

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 155**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/11** (2006.01)

**A61K 31/155** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2016 PCT/KR2016/001111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016 WO16126073**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2016 E 16746814 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.09.2021 EP 3254680**

54 Título: **Composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células madre de cáncer, que contiene un inhibidor de aldehído y un compuesto a base de biguanida**

30 Prioridad:

**02.02.2015 KR 20150016295**

**27.01.2016 KR 20160010118**

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

**08.02.2022**

73 Titular/es:

**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION  
FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY (50.0%)  
50, Yonsei-ro, Seodaemun-gu  
Seoul 03722, KR y  
NATIONAL CANCER CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KANG, SEOK GU;  
CHANG, JONG HEE;  
KIM, EUI HYUN;  
LEE, JI HYUN;  
JO, YUN HEE;  
PARK, JUNSEONG;  
SHIM, JIN KYOUNG y  
KIM, SOO YOUL**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

### Observaciones:

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

ES 2 893 155 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

Composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células madre de cáncer, que contiene un inhibidor de aldehído y un compuesto a base de biguanida

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células madre de cáncer, que contiene un inhibidor de aldehído y un compuesto a base de biguanida.

[Técnica antecedente]

El cáncer es una de las causas de muerte más comunes en el mundo. Aproximadamente 10 millones de nuevos casos de cáncer ocurren cada año, y el cáncer es responsable de aproximadamente el 12 % de la causa total de muerte, lo que convierte al cáncer en la tercera causa principal de muerte.

Entre varias clases de cánceres, particularmente el cáncer de cerebro se caracteriza porque se produce independientemente de la edad y la frecuencia de aparición del mismo en los bebés es mayor que la de otros cánceres. El cáncer de cerebro se refiere colectivamente al cáncer de cerebro primario, que se produce en el tejido cerebral y las meninges que rodean el cerebro, y al cáncer de cerebro secundario con metástasis de un cáncer que se produjo en el cráneo u otras áreas del cuerpo. Este cáncer de cerebro se diferencia en muchos aspectos de los cánceres que ocurren en otros órganos. Específicamente, los cánceres que ocurren en el estómago, pulmón, mama y similares se limitan a uno o dos tipos en cada órgano y generalmente tienen características idénticas o similares. Sin embargo, en el cerebro se producen muy diversos tipos de cánceres, que incluyen, por ejemplo, glioblastoma multiforme, glioma maligno, linfoma, germinoma, tumores metastásicos y similares.

Entre estos cánceres de cerebro, el glioma, particularmente el glioblastoma multiforme (GBM), es la forma más maligna y agresiva de cáncer de cerebro y, por lo tanto, es una enfermedad muy fetal que tiene un pronóstico muy malo y muestra un período de supervivencia promedio de aproximadamente 1 año o menos después del diagnóstico. Dado que el límite entre las células cerebrales y las células tumorales es indistinto, es casi imposible eliminar completamente el GBM mediante cirugía.

A pesar de un avance en el campo del tratamiento del cáncer, las terapias líderes actuales incluyen cirugía, radiación y quimioterapia. Los enfoques quimioterapéuticos se utilizan principalmente para el tratamiento de cáncer metastásico o particularmente cáncer agresivo. La mayoría de los agentes terapéuticos contra el cáncer que se utilizan actualmente en la práctica clínica son las citotoxinas. Los agentes citotóxicos actúan al dañar o destruir las células que exhiben un crecimiento rápido.

Los agentes citotóxicos ideales tendrían especificidad para las células de cáncer y tumorales, sin afectar a las células normales. Desafortunadamente, no se han encontrado dichos agentes citotóxicos ideales, y en su lugar se han utilizado agentes que se dirigen especialmente a células que se dividen rápidamente (tanto tumorales como normales). De acuerdo con lo anterior, son muy deseables materiales que sean citotóxicos para las células de cáncer mientras que ejercen sólo efectos leves sobre las células normales. De hecho, muchos estudios recientes se han centrado en el desarrollo de agentes anticancerígenos alternativos que particularmente puedan inhibir el crecimiento de células tumorales.

El documento KR 101 242 726 B1 divulga un agente de diagnóstico y terapéutico para el cáncer con una propiedad de célula madre tumoral que contiene un compuesto de tiocarbamato, especialmente disulfiram como un ingrediente activo.

De acuerdo con lo anterior, se requiere con urgencia el desarrollo de agentes quimioterapéuticos diferentes a la terapia quirúrgica, pero aún no se han desarrollado métodos terapéuticos eficaces y, por lo tanto, se requiere la investigación y el desarrollo de los mismos.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que pueda inhibir eficazmente el crecimiento de células madre de cáncer para inhibir la proliferación, invasión y metástasis de células de cáncer, previniendo y/o tratando de esta manera el cáncer.

[Solución técnica]

Los presentes inventores han realizado estudios extensos y, como resultado, han descubierto que la coadministración de un inhibidor de aldehído y un compuesto a base de biguanida puede inhibir el crecimiento de células madre de

cáncer para inhibir la proliferación, invasión y metástasis de las células de cáncer para de esta manera prevenir y/o tratar el cáncer. En base a este hallazgo, se ha logrado la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "células madre de cáncer" generalmente se refiere a células de cáncer que tienen potencial de autorrenovación o diferenciación, que es el potencial característico que es característico de las células madre. Por ejemplo, las células madre de cáncer pueden incluir neuroesferas que son células madre en el sistema nervioso central del cerebro. En las condiciones de crecimiento tumoral normales de las células madre de cáncer (las "condiciones de crecimiento tumoral normales" se refieren a un estado en el que un nutriente (glucosa) requerido para el crecimiento celular es suficiente y las condiciones para el crecimiento del microambiente tumoral son abundantes y, por lo tanto, no hay estrés celular), las células madre de cáncer pueden proliferar a un ritmo lento, a diferencia de las células de cáncer generales, o se pueden mantener en un estado latente y, por lo tanto, pueden tener resistencia a los agentes anticancerígenos. Por ejemplo, la expresión de reguladores de transcripción tales como PGC-1a se puede controlar, a diferencia de aquella de las células tumorales normales y, por tanto, la función de las principales sustancias reguladoras del metabolismo en ellas puede diferir de aquella de las células de cáncer en general. Por tanto, el término "células madre de cáncer" generalmente se refiere a células que adquieren resistencia a la apoptosis en un estado de deficiencia de nutrientes a través de esta capacidad reguladora del metabolismo diferente y la regulación de los sistemas de señalización celular conectados mecánicamente a las mismas, y que tienen potencial invasivo y/o metastásico. Sin embargo, las células madre de cáncer no se limitan a estas y pueden incluir cualquier célula que se pueda diferenciar en células de cáncer en general.

