group containing only sentinel scaffolds ($p = .037$ at day 40 after tumor inoculation).

DISCUSSION

The availability of antibody genes as cloned material opens the way for alternative strategies to the passive administration of high doses of purified protein. In vivo production of therapeutic antibodies by genetically engineered cells may advantageously replace injection of purified antibodies in cancer treatment [36, 37]. The feasibility of in vivo production and systemic delivery of antibodies by different cells has been demonstrated using different techniques, such as ex vivo genetically modified autologous cells and in vivo gene transfer using viral vectors. We have previously shown that human T lymphocytes, transduced ex vivo to secrete the activating diabody $\alpha\text{CEA}/\alpha\text{CD3}$ in autocrine fashion, inhibited the growth of CEA-positive tumors [30]. However, activated T lymphocytes possess a short life span, and this implies an obvious limitation to their application in a gene therapy strategy. In contrast to terminally differentiated cell types, stem cells are

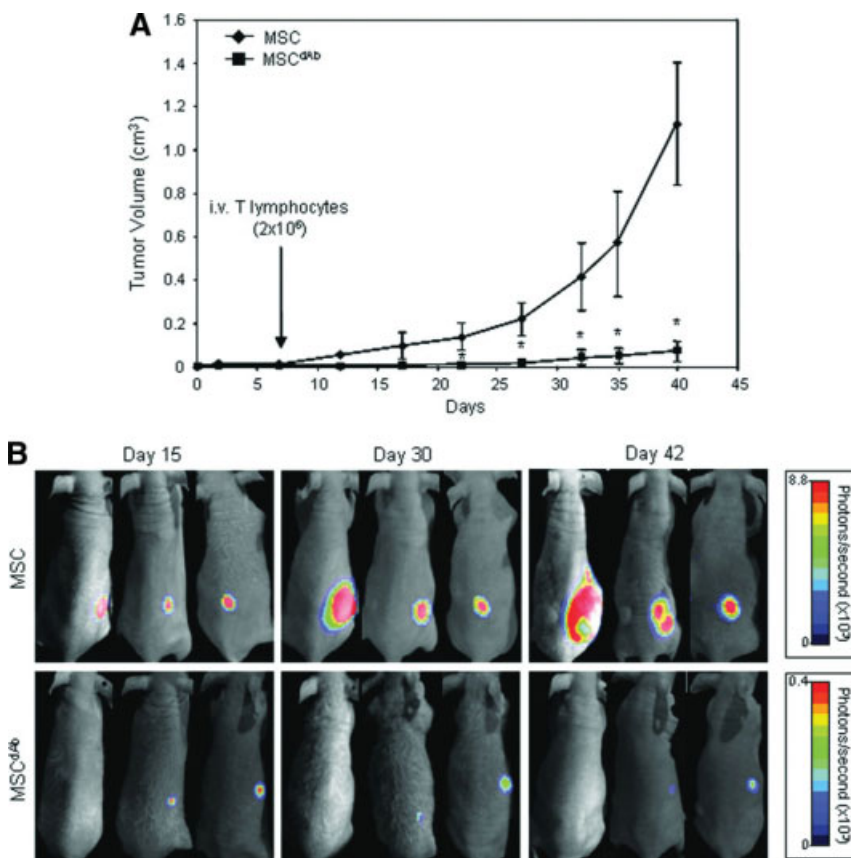


Figure 5. Human colorectal carcinoma xenograft growth in nude mice bearing MSC^{dAb}-seeded scaffold. (A): Tumor volume measurements of HCT-116 cells (2×10^6) infected with luciferase-encoding lentivirus (HCT-116^{Luc}) injected s.c. into the dorsal skin of nude mice ($n = 3$ mice per group). Five days after tumor implantation, MSCs or MSC^{dAb} (1×10^6) were seeded in a synthetic extracellular matrix Extracel-X scaffold and inoculated s.c. in the ventral area. Two days later, animals received an i.v. injection of 2×10^6 human unfractionated peripheral blood lymphocytes. (B): Bioluminescence imaging assay for monitoring tumor growth in vivo, at days 7, 30, and 42 after tumor implantation. Abbreviations: dAb, diabody; MSC, mesenchymal stem cell.

endowed, at least theoretically, with a great expansion capacity. For this reason we explored the potential of HSCs, widely used in therapeutic protocols for genetic diseases, and MSCs, relatively new in the field, as cell factories for diabody production. In our hands, HSC are difficult to gene-modify, and the cytokine cocktail used for their expansion is expensive. On the contrary, MSCs are easily transduced and exhibit a unique in vitro expansion capacity using a simple medium formulation.

Several works have explored recombinant protein delivery by genetically engineered MSCs following i.v. administration or intratumoral inoculation in cancer therapy approaches [4–15]. However, MSCs have proangiogenic and immunomodulatory properties, which raise concern over the safety of their use in cancer patients [24]. MSCs are known to produce a variety of growth factors that can promote angiogenesis. Recently, we have corroborated the role of MSCs in an in vivo model of human angiogenesis, where human endothelial cells genetically modified to express luciferase were embedded in a matrix preparation (Matrigel) along with MSCs and s.c. inoculated in nude mice [23]. The presence of MSCs was essential for sustained luciferase activity, suggesting a key role of MSCs in regulating vessel maturation and functionality. More controversy exists over the effect of MSCs on tumor growth: both enhancement and inhibition, as well as no apparent effect, have been reported [24]. Intriguingly, a recent study demonstrated a role of MSCs in increasing metastasis rate, independently of the effect on primary tumor growth. In this work, MSCs accelerated the growth of MCF7/Ras tumors without affecting the kinetics of MDA-MB-231 or MDA-MB-435 tumors, but all of them displayed a marked increase in the numbers of micro- and macroscopic lung metastases [18]. We tested the effect of MSCs over human T cell-specific activation in vitro and tumor growth in vivo and found out that it could be counterproductive to let MSCs to mix with either immune effector or tumor cells. MSCs not only inhibited T-cell proliferation when cocultured with CEA-positive tumor cells in the presence of α CEA/ α CD3 diabody but also significantly enhanced tumor growth in vivo. In our model, promotion of tumor growth by MSCs may be attributed to a supportive role in angiogenesis [23, 38]. Consequently, we searched for a strategy to confine MSCs to a concrete location, avoiding dissemination throughout the body.

With this aim, we took advantage of our experience with the in vivo human angiogenesis model previously described [23]. Matrigel is a murine basement membrane preparation constituted by a mixture of extracellular matrix proteins, widely used in angiogenesis studies in vitro and in vivo, but probably not best suited for MSC encapsulation in a clinical setting. We tested different hydrogel formulations, commercially available, that offer several advantages with respect to Matrigel: they are synthetic, of nonanimal origin, and potentially less immunogenic, and their composition is the same batch to batch. So we replaced Matrigel with a hydrogel sECM scaffold specifically designed for tissue engineering applications and the one that best supported MSC engraftment in vivo. This issue was addressed by BLI of MSC^{Luc}-seeded scaffolds and determination by ELISA of the diabody plasma levels of mice bearing MSC^{dAb}-seeded scaffolds. Both luciferase activity and diabody levels in plasma were detectable 6 weeks after s.c. implantation of the respective scaffolds. Safety of implanted cells have recently been tested in a series of murine MSCs-scaffold combinations, and it was shown that the implanted cells did not spread to other organs [39].

A similar approach was described in the study by Eliopoulos et al. [26], which showed that secretion of an EPO can

be prolonged by embedding the gene-modified MSCs in Matrigel before their s.c. delivery. Most interestingly, the same group recently reported the use of IL-12 producing MSCs, s.c. implanted, for breast cancer therapy [28]. In this study, Matrigel was replaced with a viscous bovine collagen-based matrix. IL-12-producing MSCs implanted in the vicinity of already present breast cancer tumor led to a significant slowing of cancer growth and to increased survival. These IL-12-secreting implants supported an increase in systemic levels of mL-12, as concentrations were more than 10-fold higher than in the control mice. Unexpectedly, the observed therapeutic effect was not due to systemic IL-12, since IL-12-producing MSCs implanted contralaterally did not exert the antitumoral effect. This requirement for MSC implantation at the tumor site would preclude their use in a clinical setting, given that human tumors are not easily accessible in general, and MSC implants would be hardly retrievable afterward.

These results are in clear contrast with those reported here. In our study immunodeficient mice were used for T-cell transfer experiments because of the human nature of the antigens recognized by the α CEA/ α CD3 diabody. In all of the experiments, an unfractionated population of human PBLs (containing CD4+ as well as CD8+ lymphocytes) was used. Diabody α CEA/ α CD3 was produced and secreted into the bloodstream from a distant location, given that MSC^{dAb}-seeded scaffolds were implanted in the ventral region and tumor cells in the dorsal region of nude mice. Circulating diabody was able to activate systemically transferred human T cells for the eradication of CEA-positive tumor cells, resulting in the overall reduction of tumor growth. The potential of bispecific antibodies in cancer therapy has been extensively proved in a variety of in vitro and in vivo models, and early clinical trials have shown safety of these molecules and clinical responses [40].

Nevertheless, the therapeutic potential of exogenously administered antibodies is limited by their short half-life and their poor accessibility to tumor sites. Antibody fragments exhibit rapid blood clearance and poor retention time in the target, which results in the necessity for frequent delivery of such agents. Genetically engineered cells could be the sources of sustained concentrations of soluble antibody fragments, capable of achieving long-term antitumor efficacy. In vivo production results in effective and persistent levels of antibody fragments with a syngenic glycosylation pattern. This compensates for their rapid blood clearance and could make the antibodies less immunogenic and better tolerated.

SUMMARY

We report here for the first time the use of human MSCs genetically engineered for the production of a bispecific diabody, seeded in an sECM scaffold and s.c. implanted in immunodeficient mice, to demonstrate the systemic antitumoral effect of a therapeutic antibody locally produced in a distant location.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Jerónimo Blanco and Nuria Rubio (Centro de Investigación Cardiovascular) for expert technical advice and Isabel Millan (Hospital Universitario Puerta de Hierro) for statistical analysis. This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2005-04794) and the

Comunidad Autónoma de Madrid (S-BIO-0236-2006) (to L.A.-V.) and from the Fondo de Investigación Sanitaria (PI061621) (to L.S.). M.C. is supported by Instituto de Salud Carlos III (Contrato Rio Hortega, CM06/00055). D.S.-M. was supported by a Comunidad Autónoma de Madrid/ European Social Fund. training grant (FPI-000531). V.A.C is a predoctoral fellowship from the Gobierno Vasco (BFI07.132). L.S. is an investigator from

the Ramón y Cajal Program (Ministerio de Ciencia e Innovación), cofinanced by the European Social Fund.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

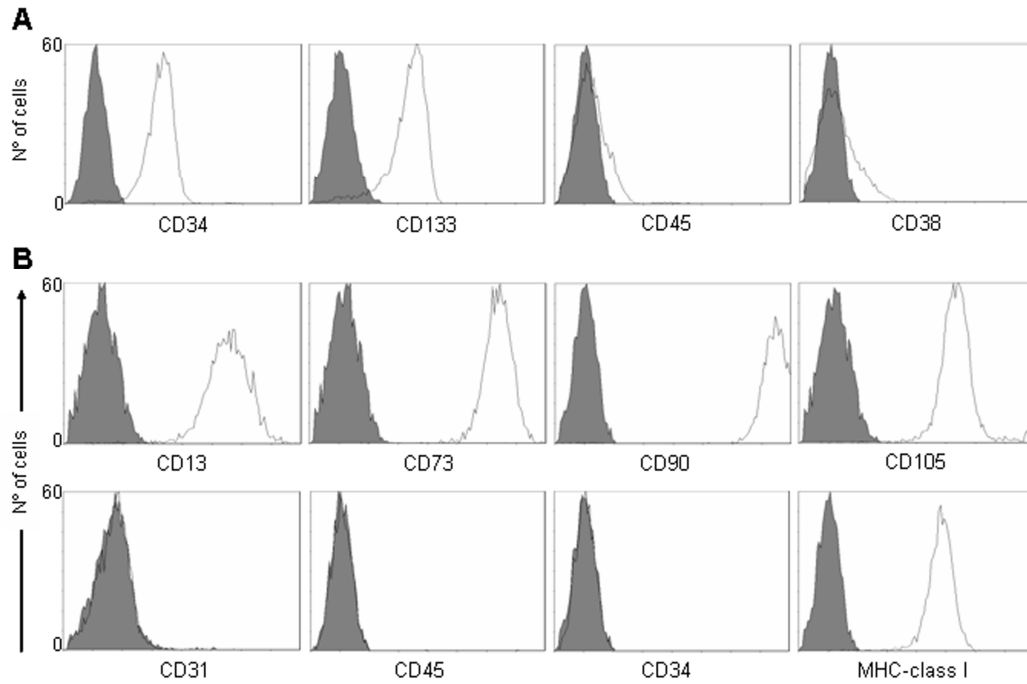
The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

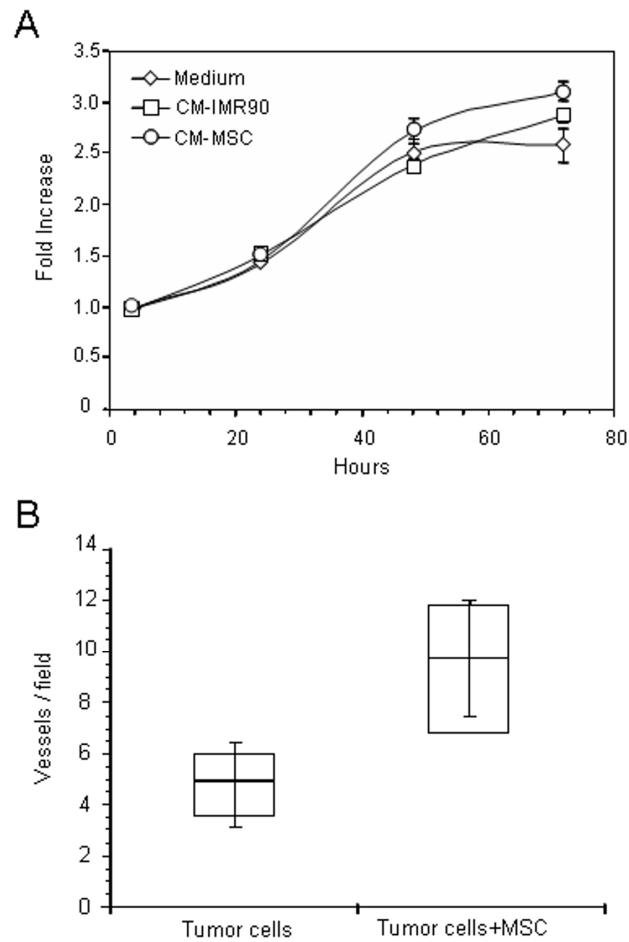
- Pittenger MF. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol* 2008;449:27–44.
- Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008;15:711–715.
- Aboody KS, Najbauer J, Danks MK. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther* 2008;15:739–752.
- Ren C, Kumar S, Chanda D et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon- α in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells* 2008;26:2332–2338.
- Nakamizo A, Marini F, Amano T et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 2005;65:3307–3318.
- Ren C, Kumar S, Chanda D et al. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Ther* 2008;15:1446–1453.
- Studeny M, Marini FC, Champlin RE et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002;62:3603–3608.
- Studeny M, Marini FC, Dembinski JL et al. Mesenchymal stem cells: Potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1593–1603.
- Nakamura K, Ito Y, Kawano Y et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 2004;11:1155–1164.
- Chen X, Lin X, Zhao J et al. A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs. *Mol Ther* 2008;16:749–756.
- Elzaouk L, Moelling K, Pavlovic J. Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. *Exp Dermatol* 2006;15:865–874.
- Xin H, Kanehira M, Mizuguchi H et al. Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007;25:1618–1626.
- Miletic H, Fischer Y, Litwak S et al. Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene. *Mol Ther* 2007;15:1373–1381.
- Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M et al. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 2007;67:6304–6313.
- Kanehira M, Xin H, Hoshino K et al. Targeted delivery of NK4 to multiple lung tumors by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cancer Gene Ther* 2007;14:894–903.
- Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA et al. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther* 2006;5:755–766.
- Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Mathis JM et al. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2007;105:157–167.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP et al. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007;449:557–563.
- Djouad F, Plence P, Bony C et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102:3837–3844.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105:2821–2827.
- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E et al. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006;177:2080–2087.
- Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499–3506.
- Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V et al. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: Critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc Res* 2008;75:308–314.
- Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: Adult multipotent stromal cells and cancer: Risk or benefit? *Stem Cells* 2008;26:1387–1394.
- Roth JC, Curiel DT, Pereboeva L. Cell vehicle targeting strategies. *Gene Ther* 2008;15:716–729.
- Eliopoulos N, Al-Khalidi A, Crosato M et al. A neovascularized organoid derived from retrovirally engineered bone marrow stroma leads to prolonged in vivo systemic delivery of erythropoietin in nonmyeloablated, immunocompetent mice. *Gene Ther* 2003;10:478–489.
- Eliopoulos N, Lejeune L, Martineau D et al. Human-compatible collagen matrix for prolonged and reversible systemic delivery of erythropoietin in mice from gene-modified marrow stromal cells. *Mol Ther* 2004;10:741–748.
- Eliopoulos N, Francois M, Boivin MN et al. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. *Cancer Res* 2008;68:4810–4818.
- Blanco B, Holliger P, Vile RG et al. Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells. *J Immunol* 2003;171:1070–1077.
- Compte M, Blanco B, Serrano F et al. Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA \times anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. *Cancer Gene Ther* 2007;14:380–388.
- Hefta LJ, Chen FS, Ronk M et al. Expression of carcinoembryonic antigen and its predicted immunoglobulin-like domains in HeLa cells for epitope analysis. *Cancer Res* 1992;52:5647–5655.
- Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng* 2006;12:3405–3416.
- Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. Tumor engineering: Orthotopic cancer models in mice using cell-loaded, injectable, cross-linked hyaluronan-derived hydrogels. *Tissue Eng* 2007;13:1091–1101.
- Riley CM, Fuegy PW, Firpo MA et al. Stimulation of in vivo angiogenesis using dual growth factor-loaded crosslinked glycosaminoglycan hydrogels. *Biomaterials* 2006;27:5935–5943.
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: An international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A:2474–2484.
- Sanz L, Blanco B, Alvarez-Vallina L. Antibodies and gene therapy: Teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol* 2004;25:85–91.
- Sanz L, Qiao J, Vile RG et al. Antibody engineering, virus retargeting and cellular immunotherapy: One ring to rule them all? *Curr Gene Ther* 2005;5:63–70.
- Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A et al. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 2008;99:622–631.
- Roman I, Vilalta M, Rodriguez J et al. Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by in vivo non-invasive photonic imaging. *Biomaterials* 2007;28:2718–2728.
- Bargou R, Eugen L, Zugmaier G et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008;321:974–977.



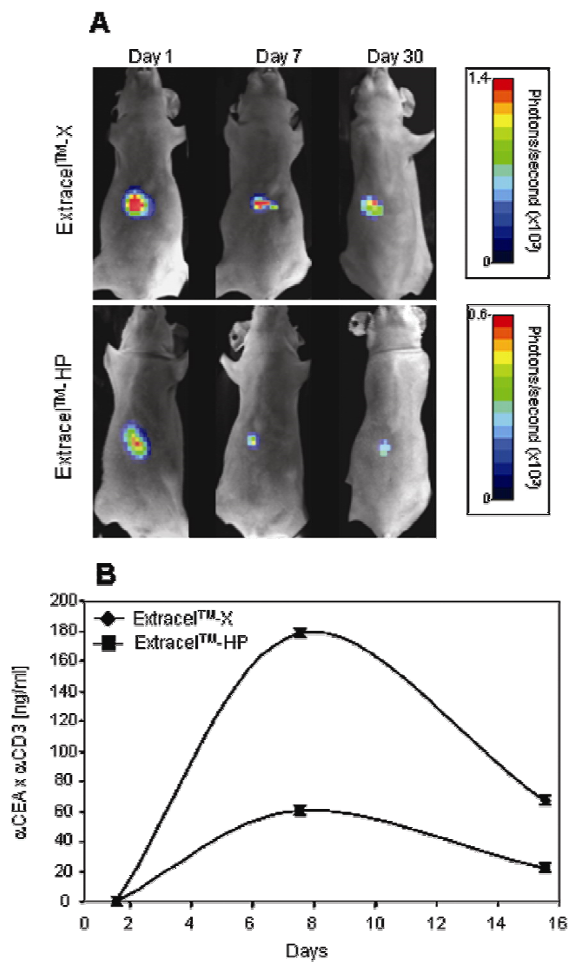
See www.StemCells.com for supporting information available online.



Supplementary Figure 1. Characterization of human stem cells. (a) Phenotype of umbilical cord blood derived human hematopoietic stem cells (HSC). Cells were analyzed by flow cytometry for the expression of CD34, CD133, CD45 and CD38. (b) Characterization of bone marrow derived human mesenchymal stem cells (MSC) by flow cytometry using different anti-human mAb: CD13, CD73, CD90, CD105, CD31, CD45, CD34 and MHC-class I. Isotype-matched antibodies were used as control (grey line).



Supplementary Figure 2. Effect of MSC on proliferation of tumor cells. (a) HCT-116 cells were cultured in the presence of medium, or cell-free CM from cultures of MSC (CM-MS) or human IMR90 fibroblasts (CM-IMR90). Tumor cell proliferation was determined by MTT assay at 24, 48 and 72 h after plating. (b) Effect of MSC on tumor vascular density. Data are expressed as the mean vessel count per high-power field \pm SD.



Supplementary Figure 3. Establishment and characterization of MSC-seeded sECM scaffolds. Either MSCLuc or MSCdAb were seeded in Extracel™-X or Extracel™-HP synthetic hydrogel solutions and contralaterally implanted s.c. in the ventral area of nude mice. The persistence of viable functional MSCLuc in the scaffolds was assessed by BLI (a), and the plasma concentration of α CEA/ α CD3 diobody was assessed by ELISA (b).

Artículo N° 3: *Factory neovessels: engineered human blood vessels secreting therapeutic proteins as a new drug delivery system.* Gene Therapy. (2010) 17, 745–751.

Resumen

En los últimos años, varios trabajos han demostrado la posibilidad de generar vasos sanguíneos viables y funcionales *in vivo* (*neovasos*) mediante procedimientos de ingeniería tisular, utilizando células endoteliales (EC) humanas primarias.

