

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 155**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016 PCT/CN2016/091023**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17185542**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016 E 16900051 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3398613**

54 Título: **Método para tratar leucemia usando un efecto reprogramante**

30 Prioridad:

28.04.2016 CN 201610280410

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2020

73 Titular/es:

**INSTITUTE OF HEMATOLOGY AND BLOOD
DISEASE HOSPITAL, CHINESE ACADEMY OF
MEDICAL SCIENCES AND PEKING UNION
MEDICAL COLLEGE (100.0%)
288 Nanjing Road, Heping District
Tianjin 300020**

72 Inventor/es:

**CHENG, TAO;
CHENG, HUI;
WANG, YAJIE;
ZHANG, HONGYAN;
ZHENG, YAWEI y
HAO, SHA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 773 155 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

Método para tratar leucemia usando un efecto reprogramante

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para tratar la leucemia utilizando un efecto de reprogramación.

5 Descripción de la técnica relacionada

La programación de células somáticas se refiere a un procedimiento de utilizar un método específico para invertir las células somáticas diferenciadas a estado pluripotentes o totipotentes. En 2006, un científico japonés Shinya Yamanaka verificó que la sobre-expresión de cuatro factores de transcripción OSKM (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Mic) hace posible que las células diferenciadas recuperen la pluripotencia, este tipo de células tiene características biológicas que son muy similares a la célula madre embrionarias, y le denominó célula madre pluripotente inducida (iPSCs) y se le concedió el premio nobel en fisiología o medicina en 2012 por sus descubrimientos. Desde el establecimiento de la tecnología iPS, tiene una previsión muy amplia de aplicaciones en los campos de la investigación fundamental, patogénesis, selección de fármacos y tratamiento clínico, etc.

Durante la fase temprana de la tecnología iPS, las técnicas de transcripción inversa de lentivirus se utilizaban principalmente para favorecer la expansión del factor reprogramante exógeno de OSKM. Considerando que la transcripción inversa por infección de virus directa puede aumentar la mutación de células somáticas y el vector viral que son capaces de integrar en el genoma directamente en las iPSCs será expresado como la diferenciación de células y, finalmente, afecta a las aplicaciones e investigaciones de iPSCs, en lo que se refiere al método de inducir los factores reprogramantes, los científicos han desarrollado una diversidad de métodos de inducción de iPSCs no integrados. Al nivel del DNA, los científicos utilizaron las tecnologías de virus Sendai episomal, transposón, etc., para llevar a cabo la expresión inducida de OSKM, sin embargo, la eficacia reprogramante de estos métodos es diferente y son necesarios varios pasos para obtener iPSCs sin vectores portadores. A nivel del RNA, Warren et al. introdujeron un mRNA transcrito *in vivo* de OSKM directamente en fibroblastos para obtener iPSCs, este método tiene un cierto nivel de dificultad técnica y requiere varias transfecciones, aunque es capaz de producir eficazmente iPSCs sin vectores portadores. A nivel de la proteína Kim et al. usaron un péptido penetrante de células para introducir OSKM en la célula y obtuvieron satisfactoriamente las iPSCs a partir de fibroblastos renales humanos, este método no implica material genético alguno, pero su eficacia inductora es baja. Además, pueden ser añadidos compuestos de moléculas pequeñas al sistema reprogramante para inhibir o activar algunas trayectorias señalizadoras con el fin de mejorar significativamente la eficacia reprogramante, o incluso los factores reprogramantes clásicos pueden ser sustituidos por una diversidad de moléculas pequeñas para llevar a cabo la reprogramación. Los métodos anteriormente mencionados sin integración de genoma dirigen en gran medida las previsiones de las aplicaciones clínicas de las iPSCs.

Aunque las células normales pueden ser eficazmente reprogramadas *in vivo* para convertirse en células iPS, actualmente no hay estudio alguno que exponga si las células tumorales pueden ser reprogramadas para convertirse en células iPS *in vivo*. De forma análoga a un tumor maligno, la generación de células iPS es inhibida por las trayectorias de genes supresores tumorales como P53 y Rb. Tanto C-MiC como KLF4 entre los factores reprogramantes son acreditados promotores de tumores. Además, hay estudios que han demostrado que células normales reprogramadas *in vivo* en ratones pueden ser desarrolladas en un tumor *in vivo*. Por tanto, hay una analogía entre la tumorigénesis y la reprogramación de células somáticas. En comparación con las células somáticas normales, la reprogramación de células tumorales es más difícil con una eficacia extremadamente baja, pero el mecanismo sigue siendo incierto.

La leucemia es un tumor maligno del sistema sanguíneo. Según las estadísticas, la mortalidad de la leucemia alcanzó el número 6 entre los diversos tumores y un valor de número 1 en los tumores pediátricos en China. Según el comienzo de la urgencia y el tipo de célula, la leucemia se puede dividir en muchos tipos. Hasta ahora, las células leucémicas se eliminan principalmente del cuerpo a través de quimioterapia de fármacos dirigidos a diana o inmunoterapia. Sin embargo, no está disponible una terapia de espectro amplio para tratar los tipos graves de leucemias. Hay unos pocos casos de reprogramación satisfactoria de células leucémicas en células iPS sugiriendo que las células leucémicas es difícil que experimenten una reprogramación eficaz, aunque el mecanismo de los mismos no ha sido expuesto. Durante el procedimiento de reprogramación inducida, como las características genéticas y la modificación epigenética cambian enormemente, algunas células experimentarán apoptosis. Se encontró en los estudios del solicitante que durante el procedimiento de reprogramación de células leucémicas, la mayoría de las células experimentan apoptosis, lo que se relaciona directamente con la dificultad de las células leucémicas para convertirse en células iPS. Utilizando estas características de las células leucémicas y combinando la tecnología reprogramante, se pueden proporcionar nuevas ideas y métodos para tratar la leucemia.

Breve compendio de la invención

La cuestión técnica que va a ser resuelta por la presente invención es eliminar selectivamente células leucémicas *in vivo* o *in vitro* utilizando el efecto de reprogramación.

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, emplea soluciones técnicas como sigue:

- 5 La presente invención proporciona un tipo de factores de inducción (es decir, factores reprogramantes) Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc (OSKM para abreviar) que son usados para favorecer la apoptosis de células leucémicas *in vivo* o *in vitro*.

En esta solicitud, los factores de inducción Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc favorecen que las células leucémicas inicien procedimientos reprogramantes.

- 10 Las células leucémicas son células leucémicas de mamíferos (incluido el ser humano), preferentemente células leucémicas humanas.

Los factores de inducción están en la forma de cDNA mRNA o proteína.

