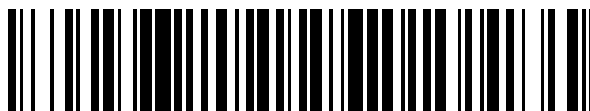


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 219**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2010 PCT/US2010/035474**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO10135468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10721223 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2433124**

54 Título: **Métodos para proporcionar ensayos de medicina personalizada ex vivo para neoplasias hematológicas**

30 Prioridad:

19.05.2009 US 179685 P

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**VIVIA BIOTECH S.L. (100.0%)
C/ Santiago Grisolia Nº 2 (PCM)
28760 Tres Cantos (Madrid), ES**

72 Inventor/es:

**BALLESTEROS, JUAN;
BENNETT, TERESA;
PRIMO, DANIEL;
ORFAO, ALBERTO;
JACKSON, COYT;
LAGO, SANTIAGO;
MATOSES, MARÍA;
SUÁREZ, LILIA;
SAPIA, SANDRA;
BOSANQUET, ANDREW;
GORROCHATEGUI, JULIÁN;
TUDELA, CONSUELO;
HERNÁNDEZ, PILAR y
CAVEDA, LUIS IGNACIO**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

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

ES 2 628 219 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

Métodos para proporcionar ensayos de medicina personalizada *ex vivo* para neoplasias hematológicas

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere al uso de una plataforma de detección para determinar un perfil de sensibilidad a fármacos citotóxicos para múltiples fármacos y combinaciones de fármacos utilizando especímenes de pacientes con cáncer. En la presente memoria se describe una plataforma de detección basada en células que incorpora tanto una preparación automatizada de la muestra como la evaluación automatizada por citometría de flujo, que es útil como un ensayo de medicina personalizada debido a su rápida adquisición de datos, análisis y notificación de los resultados, incluso a partir de un gran número de fármacos y combinaciones de fármacos. Asimismo, se describen combinaciones particulares de fármacos útiles en el tratamiento de la enfermedad linfocítica proliferativa.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Existen muchos métodos disponibles para evaluar los perfiles de sensibilidad de células tumorales a fármacos citotóxicos en muestras *ex vivo* tomadas de pacientes con cáncer. Las pruebas *ex vivo* para la detección de la muerte celular en las neoplasias hematológicas se han desarrollado durante los últimos 40 años, lo que resulta en una serie de pruebas para identificar la quimiosensibilidad. La expresión ensayo/experimentación de respuesta tumoral individualizada (ERTI) ha sido recientemente propuesta para estos métodos para describir el "efecto de los tratamientos contra el cáncer en células enteras tumorales vivas recién extraídas de pacientes con cáncer". (Bosanquet *et al.*, G. J. Kaspers, B. Coiffier, M. C. Heinrich y E. H. Estey. Nueva York, NY, 2008, *Informa Healthcare*: 23-44). Los ERTIs iniciales diseñados para estudiar la capacidad de un fármaco para retardar o detener el crecimiento de células neoplásicas (p. ej., pruebas clonogénicas) no funcionan bien. No obstante, en la década de 1980, se desarrollaron una serie de ERTIs de muerte celular que han demostrado consistentemente buenas comparaciones entre los resultados de la prueba y los resultados clínicos (es decir, correlaciones clínicas).

Incluso con buenas correlaciones clínicas, los ERTIs de muerte celular disponibles en la actualidad se ven afectados por limitaciones indeseables que restringen su uso como ensayos de medicina personalizada. Por ejemplo, las pruebas clonogénicas requieren generalmente semanas en lugar de días para generar resultados, restringiendo su utilidad clínica (Hamburger *et al.*, *Science* 1977, 197: 461-463; Marie *et al.*, *Br J Haematol* 1983, 55:427-437; Selby *et al.*, *New Engl J Med* 1983, 308:129-134). Asimismo, la mayoría de ERTIs miden la muerte celular total para evaluar el efecto de las muestras incubadas con fármacos *ex vivo*. La medición de la muerte celular total limita la capacidad de un ERTI para distinguir entre el efecto de un fármaco en las células tumorales frente a las células normales. Los ERTIs que se disponen actualmente difieren entre sí principalmente con respecto a la metodología utilizada para determinar el porcentaje de células vivas o células tumorales vivas al final de una prueba.

Si bien algunos ERTIs miden directamente las células, la mayoría evalúan indirectamente la muerte celular utilizando marcadores sustitutos. Por ejemplo, la prueba de MTT (metil-tiazolil tetrazolio) estima el número de células vivas mediante la medición de la reducción mitocondrial de MTT a formazán, provocando un cambio de color que se puede cuantificar utilizando un espectrofotómetro (Pieters *et al.*, *Blood* 1990, 76:2327-2336; Sargent *et al.*, *Br J Cancer* 1989, 60:206-210; Carmichael *et al.*, *Cancer Res* 1987, 47:936-942). Otros ERTIs utilizan hidrólisis de diacetato de fluoresceína (p. ej., la prueba de citotoxicidad fluorométrica de microcultivo (PCFM)) o los niveles celulares de ATP como marcadores indirectos de la viabilidad celular (Rhedin *et al.*, *Leuk Res* 1993, 17:271-276; Larsson *et al.*, *Int J cancer* 1992, 50:177-185). La prueba de CTDi (citotoxicidad por tinción diferencial) y, más recientemente, la prueba de RTCA (respuesta tumoral a compuestos antineoplásicos) utilizan métodos de tinción para determinar células tumorales vivas por medio de microscopía (Bosanquet *et al.*, *Br J Haematol* 2009, 146:384-395; Bosanquet *et al.*, *Leuk Res* 1996, 20:143-153; Weisenthal *et al.*, *Cancer Res* 1983, 43:749-757).

Los ERTIs antes mencionados requieren la incubación de las células neoplásicas de un paciente con fármacos citotóxicos durante un periodo de al menos 4 a 5 días. No obstante, las células hematológicas comienzan a perder propiedades importantes después de solo 24 a 48 horas fuera del cuerpo humano. Los periodos de incubación más cortos permiten la evaluación de los perfiles de citotoxicidad *ex vivo* antes del inicio del tratamiento del paciente, aumentando de este modo su utilidad clínica y permitiendo una aplicación más eficaz como ensayos de medicina personalizada.

Los fármacos citotóxicos han demostrado que eliminan las células malignas mediante la inducción de la apoptosis (Aragane *et al.*, *J Cell Biol* 1998, 140:171-182; Hannun *et al.*, *Blood* 1997, 89:1845-1853). La apoptosis es un tipo de muerte celular, referida habitualmente en la técnica como "muerte celular programada", cuya técnica se define de acuerdo con las características morfológicas y antigénicas. La apoptosis comienza habitualmente en un periodo de horas de un fármaco que entra en contacto con las células diana (Del Bino *et al.*, *Cell Prolif* 1999, 32:25-37). Existen muchos ensayos para la apoptosis basados en marcadores que reflejan diferentes aspectos del proceso apoptótico, tales como: 1) cambios en el potencial de membrana mitocondrial utilizando DiOC6 o JC-1 (Tabrizi *et al.*, *Leukemia* 2002, 16:1154-1159; Liu *et al.*, *Leukemia* 2002, 16:223-232); 2) fragmentación del ADN internucleosómico identificado por dntt en la prueba de (TUNEL) por desoxinucleotidil transferasa terminal (Liu *et al.*, *Leukemia* 2002,

16:223-232) utilizando electroforesis o etiquetado con naranja de acridina (Tabrizi *et al.*, *Leukemia* 2002, 16(6):1154-9; Kim *et al.*, *Exp Mol Med* 2000, 32:197-203; Konstantinov *et al.*, *J Cancer Res Clin Oncol* 2002, 128:271-278; Ofir *et al.*, *Cell Death Differ* 2002, 9:636-642); o 3) identificación de fragmentos proteolíticos de polimerasa poli-ADP-ribosa (PPAR) o caspasa-3 utilizando anticuerpos específicos (Konstantinov *et al.*, *J Cancer Res Clin Oncol* 2002, 128(5):271-8; Ofir *et al.*, *Cell Death Differ* 2002, 9(6): 636-42; Byrd *et al.*, *Blood* 2002, 99:1038-1043; Hasenjäger *et al.*, *Oncogene* 2004, 23:4523-4535; Prokop *et al.*, *Oncogene* 2003, 22:9107-9120).

Otra prueba de apoptosis se basa en la detección por citometría de flujo de anexina V conjugada a un marcador fluorescente (es decir, un fluorocromo). La anexina V se une a los residuos de fosfatidilserina externalizados que aparecen solo en la membrana de la superficie de las células sometidas a apoptosis (Tabrizi *et al.*, *Leukemia* 2002, 16(6):1154-9; Nimmanapalli *et al.*, *Cancer Res* 2002, 62:5761-5769). La medición de la apoptosis puede evaluarse de acuerdo con el porcentaje de células que se unen a un conjugado fluorescente de anexina V, como se detecta por citometría de flujo. Adicionalmente, se conocen en el estado de la técnica varias combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizados para la identificación de células tumorales (frente a las células normales). La Tabla 1 resume varias combinaciones de anticuerpos monoclonales que, cuando se conjugan a un fluorocromo, podrían utilizarse para identificar células tumorales hematológicas utilizando varios métodos de detección espectroscópica.

Tabla 1: Combinaciones de anticuerpos monoclonales para la identificación de células tumorales

Neoplasia hematológica	Conjugado de AcM a fluorocromo
LLA, LLC, LNH	CD19-PE, CD45-APC
MM	CD38-PE, CD45-APC
LMA	CD34-PE, CD45-APC
LLA= leucemia linfocítica aguda; LLC= leucemia linfocítica crónica; LNH= linfoma no Hodgkin; MM= mieloma múltiple; LMA= leucemia mieloide aguda	

Algunos ERTIs, particularmente, las pruebas de CTDi y RTCA, permiten la medición simultánea de la citotoxicidad en células tumorales y en células normales, lo que permite la determinación de un índice terapéutico (Bosanquet *et al.*, *Leuk. Res.* 1996; 20: 143-53; Bosanquet *et al.*, *J Exp Ther Oncol* 2004; 4: 145-54).

Los investigadores han demostrado la capacidad predictiva de ERTIs en varios estudios científicos. Un estudio realizado en 1929 de las correlaciones clínicas en neoplasias hematológicas (Bosanquet *et al.* en Kaspers *et al.* (eds.), 2008) y otros estudios (p. ej., Kaspers GJ., *Methods Mol Med.* 2005; 110:49-57) indican un alto porcentaje de eficacia predictiva positiva, particularmente con respecto a la resistencia a fármacos. Integrando los resultados de múltiples artículos (Tabla 2), Nagourney halló que la eficacia predictiva positiva con respecto a la sensibilidad a fármacos era del 81,8 %, y la eficacia predictiva negativa con respecto a la resistencia a fármacos era del 83,3 % (adaptado de <http://www.rationaltherapeutics.com/physicians/contentl.aspx?rid=35> y las referencias bibliográficas en la misma (visitado el 7 de mayo de 2010)).

Tabla 2: Listado de correlaciones clínicas publicadas que soportan la capacidad predictiva de ERTIs

Cáncer hematológico	N	PV	NV	FP	FN	Ref.
LLA	3	2	1	0	0	1
LLA	17	14	2	1	0	2
LLA	25	16	3	5	1	3
LLA	130	90	18	20	2	4
LLA	58	40	6	0	2	5
LLA	4	1	2	1	0	6
LLA	4	3	1	0	0	7
LLA	29	18	5	2	4	8
LLA	2	2	0	0	0	9
LLA/LLC	55	38	7	10	0	10
LMA	4	0	1	2	1	2
LMA	11	6	5	0	0	11
LMA	21	11	8	2	0	6
LMA	83	74	9	0	0	12
LMA	27	6	13	0	8	13
LMA	21	10	9	2	0	14

Cáncer hematológico	N	PV	NV	FP	FN	Ref.
LMA	33	11	8	4	10	15
LMA/LLA/LNH	73	45	16	9	3	16
LMA	12	7	3	2	0	17
LMA	14	9	1	2	2	3
LMA	14	9	2	1	2	4
LMA	17	11	4	1	1	7
LMA	27	12	12	2	1	18
LMA	34	20	11	2	1	19
LLC	80	12	48	18	2	2
LLC	34	26	6	2	0	20
LLC	1	1	0	0	0	6
LLC	15	11	3	0	1	21
LLC	15	9	4	1	1	8
LLC	3	2	1	0	0	9
LLC/LLA/LNH	226	102	76	41	7	22
LLC (blástica)	9	2	6	1	0	8
LNH	1	1	0	0	0	17
LNH	10	3	3	3	1	2
LNH	3	2	0	1	0	1
LNH	50	27	10	11	2	23
LNH	10	6	3	1	0	8
LNH	3	0	3	0	0	9
Total	1.178	659	310	147	62	

N= número de casos; PV= positivos verdaderos; NV= negativos verdaderos; FP= falsos positivos; FN= falsos negativos; Ref.= bibliografía (véase las referencias al final de la memoria descriptiva); LLA= leucemia linfocítica aguda; LLC= leucemia linfocítica crónica; LMA= leucemia mieloide aguda; LNH= linfoma no Hodgkin

Un estudio clínico controlado aleatorio prospectivo se está llevando a cabo actualmente en el Reino Unido utilizando un gran número de pacientes con leucemia linfocítica crónica (estudio UK LRF LLC4, Catovsky *et al.*, *Lancet* 2007, 370: 230-39). El estudio conlleva la evaluación de un ERTI como un factor del resultado relacionado con la respuesta del paciente al tratamiento (Bosanquet *et al.*: *ASH Annual Meeting Abstracts Blood*, 2006 108:94a: Abstract 303). El estudio comenzó en 1999 e incluyó a 777 pacientes con LLC no tratados previamente. Los pacientes se trataron con clorambucilo (Chl) o fludarabina +/- ciclofosfamida (Flu o FluCi). En este estudio, la prueba de RTCA se utilizó para evaluar la sensibilidad *ex vivo* a los fármacos antes de tratamiento del paciente. Para el análisis, los pacientes se dividieron en tres grupos en función de su resultado ERTI: resistente a fármacos (RF), sensible a fármacos (SF), o grado intermedio a fármacos (IF). La Tabla 3 resume los resultados.

Tabla 3. Correlación de los resultados ERTI (SF, IF, y RF) y respuesta a los mismos fármacos en pacientes con leucemia linfocítica crónica

Resultado	Ch1	Flu	FluCi	Total
SF	85,1 (94)	90,7 (54)	95,7 (70)	89,9 (218)
IF	66,3 (92)	79,2 (53)	97,3 (37)	76,4(182)
RF	37,6 (24)	21,4(14)	25,0 (4)	31,0 (42)
Total	71,5 (210)	77,7 (121)	93,7 (111)	78,7 (442)

Los resultados se representan con el % de pacientes que responde (con el número de pacientes en paréntesis) a cada fármaco (Chl y Flu) y a cada combinación de fármacos (FluCi)

Como se muestra en la Tabla 3, los resultados de ERTI se correlacionan adecuadamente con las respuestas clínicas de los pacientes. Entre el 49 % de los pacientes que eran SF, la mayoría de ellos (90%), respondieron al tratamiento con quimioterapia, mientras que el 9,5% de los pacientes que eran RF, solo el 31% respondió a la quimioterapia. Entre los 24 pacientes que eran RF a Chl, el 71% era SF o IF a Flu, y todos mostraron SF o IF a la combinación de

FluCi. Entre los 14 pacientes que eran RF a Flu, solo el 36% era SF o IF a la combinación de FluCi. Estos resultados sugieren que el uso de los resultados de ERTI podría haber orientado tratamientos más efectivos que dan lugar a mejores resultados clínicos.

- 5 El documento WO2007/015926 se refiere a la evaluación de la respuesta a fármacos en una muestra de un paciente con LLC para desarrollar estrategias terapéuticas personalizadas utilizando un método de citometría de flujo que mide la apoptosis en respuesta a fármacos y combinaciones de fármacos.

10 Dado el enorme potencial terapéutico de los ensayos de medicina personalizada, existe una urgente necesidad en la técnica para el desarrollo de un ERTI utilizando tiempos de incubación más cortos. El uso de una prueba de este tipo para ayudar en las opciones de tratamiento podría contribuir a aumentar la tasa de respuesta, el tiempo de supervivencia libre de progresión y el tiempo de supervivencia global de los pacientes aquejados de cáncer. Preferentemente, la prueba utilizaría citometría de flujo para permitir la evaluación de la muerte celular tumoral individual y reducir el tiempo de incubación de la prueba para lograr un perfil de citotoxicidad en un periodo de tiempo corto. También es deseable que un ERTI proporcione información más extensa en relación con un mayor número de fármacos y concentraciones de fármacos que podrían ser eficaces, ya sea solo o en combinación.

Resumen de la invención

20 En su sentido más amplio, la invención se define por la materia objeto de las reivindicaciones adjuntas y los siguientes aspectos:

25 1. Un método para analizar la sensibilidad celular a fármacos, que comprende: a. la obtención de una muestra de sangre entera, sangre periférica entera o médula ósea entera que se ha extraído de un paciente con una neoplasia hematológica; b. la división de la muestra completa en al menos 35 alícuotas; c. la combinación de cada una de las 35 alícuotas con al menos una composición de fármacos; y d. medir la apoptosis o la depleción celular en cada una de las al menos 35 alícuotas por citometría de flujo.

30 2. El método del aspecto 1, en el que la composición de fármacos en cada alícuota difiere de la composición de fármacos en todas las otras alícuotas en al menos una identidad de fármaco, la concentración de una combinación de los mismos y en el que las composiciones de fármacos incluyen colectivamente al menos un fármaco no citotóxico.

3. El método del aspecto 1 o 2, en el que el análisis se completa en un periodo de 72 horas tras la combinación de las alícuotas con una composición de fármacos.

35 4. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 3, en el que el número de alícuotas combinadas con una composición de fármacos es de al menos 96.

5. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 4, en el que al menos una de las composiciones de fármacos comprende un fármaco no citotóxico.

6. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 5, en el que al menos una de las composiciones de fármacos combina un fármaco no citotóxico y un fármaco citotóxico.

40 7. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 6, en el que la muestra completa comprende células procedentes de una neoplasia hematológica seleccionada entre el grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda en adultos, leucemia linfoblástica aguda pediátrica, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda no M3, leucemia mieloide aguda M3, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin y leucemia mieloide crónica.

45 8. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 7, en el que la composición de fármacos comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en 5-azacitidina, alemtuzumab, aminopterina, amonafida, amsacrina, CAT-8015, bevacizumab, ARR Y520, trióxido de arsénico, AS1413, atra, AZD 6244, AZD1152, banoxantrona, behenoilara-C, bendamustina, bleomicina, blinatumomab, bortezomib, busulfán, carboplatino, CEP-701, clorambucilo, clordesoxiadenosina, cladribina, clofarabina, CPX-351, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabina, citosina arabinosa, dasatinib, daunorubicina, decitabina, cadena A de la ricina desglucosilada conjugada a inmunotoxinas anti-CD19/anti-CD22, dexametasona, doxorubicina, elacitarabina, entinostat, epratuzumab, erwinasa, etopósido, everolimus, exatecán mesilato, flavopiridol, fludarabina, fordesina, gemcitabina, gemtuzumab-ozogamicina, homoharringtonina, hidrocortisona, hidroxycarbamida, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón alfa-2a, yodo 1131 anticuerpo monoclonal BC8, ifosfamida, isotretinoína, laromustina, L-asparaginasa, lenalidomida, lestaurtinib, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, metilprednisolona, metilprednisona, midostaurina, mitoxantrona, nelarabina, nilotinib, oblimersen, paclitaxel, panobinostat, pegaspargasa, pentostatina, pirarrubicina, PKC412, prednisolona, prednisona, PSC-833, rapamicina, rituximab, rivabirina, sapacitabina, sorafenib, sorafenib, STA-9090, tacrolimus, tanespimicina, temsirolimus, tenipósido, terameprocol, talidomida, tioguanina, tiotepa, tipifarnib, topotecán, treosulfán, troxacitabina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, voreloxina, vorinostat, etopósido, zosuquidar y combinaciones de los mismos.

60 9. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 8, en el que la composición de fármacos comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en hidrato de óxido de aluminio, lorazepam, ampicilina, meropenem, cefepima, vancomicina, teicoplanina, ondansetrón, dexametasona, anfotericina B (liposómica), caspofungina, itraconazol, fluconazol, voriconazol, trimetoprima, sulfametoxazol, FECG, ranitidina, rasburicasa, paracetamol, metamizol, cloruro de morfina, omeprazol, paroxetina, fluoxetina, sertralina y combinaciones de los

mismos.

10. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 9, en el que cada una de las 35 alícuotas contiene al menos 500 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

11. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 9, en el que cada una de las 35 alícuotas contiene al menos 5.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

12. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 9, en el que cada una de las 35 alícuotas contiene al menos 10.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

13. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 9, en el que cada una de las 35 alícuotas contiene al menos 20.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

14. El método de cualquiera de los aspectos 1 a 9, en el que cada una de las 35 alícuotas contiene al menos 40.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

La presente invención se refiere al desarrollo de un ensayo de medicina personalizada para un paciente. En una realización general, la presente invención se dirige a métodos para analizar respuestas celulares a fármacos utilizando una prueba *ex vivo*. En la presente memoria se describen métodos de análisis de muestras de sangre entera, manipulando un gran número de variables y completando rápidamente los análisis.

Además de los efectos individuales del fármaco, se pueden utilizar análisis detallados de las interacciones de fármacos, incluyendo el índice de combinación y el índice de reducción de dosis, para identificar regímenes de politerapia eficaces. Las estimaciones de la exactitud de ambos índices pueden calcularse con algoritmos de estimación algebraicos precisos (es decir, simulaciones de Montecarlo) basándose en los métodos de efecto medio descritos por Chou y Talalay (Chou *et al.*, *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55). El Índice de Combinación (IC) es una medida cuantitativa del grado de interacción del fármaco en términos de efecto aditivo, en el que el efecto sinérgico se indica por un $IC < 1$, el efecto aditivo se indica por un $IC \sim 1$, y el antagonismo se indica por un $IC > 1$. Un índice de reducción de dosis (IRD) es una medida de cuánto puede reducirse la dosis de cada fármaco en combinación sinérgica en un nivel de efecto dado en comparación con solo la dosis de cada fármaco. Más recientemente, el método MixLow (Boik *et al.*, *BMC Pharmacol* 2008, 8:13; Boik, *Stat Med* 2008, 27(7):1040-61) se ha propuesto como alternativa al método de efecto medio de Chou y Talalay (Chou *et al.*, *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55) para estimar Índices de interacción farmacológica. Una ventaja del método MixLow es que el modelo de efectos mixtos no lineales utilizado para estimar parámetros de curvas de concentración-respuesta puede proporcionar estimaciones de parámetros más exactas que la linealización logarítmica y el análisis de mínimos cuadrados utilizados en el método de efecto medio. Un experto en la materia sabrá que estos cálculos y métodos relacionados se pueden utilizar para analizar interacciones farmacológicas para tratamientos con fármacos mixtos como se describe en la presente memoria.

