

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 694**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2014** **PCT/ES2014/070090**
87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014** **WO14122353**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2014** **E 14749402 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025** **EP 2966448**

54 Título: **Método para la predicción o pronóstico de la respuesta de un sujeto humano que padece cáncer al tratamiento con un antagonista del receptor NK1**

30 Prioridad:

11.02.2013 ES 201330174

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2025

73 Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (100.00%)
Avda. de la Constitución 18
41071 Sevilla, ES

72 Inventor/es:

SALINAS MARTÍN, MANUEL VICENTE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 3 015 694 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

Método para la predicción o pronóstico de la respuesta de un sujeto humano que padece cáncer al tratamiento con un antagonista del receptor NK1

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se enmarca en el campo de la medicina, la farmacia y la biología molecular, y más concretamente, en el campo de la oncología. Específicamente, se relaciona con un método para predecir la respuesta de un sujeto humano que padece cáncer al tratamiento con un antagonista del receptor NK1, que permite clasificar a los sujetos en respondedores y no respondedores. La invención también se refiere al uso del nivel de expresión del receptor NK1 como indicador de la respuesta al tratamiento.

ESTADO DEL ARTE

Los receptores NK1 (receptores de neuropéptidos de la sustancia P y de las taquicininas) se encuentran ampliamente distribuidos en las células del organismo. Actualmente se conocen múltiples procesos biológicos en los que los receptores NK1 participan en su regulación. Dichos receptores son del tipo acoplados a proteínas G.

Al igual que otros receptores, los receptores NK1 tienen sus propios agonistas naturales. El más selectivo de ellos es la sustancia P. La sustancia P (SP) es un undecapéptido de origen natural, que pertenece a la familia de las taquicininas, es producido por los mamíferos y su secuencia fue descrita por Veber et al. (US 4,680,283). La familia de las taquicininas también incluye otros péptidos, tales como la neuroquinina A, la neuroquinina B, el neuropéptido K, el neuropéptido Gamma y la hemokinina I, entre otros. La participación de la sustancia P y de las demás taquicininas en la etiopatogenia de diversas enfermedades ha sido ampliamente referida en la investigación científica. En este sentido, la acción de las taquicininas se ha vinculado con la etiopatogenia de enfermedades del sistema nervioso humano como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, la ansiedad y la depresión (Barker R. et al., 1996; Kramer MS, et al., 1998). Asimismo, se ha verificado la participación de las taquicininas en la etiopatogenia de diversas enfermedades con un componente inflamatorio, tales como la artritis reumatoide, el asma, la rinitis alérgica, y enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Maggi CA, et al., 1993).

En este contexto, la industria farmacéutica ha desarrollado antagonistas no péptidos del receptor NK1 como medicamentos para el tratamiento de diversos trastornos del sistema nervioso central, tales como la depresión, la psicosis y la ansiedad (WO 95/16679, WO 95/18124, WO 95/23798 y WO 01/77100). Se ha descrito que el uso de antagonistas selectivos del receptor NK1 resulta útil en el tratamiento de las náuseas y los vómitos inducidos por agentes quimioterapéuticos antineoplásicos, así como en el tratamiento de diversas formas de incontinencia urinaria (Quartara L. et al., 1998; Doi T. et al., 1999).

En un estudio publicado en 2003 (Giardina G, et al., 2003) y en otro publicado en 2010 (Huang SC, et al., 2010) se presenta una revisión de las patentes más recientes sobre antagonistas del receptor NK1. Se describen las moléculas de los fabricantes más importantes del mundo, junto con indicaciones sobre sus posibles aplicaciones, que incluyen principalmente: efectos antidepresivos, antiinflamatorios, ansiolíticos, antieméticos, el tratamiento de la colitis ulcerosa, entre otros.

Se ha publicado el uso de varios antagonistas de la sustancia P para inhibir la proliferación del carcinoma de células pulmonares (Orosz A, et al., 1995; Bunn PA Jr. et al., 1994).

Se sabe que los astrocitos del sistema nervioso central expresan receptores funcionales para diversos neurotransmisores, incluidos los receptores NK1 (Palma C. et al., 2000). En los tumores cerebrales, las células gliales malignas derivadas de los astrocitos desencadenan, bajo la acción de las taquicininas y mediada por los receptores NK1, la secreción de mediadores que aumentan su tasa de proliferación. En consecuencia, los antagonistas selectivos del receptor NK1 pueden resultar muy útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de gliomas malignos.

La patente EP 773026 (Pfizer) hace referencia al uso de antagonistas no péptidos del receptor NK1 para el tratamiento del cáncer en mamíferos, en particular en el tratamiento de carcinomas pulmonares de células pequeñas, denominados APUDOMAS (tumores de células enteroquimocinas, que se localizan predominantemente en la mucosa del tracto digestivo; las siglas corresponden a "Amine Precursors Uptake and Decarboxylation").

Por otro lado, la patente WO 2001001922 describe el uso de receptores NK1 para el tratamiento de adenocarcinomas y, muy específicamente, de carcinomas prostáticos.

Diversos estudios con antagonistas específicos de los receptores de neuroquinina, tales como CP-96341-1 (Pfizer), MEN 11467, SR 48968 (Sanofi) y MEN 11420 (Nepadutant), han demostrado su eficacia en el bloqueo de la proliferación celular (Singh D et al., 2000; Bigioni M. et al., 2005).

Se ha descrito que los antagonistas no péptidos del receptor NK1 inducen apoptosis (muerte celular) en células cancerosas en varios tumores, tales como el carcinoma gástrico, el carcinoma de colon (Rosso M, et al., 2008), el melanoma (Muñoz M, et al., 2010) o el carcinoma pulmonar (Muñoz M. et al., 2012).

La patente ES 2246687 reivindica el uso de antagonistas no péptidos del receptor NK1 y de la sustancia P para la fabricación de una composición farmacéutica destinada a inducir la apoptosis en células tumorales de cáncer en mamíferos. La solicitud de patente española P201101311 (PCT/ES2012/070865) reivindica el uso de agentes modificadores del microambiente peritumoral, concretamente los antagonistas del receptor NK1, para el tratamiento del cáncer. Por otro lado, la solicitud de patente W02012020162 describe el uso de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, dirigidos contra los receptores NK1, NK2 y/o NK3, como útiles en el tratamiento del cáncer, debido a su capacidad para provocar la apoptosis de las células tumorales.

Actualmente, en la práctica clínica se utilizan diversos medicamentos dirigidos a antagonizar los efectos de determinados receptores de membrana con el objetivo de tratar el cáncer. Los ejemplos más representativos son el uso de anticuerpos monoclonales contra el receptor Her2 para tratar el cáncer de mama y de estómago, el uso de medicamentos inhibidores de la tirosina quinasa para tratar el cáncer de pulmón, y el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los receptores EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) para tratar el cáncer de colon, entre otros. En todos estos casos se conoce la existencia de marcadores biológicos predictivos de la respuesta a dichos tratamientos. Por ejemplo, en el caso del cáncer de mama se sabe que, en humanos, el anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor Her-2 es efectivo únicamente si existe una sobreexpresión de dicho receptor, lo cual se observa mediante un estudio inmunohistoquímico o una amplificación del gen. Esta amplificación se puede detectar mediante el marcaje del gen con sondas específicas que se visualizan mediante metodologías de hibridación in situ. En el tratamiento del cáncer de pulmón con inhibidores de la tirosina quinasa, se sabe que estos medicamentos solo son efectivos si existe una mutación en el gen que codifica para el receptor EGFR, lo que condiciona una alteración en la estructura del gen y, por ende, que el receptor se active de forma "constitutiva" y permanente. Si tal mutación no está presente, los medicamentos mencionados no son efectivos para tratar el cáncer de pulmón. En el caso del cáncer de colon se ha demostrado que el tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor EGFR es efectivo únicamente si no existe una mutación en el gen K-ras. Si se produce una mutación en dicho gen, lo que provoca un cambio en la proteína codificada que se activa de forma constitutiva, dichos anticuerpos no resultan efectivos en el tratamiento de estos tumores cancerosos de colon.

La investigación científica ha descrito que algunas células tumorales pueden presentar una forma truncada del receptor NK1 (Gillespie E, et al., 2011).

Por lo tanto, en conclusión, se conocen actualmente los siguientes hechos en el estado del arte:

1. Que los receptores NK1 están ampliamente distribuidos en los organismos humanos.
2. Que las taquicinas, y más concretamente la sustancia P, actúan sobre los receptores NK1.
3. Que el uso de antagonistas no péptidos del receptor NK1 ha mostrado efectos en las células tumorales, conduciendo a su muerte celular por apoptosis (ES 2246687).
4. Que el uso de agentes modificadores del microambiente tumoral, concretamente los antagonistas del receptor NK1, es útil en el tratamiento de tumores cancerosos (PCT/ES2012/070865).
5. Que el uso de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, dirigidos contra los receptores NK1, es útil para tratar el cáncer, debido a su capacidad para inducir la apoptosis de las células tumorales (W02012020162).
6. Que algunas células tumorales pueden presentar la forma truncada del receptor NK1.
7. Que existen marcadores predictivos de respuesta a varios tratamientos dirigidos a tratar el cáncer mediante la modificación del funcionamiento de diversos receptores de membrana de las células tumorales, además de los receptores NK1.

Se sabe, además, que la vía de las MAP quinasa, específicamente mediante sus vías eferentes, tales como ERK o MEK, puede modular la proliferación celular a través de diversas cascadas eferentes notables, como Fos/Jun o P90rsk, entre otras. Por otro lado, también se conoce que la activación de la vía de las PI3 quinasa conduce al aumento de una de sus vías aferentes finales, como AKT. Por ello, algunos tumores utilizan las vías de las MAP quinasa y de las PI3 quinasa, lo que favorece su capacidad proliferativa. Estos tumores presentan altos niveles de las proteínas ERK, MEK y AKT, características de dichas vías (MAP quinasa y PI3 quinasa).

La proteína RAS es un elemento clave en las vías de las MAP quinasa y de las PI3 quinasa, ocupando una posición fundamental en las cascadas de señalización de ambas. La mutación del gen K-ras condiciona la expresión de una proteína "constitutivamente activada" que mantiene dichas vías permanentemente activadas, independientemente del estado del receptor y de sus señales eferentes ascendentes, enviando una señal continua que induce una estimulación sostenida de la proliferación celular.

Sin embargo, el estado del arte conocido, que incluye el uso de antagonistas del receptor NK1 (antagonistas no péptidos o anticuerpos —o sus fragmentos—) para inducir la muerte y/o apoptosis de las células tumorales (ya sea por acción directa o mediante la modificación de su microambiente), desconoce actualmente qué grupos de pacientes podrían responder mejor al tratamiento con antagonistas del receptor NK1. Conocer esto permitiría establecer las dosis más adecuadas de dichos antagonistas, así como su uso en combinación con otros tratamientos anticancerígenos (por ejemplo, quimioterapéuticos o bloqueadores específicos de otras vías moleculares relevantes para ciertos tipos de tumores) o tratamientos de soporte para pacientes oncológicos, logrando así un resultado más eficaz y eficiente.

La patente EP 0 773 026 A2 aborda los antagonistas del receptor NK1 (por ejemplo, antagonistas del receptor de la sustancia P) para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer en mamíferos.

La patente EP 1 803 456 A1 trata sobre los antagonistas de la sustancia P y, en particular, sobre el uso de antagonistas no péptidos del receptor NK1 para el tratamiento del cáncer.

La patente EP 2 604 276 A1 aborda el uso de un anticuerpo, o fragmento del mismo, específico contra los receptores NK1, NK2 y/o NK3 para la fabricación de un medicamento destinado al manejo terapéutico del cáncer humano.

La patente WO 2009/124756 A1 discute el uso de compuestos heterocíclicos, como aprepitant, para el tratamiento del cáncer.

La patente WO 2005/077366 A1 trata sobre el uso de antagonistas de la sustancia P y, en particular, sobre el uso de antagonistas no péptidos del receptor NK1 para el tratamiento del cáncer.

J. Bussoline, en "What Is a Dispositive?" (FOUCAULT STUDIES, nº 10, 2010, pp. 85–107), analiza las traducciones de términos en francés e italiano con significados similares a "dispositivo" en inglés.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Breve descripción de la invención

Un primer objeto de la presente invención es el uso de un método in vitro para predecir la respuesta de un sujeto humano que padece cáncer a un tratamiento de dicha enfermedad con un antagonista del receptor NK1, en el que dicho método comprende:

- detectar el nivel de expresión del receptor NK1 en una muestra de células tumorales aisladas del sujeto;
- comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia; y
- predecir una respuesta positiva al tratamiento si el nivel de expresión se encuentra incrementado en relación con el valor de referencia,

siendo el valor de referencia el nivel de expresión promedio en una población de no respondedores

Preferentemente, se detectan los niveles de expresión del receptor NK1 o del ARNm que lo codifica en una muestra que incluya células tumorales de un sujeto humano con cáncer. En otra realización preferente se determina la presencia o ausencia de mutaciones en el gen K-ras en las células tumorales de la muestra aislada. En otra realización preferente se determina la presencia o ausencia de la proteína ERK en las células tumorales de la muestra aislada. Más preferentemente, se determina la presencia o ausencia de la proteína AKT en las células tumorales de la muestra aislada. Incluso más preferentemente, se determina la presencia o ausencia de la forma truncada del receptor NK1 en las células tumorales de la muestra aislada. Y, de manera aún más preferente, se determina si las células tumorales de la muestra aislada presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1.

Un segundo objeto de esta invención se refiere al uso del nivel de expresión del receptor NK1 en una muestra de células tumorales como indicador, dentro de un método in vitro, para predecir si un paciente con cáncer tendrá una respuesta positiva al tratamiento con una composición farmacéutica que contenga un antagonista del receptor NK1.

Preferentemente, el antagonista del receptor NK1 es un antagonista no péptido o péptido. Más preferentemente, el antagonista no péptido se selecciona de entre Aprepitant, Vestipitant, Casopitant, Vofopitant, Ezlopitant, Lanepitant, LY-686017, L-733,060, L-732,138, L-703,606, WIN 62,577, CP-122721, TAK637 y R673, CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735, CP-422724, L-758298, L-741671, L-742694, CP-99994, T-2328, o combinaciones de los mismos; y el antagonista péptido se selecciona de entre anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos contra el receptor NK1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de un marcador seleccionado entre:

- a) el nivel de expresión del receptor NK1, o el ARNm que lo codifica, y/o
- b) la presencia de una mutación en el gen K-ras, y/o
- c) el nivel de expresión de las proteínas ERK, preferentemente ERK1 y ERK2, o el ARNm que las codifica, y/o
- d) el nivel de expresión de las proteínas MEK, preferentemente MEK1 y MEK2, o el ARNm que las codifica, y/o
- e) el nivel de expresión de la proteína AKT, preferentemente AKT1 y AKT2, o el ARNm que la codifica, y/o
- f) la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1, o el ARNm que la codifica, y/o
- g) la presencia del receptor NK1 constitutivamente activado,

o cualquiera de las combinaciones anteriores, para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano al tratamiento con un antagonista del receptor NK1. Preferiblemente, los marcadores se utilizan de forma simultánea.

Método para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano con cáncer al tratamiento con un antagonista del receptor NK1

En la presente invención se demuestra que los tumores que presentan una sobreexpresión del receptor NK1 o una amplificación del gen NK1 muestran una respuesta mejor (más efectiva) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

Por lo tanto, una primera realización de esta invención se refiere a un método in vitro —en adelante, el primer método de la invención— para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano al tratamiento con un antagonista del receptor NK1, en el que el sujeto padece cáncer, y que incluye el uso, como indicador, de los niveles de expresión del receptor NK1.

En una realización preferente de este aspecto de la invención se utiliza como indicador la expresión del receptor NK1, o el ARNm que lo codifica.

El primer método de la invención comprende:

- a. Obtener una muestra biológica aislada que contenga células tumorales de un sujeto humano que padece cáncer; y
- b. Detectar los niveles de expresión del receptor NK1 o del ARNm que lo codifica en la muestra obtenida en el paso (a).

