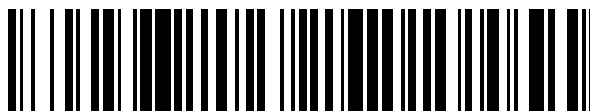


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 009**

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: **26.02.2015 PCT/KR2015/001889**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15130109**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2015 E 15754587 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 3111931**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer que contiene gospol y fenformina como principios activos**

30 Prioridad:

**27.02.2014 KR 20140023315**

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

**05.07.2018**

73 Titular/es:

**NATIONAL CANCER CENTER (100.0%)  
323 Ilsan-ro Ilsandong-gu  
Goyang-si, Gyeonggi-do 410-769, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SOO YOUL;  
KIM, JONG HEON;  
BAE, YOUNG KI;  
LEE, HO;  
JANG, HYON CHOL;  
CHOI, YONG-DOO;  
HONG, KYEONG MAN y  
HONG, DONG WAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 675 009 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 el tratamiento del cáncer que contiene gosipol y fenformina como principios activos

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene gosipol y fenformina como principios activos, y por tanto, que presenta una actividad sinérgica contra el cáncer, para su uso en el tratamiento del cáncer, y a un kit para su uso en el tratamiento del cáncer.

10

[Antecedentes de la técnica]

El fenotipo celular de cáncer agresivo es el resultado de diversas alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la alteración de la regulación de las vías de señalización intracelular (Ponder, *Nature* 411:336 (2001)). Sin embargo, el común denominador de todas las células cancerosas, es su incapacidad para ejecutar un programa apoptótico y la falta de una apoptosis adecuada debido a defectos en el mecanismo normal de la apoptosis (Lowe *et al.*, *Carcinogenesis* 21:485 (2000)). La mayoría de las terapias contra el cáncer actuales que abarcan quimioterapia, radiación e inmunoterapia inducen indirectamente la apoptosis en las células cancerosas. Por lo tanto, La incapacidad de las células para ejecutar un programa apoptótico debido a defectos en el mecanismo apoptótico normal se suele asociar con un aumento de la resistencia a la apoptosis inducida por quimioterapia, radiación o inmunoterapia. La resistencia primaria o adquirida del cáncer humano de diferentes orígenes a los protocolos de tratamiento actuales debido a defectos en la apoptosis es un problema principal en la terapia actual contra el cáncer (Lowe *et al.*, *Carcinogenesis* 21:485 (2000); *Nicholson, Nature* 407:810 (2000)). Por consiguiente, los esfuerzos actuales y futuros hacia el diseño y desarrollo de terapias contra el cáncer específicas de dianas moleculares para mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con cáncer incluyen estrategias que están dirigidas específicamente a la resistencia de las células cancerosas a la apoptosis. En este sentido, la dirección de reguladores negativos cruciales que desempeñan un papel central en la inhibición directa de la apoptosis en las células cancerosas representa una estrategia terapéutica muy prometedora para el diseño de nuevos fármacos contra el cáncer.

30

Mientras que los estudios sobre diversas sustancias dirigidas al cáncer avanzan para combatir el cáncer, en el caso del cáncer terminal, la mayoría de las terapias diana se usan para prolongar la vida, en lugar de para combatir el cáncer. Uno de estos estudios muestra que hay una variedad de reguladores metabólicos del cáncer que son útiles en el tratamiento del cáncer. La base de este estudio es la dirección hacia las características metabólicas universales específicas del cáncer. Por ejemplo, esto significa que las células cancerosas prefieren la fermentación del lactato en lugar de la descomposición de la glucosa en dióxido de carbono y agua, como el efecto de Warburg. Por este motivo, cuando se interrumpe la glicólisis para reducir el efecto de Warburg, las células cancerosas carecen de nutrientes y, por lo tanto, es más difícil que crezcan o mueran.

35

Las proteínas de la familia Bcl-2 se conocen como una clase de reguladores negativos centrales en la apoptosis (Adams *et al.*, *Science* 281:1322 (1998); *Reed, Adv. Pharmacol.* 41:501 (1997); *Reed et al., J. Cell. Biochem.* 60:23 (1996)). Bcl-2 es un miembro básico de la familia, y se aisló por primera vez como un producto oncogénico. La familia Bcl-2, en la actualidad, engloba tanto moléculas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-XL, como moléculas proapoptóticas tales como Bax, Bak, Bid y Bad. Bcl-2 y Bcl-XL se sobreexpresan en varios tipos de cáncer humano (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.) incluyendo el linfoma no Hodgkin, causado por translocaciones cromosómicas (t14, 18) que inducen la sobreexpresión de Bcl-2. Esto sugiere que una variedad de tipos de células cancerosas, dependiendo del aumento de los niveles de Bcl-2 y/o Bcl-XL, mantienen otro trastorno celular, de modo que las células cancerosas se definen como células cancerosas o células precancerosas, e intentan llevar a cabo vías de apoptosis. Además, se reconoce que la expresión aumentada de la proteína de la familia Bcl-2 es la base de la expresión de la resistencia a la radiación y a los fármacos terapéuticos contra el cáncer que inducen la muerte celular por diversas vías en las células tumorales. Se considera que Bcl-2 y Bcl-XL desempeñan un papel en la migración y la invasión, y por lo tanto, en la metástasis de las células tumorales (Amberger *et al.*, *Cancer Res.* 58:149 (1998); *Wick et al., FEBS Lett.* 440:419 (1998); *Mohanam et al., Cancer Res.* 53:143 (1993); *Pedersen et al., Cancer Res.*, 53:5158 (1993)). Parece que la proteína de la familia Bcl-2 proporciona células tumorales que tienen un mecanismo de existencia en un entorno nuevo y no replicable (por ejemplo, regiones metastásicas) y que contribuye al patrón organoespecífico de la diseminación del cáncer metastásico clínico (Rubio, *La Invest.* 81:725 (2001); *Fernandez et al., Cell Death Differ.* 7:350 (2000)). Se considera además que las proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y/o Bcl-XL regulan la interacción célula-célula a través, por ejemplo, la regulación de las integrinas de la superficie celular (Reed, *Nature* 387:773 (1997); *Frisch et al., Curr. Opin. Cell Biol.* 9:701 (1997); *Del Bufalo et al., FASEB J.* 11:947 (1997)). Por este motivo, se han examinado ampliamente estrategias terapéuticas para dirigir Bcl-2 y Bcl-XL en células a fin de recuperar la sensibilidad de las células cancerosas y superar la resistencia de las células cancerosas a la apoptosis (Adams *et al.*, *Science* 281:1322 (1998); *Reed, Adv. Pharmacol.* 41:501 (1997); *Reed et al., J. Cell. Biochem.* 60:23 (1996)). En la actualidad, hay terapias antisentido de Bcl-2 en curso, que son varios ensayos clínicos de fase III para tratar tumores sólidos y no sólidos.

65

Kate M. Bailey *et al.* proporcionan, en su revisión, un resumen de los fármacos preclínicos y clínicos en desarrollo para dirigirse a la glicólisis aeróbica, la acidosis, la hipoxia y las vías de respuesta a la hipoxia que se presentan en los tumores (*Adv. Pharmacol.* 65: 63 (2012)).

5 El gosispol es un compuesto bifenólico doble derivado de manera natural del aceite de semilla de algodón crudo (*Gossypium* sp.). Los ensayos clínicos para el gosispol como anticonceptivo masculino muestran seguridad en la administración a largo plazo de este compuesto (Wu, *Drugs* 38: 333 (1989)). Además, recientemente, se descubrió que el gosispol tiene un efecto antiproliferativo (Flack *et al.*, *J. Clin. Endocrinol.*

10 *Metab.* 76:1019 (1993); Bushunow *et al.*, *J. Neuro-Oncol.*, 43:79 (1999); Van Poznak *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.* 66:239 (2001)). Recientemente se demostró que el (-)-gosispol y un derivado del mismo son potentes inhibidores de Bcl-2 y Bcl-XL, y tienen una poderosa actividad contra el cáncer (solicitud de patente de EE.UU. N.º 2003/0008924).