- 15 La presente invención proporciona adicionalmente un método para inducir la apoptosis de células leucémicas *in vitro* o *in vivo* utilizando el efecto de reprogramación, el método incluye una etapa de inducir los factores reprogramantes Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc (OSKM para abreviar) en células leucémicas. Por tanto, se inicia el procedimiento reprogramante de las células leucémicas. La presente invención proporciona adicionalmente un método para tratar leucemia utilizando el efecto de reprogramación, en que el método incluye una etapa de introducir factores reprogramantes Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc (OSKM para abreviar) en células leucémicas. A través de la expresión de genes de OSKM en células leucémicas, se inicia el procedimiento reprogramante de células leucémicas y, por tanto,
20 se induce la apoptosis de células leucémicas, con lo que se puede conseguir la finalidad de eliminar células leucémicas *in vivo* o *in vitro*.

- 25 Preferentemente, el método de introducción emplea métodos de infección de virus, transfección de proteínas recombinantes o transfección de vectores mediante electrotransfección. Los métodos de infección de virus, transfección de proteínas recombinantes o electrotransfección de vectores mencionados en la presente invención se realizan según métodos convencionales en la técnica.

- 30 Por ejemplo, la etapa de infección de virus incluye la transfección de un vector viral que contiene Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc y sus correspondientes vectores de empaquetamiento a la línea celular de empaquetamiento (como 293T, 293A, etc.), después de la producción del virus, recolectar los correspondientes virus y añadir los correspondientes virus al medio de cultivo de células leucémicas para la infección, en que el vector viral se selecciona entre un vector de lentivirus, vector de retrovirus, vector de adenovirus o vector de virus Sendai.

Por ejemplo, la etapa de transfección de proteínas recombinantes incluye: proteínas recombinantes de Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc con péptido penetrante se mezclan y se añaden al sistema de cultivo de células leucémicas para la inducción de la reprogramación.

- 35 Por ejemplo, la etapa de electro-transfección de virus incluye: usar el método de electro-transfección, transfección de factores reprogramantes que portan plásmidos episomales en forma de células leucémicas mediante el método de electro-transfección de forma que las células leucémicas estén con una expresión transitoria elevada de los factores reprogramantes (OSKM). Específicamente, las etapas son como sigue: conducir la transfección de núcleos usando un aparato Amaxa Nucleofector (conducir según el manual de funcionamiento) con el procedimiento (la duración completa no debe sobrepasar los 15 minutos) de: añadir 100 µl de tampón de electro-transfección preparado a un tubo de centrifugadora de 15 ml que contiene 5 x 10⁵ células leucémicas, posteriormente añadir un plásmido
40 preparado, que incluye 10 µg de pEV SFFV/EF1/CAG-OS y 5 µg de pEV SFFV/EF1/CAG-MK, después de mezclar uniformemente, transferir a una cubeta de transfección, colocar una cámara de transfección y realizar la electro-transfección.

- 45 La presente invención proporciona adicionalmente un método para inducir la apoptosis de células leucémicas *in vivo* o *in vitro* utilizando el efecto de reprogramación, en que el método incluye una etapa de utilizar moléculas reprogramantes pequeñas en cultivo *in vitro*. Favorece el inicio del procedimiento de reprogramación de las células leucémicas.

- 50 La presente invención proporciona adicionalmente un método para tratar leucemia utilizando el efecto de reprogramación, en el que el método incluye una etapa de utilizar moléculas reprogramantes pequeñas en un cultivo *in vitro*. Favorece el inicio del procedimiento de reprogramación de las células leucémicas y, por tanto, induce la apoptosis de las células leucémicas, con lo que se puede conseguir la finalidad de eliminar las células leucémicas *in*

vitro.

Las moléculas reprogramantes pequeñas son una o una combinación de dos o más de forskolina (FSK, F), VPA (V), CHIR99021 (CHIR, C), RepSox (616452, 6), tranil-cipromina (TCP, T) y TTNPB (N).

5 Preferentemente, las células reprogramantes pequeñas son una combinación de seis de forskolina (FSK, F), VPA (V), CHIR99021 (CHIR, C), RepSox (616452, 6), tranilcipromina (TCP, T) y TTNPB (N).

Las células leucémicas según la presente invención son células leucémicas del hospedante de mamíferos (incluido el ser humano), preferentemente células leucémicas humanas.

Los efectos beneficiosos de la presente invención son:

10 La presente invención utiliza el efecto de reprogramación, hace posible la eliminación de células leucémicas *in vivo* o *in vitro* de forma eficaz y selectiva y, por tanto, proporciona nuevas ideas y métodos para el tratamiento clínico de leucemia en el futuro.

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

Fig. 1 - Análisis de la relación de células leucémicas en vaso y médula ósea de ratón después de añadir Dox al agua de bebida de los ratones leucémicos.

15 Fig. 2 - Análisis de la supervivencia de ratones leucémicos después de añadir Dox en el agua de bebida de varios tipos de ratones leucémicos.

Fig. 3 - Análisis de la relación y número de células madre leucémicas en bazo y médula ósea de ratón después de añadir Dox en el agua de bebida de ratones leucémicos.

20 Fig. 4 - Análisis de la apoptosis de células leucémicas en bazo y médula ósea de ratón después de añadir Dox al agua de bebida de ratones leucémicos.

Fig. 5 - Análisis de la relación y apoptosis de células madre hematopoyéticas normales/células progenitoras en médula ósea de ratón y análisis de la supervivencia de ratones leucémicos, en que los ratones OSKM fueron co-trasplantados con células de médula ósea normal y células leucémicas, después de la leucemia desarrollada en los ratones se añadió Dox al agua de bebida de los ratones leucémicos.

25 Fig. 6 - Análisis de la apoptosis y proliferación de células madre hematopoyéticas normales/células progenitoras y células leucémicas después del tratamiento con moléculas reprogramantes pequeñas *in vitro* y análisis de la capacidad patógena de las células leucémicas tratadas.

Fig. 7 - Análisis de la apoptosis y proliferación de líneas celulares leucémicas humanas después de un tratamiento con moléculas reprogramantes pequeñas.

30 Fig. 8 - Análisis de la apoptosis y capacidad de formación de colonias de células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano y células CD34+ de un paciente de AML después de un tratamiento con moléculas reprogramantes pequeñas.

Descripción detallada de la invención

35 Con el fin de comprender la presente invención, se integran las siguientes realizaciones para describir adicionalmente la presente invención, pero no están destinadas a limitar el alcance de protección de la presente invención.