Preferiblemente, el resultado del primer método de la invención es indicativo de una respuesta positiva (la respuesta más efectiva al tratamiento) si los niveles de expresión del receptor NK1 o del ARNm que lo codifica se encuentran sobreexpresados en comparación con una muestra, un valor de referencia y/o un control que exprese niveles indicativos de falta de respuesta.

Más preferentemente, la sobreexpresión se define como un nivel de expresión del receptor NK1, o del ARNm que lo codifica, incrementado en más del 20% de las células de la muestra biológica aislada obtenida en el paso (a). Aún más preferiblemente, el nivel de expresión del receptor NK1, o del ARNm que lo codifica, está aumentado en más del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y, de manera aún más preferente, en más del 90% de las células de la muestra obtenida en el paso (a).

En una realización, la respuesta corresponde a la reducción de la masa tumoral. En una realización alternativa, la respuesta es una mejora o la ausencia de deterioro en el estado del tumor.

En otra realización, la respuesta se traduce en un resultado clínico, como la supervivencia libre de progresión o la supervivencia global.

Los sujetos cuya respuesta se predice son sujetos humanos que padecen cáncer. Por ello, en esta especificación, los términos "sujeto humano", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente.

Tal como se utiliza en este documento, el receptor NK1 (también denominado receptor de neuroquinina 1, SPR; NK1R; o TAC1R) se presenta como un receptor acoplado a una proteína G (GPCR, del inglés: G protein-coupled receptors). Este receptor pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, posee siete dominios transmembrana y está codificado por el gen TACR1, que en humanos se encuentra en el cromosoma 2. Dicho gen pertenece a la

familia de los receptores de taquicininas, caracterizados por su interacción con proteínas G y por tener siete regiones transmembrana hidrofóbicas. Este gen codifica el receptor de la taquicinina sustancia P, también conocido como neuroquinina 1, y la proteína codificada participa además en la mediación del metabolismo del fosfatidilinositol de la sustancia P.

5 Tal como se emplea en el presente documento, TACR1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína incluida en el SEQ ID NO: 1 (GeneBank NP_001049.1), e incluiría diversas variaciones derivadas de:

- 10 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1;
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a);
- 15 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético;
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80%, 90%, 95%, 98% o 99% con el SEQ ID NO: 1, y en el cual el polipéptido codificado por tales ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína NK1. Entre dichas
- 20 moléculas de ácido nucleico se encuentra la incluida en la secuencia SEQ ID NO: 2.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares) se presenta como un tipo de proteína que forma parte de la vía molecular de las MAP quinasa y que participa en múltiples funciones celulares relevantes en la fisiopatología del cáncer. La MAP quinasa (ERK) es una quinasa serina-treonina que puede translocarse al núcleo para regular la transcripción, modificando la actividad de diversas proteínas (incluidos factores de transcripción) y, de este modo, modulando la expresión de diferentes genes. En el contexto de esta invención, ERK1 (también denominada quinasa activada por mitógenos 3 o MAPK3) se define asimismo por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína incluida en el SEQ ID NO: 3

30 (GeneBank M84490.1), e incluiría diversas variantes derivadas de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3;
- 35 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a);
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético;
- 40 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80%, 90%, 95%, 98% o 99% con el SEQ ID NO: 3, y en el cual el polipéptido codificado por tales ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ERK1. Entre dichas moléculas se encuentra la incluida en la secuencia SEQ ID NO: 4.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, ERK2 (también denominada quinasa activada por mitógenos 1 o MAPK1) se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos que constituye la secuencia codificante de la proteína incluida en el SEQ ID NO: 5 (GeneBank M84489.1) e incluiría diversas variantes derivadas de:

- 50 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 5;
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a);
- 55 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético;
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80%, 90%, 95%, 98% o 99% con el SEQ ID NO: 5, y en el cual el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ERK2. Entre dichas
- 60 moléculas se encuentra la incluida en la secuencia SEQ ID NO: 6.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, MEK se presenta como un tipo de proteínas que, entre otras, incluyen a MEK1 y MEK2. MEK1 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1, o MAPKK1 o MAP2K1) y está codificada por un gen ubicado en el cromosoma 15 (locus 15q22.1–q22.3). En el contexto de la presente invención, MEK1 se define también mediante una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína incluida en el SEQ ID NO: 7 (GeneBank L11284.1), e incluiría diversas variantes derivadas de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7;

5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a);

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético;

10 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80%, 90%, 95%, 98% o 99% con el SEQ ID NO: 7, y en el cual el polipéptido codificado posee la actividad y las características estructurales de la proteína MEK1. Entre dichas moléculas se encuentra la incluida en el SEQ ID NO: 8.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, MEK2 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2, o MAPKK2 o MAP2K2) está codificada por un gen ubicado en el cromosoma 19 (locus 19p13.3) y se define asimismo mediante una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína incluida en el SEQ ID NO: 9 (GeneBank L11285.1), e incluiría diversas variantes derivadas de:

20 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 9;

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a);

25 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético;

30 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80%, 90%, 95%, 98% o 99% con el SEQ ID NO: 9, y en el cual el polipéptido codificado posee la actividad y las características estructurales de la proteína MEK2. Entre dichas moléculas se encuentra la incluida en el SEQ ID NO: 10.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, AKT se presenta como un grupo de proteínas que participan en los mecanismos de control de la apoptosis (muerte celular programada) y de la proliferación celular. Entre ellas, destaca la proteína AKT1 (también llamada Protein Kinase B, por ejemplo). En el contexto de la presente invención, AKT1 se define asimismo mediante una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína incluida en el SEQ ID NO: 11 (GeneBank M63167.1), e incluiría diversas variantes derivadas de:

40 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 11;

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a);

45 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético;

50 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80%, 90%, 95%, 98% o 99% con el SEQ ID NO: 11, y en el cual el polipéptido codificado posee la actividad y las características estructurales de la proteína AKT1. Entre dichas moléculas se encuentra la incluida en el SEQ ID NO: 12.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, AKT2 se define asimismo mediante una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína incluida en el SEQ ID NO: 13 (GeneBank M77198.1), e incluiría diversas variantes derivadas de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 13;

60 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia polinucleotídica de (a);

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético;

65 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80%, 90%, 95%, 98% o 99% con el SEQ ID NO: 13, y en el cual el polipéptido codificado

posee la actividad y las características estructurales de la proteína AKT2. Entre tales moléculas se encuentra la incluida en el SEQ ID NO: 14.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muestra de referencia" o "valor de referencia" se refiere a la muestra utilizada para determinar la variación en los niveles de expresión de las proteínas objeto de la presente invención. En una realización de la invención, el valor de referencia se obtiene a partir de la señal obtenida al emplear una muestra de tejido proveniente de un individuo que presenta un tumor con falta de respuesta o con respuesta pobre al tratamiento del cáncer mediante antagonistas del receptor NK1. Preferiblemente, las muestras se extraen del mismo tejido de varios individuos no respondedores y se combinan de modo que el valor de referencia refleje el valor promedio de dichas moléculas en la población de no respondedores. El "valor de referencia" se entiende como el nivel de expresión de una proteína de la invención (receptor NK1, ERK, AKT o la forma truncada del receptor NK1) en la muestra de referencia, o el número de células que expresan dicha proteína en dicha muestra. El valor de referencia que indique la falta de respuesta para cada proteína concreta debe conocerse antes de implementar el método de la presente invención. Se prefiere que la muestra de referencia provenga del mismo tejido y/o se obtenga mediante el mismo procedimiento (según las opciones descritas anteriormente) que la muestra de la cual se predecirá la respuesta del individuo. Se prefiere que la muestra provenga del mismo estadio o del mismo grado de severidad de la enfermedad del cáncer que la muestra a partir de la cual se predecirá la respuesta del individuo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pronóstico" se define como la evolución esperada de una enfermedad, y se refiere tanto a la valoración de la probabilidad de que un sujeto padezca una enfermedad, como a la valoración de su inicio, estado de desarrollo, evolución o regresión, y/o al pronóstico del curso futuro de la enfermedad. Como comprenderán los expertos en la materia, aunque se prefiera que dicha valoración sea correcta, normalmente no lo será para el 100% de los sujetos diagnosticados. Sin embargo, el término requiere que se pueda identificar, de forma estadísticamente significativa, a una parte de los sujetos como portadores de la enfermedad o predispuestos a desarrollarla. Esta significación estadística puede determinarse mediante diversas herramientas de evaluación, tales como la determinación de intervalos de confianza, p-valores, test t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son, al menos, del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%, y los p-valores preferidos son 0,2; 0,1 o 0,05.

Con el término "predicción de respuesta" en el contexto de esta invención se entiende la determinación de la probabilidad de que el paciente responda de forma favorable o desfavorable a una terapia o tratamiento determinado, incluido el tratamiento quirúrgico. Especialmente, el término "predicción", tal como se utiliza aquí, se refiere a la evaluación individual de cualquier parámetro que pueda ser útil para determinar la evolución de un paciente. Como comprenderán los expertos en la materia, la predicción de la respuesta clínica al tratamiento, aunque se prefiera que sea correcta, no tiene que serlo para el 100% de los sujetos evaluados o diagnosticados. No obstante, el término requiere que se pueda identificar, de forma estadísticamente significativa, a una parte de los sujetos con una probabilidad incrementada de presentar una respuesta positiva. El experto en la materia puede determinar fácilmente si un sujeto es estadísticamente significativo utilizando diversas herramientas de evaluación, tales como la determinación de intervalos de confianza, p-valores, test t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son, al menos, del 50%, al menos, del 60%, al menos, del 70%, al menos, del 80%, al menos, del 90% o al menos, del 95%, y los p-valores preferidos son 0,2; 0,1 o 0,05. La predicción de la respuesta clínica se puede realizar utilizando cualquiera de los criterios de valoración empleados en oncología y conocidos por el experto en la materia.

Al mismo tiempo, considerando el método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de la clasificación principal, facilitando así la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos o tratamientos adecuados. Esta discriminación, tal como entienden los expertos en la materia, no pretende ser correcta en el 100% de las muestras analizadas; sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas se clasifique correctamente. La magnitud que se considere estadísticamente significativa puede establecerse mediante diversas herramientas estadísticas, por ejemplo, mediante la determinación de intervalos de confianza, p-valores de significancia, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann-Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal o el área bajo la curva ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son de al menos 90%, 95%, 97%, 98% o 99%. Asimismo, se prefiere que el p-valor sea inferior a 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o incluso 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, de manera aún más preferente en al menos el 80% o, incluso, en al menos el 90% de los sujetos de un grupo o población analizada.

En el contexto de la presente invención, el término "respuesta positiva" se refiere a la respuesta de pacientes con cáncer que resulta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, en comparación con otros pacientes con cáncer que no responden de manera tan efectiva a dicho tratamiento. La respuesta puede referirse tanto a las características de los tumores del sujeto como, de manera alternativa pero no excluyente, al resultado clínico del paciente. Por lo tanto, mediante el primer método de la invención se puede predecir si un paciente individual mostrará (i) una respuesta (R) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 o (ii) no mostrará respuesta (NR) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

Cuando la respuesta se refiere a las características de los tumores del paciente, la distinción entre R y NR puede implementarse en función del cambio en el tamaño de la lesión. Por ejemplo, es posible definir "Respuesta" como una reducción en la masa tumoral total (definida como la suma de las áreas de las lesiones tumorales medidas bidimensionalmente), tomando como referencia los valores correspondientes al valor inicial, sin la aparición de nuevas lesiones. En particular, la respuesta puede definirse como una reducción de $\geq 5\%$ en la masa tumoral total, o $\geq 10\%$, $\geq 15\%$, $\geq 20\%$, $\geq 25\%$, $\geq 30\%$, $\geq 35\%$, $\geq 40\%$, $\geq 45\%$ o incluso $\geq 50\%$ de reducción en la masa tumoral total. En una realización preferente de la presente invención, la respuesta se define como una reducción de $\geq 30\%$ en la masa tumoral total, considerando como referencia los valores iniciales y sin la aparición de nuevas lesiones. La ausencia de respuesta (NR) se define como lo opuesto a (R). Preferiblemente, la ausencia de respuesta se define como una reducción de $< 30\%$ en el área de una o más lesiones medibles, o la aparición de al menos una nueva lesión, lo que normalmente incluye un incremento, por ejemplo, un aumento $> 20\%$ en el área de una o más lesiones medibles o la aparición de al menos una nueva lesión.

Cada vez que "Respuesta" se refiera al resultado clínico del paciente, esta puede expresarse como supervivencia global o supervivencia libre de progresión. La supervivencia de los pacientes con cáncer se expresa de forma precisa, generalmente, mediante curvas de Kaplan-Meier, que reciben su nombre de Edward L. Kaplan y Paul Meier, quienes las describieron inicialmente (Kaplan, Meier: Amer. Statist. Assn. 53:457–35 481).

En la presente invención también se demuestra que los tumores que presentan una mutación en el gen K-ras exhiben una respuesta menor (menos efectiva) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

Por ello, en otra realización preferente de este aspecto de la invención, en el primer método se determina la presencia o ausencia de mutaciones en el gen K-ras en las células tumorales de la muestra obtenida en el paso (a). El resultado se interpreta como indicativo de una respuesta positiva (la respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1) si las células cancerosas no presentan mutación en el gen K-ras (es decir, si el gen K-ras se encuentra en su forma "wild type").

En esta invención, el término "ras" se define como un tipo de proteínas que actúan en múltiples vías de señalización molecular que regulan procesos biológicos de gran importancia en el cáncer, como la proliferación y la migración celular. Una de estas rutas es la de las MAP quinasa (Mitogen-Activated Protein Kinases). La familia de proteínas ras incluye H-ras, N-ras y K-ras, siendo la proteína K-ras codificada por el gen K-ras, ubicado en el cromosoma 12.

En la presente invención, también se demuestra que los antagonistas del receptor NK1 pueden inhibir el crecimiento y la proliferación tumoral de forma más efectiva en aquellos tumores en los que las vías de señalización de las MAP quinasa y de las PI3 quinasa funcionan de manera normal en las células que los constituyen. Es decir, cuando dichas vías están activas y sus moléculas no sufren alteraciones, el tratamiento con estos antagonistas inhibe la proliferación de las células tumorales, preferiblemente mediante la inhibición de la expresión de diversos efectores descendentes en estas vías, tales como ERK, MEK (para la vía de las MAP quinasa) y AKT (para la vía de las PI3 quinasa). No obstante, cuando estas vías no funcionan de forma normal, el uso de antagonistas del receptor NK1 presenta una efectividad menor.

Por ello, en otra realización preferente de este aspecto de la invención, en el primer método se determina la presencia o ausencia de las proteínas ERK y/o MEK, o del ARNm que las codifica, en las células tumorales de la muestra del paso (a). Un resultado indicativo de una respuesta positiva (la más efectiva) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es la presencia de las proteínas ERK y/o MEK, o un alto nivel de ARNm correspondiente en dichas proteínas.

En otra realización preferente del mismo aspecto de la invención, en el primer método se determina la presencia o ausencia de la proteína AKT, o del ARNm que la codifica, en las células tumorales de la muestra del paso (a). Un resultado indicativo de una respuesta positiva es que las células cancerosas presenten niveles altos de la proteína AKT o de su ARNm, de dichas proteínas.

En esta invención, ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares) se define como un tipo de proteína que forma parte de la vía de las MAP quinasa y que participa en múltiples funciones celulares importantes en la fisiopatología del cáncer. Por ejemplo, ERK1 (también llamada Mitogen-activated protein kinase 3 o MAPK3) es una proteína codificada por un gen ubicado en el cromosoma 16, mientras que ERK2 (también llamada Mitogen-activated protein kinase 1 o MAPK1) es codificada por un gen ubicado en el cromosoma 22.

