

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
18 de Octubre de 2007 (18.10.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/116114 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 38/00 (2006.01) A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01) A61K 31/4965 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01) A61K 31/135 (2006.01)

Wolfgang Goethe-Universität, Senckenberganlage 31,
Frankfurt am Main, 60325 Frankfurt (DE). **LUDWIG,
Ralf** [DE/DE]; Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Senckenberganlage 31, Frankfurt am Main, D-60325
Frankfurt (DE).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2007/070074

(22) Fecha de presentación internacional:

12 de Abril de 2007 (12.04.2007)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200600960 12 de Abril de 2006 (12.04.2006) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006
Madrid (ES). **JOHANN WOLFGANG GOETHE UNI-
VERSITY** [DE/DE]; Senckenberganlage 31, Frankfurt
am Main, D-60325 Frankfurt (DE).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **MAR-
TINEZ ALONSO, Carlos** [ES/ES]; Centro Nacional
de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, C/ Darwin, 3, Cantoblanco, E-28049 Madrid
(ES). **DUTHEY, Beatrice** [FR/DE]; Johann Wolfgang
Goethe-Universität, Senckenberganlage 31, Frankfurt
am Main, D-60325 Frankfurt (DE). **BOEHNCKE,
Wolf-Henning** [DE/DE]; Johann Wolfgang Goethe-Uni-
versität, Senckenberganlage 31, Frankfurt am Main,
D-60325 Frankfurt (DE). **GILLE, Jens** [DE/DE]; Johann

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: USE OF DELTA OPIOID RECEPTOR AGONISTS IN THE PREPARATION OF PHARMACEUTICAL COMPO-
SITIONS, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THAT CONTAIN THEM AND THEIR APPLICATIONS IN THE TREAT-
MENT OF TUMOURS

(54) Título: USO DE AGONISTAS DEL RECEPTOR OPIOIDE DELTA EN LA ELABORACIÓN DE COMPOSICIONES FAR-
MACÉUTICAS, COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LAS CONTIENEN Y SUS APLICACIONES EN EL TRATA-
MIENTO DE TUMORES

(57) Abstract: This invention is based on the blocking effect of the DPDPE agonist on the intramolecular signalling cascade initi-
ated by the CXCL12-CXCR4 pair, which induces tumour progression and the formation of metastases. Thus, the invention describes
the fact that the treatment with DPDPE *in vivo* reduces metastases in animal models by means of a mechanism that does not involve
an immune response.

(57) Resumen: Esta invención se fundamenta en el efecto bloqueante del agonista DPDPE sobre la cascada de señalización intra-
molecular, iniciada por el par CXCL12-CXCR4, que induce la progresión tumoral y la formación de metástasis. Así, la invención
describe que el tratamiento con DPDPE *in vivo* reduce las metástasis en modelos animales, mediante un mecanismo que no implica
la respuesta inmune.



WO 2007/116114 A1

TITULO

USO DE AGONISTAS DEL RECEPTOR OPIOIDE *DELTA* EN LA
ELABORACIÓN DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, COMPOSICIONES
FARMACÉUTICAS QUE LAS CONTIENEN Y SUS APLICACIONES EN EL
5 TRATAMIENTO DE TUMORES

SECTOR DE LA TÉCNICA

La invención se encuadra en el sector biomédico,
concretamente en el campo del desarrollo de composiciones
10 farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades
tumorales, y más específicamente, en la utilización de
agonistas del receptor opioide delta (por ejemplo, el
DPDPE, D-Pen-D-Pen-encefalina), como nuevos agentes
antitumorales que reducen específicamente la progresión
15 tumoral y la aparición de metástasis por diseminación
sanguínea.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El receptor de quimioquina CXCR4 interviene en el
20 establecimiento de metástasis al promover la migración y la
adhesión de las células tumorales a los nódulos linfáticos,
los pulmones y el hígado, cuando su ligando, CXCL12, es
sobreexpresado en esas localizaciones (Benovic, J.L. and
Marchese, A. 2004.; Muller, A. et al, 2001; Balkwill, F.,
25 2004). CXCR4 está sobreexpresado en numerosos tipos de
células tumorales y su presencia anticipa resultados
clínicos poco satisfactorios (Kang H et al. 2005; Salvucci
O et al. 2005; Wang N et al. 2005). Además, se ha
constatado que el uso de antagonistas de CXCR4, como el AMD
30 3100, anticuerpos bloqueantes o estrategias de ARN
interferente reducen las metástasis en varios modelos
murinos (Liang, Z. et al, 2004; Lapteva, N. et al, 2005;
Takenaga, M. et al, 2004). CXCL12 es liberado en grandes
cantidades a nivel de nódulos linfáticos, pulmones e

hígados, órganos donde las metástasis tienden a aparecer. En resumen, hay evidencias suficientes para relacionar el par CXCR4-CLCX12 con el desarrollo de metástasis, y por tanto, para considerarlo una diana en el diseño de
5 potenciales fármacos contra el cáncer.

CXCR4 pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR). Los receptores opioides también forman parte de esta familia. Los opiáceos endógenos (endorfinas) son pequeñas moléculas peptídicas,
10 descubiertas inicialmente en tejidos cerebrales, que reducen la sensación de dolor. Los opiáceos se unen a los GPCRs *mu*, *delta* y *kappa* (Kirk-Othmer, 1996; Kieffer BL, 2000). Si bien se expresan a altos niveles en el cerebro, los opiáceos también han sido detectadas en células del
15 sistema inmune y en algunos tipos de células malignas, como las de los melanoma, tumores de próstata y pulmón (Fichna, J. and Janecka, A. 2004), donde su papel es todavía desconocido. Distintos estudios con leucocitos *in vitro* han mostrado que los opiáceos pueden bloquear los receptores de
20 quimioquinas mediante desensibilización heteróloga (Rogers, T.J. *et al*, 2000). La desensibilización heteróloga es un mecanismo bien estudiado en esta superfamilia de receptores: un GPCR resulta activado por un agonista, iniciándose un proceso de señalización que conduce a la
25 inactivación de otro GPCR, produciéndose así una modulación cruzada.

Las metástasis tumorales constituyen la causa de mortalidad determinante en la mayoría de los cánceres malignos. Teniendo en cuenta la interacción cruzada que se
30 puede establecer entre los opiáceos y receptores relacionados con la migración de células tumorales, esta invención descubre que a los opiáceos agonistas del receptor delta pueden actuar como agentes antitumorales eficaces en la reducción de metástasis.

DESCRIPCION**Descripción breve**

Un objeto de la presente invención lo constituye la utilización de agonistas del receptor delta opiáceo, en
5 adelante utilización de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la prevención y/o tratamiento del cáncer.