Realización 1: Utilización de factor reprogramante para eliminar células leucémicas de ratón *in vivo/ in vitro*

40 1. Preparación de retrovirus de leucemia: se usó el método con lipofectamina 2000 en la preparación del retrovirus. Se cultivaron células 293T en un plato de cultivo de 10 cm, cuando las células alcanzaron una confluencia de 90% se añadió mezcla de plásmidos y lipofectamina 2000. Los plásmidos incluyen: plásmidos empaquetadores (pKat y pVSVG) y plásmido de retrovirus a diana (MSCVMLL/AF9-IRES-GFP). Las materias sobrenadantes virales se recogieron a las 48 horas y a las 72 horas, respectivamente. Se usaron dispositivos de filtros de centrifugación Amicon Ultra-15 (100K NMWL) para la concentración.

2. Preparación de células leucémicas mieloides agudas de ratón: se obtuvieron células de médula ósea de ratones

OSKM (o conocidos como ratones “todos iPS” desarrollados por el laboratorio del profesor Shaorong Gao, fuente del artículo: Kang, L. et al. Cell Stem Cell. 2009; 5:135-138.) y células de médula ósea de linaje negativo (Lin-) fueron enriquecidas mediante un método que usa gránulos magnéticos. Se añadió gen de leucemia MLL-AF9 portador de retrovirus al medio de cultivo de células Lin-, después de infectar durante 48 horas, las células infectadas se recogieron y se trasplantaron a la vena de cola de ratones C57BL/6J expuestos a una radiación de dosis letal. Después de la aparición de la leucemia, se recogieron las células leucémicas de los bazo y médulas óseas de los ratones. Como las células leucémicas se obtuvieron de los ratones OSKM, consiguientemente la expresión de OSKM en las células leucémicas pudo ser activada mediante doxiciclina (Dox).

3. Eliminación de células leucémicas *in vivo*: se trasplantaron células leucémicas a la vena de cola de ratones C57BL/6J expuestos a una radiación de dosis letal mediana. En la fase tardía de la leucemia (las células leucémicas sobrepasaban un 70% en la médula ósea), los ratones se dividieron en dos grupo, no se añadió nada al agua de bebida de los ratones en el grupo testigo, se añadió Dox (concentración de 1 mg/ml) al agua de bebida de los ratones en el grupo del experimento durante 7 días consecutivos. Los resultados son como se muestra en la Fig.1, en la Fig. 1A, el resultado de una citometría de flujo mostró que el número de leucemias en el bazo y la médula ósea de los ratones en el grupo experimental disminuyó gradualmente. Las Figs. 1B y 1C muestran las relaciones de células leucémicas en la médula ósea y el bazo, respectivamente. Se mostró que las relaciones de células leucémicas en el bazo y la médula ósea del grupo testigo aumentaron gradualmente, las relaciones de células leucémicas en el bazo y la médula ósea del grupo experimental disminuyeron gradualmente hasta desaparecer completamente. Se puede observar a partir de la Fig. 1, después de una radiación de Dox, que las células leucémicas en el bazo y la médula ósea de los ratones desaparecieron rápidamente. Esto indicó que la expresión elevada de OSKM en las células leucémicas condujo directamente a la eliminación de células leucémicas *in vivo*.

4. Eliminación de múltiples tipos de células leucémicas *in vivo*: se aplicó el mismo método para establecer otros dos tipos de modelos de leucemia: la leucemia mieloide aguda (AML) inducida por MLL-NRIP3 y la leucemia linfoblástica aguda (ALL) inducida por NOTCH1. Las curvas de supervivencia son como se muestra en la Fig.2, en la que la Fig. 2A muestra el modelo de AML inducido por MLL-AF9, los resultados de la curva de supervivencia demostraron que todos los ratones en el grupo testigo murieron de leucemia mientras que todos los ratones en el grupo experimental sobrevivieron. La Fig. 2B muestra que el modelo de AML inducido por MLL-NRIP3 los resultados de la curva de supervivencia demostraron que todos los ratones del grupo testigo murieron de leucemia mientras que solamente un pequeño número de ratones en el grupo experimental murió. La Fig. 2C muestra el modelo de ALL inducido por NOTCH1, los resultados de la curva de supervivencia demostraron que los ratones en el grupo testigo murieron de leucemia, pero todos los ratones en el grupo experimental sobrevivieron. Se puede observar a partir de la Fig. 2 que análogamente al modelo de leucemia inducido por MLL-AF9, después de que se añadió Dox en el agua de bebida de los ratones en el grupo experimental (durante 7 días consecutivos), los otros dos tipos de células leucémicas pueden ser también eliminados y la leucemia de los ratones fue tratada. Esto indicó que la utilización de factores reprogramantes OSKM era capaz de eliminar múltiples tipos de leucemias *in vivo*.

5. Eliminación efectiva de células madre leucémicas: Después de que se añadió Dox al agua de bebida durante 1-4 días, se utilizó una citometría de flujo para determinar la relación de células madre leucémicas. Los resultados se muestran en la Fig. 3 (la Fig. 3A muestra la relación y el número de células madre leucémicas en el bazo y la Fig. 3B muestra la relación y el número de células madre leucémicas en la médula ósea). Se puede observar a partir de la Fig. 3 que en comparación con las células leucémicas maduras, la eliminación de las células madre leucémicas era más rápida.

6. Los factores reprogramantes indujeron la apoptosis de células leucémicas: Después de que se añadió Dox al agua de bebida del grupo experimental durante 1-4 días, se utilizó una citometría de flujo para analizar la apoptosis de células leucémicas. Los resultados se muestran en la Fig. 4, en la que la Fig. 4A muestra las relaciones de apoptosis de las células leucémicas en el bazo en la fase temprana y la fase tardía de la leucemia después del tratamiento con Dox y la Fig. 4B muestra las relaciones de apoptosis de células leucémicas en la médula ósea en la fase temprana y en la fase tardía de la leucemia después del tratamiento con Dox. Se puede observar a partir de la Fig. 4 que el OSKM era capaz de inducir eficazmente la apoptosis de células leucémicas *in vivo*.

7. Los factores reprogramantes tienen menos efecto sobre las células hematopoyéticas normales /células progenitoras: Las células de médula ósea y las células leucémicas de ratones con OSKM fueron cotrasplantadas a ratones expuestos a radiación de dosis letal. Después de que se desarrolló la leucemia en los ratones, se añadió Dox al agua de bebida de los ratones en el grupo experimental durante 7 días. Los resultados son como se muestra en la Fig. 5. La Fig. 5A muestra las relaciones de células madre hematopoyéticas normales y células progenitoras en la médula ósea. Se puede observar a partir de la Fig. 5A que las relaciones de células madre hematopoyéticas y células progenitoras en las médulas óseas de ratón no estaban básicamente afectadas después del tratamiento con Dox. La Fig. 5B muestra las relaciones de apoptosis de células madre hematopoyéticas normales y células progenitoras en las médulas óseas. Se puede observar a partir de la Fig. 5B que la apoptosis de células madre hematopoyéticas normales y células progenitoras no se vio afectada después del tratamiento con Dox. La Fig. 5C muestra la curva de supervivencia de ratones en los que, excepto para uno, todas las células leucémicas en el grupo experimental se curaron. Se puede observar a partir de la Fig. 5B que el número y la apoptosis de células madre

hematopoyéticas normales/células progenitoras no se vio básicamente afectado y que los ratones en el grupo experimental se recuperaron de la leucemia.

