

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 493**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2015 PCT/KR2015/011436**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16068600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2015 E 15856097 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3213752**

54 Título: **Composición para el tratamiento de células madre cancerosas**

30 Prioridad:

29.10.2014 KR 20140147972

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

19.02.2020

73 Titular/es:

**HAIMBIO CO., LTD. (100.0%)
Korea University Research and Business
Building, Room 703-2, Anam-dong 5 ga, 145
Anamro, Seongbuk-gu
Seoul 02841, KR**

72 Inventor/es:

**CHEONG, JAE HO;
PARK, EUN SUNG y
PARK, KI CHEONG**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 743 493 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para el tratamiento de células madre cancerosas.

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a una composición para el tratamiento de células madre cancerosas, que contiene un inhibidor de la captación de glucosa y un inhibidor de la bomba de calcio.

[Antecedentes de la técnica]

10 Los fármacos contra el cáncer, que recientemente se han desarrollado activamente y se usan realmente en la terapia contra el cáncer, son principalmente fármacos dirigidos a las células cancerosas que proliferan rápidamente. En el caso de la terapia contra el cáncer que usa tales fármacos, parece que las células cancerosas se destruyen efectivamente en la etapa inicial, lo que sugiere que se trata el cáncer. Sin embargo, las células madre cancerosas que quedan en el cuerpo no se eliminan y, de este modo, la recurrencia del cáncer y/o la metástasis ocurren activamente. En última instancia, a menudo surgen problemas de resistencia a la terapia contra el cáncer existente. Por esta razón, las células madre cancerosas han sido recientemente de creciente interés. Se sabe que las células madre cancerosas son células cancerosas que tienen la capacidad de autorrenovarse ilimitadamente, como las células madre normales, y proliferan lentamente, a diferencia de las células cancerosas comunes, y también tienen la capacidad de autorrenovarse o diferenciarse, lo cual es característico de las células madre. Adicionalmente, se sabe que tales células madre cancerosas tienen mecanismos diferentes de los de las células cancerosas previamente conocidas. Sin embargo, los estudios sobre células madre cancerosas aún no se han llevado a cabo activamente y, en particular, hay pocos o ningún estudio sobre fármacos para tratar las células madre cancerosas, que se dirigen a las células madre cancerosas (Solicitud de Patente Coreana No. 10-2011-0066035),

15 De acuerdo con lo anterior, se espera que el desarrollo de una composición para el tratamiento de células madre cancerosas, que sea eficaz contra células madre cancerosas, pueda proporcionar un método terapéutico eficaz que pueda aumentar el efecto del tratamiento del cáncer y que pueda inhibir la recurrencia del cáncer y/o metástasis.

[Divulgación]

25 [Problema técnico]

La presente invención se ha realizado para resolver los problemas descritos anteriormente que se producen en la técnica anterior, y es un objeto de la presente invención proporcionar una composición para el tratamiento de células madre cancerosas, que contiene un inhibidor de la captación de glucosa y un inhibidor de la bomba de calcio.

30 Sin embargo, el objeto técnico que se logrará mediante la presente invención no se limita al objeto técnico anterior, y los otros objetos que no se mencionan anteriormente, se pueden entender claramente por los expertos en el arte a partir de la siguiente descripción.

[Solución técnica]

35 En lo que sigue, se describirán diversas realizaciones descritas en este documento con referencia a las figuras. En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos, tales como configuraciones, composiciones y procedimientos específicos, etc., con el fin de proporcionar una comprensión exhaustiva de la presente invención. Sin embargo, ciertas realizaciones se pueden practicar sin uno o más de estos detalles específicos, o en combinación con otros métodos y configuraciones conocidos. En otros casos, los procedimientos conocidos y las técnicas de preparación no se han descrito con particular detalle para no oscurecer innecesariamente la presente invención. La referencia a lo largo de esta especificación a "una realización" o "una realización" significa que una característica, configuración, composición o característica particular descrita en relación con la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. De este modo, los aspectos de la frase "en una realización" o "una realización" en diversos lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización de la presente invención. Además, las características, configuraciones, composiciones o características particulares se pueden combinar de cualquier manera apropiada en una o más realizaciones.

45 Como se usa en este documento, el término "células madre cancerosas" se refiere integralmente a las células cancerosas que tienen la capacidad de autorrenovarse o diferenciarse, lo cual es característico de las células madre. Las células madre cancerosas pueden proliferar a un ritmo lento, a diferencia de las células cancerosas comunes, bajo una condición de crecimiento tumoral normal (que se refiere a una situación en la que los nutrientes esenciales (glucosa) para el crecimiento celular son suficientes y las condiciones del microambiente tumoral son abundantes para que no haya estrés celular), o puede mantenerse en un estado latente, y de este modo puede tener resistencia a los fármacos contra el cáncer. Por ejemplo, en las células madre cancerosas, la expresión de reguladores transcripcionales tal como PGC-1 α se puede regular, a diferencia de las células tumorales comunes, y de este modo la función de los principales reguladores metabólicos puede diferir de la de las células cancerosas comunes. A través de esta capacidad reguladora metabólica diferente y la regulación de los sistemas de señalización conectados mecánicamente a la misma, las células madre cancerosas adquieren resistencia a la apoptosis bajo privación de

nutrientes y tienen la capacidad de invadir y/o hacer metástasis. Sin embargo, las células madre cancerosas no están limitadas a estas, siempre que se puedan diferenciar en células cancerosas comunes.

5 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células madre cancerosas o tratar células madre cancerosas, que contiene, como ingredientes activos, un inhibidor de la captación de glucosa y un inhibidor de la bomba de calcio.

10 En una realización de la presente invención, el inhibidor de la captación de glucosa es preferiblemente un derivado de glucosa, y más preferiblemente 2-desoxiglucosa (2DG), pero no está limitado a este, siempre que sea un compuesto que inhiba la captación de glucosa (que es una fuente de energía para las células) para inducir la privación de nutrientes y/o el agotamiento de la energía metabólica asociado al estrés del retículo endoplásmico para inhibir así el crecimiento celular e inducir la expresión de la Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en las células madre cancerosas. Como se usa en este documento, el término "derivado de glucosa" significa un compuesto que se obtiene modificando una porción de glucosa y que actúa de manera competitiva con la glucosa normal para inhibir la captación de glucosa.

15 En otra realización de la presente invención, el inhibidor de la bomba de calcio es preferiblemente un inhibidor de la Ca^{2+} ATPasa (PMCA) de la membrana plasmática, un inhibidor de la quinasa-2-alfa dependiente de calmodulina/ Ca^{2+} (CaMK-2 α), o similares. Más preferiblemente, el inhibidor de la bomba de calcio puede ser caloxina, nifedipino, KN62 (1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina), un ARNip que se une específicamente a CaMK-2 α , o similares, pero no se limita a la misma, siempre que sea una sustancia capaz de inhibir la capacidad de las células madre cancerosas para controlar la concentración de calcio intracelular. Como se
20 usa en este documento, el término "inhibidor de PMCA" se refiere a una sustancia capaz de inhibir la actividad de PMCA para inhibir la liberación extracelular de calcio.

25 En aún otra realización de la presente invención, la composición puede contener además un compuesto basado en biguanida. El compuesto basado en biguanida es preferiblemente un fármaco basado en biguanida para tratar la diabetes. Más preferiblemente, el compuesto basado en biguanida puede ser metformina, fenformina, buformina o similares, pero no está limitado a este, siempre que sea un compuesto basado en biguanida que interfiera con la producción de energía intracelular para inducir una deficiencia de nutrientes similar a estado.

30 En aún otra realización de la presente invención, el cáncer puede ser preferiblemente cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer gástrico, cáncer de cerebro, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de sangre, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de hígado o similares. Más preferiblemente, el cáncer puede ser cáncer de mama, pero no está limitado a él siempre que sea cáncer cuya progresión (tal como la diferenciación y/o crecimiento tumoral) depende de las células madre cancerosas descritas en la presente invención.

35 La composición farmacéutica para tratar células madre cancerosas también se puede administrar en combinación con otros fármacos contra el cáncer para tratar eficazmente no solo células madre cancerosas, sino también células cancerosas normales. Además, la composición farmacéutica también se puede usar como una composición farmacéutica para inhibir la recurrencia del cáncer o la metástasis.

40 En la presente invención, la composición farmacéutica puede estar en forma de cápsula, comprimido, gránulo, solución inyectable, pomada, polvo o bebida, y se puede administrar a un sujeto humano. Para su uso, la composición farmacéutica se puede preparar como formulaciones orales, que incluyen polvos, gránulos, cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas y similares, supositorios para uso externo y soluciones inyectables estériles, según los métodos convencionales respectivamente, pero no se limita a los mismos. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un portador farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir uno o más aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, excipientes, agentes solubilizantes, agentes dispersantes, estabilizantes, agentes de suspensión, pigmentos,
45 fragancias y similares. Para inyección, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir una o más soluciones reguladoras, conservantes, agentes para aliviar el dolor, agentes solubilizantes, agentes isotónicos, estabilizantes y similares. Para la administración local, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir una o más bases, excipientes, lubricantes, conservantes y similares. La composición farmacéutica según la presente invención se puede mezclar con los portadores farmacéuticamente aceptables como se describe anteriormente para proporcionar
50 diversas formulaciones. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar en forma de comprimido, pastilla, cápsula, elixir, suspensión, jarabe, oblea o similares, y para inyección, la composición farmacéutica se puede preparar en la forma de ampollas de dosificación unitaria o recipientes de dosificación múltiple. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar como soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o similares.

55 Mientras tanto, los ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes, que son apropiados para la formulación, incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral, o

similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener además uno o más rellenos, anticoagulantes, lubricantes, agentes humectantes, fragancias, emulsionantes, conservantes y similares.

Las rutas para la administración de la composición farmacéutica según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ruta oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intracardiaca, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, intestinal, intrarrectal, local, sublingual e intrarrectal. Se prefiere la administración oral o parenteral. Como se usa en este documento, el término "parenteral" se entiende que incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrabursal, intestinal, intratecal, intralesional e intracraneal. La composición farmacéutica de la presente invención también se puede administrar en forma de supositorios para administración rectal.

La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de la actividad de un compuesto particular usado, la edad del paciente, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de una enfermedad particular que se debe prevenir o tratar. La composición farmacéutica se puede administrar a una dosis de 0.0001-50 mg/kg/día o 0.001-50 mg/kg/día, dependiendo de la condición del paciente, el peso corporal, la gravedad de la enfermedad, la forma del fármaco, la ruta de administración y el período de administración. La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar una o varias veces al día. La dosis no limita el alcance de la presente invención de ninguna manera. La composición farmacéutica según la presente invención se puede formular como píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas o suspensiones.

[Efectos ventajosos]

La composición para el tratamiento de células madre cancerosas según la presente invención contiene un inhibidor de la captación de glucosa y un inhibidor de la bomba de calcio. La composición de la presente invención contiene el inhibidor de la captación de glucosa y un fármaco a base de biguanida, que inducen la privación de nutrientes y un estrés del retículo endoplásmico asociado al agotamiento de la energía metabólica para inducir así la expresión de la Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en células madre cancerosas. Adicionalmente, la composición de la presente invención también contiene el inhibidor de la bomba de calcio que puede reducir la resistencia de las células madre cancerosas a la apoptosis asociada al Ca^{2+} para inducir así la muerte de las células madre cancerosas, lo que sugiere que la composición se puede usar como un agente eficaz para tratar las células madre cancerosas. De acuerdo con lo anterior, se espera que la composición de la presente invención pueda tratar eficazmente diversas células madre cancerosas para inhibir así la recurrencia del cáncer y/o metástasis.

[Descripción de los dibujos]

La figura 1 muestra los resultados de determinar las viabilidades de las líneas celulares s-MDA-MB-231 y s-MCF-7 bajo privación de la glucosa por tinción con violeta cristalino según un ejemplo de la presente invención.

La figura 2 muestra los resultados de determinar las viabilidades de las líneas celulares s-MDA-MB-231 y s-MCF-7 bajo privación de la glucosa mediante un ensayo MTT según un ejemplo de la presente invención.

La figura 3 muestra los resultados de un ensayo TUNEL realizado según un ejemplo de la presente invención.

La figura 4 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia realizado según un ejemplo de la presente invención.

La figura 5 muestra los resultados del análisis del ciclo celular realizado según un ejemplo de la presente invención.

La figura 6 muestra los resultados del análisis del nivel de Ca^{2+} intracelular según un ejemplo de la presente invención.

La figura 7 muestra los resultados del análisis del nivel de expresión de CaMK-2 α según un ejemplo de la presente invención.

La figura 8 muestra los resultados del análisis de los niveles de Ca^{2+} intracelular en líneas celulares, en el que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , según un ejemplo de la presente invención.

La figura 9 muestra los resultados de un ensayo TUNEL en líneas celulares en las que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , según un ejemplo de la presente invención.

La figura 10 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de líneas celulares en las que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , según un ejemplo de la presente invención.

La figura 11 muestra los resultados del análisis del ciclo celular de líneas celulares en las que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , según un ejemplo de la presente invención.

- La figura 12 muestra los resultados del análisis de la relación entre PGC-1 α y CaMK-2 α según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 13 muestra los resultados de determinar los niveles de Ca²⁺ intracelular en líneas celulares, en las que se inhibió la expresión de PGC-1 α , según un ejemplo de la presente invención.
- 5 La figura 14 muestra los resultados del análisis de la relación de unión entre PGC-1 α y PMCA1 por EMSA según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 15 muestra los resultados del análisis de la relación de unión entre PGC-1 α y PMCA2 por EMSA según un ejemplo de la presente invención.
- 10 La figura 16 muestra los resultados del análisis del nivel de expresión de PMCA bajo privación de nutrientes según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 17 muestra los resultados del análisis del nivel de expresión de PMCA en líneas celulares, en el que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 18 muestra los resultados del análisis del efecto de un inhibidor de la bomba de calcio según un ejemplo de la presente invención.
- 15 La figura 19 muestra los resultados del análisis de la expresión de proteínas en modelos animales con cáncer de mama mediante tinción inmunohistoquímica según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 20 muestra los resultados del análisis del efecto de la coadministración a modelos animales con cáncer de mama mediante tinción inmunohistoquímica según un ejemplo de la presente invención.
- 20 La figura 21 muestra los resultados del análisis de la diferencia en la expresión génica entre las células cancerosas y las células madre cancerosas según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 22 muestra los resultados del análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas relacionadas con la regulación de calcio en células cancerosas y células madre cancerosas según un ejemplo de la presente invención.
- 25 La figura 23 es una vista esquemática que muestra esquemáticamente el mecanismo regulador de iones de calcio de las células madre cancerosas según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 24 muestra los cambios dependientes del tiempo en los mecanismos de señalización CaMK-2 α , medidos según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 25 muestra los resultados de analizar el papel de pNF-kB según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 26 muestra los resultados de un ensayo TUNEL realizado según un ejemplo de la presente invención.
- 30 La figura 27 muestra los resultados del análisis de transferencia Western realizado según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 28 muestra los resultados de determinar la viabilidad celular según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 29 muestra los resultados de examinar el crecimiento tumoral en modelos animales basados en células madre de cáncer según un ejemplo de la presente invención.
- 35 La figura 30 muestra los resultados del análisis de los niveles de expresión de proteínas en modelos animales basados en células madre cancerosas según un ejemplo de la presente invención.
- La figura 31 muestra los resultados del análisis de los niveles de expresión de proteínas en modelos animales basados en células madre cancerosas según un ejemplo de la presente invención.
- [Mejor modo]
- 40 En lo que sigue, la presente invención se describirá con más detalle. Será evidente para los expertos en el arte que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.
- Ejemplo 1: Producción de células madre cancerosas
- 45 Para producir las células madre cancerosas, se indujo la privación de nutrientes a largo plazo de p-MDA-MB-231 y p-MCF-7, que son las células parentales de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 (líneas celulares de cáncer de mama), respectivamente, y las células sobrevivientes (s-MDA-MB-231 y s-MCF-7) que evitaban la apoptosis bajo privación de nutrientes se seleccionaron y verificaron mediante análisis de características biológicas específicas para

células madre de cáncer normales, produciendo así células madre cancerosas. Para identificar el mecanismo de las células madre cancerosas y desarrollar un agente terapéutico capaz de inhibir las células madre cancerosas, se transfeció un vector shPGC-1 α pGFP-V-RS (Origene) en cada uno de las líneas celulares s-MDA-MB-231 y s-MCF-7 para producir así sshPGC-1 α -MDA-MB-231 y s-shPGC-1 α -MCF-7, que son células madre que expresan shPGC-1 α de manera estable. Las líneas celulares producidas se usaron en el experimento. Cada una de las líneas celulares se cultivó en medio RPMI-1640 que contenía 10% de suero fetal bovino (FBS).

Ejemplo 2: Determinación de la viabilidad de células madre cancerosas bajo privación de la glucosa

Para comparar las viabilidades de las células cancerosas y las células madre cancerosas bajo privación de la glucosa, cada una de las líneas celulares p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231 y s-MCF-7, preparadas de la misma manera que se describe en el ejemplo 1, se añadió a una placa de 96 pocillos a una concentración de 5×10^3 células/100 μ L y se cultivaron hasta una confluencia de aproximadamente 70%, y luego el medio se reemplazó con un medio privado de glucosa en RPMI-1640 que contiene FBS al 10%, y las células se cultivaron adicionalmente durante 3 días. En cada una de 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas, la viabilidad de cada una de las líneas celulares se determinó mediante tinción con cristal violeta y un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Los resultados de la tinción violeta cristal se muestran en la figura 1, y los resultados del ensayo MTT se muestran en la figura 2

Como se muestra en la figura 1, las células unidas a la superficie de la placa de cultivo se contaron mediante tinción con cristal violeta y, como resultado, se demostró que las líneas de células madre cancerosas (s-MDA-MB-231 y s-MCF-7) mostraron significativamente altas viabilidades en comparación con las líneas celulares parentales (p-MDA-MB-231 y p-MCF-7).

