

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 198**

51 Int. Cl.:

A61K 31/451 (2006.01)

A61K 31/485 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2006 PCT/US2006/007892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.09.2006 WO06096626**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2006 E 06748298 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 1861096**

54 Título: **Uso de antagonistas opioideos para atenuar la proliferación y la migración de células endoteliales**

30 Prioridad:

07.03.2005 US 659193 P

12.10.2005 US 725703 P

28.10.2005 US 731009 P

20.01.2006 US 760851 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2019

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF CHICAGO (100.0%)
5801 South Ellis Avenue
Chicago, IL 60637, US**

72 Inventor/es:

**MOSS, JONATHAN;
LINGEN, MARK;
SINGLETON, PATRICK A. y
GARCIA, JOE G.N.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 714 198 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

Uso de antagonistas opioideos para atenuar la proliferación y la migración de células endoteliales

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones para su uso en métodos de atenuar la migración y/o la proliferación de células endoteliales, especialmente asociadas con tumores, utilizando antagonistas opioideos periféricos.

10 **Introducción**

La proliferación celular es un proceso normal continuo en todos los organismos vivos que implica numerosos factores y señales que están delicadamente equilibradas para mantener los ciclos celulares regulares. Tanto si las células de mamífero crecerán y se dividirán como si no, se determina por varios mecanismos de control de la retroalimentación, que incluyen la disponibilidad del espacio en el que puede crecer una célula, y la secreción de factores estimuladores e inhibidores específicos en el entorno inmediato.

La angiogénesis y las enfermedades relacionadas con la angiogénesis se ven afectadas por la proliferación celular. El proceso de la angiogénesis da como resultado la formación de nuevos vasos sanguíneos. En condiciones fisiológicas normales, los animales, incluyendo los seres humanos, experimentan la angiogénesis solo en situaciones restringidas muy específicas. Por ejemplo, la angiogénesis se observa normalmente en la cicatrización de heridas, el desarrollo fetal y embrionario, y la formación del cuerpo lúteo, el endometrio y la placenta.

Durante el proceso de la angiogénesis, las células endoteliales, que existen normalmente en un estado quiescente como parte de un vaso sanguíneo existente, entran en un estado proliferativo migratorio. Este estado proliferativo migratorio de las células endoteliales se resuelve eventualmente cuando las células vuelven al estado quiescente como parte de un vaso sanguíneo nuevo funcional. La generación de nuevos capilares implica un proceso complejo que requiere que se produzcan numerosos eventos celulares y moleculares en un modelo espacial y temporal. Algunas de estas actividades incluyen la degradación de la membrana basal circundante del vaso original, la migración de las células endoteliales a través del estroma del tejido conectivo, la proliferación celular, la formación de estructuras de tipo tubular, y la maduración de estos tubos revestidos de endotelio en nuevos vasos sanguíneos. (Cliff, 1963; Schoeffl, 1963; Ausprunck y Folkman, 1977). Algunos factores angiogénicos esenciales incluyen el factor básico de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, citoquinas, proteínas de la matriz extracelular, y metaloproteasas de matriz. Estos factores se producen localmente por células estromales y por leucocitos activados que son reclutados hasta la zona (Risau, W. (1997) Nature 386(6626):671-674; Risau y Flamme (1995) Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 11:73-91). A diferencia de otros factores angiogénicos, VEGF actúa como un mitógeno específico de la célula endotelial durante la angiogénesis (Terman et al., 1992 y Ferrara, 1993).

La angiogénesis puede estimularse y aprovecharse por algunos neoplasmas (por ejemplo, tumores) para aumentar la captación de nutrientes. Se ha encontrado que la angiogénesis es esencial para el crecimiento de tumores sólidos de más de 2-3 mm de diámetro y para la metástasis tumoral (Folkman, 1995; revisado en Bouck et al., 1996). A diferencia de la angiogénesis normal, que conduce a la anastomosis y a la maduración de los capilares, la angiogénesis asociada con neoplasia es un proceso continuo. Las células endoteliales se activan por las células neoplásicas cercanas para secretar no solo VEGF que estimula la angiogénesis, sino también las metaloproteasas de matriz (MMP) que degradan la matriz extracelular circundante. Las células endoteliales invaden a continuación la matriz extracelular donde migran, proliferan, y se organizan para formar nuevos vasos sanguíneos, que soportan el crecimiento y la supervivencia de las neoplasias.

La neoplasia vascularizada recientemente continúa creciendo, conduciendo a una fuerte privación de nutrientes adicional y a una señalización proangiogénica crónica. La vasculatura de las neoplasias se caracteriza por la presencia de lagunas y una tasa baja de anastomosis. Esta vasculatura parcialmente disfuncional alimenta el requisito permanente de la angiogénesis. Adicionalmente, esta vasculatura incompleta permite el desprendimiento de células neoplásicas en la circulación sistémica. Por lo tanto, el potencial angiogénico de una neoplasia está correlacionado con el potencial metastásico. (Weidner et al. (1991) N. Engl. J. Med. 324(1): 1-8; Folkman y Shing (1992) J. Biol. Chem. 267(16):10931-10934).

Ya que una proporción significativa de neoplasias son dependientes de una angiogénesis continuada, la inhibición de la angiogénesis bloquea el crecimiento de la neoplasia que conduce a menudo a la necrosis completa del neoplasma. (Weidner et al. (1991) N. Engl. J. Med. 324(1): 1-8; Folkman y Shing (1992) J. Biol. Chem. 267(16):10931-10934).

La supresión de una cualquiera de las etapas y/o los factores implicados en la angiogénesis podría inhibir la formación de nuevos vasos, y por tanto, afectar al crecimiento del tumor y a la generación de la metástasis. De hecho, se ha estimado que la eliminación de una única célula endotelial podría inhibir el crecimiento de 100 células tumorales (Thorpe et al., 1995). Se ha encontrado también que los anticuerpo sensibilizados contra el factor angiogénico VEGF han mostrado suprimir el crecimiento del tumor *in vivo* (Kim et al., 1993).

Como parte del tratamiento y la gestión de pacientes con cáncer y muchas dolencias médicas, se usan ampliamente los agonistas de los opioideos, tales como morfina, para el dolor asociado. Por ejemplo, La morfina se usa en la fase terminal de los cuidados de aproximadamente la mitad de los pacientes que mueren de cáncer cada año en los Estados Unidos. Los agonistas de los opioideos, tales como morfina, comprenden un grupo de compuestos que actúan sobre una serie de receptores opioideos endógenos, tales como los receptores mu, kappa, y delta en sistemas biológicos. Normalmente, estos receptores endógenos se unen a opioideos endógenos. Los opioideos endógenos se producen de forma natural por las células de mamíferos. Los opioideos endógenos incluyen beta endorfinas, encefalinas, y dinorfinas. Las beta-endorfinas muestran una preferencia por los receptores mu, las encefalinas por los receptores delta y las dinorfinas por los receptores kappa. Los agonistas opioideos se clasifican por sus efectos preferentes sobre los receptores opioideos endógenos. En general, el receptor mu se asocia con el alivio del dolor, y la dependencia química (por ejemplo, drogodependencia y alcoholismo). La morfina, por ejemplo, es un agonista opioideo mu. Los receptores opioideos no se limitan al cerebro y al sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, a los receptores centrales. Los receptores opioideos periféricos pueden encontrarse en otros tejidos a lo largo del cuerpo, por ejemplo, tejido gastrointestinal.

A pesar del amplio uso en el tratamiento del dolor, la morfina y otras medicaciones opioideas pueden tener efectos secundarios graves que pueden estar producidos por la activación de los receptores periféricos. Los efectos secundarios pueden ser difíciles de gestionar y pueden dar como resultado que el paciente rechace el tratamiento del dolor basado en opioideos. Los efectos secundarios de un tratamiento con opioideos incluyen náuseas, estreñimiento, inhibición de la motilidad gastrointestinal, supresión e inmunosupresión respiratoria. Adicionalmente, la morfina y otros agonistas de receptores opioideos pueden estimular la proliferación de células endoteliales microvasculares humanas y la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* a concentraciones en sangre equivalentes a morfina normal o morfina. Esta actividad proangiogénesis de los agonistas opioideos, aunque paliativa del dolor, puede acelerar la progresión del dolor.

Los antagonistas opioideos se clasifican de forma similar por sus efectos sobre los receptores opioideos, por ejemplo, por su capacidad de antagonizar un receptor más eficazmente que otro receptor. Por ejemplo, el antagonista opioideo naloxona actúa como un antagonista competitivo en todos los receptores opioideos, pero es aproximadamente diez veces más eficaz en los receptores mu que en los receptores kappa y, por lo tanto, se clasifica como un antagonista opioideo mu. Los antagonistas opioideos pueden antagonizar receptores centrales, receptores periféricos o ambos. Los antagonistas opioideos, y en particular los antagonistas opioideos periféricos, se han usado para disminuir los efectos secundarios de los opioideos administrados exógenamente, así como para disminuir los efectos indeseados de los opioideos endógenos excesivos. Se han examinado también los antagonistas opioideos para su uso potencial como agentes anticancerosos para tipos concretos de cánceres, como se describe en las patentes de EE.UU. números 6.384.044 y 6.136.780 y en la bibliografía científica Gupta et al. *Cancer Research*, 62: 4491-98 (2002). Los efectos anticancerosos de los antagonistas opioideos han sido controvertidos y no se entienden bien, pero se ha mantenido que el antagonista opioideo con efectos anticancerosos, en la extensión en que se han mostrado en todos, no está relacionado con la angiogénesis (Poonawala T, et al., *Wound Repair Regen*. Mar-Abr 2005;13(2):165-74; Popov I., *Acta Chir Jugosl*. 2004;51(2): 117-21; Blebea J, et al., *J Vasc. Surg*. Mar 2002;35(3):532-8; Balasubramanian S, et al., *J Mol Cell Cardiol*. Dic 2001;33(12):2179-87; Zagon IS, et al., *Int J Oncol*. Nov 2000;17(5):1053-61; Blebea J et al., *J Vasc. Surg*. Ago 2000;32(2):364-73; Pasi A, et al., *Gen Pharmacol*. (991;22(6):1077-9.), documento WO01/70031 (Zagan et al.) proporciona que un péptido opioideo endógeno, el factor de crecimiento opioideo (u "OGF"), inhibe la angiogénesis *in vivo* actuando sobre los receptores del OGF. Esta divulgación proporciona también que el antagonista opioideo naltrexona estimule el desarrollo de vasos sanguíneos. De hecho, se ha notificado que en un modelo de tumores xenoinjertados en ratones, el antagonista opioideo naloxona no presenta un efecto significativo sobre la angiogénesis inducida por morfina Gupta et al. *Cancer Research*, 62: 4491-98 (2002). Por lo tanto, es sorprendente que se haya descubierto ahora que los antagonistas opioideos pueden inhibir la proliferación endotelial y la migración asociada con la angiogénesis.

Breve descripción de la invención

La divulgación describe métodos de atenuar, por ejemplo, inhibir o reducir, la proliferación y la migración celular, particularmente la proliferación y migración de células endoteliales, incluyendo las asociadas con la angiogénesis, utilizando antagonistas periféricamente restringidos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista opioideo periférico para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno caracterizados por la migración o la proliferación anómalas de células endoteliales, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del antagonista opioideo periférico a un sujeto que lo necesita, en el que el antagonista opioideo periférico es metilnaltrexona, en el que la metilnaltrexona inhibe o reduce la migración o la proliferación anómalas de células endoteliales, en el que las células endoteliales son células vasculares, y la migración o la proliferación anómalas es la angiogénesis anómala. El trastorno puede ser cualquier trastorno caracterizado por una migración o una proliferación no deseadas de células endoteliales. Dichos trastornos importantes son cáncer, anemia de células falciformes, heridas vasculares, retinopatías proliferativas y proliferación de células endoteliales no deseadas en los riñones y el pulmón.

El antagonista opioideo es un antagonista opioideo periférico que es metilnaltrexona. En realizaciones importantes, la

cantidad eficaz es tal que el sujeto tiene niveles de plasma sanguíneo en circulación eficaces del antagonista opioideo continuamente durante al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos tres semanas y, preferentemente, al menos 4 semanas.

5 La invención incluye también la administración simultánea de los antagonistas opioideos con agentes que no son antagonistas opioideos, pero que son sin embargo útiles en el tratamiento de trastornos caracterizados por la migración o la proliferación no deseadas de células endoteliales. Los ejemplos de dichos agentes incluyen agentes anticancerosos, agentes antineovascularización (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-VEGF), agentes antidiabetes, agentes dirigidos contra células falciformes, agentes cicatrizantes de heridas, y agentes dirigidos contra
10 la proliferación de células endoteliales.

se entenderá que los sujetos pueden estar, o no, en terapia opioidea concurrente, dependiendo del trastorno concreto que tenga el sujeto, la gravedad del trastorno, y la necesidad que tenga el sujeto del tratamiento del dolor. En algunas realizaciones, el sujeto está tomando terapia opioidea concurrente. En algunas realizaciones, el sujeto no está
15 tomando terapia opioidea concurrente. En algunas realizaciones, el sujeto está tomando terapia opioidea crónica concurrente. En algunas realizaciones, el sujeto no está tomando terapia opioidea crónica concurrente.

De acuerdo con cualquiera de las realizaciones, el antagonista opioideo es un antagonista opioideo periférico que es metilnaltrexona.
20

La presente memoria descriptiva describe métodos para atenuar la migración y/o la proliferación de las células endoteliales de un tumor o cáncer, que comprende poner en contacto las células con un agente antimigratorio o una cantidad antiproliferativa del antagonista opioideo. Se describen además métodos para atenuar la angiogénesis asociada con el cáncer. Estos describen el tratamiento de un paciente humano con cáncer, por ejemplo, mediante un
25 método para atenuar la angiogénesis en un tejido canceroso de un paciente, que comprende administrar al tejido canceroso del paciente una cantidad eficaz del antagonista opioideo.

En una realización, los antagonistas opioideo se usan perioperativamente. Por "perioperativamente", se entiende antes (por ejemplo, en preparación para), durante, y/o inmediatamente después de una cirugía o un procedimiento quirúrgico o endoscópico, por ejemplo, colonoscopia, gastrolaparoscopia, y especialmente una cirugía o procedimiento quirúrgico que implica la eliminación de un tumor. Los antagonistas opioideos actúan para atenuar le recidiva y/o la metástasis del tumor, que surgen especialmente de la angiogénesis asociada con el anterior.
30

Se anticipa que el antagonista opioideo se administrará preferente en un régimen de dosificación continuo, por ejemplo, un régimen que mantiene un mínimo, e incluso de forma más preferente un nivel en sangre relativamente constante. Se contempla además que las composiciones usadas en la presente invención pueden tener un valor profiláctico en determinados trastornos asociados con la angiogénesis anómala. Por tanto, la memoria descriptiva proporciona un método para prevenir la aparición o reaparición de un trastorno en un mamífero, caracterizándose el trastorno por la migración o la proliferación de células endoteliales no deseadas, incluida la angiogénesis anómala, que comprende
40 administrar a un mamífero que necesita de tal tratamiento, una cantidad eficaz del antagonista opioideo, en el que el tumor es un cáncer, anemia de células falciformes, enfermedades neovasculares oculares, diabetes, retinopatía ocular, u otra proliferación endotelial no deseada en riñones, ojos o pulmones. Se entenderá por tanto que, como se usa en el presente documento, el tratamiento de un sujeto con un trastorno caracterizado por la proliferación o migración de células endoteliales no deseadas incluye el tratamiento de un sujeto con un trastorno activo para inhibir o curar el trastorno y tratar a un sujeto para impedir que se reproduzca el trastorno. Por ejemplo, el sujeto puede haber
45 tenido un tumor sólido eliminado, y el sujeto puede recibir el tratamiento para impedir que se reproduzca el tumor.

En la atenuación de la proliferación celular, se proporciona un método para el tratamiento de la proliferación anómala de células de una célula que expresa el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista opioideo. Se describe también en el presente documento un método para inhibir o reducir la angiogénesis, particularmente, la angiogénesis inducida por opioideos, por ejemplo, de células tumorales, administrando o proporcionando un antagonista opioideo, particularmente un antagonista opioideo periférico, a las células que experimentan la angiogénesis. Se describen también en el presente documento métodos para tratar la angiogénesis inducida por opioideos en pacientes que reciben un tratamiento opioideo o en pacientes donde la angiogénesis es inducida por opioideo endógenos. el primer grupo es normalmente el de pacientes con cáncer con un tratamiento del dolor basado en opioideos. Los métodos comprenden administrar un antagonista opioideo a un paciente en una cantidad antiangiogénica, por ejemplo, una cantidad suficiente para inhibir o reducir la angiogénesis inducida por opioideos. En aquellos pacientes que reciben tratamiento opioideo, el antagonista opioideo y el antagonista opioideo periférico pueden administrarse
60 simultáneamente. Los antagonistas opioideos periféricos pueden, por lo tanto, utilizarse para inhibir o reducir los efectos angiogénicos de los opioideos sobre células tumorales, y atenuar el crecimiento de un tumor.

Los antagonistas opioideos incluyen generalmente compuestos de aminas heterocíclicas que pertenecen a diversas clases diferentes de compuestos. Por ejemplo, una clase es la de los derivados terciarios adecuados de morfina, y en particular, los derivados terciarios de noroximorfona. En una realización, el derivado terciario de noroximorfona es, por ejemplo, naloxona o naltrexona.
65

Los antagonistas opioideos periféricos son también en general compuestos de aminas heterocíclicas que pertenecen a diversas clases diferentes de compuestos. Por ejemplo, una clase es la de los derivados cuaternarios adecuados de morfinano, y en particular, derivados cuaternarios de noroximorfona. La invención utiliza el derivado cuaternario de noroximorfona N-metilnaltrexona (o simplemente metilnaltrexona).

En realizaciones de la invención, el antagonista opioideo es un antagonista opioideo μ . La invención abarca también la administración de más de un antagonista opioideo, incluyendo las combinaciones de los antagonistas μ y las combinaciones de los antagonistas μ y κ , por ejemplo, una combinación de metilnaltrexona y alvimopan, o una combinación de naltrexona y metilnaltrexona.

Se describen también en el presente documento métodos para tratar la angiogénesis inducida por opioideos en pacientes que reciben un opioideo, en el que un antagonista opioideo periférico y al menos un agente terapéutico diferente que no es un opioideo o antagonista opioideo se administran simultáneamente al paciente. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen agentes anticancerosos (incluyendo agentes quimioterapéuticos y agentes antineoplásicos), así como otros agentes antiangiogénicos.

Se describe también en el presente documento un método para reducir el riesgo de recidiva de un cáncer o tumor tras la intervención médica (tal como la intervención para incluir, aunque no de forma limitativa, la cirugía, por ejemplo, cirugía pulmonar, procedimientos quirúrgicos y endoscópicos, por ejemplo, colonoscopia, gastrolaparoscopia, quimioterapia, etc.), que comprenden administrar simultánea a un paciente con cáncer un antagonista opioideo. Por tanto, se contempla en el presente documento, por ejemplo, un método para minimizar la recidiva postquirúrgica de, por ejemplo, el cáncer de mama en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un antagonista opioideo. El antagonista opioideo periférico de acuerdo con la presente invención, es decir, MNTX, puede inhibir también VEGF, factor de crecimiento derivado plaquetas (PDGF), o la proliferación celular inducida o estimulada por esfingosina 1-fosfato (S1P) en las células endoteliales.

Breve descripción de los dibujos

La invención puede entenderse y apreciarse mejor por referencia a la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento junto con los dibujos acompañantes de los cuales:

La FIG. 1 es un gráfico de barras de la inhibición dependiente de la dosis de la migración de células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC), que representa los resultados del Ejemplo 1.

La FIG. 2 es un gráfico de barras de la inhibición dependiente de la dosis de la migración de células endoteliales microvasculares humanas, que representa los resultados del Ejemplo 2.

La FIG. 3 es un gráfico de barras de la inhibición dependiente de la dosis de la migración de HMVEC utilizando MNTX y MNTX + DAMGO.

La FIG. 4 es un gráfico de barras de la inhibición dependiente de la dosis de la migración de HMVEC utilizando naloxona y naloxona + DAMGO.

La FIG. 5 es un gráfico de barras del efecto dependiente de la dosis de M3G y M6G sobre la migración de HMVEC.

La FIG. 6 es una fotomicrografía que muestra la migración de células endoteliales inducida por morfina en presencia y ausencia de MNTX. Panel A = Control, Panel B = MS (sulfato de morfina), Panel C = MNTX, y Panel D = MS + MNTX. Se muestran las flechas en el Panel A para resaltar algunas células que han migrado satisfactoriamente a través de la membrana.

La FIG. 7 es un gráfico del porcentaje de proliferación (A) y migración (B) de células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de VEGF, morfina y DAMGO con o sin MNTX.

La FIG. 8 es un panel de inmunotransferencias que indica la fosforilación (activación) de la tirosina (A) del anticuerpo anti-VEGF R 1 (Flt-1) y 2 (Fik-1) usando el VEGF R 1 o 2 inmunoprecipitados y anti-fosfotirosina en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de VEGF, Morfina y DAMGO con o sin MNTX y un gráfico de barras (B) del porcentaje de proliferación y migración de las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de VEGF, morfina y DAMGO con o sin el inhibidor del VEGF R.

La FIG. 9 es un panel de inmunotransferencias que indica la activación de RhoA utilizando anticuerpo anti-RhoA en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de VEGF, morfina y DAMGO con o sin MNTX (A) o el inhibidor del VEGF R. (B).

La FIG. 10 es un panel de inmunotransferencias (A) de anticuerpo anti-RhoA de células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de ARNip de secuencia aleatoria (que no se dirige a ninguna secuencia de ARNm humano conocida) o ARNip de RhoA y un gráfico de barras del porcentaje de proliferación (B) y migración (C) de las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de VEGF, morfina y DAMGO con o sin ARNip de secuencia aleatoria (que no se dirige a ninguna secuencia de ARNm humano conocida).

La FIG. 11 es un diagrama esquemático que resume el mecanismo de los efectos de MNTX sobre la angiogénesis.

La FIG. 12 es un gráfico de barras del porcentaje de proliferación por encima del valor del control de las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar en presencia de S1P, VEGF, PDGF, morfina y DAMGO con o sin MNTX.

La FIG. 13 es un gráfico de barras del porcentaje de migración por encima del valor del control de las células

endoteliales de la microvasculatura pulmonar en presencia de S1P, VEGF, PDGF, morfina y DAMGO con o sin MNTX.

La FIG. 14 es un gráfico de barras del porcentaje de proliferación por encima del valor del control de las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar en presencia de S1P, VEGF, PDGF, morfina y DAMGO con el ARNip de secuencia aleatoria (del control) o con el ARNip del receptor opioideo mu.

La FIG. 15 es un gráfico de barras del porcentaje de migración por encima del valor del control de las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar en presencia de S1P, VEGF, PDGF, morfina y DAMGO con el ARNip de secuencia aleatoria (del control) o con el ARNip del receptor opioideo mu.

La FIG. 16 es un panel de inmunotransferencias que indican la fosforilación (activación) del receptor opioideo mu utilizando el receptor opioideo mu inmunoprecipitado y (A, C) antifosfo-serina, (B, D) anti-fosfotreonina de células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de morfina, DAMGO, S1P, VEGF, PDGF con MNTX (C, D) o sin MNTX (A, B); (E) es una inmunotransferencia del receptor opioideo dirigido contra mu.

La FIG. 17 es una inmunotransferencia dirigida contra RhoA de (A,B) RhoA activada y (C) RhoA total de células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de morfina, DAMGO, S1P, VEGF, PDGF con MNTX (B) y sin MNTX (A).

La FIG. 18 es un panel de inmunotransferencias del panel superior: (A, B) anti-fosfotirosina, (C) anticuerpo anti-VEGF R y en el panel inferior: (A, B) anti-fosfotirosina, (C) anticuerpo anti-PDGF R, de células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de morfina, DAMGO, VEGF (panel superior) o PDGF (panel inferior) con MNTX (B en cada panel) o sin MNTX (A en cada panel).

La FIG. 19 es un panel de inmunotransferencias que indican la fosforilación (activación) de la tirosina del receptor S1P₃ utilizando el receptor S1P₃ inmunoprecipitado y (A, B) anti-fosfotirosina, (C) anticuerpo anti-S1P₃ R, de células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana en presencia de morfina, DAMGO, y S1P con MNTX (B) o sin MNTX (A).

