

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 739**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/44** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2008 E 08793529 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2180896**

54 Título: **Composición para el diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades relacionadas con células que expresan IL-8 o GRO-, que comprende MSC de UCB**

30 Prioridad:

**29.08.2007 KR 20070087228**

**17.09.2007 US 972966 P**

**10.07.2008 KR 20080067247**

**18.08.2008 US 89733 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.09.2013**

73 Titular/es:

**MEDIPOST CO., LTD. (100.0%)  
1571-17 Seocho-3dong, Seocho-gu  
Seoul 137-874, KR**

72 Inventor/es:

**CHANG, JONG WOOK;  
KIM, DAL-SOO;  
YANG, YOON-SUN y  
OH, WON IL**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 422 739 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

Composición para el diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades relacionadas con células que expresan IL-8 o GRO- $\alpha$ , que comprende MSC de UCB

5 **Campo técnico**

10 La presente invención se refiere a una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico, un gen marcador o un producto de los mismos a una célula que expresa interleucina 8 (IL-8) o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo de citoblastos mesenquimatosos derivados de sangre del cordón umbilical o citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos proliferados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos (MSC de UCB), en la que la composición de terapia génica incluye MSC de UCB.

15 La presente invención se refiere también a una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con una célula que expresa IL-8 o GRO- $\alpha$ , o de tumores cerebrales en terapia génica, en la que la composición incluye MSC de UCB.

20 La presente invención se refiere también a una composición o kit para uso en el diagnóstico de tumores cerebrales, la prevención de tumores cerebrales, el tratamiento de tumores cerebrales o la monitorización de la progresión del tratamiento de tumores cerebrales usando MSC de UCB.

**Técnica antecedente**

25 Es conocido que los citoblastos migran hacia sitios patológicos. Recientemente, se ha encontrado que los citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea (MSC de BM) tienen tropismo por tumores y migran hacia los sitios tumorales. Dichos MSC de BM que pueden migrar a sitios de tumores específicos pueden probarse herramientas útiles en terapia génica. Por ejemplo, los MSC de BM que tienen tropismo por tumores pueden usarse como vehículos para transferir un gen suicida terapéutico a sitios tumorales [véanse Ponte A.L. *et al.*, *Stem Cells*, 25, 1737-1745 (2005); Kahler C.M. *et al.*, *Respir. Res.* 8, 50 (2007)]. A pesar de este interesante fenómeno, los mecanismos moleculares que regulan el tráfico de MSC al tumor no están claros.

30 Evidencias crecientes durante varios años indican que la inducción de la migración de MSC de BM parece estar estimulada por varios factores solubles. Recientemente, se ha mostrado que la proteína quimioattractora de monocitos 1 (MCP-1) secretada por células de cáncer de mama estimula la migración de MSC de BM [véase Dwyer R.M. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 13, 5020-5027 (2007)]. Además, el ligando de quimiocina 2 (CCL-2) y el ligando de quimiocina 10 (CCL-10) pueden inducir la migración de células progenitoras neurales a sitios dañados en el modelo de apoplejía por oclusión de la arteria cerebral media (MCAo) [véase J. *Neurosci. Res.*, 85, 2120-2125 (2007)]. El factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) aumentaba notablemente la respuesta migratoria de MSC de BM de rata [véase Li Y. *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 780-784, (2007)]. Por lo tanto, identificar los factores solubles que afectan a los eventos de migración de los MSC es importante para entender cómo los MSC migran hacia tumores o tejidos dañados.

45 Los genes introducidos en MSC de BM se sobreexpresan *in vivo* y muestran bioactividad. Por ejemplo, los MSC de BM en los que se introduce un gen hAng1 humano estimulan la generación de vasos sanguíneos en un sitio de infarto de un animal modelo de infarto de miocardio agudo [véase Sun L. *et al.*, *Biochemical Biophysical Research Communication* 357 (2007), 779-784], los MSC de BM que sobreexpresan Akt tratan sorprendentemente el infarto de miocardio y mejoran las funciones cardíacas [véase Nicolas N. *et al.*, *Molecular Therapy* 14(6), 840-850, 2006], los MSC de BM modificados con el gen Bcl-2 previenen la apoptosis y mejoran las funciones cardíacas [véase *Stem Cells* 25, 2118-2127 (2007)], y los MSC de BM que sobreexpresan óxido nítrico sintasa endotelial alivian el daño del ventrículo derecho causado por hipertensión pulmonar [véase Sachiko *et al.*, *Circulation*, 114 [supl]: I-181/I-185]. Estos resultados indican que los MSC en que se introducen genes pueden usarse como herramienta en terapia génica.

55 Por otro lado, en general, las células del sistema nervioso central están bien reguladas, consistiendo el sistema nervioso central en cerebro y médula espinal. Sin embargo, cuando esta regulación falla, las células se dividen continuamente y se forman tumores. Los tumores pueden clasificarse como tumores benignos o tumores malignos. El sistema nervioso central tiene neuronas y neuroglíocitos que soportan y protegen las neuronas. Los tumores generados en neuroglíocitos se conocen como gliomas. Los gliomas dan cuenta de un 50% de los tumores cerebrales primarios y dan cuenta de un 15% de los tumores de médula espinal primarios. Además, los tumores cerebrales incluyen tumores neurales, tumores de vasos sanguíneos y tumores glandulares. Existe también un tumor cerebral secundario causado por otros tumores desarrollados en otros sitios del cuerpo. El tumor cerebral secundario es el tipo más común de tumor cerebral.

65 El tratamiento de tumores cerebrales es difícil debido a los sitios de los tumores. Los tumores cerebrales pueden tratarse por cirugía clínica o quimioterapia. Para cirugía clínica, cuando se extirpan totalmente los sitios de tumor, es

probable que aparezcan complicaciones. Para quimioterapia, tiene que inyectarse una alta concentración de fármaco anticanceroso debido a la barrera hematoencefálica y, por tanto, daña gravemente otros órganos. Recientemente, se ha usado terapia génica para tratar tumores cerebrales. En la terapia génica, se introduce un gen para suprimir el crecimiento de células cancerosas usando un vector vírico. Puesto que el vector vírico no tiene la capacidad de migración selectiva hacia el sitio canceroso diana, se modifica la superficie del vector vírico para obtener dicha capacidad. Sin embargo, existe un límite para la migración de una cantidad suficiente de vectores víricos al sitio canceroso diana.

Se han dado a conocer resultados de la investigación sobre el efecto de atracción, que es un fenómeno en que los citoblastos migran hacia un sitio de enfermedad, indicando que los citoblastos pueden ser medios de suministro útiles para tratar tumores cerebrales. Sin embargo, los mecanismos que regulan el tráfico de citoblastos a tumores no están claros. Es conocido que los neurocitoblastos tienen tropismo por un tipo de tumor cerebral, es decir, glioma maligno. Basándose en esta teoría, se está realizando una investigación sobre un procedimiento de transferencia de genes a un sitio de tumor cerebral usando neurocitoblastos que funcionan como vehículo (véanse Yip S *et al.*, *The Cancer J.* 9(3), 189-204, 2003; Kim SK *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 12(18), 5550-5556, 2006). Yip *et al.* encontraron que los tumores cerebrales pueden tratarse con neurocitoblastos portadores de un gen inmunoregulador, un gen promotor de la apoptosis, una enzima convertidora de profármaco, un virus oncolítico, etc. Brown *et al.* han identificado que los tumores cerebrales pueden tratarse eficazmente inyectando un vector que contiene el gen de citosina desaminasa en el cerebro, en el que el gen de citosina desaminasa transforma la 5-fluorocitosina (5-FC) en 5-fluorouracilo (5-FU), en el que 5-FU es un fármaco anticanceroso y 5-FC es un profármaco de 5-FU (véase Brown AB *et al.*, *Human Gene Ther.* 14(18), 1777-1785, 2003). Ehtesham *et al.* han reseñado que el crecimiento de tumores cerebrales se reducía al inyectar neurocitoblastos tratados para suministrar interleucina 12 o un ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (*Cancer Res.* 62, 5657-5663, 2002; *Cancer Res.* 62, 7170-7174, 2002). Sin embargo, usar neurocitoblastos en experimentos clínicos causa problemas éticos relacionados con cómo se recogen los neurocitoblastos y el rechazo inmunológico causado por el trasplante alogénico. Por consiguiente, existe la necesidad de encontrar otros tipos de citoblastos que no causen estos problemas y puedan obtenerse fácilmente.

Akira *et al.* han dado a conocer que los MSC de BM tienen tropismo por tumores cerebrales (véase *Cancer Res.* 65(8), 3307-3316, 2005). Los MSC de BM pueden recogerse de los pacientes. Cuando los MSC de BM se inyectan por trasplante autólogo, no aparece rechazo inmunológico, lo que es una ventaja para el uso clínico. En un estudio, se inyectaron MSC de BM humanos en ratones atímicos con cráneos transplantados con líneas celulares de glioma humano a través de la arteria carótida. Como resultado, se encontraron MSC de BM humanos solo en glioma y no en la parte normal del cerebro adyacente al glioma. Además, incluso cuando se transplantaban MSC de BM humanos a un cráneo, los MSC de BM humanos migraban hacia el glioma. Cuando se infectaban MSC de BM humanos con un vector adenovírico que contenía ADNc de un gen de IFN- $\beta$  y se inyectaba entonces el vector resultante en un cráneo transplantado con glioma de un ratón atímico a través de la arteria carótida, aumentaba la vida del ratón atímico. El documento W0071037653A1 da a conocer una composición para tratar el cáncer que comprende MSC de BM que expresan un gen de citosina desaminasa. Sin embargo, en este caso, puesto que los MSC de BM se recogen mediante una pluralidad de procesos complejos, los sujetos de los que se recogen los MSC de BM padecen estrés mental y físico durante un largo periodo de tiempo. Por consiguiente, existe la necesidad de encontrar otros tipos de citoblastos.

Al contrario que la médula ósea, la sangre del cordón umbilical (UCB), que tiene muchos MSC, puede recogerse fácilmente de cordones umbilicales que se desechan en los procesos de parto. También la industria del almacenamiento de UCB está bien establecida y, por tanto, es fácil encontrar donantes. Incluso cuando se usan MSC recogidos de otra UCB inducida por seres humanos, no aparece rechazo inmunológico después del trasplante. Por consiguiente, puede obtenerse una alta estabilidad inmunológica. Por lo tanto, es muy importante identificar si una enfermedad tal como tumor cerebral puede tratarse basándose en el tropismo de MSC de UCB. Sin embargo, dichos intentos por identificar la disponibilidad de MSC de UCB no se han realizado todavía. La información dada a conocer en la presente memoria descriptiva se usa solo para ayudar a la comprensión de los antecedentes del presente concepto de la invención y no pueden ser técnica anterior.

## Descripción detallada de la invención

### Problema técnico

La terapia génica orientada recientemente desarrollada usa características de migración específicas de los citoblastos mesenquimatosos (MSC), en la que se introducen genes terapéuticos en MSC y los MSC resultantes migran entonces a un sitio de enfermedad y tratan la enfermedad. Para desarrollar una terapia génica que use el tropismo de MSC, debería comprenderse totalmente el mecanismo molecular que regula la migración de MSC hacia tumores. Sin embargo, el mecanismo molecular no se ha determinado todavía. Por consiguiente, el presente concepto de la invención es descubrir el mecanismo molecular de la migración de MSC de UCB hacia una célula tumoral y usar el mecanismo molecular en terapia génica.

Aunque se está realizando la investigación de si los tumores cerebrales pueden tratarse con neurocitoblastos o

citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea (MSC de BM), la recolección de neurocitoblastos y MSC de BM puede conducir a problemas éticos, rechazo inmunológico y estrés mental y físico del sujeto del que se recojan los MSC de BM. Por consiguiente, el presente concepto de la invención proporciona también un citoblasto que puede recogerse sin estos problemas descritos anteriormente y que tiene un mejor tropismo por tumores cerebrales.

5

#### Solución técnica

Los inventores de la presente invención han realizado investigaciones para resolver estos problemas, y han encontrado que los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre de cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos (MSC de UCB) tienen tropismo por células de tumor cerebral y que los MSC de UCB tienen una capacidad de migración mayor que los citoblastos mesenquimatosos aislados de médula ósea y/o los citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos (MSC DE BM). Los inventores han proporcionado una aplicación terapéutica para tratar tumor cerebral usando MSC de UCB.

10

15

También los inventores de la presente invención han encontrado que el tropismo de MSC de UCB está afectado por la interleucina 8 (IL-8) o GRO- $\alpha$ . Basándose en este hallazgo, los inventores de la presente invención proporcionan una composición para uso en el suministro de un gen terapéutico o un producto del mismo a una célula que expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo de MSC de UCB, y una aplicación terapéutica de la misma.

20

#### Efectos ventajosos

Los citoblastos mesenquimatosos derivados de sangre del cordón umbilical (MSC de UCB) en la composición según la presente invención tienen un tropismo selectivo por células que expresan IL-8 o GRO- $\alpha$ , y por tanto inducen el tropismo de MSC de UCB, o por células de tumor cerebral. La capacidad trópica de los MSC de UCB es mejor que la de otros citoblastos y por tanto pueden suministrarse más eficazmente genes terapéuticos, o un producto de los mismos que cuando se usan otros citoblastos convencionales. Por consiguiente, puede usarse una composición farmacéutica o kit que comprende MSC de UCB según la presente invención para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades relacionadas con células que expresan IL-8 o GRO- $\alpha$ , o tumores cerebrales.

25

30

#### Modo de invenciones

Los inventores de la presente invención han estudiado citoblastos que tienen un tropismo eficaz por tumores, y han encontrado sorprendentemente que los citoblastos mesenquimatosos derivados de sangre del cordón umbilical (MSC de UCB) tienen un alto tropismo por tumores cerebrales, específicamente un tropismo por tumores cerebrales mayor que los citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea (MSC de BM), que no se conocía anteriormente. También los inventores han encontrado que la interleucina 8 (IL-8) o GRO- $\alpha$  se relacionan con el tropismo de MSC de UCB.

35

40

Los inventores cultivaron conjuntamente MSC de UCB y líneas celulares tumorales representativas para identificar las características del tropismo de los MSC de UCB y citocinas relacionadas con estas líneas celulares tumorales. Específicamente, se cultivaron conjuntamente MSC de UCB y una seleccionada de las líneas celulares de tumor cerebral humano tales como células U-87 MG, LN18, U138 o U251; una línea celular de cáncer rectal humano tal como LS-174T; un linfocito B humano tal como NC37; un fibroblasto de ratón (NIH3T3); una línea celular de cáncer gástrico tal como KATO III; una línea celular de cáncer de pulmón tal como A549 y una línea celular de cáncer hepático tal como PLC/PRF5 en una cámara Transwell para medir la movilidad de los MSC de UCB. Como resultado, se encontró que los MSC de UCB tienen un alto tropismo por células U-87 MG, LN18, U138 y U251, que son células de tumor cerebral (véanse, las figuras 3 y 4). Los MSC de UCB tenían también tropismo por medios acondicionados que no incluían células U-87 MG y se obtuvieron cultivando U-87 MG (véase la figura 4).

45

50

Se comparó también el tropismo por una línea celular de tumor cerebral de MSC de UCB con el de MSC de BM que se usan actualmente como fuente de citoblastos. Como resultado, se encontró que los MSC de UCB tienen un tropismo por una línea celular de tumor cerebral mayor que los MSC de BM (figura 15). El índice quimiotáctico de los MSC de UCB era también mayor con respecto a la línea celular de tumor cerebral entre diversas líneas celulares cancerosas (figura 6). Dicho alto índice quimiotáctico con respecto a la célula tumoral cerebral es una ventaja adicional de los MSC de UCB, además del hecho de que los MSC de UCB pueden obtenerse más fácilmente y tienen más estabilidad inmunológica que los MSC de BM, probando que los MSC de UCB son un medio muy adecuado para la terapia génica de un tumor cerebral debido a que el gen terapéutico puede transferirse eficazmente al interior de o a zonas cercanas al tumor cerebral.

