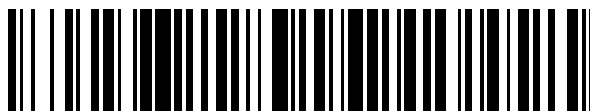


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 223**

51 Int. Cl.:

A61K 31/485 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2012** **E 12007179 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 2716291**

54 Título: **Combinación de opioides y fármacos anticancerosos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

08.10.2012 EP 12006946

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

14.08.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FRIESEN, CLAUDIA y
MILTNER, ERICH**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 779 223 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

Combinación de opioides y fármacos anticancerosos para el tratamiento del cáncer

- 5 La invención se refiere a estrategias novedosas para el tratamiento de pacientes con cáncer basándose en una combinación de un agonista de receptores opioides y un compuesto anticanceroso.

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer puede definirse como un crecimiento anómalo de tejido caracterizado por una pérdida de diferenciación celular. Este término abarca un gran grupo de enfermedades en las que hay una propagación invasiva de células no diferenciadas desde un sitio primario hasta otras partes del organismo en las que se produce replicación celular no diferenciada adicional, que eventualmente interfiere con el funcionamiento normal de tejidos y órganos.

- 15 Los cánceres son principalmente una enfermedad ambiental, atribuyéndose el 90-95% de los casos a factores ambientales y el 5-10% debidos a la genética. Ambiental, tal como se usa por los investigadores del cáncer, significa cualquier causa que no se hereda genéticamente, no simplemente contaminación. Los factores ambientales habituales que contribuyen a la muerte por cáncer incluyen tabaco (25-30%), dieta y obesidad (30-35%), infecciones (15-20%), radiación (tanto ionizante como no ionizante, hasta el 10%), estrés, falta de actividad física y contaminantes ambientales.

Con más de 3 millones de nuevos casos y 1,7 millones de muertes cada año, el cáncer representa la segunda causa de muerte y morbilidad más importante en Europa. A escala mundial, el cáncer representó 7,4 millones de muertes (aproximadamente el 13% del total) en 2004.

- 25 Aunque más del 40% de las muertes por cáncer pueden prevenirse, el cáncer es una causa de muerte principal, provocando el 20% del total en la región europea. De manera apreciable, Europa solo comprende una octava parte de la población mundial total, pero tiene aproximadamente una cuarta parte del total global de casos de cáncer: aproximadamente 3,2 millones de nuevos pacientes al año.

- 30 Las formas más comunes de cáncer fueron de próstata, colorrectal, de mama, leucemia y cáncer de pulmón. El riesgo de presentar cáncer antes de 75 años de edad es del 26,5%, o aproximadamente uno de cada cuatro. Sin embargo, dado que la población de Europa está envejeciendo, también se espera que aumente la tasa de nuevos casos de cáncer.

- 35 Cada cáncer se caracteriza por el sitio, la naturaleza y la causa clínica de proliferación celular no diferenciada, mediante lo cual no se entiende completamente el mecanismo subyacente para el inicio del cáncer.

- 40 El cáncer se trata habitualmente con quimioterapia, radioterapia y cirugía. La quimioterapia como adición a la cirugía ha demostrado ser útil en varios tipos de cáncer diferentes incluyendo: cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, sarcoma osteogénico, cáncer de testículos, cáncer de ovarios y determinados cánceres de pulmón. La radioterapia implica el uso de radiación ionizante en un intento o bien de curar o bien de mejorar los síntomas del cáncer. Se usa en aproximadamente la mitad de todos los casos y la radiación puede proceder o bien de fuentes internas en forma de braquirradioterapia o bien de fuentes externas. La radiación se usa normalmente como adición a la cirugía y/o a la quimioterapia, pero puede usarse sola para determinados tipos de cáncer tales como cáncer de cabeza y cuello temprano. Para metástasis óseas dolorosas se ha encontrado que es eficaz en aproximadamente el 70% de las personas.

- 50 A pesar de las numerosas estrategias terapéuticas todavía hay tumores que no pueden tratarse eficazmente con las opciones de tratamiento actuales. Además, la eficacia de la radioterapia y quimioterapia está limitada con frecuencia por la toxicidad en otros tejidos en el organismo. Además, con frecuencia las terapias anticancerosas son ineficaces debido a la resistencia de las células tumorales a la radioterapia y/o quimioterapia.

- 55 El documento EP 2 149 372 A1 se refiere al uso de agonistas opioides como agentes anticancerosos y da a conocer en el ejemplo 3 que la metadona muestra efectos sinérgicos en combinación con doxorubicina para la inducción de apoptosis en células de glioblastoma cultivadas *in vitro*.

- 60 Por tanto, en oncología hay una gran necesidad de estrategias novedosas que hagan que el tratamiento de los cánceres sea más eficaz. En particular, el objetivo de la presente invención es proporcionar medios novedosos para tratar a pacientes con cáncer.

Sumario de la invención

- 65 Este objetivo se resuelve usando una combinación de agonistas de receptores opioides y fármacos anticancerosos para el tratamiento del cáncer en la que esta combinación se administra en un esquema de administración específico según la reivindicación 1 de la invención.

En un primer aspecto la invención se refiere a una combinación de un agonista de receptores opioideos y al menos un agente anticanceroso para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que

- 5 (a) dicho agonista de receptores opioideos se administra a un paciente en una o más dosis para establecer un nivel en plasma terapéuticamente eficaz durante un periodo de al menos cuatro semanas, y
- (b) al menos un agente anticanceroso seleccionado del grupo que consiste en agentes quimioterápicos, agentes citotóxicos, agentes citostáticos y/o agentes inmunotóxicos se administra para establecer un periodo con un nivel
10 en plasma terapéuticamente eficaz, y
- (c) dichos periodos de a) y b) se solapan.

Esta terapia de combinación se basa en el hallazgo inesperado de que agonistas de receptores opioideos junto
15 con agentes anticancerosos destruyen células cancerosas más eficazmente. Además, los inventores pueden mostrar que la interacción entre agonistas de receptores opioideos y agentes anticancerosos representa un bucle de realimentación de autorrefuerzo tal como se ilustra mediante la figura 26. En el primer trayecto de este bucle los agonistas de receptores opioideos potencian la captación celular e inhiben el flujo de salida de fármacos anticancerosos. En el segundo trayecto de dicho bucle los fármacos anticancerosos que se acumulan conducen a
20 un aumento de la expresión de receptores opioideos en la superficie de la célula cancerosa. Por tanto, tanto el agonista de receptores opioideos como el agente anticanceroso pueden ejercer su potencial citotóxico hasta un grado superior.

Además la invención se basa en el hallazgo inesperado de que la cantidad de receptor opioideo expresado en la
25 superficie celular de células cancerosas es variable entre los diferentes tipos de cáncer y también muestra diferencias entre individuos y que esta expresión de receptores opioideos asociados a la superficie puede aumentarse mediante agentes anticancerosos. Por ejemplo, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, daunorubicina, carboplatino, oxaliplatino, cisplatino, etopósido, metotrexato, citarabina, tenipósido, rituximab fludarabina, pueden inducir un aumento del número de receptores opioideos que se expresan en la superficie celular de células
30 cancerosas. Mediante extensos experimentos *in vitro* e *in vivo*, pudo mostrarse que diferentes tipos de cáncer pueden someterse a la terapia de combinación de la invención. Además, también diferentes fármacos anticancerosos y diferentes opioideos demostraron ser activos en el bucle de realimentación descrito anteriormente.

Por tanto, la terapia de combinación de agonista de receptores opioideos y fármaco anticanceroso según la
35 invención puede mejorar la terapia contra el cáncer de una o más de las siguientes maneras:

- Debido a la regulación por incremento de receptores opioideos, tipos de cáncer anteriormente insensibles a opioideos pueden someterse a una terapia con agonista de receptores opioideos.
- 40 • Debido a la acumulación intracelular inducida por agonista de receptores opioideos (o bien mediante una captación aumentada de fármacos anticancerosos o bien mediante un flujo de salida reducido o una combinación de ambos) de fármacos anticancerosos, se potencia la eficacia del tratamiento.
- Esto puede conducir a la terapia de tipos de cáncer que no pueden tratarse o no pueden tratarse de manera
45 eficaz mediante enfoques anticancerosos terapéuticos convencionales.
- Además, esto puede permitir una reducción de la dosis para los fármacos anticancerosos potenciando la seguridad y el cumplimiento del paciente de la quimioterapia.
- 50 • Finalmente, también pueden volver a sensibilizarse células cancerosas resistentes para un tratamiento anticanceroso.
- Además, los numerosos opioideos y numerosos fármacos anticancerosos en el mercado abren el camino para nuevas combinaciones de fármacos que pueden representar un tratamiento mejorado debido a un aumento de
55 la eficacia y/o seguridad.

En el contexto de la presente invención, el término “agonista de receptores opioideos” se define como un grupo heterogéneo químico de sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas, que trabajan de manera agonista en el mismo tipo de receptor, el denominado receptor opioideo. Según el perfil de efectos secundarios y la analgesia, se conocen cinco tipos de receptores opioideos, el receptor μ (ligando = morfina), el receptor κ [kappa] (ligando = ketazocina), el receptor delta (ligando = deltorfina II), el receptor σ [sigma] (ligando = SKF 10081), así como el receptor ORL1 posteriormente identificado (ligando = nociceptina). De manera correspondiente a otros sistemas de receptores, estudios de unión así como investigaciones funcionales indican que existen subtipos de receptores opioideos. Dentro del tipo receptor μ y δ^I , se han descrito 2 subtipos, μ -1 y μ -2 y δ -1 y δ -2. El receptor κ contiene
60 un subtipo κ -3 adicional. Especialmente con respecto al receptor opioideo μ , en esta invención se incluyen sus dos

subtipos.

El término “agonista de receptores opioideos” tal como se usa en el presente documento comprende agonistas completos así como agonistas/antagonistas mixtos o agonistas parciales tales como buprenorfina.

El grupo de opioides incluye opiáceos naturales tales como alcaloides tales como morfina o dihidrocodeína, así como opiáceos semisintéticos, derivados a partir de los opiáceos naturales (por ejemplo, hidromorfona u oxycodona), u opioides completamente sintéticos, tales como fentanilo o buprenorfina. También incluye péptidos opioides endógenos, que pueden producirse de manera natural en el organismo tales como endorfinas, dinorfinas o encefalinas, pero que también pueden sintetizarse.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fármaco anticanceroso” abarca todas las intervenciones químicas o físicas que se usan para el tratamiento del cáncer. Por tanto, incluye agentes quimioterápicos tales como agentes citotóxicos o agentes inmunotóxicos pero también anticuerpos, péptidos y sustancias químicas marcados de manera radioactiva, que pueden emitir rayos alfa, beta y gamma así como electrones.

El término “nivel en plasma terapéuticamente eficaz” se define como un nivel en plasma que está entre el nivel en plasma del fármaco que provoca un efecto letal y el nivel en plasma mínimo que provoca un efecto terapéutico. En el contexto de la invención, el efecto terapéutico del agonista de receptores opioideos viene dado por el aumento de la captación celular y/o la inhibición del flujo de salida celular del fármaco anticanceroso administrado conjuntamente y/o la inducción de muerte celular, por ejemplo, mediante apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica y autofagia. En el contexto de la invención, el efecto terapéutico del fármaco anticanceroso viene dado por su capacidad para destruir células cancerosas y/o para inducir la expresión de receptores opioideos en las células cancerosas.

Hay dos maneras de analizar los resultados del tratamiento del cáncer. Una manera común es la medición de la muerte celular (datos crecientes significa que hay más células muertas). La otra manera es medir la viabilidad de células (datos decrecientes significa que hay menos células vivas presentes o que han perdido su potencial de proliferación).

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, los términos “tratar”, “que trata” o “tratamiento” se refieren a usar la combinación de la presente invención o cualquier composición que los comprende para prevenir de manera profiláctica un cáncer, o para mitigar, mejorar o detener el cáncer. Abarcan o bien curar o bien cicatrizar así como la mitigación, remisión o prevención, a menos que se mencione explícitamente lo contrario. Además, tal como se usa en el presente documento, el término “paciente” se refiere a un mamífero, incluyendo un ser humano.

Según la invención, el tratamiento se refiere específicamente a la inhibición de la proliferación y/o el crecimiento de células cancerosas. Esta actividad puede incluir, por ejemplo, actividad citostática o citotóxica así como detener el crecimiento de células y/o tumores. La proliferación de células cancerosas es el resultado de la inhibición de la división celular. En particular, los agonistas de receptores opioideos inducen la muerte celular en tumores. La muerte celular en el contexto de la invención incluye todos los tipos de muerte celular. Esto puede incluir muerte celular necrótica así como apoptótica o autofagia. En una realización de la invención la muerte celular se induce mediante la activación de la ruta dependiente de caspasas o independiente de caspasas. Sin embargo, los agonistas de receptores opioideos pueden inducir muerte celular mediante diversas rutas. En una realización preferida de la invención, los agonistas de receptores opioideos inducen la apoptosis en células cancerosas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cáncer”, que se usa como sinónimo del término “neoplasia”, se refiere a enfermedades en las que células anómalas se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden propagarse a otras partes del organismo a través de los sistemas sanguíneo y linfático.

- Los términos “terapia convencional” y “régimen de terapia convencional” en el contexto de la presente invención se definen como los programas de tratamiento (con respecto a la dosis, tiempo de repetición y duración) que se recomiendan como directrices terapéuticas de asociaciones, federaciones tales como Deutsche Krebshilfe, Deutsche Krebsgesellschaft, National Cancer Institute (NCI), National Comprehensive Cancer Network (NCCN) y organizaciones sobre el cáncer o la salud respectivas que pueden ser organizaciones privadas, no gubernamentales o federales. Esto también incluye los programas de tratamiento para un agente anticanceroso (preferiblemente individual) tal como se recomiendan por el fabricante o distribuidor del agente anticanceroso que se dan a conocer en los prospectos respectivos de los agentes anticancerosos.

El término “tiempo de terapia convencional” en el contexto de la presente invención se define como el tiempo en una terapia convencional en el que se aplica un agente anticanceroso a un paciente sin un agonista de receptores opioideos según la invención. El tiempo de terapia comienza con la primera aplicación del agente anticanceroso y puede incluir periodos de repetición que son específicos para el cáncer y el agente anticanceroso (por ejemplo, la aplicación de una dosis dos veces al día durante una semana, después una pausa de tres semanas y después aplicación de nuevo de una dosis dos veces al día durante una semana seguido por una pausa de tres semanas), hasta el punto en el tiempo en el que el agente anticanceroso está por debajo del nivel en plasma terapéutico del

paciente.

El cáncer y sus diferentes tipos en el contexto de la presente invención pueden clasificarse mediante la norma ICD-O que es una clasificación especializada de las clases C00-C97 y D00-D36 de la norma ICD-10. Alternativamente, puede usarse la clasificación de Boecker *et al.* 2008 en el capítulo 6 (Pathologie, Elsevier, Urban & Fischer, págs. 167-218).

En una realización adicional de la invención dicho agonista de receptores opioideos puede inhibir la proliferación celular.

En una realización de la invención dicho agente anticanceroso y dicho agonista de receptores opioideos se administran de manera simultánea o sucesiva.

En una realización preferida de la invención los periodos de los niveles en plasma terapéuticamente eficaces del agonista de receptores opioideos y el agente anticanceroso, respectivamente, se solapan de manera predominante.

En una realización adicionalmente preferida de la invención el periodo de los niveles en plasma terapéuticamente eficaces del agente anticanceroso está completamente dentro del periodo respectivo del agonista de receptores opioideos.

Cuando se administran dos o más agentes anticancerosos, el periodo respectivo durante el cual se reivindica un solapamiento parcial, predominante o completo, viene dado por los periodos combinados de los dos o más agentes anticancerosos.

En una realización adicional de la invención el agonista de receptores opioideos se administra de una manera que el paciente desarrolla una habituación contra dicho agonista de receptores opioideos. Por tanto, es preferible esperar con el tratamiento anticanceroso hasta que haya comenzado el periodo de habituación o incluso haya alcanzado una meseta. La habituación puede ser un resultado de eficacia de fármaco reducida y/o una reducción de efectos secundarios tales como depresión respiratoria. Los efectos secundarios de agonista de receptores opioideos son hipotensión, depresión respiratoria, vómitos, estreñimiento, mareo, sedación, euforia y efectos cardiacos. Estos efectos secundarios han de tenerse en cuenta para determinar el esquema de terapia con el agonista de receptores opioideos y el agente contra el cáncer. Esto significa que el agonista de receptores opioideos se administra a una dosis inicial a un nivel muy bajo, es decir, del 1% de la dosis terapéutica, y después se aumenta la dosis dependiendo de las directrices del agonista de receptores opioideos conocidas por un experto y publicadas por el fabricante o distribuidor del agonista de receptores opioideos en un tiempo adecuado hasta el nivel terapéutico que se requiere para la combinación de agente anticanceroso y agonista de receptores opioideos.

En una realización preferida de la invención, el régimen de administración y, por tanto, el periodo dentro de un nivel en plasma terapéuticamente eficaz del agente anticanceroso se define mediante el régimen de terapia convencional.

En un aspecto adicional de la invención, el paciente tratado con la combinación según la invención ha recibido un tratamiento previo que comprende un agente anticanceroso.

En una realización más preferida, el tratamiento previo con el agente anticanceroso se ha interrumpido o incluso terminado.

En una realización adicionalmente preferida, el tratamiento previo se ha terminado debido a la resistencia contra el tratamiento anticanceroso.

En una realización preferida de la invención el periodo con un nivel en plasma terapéuticamente eficaz del agente anticanceroso dura durante al menos 1 día, preferiblemente 3 días y más preferiblemente durante al menos 5 días.

Según la invención, el periodo con un nivel en plasma terapéuticamente eficaz para el agonista de receptores opioideos es de al menos cuatro semanas y preferiblemente representa un tratamiento crónico.

Dentro del contexto de la presente invención, el término "tratamiento crónico" se define como un tratamiento con agonista de receptores opioideos con un periodo de administración por encima de cuatro semanas, que dura preferiblemente a lo largo de varios meses. En una realización adicional, este tratamiento crónico difiere del régimen de terapia convencional tal como se recomienda o conoce el experto en la técnica o se publica en directrices terapéuticas de asociaciones o federaciones tales como Deutsche Krebshilfe o Deutsche Krebsgesellschaft; NCCN, NCI u organizaciones sobre el cáncer o la salud similares o las directrices del productor o distribuidor de fármacos que se usan para el tratamiento del cáncer.

Dentro del contexto de la presente invención, el uso de al menos un agente anticanceroso se refiere al uso de uno

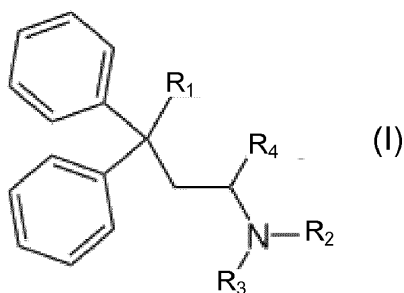
o más agentes anticancerosos que van a administrarse en combinación con el agonista de receptores opioideos según la invención. Por tanto, la combinación incluye el uso de uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso más agentes anticancerosos.

Generalmente, se conoce que puede inducirse apoptosis mediante dos rutas bioquímicas principales. La "ruta de receptores de muerte" (o ruta extrínseca) incluye el modelo inducido por receptor de TNF (factor de necrosis tumoral) y el modelo inducido por receptor de Fas (el receptor de Fas también se conoce como Apo-1 o CD95). Las uniones a estos receptores dan como resultado la formación de rutas de señalización que inducen la muerte en la célula, incluyendo la activación de caspasa 8. La "ruta mitocondrial" (o ruta intrínseca) implica la liberación de citocromo c a partir de mitocondrias, la unión de Apaf-1 y la activación de procaspasa 9. Se sabe que varios reguladores activan o desactivan las rutas de apoptosis, tales como las proteínas proapoptóticas Bax y Bak o las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-XL o XIAP.

En una realización de la invención, los agonistas de receptores opioideos inducen la apoptosis mediante escisión de caspasa 3 y poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en la célula tumoral y/o la escisión de caspasa 9 y la regulación por disminución de proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP) y/o la regulación por disminución de la proteína extragrande de linfoma de células B (BCL-XL).

Según una realización preferida de la invención, el agonista de receptores opioideos es un miembro del grupo de metadona, que comprende D-/L-metadona, levometadona, levacetilmetadol y piritramida.

En el contexto de la presente invención, el término "grupo de metadona" se refiere a opioideos que son derivados de 3,3-difenilpropilamina. Estos compuestos presentan la estructura central de 3,3-difenilamina tal como se muestra mediante la siguiente fórmula (I):



en la que R₁ es una cetona alifática, un residuo de 3-acetoxipropilo, un grupo ciano o una 1-pirrolidino-metil cetona, -(C=O)C₂H₅, R₂ y R₃ son CH₃ o juntos forman un heterociclo, preferiblemente un grupo morfolino, y R₄ es H o un residuo de alquilo, siendo preferiblemente CH₃.

Una lista no limitada de ejemplos para compuestos del grupo de metadona incluye metadona, normetadona, dextromoramida, isometadona, acetilmetadol, alfa-cetilmetadol, levoacetilmetadol, premetadona, racemoramida, fenadoxona, dextropropoxifeno, dipipanona, bencitramida, piritramida, loperamida, temalon (que representa una 3,3-ditiofenilpropilamina) y levomoramida.

Todos estos opioideos pueden usarse como sales. La forma racémica de D-/L-metadona se proporciona preferiblemente en forma de un clorhidrato. En una realización preferida de la invención, el opioide metadona induce la apoptosis en células cancerosas mediante la ruta mitocondrial.

En una realización de la invención el agonista de receptores opioideos se selecciona de la lista que consiste en compuestos del grupo de metadona tales como D-/L-metadona, D-metadona, L-metadona, normetadona, derivados de fentanilo tales como fentanilo, sufentanilo, lofentanilo, alfentanilo, remifentanilo, ohmefentanilo y carfentanilo; compuestos de morfinano tales como morfina, codeína, heroína, dextralorfanol, dextrometorfanol, dextrofanol, dimetorfanol, levorfanol, butorfanol, levofuretilnormorfanol, levometorfanol, levofenacilmorfanol, levorfanol, metorfanol, morfanol, oxilorfanol, fenomorfanol y xorfanol, derivados de benzomorfanol tales como 5,9-DEHB, alazocina, anazocina, bremazocina, butinazocina, carbazocina, cogazocina, ciclazocina, dezocina, eptazocina, etazocina, etilcetociclazocina, fluorofeno, gemazocina, ibazocina, ketazocina, cetociclazocina, metazocina, moxazocina, pentazocina, fenazocina, quadazocina, tiazocina, tonazocina, volazocina y 8-CAC; opioideos endógenos tales como endorfinas (que pueden ser alfa, beta, gamma o delta-endorfinas), encefalinas tales como Met-enkefalina, Leu-enkefalina y metorfamida, dinorfinas tales como dinorfina A, dinorfina B o alfa-neoendorfina, nociceptina, dermorfinas, morficeptina, beta-caomorfina-5, DALAMID, DADLE, DADL, DSLT, DSLET, DTLET, DAGO, DAMGO, DALCE, DAMME, DALDA, DPDPE, FK 33-824, [D-Met2,Pro5]encefalina-amida, bifalina, y endomorfinas tales como endomorfina 1 y endomorfina 2; además todos los fragmentos derivados de la proteína proopiomelanocortina (POMC) tales como beta-lipotropina, beta-LPH-[61-64], beta-LPH-[61-65]-NH₂, (Met(O)65)-beta-LPH-[61-65], beta-LPH-[61-69] y beta-LPH-[61-69]; derivados de 4-fenilpiperidina tales como petidina,

cetobemidona, anileridina, piminodina, fenoperidina, furetidina, alfa-prodina, trimeperidina, incluyendo derivados de 4-fenilpirrolidina tales como profadol y derivados de 4-fenilazepan tales como meptazinol; derivados de ciclohexano tales como tilidina, U-50488, tramadol y tapentadol.

- 5 En una realización preferida de la invención, los agonistas de receptores opioideos de la invención pueden inhibir la proliferación celular.

En una realización preferida, la metadona, preferiblemente la D,L-metadona y lo más preferiblemente la forma de clorhidrato de D,L-metadona, se administra al paciente en particular para proporcionar un nivel en plasma que es de entre 0,05 µg/ml y 3 µg/ml.

En una realización de la invención el agente anticanceroso se selecciona de la lista que consiste en sustancias de intercalación tales como antraciclina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina y daunorubicina; inhibidores de la topoisomerasa tales como irinotecán, topotecán, camptotecina, lamelarina D, etopósido, tenipósido, mitoxantrona, amsacrina, elipticinas y ácido aurintricarboxílico; compuestos de nitrosourea tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), estreptozocina; mostazas nitrogenadas tales como ciclofosfamida, mecloretamina, uramustina, bendamustina, melfalán, clorambucilo, mafosfamida, trofosfamida e ifosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfano y treosulfano; agentes alquilantes tales como procarbazona, dacarbazina, temozolomida y tiotepa; análogos de platino tales como cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino y tetranitrato de triplatino; fármacos disruptores de microtúbulos tales como vinblastina, colcemida y nocodazol; antifolatos tales como metotrexato, aminopterina, diclorometotrexato, pemetrexed, raltitrexed y pralatrexato; análogos de purina tales como azatioprina, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, fosfato de fludarabina, pentostatina y cladribina; análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-azauracilo, gemcitabina; hormonas esteroideas tales como gestágeno, andrógeno, glucocorticoides, dexametasona, prednisolona y prednisona; péptidos anticancerosos incluyendo péptidos marcados de manera radiactiva y conjugados de péptido-fármaco; anticuerpos anticancerosos incluyendo anticuerpos marcados de manera radiactiva y conjugados de anticuerpo-fármaco tales como bevacizumab, cetuximab, panitumumab, rituximab, ipilimumab, alemtuzumab, ofatumumab, gemtuzumab-ozogamicina, brentuximab-vedotina, ⁹⁰Y-ibritumomab-tiuxetán, ¹³¹I-tositumomab o trastuzumab. Los agentes anticancerosos indicados anteriormente también comprenden modificaciones tales como pegilación y formulaciones tales como el uso de liposomas (es decir, doxorubicina liposomal pegilada).

En una realización adicional el agente anticanceroso puede ser un compuesto químico, péptido, proteína o anticuerpo monoclonal marcado de manera radiactiva, en el que la etiqueta radiactiva puede emitir rayos alfa, beta o gamma y también partículas ionizantes.

En una realización preferida de la invención, el agente anticanceroso es metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, etopósido, vincristina, fludarabina especialmente cisplatino, doxorubicina, antraciclina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina o irradiación alfa, beta o gamma.

40 Cuando se trata una entidad cancerosa para la que se desea una inducción del receptor opioideo, preferiblemente se trata al paciente con un agente anticanceroso seleccionado del grupo que consiste en doxorubicina, idarubicina, epirubicina, daunorubicina, carboplatino, oxaliplatino, cisplatino, etopósido, metotrexato, citarabina, tenipósido, rituximab.

45 En una realización de la invención, el paciente que se trata con la combinación de la invención padece una neoplasia tal como se clasifica según la clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud, 10ª revisión (ICD-10), en la que la neoplasia es del grupo que consiste en neoplasias malignas de las clases C00 a C97, neoplasias *in situ* de las clases D00 a D09, neoplasias benignas de las clases D10 a D36 y neoplasias de comportamiento incierto o desconocido de las clases D37 a D48.