Un objeto particular de la presente invención lo
10 constituye la utilización de un compuesto de la invención en el que el compuesto agonista pertenece al siguiente grupo, ya sean de estructura peptídica o no: compuestos de diarilmetilpiperazina (U.S. Pat 20060004016, Chang; Kwen-Jen 2006, Enantiomerically pure opioid
15 diarylmethylpiperazine as a cardioprotection agent), TAN-67 (Fryer et al. in 274 J. Biol. Chem. 451-457, 2000), derivados tetracíclicos de piridina y pirazina (WO 99/04795, Toray Industries Inc.), pirrolooctahidroisoquinolonas (Dondio, G. et al. Discovery
20 of a novel class of substituted pyrrolooctahydroisoquinolines as potent and selective .delta. opioid agonists, based on an extension of the message-address concept. J. Med. Chem. 1997, 40: 3192-3198), el compuesto BW373U86 (Chang, KJ. et al. A novel
25 potent and selective nonpeptidic *delta* opioid receptor agonist, BW373U86. J. Pharm. Exp. Ther. 1993, 267, 852-857), el compuesto SNC 80 (Calderon, SN. et al. Probes for narcotic receptor mediated phenomena 19. Synthesis of (+)-4-[(.alpha.R)-.alpha.-(2S,5R)-4-allyl-2,5-- dimethyl-1-
30 piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80) A highly selective, nonpeptide .delta. opioid receptor agonist. J. Med. Chem. 1994, 37, 2125-2128), DPDPE y deltorfina I y II (U.S. Pat. 5,389,645 y 5,985,880, DPDPE [D-Pen.sup.2, D-Pen.sup.5]-(enkephalin) y heptapéptidos

[deltorphan I and II] respectivamente), biphalin (Crystal structure of biphalin sulfate: a multireceptor opioid peptide. Flippen-Anderson JL et al. J Pept Res 2002, 59: 123-33), el péptido DADLE ([D-Ala2, D-Leu5] enkephalin
5 (DADLE) protects liver against ischemia-reperfusion injury in the rat. Yamanouchi K, et al. J Surg Res. 2003, 114: 72-7) y la metadona.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en el que
10 el compuesto agonista es el agonista D-Pen-D-Pen-enkefalina (DPDPE).

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una
15 cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente agonista del receptor opioide delta, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en
20 la que el compuesto agonista pertenece al siguiente grupo, ya sean de estructura peptídica o no: compuestos de diarilmetilpiperazina, TAN-67, derivados tetracíclicos de piridina y pirazina, pirrolooctahidroisoquinolonas, el
25 compuesto BW373U86, el compuesto SNC 80, DPDPE, deltorfina I y II, biphalin, el péptido DADLE y la metadona.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto es el agonista D-Pen-D-Pen-enkefalina
30 (DPDPE).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por cáncer, en adelante uso de la composición

farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que reduce la progresión tumoral, por ejemplo, la migración, extravasación y asentamiento de células tumorales en localizaciones distintas de la original (metástasis).

Descripción detallada

La presente invención ofrece una nueva estrategia terapéutica para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades tumorales humanas.

La invención se basa en que los inventores han identificado el efecto inactivante del compuesto DPDPE, agonista del receptor opioide delta, sobre la cascada de eventos moleculares inducida por el par, ligando-receptor, CXCL12-CXR4 que induce a la progresión tumoral, por ejemplo al establecimiento de metástasis. Este efecto inactivante se produce tras su unión al receptor opiáceo delta y por un proceso de modulación cruzada entre receptores GPCR (Ejemplo 1).

Los inventores han descubierto que el DPDPE podría ejercer una desensibilización heteróloga sobre CLCX12-CXR4, reduciendo la adhesión celular, la migración celular, la extravasación y el anclaje en órganos distantes de las células tumorales (Ejemplo 2). Así, el tratamiento con DPDPE en animales que habían sido inyectados con células de melanona redujo la aparición de focos de metástasis en el pulmón (Ejemplo 2).

Actualmente se están realizando ensayos clínicos de las propiedades analgésicas de DPDPE (Quock RM *et al.* 1999). Esta invención muestra que la aplicación del DPDPE podría también extenderse a la eliminación de metástasis.

La utilización del DPDPE en el tratamiento de tumores ofrece las siguientes ventajas: 1) podría ayudar a remitir metástasis de numerosos tumores (de pulmón, hígado,

nódulos, mama, próstata) en cuyas células aparecen receptores del agonista DPDPE y CXCR4; además, 2) podría representar una alternativa menos agresiva a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia actuales; 3) considerando el efecto analgésico, se ha observado que en 5 ratas el DPDPE causa menos efectos indeseados que la morfina, un opiáceo se administra a enfermos de cáncer en estado crítico (Cheng, et al, 1993); 3) por último, actualmente se buscan opiáceos que no atraviesen la barrera 10 hematoencefálica y permanezcan en periferia.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye la utilización de agonistas del receptor delta opiáceo, en adelante utilización de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o 15 composiciones farmacéuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades tumorales humanas y animales.

Tal como se utiliza en la presente invención el término agonista del receptor opiáceo delta es un compuesto que se une o interactúa con el receptor opiáceo delta y 20 cuya interacción induce sus efectos terapéuticos, es decir, analgésicos y/o antitumorales.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye la utilización de un compuesto de la invención en el que el compuesto agonista pertenece al siguiente 25 grupo, ya sean de estructura peptídica o no: compuestos de diarilmetilpiperazina (U.S. Pat 20060004016, Chang; Kwen-Jen 2006, Enantiomerically pure opioid diarylmethylpiperazine as a cardioprotection agent), TAN-67 (Fryer et al. in 274 J. Biol. Chem. 451-457, 2000), 30 derivados tetracíclicos de piridina y pirazina (WO 99/04795, Toray Industries Inc.), pirrolooctahidroisoquinolonas (Dondio, G. et al. Discovery of a novel class of substituted pyrrolooctahydroisoquinolines as potent and selective

.delta. opioid agonists, based on an extension of the message-address concept. J. Med. Chem. 1997, 40: 3192-3198), el compuesto BW373U86 (Chang, KJ. et al. A novel potent and selective nonpeptidic *delta* opioid receptor agonist, BW373U86. J. Pharm. Exp. Ther. 1993, 267, 852-857), el compuesto SNC 80 (Calderon, SN. et al. Probes for narcotic receptor mediated phenomena 19. Synthesis of (+)-4-[(.alpha.R)-.alpha.-(2S,5R)-4-allyl-2,5-- dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80)

10 A highly selective, nonpeptide.*delta*. opioid receptor agonist. J. Med. Chem. 1994, 37, 2125-2128), DPDPE y deltorfina I y II (U.S. Pat. 5,389,645 y 5,985,880, DPDPE [D-Pen.^{sup.2}, D-Pen.^{sup.5}](enkephalin) y heptapéptidos [deltorphin I and II] respectivamente), biphalin (Crystal

15 structure of biphalin sulfate: a multireceptor opioid peptide. Flippen-Anderson JL et al. J Pept Res 2002, 59: 123-33), el péptido DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin (DADLE) protects liver against ischemia-reperfusion injury in the rat. Yamanouchi K, et al. J Surg Res. 2003, 114: 72-

20 7) y la metadona.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en el que el compuesto agonista es el agonista D-Pen-D-Pen-encefalina (DPDPE).

25 Tal como se utiliza en la presente invención el término "la utilización de un compuesto agonista" incluye además el uso de sus formas isoméricas, sales farmacéuticamente aceptables, derivados, solvatos, amidas, ésteres y éteres de los compuestos originales. Los

30 compuestos agonistas de la presente invención utilizados pueden ser isómeros, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros. El uso de sus isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los

enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran la utilización de los profármacos de los
5 compuestos agonistas de la invención. El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto agonista de la invención, por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de
10 fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto agonista de la invención en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un
15 compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto agonista cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del mismo en un compartimento biológico. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos
20 en la materia.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "enfermedades tumorales" se refiere a patologías creadas por el crecimiento de células tumorales humanas o animales, y de forma más concreta nos referimos, a título
25 ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de sistema nervioso central y sarcoma. Así, otro objeto particular de la presente invención lo constituye la utilización de un compuesto de la invención
30 en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades tumorales humanas pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al

siguiente grupo: melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de sistema nervioso central y sarcoma.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una
5 composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente agonista del receptor opioide delta, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos
10 farmacéuticamente aceptables. Dicha composición terapéutica es particularmente útil frente a células tumorales humanas y animales.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en
15 la que el compuesto agonista pertenece al siguiente grupo, ya sean de estructura peptídica o no: compuestos de diarilmetilpiperazina, TAN-67, derivados tetracíclicos de piridina y pirazina, pirrolooctahidroisoquinolonas, el compuesto BW373U86, el compuesto SNC 80, DPDPE, deltorfina
20 I y II, biphalin, el péptido DADLE y la metadona.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto es el agonista D-Pen-D-Pen-encefalina (DPDPE).