55

60

El tropismo de los MSC de UCB en la cámara Transwell puede derivar de las citocinas que se secretan en el cultivo conjunto de dos células. Por tanto, se cultivaron conjuntamente dos células en una cámara Transwell para preparar un medio y se analizó entonces el medio usando una matriz de citocinas. Como resultado, se identificó que se secretaban altos niveles de citocinas tales como IL-8 o GRO- $\alpha$  en un medio en que se habían cultivado conjuntamente MSC de UCB y U87 MG (véase la figura 7). Por consiguiente, es altamente probable que de estas

65

citocinas pueda derivar el tropismo de los MSC de UCB.

Los inventores de la presente invención han cultivado MSC de UCB solos, han cultivado U-87 MG solas y han cultivado conjuntamente MSC de UCB y U-87 MG y han analizado entonces los niveles de ARNm de IL-8 de estas células usando PCT-TI. Como resultado, los MSC de UCB no expresaban IL-8 en presencia ni en ausencia de células U-87 MG. Sin embargo, las U-87 MG expresaban IL-8 constitutivamente tanto en presencia como en ausencia de MSC de UCB (véase la figura 8). El tratamiento de MSC de UCB con IL-8 potenciaba significativamente su migración cuando se comparaba con células no tratadas (véase (A) de la figura 9). Sin embargo, cuando los MSC de UCB se preincubaban con anticuerpos anti-CXCR1, que son anticuerpos respecto a un receptor de IL-8, y se aplicaba IL-8 recombinante a MSC de UCB, se reducía la migración de MSC de UCB mediada por IL-8 de manera dependiente de la dosis por el tratamiento anti-CXCR1 ((B) de la figura 9). El tratamiento anti-CXCR2 mostraba también el mismo efecto. De forma similar, el tratamiento con GRO- $\alpha$  potenciaba también la migración de MSC de UCB cuando se comparaba con MSC de UCB no tratados ((C) de la figura 9). En contraposición, no había diferencias significativas en la migración de MSC de UCB en cultivos tratados con MCP-1 ((D) de la figura 9). Este dato indica que IL-8 y GRO- $\alpha$  participan en la migración de MSC de UCB hacia las células U-87 MG.

Se midió la correlación entre la concentración de IL-8 secretada por cada célula cancerosa y la migración de MSC de UCB. Como resultado, las U-87 MG, que migraban a la concentración máxima de MSC de UCB, mostraban la máxima producción de IL-8 (figura 10A). Los inventores midieron también el nivel de secreción de IL-8 en diversas células de glioma. Todas las líneas celulares de glioma ensayadas que eran células diana del tropismo de MSC de UCB mostraron también un alto nivel de secreción de IL-8 ((B) de la figura 10). Este dato sugiere que los MSC de UCB tenían una fuerte atracción migratoria hacia células secretoras de IL-8. Para identificar esto, se sobreexpresó artificialmente IL-8 en A549, que son células de cáncer de pulmón humanas de bajo nivel de expresión de IL-8, y se cultivaron conjuntamente entonces A549 que sobreexpresaban IL-8 y MSC de UCB. Como resultado, se encontró que, aunque los MSC de UCB tenían una débil migración hacia A549, los MSC de UCB tenían una fuerte migración hacia A549 que sobreexpresan IL-8. Por lo tanto, la IL-8 podría ser un fuerte inductor de MSC de UCB (véase la figura 10C).

Los inventores de la presente invención compararon las características de migración de MSC de BM y MSC de UCB con respecto a células U-87 MG o IL-8. Como resultado, se encontró que los MSC de UCB migran más fuertemente hacia células U-87 MG o IL-8 que los MSC de BM. La migración de MSC de UCB se potencia drásticamente en respuesta al tratamiento con IL-8, pero la migración de MSC de BM es débil en respuesta al tratamiento con IL-8 (véase la figura 11).

Se compararon los niveles de expresión de receptor de quimiocina CXC 1 (CXCR1) y receptor de quimiocina CXC 2 (CXCR2) en MSC de UCB y MSC de BM midiendo el ARNm y la proteína (véase la figura 12). El análisis de PCR-TI usando el ARN total aislado de MSC de UCB y MSC de BM reveló que el producto de PCR de ambos CXCR1 y CXCR2 tiene una mayor intensidad en MSC de UCB cuando se comparan con MSC de BM. Respecto a la expresión de proteína de CXCR1 y CXCR2, CXCR1 y CXCR2 se expresan en gran medida tanto en MSC de UCB como en MSC de BM. Puesto que la IL-8 tiene una alta afinidad por CXCR1 y CXCR2, una migración aumentada de MSC de UCB hacia U-87 MG puede ser debida a una expresión regulada positivamente de CXCR1 y CXCR2.

Los inventores de la presente invención efectuaron el experimento de introducir un gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) en MSC de UCB. Como resultado, se encontró que la GFP se introducía y expresaba exitosamente (véase la figura 13). Se encontró también que los MSC de UCB que sobreexpresan el gen que codifica GFP tenían también tropismo por U87 MG (véase la figura 14). Dichos resultados muestran que los MSC de UCB en los que se introduce un gen o un producto del mismo pueden transferirse a células secretoras de IL-8 o GRO- $\alpha$ .

Basándose en los resultados descritos anteriormente, la presente invención se refiere a una composición para uso en la transferencia de un gen o producto del mismo a una célula que expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  usando MSC de UCB. La presente invención se refiere también a una composición terapéutica que contiene MSC de UCB para uso en la transferencia de un gen terapéutico o marcador o un producto del mismo a una célula que expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  y que activa el tropismo de MSC de UCB. La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica, a un kit para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales y a una composición que contiene MSC de UCB para uso en el tratamiento de tumores cerebrales. La presente invención se refiere también a un kit para uso en el diagnóstico de tumores cerebrales o en la monitorización de la progresión del tratamiento de tumores cerebrales y a una composición que contiene MSC de UCB para uso en el diagnóstico de tumores cerebrales o de una composición que contiene MSC de UCB para uso en la monitorización de la progresión del tratamiento de tumores cerebrales.

Específicamente, el presente concepto de la invención se refiere a:

[1] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB;

65

- [2] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que el MSC de UCB funciona como portador de terapia génica para tumores cerebrales;
- 5 [3] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB;
- 10 [4] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona de un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis;
- 15 [5] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona de un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis, en el que el gen supresor tumoral puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), un gen de maspina, un gen de RUNX3, un gen de caveolina 1, un gen de nm23, un gen de proteína Rb, un gen de Brush-1, un gen de inhibidor del crecimiento tumoral (ING-4), un gen de survivina, un gen de proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP), un gen de proteína inhibidora de la apoptosis neural (NAIP) y genes de proteínas reguladoras de estos genes;
- 20 [6] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona de un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis, en el que el gen de factor inductor de la apoptosis puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de citocina, un gen de interleucina, un gen de factor de necrosis tumoral (TNF), un gen de interferón (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ), un gen de factor estimulante de colonias (CSF), un gen de p53, un gen de Apaf-1, un gen de TRAIL, un gen de caspasa, un gen de Bax, un gen de Bad, un gen de FADD, un gen de JNK, un gen de cinasa p38 y genes de proteínas reguladoras de estos genes;
- 25 [7] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en el que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona de un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis, en el que el gen regulador del ciclo celular puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de cdc2, un gen de ciclina (ciclina A, ciclina D, ciclina E), un gen de cdc25C, un gen de p21WAF, un gen de p16INK4, un gen de CDK (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6), un gen de proteína Rb, un gen de E2F, un ARN anticodificante o ARNip del mismo y genes de proteínas reguladoras de estos genes;
- 30 [8] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona de un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis, en el que el gen inhibidor de la angiogénesis puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de trombospondina 1, un gen de endostatina, un gen de tumstatina, un gen de canstatina, un gen de vastatina, un gen de restina, un gen de inhibidor del crecimiento endotelial vascular, un gen de maspina, un gen de angiopoyetinas, un gen de un fragmento de prolactina de 16 kDa y un gen de endorepelinina;
- 35 [9] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un gen de enzima convertora de profármaco en el MSC de UCB;
- 40 [10] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un gen de enzima convertora de profármaco en el MSC de UCB, en el que el gen de enzima convertora de profármaco se selecciona de citosina desaminasa y el gen de CYP2B1;
- 45 [11] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un ARN anticodificante o ARNip de un gen relacionado con un tumor cerebral en el MSC de UCB;
- 50 [12] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un ARN anticodificante o ARNip de un gen relacionado con un tumor cerebral en el MSC de UCB, en el que el gen relacionado con un tumor cerebral

puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de la familia Ras, un gen de c-myc, un gen de abl, un gen de erbB-1, un gen de EGF-R, un gen de Bax, un gen de la proteína de interacción con Apaf-1 (APIP), un gen de la proteína 1 secretada inducida por Wnt-1 (WISP-1), un gen de Wnt, un gen de Raf-1, un gen de Src, un gen de Akt, un gen de Erk-1,2 y un gen de Bcl-2;

5 [13] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un virus oncológico en el MSC de UCB;

10 [14] una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende un MSC de UCB, en el que se introduce un virus oncolítico en el MSC de UCB, en el que el virus oncolítico se selecciona de herpesvirus simple y reovirus de tipo 3;

15 [15] una cualquiera de las composiciones farmacéuticas para uso en la prevención o el tratamiento de tumores cerebrales descrita anteriormente, en las que el tumor cerebral se selecciona del grupo consistente en astrocitoma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma de baja malignidad, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, glioma troncoencefálico, ependimoma, subependimoma, ganglioneuroma, glioma mixto, oligodendroglioma, glioma de nervio óptico, neurinoma del estadoacústico, cordoma, linfoma del SNC, craneofaringioma, hemangioblastoma, meduloblastoma, meningioma, tumores pineales, tumores pituitarios, tumores neuroectodérmicos primitivos, tumores rabdoides, schwannoma, quistes, neurofibromatosis, seudotumor cerebral y esclerosis tuberosa;

[16] una composición para uso en el diagnóstico de tumores cerebrales o la monitorización de la progresión del tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición incluye un MSC de UCB;

25 [17] una composición para uso en el diagnóstico de tumores cerebrales o la monitorización de la progresión del tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición incluye un MSC de UCB, en el que el MSC de UCB está marcado con un marcador detectable;

30 [18] una composición para uso en el diagnóstico de tumores cerebrales o la monitorización de la progresión del tratamiento de tumores cerebrales, en la que la composición incluye un MSC de UCB, en el que el MSC de UCB está marcado con un marcador detectable, en el que el marcador detectable se selecciona de un detector fluorescente basado en enzima que contiene luciferasa y nanopartículas magnéticas derivadas del péptido Tat;

35 [19] una cualquiera de las composiciones para uso en el diagnóstico de tumores cerebrales o la monitorización de la progresión del tratamiento de tumores cerebrales, en las que el tumor cerebral se selecciona del grupo consistente en astrocitoma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma de baja malignidad, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, glioma troncoencefálico, ependimoma, subependimoma, ganglioneuroma, glioma mixto, oligodendroglioma, glioma de nervio óptico, neurinoma del estadoacústico, cordoma, linfoma del SNC, craneofaringioma, hemangioblastoma, meduloblastoma, meningioma, tumores pineales, tumores pituitarios, tumores neuroectodérmicos primitivos, tumores rabdoides, schwannoma, quistes, neurofibromatosis, seudotumor cerebral y esclerosis tuberosa;

[20] un kit para uso en el tratamiento de tumores cerebrales que incluye: un vector de expresión que tiene un gen de enzima conversora de profármaco, un MSC de UCB y un profármaco de un fármaco anticanceroso;

45 [21] un kit para uso en el tratamiento de tumores cerebrales que incluye: un vector de expresión que tiene un gen de enzima conversora de profármaco, un MSC de UCB y un profármaco de un fármaco anticanceroso, en el que el gen de enzima conversora de profármaco se selecciona de un gen de citosina desaminasa y un gen de CYP2B1;

50 [22] un kit para uso en el tratamiento de tumores cerebrales que incluye: un vector de expresión que tiene un gen de enzima conversora de profármaco, un MSC de UCB y un profármaco de un fármaco anticanceroso, en el que el gen de enzima conversora de profármaco se selecciona de un gen de citosina desaminasa y un gen de CYP2B1, en el que el MSC de UCB se transfecta con el vector de expresión que tiene un gen de enzima conversora de profármaco;

55 [23] uno cualquiera de los kits descritos anteriormente, en los que el tumor cerebral se selecciona del grupo consistente en astrocitoma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma de baja malignidad, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, glioma troncoencefálico, ependimoma, subependimoma, ganglioneuroma, glioma mixto, oligodendroglioma, glioma de nervio óptico, neurinoma del estadoacústico, cordoma, linfoma del SNC, craneofaringioma, hemangioblastoma, meduloblastoma, meningioma, tumores pineales, tumores pituitarios, tumores neuroectodérmicos primitivos, tumores rabdoides, schwannoma, quistes, neurofibromatosis, seudotumor cerebral y esclerosis tuberosa;

65 [24] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB;

[25] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que el MSC de UCB funciona como portador para terapia génica;

5 [26] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB;

10 [27] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona del grupo consistente en un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis;

15 [28] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona del grupo consistente en un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis, en el que el gen supresor tumoral puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), un gen de maspina, un gen de RUNX3, un gen de caveolina 1, un gen de nm23, un gen de proteína Rb, un gen de Brush-1, un gen de inhibidor del crecimiento tumoral (ING-4), un gen de survivina, un gen de proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP), un gen de proteína inhibidora de la apoptosis neural (NAIP) y genes de proteínas reguladoras de estos genes;

20

25

[29] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona del grupo consistente en un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis, en el que el gen de factor inductor de la apoptosis puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de citocina, un gen de interleucina, un gen de factor de necrosis tumoral (TNF), un gen de interferón (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ), un gen de factor estimulante de colonias (CSF), un gen de p53, un gen de Apaf-1, un gen de TRAIL, un gen de caspasa, un gen de Bax, un gen de Bad, un gen de FADD, un gen de JNK, un gen de cinasa p38 y genes de proteínas reguladoras de estos genes;

30

35

[30] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce el gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona del grupo consistente en un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis, en el que el gen regulador del ciclo celular puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de cdc2, un gen de ciclina (ciclina A, ciclina D, ciclina E), un gen de cdc25C, un gen de p21WAF, un gen de p16INK4, un gen de CDK (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6), un gen de proteína Rb, un gen de E2F, un ARN anticodificante o ARNip del mismo y genes de proteínas reguladoras de estos genes;

40

45

[31] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce el gen antitumoral en el MSC de UCB, en el que el gen antitumoral se selecciona del grupo consistente en un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular y un gen inhibidor de la angiogénesis, en el que el gen inhibidor de la angiogénesis puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de trombospondina 1, un gen de endostatina, un gen de tumstatina, un gen de canstatina, un gen de vastatina, un gen de restina, un gen de inhibidor del crecimiento endotelial vascular, un gen de maspina, un gen de angiopoyetinas, un gen de un fragmento de prolactina de 16 kDa y un gen de endorepelinina;

50

55

[32] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un gen de enzima convertora de profármaco en el MSC de UCB;

60

[33] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un gen de enzima convertora de profármaco en el MSC de UCB, en el que el gen de enzima convertora de profármaco se selecciona del grupo consistente en el

65



gen de citosina desaminasa y el gen de CYP2B1;

5 [34] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un ARN anticodificante o ARNip de un gen relacionado con un tumor en el MSC de UCB;

10 [35] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un ARN anticodificante o ARNip de un gen relacionado con un tumor en el MSC de UCB, en el que el gen relacionado con un tumor puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de la familia Ras, un gen de c-myc, un gen de abl, un gen de erbB-1, un gen de EGF-R, un gen de Bax, un gen de la proteína de interacción con Apaf-1 (APIP), un gen de la proteína 1 secretada inducida por Wnt-1 (WISP-1), un gen de Wnt, un gen de Raf-1, un gen de Src, un gen de Akt, un gen de Erk-1,2 y un gen de Bcl-2;

20 [36] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de tratamiento génico incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un virus oncolítico en el MSC de UCB;

25 [37] una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo del MSC de UCB, en el que se introduce un virus oncolítico en el MSC de UCB, en el que el virus oncolítico se selecciona de herpesvirus simple y reovirus de tipo 3;

[38] una composición para uso en el diagnóstico de una enfermedad que aparece en un sitio que incluye una célula o en la monitorización de la progresión del tratamiento de la enfermedad, en la que la composición incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce un tropismo del MSC de UCB;

30 [39] una composición para uso en el diagnóstico de una enfermedad que aparece en un sitio que incluye una célula o en la monitorización de la progresión del tratamiento de la enfermedad, en la que la composición incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce un tropismo del MSC de UCB, en el que el MSC de UCB está marcado con un marcador detectable; y

35 [40] una composición para uso en el diagnóstico de una enfermedad que aparece en un sitio que incluye una célula o en la monitorización de la progresión del tratamiento de la enfermedad, en la que la composición incluye un MSC de UCB, en el que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce un tropismo del MSC de UCB, en el que el MSC de UCB está marcado con un marcador detectable, en el que el marcador detectable se selecciona de un detector fluorescente basado en enzima que contiene luciferasa y nanopartículas magnéticas derivadas del péptido Tat.