La cantidad limitada de muestra que puede extraerse del paciente limita el número de composiciones de fármacos que pueden ensayarse para el ensayo de medicina personalizada. No obstante, los desarrollos recientes han proporcionado modelos de ratón que pueden propagar las células primarias de pacientes con tumores malignos hematológicos a través de múltiples ratones que se convierten en una fuente continua de células para pacientes (Pearson *et al.*, *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008, 324:25-51; Ito *et al.*, *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008, 324:53-76). Estos modelos pueden permitir un muestreo *ex vivo* de muchas más composiciones de fármacos, y en particular, de combinaciones de fármacos, de una muestra recientemente extraída de un paciente. Se contempla que estos modelos se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, las muestras pueden extraerse de un modelo animal, tal como un modelo de ratón. En particular, estos modelos pueden permitir explorar la eficacia de medicamentos concomitantes o adyuvantes dados a pacientes para paliar los efectos de la quimioterapia. Estos modelos también pueden permitir la exploración de la eficacia potencial de los fármacos seguros no citotóxicos aprobados, que, en el futuro, podrían agregarse a los tratamientos para un paciente individual para aumentar la probabilidad de la eficacia terapéutica. Además, la eficacia de cualquier combinación de fármacos de una composición de fármacos identificada en una experimentación *ex vivo* utilizando células de pacientes humanos, directamente procedentes de una muestra de pacientes o propagadas a través de modelos de ratón, podría ensayarse en modelos de ratón *in vivo*.

Como ensayo de medicina personalizada, es deseable proporcionar a pacientes y a cuidadores resúmenes de las respuestas celulares a fármacos y a combinaciones de fármacos.

La presente divulgación también incluye combinaciones de fármacos particulares que son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de LMA, LLA, LLC y LNH, y el uso de esas combinaciones de fármacos en el tratamiento de enfermedad linfoproliferativa.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la detección por citometría de flujo de la expresión de fosfatidilserina en células apoptóticas utilizando anexina V etiquetada con fluoresceína.

La Figura 2 representa un caso de un adulto con LLA-B precursora que muestra reordenamientos del gen BCR/ABL [t(9;22)positivo] y la detección de las células leucémicas y normales entre las células positivas para CD19 utilizando citometría de flujo cuantitativa.

La Figura 3 ilustra un protocolo para la evaluación *ex vivo* de sangre periférica (SP) o de médula ósea (MO) en una muestra procedente de un paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC).

La Figura 4 representa la respuesta *ex vivo* a varios fármacos actualmente aprobados para el tratamiento de LLC en nueve pacientes diferentes.

5 La Figura 5 representa el número de composiciones de fármacos deseables para optimizar un tratamiento con un ensayo de medicina personalizada para un paciente individual.

La Figura 6 representa varios fármacos no citotóxicos (es decir, paroxetina, fluoxetina, sertralina, guanabenz y astemizol) que inducen la apoptosis en las muestras malignas de LLC con una eficacia similar a los fármacos citotóxicos aprobados para el tratamiento de la LLC (es decir, fludarabina, clorambucilo, y mitoxantrona).

10 La Figura 7 representa una curva de dosis-respuesta para paroxetina en una muestra de sangre entera de un paciente con LLC y compara los efectos apoptóticos de la paroxetina en células leucémicas, T y CN.

La Figura 8 representa una diferencia cinética sobre la inducción de la apoptosis en muestras de sangre entera de un paciente con LLC por sertralina y tres fármacos actualmente utilizados en el tratamiento de la LLC (es decir, fludarabina, clorambucilo y mitoxantrona).

15 La Figura 9 representa la eficacia diferencial de los compuestos de la misma clase farmacológica que paroxetina (es decir, los ISRS) en la inducción de apoptosis en las muestras de LLC.

La Figura 10 representa la frecuencia de aciertos expresada como el número de muestras de pacientes, de 23 muestras de pacientes totales, para los que los fármacos no citotóxicos eliminan las células leucémicas de LLC con la misma eficacia que los fármacos citotóxicos aprobados, e ilustra que la mayoría de los fármacos no citotóxicos son eficaces en muy pocos pacientes.

20 La Figura 11 representa la potenciación de la eficacia del fármaco citotóxico aprobado clorambucilo, por el fármaco no citotóxico sertralina.

La Figura 12 representa el porcentaje de células positivas anexina V inducido por los fármacos citotóxicos vincristina, mitoxantrona, y ciclofosfamida (que se utilizan en los tratamientos de LLC) y el porcentaje de células positivas anexina V inducido por los fármacos no citotóxicos omeprazol y aciclovir (que a menudo se prescriben para tratar los efectos secundarios causados por la quimioterapia).

25 Las Figuras 13A-C ilustran diseños de una placa de 96 pocillos para la experimentación de medicina personalizada de pacientes con LLC.

Las Figuras. 14A-F ilustran un diseño de una placa de 96 pocillos para la experimentación de medicina personalizada de pacientes con mieloma múltiple.

30 La Figura 15 ilustra un diseño de una placa de 96 pocillos para la experimentación de medicina personalizada de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), incluyendo fármacos citotóxicos y no citotóxicos administrados en los protocolos de tratamiento de PETHEMA. MTX: metotrexato; 6MP: 6-mercaptopurina; ARA-C: citarabina; DNR: daunorrubicina; ADRIA: adriamicina; M: mitoxantrona; VP-16: etopósido; VM-26: tenipósido; CF: ciclofosfamida; IFOS: ifosfamida; V: vincristina; VIND: vindesina; L-ASA: asparaginasa; IMAT: imatinib; R: rituximab; P: prednisona; HC: hidrocortisona; DXM: dexametasona; Foli: leucovorina; Mesna: mesna; Om: omeprazol; O: ondansetrón; Allop: alopurinol; FECCG: filgrastima.

La Figura 16 ilustra un diseño de una placa de 96 pocillos para la experimentación de medicina personalizada de pacientes con síndrome mielodisplásico, incluyendo fármacos citotóxicos y no citotóxicos administrados en los protocolos de tratamiento de PETHEMA.

40 La Figura 17 ilustra un diseño de una placa de 96 pocillos para la experimentación de medicina personalizada de pacientes con leucemia mieloblástica aguda (no M3), incluyendo fármacos citotóxicos y no citotóxicos administrados en los protocolos de tratamiento de PETHEMA. Dauno: daunorrubicina; Ida: idarrubicina; ARA-C: citarabina; Mitox: mitoxantrona; VP16: etopósido; Fluda: fludarabina; FECCG: filgrastima; Ondans: ondansetrón; Cotri: co-trimoxazol; AcF: ácido fólico; Alop: alopurinol; Om: omeprazol; Carhop: carboplatino; Dauno lipo: daunorrubicina liposómica (DaunoXome®); AMSA: amsacrina; GO: gentuzumab-ozogamicina.

La Figura 18 ilustra un diseño de una placa de 96 pocillos para los ensayos de medicina personalizada de pacientes con leucemia mieloblástica aguda M3 (promielocítica), incluyendo fármacos citotóxicos y no citotóxicos administrados en los protocolos de tratamiento de PETHEMA. ATRA (ácido trans-retinoico): tretinoína; Ida: idarrubicina; Mitox: mitoxantrona; ARA-C: citarabina; 6-MP: 6-mercaptopurina; MTX: metotrexato; Ondans: ondansetrón; Alop: alopurinol; Om: omeprazol; Dexa: dexametasona; VP-16: etopósido; Fluda: fludarabina; Carbop: carboplatino; Dauno lipo: daunorrubicina liposómica; Dauno: daunorrubicina; Cotri: co-trimoxazol; FAc: ácido fólico.

50 La Figura 19 representa el efecto de sertralina en la inhibición de la proliferación celular en las líneas celulares TOM-1 y MOLT-4.

La Figura 20 representa el efecto de sertralina en la inducción de apoptosis en las líneas celulares TOM-1 y MOLT-4 a las 24 horas.

La Figura 21 representa el efecto de sertralina en la inducción de la caspasa-3 activa en las líneas celulares TOM-1 y MOLT-4 a las 24 horas.

60 La Figura 22 representa la eficacia *ex vivo* de fármacos individuales (es decir, rituximab, fludarabina, mitoxantrona, y ciclofosfamida (mafosfamida)), y de las politerapias más resistentes y sensibles con combinaciones de estos fármacos individuales en una muestra de LLC.

La Figura 23 representa los resultados del mismo experimento que la Figura 22 con una curva de dosis-respuesta de 5 puntos que caracteriza la eficacia *ex vivo* de fludarabina, ciclofosfamida (mafosfamida) y su combinación.

65 La Figura 24 representa los resultados del mismo experimento que la Figura 24 con una curva de dosis-

respuesta de 5 puntos que caracteriza la eficacia *ex vivo* de fludarabina, ciclofosfamida (mafosfamida), mitoxantrona y sus combinaciones.

La Figura 25 representa los resultados del mismo experimento que la Figura 24 con una curva de dosis-respuesta de 5 puntos que caracteriza la eficacia *ex vivo* de fludarabina, ciclofosfamida (mafosfamida), rituximab y sus combinaciones.

La Figura 26 representa el efecto de fludarabina y mafosfamida solo y en combinación en cinco concentraciones diferentes en un protocolo clínico para dos pacientes, P2.0144 (izquierda) y P2.0149 (derecha).

La Figura 27 representa un cálculo de la sinergia entre fludarabina y mafosfamida (ciclofosfamida) encontrado en un paciente P2.0149 con LLC de la Figura 26 utilizando el método de Chou y Talalay (Chou *et al.*, *Eur J Biochem* 1981, 115(1):207-16; Chou *et al.*, *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55).

La Figura 28 representa los efectos del tiempo de incubación (tanto el tiempo de exposición al fármaco (0,5, 4, y 8 horas) como el tiempo de incubación total (24 o 48 horas)) en la eficacia de fludarabina y sertralina para inducir la apoptosis en las células malignas en muestras de LLC.

La Figura 29 representa una matriz para 2 combinaciones de fármacos.

La Figura 30 representa una matriz para 3 combinaciones de fármacos.

La Figura 31 representa una matriz para 4 combinaciones de fármacos.

La Figura 32 representa una multiplexación de 3 colores de leucocitos de sangre periférica utilizando colorantes de seguimiento celular.

La Figura 33 representa colorantes fluorocromos utilizados para pocillos multiplex en una muestra de LLC que distingue las células malignas y detecta la apoptosis con anexina V.

Descripción detallada de la realización preferente

La presente invención proporciona métodos para evaluar la eficacia apoptótica *ex vivo* para múltiples combinaciones de fármacos utilizando una plataforma de detección. Específicamente, la presente invención proporciona un método para realizar una detección basada en células que incorpora tanto la preparación automatizada de muestras como la evaluación automatizada por citometría de flujo que está orientada a la adquisición rápida de datos, análisis y notificación de resultados. El uso de métodos por citometría de flujo permite la evaluación de la muerte celular individual, cuya resolución de una célula individual puede permitir el acortamiento del tiempo de incubación de ensayos *ex vivo*, y proporcionar así una respuesta más rápida en los perfiles de citotoxicidad. La plataforma de detección basada en células también se puede utilizar para completar todas las pruebas de detección y validación en 24 a 72 horas desde la extracción de la muestra. Esta línea temporal permite la notificación de los resultados a un médico después de que se haya realizado el diagnóstico en la neoplasia hematológica y antes del inicio del tratamiento. En consecuencia, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para medicina personalizada y para identificar posibles nuevas indicaciones para fármacos aprobados.

A fin de que la presente invención pueda entenderse con más facilidad, ciertos términos se definen en primer lugar. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

Como se utiliza en la presente invención, "CE₅₀" y "CE₉₀" se refieren a las concentraciones de fármacos requeridas para provocar el 50 % y el 90 % de la apoptosis máxima, respectivamente.

Como se utiliza en la presente memoria, "*ex vivo*" se refiere a células primarias de pacientes humanos *in vitro*, en el que las células pueden ser recién extraídas, criopreservadas o congeladas para preservar su estado. En algunas realizaciones, estas células se descongelan para la evaluación *in vitro* de los efectos de los fármacos.

Como se utiliza en la presente memoria, "índice terapéutico *ex vivo*" se refiere a la relación entre la muerte de células neoplásicas y la muerte de células sanas.

Como se utiliza en la presente memoria, "Exvitech" se refiere a una plataforma integrada que incorpora una preparación automatizada de muestras, el sistema EPS para la entrada automatizada a un citómetro de flujo, y el análisis automatizado bioinformático.

Como se utiliza en la presente memoria, "neoplasias hematológicas", también llamadas "tumores malignos hematológicos", se refiere a un grupo de enfermedades definido de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds): *WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agent for Research of Cancer (IARC), Lyon 4ª Edición. Lyon 2008*).

Como se utiliza en la presente memoria, ensayo/experimentación de respuesta tumoral individualizada (ERTI) se refiere a los métodos que describen el efecto de los tratamientos contra el cáncer en las células tumorales enteras vivas recién extraídas de pacientes con cáncer.

Como se utiliza en la presente memoria, "politerapia" se refiere al tratamiento de un paciente con múltiples fármacos.

Como se utiliza en la presente memoria, un compuesto o fármaco "no citotóxico" se refiere a un compuesto o

fármaco que no está aprobado por una agencia reguladora como agente citotóxico, quimioterapéutico, o antineoplásico.

5 Como se utiliza en la presente memoria, "alícuota" se refiere a una muestra o fracción de la misma que puede estar en recipientes o pocillos distintos, o puede formarse en un tubo u otro medio, en el que las diferencias en el contenido de fármacos, identidad de fármacos, o concentración de fármacos puede mantenerse incluso en muestras congruentes, si las muestras son continuas o están separadas por un gas o un líquido inmiscible (p. ej., aceite).

10 Como se utiliza en la presente memoria, "composición de fármacos" se refiere a único fármaco, y a varias concentraciones del mismo, o combinaciones de fármacos, y varias concentraciones de los mismos, administrados a una alícuota para su análisis o a un paciente para su tratamiento.

15 Como se utiliza en la presente memoria, "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una formulación de un compuesto que no causa irritación significativa a un organismo al que se administra y no abroga la actividad biológica y propiedades del compuesto. Las sales farmacéuticas pueden obtenerse mediante experimentos rutinarios.

20 Como se utiliza en la presente memoria, "pocillo" o "cámara" se refiere a cualquier estructura con la capacidad para contener una muestra lo suficiente para realizar los métodos descritos en la presente memoria. Un experto en la técnica sabrá que un "pocillo" o una "cámara" puede incluir, p. ej., un rebaje en una placa, un punto en un portaobjetos creado por la tensión superficial, o una región de un dispositivo microfluídico.

25 Ahora se hará referencia con detalle a las realizaciones actualmente preferentes de la invención, ejemplos de las cuales se proporcionan los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, los números de referencia idénticos o similares se utilizan en los dibujos y en la descripción para referirse a las partes idénticas o similares. Debe observarse que los dibujos se encuentran en forma simplificada y no están a escala precisa. Aunque la divulgación de la presente memoria se refiere a ciertas realizaciones ilustradas, queda entendido que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. Los métodos desvelados pueden utilizarse junto con varios procedimientos médicos que se utilizan convencionalmente en la materia.

30 Los métodos desvelados tienen varias ventajas sobre los de la técnica anterior que se describen en la presente memoria. Una ventaja es que los métodos pueden analizar las respuestas celulares en un gran número de variables, incluyendo muchas composiciones de fármaco y diferentes tiempos de incubación. Otra ventaja es la velocidad a la que los métodos analizan las respuestas celulares a fármacos. Otra ventaja es la capacidad para analizar sangre entera y de este modo imitar más estrechamente el entorno *in vivo* de un paciente. Además, los presentes métodos son capaces de generar curvas de dosis-respuesta para el gran número de fármacos y composiciones de fármacos. Combinados, estos métodos ofrecen la ventaja de desarrollar un régimen de politerapia para tratar pacientes. En una realización específica, los métodos facilitan el desarrollo de un régimen de politerapia para tratar pacientes que padecen un trastorno hematológico.

35 Los métodos descritos son aptos para el uso de diversos tipos de equipos, incluyendo uno o más robots de preparación de muestras y uno o más citómetros de flujo para analizar la sensibilidad celular a composiciones de fármacos. La citometría de flujo permite el análisis de células individuales a velocidades muy superiores a cualquier otra tecnología de análisis de células individuales en la materia. Esto permite analizar un número estadísticamente significativo de células de forma más rápida que el uso de otras técnicas alternativas. En una realización, la citometría de flujo se utiliza para analizar la sensibilidad celular a composiciones de fármacos. En una realización, el análisis se completa en un periodo de aproximadamente 96 horas desde el momento en que se obtiene una muestra. En otra realización, el análisis se completa en un periodo de aproximadamente 72 horas desde el momento que se obtiene una muestra. En otra realización, el análisis se completa en un periodo de aproximadamente 48 horas desde el momento en que se obtiene una muestra. En otra realización, el análisis se completa en un periodo de aproximadamente 24 horas desde el momento que se obtiene una muestra. Un ejemplo de un citómetro de flujo útil para los métodos descritos en la presente memoria se proporciona en la patente de Estados Unidos n.º 7.459.126.

40 Los robots de preparación de muestras y los citómetros de flujo pueden integrarse entre sí, o los robots de preparación de muestras y los citómetros de flujo pueden no estar integrados entre sí. Un citómetro de flujo se utiliza sin un robot de preparación de muestras. En una realización específica, un citómetro de CYAN™ (Beckman Coulter, Fullerton, CA) se utiliza sin un robot de preparación de muestras. Existen muchos tipos diferentes de robots de preparación de muestras y manipuladores de líquidos que se conocen en la materia. En una realización, un citómetro de flujo se utiliza con cualquier robot de preparación de muestras adecuado o manipulador de líquidos que se conoce en la materia. En otra realización, un citómetro de CYAN™ (Beckman Coulter, Fullerton, CA) se integra con un pequeño manipulador de líquidos, llamado EPS, para automatizar el suministro de las muestras al citómetro. En una realización específica, el EPS es un manipulador de líquidos Tecan 360 (Tecan, Männedorf, Suiza). En otra realización, el EPS se personaliza con bombas de jeringa y una válvula de conmutación de interfaz que permite que los contenidos de cada pocillo se aspiren a través de una punta fija, se transfieran a una malla de retención, y se inyecten en el citómetro. En otra realización, la preparación de muestras y el cultivo en placas del compuesto se

puede completar con un manipulador de líquidos BIOMEK® 3000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Cualquier número de placas de pocillos puede ser utilizado, y una placa de pocillos particularmente útil es una placa de 96 pocillos. También se contemplan otros tamaños de placas, incluyendo aquellas con 24, 48, 384, 1.536, 3.456, o 9.600 pocillos. Las unidades de preparación de muestras pueden recubrirse en un armario de flujo que permite que los compuestos y las muestras permanezcan estériles mientras se manipulan. Hasta la compleción del ajuste de la prueba, las placas se cargan en el sistema de análisis de muestras.

El citómetro de CYAN™ (Beckman Coulter, Fullerton, CA) es un instrumento que dispone de tres láseres y nueve detectores y las metodologías que se conocen en la materia se han desarrollado para aprovechar al máximo el multiláser y, en consecuencia, las capacidades de medición multiparamétricas de tales citómetros de flujo modernos. En una realización, un citómetro de flujo de láser único se utiliza para la etapa de análisis. En otra realización, un citómetro de flujo multiláser se utiliza para la etapa de análisis. El desarrollo y optimización de un amplio conjunto de fluorocromos y químicas de conjugación permite una variedad de ligandos, tales como inmunoglobulinas y moléculas pequeñas para ser conjugados con los fluorocromos. Los láseres con líneas de emisión que oscilan desde la región ultravioleta a la roja del espectro de luz pueden excitar estos fluorocromos. En consecuencia, un gran número de reactivos espectralmente distintos puede utilizarse para etiquetar células para el estudio con instrumentación basada en fluorescencia, tal como la citometría de flujo. Estos reactivos se conocen adecuadamente en la materia. En una realización, uno o más fluorocromos se utilizan durante la etapa de análisis. En algunas realizaciones, una o más tinciones se utilizan en el análisis de las respuestas celulares a composiciones de fármacos.

Existen varios métodos conocidos en la materia que minimizan la mezcla de la muestra accidental en los tubos antes del análisis. Se sabe que uno de tales métodos que minimizan la mezcla de la muestra accidental durante el ensayo *ex vivo* es una bomba de desplazamiento positivo que permite que todos los tubos que se van a lavar entre pocillos eliminen el arrastre de células. Otro método que es útil para minimizar la mezcla de la muestra accidental es una prueba de punto de equilibrio. Una prueba de punto de equilibrio resulta ventajosa porque el arrastre del compuesto no es un problema. En una realización, la prueba comprende una prueba de punto de equilibrio.

Existen varios métodos conocidos en la materia para recoger y almacenar datos obtenidos de ensayos que utilizan citómetros de flujo. En una realización, el software incorporado con el EPS registra la información de tiempos en los tiempos de inyección y de incubación para cada pocillo. Cuando se ejecuta una prueba de detección, dos archivos de adquisición pueden recogerse. En una realización, un archivo, situado en el software del citómetro, contiene datos reales de cada célula analizada por el instrumento. En otra realización, un segundo archivo es un archivo de temporización, que se encuentra en el software de EPS o en el software del citómetro, que contiene datos reales para cada célula analizada por el instrumento. Cada uno de estos archivos puede ser nombrado de acuerdo con un código de barras escaneado de la placa del pocillo, p. ej., una placa de 96 pocillos, al inicio de una ejecución de prueba.

Un usuario puede cargar todos los archivos de ambos instrumentos en un programa de software de análisis, tal como un analizador de EPS. Este programa está diseñado para separar los datos adquiridos del citómetro en grupos y asignar los números de pocillos de los compuestos que se mezclan con las células en cada grupo. Otro uso del programa implica seleccionar poblaciones de las poblaciones individuales basándose en lecturas fluorescentes de manera que cada población individual se pueda analizar de forma discreta. También se evalúa un marcador de análisis, incluido en la configuración de prueba. En una realización, para los ensayos de detección y validación, se utiliza anexina V-FITC, un marcador de apoptosis conjugado con un fluoróforo, para discriminar células vivas de las que entran en la vía apoptótica.

Una vez terminado el análisis, los archivos se suben a una base de datos. En una realización, la base de datos es ACTIVITYBASE™ de IDBS (Guildford, RU). La subida de archivos a una base de datos permite la rápida evaluación de los datos para determinar los compuestos que son activos para cada muestra del paciente. A medida que los datos se acumulan, pueden construirse y desarrollarse herramientas bioinformáticas para facilitar la interpretación de los datos. Como ejemplo, los criterios farmacológicos, tales como CE_{50} , CE_{90} , apoptosis máxima, etc., de los datos adquiridos pueden ser comparados a través de numerosas muestras de pacientes y se correlacionan con los resultados de inmunofenotipificación e información genética. Teniendo en cuenta las grandes cantidades de datos adquiridos con cada ensayo de detección, un sistema de gestión de base de datos flexible es importante para el proceso de detección.

