

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 471**

51 Int. Cl.:

A61K 31/343 (2006.01)

A61K 31/4188 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2011 E 11176117 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2438914**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende Z-butilidfenfaldida para tratar cáncer de cerebro o reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro**

30 Prioridad:

07.01.2011 TW 100100673

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

02.10.2013

73 Titular/es:

**CHINA MEDICAL UNIVERSITY (100.0%)
No. 91, Hsueh-Shih Road North District
Taichung, TW**

72 Inventor/es:

**HARN, HORNG-JYH;
LIN, SHINN-ZONG;
CHIOU, TZYY-WEN y
LIN, PO-CHENG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 424 471 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 que comprende Z-butilidenftalida para tratar cáncer de cerebro o reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro y a usos de la misma, y particularmente se refiere a una composición farmacéutica para reducir la resistencia a temozolomida de glioma maligno humano y a usos de la misma.

Descripciones de la técnica relacionada

- 10 El tumor cerebral maligno representa aproximadamente el 2% de los casos de neoplasmas malignos. A pesar de la baja tasa de casos de tumor cerebral maligno, es difícil de prevenir porque no hay ningún factor carcinogénico específico para esta enfermedad. Los tumores cerebrales comprenden tumores cerebrales primarios que crecen a partir del cerebro u otras células relacionadas y tumores cerebrales metastásicos a partir de células cancerosas de otras partes del cuerpo. El brote del cáncer de cerebro es generalmente lento y tarda de unas pocas semanas a varios años. Los síntomas del cáncer de cerebro incluyen náuseas, cefalea o disfunción de la conciencia provocada por el aumento de la presión cerebral, convulsiones, anomalías hormonales y disfunción cerebral parcial, tales como capacidades sensoriales reducidas, afasia, extremidades flácidas, parestesia, pérdida de visión y de campo visual, etc.

- 20 Debido a que las células de tumor cerebral maligno se propagan y crecen dentro de tejidos normales y no son fáciles de erradicar con cirugía, la terapia para el cáncer de cerebro debe ayudarse con quimioterapia. Sin embargo, la mayoría de los fármacos anticancerígenos no pueden transmitirse a las células de tumor cerebral para que produzcan efectos citotóxicos debido a la obstrucción de la "barrera hematoencefálica" especial dentro del cerebro y, por tanto, el efecto de la terapia se ve limitado. Como resultado, la esperanza de vida promedio de los pacientes con cáncer de cerebro terminal es habitualmente de no más de aproximadamente un año.

- 25 El documento EP-A1-1 645 280 da a conocer un método para el tratamiento de cánceres en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto un extracto en acetona, extracto en cloroformo o extracto en hexano de *Angelicae sinenses* o los componentes activos purificados de los extractos de *Angelicae sinenses* a una cantidad eficaz para inhibir la proliferación y migración de células cancerosas y/o inhibir la actividad telomerasa de células cancerosas y/o para inducir la apoptosis de células cancerosas.

- 30 Actualmente, la temozolomida (TMZ) es uno de los fármacos comúnmente usados para tratar el tumor cerebral maligno en la práctica clínica. Es un fármaco quimioterápico oral de tipo imidazol-tetrazina y puede pasar a través de la barrera hematoencefálica destruyendo las células de tumor cerebral. Por tanto, puede inhibir eficazmente la proliferación tumoral y tratar además el cáncer de cerebro. La temozolomida es particularmente eficaz en gliomas (incluyendo el tumor glioblastoma multiforme y astrocitoma anaplásico). Sin embargo, la toxicidad de la temozolomida es alta y produce efectos secundarios tales como náuseas, vómitos, cefalea, debilidad, fatiga, anorexia, etc. Además, la temozolomida se combina generalmente con radioterapia para potenciar los efectos terapéuticos, dando como resultado más efectos secundarios graves.

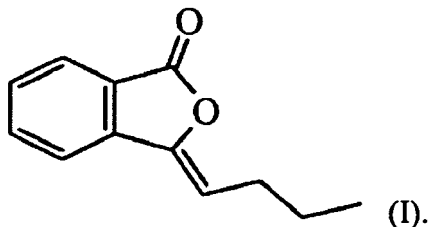
- 40 La temozolomida es un agente de metilación. Se cree generalmente que al metilar el oxígeno en la posición 6 en la guanina del ADN, la temozolomida puede distorsionar la estructura del ADN bicatenario inhibiendo la replicación del ADN y conduciendo a la muerte de las células cancerosas. Sin embargo, un mecanismo de este tipo se inhibirá por la O⁶-metilguanina ADN-metiltransferasa (MGMT) en células cancerosas, debido a que MGMT eliminará la metilación anómala dentro de la célula para realizar funciones de reparación, debilitando así la eficacia de la temozolomida. Como resultado, las células tumorales producirán resistencia a temozolomida por consiguiente. El efecto de inhibición mencionado anteriormente de MGMT hace necesario aumentar la dosificación de temozolomida con el fin de lograr la eficacia. Esto conducirá inevitablemente a más efectos secundarios graves y aumentará la carga sobre los pacientes.

- 45 Si la resistencia a temozolomida de las células tumorales puede reducirse eficazmente, será posible evitar un aumento innecesario de la dosificación de temozolomida y reducirá la carga sobre los pacientes. El estudio ha revelado que la eficacia de la temozolomida no se mejora necesariamente cuando se inhibe la expresión de MGMT dentro del cuerpo del paciente con cáncer de cerebro (véase Ranson *et al.*, Randomized Trial of the Combination of Lomeguatrib and Temozolomida Compared With Temozolomide Alone in Chemoterapia Naive Patients With Metastatic Cutaneous Melanoma, J Clin Oncol, 2007. Vol. 25:2540-5).

- 55 Por tanto, se necesita todavía una composición farmacéutica o método para reducir eficazmente la resistencia de células de cáncer de cerebro a temozolomida para evitar la sobredosis de temozolomida innecesaria durante la terapia y reducir la carga sobre los pacientes. Además, si la eficacia de la temozolomida puede mejorarse al mismo tiempo que se reduce la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro, puede proporcionarse ayuda adicional a pacientes durante el tratamiento y reducir su carga.

Sumario de la invención

El objetivo primario de la presente invención es proporcionar un método para reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un principio activo de (Z)-butilidenftalida de fórmula (I):



5

Otro objetivo de esta invención es proporcionar un método para tratar cáncer de cerebro en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un principio activo de (Z)-butilidenftalida de fórmula (I) anteriormente mencionada. Preferiblemente, se administran (Z)-butilidenftalida y temozolomida al sujeto.

10

Todavía otro objetivo de esta invención es proporcionar una composición farmacéutica para reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un principio activo de (Z)-butilidenftalida de fórmula (I).

Aún un objetivo adicional de esta invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un principio activo de (Z)-butilidenftalida de fórmula (I). Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende además temozolomida.

15

La presente invención también proporciona un kit para tratar cáncer de cerebro, que comprende una primera forma farmacéutica que contiene (Z)-butilidenftalida y una segunda forma farmacéutica que contiene temozolomida.

La tecnología detallada y las realizaciones preferidas implementadas para la invención objeto se describen en los siguientes párrafos que acompañan a los dibujos adjuntos para que los expertos en este campo aprecien mejor las características de la invención reivindicada.

20

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una fotografía de una electroforesis de proteínas que muestra la expresión de MGMT (O⁶-metilguanina ADN-metiltransferasa) dentro de diversas líneas celulares de cáncer de cerebro;

la figura 2 es un diagrama de barras estadístico que muestra la tasa de inhibición de temozolomida frente a diversas líneas celulares de cáncer de cerebro;

25

la figura 3 es una fotografía de una electroforesis que muestra la influencia de (Z)-butilidenftalida (Z-Bdph) y (E)-butilidenftalida (E-Bdph) sobre la expresión de ARN de MGMT en la línea celular de cáncer de cerebro 8901;

la figura 4 es una fotografía de una electroforesis de proteínas que muestra la influencia de (Z)-butilidenftalida y (E)-butilidenftalida sobre la expresión de proteína de MGMT en la línea celular de cáncer de cerebro resistente a temozolomida 8901;

30

la figura 5 es una fotografía de una electroforesis de proteínas que muestra la inhibición de (Z)-butilidenftalida sobre la expresión de proteína de MGMT en la línea celular de cáncer de cerebro resistente a temozolomida GBM22-TMZ;

la figura 6 es un diagrama de curvas que muestra la tasa de inhibición de la combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida frente a la línea celular de cáncer de cerebro resistente a temozolomida 8901;

35

la figura 7 es un diagrama de barras estadístico que muestra la tasa de inhibición de la combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida frente a la línea celular de cáncer de cerebro GBM22-TMZ;

la figura 8 es un diagrama de curvas que muestra la tasa de inhibición de (Z)-butilidenftalida frente a la línea celular de cáncer de cerebro DBTRG;

la figura 9 es un diagrama de curvas que muestra la tasa de inhibición de (E)-butilidenftalida frente a la línea celular de cáncer de cerebro DBTRG;

40

la figura 10 es un diagrama de barras estadístico que muestra la tasa de inhibición de (Z)-butilidenftalida frente a diversas líneas celulares de cáncer de cerebro;

la figura 11A es un diagrama de curvas que muestra la inhibición del crecimiento tumoral dentro del ratón mediante (Z)-butilidenftalida, temozolomida o la combinación de las mismas;

la figura 11B es un diagrama de curvas que muestra la variación del peso corporal del ratón;

la figura 12A es un diagrama de curvas que muestra la inhibición del crecimiento tumoral dentro del ratón combinando la oblea de (Z)-butilidenftalida (o comprimido) y la oblea de temozolomida (o comprimido); y

la figura 12B es un diagrama de curvas que muestra la variación del peso corporal del ratón.

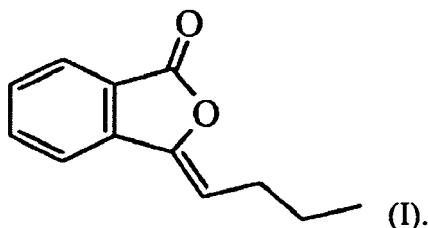
5 Descripción de la realización preferida

A menos que se establezca lo contrario en el presente documento, los términos “un (una)”, “el/la” o similares usados en esta memoria descriptiva (especialmente en las reivindicaciones a continuación en el presente documento) debe entenderse que abarcan tanto la forma singular como la forma plural.

10 Los tumores cerebrales pueden dividirse en gliomas y no gliomas. Los tumores cerebrales observados más comúnmente son gliomas, que incluyen astrocitomas (que representan de aproximadamente el 70% al 80% de los gliomas), oligodendrogliomas y ependimomas. Los no gliomas incluyen tumores embrionarios, meningiomas, craneofaringiomas, schwannomas, gangliogliomas, adenomas hipofisarios y tumores del plexo coroideo.