50 Las clases se definen de la siguiente manera: (C00) neoplasia maligna del labio, (C01) neoplasia maligna de la base de la lengua, (C02) neoplasia maligna de otras partes y de partes no especificadas de la lengua, (C03) neoplasia maligna de la encía, (C04) neoplasia maligna de la base de la boca, (C05) neoplasia maligna del paladar, (C06) neoplasia maligna de otras partes y de partes no especificadas de la boca, (C07) neoplasia maligna de la glándula parótida, (C08) neoplasia maligna de otras glándulas y de glándulas no especificadas salivares principales, (C09) neoplasia maligna de la amígdala, (C10) neoplasia maligna de la orofaringe, (C11) neoplasia maligna de la nasofaringe, (C12) neoplasia maligna del seno piriforme, (C13) neoplasia maligna de la hipofaringe, (C14) neoplasia maligna de otros sitios y de sitios mal definidos en el labio, la cavidad bucal y la faringe, (C15) neoplasia maligna del esófago, (C16) neoplasia maligna del estómago, (C17) neoplasias malignas del intestino delgado, (C18) neoplasia maligna del colon, (C19) neoplasia maligna de la unión rectosigmoidea, (C20) neoplasia maligna del recto, (C21) neoplasias malignas del ano y del canal anal, (C22) neoplasias malignas del hígado y de los conductos biliares intrahepáticos, (C23) neoplasia maligna de la vesícula biliar, (C24) neoplasia maligna de otras partes y de partes no especificadas del conducto biliar, (C25) neoplasia maligna del páncreas, (C26) neoplasias malignas de otros órganos digestivos y órganos digestivos mal definidos, (C30) neoplasia maligna de la cavidad nasal y del oído medio, (C31) neoplasia maligna de los senos paranasales, (C32) neoplasia maligna de la laringe, (C33) neoplasia maligna de la tráquea, (C34) neoplasia maligna de los bronquios y del pulmón, (C37)

neoplasia maligna del timo, (C38) neoplasia maligna del corazón, el mediastino y de la pleura, (C39) neoplasias malignas de otros sitios y de sitios mal definidos en el sistema respiratorio y los órganos intratorácicos, (C40-C41) neoplasias malignas de hueso y cartílago articular, (C43) melanoma maligno de la piel, (C44) otras neoplasias malignas de la piel, (C45) mesotelioma, (C46) sarcoma de Kaposi, (C47) neoplasia maligna de nervios periféricos y del sistema nervioso autónomo, (C48) neoplasia maligna del retroperitoneo y del peritoneo, (C49) neoplasia maligna de otro tejido blando y conjuntivo, (C50) neoplasia maligna de la mama, (C51) neoplasia maligna de la vulva, (C52) neoplasia maligna de la vagina, (C53) neoplasia maligna del cuello uterino, (C54) neoplasia maligna de cuerpo uterino, (C55) neoplasia maligna del útero, parte no especificada, (C56) neoplasia maligna de los ovarios, (C57) neoplasias malignas de otros órganos y órganos no especificados genitales y femeninos, (C58) neoplasia maligna de la placenta, (C60) neoplasia maligna del pene, (C61) neoplasia maligna de la próstata, (C62) neoplasia maligna de los testículos, (C63) neoplasia maligna de otros órganos y órganos no especificados genitales masculinos, (C64) neoplasia maligna del riñón, excepto la pelvis renal, (C65) neoplasia maligna de la pelvis renal, (C66) neoplasia maligna del uréter, (C67) neoplasia maligna de la vejiga, (C68) neoplasia maligna de otros órganos urinarios y órganos urinarios no especificados, (C69) neoplasias malignas del ojo y anejos, (C70) neoplasia maligna de la meninge, (C71) neoplasia maligna del cerebro, (C72) neoplasia maligna de la médula espinal, nervios craneales y otras partes del sistema nervioso central, (C73) neoplasia maligna de la glándula tiroidea, (C74) neoplasia maligna de la glándula suprarrenal, (C75) neoplasia maligna de otras glándulas endocrinas y estructuras relacionadas, (C76) neoplasia maligna de otros sitios y de sitios mal definidos, (C77) neoplasia maligna secundaria y no especificada de ganglios linfáticos, (C78) neoplasia maligna secundaria de órganos respiratorios y digestivos, (C79) neoplasia maligna secundaria de otros sitios, (C80) neoplasia maligna sin especificación de sitio, (C81) enfermedad de Hodgkin, (C82) linfoma no Hodgkin folicular (nodular), (C83) linfoma no Hodgkin difuso, (C84) linfomas de células T periféricas y cutáneas, (C85) otros tipos y tipos no especificados de linfoma no Hodgkin, (C88) enfermedades inmunoproliferativas malignas, (C90) mieloma múltiple y neoplasias de células plasmáticas malignas, (C91) leucemia linfoide, (C92) leucemia mieloide, (C93) leucemia monocítica, (C94) otras leucemias de tipo celular especificado, (C95) leucemia de tipo celular no especificado, (C96) otras neoplasias malignas y neoplasias malignas no especificadas de tejido linfoide, hematopoyético y relacionado, (C97) neoplasias malignas de múltiples sitios independientes (primarios), (D00) carcinoma *in situ* de la cavidad bucal, del esófago y del estómago, (D01) carcinoma *in situ* de otros órganos digestivos y órganos digestivos no especificados, (D02) carcinoma *in situ* del oído medio y del sistema respiratorio, (D03) melanoma *in situ*, (D04) carcinoma *in situ* de la piel, (D05) carcinoma *in situ* de mama, (D06) carcinoma *in situ* del cuello uterino, (D07) carcinoma *in situ* de otros órganos genitales y órganos genitales no especificados, (D09) carcinoma *in situ* de otros sitios y sitios no especificados, (D10) neoplasia benigna de la boca y la faringe, (D11) neoplasia benigna de glándulas salivares principales, (D12) neoplasia benigna del colon, recto, ano y canal anal, (D13) neoplasia benigna de otras partes y partes mal definidas del sistema digestivo, (D14) neoplasia benigna del oído medio y del sistema respiratorio, (D15) neoplasia benigna de otros órganos intratorácicos y órganos intratorácicos no especificados, (D16) neoplasia benigna del hueso y el cartílago articular, (D17) neoplasia lipomatosa benigna, (D18) hemangioma y linfangioma, cualquier sitio, (D19) neoplasia benigna del tejido mesotelial, (D20) neoplasia benigna del tejido blando del retroperitoneo y del peritoneo, (D21) otras neoplasias benignas del tejido conjuntivo y otro tejido blando, (D22) nevos melanocíticos, (D23) otras neoplasias benignas de la piel, (D24) neoplasia benigna de mama, (D25) leiomioma del útero, (D26) otras neoplasias benignas del útero, (D27) neoplasia benigna de ovarios, (D28) neoplasia benigna de otros órganos y órganos no especificados genitales femeninos, (D29) neoplasia benigna de órganos genitales masculinos, (D30) neoplasia benigna de órganos urinarios, (D31) neoplasia benigna del ojo y anejos, (D32) neoplasia benigna de la meninge, (D33) neoplasia benigna del cerebro y otras partes del sistema nervioso central, (D34) neoplasia benigna de la glándula tiroidea, (D35) neoplasia benigna de otras glándulas endocrinas y glándulas endocrinas no especificadas, (D36) neoplasia benigna de otros sitios y sitios no especificados, (D37) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido de la cavidad bucal y órganos digestivos, (D38) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido del oído medio y de órganos respiratorios e intratorácicos, (D39) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido de órganos genitales femeninos, (D40) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido de órganos genitales masculinos, (D41) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido de órganos urinarios, (D42) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido de la meninge, (D43) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido del cerebro y del sistema nervioso central, (D44) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido de glándulas endocrinas, (D45) policitemia vera, (D46) síndromes mielodisplásicos, (D47) otras neoplasias de comportamiento incierto o desconocido de tejido linfoide, hematopoyético y relacionado, (D48) neoplasia de comportamiento incierto o desconocido de otros sitios y sitios no especificados.

En una realización específica de la invención, el paciente que se trata con la combinación de la invención padece metástasis.

En una realización preferida de la invención, el paciente que se trata con la combinación de la invención padece una neoplasia seleccionada de lista de las clases que consisten en C25, C50, C56, C71, C91 y C92.

En una realización más preferida, el paciente padece una neoplasia seleccionada de la lista que comprende leucemia linfoblástica aguda (CD91.0), leucemia linfática crónica de células B (CD 91.2), leucemia promielocítica aguda (CD92.4), todas las formas de glioblastoma (CD71), todas las formas de cáncer pancreático (CD25), todas las formas de cáncer de ovarios (CD56), clases de cáncer de mama (CD50) y células madre tumorales tales como

células madre que inician glioblastoma.

En una realización preferida, el paciente que padece leucemia linfoblástica aguda (CD91.0) se trata con la combinación según la invención que incluye un agente anticanceroso seleccionado de la lista que consiste en metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, fludarabina, siendo preferiblemente cisplatino, antraciclina doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina, etopósido.

En una realización adicionalmente preferida, el paciente que padece leucemia linfoblástica aguda (CD91.0) se trata con la combinación según la invención que incluye un agonista de receptores opioideos seleccionado de la lista que consiste en D,L-metadona, buprenorfina, fentanilo y morfina, siendo preferiblemente D,L-morfina.

En una realización incluso más preferida de la invención, la realización el paciente que padece leucemia linfoblástica aguda (CD91.0) se trata con la combinación que comprende D,L-metadona y etopósido o D,L-metadona y doxorubicina.

En una realización preferida, el paciente que padece leucemia linfática crónica de células B (CD91.2) se trata con la combinación según la invención que incluye un agente anticanceroso seleccionado de la lista que consiste en metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, fludarabina, siendo preferiblemente cisplatino, antraciclina doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina, etopósido.

En una realización adicionalmente preferida, el paciente que padece leucemia linfática crónica de células B (CD91.2) se trata con la combinación según la invención que incluye un agonista de receptores opioideos seleccionado de la lista que consiste en D,L-metadona, buprenorfina, fentanilo y morfina, siendo preferiblemente D,L-metadona.

En una realización incluso más preferida de la invención, la realización el paciente que padece leucemia linfática crónica de células B (CD91.2) se trata con la combinación que comprende D,L-metadona y fludarabina, o buprenorfina y doxorubicina o fentanilo y doxorubicina o morfina y doxorubicina.

En una realización preferida, el paciente que padece leucemia promielocítica aguda (CD92.4) se trata con la combinación según la invención que incluye un agente anticanceroso seleccionado de la lista que consiste en metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, fludarabina, siendo preferiblemente cisplatino, antraciclina doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina, etopósido.

En una realización adicionalmente preferida, el paciente que padece leucemia promielocítica aguda (CD92.4) se trata con la combinación según la invención que incluye un agonista de receptores opioideos seleccionado de la lista que consiste en D,L-metadona, buprenorfina, fentanilo y morfina, siendo preferiblemente D,L-metadona.

En una realización incluso más preferida de la invención, la realización el paciente que padece leucemia promielocítica aguda (CD92.4) se trata con la combinación que comprende D,L-metadona y doxorubicina o buprenorfina y doxorubicina o fentanilo y doxorubicina o morfina y doxorubicina.

En una realización preferida, el paciente que padece glioblastoma (CD71) se trata con la combinación según la invención que incluye un agente anticanceroso seleccionado de la lista que consiste en metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, fludarabina, siendo preferiblemente cisplatino, antraciclina doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina, etopósido.

En una realización adicionalmente preferida, el paciente que padece glioblastoma (CD71) se trata con la combinación según la invención que incluye un agonista de receptores opioideos seleccionado de la lista que consiste en D,L-metadona, buprenorfina, fentanilo y morfina, siendo preferiblemente D,L-metadona.

En una realización incluso más preferida de la invención, la realización el paciente que padece glioblastoma (CD71) se trata con la combinación que comprende D,L-metadona y doxorubicina.

En una realización preferida, el paciente que padece células madre que inician glioblastoma se trata con la combinación según la invención que incluye un agente anticanceroso seleccionado de la lista que consiste en metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, fludarabina, siendo preferiblemente cisplatino, antraciclina doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina, etopósido.

En una realización adicionalmente preferida, el paciente que padece células madre que inician glioblastoma se trata con la combinación según la invención que incluye un agonista de receptores opioideos seleccionado de la lista que consiste en D,L-metadona, buprenorfina, fentanilo y morfina, siendo preferiblemente D,L-metadona.

En una realización incluso más preferida de la invención, la realización el paciente que padece células madre que inician glioblastoma se trata con la combinación que comprende D,L-metadona y doxorubicina.

En una realización preferida, el paciente que padece cáncer pancreático (CD25) se trata con la combinación según la invención que incluye un agente anticanceroso seleccionado de la lista que consiste en metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, fludarabina, siendo preferiblemente cisplatino, antraciclina doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina, etopósido.

5

En una realización adicionalmente preferida, el paciente que padece cáncer pancreático (CD25) se trata con la combinación según la invención que incluye un agonista de receptores opioideos seleccionado de la lista que consiste en D,L-metadona, buprenorfina, fentanilo y morfina, siendo preferiblemente D,L-metadona.

10 En una realización incluso más preferida de la invención, la realización el paciente que padece cáncer pancreático (CD25) se trata con la combinación que comprende D,L-metadona y cisplatino.

En una realización preferida, el paciente que padece cáncer de ovarios (CD56) se trata con la combinación según la invención que incluye un agente anticanceroso seleccionado de la lista que consiste en metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, fludarabina, siendo preferiblemente cisplatino, antraciclina doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina, etopósido.

15

En una realización adicionalmente preferida, el paciente que padece cáncer de ovarios (CD56) se trata con la combinación según la invención que incluye un agonista de receptores opioideos seleccionado de la lista que consiste en D,L-metadona, buprenorfina, fentanilo y morfina, siendo preferiblemente D,L-metadona.

20

En una realización incluso más preferida de la invención, la realización el paciente que padece cáncer de ovarios (CD56) se trata con la combinación que comprende D,L-metadona y cisplatino.

25 En una realización preferida, el paciente que padece cáncer de mama (CD50) se trata con la combinación según la invención que incluye un agente anticanceroso seleccionado de la lista que consiste en metotrexato, citarabina, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, fludarabina, siendo preferiblemente cisplatino, antraciclina doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, epirubicina, etopósido.

30 En una realización adicionalmente preferida, el paciente que padece cáncer de mama (CD50) se trata con la combinación según la invención que incluye un agonista de receptores opioideos seleccionado de la lista que consiste en D,L-metadona, buprenorfina, fentanilo y morfina, siendo preferiblemente D,L-metadona.

35 En una realización incluso más preferida de la invención, la realización el paciente que padece cáncer de mama (CD50) se trata con la combinación que comprende D,L-metadona y cisplatino.

En otra realización, el cáncer que va a tratarse es una neoplasia según la clasificación internacional de enfermedades para oncología ICD-O en la versión actual ICD-O-3 del 2000. Alternativamente, el cáncer que va a tratarse es un cáncer tal como se incluye en la clasificación de tumores malignos de TNM (TNM), que representa un sistema de estadificación del cáncer que describe la extensión del cáncer en el cuerpo de un paciente. En una alternativa adicional, el cáncer que va a tratarse se da a conocer por Boecker *et al.*, 2008 en el capítulo 6 (Pathologie, Elsevier, Urban & Fischer, págs. 167-218).

40

En una realización preferida de la invención, el paciente que se trata con dicha combinación padece tumores no sólidos del grupo que consiste en leucemia, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de huesos, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de la laringe, vesícula biliar, páncreas, recto, paratiroides, tiroideo, suprarrenal, tejido neuronal, cabeza y cuello, colon, estómago, bronquios, riñones, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas de tipo tanto ulcerante como papilar, carcinoma de piel metastásico, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células del retículo, mieloma, tumor de células gigantes, tumor de pulmón de células pequeñas, tumor de células del islote, tumor de cerebro primario, tumores granulocíticos y linfocíticos crónicos y agudos, tumor de células pilosas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuromas mucosos, ganglioneuromas intestinales, tumor de nervio corneal hiperplásico, tumor de hábito marfanoide, tumor de Wilms, seminoma, tumor de ovarios, leiomiomata, displasia de cuello uterino y carcinoma *in situ*, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tejido blando, carcinoide maligno, lesión de piel tópica, micosis fungoide, rabdomiosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, hipercalcemia maligna, tumor de células renales, policitemia vera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, leucemia, linfomas, melanomas malignos y carcinomas epidermoides.

45

50

55

En una realización adicionalmente preferida de la invención, el paciente que va a tratarse padece una neoplasia seleccionada del grupo que consiste en carcinoma pancreático, hepatoblastoma, carcinoma de colon, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma, carcinoma de mama, carcinoma de ovarios, carcinoma de próstata, glioblastoma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, proformas de leucemia, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma, células madre tumorales, células madre que inician glioblastoma y mieloma múltiple.

60

65

En otra realización de la invención, el paciente muestra una resistencia o bien intrínseca o bien adquirida.

Por consiguiente, en el contexto de la presente invención una “resistencia” puede ser o bien total o bien parcial; dicho de otro modo, los pacientes que se considera que pueden tratarse según la invención pueden mostrar una sensibilidad reducida o incluso una falta completa de sensibilidad frente a tratamientos anticancerosos convencionales. Estos pacientes también pueden determinarse como “que no responden” o “que responden mal”.

Un sinónimo adicional de un cáncer o tumor “resistente” es un tipo “insensible” de cáncer, que también puede ser o bien completa o bien parcialmente insensible. Por tanto, también puede determinarse resistencia intrínseca como “cáncer insensible primario”. Una forma particular de células cancerosas insensible o resistentes son las denominadas “células cinéticamente insensibles”; un fenómeno conocido, por ejemplo, a partir de células de leucemia, cuando las células se destruyen en primer lugar, pero se reproducen rápidamente de modo que un tratamiento eficaz apenas es posible.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término tratamiento o terapia “convencional” se refiere al tratamiento terapéutico actualmente aceptado y ampliamente usado de un determinado tipo de cáncer, basándose en los resultados de investigaciones anteriores y/o aprobación reguladora.

Los fármacos anticancerosos convencionales incluyen agentes citotóxicos y citostáticos, que destruyen las células cancerosas o reducen y/o detienen su crecimiento o proliferación. Los modos de acción de estos fármacos anticancerosos pueden variar; ejemplos son antimetabolitos (por ejemplo, citarabina, metotrexato, mercaptopurina o clofarabina), agentes de reticulación del ADN (por ejemplo, cisplatino y sus derivados), sustancias de intercalación del ADN (por ejemplo, doxorubicina), venenos de topoisomerasa (por ejemplo, etopósido), inhibidores de cinasa (por ejemplo, cetuximab), esteroides (por ejemplo, dexametasona) o inhibidores mitóticos (por ejemplo, vincristina). Un ejemplo de un tratamiento anticanceroso convencional de leucemia es la administración de doxorubicina o rituximab.

La radioterapia convencional también puede incluir radioterapia, lo cual significa el uso de radiación de alta energía a partir de rayos x, rayos alfa, beta y gamma, electrones Auger, rayos ultravioleta, neutrones, protones y otras fuentes para destruir células cancerosas y encoger tumores. La radiación puede originarse a partir de un dispositivo exterior al organismo (radioterapia de haz externo) o puede originarse a partir de fuentes radiactivas colocadas en el organismo en las inmediaciones de las células cancerosas (radioterapia interna). La radioterapia sistémica usa una sustancia radiactiva, tal como un anticuerpo monoclonal radiomarcado, que se desplaza en el torrente sanguíneo hasta el tejido objetivo. Las células cancerosas radiorresistentes no responden o solo responden parcialmente a estos tratamientos.

Tal como se expuso en detalle anteriormente, según una realización de la invención los agonistas de receptores opioideos se aplican para superar o “romper” la resistencia intrínseca o adquirida de células cancerosas frente a tratamientos anticancerosos convencionales y/o tratamiento por radiación o resistencia a la apoptosis. En una realización de la invención, células cancerosas que se considera que pueden tratarse según la invención expresan un receptor opioideo, en particular el receptor opioideo μ .

Según la invención, los términos “resistencia”, “radiorresistencia” o “quimiorresistencia” se definen como una sensibilidad reducida de una célula cancerosa frente a al menos una terapia convencional contra el cáncer, es decir, o bien un fármaco anticanceroso o bien radioterapia. Un paciente que padece un cáncer de este tipo se determina como un paciente con cáncer “resistente”. Dado que la resistencia puede ser intrínseca o adquirida, la reducción observada de la sensibilidad se compara con células cancerosas “normales” totalmente sensibles, que responden a la dosificación terapéuticamente eficaz del fármaco anticanceroso y/o la radiación aplicados en comparación con la sensibilidad original tras el inicio de la terapia. En este último caso, la resistencia se manifiesta o bien en una cantidad disminuida de regresión tumoral para la misma dosis (o bien de la radiación o bien del fármaco anticanceroso) o bien una dosis aumentada que es necesaria para una cantidad igual de regresión tumoral.

En otra realización de la invención, el paciente muestra una o más de las siguientes resistencias: resistencia a la apoptosis, resistencia a múltiples fármacos, resistencia a fármacos anticancerosos, resistencia a fármacos citotóxicos, resistencia a especies reactivas de oxígeno, resistencia a agentes que dañan el ADN, resistencia a anticuerpos tóxicos, resistencia a la doxorubicina, resistencia única o cruzada, resistencia a la irradiación (por ejemplo, alfa, beta, gamma o electrones Auger).

En una realización particular, el paciente es resistente a uno o más de los siguientes principios activos: metotrexato, citarabina, cisplatino, oxaliplatino, etopósido, vincristina, paclitaxel, carboplatino, tenipósido, dexametasona, prednisolona, ciclofosfamida, difosfamida, doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, idarubicina, mercaptopurina, fludarabina, HER2 y anti-CD20.

En una realización de la invención, el agente anticanceroso que se administra junto con el agonista de receptores opioideos se administra a una dosis que es igual o inferior a la dosis recomendada para el cáncer respectivo. La dosis recomendada se administra mediante una terapia convencional contra el cáncer sin la administración de un

agonista de receptores opioideos. Preferiblemente, la dosis respectiva del agente anticanceroso desde el punto de vista del experto representa una dosis inferior a la óptima o inferior a la terapéutica, lo cual tiene la ventaja para el paciente de tener menos efectos secundarios. El efecto principal es que la captación de la dosis del fármaco anticanceroso se aumenta en las células cancerosas, mientras que la concentración en plasma está al nivel de la terapia convencional. Esto tiene el efecto de que puede tratarse a pacientes que no responden a la terapia convencional.

En una realización adicionalmente preferida de la invención, el agente anticanceroso que se administra junto con el agonista de receptores opioideos se administra a una dosis que es igual o inferior a la dosis recomendada para el cáncer respectivo, en la que el periodo de niveles en plasma eficaces del agente anticanceroso está completamente dentro del periodo de niveles en plasma eficaces del agonista de receptores opioideos. La dosis recomendada se administra mediante una terapia convencional contra el cáncer sin la administración de un agonista de receptores opioideos.

En una realización adicionalmente preferida de la invención, el agonista de receptores opioideos es D/L-metadona y los agentes anticancerosos son metotrexato y dexametasona.

En una realización adicional de la invención, los opioideos o agonista de receptores opioideos pueden usarse como material compuesto con al menos un fármaco anticanceroso.

Un "material compuesto" dentro del contexto de la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera del agonista de receptores opioideos (componente A) tal como se define según la invención y al menos una sustancia anticancerosa adicional (componente B). Este "material compuesto" puede constituir una única composición o al menos dos composiciones, que pueden administrarse a los pacientes de manera o bien concomitante o bien posterior. Las sustancias anteriormente mencionadas se combinan preferiblemente con metadona, más preferiblemente con la forma de clorhidrato de D/L-metadona.

El material compuesto de la invención puede ser ventajoso para el tratamiento eficaz de las células cancerosas, dado que puede mostrar efectos sinérgicos en comparación con las composiciones individuales. En particular, se prefiere el material compuesto con metadona como componente A y uno de los siguientes agentes como componente B: metotrexato, citarabina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, etopósido, vincristina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, daunorubicina, fludarabina. En una realización preferida de la invención, se usan opioideos para tratar cánceres no sólidos o bien resistentes o bien sensibles, es decir, todos los tumores malignos hematológicos que afectan a la sangre, médula ósea y ganglios linfáticos, incluyendo leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica y todas las proformas de leucemia, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma y mieloma múltiple.

En un aspecto adicional la solicitud da a conocer un método para la selección de una combinación de un agonista de receptores opioideos y uno o más fármacos anticancerosos. Este método comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar un cultivo *in vitro* de células cancerosas, líneas celulares o células primarias, preferiblemente aisladas a partir de una biopsia de cáncer o a partir de una muestra de líquido (tal como, por ejemplo, sangre, líquido amniótico, líquido pleural, líquido peritoneal o líquido cefalorraquídeo);

(b) opcionalmente someter a prueba las células de la etapa (a) para determinar la expresión de receptores opioideos;

(c) tratar las células de la etapa (a) con un agonista opioideo o al menos un fármaco anticanceroso o una combinación de los mismos;

(d) analizar las células para determinar la muerte celular y/o expresión de receptores opioideos

(e) seleccionar la combinación de receptor opioideo/fármaco anticanceroso y preferiblemente una dosis para dicha combinación basándose en el grado deseado de muerte/viabilidad celular o inhibición de la proliferación; y/o

(f) seleccionar el agente anticanceroso y preferiblemente una dosis para dicho agente anticanceroso que muestra el grado deseado de inducción de receptores opioideos.

Las células cancerosas cultivadas *in vitro* pueden ser una línea celular inmortalizada, células de xenoinjerto, una línea de células cancerosas secundarias o primarias o células primarias. En una realización preferida la línea celular y/o las células se derivan a partir de una biopsia de cáncer, en una realización más preferida la biopsia o toma de muestra de sangre o toma de muestra de líquido cefalorraquídeo o toma de muestra de líquido pleural o toma de muestra de líquido amniótico o toma de muestra de líquido peritoneal se realiza del paciente que va a tratarse con la combinación según la invención. La línea de células cancerosas puede representar una línea celular homogénea basada únicamente en un tipo de célula cancerosa o una línea de células cancerosas heterogéneas

que comprende diferentes tipos de células.

El análisis de la expresión de receptores opioideos en la etapa (b) puede realizarse mediante técnicas que conoce el experto en la técnica. Una lista no limitativa de ejemplos incluye inmunofluorescencia usando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra dicho receptor opioideo, la inmunoprecipitación de los receptores opioideos o el uso de ligandos de receptores opioideos marcados tales como naloxona-fluoresceína.

Para el análisis de la viabilidad y apoptosis celular en la etapa (c) hay varias técnicas que conoce el experto en la técnica. Una lista no limitativa de ejemplos incluye (a) ensayos de citólisis o fuga de membrana tales como el ensayo de lactato deshidrogenasa, el ensayo de yoduro de propidio, el ensayo de azul tripano, el ensayo de 7-aminoactinomicina D, (b) ensayos de actividad mitocondrial o caspasa tales como el de resazurina y formazán (MTT/XTT) que puede someter a ensayo para detectar diversos estadios en el proceso de apoptosis que predicen la muerte celular, (c) ensayos funcionales que, en el caso de glóbulos rojos, miden la capacidad de deformación celular, fragilidad osmótica, hemólisis, nivel de ATP y contenido de hemoglobina; (d) ensayos genómicos y proteómicos que incluyen el análisis de la activación de rutas de estrés usando micromatrices de ADN y chips de proteínas.

En una realización adicionalmente preferida la viabilidad celular se mide mediante el ensayo de yoduro de propidio y la apoptosis se mide mediante determinación de ADN hipodiploide (subG1) y análisis de FSC/SSC mediante citometría de flujo.

En la etapa (d) las células cultivadas se tratan preferiblemente en experimentos en paralelo que comprenden el uso del opioide solo, el agente anticanceroso solo y una combinación de las dos sustancias. En una realización adicional, la potencia del efecto se analiza estudiando la dependencia de la dosis del efecto respectivo. En experimentos alternativos pueden combinarse varios agentes anticancerosos para aumentar el efecto antiapoptótico o la expresión de receptores opioideos o para reducir el perfil de efectos secundarios. En una realización adicional, la selección inicial de los compuestos de prueba dependerá de las características del tumor. Además, también pueden tenerse en consideración las características de paciente incluyendo la edad, el sexo, el peso corporal, comorbilidades, capacidades metabólicas individuales, alergias e incompatibilidades, predisposición genética, el curso de la enfermedad y la historia familiar.

Para el análisis *in vitro* pueden usarse para las pruebas los agonistas de receptores opioideos tal como se describieron anteriormente. Preferiblemente, se usan D,L-metadona, L-metadona, fentanilo, buprenorfina, morfina, codeína, oxicodona, tramadol y tapentadol.

En una realización preferida, se elige un agente anticanceroso que se sabe bien que tiene un efecto sobre el tipo de célula cancerosa, línea celular o células respectivo.

Cuando se somete a prueba un agente anticanceroso solo, se analizan las células cultivadas para determinar la expresión de receptores opioideos antes del tratamiento anticanceroso y después del tratamiento anticanceroso en condiciones que permiten una comparación de los niveles de expresión de receptores opioideos. Dicha comparación permite identificar agentes anticancerosos que aumentan la expresión de receptores opioideos en la célula cancerosa respectiva.

La selección en la etapa (e) prioriza la combinación de fármaco y/o las dosis respectivas con el fin de maximizar la eficacia al tiempo que se conserva un perfil de efectos secundarios que es aceptable para el paciente.

La selección en la etapa (f) prioriza un agente anticanceroso con respecto a su capacidad para aumentar la expresión de receptores opioideos en la célula cancerosa. Como consecuencia, se maximiza el efecto antiapoptótico del agonista opioideo, así como el efecto antiapoptótico del agente anticanceroso.

En el caso en el que, en la etapa (c), se trató el cultivo celular con una combinación de agonista de receptores opioideos y agente anticanceroso, la priorización de la combinación que se usa, se realiza bajo el aspecto de qué combinación de dosis tiene el mejor efecto letal sobre las células en cultivo. Debe usarse la combinación con el efecto letal más alto o, si es observable, la dosis con un efecto de hasta el 10% menos en la letalidad de células en comparación con la combinación con el efecto letal más alto sobre células en cultivo pero con la dosis inferior de agonista de receptores opioideos. La figura 2c, por ejemplo, muestra que con doxorubicina a dosis terapéutica convencional tal como se describe en el prospecto será preferible una dosis de D,L-metadona de 0,1 µg/ml.

En un aspecto adicional la solicitud da a conocer un método para la selección de un agonista de receptores opioideos para el tratamiento del cáncer que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar un cultivo *in vitro* de células cancerosas, líneas celulares o células primarias, preferiblemente aisladas a partir de una biopsia de cáncer o a partir de una muestra líquida (tal como, por ejemplo, sangre, líquido amniótico, líquido pleural o líquido peritoneal o líquido cefalorraquídeo);

(b) opcionalmente someter a prueba las células de la etapa (a) para determinar la expresión de receptores opioideos;

(c) tratar las células de la etapa (a);

(d) analizar las células para determinar la muerte/viabilidad celular o inhibición de proliferación;

(e) seleccionar la combinación de receptor opioideo/fármaco anticanceroso y preferiblemente una dosis para dicha combinación basándose en el grado deseado de muerte celular; y/o

(f) seleccionar el agonista de receptores opioideos y preferiblemente una dosis para dicho agonista de receptores opioideos que muestra el grado deseado de inducción de muerte celular.

Para este método, pueden realizarse las etapas (a) a (d) mediante métodos y estrategias tal como se describió anteriormente.

El análisis de la expresión de receptores opioideos permite una selección de tipo de cáncer que puede tratarse con un agonista de receptores opioideos. Debido al tratamiento *in vitro* con un agonista de receptores opioideos, puede determinarse la dosis individual para el tratamiento *in vivo* de cáncer.

I. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Fármacos y reactivos

Para los experimentos *in vitro*, se adquirieron clorhidrato de D,L-metadona (D,L-metadona) y doxorubicina de Sigma (Taufkirchen, Alemania), naloxona de Fagron GmbH & Co. KG (Barsbüttel, Alemania) y toxina pertussis (PTX) de Calbiochem (Nottingham, R.U.). Antes de cada experimento se disolvieron de manera reciente estas sustancias en agua destilada estéril para garantizar la calidad constante de las preparaciones. 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma) se disolvió de manera reciente en NaOH 0,01 N.

Para la aplicación *in vivo*, se usó D,L-metadona (Metaddict, Hexal, Alemania) como comprimidos de 5 mg adquiridos de la farmacia local. Se pulverizaron los comprimidos y se solubilizaron de manera reciente antes de su uso en Tween 80 al 10% en solución salina. Se adquirió doxorubicina (Hexal) como disolución para inyección (5 mg/ml) y se diluyó de manera reciente con solución salina hasta las concentraciones apropiadas.

