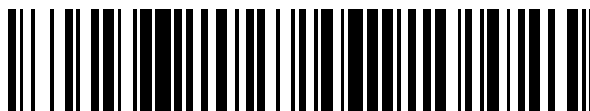


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 198**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2012 PCT/KR2012/004082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12161519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2012 E 12788729 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2714896**

54 Título: **Una estirpe de células madre adultas introducida con un gen de factor de crecimiento de hepatocitos y un gen de factor de transcripción neurogénico con un motivo hélice-bucle-hélice básico y usos de la misma**

30 Prioridad:

23.05.2011 KR 20110048628

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

08.11.2017

73 Titular/es:

**AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC
COOPERATION FOUNDATION (100.0%)
206 World Cup-ro Woncheon-dong Yeongtong-gu
Suwon-si, Gyeonggi-do 443-721, KR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 641 198 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

Una estirpe de células madre adultas introducida con un gen de factor de crecimiento de hepatocitos y un gen de factor de transcripción neurogénico con un motivo hélice-bucle-hélice básico y usos de la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una estirpe de células madre adultas, modificada mediante la introducción de un gen que codifica un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés) y un gen que codifica un factor de transcripción neurogénico de una familia de hélice-bucle-hélice básico (bHLH, por sus siglas en inglés) en una estirpe de células madre adultas, y a usos de la misma y, más en particular, a una estirpe de células madre adultas introducida con un gen de factor de crecimiento de hepatocitos y un gen de factor de transcripción neurogénico de una familia de hélice-bucle-hélice básico, a un procedimiento de preparación de la estirpe de células madre adultas, a una composición para la prevención o el tratamiento de enfermedades neurológicas que comprenden la estirpe de células madre adultas y a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades neurológicas que comprenden la etapa de administrar la composición a un sujeto que tiene enfermedades neurológicas o que se sospecha que tiene enfermedades neurológicas.

15 **Antecedentes de la técnica**

Las células madre mesenquimatosas (MSC, por sus siglas en inglés) son células del estroma que ayudan a la hematopoyesis en la médula ósea y tienen la capacidad de diferenciarse en una diversidad de células del linaje mesodérmico, incluyendo los osteocitos, los condrocitos, los adipocitos y los miocitos, manteniendo al mismo tiempo también una agrupación de células madre indiferenciadas y, por tanto, han ganado importancia como fuente celular de tejidos artificiales.

Como se ha informado que las MSC tienen un potencial para diferenciarse en células neurogliales en el cerebro, se ha propuesto que las MSC pueden utilizarse como fuentes para el tratamiento de enfermedades neurológicas en el sistema nervioso central.

25 Se ha sabido que varios factores de crecimiento u hormonas inducen la diferenciación de células indiferenciadas en células neuronales artificiales. Desafortunadamente, esos procedimientos tienen un problema de generación de células no neuronales junto con células neuronales, y el problema es más pronunciado cuando las células se trasplantan en este cerebro de animales de experimentación. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento directo de inducción de la diferenciación de las MSC en células neuronales.

30 La neurogenina, también denominada NeuroD, es un factor de transcripción que pertenece a la familia de hélice-bucle-hélice básico (bHLH) que desempeña funciones importantes en la formación del sistema nervioso, y forma un complejo con otras proteínas bHLH tales como E12 o E47 para unirse a secuencias de ADN que contienen la caja E (CANNTG) o, en raras ocasiones, a secuencias de ADN que contienen la caja N. Se ha descubierto que esta unión es crítica para que las proteínas bHLH activen la expresión génica específica de tejido que promueve la diferenciación neuronal.

35 Los presentes inventores se han esforzado para desarrollar un material estable que diferencia eficazmente las MSC en células neuronales. Como resultado, han descubierto inesperadamente que las MSC transducidas con factores de transcripción de bHLH, tales como neurogenina y neuroD, pueden expresar continuamente los factores de transcripción de bHLH; y que las MSC que expresan los factores de transcripción de bHLH pueden transdiferenciarse en un alto nivel de células neuronales cuando se trasplantan en el cerebro de animales de experimentación. Sobre la base de este hallazgo, informaron que se indujo la diferenciación de las MSC en células neuronales para obtener excelentes efectos terapéuticos en modelos animales de ictus, en comparación con las MSC no inducidas (patente coreana n.º 10-0519227).

45 El uso de las MSC en el tratamiento de enfermedades neurológicas es ventajoso en cuanto que es posible usar células autólogas en lugar de células heterólogas. En un procedimiento terapéutico práctico, sin embargo, el procedimiento tiene la desventaja de requerir de 2 a 4 semanas para el aislamiento y el cultivo de células autólogas y la transfección de genes, hasta la terapia con células autólogas después de la aparición del ictus. Por tanto, para abordar el problema del procedimiento clínico lento del trasplante de células autólogas después de la aparición del ictus, se han realizado muchos estudios para desarrollar un procedimiento de verificación y de maximización de las eficacias terapéuticas de las células autólogas en lesiones crónicas.

50 Se sabe que el HGF, también conocido como factor de dispersión, es una glicoproteína de unión a heparina que tiene una fuerte actividad antifibrótica en órganos tales como el hígado o el riñón (Silver y col., *Nat. Rev. Neurosci.*, 5: 146-156, 2004). Actualmente hay estudios en progreso del factor de crecimiento de hepatocitos para el tratamiento de enfermedades neurológicas incluyendo el ictus y la lesión de la médula espinal. Se han reportado sus efectos terapéuticos en enfermedades agudas, pero aún no se ha notificado un resultado satisfactorio en las enfermedades crónicas.

Divulgación de la invención**Problema técnico**

Los presentes inventores han hecho muchos esfuerzos para desarrollar una composición terapéutica para el ictus crónico, que comprende MSC introducidas con HGF como principio activo. Como resultado, descubrieron que las MSC introducidas con un factor de transcripción bHLH neurogenina 1 expresan continuamente el factor de transcripción bHLH, y las MSC introducidas adicionalmente con HGF mostraron efectos terapéuticos cuando se trasplantaron en modelos animales de ictus, completando de este modo la presente invención.

Solución al problema

Un objeto de la presente invención es proporcionar una célula madre mesenquimatosa, modificada mediante la introducción de un gen que codifica un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y un gen que codifica una neurogenina 1 o su fragmento activo en una célula madre mesenquimatosa.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de una célula madre mesenquimatosa modificada, que comprende las etapas de:

- (a) introducir un gen que codifica HGF que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 1 y un gen que codifica neurogenina 1 que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 2 en una célula madre mesenquimatosa cultivada;
- (b) seleccionar la célula madre mesenquimatosa modificada que se introduce con los dos genes que codifican el factor de crecimiento de hepatocitos y la neurogenina 1; y
- (c) cultivar la célula madre mesenquimatosa modificada seleccionada.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición que comprende una célula madre mesenquimatosa modificada mediante la introducción de un gen que codifica un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y un gen que codifica una neurogenina 1 o su fragmento activo en una célula madre mesenquimatosa o una célula madre mesenquimatosa modificada producida por el procedimiento descrito anteriormente, para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Efectos ventajosos de la invención

Las células madre adultas de acuerdo con la presente invención, que se introducen con un gen de HGF y un gen de factor de transcripción neurogénico de una familia de bHLH, pueden usarse para superar el deterioro crónico provocado por la muerte celular después del ictus. Por tanto, las células madre adultas pueden desarrollarse como un agente terapéutico novedoso o ampliamente utilizado en el ensayo clínico y en la investigación para la terapia de reemplazo celular y la terapia génica que son aplicables a las enfermedades neurológicas incluyendo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la lesión de la médula espinal, así como el ictus.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 son fotografías que muestran la diferenciación de las MSC en adipocitos, condrocitos y osteocitos, en la que la FIG. 1a es una fotografía de adipocitos diferenciados a partir de las MSC, teñidos con aceite rojo O, la FIG. 1b es una fotografía de condrocitos diferenciados a partir de las MSC, teñidos con azul alcian, y las FIG. 1c y 1d son fotografías de osteocitos diferenciados a partir de las MSC, teñidos con fosfatasa alcalina y von Kossa, respectivamente;

La FIG. 2 es el resultado de la transferencia Western (panel inferior) que muestra la expresión de neurogenina 1 humana en células 293T que se introdujeron con un vector retroviral (panel superior) que contenía el gen de neurogenina 1 humano;

La FIG. 3 es el resultado de la tinción inmunohistoquímica usando un anticuerpo TuJ1 marcador anti-neuronal (Beta-tubulina-III) para examinar la diferenciación neurogénica de las MSC dos semanas después de que las MSC introducidas con gen de neurogenina 1 humano se infectaran con adenovirus que expresaba GFP y se trasplantaran en el cuerpo estriado de rata albina;

La FIG. 4 es el resultado del análisis de la transferencia Western que muestra la expresión de HGF intracelular (lisado celular) y extracelular (medio acondicionado; MA) en las MSC introducidas con el vector adenoviral que expresaba HGF humano;

La FIG. 5 es una fotografía que muestra el resultado de la inmunocitoquímica para examinar el nivel de expresión de HGF en las MSC que se introdujeron con vector adenoviral que expresaba HGF humano diluido en serie;

La FIG. 6 son gráficos que muestran los resultados de los ensayos conductuales de animales incluyendo el Ensayo de retirada de adhesivo (panel izquierdo) y el Ensayo Rotarod (panel derecho) para evaluar la eficacia terapéutica de las MSC introducidas con gen de HGF humano y gen de neurogenina 1 humano en un modelo animal de ictus;

La FIG. 7 son fotografías que muestran los resultados de un análisis por IRM (panel superior) y cuantitativo de la región del infarto (panel inferior) para evaluar la eficacia terapéutica de las MSC introducidas con gen de HGF humano y gen de neurogenina 1 humano en un modelo animal de ictus;

La FIG. 8 es una fotografía que muestra el resultado de la inmunohistoquímica usando anticuerpos GFAP y

MAP2 para examinar células gliales y su patrón de expresión en la región del infarto después de un trasplante de MSC introducidas con gen de HGF humano y gen de neurogenina 1 humano; y

La FIG. 9 es un diagrama (panel superior) y un gráfico (panel inferior) que resumen las eficacias terapéuticas de las MSC introducidas con gen de HGF humano y gen de neurogenina 1 humano en un modelo animal de ictus de acuerdo con el tiempo de trasplante.