Este sistema puede determinar el índice terapéutico *ex vivo* mediante la medición de la capacidad de una composición de fármacos para inducir apoptosis. Las figuras 1 y 2 representan la capacidad de detectar células apoptóticas y diferenciar entre fenotipos normales y tumorales utilizando citometría de flujo. En una realización, el método utiliza citometría de flujo para distinguir entre fenotipos normales y tumorales. En otra realización, el método utiliza citometría de flujo y anticuerpos monoclonales para diferenciar entre fenotipos normales y tumorales. En otra realización, el método utiliza citometría de flujo para detectar células apoptóticas. En una realización específica, el método utiliza anexina V acoplada a fluoresceína isotiocianato (FITC) para detectar la expresión de fosfatidilserina en células apoptóticas. El uso simultáneo de las combinaciones apropiadas de anticuerpos monoclonales que se conocen en la materia con estrategias de análisis multiparamétricos permite la discriminación de las células leucémicas de las células normales residuales presentes en muestras de pacientes con trastornos hematológicos.

En una realización, el método permite la discriminación entre células malignas y células normales, ya sea en muestras de sangre o de médula ósea. En otra realización, la discriminación entre células malignas y normales en sangre o médula ósea se realiza de acuerdo con la reciente metodología desarrollada por la normativa para Euroflow (EuroFlow Consortium, *Cytometry A*, septiembre de 2008; 73(9):834-46; van Dongen *et al.*, 14º Congreso EHA, Berlín, AL, 4 de junio de 2009: que se publicó en *Leukemia* en 2010 (en prensa)).

Un proceso de detección *ex vivo* para composiciones de fármacos se muestra esquemáticamente en la Figura 3. En la Figura 3, se evita que la muestra se coagule por la heparina, se inmunofenotipifique y se recuente. Luego se diluye la muestra para conseguir una concentración de células leucémicas de aproximadamente 4.000 células/ μ l. 45 μ l de la suspensión celular se añaden a placas de 96 pocillos que contienen los agentes farmacológicos en 5 concentraciones diferentes. Después de incubar los fármacos y las combinaciones de fármacos con la muestra durante aproximadamente 48 horas, los glóbulos rojos se lisan y se lavan para concentrar los leucocitos que contienen las células malignas. Esto acelera el proceso de detección reduciendo drásticamente el volumen y el número de células que necesitan ser evaluadas por el citómetro de flujo. Se añaden anticuerpos etiquetados con fluorescencia para distinguir las células malignas de las sanas y se añade anexina V etiquetada con fluorescencia para medir el nivel de apoptosis en cada población de células, tal como en las células malignas. Se realiza entonces la detección y se analizan y notifican la actividad de cada composición de fármaco determinada y los resultados.

En una realización, el método comprende la división de una muestra en alícuotas y la distribución de las alícuotas en placas con pocillos. Estas placas con pocillos contienen fármacos individuales o combinaciones de fármacos en diversas concentraciones. En una realización, las placas con pocillos contienen fármacos individuales o combinaciones en varias concentraciones antes de la introducción de las muestras celulares. En otra realización, las muestras celulares se introducen en los pocillos antes de la introducción de los fármacos individuales o de las combinaciones en diversas concentraciones. En otra realización, una extensa biblioteca de compuestos puede utilizarse, incluyendo aproximadamente 20, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 500, 700, 1.000, o 2.000 compuestos, un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores precedentes, o un mayor número de compuestos.

En algunas realizaciones, las alícuotas contienen un número detectable de células enfermas por pocillo. En una realización, las alícuotas contienen aproximadamente 500 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo. En otra realización, las alícuotas contienen aproximadamente 5.000 células enfermas o neoplásicas por pocillo. En otra realización, las alícuotas contienen aproximadamente 10.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo. En otra realización, las alícuotas contienen aproximadamente 20.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo. En otra realización, las alícuotas contienen aproximadamente 40.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo. Los ensayos de las muestras pueden ejecutarse en paralelo. En una realización, al menos dos alícuotas se ensayan en paralelo para permitir la identificación inmunofenotipificada. Además, los pocillos de control sin fármaco alguno pueden incluirse (no mostrado) para identificar el nivel espontáneo de apoptosis no asociada con el tratamiento de fármacos. En una realización, el método utiliza los pocillos de control para identificar el nivel espontáneo de apoptosis en una muestra.

El periodo de tiempo para la incubación de las diferentes composiciones de fármacos con las alícuotas puede variar. En una realización, el periodo de tiempo es de hasta aproximadamente 24 horas. En otra realización, el periodo de tiempo es de hasta aproximadamente 48 horas. En otra realización, el periodo de tiempo es de hasta aproximadamente 72 horas. En otra realización, el periodo de tiempo es de hasta aproximadamente 96 horas. En otra realización, el periodo de tiempo es de hasta aproximadamente 120 horas. Tras la incubación durante un tiempo especificado, las alícuotas de la muestra expuestas a composiciones de fármacos pueden ser tratadas con un tampón para lisar la población de eritrocitos y concentrar la población de leucocitos. En una realización, un tampón conocido en la materia se utiliza para lisar la población de eritrocitos. Cada pocillo se incuba después con un reactivo para detectar la apoptosis utilizando citometría de flujo. En una realización, el reactivo es anexina V.

Es posible evaluar, utilizando citometría de flujo, el efecto de cada fármaco en cada tipo de célula y cuantificar el nivel de muerte celular selectiva inducida por cada fármaco. Los resultados se pueden evaluar entonces y, si se desea, un nuevo ensayo se puede iniciar con una muestra o alícuota adicional con el fin de confirmar los resultados más relevantes con más detalle, tales como las 10 mejores composiciones y concentraciones de fármacos previamente identificados. La selección del fármaco o de la composición de fármacos apropiada que puede inducir selectivamente la apoptosis en células neoplásicas, tales como células de leucemia, se puede efectuar después de que la prueba se realice en una muestra del paciente. En una realización, se identifican aproximadamente 5-20 composiciones de fármacos y se vuelven a ensayar con una muestra reciente. En una realización específica, se identifican las cinco mejores composiciones de fármacos y se vuelven a ensayar con una muestra reciente. En otra realización específica, se identifican las diez mejores composiciones y se vuelven a ensayar con una muestra reciente. En otra realización específica, se identifican las 20 mejores composiciones de fármacos y se vuelven a ensayar con una muestra reciente.

Los métodos proporcionados en la presente memoria se han utilizado para analizar varios fármacos actualmente aprobados para la leucemia linfocítica crónica (LLC) en varios pacientes. Por ejemplo, la eficacia de los fármacos citotóxicos aprobados individualmente en la inducción de apoptosis en las células malignas de muestras de pacientes *ex vivo* se proporciona en la Figura 4. La Figura 4 demuestra que hay una gran variabilidad de una

persona a otra en las respuestas a fármacos, destacando el potencial de los métodos descritos en la presente memoria como ensayos de medicina personalizada.

5 En una realización, el método identifica composiciones de fármacos que inducen una apoptosis superior al 90 % en las muestras de pacientes. En otra realización, el método identifica composiciones de fármacos que inducen una apoptosis superior al 75 % en las muestras de pacientes. En otra realización, el método identifica composiciones de fármacos que inducen una apoptosis superior al 50 % en muestras de pacientes.

10 La Figura 4 demuestra que los métodos descritos en la presente memoria también pueden detectar composiciones de fármacos que generalmente no inducen apoptosis en las muestras de pacientes. La incapacidad para inducir apoptosis puede ser resultado de la predisposición genética de un paciente a la resistencia a fármacos o la resistencia inherente de la neoplasia a un fármaco. Por cualquier motivo, se desea la capacidad de predecir la incapacidad de una composición de fármacos para inducir apoptosis. En una realización, el método identifica composiciones de fármacos que inducen una apoptosis inferior al 90% en muestras de pacientes. En otra
15 realización, el método identifica composiciones de fármacos que inducen una apoptosis inferior al 75% en muestras de pacientes. En otra realización, el método identifica composiciones de fármacos que inducen una apoptosis inferior al 50% en muestras de pacientes. En otra realización, el método identifica composiciones de fármacos que inducen una apoptosis inferior al 30% en muestras de pacientes.

20 El uso de muestras completas, tales como muestras de sangre periférica entera o de médula ósea, recientemente obtenidas y tratadas con heparina para evitar la coagulación, y diluidas en caso necesario, es una característica ventajosa de los métodos descritos en la presente memoria. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan una muestra de sangre entera. En otra realización, los métodos descritos en la presente
25 memoria utilizan una muestra de sangre periférica entera. En otra realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan una muestra de médula ósea. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan muestras extraídas de modelos animales. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan muestras extraídas de un modelo de ratón. Las muestras completas son ventajosas ya que las muestras habituales *in vitro* aíslan solamente la fracción mononuclear que contiene células tumorales y descarta los correspondientes linfocitos polimorfonucleares, eritrocitos, proteínas y otros elementos de plasma a través de
30 lavados. Esto altera seriamente el contexto biológico en el que se evalúan los efectos de un fármaco. En cambio, los métodos descritos en la presente memoria pueden mantener los eritrocitos en el plasma, así como proteínas, tales como albúmina que unen normalmente aproximadamente el 90% a 98% de cada fármaco.

35 De este modo, las concentraciones de fármacos utilizadas en las pruebas descritas en la presente memoria pueden considerarse más cerca de las concentraciones reales de fármacos existentes en el plasma de un paciente. Utilizar muestras completas también es importante porque facilita a uno observar los efectos de los anticuerpos, tales como camptotaxina o rituximab en la inducción de la apoptosis en células tumorales. Una métrica diferente, tal como el porcentaje de depleción de células en lugar del porcentaje de apoptosis también puede ser importante. Aunque ambas métricas miden la apoptosis, la depleción de células cuenta las células que ya no viven en relación con las
40 alícuotas de control sin fármaco. La detección de la apoptosis directa cuenta las células que están experimentando apoptosis en el momento de la medición. La diferencia es el número de células que, después de la apoptosis, influyen en la necrosis y ya no pueden detectarse por el citómetro de flujo. Dependiendo del momento de la medición, estas dos pruebas pueden notificar resultados diferentes. Por ejemplo, en tiempos de detección más cortos (p. ej., 24 horas), la depleción celular y la apoptosis celular son similares. No obstante, en tiempos de
45 detección más largos (p. ej., 48 a 72 horas), estas mediciones divergen, a medida que el número de células que se someten primero a apoptosis, y dejan de ser detectables, aumenta. Para que rituximab induzca apoptosis, se requiere un complemento encontrado en la fracción mononuclear que se elimina en las pruebas *in vitro* comunes. En consecuencia, los métodos descritos en la presente memoria permiten que se mantengan las condiciones del microentorno celular original en gran medida en las muestras analizadas. En una realización, los métodos descritos
50 en la presente memoria mantienen esencialmente el microentorno celular original.

La plataforma automatizada de citometría de flujo descrita en la presente memoria es la primera plataforma de este tipo capaz de detectar un gran número de composiciones de fármacos variables en las muestras hematológicas del paciente *ex vivo*. Esta plataforma permite la exploración de múltiples combinaciones de fármacos para la
55 inducción de la apoptosis en un paciente individual. Debido a que los hematólogos utilizan generalmente solo fármacos y combinaciones de fármacos que están formalmente acordados en un protocolo de tratamiento (p. ej., validado mediante ensayos clínicos), los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria incluyen preferentemente la evaluación de fármacos y combinaciones de fármacos en los protocolos de tratamiento existentes. Estos protocolos de tratamiento pueden incluir protocolos reconocidos en países particulares. Estos
60 protocolos de tratamiento también pueden incluir protocolos aprobados más antiguos, a pesar de que ya no son el protocolo de tratamiento preferente. Los protocolos experimentales más recientes (p. ej., los que aún son ensayos clínicos) también se incluyen, incluyendo las nuevas composiciones de fármacos de fármacos aprobados o de fármacos de ensayos clínicos aún en fase II o III. Los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria también pueden evaluar combinaciones de fármacos para cada indicación de un tumor maligno hematológico,
65 incluyendo fármacos aprobados y aquellos de los ensayos clínicos en fase II y III.

Los ensayos de ERTI *ex vivo* utilizados previamente para guiar el tratamiento personalizado a pacientes estaban restringidos a los fármacos individuales, o a un número muy pequeño de combinaciones de fármacos. El beneficio significativo de la evaluación de múltiples combinaciones de fármacos, p. ej., utilizando la plataforma ExviTech, se demuestra en la Figura 22. Para la muestra del paciente con LLC en la Figura 22, los fármacos de un individuo con LLC (izquierda) eran ineficaces, lo que sugiere un tratamiento ineficaz. No obstante, estos mismos fármacos produjeron tres combinaciones que eran muy eficaces en la eliminación de todas las células leucémicas (derecha), lo que sugiere un potencial como tratamiento sensible. De este modo, las predicciones opuestas se han hecho mediante la evaluación de solo fármacos individuales o solo combinaciones de fármacos utilizados en los protocolos de tratamiento actuales. La Figura 22 muestra información que podría ser de suma importancia para el tratamiento eficaz de los protocolos resistentes a neoplasias hematológicas que predicen la falta de respuesta clínica (centro) y de los protocolos altamente sensibles que podrían predecir una respuesta clínica favorable (derecha).

En algunas realizaciones, los ensayos de medicina personalizada descritos en la presente memoria evalúan cinco concentraciones diferentes de cada fármaco o combinación de fármacos. Esto permite que se determine una curva de dosis-respuesta mínima que proporciona una determinación farmacológica más precisa de la eficacia que los datos de dosis individuales. También facilita un control de calidad mediante el análisis de si los cinco puntos se ajustan a una curva sigmoidea de dosis-respuesta. Los mismos datos descritos anteriormente en la Figura 22 para una muestra de LLC se muestran en las curvas de dosis-respuesta de 5 puntos en las Figuras 23-25.

En la evaluación de las combinaciones de fármacos *ex vivo* es importante determinar si existe cooperatividad positiva o negativa entre los fármacos combinados, también referida como sinergia. Es probable que dicha cooperación sea predictiva *ex vivo* de la cooperación *in vivo* en el paciente. La sinergia positiva entre fármacos indica un probable aumento en la eficacia relativa a la toxicidad que es un índice terapéutico superior. Dada la naturaleza altamente tóxica de los fármacos citotóxicos, aumentar su índice terapéutico podría ser terapéuticamente importante. Por lo tanto, se han hecho esfuerzos para cuantificar la sinergia de fármacos, y el método más comúnmente utilizado es el de Chou y Talalay (Chou *et al.*, *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55). La Figura 26 muestra la combinación sinérgica de fludarabina y mafosfamida (el metabolito y el principio activo de la ciclofosfamida) en dos muestras de pacientes con LLC, en el que el índice cooperativo (IC) se calcula utilizando el programa Calcsyn (Chou *et al.*, *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55) para caracterizar el potencial sinérgico de las combinaciones. La Figura 27 representa un cálculo más elaborado del sinergismo encontrado en un paciente P2.0149 de la Figura 26 utilizando el método de Chou y Talalay.

La eficacia de los fármacos y combinaciones de fármacos también puede verse afectada por su cinética. La Figura 28 muestra un comportamiento cinético diferente en una muestra de LLC con el fármaco citotóxico aprobado fludarabina y el fármaco antidepresivo no citotóxico sertralina. La sertralina (paneles de la derecha) elimina todas las células malignas en 24 horas (panel superior derecho), mientras que la fludarabina requiere 48 horas (panel inferior izquierdo). No obstante, ambos fármacos requieren solo 30 minutos de incubación con la muestra para inducir la apoptosis máxima. Esto indica que, aunque la apoptosis medida por anexina V requiere 24 o 48 horas para que sea completamente detectable, las células malignas están programadas para la apoptosis en un corto periodo de incubación. En una realización, las composiciones de fármacos se incuban en periodos de tiempo de aproximadamente 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores precedentes. En otra realización, la apoptosis se mide en puntos temporales en aproximadamente 24 horas, 48 horas, o 72 horas después del inicio de la incubación, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores precedentes.

Tal y como demuestra la metodología descrita en la presente memoria, esta plataforma permite la evaluación de cientos a miles de pocillos individuales que contienen muestras hematológicas mezcladas con medicamentos que representan diferentes composiciones y concentraciones. El límite de composiciones de fármacos es dictado por el volumen y celularidad de la muestra hematológica obtenida del paciente en lugar del rendimiento de la plataforma. Debido al pequeño volumen utilizado para cada composición de fármacos, tal como aproximadamente 20.000 células por pocillo, es posible evaluar hasta aproximadamente 10.000 o más composiciones de fármacos por muestra obtenida o hasta 20.000 o más composiciones de fármacos por muestra en muestras con volúmenes superiores que los volúmenes habituales de la muestra. Tal número de combinaciones es suficiente para evaluar las composiciones de fármacos de politerapia alternativas que pueden administrarse a un paciente individual. En una realización, las detecciones se realizan con un mínimo de aproximadamente 500 células neoplásicas por pocillo. En otra realización, las detecciones se realizan con aproximadamente 1.000 células neoplásicas por pocillo. En otra realización, las detecciones se realizan con aproximadamente 20.000 células totales por pocillo. En otra realización, las detecciones se realizan con aproximadamente 50.000 células totales por pocillo. El número de células malignas por muestra del paciente puede variar de prácticamente cero a más de mil millones, y de este modo sus proporciones relativas al número total de células también pueden variar.

La Figura 5 ilustra el número de composiciones de fármacos potenciales que pueden ser exploradas para identificar un tratamiento óptimo de politerapia para un paciente individual. Hipotéticamente, hasta 15 fármacos aprobados para una indicación particular se consideran en la primera columna del lado izquierdo de la Figura 5. Existen numerosos fármacos en la cartera de proyectos para neoplasias hematológicas, con varios fármacos más recientes que se espera que sean aprobados en los próximos años. Existe también un número de fármacos no citotóxicos

datos a pacientes de neoplasias hematológicas para paliar los efectos del tratamiento citotóxico (es decir, los medicamentos concomitantes) cuyo intervalo es comúnmente de 5 a 10 fármacos por paciente. Estos fármacos varían desde protectores gástricos a antieméticos para las náuseas a los antibióticos y antivirales para prevenir infecciones. Los 15 fármacos elegidos en la Figura 5 representan un alto número de fármacos citotóxicos aprobados para considerarse para una indicación dada, y de este modo puede considerarse como representativo de ciertas prácticas clínicas. La selección de los 15 fármacos en la Figura 5 es meramente ilustrativa y de ninguna manera debe interpretarse como una limitación de la presente invención. En la Figura 5, una combinación de hasta 4 fármacos diferentes (2ª columna) se ha contemplado como un número medio representativo, aunque hay protocolos que combinan 5 y 6 fármacos. El diseño de placas de pocillos descritas en la presente memoria ilustra el uso de hasta 22 fármacos diferentes en una única placa de 96 pocillos. Además, diferentes números de fármacos pueden analizarse con placas que tienen diferentes números de pocillos. En una realización, aproximadamente 5 fármacos se seleccionan para su análisis. En otra realización, aproximadamente 10 fármacos se seleccionan para su análisis. En otra realización, aproximadamente 20 fármacos se seleccionan para su análisis. En otra realización, aproximadamente 40 fármacos se seleccionan para su análisis.

Como se ilustra en la Figura 5, el número de combinaciones diferentes para los 15 fármacos en la segunda columna es 1.940, y sería de 1.470 para 14 fármacos, etc. Debido a que estos resultados podrían ser utilizados para informar acerca de las decisiones de tratamiento, se realizan preferentemente en cinco concentraciones por fármaco o combinación de fármacos (3ª columna). Además, la evaluación de al menos 2 tiempos de incubación permitiría la evaluación de los parámetros cinéticos (4ª columna). No obstante, el rendimiento del análisis en cinco dosis y/o más de un tiempo de incubación no debe interpretarse como una limitación.

Incluso con todas las variables discutidas en el párrafo anterior (es decir, el número de diferentes fármacos, múltiples mediciones, variación de las concentraciones de fármacos y diversos tiempos de incubación), una plataforma automatizada capaz de evaluar hasta aproximadamente 10.000 o 20.000 composiciones de fármacos cubriría todos los escenarios hipotéticos, ilustrada como la región no sombreada en la Figura 5. El espacio terapéutico permite que se explore el área sombreada en la Figura 5 con los métodos actuales. Las composiciones de fármacos que pueden explorarse con los métodos actuales, hasta 30 o 35, están sombreadas en gris. El resto de la tabla representa el espacio innovador de composiciones de fármacos que se pueden explorar permitido por la plataforma ExviTech. Debido a que las plataformas manuales disponibles en la actualidad solo son capaces de evaluar hasta aproximadamente 35 condiciones individuales, su uso potencial como un ensayo de medicina personalizada es limitado. De ello se desprende que la automatización de los efectos de fármacos en muestras hematológicas *ex vivo* es tanto favorable como innovadora para una aplicación de medicina personalizada. En una realización, el método analiza menos de 1.000 composiciones de fármacos. En otra realización, el método analiza aproximadamente 10.000 composiciones de fármacos. En otra realización, el método analiza menos de 20.000 composiciones de fármacos. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria permiten el análisis de hasta aproximadamente 20.000 composiciones de fármacos, que incluyen 1, 2, 3, o 4 combinaciones de fármacos de hasta 15 fármacos. En algunas realizaciones, los tiempos de incubación también son variados. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 5 (4ª columna), incluyendo más de un tiempo de incubación aumenta el número de combinaciones ensayadas. En algunas realizaciones, el uso de ExviTech permite la medición del área no sombreada de la Figura 5, que representa la mayoría de las composiciones de fármacos requerida para individualizar el tratamiento a un paciente.

La plataforma ExviTech también se puede utilizar para detectar miles de fármacos y, en particular, aproximadamente 1.000 fármacos aprobados por muestra de paciente para la búsqueda de fármacos que inducen selectivamente apoptosis en las células malignas. Sorprendentemente, se demostró que un número significativo de fármacos no citotóxicos aprobados inducen apoptosis en células malignas con la misma eficacia que los fármacos citotóxicos aprobados para cada indicación. La Figura 6 muestra cómo 5 fármacos no citotóxicos (izquierda) no aprobados para tumores malignos hematológicos eliminan las células malignas de LLC con una eficacia similar a 3 fármacos citotóxicos de LLC aprobados (derecha). La Figura 7 muestra respuestas de dosis de uno de estos fármacos, el antidepresivo paroxetina, lo que demuestra que el fármaco induce apoptosis preferentemente en las células B malignas frente a las células T y CN sanas. La Figura 8 muestra cómo uno de estos fármacos no citotóxicos, sertralina, elimina las células malignas de LLC más rápido que los fármacos de LLC citotóxicos aprobados (24 frente a 48 horas) (izquierda). Tres de los cinco fármacos no citotóxicos más eficaces son los antidepresivos paroxetina, fluoxetina y fármacos con sertralina que pertenecen a la misma familia farmacológica. La Figura 9 muestra cómo solo 3 de 6 inhibidores de la recaptación de serotonina son eficaces en la inducción de la apoptosis en células malignas de LLC. Esto demuestra que estos efectos no están necesariamente relacionados con una clase farmacológica de fármacos, y que el ensayo de medicina personalizada *ex vivo* propuesto en la presente memoria se puede utilizar para identificar estas actividades.