En esta invención, MEK se define como un tipo de proteína que incluye, entre otras, a MEK1 y MEK2. Como se ha indicado, MEK1 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1, o MAPKK1 o MAP2K1) está codificada por un gen ubicado en el cromosoma 15 (locus 15q22.1–q22.3) y MEK2 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2, o MAPKK2 o MAP2K2) está codificada por un gen ubicado en el cromosoma 19 (locus 19p13.3).

De igual manera, AKT se define como un grupo de proteínas que participan en los mecanismos de control de la apoptosis (muerte celular programada) y de la proliferación celular. Entre ellas, destacan dos ejemplos prominentes:

AKT1 (también llamada Protein Kinase B), codificada por un gen ubicado en el cromosoma 14, y AKT2, codificada por un gen ubicado en el cromosoma 19.

Además, en esta invención se demuestra que los tumores que presentan una mayor cantidad de la forma truncada del receptor NK1 muestran una respuesta mejor (más efectiva) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1. Por ello, en otra realización preferente de este aspecto de la invención, en el primer método se determina la presencia o ausencia de la forma truncada del receptor NK1 en las células tumorales de la muestra del paso (a), ya sea la forma truncada del receptor NK1 o el ARNm que la codifica.

Finalmente, la presente invención también demuestra que las células tumorales con alteraciones en el gen NK1, que determinan modificaciones estructurales que hacen que dicho gen esté constitutivamente activo (es decir, que el receptor transmita señales a la baja de manera independiente de su acoplamiento a cualquiera de sus agonistas), muestran una respuesta mejor (más efectiva) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

Por ello, en otra realización preferente de este aspecto de la invención, en el primer método se determina si las células tumorales de la muestra del paso (a) presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1. El resultado se interpreta como indicativo de una respuesta positiva (la respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1) si las células tumorales presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1. De manera preferente, la determinación de la presencia o ausencia de una forma constitutivamente activada del receptor NK1 en las células tumorales de la muestra del paso (a) se realiza exponiendo las células a la sustancia P; se considera que las células presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1 si muestran una baja respuesta proliferativa al ser expuestas a la sustancia P.

Los niveles de expresión génica revelan un perfil específico de expresión génica. El término "nivel de expresión" (o "cantidad de producto génico") se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, que resulta de la expresión de un gen. En ocasiones se utiliza esta medida para inferir el grado de actividad de un gen. Con "perfil de **expresión génica**" se entiende el perfil obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de la proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por los genes utilizados como marcadores biológicos en la presente invención, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión génica se obtiene, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de la transcripción, habiéndose extraído previamente el ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado del arte. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción de los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención puede llevarse a cabo, por ejemplo —sin limitarse a ello— mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcripción inversa combinada con PCR (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa (RTqPCR), transcripción inversa combinada con reacción en cadena de ligasa (RT-LCR), análisis serial de la expresión génica (SAGE, SuperSAGE); mediante chips de ADN producidos con oligonucleótidos depositados por cualquier método; microarreglos de ADN producidos con oligonucleótidos sintetizados in situ por fotolitografía o cualquier otro método; hibridación in situ utilizando sondas específicas marcadas mediante cualquier método de marcaje; mediante electroforesis en gel; mediante transferencia de membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de imagen diagnóstica que emplee nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos detectables; o por cualquier otro medio. El perfil de expresión génica también puede obtenerse mediante la detección y/o cuantificación de las proteínas resultantes de la traducción del ARNm derivado de la transcripción de los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención, por ejemplo, mediante inmunodetección a través de western blot. La detección cuantitativa de la expresión de los genes empleados como marcadores en la presente invención se puede realizar, de manera preferente, mediante PCR en tiempo real (RT-PCR o RTqPCR), siendo la detección en tiempo real de los productos amplificados llevada a cabo mediante el uso de moléculas fluorescentes intercaladas en el ADN de doble cadena o mediante la hibridación con diferentes tipos de sondas.

Por lo tanto, la detección de los niveles de proteínas o del nivel de expresión génica puede realizarse mediante cualquiera de las técnicas conocidas en la materia por el experto. Así, en otra realización preferente de este aspecto de la invención se implementa:

- a) la detección de los niveles de expresión del receptor NK1, o del ARNm que lo codifica;
- b) la detección de la presencia o ausencia de mutaciones en el gen K-ras
- c) la detección de la presencia de la proteína ERK;
- d) la detección de la presencia de la proteína MEK;
- e) la detección de la presencia de AKT; y
- f) la detección de la presencia o ausencia de la forma truncada del receptor NK1.

Dichas detecciones se realizan mediante:

- i. un procedimiento de perfilado genético, como un microarreglo;
- ii. un procedimiento que incluya PCR, como la PCR en tiempo real (RT-PCR);
- iii. transferencia mediante Northern blot; y/o
- iv. un procedimiento inmunohistoquímico.

En otra realización preferente, la muestra biológica es un tejido reciente, un tejido fijado en parafina, o ARN extraído del tejido de un paciente con cáncer. Más preferiblemente, el primer método de la invención se implementa in vitro utilizando una muestra proveniente del sujeto humano, en el que en el momento de la toma de la muestra dicho sujeto ha sido tratado con un agonista del receptor NK1.

En otra realización preferente, la detección de los niveles de expresión génica se lleva a cabo mediante RTqPCR.

En otra realización preferente, la detección de los niveles de proteínas NK1, ERK, MEK, AKT y/o la forma truncada del receptor NK1 se realiza mediante técnicas inmunológicas. En una implementación aún más preferente, estas técnicas se basan en reacciones de precipitación, reacciones de aglutinación, inmunomarcaje, técnicas de radionumoinmunoensayo y radioinmunométrica, ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas) o en cualquier combinación de las mismas. En otra realización, las técnicas inmunológicas incluyen inmunomarcaje, seleccionándose entre inmunomarcaje con anticuerpos acoplados a enzimas, con anticuerpos acoplados a fluorocromos o mediante citometría, preferiblemente citometría de flujo.

En otra realización preferente de este aspecto de la invención, el sujeto humano padece un tipo de cáncer seleccionado entre los siguientes: carcinoma gástrico (preferentemente adenocarcinoma gástrico), carcinoma de colon (preferentemente adenocarcinoma de colon), carcinoma pancreático (preferentemente adenocarcinoma pancreático), carcinoma de células renales (preferentemente carcinoma de células claras), carcinoma de mama (preferentemente adenocarcinoma de mama), carcinoma ovárico (preferentemente adenocarcinoma ovárico), carcinoma endometrial, carcinoma del cuello uterino, carcinoma pulmonar (preferentemente cáncer de pulmón no microcítico y/o microcítico), carcinoma tiroideo (preferentemente carcinoma papilar tiroideo y/o carcinoma folicular tiroideo), carcinoma vesical (preferentemente carcinoma de células transicionales de la vejiga urinaria), carcinoma prostático, cáncer de origen glial del sistema nervioso central (glioma), sarcomas (preferentemente fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno o sarcoma de Ewing), melanoma, tumores embrionarios (preferentemente neuroblastoma) y cánceres hematológicos (preferiblemente leucemia de células B o T, linfoma no Hodgkin [de tipo B o T], linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple).

En otra realización preferente de este aspecto de la invención, los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas no péptidos, y aún más preferentemente, se seleccionan entre: Aprepitant, Vestipitant, Casopitant, Vofopitant, Ezlopitant, Lanepitant, LY-686017, L-733,060, L-732,138, L-703,606, WIN 62,577, CP-122721, TAK-637, y R673, CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735, CP-122721, L-758298, L-741671, L-742694, CP-99994, T-2328 o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización preferente, los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas péptidos, y aún más preferentemente, se seleccionan entre anticuerpos o fragmentos de estos dirigidos contra el receptor NK1. Tal como se utiliza en el presente documento, "antagonista no péptido del receptor NK1" se refiere a cualquier sustancia no péptida que posea un tamaño suficiente y la configuración adecuada para acoplarse al receptor NK1, de modo que pueda inhibir su funcionamiento normal y evitar que la sustancia P u otros agonistas de estos receptores se acoplen a ellos. Preferiblemente, en la presente invención se han probado los siguientes antagonistas no péptidos de receptores NK1 comercializados: L-733,060 ((2S,3S)-3-[(3,5-bis(trifluorometil)fenil)metoxi]-2-fenilpiperidina hidrocloreto) (Sigma-Aldrich), L-732,138 (N-Acetil-L-triptófano 3,5-bis(trifluorometil)éster de bencil) (Sigma-Aldrich), L-703,606 (cis-2-(difenilmetil)-N-[(2-iodofenil)metil]-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-amina sal oxalato) (Sigma-Aldrich), WIN 62,577 (Sigma-Aldrich), CP-122721 (Pfizer), Aprepitant o MK 869 o L-754030 (MSD), TAK-637 (Takeda/Abbott), Vestipitant o GW597599 (GSK), Casopitant o GW679769 (GSK) y R673 (Roche); CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735; y de manera similar, se pueden utilizar otras composiciones de antagonistas no péptidos del receptor NK1 y de sustancia P, tales como Vofopitant o GR-205171 (Pfizer), Ezlopitant o CJ-11974 (Pfizer), CP-122721 (Pfizer), L-758298 (MSD), L-741671, L-742694, CP-99994, Lanepitant o LY-303870, T-2328, LY-686017, siendo los preferidos Aprepitant o MK 869 o L-754030 (MSD), Vestipitant o GW597599 (GSK) y Casopitant o GW679769 (GSK).

Los anticuerpos son composiciones péptidas capaces de acoplarse de forma altamente selectiva a diversas moléculas orgánicas, y su unión a ciertos receptores celulares induce una modificación en su actividad, lo que puede alterar las funciones fisiológicas regulares del metabolismo celular.

Tal como se utiliza aquí, "anticuerpo contra el receptor NK1" se refiere a cualquier anticuerpo policlonal o monoclonal, o fragmentos de ellos, dirigidos contra los receptores NK1; un fragmento de anticuerpo es aquella parte del anticuerpo que posee un tamaño suficiente y la configuración adecuada para unirse a un epítipo presente en el receptor NK1, modificando así su funcionamiento normal y evitando que la sustancia P u otros agonistas se acoplen al receptor.

El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular de diversos receptores celulares, como tratamiento contra el cáncer, está ampliamente extendido en el ámbito clínico. Entre estos anticuerpos monoclonales terapéuticos aprobados para su uso en oncología, se destacan trastuzumab (un anti-ErbB2/HER2 para el cáncer de mama), cetuximab (un anti-ErbB1/EGFR para el cáncer de colon) y bevacizumab (un anti-VEGFR, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, para diversos tipos de cáncer) (Adams GP et al., 2005).

Con "cáncer" se hace referencia a un tumor maligno de crecimiento potencialmente ilimitado, que se expande localmente mediante invasión y sistémicamente mediante metástasis. Según la presente invención, el antagonista no péptido del receptor NK1 se administrará a individuos portadores de cáncer.

En el contexto de la invención, el uso de "fármacos que buscan modificar el funcionamiento de los receptores NK1" se refiere a moléculas antagonistas no péptidas o a anticuerpos, o fragmentos de estos, que actúan sobre los receptores NK1 y modifican su funcionamiento, con el objetivo de inhibir la proliferación que genere muerte y/o apoptosis en las células tumorales de mamíferos (incluidos los humanos), ya sea actuando directamente sobre los mecanismos fisiológicos de las células tumorales o modificando el microambiente tumoral.

En el contexto de la presente invención, la enfermedad se define como cáncer, preferentemente carcinoma gástrico (especialmente adenocarcinoma gástrico), carcinoma de colon (especialmente adenocarcinoma de colon), carcinoma pancreático (especialmente adenocarcinoma pancreático), carcinoma de células renales (preferentemente carcinoma de células claras), carcinoma de mama (especialmente adenocarcinoma de mama), carcinoma ovárico (preferentemente adenocarcinoma ovárico y/o carcinoma ovárico), carcinoma endometrial, carcinoma del cuello uterino, carcinoma pulmonar (preferentemente adenocarcinoma pulmonar, cáncer de pulmón no microcítico y/o microcítico), carcinoma tiroideo (preferentemente carcinoma papilar tiroideo metastásico y/o carcinoma folicular tiroideo), carcinoma vesical (preferentemente carcinoma de vejiga urinaria y/o carcinoma de células transicionales de la vejiga urinaria), carcinoma prostático, cáncer de linaje glial del sistema nervioso central (glioma), sarcomas (preferentemente fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno y sarcoma de Ewing, aunque también resulta útil en sarcoma del estroma endometrial, osteosarcoma y/o rhabdomyosarcoma), melanoma, tumores embrionarios (preferentemente neuroblastoma, aunque también resulta útil en meduloblastoma, retinoblastoma, nefroblastoma y/o hepatoblastoma) y cánceres hematológicos (preferentemente leucemia de células B o T, linfoma no Hodgkin [de tipo B o T], linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple).

Uso de composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista del receptor NK1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del nivel de expresión del receptor NK1 en una muestra de células tumorales como indicador en un método in vitro para predecir si un ser humano que padece cáncer tendrá una respuesta positiva al tratamiento con una composición farmacéutica que comprenda un antagonista del receptor NK1.

En una realización preferente de este aspecto de la invención, los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas no péptidos. Más preferiblemente, los antagonistas no péptidos se seleccionan entre: Aprepitant, Vestipitant, Casopitant, Vofopitant, Ezlopitant, Lanepitant, LY-686017, L-733,060, L-732,138, L-703,606, WIN 62,577, CP-122721, TAK-637 y R673, CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735, CP-122721, L-758298, L-741671, L-742694, CP-99994, T-2328 o combinaciones de estos.

Los antagonistas no péptidos del receptor NK1 son, pero no se limitan a: L-733,060 ((2S,3S)-3-[(3,5-bis(trifluorometil)fenil)metoxi]-2-fenilpiperidina hidrocloreuro) (Sigma-Aldrich), L-732,138 (N-Acetil-L-triptófano 3,5-bis(trifluorometil)éster de bencil) (Sigma-Aldrich), L-703,606 (cis-2-(difenilmetil)-N-[(2-iodofenil)methyl]-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-amina sal oxalato) (Sigma-Aldrich), WIN 62,577 (Sigma-Aldrich), CP-122721 (Pfizer), Aprepitant o MK 869 o L-754030 (MSD), TAK-637 (Takeda/Abbott), Vestipitant o GW597599 (GSK), Casopitant o GW679769 (GSK) y R673 (Roche). CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735. De manera similar, se pueden utilizar otras composiciones de antagonistas no péptidos del receptor NK1 y de SP, tales como: Vofopitant o GR-205171 (Pfizer), Ezlopitant o CJ-11974 (Pfizer), CP-122721 (Pfizer), L-758298 (MSD), L-741671, L-742694, CP-99994, Lanepitant o LY-303870, T-2328, LY-686017. Las composiciones preferidas son: Aprepitant o MK 869 o L-754030 (MSD), Vestipitant o GW597599 (GSK) y Casopitant o GW679769 (GSK), o combinaciones de estos.

En otra realización preferente de este aspecto de la invención, los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas péptidos. Más preferiblemente, los antagonistas péptidos se seleccionan entre anticuerpos o fragmentos de ellos dirigidos contra el receptor NK1.

Estos antagonistas del receptor NK1, tanto péptidos como no péptidos, pueden utilizarse solos, combinados entre sí o en conjunto con diversos agentes anticancerígenos que se seleccionen, sin limitarse a, entre los siguientes: clorambucilo, melphalan, aldesleucina, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo, Ara-C, bexaroteno, bleomicina, capecitabina, carboplatino, cisplatino, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, fludarabina, irinotecán, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, rituximab, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, vinorelbina, imatinib, erlotinib, cetuximab y trastuzumab, o cualquier combinación de estos.