Mejor modo para realizar la invención

La presente divulgación describe una estirpe de células madre adultas, modificada mediante la introducción de un gen que codifica un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y un gen que codifica un factor de transcripción neurogénico de una familia de hélice-bucle-hélice básico (bHLH) en una estirpe de células madre adultas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre adulta" significa una célula indiferenciada que pueden diferenciarse en tipos celulares especializados del tejido si es necesario. La estirpe de células madre adultas es, pero no se limita particularmente a, preferentemente, una célula madre derivada de médula ósea, tejido adiposo, sangre, sangre de cordón umbilical, hígado, piel, tracto gastrointestinal, placenta, útero o fetos abortados, más preferentemente una estirpe de células madre adultas derivada de médula ósea, y mucho más preferentemente un MSC derivada de médula ósea. La célula madre adulta derivada de médula ósea incluye una diversidad de células madre adultas, tales como las MSC y las células madre hematopoyéticas capaces de producir células sanguíneas y linfocitos. Entre ellas, las MSC son capaces de proliferar fácilmente *ex vivo* y de diferenciarse en una diversidad de tipos celulares (adipocitos, condrocitos, miocitos y osteocitos). Por tanto, pueden usarse como una diana útil en terapia génica y celular, pero el uso de las mismas no se limita particularmente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF)", también conocido como factor de dispersión, significa un polipéptido heterodimérico multifuncional producido por células mesenquimatosas. El HGF se compone de una cadena alfa de 69 kDa que contiene el dominio dedo N-terminal y cuatro dominios Kringle, y una cadena beta de 34 kDa que tiene una similitud con los dominios proteasa de la proteasa de serina similar a quimotripsina. El HGF humano se sintetiza como un precursor monocatenario biológicamente inactivo que consiste en 728 aminoácidos. El HGF biológicamente activo se consigue a través de la escisión en el residuo R494 por una proteasa de serina sérica específica. El HGF activo es un heterodímero que se compone de una cadena alfa de 69 kDa y una cadena beta de 34 kDa unidas a través de un enlace disulfuro. En la presente invención, el HGF se introduce en la estirpe de células madre adultas para obtener una estirpe celular transformada. Se conoce una secuencia de nucleótidos que codifica el HGF preferido (N.º de Referencia de GenBank NM_000601.4 166-2352 o BC130286.1 (76-2262)).

Como se usa en el presente documento, la expresión "hélice-bucle-hélice básico (bHLH)" expresa la forma de factores de transcripción y se refiere a una forma de dos hélices conectadas por un bucle. Se sabe que los factores de transcripción de bHLH desempeñan funciones importantes en la expresión génica de organismos multicelulares.

Los factores de transcripción de bHLH son, pero no se limitan particularmente a, preferentemente factores de transcripción neurogénicos y más preferentemente el gen de neurogenina 1 (N.º de Referencia de GenBank: U63842, U67776), el gen de neurogenina 2 (N.º de Referencia de GenBank: U76207, AF303001), el gen de neuro D1 (N.º de Referencia de GenBank: U24679, AB018693), el gen Mash1 (N.º de Referencia de GenBank: M95603, L08424), el gen de MATH3 (N.º de Referencia de GenBank: D85845), el gen de E47 (N.º de Referencia de GenBank: M65214, AF352579) o similares. Además, puede usarse el factor de transcripción neurogénico que tiene una alteración, una delección o una sustitución en una parte de la secuencia de polinucleótidos, a condición de que muestre una actividad equivalente o similar a la del factor de transcripción neurogénico.

Las MSC introducidas con el gen de factor de transcripción de bHLH tienen el potencial de diferenciarse en células neuronales en lugar del potencial de diferenciarse en osteocitos, miocitos, adipocitos y condrocitos, y son capaces de diferenciarse en células neuronales en condiciones particulares *in vitro*. De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, se prepararon células madre adultas introducidas con el gen de HGF y el gen de neurogenina 1, y se descubrió se diferencian eficazmente en células neuronales cuando se trasplantan en el tejido cerebral de animales de experimentación (FIG. 3).

Como se usa en el presente documento, la expresión "estirpe de células madre adultas introducida con el gen de HGF y el gen del factor de transcripción neurogénico de la familia de bHLH" se refiere a una estirpe de células madre adultas que se introduce con el gen HGF y el gen del factor de transcripción neurogénico de la familia de bHLH descritos anteriormente, preferentemente una estirpe de células madre adultas que se introduce con el gen de HGF de la SEQ ID NO. 1 y el gen de neurogenina 1 de la SEQ ID NO. 2. Sin embargo, la estirpe de células madre adultas no se limita particularmente a la misma, a condición de que conserve la capacidad de diferenciarse en células neuronales.

Con respecto a los objetos de la presente invención, es de preferencia que el gen de HGF se clone en un vector y después se introduzca en la célula madre adulta.

Como se usa en el presente documento, el término "vector", que describe un vector de expresión capaz de expresar una proteína diana en una célula hospedadora adecuada, se refiere a una construcción genética que incluye

elementos reguladores esenciales a los que un inserto génico se une operativamente de manera que se exprese.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína deseada y una secuencia de control de expresión de ácidos nucleicos de una manera que permita funciones generales. La unión operativa puede prepararse usando una técnica recombinante genética que se bien conocida en la técnica, y puede realizarse la escisión de ADN específica de sitio y la ligadura puede realizarse usando enzimas que sean conocidas generalmente en la técnica. El vector es, pero no se limita particularmente a, preferentemente un vector de plásmido, un vector de cósmido, un vector viral y, más preferentemente, vectores víricos derivados de VIH (virus de inmunodeficiencia humano), MLV (virus de la leucemia murina), ASLV (sarcoma aviar/leucosis), SNV (virus de la necrosis esplénica), RSV (virus del sarcoma de Rous), MMTV (virus del tumor mamario de ratón), MSV (virus del sarcoma murino), adenovirus, virus adeno-asociado, virus del herpes simple o similares.

De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, para la introducción del gen de neurogenina 1 humano, la región de codificación (55 a 768 pb) en la secuencia del gen N.º de Referencia de GenBank U63842 de la FIG. 2 se clonó en un plásmido pMSCV-puro para preparar un vector recombinante pMSCV/Puro-hNgn1, y el vector recombinante obtenido se introdujo en una estirpe celular que produce retrovirus para preparar un vector retrovírico. Después, el vector retrovírico obtenido se introdujo en una estirpe de MSC derivada de médula ósea para preparar una célula madre adulta transformada.

De acuerdo con otro ejemplo de la presente invención, para la introducción del gen de HGF, la región codificante (166-2352 pb) en la secuencia del gen del N.º de Referencia de GenBank NM_000601.4 se clonó en pShuttle-CMV, y después se preparó un vector recombinante pAd-HGF por recombinación con pAdEasy-1. El vector recombinante se linealizó por escisión con la enzima de restricción *PacI* y el vector recombinante linealizado se introdujo en una estirpe celular productora de adenovirus para preparar un vector Adeno-HGF. Después, el vector Adeno-HGF obtenido se introdujo en una estirpe de MSC derivada de médula ósea para preparar una célula madre adulta transformada.

La introducción del gen en la célula madre adulta descrita en el presente documento se realiza, pero no se limita particularmente a, por transformación, y la transformación puede realizarse fácilmente por el procedimiento típico conocido en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la alteración genética artificial por introducción de un DNA extraño o un vector viral que contiene ADN extraño en una célula hospedadora, ya sea como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica. Generalmente, el procedimiento de transformación incluye la infección usando retrovirus y adenovirus, precipitación con CaCl_2 del ADN, un procedimiento de Hanahan que es un procedimiento con CaCl_2 mejorado mediante el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como material reductor, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, agitación usando fibra de carburo de silicio, transformación mediada por *Agrobacterium*, PEG-, sulfato de dextrano-, lipofectamina- y transformación mediada por desecación/inhibición. De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, la transformación se realizó por introducción del vector retrovírico que contenía neurogenina y el vector Adeno-HGF que contenía el gen de HGF en células madre.

También se describe en el presente documento un procedimiento de preparación de la estirpe de células madre adultas que se introduce con el gen de HGF y el gen neurogénico 1.

Como se ha descrito anteriormente, el tipo de la estirpe de células madre adultas introducida con el gen de HGF y el gen neurogénico 1 no se limita particularmente, y puede usarse cualquier estirpe celular como la estirpe celular de la presente invención, a condición de que tenga el potencial de diferenciarse en los tipos celulares especializadas del tejido.

Preferentemente, la estirpe de células madre adultas puede ser una estirpe de células madre adultas derivada de médula ósea, tejido adiposo, sangre, sangre de cordón umbilical, hígado, piel, tracto gastrointestinal, placenta, útero o fetos abortados. Más preferentemente, la estirpe de células madre adultas es una estirpe de células madre adultas derivada de médula ósea. Mucho más preferentemente, la estirpe de células madre adultas es una estirpe de MSC derivada de médula ósea.

La introducción de un gen particular en una estirpe de células madre puede realizarse mediante el uso de un procedimiento de transformación. Como se ha descrito anteriormente, puede usarse un procedimiento de transformación típico conocido en la técnica sin limitación. De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, se preparó una estirpe de células madre adultas transformada mediante la introducción del MSCV-puro/hNgn1 y Adeno-HGF en la estirpe de células madre adultas. Después de la transfección de las MSC con el gen MSCV-puro/hNgn1, se usó puomicina para la selección. Después de la transfección de las MSC con Adeno-HGF, se usó un anticuerpo HGF para examinar su expresión y se determinó y se usó la multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés).