40 De aquí en adelante, se describirá con detalle la presente invención.

45 En la presente memoria descriptiva, el término "sangre umbilical" hace referencia a sangre recogida de la vena umbilical que conecta la placenta con el feto en todos los mamíferos, incluyendo los seres humanos.

En la presente memoria descriptiva, el término "citoblasto mesenquimatoso derivado de sangre del cordón umbilical (MSC de UCB)" hace referencia a un MSC que se aísla de sangre umbilical de mamíferos, preferiblemente seres humanos, y se cultiva.

50 En la presente memoria descriptiva, el término "tratamiento" hace referencia a: prevenir el desarrollo de una enfermedad o trastorno en un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente seres humanos, que todavía no se han diagnosticado con, pero son susceptibles de, la enfermedad; detener la progresión de la enfermedad y aliviar la enfermedad.

55 En la presente memoria descriptiva, el término "tumor cerebral" hace referencia a un tumor maligno o benigno desarrollado en el cerebro y la médula espinal y a todo tipo de tumores desarrollados en un neuroglíocito o no en neuroglíocito. A este respecto, el tumor cerebral puede ser un tumor cerebral primario o un tumor cerebral secundario.

60 Por su parte, los términos que no se definen en la presente memoria descriptiva pueden tener los significados que se definen convencionalmente en la materia.

65 Para aislar monocitos, que incluyen MSC de UCB, puede usarse cualquier procedimiento conocido tal como el procedimiento dado a conocer en la patente coreana registrada nº 489248, presentada y registrada por el solicitante de la presente solicitud. Por ejemplo, el procedimiento de aislamiento puede ser un procedimiento de gradiente de

densidad de Ficoll-Hypaque, pero no está limitado al mismo. Específicamente, se centrifuga la UCB recogida de una vena umbilical después del parto y antes de separarse la placenta con un gradiente de Ficoll-Hypaque obteniéndose monocitos, y se lavan entonces los monocitos varias veces para retirar las impurezas de los mismos. Los monocitos resultantes pueden usarse directamente para el aislamiento o cultivo de MSC, o criopreservarse durante un largo periodo de tiempo.

Puede aislarse un MSC de UCB y cultivarse usando cualquier procedimiento conocido (véanse Pittinger MF *et al.* Science, 284: 143-7, 1999 y Lazarus HM *et al.* Bone Marrow Transplant, 16: 557-64, 1995), tal como el procedimiento descrito en la patente coreana publicada nº 2003-0069115.

En primer lugar, se centrifuga la UCB aislada, por ejemplo, con un gradiente de Ficoll-Hypaque para separar los monocitos, incluyendo células hematopoyéticas y MSC, y se lavan entonces los monocitos varias veces para retirar las impurezas de los mismos. Se siembran entonces los monocitos a una concentración apropiada en una placa de cultivo para hacer crecer células en forma de una monocapa. Se identificaron estas células con un microscopio de contraste de fases. En la imagen microscópica de contraste de fases, las colonias de células que tienen una forma de huso homogénea son MSC. Se subcultivan y multiplican entonces las células, después de cultivadas y crecidas, hasta que el número de células alcanza el número deseado.

Los MSC de UCB incluidos en la composición según la presente invención pueden criopreservarse usando procedimientos conocidos (véase Campos *et al.*, Cryobiology 35: 921-924, 1995). Un medio para el proceso de criopreservación puede incluir 10-20% de suero bovino fetal (FBS) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Se suspenden las células en el medio hasta que la concentración de células es de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por 1 ml de medio.

Se divide la suspensión celular, se carga cada parte en una ampolla de vidrio o plástico para criopreservación y se sella entonces la muestra y se carga en un congelador programado de temperatura controlada. Las células pueden congelarse usando un programa de congelación que proporciona un cambio de temperatura de  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ , de modo que pueda reducirse el daño a las células cuando se descongelan las células congeladas. Cuando la temperatura de la muestra alcanza  $-90^\circ\text{C}$  o menos, se pasa la muestra a un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido que tiene una temperatura de  $-150^\circ\text{C}$  o menos.

Cuando se descongelan las células congeladas, se pasa rápidamente la muestra del tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido a un baño de agua que tiene una temperatura controlada de  $37^\circ\text{C}$ . Se pasa inmediatamente el contenido descongelado en la ampolla a una placa de cultivo que contiene un medio de cultivo en condiciones estabilizadas.

Según la presente invención, un medio de cultivo para aislar y cultivar un MSC puede ser un medio de cultivo celular que contiene de 10 a 30% de FBS. El medio de cultivo celular puede ser cualquier medio de cultivo celular que se use convencionalmente en la materia. Los ejemplos de medio de cultivo celular incluyen un medio DMEM, un medio MEM, un medio  $\alpha$ -MEM, un medio McCoy 5A, un medio basal Eagle, un medio CMRL, un medio necesario mínimo de Glasgow, un medio F-12 (de Ham), un medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), un medio L-15 (de Liebovitz) y un medio RPMI 1640. Por ejemplo, el medio de cultivo celular puede ser el medio DMEM. Durante el cultivo, las células pueden suspenderse de modo que la concentración de células sea de aproximadamente  $5 \times 10^3$  a  $2 \times 10^4$  células por 1 ml de medio.

El medio de cultivo celular puede incluir además también uno o más aditivos, si se requieren. Los aditivos pueden incluir al menos un material seleccionado del grupo consistente en: un suero fetal de ternero, caballo o ser humano; una penicilina G para prevenir la contaminación por microorganismos; antibióticos tales como sulfato de estreptomycin o gentamicina; agentes antifúngicos tales como anfotericina B o nistatina y mezclas de al menos dos materiales seleccionados de los anteriores.

Según la presente invención, los MSC de UCB pueden genomanipularse de modo que transfieran un fármaco terapéutico para inhibir sustancialmente el crecimiento de células tumorales cerebrales. También según la presente invención, los MSC de UCB pueden genomanipularse de modo que transfieran un gen terapéutico o producto del mismo a células que secretan IL-8 o GRO- $\alpha$ . A este respecto, el término "inhibir" hace referencia a inhibir la proliferación y crecimiento celulares, además de a necrosis y apoptosis. El gen terapéutico puede ser, por ejemplo, un gen antitumoral, un gen de una enzima convertora de profármaco en fármaco, un ARN anticodificante o ARNip de un gen relacionado con un tumor o un virus oncolítico (véase Yip S *et al.*, The Cancer J. 259(3), 189-204, 2003). El gen antitumoral puede ser un gen supresor tumoral, un gen de factor inductor de la apoptosis, un gen regulador del ciclo celular o un gen inhibidor de la angiogénesis. Específicamente, el gen supresor tumoral puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), un gen de maspina, un gen de RUNX3, un gen de caveolina 1, un gen de nm23, un gen de proteína Rb, un gen de Brush-1, un gen de inhibidor del crecimiento tumoral (ING-4), un gen de survivina, un gen de proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP), un gen de proteína inhibidora de la apoptosis neural (NAIP) y genes de proteínas reguladoras de estos genes. El gen supresor tumoral no está limitado a los genes descritos anteriormente. El gen de factor inductor de la apoptosis puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de citocina, un gen de interleucina, un

gen de factor de necrosis tumoral (TNF), un gen de interferón (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ), un gen de factor estimulante de colonias (CSF), un gen de p53, un gen de Apaf-1, un gen de TRAIL, un gen de caspasa, un gen de Bax, un gen de Bad, un gen de FADD, un gen de JNK, un gen de cinasa p38 y genes de proteínas reguladoras de estos genes. El gen de factor inductor de la apoptosis no está limitado a los genes descritos anteriormente. El gen regulador del ciclo celular puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de cdc2, un gen de ciclina (ciclina A, ciclina D, ciclina E), un gen de cdc25C, un gen de p21WAF, un gen de p16INK4, un gen de CDK (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6), un gen de proteína Rb o un gen de E2F. El gen regulador del ciclo celular no está limitado a los genes descritos anteriormente. El gen inhibidor de la angiogénesis puede seleccionarse del grupo consistente en un gen de trombospondina 1, un gen de endostatina, un gen de tumstatina, un gen de canstatina, un gen de vastatina, un gen de restina, un gen de inhibidor del crecimiento endotelial vascular, un gen de maspina, un gen de angiopoyetinas, un gen de un fragmento de prolactina de 16 kDa y un gen de endorepelinina. El gen inhibidor de la angiogénesis no está limitado a los genes descritos anteriormente. El gen de enzima conversora de profármaco en fármaco puede ser citosina desaminasa que convierte 5-FC en 5FU, que es un fármaco anticanceroso, o el gen CYP2B1, que participa en la bioactivación de ciclofosfamida e ifosfamida que son fármacos anticancerosos, en los que 5-FC es un profármaco de 5-FU. El gen de enzima conversora de profármaco en fármaco no está limitado a estos materiales descritos anteriormente. El ARN anticodificante o ARNip de un gen relacionado con un tumor puede ser, pero sin limitación, un ARN anticodificante o ARNip de un gen de la familia Ras, un gen de c-myc, un gen de abl, un gen de erbB-1, un gen de EGF-R, un gen de Bax, un gen de la proteína de interacción con Apaf-1 (APIP), un gen de la proteína 1 secretada inducida por Wnt-1 (WISP-1), un gen de Wnt, un gen de Raf-1, un gen de Src, un gen de Akt, un gen de Erk-1,2 y un gen de Bcl-2.

El virus oncolítico que puede portarse por MSC de UCB puede ser un herpesvirus simple o un reovirus de tipo 3, pero no está limitado a los mismos.

Los MSC de UCB en los que se introduce un gen deseado en estado expresable pueden fabricarse apropiadamente usando técnicas que son conocidas en la materia. Por ejemplo, se prepara un vector que incluye el gen para introducir (véase Dehari H *et al.*, Cancer Gene Ther., 10, 75-85, 2003; W007/037653) y se transduce entonces el vector *ex vivo* en MSC de cultivo primario. A este respecto, los ejemplos de vector incluyen vector adenovirico, vector retrovirico, vector virico adenorelacionado, vector herpesvirico simple, vector de SV40, vector poliomavirico, vector papilomavirico, vector picarnovirico, vector de virus Vaccinia vector lentivirico. Por ejemplo, puede usarse un procedimiento desarrollado por Tsuda H *et al.* (Mol. Ther. 2003, 7, 354-365). Específicamente, un día antes de infectarse con un gen adenovirico, pueden inocularse MSC ( $5 \times 10^5$  células) en una placa de cultivo. Se incuban entonces a 37°C en una incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora los MSC y una solución que incluye un vector adenovirico en que se introduce el gen adenovirico, de modo que los MSC se infecten con el gen adenovirico. Se lavan entonces los MSC infectados con una solución tamponadora de ácido fosfórico y se aplica entonces un medio convencional a la misma. Como alternativa, sin usar un vector virico, puede introducirse un gen deseado en MSC de UCB usando ADN desnudo y cualquier procedimiento seleccionado del procedimiento de fosfato de calcio, el procedimiento de liposoma catiónico y el procedimiento de electroporación. Como alternativa, puede introducirse una gen de proteína de fusión del dominio de transducción de proteína (PTO) y una proteína antitumoral en MSC de UCB usando el vector que incluye el gen de proteína de fusión (véase Wu SP *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 346(1), 1-6, 2006).

Los vectores pueden incluir además un gen marcador para un examen cronológico adicional. El gen marcador puede ser, por ejemplo, un gen que codifica una proteína cromogénica o fluorescente, tal como lacZ o la proteína fluorescente verde (GFP), pero no está limitado a las mismas (véase Yip S *et al.*, The Cancer J. 9(3), 189-204, 2003).

Los tumores cerebrales que pueden diagnosticarse, prevenirse y tratarse usando la composición farmacéutica según la presente invención pueden ser tumores cerebrales primarios o tumores cerebrales secundarios. Los ejemplos de tumores cerebrales que pueden diagnosticarse, prevenirse y tratarse usando la composición según la invención incluyen astrocitoma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma de baja malignidad, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, glioma troncoencefálico, ependimoma, subependimoma, ganglioneuroma, glioma mixto, oligodendroglioma, glioma de nervio óptico, neurinoma del estatoacústico, cordoma, linfoma del SNC, craneofaringioma, hemangioblastoma, meduloblastoma, meningioma, tumores pineales, tumores pituitarios, tumores neuroectodérmicos primitivos, tumores rabdoides, schwannoma, quistes, neurofibromatosis, seudotumor cerebral y esclerosis tuberosa. Sin embargo, los tumores cerebrales que pueden diagnosticarse, prevenirse y tratarse usando la composición según la presente invención no están limitados a estos tumores descritos anteriormente.

La composición farmacéutica según la presente invención puede administrarse junto con cualquier fármaco anticanceroso.

Puesto que los MSC de UCB no expresan HLA-DR (complejo principal de histocompatibilidad de clase II), que es la causa principal de rechazo inmunológico cuando se transplanta un tejido u órgano (véanse Le Blanc, KC, Exp. Hematol., 31: 890-896, 2003 y Tse WT *et al.*, Transplantation, 75: 389-397, 2003), no aparecen o pueden minimizarse reacciones inmunológicas tales como el rechazo, que son problemas importantes en los transplantes. Por consiguiente, los MSC de UCB incluidos en la composición farmacéutica según la presente invención pueden

recogerse, además de UCB derivada del paciente, de UCB derivada de otro sujeto. Según la presente invención, los MSC de UCB pueden usarse después de crioconservarse.

