

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 348**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/436** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2015 PCT/GB2015/051686**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189597**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2015 E 15730526 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3151831**

54 Título: **Cebado de células cancerosas con baja dosis de naltrexona**

30 Prioridad:

**09.06.2014 GB 201410216**

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

**11.11.2019**

73 Titular/es:

**LDN PHARMA LIMITED (100.0%)  
Locke Lord (UK) LLP 201, Bishopsgate  
London, Greater London EC1M 3AB, GB**

72 Inventor/es:

**DALGLEISH, ANGUS y  
LIU, WAI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 730 348 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

Cebado de células cancerosas con baja dosis de naltrexona

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a regímenes de administración de fármacos y combinaciones de fármacos para uso en el tratamiento de cáncer.

**Antecedentes de la invención.**

10 La naltrexona es un antagonista opioide administrado por vía oral con el nombre químico de morfina-6-ona,17-(ciclopropilmetil)-4,5-epoxi-3,14-dihidroxi-(5 $\alpha$ ), que se usa comúnmente como tratamiento para la adicción a los opiáceos. Sin embargo, varios pacientes usan dosis bajas de naltrexona (LDN) como tratamiento fuera de lo indicado para una variedad de patologías relacionadas con el sistema inmune y el cáncer. Existe evidencia preliminar de que las LDN pueden ser efectivas en la esclerosis múltiple (Rahn et al. 2011), la enfermedad de Crohn (Smith et al. 2011) y ciertos cánceres.

15 Con respecto al cáncer, Zagon y McLaughlin (1983) e Hytrek et al. (1996) informaron de la inhibición mediada por LDN del neuroblastoma murino y del crecimiento de células de cáncer de colon humano respectivamente, cuando se evaluaron en modelos de xenoinjerto murino. Además, se ha encontrado que las combinaciones de LDN con agentes terapéuticos adicionales son efectivas contra el crecimiento y la progresión de ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, Donahue et al. (2011 a) informaron de potentes efectos antiproliferativos de LDN y cisplatino en células de cáncer de ovario humano tanto in vitro como en un modelo de xenoinjerto murino in vivo. En la clínica, Berkson et al. (2006) describieron la supervivencia a largo plazo de un paciente con cáncer de páncreas con metástasis en el hígado, después del tratamiento con ácido  $\alpha$ -lipoico en combinación con LDN; los autores desde entonces han publicado observaciones similares en tres pacientes más con cáncer de páncreas metastásico (Berkson et al. 2009).

20 Con respecto al mecanismo de inhibición del crecimiento por naltrexona, Donahue et al. (2011 b) informaron de que los efectos antiproliferativos de la exposición a corto plazo a la naltrexona en células de cáncer de ovario humano están relacionados con una disminución en la síntesis de ADN, dependiente de las vías de quinasas inhibitorias dependientes de ciclina p16 y/o p21. Los autores no informaron de alteraciones, resultantes de esta exposición, en vías relacionadas con la supervivencia celular (necrosis y apoptosis). Por lo tanto, el mecanismo subyacente a los efectos antiproliferativos de la naltrexona, en particular la LDN, está en gran medida aún por explorar. En consecuencia, las estrategias terapéuticas racionales derivadas de una mayor comprensión mecanicista de la LDN aún están por desarrollar.

**30 Sumario de la invención**

35 Se ha encontrado por los presentes inventores que, en primer lugar, la eficacia de la baja dosis de naltrexona (LDN), cuando se usa para inhibir el crecimiento de células de un tumor/cáncer, se eleva mediante el uso de una fase de recuperación (o lavado) después de la administración (Ejemplo 1). En segundo lugar, los presentes inventores han determinado que la LDN tiene efectos específicos con respecto a los niveles de proteínas celulares que tienen un papel en la regulación de la apoptosis (entre otras, la proteína promotora de la muerte asociada a Bcl-2 (BAD) y las quinasas específicas de serina/treonina, tales como como AKT, también conocida como proteína quinasa B) (Ejemplo 2).

40 Las propiedades anteriores de la LDN, previamente desconocidas en la técnica, indican que los regímenes específicos de administración cuando se usan en combinación con inhibidores de señalización de molécula pequeña (que se alimentan en las vías que se encuentra que están mediadas por LDN), maximizarán el potencial pro-apoptótico, y por lo tanto, antitumorigénico del fármaco. De este modo, la LDN se debe usar para cebar las células de un tumor/cáncer (en una primera fase de tratamiento) antes de la intervención con un inhibidor de señalización de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular (una segunda fase de tratamiento).

45 El cebado con LDN como parte de una primera fase de tratamiento, antes de la intervención con inhibidores de señalización de molécula pequeña ejemplares, se demuestra en el Ejemplo 3. Los presentes inventores han mostrado que dicho cebado da como resultado una mayor destrucción de células que tanto la administración del inhibidor después de una fase sin tratamiento (en la que no se administra LDN) como también la administración continua de LDN. Dicho cebado con LDN se va a hacer más efectivo mediante el uso de una fase de recuperación intermedia (como se detalla anteriormente), en la que no hay administración de LDN ni del inhibidor de señalización de molécula pequeña.

50 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende naltrexona o un análogo de la misma para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor/cáncer; en el que la naltrexona o el análogo de la misma se va a administrar al sujeto en una primera fase de tratamiento, seguida de una fase de recuperación; en el que, después de la fase de recuperación, se va a administrar al sujeto en una segunda fase de tratamiento un inhibidor de señalización de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de

PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular; estando caracterizada la fase de recuperación por la ausencia de administración de la naltrexona o del análogo de la misma y del inhibidor de señalización de molécula pequeña.

5 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una prueba de diagnóstico para monitorizar la respuesta de un sujeto que tiene un tumor/cáncer a una primera fase de tratamiento en el que al sujeto se le administra naltrexona o un análogo de la misma; que comprende analizar una muestra obtenida del sujeto que está o ha estado sometido a dicha primera fase de tratamiento para determinar si:

(a) la proteína BAD está regulada positivamente y/o la proteína AKT fosforilada está regulada negativamente,

(b) la proteína BAD está localizada sustancialmente en las mitocondrias, y/o

10 (c) La proteína BAD no está sustancialmente en un estado fosforilado

en el que, si lo están, hay una indicación positiva de que el sujeto es apropiado para emprender una segunda fase de tratamiento, que comprende la administración de un inhibidor de señalización de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular.

15 Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método in vitro para probar la eficacia de un inhibidor de señalización de molécula pequeña en el tratamiento de un tumor/cáncer cuando se usa en combinación con naltrexona o un análogo de la misma; que comprende administrar el inhibidor de señalización de molécula pequeña, seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular, simultáneamente con y/o después de la naltrexona o del  
20 análogo de la misma a células del tumor/cáncer, y analizar una muestra que comprende una o más de dichas células para determinar si:

(a) la proteína BAD está regulada positivamente y/o la proteína AKT fosforilada está regulada negativamente,

(b) la proteína BAD está localizada sustancialmente en las mitocondrias, y/o

(c) la proteína BAD no está sustancialmente en un estado fosforilado;

25 en el que, si lo están, hay una indicación positiva de la eficacia del inhibidor de señalización de molécula pequeña.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una fase de recuperación después de la exposición a LDN que provoca una reducción de los números de células. (A) células A549 (una línea celular de cáncer de pulmón) y (B) células HCT116 (una línea celular de carcinoma colorrectal), se cultivaron durante 48 h en naltrexona (LDN) 1 nM y 10nM (dosis baja) y en naltrexona (NTX) 1 μM y 10 μM (dosis estándar). Las células a continuación se lavaron y se dejaron crecer en medio libre de fármacos durante 24 h (lavado) o se cultivaron continuamente en naltrexona durante un total de 72 h (72); la viabilidad celular se evaluó mediante lecturas de absorbancia. El efecto de la etapa de lavado en las células HCT116 también se midió mediante (C) el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), (D) recuento de células y (E) porcentaje de células viables.  
30

35 La Figura 2 muestra los efectos anteriores para las células T98G y U87MG (líneas celulares de glioma), evaluados por lecturas de absorbancia.