15 La fenformina, que es un fármaco basado en biguanida, tal como la metformina, es conocida como agente antidiabético. Sin embargo, como se sabe que los fármacos basados en biguanida, entre los que se incluyen la fenformina, son eficaces para el tratamiento del cáncer deficiente en el gen p53 mediante la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que es una enzima crucial para regular fisiológicamente el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos, se realizó una investigación sobre el efecto contra el cáncer de un fármaco de  
20 fenformina para demostrar la probabilidad del efecto contra el cáncer de la fenformina (efecto de la fenformina sobre la proliferación de estirpes celulares tumorales humanas. *Life Sciences*, 19 de diciembre de 2003: vol. 74 (número 5): 643-650.; «Potentiation of antitumor effect of cyclophosphamide and hydrazine sulfate by treatment with the antidiabetic agent, 1-phenylethylbiguanide (phenformin)», *Cancer Let.* octubre de 1979; 7(6):357-61). Aunque se conoce el efecto contra el cáncer tanto de la fenformina como del gosispol, todavía se desconoce un efecto contra el  
25 cáncer sinérgico de las acciones de estos fármacos.

Por lo tanto, a partir del resultado de la investigación sobre el desarrollo de sustancias que presenten un efecto contra el cáncer más potente, los inventores demostraron que la combinación de gosispol como inhibidor de la ALDH y fenformina basada en biguanida muestra un considerable efecto contra el cáncer sinérgico, a diferencia de otras  
30 sustancias, completándose así la presente invención.

[Divulgación]

[Problema técnico]

35 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que contenga gosispol y fenformina como principios activos para su uso en el tratamiento del cáncer.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un kit farmacéutico para su uso en el tratamiento del  
40 cáncer.

[Solución técnica]

45 Para conseguir los objetivos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene gosispol y fenformina, o sales aceptables de los mismos, como componentes eficaces para su uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención proporciona además un kit farmacéutico para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende dos ingredientes separados que consisten en:

- 50
- a) gosispol o una sal aceptable del mismo y
  - b) fenformina o una sal aceptable de la misma.

[Efectos ventajosos]

55 De acuerdo con la presente invención, en comparación con el tratamiento individual, el tratamiento con la combinación del gosispol, que no tiene efecto apoptótico sobre estirpes celulares cancerosas o que tiene un efecto inhibidor débil contra la ALDH, y la fenformina, que reduce la fosforilación oxidativa mitocondrial, muestra un considerable efecto contra el cáncer y, por tanto, una composición farmacéutica que contiene gosispol y fenformina  
60 como principios activos de la presente invención puede ser útil en el tratamiento del cáncer.

[Descripción de dibujos]

65 La FIG. 1 muestra la inhibición de la producción de ATP en células cancerosas mediante el tratamiento con gosispol:

epitelio primario de la vía aérea pequeña: células epiteliales pulmonares normales (control).

La FIG. 2 muestra la inhibición de la producción de ATP en células cancerosas mediante el tratamiento con gosipol 0, 0,1 o 1  $\mu\text{M}$ .

5 La FIG. 3 muestra el resultado de una prueba de SRB para 9 tipos de estirpes celulares de cáncer de pulmón:

0: control no tratado con gosipol;  
 -7: tratamiento de gosipol  $10^{-7}$  M (0,1  $\mu\text{M}$ );  
 -6: tratamiento de gosipol  $10^{-6}$  M (1  $\mu\text{M}$ );  
 10 -5: tratamiento de gosipol  $10^{-5}$  M (10  $\mu\text{M}$ ); y  
 -4: tratamiento de gosipol  $10^{-4}$  M (100  $\mu\text{M}$ ).

La Fig. 4 muestra la fosforilación de AMPK producida por el gosipol a lo largo del tiempo o por la concentración en estirpes celulares de cáncer de pulmón A549:

15

p-AMPK (T172): AMPK fosforilada;  
 AMPK: cantidad total de AMPK; y  
 $\beta$ -actina: control.

20

La Fig. 5 muestra el crecimiento de estirpes celulares cancerosas mediante el tratamiento de gosipol 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ , mientras que se trata con fenformina 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$  individualmente:

25

línea continua: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento individual de fenformina para la estirpe celular A549/ATCC;  
 línea de puntos: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento combinado de fenformina y gosipol para la estirpe celular A549/ATCC; y  
 Control: células cancerosas tratadas sin gosipol ni fenformina.

30

La Fig. 6 muestra el crecimiento de estirpes celulares cancerosas mediante el tratamiento de gosipol 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ , mientras que se trata con fenformina 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$  individualmente:

35

línea continua: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento individual de fenformina para la estirpe celular NCI-H460;  
 línea de puntos: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento combinado de fenformina y gosipol para la estirpe celular NCI-H460;  
 y  
 Control: células cancerosas con tratamiento sin gosipol ni fenformina.

40

La Fig. 7 muestra el crecimiento de estirpes celulares cancerosas mediante el tratamiento de gosipol 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ , individualmente, mientras se trata con metformina 100  $\mu\text{M}$ :

45

gráfico de la izquierda, línea continua: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento individual de metformina para la estirpe celular A549/ATCC;  
 gráfico de la izquierda, línea de puntos: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento combinado de metformina y gosipol para la estirpe celular A549/ATCC;  
 gráfico de la derecha, línea continua: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento individual de metformina para la estirpe celular NCI-H460;  
 gráfico de la derecha, línea de puntos: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento combinado de metformina y gosipol para la estirpe celular NCI-H460; y  
 50 Control: células cancerosas con tratamiento sin gosipol ni metformina.

La Fig. 8 muestra el crecimiento de estirpes celulares cancerosas mediante el tratamiento de gosipol 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ , mientras se trata con cisplatino 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  individualmente:

55

línea continua: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento individual de cisplatino para la estirpe celular A549/ATCC;  
 línea de puntos: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento combinado de cisplatino y gosipol para la estirpe celular A549/ATCC; y  
 Control: células cancerosas con tratamiento sin gosipol ni cisplatino.

60

La Fig. 9 muestra el crecimiento de estirpes celulares cancerosas mediante el tratamiento de cisplatino 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ , mientras se trata con gosipol 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  individualmente:

65

línea continua: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento individual de cisplatino para la estirpe celular NCI-H460;

línea de puntos: curva de crecimiento de células cancerosas con el tratamiento combinado de cisplatino y gosipol para la estirpe celular NCI-H460; y  
Control: células cancerosas con tratamiento sin gosipol ni cisplatino.

- 5 La FIG. 10 muestra el tamaño tumoral y el efecto reductor del tumor evaluados en ratones portadores de tumores a quienes se administra gosipol y/o fenformina.  
La FIG. 11 muestra los tamaños tumorales de un grupo murino tratado conjuntamente con 100 mg/kg de fenformina y 10 mg/kg de gosipol y un control.

10 [Modos de la invención]

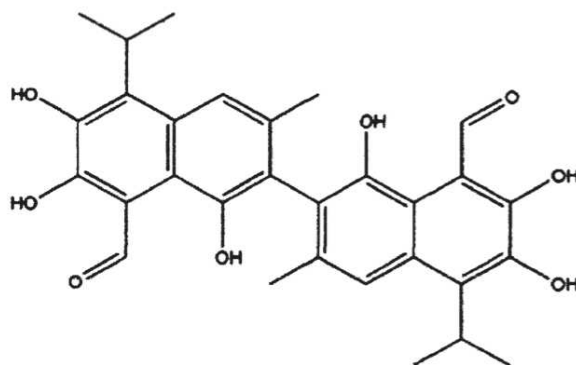
En lo sucesivo, en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle.