Los términos "polinucleótidos" y "ácido nucleico" se utilizan aquí de manera intercambiable, refiriéndose ambos a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN) como desoxirribonucleótidos (ADN). Los términos "secuencia de aminoácidos", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan de forma intercambiable, y se refieren a una secuencia polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, la cual puede o no estar codificada y puede ser modificada química o bioquímicamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados aquí tienen el mismo significado que habitualmente comprende un experto en el campo de la invención. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos pueden utilizarse en la aplicación de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no tienen carácter limitativo, por lo que no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Por el contrario, la palabra "consiste" y sus variantes sí presentan un carácter limitativo, refiriéndose exclusivamente a las características técnicas, aditivos, componentes o pasos que la acompañan. Para los expertos en la materia, otros objetivos, ventajas y características de la invención surgirán tanto de la descripción como de la aplicación de la misma. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan únicamente como ilustraciones y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

Ejemplos de la invención

A continuación, se muestran ejemplos como ilustración, sin ser limitativos de la presente invención, los cuales reflejan sus ventajas. Se proporcionan ejemplos que quedan fuera del alcance de las reivindicaciones con fines de referencia.

Ejemplo 1. Las células cancerosas con una mayor expresión del receptor NK1 presentan una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

Para verificar que las células cancerosas con una mayor expresión del receptor NK1 (ya sea un mayor porcentaje de células que expresan dicho receptor o una mayor intensidad de expresión) muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, se tomaron células tumorales primarias procedentes de tumores de pacientes. La presencia del receptor NK1 en dichas células se determinó mediante técnicas de Western blot e inmunohistoquímica, y posteriormente se cultivaron en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1. Los diferentes tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los pacientes y de las muestras tumorales obtenidas para el cultivo celular.

Tipo de tumor	Número de Casos	Género (Hombre/ Mujer)	Edad	Tipo Histológico
Carcinoma gástrico	10	4/6	52±3	Adenocarcinoma
Carcinoma de colon	12	5/7	58±4	Adenocarcinoma
Carcinoma de páncreas	9	4/5	52±7	Adenocarcinoma
Carcinoma de células renales	9	5/4	52±7	Carcinoma de células claras
Carcinoma de mama	9	0/9	49±6	Adenocarcinoma ductal
Carcinoma de ovario	9	0/9	52±5	Adenocarcinoma
Carcinoma de endometrio	9	0/9	61±5	Adenocarcinoma
Carcinoma de cuello uterino	9	0/9	35±4	Carcinoma de células escamosas
Carcinoma de pulmón	10	8/2	59±5	Carcinoma de células pequeñas
Carcinoma de pulmón	10	8/2	66±4	Carcinoma de células no pequeñas
Carcinoma de tiroides	9	2/7	46±5	Carcinoma folicular
Carcinoma de tiroides	9	2/7	38±4	Carcinoma papilar
Vejiga urinaria	9	7/2		Carcinoma de células uroteliales (transicionales)
Carcinoma de próstata	9	9/0	70±5	Adenocarcinoma (Gleason 3+4)
Glioma	9	6/3	59±4	Astrocitoma
Fibrosarcoma	9	6/3	60±4	Fibrosarcoma (grado histológico 2)
Histiocitoma fibroso maligno	9	6/3	68±5	Histiocitoma fibroso maligno (grado histológico 3).
Sarcoma de Ewing	9	5/4	33±4	Sarcoma de Ewing
Melanoma	10	5/5	56±4	Melanoma nodular.
Neuroblastoma	9	5/4	10±5	Neuroblastoma
Leucemia B	9	6/3	24±4	Leucemia crónica B
Leucemia T	9	6/3	31±5	Leucemia crónica T
Linfoma no Hodgkin B	9	5/4	51±4	Linfoma difuso B
Linfoma no Hodgkin T	9	5/4	35±5	Linfoma difuso T
Linfoma de Burkitt	9	5/4	25±4	Linfoma de Burkitt
Linfoma de Hodgkin	9	5/4		Linfoma de Hodgkin
Mieloma	9	5/4	61±3	Mieloma múltiple

Cultivos celulares. Para obtener células tumorales de tumores primarios humanos se utilizó el método descrito en De Bari et al. (De Bari et al. 2001). En resumen, pequeños fragmentos de los tumores fueron digeridos en una solución de hialuronidasa (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a una concentración de 1 mg/ml durante 15 minutos a 37 °C, y posteriormente se trataron con colagenasa tipo IV (Invitrogen) a 6 mg/ml durante 2 horas a 37 °C. A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo DMEM con alta concentración de glucosa (Dulbecco's

Modified Eagle's Medium, Invitrogen), suplementado con 1% de antibióticos-antimicóticos (Invitrogen) y 1% de piruvato de sodio (Invitrogen), y se sembraron en portaobjetos de cultivo a una concentración de 10.000 células por centímetro cuadrado. Cuando las células alcanzaron la confluencia, las células adherentes se separaron utilizando tripsina estéril al 0,5% (Invitrogen) y se emplearon entre los pasajes 3 y 9. Para los ensayos siguientes, las células tumorales se sembraron en portaobjetos a una concentración de 25.000 células por pozo. Se utilizaron en total 6 pozos con las células tumorales como control de supervivencia, y otros grupos de 6 pozos se cultivaron en presencia de los distintos antagonistas del receptor NK1, tales como Aprepitant, Vestipitant, Casopitant y anticuerpos contra dicho receptor (obtenidos de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305). Todos los cultivos se mantuvieron durante 48 horas y, posteriormente, se recolectaron para su análisis.

Western-Blot. Se comprobó en todas las líneas celulares tumorales la presencia del receptor NK1 mediante Western-Blot. En resumen, se extrajeron las proteínas totales de muestras obtenidas de los cultivos celulares. Las células se lisaron utilizando métodos ampliamente conocidos en el estado del arte, y su concentración se cuantificó mediante el kit comercial "Protein Assay" (Bio-Rad Laboratories, S.A. Madrid), siguiendo las instrucciones proporcionadas. De cada muestra se separaron 50 µg de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS y se transfirieron electroforéticamente a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF). Dichas membranas se incubaron durante la noche en una solución de bloqueo (5% de leche desnatada en tampón fosfato –PBS– con 0,1% de Tween, es decir, PBST), seguida de una incubación durante la noche con el anticuerpo primario diluido 1/4000 en tampón PBST. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo anti-NK1 (S8305, Sigma-Aldrich), que reconoce los aminoácidos 393-407 del dominio carboxi-terminal del receptor NK1. Luego, las membranas se lavaron con PBS y con PBST (PBS con Tween-20), y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente (dilución 1:10.000). Para confirmar que se había cargado la misma cantidad de proteína, las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-beta-tubulina. La detección de los anticuerpos se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia (ECL Western Blot detection; Amersham Life Science, Reino Unido).

Técnicas de inmunohistoquímica. La presencia de receptores NK1 también se analizó utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Brevemente, se tomó una muestra de cada uno de los cultivos de las líneas celulares utilizadas en la presente invención, se centrifugó durante 5 minutos a 1.500 rpm y el sedimento obtenido se deshidrató utilizando concentraciones crecientes de etanol y, finalmente, xilol. Posteriormente, las muestras deshidratadas se incluyeron en parafina, formando un bloque de células. Dichos bloques de parafina se cortaron con un microtomo a 5 micrones de grosor y se colocaron en portaobjetos adecuados para realizar técnicas de inmunohistoquímica. Consecutivamente, se desparafinizaron sumergiéndolos en xilol, para luego rehidratarlos mediante soluciones con concentraciones decrecientes de etanol y, finalmente, sumergirlos en agua. Luego, las muestras fueron sometidas a un tratamiento en una olla a presión con tampón citrato 10x pH 6.0 para lograr una mayor exposición de los antígenos. Tras ello, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar las muestras con tampón Tris 0,05 M, se incubaron con suero porcino no inmunológico al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para analizar la expresión de los receptores NK1, las muestras celulares se incubaron en presencia de anticuerpos anti-NK1 (S8305, Sigma-Aldrich) diluidos 1:1000, durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las muestras se lavaron con tampón Tris 0,05 M a temperatura ambiente. El siguiente paso fue la adición de reactivos del sistema Envision-HRP (Dako) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las muestras se lavaron nuevamente con tampón Tris 0,05 M y la inmunoreactividad se visualizó mediante microscopía de luz utilizando una solución cromogénica que contenía 3,3'-Diaminobencidina (DAB+; Dako, EE. UU.). Para diferenciar los núcleos celulares se tiñeron ligeramente con hematoxilina. Como control negativo se utilizaron muestras no incubadas con el anticuerpo primario anti-NK1, el cual fue reemplazado por suero no inmunológico. Todas las muestras fueron evaluadas.

Para valorar la inmunomarcación en cada uno de los casos se realizaron seis cortes, los cuales se analizaron mediante la técnica de inmunohistoquímica. En cada uno de los seis cortes se contaron células en 20 campos (a aumento de 400x) utilizando un microscopio Olympus (modelo CX31). En cada campo se contó el número total de células y el número de células que presentaron inmunomarcación, calculándose posteriormente el porcentaje de células inmunomarcadas. Los tumores se distribuyeron en grupos de acuerdo al porcentaje de células que presentaron inmunomarcación para el receptor NK1: grupo 1, en el que la inmunomarcación se observó en menos del 20% de las células cancerosas; grupo 2, en el que la inmunomarcación se observó entre el 20% y el 80% de las células cancerosas; y grupo 3, en el que la inmunomarcación se observó en más del 80% de las células cancerosas. Adicionalmente, se evaluó la intensidad de la inmunomarcación, calificándola de 1 a 3 (en comparación con el control). Como control se utilizó una muestra de tejido sano (los controles empleados en cada caso se detallan en la Tabla 3). Se asignó el nivel de intensidad 1 a aquellos casos en los que más del 80% de las células tumorales presentaron una inmunomarcación similar a la del grupo control, y solo el 20% de ellas mostraron un nivel de intensidad superior al control. Se asignó el nivel de intensidad 2 a aquellos casos en los que entre el 40% y el 80% de las células tumorales presentaron una intensidad de inmunomarcación superior al control. Se asignó el nivel de intensidad 3 a aquellos casos en los que más del 80% de las células tumorales presentaron un nivel de inmunomarcación superior al control.

En la Tabla 2 se muestran los tipos de tumores de los cuales se extrajeron las muestras para los cultivos celulares, y la distribución de los casos según el porcentaje de células cancerosas que presentaron inmunomarcación para el receptor NK1, utilizando técnicas de inmunohistoquímica.

Tabla 2. Características de los tipos de cáncer de los cuales se obtuvieron las muestras para los cultivos celulares, y distribución de los casos según el porcentaje de células cancerosas que presentaron inmunomarcación para el receptor NK1, mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Tipo de tumor histológico	Número de casos.	Número de casos en el grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células).	Número de casos en el grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células).	Número de casos en el grupo 3 (expresión en más del 80% de las células).
Carcinoma gástrico	10	4	3	3
Carcinoma de colon	12	4	4	5
Carcinoma de páncreas	9	3	3	3
Carcinoma de células renales	9	3	3	3
Carcinoma de mama	9	3	3	3
Carcinoma de ovario	9	3	3	3
Carcinoma de endometrio	9	3	3	3
Carcinoma de cuello uterino	9	3	3	3
Carcinoma de pulmón (tipo de células no pequeñas)	10	3	3	4
Carcinoma de pulmón	10	3	4	3
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	9	3	3	3
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	9	3	3	3
Carcinoma de vejiga urinaria	9	3	3	3
Carcinoma de próstata	9	3	3	3
Glioma	9	3	3	3
Fibrosarcoma	9	3	3	3
Histiocitoma fibroso maligno	9	3	3	3
Sarcoma de Ewing	9	3	3	3
Melanoma	10	3	3	4
Neuroblastoma	9	3	3	3
Leucemia B	9	3	3	3
Leucemia T	9	3	3	3
Linfoma no Hodgkin B	9	3	3	3
Linfoma no Hodgkin T	9	3	3	3
Linfoma de Burkitt	9	3	3	3
Linfoma de Hodgkin	9	3	3	3
Mieloma	9	3	3	3

5 Tabla 3 muestra los tipos de tumores de los cuales se extrajeron las muestras para los cultivos celulares, el control utilizado para valorar la intensidad de la expresión inmunohistoquímica del receptor NK1, y la distribución de los casos según la intensidad de la inmunomarcación.

10 **Tabla 3.** Características de los pacientes de los cuales se obtuvieron las muestras para los cultivos celulares, tipos de tumores de los cuales se extrajeron dichas muestras, control utilizado para valorar la intensidad de la expresión inmunohistoquímica del receptor NK1 y distribución de los casos según la intensidad de la inmunomarcación.

Tipo histológico de tumor	Células de control (células normales / no tumorales)	Número de casos (total)	Número de casos con grado de intensidad 1	Número de casos con grado de intensidad 2	Número de casos con grado de intensidad 3
Carcinoma gástrico	Células de la mucosa gástrica normal.	10	3	4	3
Carcinoma de colon	Células de la mucosa colónica normal.	12	4	5	3
Carcinoma de páncreas	Células ductales del páncreas.	9	3	3	3
Carcinoma de células renales	Células ductales del riñón.	9	3	3	3

Tipo histológico de tumor	Células de control (células normales / no tumorales)	Número de casos (total)	Número de casos con grado de intensidad 1	Número de casos con grado de intensidad 2	Número de casos con grado de intensidad 3
Carcinoma de mama	Células ductales de la mama.	9	3	3	3
Carcinoma de ovario	Células de la superficie del ovario.	9	3	3	3
Carcinoma de endometrio	Células glandulares del endometrio	9	3	3	3
Carcinoma de cuello uterino	Células escamosas cervicales del cuello uterino	9	3	3	3
Carcinoma de pulmón (de células no pequeñas)	Células de los bronquios pulmonares	10	3	4	3
Carcinoma de pulmón (de células pequeñas)	Células de los bronquios pulmonares	10	4	3	3
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	Células foliculares de la tiroides.	9	3	3	3
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	Células foliculares de la tiroides.	9	3	3	3
Carcinoma de vejiga urinaria	Células epiteliales de la vejiga urinaria.	9	3	3	3
Carcinoma de próstata	Células glandulares de la próstata.	9	3	3	3
Glioma	Astrocitos del sistema nervioso central	9	3	3	3
Fibrosarcoma	Fibroblastos de los tejidos blandos normales	9	3	3	3
Histiocitoma fibroso maligno	Fibroblastos de los tejidos blandos normales	9	3	3	3
Sarcoma de Ewing	Fibroblastos de los tejidos blandos normales	9	3	3	3
Melanoma	Melanocitos de la piel	10	3	4	3
Neuroblastoma	Neuronas del sistema nervioso central	9	3	3	3
Leucemia B	Linfocitos de la sangre.	9	3	3	3
Leucemia T	Linfocitos de la sangre.	9	3	3	3
Linfoma no Hodgkin B	Linfocitos de la sangre.	9	3	3	3
Linfoma no Hodgkin T	Linfocitos de la sangre.	9	3	3	3
Linfoma de Burkitt	Linfocitos de la sangre.	9	3	3	3
Linfoma de Hodgkin	Linfocitos de la sangre.	9	3	3	3
Mieloma	Células plasmáticas	9	3	3	3

Se observa un aumento en la inhibición de la proliferación celular en los cultivos de células cancerosas que presentaron un mayor porcentaje de células con inmunomarcación para el receptor NK1 mediante inmunohistoquímica. En las Tablas 4 a 7 se puede apreciar cómo en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 4), Casopitant (Tabla 5), Vestipitant (Tabla 6) y anticuerpos contra el receptor NK1 –obtenidos de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305– se produce

una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos que presentan un mayor porcentaje de inmunomarcación para el receptor NK1. Por lo tanto, a medida que aumenta el porcentaje de células cancerosas que expresan el receptor NK1, la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es mayor.