15 Tal como se mencionó anteriormente, la temozolomida tiene alta toxicidad y fuertes efectos secundarios, y las células tumorales pueden desarrollar fácilmente resistencia farmacológica a la misma, y por tanto tiene una aplicación clínica bastante limitada. Los inventores de la presente invención encontraron que, en comparación con (E)-butilidenftalida (*trans*-butilidenftalida), (Z)-butilidenftalida (*cis*-butilidenftalida) tiene una actividad superior inhibiendo la expresión de MGMT, y puede reducir la resistencia a temozolomida de células de tumor cerebral eficazmente y potenciar la sensibilidad citotóxica de temozolomida frente a células de cáncer de cerebro resistentes a temozolomida. Por tanto, (Z)-butilidenftalida puede disminuir o incluso solucionar los problemas provocados por la administración de temozolomida al sujeto.

20 Por tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un principio activo de (Z)-butilidenftalida de fórmula (I):



25 La composición farmacéutica de la presente invención se usa preferiblemente para reducir la resistencia a temozolomida de glioma maligno humano.

30 Cuando se aplica la composición farmacéutica de la presente invención para reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro, el principio activo puede administrarse una vez al día, múltiples veces al día o una vez cada pocos días, etc., dependiendo de la necesidad del sujeto. Por ejemplo, puede administrarse (Z)-butilidenftalida una vez al día, y la cantidad de la misma es de aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. La unidad “mg/kg de peso corporal” se refiere a la dosificación requerida para el sujeto por kilogramo de peso corporal. Sin embargo, para pacientes con resistencia grave a temozolomida, la dosificación puede aumentarse hasta varias o varias decenas de veces dependiendo de las condiciones prácticas. Además, la administración puede realizarse mediante cualquier enfoque adecuado, por ejemplo, pero sin limitarse a, administración oral, subcutánea, nasal o intravenosa, etc. Debido a que la dosificación y el tiempo de liberación del fármaco pueden controlarse de manera precisa mediante administración mediante inyección, es preferible aplicar una inyección subcutánea o intravenosa.

40 Se encontró también que (Z)-butilidenftalida no sólo puede reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro, sino que también tiene efectos anti-cáncer de cerebro, y puede potenciar la citotoxicidad de temozolomida frente a células de cáncer de cerebro. Cuando se administra (Z)-butilidenftalida junto con temozolomida (sucesiva o simultáneamente), (Z)-butilidenftalida puede proporcionar una eficacia excelente para el tratamiento del cáncer de cerebro y reducir además la dosificación de administración de temozolomida.

45 Por tanto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro, y preferiblemente, para tratar glioma maligno humano. La composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un principio activo de (Z)-butilidenftalida de fórmula (I). Tal como se ilustra en los siguientes ejemplos, en comparación con (E)-butilidenftalida, que no puede destruir células de cáncer de cerebro eficazmente incluso a una dosificación alta de 2500 μ M, (Z)-butilidenftalida puede lograr una tasa de muerte de células de cáncer de cerebro del 50% (CI_{50}) a la dosificación de aproximadamente 250 μ M.

La composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro de la presente invención puede comprender además una cantidad eficaz de un componente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en temozolomida, un hidrato de temozolomida, un isómero de temozolomida, una sal farmacéuticamente aceptable de temozolomida y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el componente anticancerígeno es temozolomida. Preferiblemente, la composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro de la presente invención comprende (Z)-butilidenftalida y temozolomida y se usa para tratar cáncer de cerebro con resistencia a temozolomida, especialmente para tratar glioma maligno humano con resistencia a temozolomida.

En la composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro de la presente invención, pueden administrarse simultánea o sucesivamente (Z)-butilidenftalida y el componente anticancerígeno. La dosificación de (Z)-butilidenftalida y el componente anticancerígeno puede ajustarse opcionalmente. Se encontró que, en la composición farmacéutica de la presente invención, cuando se usan (Z)-butilidenftalida y temozolomida, con la misma dosificación de (Z)-butilidenftalida, a medida que la dosificación de temozolomida aumenta, a menudo disminuye el índice de combinación (IC). El índice de combinación se obtiene trazando la curva de reacción de la dosificación de fármaco y realizando el cálculo con el software CalcuSyn (véase Chou y Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.*, 22: 27-55, 1984). Cuando el índice de combinación es inferior a 1, fármacos diferentes pueden tener sinergismo entre sí y muestran efecto sinérgico sobre la eficacia del fármaco. Cuando el índice de combinación es igual a 1, los fármacos no tienen influencia entre sí. Cuando el índice de combinación es mayor de 1, los fármacos son antagonistas entre sí. Preferiblemente, en la composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro de la presente invención, cuando se usan (Z)-butilidenftalida y temozolomida en combinación, (Z)-butilidenftalida y temozolomida juntas proporcionan un índice de combinación inferior a 1.

En una realización de la presente invención, cuando las concentraciones de (Z)-butilidenftalida y temozolomida son de 100 μM y 1200 μM (200 μl), respectivamente, el índice de combinación es de aproximadamente 0,33. Cuando las concentraciones de (Z)-butilidenftalida y temozolomida son de 100 μM y 3200 μM (200 μl), respectivamente, el índice de combinación es de aproximadamente 0,22. Cuando las concentraciones de (Z)-butilidenftalida y temozolomida son de 50 μM y 3200 μM (200 μl), respectivamente, el índice de combinación es de aproximadamente 0,20.

Debido a que (Z)-butilidenftalida puede reducir eficazmente la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro, aumentar la sensibilidad citotóxica de temozolomida frente a células de cáncer de cerebro con resistencia a temozolomida y proporcionar un efecto sinérgico excelente cuando se administra junto con temozolomida, puede reducir la dosificación de temozolomida requerida para el tratamiento y reducir los efectos secundarios provocados por la administración de temozolomida. Tal como se ilustra en los siguientes ejemplos, la dosificación de temozolomida requerida para lograr una tasa de muerte del 50% de células de cáncer de cerebro (valor de CI_{50}) disminuye a medida que la dosificación de (Z)-butilidenftalida aumenta.

En la composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro de la presente invención, el principio activo puede administrarse con diferentes frecuencias dependiendo de la necesidad del sujeto, tal como una vez al día, múltiples veces al día o una vez cada pocos días, etc. Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica se usa en el cuerpo humano para tratar cáncer de cerebro, puede dosificarse (Z)-butilidenftalida una vez al día (por ejemplo, en forma de una tableta o un comprimido) con una dosificación de la misma de aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente es, aproximadamente de 40 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 120 mg/kg de peso corporal. La unidad "mg/kg de peso corporal" se refiere a la dosificación requerida para el sujeto por kilogramo de peso corporal. Cuando se usan juntos (Z)-butilidenftalida y el componente anticancerígeno, el componente anticancerígeno (como temozolomida) puede dosificarse una vez al día (por ejemplo, en forma de una tableta o un comprimido) con una dosificación de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente, de aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal. Por ejemplo, cuando se usan juntas (Z)-butilidenftalida y temozolomida, puede dosificarse temozolomida una vez al día con una dosificación de aproximadamente 65 mg/kg de peso corporal para proporcionar un buen efecto de tratamiento, en el que (Z)-butilidenftalida y temozolomida pueden estar contenidas en la misma tableta o en tabletas diferentes. Sin embargo, para pacientes con cáncer de cerebro grave, la dosificación puede aumentarse en varias o varias decenas de veces dependiendo de las condiciones.

En la composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro de la presente invención, el principio activo (que puede combinarse con el componente anticancerígeno) puede administrarse mediante cualquier enfoque adecuado, por ejemplo, pero sin limitarse a, administración oral, subcutánea, nasal o intravenosa. La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse en medicina humana y veterinaria, sola o conjuntamente con un adyuvante farmacéutico. Cuando se usan tanto (Z)-butilidenftalida como temozolomida en la composición farmacéutica de la presente invención, pueden dosificarse con el mismo enfoque o diferentes, al mismo tiempo o por separado. Por ejemplo, puede administrarse (Z)-butilidenftalida mediante inyección intravenosa mientras que se administra temozolomida mediante administración oral.

Para la forma farmacéutica adecuada para administración oral, por ejemplo, la composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro o reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro de la presente invención

5 puede comprender un adyuvante que no afectará de manera adversa a la eficacia del componente anti-cáncer de cerebro. El adyuvante puede ser, por ejemplo, disolventes, disolventes oleosos, diluyentes, estabilizantes, retardantes de la absorción, disgregantes, emulsionantes, adhesivos, lubricantes, absorbentes de humedad, polímeros, etc. Por ejemplo, el disolvente puede seleccionarse de agua y una solución salina fisiológica; los polímeros pueden seleccionarse de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), colágeno, hidrogel, poli-anhídrido, etc.; y los polianhídridos pueden prepararse a partir de los componentes seleccionados del grupo que consiste en bis(*p*-carboxilfenoxi)propano, bis(*p*-carboxilfenoxi)butano, bis(*p*-carboxilfenoxi)pentano, bis(*p*-carboxilfenoxi)hexano, bis(*p*-carboxilfenoxi)heptano, bis(*p*-carboxilfenoxi)octano, ácido isoftálico, ácido 1,4-fenilendipropiónico, ácido dodecanodioico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido pentanodioico, ácido adípico, ácido glutárico, ácido octanodioico, ácido azelaico, ácido sebácico, ácido ftálico, ácido tereftálico y combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica, mediante cualquier método conocido, puede producirse en cualquier forma farmacéutica oral, por ejemplo, obleas (o comprimidos), cápsulas, gránulos, polvos, extractos de fluidos, disoluciones, jarabes, suspensiones, emulsiones, tinturas, etc.

10 En lo que respecta a formas farmacéuticas subcutáneas o intravenosas, la composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro o reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro de la presente invención puede comprender uno o más componentes como solubilizantes, emulsionantes y otros adyuvantes para formar una inyección de fluido intravenoso, una inyección de emulsión intravenosa, una disolución de inyección, una inyección de polvo seco, una inyección de suspensión, una inyección de suspensión de polvo seco, etc. Los disolventes pueden incluir agua, una solución salina fisiológica, alcoholes (por ejemplo, etanol, propanol o glicerol, etc.), una disolución de azúcar o combinaciones de los mismos.

15 La composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro o reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro de la presente invención puede comprender además opcionalmente aditivos tales como agentes aromatizantes, tonificantes, agentes colorantes, etc., para mejorar las sensaciones oral y visual durante la administración. Además, puede añadirse una cantidad razonable de conservantes, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, etc., para mejorar la capacidad de almacenamiento del medicamento.