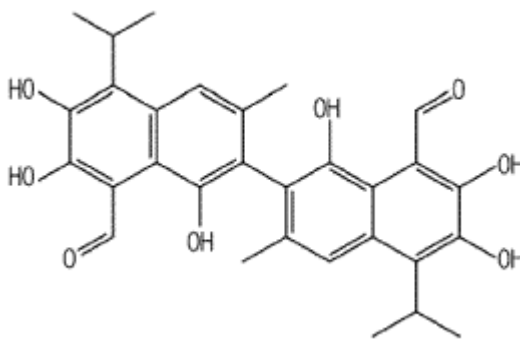
Como se utiliza en el presente documento, la expresión "inhibir el crecimiento de células madre de cáncer" pretende incluir la inhibición de mantenimiento de las células madre de cáncer, la inhibición de neoplasia maligna de células madre de cáncer, y la inhibición de la invasión de células madre de cáncer.

Específicamente, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del glioblastoma multiforme (GBM) al inhibir el crecimiento de células madre de cáncer, que contiene el inhibidor de aldehído gosipol y el compuesto a base de biguanida fenformina. Las realizaciones preferidas se establecen en las reivindicaciones adjuntas 2 a 8. Cualquier materia objeto mencionada a continuación en el presente documento y que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la presente invención.

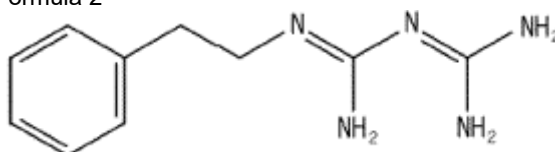
En el presente documento, "el gosipol" es un derivado de fenol que está contenido en grandes cantidades en las plantas de algodón. En China, se encontró que este gosipol inhibe la función de los espermatozoides masculinos. Por tanto, el gosipol se ha estudiado para su uso como anticonceptivos orales masculinos. Adicionalmente, "la fenformina" se conoce generalmente como un agente terapéutico para la diabetes que regula fisiológicamente el metabolismo de los carbohidratos y el metabolismo de los lípidos.

En la presente invención, una combinación del gosipol y la fenformina exhibe preferiblemente un efecto sinérgico muy alto sobre la inhibición del crecimiento de células madre de cáncer. en el presente documento, el gosipol es preferiblemente un compuesto representado por la siguiente fórmula 1 o su derivado, pero no se limita a este, y la fenformina es preferiblemente un compuesto representado por la siguiente fórmula 2 o su derivado, pero no se limita a esta:

Fórmula 1



Fórmula 2



En la composición farmacéutica utilizada en la presente invención, el inhibidor de aldehído y el compuesto a base de biguanida pueden estar contenidos en una relación en peso de 1:1 a 100, preferiblemente de 1:2 a 20.

Adicionalmente, en la composición farmacéutica utilizada en la presente invención, el inhibidor de aldehído puede estar contenido en una cantidad de 0.5 a 50  $\mu\text{M}$ .

Más aún, en la composición farmacéutica utilizada en la presente invención, el compuesto a base de biguanida puede estar contenido en una cantidad de 10 a 1000  $\mu\text{M}$ .

Como se describió anteriormente, la composición utilizada en la presente invención inhibe el crecimiento de células madre de cáncer para de esta manera prevenir y/o tratar el glioblastoma multiforme (GBM).

Sin embargo, la composición farmacéutica utilizada en la presente invención se puede coadministrar con otros agentes anticancerígenos adicionales para tratar eficazmente no solo las células madre de cáncer, sino también las células de cáncer en general.

El agente anticancerígeno que se puede utilizar en la presente invención puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en mostaza nitrogenada, imatinib, oxaliplatino, rituximab, erlotinib, neratinib, lapatinib, gefitinib, vandetanib, nilotinib, semaxanib, bosutinib, axitinib, cediranib, lestaurtinib, trastuzumab, gefitinib, bortezomib, sunitinib, carboplatino, sorafenib, bevacizumab, cisplatino, cetuximab, viscum album, asparaginasa, tretinoin, hidroxycarbamida, dasatinib, estramustina, gemtuxumab, ozogamicina, ibritumomab tiuxetan, heptaplatino, ácido metilaminolevulínico, amsacrina, alemtuzumab, procarbazona, alprostadil, nitrato de holmio quitosano, gemcitabina, doxifluridina, pemetrexed, tegafur, capecitabina, gimeracilo, oteracilo, azacitidina, metotrexato, uracilo, citarabina, fluorouracilo, fludarabina, enocitabina, flutamida, decitabina, mercaptopurina, tioguanina, cladribina, carmofur, raltitrexed, docetaxel, paclitaxel, irinotecan, belotecan, topotecan, vinorelbina, etopósido, vincristina, vinblastina, tenipósido, doxorubicina, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona, mitomicina, bleomicina, daunorubicina, dactinomicina, pirarubicina, aclarubicina, peplomicina, temsirolimus, temozolomida, busulfan, ifosfamida, ciclofosfamida, melfalan, altretamina, dacarbazina, tiotepa, nimustina, clorambucilo, mitolactol, leucovorina, tretinina, exemestano, aminoglutetimida, anagrelida, navelbina, fadrazol, tamoxifen, toremifén, testolactona, anastrozol, letrozol, vorozol, bicalutamida, lomustina y carmustina, pero no se limita a estos.

En la presente invención, la composición farmacéutica puede estar en forma de cápsulas, comprimidos, gránulos, soluciones inyectables, ungüentos, polvos o bebidas. La composición farmacéutica puede ser para administración a humanos.

Para uso, la composición farmacéutica utilizada en la presente invención se puede formular como preparaciones orales, que incluyen polvos, gránulos, cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas y similares, preparaciones externas para la piel, supositorios y soluciones inyectables estériles, de acuerdo con los métodos convencionales, pero no se limita a ellos. La composición farmacéutica utilizada en la presente invención puede contener un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en la presente invención incluyen aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, excipientes, solubilizantes, agentes dispersantes, estabilizadores, agentes de suspensión, pigmentos, fragancias y similares, que se pueden utilizar para administración oral; tampones, conservantes, agentes analgésicos, solubilizantes, agentes isotónicos, estabilizadores y similares, que se pueden utilizar para inyección; y bases, excipientes, lubricantes, conservantes y similares, que se pueden utilizar para administración local. La composición farmacéutica utilizada en la presente invención se puede formular de diversas formas al mezclarla con el portador farmacéuticamente aceptable como se describió anteriormente. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica utilizada en la presente invención se puede formular como comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas o similares, y para inyección, se puede formular como ampollas de dosis unitaria o viales de múltiples dosis. Además, la composición farmacéutica utilizada en la presente invención se puede formular como soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, preparaciones de liberación sostenida o similares.