La Figura 3 muestra los efectos de la naltrexona a 10μM (NTX) y 10nM (LDN) en células HCT116, en relación con células no tratadas, en niveles de varias proteínas del ciclo celular según se evalúa por (A) Western blot y (B) análisis de densitometría de bandas de proteínas en (A). Metodológicamente, las células HCT116 se trataron con NTX y LDN durante 48 h antes de la determinación de las proteínas celulares como se marca en la figura. Las intensidades de cada una de las bandas indican el nivel al que se expresaron estas proteínas, que se enumeraron mediante análisis de densidad.  
40

La Figura 4 compara (A) los niveles de expresión génica de las proteínas del ciclo celular anteriores (después del tratamiento con NTX y LDN), como se mide mediante análisis de micromatrices con (B) los niveles de proteína que se muestran en la Figura 3 (B).  
45

La Figura 5 muestra los efectos de los regímenes de tratamiento detallados en el Ejemplo 3 sobre (A) los números de células y (B) la viabilidad celular de las células HCT116. U-U: no tratadas durante 96 h; L-L: LDN durante 96h; U-C: no tratadas durante 48 h, a continuación ciclofosfamida durante 48 h; L-C: LDN durante 48 h, a continuación ciclofosfamida durante 48 h; U-G: no tratadas durante 48 h, a continuación gemcitabina durante 48 h; L-G LDN durante 48 h, a continuación gemcitabina durante 48 h; U-O: no tratadas durante 48 h, a continuación oxaliplatino durante 48 h.  
50

### Descripción detallada de la invención

La invención proporciona nuevos usos de LDN en el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor/cáncer. Además, se proporciona una prueba de diagnóstico para evaluar la respuesta de un sujeto al cebado con LDN. Además, también se contempla un método para ensayar la eficacia de un inhibidor de señalización de molécula pequeña in vitro, cuando se va a usar en combinación con LDN.

Los autores de la presente invención han encontrado que el uso de una fase de recuperación o lavado después de la administración de LDN provoca una mayor reducción del número de células cuando se compara con la administración continua. Esto se observa para varias líneas celulares de cáncer (Ejemplo 1; Figuras 1 y 2). Además, se han explorado los efectos de la LDN en los niveles de varias proteínas del ciclo celular, con el hallazgo de que la proteína promotora de la muerte asociada a Bcl-2 (BAD) está regulada positivamente y la AKT fosforilada (un inhibidor de BAD) está regulada negativamente después del tratamiento LDN (Ejemplo 2; Figuras 3 y 4). De este modo, la combinación de la administración de LDN con la intervención con inhibidores de señalización de molécula pequeña (como se define aquí), que se incorporan a estas vías de regulación de la supervivencia celular, presenta una nueva estrategia terapéutica racional para el uso de naltrexona.

Los efectos del cebado con LDN se muestran en el Ejemplo 3. Las células HCT-116 (carcinoma colorrectal) a las que se administró LDN durante 48 horas, seguido del cultivo con antimetabolitos y agentes de alquilación ejemplares durante 48 horas más, muestran un número de células y una viabilidad más bajos que en la ausencia de cebado con LDN (Figura 5A y B; L-C, L-G y L-O frente a U-C, U-G y U-O). La muerte celular conseguida mediante estos regímenes también es mayor que la de la administración continua de LDN (Figura 5A y B; L-L). Estos datos se generan usando un modelo de línea celular in vitro de cáncer colorrectal estándar industrial. Sin embargo, se espera que la eficacia del cebado de LDN in vivo sea mayor que la observada con las líneas celulares, debido a los efectos inmunológicos del fármaco (por ejemplo, por medio de una intercomunicación mejorada entre las células T efectoras y las células presentadoras de antígeno profesionales). No deseando estar limitados por la teoría, la LDN también puede detener las células cancerosas en etapas específicas del ciclo celular (además de regular positivamente las proteínas pro-apoptóticas, tales como BAD). Esto puede permitir que el inhibidor de señalización de molécula pequeña actúe sobre una población de células que están en un estado alineado en el ciclo celular, incrementando por ello la sensibilidad.

La proteína BAD es conocida por la persona experta, y como se usa aquí, el término tiene su significado convencional como se usa en la técnica, por ejemplo, por Danial (2009). De manera similar, todos los demás términos usados aquí para denotar proteínas que son conocidas en la técnica tienen sus significados convencionales, como entenderá la persona experta. La BAD pertenece a la familia de proteínas pro-apoptóticas solo BH3, que inician la muerte celular tras la activación, estando su actividad en gran medida regulada por modificaciones postraduccionales que integran una variedad de señales de supervivencia o muerte celular (Danial 2009). La BAD específicamente promueve la apoptosis por medio de la unión y neutralización de sus socios antiapoptóticos BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> y BCL-W, localizados en las mitocondrias, donde BAD se traslada (del citosol) al retirar las señales de supervivencia del factor de crecimiento. La fosforilación de BAD (resultante de las señales de supervivencia anteriores) es inhibitoria; esto está mediado específicamente por tres residuos de serina (S112, S136 y S155). La fosforilación en los dos sitios anteriores permite el acoplamiento con la proteína inhibidora de BAD 14-3-3, y la fosforilación en el último (y la carga negativa asociada) hace las interacciones entre BAD y los sitios de unión hidrófobos de BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> y BCL-W energéticamente desfavorables. En consecuencia, cuando se fosforila, la BAD está unida por la proteína 14-3-3 y, por lo tanto, secuestrada en el citosol (de este modo, se evita que se traslade a las mitocondrias para iniciar la apoptosis), y se evita que se una a y neutralice sus proteínas diana antiapoptóticas mitocondriales. Sin embargo, en células sanas, una porción de BAD fosforilada también puede residir en las mitocondrias (Danial et al. 2003).

La fosforilación inhibitoria de BAD está regulada por innumerables señales de supervivencia y muerte celular anteriores; como tal, la BAD está en el vértice de una serie de vías de señalización. La actividad inhibitoria de BAD (por medio de la fosforilación) se muestra por, pero no está limitada a, AKT, RSK, S6K, PKA y PIM quinasas. En consecuencia, un inhibidor de señalización de molécula pequeña que regula negativamente (con respecto a la actividad o la expresión) entre otras, las quinasas anteriores, o sus activadores anteriores complementarán los efectos anti-proliferativos de la LDN. Con respecto a las quinasas anteriores, la AKT está regulada positivamente por, entre otros, la actividad de la PI3-quinasa y la RAF-quinasa (mediada por el factor de crecimiento y las vías reguladas por citoquinas); la RSK está regulada positivamente, entre otras, por la actividad de MAP-quinasa (mediada por el factor de crecimiento y las vías reguladas por citoquinas); la PIM está regulada positivamente, entre otras, por la proteína STAT (mediada por vías reguladas por citoquinas); la S6K está regulada positivamente por entre otras, mTOR (mediada por diversos estímulos que incluyen vías mediadas por el factor de crecimiento y niveles de nutrientes); la PKA está regulada positivamente por, entre otras, los niveles de AMP cíclica (mediados por las citoquinas y las vías reguladas por el receptor acoplado a la proteína G) (Danial 2009). Por consiguiente, la regulación negativa de estas anteriores proteínas o moléculas de señalización por un inhibidor de señalización de molécula pequeña también complementará la actividad de LDN.

No deseando estar limitados por la teoría, se piensa que una fase de recuperación después del tratamiento con LDN permite a la célula volver a participar en los procesos del ciclo celular, que se entrelazan con los de la muerte

celular. De este modo, por medio de la fase de recuperación, también se aumenta la muerte celular. Además, las vías de señalización descritas anteriormente son sensibles a la competencia de la dinámica de los ciclos celulares de las células tumorales. Las células que están en el ciclo tienden a responder mejor a los inhibidores de señalización de molécula pequeña que interfieren con estas vías. En consecuencia, una fase de recuperación da tiempo a que las células tumorales vuelvan a participar en algunos aspectos de la maquinaria del ciclo celular, permitiendo de este modo que los inhibidores de molécula pequeña funcionen más efectivamente y aumenten la respuesta citotóxica.

Como se usa aquí, "naltrexona" se refiere a morfina-6-ona,17-(ciclopropilmetil)-4,5-epoxi-3,14-dihidroxi-(5 $\alpha$ ), y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos de los mismos farmacéuticamente aceptables. El uso de la naloxona, un análogo estructural de la naltrexona, está dentro del alcance de la invención y se engloba dentro del término "análogo" usado en la descripción y las reivindicaciones. De manera similar, la metilnaltrexona también se considera un análogo apropiado para su uso en todos los aspectos de la invención. La forma preferida de naltrexona es como su forma de sal de hidrocloreto.

