

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 363**

51 Int. Cl.:

A61K 31/485 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2009 PCT/EP2009/000584**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2010 WO10012319**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009 E 09776348 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2320900**

54 Título: **Opioides para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer resistente**

30 Prioridad:

31.07.2008 EP 08013741

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

09.01.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ULM (100.0%)
Helmholtzstrasse 16
89081 Ulm, DE**

72 Inventor/es:

**MILTNER, ERICH;
FRIESEN, CLAUDIA y
ALT, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 596 363 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

Opioides para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer resistente

La invención se refiere a nuevas estrategias para el tratamiento de pacientes con cáncer resistente.

5 Las terapias antineoplásicas son frecuentemente ineficaces debido a la resistencia de las células tumorales a la radio- y/o a la quimio-terapia. Cuando la resistencia se adquiere durante la terapia, a menudo se manifiesta bien como una disminución en la cantidad de regresión tumoral para una misma dosis (bien de la radiación o bien de la sustancia citotóxica), o bien como la necesidad de una dosis mayor para una misma cantidad de regresión tumoral. Cuando la resistencia es intrínseca, es decir, no adquirida ni inducida por el tratamiento antineoplásico, las células tumorales ya carecen originalmente de la sensibilidad a uno o más de los fármacos antineoplásicos o a la radiación ionizante.

10 La quimiosensibilidad de las células cancerosas a menudo varía sobre una base individual. Por ejemplo, para el carcinoma de páncreas, se sabe que sólo aproximadamente el 25 % de todos los pacientes se benefician del fármaco antineoplásico gemcitabina. El otro 75 % es intrínsecamente resistente a esta quimioterapia. Algunos ejemplos adicionales de células tumorales con una quimio- o una radio-resistencia intrínseca son las células de glioblastoma o de melanoma.

15 La resistencia intrínseca o adquirida (o la ausencia de respuesta) de las células tumorales a la radio y/o a la quimioterapia puede tener múltiples razones, y puede variar - como se ha ejemplificado anteriormente - según el individuo. A pesar de la intensa investigación, los mecanismos precisos todavía siguen siendo inciertos. Sin embargo, se sabe que una única mutación, por ejemplo, en el sitio de unión de la sustancia farmacológica o en el proceso de desintoxicación celular, puede ser responsable de la ausencia o de la reducción en la quimiosensibilidad. También, la manifestación de resistencias cruzadas con varios fármacos antineoplásicos a menudo limita la eficacia de los tratamientos antineoplásicos.

20 De significativa importancia clínica es el fenómeno de la denominada resistencia multifarmacológica (MDR). De acuerdo con este concepto, las proteínas de membrana, a saber, los miembros de las proteínas transportadoras del casete de unión al ATP (ABC), tales como la glucoproteína P o las proteínas asociadas a la resistencia multifarmacológica (MRP), se expresan cada vez más, lo que conduce a un aumento en la evacuación de las sustancias farmacológicas mediante un transporte activo a través de la membrana celular. Los pacientes que muestran una resistencia multifarmacológica son resistentes lo más a menudo a un amplio espectro de fármacos citotóxicos.

25 Las resistencias no se limitan a los quimioterapéuticos o fármacos antineoplásicos; los pacientes con cáncer también muestran una resistencia intrínseca o adquirida frente a la radiación ionizante aplicada en la radioterapia. Se conoce una radiorresistencia intrínseca, por ejemplo, en células de melanoma y de glioblastoma.

30 La radiorresistencia también puede ser inducida por la exposición a pequeñas o fraccionadas dosis de radiación ionizante. Varios estudios han documentado este efecto *in vitro* incluso en células humanas, así como en varios modelos animales. Puede haber implicados varios mecanismos de radioprotección celular, tales como alteraciones en los niveles de algunas proteínas citoplasmáticas y nucleares, un aumento en la expresión génica o procesos de reparación del ADN.

35 Como método de tratamiento de cáncer resistente a fármaco, la solicitud de patente internacional WO 2006/1244113 (Novartis AG) enseña el uso de derivados de 1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona que actúan de inhibidores de proteínas tirosina cinasas.

40 Por lo tanto, en oncología existe una gran necesidad de nuevas estrategias que hagan que los tratamientos oncológicos sean más eficaces. En particular, es el objetivo de la presente invención proporcionar nuevos medios para el tratamiento de pacientes oncológicos que muestran resistencia a las terapias antineoplásicas convencionales, tales como los fármacos antineoplásicos (quimioterapia) o la radioterapia, o para el tratamiento de pacientes oncológicos con células resistentes a la apoptosis.

45 Este objetivo se resuelve mediante el uso de opioides en el tratamiento con radioterapia y/o con quimioterapia de pacientes con cáncer resistente, dado que ahora se ha averiguado que los opioides que son capaces de inhibir la proliferación celular y o el crecimiento de las células cancerosas, pueden superar las resistencias en estas células cancerosas. Por lo tanto, estos opioides proporcionan nuevas estrategias para el tratamiento de pacientes que hasta la fecha se consideraban no tratables o no tratables eficazmente con las metodologías terapéuticas antineoplásicas convencionales. Este grupo de presuntos pacientes oncológicos no tratables también puede denominarse pacientes oncológicos "no respondedores", "malos respondedores" o "no quimiosensibles" o "no radiosensibles".

50 Adicionalmente se ha comprobado que los opioides pueden superar la resistencia a la apoptosis de las células cancerosas, y por lo tanto pueden aplicarse clínicamente de forma eficaz como sustancias antineoplásicas. En particular, lo más sorprendentemente, se ha averiguado que los opioides - en particular la metadona - eran tan eficaces como la quimioterapia convencional (por ejemplo, doxorubicina) y los tratamientos con radiación frente a

células leucémicas no resistentes (es decir, sensibles), y que los linfocitos sanguíneos periféricos normales sobrevivieron después de este tratamiento. Por lo tanto, de acuerdo con una forma de realización de la invención, los opioides también son eficaces para destruir las células tumorales, pero no afectan sustancialmente a las células sanas normales del paciente.

5 En el contexto de la presente invención, el término "opioide" se define como un grupo químico heterogéneo de sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas, que trabajan de forma agonista o antagonista, que pueden unirse a todos los bien conocidos receptores opioides, preferiblemente al receptor opioide μ , y que son capaces de detener la proliferación de células cancerosas. El grupo de los opioides incluye opiáceos naturales tales como alcaloides como morfina, dihidrocodeína, codeína y tebaína, así como opiáceos semisintéticos derivados de los opiáceos naturales (por ejemplo, hidromorfona, hidrocodona, oxicodona, oximorfona, desomorfina, diacetilmorfina (heroína), nicomorfina, dipropanoil morfina, bencilmorfina y etilmorfina), u opioides totalmente sintéticos, tales como fentanilo, petidina y metadona, tramadol o propoxifeno. También incluye péptidos opioides endógenos que pueden ser producidos en forma natural en el cuerpo como endorfinas, diorfinas o encefalinas, pero que también pueden ser sintetizados.

15 Los opioides se conocen por su uso como analgésicos. El hecho de que los receptores opioides, especialmente los receptores opioides μ , estén implicados en la activación de las vías de señalización que conducen a la apoptosis, era previamente conocido (Polakiewicz et al. 1998). En la pasada década se averiguó que los opioides pueden promover la apoptosis (Hatsukari et al. 2003). Adicionalmente se analizó el uso de opioides para la inducción de la apoptosis en células de cáncer de pulmón microcítico (Heusch & Maneckjee 1999). Sin embargo, los mecanismos subyacentes no fueron revelados, ni los resultados sugirieron el empleo de los opioides para superar las resistencias a los tratamientos antineoplásicos convencionales.

25 De acuerdo con la invención, el opioide es capaz de inhibir la proliferación y/o el crecimiento de las células cancerosas. Esta actividad puede incluir, por ejemplo, una actividad citostática o citotóxica, así como la detención del crecimiento de las células y/o de los tumores. La proliferación de las células cancerosas es el resultado de la inhibición de la división celular. En particular, los opioides inducen la muerte celular en tumores. La muerte celular, en el contexto de la invención, incluye todos los tipos de muerte celular. Éstos pueden incluir una muerte celular necrótica, así como apoptótica o por autofagia. En una forma de realización de la invención, la muerte celular es inducida por la activación de la vía dependiente de las caspasas o independiente de las caspasas. Sin embargo, los opioides pueden inducir la muerte celular a través de varias vías. En una forma de realización preferida de la invención, los opioides inducen la apoptosis en células cancerosas.

35 Generalmente, se sabe que la apoptosis puede ser inducida a través de dos vías bioquímicas principales. La "vías de receptores de muerte" (o vía extrínseca) incluyen el modelo inducido por el receptor del TNF (factor de necrosis tumoral) y modelo inducido por el receptor del Fas (el receptor del Fas también se conoce como Apo-1 o CD95). Las uniones a estos receptores dan como resultado la formación de unas vías de señalización inductoras de muerte en la célula, que incluyen la activación de las caspasas-8. La "vía mitocondrial" (o vía intrínseca) implica la liberación del citocromo c desde la mitocondria, la unión de la Apaf-1 y la activación de la procaspasa-9. Se conocen varios reguladores que activan o desactivan las vías de la apoptosis, tales como las proteínas proapoptóticas Bax y Bak o las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl_{XL} o XIAP.

40 En una forma de realización de la invención, los opioides inducen la apoptosis mediante uno o más de los siguientes mecanismos:

- i. escisión de la caspasa-3 y la PARP en la célula tumoral
- ii. escisión de la caspasa-9 y regulación por disminución de la XIAP
- iii. regulación por disminución de la Bcl_{XL}

45 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el opioide es un miembro del grupo de la metadona, que comprende D-/L-metadona, levometadona, levacetilmetadol y piritramida. Todos estos opioides pueden usarse como sales. La forma racémica de la D-/L-metadona se proporciona preferiblemente en forma de un clorhidrato. En una forma de realización preferida de la invención, el opioide metadona induce la apoptosis en las células cancerosas a través de la vía mitocondrial.

50 De acuerdo con la invención, los términos "resistencia", "radiorresistencia" o "quimiorresistencia" se definen como una sensibilidad reducida de una célula cancerosa frente a al menos una terapia oncológica convencional, es decir, un fármaco antineoplásico o radioterapia. Un paciente que padece dicho cáncer es determinado como paciente oncológico "resistente". Dado que la resistencia puede ser intrínseca o adquirida, la reducción observada en la sensibilidad se compara bien con las células cancerosas "normales" completamente sensibles, que responden a la dosis terapéuticamente eficaz del fármaco antineoplásico y/o de la radiación aplicada, o bien con la sensibilidad original tras el comienzo de la terapia. En el último caso, la resistencia se manifiesta bien como una disminución en la cantidad de regresión tumoral para una misma dosis (bien de radiación o bien de fármaco antineoplásico), o bien como la necesidad de una dosis mayor para una misma cantidad de regresión tumoral.

En una forma de realización particularmente preferida, se usan los opioides para tratar pacientes oncológicos que muestran una o más de las subsiguientes resistencias:

- resistencia a la apoptosis
- resistencia multifarmacológica
- 5 ○ resistencia a fármacos antineoplásicos
- resistencia a fármacos citotóxicos
- resistencia a especies de oxígeno reactivas
- resistencia a agentes lesivos del ADN
- resistencia a anticuerpos tóxicos
- 10 ○ resistencia a la doxorubicina
- resistencia individual o cruzada, en particular a una o más de las siguientes sustancias farmacológicas: metotrexato, citarabina, cisplatino, etopósido, vincristina, paclitaxel (taxol), carboplatino, tenipósido, dexametasona, prednisolona, ciclofosfamida, ifosfamida, doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, mercaptopurina, fludarabina, 5-fluorouracilo
- 15 ○ resistencia a la irradiación (por ejemplo, alfa, beta, gamma o electrones Auger)

Consecuentemente, en el contexto de la presente invención, una "resistencia" puede ser total o parcial; en otras palabras, los pacientes considerados como tratables de acuerdo con la invención pueden mostrar una sensibilidad reducida, o incluso una ausencia total de sensibilidad, a los tratamientos antineoplásicos convencionales. Estos pacientes también pueden determinarse como "no respondedores" o "malos respondedores".