8. Utilización de moléculas reprogramantes-inductoras pequeñas para eliminar células leucémicas de ratón: las moléculas reprogramantes pequeñas incluyen forskolina (FSK, F), VPA (V), CHIR99021 (CHIR, C), RepSox (616452, 6), Tranilcipromina (TCP, T) y TTNPB (N). Se usaron diferentes combinaciones para tratar las células leucémicas y las células madre hematopoyéticas normales/células progenitoras *in vitro*.

Condiciones de tratamiento: el número inicial de células leucémicas de ratón es de 1×10^5 . Medio de cultivo: IMDM + 15% de suero bovino fetal + 10 mg/ml de IL-6 de ratón + 10 ng/ml de IL-3 de ratón + 50 ng/ml de SCF de ratón.

- 10 El número inicial de células madre hematopoyéticas c-Kit+/ células progenitoras es de 8×10^4 . Medio de cultivo: IMDM + 15% de suero bovino fetal + 10 ng/ml de IL-6 de ratón + 10 ng/ml de IL-3 de ratón + 50 ng/ml de SCF de ratón + 20 ng/ml de TPO de ratón + 10 mg/ml de Flt3-L de ratón.

Concentración de moléculas pequeñas: Forskolina (10 μ M), VPA (500 μ M), CHIR99021 (10 μ M), RepSox (5 μ M), tranilcipromina (5 μ M) y TTNPB (1 μ M).

- 15 Los resultados son como se muestran en la Fig. 6. Se puede observar a partir de la Fig. 6A que, después de tratar con diversas combinaciones de moléculas reprogramantes pequeñas, la apoptosis de las células leucémicas se aumentó significativamente, mientras se proporcionaba un efecto menor sobre las células madre hematopoyéticas normales/células progenitoras. Se puede observar a partir de la Fig. 6B, que después de tratar las células leucémicas con las moléculas reprogramantes pequeñas, la proliferación celular se suprimió significativamente y el número de células se disminuyó significativamente en comparación con el pretratamiento (día 0). Se puede observar a partir de la Fig. 6C que la proliferación de células madre hematopoyéticas normales/células progenitoras se suprimió también después de un tratamiento con las moléculas reprogramantes pequeñas, pero el número de células aumentó solo ligeramente en comparación con el pretratamiento (día 0). Se puede observar a partir de la Fig. 6D que la patogenicidad del mismo número de células leucémicas se redujo significativamente después de un tratamiento con dos combinaciones de UVC 6T y FVC6TN y la leucemia no se desarrolló en la mayoría de los ratones. Se puede observar a partir de la Fig. 6E que la expresión de genes de pluripotencia en las células se aumentó después de tratar las células con las moléculas reprogramantes pequeñas, indicando el inicio del procedimiento de reprogramación. Se puede observar a partir de la Fig. 6 que las moléculas reprogramantes pequeñas eran capaces de eliminar selectivamente células leucémicas de ratón *in vivo/in vitro* y provocaron menos intervención de células madre hematopoyéticas normales/células progenitoras y pueden tratar eficazmente la leucemia de ratón.

Experimento 2: Utilización de moléculas reprogramantes-inductoras pequeñas para eliminar células leucémicas humanas *in vitro*

1. Líneas de células leucémicas humanas: una diversidad de líneas de células leucémicas se trató con las moléculas reprogramantes pequeñas y se determinaron sus niveles de apoptosis y estado de crecimiento.

- 35 Condiciones de tratamiento: el número inicial fue de 1×10^5 .

Células HL-60, K562, NB4, Kasumi-1 y Jurkat: RPMI 1640 + 10 % de suero bovino fetal

Células THP-1: RPMI 1640 + 10% de suero bovino fetal + 2-mercaptoetanol 0,05 mM

Células KG-1 y KG-1a: IMDM + 20% de suero bovino fetal

- 40 Concentración de moléculas pequeñas: Forskolina (10 μ M), VPA (500 μ M) CHIR99021 (10 μ M), Rep-Sox (5 μ M), tranilcipromina (5 μ M) y TTNPB (1 μ M)

Los resultados son como se muestra en la Fig. 7, en que después de un tratamiento con una combinación de moléculas pequeñas FVC6TN, la apoptosis fue aumentada en todas las líneas de células leucémicas y el crecimiento celular se suprimió considerablemente.

- 45 2. Muestra de pacientes de leucemia: un total de 22 casos de células de pacientes de leucemia mielogenosa aguda (AML) y 5 casos de células madre de sangre de cordón umbilical humano normal (CD34 +) fueron recogidas para el presente experimento. Se usaron moléculas reprogramantes pequeñas para el tratamiento con fármaco bajo la condición de cultivo *in vitro*.

Condiciones de tratamiento: el número inicial de células CD34 + de sangre de cordón umbilical humano y células

CD34+ de pacientes de AML fue de 1×10^5 . Medio de cultivo: IMDM + 15% de suero bovino fetal + 1% de antibiótico doble + 100 ng/ml de SCF humano + 100 ng/ml de Flt3-L humano + 50 ng/ml de TPO humano + 10 ng/ml de IL-3 humano + 100 ng/ml de IL-6 humano.

5 Concentración de moléculas pequeñas: forskolina (10 μ M), VPA (500 μ M), CHIR99021 (10 μ M), Rep-SoxL (5 μ M), tranilcipromina (5 μ M) y TTNPB (1 μ M)

Los resultados son como se muestra en la Fig. 8. La Fig. 8A muestra las relaciones de apoptosis de células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano y células CD34+ de paciente de AML después de un tratamiento con diversas combinaciones de moléculas reprogramantes pequeñas. Se puede observar a partir de la Fig. 8A que después de un tratamiento con la combinación de moléculas reprogramantes pequeñas, la apoptosis de células CD34+ de pacientes de AML era más significativa en comparación con las células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano. Las Figs. 8B y 8C, respectivamente, muestran el número de colonias de células CD34+ de pacientes de AML y células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano, respectivamente, después de un tratamiento con una combinación de moléculas pequeñas FVC6TN. Se puede observar a partir de la Fig. 8B que, después de un tratamiento con la combinación de moléculas pequeñas FVC6TN, la capacidad de formación de colonias de células CD34+ de pacientes de AML se redujo significativamente (L1, L2, L17, L19 y L21 son el número de pacientes). Se puede observar a partir de la Fig. 8C que, después de un tratamiento con la combinación de moléculas pequeñas FVC6TN, la capacidad de formación de colonias de células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano no se vio significativamente afectada después del tratamiento con la combinación de moléculas pequeñas. Se puede observar a partir de la Fig. 8D que después de que las células fueran tratadas con la combinación de moléculas reprogramantes-inductoras pequeñas, después de que las células fueran tratadas con la combinación de moléculas reprogramantes pequeñas, la expresión de genes de pluripotencia intracelulares se aumentó, indicando el inicio del procedimiento de reprogramación. Se puede observar a partir de la Fig. 8 que, en comparación con las células CD34+ de sangre de cordón umbilical normal, el nivel de apoptosis de células CD34+ de pacientes de AML se aumentó significativamente. El ensayo de células formadoras de colonias (CFC) *in vitro* indicó que, después de un tratamiento con las moléculas pequeñas, la capacidad de formación de colonias de células CD34+ de pacientes de AML se suprimió considerablemente y la capacidad formadora de colonias de células CD34+ de sangre de cordón umbilical normal no se vio afectada.