Como se usa aquí, la expresión "inhibidor de señalización de molécula pequeña" se refiere a compuestos que tienen un peso molecular de menos de 3000 daltons, que incluyen, pero no están limitados a, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos y peptidomiméticos; teniendo dichos compuestos actividad inhibitoria o antagonista hacia uno o más componentes de una o más vías de señalización celular; siendo conocido en la técnica que dicha (s) vía (s) de señalización celular media (n) en el crecimiento y/o proliferación celular, que incluyen, pero no están limitadas, al proceso de apoptosis. La actividad "inhibitoria" o "antagonista", con referencia al inhibidor de señalización de molécula pequeña, se refiere a la actividad del uno o más componentes de la vía de señalización celular que se reduce en presencia del inhibidor de señalización de molécula pequeña, cuando se compara con el nivel de tal actividad en ausencia de dicho inhibidor de señalización de molécula pequeña, cuando se mide en condiciones de otro modo análogas. Dichos componentes incluyen, pero no están limitados a; receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de factor de crecimiento, receptores de citoquinas y receptores acoplados a proteína G); enzimas intracelulares, que incluyen las enzimas ligadas a la membrana (por ejemplo, quinasas, fosfatasa y GTPasas); y otros mediadores y efectores posteriores de la vía de señalización celular (por ejemplo, chaperonas, adaptadores, andamios, microtúbulos, factores de transcripción e iniciadores de la traducción). Dichas vías de señalización celular incluyen, pero no están limitadas a, vías mediadas por Akt (proteína quinasa B), vías mediadas por integrina, vías mediadas por Jak-STAT, vías mediadas por proteína quinasa activada por mitógenos, vías mediadas por Wnt/ $\beta$ -catenina, vías mediadas por el factor de necrosis tumoral; incluyendo dichas vías los reguladores anteriores de las mismas. En algunos casos, el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un compuesto que tiene las propiedades anteriores y un peso molecular de menos de 1000 daltons, típicamente menos de 500 daltons. Los inhibidores de señalización de molécula pequeña apropiados según la invención se seleccionan del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular; teniendo dichas clases sus significados convencionales como se usan en la técnica. "Inhibidor del ciclo celular" se refiere a un compuesto que es capaz de ralentizar o detener la progresión de una célula o células en una etapa del ciclo celular para avanzar a la etapa subsecuente del ciclo celular.

Como se usa aquí, el término "inhibidor" tiene su significado convencional como se usa en la técnica.

Como se usa aquí, los términos "regulación positiva" y "regulación negativa", con respecto a los niveles celulares de una proteína, se refieren respectivamente a niveles mayores o menores cuando se comparan con los niveles basales de dicha proteína en células no tratadas y/o no estimuladas del mismo tipo de tejido, medidos en condiciones de otro modo análogas. Los niveles celulares mayores o menores de la proteína están reflejados típicamente, pero no necesariamente, por una mayor o menor concentración citosólica de la proteína, cuando se compara con células no tratadas y/o no estimuladas. "regulación positiva" y "regulación negativa", respectivamente, incluyen, pero no están limitados a, aumento y disminución de la expresión de la proteína en cuestión (ya sea por aumento o disminución de los niveles de transcripción del ARNm diana y/o la traducción del polipéptido); sin embargo, los términos también pueden incluir respectivamente la disminución y el aumento del secuestro y/o degradación de dicha proteína; también se incluyen combinaciones de los efectos anteriores.

Como se usa aquí, la expresión "localización subcelular", cuando se considera una proteína, se refiere a la localización específica, dentro del volumen de una célula, de una proporción sustancial de la cantidad total de la proteína en la célula; más específicamente, la expresión se refiere a donde está situada dicha proporción sustancial en relación con los orgánulos, características o compartimentos celulares identificables que incluyen, pero no están limitados a, la membrana plasmática, el núcleo, las mitocondrias, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y las vesículas endosómicas. En el contexto anterior, "sustancialmente localizada" se refiere a que dicha proporción sustancial está situada dentro del volumen de, o está próxima a, un orgánulo, característica o compartimento celular dado; "próxima a" incluye, pero no está limitada a, la proteína que tiene contacto con una membrana de fosfolípido que forma un perímetro exterior del orgánulo, característica o compartimento. A modo de ejemplo y no de limitación, cuando se considera una célula tratada y/o estimulada, una proteína se puede considerar "sustancialmente localizada" en un orgánulo, característica o compartimento celular dado cuando la cantidad de dicha proteína dentro del volumen, o próxima a, dicho orgánulo, característica o compartimento aumenta cuando se compara con una célula no tratada y/o no estimulada (es decir, en un estado basal) del mismo tipo de tejido, cuando se mide en condiciones de otro modo análogas; de nuevo, "próxima a" incluye, pero no está limitada a, la proteína que tiene

contacto con una membrana de fosfolípido que forma un perímetro exterior del orgánulo, característica o compartimento.

Como se usan aquí, los términos "fosforilado" y "estado fosforilado", con respecto a la proteína BAD, se refieren a uno o más grupos fosfato que se unen a la proteína por medio de cualquier residuo apropiado, por ejemplo, uno o más residuos serina, treonina, tirosina y/o histidina. La fosforilación enzimática de la proteína BAD en los residuos S112, S136 y/o S155 por medio de la acción de quinasas corriente arriba, en particular AKT, RSK, S6K, PKA y/o PIM quinasas, o la ausencia de dicha actividad, se va a considerar en particular. En el contexto anterior, la proteína BAD que se encuentra "sustancialmente en un estado fosforilado" se refiere al estado fosforilado que es la forma predominante de la proteína BAD celular y, estando de este modo la actividad celular de la proteína BAD sustancialmente inhibida, especialmente cuando es el resultado de la actividad de AKT, RSK, S6K, PKA y/o PIM quinasas. La proteína que "no" se encuentra sustancialmente en el estado anterior se refiere a lo contrario de las condiciones anteriores, en las que el estado no fosforilado de la proteína BAD es dominante, especialmente debido a la ausencia sustancial de actividad de las quinasas anteriores.

Tal como se usa aquí, los términos "tratando" y "tratamiento" y "tratar" se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, disminuyen la velocidad y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado como 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o retrasan el desarrollo de una afección o trastorno patológico específico. De este modo, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en quienes se va a prevenir el trastorno. En algunos casos, un sujeto se "trata" con éxito de un tumor/cáncer según la presente invención si el sujeto muestra uno o más de los siguientes: una reducción del número o ausencia completa de células cancerosas; una reducción del tamaño del tumor; inhibición de, o ausencia de, infiltración de células cancerosas en órganos periféricos que incluye, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejidos blandos y huesos; inhibición o ausencia de metástasis tumorales; inhibición o ausencia de crecimiento tumoral; reducción de la morbilidad y la mortalidad; reducción de la tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica de un tumor; reducción del número o la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor; diferenciación de las células tumorigénicas a un estado no tumorigénico; o alguna combinación de efectos.

Como se usa aquí, el término "tumor/cáncer" se refiere a cualquier masa de tejido que es el resultado de un crecimiento, proliferación y/o supervivencia celular excesivo, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso), incluyendo las lesiones precancerosas. Los términos "tumor/cáncer" y "neoplasma" se pueden usar indistintamente.

Como se usa aquí, el término "tumorigénico" se refiere a las características funcionales de una célula madre de tumor sólido que incluyen las propiedades de autorenovación (que dan lugar a células madre cancerosas tumorigénicas adicionales) y la proliferación para generar todas las demás células tumorales (que da lugar a células madre diferenciadas y de este modo no tumorigénicas) que permiten que las células madre tumorales sólidas formen un tumor.

Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, entre otros, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, roedores y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento en el que se va a usar LDN según la presente invención. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente aquí en referencia a un sujeto humano.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende naltrexona o un análogo de la misma para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor/cáncer; en el que la naltrexona o el análogo de la misma se va a administrar al sujeto en una primera fase de tratamiento, seguida de una fase de recuperación; en el que, después de la fase de recuperación, se va a administrar al sujeto en una segunda fase de tratamiento un inhibidor de señalización de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular; estando caracterizada la fase de recuperación por la ausencia de administración de la naltrexona o del análogo de la misma y del inhibidor de señalización de molécula pequeña.