20 La composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro o reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro de la presente invención puede comprender además opcionalmente uno o más componentes anti-cáncer de cerebro para potenciar la eficacia de la composición farmacéutica de la presente invención o aumentar la flexibilidad para fabricar formulaciones, siempre que los otros componentes anticancerígenos no tengan efectos adversos sobre la eficacia de (Z)-butilidenftalida y/o temozolomida.

25 En la composición farmacéutica para tratar cáncer de cerebro de la presente invención, el principio activo (por ejemplo, (Z)-butilidenftalida) y el componente anticancerígeno (por ejemplo, temozolomida) pueden administrarse, por separado o sucesivamente. Por ejemplo, puede dosificarse en primer lugar (Z)-butilidenftalida mediante inyección, y después de un periodo de tiempo (habitualmente de 1 a 2 horas), se dosifica temozolomida mediante una administración oral. Alternativamente, tras dosificarse (Z)-butilidenftalida mediante inyección, se dosifica temozolomida inmediatamente mediante administración oral.

30 Debido a que en la composición farmacéutica de la presente invención el principio activo (por ejemplo, (Z)-butilidenftalida) y el componente anticancerígeno (por ejemplo, temozolomida) pueden administrarse juntos, por separado o sucesivamente, la composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de un kit. Por tanto, la presente invención también proporciona un kit para tratar cáncer de cerebro, que comprende una primera forma farmacéutica que contiene (Z)-butilidenftalida y una segunda forma farmacéutica que contiene temozolomida.

35 En el kit de la presente invención, las formas farmacéuticas primera y segunda pueden ser iguales o diferentes y son adecuadas independientemente para administración oral, subcutánea, nasal o intravenosa. Por ejemplo, tanto la primera forma farmacéutica como la segunda forma farmacéutica pueden ser la misma forma farmacéutica para administración oral como obleas (o comprimidos), cápsulas, gránulos, polvos, extractos de fluido, disoluciones, jarabes, suspensiones, emulsiones, tinturas, etc. En una realización del kit de la presente invención, la primera forma farmacéutica es una forma farmacéutica subcutánea o intravenosa (por ejemplo, una disolución de inyección) y la segunda forma farmacéutica es una forma farmacéutica oral (por ejemplo, una oblea o un comprimido).

40 Por ejemplo, cuando se usa el kit en el cuerpo humano para tratar cáncer de cerebro, puede dosificarse (Z)-butilidenftalida una vez al día con una dosificación de aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente, de aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 120 mg/kg de peso corporal. Y puede dosificarse temozolomida una vez al día con una dosificación de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente, de aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal.

45 En el kit de la presente invención, pueden administrarse (Z)-butilidenftalida y temozolomida juntas, por separado o sucesivamente. Por ejemplo, puede dosificarse en primer lugar (Z)-butilidenftalida mediante inyección (por ejemplo, administración subcutánea, s.c.), y tras un periodo de tiempo (habitualmente de aproximadamente 1 a 2 horas), se dosifica temozolomida mediante una administración oral (v.o.). Alternativamente, tras dosificarse (Z)-butilidenftalida mediante inyección, se dosifica temozolomida inmediatamente mediante administración oral.

5 Puede obtenerse (Z)-butilidenftalida mediante cualquier enfoque adecuado, por ejemplo, puede prepararse mediante síntesis química o extraerse y purificarse a partir de *Angelica sinensis*. Por ejemplo, pueden adquirirse compuestos de butilidenftalida (que comprenden las mezclas racémicas de (Z)-butilidenftalida y (E)-butilidenftalida) en el mercado (por ejemplo, Alfa Aesar Company) e incrustarse con una cantidad adecuada de gel de sílice (razón en peso de butilidenftalida:gel de sílice = 1:3). Entonces, se realiza cromatografía en columna de gel de sílice y se usa n-hexano como fase móvil para la elución. Se recogen la (Z)-butilidenftalida y (E)-butilidenftalida eluidas a diferentes puntos de tiempo, y se confirma el resultado de la purificación mediante RMN, y se obtiene (Z)-butilidenftalida por consiguiente.

10 La presente invención proporciona también un método para reducir la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un principio activo de (Z)-butilidenftalida de fórmula (I). La dosificación y forma de aplicación del principio activo se proporcionan en la descripción anterior para la composición farmacéutica de la presente invención.

15 La presente invención proporciona también un método para tratar cáncer de cerebro en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un principio activo de (Z)-butilidenftalida de fórmula (I). La dosificación y forma de aplicación del principio activo y la administración en combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida se proporcionan en la descripción anterior para la composición farmacéutica de la presente invención.

La tecnología detallada y las realizaciones preferidas implementadas para la presente invención se describen en los siguientes párrafos que acompañan a los dibujos adjuntos para que expertos en este campo aprecien mejor las características de la invención reivindicada.

20 **[Ejemplos]**

[Ejemplo 1] Expresión de MGMT en diferentes líneas celulares de cáncer de cerebro

25 Se cultivaron las líneas celulares de cáncer de cerebro 8401, 8901, DBTRG, U87MG y G5T/VGH en una placa de Petri con un diámetro de 10 cm, respectivamente. Se usó una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para enjuagar las células después de que la proliferación celular alcanzara el 60% en volumen de la placa. Finalmente, se recogieron las células y proteínas intracelulares. Se usaron electroforesis en gel de dodecilsulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunotransferencia de tipo Western para analizar la expresión de la proteína MGMT en cada línea celular de cáncer de cerebro. Se muestran los resultados en la figura 1.

30 Tal como se muestra en la figura 1, cada línea celular de cáncer de cerebro mostró niveles diferentes de expresión de MGMT, y la línea celular de cáncer de cerebro 8901, DBTRG y G5T/VGH tenían niveles superiores de expresión de MGMT.

[Ejemplo 2] El efecto de mortalidad de temozolomida frente a diversas líneas celulares de cáncer de cerebro

Se usó el ensayo de viabilidad celular de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,4-difenil-tetrazolio) para estudiar el efecto de mortalidad de temozolomida frente a diversas líneas celulares de cáncer de cerebro. (Véase Pauwels *et al.*, J. Virol. Methods, 1988, 20, 309-321 para el ensayo de viabilidad celular de MTT).

35 En una placa de 96 micropocillos, se cultivó respectivamente cada pocillo con 3 x 10³ líneas celulares de cáncer de cerebro 8401, 8901, DBTRG, U87MG y G5T/VGH. Al siguiente día, se hicieron gotear diferentes concentraciones de temozolomida (de 0 a 3200 µM, 200 µl) en el pocillo a lo largo de la pared interior de la placa. Se colocó un disolvente en la primera fila como grupo control. Tras cultivarse las células durante 2 días, se extrajo la disolución de cultivo y se desechó, y se añadió una disolución de cultivo que contenía 500 µg/ml de MTT (200 µl) al cultivo durante otras 4 horas. Se extrajo la disolución de cultivo y se desechó, se añadieron 200 µl de DMSO y entonces se usó un espectrómetro de placas de micropocillos para medir la absorbancia de las células a una longitud de onda de 570 nm. Se calcularon la tasa de viabilidad celular, la tasa de mortalidad y las concentraciones de temozolomida que alcanzaban una tasa de mortalidad del 50% de diversas líneas celulares de cáncer de cerebro (CI₅₀) basándose en la absorbancia. Se muestran los resultados del experimento anterior en la tabla 1 y la figura 2.

45 Tabla 1

Línea celular de cáncer de cerebro	Valor de CI ₅₀ (µM)
DBTRG	1658,6
8401	831,3
8901	1201,6
G5T/VGH	1660,1

Tal como se muestra en la tabla 1 y la figura 2, en comparación con la línea celular de cáncer de cerebro 8401, las líneas celulares de cáncer de cerebro 8901, DBTRG y G5T/VGH con alto nivel de expresión de MGMT mostraban valores de CI₅₀ superiores de temozolomida, lo que indica que las líneas celulares de cáncer de cerebro con alta expresión de MGMT tienen resistencia farmacológica a temozolomida, requiriendo por tanto una dosificación

superior para lograr el efecto de mortalidad.

[Ejemplo 3] La inhibición de butilidenftalida de la expresión de MGMT en células de cáncer de cerebro

Este experimento mostró el efecto inhibitor de (Z)-butilidenftalida y (E)-butilidenftalida de la expresión de MGMT en células de cáncer de cerebro.

5 Se cultivaron las líneas celulares de cáncer de cerebro 8901 y GBM22-TMZ con resistencia a temozolomida en una placa de Petri con un diámetro de 10 cm, respectivamente. Se usó una disolución de PBS para enjuagar las células después de que la proliferación celular alcanzara el 60% en volumen de la placa. Se añadieron (Z)-butilidenftalida o (E)-butilidenftalida para tratar las células durante de 3 a 48 horas, y entonces se recogieron las células. Se extrajo el ARN total de las células y se transcribió de manera inversa para dar ADNc (usando 50 micromoles de oligo dNTP y 10 50 picomoles de cebador de hexámeros al azar). Se añadieron una unidad de ADN polimerasa ExTaq, dNTP 200 nM (1 µl) y 2,5 mM de MgCl₂ (1 µl), y entonces se añadieron 20 mM de cebadores de nucleótidos de MGMT (1 µl cada uno) y 50 µl de agua.

15 Se colocó la muestra en un sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, EE.UU.). Se fijaron las condiciones como: desnaturalización, 94°C, 30 s; apareamiento, 55°C, 30 s; extensión, 94°C, 60 s; 30 ciclos; y finalmente 72°C, 10 minutos. Después de eso, se disminuyó la temperatura del sistema hasta 4°C para terminar la reacción. Se analizó el producto de la PCR mediante una electroforesis en gel al 1,5%. Se analizó el gel mediante el sistema de obtención de imágenes Flouro-Chem (Alpha InnoTech Cooperation) para determinar el nivel de expresión del gen de MGMT. Se muestra el resultado en la figura 3.

20 En otro aspecto, se recogieron las proteínas intracelulares de las líneas celulares de cáncer de cerebro 8901 y GBM22-TMZ mencionadas anteriormente. Se usaron SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western para analizar la expresión de la proteína MGMT en las líneas celulares de cáncer de cerebro. Se muestran los resultados en las figuras 4 y 5.

25 Tal como se muestra en las figuras 3 a 5, se redujo la expresión de ARN y proteínas de MGMT dentro de las líneas celulares de cáncer de cerebro mientras aumentaba la concentración de (Z)-butilidenftalida, lo que indica que (Z)-butilidenftalida puede inhibir la expresión de MGMT. Sin embargo, no hubo ningún cambio significativo para la expresión de ARN y proteínas de MGMT dentro de las líneas celulares de cáncer de cerebro a medida que aumentaba la concentración de (E)-butilidenftalida.

[Ejemplo 4] (Z)-Butilidenftalida aumenta la sensibilidad citotóxica de temozolomida frente a la línea celular de cáncer de cerebro 8901.

