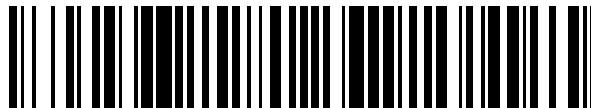


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 308**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2015 E 15166347 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3029137**

54 Título: **Células madre pluri- o multi-potentes genéticamente modificadas y sus usos**

30 Prioridad:

06.12.2014 US 201462088578 P

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

20.06.2019

73 Titular/es:

**GEMOAB MONOCLONALS GMBH (100.0%)
Tatzberg 47
01307 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

EHNINGER, ARMIN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 717 308 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células madre pluri- o multi-potentes genéticamente modificadas y sus usos

La invención se refiere a células madre pluri- o multi-potentes (SCs), por ejemplo, células madre pluri- o multi-potentes humanas (hSCs) tratadas por ingeniería genética para expresar un anticuerpo multiespecífico y que expresa adicionalmente, sobre su superficie, un ligando coestimulador de células inmunes humanas.

Estado de la técnica

El uso de anticuerpos biespecíficos recombinantes (bsabs) para redirigir a diana linfocitos efectores T hacia las células cancerígenas está surgiendo recientemente como una herramienta inmunoterapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades malignas hematológicas y otros cánceres. La elevada eficacia de esta clase de moléculas redirigiendo específicamente células T CD8+ y CD4+ a cualquier antígeno asociado a un tumor escogido (TAA) sobre la superficie de células tumorales, reticulando su receptor de CD3 activante, ha sido descrita en muchos estudios preclínicos y clínicos. No obstante, debido a su bajo peso molecular, los bsabs tienen una semivida corta *in vivo* y, consecuentemente, tienen que ser continuamente administrados a pacientes durante períodos prolongados de varias semanas para conseguir respuestas clínicas (Schlereth *et al.* 2005, Stork *et al.* 2008, Bargou *et al.* 2008, Handgretinger *et al.* 2011). Los dispositivos de bombas médicas externas actualmente usados en ensayos clínicos pueden ser una fuente potencial de infección. Por tanto, hay necesidad de mejorar la vía de aplicación para esta clase altamente eficaz de fármacos para tratar trastornos como el cáncer. Una alternativa a la infusión continua a través de dispositivos de bombas médicas externas son las células genéticamente modificadas, que producen y secretan continuamente bsabs debido a su semivida en el cuerpo del paciente.

Kasuya, *et al.* (Kasuya *et al.*, Int. J. Mol Med, 25, 2010, 209-215) describen la producción de un anticuerpo específico anti-HER2 y anti-CD16 mediante fibroblastos embrionarios que han sido trasplantados a ratones inmunodeficientes.

Además, Compte y sus colaboradores (Compte, *et al.*, Stem Cells, 2009, 27, 753-760) describen una inmunoterapia tumoral mediante el uso de células madre mesenquimales humanas genéticamente modificadas (hMSC) para producir un anticuerpo biespecífico anti-CEA y anti -CD3.

Además, Compte y sus colaboradores (Compte *et al.*, 2010, Gene Therapy, 17 (6), 745-751) describen vasos sanguíneos humanos que comprenden células endoteliales humanas (ECs) tratadas por ingeniería genética para secretar un anticuerpo (α CEA)- α CD3 de antígeno α -carcinoembrionario biespecífico y células madre mesenquimales humanas (hMSCs). Describen el efecto terapéutico de los vasos sanguíneos humanos tratados por ingeniería genética implantados en ratones que portan tumores positivos a antígenos carcinoembrionarios (CEA) distantes después de la inoculación de células T humanas. Además, la función de las MSCs se describe como una fuente de células murales así como para proteger las ECs de respuestas inmunes. Klyushnenkova (Klyushnenkova *et al.*, 2005, Journal of Biomedical Science, 12 (1), 47-57) describe la activación de células T mediante células madre mesenquimales humanas (hMSCs), en que la proliferación de células T no es aumentada. Además, se describe la expresión de CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) y CD40 por MSCs.

Han sido descritas células estromales mesenquimales como células que presentan antígenos tumorales en agentes terapéuticos para el cáncer (Romieu-Mourez et Galipeau 2013, Chapter 10: Mesenchymal Stromal Cells as Effective Tumor Antigen-Presenting Cells in Cancer Therapeutics, In: Stem Cell Therapeutics for Cancer). Además, se han descrito las capacidades potenciales de las células estromales mesenquimales como un vehículo de suministro para fármacos para el cáncer o como células que presentan antígenos tumorales en inmunoterapia del cáncer.

Ling y sus colaboradores (Ling *et al.*, 2001, The Journal of Immunology, 166 (12), 7300-7308) describen la coestimulación inmunológica entre células que presentan antígenos (APCs) y células T mediadas mediante interacciones receptores de ligandos de proteínas. Además, se ha descrito la expresión de receptores coestimulantes CD28 y el coestimulador inducible (ICOS) mediante células T y los ligandos correspondientes B7-1 y B7-2 o GL50, respectivamente.

Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2013, Nature Reviews Immunology, 13 (4), 227-242) describen los mecanismos moleculares de coestimulación y coinhibición de células T, particularmente los mecanismos de activación, diferenciación y función de células T.

Weidle *et al.* (Weidle *et al.* 2013, Cancer Genomics & Proteomics, 10 (1), 1-18) describen anticuerpos multiespecíficos para dirigir a diana células efectoras inmunes y/o citoquinas a tumores para el tratamiento del cáncer. Las dianas preferidas para reclutar células efectoras inmunes son CD3 sobre células T, CD16 sobre células asesinas naturales y CD64 sobre monocitos y neutrófilos. Describen anticuerpos químicamente reticulados como la primera generación de anticuerpos biespecíficos y sus desventajas y, describen adicionalmente anticuerpos biespecíficos trifuncionales.

Además Frank, *et al.* (Frank, *et al.*, PloSone, 2009, 4, e831) usaron células madre neurales (NSC) como una nueva plataforma para el suministro específico tumoral de anticuerpos terapéuticos.

Aunque se han hecho varios avances en el uso de células genéticamente modificadas para producir anticuerpos terapéuticos, hay todavía limitaciones que tienen que ser superadas.

Objetivo

5 Por lo tanto, es un objeto de la presente memoria descriptiva proporcionar células genéticamente modificadas tratadas por ingeniería para producir anticuerpos multiespecíficos y un método mejorado para el suministro *in situ* de anticuerpos terapéuticos por medio de estas células genéticamente modificadas.

Descripción general de la invención

El objetivo se resuelve usando células madre pluri- o multi-potentes según la presente memoria descriptiva.

10 En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria descriptiva células madre pluri- o multi-potentes tratadas por ingeniería genética para expresar un anticuerpo multiespecífico, que expresan adicionalmente sobre su superficie un ligando coestimulador de células inmunes humanas.

15 La expresión célula madre (SC) pluri- o multi-potente se refiere a cualquier célula madre que distinta de una célula madre embrionaria o célula madre derivada de embriones o fetos. La expresión célula madre (SC) pluri- o multi-potente excluye las células de embriones o fetos e incluye células que se encuentran en niños, así como en adultos o que son generadas mediante manipulación genética de una célula somática.

La expresión célula madre (SC) pluri- o multi-potente se refiere a células madre que comprenden células madre mesenquimales (MSC), células madre neurales (NSC), células progenitoras endoteliales (EPC), células madre hematopoyéticas (HSC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Preferentemente, las células madre son células madre humanas.

20 En una realización preferida, las células madre pluri- o multi-potentes son células madre mesenquimales humanas (hMSC).

25 En ciertas realizaciones, el ligando coestimulador de células inmunes humanas, que puede ser expresado recombinantemente sobre la superficie celular de SCs, que se proporcionan en la presente memoria descriptiva, se selecciona entre un grupo de ligandos de CD28, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), ligando de CD137 (CD137L, 4-1BBL), ligando OX40L de Ox40 (CD252), ligando de CD27 CD70 (CD27L), ligando coestimulador de células T inducible (ICOS) ICOSL (CD275), molécula de adhesión intracelular de ligando 1 de antígeno asociado a función de linfocitos (LFA) (ICAM)-1 (CD54), -2 (CD102) y -3 (CD50), y ligandos de familia de moléculas de activación de señalización linfocítica (SLAM), por ejemplo, ligando de 2B4 (CD244) y de SLAMF2 (CD48).

30 En ciertas realizaciones, las células madre pluri- o multi-potentes son tratadas por ingeniería genética para expresar anticuerpos multiespecíficos que comprenden al menos un dominio de unión específico a células diana y al menos un dominio de unión específico células inmunes.

Los dos dominios específicos (célula diana y célula inmune) se expresan preferentemente en forma de una proteína de fusión.

35 El dominio de unión específico a células diana es preferentemente específico para un antígeno asociado tumoral o un antígeno de un agente patógeno, parásito o parasitoide.

40 De forma más preferida, el dominio de unión específico de células diana es específico para un antígeno seleccionado entre antígenos superficiales, citoplásmicos o nucleares como el antígeno La/SSB, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD56, CD157, CD123, CCR5, STEAP1, antígeno de células madre de próstata PSCA, antígeno de membrana específica de próstata PSMA, miembros de la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico, preferentemente EGFR (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) y Her4 (ErbB-4) y sus mutantes, miembros de la familia de receptores de efrina, preferentemente EphA1-10 o EphB1-6, antígenos embrionarios, preferentemente antígeno carcinoembrionario CEA, receptor de acetilcolina fetal, CEACAM-6, CEACAM-7.

45 A continuación, de forma más preferida, el dominio de unión específico a células diana es específico para un antígeno seleccionado entre miembros de la familia Rho de GTPasas, miembros de proteínas del grupo de movilidad elevada, antígeno de tumor de vejiga (BTA), CA125, CD2, CD4, CD8, CD10, CD23, CD30, CD44, CD52, CD99, CD135, CD274, carboanhidrasa IX, endosialina, proteasa-alfa de activación de fibroblastos (FAP-alfa), FBP, gpA33, gp100, c-Met (receptor de factor de crecimiento de hepatocitos), MCSP y TIM-3, miembros de la familia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR 1-3), EPCAM de moléculas de adhesión de células epiteliales, alfafetoproteína AFP, miembros de la familia de proteínas de mucina, preferentemente MUC1 o MUC16, receptores de hormonas estimuladoras de folículos (FSHR), el antígeno asociado a melanoma humano de peso molecular elevado (HMW-MAA), proteína de unión de folato FBP, receptor de a-folato, ligandos del receptor NKG2D, miembros de la familia de glicoproteínas epiteliales, preferentemente EGP-2, EGP-4 o EGP-40, miembros de la familia de receptores de factor

de crecimiento de tipo insulina, preferentemente IGF-1R, diasialogangliósidos, preferentemente GD2 o GD3, miembros de la familia de anhidrasa carbónica, preferentemente CAIX, miembros de la familia de antígenos de hidratos de carbono, preferentemente Ley, incluidos mutantes de las proteínas mencionadas y familias de proteínas y proteínas de envoltura viral, preferentemente gp120, gp41 o EBOV GP.

- 5 De forma alternativa y preferida, el dominio de unión de células diana está compuesto por las cadenas alfa y beta o las gamma y delta de un receptor de células T (TCR) o sus fragmentos. Estos restos de unión derivados de TCR reconocen y se unen a péptidos representados por complejos de proteínas I y II de la clase de antígenos de leucocitos humanos (HLA). Ejemplos preferidos son, pero no sin limitación, TCRs específicos para péptidos virales, péptidos derivados de proteínas como la familia EGFR, survivina, familia de proteínas de la agrupación de motilidad elevada de tipo sry (SOX), antígenos asociados a melanoma, preferentemente antígeno NY-ESO-1 de cáncer autoinmuno/génico/testículos, miembros de la familia de antígenos de melanoma A MAGEA, el antígeno preferentemente expresado en melanoma PRAME y antígenos asociados a leucemia, preferentemente gen 1 WT1 de tumor wilms. El resto de unión de células diana podría comprender también ligandos para proteínas y complejos de proteínas, también denominados receptores. Estos ligandos se pueden unir, pero no están limitados, a receptores de citoquinas, preferentemente receptor de IL-13, ligandos del receptor NKG2D, ligandos de los miembros de la familia EGFR, o TCR auto-reactivos.

- 20 Para la generación de anticuerpos multiespecíficos que expresan SCs permanentes, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, el cDNA que codifica un anticuerpo recombinante, preferentemente un anticuerpo multiespecífico, como un constructo de anticuerpo biespecífico, pueden ser clonados, por ejemplo, en un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral autoinactivante), como un vector retroviral o un vector lentiviral, preferentemente p6NST50 para generar un vector de transferencia. En este vector viral, la expresión de un anticuerpo recombinante (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico) puede ser dirigido por un promotor adecuado, como un promotor viral, por ejemplo, promotor interno derivado de virus formador de focos de bazo (SFFV). En ciertas realizaciones, una proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) proteína de fusión de Zeocina puede ser coexpresada mediante un sitio de entrada ribosomal interno (IRES). Pueden ser generadas partículas lentivirales pseudoimpresas con una proteína de envoltura, por ejemplo, la envoltura del virus de estomatitis vesicular 120 (VSV-G) mediante la transfección transitoria de una célula empaquetadora, por ejemplo, células HEK293T y la materia sobrenadante de virus se recolecta y se usa para transducir establemente SCs como células SCP-1.

- 30 Para la expresión ectópica de un ligando coestimulador, por ejemplo, el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L), sobre la superficie de SCs, como las células SCP-1, puede ser usado un vector viral, como un vector retroviral o un vector lentiviral, que alberga un promotor de mamífero apropiado, como un promotor alfa de factor 1 de alargamiento humano mínimo interno.

- 35 En un aspecto particular, las SCs pueden ser cotransfectadas con dos o más vectores de expresión (por ejemplo, vectores virales) que codifican polipéptidos que se asocian (por ejemplo, de forma covalente o no covalente) para formar dominios de unión a antígeno (por ejemplo, dominios de unión a antígeno que comprenden un VH y un VL) de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico) expresado por SCs.

- 40 En ciertas realizaciones, al menos 1 pg, 5 pg, 10 pg, 50 pg, 75 pg, 100 pg o 250 pg de anticuerpo se producen por célula durante un período de 48 horas. En otras realizaciones, como máximo 1 pg, 5 pg, 10 pg, 50 pg, 75 pg, 100 pg o 250 pg de anticuerpo se producen por célula durante un período de 48 horas. En ciertas realizaciones, 5-10, 5-50, 10-50, 25-75 u 8-70 pg de anticuerpo se producen por célula durante un período de 48 horas.

- En aspectos específicos, se proporcionan en la presente memoria descriptiva anticuerpos multiespecíficos, como anticuerpos biespecíficos, que son recombinantemente expresados por SCs, en que los anticuerpos multiespecíficos comprenden al menos un dominio de unión específico a células diana y al menos un dominio de unión específico células inmunes.

- 45 Los dos dominios específicos (célula diana y célula inmune) son expresados preferentemente en forma de una proteína de fusión.

El dominio de unión específico a células diana es preferentemente específico para un antígeno asociado a tumor o un antígeno de un agente patógeno, parásito o parasitoide.