Según dicho primer aspecto, preferentemente la naltrexona o el análogo de la misma se va a administrar en la primera fase de tratamiento al sujeto con una dosis "baja", menor de 0.5 mg/kg, preferentemente menor de 0.2 mg/kg, más preferentemente entre 0.01 mg/kg y 0.08 mg/kg, incluso más preferentemente entre 0.03 mg/kg y 0.06 mg/kg, lo más preferentemente entre 0.04 mg/kg y 0.05 mg/kg. La composición se puede administrar de cualquier modo convencional. La administración puede ser por administración oral o parenteral, preferentemente administración oral. Sin embargo, también se contemplan otras vías de administración. Dicha primera fase de tratamiento es preferentemente para administración durante entre 1 y 7 días, más preferentemente entre 1 y 4 días, lo más preferentemente entre 1 y 2 días; entendiendo por "día" un período continuo de 24 horas. La naltrexona se administra preferentemente a diario (con las dosis anteriores) durante la primera fase de tratamiento. Dicha fase de recuperación, en la que no hay administración de naltrexona (o del análogo de la misma) o del inhibidor de señalización de molécula pequeña, es preferentemente por lo menos 1 día, y más preferentemente por lo menos 2 días. Alternativamente, la fase de recuperación puede ser entre 24 y 48 horas, 24 y 36 horas, o 24 y 30 horas. Las características de dicha segunda fase de tratamiento dependen del inhibidor de señalización de molécula pequeña que se va a usar, sin embargo, la administración es preferentemente diaria, durante por lo menos 1 día.

Además, según dicho primer aspecto, preferentemente el inhibidor de señalización de molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en antimetabolitos y agentes de alquilación. El inhibidor de señalización de molécula pequeña se puede administrar de cualquier manera convencional, dependiendo el método de administración en gran medida del inhibidor de señalización de molécula pequeña que se va a usar. En consecuencia, se contempla la administración por vía, entre otras, parenteral, oral, sublingual, nasal y/o pulmonar.

5 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un inhibidor de PI3-quinasa, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, wortmanina, LY294002, demetoxiviridina, IC87114, NVP-BEZ235, BAY 80-6946, BKM120, GDC-0941, GDC-9080; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

10 Cuando el inhibidor de molécula pequeña es un inhibidor de AKT, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, MK-2206, GSK690693, perifosina, PHT-427, AT7867, honokiol, PF-04691502; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

15 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un taxano, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, paclitaxel y docetaxel; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

20 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un antimetabolito, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, metotrexato, 5-fluorouracilo, capecitabina, citosinarabinosida (citarabina), gemcitabina, 6-tioguanina, pentostatina, azatioprina, 6-mercaptopurina, fludarabina y cladribina; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. La gemcitabina es un antimetabolito especialmente preferido. A modo de ejemplo, la gemcitabina se puede administrar con una dosis (por administración) de 800-1200 mg/m<sup>2</sup>, preferentemente 900-1100 mg/m<sup>2</sup>, por ejemplo, alrededor de 1000 mg/m<sup>2</sup>, o 1000 mg/m<sup>2</sup>. Se prevé que la gemcitabina puede ser especialmente efectiva debido a la inhibición de las células supresoras mieloides, que pueden formar un "escudo" inmunosupresor alrededor de ciertos tipos de células cancerosas; esto es particularmente relevante para el tratamiento del cáncer de páncreas.

30 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un agente de alquilación, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, melfalán (L-sarcolisina) clorambucil, hexametilmelamina, tiotepa, busulfan, carmustina (BCNU), estreptozocina (estreptozotocina), dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida), temozolomida y oxaliplatino; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. La ciclofosfamida y la oxaliplatina son agentes de alquilación especialmente preferidos. A modo de ejemplo, el oxaliplatino se puede administrar con una dosis (por administración) de 65-105 mg/m<sup>2</sup>, preferentemente de 75 a 95 mg/m<sup>2</sup>, por ejemplo, alrededor de 85 mg/m<sup>2</sup>, o 85 mg/m<sup>2</sup>. A modo de ejemplo, la ciclofosfamida se puede administrar con una dosis (por administración) de hasta 1800 mg/m<sup>2</sup>, por ejemplo 400-1800 mg/m<sup>2</sup>.

40 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un inhibidor del ciclo celular, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, epotilona, vincristina, vinblastina, UCN-01, 17AAG, XL844, CHIR-124, PF-00477736, CEP-3891, flavopiridol, berberina, P276-00, terameprocol, isoflavona daidzeína, BI2536, BI6727, GSK461364, ciclapolin, ON-01910, NMS-P937, TAK-960, ispinesib, monastrol, AZD4877, LY2523355, ARRY-520, MK-0731, SB743921, GSK923295, lonafarnib, proTAME, bortezumib, MLN9708, ONX0912, CEP-18770; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; los ejemplos particularmente apropiados de inhibidores del ciclo celular incluyen, pero no están limitados a, hespaeradin, ZM447439, VX-680, MLN-8054, PHA-739358, AT-9283, AZD1152, MLN8237, ENMD2076, SU6668; incluyendo combinaciones de los mismos; y otros inhibidores de aurora quinasas; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

50 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una prueba de diagnóstico para monitorizar la respuesta de un sujeto que tiene un tumor/cáncer a una primera fase de tratamiento en la que a un sujeto se le administra naltrexona o un análogo de la misma; que comprende analizar una muestra obtenida del sujeto que está o ha estado sometido a dicha primera fase de tratamiento para determinar si:

(a) la proteína BAD está regulada positivamente y/o la proteína AKT fosforilada está regulada negativamente,

(b) la proteína BAD está localizada sustancialmente en las mitocondrias, y/o

(c) la proteína BAD no está sustancialmente en un estado fosforilado;

55 en el que, si lo están, hay una indicación positiva de que el sujeto es apropiado para emprender una segunda fase de tratamiento, que comprende la administración de un inhibidor de señalización de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de

alquilación e inhibidores del ciclo celular.

Las observaciones anteriores son todas indicadores positivos de la actividad antiapoptótica de la actividad de la proteína BAD que se estimula por medio del cebado con LDN.

5 Según dicho segundo aspecto, preferentemente la naltrexona o el análogo de la misma se va a administrar en la primera fase de tratamiento al sujeto en una dosis "baja", menor de 0.5 mg/kg, preferentemente menor de 0.2 mg/kg, más preferentemente entre 0.01 mg/kg y 0.08 mg/kg, incluso más preferentemente entre 0.03 mg/kg y 0.06 mg/kg, lo más preferentemente entre 0.04 mg/kg y 0.05 mg/kg. La composición se puede administrar de cualquier modo convencional. La administración puede ser por administración oral o parenteral, preferentemente administración oral. Sin embargo, también se contemplan otras vías de administración. Dicha primera fase de tratamiento es preferentemente para administración durante entre 1 y 7 días, más preferentemente entre 1 y 4 días, lo más preferentemente entre 1 y 2 días; entendiéndose por "día" un período continuo de 24 horas. La naltrexona se administra preferentemente diariamente (con las dosis anteriores) durante la primera fase de tratamiento.

15 Además, según dicho segundo aspecto, se puede determinar la regulación positiva de la proteína BAD y/o la regulación negativa de la proteína AKT fosforilada, respectivamente, si están presentes en las células de una muestra obtenida del sujeto. La cuantificación de niveles de proteína específica en una o más células en una muestra tomada del sujeto se puede realizar mediante cualquier método apropiado conocido en la técnica, incluyendo los métodos semicuantitativos. Tales métodos apropiados incluyen, pero no están limitados a, Western blot cuantitativo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), espectrometría de masas (en particular espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)), y derivados apropiados y combinaciones de los anteriores; también se contemplan y están dentro del alcance de la invención métodos por los que se cuantifican uno o más fragmentos identificables de la proteína. La regulación positiva y/o regulación negativa se van a determinar con relación a un control que comprende una o más células no tratadas y/o no estimuladas (es decir, en un estado basal) del mismo tipo de tejido, cuando se miden en condiciones análogas, preferentemente en una muestra tomada del sujeto antes de la primera fase de tratamiento.

25 Además, según dicho segundo aspecto, se puede determinar la localización subcelular de la proteína BAD en células de una muestra obtenida del sujeto. Esto se puede realizar usando cualquier método apropiado en la técnica, que incluye, entre otros, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica y derivados apropiados y combinaciones de los anteriores. La proteína BAD se puede considerar "sustancialmente localizada" en las mitocondrias cuando la cantidad de proteína BAD dentro del volumen de las mitocondrias o en su proximidad aumenta cuando se compara con una célula no tratada o no estimulada (es decir, en un estado basal) del mismo tipo de tejido, cuando se mide en condiciones análogas de otro modo; preferentemente en una muestra tomada del sujeto antes de la primera fase de tratamiento.

