

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 546**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2006 PCT/KR2006/003928**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2007 WO07037653**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2006 E 06799011 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 1951268**

54 Título: **Uso de células madre mesenquimales modificadas genéticamente para expresar un gen suicida para tratar un cáncer**

30 Prioridad:

29.09.2005 KR 20050091155

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

28.09.2017

73 Titular/es:

**AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC
COOPERATION FOUNDATION (100.0%)
206, Worldcup-ro, Yeongtong-gu
Suwon-si, Gyeonggi-do 16499 , KR**

72 Inventor/es:

**SUH, HAE-YOUNG;
CHANG, DA-YOUNG;
KIM, SUNG-SOO;
YOO, SEUNG-WAN y
LEE, YOUNG-DON**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 634 546 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

Uso de células madre mesenquimales modificadas genéticamente para expresar un gen suicida para tratar un cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de una célula madre mesenquimal que expresa un gen suicida para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer, en el que el gen suicida es un gen que codifica para citosina desaminasa, y en el que la citosina desaminasa expresada del gen suicida convierte la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo, en el que la célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal humana aislada de médula ósea, sangre periférica o sangre extraída, y en el que el cáncer se selecciona de cáncer cerebral, cáncer de mama, 10 cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón, y una célula madre mesenquimal correspondiente que expresa un gen suicida para su uso en el tratamiento de un cáncer.

Antecedentes de la invención

15 El glioblastoma es uno de los cánceres más complicados debido a su metástasis en otros sitios y a que actualmente no están disponibles tratamientos eficaces. En la mayoría de los casos, la extirpación convencional del tumor cerebral no puede realizarse de manera segura y la quimioterapia con medicinas anticancerígenas no es eficaz debido a la barrera hematoencefálica (BHE) que bloquea la penetración de fármacos en el parénquima cerebral.

Además, la terapia génica para el tratamiento de glioblastoma introduciendo virus modificados por ingeniería genética para portar un gen anticancerígeno directamente al interior de las células tumorales no es eficaz cuando están implicados varios tumores diminutos. Adicionalmente, las inyecciones repetidas de virus pueden producir 20 rechazo inmunitario grave.

Recientemente se ha notificado que las células madre neurales (Aboody *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 12846-12851 (2000); Brown *et al.*, Human Gene Therapy, 14, 1777-1785 (2003); Tang *et al.*, Human Gene Therapy, 14, 1247-1254, (2003) y Zhang *et al.*, NeuroImage, 23, 281 -287 (2004)) y las células madre mesenquimales (Nakamura *et al.*, Gene Therapy, 11, 1155-1164 (2004) y Zhang *et al.*, NeuroImage, 23, 281-287 (2004)) presentaron 25 tropismo por glioblastoma, y por tanto, hubo intentos de utilizar tales células madre como portadores de genes.

Por ejemplo, se ha notificado que el uso de células madre neurales que expresan citosina desaminasa (CD), un gen suicida de *E. coli*, mostró efectos anticancerígenos excelentes en el tratamiento de glioblastoma (Aboody *et al.*, citado anteriormente y Brown *et al.*, citado anteriormente). Sin embargo, es muy difícil obtener células madre neurales debido a que deben aislarse y cultivarse a partir del tejido cerebral de fetos abortados. Por tanto, en los 30 experimentos anteriores se usaron líneas celulares inmortalizadas mediante un oncogén, que podrían inducir un cáncer y rechazo inmunitario.

Se ha notificado que la inyección de células madre mesenquimales (MSC) que expresan interleucina-2 (IL-2) en el modelo de glioma de rata aumenta el efecto antitumoral y prolonga la supervivencia de las ratas que portan tumores (Nakamura *et al.*, citado anteriormente). Sin embargo, el método anterior presenta los problemas de que es difícil 35 que las células inmunitarias penetren la barrera hematoencefálica y que muchas células cancerosas a menudo no están significativamente afectadas por el sistema inmunitario.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un método y agente terapéutico novedoso que pueda dirigirse específicamente a células tumorales sin perjudicar a células no tumorales, y que no tenga inmunotoxicidad, de modo que sean posibles administraciones repetidas de los agentes terapéuticos.

40 Las MSC son células estromales de la médula ósea multipotentes que pueden diferenciarse en células de linaje mesodérmico tales como osteocitos, condrocitos, adipocitos y miocitos. Las MSC pueden proliferar también fácilmente con el mantenimiento de sus estados no diferenciados que son adecuados para portar agentes anticancerígenos frente a glioblastoma debido a su tropismo por células tumorales.

Los genes suicidas pueden convertir un profármaco no tóxico en el fármaco anticancerígeno correspondiente. Por ejemplo, CD puede convertir 5-fluorocitosina (5-FC) en un agente anticancerígeno citotóxico, 5-fluorouracilo (5-FU), y el 5-FU secretado destruye células vecinas, lo que se denomina "efecto inespecífico".

La administración directa del 5-FU produce citotoxicidad y conduce a efectos secundarios adversos, sin embargo el uso combinado de un gen suicida y 5-FC de manera específica hace posible que se genere 5-FU selectivamente 50 alrededor de células tumorales (Bourbeau *et al.*, The Journal of Gene Medicine, 6, 1320-1332 (2004)). El documento WO99/37332 da a conocer una terapia de cáncer de huesos usando una línea celular de médula ósea de migración que incluye un gen suicida.

Los presentes inventores se han esforzado en desarrollar un agente anticancerígeno seguro y eficaz usando las MSC; y han encontrado que un tumor cerebral puede curarse eficazmente cuando las MSC que expresan un gen suicida se trasplantan en el cerebro de un modelo animal con cáncer cerebral, seguido por la administración de un

profármaco de un agente anticancerígeno.

Sumario de la invención

5 Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar medio para tratar un cáncer, que presenta una alta eficacia de direccionamiento a tejidos cancerosos, que no presenta toxicidad a células normales, y que no presenta inmunotoxicidad, que permite la administración repetida de la composición.

Según un aspecto de la presente invención, se usa una célula madre mesenquimal que expresa un gen suicida para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer.

Breve descripción de los dibujos

10 Lo anterior será evidente a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se toma en conjunto con los dibujos adjuntos, que muestran respectivamente:

Figura 1: Fotografías microscópicas de luz de las células madre mesenquimales (MSC) aisladas de la médula ósea humana tras cultivar durante 1, 2, 3, y 7 días *in vitro*;

Figura 2: Fotografías que muestran multipotenciales de MSC (A: adipocitos teñidos con aceite rojo O; B: condrocitos teñidos con azul alciano; C: actividad de fosfatasa alcalina en osteocitos; y D: osteocitos teñidos con von Kossa);

15 Figura 3: La construcción de un vector retroviral que comprende el gen de citosina desaminasa (CD) de *E. coli* como gen suicida;

Figuras 4A a 4C: Gráficos y fotografía que muestran la expresión de CD en células 293T (A: actividad de CD expresada que convierte [³H] citosina en [³H] uracilo; B: muerte celular de células 293T que expresan la CD, dependiendo de la conc. de 5-FC que es el profármaco de 5-FU; y C: fotografías microscópicas de luz de células 293T y 293T/CD cultivadas en presencia de 5-FC 1.000 μM);

20

Figuras 5 A y 5B: Fotografías y un gráfico que muestran los efectos inespecíficos de células 293T/CD (la figura 5A: fotografías microscópicas de contraste de fases de células 293T y 293T/CD tras el cocultivo con células de glioma C6/LacZ en presencia de 5-FC 1.000 μM, y fotografías microscópicas de luz tomadas tras la tinción con X-gal (aumento: x100 cada una); y la figura 5B: el gráfico que muestra actividad de β-galactosidasa (β-gal) en las células 293T y 293T/CD con la conc. de 5-FC);

25

Figuras 6 A y 6B: Fotografías y un gráfico que muestran la muerte celular de MSC y las MSC transfectadas con un vector retroviral que comprende un gen CD (MSC/CD), tras el tratamiento con 5-FC (figura 6A: fotografías microscópicas de luz; y figura 6B: el gráfico de resultados de análisis de MTT);

Figuras 7A a 7C: Fotografías y un gráfico que muestran los efectos inespecíficos de las células MSC/CD (figura 7A: fotografías microscópicas de contraste de fases de células MSC y MSC/CD tras el cocultivo con células de glioma C6/LacZ en presencia de 5-FC 1.000 μM y fotografías microscópicas de luz tomadas tras la tinción con X-gal (aumento: x100 cada una); figura 7B: el gráfico que muestra la tasa de supervivencia de células C6/LacZ en el ensayo con β-gal; y figura 7C: fotografías microscópicas digitales y microscópicas de disección de pocillos completos);

30

Figuras 8 A y 8B: resultados de los análisis con HPLC que muestran la conversión de profármaco 5-FC en 5-FU en las células MSC y MSC/CD (figura 8A: cromatogramas HPLC de las células MSC y MSC/CD; y figura 8B: un gráfico que muestra la cantidad de 5-FU detectado);

35

Figura 9: Un gráfico que muestra la tasa de muerte celular de líneas celulares de glioma C6, U373 y U87 con la conc. de 5-FU;

Figura 10: Resultados que muestran tropismo de MSC por glioma (A: diagrama esquemático que muestra la migración de MSC/LacZ trasplantada en un hemisferio al hemisferio que porta glioma contralateral; B: fotografía microscópica de un corte de tejido cerebral que muestra la migración de MSC/LacZ al hemisferio que porta el glioma; y C y D: fotografías microscópicas de 100 y 200 aumentos, respectivamente, que muestran la distribución de células MSC/lacZ en el límite del glioma);

40

Figura 11: Imágenes de MRI que muestran los efectos anticancerígenos de las MSC que expresan las CD; y

45

Figura 12: Resultados de la tinción con X-gal de cortes del cerebro de modelos de rata con tumor cerebral, que muestran los efectos anticancerígenos de las MSC que expresan las CD.

