



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 280**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/485** (2006.01)  
**A61K 31/445** (2006.01)  
**A61K 31/135** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02767251 .8**  
86 Fecha de presentación : **23.07.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1420789**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **Utilización de sustancias activas con un efecto agonista de receptores  $\mu$  de opioides y con un efecto antagonista de receptores de opioides, como medicamentos combinados para el tratamiento de un cáncer.**

30 Prioridad: **01.09.2001 DE 101 42 996**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2007**

73 Titular/es:  
**PAZ Arzneimittel- Entwicklungsgesellschaft mbH  
In der Schildwacht 13  
65933 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es: **Geisslinger, Gerd y  
Tegeder, Irmgard**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 286 280 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

Utilización de sustancias activas con un efecto agonista de receptores  $\mu$  de opioides y con un efecto antagonista de receptores de opioides, como medicamentos combinados para el tratamiento de un cáncer.

Medicamentos para el tratamiento de enfermedades de cáncer, tales como un cáncer de mama, en los casos de seres humanos y animales, que contienen, ya sea en una sola forma medicamentosa o en formas medicamentosas separadas, sustancias activas agonistas de receptores de opioides así como sustancias activas antagonistas de receptores de opioides, y que se aplican al mismo tiempo o de modo desfasado en el tiempo en una dosis apropiada para la terapia optimizada para un paciente.

Las enfermedades de cáncer son, en los países industriales, una de las causas más frecuentes de mortalidad. La frecuencia de la enfermedad (incidencia) depende de la disposición (índole), de la exposición (estar sometido a influencias generadoras de cánceres tales como productos químicos, radiación, virus, estrés, etc) y de la edad. El aumento de la incidencia para enfermedades de cáncer en la última centuria se atribuye principalmente al aumento de la esperanza de vida. A causa de la frecuencia y de la gravedad de la enfermedad, se realizaron y realizan intensos trabajos de investigación con el fin de evitar, diagnosticar y curar un cáncer. A pesar de estos esfuerzos y de las medidas adoptadas para el reconocimiento precoz, las posibilidades de curación se han mejorado sólo escasamente, dejando aparte ciertas excepciones, en los casos de las formas de cáncer que aparecen con la mayor frecuencia.

Todas las medidas terapéuticas se basan en una eliminación, o en una inhibición del crecimiento, de las células cancerosas degeneradas. Todavía no están a disposición posibilidades clínicas para la retrotransformación de una célula tumoral en una célula de tejido normal. Como procedimientos médicos de tratamiento entran en cuestión, dependiendo del tipo de la enfermedad de cáncer, del estadio de la enfermedad y del estado del paciente, la operación quirúrgica, la irradiación y la administración de medicamentos. En el caso de la terapia medicamentosa, con el fin de destruir a, o inhibir el crecimiento de, las células cancerosas, se emplean sustancias inhibitorias de la mitosis, agentes citostáticos alquilantes, antibióticos eficaces citostáticamente, antimetabolitos, hormonas y agentes antagonistas de hormonas, agentes inmunomoduladores, enzimas o radioisótopos. Se encuentran asimismo en el estadio de desarrollo ciertos métodos para la terapia medicamentosa de un cáncer, específica para ciertos tejidos, tales como medidas terapéuticas génicas. Unas vías para la intervención selectiva en la transducción de señales dentro del ciclo celular de la célula cancerosa o en la angiogénesis (neoformación de vasos) dentro del tumor se encuentran todavía en el estadio de investigación.

Todas las terapias medicamentosas de cánceres, que se conocen hasta ahora, se basan en una intervención relativamente inespecífica en el ciclo celular de la célula cancerosa. Siempre, también las células sanas son afectadas conjuntamente por el ataque de los medicamentos. Por lo tanto, dependiendo del mecanismo de efecto de la sustancia aparecen diferentes efectos indeseados de medicamentos, que en la mayor parte de los casos son sin embargo considerables.

Fue misión del invento encontrar sustancias activas para el tratamiento de cánceres, que ya sean conocidas como medicamentos para otros sectores de aplicaciones. Estas sustancias activas deberían ejercer sobre la célula tumoral unos efectos deseados similares a los de los agentes terapéuticos para el cáncer que hasta ahora se están empleando, y en este contexto, en lo posible deberían tener un espectro más favorable de efectos colaterales.

A causa de los intensos esfuerzos internacionales en investigación, en particular del NCI (National Cancer Institute = Instituto Nacional del Cáncer, EE.UU.), para descubrir agentes anticancerosos potenciales a partir de todas las sustancias químicas y naturales disponibles, parecieron ser muy bajas las posibilidades para la identificación de agentes anticancerosos a partir de los medicamentos conocidos. Sorprendentemente, esto se consiguió por fin, sin embargo, en el caso de la aplicación simultánea del conocido agente analgésico fuerte (opioide), morfina, y del agente antagonista de opioides, naloxona. Mediante subsiguientes investigaciones sistemáticas, este principio de terapia se pudo transferir a otras sustancias activas, similares desde el punto de vista del mecanismo de efecto, es decir opioides y agentes antagonistas de opioides.