Adicionalmente, como se muestra en la figura 2, en la fase temprana de cultivo (después de 12 horas de cultivo), no hubo diferencias significativas en la viabilidad celular entre las células madre cancerosas y las células cancerosas normales; sin embargo, a medida que avanzaba hacia la fase tardía del cultivo (después de 48 horas de cultivo), hubo una diferencia significativa en la viabilidad celular entre las células madre cancerosas y las células cancerosas normales. En particular, en el caso de la línea celular s-MDA-MB231, se demostró que la diferencia en la viabilidad celular entre las células cancerosas y las células madre cancerosas era del 40% o más.

A través de los resultados anteriores, se encontró que las células madre cancerosas mostraron una alta viabilidad en comparación con las células cancerosas normales bajo privación de la glucosa (esto es, privación de nutrientes), lo que sugiere que las células madre cancerosas tienen una alta resistencia a la privación de nutrientes (esto es, privación de energía).

Ejemplo 3: Análisis de células madre cancerígenas de resistencia apoptótica

3.1: ensayo TUNEL

Para examinar si la razón por la cual las células madre cancerosas muestran una alta viabilidad bajo privación de nutrientes se debe a su resistencia a la apoptosis, cada una de las líneas celulares p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231 y s-MCF-7, cultivadas bajo privación de la glucosa durante 40 horas de la misma manera que se describe en el ejemplo 2, se recogieron y se sometieron a un ensayo TUNEL. En el ensayo TUNEL, las células recolectadas se fijaron con solución de paraformaldehído al 4%, durante 48 horas, y luego se tiñeron usando un kit de etiquetado de extremo libre terminal por desoxinucleotidil transferasa dUTP (TUNEL) según el protocolo del fabricante, y se obtuvieron las imágenes de fluorescencia de las células con un microscopio de fluorescencia y se analizaron con el programa de software Zeiss LSM Image Browser. Los resultados se muestran en la figura 3.

Como se muestra en la figura 3, en las líneas celulares de cáncer normales (p-MDA-MB-231 y p-MCF-7), se observó fragmentación de ADN causada por apoptosis en un gran número de células; sin embargo, en las líneas de células madre cancerosas (s-MDA-MB-231 y s-MCF-7), se observó fragmentación del ADN en un número menor de células. Esto sugiere que las células madre cancerosas tuvieron resistencia a la apoptosis inducida por la privación de nutrientes y mostraron una alta viabilidad incluso bajo la privación de nutrientes.

3.2: Análisis de inmunotransferencia (transferencia Western)

Para examinar si las proteínas relacionadas con la apoptosis están implicadas en la resistencia apoptótica, que es la razón por la cual las células madre cancerosas muestran una alta viabilidad bajo privación de nutrientes, cada una de las líneas celulares p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231 y s-MCF-7, cultivadas bajo privación de la glucosa durante 40 horas de la misma manera que se describe en el ejemplo 2, se recogieron y se sometieron a análisis de inmunotransferencia. Las células recolectadas se lavaron dos veces con solución reguladora PBS enfriada (solución salina regulada con fosfato) y se lisaron con solución reguladora RIPA para aislar la proteína. Para el siguiente experimento, la cantidad de proteína aislada se midió mediante un ensayo de BCA. Se sometieron a electroforesis 20 μ g de la proteína obtenida de cada una de las líneas celulares en gel de SDS-poliacrilamida al 8-10% y se transfirieron a una membrana de PVDF usando electricidad. Las membranas de PVDF transferidas con proteínas se trataron con leche descremada al 5% a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se incubaron con un

anticuerpo primario contra cada una de caspasa-3, caspasa-7, Bcl-2 y beta-actina (control) a 4°C, durante 16 horas. Las membranas de PVDP incubadas con los anticuerpos se lavaron tres veces con solución reguladora TBST para eliminar los anticuerpos primarios no unidos, y se incubaron adicionalmente con anticuerpos secundarios conjugados con HPR a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez completada la incubación, las membranas se lavaron con solución reguladora TBST para eliminar completamente los anticuerpos secundarios, y se trataron con solución reguladora ECL y se incubaron durante 3 minutos, seguido de exposición a la película Kodak X-OMAT AR. Los resultados se muestran en la figura 4.

Como se muestra en la figura 4, en la línea celular s-MDA-MB231, se redujeron los niveles de caspasa activada (forma escindida) 3 y 7, y en s-MCF-7, se redujeron los niveles de caspasa escindida 7 y 9. Tales resultados sugieren que, en las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes, las expresiones de caspasas, conocidas como marcadores de apoptosis, y p62 y LC3B, que son sustancias relacionadas con la muerte celular autofágica, disminuyeron, pero la expresión de Bcl-2 conocida como el marcador antiapoptosis aumentó, de modo que aumentó la viabilidad de las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes.

3.3: Análisis del ciclo celular

Para examinar si la apoptosis de las células madre cancerosas se indujo bajo privación de nutrientes, cada una de las líneas celulares p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231 y s-MCF-7, cultivadas bajo privación de la glucosa durante 12 horas (fase temprana) y 40 horas (fase tardía) de la misma manera que se describe en el ejemplo 2, y se recogieron y sometieron a análisis del ciclo celular. Las células recolectadas se fijaron con etanol al 70% y luego se incubaron en una solución reguladora de PBS que contenía 40 µg/mL de yoduro de propidio (PI) y 100 µg/mL de RNasa durante 30 minutos para teñir el ADN total. El análisis del ciclo celular de las células teñidas se realizó usando un citómetro de flujo FACS Calibur. Las proporciones de las células en la etapa G0/G1, la etapa S y las etapas G2/M se midieron usando el programa de software FACS y ADN (FlowJo). Los resultados se muestran en la figura 5.

Como se muestra en la figura 5, en la fase inicial, no hubo cambios significativos dependientes del ciclo celular en las células madre normales y las células madre cancerosas; sin embargo, en la fase tardía, el número de células madre cancerosas en la etapa sub-G0/G1 disminuyó significativamente. Tales resultados sugieren que la apoptosis de las células cancerosas normales en la etapa tardía bajo privación de nutrientes aumentó, mientras que la apoptosis de las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes disminuyó.

A partir de los resultados descritos anteriormente, se pudo ver que las células madre cancerosas tenían resistencia a la apoptosis (antiapoptosis) bajo privación de nutrientes, a diferencia de las células madre normales, y de este modo mostraron una alta viabilidad incluso bajo privación de nutrientes.

Ejemplo 4: Examen de la causa de la resistencia apoptótica de las células madre cancerosas

4.1: Medición del nivel de Ca²⁺ intracelular

En el caso de muchas células que sufren apoptosis, la concentración de calcio intracelular no se mantiene, porque surgen eventos en los que Ca²⁺ se libera del retículo endoplásmico al citosol o en el que Ca²⁺ fluye hacia las células a través de la membrana plasmática. De este modo, para examinar si la migración de Ca²⁺ también se produce en células madre cancerosas, las líneas celulares bajo derivación de nutrientes se prepararon de la misma manera que se describe en el ejemplo 3, el nivel de Ca²⁺ intracelular se midió usando fura-2-AM, que es un calcio indicador. Los resultados se muestran en la figura 6.

Como se muestra en la figura 6, en la fase temprana, no hubo diferencias significativas en el nivel de Ca²⁺ intracelular entre las células cancerosas normales y las células madre cancerosas; sin embargo, en la fase tardía, el nivel de Ca²⁺ intracelular en las células madre cancerosas fue mayor que el de las células cancerosas normales.

4.2: Análisis del nivel de expresión de CaMK-2α (quinasa-2-alfa dependiente de calmodulina/Ca²⁺)

Para examinar la razón por la cual el nivel de Ca²⁺ intracelular en las células madre cancerosas es mayor que el de las células cancerosas normales, el nivel de expresión de CaMK-2α se analizó mediante transferencia Western. La transferencia Western se realizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 3.2. Los resultados se muestran en la figura 7.

Como se muestra en la figura 7, tanto en las fases temprana como en la tardía, aumentó el nivel de expresión de CaMK-2α en las células madre cancerosas. A partir de tales resultados, se pudo ver que el nivel de expresión de CaMK-2α en las células madre cancerosas aumentó de modo que el nivel de Ca²⁺ liberado del retículo endoplásmico a las células bajo privación de nutrientes y estrés energético metabólico se controlaría a un nivel de control, y de este modo las células madre cancerosas tuvieron resistencia a la apoptosis.

4.3: Examen del efecto de la inhibición de la expresión de CaMK-2α (quinasa-2-alfa dependiente de calmodulina/Ca²⁺)

5 Para examinar un efecto que se obtiene cuando la expresión de CaMK-2 α en las células madre cancerosas, el ARNip de CaMK-2 α adquirido de Bioneer (Corea) se transfectó en cada línea celular, produciendo así células madre cancerosas en las que se expresó la expresión de CaMK-2 α . Adicionalmente, el nivel de expresión de CaMK-2 α y el nivel de Ca²⁺ intracelular se midieron de la misma manera que se describe en los ejemplos 4. 1 y 4.2. Los resultados se muestran en la figura 8.

Como se muestra en la figura 8, en las células madre cancerosas en las que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , el nivel de Ca²⁺ no se redujo. Este resultado sugiere que la expresión de CaMK-2 α en las células madre cancerosas juega un papel importante en el mantenimiento del nivel de Ca²⁺ intracelular.

10 Además, usando las células madre cancerosas en las que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , se realizó un ensayo TUNEL, análisis de inmunotransferencia y análisis del ciclo celular de la misma manera que se describe en el ejemplo 3. Los resultados de los análisis se muestran en las figuras 9 a 11, respectivamente.

15 Como se muestra en la figura 9, las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes generalmente mostraron resistencia a la apoptosis; sin embargo, en el caso de las células madre cancerosas en las que se inhibió la expresión de CaMK-2 α usando ARNip, se indujo la apoptosis para inducir la fragmentación del ADN, como en el caso de las células cancerosas normales.

20 Como se muestra en la figura 10, en el caso de las células madre cancerosas en las que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , los niveles de caspasas escindidas aumentaron nuevamente bajo privación de nutrientes y el nivel de expresión de Bcl-2 disminuyó, como el caso de las células cancerosas normales. Además, se demostró que los niveles de AKT fosforilado (pAKT), I κ B fosforilado (p I κ B) y NF- κ B fosforilado (p NF- κ B) disminuyeron y que IP3R (que es un canal de liberación de iones de calcio) aumentó.

Tales resultados sugieren que, cuando se inhibe la expresión de CaMK-2 α en las células madre cancerosas, disminuye la resistencia apoptótica de las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes y las células madre cancerosas muestran resultados similares a los de las células cancerosas normales.

25 Como se muestra en la figura 11, en el caso de las células madre cancerosas en las que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , la proporción de células en la etapa sub-G0/G1 de la fase tardía aumentó, como en las células madre normales, lo que sugiere que la apoptosis de las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes aumentó.

30 A partir de los resultados anteriores, se pudo ver que las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes tienen resistencia a la apoptosis mediada por Ca²⁺ al aumentar el nivel de expresión de CaMK-2 α para regular el nivel de Ca²⁺ intracelular a un nivel apropiado y que, cuando se inhibe la expresión de CaMK-2 α en las células madre cancerosas, las células madre cancerosas pierden su resistencia a la apoptosis.

4.4: Examen de la relación entre PGC-1 α (receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma) y CaMK-2 α

35 Para examinar si PGC-1 α cuya expresión se sabe que está regulada bajo privación de nutrientes tiene una relación con la resistencia a la apoptosis mediada por Ca²⁺, se transfectó un vector sh-PGC-1 α (Origene) en la línea celular s-MDA-MB-231, produciendo así una línea de células madre cancerosas en la cual se inhibió la expresión de PGC-1 α . El análisis de inmunotransferencia de la línea de células madre cancerosas producidas se realizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 3.2. Los resultados se muestran en la figura 12.

40 Se muestra A en la figura 12, en las células madre cancerosas en las que se inhibió la expresión de PGC-1 α , también se inhibió la expresión de CaMK-2 α en las fases temprana y tardía, y los niveles de expresión de Bcl-2, AKT fosforilado y NF- κ B fosforilado se redujeron bajo privación de nutrientes, como los de las células cancerosas normales. Además, se demostró que también se redujo el nivel de expresión de la proteína PMCA (Ca²⁺ ATPasa de membrana plasmática) implicada en la liberación extracelular de Ca²⁺ liberado del retículo endoplásmico.

45 A partir de los resultados anteriores, se encontró que los niveles de expresión de CaMK-2 α y PMCA en las células madre cancerosas, en las que se inhibía la expresión de PGC-1 α , estaban inhibidos. De este modo, para examinar si el nivel de Ca²⁺ intracelular cambia, el nivel de Ca²⁺ se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo 4.1. Los resultados se muestran en la figura 13.

Como se muestra en la figura 13, en la fase temprana de privación de nutrientes, no hubo diferencias significativas; sin embargo, en la fase tardía, el nivel de Ca²⁺ intracelular en las células madre cancerosas, en el que se produjo la expresión de PGC-1 α , aumentó y se produjo apoptosis de las células madre cancerosas.

50 Los resultados anteriores sugieren que el nivel de expresión de PGC-1 α en las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes aumenta para inducir la expresión de CaMK-2 α para mantener así el nivel de Ca²⁺ intracelular a un nivel apropiado para tienen resistencia a la apoptosis mediada por Ca²⁺, y que PGC-1 α juega un papel importante en el aumento de la viabilidad de las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes.

Ejemplo 5: Examen del papel de PGC-1 α en células madre cancerosas

5.1: Examen de la relación de unión entre PGC-1 α y PMCA1

Para examinar la relación de unión entre PGC-1 α y PMCA1, se realizó un ensayo EMSA usando un kit EMSA según el protocolo del fabricante. Como secuencia de unión (sonda), se usó "TTGACCTTTGGCCCA", que es la secuencia del sitio de unión del promotor de PMCA1. Los resultados se muestran en la figura 14.

Como se muestra en la figura 14, en las células madre cancerosas en la fase tardía, la unión entre HNF4 α , PGC-1 α y ADN (sonda) aumentó, mientras que la unión disminuyó en las células cancerosas normales o en las células madre cancerosas en las que la expresión de PGC-1 α fue inhibido. Tales resultados sugieren que, bajo privación de nutrientes, PGC-1 α se une a HNF4 α y se une a la región promotora de PMCA1 para regular así la expresión de PMCA1.

5.2: Examen de la relación de unión entre PGC-1 α y PMCA2

Para examinar la relación entre PGC-1 α y PMCA2, se realizó un ensayo EMSA usando un kit EMSA según el protocolo del fabricante. Como secuencia de unión (sonda), se usó "CTGGAAATACCCC", que es la secuencia del sitio de unión del promotor de PMCA2. Los resultados se muestran en la figura 15.

Como se muestra en la figura 15, en las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes, la unión entre NF-kB, PGC-1 α y ADN (sonda) aumentó, y cuando se añadió anti-p65 o anti-p50, que es un anticuerpo contra NF-kB, el anticuerpo se unió aún más para causar el superdesplazamiento. Tales resultados sugieren que, bajo privación de nutrientes, PGC-1 α se une a NF-kB y se une a la región promotora de PMCA2 para regular así la expresión de PMCA2.

5.3: Examen de la relación entre PMCA y privación de nutrientes

Para examinar el cambio en el nivel de expresión de PMCA bajo privación de nutrientes, cada línea celular bajo privación de nutrientes se cultivó de la misma manera que se describe en el ejemplo 2, y se realizó qRT-PCR en puntos de tiempo variables durante el período de cultivo. De las células recolectadas en cada punto de tiempo, se extrajo el ARN usando el RNeasy Mini Kit según el protocolo del fabricante. Usando 1 μ g del ARN extraído, se realizó qRT-PCR usando un kit de RT-PCR de una sola etapa. Las secuencias de cebador utilizadas se muestran en la tabla 1 a continuación. Los resultados se muestran en la figura 16. Adicionalmente, se realizó el mismo experimento descrito anteriormente usando la línea celular en la que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , y los resultados se muestran en la figura 17.

Tabla 1

Productos genéticos	Cebador hacia adelante	Cebador hacia atrás
PMCA1	TTTCCAACACTGCTTCTCTTC	GGTCCACAGATGCATTACGA
PMCA2	GTTTTAGGCACTTTTGTGGT	CTAATTCCTCCTCAGGTATT
PMCA3	AGGCCTGGCAGACAACACCA	TCCCACACCAGCTGCAGGAA
PMCA4	GAGCTTCCTGGATACCGATG	CTAGCTTGGCCACACTG
GAPDH	GGTAAGGTCGGAGTCAACGG	GAGGTCAATGAAGGGGTCATT G

Como se muestra en la figura 16, en la línea celular s-MDA-MB-231, los niveles de expresión de PMCA1 y PMCA2 aumentaron a medida que aumentó el tiempo de cultivo, y en la línea celular s-MCF-7, aumentaron los niveles de expresión de PMCA1, PMCA2 y PMCA4. Además, como se muestra en la figura 17, en la línea celular en la que se inhibió la expresión de CaMK-2 α , el nivel de expresión de PMCA bajo privación de nutrientes no aumentó, a diferencia del caso de las células madre cancerosas.

5.4: Examen del efecto de la inhibición de PMCA

Para examinar si la capacidad reguladora de la concentración de calcio de las células madre cancerosas cambia cuando se inhibe PMCA bajo privación de nutrientes, la actividad de PMCA y SERCA se inhibió usando caloxina (que es un inhibidor de la bomba de calcio) como inhibidor de PMCA que actúa como Ca²⁺-ATPasa (ATPasa de calcio) en la membrana plasmática y usa tapsigargina que es un inhibidor de SERCA (sarco/retículo endoplásmico

Ca²⁺-ATPasa) que actúa como Ca²⁺-ATPasa (ATPasa de calcio), y luego se midieron cambios en las concentraciones del Ca²⁺ extracelular de células madre cancerosas. Los resultados se muestran en la figura 18.