30 Se usó el ensayo de viabilidad de MTT para someter a prueba si (Z)-butilidenftalida puede aumentar la sensibilidad citotóxica de temozolomida frente a las células de cáncer de cerebro.

35 En una placa de 96 micropocillos, se cultivó cada pocillo con 3 10³ células de línea celular de cáncer de cerebro 8901 que tienen resistencia a temozolomida. El siguiente día, se hicieron gotear diferentes concentraciones de temozolomida (de 0 a 1200 µM, 200 µl) o la combinación de temozolomida y (Z)-butilidenftalida (de 0 a 200 µM, 200 µl) en el pocillo a lo largo de la pared interior de la placa. Se usaron cuatro micropocillos para cada análisis, y se usaron cuatro pocillos para cada combinación de diversas concentraciones de fármaco. Se colocó un disolvente en la primera fila como grupo control. Tras cultivarse las células durante 2 días, se extrajo la disolución de cultivo y se desechó, y se añadió una disolución de cultivo que contenía 500 µg/ml de MTT (200 µl) durante otras 4 horas. Se extrajo la disolución de cultivo y se desechó, y se añadieron 200 µl de DMSO, y entonces se usó el espectrómetro de placa de micropocillos para medir la absorbancia de las células a una longitud de onda de 570 nm. Se calcularon basándose en la absorbancia la tasa de viabilidad celular y la tasa de mortalidad y las concentraciones de temozolomida que alcanzaban la tasa de mortalidad del 50% de diversas líneas celulares de cáncer de cerebro (CI₅₀). Se muestran los resultados del experimento anterior en la tabla 2 y la figura 6.

Tabla 2. Línea celular de cáncer de cerebro 8901

Principio activo	CI ₅₀ (µM)
Temozolomida	1201,6
Temozolomida + (Z)-butilidenftalida (25 µM)	992,3
Temozolomida + (Z)-butilidenftalida (50 µM)	866,8
Temozolomida + (Z)-butilidenftalida (100 µM)	685,5
Temozolomida + (Z)-butilidenftalida (200 µM)	582,5

45 Tal como se muestra en la tabla 2 y la figura 6, cuando se usó la combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida, la dosificación de temozolomida requerida para alcanzar la tasa de mortalidad del 50% de las líneas celulares de cáncer de cerebro (CI₅₀) se reducía a medida que la dosificación de (Z)-butilidenftalida aumentaba, lo que indica que (Z)-butilidenftalida puede aumentar la sensibilidad citotóxica de temozolomida frente a la línea celular de cáncer de cerebro. Por tanto, la dosificación de temozolomida puede reducirse cuando se usa la combinación de (Z)-

butilidenftalida y temozolomida.

[Ejemplo 5] (Z)-Butilidenftalida aumenta la sensibilidad citotóxica de temozolomida frente a la línea celular de cáncer de cerebro GBM22-TMZ.

5 Se repitieron las etapas del experimento en el ejemplo 4, pero se cambió la línea celular de cáncer de cerebro por GBM22-TMZ resistente a temozolomida, y se cambió la concentración de temozolomida de desde 0 hasta 3200 μM (200 μl), mientras que se cambió la concentración de (Z)-butilidenftalida de desde 0 hasta 600 μM (200 μl). Se muestra el resultado en la figura 7.

10 Tal como se muestra en la figura 7, cuando se usó la combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida, el efecto de destrucción de temozolomida frente a la línea celular de cáncer de cerebro mejoraba a medida que la dosificación de (Z)-butilidenftalida aumentaba, lo que indica que (Z)-butilidenftalida puede aumentar la sensibilidad citotóxica de temozolomida frente a la línea celular de cáncer de cerebro y, por tanto, puede reducirse la dosificación de temozolomida cuando se usa la combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida.

[Ejemplo 6] Prueba de inhibición de butilidenftalida sobre células de cáncer de cerebro

15 Se usó el ensayo de viabilidad celular de MTT para estudiar la actividad anti-cáncer de cerebro de (Z)-butilidenftalida y (E)-butilidenftalida.

20 En una placa de 96 micropocillos, se cultivó cada pocillo con 3 10^3 células de línea celular de cáncer de cerebro DBTRG. El siguiente día, se hicieron gotear diferentes concentraciones de (Z)-butilidenftalida (de 0 a 500 μM , 200 μl) o (E)-butilidenftalida (de 0 a 2500 μM , 200 μl) en el pocillo a lo largo de la pared interior de la placa. Se colocó un disolvente en la primera fila como grupo control. Tras cultivarse las células durante 2 días, se extrajo la disolución de cultivo y se desechó. Se añadió una disolución de cultivo que contenía 500 $\mu\text{g/ml}$ de MTT (200 μl) al cultivo durante otras 4 horas. Se extrajo la disolución de cultivo y se desechó, y se añadieron 200 μl de DMSO, y entonces se usó el espectrómetro de placa de micropocillos para medir la absorbancia de las células a una longitud de onda de 570 nm. Se calcularon la tasa de viabilidad celular y la tasa de mortalidad basándose en la absorbancia. Se muestran los resultados en la tabla 3 y las figuras 8 y 9.

25 Tabla 3

	(Z)-Butilidenftalida				(E)-Butilideneftalida			
Concentración (μM)	0	125	250	500	0	500	1500	2500
Tasa de viabilidad de DBTRG(%)	100	80	58	30	100	88	81	70

Tal como se muestra en la tabla 3 y las figuras 8 y 9, en comparación con (E)-butilidenftalida, que no puede destruir células de cáncer de cerebro eficazmente incluso a una alta dosificación con la concentración de 2500 μM , (Z)-butilidenftalida puede alcanzar la tasa de mortalidad del 50% de las células cancerosas a la concentración de dosificación de aproximadamente 250 μM .

30 [Ejemplo 7] Prueba de inhibición de (Z)-butilidenftalida sobre células de cáncer de cerebro

Se repitieron las etapas del experimento en el ejemplo 6, pero se reemplazaron las líneas celulares de cáncer por líneas celulares de cáncer de cerebro DBTRG, 8401, 8901 y G5T/VGH, y se cambió la concentración de (Z)-butilidenftalida de desde 0 hasta 400 μM (200 μl). Se muestra el resultado en la figura 10.

35 Tal como se muestra en la figura 10, (Z)-butilidenftalida puede inhibir eficazmente el crecimiento de diversas líneas celulares de cáncer de cerebro, y a medida que aumenta la dosificación, el efecto de inhibición de células de cáncer de cerebro mejora.

[Ejemplo 8] El efecto sinérgico de la composición de (Z)-butilidenftalida y temozolomida para inhibir células de cáncer de cerebro

40 Se usó el ensayo de viabilidad celular de MTT para estudiar la actividad de la combinación de diferentes concentraciones de (Z)-butilidenftalida y temozolomida sobre células de cáncer de cerebro. Se analizó el índice de combinación (IC) para observar si había cualquier efecto sinérgico entre (Z)-butilidenftalida y temozolomida.

45 En una placa de 96 micropocillos, se cultivó cada pocillo con 3 10^3 células de línea celular de cáncer de cerebro 8901 o GBM22-TMZ con resistencia a temozolomida. El siguiente día, se hicieron gotear diferentes concentraciones de (Z)-butilidenftalida (línea celular de cáncer de cerebro 8901: de 25 a 200 μM (200 μl), línea celular de cáncer de cerebro GBM22-TMZ: de 50 a 600 μM (200 μl), temozolomida (línea celular de cáncer de cerebro 8901: de 100 a 1200 μM (200 μl), línea celular de cáncer de cerebro GBM22-TMZ: de 100 a 3200 μM (200 μl)) en el pocillo a lo largo de la pared interior de la placa. Se usaron cuatro placas de micropocillos para cada análisis, y se usaron cuatro pocillos para cada combinación de diversas concentraciones de fármacos. Se colocó un disolvente en la primera fila como grupo control. Tras cultivarse las células durante 2 días, se extrajo la disolución de cultivo y se desechó, y se

añadió una disolución de cultivo que contenía 500 µg/µl de MTT (200 µl) al cultivo durante otras 4 horas. Se extrajo la disolución de cultivo y se desechó y entonces se añadieron 200 µl de DMSO. Se usó entonces el espectrómetro de placa de micropocillos para medir la absorbancia de las células a una longitud de onda de 570 nm. Pueden usarse los valores promedio de D.O. de las combinaciones de diversas concentraciones para calcular y trazar la curva de reacción para diferentes dosificaciones de fármacos. Se usó la lectura del pocillo con la dosificación de fármaco más alta como control positivo (es decir, no se inhibía el crecimiento de células vivas), mientras que se usó como control negativo la lectura de los pocillos de la primera fila a la que sólo se le ha añadido el disolvente, obteniendo, de ese modo, los valores de CI₅₀ de los fármacos.

Además, se usó el software CalcuSyn para trazar la curva de reacción para las dosificaciones de fármacos, y se calculó el índice de combinación para analizar la composición farmacéutica de (Z)-butilidenftalida y temozolomida y su sinergismo, aditividad o antagonismo (véase Chou y Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv. Enzyme Regul., 22:27-55, 1984). Cuando el índice de combinación es inferior a 1, (Z)-butilidenftalida y temozolomida tienen sinergismo entre sí, lo que significa que la eficacia farmacológica tiene un efecto sinérgico. Cuando el índice de combinación es igual a 1, no hay ninguna influencia entre (Z)-butilidenftalida y temozolomida. Cuando el índice de combinación es mayor de 1, (Z)-butilidenftalida y temozolomida son antagonicas entre sí. Se muestran los resultados en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4

Principio activo	CI ₅₀ (µM)	
	8901	GBM22-TMZ
(Z)-butilidenftalida	218,62	450.9
Temozolomida	1201,6	> 3200

Tabla 5. Línea celular de cáncer de cerebro 8901

(Z)-butilidenftalida (µM)	Temozolomida (µM)	Valor de IC	(Z)-Butilidenftalida (µM)	Temozolomida (µM)	Valor de IC
25	100	1,777	100	100	0,846
	200	1,708		200	0,610
	400	1,361		400	0,776
	1000	0,950		1000	0,748
50	1200	0,455	200	1200	0,332
	100	1,017		100	0,951
	200	0,841		200	0,991
	400	0,902		400	0,922
	1000	0,839		800	0,822
	1200	0,242		1000	0,827
				1200	0,369

Tabla 6. Línea celular de cáncer de cerebro GBM22-TMZ

(Z)-Butilidenftalida (µM)	Temozolomida (µM)	Valor de IC	(Z)-Butilidenftalida (µM)	Temozolomida (µM)	Valor de IC
50	100	1,713	400	100	1,026
	200	1,168		200	1,176
	400	1,438		400	0,872
	800	0,894		800	0,776
	1600	0,649		1600	0,513
100	3200	0,198	600	3200	0,569
	100	1,578		100	0,622
	400	1,776		200	0,601
	800	0,881		400	0,604
	1600	0,581		800	0,619
200	3200	0,223		1600	0,622
	100	2,911		3200	0,632
	200	2,898			
	400	2,105			
	800	0,961			
	1600	0,725			
	3200	0,359			

Tal como se muestra en las tablas 5 y 6, cuando se usan juntas (Z)-butilidenftalida y temozolomida, esta combinación podía proporcionar un índice de combinación inferior a 1 (mostrado como los valores numéricos en

negrita en las tablas). En tales condiciones, (Z)-butilidenftalida y temozolomida tenían eficacia sinérgica entre sí. En particular, cuando las concentraciones de (Z)-butilidenftalida y temozolomida eran de 100 μM y 1200 μM (200 μl), respectivamente, el índice de combinación era de aproximadamente 0,33. Cuando las concentraciones de (Z)-butilidenftalida y temozolomida eran de 100 μM y 3200 μM (200 μl), respectivamente, el índice de combinación era de aproximadamente 0,22. Cuando las concentraciones de (Z)-butilidenftalida y temozolomida eran de 50 μM y 3200 μM (200 μl), respectivamente, el índice de combinación era de aproximadamente 0,20.