- 15 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende gosipol y fenformina, o sales aceptables de los mismos, como ingredientes eficaces para su uso en el tratamiento del cáncer.

El gosipol puede ser un compuesto de Fórmula 1:

[Fórmula 1]

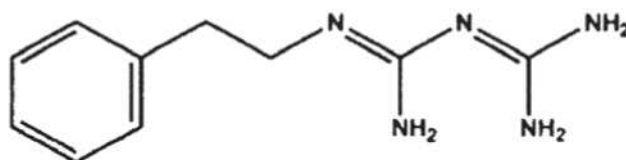
20



La fenformina puede ser un compuesto de Fórmula 2:

25

[Fórmula 2]



- 30 La concentración de gosipol puede ser, aunque sin limitación, de 0,1 nM a 100 μM.

La concentración de fenformina puede ser, aunque sin limitación, de 1 a 200 μM.

- 35 El cáncer puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer hematológico y cáncer de hígado, preferentemente, cáncer de pulmón, y lo más preferentemente, cáncer microcítico de pulmón. Sin embargo, la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a cualquier tipo de cáncer, ya que se dirige a un metabolismo específico de las células cancerosas, y por lo tanto, la presente invención no se limita a los ejemplos enumerados anteriormente.

- 40 La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer puede liberar simultáneamente fenformina y gosipol, o puede liberar primero fenformina o gosipol.

- 45 A lo largo de la memoria descriptiva, se ha de interpretar que la expresión "composición farmacéutica", a menos que se defina otra cosa en particular, abarca una sola dosis, tal como un fármaco oral o una inyección tomado o administrado una vez, además de una pluralidad de formas de dosificación unitaria divididas en dos o más veces cuando se administra. Por ejemplo, se ha de interpretar que la expresión "composición farmacéutica que contiene gosipol y fenformina" incluye una sola forma de dosificación unitaria que incluye ambos principios activos, además de dos formas de dosificación unitarias que incluyen los respectivos principios activos. Además, la expresión

"composición farmacéutica que contiene gopipol y fenformina" puede abarcar una o dos formas de dosificación unitarias, incluso cuando se prepara una sola forma de dosificación unitaria que incluye ambos principios activos para su liberación con un desfase temporal y se administra simultáneamente, o se administran dos formas de dosificación unitarias simultáneamente o en intervalos de un tiempo predeterminado o inferior, dando lugar a una acción sinérgica entre los dos principios activos incluidos juntos en las formas de dosificación unitarias respectivas en un organismo vivo, y así se incluyen dentro del alcance de la "composición farmacéutica para tratamiento del cáncer que contiene gopipol y fenformina como principios activos". Ambos principios activos se pueden liberar o tratar (o administrar) simultáneamente o con un desfase temporal. Por consiguiente, la composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, que contiene gopipol y fenformina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, como principios activos, puede ser una composición farmacéutica combinada simple que permita el tratamiento combinado simultáneo (o la liberación) o una composición farmacéutica que permita el tratamiento combinado (o la liberación) con un desfase temporal.

A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "liberación con desfase temporal o administración con desfase temporal" se refiere a la liberación o la administración de un fármaco de modo que los principios activos que se toman o se administran individualmente no se absorben simultáneamente, sino secuencialmente. Dicha "liberación con desfase temporal o administración con desfase temporal" puede realizarse en una formulación combinada en la que se incluyan dos ingredientes en una forma farmacéutica, o una formulación o forma farmacéutica que esté diseñada para permitir la liberación con desfase temporal de al menos un ingrediente incluso cuando los principios activos individuales se preparan en sus respectivas formulaciones individuales, presentando, por lo tanto, un efecto de desfase temporal aunque los ingredientes se tomen o se administren simultáneamente. Además, la "administración con desfase temporal" también puede incluir un método de administración de dos principios activos a intervalos regulares.

A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "sal aceptable" pretende referirse a una sal que conserva un efecto biológico de un compuesto específico, y las sales farmacéuticamente aceptables son ampliamente conocidas por los expertos en la materia.

En la composición farmacéutica, se pueden usar gopipol y fenformina como tales, pero se puede preparar un derivado de los mismos, en consideración a la solubilidad y a la estabilidad.

La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender además un agente contra el cáncer.

El agente contra el cáncer puede ser, aunque sin limitación, al menos un fármaco seleccionado entre mostaza de nitrógeno, imatinib, oxaliplatino, rituximab, erlotinib, neratinib, lapatinib, gefitinib, vandetanib, nilotinib, semaxanib, bosutinib, axitinib, cediranib, lestaurtinib, trastuzumab, gefitinib, bortezumib, sunitinib, carboplatino, sorafenib, bevacizumab, cisplatino, cetuximab, *Viscum album*, asparaginasa, tretinoína, hidroxycarbamida, dasatinib, estramustina, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab tiuxetan, heptaplatino, ácido metil-aminolevulínico, amsacrina, alemtuzumab, procarbazona, alprostado, nitrato de holmio•quitosano, gemcitabina, doxilfludina, pemetrexed, tegafur, capecitabina, gimeracilo, oteracilo, azacitidina, metotrexato, uracilo, citarabina, fluorouracilo, fludarabina, enocitabina, flutamida, decitabina, mercaptopurina, tioguanina, cladribina, carmofur, raltitrexed, docetaxel, paclitaxel, irinotecán, belotecán, topotecán, vinorelbina, etopósido, vincristina, vinblastina, tenipósido, doxorubicina, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona, mitomicina, bleomicina, daunorrubicina, dactinomicina, pirarrubicina, aclarubicina, peplomicina, temsirolimus, temozolomida, busulfán, ifosfamida, ciclofosfamida, melfalán, altretamina, dacarbazina, tiotepa, nimustina, clorambucilo, mitolactol, leucovorina, tretinoína, exemestano, aminoglutetimida, anagrelida, navelbina, fadrozol, tamoxifeno, toremifeno, testolactona, anastrozol, letrozol, vorozol, bicalutamida, lomustina y carmustina.

Sin embargo, la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más tipos de vehículos farmacéuticamente aceptables, distintos de los principios activos descritos anteriormente. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" usada en el presente documento se refiere a un aditivo farmacéutico que es útil en la formulación de una composición farmacéutica para la administración en una forma farmacéutica adecuada, y que no es tóxico ni sensible en las condiciones de uso, y una proporción del contenido específico de dicho vehículo se puede determinar de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, así como la solubilidad, la propiedad química o la vía de administración seleccionada de un principio activo. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un aditivo farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos del aditivo farmacéuticamente aceptable pueden comprender almidón, almidón gelatinizado, celulosa microcristalina, lactosa, povidona, dióxido de silicio coloidal, hidrógenofosfato cálcico, lactosa, manitol, melcocha, goma arábiga, almidón pregelatinizado, almidón de maíz, celulosa en polvo, hidroxipropilcelulosa, Opadry, glicolato sódico de almidón, cera de carnauba, silicato de aluminio sintético, ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de aluminio, estearato de calcio, sacarosa, dextrosa, sorbitol y talco. El aditivo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la presente invención se puede incluir de 0,1 a 90 partes en peso con respecto a la composición, pero la presente invención no se limita a ello.