El descubrimiento inesperado de que múltiples fármacos aprobados no citotóxicos seguros podría ser eficaz contra las células tumorales provocó una evaluación más amplia. En primer lugar, solo unos pocos fármacos fueron eficaces en una muestra dada, descartando un efecto no selectivo. La Figura 10, derivada de una detección de 2.000 fármacos en 23 muestras de LLC, muestra cómo la eficacia de estos fármacos no citotóxicos aprobados puede variar enormemente de un paciente a otro. Los fármacos se definen como eficaces si destruyen más del 80 % de las células malignas, un patrón similar a los fármacos citotóxicos más eficaces. Mientras que solo 3 fármacos

fueron eficaces en más del 80 % de los pacientes, 229 fármacos fueron eficaces en menos del 20 % de las muestras de pacientes. Esto indica que los fármacos no citotóxicos pueden ser eficaces contra las células malignas *ex vivo*, pero muestran un grado muy grande de variabilidad de un paciente a otro. No obstante, en casi todas las muestras de pacientes con LLC, se encontraron 5-10 fármacos no citotóxicos eficaces contra las células malignas *ex vivo*.

5 Aunque la previsibilidad de este efecto *in vivo* es desconocida, con la farmacocinética y otros factores, tales como la formulación desempeñan potencialmente un papel, el efecto de dichos 5-10 fármacos no citotóxicos administrados a un paciente podría representar un beneficio terapéutico significativo.

10 Algunos de los fármacos no citotóxicos que son eficaces *ex vivo* son fármacos utilizados para paliar los efectos de los fármacos citotóxicos que se administran a pacientes con un tumor maligno hematológico (es decir, fármacos concomitantes). La Figura 12 muestra un ejemplo de una muestra de LLC para el cual el inhibidor de la bomba de protones, omeprazol y el antiviral aciclovir, mostraron una eficacia significativa contra las células malignas *ex vivo* similar a la eficacia de los fármacos citotóxicos. La Tabla 4 enumera algunos de estos fármacos concomitantes

15 Tabla 4. Fármacos concomitantes

Fármaco	Indicación
Hidrato de óxido de aluminio	Antiácido
Lorazepam	Agente anti-ansiedad
Amikacina	Antibiótico (aminoglucósido)
Meropenem	Antibiótico (Betalactámico)
Cefepima	Antibiótico (Cefalosporina)
Vancomicina	Antibiótico (Glicopéptido)
Teicoplanina	Antibiótico (Glicopéptido)
Ondasetrón	Antiemético
Dexametasona	Antiinflamatorio, inmunosupresor, glucocorticoides
Anfotericina B (liposómica)	Antimicótico
Caspofungina	Antimicótico
Itraconazol	Antimicótico
Fluconazol	Antimicótico
Voriconazol	Antimicótico
Trimetoprima y sulfametoxazol	Bacteriostático
FECG	Factor estimulante de colonias de granulocitos
Ranitidina	Antagonista del receptor H2 de histamina
Rasburicasa	Tratamiento contra la hiperuricemia
Paracetamol	Antiinflamatorio no esteroideo
Metamizol	Antiinflamatorio no esteroideo
Cloruro de morfina	Analgésico opiáceo
Omeprazol	Inhibidor de la bomba de protones
Paroxetina	Antidepresivo
Fluotexina	Antidepresivo
Sertralina	Antidepresivo

20 Algunos de los fármacos aprobados no citotóxicos podrían ser terapéuticamente beneficiosos para potenciar el efecto de los fármacos citotóxicos (es decir, como agentes quimiosensibilizadores). Un ejemplo se muestra en la Figura 11, en la que las bajas concentraciones del antidepresivo sertralina potencian la eficacia de bajas concentraciones del fármaco citotóxico clorambucilo.

25 Debido a que los presentes métodos tienen por objeto analizar grandes números de variables, se han diseñado placas de 96 pocillos para explorar las posibles variaciones en los tratamientos de politerapia. Otras placas, incluyendo las placas con números de pocillos más grandes o más pequeños, también se pueden utilizar. En una realización, se utilizan placas de 1.536 pocillos. En otra realización, se utilizan placas de 384 pocillos. En otra realización, se utilizan placas de 96 pocillos.

Las Figuras 13-18 y los Ejemplos 9-14 ilustran el uso de un formato de placa de 96 pocillos para el análisis de

muestras de pacientes para las siguientes indicaciones: leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda (no M3) y leucemia mieloide aguda M3. El diseño de la placa para cada indicación comprende los fármacos que cumplen actualmente con el protocolo de tratamiento para la indicación *Spanish Program for the Treatment of Hematological Malignancies* (Programa para el Tratamiento de Hemopatías Malignas (PETHEMA)).

En una realización, el método analiza fármacos seleccionados entre los protocolos aprobados de una autoridad clínica. En una realización específica, el método analiza fármacos seleccionados entre el protocolo de tratamiento PETHEMA. El diseño de pocillos utiliza fármacos prescritos para la monoterapia en el protocolo de tratamiento PETHEMA y también utiliza combinaciones de fármacos en monoterapia. Adicionalmente, el diseño utiliza fármacos prescritos para paliar los efectos secundarios del protocolo de tratamiento PETHEMA y también utiliza combinaciones de estos fármacos.

En una realización, el método analiza fármacos citotóxicos, incluyendo fármacos aprobados y fármacos aún no aprobados en los ensayos clínicos. En otra realización, el método analiza combinaciones de fármacos citotóxicos. En una realización adicional, el método analiza fármacos prescritos para tratar los efectos secundarios de fármacos citotóxicos. En una realización adicional, el método analiza combinaciones de fármacos prescritos para tratar los efectos secundarios de fármacos citotóxicos. Además, el diseño de pocillos utiliza combinaciones de fármacos citotóxicos y de fármacos prescritos para tratar los efectos secundarios de los fármacos citotóxicos. En una realización, el método analiza combinaciones de fármacos citotóxicos y de fármacos prescritos para tratar los efectos secundarios de los fármacos citotóxicos. En otra realización, el método analiza cualquiera y todos los fármacos no citotóxicos, aprobados o en ensayos clínicos, prescritos para cualquiera y todas las indicaciones. En una realización adicional, el método analiza combinaciones de fármacos no citotóxicos. Por ejemplo, el diseño de una placa puede utilizar combinaciones de fármacos citotóxicos y de fármacos no citotóxicos. En una realización, el método analiza combinaciones de fármacos citotóxicos y de fármacos no citotóxicos.

Los tratamientos para neoplasias hematológicas son dictados por un determinado número limitado de protocolos de tratamiento acordados por los hematólogos. Estos protocolos definen el régimen de politerapia para fármacos citotóxicos y de combinación adicionales, incluyendo la dosificación y el momento de administración de cada fármaco. Los protocolos difieren dependiendo de variables, tales como edad, bienestar, y estado de la enfermedad de cada paciente. Los protocolos también pueden variar de un país a otro, pero son normalmente seguidos detenidamente en un país. Aún hay variaciones significativas en estos protocolos en términos de intervalos de dosificaciones y composiciones de fármacos diferentes que requieren decenas a cientos de condiciones a explorar. En una realización, los reactivos clínicamente validados se utilizan para evaluar la apoptosis celular. En otra realización, los reactivos validados clínicamente se utilizan en combinación con anticuerpos para identificar subtipos de células tumorales. En otra realización, los reactivos utilizados para identificar subtipos de células tumorales se definen de acuerdo a la reciente normativa para Euroflow (van Dongen *et al.*, *Euroflow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes*, 14^o Congreso EHA, Berlín, AL, 4 de junio de 2009: que se publicó en *Leukemia* en 2010 (en prensa)). En otra realización, las composiciones de fármacos se seleccionan entre un protocolo para el tratamiento hematológico utilizado en un país particular. En otra realización, las composiciones de fármacos se seleccionan entre un protocolo más antiguo para el tratamiento hematológico utilizado en un país particular. En otra realización, las composiciones de fármacos se seleccionan entre un protocolo experimental utilizado en un país particular, definido como una nueva combinación de fármacos aprobados, para el tratamiento hematológico. En otra realización, las composiciones de fármacos se seleccionan entre un protocolo, incluyendo fármacos que se evalúan en un ensayo clínico para el tratamiento hematológico.

El efecto de cada fármaco utilizado en un protocolo de tratamiento debe explorarse preferentemente de forma individual. No obstante, esta exploración no debe interpretarse como una limitación. No solo deben explorarse individualmente los fármacos en monoterapia utilizando los métodos descritos en la presente memoria, sino también fármacos administrados normalmente solo en combinaciones. Por ejemplo, la detección individual de fármacos que se administran normalmente solo en combinación puede proporcionar datos que permiten la determinación de los efectos individuales de estos fármacos.

En una realización, los fármacos en monoterapia se analizan individualmente. En otra realización, los fármacos administrados normalmente solo en una combinación se analizan individualmente. Los fármacos no citotóxicos utilizados habitualmente junto con fármacos citotóxicos también deben ser explorados (p. ej., como en la Figura 12). Esto incluye antibióticos, antieméticos (anti-náuseas), antiácidos, antivirales, etc. En una realización, el método analiza la capacidad del omeprazol para inducir apoptosis en una muestra de paciente. En otra realización, el método analiza la capacidad del aciclovir para inducir apoptosis en una muestra de paciente.

De hecho, los métodos descritos en la presente memoria se han utilizado para demostrar que algunos fármacos no citotóxicos, tales como paroxetina y sertralina, pueden modular el efecto de fármacos citotóxicos, tales como fludarabina y clorambucilo, potenciar respectivamente su eficacia (p. ej., como se muestra en la Figura 11). Como indica la Figura 6, algunos de estos fármacos no citotóxicos administrados solos pueden inducir apoptosis *ex vivo* en células malignas con una eficacia similar a la de los fármacos citotóxicos aprobados. En una realización, el método

utiliza fármacos no citotóxicos para inducir apoptosis en una muestra de paciente. En otra realización, el método utiliza combinaciones de fármacos no citotóxicos para inducir apoptosis en una muestra de paciente. En otra realización, el método utiliza combinaciones de fármacos citotóxicos y no citotóxicos para inducir apoptosis en una muestra de paciente.

5 Inesperadamente, ciertos fármacos no citotóxicos eliminan las células malignas sin dañar las células sanas, lo que indica que estos fármacos atacan selectivamente las células malignas (p. ej., como se aprecia en la Figura 12). Tal resultado inesperado puede tener implicaciones de largo alcance para el tratamiento de neoplasias hematológicas. En una realización, el método utiliza fármacos no citotóxicos para inducir selectivamente la apoptosis en células neoplásicas. En una realización, el índice terapéutico *ex vivo* es superior a aproximadamente 1. En otra realización, el índice terapéutico *ex vivo* es superior a aproximadamente 5. En otra realización, el índice terapéutico *ex vivo* es superior a aproximadamente 10. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria permiten la discriminación entre células leucémicas y células normales en los tejidos implicados en una neoplasia hematológica, tales como muestras de sangre, médula ósea, ganglio linfático, o bazo.

15 Adicionalmente, la capacidad de los fármacos no citotóxicos para inducir apoptosis varía dentro de las clases farmacológicas de los fármacos (p. ej., como se aprecia en la Figura 9), así como entre las clases farmacológicas de fármacos. En una realización, el método analiza fármacos seleccionados de la misma clase farmacológica al igual que los fármacos administrados a un paciente para el tratamiento de una determinada indicación o para paliar los efectos secundarios del tratamiento de una determinada indicación. En una realización específica, el método analiza inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. Además, los métodos descritos en la presente memoria no se limitan al análisis solo de fármacos citotóxicos o solo de fármacos no citotóxicos. De hecho, hay casos en los que la combinación de un fármaco no citotóxico con un fármaco citotóxico es deseable, ya que la combinación puede tener una mayor capacidad para inducir la apoptosis en una muestra del paciente con respecto a la capacidad del fármaco citotóxico solo (p. ej., como se aprecia en la Figura 11).

El presente sistema es completamente capaz de analizar combinaciones de dos clases de fármacos, tales como fármacos citotóxicos y no citotóxicos, que se administran normalmente juntos. En una realización, se analizan los fármacos no citotóxicos que se prescriben para pacientes a los que se les administra fármacos citotóxicos. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para analizar una muestra de un paciente tratado con el fármaco citotóxico fludarabina y con un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina no citotóxico. En una realización específica, el método se utiliza para analizar una muestra del paciente tratado con el fármaco citotóxico fludarabina y el fármaco no citotóxico paroxetina. Para neoplasias hematológicas, los regímenes de fármacos a pacientes pueden incluir múltiples combinaciones de fármacos. En una realización, los fármacos prescritos para indicaciones hematológicas se analizan en varias combinaciones. Por ejemplo, a cada paciente se le puede administrar de 8 a 10 fármacos en promedio. En una realización, se analizan 5 o más composiciones de fármacos. Los diseños preferentes de placas para algunas de las principales indicaciones se muestran en los Ejemplos a continuación.

40 La estrategia actual de los tratamientos basados en el protocolo para neoplasias hematológicas es una consecuencia del estancamiento del desarrollo de fármacos. Este estancamiento ha permitido a los hematólogos familiarizarse con fármacos particulares y desarrollar una estimación razonable de las mejores combinaciones de cada fármaco. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria se utilizan para validar expectativas científicas actuales para composiciones de fármacos. No obstante, dos factores están cambiando radicalmente la estrategia actual de los tratamientos basados en el protocolo. En primer lugar, como se representa en la Figura 4, la constatación de que cada paciente responde de manera diferente a la quimioterapia ha puesto recientemente en primer plano de la investigación médica la medicina personalizada. La revolución traída por técnicas de biología molecular y la decodificación del genoma humano ha generado un foco importante en el análisis genómico de muestras de pacientes con neoplasias hematológicas. No obstante, 10 y 15 años de investigación genómica ha permitido la estratificación de pacientes en subpoblaciones de riesgo, pero no ha sido capaz de personalizar el tratamiento a pacientes individuales. La consecuencia de esta realización crea un deseo para que cada paciente coincida con su tratamiento óptimo utilizando un ensayo de medicina personalizada. No obstante, se estiman que los protocolos actuales exploran menos del 1-5 % del espacio terapéutico disponible de lo que la plataforma descrita en la presente memoria puede explorar (como se representa en la Figura 5). En segundo lugar, hay un número significativo de nuevos medicamentos aprobados recientemente para las neoplasias hematológicas y también existen varios candidatos clínicos en última fase. En consecuencia, estas enfermedades están pasando rápidamente de un escenario en el que los mismos medicamentos antiguos prescritos durante muchos años a un escenario con muchos medicamentos nuevos que se aprobaron hace unos pocos años. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria se utilizan para evaluar los fármacos antiguos, los nuevos fármacos, los candidatos clínicos en fase tardía, o las combinaciones de los mismos.

Los métodos descritos en la presente memoria son útiles para la selección de medicamentos sobre una base individualizada de pacientes y para la identificación de las tendencias en los protocolos de tratamiento que serán de utilidad para la selección de fármacos para pacientes que tienen indicaciones y respuestas similares a los regímenes de fármacos actuales. Cada paciente tendrá estos compuestos en su torrente sanguíneo y médula ósea en concentraciones seleccionadas a fin de eliminar las células malignas. Una ventaja del ensayo de medicina

personalizada de politerapia descrita en la presente memoria es la capacidad de explorar muchas composiciones de fármacos diferentes, a veces alcanzando 8 a 10 fármacos administrados simultáneamente. En una realización, múltiples fármacos se administran simultáneamente a un paciente. En otra realización, múltiples fármacos se administran en serie a un paciente. Muchos de los fármacos proporcionados en la presente memoria no se han
 5 evaluado para la administración en combinación. Como se muestra a continuación en los Ejemplos, pueden observarse efectos claros y dramáticos sobre la inducción de la apoptosis por estos medicamentos en combinación.

Otra ventaja es la capacidad de determinar composiciones óptimas de fármacos en una base personalizada. Como se indica en la Figura 10, existe una gran cantidad de variabilidad para la respuesta de un paciente a ciertas
 10 composiciones de fármacos. De hecho, solo tres fármacos indujeron apoptosis en más del 80% de las células neoplásicas para más del 80% de las 23 muestras de pacientes. Por el contrario, 229 fármacos diferentes indujeron apoptosis en más del 80% de las células neoplásicas para menos del 20% (1-4) de muestras de pacientes. Esto sugiere que la mayoría de los fármacos no citotóxicos son eficaces en muy pocos pacientes y demuestra un mayor grado de variación de una persona a otra que para los fármacos citotóxicos. No obstante, a los pacientes con
 15 neoplasias hematológicas se les administran habitualmente 5-10 fármacos concomitantes no citotóxicos para paliar el efecto de los fármacos citotóxicos. De este modo, puede ser significativo el efecto aditivo de la selección entre estos medicamentos concomitantes de un subgrupo que muestra una eficacia significativa en la inducción de la apoptosis de las células malignas *ex vivo*, tal como en la Figura 12.

Además de identificar los fármacos potencialmente más eficaces para un paciente individual, estos resultados también permiten la estratificación de pacientes en subgrupos, y la posibilidad de nuevos protocolos de tratamiento para estos subgrupos, incluyendo fármacos citotóxicos y no citotóxicos. En una realización, un protocolo de
 20 tratamiento de fármacos se selecciona sobre una base de paciente individual. En otra realización, se selecciona un protocolo de tratamiento de fármacos basado en su eficacia en 1-4 muestras de pacientes. En otra realización, se selecciona un protocolo de tratamiento de fármacos basado en su eficacia en 5-9 muestras de pacientes. En otra realización, se selecciona un protocolo de tratamiento de fármacos basado en su eficacia de 10-14 muestras de pacientes. En otra realización, se selecciona un protocolo de tratamiento de fármacos basado en su eficacia en 15-
 25 19 muestras de pacientes. En otra realización, se selecciona un protocolo de tratamiento de fármacos basado en su eficacia en más de 20 muestras de pacientes. Los métodos descritos en la presente memoria permiten más opciones para los protocolos de tratamiento que están disponibles actualmente.

Una de las ventajas de un ensayo de medicina personalizada es su capacidad para optimizar un régimen de fármacos particular sobre una base individual. En un régimen de politerapia, en el que varios fármacos diferentes se administran en combinación a un paciente, la farmacocinética y las curvas típicas de dosis-respuesta de un fármaco
 35 individual pueden ser poco convencionales. Utilizando los métodos descritos en la presente memoria, las dosificaciones óptimas pueden ser observadas tanto para células neoplásicas como normales basándose en el reconocimiento de una curva de dosis-respuesta óptima para un paciente particular.

Varios fármacos y combinaciones de fármacos pueden utilizarse en los métodos y en los dispositivos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede utilizarse una combinación de fármacos que comprende fármacos citotóxicos. También, se puede utilizar una combinación de fármacos que comprende fármacos no citotóxicos. Además, se puede utilizar una combinación de fármacos de fármacos citotóxicos y no citotóxicos.

Algunos ejemplos de compuestos citotóxicos que se pueden utilizar solos o en combinación con otros compuestos incluyen fludarabina (designada como "1"), clorambucilo (designado como "2"), mitoxantrona (designada como "3"), vincristina (designada como "4"), mitoxantrona (designada como "5"), ciclofosfamida (designada como "6"), adriamicina (designada como "7"), y doxorubicina (designada como "8").

Algunos ejemplos de compuestos no citotóxicos que se pueden utilizar solos o en combinación con otros compuestos incluyen 5-azacitidina (designada como "1"), alemtuzumab (designado como "2"), aminopterina (designada como "3"), amonafida (designada como "4"), amsacrina (designada como "5"), CAT-8015 (designado como "6"), bevacizumab (designado como "7"), ARR Y520 (designado como "8"), trióxido de arsénico (designado como "9"), AS1413 (designado como "10"), atra (designado como "11"), AZD 6244 (designado como "12"), AZD1152 (designado como "13"), banoxantrona (designada como "14"), behenoilara-C (designado como "15"), bendamustina (designada como "16"), bleomicina (designada como "17"), blinatumomab (designado como "18"), bortezomib (designado como "19"), busulfán (designado como "20"), carboplatino (designado como "21"), CEP-701 (designado como "22"), clorambucilo (designado como "23"), clorodesoxiadenosina (designada como "24"), cladribina (designada como "25"), clofarabina (designada como "26"), CPX-351 (designado como "27"), ciclofosfamida (designada como "28"), ciclosporina (designada como "29"), citarabina (designada como "30"), arabinósido de citosina (designado como "31"), dasatinib (designado como "32"), daunorrubicina (designada como "33"), decitabina (designada como "34"), cadena A de la ricina desglucosilada conjugada a inmunotoxinas anti-CD19/anti-CD22 (designada como "35"), dexametasona (designada como "36"), doxorubicina (designada como "37"), elacitarabina (designada como "38"), entinostat (designado como "39"), epratuzumab (designado como "40"), erwinasa (designada como "41"), etopósido (designado como "42"), everolimus (designado como "43"), mesilato de exatecán (designado como "44"), flavopiridol (designado como "45"), fludarabina (designada como "46"), forodesina (designada como "47"), gemcitabina (designada como "48"), gemtuzumab-ozogamicina (designada como "49"), homoharringtonina

(designada como "50"), hidrocortisona (designada como "51"), hidroxycarbamida (designada como "52"), idarrubicina (designada como "53"), ifosfamida (designada como "54"), imatinib (designado como "55"), interferón alfa-2a (designado como "56"), yodo 1131 anticuerpo monoclonal BC8 (designado como "57"), ifosfamida (designada como "58"), isotretinoína (designada como "59"), larmustina (designada como "60"), L-asparaginasa (designada como "61"), lenalidomida (designada como "62"), lestaurtinib (designado como "63"), mafosfamida (designada como "64"), melfalán (designado como "65"), mercaptopurina (designada como "66"), metotrexato (designado como "67"), metilprednisolona (designada como "68"), metilprednisona (designada como "69"), midostaurina (designada como "70"), mitoxantrona (designada como "71"), nelarabina (designada como "72"), nilotinib (designado como "73"), oblimersen (designado como "74"), paclitaxel (designado como "75"), panobinostat (designado como "76"), pegaspargasa (designada como "77"), pentostatina (designada como "78"), pirarrubicina (designada como "79"), PKC412 (designado como "80"), prednisolona (designada como "81"), prednisona, PSC-833 (designado como "82"), rapamicina (designada como "83"), rituximab (designado como "84"), rivabirina (designada como "85"), sapacitabina (designada como "86"), dinaciclib (designado como "87"), sorafenib (designado como "88"), sorafenib (designado como "89"), STA-9090 (designado como "90"), tacrolimus (designado como "91"), tanespimicina (designada como "92"), temsirolimus (designado como "93"), tenipósido (designado como "94"), terameprocol (designado como "95"), talidomida (designada como "96"), tioguanina (designada como "97"), tiotepa (designada como "98"), tipifarnib (designado como "99"), topotecán (designado como "100"), treosulfán (designado como "101"), troxacitabina (designada como "102"), vinblastina (designada como "103"), vincristina (designada como "104"), vindesina (designada como "105"), vinorelbina (designada como "106"), voreloxina (designada como "107"), vorinostat (designado como "108"), etopósido (designado como "109"), y zosuquidar (designado como "110").