La FIG. 20 es un gráfico de barras del porcentaje de proliferación por encima del valor del control de las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar en presencia de S1P, VEGF, PDGF, morfina y DAMGO con ARNip de secuencia aleatoria (del control o con ARNip de RhoA).

La FIG. 21 es un gráfico de barras del porcentaje de migración por encima del valor del control de las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar en presencia de S1P, VEGF, PDGF, morfina y DAMGO con ARNip de secuencia aleatoria (del control o con ARNip de RhoA).

La FIG. 22 es un diagrama esquemático que resume el mecanismo de los efectos de MNTX sobre la sobre la activación de RhoA y la angiogénesis.

Descripción detallada de la invención

La divulgación describe métodos para atenuar la migración y/o la proliferación anómala o indeseable de las células endoteliales. Por tanto, la divulgación proporciona métodos para atenuar la angiogénesis en un tejido o un órgano de un sujeto mediante el uso de antagonistas opioideos, y una novedosa estrategia para tratar las enfermedades relacionadas con la angiogénesis y otras enfermedades hiperproliferativas en mamíferos. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, los tumores sólidos se basan en la generación de nuevos vasos sanguíneos para que los nutrientes alcancen las células en el tumor. Los factores de crecimiento requeridos para la angiogénesis se pueden producir por las células tumorales o alternativamente, factores exógenos, tales como los opioideos pueden estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. La presente invención proporciona una novedosa estrategia terapéutica mediante el uso de antagonistas opioideos para el tratamiento de dichos tumores, en el que la generación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor, más bien que las propias células tumorales, es la diana. Este tratamiento no es probable que conduzca al desarrollo de células tumorales resistentes.

Se describen en el presente documento antagonistas opioideos que inhiben la proliferación y la migración inducida por opioideos, endógenos o exógenos, y factores de crecimiento, tales como VEGF, PDGF, S1P, etc. Los antagonistas opioideos periféricos, en particular, mostraron una sustancial eficacia en inhibir los opioideos y el factor de crecimiento que indujeron la proliferación y la migración de las células endoteliales. El antagonista opioideo periférico metilnaltrexona (MNTX) inhibió los opioideos y el factor de crecimiento que indujeron la proliferación y la migración de una manera dependiente de la concentración. Además, naloxona inhibió también la migración endotelial inducida por opioideos. Debe notarse, sin embargo, que la inhibición de DAMGO por la naloxona indujo que la migración de células endoteliales se produjera a una concentración micromolar de naloxona relativamente alta. Además, se ha descubierto ahora que los antagonistas opioideos, y el antagonista opioideo periférico MNTX en particular, inhibe la proliferación y migración de células endoteliales (EC) inducida por el agonista mediante la inhibición del receptor de la fosforilación y/o las transactivación y la posterior inhibición de la activación de RhoA. Los agonistas pueden ser opioideos, exógenos y/o endógenos, factores angiogénicos (VEGF) y otros factores estimuladores de la proliferación y/o la migración (PDGF, S1P, el receptor S1P₃, RhoA, etc.). Estos resultados sugieren que la inhibición de la angiogénesis por antagonistas opioideos puede ser una intervención terapéutica útil para, entre otros trastornos, el cáncer.

Antes se explican en detalle algunas realizaciones de la invención, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles de la estructura y función de la invención que se muestran en la siguiente descripción o que se ilustran en las figuras adjuntas de los dibujos. La invención es capaz de otras realizaciones o de practicarse o de llevarse a cabo en diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento son a fines de descripción y no deben considerarse como limitantes. El uso de términos tales

como "que incluye", "que comprende", o "que tiene" y las variaciones de los mismos en el presente documento pretende incluir los elementos enumerados a continuación y los equivalentes de los mismos así como los elementos adicionales.

5 A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con su uso convencional. Como se usa en el presente documento, sin embargo, las siguientes definiciones pueden ser útiles para ayudar al médico especializado a comprender la invención:
"Sujeto" se refiere a seres humanos, perros, gatos y caballos.

10 "Uso opioideo crónico" se refiere a y se caracteriza por la necesidad de niveles sustancialmente mayores de opioideo para producir el beneficio terapéutico como resultado del anterior uso del opioideo, como es bien sabido en la técnica. El uso opioideo crónico como se usa en el presente documento incluye el tratamiento diario con opioideos durante una semana o más o el uso intermitente de opioideos durante al menos dos semanas.

15 "Alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que está saturado y que puede ser lineal, ramificado o cíclico teniendo de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono en la cadena, y todas las combinaciones y subcombinaciones de las cadenas del mismo. Los grupos alquilo ilustrativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, y decilo.

20 "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

Alquenilo se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que tiene de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono en la cadena, y todas las combinaciones y subcombinaciones de las cadenas del mismo. Los grupos alquenilo ilustrativos incluyen grupos vinilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo y decenilo.

"Alquinilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono y que tiene de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono en la cadena, y las combinaciones y subcombinaciones de las cadenas del mismo. Los grupos alquinilo ilustrativos incluyen grupos etinilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo y decenilo.

"Alquileno" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático bivalente que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y todas las combinaciones y subcombinaciones de las cadenas del mismo. El grupo alquileno puede ser lineal, ramificado o cíclico. Puede haber insertado a lo largo del grupo alquileno uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno opcionalmente sustituidos, en el que el sustituyente de nitrógeno es alquilo como se ha descrito anteriormente.

"Alquenileno" se refiere a un grupo alquileno que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquenileno ilustrativos incluyen etenileno (-CH=CH-) y propenileno (CH=CHCH₂-).

"Cicloalquilo" se refiere a cualquier anillo monocíclico o bicíclico estable que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 carbonos, y todas las combinaciones y subcombinaciones de los anillos del mismo. El grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes del grupo cicloalquilo. Los grupos cicloalquilo ilustrativos incluyen grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

"Alquilo sustituido con cicloalquilo" se refiere a un grupo alquilo lineal, preferentemente un grupo alquilo inferior, sustituido en un carbono terminal con un grupo cicloalquilo, preferentemente un grupo cicloalquilo C3-C8. Los grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo incluyen ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo, ciclopentiletilo, ciclopentilpropilo, ciclopropilmetilo y similares.

"Cicloalquenilo" se refiere a un grupo cicloalifático olefinicamente insaturado que tiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 carbonos, y todas las combinaciones y subcombinaciones de los anillos del mismo.

"Alcoxi" se refiere a un grupo alquil-O- donde el grupo alquilo es como se ha descrito anteriormente. Los grupos alcoxi ilustrativos incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y heptoxi.

"Alcoxi-alquilo" se refiere a un grupo alquil-O-alquilo donde el alquilo es como se ha descrito anteriormente.

"Acilo" significa un grupo alquil-CO- en el que alquilo es como se ha descrito anteriormente. Los grupos acilo ilustrativos incluyen acetilo, propanoilo, 2-metilpropanoilo, butanoilo y palmitoilo.

"Ariilo" se refiere a un radical carbocíclico aromático que contiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 carbonos, y todas las combinaciones y subcombinaciones de los anillos del mismo. El grupo ariilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o dos o más sustituyentes del grupo ariilo. Los grupos ariilo ilustrativos incluyen fenilo y naftilo.

"Alquilo sustituido con arilo" se refiere a un grupo alquilo lineal, preferentemente un grupo alquilo inferior, sustituido en un carbono terminal con un grupo arilo opcionalmente sustituido, preferentemente un anillo de fenilo opcionalmente sustituido. Los grupos alquilo sustituidos con arilo ilustrativos incluyen, por ejemplo, fenilmetilo, feniletilo y 3-(4-metilfenil)propilo.

5 "Heterocíclico" se refiere a un radical carbocíclico de un sistema de anillo monocíclico o multicíclico que contiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 miembros, y todas las combinaciones y subcombinaciones de los anillos del mismo, en el que uno o más de los miembros del anillo es un elemento diferente del carbono, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno o azufre. El grupo heterocíclico puede ser aromático o no aromático. Los grupos heterocíclico
10 ilustrativos incluyen, por ejemplo, grupos pirrol y piperidina.

"Halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

15 "Periférico", en referencia a los antagonistas opioideos, designa antagonistas opioideos que actúan principalmente sobre los sistemas fisiológicos y los componentes externos al sistema nervioso central, por ejemplo, no cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica en una cantidad eficaz para inhibir los efectos centrales de los opioideos. En otras palabras, Los antagonistas opioideos periféricos no inhiben eficazmente los efectos analgésicos de los opioideos cuando se administran periféricamente, por ejemplo, no reducen el efecto analgésico de los opioideos. Por ejemplo,
20 los compuestos antagonistas opioideos periféricos empleados en los métodos de la presente invención presentan altos niveles de actividad con respecto al tejido gastrointestinal, presentando a la vez actividad reducida o prácticamente ninguna actividad en el sistema nervioso central (SNC). Los compuestos antagonistas opioideos periféricos empleados en los presentes métodos presentan de forma adecuada menos de aproximadamente 5-15 % de su actividad farmacológica en el SNC, siendo la más adecuada aproximadamente un 0 % (por ejemplo, sin actividad en el SNC). La acción no central característica de un antagonista opioideo periférico se relaciona a menudo con la carga, la polaridad y/o el tamaño de la molécula. Por ejemplo, los antagonistas opioideos de aminas cuaternarias que actúan periféricamente están cargados positivamente mientras que los antagonistas opioideos de aminas terciarias que actúan centralmente son moléculas neutras. Los antagonistas opioideos periféricos útiles en la presente invención son
25 normalmente los antagonistas opioideos mu y/o kappa.

30 Como se usa en el presente documento, se entiende que "antiangiogénesis" o "antiangiogénico" se refiere a la capacidad de una molécula/compuesto de atenuar, por ejemplo, inhibir, reducir o modular, la proliferación de nuevos vasos sanguíneos, en general, y por ejemplo, para reducir o inhibir la migración y la proliferación de células endoteliales microvasculares humanas en cultivo en presencia de determinados factores de crecimiento. Como se ha descrito anteriormente, la formación de nuevos vasos sanguíneos por células endoteliales implica la migración, proliferación y
35 diferenciación de las células.

En la siguiente descripción de la invención, se llevaron a cabo las etapas del proceso a temperatura ambiente y presión atmosférica salvo que se especifique de otra forma. Se entiende también específicamente que cualquier intervalo numérico enumerado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor inferior al valor superior, por ejemplo, todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados son a considerar para declararse expresamente en esta solicitud. Por ejemplo, si un intervalo de concentración o intervalo de efecto beneficioso se indica como de 1 % a 50 %, se pretende que los valores tales como de 2 % a 40 %, del 10 % al 30 %, o del 1 % al 3 %, etc., estén enumerados expresamente en la presente memoria descriptiva. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente.

45 Se describen en el presente documento métodos para atenuar la migración y/o la proliferación celular anómalas o indeseables, particularmente la migración y/o la proliferación de células endoteliales, y la angiogénesis en tejidos o en un órgano de un sujeto. Los métodos comprenden proporcionar o administrar uno o más antagonistas opioideos en una cantidad eficaz a células endoteliales del tejido u órgano de un paciente para inhibir la migración proliferación de células endoteliales, y la angiogénesis. La angiogénesis puede, en parte, ser el resultado de recibir un tratamiento opioideo, particularmente para el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer, o tener altos niveles de opioideos endógenos.

55 Se observó que la morfina y el agonista mu de la encefalina DAMGO ([D-Ala², N-McPhe⁴, Gly⁵-ol] encefalina), produce cada uno un aumento dependiente de la dosis en la migración de células endoteliales similar a la del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como se midió mediante, por ejemplo, un ensayo de quimiotaxia (como se detalla en los ejemplos siguientes) u otros ensayos similares utilizados para identificar factores en la angiogénesis tumoral y los fármacos que afectan a esta. A concentraciones clínicamente relevantes de morfina, la magnitud del efecto es aproximadamente del 70 % con respecto al que se consigue mediante VEGF. Esta migración de células endoteliales basada en morfina se atenúa por el antagonista opioideo mu metilnaltrexona (MNTX) de una manera dependiente de la dosis. Por ejemplo, la migración de células endoteliales inducida por morfina, en concentraciones tan bajas como 10⁻⁷M, está significativamente bloqueada por 10⁻⁷M MNTX (FIG 2). Esta atenuación sugiere fuertemente que la migración de células endoteliales está mediada por la acción de la morfina sobre el receptor opioideo mu (MOR). Tal como se describe en los ejemplos siguientes, el efecto mediante el MOR más bien que otros receptores opioideos se confirmó mediante experimentos que muestran que el agonista mu de la encefalina sintética DAMGO muy selectivo induce también la migración. El efecto migratorio inducido por DAMGO está también bloqueado
65

por MNTX (FIG. 3).

En una revisión comprehensiva (Neumann et al. Pain 1982;13:247-52), la analgesia en los pacientes de cáncer se asoció con un intervalo de concentraciones en estado estacionario de morfina y plasma que varía de 6 a 364 ng/ml. Se observó un efecto de la morfina que produce la migración de células endoteliales a 100 ng/ml bien comprendido en el intervalo de la dosis clínica. Los inventores creen por tanto en el presente documento que una dosis de MNTX que mantendrá los niveles en plasma de MNTX a niveles mínimos de MNTX en plasma entre aproximadamente 25 y 150 ng/ml sería adecuado. Dichas dosis son alcanzables y están bien toleradas (Yuan et al., J Clin Pharmacol 2005;45:538-46).

Alvimopan, otro antagonista opioideo periférico selectivo proporcionado oralmente, está en la última etapa de desarrollo para la profilaxis del íleo postquirúrgico y el tratamiento con el opioideo indujo el estreñimiento (Moss et al., Pain relief without side effects: peripheral opioid antagonists. En Schwartz, A.J., editor. 33° ASA Refresher Course in Anesthesiology. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins (en prensa).) There is some transpassage of alvimopan across the membrane (J. Foss, et al., Clin. Pharm. & Ther. 2005, PII-90, pág. 74) y este puede, por lo tanto, poseer la capacidad de invertir algunos de los efectos sistémicos de los opioideos sin afectar la analgesia incluso cuando se administran oralmente.

Sin desear quedar ligado por ninguna teoría concreta, puede ser que el mecanismo del efecto del opioideo mu sobre la migración de células endoteliales se produzca al nivel de la membrana ya que MNTX, a diferencia de naloxona, es una molécula cargada a pH fisiológico. La morfina actúa mediante los receptores acoplados a la proteína G, mientras que VEGF actúa mediante el receptor de las tirosina quinasas. Mientras que las acciones de los agonistas mu y VEGF pueden ser independientes, existe una evidencia creciente de la transactivación del receptor como un mecanismo. Una investigación previa demostró que la toxina pertussis dependiente de los GPRC transactiva el receptor-2/F1 K1 de VEGF (Zeng, H. et al., J. Biol. Chem. 2003;278:20738-45). De esta manera, la morfina podría transactivar F11c-1 y promover un entorno donde podrían producirse la proliferación de células endoteliales y el crecimiento del tumor. Un estudio reciente de los ratones MOR inactivados genéticamente infectados con células T241 de fibrosarcoma demostró diferencias significativas en las incidencias del crecimiento del tumor y un aumento de 10 veces en la expresión de F11 c-1 en ratones tratados con morfina frente a los controles, frente al nulo aumento en los ratones KO tratados con morfina (K. Gupta, comunicación personal). Esto proporciona una evidencia adicional de que la morfina estimula la proliferación de células endoteliales y promueve el crecimiento tumoral transactivando probablemente la fosforilación de FLK1. Por tanto, La presente invención proporciona estrategias clínicas potenciales utilizando MNTX junto con las terapias actuales que se dirigen a VEGF. Aunque es posible un efecto directo por la transactivación del receptor, un factor adicional potencial implicado en la proliferación de tumores puede ser también el papel de las quimioquinas como integradores del dolor y la inflamación. Una reciente revisión sobre este sujeto (White et al., Nature Rev. Drug Discovery 2005;4:834-44) sugiere también un posible papel para los leucocitos en la activación de los receptores opioideos.

Además, se observó que la morfina, DAMGO y VEGF estimulan la activación de RhoA que se inhibió por antagonistas opioideos, tales como MNTX. RhoA es una importante molécula de señalización implicada en la angiogénesis (Aepfelbacher et al., 1997; Cascone et al., 2003; Hoang et al., 2004; Liu y Sanger, 2004.) La transactivación del receptor de VEGF es importante para la activación de RhoA inducida por un opiáceo. El silenciamiento de la expresión de RhoA bloqueó al opioideo y la proliferación y migración de EC inducida por VEGF, demostrando un papel para la activación de RhoA en la actividad angiogénica de EC inducida por agonistas. La atenuación mediada por MNTX de la activación de RhoA puede ser importante para el papel inhibitor de MNTX sobre la angiogénesis inducida por el opioideo y VEGF.

Debido a que la morfina y otros opioideos a dosis clínicas potencian la migración de células endoteliales, La presente invención puede ser de valor terapéutico en el tratamiento del antagonista opioideo para pacientes en dosis significativas y sostenidas de opioideos que tienen tumores que soportan el proceso angiogénico. Además, aunque las observaciones clínicas del inventor se han centrado sobre la morfina, que se administra de forma exógena, los opioideos endógenos, que se liberan por estrés o dolor, pueden también jugar un papel en la migración de células endoteliales. Basándose en los experimentos de migración de células endoteliales detallados a continuación en los ejemplos, MNTX y los antagonistas opioideos generalmente son generalmente de valor terapéutico como una terapia antiangiogénica incluso ausentes de la administración de opioideos exógenos (como se detalla en el presente documento). Se considera que los métodos descritos en el presente documento inhibirán o reducirán el crecimiento en y hacia un tumor. Inhibir el crecimiento de los vasos sanguíneos en los tumores evita que los nutrientes y el oxígeno que se suministran al tumor soporten el crecimiento más allá de un determinado tamaño. Minimizar el número de vasos sanguíneos u otros tumores disminuye también la probabilidad de que el tumor metastatice.

La presente invención puede ser de valor terapéutico en el tratamiento con antagonistas opioideos para pacientes que tienen tumores que se basan en el proceso angiogénico. Los tumores que se basan en procesos angiogénicos son tumores sólidos, leucemias y mielomas. Los tumores sólidos incluyen, aunque no se limitan a carcinoma de la corteza suprarrenal, tumores de la vejiga: carcinoma escamocelular, carcinomas uroteliales; tumores del hueso: adamantinoma, quistes óseos por aneurisma, condroblastoma, condroma, fibroma condromixioide, condrosarcoma, displasia fibrosa del hueso, tumor de células gigantes, osteocondroma, osteosarcoma; tumores de mama: carcinoma

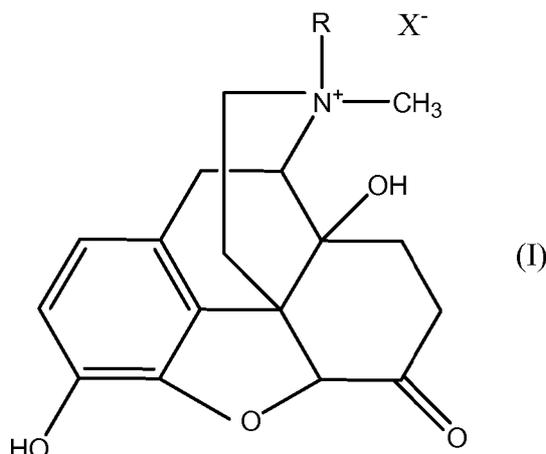
ductal secretor, cordoma; tumores de colon: adenocarcinoma colorrectal; tumores de los ojos: melanoma de la úvea posterior, fibrogénesis imperfecta de los huesos, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; tumor de riñón: carcinoma de células renales cromóforo, carcinoma de células renales de células claras, nefroblastoma (tumor de Wilms), riñón: carcinoma de células renales papilares, tumor ASPSCR1-TFE3 renal primario, carcinoma de células renales; tumores de hígado: hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular; tumores de pulmón: carcinoma no microcítico, cáncer microcítico; melanoma maligno de partes blandas; tumores del sistema nervioso: meduloblastoma, meningioma, neuroblastoma, tumores astrocíticos, ependimomas, tumores de la vaina del nervio periférico, feocromocitoma; tumores de ovario: tumores epiteliales, tumores de células germinales, tumores del estroma del cordón sexual, pericitoma; adenomas de la pituitaria; tumor rabdoide; tumores de la piel: histiocitomas fibrosos benignos cutáneos; tumores del músculo liso: leiomiomatosis intravenosa; tumores de tejidos blandos: liposarcoma, liposarcoma mixoide, sarcoma fibromixoide de grado bajo, leiomiosarcoma, sarcoma alveolar de las partes blandas, histiocitoma fibroso angiomatoide (AFH), sarcoma de células claras, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, elastofibroma, tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extraesquelético, tumor miofibroblástico inflamatorio, lipoblastoma, lipoma / tumores lipomatosos benignos, liposarcoma / tumores lipomatosos malignos, mioepitelioma maligno, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial, cáncer escamocelular; tumores de los testículos: tumores de células germinales, seminoma espermatocítico; tumores del tiroides: carcinoma anaplásico (indiferenciado), tumores oncocíticos, carcinoma papilar; tumores del útero: carcinoma del cuello uterino, carcinoma de endometrio, leiomioma etc.

En una realización de la invención los tumores son cáncer de próstata, tumores gastrointestinales tales como cáncer de colon o páncreas y los compuestos de la invención se administran simultáneamente con los otros agentes anticancerosos que se describen en el presente documento.

Los antagonistas opioideos de acuerdo con la presente invención son antagonistas opioideos que actúan periféricamente. Especialmente adecuado puede ser un antagonista opioideo mu, especialmente un antagonista opioideo periférico mu. Los antagonistas opioideo forman una clase de compuesto que puede variar en estructura manteniendo a la vez la propiedad restrictiva periférica. Estos compuestos incluyen morfinaos terciarios y cuaternarios, en particular, derivados de noroximorфона, piperidinas N-sustituidas, y en particular, piperidina-N-alkilcarboxilatos, y 20 benzomorfanos terciarios y cuaternarios. Los antagonistas periféricamente restringidos, aunque variados en la estructura, están cargados normalmente, son polares y/o de alto peso molecular, cada uno de los cuales les impide cruzar la barrera hematoencefálica.

Los ejemplos de antagonistas opioideos, que cruzan la barrera hematoencefálica y son activos centralmente (y periféricamente), incluyen, por ejemplo, naloxona, naltrexona (cada uno de los cuales se encuentra comercialmente disponible de Baxter Pharmaceutical Products, Inc.) y nalmefeno (disponible, por ejemplo, de DuPont Pharma). Estos pueden tener valor en la atenuación de la angiogénesis en el sistema nervioso central o en pacientes que no están siendo tratados con un tratamiento para el dolor u otro tratamiento opioideo.

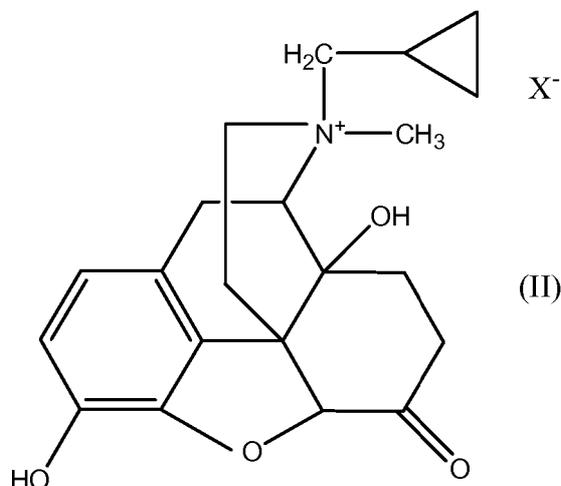
Un antagonista opioideo útil para la presente invención es un compuesto que es un derivado de morfinao cuaternario, y en particular, una noroximorфона de fórmula (I):



en la que R es alquilo, alqueno, alquino, arilo, alquilo sustituido con cicloalquilo o alquilo sustituido con arilo, y X' es el anión, especialmente un anión cloruro, bromuro, yoduro o metilsulfato. Se pueden preparar derivados de noroximorфона de fórmula (I), por ejemplo, de acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. n.º 4.176.186; véase también, las patentes de EE.UU. números 4.719.215; 4.861.781; 5.102.887; 5.972.954 y 6.274.591, las solicitudes de patente de EE.UU. números 2002/0028825 y 2003/0022909; y las publicaciones PCT números WO 99/22737 y WO 98/25613.