Se nota un aumento en la inhibición de la proliferación celular en cultivos de células cancerosas que presentaron una mayor intensidad de inmunomarcación para el receptor NK1 mediante inmunohistoquímica. En las Tablas 8 a 11 se puede apreciar cómo en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 8), Casopitant (Tabla 9), Vestipitant (Tabla 10) y anticuerpos contra el receptor NK1—obtenidos de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305— se observa una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos con un mayor porcentaje de inmunomarcación para el receptor NK1. Por lo tanto, a medida que aumenta la intensidad de la expresión del receptor NK1, la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es mayor. En los experimentos reflejados en las Tablas 4 a 11, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se usaron a una concentración de 1 micromolar, y el anticuerpo contra el receptor NK1 se usó a una dilución de 1/100. Los porcentajes de inhibición se expresan en porcentaje de variación respecto al control $\pm$ desviación estándar.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Aprepitant en relación al porcentaje de células que presentan inmunomarcación para el receptor NK1.

Tipo de tumor	Número de casos	Grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células)	Grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células)	Grupo 3 (expresión en más del 80% de las células)
Carcinoma gástrico	100	10 $\pm$ 3	45 $\pm$ 3	92 $\pm$ 3
Carcinoma de colon	100	11 $\pm$ 4	44 $\pm$ 2	95 $\pm$ 4
Carcinoma pancreático	100	12 $\pm$ 3	47 $\pm$ 1	94 $\pm$ 6
Carcinoma de células renales	100	10 $\pm$ 3	45 $\pm$ 4	93 $\pm$ 6
Carcinoma de mama	100	11 $\pm$ 1	46 $\pm$ 3	94 $\pm$ 5
Carcinoma de ovario	100	11 $\pm$ 2	45 $\pm$ 4	93 $\pm$ 3
Carcinoma de endometrio	100	12 $\pm$ 2	49 $\pm$ 2	95 $\pm$ 4
Carcinoma de cuello uterino	100	10 $\pm$ 2	48 $\pm$ 5	95 $\pm$ 5
Carcinoma de pulmón (de células no pequeñas)	100	9 $\pm$ 3	41 $\pm$ 3	94 $\pm$ 7
Carcinoma de pulmón (de células pequeñas)	100	10 $\pm$ 2	42 $\pm$ 3	97 $\pm$ 6
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	100	10 $\pm$ 2	45 $\pm$ 2	97 $\pm$ 5
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	100	10 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3	97 $\pm$ 6
Carcinoma de vejiga urinaria	100	10 $\pm$ 2	48 $\pm$ 4	96 $\pm$ 5
Carcinoma de próstata	100	11 $\pm$ 3	46 $\pm$ 6	95 $\pm$ 5
Glioma	100	11 $\pm$ 4	47 $\pm$ 4	94 $\pm$ 6
Fibrosarcoma	100	10 $\pm$ 3	48 $\pm$ 3	96 $\pm$ 5
Histiocitoma fibroso maligno	100	11 $\pm$ 2	47 $\pm$ 2	95 $\pm$ 6
Sarcoma de Ewing	100	11 $\pm$ 2	48 $\pm$ 6	94 $\pm$ 6
Melanoma	100	11 $\pm$ 3	49 $\pm$ 5	96 $\pm$ 4
Neuroblastoma	100	10 $\pm$ 3	44 $\pm$ 5	97 $\pm$ 5
Leucemia B	100	11 $\pm$ 2	43 $\pm$ 4	95 $\pm$ 4
Leucemia T	100	11 $\pm$ 3	46 $\pm$ 6	97 $\pm$ 5
Linfoma no Hodgkin B	100	10 $\pm$ 2	47 $\pm$ 4	96 $\pm$ 5
Linfoma no Hodgkin T	100	11 $\pm$ 3	48 $\pm$ 5	95 $\pm$ 6
Linfoma de Burkitt	100	10 $\pm$ 2	45 $\pm$ 6	96 $\pm$ 4
Linfoma de Hodgkin	100	10 $\pm$ 3	49 $\pm$ 3	94 $\pm$ 5
Mieloma	100	11 $\pm$ 2	46 $\pm$ 5	95 $\pm$ 4

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Casopitant en relación al porcentaje de células que presentan inmunomarcación para el receptor NK1.

Tipo de tumor	Número de casos	Grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células)	Grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células)	Grupo 3 (expresión en más del 80% de las células)
Carcinoma gástrico	100	12 $\pm$ 4	46 $\pm$ 2	90 $\pm$ 2
Carcinoma de colon	100	13 $\pm$ 3	46 $\pm$ 3	92 $\pm$ 3
Carcinoma de páncreas	100	10 $\pm$ 4	45 $\pm$ 2	92 $\pm$ 4
Carcinoma de células renales	100	16 $\pm$ 4	46 $\pm$ 3	91 $\pm$ 5

Tipo de tumor	Número de casos	Grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células)	Grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células)	Grupo 3 (expresión en más del 80% de las células)
Carcinoma de mama	100	15±3	47±4	92±3
Carcinoma de ovario	100	14±3	49±3	94±4
Carcinoma de endometrio	100	16±3	46±3	92±3
Carcinoma de cuello uterino	100	16±3	47±4	93±3
Carcinoma de pulmón (tipo de células no pequeñas)	100	10±2	46±2	92±5
Carcinoma de pulmón (tipo de células pequeñas)	100	12±2	45±2	93±4
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	100	14±3	44±3	94±4
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	100	16±2	44±2	95±5
Carcinoma de vejiga urinaria	100	17±3	45±3	94±6
Carcinoma de próstata	100	16±2	45±4	93±4
Glioma	100	16±3	46±4	93±5
Fibrosarcoma	100	15±2	47±5	93±4
Histiocitoma fibroso maligno	100	14±3	46±4	94±5
Sarcoma de Ewing	100	15±2	47±5	93±5
Melanoma	100	15±3	46±4	93±5
Neuroblastoma	100	16±2	45±4	94±4
Leucemia B	100	17±3	46±5	94±6
Leucemia T	100	16±2	47±5	95±3
Linfoma no Hodgkin B	100	15±3	46±5	94±4
Linfoma no Hodgkin T	100	14±2	46±6	94±5
Linfoma de Burkitt	100	15±3	46±5	94±5
Linfoma de Hodgkin	100	15±2	47±4	95±4
Mieloma	100	16±3	47±4	94±5

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Vestipitan en relación al porcentaje de células que presentaron inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor	Número de casos	Grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células)	Grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células)	Grupo 3 (expresión en más del 80% de las células)
Carcinoma gástrico	100	11±3	48±3	92±3
Carcinoma de colon	100	12±4	45±3	91±2
Carcinoma de páncreas	100	11±3	45±2	91±3
Carcinoma de células renales	100	10±4	45±3	93±6
Carcinoma de mama	100	12±3	46±3	93±4
Carcinoma de ovario	100	14±4	47±4	95±5
Carcinoma de endometrio	100	15±3	44±3	93±6
Carcinoma de cuello uterino	100	17±4	46±3	94±4
Carcinoma de pulmón (tipo de células no pequeñas)	100	15±2	45±2	93±4
Carcinoma de pulmón (tipo de células pequeñas)	100	16±3	46±3	93±3
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	100	16±3	45±3	95±5
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	100	15±3	47±5	96±4
Carcinoma de vejiga urinaria	100	15±3	47±4	92±5
Carcinoma de próstata	100	17±4	46±3	92±5
glioma	100	15±4	45±4	92±4

Tipo de tumor	Número de casos	Grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células)	Grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células)	Grupo 3 (expresión en más del 80% de las células)
fibrosarcoma	100	16±3	45±3	91±3
Histiocitoma fibroso maligno	100	15±4	46±4	91±5
Sarcoma de Ewing	100	16±3	46±4	90±6
Melanoma	100	16±3	45±4	92±6
Neuroblastoma	100	17±2	46±3	93±3
Leucemia B	100	16±5	47±5	92±5
Leucemia T	100	17±4	46±3	94±4
Linfoma no Hodgkin B.	100	14±3	45±5	93±5
Linfoma no Hodgkin T.	100	13±4	46±4	93±6
Linfoma de Burkitt	100	12±3	45±3	92±4
Linfoma de Hodgkin	100	14±3	46±3	92±5
Mieloma	100	15±2	45±4	93±6

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con anticuerpo contra el receptor NK1, en relación al porcentaje de células que presentaron inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor	Número de casos	Grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células)	Grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células)	Grupo 3 (expresión en más del 80% de las células)
Carcinoma gástrico	100	21±4	51±4	95±5
Carcinoma de colon	100	22±4	53±4	94±4
Carcinoma de páncreas	100	23±3	53±4	96±5
Carcinoma de células renales	100	22±4	52±5	94±5
Carcinoma de mama	100	22±4	54±4	96±5
Carcinoma de ovario	100	24±4	55±5	97±6
Carcinoma de endometrio	100	22±5	53±3	96±5
Carcinoma de cuello uterino	100	24±3	54±4	95±5
Carcinoma de pulmón (tipo de células no pequeñas)	100	23±4	55±5	94±3
Carcinoma de pulmón (tipo de células pequeñas)	100	24±4	56±3	95±4
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	100	25±2	54±3	96±4
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	100	22±4	53±5	94±3
Carcinoma de vejiga urinaria	100	23±5	54±3	95±5
Carcinoma de próstata	100	23±4	57±4	96±4
glioma	100	24±5	54±3	97±4
fibrosarcoma	100	23±4	55±5	97±5
Histiocitoma fibroso maligno	100	22±4	56±3	96±6
Sarcoma de Ewing	100	23±4	54±3	95±4
Melanoma	100	24±5	55±5	96±5
Neuroblastoma	100	22±4	54±4	95±4
Leucemia B	100	23±3	55±4	95±5
Leucemia T	100	24±2	56±5	96±6
Linfoma no Hodgkin B.	100	23±3	54±4	96±4
Linfoma no Hodgkin T.	100	23±4	55±3	96±5
Linfoma de Burkitt	100	24±4	54±4	97±4
Linfoma de Hodgkin	100	22±4	55±3	97±5
Mieloma	100	23±3	56±6	96±6

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Aprepitant en relación a la intensidad de la inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (Tipo histológico).	Control	Intensidad grado 1	Intensidad grado 2	Intensidad grado 3
Carcinoma gástrico	100	25±6	57±5	96±4
Carcinoma de colon	100	26±6	56±6	95±5
Carcinoma de páncreas	100	27±7	56±5	94±3
Carcinoma de células renales	100	27±6	57±6	95±6
Carcinoma de mama	100	28±6	58±5	95±7
Carcinoma de ovario	100	23±6	58±6	96±8
Carcinoma de endometrio	100	25±7	59±5	94±5
Carcinoma de cuello uterino	100	27±4	56±4	95±4
Carcinoma de pulmón (tipo de células no pequeñas)	100	28±5	57±5	95±3
Carcinoma de pulmón (tipo de células pequeñas)	100	29±6	56±6	96±4
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	100	26±6	57±5	95±5
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	100	27±6	56±4	94±6
Carcinoma de vejiga urinaria	100	26±5	57±3	96±6
Carcinoma de próstata	100	27±5	58±6	93±7
glioma	100	28±7	55±6	97±4
fibrosarcoma	100	27±6	54±5	95±5
Histiocitoma fibroso maligno	100	28±7	56±5	94±3
Sarcoma de Ewing	100	27±6	57±4	95±6
Melanoma	100	26±4	55±5	96±7
Neuroblastoma	100	27±6	57±6	97±5
Leucemia B	100	28±5	54±5	95±6
Leucemia T	100	27±7	53±5	96±5
Linfoma no Hodgkin B.	100	27±5	55±5	97±6
Linfoma no Hodgkin T.	100	26±5	55±3	92±3
Linfoma de Burkitt	100	27±5	55±3	92±5
Linfoma de Hodgkin	100	26±5	55±3	92±6
Mieloma	100	28±5	55±3	92±5

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Casopitant en relación a la intensidad de la inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (Tipo histológico).	Control	Intensidad grado 1	Intensidad grado 2	Intensidad grado 3
Carcinoma gástrico	100	31±3	53±3	91±3
Carcinoma de colon	100	32±4	54±4	92±2
Carcinoma de páncreas	100	33±5	53±3	93±1
Carcinoma de células renales	100	34±2	55±5	91±4
Carcinoma de mama	100	35±3	56±6	92±2
Carcinoma de ovario	100	33±4	54±4	91±3
Carcinoma de endometrio	100	34±5	55±5	94±4
Carcinoma de cuello uterino	100	33±3	53±3	92±2
Carcinoma de pulmón (tipo de células no pequeñas)	100	32±4	54±4	93±3
Carcinoma de pulmón (tipo de células pequeñas)	100	33±2	55±3	94±4

Tipo de tumor (Tipo histológico).	Control	Intensidad grado 1	Intensidad grado 2	Intensidad grado 3
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	100	34±3	54±5	93±2
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	100	35±4	55±6	92±3
Carcinoma de vejiga urinaria	100	34±4	56±4	93±4
Carcinoma de próstata	100	33±5	53±3	94±2
glioma	100	36±3	54±5	91±3
fibrosarcoma	100	35±6	55±3	92±4
Histiocitoma fibroso maligno	100	32±5	53±4	93±2
Sarcoma de Ewing	100	33±4	54±3	92±4
Melanoma	100	34±3	52±4	93±3
Neuroblastoma	100	35±4	55±5	94±4
Leucemia B	100	36±3	52±3	92±5
Leucemia T	100	34±2	56±4	93±3
Linfoma no Hodgkin B.	100	32±3	55±5	94±4
Linfoma no Hodgkin T.	100	36±5	54±5	92±2
Linfoma de Burkitt	100	37±5	55±3	93±3
Linfoma de Hodgkin	100	34±5	54±4	92±4
Mieloma	100	35±3	55±3	93±3

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Vestipitan en relación a la intensidad de la inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (Tipo histológico).	Control	Intensidad grado 1	Intensidad grado 2	Intensidad grado 3
Carcinoma gástrico	100	19±4	49±4	92±4
Carcinoma de colon	100	18±5	46±4	91±5
Carcinoma de páncreas	100	21±4	47±5	91±5
Carcinoma de células renales	100	21±3	46±4	93±4
Carcinoma de mama	100	19±4	45±3	93±3
Carcinoma de ovario	100	15±3	46±2	95±4
Carcinoma de endometrio	100	18±2	47±4	93±5
Carcinoma de cuello uterino	100	19±3	48±3	94±3
Carcinoma de pulmón (tipo de células no pequeñas)	100	17±2	49±5	93±5
Carcinoma de pulmón (tipo de células pequeñas)	100	18±3	45±3	93±3
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	100	19±4	46±4	95±3
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	100	16±2	47±5	96±5
Carcinoma de vejiga urinaria	100	17±3	46±3	92±3
Carcinoma de próstata	100	18±4	47±4	92±4
glioma	100	19±3	48±5	92±3
fibrosarcoma	100	18±2	47±3	91±2
Histiocitoma fibroso maligno	100	17±3	48±4	91±5
Sarcoma de Ewing	100	16±4	47±3	90±6
Melanoma	100	15±3	48±4	92±4
Neuroblastoma	100	16±1	49±5	93±4
Leucemia B	100	17±2	47±3	92±4
Leucemia T	100	15±3	48±4	94±5
Linfoma no Hodgkin B.	100	16±4	47±5	93±4
Linfoma no Hodgkin T.	100	17±2	48±4	93±5
Linfoma de Burkitt	100	15±3	47±5	92±6
Linfoma de Hodgkin	100	16±4	48±3	92±4
Mieloma	100	17±2	47±4	93±5

5 **Tabla 11.** Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con anticuerpo contra el receptor NK1 en relación a la intensidad de la inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (Tipo histológico).	Control	Intensidad grado 1	Intensidad grado 2	Intensidad grado 3
Carcinoma gástrico	100	24±3	53±4	96±4
Carcinoma de colon	100	23±3	52±4	96±3
Carcinoma de páncreas	100	22±4	54±4	93±4
Carcinoma de células renales	100	23±5	53±5	97±3
Carcinoma de mama	100	24±3	54±4	96±4
Carcinoma de ovario	100	23±4	54±5	96±4
Carcinoma de endometrio	100	24±3	54±3	97±6
Carcinoma de cuello uterino	100	25±4	53±4	96±4
Carcinoma de pulmón (tipo de células no pequeñas)	100	24±3	55±5	97±4
Carcinoma de pulmón (tipo de células pequeñas)	100	25±3	54±3	94±3
Carcinoma de tiroides (tipo folicular)	100	26±4	53±3	95±5
Carcinoma de tiroides (tipo papilar)	100	24±3	56±5	94±4
Carcinoma de vejiga urinaria	100	25±4	55±3	96±3
Carcinoma de próstata	100	24±5	56±4	93±6
glioma	100	26±4	55±3	95±4
fibrosarcoma	100	24±6	54±5	94±5
Histiocitoma fibroso maligno	100	25±4	55±3	95±4
Sarcoma de Ewing	100	24±5	55±3	96±4
Melanoma	100	23±3	56±5	97±4
Neuroblastoma	100	25±4	53±4	93±5
Leucemia B	100	24±3	54±4	94±6
Leucemia T	100	25±2	55±5	95±4
Linfoma no Hodgkin B.	100	26±5	55±4	96±5
Linfoma no Hodgkin T.	100	27±3	56±3	95±4
Linfoma de Burkitt	100	25±4	55±4	94±6
Linfoma de Hodgkin	100	24±3	56±3	95±4
Mieloma	100	25±4	56±6	95±5

Ejemplo 2. Las células cancerosas sin mutación en el gen K-ras (K-ras no mutado o “wild type”) presentan una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

- 5 Para verificar que las células cancerosas sin mutación en el gen K-ras (K-ras no mutado o “wild type”) mostraban una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, se tomaron células tumorales primarias humanas de tumores de pacientes, se comprobó la presencia del receptor NK1 mediante técnicas de Western-Blot e inmunohistoquímica, y se determinó si presentaban o no mutaciones en el gen K-ras (forma “wild type”).
- 10 Posteriormente, las células cancerosas se sembraron en cultivo en presencia de varios antagonistas del receptor NK1. Los diferentes tipos de tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 12.