65

La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención se puede administrar en diversas formas orales y parenterales en la administración clínica real, y en la preparación, se puede formular con agentes diluyentes o excipientes usados normalmente tales como una carga, un agente espesante, un aglutinante, un agente humectante, un dispersante, un tensioactivo, etc. Los ejemplos de una formulación oral sólida pueden incluir un comprimido, una píldora, polvos, un gránulo y una cápsula, y dicha preparación sólida puede formularse mezclando al menos un excipiente, por ejemplo, almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa o gelatina, con un extracto de Pueraria. Además, en lugar de un excipiente simple, se pueden usar lubricantes tales como estearato de magnesio. Una formulación oral líquida puede ser una suspensión, un líquido para uso interno, una emulsión y un jarabe, y contiene diversos excipientes, por ejemplo, un agente humectante, un edulcorante, un agente aromatizante y un conservante, además de un diluyente simple de uso frecuente tal como el agua o parafina líquida. Los ejemplos de una formulación parenteral pueden incluir una solución acuosa esterilizada, un disolvente no acuoso, una suspensión, una emulsión, un agente liofilizador y un supositorio. Como disolvente o agente de suspensión no acuoso, se pueden usar propilenglicol, polietilenglicol, un aceite vegetal tal como aceite de oliva, o un éster inyectable tal como etilolato. Como base de un supositorio, se pueden usar Witepsol, Macrogol, Tween 61, manteca de cacao, grasa de laurina o glicerogelatina.

La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral o parenteral de acuerdo con un método deseado, y para la administración parenteral, se puede usar la vía tópica por la piel, intraperitoneal, intrarrectal, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intracardiaca. La dosis de la composición farmacéutica puede variar dependiendo del peso corporal del paciente, la edad, el sexo, el estado de salud, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la gravedad de la enfermedad.

La dosis de la composición farmacéutica puede variar dependiendo del peso corporal del paciente, la edad, el sexo, el estado de salud, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la gravedad de la enfermedad, y puede administrarse a dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferentemente, de 0,001 a 10 mg/kg de una o seis veces al día, según la cantidad de extracto de Pueraria.

Para el tratamiento de un paciente con cáncer, la composición farmacéutica puede usarse individualmente o en combinación con cirugía, tratamiento hormonal, tratamiento con fármacos y un regulador de la reacción biológica.

Un sujeto en quien se puede aplicar la presente invención puede ser un mamífero, preferentemente, un mamífero humano o no humano, y lo más preferentemente, un ser humano.

A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "tratamiento del cáncer" usada en el presente documento se refiere a la ralentización o interrupción del desarrollo del cáncer. El tratamiento del cáncer incluye el tratamiento y/o alivio de los síntomas del cáncer.

A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" usada en el presente documento se refiere a la cantidad suficiente para proporcionar un efecto terapéutico a un sujeto. Por lo tanto, las cantidades terapéuticamente eficaces de gosispol y fenformina, o sales aceptables de los mismos, pueden ser las cantidades suficientes para tratar el cáncer cuando se administran a un sujeto con cáncer.

A lo largo de la memoria descriptiva, el término "sujeto" o "paciente" usado en el presente documento puede ser un mamífero, preferentemente, un mamífero humano o no humano, y lo más preferentemente, un ser humano.

Además, La presente invención proporciona un kit farmacéutico para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende dos ingredientes separados que consisten en:

- a) gosispol o una sal aceptable del mismo y
- b) fenformina o una sal aceptable de la misma.

El cáncer puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer hematológico y cáncer de hígado, preferentemente, cáncer de pulmón, y lo más preferentemente, cáncer microcítico de pulmón.

Los componentes a) y b) del kit de partes se pueden envasar en uno o más recipientes, estando envasado cada componente incluido en el kit en cada recipiente. El envase y las instrucciones adecuadas se proporcionarán con el kit.

El kit puede incluir el gosispol o una sal aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria, y la fenformina o una sal aceptable de la misma en una segunda forma de dosificación unitaria.

En lo sucesivo, en el presente documento, para ayudar a comprender la presente invención, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos y ejemplos comparativos. Sin embargo, los siguientes ejemplos y ejemplos comparativos se proporcionan simplemente para ilustrar las descripciones de la presente invención. Los

ejemplos y ejemplos comparativos de la presente invención se proporcionan para explicar de manera más completa la presente invención a los expertos habituales en la materia.

<Ejemplo 1> Examen de la actividad anticancerígena del gosispol

<1-1> Examen de la inhibición de la generación de energía en células cancerosas

Para examinar si la generación de energía en las células cancerosas fue inhibida por el gosispol, que es ALDH, se trataron estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), por ejemplo, una estirpe celular A549, una estirpe celular H460, una estirpe celular Hop-92 y una estirpe celular H23, con gosispol 1  $\mu\text{M}$  durante 1 hora, seguido de la medición de los niveles de ATP usando un kit de ensayo de ATP (Biovision; n.º K354-100). Como control, se usaron células epiteliales pulmonares normales.

Además, para investigar un cambio en los niveles de ATP de acuerdo con la concentración de gosispol, se trató una estirpe celular A549 con gosispol 0, 0,1 o 1  $\mu\text{M}$  durante 1 hora, seguido de la medición de los niveles de ATP.

Como resultado de ello, se puede observar que los niveles de producción de ATP (1 a 6 nmol por  $1 \times 10^6$  células) aumentados en las estirpes celulares de cáncer fueron inhibidos por el gosispol (FIG. 1), y la inhibición de la producción de ATP dependió de la concentración de gosispol (FIG. 2).

<1-2> Examen de la inhibición del crecimiento de células cancerosas

Se realizó un análisis de SRB para examinar el efecto del gosispol sobre la inhibición del crecimiento de estirpes celulares cancerosas. Específicamente, de acuerdo con el tiempo de duplicación de las estirpes celulares de cáncer de pulmón, por ejemplo, las estirpes celulares A549/ATCC, HOP-62, HOP-92, NCI-H23, NCI-H460 o NCI-H522, se sembraron de 5.000 a 40.000 células por pocillo, y se cultivaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de 24 horas, las células se trataron con 100 ml de gosispol 0, 0,1, 1, 10 o 100  $\mu\text{M}$  por pocillo, y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Posteriormente, se añadieron 50 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío (4 °C) al 50 % a cada una de las estirpes celulares unidas, y se añadieron 50 ml de TCA al 80 % a cada una de las estirpes celulares suspendidas para fijar las células. Tras la incubación de la placa a 4 °C durante de 1 a 3 horas, se desechó la solución de TCA en la placa, y luego se enjuagó la placa con agua destilada cinco veces. Se secó la placa a temperatura ambiente durante aproximadamente de 12 a 24 horas, y luego se tiñeron las células fijadas con 100 ml de sulforrodamina B (SRB) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras la tinción, se lavó la placa con ácido acético glacial al 1 % tres veces y se secó a temperatura ambiente durante aproximadamente de 12 a 24 horas. Se disolvió el colorante SRB con una base Trizma 10 mM, y se midió una densidad óptica a 515 nm. El efecto del gosispol sobre la inhibición de las células cancerosas se representó como el 50 % de la inhibición del crecimiento (IC50).

Como resultado de ello, se observó que la concentración de IC50 del gosispol a la que se inhibió el crecimiento de las estirpes celulares de cáncer de pulmón es de 5  $\mu\text{M}$  (FIG. 3).

<1-3> Efecto del gosispol sobre la inhibición de la proliferación de células cancerosas de acuerdo con el tiempo de tratamiento o la concentración de gosispol

Para examinar el efecto contra el cáncer de acuerdo con el tiempo de tratamiento o la concentración de gosispol, se trataron estirpes celulares de cáncer de pulmón A549 con gosispol 1  $\mu\text{M}$  durante 0, 8, 16 o 24 horas, y luego se analizó la fosforilación de una proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que es una proteína fundamental para la división de las células cancerosas, mediante transferencia Western.

Además, después del tratamiento individual de gosispol 0, 0,1, 0,5 o 1  $\mu\text{M}$  durante 24 horas, también se analizó la fosforilación de AMPK mediante transferencia Western.

