

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 693**

21 Número de solicitud: 201330174

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

11.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.09.2014

Fecha de la concesión:

30.06.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.07.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070090

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (100.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

SALINAS MARTÍN, Manuel Vicente

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

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

57 Resumen:

Método para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece un cáncer al tratamiento con un antagonista del receptor NK1, que permite agrupar a los sujetos en respondedores y no respondedores, así como al kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo dicho método, y su uso. Este método predictivo permite optimizar el tratamiento con estos antagonistas, por ejemplo, en lo referente a dosis de uso de los mismos o asociación con otros agentes antitumorales.

ES 2 493 693 B1

DESCRIPCIÓN**Método para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece un cáncer al tratamiento con un antagonista del receptor NK1.****SECTOR DE LA TÉCNICA.**

5

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, la farmacia y la biología molecular, y más concretamente en el campo de la oncología. Específicamente, está relacionada con un método para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece un cáncer al tratamiento con un antagonista del receptor NK1, que permite agrupar a los sujetos en respondedores y no respondedores, así como al kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo dicho método, y su uso.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA.

15 Los receptores NK1 (receptores de la Neurokinina 1 o neuropeptídicos de la Sustancia P y de las taquicininas), están ampliamente distribuidos en las células del organismo. Actualmente se conocen numerosos procesos biológicos en cuya regulación están involucrados los receptores NK1. Los receptores NK1 son receptores del tipo de los receptores acoplados a la proteína G.

20 Como otros receptores, los receptores NK1 tienen sus propios agonistas naturales. El más selectivo de éstos es la Sustancia P. La Sustancia P (SP) es un undecapéptido de origen natural, que pertenece a la familia de las taquicininas, es producido en los mamíferos y su secuencia fue descrita por Veber et al., (US 4,680,283). La familia de las taquicininas también incluye otros péptidos como Neurokinina A, Neurokinina B, Neuropeptido K, Neuropeptido Gamma y Hemokinina I, entre otros. La implicación de la SP y de otras taquicininas en la etiopatogenia de diversas enfermedades ha sido ampliamente referida en la bibliografía científica. En este sentido, la acción de las taquicininas se ha relacionado 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). También se ha constatado la implicación de las taquicininas en la etiopatogenia de diversas enfermedades con componente inflamatorio como la artritis reumatoide, el asma, la rinitis alérgica, las enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Maggi CA, et al., 1993).

30

En este sentido, la industria farmacéutica ha desarrollado antagonistas no peptídicos de los receptores NK1 como medicamentos para el tratamiento de diversos desórdenes del sistema nervioso central

35

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 es útil en el tratamiento de las náuseas y el vómito inducido por quimioterápicos antineoplásicos, así como en el tratamiento de ciertas formas de incontinencia urinaria (Quartara L. et al., 1998; Doi T. et al., 1999).

5

En un trabajo publicado en 2003 (Giardina G, et al., 2003) y en otro publicado en 2010 (Huang SC, et al., 2010) se hace una revisión de las patentes más recientes sobre antagonistas de receptores NK1. Se describen las moléculas de los más importantes fabricantes mundiales con indicación de sus posibles aplicaciones entre las que cabe destacar: antidepresivo, antiinflamatorio, ansiolítico, antiemético, tratamiento de la colitis ulcerosa y otros.

10

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

15

Es conocido que los astrocitos del sistema nervioso central expresan receptores funcionales para varios neurotransmisores incluidos los receptores NK1 (Palma C. et al., 2000). En los tumores cerebrales, las células gliales malignas derivadas de astrocitos desencadenan bajo la acción de las taquicinas y por mediación de los receptores NK1, la secreción de mediadores que aumentan su velocidad de proliferación. Consecuentemente, los antagonistas selectivos del NK1 pueden ser muy útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de gliomas malignos.

20

En la patente EP 773026 (Pfizer) se hace referencia a la utilización de antagonistas no peptídicos del receptor NK1 para el tratamiento de cánceres en mamíferos. Particularmente en el tratamiento de pequeños carcinomas pulmonares, APUDOMAS (tumores de células enterocromafines que se localizan de modo predominante en la mucosa del tubo digestivo. Sus siglas significan "Amine Precursors Uptake and Decarboxylation", utilización y decarboxilación de los precursores de aminas).

25

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

30

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

Se ha descrito que los antagonistas no peptídicos de receptores NK1 inducen apoptosis (muerte celular) en las células cancerosas de diversos tumores como el carcinoma de estómago, el carcinoma de colon (Rosso M, et al., 2008) , el melanoma (Muñoz M, et al., 2010) o el carcinoma de pulmón (Muñoz M, 2012).

5

La patente ES 2246687 reivindica la utilización de los antagonistas no peptídicos de receptores NK1 y de la SP en la elaboración de una composición farmacéutica para la producción de apoptosis en células tumorales cancerosas de mamíferos. La solicitud de patente española P201101311 (PCT/ES2012/070865) reivindica el uso de agentes modificadores del microambiente peritumoral, en concreto los antagonistas de los receptores NK1, para el tratamiento del cáncer. Por otro lado, la solicitud de patente WO2012020162 describe el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos, frente a los receptores NK1, NK2 y/o NK3, útiles en el tratamiento del cáncer, mediante la producción de apoptosis de las células tumorales.

10

15 Actualmente son de uso común en la práctica clínica diversos fármacos dirigidos para antagonizar los efectos de ciertos receptores de membrana con objeto de tratar el cáncer. Los ejemplos más representativos son el uso de anticuerpos monoclonales contra el receptor Her2 para el tratamiento del cáncer de mama y estómago, el uso de fármacos inhibidores de la Tirosín Kinasa para el tratamiento del cáncer del Pulmón y el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico) para el tratamiento del 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, es conocido que, en humanos, el anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor Her-2 sólo es efectivo si existe una sobreexpresión de dicho receptor observada mediante la realización de un estudio inmunohistoquímico o una
20 amplificación del gen observada mediante marcaje de dicho gen con sondas específicas que se pueden visualizar, por métodos de hibridación “in situ”. En el caso del tratamiento del cáncer de pulmón con fármacos inhibidores de la Tirosín Kinasa, se sabe que estos fármacos sólo son efectivos si existe una mutación del gen que codifica el receptor EGFR, que condicionan una alteración en la estructura del mismo, que condiciona, a su vez que dicho receptor se encuentre “constitucionalmente” y
25 permanentemente activado, mientras que si no existe dicha mutación en este gen, los mencionados fármacos no son efectivos en el tratamiento del cáncer de pulmón. En el caso del cáncer de colon, se sabe que el tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor EGFR es efectivo sólo si no existe mutación a nivel del gen K-ras, mientras que si existe mutación a nivel de este gen, que condiciona un cambio a nivel de la proteína codificada por este gen de forma que ésta se encuentra

20

25

30

constitucionalmente activada, dichos anticuerpos no son efectivos en el tratamiento de estos tumores cancerosos de colon.

Se ha descrito en la literatura científica que algunas células tumorales pueden tener una forma truncada de receptor NK1 (Gillespie E, et al. 2011).

Por lo tanto y en conclusión, en la actualidad son conocidos en el estado del arte, los siguientes hechos:

1. Que los receptores NK1 están ampliamente difundidos en el organismo del ser humano.
2. Que las taquicininas y en concreto la SP actúan sobre los receptores NK1.
3. Que la utilización de antagonistas no peptídicos del receptor NK1 ha demostrado efectos sobre las células tumorales, que se traducen en su muerte celular por apoptosis (ES 2246687).
4. Que la utilización de agentes modificadores del microambiente tumoral, en concreto los antagonistas de los receptores NK1, es útil en el tratamiento de los tumores cancerosos (PCT/ES2012/070865).
5. Que el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos, frente a los receptores NK1, es útil en el tratamiento del cáncer, mediante la producción de apoptosis de las células tumorales (WO2012020162).
6. Que algunas células tumorales pueden tener una forma truncada del receptor NK1.
7. Que existen marcadores predictivos de respuesta a diversos tratamientos dirigidos a tratar el cáncer mediante la modificación del funcionamiento de diversos receptores de la membrana de las células tumorales, diferentes al receptor NK1.

Es conocido, en el estado de la técnica, que la ruta de las MAP Kinasas, específicamente a través de sus eferentes “aguas abajo” como por ejemplo, ERK o MEK puede modular la proliferación celular a través de varios eferentes, a su vez “aguas abajo”, de gran importancia como Fos/Jun o P90rsk, entre otros. Por otro lado, también es conocido en el estado de la técnica, que la ruta de las PI3 Kinasas tiene una gran importancia en el control del ciclo celular. La activación de la ruta de las PI3 Kinasas produce un aumento de uno de sus aferentes finales “aguas abajo” como es AKT. Por lo tanto, algunos tumores utilizan las rutas de las MAP Kinasas y de las PI3 Kinasas, lo que les confiere ventajas competitivas en lo referente a su capacidad de proliferación. Estos tumores presentan altas cantidades de las proteínas ERK, MEK y AKT, que son propias de estas rutas (MAP Kinasas y PI3 Kinasas).

La proteína RAS es un elemento clave de la ruta de las MAP kinasas y de la ruta de la PI3 Kinasa. La proteína Ras ocupa un lugar clave “aguas abajo” en las rutas de señalización de las MAP Kinasas y de

la PI3 Kinasas. La mutación del gen K-ras, condiciona la expresión de una proteína “constitucionalmente activada”, que mantiene permanentemente activadas dichas rutas, independientemente del estado del receptor y de sus eferentes “aguas arriba”, por lo que emite una señal de acitvación de dichas rutas de manera continua, lo que induce un estímulo permanente de la proliferación celular.

No obstante, las anterioridades conocidas, que incluyen la utilización de los antagonistas (antagonistas no peptídicos o anticuerpos –o fragmentos de los mismos-) de los receptores NK1 para la producción de muerte y/o apoptosis en las células tumorales (bien por acción directa sobre estas células tumorales o a través de la modificación del microambiente), actualmente se desconoce que grupos de pacientes podrían responder mejor al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1. Este conocimiento permitiría establecer las dosis del antagonista del receptor NK1 más adecuada y su utilización de manera conjunta con otros tratamientos anticancerosos (por ejemplo, quimioterápicos o fármacos bloqueadores específicos de otras rutas moleculares de importancia en un determinada tipo de tumor) o de soporte propios de pacientes oncológicos, para conseguir un resultado más eficaz y eficiente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

Breve descripción de la invención

Un primer objeto de la presente invención se refiere a un método para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano al tratamiento con un antagonista del receptor NK1, en el que el sujeto padece un cáncer, que comprende usar, como un indicador, los niveles de expresión del receptor NK1. Preferiblemente, se detectan los niveles de expresión del receptor NK1 o del ARNm que codifica para el receptor NK1, en una muestra biológica aislada que comprende células tumorales de un sujeto humano que padece un cáncer. En otra realización preferida, se determina la presencia o no de mutaciones en el gen K-ras en las células tumorales de la muestra biológica aislada. En otra realización preferida, se determina la presencia o no de la proteína ERK en las células tumorales de la muestra biológica aislada. Más preferiblemente, se determina la presencia o no de la proteína AKT en las células tumorales de la muestra biológica aislada. Aún más preferiblemente, se determina la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1 en las células tumorales de la muestra biológica aislada. Aún mucho más preferiblemente, se determina si las células tumorales de la muestra biológica aislada presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1.

Un segundo objeto de la invención se refiere a un método para clasificar un sujeto humano que padece de cáncer en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los sujetos identificables mediante el método del primer objeto de la invención, y en el que el grupo 2 representa el resto de sujetos.

- 5 Un tercer objeto de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un antagonista del receptor NK1, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano del grupo 1 identificable mediante el método del segundo objeto de la invención.

- 10 Un cuarto objeto de la invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo el método del primer o del segundo objeto de la invención.

Un quinto objeto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo del cuarto objeto de la invención.

15 **Descripción detallada de la invención.**

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

- a) el nivel de expresión del receptor NK1, o del ARNm que lo codifica, y/o
 - b) la presencia de mutación en el gen *K-ras*, y/o
 - 20 c) el nivel de expresión de las proteínas ERK, preferentemente ERK1 y ERK2, o del ARNm que las codifica, y/o
 - d) el nivel de expresión de las proteínas MEK, preferentemente MEK1 y MEK2, o del ARNm que las codifica, y/o
 - d) el nivel de expresión de la proteína AKT, preferentemente AKT 1 y AKT2, o del ARNm
 - 25 que las codifica, y/o
 - e) la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1, o del ARNm que lo codifica, y/o
 - f) la presencia del receptor NK1 constitutivamente activado,
- o cualquiera de sus combinaciones, para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano al tratamiento con un antagonista del receptor NK1. Preferiblemente, los marcadores se emplean
- 30 simultáneamente.

Método para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece 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*, presentan una mejor (más efectiva) respuesta al tratamiento con los antagonistas del receptor NK1.

5 Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante 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 un cáncer, que comprende usar, como un indicador, los niveles de expresión del receptor NK1.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, se usa como indicador la expresión del receptor NK1, o del ARNm que codifica para el receptor NK1.

En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende:

- a. obtener una muestra biológica aislada que comprende células tumorales de un sujeto
- 15 humano que padece un cáncer, y
- b. detectar los niveles de expresión del receptor NK1 o del ARNm que codifica para el receptor NK1, en la muestra obtenida en el paso (a).

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

Más preferiblemente, la sobreexpresión se define como un nivel de expresión del receptor NK1, o del

25 ARNm que codifica para el receptor NK1, aumentado 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 codifica para el receptor NK1, aumentado en más del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y aún mucho más preferiblemente, en más de un 90% de las células de la muestra biológica aislada obtenida en el paso (a).

30 En una realización, la respuesta es una respuesta a la reducción de la carga tumoral. En una realización alternativa, la respuesta es una mejora o ausencia de deterioro del estado del tumor. En otra realización, la respuesta es un resultado clínico, tal como la supervivencia exenta de progresión o la supervivencia global.

35

Los sujetos cuya respuesta se predice son sujetos humanos que padecen cáncer. Los términos “sujeto humano”, “sujeto” y “paciente” se usan por tanto de manera indistinta en esta memoria descriptiva.

En esta memoria se entiende por receptor NK1 (también denominado receptor de la neurokinina 1, SPR; NK1R; NK1R; o TAC1R) a un receptor acoplado a proteína G (GPCR, del inglés: *G protein-coupled receptors*). Se trata de un receptor del tipo de los receptores acoplados a la proteína G, con siete puentes transmembrana, codificado por el gen *TAC1R* que se encuentra en el cromosoma 2 en humanos. Este gen pertenece a una familia de genes de receptores de taquiquinina. Estos receptores de taquiquinina se caracterizan por la interacción con las proteínas G y contienen siete regiones transmembrana hidrófobas. Este gen codifica para el receptor de la sustancia P taquiquinina, también conocida como la neurocinina o neurokinina 1. La proteína codificada también está implicado en la mediación del metabolismo de fosfatidilinositol de la sustancia P.

En el contexto de la presente invención, *TAC1R* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1 (con número en el GeneBank NP_001049.1), y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *NKI*. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 2

En esta memoria se entiende por ERK (del inglés *Extracellular-signal-regulated kinases*) a un tipo de proteína que forma parte de la ruta molecular de las MAP Kinasas y que participa en importantes múltiples funciones celulares, de importancia en la fisiopatología del cáncer. La MAP quinasa (ERK) es una serín treonín quinasa que es capaz de traslocarse al núcleo para, allí, regular la transcripción modificando la actividad de proteínas (incluyendo factores de transcripción, modulando así la expresión de distintos genes. En el contexto de la presente invención, ERK1 (también denominada Mitogen-activated protein kinase 3 ó MAPK3) se define también por una secuencia de nucleótidos o

polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 3 (con número en el GeneBank M84490.1), y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 3,

5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 3, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ERK1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 4.

15 En el contexto de la presente invención, ERK2 (también denominada Mitogen-activated protein kinase 1 ó MAPK1) se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 5 (con número en el GeneBank M84489.1), y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 5,

20 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

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

25 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 5, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ERK2. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 6

30

En esta memoria se entiende por MEK un tipo de proteínas que comprende entre otras MEK1 y MEK2. MEK1 (del inglés *Mitogen-Activated Protein kinase kinase 1* ó MAPKK1 ó MAP2K1, es codificada en un gen localizado en el cromosoma 15 (locus 15q22.1q22.3). En el contexto de la presente invención, MEK1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que

constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 7 (con número en el GeneBank L11284.1), y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 7,
- 5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 7, y
- 10 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MEK1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 8.

15 En el contexto de la presente invención, MEK2 (*Mitogen-Activated Protein kinase kinase 2* ó MAPKK2 ó MAP2K2) es codificada en un gen localizado en el cromosoma 19 (locus 19p13.3) se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 9 (con número en el GeneBank L11285.1), y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 20 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 9,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código
- 25 genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 9, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MEK2. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida
- 30 en la secuencia SEQ ID NO: 10.

En esta memoria se entiende por AKT un grupo de proteínas que participan en los mecanismos de control de la apoptosis (muerte celular programada) y de la proliferación de las células. Entre ellas destacan, por ejemplo, la proteína AKT1 (también denominada proteína Kinasa B). En el contexto de la

35 presente invención, AKT1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que

constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 11 (con número en el GeneBank M63167.1), y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 11,
- 5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica
- 10 con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 11, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína AKT1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 12.

15 En el contexto de la presente invención, AKT2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 13 (con número en el GeneBank M77198.1), y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 13,
- 20 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica
- 25 con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 13, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína AKT2. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 14.

30 En el contexto de la presente invención, se entiende “muestra de referencia” o “valor de referencia” como la muestra que se usa para determinar la variación de los niveles de expresión de las proteínas de la presente invención. En una realización de la invención, el valor de referencia se obtiene a partir de la señal proporcionada usando una muestra de tejido obtenida de un individuo que presenta un tumor no respondedor o menos respondedores al tratamiento del cáncer con antagonistas de los receptores

35 NK1. Preferiblemente, las muestras se toman del mismo tejido de varios individuos no respondedores

y se combinan, de tal manera que el valor de referencia refleja el valor promedio de dichas moléculas en la población de no respondedores. "Valor de referencia" es el nivel de expresión de una proteína de la invención (receptor NK1, ERK, AKT, o forma truncada del receptor NK1) en la muestra de referencia, o el número de células que expresan una proteína de la invención en una muestra de referencia. El valor de referencia indicativo de la no respuesta para cada proteína concreta debe conocerse antes de llevar a cabo el método de la presente invención. Se prefiere que la muestra de referencia sea del mismo tejido y/u obtenida mediante el mismo procedimiento (opciones descritas anteriormente) que la muestra a partir de la cual se va a predecir la respuesta del individuo. Se prefiere que la muestra se origine a partir de la misma etapa o gravedad del cáncer que la muestra a partir de la cual se va a predecir la respuesta del individuo.

