

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 184**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2005 E 05708080 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 1803456**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende L-733060 para su uso en el tratamiento de tumores cancerosos**

30 Prioridad:

11.02.2004 ES 200400424

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

06.05.2015

73 Titular/es:

ANTAGONISTA ENEKAUNO, S.L. (100.0%)
Alberto Durero 8 - 4ª
41018 Sevilla, ES

72 Inventor/es:

MUÑOZ SÁEZ, MIGUEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 535 184 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende L-733060 para su uso en el tratamiento de tumores cancerosos

Objeto de la invención

5 El objeto de la presente invención es el uso de antagonistas de la sustancia P, en particular el uso de los antagonistas no-peptídicos de los receptores NK1 para el tratamiento del cáncer y más específicamente en melanoma humano, neuroblastoma, el glioma, linfoma de Hodgkin humano, leucemia linfoblástica, carcinoma humano de mama, sarcoma humano de Ewing, glioma humano y osteosarcoma humano.

Estado de la técnica

10 La sustancia P es un undecapéptido de origen natural que pertenece a la familia de las taquicininas, llamados así por su rápida acción estimulante sobre los tejidos de los músculos lisos. Más específicamente, la sustancia P es un neuropéptido farmacológicamente activo que se produce en mamíferos (ha sido originalmente aislado en el intestino) y posee una secuencia de aminoácidos que ha sido descrita por D. F. Veber y col. en la patente de Estados Unidos 4.680.283. La implicación de la sustancia P, así como de otras taquicininas, en la fisiopatología de un gran número de enfermedades ha sido ampliamente demostrada en la literatura.

15 El receptor de la sustancia P es un miembro de la superfamilia de los receptores acoplados a la proteína G. El receptor neuropeptídico de la sustancia P (NK-1) esta ampliamente distribuido en el sistema nervioso de los mamíferos (especialmente en el cerebro y en la espina espinal), el sistema circulatorio y en los tejidos periféricos (especialmente en el duodeno y en el yeyuno) y esta involucrado en la regulación de diversos procesos biológicos.

20 La acción central y periférica de la taquicinina en mamíferos se ha asociado con varias afecciones inflamatorias tales como migraña, artritis reumatoide, asma y enfermedad inflamatoria intestinal, así como en la mediación del reflejo nauseoso y en la regulación de los desórdenes del sistema nervioso central (SNC) tales como la enfermedad del Parkinson (Neurosci. Res., 1996, 7, 187-214), ansiedad (Can. J. Phys.; 1997, 612-621) y depresión (Science, 1998, 281, 1640-1645).

25 En el artículo de revisión cuyo título es "Tachykinin Receptor and Tachykinin Receptor Antagonists", por J. Auton, en Pharmacol.; 1993, 13, 23-93, se han descritas evidencias sobre la utilidad de los antagonistas de la sustancia P para el tratamiento del dolor de cabeza, especialmente migraña, Alzheimer, esclerosis múltiple, atenuación del síndrome de abstinencia a opiáceos, cambios cardiovasculares, edemas, tales como edema provocado por quemaduras, enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, asma, hiperactividad bronquial y otras enfermedades respiratorias incluida la rinitis alérgica, enfermedades inflamatorias del intestino, incluidas la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, lesiones oculares y enfermedades de inflamación ocular.

30 Adicionalmente, los antagonistas de receptores NK1 están actualmente desarrollándose como medicamentos para el tratamiento de un gran número de trastornos fisiológicos asociados con un exceso o un desequilibrio de taquicininas, en particular la sustancia P. Así, la sustancia P ha sido relacionada con trastornos del sistema nervioso tales como la ansiedad, la depresión y la psicosis. (documentos WO 95/16679, WO 95/18124, WO 95/23798 y WO 01/77100).

35 Los antagonistas de receptores NK1 tienen utilidad adicional para el tratamiento de las enfermedades motrices y el vómito inducido por determinados tratamientos quimioterapéuticos.

La utilidad de los antagonistas de receptores NK1 en el tratamiento de determinadas formas de incontinencia urinaria se ha descrito en Neuropeptides, 32 (1), 1-49, 1998 y en Eur J. Pharmacol.; 383(3), 297-303, 1999.

40 Por otra parte, el documento US 5972938 describe un procedimiento para el tratamiento de un trastorno psicoinmunológico o psicomotor mediante la administración de un antagonista de los receptores NK1.

En el artículo publicado en Nature, 2000, 405 (6783), 180-183 describe que ratones carentes de receptores NK-1 muestran una pérdida en el efecto beneficioso de la morfina. Consecuentemente, los antagonistas de receptores NK-1 pueden ser útiles en el tratamiento de deshabitación a ciertas drogas adictivas, tales como los opiáceos, la nicotina, así como en la reducción de su abuso y abstinencia.

45 El artículo en Life Sci.; 2000, 67(9), 985-1001 describe que los astrocitos expresan receptores funcionales para diversos neurotransmisores incluidos los receptores de la sustancia P. En los tumores de cerebro las células gliales malignas derivadas de astrocitos desencadenan bajo la acción de las taquicininas mediante los receptores NK-1 la secreción de mediadores solubles que aumentan su velocidad de proliferación. Consecuentemente, los antagonistas selectivos de NK-1 pueden ser muy útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de gliomas malignos y para el tratamiento del cáncer.

50 Adicionalmente, en el New Journal of Medicine, 1999, 340, 190-195, se ha descrito que el uso de un antagonista selectivo de receptores NK1 induce la reducción del vómito provocado por el tratamiento con cisplatino.

5 En el artículo publicado en el International Journal of Cancer por Antal Orosz y col. 1995, 60, 82-87, se describe el uso de diversos antagonistas peptídicos de la sustancia P (SP) para inhibir la proliferación de carcinoma de células pulmonares (por ejemplo, en células designadas NCI-H69). Además, en el artículo publicado en Cáncer Research, 1994, 54, 3602-3610, se describen otros antagonistas de SP, también peptídicos, capaces de inhibir el crecimiento in vitro de varias líneas celulares pulmonares cancerosas (por ejemplo, células designadas NCI-H510, NCI-H345, y SHP-77).

En la patente EP 773026 (Pfizer) se describe el uso de antagonistas no peptídicos de receptores NK1 para el tratamiento de cánceres en mamíferos, particularmente en el tratamiento de carcinomas pulmonares de células pequeñas en APUDoma, tumores neuroendocrinos y carcinomas de células pequeñas extrapulmonares.

10 Adicionalmente en la patente WO 2001001922 se describe el uso de antagonistas de receptores NK1 para el tratamiento de adenocarcinoma y muy específicamente los carcinomas prostáticos. En Giardina, G.; Gagliardi S. y Martinelli M. "Antagonists at the neurokinin receptors - Recent patent literature" (IDrugs 2003; 6(8): 758-772) se hace una revisión de las patentes más recientes sobre antagonistas de receptores NK1, NK2 y NK3. Se describen las moléculas de los más importantes fabricantes mundiales con indicación específica de las posibles aplicaciones entre
15 las que cabe destacar: depresión, inflamación, ansiolítico, antiemético, colitis ulcerosa y otros.

Descripción de la invención

20 El objeto de la presente invención es el uso de antagonistas no peptídicos de receptores NK1 y de la sustancia P para la producción de apoptosis en células tumorales de mamíferos. Las células tumorales sobre las que actúan los antagonistas presentan un número de receptores NK1 muy superior a los existentes en células no tumorales, comprendido entre el 400 % y el 500 % del número de receptores habituales en células no tumorales.