25 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e
30 incluye adyuvantes, sólidos o líquidos, disolventes, tensioactivos, etc.

Si se desea, dicha composición farmacéutica puede contener, además, uno o más agentes terapéuticos que, eventualmente, potencien la acción terapéutica de dicho

compuesto agonista o bien que incrementen su espectro de acción.

Dicha composición farmacéutica puede ser utilizada para prevenir y/o tratar enfermedades tumorales humanas o
5 animales.

El compuesto agonista estará presente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad apropiada para ejercer su efecto terapéutico. En una realización particular, la
10 composición farmacéutica proporcionada por esta invención, contiene entre 0,01% y 99,99% en peso de un compuesto agonista y sus mezclas, y puede presentarse en cualquier forma farmacéutica de administración apropiada en función de la vía de administración elegida, por ejemplo, oral,
15 parenteral o tópica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, 1ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad tumoral, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención,
20 consistente en la administración de dicha composición terapéutica que reduce la progresión tumoral, por ejemplo, la migración, extravasación y asentamiento de células tumorales en localizaciones distintas de la original (metástasis).

El uso de la composición farmacéutica de la invención puede por tanto ser útil para el tratamiento de pacientes con distintos tipos de cáncer, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el melanoma, cáncer
30

de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de sistema nervioso central y sarcoma.

De esta manera, la invención proporciona un método para prevenir y/o tratar enfermedades tumorales en humanos que comprende la etapa de administrar a un ser humano, con
5 necesidad de tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica proporcionada por esta invención.

En resumen, la presente invención considera la
10 utilización de ciertos fármacos opiáceos no sólo como analgésicos sino también como agentes anti-tumorales, debido a la modulación cruzada por los agonistas del receptor opioide delta sobre la cascada de transducción CXCL12-CXCR4 que está implicada en la progresión tumoral y
15 generación de metástasis.

DESCRIPCION DE LAS FIGURA

Figura 1.-Tinción inmunoquímica representativa de CXCR4 y del receptor opiáceo delta en células B16 de melanoma murino. Las células fueron permeabilizadas, fijadas y
20 teñidas como se describe en materiales y métodos con anticuerpos anti-CXCR4 o anti- receptor opiáceo delta. Como control de tinción, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con FITC o con un
25 anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC. La expresión de los receptores se puede visualizar en las imágenes B (expresión de CXCR4) y D (expresión del DOR), mientras que A and C representan las células controles.

Figura 2.- Desensibilización de CXCR4 por DPDPE. Las
30 células fueron activadas con forskolina y los ligandos como se describe en materiales y métodos. Los niveles de AMPc fueron determinados a continuación. Las barras representan el porcentaje de inhibición del AMPc vs control (células pretratadas con forskolina y no expuestas a ligandos). Como

se muestran en el gráfico, dosis de DPDPE del orden de 10^{-7} M reducen significativamente los niveles de AMPc. Los datos fueron recogidos a partir de cuatro experimentos independientes. Los datos se expresan como valores medios más desviación estándar. Se consideraron diferencias significativas para valores de P menores que 0.05.

Figura 3.- Efecto de DPDPE en la viabilidad de las células B16. A) Perfil del ciclo celular de la línea B16 tratada con DPDPE durante 24, 48 y 72 horas. B) Las células crecieron bajo las condiciones descritas en ausencia y en presencia de DPDPE (10^{-5} M) de 24 a 72 horas. Las barras representan el número medio células por placa. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes.

Figura 4.- Unión de CXCL12 a células B16 de melanoma. Las células B16 fueron incubadas con CXCL12 marcado. Después de los tiempos indicados se cuantificó el I^{125} -CXCL12 unido a la superficie. Los datos son expresados como cuentas por minuto (cpm), procedentes de tres ensayos independientes. No se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos.

Figura 5.- Efecto de DPDPE en la adhesión y migración de células B16. A) Células B16 marcadas con BCECF fueron sembradas en placas cubiertas tratadas con fibronectina. A una concentración de DPDPE 10^{-3} M se observa un efecto similar al que se observa con una concentración de AMD3100 10^{-6} M. Los datos se expresan como luminiscencia a partir de al menos tres experimentos por grupo. B) Migración polarizada a través de matrigel de células B16 hacia CXCL12 en ausencia o en presencia de las sustancias indicadas. De nuevo, se puede observar una reducción de la movilidad celular, en este caso en la migración, después del tratamiento de las células B16 de melanoma con DPDPE. Los datos proceden de 3 experimentos, cada uno de ellos realizado por triplicado.

Figura 6.- Efecto de DPDPE en el movimiento rodante de células B16 in vivo. Células B16 marcadas con CFDA fueron inyectadas en ratones C57Bl/6. Las interacciones de rodamiento de las células con la microvasculatura de la piel fueron observadas después de inyección subcutánea de CXCL12. Se estudiaron las interacciones de rodamiento de células B16 de melanoma pretratadas con DPDPE en el mismo suelo vascular. Cada par de datos conectados (líneas punteadas) representan el rodamiento de células no tratadas con DPDPE (izquierda) y células tratadas (derecha). La línea llena y los puntos de datos corresponden a la media de rodamiento en nueve vasos de cuatro ratones ($P = 0.027$, prueba t-student pareada).

Figura 7.-Efecto de DPDPE sobre metástasis experimentales de pulmón en ratones C57/BL6. A) Células B16 fueron inyectadas por vía intravenosa en ratones singénicos C57/BL6. El gráfico muestra el número de puntos de metástasis presentes en la superficie de los pulmones en ratones C57/BL6 tratados o no con DPDPE 7 días después de la inoculación de células tumorales. En comparación con los controles, se observa una reducción de más del 50% en los animales tratados con DPDPE. El experimento fue repetido 3 veces con de 7 a 10 ratones por grupo. **B)** Efecto del DPDPE en ensayos de metástasis experimental de melanoma sobre pulmones con ratones SCID. Como el número de focos metastásicos no pudo ser contado en los ratones control, se muestra una estimación de la superficie afectada por la metástasis. De forma similar a los resultados obtenidos usando ratones C57/BL6, hay una gran reducción en la formación de metástasis debido al tratamiento con DPDPE. **C)** Imágenes representativas de pulmones en ratones C57BL/6 tratados o no tratados con DPDPE, una semana después de la inyección de células de melanoma B16 F10.

Propósitos adicionales, ventajas y características de la invención podrán desarrollarse en el estado de la técnica o ser aprendidos por la práctica del invento. A través de los métodos descritos y demandas no se intenta
5 excluir otros rasgos técnicos, componentes, aditivos o etapas del proceso que surjan como resultado del desarrollo de la técnica. Los siguientes ejemplos e ilustraciones no intentan limitar la presente invención.

10 EJEMPLOS DE LA INVENCION

Ejemplo 1.- Efecto del agonista opiáceo DPDPE sobre el par receptor-ligando CXCR4-CXCL12.

Se realizaron ensayos con melanoma de ratón, tanto *in vivo* como *in vitro*. En primer lugar, se buscó si las
15 células B16 de melanoma de ratón expresaban los receptores del agonista DPDPE y CXCR4 (marcaje inumnoquímico). Células de melanoma ratón B16 (colección americana de cultivos tipo ATTC N° CRL-6475; Manassas, VA) fueron crecidas en medio Dulbecco-Eagle modificado (Sigma, St. Louis, MO),
20 suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), penicilina y estreptomycin. Los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CXCR4 habían sido obtenidos con anterioridad por los mismos inventores (Vila-Coro, A.J. et al. 1999); el anticuerpo policlonal de conejo anti-receptor opioide delta se obtuvo de Oncogene Research
25 (San Diego, CA); el anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el anticuerpo marcado anti-conejo (FITC) fueron suministrados por BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA). El BCECF "Cell Tracker" de tinción
30 procedía de Molecular Probes (Eugene, OR).