Descripción detallada de la invención

50 El gen suicida usado en la presente invención es citosina desaminasa (CD). CD convierte 5-fluorocitosina no tóxica (5-FC) en 5-fluorouracilo tóxico (5-FU). El gen CD es preferible para su uso en la terapia génica debido a que 5-FU

presenta un efecto inespecífico fuerte.

5 El gen suicida puede introducirse en una célula madre mesenquimal (MSC) empleando un vector viral, preferiblemente, un vector retroviral, que comprende el gen según cualquier método conocido para introducir un gen en una célula. Por ejemplo, el gen suicida puede introducirse en la célula madre mesenquimal introduciéndolo en un vector retroviral para obtener un vector de expresión, transfectando un célula empaquetadora con el vector de expresión, cultivando la célula transfectada en condiciones de cultivo apropiadas, filtrando el medio de cultivo para obtener una disolución retroviral, y transfectando las MSC con la disolución retroviral. Luego, las MSC que expresan continuamente el gen suicida pueden obtenerse usando un marcador de selección contenido en el vector retroviral.

10 La célula madre mesenquimal que expresa un gen suicida puede producirse en masa *in vitro* mediante la introducción del gen suicida en las células madre y la selección y amplificación de las células madre resultantes en condiciones adecuadas; o mediante la proliferación de manera suficiente de células madre, la introducción del gen suicida en las células madre proliferadas y la colección de las células madre resultantes.

15 Las células madre que pueden usarse en la presente invención pueden aislarse de la médula ósea, de la sangre periférica o de la sangre del cordón umbilical de cualquier mamífero incluyendo seres humanos, preferiblemente de la médula ósea humana.

El medicamento que comprende células madre mesenquimales que expresan un gen suicida es útil en el tratamiento de un cáncer. Los cánceres incluyen cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón.

20 El medicamento puede comprender además excipientes, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, puede formularse en una formulación de inyección adecuada para su inyección en un tejido u órgano.

El medicamento puede incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes saborizantes, emulsionantes, conservantes y similares.

25 El medicamento puede inyectarse en el cuerpo del paciente según los métodos convencionales bien conocidos en la técnica tal como el método clínico dado a conocer por Bjorklund y Stenevi (Brain Res., 177, 555-560 (1979) y Lindvall *et al.* (Arch. Neurol., 46, 615-31(1989)).

La dosis unitaria de las células madre mesenquimales de la presente invención que realmente va a administrarse debe determinarse a la luz de diversos factores relevantes incluyendo la enfermedad que va a tratarse, la gravedad del síntoma del paciente, la vía de administración escogida, y la edad, sexo y peso corporal del paciente individual.

30 Además, se ilustra un kit para tratar un cáncer que comprende un vector de expresión que comprende un gen suicida, una célula madre mesenquimal y un profármaco de un agente anticancerígeno.

35 En el kit, el vector de expresión que comprende el gen suicida y la célula madre mesenquimal pueden proporcionarse separadamente o proporcionarse en forma de una célula madre mesenquimal transfectada con el vector de expresión que comprende el gen suicida o transducida con virus que expresan el gen suicida. El vector de expresión se prepara preferiblemente introduciendo el gen suicida en un vector viral, preferiblemente, un vector retroviral.

También se ilustra un método para tratar un sujeto que padece un cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre mesenquimales que expresan un gen suicida, seguido por la administración de un profármaco de un agente anticancerígeno.

40 Los rechazos inmunitarios pueden minimizarse en la terapia génica usando el medicamento cuando las células madre mesenquimales se obtienen a partir de la médula ósea del propio paciente o de la médula ósea de otros que tienen el mismo tipo de HLA (antígeno leucocitario humano) que el paciente. Por consiguiente, el medicamento puede administrarse repetidamente para evitar completamente la recaída del cáncer. Adicionalmente, el uso de las células madre mesenquimales en terapia génica tiene ventajas en que las células madre mesenquimales pueden cultivarse fácilmente sin usar un oncogén y obtenerse en una gran cantidad suficiente para el trasplante al paciente.

45 Además, el medicamento puede aplicarse para el tratamiento de un cáncer que se oculta de la vigilancia inmunitaria debido a que el efecto del mismo no depende de la mejora de las respuestas inmunitarias.

Por consiguiente, el medicamento puede usarse solo o en combinación con otra terapia para el tratamiento de un cáncer, especialmente un cáncer que no sea tratable.

50 Tras la inyección, las células madre mesenquimales en el medicamento presentan tropismo por tejidos cancerosos. Por consiguiente, pueden minimizarse los efectos secundarios adversos en las células normales haciendo llegar específicamente las células madre mesenquimales que expresan un gen suicida a tejidos cancerosos y, administrando posteriormente un profármaco de un agente anticancerígeno que va a activarse por el gen suicida de modo que el agente anticancerígeno se genere sólo alrededor de los tejidos cancerosos. Adicionalmente, las células

madre mesenquimales que expresan un gen suicida presentan efectos inespecíficos sobre células cancerosas circundantes en las que el gen suicida no se introduce directamente, aumentando de ese modo su efecto anticancerígeno.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la presente invención.

- 5 Adicionalmente, los porcentajes dados a continuación para sólido en mezcla sólida, líquido en líquido y sólido en líquido son basándose en p/p, vol/vol y p/vol, respectivamente, y todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, a menos que se indique específicamente de otro modo.

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales humanas (hMSC)

(Etapa 1) Extracción de médula ósea y aislamiento de células madre mesenquimales

- 10 Se añadieron 4 ml de HISTOPAQUE 1077 (Sigma, EE.UU.) y 4 ml de médula ósea obtenida de banco de médula ósea (Korean Marrow Donor Program, KMDP) a un tubo de ensayo de 15 ml esterilizado. Tras la centrifugación a 400 x g durante 30 minutos, se recogieron 0,5 ml de la capa leucocítica en la interfase y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 10 ml de solución salina tamponada con fosfato esterilizada. Se centrifugó la suspensión resultante a 250 x g durante 10 minutos para retirar el sobrenadante y a ello se le añadieron 10 ml de tampón fosfato para obtener una suspensión, que se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos. Se repitió el procedimiento anterior dos veces y se añadió medio DMEM (Gibco, EE.UU.) que contenía FBS al 10% (Gibco) al precipitado resultante. Se colocó una parte de la disolución resultante que correspondía a 1×10^7 células en una placa de 100 mm y se incubó a 37°C durante 4 horas mientras se suministraba CO₂ al 5% y aire al 95%. Entonces se retiró el sobrenadante y se añadió un nuevo medio para continuar cultivando.

- 20 (Etapa 2) Cultivo y subcultivo de hMSC

Se incubaron las hMSC obtenidas en la etapa 1 usando un medio MSC (FBS al 10% (Gibco) + bFGF 10 ng/ml (Sigma) + penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco) + DMEM al 89% (Gibco)) en una incubadora de CO₂ mantenidas a 37°C. Se llevaron a cabo incubaciones en serie mientras se cambiaba el medio en un intervalo de 2 días. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se recogieron las células usando tripsina al 0,25%/EDTA 0,1 mM (Gibco) y se diluyó 20 veces con el medio, y entonces, se subcultivó en las nuevas placas. El resto de células así obtenidas se mantuvieron congeladas en un medio que contenía DMSO al 10% (Sigma). La figura 1 muestra fotografías microscópicas de luz de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea humana tras cultivar durante 1, 2, 3, y 7 días *in vitro*.

(Etapa 3) Potenciales de diferenciación múltiples de hMSC

- 30 Se examinaron los potenciales de diferenciación *in vitro* de hMSC en adipocitos, condrocitos y osteocitos como sigue.

(1) Diferenciación adipogénica de hMSC

Se cultivaron hMSC en el medio MSC, seguido por cultivo en un medio de inducción de diferenciación adipogénica (medio DMEM (Gibco) complementado con dexametasona 1 μM (Sigma), metilisobutilxantina 0,5 mM (Sigma), 10 μg/ml de insulina (Gibco), indometacina 100 nM (Sigma) y FBS al 10% (Gibco)) durante 48 horas. Posteriormente se incubó la mezcla resultante en un medio de mantenimiento adipogénico (medio DMEM que contenía 10 μg/ml de insulina y FBS al 10%) durante 1 semana y se tiñó con aceite rojo O. Tal como se muestra en la figura 2, los adipocitos teñidos con aceite rojo O están pronunciados dentro de las células (figura 2, A). Este resultado sugiere que las hMSC pueden diferenciarse satisfactoriamente en adipocitos.