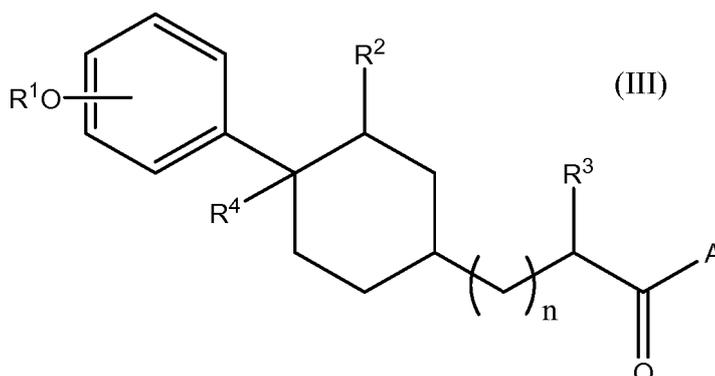
50

El compuesto de fórmula (I) utilizado en la presente invención es N-metilnaltrexona (o simplemente metilnaltrexona), en la que R es ciclopropilmetilo como se representa en la fórmula (II):



5 en la que X⁻ es como se ha descrito anteriormente. Metilnaltrexona es un derivado cuaternario del antagonista opioideo naltrexona. Metilnaltrexona existe como una sal, y "metilnaltrexona" o "MNTX", como se usa en el presente documento, abarca por tanto las sales. "Metilnaltrexona" o "MNTX" incluye específicamente, aunque no de forma limitativa, las sales de bromuro, sales de cloruro, sales de yoduro, sales de carbonato, y sales de sulfato de metilnaltrexona. Los nombres utilizados para la sal de bromuro de MNTX en la bibliografía incluyen: bromuro de metilnaltrexona; bromuro de N-metil naltrexona; metobromuro de naltrexona; metilbromuro de naltrexona; SC-37359, MRZ-2663-BR, y N-ciclopropilmetilnoroxi-morfina-metobromuro. Metilnaltrexona está comercialmente disponible de, por ejemplo, Mallinckrodt Pharmaceuticals, St. Louis, Mo. Metilnaltrexona se proporciona como un polvo cristalino de color blanco, soluble libremente en agua, normalmente como una sal de bromuro. El compuesto que se proporciona tiene una pureza del 99,4 % mediante HPLC en fase invertida y contiene menos de 0,011 % de naltrexona sin cuaternizar por el mismo método. Se puede preparar metilnaltrexona como una solución estéril a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 5 mg/ml.

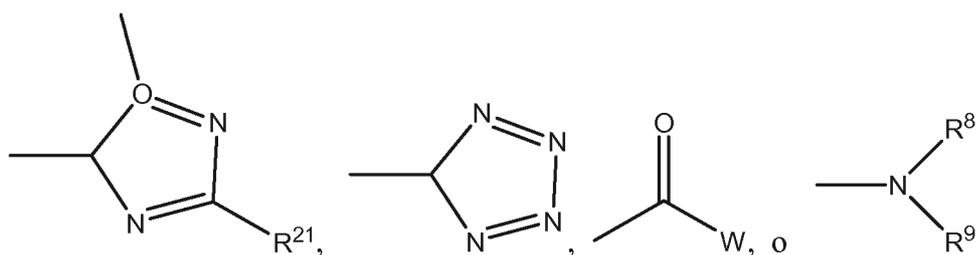
20 Otros antagonistas opioideos periféricos adecuados pueden incluir piperidinas N-sustituidas, y en particular, piperidina-N-alkilcarboxilatos como se representa por la fórmula (III):



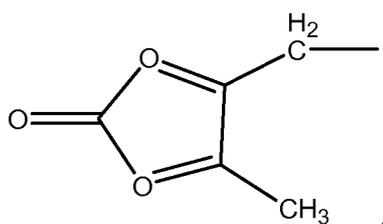
en donde

25 R¹ es hidrógeno o alquilo;
 R² es hidrógeno, alquilo, o alqueno;
 R³ es hidrógeno, alquilo, alqueno, arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alquilo sustituido con cicloalqueno o alquilo sustituido con arilo;
 30 R⁴ es hidrógeno, alquilo, o alqueno;
 A es OR⁵ o NR⁶R⁷; en donde
 R⁵ es hidrógeno, alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alquilo sustituido con cicloalqueno o alquilo sustituido con arilo;
 R⁶ es hidrógeno o alquilo;
 35 R⁷ es hidrógeno, alquilo, alqueno, arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alquilo sustituido con cicloalqueno o alquilo sustituido con arilo, o B sustituido con alqueno o junto con el átomo de nitrógeno al cual se unen, R⁶ y R⁷ forman un anillo heterocíclico seleccionado entre pirrol y piperidina;

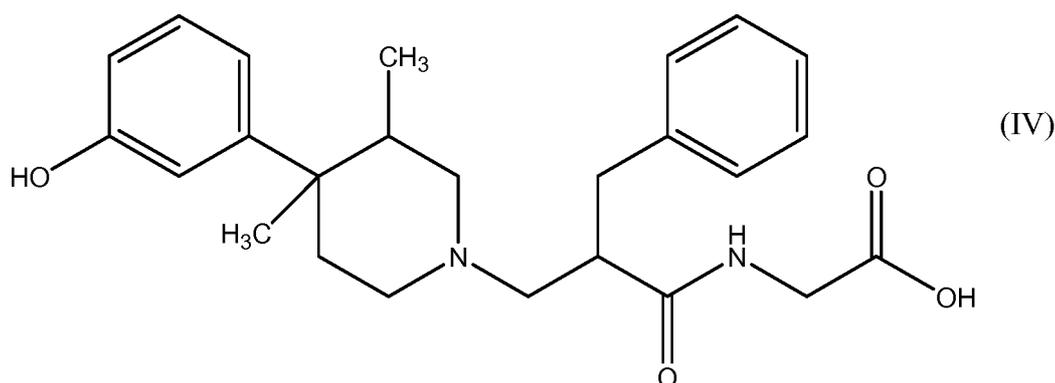
B es



- 5 en el que R⁸ es hidrógeno o alquilo;
 R⁹ es hidrógeno, alquilo, alqueno, arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alquilo sustituido con cicloalqueno o alquilo sustituido con arilo o junto con el átomo de nitrógeno al cual se unen, R⁸ y R⁹ forman un anillo heterocíclico seleccionado entre pirrol y piperidina;
 W es OR¹⁰, NR¹¹R¹², u OE; en donde
 10 R¹⁰ es hidrógeno, alquilo, alqueno, arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alqueno sustituido con cicloalqueno, o alquilo sustituido con arilo;
 R¹¹ es hidrógeno o alquilo;
 R¹² es hidrógeno, alquilo, alqueno, arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alquilo sustituido con cicloalqueno, alquilo sustituido con arilo o C(=O)Y sustituido con alqueno o, junto con el átomo de nitrógeno al cual se unen, R¹¹ y R¹² forman un anillo heterocíclico seleccionado entre pirrol y piperidina;
 15 E es



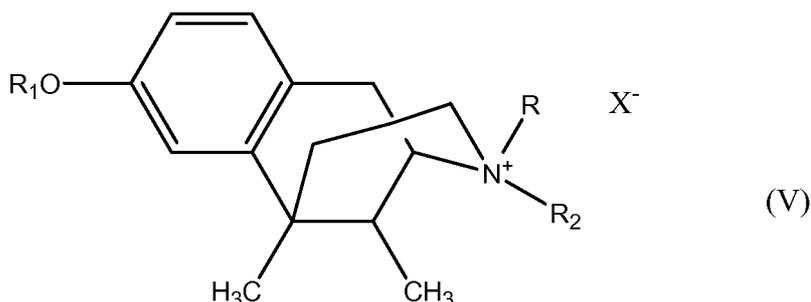
- 20 (C=O)D sustituido con alqueno, o -R¹³OC(=O)R¹⁴; en donde
 R¹³ es alqueno sustituido con alquilo;
 R¹⁴ es alquilo;
 D es OR¹⁵ o NR¹⁶R¹⁷; en donde
 25 R¹⁵ es hidrógeno, alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alquilo sustituido con cicloalqueno, o alquilo sustituido con arilo;
 R¹⁶ es hidrógeno, alquilo, alqueno, arilo, alquilo sustituido con arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo o alquilo sustituido con cicloalqueno;
 R¹⁷ es hidrógeno o alquilo o, junto con el átomo de nitrógeno al cual se unen, R¹⁶ y R¹⁷ forman un anillo heterocíclico seleccionado entre el grupo que consiste en pirrol o piperidina;
 30 Y es OR¹⁸ o NR¹⁹R²⁰; en donde
 R¹⁸ es hidrógeno, alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alquilo sustituido con cicloalqueno, o alquilo sustituido con arilo;
 R¹⁹ es hidrógeno o alquilo;
 R²⁰ es hidrógeno, alquilo, alqueno, arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido con cicloalquilo, alquilo sustituido con cicloalqueno, o alquilo sustituido con arilo o, junto con el átomo de nitrógeno al cual se unen, R¹⁹ y R²⁰ forma un anillo heterocíclico seleccionado entre pirrol y piperidina;
 35 R²¹ es hidrógeno o alquilo;
 y n es 0 a 4.
- 40 Los piperidina-N-alquilcarbonilatos que pueden ser de valor son N-alquilamino-3, 4, piperidinas 4 sustituidas, tales como alvimopan, representado a continuación como la fórmula (IV):



Las piperidinas N-sustituidas adecuadas se pueden preparar como se divulga en las patentes de EE.UU. números 5.270.328; 6.451.806; y 6.469.030. Alvimopan está disponible de Adolor Corp., Exton, PA. Dichos compuestos tienen pesos moleculares moderadamente altos, una forma de ion híbrido y una polaridad que evita la penetración de la barrera hematoencefálica.

Otros compuestos antagonistas opioideos periféricos más adecuados pueden incluir compuestos de benzomorfanio cuaternario. Los compuestos de benzomorfanio cuaternarios empleados en los métodos descritos en el presente documento presentan altos niveles de antagonismo de la morfina, presentando a la vez actividad agonista reducida, y preferentemente sustancialmente ninguna.

Los compuestos de benzomorfanio cuaternarios que se pueden emplear en los métodos descritos en el presente documento tienen la siguiente fórmula (V):



en la que;

R¹ es hidrógeno, acil o acetoxi; y

R² es alquilo o alqueno;

R es alquilo, alqueno o alquino

y

X⁻ es un anión, especialmente un anión cloruro, bromuro, yoduro o metilsulfato.

Los derivados cuaternarios específicos de los compuestos de benzomorfanio que se pueden emplear en los métodos descritos en el presente documento incluyen los siguientes compuestos de fórmula (V): 2'-hidroxi-5,9-dimetil-2,2-dialil-6,7-benzomorfanio-bromuro; 2'-hidroxi-5,9-dimetil-2-n-propil-2-alil-6,7-benzomorfanio-bromuro; 2'-hidroxi-5,9-dimetil-2-n-propil-2-propargil-6,7-benzomorfanio-bromuro; y 2'-acetoxi-5,9-dimetil-2-n-propil-2-alil-6,7-benzomorfanio-bromuro.

Se describen otros compuestos de benzomorfanio cuaternarios que se pueden emplear en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 3.723.440.

Los compuestos empleados en los métodos descritos en el presente documento pueden existir en forma de profármaco. Como se usa en el presente documento, se pretende que "profármaco" incluya algunos transportadores unidos covalentemente que liberan el fármaco precursor activo de acuerdo con las fórmulas (I) a (V) u otras fórmulas o compuestos en los métodos descritos en el presente documento *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un sujeto mamífero. Como se sabe que los profármacos potencian numerosas calidades deseables de los compuestos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.), los compuestos empleados en los presentes métodos pueden, si se desea, administrarse en forma de profármacos. En consecuencia, los profármacos incluyen, por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento en los que un grupo hidroxilo, amino, o carboxi se une a cualquier grupo que, cuando el profármaco se administra a un sujeto mamífero, se escinde para

formar un hidroxilo libre, un amino libre, o un ácido carboxílico, respectivamente.

Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, derivados de acetato, formiato y benzoato de grupos funcionales de alcohol y amina; y alquilo, carbocíclicos, arilo, y ésteres de alquilarilo tales como ésteres de metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, ciclopropilo, fenilo, bencilo, y fenetilo, y similares.

Como se ha indicado, Los compuestos empleados en los métodos descritos en el presente documento pueden prepararse de numerosas maneras bien conocidas por los expertos en la materia. Todas las preparaciones divulgadas junto con la presente invención se contemplan en la práctica a cualquier escala, incluidos miligramo, gramo, multigramo, kilogramo, multikilogramo o a escala farmacéutica comercial.

Los compuestos empleados en los presentes métodos pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos y pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Por tanto, se pretenden todas las formas quirales, diastereoméricas, racémicas, epiméricas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a no ser que se indique específicamente la estereoquímica o forma isomérica concretas. es bien conocido en la técnica, cómo preparar y aislar dichas formas ópticamente activas. Por ejemplo, las mezclas de estereoisómeros se pueden separar mediante técnicas convencionales que incluyen, aunque no de forma limitativa, resolución de formas racémicas, cromatografía normal, en fase invertida, y cromatografía quiral, formación preferencial de sales, recristalización y similares, o síntesis quiral a partir de materiales de partida quirales o síntesis deliberada de centros quirales diana.

En la invención, el antagonista opioideo es un antagonista opioideo μ . La invención abarca también la administración de más de un antagonista opioideo, incluyendo las combinaciones de los antagonistas μ y las combinaciones de los antagonistas μ y κ , por ejemplo, una combinación de metilnaltrexona y alvimopan.

Los métodos descritos en el presente documento abarcan proporcionar un papel terapéutico o profiláctico en otras enfermedades basadas en células endoteliales, por ejemplo, en varias angiogénesis y/o en enfermedades neoplásicas y no neoplásicas relacionadas con la proliferación, por ejemplo, enfermedad de células falciformes, enfermedad neovascular del ojo (tal como retinopatía diabética, glaucoma neovascular, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada con la edad), proliferación endotelial en los riñones o pulmones y psoriasis. Las dolencias no neoplásicas que son sensibles al tratamiento incluyen la artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabética y otras retinopatías proliferativas que incluyen retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular asociada a la edad, hiperplasias de tiroides (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante de córnea y trasplante de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (tal como el asociado con pericarditis), y derrame pleural. Por ejemplo, se ha mostrado que la morfina indujo la retinopatía en la enfermedad de células falciformes (Gupta et al., comunicación personal). Se anticipa que el tratamiento con un antagonista opioideo puede inhibir significativamente la retinopatía, particularmente con la retinopatía inducida por opioideos en pacientes con enfermedad de células falciformes que están en terapia activa de opioideos, y reciben opioideos durante largos periodos de tiempo, incluyendo terapia crónica durante semanas, meses o incluso años.

Los métodos descritos en el presente documento se considera también que son valiosos para reducir el riesgo de recidiva de una neoplasia o neoplasma tras el tratamiento con otras modalidades terapéuticas, por ejemplo, tras intervención quirúrgica. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un método para reducir el riesgo de recidiva del cáncer postquirúrgico. Los cánceres pueden incluir, por ejemplo, cáncer de mama o cáncer de próstata, y se puede conseguir un riesgo reducido proporcionando al paciente que padece dicho cáncer una cantidad eficaz de un antagonista opioideo, particularmente un antagonista opioideo periférico. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, los pacientes que experimentan cirugía de cáncer de mama tienen una diferencia significativa (de cuatro veces) en la incidencia de la recidiva a los 2-4 años dependiendo de si los pacientes recibieron anestesia local o general (con morfina durante su cirugía inicial). La administración simultánea de los antagonistas opioideos, especialmente antagonistas periféricos, De acuerdo con la presente invención, con tratamiento quirúrgico puede ser valiosa para reducir la incidencia de la recidiva del cáncer.

Tal como se muestra también en los ejemplos siguientes, se ha encontrado además que un antagonista opioideo periférico, MNTX, atenúa no solo la migración de células endoteliales inducida por VEGF, sino también la migración y/o la proliferación endotelial por otros factores promigración/pro-proliferativos tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o la esfingosina 1-fosfato (S1P). Dicha atenuación varía desde aproximadamente desde 10 % a 60 %, y proporciona una evidencia adicional de que los compuestos para su uso en la presente invención son valiosos en la inhibición de los factores promigración y proangiogénicos.

Se describen también en el presente documento métodos para tratar pacientes, por ejemplo, pacientes de cáncer, que están experimentando tratamiento con agonistas opioideos. Los agonistas opioideos incluyen, aunque no de forma limitativa, morfina, metadona, codeína, meperidina, fentidina, fentanilo, sufentanilo, alfentanilo y similares. Como se ha descrito anteriormente, los agonistas opioideos se clasifican por su capacidad de agonizar un tipo de receptor u orden de magnitud más eficazmente que otro. Por ejemplo, la afinidad relativa de la morfina por el receptor μ es 200 veces mayor que para el receptor κ , y se clasifica por tanto como un agonista opioideo μ . Algunos agonistas

- opioideos pueden actuar como agonistas hacia un receptor y como antagonistas hacia otro receptor y se clasifican como agonistas/antagonistas, (conocidos también como agonistas mixtos o parciales). "Agonista/antagonista", "agonista parcial", y "agonista mixto" se usan de manera indistinta en el presente documento. Estos opioideos incluyen, aunque no de forma limitativa, pentazocina, butorfanol, nalorfina, nalbufina, buprenorfina, bremazocina, y bezocina.
- 5 Muchos de los grupos de agonistas/antagonistas de opioideos son agonistas en los receptores kappa y antagonistas en los receptores mu. Además, se considera que los metabolitos activos de los agonistas opioideos pueden ser también activos como inductores de la angiogénesis. Por ejemplo, los metabolitos de morfina, morfina 3-glucuronida (M3G) y morfina 6-glucuronida (M6G) pueden ser factores proangiogénicos activos.
- 10 En general, el antagonista opioideo periférico utilizado de acuerdo con la presente invención puede administrarse en una cantidad eficaz de tal manera que el nivel en el plasma del paciente del antagonista opioideo periférico está en el intervalo de 10^{-6} M a 10^{-9} M. los niveles de fármaco en el plasma del paciente se pueden medir usando métodos de HPLC rutinarios conocidos por los expertos en la materia.
- 15 Tal como se describe en los ejemplos siguientes, el análogo de encefalina DAMGO induce la migración endotelial. Por tanto, los métodos descritos en el presente documento pueden ser valiosos para el paciente que padece de enfermedades hiperproliferativas o relacionadas con la angiogénesis, por ejemplo, cáncer, bastante aparte del tratamiento con agonistas opioideos.
- 20 El modo de administración concreto del antagonista opioideo seleccionado dependerá, por supuesto, de la combinación concreta de fármacos seleccionada, la gravedad de la progresión del tumor que se esté tratando, en el paciente con cáncer, la condición de salud general del paciente, y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos descritos en el presente documento, hablando en general, se pueden llevar a la práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, por ejemplo, cualquier modo que produce niveles eficaces
- 25 de los compuestos activos sin producir efectos adversos clínicamente inaceptables. Dichos modos de administración incluyen la administración oral, rectal, tópica (como mediante polvos, pomada, gotas, parche transdérmico o dispositivo iontoforético), transdérmica, sublingual, intramuscular, infusión, intravenosa, pulmonar, intramuscular, intracavitaria, como un aerosol, aural (por ejemplo, mediante gotas óticas), intranasal, por inhalación, intraocular o subcutánea. Se podría usar también la inyección directa para la administración local. La administración oral o subcutánea puede ser
- 30 adecuada para el tratamiento profiláctico o a largo plazo en función de la conveniencia del paciente así como del calendario de dosificación. Para enfermedades oculares, las formulaciones oftálmicas pueden inyectarse o instilarse directamente.
- Adicionalmente, los antagonistas opioideos pueden administrarse como un comprimido o cápsula revestido
- 35 entéricamente. En algunas realizaciones, el antagonista opioideo se administra mediante un método de infusión lenta o mediante un método de liberación controlada o liberación en el tiempo, o como un polvo liofilizado.
- Cuando se administran, los compuestos para su uso en la invención se administran en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones o preparaciones farmacéuticamente aceptables. Dichas preparaciones pueden
- 40 contener de forma rutinaria sales, agentes tamponantes, conservantes, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no convenientemente aceptables pueden utilizarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no se excluyen del alcance de la invención. Dichas sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no de forma limitativa, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico,
- 45 bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, succínico, naftaleno-2-sulfónico, pamoico, 3-hidroxi-2-naftalenocarboxílico, y benceno sulfónico. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, ácido acético y las sales del mismo (1-2 % WN); ácido cítrico y las sales del mismo (1-3 % WN); ácido bórico y las sales del mismo (0,5-2,5 % WN); y ácido fosfórico y las sales del mismo (0,8-2 % WN).
- 50 Los conservantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % WN); clorobutanol (0,3-0,9 % de W/N); parabenos (0,01-0,25 % WN) y timerosal (0,004-0,02 % WN).
- Para facilitar la administración, una composición farmacéutica del antagonista opioideo periférico puede contener
- 55 también uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como lubricantes, diluyentes, aglutinantes, transportadores, y disgregantes. Otros agentes auxiliares pueden incluir, por ejemplo, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para variar la presión osmótica, la coloración, la aromatización y/o los compuestos aromáticos activos.
- 60 Un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un sólido, semisólido o carga líquida no tóxica, un diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo. Por ejemplo, Los transportadores, diluyentes disolventes o vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, agua, soluciones salinas (tampones), alcoholes, goma arábiga, aceites minerales y vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco,
- 65 ácido silícico, parafina viscosa, aceites vegetales, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. La fluidez adecuada se puede mantener, por

ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos tales como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares.

5 Si se utiliza un transportador sólido farmacéuticamente aceptable, la forma farmacéutica de los análogos puede ser comprimidos, cápsulas, polvos, supositorios, o pastillas para chupar. Si se usa un transportador líquido, cápsulas de gelatina blanda, se pueden utilizar parches transdérmicos, pulverizadores en aerosol, crema tópica, jarabes o suspensiones líquidas, emulsiones o soluciones pueden ser la forma farmacéutica.

10 Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuados los inyectables, soluciones estériles, preferentemente soluciones acuosas o no acuosas, así como dispersiones, suspensiones, emulsiones, o implantes, incluyendo supositorios. Las ampollas son a menudo dosificaciones unitarias convenientes. La forma de depósito inyectable puede ser también adecuada y puede prepararse formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como poliláctida-polglicolida, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación del fármaco.

15 Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que con compatibles con tejidos corporales. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril exactamente antes de su uso.

20 Para la aplicación entérica, son particularmente adecuados los comprimidos, grageas, líquidos, gotas, supositorios, o cápsulas tales como cápsulas de gelatina blanda. Un jarabe, puede utilizarse un elixir o similar en el que se emplea un vehículo edulcorado.

25 Como se ha indicado, otro sistema de administración puede incluir un sistema de administración de liberación en el tiempo, liberación retardada o liberación continua. Dichos sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de los compuestos de la invención, mayor comodidad para el paciente y el médico y mantener niveles sostenido de los compuestos en plasma. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración de la liberación y son conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. Pueden formularse composiciones de liberación continua o controlada, por ejemplo, como liposomas o aquello en el que el compuesto activo se protege con revestimientos diferencialmente degradables, tales como mediante microencapsulación, múltiples revestimientos, etc.