- 50 El antígeno tumoral puede estar asociado, pero no está restringido a esto, a enfermedades malignas hematopoyéticas y linfoides, como leucemia (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa aguda o leucemia linfocítica o mielogenosa crónica), linfoma (por ejemplo, linfomas que no son de Hodgkin y de Hodgkin) o mieloma. Puede estar asociado también con carcinoma (por ejemplo, carcinoma de mama, próstata, pulmón, páncreas o colon), sarcoma (por ejemplo, osteosarcoma, sarcoma de Ewing) o blastoma (por ejemplo, neuroblastoma, glioblastoma multifome).

En ciertos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente memoria descriptiva es un anticuerpo biespecífico de cadena única. En una realización particular, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente memoria descriptiva, como un anticuerpo biespecífico de cadena única, es humanizado (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico humanizado de dirección a diana CD33 y CD3).

5 Como se usan en la presente memoria descriptiva, las expresiones “región variable” o “dominio variable” se refieren a una parte de un anticuerpo, generalmente, una parte de un anticuerpo de cadena ligera o pesada, normalmente de aproximadamente 110 a 120 aminoácidos amino-terminales en una cadena pesada y aproximadamente 90 a 100 aminoácidos amino-terminales en una cadena ligera madura. Las regiones variables comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDRs) flanqueadas por regiones marco (FRs). Generalmente, la orientación espacial de CDRs y FRs es como sigue, en una dirección N-terminal a C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Aunque no se desea una vinculación a cualquier mecanismo o teoría particular, se cree que las CDRs de las cadenas ligeras y pesadas son primariamente responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno y de la especificidad del anticuerpo para un epítipo.

15 En una realización específica, la numeración de las posiciones de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva es según el Índice de la UEEU Index, como en Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nº 91-3242. En ciertas realizaciones, la región variable es una región variable humana. En ciertas realizaciones, la región variable comprende CDRs de muridos (por ejemplo, ratón o rata) y regiones marco humanas (FRs). En realizaciones particulares, la región variable es una región variable de primates (por ejemplo, primate humano o no humano). En ciertas realizaciones, la región variable comprende CDRs de muridos (por ejemplo, ratón o rata) y regiones marco (FRs) de primates (por ejemplo, humanos o primates no humanos). Como un ejemplo no limitativo, una región variable descrita en la presente memoria descriptiva se obtiene ensamblando dos o más fragmentos de secuencias humanas en forma de una secuencia humana compuesta.

25 En ciertos aspectos, las CDRs de un anticuerpo pueden ser determinadas según (i) el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y, Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nº 91-3242); o (ii) el esquema de numeración de Chothia, al que se hará referencia en la presente memoria descriptiva como las “CDRs de Chothia” (ver, por ejemplo, Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol., 196: 901-917; Al-Lazikani *et al.*, 1997, J. Mol. Biol., 273: 927-948; Chothia *et al.*, 1992, J. Mol. Biol., 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215 (1): 175-82; y la ζ patente de EE.UU. nº 7.709.226); o (iii) el sistema de numeración ImMunoGeneTics (IMGT), por ejemplo, como se describe por Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7: 132-136 y Lefranc, M.-P. *et al.*, 1999, Nucleic Acids Res., 27: 209-212 (“IMGT CDRs”); o (iv) MacCallum *et al.*, 1996, J. Mol. Biol., 262: 732-745. Véase también, por ejemplo, Martin, A., “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains”, in Antibody Engineering, Kontermann and Dübel, eds., capítulo 31, págs. 422-439, Springer-Verlag, Berlín (2001).

35 En un aspecto específico, se proporcionan en la presente memoria descriptiva anticuerpos multiespecíficos que expresan SCs, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, como anticuerpos biespecíficos de cadena única, que comprenden un VL y un VH que dirigen a diana un antígeno asociado a tumor o un antígeno de un agente patógeno, parásito o parasitoide. En aspectos específicos, los anticuerpos multiespecíficos, como anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de cadena única, descritos en la presente memoria descriptiva comprenden uno o más conectores (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco, o más conectores).

En una cierta realización, este conector descrito en la presente memoria descriptiva comprende repeticiones, por ejemplo, al menos una, dos, tres, cuatro o cinco repeticiones de conectores de glicina-serina, por ejemplo, G₄S.

45 En una realización específica, se proporcionan en la presente memoria descriptiva SCs que expresan un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, como un anticuerpo biespecífico de cadena única, que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor o un antígeno de un agente patógeno, parásito o parasitoide que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL).

En realizaciones específicas, los anticuerpos multiespecíficos, como anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de cadena única, descritos en la presente memoria descriptiva, comprenden en el N-terminal un péptido de señalización, por ejemplo, una secuencia líder Ig kappa como un péptido de señalización, para la secreción de proteínas.

50 En ciertas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, como anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de cadena única, descritos en la presente memoria descriptiva comprenden en el C-terminal una etiqueta, por ejemplo, etiqueta myc o etiqueta histidina (his) (por ejemplo, etiqueta 6xhis) para la protección y/o detección de proteínas.

55 En ciertas realizaciones, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos, como los anticuerpos biespecíficos) descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM,

IgD, IgA o IgY), de cualquier clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂) o cualquier subclase (por ejemplo, IgG_{2a} o IgG_{2b} o una mezcla de los mismos) de moléculas de inmunoglobulina.

5 En realizaciones específicas, los anticuerpos multiespecíficos, como anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de cadena única, descritos en la presente memoria descriptiva no comprenden una región constante de anticuerpo.

Los métodos para preparar multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) han sido descritos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n^{os} 7951917, 7183076, 8227577, 5837242, 5989830, 5869620, 6132992 y 8586713.

10 En ciertas realizaciones, los métodos y usos actualmente descritos mejoran la respuesta de células T frente a una célula cancerígena. Aunque no se desean vinculaciones teóricas, la respuesta mejorada de las células T frente a una célula cancerígena está acompañada por la dirección a diana de células madre pluri- o multi-potentes para la célula cancerígena en un paciente. En ciertas realizaciones, al menos 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 o al menos 1×10^7 SCs, como se describen en la presente memoria descriptiva son administradas a un paciente. En ciertas realizaciones, como máximo 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 o al menos 1×10^7 SCs, como se describen en la presente memoria descriptiva, son administradas a un paciente. En una realización más específica entre 5×10^6 y 6×10^6 SCs, como se describen en la presente memoria descriptiva son administradas a un paciente.

20 En ciertas realizaciones, al menos 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg o al menos 10 mg de peso de células de una SC, como se describe en la presente memoria descriptiva, pueden ser trasplantados a un paciente. En ciertas realizaciones, como máximo 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg o al menos 10 mg de peso de células de una SC, como se describe en la presente memoria descriptiva, pueden ser trasplantados a un paciente. En ciertas realizaciones, aproximadamente 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 5,5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg o al menos 10 mg de peso de células de una SC, como se describe en la presente memoria descriptiva, pueden ser trasplantados a un paciente.

25 Las SC pueden ser usadas como productor *in situ* de agentes terapéuticos anticancerígenos. En ciertas realizaciones, las SCs autólogas genéticamente modificadas descritas en la presente memoria descriptiva pueden ser inyectadas por vía intravenosa a un paciente y, aunque no se desean vinculaciones teóricas, desplazarse hasta el sitio del tumor y suministrar su contenido útil por vía local.

30 En cierta realización, el uso de SCs para la producción *in situ* de agentes terapéuticos anticancerígenos (por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos) da lugar a un suministro continuo de los agentes terapéuticos anticancerígenos en un paciente. Más específicamente, esta producción continua puede durar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años. Más específicamente, esta producción continua puede durar como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años.

35 En aspectos específicos, se proporcionan en la presente descriptiva métodos para tratar cáncer, como leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto administrando una cantidad terapéutica eficaz de SCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico y ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L). También se proporcionan en la presente memoria descriptiva métodos para inducir/aumentar la proliferación de células T y métodos relacionados para activar células T usando estas SCs.

40 En realizaciones particulares, se proporcionan en la presente memoria descriptiva métodos para gestionar, tratar, prevenir o proteger contra AML a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que lo necesita, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de SCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L).

45 En una realización particular, se proporciona en la presente memoria descriptiva un método para inducir o mejorar la proliferación de células T que comprende hacer interaccionar células T con una cantidad eficaz de SCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L). En una realización específica, se proporciona en la presente memoria descriptiva un método para inducir o mejorar la proliferación de células T en un sujeto que lo necesita, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de SCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L).

En realizaciones particulares, la proliferación de células T es incrementada en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en presencia de SCs en comparación con su ausencia, según se determina mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la presente memoria descriptiva.

5 En una realización particular, se proporciona en la presente memoria descriptiva un método para inducir o aumentar la activación de células T, que comprende hacer interaccionar células T con una cantidad eficaz de SCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L). En una realización específica, se proporciona en la presente memoria descriptiva un método para inducir o
10 aumentar la activación de células T en un sujeto que lo necesita, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de SCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3), y un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L).

15 En realizaciones particulares, la activación de células T es incrementada en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en presencia de SC en comparación con su ausencia, según se determina mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, sección de ejemplos).

Descripción detallada

20 En un aspecto adicional, se proporcionan en la presente memoria descriptiva células madre mesenquimales (MSCs), como MSCs humanas (hMSCs), tratadas por ingeniería genética para expresar un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico que dirige a diana CD33 y CD3, y, opcionalmente, un humano ligando coestimulador de células T humanas, como el ligando coestimulador de 4-1BB de células T humanas (CD137L). En aspectos específicos, se proporcionan también en la presente memoria descriptiva métodos para tratar leucemia mieloide aguda (AML) que usando estas hMSCs, así como métodos relacionados para inducir/aumentar la
25 proliferación de células T y métodos relacionados para activar células T.

30 En un aspecto se proporcionan en la presente memoria descriptiva células madre mesenquimales humanas (hMSCs) tratadas por ingeniería genética para expresar un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico que dirige a diana CD33 y CD3, y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T humanas, como el ligando coestimulador de 4-1BB de células T humanas (CD137L). En aspectos específicos, se proporcionan también en la presente memoria descriptiva métodos para tratar leucemia mieloide aguda (AML) usando estas hMSCs, así como métodos relacionados para inducir/mejorar la proliferación de células T y métodos relacionados para activar células T usando estas hMSCs.

35 En ciertas realizaciones, los métodos y usos actualmente descritos mejoran la respuesta de células T frente una célula cancerígena. Aunque no se desean vinculaciones teóricas, la respuesta mejorada de células T frente a una célula cancerígena se realiza mediante la dirección a diana de hMSCs a la célula cancerígena en un paciente. En ciertas realizaciones, al menos 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 o al menos 1×10^7 MSCs, como se describen en la presente memoria descriptiva, son administradas a un paciente. En ciertas realizaciones, como máximo 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 o al menos 1×10^7 MSCs, como se describen en la presente memoria descriptiva, son administradas a un paciente. En una realización más específica entre 5×10^6 y 6×10^6 MSCs, como se describe en la presente memoria descriptiva, son administradas a un paciente.

40 En ciertas realizaciones, al menos 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg o al menos 10 mg de peso de células de una MSC como se describe en la presente memoria descriptiva pueden ser trasplantados a un paciente. En ciertas realizaciones, como máximo 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg o al menos 10 mg de peso de células de una MSC como se describe en la presente memoria descriptiva pueden ser trasplantados a un paciente. En ciertas realizaciones, aproximadamente 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 5,5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg o al menos 10 mg de peso de células de una MSC como se describe en la presente memoria descriptiva puede ser trasplantados a un paciente.

45 Las MSCs pueden ser usadas como un productor *in situ* de agentes terapéuticos anticancerígenos. En ciertas realizaciones, las MSCs autólogas genéticamente modificadas como se describen en la presente memoria descriptiva pueden ser inyectadas por vía intravenosa a pacientes para favorecer su migración al sitio del tumor y el suministro local de su contenido útil, sin vinculaciones teóricas. En otras realizaciones, las MSCs pueden ser atrapadas en una matriz de soporte artificial y trasplantadas por vía subcutánea a las proximidades de un sitio del tumor. Nuevamente, aunque no se desean vinculaciones teóricas, por tanto la función de soporte potencial en procedimientos de angiogénesis tumoral podría ser reducida, asegurando que las MSCs trasplantadas no puedan escapar de su entorno artificial confinado. Un beneficio adicional de esta estrategia puede ser que el suministro del agente anticancerígeno
50
55

puede ser controlado y detenido después de la separación del tumor retirando el soporte [Compte *et al.*, (2007) *Cancer Gene Ther*: 14 (4): 380-388].

En cierta realización, el uso de MSCs para la producción *in situ* de agentes terapéuticos anticancerígenos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) da lugar a un suministro continuo del agente terapéutico anticancerígeno en un paciente. Más específicamente, esta producción continua puede ser una producción durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años. Más específicamente, esta producción continua puede ser una producción durante un máximo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años.

10 Células madre mesenquimales

Cualesquiera células madre mesenquimales conocidas por un experto en la técnica pueden ser usadas en los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, se han descrito métodos para aislar hMSCs primarias, véase, por ejemplo, la publicación Penforms and Pochampally, 2011, *Methods Mol Biol.*, 698: 11-21; y Qiao *et al.*, 2008, *Cell Biol. International*, 32: 8-15. Las células madre mesenquimales, o MSCs, son células estromales multipotentes que se pueden diferenciar en una diversidad de tipos celulares que incluyen células de hueso, cartílago y grasa. Las MSCs pueden ser derivadas de médula ósea.

En un aspecto específico, se proporcionan en la presente memoria descriptiva células madre mesenquimales (MSCs), como MSCs humanas (hMSCs), que expresan de recombinantemente un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y opcionalmente un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L).

En un aspecto particular, las hMSCs proporcionadas en la presente memoria descriptiva son tratadas por ingeniería genética para expresar anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos que dirigen a diana CD33 y CD3) que son derivados de la línea celular de clon 1 cosechada en células únicas (SCP-1) (Böcker *et al.*, 2008, *J Cell Mol Med*: 12: 1347-1359), derivadas de células madre mesenquimales humanas e inmortalizadas mediante transducción lentiviral del gen que codifica la transcriptasa inversa telomerasa humana (hTERT).

En un cierto aspecto, se proporcionan en la presente memoria descriptiva, las hMSCs tratadas por ingeniería genética para expresar anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que dirigen a diana CD33 y CD3) derivadas de hMSCs primarias.

Para la generación de hMSCs permanentes que expresan anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que dirigen a diana CD33 y CD3), un cDNA que codifica un constructo de anticuerpo recombinante (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) puede ser clonado, por ejemplo, en un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral autoinactivante), como un vector retroviral o vector lentiviral (por ejemplo, p6NST50) para generar un vector de transferencia. En este vector viral, la expresión de un anticuerpo recombinante (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) puede ser dirigida por un promotor adecuado, como un promotor viral, por ejemplo, promotor interno derivado de virus formador de focos de bazo (SFFV). En ciertas realizaciones, una proteína fluorescente verde mejorada (EGFP)-proteína de fusión de Zeocina puede ser coexpresada mediante un sitio de entrada ribosomal interno (IRES). Pueden ser generadas partículas lentivirales pseudoimpresas con una proteína de envoltura, por ejemplo, la envoltura 120 de virus de estomatitis vesicular (VSV-G) mediante una transfección transitoria de una célula empaquetadora, por ejemplo, células HEK293T y la materia sobrenadante de virus es recolectada y usada para transducir establemente hMSCs, como células SCP-1.