Como se muestra en la figura 18, cuando las células madre cancerosas se trataron con el inhibidor de la bomba de calcio caloxina, la concentración de calcio extracelular de las células madre cancerosas disminuyó, y la viabilidad de las células también disminuyó, como la de las células cancerosas normales. Sin embargo, se demostró que, cuando las células madre cancerosas se trataban con el inhibidor de SERCA tapsigargina, la concentración extracelular de calcio de las células madre cancerosas se mantenía en un nivel alto, y la viabilidad de las células también era alta. Tales resultados sugieren que cuando la actividad de PMCA es inhibida por el tratamiento con el inhibidor de la bomba de calcio, la viabilidad de las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes se puede reducir.

A partir de los resultados descritos anteriormente, se pudo ver que, en las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes y estrés del retículo endoplásmico asociado al agotamiento de la energía metabólica, la expresión de PGC-1 α aumenta para promover la expresión de CaMK-2 α , y las células madre cancerosas muestran resistencia a la apoptosis mediada por Ca²⁺ en la que Ca²⁺, actuando como coactivador de PMCA1 y PMCA2 para aumentar la expresión de la proteína PMCA y liberada del retículo endoplásmico en el citosol bajo privación de nutrientes, se libera extracelularmente como para acumularse en las mitocondrias para inducir así la apoptosis. Además, a partir de los resultados descritos anteriormente, se podría esperar que una combinación del inhibidor de la bomba de calcio con un método para inducir la privación de nutrientes, que generalmente se usa en la terapia contra el cáncer, se pueda usar como un método eficaz para tratar las células madre cancerosas.

Ejemplo 6: Identificación del método terapéutico eficaz contra las células madre cancerosas

6.1: Construcción de modelos animales

Para identificar un método terapéutico eficaz contra las células madre cancerosas, se construyeron modelos animales con cáncer de mama. Para la construcción de los modelos animales de cáncer de mama, cada una de las células de cáncer de mama (p-MDA-MB-231 y p-MCF-7) y las líneas de células madre de cáncer de mama (s-MDA-MB-231 y s-MCF-7) se cultivó in vitro, y las células cultivadas se inyectaron en el flanco superior izquierdo de ratones desnudos BALB/c de 5-6 semanas a una densidad de 1.0×10^7 células/ratón. Luego, los ratones se alojaron a 22°C bajo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad durante 7 días mientras se alimentaban con agua y alimento, construyendo así modelos animales con cáncer de mama.

6.2: inmunohistoquímica

Para examinar si las expresiones de PMCA1, PMCA2, PGC-1 α y CaMK-2 α en los modelos animales de cáncer de mama construidos de la misma manera que se describe en el ejemplo 6.1 se aumentarían, se realizó inmunohistoquímica. Específicamente, según los protocolos estándar de patología quirúrgica, se recolectó tejido canceroso de cada ratón y se fijó con formalina regulada neutra al 10% y se embebió en parafina. Luego, el tejido se seccionó a un grosor de 5 μ m, seguido de la eliminación de la parafina. El tejido seccionado se sometió a recuperación de antígeno en solución reguladora de citrato (pH 6) y se trató con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos, después de lo cual el tejido se trató con una dilución 1:100 de un anticuerpo monoclonal primario contra cada uno de PMCA1, PMCA2, PGC-1 α y CaMK-2 α . A continuación, el tejido se contratiñó con hematoxilina, y luego se secó y se observó. La porción manchada se cuantificó usando el software MetaMorph 4.6. Los resultados se muestran en la figura 19.

Como se muestra en la figura 19, las expresiones de PMCA1, PMCA2, PGC-1 α y CaMK-2 α en los modelos animales con cáncer de mama inyectados con las células madre cancerosas se incrementaron.

6.3: Identificación del método para tratar las células madre cancerosas

Los modelos animales de cáncer de mama, construidos de la misma manera que se describe en el ejemplo 6.1, se dividieron en diversos grupos, cada uno formado por 9 animales, y se inyectaron intraperitonealmente con una combinación de 500 mg/kg del inhibidor de la captación de glucosa 2- desoxiglucosa (2DG), 250 mg/kg de metformina a base de biguanida y 200 mg/kg de caloxina 2a1, una vez al día durante 45 días, y el diámetro horizontal (a) y el diámetro vertical (b) del cáncer se midieron diariamente usando calibradores, y el volumen del cáncer se determinó usando la siguiente ecuación: $4/3 \pi X B X (a \text{ cm } X b \text{ cm})^3 X 1/2$. Los resultados se muestran en la tabla 2 y la figura 20.

Tabla 2

Día	P231					S231				
	Control	2DG	2DG+caloxina	2DG+metformina	2DG+ metfor. +calox.	Control	2DG	2DG+caloxina	2DG+metformina	2DG+metfor. +calox.
7	210.6 ± 33	219.1 ± 35	210.5 ±24	210.7 ±28	213.7 ±22	210.5 ± 18	228.5 ± 23	218.7 ± 24	221.5 ± 26	222.4 ± 32
10	300.2 ± 38	302 ± 49	267.7 ± 22	224.4 ± 25	281.0 ± 25	277.3 ± 38	277.6 ± 21	248.7 ± 27	239.8 ± 30	261.0 ± 54
13	351.0 ± 28	337.6 ± 47	330.5 ± 39	239.4 ± 17	305.1 ± 25	481.2 ± 21	474.4 ± 31	472.6 ± 35	268.1 ± 34	274.0 ± 56
16	417.1 ± 34	388.6 ± 47	373.1 ±36	259.0 ± 19	331.6 ± 44	594.6 ± 33	539.2 ± 33	534.0 ± 28	307.0 ± 47	305.5 ± 62
19	559.8 ± 38	440.7 ± 45	442.5 ± 53	296.4 ± 30	375.2 ± 57	743.0 ± 55	638.2 ± 49	544.4 ± 29	360.4 ± 67	361.4 ± 60
22	751.7 ± 60	513.4 ± 46	492.6 ± 59	332.6 ± 44	452.3 ± 64	878.2 ± 80	777.0 ± 35	597.2 ± 73	440.5 ± 85	450.5 ± 57
25	904.1 ± 96	621.4 ± 50	565.3 ± 84	399.2 ± 56	467.6 ± 66	1098.7 ± 98	911.6 ± 35	631.2 ± 93	544.2 ± 103	468.3 ± 60
28	1088.6 ± 87	834.4 ± 48	659.6 ± 126	484.3 ± 75	482.2 ± 74	1393.0 ± 97	1077.4 ± 68	655.6 ± 101	678.2 ± 130	496.3 ± 56
31	1390.7 ± 56	1142.7 ± 50	707.8 ± 145	594.7 ± 102	490.0 ± 62	1896.8 ± 101	1290.6 ± 72	681.4 ± 101	816.5 ± 150	496.7 ± 56
34	1791.3 ± 52	1547.4 ± 57	733.1 ± 177	714.8 ± 129	479.1 ± 57	2609.7 ± 106	1722.1 ± 69	723.6 ± 112	1066.0 ± 179	485.6 ± 54
37	2223.2 ± 85	1944.2 ± 64	767.8 ± 187	865.1 ± 160	463.2 ± 56	3403.7 ± 96	2471.7 ± 81	829.5 ± 70	1448.0 ± 260	468.3 ± 59
40	2704.1 ± 102	2359.0 ± 48	855.1 ± 240	1052.4 ± 169	482.1 ± 60	4118.2 ± 506	3173.2 ± 105	927.2 ± 58	1805.5 ± 363	484.2 ± 57
43	3425.1 ± 152	2866.1 ± 45	953.6 ± 228	1278.8 ± 175	535.2 ± 41	5265.3 ± 445	4065.2 ± 119	1074.7 ± 85	2278.3 ± 527	536.2 ± 38

- Como se muestra en la tabla 2 anterior y la figura 20, cuando se comparó el volumen del tumor entre las células cancerosas normales y las células madre cancerosas, se demostró que el crecimiento tumoral en el caso de las células madre cancerosas era significativamente rápido. Adicionalmente, en el caso en que las células madre cancerosas se trataron solo con 2-desoxiglucosa, el volumen del tumor disminuyó ligeramente en comparación con el del grupo control. En el caso en que las células madre cancerosas se trataron con una combinación de 2-desoxiglucosa y metformina, el volumen del tumor disminuyó ligeramente, pero en el caso en que las células madre cancerosas se trataron con una combinación de 2-desoxiglucosa y caloxina, el volumen tumoral disminuyó 5 veces o más. Además, en el caso en que las células madre cancerosas se trataron con una combinación de 2-desoxiglucosa, caloxina y metformina, las células madre cancerosas no crecieron sustancialmente.
- Los resultados anteriores sugieren que el uso del inhibidor de la captación de glucosa y el fármaco a base de biguanida induce la privación de nutrientes y el estrés del retículo endoplásmico asociado al agotamiento de la energía metabólica en las células madre cancerosas para inducir así la expresión de PMCA en las células madre cancerosas. y que la administración del inhibidor de la bomba de calcio en combinación con el inhibidor de la captación de glucosa y el fármaco a base de biguanida reduce la resistencia de las células madre cancerosas a la apoptosis mediada por Ca^{2+} para inducir así la apoptosis de las células madre cancerosas, lo que indica que puede proporcionar un método de tratamiento eficaz específico para células madre cancerosas. De acuerdo con lo anterior, se podría encontrar que el uso del inhibidor de la captación de glucosa y el fármaco a base de biguanida en combinación con el inhibidor de la bomba de calcio puede inhibir eficazmente la recurrencia y/o metástasis del cáncer mediado por células madre cancerosas, que es la limitación de los fármacos contra el cáncer convencionales.

Ejemplo 7: Examen del mecanismo de supervivencia de células madre cancerosas

7.1: Examen de la diferencia en la expresión génica entre células cancerosas y células madre cancerosas

- Para examinar el mecanismo de supervivencia de las células madre cancerosas, se recogieron cada una de las líneas celulares p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDAMB-231 y s-MCF-7, cultivadas bajo privación de la glucosa, durante 40 horas de la misma manera que se describe en el ejemplo 2, y se extrajo ARN de las células recolectadas de la misma manera que se describe en el ejemplo 5.3 y se sometió a análisis de micromatriz. Los resultados se muestran en la figura 21.

Como se muestra en la figura 21, el gen SERCA2 que actúa como Ca^{2+} -ATPasa (ATPasa de calcio) aumentó significativamente en las células madre cancerosas.

- Además, para examinar la diferencia en la expresión de genes reguladores de calcio, la transferencia Western se realizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 3.2. Los resultados se muestran en la figura 22. Como se muestra en la figura 22, en las células madre cancerosas, la expresión de SERCA2 aumentó, mientras que la expresión de IP3R disminuyó. En general, se sabe que, en las células bajo privación de la glucosa, los iones de calcio se liberan en el citosol a través del canal IP3R, y cuando la liberación de calcio aumenta rápidamente, finalmente se induce la apoptosis, y durante esta inducción de apoptosis, la recaptación de iones de calcio a través de SERCA2 puede ocurrir que inhiba la apoptosis.

A partir de los resultados anteriores, se pudo ver que, en las células madre cancerosas, la expresión de SERCA2 aumentó para promover la recaptación de calcio, y la expresión de IP3R se inhibió para que también sea inhibida la liberación de iones de calcio en el citosol.

- Como se muestra en la figura 23, se pudo ver que, debido a la regulación de $\text{CaMK-2}\alpha$, la expresión de IP3R en las células madre cancerosas se inhibió primero para que se inhibiera la liberación de iones de calcio, y luego la captación intracelular de los iones de calcio liberados a través de SERCA se inhibió la apoptosis, de modo que la viabilidad de las células aumentaría incluso bajo el agotamiento de nutrientes.

7.2: Examen de cambio en el mecanismo de señalización $\text{CaMK-2}\alpha$

- Para examinar el cambio dependiente del tiempo en el mecanismo de señalización $\text{CaMK-2}\alpha$ bajo privación de nutrientes, se realizó la transferencia Western de la misma manera que se describe en el ejemplo 3.2, y se realizó un ensayo EMSA usando p NF- κB de la misma manera que se describe en el ejemplo 5.1. Los resultados se muestran en las figuras 24 y 25.

- Como se muestra en la figura 24, en las células madre cancerosas, las sustancias de señalización del mecanismo de señalización $\text{CaMK-2}\alpha$ se activaron a medida que progresaba la privación de nutrientes, a diferencia de las células madre normales.

Adicionalmente, como se muestra en la figura 25, p NF- κB actuó como un factor de transcripción para aumentar las expresiones del inhibidor de IP3R Bcl-2 y SERCA2. Tales resultados sugieren que, cuando se activa la señalización de $\text{CaMK-2}\alpha$, el NF- κB se fosforila y se activa, y debido al NF- κB activado, las expresiones de Bcl-2 y CERCA2 se

aumentan para que aumente la recaptación de iones de calcio, y la expresión de IP3R se inhibe de modo que se inhibe la liberación de iones de calcio.

7.3: Examen del efecto de la inhibición del mecanismo de señalización CaMK-2 α

5 Para examinar un efecto que ocurre cuando se inhibe la señalización de CaMK-2 α , las células madre cancerosas se trataron con 10 μ M de KN62 (1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina) bien conocido como un inhibidor de CaMK-2 α , y luego se realizó un ensayo TUNEL de la misma manera que se describe en el ejemplo 3.1 para examinar la apoptosis y la fragmentación del ADN. Además, la transferencia Western se realizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 3.2 para examinar la expresión de genes, y la viabilidad de las células se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo 2. Los resultados se muestran en las figuras 26 a 28.

10 Como se muestra en las figuras 26 a 28, cuando se inhibió la señalización de CaMK-2 α en las células madre cancerosas bajo privación de nutrientes, no se produjo la fosforilación de NF- κ B, y por esta razón, se inhibió la expresión de IP3R mientras que se aumentó la expresión de SERCA2 de modo que la liberación de iones de calcio aumentaría, induciendo así la apoptosis. Tales resultados sugieren que un inhibidor de CaMK-2 α puede reducir la resistencia de las células madre cancerosas a la apoptosis mediada por Ca²⁺ para inducir así la apoptosis de las células madre cancerosas, lo que indica que el uso del inhibidor CaMK-2 α puede proporcionar un método de tratamiento específico eficaz para células madre cancerosas.

Ejemplo 8: Examen de características de modelos animales de células madre cancerosas

20 Para examinar las características de los modelos animales construidos de la misma manera que se describe en el ejemplo 6, el tejido de cáncer de mama producido se extrajo de los modelos animales y se midió el volumen del tumor. Los resultados se muestran en la figura 29. Además, los niveles de expresión de proteínas en el tejido de cáncer de mama se analizaron mediante transferencia Western e inmunohistoquímica. La transferencia Western se realizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 3.2, y la inmunohistoquímica se realizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 6.2. Los resultados se muestran en las figuras 30 y 31,

25 Como se muestra en la figura 29, la tasa de crecimiento de tumores en los modelos animales basados en las células madre cancerosas fue mayor que en los modelos animales basados en las células cancerosas normales.

30 Además, como se muestra en las figuras 30 y 31, la expresión de IP3R en los modelos animales basados en las células madre cancerosas disminuyó y la expresión de SERCA2 aumentó, en comparación con las de los modelos animales basados en las células cancerosas normales. Tales resultados fueron consistentes con los resultados del experimento in vitro.

35 A partir de tales resultados, se pudo ver que, en el caso de las células madre cancerosas, el mecanismo de señalización de CaMK-2 α se podría activar en un entorno pobre in vivo para inhibir así la expresión de IP3R y aumentar la expresión de SERCA2, inhibiendo así la apoptosis inducida por la liberación de iones de calcio para aumentar la viabilidad de las células cancerosas in vivo y promover la recurrencia y/o metástasis del cáncer. Esto sugiere que una composición para el tratamiento de células madre cancerosas, que es eficaz contra las células madre cancerosas, se puede usar como un método terapéutico eficaz que puede superar la limitación de las terapias convencionales contra el cáncer para maximizar la eficacia del tratamiento del cáncer e inhibir la recurrencia del cáncer y/o metástasis

40 Aunque la presente descripción se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en el arte que esta descripción es solo una realización preferida de la misma, y no limita el alcance de la presente invención. De este modo, el alcance sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

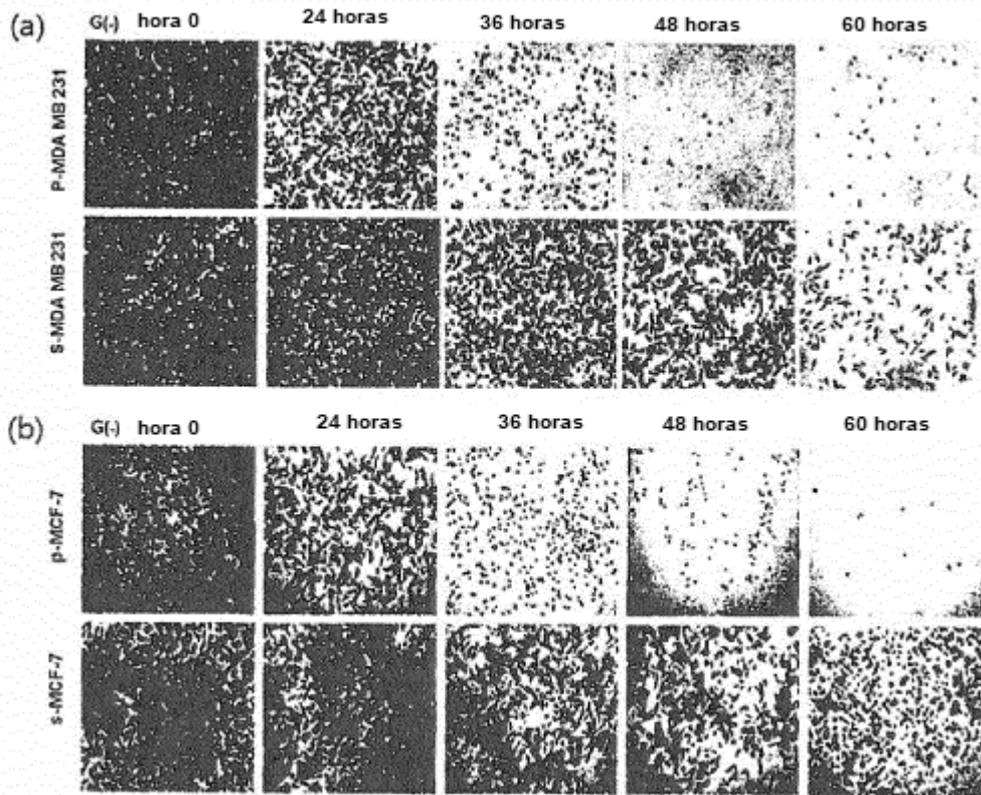
[Aplicabilidad industrial]

45 Como se describió anteriormente, la composición de la presente invención se puede usar como un agente para tratar células madre cancerosas induciendo efectivamente la apoptosis de las células madre cancerosas. De acuerdo con lo anterior, la composición de la presente invención se puede usar como una composición farmacéutica capaz de tratar eficazmente diversas células madre cancerosas para inhibir eficazmente la recurrencia del cáncer y/o metástasis.