30 Por ejemplo, los compuestos para su uso en la invención pueden combinarse con matrices de liberación continua farmacéuticamente aceptables, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. Una matriz de liberación continua, como se usa en el presente documento, es una matriz preparada de materiales, usualmente polímeros, que son degradables mediante hidrólisis enzimática o hidrólisis ácido-base o mediante disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz se activa mediante las enzimas y fluidos corporales. Se puede seleccionar una matriz de liberación continua de forma deseable entre materiales biocompatibles tales como liposomas, un sistema basado en polímero tal como poliláctidos (ácido poliláctico), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), poliláctido co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(ortoésteres), polisacáridos, poliaminoácidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, polinucleótidos, polivinilpirrolidona, polivinilpirrolidona, y silicona; sistema sin polímeros tales como ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, aminoácidos, lípidos tales como esteroides, sistemas de liberación de hidrogeles; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; implantes y similares. Los ejemplos específicos incluyen, aunque no de forma limitativa: (a) un sistema erosional en el que el polisacárido está contenido en una forma en una matriz, se encuentra en las patentes de EE.UU. números 4.452.775, 4.675.189, y 5.736.152, y (b) un sistema difusional en el que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de EE.UU. números 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se puede usar un sistema de administración por cable con bomba, algunos de los cuales se adaptan para implante. Se describen revestimientos entéricos adecuados en la publicación PCT n.º WO 98/25613 y la patente de EE.UU. n.º 6.274.591.

55 El uso de un implante de liberación continua a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de dolencias crónicas. Liberación a "largo plazo", como se usa en el presente documento, significa que el implante se construye y dispone para administrar niveles terapéuticos del principio activo durante al menos 7 días, y, de forma adecuada, de 30 a 60 días. Los implantes de liberación continua a largo plazo son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la materia e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

60 Para aplicación tópica, se emplean como una forma no pulverizable, una forma viscosa a semisólida o sólida que comprende un transportador compatible con la aplicación y que tiene una viscosidad dinámica preferentemente mayor que la del agua. Como formulaciones adecuadas se incluyen, aunque no de forma limitativa, soluciones, suspensiones, emulsiones, crema, pomadas, polvos, linimentos, salvas, aerosoles, etc., que son, si se desea, esterilizadas o mezcladas con agentes auxiliares, por ejemplo, conservantes, etc.

Es también posible la administración transdérmica o iontoforética de las composiciones farmacéuticas de los antagonistas opioides.

5 Con respecto a MNTX específicamente, las formulaciones acuosas pueden incluir un agente quelante, un agente tamponante, un antioxidante y, opcionalmente, un agente de isotonicidad, preferentemente con pH ajustado a entre 3,0 y 3,5. Dichas formulaciones preferidas que son estables para autoclavar y de almacenamiento a largo plazo se describen en la aplicación con n.º de serie 10/821811, publicada ahora como 20040266806, titulada "Formulación farmacéutica".

10 En una realización, los compuestos para su uso en la invención se administran con un régimen de dosificación que proporciona un régimen de dosificación continua del compuesto a un sujeto, por ejemplo, un régimen que mantenga niveles plasmáticos mínimos del antagonista opioide, y preferentemente elimine las puntas y valles de un nivel de fármaco con los regímenes convencionales. De manera adecuada, se puede conseguir una dosis continua mediante la administración del compuesto a un sujeto diariamente usando cualquiera de los métodos de administración divulgados en el presente documento. En una realización, la dosis continua se puede conseguir usando una infusión continua al sujeto, o por un mecanismo que facilite la liberación del compuesto con el tiempo, por ejemplo, un parche transdérmico, o una formulación de liberación sostenida. De manera adecuada, los compuestos para su uso en la invención se liberan continuamente al sujeto en cantidades suficientes para mantener una concentración del compuesto en el plasma eficaz para inhibir o reducir la angiogénesis inducida por opioides; o en pacientes de cáncer, para atenuar el crecimiento de un tumor. Los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención, tanto si se proporcionan en solitario o junto con otros agentes terapéuticos, se proporcionan en una cantidad antiangiogénicamente eficaz. Se entenderá, sin embargo, que la utilización diaria total de los compuestos y composiciones para su uso en la presente invención la decidirá el médico a cargo del tratamiento dentro del alcance de un buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente concreto dependerá de diversos factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de excreción del compuesto empleado concreto; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o casuales con el compuesto específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien comprendido entre las habilidades del experto en la técnica iniciar las dosis del compuesto a niveles menores que los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.

35 Si se desea, la dosis diaria eficaz puede dividirse en múltiples dosis para fines de administración. Por consiguiente, las composiciones de una sola dosis pueden contener dichas cantidades o submúltiplos de las mismas para constituir la dosis diaria. Como se ha indicado, los expertos en la materia optimizarán fácilmente las dosis eficaces y los regímenes de administración simultánea (como se describe en el presente documento) según determine la buena práctica médica y el estado clínico del paciente individual.

40 En general, las dosis orales de los antagonistas opioides, especialmente antagonistas periféricos, estará comprendida de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal por día. Se espera que las dosis orales en el intervalo de 1 a 20 mg/kg de peso corporal proporcionen los resultados deseados. En general, administración parenteral, incluidas las administraciones intravenosa y la administración subcutánea, estará comprendida de aproximadamente 0,001 a 5 mg/kg de peso corporal. Se espera que las dosis comprendidas de 0,05 a 0,5 mg/kg de peso corporal proporcionen los resultados deseados. La dosificación se puede ajustar de manera adecuada para conseguir los niveles de fármaco deseados, locales o sistémicos, dependiendo del modo de administración. Por ejemplo, se espera que la dosis para la administración oral de los antagonistas opioides en una formulación con revestimiento entérico esté entre el 10 y el 30 % de la dosis oral no revestida. En el caso que la respuesta del paciente sea insuficiente a dichas dosis, se pueden emplear dosis incluso más altas (o eficazmente una dosis mayor 30 por una ruta de administración diferente, más localizada) en la medida que lo permita la tolerancia del paciente. Se contemplan múltiples dosis al día para conseguir los niveles sistémicos adecuados de los compuestos. Los niveles adecuados del sistema se pueden determinar mediante, por ejemplo, la medición del nivel de fármaco en el plasma del paciente usando métodos de HPLC rutinarios conocidos e los expertos en la materia.

55 En algunas realizaciones de la invención, los antagonistas opioides se administran simultáneamente con el opioide. La expresión "administración simultánea" se entiende referida a una terapia combinada mediante cualquier vía de administración en la que dos o más agentes se administran a un paciente o sujeto. La administración simultánea de agentes también se puede denominar como terapia combinada o tratamiento en combinación. Los agentes pueden estar en las mismas formulaciones de dosificación o en formulaciones independientes. Para el tratamiento en combinación con más de un principio activo, cuando los principios activos están en formulaciones de dosificación independientes, los principios activos se pueden administrar simultáneamente, o cada uno de ellos se puede administrar en momentos separados escalonadamente. Los agentes se pueden administrar simultánea o secuencialmente (por ejemplo, un agente puede seguir directamente después de la administración del otro, o los agentes se pueden proporcionar episódicamente, por ejemplo, uno se puede administrar en un momento seguido del otro en un momento posterior, por ejemplo, en el plazo de una semana), siempre que se proporcionen de una forma

suficiente para permitir que ambos agentes consigan concentraciones eficaces en el organismo. Los agentes también se pueden administrar a través de diferentes rutas, por ejemplo, un agente se puede administrar por vía intravenosa mientras que el segundo agente se puede administrar por vía intramuscular, vía intravenosa u oral. En otras palabras, la administración simultánea del compuesto antagonista opioideo de acuerdo con la presente invención con un opioide se considera de forma adecuada una preparación farmacéutica combinada que contiene un antagonista opioideo y un agente opioideo, estando la preparación adaptada para la administración del antagonista opioideo periférico diariamente o de forma intermitente, y la administración del agente opioideo diariamente o de forma intermitente. Por tanto, los antagonistas opioideos se pueden administrar antes de, de forma simultánea con o después de la administración de los opioides. Los agentes que se pueden administrar simultáneamente se pueden formular en premezcla, tal como, por ejemplo, en una única formulación o único comprimido. Estas formulaciones pueden ser parenterales u orales, tales como las formulaciones descritas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos con números 6.277.384; 6.261.599; 5.958.452 y la publicación PCT N.º WO 98/25613.

Se contempla además que los métodos descritos en el presente documento se pueden usar en solitario o junto con otros tratamientos para controlar el crecimiento o la migración de las células endoteliales, respecto a las diversas enfermedades anteriormente descritas. El antagonista opioideo periférico se puede administrar simultáneamente con otro agente terapéutico que no sea un opioide o un antagonista opioideo. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen agentes antineoplásicos, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, radioterapia, u otros agentes antiangiogénicos tales como suramina, o un mAb dirigido contra VEGF, una endostatina o radioterapia. Se pretende que los antagonistas opioideos de acuerdo con la presente invención sean de valor especial cuando se administran simultáneamente con aquellos agentes que inhiben la actividad de VEGF, por ejemplo, un mAb dirigido contra VEGF. Los anticuerpos anti-VEGF son útiles en el tratamiento de varias enfermedades neoplásicas y no neoplásicas, así como trastornos, incluidos hiperplasia endometrial, endometriosis, proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales y síndrome de Meigs. Un ejemplo de un mAb dirigido contra VEGF es bevacizumab (Avastina, Genentech) descrito en la patente de Estados Unidos n.º 6.884.879 y en el documento WO94/10202. En una determinada realización de la invención, MNTX se administra simultáneamente con avastina.

En otras palabras, los compuestos para su uso la presente invención también se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer en pacientes, como se ha descrito anteriormente, tanto cuando se utilizan en solitario o en combinación con uno o más agentes antineoplásicos adicionales, por ejemplo, radioterapia y/u otros tratamientos quimioterapéuticos, incluidos los antiangiogénicos, administrados habitualmente a los pacientes para el tratamiento del cáncer. Las principales categorías y ejemplos de dichos fármacos se han relacionado en el presente documento, e incluyen, aunque no de forma limitativa, inhibidores de metaloproteasa, inhibidores de la proliferación/migración de las células endoteliales, antagonistas de factores de crecimiento angiogénicos, inhibidores de la señalización de integrina/survivina, y quelantes del cobre.

En algunas realizaciones, los compuestos para su uso en la invención se pueden combinar con combinaciones conocidas de agentes neoplásicos. Los compuestos para su uso en la invención se pueden combinar con un agente antiangiogénico y un agente quimioterapéutico y administrarse a un paciente de cáncer. Por ejemplo, MNTX se puede administrar a pacientes de cáncer junto con Avastina y 5-fluorouracilo.

Se anticipa que los antagonistas opioideos administrado simultáneamente con varios fármacos contra el cáncer, radioterapia, u otros fármacos antiangiogénicos, puede producir un efecto antiproliferativo significativamente aumentado sobre las células cancerosas, y proporcionar de esta forma un efecto terapéutico mayor, por ejemplo, el uso de antagonistas opioideos periféricos a determinados tumores puede potenciar su respuesta a otros regímenes de tratamiento. Específicamente, se obtiene un efecto antiangiogénico significativamente aumentado con las combinaciones anteriormente divulgadas se administran simultáneamente usando concentraciones más bajas del agente antineoplásico, una dosis de radiación más baja, u otros fármacos antiangiogénicos en comparación con regímenes de tratamiento en los que los fármacos o la radiación se utilizan en solitario, existe el potencial de proporcionar una terapia en la que los efectos secundarios adversos asociados con los fármacos contra el cáncer u otros fármacos antiangiogénicos o radioterapia están notablemente reducidos respecto a los que normalmente se observan con los fármacos contra el cáncer u otros fármacos antiangiogénicos o radioterapia usados en solitario o a dosis más altas. Por ejemplo, la administración simultánea de un antagonista opioideo de acuerdo con la presente invención con un agente contra VEGF, por ejemplo, un mAb dirigido contra VEGF, puede reducir la dosis del agente anti-VEGF o aumentar la potencia o la eficacia o ambos. Además, tal como se detalla en el presente documento, la administración simultánea de un antagonista opioideo para su uso de acuerdo con la presente invención con otras modalidades contra el cáncer puede tener valor profiláctico.

Cuando se usa en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, los compuestos para su uso en la presente invención se pueden administrar simultáneamente con inhibidores de la metaloproteasa tales como, por ejemplo: marimastat, inhibidor sintético de la metaloproteasa de la matriz (MMPi), British Biotech; Bay 12-9566, MMPi sintético e inhibidor del crecimiento tumoral, Bayer; AG3340, MMPi sintético, Agouron/Warner-Lambert; CGS 27023A, MMPi sintético, Novartis; CGS 27023A, MMPi sintético; COL-3, MMPi sintético, derivado de tetraciclina, Collagenex; AE-941 (Neovastat), MMPi de origen natural, AEterna, BMS-275291, MMPi sintético, Bristol-Myers Squibb; penicilamina, inhibidor de uroquinasa, NCI-NABTT.

- 5 Cuando se usa en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, los compuestos para su uso en la presente invención se pueden administrar simultáneamente con inhibidores directos de la proliferación/migración de las células endoteliales tales como: TNP-470 (derivado de la fumagilina), inhibe el crecimiento de células endoteliales, TAP Pharmaceuticals; escualamina, inhibe el intercambiador sodio-hidrógeno, NIHE3, magainina; combretastatina, inducción de la apoptosis en células endoteliales en proliferación, oxígeno; endostatina, inhibición de células endoteliales, EntreMed; penicilamina, migración y proliferación de bloques de células endoteliales, NCI-NABTT; inhibidor de la farnesil transferasa (FTI), migración y proliferación de bloques de células endoteliales, NCI-NABTT, -L-778.123 Merck, -SCH66336 Schering-Plough,-R115777 Janssen.
- 10 Cuando se usa en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, los compuestos para su uso en la presente invención se pueden administrar simultáneamente con antagonistas de factores de crecimiento angiogénicos tales como: anticuerpo dirigido contra VEGF, anticuerpo monoclonal que inactiva VEGF, Genentech; talidomida, bloquea la actividad de factores de crecimiento angiogénicos (bFGF, VEGF, TNF-alfa), Celgene; SU5416, bloquea la señalización del receptor de VEGF (Flk-1/KDR) (tirosina quinasa), Sugen-NCI; ribozima (Angiozyme), atenúa el ARNm de los receptores VEGF, Ribozyme Pharmaceuticals, Inc; SU6668, bloquea la señalización del receptor de VEGF, bFGF, y PDGF, Sugen; PTK787/ZK22584, bloquea la señalización del receptor de VEGF, Novartis; interferón-alfa, inhibición de la producción de bFGF y VEGF; suramina, bloquea la unión del factores de crecimiento a su receptor, NCI-NABTT.
- 15 Cuando se usa en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, los compuestos para su uso en la presente invención se pueden administrar simultáneamente con fármacos que inhiben la señalización de integrina/survivina específica de células endoteliales: Vitaxin, anticuerpo contra alfa-v-beta3 integrina presente sobre la superficie de las células endoteliales, Ixsys; EMD121974, bloqueador de molécula pequeña de la integrina presente sobre la superficie de las células endoteliales, Merck KGaA.
- 20 Cuando se usa en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, los compuestos para su uso en la presente invención se pueden administrar simultáneamente con quelantes de cobre, tales como: penicilamina, el grupo sulfhidrilo se une al cobre; aclara el cobre mediante excreción urinaria, NCI-NABTT; tetratiomolibdato, los grupos tiol se unen fuertemente al cobre, inactivan el cobre disponible para el tumor, University of Michigan Cancer Center; captopril, quelante de cobre y cinc; también, inhibidor de MMP y de la enzima convertidora de la angiotensina, Northwestern University.
- 25 Cuando se usa en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, los compuestos para su uso en la presente invención se pueden administrar simultáneamente con antagonistas de la angiogénesis con diferentes mecanismos: CDI, inhibidor del flujo de entrada de calcio, NCI; ABT-627, antagonista del receptor de la endotelina, Abbott/NCI; CM101/ZDO101, toxina de Strep del grupo B que perturba selectivamente el endotelio en proliferación mediante su interacción con el receptor (CM201), CarboMed/Zeneca; interleucina-12, inducción de interferón gamma, regulación por defecto de la IL-10, inducción de la IP-10, M.D. Anderson Cancer Center/Temple University, Temple University, Genetics Institute, Hoffman LaRoche; IM862, bloquea la producción de VEGF y bFGF; aumenta la producción del inhibidor de IF-12, Cytran; PNU-145156E, bloquea la angiogénesis inducida por la proteína Tat, Pharmacia and Upjohn.
- 30 Cuando se usa en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, los compuestos para su uso en la presente invención se pueden administrar simultáneamente con agentes quimioterapéuticos tales como, por ejemplo, interferón alfa, COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato y prednisona), etopósido, mBACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona), PRO-MACE/MOPP (prednisona, metotrexato (w/leucovina como rescate), doxorubicina; ciclofosfamida, paclitaxol, docetaxol, etopósido/mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona), vincristina, vinblastina, angiinhibinas, TNP-470, polisulfato de pentosán, factor plaquetario 4, angiostatina, LM-609, SU-101, CM-101, Techgalan, talidomida, SP-PG y similares.
- 35 Los agentes antineoplásicos que se pueden administrar simultáneamente con los compuestos para su uso en la presente invención también incluyen, de forma adecuada, antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, metotrexato, fludarabina), agentes antimicrotúbulos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, taxanos tales como paclitaxel, docetaxel), un agente alquilante (por ejemplo, ciclofosfamida, melfalán, biocoroetilnitrosurea, hidroxiaurea), mostazas nitrogenadas, (por ejemplo, mecloetamina, melfano, clorambucilo, ciclofosfamida e ifosfamida); nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina, semustina y estreptozocina), agentes de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, JM-216, C1-973), antraciclina (por ejemplo, doxorubicina, daunorubicina), antibióticos (por ejemplo, mitomicina, idarubicina, adriamicina, daunomicina), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido, camptotecinas), alquilsulfonatos, incluido busulfán; triazinas (por ejemplo, dacarbazina); etieniminas (por ejemplo, tiotepa y hexametilmelamina); análogos de ácido fólico (por ejemplo, metotrexato); análogos de pirimidina (por ejemplo, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido); análogos de purina (por ejemplo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, actinomicina D; bleomicina, mitomicina C y metramicina); hormonas y antagonistas de hormonas (por ejemplo, tamoxifeno, corticoesteroides) y cualesquiera otros agentes citotóxicos, (por ejemplo, estramustina fosfato, prednimustina).
- 40 Se entenderá que los agentes que se pueden combinar con los compuestos para su uso en la presente invención para la inhibición, tratamiento o profilaxia de la angiogénesis y/o cánceres no están limitados a los anteriormente
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

relacionados, sino que incluyen, en principio, cualesquiera agentes útiles para el tratamiento de enfermedades angiogénicas inducidas por opioideos así como el crecimiento tumoral.

5 La presente invención se explica además mediante los siguientes ejemplos, que no deben tomarse en forma alguna como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de migración de células endoteliales

10 La actividad antiangiogénica de los antagonistas periféricos opioideos para su uso de acuerdo con la presente invención se evaluó en experimentos que sometían a ensayo la capacidad del antagonista para inhibir o modular la migración capilar de células endoteliales usando una cámara de Boyden modificada.

15 El ensayo de migración de células endoteliales se llevó a cabo como se ha descrito en Lingen, M.W., *Methods in Molecular Medicine*, 78: 337-347 (2003). Brevemente, Células endoteliales de la microvasculatura humana (HMVEC) (Cell Systems, Kirkland, WA.) se privaron de alimento durante la noche en medio de cultivo endotelial (EGM) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 %. A continuación, las células se tripsinizaron y se resuspenden en medio Eagle modificado por Dulbecco (DME) con BSA al 0,1 % a una concentración de 1×10^6 células/ml. Las células se añadieron al fondo de una cámara de Boyden de 48 pocillos modificada (NeuroPore Corporation, Pleasanton, CA.). La cámara se ensabló y se invirtió, y se dejó que las células se adhirieran durante 2 horas a 37 °C a membranas de quimiostatia de policarbonato (tamaño de poro de 5 μm) (NeuroProbe) que se habían humedecido en gelatina al 0,1 % durante una noche, y se secaron. A continuación, la cámara se volvió a invertir y el compuesto a estudiar, a diferentes concentraciones por cuadruplicado, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (como control positivo) o vehículo se añadieron a los pocillos de la cámara superior (hasta un volumen total de 50 ml); a continuación el aparato se incubó durante 4 horas a 37 °C. Las membranas se recuperaron, se fijaron y se tiñeron (DiffQuick, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.) y se contó el número de células que migraron hasta la cámara superior por 10 campos de potencia alta. La migración del fondo hasta el DME+BSA al 0,1 % se restó, y los datos se notificaron como el número de células que migraron por 10 campos de potencia alta (400 veces). Cada sustancia se estudió por cuadruplicado en cada experimento, y todos los experimentos se repitieron al menos dos veces. VEGF (R&D System, Minneapolis, MN) se usó como control positivo, a una concentración de 200 pg/ml. La concentración óptima de VEGF se había determinado anteriormente en experimentos de respuesta a las dosis (no se muestran los datos). Los compuestos estudiados como se ha descrito anteriormente fueron morfina, naloxona, metilnaltrexona, y la combinación de metilnaltrexona y morfina. Las concentraciones de cada sustancia estudiada estaban en un intervalo de 0,001 a 10,0 μM . La concentración de la morfina fue constante y de 0,1 μM . Los resultados se muestran en la figura 1.

La Figura 1 muestra que la morfina aumentó la migración de una forma dependiente de la concentración. La adición simultánea de metilnaltrexona y morfina, sin embargo, disminuyó la migración de una forma dependiente de la concentración. Ni metilnaltrexona ni naloxona en solitario afectaron la migración.

Ejemplo 2: Ensayo de migración de células endoteliales

45 Se llevó a cabo otro conjunto de experimentos de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. En este conjunto de experimentos, metilnaltrexona y la combinación de metilnaltrexona y morfina se volvió a estudiar para determinar su capacidad para inhibir la migración de las células endoteliales. Las concentraciones de metilnaltrexona, cuando se ensayaron en solitario, estaban comprendidas de 0,001 a 10,0 μM . En combinación, las concentraciones de metilnaltrexona estaban comprendidas de 0,001 a 10,0 μM , mientras que la concentración de morfina permaneció constante a 0.1 μM como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 2.

50 La FIG. 2 muestra que la combinación de metilnaltrexona y morfina disminuyó la migración de una forma dependiente de la concentración, mientras que la metilnaltrexona en solitario no alteró la migración.

Ejemplo 3: Migración de células endoteliales inducida por DAMGO

55 Los fármacos usados en este estudio fueron [D-Ala 2, N-McPhe4, Gly5-ol] encefalina o DAMGO (Sigma, St. Louis, MO); naloxona (Sigma, St. Louis, MO); bromuro de N-metilnaltrexona o metilnaltrexona (Mallinckrodt Specialty Chemicals, Phillipsburg, NJ). El ensayo de migración de células endoteliales se llevó a cabo como se ha descrito previamente (9). Las células endoteliales de la microvasculatura dérmica humana (Cell Systems, Kirkland, WA) se privaron de alimento durante la noche en medio que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 %, se recogieron, se resuspendieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) con BSA al 0,1 %, y se sembraron en una membrana semiporosa gelatinizada en una cámara de Boyden modificada (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA). A continuación se añadieron las sustancias experimentales a los pocillos de la cámara superior, y se dejó que las células migraran durante cuatro horas a 37° C.

65 Las membranas se recuperaron, se fijaron, y se tiñeron, y se contó el número de células que migraron hasta la cámara superior por diez campos de potencia alta, contadas por un observador enmascarado. La migración del fondo hasta

el DME + BSA al 0,1 % se restó, y los datos se notificaron como el número de células que migraron por 10 campos de potencia alta (400x). Cada sustancia se estudió por cuadruplicado en cada experimento y todos los experimentos se repitieron al menos dos veces. La concentración de DAMGO fue 1 μ M, VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) se usó como control positivo, a una concentración de 200 pg/ml. La concentración óptima de VEGF se había determinado anteriormente en experimentos de respuesta a las dosis (no se muestran los datos).

Los resultados se muestran en la FIG. 3, que muestra que metilnaltrexona y DAMGO disminuyeron la migración de una forma dependiente de la concentración. La FIG. 4 ilustra resultados similares con naloxona y DAMGO. El metabolito de morfina inactivo, M3G, no ejerce actividad angiogénica, mientras que el M6G, conocido por actuar en el receptor μ , mostró un efecto dependiente de la concentración sobre la angiogénesis (FIG. 5).