Líneas celulares

Las líneas celulares de leucemia de células B humana (BCP-ALL) Tanoue, Reh y Nalm6 se obtuvieron a partir de DSMZ (Braunschweig, Alemania) y se cultivaron en RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía FCS inactivado por calor al 10% (Lonza, Verviers, Bélgica), glutamina 1 mmol/l (Invitrogen), el 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), HEPES 25 mmol/l (Biochrom) a 37°C, el 95% de aire / el 5% de CO₂. En entornos experimentales, se sembraron las células de leucemia a una densidad de 10.000 células/ml.

Pruebas de señalización de receptores opioideos

La estimulación de receptores opioideos (OR) mediante agonistas tales como D,L-metadona conduce a una activación de la proteína G_i inhibidora. La subunidad α_i inactiva la adenilil ciclasa (AC) dando como resultado una reducción de los niveles de cAMP dentro de la célula, lo que a su vez conduce a la apoptosis que puede mediarse mediante varios moduladores diferentes. Las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G_i también modulan la actividad de diferentes efectores tales como la inhibición de canales de Ca²⁺ y la activación de canales de K⁺. Naloxona como antagonista de receptores opioideos inhibe por competencia los receptores opioideos. PTx (toxina pertussis) inactiva las proteínas G_i y bloquea la regulación por disminución de cAMP. IBMX (isobutil-1-metilxantina) inhibe la fosfodiesterasa y aumenta los niveles de cAMP

Concentraciones en suero de metadona

Se llevó a cabo la determinación de metadona en muestras de suero después de una extracción de líquido/líquido usando un espectrómetro de masas equipado con un cromatógrafo de gas (CG/EM). Como patrón interno, se añadió d₉-metadona. Se hizo funcionar el detector selectivo de masa en modo de impacto de electrones. Se adquirieron datos en el modo de monitorización de iones seleccionados. Se identificaron los analitos con las siguientes masas m/z 294, 223, 72 (ion objetivo) para metadona y m/z 303, 226 y 78 para d₉-metadona con un límite de detección de 0,8 ng/ml y un límite de cuantificación de 1,2 ng/ml.

Concentraciones en suero de doxorubicina

Se realizó la determinación de doxorubicina y sus metabolitos principales en suero tal como se describió

anteriormente (Hilger *et al.*, 2005; Richly *et al.*, 2006). Usando este método validado, fue posible la cuantificación de doxorubicina, doxorubicinol y 7-desoxi-doxorubicinol con un LLQ de 0,2 ng/ml.

Xenoinjertos de ALL derivada de paciente

5

Para su uso *in vivo*, se eligió el modelo de ALL-SCID6. Se trasplantaron fragmentos a partir de tumores sometidos a pases *in vivo* en el día cero por vía subcutánea a 32 ratones NOD/SCID/IL2ry nulo (NSG) macho. Después de la aleatorización, se inició el tratamiento oral (mediante sonda nasogástrica) con D,L-metadona un día después y se realizó diariamente hasta el final del experimento con dosis crecientes: 1ª semana 20 mg/kg/d, 2ª semana 30 mg/kg/d, 3ª semana 40 mg/kg/d, 4ª semana 60 mg/kg/d, 5ª-10ª semana 2 x 60 mg/kg/iny. Fue necesaria la adaptación a la dosis para evitar muertes tóxicas debido a una sobredosis de D,L-metadona. La dosis máxima tolerada de D,L-metadona en la raza de ratón empleada es de 2 x 60 mg/kg/iny. En el día 46, 53, 60 y 76 se administró doxorubicina 3 mg/kg i.v. Se midió el tamaño tumoral dos veces por semana en dos dimensiones y se calcularon los volúmenes tumorales según la fórmula $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$. Se calcularon volúmenes tumorales medios y desviaciones estándar por grupo. Se calcularon valores de tratado frente a control (T/C) en porcentaje relacionando los volúmenes tumorales medios de cada grupo en cada día de medición con los controles. Se determinó el peso corporal individual dos veces por semana como parámetro para la tolerabilidad y se calcularon cambios de peso corporal en porcentaje relacionando los valores medios de cada grupo con el primer día de medición.

20

Se extrajo suero a partir de ratones tratados con D,L-metadona 0,5, 1, 4 y 24 horas después del último tratamiento con D,L-metadona en el día 76, respectivamente, y se almacenó a -20°C hasta la determinación de la concentración de metadona. Se sacrificaron los ratones en el día 77 por motivos éticos.

25

Para las investigaciones *in vitro*, se obtuvieron suspensiones celulares de células de ALL derivada de xenoinjerto humano a partir de pacientes con leucemia aguda de células T (ALL-SCID6, ALL-SCID3), células B (ALL-SCID7) y precursores de células B (BCP, pre-B-ALL-SCID) y se cultivaron *in vitro* y se caracterizaron de manera fenotípica y genotípica tal como se describe (Borgmann *et al.*, 2000). Todos los experimentos con animales los aprobaron las autoridades responsables locales (LaGeSo Berlin) y se realizaron según las directrices para el bienestar de los animales en experimentos oncológicos (Workman *et al.* 2000).

30

Ensayo de citometría de flujo para la determinación de receptores opioideos en la superficie celular

35

Se lavaron células en PBS suplementada con FCS al 1%, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS/FCS al 1% que contenía naloxona-fluoresceína (0,05 mM, Invitrogen) (Hedin *et al.*, 1997). Después de 30 min de incubación a TA, se lavaron las células dos veces con PBS/FCS al 1%, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS/FCS al 1% helado. Se realizó análisis de citometría de flujo usando un dispositivo FACSCalibur (BD, Heidelberg, Alemania).

40

Inducción de apoptosis

Se trataron células de ALL con D,L-metadona (concentración en plasma terapéutica $\leq 3 \mu\text{g/ml}$) sola o además de doxorubicina en matraces de 175 cm² o placas de 96 pocillos. Se realizaron experimentos adicionales de manera simultánea después de la adición de naloxona 60 $\mu\text{g/ml}$, IBMX 200 μM o PTX 200 ng/ml. Después de diferentes puntos de tiempo, se midieron las tasas de apoptosis mediante citometría de flujo (Carbonari *et al.*, 1994; Nicoletti *et al.*, 1991). Para determinar la apoptosis, se sometieron las células a lisis con tampón de Nicoletti que contenía citrato de sodio (0,1%), Triton X-100 (0,1%) y yoduro de propidio (50 $\mu\text{g/ml}$) tal como se describe por Nicoletti (Nicoletti *et al.*, 1991). Se determinaron las células apoptóticas mediante ADN hipodiploide (subG1) o análisis de dispersión directa/dispersión lateral (Carbonari *et al.*, 1994). Se calculó el porcentaje de apoptosis específica de la siguiente manera: $100 \times [\text{células muertas experimentales (\%)} - \text{células muertas espontáneas en el medio (\%)}] / [100\% - \text{células muertas espontáneas en el medio (\%)}]$. Las células muertas espontáneas estaban en el intervalo del 5 al 10% usando líneas celulares. La viabilidad de las células de pacientes sin tratar (células muertas espontáneas) era de menos del 35% a las 24 h y 48 h.

55

Inhibición de caspasa general mediante zVAD.fmk

Para la inhibición de la apoptosis, se trataron células de leucemia con el inhibidor de pancaspasa de caspasas, zVAD.fmk (benzoilcarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona; Enzyme-Systems-Products, Dubli, EE.UU.) tal como se describe (Friesen *et al.*, 2007). Se añadió zVAD.fmk 50 μM a las células 1 h antes de la estimulación con D,L-metadona y doxorubicina. Después de diferentes puntos de tiempo, se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante análisis de FSC/SSC mediante citometría de flujo (Carbonari *et al.*, 1994).

60

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

65

Se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe (Classen *et al.*, 2003; Friesen *et al.*, 2004). Se sometieron lisados de células completas a inmunodetección para PARP, caspasa 3, caspasa 9,

caspasa 2, XIAP, Bcl-x_L y β-actina usando anticuerpo policlonal de conejo anti-PARP (1:5000, Roche), anticuerpo monoclonal de ratón anti-caspasa 2 (1:1000, BD-Transduction-Laboratories, Heidelberg, Alemania), anticuerpo monoclonal anti-XIAP (1:1000, BD-Transduction-Laboratories), anticuerpo monoclonal de ratón anti-caspasa 3 (1:1000, Cell-Signaling, Boston, MA/EE.UU.), anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa 9 (1:1000, Cell-Signaling), anticuerpo policlonal de conejo anti-Bcl-x_L (1:1000, Santa-Cruz, Heidelberg, Alemania) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (1:5000, Sigma). Como anticuerpos secundarios se usaron IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa o IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa (1:5000, Santa-Cruz) para el sistema de quimioluminiscencia potenciado (ECL, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania). Se controló la carga de proteína igual mediante detección de β-actina.

10 Análisis de captación y flujo de salida de doxorubicina

Para el análisis de la captación de doxorubicina, se sembró la línea celular de leucemia de BCP, Tanoue, a una densidad de 100.000 células/ml en matraces de 175 cm² y o bien se dejó sin tratar o bien se incubó con doxorubicina 0,3 µg/ml o una combinación de doxorubicina 0,3 µg/ml y D,L-metadona 3 µg/ml a 37°C/el 5% de CO₂. Después de 24 h, se lavaron las células dos veces con PBS/FCS al 1% helado. Se analizó la captación de doxorubicina relativa en células usando citometría de flujo.

Para el análisis del flujo de salida de doxorubicina, se lavaron las células para retirar doxorubicina a partir del medio después de la incubación durante 24 h. A continuación, se incubaron las células con medio reciente sin doxorubicina o medio reciente que contenía D,L-metadona 3 µg/ml a 37°C/el 5% de CO₂ sin doxorubicina para medir el flujo de salida de doxorubicina. Después de diferentes puntos de tiempo, se recogieron células, se lavaron y se analizó el contenido de doxorubicina relativo en células de leucemia usando citometría de flujo.

25 II. Ejemplos

Ejemplo 1: D,L-metadona induce muerte celular en células de ALL derivada de xenoinjerto dependiendo de la expresión de receptores opioideos

Para mostrar la relevancia clínica de D,L-metadona en el tratamiento de leucemia y el papel de la activación de receptores opioideos en la inducción de muerte celular, se analizó el efecto anticanceroso de D,L-metadona en diferentes células de ALL derivada de xenoinjerto. Los xenoinjertos se establecieron originalmente a partir de pacientes con leucemia aguda de células T (ALL-SCID6, ALL-SCID3), células B (ALL-SCID7) (Borgmann *et al.*, 2000) y precursores de células B (BCP, pre-B-ALL-SCID). En primer lugar, se midió la expresión de receptores opioideos en células de ALL derivada de xenoinjerto. Se observó que las células de leucemia ALL-SCID6, ALL-SCID3 y ALL-SCID7 presentaban receptores opioideos en altas cantidades (figura 1A), mientras que pre-B-ALL-SCID solo expresaba niveles moderados de receptores opioideos (figura 1A).

Para analizar si la inducción de muerte celular usando D,L-metadona depende de los niveles de expresión de receptores opioideos, se trataron ALL-SCID6, ALL-SCID3, ALL-SCID7 y pre-B-ALL-SCID con diferentes concentraciones de D,L-metadona (figura 1B).

Se usaron concentraciones en plasma terapéuticas de D,L-metadona (≤3 µg/ml) pero también se usó una concentración superior de D,L-metadona 10 µg/ml, porque los niveles de D,L-metadona en tejido linfático y médula pueden ser superiores, pero no se han medido (Singh *et al.*, 2011). Se encontró que concentraciones en plasma terapéuticas de D,L-metadona (≤3 µg/ml) inducían una fuerte muerte celular en células de ALL derivada de xenoinjerto que expresaban altas cantidades de receptores opioideos en su superficie celular (figura 1A, B). En comparación con estas observaciones, pre-B-ALL-SCID que tenía un nivel de receptores opioideos moderado (figura 1A) solo podía destruirse ligeramente con concentraciones terapéuticas de D,L-metadona (figura 1B). Esto revela claramente que la inducción de apoptosis mediante D,L-metadona depende del nivel de expresión de receptores opioideos.

EJEMPLO 2: el tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina destruye y activa caspasas en células de ALL con expresión de receptores opioideos moderada

En estudios análogos, se sometió a prueba el potencial citotóxico de D,L-metadona sobre líneas celulares de BCP-ALL (Tanoue, Reh, Nalm6) que expresan receptores opioideos a un nivel moderado sobre su superficie celular (figura 2A).

Estas líneas celulares de BCP-ALL solo pudieron destruirse ligeramente mediante D,L-metadona (figura 2b) tal como se observa para pre-B-ALL-SCID (figura 1B). Con el fin de mostrar si diferentes sustancias actuarán de manera sinérgica, se trataron las líneas celulares Tanoue, Reh, Nalm6 y pre-B-ALL-SCID con diferentes concentraciones de D,L-metadona y doxorubicina solas o en combinación entre sí (figuras 2B, 2C). Se observó que el tratamiento de combinación indujo fuertemente la muerte celular en líneas celulares de BCP-ALL así como en células de pacientes de BCP-ALL derivadas de xenoinjerto (pre-B-ALL-SCID) (figura 2B, C).

Con el fin de analizar las rutas moleculares de la muerte celular en más detalle y hallar cómo el tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina induce apoptosis, se analizó en primer lugar qué moléculas efectoras de señalización de apoptosis se activan en células de BCP-ALL tras este tratamiento de combinación en comparación con células tratadas con D,L-metadona o doxorubicina solas. 120 h después de tratar la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, con D,L-metadona además de doxorubicina, se observó la activación de la cascada de caspasas en células de BCP-ALL. El análisis reveló una fuerte activación de caspasa 3, caspasa 9 y caspasa 2 y la escisión del sustrato prototipo de caspasa 3, poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) (figura 3A).

Se investigó adicionalmente el papel de la cascada de caspasas en la inducción de apoptosis con el inhibidor de caspasas de amplio espectro zVAD.fmk. Se incubaron previamente células de BCP-ALL con o sin 50 μ M de zVAD.fmk y se trataron con D,L-metadona además de doxorubicina. zVAD.fmk disminuyó fuertemente la muerte celular después del tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina en células de BCP-ALL (figura 3B), destacando la dependencia de la activación de caspasas.

La maquinaria apoptótica está estrechamente controlada por factores antiapoptóticos tales como XIAP y Bcl-x_L (Fulda, 2009a; Fulda, 2009b) que se encontró que estaban fuertemente regulados por disminución en células de BCP-ALL tratadas con D,L-metadona además de doxorubicina (figura 3C). Estos resultados indican que la combinación de D,L-metadona y doxorubicina sensibiliza a células de BCP-ALL frente a apoptosis mediante la activación de caspasas y la regulación por disminución de XIAP y Bcl-x_L.

EJEMPLO 3: la doxorubicina induce fuertemente la expresión de receptores opioides en células de leucemia.

La eficiencia de la inducción de muerte celular y la activación de moléculas efectoras en rutas de apoptosis después de tratar células de leucemia con D,L-metadona parece depender de la cantidad de receptores opioides presentados en la superficie de la célula. El tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina destruye profundamente células de leucemia con expresión de receptores opioides moderada, que solo pueden destruirse ligeramente mediante D,L-metadona o doxorubicina solas. Los agentes quimioterápicos potencian la expresión de receptores tales como CD95 en células de leucemia (Posovszky *et al.*, 1999). Para analizar si la doxorubicina podía influir en la expresión de receptores opioides, se trató la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, con doxorubicina durante 96 h. Después de eso, se midió la cantidad relativa de receptores opioides en comparación con células sin tratar mediante citometría de flujo. Se encontró que doxorubicina aumentó fuertemente la expresión de receptores opioides (figura 4A), lo que sugiere que D,L-metadona puede unirse en cantidades superiores a células tratadas conjuntamente con doxorubicina. Este efecto puede dar supuestamente como resultado el potencial citotóxico superior del tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina.

EJEMPLO 4: los opioides tales como D,L-metadona potencian la captación de doxorubicina e inhiben su flujo de salida

Los opioides son sustratos de la glicoproteína P de bomba de flujo de salida implicada en resistencias a múltiples fármacos (P-gp). Para analizar si la D,L-metadona podía influir en la captación y/o el flujo de salida de doxorubicina en células de leucemia, se incubó la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, durante diferentes intervalos con doxorubicina sola o con una combinación de doxorubicina y D,L-metadona. Después de 24 h (0 h), se observó una concentración de doxorubicina potenciada en las células incubadas conjuntamente con doxorubicina y D,L-metadona (figura 4B). Después de retirar la doxorubicina a partir del sobrenadante, se añadió medio reciente sin doxorubicina y se aplicó D,L-metadona. Después de 8 h y 24 h, D,L-metadona redujo fuertemente el flujo de salida de doxorubicina (figura 4B) lo que indica que D,L-metadona aumenta la captación de doxorubicina e inhibe el flujo de salida de doxorubicina fuera de células de leucemia. Esto explica cómo D,L-metadona así como doxorubicina aumentan mutuamente su potencial citotóxico.

EJEMPLO 5: la inducción de apoptosis mediante D,L-metadona y doxorubicina depende de manera crítica de la activación de receptores opioides y la concentración de cAMP

Para analizar adicionalmente el papel de la activación de receptores opioides en la inducción de apoptosis y por consiguiente la activación de rutas apoptóticas, se trató la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, con D,L-metadona, doxorubicina o con el antagonista de receptores opioides, naloxona, solas o en diferentes combinaciones entre sí (figura 5A, B).

Después de 96 h se encontró que el bloqueo de receptores opioides mediante naloxona redujo fuertemente las tasas de apoptosis del tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina (figura 5A). Además, el bloqueo de receptores opioides mediante naloxona redujo drásticamente la activación de caspasa 9, caspasa 2 y caspasa 3 y la escisión de PARP después de tratar células de BCP-ALL con D,L-metadona además de doxorubicina (figura 5B). Esto indica que la activación de receptores opioides está implicada de manera crítica en la inducción de apoptosis y en la activación de caspasas (figura 7).

La estimulación de receptores opioides activa proteínas G_i inhibitoras, que a su vez bloquean la actividad adenilil

ciclasa reduciendo cAMP (figura 7). cAMP es un inhibidor de la apoptosis inducida por daño de ADN así como por doxorubicina en células de leucemia (Naderi *et al.*, 2009; Safa *et al.*, 2010a). La toxina pertussis (PTX) inactiva las proteínas G_i y bloquea la regulación por disminución de cAMP (Law *et al.*, 1985) (figura 7). Sin embargo, IBMX aumenta los niveles de cAMP como resultado de la inhibición de fosfodiesterasa (figura 7). Para analizar el papel crítico de cAMP en la apoptosis inducida por activación de receptores opioideos, se trató la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, con D,L-metadona, doxorubicina e IBMX o PTX o bien solos o bien en diferentes combinaciones entre sí (figura 5C, D). Después de 96 h se encontró que la regulación por incremento de cAMP mediante IBMX (figura 5C) y el bloqueo de la regulación por disminución de cAMP mediante PTX (figura 5D) reducían fuertemente las tasas de apoptosis del tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina. Además, la regulación por incremento de cAMP mediante IBMX también disminuyó la apoptosis inducida por doxorubicina (figura 5C). Estos resultados indican que la activación de las proteínas G_i acopladas a los receptores opioideos es esencial para la inducción de apoptosis, lo cual puede regularse mediante los niveles de cAMP intracelulares.

EJEMPLO 6: D,L-metadona sola o además de doxorubicina inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de ALL

Los resultados *in vitro* demostraron que D,L-metadona puede inducir apoptosis en varias líneas celulares de leucemia y aumentó la citotoxicidad de doxorubicina. Para confirmar la relevancia clínica del potencial anticanceroso de D,L-metadona sola o en combinación con doxorubicina y para verificar los resultados obtenidos hasta ahora se emprendió un estudio de xenoinjerto de ALL.

Para el estudio *in vivo*, se usó un modelo de xenoinjerto de ALL derivada de paciente (ALL-SCID6). Se demostró su identidad fenotípica y genotípica con la muestra de paciente original (Borgmann *et al.*, 2000). El experimento comenzó en el día 0 con la inoculación subcutánea de fragmentos de ALL-SCID6 a partir de un pase *in vivo* en ratones NOD/SCID/IL2ry nulo (NSG) macho. Después de la aleatorización, se administró D,L-metadona por vía oral comenzando en el día uno después de la inoculación de ALL con dosis crecientes. Cuando los tumores eran palpables, se inició el tratamiento con doxorubicina. El tratamiento con D,L-metadona y doxorubicina condujo a una inhibición significativa del crecimiento tumoral a niveles comparables (figura 6).

El tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina tuvo una eficacia antitumoral similar a D,L-metadona o doxorubicina solas hasta el día 70. En puntos de tiempo posteriores, la inhibición tumoral fue más duradera durante el tratamiento combinado de D,L-metadona y doxorubicina. La terapia se toleró bien con cambios de peso corporal de -10% para la combinación y de -8% o -4% para el tratamiento con D,L-metadona o doxorubicina, respectivamente. Para analizar las concentraciones en suero de D,L-metadona en ratones, se extrajo suero 0,5, 1, 4 y 24 horas después de la última aplicación de D,L-metadona y se cuantificó la D,L-metadona mediante espectrometría de masas. Se encontró que las concentraciones en suero de metadona eran de entre 28 ng/ml y 138 ng/ml en el transcurso de tiempo de desde 0,5 hasta 4 horas después de la aplicación de D,L-metadona, lo que indica que podían alcanzarse niveles comparables con las concentraciones *in vitro*. Se encontró que las concentraciones en suero de doxorubicina eran de entre 156 ng/ml y 198 ng/ml. Estos resultados demuestran que D,L-metadona y el tratamiento conjunto usando doxorubicina y D,L-metadona inhibieron significativamente el crecimiento tumoral *in vivo*.

EJEMPLO 7: D,L-metadona sensibiliza células de glioblastoma para el tratamiento con doxorubicina.

Tal como se muestra mediante citometría de flujo, las líneas celulares de glioblastoma A172 y U118MG (véase la figura 8) así como células de glioblastoma primarias (véase la figura 11A) y células madre que inician glioblastoma (véase la figura 12A) expresan receptores opioideos. En todas estas células y líneas celulares el tratamiento de combinación de D,L-metadona y doxorubicina induce apoptosis de manera dependiente de la dosis (véanse las figuras 9, 10, 11B y 12B). Tal como se muestra a modo de ejemplo para la línea celular de glioblastoma A172, pudo mostrarse que la inducción de muerte celular de células de glioma usando tratamiento conjunto con D,L-metadona y doxorubicina depende de la activación de caspasas (véase la figura 13). Además, pudo mostrarse que D,L-metadona invirtió la activación deficiente de rutas de apoptosis mediante doxorubicina en células madre que inician glioblastoma (véase la figura 14).

EJEMPLO 8: efecto de D,L-metadona sobre la captación y flujo de salida de doxorubicina.

Los resultados *in vitro* usando la línea celular de glioblastoma A172 demostraron que D,L-metadona puede potenciar la captación y también inhibir el flujo de salida de doxorubicina (véase la figura 15). Esto da una explicación para la sensibilización de células cancerosas frente al tratamiento con fármacos anticancerosos.

EJEMPLO 9: efecto de doxorubicina o cisplatino sobre la expresión de receptores opioideos en células cancerosas.

Tal como se muestra para la línea celular de glioblastoma A172, la doxorubicina conduce a un aumento de 6 veces en la expresión de receptores opioideos (véase la figura 16). Pudo mostrarse que este mecanismo también es cierto para otros tipos de cáncer y fármacos anticancerosos dado que en la línea celular de leucemia promielocítica, HL60, el tratamiento con cisplatino conduce a un aumento de 2,1 veces en la expresión de receptores opioideos

(véase la figura 19).

EJEMPLO 10: sensibilización de células de leucemia, cáncer pancreático y de ovarios para el tratamiento con diferentes agentes anticancerosos.

En análisis *in vitro* adicionales, pudo demostrarse que D,L-metadona sensibiliza células cancerosas de leucemia (Nalm-6), células de cáncer pancreático (Nalm6) y células de cáncer de ovarios (A2780) para el tratamiento con etopósido o cisplatino (véase la figura 17). Además, también pudieron sensibilizarse células de leucemia linfocítica crónica (CLL) mediante D,L-metadona para el tratamiento apoptótico usando fludarabina (véase la figura 18).

EJEMPLO 11: sensibilización de células de carcinoma de mama para el tratamiento con diferentes agentes anticancerosos.

Tal como se muestra mediante citometría de flujo, la línea celular de carcinoma de mama resistente a Her2/Neu, JIMT-1, expresa el receptor opioideo μ (véase la figura 20). Tal como se muestra mediante análisis de FACS, el tratamiento de combinación de D,L-metadona y doxorubicina induce apoptosis de manera dependiente de la dosis en células JIMT-1 (véase la figura 21). Pudo mostrarse que la inducción de muerte celular de células JIMT-1 usando tratamiento conjunto con D,L-metadona y doxorubicina depende de la activación de caspasas (véanse las figuras 22 y 23).

EJEMPLO 12: sensibilización de células cancerosas para el tratamiento con doxorubicina mediante el opioide fentanilo.

Tal como se muestra a modo de ejemplo para la línea celular de leucemia derivada de células T, CEM, pudo mostrarse que el opioide fentanilo también podía sensibilizar las células CEM para el tratamiento usando doxorubicina (véase la figura 24). En un experimento *in vitro* adicional, el opioide buprenorfina sensibilizó células de leucemia (HL-60) para la apoptosis debida a doxorubicina (véase la figura 25).

EJEMPLO 13: el tratamiento de combinación con D,L-metadona y cisplatino (CDDP) destruye y activa caspasas en diferentes células de leucemia.

Se mostró el potencial de muerte celular de D,L-metadona sobre diferentes líneas celulares de leucemia en leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana, leucemia de células B humana. Todas las líneas celulares sometidas a prueba expresaban receptores opioideos en un nivel moderado en su superficie celular (figura 27).

Estas células de leucemia solo pudieron destruirse ligeramente mediante D,L-metadona (figura 28, barras blancas). Con el fin de mostrar que diferentes agentes anticancerosos (sustancias) actuarán de manera sinérgica, se trataron leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana y leucemia de células B humana con diferentes concentraciones de D,L-metadona (-CDDP) o cisplatino solos o con D,L-metadona además de cisplatino (+CDDP) (figura 28). El tratamiento de combinación indujo fuertemente la muerte celular en diferentes leucemias dependiendo de las diferentes concentraciones de cisplatino y/o D,L-metadona.

Se mostraron en más detalle las rutas moleculares de destrucción celular y se mostró cómo el tratamiento de combinación con un agonista de receptores opioideos, es decir, D,L-metadona, y un agente anticanceroso, es decir, cisplatino, induce la apoptosis. En primer lugar, se mostraron las moléculas efectoras de señalización de apoptosis, que se activan en diferentes células de leucemia (leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana). Se comparó el tratamiento de combinación de D,L-metadona en combinación con cisplatino (+ CDDP) con células tratadas con D,L-metadona (- CDDP) o cisplatino solos. Se mostró que, tratando las diferentes células de leucemia con D,L-metadona además de cisplatino (+ CDDP), se indujo la activación de la cascada de caspasas en células de leucemia. Se indujo una fuerte activación de caspasa 3 (caspasa activa 3 p19, p17), caspasa 9 (caspasa activa 9 p37) y caspasa 2 y escisión del sustrato prototipo de caspasa 3, poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) (escisión p85 y/o una regulación por disminución de PARP p116) dependiendo del tratamiento de combinación (figura 29).

Se investigó adicionalmente el papel de la cascada de caspasas en la inducción de apoptosis con el inhibidor de amplio espectro de caspasas zVAD.fmk. Se incubaron previamente diferentes células de leucemia (leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana) con 50 μ M de zVAD.fmk (+ zVAD.fmk, barras blancas) o sin zVAD.fmk (-zVAD.fmk, barras negras) y se trataron con D,L-metadona además de cisplatino. zVAD.fmk disminuyó fuertemente la muerte celular después del tratamiento de combinación con D,L-metadona y cisplatino (figura 30), destacando la dependencia de la activación de caspasas.

La maquinaria apoptótica se controla estrechamente mediante factores antiapoptóticos tales como XIAP y Bcl-xL y factores proapoptóticos tales como Bax (Fulda, 2009a; Fulda, 2009b). XIAP se reguló fuertemente por disminución (p57) y/o se escindió (p30) en diferentes células de leucemia tratadas con D,L-metadona además de

cisplatino (+CDDP) (figura 29) dependiendo de diferentes concentraciones de cisplatino y/o diferente concentración de D,L-metadona. Se induce una fuerte regulación por incremento de Bax (p21) en leucemia de células T humana inducida después del tratamiento con D,L-metadona además de cisplatino (+ CDDP). La combinación de D,L-metadona y cisplatino sensibiliza diferentes células de leucemia para la apoptosis mediante la activación de caspasas y mediante regulación por disminución e inhibición de factores antiapoptóticos tales como XIAP y la regulación por incremento de factores proapoptóticos tales como Bax. Por tanto, se muestra que los receptores opioideos son receptores que inducen muerte celular y activan rutas de apoptosis que implican la activación de caspasas, la regulación por disminución y/o escisión de PARP, y/o regulación por disminución de factores antiapoptóticos, y/o regulación por incremento de factores proapoptóticos, y/o regulación por disminución e inhibición de proteínas apoptóticas inhibidoras (IAP). Por tanto, los receptores opioideos son una nueva manera desconocida con un nuevo mecanismo de inducción de muerte celular, además de los sistemas comunes conocidos de receptores de muerte celular / ligandos que inducen la muerte y mecanismos tales como el sistema de CD95/CD95L.

EJEMPLO 14: el cisplatino induce fuertemente la expresión de receptores opioideos en células de leucemia.