El procedimiento de producción de la estirpe de células madre adultas derivada de médula ósea introducida con el gen de HGF y el gen de neurogenina 1 de la presente invención puede incluir las siguientes etapas:

(a) introducir un gen que codifica el factor de crecimiento de hepatocitos que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 1 y un gen que codifica neurogenina 1 que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 2 en células madre adultas cultivadas;

(b) seleccionar la célula madre adulta modificada que se introduce con los dos genes que codifican el factor de crecimiento de hepatocitos y la neurogenina 1; y

(c) cultivar la célula madre adulta modificada seleccionada.

En el procedimiento de producción de la estirpe de células madre adultas derivada de médula ósea que se introduce con el gen de HGF y el gen de neurogenina 1, la introducción del gen que codifica el factor de crecimiento de hepatocitos y el gen que codifica neurogenina 1 se realiza de forma secuencial o en orden inverso, o simultáneamente, pero el orden y el procedimiento no se limitan particularmente.

De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, entre las células madre adultas, se aislaron MSC derivadas de médula ósea. Las MSC aisladas se cultivaron en un medio DMEM que contenía FBS al 10 %, bFGF 10 ng/ml y penicilina al 1 %/estreptomycin y se subcultivaron hasta cuatro pases para su uso en los experimentos.

En la etapa de transformación con el gen de neurogenina 1, el gen de neurogenina 1 se unió al vector pMSCV-puro usando ADN ligasa T4 y se transformó en *E. coli* DH5 α . Por último, se preparó un vector pMSCV-puro/hNgn1 por inserción del gen de hNgn1 en el vector de pMSCV-puro y el gen de neurogenina 1 se introdujo en la estirpe celular subcultivada. Las células introducidas con neurogenina 1 se subcultivaron en el medio que contenía 2 μ g/ml de puomicina durante 2 semanas de manera que se seleccionaran las células supervivientes introducidas con neurogenina 1. Por último, se preparó una estirpe celular que expresaba neurogenina 1 continuamente mediante el procedimiento anterior.

En la etapa de transformación con el gen de HGF, el pShuttle-CMV-HGF clonado con HGF y pAdEasy-1 se co-transformaron en *E. coli* (cepa BJ 5183) por electroporación y después se cultivaron en un medio que contenía kanamicina (50 μ g/ml) hasta que se formaron colonias. Los plásmidos se obtuvieron a partir de cada colonia y las colonias candidatas se seleccionaron por digestión con enzimas de restricción convencionales. Se analizó la secuencia de bases para obtener pAd-HGF. El pAd-HGF se linealizó por escisión con la enzima de restricción *PacI* y se introdujo en células HEK293 por precipitación con CaCl_2 para obtener un caldo de cultivo que contenía virus adeno-HGF. Con el fin de seleccionar una estirpe de MSC en la que se introdujo HGF satisfactoriamente, se examinó la expresión de proteína de HGF por tinción inmunocitoquímica usando un anticuerpo contra HGF.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición que comprende la estirpe de células madre mesenquimatosas introducida con el gen de HGF y el gen de neurogenina 1 para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedades neurológicas" se refiere a una diversidad de enfermedades asociadas a los nervios, en particular, los nervios craneales. Las enfermedades neurológicas pueden ser, pero no se limitan particularmente a, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la epilepsia, la esquizofrenia, el ictus agudo, el ictus crónico o la lesión de la médula espinal y preferentemente el ictus crónico.

Como se usa en el presente documento, el término "prevención" se refiere a todas las acciones en las que la aparición de enfermedades neurológicas o enfermedades asociadas a las mismas se evita o se retarda mediante la estirpe de células madre adultas introducida con el gen de HGF y el gen de neurogenina 1.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a todas las acciones en las que los síntomas de las enfermedades neurológicas o enfermedades asociados a las mismas se han dado la vuelta a mejor o se han modificado favorablemente mediante la estirpe de células madre adultas introducida con el gen de HGF y el gen de neurogenina 1.

Las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de neurogenina 1 de la presente invención pueden existir en forma de una composición farmacéutica que incluya las MSC para el tratamiento.

Mientras tanto, la composición de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que incluya adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable puede prepararse en una formulación oral o parenteral. Pueden prepararse formulaciones usando diluyentes o excipientes empleados habitualmente, tales como una carga, un expansor, un aglutinante, un agente humectante, un agente disgregante y un tensioactivo. Los ejemplos de preparación sólida para la administración oral incluyen un comprimido, una píldora, un polvo, un gránulo y una cápsula, y la preparación sólida puede prepararse mezclando uno o más compuestos con al menos un excipiente tal como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa y gelatina. Adicionalmente, además de los excipientes, pueden usarse lubricantes tales como estearato de magnesio y talco. Los ejemplos de una preparación líquida para la administración oral incluyen una suspensión, un líquido para su uso interno, una emulsión y un jarabe, y pueden estar contenidos diversos excipientes tales como un agente humectante, un edulcorante, un aromatizante y un conservante, además de diluyentes generales tales como agua y parafina líquida. Los ejemplos de preparación para la administración parenteral pueden incluir una solución aséptica acuosa, un disolvente no acuoso, una suspensión, una emulsión, un

agente liofilizado y supositorios. Como disolvente no acuoso y suspensión, pueden usarse propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva y un éster inyectable tal como oleato de etilo. Como base de supositorio, pueden usarse Witepsol, macrogol, tween 61, manteca de cacao, mantequilla láurica, glicerogelatina o similares. La composición farmacéutica puede formularse en cualquier preparación seleccionada entre el grupo que

consiste en un comprimido, una píldora, un polvo, un gránulo y una cápsula, una suspensión, un líquido para su uso interno, una emulsión y un jarabe, una solución acuosa aséptica, un disolvente no acuoso, una suspensión, una emulsión, un agente liofilizado y supositorios.

En el presente documento también se describe un procedimiento para el tratamiento de enfermedades neurológicas, que comprende la etapa de administrar la composición a un sujeto que tiene enfermedades neurológicas o que se sospecha que tiene enfermedades neurológicas.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a organismos vivos que tienen sistema nervioso y, por tanto, son susceptibles a las enfermedades neurológicas descritas anteriormente provocadas por diversos factores, y preferentemente a mamíferos.

Como se usa en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a ratón, rata, conejo, perro, gato y especialmente seres humanos, y se refiere a cualquier organismo de la clase "Mammalia" de vertebrados superiores que alimentan a sus crías con leche secretada por las glándulas mamarias.

La composición de la presente invención puede administrarse a un sujeto a través de cualquiera de las vías comunes, a condición de que sea capaz de alcanzar un tejido deseado. Se contempla una diversidad de modos de administración, incluyendo por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía oral, por vía intranasal, por vía intrapulmonar y por vía intrarrectal, pero la presente invención no se limita a estos modos de administración ejemplificados. Además, la composición de la presente invención puede usarse individualmente o en combinación con terapia hormonal, terapia con fármacos y reguladores de la respuesta biológica con el fin de presentar efectos antioxidantes.

Además, la composición de la presente invención puede administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para el tratamiento de enfermedades, que es coherente con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable para el tratamiento médico. Una dosificación eficaz de la presente composición puede determinarse en función del sujeto y la gravedad de las enfermedades, la edad, el género, la actividad del fármaco, la sensibilidad a los fármacos, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la duración del tratamiento, los fármacos utilizados de forma simultánea y otros factores conocido en medicina. La composición de la presente invención puede administrarse como un único agente terapéutico o en combinación con otros agentes terapéuticos y puede administrarse secuencialmente o simultáneamente con agentes terapéuticos convencionales. Esta administración puede proporcionarse en dosis únicas o múltiples. Teniendo en cuenta todos los factores, es importante realizar la administración de dosis mínimas capaces de proporcionar los mayores efectos sin ningún efecto adverso, dichas dosis se determinan fácilmente por los expertos en la materia.

Además, la composición de la presente invención puede usarse individualmente o en combinación con la operación quirúrgica, la terapia hormonal, la terapia con fármacos y los reguladores de la respuesta biológica con el fin de prevenir o tratar enfermedades inflamatorias.

Modo para la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los Ejemplos.

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de las MSC

Ejemplo 1-1: Aislamiento de las MSC

Se añadieron 4 ml de HISTOPAQUE 1077 (Sigma) y 4 ml de médula ósea obtenida del banco de médula ósea (Korean Marrow Donor Program, KMDP) a un tubo de ensayo esterilizado de 15 ml y se realizó una centrifugación usando una centrífuga a temperatura ambiente y 400 x g durante 30 minutos. Después de la centrifugación, se recogieron cuidadosamente 0,5 ml de la capa leucocitaria situada en la interfase usando una pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 10 ml de solución salina tamponada con fosfato esterilizada (PBS). La capa leucocitaria transferida se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos para retirar el sobrenadante y se añadieron 10 ml de tampón de fosfato a la misma para obtener una suspensión, que se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos.

El procedimiento anterior se repitió dos veces y se añadió un medio DMEM (Gibco) que contenía FBS al 10 % (Gibco) al precipitado resultante. Una porción de la solución resultante correspondiente a 1×10^7 células se colocó en una placa de 100 mm y se incubó a 37 °C durante 4 horas mientras se suministraba un 5 % de CO₂ y un 95 % de aire. Después se retiró el sobrenadante para retirar las células que no están fijadas al fondo de la placa de cultivo y se añadió un nuevo medio para continuar el cultivo.

