

COMBINACIONES DE MEDICAMENTO DESTINADAS A INHIBIR LA IN-
FLAMACIÓN Y ACTIVACIÓN DE SRC QUINASA DESPUÉS DE PROCEDI-
MIENTOS QUIRÚRGICOS INVASIVOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a combinaciones de compuestos que inhiben la activación de p-Src tirosina quinasa y la inflamación, particularmente después de procedimientos quirúrgicos sintéticos para cáncer y otros problemas médicos. En un aspecto particularmente preferido, la invención se refiere a combinaciones de lidocaína y metilnaltrexona y sus sales aceptables en el campo farmacéutico, para la prevención o tratamiento de inflamación, proliferación cancerosa y metástasis cancerosa después de procedimientos quirúrgicos invasivos.

ANTECEDENTES

Los miembros de la familia Src de quinasas (SFKs) son tirosina quinasas no receptoras implicadas en numerosas trayectorias de transducción de señal. Los campos catalíticos SH3 y SH2 están unidos al campo SH4 de fijación de membrana a través de los campos "Únicos" intrínsecamente desordenados, los cuales presentan fuerte divergencia de secuencia entre los miembros SFK. En las últimas dos décadas, se han realizado estudios estructurales y bioquímicos para descubrir el papel crucial del campo Único en la regulación de la actividad de SFK.

Src es una tirosina quinasa de proteína no receptora con una función clave en la regulación de la adhesión, migración y estabilidad de unión célula a matriz (Frame, 2004 J. Cell Sci. 117(Pt7), 989-998). De este modo, es crítica la regulación precisa de la actividad de Src para el crecimiento de la célula normal. Se obtiene el estado inactivo de Src mediante la tirosina fosforilatada cerca del terminal C de Src (Tyr530 en Src de mamífero; Tyr527 en Src de pollo), el cual es reconocido por su campo SH2, mientras que el campo SH3 interactúa con un motivo poliprolina situado en la región de enlace entre los campos SH2 y quinasa; estas interacciones moleculares restringen el acceso al campo quinasa (Xu et al., 1997 Nature 385, 595-602). La desfosforilación de Tyr530 va seguida por la autofosforilación en Tyr419, conduciendo a una activación total de la quinasa.

Se han postulado papeles potenciales en las interacciones proteína-proteína o localización celular, para la fosforilación de Src en Ser17 por PKA (proteína quinasa dependiente de cAMP). Por ejemplo, se ha observado que el tratamiento de fibroblastos 3T3 con PDGF da como resultado la translocación de Src desde la membrana del plasma hasta el citosol, concomitante con un aumento en la fosforilación de Ser17 por PKA (Walker et al., 1993 J. Biol. Chem. 268, 19552-19558). Esta observación sugiere que es-

ta fosforilación podría interferir con las interacciones electrostáticas que actúan para fijar Src a la bicapa de lípido. Se requiere también la fosforilación PKA de Src en Ser17, en la activación cAMP de Rap1, inhibición de quinasas reguladas por la señal extracelular e inhibición del crecimiento celular, aunque no se conoce el mecanismo mediante el cual esta fosforilación media en estos procesos (Obara et al., 2004 J. Cell. Sci. 117, 6085-6094). Ver también Amata et al. (Frontiers in Genetics, Junio 2014; Volumen 5, Artículo 181, 1).

La metilnaltrexona antagonista del receptor μ -opioide periférico ha sido aprobada por U.S. Food and Drug Administration y European Medicines Agency desde 2008, para el tratamiento de estreñimiento inducido por opioides en pacientes con enfermedad avanzada y quienes están recibiendo cuidado paliativo cuando la respuesta a terapia con laxantes no ha sido suficiente y, de manera más reciente, para estreñimiento inducido por opioides en pacientes con dolor crónico. Debido a que metilnaltrexona ha restringido el paso a través de la barrera sangre-cerebro, puede ser administrada a pacientes con cáncer quienes están recibiendo terapia opioide, sin afectar la analgesia.

En 2008, Singleton et al. (Mol Cancer Ther 2008; 7(6). Junio 2008) informaron que metilnaltrexona ejerce

un efecto sinérgico con 5-FU y bevacizumab sobre la inhibición de la proliferación y migración de las células endoteliales microvasculares pulmonares humanas, inducidas por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o sea dos componentes clave en la angiogénesis asociada con cáncer. Observaron también que el tratamiento de células endoteliales humanas con metilnaltrexona pero no con naltrexona, aumentó la actividad de tirosina fosfatasa de la proteína receptora, lo cual fue independiente de la expresión del receptor μ -opioide. Estos mismos investigadores publicaron posteriormente varias solicitudes de patente que proponían el uso de metilnaltrexona para inhibir la proliferación y migración celular, particularmente la proliferación y migración de las células endoteliales asociadas con angiogénesis. Ver WO 2007/121447 por Moss y otros.

En 2016, Janku et al. (Annals of Oncology 27:2032-2038,2016) estudiaron los datos recogidos a partir de dos ensayos de registro aleatorizados y controlados por placebo, en pacientes con enfermedad avanzada, y examinaron a aquellos pacientes con cáncer para identificar si la metilnaltrexona administrada a dosis clínicas regulares podría influir en la supervivencia durante el período de ensayo. Concluyeron que el tratamiento con metilnaltrexona estuvo asociado con supervivencia general aumentada,

que esto apoyó la hipótesis preclínica que el receptor de μ -opioide puede desempeñar un papel en el avance del cáncer y que el ataque del receptor μ -opioide con metilnaltrexona amerita investigación adicional en la terapia del cáncer.

La lidocaína, 2-dietilaminoaceto-2',6'-xilidido ($C_{14}H_{22}N_2O$) es un anestésico local amida y un agente antiarrítmico Clase 1b, de acuerdo con la clasificación de Vaughn Williams. Un agente antiarrítmico Clase 1b se fija a los canales abiertos de sodio durante la fase 0 de la acción potencial, bloqueando por lo tanto muchos de los canales cuando el potencial de acción alcanza su punto máximo. Las indicaciones aprobadas para lignocaína incluyen el requerimiento de anestesia local, neuraxial, regional o periférica mediante aplicación por infiltración, en bloque o tópica, o la profilaxis o tratamiento de arritmias ventriculares que ponen en peligro a la vida. Ha sido utilizada también ampliamente para tratamiento de dolor crónico o neuropático y más recientemente como instilación intravenosa para el manejo de analgesia post-operativa y recuperación quirúrgica. La lidocaína tiene utilidad potencial como un potente agente antiinflamatorio, aunque hasta la fecha no existen estudios bien diseñados para apoyar su uso en la mayor parte de los escenarios clínicos y, además, la lidocaína no está

aprobada para esta indicación específica. Weinberg et al., World J. Anesthesiol. Jul 27, 2015; 4(2): 17-29.

Los procesos inflamatorios que implican a la tirosina proteína quinasa Src y molécula-1 de adhesión intercelular, son importantes en el crecimiento y metástasis del tumor. Piegeler et al. (Anesthesiology. 2012 Septiembre; 177(3): 548-559) plantearon la hipótesis de que los anestésicos locales ligados a amidas, tales como lidocaína, cloroprocaína y ropivacaína, pueden inhibir a las señales Src inflamatorias implicadas en la migración de las células de adenocarcinoma. Para evaluar el efecto de la lidocaína sobre las señales Src de la célula de cáncer pulmonar NCI-H838, Piegeler et al. trataron células con concentraciones crecientes de lidocaína (1 nm, 10 μ M, 100 μ M) durante 20 minutos y analizaron la fosforilación de Src a través de Western Blot. Aunque se observó una disminución dependiente de la dosis en la fosforilación Src en tirosina 419 después de incubación de las células con lidocaína durante 20 minutos, esta disminución no alcanzó significado estadístico (prueba Kruskal-Wallis, $p=0,146$). Sin embargo, se observó una disminución significativa en la fosforilación de Src inducida por TNF- α , de 73%, después de co-incubación de células con TNF- α y 10 μ M ($p=0,012$) de lidocaína.

El trabajo hasta la fecha con inhibidores de fosforilación de Src-quinasa ha dado lugar a caminos prometedores para investigación adicional, pero no se han obtenido datos o tratamiento clínicos en el mundo real. Lo que se necesita son métodos y composiciones mejorados para prevenir la activación de la quinasa Src.