Mientras tanto, ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes adecuados para la formulación incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metil celulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, benzoato de metilhidroxilo, benzoato de propilhidroxilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Además, la composición farmacéutica utilizada en la presente invención puede contener adicionalmente un agente de carga, un anticoagulante, un lubricante, un agente humectante, una fragancia, un emulsionante, un conservante o similares.

Las rutas de administración de la composición farmacéutica utilizada de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ruta oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intradural, intracardiaca, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, gastrointestinal, tópica, sublingual e intrarrectal. Se prefiere la administración oral o parenteral. Como se utiliza en el presente documento, el término "parenteral" pretende incluir técnicas de inyección o infusión subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intradural, intralesional e intracraneal. La composición farmacéutica utilizada en la presente invención también se puede formular como supositorios para administración intrarrectal.

La composición farmacéutica utilizada en la presente invención puede variar dependiendo de varios factores, que incluyen la actividad de los compuestos específicos utilizados, la edad del paciente, peso corporal, salud general, sexo, dieta, el período de administración, la ruta de administración, tasa de excreción, el contenido del fármaco y la gravedad de una enfermedad específica que se va a prevenir o tratar. La dosis de la composición farmacéutica se puede seleccionar adecuadamente por un experto en la técnica dependiendo del estado del paciente, peso corporal, la gravedad de la enfermedad, la forma del fármaco y la ruta y período de administración, y puede ser de 0.0001 a 50 mg/kg/día o 0.001 a 50 mg/kg/día. La composición farmacéutica se puede administrar una o varias veces al día. La dosis no pretende limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. La composición farmacéutica utilizada de acuerdo con la presente invención se puede formular como píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, soluciones acuosas o suspensiones.

[Efectos ventajosos]

La composición farmacéutica utilizada de acuerdo con la presente invención contiene una combinación del inhibidor de aldehído gosipol y el compuesto a base de biguanida fenformina, que inhibe eficazmente el crecimiento de células madre de cáncer tales como neuroesferas y también puede inhibir la proliferación, invasión y metástasis de células de cáncer, previniendo y/o tratando de esta manera el cáncer, en particular GBM.

[Descripción de los dibujos]

La FIG. 1 muestra gráficamente los resultados del ensayo MTT realizado en concentraciones variables de gosipol en el Ejemplo de Referencia 1.

La FIG. 2 muestra gráficamente el cambio en la viabilidad de las células U87 mediante el tratamiento con cada una de las composiciones de los Ejemplos y Ejemplos Comparativos en el Ejemplo Experimental 1.

La FIG. 3 muestra fotografías de células de la neuroesfera U87 después de cada tratamiento en el Ejemplo Experimental 2.

La FIG. 4 muestra gráficamente el cambio en el radio de las células de la neuroesfera U87 después de cada tratamiento en el Ejemplo Experimental 2.

La FIG. 5 muestra gráficamente el grado de formación de las células de la neuroesfera U87 después de cada tratamiento en el Ejemplo Experimental 2.

La FIG. 6 muestra fotografías de células de la neuroesfera U87 después de cada tratamiento en el Ejemplo Experimental 3.

La FIG. 7 muestra el grado de aparición de cáncer de cerebro en ratones con modelo de xenoinjerto ortotópico después de cada tratamiento en el Ejemplo Experimental 4.

La FIG. 8 muestra la tasa de supervivencia de ratones con modelo de xenoinjerto ortotópico después de cada tratamiento en el Ejemplo Experimental 4.

[Mejor Modo]

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene una combinación del inhibidor de aldehído gosipol y el compuesto a base de biguanida fenformina, que inhibe eficazmente el crecimiento de células madre de cáncer tales como neuroesferas para inhibir la proliferación, invasión y metástasis de células de cáncer previniendo y/o tratando de esta manera el GBM.

[Modo de invención]

A continuación, se describirá la presente invención con más detalle con referencia a los ejemplos. Será obvio para aquellos expertos en la técnica que estos ejemplos tienen fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo de Referencia 1: Análisis de la viabilidad celular después del tratamiento con gosipol

Se trataron células U87 (células de GBM) con 0.5, 1, 5, 10 y 50  $\mu$ M de gosipol durante 72 horas (FIG. 1).

Como se puede ver en la FIG. 1, cuando las células se trataron con cada concentración de gosipol durante 72 horas, se inhibió el crecimiento de las células.

Ejemplo Experimental 1: Análisis de la viabilidad celular después del tratamiento con una combinación de gosipol y fenformina

Se sembraron células U87 sobre una placa de 96 pocillos y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. Luego, las células se trataron con cada una de las composiciones farmacéuticas de los Ejemplos y Ejemplos Comparativos como se muestra en la Tabla 1 a continuación, después de lo cual las células se trataron con reactivo MTS a una concentración

de 20 µl/pocillo y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. A continuación, se midió la absorbancia a 490 nm, y luego se calculó el cambio en la absorbancia con respecto a un grupo de control no tratado para determinar la viabilidad celular. Los resultados se muestran gráficamente en la FIG. 2.

5

Tabla 1

|                       | Composición                      |
|-----------------------|----------------------------------|
| Ejemplo Comparativo 1 | -                                |
| Ejemplo Comparativo 2 | gospol 0.5 µM                    |
| Ejemplo Comparativo 3 | gospol 1 µM                      |
| Ejemplo Comparativo 4 | fenformina 10 µM                 |
| Ejemplo 1             | fenformina 10 µM + gospol 0.5 µM |
| Ejemplo 2             | fenformina 10 µM + gospol 1 µM   |

Como se puede ver en la FIG. 2, la viabilidad de las células disminuyó significativamente cuando las células se trataron con una combinación de gospol y fenformina en comparación con cuando las células se trataron solo con gospol o fenformina.