- 20 Un sinónimo adicional para un cáncer o un tumor "resistente" es un tipo de cáncer "refractario", que también puede ser completamente o parcialmente refractario. Por lo tanto, la resistencia intrínseca puede también determinarse como un "cáncer refractario primario". Una forma particular de células cancerosas refractarias o resistentes son las denominadas "células cinéticamente refractarias"; un fenómeno conocido, por ejemplo, en células de leucemia cuando al principio las células son destruidas, pero se reproducen tan rápido que difícilmente es posible un
- 25 tratamiento eficaz.

Como se usa en el contexto de la presente invención, el término tratamiento o terapia "convencional" se refiere al tratamiento terapéutico aceptado actualmente y ampliamente usado para un cierto tipo de cáncer, basado en los resultados de investigaciones pasadas y/o la autorización sanitaria.

- 30 Algunos fármacos antineoplásicos convencionales incluyen agentes citotóxicos y citostáticos, que destruyen las células cancerosas o reducen y/o detienen su crecimiento o su proliferación. Los modos de acción de estos fármacos antineoplásicos pueden variar; algunos ejemplos son los antimetabolitos (por ejemplo, citarabina, metotrexato, mercaptopurina o clofarabina), los agentes de reticulación del ADN (por ejemplo, cisplatino y sus derivados), sustancias intercalantes del ADN (por ejemplo, doxorubicina), venenos de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido), inhibidores de cinasas (por ejemplo, cetuximab), esteroides (por ejemplo, dexametasona) o
- 35 inhibidores de la mitosis (por ejemplo, vincristina). Un ejemplo de un tratamiento antineoplásico convencional de la leucemia es la administración de doxorubicina.

- La radioterapia convencional también puede incluir una terapia de radiación, que significa el uso de radiación de alta energía procedente de rayos X, de rayos alfa, beta y gamma, de electrones Auger, de rayos ultravioleta, de neutrones, de protones y de otras fuentes que destruyen las células cancerosas y encogen los tumores. La radiación
- 40 puede proceder de un dispositivo exterior al cuerpo (terapia de radiación por haz externa), o puede proceder de fuentes radiactivas colocadas en el cuerpo en las cercanías de las células cancerosas (terapia de radiación interna). La terapia de radiación sistémica usa una sustancia radiactiva, tal como un anticuerpo monoclonal radiomarcado, que viaja por el torrente sanguíneo hasta el tejido objetivo. Las células cancerosas radiorresistentes no responden, o sólo parcialmente, a estos tratamientos.

- 45 Como se ha descrito con detalle anteriormente, de acuerdo con una forma de realización de la invención se aplican los opioides para superar o "romper" la resistencia intrínseca o adquirida en las células cancerosas frente a los tratamientos antineoplásicos convencionales y/o los tratamientos por radiación o la resistencia a la apoptosis. En una forma de realización de la invención, las células cancerosas consideradas como tratables de acuerdo con la invención expresan un receptor opioide, en particular el receptor opioide μ .

- 50 En una forma de realización adicional, el grupo de cánceres incluye, pero no se limita a leucemia, cáncer de mama, glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer colorrectal.

Algunos ejemplos de los tipos de cáncer considerados como tratables de acuerdo con la invención, con una resistencia intrínseca a la irradiación, son células cancerosas de glioblastoma, de melanoma o de páncreas. El cáncer de mama, el cáncer de vejiga o la leucemia son a menudo resistentes a los quimioterapéuticos. Algunos ejemplos de dos tipos de cáncer que a menudo adquieren resistencia son melanoma, carcinoma de colon, tumores cerebrales, glioblastoma, cáncer de cerebro, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, leucemia crónica u osteosarcoma.

En una forma de realización adicional de la invención, los opioides pueden usarse en combinación - es decir como un composite - con las sustancias o los tratamientos antineoplásicos convencionales, por ejemplo, sustancias citostáticas o citotóxicas, o radioterapia. Los opioides pueden combinarse, por ejemplo, con sustancias antineoplásicas naturales y/o sintéticas, con sustancias citotóxicas naturales y/o sintéticas, con antibióticos, con anticuerpos citotóxicos, con hormonas, con psicofármacos, con organismos naturales o modificados genéticamente y con sustancias de organismos (por ejemplo, plantas, microorganismos, frutas), con sustancias para el dolor y/o con diferentes tipos de sustancias unidas o no unidas a radiación (por ejemplo, anticuerpos). El paciente puede ser resistente o no ser resistente a este tratamiento.

Un "composite" significa una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los opioides (componente A) según se define de acuerdo con la invención, y al menos una sustancia antineoplásica adicional (componente B). Este "composite" puede constituir una única composición o al menos dos composiciones, que pueden ser administradas a los pacientes concomitantemente o subsiguientemente. Las sustancias mencionadas anteriormente están preferiblemente combinadas con metadona.

El composite de la invención puede ser ventajoso para el tratamiento eficaz de las células cancerosas, dado que muestra unos efectos sinérgicos en comparación con las composiciones individuales. En particular, es posible un composite con metadona como componente A y uno de los siguientes agentes como componente B: metotrexato, citarabina, cisplatino, etopósido, vincristina. Además, también es posible un tratamiento combinatorio que comprenda tratamientos de irradiación.

En una forma de realización preferida de la invención, se usan los opioides para tratar cánceres no sólidos resistentes o sensibles, es decir, todas las neoplasias hematológicas que afectan a la sangre, a la médula ósea y a los nódulos linfáticos, incluyendo leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfática de linfocitos B, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica y todas las proformas de leucemias, tricoleucemia, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano y mieloma múltiple.

Ejemplo 1: Uso de metadona para el tratamiento de células de leucemia, y especialmente para el tratamiento de las células de leucemia a las que los fármacos antineoplásicos usados habitualmente en las terapias convencionales no consiguen destruir.

Fármacos y reactivos

Se disolvió clorhidrato de D,L-metadona reciente (metadona, Sigma, Taufkirchen, Alemania) en agua destilada estéril antes de cada experimento para asegurar la calidad constante de las preparaciones.

Cultivo celular

Se cultivó la línea celular de leucemia mieloide humana HL-60 y la línea de linfocitos T de leucemia linfoblástica humana CEM en RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) que contenía un 10 % de suero bovino fetal (Biochrom, Berlín, Alemania), HEPES 10 mM, a pH 7,3 (Biochrom), 100 U/ml de penicilina (GIBCO), 100 µg/ml de estreptomycin (GIBCO) y L-glutamina 2 mM (Biochrom) a 37 °C y un 5 % de CO₂. Las CEM^{CD95R} son resistentes a 1 µg/ml de anti-CD95 (Friesen et al. 1996) y las CEM^{DOXOR} son resistentes a 0,1 µg/ml de doxorubicina (Friesen et al. 2004). Las CEM^{CD95R} son resistentes al tratamiento de apoptosis y resistentes a múltiples fármacos. Las CEM^{CD95R} son resistentes cruzadas a varios fármacos antineoplásicos tales como metotrexato, citarabina, cisplatino, etopósido, vincristina y a la radiación gamma y beta (Friesen et al. 1996, Los et al 1997, Friesen et al. 2007). Todas las líneas celulares usadas en este estudio estaban exentas de micoplasma.

Inducción de la apoptosis

Se trataron células de leucemia (1 x 10⁵ células/ml) con metadona 30, 20, 15, 10 µM en matraces de 150 ml o en placas de 96 pocillos. Después de 24 h y de 48 h se midió la cuantificación de la apoptosis mediante una citometría de flujo según se describe (Carbonari et al. 1994, Friesen et al. 2003). En resumen, para determinar la apoptosis, se lisaron las células con tampón de Nicoletti que contenía citrato de sodio al 0,1 % más Triton X-100 al 0,1 % y 50 µg/ml de yoduro de propidio según describen Nicoletti et al. (1991). El porcentaje de células apoptóticas se midió mediante el ADN hipodiploide (subG1) o un análisis mediante FSC / SSC (Nicoletti et al. 1991, Carbonari et al. 1994). Los perfiles de las células con los núcleos teñidos con yoduro de propidio (PI) o con una dispersión hacia delante / dispersión lateral (FSC / SSC) se analizaron mediante una citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

Aislamiento de los linfocitos sanguíneos periféricos

Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBL) a partir de sangre reciente de personas sanas. Los PBL (1×10^6 células en 1 ml) se trataron con metadona 30, 20, 15, 10 μM en placas de 96 pocillos. Después de 24 h y de 48 h la cuantificación de la apoptosis se midió mediante una citometría de flujo según se describe (Carbonari et al. 1994).

5 Inhibición de la activación de las caspasas inducida por metadona por parte de zVAD.fmk

La inhibición de la activación de las caspasas se realizó como se ha descrito previamente (Friesen et al. 2007). En resumen, se usó el inhibidor tripeptídico de amplio espectro de las caspasas zVAD.fmk (benzoilcarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometil cetona, Enzyme Systems Products, Dubli, EE.UU.) a una concentración de 50 $\mu\text{mol/l}$. Las células HL-60 y CEM se preincubaron con zVAD.fmk 1 h antes del tratamiento con metadona. Después de 24 h y de 48 h se midió el porcentaje de células apoptóticas mediante el ADN hipodiploide (subG1) o un análisis mediante FSC / SSC. Los perfiles de las células con los núcleos teñidos con yoduro de propidio (PI) (Nicoletti et al. 1991) o con una dispersión hacia delante / dispersión lateral (FSC / SSC) (Carbonari et al. 1994) se analizaron mediante una citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

Análisis por inmunotransferencia Western

Los análisis por inmunotransferencia Western se realizaron como se ha descrito (Friesen et al. 2004, Friesen et al. 2003). La inmunodetección de la acción de las PARP, caspasa-3, caspasa-9, caspasa-8, XIAP, CD95, CD95-L, Bax, Bcl-x_L y β -actina se realizó mediante el uso de un anticuerpo policlonal de conejo anti-PARP (1:5000, Roche), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-caspasa-3 (1:1000, Cell-Signalling), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-caspasa-8 (1:1000, Cell-Signalling), un anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa activa-9 (1:1000, Cell-Signalling), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-XIAP (1:1000, Transduction-Laboratories, Lexington, Kentucky), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fas (anti-CD95) (1:1000, Transduction-Laboratories), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ligando Fas (anti-ligando de CD95) (1:250, BD, Pharmingen), un anticuerpo policlonal de conejo anti-Bax (1:250, Oncogene, Cambridge), un anticuerpo policlonal de conejo anti-Bcl-X_{S/L} (1:1000, Santa-Cruz-Biotechnology, Santa-Cruz, CA), un anticuerpo policlonal de conejo anti-p21 (1:1000, Santa-Cruz) y un anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (Sigma). Se usó IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa o IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa (1:5000, Santa-Cruz) como anticuerpo secundario para el sistema de quimioluminiscencia mejorado (ECL, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania). El control de una carga idéntica de proteína se realizó mediante la detección de la β -actina.

30 La metadona induce la destrucción celular en células de leucemia CEM y HL-60 a través de una apoptosis, sin efectos tóxicos en los PBL no leucémicos

Se ha demostrado que en las leucemias y en los tumores sólidos, los fármacos antineoplásicos inducen la apoptosis e inhiben la proliferación (Kaufmann & Earnshaw 2000). Por lo tanto, se analizó si el fármaco opioide terapéutico metadona también podía inhibir la proliferación y desencadenar la apoptosis en la línea de linfocitos T de leucemia linfoblástica humana CEM y en la línea celular de leucemia mieloide humana HL-60 en comparación con los bien conocidos fármacos antineoplásicos establecidos (Fig. 1A, B). 24 h y 48 h después del tratamiento con diferentes concentraciones de metadona (30, 20, 15, 10 μM) se detectó una fuerte inducción de la apoptosis (Fig. 1A) y una fuerte inhibición del crecimiento (Fig. 1B) en las células CEM y HL-60. A continuación se analizó si la metadona también inducía la apoptosis en los linfocitos sanguíneos periféricos no leucémicos (PBL) (Fig. 1C). Se incubaron PBL aislados con diferentes concentraciones de metadona (30, 20, 15, 10 μM). 24 h y 48 h después del tratamiento con metadona se averiguó que la metadona no podía destruir los PBL a unas concentraciones comparables a las usadas para el tratamiento de las células leucémicas tales como las CEM (Fig. 1C). Esto demuestra que la metadona induce la apoptosis en las células leucémicas sin efectos tóxicos para los PBL no leucémicos.