En la presente invención "pronóstico" se entiende como la evolución esperada de una enfermedad y se refiere a la valoración de la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad así como a la valoración de su inicio, estado de desarrollo, evolución, o de su regresión, y/o el pronóstico del curso de la enfermedad en el futuro. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diagnosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

Por "predicción de la respuesta" se entiende, en el contexto de la presente invención, la determinación de la probabilidad de que el paciente responda de forma favorable o desfavorable a una terapia o a un tratamiento determinado, incluyendo el tratamiento quirúrgico. Especialmente, el término "predicción", como se usa aquí, se refiere a una evaluación individual de cualquier parámetro que pueda ser útil en determinar la evolución de un paciente. Como entenderán los expertos en la materia, la predicción de la respuesta clínica al tratamiento, aunque se prefiere que sea, no necesita ser correcta para el 100% de los sujetos a ser diagnosticados o evaluados. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de los sujetos como que tienen una probabilidad aumentada de tener una respuesta positiva. El experto en la materia puede determinar fácilmente si un sujeto es estadísticamente significativo usando varias herramientas de evaluación

estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de los valores de p, prueba 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%), al menos del 95%>. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1 ó 0,05. La predicción de la respuesta clínica se puede hacer utilizando cualquier criterio de valoración usado en oncología y conocido por el experto en la materia.

A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos o tratamiento adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 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%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

En el contexto de la presente invención el término “respuesta positiva” hace referencia a una respuesta, por parte de los pacientes que padecen cáncer, más efectiva al tratamiento con antagonistas del receptor NK1, que otros pacientes que padecen cáncer pero que no reponen de dicha manera efectiva al tratamiento con los antagonistas del receptor NK1. La respuesta puede referirse a las características de los tumores del sujeto. De manera alternativa pero no mutuamente excluyente, la respuesta puede referirse al resultado clínico del sujeto. De esta manera, 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.

Siempre que la respuesta se refiera a las características de los tumores del sujeto, la distinción entre R y NR se puede llevar a cabo sobre la base del cambio en el tamaño de la lesión. Por ejemplo, se puede definir “Respuesta” como una disminución en la carga total del tumor (definida como la suma de las áreas del tumor de lesiones medidas bidimensionalmente), tomando como referencia los valores correspondientes al valor inicial, sin la aparición de una nueva lesión. De manera particular, la respuesta puede ser $\geq 5\%$ de disminución en la carga total del tumor, tal como $\geq 10\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 15\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 20\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 25\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 30\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 35\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 40\%$ de disminución en la carga total del tumor, $\geq 45\%$ de disminución en la carga total del tumor o $\geq 50\%$ de disminución en la carga total del tumor, definida cada una como la suma de las áreas del tumor de las lesiones medidas bidimensionalmente. En una realización preferida de la presente invención, la respuesta se define como $\geq 30\%$ de disminución en la carga total del tumor (definida como la suma de las áreas del tumor de las lesiones medidas bidimensionalmente), tomando como referencia los valores correspondientes a los valores iniciales, sin la aparición de una nueva lesión. La falta de respuesta (NR) se define de forma contraria a (R). Preferiblemente, sin respuesta (NR) se define como $< 30\%$ de disminución en el área del tumor de una o más lesiones medibles, o la aparición de al menos una nueva lesión. Esto incluye normalmente un aumento, tal como $> 20\%$ de aumento en el área de una o más lesiones medibles o la aparición de al menos una nueva lesión.

Siempre que “Respuesta” se refiera al resultado clínico del sujeto, se puede expresar la “Respuesta” como la supervivencia global o la supervivencia exenta de progresión. La supervivencia de pacientes de cáncer se expresa de manera adecuada generalmente mediante las curvas de Kaplan-Meier, que han recibido su denominación de Edward L. Kaplan y Paul Meier que fueron los que describieron éstas en primer lugar (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*, presentan una respuesta menor (menos efectiva) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, en el primer método además se determina la presencia o no de mutaciones en el gen *K-ras* en las células tumorales de la muestra del paso (a), siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva (respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1) si las células cancerosas no presentan mutación en el gen *K-ras* (*K-ras* no mutado o “wild type”).

En esta memoria se define ras como un tipo de proteínas que actúan en múltiples rutas de señalización molecular que regulan procesos biológicos de gran importancia en el cáncer, como por ejemplo la proliferación celular, la migración, etc. Una de estas rutas es la ruta de las MAP Kinasas (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*). La familia de proteínas ras, comprende H-ras, N-ras y K-ras. La proteína K-ras es codificada por el gen *K-ras*, localizado en el cromosoma 12.

En la presente invención también se demuestra que los antagonistas de NK1 son capaces de inhibir el crecimiento y proliferación tumoral, con más eficacia, en aquellos tipos de tumores en los que las vías de señalización de las MAP Kinasas y PI3 Kinasas se encuentran íntegras en las células que los componen, es decir, están activas y no sufren alteraciones las moléculas que las componen, y por lo tanto el tratamiento con dichos antagonistas inhibe la proliferación de las células tumorales a través de las rutas de las MAP Kinasas y PI3 Kinasas, preferentemente a través de la inhibición de la expresión de diferentes efectores “aguas abajo” de dichas rutas, como por ejemplo ERK, MEK (para la ruta de las MAP Kinasas) y AKT (para la rutas de las PI3 kinasas). Sin embargo, cuando dichas vías no están íntegras, el uso de los antagonistas de NK1 presenta una menor efectividad.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, en el primer método además se determina la presencia o no de las proteínas ERK y/o MEK, o del ARNm que la/s codifica, en las células tumorales de la muestra del paso (a), siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva (respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1) si las células cancerosas presentan las proteínas ERK y/o MEK, o una cantidad elevada de ARNm de dichas proteínas.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, en el primer método además se determina la presencia o no de la proteína AKT, o del ARNm que la codifica, en las células tumorales de la muestra del paso (a), siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva (respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1) si las células cancerosas presentan la proteína AKT, o una cantidad elevada de ARNm de dichas proteínas.

En esta memoria se define como ERK (del inglés *Extracellular-signal-regulated kinases*) a un tipo de proteína que forma parte de la ruta molecular de las MAP Kinasas y que participa en importantes múltiples funciones celulares, de importancia en la fisiopatología del cáncer. Por ejemplo ERK1 (también denominada Mitogen-activated protein kinase 3 ó MAPK3) es una proteína codificada en un gen situado en el cromosoma 16. ERK2 (también denominada Mitogen-activated protein kinase 1 ó MAPK1) es una proteína codificada en un gen situado en el cromosoma 22.

En esta memoria se define como MEK un tipo de proteínas que comprende, entre otras MEK1 y MEK2. MEK1 también denominada *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1* ó MAPKK1 ó MAP2K1, es codificada en un gen localizado en el cromosoma 15 (locus 15q22.1-q22.3). MEK2 también denominada *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2* ó MAPKK2 ó MAP2K2, es
5 codificada en un gen localizado en el cromosoma 19 (locus 19p13.3).

En esta memoria se define como AKT un grupo de proteínas que participan en los mecanismos de control de la apoptosis (muerte programada) y de la proliferación de las células. Entre ellas destacan, por ejemplo AKT1 (también denominada proteína Kinasa B), que se codifica en un gen localizado en el
10 cromosoma 14 y AKT2 que se codifica en un gen localizado en el cromosoma 19.

Además, en la presente invención se demuestra que los tumores que presentan una mayor cantidad de forma truncada del receptor NK1, tienen una mejor (más efectiva) respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.
15

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, en el primer método además se determina la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1 en las células tumorales de la muestra del paso (a), siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva (respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1) si las células cancerosas presentan la forma
20 truncada del receptor NK1, o del ARNm que lo codifica.

Por último, en la presente invención se demuestra que las células tumorales con alteraciones en el gen NK1 que determinan alteraciones estructurales que hacen que este gen esté constitucionalmente activo, es decir que el receptor transmita señales “aguas abajo” independientemente que esté o no
25 unido a alguno de sus agonistas, tienen una mejor respuesta (más eficaz) al tratamiento con antagonistas del receptor NK1.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, en el primer método además se determina si las células tumorales de la muestra del paso (a) presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1, siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva (respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1) si las células cancerosas presentan una
30 forma constitutivamente activada del receptor NK1. Más preferiblemente, la determinación de si las células tumorales de la muestra del paso (a) presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1 o no se realiza exponiendo las células a la sustancia P, considerando que las células

presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1, si presentan escasa respuesta proliferativa ante la exposición a la sustancia P.

Los niveles de expresión de los genes van a dar un determinado perfil de expresión génica. El término “nivel de expresión”, también denominado “cantidad producto génico” se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultado de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen. Se entiende por “perfil de expresión génica” el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión de los genes se realiza, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción de los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa, retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; análisis en serie de la expresión génica (SAGE, SuperSAGE); chips de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. El perfil de expresión génica también podría obtenerse mediante la detección y/o cuantificación de las proteínas producto de la traducción del ARNm derivado de la transcripción de los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, inmunodetección por western blot. La detección cuantitativa de la expresión de los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención puede realizarse más preferiblemente mediante PCR en tiempo real (RT-PCR ó RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas.

Así pues, la detección de los niveles de proteínas o del nivel de expresión de los genes puede hacerse por cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la materia. Así, en otra realización preferida de este aspecto de la invención,

- 5 a) la detección de los niveles de expresión del receptor NK1, o del ARNm que codifica para el receptor NK1, o
 - b) de la presencia o no de mutaciones en el gen *K-ras*,
 - c) de la presencia de la proteína ERK, y/o
 - d) de la presencia de la proteína MEK, y/o
 - e) de la presencia de la proteína AKT, o
 - 10 f) de la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1,
- se realiza por
- i. un procedimiento de perfil genético, tal como una micromatriz, y/o
 - ii. un procedimiento que comprende PCR, tal como una PCR en tiempo real;
 - y/o
 - 15 iii. transferencia Northern, y/o
 - iv. un procedimiento inmunohistoquímico.

En otra realización preferida, la muestra biológica es un tejido reciente, tejido embebido en parafina o ARN extraído de un tejido de un paciente con cáncer. Más preferiblemente, el primer método de la invención se lleva a cabo *in vitro* usando una muestra originaria del sujeto humano, y en el que en el momento de tomar la muestra del sujeto humano, el sujeto humano no ha sido tratado con un antagonista del receptor NK1.

En otra realización preferida, la detección de los niveles de expresión de los genes se realiza mediante Q-RT-PCR.

En otra realización preferida, la detección de los niveles de proteínas NK1, ERK, MEK, AKT y/o el receptor truncado de NK1, se realiza mediante técnicas inmunológicas. En una realización más preferida, las técnicas inmunológicas están basadas en reacciones de precipitación, basadas en reacciones de aglutinación, inmunomarcación, radioinmunoanálisis y técnicas radioinmunométricas, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), o en cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida, las técnicas inmunológicas comprenden el inmunomarcaje. En otra realización aún más preferida, el inmunomarcaje se selecciona de entre inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a enzimas, inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a fluorocromos, o citometría. Aún más preferiblemente, la citometría es citometría de flujo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el sujeto humano padece un cáncer que se selecciona de entre los siguientes: carcinoma gástrico, preferentemente adenocarcinoma gástrico, carcinoma de colon, preferentemente adenocarcinoma de colon, carcinoma de páncreas, preferentemente adenocarcinoma de páncreas, carcinoma renal, preferentemente carcinoma renal de células claras, carcinoma de mama, preferentemente adenocarcinoma de mama, carcinoma de ovario, preferentemente adenocarcinoma de ovario, carcinoma de endometrio, carcinoma de cérvix uterino, carcinoma de pulmón, preferentemente carcinoma de pulmón de célula no pequeña y/o carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de tiroides, preferentemente carcinoma de tiroides papilar y/o carcinoma folicular de tiroides, carcinoma de vejiga, preferentemente carcinoma transicional de vejiga de la orina, carcinoma de próstata, cáncer de estirpe glial del sistema nervioso central (glioma), sarcomas, preferentemente fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno y sarcoma de Edwing, melanoma, cánceres embrionarios, preferentemente neuroblastoma y cánceres hematológicos, preferentemente leucemias de estirpe B o de estirpe T, linfomas no Hodgkin, preferentemente de estirpe B o de estirpe T, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas no peptídicos, y aún más preferiblemente, los antagonistas no peptídicos se seleccionan de 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 cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas peptídicos, y aún más preferiblemente, se seleccionan de entre anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos contra el receptor NK1.

Como se usa aquí "antagonista no peptídico de los receptores NK1" significa cualquier sustancia de naturaleza no peptídica con un tamaño suficiente y conformación adecuada para unirse al receptor NK1 y así inhibir su funcionamiento normal, incluyendo el hecho de evitar que la SP u otros agonistas de estos receptores, se unan a los mencionados receptores. Preferentemente, en la presente invención se han ensayado los siguientes antagonistas no peptídicos de los receptores NK1 comerciales: L-733,060 ((2S,3S)-3-[(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)methoxy]-2-phenylpiperidine hydrochloride) (Sigma-Aldrich), L-732,138 (N-Acetyl-L-tryptophan 3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl ester) (Sigma-Aldrich), L-703,606 (cis-2-(Diphenylmethyl)-N-[(2-iodophenyl)methyl]-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-amine oxalate salt) (Sigma-Aldrich), WIN 62,577 (Sigma-Aldrich), CP-122721 (Pfizer), Aprepitant ó

MK 869 ó L-754030 (MSD), TAK-637 (Takeda/Abbot), Vestipitant ó GW597599 (GSK), Casopitant ó GW679769 (GSK) y R673 (Roche). CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735. De manera similar, se pueden utilizar otros compuestos antagonistas no peptídicos de receptores NK1 y de la SP tales como: Vofopitant ó GR-205171 (Pfizer), Ezlopitant ó CJ -11974 (Pfizer), CP-122721 (Pfizer), L-758298 (MSD), L-741671, L-742694, CP-99994, Lanepitant ó LY-303870, T-2328, LY-686017. Son preferidos los compuestos: Aprepitant ó MK 869 ó L-754030 (MSD), Vestipitant ó GW597599 (GSK) y Casopitant ó GW679769 (GSK).

Los anticuerpos son compuestos peptídicos con capacidad para unirse de forma altamente selectiva a diversas moléculas orgánicas. Su unión a determinados receptores celulares induce una modificación en la actividad de los mismos, lo que puede determinar una modificación en las actividades fisiológicas habituales del metabolismo celular.

Como se usa aquí "anticuerpo contra los receptores NK1" significa cualquier anticuerpo policlonal o monoclonal o fragmentos de estos anticuerpos contra los receptores NK1. Un fragmento de anticuerpo significa una parte de un anticuerpo contra los receptores NK1 que es de un tamaño suficiente y conformación adecuada para unirse a un epítipo presente en los receptores NK1 y así modificar su funcionamiento normal, incluyendo el hecho de evitar que la sustancia P u otros agonistas de estos receptores, se unan a los mencionados receptores.

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

Por "cáncer" se entiende un tumor maligno de potencial crecimiento ilimitado que se expande localmente por invasión y sistémicamente por metástasis. De acuerdo con la presente invención, el antagonista no peptídico del receptor NK1 se administra a individuos con un cáncer.

En el contexto de la presente invención, como se usa "fármacos dirigidos a modificar el funcionamiento de los receptores NK1" se refieren a moléculas antagonistas no peptídicos o anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que actúan sobre el receptor NK1 y que modifican su funcionamiento, con objeto de la producción de inhibición de la proliferación, producción de muerte

y/o apoptosis en las células tumorales, en un mamífero, incluyendo el hombre, bien por acción directa sobre los mecanismos fisiológicos de las células tumorales o bien por la modificación del microambiente tumoral.

- 5 En el contexto de la presente invención, la enfermedad es el cáncer, preferentemente carcinoma gástrico, preferentemente adenocarcinoma gástrico, carcinoma de colon, preferentemente adenocarcinoma de colon, carcinoma de páncreas, preferentemente adenocarcinoma de páncreas, carcinoma renal, preferentemente carcinoma renal de células claras, carcinoma de mama, preferentemente adenocarcinoma de mama y/o carcinoma de mama, carcinoma de ovario, 10 preferentemente adenocarcinoma de ovario y/o carcinoma de ovario, carcinoma de endometrio, carcinoma de cérvix uterino, carcinoma de pulmón, preferentemente adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de célula no pequeña y/o carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de tiroides, preferentemente carcinoma de tiroides papilar metastatizante y/o carcinoma folicular de tiroides, carcinoma de vejiga, preferentemente carcinoma de vejiga de la orina y/o carcinoma 15 transicional de vejiga de la orina, carcinoma de próstata, Tumor de estirpe glial del sistema nervioso central (glioma), sarcomas, preferentemente fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno y sarcoma de Edwing (aunque también es de utilidad en el sarcoma del estroma endometrial humano, osteosarcoma y/o rhabdomyosarcoma), melanoma, cánceres embrionarios, preferentemente neuroblastoma (aunque también es útil en méduloblastoma, retinoblastoma, nefroblastoma y/o hepatoblastoma) y cánceres 20 hematológicos, preferentemente leucemias de estirpe B o de estirpe T, linfomas no Hodgkin, preferentemente de estirpe B o de estirpe T, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, leucemias, preferentemente de estirpe B o de estirpe T, mieloma múltiple.

- Otro aspecto de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante segundo método de la 25 invención, para clasificar un sujeto humano que padece de cáncer en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los sujetos identificables mediante el método descrito previamente y denominado primer método de la invención, y en el que el grupo 2 representa el resto de sujetos.

Composiciones farmacéuticas de la invención

30

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un antagonista del receptor NK1, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano del grupo 1 identificable mediante el segundo método de la invención. Alternativamente, se refiere a una composición farmacéutica que comprende un antagonista del

receptor NK1 para su uso en el tratamiento de un sujeto humano del grupo 1 identificable mediante el segundo método de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas no peptídicos. Más preferiblemente, los antagonistas no peptídicos se seleccionan de 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 cualquiera de sus combinaciones.

Antagonistas no peptídicos del receptor NK1 son, pero sin limitarse, : L-733,060 ((2S,3S)-3-[(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)methoxy]-2-phenylpiperidine hydrochloride) (Sigma-Aldrich), L-732,138 (N-Acetyl-L-tryptophan 3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl ester) (Sigma-Aldrich), L-703,606 (cis-2-(Diphenylmethyl)-N-[(2-iodophenyl)methyl]-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-amine oxalate salt) (Sigma-Aldrich), WIN 62,577 (Sigma-Aldrich), CP-122721 (Pfizer), Aprepitant ó MK 869 ó L-754030 (MSD), TAK-637 (Takeda/Abbot), Vestipitant ó GW597599 (GSK), Casopitant ó GW679769 (GSK) y R673 (Roche). CP-100263, WIN 51708, CP-96345, L-760735. De manera similar, se pueden utilizar otros compuestos antagonistas no peptídicos de receptores NK1 y de la SP tales como: Vofopitant ó GR-205171 (Pfizer), Ezlopitant ó CJ -11974 (Pfizer), CP-122721 (Pfizer), L-758298 (MSD), L-741671, L-742694, CP-99994, Lanepitant ó LY-303870, T-2328, LY-686017. Son preferidos los compuestos: Aprepitant ó MK 869 ó L-754030 (MSD), Vestipitant ó GW597599 (GSK) y Casopitant ó GW679769 (GSK), o combinaciones de los mismos.