Ejemplo 4: Tratamiento de sujetos humanos y mamíferos con metilnaltrexona

En un primer conjunto de experimentos, se indujeron ratones para desarrollar tumores mediante transformación, endogamia o trasplante de células tumorales. Treinta y seis ratones, teniendo cada uno tumores con un volumen de al menos 60 mm³, se dividieron aleatoriamente en tres grupos. El primer grupo recibe una sustancia de control que no comprende ni un opioide ni un antagonista opioideo. El segundo grupo recibe un opioideo, por ejemplo, morfina, administrada por vía oral a una dosis de 0,5 mg/kg/día. El tercer grupo recibe un opioideo, por ejemplo, morfina, administrada por vía oral a una dosis de 0,5 mg/kg/día, y el antagonista opioideo periférico metilnaltrexona, administrada por vía oral a una dosis de 5 mg/kg/día.

Los compuestos se administraron diariamente durante un periodo de ocho semanas. Se registraron las diferencias en la velocidad del crecimiento tumoral, el tamaño del tumor, una reducción en la angiogénesis del tumor, y la mortalidad de los ratones entre cada uno de los grupos. Los resultados demostraron una reducción en el crecimiento tumoral y angiogénesis, en comparación con los controles o la morfina en solitario.

En un segundo conjunto de experimentos, pacientes de cáncer humanos se inscribieron en un estudio. Los inscritos en el estudio se controlaron según la edad, el estadio de la enfermedad, los tipos de tratamiento, y los factores genéticos y familiares. Los participantes se dividieron en dos grupos, según si estaban recibiendo opioides, por ejemplo, morfina. El grupo que recibía opioide se subdividió aleatoriamente en dos subgrupos. Uno de los dos subgrupos que recibía opioides recibió un antagonista opioideo periférico, por ejemplo, metilnaltrexona administrada por vía oral a una dosis de 5 mg/kg/día durante un periodo de ocho semanas. Los otros dos subgrupos recibieron placebo durante el mismo periodo de tiempo. Se registraron las diferencias en la velocidad del crecimiento tumoral, el tamaño del tumor, una reducción en la angiogénesis del tumor, y la mortalidad de los participantes entre cada uno de los grupos.

Ejemplo 5: Terapias que comprenden la administración simultánea del antagonista opioideo periférico metilnaltrexona y un segundo agente terapéutico

En un primer conjunto de experimentos, se indujeron ratones para desarrollar tumores mediante transformación, endogamia o trasplante de células tumorales. Cuarenta y ocho ratones, teniendo cada uno tumores con un volumen de al menos 60 mm³, se dividieron aleatoriamente en seis grupos. El primer grupo recibe una sustancia de control que no comprende un opioide, un antagonista opioideo, o un agente antineoplásico. El segundo grupo recibe un opioideo, por ejemplo, morfina, administrada por vía oral a una dosis de 0,5 mg/kg/día. El tercer grupo recibe un opioideo, por ejemplo, morfina, administrada por vía oral a una dosis de 0,5 mg/kg/día, y el antagonista opioideo periférico metilnaltrexona, administrada por vía oral a una dosis de 5 mg/kg/día. El cuarto grupo recibe un opioideo, por ejemplo, morfina, administrada por vía oral a una dosis de 0,5 mg/kg/día, y el antagonista opioideo periférico metilnaltrexona administrada por vía oral a una dosis de 5 mg/kg/día con un agente terapéutico antineoplásico, por ejemplo, bevacizumab (Avastin) a una dosis de 5 mg/kg cada 14 días. El sexto grupo recibe un opioideo, por ejemplo, morfina, a una dosis de 0,5 mg/kg/día y un agente terapéutico antineoplásico, por ejemplo, bevacizumab (Avastin) a una dosis de 5 mg/kg cada 14 días.

Los compuestos se administraron diariamente durante un periodo de ocho semanas. Se registraron las diferencias en la velocidad del crecimiento tumoral, el tamaño del tumor, una reducción en la angiogénesis del tumor, y la mortalidad de los ratones en cada uno de los grupos. Los resultados demuestran un resultado mejorado (por ejemplo, reducción en la angiogénesis y crecimiento tumoral) para los grupos que recibieron la combinación de un opioideo, un antagonista opioideo, y un agente antineoplásico, en comparación con el resto de grupos.

En un segundo conjunto de experimentos, pacientes de cáncer humanos que recibían un opioideo, por ejemplo, morfina, un agente terapéutico antineoplásico, por ejemplo, bevacizumab (Avastin), o ambos, se inscribieron en un estudio. Los inscritos en el estudio se controlaron según la edad, estadio y tipo de enfermedad, los tipos de tratamiento, y los factores genéticos y familiares. Los pacientes que recibían un opioideo se dividieron aleatoriamente en los grupos primero y segundo; los participantes que recibían un agente terapéutico antineoplásico, por ejemplo, bevacizumab (Avastin), se dividieron aleatoriamente en los grupos tercero y cuarto; los participantes que recibían un opioideo junto con un agente terapéutico antineoplásico, por ejemplo, bevacizumab (Avastin), se dividieron aleatoriamente en los grupos quinto y sexto. El primer, tercer y quinto grupos recibieron, cada uno de ellos, un antagonista opioideo periférico,

por ejemplo, metilnaltrexona administrada por vía oral a una dosis de 5 mg/kg/día durante un periodo de ocho semanas. El segundo, cuarto y sexto grupos recibieron placebo durante el mismo periodo. Se registraron las diferencias en la velocidad del crecimiento tumoral, el tamaño del tumor, una reducción en la angiogénesis del tumor, y la mortalidad de los participantes entre cada uno de los grupos. Los resultados demuestran un resultado mejorado (por ejemplo, reducción en la angiogénesis y crecimiento tumoral) para los grupos que recibieron la combinación de un opioideo, un antagonista opioideo, y un agente antineoplásico, en comparación con el resto de grupos.

Ejemplo 6: Efecto de los antagonistas opioideos sobre la migración/proliferación de células endoteliales

El cultivo de células y los reactivos -células endoteliales de la microvasculatura dérmica humana (Cell Systems, Kirkland, WA) y células endoteliales de la microvascular pulmonar humana (Clonetics, Walkersville, MD) se cultivaron como se ha descrito anteriormente en medio EBM-2 completo (Clonetics) a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %, aire al 95 %, usando los pasos 6-10 para la experimentación (Garcia et al. 2001). A menos que se especifique de otro modo, los reactivos se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). Los reactivos de la electroforesis SDS-PAGE se adquirieron de Bio-Rad (Richmond, CA), la membrana de transferencia Immobilon-P de Millipore (Millipore Corp., Bedford, MA). Los fármacos usados en este estudio fueron [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁵-ol] encefalina o DAMGO (Sigma, St. Louis, MO); naloxona, morfina-3-glucuronido (M3G) y morfina-6-glucuronido (M6G) (Sigma, St. Louis, MO); bromuro de N-metilnaltrexona o metilnaltrexona (Mallinckrodt Specialty Chemicals, Phillipsburg, NJ), morfina (Baxter, Deerfield, Illinois). El inhibidor de la tirosina quinasa del receptor de VEGF se adquirió de Calbiochem (San Diego, CA). El anticuerpo dirigido contra RhoA de ratón, el anticuerpo dirigido contra fosfotirosina de ratón, y perlas conjugadas con el dominio de unión a rho (RBD) se adquirieron de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Los anticuerpos dirigidos contra el receptor de VEGF 1 (Flt-1), y contra el receptor de VEGF 2 (Flk-1) de conejo se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo dirigido contra β-actina de ratón se adquirió de Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos secundario marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) se adquirieron de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

Inmunoprecipitación e inmunotransferencia -Los materiales celulares se incubaron en tampón IP (HEPES 50 mM, pH 7,5), NaCl 150 mM, MgCl₂ 20 mM, Triton X-100 al 1 %, SDS al 0,1 %, Na₃VO₄ 0,4 mM, NaF 40 mM, ácido okadaico 50 μM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,2 mM, dilución 1:250 de la mezcla de inhibidores de la proteasa Calbiochem 3).

A continuación, las muestras se inmunoprecipitaron con IgG dirigida contra el receptor de VEGF 1 o contra el receptor de VEGF 2 seguido por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 4-15 %, transferencia a membranas ImmobilonTM, y se revelaron con anticuerpos específicos primarios y secundarios. La visualización de las bandas inmunorreactivas se consiguió utilizando quimioluminiscencia potenciada (Amersham Biosciences).

Determinación de la fosforilación de la tirosina de los receptores de VEGF 1 y 2 - Las proteínas solubilizadas en tampón PN (véase anteriormente) se inmunoprecipitaron con uno cualquiera de anticuerpo dirigido contra el receptor de VEGF 1 de conejo o anticuerpo dirigido contra el receptor de VEGF 2 de conejo seguido por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 4-15 % y transferencia a membranas ImmobilonTM (Millipore Corp., Bedford, MA). Tras bloquear los sitios no específicos con albúmina de suero bovino al 5 %, las transferencias se incubaron bien con anticuerpo dirigido contra el receptor de VEGF 1 de conejo, el anticuerpo dirigido contra el receptor de VEGF 2 de conejo, o bien anticuerpo dirigido contra fosfotirosina de ratón, seguido por incubación con anticuerpo de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) dirigido contra IgG de conejo, o bien anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón. La visualización de las bandas inmunorreactivas se consiguió utilizando quimioluminiscencia potenciada (Amersham Biosciences).

La construcción y transfección de ARNip contra RhoA - La secuencia de ARNip que dirige el anticuerpo humano contra RhoA se generó usando secuencias de ARNm procedentes de GenbankTM (gi:33876092). Para cada ARNm (o secuencia aleatoria), se identificaron dos dianas. Específicamente, Secuencia diana de RhoA 1 (5'-AAGAACTGGTGATTGTTGGT-3') (SEQ ID NO:1), Secuencia diana de RhoA 2 (5'-AAAGACATGCTTGCTCATAGT-3') (SEQ ID NO:2), secuencia aleatoria 1 (5'-AAGAGAAATCGAAACCGAAAA-3') (SEQ ID NO:3), y secuencia aleatoria 2 (5'-AAGAACCCAATTAAGCGCAAG-3') (SEQ ID NO:4), fueron las utilizadas. Los oligonucleótidos de sentido directo y de sentido contrario se adquirieron de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Para la construcción del ARNip, se usó un kit basado en transcripción de Ambion (kit de construcción de ARNip SilencerTM). A continuación, las EC de la microvasculatura pulmonar humana se transfectaron con el ARNip usando siPORTamineTM como reactivo de transfección (Ambion, TX) de acuerdo con el protocolo proporcionado por Ambion. Las células (~40 % confluencia) se privaron de suero durante una hora, seguido por incubación con 3 μM (1,5 μM de cada ARNip) o ARNip diana (o ARNip de secuencia aleatoria o sin ARNip) durante 6 horas en medio exento de suero. A continuación se añadió medio que contenía suero (concentración final 1 % en suero) durante 42 h antes de realizar los experimentos bioquímicos y/o los ensayos funcionales.

Ensayos de activación de RhoA -Después del tratamiento con el agonista y/o el inhibidor, las EC se solubilizaron en tampón de solubilización, y se incubaron con perlas conjugadas al dominio de unión a rho (RBD) durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró y las perlas unidas a RBD con la forma unida a GTP de RhoA unida se lavaron abundantemente. Las perlas RBD se hirieron en tampón de muestra SDS-PAGE y el material de RhoA unido se analizó mediante SDS-PAGE, se transfirió a ImmobilonTM y se inmunotransfirieron con un anticuerpo dirigido contra RhoA (Garcia et al 2001).

Ensayo de migración de EC de la microvasculatura dérmica humana -El ensayo de migración de células endoteliales se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Lingen 2002). Las células endoteliales de la microvasculatura dérmica humana (Cell Systems, Kirkland, WA) se privaron de alimento durante la noche en medio que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 %, se recogieron, se resuspendieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) con BSA al 0,1 %, y se sembraron en una membrana semiporosa gelatinizada en una cámara de Boyden modificada (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA). A continuación se añadieron las sustancias experimentales a los pocillos de la cámara superior, y se dejó que las células migraran durante 4 h a 37° C. Las membranas se recuperaron, se fijaron, y se tiñeron, y un observador enmascarado contó el número de células que migraron hasta la cámara superior por 10 campos de potencia alta. La migración del fondo hasta el DME + BSA al 0,1 % se restó, y los datos se notificaron como el número de células que migraron por 10 campos de potencia alta (400x). Cada sustancia se estudió por cuadruplicado en cada experimento y todos los experimentos se repitieron al menos dos veces. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, R&D Systems, Minneapolis, MN) se usó como control positivo, a una concentración de 200 pg/ml. La concentración óptima de VEGF se había determinado anteriormente en experimentos de respuesta a las dosis (no se muestran los datos).

Ensayo de migración de EC de la microvasculatura pulmonar humana - Veinticuatro unidades Transwell™ con tamaño de poro 8 M se usaron para supervisar la migración celular *in vitro*. HPMVEC (~1 x 10⁴ células/pocillo) se sembraron en placas con varios tratamientos (MNTX 100 nM, inhibidor de la tirosina quinasa del receptor de VEGF 10 μM o ARNip) a la cámara superior, y se añadieron varios agonistas a la cámara inferior (MD 100 nM, DAMGO o VEGF). Las células se dejaron migrar durante 18 horas. Las células de las cámaras superior e inferior se cuantificaron utilizando el ensayo CellTiter96™ MTS (Promega, San Luis Obispo, CA) y se leyeron a 492 nm. El % de migración se definió como el n.º de células en la cámara inferior % el número de células en la cámara superior e inferior. Cada ensayo se realizó por triplicado, se repitió al menos cinco veces y se analizó estadísticamente mediante el test de la t de Student (configurando la significación estadística a P < 0,05).

Ensayo de proliferación de EC de la microvasculatura pulmonar humana - Para medir el crecimiento celular, HPMVEC [5 x 10³ células/pocillo, pretratadas con varios agentes (MNTX 100 nM, inhibidor de la tirosina quinasa del receptor de VEGF 10 μM o ARNip) se incubaron con 0,2 ml de medio exento de suero que contenía varios agonistas (MS 100 nM, DAMGO o VEGF) durante 24 h a 37 °C en CO₂ al 5 %/aire al 95 % en placas de cultivo de 96 pocillos. El ensayo de proliferación celular *in vitro* se analizó midiendo los incrementos en el número de células usando el ensayo CellTiter96™ MTS (Promega, San Luis Obispo, CA) y se leyeron a 492 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado, se repitió al menos cinco veces y se analizó estadísticamente mediante el test de la t de Student (configurando la significación estadística a P < 0,05).

Usando el ensayo de migración de células endoteliales, se descubrió que MS producía un aumento en la migración endotelial dependiente de la concentración. Naloxona y MNTX en solitario no tuvieron efectos sobre la migración de las células endoteliales en una amplia gama de concentraciones. Esto se demuestra en las fotomicrografías representativas, así como cuantitativamente (FIGS. 6 y 1, respectivamente). A concentraciones clínicamente relevantes de morfina, la magnitud del efecto fue aproximadamente de un 70 % del conseguido con VEGF. Migración de las células endoteliales inducida por morfina en concentraciones tan bajas como 10⁻⁷M (FIG. 2). La migración de las células endoteliales basada en morfina se atenuó por los antagonistas opioideos del receptor mu, naloxona y MNTX (en dosis tan bajas como 10⁻⁸ μM) de una forma dependiente de la concentración, lo que sugiere fuertemente que la migración de las células endoteliales está mediada por la acción de la morfina sobre el receptor opioideo mu (MOR). Que este efecto es vía MOR en lugar de otros receptores opioideos se confirmó mediante las observaciones de los inventores de que el agonista sintético encefalina muy selectivo para mu, DAMGO, también indujo la migración de una forma dependiente de la concentración. El efecto de DAMGO también se bloqueó mediante MNTX (FIG. 3). Que el metabolito de morfina inactivo M3G no ejerce actividad angiogénica, mientras que M6G, conocido por actuar en el receptor mu, muestra un efecto sobre la angiogénesis dependiente de la concentración, confirma la hipótesis de los inventores de que el efecto de la morfina sobre el endotelio está mediado por los receptores de mu (McQuay et al. 1997) (FIG. 5).

Para evaluar los mecanismos de los efectos inducidos por el opioideo y MNTX sobre la angiogénesis, se usó una línea de EC bien caracterizada, células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana (HPMVEC). En conformidad con los efectos sobre las EC de la microvasculatura dérmica humana, se observó que MS, DAMGO y VEGF inducen la migración de las HPMVEC que se inhibe mediante MNTX (FIG. 7B). Se ha mostrado que MS, DAMGO y VEGF también estimulan la proliferación de HPMVEC, que se atenúa mediante MNTX (FIG. 7A).

Teniendo en cuenta los efectos inhibidores de MNTX, un antagonistas del receptor opioideo mu, sobre la proliferación y migración de EC inducida por VEGF, se analizó el papel de los opioideos sobre la transactivación del receptor de VEGF. La FIG. 8A muestra que MS y DAMGO inducen la fosforilación de la tirosina tanto en el receptor de VEGF 1 (Flt-1) como en el 2 (Flk-1), que se bloquea mediante MNTX. Además, MNTX atenúa la fosforilación de la tirosina en los receptores de VEGF 1 y 2 inducida por VEGF. Estos resultados indican que los opioideos inducen la transactivación del receptor de VEGF.

Para resolver si la actividad tirosina quinasa del receptor de VEGF es necesaria para la angiogénesis inducida por

opioides, las EC se pretrataron con un inhibidor de la tirosina quinasa del receptor de VEGF 1 y 2, y se midió la proliferación y migración de las EC inducidas por opioides (FIG. 8B). Los resultados indican que la actividad tirosina quinasa de los receptores de VEGF es importante para las funciones angiogénicas inducidas por opioides.

5 Una molécula de señalización importante implicada en la angiogénesis es la proteína G pequeña, RhoA (Aepfelbacher et al. 1997; Cascone et al. 2003; Hoang et al. 2004; Liu y Senger 2004). Se observó que MS, DAMGO y VEGF estimulan la activación de RhoA, que se inhibe mediante MNTX (Figura 9A). Además, la transactivación del receptor de VEGF es importante para la activación de RhoA inducida por opioides (Figura 9B). El silenciamiento de la expresión de RhoA bloquea la proliferación y migración de las EC inducidas por opioides (FIG. 10). Estos resultados indican el papel fundamental de la activación de RhoA sobre la actividad angiogénica de las EC inducida por el agonista.

Tomados en su conjunto, estos hallazgos sugieren un modelo en el que el antagonista del receptor opioideo periférico mu, MNTX, atenúa la activación del receptor de VEGF y de RhoA inducidas por VEGF. Esta atenuación es importante para determinar el papel inhibidor de MNTX sobre la angiogénesis mediada por los opioides y por VEGF (FIG. 11).

15 **Ejemplo 7: Metilnaltrexona inhibe la angiogénesis inducida por S1P, VEGF y PDGF: Papel de la transactivación del receptor**

Se realizaron ensayos de acuerdo con el procedimiento similar al que se describe en los Ejemplos 1-3. Se observó que S1P, VEGF, PDGF, morfina y DAMGO inducían proliferación (FIG. 12) (tal como se mide en el ensayo colorimétrico CellTiter™ (Promega) MTS) y migración (Figure 13) (tal como se mide en el ensayo con filtro de membrana permeable Transwell™ (Costar) (tamaño de poro 8 μm)) de las EC que se inhibieron mediante un pretratamiento con MNTX (0,1 μM, 1 hora). El silenciamiento de la expresión del receptor opioideo mu (ARNip) bloquea la proliferación (FIG. 14) y la migración (FIG. 15) de las EC inducida por morfina y DAMGO, a la vez que también inhibe de forma significativa la proliferación (FIG. 14) y la migración (FIG. 15) de las EC inducidas por S1P, VEGF y PDGF. La inmunoprecipitación, seguida por análisis de inmunotransferencia, indican que el tratamiento con S1P, VEGF y PDGF de las EC indujo la fosforilación de la serina/treonina del receptor opioideo mu (FIG. 16) (lo que indica la transactivación del receptor) y la activación de la proteína G reguladora del citoesquelético, RhoA (FIG. 17). Además, el tratamiento con morfina y DAMGO de las EC indujo la fosforilación de la tirosina del receptor de VEGF (Figura 18), del receptor de PDGF (FIG. 18) y del receptor de S1P₃ (FIG. 19) junto con la activación de RhoA. El pretratamiento con MNTX de las EC atenuó los eventos de fosforilación el receptor inducidos por morfina, DAMGO, S1P, VEGF y PDGF, así como la activación de RhoA. Por último, el silenciamiento de la expresión de RhoA (ARNip) bloqueó la proliferación (FIG. 20) y migración (FIG. 21) de las EC inducidas por el agonista. En conjunto, estos resultados indican que MNTX inhibe la proliferación y la migración de las EC inducidas por el agonista mediante la inhibición de la fosforilación/transactivación del receptor, y la posterior inhibición de la activación de RhoA (FIG. 22). Estos resultados sugieren que la inhibición de la angiogénesis mediante MNTX puede ser una intervención terapéutica útil para el tratamiento del cáncer.

En resumen, se han descrito en el presente documento métodos para atenuar la migración y/o la proliferación de células endoteliales asociadas con la angiogénesis y/o la potenciación e la función de barrera de las células endoteliales en un tejido u órgano de un sujeto que lo necesita mediante la administración de uno o más antagonistas opioideos, especialmente antagonistas periféricos opioideos, en una cantidad eficaz al paciente para inhibir la migración y/o la proliferación y la angiogénesis, y/o para mejorar la función de barrera. Los métodos descritos en el presente documento también pueden implicar administrar un antagonista opioideo periférico a un paciente que está en tratamiento con opioides. Puede ser especialmente adecuado un mu antagonista opioideo periférico de mu. También se describen en el presente documento métodos para administrar simultáneamente un opioide y un antagonista opioideo periférico a un sujeto que lo necesita por tanto. El antagonista opioideo periférico también se puede administrar simultáneamente con un agente antineoplásico, como puede ser la combinación del opioide con un antagonista opioideo periférico que se administran simultáneamente con un agente antineoplásico.