Las células B16 fueron sembradas en pocillos con fibronectina adherida, fijadas con paraformaldehído al 4% (15 minutos a temperatura ambiente), permeabilizadas con 0.01% Triton X100 (5 minutos), lavadas tres veces con PBS-

0.01% Tween, y bloqueadas con PBS-BSA (1 hora a temperatura ambiente). Entonces, fueron incubadas con anticuerpo anti-CXCR4 (1:50) o con anticuerpo anti-receptor opioide delta (1:100), junto con el segundo anticuerpo FITC-anti-ratón (1:200) o con FITC-anti-conejo (1:100), respectivamente. Las células fueron lavadas y la expresión del receptor fue evaluada mediante microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados obtenidos confirmaron, efectivamente, que ambos receptores se expresan en las células B16 de melanoma (Figura 1).

A continuación, se estudió si el agonista DPDPE podría desensibilizar el receptor CXCR4 en células B16 de melanoma (modulación cruzada) mediante ensayos de AMPc. Para ello, las células B16 fueron incubadas con forskolina 10 mM (3 minutos a 37°C) para incrementar la producción de AMPc; posteriormente fueron estimuladas con los agonistas CXCL12 (50 nM), DPDPE (10^{-5} M), o con ambos (10 minutos a 37°C). Los niveles de AMPc fueron determinados con el paquete comercial AMPc Direct Immunoassay Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany). En presencia de DPDPE los niveles de AMPc fueron similares a los que existían en células sin estimular, de lo que se concluye que el DPDPE desensibiliza CXCR4 (Figura 2).

Seguidamente, se valoró la posible citotoxicidad del DPDPE sobre las células (Figura 3), pero no se observó ningún efecto citotóxico. Para ello, se usó un paquete comercial para determinar la proliferación celular (Beckman Coulter, Hialeah, FL) y analizar los posibles efectos de este agonista opiáceo en el ciclo celular de las células B16. Las células fueron plantadas en una placa de 6 pocillos, incubadas durante entre 24 y 72 horas en medio DMEM completo, solas o con DPDPE a concentraciones de hasta 10^{-5} M. Posteriormente, se recogieron las células, se

trataron de acuerdo al protocolo proporcionado, y el ciclo celular se analizó mediante citometría de flujo.

Seguidamente, para determinar si el efecto observado se debía a la internalización de CXCR4, se llevó a cabo un ensayo de unión a la superficie en células B16, y más concretamente sobre células intactas para marcar sólo los receptores presentes en la superficie celular. Así, las células (500.000 células/pocillo) fueron sembradas en una placa de 24 pocillos y expuestas a DPDPE (10^{-5} M) durante 15 a 30 minutos a 37°C. Para el resto del experimento, la temperatura se mantuvo a 4°C. Las células fueron entonces tratadas con 125 I CXCL12 0.15 nM (2000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia) durante 2 horas a 4°C con una agitación suave. La unión no específica se evaluó mediante la incubación de las células conjuntamente con CXCL12 no marcado (500 nM) en el medio de unión. Las células fueron entonces lavadas 3 veces cuidadosamente con PBS y recogidas en tubos. La cantidad de 125 I CXCL12 se cuantificó para cada una de las condiciones con un contador de centelleo γ . Como se muestra en la Figura 4, las células pretratadas con DPDPE no presentaron diferencias significativas en las cantidades de 125 I CXCL12 unido en la superficie celular, lo que indica que la alteración de la respuesta de CXCR4 por DPDPE no se debe a la internalización del receptor.

25

Ejemplo 2.- Efecto del DPDPE sobre distintos parámetros indicativos de progresión tumoral.

Se realizaron ensayos *in vitro* para determinar el efecto del DPDPE tras la desensibilización de CXCR4 en la adhesión, invasión y migración de las células tumorales. Para el ensayo de adhesión celular se prepararon placas de cultivo celular de 96 pocillos de BD BioScience durante la noche a 4°C con 20 μ g/ml de fibronectina y los ligandos.

30

Las placas fueron lavadas con PBS y bloqueadas con 0.5% BSA durante 1 hora a 37°C. Las células B16, previamente marcadas con BCECF, se sembraron (2×10^5 /pocillo) en 200 μ l de PBS para su adhesión (10 minutos, 37°C). Las células no
5 adheridas se eliminaron mediante un lavado suave con PBS; la adhesión celular se determinó con un luminómetro tal como se describió por otros autores (Chen, C. et al. 2004). La luminiscencia es directamente proporcional al número de células por pocillo. Para el ensayo concreto de la
10 invención las células fueron sembradas en placas recubiertas con CXCL12/fibronectina en presencia o en ausencia de DPDPE, observándose que el nivel de adhesión celular se redujo en presencia de DPDPE y en un nivel dependiente de la dosis (Figura 5a).

15 Los ensayos de migración se realizaron en cámaras de invasión de matrigel (BD, Biocat, San José, CA) por triplicado. Las células B16 (10^5 células/100 μ l) se añadieron al compartimiento superior de la cámara y los ligandos fueron añadidos a la cámara inferior para promover
20 la migración celular a través del matrigel. Las placas se incubaron a 37°C durante 22 horas. Las células que no migraron se eliminaron de la parte superior del matrigel con un bastoncillo de algodón. Después del ensayo de migración, el matrigel fue digerido con dispasa 15 minutos
25 a 37°C y las células emigrantes fueron contabilizadas después de la completa digestión del matrigel por citometría de flujo (Bartolome, R.A. et al, 2004). Como se esperaba, el CXCL12 indujo la migración de las células B16. Sin embargo, en presencia de concentraciones de 10^{-5} a 10^{-3}
30 de DPDPE la migración inducida por CXCL12 fue inhibida de una manera dependiente de dosis por DPDPE (Figura 5b).

Los inventores también analizaron el efecto del DPDPE en el rodamiento *in vivo* de células de melanoma B16, primer

paso crítico de la adhesión de las células sanguíneas a las paredes del endotelio vascular. La alta expresión de CXCL12 en órganos como hígado y pulmón podría explicar la alta frecuencia de metástasis en esos órganos (hipótesis semilla-suelo). Mediante microscopía intravital se estudió la interacción de células B16 de melanoma con la microvasculatura de la oreja en presencia o en ausencia del agonista DPDPE (Ludwig, R.J. 2004). El ratón fue anestesiado mediante inyección intraperitoneal de ketamina (Schwabe-Curamed, Karlsruhe, Germany) y xilacina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany), y colocado en una manta homotérmica. Se preparó para microcirugía la arteria carótida común derecha; se insertó un catéter para la inyección retrograda de las células. La oreja izquierda del ratón, que recibió 50 μ l de 1.25 μ M de CXCL12, fue colocada suavemente entre un microscopio y un soporte. La arquitectura vascular y las células marcadas con fluorescencia (10 μ M CFDA-SE, Molecular Probes, Eugene, OR) se visualizaron durante su paso por los vasos bajo una epiluminación fluorescente usando un sistema de filtro multibanda (XF 53, Omega Optical, Brattleboro, VT). Se obtuvieron imágenes continuas de la microcirculación con una cámara 1/3" DSP 3-CCD (DXC-390, Sony, Cologne, Germany), montada en un microscopio 32 Zeiss modificado (Axioteck Vario 100 HD, Zeiss) que estaba equipado con un objetivo de inmersión saltwater 10 $\times$ (Nikon, Düsseldorf, Germany). Las imágenes fueron almacenadas digitalmente usando MediaStudio Pro7 (Ulead, Kaarst, Germany). Las velocidades de las células en segmentos de vasos individuales fueron determinadas mediante un análisis off-line. Las células fueron consideradas no interactuantes si se movían a la velocidad media del flujo sanguíneo, o rodantes si se movían a velocidades menores.