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

Estos antagonistas del receptor NK1, tanto peptídicos como no peptídicos, se pueden usarse solos, combinados entre ellos o con diversos agentes anticancerosos que se seleccionan, pero sin limitarnos, de entre cualquiera de los siguientes: Clorambucil, Melfalán, Aldesleukina, 6-mercaptopurina, 5-fluoruracilo, Ara-c, Bexaroteno, Bleomicina, Capecitabina, Carboplatino, Cisplatino, Docetaxel, Doxorubicina, Epirubicina, Fludarabina, Irinotecan, Metotrexato, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Rituximab, Etopósido, Tenipósido, Vincristina, Vinblastina, Vinorelbina, Imatinib, Erlotinib, Cetuximab y Trastuzumab, o cualquiera de sus combinaciones.

Kit o dispositivo de la invención

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar:

- 5 a) el nivel de expresión del receptor NK1, y/o
- b) la presencia de mutación en el gen *K-ras*, y/o
- c) el nivel de expresión de las proteínas ERK, ERK1 y ERK2, y/o
- d) el nivel de expresión de las proteínas MEK, y más preferiblemente MEK1 y MEK2, y/o
- d) el nivel de expresión de la proteína AKT, preferentemente AKT 1 y AKT2, y/o
- 10 e) la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1, y/o
- f) la presencia del receptor NK1 constitutivamente activado

en las células cancerosas de la muestra biológica del primer o segundo método de la invención.

- 15 En una realización preferida el kit puede contener oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes, y/o capaces de hibridar con la secuencia de los genes *NK1*, *ERK*, *MEK* y/o *AKT*, para la posterior amplificación por PCR.

Preferiblemente, el kit o dispositivo de la invención comprende al menos un anticuerpo que se selecciona de entre:

- 20 a) un anticuerpo anti-NK1 en su forma completa o “full length”
- b) un anticuerpo anti-NK1 en su forma truncada
- c) un anticuerpo anti-ERK, y/o
- d) un anticuerpo anti-MEK, y/o
- e) un anticuerpo anti- AKT

- 25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización más preferida, el anticuerpo es monoclonal. En otra realización más preferida, el anticuerpo se encuentra marcado con un fluorocromo. Más preferiblemente, el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y
- 30 derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los medios necesarios para comparar la cantidad detectada en el paso (b.) con una cantidad de referencia.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Cuando para la cuantificación génica y/o proteica mediante el kit de la invención se utiliza la técnica RQ-PCR, una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible, se desea que el kit comprenda adicionalmente un cebador del oligonucleótido poliT además del (de los) oligonucleótido(s) del kit. Estos reactivos pueden estar comprendidos opcionalmente en el kit.

Una Transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar las muestras de ARN por tamaño y la posterior detección con un(os) oligonucleótido(s) (sonda de hibridación) complementaria con (parte de) la secuencia diana del ARN de interés.

Es también posible que el(los) oligonucleótido(s) estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz, o micromatriz de la invención. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, normalmente una secuencia de ADN, como sondas (o indicadores). Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención. En una realización, dicha matriz personalizada comprende cincuenta manchas o menos, tal como treinta manchas o menos, incluyendo veinte manchas o menos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una micromatriz que comprende oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes, y/o capaces de hibridar con la secuencia de los genes *NK1*, *ERK*, *MEK* y/o *AKT*.

Otro aspecto de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes *NK1*, *MEK*, *ERK* y/o *AKT*.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos son construidas en la superficie de un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando

fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

5 Así, las sondas oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos. Para la cuantificación de la expresión génica, preferiblemente se emplean aproximadamente unos 40 oligonucleótidos por gen.

10 La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a un microarray de proteínas, de ahora en adelante microarray de proteínas de la invención, que comprende anticuerpos anti- NK1, anticuerpos anti- ERK, anticuerpos anti-MEK, anticuerpos anti-AKT y/o anticuerpos anti- receptor truncado de NK1. Las sondas son anticuerpos fijados a portaobjetos de vidrio y los blancos son muestras de suero o tejido.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo, la micromatriz, o el microarray de la invención, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico del adenocarcinoma de pulmón o del carcinoma escamoso.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención (del primer o del segundo método de la invención).

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

30

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA). Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”,

35

“oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los habitualmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes, no tienen carácter limitativo y por lo tanto no pretenden excluir otras
10 características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Por el contrario, la palabra “consiste” y sus variantes, sí que presentan carácter limitativo, refiriéndose exclusivamente a las características técnicas, aditivo, componentes o pasos que la acompañan. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de
15 ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos de la invención

A continuación, se muestran ejemplos a modo de ilustración, sin pretender que sean limitativos de la
20 presente invención, dónde se ponen de manifiesto las ventajas de la invención.

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

25 Para comprobar que las células cancerosas con mayor expresión del receptor NK1 (mayor porcentaje de células con expresión de dicho receptor o mayor intensidad en la expresión del mismo) mostraban una respuesta más efectiva al tratamiento con los antagonistas de los receptores NK1, se tomaron células tumorales humanas primarias procedentes de tumores de pacientes, se determinó la presencia del receptor NK1 mediante técnicas de western-blot e inmunohistoquímica en las mismas y se
30 pusieron en cultivo en presencia de diversos antagonistas de los receptores NK1. Los distintos tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los pacientes de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	Edad	Tipo histológico
Carcinoma de estómago.	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 Renal.	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 cérvix.	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
Carcinoma Vejiga de la Orina	9	7/2		Carcinoma transicional
Carcinoma de próstata.	9	9/0	70±5	Adenocarcinoma (Gleasson 3+4)
Glioma	9	6/3	59±4	Astrocitoma
Fbrosarcoma	9	6/3	60±4	Fibrosarcoma Grado histológico 2
Histiocitoma fibroso maligno	9	6/3	68±5	Histiocitoma fibroso maligno (Grado 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 Hodgking B	9	5/4	51±4	Linfoma B difuso
Linfoma No Hodgkin T	9	5/4	35±5	Linfoma T difuso
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 las células tumorales a partir de tumores primarios humanos se empleó el mismo método descrito en De Bari et al (De Bari et al. 2001). Brevemente, pequeños trozos de los tumores fueron digeridos en una solución de hialuronidasa (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 1 mg/ml durante 15 minutos a 37°C y posteriormente tratados con 6 mg/ml de colagenasa tipo IV (Invitrogen) durante 2 horas a 37°C. A continuación, se lavaron las células, 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 con un 1% de piruvato de sodio (Invitrogen), y se sembraron en placas de cultivo a una concentración de 10.000 células por centímetro cuadrado. Cuando las células alcanzaron la confluencia, las células adherentes fueron separadas utilizando tripsina estéril al 0,5% (Invitrogen) y se utilizó entre los pases 3 y 9. Para los ensayos mostrados a continuación, las células tumorales se sembraron en placas a una concentración de 25.000 células por pocillos. Un total de 6 pocillos conteniendo las células tumorales se utilizaron como control de supervivencia. Otros grupos de 6 pocillos conteniendo las células tumorales se cultivaron en presencia de los diferentes antagonistas del receptor NK1 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 fueron recolectados para su análisis.

Western-Blot. Se comprobó en todas las líneas celulares tumorales que presentaban receptor NK1, mediante la técnica de Western-Blot. Brevemente, la extracción de las proteínas totales se realizó a partir de las muestras obtenidas de los cultivos celulares. Las células se lisaron mediante métodos comúnmente conocidos en el estado de la técnica y se cuantificó su concentración mediante un kit comercial "Protein Assay" de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, S.A. Madrid), siguiendo para ello las instrucciones del fabricante. De cada muestra, se separaron 50 mg de proteína por electroforesis en geles al 10% SDS-poliacrilamida y se transfirieron electroforéticamente a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Dichas membranas fueron incubadas durante toda la noche en una solución de bloqueo (5% de leche descremada en tampón fosfato -PBS- con un 0,1% de Tween-PBST), seguido de una incubación durante la noche con los anticuerpos primarios diluidos 1/4000 en tampón PBST. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo anti-NK1 (S8305, Sigma-Aldrich) que reconoce el dominio correspondiente a la región carboxilo terminal del receptor NK1 entre los aminoácidos 393-407. A continuación, las membranas fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) y en presencia del detergente Tween-20 (PBST) y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano durante 2 horas a temperatura ambiente (dilución 1:10000). Para confirmar que se había cargado la misma cantidad de proteína, las membranas se incubaron con el anticuerpo

monoclonal anti- β -tubulina. La detección de anticuerpos se realizó con una reacción de quimioluminiscencia (ECL Western Blot detección; Amersham Life Science, Reino Unido).

Técnicas de inmunohistoquímica. La presencia de receptores NK1 también fue analizada mediante técnicas inmunohistoquímicas. Brevemente, una muestra de cada uno de los cultivos de las líneas celulares utilizadas en la presente invención, se centrifugó (5 minutos a 1.500 rpm) y el pellet obtenido se deshidrató mediante un tratamiento a concentraciones crecientes de etanol y, finalmente, en xilol. A continuación, dichas muestras deshidratadas se incluyeron en parafina creándose un bloque de células. Dichos bloques de parafina se cortaron en un microtomo a un grosor de 5 micras, que se colocaron sobre portaobjetos adecuados para la realización de técnicas de inmunohistoquímica. Posteriormente se desparafinaron mediante su inmersión en xilol, para posteriormente ser hidratados a través de una serie de soluciones que contienen concentraciones decrecientes de etanol, para finalmente, sumergirlos en agua. Después, dichas muestras se sometieron a un tratamiento en olla a presión en tampón citrato 10x a pH 6.0, para obtener una mayor exposición de los antígenos. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar las muestras con 0,05 M de tampón Tris, se incubaron con suero de cerdo no-inmune al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para comprobar la expresión de receptores NK1, las muestras celulares se incubaron en presencia de los anticuerpos anti-NK1 (S8305, Sigma-Aldrich) diluido 1:1000, durante toda la noche a 4° C. Transcurrido dicho tiempo se lavaron en tampón Tris 0,05 M a temperatura ambiente. El siguiente paso fue la adición de los reactivos Envision System-HRP (Dako) durante 30 min a temperatura ambiente. Trascurrido dicho tiempo, se lavaron nuevamente las muestras en tampón Tris 0,05 M, y la inmunorreactividad fue visualizada mediante microscopía de luz con una solución cromogénica con 3,3'-Diaminobencidina (DAB+; Dako, USA). Para diferenciar los núcleos celulares, éstos se tiñeron ligeramente con hematoxilina. Como control negativo, se utilizaron muestras a las que no se les incubó con el anticuerpo primario anti-NK1, siendo reemplazado por suero no inmune. Todas las muestras fueron evaluadas.

Para valorar la inmunotinción en cada uno de los casos se realizaron seis cortes a los que se realizó la técnica de inmunohistoquímica. En cada uno de los seis cortes se realizó un conteo de las células en 20 campos de gran aumento (400x) mediante un microscopio de la marca Olympus (modelo CX31). En cada uno de los campos se contó el número de células total y el número de células que presentaban inmunotinción, hallándose posteriormente el porcentaje de células que presentaban dicha inmunotinción. Los tumores se distribuyeron en grupos en función del porcentaje de células que presentaban inmunotinción para el receptor NK1: grupo 1 a aquellos casos en los que se apreciaba

inmunotinción en menos del 20 % de las células cancerosas, grupo 2 a aquellos en los que se observaba inmunotinción entre el 20 y el 80% de las células cancerosas y grupo 3 a aquellos en los que se observaba inmunotinción en más del 80% de las células cancerosas. También se valoró la intensidad de la inmunotinción que se graduó de 1 a 3 (en relación al control). Como control se utilizó una muestra de tejido sano (los controles utilizados en cada caso se detallan en la Tabla 3). Se asignó el nivel de intensidad 1 a aquéllos casos en los que más del 80% de las células tumorales presentaban un nivel de inmunotinción similar al control y el 20% de las mismas, un nivel de intensidad mayor al control. Se asignó el nivel de intensidad 2 a aquéllos casos en los que entre el 40 y el 80% de las células tumorales presentaban un nivel de inmunotinción de mayor intensidad que el control. Se asignó el nivel de intensidad 3 a aquéllos casos en los que más del 80% de las células tumorales presentaban un nivel de inmunotinción de mayor intensidad que el control.

En la Tabla 2 se exponen los tipos de tumores de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular y la distribución de casos en función de la intensidad de inmunotinción, determinada mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Tabla 2. Características de los tipos de cánceres para los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular y distribución de casos en función del porcentaje de células cancerosas que presentaban inmunotinción para el receptor NK1, mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos (totales)	Número de casos del grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células).	Número de casos del grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células).	Número de casos del grupo 3 (expresión en más del 80% de las células).
Carcinoma de estómago.	10	4	3	3
Carcinoma de Colon.	12	4	4	5
Carcinoma de Páncreas.	9	3	3	3
Carcinoma Renal.	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 cérvix.	9	3	3	3
Carcinoma de pulmón	10	3	3	4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos (totales)	Número de casos del grupo 1 (expresión en menos del 20% de las células).	Número de casos del grupo 2 (expresión en el 20-80% de las células).	Número de casos del grupo 3 (expresión en más del 80% de las células).
Carcinoma de pulmón	10	3	4	3
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	9	3	3	3
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	9	3	3	3
Carcinoma Vejiga de la Orina	9	3	3	3
Carcinoma de próstata.	9	3	3	3
Glioma	9	3	3	3
Fbrosarcoma	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 Hodgking 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

En la Tabla 3 se exponen los tipos de tumores de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular, el control utilizado para la valoración de la intensidad de la expresión inmunohistoquímica del receptor NK1 y la distribución de casos en función de la intensidad de inmunotinción.

Tabla 3. Características de los pacientes de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular, tipos de tumores de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular, control utilizado para la

valoración de la intensidad de la expresión inmunohistoquímica del receptor NK1 y distribución de casos en función de la intensidad de inmunotinción.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Número de casos (totales)	Número de casos con intensidad grado 1	Número de casos con intensidad grado 2	Número de casos con intensidad grado 3
Carcinoma de estómago.	Células mucosas gástricas normales	10	3	4	3
Carcinoma de Colon.	Células mucosa colónicas normales	12	4	5	3
Carcinoma de Páncreas.	Células ductales pancreático pancreáticas normales	9	3	3	3
Carcinoma Renal.	Células ductales renales normales	9	3	3	3
Carcinoma de mama.	Células ductales renales normales	9	3	3	3
Carcinoma de Ovario.	Células de la superficie ovárica normales	9	3	3	3
Carcinoma de endometrio.	Células de las glándulas endometriales normales.	9	3	3	3
Carcinoma de cérvix.	Células escamosas cervicales normales.	9	3	3	3
Carcinoma de pulmón	Células bronquiales normales	10	3	4	3
Carcinoma de pulmón	Células bronquiales normales	10	4	3	3
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	Células foliculares tiroideas normales	9	3	3	3

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Número de casos (totales)	Número de casos con intensidad grado 1	Número de casos con intensidad grado 2	Número de casos con intensidad grado 3
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	Células foliculares tiroideas normales	9	3	3	3
Carcinoma Vejiga de la Orina	Células del epitelio de la vejiga de la orina normales	9	3	3	3
Carcinoma de próstata.	Células glándulares prostáticas normales.	9	3	3	3
Glioma	Astroцитos normales	9	3	3	3
Fbrosarcoma	Fibroblastos normales	9	3	3	3
Histiocitoma fibroso maligno	Fibroblastos normales	9	3	3	3
Sarcoma de Ewing.	Fibroblastos normales	9	3	3	3
Melanoma	Melanocitos normales	10	3	4	3
Neuroblastoma	Neuronas normales	9	3	3	3
Leucemia B	Linfocitos normales	9	3	3	3
Leucemia T	Linfocitos normales	9	3	3	3
Linfoma No Hodgking B	Linfocitos normales	9	3	3	3
Linfoma No Hodgkin T	Linfocitos normales	9	3	3	3
Linfoma de Burkitt	Linfocitos normales	9	3	3	3
Linfoma de Hodgkin	Linfocitos normales	9	3	3	3
Mieloma	Células plasmáticas normales	9	3	3	3

Se aprecia un aumento de la inhibición de la proliferación celular en los cultivos de células cancerosas que presentaban mayor porcentaje de células con inmunotinción para el receptor NK1 por inmunohistoquímica. En las Tablas 4 a 7 se aprecia como en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla

4), Casopitant (Tabla 5), Vestipitant (Tabla 6) y anticuerpos contra el receptor NK1 -obtenido de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305- (Tabla 7), se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos de células cancerosas que presentan un mayor porcentaje de inmunotinción del receptor NK1. De forma, que en la medida que el porcentaje de células cancerosas que presentan expresión del receptor NK1 es mayor, la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1 es mayor. Se aprecia un aumento de la inhibición de la proliferación celular en los cultivos de células cancerosas que presentaban una mayor intensidad de inmunotinción para el receptor NK1 por inmunohistoquímica. En las Tablas 8 a 11 se aprecia como en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 8), Casopitant (Tabla 9), Vestipitant (Tabla 10) y anticuerpos contra el receptor NK1 -obtenido de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305- (Tabla 11), se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos de células cancerosas que presentan una mayor intensidad de inmunotinción del receptor NK1. De forma, que en la medida que la intensidad de la expresión del receptor NK1 es mayor, 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 concentración 1 micromolar. El anticuerpo contra el receptor NK1 se usó a concentración 1/100. Los porcentajes de inhibición se expresan en porcentaje de variación respecto al control \pm la desviación estándar.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Aprepitant en función del porcentaje de células que presentaban inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	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 estómago.	100	10 \pm 3	45 \pm 3	92 \pm 3
Carcinoma de Colon.	100	11 \pm 4	44 \pm 2	95 \pm 4
Carcinoma de Páncreas.	100	12 \pm 3	47 \pm 1	94 \pm 6
Carcinoma Renal.	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 cérvix.	100	10 \pm 2	48 \pm 5	95 \pm 5
Carcinoma de pulmón	100	9 \pm 3	41 \pm 3	94 \pm 7
Carcinoma de pulmón	100	10 \pm 2	42 \pm 3	97 \pm 6
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	10 \pm 2	45 \pm 2	97 \pm 5

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	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 tiroides (carcinoma papilar)	100	10±3	47±3	97±6
Carcinoma Vejiga de la Orina	100	10±2	48±4	96±5
Carcinoma de próstata.	100	11±3	46±6	95±5
Glioma	100	11±4	47±4	94±6
Fbrosarcoma	100	10±3	48±3	96±5
Histiocitoma fibroso maligno	100	11±2	47±2	95±6
Sarcoma de Ewing.	100	11±2	48±6	94±6
Melanoma	100	11±3	49±5	96±4
Neuroblastoma	100	10±3	44±5	97±5
Leucemia B	100	11±2	43±4	95±4
Leucemia T	100	11±3	46±6	97±5
Linfoma No Hodgking B	100	10±2	47±4	96±5
Linfoma No Hodgkin T	100	11±3	48±5	95±6
Linfoma de Burkitt	100	10±2	45±6	96±4
Linfoma de Hodgkin	100	10±3	49±3	94±5
Mieloma	100	11±2	46±5	95±4