Aunque la presente invención se ha descrito e ilustrado ahora con cierta especificidad, los expertos en la materia apreciarán las diferentes modificaciones, incluidas variaciones, adiciones, y omisiones, que se pueden realizar en lo que se ha descrito. En consecuencia, se pretende que estas modificaciones también queden abarcadas en la presente invención, y que el alcance de la presente invención esté limitado solamente por la interpretación más amplia que legalmente se pueda realizar de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE UNIVERSITY OF CHICAGO

< 120> USO DE ANTAGONISTAS OPIOIDEOS PARA ATENUAR LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

<130> 092234-9035-WO00

<150> 60..659.193

<151> 07/03/2005
 <150> 60..725.703
 <151> 12/10/2005

5 <150> 60..731.009
 <151> 28/10/2005

<150> 60..760.851
 <151> 20/01/2006

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.2

15 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 1
 aagaaactgg tgattgttg t 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 2
 aaagacatgc ttgctcatag t 21

30 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 3
 aagagaaatc gaaaccgaaa a 21

40 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 4
 aagaacccaa ttaagcgcaa g 21

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista opioideo periférico para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno caracterizados por una migración o una proliferación anómalas de las células endoteliales, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del antagonista opioideo periférico a un sujeto que lo necesita,
 5 en donde el antagonista opioideo periférico es metilnaltrexona, en donde la metilnaltrexona inhibe o reduce la migración o la proliferación anómalas de células endoteliales, en donde las células endoteliales son células vasculares, y la migración o la proliferación anómalas es angiogénesis anómala.
 10
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad o el trastorno son cáncer, una herida vascular, enfermedad de células falciformes, enfermedad neovascular del ojo, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, retinopatía del prematuro, degeneración macular asociada a la edad, proliferación endotelial en los riñones, o pulmones, psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis, diabetes, retinopatía proliferativa, fibroplasia retrolent, hiperplasia de la tiroides, enfermedad de Grave, trasplante de córnea y trasplante de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico, derrame pericárdico con pericarditis o derrame pleural.
 15
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método para tratar una enfermedad o un trastorno es un método para prevenir la aparición o la reaparición de retinopatía ocular o proliferación endotelial en el ojo.
 20
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enfermedad o el trastorno es un cáncer.
 25
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el método comprende administrar simultáneamente al sujeto dicha cantidad eficaz del antagonista opioideo periférico y una cantidad eficaz de un agente antineoplásico.
 30
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el agente antineoplásico es un agente antineovascularización.
 35
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agente antineovascularización es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF.
 40
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el anticuerpo monoclonal anti-VEGF es bevacizumab.
 45
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el agente antineoplásico es 5-fluorouracilo.
 50
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o el trastorno es diabetes.
 55
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o el trastorno es anemia de células falciformes.
 60
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o el trastorno es una herida vascular.
 65
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o el trastorno es una enfermedad neovascular del ojo.
 70
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad o el trastorno es una retinopatía proliferativa.
 75
15. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el sujeto está tomando simultáneamente una terapia con opioides.
 80
16. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el sujeto no está tomando simultáneamente una terapia con opioides.
 85
17. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el sujeto está tomando simultáneamente una terapia con opioides crónica.
 90
18. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el sujeto no está tomando simultáneamente una terapia con opioides crónica.
 95

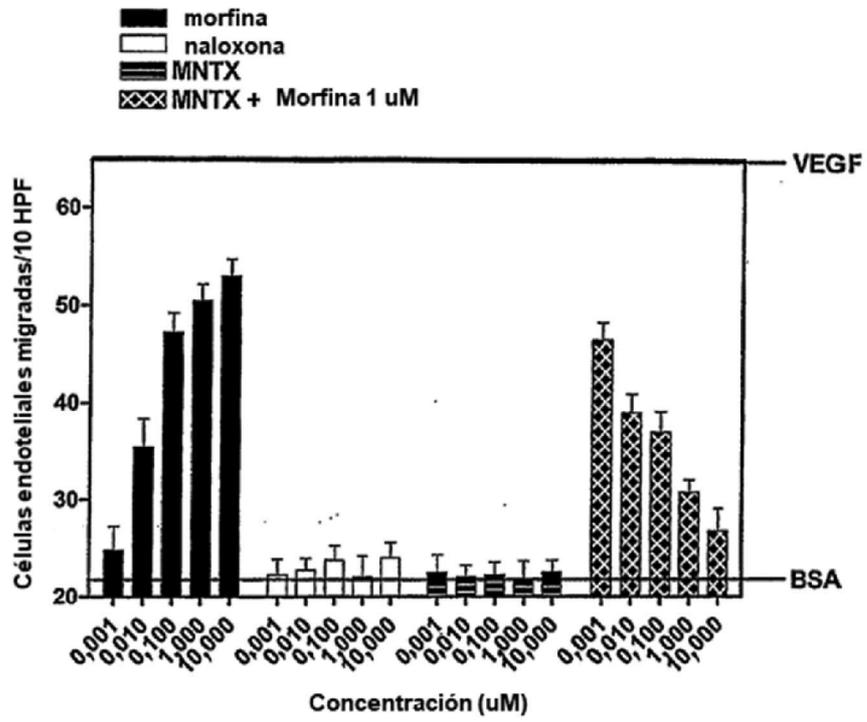


FIGURA 1

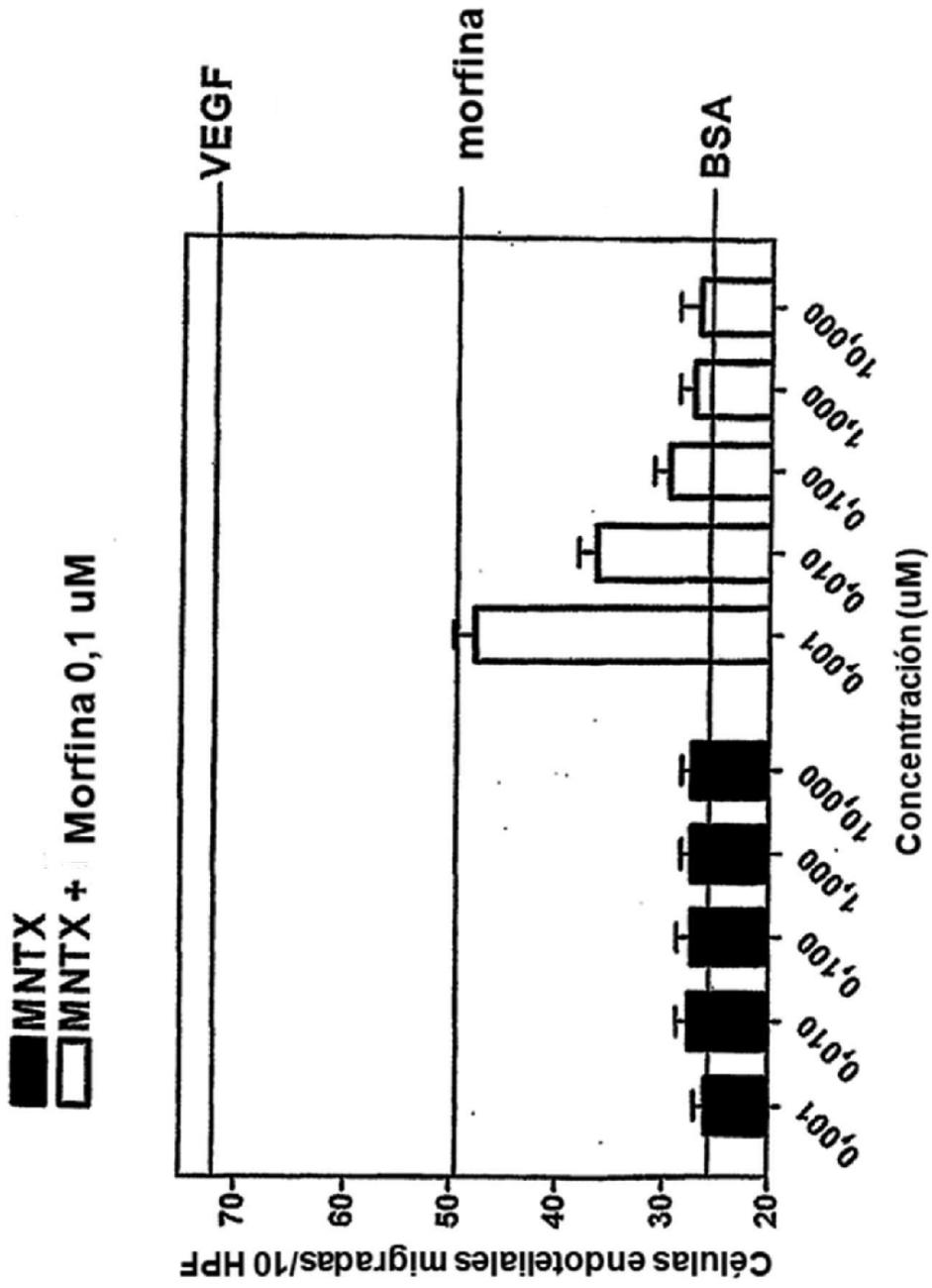


FIGURA 2

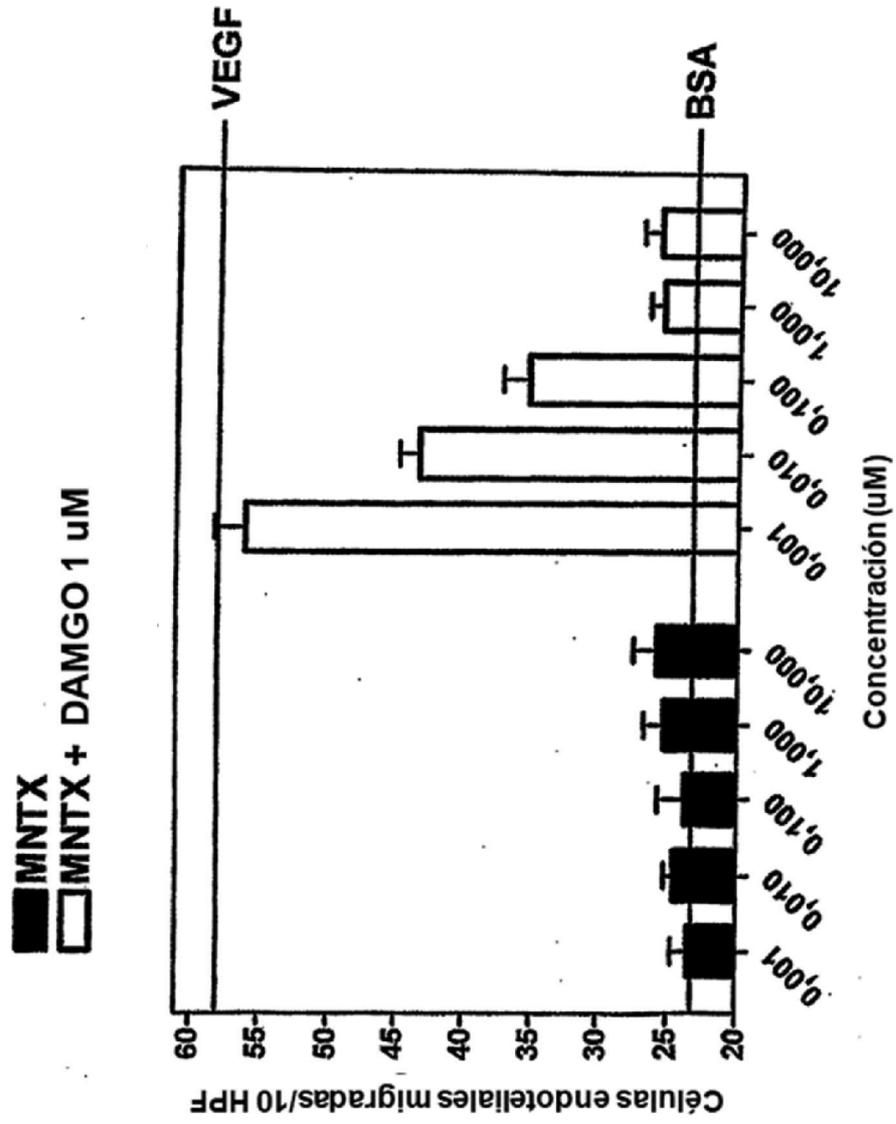


FIGURA 3

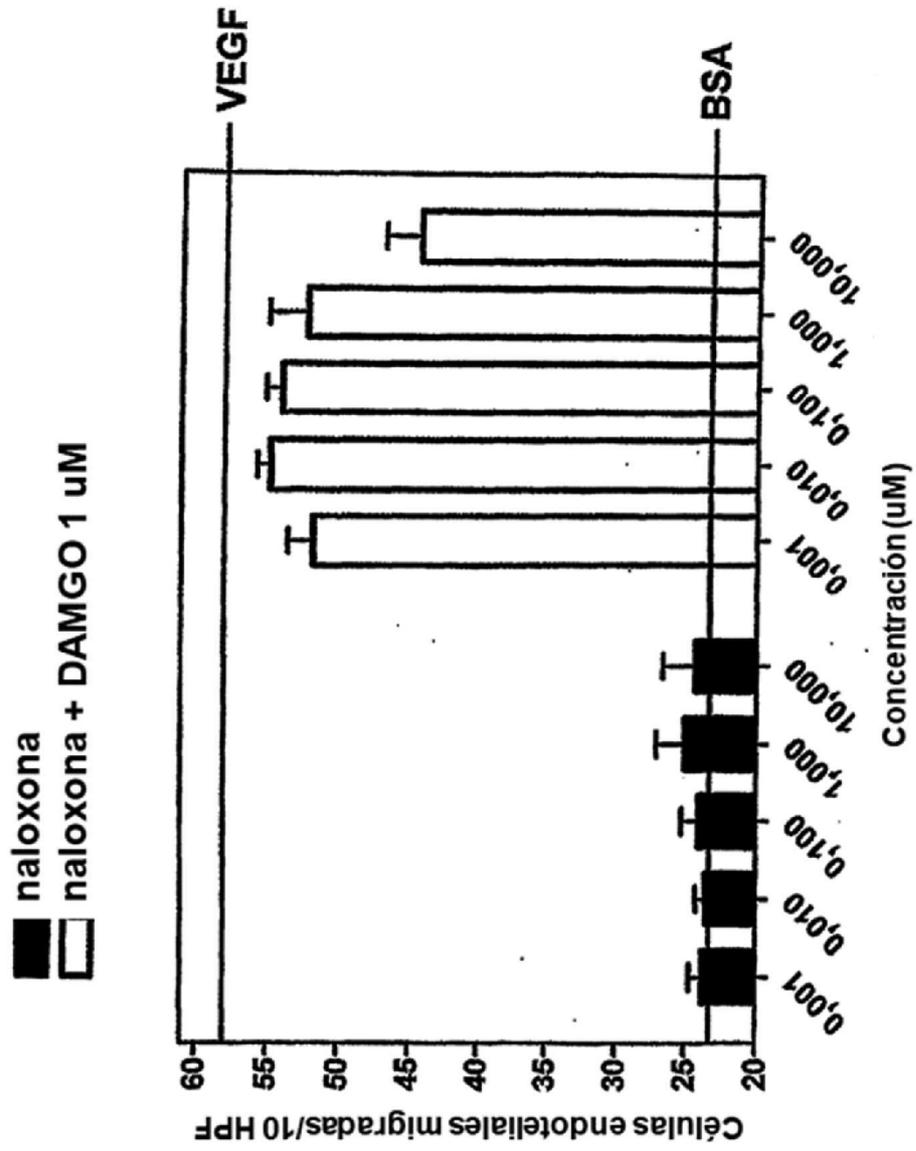


FIGURA 4

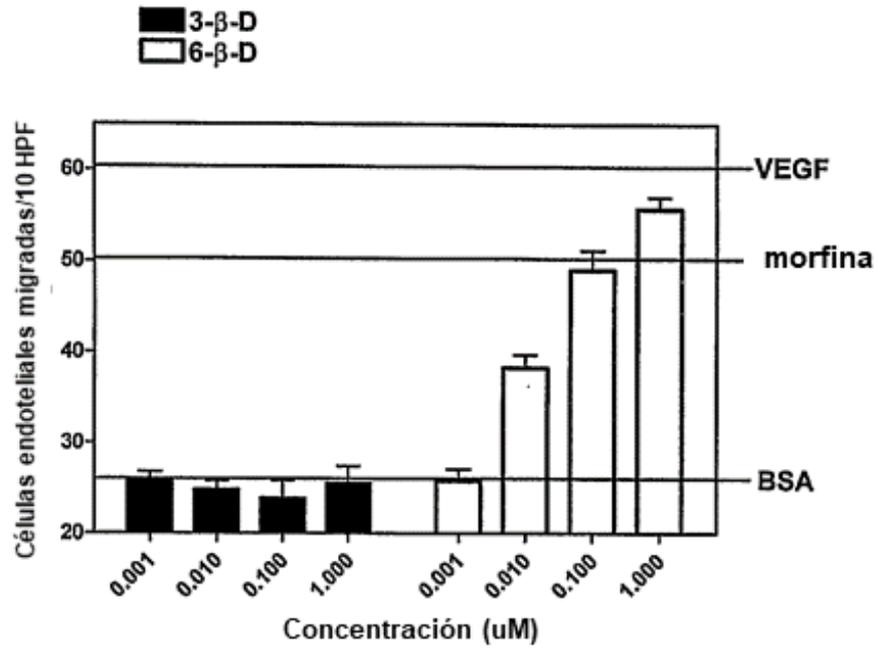


FIGURA 5

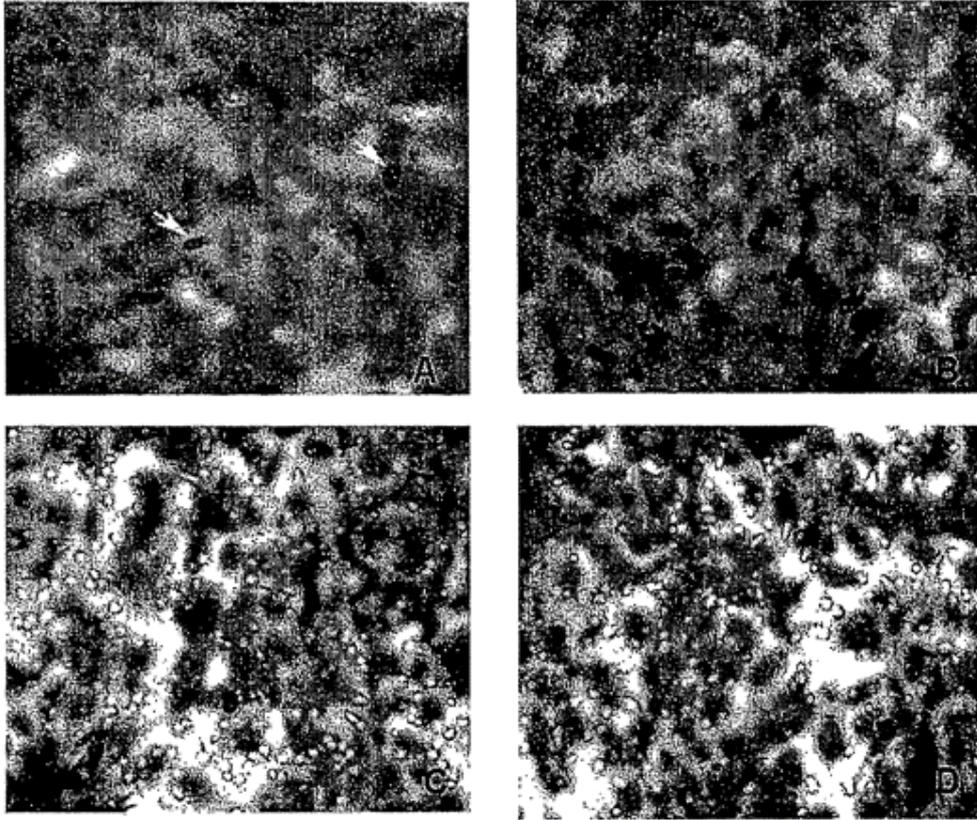


FIGURA 6

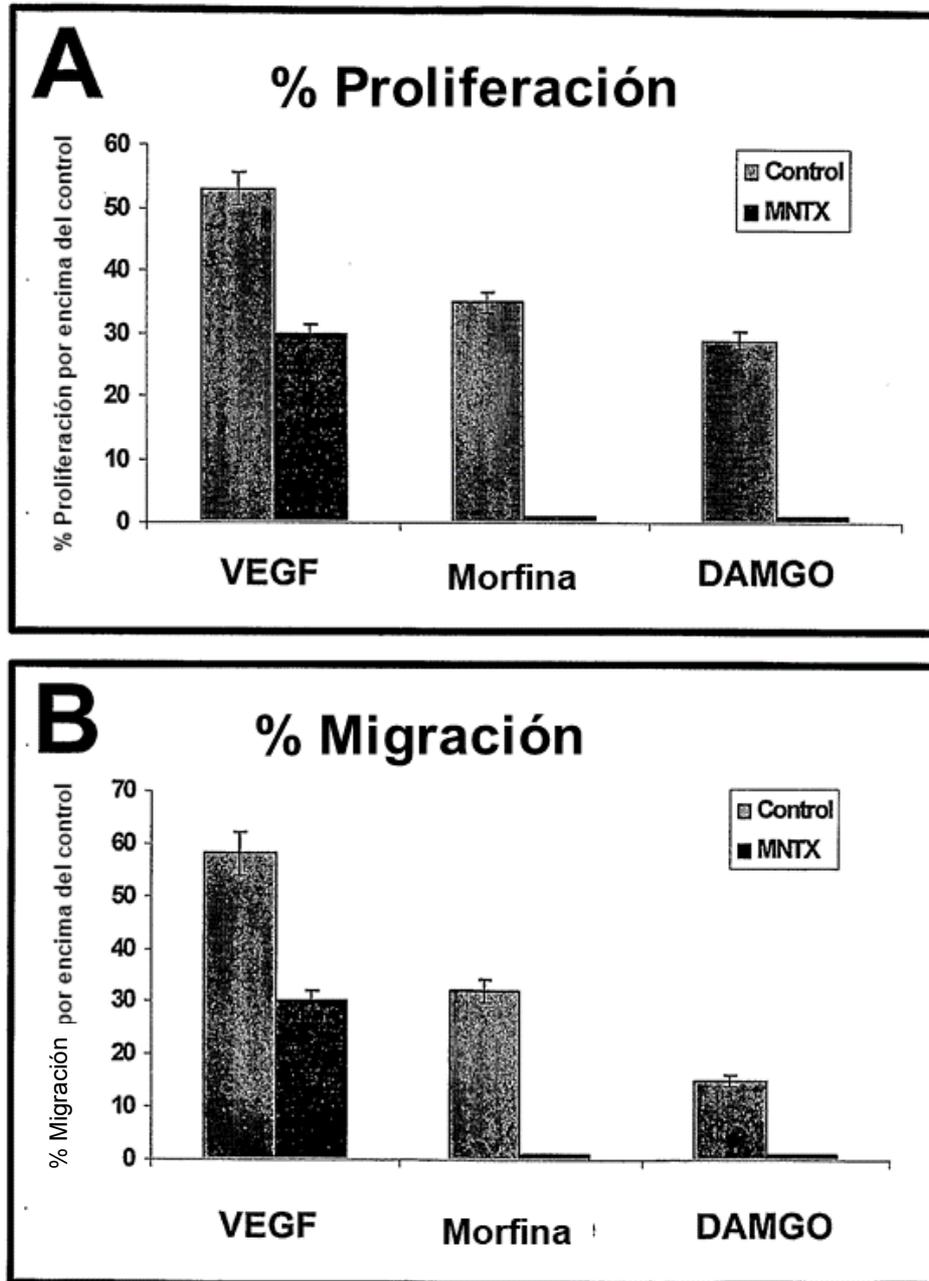


FIGURA 7

A

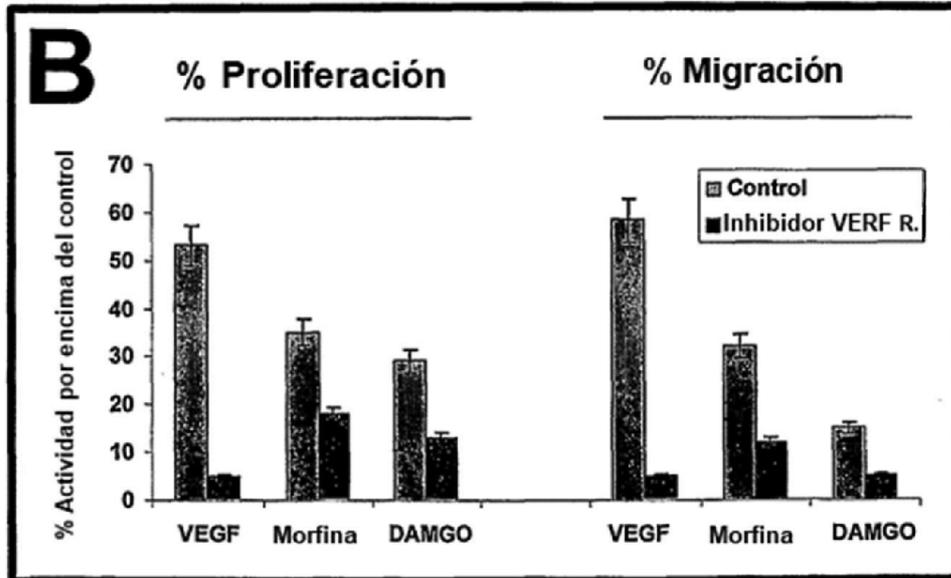
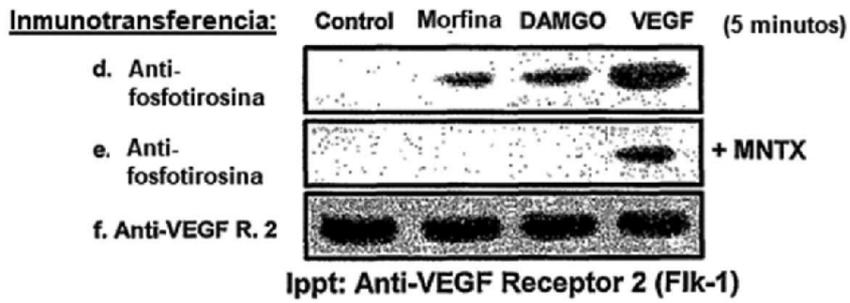
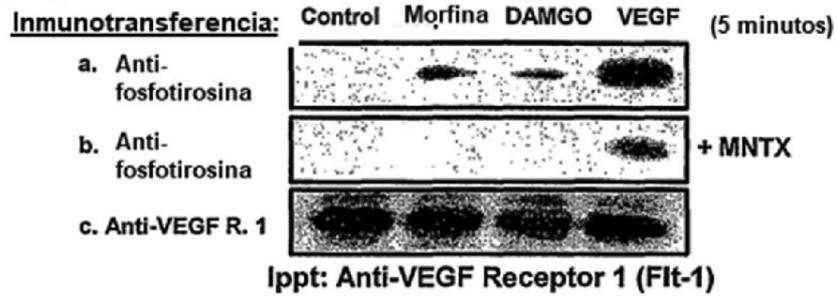