Para la expresión ectópica de un ligando coestimulador, por ejemplo, ligando coestimulador 41BB (CD137L), sobre la superficie de las hMSCs, como células SCP-1, un vector viral, como un vector retroviral o un vector lentiviral puede ser usada para albergar un promotor apropiado, como un promotor 1-alfa de factor de alargamiento humano mínimo interno.

En un aspecto particular, las hMSCs pueden ser co-transfectadas con dos o más vectores de expresión (por ejemplo, vectores virales) que codifican polipéptidos que se asocian (por ejemplo, de forma covalente o no covalente) para formar dominios de unión a antígeno (por ejemplo, dominios de unión a antígeno que comprenden VH y VL) de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) expresado por hMSCs.

En ciertas realizaciones, se producen al menos 1 pg, 5 pg, 10 pg, 50 pg, 75 pg, 100 pg o 250 pg de anticuerpo por célula durante un periodo de 48 horas. En otras realizaciones, se producen como máximo 1 pg, 5 pg, 10 pg, 50 pg, 75

pg, 100 pg o 250 pg de anticuerpo por célula durante un período de 48 horas. En ciertas realizaciones, se producen 5-10, 5-50, 10-50, 25-75 u 8-70 pg de anticuerpo por célula durante un período de 48 horas.

Anticuerpos

5 En aspectos específicos, se proporcionan en la presente memoria descriptiva anticuerpos, como anticuerpos
 5 bispecíficos, que se expresan recombinantemente mediante hMSCs. En una realización particular, estos anticuerpos
 bispecíficos dirigen a diana CD33, por ejemplo, CD33 humano. En una realización específica, estos anticuerpos
 bispecíficos dirigen a diana CD33, por ejemplo, CD33 humano y CD3, por ejemplo, CD3 humano. En ciertos aspectos,
 un anticuerpo bispecífico proporcionado en la presente memoria descriptiva es un anticuerpo bispecífico de cadena
 10 única. En una realización particular, un anticuerpo bispecífico proporcionado en la presente memoria descriptiva,
 como un anticuerpo bispecífico de cadena única, es humanizado (por ejemplo, un anticuerpo bispecífico
 humanizado que dirige a diana CD33 y CD3).

15 Como se usan en la presente memoria descriptiva, las expresiones "región variable" o "dominio variable" se refieren a
 una parte de un anticuerpo, generalmente, una parte de un anticuerpo de cadena ligera o pesada, normalmente
 aproximadamente de 110 a 120 aminoácidos amino-terminales en una cadena pesada madura y aproximadamente
 15 de 90 a 100 aminoácidos amino-terminales en una cadena ligera madura. Las regiones variables comprenden regiones
 determinantes complementarias (CDRs) flanqueadas por regiones marco (FRs). Generalmente, la orientación espacial
 de CDRs y FRs es como sigue, en una dirección N-terminal a C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.
 Aunque no se desea una vinculación con cualquier mecanismo o teoría particular, se cree que las CDRs de las
 20 cadenas ligeras y pesadas son principalmente responsables de la interacción del anticuerpo con un antígeno y de la
 especificidad de un anticuerpo para un epítopo. En una realización específica, la numeración de las posiciones de
 aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva es según el EU Index, como en Kabat *et al.*
 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human
 Services, NIH Publication n° 91-3242. En ciertas realizaciones, la región variable es una región variable humana. En
 25 ciertas realizaciones, la región variable comprende CDRs de muridos (por ejemplo, ratón o rata) y regiones marco
 humanas (FRs). En realizaciones particulares, la región variable es una región variable de primate (por ejemplo,
 primate humano o no humano). En ciertas realizaciones, la región variable comprende CDRs de muridos (por ejemplo,
 ratón o rata) y regiones marco (FRs) de primates (por ejemplo, primate humano o no humano). Como ejemplo no
 limitativo, una región variable descrita en la presente memoria descriptiva es obtenida a partir del ensamblamiento de
 dos o más fragmentos de secuencias humanas en forma de una secuencia humana compuesta.

30 En ciertos aspectos, las CDRs de un anticuerpo se pueden determinar según (i) el sistema de numeración de Kabat
 (Kabat *et al.*, (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 y Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological
 Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication n° 91-3242); o (ii) el esquema
 de numeración de Chothia, que se denominará en la presente memoria descriptiva como "CDRs de Chothia" (véase,
 35 por ejemplo, Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917; Al-Lazikani *et al.*, 1997, *J. Mol. Biol.*, 273: 927-948;
 Chothia *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.*, 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215 (1): 175-82; ¿y la patente
 de EE.UU. n° 7.709.226); o (iii) el sistema de numeración de ImMunoGeneTics (IMGT), por ejemplo, como se describe
 por Lefranc, M.-P., 1999, *The Immunologist*, 7:132-136 y Lefranc, M.-P. *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212
 ("IMGT CDRs"); o (iv) MacCallum *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745. Véase también, por ejemplo, Martin, A.,
 40 "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in *Antibody Engineering*, Kontermann and
 Dübel, eds., capítulo 31, págs. 422-439, Springer-Verlag, Berlín (2001).

En un aspecto específico, se proporcionan en la presente memoria descriptiva hMSCs que expresan anticuerpos
 multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos bispecíficos, como anticuerpos bispecíficos de cadena única, que
 comprenden una VL y una VH que dirigen a diana CD33 (por ejemplo, CD33 humano). En aspectos específicos, los
 45 anticuerpos multiespecíficos, como los anticuerpos bispecíficos, por ejemplo, anticuerpos bispecíficos de cadena
 única, descritos en la presente memoria descriptiva comprenden uno o más conectores (por ejemplo, uno, dos, tres,
 cuatro o cinco o más conectores). En una cierta realización, este conector descrito en la presente memoria descriptiva
 comprende repeticiones, por ejemplo, al menos una, dos, tres, cuatro o cinco repeticiones de conectores de glicina-
 serina, por ejemplo, G₄S. En ciertas realizaciones específicas, un anticuerpo bispecífico para ser usado en los
 métodos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva consiste o comprende la siguiente estructura:
 50 (región variable de cadena pesada humanizada de anti-CD33)-(G₄S)₃-(región variable de cadena ligera humanizada
 de anti-CD33) -AAARG- (región variable de cadena pesada humanizada de anti-CD33)-(G₄S)₃-(región variable de
 cadena ligera humanizada de anti-CD33). Incluso en ciertas realizaciones más específicas, este anticuerpo bispecífico
 comprende adicionalmente en su N-terminal un péptido de señalización adecuado para la secreción del anticuerpo
 bispecífico a partir de hMSC y/o una secuencia AAQPA entre el péptido de señalización y la región variable de cadena
 55 pesada humanizada de anti-CD33 y/o etiqueta myc en el C-terminal y/o una etiqueta de histidina en el C-terminal.

Ejemplos no limitativos de anticuerpos que comprenden una VL y una VH que dirigen a diana CD33 han sido descritos,
 por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n° US 2012/0251554 A1 (por ejemplo, anticuerpos
 que comprenden CDRs de anticuerpo anti-CD33 DRB1 o DRB2); Stamova *et al.*, 2011, *Molecular Immunol.*, 49: 474-
 482; Arndt *et al.*, 2013, *Leukemia*, 27: 964-967 y Arndt *et al.*, 2014, *Leukemia*, 28: 59-69.

- 5 En una realización específica, se proporcionan en la presente memoria descriptiva hMSCs que expresan un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, como un anticuerpo biespecífico de cadena única, que se une específicamente a CD33 (por ejemplo, CD33 humano) que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en que (i) la VH comprende una región determinante complementaria CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYVVH (SEC ID 1), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos YINPYNDGTYNEKFKG (SEC ID 2) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYRYEYVGM DY (SEC ID 3); y (ii) la VL comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos TASSSVNYIH (SEQ ID 4), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos TSKVAS (SEQ ID 5) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQWRSYPLT (SEQ ID 6).
- 10 En una realización específica, se proporcionan en la presente memoria descriptiva hMSCs que expresan un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, como un único anticuerpo biespecífico de cadena única, que se une específicamente a CD33 (por ejemplo, CD33 humano) que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en que (i) la VH comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la tabla 1; y (ii) la VL comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la tabla 2.
- 15

Tabla 1: CDRs de VH de anticuerpos anti-CD33 representativos

VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
SYIYH (SEC ID 7)	VIYPGNDDISYNQKFXG (SEC ID 8)	EVRLRYFDV (SEC ID 9)
DYNMH (SEC ID 10)	YIYPYNGGTGYNQKFKS (SEC ID 11)	GRPAMDY (SEC ID 12)
DINAMY (SEC ID 13)	YIDPYKGGTIYNQKFKG (SEC ID 14)	QMITAYYFDY (SEC ID 15)
DYVLH (SEC ID 16)	LINTYNGDVRYNQKFMG (SEC ID 17)	DYRYEYAMDY (SEC ID 18)

Tabla 2: CDRs de VL de anticuerpos anti-CD33 representativos

VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEC ID 19)	RESIDUOS (SEC ID 20)	HQYLSSRT (SEC ID 21)
RASEVDNYGISFMN (SEC ID 22)	ASNQGS (SEC ID 23)	QQSKEVPWT (SEC ID 24)
KASQDINKYIA (SEC ID 25)	TSTLQP (SEC ID 26)	LQYDNLLT (SEC ID 27)
SANSSVSYIH (SEC ID 28)	TSKLAS (SEC ID 29)	QQWTSYPLT (SEC ID 30)

- 20 En un aspecto específico, se proporcionan en la presente memoria descriptiva hMSCs que expresan anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, como anticuerpos biespecíficos de cadena única, que comprenden (i) una VL y una VH que dirigen a diana CD33 (por ejemplo, CD33 humano) y (ii) una VL y una VH que dirigen a diana CD3 (por ejemplo, CD3 humano). Ejemplos no limitativos de anticuerpos que comprenden VL y V3 que dirigen a diana CD3 han sido descritos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n^{os} 7728114 y 5929212; y en la publicación de solicitud de patente internacional PCT n^o WO 2014/047231 y WO 2004/108158.
- 25

- 30 En una realización específica, se proporcionan en la presente memoria descriptiva hMSCs que expresan un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, como un anticuerpo biespecífico de cadena única, que se une específicamente a CD33 (por ejemplo, CD33 humano) y CD3 (por ejemplo, CD3 humano), que comprenden una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo humanizado que se une específicamente a CD33 humano, en que (i) la VH comprende una región determinante de complementariedad CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYWH (SEQ ID 1), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos YINPYNDGTYNEKFKG (SEC ID 2), y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYRYEYVGM DY (SEC ID 3); y (ii) la VL que comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos TASSSVNYIH (SEC ID 4), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos TSKVAS (SEC ID 5) y CDR3 que comprende la secuencia de

aminoácidos QQWRSYPLT (SEC ID 6). Ejemplo no limitativos de anticuerpos biespecíficos anti-CD33-anti-CD3 completamente humanizados, han sido descritos por ejemplo, por Arndt *et al.*, 2013, *Leukemia*, 27: 964-967.

5 En una realización específica, el anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3 tiene la siguiente configuración desde el N terminal hasta el C terminal: región variable de cadena pesada que dirige a diana CD33 (VH/CD33) - conector 1 - región variable de la cadena variable que dirige a diana CD33 (VL/CD33) - conector 2 - región variable de cadena pesada que dirige a diana CD3 (VH/CD3) - conector 3 - región variable de cadena ligera que dirige a diana CD3 (VL/CD3).

En ciertas realizaciones, las CDRs para la parte anti-CD3 de un anticuerpo multiespecífico o biespecífico son las CDRs de MT-301 (véase, por ejemplo, Arndt *et al.* 2014, *Leukemia* 28: 59-69).

10 En realizaciones específicas, los anticuerpos multiespecíficos, como los anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de cadena única, descritos en la presente memoria descriptiva comprende en el N terminal, un péptido de señalización, por ejemplo, una secuencia líder Ig como péptido de señalización, para la secreción de proteínas.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, como los anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos de cadena única, descritos en la presente memoria descriptiva, comprenden en el C terminal una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta myc y una etiqueta de histidina (His) (por ejemplo, etiqueta 6xhi) para la purificación y/o detección de proteínas.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos, como anticuerpos biespecíficos) descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY), de cualquier clase, (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂) o de cualquier subclase (por ejemplo, IgG_{2a} o IgG_{2b} o una mezcla de los mismos) de una molécula de inmunoglobulina.

[0078] En realizaciones específicas, los anticuerpos multiespecíficos, como los anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de cadena única, descritos en la presente memoria descriptiva, no comprenden una región constante de anticuerpos.

25 Los métodos para preparar componentes multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) han sido descritos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n^{os} 7951917, 7183076, 8227577, 5837242, 5989830, 5869620, 6132992 y 8586713.

Ligandos de moléculas coestimuladoras

30 En un aspecto específico, se proporcionan en la presente memoria descriptiva hMSCs que expresan recombinantemente un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T, como un ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L).

35 Ejemplos no limitativos de receptores coestimuladores que tienen ligandos, que pueden ser recombinantemente expresados sobre la superficie celular de hMSCs proporcionados en la presente memoria descriptiva incluyen, pero sin limitación, los descritos en la tabla 3, por ejemplo, ligando de CD28 B7-1 y B7-2, ligando de Ox40 OX40L, ligando de CD27 CD70 (CD27L), ligando de LFA-1 ICAM-1, -2 y -3, y ligando de SLAM.