En la bibliografía científica se encuentran, a partir de estudios de fijación a receptores, de ensayos con cultivos celulares o de ensayos con animales, algunas indicaciones acerca de que la morfina o respectivamente sustancias similares pueden intervenir en la regulación de la supervivencia celular de células no tumorales, pero también en la biología celular de los tumores, y a que agentes antagonistas de opiato, tales como naloxona o naltrexona, suprimen este efecto [Polakiewicz, R.D., Schieferl, S.M., Gingras, A.C., Sonenberg, N. & Comb, M.J. "mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control" [Un receptor  $\mu$  de opioides activa a las rutas de señalización implicadas en la supervivencia celular y el control de la traducción] *J Biol Chem* 273, 23534 - 41 (1998); Maneckjee, R & Minna, J.D. "Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells" [Los opioides inducen, mientras que la nicotina suprime, la apoptosis en células humanas de cáncer de pulmón] *Cell Growth Differ* 5, 1033 - 40 (1994); Maneckjee, R. & Minna, J.D. "Nonconventional opioid binding sites mediate growth inhibitory effects of methadone on human lung cancer cells" [Unos sitios de fijación a opioides no convencionales median en los efectos inhibidores del crecimiento de la metadona sobre células cancerosas de pulmones humanos], *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1169 - 73 (1992); Zagon, I.S. & McLaughlin, P.J. "Heroin prolongs survival time and retards tumor growth in mice with neuroblastoma" [La heroína prolonga el periodo de tiempo de supervivencia y retarda el crecimiento de tumores en ratones con neuroblastomas], *Brain Res Bull* 7, 25 - 32 (1981);

Sueoka, N., Sueoka, E., Okabe, S. & Fujiki, H. "Anti-cancer effects of morphine through inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  release and mRNA expression" [Efectos anticancerosos de la morfina mediante inhibición de la liberación del factor alfa de necrosis de tumores y mediante expresión de ARNm] *Carcinogenesis* 17, 2337 - 41 (1996)]. El documento de patente de los EE.UU. 6.277.384 describe combinaciones que se han de aplicar por vía oral, a base de agentes agonistas de opioides y de agentes antagonistas de opioides para el tratamiento del dolor. Estas combinaciones deben impedir el uso impropio (abuso) por personas dependientes de opioides, mediante el hecho de que ellas, en el caso de este círculo de personas, causan un síndrome de abstinencia que el usuario quisiera impedir precisamente en el caso de la ingestión inapropiada de opioides. El documento US 5.266.574 describe la aceleración del crecimiento de células vegetales, animales o humanas mediante un tratamiento con agentes antagonistas de opioides. El empleo, que siempre es todavía muy restrictivo, de morfina o de las sustancias afines en el tratamiento del dolor de pacientes de cáncer, no permitió sin embargo aparecer como justificado emplear estas sustancias para el tratamiento de un cáncer, cuando los pacientes no necesitan al mismo tiempo esta terapia del dolor. En particular, el potencial de dependencia y un efecto inhibitorio sobre el centro respiratorio se presentan en contra de emplear morfina o sustancias similares en los casos de pacientes, que están exentos de dolor o pueden ser curados suficientemente con otros agentes analgésicos, en particular cuando para el tratamiento de tumores son necesarias unas dosificaciones más altas y por lo tanto más tóxicas. A partir de esta bibliografía se puede deducir además que la naloxona u otros agentes antagonistas de opioides, que disminuyen la toxicidad de los opioides, también suprimen el efecto inhibitorio del crecimiento de tumores que presentan los opioides en los casos de los cultivos celulares de tumores pulmonares que se investigaron. Esta vía de aumentar la cantidad de los opioides no pareció por lo tanto ser practicable. Sorprendentemente, sin embargo, en un animal entero se pudo comprobar que éste reacciona de un modo distinto que lo que se había de suponer a partir de los ensayos con cultivos celulares.

El invento se refiere a la utilización de acuerdo con la reivindicación 1 y se basa en los resultados seguidamente descritos.

En un modelo con animales, reconocido farmacológicamente, se inyectó subcutáneamente a ratones desprovistos de inmunidad (= desnudos) (NMRInu/nu; Harlan, Borchon) una suspensión celular ( $5 \times 10^6$  células en  $300 \mu\text{l}$  por ratón) procedente de células humanas de cáncer de mama (linaje celular MCF-7). Durante más de 3 semanas, los animales procedentes del grupo testigo fueron tratados con una solución fisiológica de cloruro de sodio y los animales procedentes de los tres grupos sometidos a tratamiento se trataron con morfina, con naloxona o con la combinación de morfina y naloxona (Fig. 1. con una descripción más exacta del ensayo). La dosis semanalmente creciente debería compensar el conocido desarrollo de tolerancia frente a la morfina. La dosis de naloxona fue de 1/10 de la dosis de morfina, puesto que en el caso de esta relación entre dosificaciones, tal como es conocido, los efectos de la morfina son antagonizados totalmente. En comparación con el grupo testigo, el tratamiento con morfina disminuyó de manera muy significativa estadísticamente, hasta aproximadamente un tercio, el crecimiento de tumores en el transcurso de 3 semanas (Fig. 1 A). Sorprendentemente, la combinación a base de morfina y del agente antagonista de opioides, naloxona, mostró un efecto desde por lo menos igual de bueno hasta mejor. A causa de la completa antagonización mediante la naloxona de los efectos farmacológicos típicos para la morfina, se puede deducir a partir de estos resultados, que también otros mecanismos de acción distintos de los responsables del alivio del dolor contribuyen esencialmente al efecto antitumoral de la morfina. La Fig. 1 B muestra como un efecto indeseado conocido, una disminución del peso corporal en el caso de los ratones tratados con morfina. En el grupo testigo y en el grupo sometido a tratamiento con morfina + naloxona, el peso corporal permaneció sin afectar. En el grupo con naloxona aumentó ligeramente el peso corporal.

En un ensayo con animales concebido de una manera similar (Fig. 2) con el fin de verificar los sorprendentes resultados, se compararon morfina, el 6-glucurónido de morfina (un metabolito de morfina) y la combinación de morfina + naltrexona (un agente antagonista de opioides) frente a un testigo. Se confirmó el buen efecto antitumoral de la morfina y el efecto desde similarmente bueno hasta mejor de la morfina en combinación con el agente antagonista de opioides, naltrexona. El 6-glucurónido de morfina se manifestó como desde similarmente eficaz hasta algo menos eficaz que la morfina. Con el fin de poder clasificar adicionalmente el invento en lo referente a la relevancia terapéutica así como de poder producir la posibilidad de transferencia a sustancias activas similares, se llevaron a cabo investigaciones sistemáticas acerca del mecanismo de los efectos ventajosos descubiertos.