La prueba muestra que (Z)-butilidenftalida y temozolomida pueden proporcionar una eficacia sinérgica excelente cuando se usan juntas.

[Ejemplo 9] Prueba *in vivo*

Se llevó a cabo una prueba *in vivo* mediante un modo de trasplante de tumor subcutáneo para observar la actividad antitumoral de (Z)-butilidenftalida, temozolomida o su combinación *in vivo*.

En primer lugar, se cultivaron 2×10^6 células de línea celular de cáncer de cerebro GBM22-TMZ con resistencia a temozolomida de manera estéril y se inyectaron por vía subcutánea en ratones desnudos Balb/c (adquiridos del National Laboratory Animal Center, Taiwán) para llevar a cabo el experimento de trasplante tumoral *in vivo*. Cuando el tumor creció hasta 100 mm^3 (longitud anchura anchura/2), se llevó a cabo la administración subcutánea para el tratamiento. En el lado contralateral del tejido tumoral, en una posición a más de 1,5 cm, se inyectó (Z)-butilidenftalida, o se administró temozolomida por vía oral, una vez al día consecutivamente durante 5 días. En el grupo de tratamiento en el que se administraron (Z)-butilidenftalida y temozolomida en combinación, se administró en primer lugar (Z)-butilidenftalida por vía subcutánea (s.c.), y 2 horas más tarde, se administró temozolomida por vía oral (v.o.). Tras la administración en el 5º día, se observaron el tamaño tumoral y el peso corporal de los ratones de manera continua durante 28 días, y se midieron cada 3 días. Se usó el valor de medición en el día 28 como resultado de la evaluación de la actividad de inhibición sobre el crecimiento tumoral. Cuanto más pequeño sea el valor, mejor será el efecto de inhibición. Se observó el tamaño tumoral relativo entre el grupo con el tratamiento de fármacos por separado o en combinación y el grupo control (sólo con inyección de disolvente) para ver si había cualquier diferencia significativa. Había una diferencia significativa cuando el valor de P era inferior a 0,5. Se muestran los resultados en la tabla 7 y las figuras 11A y 11B.

Tabla 7

Medicamento	Modo de tratamiento/tiempo	Dosificación (mg/kg/día)	Tamaño tumoral relativo (veces)	Análisis estadístico
Disolvente	s.c./consecutivamente durante 5 días	0	4,9	
Temozolomida	v.o./consecutivamente durante 5 días	66	4,3	P=0,85
(Z)-Butilidenftalida	s.c./consecutivamente durante 5 días	50	2,7	P=0,52
(Z)-Butilidenftalida	s.c./consecutivamente durante 5 días	100	2,6	P=0,44
(Z)-Butilidenftalida + temozolomida	s.c./consecutivamente durante 5 días+ PO/ consecutivamente durante 5 días	50 + 66	1,3	P=0,13
(Z)-Butilidenftalida + temozolomida	s.c./consecutivamente durante 5 días + PO/consecutivamente durante 5 días	100 + 66	1,5	P=0,26

Tal como se muestra en la tabla 7 y la figura 11 A, en comparación con la administración separada de (Z)-butilidenftalida o temozolomida, la administración en combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida con la misma dosificación podía inhibir el crecimiento tumoral incluso más eficazmente. Esta prueba *in vivo* ilustró que (Z)-butilidenftalida y temozolomida son sinérgicos entre sí, y la combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida podía proporcionar un efecto de tratamiento más excelente para el cáncer cerebral, y reducir la dosificación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida requerida para el tratamiento.

[Ejemplo 10] Prueba *in vivo* – prueba de formulación de oblea

Se mezclaron uniformemente (Z)-butilidenftalida y poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (p(CPP-co-SA)) mediante un método físico. Se colocó el polvo mezclado resultante en un molde redondo con un diámetro de 1 a 13 mm y se prensó para formar una oblea redonda (o un comprimido) con un grosor de 1 a 2 mm. Se usó diclorometano (al 10% p/v) para mezclar temozolomida y p(CPP-co-SA), y entonces se evaporó el diclorometano mediante una bomba de vacío y, finalmente, se prensó el polvo resultante para formar una oblea redonda (o un comprimido) para preparar una oblea de temozolomida.

Se usaron ratones BALB/c nu/nu hembra, de 6 a 8 semanas de edad, con un peso de entre 18 y 22 g (adquiridos del

National Laboratory Animal Center, Taiwán) para llevar a cabo el trasplante de la línea celular de cáncer de cerebro humano resistente a temozolomida para evaluar el efecto anticancerígeno de (Z)-butilidenftalida, temozolomida o su combinación. Se implantaron 2×10^6 células de línea celular de cáncer de cerebro GBM22-TMZ por vía subcutánea en los ratones. Se llevó a cabo el tratamiento cuando se formó el tumor y creció hasta de 100 a 300 mm³. Se agruparon los ratones aleatoriamente. Había de 6 a 8 ratones en cada uno del grupo control (sin tratamiento mediante las obleas) y en el grupo de tratamiento (con tratamiento mediante las obleas). Se implantaron las obleas con diferente combinación de dosificación ((Z)-butilidenftalida: temozolomida = 1:2 ó 1:4) por vía subcutánea 1 cm aleadas del tejido tumoral, y se midieron la variación del tamaño tumoral y el peso corporal de los ratones y se registraron cada 2 días. Se muestran los resultados experimentales en las figuras 12A y 12B.

Tal como se muestra en la figura 12A, podía inhibirse eficazmente el crecimiento tumoral cuando se usó la combinación de la oblea de (Z)-butilidenftalida y la oblea de temozolomida.

Los ejemplos anteriores muestran que (Z)-butilidenftalida puede reducir eficazmente la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro, y puede proporcionar un efecto de sinergismo excelente cuando se usa en combinación con temozolomida. Por tanto, puede reducirse la dosificación de temozolomida requerida para el tratamiento, y también pueden reducirse los efectos secundarios mediante la administración de temozolomida.

[Ejemplo 11] Prueba *in vivo* – análisis de supervivencia

Se llevó a cabo un análisis de supervivencia para investigar el efecto antiglioma de la combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida *in vivo*. Se aleatorizaron ratones con xenoinjertos ortotópicos de glioblastoma establecidos a partir de la línea celular de cáncer de cerebro GBM22-TMZ para llevar a cabo la terapia con temozolomida (66 mg/kg/día; 5 días), (Z)-butilidenftalida (50 ó 100 mg/kg/día; 5 días) indicada o combinaciones de las mismas. Se registró la observación hasta que los ratones alcanzaron un estado moribundo, y se muestran los resultados de supervivencia como curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Se muestra la tasa de supervivencia en la tabla 8.

Tabla 8

Tasa de supervivencia \ Día	0	5	8	11	14	18	21	28	30
Control	100	100	100	100	100	100	25	0	0
Temozolomida (66 mg/kg)	100	100	100	66	66	66	33	0	0
(Z)-Butilidenftalida (50 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	66	0	0
(Z)-Butilidenftalida (100 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	66	0	0
(Z)-Butilidenftalida (66 mg/kg) + temozolomida (50 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
(Z)-Butilidenftalida (66 mg/kg) + temozolomida (100 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

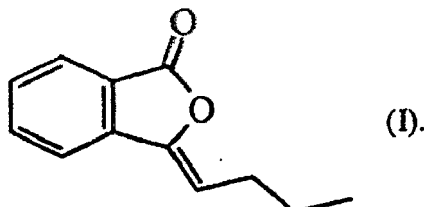
P < 0,05

Tal como se muestra en la tabla 8, en comparación con el grupo control, los ratones tratados con temozolomida, (Z)-butilidenftalida o la combinación de las mismas presentaban una tasa de supervivencia mejorada. Además, los ratones tratados con temozolomida junto con (Z)-butilidenftalida (50 mg/kg o 100 mg/kg) mostraban la tasa de supervivencia del 100%, lo que indica que la tasa de supervivencia de los ratones que tenían tumor podía mejorarse eficazmente cuando se usaba la combinación de (Z)-butilidenftalida y temozolomida.

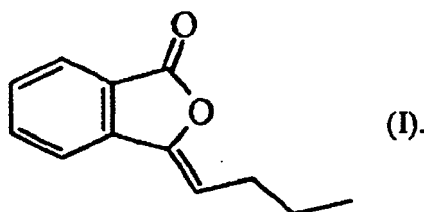
Este análisis de supervivencia mostró que (Z)-butilidenftalida puede proporcionar un efecto de sinergismo excelente cuando se usa en combinación con temozolomida. Por tanto, puede reducirse la dosificación de temozolomida requerida para el tratamiento del cáncer, y también puede reducirse los efectos secundarios provocados por la administración de temozolomida.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en la reducción de la resistencia a temozolomida de células de cáncer de cerebro, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y (Z)-butilidenftalida de fórmula (I):



- 5
2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que las células de cáncer de cerebro son glioma maligno humano.
3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 ó 2, que se usa para aumentar la sensibilidad citotóxica de temozolomida frente a células de cáncer de cerebro resistentes a temozolomida.
- 10 4. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer de cerebro resistente a temozolomida, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, (Z)-butilidenftalida de fórmula (I) y una cantidad eficaz de temozolomida, en la que temozolomida y (Z)-butilidenftalida juntas proporcionan un índice de combinación inferior a 1:



- 15 5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en la que (Z)-butilidenftalida y la temozolomida se administran juntas, por separado o sucesivamente.
6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4 ó 5, en la que la dosificación de (Z)-butilidenftalida es de 30 mg/kg de peso corporal a 500 mg/kg de peso corporal al día, y la dosificación de temozolomida es de 10 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal al día.
- 20 7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en el que la dosificación de (Z)-butilidenftalida es de 40 mg/kg de peso corporal a 120 mg/kg de peso corporal al día, y la dosificación de la temozolomida es de 40 mg/kg de peso corporal a 80 mg/kg de peso corporal al día.
8. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que el cáncer de cerebro es glioma maligno humano.
- 25 9. Kit para su uso en el tratamiento de cáncer de cerebro resistente a temozolomida, que comprende una primera forma farmacéutica que contiene (Z)-butilidenftalida y una segunda forma farmacéutica que contiene temozolomida, en el que (Z)-butilidenftalida y temozolomida juntas proporcionan un índice de combinación inferior a 1.
- 30 10. Kit para su uso según la reivindicación 9, en el que se administra (Z)-butilidenftalida con una dosificación de 30 mg/kg de peso corporal a 500 mg/kg de peso corporal al día, y la temozolomida se administra con una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal al día.
- 35 11. Kit para su uso según la reivindicación 9, en el que se administra en primer lugar (Z)-butilidenftalida por vía subcutánea con una dosificación de 30 mg/kg de peso corporal a 500 mg/kg de peso corporal, y de 1 a 2 horas más tarde, se administra la temozolomida por vía oral con una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal al día.