La metadona rompe la resistencia a la doxorrubicina, la resistencia a CD95 y la resistencia multifarmacológica en células leucémicas

La resistencia a los fármacos antineoplásicos es un factor limitante en el tratamiento de la leucemia y de los pacientes con tumores (Bergman & Harris 1997, Friesen et al. 2003). Se ha averiguado que la metadona muestra una potente actividad antileucémica y que destruye eficazmente las células leucémicas. Por lo tanto, se analizó si la metadona también inducía la muerte celular en células leucémicas resistentes a la doxorrubicina, que eran resistentes a la apoptosis. Se trataron células leucémicas CEM resistentes a la doxorrubicina (CEM^{DoxoR}) con diferentes concentraciones de metadona (30, 20, 15, 10 μM). 24 h y 48 h después del tratamiento con metadona, se midió la muerte celular mediante una citometría de flujo. Después de un tratamiento con metadona 30, 20, 15 μM , se midió una fuerte inducción de la apoptosis en las células CEM^{DoxoR} resistentes a la doxorrubicina, que era similar a la de las células leucémicas CEM sensibles (Fig. 2), lo que indica que la metadona supera la resistencia a la doxorrubicina y la resistencia a la apoptosis.

55 A continuación se examinó si la metadona también podía destruir las células leucémicas que eran resistentes a múltiples fármacos. Por lo tanto, se trataron células leucémicas CEM^{CD95R} resistentes a CD95, que eran resistentes a varios fármacos antineoplásicos tales como etopósido, cisplatino, metotrexato, citarabina, doxorrubicina, vincristina, con diferentes concentraciones de metadona (30, 20, 15, 10 μM). Después del tratamiento con metadona 30, 20, 15

5 μM , se midió una fuerte inducción de la apoptosis en las células leucémicas CEM^{CD95R} resistentes a CD95 después de 24 h y de 48 h, lo que era similar a la de las células leucémicas CEM sensibles (Fig. 2). Esto sugiere que la metadona no induce únicamente una fuerte inducción de la apoptosis en las células leucémicas sensibles, sino que también destruye las células leucémicas y resistentes a la doxorubicina y a CD95, que son fármacos antineoplásicos usados habitualmente que fueron ineficaces (Friesen et al. 1996, Los et al. 1997).

La metadona induce una muerte celular dependiente de las caspasas y activa la mitocondria en células leucémicas sensibles, resistentes a la doxorubicina, resistentes a CD95 y resistentes a múltiples fármacos

10 La metadona induce la apoptosis en las células leucémicas sensibles y en las resistentes con unos mecanismos moleculares desconocidos. Por lo tanto, se examinaron el mecanismo y las moléculas efectoras que pueden ser alteradas por la muerte celular desencadenada por la metadona en células leucémicas.

15 Las caspasas juegan un papel crítico en la inducción de la apoptosis por parte de los fármacos antineoplásicos (Kaufmann & Earnshaw 2000, Hengartner 2000). Por lo tanto, se usó un análisis por inmunotransferencia Western para examinar si la metadona activa las caspasas en las células leucémicas HL-60 y CEM, así como en las células leucémicas CEM^{DoxoR} resistentes a la doxorubicina, que eran resistentes a la apoptosis, y en las células leucémicas CEM^{CD95R} resistentes a CD95, que eran resistentes a múltiples fármacos y resistentes a la apoptosis. Después de un tratamiento con diferentes concentraciones de metadona (20, 15 μM), se escindieron la caspasa-3 y la PARP en las células leucémicas HL-60 y CEM (Fig. 3A), así como en las células leucémicas CEM^{DoxoR} resistentes a la doxorubicina y en las células leucémicas CEM^{CD95R} resistentes a CD95 (Fig. 3B). La activación de la caspasa-8, lo que los fármacos antineoplásicos han demostrado inducir en las células leucémicas, no se encontró después del tratamiento con metadona. Para investigar el papel crítico de la metadona en la activación de las caspasas se preincubaron células CEM y HL-60 con el inhibidor de amplio espectro de las caspasas zVAD.fmk. La incubación con zVAD.fmk inhibió casi completamente la apoptosis inducida por la metadona (Fig. 3C), lo que sugiere que las caspasas son cruciales para la apoptosis de las células leucémicas inducida por la metadona.

25 Se ha demostrado que los fármacos antineoplásicos activan la vía mitocondrial, así como la vía del ligando / receptor, en las células leucémicas y tumorales (Kaufmann & Earnshaw 2000). Se investigó si la mitocondria también podría jugar un papel en la apoptosis inducida por metadona en las células leucémicas. Se trataron CEM, HL-60, células leucémicas CEM^{DoxoR} resistentes a la doxorubicina y células leucémicas CEM^{CD95R} resistentes a CD95 con diferentes concentraciones de metadona (20, 15 μM) (Fig. 4). Después de 24 h y de 48 h se encontró una fuerte escisión (fragmento de 37 kDa) de la caspasa-9 y una fuerte regulación por disminución de la proteína inhibidora de las caspasas XIAP (proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X) en las células leucémicas HL-60 y CEM (Fig. 4A), así como en las células leucémicas CEM^{DoxoR} resistentes a la doxorubicina y en las células leucémicas CEM^{CD95R} resistentes a CD95 (Fig. 4B), que eran resistentes a múltiples fármacos y a la apoptosis.

35 Los cambios mitocondriales son regulados por miembros de la familia Bcl-2 pro y antiapoptóticos. Después de 24 h y de 48 h se encontró una fuerte regulación por disminución de la Bcl-x_L en las células leucémicas HL-60 y CEM (Fig. 4A), así como en las células leucémicas CEM^{DoxoR} resistentes a la doxorubicina y en las células leucémicas CEM^{CD95R} resistentes a CD95 (Fig. 4B) después del tratamiento con diferentes concentraciones de metadona (20, 15 μM). La regulación por aumento de la Bax no se encontró en las células leucémicas después del tratamiento con metadona.

40 Adicionalmente, la regulación por aumento de los ligandos inductores de muerte y de los receptores inductores de muerte, tales como CD95, que los fármacos antineoplásicos han demostrado regular por aumento, no se encontró después del tratamiento de las células leucémicas con metadona (datos no mostrados). Esto indica que la metadona induce la apoptosis directamente mediante la activación de la vía mitocondrial intrínseca en las células leucémicas sensibles, así como en las resistentes.

45 Ejemplo 2: La metadona induce la apoptosis en células de glioblastoma

50 El glioblastoma es el tipo más agresivo y más habitual de tumores cerebrales primarios. Las células del glioblastoma son conocidas por ser muy resistentes a la quimioterapia y a la irradiación. El tratamiento puede implicar la quimioterapia y la radioterapia, pero éstas sólo son medidas paliativas y no proporcionan una cura. Además, muchos fármacos no pueden atravesar la barrera hematoencefálica y son por lo tanto inútiles en el tratamiento del glioblastoma. La metadona es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Se examinó el efecto de la metadona sobre las células de glioblastoma.

Adicionalmente se probó el efecto de la metadona junto con concentraciones terapéuticas de doxorubicina sobre las células de glioblastoma.

55 Se cultivó la línea celular de glioblastoma humana A172 en DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) que contenía un 10 % de suero bovino fetal (Biochrom, Berlín, Alemania), HEPES 10 mM, a pH 7,3 (Biochrom), 100 U/ml de penicilina (Invitrogen), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (Invitrogen) y L-glutamina 2 mM (Biochrom) a 37 °C y un 5 % de CO₂. Antes del tratamiento con metadona, las células de glioblastoma se sembraron a una densidad de 7000 células/cm² y el tratamiento se realizó 24 h después de sembrar las células.

Se trataron células de glioblastoma A172 (7000 células/cm²) con 30, 20 µg/ml de metadona en matraces de 75 cm². Después de 120 h, de 144 h y de 168 h, se midió la cuantificación de la apoptosis mediante una citometría de flujo. Para determinar la apoptosis, las células se lisaron con tampón de Nicoletti que contenía citrato de sodio al 0,1 % más Triton X-100 al 0,1 % y 50 µg/ml de yoduro de propidio. Los núcleos teñidos con yoduro de propidio (PI) se analizaron mediante una citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

Después de 120 h, 144 h y 168 h, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante un análisis del ADN hipodiploide. El porcentaje de muerte celular específica se calculó como sigue: $100 \times ((\%) \text{ de células muertas experimentalmente} - (\%) \text{ de células muertas espontáneamente en el medio celular}) / (100 \% - \text{ de células muertas espontáneamente en el medio} (\%))$. El tratamiento con metadona dio como resultado más de un 20 % de células muertas después de 120 h y más de un 80 % de células muertas después de 168 h después del tratamiento con 20 µg/ml de metadona. El tratamiento con metadona dio como resultado más de un 85 % de células muertas después de 120 h y prácticamente un 100 % de células muertas después de 168 h después del tratamiento con 30 µg/ml metadona (Fig. 5). Se obtuvieron unos resultados similares en tres experimentos independientes. Esto demuestra que la metadona induce unas elevadas tasas de apoptosis en las células de glioblastoma.

Ejemplo 3: La metadona muestra efectos sinérgicos junto con la doxorubicina en la inducción de la apoptosis en células de glioblastoma

Se trataron células de glioblastoma A172 (7000 células/cm²) con una concentración terapéutica de 0,1 µg/ml de doxorubicina (doxorubicina, columnas blancas), con una baja concentración de 1 µg/ml de metadona (metadona, columnas negras) y con 0,1 µg/ml de doxorubicina además de 1 µg/ml de metadona (doxorubicina + metadona, columnas sombreadas). Después de 72 h se midió la cuantificación de la apoptosis mediante una citometría de flujo. Para determinar la apoptosis, las células se lisaron con tampón de Nicoletti que contenía citrato de sodio al 0,1% más Triton X-100 al 0,1 % y 50 µg/ml de yoduro de propidio. Los núcleos teñidos con yoduro de propidio(PI) se analizaron mediante una citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

La combinación de una concentración terapéutica de doxorubicina con bajas concentraciones de metadona tuvo un fuerte efecto apoptótico sobre las células de glioblastoma ensayadas (Fig. 6). Este ensayo demuestra que la metadona produce unos efectos sinérgicos cuando se aplica junto con otros quimioterapéuticos, aquí la doxorubicina.

Ejemplo 4: Inducción de apoptosis en células cancerosas aisladas de pacientes ex vivo usando D,L-metadona sola o en combinación con fludarabina

Se aislaron células de B-ALL (leucemia linfática de linfocitos B) y CLL (leucemia linfática crónica) de pacientes *ex vivo*. Estas células se trataron con diferentes concentraciones de D,L-metadona o D,L-metadona además de fludarabina.

En un primer estudio, se trataron células de B-ALL (leucemia linfática de linfocitos B) (50000 células/100 µl) con metadona 30, 20, 15, 10 µM. Después de 48 h y 72 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo. Los resultados indicaron que metadona ya 10 µM fue suficiente para inducir la apoptosis en hasta más del 80 % de las células tratadas durante 72 h (véase la Fig. 8).

En un segundo estudio, se trataron células de CLL (leucemia linfática crónica) (50000 células/200 µl) con 30, 10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3 y 0,1 µg/ml de metadona sola o además de fludarabina 0,1 µM. Después de 24 h y 48 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo. Los resultados indicaron que la apoptosis se indujo en el 100 % de las células ya después de 24 h, cuando se combinaron 3 µg/ml de metadona con fludarabina 0,1 µM (véase la Fig. 9).

En un tercer estudio, se trataron células de CLL (leucemia linfática crónica) (50000 células/200 µl) con 30, 10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de metadona sola o además de fludarabina 0,1 µM. Después de 24 h y 48 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo. Los resultados indicaron que la apoptosis se indujo en casi el 50 % de las células después de 48 horas, cuando se combinaron 3 µg/ml de metadona con fludarabina 0,1 µM. La apoptosis se indujo en más del 90 % de las células después de 48 h, cuando se combinaron 30 µg/ml de metadona con fludarabina 0,1 µM (véase la Fig. 10).