Como sustancias de modelo para las investigaciones adicionales se emplearon DAMGO {(D-Ala<sup>2</sup>, N-metil-Phe<sup>4</sup>, Gly-<sup>o</sup>15)- encefalina}, naloxona y la combinación de ambas sustancias activas. Estas sustancias se emplean frecuentemente en la investigación farmacológica, con el fin de poner en claro los principios generales de acción de los opioides. Se designa como opioides a todas las sustancias cuyo efecto se realiza a través de la fijación a los receptores de opioides en el organismo. Entre ellos se cuentan los numerosos alcaloides del opio procedentes de las cápsulas de semillas de *Papaver somniferum*, de los cuales le corresponde la máxima importancia médica a la morfina. A partir de los alcaloides del opio se preparan otras sustancias eficaces mediante una transformación parcialmente sintética. En el organismo, a través de un sistema inhibitorio del dolor, propio del cuerpo, se forman péptidos de opioides, p.ej. endorfinas, encefalinas y dinorfinas. Finalmente, están a disposición sustancias activas preparadas de una manera totalmente sintética, que se hacen eficaces farmacológicamente a través de la fijación a los receptores de opioides.

Las sustancias que se fijan a los receptores de opioides pueden actuar de una manera agonista (excitadora), antagonista (inhibidora) o de una manera agonista y antagonista mixta. Esta diferencia y el hecho de que los receptores de opioides se subdividen todavía en subtipos (receptores  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ), que cumplen diferentes funciones fisiológicas, ponen en claro que las sustancias que se fijan a los receptores de opioides se pueden diferenciar en cuanto a la calidad de la

acción y en la magnitud de los efectos. En los efectos esenciales, sin embargo, todos los agentes agonistas y todos los agentes antagonistas se comportan de un modo similar entre ellos. La sustancia de modelo DAMGO, escogida para las investigaciones adicionales, se ha consagrado ampliamente como agente agonista de  $\mu$  selectivo en la investigación farmacológica, con el fin de poder investigar de una manera planificada la acción inhibitoria del dolor, más importante para el efecto clínico de los opioides, así como las acciones indeseadas. Con los conocimientos, que se obtienen con la DAMGO, sobre la base de la experiencia existente se puede sacar una conclusión acerca de otros opioides que predominantemente tienen un efecto agonista de  $\mu$ . La naloxona es el agente antagonista de receptores de opioides más ampliamente propagado en la investigación farmacológica y en la aplicación clínica, que actúa como antagonista en todos los conocidos subtipos de receptores de opioides.

En un ensayo de proliferación celular con células humanas de cáncer de mama MCF-7, se midió el efecto de la DAMGO, de la naloxona y de la mezcla de ambas sustancias activas (Fig. 3 A). Frente al testigo sin tratar, la DAMGO redujo considerablemente el ciclo de división celular de una manera dependiente de la concentración. En el caso de los cultivos tratados con DAMGO, el máximo número de células se alcanzó después de 48 horas. Entre las 48 y 72 horas murió una parte de las células sometidas al tratamiento con DAMGO (Fig. 3 A a la izquierda). De manera interesante, también el tratamiento con naloxona y con la mezcla de naloxona y DAMGO condujo a un efecto inhibitorio del crecimiento (Fig. 3 A a la derecha). Como consecuencia, el efecto inhibitorio del crecimiento de la DAMGO no fue antagonizado por la naloxona.

En el mismo linaje celular se determinó el efecto citotóxico de las sustancias activas mediante determinación de las tasas de supervivencia celular (Fig. 3 B). La DAMGO y, de manera interesante, también a su vez la naloxona, mostraron un efecto positivo dependiente de la concentración sobre la tasa de supervivencia. Cuando a 100  $\mu$ Mol DAMGO se les añadieron concentraciones crecientes de naloxona, la curva de supervivencia se desplazó manifiestamente hacia la izquierda. Esto muestra, por una parte, que la mezcla de ambas sustancias activas actúa esencialmente mejor que las sustancias a solas y, por otra parte, que no apareció ninguna antagonización recíproca entre la DAMGO y la naloxona. El TNF $\alpha$  sirvió como testigo positivo. Mediante una adición de DAMGO se pudo aumentar de nuevo considerablemente el efecto del TNF $\alpha$ .

Para la caracterización más detallada de la muerte celular apoptótica, con un estuche de la medición de la apoptosis, que es usual en la ciencia, se midió la tasa de la disociación de ADN (Fig. 4). El TNF $\alpha$ , del que es conocido que inicia la apoptosis en células MCF-7, se utilizó como testigo positivo. En comparación con el testigo sin tratar, con 500  $\mu$ Mol de naloxona y 500  $\mu$ Mol de DAMGO + 500  $\mu$ Mol de naloxona aumentó significativamente la tasa de la disociación de ADN.

Puesto que se trata de un péptido, el agente agonista de  $\mu$  selectivo DAMGO no se emplea actualmente a escala clínica. Con el fin de garantizar la posibilidad de transferir los resultados obtenidos con éste al agente antagonista de opioides, morfina, que clínicamente se emplea con la mayor frecuencia, con un efecto relativamente más selectivo como agente agonista de  $\mu$ , pero también con una fijación más débil a receptores  $\delta$  y  $\kappa$  de opioides, se llevaron a cabo unos análisis de los ciclos celulares en células MCF-7 después de un tratamiento con morfina, con naloxona o con morfina + naloxona (Fig. 5). Se midió la proporción de células que se encontraban en la fase G1, que está dentro de la interfase del ciclo celular delante de la fase S (síntesis del ADN). El aumento de células en la fase G1, dependiente de la concentración, muestra que la morfina inhibe el progreso del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S. Sorprendentemente, también en el caso de la naloxona se encontró un similar bloqueo del ciclo celular. La combinación de ambas sustancias activas era más fuertemente eficaz que cada una de las sustancias activas a solas, lo cual indica un efecto aditivo de la combinación.