La eficiencia de inducción de muerte celular y la activación de moléculas efectoras en rutas de apoptosis después de tratar células de leucemia con agonistas de receptores opioideos, es decir, D,L-metadona, depende de la cantidad de receptores opioideos presentados en la superficie de la célula. El tratamiento de combinación con D,L-metadona y cisplatino destruye profundamente células de leucemia con expresión de receptores opioideos moderada, que solo pueden destruirse ligeramente mediante D,L-metadona o cisplatino solos. Los agentes quimioterápicos potencian la expresión del receptor CD95 (FAS, APO-1) en células de leucemia, lo cual es un receptor de muerte conocido especial (Posovszky *et al.*, 1999). Para mostrar que cisplatino tiene influencia sobre la expresión de receptores opioideos, se trataron las diferentes células de leucemia (leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana) con cisplatino. Después de eso, se midió la cantidad relativa de receptores opioideos en comparación con células sin tratar mediante citometría de flujo. Se mostró que cisplatino aumentó fuertemente la expresión de receptores opioideos (figura 31). Por tanto, los agonistas de receptores opioideos tales como D,L-metadona pueden unirse en cantidades superiores a células, tratadas conjuntamente con cisplatino u otros agentes anticancerosos que pueden inducir un nivel superior de receptores opioideos expresados. Este efecto da como resultado un potencial superior de muerte celular del tratamiento de combinación de un agonista de receptores opioideos, es decir, D,L-metadona, y un agente anticanceroso, es decir, cisplatino.

En la invención se muestra que el agonista de receptores opioideos que tiene una duración de eficacia mínima más larga, tal como D,L-metadona, tiene un mejor resultado que uno que tiene una duración de eficacia mínima más corta, tal como morfina en comparación con D,L-metadona (figura 33 y figura 34).

EJEMPLO 15: la inducción de apoptosis mediante D,L-metadona y doxorubicina depende de manera crítica de la activación de receptores opioideos en glioblastomas

Para mostrar el papel de la activación de receptores opioideos en la inducción de apoptosis en glioblastomas, que es un tumor sólido, se trataron células de glioblastoma con D,L-metadona, doxorubicina o con el antagonista de receptores opioideos naloxona solos o en diferentes combinaciones entre sí (figura 32).

Después de 120 h y 144 h se mostró que bloquear los receptores opioideos mediante naloxona redujo fuertemente las tasas de apoptosis del tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina (figura 32).

EJEMPLO 16: una duración de eficacia diferente de diferentes opioides induce diferentes tasas de apoptosis usando D,L-metadona o morfina en combinación con fármacos anticancerosos tales como doxorubicina en glioblastomas o en leucemias

La eficiencia de inducción de muerte celular después de tratar células de glioblastoma o células de leucemia con opioides depende de la duración de eficacia de los opioides. La duración de eficacia mínima de metadona es de 5-7 horas y la duración de eficacia mínima de morfina es de 2-4 horas. El tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina indujo fuertemente altas tasas de muerte celular en células de glioblastoma (figura 33 A) y células de leucemia (figura 34 A). En cambio, el tratamiento de combinación con morfina y doxorubicina indujo tasas de muerte celular inferiores en células de glioblastoma (figura 33 B) y células de leucemia (figura 34 B). Esto indica que las tasas de inducción de muerte celular después del tratamiento de combinación de opioides con fármacos anticancerosos también dependen de la duración de eficacia de los opioides. También se encuentra el efecto en otros agentes anticancerosos.

Ejemplo 17: el tratamiento de combinación usando D,L-metadona además de doxorubicina medió en la inhibición de la proliferación celular y la parada del ciclo celular en G2/M en células de glioblastoma.

La proliferación celular está gobernada por el ciclo de células eucariotas (Sherr C.J. Cancer cell cycles. Science 1996; 274: 1672-7), que se regula no solo mediante factores de crecimiento sino también mediante una variedad

de señales que actúan para inhibir la progresión del ciclo celular. La mayor parte de las células cancerosas tienen 4 estadios de ciclo de división celular: hueco 1 (G1), síntesis (S), G2 y mitosis (M). El ADN cromosómico se replica durante la fase S. A medida que las células de glioblastoma se dividen, el ciclo celular debe pasar del estadio S al estadio G2/M. Este orden temporal estrechamente controlado está impuesto por la activación secuencial de varias proteínas cinasas conocidas como cinasas dependientes de ciclina (CDK), mediante la formación de complejos con diversas ciclinas. Un agonista de receptores opioideos, por ejemplo, metadona, en combinación con doxorubicina inhibe la proliferación de células cancerosas tales como células de glioblastoma e induce la parada del ciclo celular en S/G2-M en células de glioblastoma.

10 DISCUSIÓN

Los ejemplos proporcionan evidencias de que D,L-metadona induce apoptosis, activa caspasas y aumenta la muerte celular inducida por doxorubicina en células de leucemia dependiendo de la activación de receptores opioideos que inducen la regulación por disminución de cAMP. Además, pudo demostrarse por primera vez que D,L-metadona puede reducir fuertemente el crecimiento tumoral de ALL en un modelo de xenoinjerto *in vivo*. De manera apreciable, este efecto de destrucción de tumor pudo potenciarse mediante la combinación de D,L-metadona con el fármaco anticanceroso doxorubicina.

Metadona es un agonista de receptores opioideos μ que se une a receptores opioideos μ si están presentes en células. Se encontró que D,L-metadona destruye fuertemente células de ALL derivada de xenoinjerto que expresan altos niveles de receptores opioideos. En cambio, D,L-metadona solo induce muerte celular ligeramente en líneas celulares y células de ALL derivada de xenoinjerto que expresan cantidades moderadas de receptores opioideos, lo que indica que la apoptosis inducida por D,L-metadona parece depender de niveles críticos de expresión de receptores opioideos en células de leucemia.

El tratamiento de combinación puede demostrar ser ventajoso en tumores malignos que todavía responden parcialmente a cualquier tratamiento solo, ya que se sabe que diferentes productos terapéuticos interaccionan entre sí amplificando señales de muerte más débiles. El tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina potencia la eficacia antitumoral de ambos agentes de manera sinérgica en células de BCP-ALL que expresan niveles moderados de receptores opioideos y aumenta fuertemente la activación de caspasas que desempeñan un papel crítico en la inducción de apoptosis en células cancerosas sensibles y resistentes (Fulda, 2009c). Además, la regulación por disminución de las proteínas antiapoptóticas XIAP y Bcl-x_L implicadas en la aparición de resistencias en muchos tumores malignos tales como ALL o NHL (Addeo *et al.*, 2005) se potencia de manera notable. Esto sugiere que el tratamiento de combinación de D,L-metadona y doxorubicina aumenta fuertemente la inducción de apoptosis y puede mejorar su eficacia antitumoral de manera sinérgica.

La resistencia frente a fármacos quimioterápicos convencionales es un factor limitante en la eficacia de terapias mediante lo cual las resistencias a múltiples fármacos como resultado de la sobreexpresión de transportadores de fármacos tales como P-gp también están bien caracterizadas. Mientras que en células sanas la expresión de P-gp pertenece al sistema de defensa celular normal, en células cancerosas humanas la sobreexpresión de P-gp se correlaciona con una supervivencia reducida y un mal desenlace (Diestra *et al.*, 2003). Pudo mostrarse que D,L-metadona es un sustrato de P-gp que inhibe su acción (Crettol *et al.*, 2007). Tal como se muestra en el presente documento, el tratamiento conjunto de doxorubicina con D,L-metadona potencia la captación celular de doxorubicina y además inhibe el flujo de salida de doxorubicina fuera de las células de leucemia, lo que sugiere que D,L-metadona sensibiliza células de leucemia para la apoptosis inducida por doxorubicina aumentando concentraciones de doxorubicina dentro de las células.

El tratamiento de combinación usando D,L-metadona y doxorubicina indujo apoptosis y activación de caspasas en células de BCP-ALL que expresaban cantidades moderadas de receptores opioideos en su superficie. Se encontró que la toxicidad potenciada de este tratamiento de combinación estaba asociada adicionalmente con un aumento de la expresión de receptores opioideos después del tratamiento con doxorubicina. Por tanto, D,L-metadona puede unirse en cantidades superiores a células tratadas conjuntamente con doxorubicina. Estos resultados indican que la toxicidad potenciada en el tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina está asociada con la regulación por incremento de la expresión de receptores opioideos mediada por doxorubicina y además con una captación aumentada y un flujo de salida reducido de doxorubicina mediado por D,L-metadona. Por tanto, ambos agentes pueden ejercer su potencial citotóxico hasta un grado superior.

Los receptores opioideos señalizan catalizando el intercambio de nucleótidos dependiente de ligando en G_i, inhibiendo de ese modo la adenilil ciclasa y modulando los canales de calcio de tipo N así como canales de potasio de tipo de potasio rectificadores de entrada activados por proteína G (GIRK) conduciendo a cambios en la señalización celular (figura 7). La dependencia de la inducción de apoptosis con respecto a la activación de receptores opioideos se destaca mediante su inhibición. Bloquear la señalización de receptores opioideos con el antagonista de receptores opioideos naloxona inhibió el tratamiento de combinación con D,L-metadona y la apoptosis inducida por doxorubicina y la activación de caspasas a una alta tasa, lo que sugiere que la activación de receptores opioideos mediante D,L-metadona está implicada en la inducción de apoptosis y activación de caspasas (figura 7). Basándose en este mecanismo de acción, todos los agonistas de receptores opioideos

independientes del receptor opioideo individual deben destruir células tumorales mediante apoptosis ya que todos los receptores opioideos están vinculados a la adenilil ciclasa mediante la ruta de G_i .

Experimentos adicionales demuestran la aplicabilidad general de la terapia de combinación descrita anteriormente:

5 Amplio espectro de cánceres. Pueden tratarse varios tipos diversos de cáncer con la combinación de agonistas de receptores opioideos tales como

10 Amplio espectro de opioideos. Según el mecanismo de acción asociado a G_i , varios opioideos estructural y farmacológicamente distintos, tales como D,L-metadona, buprenorfina y fentanilo, pueden sensibilizar las células cancerosas para fármacos anticancerosos.

15 Amplio espectro de fármacos anticancerosos. Para varios fármacos anticancerosos estructural y farmacológicamente distintos, pudo mostrarse que aumentan la expresión de receptores opioideos y muestran un flujo de entrada aumentado/flujo de salida reducido debido al agonista opioideo aplicado conjuntamente.

Sumario

20 Se tiene que enfatizar que la interacción entre opioideos y agentes anticancerosos representa un bucle de realimentación de autorrefuerzo tal como se ilustra mediante la figura 26. En el primer trayecto de este bucle, los opioideos potencian la captación celular e inhiben el flujo de salida de fármacos anticancerosos. En el segundo trayecto de dicho bucle, la acumulación de fármacos anticancerosos conduce a un aumento de la expresión de receptores opioideos. Por tanto, ambos agentes pueden ejercer su potencial citotóxico hasta un grado superior.

25 Los presentes ejemplos pudieron verificar la relevancia clínica con células de ALL derivada de paciente *ex vivo* y pudieron mostrar por primera vez que D,L-metadona como monoterapia o en combinación con doxorubicina conduce a una fuerte inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de leucemia derivada de paciente. Tanto la eficacia antileucémica como los efectos secundarios de D,L-metadona sola o en combinación con doxorubicina fueron comparables con los de doxorubicina sola. Sin embargo, solo el tratamiento de combinación pudo lograr
30 una inhibición del crecimiento más duradera. Las concentraciones en suero de metadona en ratones se correlacionaron con las concentraciones que mostraban citotoxicidad *in vitro*.

En resumen, una terapia de combinación de opioideos y fármacos anticancerosos puede mejorar las terapias contra el cáncer de varias maneras:

- 35 • Debido a la regulación por incremento de receptores opioideos, tipos de cáncer anteriormente insensibles a opioideos pueden someterse a una terapia con opioideos.
- 40 • Debido a la acumulación intracelular inducida por opioideos de fármacos anticancerosos, se potencia la eficacia del tratamiento.
- Esto puede conducir a la terapia de tipos de cáncer que son difíciles de tratar.
- 45 • Además, esto puede permitir una reducción de la dosis para los fármacos anticancerosos potenciando la seguridad y el cumplimiento del paciente de la quimioterapia.
- Finalmente, también pueden volver a sensibilizarse células cancerosas resistentes para un tratamiento anticanceroso.
- 50 • Además, los numerosos opioideos y numerosos fármacos anticancerosos en el mercado abren el camino para nuevas combinaciones de fármacos que pueden representar un tratamiento mejorado debido a un aumento de la eficacia y/o seguridad.

Figuras

55 Figura 1: D,L-metadona destruye células de ALL *ex vivo* dependiendo de niveles críticos de expresión de receptores opioideos

60 (A) ALL-SCID6 y ALL-SCID3, ALL-SCID7 y pre-B-ALL-SCID humanas derivadas de ratones sometidos a xenoinjerto presentan diferentes niveles de receptores opioideos en su superficie celular. Se tiñeron ALL-SCID6, ALL-SCID3 y ALL-SCID7 con naloxona-fluoresceína que mide la expresión de receptores opioideos (OR, curva negra gruesa) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran controles (Co) como curvas negras finas.

65 (B) Se trataron ALL-SCID6, ALL-SCID3, ALL-SCID7 y pre-B-ALL-SCID con diferentes concentraciones de D,L-metadona (tal como se indica). Después de 24 h y 48 h, se midieron los porcentajes de células apoptóticas

mediante análisis de FSC/SSC. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica de la siguiente manera: $100 \times [\text{células muertas experimentales (\%)} - \text{células muertas espontáneas en el medio (\%)}] / [100\% - \text{células muertas espontáneas en el medio (\%)}]$. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE<10%.

- 5 Figura 2: el tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina induce apoptosis en células de ALL que expresan cantidades moderadas de receptores opioideos

10 (A) Diferentes líneas celulares de BCP-ALL (Tanoue, Nalm6 y Reh) expresan un número moderado de receptores opioideos en su superficie celular. Se tiñeron Tanoue, Nalm6 y Reh con naloxona-fluoresceína que mide la expresión de receptores opioideos (OR, curva negra gruesa) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran controles (Co) como curvas negras finas.

15 (B) Se trataron líneas celulares de BCP-ALL (Tanoue, Nalm6 y Reh) con diferentes concentraciones de D,L-metadona (tal como se indica) sola (-Doxo, columnas blancas), con doxorubicina sola o con D,L-metadona (tal como se indica) además de doxorubicina (+Doxo, columnas negras). Para la línea celular Tanoue, se usó doxorubicina en una concentración de 0,06 µg/ml, para Nalm6 y Reh una concentración de 0,01 µg/ml. 120 h después de la estimulación, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide.

20 (C) D,L-metadona potencia fuertemente la sensibilidad a doxorubicina de células de pacientes de BCP-ALL derivada de xenoinjerto *ex vivo*. Se trataron células de BCP-ALL derivada de xenoinjerto (pre-B-ALL-SCID) con diferentes concentraciones de D,L-metadona (tal como se indica) sola (-Doxo, columnas blancas) con doxorubicina 0,01 µg/ml sola o con D,L-metadona además de doxorubicina (+Doxo, columnas negras). 48 h después de la estimulación, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de FSC/SSC. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1B. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE<10%.

Figura 3: D,L-metadona en combinación con doxorubicina restaura la activación deficiente de rutas apoptóticas en células de BCP-ALL que expresan cantidades moderadas de receptores opioideos *in vitro*

30 (A) El tratamiento conjunto con D,L-metadona y doxorubicina provoca la activación de caspasas. Se trató la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, con D,L-metadona (tal como se indica) sola (-Doxo), con doxorubicina 0,06 µg/ml (+Doxo) sola o con D,L-metadona (tal como se indica) además de doxorubicina (+Doxo). Después de 120 h se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar caspasa 2, caspasa 9, caspasa 3 y PARP. Se detectó la regulación por disminución de procaspasa 2 a -48 kDa. Se detectó el fragmento activo de caspasa 9 a -37 kDa, el fragmento activo de caspasa 3 a -19 kDa y -17 kDa y la escisión de PARP a -85 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti-β-actina.

40 (B) La apoptosis inducida por D,L-metadona y doxorubicina depende de la activación de caspasas. La incubación previa de la línea celular Tanoue con 50 µM del inhibidor de caspasas zVAD.fmk durante 1 h (columnas blancas) o sin tratamiento previo (columnas negras) fue seguida por la adición de D,L-metadona (tal como se indica) en combinación con doxorubicina 0,06 µg/ml. Se detectó inducción de apoptosis 120 h después de la estimulación mediante análisis de FSC/SSC. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1B. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE<10%.

45 (C) Regulación por disminución de XIAP y Bcl-x_L mediante tratamiento conjunto con D,L-metadona y doxorubicina. Se trató la línea celular Tanoue con D,L-metadona (tal como se indica) sola (-Doxo), con doxorubicina 0,06 µg/ml (+Doxo) sola o con D,L-metadona (tal como se indica) además de doxorubicina (+Doxo). Después de 120 h se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para XIAP y Bcl-x_L. Se detectó XIAP a 58 kDa y Bcl-x_L a ~30 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti-β-actina.

Figura 4: doxorubicina potencia la expresión de receptores opioideos mientras que D,L-metadona potencia la captación de doxorubicina e inhibe su flujo de salida

55 (A) Doxorubicina potencia la expresión de receptores opioideos en la superficie de las células. Se trató la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, durante 96 h con doxorubicina 0,06 µg/ml. Después de la tinción de células tratadas con doxorubicina (+Doxo) y sin tratar (-Doxo) con naloxona-fluoresceína, se determinaron las intensidades de fluorescencia relativa mediante citometría de flujo. Se muestra un aumento de X veces en la expresión de receptores opioideos después de restar la autofluorescencia de las células (-Doxo) y la fluorescencia de doxorubicina (+Doxo).

60 (B) D,L-metadona potencia la captación de doxorubicina e inhibe su flujo de salida. Se trató previamente la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, o bien con doxorubicina 0,3 µg/ml (Doxo) sola o bien con una combinación de doxorubicina y D,L-metadona 10 µg/ml (Doxo + metadona) durante 24 h. Se analizó la captación celular de doxorubicina máxima mediante fluorescencia de doxorubicina en células usando citometría de flujo después de 24

h (0 h, captación máx.). Después de lavar células tratadas con doxorubicina, o bien se dejaron las células sin tratar (Doxo) o bien se trataron con D,L-metadona 10 µg/ml (Doxo + Metadona) y se incubaron durante diferentes puntos de tiempo (8 h, 24 h). Se analizó el flujo de salida de doxorubicina mediante fluorescencia de doxorubicina en células usando citometría de flujo después de 8 h y 24 h. Los valores son intensidades de fluorescencia medias +/- EE.

Figura 5: la apoptosis inducida por tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina depende de la activación de receptores opioideos mediante regulación por disminución de cAMP

(A) La inhibición de la activación de receptores opioideos inhibe la inducción de apoptosis mediada mediante tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina. Se incubó la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, con naloxona 60 µg/ml (Naloxona), D,L-metadona 3 µg/ml (D,L-Metadona) y doxorubicina 0,06 µg/ml (Doxo) solas o en diferentes combinaciones tal como se indica. Después de 96 h, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de FSC/SSC.

(B) La inhibición de la activación de receptores opioideos inhibe la activación de caspasas mediada mediante tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina. Se incubó la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, con naloxona 60 µg/ml (Naloxona), D,L-metadona 3 µg/ml (D,L-Metadona) y doxorubicina 0,06 µg/ml (Doxo) solas o en diferentes combinaciones tal como se indica. Se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar caspasa 2, caspasa 9, caspasa 3 y PARP después de 96 h de incubación. Se detectó la regulación por disminución de procaspasa 2 a -48 kDa. Se detectó el fragmento activo de caspasa 9 a -37 kDa, de caspasa 3 a -19 kDa y -17 kDa y la escisión de PARP a -85 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti-β-actina.

(C) El aumento de niveles de cAMP mediante represión de la actividad fosfodiesterasa inhibe la apoptosis. Se incubó la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, durante 96 h con 3-isobutil-1-metilxantina 200 µM (IBMX), D,L-metadona 3 µg/ml (D,L-Metadona) y doxorubicina 0,06 µg/ml (Doxo) solas o en diferentes combinaciones tal como se indica.

(D) El desacoplamiento de proteínas G inhibitoras a partir de receptores opioideos inhibe la apoptosis impidiendo la inhibición de adenilil ciclasa. Se incubó la línea celular de BCP-ALL, Tanoue, con toxina pertussis 20 ng/ml (PTX), D,L-metadona 3 µg/ml (D,L-Metadona) y doxorubicina 0,06 µg/ml (Doxo) solas o en diferentes combinaciones tal como se indica. Después de 96 h, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de FSC/SSC. Se determinó la fracción de células apoptóticas mediante análisis de FSC/SSC. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1B. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE<10%.

Figura 6: D,L-metadona inhibe el crecimiento de xenoinjertos de leucemia y aumenta la sensibilidad a doxorubicina. Se trasplantaron fragmentos de un pase *in vivo* de una TALL derivada de paciente (ALL-SCID6, véase también la figura 1) a ratones NSG macho. Se trataron los ratones con D,L-metadona sola (n=8, por vía oral, día 1-76, D,L-Metadona), con doxorubicina sola (n=8, i.v., día 46, 53, 60, 76, Doxorubicina) o con un tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina (n=8, D,L-Metadona + Doxo). Se usó D,L-metadona en dosis crecientes semanalmente desde 20 hasta 120 mg/kg/día y doxorubicina en una dosis de 3 mg/kg. Como grupo de control se trataron ratones sometidos a xenoinjerto i.v. con Tween 80 al 10% en solución salina (n=8, Vehículo). Durante 76 días después del trasplante, se monitorizaron todos los ratones para detectar crecimiento tumoral, peso corporal y estado de salud. * significativo con respecto al vehículo (p<0,05, prueba de la U de Mann-Whitney).

Figura 7: señalización de receptores opioideos. La estimulación de receptores opioideos (OR) mediante agonistas tales como D,L-metadona conduce a una activación de la proteína G_i inhibitora. La subunidad α_i inactiva la adenilil ciclasa (AC) dando como resultado una reducción de los niveles de cAMP dentro de la célula, lo cual conduce a su vez a apoptosis que puede estar mediada por diversos moduladores diferentes. Las subunidades βγ de la proteína G_i también modulan la actividad de diferentes efectores tales como la inhibición de canales de Ca²⁺ y la activación de los de K⁺.

Figura 8: expresión de receptores opioideos en células de glioblastoma. Se tiñeron las líneas celulares de glioblastoma U118MG y A172 con naloxona-fluoresceína que mide la expresión de receptores opioideos (OR, curva negra gruesa) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran controles (Co) como curvas negras finas.

Figura 9: D,L-metadona sensibiliza células de glioblastoma para el tratamiento con doxorubicina. Se incubaron células de glioblastoma A172 con D,L-metadona 3 µg/ml sola, con doxorubicina 0,1 µg/ml (Doxo 0,1 µg/ml) sola o con D,L-metadona 3 µg/ml en combinación con doxorubicina 0,1 µg/ml (Doxo + D,L-Metadona). El control representa células de glioblastoma sin tratar. Después de 144 h se captaron imágenes de microscopía óptica. El tratamiento conjunto de A172 con D,L-metadona 3 µg/ml y doxorubicina 0,1 µg/ml condujo al desprendimiento de las células a partir del suelo, formación de ampollas de membrana y contracción celular.

Figura 10: el tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina induce apoptosis en células de glioblastoma. Se trataron células de glioblastoma A172 y U118MG con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) sola (Medio, columnas blancas), con doxorubicina (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$, columnas negras) sola o con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) además de doxorubicina (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$, columnas negras). Después de 120 h y 144 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica de la siguiente manera: $100 \times [\text{células muertas experimentales (\%)} - \text{células muertas espontáneas en el medio (\%)}] / [100\% - \text{células muertas espontáneas en el medio (\%)}]$. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE <10%. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Figura 11: D,L-metadona sensibiliza células de glioblastoma humano primarias para el tratamiento con doxorubicina. (A) Se tiñeron células de glioblastoma humano primarias con naloxona-fluoresceína que mide la expresión de receptores opioideos (OR, curva negra gruesa) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra el control (Co) como curva negra fina. (B) Se trataron células de glioblastoma humano primarias con diferentes concentraciones de D,L-metadona (3, 1 $\mu\text{g/ml}$) sola (Medio, columnas blancas) con doxorubicina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$, columnas negras) sola o con D,L-metadona (3, 1 $\mu\text{g/ml}$) además de doxorubicina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$, columnas negras). Después de 120 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1c. Columnas, media de repeticiones por triplicado, barras, DE <10%. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Figura 12: D,L-metadona sensibiliza células madre que inician glioblastoma para el tratamiento con doxorubicina. (A) Se tiñeron células madre que inician glioblastoma con naloxona-fluoresceína que mide la expresión de receptores opioideos (OR, curva negra gruesa) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra el control (Co) como curva negra fina. (B) Se trataron células madre que inician glioblastoma con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) sola (Medio, columnas blancas), con doxorubicina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$, columnas negras) sola o con D,L-metadona (3, 1 $\mu\text{g/ml}$) además de doxorubicina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$, columnas negras). Después de 144 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1c. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE <10%. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Figura 13: La inducción de muerte celular de células de glioblastoma usando tratamiento conjunto con D,L-metadona y doxorubicina depende de la activación de caspasas. (A) D,L-metadona restauró la activación deficiente de caspasas mediante doxorubicina en células de glioblastoma. Se trataron células A172 con diferentes concentraciones de D,L-metadona (3, 1 $\mu\text{g/ml}$) sola, con doxorubicina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$) sola o con diferentes concentraciones de D,L-metadona (3, 1 $\mu\text{g/ml}$) además de doxorubicina (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Después de 144 h se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar caspasa 10, 2, 9, 3 y PARP. Se detectó la regulación por disminución de procaspasa 10 a ~58 kDa y de procaspasa 2 a ~48 kDa. Se detectó el fragmento activo de caspasa 9 a ~37 kDa, el fragmento activo de caspasa 3 a ~17 kDa y la escisión de PARP a ~85 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti- β -actina. (B) La inhibición de la activación de caspasas con el inhibidor de caspasas de amplio espectro zVAD.fmk bloquea la apoptosis inducida mediante tratamiento conjunto de D,L-metadona y doxorubicina en células A172. Se trataron células de glioblastoma A172 con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) en combinación con doxorubicina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (+ Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$) en ausencia (Medio, columnas negras) o presencia de 50 $\mu\text{mol/l}$ de zVAD.fmk (columnas blancas, zVAD.fmk 50 $\mu\text{mol/l}$). Después de 120 h y 144 h, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1c. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE <10%. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. (C) Regulación por disminución de XIAP y Bcl- x_L en células de glioblastoma mediante el uso de D,L-metadona en combinación con doxorubicina. Se trataron células de glioblastoma A172 con diferentes concentraciones de D,L-metadona (3, 1 $\mu\text{g/ml}$) sola, con doxorubicina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$) sola o con D,L-metadona (3, 1 $\mu\text{g/ml}$) además de doxorubicina (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$) durante 144 h. Se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar XIAP y Bcl- x_L . Se detectó XIAP a 58 kDa y se detectó Bcl- x_L a 30 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti- β -actina.

Figura 14: D,L-metadona invirtió la activación deficiente de rutas de apoptosis mediante doxorubicina en células madre que inician glioblastoma. (A) Se trataron células madre que inician glioblastoma con D,L-metadona (3 $\mu\text{g/ml}$) sola, con doxorubicina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$) sola o con D,L-metadona (3 $\mu\text{g/ml}$) además de doxorubicina (Doxo 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Después de 144 h se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar caspasa 10, 2, 9, 3 y PARP. Se detectó la regulación por disminución de procaspasa 10 a ~58 kDa y de procaspasa 2 a ~48 kDa. Se detectó el fragmento activo de caspasa 9 a ~37 kDa, el fragmento activo de caspasa 3 a ~19 kDa y ~17 kDa y la escisión de PARP a ~85 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti- β -actina. (B) Se trataron células madre que inician glioblastoma con D,L-metadona (3 $\mu\text{g/ml}$) sola, con doxorubicina

0,1 µg/ml (Doxo 0,1 µg/ml) sola o con D,L-metadona (3 µg/ml) además de doxorubicina (Doxo 0,1 µg/ml) durante 144 h. Se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar XIAP, Bcl-x_L y Bcl-x_S. Se detectó XIAP a 58 kDa, se detectó Bcl-x_L a 30 kDa y se detectó Bcl-x_S a 27 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti-β-actina.

5

Figura 15: D,L-metadona potencia la captación de doxorubicina e inhibe su flujo de salida. (A) D,L-metadona potencia la acumulación de doxorubicina en la línea celular de glioblastoma A172. Se incubaron células A172 con doxorubicina 0,3 µg/ml sola o en combinación con D,L-metadona 10 µg/ml. Después de 4, 8 y 24 h de incubación, se determinó la intensidad de fluorescencia de doxorubicina (Doxo) usando análisis de citometría de flujo. En el gráfico se muestra la captación de doxorubicina relativa. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE <10%. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. (B) Se incubaron células A172 con doxorubicina 0,3 µg/ml durante 4 h. En distintos puntos de tiempo (4, 8 y 24 h) después de eliminar mediante lavado el medio que contenía doxorubicina (0 h), se determinó la intensidad de fluorescencia de doxorubicina usando análisis de citometría de flujo. En el gráfico se muestra el contenido de doxorubicina relativo. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE <10%. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

10

15

Figura 16: doxorubicina potencia la expresión de receptores opioideos en la superficie celular. (A) Se trató la línea celular de glioblastoma A172 durante 106 h con doxorubicina 0,1 µg/ml. Después de la tinción de células tratadas con doxorubicina (doxorubicina) y sin tratar con naloxona-fluoresceína (naloxona), se determinaron las intensidades de fluorescencia relativa mediante citometría de flujo. (B) Resumen en forma de tabla de células de control sin tratar y con doxorubicina, células tratadas con naloxona, mientras que D_(control naloxona) representa la mediana de las intensidades de fluorescencia después de restar la autofluorescencia de las células (control).