Así, como se sugirió por estos estudios, la metadona sola o en combinación con un tratamiento citostático es satisfactoria en células cancerosas aisladas de pacientes *ex vivo*.

Ejemplo 5: Inducción de la apoptosis en células de leucemia usando buprenorfina en combinación con doxorubicina

Se usó satisfactoriamente buprenorfina en combinación con doxorubicina para inducir la apoptosis en células de leucemia HL-60 *in vitro*. La buprenorfina es un fármaco opiode semi-sintético, también usado como analgésico. Es un agonista parcial de los receptores opiodes µ.

Se trató la línea celular de leucemia mieloide aguda humana HL-60 (5000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de buprenorfina sola o además de 0,003 µg/ml o 0,001 µg/ml de doxorubicina. Después de 144 h o 168 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

- 5 Los resultados indicaron que 20 µg/ml de buprenorfina fueron suficientes para inducir la apoptosis en más del 90 % de las células después de 144 h. Se obtuvo el mismo resultado cuando se añadieron 0,003 µg/ml de doxorubicina. La apoptosis se indujo en casi el 100 % de las células cuando se combinaron 10 µg/ml de buprenorfina con 0,003 µg/ml de doxorubicina e incubando las células durante 168 h (véase la Fig. 13).

Ejemplo 6: Inducción de la apoptosis en células de leucemia usando fentanilo en combinación con doxorubicina

- 10 Se usó satisfactoriamente fentanilo en combinación con doxorubicina para inducir la apoptosis en células de leucemia CEM *in vitro*. El fentanilo es un opiáceo sintético, que se usa frecuentemente como analgésico en el tratamiento de dolor por cáncer. El fentanilo es un agonista de los receptores opiodes µ.

- 15 Se trató la línea celular CEM de leucemia de linfocitos T humana (10000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3,1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de fentanilo solo o además de 0,02 µg/ml de doxorubicina. Después de 48 h y 72 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Los resultados indicaron que el fentanilo indujo satisfactoriamente la apoptosis en más del 85 % de las células después de 72 h, cuando se combinaron 30 µg/ml de fentanilo con 0,02 µg/ml de doxorubicina (véase la Fig. 14).

Ejemplo 7: Inducción de la apoptosis en células de leucemia usando morfina

- 20 Se usó satisfactoriamente morfina sola y en combinación con doxorubicina para la inducción de la apoptosis en células HL-60 de leucemia. La morfina es un opiáceo que se usa actualmente como analgésico en el tratamiento de dolor por cáncer. La morfina es un antagonista de los receptores opiodes µ.

- 25 En un primer estudio, se trataron células HL-60 de leucemia mieloide aguda humana (5000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 µg/ml de morfina. Después de 120 h o 144 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo. Los resultados indicaron que después de 144 h la apoptosis se indujo en el 40 % de las células cuando se aplicaron 40 µg/ml de morfina (véase la Fig. 15).

En un segundo estudio, se trataron células HL-60 de leucemia mieloide aguda humana (5000 células/100 µl) con 1, 0,5, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 µg/ml de morfina. Después de 96 h, 120 h, 144 h y 168 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo. Los resultados indicaron que después de 168 h la apoptosis se indujo en más del 50 % de las células, cuando se aplicó 1 µg/ml de morfina (véase la Fig. 16).

- 30 En un tercer estudio, se trataron células HL-60 de leucemia mieloide aguda humana (5000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de morfina sola o además de 0,003 µg/ml de o 0,001 µg/ml de doxorubicina. Después de 168 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo. Los resultados indicaron que la apoptosis se indujo en el 50 % de las células cuando se aplicó 1 µg/ml de morfina en combinación con 0,001 µg/ml de doxorubicina (véase la Fig. 17).

- 35 Así, como se sugiere por estos estudios, el opiáceo y el agonista de receptores µ morfina pueden usarse satisfactoriamente para inducir la apoptosis en células de leucemia.

La siguiente bibliografía citada en el presente documento se incorpora por referencia:

- Bergmann JP, Harris D. Radioresistance, chemoresistance and apoptosis resistance. *Radiation Oncology* 1997; 27:47-57.
- 40 Carbonari M, Cibati M, Cherchi M, et al. Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus-infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method. *Blood* 1994; 83:1268-77.
- Friesen C, Glattig G, Koop B, et al. Breaking chemo- and radioresistance with [213Bi]anti-CD45 antibodies in leukaemia cells. *Cancer Res* 2007; 67(5):1950-8.
- 45 Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukaemia cells. *Nat Med* 1996; 2(5):574-7.
- Friesen C, Kiess Y, Debatin KM. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukaemia cells. *Cell Death Differ* 2004; 11 (Suppl 1):S73-85.
- 50 Friesen C, Lubatschowski A, Kotzerke J, Buchmann I, Reske SN, Debatin KM. Beta-irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activates apoptosis pathways in leukaemia cells. *Eur J Nucl Med* 2003; 30:1251-61.

Hatsukari I, Hitosugi N, Matsumoto I, Nagasaka H, Sakagami H. Induction of early apoptosis marker by morphine in human lung and breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun; 23(3B):2413-7.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):770-6.

5 Heusch WL, Maneckjee R. Effects of bombesin on methadone-induced apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Lett* 1999; 136:177-85.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer therapy. *Experimental Cell Research* 2000; 256: 42-9.

10 Los M, Herr I, Friesen C, Fulda S, Schulze-Osthoff K, Debatin K-M. Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). *Blood* 1997; 90(8):3118-29.

Milas L, Raju U, Liao Z, Ajani J. Targeting molecular determinants of tumour chemo-radioresistance. *Semin Oncol* 2005; 32:78-81.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 1991;139:271-9.

15 Polakiewicz RD, Schieferl SM, Gingras AC, Sonenberg N, Comb MJ. Mu-Opioid receptor activates signalling pathways implicated in cell survival and translational control. *J Biol Chem.* 1998 Sep 4; 273(36):23534-41.

FIGURAS

Figura 1:

20 La Figura 1 indica que el opioide metadona induce eficazmente la apoptosis en células leucémicas, pero no afecta a las células PBL sanas no leucémicas.

25 1A: se trataron células CEM y HL-60 con diferentes concentraciones de metadona según se indica. Después de 24 h (barras blancas) y de 48 h (barras negras) se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante un análisis del ADN hipodiploide. El porcentaje de muerte celular específica se calculó como sigue: $100 \times ((\% \text{ de células experimentales muertas} - (\% \text{ de células muertas espontáneamente en el medio})) / (100 \% - (\% \text{ de células muertas espontáneamente en el medio}))$. Los datos se proporcionan como la media de los triplicados con una desviación típica (DT) de menos del 10 %. Se obtuvieron unos resultados similares en tres experimentos independientes.

30 1B: se trataron células CEM y HL-60 (2×10^5 células/ml) con diferentes concentraciones de metadona según se indica, o se dejaron sin tratar (Co, control). Después de 0 h (barras blancas), de 24 h (barras negras) y de 48 h (barras sombreadas) se contó el número de células en 1 ml. Los datos se proporcionan como la media de los triplicados con una desviación típica (DT) de menos del 10 %. Se obtuvieron unos resultados similares en tres experimentos independientes.

35 1C: se trataron células CEM (barras negras) y PBL (barras blancas) con diferentes concentraciones de metadona según se indica. Después de 24 h y de 48 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante un análisis del ADN hipodiploide. El porcentaje de muerte celular específica se calculó como se describe en la Figura 1A. Los datos se proporcionan como la media de los triplicados con una desviación típica (DT) de menos del 10 %. Se obtuvieron unos resultados similares en tres experimentos independientes.

Figura 2:

40 La Figura 2 muestra que el opioide metadona induce la apoptosis en células leucémicas CEM resistentes a CD95 ($\text{CEM}^{\text{CD95R}}$) y en resistentes a la doxorubicina ($\text{CEM}^{\text{DoxoR}}$) con unas tasas de apoptosis comparables con las de la parental sensible. Se trataron células leucémicas CEM (barras negras), $\text{CEM}^{\text{CD95R}}$ (barras blancas) y $\text{CEM}^{\text{DoxoR}}$ (barras sombreadas) con diferentes concentraciones de metadona según se indica. Después de 24 h y de 48 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante un análisis del ADN hipodiploide. El porcentaje de muerte celular específica se calculó como se describe en la Figura 1A. Los datos se proporcionan como la media de los triplicados con una desviación típica (DT) de menos del 10 %. Se obtuvieron unos resultados similares en tres experimentos independientes.

Figura 3:

La Figura 3 muestra que el opioide metadona induce la muerte dependiente de las caspasas en las células leucémicas sensibles (HL-60, CEM), en las resistentes a la doxorubicina ($\text{CEM}^{\text{DoxoR}}$) y en las resistentes a CD95 ($\text{CEM}^{\text{CD95R}}$), que eran resistentes a múltiples fármacos y resistentes a la apoptosis.

50 3A: y 3B: activación inducida por metadona de la caspasa-3 y escisión de la PARP en células HL-60, CEM, $\text{CEM}^{\text{DoxoR}}$ y $\text{CEM}^{\text{CD95R}}$. A, se trataron células HL-60, CEM, B, $\text{CEM}^{\text{DoxoR}}$, $\text{CEM}^{\text{CD95R}}$ con diferentes concentraciones de

metadona según se indica, o se dejaron sin tratar (Control). Después de 24 h y de 48 h se realizaron unos análisis por inmunotransferencia Western para la caspasa-3 y la PARP. Se detectó el fragmento activo de la caspasa-3 a ~19 y 17 kDa, y el producto escindido de la PARP a ~85 kDa. El control de una carga idéntica de proteína se realizó mediante el anticuerpo anti-actina beta.

- 5 3C: inhibición de la activación de la caspasa con bloques de zVAD.fmk en apoptosis inducida por metadona en células CEM y HL-60. Se trataron células CEM y HL-60 con diferentes concentraciones de metadona según se indica en ausencia (barras negras, medio) o en presencia (barras blancas, zVAD.fmk 50 μ M) de zVAD.fmk 50 μ M. Después de 48 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante un análisis del ADN hipodiploide. El porcentaje de muerte celular específica se calculó como se describe en la Figura 1A. Los datos se proporcionan como la media de los triplicados con una desviación típica (DT) de menos del 10 %. Se obtuvieron unos resultados similares en tres experimentos independientes.

Figura 4:

- 15 La Figura 4 muestra que el opioide metadona activa la vía mitocondrial en las células leucémicas sensibles (HL-60, CEM), en las resistentes a la doxorrubicina (CEM^{DoxoR}) y en las resistentes a CD95 (CEM^{CD95R}), que eran resistentes a múltiples fármacos y resistentes a la apoptosis.

4A y 4B: activación inducida por metadona de la caspasa-9, regulación por disminución de la XIAP y regulación por disminución de la Bcl-x_L en células HL-60, CEM, CEM^{DoxoR} y CEM^{CD95R}.

- 20 Se trataron células HL-60, CEM (4A), CEM^{DoxoR}, CEM^{CD95R} (4B) con diferentes concentraciones de metadona según se indica, o se dejaron sin tratar (Control). Después de 24 h y de 48 h se realizaron unos análisis por inmunotransferencia Western para la caspasa-9, la XIAP y la Bcl-x_L. Se detectó el fragmento activo de la caspasa-9 a ~37 kDa, la XIAP se detectó a ~58 kDa y la Bcl-x_L se detectó a ~30 kDa. El control de una carga idéntica de proteína se realizó mediante el anticuerpo anti-actina beta.

Figura 5:

La Figura 5 indica que el opioide metadona induce la apoptosis en células de glioblastoma.

- 25 Se trataron células A172 de glioblastoma con diferentes concentraciones de metadona según se indica. Después de 120 h (columnas blancas), de 144 h (columnas negras) y de 168 h (columnas sombreadas) se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante un análisis del ADN hipodiploide.

- 30 El porcentaje de muerte celular específica se calculó como sigue: $100 \times (\text{de células experimentales muertas} - (\% \text{ de células muertas espontáneamente en el medio})) / (100\% - (\% \text{ de células muertas espontáneamente en el medio}))$. Los datos se proporcionan como la media de los triplicados con una desviación típica (DT) de menos del 10 %. Se obtuvieron unos resultados similares en tres experimentos independientes.