10

#### Ejemplo Experimental 2: Análisis de la formación de neuroesferas

Se cultivaron células U87 en medio DMEM/F-12 que contenía 2% en peso de 1xB27, 0.02% en peso de bFGF (20 ng/ml), 0.02% en peso de EGF (20 ng/ml) y 50 U/ml de penicilina-50 mg/ml de estreptomicina (100x, Gibco, Invitrogen Korea, Seúl, Corea del Sur) para formar esferas tumorales. A continuación, las células se sembraron sobre una placa de 96 pocillos a una densidad de 10 células/pocillo y se trataron con gospol 1 µM, fenformina 10 µM y una mezcla de gospol 1 µM y fenformina 10 µM. Luego, las células se cultivaron a 37 °C durante 3 semanas. Para observar la morfología y el tamaño de las células U87, los cultivos celulares obtenidos se observaron con un microscopio de contraste de fase invertida (Microscopio Invertido 1x71; Olympus, Tokio, Japón) y se fotografiaron con una cámara digital (Cámara de Microscopio Digital DP70; Olympus). Las fotografías se muestran en la FIG. 3. Además, el cambio en el radio de las neuroesferas por cada tratamiento se muestra gráficamente en la FIG. 4, y el grado de formación de neuroesferas se muestra gráficamente en la FIG. 5.

15

20

25

En la FIG. 4, el cambio porcentual en el radio de las neuroesferas se expresa como el porcentaje del radio promedio de las neuroesferas después de cada tratamiento con respecto al radio promedio de las neuroesferas sembradas en la placa de 96 pocillos, y en la FIG. 5, el grado de formación de la neuroesfera se expresa como el porcentaje del número de células de la neuroesfera después de cada tratamiento en relación con el número de células de la neuroesfera sembradas en la placa de 96 pocillos.

30

Como se puede ver en las fotografías de las células de la FIG. 3, incluso cuando las células de la neuroesfera se trataron con gospol o fenformina sola, el tamaño de las células de la neuroesfera disminuyó, pero cuando las células de la neuroesfera se trataron con una combinación de gospol y fenformina, no se observaron células de la neuroesfera.

35

Adicionalmente, como se puede ver en las FIGS. 4 y 5, el radio de las células de la neuroesfera disminuyó significativamente cuando las células se trataron con una combinación de gospol y fenformina en comparación con cuando las células se trataron solo con gospol o fenformina, y el número de células de la neuroesfera también disminuyó significativamente cuando se trataron con una combinación de gospol y fenformina.

40

#### Ejemplo Experimental 3: Ensayo de invasión de Transwell

Se suspendieron células U87 ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) en 0.1 ml de medio de crecimiento y luego se trataron con gospol 1 µM, fenformina 10 µM o una mezcla de gospol 1 µM y fenformina 10 µM y se cargaron en los pocillos superiores de una cámara transwell (tamaño de poro de 8 µm; Corning Glass). En el presente documento, la porción superior de la cámara transwell se llenó con 0.5 ml de medio de crecimiento y la porción superior se cubrió previamente con 8.4 mg/ml de Matrigel (Corning Matrigel Matrix) con factores de crecimiento reducidos. Las células se cultivaron en la cámara a 37 °C durante 48 horas, y luego las células no invadidas sobre la superficie superior del filtro se eliminaron con hisopos de algodón. Las células que migraron a la superficie inferior del filtro se fijaron y tiñeron con un kit Diff-Quick (Fisher), y luego se observaron los cultivos celulares obtenidos con un microscopio de contraste de fase (Olympus). Las fotografías de los cultivos celulares se muestran en la FIG. 6. Para medir la invasión celular, se contó el número de células en 10 campos microscópicos por pocillo.

50

Como se puede ver en la FIG. 6, el radio de las células de la neuroesfera disminuyó significativamente cuando las células se trataron con una combinación de gospol y fenformina en comparación con cuando las células se trataron solo con gospol o fenformina, y el número de células de la neuroesfera también disminuyó significativamente cuando se trataron con una combinación de gospol y fenformina.

55

Esto sugiere que el tratamiento con una combinación de gosipol y fenformina de acuerdo con la presente invención puede inhibir eficazmente la proliferación y metástasis de las células madre de cáncer de cerebro, en comparación con el tratamiento con solo gosipol o fenformina, aumentando significativamente de esta manera el efecto del tratamiento del cáncer de cerebro.

#### Ejemplo Experimental 4: Evaluación del efecto del gosipol en modelos de xenoinjerto ortotópico

Se disolvieron gosipol y fenformina para utilizar en un estudio con animales en DMSO y PBS, respectivamente. Se disolvió una composición para la coadministración de gosipol y fenformina en PBS que contenía 10 % en peso de DMSO y 10 % en peso de cremóforo.

Para la preparación de modelos de xenoinjerto ortotópico, se utilizaron ratones sin pelaje atímicos machos de 4-8 semanas de edad (Central Lab., Corea). Para la estabilización, los ratones se mantuvieron en un ambiente esterilizado durante al menos una semana antes de uso en el experimento mientras se alimentaban con una dieta suficiente. Todos los protocolos del estudio con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Yonsei. Primero, los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de 30 mg/kg de Zoletil y 10 mg/kg de xilazina, y se trasplantaron  $2 \times 10^5$  células U87-luc en el lóbulo frontal derecho del cerebro a una profundidad de 4.5 mm mediante el uso de una jeringa Hamilton. Las células U87-luc se inyectaron en cinco ratones del mismo grupo al mismo tiempo a una tasa de 0.5  $\mu$ l/minuto mediante el uso de una bomba de jeringa de microinfusión. A continuación, se administró a los ratones por vía oral gosipol (40 mg/kg) y/o fenformina (100 mg/kg) cada día. Los grupos de ratones de acuerdo con el tipo de fármaco administrado se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

|                       | Tipo de fármaco administrado                                                       |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Ejemplo Comparativo 6 | Administración de agua destilada después del trasplante de células U87-leu         |
| Ejemplo 4             | Administración de solo gosipol después del trasplante de células U87-leu           |
| Ejemplo 5             | Administración de solo fenformina después del trasplante de células U87-leu        |
| Ejemplo 6             | Coadministración de gosipol y fenformina después del trasplante de células U87-leu |

Se comprobó cada día un aumento o disminución en el peso corporal, y cuando un ratón cuyo peso corporal disminuyó en un 15 % en peso en comparación con el peso corporal antes del inicio del experimento, se sacrificó de acuerdo con el protocolo aprobado.