- 40 (2) Diferenciación condrogénica de hMSC

Se cultivaron hMSC en el medio MSC. Se recogieron 2×10^5 de las células usando tripsina, se centrifugaron, y entonces se reincubaron en 0,5 ml de un medio de inducción de diferenciación condrogénica libre de suero (50 ml de DMEM con alta concentración de glucosa (Gibco) que contenía 0,5 ml de 100 x ITS (0,5 mg/ml de insulina bovina, 0,5 mg/ml de transferina humana, 0,5 μg/ml de selenato de sodio (Sigma) y 10 ng/ml de TGF-β1 (Sigma)) durante 3 semanas mientras se reemplazaba el medio cada 3 días. Entonces se fijaron las masas celulares con paraformaldehído al 4%, se cortaron usando un microtomo, y entonces se tiñeron con azul alciano. Tal como se muestra en la figura 2, se tiñó la matriz de cartílago extracelular de azul y se observó la presencia de condrocitos en lagunas de cartílago (figura 2, B). Estos resultados sugieren que las hMSC diferenciaban en condrocitos.

(3) Diferenciación osteogénica de hMSC

- 50 Se incubaron hMSC en el medio MSC, seguido por cultivo en 0,5 ml de un medio de inducción de diferenciación osteogénica (DMEM complementado con fosfato de β-glicerol 10 mM (Sigma), ascorbato-2-fosfato 0,2 mM (Sigma), dexametasona 10 nM (Sigma) y FBS al 10% (Gibco)) durante 2 semanas mientras se reemplazaba el medio cada 3 días. Entonces se fijaron las células con paraformaldehído al 4%, y se tiñeron para detectar fosfatasa alcalina y con

el método von Kossa, respectivamente. Tal como se muestra en la figura 2, el aumento de la actividad de fosfatasa alcalina y la acumulación extracelular de minerales de calcio en forma de hidroxapatita sugieren que las hMSC diferenciaban en osteocitos (la figura 2, C y D).

Ejemplo 2: Construcción de un vector retroviral que expresa citosina desaminasa

5 (Etapa 1) Clonación de citosina desaminasa

Se clonó el gen de citosina desaminasa (CD) mediante la reacción PCR usando ADN genómico de *E. coli* K12 MG1655 (ATCC 700926, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) como molde. Se llevó a cabo la PCR usando oligonucleótidos CD-F (5' -GAA TTC AGG CTA GCA ATG TCT CGA ATA ACG CTT TAC AAA C-3': SEQ ID NO: 1) y CD-R (5' -GGA TTC TCT AGC TGG CAG ACA GCC GC-3'; SEQ ID NO: 2) en condiciones de 10 minutos a 94°C; 27 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C; 7 minutos a 72°C. Se clonó el producto de PCR usando el kit de clonación de Easy vector pGEM-T (Promega) y se aisló el vector pGEM-T-CD que contenía el gen CD mediante selección de colonias blancas y azules usando X-gal e IPTG. A través del análisis de la secuencia del vector pGEM-T-CD usando oligonucleótidos de SEQ ID NO: 3 (5'-CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') y SEQ ID NO: 4 (5'-ACC GGG AAA CAC CTA TTG TG-3'), se verificó el gen CD (gi298594).

15 (Etapa 2) Construcción de un vector retroviral que expresa citosina desaminasa

Se aisló el ADNc de CD del vector pGEM-T-CD con *EcoRI* (Roche, Alemania) y *NotI* (Roche), y se insertó en los sitios *EcoRI* y *NotI* del vector pcDNA3.1 (Clontech, EE.UU.) usando ADN ligasa de T4 (Roche). Se transformó *E. coli* DH5 α con el vector resultante, y se cultivó el transformante resultante y se seleccionó en placa de LB con 50 μ g/ml, de ampicilina para obtener pcDNA3.1/CD. Se aisló el ADNc de CD de pcDNA3.1/CD con *BamHI* (Roche), y se insertó en el sitio de *Bg/III* (Roche) del vector retroviral pMSCV-puro (Clontech) con ADN ligasa de T4 (Roche). El constructo resultante designado pMSCV-puro/CD se muestra en la figura 3.

(Etapa 3) Preparación de retrovirus

Se transfectó vector pMSCV-puro/CD en una línea celular empaquetadora retroviral, PA317 (ATCC CRL-9078) o PG13 (ATCC CRL-10686) con el método de coprecipitación con fosfato de calcio [Jordan, Nucleic Acid Research, 24, 569-601(1996)], y se cultivaron las células a 37°C, CO₂ al 5%. Tras 48 horas, se recogió la disolución de cultivo y se filtró con una membrana de nailon de 0,45 μ m para obtener disolución de retrovirus. Se mantuvo la disolución de retrovirus a -70°C hasta su uso.

Ejemplo 3: Verificación de expresión de CD en células 293T

(Etapa 1) Cuantificación de la actividad de citosina desaminasa

30 Se transfectó pMSCV-puro/CD en células 293T (ATCC CRL-11268) según el método de coprecipitación con fosfato de calcio. Tras 48 h de transfección, se dividieron las células en 1:10 en el medio de selección que contenía puromicina (4 μ g/ml, Sigma, EE.UU.) durante 2 semanas. Se cosecharon las células crecidas en solución salina tamponada con fosfato y se lisaron repitiendo 5 veces de congelación en hielo seco en etanol durante 2 minutos y descongelación a 37°C durante 5 minutos. Se obtuvo un sobrenadante centrifugando el lisado de células a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Anal Biochem, 72: 248-254, 1976). Se mezclaron diez μ g de proteínas en 10 μ l con 5 μ l de [6-³H]citosina 3 mM (0,14 mCi/mmol, Moravek, EE.UU.) y se incubó a 37°C durante 1 h. Se terminó la reacción añadiendo 345 μ l de ácido acético 1 M. Se eluyó la mezcla con una columna de elución SCX Bond (Varian, EE.UU.) enjuagado con 1 ml de ácido acético 1 M y se determinó el [6-³H]uracilo producido con un contador de centelleo líquido. Se usaron células 293T transformadas con pMSCV-Puro como control negativo en este experimento. Tal como se muestra en la figura 4A, el grupo experimental en pMSCV-puro/CD transformado con 293T fue 4 veces superior que el grupo de control negativo. Este resultado indica que el pMSCV-puro/CD se expresó funcionalmente.

(Etapa 2) Efectos suicidas del gen CD en células 293T

45 Las células 293T normales y las células 293T/CD transformadas con pMSCV-puro/CD preparadas en la etapa 1 se sembraron en placa a una densidad de 2.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos que contenía DMEM con suero bovino fetal al 10%. Tras 24 horas, se añadió 5-FC a las células a diversas concentraciones (0-10 mM). Se reemplazaron los medios con medio fresco que contenía 5-FC cada 2 días durante 1 semana. Tal como se muestra en la figura 4C, se redujo la viabilidad de 293T/CD en presencia de 5-FC 1.000 μ M tal como se determinó mediante microscopía por contraste de fases. Se estimó la viabilidad midiendo actividad de NADPH de la mitocondria mediante el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se incubaron las células en 200 μ l de MTT 25 mg/ml (Sigma, EE.UU.) en PBS durante 4 horas. Se reemplazó la disolución con 200 μ l de dimetilsulfóxido absoluto (DMSO, Sigma). Tras incubarse a temperatura ambiente durante 15 minutos, se midió la absorbancia a 540 nm con un lector de ELISA (Molecular Probe, EE.UU.). Los datos en la figura 4B se presentan como promedios \pm E.C. con respecto al de las células crecidas en ausencia de 5-FC a partir de 3 experimentos 55 independientes. Se detectó la muerte celular de la 293T/CD a partir de 10 μ M de 5-FC con CI₅₀ de 296 μ M. En

cambio, las células 293T no mostraron muerte celular en presencia de 1.000 μM de 5-FC.

(Etapa 3) Efectos inespecíficos *in vitro* de células 293T/CD

5 En placas de 6 pocillos, se cocultivaron respectivamente 3×10^3 /pocillo de células 293T/CD y 293T con 3×10^3 de células de glioma C6/LacZ (ATCC CRL2199). Se obtuvieron originalmente células C6/LacZ transformando células de glioma C6 con el gen LacZ de *E. coli* y se usó para determinar el efecto inespecífico de células 293T/CD. Tras 24 horas, se añadió 5-FC a las células a las concentraciones indicadas. Se reemplazaron los medios con medio fresco que contenía 5-FC cada 2 días durante 1 semana. Se sometió el cultivo a tinción con X-gal o ensayo con β -galactosidasa (β -gal). Para la tinción con X-gal, se fijaron las células con glutaraldehído al 0,00625% (Merck, EE.UU.) durante 10 min, se enjuagaron 3 veces con PBS y se incubaron en MgCl_2 2 mM, ferrocianuro de potasio/ferricianuro de potasio 5 mM, y X-gal 1 mg/ml (Koma, Corea) durante 8 horas. Tal como se muestra en la figura 5A, las células C6/LacZ que se cocultivaron con células 293T parentales aumentaron en número y se tiñeron de azul con X-gal. En cambio, cuando se cocultivaron con 293T/CD, las células C6/LacZ murieron en presencia de 1.000 μM de 5-FC debido al efecto inespecífico de 293T/CD.