Figura 6:

- 35 La Figura 6 indica que puede inducirse con éxito la apoptosis en células de glioblastoma mediante el uso de una combinación de concentraciones terapéuticas de doxorrubicina y bajas concentraciones de metadona. Se trataron las células de glioblastoma A172 (7000 células/cm²) con una concentración terapéutica de 0,1 μ g/ml de doxorrubicina (doxorrubicina, columnas blancas), con una baja concentración de 1 μ g/ml de metadona (metadona, columnas negras) y con 0,1 μ g/ml de doxorrubicina además de 1 μ g/ml de metadona (doxorrubicina+ metadona, columnas sombreadas). Después de 72 h se midió la cuantificación de la apoptosis mediante una citometría de flujo. Para determinar la apoptosis, las células se lisaron con tampón de Nicoletti que contenía citrato de sodio al 0,1 % más Triton X-100 al 0,1 % y 50 μ g/ml de yoduro de propidio. Los núcleos teñidos con yoduro de propidio (PI) se analizaron mediante una citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

Figura 7:

La Figura 7 indica que puede inducirse con éxito la apoptosis en células CEM mediante el uso del opioide cocaína.

- 45 Se trataron células CEM (columna blanca) y HL-60 (columna negra) con 1000 mg/ml de cocaína. Después de 48 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante un análisis del ADN hipodiploide. El porcentaje de muerte celular específica se calculó como sigue: $100 \times (\text{de células experimentales muertas} - (\% \text{ de células muertas espontáneamente en el medio})) / (100\% - (\% \text{ de células muertas espontáneamente en el medio}))$. Los datos se proporcionan como la media de los triplicados con una desviación típica (DT) de menos del 10 %. Se obtuvieron unos resultados similares en tres experimentos independientes.

Figura 8:

La Figura 8 indica que la D,L-metadona induce la muerte celular en células de pre-B-ALL (leucemia linfática de linfocitos B) aisladas de pacientes *ex vivo*.

Se trataron células de B-ALL (leucemia linfática de linfocitos B) (50000 células/100 µl) con metadona 30, 20, 15, 10 µM. Después de 48 h (barras negras) y 72h (barras blancas) se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Figura 9:

- 5 La Figura 9 indica que la D,L-metadona en combinación con fludarabina induce la muerte celular en células de CLL resistentes (leucemia linfática crónica) aisladas de pacientes *ex vivo*.

Se trataron células de CLL (leucemia linfática crónica) (50000 células/200 µl) con 30, 10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de metadona sola (barras blancas) o además de fludarabina 0,1 µM (barras negras). Después de 24 h y 48 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

10 **Figura 10:**

La Figura 10 indica que la D,L-metadona en combinación con fludarabina induce la muerte celular en células de CLL resistentes (leucemia linfática crónica) aisladas de pacientes *ex vivo*.

- 15 Se trataron células de CLL (leucemia linfática crónica) (50000 células/200 µl) con 30, 10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de metadona sola (barras blancas) o además de fludarabina 0,1 µM (barras negras). Después de 24 h y 48 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Figura 11:

La Figura 11 muestra la inducción de la apoptosis en la línea celular Tanoue de leucemia de linfocitos B humana tratada con doxorubicina + metadona *in vitro*.

- 20 Se trató la línea celular Tanoue de B-ALL (leucemia linfática de linfocitos B) (5000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3, 1 µg/ml de metadona sola (barras blancas) o además de 0,03 µg/ml de doxorubicina (barras negras). Después de 96 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Figura 12:

La Figura 12 muestra la inducción de la apoptosis en la línea celular Nalm6 de leucemia precursora de linfocitos B humana tratada con doxorubicina + metadona *in vitro*.

- 25 Se trató la línea celular Nalm6 de B-ALL (leucemia linfática de linfocitos B) (5000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3, 1 µg/ml de metadona sola (barras blancas) o además de 0,01 µg/ml de doxorubicina (barras negras). Después de 96 h, 120 h, 144 h, 168 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Figura 13:

- 30 La Figura 13 muestra la inducción de la apoptosis en la línea celular HL-60 de leucemia mieloide aguda humana tratada con doxorubicina + buprenorfina *in vitro*.

Se trató la línea celular HL-60 de leucemia mieloide aguda humana (5000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de buprenorfina sola (barras blancas) o además de 0,003 µg/ml o 0,001 µg/ml de doxorubicina (barras negras). Después de 144 h o 168 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Figura 14:

- 35 La Figura 14 muestra la inducción de la apoptosis en la línea celular CEM de leucemia de linfocitos T humana tratada con doxorubicina + fentanilo *in vitro*.

Se trató la línea celular CEM de leucemia de linfocitos T humana (10000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3,1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de fentanilo sola (barras blancas) o además, de 0,02 µg/ml de doxorubicina (barras negras). Después de 48 h y 72 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

40 **Figura 15:**

La Figura 15 muestra la inducción de la apoptosis en la línea celular HL-60 de leucemia mieloide aguda humana tratada con morfina *in vitro*.

- 45 Se trató la línea celular HL-60 de leucemia mieloide aguda humana (5000 células/100 µl) con 30,10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 µg/ml de morfina. Después de 120 h (barras blancas) o 144 h (barras negras) se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Figura 16:

La Figura 16 muestra la inducción de la apoptosis en la línea celular HL-60 de leucemia mieloide aguda humana tratada con morfina *in vitro*.

- 5 Se trató la línea celular HL-60 de leucemia mieloide aguda humana (5000 células/100 µl) con 1, 0,5, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 µg/ml de morfina. Después de 96 h (barras blancas), 120 h (barras negras), 144 h (barras sombreadas) y 168 h (barras grises) se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Figura 17:

La Figura 17 muestra la inducción de la apoptosis en HL-60 de leucemia mieloide aguda humana tratadas con doxorubicina + morfina *in vitro*.

- 10 Se trató la línea celular HL-60 de leucemia mieloide aguda humana (5000 células/100 µl) con 30, 10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml de morfina sola (barras blancas) o además de 0,003 µg/ml (barras negras) o 0,001 µg/ml de doxorubicina (barras grises). Después de 168 h se midió la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo.

Sumario

- 15 Se sugiere el uso de opioides para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de pacientes con cáncer resistente.

REIVINDICACIONES

1. Uso de opioides capaces de inhibir la proliferación de células cancerosas para la preparación de un fármaco para el tratamiento de pacientes con cáncer resistente.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paciente oncológico muestra al menos una resistencia del siguiente grupo: resistencia a la apoptosis, quimiorresistencia, radiorresistencia.
3. Uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que el paciente muestra una resistencia intrínseca o una adquirida.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente muestra una o más de las subsiguientes resistencias:
 - 10 i. resistencia a la apoptosis
 - ii. resistencia multifarmacológica
 - iii. resistencia a fármacos antineoplásicos
 - iv. resistencia a fármacos citotóxicos
 - v. resistencia a especies de oxígeno reactivas
 - 15 vi. resistencia a agentes lesivos del ADN
 - vii. resistencia a anticuerpos tóxicos
 - viii. resistencia a la doxorrubicina
 - ix. resistencia individual o cruzada, en particular a una o más de las siguientes sustancias farmacológicas: metotrexato, citarabina, cisplatino, etopósido, vincristina, paclitaxel, carboplatino, tenipósido, dexametasona, prednisolona, ciclofosfamida, difosfamida, doxorrubicina, epirubicina, daunorrubicina, mercaptopurina.
 - 20 x. resistencia a la irradiación (por ejemplo, alfa, beta, gamma o electrones Auger)
5. Uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que los pacientes padecen uno de los siguientes cánceres: leucemia, cáncer de cerebro, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pecho, cáncer de vejiga, carcinoma de colon, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, leucemia crónica u osteosarcoma.
- 25 6. Uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que los pacientes padecen tumores no sólidos del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, proformas de leucemias, tricoleucemia, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano y mieloma múltiple.
- 30 7. Uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho opioide es capaz de inducir la vía mitocondrial de la apoptosis en las células cancerosas.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho opioide es capaz de inducir la apoptosis mediante al menos una de las siguientes reacciones:
 - i. escisión de la caspasa-3 y la PARP en la célula tumoral
 - 35 ii. escisión de la caspasa-9 y regulación por disminución de la XIAP
 - iii. regulación por disminución de la Bcl_L
9. Uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho opioide pertenece al grupo de la metadona.
- 40 10. Uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho opioide es la forma de clorhidrato de D-/L-metadona.
11. Una preparación farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un opioide (componente A) y al menos un agente antineoplásico adicional (componente B) que está seleccionado de entre el grupo que consiste en metotrexato, citarabina, cisplatino, etopósido, vincristina, especialmente doxorrubicina, o irradiación beta o irradiación gamma; para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer resistente.

12. Uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho opioide está seleccionado del grupo que consiste en fentanilo, buprenorfina y morfina.

13. Opioides capaces de inhibir la proliferación de células del cáncer para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer resistente.