La recogida y el análisis de bioluminiscencia se realizaron utilizando un Sistema de Formación de Imágenes IVIS y un programa de análisis de imágenes (software Living Image V4.2). Para ello, 15 minutos antes de la medición de la señal, se inyectaron por vía intraperitoneal 100  $\mu$ l de d-luciferina (30 mg/ml de PBS) en cada ratón bajo anestesia con isoflurano al 2.5 %. La medición de la señal se realizó durante 5 segundos a las 1, 3 y 5 semanas después del trasplante de las células U87-luc. Los resultados se muestran en la FIG. 7.

Los resultados experimentales obtenidos utilizando los modelos de xenoinjerto ortotópico se muestran en la FIG. 7. Como se puede ver en la misma, a las 5 semanas después del trasplante de las células, se observó fluorescencia en el Ejemplo Comparativo 6, Ejemplo 4 (administración de solo gosipol) y Ejemplo 5 (administración de solo fenformina), lo que indica que el cáncer de cerebro fue causado por las células U87-luc, pero el Ejemplo 6 (coadministración de gosipol y fenformina) mostró un nivel muy bajo de cáncer de cerebro en comparación con el Ejemplo Comparativo 6, Ejemplos 4 y 5. Además, los resultados de la medición de la tasa de supervivencia de los ratones (FIG. 8) indicó que la tasa de supervivencia del grupo de ratones del Ejemplo 6 era mayor que la de los grupos de ratones del Ejemplo Comparativo 6 y los Ejemplos 4 y 5.

#### [Aplicabilidad industrial]

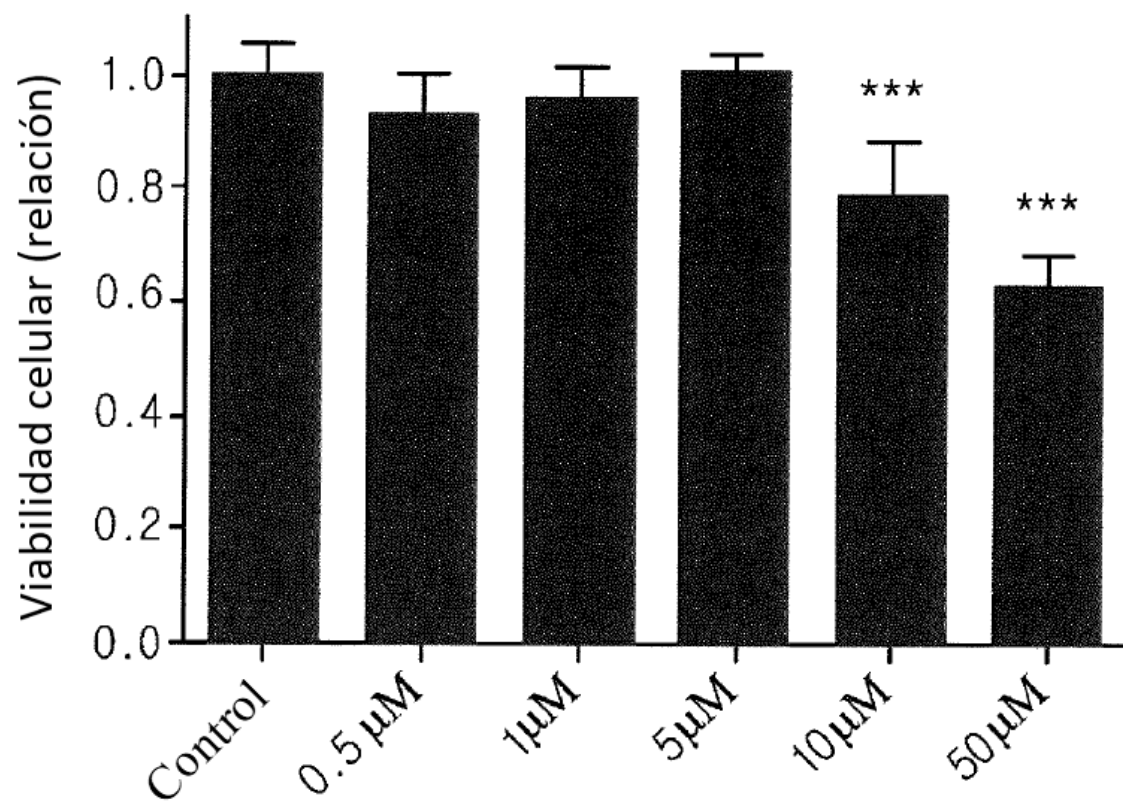
Como se describió anteriormente, la composición farmacéutica utilizada de acuerdo con la presente invención contiene una combinación del inhibidor de aldehído gosipol y el compuesto a base de biguanida fenformina, que puede inhibir eficazmente el crecimiento de células madre de cáncer tales como neuroesferas y también puede inhibir la proliferación, invasión y metástasis de células de cáncer, previniendo y/o tratando de esta manera el GBM.