Después de la inyección subcutánea de CXCL12 se observó un incremento del rodamiento respecto al observado espontáneamente. No obstante, después del tratamiento con DPDPE el rodamiento se redujo de una manera significativa
5 (3.9+/-5.1%) (Figura 6). Por tanto, el tratamiento con el agonista DPDPE también afecta las interacciones celulares dependientes de CXCL12 *in vivo*, impidiendo que las células cancerosas interactúen con las paredes vasculares.

Como última etapa, se procedió al estudio del efecto
10 del agonista DPDPE *in vivo*, observando la aparición de metástasis de pulmón en hembras de ratón inyectadas con células de melanoma B16 con y sin DPDPE. Así, se construyó un modelo experimental, inyectando células B16 de melanoma singénicas en ratones C57BL/6. Se utilizaron hembras de
15 ratón (6 a 8 semanas de edad) C57BL/6 (Charles River); y hembras de ratón con inmunodeficiencias severas combinadas y deficientes en NK más adelante (CB17 SCID beige de Harlan, Chicago, IL). Los animales fueron mantenidos a temperatura constante (23°C) y humedad (50%-60%) con acceso
20 libre a dieta estándar y agua. Todas estas experiencias con animales se realizaron observando la legislación española.

En el primer día, células B16 de melanoma fueron inyectadas en la vena de la cola del ratón (10^5 células/ratón C57BL/6 y 10^4 células/ratón CB17 SCID en un
25 volumen de 250 μ l). Desde el día 1 al día 3, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal diaria de DPDPE (10^{-4} M; 500 μ l); los animales control fueron tratados con PBS. La primera inyección de DPDPE fue aplicada justo antes de la inyección de las células. Las dosis de DPDPE
30 utilizadas fueron las establecidas para promover la analgesia en el ratón (Heyman, J.S et al, 1987).

Los animales fueron sacrificados 7 días después de la inoculación de células B16 para analizar la propagación de

los tumores. Los pulmones fueron lavados con PBS y fijados con una solución de Bouin durante 24h. A continuación, se contaron los nódulos metastásicos en C57BL/6 con microscopía. Los experimentos fueron realizados por triplicado, con 10 animales en cada grupo.

Como resultado, en el día 7 después de la inoculación de células tumorales *in vivo*, se hicieron visibles focos metastásicos en la superficie de los pulmones de todos los ratones. Sin embargo, en el ratón tratado con DPDPE el número de nódulos era significativamente más bajo que en el grupo control (40 ± 27 nódulos/pulmón vs 150 ± 40 nódulos/pulmón) (Figura 7).

Como se ha visto que los opiáceos modifican la respuesta inmune y podrían estar implicados en el fenómeno observado, para excluir la participación del sistema inmune, se realizaron experiencias en la cepa inmunocomprometida SCID. En el ratón SCID, debido a la gran masa tumoral, la superficie afectada por la metástasis fue estimada independientemente por dos investigadores. Los experimentos fueron realizados por triplicado, con 10 animales en cada grupo. En los ratones de esta cepa, como cabría esperar, la formación y la propagación de metástasis se desarrolló más rápidamente que en ratones C57BL/6. Los resultados muestran que en un ratón sin tratar el $50 \pm 18\%$ del pulmón resultó afectado por metástasis. En ratones tratados con DPDPE, sin embargo, aunque los pulmones aparecían también con metástasis, se estimó que sólo el $7 \pm 4\%$ del pulmón estaba afectado. Estos datos muestran que el DPDPE reduce la progresión de las metástasis sin a intervención de la respuesta inmune.

REFERENCIAS

1. Benovic, J.L., and Marchese, A. 2004. A new key in breast cancer metastasis. *Cancer Cell* 6:429-430.
2. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D.,
5 Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W.,
Wagner, S.N., et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.
3. Balkwill, F. 2004. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer*
10 *Biol* 14:171-179.
4. Liang, Z., Wu, T., Lou, H., Yu, X., Taichman, R.S.,
Lau, S.K., Nie, S., Umbreit, J., and Shim, H. 2004. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 64:4302 -
15 4308.
5. Lapteva, N., Yang, A.G., Sanders, D.E., Strube, R.W., and Chen, S.Y. 2005. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer Gene Ther* 12:84-89.
- 20 6. Takenaga, M., Tamamura, H., Hiramatsu, K., Nakamura, N., Yamaguchi, Y., Kitagawa, A., Kawai, S., Nakashima, H., Fujii, N., and Igarashi, R. 2004. A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma. *Biochem Biophys*
25 *Res Commun* 320:226-232.
9. Fichna, J., and Janecka, A. 2004. Opioid peptides in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23:351-366.
10. Rogers, T.J., Steele, A.D., Howard, O.M., and Oppenheim, J.J. 2000. Bidirectional heterologous
30 desensitization of opioid and chemokine receptors. *Ann N Y Acad Sci* 917:19-28.
13. Chen, C., Li, J., Bot, G., Szabo, I., Rogers, T.J., and Liu-Chen, L.Y. 2004. Heterodimerization and cross-

desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor. *Eur J Pharmacol* 483:175-186.

14. Vila-Coro, A.J., Rodriguez-Frade, J.M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M.C., Martinez, A.C., and Mellado, M.
5 1999. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb J* 13:1699-1710.
15. Bartolome, R.A., Galvez, B.G., Longo, N., Baleux, F., Van Muijen, G.N., Sanchez-Mateos, P., Arroyo, A.G., and
10 Teixido, J. 2004. Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res* 64:2534-2543.
- 15 16. Ludwig, R.J., Boehme, B., Podda, M., Henschler, R., Jager, E., Tandi, C., Boehncke, W.H., Zollner, T.M., Kaufmann, R., and Gille, J. 2004. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res* 64:2743-2750.
- 20 17. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Volume 17, Fourth Edition, 1996, pp. 858-881.
- 18.- C. Faulí i Trillo. Tratado de Farmacia Galénica, 1ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones

REIVINDICACIONES

1. Utilización de agonistas del receptor delta opiáceo en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades tumorales.
- 2.- Utilización de agonistas según la reivindicación 1 caracterizado porque el compuesto agonista, ya sea de estructura peptídica o no, pertenece al siguiente grupo: compuestos de diarilmetilpiperazina, TAN-67, derivados tetracíclicos de piridina y pirazina, pirrolooctahidroisoquinolonas, el compuesto BW373U86, el compuesto SNC 80, DPDPE y deltorfina I y II, biphalin, el péptido DADLE y la metadona.
- 3.- Utilización de agonistas según la reivindicación 1 caracterizado porque el compuesto es el agonista D-Pen-D-Pen-encefalina (DPDPE).
- 4.- Utilización de agonistas según la reivindicación 1 caracterizado porque la enfermedad tumoral pertenece al siguiente grupo: melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de sistema nervioso central y sarcoma.
- 5.- Composición farmacéutica útil para la prevención y/o tratamiento del cáncer caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente agonista del receptor opioide delta, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 6.- Composición farmacéutica según la reivindicación 5 caracterizada porque el compuesto agonista pertenece al siguiente grupo, ya sean de estructura peptídica o no: compuestos de diarilmetilpiperazina, TAN-67, derivados tetracíclicos de piridina y pirazina, pirrolooctahidroisoquinolonas, el compuesto BW373U86, el