20

Figura 17: D,L-metadona sensibiliza células cancerosas de leucemia (Nalm-6), células de cáncer pancreático (Colo357) y células de cáncer de ovarios (A2780) para el tratamiento con etopósido o cisplatino. Se trataron las células Nalm6, Colo357 y A2780 con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 µg/ml) sola (Medio, columnas blancas), con etopósido 0,03 µg/ml o cisplatino 0,3 µg/ml solos o con D,L-metadona (10, 3, 1 µg/ml) además de etopósido 0,03 µg/ml (etopósido 0,03 µg/ml, columnas negras) o cisplatino 0,3 µg/ml (cisplatino 0,3 µg/ml, columnas negras). Después de 120 a 144 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1c. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE <10%. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

25

30

Figura 18: D,L-metadona sensibiliza células de leucemia linfocítica crónica (CLL) para el tratamiento con fludarabina. Se trataron las células de CLL con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 µg/ml) sola (Medio, columnas blancas), con fludarabina 0,1 µM (fludarabina 0,1 µM, columnas negras) sola o con D,L-metadona (30, 10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 µg/ml) además de fludarabina 0,1 µM (fludarabina 0,1 µM, columnas negras). Después de 72 h se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1B. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE <10%. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

35

40

Figura 19: cisplatino potencia la expresión de receptores opioideos en células HL60. Cisplatino potencia la expresión de receptores opioideos en la superficie de la línea celular de leucemia promielocítica HL60. Se trató la línea celular HL60 durante 24 h con cisplatino 0,3 µg/ml. Después de la tinción de células tratadas con cisplatino (+Cisplatino) y sin tratar (-Cisplatino) con naloxona-fluoresceína, se determinaron las intensidades de fluorescencia relativa mediante citometría de flujo. Se muestra un aumento de 2,1 veces en la expresión de receptores opioideos después de restar la autofluorescencia de las células.

45

Figura 20: la línea celular de carcinoma de mama resistente a Her2/neu, JIMT-1, expresa altos niveles del receptor opioideo µ

50

La línea celular JIMT-1 humana, derivada a partir de una metástasis pleural de una paciente de 62 años de edad con cáncer de mama que era clínicamente resistente a Herceptin, presenta receptores opioideos en su superficie celular. Se tiñeron células JIMT-1 con naloxona-fluoresceína que mide la expresión de receptores opioideos (OR, curva negra gruesa) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran controles (Co) como curvas negras finas.

55

Figura 21: análisis de ciclo celular y apoptosis de la línea celular de carcinoma de mama resistente a Her2/neu, JIMT-1, tratada con una combinación de D,L-metadona y doxorubicina. Se trató la línea celular JIMT-1 humana con 1, 3 o 10 µg/ml de metadona sola (1, 3, 10 Met -Doxo), con 0,015 µg/ml de doxorubicina (Doxo) o una combinación de 0,015 µg/ml de doxorubicina con 1, 3 o 10 µg/ml de metadona (1, 3, 10 Met +Doxo). (A) Un análisis de FACS de las células reveló que la combinación de ambas sustancias aumentó de manera dependiente de la dosis la apoptosis de las células JIMT-1 a las 96 horas después del tratamiento. (B) Un análisis de FACS realizado a las 96 horas (lado izquierdo de la figura) y 120 horas (lado derecho de la figura) después del tratamiento mostró

60

65

niveles de apoptosis adicionalmente aumentados debido al tratamiento de combinación. Doxorubicina 0 o 0,015 $\mu\text{g/ml}$ (barras negras), metadona 1 $\mu\text{g/ml}$ más doxorubicina 0 o 0,015 $\mu\text{g/ml}$ (barras blancas), metadona 3 $\mu\text{g/ml}$ más doxorubicina 0 o 0,015 $\mu\text{g/ml}$ (barras sombreadas), metadona 10 $\mu\text{g/ml}$ más doxorubicina 0 o 0,015 $\mu\text{g/ml}$ (barras con puntos).

5

Figura 22: la inducción de muerte celular de células JIMT-1 usando tratamiento conjunto con D,L-metadona y doxorubicina depende de la activación de caspasas. La inhibición de la activación de caspasas con el inhibidor de caspasas de amplio espectro zVAD.fmk bloquea la apoptosis inducida mediante tratamiento conjunto de D,L-metadona y doxorubicina en células JIMT-1. Se trató la línea celular humana JIMT-1 con diferentes

10

Figura 23: la inducción de muerte celular de células JIMT-1 usando tratamiento conjunto con D,L-metadona y doxorubicina depende de la activación de caspasas. (A) D,L-metadona restauró la activación deficiente de caspasas mediante doxorubicina en células JIMT-1. Se trataron células A172 con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) sola, con doxorubicina 0,015 $\mu\text{g/ml}$ sola o con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) además de doxorubicina 0,015 $\mu\text{g/ml}$. Después de 96 h se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar caspasa 8, 9, 3 y PARP. Se detectó el fragmento activo de caspasa 8 a ~ 43 kDa, se detectó el fragmento activo de caspasa 9 a ~ 37 kDa, el fragmento activo de caspasa 3 a ~ 17 kDa y la escisión de PARP a ~ 85 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti- β -actina. (B) Regulación por disminución de XIAP y Bcl-x_L en células JIMT-1 usando D,L-metadona en combinación con doxorubicina. Se trataron células de carcinoma de mama JIMT-1 con diferentes concentraciones de D,L-metadona (10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) sola, con doxorubicina 0,015 $\mu\text{g/ml}$ sola o con D,L-metadona (10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) además de doxorubicina (Doxo 0,015 $\mu\text{g/ml}$) durante 96 h. Se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar XIAP y Bcl-x_L. Se detectó XIAP a 57 kDa y se detectó Bcl-x_L a 21 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti- β -actina.

15

20

25

30

Figura 24: inducción de apoptosis en células CEM de leucemia de células T mediante una combinación de doxorubicina y fentanilo. Se trató línea celular CEM de leucemia de células T humana (10000 células/100 μl) con fentanilo 30, 10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ solo (barras blancas) o además de doxorubicina 0,02 $\mu\text{g/ml}$ (barras negras). Después de 48 h y 72 h se midió la cuantificación de la apoptosis mediante citometría de flujo.

35

Figura 25: inducción de apoptosis en células HL-60 de leucemia mieloide aguda humana mediante una combinación de doxorubicina y buprenorfina. Se trató línea celular HL-60 de leucemia mieloide aguda humana (5000 células/100 μl) con buprenorfina 20, 10, 5, 3, 1, 0,5, 0,3, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sola (barras blancas) o además de doxorubicina 0,003 $\mu\text{g/ml}$ (barras negras). Después de 144 h o 168 h se midió la cuantificación de la apoptosis mediante citometría de flujo.

40

Figura 26: diagrama esquemático que muestra la interacción positiva mutua entre opioides y fármacos anticancerosos. Por un lado, los opioides potencian la captación celular e inhiben el flujo de salida de fármacos anticancerosos. Por otro lado, los fármacos anticancerosos conducen a un aumento de la expresión de receptores opioides. Por tanto, ambos agentes pueden ejercer su potencial citotóxico hasta un grado superior.

45

Figura 27: expresión de receptores opioides en leucemia diferente

Diferentes células de leucemia (leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana y leucemia de células B humana) expresan diferentes números moderados de receptores opioides en su superficie celular. Se tiñeron células de leucemia con naloxona-fluoresceína que mide la expresión de receptores opioides (OR, curva negra gruesa) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran controles (Co) sin naloxona como curvas negras finas.

50

Figura 28: efecto de la terapia de combinación de agonista de receptores opioides y agente anticanceroso

55

D,L-metadona potencia fuertemente la sensibilidad a cisplatino de diferentes células de leucemia. Se trataron diferentes células de leucemia (leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana y leucemia de células B humana) con diferentes concentraciones de D,L-metadona (tal como se indica) sola (- CDDP, columnas blancas), con cisplatino solo o con D,L-metadona además de cisplatino (+ CDDP, columnas negras). Después del tiempo de incubación, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de FSC/SSC. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1B. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE<10%.

60

Figura 29: D,L-metadona en combinación con cisplatino restaura la activación deficiente de rutas apoptóticas en células de leucemia

65

El tratamiento conjunto con D,L-metadona y cisplatino provoca la activación de caspasas e induce la regulación por disminución y escisión de XIAP y la regulación por incremento de Bax. Se trataron diferentes células de leucemia (leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana) con D,L-metadona (tal como se indica) sola (- CDDP), con cisplatino (CDDP) solo o con D,L-metadona (tal como se indica) además de cisplatino (+ CDDP). Después del tiempo de incubación se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar caspasa 2, caspasa 9, caspasa 3, PARP, XIAP y Bax. Se detectó la regulación por disminución de procaspasa 2 a -48 kDa. Se detectó el fragmento activo de caspasa 9 a -37 kDa, el fragmento activo de caspasa 3 a -19 kDa y/o -17 kDa, PARP a -116 kDa, la escisión de PARP a -85 kDa, se detectó XIAP a -58 kDa y la escisión de XIAP a -30 kDa y Bax a -21 kDa. Se controló una carga de proteína igual mediante anticuerpo anti- β -actina.

Figura 30: la apoptosis inducida por D,L-metadona y cisplatino depende de la activación de caspasas. La incubación previa de diferentes células de leucemia (leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana, leucemia de precursores de células B humana) con 50 μ M del inhibidor de caspasas zVAD.fmk durante 1 h (+ zVAD.fmk, columnas blancas) o sin tratamiento previo (- zVAD.fmk, columnas negras) fue seguida por adición de D,L-metadona (tal como se indica) en combinación con cisplatino (tal como se indica). Se detectó inducción de apoptosis después del tiempo de incubación mediante análisis de FSC/SSC. Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1B. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE<10%.

Figura 31: cisplatino potencia la expresión de receptores opioideos

(A) Cisplatino potencia la expresión de receptores opioideos en la superficie de las células de diferentes células de leucemia (leucemia de células T humana, leucemia mieloide aguda humana y leucemia de precursores de células B humana) que se trataron con cisplatino (tal como se indica). Después de la tinción de células tratadas con cisplatino (CDDP) y células sin tratar (Co) con naloxona-fluoresceína, se determinaron las intensidades de fluorescencia relativa mediante citometría de flujo. Se muestra un aumento de X veces en la expresión de receptores opioideos en comparación con el grupo de control sin tratar después de restar la autofluorescencia de las células y la fluorescencia de cisplatino.

Figura 32: la apoptosis inducida por tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina depende de la activación de receptores opioideos

La inhibición de la activación de receptores opioideos inhibe la inducción de apoptosis mediada mediante tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina. Se incubaron células de glioblastoma con naloxona 60 μ g/ml (Naloxona), D,L-metadona 3 μ g/ml (D,L-Metadona) y doxorubicina 0,1 μ g/ml (Doxo) solas o en diferentes combinaciones tal como se indica mediante las marcas + y -. Después de 120 h y 144 h, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de FSC/SSC. Los resultados de los diferentes tratamientos que se indican con respecto a las sustancias dadas bajo las barras individuales después de 120 h (lado izquierdo de la figura) y 144 h (lado derecho de la figura) se muestran en la figura 32.

Figura 33: la diferente duración de eficacia de diferentes opioideos induce diferentes tasas de muerte celular en células de glioblastoma

(A) Se trataron células de glioblastoma con diferentes concentraciones de D,L-metadona (tal como se indica) sola (-Doxo, columnas blancas, que son muy bajas y están en el lado izquierdo de una barra negra), con doxorubicina sola o con D,L-metadona (tal como se indica) además de doxorubicina (+Doxo, columnas negras) usando la misma concentración de doxorubicina 0,1 μ g/ml para todos los tratamientos y diferentes concentraciones de D,L-metadona tal como se indica. 144 h después de la estimulación, se midieron los porcentajes de muerte celular y células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide.

(B) Se trataron células de glioblastoma con diferentes concentraciones de morfina (tal como se indica) sola (-Doxo, columnas blancas que son muy bajas y están en el lado izquierdo de una barra negra), con doxorubicina sola o con morfina (tal como se indica) además de doxorubicina (+Doxo, columnas negras) usando la misma concentración de doxorubicina 0,1 μ g/ml para todos los tratamientos y diferentes concentraciones de D,L-metadona tal como se indica. 144 h después de la estimulación, se midieron los porcentajes de muerte celular y células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide.

Se calculó el porcentaje de muerte celular específica tal como se describe en la figura 1B. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE<10%.

Figura 34: la diferente duración de eficacia de diferentes opioideos induce diferentes tasas de muerte celular en células de leucemia

(A) Se trataron células de leucemia (leucemia de células B humana) con diferentes concentraciones de D,L-metadona (tal como se indica) sola (-Doxo, columnas blancas en el lado izquierdo de una barra negra), con doxorubicina sola o con D,L-metadona (tal como se indica) además de doxorubicina (+Doxo, columnas negras) usando la misma concentración de doxorubicina 0,1 µg/ml para todos los tratamientos y diferentes concentraciones de D,L-metadona tal como se indica. 96 h después de la estimulación, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide.

(B) Se trataron células de leucemia (leucemia de células B humana) con diferentes concentraciones de morfina (tal como se indica) sola (-Doxo, columnas blancas en el lado izquierdo de una barra negra), con doxorubicina sola o con morfina (tal como se indica) además de doxorubicina (+Doxo, columnas negras) usando la misma concentración de doxorubicina 0,1 µg/ml para todos los tratamientos y diferentes concentraciones de D,L-metadona tal como se indica. Durante las 96 h después de la estimulación, se midieron los porcentajes de células apoptóticas mediante análisis de ADN hipodiploide.

Se calculó el porcentaje de apoptosis específica tal como se describe en la figura 1B. Columnas, media de repeticiones por triplicado; barras, DE<10%.

Figura 35: el tratamiento de combinación con D,L-metadona y doxorubicina inhibe la proliferación e induce parada del ciclo celular en S/G2-M en células de glioblastoma.

Se mostró el análisis de citometría de flujo de células de glioblastoma tratadas con metadona y doxorubicina. Análisis de citometría de flujo de células sin tratar (Células sin tratar) (el pico de G1 es superior al pico de G2), células tratadas con metadona 1 µg/ml (Metadona) (el pico de G1 es superior al pico de G2) y células tratadas con metadona además de doxorubicina 0,1 µg/ml (Metadona + Doxo). Se mostró la parada del avance del ciclo celular en la fase G2/M (el pico de G1 es inferior al de células sin tratar y el pico de G2 es superior al de células sin tratar) en células de glioblastoma tratadas con metadona además de doxorubicina después de 96 h (A). El pico de subG1 delante de G1 es el ADN fragmentado ADN (porcentaje de muerte celular). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Bibliografía

Addeo, R., Caraglia, M., Baldi, A., D'Angelo, V., Casale, F., Crisci, S., Abbruzzese, A., Vincenze, B., Campioni, M., Di Tullio, M. T., y Indolfi, P. (2005). Prognostic role of bcl-xL and p53 in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Biol Ther* 4, 32-38.

Bergmann JP, Harris D. Radioresistance, chemoresistance and apoptosis resistance. *Radiation Oncology* 1997; 27:47-57.

Boecker W *et al.*, eds., capítulo 6: "Tumorerkrankungen" en *Pathologie*, Urban & Fischer, Elsevier, 4ª edición, 2008.

Borgmann, A., Baldy, C., von Stackelberg, A., Beyermann, B., Fichtner, I., Nurnberg, P., y Henze, G. (2000). Childhood all blasts retain phenotypic and genotypic characteristics upon long-term serial passage in NOD/SCID mice. *Pediatr Hematol Oncol* 17, 635-650.

Carbonari M, Cibati M, Cherchi M, *et al.* Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus-infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method. *Blood* 1994; 83:1268-77.

Classen, C. F., Falk, C. S., Friesen, C., Fulda, S., Herr, I., y Debatin, K. M. (2003). Natural killer resistance of a drug-resistant leukemia cell line, mediated by up-regulation of HLA class I expression. *Haematologica* 88, 509-521.

Crettol, S., Digon, P., Golay, K. P., Brawand, M., y Eap, C. B. (2007). In vitro P-glycoprotein-mediated transport of (R)-, (S)-, (R,S)-methadone, LAAM and their main metabolites. *Pharmacology* 80, 304-311.

Diestra, J. E., Condom, E., Del Muro, X. G., Scheffer, G. L., Perez, J., Zurita, A. J., Munoz-Segui, J., Vignes, F., Scheper, R. J., Capella, G., *et al.* (2003). Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications. *J Urol* 170, 1383-1387.

Friesen C, Glatting G, Koop B, *et al.* Breaking chemo- and radioresistance with [213Bi]anti-CD45 antibodies in leukaemia cells. *Cancer Res* 2007; 67(5):1950-8.

Friesen C, Kiess Y, Debatin KM. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukaemia cells. *Cell Death Differ* 2004; 11(Sup. 1):S73-85.

Fulda, S. (2009a). Cell death in hematological tumors. *Apoptosis* 14, 409-423.

Fulda, S. (2009b). Therapeutic opportunities for counteracting apoptosis resistance in childhood leukaemia. *Br J Haematol* 145, 441-454.

5 Fulda, S. (2009c). Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer* 124, 511-515.

Hilger, R. A., Richly, H., Grubert, M., Oberhoff, C., Strumberg, D., Scheulen, M. E., y Seeber, S. (2005). Pharmacokinetics (PK) of a liposomal encapsulated fraction containing doxorubicin and of doxorubicin released from the liposomal capsule after intravenous infusion of Caelyx/Doxil. *Int J Clin Pharmacol Ther* 43, 588-589.

10 Law, P. Y., Wong, Y. H., y Loh, H. H. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 389-430. Law 2000.

15 Naderi, E. H., Findley, H. W., Ruud, E., Blomhoff, H. K., y Naderi, S. (2009). Activation of cAMP signaling inhibits DNA damage-induced apoptosis in BCP-ALL cells through abrogation of p53 accumulation. *Blood* 114, 608-618.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., y Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 139, 271-279.

20 Posovszky, C., Friesen, C., Herr, I., y Debatin, K. M. (1999). Chemotherapeutic drugs sensitize pre-B ALL cells for CD95- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *Leukemia* 13, 400-409.

25 Richly, H., Henning, B. F., Kupsch, P., Passarge, K., Grubert, M., Hilger, R. A., Christensen, O., Brendel, E., Schwartz, B., Ludwig, M., *et al.* (2006). Results of a Phase I trial of sorafenib (BAY 43-9006) in combination with doxorubicin in patients with refractory solid tumors. *Ann Oncol* 17, 866-873.

Safa, M., Kazemi, A., Zand, H., Azarkeivan, A., Zaker, F., y Hayat, P. (2010a). Inhibitory role of cAMP on doxorubicin-induced apoptosis in pre-B ALL cells through dephosphorylation of p53 serine residues. *Apoptosis* 15, 196-203.

30 Workman, P., Aboagye, E. O., Balkwill, F., Balmain, A., Bruder, G., Chaplin, D. J., Double, J. A., Everitt, J., Farningham, D. A., Glennie, M. J., *et al.* (2010). Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 102, 1555-1577

35 Sumario

La invención se refiere a estrategias novedosas para el tratamiento de pacientes con cáncer basándose en una combinación de un agonista de receptores opioides y un compuesto anticanceroso

REIVINDICACIONES

1. Combinación de un agonista de receptores opioideos y al menos un agente anticanceroso para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que
 - (a) dicho agonista de receptores opioideos se administra a un paciente en una o más dosis para establecer un nivel en plasma terapéuticamente eficaz durante un periodo de al menos cuatro semanas, y
 - (b) al menos un agente anticanceroso seleccionado del grupo que consiste en agentes quimioterápicos, agentes citotóxicos, agentes citostáticos y/o agentes inmunotóxicos se administra para establecer un periodo con un nivel en plasma terapéuticamente eficaz, y
 - (c) dichos periodos de a) y b) se solapan.
2. Combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho agente anticanceroso y dicho agonista de receptores opioideos se administran de manera simultánea o sucesiva.
3. Combinación para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que dicho agonista de receptores opioideos puede inhibir la proliferación celular.
4. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el paciente ha recibido un tratamiento previo que comprende un agente anticanceroso.
5. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el periodo de administración para el agonista de receptores opioideos que proporciona una dosis terapéuticamente relevante representa un tratamiento crónico.
6. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agonista de receptores opioideos se selecciona de la lista que consiste en
 - i. compuestos del grupo de metadona tales como D/l-metadona, D-metadona, L-metadona, normetadona,
 - ii. derivados de fentanilo tales como fentanilo, sufentanilo y carfentanilo;
 - iii. compuestos de morfinano tales como morfina, codeína, heroína, dextralorfanol, dextrometorfanol, dextrofanol, dimetorfanol, levalorfanol, levofuretilnormorfanol, levometorfanol, levofenacilmorfanol, levorfanol, metorfanol, morfanol, oxilorfanol, fenomorfanol y xorfanol,
 - iv. derivados de benzomorfanol tales como 5,9-DEHB, alazocina, anazocina, bremazocina, butinazocina, carbazocina, cogazocina, ciclazocina, dezocina, eptazocina, etazocina, etilcetociclazocina, fluorofeno, gemazocina, ibazocina, ketazocina, metazocina, moxazocina, pentazocina, fenazocina, quadazocina, tiazocina, tonazocina, volazocina y 8-CAC;
 - v. derivados de 4-fenilpiperidina tales como petidina, cetobemidona, anileridina, piminodina, fenoperidina, furetidina, alfa-prodina, trimeperidina, incluyendo derivados de 4-fenilpirrolidina tales como profadol y derivados de 4-fenilazepán tales como meptazinol,
 - vi. derivados de ciclohexano tales como tilidina, U-50488, tramadol y tapentadol
 - vii. opioideos endógenos tales como endorfinas, encefalinas, dinorfinas, nociceptina, dermorfinas, morficeptina, endomorfinas y fragmentos derivados de la proteína proopiomelanocortina (POMC).
7. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agonista de receptores opioideos pertenece al grupo de metadona.
8. Combinación para su uso según la reivindicación 7, en la que el agonista de receptores opioideos es D/l-metadona y preferiblemente la forma de clorhidrato de la misma.
9. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente anticanceroso se selecciona de la lista que consiste en:
 - i. sustancias de intercalación tales como antraciclina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina y daunorubicina;
 - ii. inhibidores de la topoisomerasa tales como irinotecán, topotecán, camptotecina, lamellarina D, etopósido, tenipósido, mitoxantrona, amsacrina, elipticinas y ácido aurintricarboxílico;

- iii. compuestos de nitrosourea tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), estreptozocina;
 - 5 iv. mostazas nitrogenadas tales como ciclofosfamida, mecloretamina, uramustina, bendamustina, melfalán, clorambucilo, mafosfamida, trofosfamida e ifosfamida;
 - v. alquilsulfonatos tales como busulfano y treosulfano;
 - 10 vi. agentes alquilantes tales como procarbazona, dacarbazina, temozolomida y tiotepa;
 - vii. análogos de platino tales como cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino y tetranitrato de triplatino;
 - 15 viii. fármacos disruptores de microtúbulos tales como vinblastina, colcemida y nocodazol;
 - ix. antifolatos tales como metotrexato, aminopterina, diclorometotrexato, pemetrexed, raltitrexed y pralatrexato;
 - 20 x. análogos de purina tales como azatioprina, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, fosfato de fludarabina, pentostatina y cladribina;
 - xi. análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-azauracilo, gemcitabina;
 - 25 xii. hormonas esteroideas tales como gestágeno, andrógeno, glucocorticoides, dexametasona, prednisolona y prednisona;
 - xiii. anticuerpos anticancerosos tales como anticuerpos monoclonales, anticuerpos marcados de manera radioactiva y conjugados de anticuerpo-fármaco;
 - 30 xiv. péptidos anticancerosos tales como péptidos marcados de manera radioactiva y conjugados de péptido-fármaco.
10. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente anticanceroso es metotrexato, citarabina, cisplatino, etopósido o vincristina, y especialmente doxorubicina o rituximab.
 - 35 11. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los pacientes padecen una neoplasia tal como se clasifica según la clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud, 10ª revisión (ICD-10), y en la que la neoplasia es del grupo que consiste en neoplasias malignas de las clases C00 a C97, neoplasias *in situ* de las clases D00 a D09, neoplasias benignas de las clases D10 a D36 y neoplasias de comportamiento incierto o desconocido de las clases D37 a D48.
 - 40 12. Combinación para su uso según la reivindicación 11, en la que los pacientes padecen neoplasia del grupo que consiste en carcinoma pancreático, hepatoblastoma, carcinoma de colon, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma, carcinoma de mama, carcinoma de ovarios, carcinoma de próstata, glioblastoma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, proformas de leucemia, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, células madre que inician glioblastoma, células madre tumorales y mieloma múltiple.
 - 45 13. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el paciente muestra una resistencia o bien intrínseca o bien adquirida.
 - 50 14. Combinación para su uso según la reivindicación 13, en la que el paciente muestra una o más de las siguientes resistencias:
 - i. resistencia a la apoptosis
 - ii. resistencia a múltiples fármacos
 - 60 iii. resistencia a fármacos anticancerosos
 - iv. resistencia a fármacos citotóxicos
 - 65 v. resistencia a especies reactivas de oxígeno

- vi. resistencia a agentes que dañan el ADN
- vii. resistencia a anticuerpos tóxicos
- 5 viii. resistencia a doxorubicina o rituximab
- ix. resistencia única o cruzada, en particular a uno o más de los siguientes principios activos: metotrexato, citarabina, cisplatino, etopósido, vincristina, paclitaxel, carboplatino, oxaliplatino, tenipósido, dexametasona, prednisolona, ciclofosfamida, difosfamida, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, daunorubicina, mercaptopurina y fludarabina.
- 10 x. resistencia a la irradiación (por ejemplo, alfa, beta, gamma o electrones Auger).
- 15. 15. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente anticanceroso se administra a una dosis que es igual o inferior a la dosis recomendada para el tratamiento del cáncer usando solo el agente anticanceroso.
- 15