El objetivo principal de este trabajo es demostrar el potencial terapéutico de los *neovasos*, generados a partir de EC modificadas genéticamente, para la secreción de una proteína terapéutica. La funcionalidad de los neovasos humanos y su conexión anatómica con la red vascular del huésped implicaría una liberación inmediata de la proteína de interés al torrente circulatorio.

Para la validación de esta hipótesis utilizamos EC primarias derivadas de la vena de cordón umbilical (HUVEC), modificadas genéticamente para la expresión de un AcBisR α CEA x α CD3 con formato *diabody* (HUVEC^{dAb}). Para la generación de los *neovasos*, las EC fueron embebidas en una preparación de matriz extracelular (Matrigel) junto a MSC humanas, utilizadas en este contexto como precursoras de las células de soporte vascular (células murales). El implante vascular se generó inoculando la mezcla, previamente descrita, por vía subcutánea en el área ventral de ratones inmunodeficientes.

La viabilidad y funcionalidad de los implantes vasculares se determinó mediante ELISA y ensayos de bioluminescencia *in vivo*, durante un periodo de 30 días. La actividad antitumoral se evaluó en un modelo de xenotrasplante humano en el que ratones inmunodeficientes fueron inoculados por vía subcutánea con células de carcinoma de colon humano CEA⁺, tras la administración intravenosa de linfocitos T humanos. La secreción del *diabody* α CEA x α CD3 aumentó la supervivencia y retrasó el crecimiento tumoral de forma estadísticamente significativa.

Estos resultados demuestran el efecto terapéutico de un AcBisR secretado de forma continuada a nivel sistémico por *neovasos* humanos generada mediante ingeniería de tejidos.

ORIGINAL ARTICLE

Factory neovessels: engineered human blood vessels secreting therapeutic proteins as a new drug delivery system

M Compte¹, V Alonso-Camino¹, P Santos-Valle¹, ÁM Cuesta¹, D Sánchez-Martín¹, MR López¹, JL Vicario², C Salas³, L Sanz¹ and L Álvarez-Vallina¹

¹Molecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ²Histocompatibility Department, Centro de Transfusión, Madrid, Spain and ³Pathology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain

Several works have shown the feasibility of engineering functional blood vessels *in vivo* using human endothelial cells (ECs). Going further, we explored the therapeutic potential of neovessels after gene-modifying the ECs for the secretion of a therapeutic protein. Given that these vessels are connected with the host vascular bed, we hypothesized that systemic release of the expressed protein is immediate. As a proof of principle, we used primary human ECs transduced with a lentiviral vector for the expression of a recombinant bispecific α CEA/ α CD3 antibody. These ECs, along with

mesenchymal stem cells as a source of mural cells, were embedded in Matrigel and subcutaneously implanted in nude mice. High antibody levels were detected in plasma for 1 month. Furthermore, the antibody exerted a therapeutic effect in mice bearing distant carcinoembryonic-antigen (CEA)-positive tumors after inoculation of human T cells. In summary, we show for the first time the therapeutic effect of a protein locally secreted by engineered human neovessels. Gene Therapy (2010) 17, 745–751; doi:10.1038/gt.2010.33; published online 25 March 2010

Keywords: cell-based gene therapy; human endothelial cells; human mesenchymal stem cells; lentivirally transduced ECs; blood vessels; cancer

Introduction

Recent studies showed that a network of human mature blood vessels can be formed by co-implantation of primary human endothelial cells (EC) and human mesenchymal stem cells (MSCs) in immunodeficient mice.^{1–5} The vessel walls engineered under these conditions were found to be substantially similar to native vessels at both molecular and cellular levels.^{2–5} These findings have generated considerable interest in the potential application of engineered blood vessels in regenerative medicine and cell-based revascularization therapies. Furthermore, the possibility of establishing a functional vascular network in a surgically accessible location provides an unprecedented opportunity for therapeutic intervention that goes far beyond tissue engineering.

In this context, the genetic modification of ECs would ensure the secretion of a therapeutic protein into the systemic circulation for a prolonged period of time. We have previously reported that vasculature generated from lentivirally transduced human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) expressing firefly luciferase

(HUVEC^{Luc}) and co-implanted with human bone marrow MSC can be assessed quantitatively by *in vivo* whole-body bioluminescence imaging (BLI) for more than 120 days.² Luciferase activity correlated with the formation of a network of mature, functional blood vessels of human nature inside the implant, as assessed by human CD34 and anti-smooth muscle actin (anti-smooth muscle actin) staining.² The presence of MSC is essential for sustained luciferase activity, suggesting a key role of MSC in regulating vessel maturation and functionality, providing efficient recruitment and investment of mural cells to the engineered vessels. The presence of erythrocytes within the lumen of these neovessels was highly indicative of a functional vasculature, integrated into the recipient's vascular bed. To further assess the connection to the mouse circulatory system, we intravenously (*i.v.*) injected TRITC-conjugated lectin UEA-1 and showed binding to neovessels lined by human ECs inside the implants.²

We have previously shown the feasibility of *in vivo* production and systemic delivery of therapeutic antibodies by gene-modified human cells.^{6–8} Bispecific antibodies are non-natural immunoglobulin-based molecules that contain two distinct binding specificities.⁹ Bispecific antibodies redirect the cytolytic activity of a variety of immune effector cells toward tumor cells by binding to cell activation molecules with one domain and to specific tumor-associated antigen on cancer cells with the other. T-cell-activating bispecific antibodies have shown great potential for the treatment of malignant

Correspondence: Dr L Sanz or Dr L Álvarez-Vallina, Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, San Martín de Porres 4, 28035 Madrid, Spain.
E-mail: lsanz.hpth@salud.madrid.org or lalvarezv.hpth@salud.madrid.org

Received 31 August 2009; revised 9 February 2010; accepted 11 February 2010; published online 25 March 2010

diseases in both animal models^{7,8,11} and humans.¹² Recently, it was reported that systemically administered recombinant anti-CD19 × anti-CD3 antibody induced partial and complete tumor regressions in patients with non-Hodgkin's lymphoma.¹² In previous works we have shown the antitumoral effect of a small recombinant bispecific antibody (diabody, dAb)^{13,14} directed against the human carcinoembryonic antigen (CEA, CD66) and the T-cell co-receptor CD3 (anti-CEA × anti-CD3), secreted by different human cells, including T lymphocytes^{7,8} and MSCs.¹⁰ However, activated T lymphocytes possess a short life span, and this implies an obvious limitation to their application in a gene therapy strategy. On the other hand, MSCs are endowed with a greater expansion capacity but their proangiogenic and immunomodulatory properties may raise concern over its potential use in cancer patients.¹⁵

The stability of tissue-engineered human blood vessel, the permissiveness of HUVEC to be transduced by lentiviral vectors and the comparative tolerance of its use encouraged us to use engineered blood vessels as therapeutic protein factories. Given that these neovessels connect to the host vascular bed, we hypothesized that the therapeutic protein would be directly released into the bloodstream and exert a systemic effect.

Results

Transduction of human endothelial cells with a lentiviral vector encoding a bispecific α CEA/ α CD3 diabody

To validate the concept of human neovessels as cell factories and its therapeutic potential, we used a small anti-CEA × anti-CD3 diabody (α CEA/ α CD3).¹¹ Early passage HUVECs were transduced at a vector multiplicity of infection of 10, with lentivirus encoding the α CEA/ α CD3 diabody and enhanced green fluorescent protein (EGFP) (Lenti^{dAb}), or with a lentivirus harboring a luciferase-IRES-EGFP cassette (Lenti^{Luc}).^{7,8} More than 90% of transduced HUVEC (HUVEC^{dAb} and HUVEC^{Luc}) expressed EGFP for at least 30 days *in vitro* (Figure 1a) and showed normal morphology, phenotype and function (data not shown). Interestingly, the secretion of functional α CEA/ α CD3 diabody molecules remained stable during this period with levels around 100 ng ml⁻¹ per 10⁵ cells per 72 h at day 30 (Figure 1b). A suspension of HUVEC^{Luc} cells was serially diluted in a 96-well plate

and was imaged with BLI.² The light emitted from HUVEC^{Luc} in the presence of the substrate luciferin was approximately 10 photons per second per cell (data not shown).

Effect of engineered blood vessels on tumor growth

Mixtures (ratio 4:1) of either HUVEC^{dAb} and MSC or HUVEC^{Luc} and MSC were embedded in Matrigel and inoculated subcutaneously (s.c.; vascular implants) in the ventral area of nude mice. Vascular implants containing HUVEC^{dAb} and MSC ('factory' neovessels) were inoculated in the left flank and vascular implants containing HUVEC^{Luc} and MSC (control neovessels) were inoculated contralaterally for BLI monitoring of cell engraftment and persistence. As shown in Figure 2a, control vascular implants showed stable luciferase activity throughout the study period indicating a good connection to the mouse circulatory system. Functional α CEA/ α CD3 diabodies were detected in the plasma of factory neovessels-bearing mice but not in samples from mice only bearing control neovessels. Following an initial peak of expression of about 90 ng ml⁻¹, α CEA/ α CD3 diabody plasma levels persisted around 50 ng ml⁻¹ at least up to 7 weeks (Figure 2b). Interestingly, diabody levels expressed by HUVEC are much more stable than those previously reported with MSC,¹⁰ which dropped more than 80% in the same lapse of time.

To determine the *in vivo* antitumor activity of the angio-secreted diabodies, we used a human colon carcinoma xenograft model by injecting CEA⁺ HCT-116 tumor cells s.c. into the dorsal space of nude mice on day 0. The animals then were divided into three cohorts (A, B and C) and 5 days after tumor inoculation vascular implants were injected s.c. in the ventral area. Group A received one vascular implant (control neovessels) inoculated s.c. in the left ventral area; groups B and C received two vascular implants (control neovessels and factory neovessels) injected s.c. in opposite flanks in the ventral area. The experiment was performed three times with 4–5 animals per group ($n = 12/15$). In two experiments (nos. 1 and 3) mice from groups A and B received a single i.v. injection of 2×10^6 human T cells through the tail vein on day 7 (Figure 1; Supplementary Figure 1). In an attempt to improve the therapeutic effect, mice from groups A and B received two i.v. injections (days 10 and 25) of 2×10^6 human T cells (Figure 3; experiment 2). Mice from group C did not receive T cells.

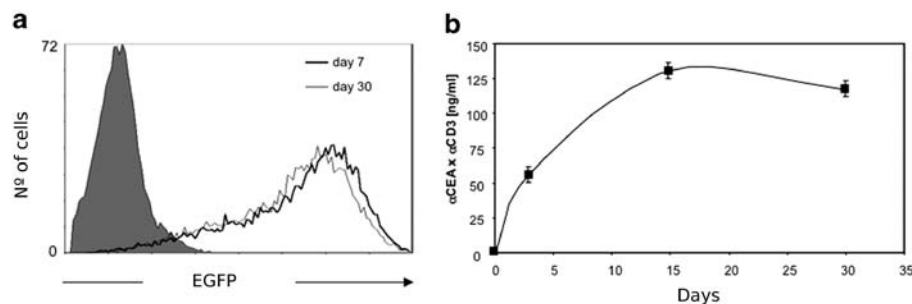


Figure 1 *In vitro* transgene expression stability in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) after infection with dAb.EGFP-encoding lentivirus (HUVEC^{dAb}). (a) Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and (b) secretion of α CEA/ α CD3 diabody (ng/ml per 10⁵ cells per 72 h).

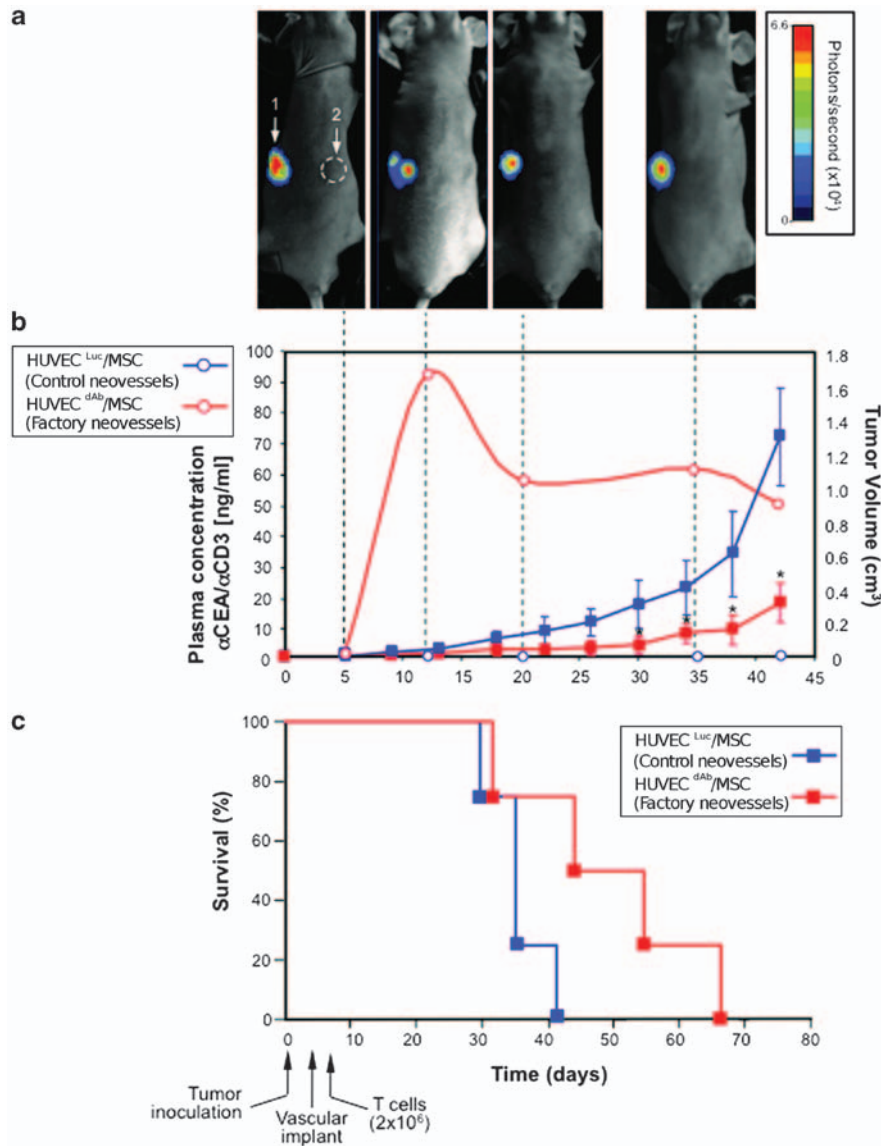


Figure 2 Inhibition of tumor growth by angio-secreted α CEA/ α CD3 diabodies. The persistence of viable functional human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) infected with luciferase-encoding lentivirus (HUVEC^{Luc}) was assessed by bioluminescence imaging (BLI) at the indicated times after implantation of HUVEC^{Luc}/MSC (1) and HUVEC^{dAb}/MSC (2) vascular implants (a). BLI of a representative mouse (total, $n = 4$ mice per group). (b) Plasma concentration of α CEA/ α CD3 diabody was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HCT-116 human colon carcinoma cells (2×10^6) were injected s.c. into the dorsal skin of nude mice ($n = 4$ mice per group). Five days after tumor implantation, either HUVEC^{Luc}/MSC vascular implants (control neovessels) or HUVEC^{dAb}/MSC and HUVEC^{dAb}/MSC vascular implants (factory neovessels) were inoculated s.c. in the ventral area. After 2 days animals received an i.v. injection of 2×10^6 human peripheral blood lymphocytes (PBLs). The mean tumor volume \pm s.d. (b) and the Kaplan-Meier survival curves (c). Mice from group B showed significant tumor growth inhibition ($P = 0.035$) and survived significantly longer ($P = 0.0481$) than control mice.

The group of mice with α CEA/ α CD3 diabody-secreting neovessels (group B) showed consistently slower tumor growth rate and statistically significant difference in tumor volume compared with the group of mice bearing control neovessels (group A) in three independent experiments (Figures 2b and 3; Supplementary Figure 1). Moreover, in the three experiments the survival times between factory neovessels-bearing and control mice differed significantly ($P < 0.05$). Overall, mice with diabody-secreting neovessels survived an average of 23 days longer than control mice. No therapeutic effect of angio-secreted α CEA/ α CD3 diabo-

dies was observed in the absence of human T cells (group C) (Figure 3; data not shown).

Tumor homing of human T cells

To show tumor homing of human T cells, we retrieved tumors 2 days after T-cell injection and analyzed immunohistochemically. T cells could be clearly identified with a mouse mAb anti-human CD3 (Supplementary Figure 2). Previously, circulating T human lymphocytes with the original phenotype had been detected in peripheral blood by fluorescence-activated cell sorting 24 h after administration (Figures 4a and b).

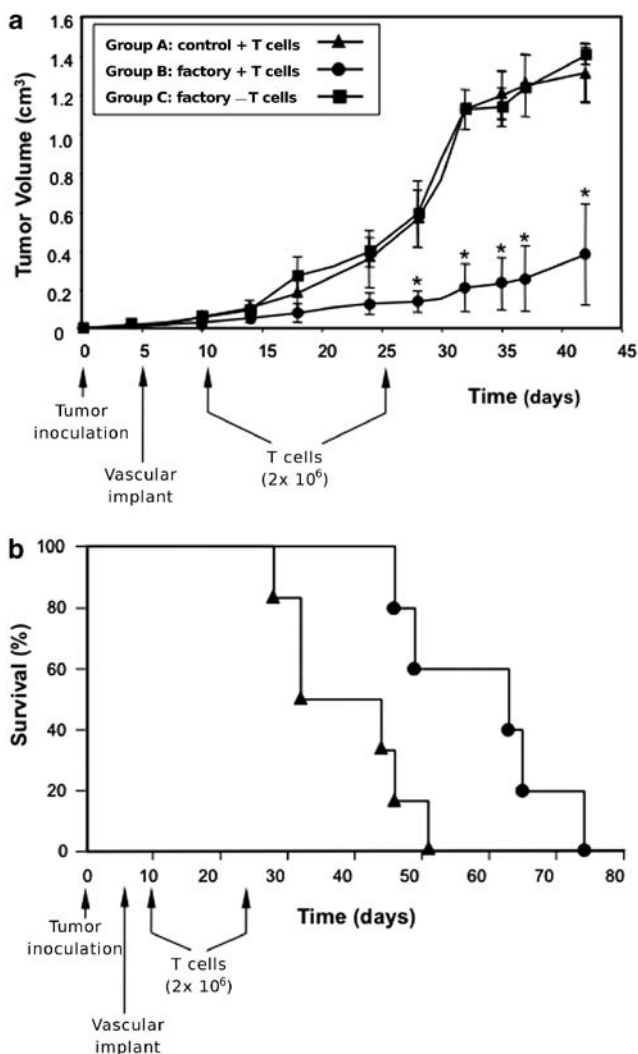


Figure 3 The mean tumor volume \pm s.d. (a) and the Kaplan–Meier survival curves (b) of nude mice bearing human colon carcinoma xenografts after implantation of control or factory neovessels. HCT-116 cells (2×10^6) were injected s.c. into the dorsal skin of nude mice ($n = 5$ mice per group). At 5 days after cell inoculation, either control neovessels (group A) or factory neovessels (groups B and C) were implanted s.c. in the ventral area. At days 10 and 25 mice from groups A and B received an i.v. injection of 2×10^6 human peripheral blood lymphocytes (PBLs). Mice from group C received phosphate-buffered saline (PBS) instead of lymphocytes. Mice from group B showed significant tumor growth inhibition ($P = 0.02$) and survived significantly longer ($P = 0.0333$) than control mice.

Human T cells localized to tumors, as further assessed by the detection of human CD3 transcripts by real-time-PCR. Percentage of CD3 RNA with respect to total RNA in tumors peaked at day 2 after inoculation and subsequently decreased, being still detectable at day 15 (Figure 4c). Most remarkably, expression of CD3 RNA was far more abundant in mice bearing factory neovessels, indicating that T-cell infiltration was higher than in the control group (Figure 4c).

Discussion

Here, we show for the first time the capability of engineered human blood vessels to secrete a recombi-

nant bispecific antibody. This strategy allows systemic release of sustainedly high antibody levels, and induces tumor growth inhibition *in vivo* after i.v. injection of human T lymphocytes. T-cell-activating bispecific antibodies are able to target polyclonal T-cell populations on tumor cells and are considered powerful reagent for cancer immunotherapy. Indeed, several groups have used bispecific antibodies successfully in both animal models^{16,17} and humans.¹² Recently, it was reported that systemically administered recombinant α CD19/ α CD3 antibodies induced partial and complete responses in patients with refractory non-Hodgkin's lymphoma.¹² However, practical use of systemically administered recombinant antibody fragments is limited, by problems related to large-scale production and biodistribution.^{9,17}

In situ secretion of therapeutic antibodies is an attractive alternative to systemic administration of antibody fragments. *In situ* expression potentially circumvents problems of tumor penetration and compensates for the rapid blood clearance of antibody fragments and could make the antibody less immunogenic and better tolerated.^{9,17} The use of gene therapy methods offers additional benefits by achieving sustained and effective concentrations of therapeutic antibodies directly at points of target intervention. In fact, we have previously shown that human T lymphocytes, transduced *ex vivo* to secrete the α CEA/ α CD3 diabody in autocrine manner, inhibited the growth of CEA-positive tumors.⁸ However, the short life span of activated human T lymphocytes and their inefficient transduction constitute important drawbacks for their application in cancer therapy.

Another strategy to deliver therapeutic genes to tumors is to exploit the tumor-targeting capabilities of certain cells, as bone-marrow-derived stem cells, that after systemic administration are supposed to migrate to and infiltrate primary and metastatic solid tumors.¹⁸ However, incorporation into the tumor microenvironment is not always apparent. What is more, the role of recruited MSC in the tumor microenvironment remains unclear, given that recent evidence also suggests that they could have a role in tumor growth and metastasis.^{10,19} This implies a potential risk in the use of MSCs in cell-based anticancer therapies,¹⁵ especially when MSCs are inoculated in the vicinity of tumor cells or allowed to migrate toward them.