Como resultado de ello, se puede observar que la fosforilación de AMPK se aumentó dependiendo del tiempo de tratamiento y de la concentración de gosispol (FIG. 4). Por consiguiente, se puede observar que el gosispol inhibe la biosíntesis que es absolutamente necesaria para la división de las células cancerosas, lo que es una evidencia fundamental que muestra que el gosispol inhibe la proliferación de las células cancerosas.

<Ejemplo 2> Examen del efecto contra el cáncer de acuerdo con el tratamiento combinado de gosispol y fenformina

Se trataron las estirpes celulares de cáncer A549/ATCC y NCI-H460 individualmente con gosispol 0,1, 0,5, 1,0, 10 o 50  $\mu\text{M}$ , y se trataron en combinación con fenformina 10, 50 o 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente, seguido por el análisis de SRB de la misma manera que en el Ejemplo <1-2>.

Como resultado de ello, se observó que, en el tratamiento de solo gosispol, el crecimiento de las células cancerosas apenas se inhibió, pero, en el tratamiento de combinación de fenformina y gosispol, el crecimiento de las células cancerosas se inhibió a una concentración considerablemente inferior a 5  $\mu\text{M}$ , que es la concentración de inhibición



del crecimiento de células cancerosas (IC50) en el tratamiento de solo gopipol (FIG. 5 y 6). Por consiguiente, se confirmó un efecto sinérgico del tratamiento combinado de fenformina y gopipol sobre la inhibición del crecimiento de las células cancerosas.

5 <Ejemplo 3> Examen del efecto contra el cáncer ejercido por el tratamiento combinado de gopipol y fenformina en modelos de animales

10 Se trataron células A549-luciferasa con tripsina al 0,12 % y EDTA (T/E) al 0,008 %, se separaron de una placa, se lavaron con PBS frío y luego se inyectaron en ratones Balb/c hembra atímicos de 6 semanas de vida a  $2 \times 10^6$  células/cabeza/100  $\mu$ l de PBS. Tras un mes, cuando el tamaño del tumor hubo alcanzado los 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en grupos (cinco ratones por grupo) y luego se sometieron a la administración oral de fenformina a 100 mg/kg/100  $\mu$ l de PBS y/o gopipol a 0, 5 o 10 mg/kg/100  $\mu$ l de PBS (EtOH al 40 %) cinco veces a la semana. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana.

15 Como resultado de ello, se observó que, en comparación con los ratones tratados con cada uno de gopipol y fenformina, los ratones tratados conjuntamente con gopipol y fenformina muestran una disminución considerable del tamaño del tumor (FIG. 10 y 11).

20 <Ejemplo comparativo 1> Examen del efecto contra el cáncer ejercido por el tratamiento combinado de gopipol y un compuesto a base de biguanida diferente

25 Para examinar si un efecto contra el cáncer sinérgico solo es causado por el tratamiento combinado de gopipol y fenformina, se trataron las estirpes celulares de cáncer A549/ATCC y NCI-H460 individualmente con gopipol 0,1, 0,5, 1,0, 10 o 50  $\mu$ M, respectivamente, y se trataron en combinación con fenformina 100  $\mu$ M, que pertenece a un grupo a base de biguanida que incluye la fenformina entre los inhibidores de la fosforilación oxidativa mitocondrial, y que es conocido por tener un efecto contra el cáncer, y luego se examinó el efecto de inhibición del crecimiento de las células cancerosas en cada muestra mediante el mismo método descrito anteriormente.

30 Como resultado de ello, puede observarse que el tratamiento combinado de metformina 100  $\mu$ M con gopipol no se diferencia significativamente del tratamiento individual de gopipol, y a diferencia del tratamiento combinado de gopipol y fenformina, no tiene efecto sinérgico (FIG. 7). Por lo tanto, una sustancia que tiene un efecto sinérgico contra el cáncer en combinación con gopipol se considera una sustancia a base de fenformina.

35 <Ejemplo comparativo 2> Examen del efecto contra el cáncer ejercido por el tratamiento combinado de gopipol y un agente contra el cáncer convencional

Se examinó un efecto sinérgico contra el cáncer tras tratar solo con cisplatino, que se usa comercialmente como fármaco contra el cáncer en el entorno clínico, o en combinación con gopipol.

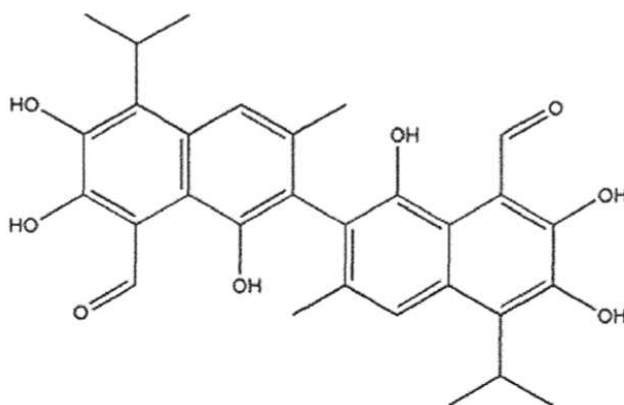
40 Como resultado de ello, aunque se trató con cisplatino 1, 10 o 50  $\mu$ M en combinación con gopipol, no hubo diferencia significativa en la actividad contra el cáncer del tratamiento solo con gopipol y, por lo tanto, como se puede ver, no se muestra un efecto sinérgico. (FIG. 8 y 9).

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende gosispol y fenformina, o sales aceptables de los mismos, como principios activos para su uso en el tratamiento del cáncer.

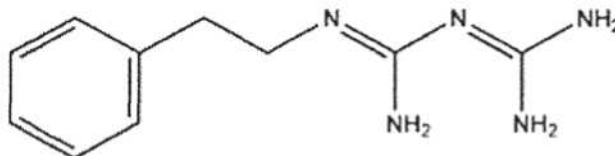
2. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gosispol es un compuesto de Fórmula 1:

[Fórmula 1]



3. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la fenformina es un compuesto de Fórmula 2:

[Fórmula 2]



4. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gosispol tiene una concentración de 0,1 nM a 100  $\mu$ M, y en la que la fenformina tiene una concentración de 1 a 200  $\mu$ M.

5. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el cáncer es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer hematológico y cáncer de hígado.

6. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, que libera simultáneamente fenformina y gosispol.

7. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:

un agente contra el cáncer.

8. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el agente contra el cáncer es al menos un fármaco seleccionado entre mostaza de nitrógeno, imatinib, oxaliplatino, rituximab, erlotinib, neratinib, lapatinib, gefitinib, vandetanib, nilotinib, semaxanib, bosutinib, axitinib, cediranib, lestaurinib, trastuzumab, gefitinib, bortezomib, sunitinib, carboplatino, sorafenib, bevacizumab, cisplatino, cetuximab, *Viscum album*, asparaginasa, tretinoína, hidroxycarbamida, dasatinib, estramustina, gemtuzumab, ozogamicina, ibritumomab tiuxetan, heptaplatino, ácido metil-aminolevulínico, amsacrina, alemtuzumab, procarbazona, alprostado, 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, irinotecán, belotecán, topotecán, vinorelbina, etopósido, vincristina, vinblastina, tenipósido, doxorubicina, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona, mitomicina, bleomicina, daunorrubicina, dactinomicina, pirarrubicina, aclarubicina, peplomina,