Tabla 3: Receptores coestimuladores

Molécula coestimuladora	Descripción	Nº de Acceso Genbank
4-1BB (CD137)	(Watts & DeBenedette, <i>Current Opinion in Immunology</i> , 1999. 11: 286-293).	U03397.1
CD28	CD28 is the primary co-stimulatory receptor for inducing high level IL-2 production and survival of naive CD4+ T cells. Ligand: B7-1 and B7-2 (Watts & DeBenedette, <i>Current Opinion in Immunology</i> , 1999. 11: 286-293).	J02988.1
Ox40 (CD134)	Promotes Th2 response; Sustains proliferation of Th1 and Th2 effectors; Enhances IL-2 and Th2 cytokine production; Up regulated on CD4+ T cells Ligand: OX40L (Watts & DeBenedette, <i>Current Opinion in Immunology</i> , 1999. 11: 286-293).	S76792.1

Molécula coestimuladora	Descripción	Nº de Acceso Genbank
CD27	CD27 is a tumor necrosis factor receptor; Functions in T cell-B cell and T cell-T cell interations; Role in expansion of T cells after CD28 co-stimulation. Ligand: CD70 (CD27L) (Watts & DeBenedette, Current Opinion in Immunology, 1999. 11: 286-293).	NM_001242.4
Ligando de CD40 (CD154)	Primarily expressed on activated T cells, acts as a costimulatory molecule van Kooten C, Banchereau J (2000). "CD40-CD40 ligand". J. Leukoc. Biol. 67 (1): 2-17.	NG_007279.1
Ligando de ICOS	Inducible T-cell Costimulator (CD278) is a CD28-superfamily costimulatory molecule that is expressed on activated T cells. (Watts & DeBenedette, Current Opinion in Immunology, 1999. 11: 286-293).	NM_012092.3
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1; Adhesion and cytoskeleton reorganization during T cell activation. Ligand: ICAM-1, -2, -3 (Watts & DeBenedette, Current Opinion in Immunology, 1999. 11: 286-293).	NM_001114380.1
SLAM	Signaling lymphocytic activation molecule. SLAM is a CD2-related surface receptor expressed by activated T cells and B cells. (Henning, Eur J Immunol. 2001 Sep; 31(9):2741-50; Watts & DeBenedette, Current Opinion in Immunology, 1999. 11: 286-293). Ligand: SLAM	AY040554.1
2B4 (CD244)	cell surface receptor expressed on natural killer cells (NK cells) and T cells mediating non-major histocompatibility complex (MHC) restricted killing. Latchman Y, McKay PF, Reiser H (1998) "Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48". J. Immunol. 161 (11): 5809-12.	BC028073.1

Usos y Métodos

5 En aspectos específicos, se proporcionan en la presente memoria descriptiva métodos para tratar cáncer, como leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto mediante la administración de números terapéuticamente eficaces de hMSCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y opcionalmente un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L). En ciertas realizaciones, el cáncer es un tipo de cáncer asociado con la expresión de CD33 como AML y un dominio de unión del anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo anti-CD33.

10 También se proporcionan en la presente memoria descriptiva métodos relacionados para inducir/aumentar la proliferación de células T y métodos relacionados para activar células T usando estas hMSCs.

15 En realizaciones particulares, se proporcionan en la presente memoria descriptiva métodos para gestionar, tratar, prevenir o proteger contra AML en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de hMSCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L).

20 En una realización particular, se proporciona en la presente memoria descriptiva un método para inducir o aumentar la proliferación de células T que comprende poner en contacto células T con una cantidad eficaz de hMSCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L). En una realización específica, se proporciona en la presente memoria descriptiva un método para inducir o aumentar la proliferación de células T en un sujeto que lo necesita, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de hMSCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti CD33-anti-CD3) y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L).

25 En realizaciones particulares, la proliferación de células T es aumentada en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en presencia de hMSCs que secretan un anticuerpo y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T, en comparación con hMSCs sin modificar o

en ausencia de hMSCs según se determina mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, en la sección de ejemplos).

5 En una realización particular, se proporciona en la presente memoria descriptiva un método para inducir o aumentar la activación de las células T, que comprende células T estimuladas mediante una cantidad eficaz de hMSCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L). En una realización específica, se proporciona en la presente memoria descriptiva un método para inducir o aumentar la activación de células T en un sujeto que lo necesita, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de hMSCs que expresan un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD33-anti-CD3) y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T, como el ligando coestimulador de 4-1BB (CD137L).

10 En realizaciones particulares, la activación de células T es aumentada en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en presencia de hMSCs que secretan un anticuerpo y, opcionalmente, un ligando coestimulador de células T, en comparación con hMSCs sin modificar o en ausencia de hMSCs, según se determina mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, en la sección de ejemplos).

La invención se explicará más en detalle basada en las siguientes figuras y realizaciones sin que la invención esté limitada a las mismas.

Breve descripción de las figuras

20 Figura 1: generación de bsab CD33-CD3 que libera hMSCs genéticamente modificadas. a) Representación esquemática de la estructura de bsab CD33-CD3 construido en forma de una variable de fragmentos tándem biespecíficos de cadena única (scBsTaFv). Los dominios de VH y VL de cada scFv fueron humanizados mediante injertado de CDR y conectados a través de un conector comprendido por tres repeticiones de residuos de 3* cuatro glicinas y una de serina (Gly4Ser). El N-terminal del constructo bsab contiene un péptido de señalización (SP) para la secreción del bsab en el medio de cultivo celular, mientras que su etiqueta del C-terminal alberga una etiqueta de myc- (myc) y his- (his) usadas para la detección y purificación inmuoquímica de ab. (b) El análisis por expresión transgénica de hMSCs parentales y transducidas se realizó mediante citometría de flujo. Se muestran los porcentajes de células vivas CD45 y EGFP+. Las células muertas fueron excluidas mediante tinción con yoduro de propidio. (c) Las fracciones purificadas de bsab CD33-CD3 secretado en el medio de cultivo se separaron en geles SDS y posteriormente se tiñeron con azul brillante de Coomassie® o se analizaron mediante transferencia Western. (e) El análisis cuantitativo de bsab liberadas se realizó mediante ELISA. Las células hMSCs se sembraron a densidades celulares limitantes y la concentración de anticuerpo [ng/ml] en medio de cultivo se determinó después de 48 h de cultivo. Los resultados representan los valores medios ± SD de dos experimentos independientes.

35 Figura 2: Propiedades de unión a antígenos de la proteína recombinante secretada por hMSCs. (a) Se tiñeron las células CD33 + MOLM-13 (paneles de la izquierda) y células T (paneles de la derecha) con los mAbs anti-CD33 y anti-CD3 maternos, seguido de una Ab secundaria de IgG anti-ratón conjugada a PE (gráficos en negro) o el bsab anti-CD33-anti-CD3 y Ab anti-myc marcada con FITC (gráficos blanco). (b) La unión de BsAb a células CD33-HEK293T o células SCP-1 wt se analizó en paralelo mediante citometría de flujo después de teñir con bsab y el Ab anti-myc/FITC. (c) La accesibilidad del bsab al antígeno CD33 sobre células MOLM-13 se ensayó después de un pretratamiento con 2, 20 y 200 µg/ml de mAb anti-CD33 materno, respectivamente.

40 Figura 3: La destrucción eficaz de células T de líneas celulares diana con niveles variables de expresión de CD33 es inducida en presencia de hMSCs que liberan bsab. (a) Se analizaron HEK293T, OCI-AML3, U937 y MOLM-13 en cuanto a niveles de expresión superficial de CD33 mediante tinción con mAb anti-CD33/PE (en negro) o Ab testigo de isotipo coincidente (en gris), respectivamente. Los números representan la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células totales. (b) En un ensayo estándar de liberación de cromo, se incubaron células CD33 + MOLM-13 marcadas con ⁵¹Cr y células CD33-HEK293T con células T recién aisladas a una relación celular de efector respecto a diana (e:t) de 5:1 durante 20 h con concentraciones decrecientes de bsab CD33-CD3 purificadas. Se muestra la media ± SD de 2 donantes independientes. (c) Se midió la lisis de células específicas de líneas celulares de AML U937 (superior) y MOLM-13 (inferior) mediante un ensayo de liberación de cromo estándar. Células T de CD33+ recientemente aisladas fueron conjuntamente cultivadas durante 10 y 20 h con células diana CD33+ marcadas con ⁵¹Cr a una relación celular e:t de 5:1 en presencia de líneas hMSCs sembradas a diferentes concentraciones 48 h antes de añadir células T efectoras y células diana. Los datos se presentan en forma de valores medios ± SD a partir de dos o tres donantes diferentes, respectivamente. (d) densidades decrecientes de hMSCs genéticamente modificadas y marcadas con ⁵¹Cr fueron conjuntamente cultivadas con PBMCs en presencia o ausencia de células CD33 + MOLM-13 a una relación e:t de 5:1. Después de 20 h de coincubación, se examinó la lisis de específica de hMSCs a través de un ensayo de liberación de cromo. Los datos muestran valores medios ± SD de dos donantes independientes.

Figura 4: La destrucción de células tumorales mediada por células T provocada por anti-CD33-anti-bsab producida por hMSCs es aumentada mediante una coestimulación a partir de 4-1 BBL. (a) Para el análisis de la expresión transgénica de 4-1BBL, se tiñeron hMSC con anticuerpo anti-CD137L conjugado a PE y la expresión superficial del inmunoligando así como la señal de EGFP intracelular que se correlaciona con la expresión de bsab CD33-CD3 se analizó mediante citometría de flujo. Las células positivas se muestran como porcentajes de todas las células analizadas. Las células muertas fueron excluidas mediante contra-tinción de yoduro de propidio. La posición cuadrante se colocó basada en una tinción testigo de isotipo (no mostrada). (b) En un ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo eFluor670 las se incubaron células CD33 + OCI-AML3 marcadas con colorante en proliferación con células pan T a una relación e:t de 1:1 durante 24 h, 48 h (superior) y 96 h (inferior) en presencia o ausencia de hMSCs genéticamente modificadas a densidades limitantes 48 h antes del experimento. Los recuentos de números de células diana en los valores de tiempo indicados se normalizaron respecto a la muestra testigo con solamente células diana. Los datos representan los medios \pm SD de tres donantes diferentes. La relevancia estadística se determinó usando la norma ANOVA de dirección única con un ensayo de comparación múltiple de Bonferroni. ** p <0,01.

Figura 5: La presencia de señalización de 4-1BBL coestimuladora aumenta enormemente la secreción de citoquinas y la expansión de células T. (a) La secreción de citocinas proinflamatorias mediante células T se determinó después de un cultivo de 24 h tras su reticulación con las células HEK293T que expresan CD33 transgénicas a través de CD33-CD3 bsab producidas por hMSCs en presencia o ausencia de 4-1BBL coestimuladora presentada por hMSCs. (c) Después de 6 días de cultivo conjunto con células T diana, se investigaron los recuentos y se calculó la expansión de células T en forma de relación de número de células T en el día 6 respecto al número de células T sembradas en el día 0. Los datos se muestran como valores medios \pm SD de tres o cuatro individuos donantes. La relevancia estadística se determinó usando la norma ANOVA de dirección única con un ensayo de comparación múltiple de Bonferroni. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

Figura 6: Efecto antitumoral de células T redirigidas derivadas de paciente de AML contra blastos autólogos de AML a través de bsab CD33-CD3 producidas por hMSCs y molécula 4-1BBL presentada en superficie. (a) Se cultivaron 1×10^5 MNCs derivadas de paciente de AML conjuntamente con 1×10^4 hMSCs previamente sembradas 48 h. Después de 96 h de cultivo conjunto, se determinaron respectivamente los porcentajes de blastos de HLA-DR + AML supervivientes y células T de CD3+ en forma de proporciones de todas las células CD45+ mediante análisis de citometría de flujo. (b) Se calcularon los blastos totales de AML después de 24, 48 y 96 h de coincubación. El promedio de células sobrevivientes y las SD de tripletes se muestran para un donante representativo de cada tres. (c) Los números totales de blastos de CD3-CD123 + HLA-DR + CD45 + AML (izquierda) y células T de CD3+ CD123-HLA-DR-CD45+ (derecha) después de 96 h de cocultivo con o sin testigo/ hMSCs que expresan bsab y 4-1BBL se expresan para tres donantes independientes. Los números de cada subpoblación se calcularon según sus relativos porcentajes determinados mediante tinción para marcadores de superficies celulares específicos. (d) El número autólogo absoluto de células T se midió después de 96 h y se determinó la expansión global de las células en presencia de hMSCs. Los datos se presentan como medias \pm SD de tres donantes diferentes. La relevancia estadística se determinó usando la norma ANOVA de dirección única mediante un ensayo de comparación múltiple de Bonferroni. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

Figura 7: Las hMSC que liberan BsAb previenen el establecimiento de AML en ratones NOD/SCID IL2R γ -/- (NSG). (a) UN análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones NOD/SCID IL2R γ -/- después de una inyección intravenosa de células T y células de AML MOLM-13 a una relación e:t de 5:1 junto con hMSCs que contenían testigo vector (línea de rayas) o liberaban bsab (línea negra), indicados como grupo testigo (n = 5) y de tratamiento (n = 4), respectivamente. Se realizó un ensayo de rango logarítmico para determinar la relevancia estadística de la supervivencia entre los grupos a partir del experimento en curso. ** p <0,01.

EJEMPLOS

Los ejemplos en esta sección se presentan a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Ejemplo 2

Los anticuerpos biespecíficos (bsabs) que implican las células T contra células cancerígenas son una herramienta inmunoterapéutica alentadora emergente para el tratamiento de leucemia y tumores sólidos. Debido a su bajo peso molecular, los bsabs tienen una semivida corta y tienen que ser continuamente infundidos en pacientes durante períodos prolongados de varias semanas para conseguir respuestas clínicas. Como una alternativa a la infusión intravenosa continua a través de dispositivos médicos extracorporales, está el uso de células madre mesenquimales (MSCs) como máquinas celulares autónomas para la producción y secreción de bsabs.

Un bsabs anti-CD33-anti-CD3 humanizado que es capaz de redirigir células T humanas contra células leucémicas que expresan CD33 fue expresado en la línea de MSCs humanas inmortalizadas SCP-1. Véase la publicación de Stamova S, *et al.* (2011) *Leukemia*: 25[6]: 1053-1056; Stamova S, *et al.* (2012) *Anal Biochem*: 423[2]: 261-268; Arndt C, *et al.* (2011) *Blood*: 118: 663-664; Arndt C, *et al.* (2013) *Blood*: 122[21]: 930; Arndt C, *et al.* (2013) *Leukemia*: 27: 964-967. Las células SCP-1 genéticamente modificadas expresaron el bsab en cantidades suficientes para redirigir células T

eficazmente contra células diana que presentan CD33 tanto *in vitro* como también en un modelo de ratón inmunodeficiente. El efecto destructor fue independiente de la actividad antígenica sobre las células diana. Además, las células T de pacientes que padecen leucemia mieloide aguda (AML) en crisis de blastos eliminaron células leucémicas autólogas a lo largo del tiempo en presencia de las MSCs que secretan bsab. La respuesta inmune contra células de AML pudo ser adicionalmente mejorada proporcionando a las células T un coestímulo adicional a través del eje de ligandos de CD137-CD137 a través de la expresión de CD137L en las MSCs.

Han sido descritos anticuerpos biespecíficos que implican células T (bsabs). Véase, por ejemplo, las publicaciones de Stamova S, *et al.* (2012), *Antibodies*: 1[2]: 172-198; Stamova S, *et al.* (2011), *LeuKemia*: 25[6]: 1053-1056; Feldmann A, *et al.* (2012), *J Immunol*: 189[6]: 3249-3259; Bargou R, *et al.* (2008), *Science*: 321[1]: 974-977; Handgretinger R, *et al.* (2011), *LeuKemia*: 25: 181-184 ; Schlereth B, *et al.* (2006) *Cancer Immunol Immunother* 55[5]: 503-514; Stork R, *et al.* (2008) *J Biol Chem*: 283[12]: 7804-7812. Han descrito células madre mesenquimales humanas (MSCs) [Hamada H, *et al.* (2005) *Cancer Sci*: 96[3]: 149-156; Compte M, *et al.* (2013) *Biomateria*: 3[1]: e-pub doi: 10.4161/biom.23897]. Aunque no se desean vinculaciones teóricas, las MSCs tienen una inmunogenicidad limitada y son incluso excasamente reconocidas por hospedantes incompatibles con HLA [Le Blanc K, *et al.* (2003) *Exp Hematol*: 31[10]: 890-896; Götherström C, *et al.* (2004) *Am J Obstet Gynecol*: 190[1]: 239-245; Uccelli A, *et al.* (2008) *Autoimmunity*: 41[8]: 592-595] y tienen tendencia a acumularse en el sitio de tumores que incluyen lesiones metastásicas [Ren C, *et al.* (2008) *Stem Cells*: 26 [9]: 2332-2338; Kim SM, *et al.* (2008) *Cancer Res*: 68[23]: 9614-9623; Uchibori R, *et al.* (2009) *J Gene Med*: 11[5]: 373-381]. Además, aunque no se desean vinculaciones teóricas, la transferencia adoptiva de MSCs puede proporcionar un entorno inmunosupresor útil para reducir reacciones de GvHD [por ejemplo, véanse las publicaciones de von Bonin M, *et al.* (2009) *Bone Marrow Transplant*: 43[3]: 245-251; Wehner R, *et al.* (2009) *Haematologica*: 94[8]: 1151-1156].