5 La composición que contiene MSC de UCB para terapia génica o para prevenir o tratar enfermedades según la presente invención puede incluir además aditivos farmacéuticamente aceptables, además del componente eficaz. La composición farmacéutica que contiene MSC de UCB puede conformarse en una formulación adecuada, que puede administrarse a un cuerpo. La formulación adecuada puede ser una formulación de administración no oral, tal como una formulación inyectable o una formulación administrable por vía local. Por ejemplo, una solución o suspensión esterilizada que incluye agua o un disolvente farmacéuticamente aceptable puede administrarse por vía no oral en  
10 forma inyectable. Específicamente, el agua o disolvente farmacéuticamente aceptable se combina apropiadamente con un portador o medio farmacéuticamente aceptable, formando así una formulación inyectable en una dosificación unitaria convencionalmente aceptable. Los ejemplos de portador o medio farmacéuticamente aceptable pueden incluir agua estéril, solución salina, aceites vegetales, emulsionante, suspensión, tensioactivo, estabilizante, excipiente, vehículo, sustancia antiséptica, aglutinante, etc.

15 La formulación inyectable descrita anteriormente puede administrarse por vía no oral, específicamente administrarse directamente al sitio de enfermedad, usando un procedimiento convencional. Como alternativa, la formulación inyectable descrita anteriormente puede administrarse mediante fluido cerebroespinal, una vena o una arteria que suministre sangre al sitio de enfermedad, preferiblemente administrarse directamente a las zonas cercanas al sitio de enfermedad en el cerebro o la médula espinal o zonas contiguas al mismo. Por ejemplo, la formulación inyectable descrita puede administrarse usando un procedimiento clínico desarrollado por Douglas Kondziolka en Pittsburgh en 1998. Es decir, se perfora el cráneo de un sujeto para administrar a un diámetro de aproximadamente 1 cm, el tamaño de un guisante, y se inyecta entonces en el mismo una solución de MSC mezclados con solución salina equilibrada de Hank (HBSS). A este respecto, se efectúa la inyección de la solución de MSC usando un inyector que  
20 incluye una aguja larga y un marco estereotáctico para inyectar exactamente la solución de MSC en el cerebro.

25 La dosis diaria de MSC de UCB puede ser de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^7$  células/kg de peso corporal, preferiblemente de  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/kg de peso corporal. La dosis diaria puede administrarse de una vez o dividirse para varios tratamientos. Sin embargo, según la presente invención, la dosis de administración de MSC de UCB puede variar según los tipos de enfermedad para tratar, la gravedad de la enfermedad para tratar, las vías de administración y el peso, edad y género del paciente. Por consiguiente, la dosis de administración descrita anteriormente no limita el alcance de la presente invención.

30 La presente invención da a conocer también un procedimiento de tratamiento de una enfermedad relacionada con una célula que produce IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo de MSC de UCB, o de un tumor cerebral, en el que el procedimiento incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica según la presente invención a un paciente. En este sentido, los MSC de UCB incluidos en la composición farmacéutica pueden recogerse de UCB del paciente mismo o de otros seres humanos o animales usados con fines médicos. En este sentido, los MSC de UCB pueden usarse después de crioconservación. Dicho procedimiento que usa MSC de UCB no está limitado a seres humanos, y puede aplicarse a otros mamíferos.

35 La presente invención da a conocer también un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad relacionada con una célula que produce IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo de MSC de UCB, o de un tumor cerebral, y un kit usado para efectuar el procedimiento, en el que el procedimiento usa MSC de UCB. En este procedimiento, los MSC de UCB pueden marcarse con un marcador detectable. Los MSC de UCB marcados con el marcador detectable pueden visualizarse mediante una técnica del estado de la técnica, y pueden rastrearse instantáneamente en un animal vivo. El marcador detectable puede ser un detector fluorescente basado en enzima que contiene luciferasa o nanopartículas magnéticas derivadas de péptido Tat (Yip S *et al.*, The Cancer J. 9(3), 189-204, 2003). Si se usa un citoblasto que expresa luciferasa, el citoblasto administrado que migra al sitio de enfermedad puede rastrearse identificando la bioluminiscencia instantáneamente y, por tanto, pueden diagnosticarse las enfermedades e  
45 identificarse el sitio de enfermedad (véase Weissleder R *et al.*, Nat Med. 9, 123-128, 2003). Las nanopartículas magnéticas derivadas del péptido Tat se conectan con MSC de UCB usando un procedimiento desarrollado por Lewin *et al.*, (véase Nat. Biotech. 18, 410-414, 2000) y se administran entonces *in vivo*. Los MSC de UCB administrados pueden rastrearse mediante la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). Por consiguiente, los MSC de UCB marcados con un marcador pueden administrarse *in vivo* y entonces, identificando la localización donde se reúnen los MSC de UCB, pueden identificarse el tumor y el sitio tumoral. Además, los MSC de UCB marcados con el marcador pueden administrarse durante el tratamiento del tumor cerebral o después del tratamiento del tumor cerebral para identificar la localización y el tamaño de la distribución de los MSC de UCB administrados. Es decir, puede monitorizarse también la progresión del tratamiento del tumor cerebral. Por  
50 consiguiente, la presente invención da a conocer también un procedimiento de monitorización de la progresión del tratamiento del tumor cerebral y un kit usado para efectuar el procedimiento, en el que el procedimiento usa MSC de UCB. El procedimiento de monitorización y el kit usados para efectuar el procedimiento pueden aplicarse también a una enfermedad relacionada con una célula que produce IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo de MSC de UCB.

65 La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo con fines ilustrativos.

## Ejemplos

Se adquirieron las líneas celulares U-87 MG, A549, KATO III, PLC/PRF5, LN18, U138 y U251 en la American Type Culture Collection (ATCC) y se usaron en los presentes experimentos. Se cultivaron las células A549, KATO III y PLC/PRF5 en RPMI que contenía 10-20% (v/v) de FBS (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) y gentamicina al 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivaron las células U-87 MG, LN18, U138 y U251 en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) que contenía 10-20% (v/v) de FBS. Se adquirieron los citoblastos mesenquimatosos derivados de médula ósea (MSC de BM) en LONZA. Los MSC de BM y MSC de UCB establecidos se cultivaron en medios  $\alpha$ -MEM que contenían 10-20% de FBS.

### <Ejemplo 1> Preparación de citoblastos mesenquimatosos derivados de sangre del cordón umbilical (MSC de UCB)

Se recolectaron muestras de UCB de la vena umbilical de partos, con consentimiento informado materno. Específicamente, se insertó una aguja de calibre 16 de una bolsa de recogida de UCB que contenía 44 ml de anticoagulante CPDA-1 (Greencross Co., Yongin, Kyungki-do, Corea) en la vena umbilical y se recolectó la UCB por gravedad. En todos los casos, se procesaron las recolecciones de UCB al cabo de 48 horas de la recogida, con una viabilidad del 90% o más.

### <Ejemplo 2> Aislamiento y propagación de MSC de UCB

Se centrifugaron los MSC de UCB preparados según el ejemplo 1 con un gradiente de Ficoll-Hypaque (producido por Sigma Co., densidad: 1,077 g/ml) y se lavaron entonces varias veces para retirar impurezas. Se añadió un medio básico que contenía de 10 a 20% de FBS (HyClone Co.) ( $\alpha$ -MEM, Gibco BRL Co.) al producto resultante para suspender los MSC de UCB. Se repartieron los MSC de UCB a una concentración adecuada en cada uno de los medios básicos que contienen de 10 a 20% de FBS y se cultivaron entonces a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, cambiándose el medio dos veces por semana (figura 1). Cuando las células cultivadas formaron una monocapa, se identificaron los MSC propagados en forma de huso con un microscopio de contraste de fases. Se efectuó repetidamente entonces el subcultivo hasta que los MSC se propagaron suficientemente.

### <Ejemplo 3> Preparación de MSC de UCB marcados con PKH-26

Se tiñeron con PKH-26 (Sigma Co.) MSC de UCB cultivados según el ejemplo 2 usando un procedimiento dado a conocer en una referencia [Barreda DA *et al.*, Developmental and Comparative Immunology, 24: 395-406, 2000]. En primer lugar, se separaron los MSC de UCB de la placa de cultivo celular usando tripsina, y entonces, se lavaron 2 x 10<sup>7</sup> células con un medio exento de FBS. Se recogieron las células lavadas usando una centrifuga y se suspendieron entonces en 1 ml de diluyente C en un kit proporcionado por el fabricante. Se mezcló entonces la solución de suspensión celular resultante (2x) con 1 ml de solución de tinte fluorescente PKH (2x) y se hizo reaccionar entonces la mezcla a 25°C durante 5 minutos. Para terminar la reacción de marcaje, se añadió un medio que contenía un volumen igual de suero fetal bovino (FBS) al producto de reacción y se dejó reposar entonces durante 1 minuto. Se recolectaron las células marcadas con PKH26 mediante centrifugación y se lavaron entonces con un medio que contenía de 10 a 20% de FBS tres veces y se usaron en los experimentos.

### <Ejemplo 4> Cultivo conjunto de MSC y otras líneas celulares en una cámara Transwell

Se tiñeron con PKH-26 (producido por Sigma) MSC de UCB humana (MSC de UCBh). Se cultivaron conjuntamente los MSC de UCBh teñidos y otras líneas celulares tumorales en condiciones de cultivo en una cámara Transwell (FALCON) (MSC: líneas celulares cancerosas= 1:5). Para el grupo de control, se cultivaron MSC exentos de líneas celulares cancerosas en las mismas condiciones que se describen anteriormente. La cámara Transwell usada en el cultivo conjunto, como se ilustra en la figura 2, incluía un compartimento inferior y un compartimento superior, estando separado el compartimento inferior del compartimento superior por una membrana microporosa (8  $\mu$ m de tamaño). En el compartimento superior, se cultivaron MSC de UCBh marcados con PKH26 y en el compartimento inferior se cultivaron cada una de la línea celular tumoral de cerebro humano U87-MG, la línea celular de cáncer rectal humano LS174-T, NC-37 de linfocitos B humanos y NIH3T3 de fibroblasto de ratón. Después de cultivar conjuntamente durante un día, dos días y tres días cada uno, se identificó la migración de MSC de UCB marcados con PKH26 usando un microscopio de contraste de fases (x100) y se contaron los MSC de UCB marcados con PKH26 (figura 3). Se efectuó el mismo experimento usando KATO III, A549, PLC/PRF5, LN18, U138 y U251, que son líneas tumorales celulares, y se identificó la migración de MSC de UCB marcados con PKH26. Se efectuó el mismo experimento en condiciones en que el medio acondicionado con células U-87 MG se disponía en el compartimento inferior (figura 4).

Es decir, se cultivaron conjuntamente MSC de UCB marcados con PKH26 con diversas líneas celulares tumorales en una cámara Transwell y se contaron entonces los citoblastos mesenquimatosos marcados con PKH que han migrado al compartimento inferior. Como resultado, los MSC de UCB tenían un fuerte tropismo por U87-MG, LN18, U138 y U251, que son líneas celulares de tumor cerebral, y un débil tropismo por otras células tumorales (figura 3 y 4). En B de la figura 3, la imagen izquierda muestra el caso del grupo de control en que se añadió medio exento de

línea celular humana en lugar de células tumorales, y la imagen derecha muestra el caso en que se cultivaron conjuntamente MSC de UCB con células U87-MG. Con respecto a la figura 3, se identificó la migración de muchos MSC de UCB marcados con PKH26. Cuando se usó medio exento de línea celular humana en lugar de células tumorales y se cultivó, la migración de MSC de UCB marcados con PKH26 era insignificante (véase la imagen izquierda de B de la figura 3). Sin embargo, los MSC de UCB marcados con PKH26 tenían tropismo por medio acondicionado que no contenía células U-87 MG pero en que se habían cultivado células U-87 MG (véase D de la figura 4). Dichos resultados muestran que el medio acondicionado contenía factores solubles que funcionaban atrayendo los MSC de UCB hacia las células U-87 MG.

10 <Ejemplo 5 > Comparación del tropismo de MSC de BM por U87-MG y el tropismo de MSC de UCB por U87-MG

Se comparó el tropismo de MSC de BM por U87-MG con el tropismo de MSC de UCB por U87-MG usando una cámara Transwell. Se dispusieron las células o medio cancerosos U87-MG en el compartimento inferior, y se dispusieron cada uno de MSC de BM y MSC de UCB en el compartimento superior. En todos los casos, se efectuó el cultivo durante 2 días. Como resultado, se encontró que los MSC de UCB tenían un tropismo mayor por U87-MG que los MSC de BM (figura 5).

<Ejemplo 6> Comparación de las migraciones de MSC

20 Se cultivaron conjuntamente en una cámara Transwell MSC de UCB donados de cuatro donantes en el compartimento superior y cada una de A549, que es célula de cáncer de pulmón, HeLa, que es célula de cáncer cervicouterino, y U87-MG, que es célula de glioma-cáncer cerebral en el compartimento inferior. Se compararon entonces los índices quimiotácticos de los MSC de UCB en cada caso (figura 6).

25 Se adquirieron las células A549, HeLa y U87-MG en la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivaron cada una de las células A549 y U87 MG en RPMI1640 que contenía suero bovino al 10-20%, y se cultivaron las HeLa en DMEM. En cada caso, se calculó el índice quimiotáctico dividiendo el número de MSC de UCB migrados hacia U87 MG entre el número de MSC de UCB migrados en el experimento de control. Se analizó el tropismo de MSC de UCB por estas células cancerosas. Como resultado, se encontró que los MSC de UCB tenían un tropismo mayor por U87 MG que una línea celular de tumor cerebral.

<Ejemplo 7> Matriz de citocinas

35 Se cultivaron conjuntamente MSC y cada uno de los tres tipos de células humanas, incluyendo células tumorales U87-MG, y se recolectó el medio cultivado. Se examinó el perfil de citocinas del medio cultivado usando una matriz de anticuerpos de citocinas.

Se extrajo una película en la que estaban enlazados anticuerpos de diversas citocinas de un kit de matriz de citocinas adquirido en R&D System Co., y se hizo reaccionar con una solución de bloqueo durante 1 hora. Separadamente, se ajustaron a 1,5 ml o menos las cantidades de los medios preparados mediante cultivo conjunto de MSC de UCB y cada uno de los tres tipos de células humanas, incluyendo células tumorales U87-MG, y se mezcló cada medio con los anticuerpos mixtos de citocinas contenidos en el kit, y se indujo una reacción de antígeno-anticuerpo durante 1 hora. Se hizo reaccionar el medio en que se combinaron los anticuerpos de citocina suministrados con citocinas secretadas con la película, que se sometió a bloqueó a 4°C durante 12 horas. Después de la reacción, se dispuso la película en una solución de lavado, se lavó y se secó entonces con agua destilada tres veces. Se secó entonces la película a temperatura ambiente. Después de repetir los procesos de lavado y secado dos o tres veces, se hizo reaccionar la película con una solución que contenía estreptavidina-HRP durante 30 minutos. Se lavó entonces la película con una solución de lavado tres veces, se hizo reaccionar con un agente cromático y se expuso entonces a una película de rayos X en sala oscura.

50 Las U87-MG inductoras de un alto tropismo de MSC de UCB secretaron oncogén relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ), IL-8, MCP-1, G-CSF, GM-DSF, IL-6, IL-1 $\beta$ , un factor inhibidor de la migración (MIF) y serpina E1. Específicamente, las cantidades de GRO- $\alpha$  e IL-8 eran mayores que las de MCP-1, G-CSF, GM-DSF, IL-6, IL-1 $\beta$ , un MIF y serpina E1.

55 La figura 7 muestra los resultados obtenidos analizando los lisados celulares y sobrenadantes de cultivo celular mediante una matriz de citocinas. Se muestran en la figura 1 los resultados de la matriz e información sobre los puntos cambiados en comparación con el grupo de control. En la Tabla 1, las citocinas entre paréntesis son citocinas que derivaban del cultivo conjunto con células tumorales. Es altamente probable que estas citocinas puedan inducir el tropismo de MSC de UCB.