Figura 1

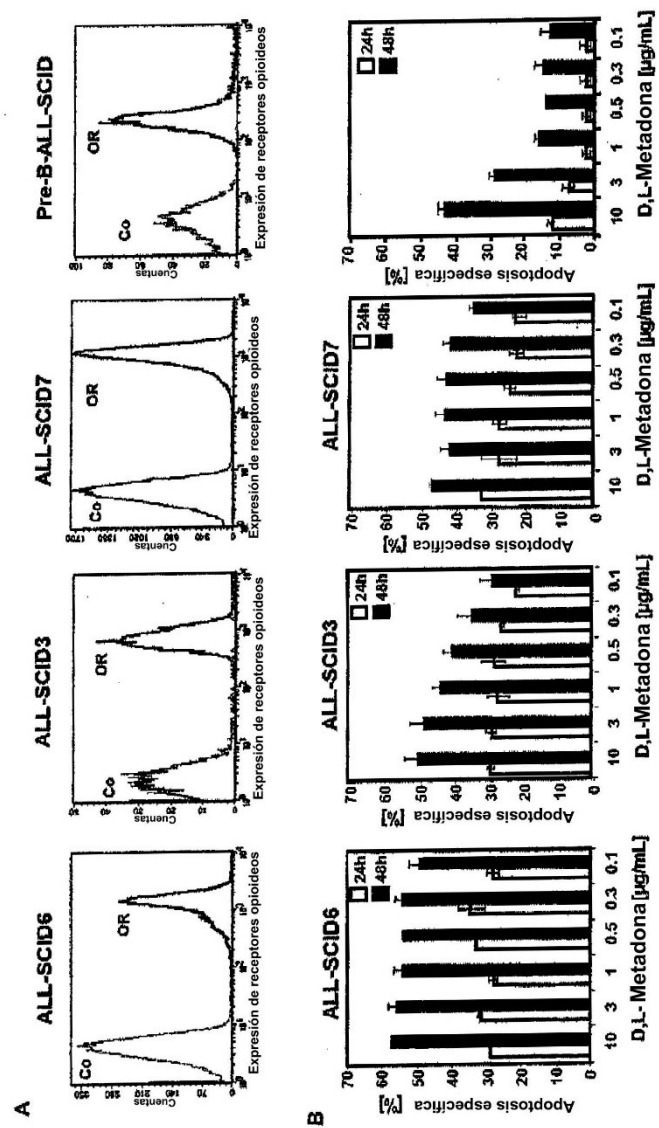


Figura 2

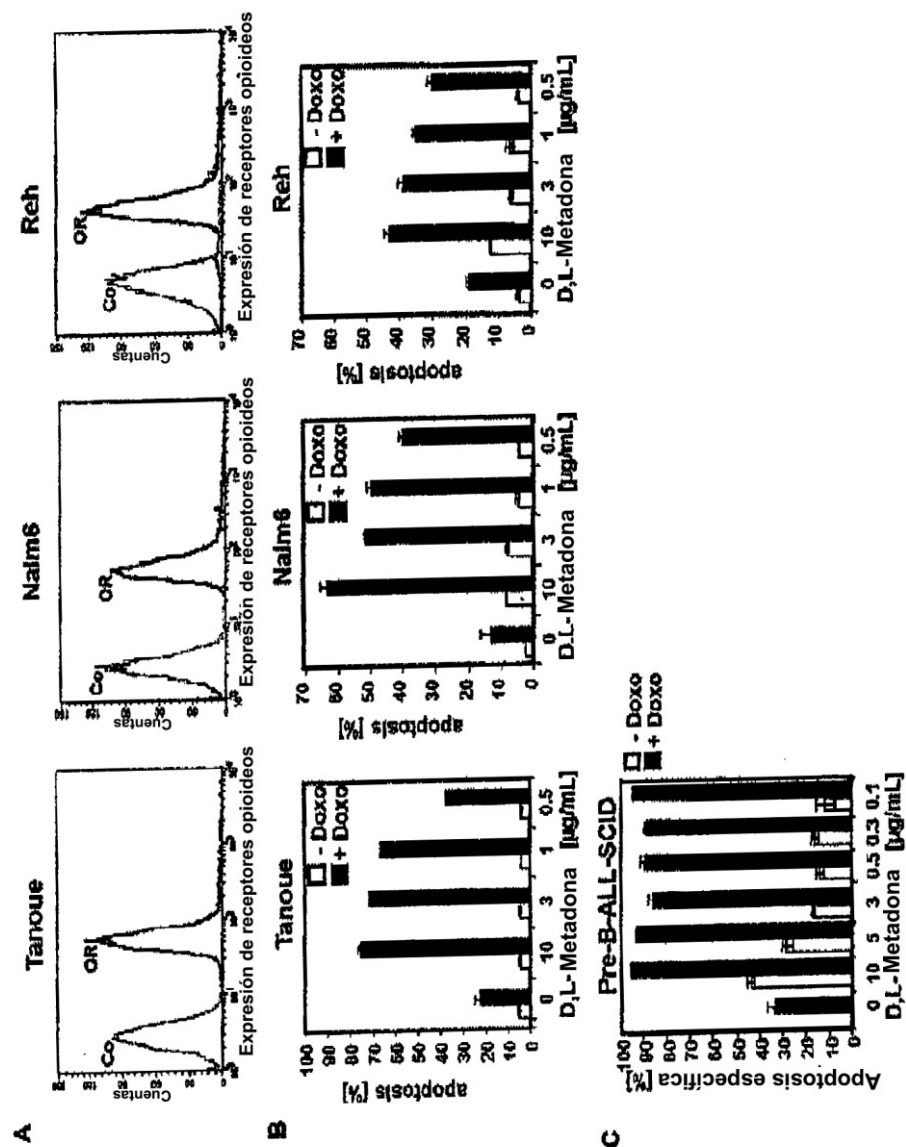


Figura 3

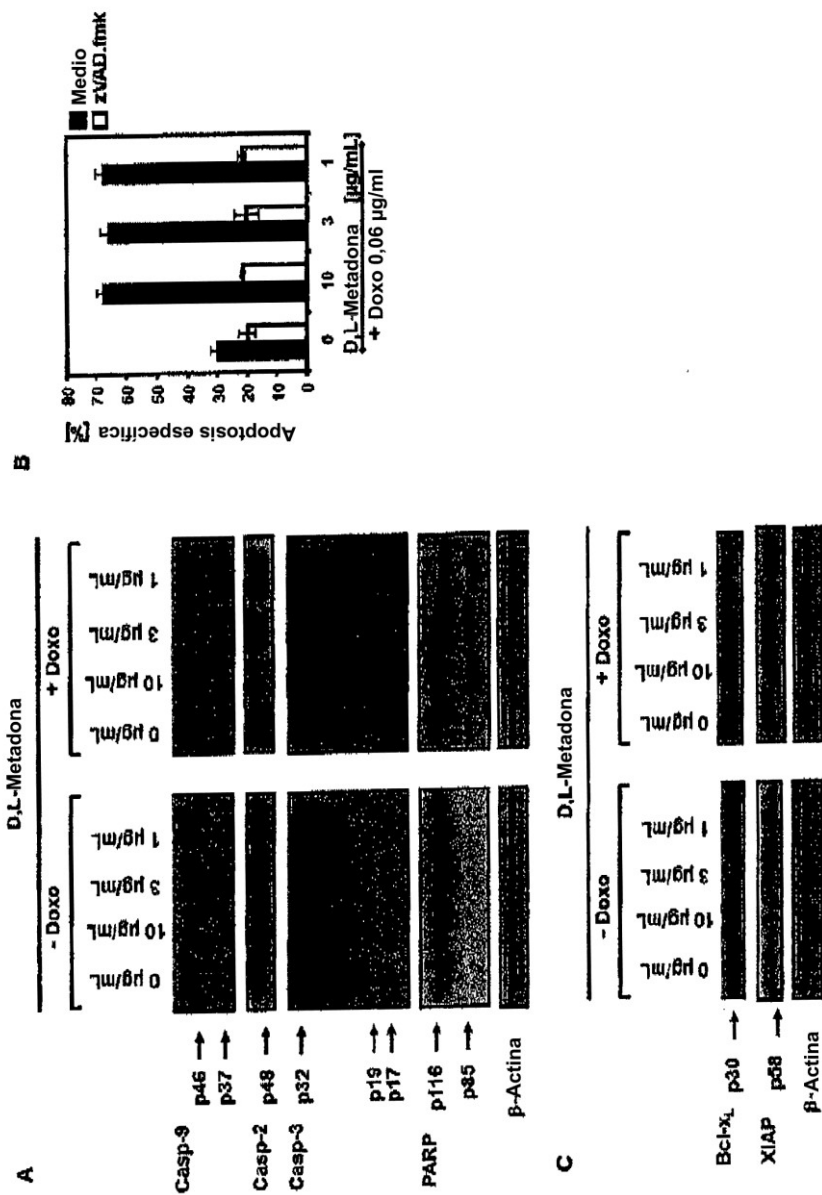


Figura 4

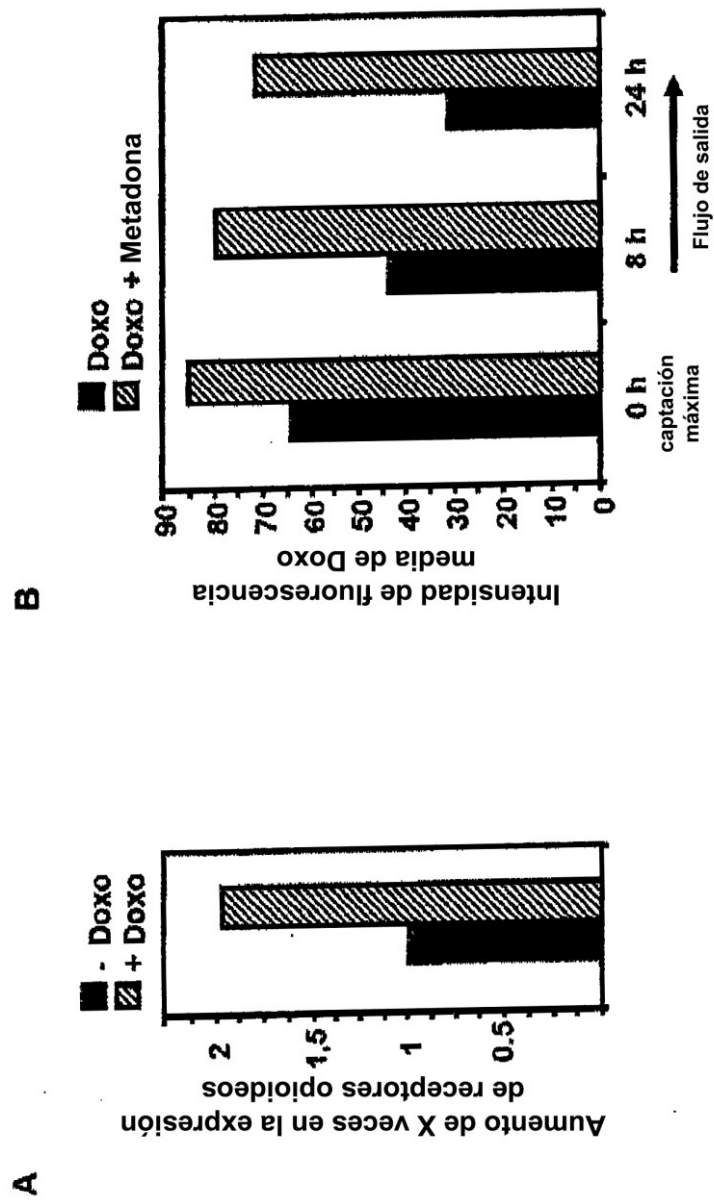


Figura 5

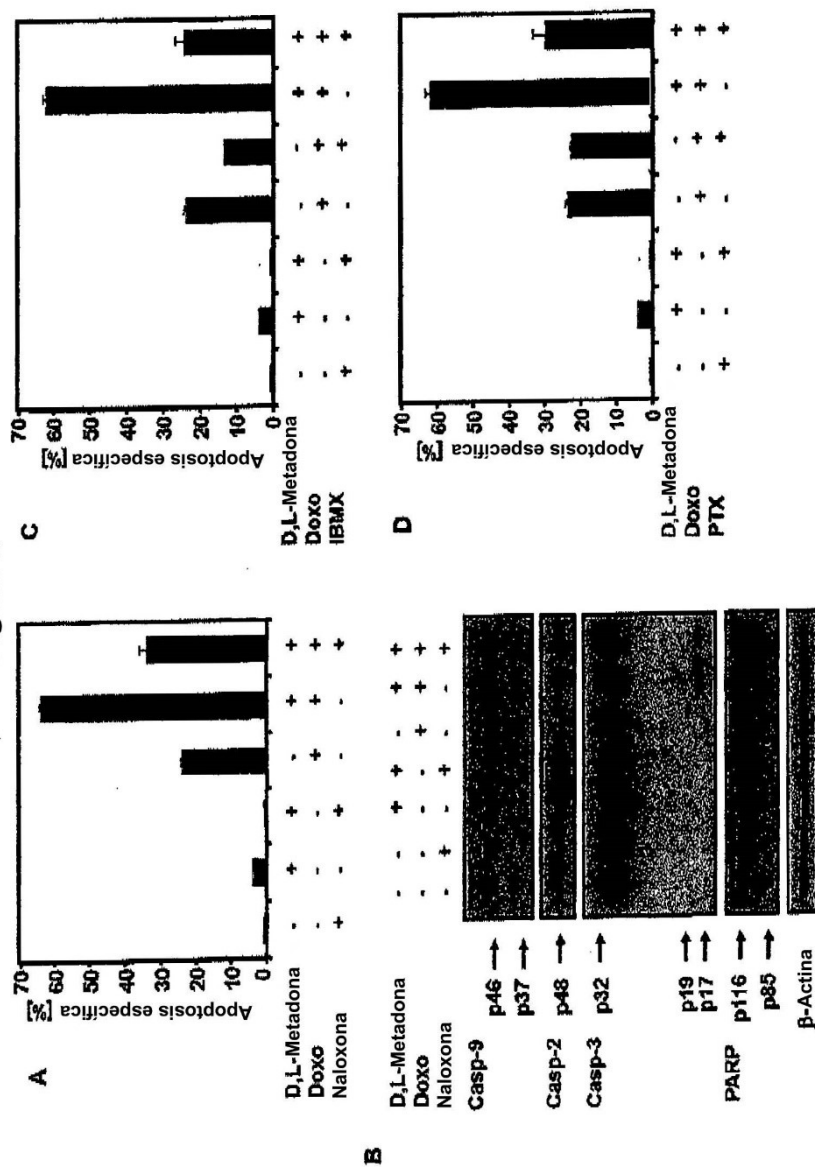


Figura 6

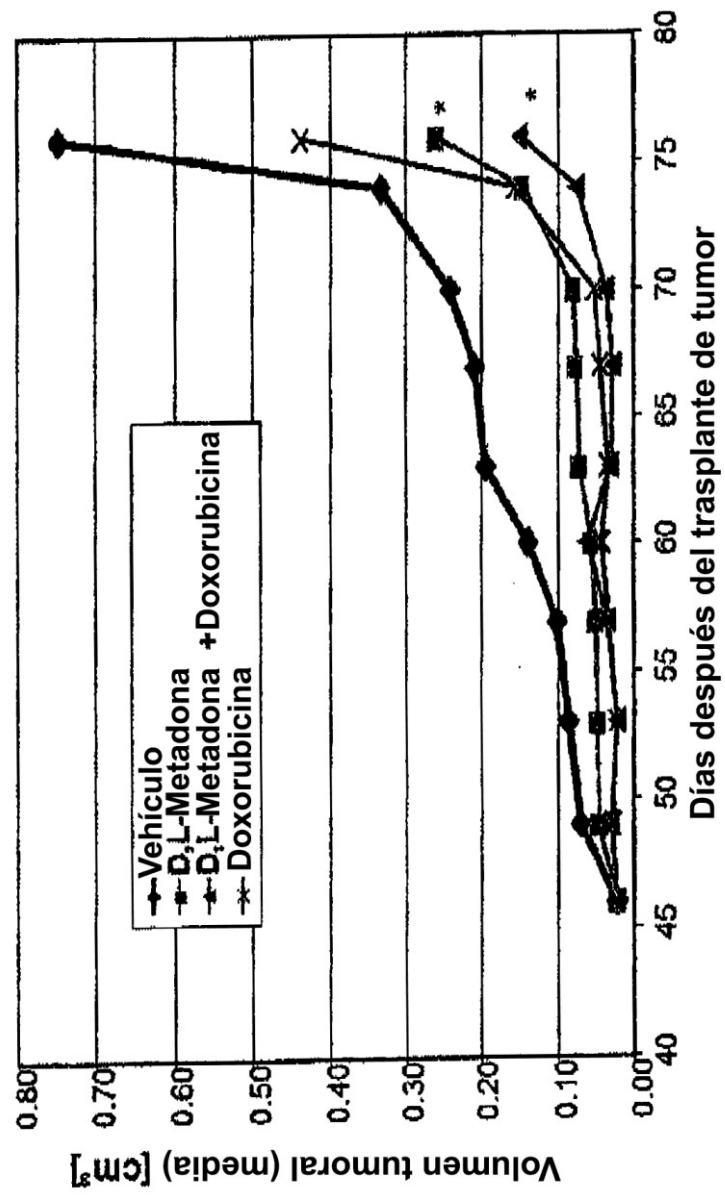


Figura 7

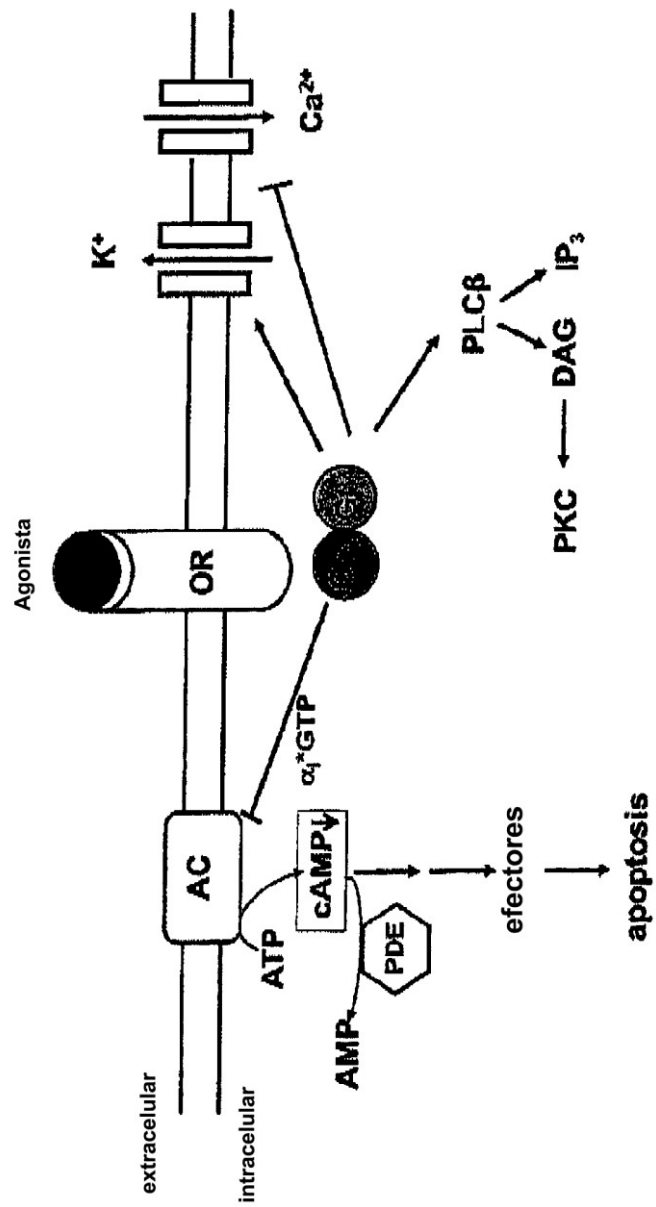


Figura 8

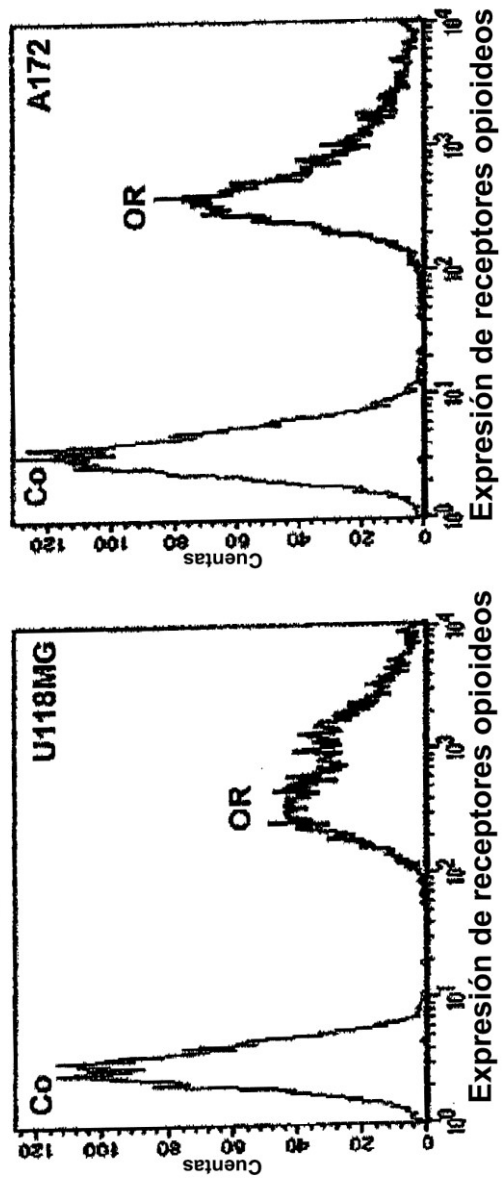


Figura 9

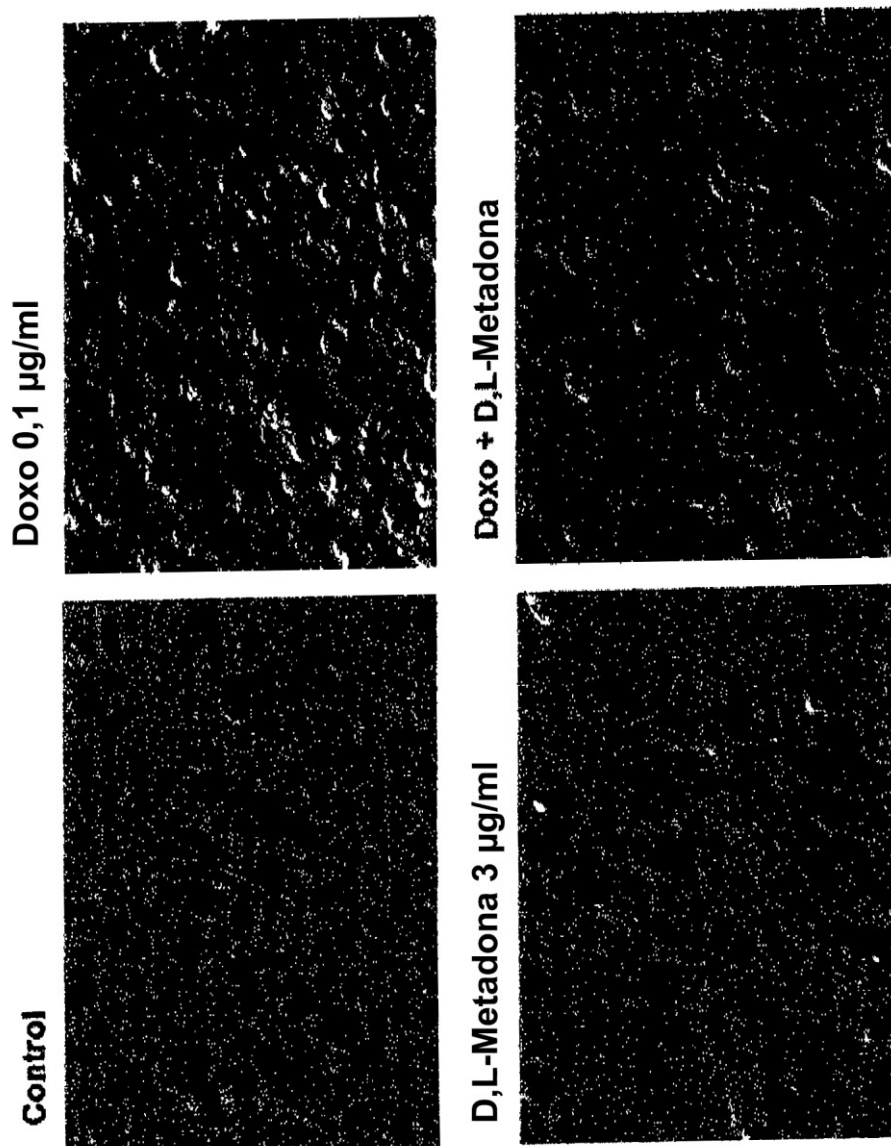


Figura 10

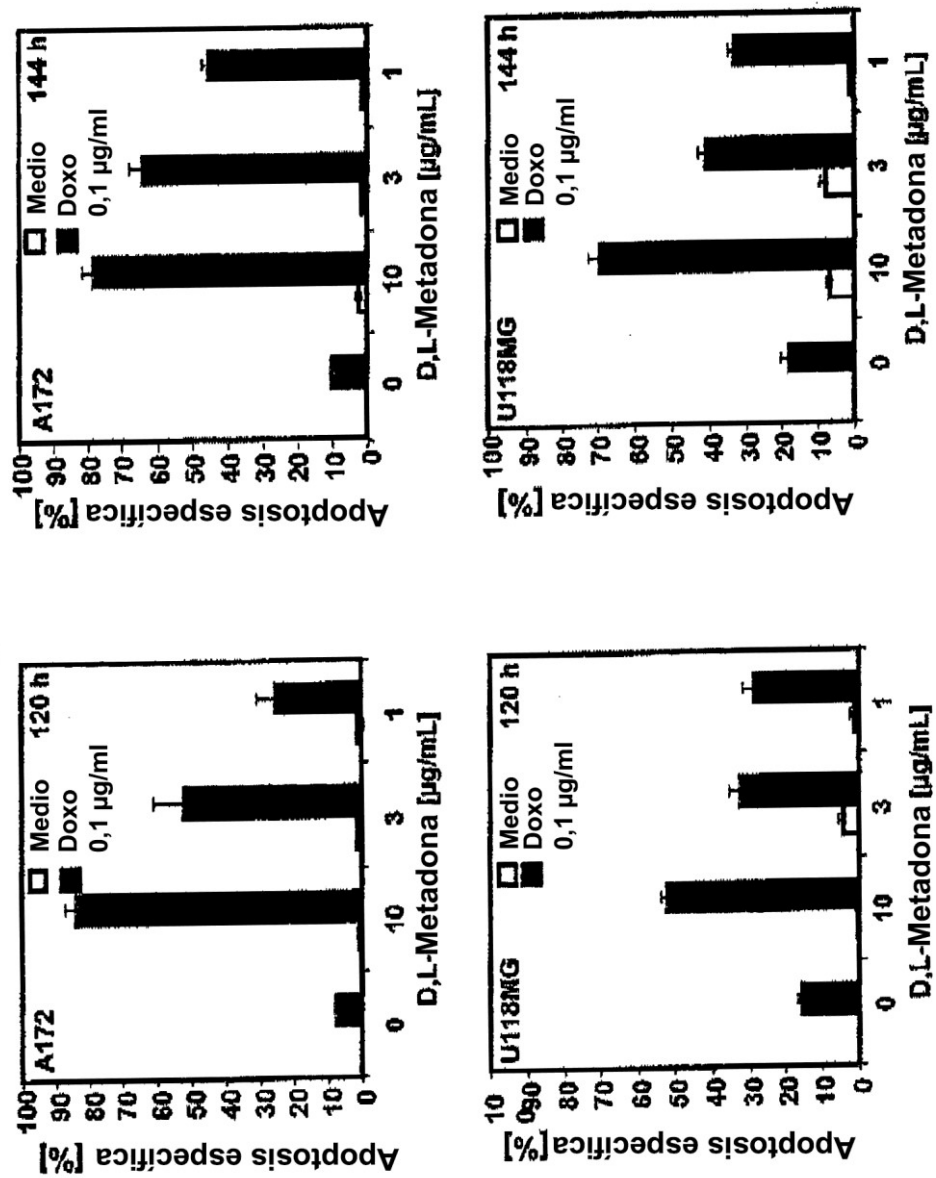


Figura 11

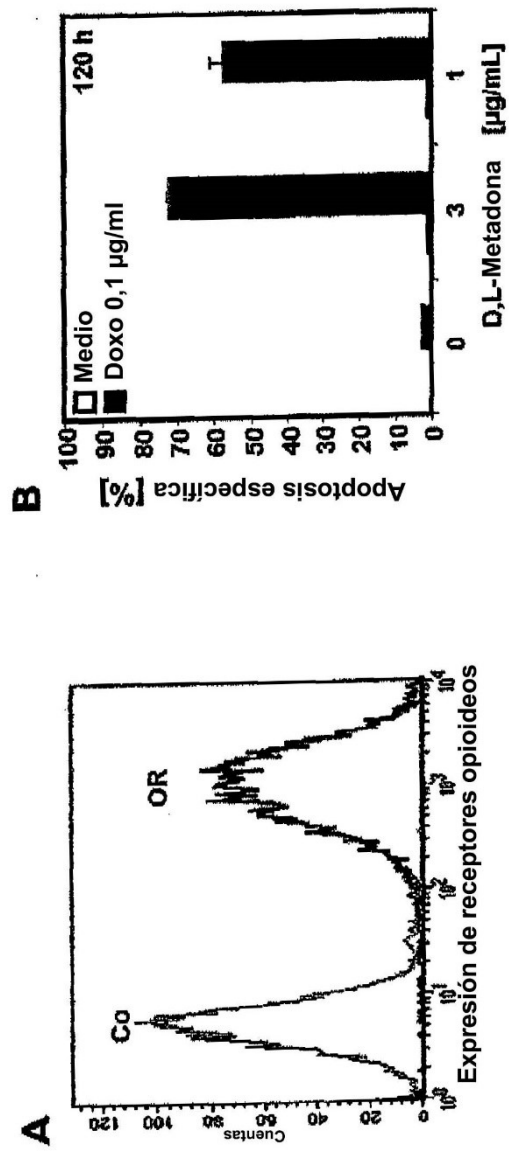


Figura 12

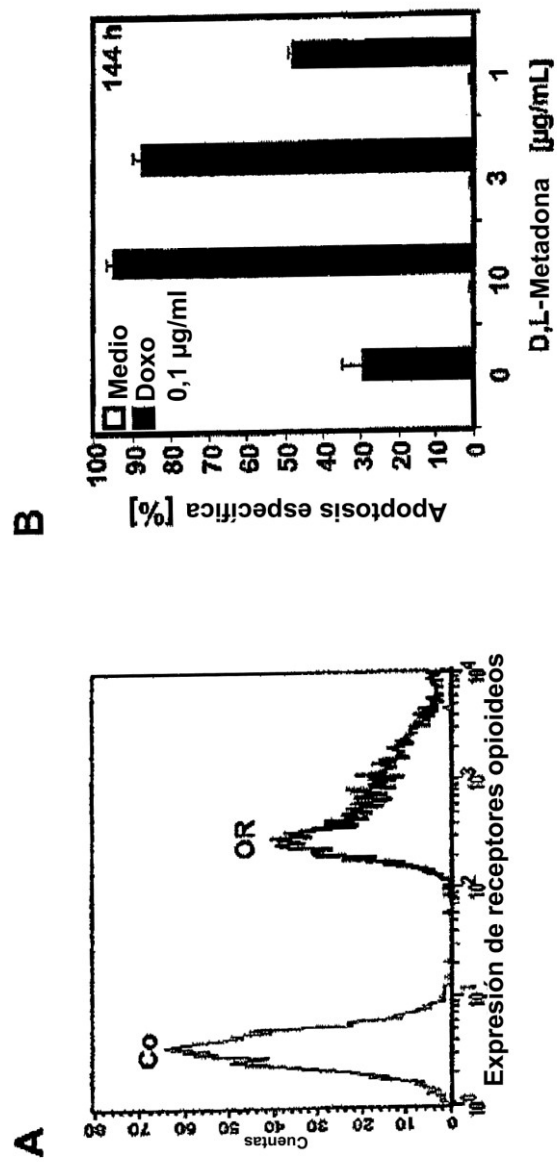
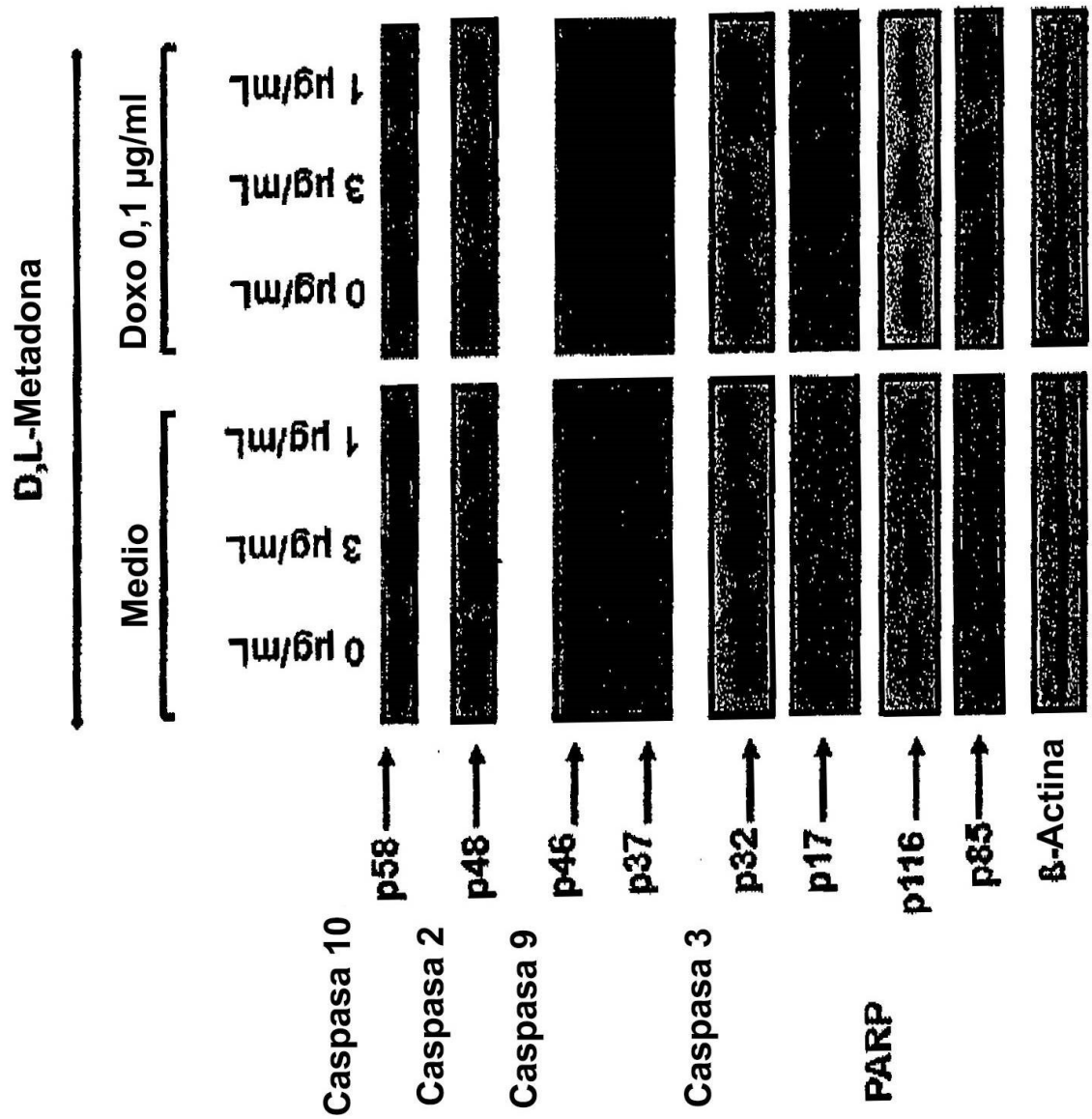