Ejemplo 1-2: Cultivo de las MSC

Las MSC aisladas en el Ejemplo 1-1 se incubaron en una incubadora de CO₂ mantenida a 37 °C, mientras se cambiaba un medio de MSC (FBS al 10 % + 10 ng/ml de bFGF (Sigma) + penicilina al 1 % /estreptomicina (Gibco) + DMEM al 89 %) a un intervalo de 2 días. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 80 % de confluencia, las células se recogieron usando tripsina al 0,25 %/EDTA 0,1 mM (GIBCO) y se diluyeron 20 veces con el medio y después se subcultivaron en los nuevos platos. El resto de las células obtenidas de este modo se mantuvieron congeladas en un medio que contenía DMSO al 10 % y sus potenciales de diferenciarse en adipocitos, condrocitos, osteocitos y se examinaron como se indica a continuación.

Ejemplo 1-3: Diferenciación adipogénica

Se cultivaron MSC en el medio de MSC durante un período de tiempo predeterminado, seguido de cultivo en un medio de inducción de la diferenciación adipogénica (medio DMEM que contenía dexametasona 1 µM (Sigma), metil-iso-butilxantina 0,5 µM (Sigma), insulina 10 µg/ml (GIBCO), indometacina 100 nM (Sigma) y FBS al 10 %) durante 48 horas. La mezcla resultante se incubó posteriormente 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 (FIG. 1a). La FIG. 1a es una fotografía de los adipocitos diferenciados a partir de las MSC, que se tiñeron con aceite rojo O. Como se muestra en la FIG. 1a, se observaron gotitas de lípidos teñidas con rojo dentro de las células, lo que indica que las MSC se diferenciaron satisfactoriamente en adipocitos.

Ejemplo 1-4: Diferenciación condrogénica

Se cultivaron MSC en el medio de MSC durante un período de tiempo predeterminado y se recogieron 2×10^5 de las células usando tripsina y se transfirieron a un tubo de ensayo, se centrifugaron y, después, se volvieron a incubar en 0,5 ml de un medio de inducción de diferenciación condrogénica sin suero (50 ml de DMEM de alta glucosa (GIBCO), 0,5 ml de 100 x ITS (0,5 mg/ml de insulina bovina, 0,5 mg/ml de transferrina humana, 0,5 mg/ml de selenato de sodio (Sigma), 50 µl de ácido linoléico-albúmina (Sigma), dexametasona 0,2 mM 100 nM y TGF-beta1 10 ng/ml (Sigma)) durante 3 semanas mientras se reemplaza el medio cada 3 días. Después, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se seccionaron usando un microtomo y después se tiñeron con azul alcian (FIG. 1b). La FIG. 1b es una fotografía de condrocitos diferenciados a partir de las MSC, que se tiñeron con azul alcian. Como se muestra en la FIG. 1b, la matriz de cartílago extracelular se tiñó de azul y se observó la presencia de condrocitos en lagunas de cartílago, lo que indica que las MSC se diferenciaron en condrocitos.

Ejemplo 1-5: Diferenciación osteogénica

Se cultivaron MSC en el medio de MSC durante un período de tiempo predeterminado, seguido de cultivo en un medio de inducción de la diferenciación osteogénica (DMEM que contenía fosfato de beta-glicerol 10 mM (Sigma), ascorvato-2-fosfato 0,2 mM (Sigma), dexametasona 10 nM y FBS al 10 %) durante 2 semanas, mientras que se reemplazaba el medio cada 3 días. Después, las células se fijaron con paraformaldehído y se tiñeron con von Kossa y fosfatasa alcalina (AP) (FIG. 1c y 1d). Las FIG. 1c y 1d son fotografías de osteocitos diferenciados a partir de las MSC, que se tiñeron con fosfatasa alcalina y von Kossa, respectivamente. Como se muestra en las FIG. 1c y 1d, la acumulación extracelular de minerales de calcio en forma de hidroxiapatita y el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina intracelular sugieren que las MSC se diferenciaban en osteocitos.

Ejemplo 2: Construcción y expresión de retrovirus de factor de transcripción neurogénico humano, neurogenina 1**Ejemplo 2-1: Construcción de vector retrovítico que expresa neurogenina 1 humana**

La secuencia de la SEQ ID NO. 2 que correspondía a la región codificante (55-768 pb) en la secuencia del gen U63842 se unió en un vector pMSCV-puro (Clontech) usando ADN ligasa T4 (Roche) y después se transformó en *E. coli* DH5α para construir finalmente un vector pMSCV-puro/hNgn1 en el que se insertó el gen de neurogenina 1 humano (hNgn1) en el vector pMSCV-puro. El vector pMSCV-puro/hNgn1 construido se introdujo en células 293T por precipitación con fosfato de calcio y la expresión se examinó mediante transferencia Western (FIG. 2). La FIG. 2 es el resultado de la transferencia Western (panel inferior) que muestra la expresión de hNgn1 en células 293T que se introdujo con un vector retrovítico (panel superior) que contenía el gen hNgn1.

Ejemplo 2-2: Preparación de retrovirus que contenía neurogenina 1

El vector pMSCV-puro/hNgn1 se introdujo en una célula de empaquetamiento retrovítico, PA317 (ATCC CRL-9078) o PG13 (ATCC CRL-10686) de acuerdo con el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio. Después de 48 horas, la solución de cultivo se recogió y se filtró con una membrana de 0,45 µm para obtener una solución retrovirus. La solución de retrovirus se mantuvo a -70 °C hasta su uso.

Ejemplo 3: Construcción de MSC introducidas con el gen de neurogenina 1 y diferenciación neuronal *in vivo***Ejemplo 3-1: Introducción de neurogenina 1 en las MSC**

Se cultivaron MSC al 70 % de confluencia en placas de cultivo de 100 mm. Se añadieron a las mismas 4 ml de la solución de retrovirus de neurogenina 1 obtenida en el Ejemplo 2-2, que se mezcló con polibreno (Sigma) a una concentración final de 8 µg/ml y se incubó durante 8 horas. Después, la solución retrovirus se retiró y las MSC se cultivaron en 10 ml de medio de MSC durante 24 horas, seguido de la reinfección del retrovirus. El procedimiento anterior se repitió 1-4 veces. Después, se recogieron las MSC usando tripsina y se diluyeron 20 veces con el medio. Las células obtenidas se subcultivaron en un medio suplementado con 2 µg/ml de puomicina (Sigma) durante 2 semanas de manera que se seleccionaran las células supervivientes infectadas con retrovirus. Por último, las MSC que tenían una resistencia a la puomicina se usaron como células que expresaban neurogenina 1.

Ejemplo 3-2: Marcado de células para trasplante

Con el fin de examinar si el gen de neurogenina 1 aumenta la tasa de trasplante y la diferenciación neuronal, las MSC introducidas con el gen hNgn1 se infectaron con adenovirus que expresaba GFP.

La transfección del adenovirus se realizó mediante la adición de la solución de adenovirus que tenía un título de 1×10^8 PFU/ml con 100 MOI ya descrita anteriormente durante 3 horas. Después de la transfección del adenovirus, se recogieron las MSC introducidas con neurogenina 1 usando tripsina al 0,25 %/EDTA al 0,1 % y se diluyeron con PBS a 3×10^3 células por 1 µl.

Ejemplo 3-3: Trasplante

El trasplante se realizó usando ratas Sprague-Dawley hembras albinas adultas (250 g) (Dae Han Bio Enlace Co., Ltd) como se indica a continuación:

En primer lugar, se anestesiaron las ratas albinas con una inyección intraperitoneal de ketamina 75 mg/kg y Rumpun 5 mg/kg, se retiró el pelo en la región de la incisión y después las orejas y la boca se fijaron a un marco estereotáxico. El vértice se esterilizó con etanol al 70 % y se hizo una incisión de aproximadamente 1 cm. Posteriormente, se puso 1 µl de PBS que contenía 3×10^3 de MSC que expresaba hNgn1 (MSC/hNgn1) en una jeringuilla Hamilton de 10 ml, que se colocó en un bastidor de jeringuillas Hamilton. Después de la perforación en la duramadre expuesta en las posiciones de bregma AP, + 1,0; ML 3.0; LV, + 4,0, se inyectó 1 µl de las células a una tasa de 0,2 µl/min usando una jeringuilla Hamilton. Veinte minutos después de la inyección, la jeringuilla se retiró lentamente. La incisión se suturó usando un hilo y una aguja esterilizados y se desinfectó usando un desinfectante. Se administraron 5 mg/kg de una ciclosporina A inmunosupresora (Sigma) a diario por inyección intraperitoneal hasta que se extrajo el cerebro.

Ejemplo 3-4: Preparación de corte de tejido

Dos semanas después del trasplante, las ratas albinas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina 75 mg/kg y Rumpun 5 mg/kg. Los pechos se abrieron y se realizó un lavado por perfusión usando solución salina a través del ventrículo izquierdo. La fijación por perfusión se realizó usando paraformaldehído en solución de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Se extrajeron los cerebros y se posfijaron en la misma solución de fijación a 4 °C durante 16 horas. El cerebro posfijado se depositó en sacarosa al 30 % durante 24 horas y se seccionó usando un microtomo de deslizamiento con un espesor de 35 µm. Las secciones obtenidas de este modo se montaron en portaobjetos revestidos de silano (MUTO PUREW CHEMICALS CO., LTD, Japón) y se almacenaron a 4 °C en PBS hasta su uso. Las secciones de tejido montadas sobre portaobjetos se sumergieron en 1 x PBS/Triton X-100 al 0,1 % durante 30 minutos.