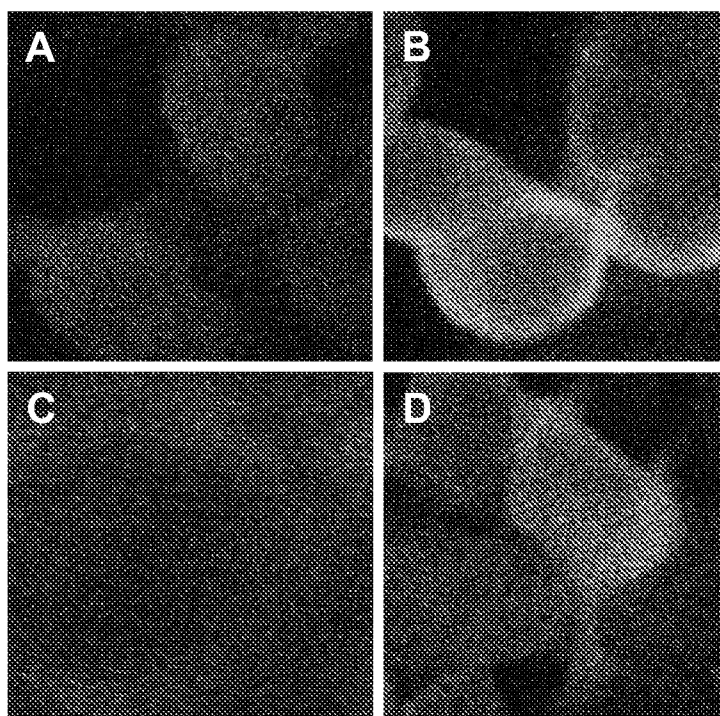
compuesto SNC 80, DPDPE, deltorfina I y II, biphalin, el péptido DADLE y la metadona.

7.- Composición farmacéutica según la reivindicación 5
5 caracterizada porque el compuesto agonista es el agonista D-Pen-D-Pen-encefalina (DPDPE).

8.- Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 6 y 7 en la prevención y/o el tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad tumoral.

10 9.- Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 8 caracterizado porque la enfermedad tumoral pertenece al siguiente grupo: melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de sistema nervioso central y sarcoma.

Figura 1



2/7

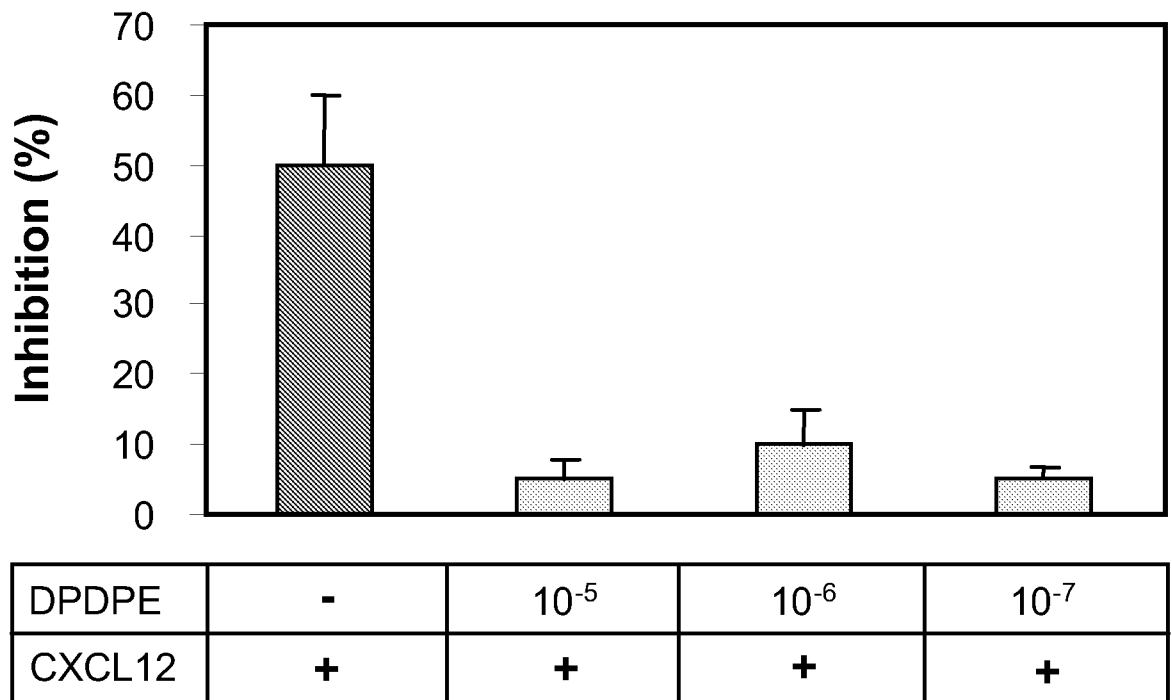
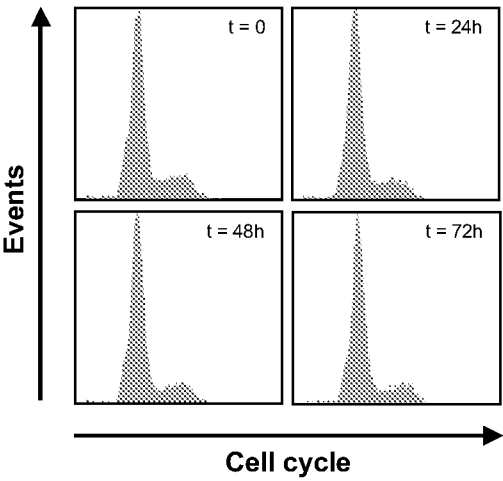
Figura 2