Las células tumorales sobre las que actúan los antagonistas se seleccionan de entre:

- células primarias de melanoma maligno invasivo humano
- células metastáticas de melanoma humano
- células de melanoma de localización en ganglio linfático
- 25 - células de glioma humano
- células de cáncer de mama humano
- células de leucemia linfoblástica aguda de células B humana
- células de leucemia linfoblástica aguda de células T humana
- células de neuroblastoma humano
- 30 - células primarias de neuroblastoma humano
- células de astrocitoma humano
- células de linfoma de Hodgkin humano
- células de sarcoma de Ewing humano
- células de osteosarcoma humano

35 Se indican a continuación las líneas celulares específicas sobre las que actúan los antagonistas no peptídicos de receptores NK1 y de la sustancia P. Las células tumorales relacionadas con el melanoma humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a las líneas celulares COLO 858 [ICLC, Interlab Cell Line Collection -CBA-Genova), MEL HO [DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen] y COLO 679 [DSMZ].

40 Las células tumorales relacionadas con el glioma humano y el neuroblastoma humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a las líneas celulares GAMG [DSMZ] y SKN-BE (2) [ICLC].

Las células tumorales relacionadas con la leucemia linfoblástica sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a las líneas celulares de leucemia linfoblástica humana de células B SD1 [DSMZ] y leucemia linfoblástica humana de células T BE-13 [DSMZ]

45 Las células tumorales relacionadas con el linfoma de Hodgkin humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a la línea celular KM-H2 [DSMZ].

Las células tumorales relacionadas con el cáncer de mama humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a la línea celular MT-3 [DSMZ]

Las células tumorales relacionadas con el sarcoma de Ewing humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a la línea celular MHH-ES-1 [DSMZ].

Las células tumorales relacionadas con el osteosarcoma humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a la línea celular MG-63 [ICLC].

- 5 El antagonista usado en la presente invención es la (2S, 3S) 3-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil] metoxi]-2-fenilpiperidina, conocida comercialmente como L-733060 (Sigma- Aldrich) y se ha usado a concentraciones comprendidas entre 5 μ M y 50 μ M.

Se pueden usar otros compuestos antagonistas no peptídicos de receptores NK1 y de la sustancia P tales como:

- vofopitant o GR-205171 (Pfizer),
- 10 - ezlopitant o CJ -11974 (Pfizer),
- CP-122721 (Pfizer),
- Aprepitant o MK 869 ó L-754030 (MSD),
- L-758298 (MSD).
- TAK-637 (Takeda/Abbot),
- 15 - GW597599 (GSK),
- GW679769 (GSK),
- R673 (Roche).

- 20 Por último, constituye otro objeto de la presente invención el uso de antagonistas no peptídicos de receptores NK1 y de la sustancia P, tales como los reivindicados para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de las figuras

- Figuras 1A y 1B: variación en función del tiempo de la concentración de células SKN-BE(2) a concentraciones crecientes de L-733.060 (1A) e inhibición del crecimiento celular de SKN-BE(2) (1 B).
- 25 Figuras 2A y 2B: variación en función del tiempo de la concentración de células COLO 858 a concentraciones crecientes de L-733.060 (2A) e inhibición del crecimiento celular de COLO 858 (2B).
- Figuras 3A y 3B: variación en función del tiempo de la concentración de células MEL HO a concentraciones crecientes de L-733.060 (3A) e inhibición del crecimiento celular de MEL HO (3B).
- Figuras 4A y 4B: variación en función del tiempo de la concentración de células COLO 679 a concentraciones crecientes de L-733.060 (4A) e inhibición del crecimiento celular de COLO 679 (4B).
- 30 Figuras 5A y 5B: variación en función del tiempo de la concentración de células SD1 a concentraciones crecientes de L-733.060 (5A) e inhibición del crecimiento celular de SD1 (5B).
- Figuras 6A y 6B: variación en función del tiempo de la concentración de células KM-H2 a concentraciones crecientes de L-733.060 (6A) e inhibición del crecimiento celular de KM-H2 (6B).
- 35 Figuras 7A y 7B: variación en función del tiempo de la concentración de células MT-3 a concentraciones crecientes de L-733.060 (7A) e inhibición del crecimiento celular de MT-3 (7B).
- Figuras 8A y 8B: variación en función del tiempo de la concentración de células MHH- ES-1 a concentraciones crecientes de L-733.060 (8A) e inhibición del crecimiento celular de MHH-ES-1 (8B).
- Figuras 9A y 9B: variación en función del tiempo de la concentración de células MG-63 a concentraciones crecientes de L-733.060 (9A) e inhibición del crecimiento celular de MG-63 (9B).
- 40 Figuras 10A y 10B: variación en función del tiempo de la concentración de células GAMG a concentraciones crecientes de L-733.060 (10A) e inhibición del crecimiento celular de GAMG (10B).

Descripción detallada de la invención

Se incluye a continuación una explicación detallada de como se han realizado los experimentos en los que se basa la presente invención para cada una de las líneas celulares ensayadas.

Ejemplo 1 : Líneas celulares relacionadas con neuroblastoma:

Se usó la línea celular de neuroblastoma humano SKN-BE(2) (ICLC Interlab Cell Line Collection-CBA-Genova).

Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado con suero bovino fetal al 10 % de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

- 5 La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO_2).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1:

- 10 Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina, (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μM a 20 μM).

- 15 La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular

- 20 Durante el tiempo del experimento, las células cultivadas se despegaron cada 4-5 días mediante tripsinización y para la viabilidad celular se usó el procedimiento de azul de tripano. Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10⁴ células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10⁴ células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

- 25 En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μl de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (2,5 μM a 20 μM) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 30 h. (primera división celular) (T_1) y 72 h (segunda división celular) (T_2).

- 30 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μl del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

35 Resultados

Los resultados mostrados en la Figura 1A representan la variación en función del tiempo de la concentración de células SKN-BE(2) a concentraciones crecientes de L-733.060.

- 40 La Figura 1B muestra la inhibición del crecimiento celular de SKN- BE(2) (a 30 h y 72 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (2,5, 5, 10, 20 μM) y el porcentaje de inhibición para el primer y segundo tiempo de división de la incubación. Las líneas discontinuas representan la CI_{50} para 30 h y 72 h. Los puntos de la gráfica representan el valor medio \pm desviación típica.

Ejemplo 2: Líneas celulares relacionadas con melanomas

Se usaron líneas celulares de melanoma humano COLO 858 (ICLC Interlab Cell Line Collection-CBA-Genova), MEL HO y COLO 679 (DSMZ -Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

- 45 Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC, de la ICLC y de la DSMZ.

Las líneas celulares se cultivaron en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO_2).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1

5 Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μ M a 50 μ M).

La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular.

10 Durante el tiempo del experimento, las células cultivadas se despegaron cada 4-5 días mediante tripsinización y para la viabilidad celular se usó el procedimiento de azul de tripano. Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

15 T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10^4 células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10^4 células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μ l de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (2,5 μ M a 50 μ M) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo variable para cada línea celular.

20 Línea COLO 858: 48 h (primera división celular) (T_1) y 96 h (segunda división celular) (T_2).

Línea MEL HO: 24 h (primera división celular) (T_1) y 48 h (segunda división celular) (T_2).

Línea COLO 679: 30 h (primera división celular) (T_1) y 72 h (segunda división celular) (T_2).

25 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μ l del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. Las concentraciones para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

30 Los datos obtenidos fueron evaluados usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Resultados

Los resultados se muestran en las figura 2A, 2B (COLO 858), figuras 3A y 3B (MEL HO) y figuras 4A y 4B (COLO 679).

35 La figura 2A muestra la variación en función del tiempo de la concentración de células COLO 858 a concentraciones crecientes de L-733.060 (de 2,5 a 20 μ M).

La figura 3A muestra la variación en función del tiempo de la concentración de células MEL HO a concentraciones crecientes de L-733.060 (de 10 a 30 μ M).

La figura 4A muestra la variación en función del tiempo de la concentración de células COLO 679 a concentraciones crecientes de L-733.060 (de 20 a 50 μ M).

40 La Figura 2B muestra la inhibición del crecimiento celular de COLO 858 (a 48 h y 96 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (2,5, 5, 10, 20 μ M).. Las líneas discontinuas muestran la CI_{50} para 48 h y 96 h. Los puntos de la gráfica muestran el valor medio \pm desviación típica.