Se necesitan también métodos y composiciones que tengan utilidad potencial en una variedad de condiciones médicas mediadas por las señales Src, incluyendo inflamación, proliferación celular y migración celular implicadas en la angiogénesis del cáncer y metástasis del cáncer.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se ha descubierto inesperadamente que la lidocaína y metilnaltrexona actúan en forma sinérgica para inhibir la activación de la proteína quinasa Src y las señales inflamatorias, apoyando así el uso de esta combinación en varias condiciones mediadas por la activación e inflamación de la proteína quinasa Src. Así, en una primera forma principal, la invención proporciona un método para el tratamiento de la inflamación resultante de un procedimiento quirúrgico invasivo en una persona que lo requiere, el cual comprende la administración de una instilación intravenosa de: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en

el campo farmacéutico y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

Los métodos son también particularmente útiles para la prevención de la proliferación o propagación del cáncer después de cirugía del mismo. Así, en una segunda forma principal, la invención proporciona un método para inhibir la proliferación o metástasis de células cancerosas después de intervención quirúrgica para remover un tumor canceroso en una persona que lo requiere, comprendiendo la administración como una instilación intravenosa de: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

La combinación sinérgica es particularmente útil para suprimir la inflamación o la activación de la proteína quinasa Src después de procedimientos quirúrgicos invasivos. Así, una tercera forma principal de la invención proporciona un método para inhibir la fosforilación de la tirosina proteína quinasa Src en Tyr419, después de un procedimiento quirúrgico invasivo en una persona que lo requiere; dicho método comprende administrar a la persona, como una instilación intravenosa: (a) una cantidad

terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

En una cuarta forma principal, la invención proporciona un método para inhibir las señales celulares mediadas por la fosforilación de la tirosina proteína quinasa Src, después de un procedimiento quirúrgico invasivo en una persona que lo necesita, comprendiendo la administración como una instilación intravenosa de: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

En una quinta forma principal, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad mediada por la fosforilación de la tirosina proteína quinasa Src, después de un procedimiento quirúrgico invasivo en una persona que lo necesita; dicho método comprende administrar a esa persona, como una instilación intravenosa: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

La invención se refiere también a las combinaciones sinérgicas de lidocaína y metilnaltrexona en una forma de dosis unitaria. Así, en una sexta forma principal, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (c) uno o más vehículos aceptables en el campo farmacéutico.

Se presentan ventajas adicionales de la invención, en parte en la siguiente descripción y, en parte, serán evidentes a partir de la misma o pueden ser aprendidas mediante la práctica de la invención. Se realizarán y alcanzarán las ventajas de la invención por medio de los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones finales. Se comprenderá que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicatorias y no son restrictivas de la invención, tal como se reivindica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los dibujos adjuntos que se incorporan y constituyen una parte de esta Memoria, ilustran varias formas de la invención y junto con la descripción sirven para explicar los principios de la misma.

La Figura 1 ilustra patrones de bandas de página de la activación de la proteína Src resultante de 20 ng/ml de TNF- α de ratón en una línea celular de ratón KPC-105 (Figura 1A) y 20 ng/ml de TNF- α humano en células de cáncer pancreático (Figura 1B) tal como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 2 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de varias concentraciones de lidocaína en línea de células cancerosas pancreáticas humanas, después de 30 minutos de incubación, tal como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 3 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de varias concentraciones de lidocaína en una línea de células de ratón KPC-105, después de 30 minutos de incubación, tal como se describe en el Ejemplo 3.

Las Figuras 4A y 4B ilustran patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células KPC-105 tratadas con 10 μ M de lidocaína en diferentes puntos de tiempo, utilizando 25 μ g/banda (lisados NP40) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 5 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células KPC-105 tratadas con 10 μ M de lidocaína (Figura 5A) y células tratadas con metilnaltrexona (Figura 5B), utilizan-

do 15 µg/banda (lisados NP40) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 6 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células KPC-105 tratadas con 100 nM de metilnaltrexona, utilizando 10 µg/banda (lisados NP40) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 7 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células KPC-105 tratadas con 10 µM de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona, utilizando 10 µg/banda (lisados NP40) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 7.

La Figura 8 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células KPC-105 tratadas con 10 µM de lidocaína, 100 nM de metilnaltrexona y 10 µM de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona, utilizando 7,5 µg/banda (lisados RIPA) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 9 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células KPC-105 tratadas con 10 µM de lidocaína, 100 nM de metilnaltrexona y 10 µM de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona, utilizando 7,5 µg/banda (lisados RIPA) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 9.

La Figura 10 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células de cáncer pancreático humano tratadas con 10 μ M de lidocaína, 100 nM de metilnaltrexona y 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona, después de una hora, utilizando 30 μ g/banda (lisados RIPA) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 11 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células de cáncer pancreático humano tratadas con 10 μ M de lidocaína, 100 nM de metilnaltrexona y 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona, después de una hora, utilizando 30 μ g/banda (lisados RIPA) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 11.

La Figura 12 ilustra patrones de bandas de página SDS de la activación de proteína Src resultante de células de cáncer pancreático humano tratadas con 10 μ M de lidocaína, 100 nM de metilnaltrexona y 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona, después de múltiples puntos de tiempo, utilizando 15 μ g/banda (lisados RIPA) 10% SDS PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 12.

La Figura 13 ilustra el teñido con hematoxilina y eosina (H&E) y la puntuación patológica de pulmones y bazo de ratones no estimulados o estimulados con LPS, tratados con lidocaína, metilnaltrexona o una combinación de

lidocaína y metilnaltrexona, patológicamente calificados en una escala móvil desde 0 (sin expresión) hasta 4+ (expresión fuerte y uniforme), tal como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 14 ilustra perfiles de citosinas inflamatorias del suero inducidas por LPS para (A) interleucina 1 alfa (IL-1 α) (A), interferón-gamma (IFN γ) (B), factor alfa (TNF- α) (C) de necrosis tumoral, proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (MCP-1) (D), interleucina 10 (IL-10) (E), interleucina 6 (IL-6) (F) e interleucina 17A (IL-17A) (G), medido en suero de control; y ratones estimulados con LPS tratados con lidocaína, metilnaltrexona o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona, utilizando un kit de panel de inflamación de ratón LEGENDplex™ (BioLegend, USA), seguido por citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 15 ilustra la situación de macrófagos en pulmones (A) y bazo (B) después de teñido por inmunohistoquímica (IHC), utilizando anticuerpo F4/80 anti-ratón y calificación en pulmones y bazo de ratones no estimulados o estimulados con LPS, tratados con lidocaína, metilnaltrexona o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona, calificados patológicamente en una escala móvil desde 0 (sin expresión) hasta 4+ (expresión fuerte y uniforme), tal como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 16 ilustra la situación de células asesinas (NK) en pulmones (A) y bazo (B) después de teñido por inmuno-histoquímica (IHC), utilizando anticuerpo NK1.1 anti-ratón y calificación en pulmones y bazo de ratones no estimulados o estimulados con LPS, tratados con lidocaína, metilnaltrexona o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona, calificados patológicamente en una escala móvil desde 0 (sin expresión) hasta 4+ (expresión fuerte y uniforme), tal como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 17 ilustra la situación de células B en pulmones (A) y bazo (B) después de teñido por inmuno-histoquímica (IHC), utilizando anticuerpo CD19 anti-ratón y calificación en pulmones y bazo de ratones no estimulados o estimulados con LPS, tratados con lidocaína, metilnaltrexona o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona, calificados patológicamente en una escala móvil desde 0 (sin expresión) hasta 4+ (expresión fuerte y uniforme), tal como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 18 ilustra la situación de células T en pulmones (A) y bazo (B) después de teñido por inmuno-histoquímica (IHC), utilizando anticuerpo CD19 anti-ratón y calificación en pulmones y bazo de ratones no estimulados o estimulados con LPS, tratados con lidocaína, metilnaltrexona o una combinación de lidocaína y metilnal-

trexona, calificados patológicamente en una escala móvil desde 0 (sin expresión) hasta 4+ (expresión fuerte y uniforme), tal como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 19 ilustra la situación de células CD4+T en pulmones (A) y bazo (B) después de teñido por inmunohistoquímica (IHC), utilizando anticuerpo CD19 anti-ratón y calificación en pulmones y bazo de ratones no estimulados o estimulados con LPS, tratados con lidocaína, metilnaltrexona o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona, calificados patológicamente en una escala móvil desde 0 (sin expresión) hasta 4+ (expresión fuerte y uniforme), tal como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 20 ilustra la situación de células CD8+T en pulmones (A) y bazo (B) después de teñido por inmunohistoquímica (IHC), utilizando anticuerpo CD19 anti-ratón y calificación en pulmones y bazo de ratones no estimulados o estimulados con LPS, tratados con lidocaína, metilnaltrexona o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona, calificados patológicamente en una escala móvil desde 0 (sin expresión) hasta 4+ (expresión fuerte y uniforme), tal como se describe en el Ejemplo 13.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones y Uso de Términos

Tal como se utiliza en esta Memoria y en las reivindicaciones subsiguientes, la formas singulares "un",

"uno" y "el" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en esta Memoria y en las reivindicaciones subsiguientes, la palabra "comprende" y variaciones de la misma, tales como "comprendiendo" y "comprende", significan "incluyendo pero no limitado a" y no se pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, enteros o etapas. Cuando se describe a un elemento como comprendiendo varios componentes, etapas o condiciones, se entenderá que tal elemento puede ser descrito como comprendiendo cualquier combinación de tal pluralidad o "consistente en" o "que consiste esencialmente en" la pluralidad o combinación de componentes, etapas o condiciones.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" significa aquella cantidad que, cuando se la administra a un humano para apoyar o afectar un proceso metabólico o para tratar o prevenir una enfermedad, es suficiente para causar tal tratamiento o prevención de la enfermedad o para apoyar o afectar al proceso metabólico.