FIGURA 8

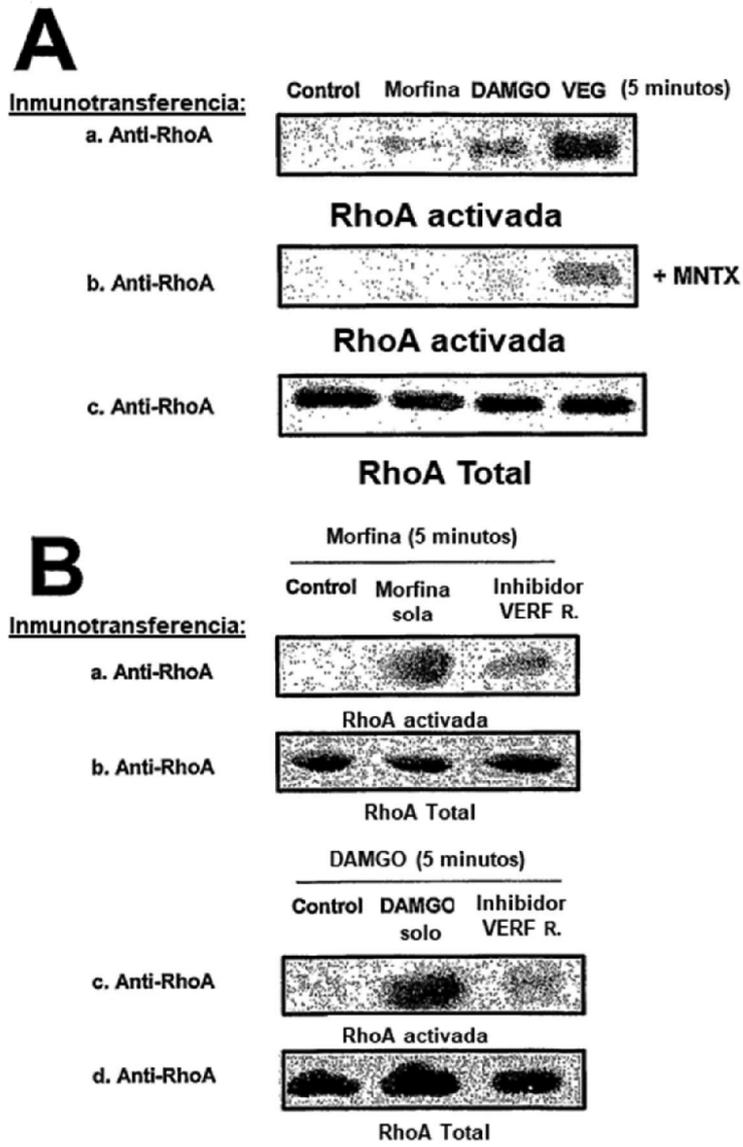


FIGURA 9

A

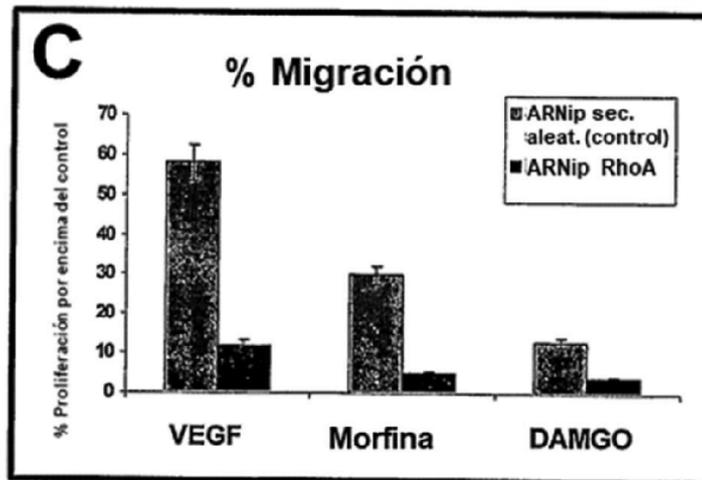
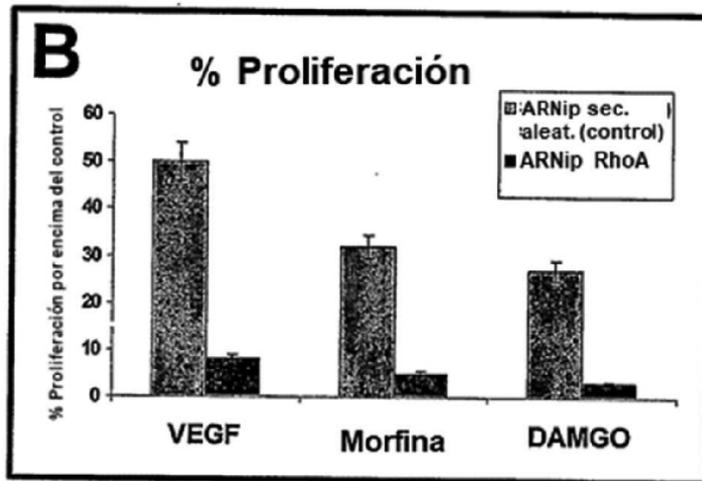
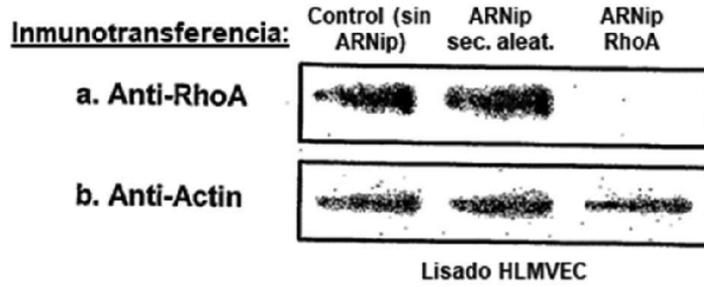


FIGURA 10

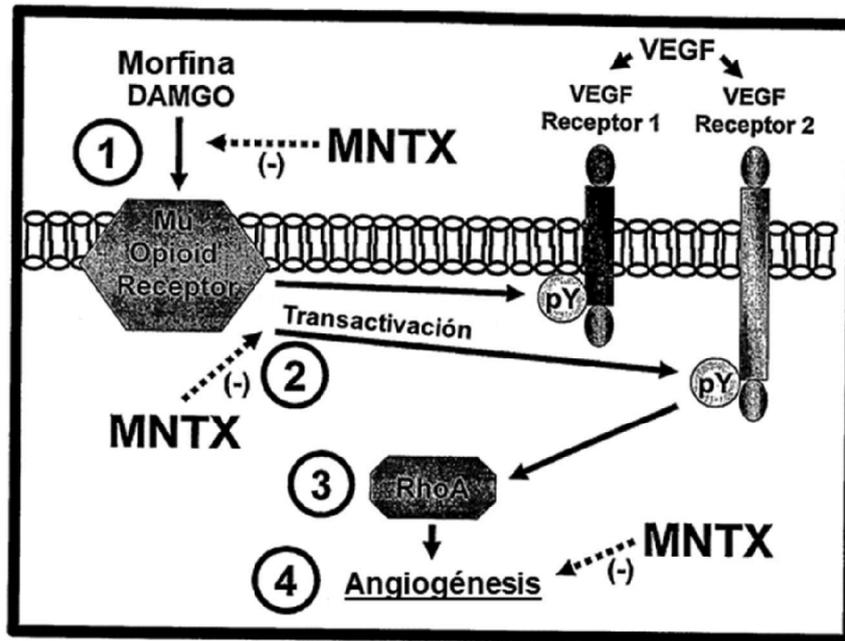
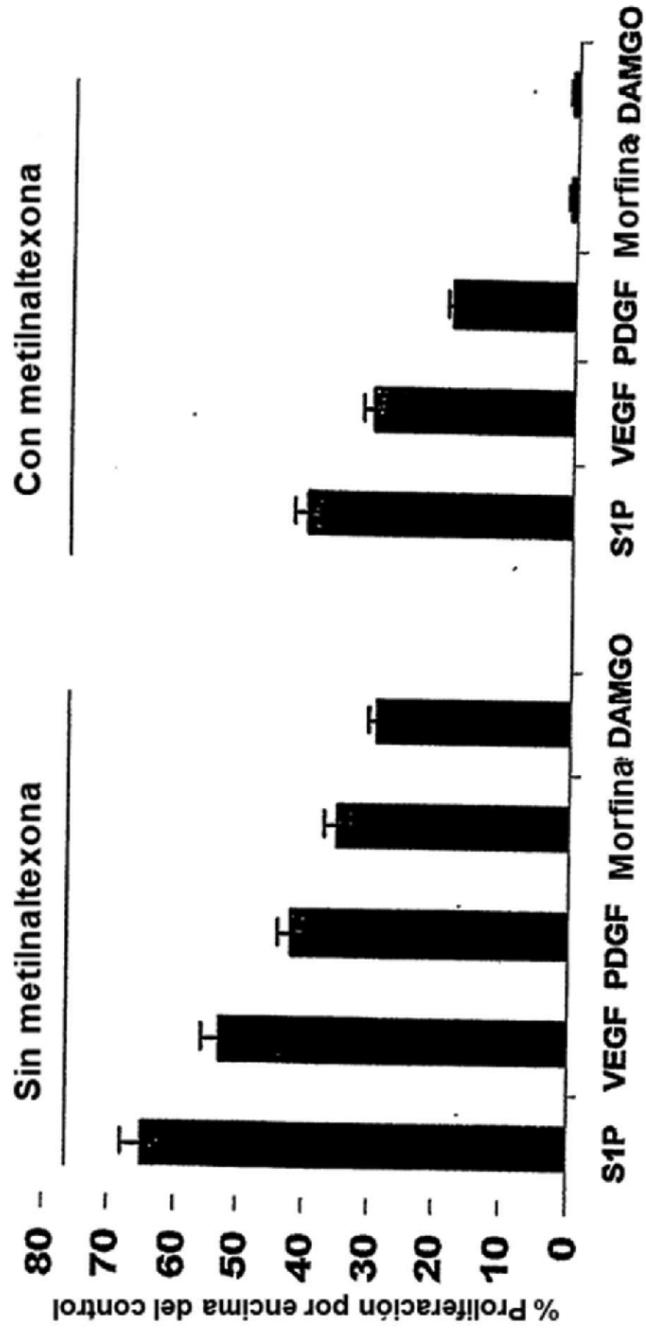