Algunos ejemplos de compuestos no citotóxicos que se pueden utilizar solos o en combinación con otros compuestos incluyen hidrato de óxido de aluminio (designado como "111"), lorazepam (designado como "112"), amikacina (designada como "113"), meropenem (designado como "114"), cefepima (designada como "115"), vancomicina (designada como "116"), teicoplanina (designada como "117"), ondansetrón (designado como "118"), dexametasona (designada como "119"), anfotericina B (liposómica) (designada como "120"), caspofugina (designada como "121"), itraconazol (designado como "122"), fluconazol (designado como "123"), voriconazol (designado como "124"), trimetoprima (designada como "125"), sulfametoxazol (designado como "126"), FECG (designado como "127"), ranitidina (designada como "128"), rasburicasa (designada como "129"), paracetamol (designado como "130"), metamizol (designado como "131"), cloruro de morfina (designado como "132"), omeprazol (designado como "133"), paroxetina (designada como "134"), fluoxetina (designada como "135"), y sertralina (designada como "136").

Además, en la mayoría de países, combinaciones particulares de fármacos representan las terapias citotóxicas preferentes o convencionales para el tratamiento de LMA, LLA, LLC y LNH. Estas terapias existentes pueden ser designadores numéricos asignados, y en las siguientes combinaciones, se pueden utilizar en una combinación adicional con fármacos adicionales.

Utilizando las designaciones numéricas establecidas anteriormente en un formato n°.n°, los ejemplos de combinaciones de dos compuestos que comprenden al menos uno de los compuestos citotóxicos se enumeran a continuación, que pueden o no pueden comprender además otros compuestos en la combinación:

ES 2 628 219 T3

1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 1.10, 1.11, 1.12, 1.13, 1.14, 1.15, 1.16, 1.17, 1.18, 1.19, 1.20, 1.21, 1.22, 1.23, 1.24, 1.25, 1.26, 1.27, 1.28; 1.29, 1.30, 1.31, 1.32, 1.33, 1.34, 1.35, 1.36, 1.37, 1.38, 1.39, 1.40, 1.41, 1.42, 1.43, 1.44, 1.45, 1.46, 1.47, 1.48, 1.49, 1.50, 1.51, 1.52, 1.53, 1.54, 1.55, 1.56, 1.57, 1.58, 1.59, 1.60, 1.61, 1.62, 1.63, 1.64, 1.65, 1.66, 1.67, 1.68, 1.69, 1.70, 1.71, 1.72, 1.73, 1.74, 1.75, 1.76, 1.77, 1.78, 1.79, 1.80, 1.81, 1.82, 1.83, 1.84, 1.85, 1.86, 1.87, 1.88, 1.89, 1.90, 1.91, 1.92, 1.93, 1.94, 1.95, 1.96, 1.97, 1.98, 1.99, 1.100, 1.101, 1.102, 1.103, 1.104, 1.105, 1.106, 1.107, 1.108, 1.109, 1.110, 1.111, 1.112, 1.113, 1.114, 1.115, 1.116, 1.117, 1.118, 1.119, 1.120, 1.121, 1.122, 1.123, 1.124, 1.125, 1.126, 1.127, 1.128, 1.129, 1.130, 1.131, 1.132, 1.133, 1.134, 1.135, 1.136; 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15, 2.16, 2.17, 2.18, 2.19, 2.20, 2.21, 2.22, 2.23, 2.24, 2.25, 2.26, 2.27, 2.28; 2.29, 2.30, 2.31, 2.32, 2.33, 2.34, 2.35, 2.36, 2.37, 2.38, 2.39, 2.40, 2.41, 2.42, 2.43, 2.44, 2.45, 2.46, 2.47, 2.48, 2.49, 2.50, 2.51, 2.52, 2.53, 2.54, 2.55, 2.56, 2.57, 2.58, 2.59, 2.60, 2.61, 2.62, 2.63, 2.64, 2.65, 2.66, 2.67, 2.68, 2.69, 2.70, 2.71, 2.72, 2.73, 2.74, 2.75, 2.76, 2.77, 2.78, 2.79, 2.80, 2.81, 2.82, 2.83, 2.84, 2.85, 2.86, 2.87, 2.88, 2.89, 2.90, 2.91, 2.92, 2.93, 2.94, 2.95, 2.96, 2.97, 2.98, 2.99, 2.100, 2.101, 2.102, 2.103, 2.104, 2.105, 2.106, 2.107, 2.108, 2.109, 2.110, 2.111, 2.112, 2.113, 2.114, 2.115, 2.116, 2.117, 2.118, 2.119, 2.120, 2.121, 2.122, 2.123, 2.124, 2.125, 2.126, 2.127, 2.128, 2.129, 2.130, 2.131, 2.132, 2.133, 2.134, 2.135, 2.136; 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28; 3.29, 3.30, 3.31, 3.32, 3.33, 3.34, 3.35, 3.36, 3.37, 3.38, 3.39, 3.40, 3.41, 3.42, 3.43, 3.44, 3.45, 3.46, 3.47, 3.48, 3.49, 3.50, 3.51, 3.52, 3.53, 3.54, 3.55, 3.56, 3.57, 3.58, 3.59, 3.60, 3.61, 3.62, 3.63, 3.64, 3.65, 3.66, 3.67, 3.68, 3.69, 3.70, 3.71, 3.72, 3.73, 3.74, 3.75, 3.76, 3.77, 3.78, 3.79, 3.80, 3.81, 3.82, 3.83, 3.84, 3.85, 3.86, 3.87, 3.88, 3.89, 3.90, 3.91, 3.92, 3.93, 3.94, 3.95, 3.96, 3.97, 3.98, 3.99, 3.100, 3.101, 3.102, 3.103, 3.104, 3.105, 3.106, 3.107, 3.108, 3.109, 3.110, 3.111, 3.112, 3.113, 3.114, 3.115, 3.116, 3.117, 3.118, 3.119, 3.120, 3.121, 3.122, 3.123, 3.124, 3.125, 3.126, 3.127, 3.128, 3.129, 3.130, 3.131, 3.132, 3.133, 3.134, 3.135, 3.136; 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28; 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41, 4.42, 4.43, 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49, 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55, 4.56, 4.57, 4.58, 4.59, 4.60, 4.61, 4.62, 4.63, 4.64, 4.65, 4.66, 4.67, 4.68, 4.69, 4.70, 4.71, 4.72, 4.73, 4.74, 4.75, 4.76, 4.77, 4.78, 4.79, 4.80, 4.81, 4.82, 4.83, 4.84, 4.85, 4.86, 4.87, 4.88, 4.89, 4.90, 4.91, 4.92, 4.93, 4.94, 4.95, 4.96, 4.97, 4.98, 4.99, 4.100, 4.101, 4.102, 4.103, 4.104, 4.105, 4.106, 4.107, 4.108, 4.109, 4.110, 4.111, 4.112, 4.113, 4.114, 4.115, 4.116, 4.117, 4.118, 4.119, 4.120, 4.121, 4.122, 4.123, 4.124, 4.125, 4.126, 4.127, 4.128, 4.129, 4.130, 4.131, 4.132, 4.133, 4.134, 4.135, 4.136; 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13, 5.14, 5.15, 5.16, 5.17, 5.18, 5.19, 5.20, 5.21, 5.22, 5.23, 5.24, 5.25, 5.26, 5.27, 5.28; 5.29, 5.30, 5.31, 5.32, 5.33, 5.34, 5.35, 5.36, 5.37, 5.38, 5.39, 5.40, 5.41, 5.42, 5.43, 5.44, 5.45, 5.46, 5.47, 5.48, 5.49, 5.50, 5.51, 5.52, 5.53, 5.54, 5.55, 5.56, 5.57, 5.58, 5.59, 5.60, 5.61, 5.62, 5.63, 5.64, 5.65, 5.66, 5.67, 5.68, 5.69, 5.70, 5.71, 5.72, 5.73, 5.74, 5.75, 5.76, 5.77, 5.78, 5.79, 5.80, 5.81, 5.82, 5.83, 5.84, 5.85, 5.86, 5.87, 5.88, 5.89, 5.90, 5.91, 5.92, 5.93, 5.94, 5.95, 5.96, 5.97, 5.98, 5.99, 5.100, 5.101, 5.102, 5.103, 5.104, 5.105, 5.106, 5.107, 5.108, 5.109, 5.110, 5.111, 5.112, 5.113, 5.114, 5.115, 5.116, 5.117, 5.118, 5.119, 5.120, 5.121, 5.122, 5.123, 5.124, 5.125, 5.126, 5.127, 5.128, 5.129, 5.130, 5.131, 5.132, 5.133, 5.134, 5.135, 5.136; 6.7, 6.8, 6.9, 6.10, 6.11, 6.12, 6.13, 6.14, 6.15, 6.16, 6.17, 6.18, 6.19, 6.20, 6.21, 6.22, 6.23, 6.24, 6.25, 6.26, 6.27, 6.28; 6.29, 6.30, 6.31, 6.32, 6.33, 6.34, 6.35, 6.36, 6.37, 6.38, 6.39, 6.40, 6.41, 6.42, 6.43, 6.44, 6.45, 6.46, 6.47, 6.48, 6.49, 6.50, 6.51, 6.52, 6.53, 6.54, 6.55, 6.56, 6.57, 6.58, 6.59, 6.60, 6.61, 6.62, 6.63, 6.64, 6.65, 6.66,

ES 2 628 219 T3

6.67, 6.68, 6.69, 6.70, 6.71, 6.72, 6.73, 6.74, 6.75, 6.76, 6.77, 6.78, 6.79, 6.80, 6.81, 6.82, 6.83, 6.84, 6.85, 6.86, 6.87, 6.88, 6.89, 6.90, 6.91, 6.92, 6.93, 6.94, 6.95, 6.96, 6.97, 6.98, 6.99, 6.100, 6.101, 6.102, 6.103, 6.104, 6.105, 6.106, 6.107, 6.108, 6.109, 6.110, 6.111, 6.112, 6.113, 6.114, 6.115, 6.116, 6.117, 6.118, 6.119, 6.120, 6.121, 6.122, 6.123, 6.124, 6.125, 6.126, 6.127, 6.128, 6.129, 6.130, 6.131, 6.132, 6.133, 6.134, 6.135, 6.136; 7.8, 7.9, 7.10, 7.11, 7.12, 7.13, 7.14, 7.15, 7.16, 7.17, 7.18, 7.19, 7.20, 7.21, 7.22, 7.23, 7.24, 7.25, 7.26, 7.27, 7.28; 7.29, 7.30, 7.31, 7.32, 7.33, 7.34, 7.35, 7.36, 7.37, 7.38, 7.39, 7.40, 7.41, 7.42, 7.43, 7.44, 7.45, 7.46, 7.47, 7.48, 7.49, 7.50, 7.51, 7.52, 7.53, 7.54, 7.55, 7.56, 7.57, 7.58, 7.59, 7.60, 7.61, 7.62, 7.63, 7.64, 7.65, 7.66, 7.67, 7.68, 7.69, 7.70, 7.71, 7.72, 7.73, 7.74, 7.75, 7.76, 7.77, 7.78, 7.79, 7.80, 7.81, 7.82, 7.83, 7.84, 7.85, 7.86, 7.87, 7.88, 7.89, 7.90, 7.91, 7.92, 7.93, 7.94, 7.95, 7.96, 7.97, 7.98, 7.99, 7.100, 7.101, 7.102, 7.103, 7.104, 7.105, 7.106, 7.107, 7.108, 7.109, 7.110, 7.111, 7.112, 7.113, 7.114, 7.115, 7.116, 7.117, 7.118, 7.119, 7.120, 7.121, 7.122, 7.123, 7.124, 7.125, 7.126, 7.127, 7.128, 7.129, 7.130, 7.131, 7.132, 7.133, 7.134, 7.135, 7.136; 8.9, 8.10, 8.11, 8.12, 8.13, 8.14, 8.15, 8.16, 8.17, 8.18, 8.19, 8.20, 8.21, 8.22, 8.23, 8.24, 8.25, 8.26, 8.27, 8.28; 8.29, 8.30, 8.31, 8.32, 8.33, 8.34, 8.35, 8.36, 8.37, 8.38, 8.39, 8.40, 8.41, 8.42, 8.43, 8.44, 8.45, 8.46, 8.47, 8.48, 8.49, 8.50, 8.51, 8.52, 8.53, 8.54, 8.55, 8.56, 8.57, 8.58, 8.59, 8.60, 8.61, 8.62, 8.63, 8.64, 8.65, 8.66, 8.67, 8.68, 8.69, 8.70, 8.71, 8.72, 8.73, 8.74, 8.75, 8.76, 8.77, 8.78, 8.79, 8.80, 8.81, 8.82, 8.83, 8.84, 8.85, 8.86, 8.87, 8.88, 8.89, 8.90, 8.91, 8.92, 8.93, 8.94, 8.95, 8.96, 8.97, 8.98, 8.99, 8.100, 8.101, 8.102, 8.103, 8.104, 8.105, 8.106, 8.107, 8.108, 8.109, 8.110, 8.111, 8.112, 8.113, 8.114, 8.115, 8.116, 8.117, 8.118, 8.119, 8.120, 8.121, 8.122, 8.123, 8.124, 8.125, 8.126, 8.127, 8.128, 8.129, 8.130, 8.131, 8.132, 8.133, 8.134, 8.135, 8.136; 9.10, 9.11, 9.12, 9.13, 9.14, 9.15, 9.16, 9.17, 9.18, 9.19, 9.20, 9.21, 9.22, 9.23, 9.24, 9.25, 9.26, 9.27, 9.28; 9.29, 9.30, 9.31, 9.32, 9.33, 9.34, 9.35, 9.36, 9.37, 9.38, 9.39, 9.40, 9.41, 9.42, 9.43, 9.44, 9.45, 9.46, 9.47, 9.48, 9.49, 9.50, 9.51, 9.52, 9.53, 9.54, 9.55, 9.56, 9.57, 9.58, 9.59, 9.60, 9.61, 9.62, 9.63, 9.64, 9.65, 9.66, 9.67, 9.68, 9.69, 9.70, 9.71, 9.72, 9.73, 9.74, 9.75, 9.76, 9.77, 9.78, 9.79, 9.80, 9.81, 9.82, 9.83, 9.84, 9.85, 9.86, 9.87, 9.88, 9.89, 9.90, 9.91, 9.92, 9.93, 9.94, 9.95, 9.96, 9.97, 9.98, 9.99, 9.100, 9.101, 9.102, 9.103, 9.104, 9.105, 9.106, 9.107, 9.108, 9.109, 9.110, 9.111, 9.112, 9.113, 9.114, 9.115, 9.116, 9.117, 9.118, 9.119, 9.120, 9.121, 9.122, 9.123, 9.124, 9.125, 9.126, 9.127, 9.128, 9.129, 9.130, 9.131, 9.132, 9.133, 9.134, 9.135, 9.136; 10.11, 10.12, 10.13, 10.14, 10.15, 10.16, 10.17, 10.18, 10.19, 10.20, 10.21, 10.22, 10.23, 10.24, 10.25, 10.26, 10.27, 10.28; 10.29, 10.30, 10.31, 10.32, 10.33, 10.34, 10.35, 10.36, 10.37, 10.38, 10.39, 10.40, 10.41, 10.42, 10.43, 10.44, 10.45, 10.46, 10.47, 10.48, 10.49, 10.50, 10.51, 10.52, 10.53, 10.54, 10.55, 10.56, 10.57, 10.58, 10.59, 10.60, 10.61, 10.62, 10.63, 10.64, 10.65, 10.66, 10.67, 10.68, 10.69, 10.70, 10.71, 10.72, 10.73, 10.74, 10.75, 10.76, 10.77, 10.78, 10.79, 10.80, 10.81, 10.82, 10.83, 10.84, 10.85, 10.86, 10.87, 10.88, 10.89, 10.90, 10.91, 10.92, 10.93, 10.94, 10.95, 10.96, 10.97, 10.98, 10.99, 10.100, 10.101, 10.102, 10.103, 10.104, 10.105, 10.106, 10.107, 10.108, 10.109, 10.110, 10.111, 10.112, 10.113, 10.114, 10.115, 10.116, 10.117, 10.118, 10.119, 10.120, 10.121, 10.122, 10.123, 10.124, 10.125, 10.126, 10.127, 10.128, 10.129, 10.130, 10.131, 10.132, 10.133, 10.134, 10.135, 10.136; 11.12, 11.13, 11.14, 11.15, 11.16, 11.17, 11.18, 11.19, 11.20, 11.21, 11.22, 11.23, 11.24, 11.25, 11.26, 11.27, 11.28; 11.29, 11.30, 11.31, 11.32, 11.33, 11.34, 11.35, 11.36, 11.37, 11.38, 11.39, 11.40, 11.41, 11.42, 11.43, 11.44, 11.45, 11.46, 11.47, 11.48, 11.49, 11.50, 11.51, 11.52, 11.53, 11.54, 11.55, 11.56, 11.57, 11.58, 11.59, 11.60, 11.61, 11.62, 11.63, 11.64, 11.65, 11.66, 11.67, 11.68, 11.69, 11.70, 11.71, 11.72, 11.73, 11.74, 11.75, 11.76, 11.77, 11.78, 11.79, 11.80, 11.81, 11.82, 11.83, 11.84, 11.85, 11.86, 11.87, 11.88, 11.89, 11.90, 11.91, 11.92, 11.93, 11.94, 11.95, 11.96, 11.97, 11.98, 11.99, 11.100, 11.101, 11.102, 11.103, 11.104, 11.105, 11.106, 11.107, 11.108, 11.109, 11.110, 11.111, 11.112, 11.113, 11.114, 11.115, 11.116, 11.117, 11.118, 11.119, 11.120, 11.121, 11.122, 11.123, 11.124, 11.125, 11.126, 11.127, 11.128, 11.129, 11.130, 11.131, 11.132, 11.133, 11.134, 11.135, 11.136; 12.13, 12.14, 12.15, 12.16, 12.17, 12.18, 12.19, 12.20, 12.21, 12.22, 12.23, 12.24, 12.25, 12.26, 12.27, 12.28; 12.29, 12.30, 12.31, 12.32, 12.33, 12.34, 12.35, 12.36, 12.37, 12.38, 12.39, 12.40, 12.41, 12.42, 12.43, 12.44, 12.45, 12.46, 12.47, 12.48, 12.49, 12.50, 12.51, 12.52, 12.53, 12.54, 12.55, 12.56, 12.57, 12.58, 12.59, 12.60, 12.61, 12.62, 12.63, 12.64, 12.65, 12.66, 12.67, 12.68, 12.69, 12.70, 12.71, 12.72, 12.73, 12.74, 12.75, 12.76, 12.77, 12.78, 12.79, 12.80, 12.81, 12.82, 12.83, 12.84, 12.85, 12.86, 12.87, 12.88, 12.89, 12.90, 12.91, 12.92, 12.93, 12.94, 12.95, 12.96, 12.97, 12.98, 12.99, 12.100, 12.101, 12.102, 12.103, 12.104, 12.105, 12.106, 12.107, 12.108, 12.109, 12.110, 12.111, 12.112, 12.113, 12.114, 12.115, 12.116, 12.117, 12.118, 12.119, 12.120, 12.121, 12.122, 12.123, 12.124, 12.125, 12.126, 12.127, 12.128, 12.129, 12.130, 12.131, 12.132, 12.133, 12.134, 12.135, 12.136; 13.14, 13.15, 13.16, 13.17, 13.18, 13.19, 13.20, 13.21, 13.22, 13.23, 13.24, 13.25, 13.26, 13.27, 13.28; 13.29, 13.30, 13.31, 13.32, 13.33, 13.34, 13.35, 13.36, 13.37, 13.38, 13.39, 13.40, 13.41, 13.42, 13.43, 13.44, 13.45, 13.46, 13.47, 13.48, 13.49, 13.50, 13.51, 13.52, 13.53, 13.54, 13.55, 13.56, 13.57, 13.58, 13.59, 13.60, 13.61, 13.62, 13.63, 13.64, 13.65, 13.66, 13.67, 13.68, 13.69, 13.70, 13.71, 13.72, 13.73, 13.74, 13.75, 13.76, 13.77, 13.78, 13.79, 13.80, 13.81, 13.82, 13.83, 13.84, 13.85, 13.86, 13.87, 13.88, 13.89, 13.90, 13.91, 13.92, 13.93, 13.94, 13.95, 13.96, 13.97, 13.98, 13.99, 13.100, 13.101, 13.102, 13.103, 13.104, 13.105, 13.106, 13.107, 13.108, 13.109, 13.110, 13.111, 13.112, 13.113, 13.114, 13.115, 13.116, 13.117, 13.118, 13.119, 13.120, 13.121, 13.122, 13.123, 13.124, 13.125, 13.126, 13.127, 13.128, 13.129, 13.130, 13.131, 13.132, 13.133, 13.134, 13.135, 13.136; 14.15, 14.16, 14.17, 14.18, 14.19, 14.20, 14.21, 14.22, 14.23, 14.24, 14.25, 14.26, 14.27, 14.28; 14.29, 14.30, 14.31, 14.32,

103.131, 103.132, 103.133, 103.134, 103.135, 103.136; 104.105, 104.106, 104.107, 104.108, 104.109, 104.110, 104.111, 104.112, 104.113, 104.114, 104.115, 104.116, 104.117, 104.118, 104.119, 104.120, 104.121, 104.122, 104.123, 104.124, 104.125, 104.126, 104.127, 104.128, 104.129, 104.130, 104.131, 104.132, 104.133, 104.134, 104.135, 104.136; 105.106, 105.107, 105.108, 105.109, 105.110, 105.111, 105.112, 105.113, 105.114, 105.115, 105.116, 105.117, 105.118, 105.119, 105.120, 105.121, 105.122, 105.123, 105.124, 105.125, 105.126, 105.127, 105.128, 105.129, 105.130, 105.131, 105.132, 105.133, 105.134, 105.135, 105.136; 106.107, 106.108, 106.109, 106.110, 106.111, 106.112, 106.113, 106.114, 106.115, 106.116, 106.117, 106.118, 106.119, 106.120, 106.121, 106.122, 106.123, 106.124, 106.125, 106.126, 106.127, 106.128, 106.129, 106.130, 106.131, 106.132, 106.133, 106.134, 106.135, 106.136; 107.108, 107.109, 107.110, 107.111, 107.112, 107.113, 107.114, 107.115, 107.116, 107.117, 107.118, 107.119, 107.120, 107.121, 107.122, 107.123, 107.124, 107.125, 107.126, 107.127, 107.128, 107.129, 107.130, 107.131, 107.132, 107.133, 107.134, 107.135, 107.136; 108.109, 108.110, 108.111, 108.112, 108.113, 108.114, 108.115, 108.116, 108.117, 108.118, 108.119, 108.120, 108.121, 108.122, 108.123, 108.124, 108.125, 108.126, 108.127, 108.128, 108.129, 108.130, 108.131, 108.132, 108.133, 108.134, 108.135, 108.136; 109.110, 109.111, 109.112, 109.113, 109.114, 109.115, 109.116, 109.117, 109.118, 109.119, 109.120, 109.121, 109.122, 109.123, 109.124, 109.125, 109.126, 109.127, 109.128, 109.129, 109.130, 109.131, 109.132, 109.133, 109.134, 109.135, 109.136; 110.111, 110.112, 110.113, 110.114, 110.115, 110.116, 110.117, 110.118, 110.119, 110.120, 110.121, 110.122, 110.123, 110.124, 110.125, 110.126, 110.127, 110.128, 110.129, 110.130, 110.131, 110.132, 110.133, 110.134, 110.135, y 110.136;