Las células tumorales se obtuvieron de muestras de cáncer primario humano de pacientes voluntarios, y la presencia del receptor NK1 se determinó utilizando Western-Blot e inmunohistoquímica, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, tales como Aprepitant, Casopitant, Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. En cada caso se determinó la presencia o ausencia de mutaciones en el gen K-ras.

Para determinar la existencia de mutaciones en el gen K-ras, se extrajo ADN de las células tumorales cancerosas a partir de muestras obtenidas de los diferentes tumores, utilizando kits de extracción de ADN de Takara (Madison, WI, EE. UU.) o Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante y tal como se ha publicado previamente (Di Fiore F, et al. 2007). Posteriormente, se analizó la secuencia del exón 2 del gen KRAS mediante amplificación por PCR a partir del ADN extraído, utilizando el siguiente cebador sentido (SEQ ID NO: 15): 5'-AAGGCCTGCTGAAAATGACTG-3' y el cebador antisentido (SEQ ID NO: 16): 5'-CAAAGAATGGTCCTGCACCAG-3'. Tras la purificación mediante el kit de extracción de Qiagen, los productos de la

PCR se secuenciaron utilizando el Big Dye Terminator Kit V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y un secuenciador de ADN ABI Prism 377 o 3100 (Applied Biosystems). La presencia de una mutación heterocigota en el gen KRAS en las células tumorales de los cultivos se definió como la aparición de un pico mutante con una altura de, al menos, un tercio respecto al del tipo salvaje. Todos los análisis de secuencia se ejecutaron al menos dos veces en dos PCR independientes.

Tabla 12. Characteristics of patients from whom the samples for cell cultures were extracted and number of cases with mutated Kras and “wild type” (wild).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Número de casos (total)	Sexo (Hombre /Mujer)	Edad	Número de casos con Kras mutado	Número de casos con Kras No-Mutado (Wild type).
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	8	3/5	51±4	4	4
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	8	4/4	54±3	4	4
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	8	3/5	53±2	4	4
Carcinoma de células renales (carcinoma de células renales de células claras)	8	4/4	52±4	4	4
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	8	0/8	46±5	4	4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	8	0/8	51±4	4	4
Carcinoma de endometrio	8	0/8	63±3	4	4
Carcinoma del cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	8	0/8	34±2	4	4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	8	6/2	52±4	4	4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	8	6/2	64±3	4	4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular).	8	2/6	45±5	4	4
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar).	8	2/6	38±4	4	4
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	8	6/2	62±5	4	4
Carcinoma de próstata	8	8/0	71±3	4	4
Glioma (astrocitoma)	8	5/3	56±4	4	4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3)	8	5/3	67±2	4	4
Melanoma (melanoma nodular)	8	3/5	58±3	4	4
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B)	8	4/4	54±4	4	4
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T)	8	4/4	33±3	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	24±4	4	4

Se puede observar un aumento en la inhibición de la proliferación celular en cultivos de células cancerosas que no portan la mutación en el gen Kras. En las Tablas 13 a 16 se muestra cómo en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 13), Casopitant (Tabla 14), Vestipitant (Tabla 15) y anticuerpos contra el receptor NK1 —obtenidos de Sigma-Aldrich, catálogo S8305— se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos que no presentan la mutación en Kras. Por lo tanto, en las células cancerosas obtenidas de tumores sin la mutación en el gen Kras, la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es superior. En los experimentos reflejados en las Tablas 13 a 15, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se emplearon a una concentración de 100 micromolar, mientras que el anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 16) se utilizó a una dilución de 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan como porcentaje de variación respecto al control ± desviación estándar.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Aprepitant, en relación a la presencia o ausencia de mutaciones en el gen Kras en las células tumorales.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no-mutado (wild type).
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	100	24±3	94±4
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	100	23±4	94±5
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	100	22±4	94±4
Carcinoma de células renales (carcinoma de células renales de células claras)	100	23±3	94±5
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	100	22±2	94±3
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	100	24±5	94±4
Carcinoma de endometrio	100	25±4	94±3
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	100	23±3	94±5
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	22±4	94±4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	21±2	94±3
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular).	100	26±3	94±6
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar).	100	25±4	94±5
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	100	26±5	94±4
Carcinoma de próstata	100	24±3	94±3
Glioma (astrocitoma)	100	23±4	94±4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	24±3	94±3
Melanoma (melanoma nodular).	100	26±4	94±4
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	100	27±5	94±3
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	25±4	94±4
Linfoma de Burkitt	100	24±3	94±5

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Casopitant, en relación a la presencia o ausencia de mutaciones en el gen Kras en las células tumorales.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no-mutado (wild type).
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	100	25±5	95±5
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	100	32±4	94±6
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	100	27±3	93±4
Carcinoma de células renales (carcinoma de células renales de células claras)	100	27±4	94±3
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	100	28±6	96±4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	100	29±4	97±6
Carcinoma de endometrio	100	28±2	94±4
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	100	27±3	93±3
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	26±4	94±2
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	25±5	95±5
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular).	100	26±4	96±4
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar).	100	24±5	94±5
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	100	25±4	95±6
Carcinoma de próstata	100	23±3	93±7
Glioma (astrocitoma)	100	26±4	94±6
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±5	95±5
Melanoma (melanoma nodular).	100	25±6	94±6
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	100	26±3	95±4

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no-mutado (wild type).
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	26±4	96±5
Linfoma de Burkitt	100	25±2	92±5

Tabla 15. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Vestipitant, en relación a la presencia o ausencia de mutaciones en el gen Kras en las células tumorales.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no-mutado (wild type).
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	24±4	96±4
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	33±5	96±5
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	24±4	97±4
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	25±5	95±6
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	26±4	97±5
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	27±5	96±6
Carcinoma de endometrio	100	24±6	95±4
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	25±5	94±3
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	23±4	95±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	24±5	96±6
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	25±3	97±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	26±4	94±5
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	25±5	95±6
Carcinoma de próstata	100	24±4	96±4
Glioma (Astrocitoma)	100	25±3	97±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±4	95±6
Melanoma (Melanoma nodular).	100	23±5	96±5
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	24±4	97±6
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	25±5	96±5
Linfoma de Burkitt	100	24±3	95±3

5 **Tabla 16.** Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con anticuerpos contra el receptor NK1, en relación a la presencia o ausencia de mutaciones en el gen Kras en las células tumorales.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no-mutado (wild type).
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	24±6	94±6
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	29±7	93±4
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	24±5	95±7
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	25±4	96±4
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	27±5	93±5
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	28±3	92±3
Carcinoma de endometrio	100	25±2	93±4
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	23±4	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	28±3	95±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	25±2	96±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	23±3	97±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	25±4	94±5
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	27±2	95±3
Carcinoma de próstata	100	28±3	96±4

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no-mutado (wild type).
Glioma (Astrocitoma)	100	24±2	93±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±4	94±4
Melanoma (Melanoma nodular).	100	26±3	95±3
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	23±2	93±4
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	24±4	94±5
Linfoma de Burkitt	100	26±3	95±4

Ejemplo 3. Las células cancerosas que presentan mayor actividad en la vía de las MAP quinasa exhiben una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

- 5 Para verificar que las células cancerosas con mayor actividad en la vía de las MAP quinasa muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, se obtuvieron células tumorales primarias humanas a partir de tumores de pacientes, y se comprobó la presencia del receptor NK1 mediante técnicas de Western Blot e inmunohistoquímica, así como la ausencia de mutaciones en el gen K-ras (forma "wild type"). Posteriormente, las células se sembraron en cultivo en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1. Los diferentes tipos de tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 17.

15 Las células tumorales se obtuvieron de muestras de cáncer primario humano de pacientes voluntarios, y la presencia del receptor NK1 se determinó utilizando Western Blot e inmunohistoquímica, cultivándose las células conforme a lo explicado en el Ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, tales como Aprepitant, Casopitant, Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. En todos los casos se comprobó la ausencia de mutaciones en el gen K-ras, siguiendo el método explicado en el Ejemplo 2. Además, en cada caso se determinó la presencia o ausencia del efector descendente de la vía de las MAP quinasa, ERK, y también se evaluó la presencia de MEK, obteniéndose resultados similares.

20 Para determinar la presencia de la proteína ERK se realizó la técnica de Western Blot, utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb (4370, Cell Signalling). Para determinar la presencia de la proteína MEK se llevó a cabo la técnica de Western Blot, utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (9121, Cell Signalling).

25 **Tabla 17.** Características de los pacientes de los cuales se extrajeron las muestras para los cultivos celulares y número de casos con ausencia o presencia de la proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Número de casos (total)	Sexo (Hombre /Mujer)	Edad	Número de casos con ausencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	8	4/4	52±5	4	4
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	8	3/5	52±4	4	4
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	8	3/5	54±3	4	4
Carcinoma de células renales (carcinoma de células renales de células claras)	8	5/3	51±5	4	4
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	8	0/8	49±4	4	4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	8	0/8	52±3	4	4
Carcinoma de endometrio	8	0/8	62±4	4	4
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	8	0/8	35±5	4	4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	8	6/2	54±3	4	4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	8	6/2	63±4	4	4

Tipo de tumor (tipo histológico)	Número de casos (total)	Sexo (Hombre /Mujer)	Edad	Número de casos con ausencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular).	8	2/6	44±4	4	4
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar).	8	2/6	35±3	4	4
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	8	6/2	66±4	4	4
Carcinoma de próstata	8	8/0	71±4	4	4
Glioma (astrocitoma)	8	5/3	55±3	4	4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	8	5/3	66±4	4	4
Melanoma (melanoma nodular).	8	3/5	54±4	4	4
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	8	4/4	53±5	4	4
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	8	4/4	35±4	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	26±5	4	4

Se observa un aumento en la inhibición de la proliferación celular en cultivos de células cancerosas que muestran la presencia de ERK en la vía descendente eferente de las MAP quinasa. En las Tablas 18 a 21 se muestra cómo en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 18), Casopitant (Tabla 19), Vestipitant (Tabla 20) y anticuerpos contra el receptor NK1 –obtenidos de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305– se observa una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos que presentan mayor presencia de ERK. Por lo tanto, en las células cancerosas obtenidas de tumores que presentan la proteína ERK –lo que indica la activación de la vía de las MAP quinasa en dichos tumores–, la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es mayor. Se obtuvieron resultados similares en el caso de la proteína MEK (mayor respuesta en tumores cancerosos que presentan mayor cantidad de proteína MEK). En los experimentos reflejados en las Tablas 18 a 20, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se utilizaron a una concentración de 100 micromolar, mientras que el anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 21) se empleó a una dilución de 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan como porcentaje de variación en relación al control $\pm$ desviación estándar.

Tabla 18. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Aprepitant, en relación a la ausencia o presencia de la proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos con presencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	23±7	96±5
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	24±7	95±4
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	23±6	94±5
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	24±4	97±5
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	25±5	93±5
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	26±7	92±5
Carcinoma de endometrio	100	24±4	93±4
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	25±5	94±5
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	26±6	95±3
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	27±4	96±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	24±5	95±6
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	23±3	93±7
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	25±4	94±5
Carcinoma de próstata	100	26±5	95±6
Glioma (Astrocitoma)	100	27±6	93±4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	24±4	94±5

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos con presencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Melanoma (Melanoma nodular).	100	25±5	96±6
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	26±6	97±3
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	23±3	94±4
Linfoma de Burkitt	100	24±4	93±5

Tabla 19. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Casopitant, en relación a la ausencia o presencia de la proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos con presencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	25±6	96±4
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	24±3	95±3
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	23±4	94±2
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	27±3	94±3
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	26±4	93±4
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	28±5	92±6
Carcinoma de endometrio	100	29±2	93±5
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	28±3	93±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	29±4	94±5
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	27±5	95±7
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	26±4	96±6
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	28±3	97±4
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	29±4	98±2
Carcinoma de próstata	100	27±4	94±5
Glioma (Astrocitoma)	100	28±3	93±4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±4	95±3
Melanoma (Melanoma nodular).	100	27±5	96±5
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	28±4	97±5
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	29±5	98±4
Linfoma de Burkitt	100	28±6	97±5

5 **Tabla 20.** Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Vestipitant, en relación a la ausencia o presencia de la proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos con presencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	24±4	95±3
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	23±	94±3
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	24±34	93±4
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	25±2	92±2
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	26±4	94±3
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	24±2	95±5
Carcinoma de endometrio	100	28±5	93±3
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	29±3	94±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	27±4	96±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	26±2	95±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	25±3	94±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	26±4	96±3

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos con presencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	24±5	97±5
Carcinoma de próstata	100	22±3	94±4
Glioma (Astrocitoma)	100	27±4	95±3
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±2	93±4
Melanoma (Melanoma nodular).	100	25±3	94±5
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	24±4	96±3
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	25±2	92±4
Linfoma de Burkitt	100	26±4	93±5

Tabla 21. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con anticuerpos contra el receptor NK1, en relación a la ausencia o presencia de la proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos con presencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	27±5	91±4
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	28±5	95±5
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	94±4	94±3
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	32±6	95±6
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	29±5	94±7
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	24±7	96±5
Carcinoma de endometrio	100	29±6	95±4
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	28±5	96±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	27±6	94±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	29±7	95±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	26±5	96±3
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	27±6	89±4
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	28±4	88±5
Carcinoma de próstata	100	27±3	90±4
Glioma (Astrocitoma)	100	28±4	89±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	27±5	90±4
Melanoma (Melanoma nodular).	100	28±3	90±5
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	29±4	98±6
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	27±5	97±4
Linfoma de Burkitt	100	28±3	96±5

5 Ejemplo 4. Las células cancerosas que presentan mayor actividad en la vía de las PI3 quinasa exhiben una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

10 Para comprobar que las células cancerosas con mayor actividad en la vía de las PI3 quinasa muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, se obtuvieron células tumorales primarias humanas a partir de tumores de pacientes, y se confirmó la presencia del receptor NK1 mediante técnicas de Western Blot e inmunohistoquímica, además de constatar la ausencia de mutaciones en el gen K-ras (forma "wild type"). Posteriormente, las células se sembraron en cultivo en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1. Los diferentes tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 22.