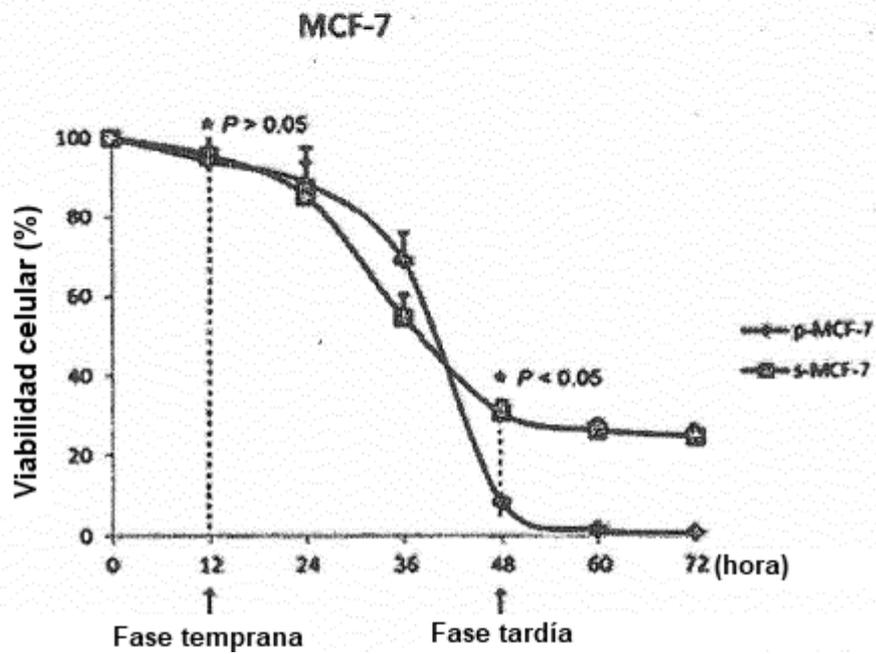
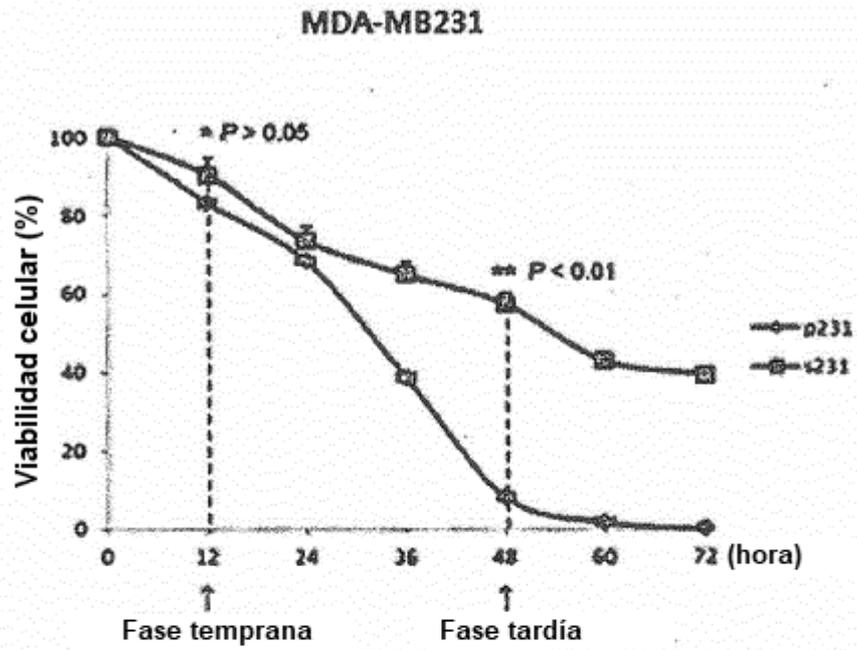
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un inhibidor de la captación de glucosa y un inhibidor de la bomba de calcio para su uso en la inhibición o tratamiento del crecimiento de células madre cancerosas.
- 5 2. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la captación de glucosa es la 2-desoxiglucosa (2DG).
3. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la bomba de calcio es un inhibidor de la Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA).
- 10 4. La composición para uso según la reivindicación 3, en la que el inhibidor de la bomba de calcio es caloxina o nifedipino.
5. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la bomba de calcio es un inhibidor de CaMK-2 α (quinasa-2-alfa dependiente de calmodulina/ Ca^{2+}).
6. La composición para uso según la reivindicación 5, en la que el inhibidor de la bomba de calcio es KN62 (1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina) o un ARNip que se une específicamente a CaMK-2 α .
- 15 7. La composición para uso según la reivindicación 1, que además contiene un compuesto a base de biguanida.
8. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que el compuesto basado en biguanida es uno o más seleccionados del grupo que consiste en metformina, fenformina y buformina.
- 20 9. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el cáncer es uno o más seleccionados del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer gástrico, cáncer de cerebro, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de sangre y cáncer de hígado.

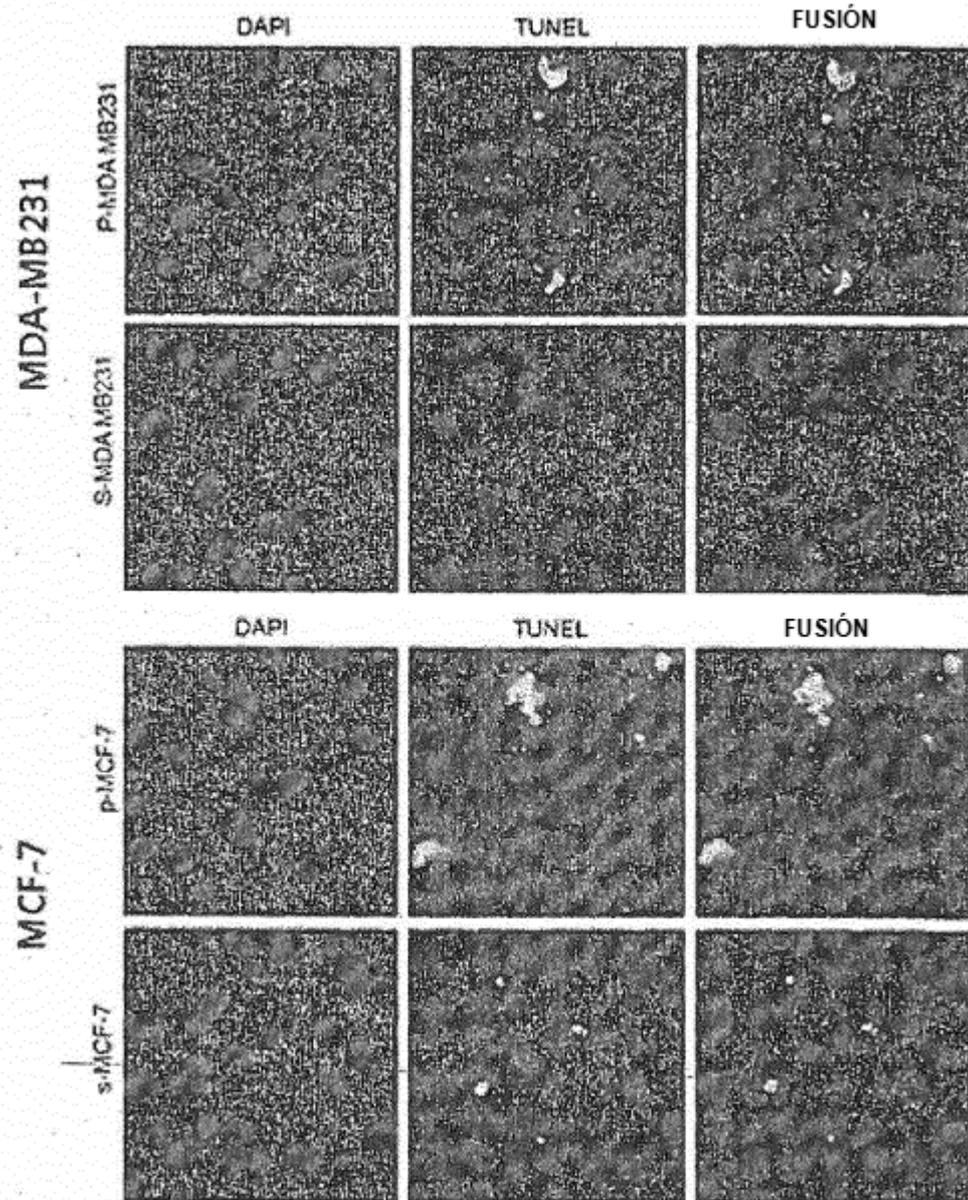
【FIG. 1】



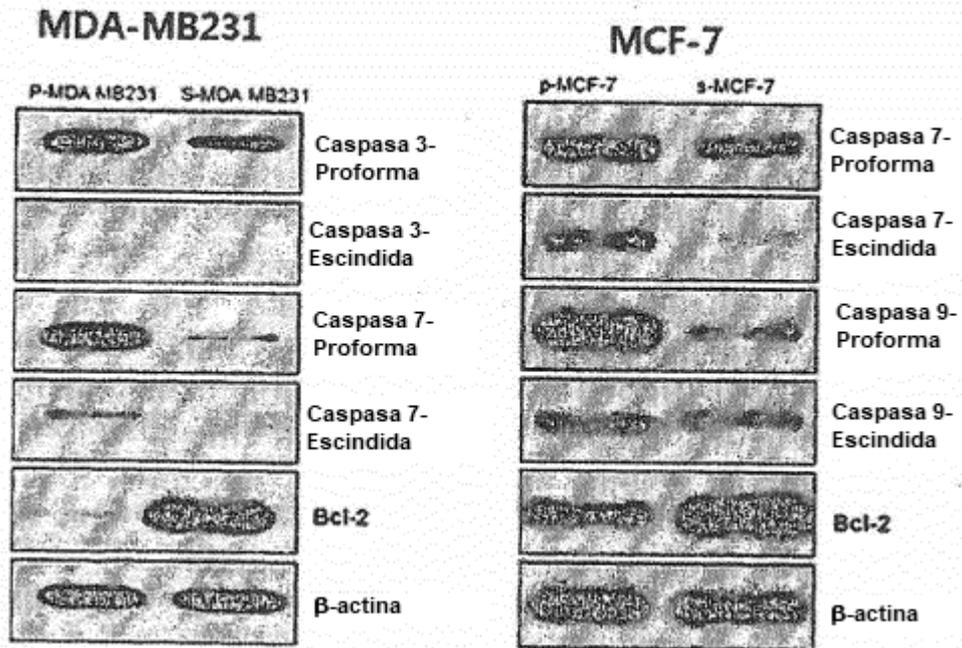
[FIG. 2]



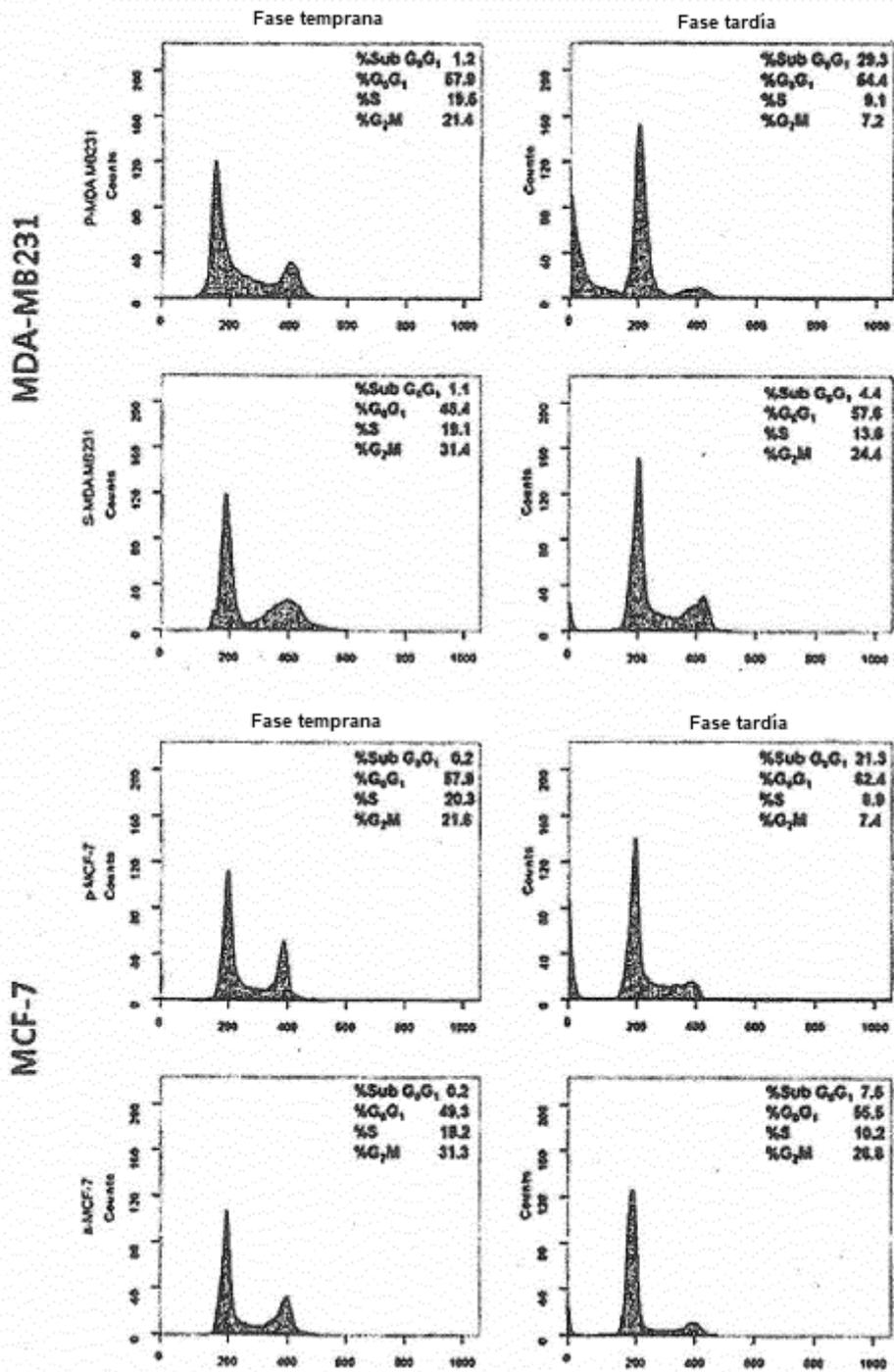
[FIG. 3]



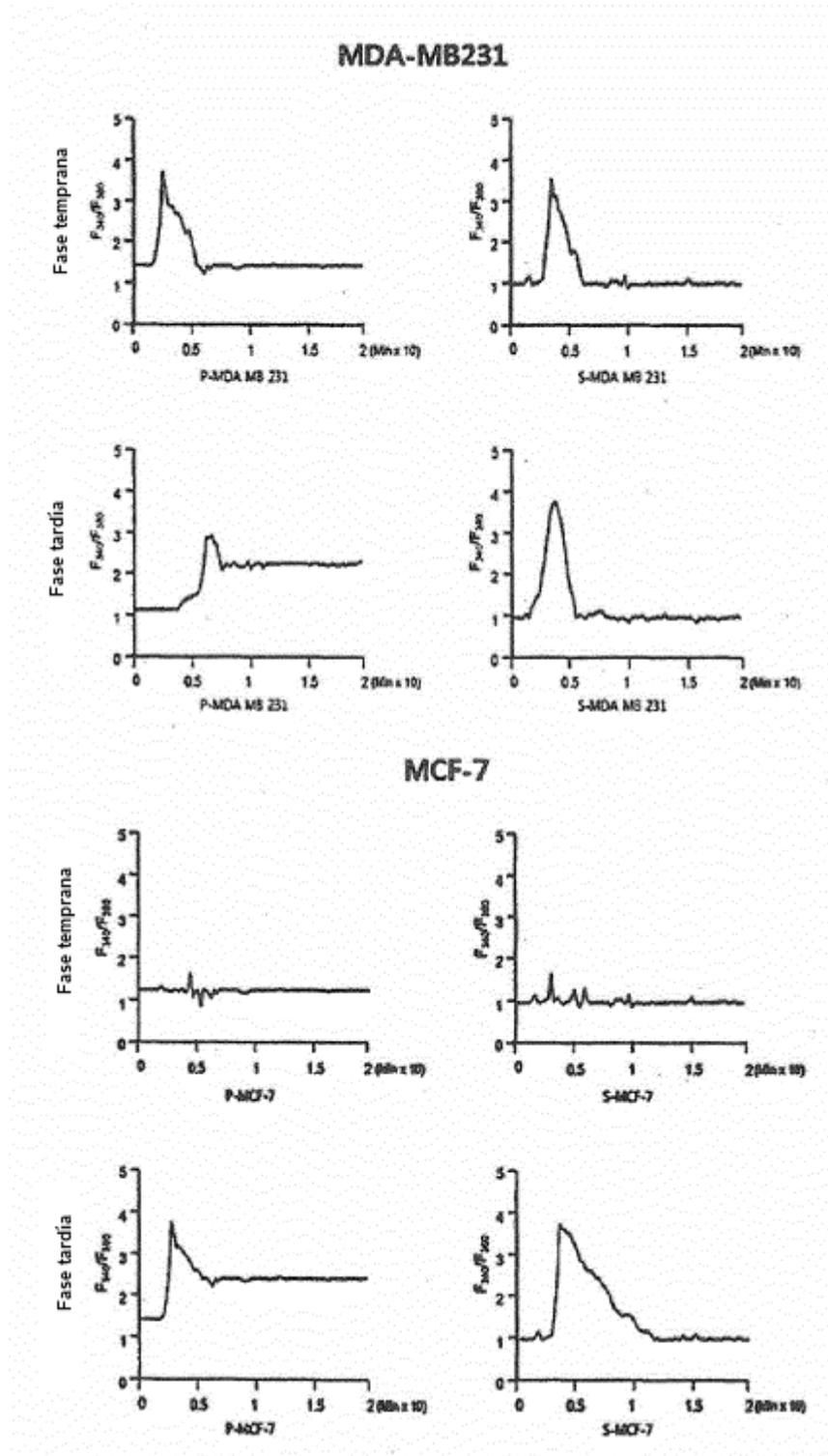
[FIG. 4]