Figura 1

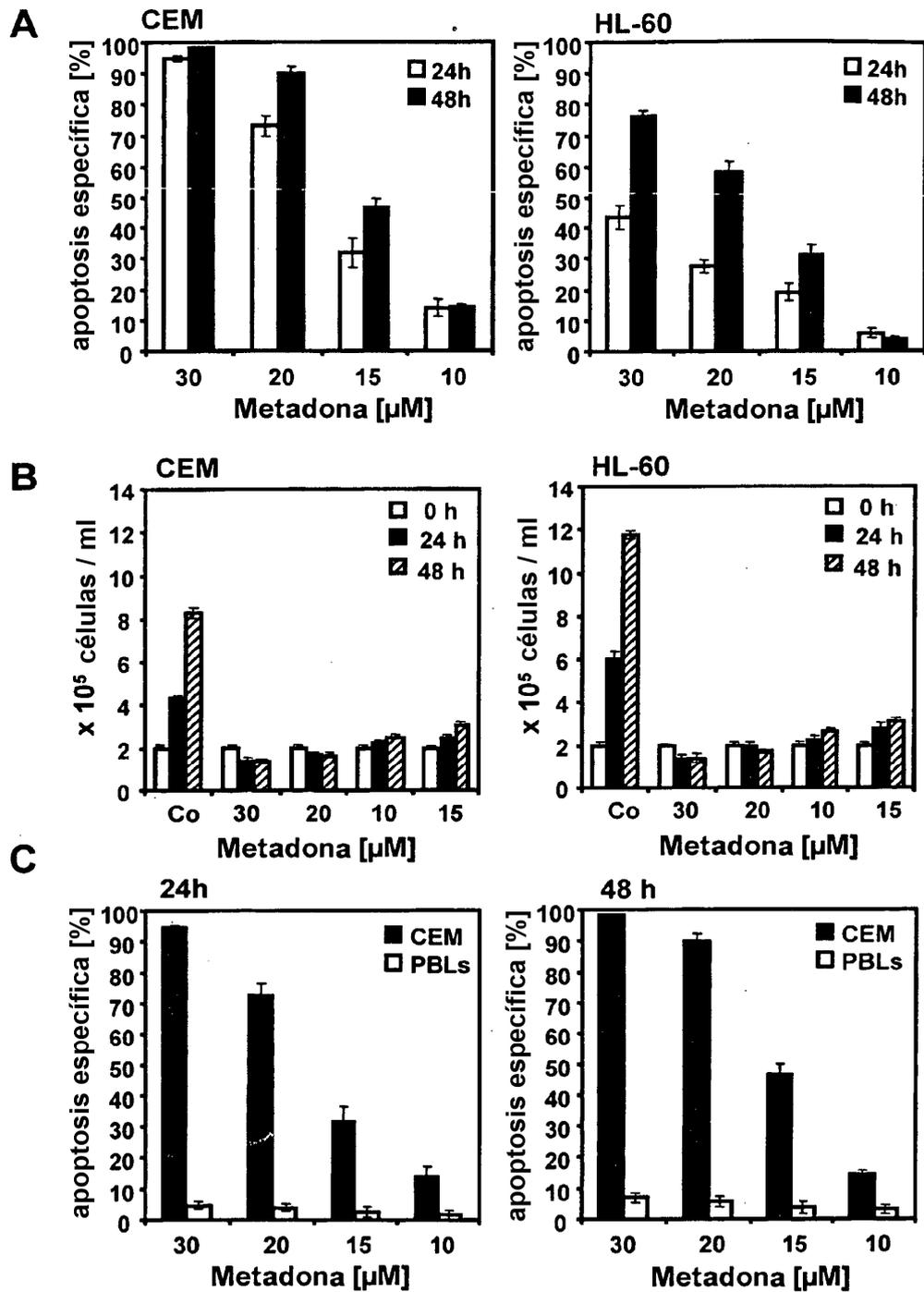


Figura 2

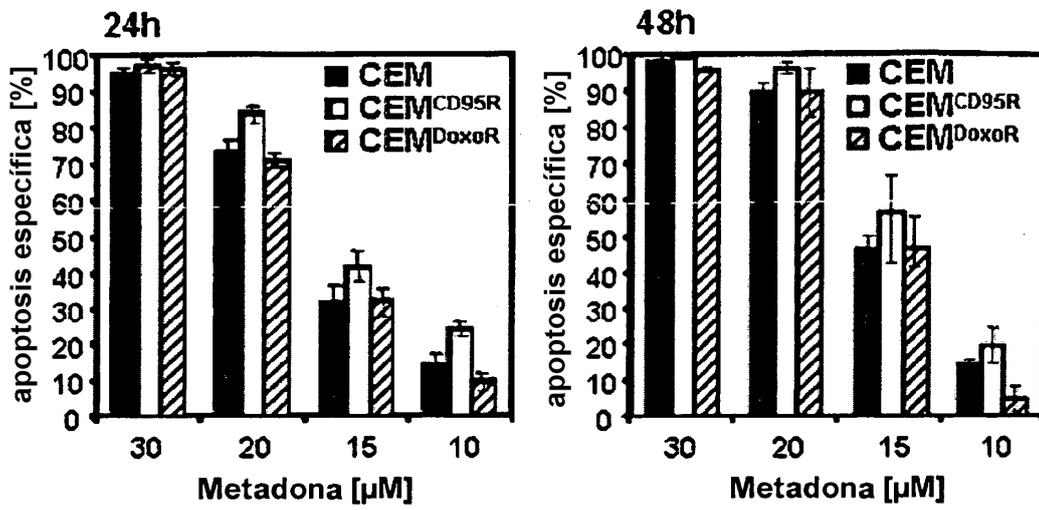


Figura 3

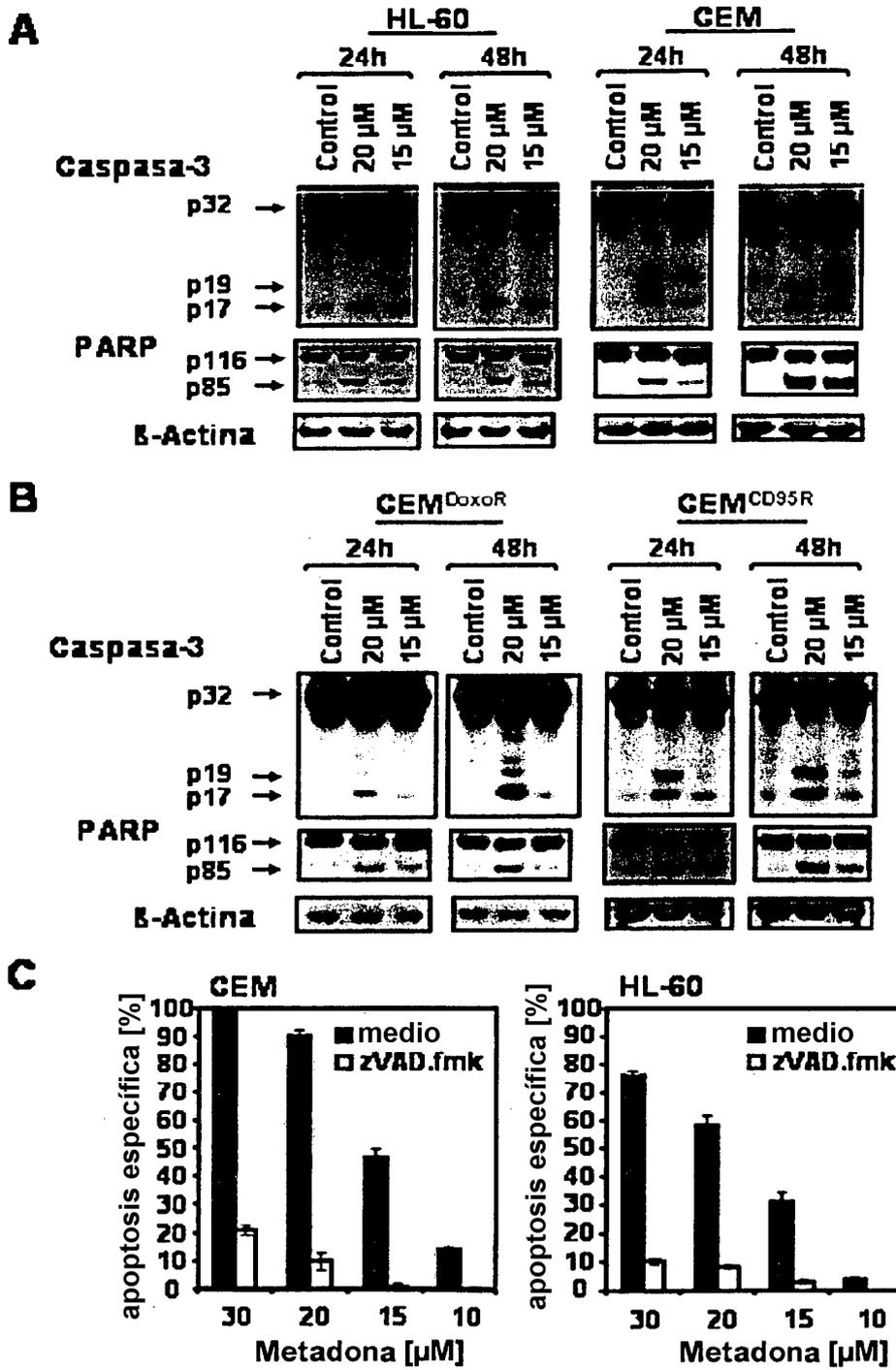


Figura 4

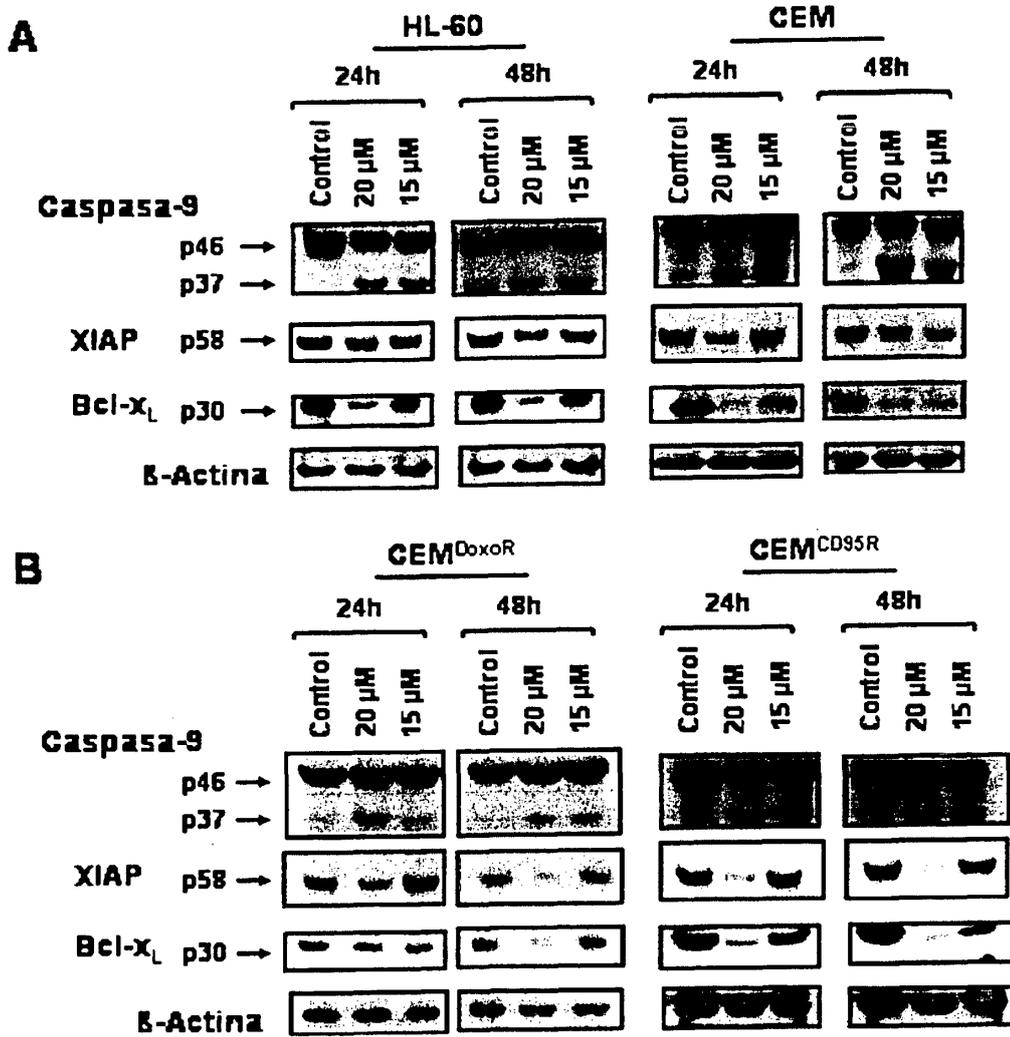


Figura 5

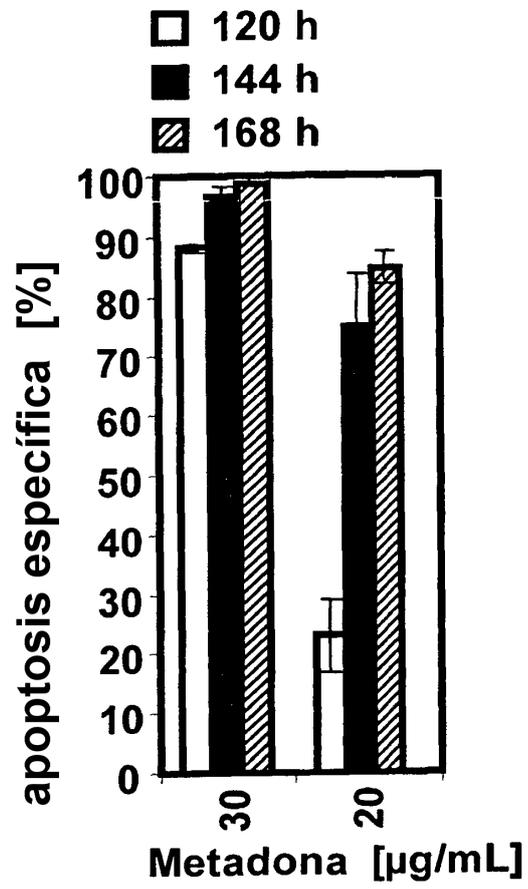


Figura 6

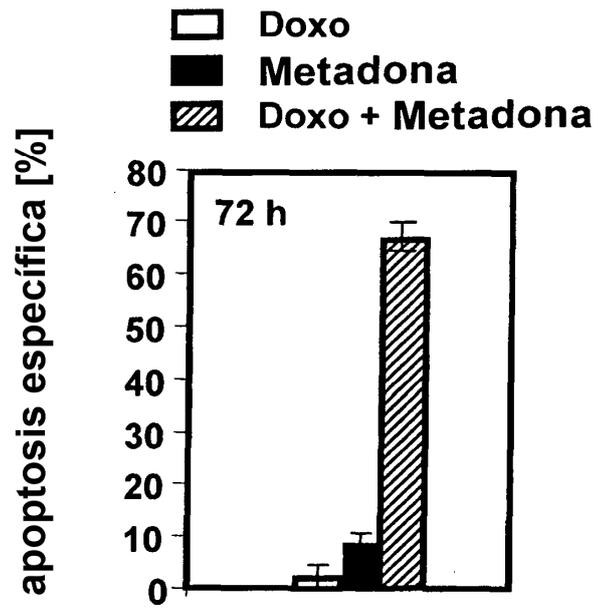