Cuando se indican escalas mediante la especificación del extremo inferior de una escala, separadamente del extremo superior de la misma, o especificando valores numéricos particulares, se comprenderá que se puede definir una escala mediante la combinación selectiva de cuales-

quiera de las variables del extremo inferior, variables del extremo superior y valores numéricos particulares que sean matemáticamente posibles. En forma similar, cuando se define una escala como abarcando desde un punto final a otro, se entenderá también que abarca un intervalo entre y excluyendo a los dos puntos finales.

Cuando se habla acerca de "terapia con medicamento" o un "método de tratamiento", se entenderá que el tratamiento puede ser realizado a través de cualquier vía apropiada de administración y utilizando cualquier forma aceptable de dosificación; y que el medicamento puede ser administrado como la base libre, una sal o un éster u otra mitad profármaco.

Cuando se emplea aquí el término "más o menos", compensará la variabilidad permitida en la industria farmacéutica e inherente en productos de esta industria, tales como diferencias en la concentración del producto debidas a la variación de fabricación y degradación del producto con el transcurso del tiempo, selección de la sal y solvatos moleculares, así como los grados de hidratación.

En el contexto de la presente invención hasta donde se refiere a cualesquiera condiciones de la enfermedad descritas aquí, el término "tratamiento" significa reducir la aparición de un síntoma o condición o aliviar o paliar por lo menos un síntoma asociado con tal condi-

ción; o retardar o invertir el avance de tal condición; o manejar o afectar a los procesos metabólicos subyacentes a tal condición. Dentro del significado de la presente invención, los términos denotan también la interrupción, demora el comienzo (o sea, el período antes de la manifestación clínica de una enfermedad) y/o la reducción del riesgo de desarrollo o empeoramiento de una enfermedad.

La palabra "aceptable" tal como se emplea en relación con las composiciones de la invención, se refiere a las entidades moleculares y otros ingredientes de tales composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente reacciones indeseables cuando se administran a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un humano).

Cuando se ofrecen porcentajes aquí, se entenderá que los mismos son porcentajes en peso y que las proporciones se basan en peso, a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto circundante.

Cuando se indica un compuesto sin indicar si está presente como una base libre o una sal, se entenderá que incluye tanto a ambas formas de base libre y sal. En forma similar, cuando se ofrece una escala de pesos, dosis o proporciones para un compuesto, se entenderá que incluye escalas calculadas basadas en el peso de la base libre y la sal, a menos que se mencione una sal particular, caso

en el cual la escala hará referencia al peso de la sal mencionada. Así, cuando se hace referencia a 100 mg de lidocaína o 100 mg de lidocaína o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se entenderá que la descripción abarca 100 mg de lidocaína como la base libre, 100 mg de hidrocloreto de lidocaína basado en el peso de la base libre o 100 mg de hidrocloreto de lidocaína basado en el peso de la sal, entre otras sales. Cuando se hace referencia a 100 mg de hidrocloreto de lidocaína, se entenderá que abarca solamente 100 mg de hidrocloreto de lidocaína basado en el peso de la sal.

Una sal preferida de metilnaltrexona en cualesquiera formas de la invención es hidrobromuro de metilnaltrexona. Una sal preferida en cualesquiera de las formas de la invención es hidrocloreto de lidocaína.

Siempre que se requiere un análisis o prueba para comprender determinada propiedad o característica indicadas aquí, se entenderá que se realiza tal análisis o prueba de acuerdo con guías aplicables, proyectos de guías, reglamentos y monografías de la United States Food and Drug Administration ("FDA") y United States Pharmacopeia ("USP") aplicables a fármacos en los Estados Unidos, vigentes para el 1 de enero de 2020, a menos que se especifique de otro modo.

Formas Principales

Se describe la invención en términos de las formas principales y sub-formas y se entenderá que las formas principales pueden ser combinadas para definir otras formas principales, que las sub-formas pueden ser combinadas para definir sub-formas adicionales y que las sub-formas y combinaciones de sub-formas pueden ser combinadas con todas las formas principales para definir formas adicionales de la presente invención. La capacidad para combinar formas y sub-formas está limitada solamente por lo que es matemática o físicamente imposible.

En una primera forma principal, la invención proporciona un método para el tratamiento de la inflamación causada por un procedimiento quirúrgico invasivo en un humano que lo requiere, comprendiendo la administración de una instilación intravenosa que contiene: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

En una segunda forma principal, la invención proporciona un método para inhibir la proliferación o metástasis de células cancerosas después de una intervención quirúrgica para remover un tumor canceroso en un humano que lo requiere, comprendiendo la administración de una instilación intravenosa de: (a) una cantidad terapéutica-

mente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

En una tercera forma principal, la invención proporciona un método para inhibir a la fosforilación de tirosina proteína quinasa Src en Tyr419, después de un procedimiento quirúrgico invasivo en un humano que lo requiere, comprendiendo administrar a este último como una instilación intravenosa: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

En una cuarta forma principal, la invención proporciona un método para inhibir a las señales celulares mediadas por la fosforilación de tirosina proteína quinasa Src, después de un procedimiento quirúrgico invasivo en un humano que lo requiere, comprendiendo administrar a este último como una instilación intravenosa: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

En una quinta forma principal, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por la fosforilación de tirosina proteína quinasa Src, después de un procedimiento quirúrgico invasivo en un humano que lo requiere, comprendiendo administrar a este último como una instilación intravenosa: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico.

En una sexta forma principal, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de lidocaína o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; (b) una cantidad terapéuticamente efectiva de metilnaltrexona o una sal de la misma aceptable en el campo farmacéutico; y (c) uno o más vehículos aceptables en el campo farmacéutico.

Discusión de las Sub-formas

Existen varias técnicas disponibles para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Por ejemplo, se puede realizar la invención pre-operativamente, durante la cirugía y/o después de la misma, a través de una instilación intravenosa continua.

Así, en las varias sub-formas la invención contempla:

- la administración de la composición como una instilación continua antes de la cirugía;
- la administración de la composición como una instilación continua durante la cirugía;
- la administración de la composición como una instilación continua después de la cirugía, preferiblemente durante un período de por lo menos 24 o 48 horas;
- cualquier combinación de lo anterior.

De manera más preferible, la composición será administrada antes de la cirugía, durante la cirugía y después de la cirugía, definido aquí como el período "perioperativo".

Para propósitos de esta invención, a menos que existan las condiciones para excluir un bolo lento, se entenderá que una instilación intravenosa continua servirá como un bolo lento, aunque en una forma preferida se utilizará el término en su sentido tradicional.

También es importante vigilar las complicaciones cardíacas. Así, en una forma preferida, se vigila al paciente preferiblemente de modo telemétrico durante cualesquiera o todos estos periodos. Es más conveniente la vigilancia telemétrica durante la cirugía pero, cuando

sea posible, se debe aplicar la vigilancia telemétrica durante todas las etapas.

Cuando se administra la composición mediante instilación antes de la cirugía, dicha instilación tiene lugar preferiblemente durante un período que dura de 30 minutos a 12 horas o de 30 minutos a 6 horas. Se debe aplicar una instilación pre-cirugía tan cerca como sea posible a la cirugía propiamente dicha y debe terminar a más tardar 2 horas o 30 minutos antes de la cirugía.

Cuando se administra la composición mediante instilación después de la cirugía, dicha instilación tiene lugar durante por lo menos 6 horas y puede durar hasta 72 horas; preferiblemente durante más o menos 48 o 24 horas. Se debe aplicar una instilación pos-cirugía tan cerca como sea posible a la cirugía propiamente dicha y debe comenzar preferiblemente a más tardar 2 horas o inclusive 30 minutos después de la cirugía. En una forma preferida, la instilación continuará sin disminución conforme el paciente avance a través de los períodos de pre-cirugía, perioperativo y pos-cirugía.

La cantidad de la lidocaína administrada puede ser expresada sobre una base diaria. Así, en general, la dosis de lidocaína variará sobre una dosis diaria desde 10 hasta 3000 mg, desde 100 hasta 2500 mg o desde 200 hasta 2000 mg. En formas alternativas, la cantidad varía desde:

10-100 mg, 10-50 mg, 50-100 mg, 100-200 mg, 100-150 mg, 150-200 mg, 200-300 mg, 200-250 mg, 250-300 mg, 300-400 mg, 300-350 mg, 350-400 mg, 400-500 mg, 400-450 mg, 450-500 mg, 500-600 mg, 500-550 mg, 550-600 mg, 600-700 mg, 600-650 mg, 650-700 mg, 700-800 mg, 700-750 mg, 750-800 mg, 800-900 mg, 800-850 mg, 850-900 mg, 900-1000 mg, 900-950 mg, 950-1000 mg, 1000-1100 mg, 1100-1200 mg, 1200-1300 mg, 1300-1400 mg, 1400-1500 mg, 1500-1600 mg, 1600-1700 mg, 1700-1800 mg, 1800-2000 mg, 2000-2200 mg, 2200-2400 mg, 2400-2600 mg, 2500 o 2800 mg, o 2800-3000 mg, puntos finales incluidos preferiblemente.