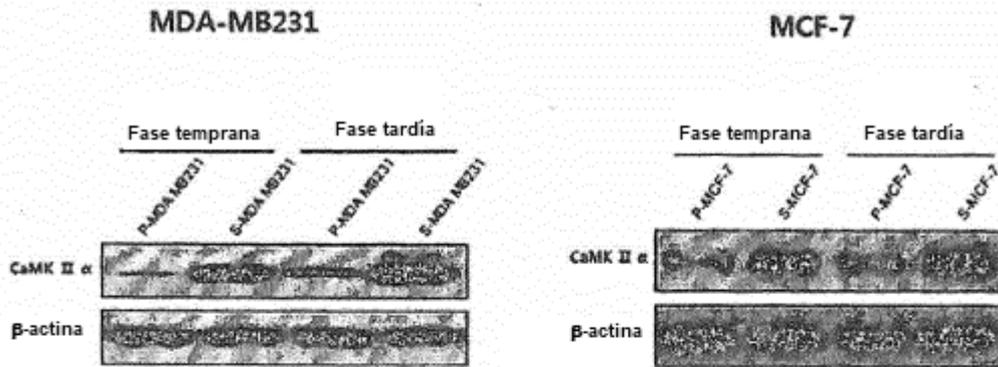
[FIG. 5]



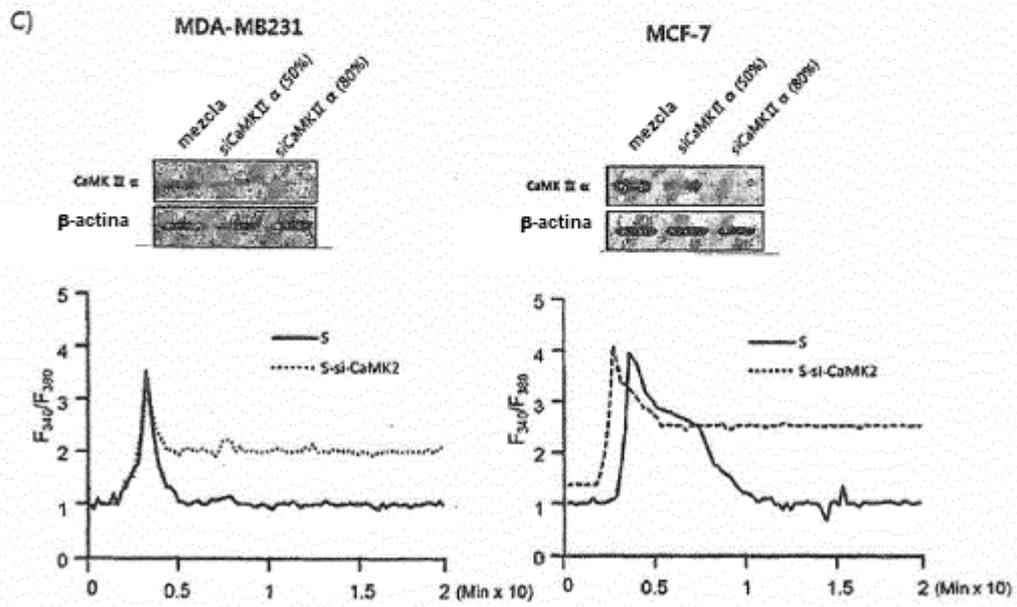
[FIG. 6]



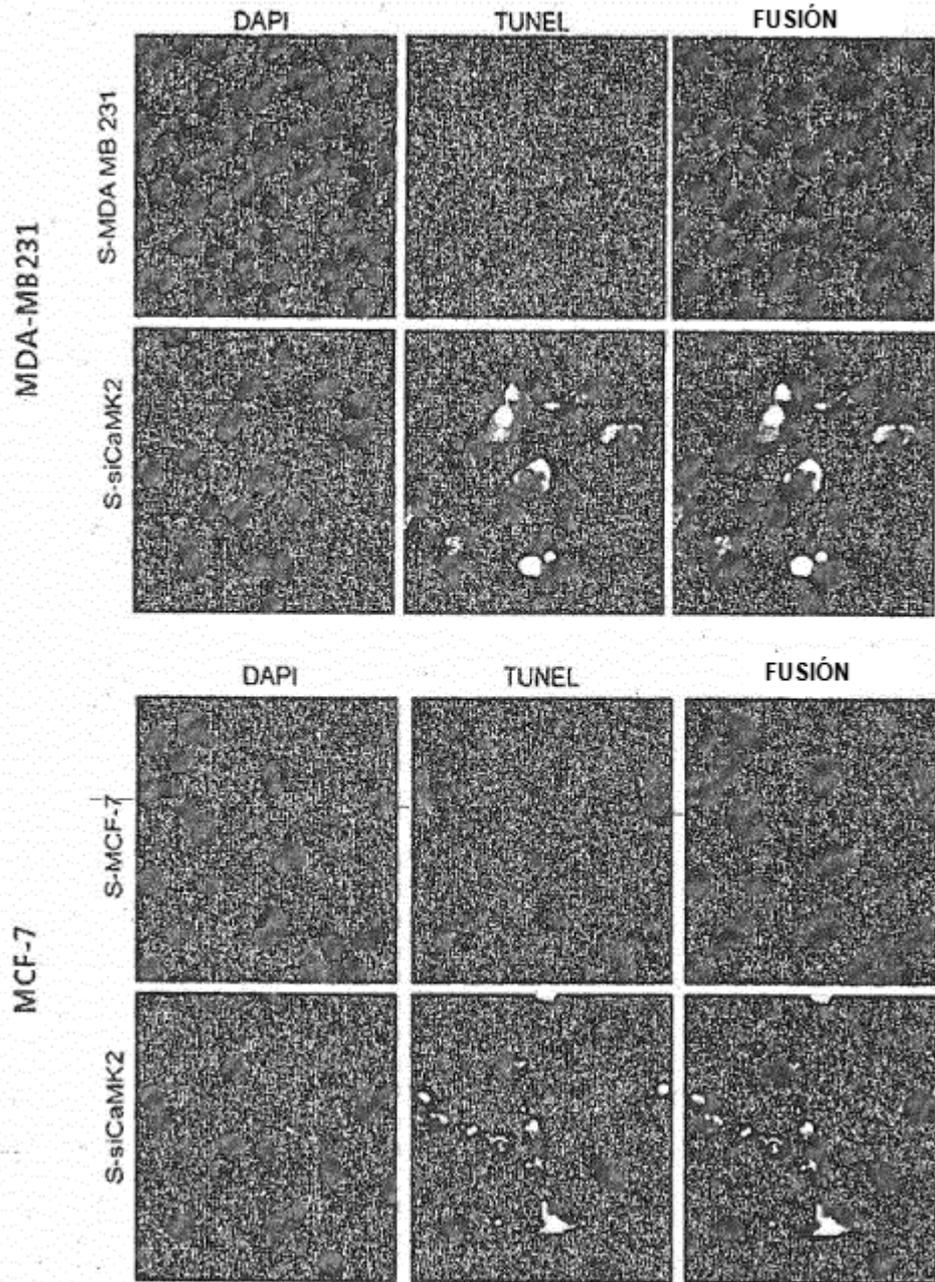
[FIG. 7]



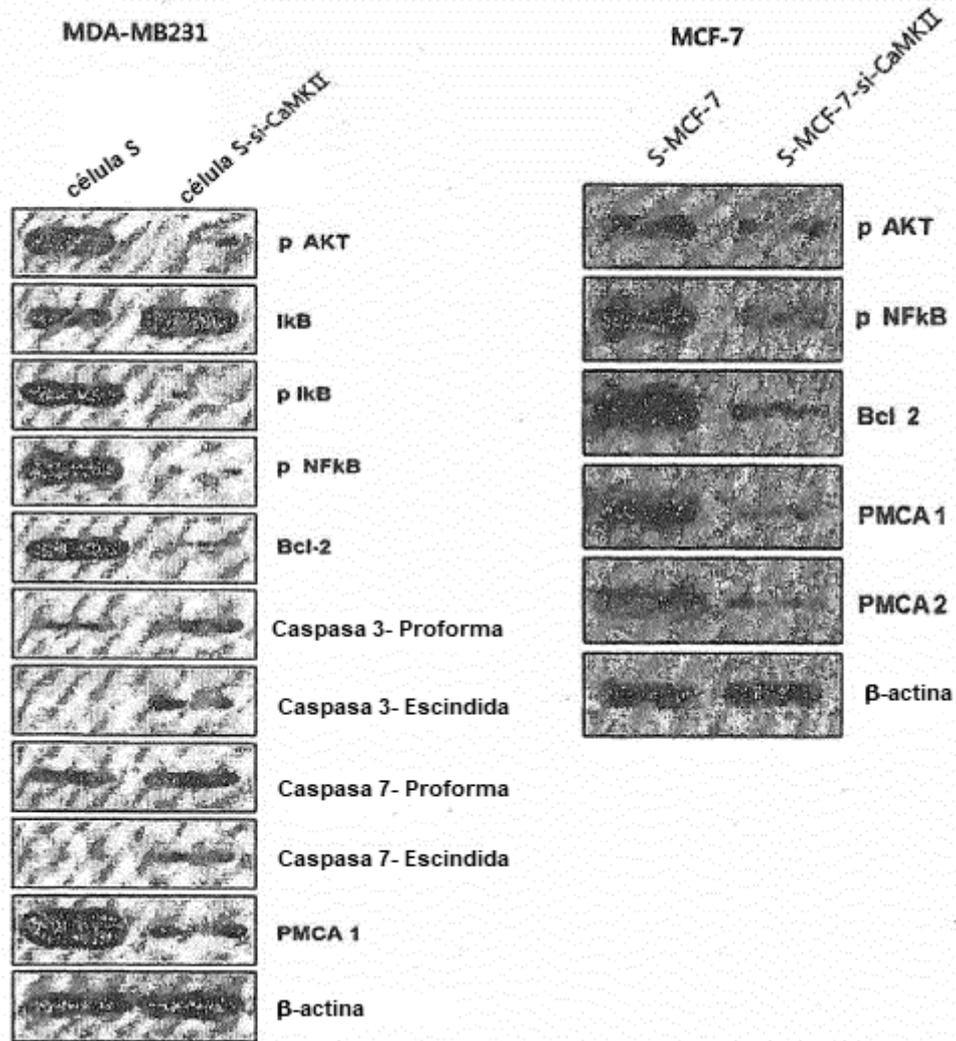
[FIG. 8]



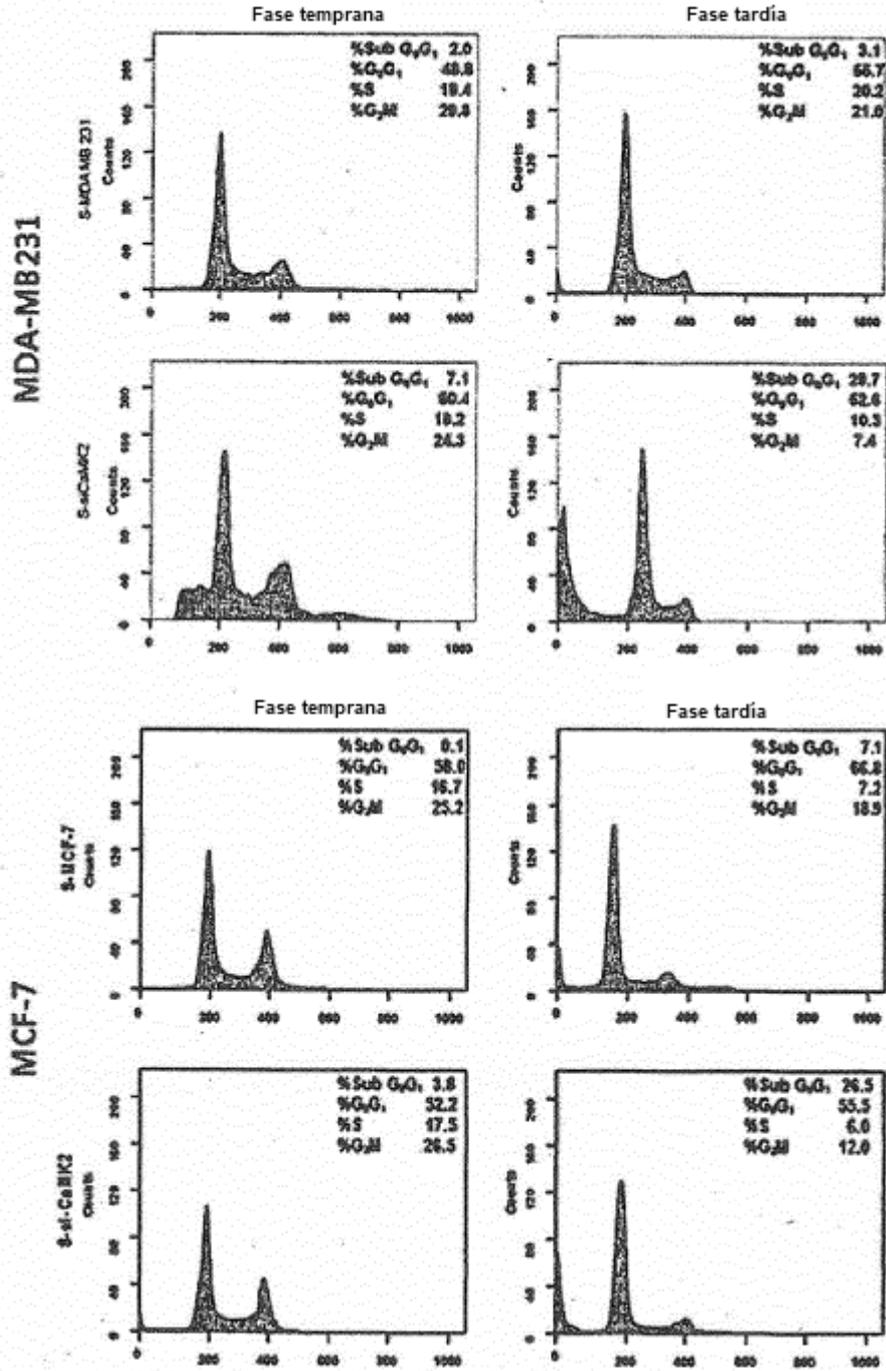
[FIG. 9]



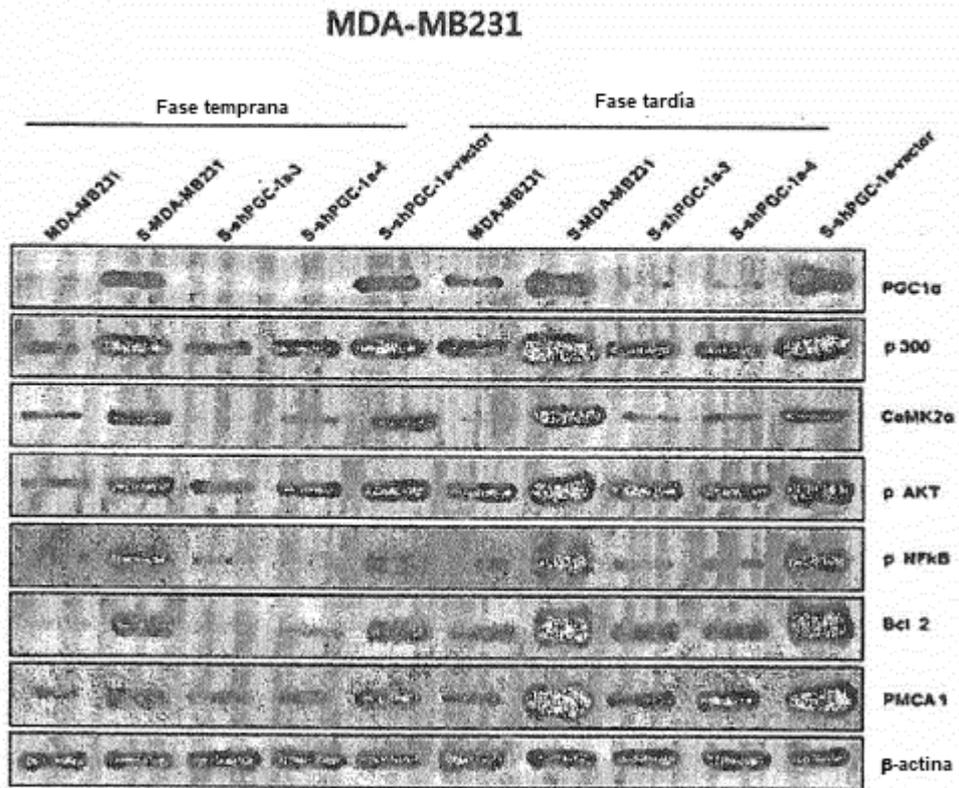
[FIG. 10]