In fact, for strategies where cells are used as therapeutic factories, their ability to disseminate throughout the body is not required, or is even undesirable. Producer cells can be confined to scaffolds that keep cells at the implantation site, although the therapeutic protein may act at distance if secreted into circulation.²⁰ Recent studies established the feasibility of using gene-modified MSCs embedded in matrix scaffolds, as cell factories for the production of therapeutic protein.^{10,21} According to our histological study data MSCs in factory 'plugs' do not organize or differentiate into recognizable structures (unpublished results). Conversely, the co-implantation of HUVECs and MSCs in Matrigel produces mature blood vessels that are connected with the host vascular bed,² allowing immediate systemic release of the expressed protein. This could explain why plasma concentration of α CEA/ α CD3 diabody in mice bearing factory neovessels dropped less than 30% with respect to the peak of expression. Interestingly, plasma levels of diabody produced by in

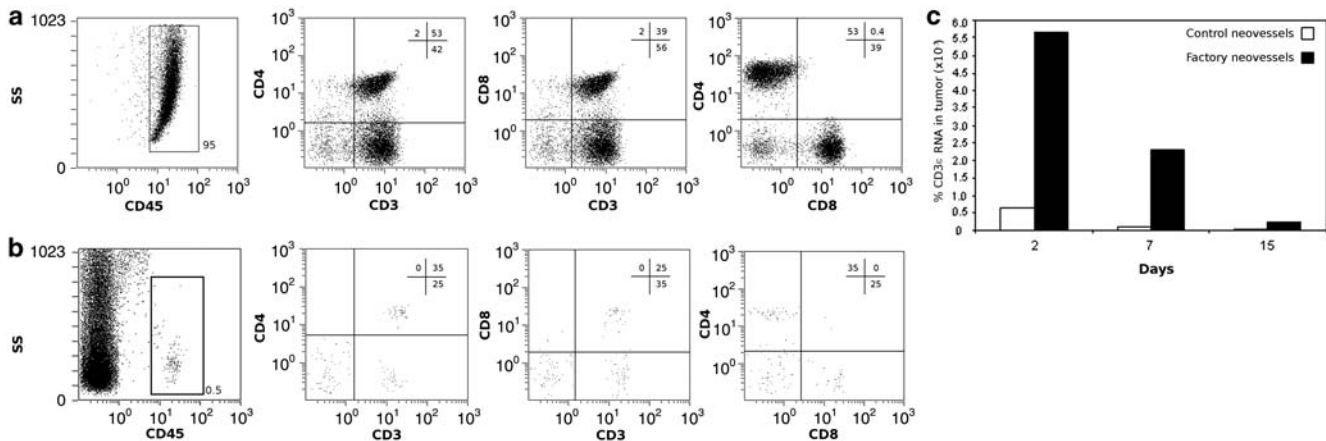


Figure 4 (a) Flow cytometry analysis of *in vitro* expanded human T-cell phenotype before inoculation. (b) Flow cytometry detection of circulating human T cells 24 h after i.v. injection. (c) Percentage of human CD3 ϵ RNA transcripts with respect to total RNA from tumors of mice receiving human T cells and bearing control or factory neovessels.

mice implanted with MSCs in the same lapse of time dropped more than 80% with respect to the peak of expression.¹⁰ Even after a single administration of human T cells to factory neovessels-bearing mice, the *in vivo* secretion of diabody is correlated with a significant therapeutic effect. We could hypothesize that this effect should be significantly improved in a human host, with a continuous supply of human T cells.

The 'factory neovessel' approach offers the added advantage of gene-modifying terminally differentiated EC that will remain quiescent after blood vessel formation, avoiding the potential risks of stem cells. MSCs in this model are not only the source of mural cells, but also show immunomodulatory properties that may protect producer ECs from immune responses. Subcutaneous delivery of ECs would provide an easily accessible vascular implant that could be retrieved once the therapeutic effect is fulfilled, increasing tolerance and facilitating the application in a clinical setting.

Factory neovessels secreting other types of therapeutic proteins could easily be engineered encompassing a wide range of applications (inherited or acquired diseases). The neovessels formed in this way can serve as a continuous drug delivery system to replace periodic administration of the needed protein. In a different setting, VEGF-transduced ECs could enhance angiogenesis in revascularization therapies.

Materials and methods

Cells and culture conditions

Human umbilical vein endothelial cells, isolated from human umbilical cord veins by collagenase treatment, were kindly provided by M Feijóo (Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain) and cultured in EGM-2 medium containing 2% fetal bovine serum and EC growth supplements (Cambrex, Baltimore, MD, USA). Human MSCs were obtained from bone marrow samples from healthy donors after informed consent. MSCs were purified, expanded and characterized as previously described.^{2,10} MSCs were used for experiments between the third and fourth passages. Human peripheral blood lymphocytes were isolated from healthy donors

peripheral blood by density-gradient centrifugation. Cells were expanded and characterized by flow cytometry as described.⁸ Human colon carcinoma cell line HCT-116 (CCL-247; ATCC, Rockville, MD, USA) was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum.

Lentiviral vectors and cell transduction

The vector pRRL.dAb. EGFP promotes the expression of a bispecific α CEA/ α CD3 diabody and EGFP⁸ and the vector pRRL-Luc-EGFP promotes the expression of firefly luciferase and EGFP.² Lentiviral particles were produced by co-transfection of 293T cells through calcium phosphate precipitation method. HUVEC passage 1 were seeded at a density of 7.5×10^3 cells per cm², allowed to adhere and infected overnight with the lentivirus dAb-EGFP (HUVEC^{dAb}) or Luc-EGFP (HUVEC^{Luc}) at a final multiplicity of infection of 10. EGFP transgene expression was monitored by flow cytometry. Conditioned medium from transduced HUVECs was analyzed for α CEA/ α CD3 diabody secretion by enzyme-linked immunosorbent assay as described.⁸ Transgene expression *in vitro* was monitored for more than 50 days. Transduced HUVECs were used *in vivo* in passages 3–5.

Mice

Five-week-old female athymic nude mice (Hsd: athymic Nude/Nude; Harlan Iberica, Barcelona, Spain) were used. All animals were maintained in a sterile environment. Cages, bedding, food and water were autoclaved. Anesthesia was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of a combination of ketamine (Ketolar; Pfizer, New York, NY, USA) and diazepam (Valium; Roche, Nutley, NJ, USA). All mice were handled in accordance with the guidelines of institutional animal care and use committee and the experiment was performed in accordance with Spanish legislation.

Vascular implants

A mixture of either HUVEC^{Luc} or HUVEC^{dAb} (3×10^5) with MSCs (7.5×10^4) was suspended in 200 μ l Matrigel (BD Biosciences, Erembodegen, Belgium) and inoculated s.c. in opposite flanks in the ventral area of nude mice, as described.² All batches of Matrigel were adjusted to

8 mg ml⁻¹ by addition of phosphate-buffered saline and supplemented with heparin (128 U ml⁻¹ final concentration; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), human VEGF (50 ng ml⁻¹) and human bFGF (150 ng ml⁻¹) (both from PeproTech, London, UK). Mice were bled by retro-orbital puncture and α CEA/ α CD3 diabody plasma concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay.⁸

In vivo effect of vascular implants

HCT-116 tumor cells (2×10^6) were inoculated s.c. into the dorsal space of nude mice. At 5 days after tumor implantation, mice received HUVEC^{Luc} implant and HUVEC^{dAb} implant injected s.c. in opposite flanks in the ventral area. Control group received only the HUVEC^{Luc} implant. After 2 days, mice received i.v. injection of human T lymphocytes (2×10^6). Tumor volumes were determined at various time points using the formula: width² \times length \times 0.52. In a follow-up study mice received two i.v. injections (days 10 and 25) of human T lymphocytes (2×10^6). Some animals were killed at different time points to analyze the systemic distribution and tumor localization of human T lymphocytes.

In vivo bioluminescence imaging

Mice were imaged using the high-resolution charge-coupled device cooled digital camera ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics France, Massy, France) and Wasabi software (Hamamatsu Photonics). Animals were injected i.p. with 125 mg kg⁻¹ (150–200 μ l) D-luciferin (Promega, Madison, WI, USA) 10 min before imaging. BLI was collected with 1 min integration time and pseudocolor representations of light intensity were superimposed over the gray scale reference image acquired at low light (exposure time 20 ms). An average of six kinetic BLI acquisitions were collected after substrate injection to confirm a peak of photon emission. For quantification of the detected light, regions of interest were drawn and the light emitted from each region was assessed by recording the total number of photons per second (total flux) after background subtraction.

Flow cytometric identification of circulating human T lymphocytes in recipient mice

Blood samples (100 μ l) were obtained by retro-orbital puncture before and after (days 1 and 7) i.v. injection of *in vitro* expanded human T lymphocytes. Blood samples were collected aseptically using EDTA as anticoagulant. Circulating human T cells were identified using anti-human CD45-FITC (clone B3821F4A), CD4-RD1 (clone SFC112T4D11), CD8-ECD (clone SFC121Thy2D3) and CD3-PC5 (clone UCHT1) mAbs (Beckman Coulter Inc., Galway, Ireland). Erythrocyte lysis procedure was performed using the TQ-Prep workstation (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA), and samples were analyzed using an EPICS XL flow cytometer (Coulter Electronics).

RNA isolation

At different time points after i.v. injection of human T cells, animals were killed. Blood, tumor and organs (lung, liver and spleen) were removed and processed for total RNA isolation. Approximately 1 ml EDTA blood

was mixed with 5 ml of ACK lysis buffer (BioWhittaker, Lonza, Walkersville, MD USA) and incubated for 10 min at room temperature. After centrifugation the buffer was removed and the cell pellet was resuspended in 350 μ l RLT buffer (Qiagen, Basel, Switzerland), total RNA was isolated with the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Total RNA isolation of tumor and organs was performed using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). For disruption and homogenization of samples, MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics, IN, USA) were used according to the manufacturer's protocol.

Reverse transcription, primers and real-time polymerase chain reaction

cDNA was synthesized using 0.5 μ g of total RNA from blood, tumor and organs, by random primed reverse transcription with First Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics) according to the recommended protocol. Real-time PCR (RT-PCR) was performed in a LightCycler 480 apparatus (Roche Diagnostics) using the LightCycler FastStartPLUS DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). mRNA expression in each sample was measured as a ratio against the geometric average of the reference house-keeping human gene succinate dehydrogenase complex subunit A (hSDHA). The relative concentrations of the target and the reference genes were calculated by interpolation using a standard curve of each gene plotted from the same serial dilution of cDNA. For human CD3 ϵ (hCD3) detection in tumors, a standard curve was generated mixing, at different percentages, RNA from *in vitro* expanded human T cells and tumor RNA from mice that did not receive human T cells. The quantitative mRNA analysis was performed in duplicate. PCR primers for hCD3, hSDHA and murine SDHA (mSDHA) were designed with Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and were placed in two exons to eliminate amplification for genomic DNA. The following primers (5'-3') were used: hCD3, forward (F)-CTACCCAGAGGAAGCAAACC and reverse primer (R)-gacatcacatcctctcatgc; hSDHA (F)-TGGGAACAAGAGGCATCTG and (R)-CCACCACTGCATCAAATTCATG and mSDHA (F)-GCAGTTTCGAGGCTTCTTCG and (R)-AAGTGAAAGCCGCAGGTCTG. The resulting amplicons had a size of approximately 100 pb.

Histology and immunohistochemical study of tumors

Tumors were retrieved 2, 7 and 15 days after i.v. injection of human T lymphocytes, and at the end of study were formalin-fixed and paraffin-embedded. Sections were stained with hematoxylin and eosin according to standard protocols. Human T lymphocytes were visualized with mouse anti-human CD3 ϵ mAb, clone F7.2.38 (Dako, Glostrup, Denmark) using the Mouse on Mouse (M.O.M) peroxidase kit (Vector, Burlingame, CA, USA).

Statistical analysis

The SPSS version 14.0 software was used for statistical analysis. Repeated-measures analysis of variance model was used to compute the statistical significance of differences between groups. All *P*-values were two sided and values of 0.05 or less were considered to indicate statistical significance.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

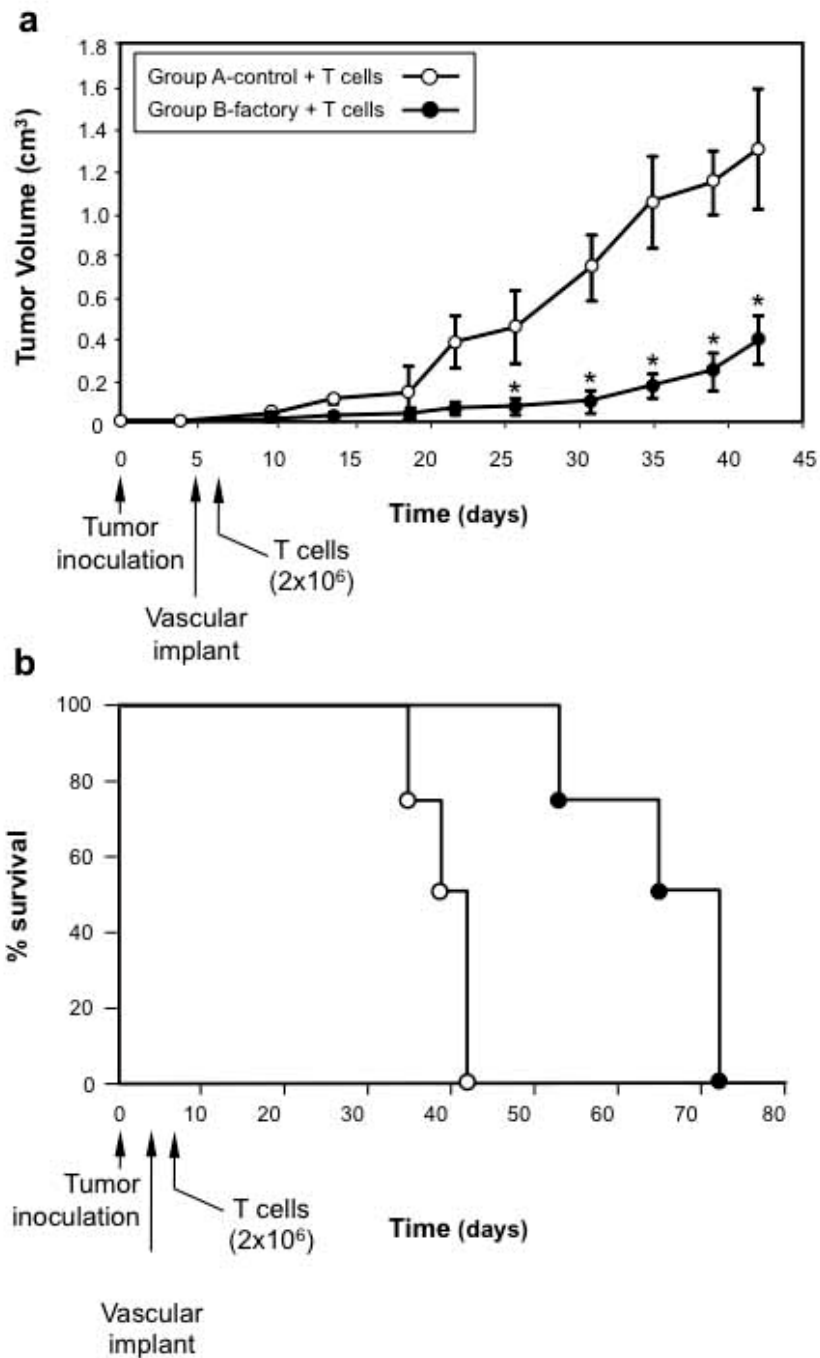
Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2008-03233), the Comunidad Autónoma de Madrid (S-BIO-0236-2006) and the European Union (Immunonet-SUDOE) to LA-V; and from the Fondo de Investigación Sanitaria (PI061621) to LS. MC was supported by Instituto de Salud Carlos III (Contrato Rio Hortega, CM06/00055). DS-M was supported by a Comunidad Autónoma de Madrid/European Social Fund training grant (FPI-000531). LS is an investigator from the Ramón y Cajal Program (Ministerio de Ciencia e Innovación), co-financed by the European Social Fund. VAC is a predoctoral fellow from the Gobierno Vasco (BFI07.132).

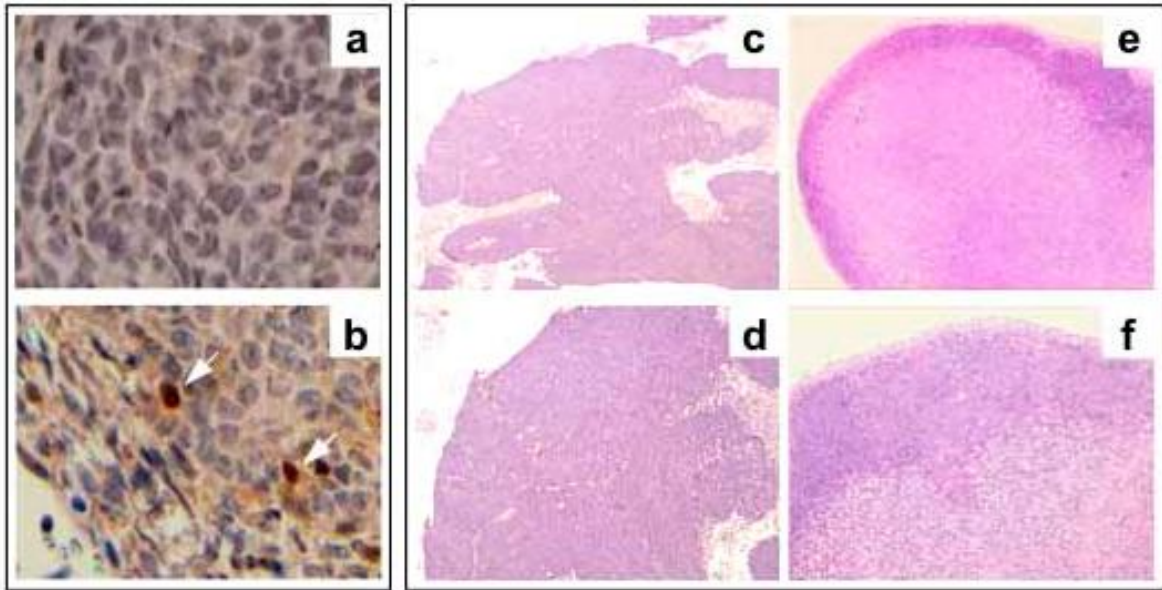
References

- 1 Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* 2004; **428**: 138–139.
- 2 Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, Salas C, Serrano A, Vicario JL *et al*. Long-term *in vivo* imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc Res* 2008; **75**: 308–314.
- 3 Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* 2008; **111**: 4551–4558.
- 4 Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. *In vivo* vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood* 2007; **109**: 4761–4768.
- 5 Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, Khan ZA, Yuan L, Oettgen P *et al*. Engineering robust and functional vascular networks *in vivo* with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res* 2008; **103**: 128–130.
- 6 Sanz L, Kristensen P, Blanco B, Faceteau S, Russell SJ, Winter G *et al*. Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by *in situ* production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Therapy* 2002; **15**: 1049–1053.
- 7 Blanco B, Holliger P, Vile RG, Ivarez-Vallina L. Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells. *J Immunol* 2003; **171**: 1070–1077.
- 8 Compte M, Blanco B, Serrano F, Cuesta AM, Sanz L, Bernad A *et al*. Inhibition of tumor growth *in vivo* by *in situ* secretion of bispecific anti-CEA x anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. *Cancer Gene Ther* 2007; **14**: 380–388.
- 9 Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005; **23**: 1126–1136.
- 10 Compte M, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Alonso-Camino V, Vicario JL, Sanz L *et al*. Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds. *Stem Cells* 2009; **27**: 753–760.
- 11 Holliger P, Manzke O, Span M, Hawkins RE, Fleischmann B, Qinghua L *et al*. Carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell activation in colon carcinoma induced by anti-CD3 x anti-CEA bispecific diabodies and B7 x anti-CEA bispecific fusion proteins. *Cancer Res* 1999; **59**: 2909–2916.
- 12 Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Know S *et al*. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008; **321**: 974–977.
- 13 Holliger P, Prospero T, Winter G. 'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6444–6448.
- 14 Perisic O, Webb PA, Holliger P, Winter G, Williams RL. Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment. *Structure* 1994; **2**: 1217–1226.
- 15 Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 2008; **26**: 1387–1394.
- 16 Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1999; **11**: 558–562.
- 17 Sanz L, Blanco B, Alvarez-Vallina L. Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol* 2004; **25**: 85–91.
- 18 Aboody KS, Najbauer J, Danks MK. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Therapy* 2008; **15**: 739–752.
- 19 Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW *et al*. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; **49**: 557–563.
- 20 Roth JC, Curiel DT, Pereboeva L. Cell vehicle targeting strategies. *Gene Therapy* 2008; **15**: 716–729.
- 21 Eliopoulos N, Francois M, Boivin MN, Martienau D, Galipeau J. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. *Cancer Res* 2008; **68**: 4810–4818.

Supplementary Information accompanies the paper on Gene Therapy website (<http://www.nature.com/gt>)



Supplementary Figure 1. The mean tumor volume \pm S.D (a) and the Kaplan-Meier survival curves (b) of nude mice bearing human colon carcinoma xenografts after implantation of control or factory neovessels. HCT-116 cells (2×10^6) were injected s.c. into the dorsal skin of nude mice ($n = 4$ mice per group). Five days after cell inoculation, either control neovessels or factory neovessels were implanted s.c. in the ventral area. At day 7 animals received an i.v. injection of 2×10^6 human PBLs. Mice from group B exhibited significant tumor growth inhibition ($p = 0.037$) and survived significantly longer ($p = 0.0122$) than control mice.



Supplementary Figure 2. Immunohistochemical analysis of tumors from mice bearing control (a) and factory neovessels (b) two days after injection of human T cells, stained with anti-human CD3e mAb. The white arrows indicate positive human CD3+ cells. Histological appearance of tumor specimens from mice bearing control (c and e) or factory neovessels (e and f). Original magnifications: a and b, x40; e and g, x5; f and h, x10.

DISCUSIÓN

La ingeniería de anticuerpos está contribuyendo a mejorar la eficacia de las estrategias de inmunoterapia del cáncer, gracias al diseño de Ac menos inmunogénicos, con mayor potencia efectora y/o mejores propiedades farmacocinéticas [94]. En este sentido, los AcBis representan una de las estrategias más prometedoras [155]. Aunque la mayoría de AcBis están en los estadios iniciales del desarrollo clínico (fases I y II), un AcBis híbrido (ratón/rata) α EpCAM x α CD3 en formato IgG (catumaxomab) ha sido aprobado por la EMA para el tratamiento de la ascitis maligna [156, 157]. Sin embargo, en un estudio fase I para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico, se estableció que la dosis máxima tolerada de catumaxomab en protocolos de administración intravenosa múltiple era de sólo 5 μ g [107]. Esto es debido a que el *crosslinking* del CD3 mediado por catumaxomab a través del dominio Fc y células inmunes accesorias que expresan FcR promueve la activación simultánea de ambos tipos celulares, con la subsiguiente liberación masiva de citoquinas.