Para describir adicionalmente la apoptosis mediante morfina, mediante naloxona o mediante la mezcla de ambas sustancias activas, se midieron, bajo la influencia de las sustancias activas, mediante la citometría de flujo, la fijación de anexina V a fosfatidil-serina de la membrana plasmática y la fijación de 7-amino-actinomicina D (7-AAD) a ADN (Fig. 6). En el caso de unas concentraciones de 3 mmol, la morfina y la naloxona mostraron un manifiesto aumento de células en la apoptosis tardía. En el caso de 2 mmol el efecto era más débilmente pronunciado y en el caso de 1 mmol (no reproducido), este efecto ya no se podía comprobar. La mezcla de sustancias activas era de nuevo más fuertemente eficaz que las sustancias activas individuales. No apareció una antagonización recíproca de este efecto entre morfina y naloxona.

A partir de las investigaciones reproducidas y de otras llevadas a cabo conforme al invento, se puede sacar la conclusión de que en el ensayo modelo con células humanas de cáncer de mama MCF-7, unas sustancias activas tomadas del grupo de los agentes agonistas de receptores  $\mu$  de opioides, en particular la morfina importante clínicamente, provocan un bloqueo del ciclo celular y un aumento de la tasa de mortalidad celular. De modo correspondiente, en el reconocido modelo farmacológico con este linaje celular, se inhibe el crecimiento de tumores en el caso de ratones desnudos. Las concentraciones de morfina en el plasma de estos animales (no reproducidas) correspondieron a los niveles en plasma en el caso de pacientes sometidos a una administración crónica de morfina por vía oral para el tratamiento del dolor. No apareció ninguna antagonización recíproca esencial de los efectos ensayados. La combinación de un agente agonista y de un agente antagonista era por lo menos igual de eficaz, o más eficaz, que las sustancias individuales. En conjunto, las sustancias causan un mecanismo mediado parcialmente a través del receptor  $\mu$ , incluyendo una fosforilación y una estabilización de p53 y una regulación en sentido ascendente de proteínas dependientes de p53, incluyendo a las p21, Bax y al "receptor mortal" CD95/Fas (Fig. 7) (representado en detalle sólo parcialmente). La falta de una antagonización recíproca entre un agente agonista de  $\mu$  y un agente antagonista en el caso de una parte

esencial de los efectos mostrados, pone en claro que una parte de los efectos es mediada de una manera independiente de los conocidos efectos sobre los receptores  $\mu$ .

Las investigaciones llevadas a cabo conforme al invento muestran que los agentes agonistas de receptores  $\mu$  de opioides son apropiados como sustancias activas para el tratamiento del cáncer. Esto es válido para agentes agonistas de  $\mu$  tanto selectivos como también parcialmente selectivos. Mediante una combinación de estas sustancias activas con agentes antagonistas de receptores de opioides, los efectos encontrados para los agentes agonistas se pueden reforzar o bien por lo menos conservar totalmente, mediando reducción de los efectos colaterales que son típicos para los agentes antagonistas de receptores de opioides.

En el caso de la utilización combinada de agentes agonistas de receptores  $\mu$  de opioides y de agentes antagonistas de receptores de opioides, las relaciones entre dosificaciones pueden ser adaptadas a las necesidades terapéuticas individuales. Los pacientes sin dolor se combinan con una cierta dosis eficaz contra el cáncer del agente agonista en común con una cierta proporción del agente antagonista, de tal manera que se suprimen totalmente los típicos efectos de los opioides. De esta manera se pueden impedir ampliamente los efectos colaterales, en parte considerables, de esta clase de sustancias. A causa del potencial de dependencia, reducido o totalmente excluido, por consiguiente se pueden emplear agentes agonistas de receptores de opioides, en particular la morfina que es importante a escala clínica, sin que se establezcan clínicamente las restricciones que en caso contrario son usuales. Dependiendo de la gravedad de los dolores, la proporción relativa de agentes agonistas de receptores de opioides se puede aumentar hasta tal grado que junto a una dosis suficiente para la terapia de un cáncer, se consiga un suficiente efecto aliviador del dolor mediante un exceso relativo de dosis del agente agonista. En el caso de la utilización combinada, la dosis del agente agonista se puede escoger más alta correspondiendo al cuadro clínico, puesto que mediante una exclusión total o parcial del efecto sobre los receptores  $\mu$  mediante el agente antagonista, se pueden reducir al mínimo los típicos efectos colaterales. Puesto que, en lo que se refiere a la actividad contra un cáncer, no tiene lugar ninguna antagonización recíproca de los efectos mediante los partícipes en la combinación, por medio de la dosis del agente agonista, más alta en comparación con la sustancia individual (monosustancia), se puede conseguir un efecto deseado máximo junto con efectos colaterales manifiestamente reducidos.

En los casos de pacientes de cáncer con dolor, a la mezcla de agentes agonistas de receptores de opioides y de agentes antagonistas de receptores de opioides se le pueden añadir otros agentes analgésicos tales como paracetamol, ácido acetilsalicílico, agentes antiinflamatorios no esteroideos, agentes inhibidores selectivos de COX 2, etc. Estas sustancias muestran, en muchos casos, a causa del distinto mecanismo de efecto, un alivio adicional del dolor en comparación con la utilización a solas de agentes agonistas de receptores de opioides. En el caso de un alivio del dolor por medio de estos partícipes adicionales en las combinaciones, se puede incorporar en el medicamento una proporción del agente antagonista más alta en relación con la del agente agonista, con la consecuencia de que se consigue un efecto óptimo contra el cáncer junto con mínimos efectos colaterales y un buen alivio del dolor.