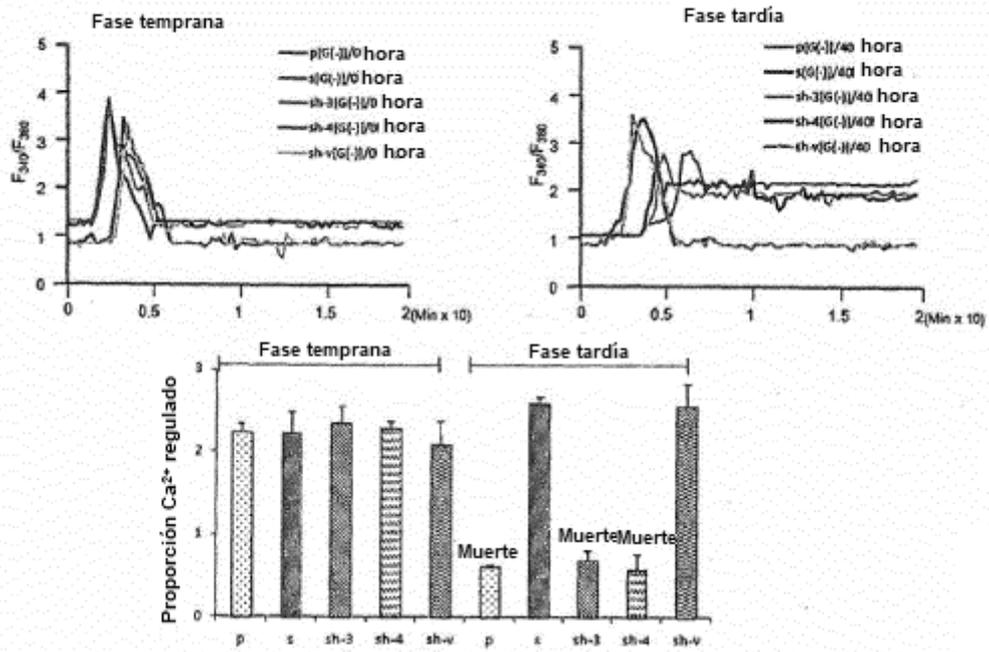
[FIG. 11]



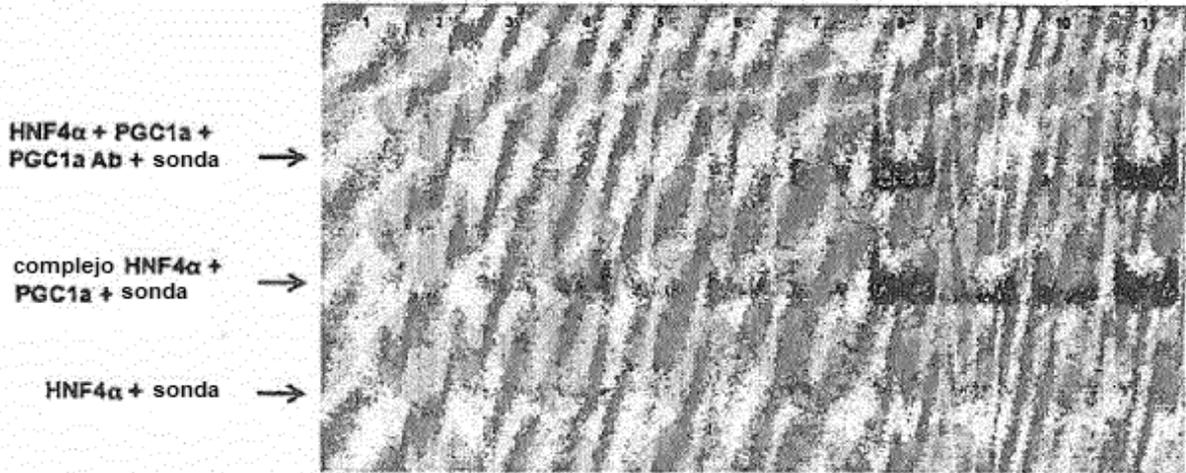
[FIG. 12]



[FIG. 13]

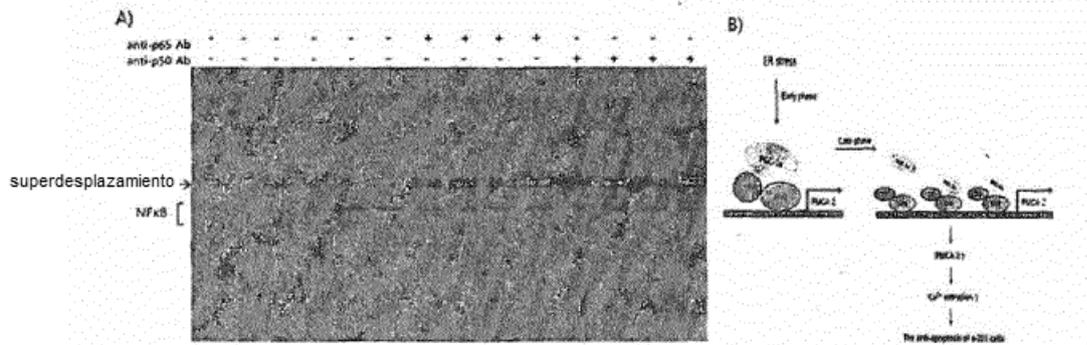


[FIG. 14]



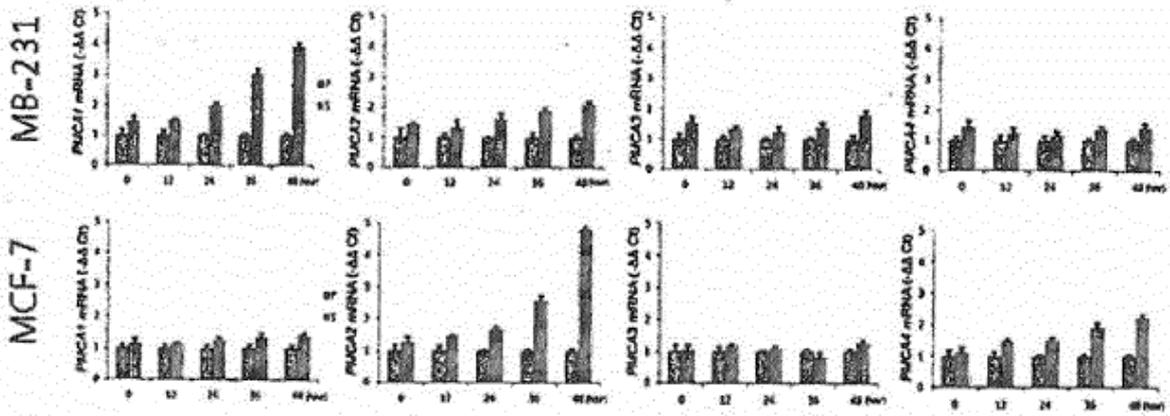
1. competidor (sonda caliente HNF4 α + sonda fría HNF4 α) + extracto nucleico
2. control (sonda caliente HNF4 α , mutante) + extracto nucleico
3. P temprana (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico)
4. S temprana (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico)
- * 5-11: supershift.
5. P temprana (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico) + anti-PGC1 α 3ug
6. S temprana (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico) + anti-PGC1 α 3ug
7. P tardía (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico) + anti-PGC1 α 3ug
8. S tardía (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico) + anti-PGC1 α 3ug
9. sh-3 tardío (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico) + anti-PGC1 α 3ug
10. sh-4 tardío (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico) + anti-PGC1 α 3ug
11. sh-v tardío (sonda caliente HNF4 α + extracto nucleico) + anti-PGC1 α 3ug

[FIG. 15]

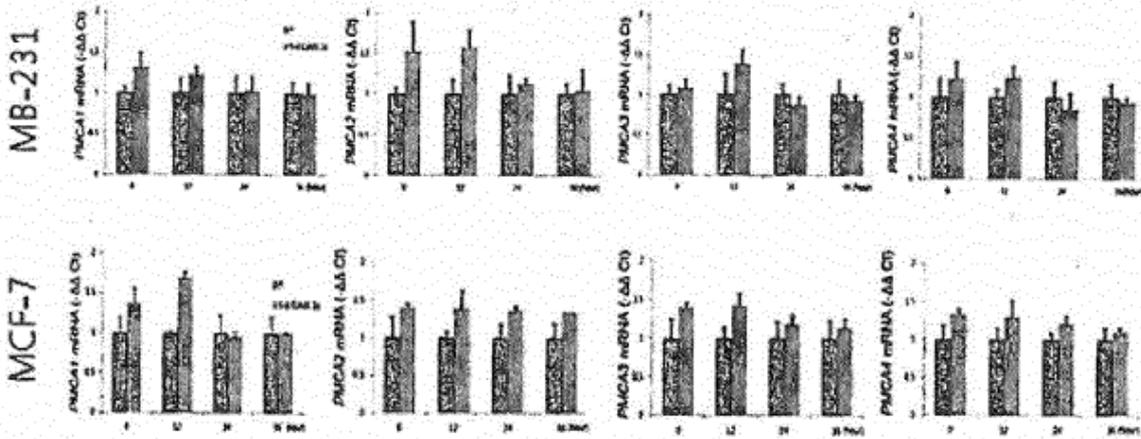


- | | |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. competidor (sonda caliente HFκB + sonda fría HNF4α) + extracto nucleico 2. control (sonda caliente HFκB, mutante) + extracto nucleico 3. P-MCF-7 temprana (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) 4. S-MCF-7 temprana (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) 5. P-MCF-7 tardía (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) 6. S-MCF-7 tardía (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) | <ol style="list-style-type: none"> 7. P-MCF-7 temprana (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) + HFκB Ab₅₅ 8. S-MCF-7 temprana (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) + HFκB Ab₅₅ 9. P-MCF-7 tardía (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) + HFκB Ab₅₅ 10. S-MCF-7 tardía (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) + HFκB Ab₅₅ 11. P-MCF-7 temprana (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) + HFκB Ab₅₅ 12. S-MCF-7 temprana (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) + HFκB Ab₅₅ 13. P-MCF-7 tardía (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) + HFκB Ab₅₅ 14. S-MCF-7 tardía (sonda caliente HFκB + extracto nucleico) + HFκB Ab₅₅ |
|---|---|

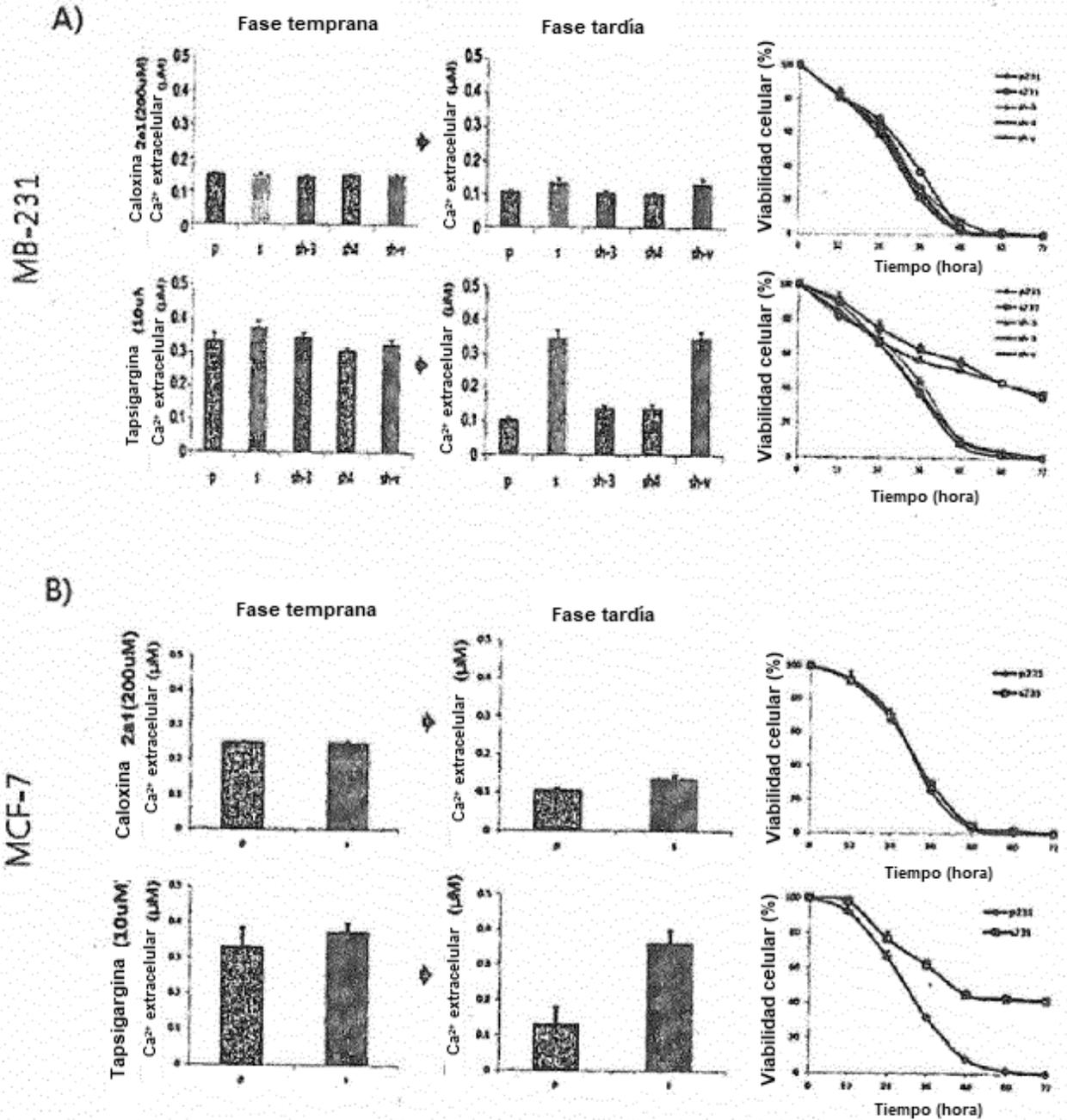
[FIG. 16]



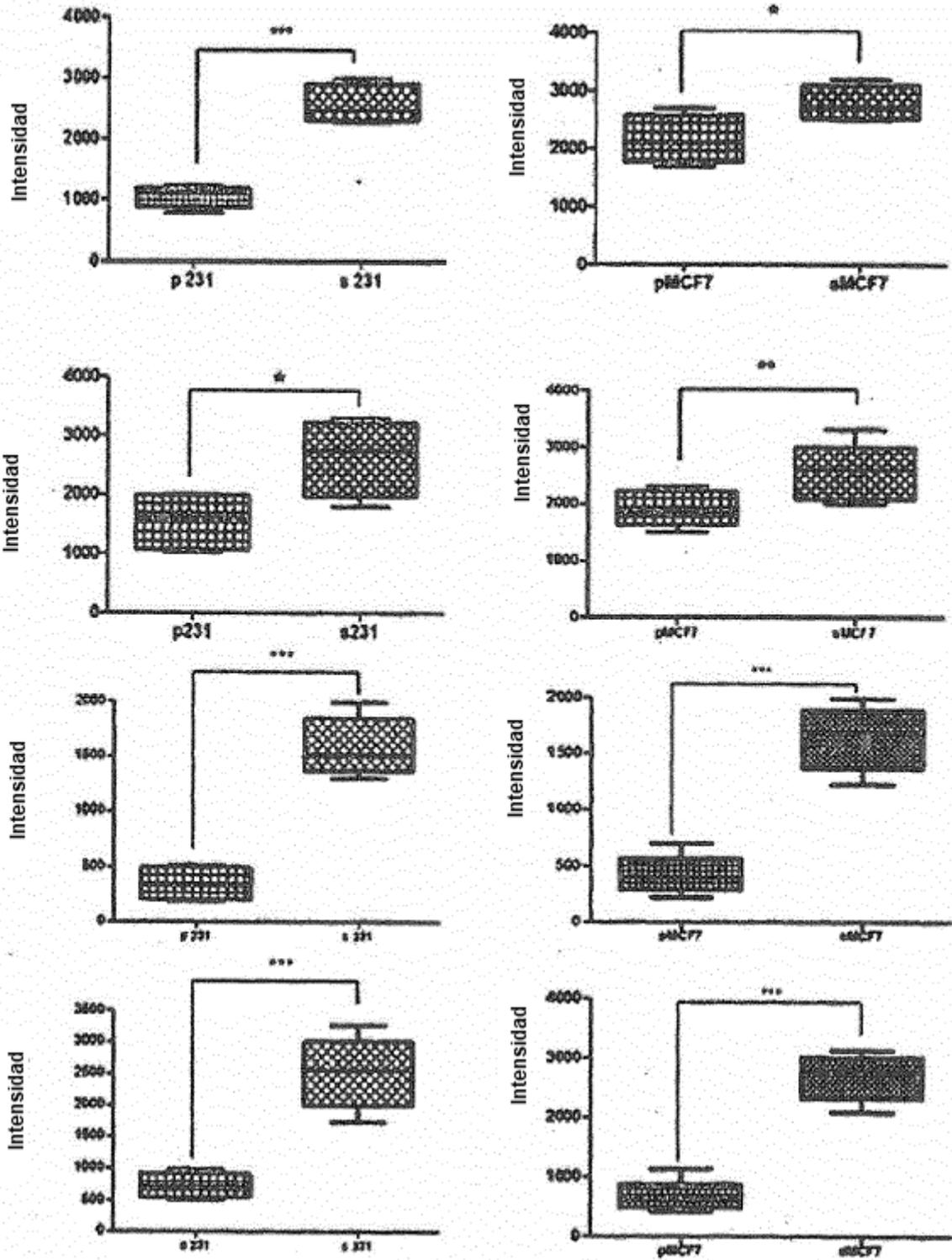
[FIG. 17]