45 La Figura 3B muestra la inhibición del crecimiento celular de MEL HO (a 24 h y 48 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (10, 20, 25 y 30 μ M). Las líneas discontinuas muestran la CI_{50} para 24 h y 48 h. Los puntos de la gráfica muestran el valor medio \pm desviación típica.

La Figura 4Be muestra la inhibición del crecimiento celular de COLO 679 (a 30 h y 72 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (20, 30, 40 y 50 μ M). Las líneas discontinuas muestran la IC_{50} para 30 h y 72 h. Los puntos de la gráfica muestran el valor medio \pm desviación típica.

Ejemplo 3: Líneas celulares relacionadas con leucemia linfoblástica

Se usaron las líneas celulares de leucemia linfoblástica humana de células B SD1 (DSMZ) y de células T BE-13 (DSMZ).

5 Estas líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO₂).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1

10 Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)-3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI₅₀, se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 µM a 25 µM).

15 La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular.

Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T₀, T₁ y T₂.

20 T₀ contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10⁴ células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T₁ y T₂, incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10⁴ células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

En T₀ a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 µl de MTS y se leyeron 90 minutos después. T₁ y T₂ se trataron con diferentes concentraciones (2,5 µM a 20 µM) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 30 h. (primera división celular) (T₁) y 72 h (segunda división celular) (T₂).

25 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 µl del reactivo MTS a cada pocillo (T₁, T₂) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI₅₀) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

30

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de P < 0,05

Resultados

35 Los resultados mostrados en la Figura 5A representan la variación en función del tiempo de la concentración de células B SD1 a concentraciones crecientes de L-733.060.

La Figura 5B representa la inhibición del crecimiento celular de B SD1 (a 30 h y 72 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (2,5, 5, 10, 25 µM) y el porcentaje de inhibición para el primer y segundo tiempo de división de la incubación. Las líneas discontinuas representan la CI₅₀ para 30 h y 72 h. Los puntos de la gráfica representan el valor medio ± desviación típica.

40 **Ejemplo 4: Líneas celulares relacionadas con linfoma de Burkitt humano** (no es parte de la invención)

Se usó la línea celular de linfoma de Burkitt humano CA-46 (DSMZ).

Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

45 La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca²⁺ y Mg²⁺) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO₂).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1

Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μ M a 50 μ M).

- 5 La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular.

- 10 Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10⁴ células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10⁴ células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

- 15 En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μ l de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (2,5 μ M a 25 μ M) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 35 h (primera división celular) (T_1) y 72 h (segunda división celular) (T_2).

- 20 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μ l del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

- 25 **Resultados**

A las concentraciones más altas se produce inhibición del crecimiento celular y a la dosis máxima se produce apoptosis.

Ejemplo 5: Líneas celulares relacionadas con linfoma de Hodgkin humano

Se usó la línea celular de linfoma de Hodgkin humano KM-H2 (DSMZ).

- 30 Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO₂).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1

- 35 Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μ M a 25 μ M).

- 40 La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular.

Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

- 45 T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10⁴ células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10⁴ células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μ l de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron

con diferentes concentraciones (2,5 μM a 20 μM) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 48 h.(primera división celular) (T_1) y 96 h (segunda división celular) (T_2).

5 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μl del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 180 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

10 Los datos obtenidos fueron evaluados usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

Resultados

Los resultados mostrados en la Figura 6A representan la variación en función del tiempo de la concentración de células KM-H2 a concentraciones crecientes de L-733.060.

15 En la Figura 6B se representa la inhibición del crecimiento celular de KM-H2 (a 48 h y 96 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (2,5, 5, 10, 20 μM). El porcentaje de inhibición para el primer y segundo tiempo de división de la incubación. Las líneas discontinuas representan la CI_{50} para 48 h y 96 h. Los puntos de la gráfica representan el valor medio \pm desviación típica.

Ejemplo 6: Líneas celulares relacionadas con rbdomiosarcoma humano (no es parte de la invención)

Se usó la línea celular de rbdomiosarcoma humano A-204 (DSMZ).

20 Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo Mc-Coy suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO_2).

25 *Tratamiento con el antagonista de receptores NK1*

Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)-3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina, (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μM a 25 μM).

30 La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular

35 Durante el tiempo del experimento, las células cultivadas se despegaron cada 4-5 días mediante tripsinización y para la viabilidad celular se usó el procedimiento de azul de tripano. Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

40 T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10^4 células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10^4 células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μl de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (5 μM a 25 μM) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 36 h.(primera división celular) (T_1) y 72 h (segunda división celular) (T_2).

45 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μl del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

50 *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos se evaluaron usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

Resultados

A las concentraciones más altas se produce inhibición del crecimiento celular y a la dosis máxima apoptosis.

Ejemplo 7: Líneas celulares relacionadas con carcinoma de pulmón de células pequeñas (no es parte de la invención)

Se usó la línea celular de carcinoma de pulmón de células pequeñas COLO-677 (DSMZ). Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO_2).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1:

Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)-3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina, (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μM a 25 μM).

La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular

Durante el tiempo del experimento, las células cultivadas se despegaron cada 4-5 días mediante tripsinización y para la viabilidad celular se usó el procedimiento de azul de tripano. Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10^4 células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10^4 células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μl de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (5 μM a 20 μM) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 40 h. (primera división celular) (T_1) y 96 h (segunda división celular) (T_2).

Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μl del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

Resultados

A las concentraciones más altas se produce inhibición del crecimiento celular y a la dosis máxima se produce apoptosis.

Ejemplo 8: Líneas celulares relacionadas con cáncer de mama humano

Se usó la línea celular de cáncer de mama humano MT-3 (DSMZ). Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO_2).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1:

5 Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina, (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μ M a 25 μ M).

La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular

10 Durante el tiempo del experimento, las células cultivadas se despegaron cada 4-5 días mediante tripsinización y para la viabilidad celular se usó el procedimiento de azul de tripano. Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

15 T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10⁴ células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10⁴ células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μ l de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (2,5 μ M a 20 μ M) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 30 h.(primera división celular) (T_1) y 72 h (segunda división celular) (T_2).

20 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μ l del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

Resultados

30 Los resultados mostrados en la Figura 7A representan la variación en función del tiempo de la concentración de células MT-3 a concentraciones crecientes de L-733.060.

La Figura 7B representa la inhibición del crecimiento celular de MT-3 (a 30 h y 72 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (2,5, 5, 10, 20 μ M). El porcentaje de inhibición para el primer y segundo tiempo de división de la incubación. Las líneas discontinuas representan la CI_{50} para 30 h y 72 h. Los puntos de la gráfica representan el valor medio \pm desviación típica.

Ejemplo 9: Líneas celulares relacionadas con sarcoma de Ewing humano

Se usó la línea celular de sarcoma de Ewing humano MHH-ES-1 (DSMZ). Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

40 La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO_2).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1:

45 Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina, (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μ M a 25 μ M).

La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

50 *Procedimiento de proliferación celular*

Durante el tiempo del experimento, las células cultivadas se despegaron cada 4-5 días mediante tripsinización y para la viabilidad celular se usó el procedimiento de azul de tripano. Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

- 5 T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10^4 células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10^4 células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

- 10 En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μ l de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (5 μ M a 20 μ M) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 30 h. (primera división celular) (T_1) y 72 h (segunda división celular) (T_2).

- 15 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μ l del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

Resultados

- 20 Los resultados mostrados en la Figura 8A representan la variación en función del tiempo de la concentración de células MHH-ES-1 a concentraciones crecientes de L-733.060.

- 25 La Figura 8B representa la inhibición del crecimiento celular de MHH-ES-1 (a 30 h y 72 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (5, 10, 15, 20 μ M). El porcentaje de inhibición para el primer y segundo tiempo de división de la incubación. Las líneas discontinuas representan la CI_{50} para 30 h y 72 h. Los puntos de la gráfica representan el valor medio \pm desviación típica.