En un grupo de formas particularmente preferido, la dosis de lidocaína sobre una base diaria es 850-3000 mg, 950-2500 mg o 1000-2000 mg, puntos finales incluidos preferiblemente.

La cantidad de lidocaína administrada puede ser expresada también como proporción por peso del cuerpo. Así, se administra preferiblemente a la lidocaína como una instilación continua a un régimen desde 0,5-50 mg/kg/día, 1-40 mg/kg/día o 5-30 mg/kg/día. Otras alternativas incluyen 0,5-2 mg/kg/día, 2-5 mg/kg/día, 5-10 mg/kg/día, 10-15 mg/kg/día, 15-20 mg/kg/día, 20-25 mg/kg/día, 25-30 mg/kg/día, 30-35 mg/kg/día, 35-40 mg/kg/día, 40-45 mg/kg/día.

Los regímenes particularmente preferidos para la administración son 10-45 mg/kg/día, 15-35 mg/kg/día y 20-30 mg/kg/día. La dosis será siempre menor que la cantidad que produce una concentración en el suero mayor de 5 mg/L para prevenir complicaciones indeseables tales como aturdimiento.

La cantidad de metilnaltrexona administrada puede ser expresada también sobre una dosis diaria. Así, en general, la dosis de metilnaltrexona variará sobre una dosis diaria desde 0,2 hasta 175 mg, desde 0,5 mg hasta 100 mg, desde 2 hasta 20 mg o desde 5 hasta 15 mg. En formas alternativas, la cantidad varía desde: 0,5-10 mg, 0,5-5 mg, 5-10 mg, 10-20 mg, 10-15 mg, 15-20 mg, 20-30 mg, 20-25 mg, 25-30 mg, 30-40 mg, 30-35 mg, 35-40 mg, 40-50 mg, 45,50 mg, 50-60 mg, 50-55 mg, 55-60 mg, 60-70 mg, 70-80 mg, 80-90 mg, 90-100 mg o 100-175 mg, incluidos preferiblemente los puntos finales.

Los regímenes particularmente preferidos de la instilación intravenosa son desde 15 hasta 150 mg/día, desde 20 hasta 120 mg/día y desde 25 hasta 100 mg/día, incluidos preferiblemente los puntos finales.

Expresada sobre una base de régimen por peso corporal, se administra preferiblemente la metil-naltrexona como una instilación continua a un régimen desde 0,02 hasta 2,5 mg/kg/día, desde 0,05 hasta 1 mg/kg/día, desde

0,1 hasta 0,5 mg/kg/día o más o menos 0,3 mg/kg/día. En formas alternativas, la cantidad varía desde 0,02-0,05 mg/kg/día, 0,05-0,1 mg/kg/día, 0,1-0,5 mg/kg/día, 0,5-1 mg/kg/día, 1-1,5 mg/kg/día, 1,5-2 mg/kg/día o 2-2,5 mg/kg/día, incluidos preferiblemente los puntos finales.

Los regímenes particularmente preferidos de instilación intravenosa para metilnaltrexona son 0,2-2 mg/kg/día, 0,25-1,75 mg/kg/día y 0,30-1,5 mg/kg/día, incluidos preferiblemente los puntos finales. La concentración de metilnaltrexona en el plasma será mantenida siempre por debajo de 1400 ng/ml para prevenir complicaciones cardiovasculares indeseables.

Como con todos los regímenes de expresión dados aquí para lidocaína y metilnaltrexona, los regímenes de administración indicados anteriormente se aplican sin tomar cuenta el hecho de que la composición sea administrada durante varios días, un día entero o fracción del mismo. Sin embargo, se adoptarán típicamente regímenes más altos cuando se instila el fármaco durante períodos inferiores a un día completo, a fin de acomodar el tiempo más pequeño necesario para instilar una dosis completa.

La proporción de metilnaltrexona a lidocaína en las composiciones de la presente invención o administrada de acuerdo con esta última, es preferiblemente desde 1:5 hasta 1:350 o desde 1:20 hasta 1:200. En formas alterna-

tivas, la proporción en peso varía desde: 1:5-1:25, 1:5-1:15, 1:15-1:25, 1:25-1:45, 1:25-1:35, 1:35-1:45, 1:45-1:65, 1:45-1:55, 1:55-1:65, 1:65-1:85, 1:65-1:75, 1:75-1:85, 1:85-1:95, 1:95-1:105, 1:05-1:15 o 1:15-1:25, incluidos preferiblemente los puntos finales.

Las proporciones en peso particularmente preferidas de lidocaína a metilnaltrexona varían desde: 1:10-1:125; 1:20-1:100 y 1:30-1:75.

Las cantidades totales preferidas de hidrocloreto de lidocaína y bromuro de metilnaltrexona para administración durante el período pre-cirugía, el período quirúrgico real y/o el período pos-cirugía y sus proporciones en cualesquiera de las preparaciones combinadas son:

- 0,5-100 mg de bromuro de metilnaltrexona y 10-3000 mg de hidrocloreto de lidocaína a una proporción de 1:5 a 1:350;
- 0,5-100 mg de bromuro de metilnaltrexona y 10-3000 mg de hidrocloreto de lidocaína a una proporción de 1:20 a 1:200;
- 2-20 mg de bromuro de metilnaltrexona y 100-2500 mg de hidrocloreto de lidocaína a una proporción de 1:5 a 1:350;
- 2-20 mg de bromuro de metilnaltrexona y 100-2500 mg de hidrocloreto de lidocaína a una proporción de 1:20 a 1:200;

- 0,02-2,5 mg/kg/día de bromuro de metilnaltrexona y 0,5-50 mg/kg/día de hidrocloreto de lidocaína a una proporción de 1:5 a 1:350;

- 0,02-2,5 mg/kg/día de bromuro de metilnaltrexona y 0,5-50 mg/kg/día de hidrocloreto de lidocaína a una proporción de 1:20 a 1:200;

- 0,1-0,5 mg/kg/día de bromuro de metilnaltrexona y 5-30 mg/kg/día de hidrocloreto de lidocaína a una proporción de 1:5 a 1:350;

- 0,1-0,5 mg/kg/día de bromuro de metilnaltrexona y 5-30 mg/kg/día de hidrocloreto de lidocaína a una proporción de 1:20 a 1:200.

Una vez más, el tratamiento durante el período post-cirugía dura preferiblemente 24 o 48 horas y la administración durante cualesquiera de estos períodos va acompañada preferiblemente por vigilancia telemétrica.

La invención es particularmente útil en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos invasivos. Para propósitos de esta invención, un procedimiento quirúrgico invasivo se refiere a un procedimiento operativo en el cual se realiza la penetración o incisión de la piel o las membranas mucosas y el tejido conectivo e incluye procedimientos para extirpar tejido canceroso, trasplante de órganos, reemplazo de cadena y rodilla, etc. La invención incluye intervenciones quirúrgicas tanto menores

como mayores. Cirugía mayor es por lo general cualquier procedimiento operativo invasivo en el cual se realiza una resección más extensa, por ejemplo, se ingresa en una cavidad corporal, se extirpa órganos o tejido o se altera la anatomía normal. En general, si se abre una barrera mesenquimal (cavidad pleural, peritoneo, meninges), se califica a la cirugía de mayor. Las cirugías mayores no se realizan típicamente a través de laparoscopia. En consecuencia, los métodos de la invención son particularmente apropiados para cirugías no laparoscópicas.

La invención tiene utilidad particular en resección de tumores, particularmente en la resección de tumores de páncreas, riñón, hígado, pulmón, colorectal, seno y vejiga. Así, por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden ser utilizados para tratar pacientes con cáncer pancreáticos exocrinos que incluyen adenocarcinoma (ductal y acinar), carcinoma de células acinares de neoplasma mucinoso papilar intraductal, carcinoma adenoescamoso, carcinoma coloide, tumor de células gigantes, carcinoma hepatoide, neoplasmas císticos mucinosos, pancreatoblastoma, cistadenoma ceroso, carcinoma de células en anillo de sello, tumores sólidos yseudopapilares, carcinoma de células escamosas y carcinoma no diferenciado. Los métodos pueden ser utilizados para tratar cánceres pancreáticos endocrinos, incluyendo tumores neuroendocri-

nos pancreáticos (funcionales o no funcionales) o tumores de células islotes. El tumor neuroendocrino funcional incluye: Insulinoma, Glucagonoma, Gastrinoma, Somatostatina, VIPomas y PPomas. Los métodos pueden ser utilizados también para tratar un tumor de los riñones, tal como carcinoma de células renales cromóforas, carcinoma de células renales claras, nefroblastoma (tumor de Wilms); carcinoma de células renales papilares, tumor renal primario ASPSCR1-TFE3 o carcinoma de células renales. De otro modo, los métodos pueden ser utilizados para tratar un tumor del hígado tal como hepatoblastoma o carcinoma hepatocelular. En una forma adicional, los métodos pueden ser utilizados para tratar un tumor pulmonar tal como carcinoma de células no pequeñas o cáncer de células pequeñas.