15 La supervivencia de células C6/LacZ se confirmaron adicionalmente con ensayo con β -gal que mide la actividad de enzima remanente del producto de gen LacZ, β -galactosidasa. Se cosecharon las células y se lisaron en 1x tampón de lisis pasivo (Promega, EE.UU.). Se incubaron los 10 μg de proteína de lisados de células en 300 μl de ONPG 0,88 mg/ml (Sigma), MgCl_2 1 mM y tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) a 37°C aproximadamente 30 minutos. Se paró la reacción añadiendo 500 μl de Na_2CO_3 1 M y se determinó la absorbancia de la mezcla a 420 nm. La figura 5B presenta las relaciones relativas con respecto a la de las células sin tratar. Consecuentemente con el resultado mostrado en la figura 5A, las C6/LacZ cocultivadas con 293T no se alteraba por 5-FC en el ensayo con β -gal. En cambio, la actividad de β -galactosidasa de las células C6/LacZ se redujo mediante el cocultivo con 293T/CD en presencia de 5-FC 100-1.000 μM . Los datos indican que el cocultivo con 293T/CD induce la muerte celular de células C6/LacZ vecinas debido a efectos inespecíficos en presencia de 5-FC.

Ejemplo 4: Preparación de hMSC que expresan citosina desaminasa

25 (Etapa 1) Introducción de genes CD en hMSC

Se usó retrovirus que expresa CD para hacer llegar el gen CD a las MSC. Se hicieron crecer MSC obtenidas en la etapa 1 del ejemplo 1 en medio de crecimiento (DMEM que contenía FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 37°C y CO_2 al 5% hasta el 70% de confluencia. Se añadió retrovirus que expresa CD preparado en el ejemplo 2 al cultivo con dilución 1:1 en el medio de crecimiento en presencia de polibreno 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma) durante 8 horas y en el medio de crecimiento fresco durante 16 horas. Tras la transducción retroviral se repitió dos veces más, se dividieron las células en 1:3 en medio de crecimiento que contenía puromicina 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma) durante 14 días. Se combinaron las células supervivientes y se usaron en los experimentos posteriores.

(Etapa 2) Efectos suicidas del gen CD en células MSC/CD

35 Se sembraron en placa células MSC/CD o MSC en medio de crecimiento a una densidad de 5.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos un día antes de la exposición a 5-FC. Se reemplazó el medio cada 2 días con medio de crecimiento fresco que contenía 5-FC 0-10 mM durante 2 semanas. Tal como se muestra en la figura 6A, las células MSC/CD casi murieron tras el tratamiento con 5-FC 1.000 μM durante 2 semanas. Se estimó la viabilidad midiendo la actividad de NADPH de la mitocondria usando ensayo con MTT tal como se mencionó anteriormente con células 293T/CD. Los datos se presentan como promedios \pm E.C con respecto al de las células sin tratar a partir de 3 experimentos independientes (figura 6B). Se detectó la muerte celular de MSC/CD a partir de 100 μM de 5-FC con $\text{Cl}_{50} = 332 \mu\text{M}$. En cambio, MSC no mostraron muerte celular hasta 1.000 μM de 5-FC.

(Etapa 3) Efectos inespecíficos *in vitro* de MSC que expresan genes CD

45 En placas de 6 pocillos, se cocultivaron respectivamente 1×10^4 /pocillo de células MSC/CD y MSC con 3×10^3 de células de glioma C6/LacZ en medio de crecimiento. Tras 24 horas, se añadió 5-FC a las células hasta las concentraciones finales de 1-1.000 μM y se reemplazó el medio cada 2 días durante 1 semana. Las células restantes se sometieron a tinción con X-gal (las figuras 7A y 7C) o ensayo con β -galactosidasa (figura 7B) tal como se describió anteriormente con las células 293T/CD. En presencia de 1000 μM de 5-FC, las células MSC/CD indujeron muerte celular de C6/LacZ mientras que MSC no alteraron la proliferación reducida de células C6/LacZ (figuras 7A y 7C). Por tanto, se redujo la frecuencia de formación de colonias de células C6/LacZ tras el cocultivo con MSC/CD de manera dependiente de la dosis (figura 7C). Los datos indican que las células MSC/CD ejercen el efecto inespecífico en células C6/LacZ en presencia de 5-FC.

55 La supervivencia de las células C6/LacZ se verificó adicionalmente mediante ensayo con β -gal, mediante el cual se cuantificaron indirectamente las células supervivientes. Los ensayos se llevaron a cabo de manera similar tal como se describió anteriormente con células 293T/CD usando 10 μg de proteínas de lisados de células. Se presentó la absorbancia a 420 nm como razón relativa con respecto al de las células sin tratar. Tal como se muestra en la figura

7B, la actividad de β -galactosidasa se redujo drásticamente en células C6/LacZ de una manera dependiente de la concentración cuando las células se cocultivaron con células MSC/CD. En cambio, no se alteró la actividad de β -galactosidasa en células C6/LacZ que se cocultivaron con MSC normales. De nuevo, las células MSC/CD ejercen efectos inespecíficos en células C6/LacZ en presencia de 5-FC.

5 (Etapa 4) Verificación de la conversión de 5-FC en 5-FU mediante MSC/CD

Se sembraron en placa células MSC y MSC/CD a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron en presencia de 5-FC $1.000 \mu\text{M}$ durante 3 días. Se extrajeron los $50 \mu\text{l}$ de medio mediante $500 \mu\text{l}$ de acetato de etilo:isopropanol:ácido acético $0,5 \text{ mol/l}$ (84:15:1(v/v/v)) con $0,3 \mu\text{g}$ de 5-bromouracilo (5-BU, Aldrich, EE.UU.). Tras secarse la fracción orgánica con un evaporador a vacío a 4°C durante 90 minutos, se reconstituyó el aglomerado en $500 \mu\text{l}$ de la mezcla de H_2O :metanol (4:1). Se realizó HPLC usando columna C-18 de $5 \mu\text{m}$ Xterra TM RP18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$, Waters, EE.UU.). Se llevó a cabo la elución isocráticamente a una velocidad de flujo de $0,6 \text{ ml/min}$ con una fase móvil isocrática que consistía en KH_2PO_4 40 mM y se ajustó a pH 7,0 con KOH al 10%. Se eluyeron 5-FC y 5-FU en 3,1 min y 3,9 min. Se eluyó 5-BU, un patrón interno, en 10,2 min (la figura 8A). Tal como se muestra en la figura 8B, MSC/CD convirtieron 5-FC $1.000 \mu\text{M}$ en 5-FU $2,67 \mu\text{M}$ mientras que MSC no podían producir ningún 5-FU. Los resultados indicaron que la conversión de 5-FC en 5-FU era específica para el gen CD.

Ejemplo 5: Validación del efecto citotóxico del 5-FU producido mediante MSC/CD sobre diversas líneas celulares de glioma

Para verificar que 5-FU producido por MSC/CD es suficiente para inducir muerte celular en diversas células de glioma, se obtuvieron células C6 (KCLB No. 10107), U373 (KCLB No. 30017), U87 (KCLB No. 30014) recientes a partir de KCLB (banco de líneas celulares coreano) y se sembraron en placa en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento a una densidad de 100 células/pocillo, 100 células/pocillo, y 500 células/pocillo, respectivamente. Tras 24 horas, se añadió 5-FU a las células a $0,01$ - $100 \mu\text{M}$. Tras 1 semana, se estimó la viabilidad celular mediante ensayo con MTT tal como se describió anteriormente. Tal como se muestra en la figura 9, 5-FU indujo muerte celular en todas las líneas celulares de glioma con CI_{50} de $0,93$, $5,34$, y $5,65 \mu\text{M}$ para C6, U373 y U87, respectivamente, y alcanzó una meseta a $10 \mu\text{M}$. Los datos indican que concentraciones de 5-FU como producto de conversión de 5-FC en MSC/CD es suficiente para inducir muerte celular en diversas células de glioma.