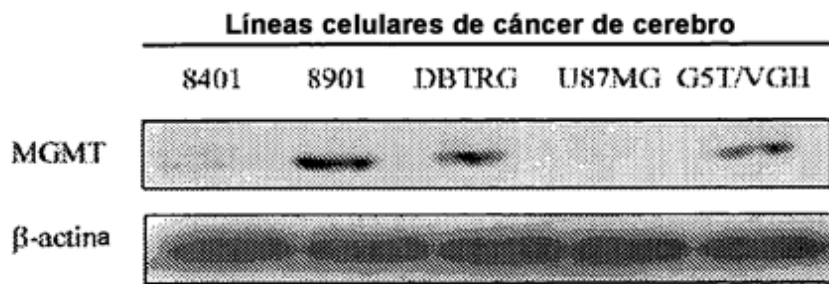


FIG. 1

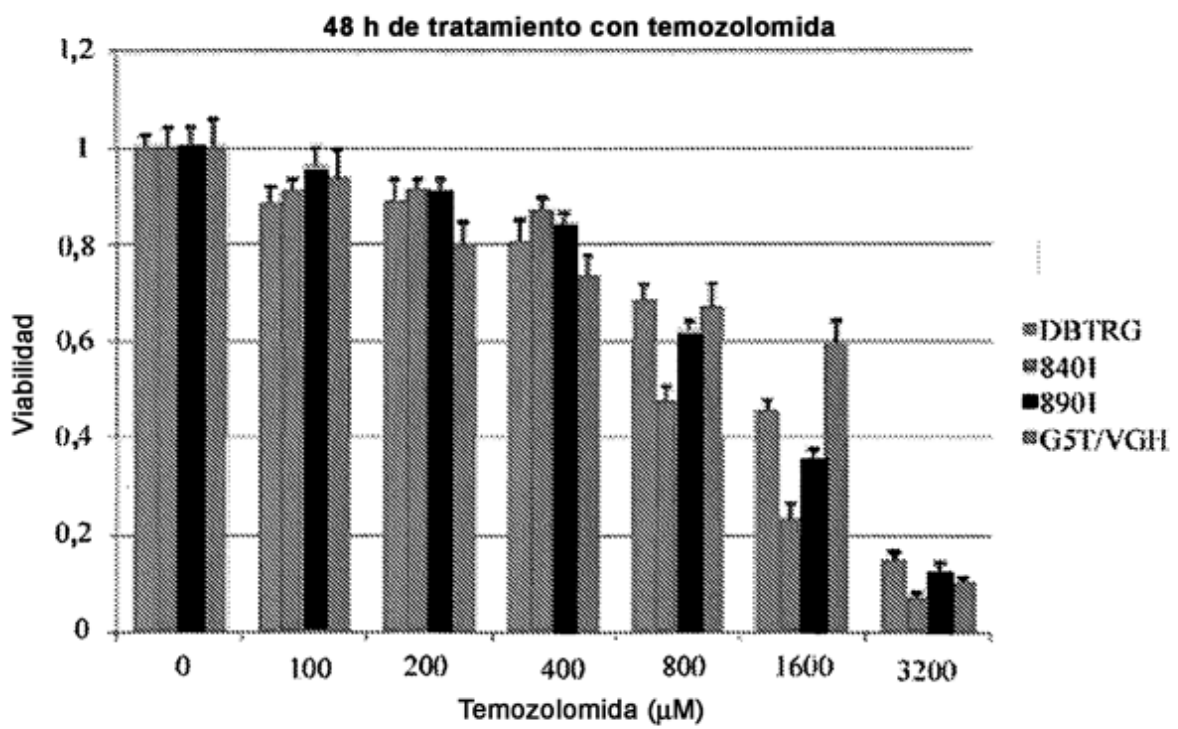


FIG. 2

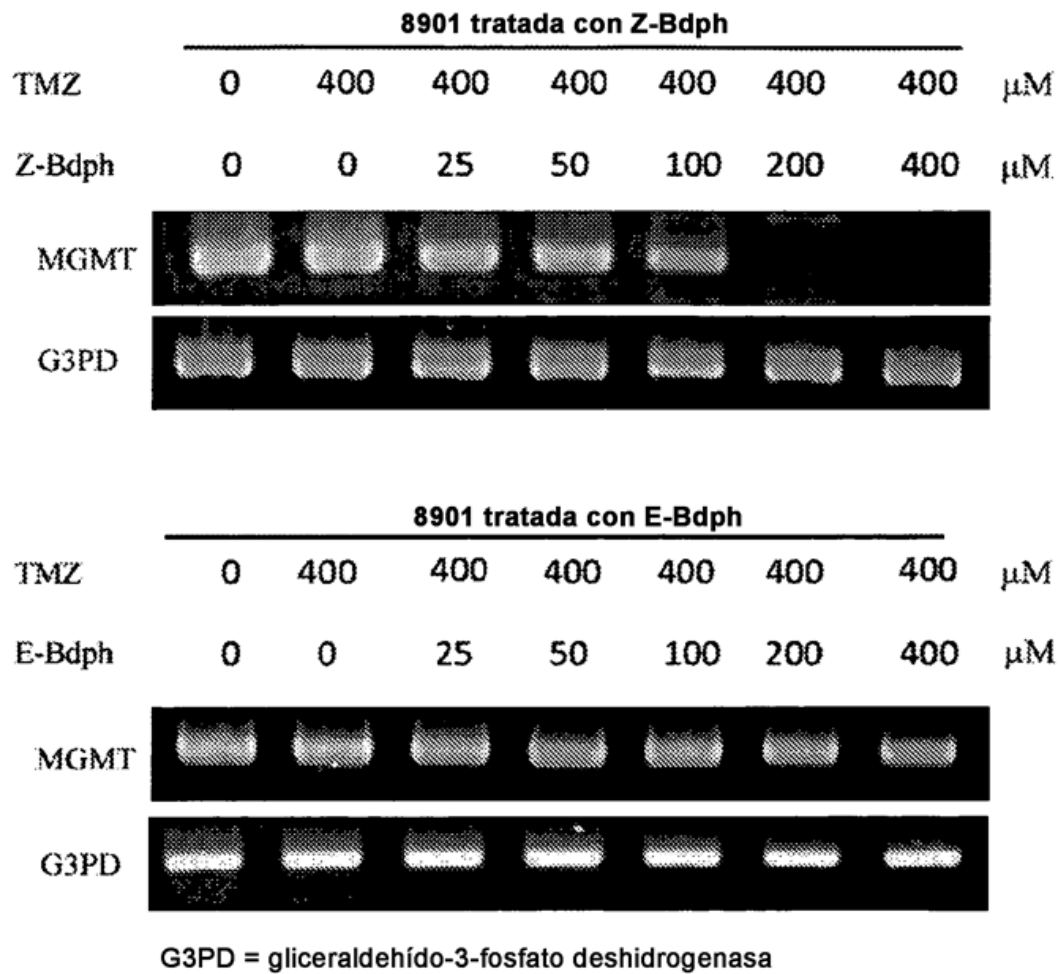


FIG. 3

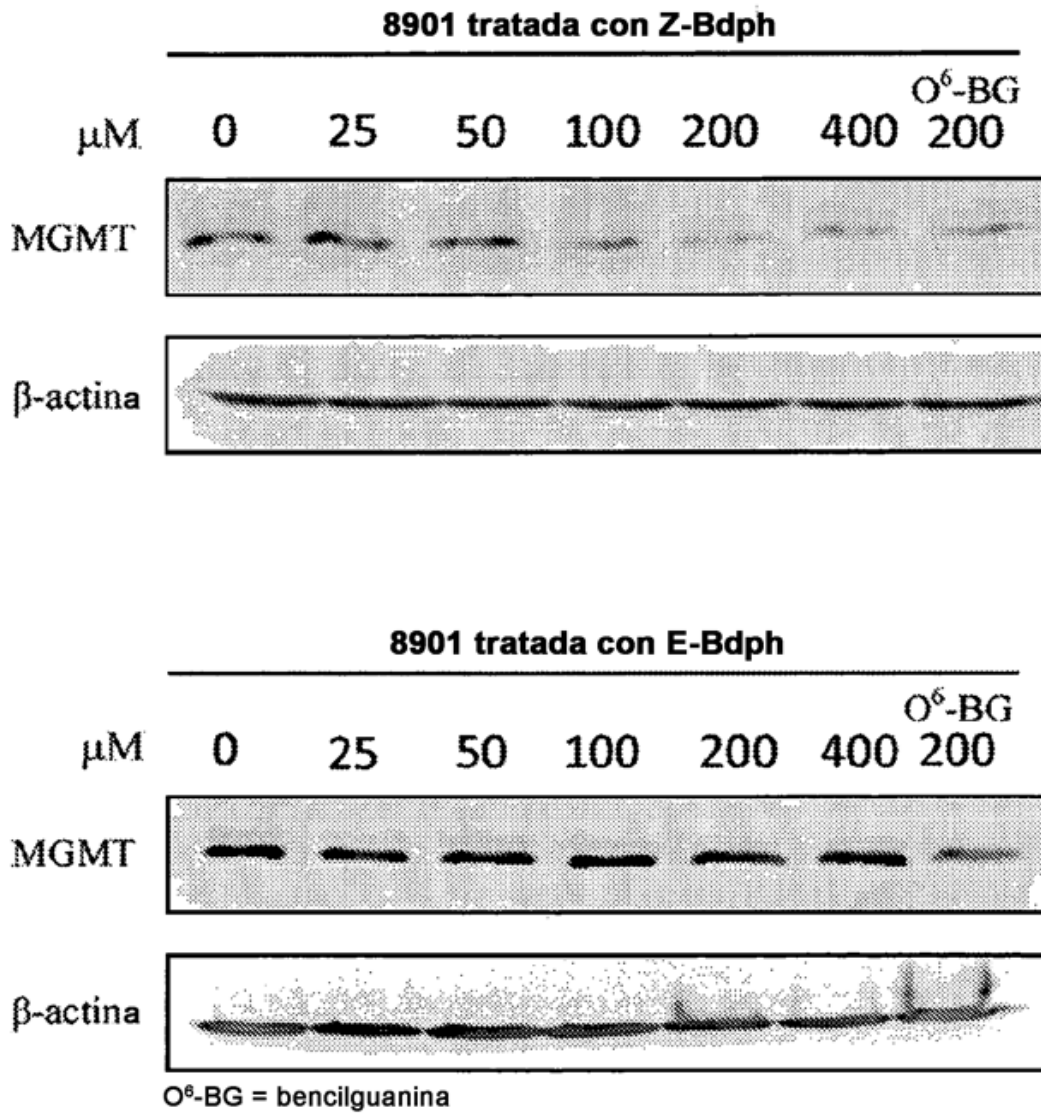


FIG. 4

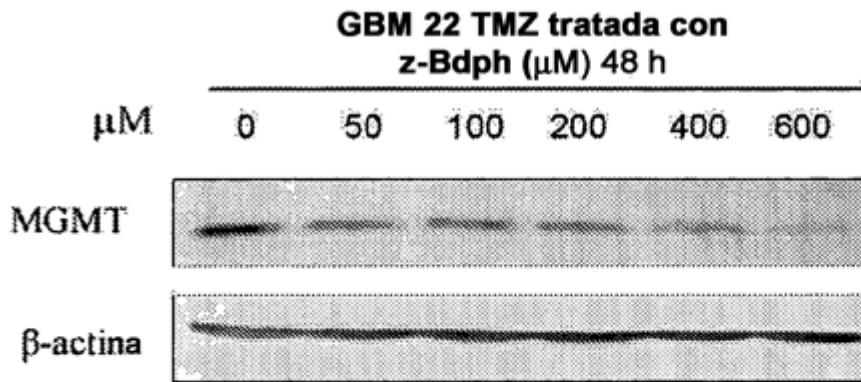