[Tabla 1]

	Lisado celular	Sobrenadantes
NC37	MIF+++	MIF+++

	sICAM-1++	Serpina E1+++
	MIP-1a++	MIP-1a++
	IL-16++	MIP-1b++
		IL-6+
		IL-8+
LS174T	MIF+++	MIF+++
	IL-1ra++	Serpina E1+++
	GRO- $\alpha$ +	IL-6+
		IL-8+
U87	sICAM-1+++	(GRO- $\alpha$ +++)
	IL-6+++	IL-6+++
	MIF+++	(IL-8+++)
	Serpina E1+++	Serpina E1+++
	IL-1ra++	(G-CSF++)
	IL-8++	MIF++
	G-CSF++	(MCP-1+)
	IL-1a+	
	IL-1b+	

- Se prepararon medios acondicionados recolectados de cultivos de MSC de UCB solos, cultivos de células U-87 MG solas y cultivo conjunto de ambas células. Se incubó cada medio acondicionado en una membrana de matriz y se visualizó entonces mediante un reactivo ECL. Se compararon entonces los medios acondicionados visualizados entre sí (véase la figura 8). La figura 8A muestra los resultados del análisis de la matriz de anticuerpos de citocina del medio preparado cultivando MSC de UCB solos y un medio de control. La figura 8B muestra los resultados del análisis de la matriz de anticuerpos de citocina del medio preparado cultivado U-87 MG solas y medio preparado cultivando conjuntamente MSC de UCB y U-87 MG.
- 10 La figura 8C muestra los resultados identificados al aislar ARNm de MSC de UCB cultivados con y sin U-87 MG (izquierda) o de U-87 MG cultivadas con y sin MSC de UCB (derecha). Se efectuó una PCT-TI con cebadores específicos de IL-8 y se usó GAPDH como control. Cuando se midió el nivel de ARNm de IL-8 mediante PCR-TI, se encontró que la U-87 MG expresa IL-8 en ambos casos en que la U-87 MG se cultivaba con y sin MSC de UCB.
- 15 <Ejemplo 8> Efecto de la citocina con respecto a la migración de MSC de UCB
- Se midió el efecto de IL-8, GRO- $\alpha$ , MCP-1 (RND Systems, MN, EE.UU.) con respecto a la migración de MSC de UCB usando el ensayo de migración Transwell. Se dispusieron MSC de UCB marcados con PHK-26 en el compartimento superior y no se dispuso ninguna célula en el compartimento inferior. Se cultivaron los MSC de UCB en un medio exento de IL-8 o en un medio que contenía diferentes concentraciones de IL-8 humana recombinante durante 24 horas. Como resultado, puede observarse que los MSC de UCB migraban más cuando se trataban con IL-8 que cuando no se trataban con IL-8 (figura 9A).
- 25 El receptor de IL-8 en MSC de HCB puede bloquearse eficazmente por anticuerpos de receptor 1 de quimiocina CXC (CXCR1) antihumanos. Después de la preincubación de MSC de UCB con anticuerpos anti-CXCR1, se aplicó de nuevo IL-8 recombinante a MSC de UCB. Se redujo la migración de MSC de UCB mediada por IL-8, de manera dependiente de la dosis, por el tratamiento con anti-CXCR1 (figura 9B). El tratamiento con anti-CXCR2 mostró también el mismo efecto.
- 30 De forma similar, el tratamiento con GRO- $\alpha$  potenciaba también la migración de MSC de UCB cuando se comparaba con células no tratadas (figura 9C). GRO- $\alpha$  pertenece también a la subfamilia de CC y puede interactuar con el receptor de CXCR2 [véase Wuys A. *et al.* Eur. J. Biochem. 255, 67-73 (1998)].
- 35 En contraposición, no se encontraron diferencias significativas en la migración de MSC de UCB en cultivos tratados con MCP-1 (figura 9D). Estos datos indican firmemente que IL-8 y GRO-a participan en la migración de MSC de UCB hacia células U-87 MG.

<Ejemplo 9> Los MSC de UCB migran hacia células A549 que sobreexpresan IL-8

Se identificó la relación entre la concentración de IL-8 secretada de varias células cancerosas y la migración de MSC de UCB hacia cada célula cancerosa. La figura 10A muestra resultados de ELISA que indican las concentraciones de IL-8 secretada en medios en que se cultivaron células U87 MG (tumor cerebral), KATO III (cáncer gástrico), A549 (cáncer de pulmón) y PLC/PRF5 (cáncer hepático). En este sentido, se midió la concentración de IL-8 por  $1 \times 10^5$  células. Entre las líneas celulares cancerosas ensayadas, la U-87 MG mostraba la mayor producción de IL-8. Este dato sugería que los MSC de UCB tenían una fuerte atracción migratoria hacia las células productoras de IL-8. Además, otras células de tumores cerebrales humanos, es decir, células LN18, U13B y U251, mostraban también un nivel de concentración similar de IL-8 que el de U-87 MG (véase la figura 10B). Por lo tanto, puede observarse que los MSC de UCB tienen tropismo por IL-8 secretada por células tumorales cerebrales.

Para saber si la adición de IL-8 a células que expresan un bajo nivel de IL-8 induce la migración de MSC de UCB, se sobreexpresó IL-8 en A549, que es una célula de cáncer de pulmón humano. La figura 10C muestra los resultados de migración de MSC de UCB después de introducir el gen de IL-8 en células A549, que secretan un bajo nivel de IL-8, usando un reactivo de lipofectamina, y se sobreexpresó entonces IL-8. Con respecto a la figura 10C, migraban más MSC de UCB en células A549 que tuvieran IL-8 sobreexpresada que en células A549. Por consiguiente, puede observarse que la IL-8 podía ser un inductor fuerte de la migración de MSC de UCB. La figura 10D muestra la concentración de IL-8 secretada en un medio en condiciones C medido por ELISA.

<Ejemplo 10> Comparación de la reacción de MSC de BM y MSC de UCB con respecto a IL-8

Puesto que es conocido que los MSC de BM migran hacia células U-87 MG *in vitro* e *in vivo*, se compararon las características de migración de MSC de BM y MSC de UCB con respecto a las células U-87 MG con aquellas con respecto a IL-8 (figura 11). A de la figura 11 muestra las características de tropismo de MSC de BM y MSC de UCB que migraban hacia el compartimento inferior B, es decir, hacia U87 MG. B de la figura 11 muestra las características de tropismo de MSC de BM y MSC de UCB que migraban hacia el compartimento inferior B cuando se tratan con IL-8 durante 14 horas. Con respecto a la figura 11, migraban más MSC de UCB que MSC de BM. Por lo tanto, puede observarse que los MSC de UCB correspondían fuertemente a IL-8 y migraban más, pero los MSC de BM correspondían de forma relativamente débil a IL-8.

<Ejemplo 11> Niveles de expresión de los receptores de IL-8 CXCR1 y CXCR2 en MSC de UCB

Se compararon los niveles de expresión de CXCR1 y CXCR2, que son receptores de IL-8, en MSC de UCB y MSC de BM midiendo ARNm y proteína en cada uno de CXCR1 y CXCR2. La figura 12A muestra los resultados de una PCR-TI que se efectuó con cebadores de CXCR1 y CXCR2 después de aislar el ARNm de cada uno de CXCR1 y CXCR2. Se incluyó GAPDH en cada muestra para valorar la cantidad de ARN aislado. La figura 12B muestra los resultados de los niveles de expresión de CXCR1 y CXCR2 obtenidos midiendo cada intensidad de banda de ARNm del gel obtenido en la figura 12A usando un densitómetro (\* y \*\*,  $p < 0.001$ ;  $n = 4$ ). Como resultado del análisis de PCR-TI para todo el ARN aislado de MSC de UCB y MSC de BM, la densidad de banda del producto de PCR de CXCR1 y CXCR2 era mayor en MSC de UCB que en MSC de BM. La Figura 12C muestra los resultados del análisis obtenidos mediante inmunotinción de MSC de UCB y MSC de BM con anticuerpos anti-CXCR1 y CXCR2 para identificar los niveles de expresión de CXCR1 y CXCR2 (x400). Con respecto a C de la figura 12, los MSC de UCB y MSC de BM mostraron altos niveles de expresión de CXCR1 y CXCR2. Puesto que la IL-8 tiene una alta afinidad por CXCR1 y CXCR2, la migración aumentada de MSC de UCM hacia U-87 MG puede ser debida a una expresión regulada positivamente de CXCR1 y CXCR2. La figura 12 D muestra los resultados del análisis obtenido mediante inmunotinción de MSC de UCB y MSC de BM con un anticuerpo secundario solo sin anticuerpos anti-CXCR1 y CXCR2 para identificar la especificidad de antígeno de los anticuerpos anti-CXCR1 y CXCR2.

<Ejemplo 12> Introducción del gen en citoblasto mesenquimatoso de sangre del cordón umbilical

Como ejemplo de experimento en que se introduce un gen en MSC de UCB, se sobreexpresó una proteína fluorescente verde (GFP) usando un procedimiento de electroporación con un nucleofactor de MSC humano producido por Amaxa Biosystem Co. y un procedimiento de electroporación. Se cultivaron  $4 \times 10^5$  células de MSC de UCB durante dos días, se dispusieron entonces en una mezcla de 5 mg de un gen que codificaba GFP y 100 ml de un nucleofactor de MSC humano durante 15 minutos y se introdujo el gen en un electroporador. Se pasaron los MSC de UCB resultantes a una placa y, después de 24 horas, se identificaron los niveles de expresión de GFP en un microscopio fluorescente. La GFP podía identificarse en el citoplasma de cada MSC (véase la figura 13).

Para ensayar el tropismo de MSC de UCB en el que se introduce el gen que codifica GFP, se sobreexpresaron cada uno del gen que codifica GFP y un gen vacío en MSC de UCB y se identificó entonces el tropismo de los MSC de UCB resultantes por U-87 MG. Después de introducir el gen como se describe anteriormente, se dispusieron los MSC de UCB que expresaban GFP en el compartimento superior de una cámara Transwell, se dispusieron U-87 MG en el compartimento inferior de la cámara Transwell y se cultivaron conjuntamente entonces MSC de UCB que expresaban GFP y U-87 MG durante 24 horas. Entre las células migradas hacia el compartimento inferior, se identificaron células positivas de GFP. Como resultado, puede observarse que los MSC de UCB que sobreexpresan



GFP debido a la introducción de un gen de GFP tenían un fuerte tropismo por U87 MG (figura 14).

### Descripción de los dibujos

5 La figura 1 es una vista que ilustra el proceso de recogida de citoblastos mesenquimatosos (MSC).

La figura 2 es una vista esquemática de una cámara Transwell que se usa para cultivar conjuntamente citoblastos mesenquimatosos derivados de sangre del cordón umbilical (MSC de UCB) y diversas líneas celulares según la presente invención.

10 La figura 3 es una gráfica del número de MSC de UCB migrados hacia el compartimento inferior de una cámara Transwell cuando se cultivan conjuntamente MSC de UCB marcados con PKH en el compartimento superior de la cámara Transwell y cada una de células U87-MG, LS174-T, NC-37 y NIH3T3 dispuestas en el compartimento inferior de la cámara Transwell, en la que, en (A), la barra izquierda indica el caso en que el número de células de las líneas celulares en el compartimento inferior de la cámara Transwell es de  $1 \times 10^5$  células y la barra derecha indica el caso en que el número de células en el compartimento inferior de la cámara Transwell es de  $5 \times 10^5$  células, y en ambos casos, el número de MSC de UCB es de  $1 \times 10^5$  células; y en (B), la imagen microscópica fluorescente izquierda muestra los MSC de UCB marcados con PKH26 migrados hacia el compartimento inferior de la cámara Transwell cuando se usa solo un medio exento de líneas celulares humanas (control), y la imagen microscópica fluorescente derecha muestra los MSC de UCB marcados con PKH26 migrados hacia el compartimento inferior de la cámara Transwell cuando se cultivan conjuntamente MSC de UCB con células U87-MG.

15 La figura 4 es una gráfica del número de MSC de UCB migrados hacia el compartimento inferior de la cámara Transwell cuando se cultivan conjuntamente MSC de UCB marcados con PKH dispuestos en el compartimento superior de la cámara Transwell y cada una de las células U87-MG, KATO III, A549, PLC/PRF5, LN18, U138 y U251 dispuestas en el compartimento inferior de la cámara Transwell (A y C), en la que (B) es una imagen microscópica fluorescente de MSC de UCB marcados con PKH26 migrados hacia el compartimento inferior y (D) es una gráfica del número de MSC de UCB migrados cuando se cultivan conjuntamente MSC de UCB con células U-87 MG, o con medios acondicionados con cultivo exento de células U87 MG, que se prepara cultivando células U87 MG en medios y retirando entonces las células U87 MG de los medios.

20 La figura 5 es una gráfica para comparar tropismos de MSC de BM y MSC de UCB por células U87 MG, en la que se cultivan conjuntamente cada uno de MSC de UCB marcados con PKH y MSC de BM marcados con PKH dispuestos en el compartimento superior de la cámara Transwell, y se compara el número de MSC de UCB marcados con PKH migrados hacia el compartimento inferior con el número de MSC de BM marcados con PKH, en la que la barra izquierda indica el caso en que no existen células U-87 MG y la barra derecha indica el caso en que existen células U-87 MG (el número de células U-87 es de  $5 \times 10^5$ , y en ambos casos, el número de MSC es de  $1 \times 10^5$ ).

25 La figura 6 es una gráfica de los índices quimiotácticos de MSC de UCB cuando se cultivan conjuntamente MSC de UCB con líneas celulares cancerosas (células A549, HeLa y U-87 MG).

30 La figura 7 muestra los resultados obtenidos analizando los lisados celulares y los sobrenadantes de cultivo celular mediante una matriz de citocinas después de cultivar conjuntamente cada una de las células NC37, LS174-T y U-87 MG con MSC de UCB.

35 La figura 8 muestra los resultados del análisis obtenido recolectando medios acondicionados en que se cultivaron MSC de UCB solos, se cultivaron células U-87 MG solas y se cultivaron conjuntamente ambos de MSC de UCB y células U-87 MG, incubando los medios acondicionados en membrana de matriz y visualizando entonces los resultados incubados con reactivos ECL, en la que (A) muestra los resultados del análisis de matriz de anticuerpos de citocina de los medios acondicionados con MSC de UCB y medio de control, (B) muestra los resultados del análisis cuando se cultivan los medios acondicionados en que se usa U-87 MG solas y cuando se usan los medios en que se cultivan conjuntamente MSC de UCB y U-87 MG, y (C) muestra los resultados del aislamiento de ARNm de MSC de UCB (izquierda) cultivados con o sin células U-87 MG o MSC de UCB, y de células U-87 MG cultivadas con y sin MSC de UCB, en la que se efectúa una PCR-TI con cebadores específicos de IL-8 y se usa GAPDH como grupo de control.

40 La figura 9 es una gráfica para identificar el efecto de IL-8 y GRO- $\alpha$ , entre las citocinas analizadas con referencia a la figura 8, sobre la migración de MSC, en la que (A) es una gráfica de la migración celular hacia el compartimento inferior cuando se tratan los MSC con una proteína IL-8 recombinante a 0, 1, 10 y 100 ng durante 24 horas, (B) es una gráfica de la migración celular hacia el compartimento inferior cuando se pretratan MSC de UCB con 0,02, 0,2 y 2  $\mu$ g de un anticuerpo de receptor 1 de quimiocina CXC (CXCR1), que es conocido como receptor de IL-8 en células, y se trata entonces con 50 ng de IL-8 para promover la migración de MSC (\*,  $p=0,007$ ; \*\*,  $p<0,001$ ), (C) es una gráfica de la migración celular hacia el compartimento inferior cuando se tratan MSC de UCB con GRO- $\alpha$  (\*,  $p<0,005$ ) y (D) es una gráfica de la migración celular cuando se tratan MSC con proteína 1 quimioattractora de monocitos (MCP-1).