El modo más sencillo de la utilización simultánea de agentes agonistas de receptores  $\mu$  de opioides y de agentes antagonistas de receptores de opioides, eventualmente en unión con otros agentes aliviadores del dolor, es la formulación en una sola forma medicamentosa. Mediante diferentes relaciones de dosificaciones entre un agente agonista y un agente antagonista, se pueden producir formas medicamentosas terminadas para las necesidades terapéuticas individuales arriba mencionadas. Un agente agonista, un agente antagonista y eventualmente el agente analgésico adicional se pueden poner a disposición también en formas medicamentosas separadas. De esta manera, en un caso individual sería posible un tratamiento optimizado todavía más para los pacientes individuales, mediante una elección individual de la dosis y del intervalo de dosificaciones.

Los medicamentos se pueden administrar de acuerdo con todos los modos de aplicación consagrados médicamente. Entran en consideración p.ej. unas formas, que se administran por vía intravenosa, intraarterial (p.ej. en la arteria que conduce al tumor), intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, oral, bucal, rectal, tópica, transdérmica, epidural, intratecal o local en el tumor. Como posibles formulaciones entran en cuestión p.ej. soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, cápsulas, formulaciones para beber, supositorios, formulaciones semisólidas, sistemas terapéuticos transdérmicos y formulaciones para inhalación. La preparación de estas formulaciones se efectúa con las sustancias coadyuvantes que son usuales en la tecnología farmacéutica. Para la formulación y la aplicación óptimas se pueden aprovechar los extensos conocimientos adquiridos acerca del comportamiento biofarmacéutico y farmacocinético, así como acerca de la aplicación médica usual de estas sustancias individuales bien conocidas.

Con ayuda de las siguientes Figuras se explicará con mayor detalle el presente invento. En este contexto muestran:

La Fig. 1 A el crecimiento de tumores MCF-7 en ratones desnudos NMRI nu/nu (Harlan, Borchon) después de un tratamiento con morfina ( $\blacktriangle$ ; n = 15), con naloxona ( $\circ$ ; n = 8), con morfina + naloxona ( $\Delta$ ; n = 11) o con un vehículo ( $\bullet$ ; n = 13). Se inyectaron  $5 \times 10^6$  células por vía subcutánea por ratón. Las dosis de morfina y de naloxona fueron de 10, 20 y 30 mg/kg diariamente en las semanas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>. Para la combinación de sustancias activas se utilizaron unas dosis diarias de morfina de 10, 20 y 30 mg/kg y unas dosis de naloxona de 1, 2 y 3 mg/kg. Un día antes, así como 7 y 14 días después de la inyección de células tumorales, los animales se trataron con 10 mg/kg de valerato de  $\beta$ -estradiol (i.m. = por vía intramuscular). Esta sustancia favorece el crecimiento de tumores y por lo tanto es empleada como patrón en este modelo de animales. Volumen de tumores = (diámetro más largo x diámetro más corto<sup>2</sup>)/2.

La Fig. 1 B el desarrollo del peso corporal durante el tratamiento. El tratamiento es como en 1 A.

## ES 2 286 280 T3

La Fig. 2 el crecimiento de tumores MCF-7 en ratones desnudos NMRI nu/nu después de un tratamiento con un vehículo (testigo; n = 15), con morfina (n = 10), con el 6-glucurónido de morfina (n = 5) o con morfina + naltrexona (n = 5). En el día 0 se inyectaron por vía subcutánea  $4 \times 10^6$  células MCF-7. Se administraron las siguientes dosis diarias: morfina: 10, 15 ó 20 mg/kg en las semanas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>; 6-glucurónido de morfina: 10 mg/kg; morfina + naltrexona: 10 + 10, 15 + 15 o 20 + 20 mg/kg en las semanas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> o 3<sup>a</sup>.

La Fig. 3 A la proliferación de células MCF-7 *in vitro* después de un tratamiento con 100  $\mu$ Mol de DAMGO ( $\blacktriangle$ ), con 500  $\mu$ Mol de DAMGO ( $\blacksquare$ ) (a la izquierda), con 100  $\mu$ Mol de naloxona (o) o con la mezcla de 500  $\mu$ Mol de DAMGO + 100  $\mu$ Mol de naloxona ( $\Delta$ ) (a la derecha) en comparación con células testigos sin tratar ( $\bullet$ ). Valores medios  $\pm$  ETM (= error típico de la media) a partir de 4 - 6 ensayos repetidos.

La Fig. 3 B la tasa de supervivencia de células MCF-7 después de un tratamiento con DAMGO ( $\blacktriangle$ ), con naloxona (o), con 100  $\mu$ Mol de DAMGO + naloxona ( $\Delta$ ), con TNF $\alpha$  ( $\blacksquare$ ), y con 100  $\mu$ Mol de DAMGO + TNF $\alpha$  ( $\square$ ). La tasa de supervivencia fue normalizada para el número de las células testigo sin tratar con 100%. Valores medios  $\pm$  ETM a partir de 4 ensayos repetidos.

La Fig. 4 la tasa de la disociación de ADN después de una incubación de células MCF-7 durante 24 horas con las dosis de las sustancias activas que se indican en las abscisas. Valores medios  $\pm$  ETM de 6 ensayos independientes. La medición de la disociación de ADN se efectúa a través de la determinación de los mono- y oligo-nucleosomas con un estuche para la detección de la apoptosis, de las antihistonas y de los anticuerpos anti-ADN.

La Fig. 5 el análisis del ciclo celular con un análisis de FACS de células MCF-7 a las 24 horas después de un tratamiento con morfina ( $\blacktriangle$ ) o con naloxona ( $\bullet$ ) en las concentraciones de 0,5, 1, 0 y 2,0  $\mu$ Mol así como después de un tratamiento con morfina + naloxona ( $\Delta$ ) en las concentraciones de 0,5 mMol de morfina + 0,1 mMol de naloxona y de 1 mMol de morfina + 1 mMol de naloxona. Valores medios de 3 ensayos independientes.