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con Casopitant en función del porcentaje de células que presentaban inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	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 estómago.	100	12±4	46±2	90±2
Carcinoma de Colon.	100	13±3	46±3	92±3
Carcinoma de Páncreas.	100	10±4	45±2	92±4
Carcinoma Renal.	100	16±4	46±3	91±5
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 cérvix.	100	16±3	47±4	93±3
Carcinoma de pulmón	100	10±2	46±2	92±5
Carcinoma de pulmón	100	12±2	45±2	93±4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	14±3	44±3	94±4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	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 tiroides (carcinoma papilar)	100	16±2	44±2	95±5
Carcinoma Vejiga de la Orina	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
Fbrosarcoma	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 Hodgking 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 los cultivos celulares tratados con Vestipitan en función del porcentaje de células que presentaban inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	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 estómago.	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 Renal.	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 cérvix.	100	17±4	46±3	94±4
Carcinoma de pulmón	100	15±2	45±2	93±4
Carcinoma de pulmón	100	16±3	46±3	93±3
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	16±3	45±3	95±5

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	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 tiroides (carcinoma papilar)	100	15±3	47±5	96±4
Carcinoma Vejiga de la Orina	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
Fbrosarcoma	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 Hodgking 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 los cultivos celulares tratados con anticuerpo contra el receptor NK1, en función del porcentaje de células que presentaban inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	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 estómago.	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 Renal.	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 cérvix.	100	24±3	54±4	95±5
Carcinoma de pulmón	100	23±4	55±5	94±3
Carcinoma de pulmón	100	24±4	56±3	95±4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	25±2	54±3	96±4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	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 tiroides (carcinoma papilar)	100	22±4	53±5	94±3
Carcinoma Vejiga de la Orina	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
Fbrosarcoma	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 Hodgking 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 los cultivos celulares tratados con Aprepitant en función de la intensidad de la inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grado 1 de intensidad	Grado 2 de intensidad	Grado 3 de intensidad
Carcinoma de estómago.	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 Renal.	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 cérvix.	100	27±4	56±4	95±4
Carcinoma de pulmón	100	28±5	57±5	95±3
Carcinoma de pulmón	100	29±6	56±6	96±4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	26±6	57±5	95±5
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	100	27±6	56±4	94±6

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grado 1 de intensidad	Grado 2 de intensidad	Grado 3 de intensidad
Carcinoma Vejiga de la Orina	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
Fbrosarcoma	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 Hodgking 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 los cultivos celulares tratados con Casopitant en función de la intensidad de la inmunotinción para el receptor NK1.

5

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grado 1 de intensidad	Grado 2 de intensidad	Grado 3 de intensidad
Carcinoma de estómago.	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 Renal.	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 cérvix.	100	33±3	53±3	92±2
Carcinoma de pulmón	100	32±4	54±4	93±3
Carcinoma de pulmón	100	33±2	55±3	94±4
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	34±3	54±5	93±2
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	100	35±4	55±6	92±3
Carcinoma Vejiga de la Orina	100	34±4	56±4	93±4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grado 1 de intensidad	Grado 2 de intensidad	Grado 3 de intensidad
Carcinoma de próstata.	100	33±5	53±3	94±2
Glioma	100	36±3	54±5	91±3
Fbrosarcoma	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 Hodgking 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 los cultivos celulares tratados con Vestipitan en función de la intensidad de la inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grado 1 de intensidad	Grado 2 de intensidad	Grado 3 de intensidad
Carcinoma de estómago.	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 Renal.	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 cérvix.	100	19±3	48±3	94±3
Carcinoma de pulmón	100	17±2	49±5	93±5
Carcinoma de pulmón	100	18±3	45±3	93±3
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	19±4	46±4	95±3
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	100	16±2	47±5	96±5
Carcinoma Vejiga de la Orina	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
Fbrosarcoma	100	18±2	47±3	91±2

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grado 1 de intensidad	Grado 2 de intensidad	Grado 3 de intensidad
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 Hodgking 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

Tabla 11. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con anticuerpo contra el receptor NK1, en función de la intensidad de la inmunotinción para el receptor NK1.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grado 1 de intensidad	Grado 2 de intensidad	Grado 3 de intensidad
Carcinoma de estómago.	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 Renal.	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 cérvix.	100	25±4	53±4	96±4
Carcinoma de pulmón	100	24±3	55±5	97±4
Carcinoma de pulmón	100	25±3	54±3	94±3
Carcinoma de tiroides (carcinoma folicular)	100	26±4	53±3	95±5
Carcinoma de tiroides (carcinoma papilar)	100	24±3	56±5	94±4
Carcinoma Vejiga de la Orina	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
Fbrosarcoma	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

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grado 1 de intensidad	Grado 2 de intensidad	Grado 3 de intensidad
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 Hodgking 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 de los receptores NK1.

5

Para comprobar que las células cancerosas sin mutación en el gen K-ras (K-ras no mutado o de forma “wild type”) mostraban una respuesta más efectiva al tratamiento con los antagonistas de los receptores NK1, se tomaron células tumorales humanas primarias procedentes de tumores de pacientes, se comprobó que presentaban el receptor NK1 mediante técnicas de western-blot e inmunohistoquímica y se determinó si presentaban mutaciones en K-ras o no las presentaban (forma “wild type”). Posteriormente se pusieron en cultivo en presencia con diversos antagonistas de los receptores NK1. Los distintos tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 12.

10

15 Las células tumorales fueron recolectadas de muestras de cánceres primarios humanos tomadas de pacientes voluntarios, se determinó la presencia de receptor NK1 mediante técnicas de Western-Blot e inmunohistoquímica y cultivadas según se explica en el Ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, como Aprepitant, Casopitant, Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. En cada caso se determinó la presencia o no de mutaciones en el gen K-ras.

20

Para determinar la existencia de mutaciones en el gen K-ras se realizó una extracción de ADN de las células tumorales cancerosas a partir de muestras obtenidas de los diferentes tumores cancerosos utilizando los kits de extracción de ADN de Takara (Madison, WI, EE.UU.) o Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y según se ha publicado previamente (Di Fiore F, et al. 2007). Posteriormente se realizó el análisis de secuenciación del gen KRAS, exón 2, mediante amplificación por PCR a partir del ADN tumoral canceroso extraído previamente, usando el siguiente sentido (SEQ ID NO. 15): 5'-AAGGCCTGCTGAAAATGACTG-3'

25

y antisentido (SEQ ID NO. 16): 5'-CAAAGAATGGTCCTGCACCAG-3'. Después de la purificación mediante el kit de extracción de gel de Qiagen, los productos PCR se secuenciaron utilizando el Big Dye Terminator Kit V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y un ABI Prism 377 o 3100 secuenciador de ADN (Applied Biosystems). La presencia de una mutación heterocigota en el gen KRAS en las células tumorales cancerosas de los cultivos se definió como la aparición de un pico mutante con una altura de al menos un tercio de la del tipo salvaje. Todos los análisis de secuenciación se realizaron al menos dos veces en dos PCR independientes.

Tabla 12. Características de los pacientes de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular y número de casos con Kras mutado y “wild type” (salvaje).

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	Edad	Número de casos con Kras mutado	Número de casos con Kras no mutado (wild type).
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal 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 de cérvix (Carcinoma de células escamosas).	8	0/8	34±2	4	4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	8	6/2	52±4	4	4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	Edad	Número de casos con Kras mutado	Número de casos con Kras no mutado (wild type).
Carcinoma Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	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 Pleomorfo 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 Hodgking B (Linfoma B difuso).	8	4/4	54±4	4	4
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	8	4/4	33±3	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	24±4	4	4

Se aprecia un aumento de la inhibición de la proliferación celular en los cultivos de células cancerosas que no presentaban mutación de Kras. En las Tablas 13 a 16 se aprecia como en cultivos tratados con Aprepitant (tabla 13), Casopitant (Tabla 14), Vestipitant (Tabla 15) y anticuerpos contra el receptor NK1 -obtenido de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305- (Tabla 16), se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos de células cancerosas que no presentan mutación de Kras. De forma, que en las células cancerosas procedentes de tumores que no presentan mutación de Kras, es mayor la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1. En los experimentos reflejados en las Tablas 13 a 15, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se usaron a concentración 100 micromolar. El anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 16) se usó a concentración 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan en porcentaje de variación respecto al control ± la desviación estándar.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con aprepitant, en función de la presencia o no de mutaciones de Kras en las células tumorales cancerosas.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no mutado (wild type).
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal 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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	23±3	94±5
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	22±4	94±4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	26±5	94±4
Carcinoma de próstata.	100	24±3	94±3
Glioma (astrocitoma)	100	23±4	94±4
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	24±3	94±3
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	26±4	94±4
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	27±5	94±3
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	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 función de la presencia o no de mutaciones de Kras en las células tumorales cancerosas.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no mutado (wild type).
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal 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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	27±3	93±3
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	26±4	94±2
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	25±4	95±6
Carcinoma de próstata.	100	23±3	93±7
Glioma (astrocitoma)	100	26±4	94±6
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±5	95±5
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	25±6	94±6
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	26±3	95±4
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	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 función de la presencia o no de mutaciones de Kras en las células tumorales cancerosas.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no mutado (wild type).
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	25±5	94±3
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	23±4	95±4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	25±5	95±6
Carcinoma de próstata.	100	24±4	96±4
Glioma (astrocitoma)	100	25±3	97±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±4	95±6
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	23±5	96±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	24±4	97±6
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	25±5	96±5
Linfoma de Burkitt	100	24±3	95±3

Tabla 16. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con anticuerpos contra el receptor NK1, en función de la presencia o no de mutaciones de Kras en las células tumorales cancerosas.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos con Kras mutado	Casos con Kras no mutado (wild type).
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	23±4	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	28±3	95±4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	27±2	95±3
Carcinoma de próstata.	100	28±3	96±4
Glioma (astrocitoma)	100	24±2	93±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±4	94±4
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	26±3	95±3
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	23±2	93±4
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	24±4	94±5
Linfoma de Burkitt	100	26±3	95±4

5 Ejemplo 3. Las células cancerosas que presentan mayor actividad de la ruta de las MAP kinasas presentan una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1.

Para comprobar que las células cancerosas que tienen una mayor actividad de la ruta de las MAP Kinasas muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con los antagonistas de los receptores

NK1, se tomaron células tumorales humanas primarias procedentes de tumores de pacientes, se comprobó que presentaban receptor NK1 mediante técnicas de western-blot e inmunohistoquímica y que no presentaban mutaciones en K-ras (forma “wild type”). Posteriormente se pusieron en cultivo en presencia con diversos antagonistas de los receptores NK1. Los distintos tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 17.

Las células tumorales fueron recolectadas de muestras de cánceres primarios humanos tomadas de pacientes voluntarios, se determinó la presencia de receptor NK1 mediante técnicas de Western-Blot e inmunohistoquímica y fueron cultivadas según se explica en el ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, como Aprepitant, Casopitant, Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. Se comprobó en todos los casos que no existía mutación en Kras, según el método explicado en el Ejemplo 2. En cada caso se determinó la presencia o no del efector “aguas abajo” de la ruta de las MAP Kinasas, ERK. También se determinó la presencia de MEK, con similares resultados.

Para determinar la presencia de la proteína ERK, se realizó una técnica de Western Blot, utilizando como anticuerpo primario: 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 realizó la técnica de Western Blot, utilizando como anticuerpo primario Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (9121, Cell Signalling).

Tabla 17. Características de los pacientes de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular y número de casos con ausencia o presencia de la proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	Edad	Número de casos con ausencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal 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

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	Edad	Número de casos con ausencia de ERK	Número de casos con presencia de ERK
Carcinoma de cérvix (Carcinoma decélulas escamosas).	8	0/8	35±5	4	4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	8	6/2	54±3	4	4
Carcinoma de pulmón Carcinoma de células No Pequeñas	8	6/2	63±4	4	4
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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	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 Pleomorfo 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 Hodgking B (Linfoma B difuso).	8	4/4	53±5	4	4
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	8	4/4	35±4	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	26±5	4	4

Se aprecia un aumento de la inhibición de la proliferación celular en los cultivos de células cancerosas que muestran presencia del efector “aguas abajo” de la ruta de las MAP Kinasas ERK. En las Tablas 18 a 21 se aprecia como en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 18), Casopitant (Tabla 19), Vestipitant (Tabla 20) y anticuerpos contra el receptor NK1 -obtenido de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305- (Tabla 21), se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos de células cancerosas que muestran más presencia de ERK. De forma, que en las células cancerosas procedentes de tumores presentan proteína ERK, signo de la activación de la ruta de la MAP Kinasas en estos tumores, es mayor la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1. Se apreciaron similares resultados en el caso de la proteína MEK (mayor respuesta en los tumores cancerosos que presentan mayor cantidad de proteína). En los experimentos reflejados en las Tablas 18 a 20, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se usaron a concentración 100 micromolar. El anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 21) se usó a concentración 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan en porcentaje de variación respecto al control \pm la desviación estándar.

Tabla 18. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con aprepitant, en función de la ausencia o presencia de proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin presencia de ERK	Casos con presencia de ERK
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	25±5	94±5
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	26±6	95±3
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	25±4	94±5
Carcinoma de próstata.	100	26±5	95±6
Glioma (astrocitoma)	100	27±6	93±4
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	24±4	94±5
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	25±5	96±6
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	26±6	97±3
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	23±3	94±4
Linfoma de Burkitt	100	24±4	93±5

Tabla 19. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con casopitant, en función de la ausencia o presencia de proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin presencia de ERK	Casos con presencia de ERK
Carcinoma de estómago (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 Renal carcinoma renal de células claras	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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	28±3	93±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	29±4	94±5
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	29±4	98±2
Carcinoma de próstata.	100	27±4	94±5
Glioma (astrocitoma)	100	28±3	93±4
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±4	95±3
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	27±5	96±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	28±4	97±5
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	29±5	98±4
Linfoma de Burkitt	100	28±6	97±5

Tabla 20. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con vestipitant, en función de la ausencia o presencia de proteína ERK.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin presencia de ERK	Casos con presencia de ERK
Carcinoma de estómago (Adenocarcinoma).	100	24±4	95±3
Carcinoma de Colon (Adenocarcinoma).	100	23±	94±3
Carcinoma de Páncreas (Adenocarcinoma)	100	24±34	93±4
Carcinoma Renal carcinoma renal de células claras	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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	29±3	94±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	27±4	96±6
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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
Carcinoma Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	24±5	97±5
Carcinoma de próstata.	100	22±3	94±4
Glioma (astrocitoma)	100	27±4	95±3
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±2	93±4
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	25±3	94±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	24±4	96±3
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	25±2	92±4
Linfoma de Burkitt	100	26±4	93±5

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

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin presencia de ERK	Casos con presencia de ERK
Carcinoma de estómago (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 Renal carcinoma renal de células claras	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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	28±5	96±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	27±6	94±4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	28±4	88±5
Carcinoma de próstata.	100	27±3	90±4
Glioma (astrocitoma)	100	28±4	89±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	27±5	90±4
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	28±3	90±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	29±4	98±6
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	27±5	97±4
Linfoma de Burkitt	100	28±3	96±5

5 Ejemplo 4. Las células cancerosas que presentan mayor actividad de la ruta de las PI3 kinasas presentan una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1.

Para comprobar que las células cancerosas que tienen una mayor actividad de la ruta de las PI3 Kinasas muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con los antagonistas de los receptores

NK1, se tomaron células tumorales humanas primarias procedentes de tumores de pacientes, se comprobó que presentaban receptor NK1 mediante técnicas de western-blot e inmunohistoquímica y que no presentaban mutaciones en K-ras (forma “wild type”). Posteriormente se pusieron en cultivo en presencia con diversos antagonistas de los receptores NK1. Los distintos tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 22.

Las células tumorales fueron recolectadas de muestras de cánceres primarios humanos tomadas de pacientes voluntarios, se determinó la presencia de receptor NK1 mediante técnicas de Western-Blot e inmunohistoquímica y fueron cultivadas según se explica en el ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, como Aprepitant, Casopitant, Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. Se comprobó en todos los casos que no existía mutación en Kras, según el método explicado en el Ejemplo 2. En cada caso se determinó la presencia o no del efector “aguas abajo” de la ruta de las PI3 Kinasas, AKT.

Para determinar la presencia de la proteína AKT en los diferentes cultivos celulares se realizó una técnica de Western Blot (según lo descrito en el ejemplo 1 -apartado Western Blot-), pero utilizando como anticuerpo primario con referencia: Akt (pan) (11E7) Rabbit mAb (4685, Cell Signalling).

Tabla 22. Características de los pacientes de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular y número de casos con ausencia o presencia de la proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	Edad	Número de casos con ausencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	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 cérvix (Carcinoma decélulasescamosas).	8	0/8	36±4	4	4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	Edad	Número de casos con ausencia de AKT	Número de casos con presencia de AKT
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	8	6/2	53±5	4	4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	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 Pleomorfo 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 Hodgking B (Linfoma B difuso).	8	4/4	54±4	4	4
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	8	4/4	33±5	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	28±3	4	4

Se aprecia un aumento de la inhibición de la proliferación celular en los cultivos de células cancerosas que muestran presencia del efector de la ruta de las PI3 Kinasas, AKT. En las Tablas 23 a 26 se aprecia como en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 23), Casopitant (Tabla 24), Vestipitant (Tabla 25) y anticuerpos contra el receptor NK1 -obtenido de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305- (Tabla 26), se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos de células cancerosas que muestran más presencia de AKT. De forma, que en las células cancerosas procedentes de tumores presentan proteína AKT, signo de la activación de la ruta de la PI3 Kinasas en estos tumores, es mayor la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1. En los experimentos reflejados en las Tablas 23 a 25, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se usaron a concentración 100 micromolar. El anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 26) se usó a concentración 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan en porcentaje de variación respecto al control \pm la desviación estándar.