15 Las células tumorales se obtuvieron de muestras de cáncer primario humano de pacientes voluntarios, y la presencia del receptor NK1 se determinó utilizando Western Blot e inmunohistoquímica, cultivándose las células según lo explicado en el Ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, tales como Aprepitant, Casopitant,

Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. En todos los casos se comprobó la ausencia de mutaciones en el gen K-ras, siguiendo el método descrito en el Ejemplo 2. Además, en cada caso se determinó la presencia o ausencia del efector descendente de la vía de las PI3 quinasa, la proteína AKT.

- 5 Para determinar la presencia de la proteína AKT en los diferentes cultivos se realizó la técnica de Western Blot (según la descripción de la sección de Western Blot del Ejemplo 1), utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo Akt (pan) (11E7) Rabbit mAb (4685, Cell Signalling).

10 **Tabla 22.** Características de los pacientes de los cuales se obtuvieron las muestras para los cultivos celulares y número de casos con ausencia o presencia de la proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Número de casos (total)	Sexo (Hombre /Mujer)	Edad	Número de casos con ausencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	8	4/4	51±4	4	4
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	8	3/5	50±3	4	4
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	8	3/5	55±4	4	4
Carcinoma de células renales (carcinoma de células claras de riñón)	8	5/3	50±3	4	4
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	8	0/8	48±2	4	4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	8	0/8	52±2	4	4
Carcinoma de endometrio	8	0/8	61±3	4	4
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	8	0/8	36±4	4	4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	8	6/2	53±5	4	4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	8	6/2	62±3	4	4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	8	2/6	43±2	4	4
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	8	2/6	36±4	4	4
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	8	6/2	63±5	4	4
Carcinoma de próstata	8	8/0	70±3	4	4
Glioma (astrocitoma)	8	5/3	58±3	4	4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	8	5/3	65±3	4	4
Melanoma (melanoma nodular).	8	3/5	57±3	4	4
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	8	4/4	54±4	4	4
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	8	4/4	33±5	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	28±3	4	4

15 Se observa un aumento en la inhibición de la proliferación celular en cultivos de células cancerosas que muestran la presencia del efector AKT de la vía de las PI3 quinasa. En las Tablas 23 a 26 se muestra cómo en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 23), Casopitant (Tabla 24), Vestipitant (Tabla 25) y anticuerpos contra el receptor NK1 – obtenidos de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305– se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos que presentan mayor presencia de AKT. Por lo tanto, en las células cancerosas obtenidas de tumores que presentan la proteína AKT –lo cual es indicativo de la activación de la vía de las PI3 quinasa en dichos tumores–, la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es mayor.

20 En los experimentos reflejados en las Tablas 23 a 25, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se utilizaron a una concentración de 100 micromolar, mientras que el anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 26) se empleó a una

dilución de 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan como porcentaje de variación en relación al control $\pm$ desviación estándar.

5 **Tabla 23.** Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Aprepitant, en relación a la ausencia o presencia de la proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos sin presencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	100	24 $\pm$ 6	92 $\pm$ 4
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	100	25 $\pm$ 3	93 $\pm$ 3
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	100	24 $\pm$ 4	92 $\pm$ 2
Carcinoma de células renales (carcinoma de células claras de riñón)	100	25 $\pm$ 3	93 $\pm$ 3
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	100	26 $\pm$ 5	94 $\pm$ 4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	100	27 $\pm$ 4	93 $\pm$ 3
Carcinoma de endometrio	100	25 $\pm$ 3	95 $\pm$ 5
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	100	24 $\pm$ 4	94 $\pm$ 4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	25 $\pm$ 3	96 $\pm$ 3
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	26 $\pm$ 4	94 $\pm$ 4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	24 $\pm$ 3	97 $\pm$ 3
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	100	25 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	100	23 $\pm$ 5	94 $\pm$ 2
Carcinoma de próstata	100	24 $\pm$ 4	97 $\pm$ 6
Glioma (astrocitoma)	100	25 $\pm$ 5	96 $\pm$ 5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26 $\pm$ 4	95 $\pm$ 4
Melanoma (melanoma nodular).	100	25 $\pm$ 5	94 $\pm$ 5
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	100	24 $\pm$ 6	95 $\pm$ 3
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	25 $\pm$ 3	93 $\pm$ 5
Linfoma de Burkitt	100	26 $\pm$ 4	94 $\pm$ 4

Tabla 24. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Casopitant, en relación a la ausencia o presencia de la proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos sin presencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	100	26 $\pm$ 5	95 $\pm$ 3
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	100	24 $\pm$ 5	96 $\pm$ 4
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	100	23 $\pm$ 4	95 $\pm$ 3
Carcinoma de células renales (carcinoma de células claras de riñón)	100	24 $\pm$ 3	96 $\pm$ 5
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	100	23 $\pm$ 4	95 $\pm$ 4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	100	24 $\pm$ 3	94 $\pm$ 5
Carcinoma de endometrio	100	23 $\pm$ 4	95 $\pm$ 46
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	100	24 $\pm$ 3	97 $\pm$ 4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	23 $\pm$ 4	96 $\pm$ 5
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	25 $\pm$ 6	95 $\pm$ 4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	24 $\pm$ 5	96 $\pm$ 5
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	100	26 $\pm$ 2	95 $\pm$ 4
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	100	24 $\pm$ 3	94 $\pm$ 3
Carcinoma de próstata	100	23 $\pm$ 4	95 $\pm$ 3

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos sin presencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Glioma (astrocitoma)	100	27±3	96±4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±3	95±3
Melanoma (melanoma nodular).	100	23±4	94±4
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	100	24±5	95±5
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	23±3	98±4
Linfoma de Burkitt	100	24±4	96±3

Tabla 25. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Vestipitant, en relación a la ausencia o presencia de la proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos sin presencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	100	25±5	94±4
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	100	24±3	93±5
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	100	23±5	94±4
Carcinoma de células renales (carcinoma de células claras de riñón)	100	23±3	96±5
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	100	22±5	95±4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	100	23±6	94±6
Carcinoma de endometrio	100	24±4	95±5
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	100	25±5	93±4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	23±4	94±5
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	24±3	95±4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	23±4	94±5
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	100	25±5	96±4
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	100	24±4	95±5
Carcinoma de próstata	100	26±3	94±4
Glioma (astrocitoma)	100	23±4	95±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	27±3	94±6
Melanoma (melanoma nodular).	100	25±4	93±5
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	100	24±3	95±6
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	25±5	96±5
Linfoma de Burkitt	100	24±4	95±6

5 **Table 26.** Percentage of inhibition of cell cultures treated with NK1 receptor antibodies, in relation to the absence or presence of AKT protein.

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos sin presencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	100	24±4	92±5
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	100	23±3	94±3
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	100	94±4	95±4
Carcinoma de células renales (carcinoma de células claras de riñón)	100	34±5	94±3
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	100	25±4	93±5
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	100	24±6	95±3
Carcinoma de endometrio	100	23±5	95±4
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	100	23±4	96±5
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	24±5	94±4

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Número de casos sin presencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	25±6	95±5
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	24±5	96±4
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	100	24±6	89±5
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	100	25±5	91±6
Carcinoma de próstata	100	26±6	90±5
Glioma (astrocitoma)	100	28±4	89±4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±5	90±3
Melanoma (melanoma nodular).	100	25±3	97±4
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	100	24±4	95±5
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	25±3	94±4
Linfoma de Burkitt	100	25±2	95±6

Ejemplo 5. Las células cancerosas que presentan una mayor cantidad de la forma truncada del receptor NK1 tienen una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

- 5 Para comprobar que las células cancerosas con mayor cantidad de la forma truncada del receptor NK1 muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, se obtuvieron células tumorales primarias humanas a partir de tumores de pacientes, y se comprobó la presencia del receptor NK1 utilizando técnicas de Western Blot e inmunohistoquímica. Se determinó la presencia de la forma truncada del receptor NK1 y, posteriormente, las células se cultivaron en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1. Los diferentes tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 27.

Las células tumorales se obtuvieron de muestras de cáncer primario humano de pacientes voluntarios. La presencia del receptor NK1 se determinó utilizando Western Blot e inmunohistoquímica, y las células se cultivaron según lo descrito en el Ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, tales como Aprepitant, Casopitant, Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. En cada caso se determinó la presencia de la forma truncada del receptor NK1.

Para determinar la presencia de la forma truncada del gen del receptor NK1 se realizó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La extracción de ARN, las amplificaciones por PCR, las condiciones del ciclo y el análisis cuantitativo se llevaron a cabo tal como se ha descrito previamente. Los cebadores específicos fueron los siguientes: para el receptor NK1R de longitud completa (NM_001058.3; cebador sentido [SEQ ID NO: 17]: 5'-AACCCCATCATCTACTGCTGC-3' y cebador antisentido [SEQ ID NO: 18]: 5'-ATTTCCAGCCCCTCATAGTCG-3') y para el receptor NK1 truncado (NM_015727.2; cebador sentido [SEQ ID NO: 19]: 5'-GGGCCACAAGACCATCTACA-3' y cebador antisentido [SEQ ID NO: 20]: 5'-AAGTTAGCTGCAGTCCCCAC-3').

Los casos se distribuyeron en dos grupos:

- Grupo A – baja expresión de la forma truncada del receptor NK1: para aquellos casos en los que la expresión de la forma truncada del receptor NK1 fue inferior al doble de la expresión de la forma completa del receptor.
- Grupo B – alta expresión de la forma truncada del receptor NK1: para aquellos casos en los que la expresión de la forma truncada del receptor NK1 fue superior al doble de la expresión de la forma completa del receptor.

Tabla 27. Características de los pacientes de los cuales se extrajeron las muestras para los cultivos celulares, y número de casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A) y alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Número de casos	Sexo (hombre / mujer)	Edad	Número de casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A)	Número de casos con alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B)
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	8	4/4	50±4	4	4

Tipo de tumor (tipo histológico)	Número de casos	Sexo (hombre / mujer)	Edad	Número de casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A)	Número de casos con alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B)
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	8	4/4	53±3	4	4
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	8	3/5	55±4	4	4
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células renales de células claras)	8	5/3	56±3	4	4
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	8	0/8	43±2	4	4
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	8	0/8	51±2	4	4
Carcinoma de endometrio	8	0/8	62±3	4	4
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas)	8	0/8	33±4	4	4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	8	5/3	54±5	4	4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	8	6/2	63±3	4	4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular)	8	2/6	45±2	4	4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar)	8	2/6	33±4	4	4
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	8	6/2	64±5	4	4
Carcinoma de próstata	8	8/0	70±3	4	4
Glioma (Astrocitoma)	8	4/2	50±3	4	4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	8	5/3	62±3	4	4
Melanoma (Melanoma nodular).	8	3/5	54±3	4	4
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	8	4/4	55±4	4	4
Linfoma no Hodgkin T (Linfoma difuso de células T).	8	4/4	32±5	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	22±3	4	4

Se observa un aumento en la inhibición de la proliferación celular en cultivos de células cancerosas que muestran una alta expresión de la forma truncada del receptor NK1. En las Tablas 28 a 31 se muestra cómo en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 28), Casopitant (Tabla 29), Vestipitant (Tabla 30) y anticuerpos contra el receptor NK1 —obtenidos de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305— se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos que presentan mayor expresión de la forma truncada del receptor NK1. Por lo tanto, en las células cancerosas obtenidas de tumores que presentan una alta expresión de la forma truncada del receptor NK1, lo cual es indicativo de la activación de la vía de las PI3 quinasa en dichos tumores, la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es mayor. En los experimentos reflejados en las Tablas 28 a 30, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se utilizaron a una concentración de 100 micromolar, mientras que el anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 31) se usó a una dilución de 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan como porcentaje de variación en relación al control $\pm$ desviación estándar.

Tabla 28. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Aprepitant, en relación a la existencia de baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A) o alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A)	Casos con alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B)
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	25±5	94±3
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	26±4	93±4
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	23±4	94±5
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células renales de células claras)	100	26±3	93±3
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	27±5	94±4
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	29±3	95±5
Carcinoma de endometrio	100	26±5	96±3
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas)	100	26±5	94±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	24±4	96±3
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	25±3	94±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular)	100	26±4	95±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar)	100	27±5	96±4
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	25±6	95±4
Carcinoma de próstata	100	24±6	94±5
Glioma (Astrocitoma)	100	27±5	95±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	27±6	96±6
Melanoma (Melanoma nodular).	100	25±7	96±5
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	23±4	97±7
Linfoma no Hodgkin T (Linfoma difuso de células T).	100	26±5	98±6
Linfoma de Burkitt	100	27±6	99±5

Tabla 29. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Casopitant, en relación a la existencia de baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A) o alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A)	Casos con alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B)
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	22±4	95±3
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	22±3	94±2
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	23±4	95±4
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células renales de células claras)	100	24±5	94±5
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	23±3	95±3
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	25±4	95±6
Carcinoma de endometrio	100	26±3	94±5
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas)	100	25±5	93±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	24±5	94±5
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	25±4	95±6
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular)	100	23±3	93±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar)	100	24±5	94±5
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	25±4	95±7
Carcinoma de próstata	100	23±6	94±4
Glioma (Astrocitoma)	100	24±5	95±7

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A)	Casos con alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B)
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±4	94±5
Melanoma (Melanoma nodular).	100	23±5	96±6
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	24±3	97±4
Linfoma no Hodgkin T (Linfoma difuso de células T).	100	23±4	98±3
Linfoma de Burkitt	100	24±5	93±3

Tabla 30. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con Vestipitant, en relación a la existencia de baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A) o alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A)	Casos con alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B)
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	24±4	94±4
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	23±3	93±3
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	24±4	94±4
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células renales de células claras)	100	25±5	95±5
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	24±3	93±3
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	25±4	94±6
Carcinoma de endometrio	100	26±3	95±5
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas)	100	24±5	96±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	25±5	95±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	26±4	94±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular)	100	27±3	95±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar)	100	26±5	96±6
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	25±4	94±5
Carcinoma de próstata	100	24±6	95±6
Glioma (Astrocitoma)	100	25±5	94±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±4	95±3
Melanoma (Melanoma nodular).	100	24±5	96±4
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	23±5	98±5
Linfoma no Hodgkin T (Linfoma difuso de células T).	100	23±4	98±4
Linfoma de Burkitt	100	24±5	93±5

5

Tabla 31. Porcentaje de inhibición de cultivos celulares tratados con anticuerpos contra el receptor NK1, en relación a la existencia de baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A) o alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A)	Casos con alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B)
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	22±4	96±4
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	24±3	94±3
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	23±4	95±4

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos con baja expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo A)	Casos con alta expresión de la forma truncada del receptor NK1 (Grupo B)
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células renales de células claras)	100	24±5	93±5
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	24±3	94±3
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	25±4	95±6
Carcinoma de endometrio	100	26±3	94±5
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas)	100	24±5	95±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	25±5	96±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	26±4	95±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular)	100	24±3	94±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar)	100	25±5	95±6
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	26±4	96±5
Carcinoma de próstata	100	27±6	95±6
Glioma (Astrocitoma)	100	24±5	96±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±4	95±3
Melanoma (Melanoma nodular).	100	26±5	96±4
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	24±5	95±5
Linfoma no Hodgkin T (Linfoma difuso de células T).	100	25±4	95±4
Linfoma de Burkitt	100	26±5	96±5

Ejemplo 6. Las células cancerosas que presentan amplificación a nivel del gen que codifica para el receptor NK1 muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

- 5 Para comprobar que las células cancerosas con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 exhiben una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, se obtuvieron células tumorales primarias humanas a partir de tumores de pacientes y se comprobó la presencia del receptor NK1 mediante técnicas de Western Blot e inmunohistoquímica. Se determinó la presencia o ausencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1, y posteriormente las células se sembraron en cultivo en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1.
- 10 Los diferentes tipos de tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 32. Las células tumorales se obtuvieron de muestras de cáncer primario humano de pacientes voluntarios, y la presencia del receptor NK1 se determinó utilizando Western Blot e inmunohistoquímica, cultivándose las células según lo explicado en el Ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, tales como Aprepitant, Casopitant, Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. En cada caso se determinó la presencia o ausencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1.
- 15

Para determinar la presencia de la amplificación (incremento en el número de copias) del gen que codifica para el receptor NK1 (TAC1R), se empleó la técnica de hibridación genómica comparativa (CGH Array). En primer lugar, se extrajo ADN genómico de cada caso. Posteriormente, se realizó el marcaje y la hibridación del ADN de cada muestra junto con ADN de una referencia comercial sin alteraciones genómicas (del sexo masculino o femenino, según el género del paciente de quien se obtuvieron las muestras). Se utilizó el microarreglo Sureprint G3 Human CGH de la compañía Agilent, con una separación promedio entre sondas de 5,3 Kb y 4,6 Kb para los genes RefSeq. La lectura del microarreglo se realizó con el DNA Microarray Scanner G2565CA de Agilent, a una resolución de 3 µm. El análisis de los resultados se llevó a cabo con el software Cytogenomics v2.0.6.0 de Agilent, utilizando los siguientes parámetros: ADM-2: 6.0; Centralización: ON (umbral: 6.0, tamaño de contenedor: 10); Fuzzy zero: ON; Filtros de aberraciones: ON (minProbes=5 y minAvgAbsLopRatio=0,5); Filtros a nivel de características: ON. Las coordenadas genómicas son coincidentes con el genoma NCBI36 (hg18). Los casos se distribuyeron en dos grupos: Grupo I para los casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (locus 2p13.1-p12), y Grupo II para los casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (locus 2p13.1-p12).