La Fig. 6 el análisis por citometría de flujo de la fijación de anexina V y de 7-AAD con el fin de determinar la tasa de apoptosis después de un tratamiento durante 24 horas con morfina (MOR), con naloxona (Nx) o con la combinación de morfina y naloxona en las concentraciones indicadas.

La Fig. 7 la expresión del ARNm de CD95/Fas en células MCF-7 después de un tratamiento con actinomicina D (testigo positivo), con DAMGO, con naloxona o con DAMGO + naloxona en las concentraciones y con los periodos de tiempo de tratamiento que se indican. El contenido de ARNm de Fas se determinó mediante una rt-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) mediando utilización de 1  $\mu$ g de ARN total. Resultados representativos de 3 ensayos independientes.

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de sustancias activas con un efecto agonista de receptores  $\mu$  de opioides, escogidas entre morfina, el 6-glucurónido de morfina, metadona, petidina, fentanil, tramadol, pentazocina, buprenorfina, tilidina, levometadona, piritramida, levacetilmetadol, codeína, oxicodona, hidromorfona, dihidrocodeína, diamorfina, sufentanil, alfentanil, remifentanil, nalbufina, butorfanol, sus sales y glucurónidos, así como mezclas de estas sustancias y de sustancias con un efecto antagonista de receptores de opioides, escogidas entre naloxona y naltrexona y sus sales, así como mezclas de estas sustancias como medicamentos combinados para el tratamiento de un cáncer.

10 2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** porque el caso del cáncer se trata de un cáncer de mama.

15 3. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque los agentes agonistas de receptores  $\mu$  de opioides y los agentes antagonistas de receptores de opioides se combinan en una sola forma medicamentosa o se ponen a disposición para la terapia formulados individualmente en un envase combinado o formulados individualmente en envases separados para medicamentos.

20 4. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque a los agentes agonistas de receptores  $\mu$  de opioides y a los agentes antagonistas de receptores de opioides se les añaden otras sustancias activas que alivian el dolor (analgésicas) o inhiben la inflamación (antiinflamatorias), escogidas entre paracetamol, ácido acetilsalicílico, agentes antirreumáticos no esteroideos, agentes inhibidores selectivos de COX-2 y/o agentes inhibidores de TNF $\alpha$ .

25 5. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque a partir de las sustancias activas, en común con sustancias coadyuvantes compatibles farmacéutica y farmacológicamente, se preparan medicamentos terminados, tales como soluciones destinadas a la inyección o infusión, suspensiones, emulsiones, tabletas, cápsulas, formulaciones para beber, formulaciones para mascar, supositorios, formulaciones semisólidas, formulaciones terapéuticas transdérmicas o formulaciones para inhalación.

30 6. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque a partir de las sustancias activas, en común con sustancias coadyuvantes compatibles farmacéutica y farmacológicamente, se preparan sistemas terapéuticos transdérmicos con una característica de liberación continua o intermitente a largo plazo, en particular con las sustancias activas fentanil y buprenorfina.

35 7. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque los medicamentos se pueden aplicar en el tumor por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, oral, bucal, nasal, rectal, tópica, transdérmica, epidural, intratecal o local.