- 5 Utilizando las designaciones numéricas establecidas anteriormente en un formato n°n.º, los ejemplos de combinaciones de dos compuestos que comprenden al menos uno de los compuestos no citotóxicos se enumeran a continuación, que pueden o no pueden comprender además otros compuestos en la combinación:

111.112, 111.113, 111.114, 111.115, 111.116, 111.117, 111.118, 111.119, 111.120, 111.121, 111.122, 111.123, 111.124, 111.125, 111.126, 111.127, 111.128, 111.129, 111.130, 111.131, 111.132, 111.133, 111.134, 111.135, 111.136; 112.113, 112.114, 112.115, 112.116, 112.117, 112.118, 112.119, 112.120, 112.121, 112.122, 112.123, 112.124, 112.125, 112.126, 112.127, 112.128, 112.129, 112.130, 112.131, 112.132, 112.133, 112.134, 112.135, 112.136; 113.114, 113.115, 113.116, 113.117, 113.118, 113.119, 113.120, 113.121, 113.122, 113.123, 113.124, 113.125, 113.126, 113.127, 113.128, 113.129, 113.130, 113.131, 113.132, 113.133, 113.134, 113.135, 113.136; 114.115, 114.116, 114.117, 114.118, 114.119, 114.120, 114.121, 114.122, 114.123, 114.124, 114.125, 114.126, 114.127, 114.128, 114.129, 114.130, 114.131, 114.132, 114.133, 114.134, 114.135, 114.136; 115.116, 115.117, 115.118, 115.119, 115.120, 115.121, 115.122, 115.123, 115.124, 115.125, 115.126, 115.127, 115.128, 115.129, 115.130, 115.131, 115.132, 115.133, 115.134, 115.135, 115.136; 116.117, 116.118, 116.119, 116.120, 116.121, 116.122, 116.123, 116.124, 116.125, 116.126, 116.127, 116.128, 116.129, 116.130, 116.131, 116.132, 116.133, 116.134, 116.135, 116.136; 117.118, 117.119, 117.120, 117.121, 117.122, 117.123, 117.124, 117.125, 117.126, 117.127, 117.128, 117.129, 117.130, 117.131, 117.132, 117.133, 117.134, 117.135, 117.136; 118.119, 118.120, 118.121, 118.122, 118.123, 118.124, 118.125, 118.126, 118.127, 118.128, 118.129, 118.130, 118.131, 118.132, 118.133, 118.134, 118.135, 118.136; 119.120, 119.121, 119.122, 119.123, 119.124, 119.125, 119.126, 119.127, 119.128, 119.129, 119.130, 119.131, 119.132, 119.133, 119.134, 119.135, 119.136; 120.121, 120.122, 120.123, 120.124, 120.125, 120.126, 120.127, 120.128, 120.129, 120.130, 120.131, 120.132, 120.133, 120.134, 120.135, 120.136; 121.122, 121.123, 121.124, 121.125, 121.126, 121.127, 121.128, 121.129, 121.130, 121.131, 121.132, 121.133, 121.134, 121.135, 121.136; 122.123, 122.124, 122.125, 122.126, 122.127, 122.128, 122.129, 122.130, 122.131, 122.132, 122.133, 122.134, 122.135, 122.136; 123.124, 123.125, 123.126, 123.127, 123.128, 123.129, 123.130, 123.131, 123.132, 123.133, 123.134, 123.135, 123.136; 124.125, 124.126, 124.127, 124.128, 124.129, 124.130, 124.131, 124.132, 124.133, 124.134, 124.135, 124.136; 125.126, 125.127, 125.128, 125.129, 125.130, 125.131, 125.132, 125.133, 125.134, 125.135, 125.136; 126.127, 126.128, 126.129, 126.130, 126.131, 126.132, 126.133, 126.134, 126.135, 126.136; 127.128, 127.129, 127.130, 127.131, 127.132, 127.133, 127.134, 127.135, 127.136; 128.129, 128.130, 128.131, 128.132, 128.133, 128.134, 128.135, 128.136; 129.130, 129.131, 129.132, 129.133, 129.134, 129.135, 129.136; 130.131, 130.132, 130.133, 130.134, 130.135, 130.136; 131.132, 131.133, 131.134, 131.135, 131.136; 132.133, 132.134, 132.135, 132.136; 133.134, 133.135, 133.136; 134.135, 134.136; y 135.136.

- 10 Como indica la Figura 7, los métodos descritos en la presente memoria proporcionan la observancia de curvas de dosis-respuesta óptimas. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan una curva de dosis-respuesta para seleccionar concentraciones de fármacos para un paciente. En otra realización, las concentraciones de fármacos se seleccionan para inducir la apoptosis en más de aproximadamente el 75% de las células en la muestra. En otra realización, las concentraciones de fármacos se seleccionan para inducir la apoptosis

en más de aproximadamente el 50% de las células en la muestra. En otra realización, las concentraciones de fármacos se seleccionan para inducir la apoptosis en más de aproximadamente el 25% de las células en la muestra. Además, las concentraciones de fármacos convencionales, tales como valor CE_{50} de un fármaco, pueden no corresponder a la dosis deseada para administrar en un régimen de tratamiento de politerapia. En otra realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan un valor óptimo para seleccionar concentraciones de fármacos para un paciente. En otra realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan CE_{50} para seleccionar concentraciones de fármacos para un paciente. En otra realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan CE_{90} para seleccionar concentraciones de fármacos para un paciente. En otra realización, los métodos descritos en la presente memoria utilizan la respuesta celular de las células normales para seleccionar la composición de fármacos deseada y la concentración para una enfermedad neoplásica.

Los métodos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para evaluar el perfil cinético de las composiciones de fármacos tanto citotóxicos como no citotóxicos. Como indica la Figura 8, la cinética de un paciente individual puede variar para diferentes composiciones de fármacos. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria determinan un perfil cinético de un fármaco para una determinada indicación. En otra realización, los métodos descritos en la presente memoria determinan un perfil cinético de una composición de fármacos para una determinada indicación. En algunas realizaciones, se selecciona un régimen de fármacos sobre la base del perfil cinético de un fármaco para una determinada indicación.

La Figura 8 también indica que los métodos descritos en la presente memoria son útiles para medir la capacidad para inducir apoptosis de diferentes composiciones de fármacos en diferentes periodos de tiempo. Además, los métodos descritos en la presente memoria son útiles para evaluar las diferencias en la inducción de apoptosis entre las diferentes composiciones de fármacos después de que hayan transcurrido diferentes periodos de tiempo. En una realización, el método detecta la inducción de la apoptosis en aproximadamente 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, o 24 horas, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores precedentes. En otra realización, el método detecta la inducción de la apoptosis en aproximadamente 36 o 48 horas. En otra realización, el método detecta la inducción de la apoptosis en aproximadamente 72 horas.

Una medición relacionada es el tiempo mínimo que un fármaco necesita para ser incubado con las células para inducir eficazmente la muerte celular programada (es decir, apoptosis), como se muestra en la Figura 28. Para esta medición, un análisis similar se puede efectuar mediante la incubación de las composiciones de fármacos durante 15 minutos, seguido del lavado del fármaco y espera de 48 horas para medir la apoptosis. En una realización, el método detecta la inducción de la apoptosis después de incubarse antes del lavado del fármaco durante aproximadamente 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, o 4 horas, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores precedentes. En otra realización, el método detecta la inducción de la apoptosis en aproximadamente 24 o 48 horas. En otra realización, el método detecta la inducción de la apoptosis en aproximadamente 72 horas.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Detección por citometría de flujo de células normales apoptóticas y neoplásicas

Un índice terapéutico *ex vivo* puede determinarse midiendo la capacidad de una composición de fármacos para inducir la apoptosis. Las Figuras 1 y 2 representan la capacidad para detectar células apoptóticas y diferenciar entre fenotipos normales y tumorales utilizando citometría de flujo. En la Figura 1, se utilizó el reactivo anexina V acoplado a fluoresceína isotiocianato (FITC) para detectar la expresión de fosfatidilserina en células apoptóticas. La intensidad de la fluoresceína se muestra en el eje y, y el tamaño celular se muestra en el eje x. La Figura 1 ilustra la capacidad para identificar células apoptóticas (recuadro superior izquierdo) y células vivas (grupo inferior derecho) y demuestra que el uso simultáneo de combinaciones apropiadas de anticuerpos monoclonales y estrategias de análisis multiparamétricos puede permitir la discriminación de las células leucémicas de las células normales residuales presentes en muestras procedentes de pacientes con trastornos hematológicos. La Figura 2 representa un caso adulto con LLA B precursora que presenta reordenamientos del gen BCR/ABL [t (9;22)positivo]. Dos subconjuntos celulares, leucémicos (gris claro) y normales (gris oscuro), se detectaron entre las células positivas para CD19 utilizando tinción de anticuerpo monoclonal múltiple analizado por citometría de flujo cuantitativa. Las células leucémicas expresan un fenotipo único (expresión homogénea de CD34, pero expresión de CD38 baja y relativamente heterogénea) asociado con la translocación.

EJEMPLO 2: Protocolo para la evaluación *ex vivo* de composiciones de fármacos

Un proceso de detección *ex vivo* para composiciones de fármacos se muestra esquemáticamente en la Figura 3. Una muestra de sangre puede dividirse en pequeñas alícuotas que se distribuyen en placas de pocillos de cualquier tamaño adecuado. Estas placas de pocillos contienen fármacos individuales o combinaciones de fármacos, cada uno en diversas concentraciones. Para facilitar el desarrollo de la prueba óptima, una muestra se diluyó en medio RPMI y se concentró a aproximadamente 20.000 células leucémicas por pocillo. En paralelo, otra alícuota es analizada para identificación inmunofenotípica utilizando citometría de flujo para la identificación de las células normales y patológicas y la detección de la apoptosis basal. Los pocillos de control sin ningún fármaco se pueden incluir (no mostrado) para identificar el nivel espontáneo de la apoptosis no asociado con el tratamiento de fármacos.

Después de aproximadamente 48 horas, cada pocillo con la muestra expuesta a los fármacos se trata con un tampón para lisar la población de eritrocitos y concentrar la población de leucocitos. Cada pocillo se incubaba después con anexina V para la detección de apoptosis con una combinación de anticuerpos para detectar e identificar células tumorales y células normales con precisión. Es posible evaluar, utilizando citometría de flujo, el efecto de cada fármaco en cada tipo de célula y cuantificar el nivel de muerte celular selectiva inducida por cada fármaco.

Los resultados pueden evaluarse a continuación y un nuevo ensayo puede iniciarse con una alícuota adicional con el fin de confirmar los resultados más relevantes, tales como las 10 mejores composiciones de fármacos y las concentraciones identificadas en un estudio anterior. La selección de un fármaco o combinación de fármacos apropiada que induce selectivamente la apoptosis en las células neoplásicas, tales como células de leucemia, se puede efectuar después de que el ensayo se realice para una muestra de paciente.

EJEMPLO 3: Las respuestas de los pacientes individuales demuestran los efectos citotóxicos de diferentes fármacos actualmente aprobados para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica

Los presentes métodos se han utilizado para analizar concentraciones de 30 μM de cinco fármacos clorambucilo, ciclofosfamida, vincristina, mitoxantrona, y doxorubicina, aprobados actualmente para la leucemia linfocítica crónica (LLC) en varios pacientes. Los resultados de la eficacia de los fármacos citotóxicos aprobados individualmente para inducir apoptosis en las células malignas de 9 muestras de pacientes *ex vivo* se proporcionan en la Figura 4. La Figura 4 demuestra que hay una gran variabilidad de una persona a otra en las respuestas a fármacos, poniendo de relieve un importante uso para los ensayos de medicina personalizada descritos en la presente memoria.

En cuanto a la respuesta del paciente a los tratamientos farmacológicos individuales en concentraciones de 30 μM , varios fármacos tuvieron generalmente una respuesta del paciente pobre, definida como la inducción de menos del 60% de apoptosis en las muestras de pacientes como se mide por las células positivas para anexina V. Adicionalmente, la Figura 4 indica que algunos de los pacientes (específicamente P1.0105, P2.0019, y P2.035) mostraron *ex vivo* resistencia extrema a mitoxantrona. Alternativamente, para los dos pacientes denotados por una estrella, solamente doxorubicina es muy eficaz y los otros 3 fármacos son resistentes, lo que indica que este tipo de ensayo podría ser muy útil en la orientación del tratamiento para estos pacientes. Aunque los resultados obtenidos a partir de las pruebas *ex vivo* pueden ser más precisos en la predicción de resistencia a fármacos que la eficacia del fármaco (p. ej., como se muestra en la Tabla 2), si un fármaco no destruye las células malignas *ex vivo*, es poco probable que destruya las mismas células *in vivo*.

EJEMPLO 4: Inducción de apoptosis por fármacos citotóxicos y no citotóxicos en muestras de LLC

La capacidad de los fármacos no citotóxicos para inducir apoptosis en muestras *ex vivo* se exploró utilizando muestras de sangre periférica obtenidas de pacientes con LLC (leucemia linfática crónica). Aproximadamente 900 fármacos, disponibles comercialmente, se detectaron *ex vivo*, uno por uno, en 23 muestras diferentes de pacientes. La Figura 6 muestra la eficacia de varios fármacos citotóxicos clínicamente aprobados y varios fármacos no citotóxicos para las neoplasias hematológicas en estas muestras de LLC *ex vivo*. Los resultados se representan gráficamente como % de la apoptosis. Como indican los resultados, los fármacos clínicamente aprobados inducen apoptosis en más del 75% de las células malignas. De izquierda a derecha, los fármacos no citotóxicos estudiados fueron paroxetina, fluoxetina, sertralina, guanabenz, y astemizol. De izquierda a derecha, los fármacos citotóxicos estudiados fueron fludarabina, clorambucilo, y mitoxantrona. La Figura 6 demuestra que los fármacos no citotóxicos destruyen selectivamente las mismas células malignas con eficacia *ex vivo* similar a la de los fármacos citotóxicos aprobados. Este resultado inesperado indica que estos fármacos no citotóxicos podrían tener un beneficio terapéutico significativo para los pacientes estudiados en la Figura 6.

Se realizaron estudios de validación adicionales para la inducción de apoptosis por los fármacos no citotóxicos. La Figura 7 compara las diferencias en los efectos citotóxicos de paroxetina entre las células leucémicas malignas y las células T y DC no malignas. A una concentración de aproximadamente 30 μM , la paroxetina indujo apoptosis en casi el 100% de las células leucémicas. No obstante, en la misma concentración de aproximadamente 30 μM , la paroxetina indujo apoptosis en solo el 15% de las células T y DC. Por consiguiente, la Figura 7 indica que la paroxetina induce selectivamente la apoptosis en las células malignas de LLC *ex vivo* y afecta mínimamente a las células DC y T no malignas.

Los fármacos no citotóxicos habitualmente prescritos en los protocolos de tratamiento, pueden tener una eficacia apoptótica muy selectiva contra las células malignas. Uno de estos casos se muestra en la Figura 12 para un paciente con LLC, que muestra el porcentaje de células positivas para anexina V inducido por diferentes fármacos. Una alta variabilidad se observó en el efecto citotóxico de diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de LLC (es decir, vincristina, mitoxantrona, y ciclofosfamida). Sorprendentemente, dos compuestos no citotóxicos que se incluyen normalmente en el tratamiento de los efectos secundarios causados por la quimioterapia (es decir, omeprazol y aciclovir) mostraron tasas de apoptosis similares a las de los agentes citotóxicos. De este modo, los ensayos de medicina personalizada que incluyen fármacos no citotóxicos, como se describe en la presente memoria, incluyendo los ejemplos proporcionados en la presente memoria, pueden proporcionar beneficios terapéuticos potenciales inesperados para los pacientes. Por ejemplo, la adición de fármacos no citotóxicos a los

ensayos *ex vivo* puede permitir nuevos e inesperados tratamientos que son complementarios a los tratamientos convencionales.

EJEMPLO 5: Análisis de 24 horas y 48 horas de la capacidad de los fármacos seleccionados para inducir apoptosis

5 La cinética de la inducción de la apoptosis se evaluó observando el porcentaje de células que experimentan apoptosis en puntos temporales de 24 horas y 48 horas. La Figura 8 indica que el fármaco no citotóxico sertralina elimina las células malignas de LLC más rápido que los citotóxicos aprobados. En la Figura 8, se analizaron
10 muestras de sangre entera obtenidas de pacientes diagnosticados con LLC para su respuesta al tratamiento farmacológico. Las muestras de sangre entera se incubaron con sertralina o uno de los tres fármacos (fludarabina, clorambucilo, o mitoxantrona) que están aprobados actualmente para el tratamiento de LLC. Después de la adición de los fármacos, las muestras de sangre entera se incubaron durante 24 o 48 horas antes del análisis. Como los resultados de la Figura 8 indican, la cinética de inducción de la apoptosis es más rápida para sertralina (más del 90% de inducción de apoptosis después de 24 horas) que para los otros 3 fármacos clínicamente aprobados
15 (aproximadamente el 40%, 45% y 50% de inducción de apoptosis después de 24 horas, respectivamente). Por lo tanto, sertralina indujo una apoptosis casi completa en 24 horas, mientras que los otros fármacos de LLC requieren 48 horas para la eficacia óptima.

20 Una apoptosis más rápida *ex vivo* podría traducirse en una mejor eficacia *in vivo*. No obstante, la Figura 8 también indica que la eficacia de estos cuatro fármacos es aproximadamente igual después de 48 horas. La Figura 8 hace hincapié en la utilidad de la evaluación de múltiples tiempos de incubación para seleccionar el tratamiento óptimo para cada paciente. Además, la Figura 8 indica que varias variables deben ser estudiadas (p. ej., composiciones de fármacos y tiempos de incubación) para el desarrollo de un tratamiento óptimo de politerapia.

EJEMPLO 6: Inducción diferencial de apoptosis por fármacos de la misma clase farmacológica

La paroxetina es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS). Otros miembros de la clase ISRS de compuestos se ensayaron con el fin de determinar si la clase farmacológica de fármacos ISRS tiene propiedades de inducción de apoptosis universales. La Figura 9 resume la capacidad de 6 ISRSs (paroxetina, fluoxetina, sertralina, citalopram, fluvoxamina, y zimelidina) para inducir la apoptosis en células malignas de LLC. Como demuestran los
30 resultados de la Figura 9, de los 6 fármacos, solo 3 (paroxetina, fluoxetina y sertralina) inducen la apoptosis de manera similar a los fármacos citotóxicos clínicamente aprobados. Estas diferencias entre fármacos que comparten mecanismos de acción similares y el mismo perfil farmacológico ponen de relieve la necesidad de que la metodología de ensayo *ex vivo* descrita en la presente memoria se seleccione entre los fármacos farmacológicamente análogos. Estas diferencias también indican la necesidad de experimentación *ex vivo* de cada fármaco sin tener en cuenta la clase farmacológica. Estas diferencias ponen aún más de relieve la importancia de la capacidad para estudiar un gran número de variables con el fin de desarrollar un ensayo de medicina personalizada.

EJEMPLO 7: Frecuencia de pacientes que exhiben más del 80 % de inducción apoptótica por el mismo tratamiento de fármacos

40 La eficacia apoptótica de los fármacos no citotóxicos varía más de una persona a otra que la eficacia apoptótica de los fármacos citotóxicos aprobados (p. ej., como se muestra en la Figura 4). Esta variación se ilustra también en la Figura 10. Se llevó a cabo una detección inicial de 23 muestras (combinación de sangre entera o de médula ósea) de pacientes diagnosticados con LLC con aproximadamente 2.000 compuestos (algunas muestras no eran
45 suficientes para detectar todos los compuestos). El cribado midió la capacidad de cada compuesto para inducir la apoptosis selectivamente en la población de células leucémicas de cada paciente. Un compuesto se considera un "acierto" para un paciente particular si se indujo un nivel de apoptosis superior al 80% en la población leucémica mientras que tiene un escaso o ningún efecto en la población celular normal.

50 Los resultados en la Figura 10 indican que solo un pequeño número de fármacos fue eficaz en la mayoría de las muestras de pacientes (80-100%). Del mismo modo, solo los 10 compuestos adicionales fueron eficaces en el 60-80% de las muestras de pacientes. 45 fármacos fueron eficaces en el 40-60% de las muestras, 66 fármacos fueron eficaces en el 20-40% de las muestras y 229 fármacos adicionales fueron eficaces en menos de 20% de las
55 muestras. La adición de estos fármacos significa que 353 fármacos fueron eficaces en la inducción de apoptosis *ex vivo* en estas 23 muestras. Estos son en su mayoría fármacos que no se han observado previamente como tratamientos para los tumores malignos hematológicos, lo que indica que el desarrollo de un ensayo de medicina personalizada requerirá la detección de un gran número de fármacos, tanto citotóxicos como no citotóxicos, para determinar un régimen de fármacos óptimo. Tales datos inesperados pueden tener importantes implicaciones
60 clínicas para el tratamiento de neoplasias hematológicas.

Las agencias reguladoras normalmente solo aprueban el uso de un pequeño subconjunto de los fármacos no citotóxicos a pacientes con neoplasias hematológicas que tienen por objeto paliar los efectos de los tratamientos citotóxicos. Sin embargo, la eficacia potencial observada en este caso para la mayoría de los otros fármacos no citotóxicos y reivindicada en la presente memoria podría, con el tiempo, convertirse en parte de estos tratamientos, como el concepto de avances de medicamentos aún más personalizados. Los ensayos de medicina personalizada

de politerapia descritos en la presente memoria pueden identificar fármacos no citotóxicos potencialmente útiles para cada paciente individual, representando un enfoque novedoso y terapéuticamente beneficioso que antes no estaba disponible.

5 EJEMPLO 8: Potenciación de la eficacia de un fármaco citotóxico aprobado por un fármaco no citotóxico

Como ejemplo de los beneficios potenciales de un ensayo de detección de medicina personalizada, el compuesto sertralina, identificado como un éxito contra una muestra de paciente con LLC, puede potenciar la respuesta de clorambucilo. Esto se muestra en la Figura 11. Clorambucilo es el fármaco más comúnmente prescrito utilizado para la terapia de primera línea de LLC en aproximadamente un 25% de los pacientes que no pueden soportar tratamientos basados en fludarabina. Como clorambucilo es altamente citotóxico, y causa varios efectos secundarios severos, la búsqueda de una manera para limitar la dosificación sería de gran beneficio para los pacientes. En este ensayo particular, la sertralina es un antidepresivo que está disponible en una formulación genérica y ha estado en el mercado durante muchos años. Clorambucilo solo en las concentraciones mostradas no indujo mucha apoptosis (curva inferior), pero la presencia de una dosis submáxima de sertralina potenció en gran medida el nivel de apoptosis (curva superior). Tal ejemplo demuestra posibles opciones de terapia concomitante que pueden tener la capacidad de potenciar la respuesta del tratamiento quimioterapéutico prescrito.

Estos resultados demuestran una necesidad para el desarrollo de ensayos de medicina personalizada utilizando una detección de alto rendimiento, tales como los métodos que utilizan citometría de flujo, que permiten la exploración del efecto de posibles fármacos y combinaciones de fármacos, incluidos todos los fármacos aprobados y, en particular, el concomitante no citotóxico se utiliza para paliar los efectos secundarios de las estrategias quimioterapéuticas.