Los cánceres colorectales tratables de acuerdo con la invención, incluyen adenocarcinomas de colon y recto, los cuales constituyen hasta al 95 por ciento de todos los casos de cáncer colorectal pero incluyen también linfomas colorectales primarios, tumores estromales gastrointestinales, leiomiomas, tumores carcinoides y melanomas. Los cánceres de seno tratables mediante la presente invención incluyen cánceres de seno invasivos, cánceres de seno no invasivos, carcinoma ductal in situ (DCIS), carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular in-

vasivo, carcinoma lobular in situ, hiperplasia lobular atípica, cáncer de seno inflamatorio, sarcoma de seno, carcinoma metaplásico, cáncer de seno positivo al receptor de estrógeno, cáncer de seno triple-negativo y papiloma de seno. Los cánceres de vejiga tratables mediante la presente invención incluyen carcinoma urotelial, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas. Los tumores cancerosos particularmente preferidos para tratamiento mediante la presente invención, sin tomar en cuenta el tipo de cáncer, son tumores cancerosos que confían en los procesos angiogénicos o señales Src. Puede variar el tamaño del tumor extirpado en el procedimiento quirúrgico pero, en varias formas, se extirpa más de 5 g, 20 g, 50 g o inclusive 100 g de tejido.

El paciente podría ser sometido también a quimioterapia. Así, en una forma, el paciente ha recibido o está recibiendo corrientemente un agente anticanceroso. En otra forma preferida, se realiza el método en ausencia de opioides concurrentes.

Las composiciones están presentes preferiblemente en la forma de un líquido o polvo estéril para administración inyectable después de reconstitución. Se administran las composiciones preferiblemente como una instilación intravenosa inyectable la cual, como se mencionó ante-

riormente, puede incluir un bolo lento. La composición se encuentra preferiblemente en la forma de una dosis unitaria o líquido o polvo estéril de varias dosis, para administración inyectable.

Las preparaciones para administración inyectable incluyen soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones o emulsiones. Si bien es muy probable que no se requieran solventes para la preparación de lidocaína y metilnaltrexona, ejemplos de solventes no acuosos apropiados cuando se utilizan solventes, incluyen propileno glicol, polietileno glicol, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tal como etil oleato. Ejemplos de vehículos acuosos incluyen agua, solución salina y medios amortiguados, soluciones alcohólicas/acuosas y emulsiones o suspensiones. Ejemplos de vehículos inyectables incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución láctica de Ringer y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer), etc. Se pueden incluir u omitir preservativos y otros aditivos tales como otros antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante incorporación de la composición farmacéutica en la cantidad requerida en un solvente apropiado con un ingrediente o combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización filtrada. En general, se preparan dispersiones mediante la incorporación de la composición farmacéutica en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los demás ingredientes requeridos tomados a partir de los enumerados anteriormente.

Es especialmente ventajoso preparar composiciones inyectables en forma de dosis unitaria a fin de facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. "Forma de dosis unitaria" tal como se emplea aquí, se refiere a unidades físicamente separadas apropiadas como dosis unitarias para el individuo a ser tratado; se calcula cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de composición farmacéutica, para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosis unitarias de la descripción se refieren a las características de la composición farmacéutica y el efecto terapéutico a ser logrado.

Finalmente, si bien la invención ha sido expresada en términos de una sola composición que contiene me-

tilnaltrexona y lidocaína, se comprenderá que ambos componentes pueden ser administrados separadamente con el mismo efecto terapéutico.

EJEMPLOS

En los siguientes ejemplos se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tomar en cuenta algunos errores y desviaciones. Se ofrecen los siguientes ejemplos a fin de ofrecer a aquellos expertos en el arte una descripción completa de la forma en que se realizan y evalúan los métodos aquí reivindicados y están destinados a ser puramente ejemplares de la invención y no están destinados a limitar los que los inventores consideran como su invención.

Cuando se hace referencia en los Ejemplos, Gene Tex se refiere a Gene Tex Biotechnology Co. En Irvine, California. Cell Signaling Technology se refiere a Cell Signaling Technology, Inc. en Danvers, Massachusetts, Invitrogen se refiere a una línea de productos de marca vendidos por Thermo Fisher Scientific Corporation con oficinas principales en Carlsbad, California.

EJEMPLO 1

El Ejemplo 1 evaluó la activación de p-Src en líneas de células de cáncer pancreático KPC-105 de ratones y humanos tratadas con TNF- α , en varios puntos de tiempo.

Condiciones experimentales

En el día 1 se cultivó líneas celulares de cáncer pancreático KPC-105 de ratones y humanos, hasta obtener 300.000 células por foso en una placa de 6 fosos. En el día 2, cada línea celular fue tratada con 20 ng/ml de TNF- α de ratón o humanos, durante 2 horas. Luego, se recogió y lavó a las células con solución salina amortiguada con fosfato y se almacenó a -80°C. Luego, las células fueron lisadas con 100 μ l de amortiguador de prueba de radio-inmuno-precipitación, con amortiguadores proteasa y fosfatasa.

Luego, se realizó la estimación de la proteína utilizando una prueba Bradford bajo las siguientes condiciones:

- Se separó un Western Blot con hidrocloruro de guanidina 6M, después de bloquear a la proteína p-Src para probar con proteína Src total.
- 10% SDS-PAGE con bloqueo de 15 fosos: 5% de albúmina de suero bovino para mancha p-Src. P-Src-Tyr416 (Gene Tex GTX81151) Rb: 1:1000 en albúmina de suero bovino al 5%, durante toda la noche.
- Src total (Cell Signaling Technology 2108S) Rb mAB 1:1000 durante toda la noche en 5% de leche.
- GAPDH (Invitrogen# AM4300):1:5000 en 5% de leche durante toda la noche.

- Lavado: 4x durante 5 minutos con 1x TBST.
- Revelado utilizando 50% de femto para la proteína p-Src y ECL casero para Src total y proteína GAPDH.

Resultados:

Como se ilustra en la Figura 1, se observa una activación máxima de la proteína Src durante el tratamiento con TNF- α (20 ng/ml) después de 45 minutos de exposición tanto en la línea de células de ratón KPC-105 como en la línea de células de cáncer pancreático humano.

EJEMPLO 2

El Ejemplo 2 evaluó la capacidad de las dosis crecientes de lidocaína para inhibir p-Src en células de cáncer pancreático humano, incubadas durante 30 minutos.

Condiciones experimentales:

En el día 1, se cultivó a las células de cáncer pancreático hasta obtener 300.000 células por foso en una placa de 6 fosos. En el día 2, las células fueron tratadas con 0, 0,5, 1,5, 10, 15, 30, 50 y 100 μ M de lidocaína durante 30 minutos. Luego, se recogió a las placas y se las lavó con solución salina amortiguada con fosfato y se las almacenó a -80°C. Luego, las células fueron lisadas con 100 μ l de amortiguador de prueba de radioinmunoprecipitación, utilizando amortiguadores proteasa y fosfatasa.

Se realizó la estimación de la proteína utilizando una prueba Bradford bajo las siguientes condiciones:

- Se separó un Western Blot con hidrocloruro de guanidina 6M, después de bloquear a la proteína p-Src para probar con proteína Src total.
- 10% SDS-PAGE con bloqueo de 10 fosos: 5% de albúmina de suero bovino para mancha p-Src.
- P-Src-Tyr (Gene Tex GTX81151) Rb: 1:1000 en 5% de albúmina de suero bovino al 5%, durante toda la noche.
- Src total (Cell Signaling Technology 2108S) Rb mAb 1:1000 durante toda la noche en 5% de leche.
- GAPDH (Invitrogen# AM4300):1:5000 en 5% de leche durante toda la noche.
- Lavado: 4x durante 5 minutos con 1x TBST.
- Revelado utilizando 50% de femto para la proteína p-Src y sustrato ECL casero para Src total y proteína GAPDH.

Resultados:

Como se ilustra en la Figura 2, la lidocaína redujo el nivel de proteína Src después de 30 minutos de tratamiento en células de cáncer pancreático humano, comenzando a dosis de 10 μ M y 15 μ M.

EJEMPLO 3

El Ejemplo 3 evaluó la capacidad de las dosis crecientes de lidocaína para inhibir p-Src en células KPC-105 de ratón incubadas durante 30 minutos.