Tabla 23. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con aprepitant, en función de la ausencia o presencia de proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin presencia de AKT	Casos con presencia de AKT
Carcinoma de estómago (Adenocarcinoma).	100	24±6	92±4
Carcinoma de Colon (Adenocarcinoma).	100	25±3	93±3
Carcinoma de Páncreas (Adenocarcinoma).	100	24±4	92±2
Carcinoma Renal (carcinoma renal de células claras)	100	25±3	93±3
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal).	100	26±5	94±4
Carcinoma de Ovario (Adenocarcinoma).	100	27±4	93±3
Carcinoma de endometrio.	100	25±3	95±5
Carcinoma de cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	24±4	94±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	25±3	96±3
Carcinoma de pulmón Carcinoma de células No Pequeñas	100	26±4	94±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	24±3	97±3
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	25±4	92±4
Carcinoma Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	23±5	94±2
Carcinoma de próstata.	100	24±4	97±6
Glioma (astrocitoma)	100	25±5	96±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±4	95±4
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	25±5	94±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	24±6	95±3
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	25±3	93±5
Linfoma de Burkitt	100	26±4	94±4

Tabla 24. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con casopitant, en función de la ausencia o presencia de proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin presencia de AKT	Casos con presencia de AKT
Carcinoma de estómago (Adenocarcinoma).	100	26±5	95±3
Carcinoma de Colon (Adenocarcinoma).	100	24±5	96±4
Carcinoma de Páncreas (Adenocarcinoma)	100	23±4	95±3
Carcinoma Renal carcinoma renal de células claras	100	24±3	96±5
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal)	100	23±4	95±4
Carcinoma de Ovario (Adenocarcinoma).	100	24±3	94±5
Carcinoma de endometrio.	100	23±4	95±46
Carcinoma de cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	24±3	97±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	23±4	96±5
Carcinoma de pulmón Carcinoma de células No Pequeñas	100	25±6	95±4
Carcinoma de tiroides (Carcinoma folicular).	100	24±5	96±5
Carcinoma de tiroides (Carcinoma papilar).	100	26±2	95±4
Carcinoma Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	24±3	94±3
Carcinoma de próstata.	100	23±4	95±3
Glioma (astrocitoma)	100	27±3	96±4
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±3	95±3
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	23±4	94±4
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	24±5	95±5
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	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 función de la ausencia o presencia de proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin presencia de AKT	Casos con presencia de AKT
Carcinoma de estómago (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 Renal carcinoma renal de células claras	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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	25±5	93±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	23±4	94±5
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	24±4	95±5
Carcinoma de próstata.	100	26±3	94±4
Glioma (astrocitoma)	100	23±4	95±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	27±3	94±6
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	25±4	93±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	24±3	95±6
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	25±5	96±5
Linfoma de Burkitt	100	24±4	95±6

Tabla 26. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con anticuerpos contra el receptor NK1, en función de la ausencia o presencia de proteína AKT.

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin presencia de AKT	Casos con presencia de AKT
Carcinoma de estómago (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 Renal carcinoma renal de células claras	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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	23±4	96±5
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	24±5	94±4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	25±5	91±6
Carcinoma de próstata.	100	26±6	90±5
Glioma (astrocitoma)	100	28±4	89±4
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±5	90±3
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	25±3	97±4
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	24±4	95±5
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	25±3	94±4
Linfoma de Burkitt	100	25±2	95±6

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

5 Para comprobar que las células cancerosas que tienen una mayor cantidad de la forma truncada del receptor NK1 muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con los antagonistas de los receptores NK1, se tomaron células tumorales humanas primarias procedentes de tumores de pacientes, se comprobó que presentaban receptor NK1 mediante técnicas de western-blot e inmunohistoquímica. Se determinó la presencia de la forma truncada del receptor NK1 y
10 posteriormente se pusieron en cultivo en presencia con diversos antagonistas de los receptores NK1. Los distintos tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 26.

Las células tumorales fueron recolectadas de muestras de cánceres primarios humanos tomadas de pacientes voluntarios, se determinó la presencia de receptor NK1 mediante técnicas de Western-Blot e
15 inmunohistoquímica y fueron cultivadas según se explica en el Ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, 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 expresión de la forma truncada de del gen del receptor NK1 se realizó una técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La extracción de RNA, amplificaciones de PCR, condiciones de ciclo y el análisis cuantitativo fueron realizaron como se ha descrito previamente. Los cebadores –“primers”- específicos fueron las siguientes: Para el receptor NK1R de longitud completa –“full lengt”- (NM_001058.3; adelante -“forward” (SEQ ID N. 17)-: 5'-AACCCCATCATCTACTGCTGC-3 ' y reverso -“reverse”- (SEQ ID NO. 18): 5'-
25 ATTTCCAGCCCCTCATAGTCG-3 ') y para el receptor NK1 truncado (NM_015727.2; adelante -“forward” (SEQ ID NO. 19): 5'-GGGCCACAAGACCATCTACA-3 'y reverso -“reverse” (SEQ ID NO. 20): 5'-AAGTTAGCTGCAGTCCCCAC-3 ').

Los casos se distribuyeron en dos grupos:

- 30 • 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 era menor del doble de la expresión de la forma de longitud completa de dicho
- 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 era mayor del doble de la expresión
35 de la forma de longitud completa de dicho receptor.

Tabla 27. Características de los pacientes de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular 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).

5

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	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 estómago (Adenocarcinoma).	8	4/4	50±4	4	4
Carcinoma de Colon (Adenocarcinoma).	8	4/4	53±3	4	4
Carcinoma de Páncreas (Adenocarcinoma).	8	3/5	55±4	4	4
Carcinoma Renal (carcinoma renal 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 cérvix (Carcinoma decélulasescamosas).	8	0/8	33±4	4	4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	8	5/3	54±5	4	4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	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 Pleomorfo Indiferenciado(Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	8	5/3	62±3	4	4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	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)
Melanoma (Melanoma Nodular).	8	3/5	54±3	4	4
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	8	4/4	55±4	4	4
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	8	4/4	32±5	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	22±3	4	4

Se aprecia un aumento de la inhibición de la proliferación celular en los cultivos de células cancerosas que muestran una alta expresión de la forma truncada del receptor NK1. En las Tablas 28 a 31 se aprecia como en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 28), Casopitant (Tabla 29), Vestipitant (Tabla 30) y anticuerpos contra el receptor NK1 -obtenido de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305- (Tabla 31), se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos de células cancerosas que muestran más expresión de la forma truncada del receptor NK1. De forma, que en las células cancerosas procedentes de tumores presentan una alta expresión de la forma truncada del receptor NK1, signo de la activación de la ruta de la PI3 Kinasas en estos tumores, es mayor la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1. En los experimentos reflejados en las Tablas 28 a 30, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se usaron a concentración 100 micromolar. El anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 31) se usó a concentración 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan en porcentaje de variación respecto al control \pm la desviación estándar.

Tabla 28. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con aprepitant, en función 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).

5

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 estómago (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 Renal (carcinoma renal 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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	26±5	94±4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	24±4	96±3
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	25±6	95±4
Carcinoma de próstata.	100	24±6	94±5
Glioma (astrocitoma)	100	27±5	95±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	27±6	96±6
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	25±7	96±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	23±4	97±7
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	26±5	98±6
Linfoma de Burkitt	100	27±6	99±5

Tabla 29. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con casopitant, en función 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 de estómago (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 Renal (carcinoma renal 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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	25±5	93±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	24±5	94±5
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	25±4	95±7
Carcinoma de próstata.	100	23±6	94±4
Glioma (astrocitoma)	100	24±5	95±7
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±4	94±5
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	23±5	96±6
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	24±3	97±4
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	23±4	98±3
Linfoma de Burkitt	100	24±5	93±3

Tabla 30. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con vestipitant, en función 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 de estómago (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 Renal (carcinoma renal 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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	24±5	96±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	25±5	95±6
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	25±4	94±5
Carcinoma de próstata.	100	24±6	95±6
Glioma (astrocitoma)	100	25±5	94±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±4	95±3
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	24±5	96±4
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	23±5	98±5
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	23±4	98±4
Linfoma de Burkitt	100	24±5	93±5

Tabla 31. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con anticuerpo contra el receptor NK1, en función 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 de estómago (Adenocarcinoma).	100	22±4	96±4
Carcinoma de Colon (Adenocarcinoma).	100	24±3	94±3
Carcinoma de Páncreas (Adenocarcinoma).	100	23±4	95±4
Carcinoma Renal (carcinoma renal 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 cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	24±5	95±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	25±5	96±6
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	26±4	96±5
Carcinoma de próstata.	100	27±6	95±6
Glioma (astrocitoma)	100	24±5	96±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±4	95±3
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	26±5	96±4
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	24±5	95±5
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	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 el receptor NK1 muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con antagonistas de los receptores NK1.

5 Para comprobar que las células cancerosas que tienen amplificación a nivel del gen que codifica el receptor NK1 muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con los antagonistas de los receptores NK1, se tomaron células tumorales humanas primarias procedentes de tumores de pacientes, se comprobó que presentaban receptor NK1 mediante técnicas de western-blot e inmunohistoquímica. Se determinó la presencia o no de amplificación del gen que codifica el receptor
10 NK1 y posteriormente se pusieron en cultivo en presencia con diversos antagonistas de los receptores NK1. Los distintos tumores y las características de los pacientes se muestran en la Tabla 32.

Las células tumorales fueron recolectadas de muestras de cánceres primarios humanos tomadas de pacientes voluntarios, se determinó la presencia de receptor NK1 mediante técnicas de Western-Blot e
15 inmunohistoquímica y fueron cultivadas según se explica en el ejemplo 1, en presencia de diversos antagonistas del receptor NK1, como Aprepitant, Casopitant, Vestipitant y un anticuerpo contra dicho receptor. En cada caso se determinó la presencia o no de amplificación a nivel del gen que codifica el receptor NK1.

20 Para determinar la presencia de amplificación (aumento en el número de copias) del gen que codifica el receptor NK1 (TAC1R) se utilizó una técnica de Hibridación Genómica Comparada (CGH Array). En primer lugar se realizó una extracción de ADN genómico de cada uno de los casos. Posteriormente se realizó un marcaje e hibridación del ADN de cada una de las muestras junto con ADN de una referencia comercial sin alteraciones genómicas (de sexo masculino o femenino según el sexo del
25 paciente del que se obtuvieron las muestras). El Array utilizado es el Sureprint G3 Human CGH Microarray obtenido de la empresa Agilent, con una separación media entre sondas de 5,3Kb y 4,6Kb para los genes RefSeq. La lectura del microarray se realizó con el DNA Microarray Scanner G2565CA de Agilent a una resolución de 3 µm. El análisis de los resultados se realizó con el software Cytogenomics v 2.0.6.0 de Agilent con ADM-2: 6.0; Centralización: ON (Threshold: 6.0, Bin size:
30 10); Fuzzy zero: ON; Aberration filters: ON (minProbes=5 and minAvgAbsLopRatio= 0,5); Feature Level Filters:ON. Las coordenadas genómicas se corresponden con el genoma NCBI36 (hg18). Los casos se distribuyeron en dos grupos: Grupo I para aquellos casos sin amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (locus 2p13.1-p12) y Grupo II para aquellos casos con amplificación del gen que codifica para el receptor NK1 (locus 2p13.1-p12).

35

Tabla 32. Características de los pacientes de los que se obtuvieron muestras para el cultivo celular y número de casos del Grupo I sin amplificación del gen que codifica del receptor NK1 (locus 2p13.1-p12) y del Grupo II con amplificación del gen que codifica del 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 el receptor NK1.	Número de casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal 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 cérvix (Carcinoma decélulasescamosas).	8	0/8	33±4	4	4
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	8	5/3	53±5	4	4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	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 Pleomorfo 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 Hodgking B	8	4/4	55±4	4	4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Número de casos	Sexo (Hombres /Mujeres)	Edad	Número de casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Número de casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
(Linfoma B difuso).					
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	8	4/4	32±5	4	4
Linfoma de Burkitt	8	4/4	22±3	4	4

Se aprecia un aumento de la inhibición de la proliferación celular en los cultivos de células cancerosas que muestran amplificación del gen que codifica el recepto del NK1. En las Tablas 33 a 36 se aprecia cómo en cultivos tratados con Aprepitant (Tabla 33), Casopitant (Tabla 34), Vestipitant (Tabla 35) y anticuerpos contra el receptor NK1 -obtenido de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8305- (Tabla 36), se produce una mayor inhibición de la proliferación celular en aquellos cultivos de células cancerosas que muestran amplificación de la región genómica que codifica el receptor NK1. De forma, que en las células cancerosas procedentes de tumores que presentan amplificación en la región genómica que codifica el receptor NK1, es mayor (más efectiva) la respuesta al tratamiento con antagonistas del receptor NK1. En los experimentos reflejados en las Tablas 33 a 35, Aprepitant, Casopitant y Vestipitant se usaron a concentración 100 micromolar. El anticuerpo contra el receptor NK1 (Tabla 36) se usó a concentración 1/50. Los porcentajes de inhibición se expresan en porcentaje de variación respecto al control \pm la desviación estándar.

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

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	100	26±3	97±7
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal).	100	24±4	99±4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de Ovario (Adenocarcinoma).	100	23±6	92±5
Carcinoma de endometrio.	100	24±5	94±5
Carcinoma de cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	25±4	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	26±5	93±4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	23±4	97±3
Carcinoma de próstata.	100	25±4	94±6
Glioma (astrocitoma)	100	25±5	95±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	26±7	96±4
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	24±4	97±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	25±5	93±6
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	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 función de la ausencia de amplificación del gen que codifica el receptor NK1 (Grupo I) o la presencia de amplificación a nivel del gen que codifica el receptor NK1 (Grupo II).

5

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	100	27±7	93±6
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal).	100	23±8	94±7

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de Ovario (Adenocarcinoma).	100	24±5	95±4
Carcinoma de endometrio.	100	24±4	96±5
Carcinoma de cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	23±6	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	24±4	95±4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	26±4	97±3
Carcinoma de próstata.	100	27±5	96±5
Glioma (astrocitoma)	100	24±6	95±4
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±7	96±6
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	26±4	97±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	27±5	95±7
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	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 función de la ausencia de amplificación del gen que codifica el receptor NK1 (Grupo I) o la presencia de amplificación a nivel del gen que codifica el receptor NK1 (Grupo II).

5

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	100	27±4	94±5
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal).	100	24±3	94±6

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de Ovario (Adenocarcinoma).	100	25±4	96±5
Carcinoma de endometrio.	100	23±5	95±5
Carcinoma de cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	26±6	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	25±3	94±4
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	24±5	95±5
Carcinoma de próstata.	100	25±6	96±6
Glioma (astrocitoma)	100	26±5	94±7
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	27±4	95±7
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	24±6	96±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	27±5	94±6
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	29±3	95±4
Linfoma de Burkitt	100	23±5	97±5

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

5

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	100	27±7	97±7
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal).	100	26±5	96±4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Casos sin amplificación del gen que codifica el receptor NK1.	Casos con amplificación del gen que codifica el receptor NK1.
Carcinoma de Ovario (Adenocarcinoma).	100	24±6	95±5
Carcinoma de endometrio.	100	28±4	96±6
Carcinoma de cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	27±3	94±6
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	26±4	95±3
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	24±4	94±5
Carcinoma de próstata.	100	25±3	95±6
Glioma (astrocitoma)	100	25±5	95±5
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	25±6	96±4
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	26±5	97±5
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	26±4	94±4
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	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 de los receptores NK1.

5

Para comprobar que las células cancerosas que presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1 muestran una respuesta más efectiva al tratamiento con los antagonistas de los receptores NK1, se tomaron células tumorales humanas primarias procedentes de tumores de pacientes, se comprobó que presentaban receptor NK1 mediante técnicas de western-blot e inmunohistoquímica. Se determinó el aumento de proliferación o no con la exposición a la sustancia P (agonista del receptor NK1), de forma que los cultivos celulares que crecían independientemente de la exposición a la sustancia P, se consideró que tenían formas constitutivamente activadas de dicho receptor, ya que se transmitía una señal mitogénica independientemente de la presencia del agonista.

10

Se comprobó que todas las células tumorales presentaban integridad de las rutas de las MAP Kinasas y de las PI3 Kinasas, así como del gen K-ras y la proteína derivada de él.

Las células tumorales fueron recolectadas de muestras de cánceres primarios humanos tomadas de pacientes voluntarios, se determinó la presencia de receptor NK1 mediante técnicas de Western-Blot e inmunohistoquímica y fueron cultivadas según se explica en el Ejemplo 1, en presencia del agonista sustancia P. El grupo I estaba constituido por células con escasa respuesta proliferativa ante la exposición a la sustancia P (receptor constitutivamente activado, independientemente de la unión al agonista) y el grupo II estaba constituido por células con mayor respuesta proliferativa ante la exposición al agonista de dicho receptor sustancia P (receptor con respuesta normal al estímulo con el agonista).

En la Tabla 37 se aprecia cómo se produce una mayor inhibición del crecimiento con el tratamiento con el antagonista Aprepitant, de las células tumorales cancerosas en el grupo con escasa respuesta proliferativa ante la exposición a la sustancia P (con presencia de la forma constitucionalmente activada del receptor NK1). Se pueden observar resultados similares con Vestipitant, Casopitant, Vofopitant, Ezlopitant, Lanepitant. También se observan resultados similares con el tratamiento con anticuerpos contra el receptor NK1.

Tabla 37. Porcentaje de inhibición de los cultivos celulares tratados con el antagonista Aprepitant en función de la presencia de forma constitucionalmente activada del receptor NK1 (Grupo I) o la presencia de de forma normofuncionante del receptor (Grupo II).