25 EJEMPLO 9: Diseño de un ensayo de medicina personalizada (MP) de politerapia para LLC de acuerdo con los protocolos de tratamiento de PETHEMA

Un diseño de una placa de 96 pocillos para un ensayo de medicamentos personalizado para un paciente con LLC (leucemia linfocítica crónica) se ilustra en la Figura 13, sin considerar los fármacos no citotóxicos. En cada placa, la columna 1 contiene una solución de DMSO al 0,34% como control negativo y la columna 12 contiene 50 µM de solución de paroxetina y 50 µM de solución de estaurosporina (pocillos E-H) como controles positivos. Los fármacos y combinaciones de fármacos en las placas fueron los aprobados para esta indicación en los protocolos de tratamiento convencionales. En cada fila, los pocillos 2-6 y 7-11 incluyen una respuesta a la dosis de 5 puntos de cada uno de estos fármacos y combinaciones de fármacos, con un factor de dilución de 2:3. Las columnas 2 y 7, por lo tanto, contienen las concentraciones más altas de fármacos, que se establecieron para cada fármaco de acuerdo con su intervalo terapéutico. Clorambucilo (CH); fludarabina (F1); mafosfamida (MA); doxorubicina (DO); vincristina (VI); prednisolona (Pr); mitoxantrona (MI); 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA); flavopiridol (FL); melfalán (ME); metoprednisolona (MEPR); bendamustina (BE); pentostatina (PE); rituximab (RIT); alemtuzumab (ALE).

40 EJEMPLO 10: Diseño de un ensayo de MP para MM de acuerdo con los protocolos de tratamiento de PETHEMA

Un diseño de una placa de 96 pocillos para un ensayo de medicina personalizada para un paciente con MM (mieloma múltiple) se ilustra en la Figura 14 en los seis paneles A a F, sin tener en cuenta los fármacos no citotóxicos. La disposición de la placa se ha creado de acuerdo con los protocolos de tratamiento actuales, incluidos los fármacos individuales. En cada placa, la columna 1 contiene una solución de DMSO al 0,34% como control negativo y la columna 12 contiene 50 µM de solución de paroxetina y 50 µM de solución de estaurosporina (pocillos E-H) como controles positivos. Los fármacos y combinaciones de fármacos en las placas fueron los aprobados para esta indicación en los protocolos de tratamiento convencionales. En cada fila, los pocillos 2-6 y 7-11 incluyen una respuesta a la dosis de 5 puntos de cada uno de estos fármacos y combinaciones de fármacos, con un factor de dilución de 2:3. Las columnas 2 y 7, por lo tanto, contienen las concentraciones más altas de fármacos, que se establecieron para cada fármaco de acuerdo con su intervalo terapéutico. Además, las placas de 4-6 contienen todas las posibles combinaciones dobles de los protocolos aprobados con el fin de aclarar la sinergia entre todos los fármacos. Dexametasona (D); prednisona (P); melfalán (M); ciclofosfamida (C); doxorubicina (A); vincristina (VI); carmustina (BCNU-B); bortezomib (V); talidomida (T); lenalidomida (L); panobinostat (Pa); tanespimicina (Tn); perifosina (Pe); vorinostat (Vo); rapamicina (Ra); everolimus (Ev); temsirolimus (Te); tipifamib (Ti); cisplatino (cP); etopósido (E).

EJEMPLO 11: Diseño de un ensayo de MP para LLA de acuerdo con los protocolos de tratamiento de PETHEMA

Un diseño de una placa de 96 pocillos para un ensayo de medicina personalizada para un paciente con LLA (leucemia linfoblástica aguda) se ilustra en la Figura 15. La disposición de la placa se ha creado de acuerdo con los protocolos de tratamiento actuales, incluyendo los fármacos utilizados en monoterapia. El diseño del estudio tiene por objeto determinar la capacidad de los siguientes fármacos para inducir la apoptosis en una muestra del paciente: metotrexato (MTX), 6-mercaptopurina (6MP), citarabina (ARA-C), daunorrubicina (DNR), adriamicina, mitoxantrona (M), etopósido, tenipósido (VM-26), ciclofosfamida (CF), ifosfamida (IFOS), vincristina (V), vindesina (VIND), asparaginasa (L-ASA), imatinib (IMAT), rituximab (R), prednisona (P), hidrocortisona (HC), dexametasona (DXM),

leucovorina (Foli), mesna, omeprazol (Orn), ondansetrón (O), alopurinol (Alop), y filgrastima (FECG). El diseño de esta placa de 96 pocillos permite la comparación simultánea de numerosas estrategias quimioterapéuticas. El diseño también ensaya los efectos de los fármacos adyuvantes y de los fármacos que se utilizan para paliar los efectos secundarios de forma individual o en combinación con fármacos en monoterapia.

5

EJEMPLO 12: Diseño de un ensayo MPP para SMD de acuerdo con los protocolos de tratamiento de PETHEMA

Un diseño de una placa de 96 pocillos para un ensayo de medicina personalizada para un paciente con SMD (síndrome mielodisplásico) se ilustra en la Figura 16. La disposición de la placa se ha creado de acuerdo con los protocolos de tratamiento actuales, incluyendo los fármacos utilizados en monoterapia. El diseño del estudio tiene por objeto determinar la capacidad de los siguientes fármacos para inducir la apoptosis en una muestra del paciente: eritropoyetina (EPO), filgrastima (FECG), talidomida, ciclosporina (CsA), timoglobulina (ATG), trióxido de arsénico, azacitidina, decitabina, fludarabina (Fluda), etopósido (VP-16), citarabina (ARA-C), idarubicina (Ida), carboplatino (Carbop), prednisona (Pred), ondansetrón (Ondans), omeprazol (Om), alopurinol (Alop), co-trimoxazol (Cotri), y ácido fólico (AcF). El diseño de esta placa de 96 pocillos permite la comparación simultánea de numerosas estrategias quimioterapéuticas. El diseño también ensaya los efectos de los fármacos adyuvantes y de los fármacos que se utilizan para paliar los efectos secundarios de forma individual o en combinación con fármacos en monoterapia.

10

15

EJEMPLO 13: Diseño de un ensayo MP para LMA de acuerdo con los protocolos de tratamiento de PETHEMA

Un diseño de una placa de 96 pocillos para un ensayo de medicina personalizada para un paciente con LMA (leucemia mieloide aguda no M3) se ilustra en la Figura 17. La disposición de la placa se ha creado de acuerdo con los protocolos de tratamiento actuales, incluyendo los fármacos utilizados en monoterapia. El diseño del estudio tiene por objeto determinar la capacidad de los siguientes fármacos para inducir la apoptosis en una muestra del paciente: daunorrubicina (Dauno), idarubicina (Ida), citarabina (ARA-C), mitoxantrona (Mitox), etopósido (VP16), fludarabina (Fluda), filgrastima (FECG), omeprazol (Om), ondansetrón (Ondans), alopurinol (Alop), co-trimoxazol (Cotri), ácido fólico (AcF), amsacrina (AMSA), carboplatino (Carbop), daunorrubicina liposómica (Dauno lipo), gentuzumab-ozogamicina (GO), e hidroxilurea. El diseño de esta placa de 96 pocillos permite la comparación simultánea de numerosas estrategias quimioterapéuticas. El diseño también ensaya los efectos de los fármacos adyuvantes y de los fármacos que se utilizan para paliar los efectos secundarios de forma individual o en combinación con fármacos en monoterapia.

20

25

30

EJEMPLO 14: Diseño de un ensayo MP para LMA M3 de acuerdo con los protocolos de tratamiento de PETHEMA

Un diseño de una placa de 96 pocillos para un ensayo de medicina personalizada para un paciente con LMA M3 (leucemia mieloide aguda M3) se ilustra en la Figura 18. La disposición de la placa se ha creado de acuerdo con los protocolos de tratamiento actuales, incluyendo los fármacos utilizados en monoterapia. El diseño del estudio tiene por objeto determinar la capacidad de los siguientes fármacos para inducir la apoptosis en una muestra del paciente: tretinoína (ATRA), idarubicina (Ida), mitoxantrona (Mitox), citarabina (ARA-C), 6-mercaptopurina (6-MP), metotrexato (MTX), ondansetrón (Ondans), alopurinol (Alop), omeprazol (Om), dexametasona (DEXA), daunorrubicina (Dauno), etopósido (VP-16), fludarabina (Fluda), carboplatino (Carbop), daunorrubicina liposómica (Dauno lipo), co-trimoxazol (Cotri), y ácido fólico (AcF). El diseño de esta placa de 96 pocillos permite la comparación simultánea de numerosas estrategias quimioterapéuticas. El diseño también ensaya los efectos de los fármacos adyuvantes y de los fármacos que se utilizan para paliar los efectos secundarios de forma individual o en combinación con fármacos en monoterapia.

35

40

45

EJEMPLO 15: Prueba de proliferación por MTT en líneas celulares leucémicas de origen primario

Las células TOM-1 se derivaron de las células de médula ósea de un paciente con leucemia linfocítica aguda (LLA) positiva al Ph1. Las células MOLT-4 se derivaron a partir de una línea celular de leucemia linfoblástica aguda humana. Una prueba de MTT convencional se realizó para determinar Cl_{50} para los artículos individuales que se van a ensayar en líneas celulares específicas. La prueba de MTT se basa en la escisión de la sal de tetrazolio amarilla MTT a cristal de formazán de color púrpura por células activas metabólicas. El formazán se solubilizó entonces, y la concentración se determinó por densidad óptica a 570 nm. De seis a ocho diferentes concentraciones de sertralina, por triplicado, se analizaron a las 24 horas post-tratamiento.

50

55

Se valoró el efecto de la sertralina en la inhibición de la proliferación celular a las 24 horas en las líneas celulares de origen primario TOM-1 y MOLT-4. La Cl_{50} para la línea celular MOLT-4 fue de 40 μ M, y la Cl_{50} para la línea celular TOM-1 fue de 50 μ M (Figura 19).

60

EJEMPLO 16: Determinación de apoptosis utilizando ELISA de apoptosis

Un ELISA de tipo sándwich de una etapa se realizó utilizando las células TOM-1 y MOLT-4 del Ejemplo 15. El ELISA de tipo sándwich de una etapa se basa en la cuantificación de fragmentos de ADN complejo a histona (mono- y oligonucleosomas) fuera del citoplasma de las células después de la inducción de la apoptosis o cuando se libera de las células necróticas.

65

Se valoró el efecto de la sertralina en la inducción de la apoptosis a las 24 horas en las líneas celulares de origen primario TOM-1 y MOLT-4. La sertralina aumentó el índice de apoptosis hasta 7 veces en las células MOLT-4 (Figura 20).

5 EJEMPLO 17: Determinación de la caspasa-3 activa

La activación de la caspasa-3 se determinó utilizando un Western blot de extractos de dos líneas celulares linfoblásticas agudas (TOM-1 y MOLT-4) expuestas a mayores concentraciones de sertralina. Los extractos fueron tomados a las 24 y 48 horas. La caspasa-3 activa es una proteasa que sirve como marcador de apoptosis.

10 Se valoró el efecto de la sertralina en la inducción de la caspasa-3 activa a las 24 horas en las líneas celulares de origen primario TOM-1 y MOLT-4. La sertralina indujo notablemente la caspasa-3 activa en las células MOLT-4, con la inducción máxima que se produce en la concentración de 70 μm (Figura 21).

15 EJEMPLO 18: Eficacia de combinaciones de politerapia *ex vivo* en una muestra de LLC

Las combinaciones de politerapia de rituximab, fludarabina, mitoxantrona y ciclofosfamida se ensayaron a concentraciones máximas en una muestra de LLC. La ciclofosfamida no se ensayó directamente, sino más bien por su metabolito mafosfamida (un compuesto activo en el cuerpo humano). Los cuatro principales fármacos individuales fueron resistentes (es decir, rituximab, fludarabina, mitoxantrona, y ciclofosfamida) (Figura 22, lado izquierdo). Un protocolo de politerapia con fludarabina y rituximab también era resistente (Figura 22, centro). Tres protocolos de politerapia (es decir, fludarabina y ciclofosfamida; fludarabina, ciclofosfamida, y mitoxantrona; y fludarabina, ciclofosfamida y rituximab) eran muy sensibles, eliminando esencialmente todas las células leucémicas (lado derecho) (Figura 22).

25 Las curvas de respuesta de cinco puntos se generaron para las combinaciones de fludarabina y ciclofosfamida; fludarabina, ciclofosfamida, y mitoxantrona; y fludarabina, ciclofosfamida y rituximab para caracterizar la eficacia *ex vivo* (Figuras 23-25). Estas curvas muestran un efecto sinérgico significativo para estas combinaciones de fármacos, destacando la importancia de la evaluación de las combinaciones de fármacos como se describe en la presente memoria.

30 EJEMPLO 19: Efecto de fármacos individuales en cinco concentraciones diferentes en dos pacientes

35 La fludarabina, mafosfamida y la combinación de fludarabina y mafosfamida se ensayaron en dos pacientes, P2.0144 (Figura 26, izquierda) y P2.0149 (Figura 26, derecha), en cinco concentraciones. El índice de combinación (IC) se calculó utilizando el programa Calcsyn (Chou *et al.*, *Adv Enzyme Regul* 1984; 22:27-55; Chou *et al.*, *Eur J Biochem* 1981; 115(1):207-16) para caracterizar la sinergia de las combinaciones en cada concentración (que se muestra en la parte superior de los paneles). El IC es una medida cuantitativa del grado de interacción del fármaco en términos de efectos aditivos. El sinergismo se produce cuando $IC < 1$, el efecto aditivo se produce cuando $IC \sim 1$, y el antagonismo se produce cuando $IC > 1$. El índice de reducción de la dosis (IRD) es una medida de cuánta dosis de cada fármaco en combinación sinérgica se puede reducir a un nivel de efecto dado en comparación con la dosis de solo cada fármaco.

45 La Figura 27 muestra el índice de combinación frente al efecto fraccional basado en el método de Chou y Talalay (panel superior). Los marcadores transversales indican valores observados. La línea de color negro corresponde con un modelo de simulación. El panel medio muestra el isoblograma de la interacción de fármacos basada en el método de Chou y Talalay en tres niveles de respuesta diferentes (DE_{50} , DE_{75} , y DE_{90}) basándose en estimaciones de respuesta a la dosis. Los puntos que se trazan sobre cada eje corresponden a las dosis estimadas para estas respuestas para cada fármaco individualmente. Las líneas rectas representan el área del efecto aditivo para las combinaciones. Los puntos para las dosis combinadas que se encuentran por debajo de estas líneas denotan el sinergismo de fármacos. Las Figuras 26 y 27 demuestran que la combinación de fludarabina y mafosfamida potenció su citotoxicidad con respecto a la eficacia del fármaco solo contra las células B de LLC leucémicas.

55 EJEMPLO 20: Efecto del tiempo de incubación sobre la eficacia de los fármacos para inducir apoptosis en las células malignas en muestras de LLC

Se ensayó el efecto del tiempo de incubación sobre la eficacia de fludarabina y sertralina en la inducción de apoptosis en las células malignas en muestras de LLC. La Figura 28 muestra curvas para fludarabina (panel izquierdo) y sertralina (panel derecho), cuando la apoptosis se midió a las 24 horas (parte superior) o 48 horas (parte inferior). En ambos casos, los fármacos se incubaron con la muestra durante 30 min, 4 horas u 8 horas antes de lavar el fármaco y esperar 24 o 48 horas para medir la apoptosis. La sertralina, un fármaco no citotóxico que induce la apoptosis en las células malignas de LLC, demostró cinética más rápida que la fludarabina.

65 EJEMPLO 21: Número de combinaciones de fármacos

Se realizaron cálculos para valorar el número de combinaciones de 2 fármacos, 3 fármacos y 4 fármacos para 15

fármacos.

La Figura 29 representa el número de combinaciones únicas de 2 fármacos que puede efectuarse a partir de 15 fármacos individuales. Cada fármaco se representa por un número y las celdas sombreadas representan las combinaciones de 2 fármacos. Esto da un total de 105 combinaciones únicas de 2 fármacos.

La Figura 30 representa el número de combinaciones únicas de 3 fármacos que puede efectuarse a partir de 15 fármacos individuales. Las combinaciones de 2 fármacos enumeradas en la fila superior de cada matriz se combinarán con los fármacos individuales en la columna de la izquierda cuando los recuadros en el centro estén sombreados de color gris claro. Las combinaciones de 2 fármacos enumeradas en la fila inferior de cada matriz se combinarán con los fármacos individuales en la columna de la izquierda cuando los recuadros en el centro estén sombreados en gris oscuro. Esto da un total de 455 combinaciones únicas de 3 fármacos.

La Figura 31 representa el número de combinaciones únicas de 4 fármacos que puede efectuarse a partir de 15 fármacos individuales. Las combinaciones de 3 fármacos enumeradas en el lado izquierdo de cada columna se combinarán con el fármaco individual enumerado en la parte superior de las columnas para cada recuadro que esté sombreado. Las combinaciones de 3 fármacos enumeradas en el lado derecho de cada columna se combinarán con el fármaco individual enumerado en la parte superior de las columnas para cada recuadro que contenga una "X". Esto da un total de 1.365 combinaciones únicas de 4 fármacos.

EJEMPLO 22: Diseño de un ensayo de MP utilizando un sistema de etiquetado

El rendimiento de los ensayos de medicina personalizada *ex vivo* se puede aumentar aún más por el etiquetado de pocillos que contienen diferentes composiciones de fármacos con sondas fluorescentes. Los pocillos etiquetados pueden mezclarse y pasar juntos a través de un citómetro de flujo, ahorrando tiempo en relación con la evaluación de cada pocillo individualmente. Los ahorros obtenidos pueden ser aproximadamente iguales al número de pocillos mezclados. El ahorro de tiempo permite la experimentación de más composiciones de fármacos en menos tiempo, lo que permite más ensayos a realizar por la plataforma ExviTech por unidad de tiempo. Esto se traduce en un aumento en el rendimiento y una disminución de los costos que podrían ser muy significativos.

Las Figuras 32 y 33 muestran ejemplos de multiplexación utilizando fluorocromos como colorantes. En una realización, los fluorocromos colorantes se utilizan como reactivos para etiquetar las células en diferentes composiciones de fármacos que son, p. ej., contenidos en diferentes pocillos. En otra realización, los fluorocromos colorantes se utilizan para etiquetar anticuerpos que luego se utilizan como reactivos para etiquetar las células en presencia de diferentes composiciones de fármacos que son, p. ej., contenidos en diferentes pocillos. En otra realización, los reactivos de fluorescencia son los puntos cuánticos utilizados para etiquetar células en diferentes composiciones de fármacos que son, p. ej., contenidos en diferentes pocillos. En una realización, el número de composiciones de fármaco que puede ser evaluado en el modo de multiplexación es aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, o aproximadamente o más de 50, o un intervalo definido por dos de los valores precedentes.

La Figura 32 representa la multiplexación de 3 colores, de leucocitos de sangre periférica utilizando diferentes colorantes de seguimiento celular. Tres pocillos consecutivos que contienen sangre periférica lisada se tiñeron de forma individual con diferentes colorantes de seguimiento celular. El pocillo 1 se tiñó con Pacific Blue (P22652) (Invitrogen, Carlsbad, CA), el pocillo 2 se tiñó con DiR (D12731) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el pocillo 3 se tiñó con DiD (V-22889) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El contenido de los tres pocillos se mezcló y se adquirió simultáneamente. Los espectros de excitación/emisión únicos de cada colorante de seguimiento celular permiten la separación de las tres poblaciones celulares distintas que refleja tres pocillos de origen diferente.

Las células del pocillo 1 muestran una señal más fuerte en el detector de láser violeta que las células de los pocillos 2 y 3. Por el contrario, las células de los pocillos 2 y 3 muestran una señal más fuerte en los detectores de láser rojo en comparación con las células del pocillo 1. Finalmente, las células de los pocillos 2 y 3 muestran diferentes picos de emisión, lo que permite su separación en un gráfico de dos variables de los dos detectores de láser rojo.

1 Leone *et al.*, *Cancer Invest* 1991, 9:491-503.

2 Bosanquet *et al.*, *Lancet* 1991, 337: 711-716.

3 Hongo *et al. et al.*, *Cancer* 1990; 65: 1263-1272.

4 Hongo *et al. et al.*, eds. *Drug resistance in leukemia and lymphoma*. Langhorne, PA: Harwood Academic Publishers 1993, 319.

5 Kaspers *et al.*, eds. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma*. Chur: Harwood Academic Publishers 1993, 321-328.