Condiciones experimentales:

En el día 1 se cultivó células KPC-105 de ratón hasta obtener 300.000 células por foso en una placa de 6 fosos. En el día 2, las células fueron tratadas con 0, 0,5, 1,5, 10, 15, 30, 50 y 100 μ M de lidocaína durante 30 minutos. Luego, las placas fueron recogidas y lavadas con solución salina amortiguada con fosfato y almacenadas a -80°C . Luego las células fueron lisadas con 100 μ l de amortiguador de prueba de radioinmuno-precipitación, utilizando los amortiguadores proteasa y fosfatasa.

Se realizó la estimación de la proteína utilizando una prueba Bradford bajo las siguientes condiciones:

- Se separó un Western Blot con hidrocloreuro de guanidina 6M, después de bloquear a la proteína p-Src para probar con proteína Src total.
- 10% SDS-PAGE con bloqueo de 10 fosos: 5% de albúmina de suero bovino para mancha p-Src.
- P-Src-Tyr416 (Gene Tex GTX81151) Rb: 1:1000 en 5% de albúmina de suero bovino al 5%, durante toda la noche.
- Src total (Cell Signaling Technology 2108S) Rb mAb 1:1000 durante toda la noche en 5% de leche.

- GAPDH (Invitrogen# AM4300):1:5000 en 5% de leche durante toda la noche.
- Lavado: 4x durante 5 minutos con 1x TBST.
- Revelado utilizando 50% de femto para la proteína p-Src y sustrato ECL casero para Src total y proteína GAPDH.

Resultados:

Como se ilustra en la Figura 3, la lidocaína redujo el nivel de proteína p-Src en células KPC105 después de 30 minutos de tratamiento, comenzando a una dosis de 10 μ M.

EJEMPLO 4

El Ejemplo 4 evaluó Src y p-Src endógeno en células KPC-105 de ratón tratadas con 10 μ M de lidocaína, en diferentes puntos de tiempo. Tal como se ilustra en las Figuras 4A y 4B, el Src total no fue afectado por la exposición a lidocaína en cualquier punto de tiempo. Con respecto a p-Src, la lidocaína atenuó la fosforilación de Src después de 15 minutos y hasta 6 horas, con efectos máximos observados a 15 y 30 minutos.

EJEMPLO 5

El Ejemplo 5 evaluó Src y p-Src endógeno en células KPC-105 de ratón tratadas con 10 μ M de lidocaína durante diferentes puntos de tiempo y dosis crecientes de metilnaltrexona después de una hora de incubación. Se gene-

raron los patrones de bandas Western Blot utilizando 15 µg/banda (lisados NP40) 10% SDS PAGE durante 6 horas (lidocaína) y 1 hora (metilnaltrexona). Como se ilustra en las Figuras 5A y 5B, el Src total no fue afectado por lidocaína y metilnaltrexona. Por el contrario, la lidocaína atenuó la fosforilación de Src a 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 6 horas, con un patrón inconsistente de bandas en cada punto de tiempo. Metilnaltrexona atenuó la fosforilación de Src a concentraciones por encima de 50 nM después de 1 hora de incubación.

EJEMPLO 6

Después de nuestro experimento previo con metilnaltrexona en el Ejemplo 5, decidimos cargar menos proteína e incubar células con metilnaltrexona durante más de 1 hora y evaluar Src y p-Src endógeno en células KPC-105 tratadas con 100 nM de metilnaltrexona en diferentes puntos de tiempo.

Condiciones experimentales:

- P-Src-Tyr416 (GeneTex # GTX81151) Rb: 1:1000 en 5% de albúmina de suero bovino o/n a 4°C.
- 10 µg/banda (lisados NP40) 10% SDS PAGE.
- Src Total (CST # 2108S) Rb mAb 1:1000 en 5% de albúmina de suero bovino o/n 4°C.

Resultados:

Como se ilustra en la Figura 6, 100 nM de metilnaltrexona atenúa la fosforilación de Src en células KPC-105, comenzando a 2 horas y con efectos máximos observados a 2, 4 y 6 horas.

EJEMPLO 7

El Ejemplo 7 evaluó Src endógeno y fosfo-SRC en células KPC-105 tratadas con la combinación de 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona a diferentes puntos de tiempo.

Condiciones experimentales:

- P-Src-Tyr416 (GeneTex # GTX81151) Rb: 1:1000 en 5% de albúmina de suero bovino, 3 horas a temperatura ambiente.
- 10 μ g/banda (lisados NP40) 10% SDS PAGE
- Src Total (CST # 2108S) Rb mAB 1:1000 en 5% de albúmina de suero bovino, 3 horas a temperatura ambiente.

Resultados:

La Figura 7 ilustra que la combinación de 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona atenúa de manera consistente la fosforilación de Src en células KPC-105, comenzando a 15 minutos y extendiéndose hasta 6 horas.

EJEMPLO 8

El Ejemplo 8 evaluó Src endógeno y fosfo-Src en células KPC-105 tratadas individualmente con 10 μ M de lidocaína (L), 100 nM de metilnaltrexona (M) o la combinación

de 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona (L+M) en diferentes puntos de tiempo.

Condiciones experimentales:

- P-Src-Tyr416 (Gene Tex # GTX81151) 1:2000 en 5% de albúmina de suero bovino, o/n a 4°C.
- Src total (CST # 2108S) 1:3000 en 5% de albúmina de suero bovino, o/n a 4°C.
- Vinculin (Protein Tech) 1:4000 en 5% de leche o/n a 4°C.

Resultados:

Tal como se ilustra en la Figura 8, lidocaína disminuyó el Src total después de 1 hora de exposición y atenuó la fosforilación de Src después de 1 hora de exposición. Metilnaltrexona disminuyó Src total después de 1 hora de exposición y atenuó la fosforilación de Src después de 1 hora de exposición. Lidocaína + metilnaltrexona disminuyeron Src total después de 30 minutos de exposición (más rápidos que ambos individualmente) y atenuaron la fosforilación de Src a 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 6 horas. A 6 horas, la combinación de lidocaína y metilnaltrexona fue notablemente efectiva en comparación con lidocaína individualmente, metilnaltrexona individualmente o el control no tratado.

EJEMPLO 9

El Ejemplo 9 evaluó Src y p-Src endógeno en células KPC-105 tratadas individualmente con 10 μ M de lidocaína (L), 100 nM de metilnaltrexona (M) y la combinación de 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona (L+M) en diferentes puntos de tiempo, utilizando una carga de proteína diferente a la del Ejemplo 8.

Condiciones experimentales:

- P-Src-Tyr416 (Gene Tex # GTX81151) 1:2000 en 5% de albúmina de suero bovino, o/n a 4°C.
- Src total (CST # 2108S) 1:3000 en 5% de albúmina de suero bovino, o/n a 4°C.

Resultados:

Como se ilustra en la Figura 9, se obtuvo prácticamente los mismos resultados del Ejemplo 8.

EJEMPLO 10

El Ejemplo 10 evaluó el efecto de 10 μ M de lidocaína (L), 100 nM de metilnaltrexona (M) y la combinación de 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona (L+M), durante 1 hora sobre Src total y la expresión p-Src en una línea celular de cáncer pancreático humano (AsPc 1).

Condiciones experimentales:

- P-Src-Tyr416 (Gene Tex # GTX81151) 1:2000 en 5% de albúmina de suero bovino, a temperatura ambiente, durante 4 horas.

- Src total (CST # 2108S) 1:3000 en 5% de albúmina de suero bovino, a temperatura ambiente durante 4 horas.

Resultados:

Tal como se ilustra en la Figura 10, lidocaína y metilnaltrexona individualmente y en combinación atenuaron la actividad p-Src en células de cáncer pancreático humano AsPc 1, después de 1 hora. Los resultados preliminares después de la normalización de Src no muestran ningún aumento en Src con exposición a metilnaltrexona.

EJEMPLO 11

El Ejemplo 11 evaluó el efecto de 10 μ M de lidocaína (L), 100 nM de metilnaltrexona (M) y la combinación de 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona (L+M) durante 1 hora sobre la expresión de Src y p-Src en la línea celular de cáncer pancreático humano (MiaPaCa 2). Las condiciones experimentales fueron idénticas a las del Ejemplo 10. Tal como se ilustra en la Figura 11, ambos fármacos individualmente y en combinación atenuaron p-Src en células pancreáticas humanas MiaPaCa 2, después de una hora.

EJEMPLO 12

El Ejemplo 12 evaluó el efecto de 10 μ M de lidocaína (L), 100 nM de metilnaltrexona (M) y la combinación de 10 μ M de lidocaína + 100 nM de metilnaltrexona (L+M) sobre

la expresión de Src y p-Src total en una línea de células de cáncer pancreático humano (Panc1) en múltiples puntos de tiempo hasta 6 horas, en medios frescos. Las condiciones experimentales fueron idénticas a la del Ejemplo 10. Como se ilustra en la Figura 12, la lidocaína por si misma mostró efectos inconsistentes sobre las disminuciones de p-Src. Metilnaltrexona por si misma disminuyó inicialmente p-Src a 30 minutos y 1 hora. Por el contrario, la combinación de lidocaína + metilnaltrexona disminuyó de manera consistente p-Src desde 30 minutos en adelante.