Figura 1A

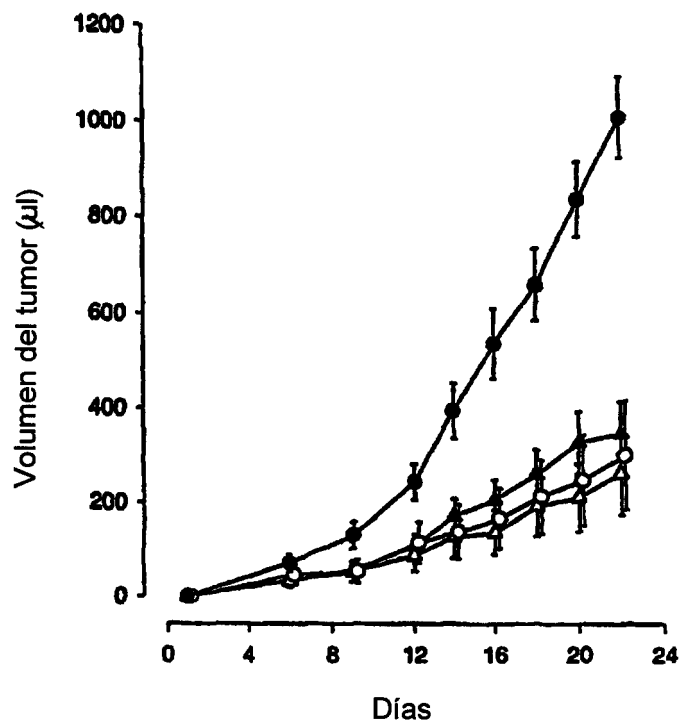


Figura 1B

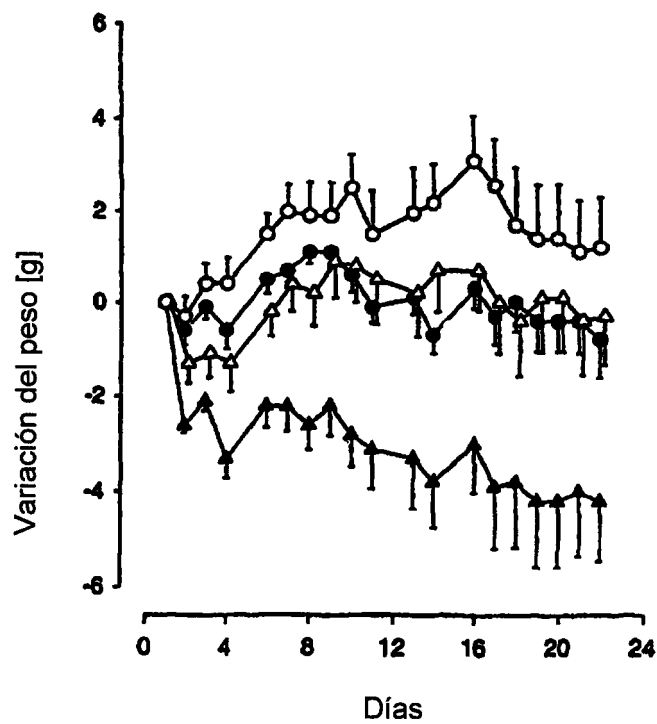


Figura 2

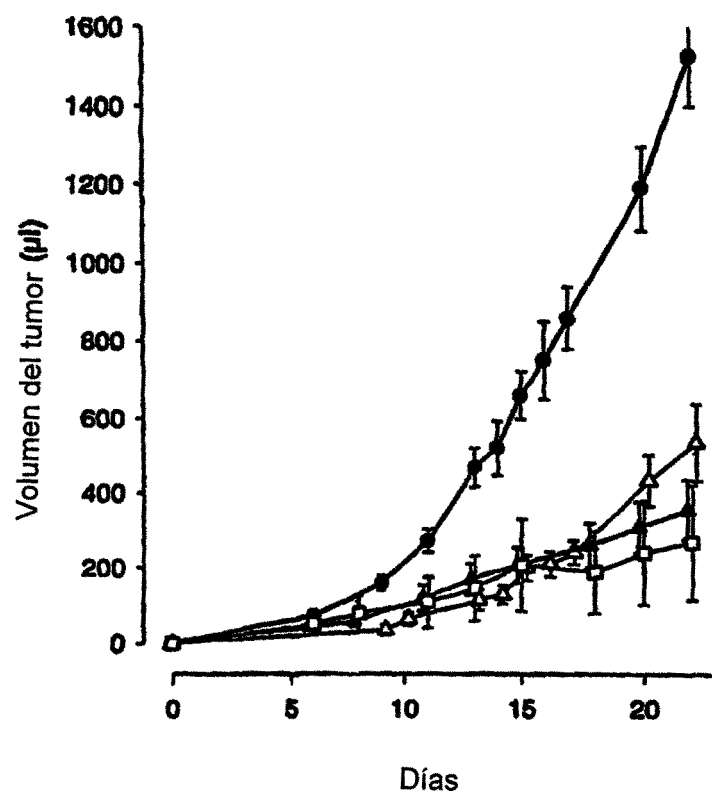


Figura 3A

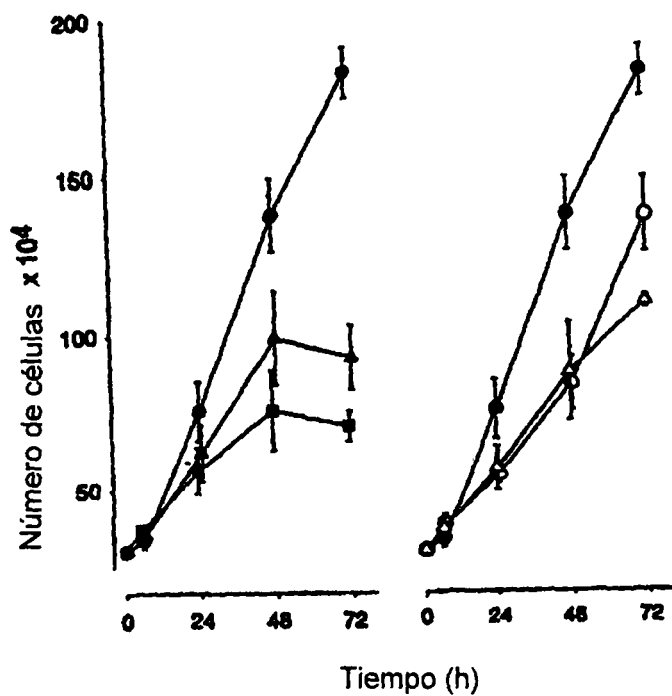