Ejemplo 6: Tropismo *in vivo* de MSC por tumor cerebral

(Etapa 1) Trasplante

Se indujo un tumor cerebral mediante el trasplante de células C6/LacZ en el cerebro de ratas albinas Sprague-Dawley macho adultas (Samtaco, Corea) que pesaban aproximadamente 250 g . En resumen, se anestesiaron las ratas mediante inyección intraperitoneal de 400 mg/kg de hidrato de cloral (Sigma). Después de esto se retiró la piel en la región de la incisión, se fijaron los animales a un marco estereotáctico (Koeper, Alemania). Se esterilizó el vértice con etanol al 70% y se realizó la incisión de 1 cm . Se realizó un orificio perforando la duramadre en posiciones de bregma $-0,5$, ML $+ 3,0$ y DV $+ 4,0$, se inyectaron 5×10^5 de células U373 en $3 \mu\text{l}$ de PBS a una velocidad de $0,2 \mu\text{l/min}$ usando una jeringa Hamilton. Tras la cirugía, se cosió la incisión y se devolvieron los animales a la jaula. Cuatro días más tarde, se trasplantaron 2×10^5 células de células MSC/LacZ contralateralmente en la posición de bregma $-0,5$, ML $- 3,0$ y DV $+ 4,0$, se inocularon $5 \mu\text{l}$ de PBS que contenía. Veinte minutos tras la inyección, se retiró la jeringa. Se suturó la incisión. Se extrajo el cerebro de rata tras trasplantarse el glioma durante 2 semanas.

40 (Etapa 2) Preparación de un trozo de tejido

Dos semanas después del 2º trasplante, se anestesiaron las ratas inyectando 400 mg/kg de hidrato de cloral (Sigma). Se perfundieron las ratas con PBS y entonces con paraformaldehído $0,1 \text{ M}$ en PBS (pH 7,4). Se extrajo el cerebro y se mantuvo a 4°C en paraformaldehído $0,1 \text{ M}$ en PBS (pH 7,4) durante 16 horas para fijar posteriormente, y entonces en sacarosa al 30% durante 24 horas. Se realizaron los cortes usando un micrótomos deslizante con un grosor de $35 \mu\text{m}$ y se montaron en portaobjetos recubiertos con silano (Muto Purew Chemicals, Japón) y se almacenaron a 4°C en PBS hasta su uso.

(Etapa 3) Tinción con X-gal

Se enjuagaron los cortes del cerebro montados sobre un portaobjetos 3 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron en MgCl_2 2 mM , ferrocianuro de potasio/ferrocianuro de potasio 5 mM , y X-gal 1 mg/ml (Koma) durante 8 horas. Para potenciar el contraste, se contratiñeron los cortes con eosina, deshidrataron y cubrieron con Balsam. Tal como se muestra en la figura 10B, células MSC/LacZ azules X-gal+ migraron desde un hemisferio hasta el otro hemisferio donde se trasplantaron en primer lugar las células de glioma. Es notable que algunas células permanecieron en el camino de la aguja donde se trasplantaron las células MSC/LacZ. En un aumento más alto del microscopio, las células MSC/LacZ se infiltraron a la masa tumoral (la figura 10C) así como a lo largo del borde de tumor (la figura 10D). Los datos indican que las MSC tienen un alto potencial de migrar a los sitios del tumor y de usarse como vehículos para suministrar genes suicidas al tumor cerebral.

Ejemplo 7: Efectos antitumorales de MSC/CD en un modelo animal con tumor cerebral

(Etapa 1) Trasplante

5 Tal como se describió en la etapa 1 del ejemplo 6, se anestesiaron ratas albinas Sprague-Dawley adultas (aproximadamente 250 g). En posiciones de bregma -0,5, ML + 3,0 y DV + 4,0, se trasplantaron 5×10^4 células C6/LacZ con 5×10^5 cada una de MSC/CD o MSC en 5 μ l de PBS a una velocidad de 0,5 μ l/min usando una jeringa Hamilton. A partir del siguiente día, a las ratas se les administró por vía intraperitoneal 500 mg/kg/día de 5-FC durante 14 días.

(Etapa 2) Medición del efecto antitumoral mediante MRI

10 Se realizó obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) a las 2 semanas tras el trasplante de las células para estimar el volumen de tumor intracerebral. Se anestesiaron los animales mediante inyección intraperitoneal de 400 μ l de hidrato de cloral y se colocaron en una espiral de superficie realizada especialmente para el estudio de ratas. Se realizó el barrido de MRI con a sistema MRI 3.0 Tesla (Magnum 3.0; Medinus Inc., Corea) y una espiral RF de jaula de pájaros (diámetro: 30 cm). El tiempo de repetición (TR) y tiempo de eco (TE) fueron 1400 ms y 60 ms, respectivamente. El grosor del trozo fue de 1,5 mm sin huecos entre trozos. El análisis de MRI indicó que el trasplante con MSC/CD disminuía el volumen tumoral en comparación con los animales con PBS o MSC sin tratar.

(Etapa 3) Verificación de la correlación de MRI con métodos histológicos

20 Para confirmar adicionalmente la reducción de tumor cerebral por MSC/CD, se extrajo el cerebro de los mismos animales que se usaron para MRI tal como se describió anteriormente excepto que el corte fue de 100 μ m de grosor y se somete a tinción con X-gal. El tamaño del tumor fue más pequeño en animales que recibieron MSC/CD en comparación con animales tratados con PBS o con MSC (figura 12). Los datos obtenidos tanto con MRI como con tinción con X-gal indicaron consecuentemente que los tumores cerebrales se reducían en tamaño con el trasplante de MSC/CD y la administración de 5-FC.

Lista de secuencias

25 <110> SUH, Hae-Young *et al.*

<120> Uso de células madre mesenquimales modificadas genéticamente para expresar un gen suicida para tratar un cáncer

30 <130> PCA60934/SHY

<150> KR 10-2005-0091155

<151> 29-09-2005

35 <160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

40 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Cebador CD-F

<400> 1

gaattcaggc tagcaatgtc tCGaataacg ctttacaac

40

50 <210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Cebador CD-R

	<400> 2 ggatttctcta gctggcagac agccgc	26
5	<210> 3 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador para secuenciar un gen CD	
	<400> 3 catacgattt aggtgacact atag	24
15	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador para secuenciar un gen CD	
25	<400> 4 accgggaaac acctattgtg	20

REIVINDICACIONES

1. Uso de una célula madre mesenquimal que expresa un gen suicida para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer,
en el que el gen suicida es un gen que codifica para citosina desaminasa,
- 5 en el que la citosina desaminasa expresada del gen suicida convierte la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo,
en el que la célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal humana aislada de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical, y
en el que el cáncer se selecciona de cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento se fabrica para la administración antes de la administración de 5-fluorocitosina.
3. Célula madre mesenquimal que expresa un gen suicida para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto,
en la que el gen suicida es un gen que codifica para citosina desaminasa,
- 15 en la que la citosina desaminasa expresada del gen suicida convierte la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo,
en la que la célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal humana aislada de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical, y
en la que el cáncer se selecciona de cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón.
- 20 4. Célula madre mesenquimal para su uso según la reivindicación 3, en la que la célula madre mesenquimal es para la administración antes de la administración de 5-fluorocitosina.