Por este motivo, el futuro de los AcBis pasa necesariamente por el empleo de formatos recombinantes (AcBisR) que carecen de dominios Fc, como los *diabodies* y los fragmentos scFv bivalentes de cadena única tipo (scFv)₂. Numerosos estudios preclínicos han demostrado la eficacia de ese tipo de AcBisR [158]. En ensayos clínicos (fase I y II) realizados en pacientes con linfoma no Hodgkin de célula B y leucemia linfocítica crónica tratados con un (scFv)₂ α CD19 x α CD3, blinatumomab, se obtuvieron resultados clínicos muy prometedores [115]. Sin embargo, estos AcBisR que carecen de dominios Fc, presentan una vida media sérica muy corta (2-3 horas) y deben ser administrada mediante bombas de infusión continua. Además, la producción y purificación de Ac recombinantes para uso terapéutico requiere el empleo de tecnologías muy sofisticadas y extremadamente caras.

Las estrategias basadas en la generación de vehículos celulares para la secreción *in vivo* de proteína terapéutica representan una alternativa a los protocolos basados en la administración repetida de altas dosis de proteína purificada (Figura 3). Estas estrategias han demostrado su eficacia a nivel preclínico en diversos contextos patológicos, mediante: (1) el empleo de tipos celulares diversos (células autólogas, alogénicas, progenitoras o maduras), y (2) la secreción de diferentes tipos de proteína (citoquinas, Ac recombinantes, agentes inhibidores de la angiogénesis o inductores de apoptosis, factores de crecimiento, factores de coagulación, etc.). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, este tipo de estrategias presentan limitaciones debido a las dificultades para alcanzar niveles de secreción suficientemente elevados y sostenidos en el tiempo, necesarios para obtener un efecto terapéutico. En este trabajo describimos, por primera vez, la utilidad de diferentes tipos celulares modificados genéticamente *ex vivo* como vehículos para la secreción a largo plazo de un AcBisR.

En un trabajo previo de nuestro grupo se había demostrado la posibilidad de modificar *ex vivo* la línea celular HEK-293 para la secreción intratumoral de un AcBisR α CEA x α CD3 en formato *diabody*. La inoculación conjunta de las células tumorales CEA⁺, células HEK-293

secretoras de *diabody* y linfocitos T humanos originó una respuesta antitumoral significativa [93]. Sin embargo, este modelo era muy complejo y no aplicable en la práctica clínica, por lo que nos planteamos investigar el uso de tipos celulares alternativos para identificar el vehículo más idóneo.

1.- Linfocitos T: capacidad de localización, secreción y actividad citotóxica

Las células del sistema inmune han sido utilizadas como vehículos celulares debido a razones prácticas (facilidad para su obtención y expansión *in vitro*) y tácticas (tropismo tumoral) [159-162]. Sin embargo, las células hematopoyéticas primarias son difíciles de modificar genéticamente, y es necesario el uso de vectores virales para la transferencia del gen terapéutico. Diferentes grupos de investigación han demostrado el potencial de los lentivirus para infectar distintos tipos de células hematopoyéticas primarias: linfocitos B y T [163, 164], células NK [165, 166], macrófagos y células dendríticas [167, 168] o células progenitoras CD34⁺ [169, 170]. Los vectores lentivirales permiten transferir genes de gran tamaño, presentan un riesgo de mutagénesis insercional menor que el de los vectores oncorretrovirales convencionales y a diferencia de éstos son capaces de infectar células en reposo [154].

Por ello generamos un vector lentiviral que codifica para el AcBisR α CEA x α CD3 en formato *diabody*, usando un sistema en el que la proteína de la envuelta del VIH es sustituida por la proteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), debido a su amplio tropismo y estabilidad [163, 170]. Inicialmente estudiamos la capacidad de este sistema viral para infectar un panel de líneas celulares hematopoyéticas humanas: células T, B, NK y monocitos. Aunque todas las líneas celulares transducidas eran capaces de secretar niveles detectables de *diabody*, las líneas celulares T eran las que secretaban niveles más altos. Aunque no disponemos de datos precisos creemos que estas diferencias pueden atribuirse más a la eficiencia de transducción que a factores relacionados con la estirpe celular.

El siguiente paso consistió en comprobar la capacidad del vector lentiviral para transducir células T humanas primarias, mucho más atractivas como vehículos celulares. No hay que olvidar que los linfocitos T pertenecen al escaso grupo de células que no son permisivas a la infección en estado de reposo, por lo que se requiere su activación con AcMo anti-CD3 y anti-CD28 y/o IL-2 [163]. Aproximadamente un 35% de los linfocitos T humanos infectados con el vector lentiviral expresaban EGFP, y la mayoría de las células EGFP⁺ presentaban un fenotipo CD3⁺CD4⁺, que se corresponde con el de la población celular diana del VIH. Aunque este porcentaje puede parecer bajo, está dentro del rango obtenido por otros grupos de investigación empleando sistemas virales similares. Así, en un ensayo clínico en pacientes con neuroblastoma en el que se transdujeron linfocitos T con lentivirus que codificaban para un CAR anti-GD2, la eficiencia media de transducción estaba próxima al 40% [171].

Los linfocitos T transducidos *in vitro* secretaron niveles apreciables de *diabody* funcional, y dicha secreción se prolongó durante varias semanas. Es más, el *diabody* secretado a nivel intratumoral por linfocitos T transducidos, originó una inhibición significativa del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de colon CEA⁺.

Los resultados de este trabajo permiten concebir una estrategia terapéutica basada en la generación *ex vivo* de poblaciones de linfocitos T secretores de AcBisR α AAT x α CD3, que una vez expandidas serían reinfundidas en el paciente por vía sistémica. Estos linfocitos T realizarían una triple función: (1) localización tumoral (*Tumor Targeting*), como consecuencia de su tropismo natural, (2) vehículo celular, asegurando la secreción intratumoral mantenida de del AcBisR funcional, y (3) actividad efectora, ya que el AcBisR actuaría de forma autocrina redirigiendo la actividad citotóxica de los linfocitos T hacia las células tumorales AAT (Figura 5). Es más, el AcBisR secretado por las células T transducidas también podría activar de forma paracrina sobre otras poblaciones T “nativas” residentes en el tumor, amplificando la respuesta efectora (efecto *bystander*). Este efecto no se da en otro tipo de estrategias antitumorales basadas en la modificación génica de linfocitos T, como las que tienen por objeto la expresión de TCR o CAR específicos.

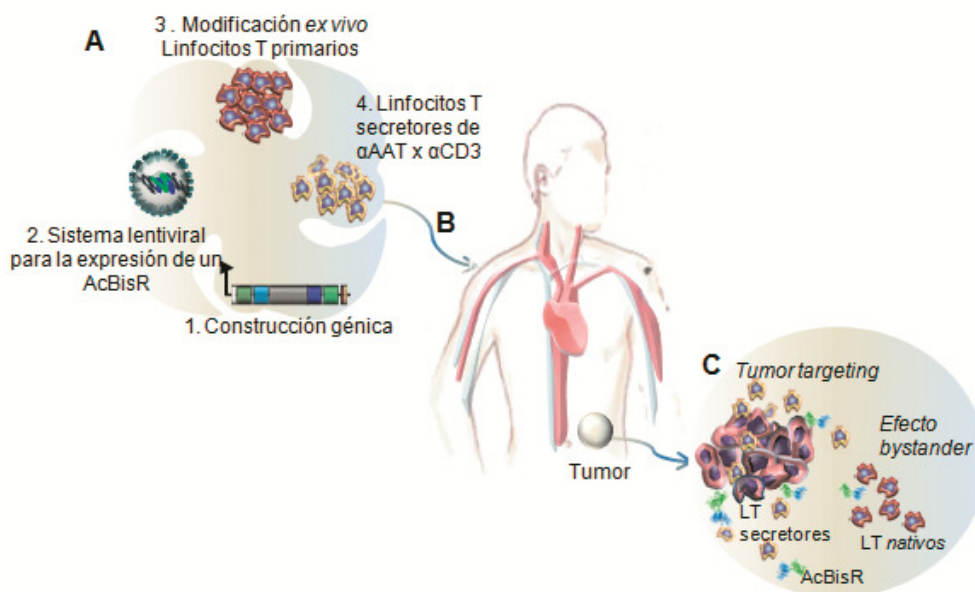


Figura 5. Representación esquemática de la generación de linfocitos T secretores de AcBisR. (A) Diseño de una construcción génica y de un sistema viral para la expresión de un AcBisR α AAT x α CD3; aislamiento, modificación *ex vivo* y expansión de linfocitos T primarios secretores del AcBisR. (B) Reinfusión de la población linfocitaria secretora al paciente (C) Actividad citotóxica específica a nivel tumoral: *tumor targeting*, infiltración, secreción intratumoral del AcBisR y efecto *bystander*.

Se podría considerar por tanto, al menos desde un punto de vista teórico, que la administración de un reducido número de este tipo de linfocitos T autólogos genéticamente modificados permitiría una secreción sostenida y localizada del AcBisR, que a su vez produciría

una activación Ag específica de los linfocitos T restringida al área tumoral. Aún en el caso de que el AcBisR difundiera fuera del tumor, el riesgo de activación linfocitaria inespecífica sería nulo al carecer de región Fc.

Se trata en definitiva de una aproximación elegante en su simplicidad, en la que la factoría celular responsable de la producción de la proteína terapéutica es también la célula diana cuya activación va a potenciar la respuesta antitumoral. Una limitación de esta estrategia podría ser la relativamente baja eficacia de transducción viral observada en las células T y la necesidad de preactivación. Sin embargo, recientes avances en el diseño de la envuelta del virus, como la sustitución de la proteína VSV-G por la glicoproteína del virus del sarampión, pueden permitir una transducción eficiente de linfocitos T *naïve*, sin alterar su fenotipo y propiedades biológicas originales [172].

2.- Células progenitoras mesenquimales y *organoides*: las nuevas bombas de infusión biológica

El tipo celular idóneo para la generación de factorías celulares debería tener una vida media larga que asegurara la producción de la proteína terapéutica durante el tiempo necesario para ejercer su efecto y consolidarlo. Los linfocitos T *naïve* presentan esa cualidad, ya que pueden persistir durante años en el organismo, pero durante el proceso de transducción con lentivirus pseudotipados se requiere una estimulación previa, lo que puede alterar sus propiedades biológicas. Es más se ha documentado que el proceso de transducción y posterior expansión de los linfocitos T puede afectar también a su capacidad de *homing* y modular su capacidad efectora [173].

Para conseguir una producción sostenida en el tiempo de la proteína terapéutica, las células progenitoras adultas constituyen una elección obvia al tratarse de células no diferenciadas con gran capacidad de expansión. Basándonos en estas premisas, comparamos el potencial de células progenitoras adultas humanas de origen hematopoyético (HSC) y no hematopoyético (MSC) como factorías celulares. Las HSC han sido ampliamente utilizadas en protocolos de terapia génica de enfermedades monogénicas. Por su parte, las MSC tienen un importante papel en medicina regenerativa, y se han utilizado más recientemente en protocolos de terapia antitumoral. Diferentes estudios experimentales han demostrado que las MSC, administradas por vía sistémica o intratumoral, pueden utilizarse como vehículos para la secreción de proteínas terapéuticas [146-148], aprovechando su potencial tropismo tumoral [138].

Como pudimos comprobar, las HSC son células con un proceso de aislamiento y expansión complejo y caro, que además presentaban una baja eficiencia de transducción con vectores lentivirales convencionales. Por el contrario, las MSC representan una excelente

alternativa como vehículo celular, ya que resultaron fáciles de obtener y expandir, así como de transducir usando este tipo de vectores virales, como ya se había descrito previamente [174-176].

Otra ventaja de este tipo celular es su *menor inmunogenicidad*, debido principalmente a que no expresan moléculas MHC de clase II, y a la baja expresión de moléculas MHC de clase I y moléculas de coestímulo, como CD80 y CD86 [177, 178]. Estas características hacen que sean menos sensibles a la actividad citolítica mediada por linfocitos T u otras células del sistema inmune, reduciendo los riesgos de un posible rechazo inmune y por tanto prolongando su vida útil. Esto, unido a su supuesta capacidad de localización tumoral, las ha hecho especialmente atractivas en estrategias antitumorales.

Sin embargo, hay dos aspectos de las MSC que desaconsejan su uso en este tipo de estrategias, al menos en las que pueda establecerse contacto directo entre MSC y célula tumoral: su capacidad inmunomoduladora y proangiogénica.

El efecto inmunomodulador de las MSC, al menos *in vitro*, abarca la inhibición de la proliferación de linfocitos T [179, 180] y células NK [181], la inhibición de la diferenciación y activación de las DC [182-184], la inducción de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ [185], y la reprogramación de macrófagos de M1 a M2 [186]. Estos efectos se han atribuido, al menos parcialmente, a la producción de IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) y de PEG2 (prostaglandina E2) [141, 187]. También nosotros hemos comprobado este efecto inmunomodulador en ensayos *in vitro* en los que las MSC fueron capaces de inhibir la proliferación específica de linfocitos T primarios, mediada por el *diabody* α CEA x α CD3, en un cocultivo con células tumorales CEA⁺.

A las MSC también se les atribuyen propiedades proangiogénicas, dada su capacidad de producción de factores solubles como VEGF y FGF [188]. Nuestro grupo también ha demostrado que en un modelo de angiogénesis humana en ratones inmunodeficientes, la coimplantación de MSC junto con células HUVEC contribuye de forma decisiva a la formación y maduración de los neovasos [142]. Es más, cuando se co-implantan MSC y células tumorales *in vivo*, apreciamos un aumento significativo del crecimiento tumoral, que se correlaciona con una mayor densidad microvascular.

Evidentemente, el aumento de la vascularización puede favorecer el crecimiento tumoral, pero también se ha descrito un papel directo de la MSC sobre la proliferación de la célula tumoral, atribuido en algún caso a la diferenciación de las MSC en fibroblastos asociados a carcinoma (CAF del inglés, *Cancer-Associated Fibroblasts*) en el estroma tumoral [189]. Por otro lado, también se ha descrito el papel de las MSC en la metástasis del cáncer de mama sin afectar al crecimiento del tumor primario, atribuido en este caso al eje CCL5-CCR5 [143].

En conjunto, estos datos sugieren, que en procesos tumorales la administración de MSC como vehículos terapéuticos no está exenta de riesgos. Por ello nos planteamos diseñar una alternativa terapéutica que permitiera confinar las MSC en una localización anatómica concreta, alejada del tumor y que permita la liberación a la circulación sistémica del *diabody* (Figura 6).

El modelo de angiogénesis humana *in vivo* descrito por nuestro grupo [142] fue utilizado como plataforma para la generación de un *organoide terapéutico* con potencial utilidad en un contexto clínico. El concepto de *organoide* fue introducido en 2003 por Gallipeau *et al.* [144], que demostraron que la inoculación de células MSC modificadas genéticamente para la producción de EPO (MSC^{EPO}), inducía temporalmente un incremento del hematocrito en modelos *in vivo*, siendo este efecto mucho más persistente en el tiempo cuando las MSC^{EPO} eran embebidas en Matrigel.

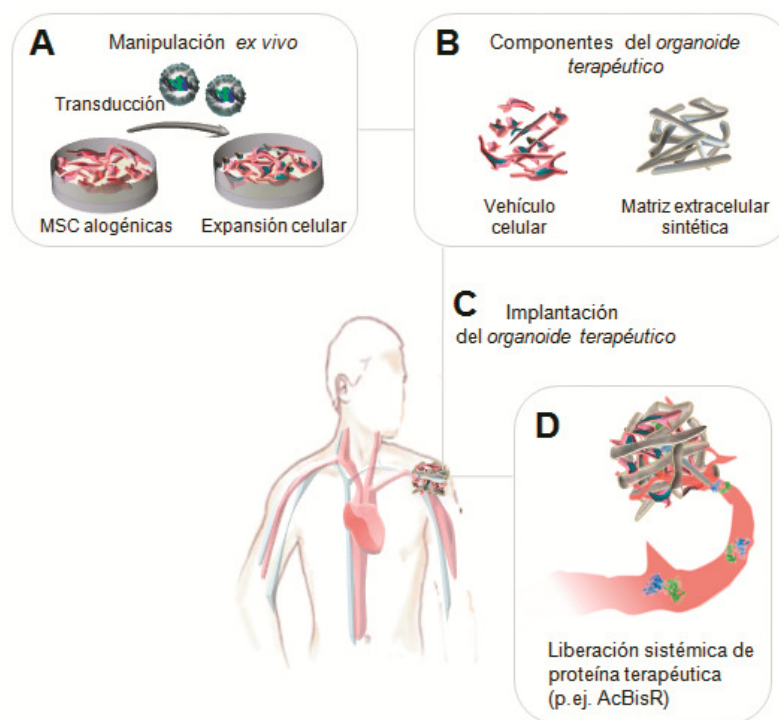


Figura 6. Representación esquemática de la generación de un *organoide terapéutico*. (A) Manipulación *ex vivo* de células progenitoras mesenquimales alogénicas (aislamiento, expansión y transducción con vectores lentivirales) para la generación de los vehículos celulares. (B) Componentes del *organoide terapéutico*. (C) Implantación del *organoide terapéutico* en una localización accesible y distante del tumor. (D) Secreción y liberación sistémica de la proteína terapéutica. Fuente: modificado de Sanz *et al.* Gene Ther (2012) 22:1–7.

Para el proceso de confinamiento de las MSC productoras de *diabody* (MSC^{dAb}) se usó un polímero sintético, muy poco inmunogénico y de consistencia de hidrogel, cuyo uso se ha descrito en numerosos protocolos de ingeniería tisular, pero que no se había utilizado previamente en este contexto [190]. Las características físicas y bioquímicas de este compuesto permiten generar un soporte útil para ensayos *in vivo*, en el que las MSC^{dAb} se mantienen viables ya que permite el aporte de nutrientes y O₂ desde el sistema circulatorio del huésped. Durante el seguimiento *in vivo* de los diferentes *organoides* no observamos diseminación de las MSC a otros territorios, lo que demuestra la seguridad de esta aproximación. Otros grupos han demostrado que MSC de origen murino quedan confinadas en soportes biológicos derivados de matriz extracelular tras su implantación *in vivo* en aproximaciones de terapia regenerativa [191].

El mismo grupo que introdujo el concepto de *organoide* ha descrito recientemente el efecto terapéutico de la IL-12 producida por MSC modificadas genéticamente, embebidas en una matriz de colágeno de origen bovino e inoculadas en el área peritumoral, en un modelo murino de cáncer de mama [142, 149]. Sin embargo, sólo se evidenció efecto antitumoral cuando la citoquina se liberaba en la proximidad del tumor y no en el flanco contralateral, lo que supone una limitación importante para su aplicabilidad clínica, ya que los tumores no siempre son accesibles y además resultaría muy complicado o imposible retirar los *organoides*, si fuese necesario.

Sin embargo, en nuestro trabajo con MSC^{dAb}, se evidenció un notable efecto antitumoral mediado por el *diabody* α CEA x α CD3 secretado por un *organoide terapéutico*, implantado en una localización distante del tumor. La liberación sostenida de *diabody* permitió activar los linfocitos T infiltrantes del tumor de manera antígeno específica, y redirigir su actividad citotóxica hacia las células tumorales CEA⁺ (Figura 6).

3.- Células endoteliales y neovasos: liberación inmediata

Estudios recientes realizados por varios grupos así como por el nuestro, han demostrado la posibilidad de generar redes vasculares funcionales (*neovasos*) en ratones inmunodeficientes, mediante la co-implantación de EC y MSC, que actúan como precursoras de las células murales de soporte, embebidas en Matrigel [142, 192-195].

La formación de vasos sanguíneos *de novo* tiene una evidente aplicación en medicina regenerativa. Sin embargo, en este trabajo decidimos explorar la capacidad de las EC humanas (HUVEC) como factorías celulares, aprovechando su estratégica contigüidad con el torrente circulatorio una vez organizadas en estructuras vasculares funcionales. Al igual que observamos con las MSC, las HUVEC secretaron niveles de *diabody* α CEA x α CD3 suficientes para ejercer un efecto terapéutico sobre el crecimiento de un tumor en una localización distante (Figura 7). De hecho, los niveles de *diabody* se mantuvieron más estables cuando la célula productora era una EC, reflejando quizás el hecho de que la conexión directa con el sistema circulatorio del huésped favorecía una rápida liberación a la circulación del *diabody* secretado, situación que en el caso de los *organoides terapéuticos* podría no ser tan favorable.

En realidad, el posible uso de EC modificadas genéticamente para la producción *in vivo* de proteínas terapéuticas fue planteado hace casi 25 años [196]. En este trabajo pionero se usaron vectores retrovirales para transducir EC de conejo, que produjeron *in vitro* hormona del crecimiento durante al menos cuatro semanas. El primer trabajo *in vivo* se publicó cinco años después [197], demostrando que EC implantadas a nivel s.c., en un gel de colágeno, eran capaces de secretar niveles de ApoE detectables en suero durante dos semanas. Poco después, Wei *et al.* [198] monitorizaron la producción de hormona del crecimiento humana por implantes neovasculares durante 340 días. La primera demostración del efecto terapéutico de la proteína

secretada por neovasos es más reciente, y se basa en un modelo murino de hemofilia en el que la modificación *ex vivo* de las EC permitió conseguir niveles efectivos de factor VIII y normalizar la coagulación [199].

Tras la generación de los *neovasos* y del establecimiento de la conexión con el sistema circulatorio del huésped, las EC se mantienen quiescentes durante periodos de tiempo muy largos, lo que resulta muy favorable para este tipo de estrategias (Figura 7). Además, las HUVEC son tan permisivas para la transducción con vectores lentivirales como las MSC. Y además, al tratarse de células maduras, se evita el riesgo de transformación espontánea documentado con las MSC. Aunque este fenómeno se había observado inicialmente en MSC murinas [200] pero no humanas, algunos trabajos abrieron esta última posibilidad [201, 202], que en la actualidad sigue siendo motivo de controversia [203-205].