Ejemplo 3-5: Inmunohistoquímica

En primer lugar, para bloquear la interacción no específica, la sección de tejido se hizo reaccionar con suero de caballo normal al 10 % (NHS) a temperatura ambiente durante 1 hora y después se hizo reaccionar a 4 °C durante 16 horas con anticuerpos primarios de anticuerpo contra MAP2 (proteína 2 asociada a microtúbulos) y anticuerpo contra GFP cada uno diluido a 1:200. Después de lavar tres veces con 1 x PBS/Triton X-100 al 0,1 % durante 15 minutos, las secciones se dejaron reaccionar con anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Vector, 1:200) para detectar el anticuerpo primario contra GFP o anti-IgG de ratón conjugado con rojo de Tejas (Vector, 1:200) para detectar el anticuerpo primario MAP2 (FIG. 3). La FIG. 3 es el resultado de la inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-marcador neuronal TuJ 1 (beta-tubulina-III) para examinar la diferenciación neurogénica de las MSC dos semanas después de que las MSC introducidas con el gen hNgn1 se infectaran con adenovirus que expresaba GFP y se trasplantaron en el cuerpo estriado de rata albina. Como se muestra en la FIG. 3, las células que expresaban GFP y las células que expresaban MAP2 estaban solapadas, lo que indica que las MSC introducidas con el gen de neurogenina 1 se diferenciaron en células neuronales.

Ejemplo 4: Construcción y expresión de vector adenovírico introducido con gen de HGF**Ejemplo 4-1: Construcción de vector adenovírico que expresa HGF**

La secuencia de bases de la SEQ ID NO. 1 correspondiente a la región codificante (166-2352 pb) en la secuencia del gen del N.º de referencia de GenBank NM_000601.4 se introdujo en un vector pShuttle-CMV para preparar un pShuttle-CMV-HGF. Este vector y pAdEasy-1 se co-transformaron en *E. coli* (cepa BJ 5183) por electroporación y se cultivaron en un medio que contenía kanamicina (50 µg/ml) hasta que se formaron colonias. Se obtuvieron plásmidos a partir de cada colonia y las colonias candidatas se seleccionaron por digestión con enzimas de restricción convencionales. La secuencia de bases se analizó para obtener un vector pAd-HGF que tiene HGF. El pAd-HGF se linealizó por escisión con la enzima de restricción *PacI* y se introdujo en células HEK293 por precipitación con CaCl_2 para obtener un caldo de cultivo que contenía virus adeno-HGF.

Ejemplo 4-2: Análisis de transferencia Western de la expresión de HGF en adenovirus

Con el fin de examinar si HGF se expresaba normalmente en el adenovirus introducido con el gen de HGF, las MSC se infectaron con el adenovirus a diversas concentraciones durante 2 horas y el HGF producido se analizó a niveles de proteína intracelular (lisado celular) y proteína extracelular (medio acondicionado; MA) mediante transferencia Western (FIG. 4). La FIG. 4 es el resultado del análisis de la transferencia Western que muestra la expresión de HGF intracelular (lisado celular) y extracelular (medio acondicionado; MA) en las MSC introducidas con un vector adenovírico que expresaba HGF humano. Como se muestra en la FIG. 4, el HGF intracelular se produjo en proporción a la concentración de adenovirus que expresaba HGF infectado en las MSC.

Ejemplo 4-3: Inmunocitoquímica de la expresión de HGF mediada por adenovirus

Se realizó una inmunocitoquímica con el fin de examinar la expresión intracelular de HGF. Se infectaron MSC con adenovirus que expresaba HGF a diversas concentraciones, se fijaron con formol al 4 % durante 10 minutos y se hicieron reaccionar con suero normal de cabra (NGS) al 10 % a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear la interacción no específica. Se usó anticuerpo contra HGF diluido a 1:200 como anticuerpo primario y se hizo reaccionar a 4 °C durante 16 horas, seguido de lavado con 1 x PBS/Triton X-100 al 0,1 % durante 15 minutos tres veces. Para detectar el anticuerpo primario contra HGF, las células se tiñeron con Alexa 488-anticuerpo secundario Ig-G de ratón conjugado (Invitrogen) diluido a 1:250 y los núcleos se tiñeron simultáneamente con Hoechst (FIG. 5). La FIG. 5 es una fotografía que muestra el resultado de la inmunocitoquímica para examinar el nivel de expresión de HGF en las MSC que se introdujeron con el vector adenovírico diluido en serie que expresaba HGF humano. Como se muestra en la FIG. 5, el HGF intracelular se produjo en proporción a la concentración de adenovirus que expresaban HGF infectados en las MSC.

Ejemplo 5: Introducción del gen de HGF en las MSC introducidas con gen de neurogenina 1 humano y trasplante del mismo en un modelo animal de ictus**Ejemplo 5-1: Introducción del gen de HGF en MSC introducidas con gen de hNgn1**

Se cultivaron MSC introducidas con el gen de hNgn1, hasta que las células alcanzaron aproximadamente el 70 % de confluencia en una placa de cultivo de 100 mm. La transfección se realizó mediante la adición de solución de adenovirus que expresaba HGF obtenida en el Ejemplo 4 con 50 MOI durante 2 horas. Las MSC se lavaron con PBS tres veces y después las MSC se desprendieron de la placa de cultivo usando tripsina.

Ejemplo 5-2: Preparación de modelo animal de ictus

Se anestesiaron ratas SD macho adultas que pesaban de 200 g a 250 g con gas isoflurano al 5 % que contenía N_2O al 70 % y O_2 al 30 %. La arteria carótida común derecha (ACC), la arteria carótida externa derecha (ACE) y la arteria carótida interna derecha (ACI) se expusieron a través de una incisión de línea media ventral en el cuello y se insertó de aproximadamente 20 mm a 22 mm de sutura de nylon 4-0 desde la ACC a la ACI para ocluir la arteria cerebral media derecha (ACM). Después de 120 minutos, se retiró la sutura de nylon. Durante la operación, la temperatura corporal de las ratas se mantuvo a 37,8 °C y todos los instrumentos quirúrgicos se esterilizaron antes de su uso.

Ejemplo 5-3: Trasplante de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 en un modelo animal de ictus

4 semanas después de la inducción del ictus, se colocaron ratas albinas en un aparato estereotáxico y se trasplantaron $5,0 \times 10^5$ de MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 a una tasa de 0,5 µl/min en las posiciones de bregma AP = + 0,5 mm, ML = 3,5 mm, DV = 5,0 mm y AP = -1,0 mm, ML = 3,0, DV = 2,5 mm usando una jeringuilla Hamilton de calibre 25.

Cinco minutos después del trasplante, la jeringuilla Hamilton se retiró. Además de las MSC que expresan el gen de HGF y el gen de hNgn1, se usaron las MSC normales, las MSC normales introducidas con el gen de HGF, las MSC introducidas con hNgn1 y PBS para el trasplante de células.

Ejemplo 6: Introducción del gen de HGF en las MSC introducidas con el gen de Neurogenina 1 humano y evaluación de sus eficacias en el modelo animal de ictus

Ejemplo 6-1: Establecimiento de criterios para la evaluación de la eficacia de la MSC en el modelo animal ictus

- 5 Para evaluar la eficacia de las MSC trasplantadas en animales con lesión cerebral, se realizaron ensayos de IRM y conductuales. Se indujo un ictus en ratas albinas por oclusión de la arteria cerebral media. Después de 4 semanas, se realizaron IRM 3.0T y los ensayos conductuales para seleccionar animales con lesión cerebral uniforme y se trasplantaron MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 al mismo.
- 10 Las ratas albinas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina 75 mg/kg y Rumpun 5 mg/kg y se realizó una exploración por IRM del cerebro de rata usando un escáner de IRM 3.0T equipado con un sistema de gradiente capaz de 35 militeslas/m. Se usó una secuencia de imágenes de eco de spin rápido para obtener imágenes anatómicas ponderadas en T2, usando los siguientes parámetros: tiempo de repetición, 4.000 ms; tiempo de eco eficaz, 96 ms; campo de visión, 55 x 55 mm²; matriz de la imagen, 256 x 256; grosor del corte, 1,5 mm; ángulo de flip, 90 °; número de excitaciones, 2; tamaño de píxel, 0,21 x 0,21 mm².
- 15 Para el ensayo conductual animal, se realizaron un Ensayo de retirada de adhesivo y un Ensayo rotarod. Para los ensayos de retirada de adhesivo, se colocó una cinta adhesiva de 10 mm x 10 mm en la pata dorsal de cada extremidad anterior y se midió el tiempo para retirar cada cinta de la pata dorsal. Para el Ensayo de Rotarod, los animales de experimentación se sometieron a ensayo para determinar su capacidad de correr en un cilindro giratorio que se aceleró de 4 a 40 rpm durante 5 minutos. Dos semanas antes de la inducción del ictus, solo se seleccionaron los animales capaces de retirar la cinta adhesiva en el plazo de 10 segundos y que permanecieron en el cilindro Rota-rod durante más de 300 segundos y se incluyeron en el experimento.
- 20

Ejemplo 6-2: Evaluación de la eficacia terapéutica de las MSC introducidas con el gen de HGF humano y el gen de hNgn1 MSC en el modelo animal de ictus

- 25 Cuatro semanas después de la inducción ictus, se realizaron los ensayos conductuales y de IRM para seleccionar animales con lesión cerebral uniforme. Los modelos animales de ictus se trasplantaron con un total de 5 grupos de células, incluyendo un grupo de control de PBS, MSC normales, MSC normales introducidas con gen de HGF y MSC introducidas con gen de hNgn1, así como las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1. La eficacia de las MSC en el modelo animal de ictus se evaluó basándose en los ensayos conductuales y de IRM (FIG. 6). La FIG. 6 son gráficos que muestran los resultados de los ensayos conductuales de animales del Ensayo de Retirada del Adhesivo (panel izquierdo) y el Ensayo Rotarod (panel derecho) para evaluar la eficacia terapéutica de las MSC introducidas con el gen de HGF humano y el gen de hNgn1 en el modelo animal de ictus. Como se muestra en la FIG. 6, cuando el PBS, las MSC normales introducidas con el gen de HGF y las MSC introducidas con el gen de hNgn1 se trasplantaron 4 semanas después de la inducción del ictus, no se observó ninguna eficacia terapéutica. Por el contrario, cuando se trasplantaron las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1, la eficacia terapéutica se observó claramente.
- 30
- 35

Los resultados anteriores sugieren que el trasplante de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 en el modelo animal de ictus muestra eficacias terapéuticas excelentes en la pérdida motora y sensitiva provocada por la lesión cerebral en el modelo de ictus.