Figura 13 A



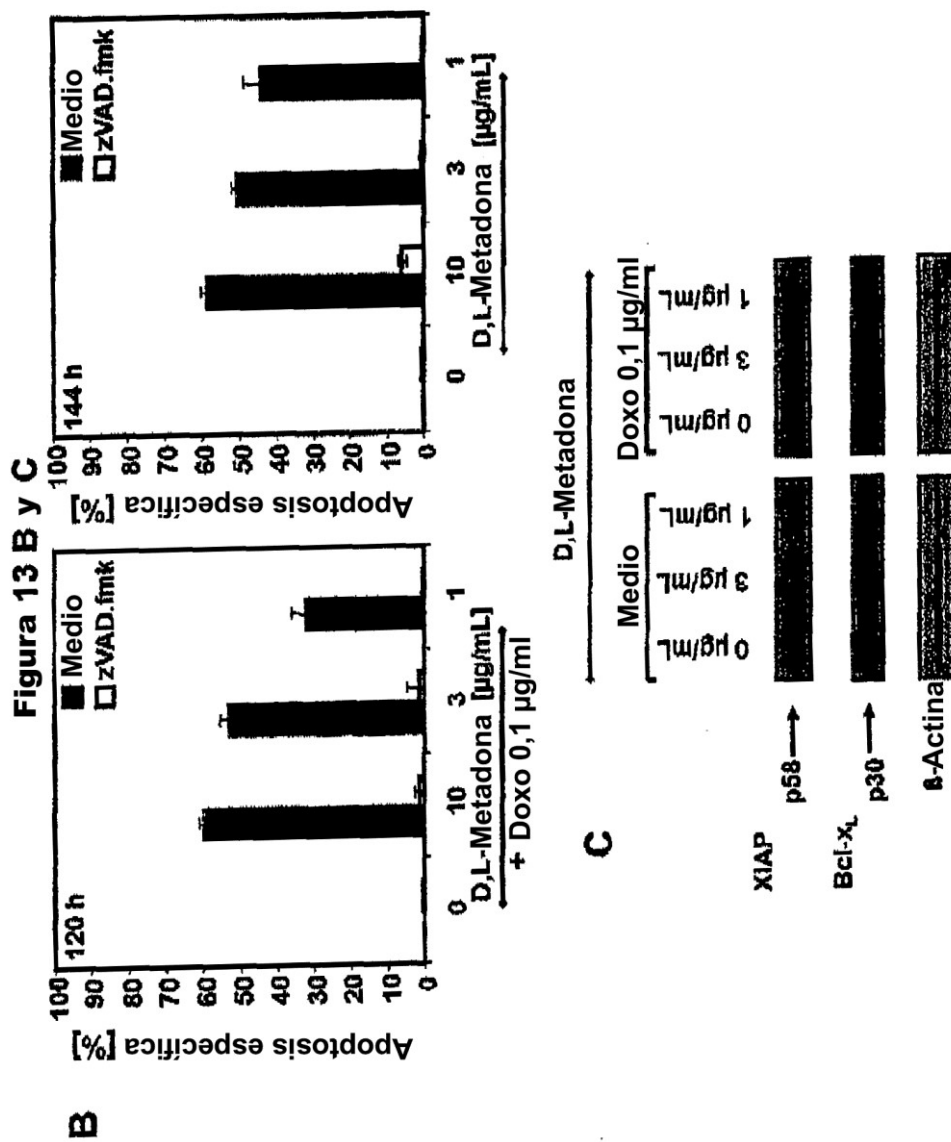


Figura 14

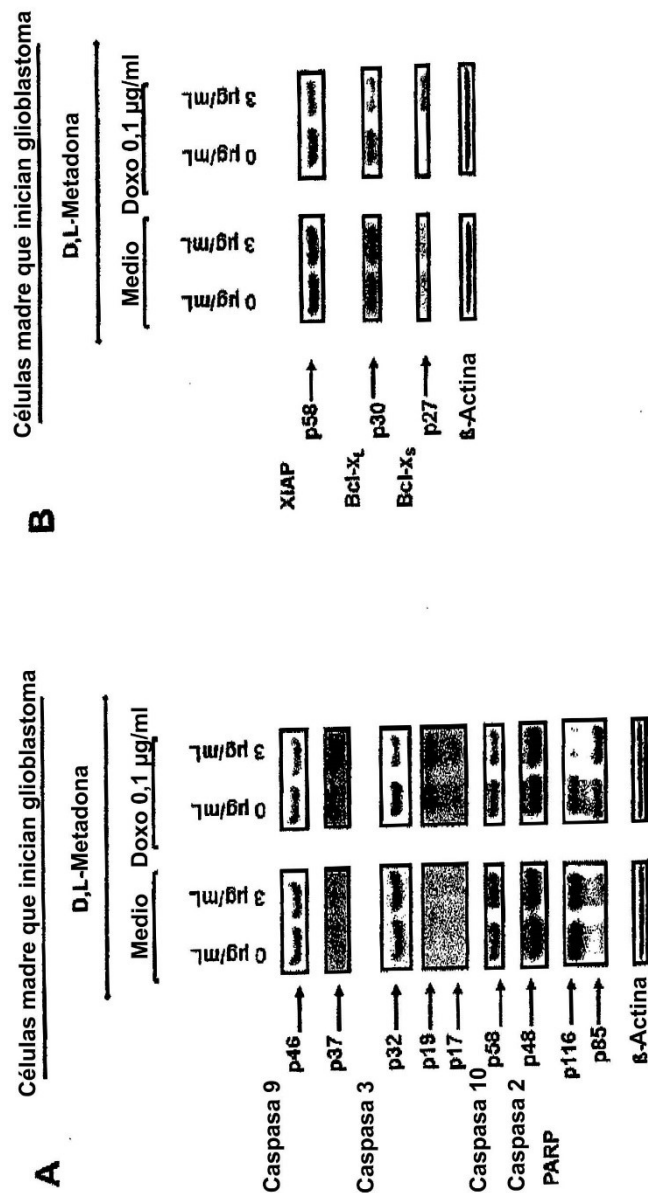


Figura 15

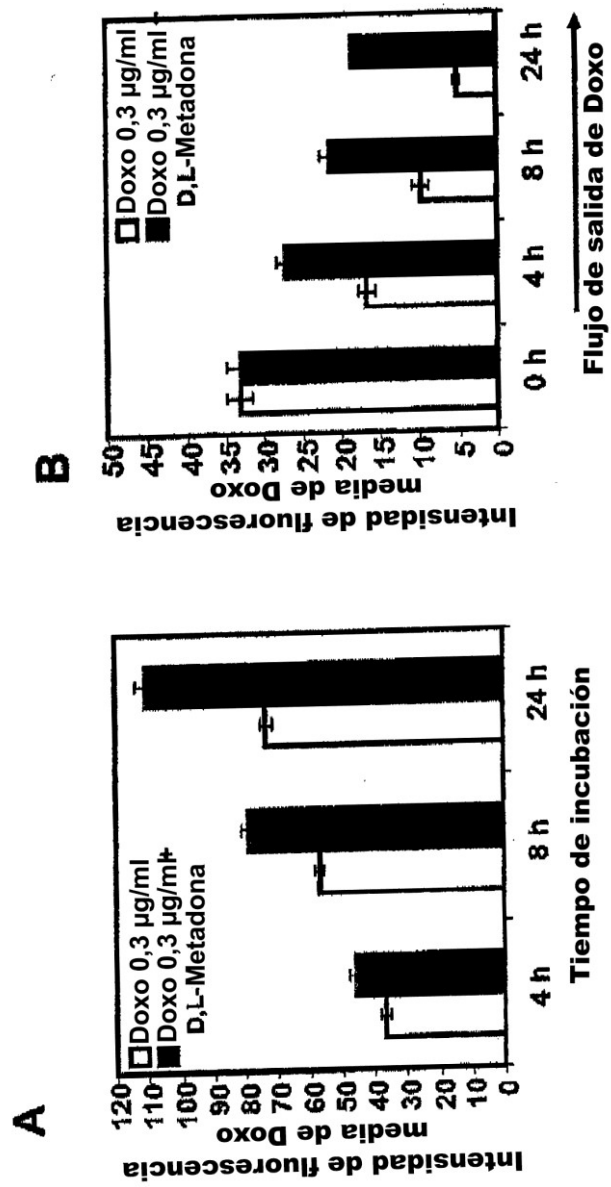
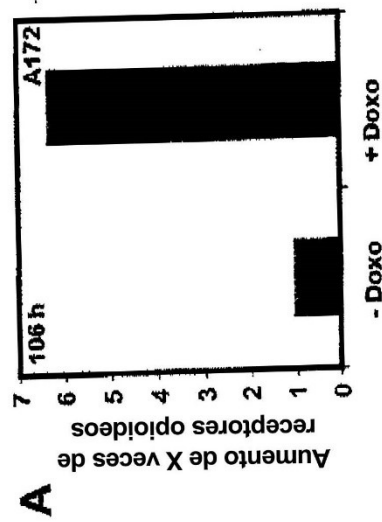