35 Además, según dicho segundo aspecto, se puede determinar el estado de fosforilación de la proteína BAD en células de un tumor/cáncer. Esto se puede realizar usando cualquier método apropiado en la técnica. Se prevén en particular los métodos por los que se detecta un aumento en el peso molecular de la proteína BAD que es el resultado de la presencia de uno o más grupos fosfato y/o se obtiene un reconocimiento específico de la proteína BAD cuando se encuentra en un estado fosforilado (por ejemplo, mediante un anticuerpo); la ausencia de estos hechos indica que la proteína BAD no se encuentra sustancialmente en un estado fosforilado. Tales métodos incluyen Eastern blotting y derivados apropiados de los mismos. Preferentemente, el estado de fosforilación de BAD se compara con un control que comprende células no tratadas y/o no estimuladas (es decir, en un estado basal) del mismo tipo de tejido, en una muestra tomada del sujeto antes de la primera fase de tratamiento.

45 Además, según dicho segundo aspecto, hay preferentemente una fase de recuperación entre la primera y la segunda fase de tratamiento, si hay una indicación positiva de que el sujeto es apropiado para emprender la segunda fase de tratamiento. Dicha fase de recuperación, en la que no hay administración de naltrexona (o del análogo de la misma) o del inhibidor de señalización de molécula pequeña, es durante preferentemente por lo menos 1 día, y más preferentemente por lo menos 2 días. Alternativamente, la fase de recuperación puede ser entre 24 y 48 horas, 24 y 36 horas, o 24 y 30 horas. Las características de dicha segunda fase de tratamiento dependen del inhibidor de señalización de molécula pequeña que se va a usar, sin embargo, la administración es preferentemente diaria, durante por lo menos 1 día.

50 Además, según dicho segundo aspecto, preferentemente el inhibidor de señalización de molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en antimetabolitos y agentes de alquilación. El inhibidor de señalización de molécula pequeña se puede administrar de cualquier manera convencional, dependiendo en gran medida el método de administración del inhibidor de señalización de molécula pequeña a usar. Por consiguiente, se prevé la administración por, entre otras, las vías parenteral, oral, sublingual, nasal y/o pulmonar.

55 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un inhibidor de PI3-quinasa, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, wortmanina, LY294002, demetoxiviridina, IC87114, NVP-BE2235, BAY 80-6946, BKM120, GDC-0941, GDC-9080; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Cuando el inhibidor de molécula pequeña es un inhibidor de AKT, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, MK-2206, GSK690693, perifosina, PHT-427, AT7867, honokiol, PF-04691502; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

- 5 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un taxano, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, paclitaxel y docetaxel; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

- 10 Cuando el inhibidor de molécula pequeña es un antimetabolito, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, metotrexato, 5-fluorouracilo, capecitabina, citosinarabinosida (citarabina), gemcitabina, 6-tioguanina, pentostatina, azatioprina, 6-mercaptopurina, fludarabina y cladribina; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. La gemcitabina es un antimetabolito especialmente preferido.

- 15 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un agente de alquilación, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, melfalán (L-sarcolisina), clorambucil, hexametilmelamina, tiotepa, busulfan, carmustina (BCNU), estreptozocina (estreptozotocina), dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida), temozolomida y oxaliplatino; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. La ciclofosfamida y la oxaliplatina son agentes de alquilación especialmente preferidos.

- 20 Cuando el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un inhibidor del ciclo celular, los ejemplos apropiados incluyen, pero no están limitados a, epotilona, vincristina, vinblastina, UCN-01, 17AAG, XL844, CHIR-124, PF-00477736, CEP-3891, flavopiridol, berberina, P276-00, terameprocol, isoflavona daidzeína, BI2536, BI6727, GSK461364, ciclapolin, ON-01910, NMS-P937, TAK-960, ispinesib, monastrol, AZD4877, LY2523355, ARRY-520, MK-0731, SB743921, GSK923295, lonafarnib, proTAME, bortezomib, MLN9708, ONX0912, CEP-18770; incluyendo combinaciones de los mismos; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; los ejemplos particularmente apropiados de inhibidores del ciclo celular incluyen, pero no están limitados a, hespaeradin, ZM447439, VX-680, MLN-8054, PHA-739358, AT-9283, AZD1152, MLN8237, ENMD2076, SU6668; incluyendo combinaciones de los mismos; y otros inhibidores de aurora quinasas; y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

- 30 Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método in vitro para probar la eficacia de un inhibidor de señalización de molécula pequeña en el tratamiento de un tumor/cáncer cuando se usa en combinación con naltrexona o un análogo de la misma; que comprende administrar el inhibidor de señalización de molécula pequeña, seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular, simultáneamente con y/o después de la naltrexona o el análogo de la misma a células del tumor/cáncer, y analizar una muestra que comprende una o más de dichas células para determinar si:

(a) la proteína BAD está regulada positivamente y/o la proteína AKT fosforilada está regulada negativamente,

(b) la proteína BAD está localizada sustancialmente en las mitocondrias, y/o

(c) la proteína BAD no está sustancialmente en un estado fosforilado;

- 40 en el que, si lo están, hay una indicación positiva de la eficacia del inhibidor de señalización de molécula pequeña.

- Según dicho tercer aspecto, se puede determinar la regulación positiva de la proteína BAD y/o la regulación negativa de la proteína AKT fosforilada, si están presentes en células de un tumor/cáncer (cuando es de una muestra obtenida del sujeto, según el cuarto aspecto). La cuantificación de los niveles de proteína específica en una o más células en una muestra tomada del sujeto se puede realizar mediante cualquier método apropiado conocido en la técnica, incluyendo métodos semicuantitativos. Tales métodos apropiados incluyen, pero no están limitados a, Western blot cuantitativo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), espectrometría de masas (en particular espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)), y derivados apropiados y combinaciones de los anteriores; también se contemplan y están dentro del alcance de la invención métodos por los que se cuantifican uno o más fragmentos identificables de la proteína. La regulación positiva y/o la regulación negativa se van a determinar con relación a un control que comprende una o más células no tratadas y/o no estimuladas (es decir, en un estado basal) del mismo tipo de tejido, cuando se mide en condiciones análogas. Además según dicho tercer aspecto, se puede determinar la localización subcelular de la proteína BAD en células de un tumor/cáncer. Esto se puede realizar usando cualquier método apropiado en la técnica, que incluye pero no está limitado a, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, y derivados apropiados y combinaciones de los anteriores.
- 55 Preferentemente la proteína BAD se va a considerar "sustancialmente localizada" en las mitocondrias cuando la cantidad de proteína BAD dentro del volumen de, o próxima a, las mitocondrias se incrementa, cuando se compara con una célula no tratada y/o no estimulada (es decir, en un estado basal) del mismo tipo de tejido, cuando se mide en condiciones análogas de otro modo.

Además según dicho tercer aspecto, se puede determinar el estado de fosforilación de la proteína BAD en células de un tumor/cáncer. Esto se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica. Se prevén en particular métodos por los que se detecta un incremento del peso molecular de la proteína BAD resultante de la presencia de uno o más grupos fosfato y/o se obtiene el reconocimiento específico de la proteína BAD cuando está en un estado fosforilado (por ejemplo, mediante un anticuerpo), indicando la ausencia de estos hechos que la proteína BAD no se encuentra sustancialmente en un estado fosforilado. Tales métodos incluyen Eastern blotting y derivados apropiados de los mismos.

Además según dicho tercer aspecto, preferentemente el inhibidor de señalización de molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en antimetabolitos y agentes de alquilación. Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de tratar o prevenir un tumor/cáncer en un sujeto que necesita prevención o tratamiento del mismo, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de naltrexona o un análogo de la misma y un inhibidor de señalización de molécula pequeña, teniendo dicho método las mismas características preferidas y opcionales que son aplicables al primer aspecto de la invención.

Según todos los aspectos de la invención, se debe advertir que los tumores/cánceres a tratar no están limitados de ninguna manera. Por consiguiente, se prevé el tratamiento de cualquier afección que comprenda una masa de tejido resultante del excesivo crecimiento, proliferación y/o supervivencia celular, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso), incluyendo las lesiones precancerosas. Por lo tanto, los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, tumores/cánceres que comprenden carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia; los ejemplos más particulares de dichos tumores/cánceres incluyen, pero no están limitados a, los que comprenden cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células escamosas, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello. En una realización preferida del primer aspecto de la invención, sin embargo, el cáncer comprende cáncer de pulmón, glioma de cáncer colorrectal o cáncer de páncreas; más preferentemente, el cáncer comprende cáncer de pulmón o cáncer colorrectal, como se muestra en el Ejemplo 1. Cuando el inhibidor de molécula pequeña es la gemcitabina (según el primer aspecto de la invención), el uso en el tratamiento del cáncer pancreático es especialmente preferido.