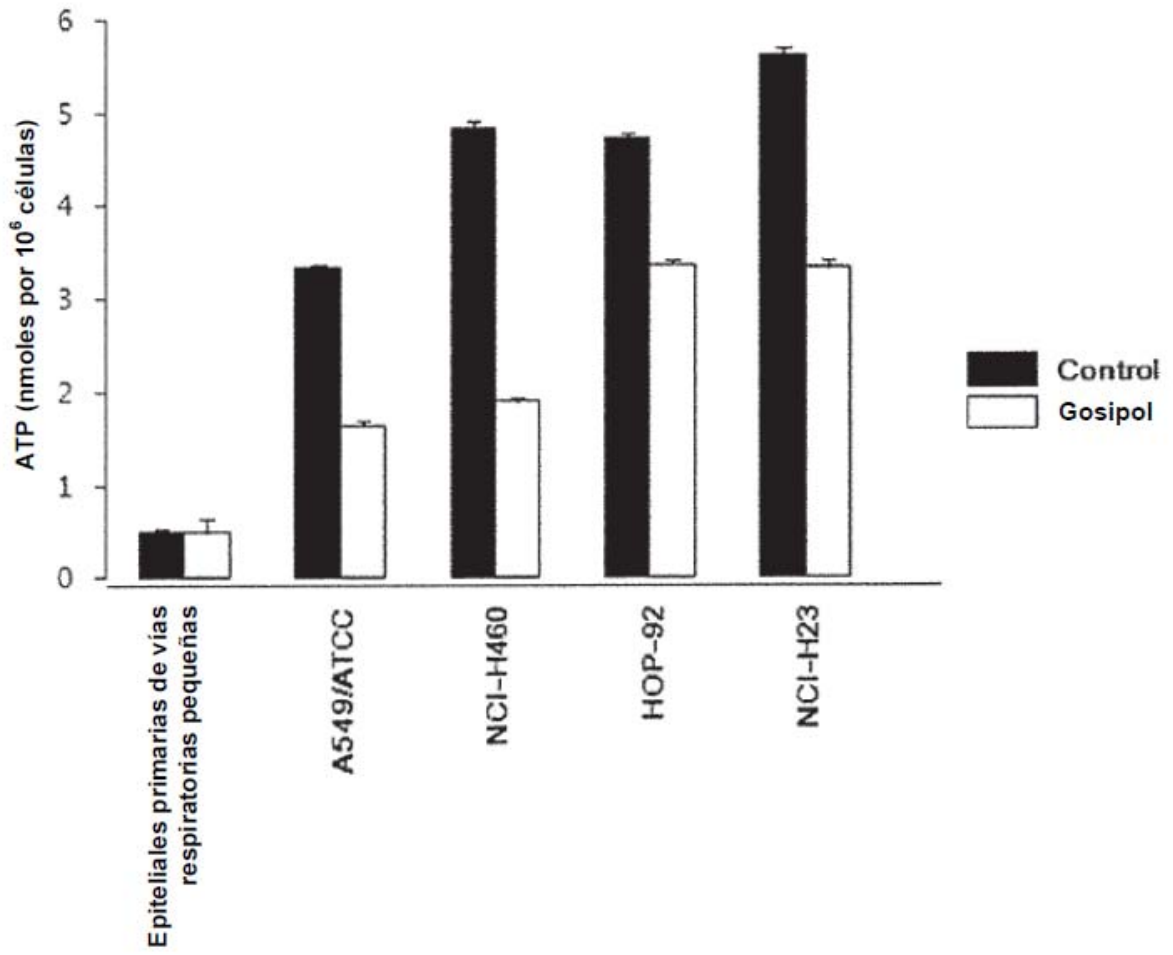
temsirolimus, temozolomida, busulfán, ifosfamida, ciclofosfamida, melfalán, altretamina, dacarbazina, tiotepa, nimustina, clorambucilo, mitolactol, leucovorina, tretinoína, exemestano, aminoglutetimida, anagrelida, navelbina, fadrozol, tamoxifeno, toremifeno, testolactona, anastrozol, letrozol, vorozol, bicalutamida, lomustina y carmustina.

5 9. Un kit farmacéutico para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende dos ingredientes separados que consisten en:

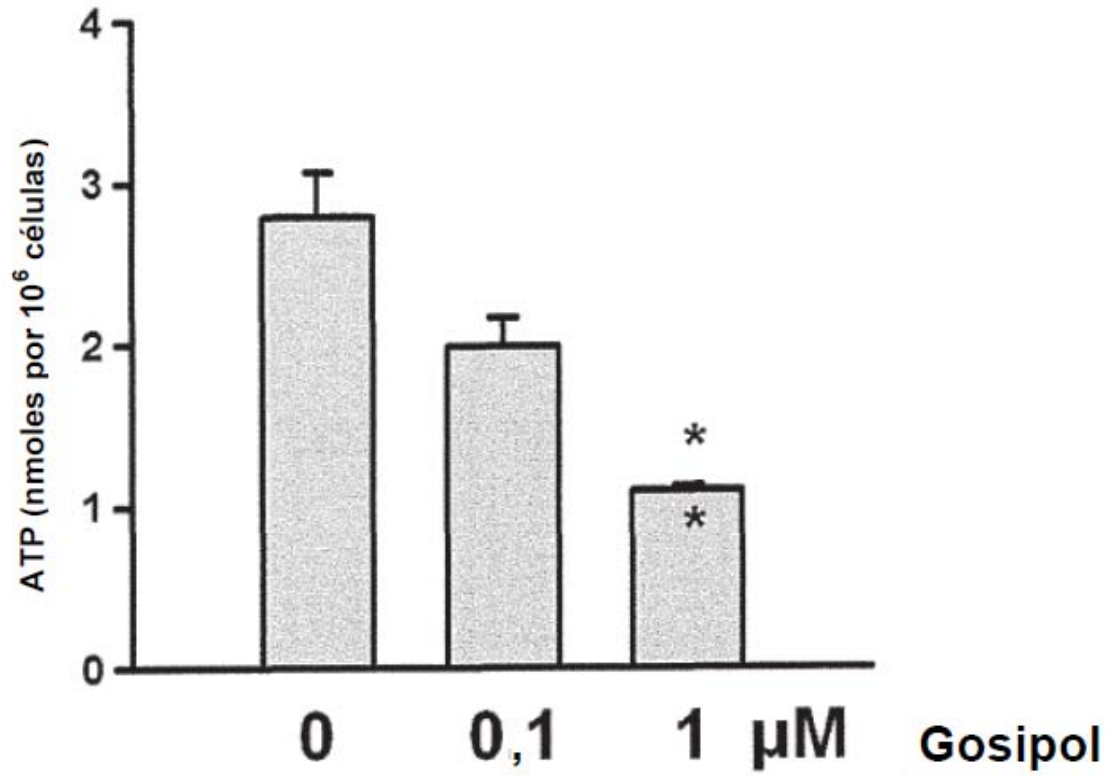
- a) gosipol o una sal aceptable del mismo; y
- b) fenformina o una sal aceptable de la misma.

10

[Fig. 1]