- 40 Además, las eficacias terapéuticas de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 en el modelo animal de ictus se examinaron mediante resonancia magnética (FIG. 7). La FIG. 7 son fotografías que muestran los resultados del análisis por IRM (panel superior) y cuantitativo de la lesión por ictus (panel inferior) para evaluar la eficacia terapéutica de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 en el modelo animal de ictus. Como se muestra en la FIG. 7, cuando se trasplantaron PBS y MSC introducidas con el gen de la neurogenina-1 28 días después de la inducción del ictus, el tamaño del infarto se no se redujo. Por el contrario, cuando se trasplantaron MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1, se observó una reducción en el tamaño del infarto.
- 45

Los resultados anteriores sugieren que las MSC que expresan el gen de hNgn1 introducidas con el gen de HGF muestran eficacias terapéuticas excelentes en el infarto cerebral, en comparación con las MSC que expresan hNgn1 que no se introdujeron con ningún gen de HGF.

- 50 **Ejemplo 7: Mecanismo de la eficacia terapéutica de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de la neurogenina 1 humano en el modelo animal de ictus**

Con el fin de examinar el mecanismo de la eficacia terapéutica de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 sobre la región del infarto, se prepararon cortes de tejido y se analizaron por inmunohistoquímica.

Ejemplo 7-1: Preparación del corte de tejido

- 55 Ocho semanas después del trasplante, las ratas albinas se anestesiaron como en el ejemplo 3-4 para extraer el

cerebro. Los cerebros se posfixaron en la solución de fijación a 4 °C durante 16 horas. Los cerebros posfixados se seccionaron con un espesor de 2 mm, se deshidrataron en un procesador de tejido automatizado y se infiltraron con xileno y parafina. Los tejidos infiltrados con parafina se embebieron con parafina, se seccionaron usando un micrótopo rotatorio (Leica) con un espesor de 5 µm y se montaron en portaobjetos recubiertos de silano. Como primera etapa de la inmunohistoquímica para recuperar la antigenicidad del tejido, los tejidos se sumergieron en citrato de sodio 10 mM, se calentaron usando un horno de microondas a 99 °C durante 10 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Ejemplo 7-2: Tinción inmunohistoquímica

Los cortes de tejido preparados en el Ejemplo 7-1 se sumergieron en 1X PBS/Triton X-100 al 0,1 % durante 30 minutos. Como primera etapa de la inmunohistoquímica, se hicieron reaccionar con suero normal de cabra a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear la interacción no específica. Como anticuerpos primarios, se usaron anticuerpos contra MAP2 y GFP diluidos a 1:200 y se hicieron reaccionar a 4 °C durante 16 horas. Después de lavar tres veces con 1X PBS/Triton X-100 al 0,1 % durante 15 minutos, las secciones se dejaron reaccionar con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 488 (Invitrogen, 1:250) para detectar el anticuerpo primario MAP2 y para reaccionar con Alexa 568 conjugada con anticuerpo anti-IgG de ratón secundario (Invitrogen, 1:250) para detectar el anticuerpo primario contra GFP.

En primer lugar, se examinaron patrones de expresión de GFAP, un marcador para células gliales que median la fibrosis cerebral, (FIG. 8). La FIG. 8 es una fotografía que muestra el resultado de la inmunohistoquímica usando anticuerpos contra GFAP y MAP2 para examinar células gliales y su patrón de expresión en la región del infarto después de un trasplante de MSC introducidas con el gen de HGF humano y el gen de hNgn1. Como se muestra en la FIG. 8, cuando el PBS, las MSC normales introducidas con genes de HGF y las MSC introducidas con el gen de hNgn1 se trasplantaron en la región del infarto 4 semanas después de la inducción del ictus (MCAo), no hubo cambios en la población glial 12 semanas después de la inducción del ictus (MCAo). Por el contrario, cuando se trasplantaron MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1, se observó una distribución de las células gliales.

A continuación, se examinó el patrón de expresión del marcador neuronal, MAP2. Como resultado, el trasplante de las MSC introducidas con el gen de hNgn1 y el trasplante de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 mostraron una mayor expresión de las células neuronales, en comparación con el trasplante de PBS y MSC normales introducidas con genes de HGF.

Los resultados anteriores sugieren que las MSC introducidas con el gen de hNgn1 se diferenciaron en células neuronales y las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 inhibieron la población de las células gliales implicadas en la fibrosis cerebral, lo que indica que las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 muestran efectos terapéuticos sobre el daño cerebral crónico.

Ejemplo 8: Efectos terapéuticos de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de la Neurogenina 1 sobre la lesión cerebral crónica

Tomadas en conjunto, las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de la neurogenina 1 mostraron efectos terapéuticos sobre la lesión cerebral crónica (FIG. 9). La FIG. 9 es un diagrama (panel superior) y un gráfico (panel inferior) que resumen las eficacias terapéuticas de las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 en el modelo animal de ictus de acuerdo con el tiempo del trasplante de células. Como se muestra en la FIG. 9, cuando se examinaron las eficacias terapéuticas de las MSC introducidas con genes de neurogenina 1 en el modelo animal de ictus de acuerdo con el tiempo del trasplante de células, se observaron funciones motoras mejoradas cuando se trasplantaron a los 3 días (agudo) y 2 semanas (subagudo) después de la lesión cerebral, en comparación con el grupo de PBS y no se observaron eficacias cuando se trasplantaron 4 semanas después de la lesión cerebral. Sin embargo, las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de la neurogenina 1 mostraron eficacias terapéuticas altas incluso cuando se trasplantaron 4 semanas (crónico) después del ictus.

Por tanto, los resultados anteriores sugieren que las MSC introducidas con el gen de HGF y el gen de hNgn1 muestran efectos terapéuticos sobre la lesión cerebral crónica.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Una estirpe de células madre adultas introducida con un gen de factor de crecimiento de hepatocitos y un gen de factor de transcripción neurogénico con un motivo hélice-bucle-hélice básico y usos de la misma

<130> OPA12056/PCT

<150> KR 10-2011-0048628 <151> 23-05-2011

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

ES 2 641 198 T3

<210> 1
 <211> 2187
 <212> ADN
 <213> ADNc de HGF

5 <400> 1

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcattctctc	60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
acaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc	300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta	420
tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct	540
cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtagc ctacgaagtc	600
tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa tgcattgacct gcaatgggga gagttatcga	660
ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca	720
caccggcaca aattcttgcc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc	780
cgcaatcccg atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca cccccgctgg	840
gagtactgtg caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg	900
gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcactgt caataccatt	960
tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact	1020
cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct	1080
gaatcaccct ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt	1140
ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg	1200
ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa	1260

gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
cgaaatccag atgatgatgc tcatggaccc tgggtgctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
tgggattatt gccctatttc tcgttgtgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta 1440
gaccatcccg taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca 1500
acacgaacaa acataggatg gatgggttagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga 1560
ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtggttccc ttctcgagac 1620
ttgaaagatt atgaagcttg gcttggaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt 1740
ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact 1860
ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920
aaatgcagcc agcatcatcg agggaaggtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980
gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggccact tgtttgtgag 2040
caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttcctg gtcgtggatg tgccattcca 2100
aatcgtcctg gtatTTTTgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca caaaattatt 2160
ttaacatata aggtaccaca gtcatag 2187