De forma análoga a los modelos de ratones, los factores de reprogramación fueron capaces de inducir selectivamente la muerte celular de células leucémicas humanas *in vitro* y el efecto sobre las células madre hematopoyéticas normales/células progenitoras fue relativamente bajo, por lo que se puede conseguir el efecto de limpieza de la leucemia.

REIVINDICACIONES

1. Factores de inducción Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc para uso en un método para tratar leucemia favoreciendo la apoptosis de células leucémicas *in vivo*.
2. Los factores para uso según la reivindicación 1, caracterizados porque los factores de inducción Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc favorecen que las células leucémicas inicien un procedimiento de reprogramación.
3. Los factores para uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizados porque las células leucémicas son células leucémicas de mamíferos.
4. Los factores para uso según la reivindicación 3, caracterizados porque las células leucémicas son células leucémicas humanas.
5. Los factores para uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizados porque los factores de inducción están en una forma de cDNA, mRNA o proteína.
6. Un método para inducir la apoptosis de células leucémicas *in vitro* utilizando un efecto de reprogramación, caracterizado porque el método comprende una etapa de introducción de factores de reprogramación Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc en células leucémicas.
7. El método según la reivindicación 6, caracterizado porque el método de introducción emplea métodos de infección con virus, transfección de proteínas recombinantes o transfección de vectores mediante electro-transfección.
8. Un método para inducir apoptosis de células leucémicas *in vitro* utilizando un efecto de reprogramación, caracterizado porque el método comprende una etapa de utilizar moléculas reprogramantes pequeñas en un cultivo *in vitro*.
9. El método para inducir apoptosis de células leucémicas *in vitro* utilizando un efecto de reprogramación según la reivindicación 8, caracterizado porque las moléculas reprogramantes pequeñas son una o una combinación de dos o más de forskolina (FSK, F), VPA (V), CHIR99021 (CHIR, C), RepSox (616452, 6), tranil-cipromina (TCP, T) y TTNPB (N).
10. El método para inducir apoptosis de células leucémicas *in vitro* utilizando un efecto de reprogramación según la reivindicación 9, caracterizado porque las moléculas reprogramantes pequeñas son una combinación de seis de forskolina (FSK, F) VPA (V), CHIR99021 (CHIR, C), RepSox (616452, 6), tranilcipromina (TCP, T) y TTNPB (N).