La figura 10 consiste en (A), (B), (C) y (D), en las que (A) y (B) son gráficas de la cantidad de IL-8 secretada a los medios de cultivo con células U-87 MG, KATO III, A549, PLC/PRF5, LN18, U138 y U251, medida por ELISA, (C) es una gráfica de la migración celular cuando se introduce el gen de IL-8 en una célula A549, que secreta un bajo nivel de IL-8, y se sobreexpresa, y (D) es una gráfica de la cantidad de IL-8 secretada en los medios en las condiciones de (C), medida por ELISA.

La figura 11 son gráficas para comparar los tropismos de MSC de UCB y MSC de BM por células U-87 MG, en las que (A) es una gráfica para comparar el tropismo de MSC de UCB y MSC de BM pasados hacia el compartimento inferior, con respecto a las células U-87 MG, y (B) es una gráfica para comparar el tropismo de MS de UCB y MSC de BM cuando se tratan MSC de UCB y MSC de BM con IL-8 durante 14 horas.

La figura 12 muestra los resultados del análisis para comparar los niveles de expresión de receptor 1 de quimiocina CXC y receptor 2 de quimiocina CXC (CXCR1 y CXCR2), que son conocidos como receptores de IL-8, en MSC de UCB y MSC de BM, midiendo ARNm y proteína, en las que (A) muestra los resultados del análisis cuando se separa ARNm de cada uno de MSC de UCB y MSC de BM y se efectúa una PCR-TI con cebadores de CXCR1 y CXCR2 en MSC de UCB y MSC de BM, en los que se cuantificó el ARN separado con referencia al GAPDH reaccionado con cada muestra, (B) es una gráfica de los niveles de expresión de CXCR1 y CXCR2 midiendo la intensidad de banda de ARNm de cada gel obtenido de (A) con un densitómetro (\* y \*\*,  $p < 0,001$ ;  $n=4$ ), (C) muestra los resultados del análisis de los niveles de expresión de proteína de CXCR1 y CXCR2 en MSC de UCB y MSC de BM efectuando un proceso de inmunotinción con anticuerpos anti-CXCR1 y anti-CXR2 (x400) y (D) muestra los resultados del análisis obtenido por inmunotinción de MSC de UCB y MSC de BM con un anticuerpo secundario solo en lugar de anticuerpos anti-CXCR1 y anti-CXCR2 para identificar la especificidad de antígeno de los anticuerpos anti-CXCR1 y anti-CXCR2.

La figura 13 es una imagen microscópica fluorescente de MSC de UCB en que se introducen un gen que codifica una proteína fluorescente verde (GFP) y se sobreexpresa.

La figura 14 muestra los resultados de un experimento en que se sobreexpresa cada uno del gen que codifica GFP y un gen vacío en MSC de UCB. Dichos MSC de UCB se disponen en el compartimento superior de una cámara Transwell y las células U-87 MG se disponen en el compartimento inferior de la cámara Transwell, se cultivan conjuntamente durante 24 horas y se identifican entonces los MSC de UCB migrados hacia el compartimento inferior.

La figura 15 muestra las secuencias cebadoras usadas en los ejemplos de la presente invención.

**Listado de secuencias**

- <110> MEDIPOST CO., LTD
- <120> Composición para el diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades relacionadas con células que expresan IL-8 o GRO- $\alpha$ , que comprende MSC de UCB
- <130> SR37139 (EP) /SG
- <140> EP 08793529.2
- <141> 27-08-2008
- <150> KR 10-2007-0087228
- <151> 29-08-2007
- <150> US 60/972.966
- <151> 17-09-2007
- <150> KR 10-2008-0067247
- <151> 10-07-2008
- <150> US 61/089.733
- <151> 18-08-2010
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3,5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> desconocido
- <220>
- <223> Secuencia cebadora 1 para GAPDH
- <400> 1
- accacagtcc atgcatcac
- <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> desconocido

	<220>		
	<223> Secuencia cebadora 2 para GAPDH		
	<400> 2		
	<b>tccaccaccc tgttgctgta</b>		20
5	<210> 3		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> desconocido		
	<220>		
10	<223> Secuencia cebadora 1 para IL-8		
	<400> 3		
	<b>tcctgatttc tgcagctctg tg</b>		22
	<210> 4		
	<211> 22		
15	<212> ADN		
	<213> desconocido		
	<220>		
	<223> Secuencia cebadora 2 para IL-8		
	<400> 4		
20	<b>tgcttgaagt ttcactggca tc</b>		22
	<210> 5		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> desconocido		
25	<220>		
	<223> Secuencia cebadora 1 para CXCR1		
	<400> 5		
	<b>gagccccgaa tctgacatta</b>		20
	<210> 6		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> desconocido		
	<220>		
	<223> Secuencia cebadora 2 para CXCR1		
35	<400> 6		
	<b>gcagacactg caacacacct</b>		20
	<210> 7		
	<211> 20		
	<212> ADN		
40	<213> desconocido		
	<220>		
	<223> Secuencia cebadora 1 para CXCR2		
	<400> 7		
	<b>attctgggca tccttcacag</b>		20
45	<210> 8		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> desconocido		
	<220>		
50	<223> Secuencia cebadora 2 para CXCR2		
	<400> 8		
	<b>tgcacttagg caggaggtct</b>		20

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en la prevención de tumores cerebrales, en la que la composición farmacéutica comprende citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos.
2. Una composición de terapia génica para uso en la transferencia de un gen terapéutico o producto del mismo a una célula, en la que la composición de terapia génica comprende los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos, en la que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo de los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos.
3. La composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o los citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos funcionan como portadores para terapia génica para tratar tumores cerebrales.
4. La composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que se introduce un gen antitumoral en los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimáticos.
5. La composición para uso según la reivindicación 4, en la que el gen antitumoral se selecciona del grupo consistente en:
- un gen supresor tumoral, preferiblemente seleccionado del grupo consistente en un gen de homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), un gen de maspina, un gen de RUNX3, un gen de caveolina 1, un gen de nm23, un gen de proteína Rb, un gen de Brush-1, un gen de inhibidor del crecimiento tumoral (ING-4), un gen de survivina, un gen de proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP), un gen de proteína inhibidora de la apoptosis neural (NAIP) y genes de proteínas relacionadas con la regulación de dichos genes;
  - un gen de factor inductor de apoptosis, preferiblemente seleccionado del grupo consistente en un gen de citocina, un gen de interleucina, un gen de factor de necrosis tumoral (TNF), un gen de interferón (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ), un gen de factor estimulante de colonias (CSF), un gen de p53, un gen de Apaf-1, un gen de TRAIL, un gen de caspasa, un gen de Bax, un gen de Bad, un gen de FADD, un gen de JNK, un gen de cinasa p38 y genes de proteínas relacionadas con la regulación de dichos genes;
  - un gen regulador del ciclo celular, preferiblemente seleccionado del grupo consistente en un gen de cdc2, un gen de ciclina (ciclina A, ciclina D, ciclina E), un gen de cdc25C, un gen de p21WAF, un gen de p16INK4, un gen de CDK (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6), un gen de proteína Rb, un gen de E2F, un ARN anticodificante o ARNip del mismo y genes de proteínas relacionadas con la regulación de dichos genes; y
  - un gen inhibidor de la angiogénesis, preferiblemente seleccionado del grupo consistente en un gen de trombospondina 1, un gen de endostatina, un gen de tumstatina, un gen de canstatina, un gen de vastatina, un gen de restina, un gen de inhibidor del crecimiento endotelial vascular, un gen de maspina, un gen de angiopoyetinas, un gen de un fragmento de prolactina de 16 kDa y un gen de endorepelin.
6. La composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que se introduce un gen de enzima convertora de profármaco, preferiblemente seleccionado del gen de citosina desaminasa y el gen CYP2B1, en los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos.
7. La composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que se introduce un ARN anticodificante o ARNip de un gen relacionado con tumor cerebral en los citoblastos mesenquimáticos aislados de sangre del cordón umbilical y/o los citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos.
8. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que el gen relacionado con tumor cerebral se selecciona del grupo consistente en un gen de la familia Ras, un gen de c-myc, un gen de abl, un gen de erbB-1, un gen de EGF-R, un gen de Bax, un gen de la proteína de interacción con Apaf-1 (APIP), un gen de la proteína 1 secretada inducida por Wnt-1 (WISP-1), un gen de Wnt, un gen de Raf-1, un gen de Src, un gen de Akt, un gen de Erk-1,2 y un gen de Bcl-2.
9. La composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que se introduce un virus oncolítico, preferiblemente seleccionado de herpesvirus simple y reovirus de tipo 3, en los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos.
10. Una composición para uso en el diagnóstico de tumor cerebral o la monitorización de la progresión del

tratamiento de tumor cerebral, en la que la composición incluye los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos.

- 5 11. Un kit para uso en el tratamiento de tumor cerebral que comprende:
- un vector de expresión que tiene un gen de enzima convertora de profármaco, preferiblemente seleccionado de un gen de citosina desaminasa y un gen de CYP2B1;
  - citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos, preferiblemente transfectados con el vector de expresión que tiene un gen de enzima convertora de profármaco; y
  - un profármaco de un fármaco anticanceroso.
- 10
- 15 12. La composición o kit para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 11, en la que el tumor cerebral se selecciona del grupo consistente en astrocitoma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma de baja malignidad, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, glioma troncoencefálico, ependimoma, subependimoma, ganglioneuroma, glioma mixto, oligodendroglioma, glioma de nervio óptico, neurinoma del estatoacústico, cordoma, linfoma del SNC, craneofaringioma, hemangioblastoma, meduloblastoma, meningioma, tumores pineales, tumores pituitarios, tumores neuroectodérmicos primitivos, tumores rabdoideos, schwannoma, quistes, neurofibromatosis, seudotumor cerebral y esclerosis tuberosa.
- 20
- 25 13. Una composición para uso en el diagnóstico de una enfermedad que aparece en un sitio que comprende una célula, o en la monitorización de la progresión del tratamiento de la enfermedad, en la que la composición comprende los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos, en la que la célula expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  e induce el tropismo de los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos.
- 30
- 35 14. La composición para uso según la reivindicaciones 10 o 13, en la que los citoblastos mesenquimatosos aislados de sangre del cordón umbilical y/o citoblastos mesenquimatosos propagados a partir de dichos citoblastos mesenquimatosos están marcados con un marcador detectable, estando preferiblemente seleccionado el marcador detectable del grupo consistente en un detector fluorescente basado en enzima que contiene luciferasa y nanopartículas magnéticas derivadas del péptido Tat.
- 40 15. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, 13 y 14, en la que la célula que expresa IL-8 o GRO- $\alpha$  se selecciona del grupo consistente en una célula de tumor cerebral, una célula de hepatoma hepático, una célula de cáncer de colon y una célula de neoplasma de linfocitos B, por ejemplo, una célula de leucemia linfoblástica aguda común de linfocitos B, una célula de leucemia linfoblástica aguda crónica de linfocitos B, una célula de linfoma de células del manto, una célula de linfoma de Burkitt y una célula de linfoma folicular.

FIG. 1

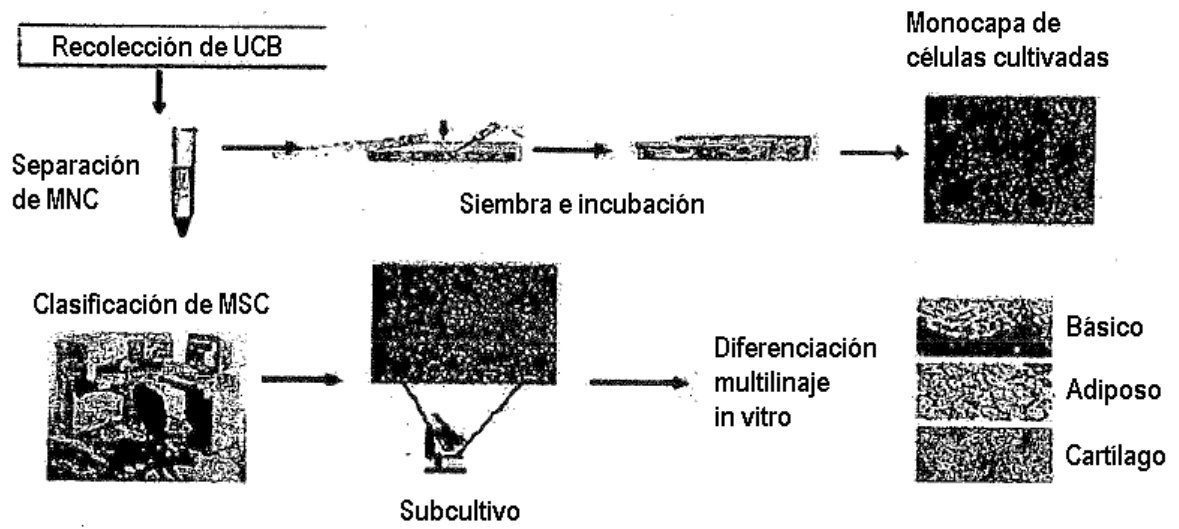


FIG. 2

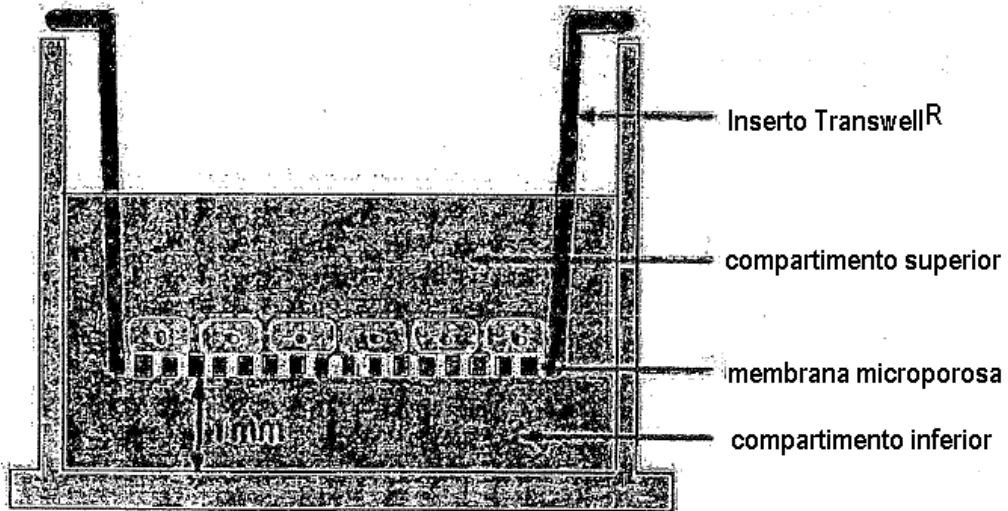
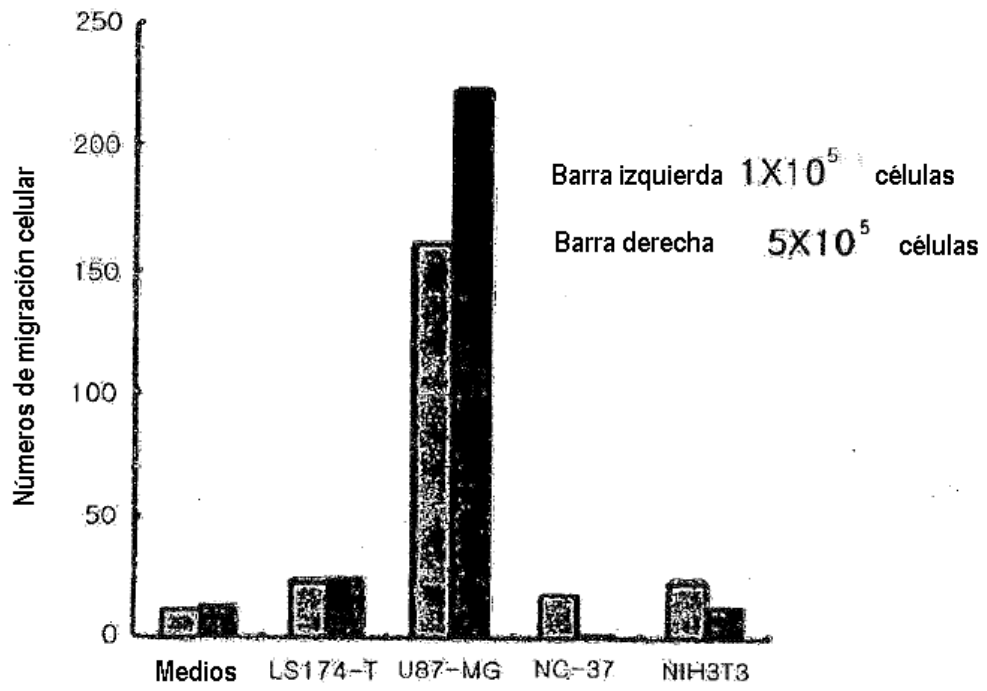