EJEMPLO 13

El modelo de lipopolisacárido (LPS) de la inflamación sistémica ha sido informado como uno de los modelos más aceptables para estudiar el impacto de nuevas terapias para inflamación aguda. LPS es una endotoxina ubicua derivada de bacterias gram-negativas y se sabe que induce enfermedades pro-inflamatorias en humanos y animales. Investigamos el papel de lidocaína o metilnaltrexona solas o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona en el modelo de inflamación inducida por LPS en ratones inmunocompetentes C57BL/6.

Detalles experimentales:

Se adquirió ratones C57BL/6J (6-8 semanas) en Charles River Laboratories (USA) y fueron aclimatados durante por lo menos 1 semana antes de usarlos. Todos los ratones

fueron alojados en una instalación libre de patógenos. Los ratones recibieron LPS durante 24 horas. Al cabo de 24 horas, los ratones fueron tratados ya sea con lidocaína sola o metilnaltrexona sola o una combinación de ambas, tal como se ilustra en la Tabla 1.

Tabla 1
Plan de Tratamiento In Vivo

Grupo	LPS	Lidocaína	Metilnaltrexona
Grupo 1	-	-	-
Grupo 2	-	+	-
Grupo 3	-	-	+
Grupo 4	-	+	+
Grupo 5	+	-	-
Grupo 6	+	+	-
Grupo 7	+	-	+
Grupo 8	+	+	+

Al final del estudio se tomaron muestras de sangre y tejido para análisis adicional. Se utilizó el suero para determinar la presencia de citosinas pro-inflamatorias mediante el uso del kit de panel de inflamación de ratón LEGENDplex™ (BioLegend, USA), seguido por citometría. Se utilizó las muestras de tejido de pulmones y bazo para teñido con hematoxilina y eosina (H&E) así como análisis inmunohisto-químicos para las células inmunes, incluyendo macrófagos y células asesinas naturales (NK), células B,

células T y sus subgrupos. Para estudios de histopatología e inmunohisto-química (IHC), se prepararon muestras de tejido cortando secciones de 4 μm a partir de bloques de parafina. Se realizó el teñido de IHC mediante los métodos descritos previamente. Se capturó las imágenes utilizando microscopio de campo brillante (Nikon Microscope). Dos investigadores independientes evaluaron el teñido con (H&E) y todo el teñido inmunohisto-químico. Para puntuación de diapositivas, cada investigador evaluó los tejidos y dio una puntuación de 0 (sin expresión) a +4 (expresión fuerte y uniforme) tal como se describió anteriormente. Los datos fueron expresados ya sea como el promedio $\pm$ SD o promedio $\pm$ SEM mediante el uso del software Graph Pad Prism.

Resultados y Discusión:

1. El tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona disminuye las anormalidades patológicas inducidas con LPS en pulmones y bazo.

La lesión pulmonar aguda es una enfermedad crítica que podría provocar mortalidad (40-60%). Después de las lesiones en el epitelio alveolar y edema pulmonar, se indica a la infiltración de neutrófilos como los principales cambios patológicos causados por la inflamación de los pulmones. Por lo tanto, para determinar la eficacia terapéutica de lidocaína sola, metilnaltrexona sola o una

combinación de lidocaína y metilnaltrexona en la inflamación, ratones C57BL/6 fueron inoculados con LPS seguido por tratamiento con el fármaco solo o en combinación tal como se describe en la Tabla 1. Al concluir el estudio, los ratones fueron sacrificados y se utilizaron cortes de tejido a partir de pulmones y bazo para realizar exámenes histopatológicos. El teñido con H&E mostró edema perivascular y acumulación de filtración de células mixtas en la sangre y vasos linfáticos en los grupos inoculados con LPS y tratados con solución salina o lidocaína sola o metilnaltrexona sola (Figura 13A). Sin embargo, el teñido con H&E mostró moderados cambios histopatológicos en los pulmones de ratones inoculados con LPS y tratados con lidocaína y metilnaltrexona combinadas (Figura 13A).

La inflamación pulmonar es estrechamente regulada por la infiltración inmune y los órganos mayor cantidad de filtrados inmunes representan una inflamación significativamente mayor. El bazo funciona para eliminar los eritrocitos senescentes, mantener una reserva de sangre y desempeñan un papel importante en el sistema inmune. Por lo tanto, investigamos la eficacia terapéutica de lidocaína o metilnaltrexona solas o una combinación de ambos fármacos en la patofisiología del bazo, utilizando el modelo de ratones con inflamación inducida por LPS tal como se ilustra en la Tabla 1. El examen histopatológico reve-

ló un número aumentado de eritrocitos en la pulpa roja, junto con edema moderado en ratones inoculados con LPS y tratados con solución salina o lidocaína sola o metilnaltrexona sola; sin embargo, los ratones tratados con una combinación de lidocaína y metilnaltrexona mostraron moderados cambios patológicos en el bazo (Figura 13B). Tomado en conjunto, el tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona disminuye las aberraciones patológicas inducidas por LPS en pulmones y bazo.

2. El tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona disminuye las citosinas pro-inflamatorias del suero inducidas por LPS.

Las infecciones bacterianas Gram-negativas son la causa principal de lesión pulmonar aguda y LPS, que es el componente principal de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, es el mayor estímulo para la liberación de mediadores inflamatorios. Por lo tanto, medimos el efecto de lidocaína sola, metilnaltrexona sola o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona sobre los perfiles de citosinas inflamatorias del suero inducidas por LPS. Se midió a las citosinas inflamatorias de ratón contenidas en suero de control y ratones inoculados con LPS tratados con los fármacos, tal como se describe en la Tabla 1, utilizando el kit de panel de inflamación de ratón LEGENDplex™ (BioLegend, USA), seguido por citometría de

flujo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Hubo cambios insignificantes en los niveles de interleucina 1 alfa (IL-1 α) e interferona-gamma (IFN γ) en ratones tratados con lidocaína sola, metilnaltrexona sola o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona (Figuras 14A y 14B). Sin embargo, se observó una disminución en los niveles del factor alfa de necrosis tumoral del suero (TNF- α), proteína 1 quimio-atractiva de monocitos (MCP-1), interleucina 10 (IL-10), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 17A (IL-17A), en ratones inoculados con LPS y tratados con lidocaína y metilnaltrexona combinadas (Figuras 14C-G). IL-1, IL-6, IL-17A, MCP-1 y TNF α son citosinas pro-inflamatorias asociadas con señales de inflamación. Tomadas en conjunto, estas observaciones indican que el tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona tiene el potencial de suprimir las señales inflamatorias.

3. El tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona disminuye los macrófagos y células asesinas naturales (NK) inducidos por LPS en pulmones y bazo.

Tanto los sistemas inmunológicos innatos y adaptativos desempeñan un papel importante en la inflamación. Entre los varios miembros del sistema inmune innato, los macrófagos son cruciales para regular la inflamación. Se ha informado que LPS ejerce efectos adyuvantes sobre los macrófagos, dando como resultado una cascada inflamatoria

definida por la producción precoz de citosinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α e IL-6. Además, se sabe que LPS estimula a los macrófagos de monocitos a través del Toll-like receptor4 (TLR4), dando como resultado la activación de una serie de eventos de señales que potencian la producción de mediadores inflamatorios. Debido a que los niveles de TNF- α e IL-6 del suero inducidos por LPS fueron regulados en forma descendente en ratones tratados con lidocaína y metilnaltrexona combinadas, determinamos la condición del macrófago en cortes de pulmones y bazo mediante teñido con IHC, utilizando el anticuerpo anti-ratón F4/80. Los resultados de IHC mostraron un área positiva F4/80 parcialmente disminuida en cortes de pulmones y bazo, tomados a partir de ratones inoculados con LPS y tratados ya sea con lidocaína o metilnaltrexona solas (Figuras 15A y 15B). Sin embargo, el tratamiento combinado con lidocaína o metilnaltrexona en ratones inoculados con LPS suprimió el área positiva F4/80 en pulmones y bazo (Figuras 15A y 15B). Las células NK son mediadores únicos de la inmunidad innata, implicados en la actividad citotóxica y la secreción de citosinas pro-inflamatorias. Para examinar minuciosamente la influencia de diferentes poblaciones de linfocitos sobre la respuesta del huésped inducida por LPS, determinamos la infiltración de las células NK en los pulmones y bazo, de lidocaína sola, me-

tilnaltrexona sola o una combinación de ambos agentes/fármacos. Determinamos la condición de la célula NK en cortes de pulmones y bazo mediante teñido con IHC, utilizando anticuerpo anti-ratón NK1.1. Los resultados demostraron un área positiva NK1.1 disminuida en pulmones y bazo de ratones inoculados con LPS, tratados con una combinación de lidocaína y metilnaltrexona (Figuras 16A y 16B). Estos resultados de IHC sugieren colectivamente que el tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona podría hacer impacto sobre las señales inflamatorias mediadas por macrófagos y células NK.