Fig. 1

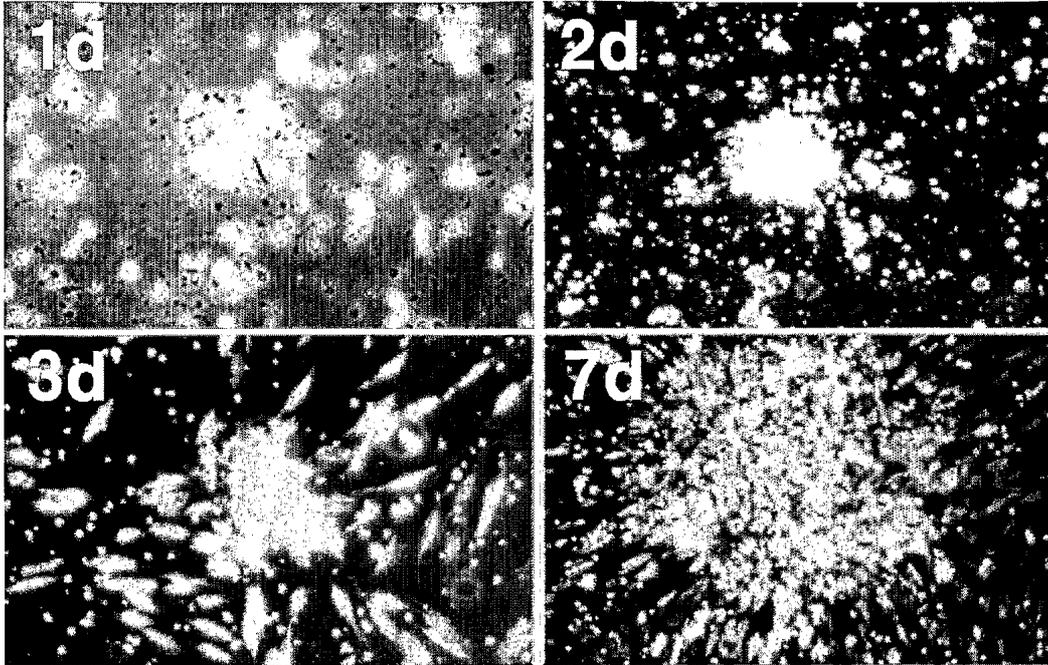


Fig. 2

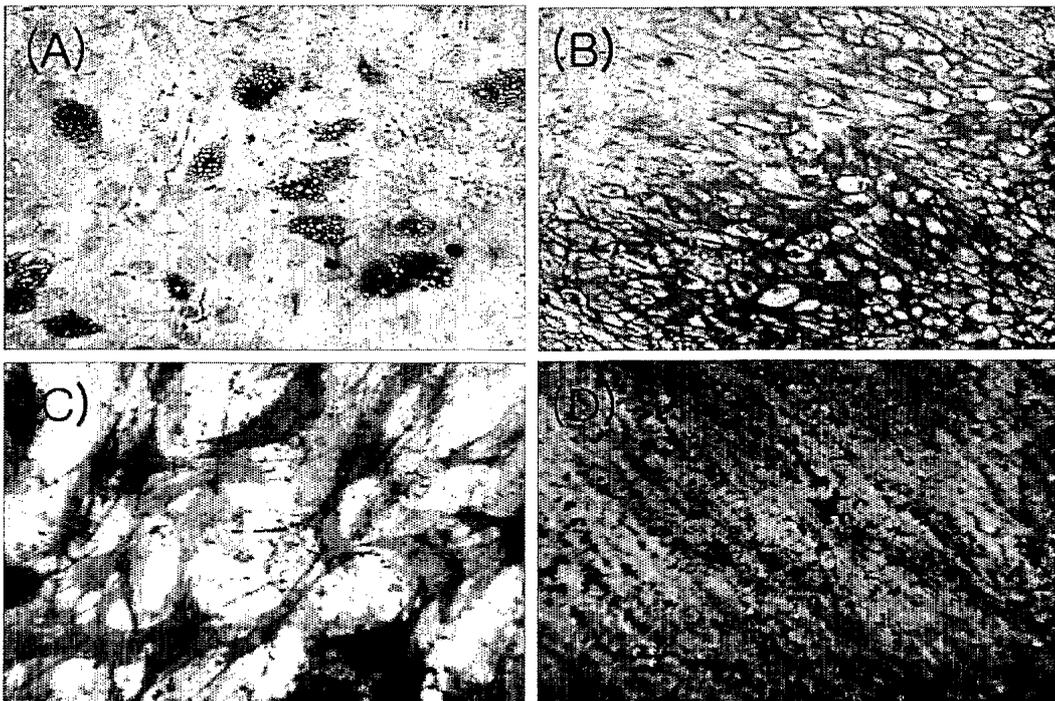


Fig. 3

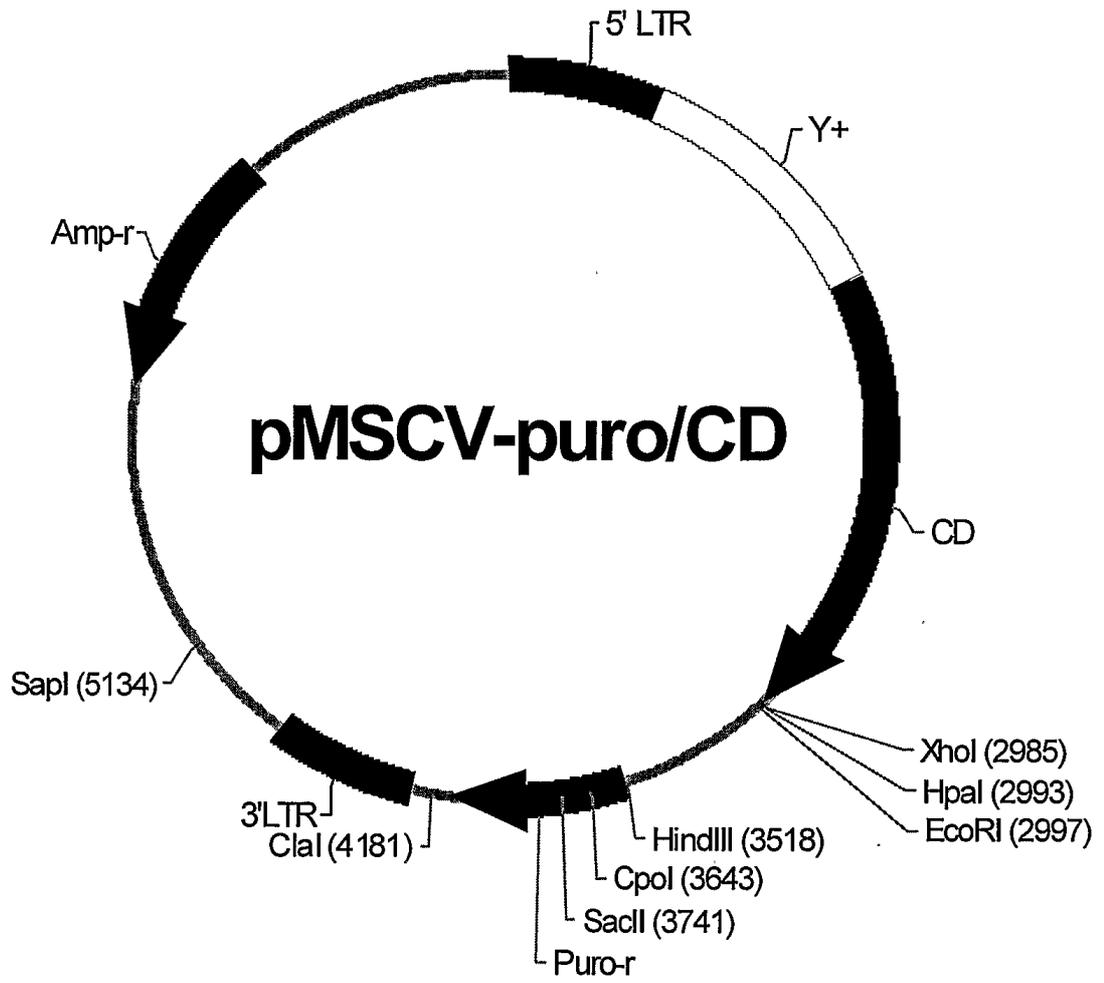


Fig. 4A

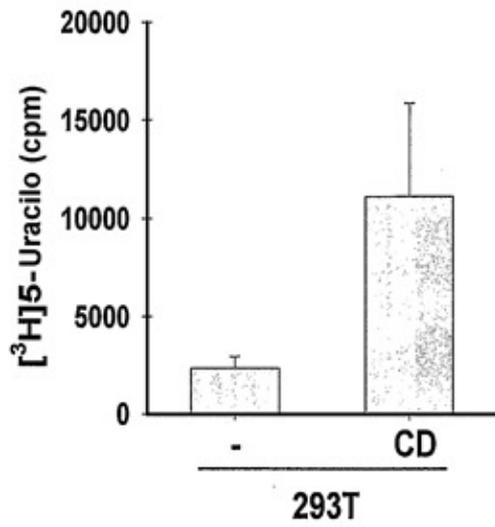


Fig. 4B

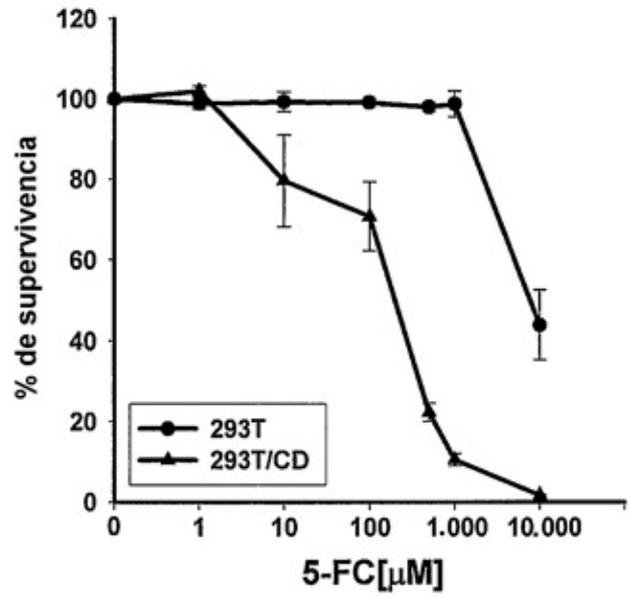


Fig. 4C

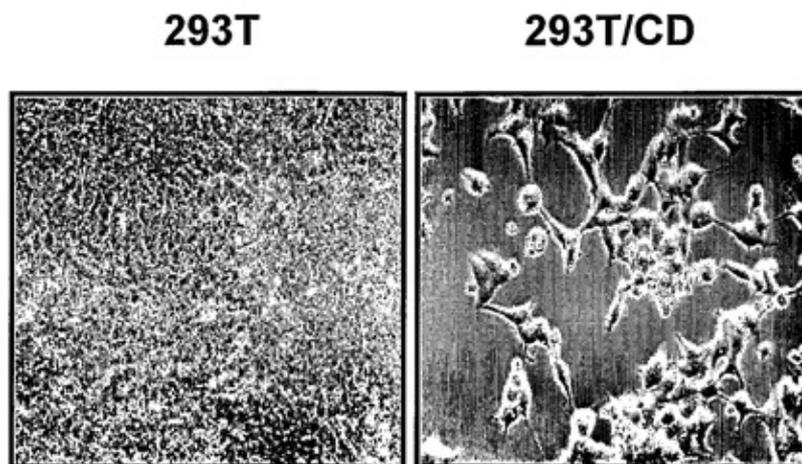


Fig. 5A

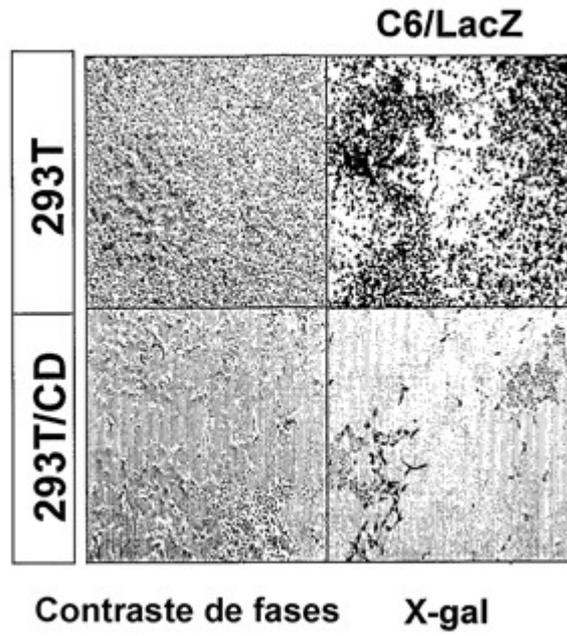


Fig. 5B