La invención se ilustra ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Para estudiar el efecto de cada agente en el crecimiento celular, se añadieron células que crecen exponencialmente a placas de 96 pocillos con una densidad de  $3 \times 10^4$ /pocillo. A continuación se añadieron fármacos a los pocillos, asegurando un volumen igual de 200  $\mu$ l en toda la placa. El número de células se midió a las 72 h usando un ensayo estándar basado en metiltiazoltetrazolio (MTT) sin modificaciones. Brevemente, se añadió MTT a cada pocillo para dar una concentración de trabajo de 0.4 mg/ml, y las placas se devolvieron a la incubadora durante 1 hora más. Después de este tiempo, el medio se retiró por aspiración, se añadieron a continuación 200  $\mu$ l de DMSO a cada pocillo y las placas se agitaron suavemente durante 5 min antes de medir la densidad óptica a 540 nm en cada pocillo. El efecto de la recuperación, donde se incluyó una etapa de lavado, se estudió retirando el medio que contiene naltrexona y reemplazándolo con medio nuevo libre de fármaco después de 48 horas, antes de evaluar el número de células en el punto de tiempo de 72 horas. El recuento celular se realizó mediante microscopía óptica usando tinción con azul de tripano para ayudar a la discriminación entre células muertas/moribundas. Véase la descripción de las Figuras 1 y 2.

### Ejemplo 2

Las células se trataron con naltrexona (NTX) 10  $\mu$ M o naltrexona 10 nM (LDN) durante 48 horas antes de su recolección, y la proteína celular total se solubilizó en tampón de lisis y se resolvió mediante electroforesis de Tris-glicina usando un gel de gradiente bis-tris 4-12%. Después de la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 lm, el bloqueo se realizó en leche desnatada al 5% (peso/v) en TTBS [0.5% (v/v) Tween-20 en TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0)]. Se realizaron sondeos primarios de anticuerpos para la proteína especificada en la figura durante la noche a 4°C antes del sondeo secundario usando IgG1 anti-especies conjugado con peroxidasa de rábano. Las bandas se visualizarán mediante el sistema de detección ECL-plus. El análisis de densitometría se realizó usando un software de análisis patentado. Se extrajo ARN de estas células para el análisis de la expresión génica. El ARN se purificó por Trizol, seguido de precipitación con isopropanol. El pellet de ARN se lavó en etanol al 70% (v/v), se secó al aire y se resuspendió en agua libre de ARNasa. El ARNc biotinilado se generó a partir de 100 ng de ARN total usando el kit de amplificación de ARN TotalPrep de Illumina (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. Cantidades iguales (750 ng) de ARNc se hibridaron a las matrices de HT12-v3 humana de Illumina durante 18 horas y subsecuentemente se procesaron según las instrucciones del fabricante antes de escanear en un lector BeadArray de Illumina. Los datos de imágenes se

procesaron usando valores por defecto en GenomeStudio v2009.1 con imputación de los datos que faltan, antes de cargarlos en GeneSpring v9.0 para la normalización y el filtrado de los datos. El análisis adicional se realizó utilizando Excel. Véase la descripción de las figuras 3 y 4.

### Ejemplo 3

- 5 Se cultivaron células HCT116 (cáncer de colon humano) en medio de cultivo estándar siguiendo un programa de tratamiento que consiste en dos fases. Cada fase duró 2 días (48h). Las células se restauraron a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/ml y se dejaron adherir a las placas de cultivo antes de la adición de fármacos como parte de la primera fase del tratamiento. Las células no se trataron o se trataron con 10 nM de naltrexona y se mantuvieron en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 37°C. Después de 2 días, los medios se aspiraron suavemente de cada uno de los pocillos y se añadieron medios nuevos. Como parte de la segunda fase del tratamiento, se añadieron naltrexona (10 nM), ciclofosfamida (10 uM), gemcitabina (1 uM) u oxaliplatino (1 uM) después de que las células estuvieron libres de fármacos durante aproximadamente 15 minutos. Después de 2 días, las células se recogieron mediante tripsina y el número de células y la viabilidad para cada muestra se evaluó mediante el recuento de células usando azul de tripano. Los resultados se muestran en la Figura 5: UU: no tratadas durante 96 h; L-L: LDN durante 96h; U-C: no tratadas durante 48 h, a continuación ciclofosfamida durante 48 h; L-C: LDN durante 48 h, a continuación ciclofosfamida durante 48 h; U-G: no tratadas durante 48 h, a continuación gemcitabina durante 48 h; L-G LDN durante 48 h, a continuación gemcitabina durante 48 h; U-O: no tratadas durante 48 h, a continuación oxaliplatino durante 48 h.

### Referencias

- 20 Berkson, B. M., D. M. Rubin, and A. J. Berkson. 2009. Revisiting the ALA/N (alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone) protocol for people with metastatic and nonmetastatic pancreatic cancer: a report of 3 new cases. *Integr Cancer Ther* 8:416-422.
- Danial N. N., Gramm C. F., Scorrano L, Zhang C. Y., Krauss S, Ranger A. M et al. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*. 424: 952-956.
- 25 Danial, N. N. 2009. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene*. 27: S53-S70
- Donahue, R. N., P. J. McLaughlin, and I. S. Zagon. 2011 a. Low-dose naltrexone suppresses ovarian cancer and exhibits enhanced inhibition in combination with cisplatin. *Experimental Biology and Medicine* 236:883-895
- Donahue, R. N., P. J. McLaughlin, and I. S. Zagon. 2011 b. Low-dose naltrexone targets the opioid growth factor-opioid growth factor receptor pathway to inhibit cell proliferation: mechanistic evidence from a tissue culture model. *Experimental Biology and Medicine* 236: 1036-1050.
- 30 Hytrek, S. D., P. J. McLaughlin, C. M. Lang, and I. S. Zagon. 1996. Inhibition of human colon cancer by intermittent opioid receptor blockade with naltrexone. *Cancer letters* 101 : 159-164.
- Rahn, K. A., P. J. McLaughlin, and I. S. Zagon. 2011. Prevention and diminished expression of experimental autoimmune encephalomyelitis by low dose naltrexone (LDN) or opioid growth factor (OGF) for an extended period: therapeutic implications for multiple sclerosis. *Brain research*.
- 35 Smith, J. P., S. I. Bingaman, F. Ruggiero, D. T. Mauger, A. Mukherjee, C. O. McGovern, and I. S. Zagon. 2011. Therapy with the opioid antagonist naltrexone promotes mucosal healing in active Crohn's disease: a randomized placebo- controlled trial. *Dig Dis Sci* 56:2088-2097.
- 40 Zagon, I. S., and P. J. McLaughlin. 1983. Naltrexone modulates tumour response in mice with neuroblastoma. *Science* 221:671.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende naltrexona o un análogo de la misma, para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor/cáncer; en el que la naltrexona o el análogo de la misma se va a administrar al sujeto en una primera fase de tratamiento, seguida de una fase de recuperación; en el que, después de la fase de recuperación, se va a administrar al sujeto en una segunda fase de tratamiento un inhibidor de señalización de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular; estando caracterizada la fase de recuperación por la ausencia de administración de la naltrexona o del análogo de la misma y del inhibidor de señalización de molécula pequeña.
2. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la naltrexona o el análogo de la misma se va a administrar en la primera fase de tratamiento al sujeto con una dosis menor de 0.5 mg/kg, preferentemente menor de 0.2 mg/kg, más preferentemente entre 0.01 mg/kg y 0.08 mg/kg
3. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:
- i) dicha primera fase de tratamiento es para administración durante entre 1 y 7 días, preferentemente entre 1 y 4 días, más preferentemente entre 1 y 2 días; y/o
- ii) dicha segunda fase de tratamiento es para administración diaria durante por lo menos 1 día;
- y/o
- iii) dicha fase de recuperación es durante por lo menos 1 día, preferentemente por lo menos 2 días consecutivos.
4. Una composición farmacéutica para uso según cualquier reivindicación precedente, en la que el inhibidor de señalización de molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en antimetabolitos y agentes de alquilación, preferentemente en la que el inhibidor de señalización de molécula pequeña se selecciona de gemcitabina, oxaliplatino o ciclofosfamida.
5. Una composición farmacéutica para uso según cualquier reivindicación precedente, en la que el tumor/cáncer a tratar comprende cáncer de pulmón, carcinoma colorrectal, glioma o cáncer de páncreas.
6. Una prueba de diagnóstico para monitorizar la respuesta de un sujeto que tiene un tumor/cáncer a una primera fase de tratamiento en la que a un sujeto se le administra naltrexona o un análogo de la misma; que comprende analizar una muestra obtenida del sujeto que está o ha estado sometido a dicha primera fase de tratamiento para determinar si:
- (a) la proteína BAD está regulada positivamente y/o la proteína AKT fosforilada está regulada negativamente,
- (b) la proteína BAD está localizada sustancialmente en las mitocondrias, y/o
- (c) la proteína BAD no está sustancialmente en un estado fosforilado;
- en el que, si lo están, hay una indicación positiva de que el sujeto es apropiado para emprender una segunda fase de tratamiento, que comprende la administración de un inhibidor de señalización de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular.
7. Una prueba de diagnóstico según la reivindicación 6, en la que dicha regulación positiva, regulación negativa, localización y/o estado de fosforilación se evalúa en relación con un control que comprende el análisis de una muestra tomada del sujeto antes de la primera fase de tratamiento.
8. Una prueba de diagnóstico según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la naltrexona o el análogo de la misma se va a administrar en la primera fase de tratamiento al sujeto con una dosis menor de 0.5 mg/kg, preferentemente menor de 0.2 mg/kg, más preferentemente entre 0.01 mg/kg y 0.08 mg/kg.
9. Una prueba de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en la que dicha primera fase de tratamiento es para administración durante entre 1 y 7 días, preferentemente entre 1 y 4 días, más preferentemente entre 1 y 2 días.
10. Una prueba de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en la que el inhibidor de señalización de molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en antimetabolitos y agentes de alquilación.
11. Una prueba de diagnóstico según la reivindicación 10, en la que el inhibidor de señalización de molécula pequeña es un antimetabolito o agente de alquilación, seleccionado preferentemente de gemcitabina, oxaliplatino o ciclofosfamida.