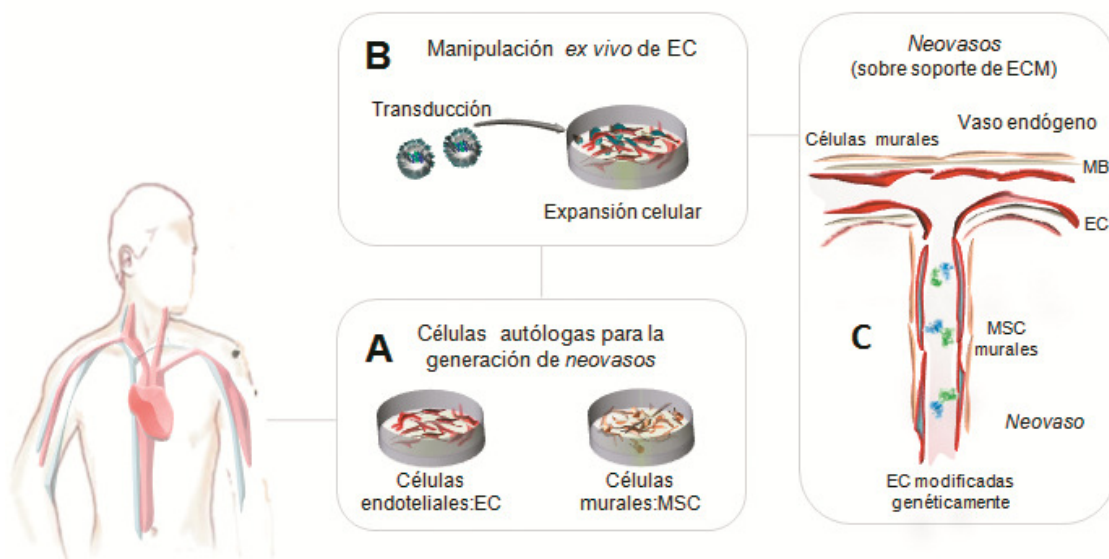


Figura 7. Representación esquemática de la generación de *neovasos* terapéuticos. (A) Aislamiento de MSC autólogas (células murales de soporte) y EC (células endoteliales) para su (B) manipulación y expansión *ex vivo*. (C) Generación de estructuras vasculares funcionales sobre un soporte de ECM, en solución de contigüidad con los vasos endógenos, que permite la liberación inmediata de la proteína terapéutica. (MB, membrana basal). Fuente: modificado de Álvarez-Vallina L; Sanz L. *Exp. Opin. Biol. Ther* (2011) 11:67–76

En sentido práctico, la aplicación clínica de este tipo de estrategias basadas en neovasos requeriría: (1) establecer una fuente de ECs autólogas, y (2) definir el tipo de soporte más apropiado para la generación de una vasculatura funcional estable y compatible con su uso clínico. Respecto al primer punto, es obvio que las HUVEC sólo podrían utilizarse en este contexto de forma muy limitada, pero la optimización de los protocolos de obtención y expansión *in vitro* de EPC a partir de sangre periférica [206], puede suponer una alternativa viable. En este sentido, Melero-Martín *et al.*, han demostrado el potencial vasculogénico *in vivo*

de EPC derivadas tanto de sangre periférica de adultos como de sangre de cordón umbilical [193].

Como en el caso de los organoides de MSC, el Matrigel ha sido ampliamente usado, como soporte de las EC implantadas *in vivo*, pero su origen murino y tumoral imposibilitaría su uso en clínica humana. El ContingenTM, utilizado en los trabajos de Gallipeau *et al.*[145], es una matriz basada en colágeno de origen bovino y aprobada para su uso clínico por la FDA. En el futuro, lo más probable es que en este tipo de aproximaciones las matrices biológicas sean sustituidas por otras de origen sintético. De hecho, ya existen sofisticadas formulaciones de hidrogeles diseñados específicamente para promover angiogénesis y que incluyen sitios de unión para integrinas, factores proangiogénicos y sustratos sensibles a proteasas, o que ofrecen propiedades mejoradas, como una mayor estabilidad mecánica o una mayor durabilidad [207-209].

Perspectivas futuras

En resumen, hemos demostrado el efecto terapéutico *in vivo* de un AcBisR en formato *diabody* secretado por tres modelos distintos de factorías celulares: linfocitos T, MSC y HUVEC, cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes. A la hora de seleccionar el modelo más adecuado para una aplicación concreta, son dos las cuestiones que debemos plantearnos: la vía de administración (sistémica o local) y el origen del vehículo celular (autólogo o alogénico) (Figura 8).

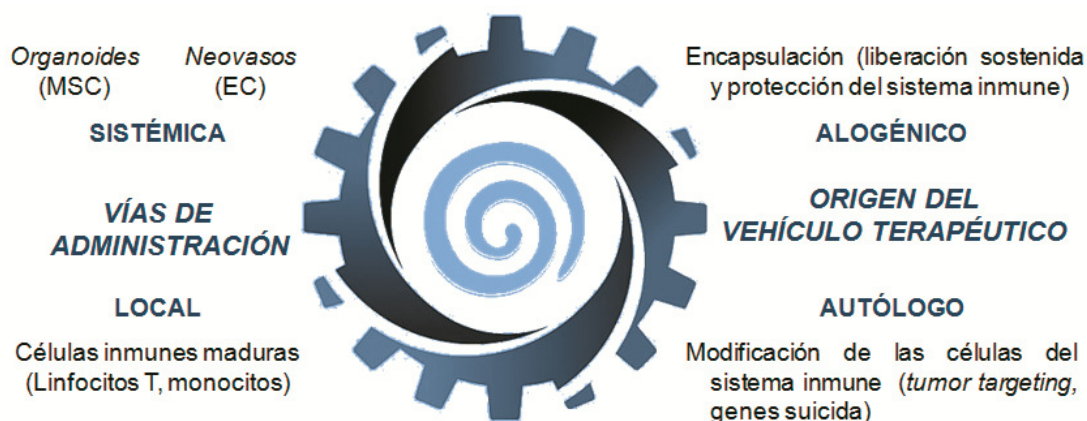


Figura 8. Resumen de las diferentes alternativas para la secreción *in vivo* de fragmentos de anticuerpo u otras proteínas terapéuticas.

En el caso de los linfocitos T, es obvio que podemos aprovechar su capacidad de localización tumoral para conseguir la producción de la proteína terapéutica *in situ*, alcanzando *a priori* concentraciones locales más elevadas. Además, existe una gran experiencia en la transducción de linfocitos T para “reprogramar” su especificidad mediante la expresión de CAR y TCR recombinantes y su posterior expansión *in vitro* a gran escala para su uso en ensayos

clínicos [210, 211]. De hecho, se podría plantear una doble estrategia: los linfocitos T podrían ser modificados genéticamente para la secreción de una proteína terapéutica y para la expresión en superficie de un CAR o TCR que contribuyera a redirigirlos de forma específica hacia el tumor. Cuando la proteína terapéutica es un AcBisR, se da además la circunstancia de que actúa de forma autocrina sobre la célula productora, y de forma paracrina sobre otros linfocitos T no modificados genéticamente, localizados en el microambiente tumoral. La administración sistémica de las células T haría imposible su recuperación en caso de posibles efectos adversos, como mutagénesis insercional, pero una opción sería la transducción con un gen suicida tipo HSV-TK que permitiría su erradicación mediante tratamiento con ganciclovir. Esta estrategia se ha propuesto para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped en protocolos de trasplante de médula ósea que incluyen células T alogénicas [212] o asociada a la transferencia génica de TCR recombinantes [213].

Por el contrario, la administración de MSC o HUVEC confinadas en una matriz, podría permitir un fácil acceso al inóculo celular en el caso de que fuera necesario su retirada. Una posible desventaja sería que la proteína terapéutica liberada al torrente sanguíneo, de forma más favorable en el caso de las HUVEC que en el de las MSC, sufriría un efecto de dilución y alcanzaría concentraciones intratumorales menores que las obtenidas con los protocolos de producción *in situ*, lo que obligaría a obtener niveles de secreción más elevados para lograr un efecto terapéutico similar.

En lo que respecta al origen celular, es obvio que el uso de células autólogas reduce el riesgo de una posible respuesta inmune frente al vehículo celular (aunque no frente al producto del transgen), y convierte a este tipo de estrategias en terapias completamente individualizadas, pero aumentando su coste y dificultando su viabilidad económica. La única posibilidad de hacer rentable este tipo de estrategias y poder aplicarlas en clínica humana de forma generalizada, implicaría disponer de *stocks* de células alogénicas modificadas genéticamente para la producción de la proteína de interés y preparadas para ser aplicadas a pacientes según demanda. No hay que olvidar tampoco que el proceso de transducción y posterior expansión de las células autólogas puede exigir un tiempo de espera demasiado largo para determinados pacientes o determinadas patologías.

El problema de la eliminación de las células alogénicas por el sistema inmune del huésped podría ser menor en el caso de las MSC, en virtud de sus propiedades inmunomoduladoras. Sin embargo, hemos comprobado que las MSC humanas inoculadas en ratones inmunocompetentes tienen una vida muy corta. Por ello, creemos que el futuro de esta estrategia terapéutica pasa por el desarrollo de técnicas de encapsulación, que permitan la liberación de la proteína terapéutica y la entrada de nutrientes manteniendo, al mismo tiempo, el vehículo celular protegido del sistema inmune.

CONCLUSIONES

- I. Empleando un sistema de vectores lentivirales derivados del VIH-1, es posible modificar *ex vivo* líneas celulares humanas, hematopoyéticas y no hematopoyéticas, para la secreción de un AcBisR en formato *diabody* de doble cadena dirigido frente al CEA y frente a la cadena ϵ del complejo TCR-CD3 (α CEA x α CD3).
- II. Las líneas celulares humanas CD3⁺, modificadas genéticamente *ex vivo*, secretan el *diabody* α CEA x α CD3 en forma funcionalmente activa, que es capaz de activar linfocitos T primarios y redirigir su actividad citolítica frente a células tumorales que expresan CEA.
- III. El sistema de vectores lentivirales derivados del VIH-1 permite la modificación *ex vivo* de linfocitos T humanos primarios, para la secreción estable y mantenida de un *diabody* α CEA x α CD3 funcional.
- IV. El *diabody* α CEA x α CD3 secretado por las células humanas primarias modificadas genéticamente, es estable en condiciones fisiológicas, induce la proliferación de linfocitos T primarios y es capaz de redirigir, de forma específica, la actividad citolítica de los linfocitos T frente a células tumorales que expresan el CEA.
- V. En un modelo de xenotrasplante de carcinoma de colon humano, la secreción intratumoral del *diabody* α CEA x α CD3, por células humanas primarias modificadas genéticamente, retrasó de forma estadísticamente significativa el crecimiento tumoral de manera antígeno específica.
- VI. La expresión localizada de un AcBisR en formato *diabody*, puede compensar algunas limitaciones asociadas a la escasa capacidad de penetración tumoral, y a la corta vida media sérica.
- VII. Es posible transducir células progenitoras mesenquimales humanas adultas con un sistema de vectores lentivirales para la secreción de un *diabody* α CEA x α CD3, funcionalmente activo. La secreción se mantuvo estable durante al menos 30 días.
- VIII. En un contexto *in vitro*, es posible demostrar el efecto inmunomodulador de las células progenitoras mesenquimales sobre los linfocitos T, inhibiendo la proliferación policlonal y la proliferación específica mediada por el *diabody* α CEA x α CD3 en presencia de células tumorales que expresan el CEA.
- IX. En un modelo de xenotrasplante de carcinoma de colon humano, la administración intratumoral de células progenitoras mesenquimales promueve el crecimiento tumoral debido, probablemente, a un incremento de la angiogénesis.
- X. La implantación subcutánea de un *organoide* constituido por células progenitoras mesenquimales modificadas genéticamente permite la obtención de niveles terapéuticos de *diabody* α CEA x α CD3.

- XI. El *diabody* α CEA x α CD3 secretado por el *organoide terapéutico* induce la inhibición del crecimiento tumoral tras la activación específica de linfocitos T humanos, administrados por vía intravenosa.
- XII. Es posible transducir células endoteliales humanas con un sistema de vectores lentivirales para la secreción de un *diabody* α CEA x α CD3 funcionalmente activo. La secreción se mantuvo estable durante al menos 30 días.
- XIII. La coimplantación de células endoteliales humanas modificadas genéticamente y células de soporte, en una preparación de matriz extracelular, genera un red vascular funcional que permite la liberación sistémica y mantenida del *diabody* α CEA x α CD3.
- XIV. El *diabody* α CEA x α CD3 secretado por una red vascular terapéutica induce la inhibición del crecimiento tumoral tras la activación específica de linfocitos T humanos administrados por vía intravenosa, aumenta la infiltración tumoral de linfocitos T e incrementa la supervivencia de manera estadísticamente significativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1967;1:1171-4.
2. Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R. Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:1161-71.
3. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991-8.
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329-60.
5. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004;305:200-5.
6. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480:480-9.
7. van der Meijden AP. Non-specific immunotherapy with bacille Calmette-Guerin (BCG). *Clin Exp Immunol* 2001;123:179-80.
8. Dye ES, North RJ, Mills CD. Mechanisms of anti-tumor action of *Corynebacterium parvum*. I. Potentiated tumor-specific immunity and its therapeutic limitations. *J Exp Med* 1981;154:609-20.
9. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990;322:352-8.
10. Brandau S, Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother* 2007;61:299-305.
11. Khanna OP, Son DL, Son K, et al. Multicenter study of superficial bladder cancer treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin or adriamycin. Results of long-term follow-up. *Urology* 1991;38:271-9.
12. Lamm DL, DeHaven JI, Shriver J, Crispen R, Grau D, Sarosdy MF. A randomized prospective comparison of oral versus intravesical and percutaneous bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer. *J Urol* 1990;144:65-7.
13. Kresowik TP, Griffith TS. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Immunotherapy* 2009;1:281-8.
14. Simons MP, O'Donnell MA, Griffith TS. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol Oncol* 2008;26:341-5.
15. Atkins MB, Hsu J, Lee S, et al. Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008;26:5748-54.
16. Heemskerk B, Liu K, Dudley ME, et al. Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2. *Hum Gene Ther* 2008;19:496-510.

17. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:133-41.
18. Hansen RM, Borden EC. Current status of interferons in the treatment of cancer. *Oncology (Williston Park)* 1992;6:19-24.
19. Sikora AG, Jaffarzad N, Hailemichael Y, et al. IFN-alpha enhances peptide vaccine-induced CD8+ T cell numbers, effector function, and antitumor activity. *J Immunol* 2009;182:7398-407.
20. Baars A, Claessen AM, van den Eertwegh AJ, et al. Skin tests predict survival after autologous tumor cell vaccination in metastatic melanoma: experience in 81 patients. *Ann Oncol* 2000;11:965-70.
21. Mitchell MS. Perspective on allogeneic melanoma lysates in active specific immunotherapy. *Semin Oncol* 1998;25:623-35.
22. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, et al. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990;60:397-403.
23. Salgia R, Lynch T, Skarin A, et al. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2003;21:624-30.
24. Markovic SN, Suman VJ, Ingle JN, et al. Peptide vaccination of patients with metastatic melanoma: improved clinical outcome in patients demonstrating effective immunization. *Am J Clin Oncol* 2006;29:352-60.
25. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998;4:321-7.
26. Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol* 1993;5:35-44.
27. Klencke B, Matijevic M, Urban RG, et al. Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a Phase I study of ZYC101. *Clin Cancer Res* 2002;8:1028-37.
28. Seder RA, Gurunathan S. DNA vaccines--designer vaccines for the 21st century. *N Engl J Med* 1999;341:277-8.
29. Yuan J, Ku GY, Gallardo HF, et al. Safety and immunogenicity of a human and mouse gp100 DNA vaccine in a phase I trial of patients with melanoma. *Cancer Immun* 2009;9:5.
30. Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC, et al. Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1894-900.
31. Van der Burg SH, Menon AG, Redeker A, et al. Induction of p53-specific immune responses in colorectal cancer patients receiving a recombinant ALVAC-p53 candidate vaccine. *Clin Cancer Res* 2002;8:1019-27.

32. Marshall JL, Gulley JL, Arlen PM, et al. Phase I study of sequential vaccinations with fowlpox-CEA(6D)-TRICOM alone and sequentially with vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas. *J Clin Oncol* 2005;23:720-31.
33. Iurescia S, Fioretti D, Fazio VM, Rinaldi M. Design and pre-clinical development of epitope-based DNA vaccines against B-cell lymphoma. *Curr Gene Ther* 2011;11:414-22.
34. Froyland M, Ruffini PA, Thompson KM, Gedde-Dahl T, Fredriksen AB, Bogen B. Targeted idiotype-fusion DNA vaccines for human multiple myeloma: preclinical testing. *Eur J Haematol* 2011;86:385-95.
35. Álvarez-Vallina L, Plaza A, Kreisler M, Cabrera R, Fernandez MN, Díaz-Espada F. Isolation of tumor-derived immunoglobulin-idiotype from peripheral blood mononuclear cells in a B-cell lymphoma patient with minimal disease. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1995;17:194-8.
36. Barrios Y, Cabrera R, Yanez R, et al. Anti-idiotypic vaccination in the treatment of low-grade B-cell lymphoma. *Haematologica* 2002;87:400-7.
37. Yanez R, Barrios Y, Ruiz E, Cabrera R, Diaz-Espada F. Anti-idiotypic Immunotherapy in follicular lymphoma patients: results of a long follow-up study. *J Immunother* 2008;31:310-2.
38. Di NM, Zappasodi R, Carlo-Stella C, et al. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood* 2009;113:18-27.
39. Alfaro C, Perez-Gracia JL, Suarez N, et al. Pilot clinical trial of type 1 dendritic cells loaded with autologous tumor lysates combined with GM-CSF, pegylated IFN, and cyclophosphamide for metastatic cancer patients. *J Immunol* 2011;187:6130-42.
40. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996;184:465-72.
41. Landuzzi L, Antognoli A, Nicoletti G, et al. HER-2/neu tolerant and non-tolerant mice for fine assessment of antimetastatic potency of dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Vaccine* 2011;29:4690-7.
42. Qin K, Tian G, Li P, et al. Anti-glioma response of autologous T cells stimulated by autologous dendritic cells electrofused with CD133(+) or CD133(-) glioma cells. *J Neuroimmunol* 2012;242:9-15.
43. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010;363:411-22.
44. Muul LM, Nason-Burchenal K, Carter CS, et al. Development of an automated closed system for generation of human lymphokine-activated killer (LAK) cells for use in adoptive immunotherapy. *J Immunol Methods* 1987;101:171-81.
45. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:622-32.

46. Disis ML, Bernhard H, Jaffee EM. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet* 2009;373:673-83.
47. Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects. *Cancer Treat Rep* 1984;68:233-55.
48. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986;233:1318-21.
49. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988;319:1676-80.
50. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005;23:2346-57.
51. Dudley ME, Gross CA, Langan MM, et al. CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:6122-31.
52. Rosenberg SA. Shedding light on immunotherapy for cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1461-3.
53. Stewart TJ, Abrams SI. How tumours escape mass destruction. *Oncogene* 2008;27:5894-903.
54. Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005;174:2591-601.
55. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 2005;202:907-12.
56. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006;314:126-9.
57. Chervin AS, Aggen DH, Raseman JM, Kranz DM. Engineering higher affinity T cell receptors using a T cell display system. *J Immunol Methods* 2008;339:175-84.
58. Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 2003;3:35-45.
59. Johnson LA, Heemskerk B, Powell DJ, Jr., et al. Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2006;177:6548-59.
60. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 2008;112:2261-71.
61. Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol* 2011;29:550-7.

62. Álvarez-Vallina L. Genetic approaches for antigen-selective cell therapy. *Curr Gene Ther* 2001;1:385-97.
63. Sanz L, Blanco B, varez-Vallina L. Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol* 2004;25:85-91.
64. Berry LJ, Moeller M, Darcy PK. Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells. *Tissue Antigens* 2009;74:277-89.
65. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 2009;21:215-23.
66. Jena B, Dotti G, Cooper LJ. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood* 2010;116:1035-44.
67. Ertl HC, Zaia J, Rosenberg SA, et al. Considerations for the clinical application of chimeric antigen receptor T cells: observations from a recombinant DNA Advisory Committee Symposium held June 15, 2010. *Cancer Res* 2011;71:3175-81.
68. Hombach A, Heuser C, Sircar R, et al. Characterization of a chimeric T-cell receptor with specificity for the Hodgkin's lymphoma-associated CD30 antigen. *J Immunother* 1999;22:473-80.
69. Jensen MC, Cooper LJ, Wu AM, Forman SJ, Raubitschek A. Engineered CD20-specific primary human cytotoxic T lymphocytes for targeting B-cell malignancy. *Cytherapy* 2003;5:131-8.
70. Cooper LJ, Topp MS, Serrano LM, et al. T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood* 2003;101:1637-44.
71. Vera J, Savoldo B, Vigouroux S, et al. T lymphocytes redirected against the kappa light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood* 2006;108:3890-7.
72. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:6106-15.
73. Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 2006;24:e20-e22.
74. Ahmed N, Ratnayake M, Savoldo B, et al. Regression of experimental medulloblastoma following transfer of HER2-specific T cells. *Cancer Res* 2007;67:5957-64.
75. Chinnasamy D, Yu Z, Theoret MR, et al. Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice. *J Clin Invest* 2010;120:3953-68.
76. Paul W.E. *Fundamental Immunology*, 6th Edn Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
77. Klee GG. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:921-3.
78. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1:118-29.

79. Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells* 2005;20:17-29.
80. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.
81. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 1988;242:423-6.
82. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5879-83.
83. Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med* 2003;9:129-34.
84. Berger M, Shankar V, Vafai A. Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Am J Med Sci* 2002;324:14-30.
85. Kontermann R. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *MAbs* 2012;4.
86. Deo YM, Sundarapandiyan K, Keler T, Wallace PK, Graziano RF. Bispecific molecules directed to the Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood. *J Immunol* 1998;160:1677-86.
87. James ND, Atherton PJ, Jones J, Howie AJ, Tchekmedyian S, Curnow RT. A phase II study of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-HER2 x CD64) with GM-CSF in HER2+ advanced prostate cancer. *Br J Cancer* 2001;85:152-6.
88. Sanz L, Blanco B, Álvarez-Vallina L. Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol* 2004;25:85-91.
89. Karpovsky B, Titus JA, Stephany DA, Segal DM. Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J Exp Med* 1984;160:1686-701.
90. Milstein C, Cuello AC. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* 1983;305:537-40.
91. Greenman J, Tutt AL, George AJ, Pulford KA, Stevenson GT, Glennie MJ. Characterization of a new monoclonal anti-Fc gamma RII antibody, AT10, and its incorporation into a bispecific F(ab')₂ derivative for recruitment of cytotoxic effectors. *Mol Immunol* 1991;28:1243-54.
92. Greenman J, Hogg N, Nikoletti S, Slade C, Stevenson G, Glennie M. Comparative efficiencies of bispecific F(ab'gamma)₂ and chimeric mouse/human IgG antibodies in recruiting cellular effectors for cytotoxicity via Fc gamma receptors. *Cancer Immunol Immunother* 1992;34:361-9.
93. Blanco B, Holliger P, Vile RG, varez-Vallina L. Induction of human T lymphocyte cytotoxicity and inhibition of tumor growth by tumor-specific diabody-based molecules secreted from gene-modified bystander cells. *J Immunol* 2003;171:1070-7.
94. Cuesta AM, Sainz-Pastor N, Bonet J, Oliva B, varez-Vallina L. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol* 2010;28:355-62.

95. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005;23:1126-36.
96. Le Gall F, Reusch U, Little M, Kipriyanov SM. Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody. *Protein Eng Des Sel* 2004;17:357-66.
97. Wolf E, Hofmeister R, Kufer P, Schlereth B, Baeuerle PA. BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity. *Drug Discov Today* 2005;10:1237-44.
98. O'Shea EK, Rutkowski R, Stafford WF, III, Kim PS. Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* 1989;245:646-8.
99. Pack P, Pluckthun A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1992;31:1579-84.
100. Sanchez-Arevalo L, V, Cuesta AM, Sanz L, et al. Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. *Int J Cancer* 2006;119:455-62.
101. Cuesta AM, Sanchez-Martin D, Sanz L, et al. In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences. *PLoS One* 2009;4:e5381.
102. Cuesta AM, Sanchez-Martin D, Blanco-Toribio A, et al. Improved stability of multivalent antibodies containing the human collagen XV trimerization domain. *MAbs* 2012;4.
103. Muller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. *BioDrugs* 2010;24:89-98.
104. Posey JA, Raspet R, Verma U, et al. A pilot trial of GM-CSF and MDX-H210 in patients with erbB-2-positive advanced malignancies. *J Immunother* 1999;22:371-9.
105. Pullarkat V, Deo Y, Link J, et al. A phase I study of a HER2/neu bispecific antibody with granulocyte-colony-stimulating factor in patients with metastatic breast cancer that overexpresses HER2/neu. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:9-21.
106. Jager M, Schoberth A, Ruf P, Hess J, Lindhofer H. The trifunctional antibody ertumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2. *Cancer Res* 2009;69:4270-6.
107. Sebastian M, Passlick B, Friccius-Quecke H, et al. Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): a phase I study. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1637-44.
108. Seimetz D. Novel monoclonal antibodies for cancer treatment: the trifunctional antibody catumaxomab (removab). *J Cancer* 2011;2:309-16.
109. Buhler P, Molnar E, Dopfer EP, et al. Target-dependent T-cell activation by coligation with a PSMA x CD3 diabody induces lysis of prostate cancer cells. *J Immunother* 2009;32:565-73.

110. Demanet C, Brissinck J, De JJ, Thielemans K. Bispecific antibody-mediated immunotherapy of the BCL1 lymphoma: increased efficacy with multiple injections and CD28-induced costimulation. *Blood* 1996;87:4390-8.
111. Cochlovius B, Kipriyanov SM, Stassar MJ, et al. Cure of Burkitt's lymphoma in severe combined immunodeficiency mice by T cells, tetravalent CD3 x CD19 tandem diabody, and CD28 costimulation. *Cancer Res* 2000;60:4336-41.
112. Dreier T, Baeuerle PA, Fichtner I, et al. T cell costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3- bispecific single-chain antibody construct. *J Immunol* 2003;170:4397-402.
113. Brischwein K, Schlereth B, Guller B, et al. MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol* 2006;43:1129-43.
114. Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res* 2009;69:4941-4.
115. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008;321:974-7.
116. Handgretinger R, Zugmaier G, Henze G, Kreyenberg H, Lang P, von SA. Complete remission after blinatumomab-induced donor T-cell activation in three pediatric patients with post-transplant relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25:181-4.
117. Sanchez-Martin D, Sanz L, Álvarez-Vallina L. Engineering human cells for in vivo secretion of antibody and non-antibody therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2011;22:924-30.
118. Sanz L, Compte M, Guijarro-Munoz I, Álvarez-Vallina L. Non-hematopoietic stem cells as factories for in vivo therapeutic protein production. *Gene Ther* 2012;19:1-7.
119. Harrington K, varez-Vallina L, Crittenden M, et al. Cells as vehicles for cancer gene therapy: the missing link between targeted vectors and systemic delivery? *Hum Gene Ther* 2002;13:1263-80.
120. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997;15:871-5.
121. Klages N, Zufferey R, Trono D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000;2:170-6.
122. Buchholz CJ, Cichutek K. Is it going to be SIN?: a European Society of Gene Therapy commentary. Phasing-out the clinical use of non self-inactivating murine leukemia virus vectors: initiative on hold. *J Gene Med* 2006;8:1274-6.
123. Persons DA. Lentiviral vector gene therapy: effective and safe? *Mol Ther* 2010;18:861-2.
124. Biffi A, Bartolomae CC, Cesana D, et al. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood* 2011;117:5332-9.

125. Sanz L, Kristensen P, Blanco B, et al. Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Ther* 2002;9:1049-53.
126. Noel D, Pelegrin M, Kramer S, Jacquet C, Skander N, Piechaczyk M. High in vivo production of a model monoclonal antibody on adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther* 2002;13:1483-93.
127. Afanasieva TA, Wittmer M, Vitaliti A, Ajmo M, Neri D, Klemenz R. Single-chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther* 2003;10:1850-9.
128. Watanabe M, Boyer JL, Crystal RG. AAVrh.10-mediated genetic delivery of bevacizumab to the pleura to provide local anti-VEGF to suppress growth of metastatic lung tumors. *Gene Ther* 2010;17:1042-51.
129. Wang G, Qiu J, Wang R, et al. Persistent expression of biologically active anti-HER2 antibody by AAVrh.10-mediated gene transfer. *Cancer Gene Ther* 2010;17:559-70.
130. Liu X, Wu J, Zhang S, Li C, Huang Q. Novel strategies to augment genetically delivered immunotoxin molecular therapy for cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 2009;16:861-72.
131. Vigna E, Pacchiana G, Mazzone M, et al. "Active" cancer immunotherapy by anti-Met antibody gene transfer. *Cancer Res* 2008;68:9176-83.
132. Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang L, Baltimore D. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* 2012;481:81-4.
133. Noel D, Pelegrin M, Marin M, et al. In vitro and in vivo secretion of cloned antibodies by genetically modified myogenic cells. *Hum Gene Ther* 1997;8:1219-29.
134. Pelegrin M, Marin M, Noel D, et al. Systemic long-term delivery of antibodies in immunocompetent animals using cellulose sulphate capsules containing antibody-producing cells. *Gene Ther* 1998;5:828-34.
135. Roth JC, Curiel DT, Pereboeva L. Cell vehicle targeting strategies. *Gene Ther* 2008;15:716-29.
136. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997;57:1007-12.
137. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103:1755-62.
138. Aboody KS, Najbauer J, Danks MK. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther* 2008;15:739-52.
139. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1593-603.
140. Frank RT, Edmiston M, Kendall SE, et al. Neural stem cells as a novel platform for tumor-specific delivery of therapeutic antibodies. *PLoS One* 2009;4:e8314.

141. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619-21.
142. Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, et al. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc Res* 2008;75:308-14.
143. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007;449:557-63.
144. Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Crosato M, Lachapelle K, Galipeau J. A neovascularized organoid derived from retrovirally engineered bone marrow stroma leads to prolonged in vivo systemic delivery of erythropoietin in nonmyeloablated, immunocompetent mice. *Gene Ther* 2003;10:478-89.
145. Eliopoulos N, Lejeune L, Martineau D, Galipeau J. Human-compatible collagen matrix for prolonged and reversible systemic delivery of erythropoietin in mice from gene-modified marrow stromal cells. *Mol Ther* 2004;10:741-8.
146. Eliopoulos N, Gagnon RF, Francois M, Galipeau J. Erythropoietin delivery by genetically engineered bone marrow stromal cells for correction of anemia in mice with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1576-84.
147. Wang N, Fallavollita L, Nguyen L, et al. Autologous bone marrow stromal cells genetically engineered to secrete an igf-I receptor decoy prevent the growth of liver metastases. *Mol Ther* 2009;17:1241-9.
148. Stagg J, Lejeune L, Paquin A, Galipeau J. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther* 2004;15:597-608.
149. Eliopoulos N, Francois M, Boivin MN, Martineau D, Galipeau J. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. *Cancer Res* 2008;68:4810-8.
150. Hefta LJ, Chen FS, Ronk M, et al. Expression of carcinoembryonic antigen and its predicted immunoglobulin-like domains in HeLa cells for epitope analysis. *Cancer Res* 1992;52:5647-55.
151. Yang Z, Korman AJ, Cooper J, et al. Expression of HLA-DR antigen in human class II mutant B-cell lines by double infection with retrovirus vectors. *Mol Cell Biol* 1987;7:3923-8.
152. Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* 1996;24:406-15.
153. Pittenger MF. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol* 2008;449:27-44.
154. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;272:263-7.
155. Kontermann R. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *MAbs* 2012;4.

156. Linke R, Klein A, Seimetz D. Catumaxomab: clinical development and future directions. *MAbs* 2010;2:129-36.
157. Dhimolea E, Reichert JM. World Bispecific Antibody Summit, September 27-28, 2011, Boston, MA. *MAbs* 2012;4:4-13.
158. Chames P, Baty D. Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *MAbs* 2009;1:539-47.
159. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:299-308.
160. Frankel TL, Burns W, Riley J, et al. Identification and characterization of a tumor infiltrating CD56(+)/CD16 (-) NK cell subset with specificity for pancreatic and prostate cancer cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1757-69.
161. Laoui D, Movahedi K, Van OE, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol* 2011;55:861-7.
162. Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res* 2011;17:6287-97.
163. Frecha C, Levy C, Cosset FL, Verhoeven E. Advances in the field of lentivector-based transduction of T and B lymphocytes for gene therapy. *Mol Ther* 2010;18:1748-57.
164. Chono H, Goto Y, Yamakawa S, et al. Optimization of lentiviral vector transduction into peripheral blood mononuclear cells in combination with the fibronectin fragment CH-296 stimulation. *J Biochem* 2011;149:285-92.
165. Tran J, Kung SK. Lentiviral vectors mediate stable and efficient gene delivery into primary murine natural killer cells. *Mol Ther* 2007;15:1331-9.
166. Savan R, Chan T, Young HA. Lentiviral gene transduction in human and mouse NK cell lines. *Methods Mol Biol* 2010;612:209-21.
167. Arce F, Rowe HM, Chain B, Lopes L, Collins MK. Lentiviral vectors transduce proliferating dendritic cell precursors leading to persistent antigen presentation and immunization. *Mol Ther* 2009;17:1643-50.
168. Kaushik R, Zhu X, Stranska R, Wu Y, Stevenson M. A cellular restriction dictates the permissivity of nondividing monocytes/macrophages to lentivirus and gammaretrovirus infection. *Cell Host Microbe* 2009;6:68-80.
169. Millington M, Arndt A, Boyd M, Applegate T, Shen S. Towards a clinically relevant lentiviral transduction protocol for primary human CD34 hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One* 2009;4:e6461.
170. Kim YS, Wielgosz MM, Hargrove P, et al. Transduction of human primitive repopulating hematopoietic cells with lentiviral vectors pseudotyped with various envelope proteins. *Mol Ther* 2010;18:1310-7.
171. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008;14:1264-70.

172. Frecha C, Costa C, Negre D, et al. Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 2008;112:4843-52.
173. Matrai J, Chuah MK, Vandendriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther* 2010;18:477-90.
174. Frank RT, Edmiston M, Kendall SE, et al. Neural stem cells as a novel platform for tumor-specific delivery of therapeutic antibodies. *PLoS One* 2009;4:e8314.
175. Balyasnikova IV, Ferguson SD, Sengupta S, Han Y, Lesniak MS. Mesenchymal stem cells modified with a single-chain antibody against EGFRvIII successfully inhibit the growth of human xenograft malignant glioma. *PLoS One* 2010;5:e9750.
176. Frank RT, Najbauer J, Aboody KS. Concise review: stem cells as an emerging platform for antibody therapy of cancer. *Stem Cells* 2010;28:2084-7.
177. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726-36.
178. Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther* 2010;21:1641-55.
179. Di NM, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838-43.
180. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42-8.
181. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006;107:1484-90.
182. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;105:4120-6.
183. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006;177:2080-7.
184. Chiesa S, Morbelli S, Morando S, et al. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:17384-9.
185. Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 2008;26:212-22.
186. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009;15:42-9.

187. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;111:1327-33.
188. Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 2008;26:1387-94.
189. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 2010;127:2323-33.
190. Compte M, Nuñez del Prado N, Sanz L, Álvarez-Vallina L. Immunotherapeutic organoids: a new approach to cancer treatment. *Biomatter* 2012;*In press*.
191. Roman I, Vilalta M, Rodriguez J, et al. Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by in vivo non-invasive photonic imaging. *Biomaterials* 2007;28:2718-28.
192. Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* 2004;428:138-9.
193. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood* 2007;109:4761-8.
194. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* 2008;111:4551-8.
195. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, et al. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res* 2008;103:194-202.
196. Zwiebel JA, Freeman SM, Kantoff PW, Cornetta K, Ryan US, Anderson WF. High-level recombinant gene expression in rabbit endothelial cells transduced by retroviral vectors. *Science* 1989;243:220-2.
197. Squinto SP, Madri JA, Kennedy S, Springhorn J. The ENCEL system: a somatic cell protein delivery system. *In Vivo* 1994;8:771-80.
198. Wei Y, Li J, Wagner TE. Long-term expression of human growth hormone (hGH) in mice containing allogeneic yolk sac cell derived neovascular implants expressing hGH. *Stem Cells* 1996;14:232-8.
199. Matsui H, Shibata M, Brown B, et al. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. *Stem Cells* 2007;25:2660-9.
200. Miura Y, Gao Z, Miura M, et al. Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource. *Stem Cells* 2006;24:2428-36.
201. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005;65:3035-9.

202. Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 2009;69:5331-9.
203. Garcia S, Bernad A, Martin MC, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, de la FR. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2010;316:1648-50.
204. Torsvik A, Rosland GV, Svendsen A, et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res* 2010;70:6393-6.
205. Torsvik A, Rosland GV, Bjerkvig R. Comment to: "Spontaneous transformation of adult mesenchymal stem cells from cynomolgus macaques in vitro" by Z. Ren et al. *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 2950-2957: spontaneous transformation of mesenchymal stem cells in culture: facts or fiction? *Exp Cell Res* 2012;318:441-3.
206. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
207. Moon JJ, Saik JE, Poche RA, et al. Biomimetic hydrogels with pro-angiogenic properties. *Biomaterials* 2010;31:3840-7.
208. Allen P, Melero-Martin J, Bischoff J. Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5:e74-e86.
209. Chen YC, Lin RZ, Qi H, et al. Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Adv Funct Mater* 2012;22:2027-39.
210. Jorritsma A, Schotte R, Coccoris M, de Witte MA, Schumacher TN. Prospects and limitations of T cell receptor gene therapy. *Curr Gene Ther* 2011;11:276-87.
211. Lipowska-Bhalla G, Gilham DE, Hawkins RE, Rothwell DG. Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:953-62.
212. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997;276:1719-24.
213. Chen X, Gao W, Gambotto A, Finn OJ. Lentiviral vectors encoding human MUC1-specific, MHC-unrestricted single-chain TCR and a fusion suicide gene: potential for universal and safe cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:977-87.

ANEXO

El trabajo desarrollado durante este periodo de investigación ha generado una serie de resultados que han sido recogidos en publicaciones y patentes cuyas referencias aparecen aquí indicadas. Se incluye, a continuación, una revisión directamente relacionada con esta Tesis Doctoral.

ARTÍCULOS PUBLICADOS:

Shneider R, Urban K, **Compte M**, Finger C, Cichuteh K, Álvarez-Vallina L, Buchholz C. Selection of functional antibodies from retroviral display libraries. *Nucl. Acid Res.* 2005; 4:24-33.

Sanz L, Cuesta AM, **Compte M**, Alvarez-Vallina L. Antibody engineering: facing new challenges in cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2005; 26: 641-648

Sánchez-Arévalo Lobo VJ, Cuesta AM, Sanz L, **Compte M**, Garcia P, Prieto J, Blanco FJ, Álvarez-Vallina L. Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. *Int. J. Cancer.* 2006; 119:455-462.

Cuesta AM, Suárez E, Larsen M, Jensen KB, Sanz L, **Compte M**, Kristensen P, Álvarez-Vallina L. Filamentous bacteriophage coat protein III domain I in DNA vaccines promotes a Th1-type dominated immune response. *Immunology.* 2006; 117: 502-506.

Compte M, Blanco B, Serrano F, Cuesta Á.M, Sanz L, Bernad A, Holliger P, Alvarez-Vallina L. Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA X anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. *Cancer Gene Ther* 2007; 14: 380-388.

Sanz, L, Santos-Valle, P, Alonso-Camino, V, Salas, C, Serrano, A, Vicario, JL, Cuesta, AM, **Compte M**, Sánchez-Martín, D, Álvarez-Vallina, L. Long term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc. Res.* 2008; 75:308-314.

Compte M, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Alonso Camino V, Vicario JL, Sanz L, Álvarez-Vallina L. Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds. *Stem Cells*. 2009;27:753–760.

Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Sanz L, Bonet J, **Compte M**, Kremer L, Blanco FJ, Oliva B, Álvarez-Vallina L. In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences. *PLoS One*. 2009;4:e5381.

Alonso-Camino V, Sánchez-Martín D, **Compte M**, Sanz L, Alvarez-Vallina L. Lymphocyte display: a novel antibody selection platform based on T cell activation. *PLoS One*. 2009; 24;4:e7174.

Compte M, Alonso-Camino V, Santos Valle P, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Rodríguez López M, Vicario JL, Salas C, Sanz L, Álvarez-Vallina L. Factory neovessels: engineered human blood vessels secreting therapeutic proteins as a new drug delivery system. *Gene Ther*. 2010; 17:745-751.

Sanz L; **Compte M**, Guijarro-Muñoz, I, Álvarez-Vallina L. Non-hematopoietic stem cells as factories for in vivo therapeutic protein production. *Gene Ther*. 2012; 19:1-7.

Silva J, Garcia V, Rodriguez M, **Compte M**, Cisneros E, Veguillas P, Garcia JM, Dominguez G, Campos-Martin Y, Cuevas J, Peña C, Herrera M, Diaz R, Mohammed N, Bonilla F. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012; 51(4):409-418.

Rommelfanger DM, **Compte M**, Diaz RM, Ilett E, Alvarez-Vallina L, Thompson JM, Kottke TJ, Melcher A, Vile RG. The efficacy versus toxicity profile of combination virotherapy and TLR immunotherapy highlights the danger of administering TLR agonists to oncolytic virus-treated mice. *Mol Ther*. 2012. doi: 10.1038/mt.2012.204.

Compte M, Nuñez del Prado N, Sanz L, Álvarez-Vallina L. Immunotherapeutic organoids: a new approach to cancer treatment. *Biomatter*. In press.

PATENTES Y MODELOS DE UTILIDAD:

TÍTULO: PROTEÍNAS OLIGOMÉRICAS Y SUS APLICACIONES

Inventores: Ángel Cuesta Martínez; Luis Álvarez-Vallina; Félix Bonilla Velasco; **Marta Compte Grau**; Laura Sanz Alcober; David Sánchez Martín.

Número de solicitud de patente española: P200901027.

Número de solicitud de patente internacional: PCT/ES2009/070107.

Fecha de prioridad: 20/04/2009. Entidad titular: FUAM

TÍTULO: MODELO ANIMAL DE ANGIOGÉNESIS HUMANA Y SUS APLICACIONES

Inventores: Laura Sanz Alcober, **Marta Compte Grau**, Vanesa Alonso Camino, Ángel Cuesta Martínez, David Sánchez Martín, Patricia Santos Valle, Félix Bonilla Velasco, Luis Álvarez-Vallina.

Número de solicitud: P200802993.

Fecha de prioridad: 22/10/2008. Entidad titular: FUAM

TÍTULO: INHIBIDORES DE ANGIOGÉNESIS MULTIFUNCIONALES Y MULTIVALENTES

Inventores: Luis Álvarez-Vallina, Víctor Javier Sánchez-Arévalo Lobo, Ángel Cuesta Martínez, Laura Sanz Alcober, Juan Antonio Vargas Nuñez, **Marta Compte Grau**.

Número de Publicación.: WO/2006/048252.

Número de Aplicación Internacional: PCT/EP2005/011714.

Fecha de prioridad: 02/11/2004. Entidad titular: FUAM

Países a los que se ha extendido: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. African Regional Intellectual Property Org. (ARIPO) (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Eurasian Patent Organization (EAPO) (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) European Patent Office (EPO) (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) African Intellectual Property Organization (OAPI) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

LICENCIA EXCLUSIVA: LEADARTIS S.L. y en explotación industrial.

REVIEW

Non-hematopoietic stem cells as factories for *in vivo* therapeutic protein production

L Sanz, M Compte, I Guijarro-Muñoz and L Álvarez-Vallina

As an alternative to recombinant protein administration, *ex vivo* gene-modified cells may provide a novel strategy for systemic delivery of therapeutic proteins. This approach has been used in preclinical and clinical studies of a plethora of pathological conditions, including anemia, hemophilia and cancer for the production of erythropoietin, coagulation factors, immunostimulatory cytokines, recombinant antibodies and angiogenesis inhibitors. Cell delivery vehicles may also be varied: autologous or allogeneic, precursor or terminally differentiated cells, with targeting properties or immobilized in immunoprotective devices. This field did not meet the expectation raised initially, mainly because of difficulties with obtaining therapeutic plasma levels and the short lifespan of producer cells that hampered clinical application. Different non-hematopoietic stem/progenitor cells have emerged as potential delivery vehicles, since they are easy to obtain, expand and transduce, and they exhibit prolonged lifespans (with mesenchymal stem cells probably being the most popular cell type, but not the only one). Special emphasis is placed on the different routes used to deliver these cellular vehicles and the controversies about their targeting abilities.