**REIVINDICACIONES**

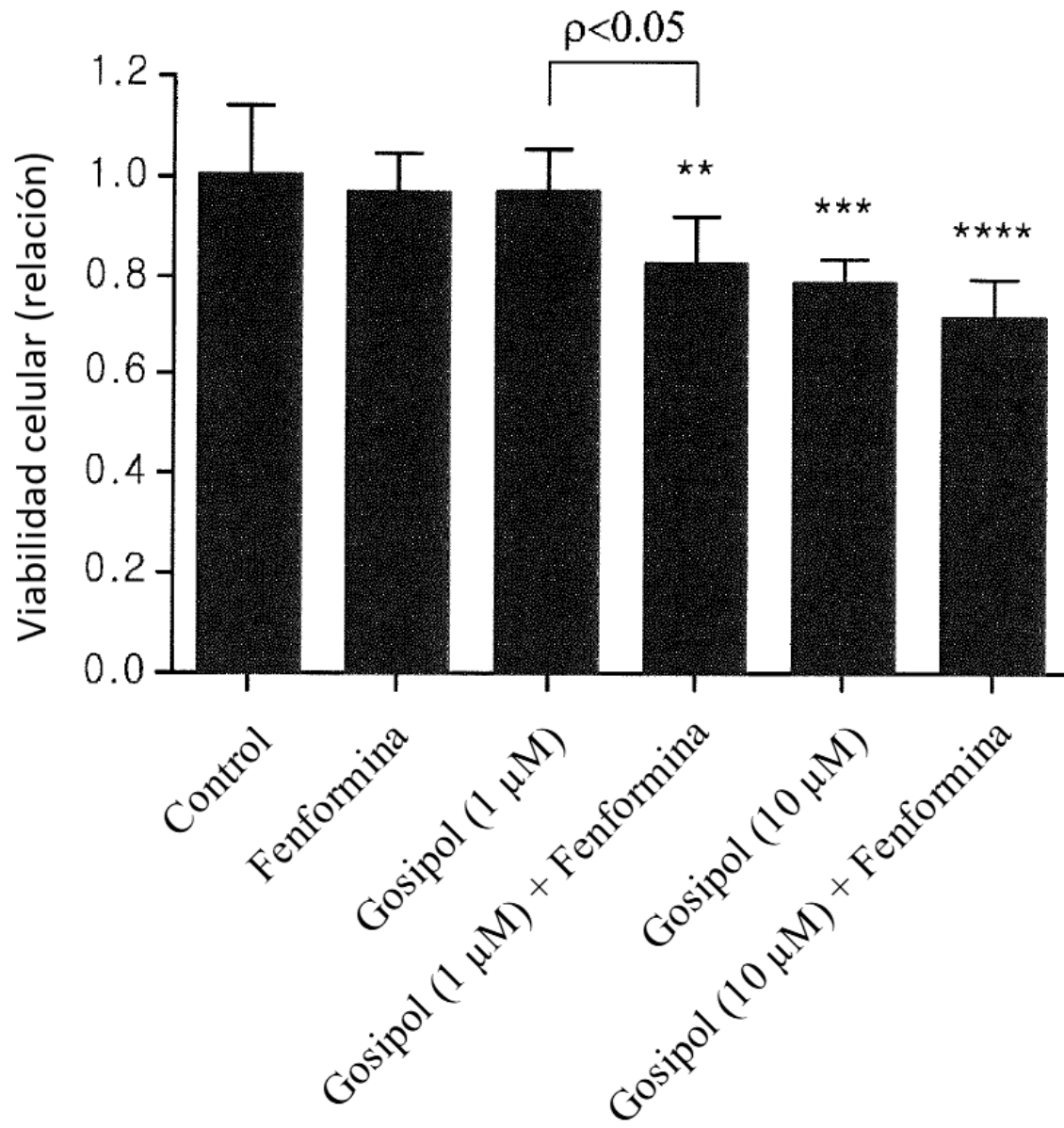
- 5 1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de glioblastoma multiforme (GBM) al inhibir el crecimiento de células madre de cáncer, que contiene gosipol y fenformina.
2. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que gosipol y fenformina están contenidos en una relación en peso de 1:1 a 100.
- 10 3. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que el gosipol y fenformina están contenidos en una relación en peso de 1:2 a 20.
4. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que el gosipol está contenido en una cantidad de 0.5 a 50  $\mu\text{M}$ .
- 15 5. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que la fenformina está contenida en una cantidad de 10 a 1000  $\mu\text{M}$ .
- 20 6. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica se administra por vía oral.
7. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las células madre de cáncer incluyen neuroesferas.
- 25 8. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que la inhibición del crecimiento de las células madre de cáncer es la inhibición del mantenimiento de células madre de cáncer, inhibición de la neoplasia maligna de células madre de cáncer, o inhibición de la invasión de células madre de cáncer.



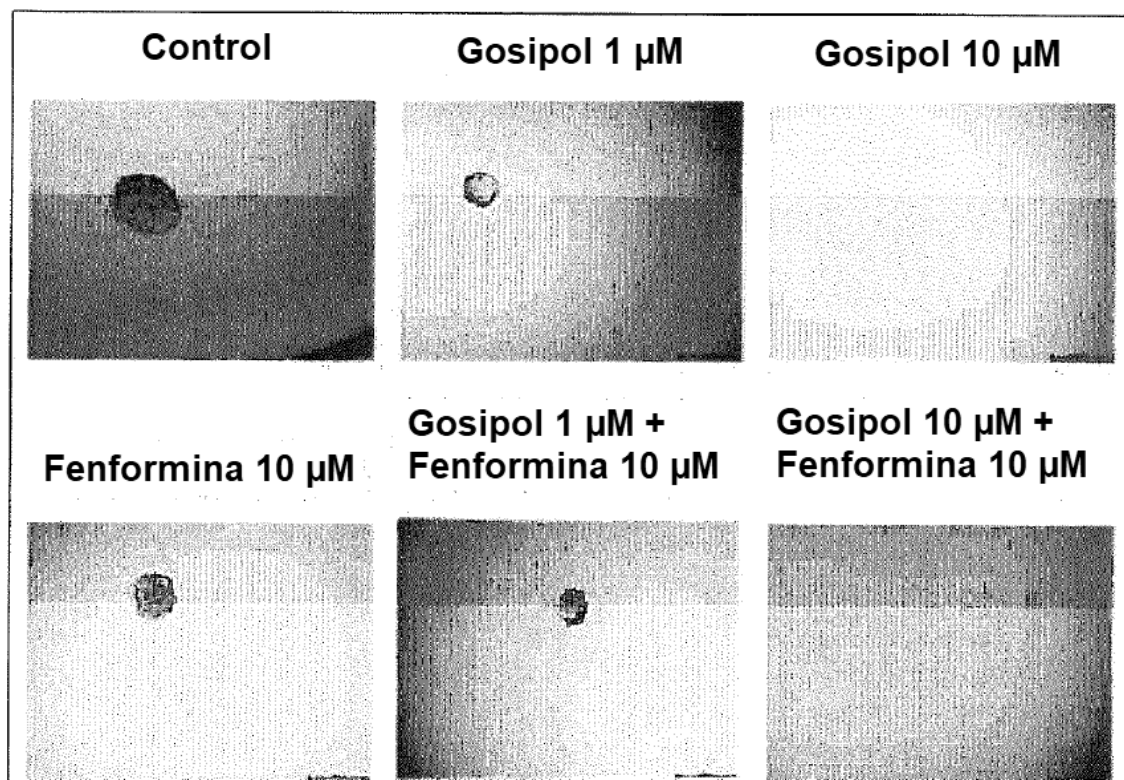
[Figura 1]