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grupo I	Grupo II
Carcinoma de estómago (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 Renal (carcinoma renal de células claras)	100	76±6	97±6
Carcinoma de mama (Adenocarcinoma ductal).	100	75±6	96±4
Carcinoma de Ovario (Adenocarcinoma).	100	77±7	97±5
Carcinoma de endometrio.	100	78±6	95±3
Carcinoma de cérvix (Carcinoma de células escamosas).	100	77±7	94±4

Tipo de tumor (tipo histológico).	Control	Grupo I	Grupo II
Carcinoma de pulmón (Carcinoma de células Pequeñas)	100	78±5	93±3
Carcinoma de pulmón Carcinoma 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 Vejiga de la Orina (Carcinoma transicional).	100	76±5	93±4
Carcinoma de próstata.	100	77±6	95±5
Glioma (astrocitoma)	100	73±7	96±3
Sarcoma Pleomorfo Indiferenciado (Histiocitoma fibroso maligno grado 3).	100	75±6	92±5
Melanoma (Melanoma Nodular).	100	74±4	94±4
Linfoma No Hodgking B (Linfoma B difuso).	100	74±6	93±3
Linfoma No Hodgkin T (Linfoma T difuso).	100	75±6	96±4
Linfoma de Burkitt	100	74±6	97±5

BIBLIOGRAFIA

- 5 • Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol.* 2005 Sep;23(9):1147-57.
- Barker R. Tachykinins, neurotrophism and neurodegenerative diseases: a critical review on the possible role of tachykinins in the aetiology of CNS diseases. *Neurosci. Res.*, 1996, 7, 187-214.
- 10 • Bigioni M, Benzo A, Irrissuto C, Maggi CA, Goso C. Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs.* 2005;16(10):1083-9.
- Bunn PA Jr, Chan D, Stewart J, Gera L, Tolley R, Jewett P, Tagawa M, Alford C, Mochzuki T, Yanaihara N. Effects of neuropeptide analogues on calcium flux and proliferation in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 1994;54(13):3602-10.
- 15 • De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1928-42.
- Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboüé R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by
20 Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer.* 2007 Apr 23;96(8):1166-9
- Doi T, Kamo I, Imai S, Okanishi S, Ishimaru T, Ikeura Y, Natsugari H. Effects of TAK- 637, a tachykinin receptor antagonist, on lower urinary tract function in the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 1999;383(3):297-303.
- Giardina GA, Gagliardi S, Martinelli M. Antagonists at the neurokinin receptors- Recent
25 patent literature. *IDrugs.* 2003; 6(8):758-72.
- Gillespie E, Leeman SE, Watts LA, Coukos JA, O'Brien MJ, Cerda SR, Farraye FA, Stucchi AF, Becker JM. Truncated neurokinin-1 receptor is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Oct 18;108(42):17420-5.
- 30 • Huang SC, Korlipara VL. Neurokinin-1 receptor antagonists: a comprehensive patent survey. *Expert Opin Ther Pat.* 2010 Aug;20(8):1019-45. Review.)
- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snavely D, Wyatt-Knowles E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swain CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti F, Scolnick EM, Cascieri MA, Chicchi GG, Sadowski S, Williams AR, Hewson L,

- Smith D, Carlson EJ, Hargreaves RJ, Rupniak NM. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*. 1998. 11;281(5383):1640-5.
- Maggi CA, Patacchini R, Rovero R, Giachetti A. Tachykinin Receptor and Tachykinin Receptor Antagonist. *Journal of Autonomic Pharmacology*. 1993 (13):23-93.
 - 5 • Muñoz M, González-Ortega A, Rosso M, Robles-Frias MJ, Carranza A, Salinas-Martín MV, Coveñas R. The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: Focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. *Peptides*. 2012 Dec;38(2):318-25.
 - Muñoz M, Rosso M, Robles-Frias MJ, Salinas-Martín MV, Rosso R, González-Ortega A, Coveñas R. The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist Aprepitant on melanoma cell lines. *Lab Invest*. 2010; 90(8):1259-69
 - 10 • Orosz A, Schrett J, Nagy J, Bartha L, Schön I, Nyéki O. New short-chain analogs of a substance-P antagonist inhibit proliferation of human small-cell lung-cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer*. 1995;60(1):82-7.
 - 15 • Palma C, Maggi CA. The role of tachykinins via NK1 receptors in progression of human gliomas. *Life Sci*. 2000;67(9):985-1001.
 - Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides*. 1998;32(1):1-49.
 - Rosso M, Robles-Frías MJ, Coveñas R, Salinas-Martín MV, Muñoz M. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol*. 2008;29(4):245-54.
 - 20 • Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascón P, Maloof PB, Mosenthal A, Rameshwar P. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):388-93.
 - 25

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método *in vitro* para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano al tratamiento con un antagonista del receptor NK1, en el que el sujeto padece un cáncer, que comprende usar, como un
5 indicador, los niveles de expresión del receptor NK1.
- 2.-El método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que se usa como indicador la expresión del receptor NK1, o del ARNm que codifica para el receptor NK1.
- 10 3.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprendedetectar los niveles de expresión del receptor NK1 o del ARNm que codifica para el receptor NK1 en una muestra aislada que comprende células tumorales de un sujeto humano que padece un cáncer.
- 4.- El método *in vitro* según la reivindicación 3, en el que el resultado es indicativo de una respuesta
15 positiva si los niveles de expresión del receptor NK1, o del ARNm que codifica para el receptor NK1, están sobreexpresados en comparación con una muestra de referencia y/o un control que expresa unos niveles indicativos de falta de respuesta.
- 5.- El método *in vitro* según la reivindicación 4, en el que la sobreexpresión se define como un nivel
20 de expresión del receptor NK1, o del ARNm que codifica para el receptor NK1, aumentado en más del 20% de las células de la muestra biológica aislada.
- 6.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en el que la sobreexpresión se define como un nivel de expresión del receptor NK1, o del ARNm que codifica para el receptor NK1,
25 aumentado en más del:
- a) 30%
 - b) 40%
 - c) 50%
 - d) 60%
 - 30 e) 70%, o del
 - f) 80%
- de las células de la muestra biológica aislada.
- 7.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que además se determina la
35 presencia o no de mutaciones en el gen K-ras en las células tumorales de la muestra aislada, siendo el

resultado indicativo de una respuesta positiva si las células cancerosas no presentan mutación en el gen K-ras.

8.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que además se determina la presencia o no de la proteína ERK en las células tumorales de la muestra aislada, siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva si las células cancerosas presentan la proteína ERK o el ARNm que la codifica.

9.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que además se determina la presencia o no de la proteína MEK en las células tumorales de la muestra aislada, siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva si las células cancerosas presentan la proteína MEK o el ARNm que la codifica.

10.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en el que además se determina la presencia o no de la proteína AKT en las células tumorales de la muestra aislada, siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva si las células cancerosas presentan la proteína AKT o el ARNm que la codifica.

11.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en el que además se determina la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1 en las células tumorales de la muestra aislada, siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva si las células cancerosas presentan la forma truncada del receptor NK1.

12.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3-11, en el que además se determina si las células tumorales de la muestra aislada presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1, siendo el resultado indicativo de una respuesta positiva si las células cancerosas presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1.

13.- El método *in vitro* según la reivindicación anterior, donde la determinación de si las células tumorales de la muestra aislada presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1 o no, se realiza exponiendo las células a la sustancia P, considerando que las células presentan una forma constitutivamente activada del receptor NK1 si presentan escasa respuesta proliferativa ante la exposición a la sustancia P.

14. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección

a. de los niveles de expresión del receptor NK1, o del ARNm que codifica para el receptor NK1, o

b. de la presencia o no de mutaciones en el gen *K-ras*,

c. de la presencia de la proteína ERK, o del ARNm que la codifica,

5 d. de la presencia de la proteína MEK, o del ARNm que la codifica,

e. de la presencia de la proteína AKT, o del ARNm que la codifica, o

f. de la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1,

se realiza por

i. un procedimiento de perfil genético, tal como una micromatriz, y/o

10 ii. un procedimiento que comprende PCR, tal como una PCR en tiempo real;

y/o

iii. transferencia Northern, y/o

iv. un procedimiento inmunohistoquímico.

15 15.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3-14, en el que la muestra biológica aislada es un tejido reciente, tejido embebido en parafina o ARN extraído de un tejido de un paciente con cáncer.

20 16.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3-15, que se lleva a cabo *in vitro* usando una muestra aislada originaria del sujeto humano, y en el que en el momento de tomar la muestra del sujeto humano, el sujeto humano no ha sido tratado con un antagonista del receptor NK1.

25 17.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de los niveles de expresión de los genes se realiza mediante Q-RT-PCR.

18.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección de los niveles de proteínas NK1, ERK, MEK, AKT y/o el receptor truncado de NK1, se realiza mediante técnicas inmunológicas.

30 19.- El método según la reivindicación 18, donde las técnicas inmunológicas están basadas en reacciones de precipitación, basadas en reacciones de aglutinación, inmunomarcación, radioinmunoanálisis y técnicas radioinmunométricas, ELISA (*Enzyme Linked Immunoassorbent Assay*), o en cualquiera de sus combinaciones.

20.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 18-19, donde las técnicas inmunológicas comprenden el inmunomarcaje.

21.- El método *in vitro* según la reivindicación 20, donde el inmunomarcaje se selecciona de entre
5 inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a enzimas, inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a fluorocromos, o citometría.

22.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que el cáncer se selecciona de entre los siguientes: carcinoma gástrico, preferentemente adenocarcinoma gástrico; carcinoma de
10 colon, preferentemente adenocarcinoma de colon; carcinoma de páncreas, preferentemente adenocarcinoma de páncreas; carcinoma renal, preferentemente carcinoma renal de células claras; carcinoma de mama, preferentemente adenocarcinoma de mama; carcinoma de ovario, preferentemente adenocarcinoma de ovario; carcinoma de endometrio; carcinoma de cérvix uterino; carcinoma de pulmón, preferentemente carcinoma de pulmón de célula no pequeña y/o carcinoma de
15 pulmón de células pequeñas; carcinoma de tiroides, preferentemente carcinoma de tiroides papilar y/o carcinoma folicular de tiroides; carcinoma de vejiga, preferentemente carcinoma transicional de vejiga de la orina; carcinoma de próstata; cáncer de estirpe glial del sistema nervioso central (glioma); sarcomas, preferentemente fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno y sarcoma de Edwing; melanoma; cánceres embrionarios, preferentemente neuroblastoma; y cánceres hematológicos,
20 preferentemente leucemias de estirpe B o de estirpe T, linfomas no Hodgkin, preferentemente de estirpe B o de estirpe T, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple.

23.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1-22, donde los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas no peptídicos.

24.- El método *in vitro* según la reivindicación 23, donde los antagonistas no peptídicos se seleccionan de 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
30 cualquiera de sus combinaciones.

25.- El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1-22, donde los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas peptídicos.

26.- El método *in vitro* según la reivindicación 25, donde los antagonistas peptídicos se seleccionan de entre anticuerpos o fragmentos de los mismos, dirigidos contra el receptor NK1.

27.- Un método *in vitro* para clasificar un sujeto humano que padece de cáncer en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los sujetos identificables mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-26, y en el que el grupo 2 representa el resto de sujetos.

28.- El uso de una composición farmacéutica que comprende un antagonista del receptor NK1 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano del grupo 1 identificable mediante el método *in vitro* de la reivindicación 27.

29.- El uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 28, donde los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas no peptídicos.

30.- El uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 29, donde los antagonistas no peptídicos se seleccionan de 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 cualquiera de sus combinaciones.

31.- El uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 28, donde los antagonistas del receptor NK1 son antagonistas peptídicos.

32.- El uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 31, donde los antagonistas peptídicos se seleccionan de entre anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos contra el receptor NK1.

33.- Un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para analizar:

- a) el nivel de expresión del receptor NK1,
- b) la presencia de mutación en el gen *K-ras*,
- c) el nivel de expresión de la proteína ERK,
- d) el nivel de expresión de la proteína AKT,
- e) la presencia o no de la forma truncada del receptor NK1,
- f) la presencia del receptor NK1 constitutivamente activado

en las células cancerosas de la muestra biológica según se definen en el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-27.

5 34.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende al menos un anticuerpo que se selecciona de entre:

- a) un anticuerpo anti-NK1,
- b) un anticuerpo anti-ERK,
- c) un anticuerpo anti-MEK y/o
- d) un anticuerpo anti- AKT.

10

35.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 33-34, donde el anticuerpo es monoclonal.

15

36.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 33-35, donde el anticuerpo se encuentra marcado con un fluorocromo.

20

37.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, donde el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende: Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, aloficocianina, o cualquiera de sus combinaciones.

38.- El uso del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 33-37, para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano a un antagonista del receptor NK1, en el que el sujeto padece un cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Servicio Andaluz de Salud (SAS)

<120> Método para predecir o pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece un cáncer al tratamiento con un antagonista del receptor NK1

<130> P-06160

<160> 20

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 321

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NK1

<400> 1

Val Val Asn Phe Thr Tyr Ala Val His Asn Glu Trp Tyr Tyr Gly Leu

1 5 10 15

Phe Tyr Cys Lys Phe His Asn Phe Phe Pro Ile Ala Ala Val Phe Ala

20 25 30

Ser Ile Tyr Ser Met Thr Ala Val Ala Phe Asp Arg Tyr Met Ala Ile

35 40 45

ES 2 493 693 B1

Ile	His	Pro	Leu	Gln	Pro	Arg	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Thr	Lys	Val	Val
50						55							60		
Ile	Cys	Val	Ile	Trp	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Pro	Gln	Gly
65					70					75				80	
Tyr	Tyr	Ser	Thr	Thr	Glu	Thr	Met	Pro	Ser	Arg	Val	Val	Cys	Met	Ile
				85				90					95		
Glu	Trp	Pro	Glu	His	Pro	Asn	Lys	Ile	Tyr	Glu	Lys	Val	Tyr	His	Ile
			100					105					110		
Cys	Val	Thr	Val	Leu	Ile	Tyr	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Ile	Gly	Tyr
			115					120					125		
Ala	Tyr	Thr	Val	Val	Gly	Ile	Thr	Leu	Trp	Ala	Ser	Glu	Ile	Pro	Gly
			130					135					140		
Asp	Ser	Ser	Asp	Arg	Tyr	His	Glu	Gln	Val	Ser	Ala	Lys	Arg	Lys	Val
145					150					155				160	
Val	Lys	Met	Met	Ile	Val	Val	Val	Cys	Thr	Phe	Ala	Ile	Cys	Trp	Leu
				165						170				175	
Pro	Phe	His	Ile	Phe	Phe	Leu	Leu	Pro	Tyr	Ile	Asn	Pro	Asp	Leu	Tyr
			180							185				190	
Leu	Lys	Lys	Phe	Ile	Gln	Gln	Val	Tyr	Leu	Ala	Ile	Met	Trp	Leu	Ala
			195					200					205		
Met	Ser	Ser	Thr	Met	Tyr	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Cys	Cys	Leu	Asn	Asp
			210					215					220		
Arg	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Lys	His	Ala	Phe	Arg	Cys	Cys	Pro	Phe	Ile
225					230					235				240	
Ser	Ala	Gly	Asp	Tyr	Glu	Gly	Leu	Glu	Met	Lys	Ser	Thr	Arg	Tyr	Leu
				245						250				255	
Gln	Thr	Gln	Gly	Ser	Val	Tyr	Lys	Val	Ser	Arg	Leu	Glu	Thr	Thr	Ile
			260							265				270	

ES 2 493 693 B1

Ser Thr Val Val Gly Ala His Glu Glu Glu Pro Glu Asp Gly Pro Lys
 275 280 285
 Ala Thr Pro Ser Ser Leu Asp Leu Thr Ser Asn Cys Ser Ser Arg Ser
 290 295 300
 Asp Ser Lys Thr Met Thr Glu Ser Phe Ser Phe Ser Ser Asn Val Leu
 305 310 315 320
 Ser

<210> 2

<211> 1732

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..1732

<223> /organism="Homo sapiens"

/note="NK1"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 2

agctgagcaa cccgaaccga gaggtgcccg cgaaactgca ggcggcggca gcggcagcaa
 60

aagagaagga aaaatctcca gctggatacg aagctccaga atcctggcca taggctcaga
 120

ES 2 493 693 B1

acttttacag gtcgctgc aatgggcccc cacttcgctc ctaagtcctc acgcagcaca
180

gggctttgcc tttccctgcg gaggaaggag aaataggagt tgcaggcagc agcaggtgca
240

taaatgcggg ggatctcttg cttcctagaa ctgtgaccgg tggaatttct ttcctttttt
300

cagtttacgg caagagagat gctgtctcca gacttctgaa ctcaaacgtc tcctgaagct
360

tgaaagtgga ggaattcaga gccaccgcgg gcaggcgggc agtgcattcca gaagcgttta
420

tattctgagc gccagttcag ctttcaaaaa gagtgctgcc cagaaaaagc cttccaccct
480

cctgtctggc tttagaagga ccctgagccc caggcgccag ccacaggact ctgctgcaga
540

ggggggttgt gtacagatag tagggcttta cgcctagct tcgaaatgga taacgtcctc
600

ccggtggact cagacctctc cccaacatc tccactaaca cctcggaacc caatcagttc
660

gtgcaaccag cctggcaaatt tgtcctttgg gcagctgcct acacgggtcat tgtggtgacc
720

tctgtgggtg gcaacgtggg agtgatgtgg atcatcttag ccacaaaaag aatgaggaca
780

ES 2 493 693 B1

gtgacgaact attttctggg gaacctggcc ttcgcggagg cctccatggc tgcattcaat
840

acagtgggtga acttcaccta tgctgtccac aacgaatggg actacggcct gttctactgc
900

aagttccaca acttctttcc catcgccgct gtcttcgcca gtatctactc catgacggct
960

gtggcctttg ataggtacat ggccatcata catcccctcc agccccggct gtcagccaca
1020

gccaccaaag tggatcatctg tgcacatctgg gtcctggctc tcctgctggc cttccccag
1080

ggctactact caaccacaga gaccatgccc agcagagtcg tgtgcatgat cgaatggcca
1140

gagcatccga acaagattta tgagaaagtg taccacatct gtgtgactgt gctgatctac
1200

ttcttcccc tgctggatgat tggctatgca tacaccgtag tgggaatcac actatgggcc
1260

agtgagatcc ccggggactc ctctgaccgc taccacgagc aagtctctgc caagcgcaag
1320

gtgggtcaaaa tgatgattgt cgtgggtgtgc accttcgcca tctgctggct gcccttcac
1380

atcttcttcc tcctgcccta catcaacca gatctctacc tgaagaagtt tatccagcag
1440

ES 2 493 693 B1

gtctacctgg ccatcatgtg gctggccatg agctccacca tgtacaaccc catcatctac
1500

tgctgcctca atgacaggtg aggatcccaa ccccatgagc tctccagggg ccacaagacc
1560

atctacatac acagtggcca agcggccatc ctaaagagt aaaccagct gtgagacaag
1620

agggacaagt ggggactgca gctaacttat catcacacaa ctcagcctgg ctgattatca
1680

ccatccagga atgggagccc ggagtggact gattttcttt ttttcttttc ca
1732

<210> 3

<211> 366

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ERK1

<400> 3

Pro Arg Arg Thr Glu Gly Val Gly Pro Gly Val Pro Gly Glu Val Glu

1 5 10 15

Met Val Lys Gly Gln Pro Phe Asp Val Gly Pro Arg Tyr Thr Gln Leu

20 25 30

Gln Tyr Ile Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Met Val Ser Ser Ala Tyr Asp

ES 2 493 693 B1

35	40	45
His Val Arg Lys Thr Arg	Val Ala Ile Lys Lys	Ile Ser Pro Phe Glu
50	55	60
His Gln Thr Tyr Cys Gln	Arg Thr Leu Arg Glu	Ile Gln Ile Leu Leu
65	70	75
Arg Phe Arg His Glu Asn	Val Ile Gly Ile Arg	Asp Ile Leu Arg Ala
85	90	95
Ser Thr Leu Glu Ala Met	Arg Asp Val Tyr Ile	Val Gln Asp Leu Met
100	105	110
Glu Thr Asp Leu Tyr Lys	Leu Leu Lys Ser Gln	Gln Leu Ser Asn Asp
115	120	125
His Ile Cys Tyr Phe Leu	Tyr Gln Ile Leu Arg	Gly Leu Lys Tyr Ile
130	135	140
His Ser Ala Asn Val Leu	His Arg Asp Leu Lys	Pro Ser Asn Leu Leu
145	150	155
Ile Asn Thr Thr Cys Asp	Leu Lys Ile Cys Asp	Phe Gly Leu Ala Arg
165	170	175
Ile Ala Asp Pro Glu His	Asp His Thr Gly Phe	Leu Thr Glu Tyr Val
180	185	190
Ala Thr Arg Trp Tyr Arg	Ala Pro Glu Ile Met	Leu Asn Ser Lys Gly
195	200	205
Tyr Thr Lys Ser Ile Asp	Ile Trp Ser Val Gly	Cys Ile Leu Ala Glu
210	215	220
Met Leu Ser Asn Arg Pro	Ile Phe Pro Gly Lys	His Tyr Leu Asp Gln
225	230	235
Leu Asn His Ile Leu Gly	Ile Leu Gly Ser Pro	Ser Gln Glu Asp Leu
245	250	255
Asn Cys Ile Ile Asn Met	Lys Ala Arg Asn Tyr	Leu Gln Ser Leu Pro