20

25

30

Tabla 32. Características de los pacientes de los cuales se obtuvieron las muestras para los cultivos celulares y número de casos del Grupo I (sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1, locus 2p13.1-p12) y del Grupo II (con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1, locus 2p13.1-p12).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Número de casos	Sexo (hombres / mujeres)	Edad	Número de casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1	Número de casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	8	4/4	54±4	4	4
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	8	4/4	54±3	4	4
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	8	4/4	52±4	4	4
Carcinoma de células renales (carcinoma de células renales de células claras)	8	4/4	51±3	4	4
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	8	0/8	43±2	4	4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	8	0/8	53±2	4	4
Carcinoma de endometrio	8	0/8	62±3	4	4
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	8	0/8	33±4	4	4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	8	5/3	53±5	4	4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	8	6/2	63±3	4	4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular).	8	2/6	45±2	4	4
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar).	8	2/6	33±4	4	4
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	8	6/2	64±5	4	4
Carcinoma de próstata	8	8/0	71±4	4	4
Glioma (astrocitoma)	8	4/2	50±3	4	4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	8	5/3	62±2	4	4
Melanoma (melanoma nodular).	8	3/5	53±5	4	4
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	8	4/4	55±4	4	4
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	8	4/4	32±5	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	22±3	4	4

Se observa un aumento en la inhibición de la proliferación celular en cultivos de células cancerosas que muestran amplificación del gen que codifica para el receptor NK1. En las Tablas 33 a 36 se muestra cómo en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 33), Casopitant (Tabla 34), Vestipitant (Tabla 35) y anticuerpos contra el receptor NK1 – obtenidos de Sigma-Aldrich, catálogo S8305– se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos que presentan amplificación en la región genómica que codifica para el receptor NK1. Por lo tanto, en las células cancerosas obtenidas de tumores que presentan amplificación en la región genómica del receptor NK1, la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es mayor (más efectiva).

En los experimentos reflejados en las Tablas 33 a 35, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se utilizaron a una concentración de 100 micromolar, mientras que el anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 36) se empleó a una dilución de 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan como porcentaje de variación respecto al control $\pm$ desviación estándar.

Tabla 33. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Aprepitant, en relación a la ausencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (Grupo I) o la presencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (Grupo II).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1	Casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1
Carcinoma gástrico (adenocarcinoma)	100	24±6	96±6
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	100	23±4	94±4
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	100	25±5	95±5
Carcinoma de células renales (carcinoma de células renales de células claras)	100	26±3	97±7
Carcinoma de mama (adenocarcinoma ductal)	100	24±4	99±4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	100	23±6	92±5
Carcinoma de endometrio	100	24±5	94±5
Carcinoma de cuello uterino (carcinoma de células escamosas).	100	25±4	94±6
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	26±5	93±4
Carcinoma de pulmón (carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	27±3	95±5
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular).	100	24±4	96±6
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar).	100	25±5	97±4
Carcinoma de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales)	100	23±4	97±3
Carcinoma de próstata	100	25±4	94±6
Glioma (astrocitoma)	100	25±5	95±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±7	96±4
Melanoma (melanoma nodular).	100	24±4	97±5
Linfoma no Hodgkin B (linfoma difuso de células B).	100	25±5	93±6
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	26±3	94±7
Linfoma de Burkitt	100	25±5	95±4

Tabla 34. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Casopitant, en relación a la ausencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (Grupo I) o la presencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (Grupo II).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1	Casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	23±5	95±5
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	24±4	96±4
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	26±6	97±5
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	27±7	93±6
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	23±8	94±7
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	24±5	95±4
Carcinoma de endometrio	100	24±4	96±5
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	23±6	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	24±4	95±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	26±6	96±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	26±5	94±6
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	24±7	96±5
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	26±4	97±3
Carcinoma de próstata	100	27±5	96±5
Glioma (Astrocitoma)	100	24±6	95±4
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±7	96±6

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1	Casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1
Melanoma (Melanoma nodular).	100	26±4	97±5
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	27±5	95±7
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	28±7	95±5
Linfoma de Burkitt	100	24±5	93±6

Tabla 35. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Vestipitant, en relación a la ausencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (Grupo I) o la presencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (Grupo II).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1	Casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	25±5	94±4
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	24±4	93±3
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	25±3	93±4
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	27±4	94±5
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	24±3	94±6
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	25±4	96±5
Carcinoma de endometrio	100	23±5	95±5
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	26±6	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	25±3	94±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	24±4	93±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	25±5	94±6
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	26±3	97±4
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	24±5	95±5
Carcinoma de próstata	100	25±6	96±6
Glioma (Astrocitoma)	100	26±5	94±7
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	27±4	95±7
Melanoma (Melanoma nodular).	100	24±6	96±5
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	27±5	94±6
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	29±3	95±4
Linfoma de Burkitt	100	23±5	97±5

5

Tabla 36. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con anticuerpos contra el receptor NK1, en relación a la ausencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (Grupo I) o la presencia de amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (Grupo II).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1	Casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	25±4	95±6
Carcinoma de colon (Adenocarcinoma)	100	24±5	96±5
Carcinoma de páncreas (Adenocarcinoma)	100	25±6	96±6
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	27±7	97±7
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	26±5	96±4
Carcinoma de ovario (Adenocarcinoma)	100	24±6	95±5

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1	Casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1
Carcinoma de endometrio	100	28±4	96±6
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	27±3	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	26±4	95±3
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	25±5	97±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	26±4	95±6
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	27±5	96±7
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	24±4	94±5
Carcinoma de próstata	100	25±3	95±6
Glioma (Astrocitoma)	100	25±5	95±5
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±6	96±4
Melanoma (Melanoma nodular).	100	26±5	97±5
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	26±4	94±4
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	24±3	95±6
Linfoma de Burkitt	100	25±5	96±7

Ejemplo 7. Las células cancerosas que presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1 muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

- 5 Para comprobar que las células cancerosas con una forma constitutivamente activada del receptor NK1 exhiben una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, se obtuvieron células tumorales primarias humanas a partir de tumores de pacientes, y se comprobó la presencia del receptor NK1 mediante técnicas de Western Blot e inmunohistoquímica. Se determinó el incremento o no de la proliferación tras la exposición a sustancia P (agonista del receptor NK1), de modo que para los cultivos celulares que crecieron independientemente de la
- 10 exposición a sustancia P se consideró que poseían formas constitutivamente activadas del receptor, ya que se transmitía una señal mitogénica de forma independiente de la presencia del agonista. Además, se verificó que todas las células tumorales presentaban integridad en las vías de las MAP quinasa y de las PI3 quinasa, así como en el gen K-ras y la proteína derivada del mismo.
- 15 Las células tumorales se obtuvieron de muestras de cáncer primario humano de pacientes voluntarios; la presencia del receptor NK1 se determinó utilizando Western Blot e inmunohistoquímica, y las células se cultivaron según lo explicado en el Ejemplo 1, en presencia del agonista sustancia P. El Grupo I se constituyó por aquellas células que mostraron una respuesta proliferativa reducida tras la exposición a sustancia P (indicando un receptor constitutivamente activado, independientemente de su acoplamiento al agonista), y el Grupo II se constituyó por
- 20 aquellas células que exhibieron una respuesta proliferativa mayor tras la exposición al agonista sustancia P (indicando un receptor con respuesta normal al estímulo).

La Tabla 37 muestra cómo se produce una mayor inhibición del crecimiento de las células tumorales al tratar con el antagonista Aprepitant en el grupo con baja respuesta proliferativa tras la exposición a sustancia P (en presencia de

25 la forma constitutivamente activada del receptor NK1). Resultados similares se han observado con Vestipitant, Casopitant, Vofopitant, Ezlopitant y Lanepitant, así como con el tratamiento con anticuerpos contra el receptor NK1.

Tabla 37. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con el antagonista Aprepitant, en relación a la presencia de forma constitutivamente activada del receptor NK1 (Grupo I) o a la presencia de la forma normal del

30 receptor (Grupo II).

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Grupo I	Grupo II
Carcinoma gástrico (Adenocarcinoma)	100	76±6	95±7
Carcinoma de colon (adenocarcinoma)	100	75±4	96±6
Carcinoma de páncreas (adenocarcinoma)	100	76±7	96±4
Carcinoma de células renales (Carcinoma de células claras de riñón)	100	76±6	97±6
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	75±6	96±4
Carcinoma de ovario (adenocarcinoma)	100	77±7	97±5

Tipo de tumor (tipo histológico)	Control	Grupo I	Grupo II
Carcinoma de endometrio	100	78±6	95±3
Carcinoma de cuello uterino (Carcinoma de células escamosas).	100	77±7	94±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células pequeñas)	100	78±5	93±3
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas)	100	73±7	95±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	73±4	94±3
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	75±6	95±3
Carcinoma de vejiga urinaria (Carcinoma de células transicionales)	100	76±5	93±4
Carcinoma de próstata	100	77±6	95±5
Glioma (astrocitoma)	100	73±7	96±3
Sarcoma pleomórfico indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	75±6	92±5
Melanoma (Melanoma nodular).	100	74±4	94±4
Linfoma no Hodgkin B (Linfoma difuso de células B).	100	74±6	93±3
Linfoma no Hodgkin T (linfoma difuso de células T).	100	75±6	96±4
Linfoma de Burkitt	100	74±6	97±5

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para predecir la respuesta de un sujeto humano que padece cáncer al tratamiento de dicha enfermedad con un antagonista del receptor NK1, en el que el método comprende:

- a) detectar el nivel de expresión del receptor NK1 en una muestra de células tumorales aisladas del sujeto;
- b) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia; y
- c) predecir una respuesta positiva al tratamiento si el nivel de expresión se incrementa en relación con el valor de referencia,

siendo dicho valor de referencia el nivel de expresión promedio en una población de no respondedores.

2. El método in vitro de la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión del receptor NK1 se determina detectando el nivel del receptor NK1 o del ARNm que lo codifica.

3. El método in vitro de la reivindicación 1 o 2, en el que la expresión del receptor NK1 se define como aumentada si el nivel de expresión del receptor NK1 está incrementado en más del 20% de las células de la muestra biológica aislada.

4. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que también se determina la presencia o ausencia de mutaciones en el gen K-ras en las células tumorales de la muestra aislada, y en el que la ausencia de mutación en el gen K-ras es indicativa de una respuesta positiva al tratamiento.

5. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que también se determina la presencia o ausencia de la proteína ERK y/o MEK y/o AKT y/o la forma truncada del receptor NK1, o cualquier combinación de las mismas, en las células tumorales de la muestra aislada, y en el que la presencia de cualquiera de las proteínas ERK, MEK, AKT, la forma truncada del receptor NK1, o cualquier combinación de ellas, o la presencia del ARNm que codifica alguna de dichas proteínas, es indicativa de una respuesta positiva al tratamiento.

6. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que también se determina la presencia o ausencia de una forma constitutivamente activada del receptor NK1 en las células tumorales de la muestra aislada, y en el que la presencia de una forma constitutivamente activada del receptor NK1 es indicativa de una respuesta positiva al tratamiento.

7. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de:

- a) el nivel de expresión del receptor NK1;
- b) la presencia o ausencia de mutaciones en el gen K-ras;
- c) la presencia de la proteína ERK o del ARNm que la codifica;
- d) la presencia de la proteína MEK o del ARNm que la codifica;
- e) la presencia de la proteína AKT o del ARNm que la codifica;
- f) la presencia o ausencia de la forma truncada del receptor NK1, se ejecuta mediante:

- i. un procedimiento de perfil genético; y/o
- ii. un procedimiento que comprenda PCR; y/o
- iii. transferencia por Northern blot; y/o
- iv. un procedimiento inmunohistoquímico.

8. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho sujeto humano no ha sido tratado previamente con un antagonista del receptor NK1.

9. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el tipo de cáncer se selecciona entre los siguientes: carcinoma gástrico, adenocarcinoma gástrico, carcinoma de colon, adenocarcinoma de colon, carcinoma pancreático, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma de células claras, carcinoma de mama, adenocarcinoma de mama, carcinoma ovárico, adenocarcinoma ovárico, carcinoma endometrial, carcinoma del cuello uterino, carcinoma pulmonar, cáncer de pulmón no microcítico y/o microcítico, carcinoma tiroideo, carcinoma papilar tiroideo y/o carcinoma folicular tiroideo, carcinoma vesical, carcinoma de células transicionales de la vejiga urinaria, carcinoma prostático, cáncer de linaje glial del sistema nervioso central (glioma), sarcomas, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno y sarcoma de Ewing, melanoma, tumores embrionarios, neuroblastoma; y cánceres hematológicos, leucemia de células B o T, linfoma no Hodgkin (de tipo B o T), linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple.

10. El método in vitro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas no péptidos o péptidos.

11. El método in vitro de la reivindicación 10, en el que los antagonistas no péptidos se seleccionan entre: Aprepitant, Vestipitant, Casopitant, Vofopitant, Ezlopitant, Lanepitant, LY-686017, L-733,060, L-732,138, L-703,606, WIN 62,577,

TAK-637, R673, CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735, CP-122721, L-758298, L-741671, L-742694, CP-99994, T-2328, o combinaciones de los mismos; y los antagonistas péptidos se seleccionan entre anticuerpos o fragmentos de estos dirigidos contra el receptor NK1.

- 5 12. Uso del nivel de expresión del receptor NK1 en una muestra de células tumorales como indicador en un método in vitro para predecir si un sujeto humano que padece cáncer tendrá una respuesta positiva al tratamiento con una composición farmacéutica que comprenda un antagonista del receptor NK1.
- 10 13. Uso según la reivindicación 12, en el que el antagonista del receptor NK1 es un antagonista no péptido o péptido.
- 15 14. Uso según la reivindicación 13, en el que el antagonista no péptido se selecciona entre: Aprepitant, Vestipitant, Casopitant, Vofopitant, Ezlopitant, Lanepitant, LY-686017, L-733,060, L-732,138, L-703,606, WIN 62,577, TAK-637, R673, CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735, CP-122721, L-758298, L-741671, L-742694, CP-99994, T-2328, o combinaciones de los mismos; y el antagonista péptido se selecciona entre anticuerpos o fragmentos de estos dirigidos contra el receptor NK1.