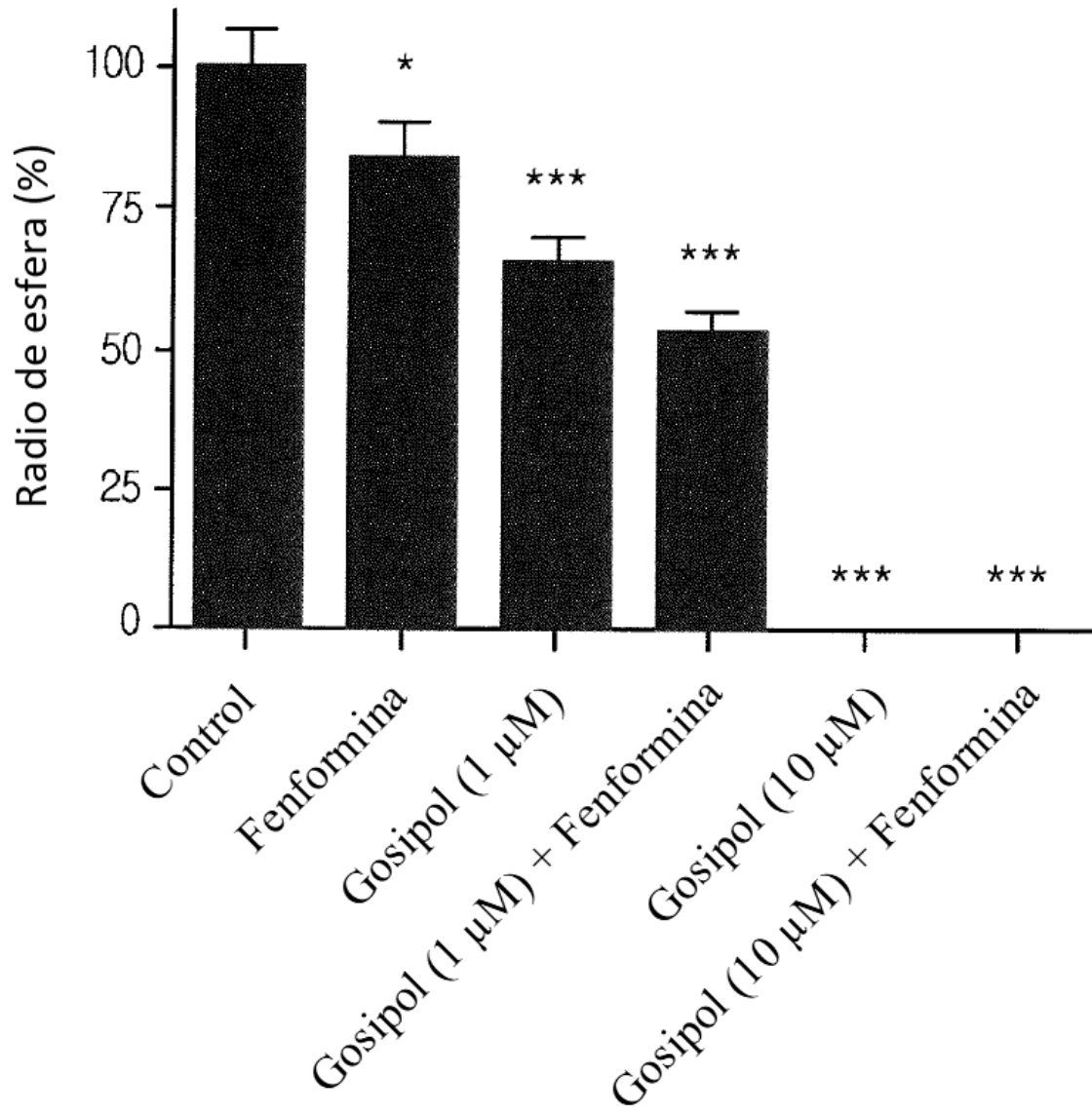
[Figura 2]



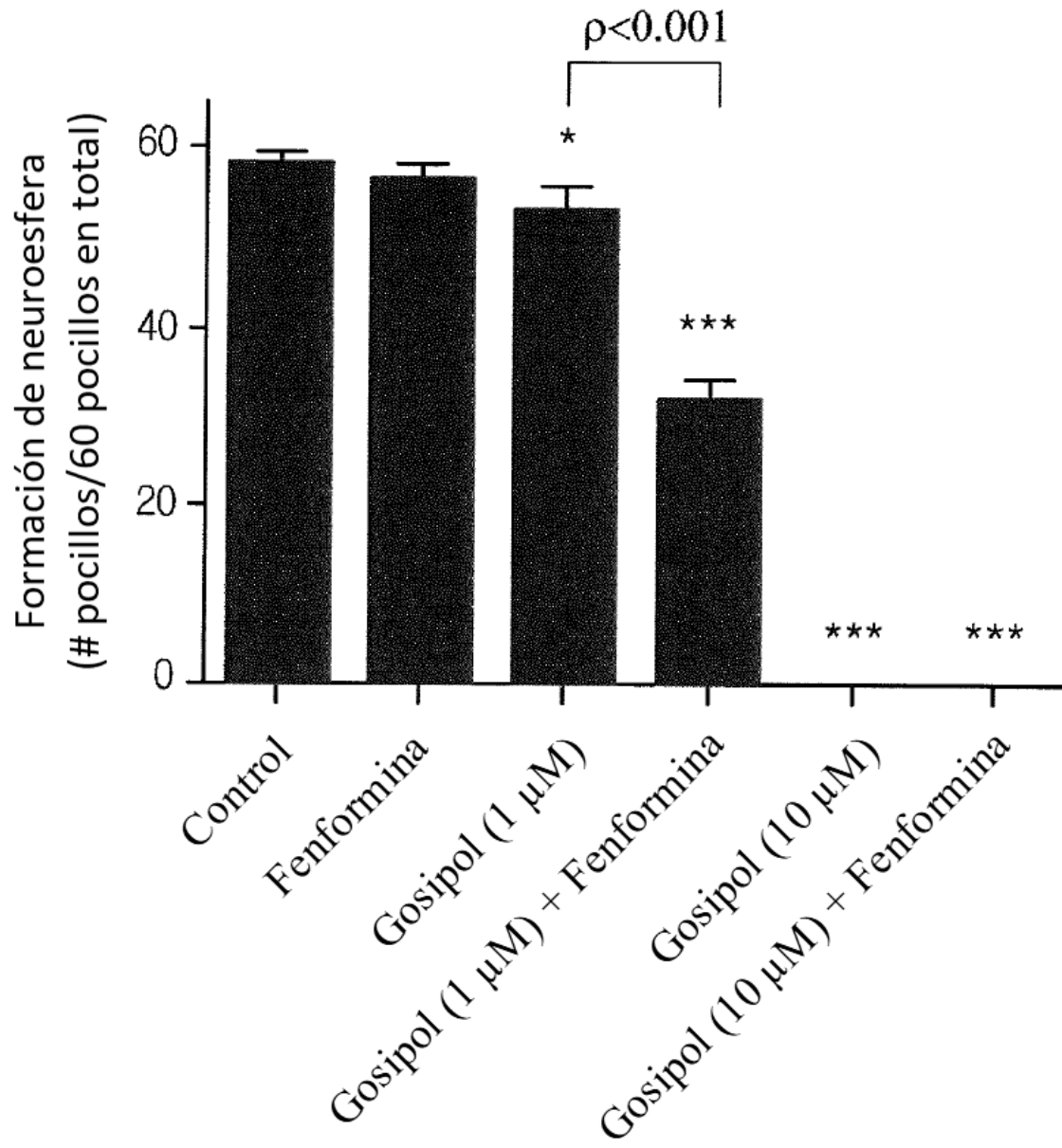
[Figura 3]