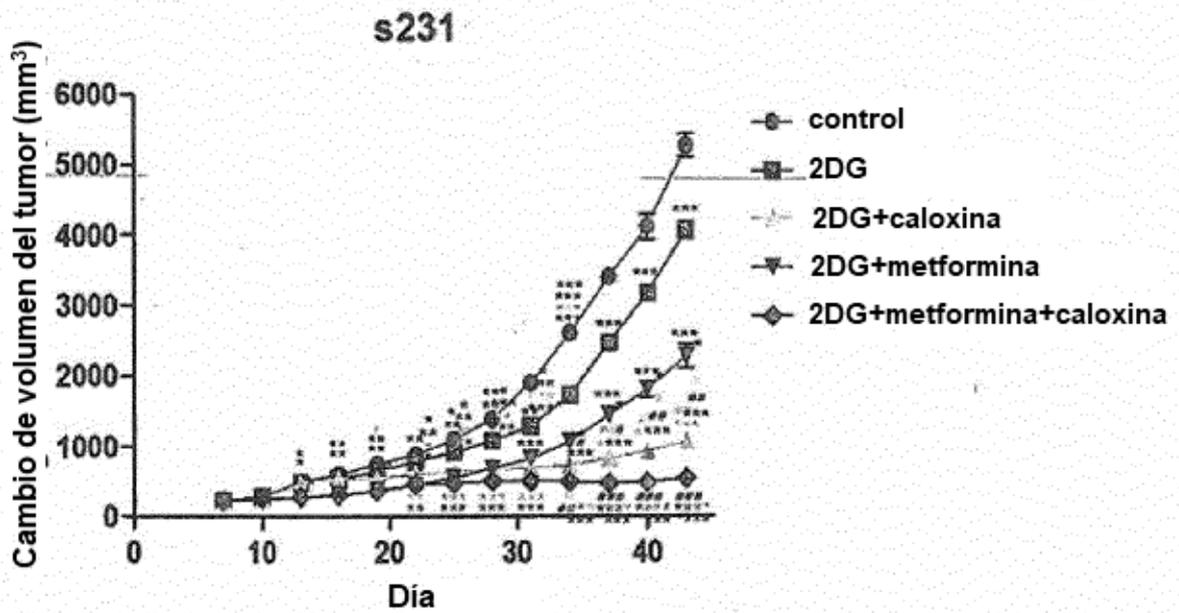
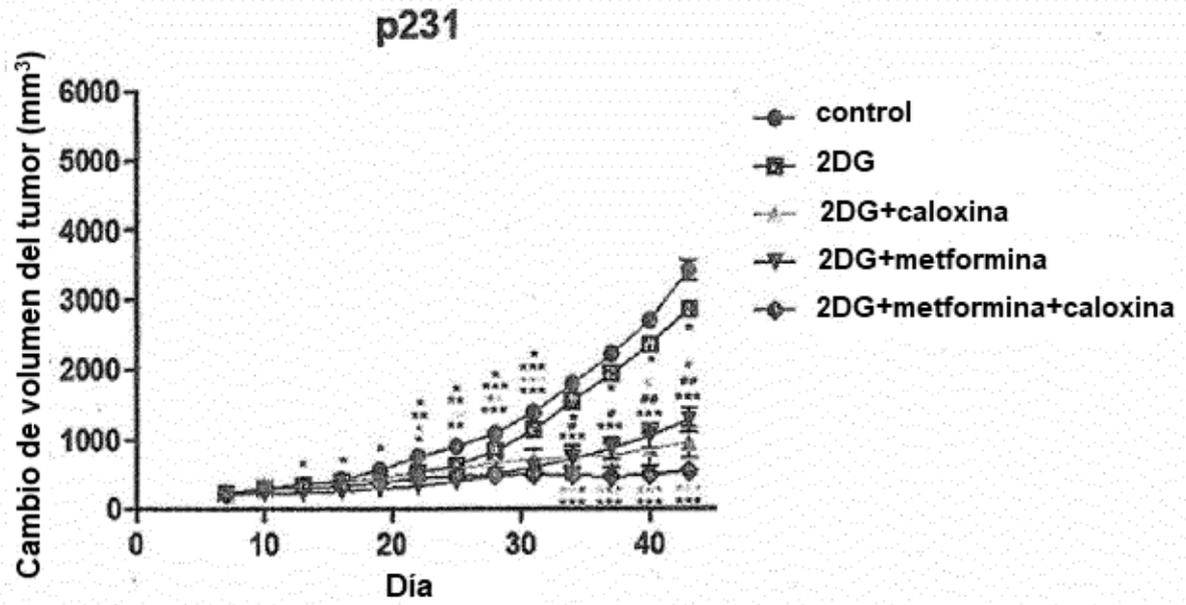
[FIG. 18]



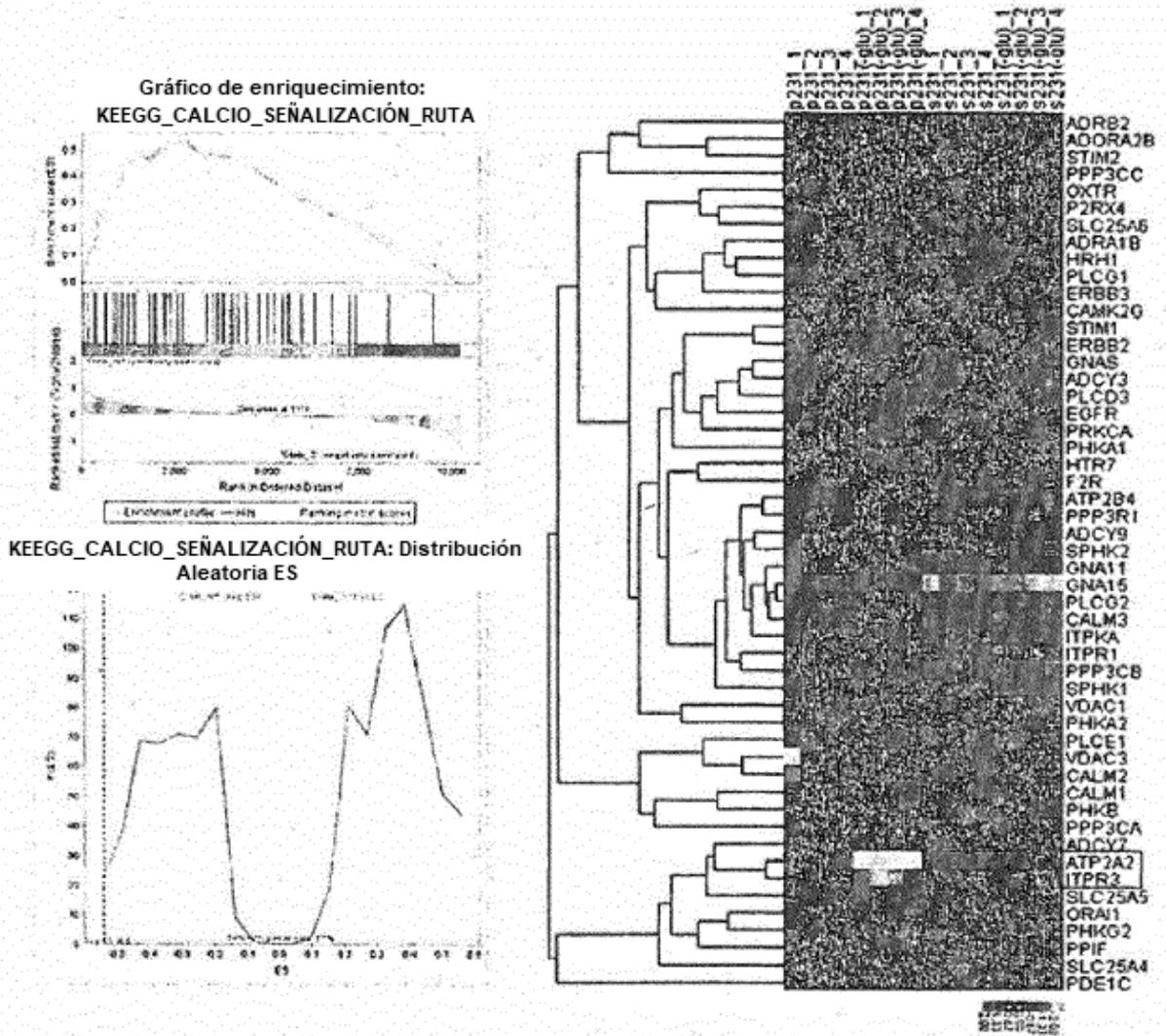
[FIG. 19]



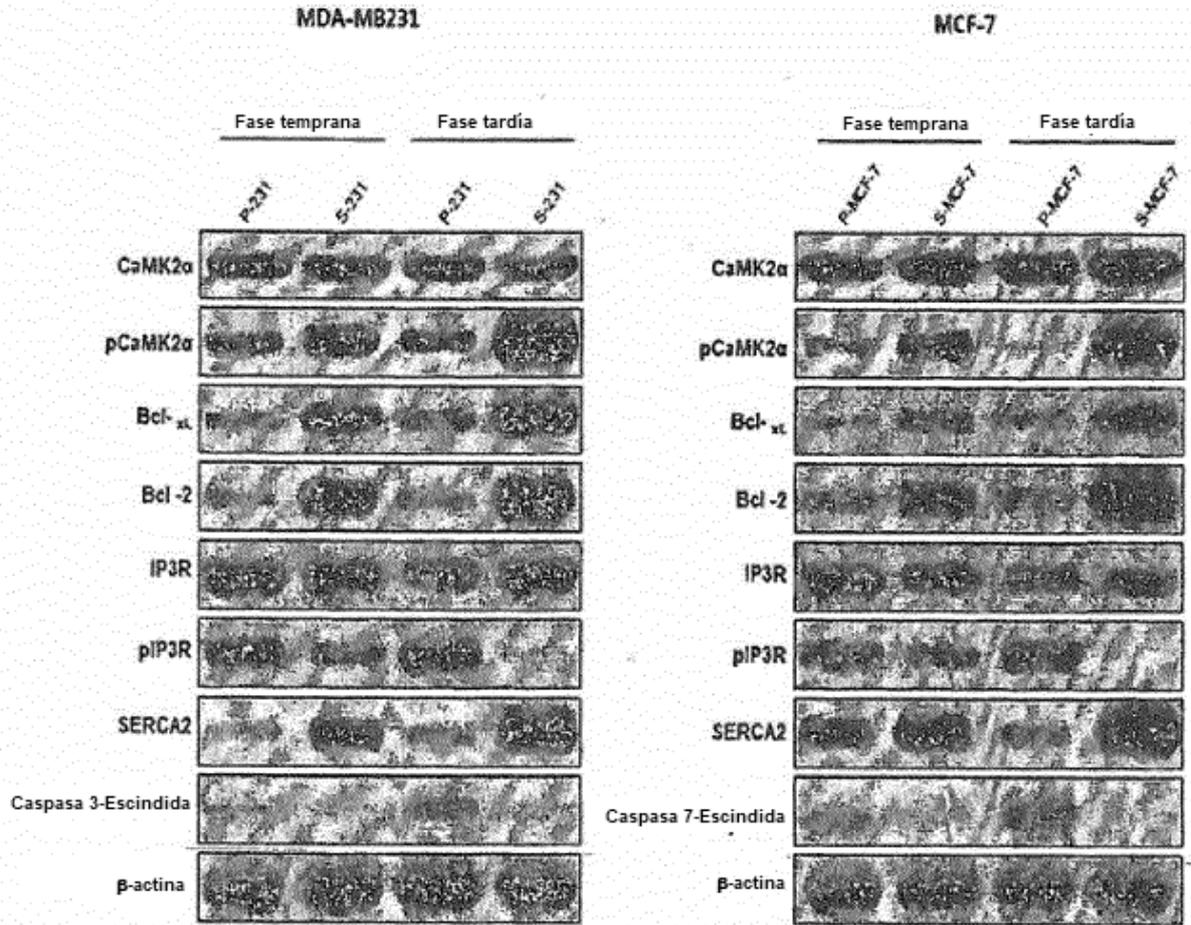
[FIG. 20]



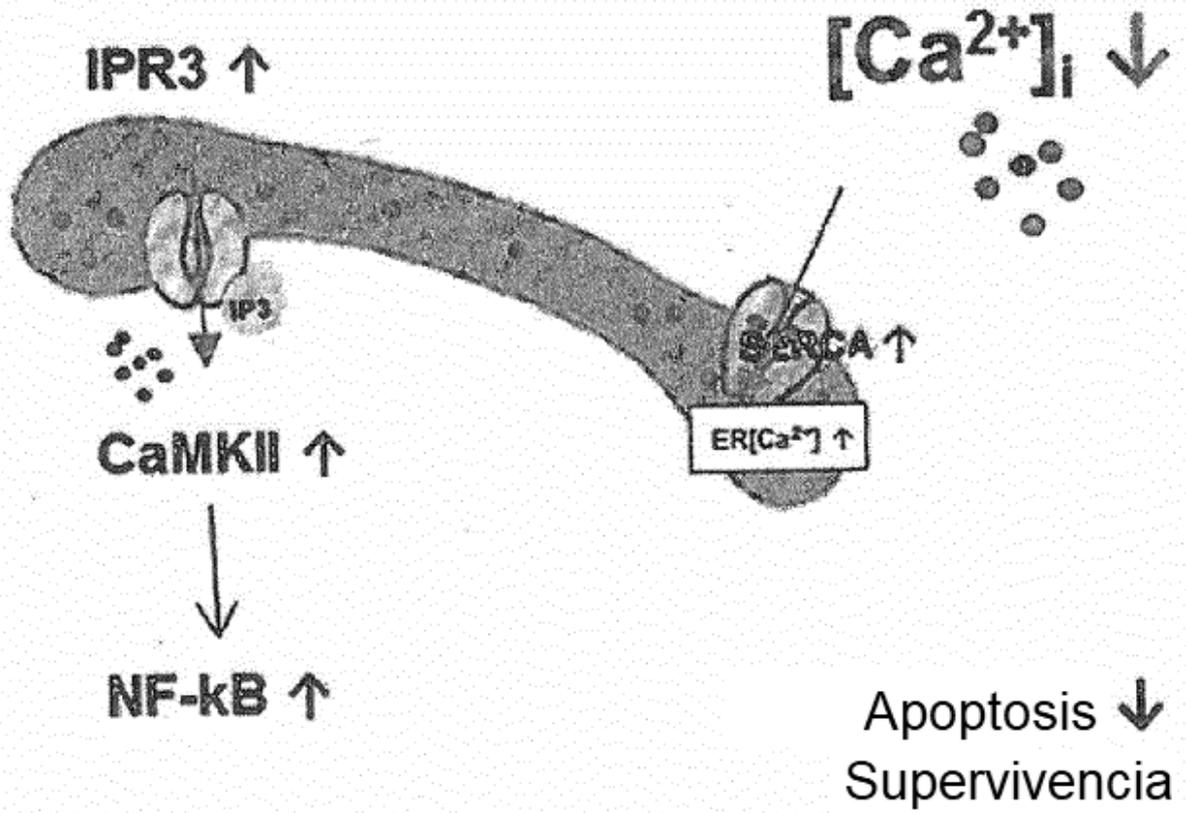
[FIG. 21]



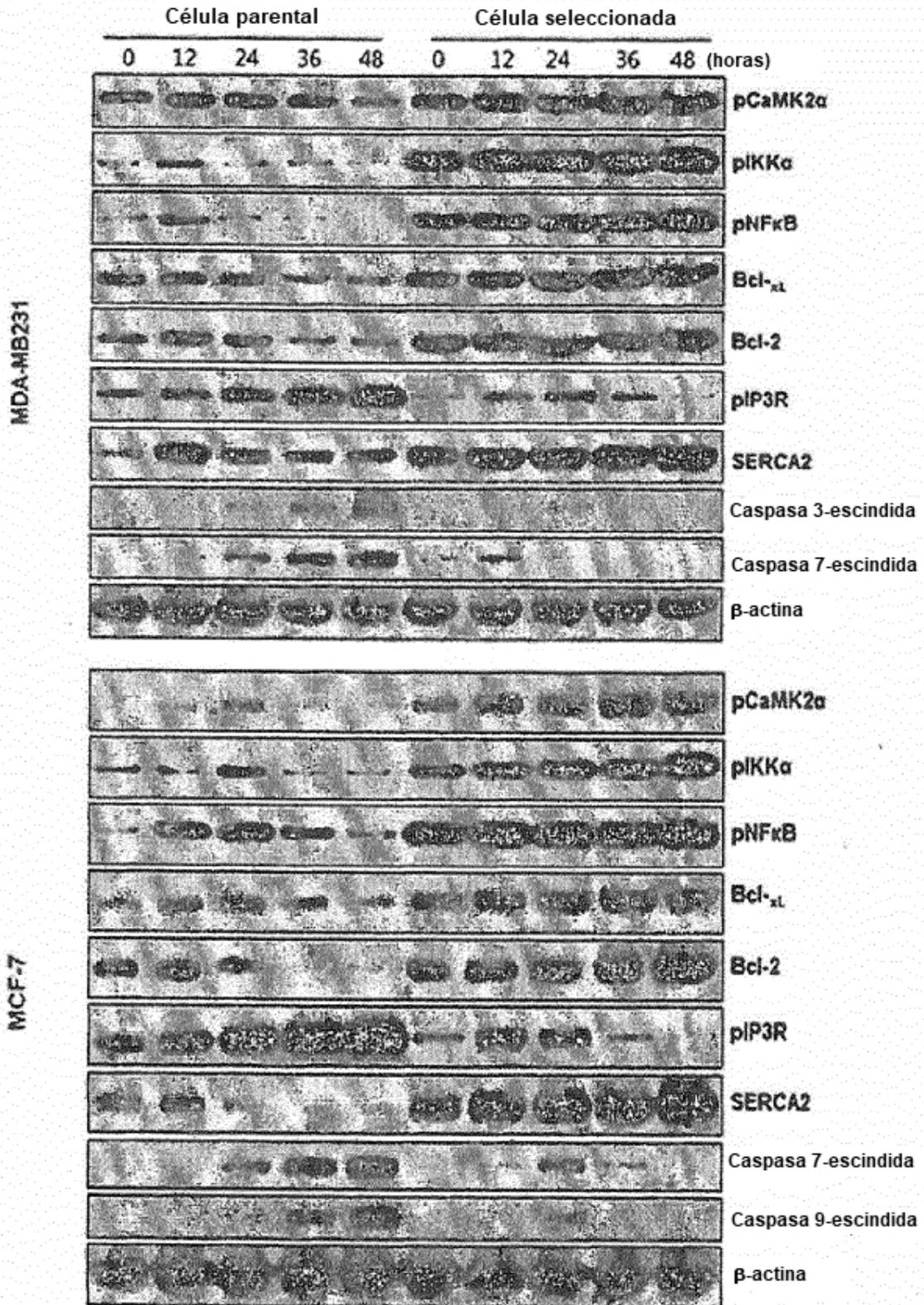
[FIG. 22]