FIG. 5

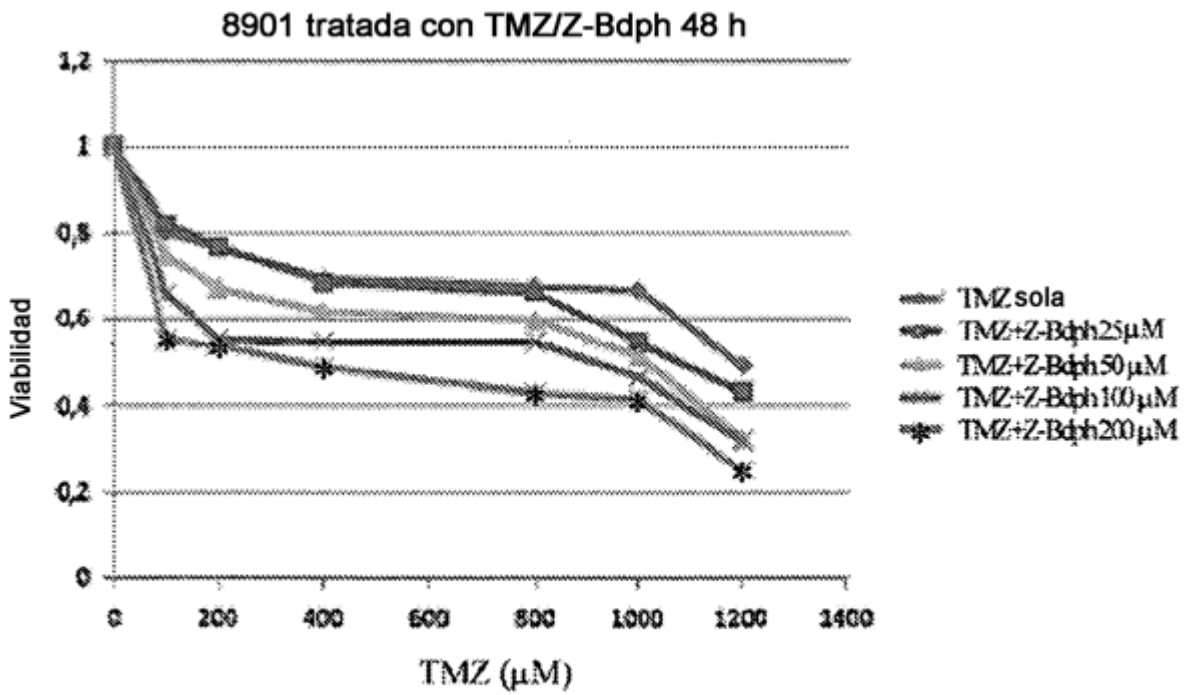


FIG. 6

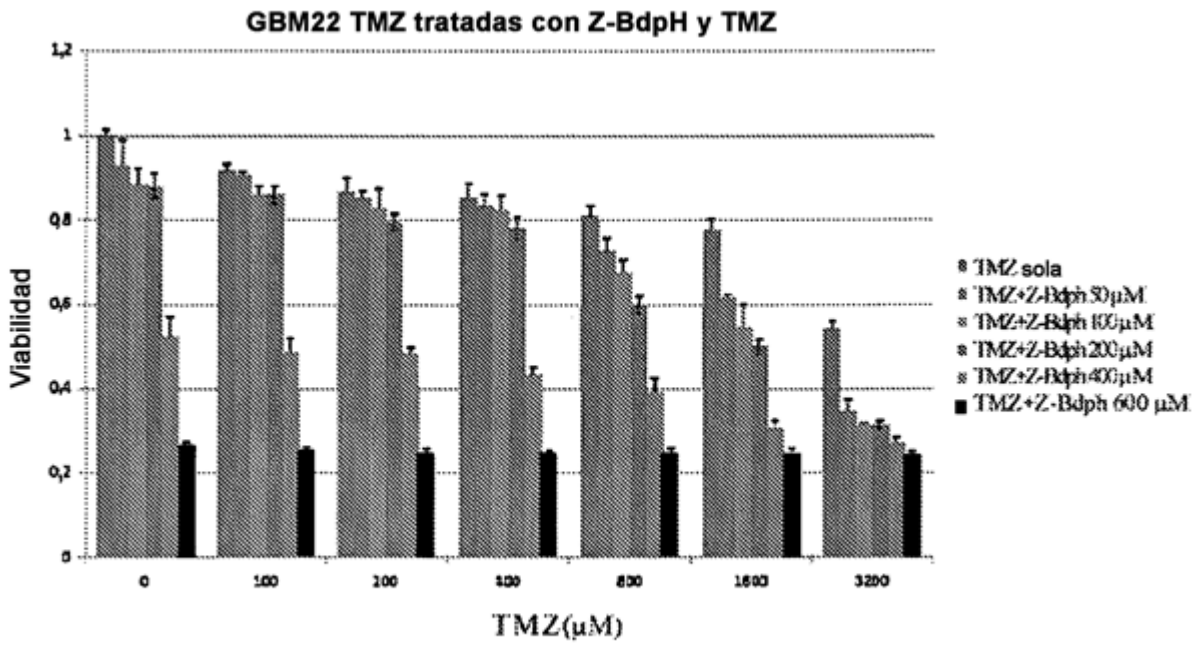


FIG. 7

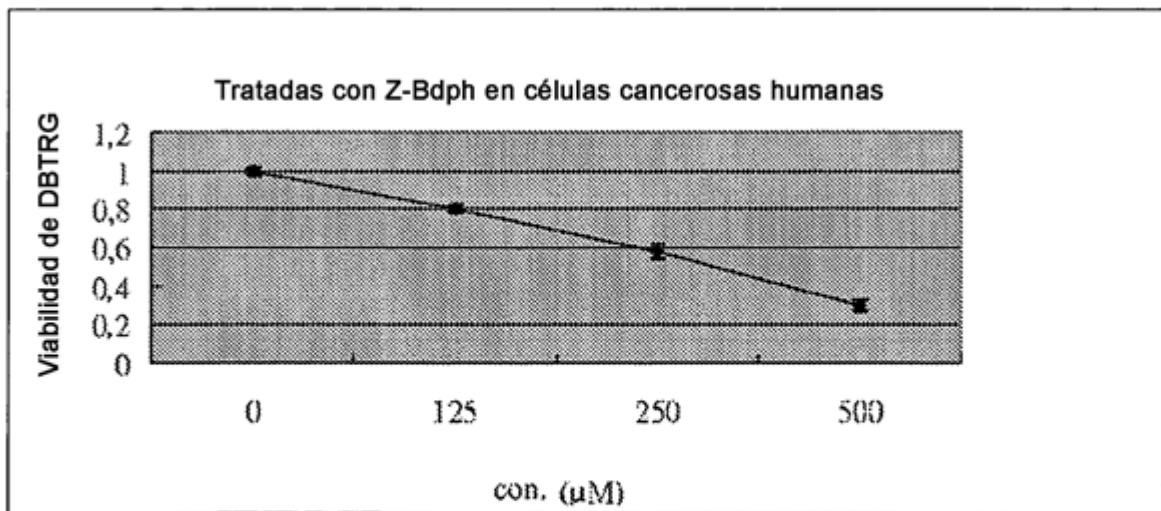


FIG. 8

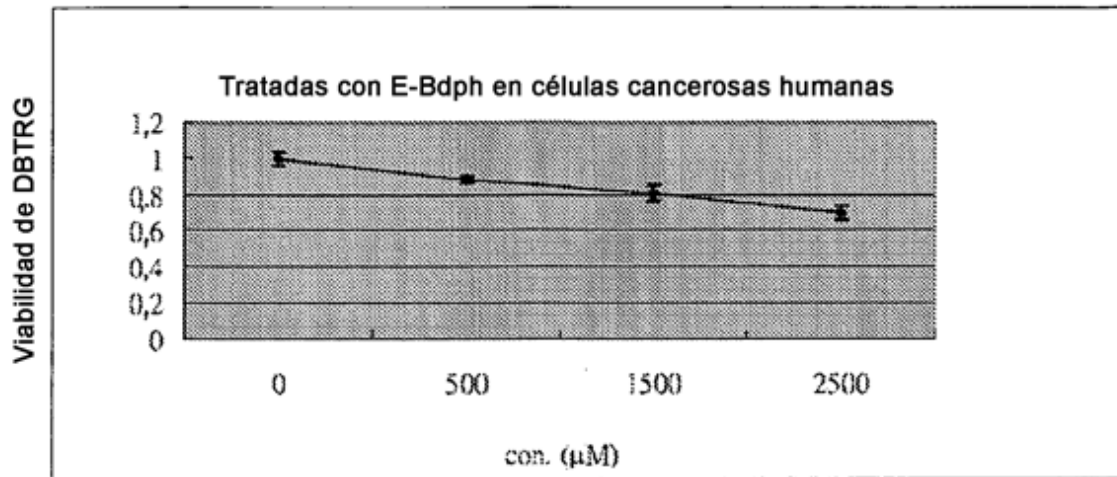


FIG. 9

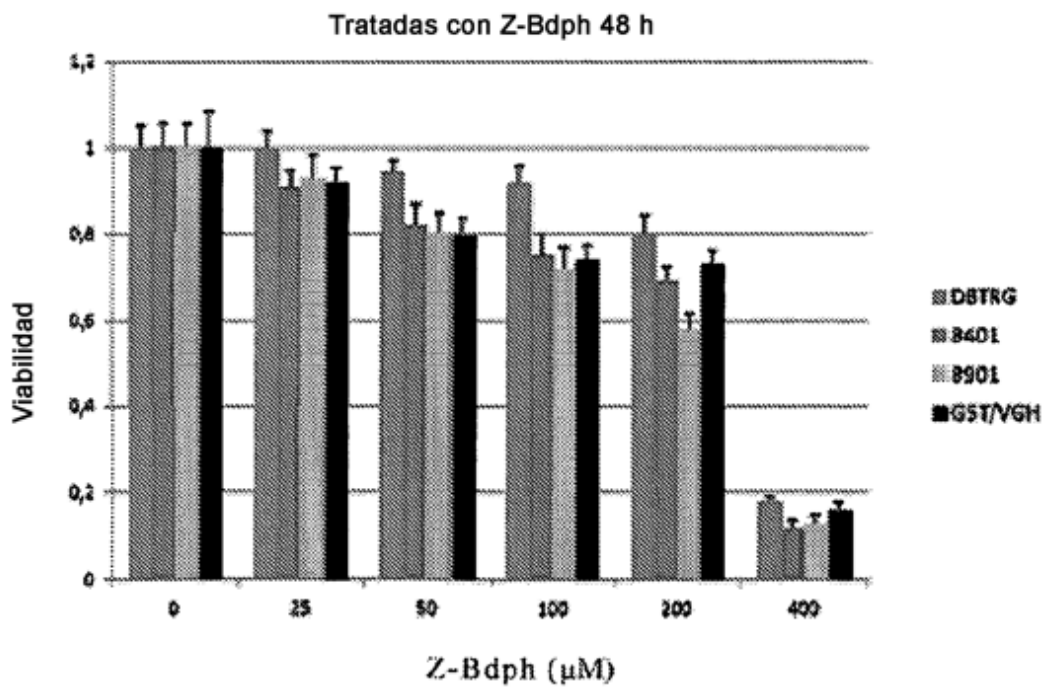