12. Un método in vitro para ensayar la eficacia de un inhibidor de señalización de molécula pequeña en el tratamiento de un tumor/cáncer cuando se usa en combinación con naltrexona o un análogo de la misma, que comprende administrar el inhibidor de señalización de molécula pequeña, seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de AKT, taxanos, antimetabolitos, agentes de alquilación e inhibidores del ciclo celular, concurrentemente con y/o después de la naltrexona o el análogo de la misma a las células del tumor/cáncer, y analizar una muestra que comprende una o más de dichas células para determinar si:
- 5 (a) la proteína BAD está regulada positivamente y/o la proteína AKT fosforilada está regulada negativamente,
- (b) la proteína BAD está localizada sustancialmente en las mitocondrias, y/o
- (c) la proteína BAD no está sustancialmente en un estado fosforilado;
- 10 en el que, si lo están, hay una indicación positiva de la eficacia del agente inhibidor de señalización de molécula pequeña.

Figura 1

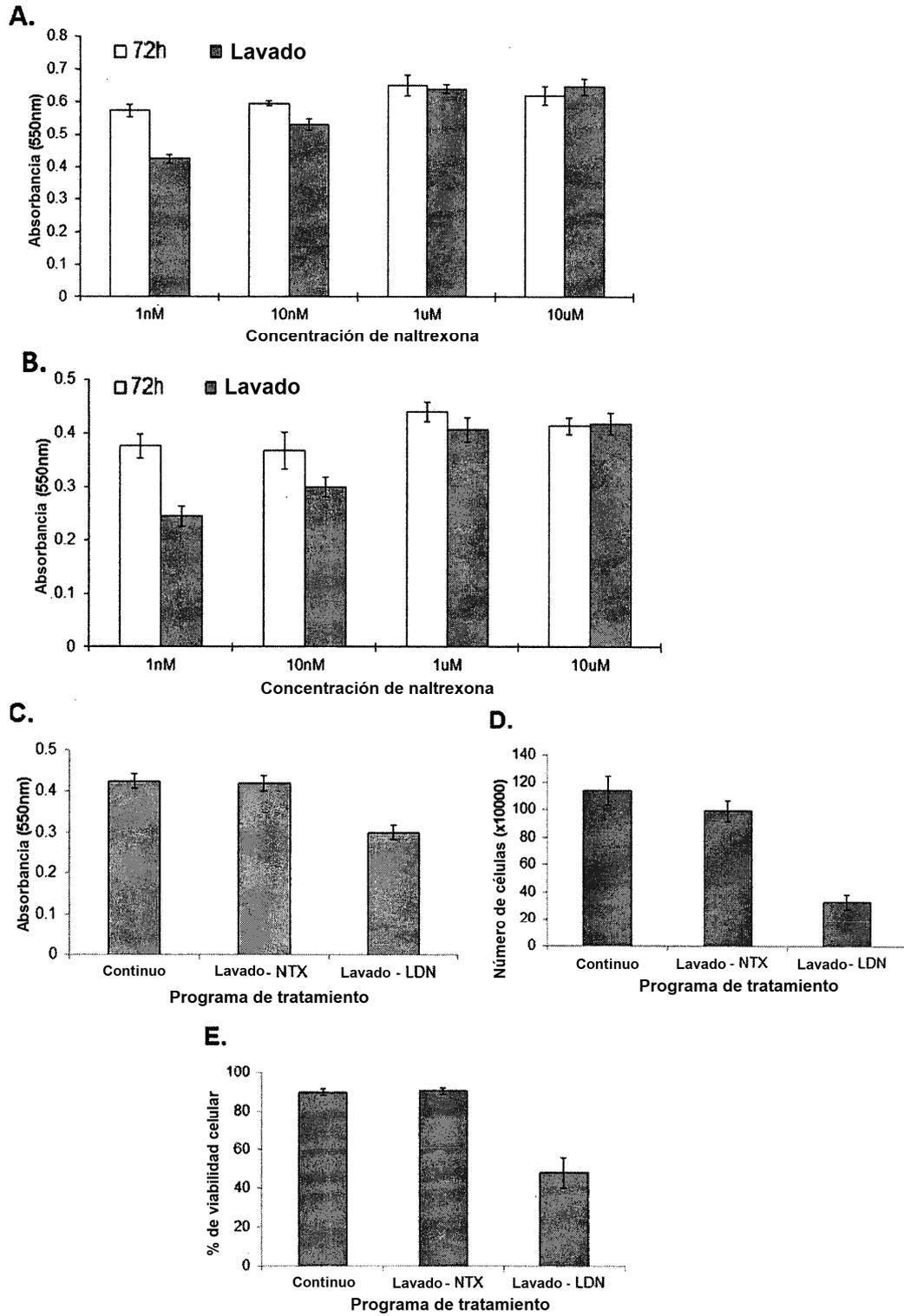


Figura 2

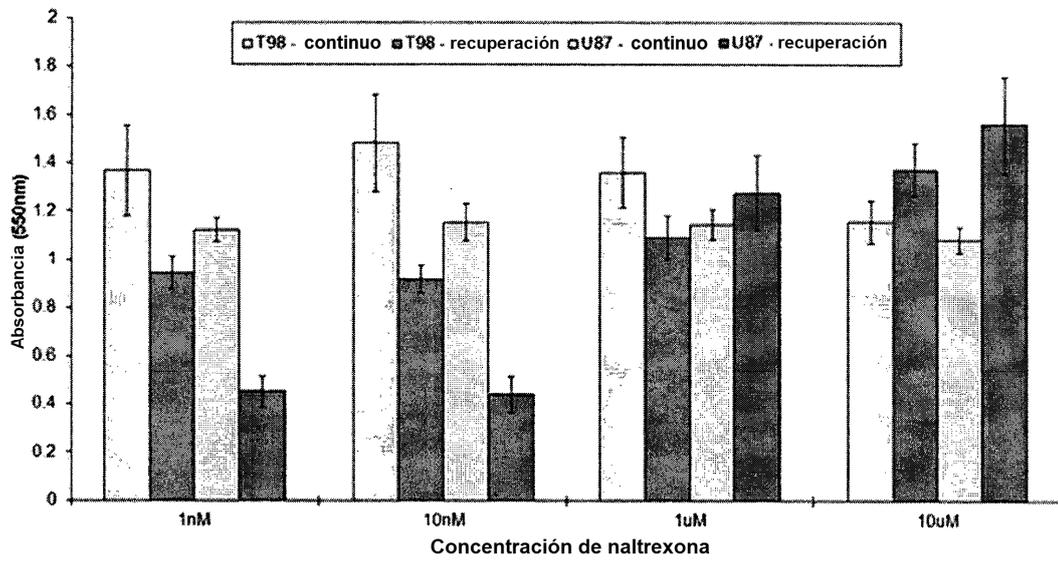


Figura 3

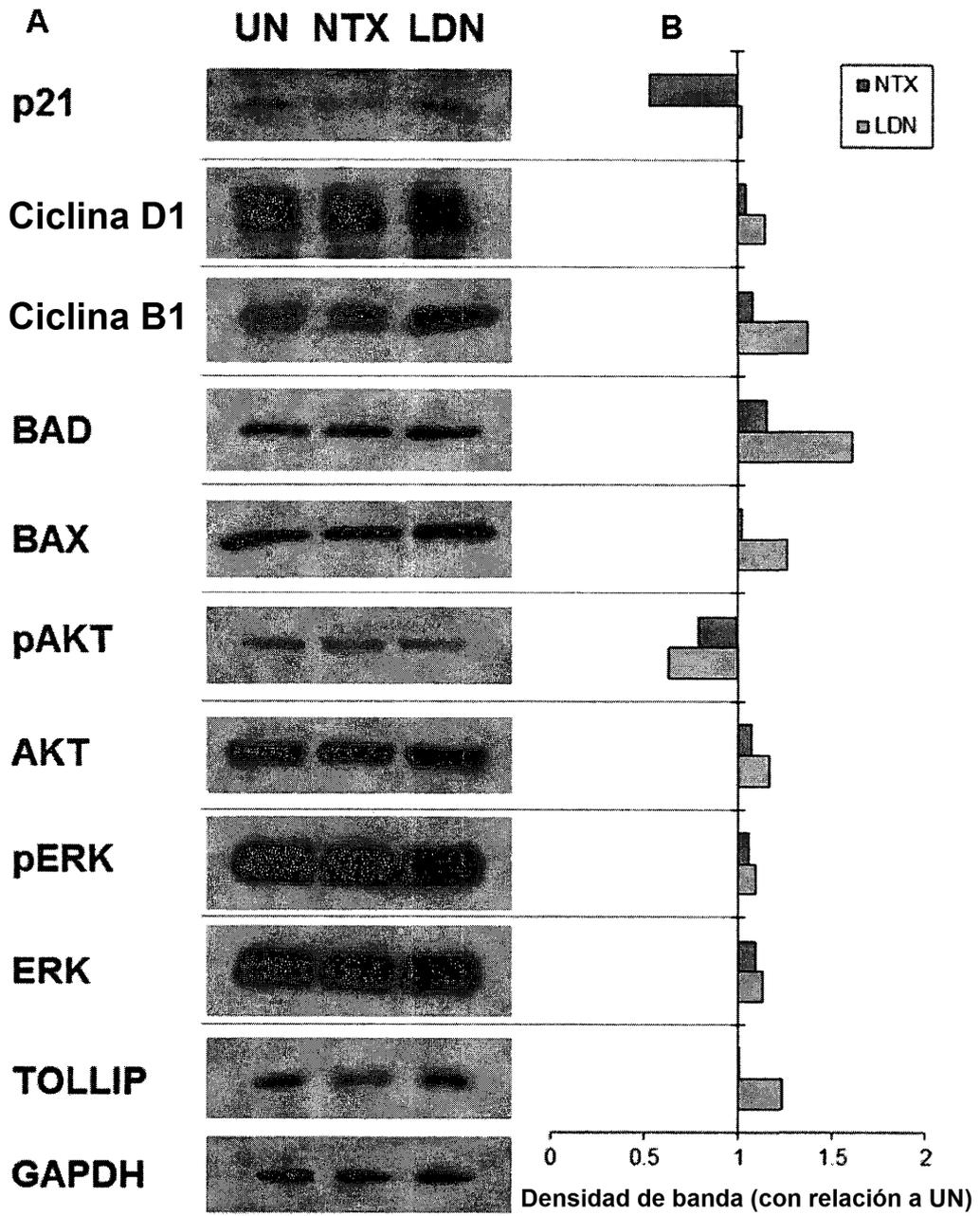
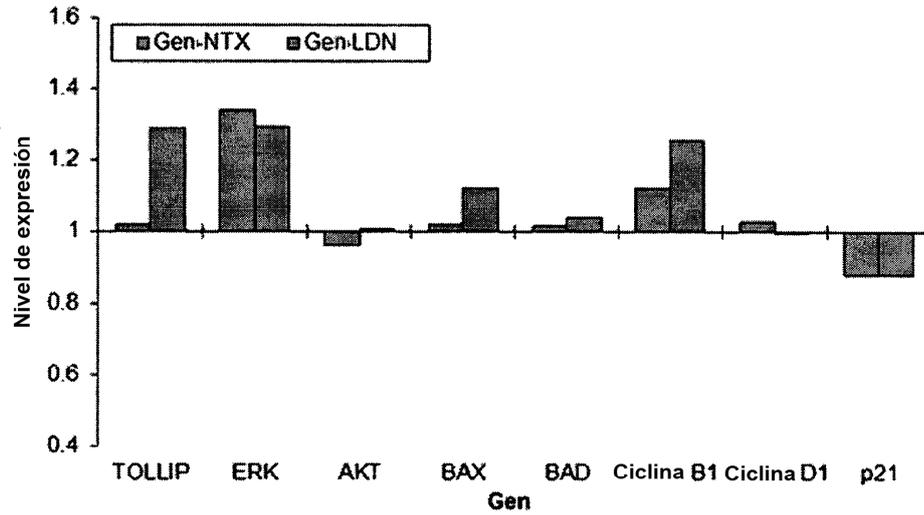


Figura 4

A.



B.

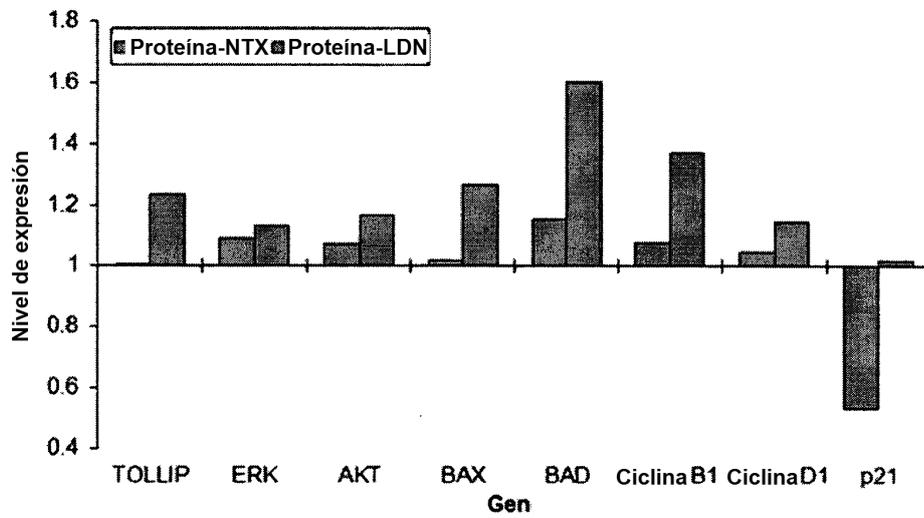
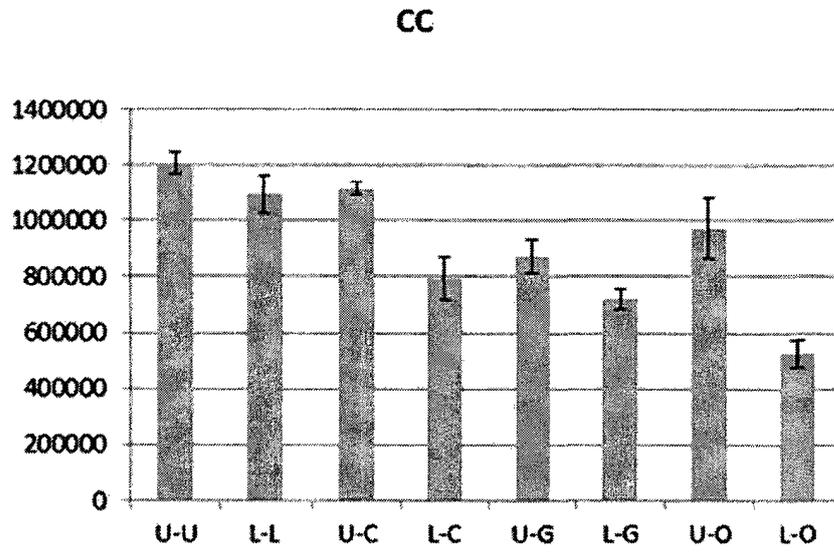


Figura 5

A



B