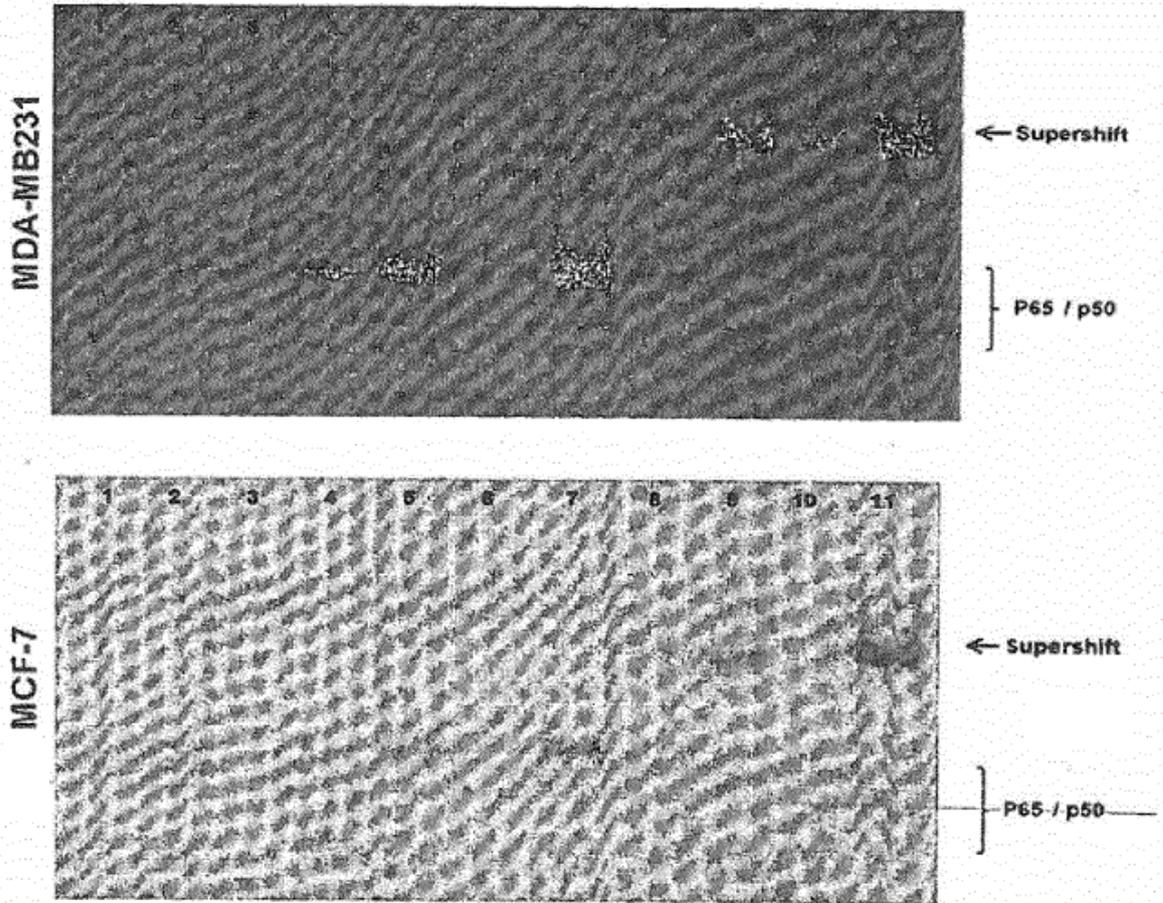
[FIG. 23]



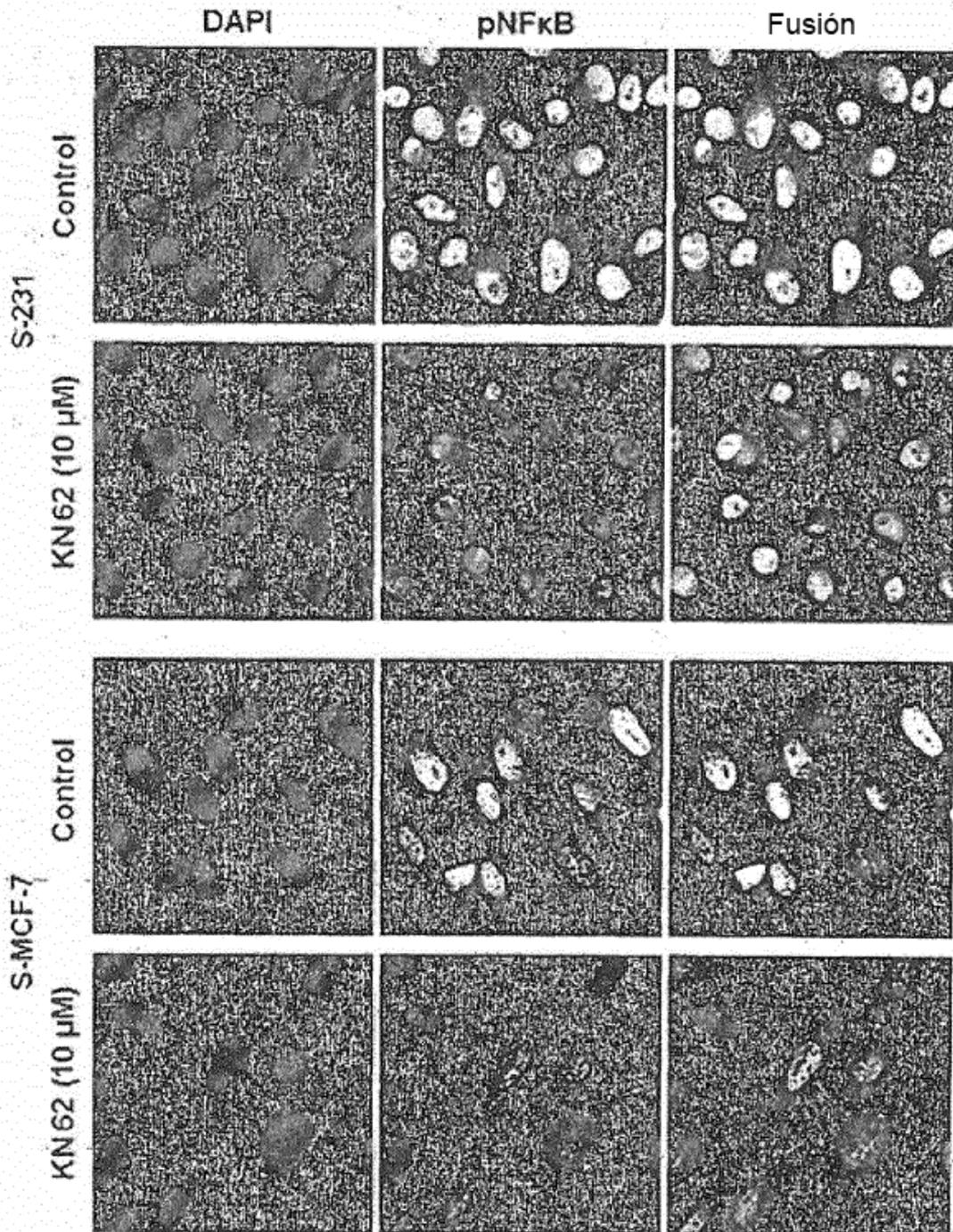
[FIG. 24]



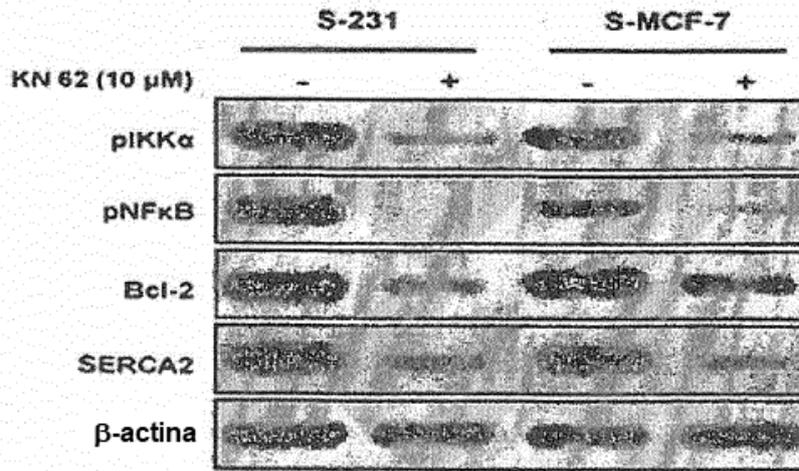
[FIG. 25]



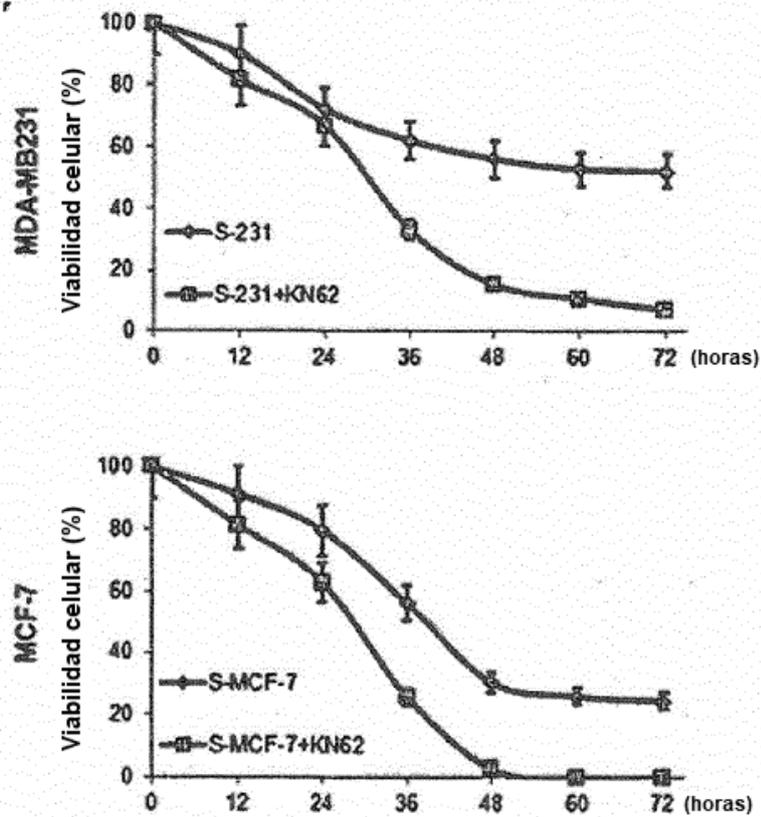
[FIG. 26]



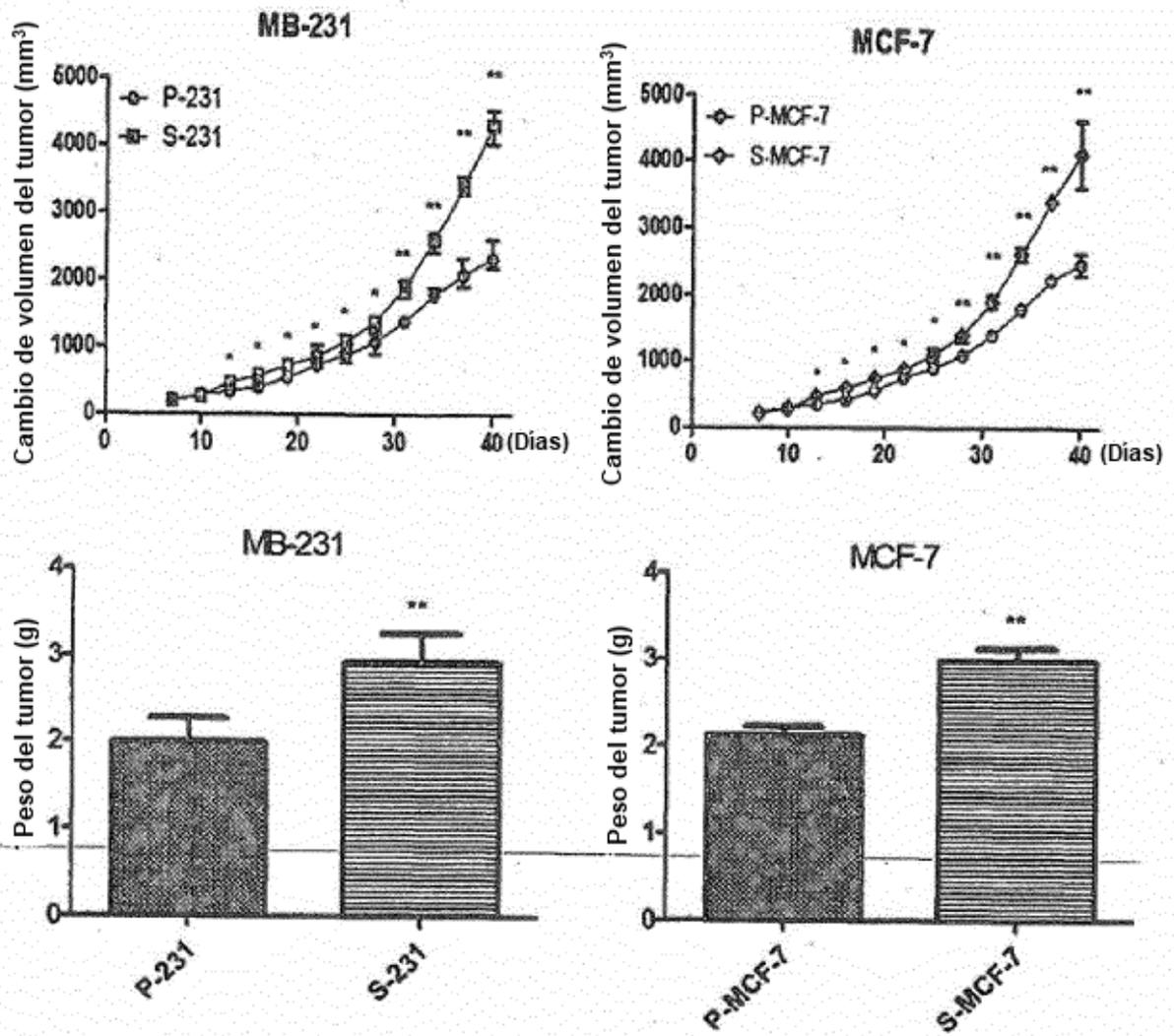
[FIG. 27]



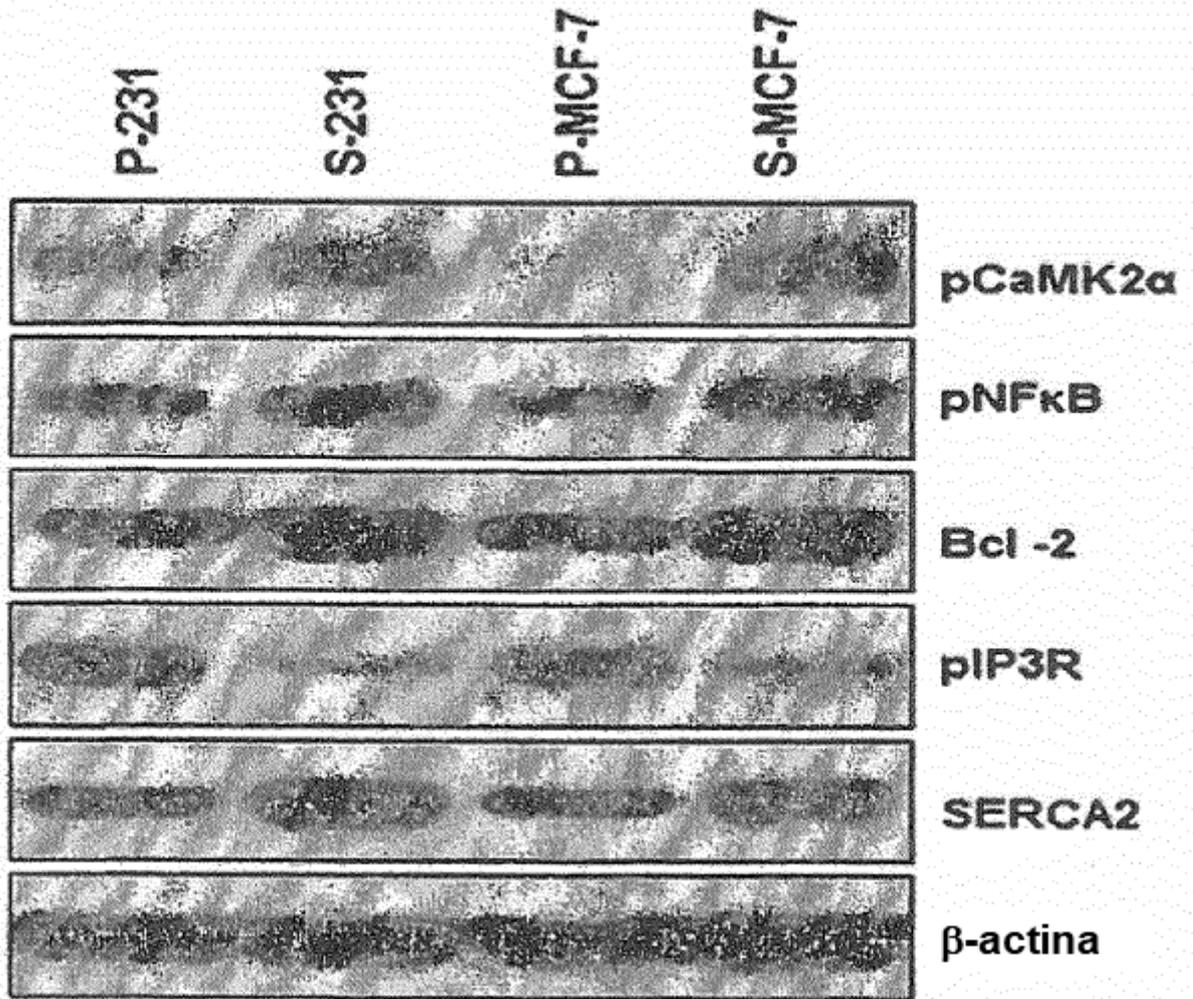
[FIG. 28]



[FIG. 29]



[FIG. 30]



[FIG. 31]