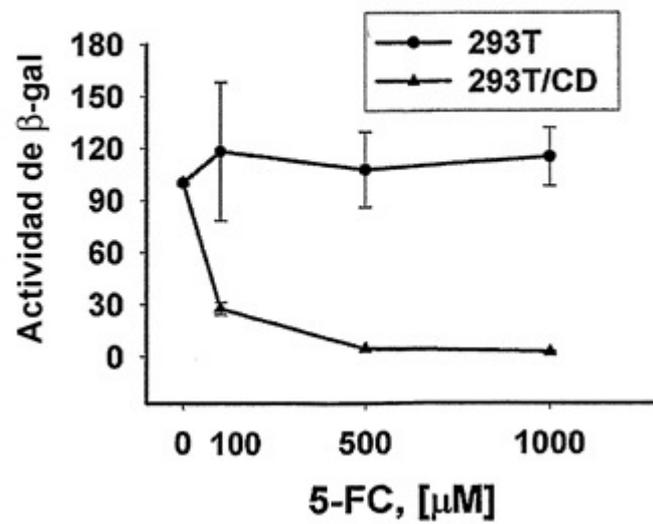


Fig. 6A

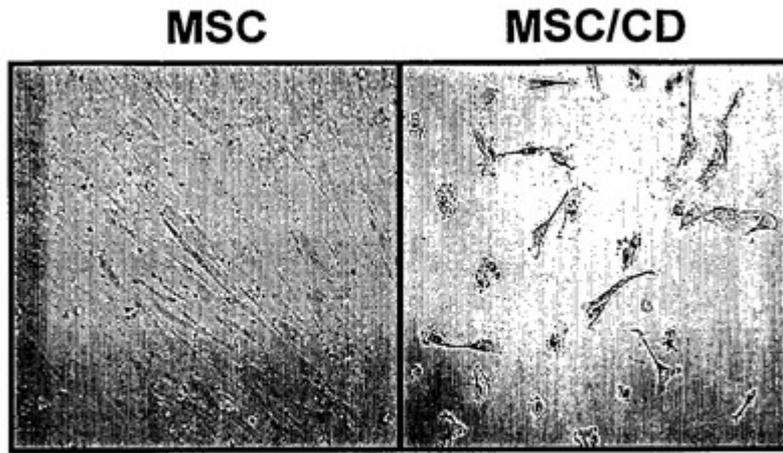


Fig. 6B

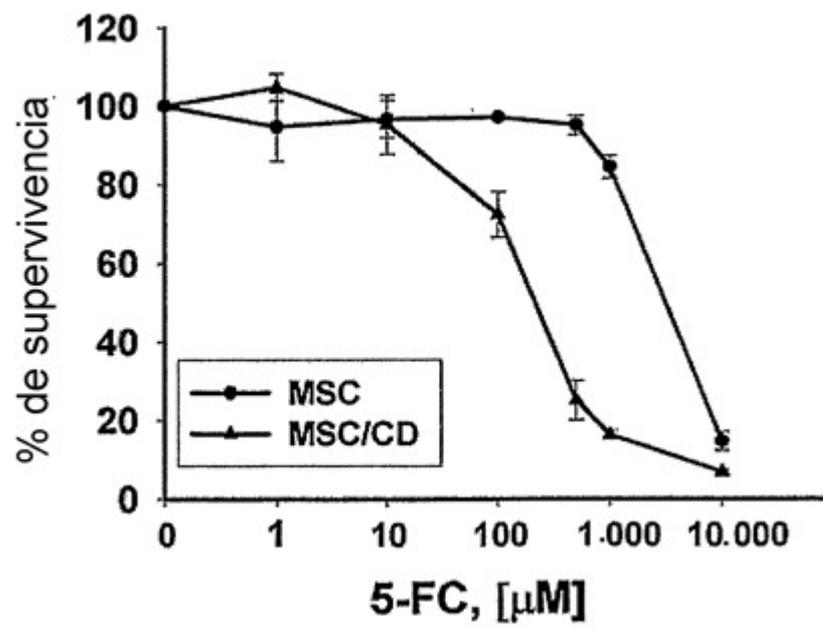


Fig. 7A

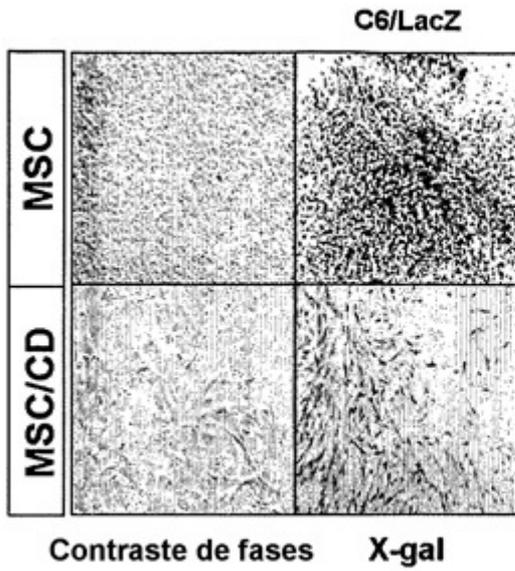


Fig. 7B

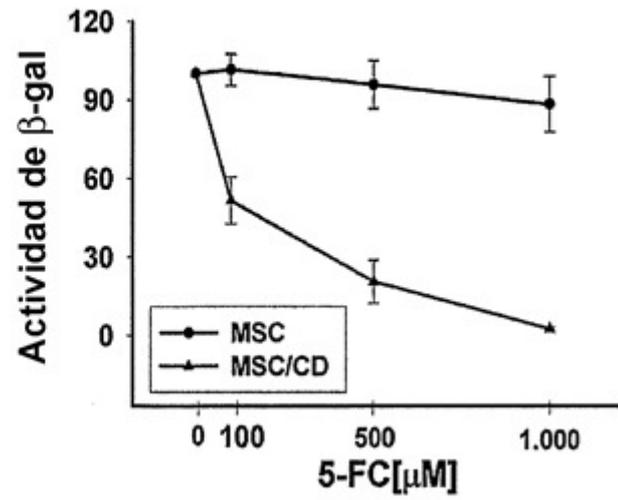


Fig. 7C

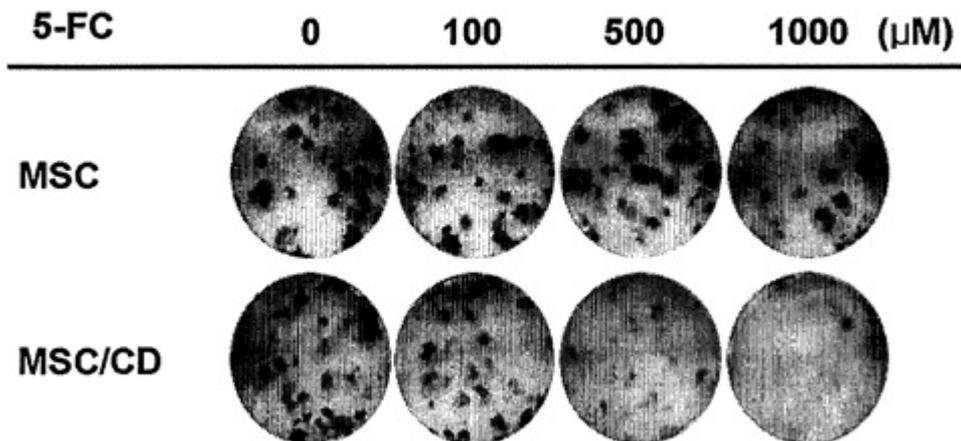


Fig. 8A

< Análisis con HPLC >

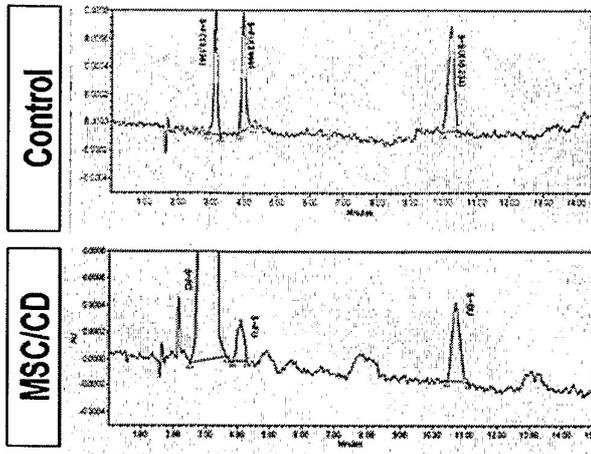


Fig. 8B