Figura 3

A



B

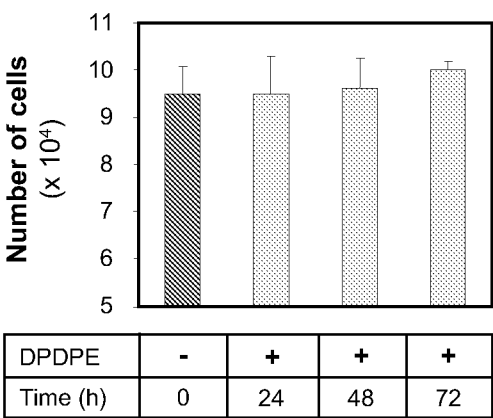


Figura 4

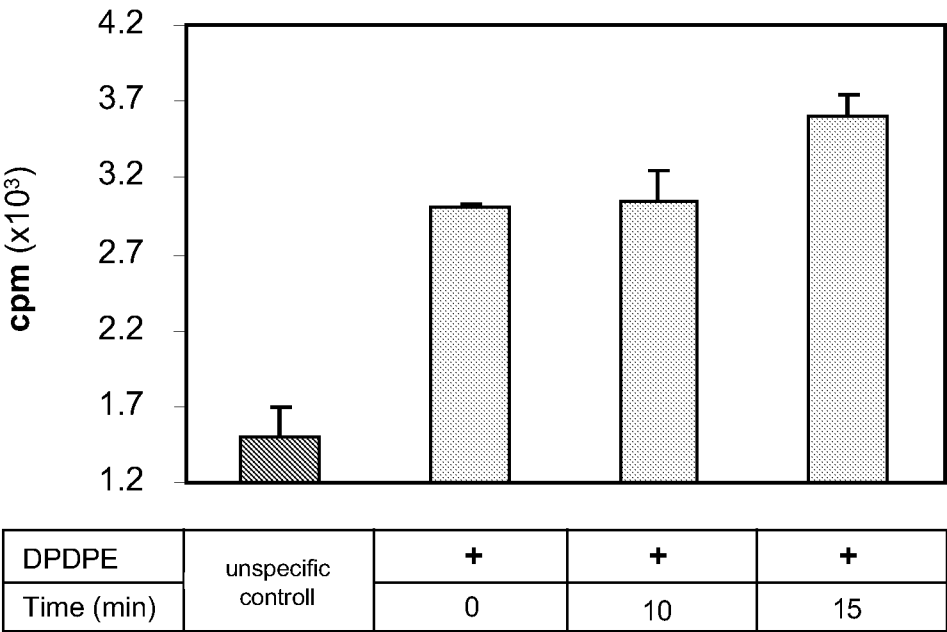


Figura 5

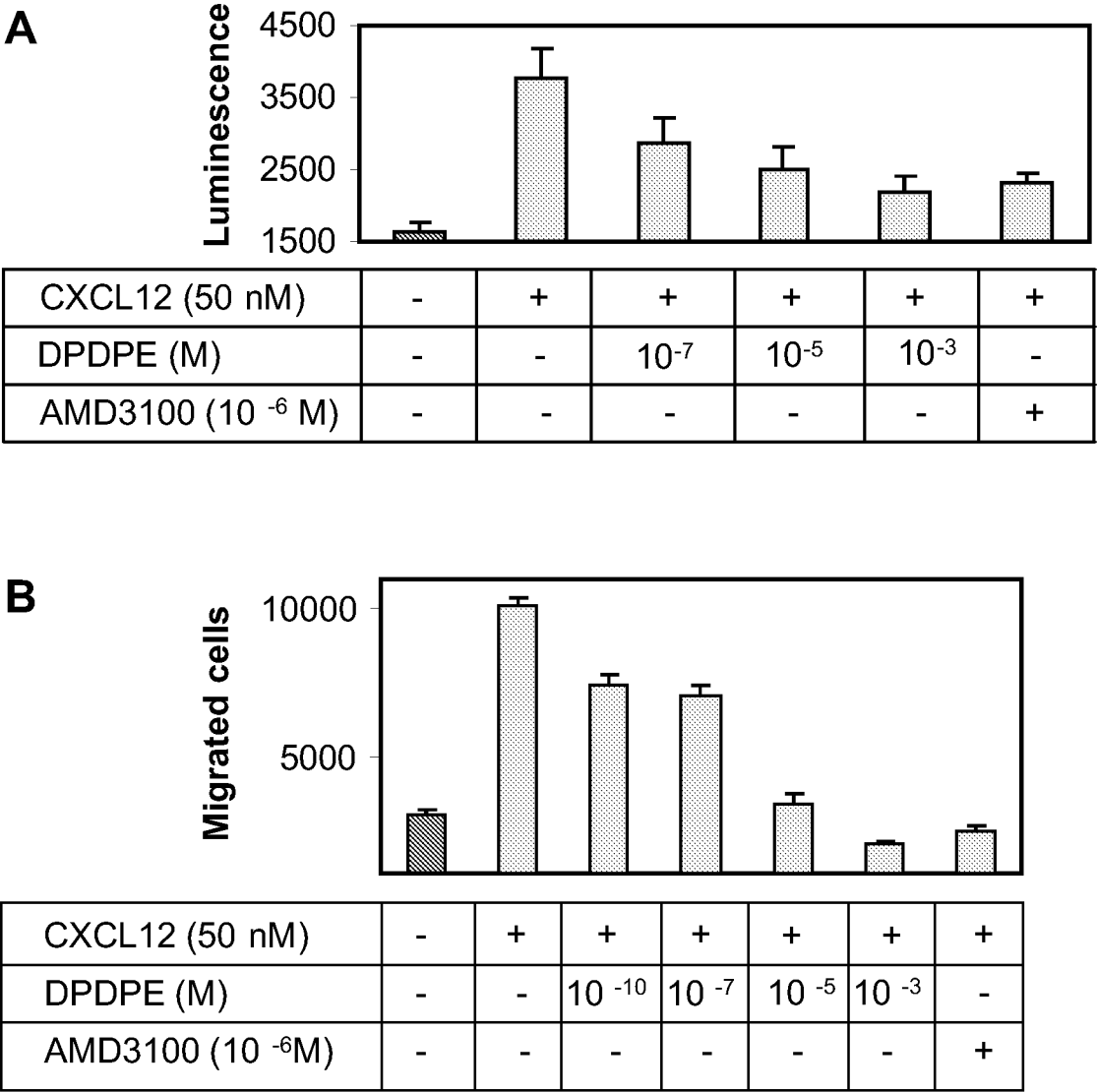


Figura 6

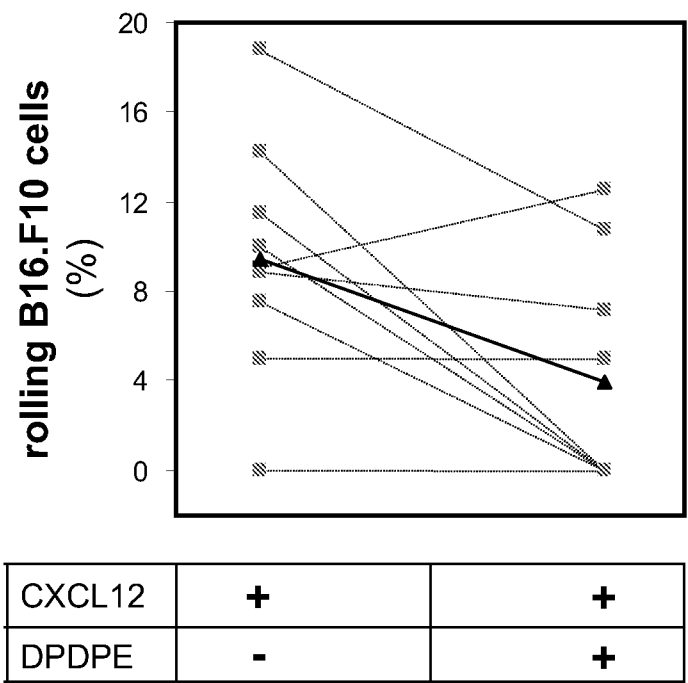
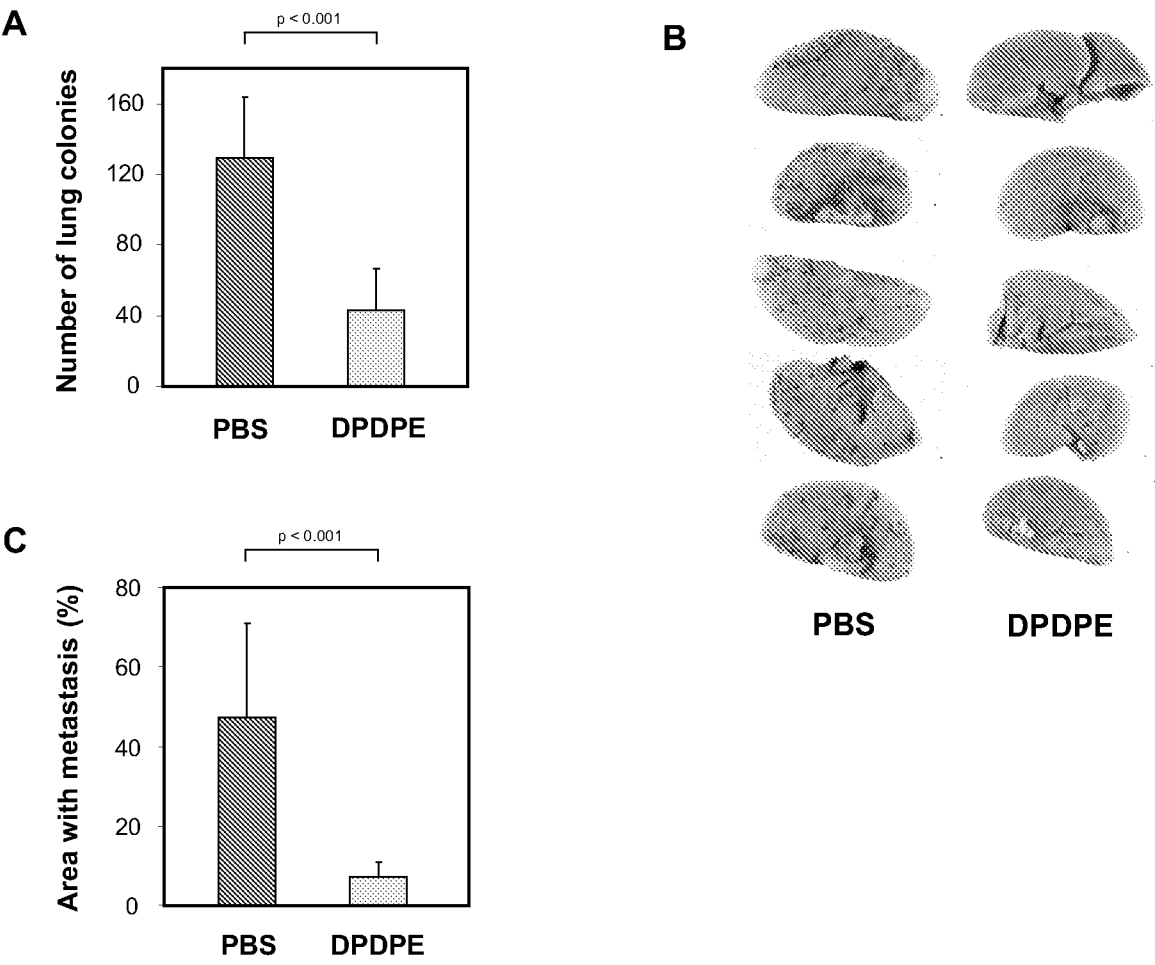