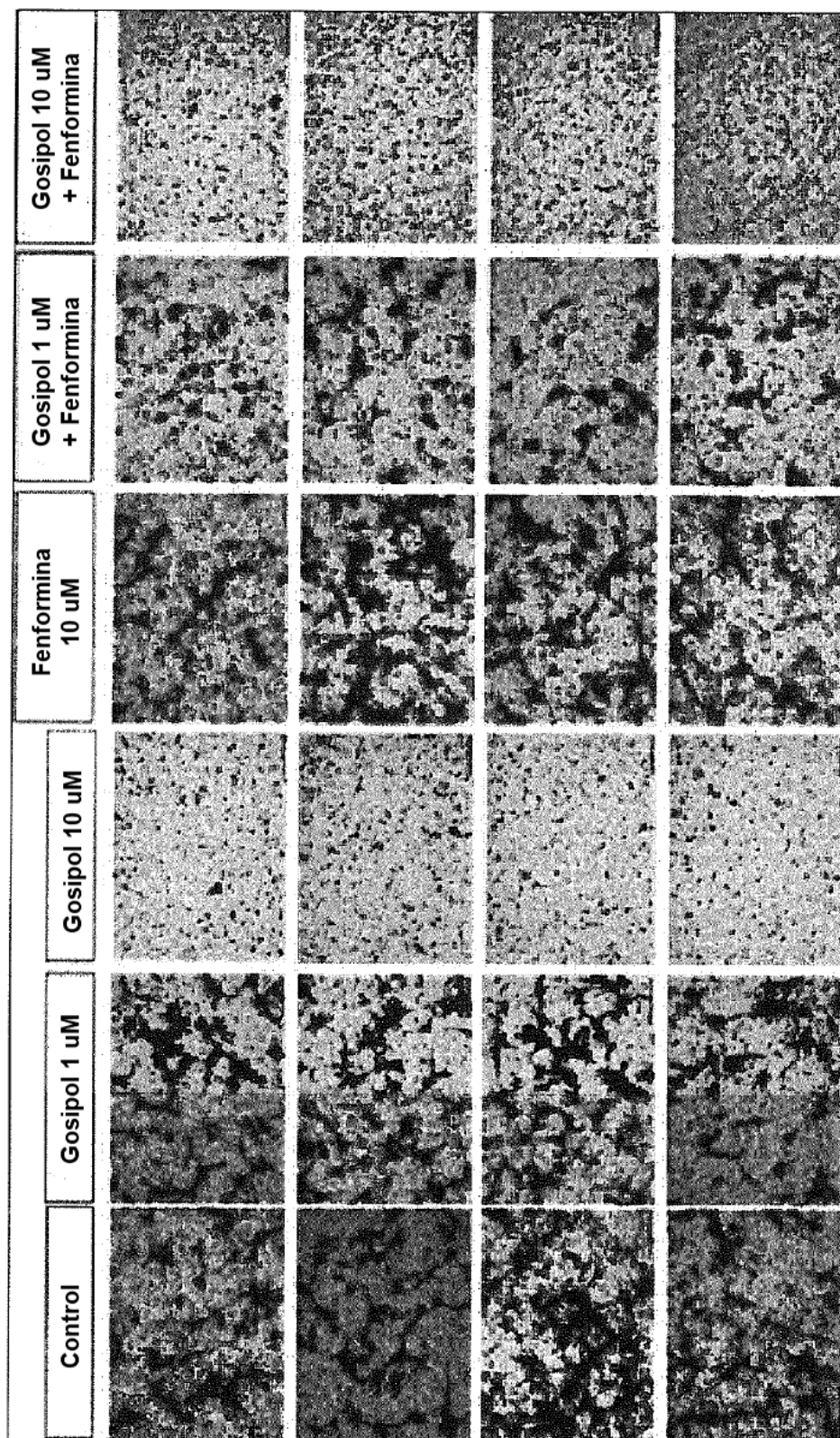
[Figura 4]



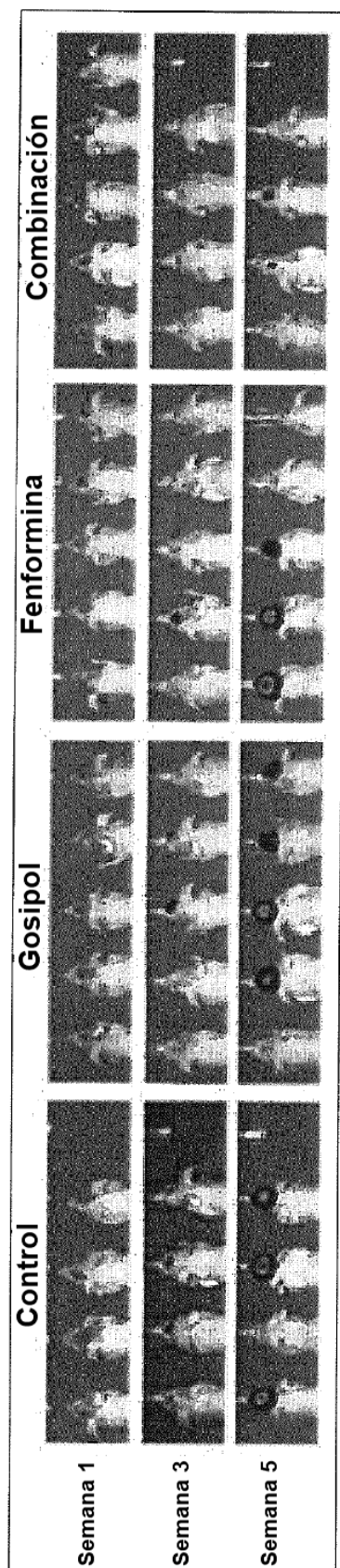
[Figura 5]



[Figura 6]



[Figura 7]



[Figura 8]