ES 2 493 693 B1

260 265 270
 Ser Lys Thr Lys Val Ala Trp Ala Lys Leu Phe Pro Lys Ser Asp Ser
 275 280 285
 Lys Ala Leu Asp Leu Leu Asp Arg Met Leu Thr Phe Asn Pro Asn Lys
 290 295 300
 Arg Ile Thr Val Glu Glu Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Tyr Asp Pro Thr Asp Glu Pro Val Ala Glu Glu Pro Phe Thr Phe Ala
 325 330 335
 Met Glu Leu Asp Asp Leu Pro Lys Glu Arg Leu Lys Glu Leu Ile Phe
 340 345 350
 Gln Glu Thr Ala Arg Phe Gln Pro Gly Val Leu Glu Ala Pro
 355 360 365

<210> 4

<211> 1745

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..1745

<223> /organism="Homo sapiens"

/note="ERK1"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 4

ccccgtagaa ccgaggggggt gggcccgggg gtcccggggg aggtggagat ggtgaagggg
 60

ES 2 493 693 B1

cagccgttcg acgtgggccc gcgctacacg cagttgcagt acatcggcga gggcgcgtac
120

ggcatgggtca gctcggccta tgaccacgtg cgcaagactc gcgtggccat caagaagatc
180

agcccccttcg aacatcagac ctactgccag cgcacgctcc gggagatcca gatacctgctg
240

cgcttccgcc atgagaatgt catcggcatc cgagacattc tgcgggcgtc caccctggaa
300

gccatgagag atgtctacat tgtgcaggac ctgatggaga ctgacctgta caagttgctg
360

aaaagccagc agctgagcaa tgaccatatt tgctacttcc tctaccagat cctgcggggc
420

ctcaagtaca tccactccgc caacgtgctc caccgagatc taaagccctc caacctgctc
480

atcaacacca cctgcgacct taagatttgt gatttcggcc tggcccggat tgccgatcct
540

gagcatgacc acaccggctt cctgacggag tatgtggcta cgcgctggta ccgggccccca
600

gagatcatgc tgaactccaa gggctatacc aagtccatcg acatctggctc tgtgggctgc
660

attctggctg agatgctctc taaccggccc atcttcctg gcaagcacta cctggatcag
720

ctcaaccaca ttctgggcat cctgggctcc ccatcccagg aggacctgaa ttgtatcatc
780

aacatgaagg cccgaaacta cctacagtct ctgccctcca agaccaaggt ggcttgggcc
840

aagcttttcc ccaagtcaga ctccaaagcc cttgacctgc tggaccggat gttaaccttt
900

aacccaata aacggatcac agtggaggaa gcgctggctc acccctacct ggagcagtac
960

tatgacccga cggatgagcc agtggccgag gagcccttca ctttcgcat ggagctggat
1020

gacctaccta aggagcggct gaaggagctc atcttccagg agacagcacg cttccagccc
1080

ggagtgctgg aggcccccta gccagacag acatctctgc accctggggc ctggacctgc
1140

ctcctgcctg cccctctccc gccagactgt tagaaaatgg aactgtgcc cagcccggac
1200

cttggcagcc caggccgggg tggagcatgg gcctggccac ctctctcctt tgctgaggcc
1260

tccagcttca ggcaggccaa ggcttctcct cccacccgc cctccccacg ggctcggga
1320

cctcaggtgg gcccagttca atctccgct gctgctgctg cgcccttacc ttccccagcg
1380

ES 2 493 693 B1

tcccagtctc tggcagtttt ggaatggaag ggttctggct gcccacacct gctgaagggc
1440

agagggtggag ggtggggggc gctgagtagg gactcacggc catgcctgcc cccctcatct
1500

cattcaaacc ccaccctagt ttccctgaag gaacattcct tagtctcaag ggctagcatc
1560

cctgaggagc caggccgggc cgaatcccct ccctgtcaaa gctgtcactt cgcgtgccct
1620

cgctgcttct gtgtgtggtg agcagaagtg gagctggggg gcgtggagag cccggctgcc
1680

cctgccacct ccctgacccg tctaataat aaatatagag atgtgtctat ggctgaaaaa
1740

aaaaa
1745

<210> 5

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ERK2

ES 2 493 693 B1

<400> 5

Met	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Pro	Glu	Met	Val	Arg	Gly
1				5						10					15
Gln	Val	Phe	Asp	Val	Gly	Pro	Arg	Tyr	Thr	Asn	Leu	Ser	Tyr	Ile	Gly
				20				25						30	
Glu	Gly	Ala	Tyr	Gly	Met	Val	Cys	Ser	Ala	Tyr	Asp	Asn	Val	Asn	Lys
				35				40						45	
Val	Arg	Val	Ala	Ile	Lys	Lys	Ile	Ser	Pro	Phe	Glu	His	Gln	Thr	Tyr
				50				55						60	
Cys	Gln	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Ile	Lys	Ile	Leu	Leu	Arg	Phe	Arg	His
65					70					75					80
Glu	Asn	Ile	Ile	Gly	Ile	Asn	Asp	Ile	Ile	Arg	Ala	Pro	Thr	Ile	Glu
					85					90					95
Gln	Met	Lys	Asp	Val	Tyr	Ile	Val	Gln	Asp	Leu	Met	Glu	Thr	Asp	Leu
				100						105					110
Tyr	Lys	Leu	Leu	Lys	Thr	Gln	His	Leu	Ser	Asn	Asp	His	Ile	Cys	Tyr
				115						120					125
Phe	Leu	Tyr	Gln	Ile	Leu	Arg	Gly	Leu	Lys	Tyr	Ile	His	Ser	Ala	Asn
				130						135					140
Val	Leu	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Ser	Asn	Leu	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr
145					150					155					160
Cys	Asp	Leu	Lys	Ile	Cys	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Val	Ala	Asp	Pro
					165					170					175
Asp	His	Asp	His	Thr	Gly	Phe	Leu	Thr	Glu	Tyr	Val	Ala	Thr	Arg	Trp
				180						185					190
Tyr	Arg	Ala	Pro	Glu	Ile	Met	Leu	Asn	Ser	Lys	Gly	Tyr	Thr	Lys	Ser
				195						200					205
Ile	Asp	Ile	Trp	Ser	Val	Gly	Cys	Ile	Leu	Ala	Glu	Met	Leu	Ser	Asn

ES 2 493 693 B1

210	215	220	
Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His Ile			
225	230	235	240
Leu Gly Ile Leu Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile Ile			
	245	250	255
Asn Leu Lys Ala Arg Asn Tyr Leu Leu Ser Leu Pro His Lys Asn Lys			
	260	265	270
Val Pro Trp Asn Arg Leu Phe Pro Asn Ala Asp Ser Lys Ala Leu Asp			
	275	280	285
Leu Leu Asp Lys Met Leu Thr Phe Asn Pro His Lys Arg Ile Glu Val			
	290	295	300
Glu Gln Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro Ser			
305	310	315	320
Asp Glu Pro Ile Ala Glu Ala Pro Phe Lys Phe Asp Met Glu Leu Asp			
	325	330	335
Asp Leu Pro Lys Glu Lys Leu Lys Glu Leu Ile Phe Glu Glu Thr Ala			
	340	345	350
Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser			
	355	360	

<210> 6

<211> 1611

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..1611

<223> /organism="Homo sapiens"

/note="ERK2"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 6

acataatttc tggagccctg taccaacgtg tggccacata ttctgtcagg aaccctgtgt
60

gatcatggtc tggatctgca acacgggcca ggccaaagtc acagatcttg agatcacagg
120

tgggtgttgag cagcaggcag gcaggcaatc ggtccgagtg gctgtcggct cttcagctct
180

ccgctcggcg tcttccttcc tctcccggtc agcgtcggcg gctgcaccgg cggcgggcag
240

tcctgcggga ggggcgacaa gagctgaggc gcggccgccg agcgtcgagc tcagcgcggc
300

ggaggcggcg gcggccccggc agccaacatg gcggcggcgg cggcggcggg cgcgggccccg
360

gagatgggtcc gcgggcaggt gttcgacgtg gggccgcgct acaccaacct ctcgtacatc
420

ggcgagggcg cctacggcat ggtgtgctct gcttatgata atgtcaacaa agttcgagta
480

gctatcaaga aaatcagccc ctttgagcac cagacctact gccagagaac cctgaggggag
540

ES 2 493 693 B1

ataaaaatct tactgcgctt cagacatgag aacatcattg gaatcaatga cattattcga
600

gcaccaacca tcgagcaaatt gaaagatgta tatatagtag aggacctcat ggaaacagat
660

ctttacaagc tcttgaagac acaacacctc agcaatgacc atatctgcta ttttctctac
720

cagatcctca gagggttaaa atatattccat tcagctaacg ttctgcaccg tgacctcaag
780

ccttccaacc tgctgctcaa caccacctgt gatctcaaga tctgtgactt tggcctggcc
840

cgtgttgtag atccagacca tgatcacaca gggttcctga cagaatatgt ggccacacgt
900

tggtagagg ctccagaaat tatgttgaat tccaagggt acaccaagtc cattgatatt
960

tggctctgtag gctgcattct ggcagaaatg ctttccaaca ggccatctt tccagggaag
1020

cattatcttg accagctgaa tcacattttg ggtattcttg gatcccatc acaagaagac
1080

ctgaattgta taataaattt aaaagctagg aactatttgc tttctcttcc acacaaaaat
1140

aaggtagcat ggaacaggct gttcccaaat gctgactcca aagctctgga cttattggac
1200

ES 2 493 693 B1

aaaatgttga cattcaaccc acacaagagg attgaagtag aacaggctct ggcccaccca
1260

tatctggagc agtattacga cccgagtgac gagcccatcg ccgaagcacc attcaagttc
1320

gacatggaat tggatgactt gcctaaggaa aagctaaaag aactaatttt tgaagagact
1380

gctagattcc agccaggata cagatcttaa atttgtcagg acaagggctc agaggactgg
1440

acgtgctcag acatcgggtg tcttcttccc agttcttgac ccctggtcct gtctccagcc
1500

cgtcttggct tatccacttt gactcctttg agccgtttgg aggggcgggt tctggtagtt
1560

gtggctttta tgctttcaaa gaatttcttc agtccagaga attcactggc c
1611

<210> 7

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> MEK1

<400> 7

ES 2 493 693 B1

Met	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Thr	Pro	Ile	Gln	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ser	Ala	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	Glu	Thr	Asn	Leu	Glu	Ala
				20				25					30		
Leu	Gln	Lys	Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	Gln	Arg	Lys
				35				40					45		
Arg	Leu	Glu	Ala	Phe	Leu	Thr	Gln	Lys	Gln	Lys	Val	Gly	Glu	Leu	Lys
				50				55				60			
Asp	Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Ile	Ser	Glu	Leu	Gly	Ala	Gly	Asn	Gly	Gly
65					70					75				80	
Val	Val	Phe	Lys	Val	Ser	His	Lys	Pro	Ser	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Arg
				85						90				95	
Lys	Leu	Ile	His	Leu	Glu	Ile	Lys	Pro	Ala	Ile	Arg	Asn	Gln	Ile	Ile
				100						105				110	
Arg	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	His	Glu	Cys	Asn	Ser	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly
				115						120				125	
Phe	Tyr	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ser	Asp	Gly	Glu	Ile	Ser	Ile	Cys	Met	Glu
				130				135					140		
His	Met	Asp	Gly	Gly	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Lys	Ala	Gly	Arg
145					150					155				160	
Ile	Pro	Glu	Gln	Ile	Leu	Gly	Lys	Val	Ser	Ile	Ala	Val	Ile	Lys	Gly
				165						170				175	
Leu	Thr	Tyr	Leu	Arg	Glu	Lys	His	Lys	Ile	Met	His	Arg	Asp	Val	Lys
				180						185				190	
Pro	Ser	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Arg	Gly	Glu	Ile	Lys	Leu	Cys	Asp
				195						200				205	
Phe	Gly	Val	Ser	Gly	Gln	Leu	Ile	Asp	Ser	Met	Ala	Asn	Ser	Phe	Val
				210						215				220	

ES 2 493 693 B1

Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
 225 230 235 240
 Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
 245 250 255
 Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
 260 265 270
 Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
 275 280 285
 Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
 290 295 300
 Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
 305 310 315 320
 Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
 325 330 335
 Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
 340 345 350
 Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
 355 360 365
 Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
 370 375 380
 Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
 385 390

<210> 8

<211> 2222

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..2222

<223> /organism="Homo sapiens"

/note="MEK1"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 8

attcggcacg agggaggaag cgagaggtgc tgccctcccc ccggagttgg aagcgcgtta
60

cccgggtcca aaatgccc aa gaagaagccg acgcccattc agctgaaccc ggcccccgac
120

ggctctgcag ttaacgggac cagctctgcg gagaccaact tggaggcctt gcagaagaag
180

ctggaggagc tagagcttga tgagcagcag cgaaagcgcc ttgaggcctt tcttaccag
240

aagcagaagg tgggagaact gaaggatgac gactttgaga agatcagtga gctgggggct
300

ggcaatggcg gtgtggtgtt caaggtctcc cacaagcctt ctggcctggt catggccaga
360

aagctaattc atctggagat caaacccgca atccggaacc agatcataag ggagctgcag
420

gttctgcatg agtgcaactc tccgtacatc gtgggcttct atggtgcgtt ctacagcgat
480

ggcgagatca gtatctgcat ggagcacatg gatggaggtt ctctggatca agtcctgaag
540

aaagctggaa gaattcctga acaaatttta ggaaaagtta gcattgctgt aataaaaggc
600

ctgacatatc tgaggggagaa gcacaagatc atgcacagag atgtcaagcc ctccaacatc
660

ctagtcaact cccgtgggga gatcaagctc tgtgactttg gggtcagcgg gcagctcatc
720

gactccatgg ccaactcctt cgtgggcaca aggtcctaca tgtcgccaga aagactccag
780

gggactcatt actctgtgca gtcagacatc tggagcatgg gactgtctct ggtagagatg
840

gcggttggga ggtatcccat ccctcctcca gatgccaaagg agctggagct gatgtttggg
900

tgccagggtg aaggagatgc ggctgagacc ccacccaggc caaggacccc cgggaggccc
960

cttagctcat acggaatgga cagccgacct cccatggcaa tttttgagtt gttggattac
1020

atagtcaacg agcctcctcc aaaactgccc agtggagtgt tcagtctgga atttcaagat
1080

tttgtgaata aatgcttaat aaaaaacccc gcagagagag cagatttgaa gcaactcatg
1140

gttcatgctt ttatcaagag atctgatgct gaggaagtgg attttgcagg ttggctctgc
1200

tccaccatcg gccttaacca gcccagcaca ccaacccatg ctgctggcgt ctaagtgttt
1260

gggaagcaac aaagagcgag tcccctgccc ggtggtttgc catgtcgctt ttgggcctcc
1320

ttcccatgcc tgtctctgtt cagatgtgca tttcacctgt gacaaaggat gaagaacaca
1380

gcatgtgcca agattctact cttgtcattt ttaatattac tgtctttatt cttattacta
1440

ttattgttcc cctaagtgga ttggctttgt gcttggggct atttgtgtgt atgctgatga
1500

tcaaaacctg tgccaggctg aattacagtg aaatttttgg tgaatgtggg tagtcattct
1560

tacaattgca ctgctgttcc tgctccatga ctggctgtct gcctgtattt tcggactttg
1620

acatttgaca tttggtggac tttatcttgc tgggcatact ttctctctag gagggagcct
1680

tgtgagatcc ttcacaggca gtgcatgtga agcatgcttt gctgctatga aaatgagcat
1740

cagagagtgt acatcatgtt attttattat tattatttgc ttttcatgta gaactcagca
1800

gttgacatcc aaatctagcc agagcccttc actgccatga tagctggggc ttcaccagtc
1860

tgtctactgt ggtgatctgt agacttctgg ttgtatttct atatttattt tcagtatact
1920

gtgtgggata cttagtggta tgtctcttta agttttgatt aatgtttctt aaatggaatt
1980

atttgaatgt cacaaattga tcaagatatt aaaatgtcgg atttatcttt ccccatatcc
2040

aagtaccaat gctgttgtaa acaacgtgta tagtgcctaa aattgtatga aaatcctttt
2100

aaccatttta acctagatgt ttaacaaatc taatctctta ttctaataaa tatactatga
2160

aataaaaaaaaa aaaggagaaa gctaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2220

aa
2222

<210> 9

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 493 693 B1

<220>

<223> MEK2

<400> 9

Met	Leu	Ala	Arg	Arg	Lys	Pro	Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Ile	Asn	Pro
1				5					10					15	
Thr	Ile	Ala	Glu	Gly	Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Ser	Glu	Ala
				20				25					30		
Asn	Leu	Val	Asp	Leu	Gln	Lys	Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu
				35				40					45		
Gln	Gln	Lys	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala	Phe	Leu	Thr	Gln	Lys	Ala	Lys	Val
				50				55					60		
Gly	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Asp	Phe	Glu	Arg	Ile	Ser	Glu	Leu	Gly	Ala
65				70				75					80		
Gly	Asn	Gly	Gly	Val	Val	Thr	Lys	Val	Gln	His	Arg	Pro	Ser	Gly	Leu
				85				90					95		
Ile	Met	Ala	Arg	Lys	Leu	Ile	His	Leu	Glu	Ile	Lys	Pro	Ala	Ile	Arg
				100				105					110		
Asn	Gln	Ile	Ile	Arg	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	His	Glu	Cys	Asn	Ser	Pro
				115				120					125		
Tyr	Ile	Val	Gly	Phe	Tyr	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ser	Asp	Gly	Glu	Ile	Ser
				130				135					140		
Ile	Cys	Met	Glu	His	Met	Asp	Gly	Gly	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Leu	Lys
145				150				155					160		
Glu	Ala	Lys	Arg	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	Gly	Lys	Val	Ser	Ile	Ala
				165				170					175		
Val	Leu	Arg	Gly	Leu	Ala	Tyr	Leu	Arg	Glu	Lys	His	Gln	Ile	Met	His
				180				185					190		