Gene Therapy (2012) 19, 1–7; doi:10.1038/gt.2011.68; published online 12 May 2011

Keywords: mesenchymal stem cell; neural stem cell; endothelial progenitor cell; cell-based gene delivery; cell factory

INTRODUCTION

Systemic administration of recombinant proteins (cytokines, antibodies and coagulation factors) has been widely used in the clinical setting for decades. As an alternative, gene therapy may provide a novel means for *in vivo* delivery of therapeutic proteins, resulting in effective and persistent levels of protein with a syngenic glycosylation pattern and without any additional formulation or manufacturing, that could make the protein less immunogenic and better tolerated. At the same time, this approach could circumvent problems related to large-scale production and high cost of recombinant proteins.

The two main gene therapy approaches are based on direct gene delivery (using viral or non-viral vectors) or on inoculation of *ex vivo* genetically modified cells (autologous or allogeneic). Viral vectors are highly efficient as gene delivery vehicles, and have been tested in numerous clinical trials, but raise concerns about safety risks¹ and limitation of the effect due to immune responses against viral antigens.^{2,3} On the other hand, use of non-viral vectors has been hampered by their low transduction efficiency.

The use of cells as delivery vehicles for therapeutic proteins⁴ (Figure 1) offers several conveniences: after *ex vivo* cell transduction, remaining viral particles are eliminated, reducing the risk of unwanted virus dissemination; levels of expression by transduced cells can be quantified *in vitro* and serum levels can be predicted; high-expression clones can be selected and expanded prior to administration; less likelihood of immune responses against autologous cells; cell vehicles can be endowed (naturally or artificially) with targeting capabilities⁵ and cells can be retrieved once the therapeutic effect is fulfilled if administered in certain formats.

Non-hematopoietic stem/progenitor cells have been successfully used as vehicles for suicide genes and oncolytic virus in cancer treatment strategies^{6,7} or trophic factors in regenerative medicine. However, we intend here to focus on the potential of these cells as 'cell factories' for the *in vivo* production of therapeutic proteins in a variety of pathological conditions, including anemia, hemophilia and cancer.

CELLS OF CHOICE

Terminally differentiated cells possess a short lifespan, and this implies an obvious limitation to their application in gene therapy strategies. In contrast, stem/progenitor cells are endowed, at least theoretically, with a great expansion capacity and constitute a more appropriate cellular source than senescence-susceptible cells.

In contrast with hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells (MSCs) are easily transduced and exhibit a unique *in vitro* proliferative capacity using a simple media formulation. Several other advantages have been attributed to MSCs as cell vehicles, being availability, tumor tropism and low immunogenicity the most appealing.⁶

Not only MSCs, but also other human adult stem cells, such as neural stem cells (NSCs) and endothelial progenitor cells (EPCs), have emerged as promising delivery vehicles of therapeutic proteins. NSCs were initially devised as potential tools for the treatment of neurodegenerative diseases or central nervous system injuries, but in 2000, their capacity to migrate throughout normal brain tissue to central nervous system tumors^{8,9} and deliver a therapeutic payload was demonstrated. Unfortunately, there are serious limitations to the obtention of primary NSCs, and most studies in preclinical models have used immortalized NSCs, with the safety concerns that it implies.¹⁰ Circulating EPCs incorporate to growing tumor vasculature

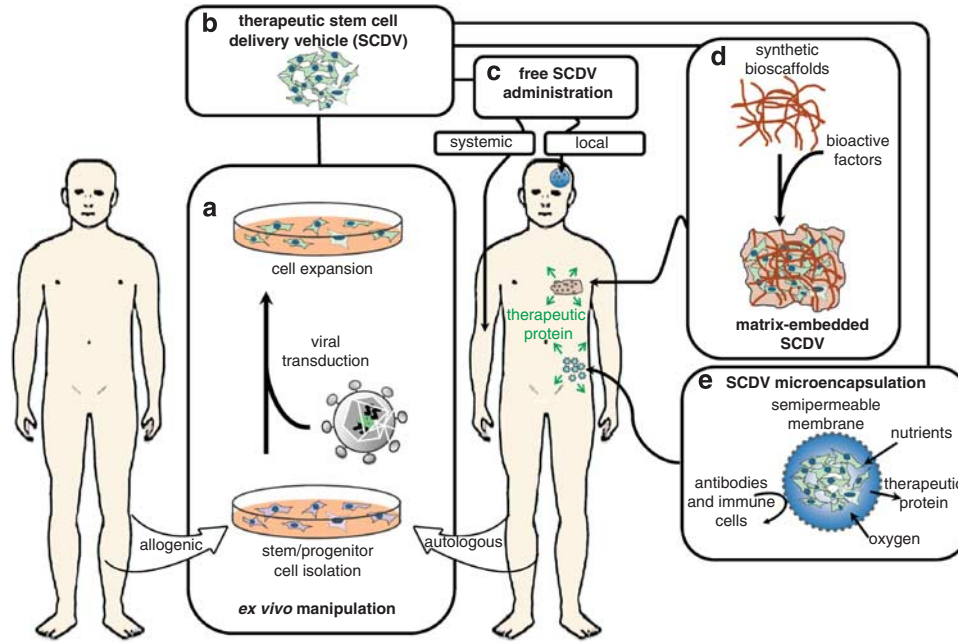


Figure 1 Schematic diagram of SCDV generation with viral vectors. *Ex vivo* manipulation (a) of autologous or allogeneic stem/progenitor cells (collection and isolation, expansion and lentiviral transduction) to generate a therapeutic SCDV (b). Producer cells can be injected directly (c), confined to s.c. scaffolds (d) or microencapsulated (e).

and, therefore, might represent a particularly well-suited delivery system for anti-angiogenic therapy of cancer. Blood late outgrowth endothelial cells (BOECs) obtained from peripheral blood are easy to isolate and expand, have extended longevity and represent true EPCs.¹¹ However, only a fraction of systemically administered EPCs seems to incorporate into tumor vessels.

LOCAL ADMINISTRATION: INTRATUMORAL INJECTION OF STEM CELL DELIVERY VEHICLES

One of the most interesting properties of MSCs, NSCs and EPCs, at least in the context of cancer therapy, is their tropism to primary/metastatic tumors that open the opportunity of systemic administration for the targeted production of the therapeutic protein. This tropism has been widely documented in the literature; however, a brief look at Table 1 reveals an intriguing fact. Most studies showing therapeutic effect of these stem cell delivery vehicles (SCDV) employ one of these two strategies: either coinjection or intratumoral (i.t.) injection for localized tumors (even if the authors have demonstrated previously specific homing after systemic administration), or intravenous (i.v.) administration for disseminated lung metastasis (Figure 1).

The first modality has been used extensively for the experimental treatment of intracranial malignant glioma. Several studies demonstrated that MSCs and NSCs, inoculated intracerebrally, could migrate to gliomas and exert a therapeutic effect. In a seminal work, Aboody *et al.* demonstrated that not only NSCs implanted intracranially at distant sites from the tumor (for example, into the contralateral hemisphere) could migrate through normal tissue targeting the tumor cells, but also after i.v. injection.⁸ Moreover, the administration of genetically modified NSCs-expressing cytosine deaminase resulted in a reduction in tumor cell burden. But in most of the reports using SCDV for therapeutic protein production cells are administered i.t., and only a few works use a peritumoral delivery route. The i.t. inoculation of MSCs has been validated for the delivery of interleukin (IL)-2,¹² IL-7,¹³ IL-18,¹⁴ interferon (IFN)- β ,¹⁵ tumor necrosis factor-

related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)^{16,17} and NSCs for the delivery of IL-4,⁹ IL-12,¹⁸ PEX (hemopexin-like protein)¹⁹ and TRAIL.²⁰ Local production of the therapeutic payload decreased tumor growth in every case.

Interestingly, TRAIL-expressing MSCs injected ipsilaterally to an established intracranial glioma xenograft model effectively inhibited tumor growth.²¹ On the contrary, IL-12-secreting MSCs (MSC^{IL-12}) administered in the peritumoral region extended animal survival but did not result in a statistically significant difference in comparison to control groups.²² Another work showed migration of peritumorally injected lacZ-expressing NSCs into the tumor mass; however, the therapeutic effect of NSCs cells expressing IL-23 was demonstrated inoculating the cells into the tumor.²³

In contrast with previous works, Bexell *et al.*²⁴ found no evidence of MSC homing to established gliomas following i.v. injections and concluded that MSC in glioma therapy should be administered by i.t. implantation rather than by i.v. injections.

SYSTEMIC ADMINISTRATION: HOMING, PREFERENTIAL ENGRAFTMENT OR PHYSICAL TRAPPING?

In fact, accumulating evidence suggests that a great proportion of i.v.-injected MSC are trapped within the lungs of mice, rats and pigs, as assessed by different techniques: nuclear imaging of ⁹⁹Tc- or ¹¹¹In-labeled MSCs, tissue iridium content for nanoparticle-labeled MSCs, *in vivo* bioluminescence imaging, *ex vivo* infrared imaging and real time PCR.^{25–30} This ‘pulmonary first-pass effect’ is attributed to the combined effect of cell size and adhesion molecule expression pattern: NSC pulmonary passage was twofold and bone marrow mononuclear cells passage was 30-fold increased as compared with MSC.²⁶ In two unrelated studies, <0.3% from injected rat MSCs could pass the lungs and reach the carotid artery.^{26,28} In a recent work with human MSCs inoculated in mice, 99% of the cells were cleared from the circulation within 5 min as assessed by real time PCR, and

Table 1 *In vivo* production of therapeutic proteins by non-hematopoietic stem cells

Gene	Cell vehicle	Route of administration	Disease model	Animal model	Ref
<i>Antibodies</i>					
α CEA α CD3 dAb	(H) MSC	s.c. (m-e)	(H) colorectal carcinoma (s.c.)	(M) athymic nude	53
α HER2 mAb	(H) NSC	i.v.	(H) breast cancer (fat pad)	(M) nude beige	39
<i>ILs/chemokines</i>					
IL-2	(M) MSC	Coinjection/p.t. (m-e)	(M) melanoma (s.c.)	(M) C57BL6	56
IL-2	(R) MSC	Coinjection/i.t.	(R) glioma (intracranial)	(R) Fisher 344	12
IL-4	(M)/(R) NSC	Coinjection/i.t.	(M)/(R) glioma (intracranial)	(M) C57BL6/(R) Sprague-Dawley	9
IL-7	(R) MSC	i.t.	(R) glioma	(M) Fisher 344	13
IL-12	(M) NSC	i.t.	(M) glioma (intracranial)	(M) C57BL6	18
IL-12	(H) MSC	i.t./i.p.	(M) melanoma (s.c.)/lung metastasis	(M) C57BL6	38
IL-12	(M) MSC	p.t. (m-e)	(M) breast cancer (s.c.)	(M) BALB/c	57
IL-12	(M) MSC	p.t.	(M) glioma (intracranial)	(M) C57BL6	22
IL-12	(M) MSC	i.v.	(M) tumors (s.c.), spontaneous metastasis	(M) C57BL6/BALBc	40
IL-12	(M) MSC	i.v.	(H) Ewing's sarcoma (s.c.)	(M) athymic nude	41
IL-18	(R) MSC	i.t.	(R) glioma (intracranial)	(M) Sprague-Dawley	14
IL-23	(M) NSC	i.t./p.t.	(M) glioma (intracranial)	(M) C57BL6	23
IFN- α	(M) MSC	i.v.	(M) melanoma lung metastasis	(M) C57BL6	35
IFN- β	(H) MSC	Coinjection/i.v.	(H) melanoma (s.c.), lung metastasis	(M) athymic nude	32
IFN- β	(H) MSC	i.t.	(H) glioma (intracranial)	(M) athymic nude	15
IFN- β	(H) MSC	i.v.	(H) breast cancer lung metastasis	(M) SCID	33
IFN- β	(M) MSC	i.v.	(M) prostate cancer lung metastasis	(M) C57BL6	34
CX3CL1	(M) MSC	i.v.	(M) melanoma/colon cancer lung metastasis	(M) C57BL6/BALBc	37
<i>Angiogenesis inhibitors</i>					
Endostatin	(H) BOEC	i.v.	(M) lung carcinoma (s.c.)	(M) SCID	43
PEX	(H) NSC	i.t.	(H) glioma (intracranial)	(M) Swiss nude	19
PEX	(H) MSC	p.t. (e-c)	(H) glioma (s.c.)	(M) athymic nude	67
<i>Soluble receptors</i>					
IGF-I receptor decoy	(M) MSC	s.c. (m-e)	(M)/(H) colon/lung carcinoma liver metastases	(M) C57BL6/(M) athymic	55
sFlt-1	(M) MSC	i.v.	(M) lung/colon carcinoma lung metastasis	(M) C57BL6/(M) BALBc	72
sFlk-1	(H) MSC	Coinjection	(H) Burkitt's lymphoma (s.c.)	(M) NOD-SCID	73
<i>Proapoptotic molecules</i>					
TRAIL	(M) NSC	i.t.	(H) glioma (intracranial)	(M) athymic nude	20
TRAIL	(H) MSC	i.t.	(H) glioma (intracranial)	(M) athymic nude	16
TRAIL	(H) MSC	i.t.	(H) glioma (intracranial)	(M) SCID	17
TRAIL	(H) MSC	p.t.	(H) glioma (intracranial)	(M) athymic nude	21
TRAIL	(H) MSC	i.t./i.v.	(H) breast cancer (s.c.)/lung metastasis	(M) NOD-SCID	74
TRAIL	(H) MSC	i.t./i.v.	(H) cervix carcinoma (s.c.)	(M) NOD-SCID	42
<i>Others</i>					
NK4	(M) MSC	i.v.	(M) colon carcinoma lung metastasis	(M) BALB/c	36
uPA antagonist	(M) MSC	Coinjection	(H) osteolytic prostate cancer (intratibial)	(M) SCID	71
<i>EPO</i>					
EPO	(M) MSC	i.p./s.c. (m-e)	N/A	(M) C57BL6	50
EPO	(M) MSC	s.c. (m-e)	N/A	(M) C57BL6	51
<i>Enzymes</i>					
β -glucuronidase	(H) MSC	i.p.	Mucopolysaccharidosis type VII	(M) NOD-SCID MPSVII	65
<i>Hormones</i>					
Insulin	(H)/(P) MSC	i.p./i.h.	Streptozotocin-induced diabetes	(M) diabetic NOD-SCID	64
<i>Coagulation factors</i>					
Factor VIII	(H) MSC	i.s.	N/A	(M) NOD-SCID	49
Factor VIII	(H) BOEC	i.v.	N/A	(M) NOD-SCID	59
Factor VIII	(C)/(M) BOEC	s.c. (m-e)	Hemophilia A	(M) NOD-SCID/(M) hemophilic	60

Table 1 (Continued)

Gene	Cell vehicle	Route of administration	Disease model	Animal model	Ref
Factor VIII	(H) MSC	s.c. (m-e)	N/A	(M) NOD-SCID	58
Factor IX	(M) MSC	s.c. (3D scaffold)	Hemophilia B	(M) R333Q hemophilic	61

Abbreviations: BOEC, blood late outgrowth endothelial cell; C, canine; dAb, diabody; e-c, encapsulated cells; EPO, erythropoietin; H, human; IFN, interferon; i.h., intrahepatic; IL, interleukin; i.p., intraperitoneal; i.s., intrasplenic; i.t., intratumoral; i.v., intravenous; M, murine; mAb, monoclonal antibody; m-e, matrix-embedded; MSC, mesenchymal stem cell; NOD, non-obese diabetic; NSC, neural stem cell; P, porcine; p.t., peritumoral; R, rat; SCID, severe combined immunodeficiency; s.c., subcutaneous; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.

cells trapped in lungs disappeared with a half-life of around 24 h, being undetectable in other organs.²⁹ Using bioluminescence imaging, Wang *et al.*²⁴ detected MSCs from firefly luciferase transgenic mice primarily into the lungs of healthy mice 1 day after their i.v. administration, as the majority of cells were trapped within the pulmonary capillaries. The number of cells that were able to reach other target organs or tumors in different publications is controversial, but generally very low. Preferential location in lungs have also been documented after systemic administration of EPCs.³¹ These facts pose a challenging conundrum: how do MSCs exert their proved systemic therapeutic effects after i.v. administration, if they are mainly retained in lungs?

These observations have also interesting implications for the interpretation of SCDV tumor tropism in mouse lung metastasis models. If we assume that most of the systemically administered MSC, or at least an important proportion of them, will be physically retained in the pulmonary filter (as tumor cells themselves have been previously trapped after i.v. inoculation to generate the metastasis model), detection of MSCs close to or in contact with tumor cells in lungs perhaps should not be considered strictly as tumor homing. Anyway, these studies have given important clues about the ability of MSCs to engraft, secrete therapeutic proteins and exert anti-tumoral effects. The extent at which these considerations might apply to NSCs and BOECs remains to be elucidated.

Studený *et al.*³² investigated the fate of MSCs injected i.v. into mice with human melanoma lung metastasis. MSCs were found randomly distributed 1 day after in healthy lung and tumor nodules by immunohistochemistry, but after 8 days MSCs persisted mainly in tumors, suggesting that tumor microenvironment is more permissive for their engraftment as compared with normal lung tissue. These results are in accordance with those by Wang *et al.*,³⁰ where firefly luciferase-expressing MSCs could be detected by bioluminescence imaging 11 days after i.v. inoculation in the lungs of mice carrying murine breast cancer metastasis, but not in control mice.

In the work by Studený *et al.*,³³ i.v.-injected IFN- β -expressing MSCs significantly decreased tumor growth rate and prolonged animal survival. In another study by the same group, systemically administered IFN- β -expressing MSC inhibited the growth of pre-established melanoma and breast cancer lung metastasis. These results were supported by Ren *et al.*,³⁴ who reported the therapeutic effect of systemically administered murine IFN- β -expressing MSC in a model of murine prostate cancer lung metastasis, with no detectable increase in serum levels of the cytokine. They also demonstrated the therapeutic effect of IFN- α -expressing MSC in a melanoma lung metastasis model.³⁵

The systemic delivery of NK4 (an antagonist of hepatocyte growth factor) was compared using MSCs as a cell vehicle or adenoviral vectors (Ad) in mice with different types of lung metastasis. MSC^{NK4} inhibited development of lung metastasis and prolonged survival without the severe liver damage associated with Ad^{NK4} administration.³⁶ The same group explored the use of MSCs for the expression of the immunostimulatory chemokine CX3CL1. After systemic administration in a model of colon carcinoma lung metastasis, expression of

CX3CL1 increased in the lung with metastasis, but not in the normal lungs. The numbers of lung metastatic nodules decreased significantly in the MSC^{CX3CL1}-treated group, but not in mice that received fibroblasts expressing the chemokine.³⁷ As an alternative route of systemic delivery, MSC^{IL-12} were administered intraperitoneally (i.p.) prior to an i.v. challenge with melanoma cells.³⁸ Treatment led to a marked decrease in the number of lung metastasis, but unfortunately no data about potential MSC trafficking or elevated IL-12 mouse serum levels are provided.

An altogether different setting is the use of systemically administered SCDVs for the targeting of subcutaneous (s.c.) tumors, assuming that a number of cells high enough pass the pulmonary filter as to exert a therapeutic effect. Frank *et al.*³⁹ tested the ability of NSCs to deliver intact anti-Human Epidermal growth factor Receptor 2 antibodies to human breast cancer foci inoculated in the mammary fat pad. Four days later, mice were euthanized and tumors were harvested. NSCs were detected within the tumor mass of each treated animal by immunohistochemistry and the local production of the antibody was demonstrated. Unfortunately, the anti-tumor effect of anti-Human Epidermal growth factor Receptor 2 antibodies was not assessed in an extended follow-up.

A therapeutic effect was shown by Chen *et al.*,⁴⁰ who inoculated s.c. different types of tumor cells into the footpad of syngenic mice. After i.v. administration of MSC^{IL-12}, the authors reported long-lasting inhibition on local tumor growth and reduction on spontaneous metastasis numbers. MSCs could be detected into the tumor foci 5 weeks after administration, but interestingly they were absent from normal tissues, such as lung and liver.⁴⁰ In a related work, i.v.-injected fluorescent-labeled MSCs were not only found in s.c. Ewing's sarcoma tumors 10 days after, but also detected in lung, liver and spleen. In this model, i.v.-inoculated MSC^{IL-12} decreased tumor growth, and local expression of IL-12 was detected in tumors of mice receiving MSC^{IL-12}, but not untransfected MSCs.⁴¹ Recently, it was reported that adipose-derived MSCs expressing TRAIL, administered i.t. or i.v. in mice bearing s.c. HeLa tumors, caused a reduction in tumor burden in both models.⁴² Presence of transduced MSCs in tumors after systemic administration was demonstrated by green fluorescent protein (GFP) amplification, but no data on MSC potential localization in normal tissues were provided. Using radiolabeled BOECs systemically administered, Dudek *et al.*⁴³ observed preferential accumulation in lung and to a lower extent in spleen and liver, with only a small fraction localized in s.c. tumors after 4 h. At 72 h post-administration, BOEC concentration remained the same in the spleen, liver and tumor, but decreased in lungs. The i.v. injection of endostatin-expressing human BOECs into mice bearing s.c. Lewis lung carcinoma resulted in decreased tumor growth.

Taking into account that it is difficult to estimate the percentage of SCDVs effectively homing to s.c. tumors in these models, and given the anti-tumoral effect observed in most of them, it cannot be ruled out that these results could be attributed, at least in part, to therapeutic protein production in locations other than tumors. Alternatively, the observed effects may be due to the small number of cells

that escape lung trapping.⁴⁴ Systematic data about plasma levels and local production of the protein could help to clarify this point.

MATRIX-EMBEDDED SCDVS AS RETRIEVABLE S.C. DEPOTS

As seen above, tumor-homing capacities of different types of SCDVs are somehow a controversial issue. Moreover, recent evidence also suggests that MSCs display immunomodulatory and pro-angiogenic properties^{45–47} and could have a role in tumor growth and metastasis,⁴⁸ implying a potential risk in the use of MSCs in cancer-targeting approaches.