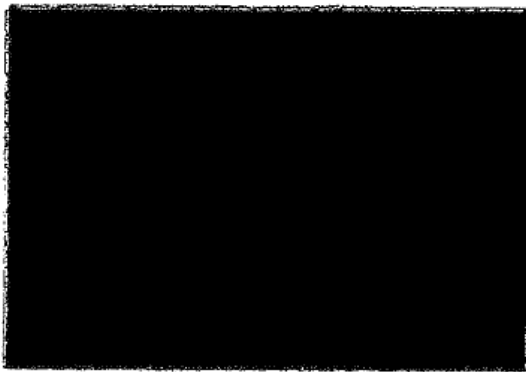
FIG. 3

A



B

Control (medios)



U-87

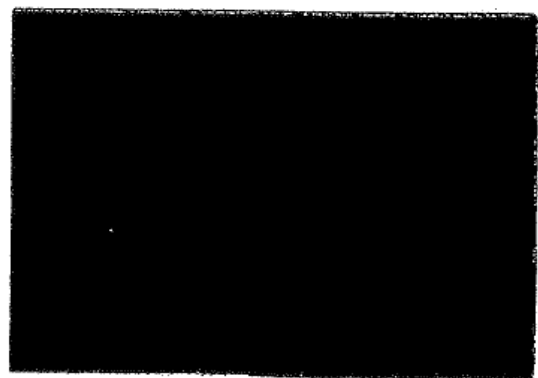
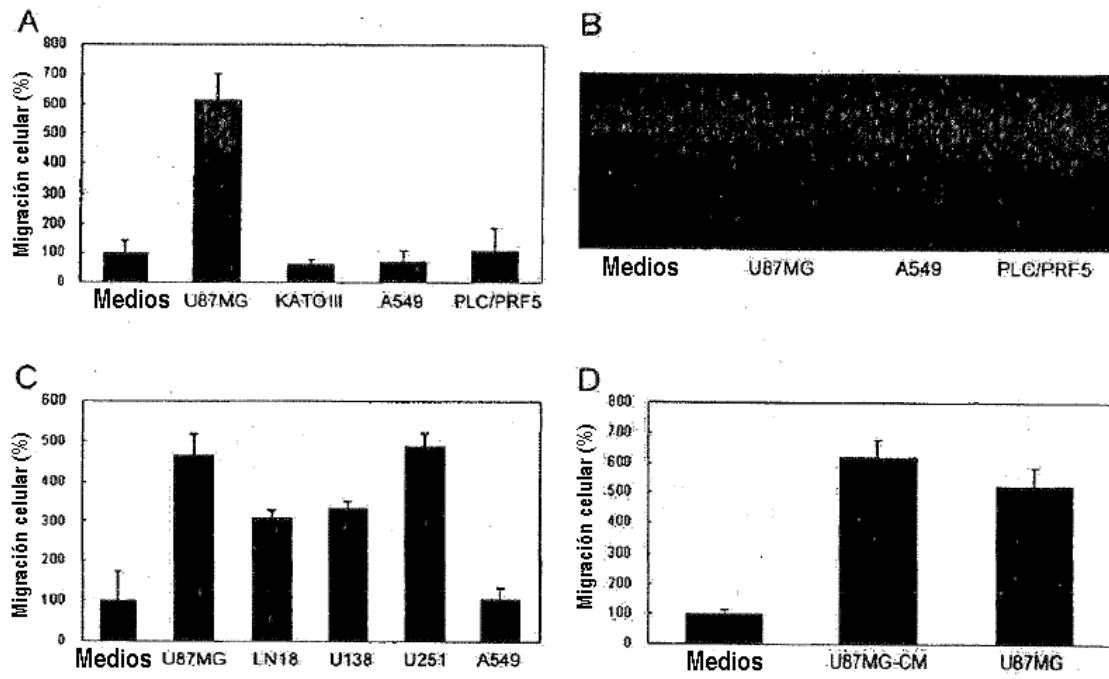




FIG. 4



**FIG. 5**

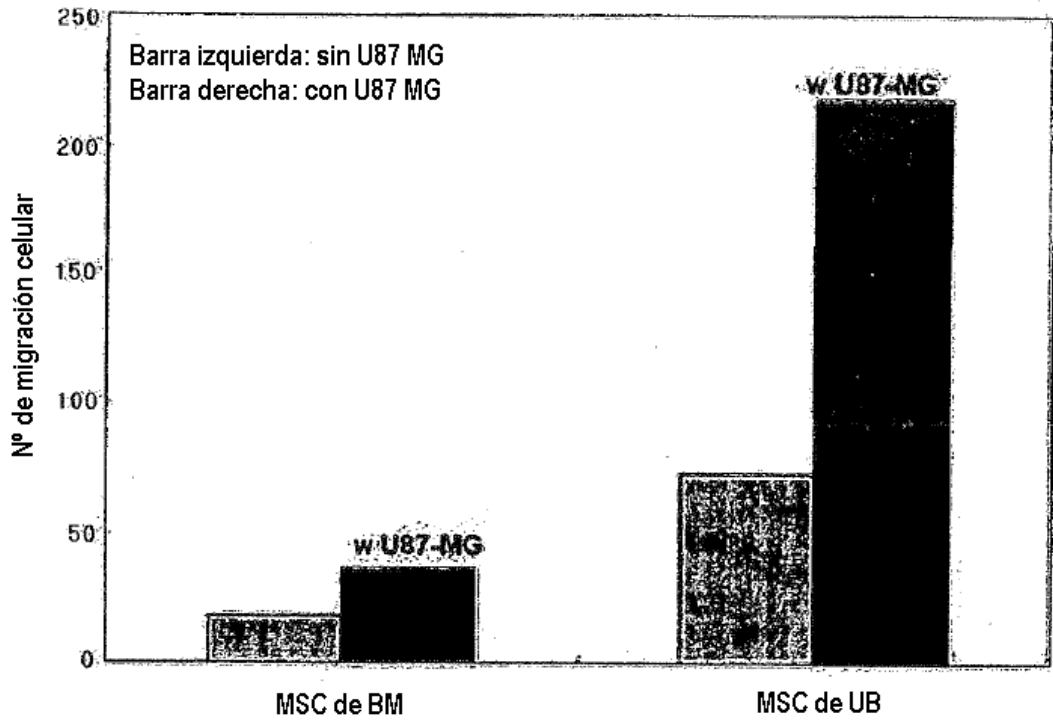
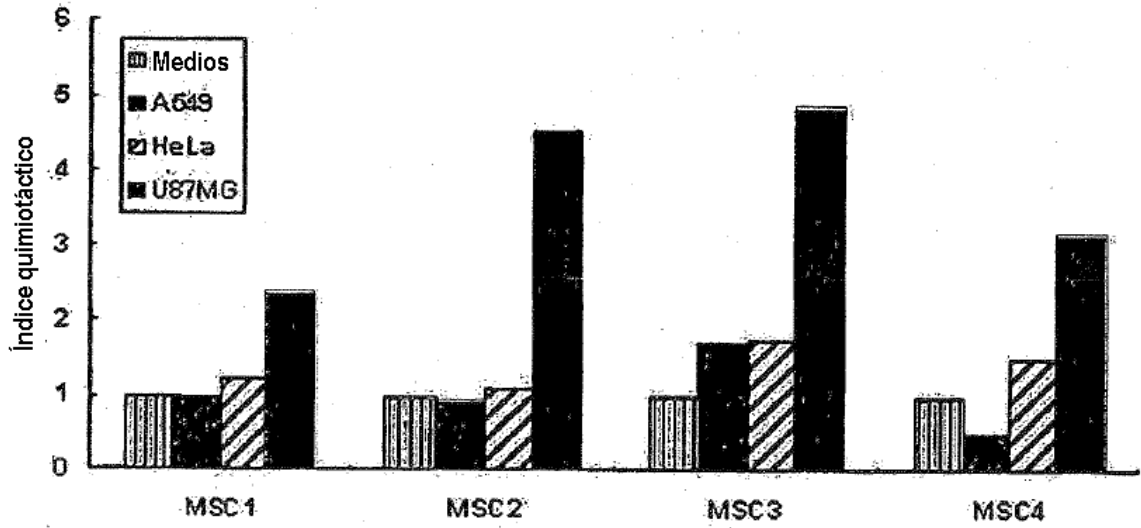