Ejemplo 10: Líneas celulares relacionadas con osteosarcoma humano

Se usó la línea celular de osteosarcoma humano MG-63 (ICLC).

Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo MEN suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

- 30 La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO_2).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1:

- 35 Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi-2-fenilpiperidina, (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (2,5 μ M a 20 μ M).

- 40 La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular

- 45 Durante el tiempo del experimento, las células cultivadas se despegaron cada 4-5 días mediante tripsinización y para la viabilidad celular se usó el procedimiento de azul de tripano. Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10^4 células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10^4 células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

- 50 En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μ l de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (2,5 μ M a 25 μ M) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 30 h. (primera

división celular) (T_1) y 72 h (segunda división celular (T_2)).

5 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μ l del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

10 *Resultados*

Los resultados mostrados en la Figura 9A representan la variación en función del tiempo de la concentración de células a concentraciones crecientes de L- 733.060.

15 La Figura 9B representa la inhibición del crecimiento celular de MG-63 (a 30 h y 72 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (2,5, 5, 10, 20 y 25 μ M). El porcentaje de inhibición para el primer y segundo tiempo de división de la incubación. Las líneas discontinuas representan la CI_{50} para 30 h y 72 h. Los puntos de la gráfica representan el valor medio \pm desviación típica.

Ejemplo 11: Líneas celulares relacionadas con glioma

Se usó la línea celular de glioma humano GAMG (DSMZ).

20 Esta línea celular se mantuvo en medio de cultivo MEN suplementado con el 10 % de suero bovino fetal de acuerdo con las condiciones de cultivos celulares de la ATCC.

La línea celular se cultivó en matraces de 75 ml (Falcon, Germany). El medio se renovó cada dos días y las células se trataron con tripsina (0,05 % y 0,02 % de EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) cada seis días. Las células se incubaron a 37 °C en humidificación (95 % de aire/5 % de CO_2).

Tratamiento con el antagonista de receptores NK1:

25 Las disoluciones del antagonista de los receptores NK1 (2S,3S)-3-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina, (L-733.060) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se disolvieron en agua destilada que contenía el 0,2 % de dimetilsulfóxido (DMSO) antes del tratamiento de las muestras. Con el objetivo de determinar la CI_{50} , se estudiaron diferentes concentraciones (10 μ M a 25 μ M).

30 La proliferación celular se evaluó usando el procedimiento MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], de acuerdo con las instrucciones de uso (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Estados Unidos).

Procedimiento de proliferación celular

35 Durante el tiempo del experimento, las células cultivadas se despegaron cada 4-5 días mediante tripsinización y para la viabilidad celular se usó el procedimiento de azul de tripano. Las células se cuantificaron mediante un procedimiento de conteo y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Cada experimento incluyó tres placas denominadas T_0 , T_1 y T_2 .

T_0 contenía pocillos sin células (0 células/0,1 ml) denominados pocillos blancos y pocillos que contienen células (10^4 células/0,1 ml) denominados pocillos control. Ambos, T_1 y T_2 , incluían pocillos blancos (0 células/0,1 ml), pocillos control (10^4 células/0,1 ml) y pocillos control tratados con L-733.060.

40 En T_0 a los pocillos se les añadió inmediatamente 20 μ l de MTS y se leyeron 90 minutos después. T_1 y T_2 se trataron con diferentes concentraciones (2,5 μ M a 25 μ M) de L-733.060 y se incubaron durante un periodo de 48 h.(primera división celular) (T_1) y 96 h (segunda división celular (T_2)).

45 Para el estudio de la proliferación celular se añadieron 20 μ l del reactivo MTS a cada pocillo (T_1 , T_2) 90 min antes de la lectura de las muestras con el lector de placas (TECAN Spectra Classic) a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS se midió por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control y control tratado con diferentes concentraciones de L-733.060) se realizó por triplicado. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. La concentración para inhibir el cincuenta por ciento de células (CI_{50}) con L-733.060 se calculó con una curva adecuada a los parámetros.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron usando el ensayo t de Student, con un nivel de significancia de $P < 0,05$

Resultados

Los resultados mostrados en la Figura 10A que representan la variación en función del tiempo de la concentración de células a concentraciones crecientes de L- 733.060.

- 5 La Figura 10B representa la inhibición del crecimiento celular de GAMG (a 48h y 96 h) tras la adición de concentraciones crecientes de L-733.060 (10,15, 20 y 25 μ M). El porcentaje de inhibición para el primer y segundo tiempo de división de la incubación. Las líneas discontinuas representan la CI_{50} para 30 h y 72 h. Los puntos de la gráfica representan el valor medio \pm desviación típica.

REIVINDICACIONES

- 1.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P (2S, 3S) 3-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]metoxi]-2-fenilpiperidina, conocido comercialmente como L-733060, para su uso en el tratamiento de tumores cancerosos en mamíferos.
- 5 2.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según la reivindicación 1, en la que las células tumorales sobre las que actúa el antagonista tienen un número de receptores NK1 muy superior, comprendido entre el 400 % y el 500 %, a los existentes en células no tumorales.
- 10 3.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según las reivindicaciones 1 y 2, en la que las células tumorales sobre las que actúa el antagonista son seleccionadas entre
- células primarias de melanoma maligno invasivo humano
 - células metastáticas de melanoma humano
 - células de melanoma localizadas en ganglios linfáticos
- 15 - células de glioma humano
- células de cáncer de mama humano
 - células de leucemia linfoblástica aguda de células B humana
 - células de leucemia linfoblástica aguda de células T humana
 - células de neuroblastoma humano
- 20 - células primarias de neuroblastoma humano
- células de astrocitoma humano
 - células de linfoma de Hodgkin humano
 - células de sarcoma de Ewing humano
 - células de osteosarcoma humano
- 25 4.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células tumorales relacionadas con el melanoma humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a las líneas celulares COLO 858 [ICLC, Interlab Cell Line Collection -CBA- Genova), MEL HO [DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen] y COLO 679 [DSMZ].
- 30 5.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células tumorales relacionadas con el glioma humano y el neuroblastoma humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a las líneas celulares GAMG [DSMZ] y SKN-BE (2) [ICLC].
- 35 6.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células tumorales relacionadas con la leucemia linfoblástica sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a las líneas celulares de leucemia linfoblástica humana de células B 10 SD1 [DSMZ] y leucemia linfoblástica humana de células T BE-13 [DSMZ]
- 40 7.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células tumorales relacionadas con el linfoma de Hodgkin humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a la línea celular KM-H2 [DSMZ]
- 8.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células tumorales relacionadas con el cáncer de mama humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a la línea celular MT-3 [DSMZ]
- 45 9.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células tumorales relacionadas con el sarcoma de Ewing humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a la línea celular MHH-ES-1 [DSMZ]
- 10.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para

su uso según las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células tumorales relacionadas con el osteosarcoma humano sobre las que actúan los antagonistas pertenecen a la línea celular MG-63 [ICLC].

- 5 11.- Composición que comprende el antagonista no peptídico de receptores NK1 y de la sustancia P L-733060 para su uso según la reivindicación 1-10, en la que dicho antagonista se usa a concentraciones comprendidas entre 5 μ M y 50 μ M.