Figura 3B

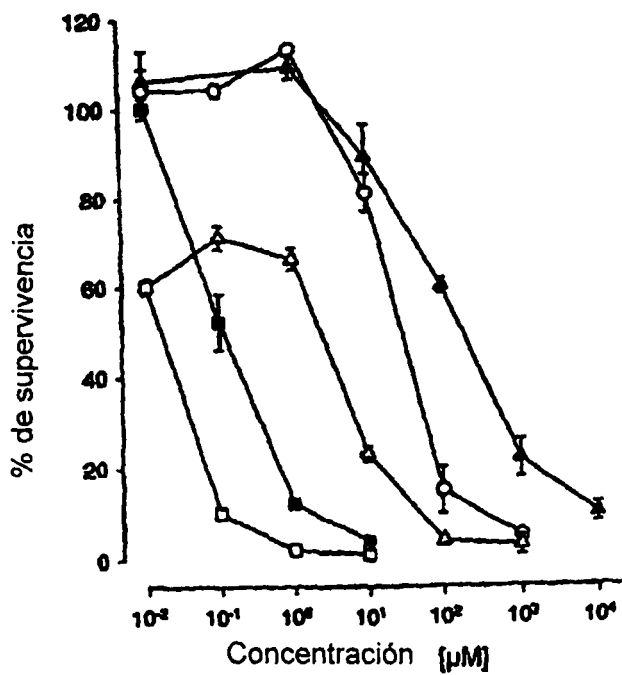


Figura 4

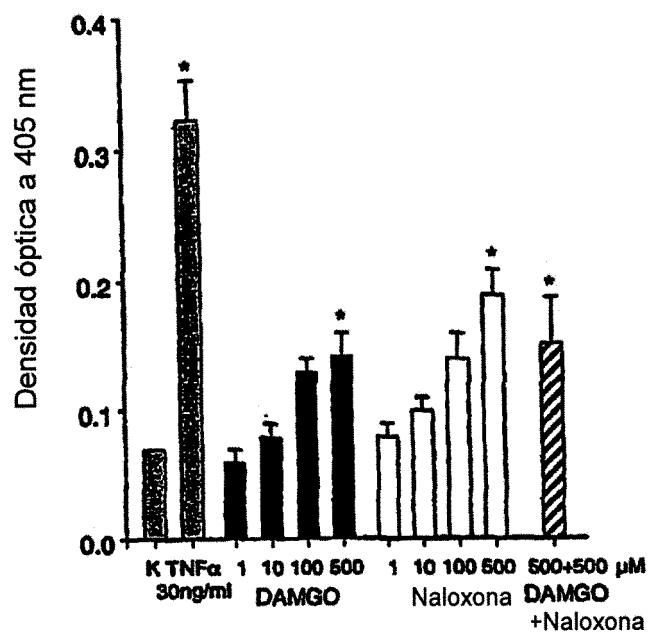


Figura 5

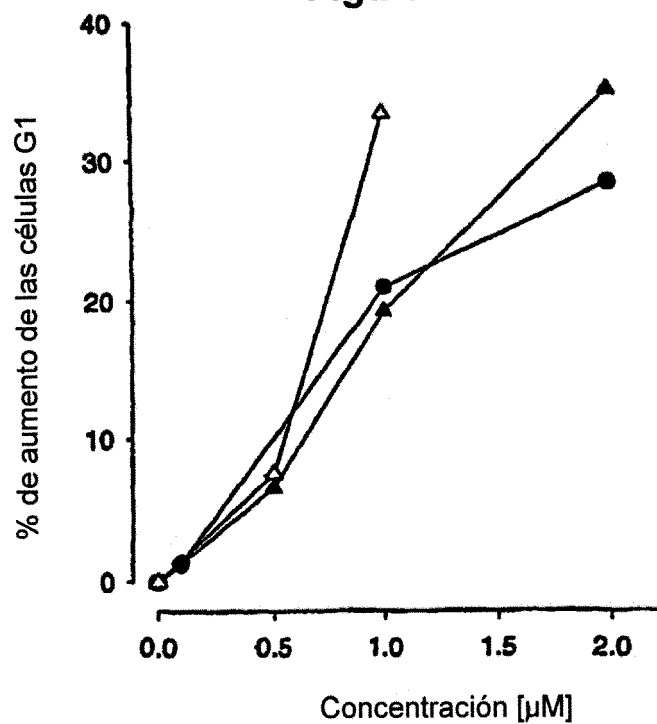


Figura 6

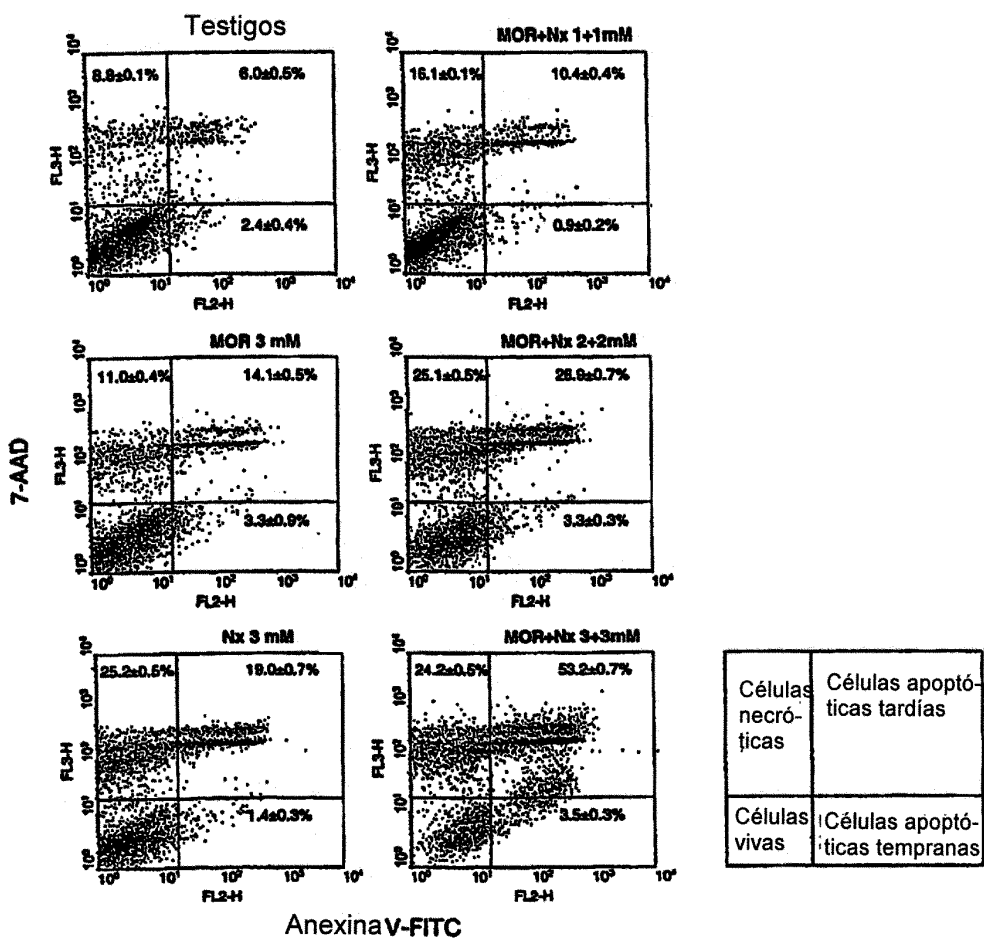


Figura 7