La CD33 ex expresada predominantemente sobre células derivadas mieloides y se encuentra sobreexpresada en células de médula ósea de pacientes con AML así como células madre leucémicas [Ehninger A, *et al.* (2014) *Blood Cancer Journal*: 4, e218: doi: 10.1038/bcj.2014.39]. Las terapias convencionales actuales de AML no consiguen remisiones a largo plazo dependientes de la edad y el subtipo de la enfermedad, por lo tanto, se necesitan urgentemente nuevas estrategias terapéuticas adyuvantes, especialmente para la eliminación de la enfermedad residual mínima (MRD). Está demostrado en la presente memoria descriptiva que las MSCs genéticamente modificadas son capaces de (i) expresar bsab específicos de CD33-CD3 a niveles elevados, y (ii) mediar una lisis eficaz de blastos de AML por células T primarias humanas a partir de donantes sanos así como pacientes e AML.

30 Líneas celulares

Las líneas celulares U937 (ACC 5) y MOLM-13 (ACC 554) de leucemia mieloide aguda (AML) humana se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero de ternera fetal (FCS, Biochrom AG), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Biochrom AG), mientras que OCI-AML3 (ACC 582), HEK293T (ACC 635) y HEK293T genéticamente modificadas para expresar ectópicamente CD33 [Arndt C, *et al.* (2011) *Blood*: 118: 663-664] fueron cultivadas en medio DMEM (10% de FCS, 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina). La línea celular del clon 1 recogida de células únicas (SCP-1) recientemente descrita [Böcker W, *et al.* (2008) *J Cell Mol Med*: 12 [4]: 1347-1359], derivada de células madre mesenquimales humanas e inmortalizadas por transducción lentiviral del gen que codifica la transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT), se hicieron crecer en medio RPMI 1640 (10% de FCS, 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂.

40 Generación de hMSCs que liberan bsab recombinante

El desarrollo de bsab anti-CD33-anti-CD3 completamente humanizado ya ha sido descrito [Arndt C, *et al.* (2013) *Leukemia*: 27: 964-967]. Para la generación de hMSCs permanentes que liberan el bsab, el cDNA que codifica el constructo de Ab recombinante fue clonado en el vector lentiviral p6NST50 [Koristka S, *et al.* (2013) *J Autoimmun*: 42: 105-116] para generar el vector de transferencia p6NST50.bsab.EGFP-Zeo. En este vector lentiviral autoinactivante, la expresión del CD33-CD3 es conducida por un promotor interno derivado de virus formador de focos de bazo (SFFV). Una proteína fluorescencia verde aumentada (EGFP)-proteína de fusión de Zeocina es coexpresada mediante un sitio de entrada ribosomal interno (IRES). Las partículas lentivirales pseudoimpresas con la envoltura del virus de estomatitis vesicular (VSV-G) fueron generadas mediante transfección transitoria de células HEK293T y la materia sobrenadante del virus se recolectó como se describió recientemente [Cartellieri M, *et al.* (2014) *PLoS One*: 9 [4]: e93745. doi: 10.1371/journal.pone.0093745] y se usó para transducir establemente células SCP-1. Para la expresión ectópica del ligando 4-1BB (CD137L) coestimulador sobre la superficie de células SCP-1 se usó un vector lentiviral que alberga un promotor 1-alfa de factor de alargamiento humano mínimo interno en lugar del promotor SFFV.

Análisis por citometría de flujo

Se tiñeron células de tipo salvaje transducidas y parentales con anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CD45/VioBlue, anti-CD33/PE, anti-CD90/VioBlue, anti-CD105/PE y anti-CD73/APC (todos de Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) para analizar el perfil del marcador de hMSC. Para verificar la expresión transgénica de 4-1BBL, se tiñeron células SCP-1 con mAb anti-CD137L/PE (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania). Las células teñidas solamente con

Ab testigo de isotipo coincidente (en gris) sirvieron como testigo negativo. Las muestras se analizaron usando un software MACSQuant Analyzer® y MACSQuantify (ambos de la entidad Miltenyi Biotec).

Expresión, purificación y análisis cuantitativo del bsab recombinante

5 Las materias sobrenadantes de los cultivos de hMSCs establemente transducidas se analizaron por medio de electroforesis de gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en cuanto a bsab anti-CD33-anti-CD3 etiquetado con His purificado mediante una cromatografía de afinidad de etapa única sobre columnas Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania) y transferencia Western usando mAb anti-penta-his (Qiagen) y un anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (AP) (Dianova, Hamburgo, Alemania) como se describió previamente [por ejemplo, Feldmann A, *et al.* (2011) *Prostate*: 71 [9]: 998-1011]. La cantidad de bsab anti-CD33-anti-CD3 secretada se cuantificó mediante ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas (ELISA) como sigue: se sembraron células SCP-1 como tripletes en placas de 96 pocillos a densidades celulares decrecientes. Después de 48 h de cultivo, la materia sobrenadante de cada muestra se recogió y se añadió a una dilución definida a los pocillos de placas ELISA F16 MaxiSorp (Nunc), previamente revestidas con 1,5 µg/ml de anticuerpo de captura anti-pentaHis de ratón (Qiagen), capaz de unirse a etiqueta de histidina (his) del C-terminal del CD33-CD3 bsab. Se prepararon muestras estándar en forma de una dilución en serie de 2 veces a partir de CD33-CD3 bsab (GEMoaB, Dresden, Alemania) purificado partiendo de 100 ng/ml. Para la unión del bsab capturado, se preparó una solución de detección diluyendo Ab de detección anti-Myc-HRP (Miltenyi) 1:1000 en tampón bloqueante y se agregó a las muestras durante 2 h a TA (temperatura ambiente). La solución de sustrato que contenía 100 µg/ml de TMB, 10% de DMS, tampón de fosfato/citrato 0,05 M y 30% de H₂O₂ se añadió por pocillo durante 15 minutos para desarrollar una reacción coloreada y se detuvo añadiendo solución de detención de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica se midió a 450 nm usando el lector de microplacas SUNRISE® (Tecan, Maennedorf, Suiza) y se usó para calcular la concentración de bsab liberado por hMSC. Se realizó un análisis de inmunofluorescencia indirecta para examinar las propiedades de unión de bsab liberado por hMSC. Se tiñó un total de 5x10⁵ líneas celulares CD33⁺ o CD33⁻ y PBMCs con 20 µg/ml del bsab purificado. El constructo biespecifico se detectó mediante citometría de flujo usando anticuerpo conjugado a FITC contra la etiqueta myc (Miltenyi) [Feldmann A, *et al.* (2012) *J Immunol*: 189 [6]: 3249-3259; Feldmann A, *et al.* (2011) *Prostate*: 71[9]: 998-1011]. Se discriminaron células CD3⁺ T usando mAb anti-CD3/VioBlue, mientras que se usaron mAbs anti-CD56/APC (Miltenyi) y anti-16/PE (BD Biosciences) para identificar células CD3-CD56⁺ CD16⁺ NK. Se usaron mAbs maternos anti-CD33 y anti-CD3 como testigo y se detectaron con un ab IgG anti-ratón (Fcγ₁) cabra F (ab)₂ conjugado a PE (Immunotech, Marsella, Francia).

30 Aislamiento de células T a partir de donantes sanos humanos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) a partir de capas leucocitarias de voluntarios sanos después de su consentimiento informado mediante centrifugación en gradiente sobre polidextrano separando solución Biocoll (Biochrom). Se aislaron células Pan T recientemente aisladas a partir de PBMCs mediante selección negativa usando el estuche de ensayo de aislamiento de células Pan T (Miltenyi Biotec), células CD4⁺ CD8⁺ T humanas mediante selección negativa usando el estuche de aislamiento de células CD4⁺ y CD8⁺ T (Miltenyi Biotec), respectivamente. Se cultivaron células T humanas en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero de ternera fetal (FCS, Biochrom AG), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Biochrom AG) y 50 U/ml de IL-2 (ImmunoTools, Friesoythe, Alemania) durante una noche antes de comenzar los experimentos al día siguiente. Las células T se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 sin aditivos antes de ser añadidas a los cultivos experimentales.

40 Ensayo de citotoxicidad basado en liberación de ⁵¹Cr y citometría de flujo

Se examinó la destrucción de células tumorales diana CD33⁺ mediante células T redirigidas a través de bsab anti-CD33-anti-CD3 liberadas a partir de hMSCs mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr estándar o mediante ensayos basados en citometría de flujo, como se estableció recientemente [Cartellieri M, *et al.* (2014) *PLoS One*: 9 [4]: e93745.doi: 10.1371/journal.pone.0093745; Feldmann A, *et al.* (2011) *Prostate*: 71[9]: 998-1011; Koristka S, *et al.* (2012) *J Immunol*: 188[3]: 1551-1558].

Determinación de la concentración de citoquinas.

Para determinar cantidades de IFN-γ, IL-10, TNF-α, e IL-2 secretadas a partir de co-cultivos, se recogieron materias sobrenadantes exentas de células en el tiempo indicado y se analizaron en cuanto a la secreción de citoquinas usando conjuntos de ELISA OptEIA (BD Biosciences) según el protocolo del fabricante. La absorción de las muestras se midió después de 30 minutos y los valores obtenidos se usaron para calcular la concentración de citoquinas en las muestras, según los valores obtenidos para series estándares proporcionados por el fabricante.

Ensayos de activación y proliferación de células T

Se analizó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 para determinar el estado de activación de células T. Como células diana se cultivaron conjuntamente 1x10⁴ células HEK293T que expresan CD33 transgénico con 5x10⁴ células pan T ¿#en presencia o ausencia de sembrado de 1x10⁴ células SCP-1 48 h antes de iniciar el

experimento. Después de los valores de tiempo indicados, se recogió la materia sobrenadante de cada muestra y las células de un triplete se reunieron con una mezcla de anti-CD3/VioBlue, anti-CD69/FITC, anti-CD4/PerCP (todos adquiridos en la entidad Miltenyi) y anti-CD25/PE (BD Biosciences). Se realizaron ensayos de proliferación de células T como se describió previamente [Koristka S, *et al.* (2013) *J Autoimmun.* 42: 105-116; Koristka S, *et al.* (2012) *J Immunol.* 188[3]: 1551-1558].

Ensayos de destrucción por citometría de flujo con muestras de AML de reciente preparación

Se obtuvieron muestras células mononucleares (MNC) de pacientes con AML con hiperleucocitosis a partir de productos de leucoféresis con consentimiento informado y la autorización del equipo de examen institucional local. Se prepararon MNCs mediante centrifugación gradiente sobre polidextrano basada en la separación de solución Biocoll (Biochrom). La redirección de células T autólogas hacia blastos de AML mediante hMSCs que liberan bsabs CD33-CD3 se investigó mediante co-cultivo de 1×10^4 48 h cultivo previo de hMSCs genéticamente modificadas con 1×10^5 MNCs derivadas de pacientes de AML. La destrucción específica de células mieloides se analizó con un analizador MACSQuant® (Miltenyi Biotec) en los valores de tiempo indicados. Además, se reunieron MNCs de un triplete y se tiñeron con una mezcla de mAbs anti-CD3/PECy7, anti-CD4/PerCP (Miltenyi) con el fin de analizar el porcentaje relativo de células T; y mAbs anti-CD123/PE, anti-HLA-DR/FITC y anti-CD45/VioBlue (Miltenyi Biotec) para discriminar las poblaciones de células mieloides. Las células vivas se identificaron por ser negativas a yoduro de propidio.

Modelo de ratón

Ratones NOD/SCID IL2R γ -/- (NSG) se mantuvieron bajo condiciones ambientales estandarizadas y recibieron alimento tratado en autoclave, agua y lecho de descanso. Antes de la inyección, se cultivaron hMSCs (5×10^3) que contenían liberación de bsab o testigo de vectores durante 48 horas y posteriormente se incubaron conjuntamente con 1×10^5 células MOLM-13 y células T humanas recientemente aisladas a una relación e:t de 5:1. A continuación de 24 horas de co-cultivo, la población celular mixta se administró por vía intravenosa (i.v.) a dos grupos de ratones NSG de ocho a diez semanas de edad a través de la vena de la cola. Un grupo (5 animales) recibió células MOLM-13, células T y hMSCs testigos vectores, mientras que el otro grupo (4 animales) fue tratado con células MOLM-13, células T y hMSCs que secretan bsab. Los ratones fueron diariamente verificados en cuanto a postura, actividad, textura de la piel e integridad del pellejo. Los animales se sacrificaron según las normas del comité ético local cuando mostraron una puntuación patológica y una pérdida de peso corporal de más de 15%. Se determinó la tasa de supervivencia de ratones tratados o con bsab sin tratar.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico usando el software graphpad Prism (La Jolla, CA, EE.UU.). Se usó un análisis de dirección única de la varianza (ANOVA) con ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para la relevancia estadística cuando se compararon múltiples experimentos. Los datos de supervivencia se analizaron usando un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier con un método de rango logarítmico de estadísticas de (**P <0,001, *P <0,01, *P <0,05).