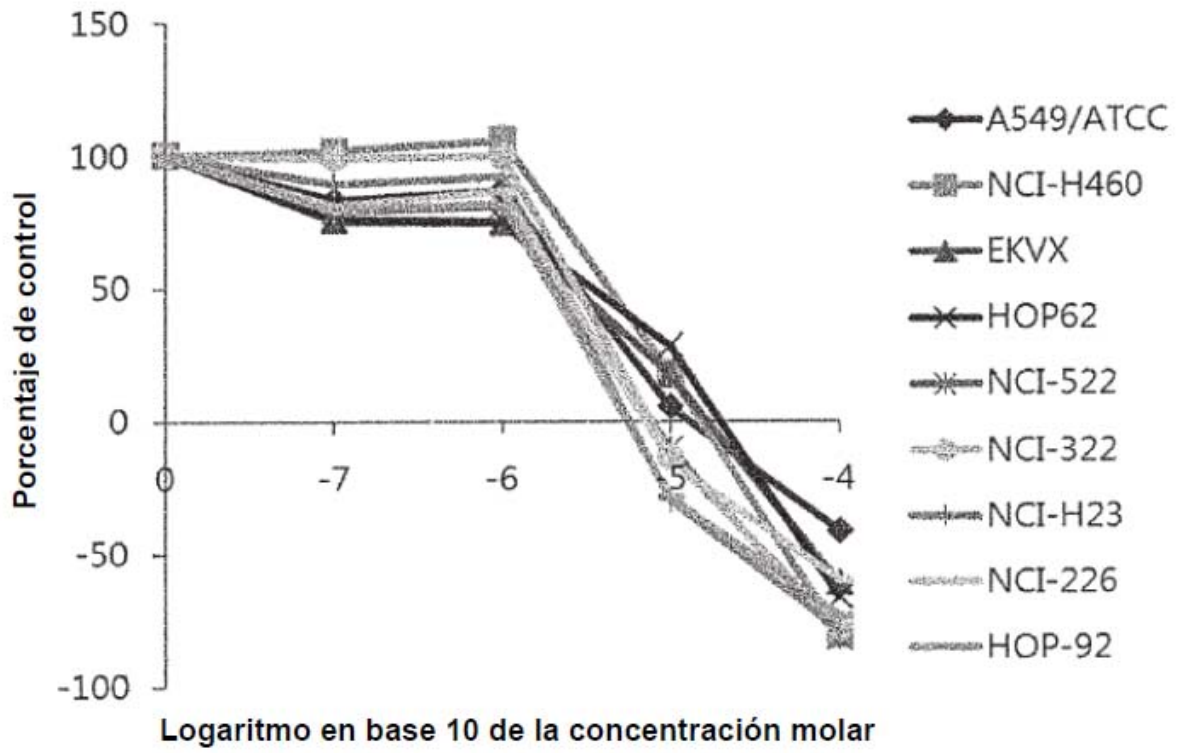


[Fig. 2]

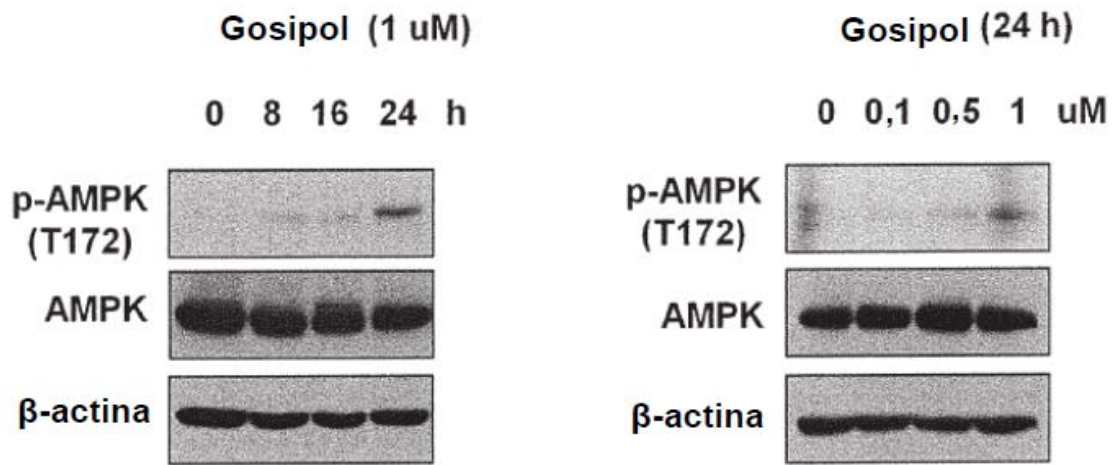


[Fig. 3]

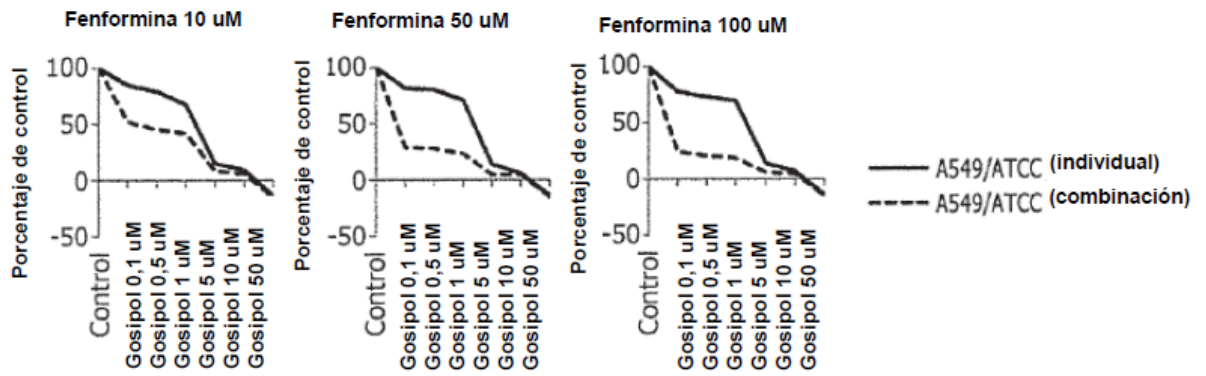
**Gospol**



[Fig. 4]

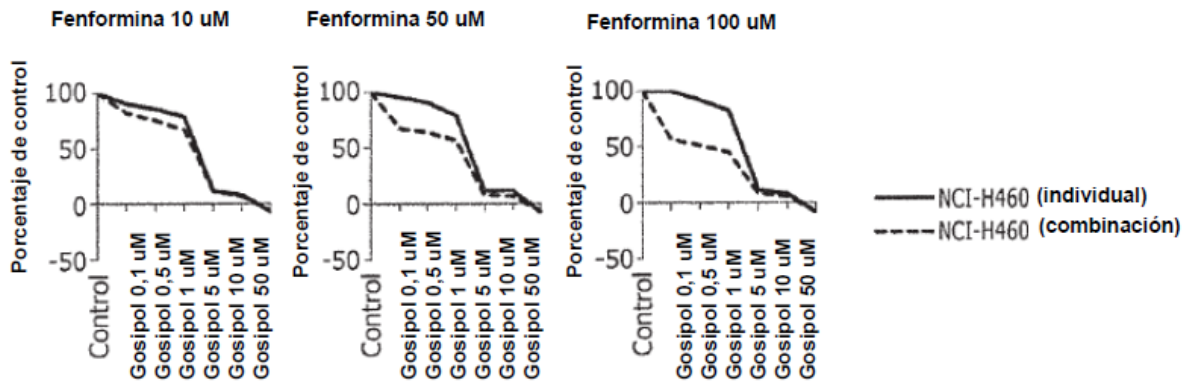


[Fig. 5]