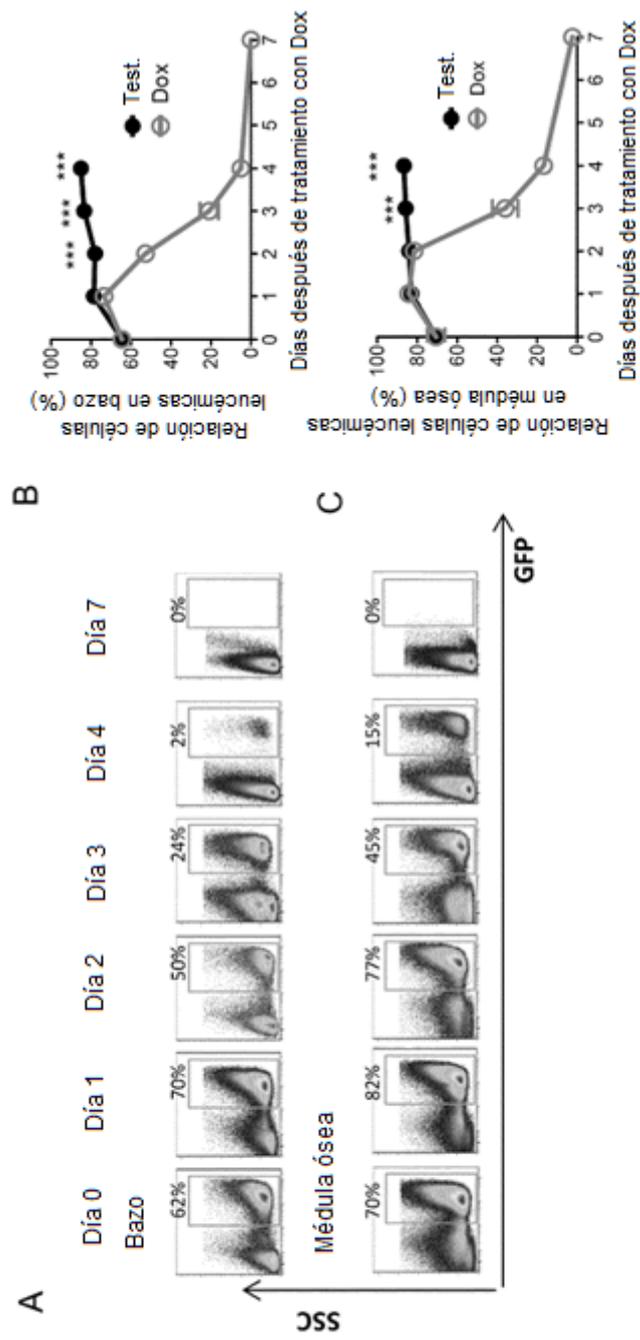


Fig.1

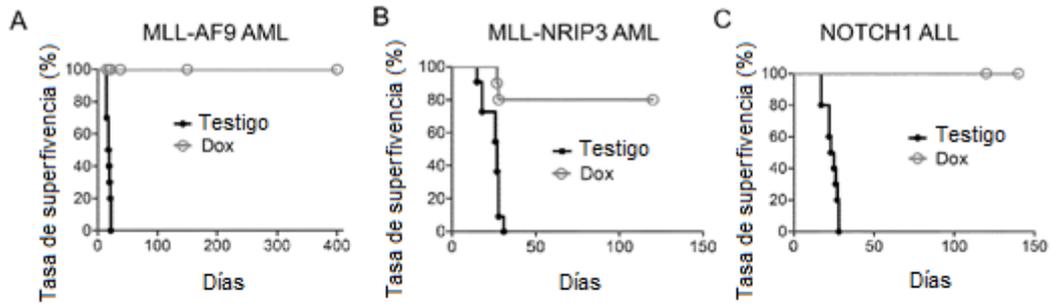


Fig. 2

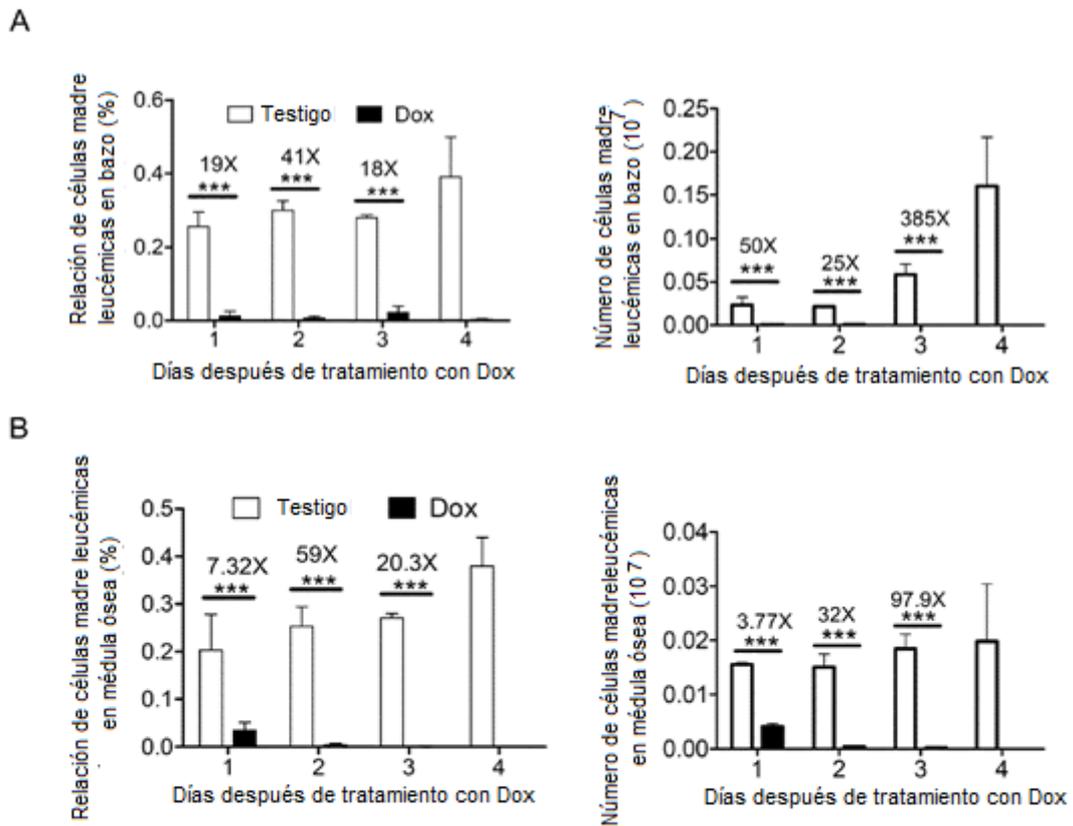