FIG.1 A

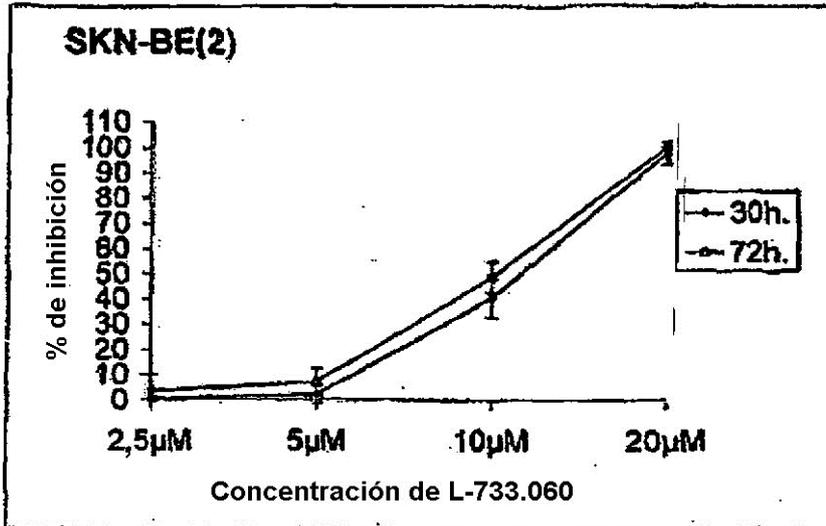


FIG.1 B

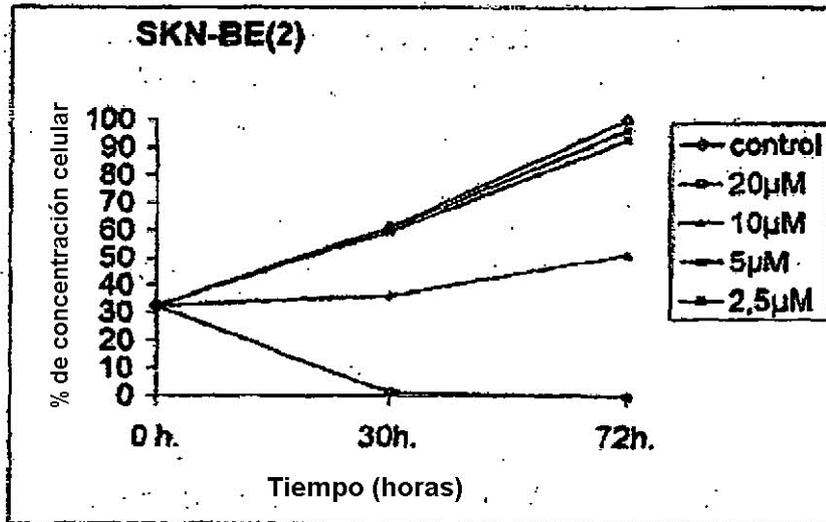


FIG.2 A

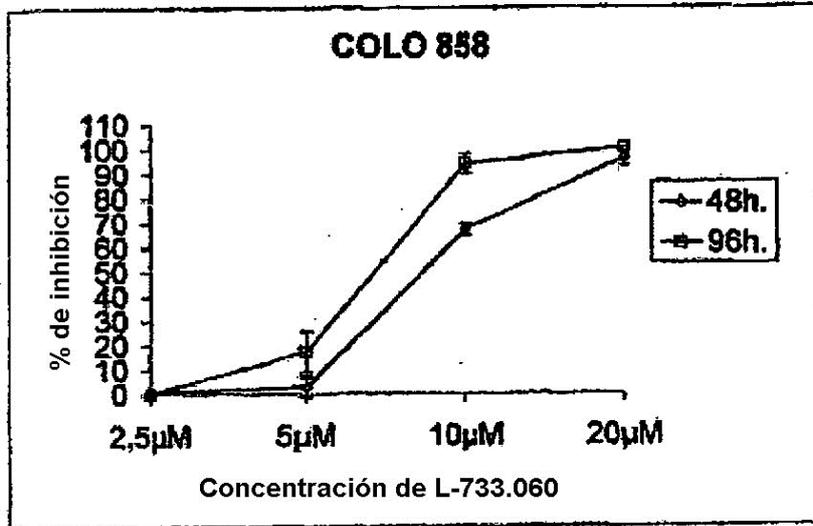


FIG.2 B

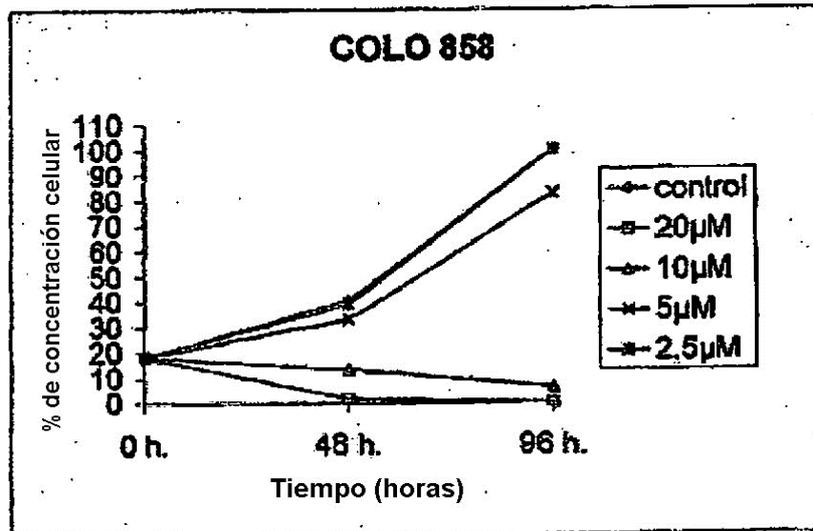


FIG. 3A

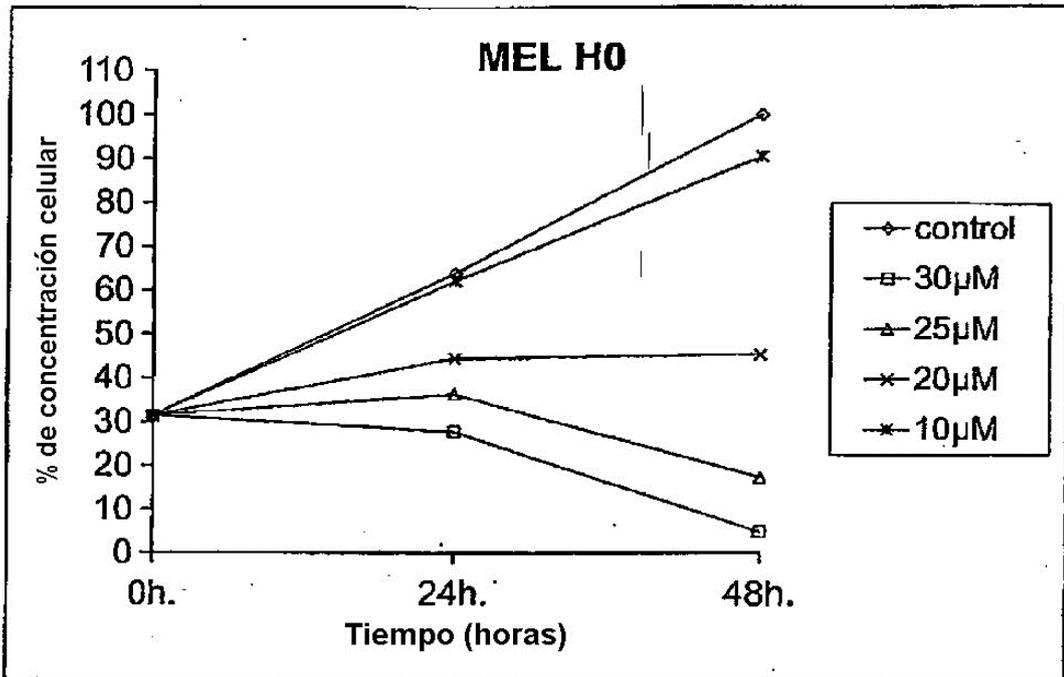