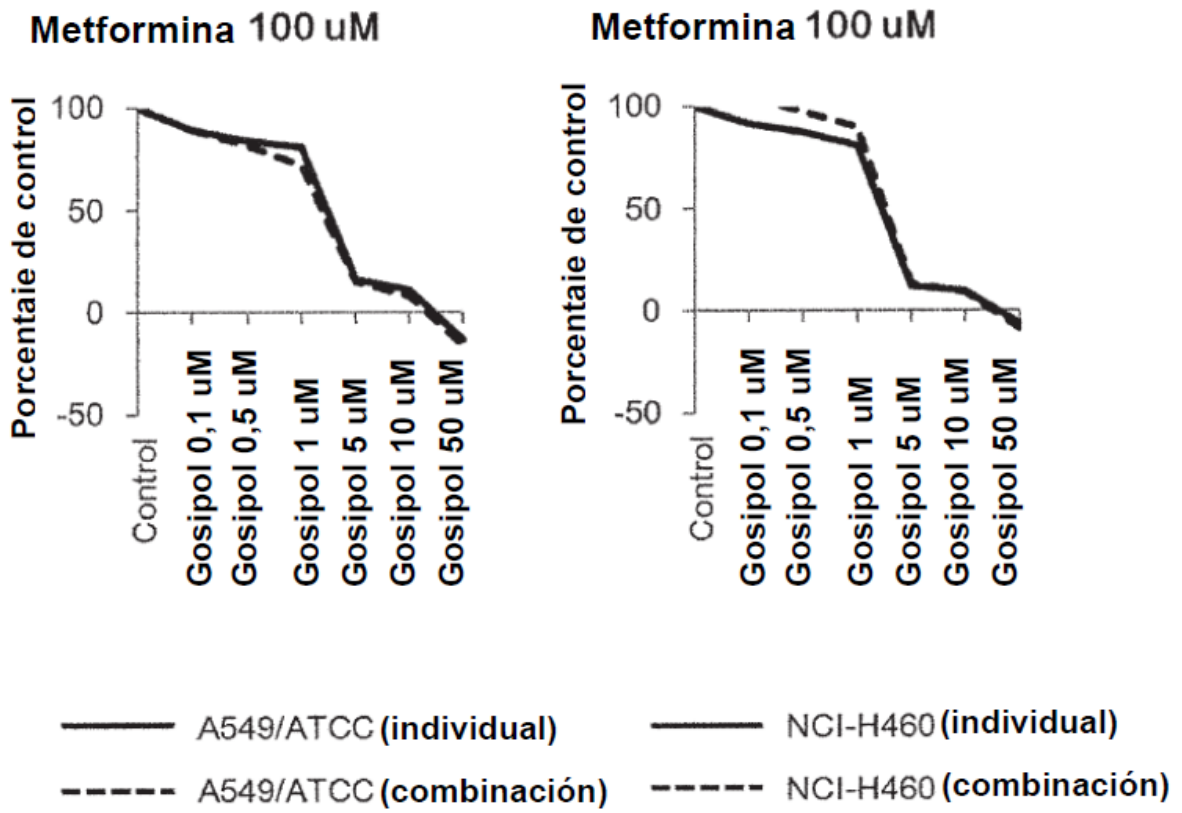




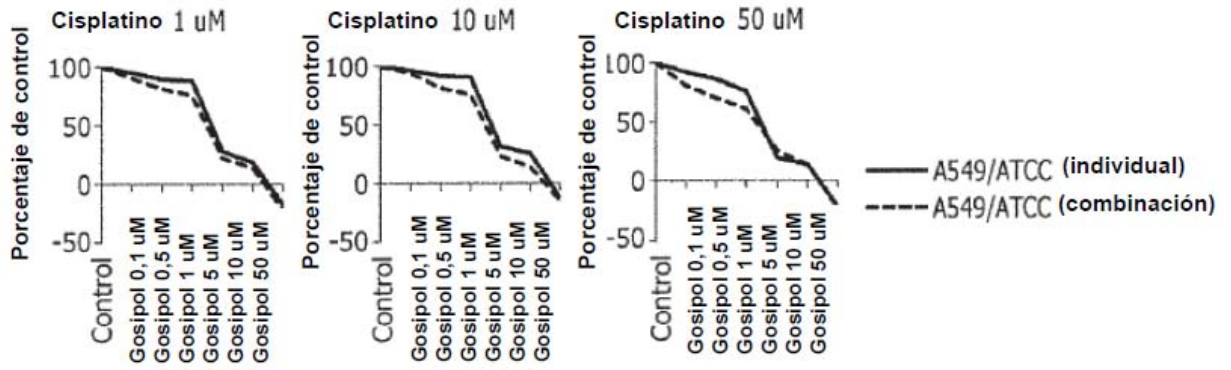
[Fig. 6]



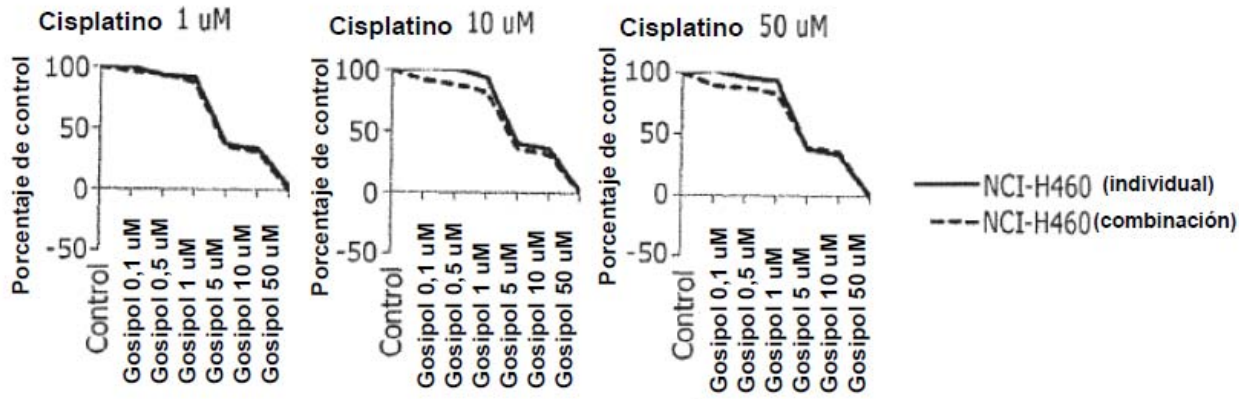
[Fig. 7]



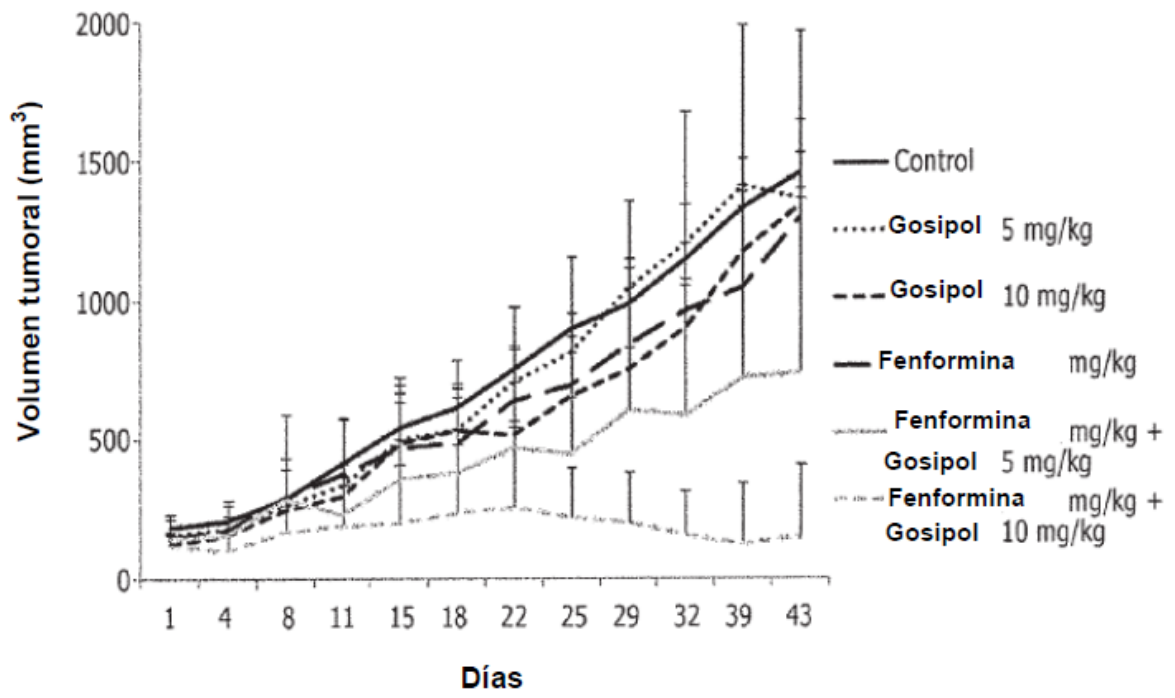
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

Grupo de control frente al grupo de combinación de 100 mg/kg de fenformina y 10 mg/kg de gosipol