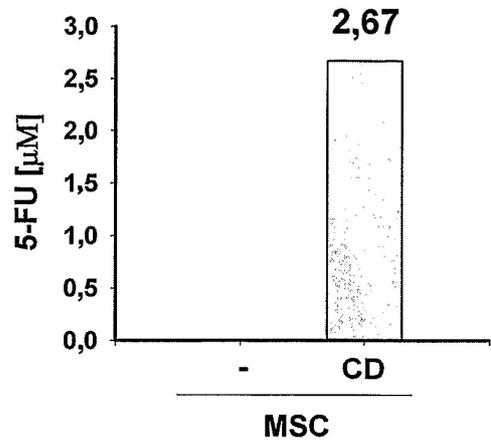


Fig. 9

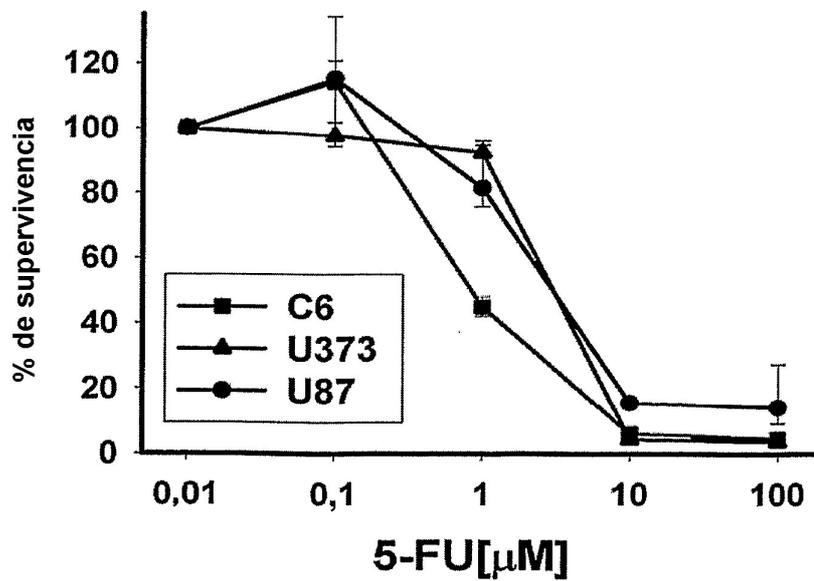


Fig. 10

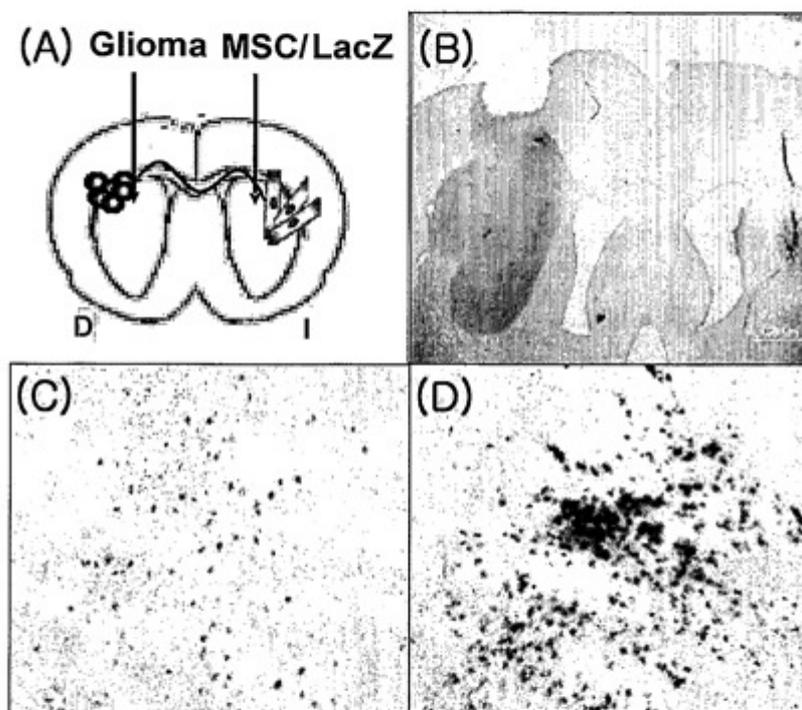
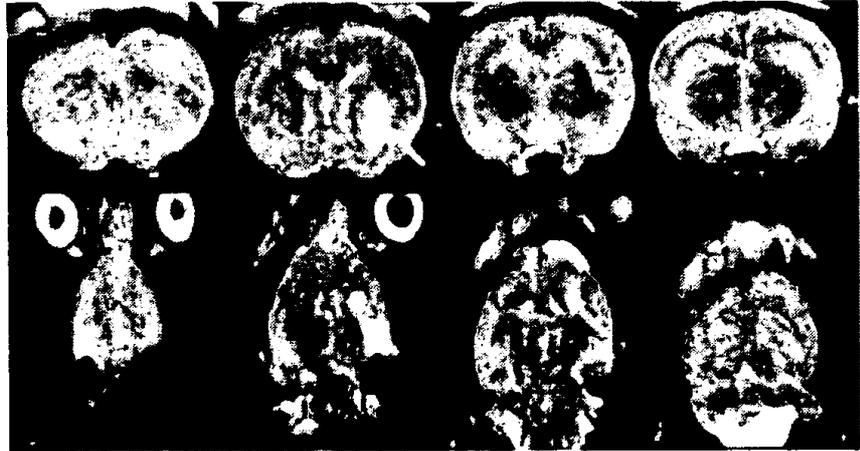
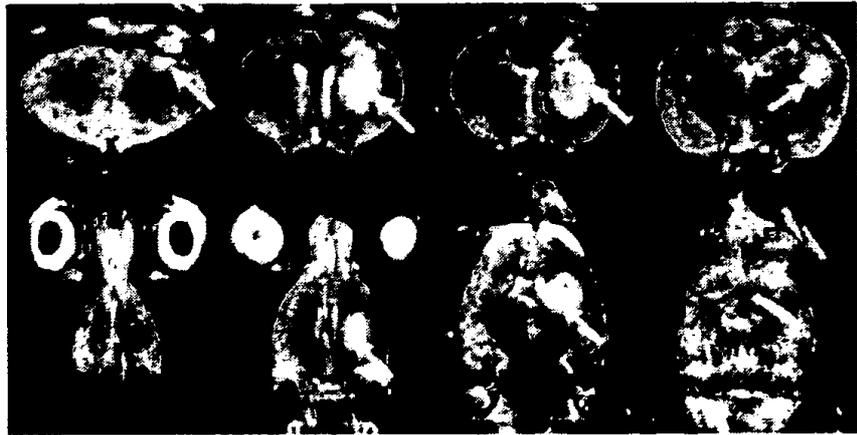


Fig. 11

C6/LacZ



C6/LacZ
+MSC



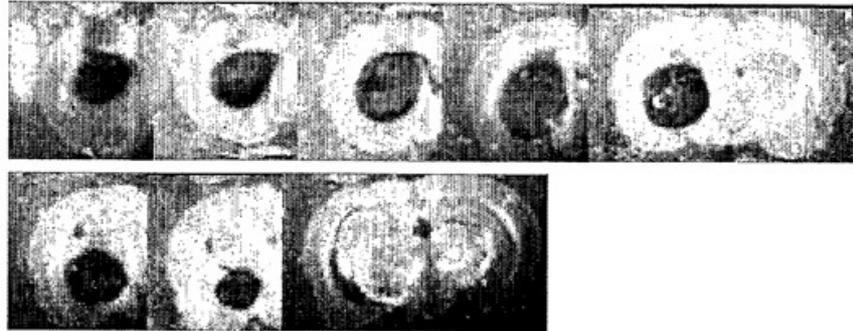
C6/LacZ
+MSC/CD



Fig. 12

Tinción con X-gal

C6/LacZ



C6/LacZ
+ MSC



C6/LacZ
+ MSC/CD