FIG. 3B

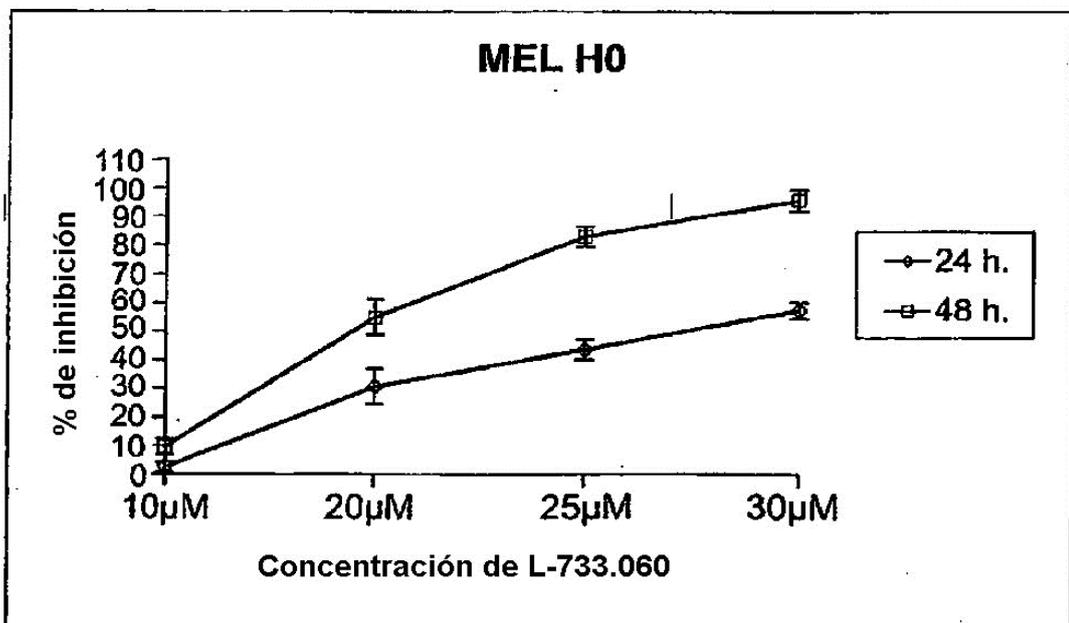


FIG.4 A

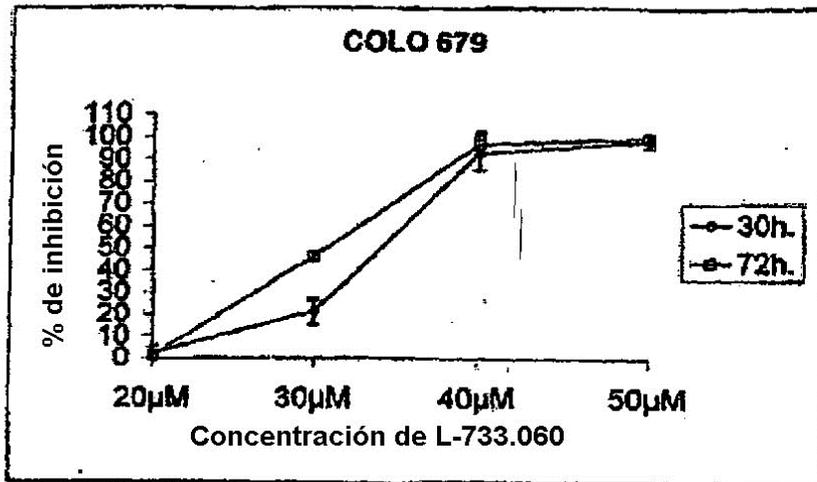


FIG.4 B

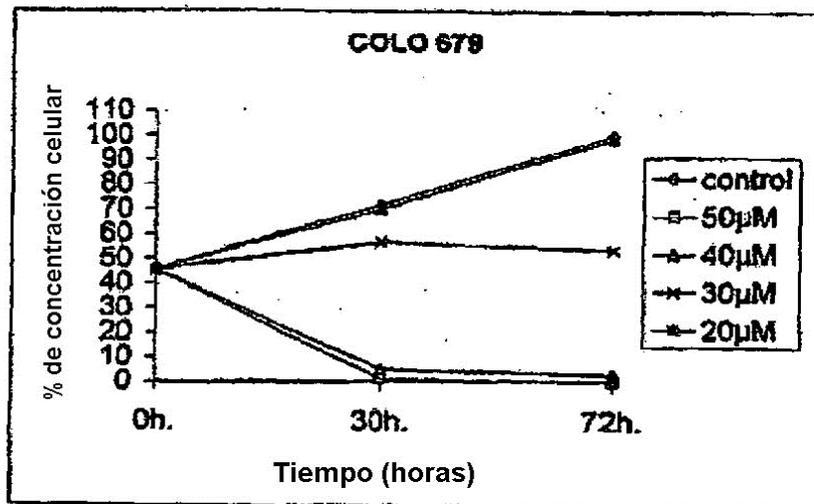


FIG. 5A

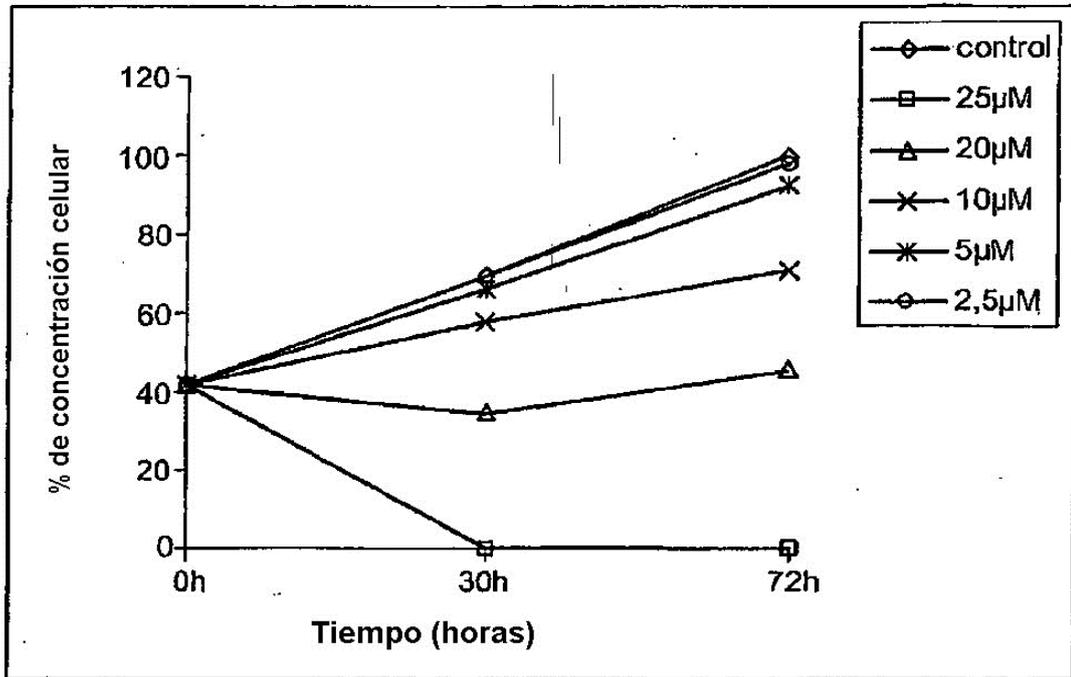


FIG. 5B

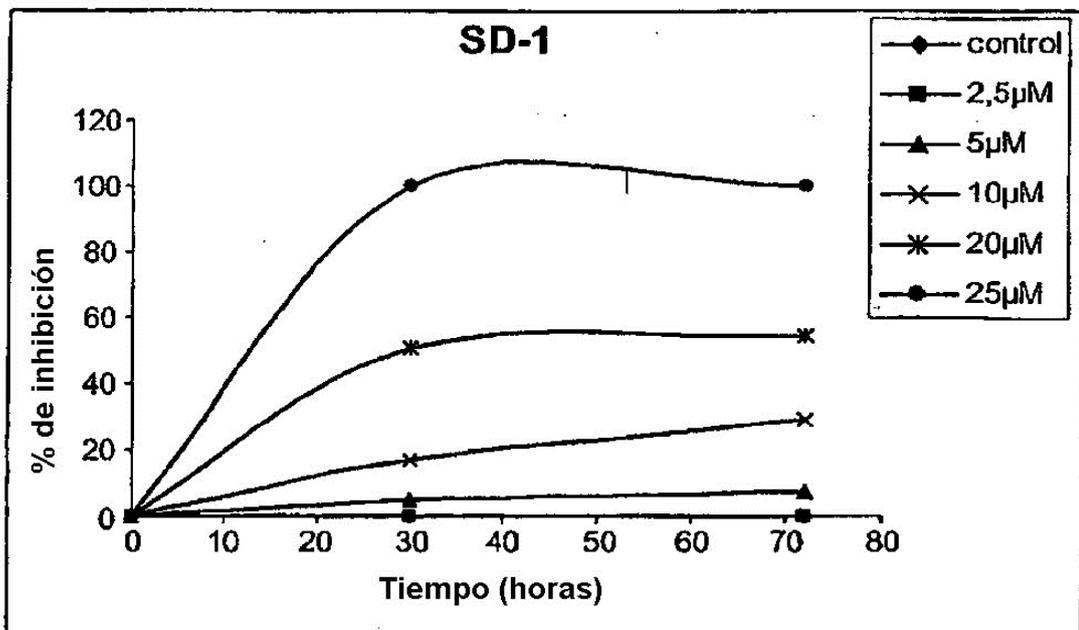