FIGURA 11

% Proliferación



100 nM para todos los agonistas e inhibidores

FIGURA 12

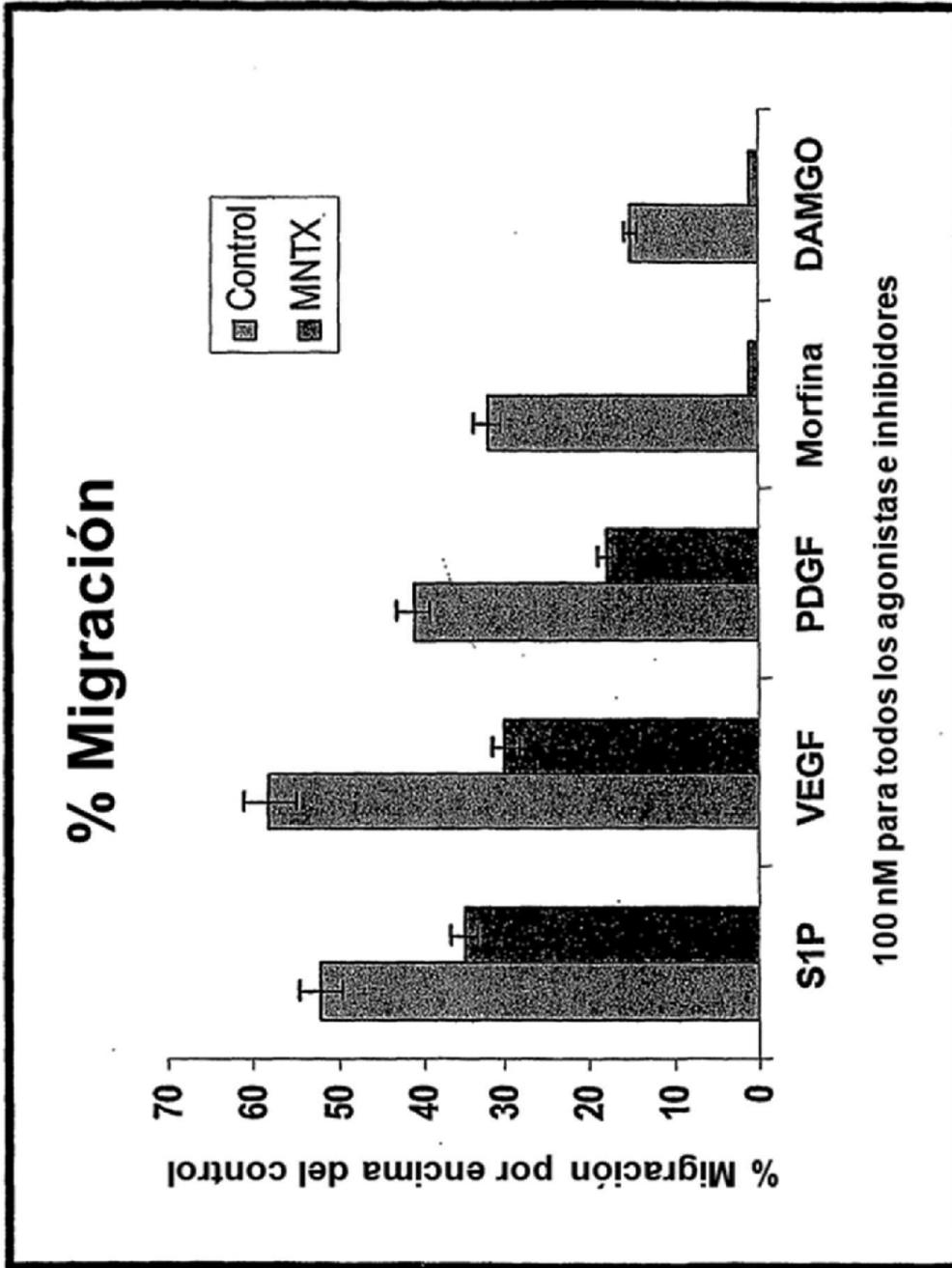


FIGURA 13

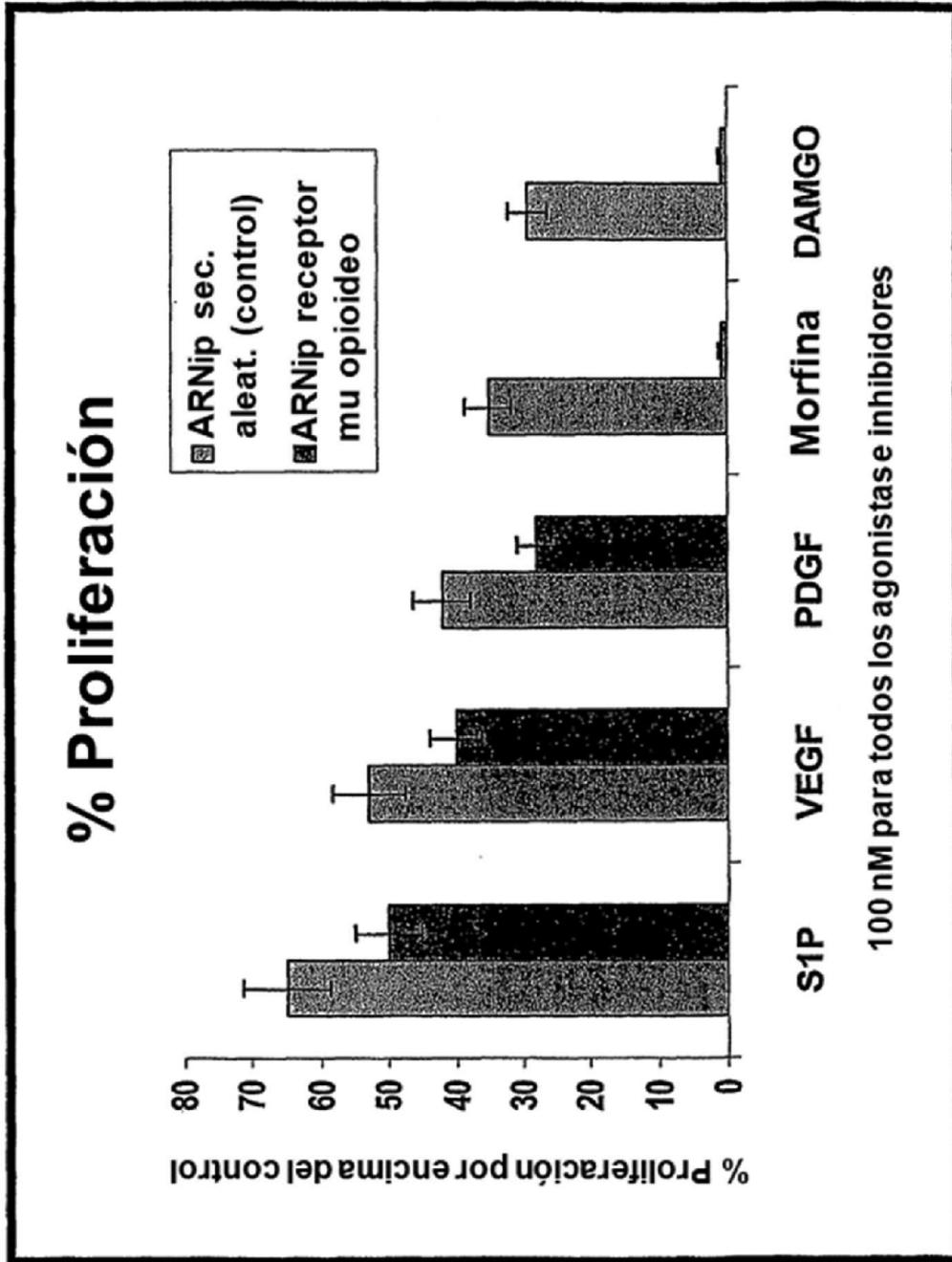


FIGURA 14

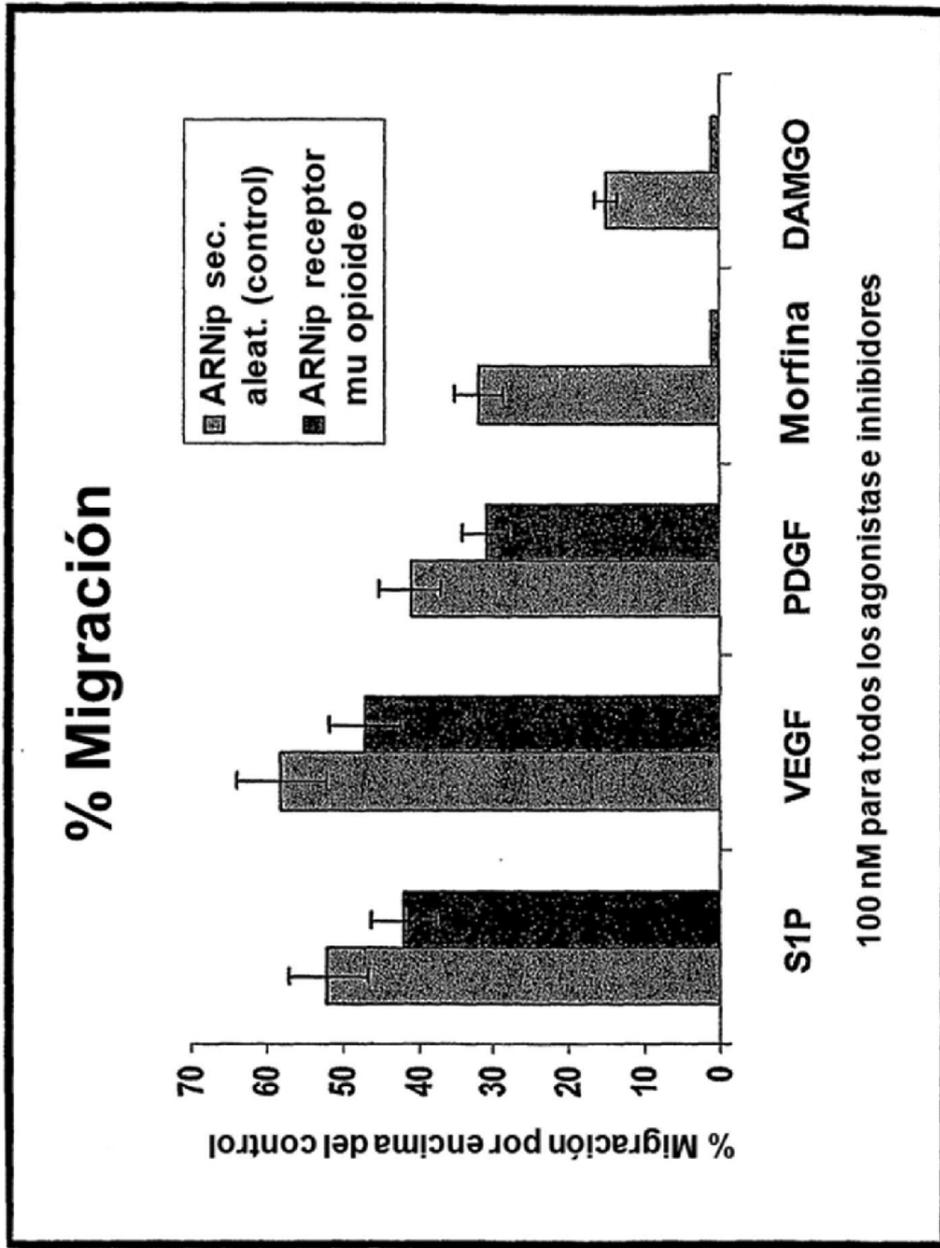


FIGURA 15

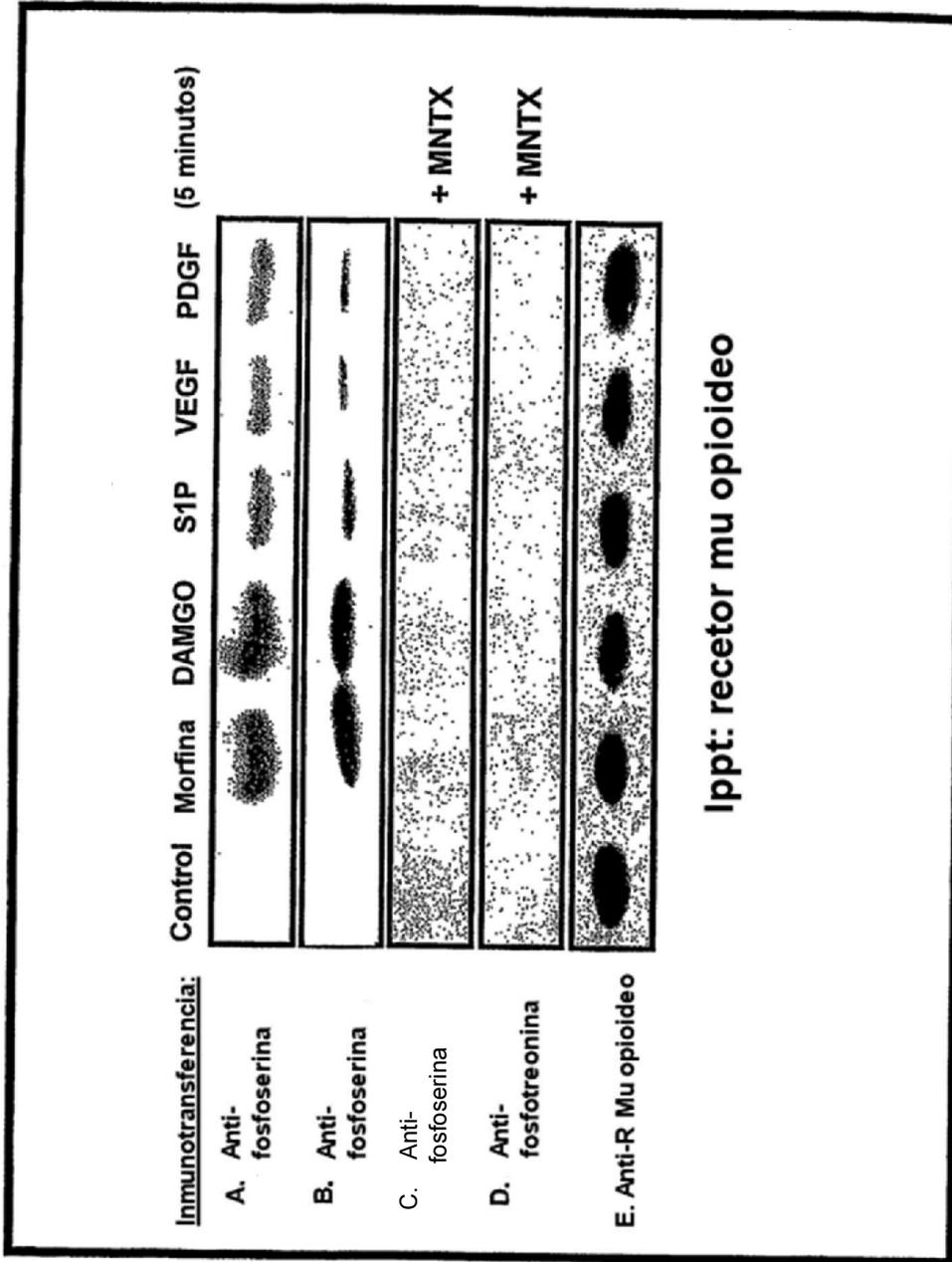


FIGURA 16

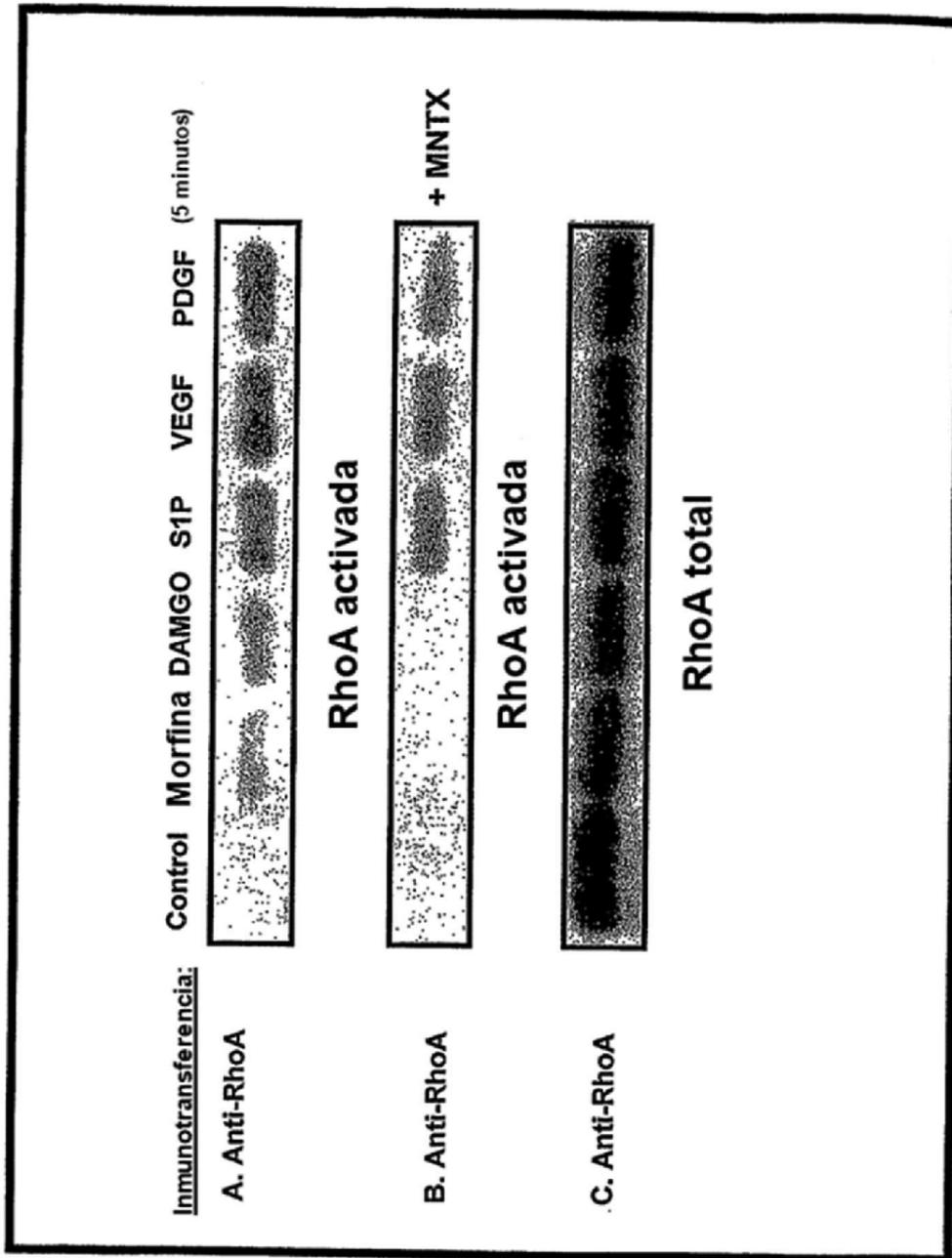


FIGURA 17

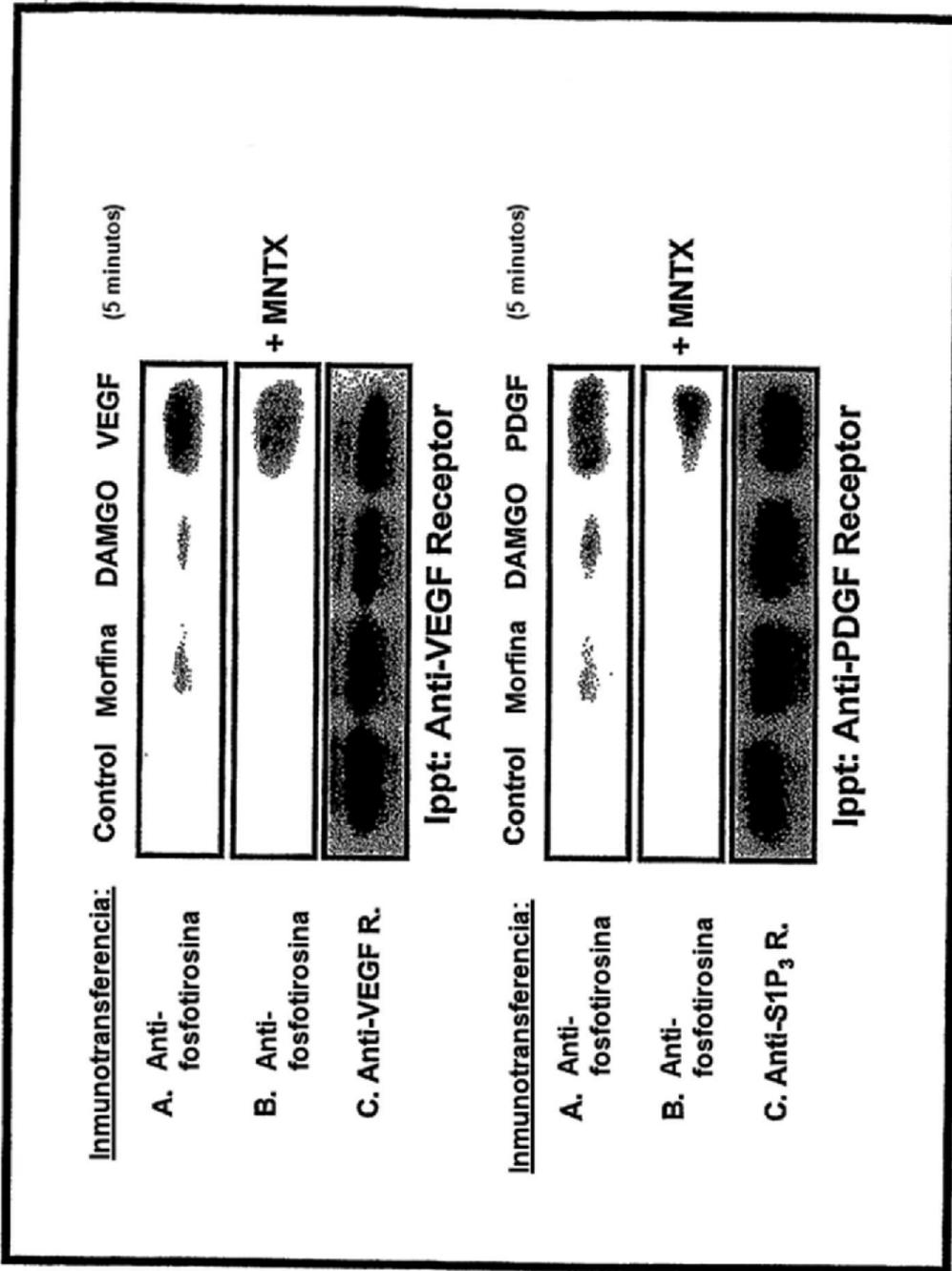


FIGURA 18

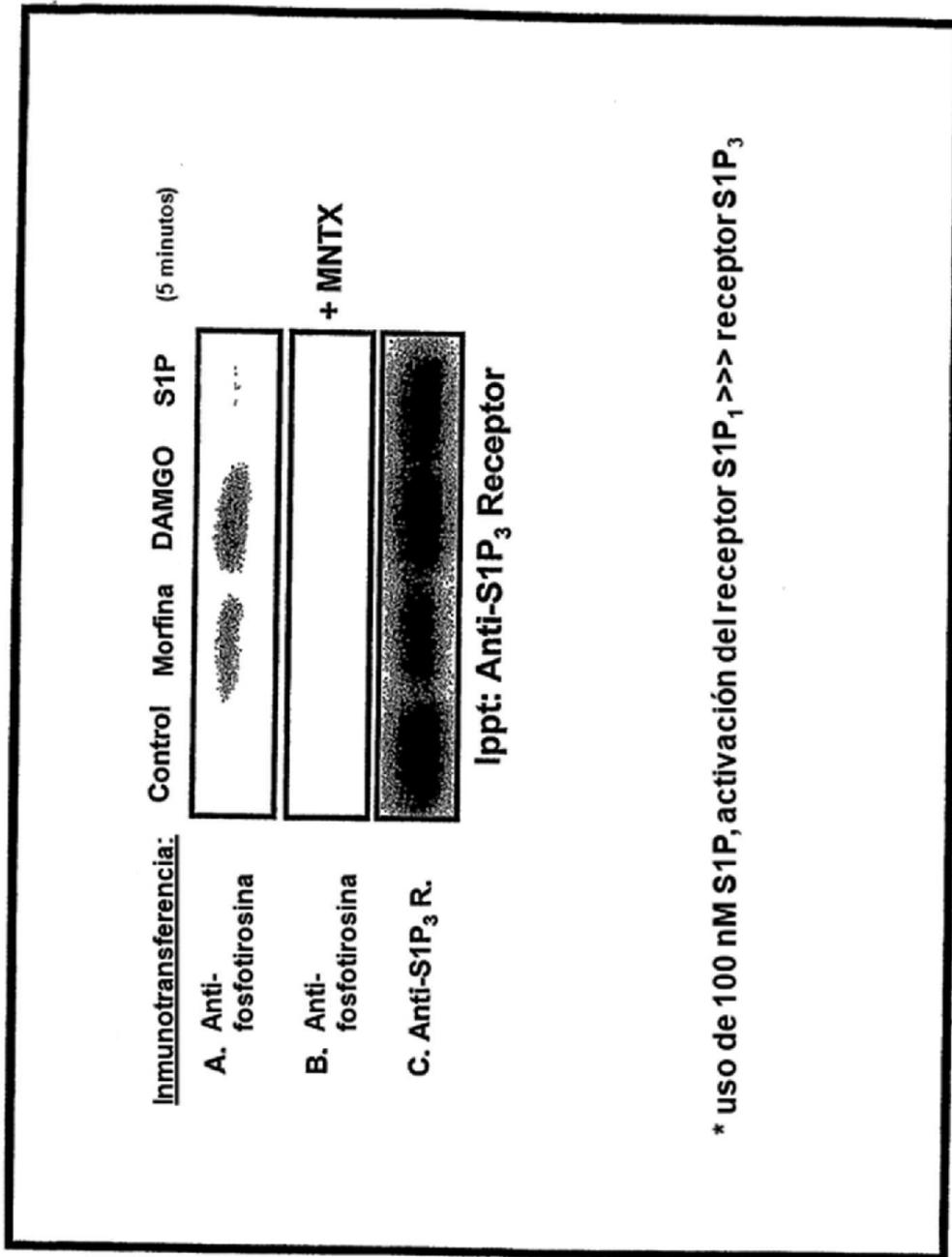


FIGURA 19

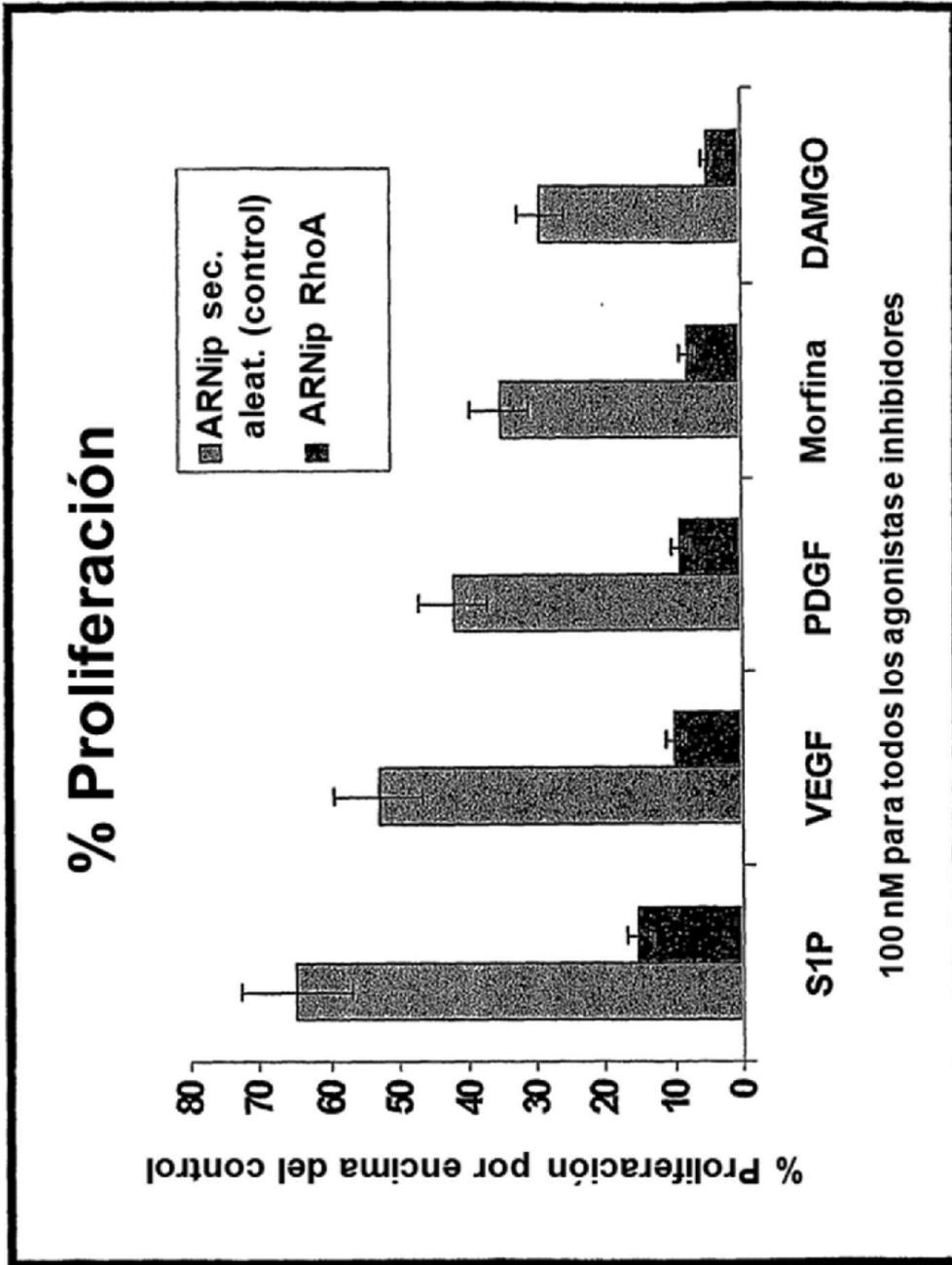


FIGURA 20

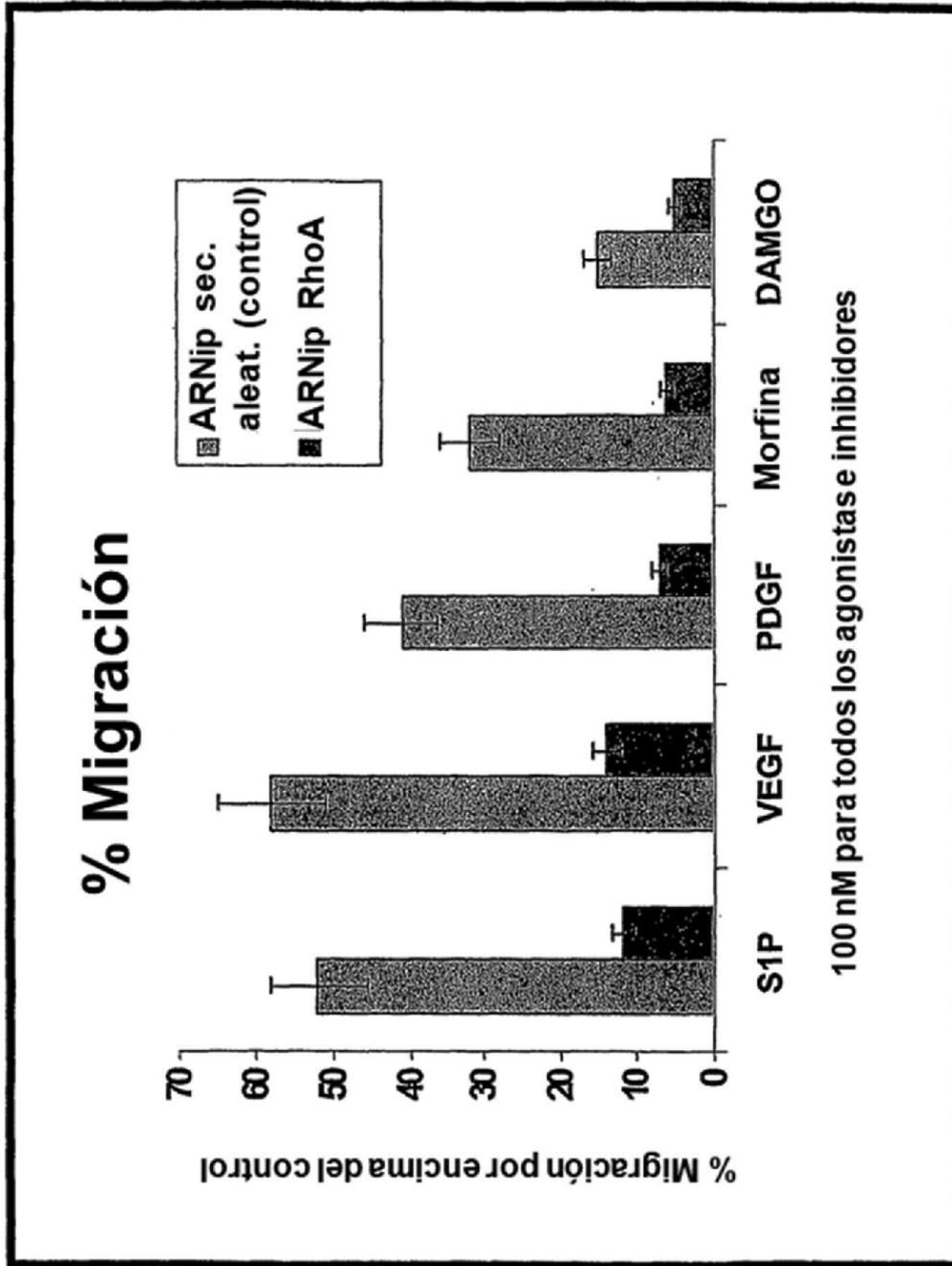


FIGURA 21

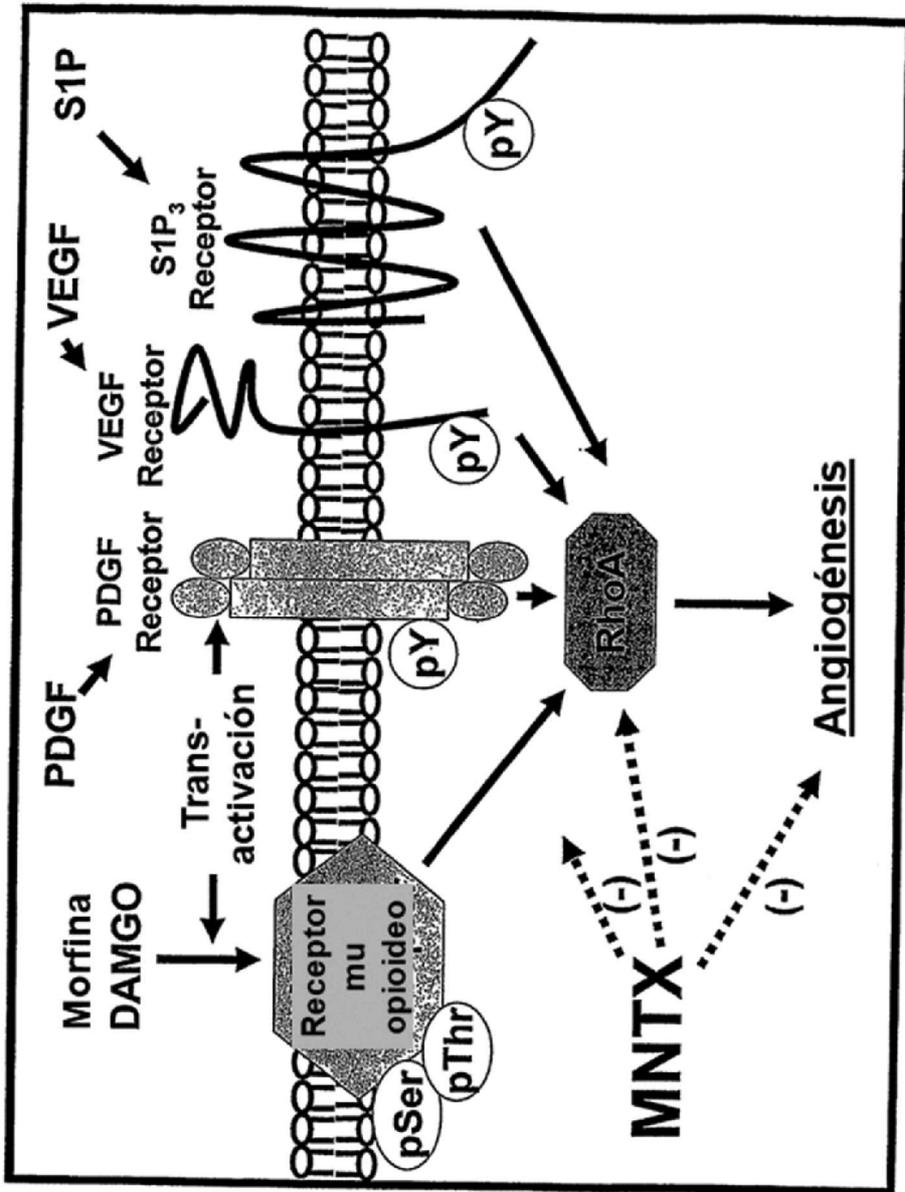


FIGURA 22