Figura 7

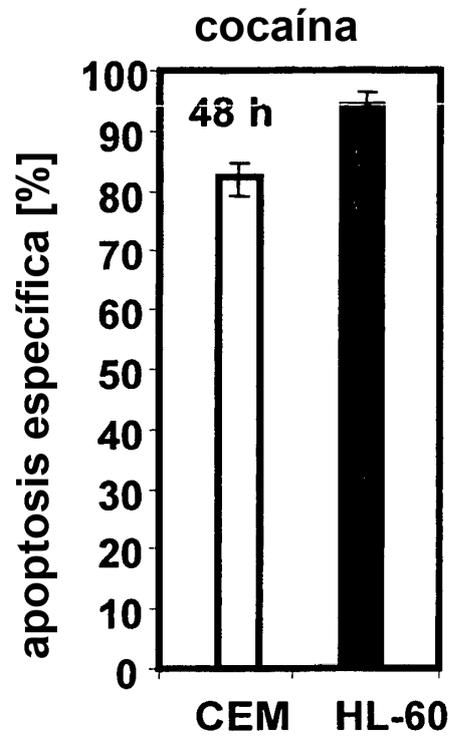


Figura 8

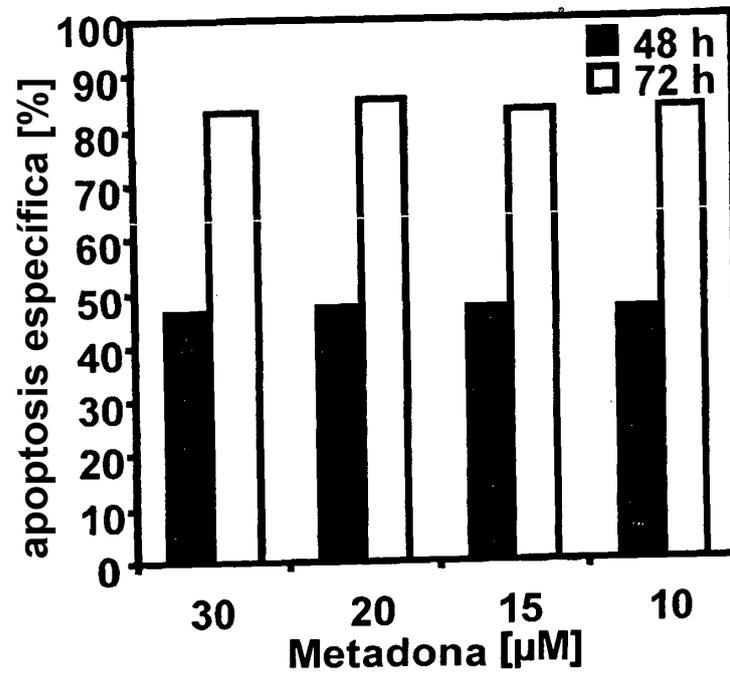


Figura 9

Paciente 1

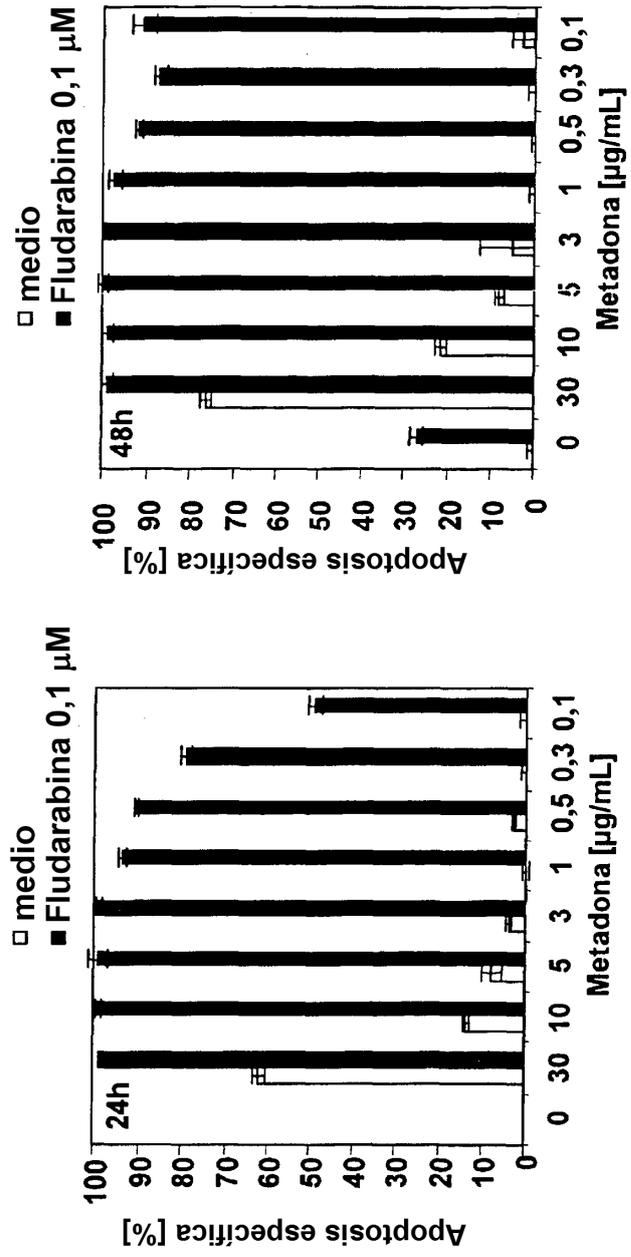


Figura 10

Paciente 3

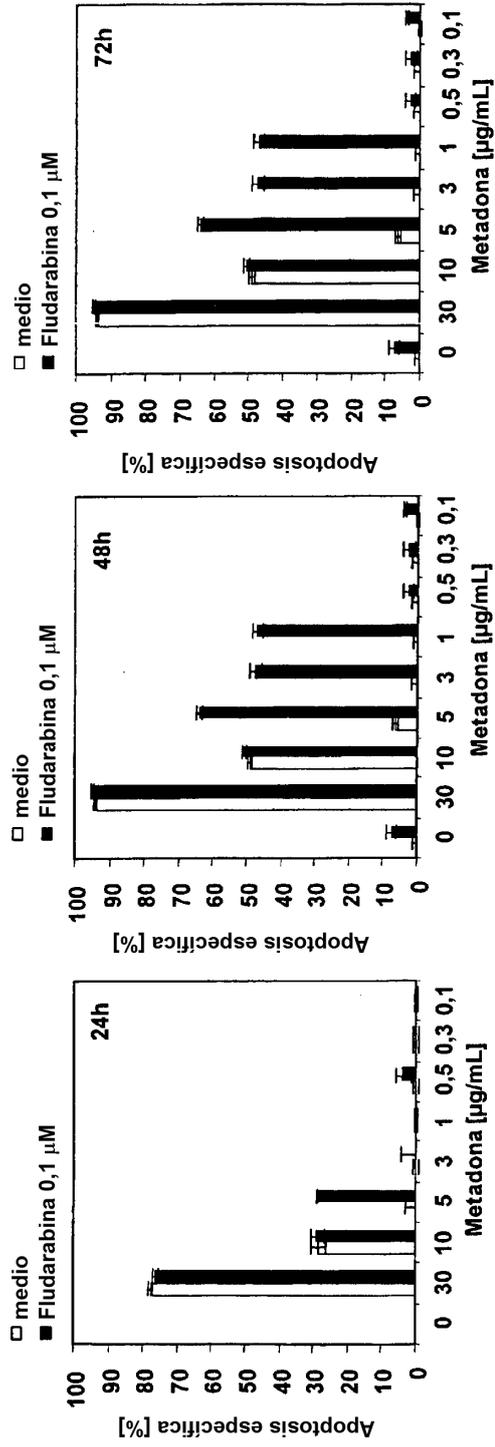


Figura 11

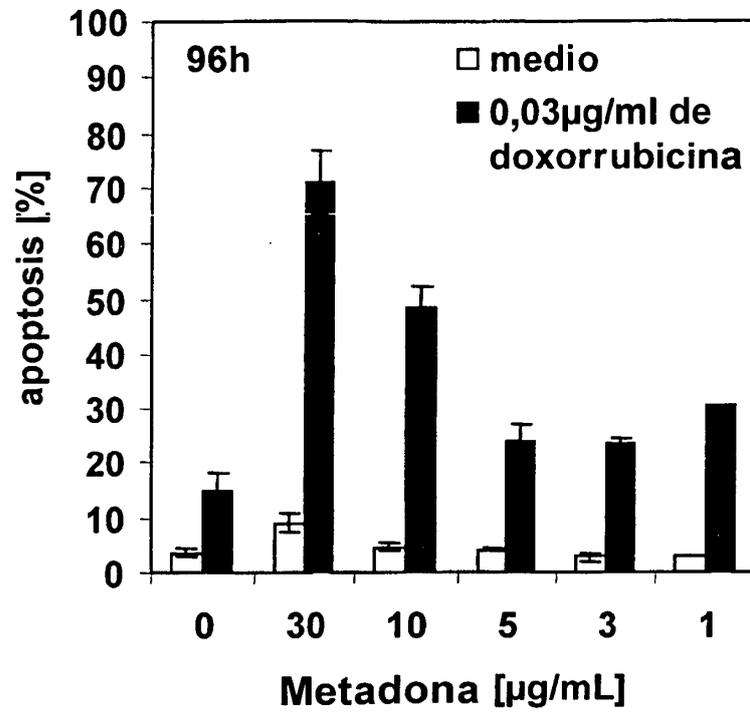