FIG.6 A

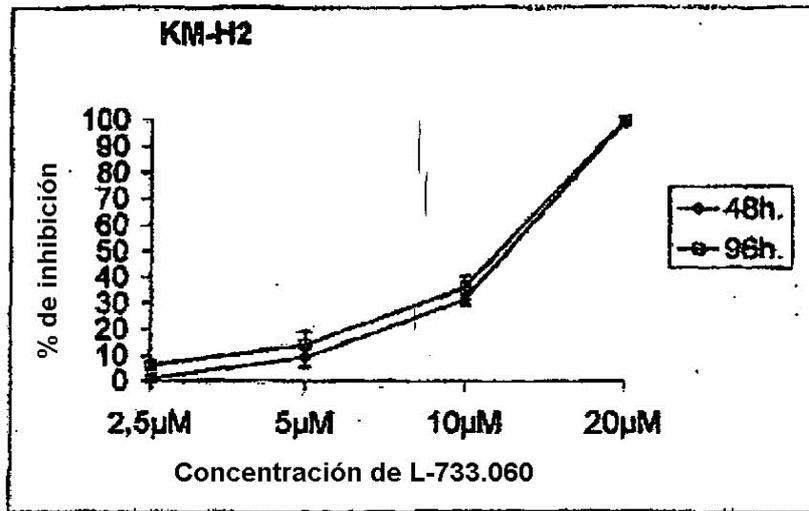


FIG.6 B

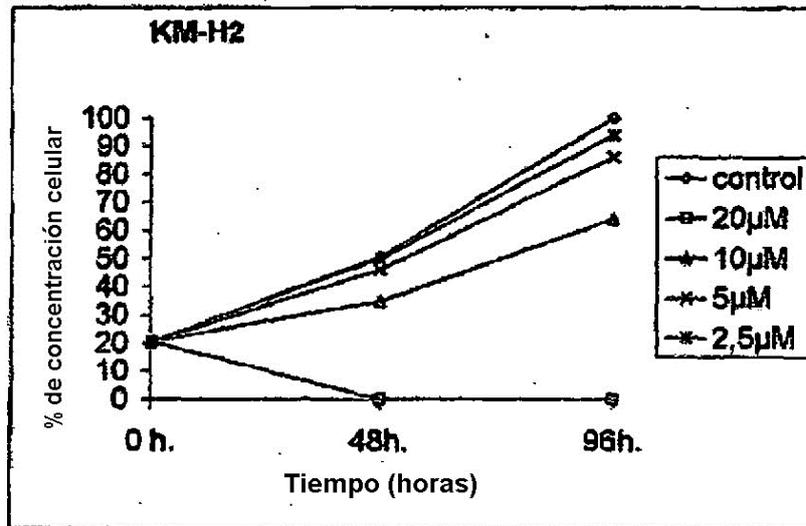


FIG.7 A

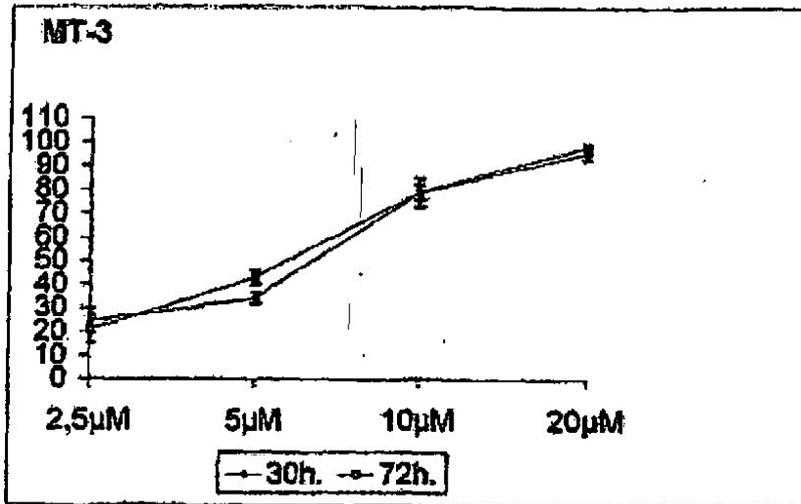


FIG.7 B

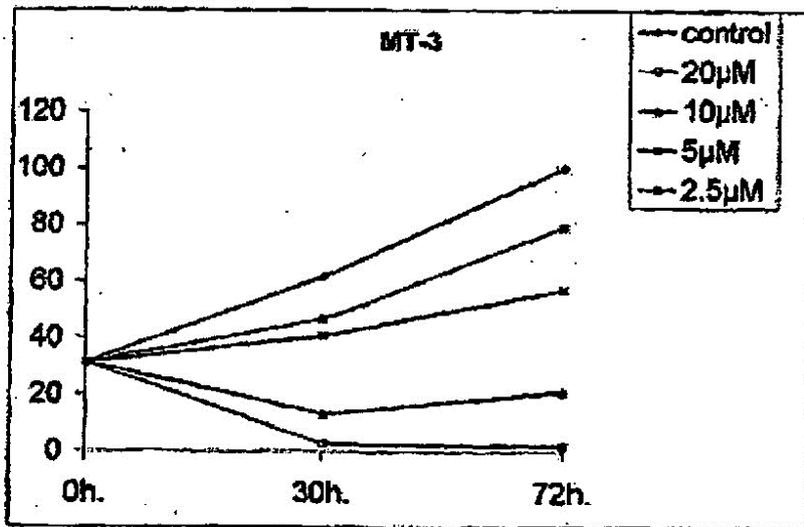


FIG.8 A