FIG. 10

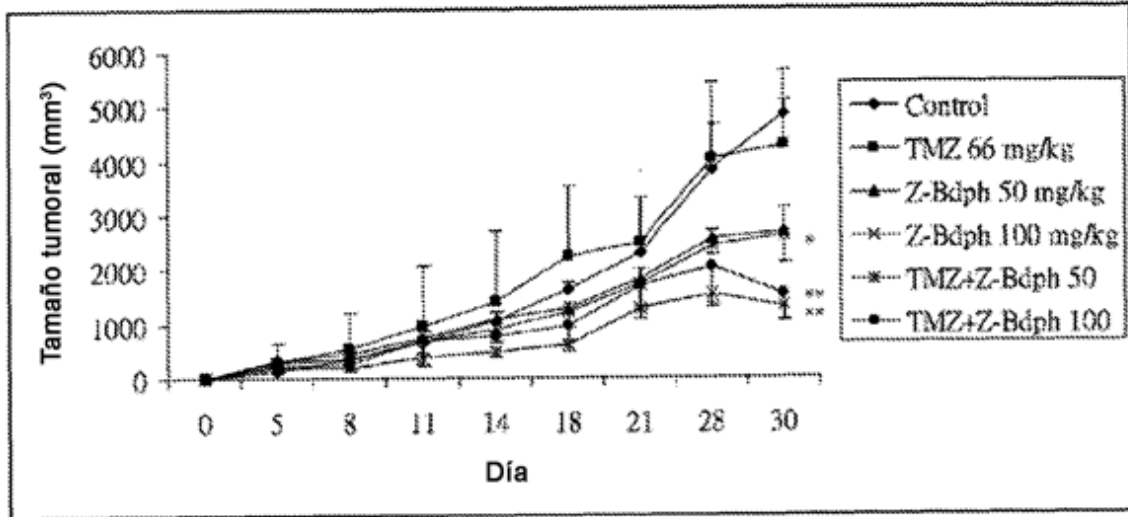


FIG. 11A

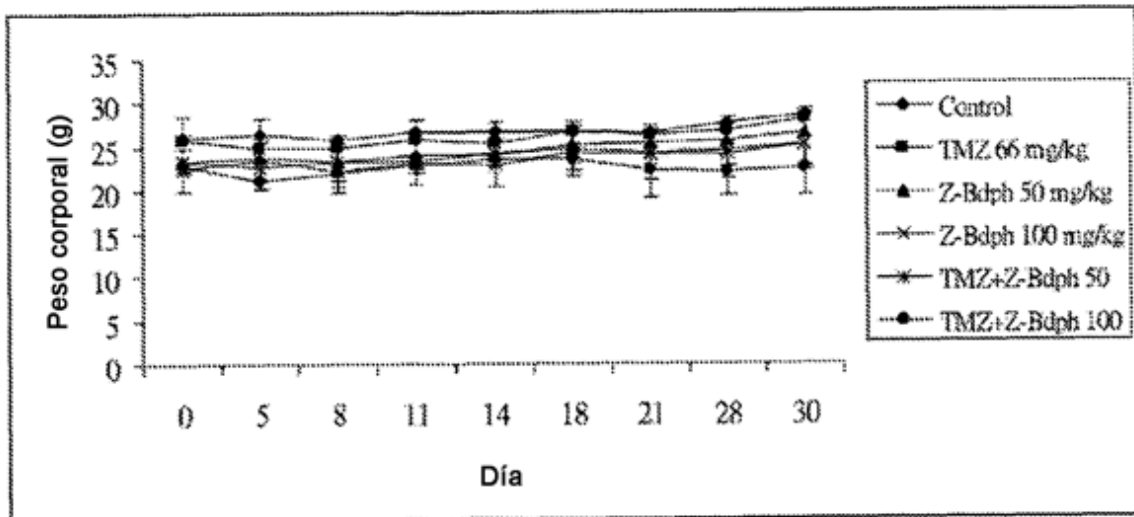


FIG. 11B

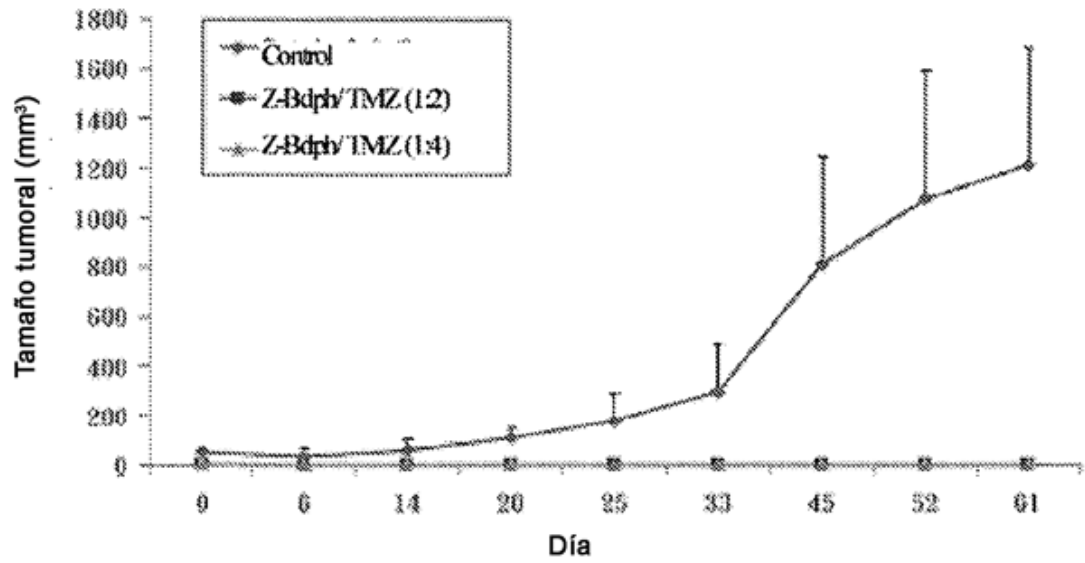


FIG. 12A

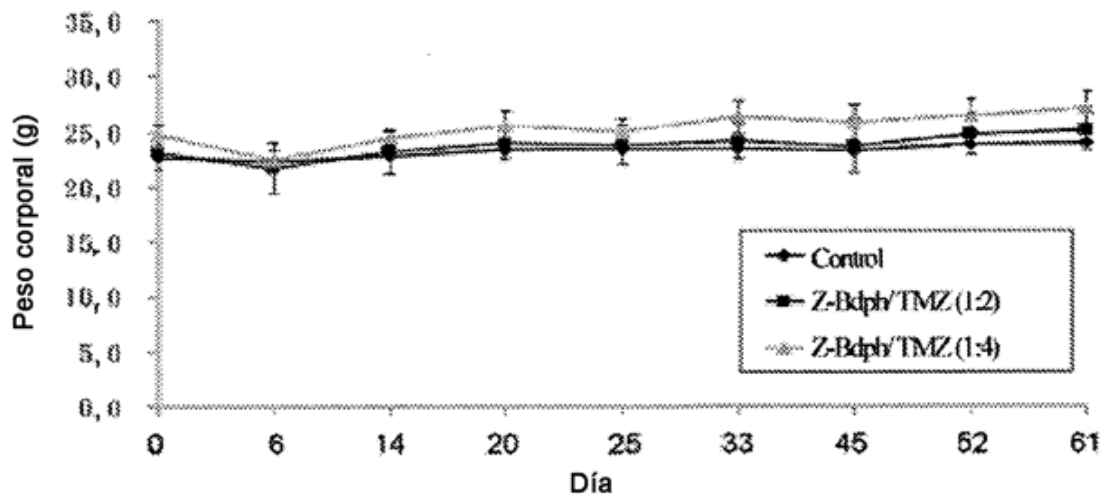


FIG. 12B