<210> 2
<211> 716
<212> ADN
<213> ADNc de hNgnI

5

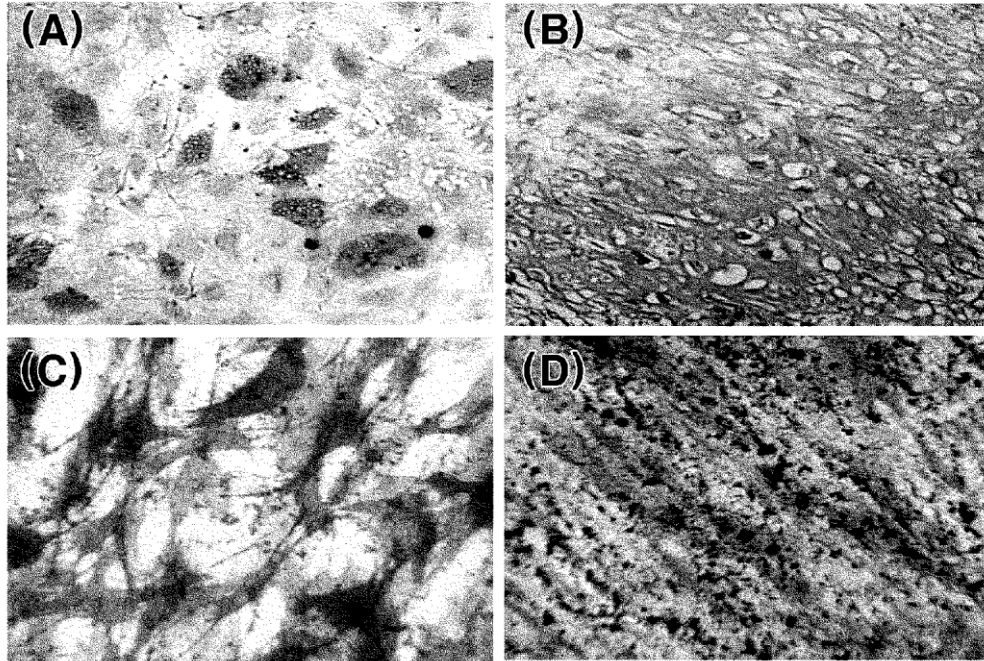
<400> 2

atgccagccc gccttgagac ctgcatctcc gacctcgact gcgccagcag cagcggcagt 60
gacctatccg gcttcctcac cgacgaggaa gactgtgcca gactccaaca ggcagcctcc 120
gcttcggggc cgcccgcgcc ggcccgagc agcgcgccc atatctcccg ggcgtctgag 180
gttccagggg cacaggacga cgagcaggag aggcggcgcc gccgcggccg gacgcgggtc 240
cgctccgagg cgctgctgca ctcgctgcgc aggagccggc gcgtcaaggc caacgatcgc 300
gagcgcaacc gcatgcacaa cttgaacgcg gccctggacg cactgcgcag cgtgctgccc 360
tcgttccccg acgacaccaa gctcaccaa atcgagacgc tgcgcttcgc ctacaactac 420
atctgggctc tggccgagac actgcgcctg gcggatcaag ggctgcccgg aggcggtgcc 480
cgggagcgcc tcctgccgcc gcagtgcgtc ccctgcctgc ccggtcccc aagccccgcc 540
agcgacgcgg agtcctgggg ctgaggtgcc gccgcgcct ccccgctctc tgacccagc 600
agcccagccg cctccgaaga cttcacctac cgccccggcg accctgtttt ctcttccca 660
agcctgccc aagacttgct ccacacaacg ccctgtttca ttcttacca ctaggc 716

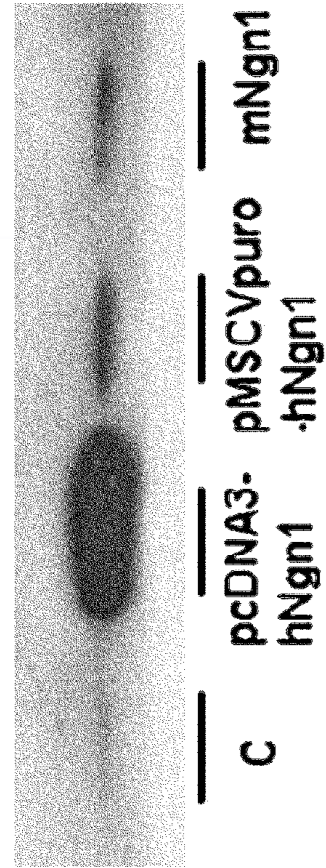
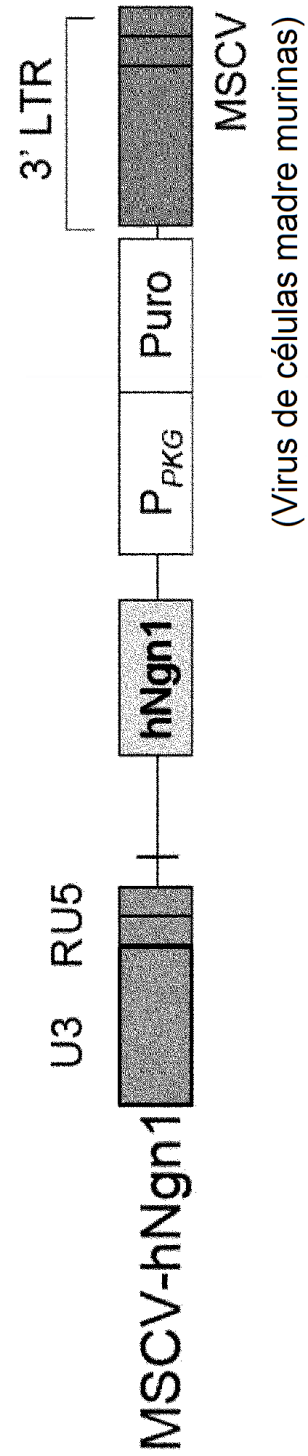
REIVINDICACIONES

1. Una célula madre mesenquimatosa modificada mediante la introducción de un gen que codifica un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y un gen que codifica la neurogenina 1 o su fragmento activo en una célula madre mesenquimatosa.
- 5 2. La célula madre mesenquimatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la célula madre mesenquimatosa es una célula madre derivada de uno o más tejidos seleccionados entre el grupo que consiste en médula ósea, sangre, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo y placenta.
3. La célula madre mesenquimatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gen de neurogenina 1 incluye una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2.
- 10 4. La célula madre mesenquimatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gen de HGF incluye una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1.
5. La célula madre mesenquimatosa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gen de HGF está codificado en un elemento extracromosómico que es un vector adenovírico.
- 15 6. Un procedimiento de preparación de una célula madre mesenquimatosa modificada, que comprende las etapas de:
 - (a) introducir un gen que codifica HGF que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 y un gen que codifica neurogenina 1 que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 en una célula madre mesenquimatosa cultivada;
 - 20 (b) seleccionar la célula madre mesenquimatosa modificada que se introduce con los dos genes que codifican el factor de crecimiento de hepatocitos y la neurogenina 1; y
 - (c) cultivar la célula madre mesenquimatosa modificada seleccionada.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la introducción del gen que codifica HGF y el gen que codifica la neurogenina 1 se realiza secuencialmente o en orden inverso, o simultáneamente.
- 25 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la célula madre mesenquimatosa es una célula madre derivada de uno o más tejidos seleccionados entre el grupo que consiste en médula ósea, sangre, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo y placenta.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el gen de HGF se introduce en la célula madre mesenquimatosa por medio de un vector adenovírico.
- 30 10. Una composición que comprende la célula madre mesenquimatosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la célula madre mesenquimatosa modificada producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades neurológicas.
- 35 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que las enfermedades neurológicas son una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en enfermedades neurológicas incluyendo enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia, esquizofrenia, ictus agudo, ictus crónico y lesión de la médula espinal, y el deterioro crónico que sigue al ictus.

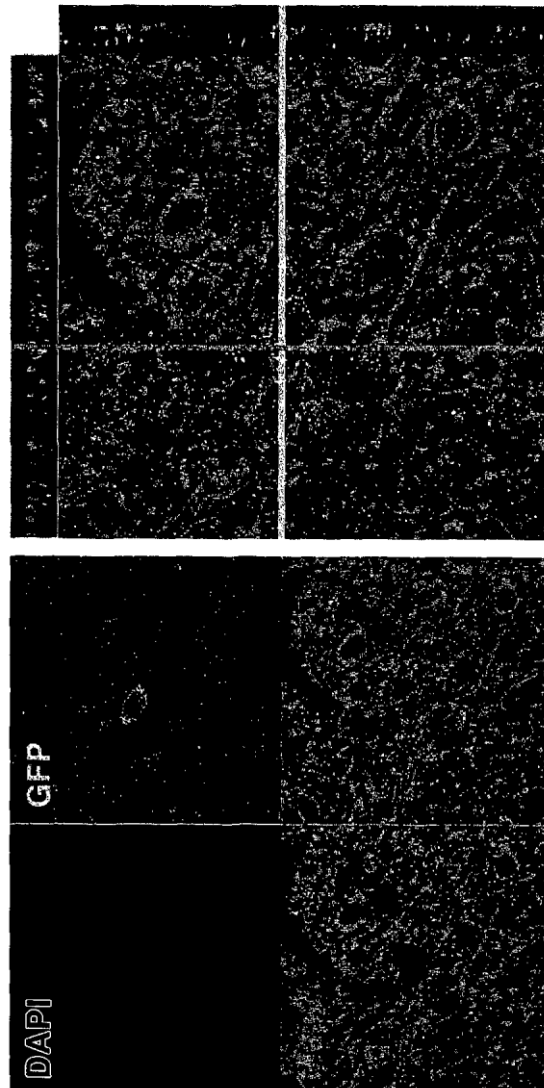
[Fig. 1]



[Fig. 2]



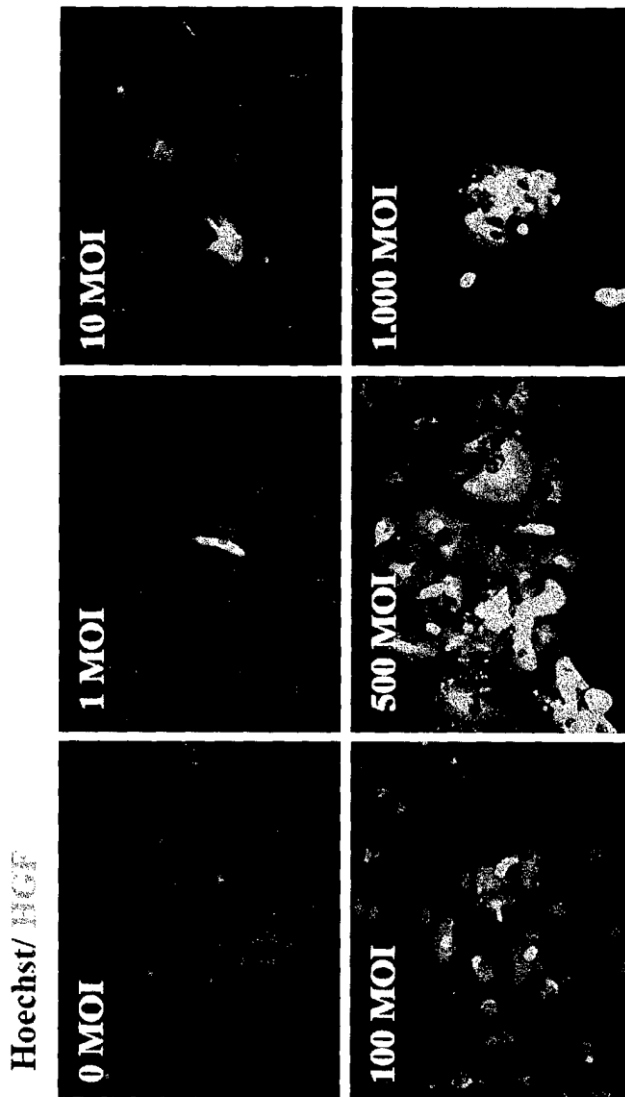
[Fig. 3]