El bsab CD33-CD3 se construyó en forma de una variable de fragmentos tándem biespecíficos de cadena única (scBsTaFv). una representación esquemática de la estructura de proteínas se proporciona en la fig. 1a. Los dominios de VH y VL de cada scFv fueron humanizados mediante injertado de CDR y se conectaron a través de un conector comprendido por tres repeticiones de residuos 3° de cuatro glicinas y una serina (Gly4Ser). El N-terminal del constructo de bsab contiene un péptido de señalización (SP) para la secreción de bsab en el medio de cultivo celular, mientras que su etiqueta de C-terminal alberga una etiqueta de myc y his para la detección y purificación de Ab inmunoquímico. La unión de bsab a sus antígenos diana CD3 y CD33 reticula una célula T y una célula tumoral y establece una sinapsis inmune (fig. 1b). Se examinó la línea celular SCP-1 parental mediante citometría de flujo a diferentes pasos para caracterizar la expresión de proteínas superficiales. Las células SCP-1 expresaron las proteínas marcadoras MS90 típicas CD90, CD105 y CD73 mientras que no mostraron expresión de antígeno CD33 o antígenos hematopoyéticos CD45 y CD34. Las líneas de hMSCs genéticamente modificadas usadas en este trabajo fueron generadas a partir de la línea de SCP-1 hMSC derivada de células únicas inmortalizadas con hTERT [Böcker W, *et al.* (2008) *J Cell Mol Med.* 12[4]: 1347-1359] usando transferencia de generes lentivirales para expresar establemente bsab CD33-CD3. Para la identificación y selección de células satisfactoriamente transducidas con gen bsab, el gen de fusión de zeocina EGFP fue coexpresado bajo el mismo promotor a través de un sitio de entrada ribosomal interno (IRES). Se usó un vector lentiviral que contenía solamente cassette de expresión de EGFP-zeocina para la generación de una línea celular testigo vector, mientras que la línea celular SCP-1 sin transducir sirvió como testigo de "tipo salvaje" (wt). A continuación de la transducción de células SCP-1, cada línea de hMSC (wt, control vector y CD33-CD3) se analizó en cuanto a señal de EGFP intracelular mediante citometría de flujo (fig. 1c). Todas las líneas celulares se seleccionaron hasta una pureza de casi 100%. Seguidamente, se ensayó si las MSCs genéticamente modificadas secretan el bsab. Por lo tanto, el medio de cultivo se realizó sobre columnas de cromatografía de afinidad para purificar bsab CD33-CD3 a través de la etiqueta de his del C-terminal. De hecho, se detectó una proteína con del tamaño esperado de 60 kDa en la fracción de elución mediante tinción Comassie (fig. 1d). Una transferencia Western confirmó la presencia de una

proteína etiquetada con his en el tamaño molecular correspondiente (fig. 1d). Después de la producción de bsab satisfactoria, se cuantificó la cantidad de bsab CD33-CD3 secretada por las MSCs modificadas mediante ELISA. La concentración máxima de bsab obtenida a partir de las hMSCs que liberan bsab bajo estas condiciones experimentales alcanzó 4400 ng/ml a una densidad de partida de 10^5 células hMSC/pocillo (fig. 1e). Considerando el volumen de la muestra de 200 μ l, se calculó que una MSC única libera aproximadamente 8,8 pg de bsab en 48 h. Sin embargo, la cantidad más elevada calculada mediante una MSC única se obtuvo a la densidad de sembrado más baja (10^3 células/pocillo), alcanzando 73,7 pg/célula en 48 h. A partir de la curva de liberación de anticuerpos, se llegó a la conclusión de que la cantidad de bsab liberado comienza a hacerse estable por encima de 5×10^4 células/pocillo bajo las condiciones experimentales elegidas. Esta observación lo más probablemente es debida a un consumo rápido de nutrientes a densidades de sembrado elevadas de hMSCs durante el periodo de cultivo de 48 h, que a su vez infrarregula la síntesis de proteínas que incluye la producción de bsab en las células. Seguidamente, se analizó la especificidad de unión de bsab purificado liberado mediante las hMSCs genéticamente modificadas. En concordancia con los análisis previos, la unión de ambos anticuerpos monoclonales parentales conduce a un desplazamiento rápido en MFI (fig. 2a). Las capacidades de unión de bsab anti-CD33-anti-CD3 liberados por MSC depende de la expresión superficial del respectivo antígeno (fig. 2a), mientras que no detectó unión sobre un negativo de antígeno, por ejemplo, células HEK293T y SCP-1 (fig. 2b). Además, el bsab liberado por MSC muestra una fuerte unión al antígeno CD33 que puede ser bloqueado de una manera dependiente de la concentración con el mab específico para CD33 parental (fig. 2c). En contraste con el dominio anti-CD33, la unión del complejo CD3 sobre células T a través del dominio anti-CD3 es difícilmente detectable (fig. 2a).

La capacidad del BsAb liberado por MSC para redirigir linfocitos T específicamente de una manera dependiente de antígeno se evaluó con diversas líneas celulares de AML que expresan niveles bajos (OCI-AML3), intermedios (U937) y elevados (MOLM-13) de antígeno CD33 (fig. 3a). Se incluyeron células HEK293T en estos experimentos como la línea celular testigo negativa de CD33. Usando células MOLM-13 como dianas, se pudo demostrar que las células T humanas eran redirigidas y mediaron la destrucción de células diana de una forma dependiente de la concentración en presencia de bsab anti-CD33-anti-CD3 purificado, mientras que las células HEK293T negativas a CD33 no fueron atacadas por células T humanas en presencia de bsab (fig. 3b). Seguidamente, se evaluó la redirección a diana de linfocitos T hacia células de AML a través de hMSCs modificadas que liberan bsab *in situ*. Por lo tanto, se incubaron 1×10^4 células CD3⁺ T con líneas celulares de CD33⁺AML marcadas con ^{51}Cr a una relación e:t de 5:1 en presencia de líneas de hMSC cultivadas durante 48 h. La reticulación de células T y células diana a través de bsab liberado de hMSC dio lugar a una destrucción eficaz de las células diana ya en los valores de tiempo tempranos independientemente de la densidad de antígeno CD33 sobre la superficie de ambas líneas celulares analizadas (fig. 3c). Después de un tiempo de incubación prolongado de 20 h, una gran parte de células diana fueron lisadas incluso a bajas densidades de sembrado de MSC (fig. 3c). No se detectó una diferencia relevante en el contexto de lisis de células diana específicas entre las muestras con diferentes densidades de hMSC, sugiriendo que las células T pueden ser eficazmente redirigidas contra células tumorales incluso a concentraciones muy bajas de bsab liberadas mediante la densidad celular más baja usada en este ajuste experimental (5×10^2 células/pocillo). Por el contrario, no se detectó una lisis específica en presencia de líneas wt y de hMSC testigo vector, confirmando que la destrucción de células tumorales observada era estrictamente dependiente de la liberación de bsab (fig. 3c). Según los descubrimiento de la presente invención, la eficacia de destrucción de bsab CD33-CD3 liberado de hMSC está dentro del intervalo de concentración de los datos de bsab CD33-CD3 previamente publicados [Stamova S, *et al.* (2011) *Leukemia*: 25[6]: 1053-1056.; Arndt C, *et al.* (2013) *Leukemia*: 27: 964-967; Arndt C, *et al.* (2014) *Leukemia*: 28[1]: 59-69]. Además, para excluir adicionalmente cualquier efecto fuera de diana dependiente de bsab sobre MSCs que liberan bsab, se realizaron ensayos de destrucción adicionales. Por lo tanto, las MSCs genéticamente modificadas marcadas con ^{51}Cr cultivadas 48 h- se incubaron con células mononucleares de sangre periférica para parecerse mejor a una situación *in vivo* natural caracterizada por la presencia de una población celular más compleja. No se observó lisis en ausencia de diana de hMSCs que expresan bsab después de 20 h de co-cultivo de hMSCs y PBMCs en presencia o ausencia de células diana CD33⁺ (fig. 3d), mientras que experimentos paralelos realizados bajo las mismas condiciones mostraron un efecto eficaz de las células diana CD33⁺. Los resultados obtenidos indican claramente que el bsab secretado por MSC es capaz de redirigir células T humanas e inducir lisis de células diana específicas provocando una activación eficaz de células T.

Las hMSCs que liberan bsab fueron adicionalmente modificadas mediante coexpresión de la molécula 4-1BBL sobre la superficie celular para demostrar que el coestímulo adicional condujo a una respuesta mejorada mediada por células T incluso frente a células de AML que expresan niveles bajos de antígeno CD33. Por lo tanto, la línea de hMSC que produce bsab CD33-CD3 fue de forma adicional genéticamente modificada para expresar la molécula 4-1BBL. La expresión superficial de 4-1BBL en la sublínea nuevamente generada pudo ser verificada mediante citometría de flujo (fig. 4a). Seguidamente, se investigó el efecto inmunoterapéutico ejercido por las sublíneas de hMSC modificadas mediante ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo. Con el fin de definir la densidad de hMSCs más baja que conducía a un efecto destructor relevante de células diana, se sembraron hMSCs a concentraciones muy bajas y se cultivaron durante 48 h. Posteriormente, se coincubaron conjuntamente células T humanas recientemente aisladas y células diana OCI-AML3 bajas en CD33 marcadas con EFLUOR®670 con las hMSCs modificadas a una relación e:t de 1:1, que se asemeja mejor a las condiciones *in vivo* naturales de pacientes de AML en crisis de blastos aguda que tienen con números bajos de células T. Los números de células diana vivas se cuantificaron después de 24 y 48 h

mediante citometría de flujo. La lisis de células diana mediada por células T activada por bsab liberado de líneas de hMSC inmunoterapéuticas (CD33-CD3 y CD33-CD3 + 4-1BBL) se retrasó y no pudo ser observada antes de un valor del tiempo de 48 h (fig. 4b). La coestimulación mediante 4-1BBL presentada sobre la superficie de la línea de hMSC modificada no mejoró significativamente las capacidades destructoras de células T redirigidas con bsab bajo estas condiciones experimentales (fig. 4b).

Como se cree que la co-estimulación mediada por 41BB está implicada principalmente en las fases tardías de la activación inmune y, como tal, se puede requerir un tiempo más prolongado para observar una respuesta específica de células T [Arndt C, *et al.* (2014) *Leukemia*: 28[1]: 59-69], se prolongó el período de tiempo de coestimulación bajo las mismas condiciones experimentales. Por tanto, se analizó adicionalmente el porcentaje de células tumorales vivas positivas a EFLUOR®670 después de 96 h. Después de un tiempo de incubación más prolongado, la estimulación adicional de células T mediante 4-1BBL presentado por hMSC mejoró la respuesta de células T respecto a células diana bajas en CD33, en comparación con las hMSCs que expresan solamente el bsab, conduciendo a una destrucción de células tumorales específicas más pronunciada incluso a la densidad más baja de hMSCs de 10 MSCs/pocillo (fig. 4b).

Con el fin de verificar los efectos de la señal coestimuladora a través de una activación de células T de interacción 4-1BBL/4-1BB, se investigó la activación de citocinas proinflamatorias y la expansión de células T. En estos experimentos se usaron células CD33⁺ HEK293T transgénicas, ligandos coestimuladores negativos para células T como B7.1, B7.2, Ox40, 4-1BB y ligando ICOS como células diana en lugar de líneas celulares de AML nativas CD33⁺ para excluir una estimulación adicional de células T ejercida por moléculas coestimuladoras.

Analizando la cantidad de citoquinas proinflamatorias secretadas en las materias sobrenadantes, se detectaron diferencias enormes. La coestimulación a través de 4-1BBL expresada sobre las hMSCs modificadas aumentó significativamente los niveles de secreción de IFN- γ y TNF- α hasta 8 veces para TNF y más de 10 veces para IFN- γ (fig. 5a). Por el contrario, la reticulación de células T con células CD33⁺ HEK293T sin la señal coestimuladora provocó una liberación inferior de IFN- γ y TNF- α , mientras que no fueron detectables casi citoquinas en presencia del wt y hMSCs de control vector (fig. 5a). De acuerdo con la secreción aumentada de citoquinas, la reticulación con hMSCs que expresan inmunoligandos indujo una proliferación más fuerte de células T activadas con bsab conduciendo a velocidades más elevadas de expansión de células T en presencia de hMSCs que presentan 4-1BBL (fig. 5b). Las células T se expandieron a más de aproximadamente dos a tres veces en presencia de hMSCs que expresan el ligando coestimulador, mientras que no se pudo observar en absoluto un aumento en el número de células T en presencia de hMSCs que liberan CD33-CD3 o las líneas de wt y testigo vector parental, respectivamente (fig. 5b).

En la siguiente etapa, se cocultivaron hMSC que producen bsab CD33-CD3 con MNCs derivadas de pacientes de AML para investigar su capacidad para redirigir células T autólogas hacia blastos de AML. Las MNCs recientemente aisladas fueron fenotipadas a través de inmunotinción para medir las proporciones de CD45⁺, CD123⁺ y blastos de AML HLA-DR⁺ y células T CD45⁺, CD3⁺, respectivamente. Como en los ajustes experimentales previos, las sublíneas de MSC fueron sembradas con 48 h de antelación y seguidamente cocultivadas con MNCs derivadas de pacientes. Se verificaron los porcentajes relativos y los números absolutos de células tanto de células leucémicas como de poblaciones de leucocitos mediante citometría de flujo tras teñir para marcadores superficiales específicos después de 24, 48 y 96 h de cocultivo para cuantificar la destrucción de células tumorales y la expansión de células T, respectivamente. Para un donante representativo, ya 48 h después del comienzo del cocultivo, los números de blastos leucémicos absolutos disminuyeron enormemente, conduciendo a una erradicación casi completa de células tumorales en 96 h (fig. 6a, b). Por el contrario, en presencia de hMSCs testigo, el número de blastos leucémicos permaneció casi estable a lo largo del tiempo.

El número de blastos de AML disminuyó enormemente en presencia de hMSCs que liberan bsab de manera comparable (fig. 6a, b, c). De forma equivalente, la presencia de la señal coestimuladora de 4-1BB aumentó significativamente la proliferación de la población de células T después de 96 h de cocultivo, conduciendo a doblar el número total de células T y a una expansión pronunciada de células T, aproximadamente 3 veces mayor en comparación con la expansión alcanzada en las otras muestras (fig. 6c, panel de la derecha). De forma conjunta, estos resultados muestran que el suministro continuo de bsab CD33-CD3 conjuntamente con una estimulación constante de células T mediante MSCs modificadas mejoró la destrucción específica de blastos autólogos de AML y aumentó la proliferación de células T derivadas del paciente a lo largo del tiempo. Además, los datos muestran que una señal de coestimulación para células T redirigidas y activadas por bsab no tuvo que ser necesariamente mediada a través de una interacción con células diana, sino que se puede proporcionar por células independientes. La eficacia del sistema de células genéticamente modificado que secretan bsab se investigó *in vivo* mediante coinyección de células MOLM-13 preincubadas 24 h, células T y líneas de hMSC que liberan bsab CD33-CD3 o que contienen testigo vector en ratones NOD/SCID IL2R γ ^{-/-}. La verificación diaria de los animales puso de manifiesto que los ratones en el grupo testigo inyectados con hMSCs modificadas con testigo vector desarrollaron indicios evidentes de injertación de células leucémicas entre la segunda y la tercera semana después del trasplante mostrando pérdida de peso, locomoción reducida, postura encorvada y piel arrugada (fig. 7). Por el contrario, los ratones del grupo de tratamiento que recibieron las hMSCs que liberan bsab parecían que estaban protegidos frente a la aparición de la enfermedad durante

el experimento. En el momento en que los ratones testigo no tratados tuvieron que ser sacrificados, todos los ratones tratados estaban todavía vivos y no mostraban indicios de enfermedad (fig. 7, relevancia significativa de supervivencia ** $p < 0,01$).

5 En conjunto, los datos presentados en la presente memoria descriptiva destacan que el suministro *in situ* continuo de bsab CD33-CD3 mediante hMSCs genéticamente modificadas puede representar una alternativa válida a la administración exógena de inmunoagentes de corta vida para inmunoterapia específica de antígenos de pacientes de AML. Además, la capacidad potencial inmunosupresora de las MSCs no limita su uso como una factoría de bsab *in vivo*.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones.