4. El tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona disminuye las células B inducidas por LPS en pulmones y bazo.

Los TLRs desempeñan un papel importante en las respuestas inmunes a patógenos, mediante la transducción de señales en células inmunes innatas en respuesta a productos microbianos, incluyendo LPS. Aparte de su expresión sobre los macrófagos, los TLRs son expresados también sobre las células B que contribuyen a las respuestas inmunes mediadas por anticuerpo. Por lo tanto, para comprender el efecto de lidocaína sola o metilnaltrexona sola, o una combinación de lidocaína y metilnaltrexona sobre las células B en pulmones y bazo, realizamos el teñido con IHC utilizando un anticuerpo CD19 anti-ratón. Los resul-

tados de IHC mostraron un área positiva CD19 parcialmente aumentada en cortes de pulmones y bazo tomados a partir de ratones inoculados con LPS y tratados conjuntamente con lidocaína y metilnaltrexona (Figuras 17A y 17B). En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona aumenta la población de células B en la inflamación inducida por LPS.

5. El tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona aumenta las células T inducidas por LS y los subgrupos en pulmones y bazo.

Al igual que las células B, las células T constituyen otro miembro del sistema inmune adaptativo. Conforme avanzan los procesos inflamatorios, la producción de citosina pro-inflamatoria induce la hipo-respuesta en las células T y sus subgrupos. Para comprender el impacto de lidocaína sola o metilnaltrexona sola o una combinación de ambos fármacos en la infiltración de células T, células CD4+ y CD8+ en pulmones y bazo de ratones inoculados con LPS, realizamos el teñido con IHC en cortes de pulmones y bazo utilizando un anti-cuerpo CD3 anti-ratón, anticuerpo CD4 anti-ratón y anticuerpo CD8 anti-ratón respectivamente. Los resultados de IHC mostraron área positiva aumentada CD3, CD4 y CD8 en cortes de pulmones y bazo tomados a partir de ratones tratados con una combinación de lidocaína y metilnaltrexona (Figuras 18-20). La

supresión de la célula T contribuye a la disfunción inmune. Se ha informado que LPS puede suprimir, de manera rápida y dependiente de la dosis, la producción de interleucina-2 (IL-2) y la proliferación de células T en las células mononucleares periféricas (PBMCs). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona podría tener el potencial de mejorar las funciones de la célula T en la inflamación inducida por LPS.

Conclusión:

Resumiendo, estos resultados indican que la lidocaína y metilnaltrexona solas podrían mitigar parcialmente la inflamación inducida por LPS en un modelo de ratón y que el tratamiento combinado con lidocaína y metilnaltrexona podría ser utilizado potencialmente en el tratamiento de estados inflamatorios.

EJEMPLO 14

Este Ejemplo ofrece un protocolo para prevenir y manejar la inflamación y el dolor que podrían surgir como consecuencia de procedimientos quirúrgicos altamente invasivos (o sea, analgesia post-operativa). Este protocolo incluye cirugías para cáncer, aunque se ofrece en el Ejemplo 15 un protocolo separado específicamente para el cáncer. Se realiza el protocolo a los regímenes de instilación intravenosa descritos en la Tabla 2, en una de las

nueve combinaciones potenciales de escalas de dosificación, en las proporciones en peso de lidocaína a metilnaltrexona descritas en la Tabla 3, para un total de 27 combinaciones de escalas y proporciones de dosis. La dosis administrada de lidocaína y metilnaltrexona estará siempre por debajo de la dosis máxima tolerada de cada ingrediente individual, tomando como base el riesgo para el sistema cardiovascular del paciente y en particular el riesgo de causar arritmias y, en el caso de metilnaltrexona, la dosis que provoca diarrea o que trata el estreñimiento inducido por opioides. La concentración de metilnaltrexona en el plasma será mantenida siempre por debajo de 1400 ng/ml para evitar complicaciones cardiovasculares indeseables. En forma similar, la concentración de lidocaína en el plasma será mantenida siempre por debajo de 5 mg/L para evitar complicaciones tales como aturdimiento.

Tabla 2

Regímenes de Instilación Diaria

	Régimen de Administración		
	(mg/kg/día)		
	Opción 1	Opción 2	Opción 3
HCl de Lido- caína	10-45	15-35	20-30

	Opción 1	Opción 2	Opción 3
Br de Metil-naltrexona	0,2-2	0,25-1,75	0,30-1,5

Tabla 3

Proporciones de Lidocaína a Metilnaltrexona

	Opción A	Opción B	Opción C
Proporción en peso de metilnaltrexona-lidocaína	1:10-1:125	1:20-1:100	1:30-1:75

*Las proporciones se basan en el peso de la sal completa

Procedimiento Quirúrgico (no laparoscópico):

- cirugías torácicas, ortopédicas y abdominales
- hemorroidectomías y bunionectomías
- artroplastia de cadera o rodilla, reparación de hernia inguinal
- resección de tumores, particularmente tumores en senos y páncreas
- osteosarcoma (cirugía para preservar las extremidades, amputación o plastia de rotación)

Mejorías Clínicas:

- Reducción del dolor a 24 horas, 48 horas, 72 horas o 1 semana al cesar el tratamiento.
- Mejorías en los biomarcadores inflamatorios a

24 horas, 48 horas, 72 horas o 1 semana al cesar el tratamiento.

- Reducción en el uso de opioides pos-cirugía durante la fase aguda (0-24 horas pos-tratamiento) o la fase demorada (24-120 horas pos-tratamiento) o ambos.
- Tiempo para ambulación auto-suficiente.
- Mejoría en la morbilidad post-operativa.
- Mejoría en el tiempo de supervivencia pos-cirugía.

Régimen de Dosificación (para pacientes hospitalizados o ambulatorios):

- Instilación perioperativa a partir de 15 minutos a 2 horas antes de la cirugía y con una duración de hasta más o menos 24 horas o 48 horas después de la cirugía (preferiblemente bajo vigilancia por telemetría).

EJEMPLO 15

Este ejemplo describe el protocolo para prevenir o manejar la migración de células cancerosas (o sea metástasis) que tiene lugar durante y después de procedimientos quirúrgicos invasivos para extirpar tumores cancerosos. Se realiza el protocolo a los mismos regímenes de instilación intravenosa descritos en el Ejemplo 14 y Tabla 2, en las proporciones en peso y molares de lidocaína

a metilnaltrexona descritas en el Ejemplo 14 y Tabla 3, para un total de 27 combinaciones de escalas y proporciones de dosificación. La dosis administrada de lidocaína y metilnaltrexona estará siempre por debajo de la dosis máxima tolerada de cada ingrediente individual, basada en el riesgo para el sistema cardiovascular del paciente, en particular para el riesgo de causar arritmias cardíacas y, en el caso de metilnaltrexona, la dosis que provoca diarrea o que trata el estreñimiento provocado por opioides. En particular, la concentración de metilnaltrexona en el plasma será mantenida por debajo de 1400 ng/ml y la concentración de lidocaína en el plasma será mantenida siempre por debajo de 5 mg/L.

Procedimiento Quirúrgico (no laparoscópico):

- cirugías torácicas, ortopédicas y abdominales
- resección de tumores, particularmente tumores en senos y páncreas
- osteosarcoma (cirugía para preservar las extremidades, amputación o plastia de rotación)

Mejorías Clínicas:

- Reducción del dolor a 24 horas, 48 horas, 72 horas o 1 semana al cesar el tratamiento.
- Mejorías en los biomarcadores inflamatorios a 24 horas, 48 horas, 72 horas o 1 semana al cesar el tratamiento.

- Reducción en el uso de opioides pos-cirugía durante la fase aguda (0-24 horas pos-tratamiento) o la fase demorada (24-120 horas pos-tratamiento) o ambos.
- Mejoría en la morbilidad post-operativa.
- Mejoría en el tiempo de supervivencia pos-cirugía.

Régimen de Dosificación (para pacientes hospitalizados o ambulatorios):

- Instilación perioperativa a partir de 15 minutos a 2 horas antes de la cirugía y con una duración de hasta más o menos 24 horas o 48 horas después de la cirugía (preferiblemente bajo vigilancia por telemetría).

En toda esta solicitud se hizo referencia a varias publicaciones. Las descripciones de estas publicaciones en su forma completa, se incorporan aquí a modo de referencia para describir de manera más detallada el estado del arte al cual pertenece esta invención. Será evidente para los expertos en el arte que se pueden realizar varias modificaciones y variaciones en la presente invención, sin apartarse de su espíritu o alcances. Serán evidentes otras formas de la invención para los expertos en el arte al considerar la Memoria y la práctica de la misma descrita aquí. Se pretende que la Memoria y los ejem-

plos sean considerados como un modelo solamente, estando indicados los alcances y espíritu verdaderos por las reivindicaciones finales.