Fig. 3

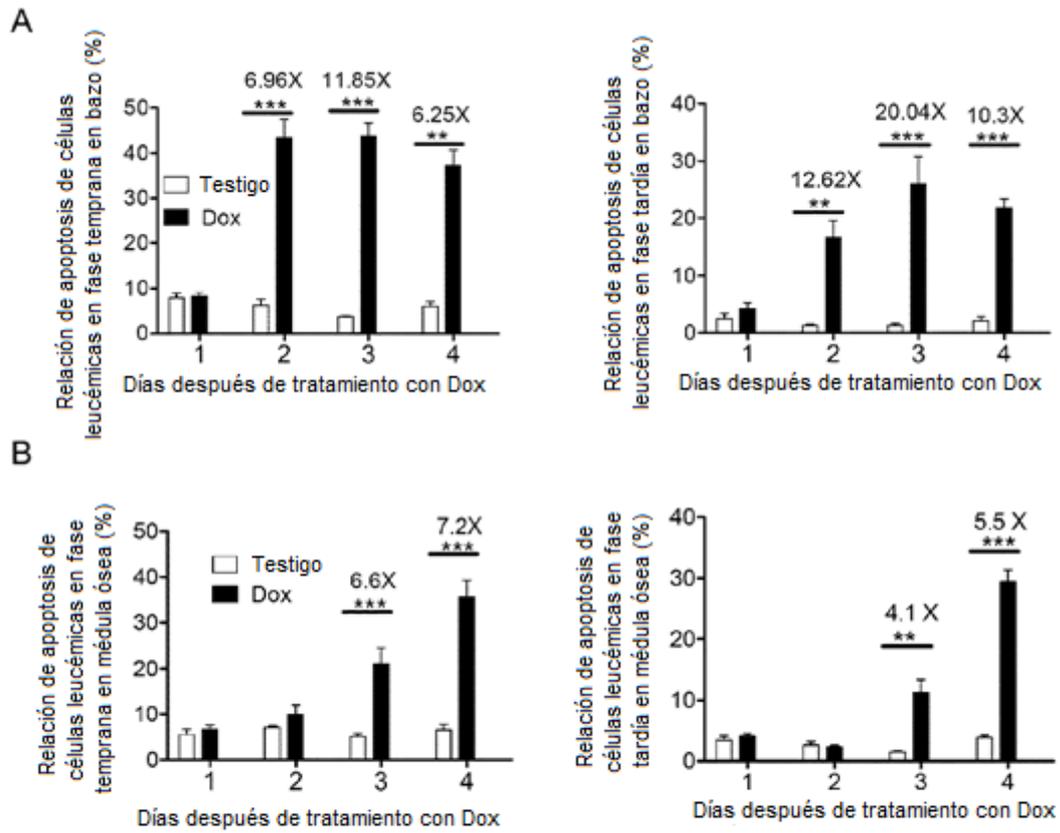


Fig. 4

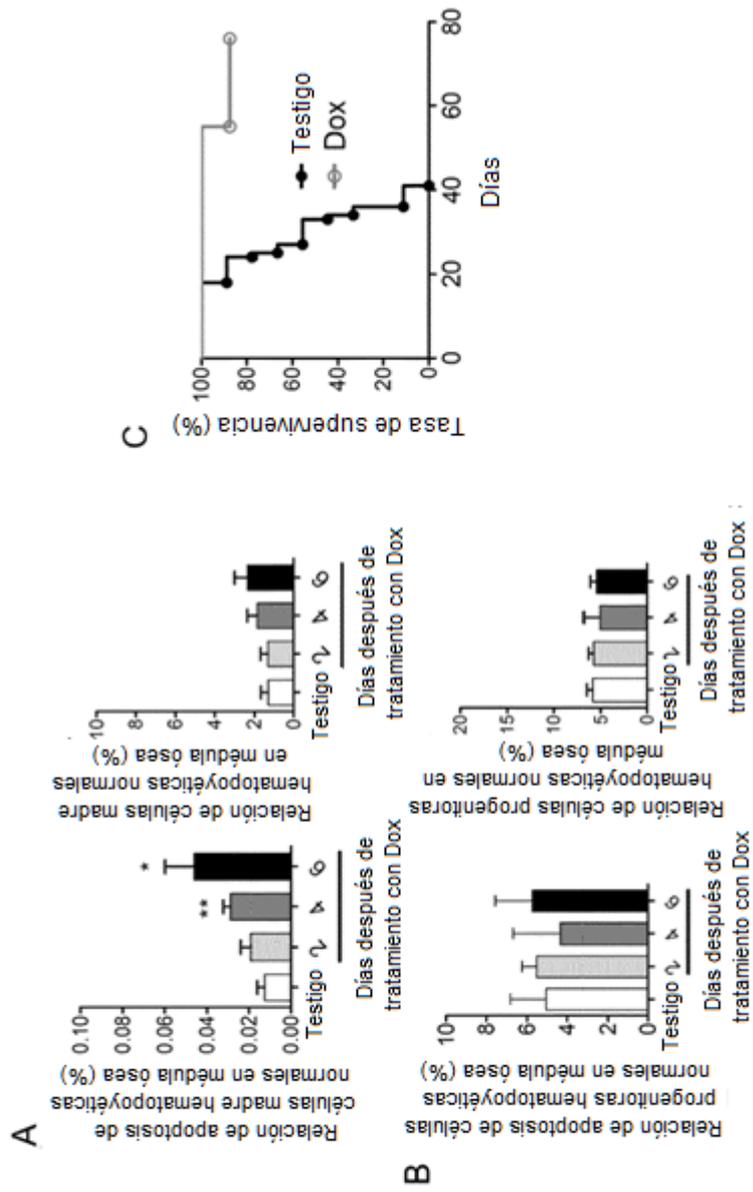


Fig. 5