10

REIVINDICACIONES

1. Una célula madre (SC) pluri- o multi-potente tratada por ingeniería genética para expresar un anticuerpo multiespecífico y un ligando coestimulador de células T humanas, en que el anticuerpo multiespecífico comprende al menos un dominio de unión específico a células diana y al menos un dominio de unión específico a células inmunes, en el que el ligando coestimulador de células T se selecciona entre un grupo de ligando de CD28 B7-1 y B7-2, ligando OX40L de Ox40, ligando 4-1BBL de 4-1BB (CD137L), ligando CD70 de CD27 (CD27L), ligando CD154 de CD40, ligando ICOSL de ICOS, ligando ICAM-1, -2 y -3 de LFA-1, ligando de 2B4 y ligando de SLAM.
2. La SC de la reivindicación 1, en la que las células madre (SC) pluri- o multi-potentes son células madre humanas (hSC) pluri- o multi-potentes.
3. La SC de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en que las SCs son tratadas por ingeniería genética para expresar anticuerpos multiespecíficos, preferentemente anticuerpos biespecíficos, que comprenden al menos un dominio de unión específico a células diana y al menos un dominio de unión específico a células inmunes, en que los dominios específicos son expresados preferentemente como una proteína de fusión.
4. La SC de la reivindicación 3, en que el dominio de unión específico a células inmunes es específico para un receptor de células inmunes activantes.
5. La SC de la reivindicación 4, en que el dominio de unión específico a células inmunes es específico para un receptor de células inmunes activantes como CD2, cadena épsilon y zeta de CD3, CD4, CD8, CD16, DAP12, NKG2D.
6. La SC de la reivindicación 5, en que el dominio de unión de células específicas diana es específico para un antígeno asociado a tumor o un antígeno de un agente patógeno, parásito o parasitoide.
7. La SC de la reivindicación 6, en que el dominio de unión específico a células diana es específico para un antígeno seleccionado entre antígenos superficiales, citoplásmicos o nucleares como el antígeno La/SSB, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD56, CD157, CD123, CCR5, STEAP1, antígeno de células madre de próstata PSCA, antígeno de membrana específica de la próstata PSMA, miembros de la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico, preferentemente EGFR (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) o Her4 (ErbB-4) o sus mutantes, miembros de la familia de receptores de efrina, preferentemente EphA1-10 o EphB1-6, antígenos embrionarios, preferentemente antígeno carcinoembrionario CEA, receptor de acetilcolina fetal, CEACAM-6, CEACAM-7.
8. La SC de la reivindicación 6, en que el dominio de unión específico a células diana es específico para un antígeno seleccionado entre miembros de la familia Rho de GTPasas, miembros de las proteínas del grupo de movilidad elevada, antígeno de tumor de vejiga (BTA), CA125, CD2, CD4, CD8, CD10, CD23, CD30, CD44, CD52, CD99, CD135, CD274, carboanhidrasa IX, endosialina, proteasa-alfa activadora de fibroblastos (FAP-alfa), FBP, gpA33, gp100, c-Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos), MCSP y TIM-3, miembros de la familia de factores de crecimiento endoteliales vasculares (VEGFR 1-3), molécula EpCAM de adhesión a células epiteliales, alfafetoproteína AFP, miembros de la familia de proteínas de mucina, preferentemente MUC1 o MUC16, receptor de hormonas estimuladoras de folículos (FSHR), el antígeno asociado a melanoma de peso molecular elevado humano (HMW-MAA), proteína de unión a folato FBP, receptor de α -folato, ligandos del receptor NKG2D, miembros de la familia de glicoproteínas epiteliales, preferentemente EGP-2, EGP-4 y EGP-40, miembros de la familia de receptores de factores de crecimiento de tipo insulina (por ejemplo, IGF-1R), diasialogangliósidos, preferentemente GD2, GD3, miembros de la familia de anhidrasa carbónica, preferentemente CAIX, miembros de la familia de antígenos de hidratos de carbono, preferentemente Ley, que incluyen mutantes de las proteínas y familias de proteínas citadas y proteínas de envoltura viral, preferentemente gp120, gp41 o EBOV GP.
9. La SC de la reivindicación 6, en que el dominio de unión de células diana está compuesto por las cadenas alfa y beta o gamma y delta de un receptor de células T (TCR) o sus fragmentos, en que estos restos de unión derivados de TCR reconocen y se unen a péptidos presentados por complejos de proteínas de clase I y II de antígenos de leucocitos humanos (HLA), preferentemente péptidos virales, péptidos derivados de proteínas como la familia EGFR, survivina, familia de proteínas de caja del grupo de movilidad elevada de tipo sry (SOX), antígenos asociados a melanoma, preferentemente antígeno NY-ESO-1 de cáncer autoinmuno/testículos, miembros de la familia de antígenos de melanoma MAGE A, el antígeno preferentemente expresado en melanoma PRAME, los antígenos asociados a leucemia, preferentemente gen 1 de tumor de Wilms WT1 o en que el resto de unión de células diana comprende ligandos para proteínas y complejos de proteínas, preferentemente receptores de citoquinas, preferentemente receptor de IL-13, ligandos del receptor NKG2D, ligandos de los miembros de la familia EGFR o TCRs autorreactivos.
10. La SC de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en que las SCs son células madre mesenquimales (MSCs), preferentemente MSCs humanas (hMSCs).

11. Un método para preparar una SC de la reivindicación 1 a 9, en que el método comprende introducir en una SC un cDNA que codifica el anticuerpo multiespecífico y un cDNA que codifica un ligando coestimulador de células T humanas.
12. Una composición farmacéutica, que comprende la SC de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 5 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