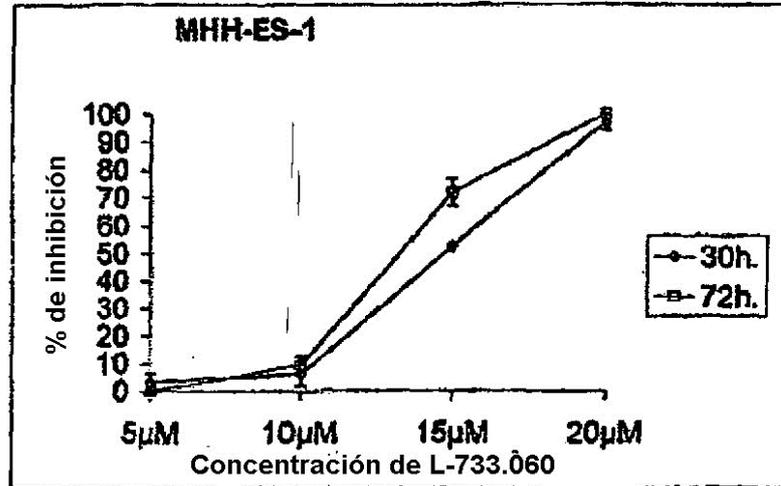


FIG.8 B

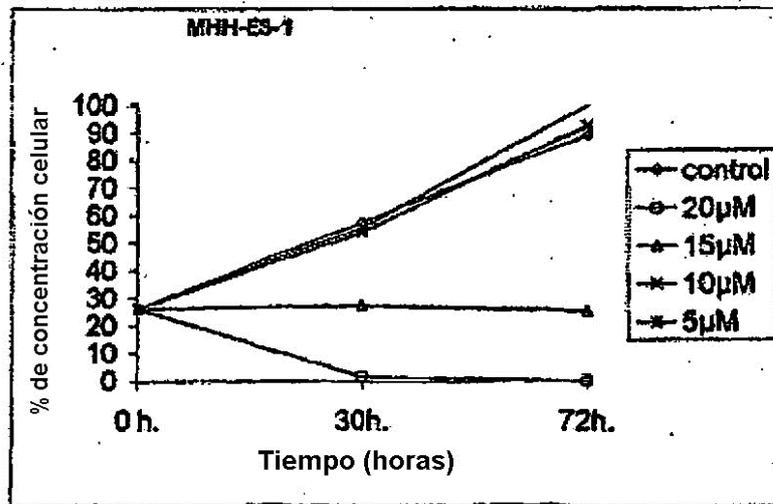


FIG. 9A

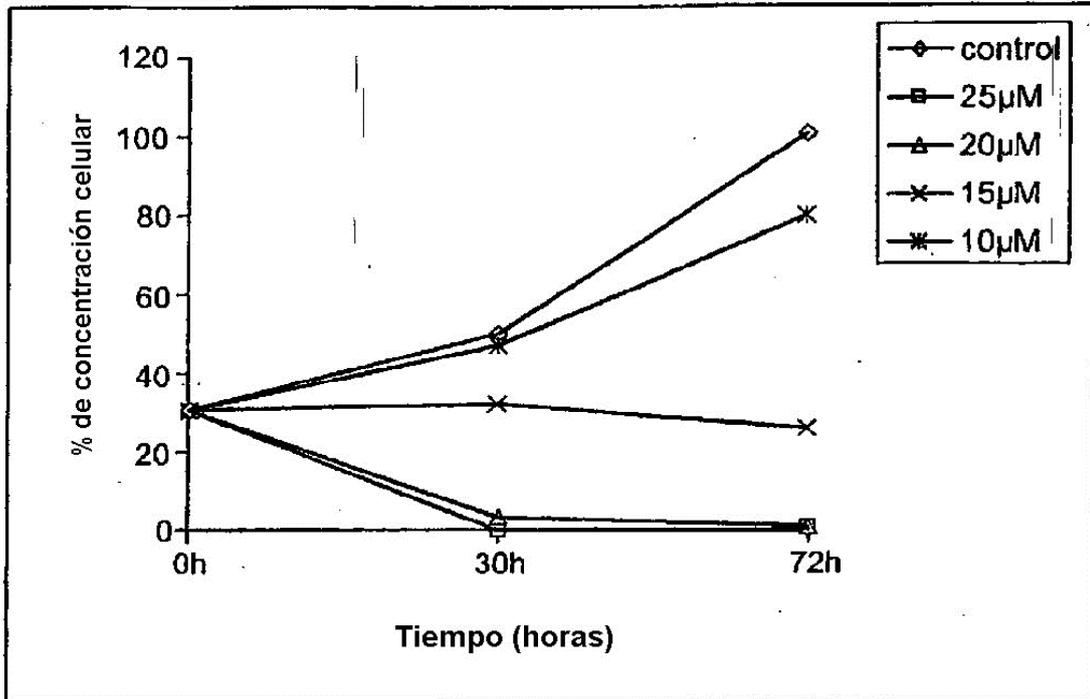


FIG. 9B

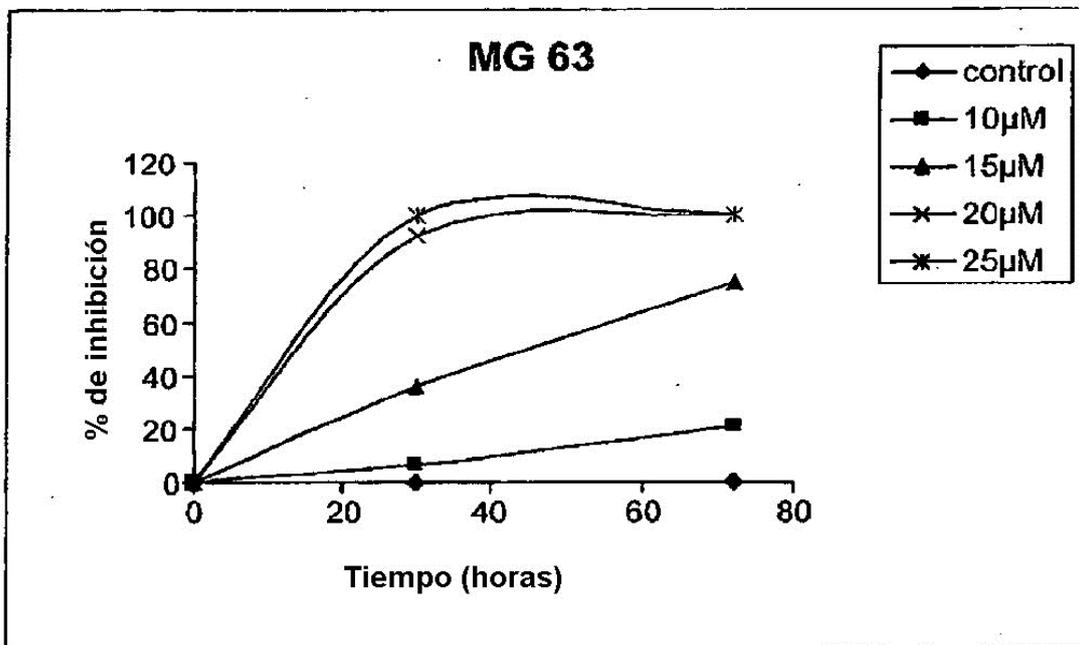


FIG.10 A

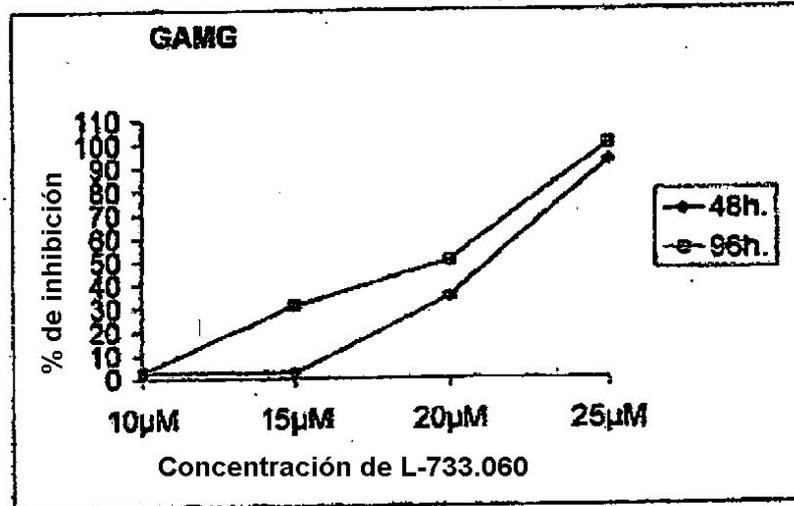


FIG.10 B