In fact, for strategies where stem cells are used as therapeutic factories, their ability to disseminate throughout the body may be simply not required (for example, therapeutic levels of factor VIII (fVIII) have been achieved by intrasplenic injection of genetically modified MSC).⁴⁹ As an alternative to systemic administration or implantation into organs, producer cells can be confined to s.c. scaffolds that would improve engraftment and keep cells at the implantation site (Figure 1d), with the therapeutic protein acting at distance after being secreted into circulation. The s.c. delivery of MSC-loaded scaffolds would provide an easily accessible implant that could be retrieved once the therapeutic effect is fulfilled or in the event of an unexpected adverse reaction. A seminal work by Eliopoulos *et al.*⁵⁰ reported that erythropoietin (Epo)-secreting MSCs (MSC^{Epo}), when administered as 'free' cells by s.c. or i.p. injection, led to a temporary hematocrit increase. In contrast, s.c. implantation of the same cell dose of Matrigel-embedded MSC^{Epo} led to a more significant and prolonged therapeutic effect. Moreover, MSCs participated in blood vessel formation to give rise to a neovascularized organoid that supported the release of Epo directly into the bloodstream.

Matrigel is an injectable, rapid gelling murine basement membrane preparation constituted by a mixture of extracellular matrix proteins, widely used in angiogenesis studies *in vitro* and *in vivo*, but probably not best suited for MSC immobilization in a clinical setting. Similar results were observed when MSC^{Epo} were embedded within the human-compatible, food and drug administration approved, bovine collagen-based matrix Contigen.⁵¹ Upon retrieval of implants of matrix-embedded MSC^{Epo}, the effect on the hematocrit was reversed. The authors also demonstrated that implantation of embedded MSC^{Epo} can correct anemia in a murine model of chronic renal failure.⁵²

As a proof of principle, we explored the production *in vivo* of a recombinant antibody by lentiviral-transduced MSC. In search of an alternative to Matrigel, we tested different hydrogel formulations, commercially available, that offer several advantages: they are synthetic, potentially less immunogenic and their composition is the same batch to batch. Human bone marrow-derived MSCs were engineered for the expression of a recombinant T-cell activating bispecific antibody, embedded in hydrogel and inoculated in the ventral s.c. space of nude mice. The antibody was released into the bloodstream at detectable levels for at least 7 weeks and inhibited the growth of human colon carcinoma cells s.c. inoculated in the dorsal region in the presence of i.v. administered human T cells.⁵³ Recently, stem cells have been proposed as an emerging platform for antibody therapy of cancer.⁵⁴ The systemic effect of a locally produced protein was also reported in the context of cancer therapy by Wang *et al.*⁵⁵ Autologous MSCs, matrix embedded and s.c. implanted provided sustained delivery of the decoy soluble IGF-1 receptor for at least 3–4 weeks post-implantation. The protein could access the systemic circulation and achieved therapeutically effective plasma concentrations, inhibiting the development of experimental hepatic metastases of colon and lung carcinoma cells after administration of tumor cells via the intrasplenic/portal route 9–14 days later.

In contrast, the therapeutic effect of MSC^{IL-2} and MSC^{IL-12} seems to be due to a local action of the secreted cytokine. Stagg *et al.*⁵⁶ observed that matrix-embedded MSC^{IL-12} injected in the vicinity of pre-established B16 melanoma tumors led to the absence of tumor growth in 90% of treated mice. Similarly, MSC^{IL-12} implanted peritumorally in a model of breast cancer led to a significant slowing of cancer growth and to increased survival.⁵⁷ Although MSC^{IL-12} scaffolds supported an increase in plasma levels of the cytokine, the observed therapeutic benefit was not due to a systemic effect, since MSC^{IL-2} and MSC^{IL-12} implanted contralaterally did not inhibit significantly tumor growth. The enhanced properties of matrix-embedded MSCs were further demonstrated by the fact that peritumoral injection of the same number of 'free' MSC^{IL-12} did not exhibit any therapeutic effect.

Another important field of application of SCDV-seeded scaffolds is hemophilia. Van Damme *et al.*⁵⁸ transduced MSCs for the expression of fVIII and monitored production over a 5-month period *in vitro*. After 3 weeks in culture, expression started to decline gradually, but remained detectable for at least 15 weeks. MSC^{GFP} implanted in collagen scaffolds into immunodeficient mice resulted in efficient engraftment of gene-modified cells, with GFP fluorescence detectable by whole-body transdermal imaging for at least 2 months post-implantation. Lin *et al.*⁵⁹ had demonstrated that i.v. administration of genetically modified BOECs (mainly located afterwards in marrow and spleen) resulted in sustained therapeutic levels of fVIII. In a related study, and to avoid concerns about cell dissemination throughout the body, BOEC^{fVIII} were implanted s.c. in Matrigel scaffolds in non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency or in immunocompetent hemophilic mice, showing therapeutic fVIII expression for several months before the eventual return to baseline levels.⁶⁰ Using an MSC-based strategy for the treatment of hemophilia B, autologous factor IX-producing MSCs were loaded into sophisticated porous scaffolds specifically designed to maximize cell capacity and provide MSC with the appropriate adhesion cues. When implanted in hemophilic mice, these scaffolds supported long-term engraftment and systemic factor IX delivery by MSCs that corrected the hemophilic phenotype of most animals for up to 12 weeks.⁶¹

ALLOGENEIC MSCS: NOT SO INVISIBLE TO THE HOST IMMUNE SYSTEM

It is obvious that the use of autologous cells as SCDVs would reduce the risk of an immune response against the vehicle. However, the only potential cost-effective method to bring this approach to the clinical setting would imply the use of 'off-the-shelf' stocks of genetically modified cells ready to be applied in a series of patients. The low immunogenicity and the immunomodulatory properties of MSCs would make them ideal candidates for this strategy, but some reports cast doubts on the administration of genetically engineered allogeneic MSCs to immunocompetent recipients.⁶²

Campeau *et al.*⁶³ explored whether MSCs from C57BL/6 mice would sustain erythropoietin production in BALB/c allogeneic recipients. Implantation of MSC^{Epo} led to increases in hematocrit in syngeneic and allogeneic mice, but the latter eventually developed severe anemia due to the production of neutralizing anti-erythropoietin antibodies.⁶³ Interestingly, while plasma soluble IGF-1 receptor levels declined progressively in immunocompetent mice in the study by Wang *et al.*⁵⁵ they were more stable in athymic mice, suggesting host immunity implication in levels and duration of soluble IGF-1 receptor production by MSCs. Given that the MSCs used were syngenic to the injected mice, the authors suggest that the immune response could be directed at the product of the GFP reporter gene.

Not only the transgene, but also the same MSC may trigger an immune response under certain circumstances (and not only in immunocompetent mice), contrary to the expected of their immunomodulatory properties. In the work by Elzaouk *et al.*,³⁸ human MSC^{IL-12} was detected for only 7 days after i.t. injection in immunocompetent mice that generated antibodies against these cells. Insulin-producing human MSCs transplanted into the liver normalized glucose levels in diabetic non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency mice, but hyperglucemia recurred 7 days post-implantation, probably due to an innate immune response against the xenogeneic cells that was somehow ameliorated after i.p. administration.⁶⁴ In contrast, human MSCs producing the enzyme β -glucuronidase and inoculated i.p. in a non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency model of mucopolysaccharidosis type VII, expressed therapeutic levels of protein and persisted for at least 4 months, with no apparent immune response.⁶⁵

If immune tolerance elicited by MSCs *in vivo* is not completely reliable, an option is to enclose gene-modified MSC into devices (Figure 1e) that protect them from the host immune system and at the same time allow entry of nutrients and oxygen and exit of the therapeutic protein.⁶⁶ Goren *et al.*⁶⁷ designed alginate-poly-L-lysine microcapsules that can encapsulate human MSCs for extended periods. As a proof of principle, encapsulated MSC^{PEX} were injected adjacent to glioblastoma tumors in nude mice. Live imaging and tumor measurements showed a significant reduction in tumor volume. The authors suggest that MSCs are the cell of choice for microencapsulation cell-based therapy, thus driving this technology closer to clinical application.⁶⁷

CONCLUDING REMARKS

Stem cell-based *in vivo* therapeutic protein production shares challenges common to any cell-based strategy, as obtaining optimal therapeutic levels, loss of transgene expression over time (due to the lifespan of producer cells, immune responses against the cell or the gene product, or transcriptional repression *in vivo*) and regulated gene expression. With respect to this point, an MSC glucose-responsive promoter able to drive insulin production in diabetic mice by intrahepatic or i.p. administration with near-physiological characteristics has been recently identified.⁶⁴

A different question is how to cope with the contradictory results found in the literature concerning tumor-homing capacities and immunomodulatory properties of these cells, especially when trying to apply them to a clinical setting. Possible explanations for these discrepancies are that perhaps we all are not using the same cells, even if we name them similarly (isolation and expansion protocols may influence radically in their properties) and the realization that cultures *in vitro* are not homogeneous and different subpopulations may have different therapeutic potentials.^{7,44} The development of unequivocal, widely accepted markers for different types and subtypes of stem cell populations of different sources (bone marrow, adipose tissue and umbilical cord) and species will be crucial to compare data on a solid ground.⁶⁸ Standardization of methods used to assess homing efficiencies would also help to clarify MSC trafficking after systemic administration.⁶⁹

Regardless of these issues, MSCs are emerging as the best option for the generation of long-lasting cell factories. Given the doubts about the capacity of MSCs to target 'extrapulmonary' tumors and the evidences suggesting the potential role of MSCs in tumor biology, we believe that the safest approach in cancer therapy might be the use of scaffolds that keep genetically modified MSCs at the implantation site. On the other hand, in approaches aimed to the treatment of inherited protein deficiencies, such as hemophilia, producer cells do not require tissue specificity, but long-term systemic protein delivery. And recent advances in the field of biomaterials have allowed the design of

scaffolds that considerably improve the engraftment of *ex vivo* transduced cells.⁷⁰ Finally, the use of encapsulation systems to protect SCDV from the host immune system would be highly desirable in an allogenic context.

Probably, the only consensus that can be extracted from all the studies commented in this review is the shared hope in the therapeutic potential of SCDV. How to manage to fulfill this potential is still an open question.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2008-03233 and PSE-01000-2009-11), the Comunidad de Madrid (S-BIO-0236-2006) and the European Union (SUOE-FEDER. IMMUNONET-SOE1/P1/E014) to LA-V; and from the Fondo de Investigación Sanitaria/ Instituto de Salud Carlos III (PI08/90856 and PS09/00227) and Fundación Investigación Biomédica Hospital Puerta de Hierro to LS. MC was supported by Instituto de Salud Carlos III (Contrato Rio Hortega, CM06/00055).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LS, MC, IG-M and LA-V wrote the manuscript; LS approved the final draft of the manuscript.

- 1 Seow Y, Wood MJ. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol Ther* 2009; **17**: 767–777.
- 2 Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy* 2004; **11**: S10–S17.
- 3 Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Therapy* 2010; **17**: 295–304.
- 4 Harrington K, Alvarez-Vallina L, Crittenden M, Gough M, Chong H, Diaz RM *et al.* Cells as vehicles for cancer gene therapy: the missing link between targeted vectors and systemic delivery? *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 1263–1280.
- 5 Roth JC, Curiel DT, Pereboeva L. Cell vehicle targeting strategies. *Gene Therapy* 2008; **15**: 716–729.
- 6 Aboody KS, Najbauer J, Danks MK. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Therapy* 2008; **15**: 739–752.
- 7 Bexell D, Scheduling S, Bengzon J. Toward brain tumor gene therapy using multipotent mesenchymal stromal cell vectors. *Mol Ther* 2010; **18**: 1067–1075.
- 8 Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W *et al.* Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 12846–12851.
- 9 Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, Rigamonti D *et al.* Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med* 2000; **6**: 447–450.
- 10 Muller FJ, Snyder EY, Loring JF. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci* 2006; **7**: 75–84.
- 11 Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F *et al.* Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; **109**: 1801–1809.
- 12 Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H *et al.* Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Therapy* 2004; **11**: 1155–1164.
- 13 Gunnarsson S, Bexell D, Svensson A, Siesjo P, Darabi A, Bengzon J. Intratumoral IL-7 delivery by mesenchymal stromal cells potentiates IFN γ -transduced tumor cell immunotherapy of experimental glioma. *J Neuroimmunol* 2010; **218**: 140–144.
- 14 Xu G, Jiang XD, Xu Y, Zhang J, Huang FH, Chen ZZ *et al.* Adenoviral-mediated interleukin-18 expression in mesenchymal stem cells effectively suppresses the growth of glioma in rats. *Cell Biol Int* 2009; **33**: 466–474.
- 15 Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeniy M, Gurnin J *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 2005; **65**: 3307–3318.
- 16 Kim SM, Lim JY, Park SI, Jeong CH, Oh JH, Jeong M *et al.* Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma. *Cancer Res* 2008; **68**: 9614–9623.
- 17 Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, Hingtgen S, van de Water JA, Mohapatra G *et al.* Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 4822–4827.
- 18 Ehteshami M, Kabos P, Kabosova A, Neuman T, Black KL, Yu JS. The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res* 2002; **62**: 5657–5763.

- 19 Kim SK, Cargioli TG, Machluf M, Yang W, Sun Y, Al-Hashem R *et al*. PEX-producing human neural stem cells inhibit tumor growth in a mouse glioma model. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 5965–5970.
- 20 Ehteshami M, Kabos P, Gutierrez MA, Chung NH, Griffith TS, Black KL *et al*. Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2002; **62**: 7170–7174.
- 21 Menon LG, Kelly K, Yang HW, Kim SK, Black PM, Carroll RS. Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expressing S-TRAIL as a cellular delivery vehicle for human glioma therapy. *Stem Cells* 2009; **27**: 2320–2330.
- 22 Hong X, Miller C, Savant-Bhonsale S, Kalkanis SN. Antitumor treatment using interleukin-12-secreting marrow stromal cells in an invasive glioma model. *Neurosurgery* 2009; **64**: 1139–1146.
- 23 Yuan X, Hu J, Belladonna ML, Black KL, Yu JS. Interleukin-23-expressing bone marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. *Cancer Res* 2006; **66**: 2630–2638.
- 24 Bexell D, Gunnarsson S, Torrin A, Darabi A, Gisselsson D, Roybon L *et al*. Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther* 2009; **17**: 183–190.
- 25 Barbash IM, Chouraqi P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A *et al*. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003; **108**: 863–868.
- 26 Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI *et al*. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 2009; **18**: 683–692.
- 27 Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; **169**: 12–20.
- 28 Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK *et al*. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2009; **110**: 1189–1197.
- 29 Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL *et al*. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009; **5**: 54–63.
- 30 Wang H, Cao F, De A, Cao Y, Contag C, Gambhir SS *et al*. Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells* 2009; **27**: 1548–1558.
- 31 Smits PA, Kleppe LS, Witt TA, Mueske CS, Vile RG, Simari RD. Distribution of circulation-derived endothelial progenitors following systemic delivery. *Endothelium* 2007; **14**: 1–5.
- 32 Studeny M, Marini FC, Champilin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002; **62**: 3603–3608.
- 33 Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN *et al*. Mesenchymal stem cells as potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 1593–1603.
- 34 Ren C, Kumar S, Chanda D, Kallman L, Chen J, Mountz JD *et al*. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Therapy* 2008; **15**: 1446–1453.
- 35 Ren C, Kumar S, Chanda D, Chen J, Mountz JD, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells* 2008; **26**: 2332–2338.
- 36 Kanehira M, Xin H, Hoshino K, Maemondo M, Mizuguchi H, Hayakawa T *et al*. Targeted delivery of NK4 to multiple lung tumors by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cancer Gene Ther* 2007; **14**: 894–903.
- 37 Xin H, Kanehira M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kikuchi T, Nukiwa T *et al*. Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**: 1618–1626.
- 38 Elzaouk L, Moelling K, Pavlovic J. Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. *Exp Dermatol* 2006; **15**: 865–874.
- 39 Frank RT, Edmiston M, Kendall SE, Najbauer J, Cheung CW, Kassa T *et al*. Neural stem cells as a novel platform for tumor-specific delivery of therapeutic antibodies. *PLoS One* 2009; **4**: e8314.
- 40 Chen X, Lin X, Zhao J, Shi W, Zhang H, Wang Y *et al*. A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs. *Mol Ther* 2008; **16**: 749–756.
- 41 Duan X, Guan H, Cao Y, Kleinerman ES. Murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interleukin-12 gene delivery into Ewing sarcoma tumors. *Cancer* 2009; **115**: 13–22.
- 42 Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E *et al*. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* 2010; **70**: 3718–3729.
- 43 Dudek AZ, Bodempudi V, Welsh BW, Jasinski P, Griffin RJ, Milbauer L *et al*. Systemic inhibition of tumour angiogenesis by endothelial cell-based gene therapy. *Br J Cancer* 2007; **97**: 513–522.
- 44 Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 2009; **17**: 939–946.
- 45 Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; **103**: 4619–4621.
- 46 Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, Salas C, Serrano A, Vicario JL *et al*. Long-term *in vivo* imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc Res* 2008; **75**: 308–314.
- 47 Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T *et al*. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; **109**: 228–234.
- 48 Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW *et al*. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; **449**: 557–563.
- 49 Chuah MK, Van DA, Zwinnen H, Goovaerts I, Vanslambrouck V, Collen D *et al*. Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 729–738.
- 50 Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Crosato M, Lachapelle K, Galipeau J. A neovascularized organoid derived from retrovirally engineered bone marrow stroma leads to prolonged *in vivo* systemic delivery of erythropoietin in nonmyeloablated, immunocompetent mice. *Gene Therapy* 2003; **10**: 478–489.
- 51 Eliopoulos N, Lejeune L, Martineau D, Galipeau J. Human-compatible collagen matrix for prolonged and reversible systemic delivery of erythropoietin in mice from gene-modified marrow stromal cells. *Mol Ther* 2004; **10**: 741–748.
- 52 Eliopoulos N, Gagnon RF, Francois M, Galipeau J. Erythropoietin delivery by genetically engineered bone marrow stromal cells for correction of anemia in mice with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 1576–1584.
- 53 Compte M, Cuesta AM, Sanchez-Martin D, Alonso-Camino V, Vicario JL, Sanz L *et al*. Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds. *Stem Cells* 2009; **27**: 753–760.
- 54 Frank RT, Najbauer J, Abody KS. Concise review: stem cells as an emerging platform for antibody therapy of cancer. *Stem Cells* 2010; **28**: 2084–2087.
- 55 Wang N, Fallavollita L, Nguyen L, Burnier J, Rafei M, Galipeau J *et al*. Autologous bone marrow stromal cells genetically engineered to secrete an igf-I receptor decoy prevent the growth of liver metastases. *Mol Ther* 2009; **17**: 1241–1249.
- 56 Stagg J, Lejeune L, Paquin A, Galipeau J. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther* 2004; **15**: 597–608.
- 57 Eliopoulos N, Francois M, Boivin MN, Martineau D, Galipeau J. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. *Cancer Res* 2008; **68**: 4810–4818.
- 58 Van Damme A, Thorrez L, Ma L, Vandenberghe H, Eyckmans J, Dell'Accio F *et al*. Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 896–907.
- 59 Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood* 2002; **99**: 457–462.
- 60 Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C *et al*. *Ex vivo* gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained *in vivo* factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. *Stem Cells* 2007; **25**: 2660–2669.
- 61 Coutu DL, Cuerquis J, El AR, Forner KA, Roy R, Francois M *et al*. Hierarchical scaffold design for mesenchymal stem cell-based gene therapy of hemophilia B. *Biomaterials* 2011; **32**: 295–305.
- 62 Rameshwar P. Casting doubt on the safety of 'off-the-shelf' mesenchymal stem cells for cell therapy. *Mol Ther* 2009; **17**: 216–218.
- 63 Campeau PM, Rafei M, Francois M, Birman E, Forner KA, Galipeau J. Mesenchymal stromal cells engineered to express erythropoietin induce anti-erythropoietin antibodies and anemia in allorecipients. *Mol Ther* 2009; **17**: 369–372.
- 64 Chen NK, Tan SY, Udolph G, Kon OL. Insulin expressed from endogenously active glucose-responsive EGR1 promoter in bone marrow mesenchymal stromal cells as diabetes therapy. *Gene Therapy* 2010; **17**: 592–605.
- 65 Meyeroose TE, Roberts M, Ohlemiller KK, Vogler CA, Wirthlin L, Nolte JA *et al*. Lentiviral-transduced human mesenchymal stem cells persistently express therapeutic levels of enzyme in a xenotransplantation model of human disease. *Stem Cells* 2008; **26**: 1713–1722.
- 66 Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Calafiore R, Chang TM, De VP *et al*. Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med* 2003; **9**: 104–107.
- 67 Goren A, Dahan N, Goren E, Baruch L, Machluf M. Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoinflammatory platform for long-term cellular therapy. *FASEB J* 2010; **24**: 22–31.
- 68 Conrad C, Gupta R, Mohan H, Niess H, Bruns CJ, Kopp R *et al*. Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery. *Curr Gene Ther* 2007; **7**: 249–260.
- 69 Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 206–216.
- 70 Coutu DL, Yousefi AM, Galipeau J. Three-dimensional porous scaffolds at the crossroads of tissue engineering and cell-based gene therapy. *J Cell Biochem* 2009; **108**: 537–546.
- 71 Fritz V, Noel D, Bouquet C, Opolon P, Voide R, Apparailly F *et al*. Antitumoral activity and osteogenic potential of mesenchymal stem cells expressing the urokinase-type plasminogen activator amino-terminal fragment in a murine model of osteolytic tumor. *Stem Cells* 2008; **26**: 2981–2990.
- 72 Hu M, Yang JL, Teng H, Jia YQ, Wang R, Zhang XW *et al*. Anti-angiogenesis therapy based on the bone marrow-derived stromal cells genetically engineered to express sFlt-1 in mouse tumor model. *BMC Cancer* 2008; **8**: 306.
- 73 Kyriakou CA, Yong KL, Benjamin R, Pizzey A, Dogan A, Singh N *et al*. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) expressing truncated soluble vascular endothelial growth factor receptor (tsFlk-1) following lentiviral-mediated gene transfer inhibit growth of Burkitt's lymphoma in a murine model. *J Gene Med* 2006; **8**: 253–264.
- 74 Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res* 2009; **69**: 4134–4142.