Figura 16



B

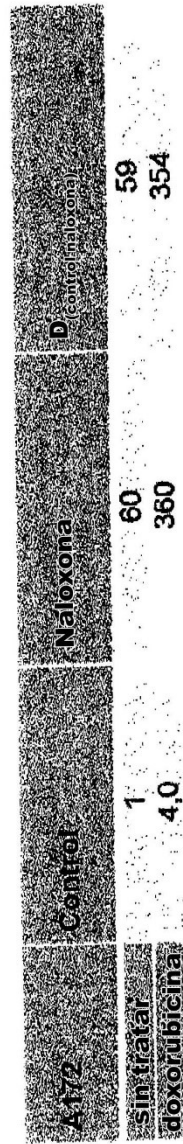


Figura 17

Figura 17

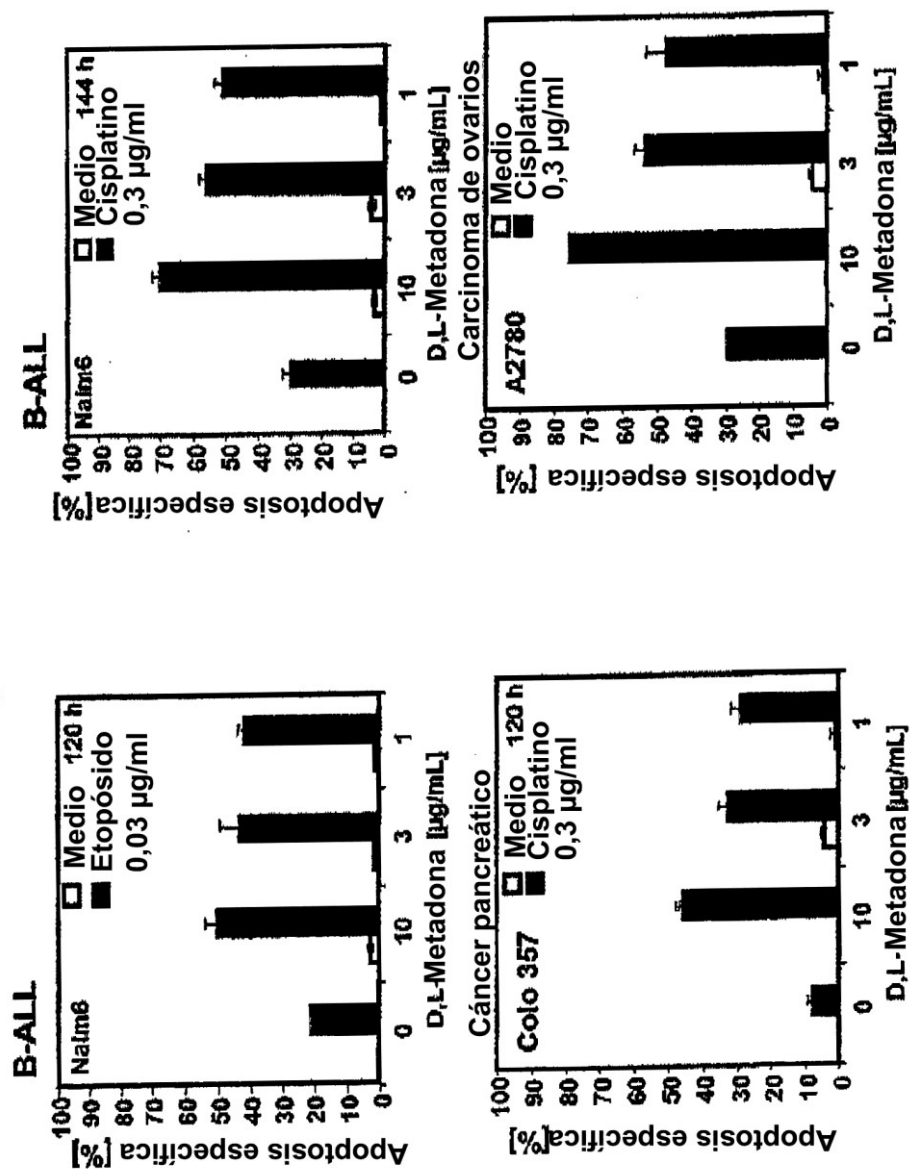


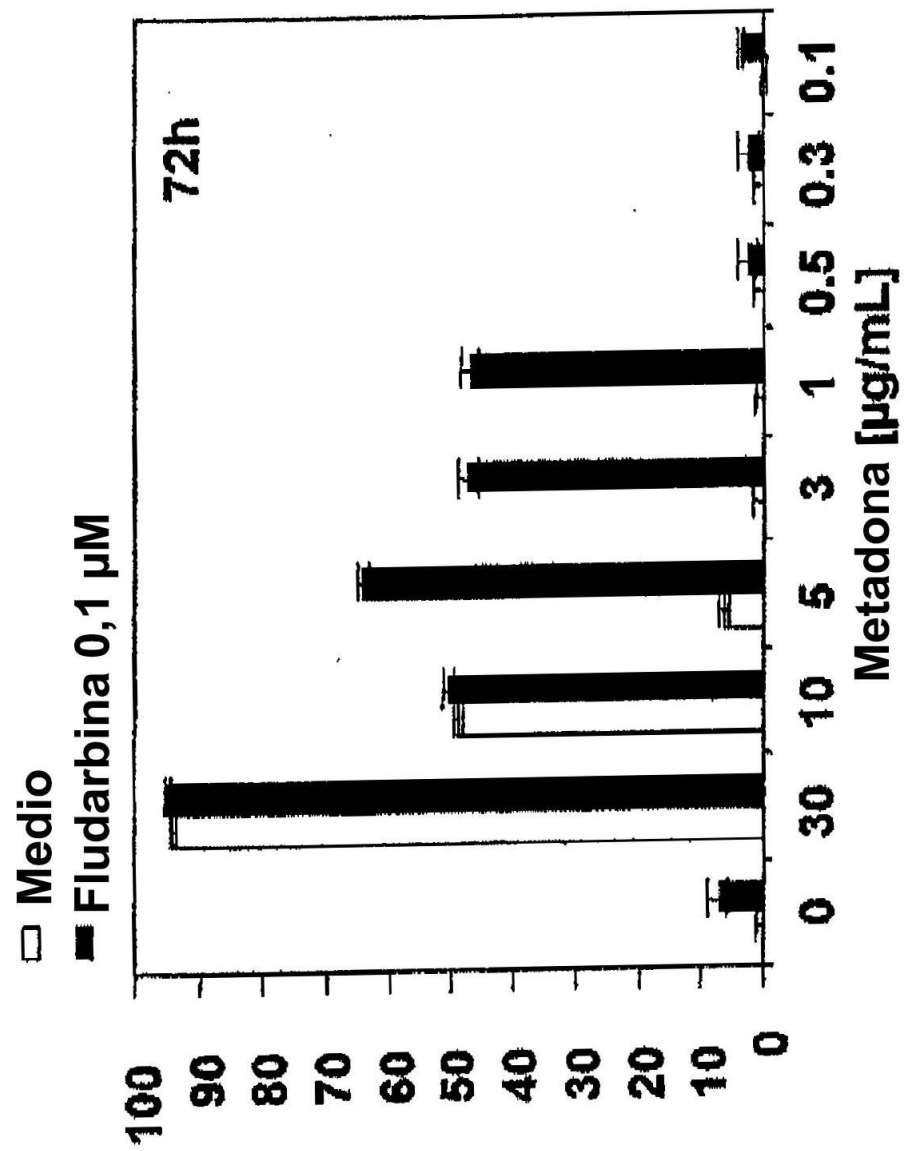
Figura 18

Figura 19

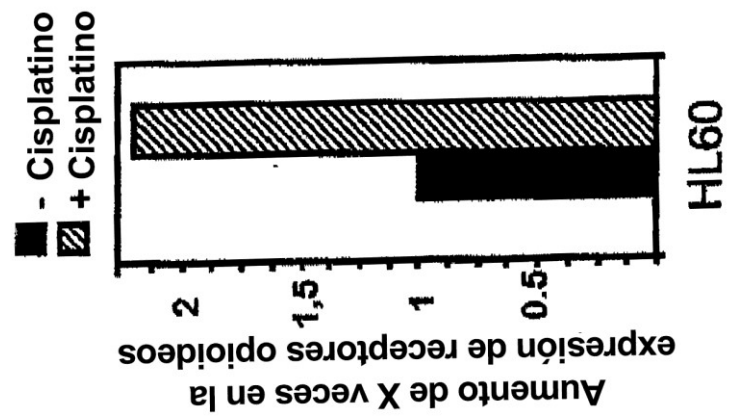


Figura 20

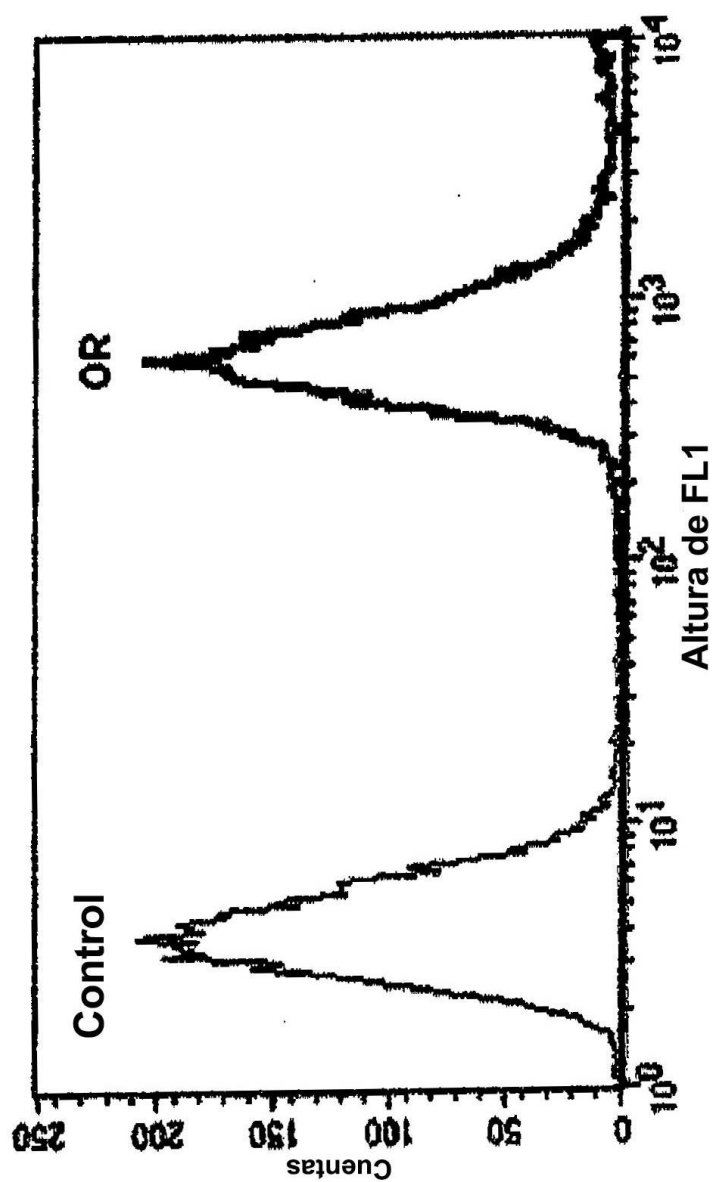


Figura 21 A

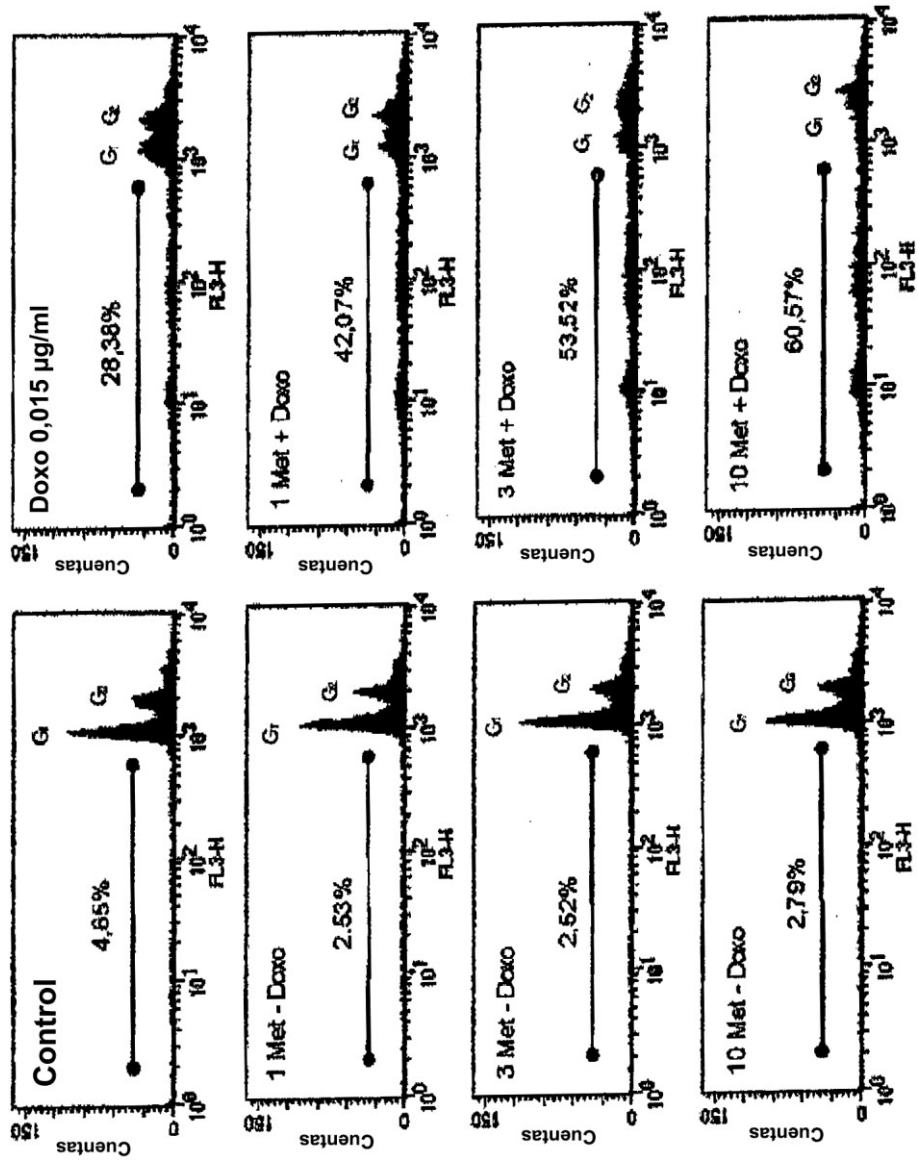


Figura 21 B

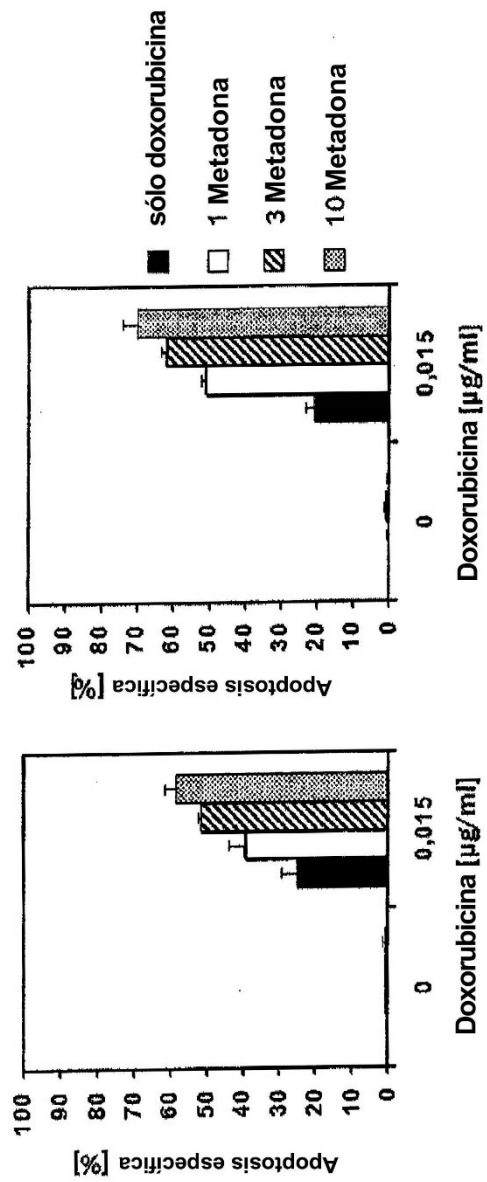


Figura 22 A

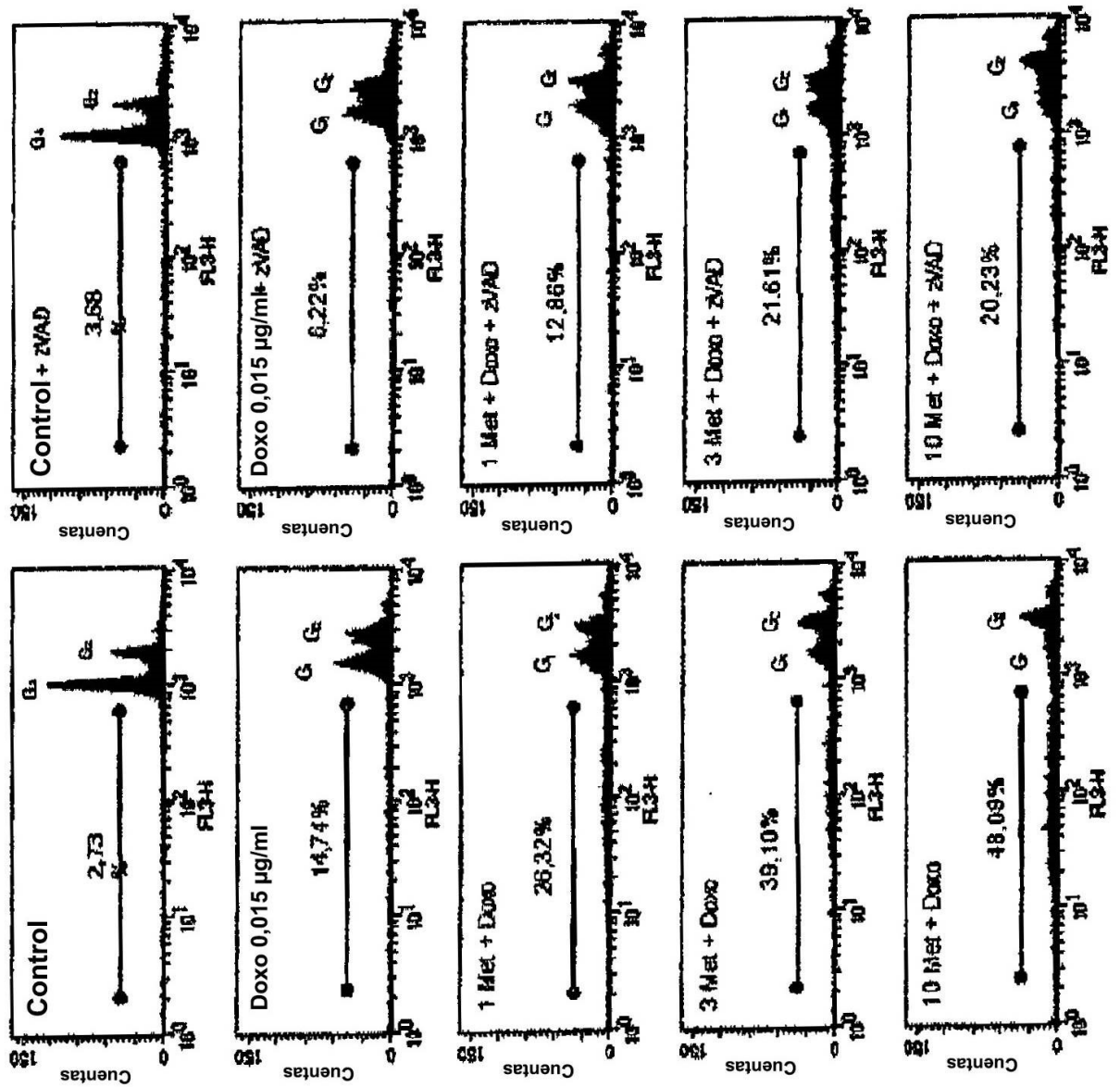


Figura 22 B

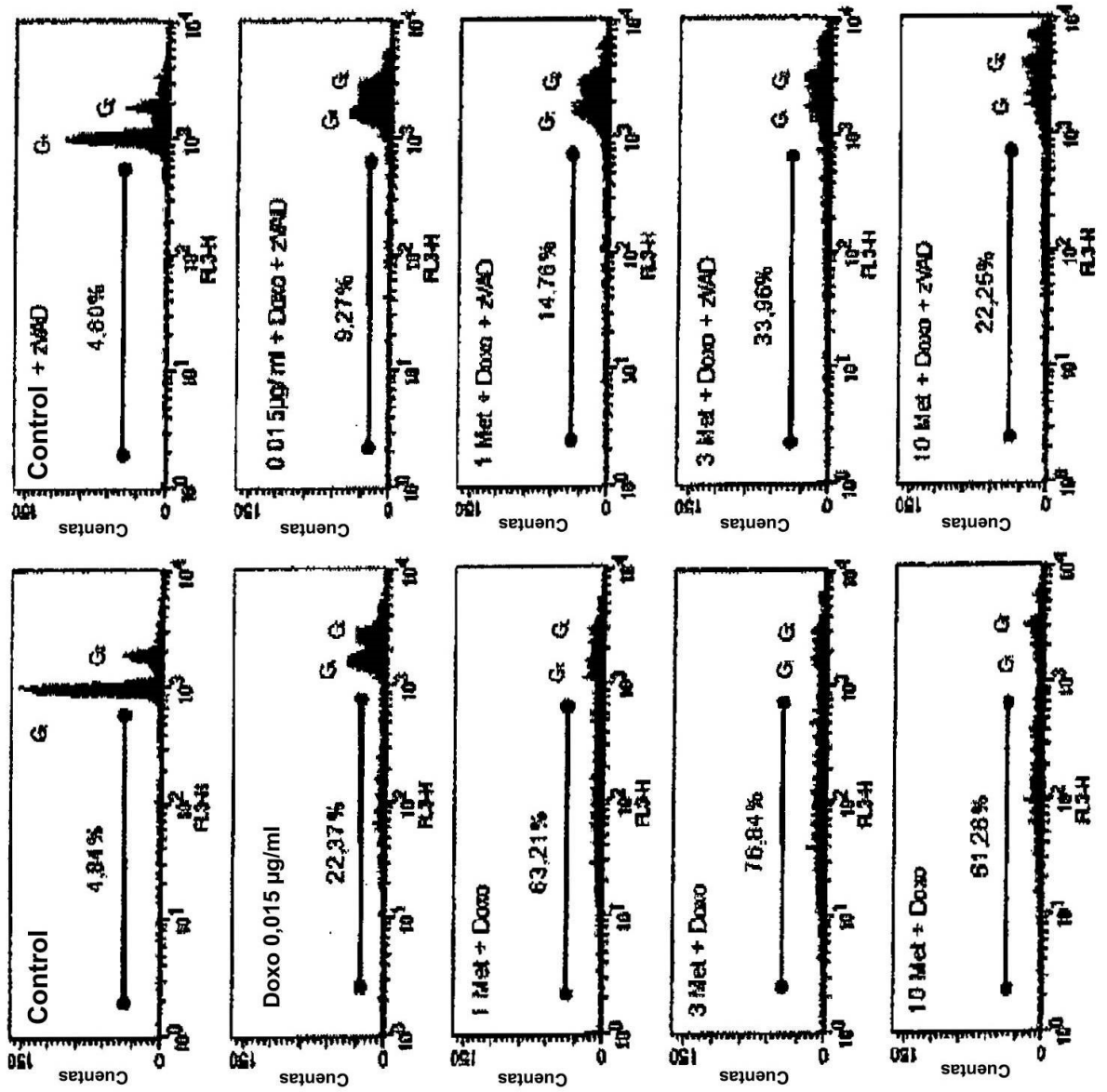


Figura 23 A

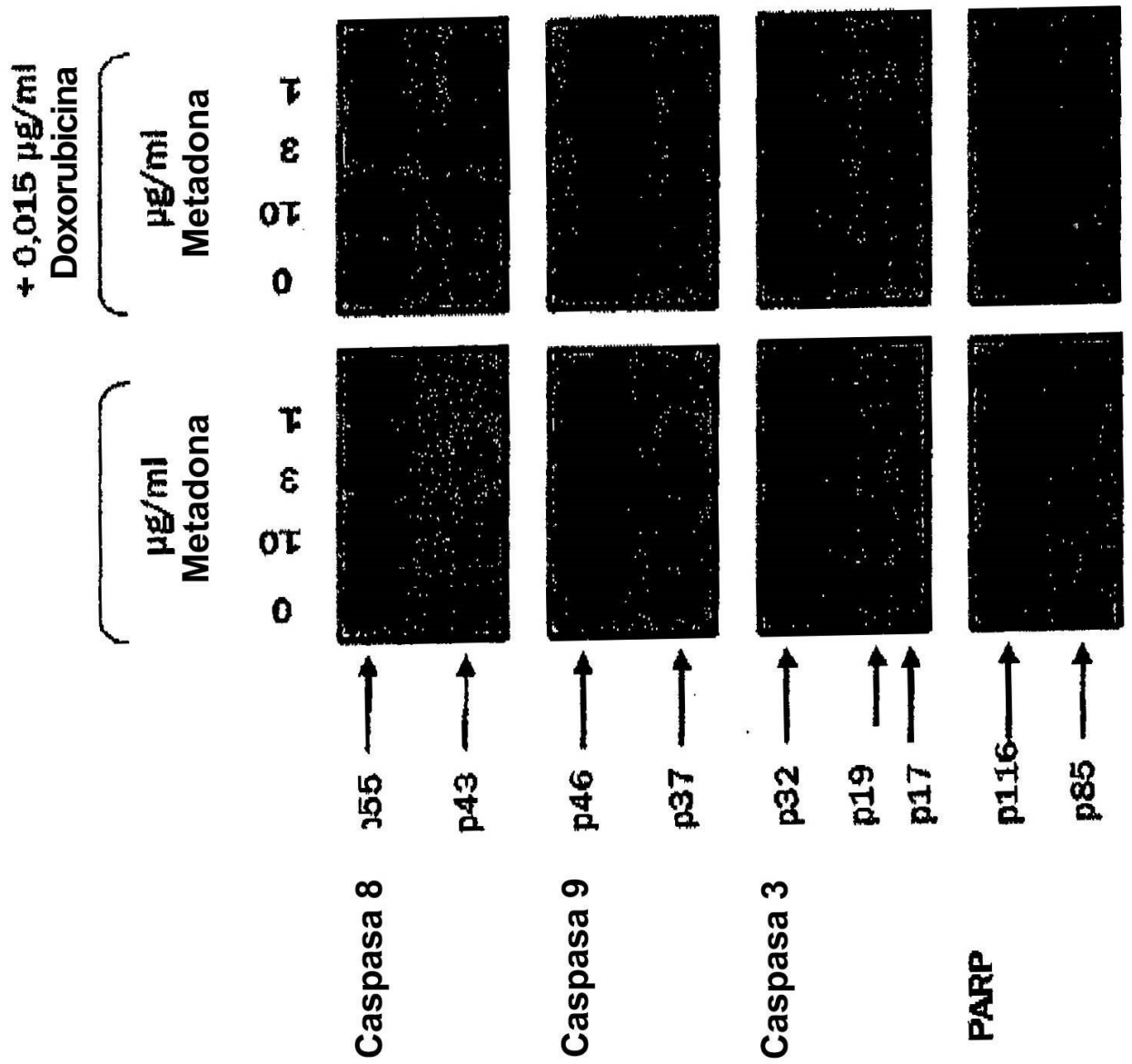


Figura 23 B

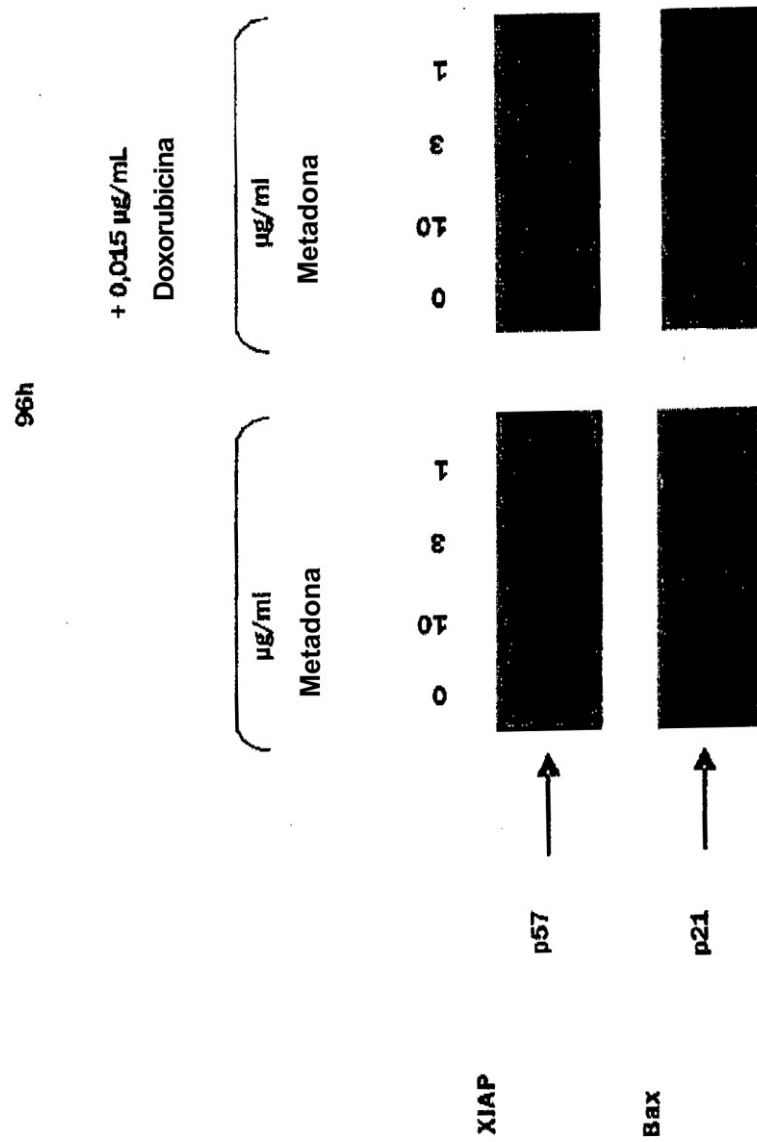


Figura 24

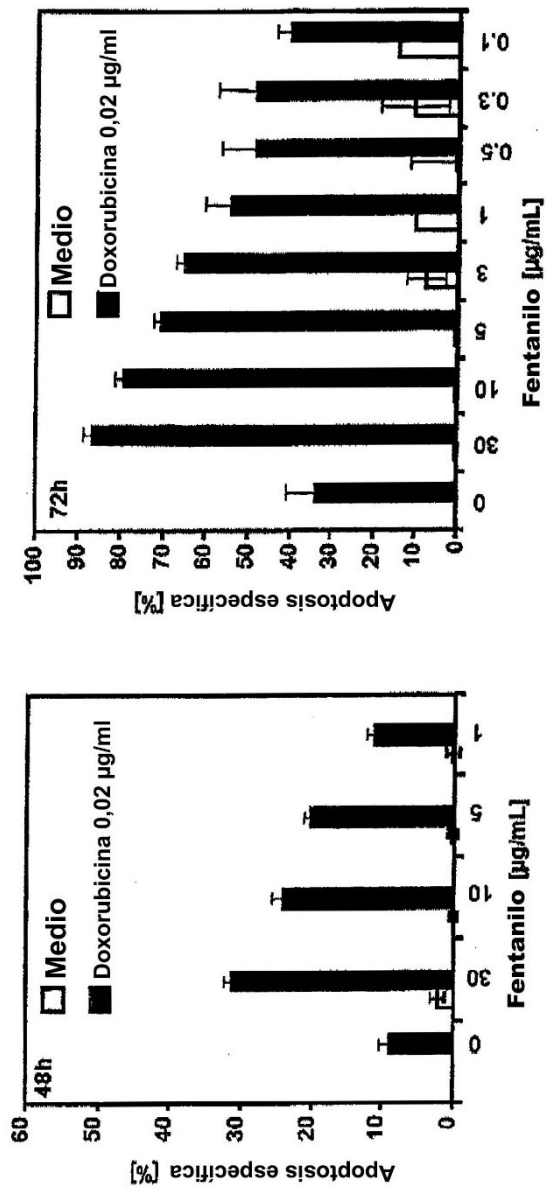


Figura 25

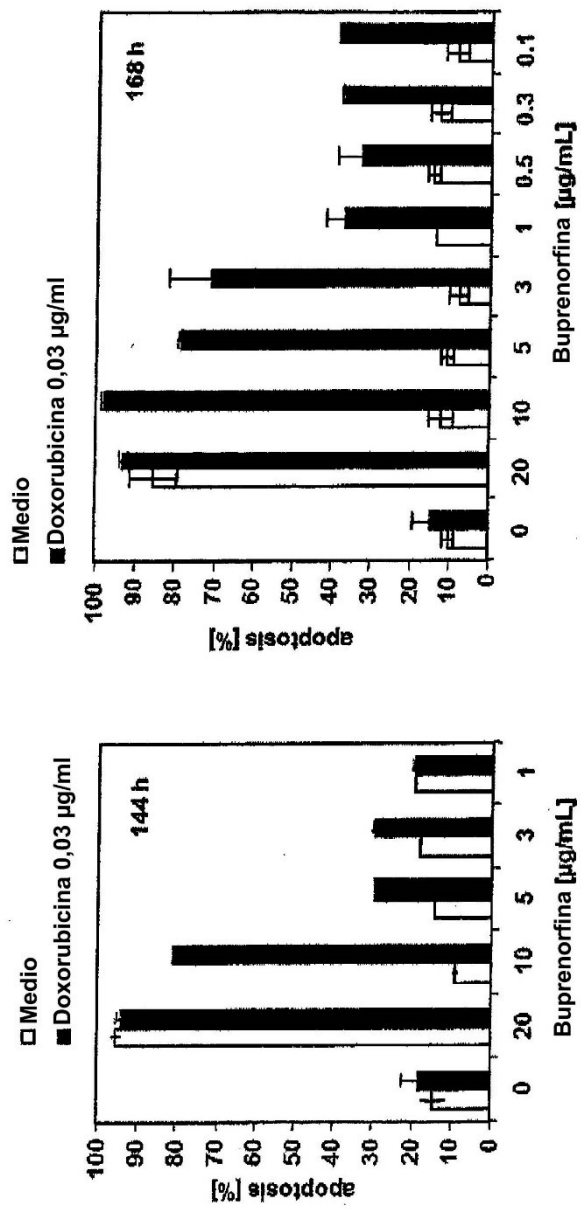


Figura 26

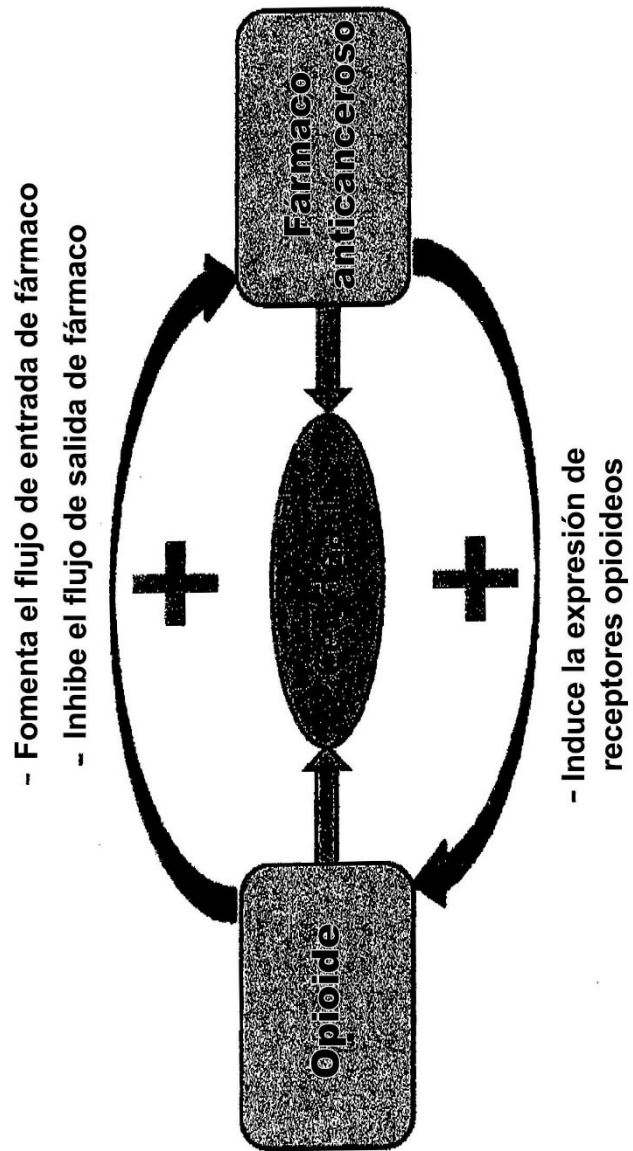


Figura 27

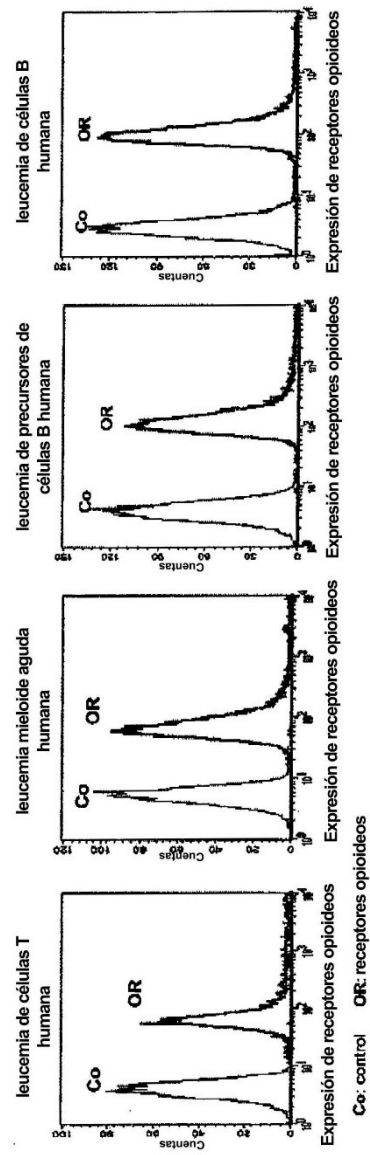


Figura 28

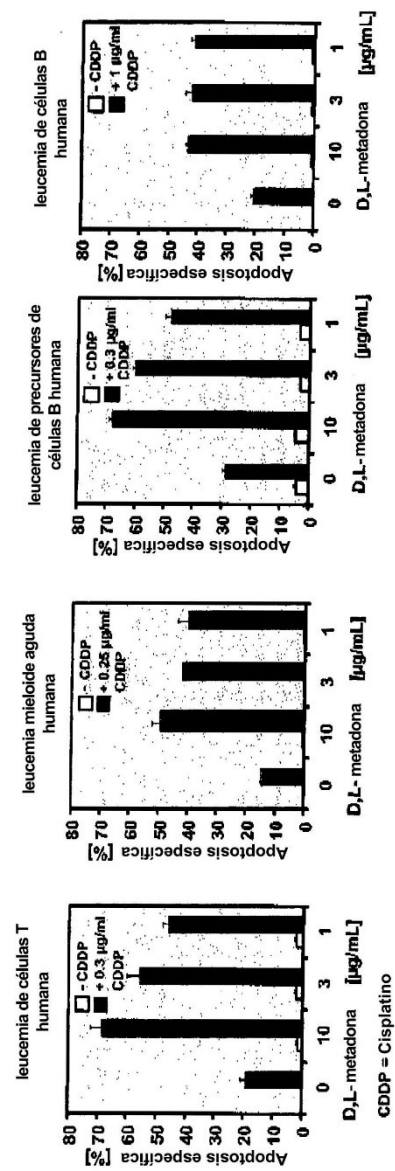


Figura 29

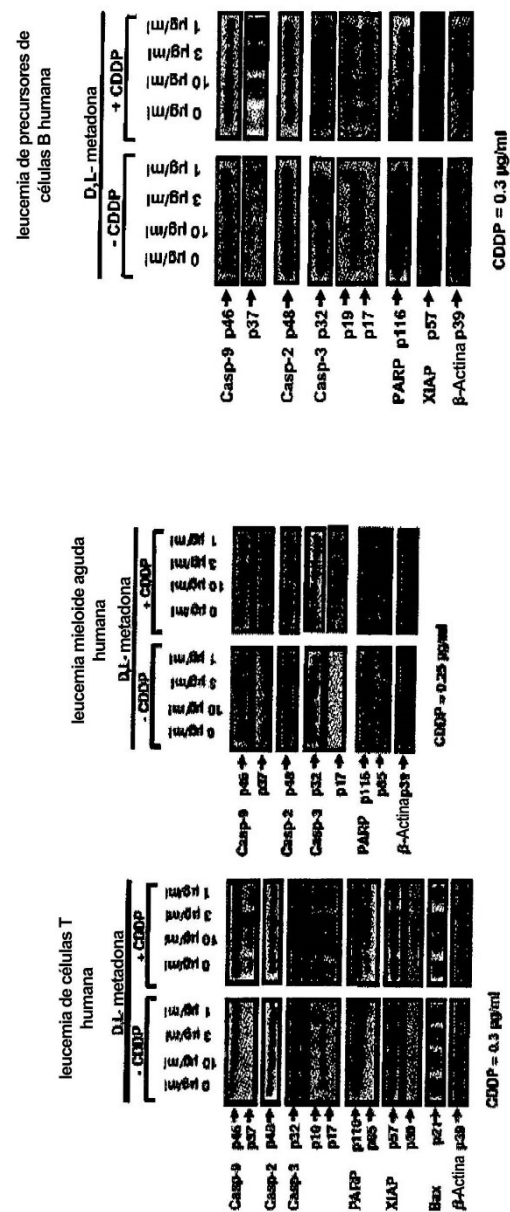


Figura 30

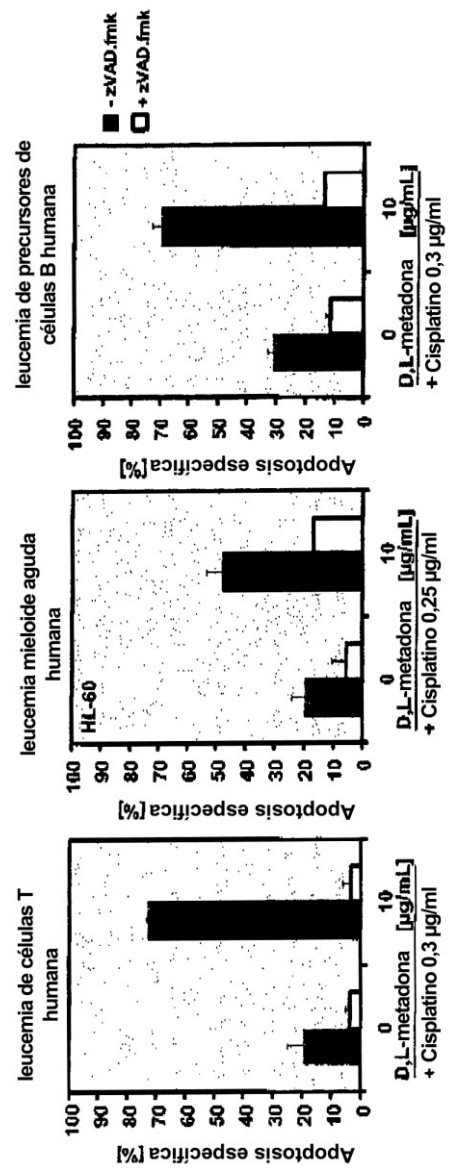


Figura 31

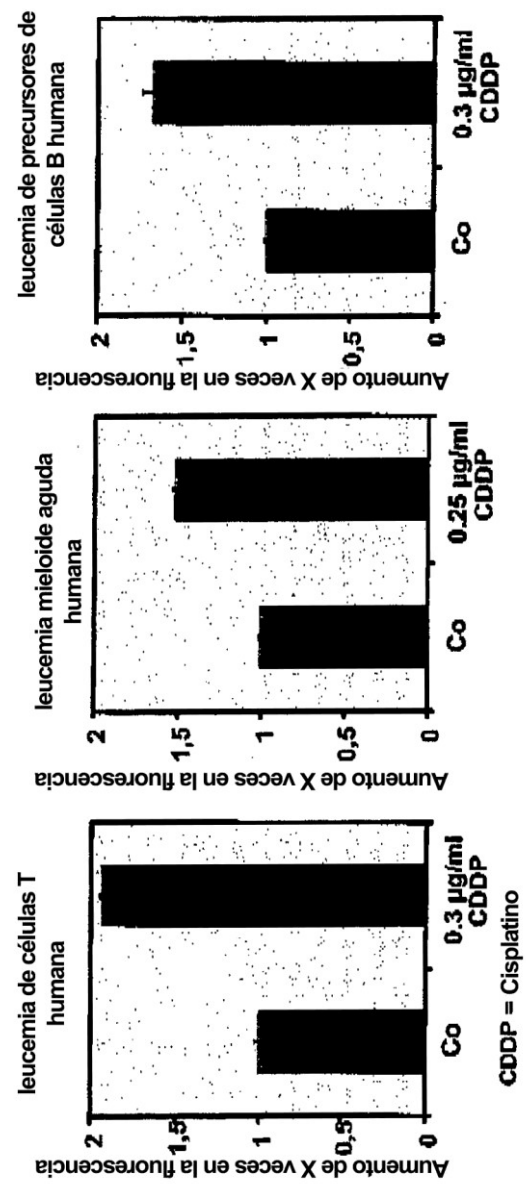


Figura 32

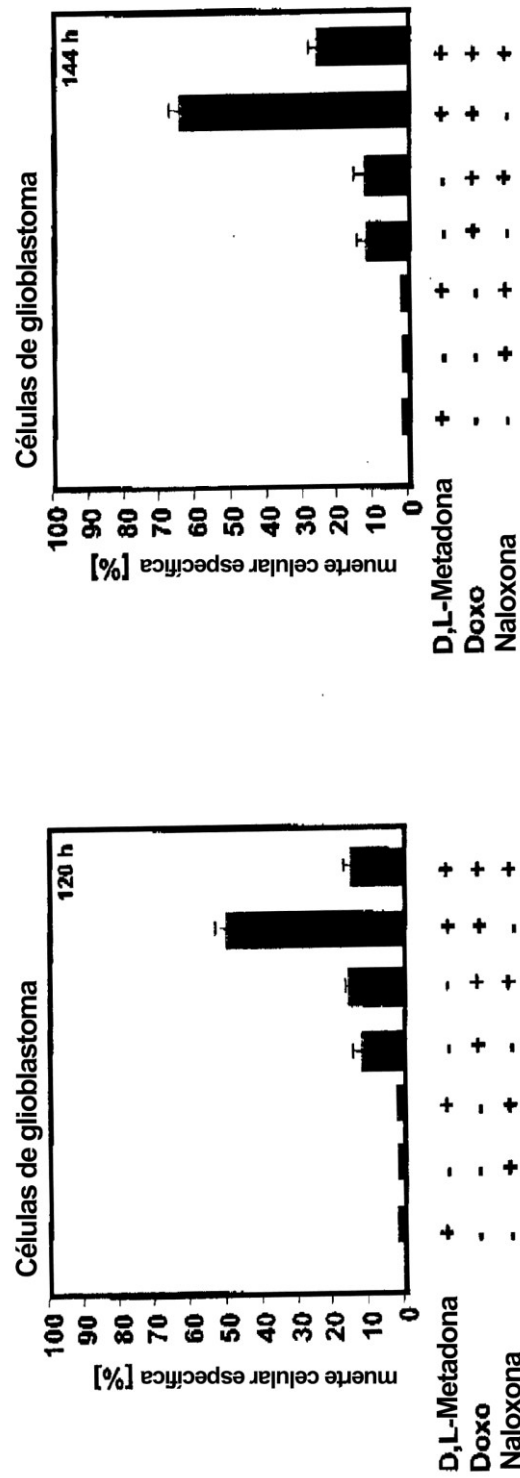


Figura 33



Figura 34



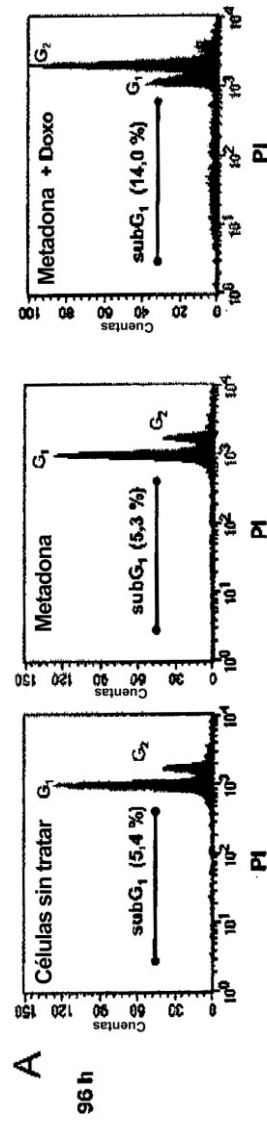


Fig. 35