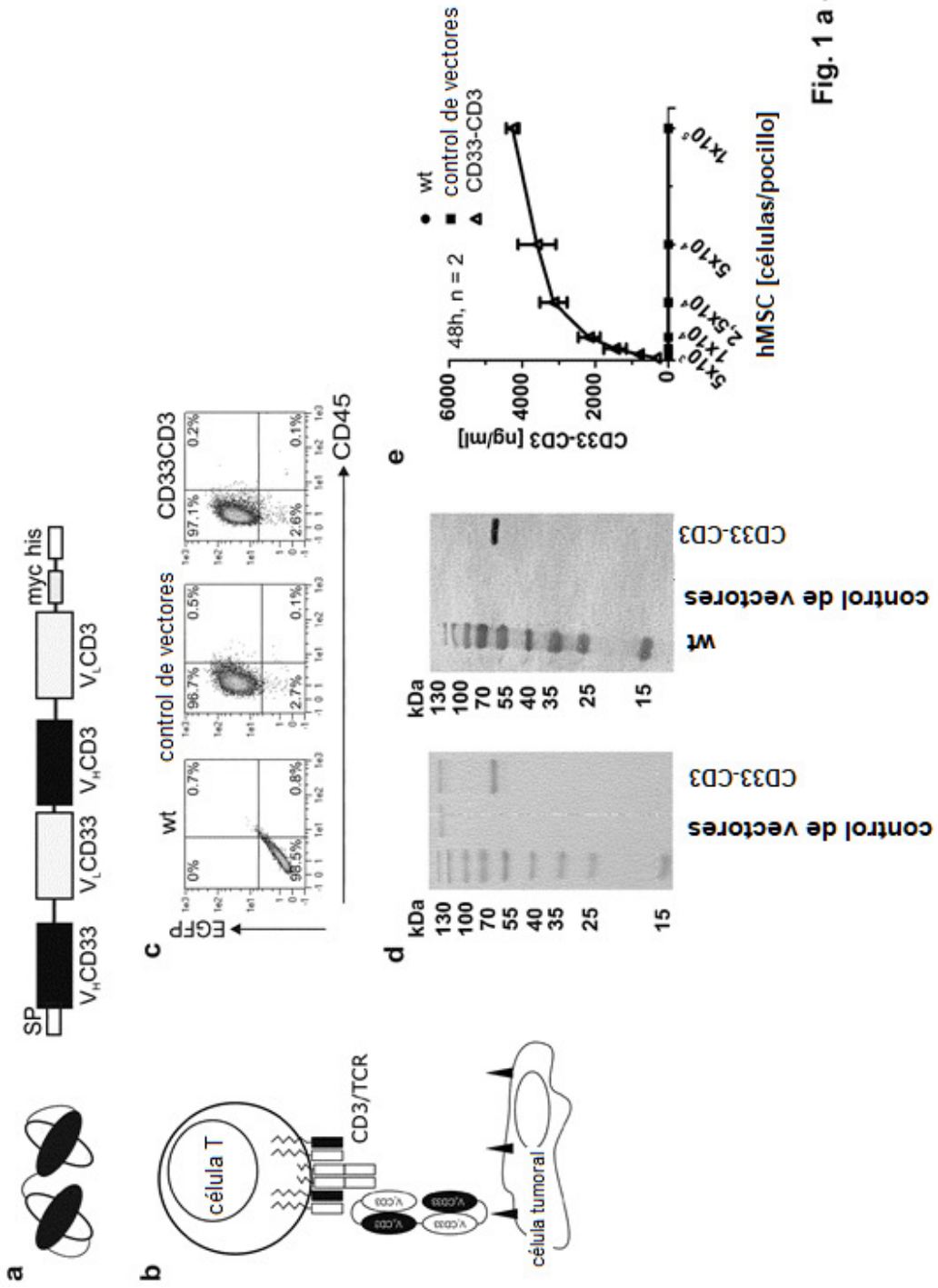


Fig. 1 a - e

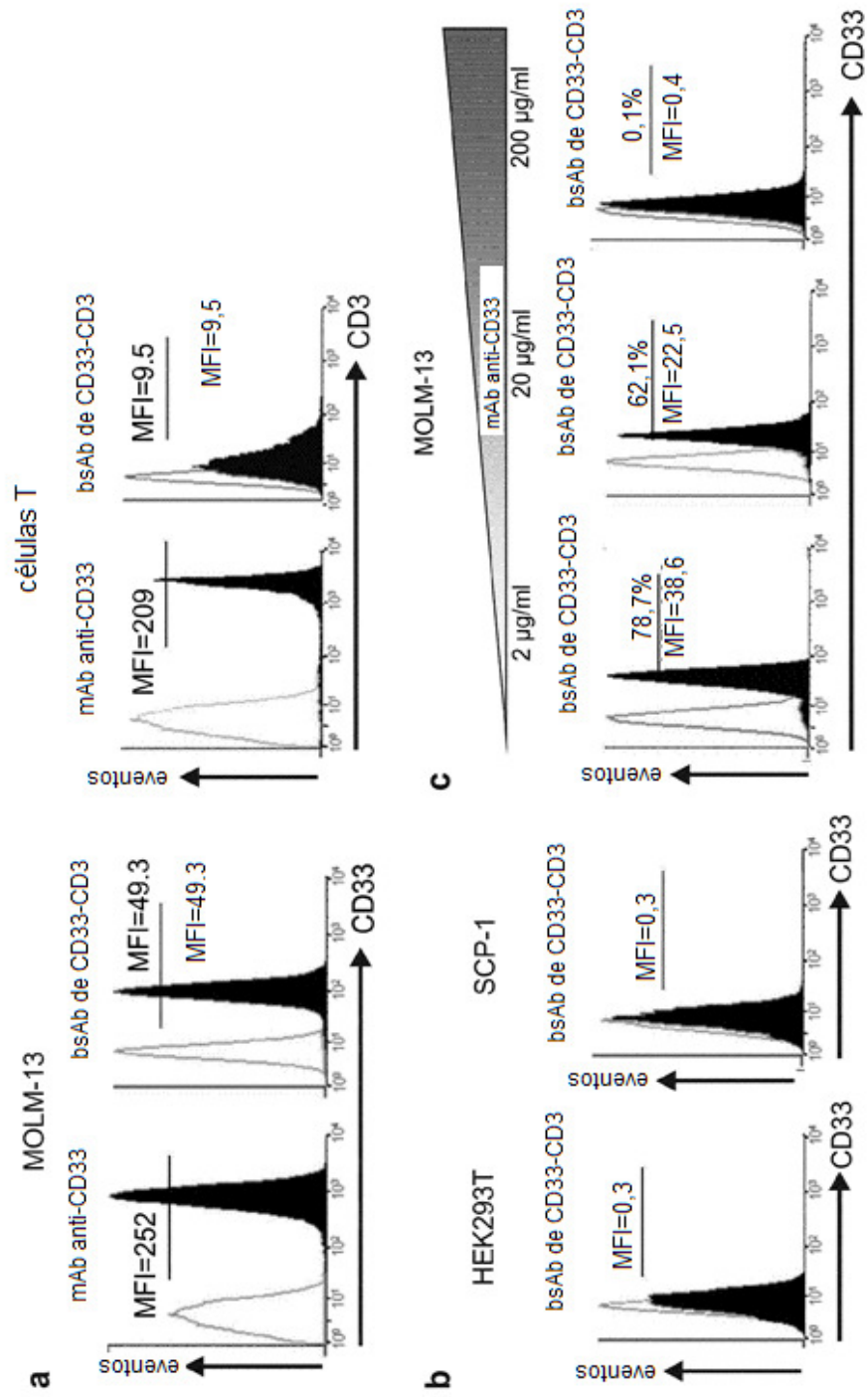


Fig. 2 a - c

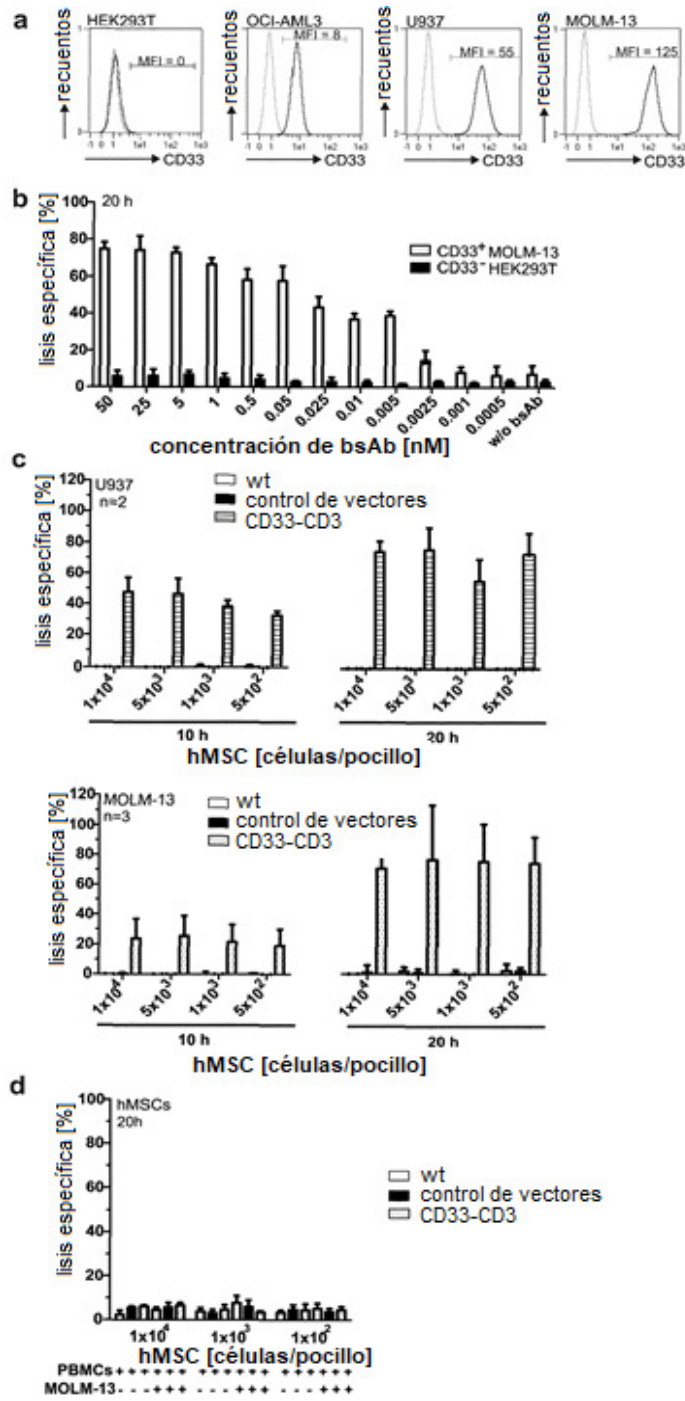


Fig. 3 a - d

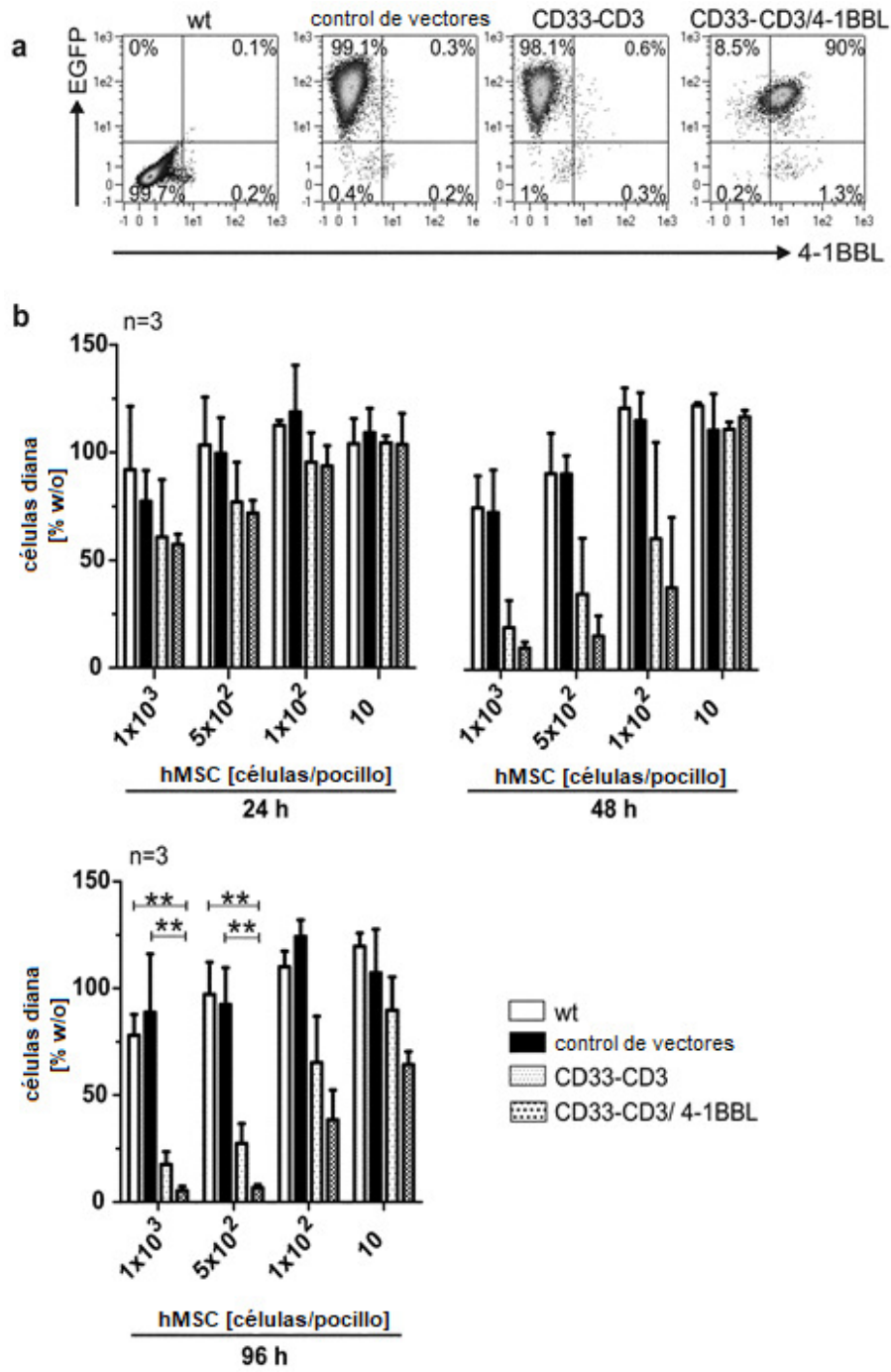


Fig. 4 a - b

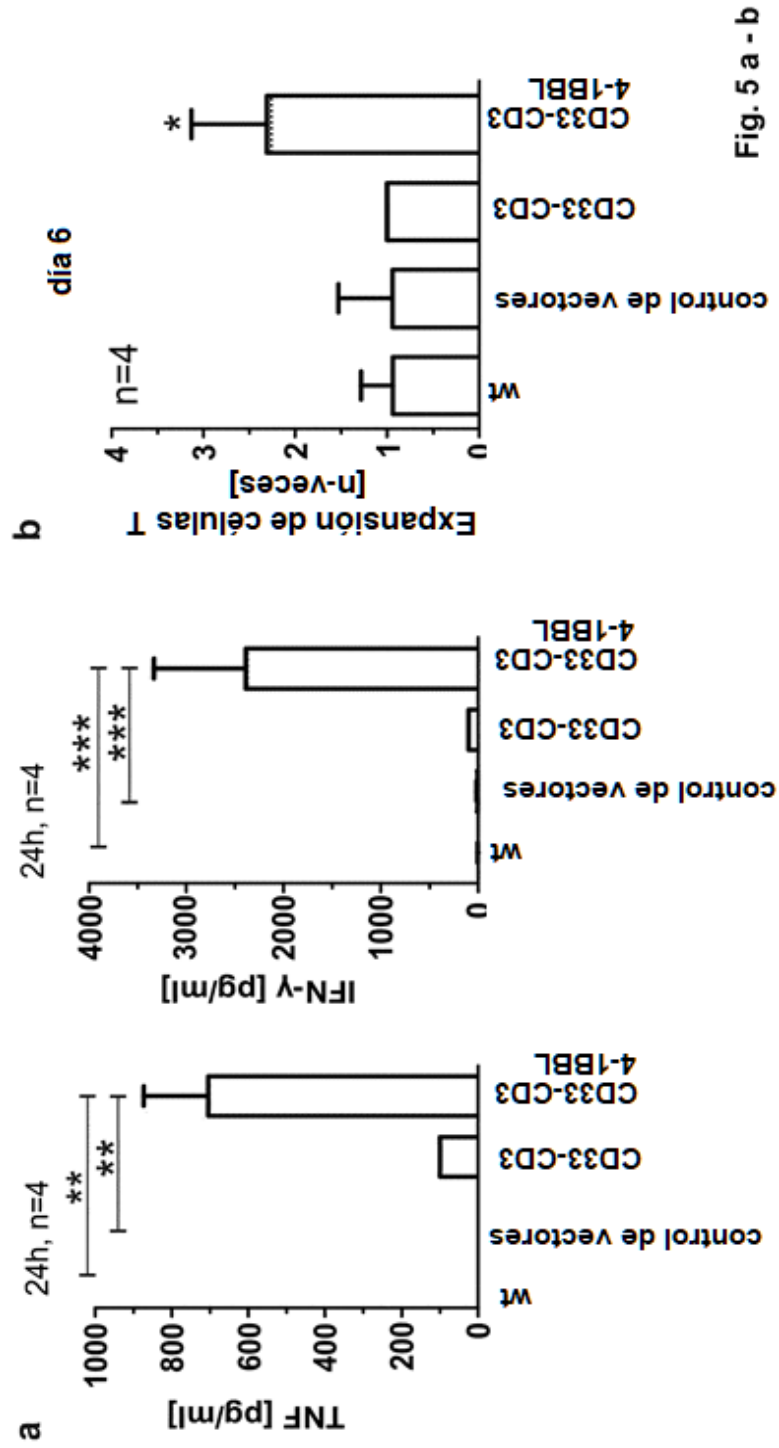


Fig. 5 a - b

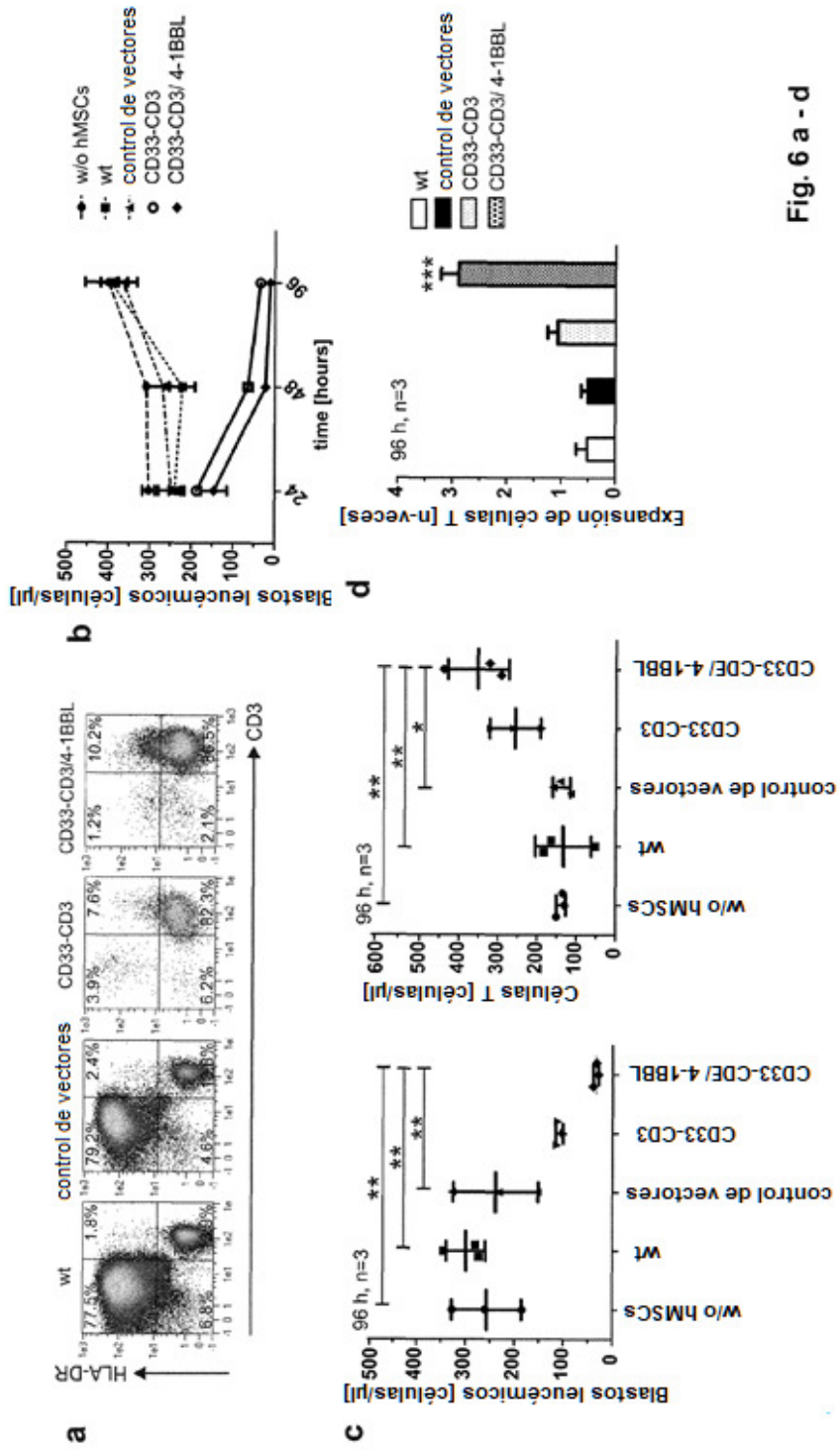


Fig. 6 a - d

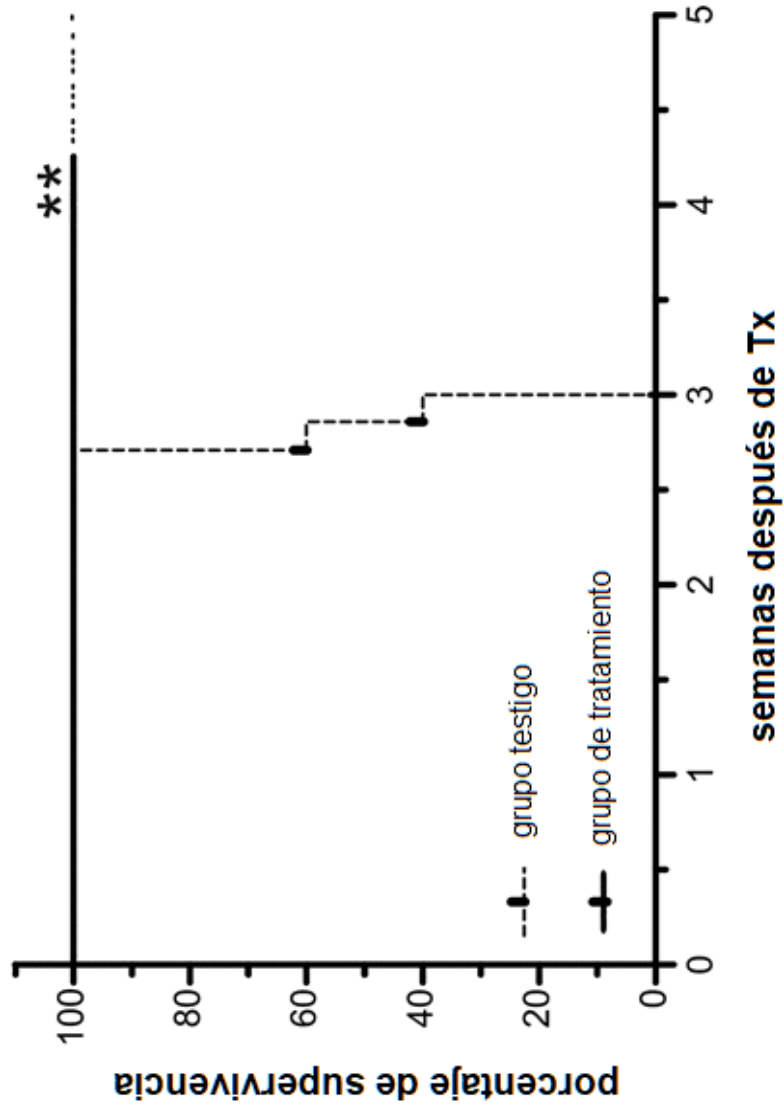


Fig. 7