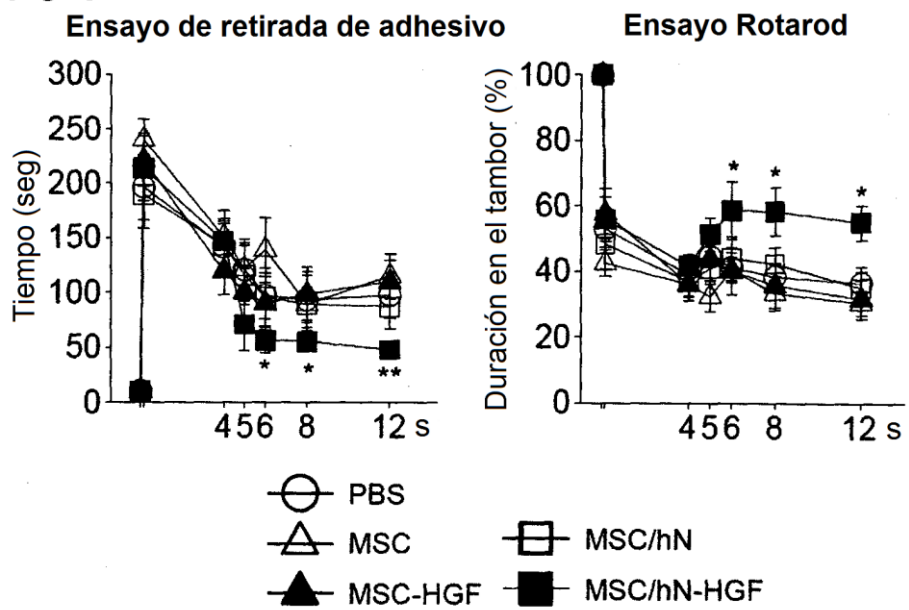
[Fig. 4]



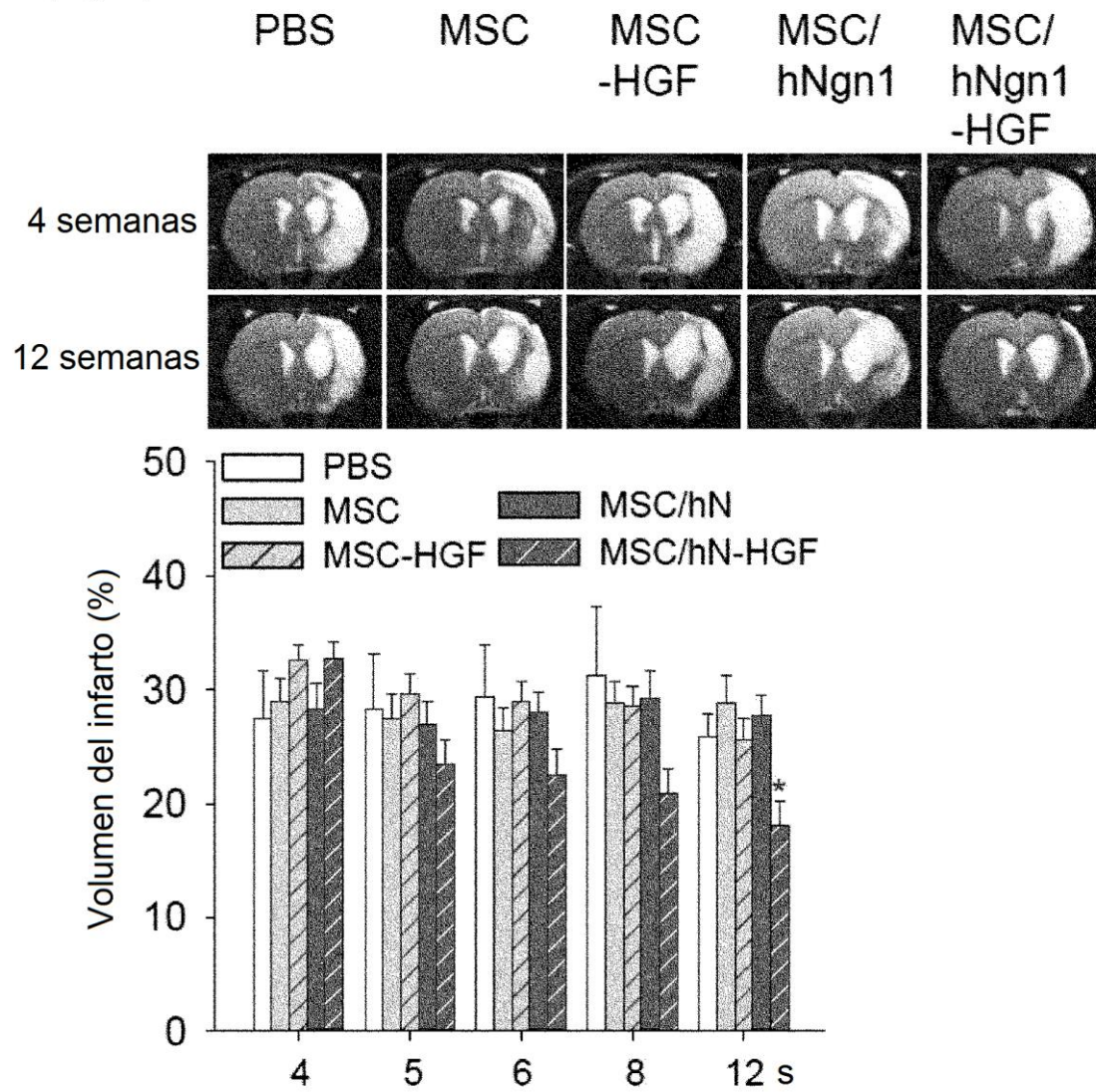
[Fig. 5]



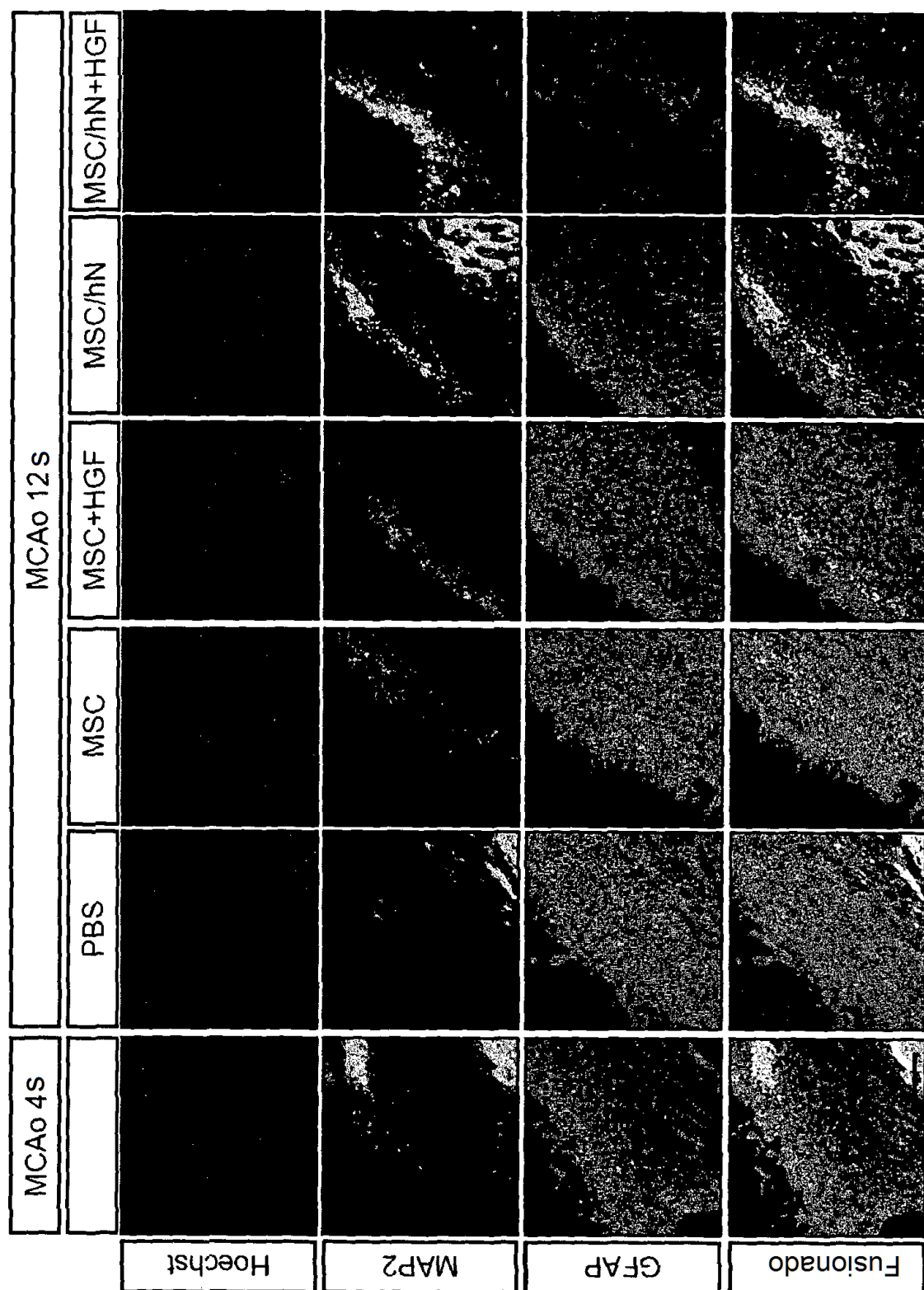
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