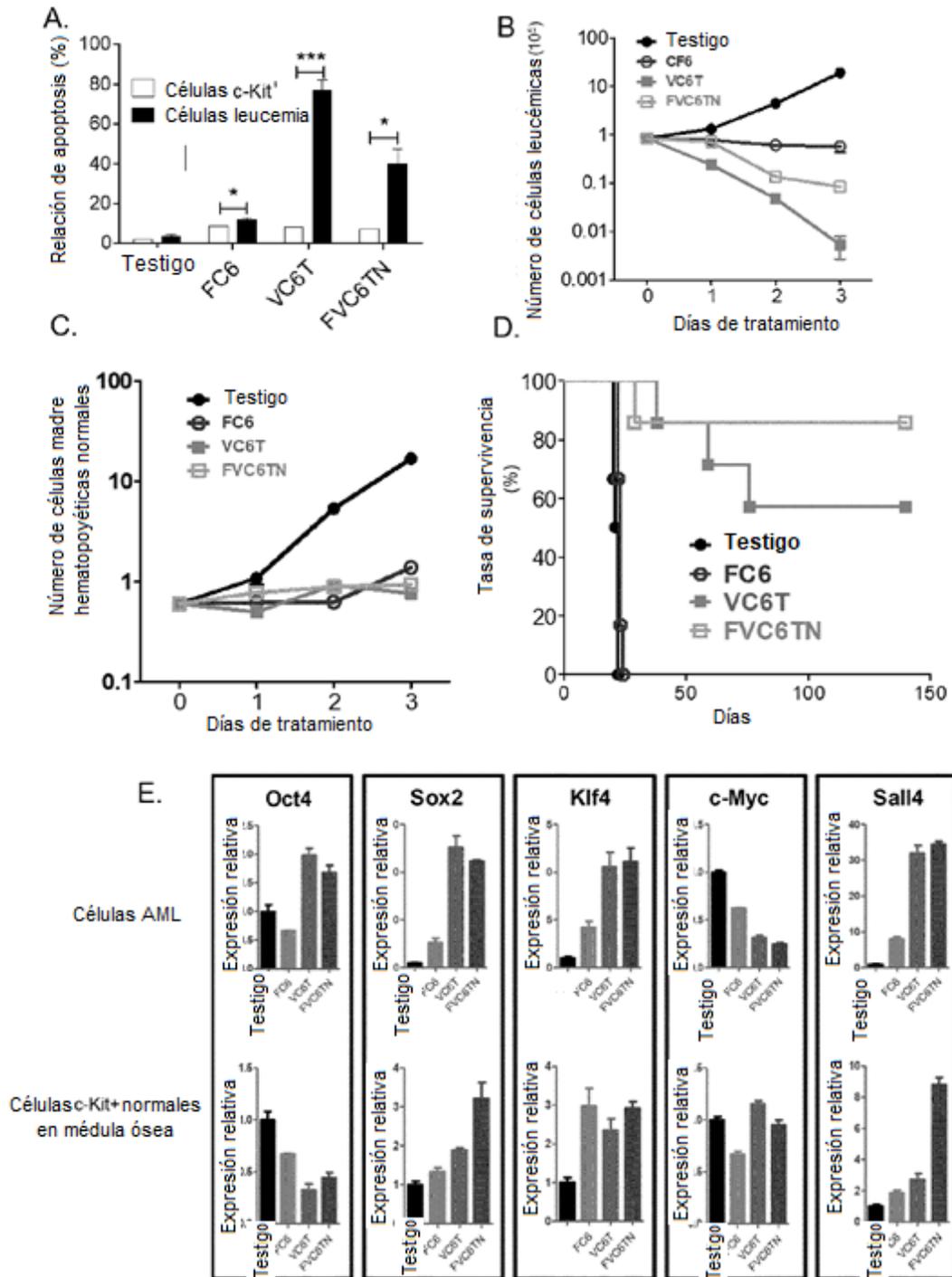


Fig. 6

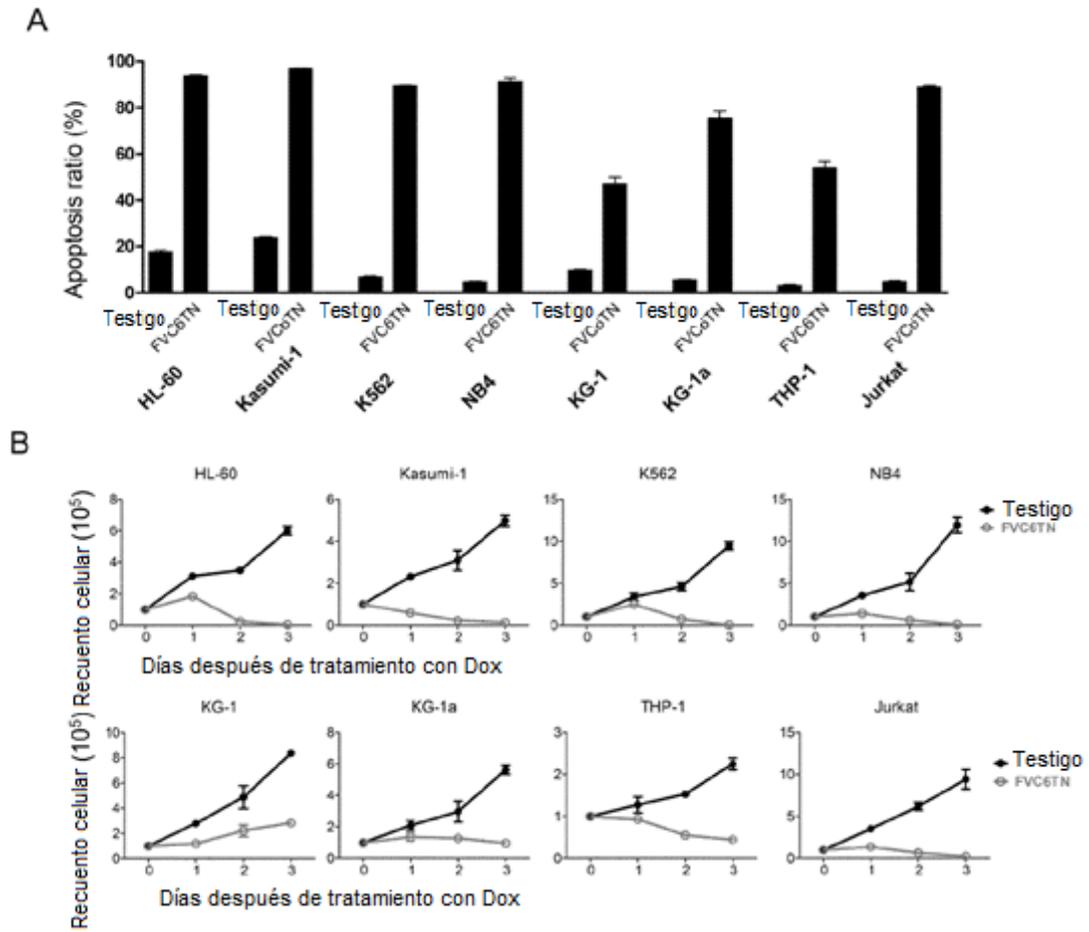


Fig. 7

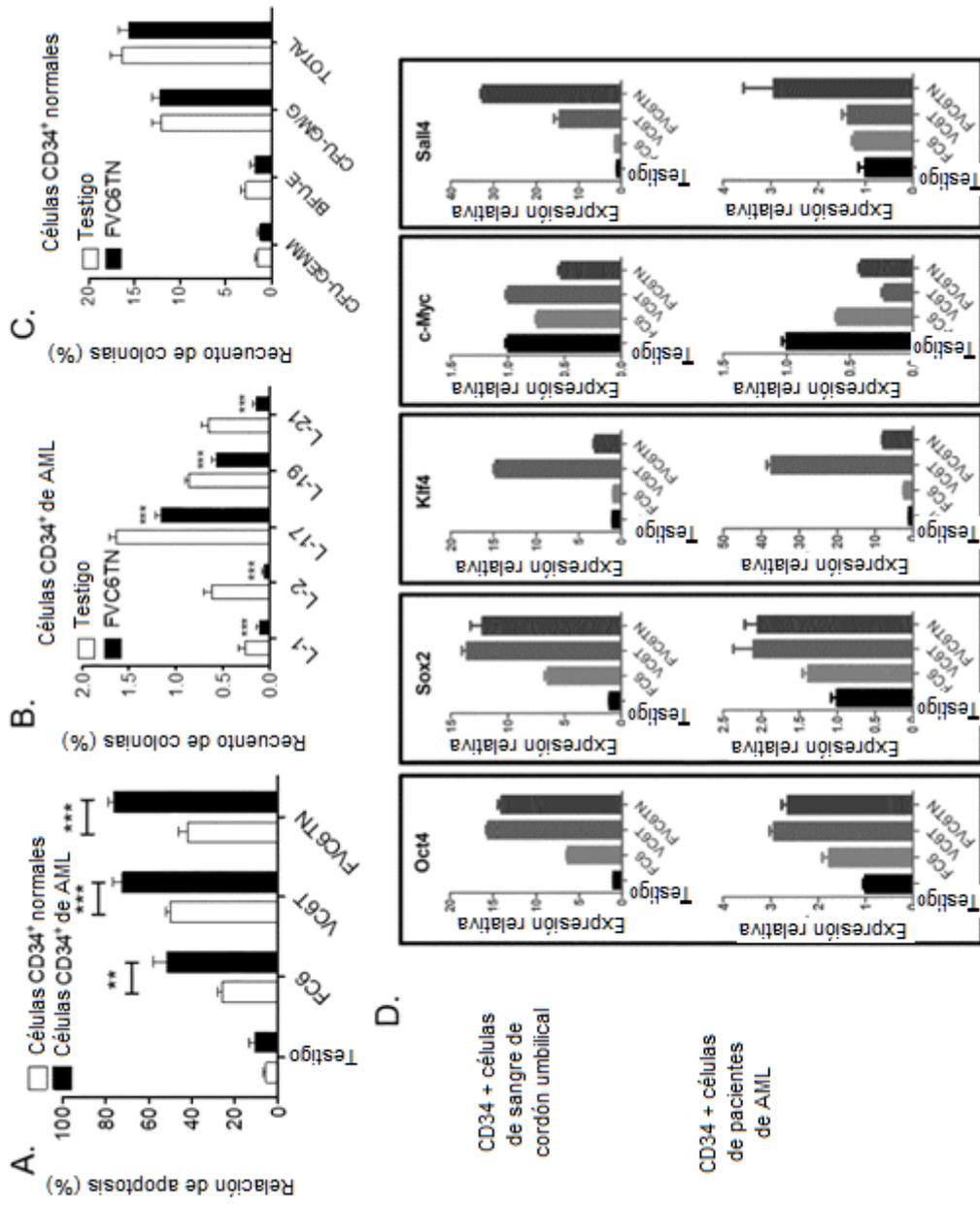


Fig. 8