Figura 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/070074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT,EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, BIOSIS, EMBASE, XPESP, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HATZOGLU, A. ET AL: "The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors". European Journal of Pharmacology, 1996, vol. 296, pages 199-207, the whole document.	1 ,2 ,4-9.
X	GOMEZ-FLORES, R. ET AL.: "Increased survival of tumor-bearing mice by the delta opioid SNC 80". Anticancer research, 2005, vol. 25, pages 4563-4568, the whole document.	1, 2, 4-9.
X	WO 99/04795 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC) 04.02.1999, the whole document.	5-7.

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 2007 (16.07.2007)

Date of mailing of the international search report

(20/08/2007)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

H. Aylagas Cancio

Telephone No. +34 91 349 8563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2007/070074

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KNAPP, R.J. ET AL.: "Properties of TAN-67, a nonpeptidic d-opioid receptor agonist, at cloned human d- and u-opioid receptors". European Journal of Pharmacology, 1995, vol. 291, pages 129-134, the whole document.	5-7.
X	WO 2004/041800 A1 (ASTRAZENECA, AB) 21.05.2004, claims.	5-7.
X	WO 03/094853 A2 (ARDENT PHARMACEUTICALS, INC) 20.11.2003, claims.	5-7.
X	WO2004/004715 A2 (GLAXO-SMITHKLINE SPA) 15.01.2004, claims.	5-7.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2007/070074

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8, 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 8 and 9 relate to a method for treatment of the human or animal body by therapy.
The search was carried out based on the possible effects of the compounds.
Box II.1.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2007/070074

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9904795 A	04.02.1999	CA 2297251 A AU 8356798 A US 6103722 A JP 2001515841 T	04.02.1999 16.02.1999 15.08.2000 25.09.2001
WO 2004041800 A	21.05.2004	CA 2502733 A AU 2003274884 A IS 7864 A NO 20052699 A KR 20050072794 A MX P EP 1562922 A BR 0315998 A CN 1711251 A PL 376895 A RU 2005111983 A JP 2006507296 T US 2006167004 A	21.05.2004 07.06.2004 25.05.2005 06.06.2005 12.07.2005 03.08.2005 17.08.2005 20.09.2005 21.12.2005 09.01.2006 20.01.2006 02.03.2006 27.07.2006
WO 03094853 A	20.11.2003	AU 2003228991 A CA 2525373 A US 2004002503 A EP 1501513 A MX P RU 2004133054 A CN 1652787 A JP 2005525416 T ZA 200409036 A	11.11.2003 20.11.2003 01.01.2004 02.02.2005 14.02.2005 10.08.2005 10.08.2005 25.08.2005 31.05.2006
WO 2004004715 A	15.01.2004	AU 2003281253 A	23.01.2004 23.01.2004 23.01.2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/070074

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61K 31/135 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2007/070074

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, BIOSIS, EMBASE, XPESP, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	HATZOGLOU, A. ET AL: "The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors". European Journal of Pharmacology, 1996, vol. 296, páginas 199-207, todo el documento.	1 ,2 ,4-9.
X	GOMEZ-FLORES, R. ET AL.: "Increased survival of tumor-bearing mice by the delta opioid SNC 80". Anticancer research, 2005, vol. 25, páginas 4563-4568, todo el documento.	1, 2, 4-9.
X	WO 99/04795 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC) 04.02.1999, todo el documento.	5-7.

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

16 Julio 2007 (16.07.2007)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

20 de agosto de 2007 (20/08/2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

H. Aylagas Cancio

Nº de teléfono +34 91 349 8563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2007/070074

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	KNAPP, R.J. ET AL.: "Properties of TAN-67, a nonpeptidic d-opioid receptor agonist, at cloned human d- and u-opioid receptors". European Journal of Pharmacology, 1995, vol. 291, páginas 129-134, todo el documento.	5-7.
X	WO 2004/041800 A1 (ASTRAZENECA, AB) 21.05.2004, reivindicaciones.	5-7.
X	WO 03/094853 A2 (ARDENT PHARMACEUTICALS, INC) 20.11.2003, reivindicaciones.	5-7.
X	WO2004/004715 A2 (GLAXO-SMITHKLINE SPA) 15.01.2004, reivindicaciones.	5-7.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2007/070074

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: 8, 9
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
se refieren a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. La búsqueda se ha realizado considerando los posibles efectos de los compuestos.
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

- Indicación en cuanto a la protesta
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
 - ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
 - ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2007/070074

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 9904795 A	04.02.1999	CA 2297251 A AU 8356798 A US 6103722 A JP 2001515841 T	04.02.1999 16.02.1999 15.08.2000 25.09.2001
WO 2004041800 A	21.05.2004	CA 2502733 A AU 2003274884 A IS 7864 A NO 20052699 A KR 20050072794 A MX P EP 1562922 A BR 0315998 A CN 1711251 A PL 376895 A RU 2005111983 A JP 2006507296 T US 2006167004 A	21.05.2004 07.06.2004 25.05.2005 06.06.2005 12.07.2005 03.08.2005 17.08.2005 20.09.2005 21.12.2005 09.01.2006 20.01.2006 02.03.2006 27.07.2006
WO 03094853 A	20.11.2003	AU 2003228991 A CA 2525373 A US 2004002503 A EP 1501513 A MX P RU 2004133054 A CN 1652787 A JP 2005525416 T ZA 200409036 A	11.11.2003 20.11.2003 01.01.2004 02.02.2005 14.02.2005 10.08.2005 10.08.2005 25.08.2005 31.05.2006
WO 2004004715 A	15.01.2004	AU 2003281253 A	23.01.2004 23.01.2004 23.01.2004

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/4965 (2006.01)
A61K 31/135 (2006.01)