Figura 12

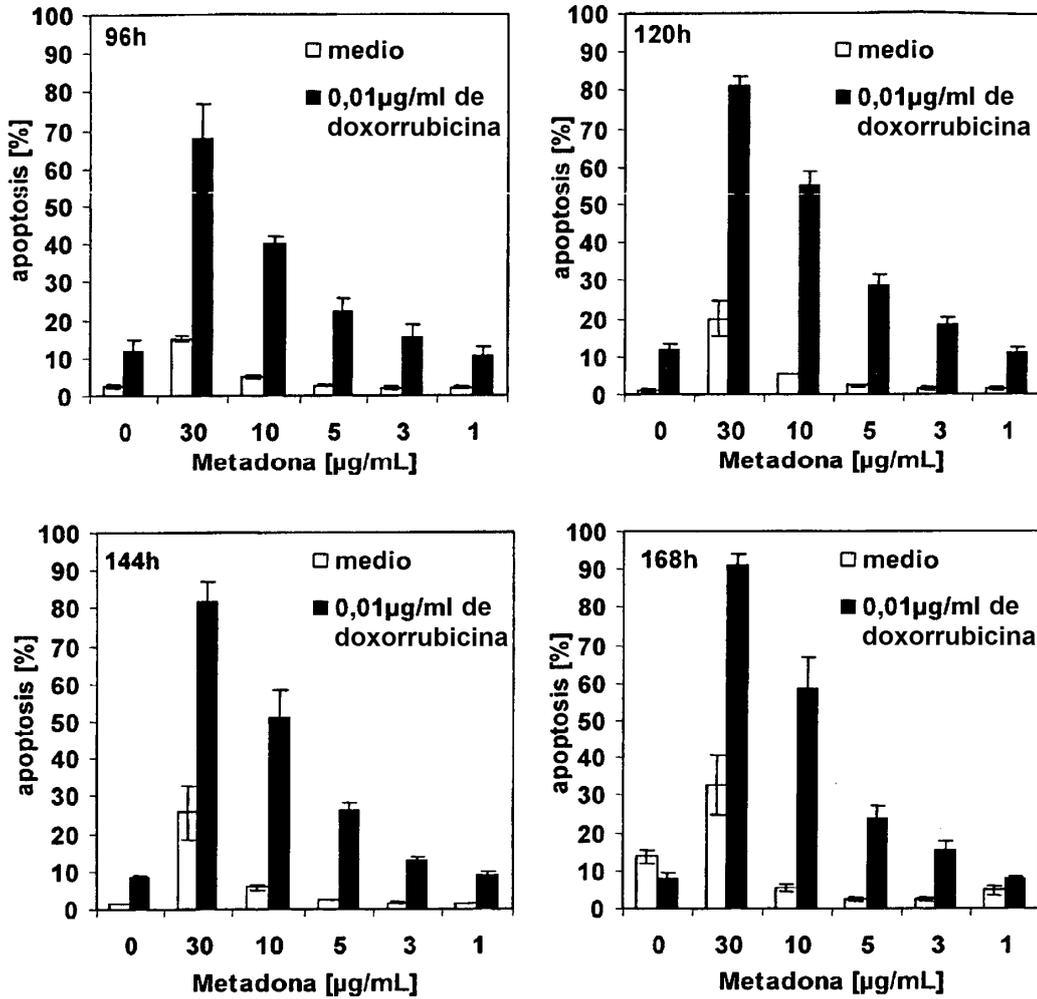


Figura 13

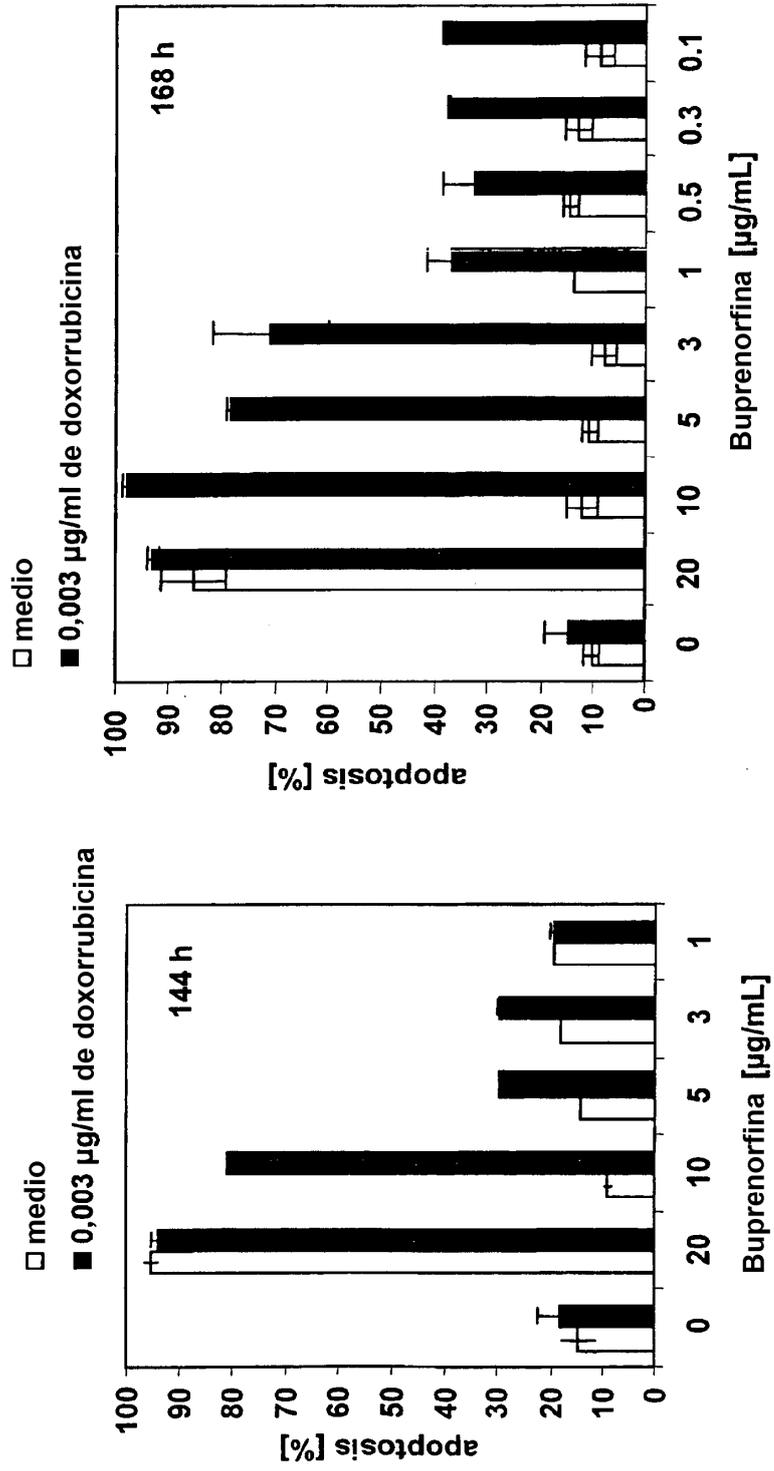


Figura 14

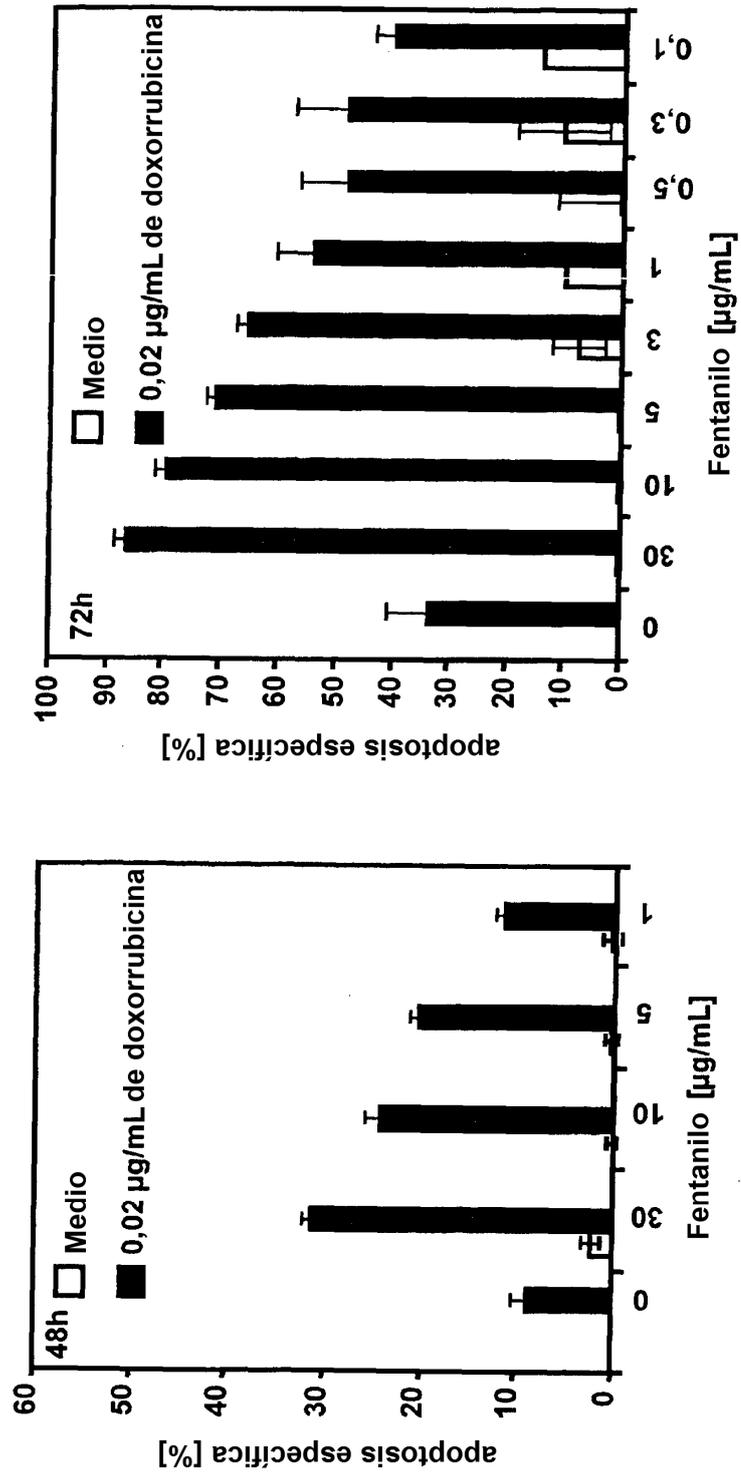


Figura 15

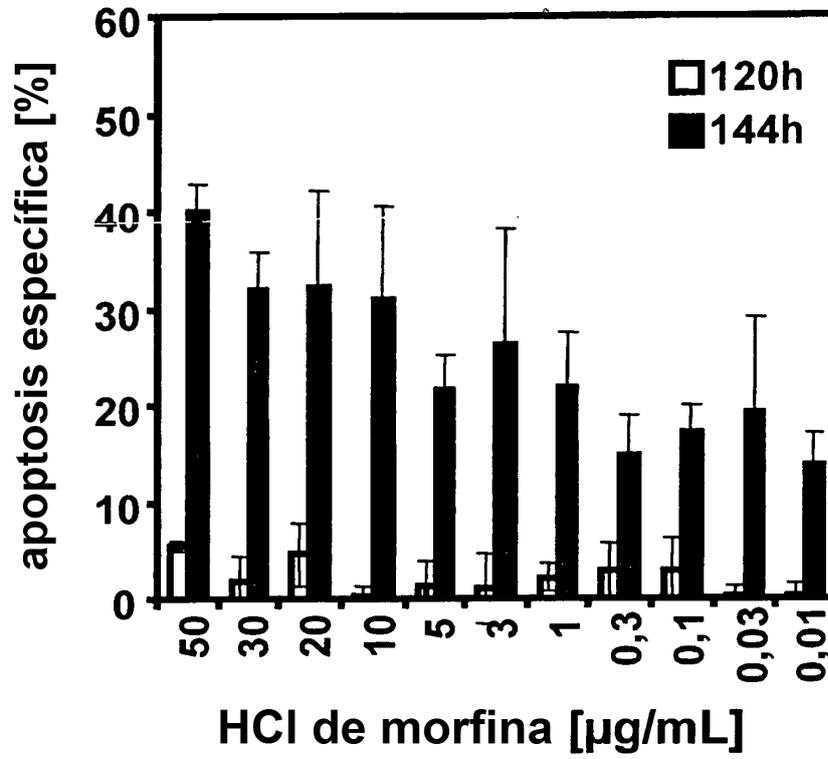


Figura 16

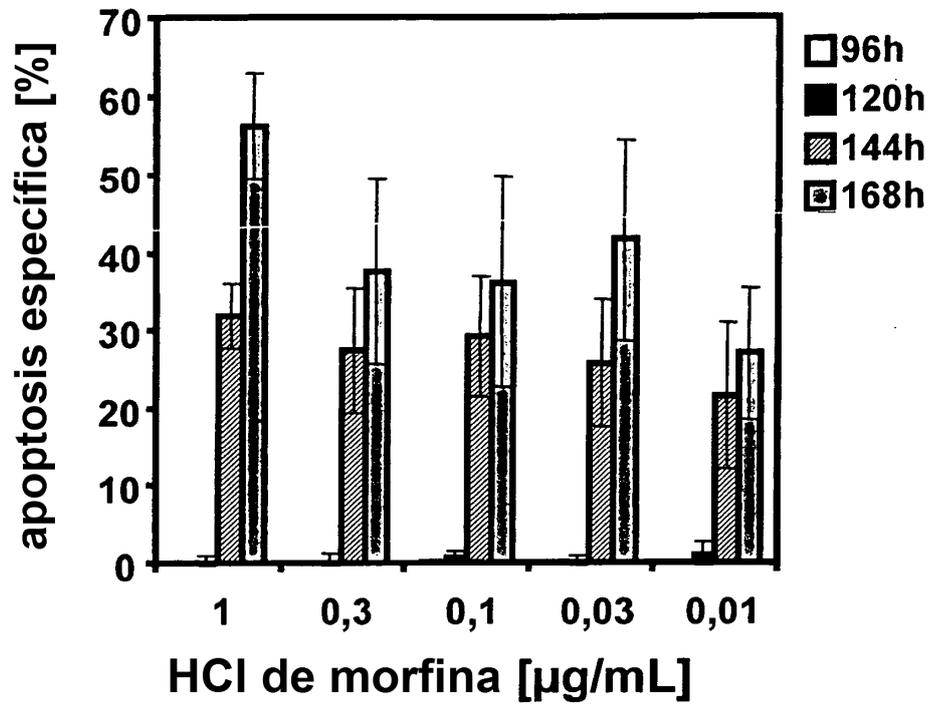


Figura 17