FIG. 6



# FIG. 7

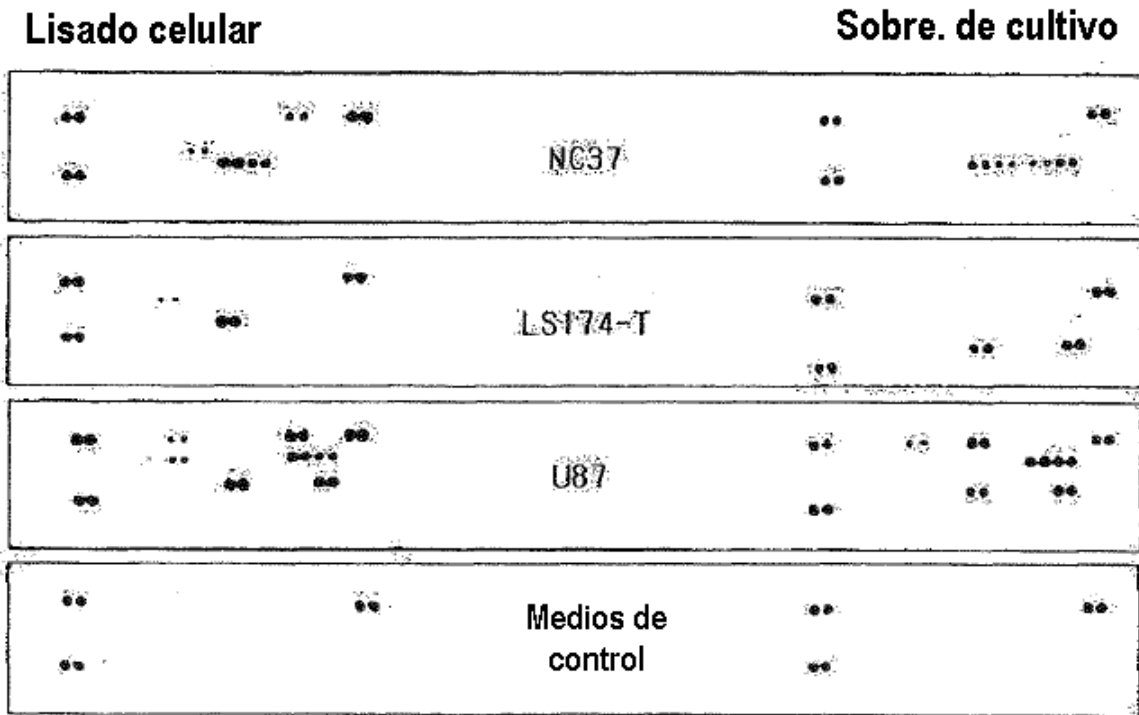


FIG. 8

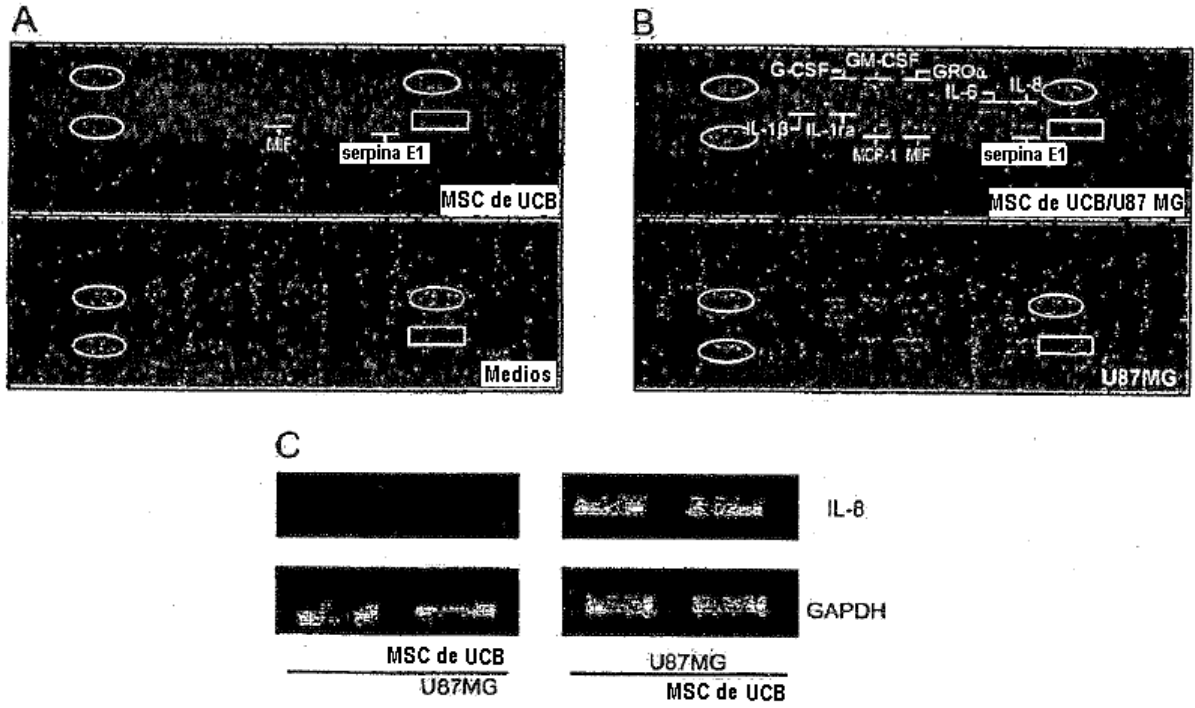


FIG. 9

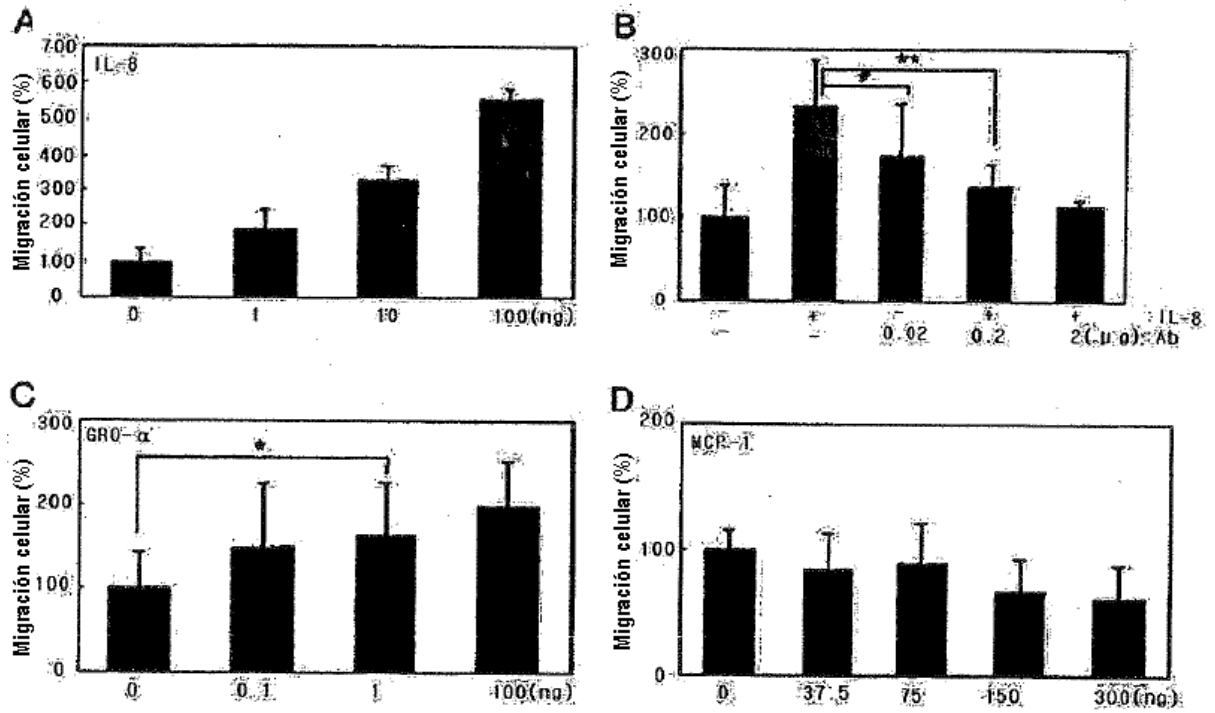


FIG. 10

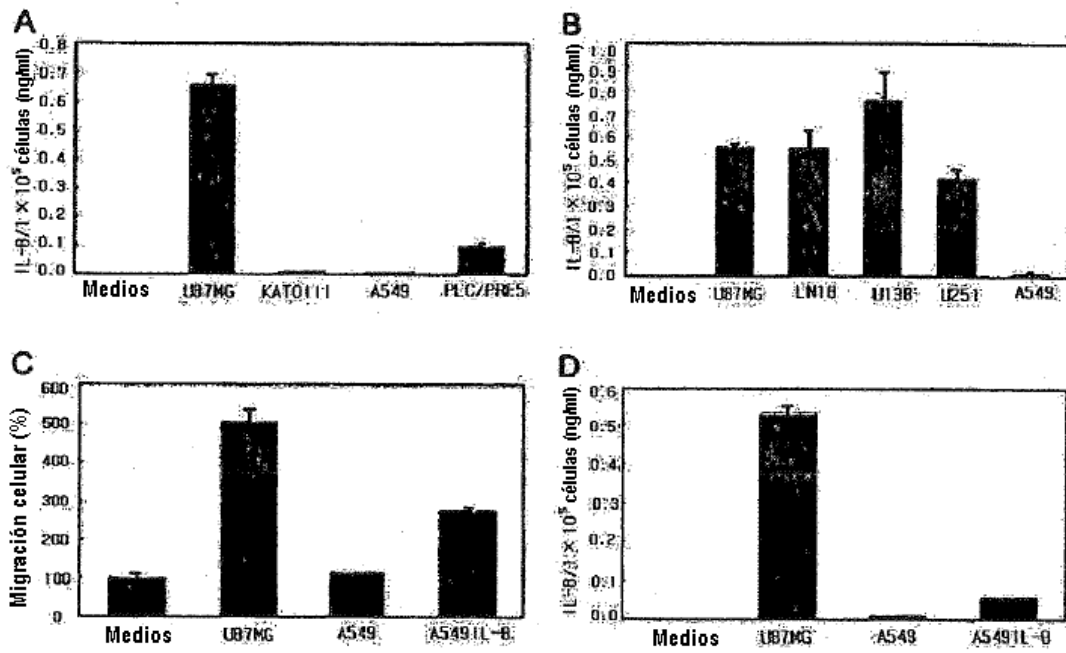


FIG. 11

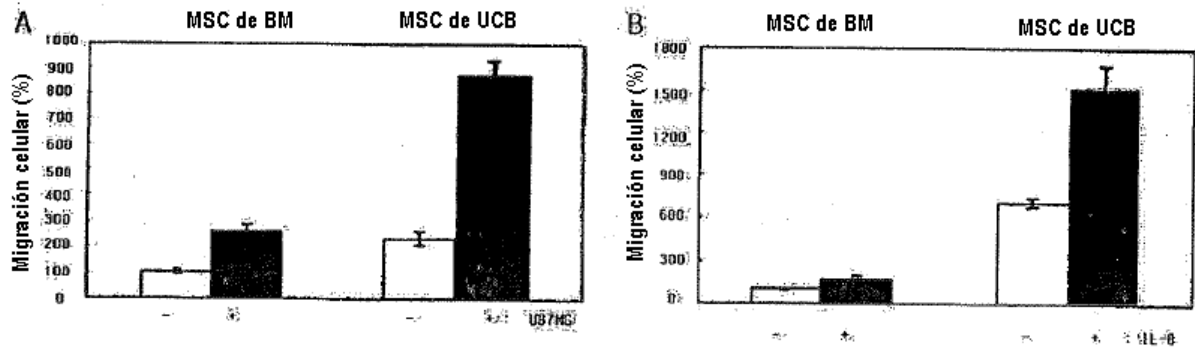
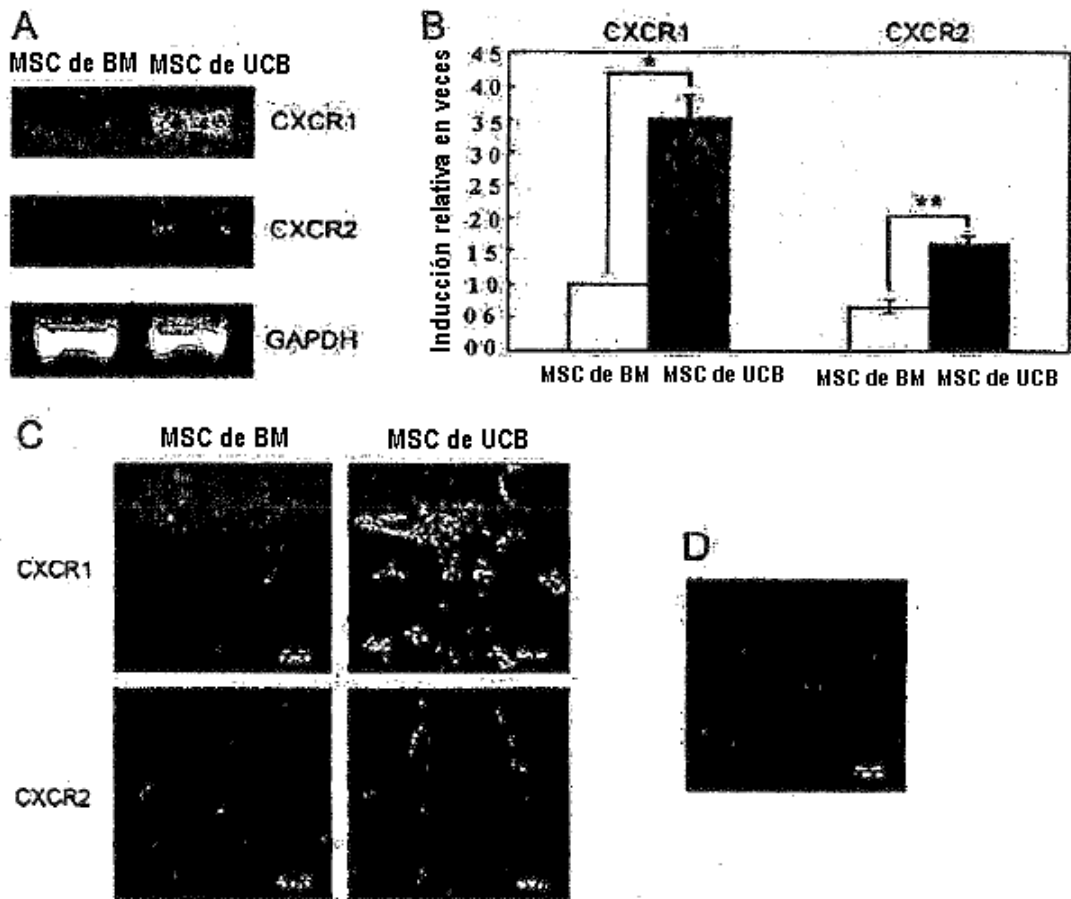
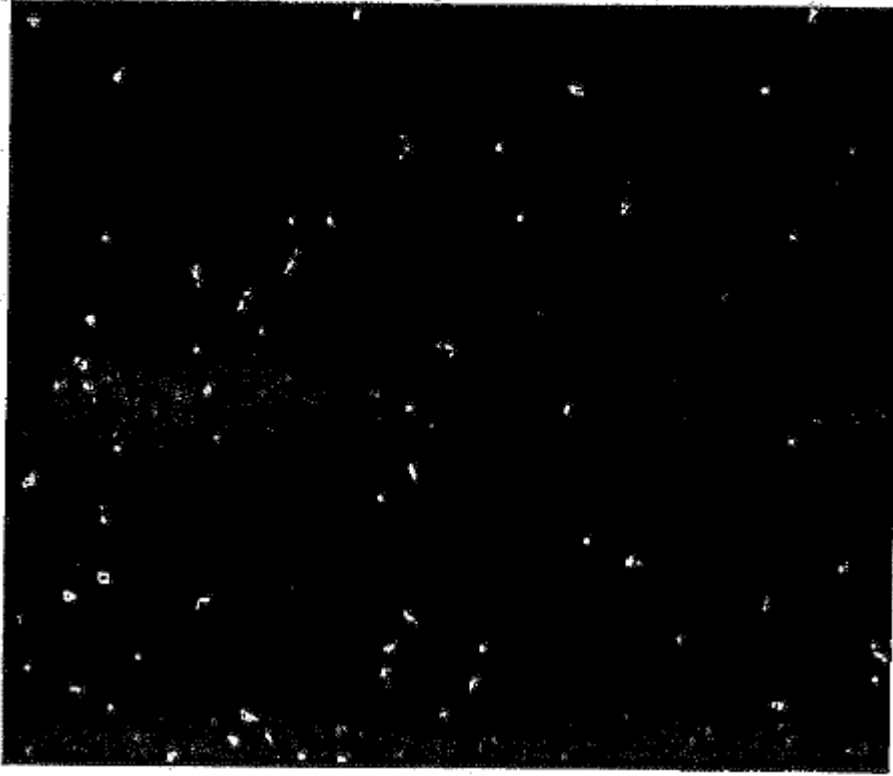




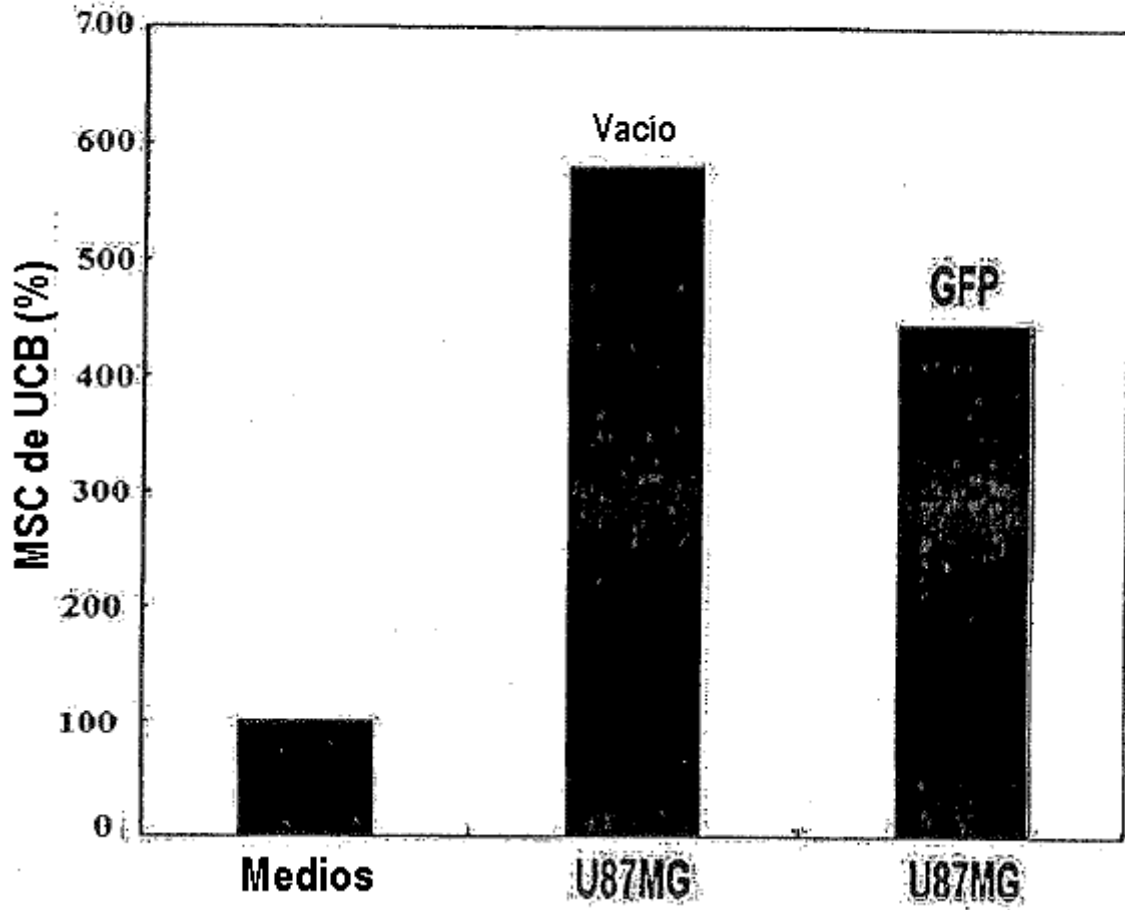
FIG. 12



**FIG. 13**



**FIG. 14**



## FIG. 15

## Secuencia cebadora para genes diana

Gen diana	Secuencia cebadora	Temperatura de asociación (°C)	Tamaño del producto de PCR (pb)
GAPDH	5'-ACCA CAGTCCATGOCATGAC-3'	55	452
	5'-TCCACCAOCCTGTTGCTGTA-3'		
IL-8	5'-TCCGATTTCTGCAGCTCTGTG-3'	55	300
	5'-TGCTTGAAGTTTCACTGGCATE-3'		
CXCR1	5'-GAGCCCCGAATCTGACATTA-3'	55	200
	5'-GCAGACACTGCAACACACCT-3'		
CXCR2	5'-ATTCTGGGCATCCTTCACAG-3'	55	202
	5'-TGCACTTAGGCA GGAGGTCT-3'		