ES 2 493 693 B1

Arg	Asp	Val	Lys	Pro	Ser	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Arg	Gly	Glu	Ile
195				200				205							
Lys	Leu	Cys	Asp	Phe	Gly	Val	Ser	Gly	Gln	Leu	Ile	Asp	Ser	Met	Ala
210				215				220							
Asn	Ser	Phe	Val	Gly	Thr	Arg	Ser	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	Arg	Leu	Gln
225				230				235				240			
Gly	Thr	His	Tyr	Ser	Val	Gln	Ser	Asp	Ile	Trp	Ser	Met	Gly	Leu	Ser
				245				250				255			
Leu	Val	Glu	Leu	Ala	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	Ile	Pro	Pro	Pro	Asp	Ala
				260				265				270			
Lys	Glu	Leu	Glu	Ala	Ile	Phe	Gly	Arg	Pro	Val	Val	Asp	Gly	Glu	Glu
275				280				285							
Gly	Glu	Pro	His	Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Arg	Pro
290				295				300							
Val	Ser	Gly	His	Gly	Met	Asp	Ser	Arg	Pro	Ala	Met	Ala	Ile	Phe	Glu
305				310				315				320			
Leu	Leu	Asp	Tyr	Ile	Val	Asn	Glu	Pro	Pro	Pro	Lys	Leu	Pro	Asn	Gly
				325				330				335			
Val	Phe	Thr	Pro	Asp	Phe	Gln	Glu	Phe	Val	Asn	Lys	Cys	Leu	Ile	Lys
340				345				350							
Asn	Pro	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp	Leu	Lys	Met	Leu	Thr	Asn	His	Thr	Phe
355				360				365							
Ile	Lys	Arg	Ser	Glu	Val	Glu	Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Gly	Trp	Leu	Cys
370				375				380							
Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Asn	Gln	Pro	Gly	Thr	Pro	Thr	Arg	Thr	Ala	Val
385				390				395				400			

<210> 10

<211> 1576

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..1576

<223> /organism="Homo sapiens"

/note="MEK2"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 10

gaattcgagc cgaccgaccg ctcccggccc gccccctatg ggccccggct agaggcgccg
60

ccgccgccgg cccgcggagc cccgatgctg gcccgaggga agccggtgct gccggcgctc
120

accatcaacc ctaccatcgc cgagggccca tcccctacca gcgaggcgcc ctccgaggca
180

aacctggtgg acctgcagaa gaagctggag gagctggaac ttgacgagca gcagaagaag
240

cggctggaag cttttctcac ccagaaagcc aaggttggcg aactcaaaga cgatgacttc
300

gaaaggatct cagagctggg cgcgggcaac ggcgggggtg tcaccaaagt ccagcacaga
360

ccctcgggcc tcatcatggc caggaagctg atccaccttg agatcaagcc ggccatccgg
420

aaccagatca tccgcgagct gcaggtcctg cacgaatgca actcgccgta catcgtgggc
480

ttctacgggg ccttctacag tgacggggag atcagcattt gcatggaaca catggacggc
540

ggctccctgg accaggtgct gaaagaggcc aagaggattc ccgaggagat cctggggaaa
600

gtcagcatcg cggttctccg gggcttggcg tacctccgag agaagcacca gatcatgcac
660

cgagatgtga agccctcaa catcctcgtg aactctagag gggagatcaa gctgtgtgac
720

ttcggggtga gcggccagct catagactcc atggccaact ccttcgtggg cacgcgctcc
780

tacatggctc cggagcggtt gcagggcaca cattactcgg tgcagtcgga catctggagc
840

atgggcctgt ccctggtgga gctggccgtc ggaaggtacc ccatcccccc gcccgacgcc
900

aaagagctgg aggccatctt tggccggccc gtggtcgacg gggaagaagg agagcctcac
960

agcatctcgc ctcggccgag gcccccgagg cgccccgtca gcggtcacgg gatggatagc
1020

cggcctgcca tggccatctt tgaactcctg gactatattg tgaacgagcc acctcctaag
1080

ctgccccaacg gtgtgttcac ccccgacttc caggagtttg tcaataaatg cctcatcaag
1140

aaccagcgg agcgggcgga cctgaagatg ctcacaaacc acaccttcac caagcgggtcc
1200

gagggtggaag aagtggattt tgccggctgg ttgtgtaaaa ccctgcggct gaaccagccc
1260

ggcacaccca cgcgaccgc cgtgtgacag tggccgggct ccctgcgtcc cgctggtgac
1320

ctgcccaccg tccctgtcca tgccccgcc ttccagctga ggacacgtgg cgcctccacc
1380

caccctcctg cctcaccctg cggagagcac cgtggcgggg cgacagcgca tgcaggaacg
1440

ggggtctcct ctctgccag tcctggccgg ggtgcctctg gggacgggcg acgtgctgt
1500

gtgtggtctc agaggctctg cttccttagg ttacaaaaca aaacaggag agaaaagcaa
1560

aaaaaaaaa aaaaaa
1576

ES 2 493 693 B1

<210> 11

<211> 480

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> AKT1

<400> 11

Met	Ser	Asp	Val	Ala	Ile	Val	Lys	Glu	Gly	Trp	Leu	His	Lys	Arg	Gly
1				5					10					15	
Glu	Tyr	Ile	Lys	Thr	Trp	Arg	Pro	Arg	Tyr	Phe	Leu	Leu	Lys	Asn	Asp
				20				25					30		
Gly	Thr	Phe	Ile	Gly	Tyr	Lys	Glu	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Asp	Gln	Arg
				35				40					45		
Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Ala	Gln	Cys	Gln	Leu	Met	Lys
				50				55				60			
Thr	Glu	Arg	Pro	Arg	Pro	Asn	Thr	Phe	Ile	Ile	Arg	Cys	Leu	Gln	Trp
65						70				75				80	
Thr	Thr	Val	Ile	Glu	Arg	Thr	Phe	His	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg
						85				90				95	
Glu	Glu	Trp	Thr	Thr	Ala	Ile	Gln	Thr	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Lys	Lys
						100				105				110	
Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Met	Asp	Phe	Arg	Ser	Gly	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn
						115				120				125	
Ser	Gly	Ala	Glu	Glu	Met	Glu	Val	Ser	Leu	Ala	Lys	Pro	Lys	His	Arg
						130				135				140	
Val	Thr	Met	Asn	Glu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Lys	Leu	Leu	Gly	Lys	Gly	Thr

ES 2 493 693 B1

145	150	155	160
Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr			
	165	170	175
Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val			
	180	185	190
Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro			
	195	200	205
Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys			
	210	215	220
Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser			
225	230	235	240
Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu			
	245	250	255
Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr			
	260	265	270
Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile			
	275	280	285
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala			
	290	295	300
Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val			
305	310	315	320
Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly			
	325	330	335
Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln			
	340	345	350
Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe			
	355	360	365
Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu			

ES 2 493 693 B1

```

370              375              380
Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys
385              390              395              400
Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val
              405              410              415
Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu
              420              425              430
Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr
              435              440              445
Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu
              450              455              460
Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Ser Thr Ala
465              470              475              480

```

<210> 12

<211> 2610

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..2610

<223> /organism="Homo sapiens"

/note="AKT1"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 12

atcctgggac agggcacagg gccatctgtc accaggggct tagggaaggc cgagccagcc
60

tgggtcaaag aagtcaaagg ggctgcctgg aggaggcagc ctgtcagctg gtgcatcaga
120

ggctgtggcc aggccagctg ggctcgggga gcgccagcct gagaggagcg cgtgagcgtc
180

gcgggagcct cgggcaccat gagcgacgtg gctattgtga aggagggttg gctgcacaaa
240

cgaggggagt acatcaagac ctggcggcca cgctacttcc tcctcaagaa tgatggcacc
300

ttcattggct acaaggagcg gccgcaggat gtggaccaac gtgaggctcc cctcaacaac
360

ttctctgtgg cgcagtgcc a gctgatgaag acggagcggc cccggcccaa caccttcac
420

atccgctgcc tgcagtggac cactgtcatc gaacgcacct tccatgtgga gactcctgag
480

gagcgggagg agtggacaac cgccatccag actgtggctg acggcctcaa gaagcaggag
540

gaggaggaga tggacttccg gtcgggctca ccagtgaca actcaggggc tgaagagatg
600

gaggtgtccc tggccaagcc caagcaccgc gtgaccatga acgagtttga gtacctgaag
660

ctgctgggca agggcacttt cggcaagggtg atcctgggtga aggagaaggc cacaggccgc
720

tactacgcca tgaagatcct caagaaggaa gtcacgtgg ccaaggacga ggtggccac
780

acactcaccg agaaccgcgt cctgcagaac tccaggcacc cttcctcac agccctgaag
840

tactctttcc agaccacga ccgcctctgc tttgtcatgg agtacgcaa cgggggcgag
900

ctgttcttcc acctgtcccg ggaacgtgtg ttctccgagg accgggccg cttctatggc
960

gctgagattg tgtcagccct ggactacctg cactcggaga agaacgtggt gtaccgggac
1020

ctcaagctgg agaacctcat gctggacaag gacgggcaca ttaagatcac agacttcggg
1080

ctgtgcaagg aggggatcaa ggacggtgcc accatgaaga ctttttcgga cacacctgag
1140

tacctggccc ccgagggtgct ggaggacaat gactacggcc gtgcagtgga ctggtggggg
1200

ctgggcgtgg tcatgtacga gatgatgtgc ggtcgcctgc ctttctacaa ccaggaccat
1260

gagaagcttt ttgagctcat cctcatggag gagatccgct tcccgcgcac gcttggtccc
1320

gaggccaagt ccttgctttc agggctgctc aagaaggacc ccaagcagag gcttggcggg
1380

ggctccgagg acgccaagga gatcatgcag catcgcttct ttgccggtat cgtgtggcag
1440

cacgtgtacg agaagaagct cagcccaccc ttcaagcccc aggtcacgtc ggagactgac
1500

accagggtatt ttgatgagga gttcacggcc cagatgatca ccatcacacc acctgaccaa
1560

gatgacagca tggagtgtgt ggacagcgag cgcaggcccc acttccccca gttctcctac
1620

tcggccagca gcacggcctg aggcggcggt ggactgcgct ggacgatagc ttggagggat
1680

ggagaggcgg cctcgtgcc a tgatctgtat ttaatggttt ttatttctcg ggtgcatttg
1740

agagaagcca cgctgtcctc tcgagcccag atggaaagac gtttttgtgc tgtgggcagc
1800

accctcccc gcagcggggt aggggaagaaa actatcctgc gggttttaat ttatttcac
1860

cagtttggtc tccgggtgtg gcctcagccc tcagaacaat ccgattcacg tagggaaatg
1920

ttaaggactt ctacagctat gcgcaatgtg gcattggggg gccgggcagg tcctgccc
1980

gtgtccccctc actctgtcag ccagccgccc tgggctgtct gtcaccagct atctgtcatc
2040

tctctggggc cctgggcctc agttcaacct ggtggcacca gatgcaacct cactatggta
2100

tgctggccag caccctctcc tgggggtggc aggcacacag cagccccca gcactaaggc
2160

cgtgtctctg aggacgtcat cggaggctgg gccctggga tgggaccagg gatgggggat
2220

gggccagggt ttaccagtg ggacagagga gcaaggttta aatttgttat tgtgtattat
2280

gttgttcaaa tgcattttgg gggtttttaa tctttgtgac aggaaagccc tcccccttcc
2340

ccttctgtgt cacagtctt ggtgactgtc ccaccggagc ctccccctca gatgatctct
2400

ccacggtagc acttgacctt ttcgacgctt aacctttccg ctgtcgcccc aggccttccc
2460

tgactccctg tgggggtggc catccctggg cccctccacg cctcctggcc agacgctgcc
2520

gctgccgctg caccacggcg tttttttaca acattcaact ttagtatttt tactattata
2580

atataatatg gaaccttccc tccaaattct
2610

<210> 13

<211> 520

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> AKT2

<400> 13

Met	Asn	Glu	Val	Ser	Val	Ile	Lys	Glu	Gly	Trp	Leu	His	Lys	Arg	Gly
1				5					10					15	
Glu	Tyr	Ile	Lys	Thr	Trp	Arg	Pro	Arg	Tyr	Phe	Leu	Leu	Lys	Ser	Asp
			20					25					30		
Gly	Ser	Phe	Ile	Gly	Tyr	Lys	Glu	Arg	Pro	Glu	Ala	Pro	Asp	Gln	Thr
		35				40						45			
Leu	Pro	Pro	Leu	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Ala	Glu	Cys	Gln	Leu	Met	Lys
		50				55					60				
Thr	Glu	Arg	Pro	Arg	Pro	Asn	Thr	Phe	Val	Ile	Arg	Cys	Leu	Gln	Trp
65				70					75					80	
Thr	Thr	Val	Ile	Glu	Arg	Thr	Phe	His	Val	Asp	Ser	Pro	Asp	Glu	Arg
			85					90					95		
Glu	Glu	Trp	Met	Arg	Ala	Ile	Gln	Met	Val	Ala	Asn	Ser	Leu	Lys	Gln
			100					105					110		
Arg	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Met	Asp	Tyr	Lys	Cys	Gly	Ser	Pro	Ser
			115					120					125		
Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Glu	Glu	Met	Glu	Val	Ala	Val	Ser	Lys	Ala	Arg

ES 2 493 693 B1

130	135	140			
Ala Lys Val Thr Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys					
145	150	155	160		
Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Thr Gly Arg					
	165	170	175		
Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu Arg Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp					
	180	185	190		
Glu Val Ala His Thr Val Thr Glu Ser Arg Val Leu Gln Asn Thr Arg					
	195	200	205		
His Pro Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ala Phe Gln Thr His Asp Arg					
	210	215	220		
Leu Cys Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His					
225	230	235	240		
Leu Ser Arg Glu Arg Val Phe Thr Glu Glu Arg Ala Arg Phe Tyr Gly					
	245	250	255		
Ala Glu Ile Val Ser Ala Leu Glu Tyr Leu His Ser Arg Asp Val Val					
	260	265	270		
Tyr Arg Asp Ile Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His					
	275	280	285		
Ile Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Ser Asp Gly					
	290	295	300		
Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu					
305	310	315	320		
Val Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu					
	325	330	335		
Gly Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn					
	340	345	350		
Gln Asp His Glu Arg Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg					

ES 2 493 693 B1

355	360	365
Phe Pro Arg Thr Leu Ser Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ala Gly Leu		
370	375	380
Leu Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Pro Ser Asp Ala		
385	390	395
Lys Glu Val Met Glu His Arg Phe Phe Leu Ser Ile Asn Trp Gln Asp		
405	410	415
Val Val Gln Lys Lys Leu Leu Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser		
420	425	430
Glu Val Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Asp Glu Phe Thr Ala Gln Ser Ile		
435	440	445
Thr Ile Thr Pro Pro Asp Arg Tyr Asp Ser Leu Gly Leu Leu Glu Leu		
450	455	460
Asp Gln Arg Thr His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Phe Arg Glu		
465	470	475
Glu Lys Asp Leu Leu Met Ser Leu Phe Val Ser Leu Ile Leu Phe Ser		
485	490	495
Asp Phe Ser Ser Leu Lys Ser His Ser Phe Ser Ser Asn Phe Ile Leu		
500	505	510
Leu Ser Phe Ser Ser Leu Lys Lys		
515	520	

<210> 14

<211> 1849

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..1849

<223> /organism="Homo sapiens"

/note="AKT2"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 14

gaattccagc ggcggcgccg ttgccgctgc cgggaaacac aaggaaaggg aaccagcgca
60

gcgtggcgat gggcgggggt agagccccgc cggagaggct gggcggctgc cggtagacaga
120

ctgtgccctg tccacggctgc ctctgcatg tcctgctgcc ctgagctgtc ccgagctagg
180

tgacagcgta ccacgctgcc accatgaatg aggtgtctgt catcaaagaa ggctggctcc
240

acaagcgtgg tgaatacatc aagacctgga ggccacggta cttcctgctg aagagcgacg
300

gctccttcat tgggtacaag gagaggcccg aggcccctga tcagactcta ccccccttaa
360

acaacttctc cgtagcagaa tgccagctga tgaagaccga gaggccgcga cccaacacct
420

ttgtcatacg ctgcctgcag tggaccacag tcatcgagag gaccttcac gtggattctc
480

ES 2 493 693 B1

cagacgagag ggaggagtgg atgcgggcca tccagatggt cgccaacagc ctcaagcagc
540

gggccccagg cgaggacccc atggactaca agtgtggctc cccagtgac tcctccacga
600

ctgaggagat ggaagtggcg gtcagcaagg cacgggctaa agtgaccatg aatgacttcg
660

actatctcaa actccttggc aagggaacct ttggcaaagt catcctggtg cgggagaagg
720

ccactggccg ctactacgcc atgaagatcc tgcggaagga agtcatcatt gccaaaggatg
780

aagtcgctca cacagtcacc gagagccggg tcctccagaa caccaggcac ccgttcctca
840

ctgcgctgaa gtatgccttc cagaccacg accgcctgtg ctttgtgatg gagtatgcca
900

acgggggtga gctgttcttc cacctgtccc gggagcgtgt cttcacagag gagcgggccc
960

ggttttatgg tgcagagatt gtctcggctc ttgagtactt gcactcgcgg gacgtggtat
1020

accgcgacat caagctggaa aacctcatgc tggacaaaga tggccacatc aagatcactg
1080

actttggcct ctgcaaagag ggcacagtg acggggccac catgaaaacc ttctgtggga
1140

ES 2 493 693 B1

ccccggagta cctgggcct gagtgctgg aggacaatga ctatggccgg gccgtggact
1200

ggtgggggct ggggtgtgtc atgtacgaga tgatgtgcgg ccgcctgccc ttctacaacc
1260

aggaccacga ggcctcttc gagctcatcc tcatggaaga gatccgcttc ccgcgcacgc
1320

tcagccccga ggccaagtcc ctgcttgctg ggctgcttaa gaaggacccc aagcagaggc
1380

ttggtggggg gccagcgat gccaaggagg tcatggagca caggttcttc ctcagcatca
1440

actggcagga cgtggtccag aagaagctcc tgccaccctt caaacctcag gtcacgtccg
1500

aggtcgacac aagg tacttc gatgatgaat ttaccgcca gtccatcaca atcacacccc
1560

ctgaccgcta tgacagcctg ggcttactgg agctggacca gcggaccac ttccccagt
1620

tctcctactc ggctttccga gaagagaaag acctgctgat gtctttgttt gtgtctttga
1680

ttctcttcag tgatttttca tctttaaaga gccattcttt ttcttctaata ttcattttgc
1740

taagtttctc ttctttgaag aaataaaatc catgatggaa gagatggtgg catctgtata
1800

tttaattgtc ttctatacag cctagaccag aattataaac tagaattcc
1849

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..21

<223> /organism="Artificial Sequence"

/note="cebador directo"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 15

aaggcctgct gaaaatgact g
21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..21

<223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="cebador inverso"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 16

caaagaatgg tcctgcacca g
 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..21

<223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="cebador directo "
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 17

aaccccatca tctactgctg c
 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..21

<223> /organism="Artificial Sequence"

/note="cebador inverso"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 18

atttccagcc cctcatagtc g
21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..20

<223> /organism="Artificial Sequence"

/note="cebador directo "

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 19

gggccacaag accatctaca
20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..20

<223> /organism="Artificial Sequence"

 /note="cebador inverso"

 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 20

aagtttagctg cagtccccac

20