6 Larsson *et al.*, *Int J Cancer* 1992, 50:177-185.

7 Lathan *et al.*, *Haematol Blood Transfus* 1990, 33:295-298.

8 Weisenthal LM *et al.*, *Cancer Treat Rep* 1986, 70:1283-1295.

9 Weisenthal LM *et al.*, *Cancer Res* 1983, 43:749-757.

10 Kirkpatrick DL *et al.*, *Leuk Res* 1990, 14:459-466.

11. Langker ST *et al.*, eds. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma*. Chur: Harwood Academic Publishers 1993, 279-291.
12. Staib P *et al.* *Adv Exper Med Biol* 1999, 457:437-444.
- 5 13. Santini V, *et al.*, eds. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma*. Chur: Harwood Academic Publishers, 1993, 365-368.
14. Sargent JM *et al.*, *Br J Cancer* 1989, 60:206-210.
15. Stute N *et al.*, *Adv Exper Med Biol* 1999, 457:445-452.
16. Larsson *et al.*, eds. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma*. Chur: Harwood Academic Publishers, 1993:399-407.
- 10 17. Beksac M *et al.*, *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1988, 5: 253-257.
18. Santini V *et al.*, *Hematol Oncol* 1989, 7:287-93.
19. Tidefelt U *Et al.*, *Eur J Haematol* 1989, 43:374-384.
20. Bosanquet *et al.*, *Br J Haematol* 1999, 106: 474-476.
21. Silber *et al.*, *Blood* 1994,84:3440-3446.
- 15 22. Bosanquet AG., eds. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma*. Chur: Harwood Academic Publishers 1993, 373-383.
23. Sevin *et al.*, *Gynec Oncol* 1988, 31:191-204.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar la sensibilidad celular a fármacos, que comprende:
 - 5 a. obtener una muestra de sangre entera, sangre periférica entera o médula ósea entera que se ha extraído de un paciente con una neoplasia hematológica;
 - b. dividir la muestra completa en al menos 35 alícuotas;
 - c. combinar cada una de las 35 alícuotas con al menos con una composición de fármacos; y
 - 10 e. medir la apoptosis o la depleción celular en cada una de las al menos 35 alícuotas por citometría de flujo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que al menos dos de las composiciones de fármacos comprenden el mismo fármaco en concentraciones diferentes.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que al menos una de las composiciones de fármacos comprende una pluralidad de fármacos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos una de las composiciones de fármacos comprende una pluralidad de fármacos que son no citotóxicos.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos una de las composiciones de fármacos comprende un fármaco no citotóxico que es el mismo o de la misma categoría terapéutica que un fármaco que ya se ha administrado al paciente.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que al menos una de las composiciones de fármacos combina un fármaco no citotóxico y un fármaco citotóxico.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el análisis se completa en un periodo de 72 horas tras la combinación de las alícuotas con una composición de fármacos.
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el número de alícuotas combinadas con una composición de fármacos es de al menos 96.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra entera comprende células de una neoplasia hematológica seleccionada entre el grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda en adultos, leucemia linfoblástica aguda pediátrica, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda no M3, leucemia mieloide aguda M3, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin y leucemia mieloide crónica.
- 35 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la composición de fármacos comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en 5-azacitidina, alemtuzumab, aminopterina, amonafida, amsacrina, CAT-8015, bevacizumab, ARR Y520, trióxido de arsénico, AS1413, atra, AZD 6244, AZD1152, banoxantrona, behenoilara-C, bendamustina, bleomicina, blinatumomab, bortezomib, busulfán, carboplatino, CEP-701, clorambucilo, clorodesoxiadenosina, cladribina, clofarabina, CPX-351, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabina, arabinósido de citosina, dasatinib, daunorrubicina, decitabina, cadena A de la ricina desglucosilada conjugada a inmunotoxinas anti-CD19/anti-CD22, dexametasona, doxorubicina, elacitarabina, entinostat, epratuzumab, erwinasa, etopósido, everolimus, exatecán mesilato, flavopiridol, fludarabina, fordesina, gemcitabina, gemtuzumab-ozogamicina, homoharringtonina, hidrocortisona, hidroxycarbamida, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón alfa-2a, yodo 1131 anticuerpo monoclonal BC8, ifosfamida, isotretinoína, laromustina, L-asparaginasa, lenalidomida, lestaurtinib, mafosfamida, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, metilprednisolona, metilprednisona, midostaurina, mitoxantrona, nelarabina, nilotinib, oblimersen, paclitaxel, panobinostat, pegaspargasa, pentostatina, pirarrubicina, PKC412, prednisolona, prednisona, PSC-833, rapamicina, rituximab, rivabirina, sapacitabina, Dinaciclib, sorafenib, sorafenib, STA-9090, tacrolimus, tanespimicina, temsirolimus, tenipósido, terameprocol, talidomida, tioguanina, tiotepa, tipifarnib, topotecán, treosulfán, troxacitabina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, voreloxina, vorinostat, etopósido, zosuquidar y combinaciones de los mismos.
- 40 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la composición de fármacos comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en hidrato de óxido de aluminio, lorazepam, ampicilina, meropenem, cefepima, vancomicina, teicoplanina, ondansetrón, dexametasona, anfotericina B (liposómica), caspofugina, itraconazol, fluconazol, voriconazol, trimetoprima, sulfametoxazol, FECG, ranitidina, rasburicasa, paracetamol, metamizol, cloruro de morfina, omeprazol, paroxetina, fluoxetina, sertralina y combinaciones de los mismos.
- 55 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que cada una de las al menos 35 alícuotas contiene 500 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.
- 60 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que cada una de las al menos 35 alícuotas contiene
- 65

5.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que cada una de las al menos 35 alícuotas contiene 10.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

5 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que cada una de las al menos 35 alícuotas contiene 20.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

10 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que cada una de las al menos 35 alícuotas contiene 40.000 o más células enfermas o neoplásicas por pocillo.

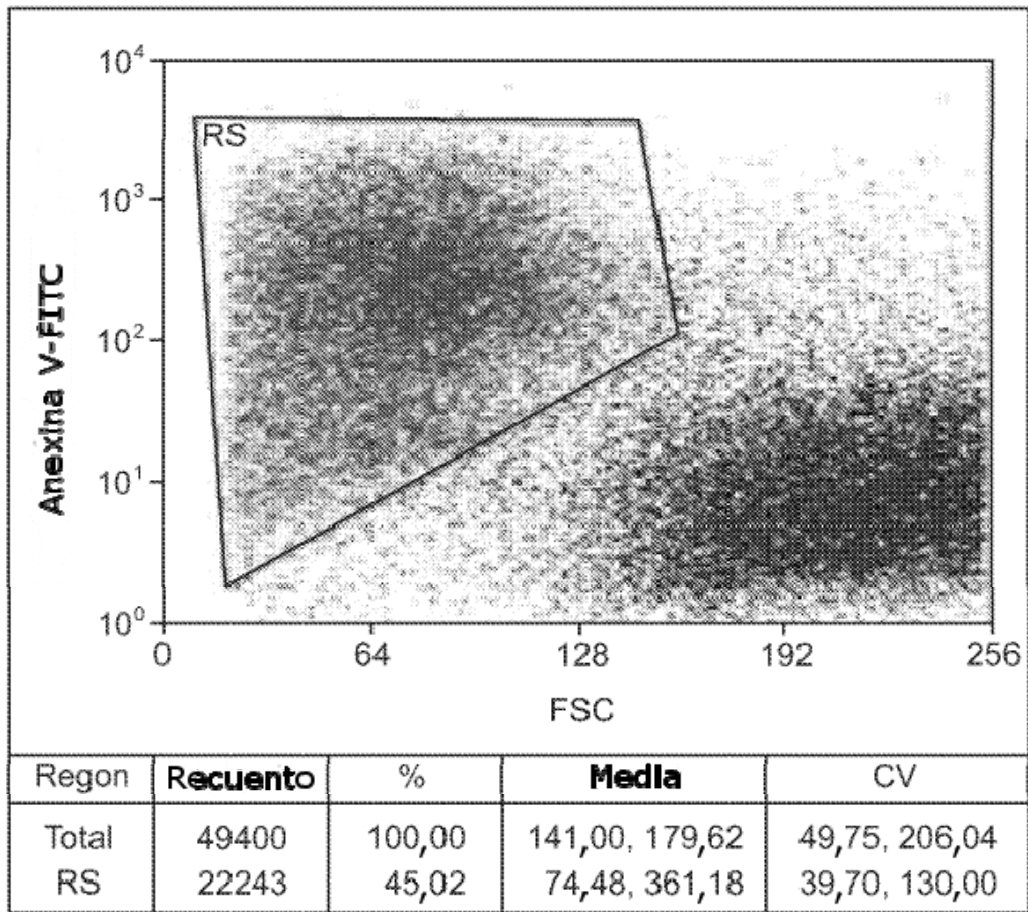


FIG. 1

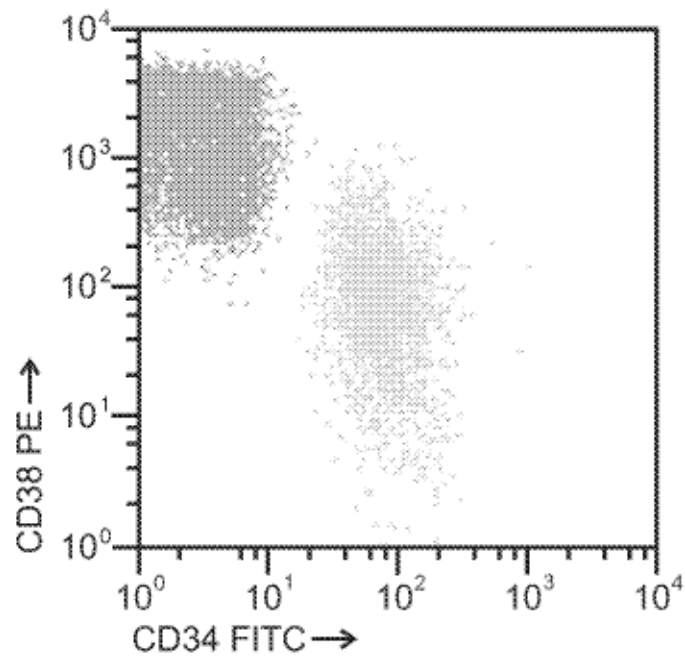


FIG. 2

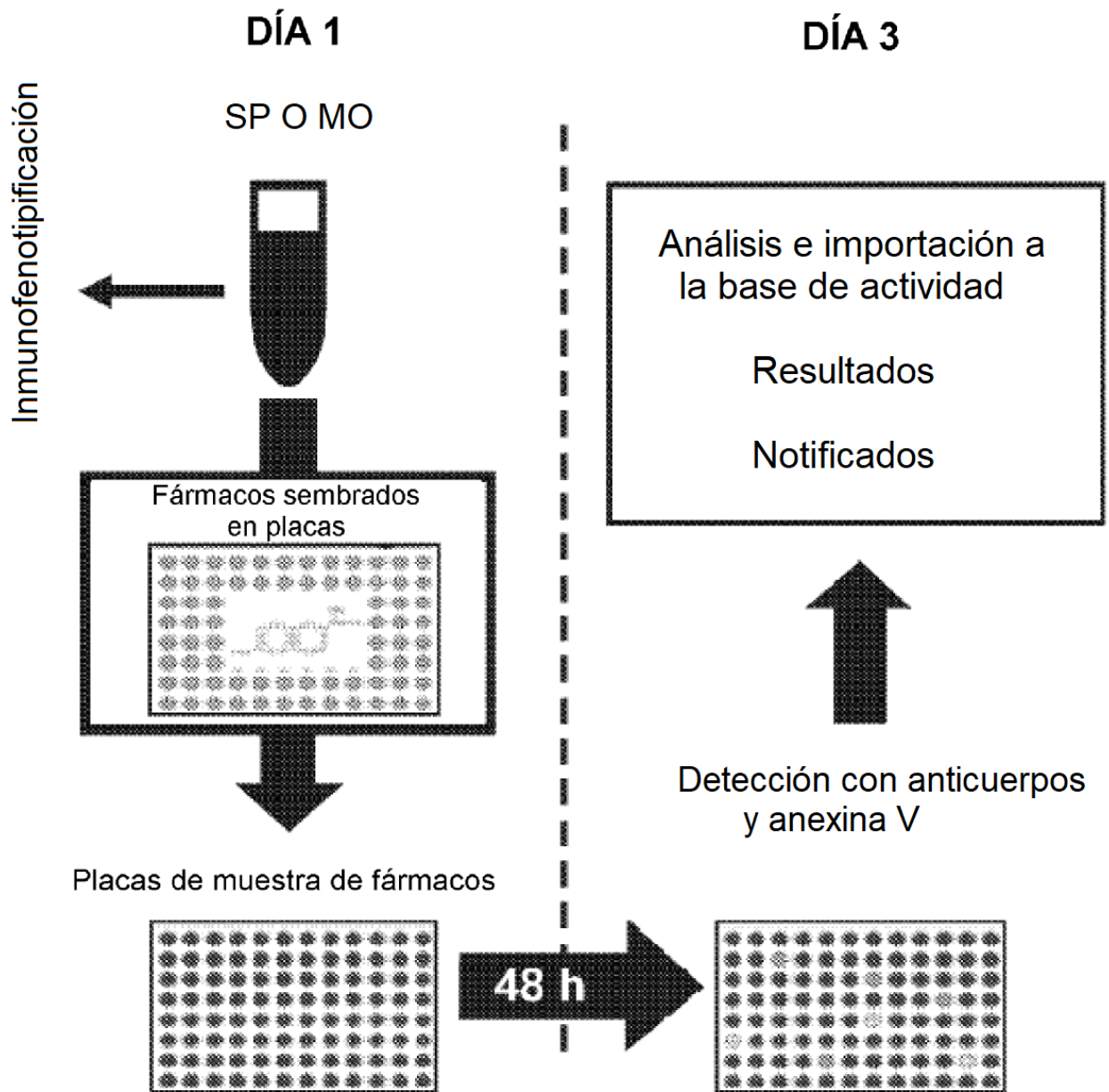


FIG. 3

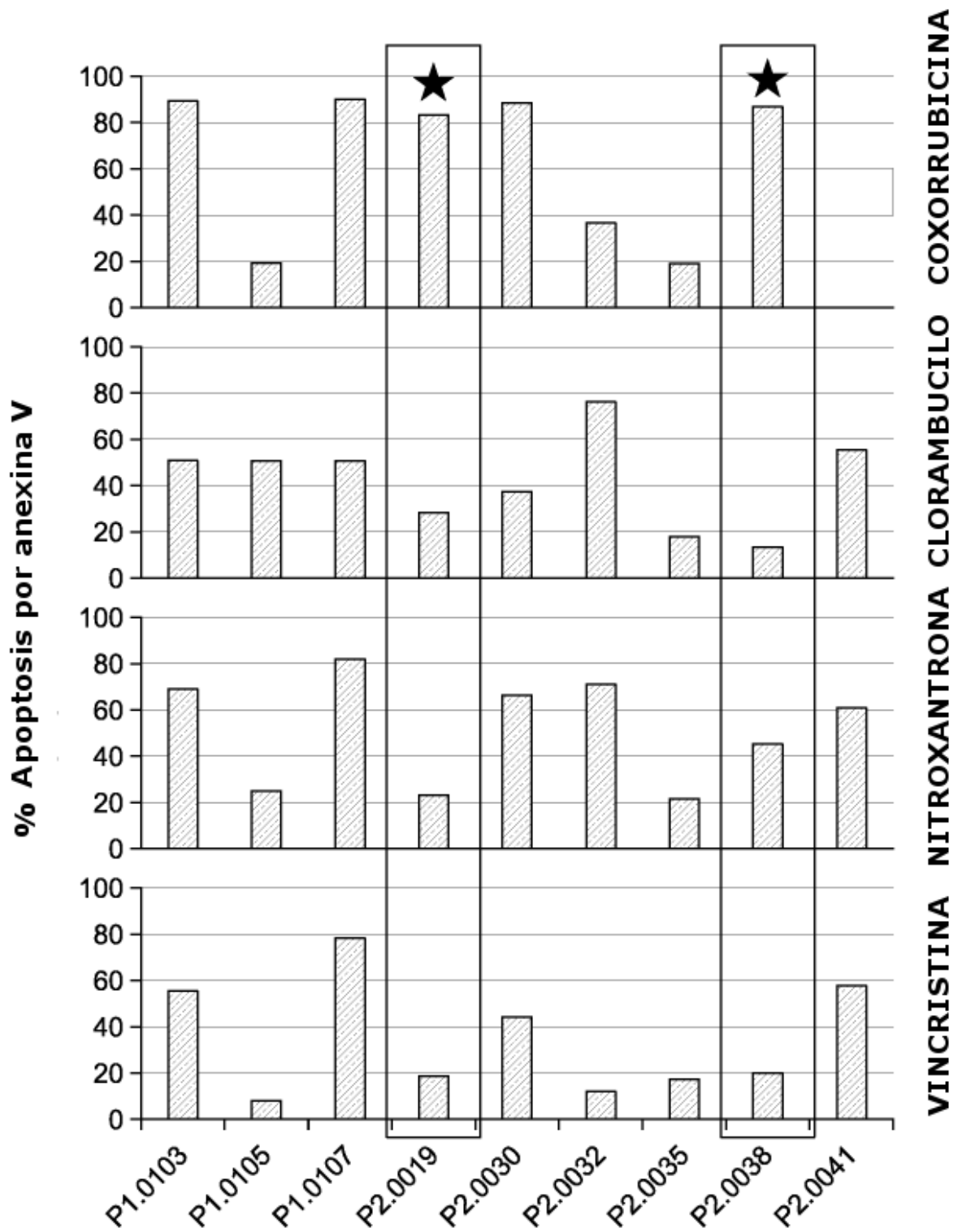


FIG. 4

N.º de fármacos	N.º de combinaciones (de hasta 4 fármacos)	5 concentraciones	2 tiempos de incubación
1	1	5	10
2	3	15	30
3	7	35	70
4	15	75	150
5	30	150	300
6	57	315	630
7	106	635	1270
8	199	995	1990
9	255	1275	2700
10	385	1925	3700
11	561	2805	5610
12	795	3975	7950
13	1092	5460	10920
14	1470	7350	14700
15	1940	9700	19400

FIG. 5

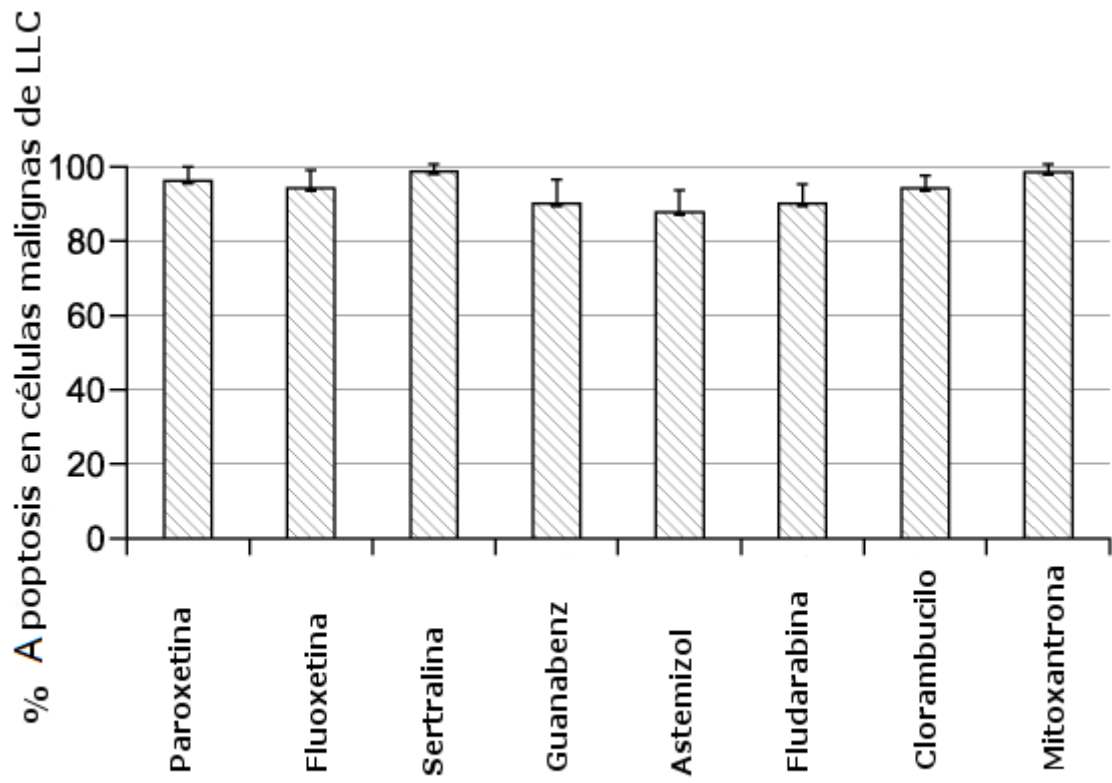


FIG. 6

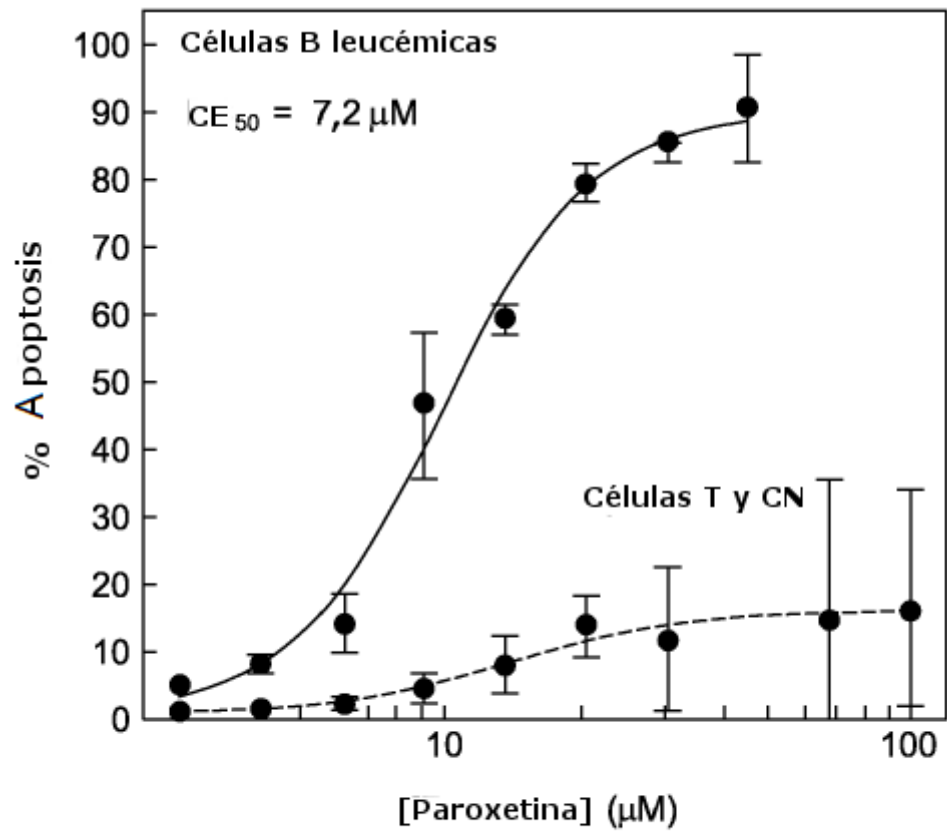


FIG. 7

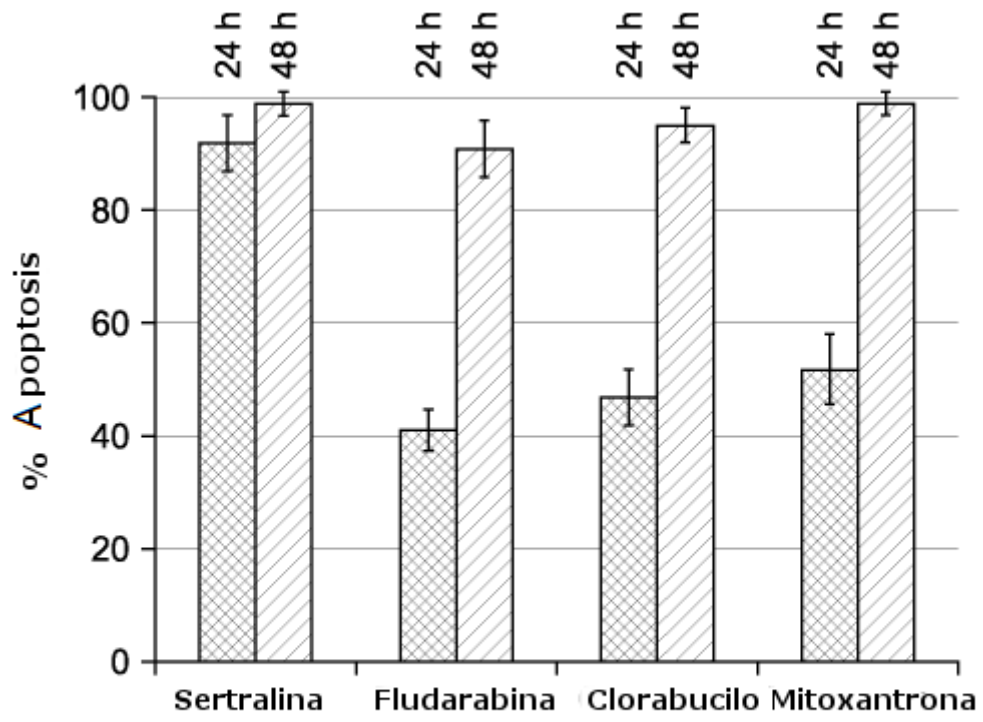


FIG. 8

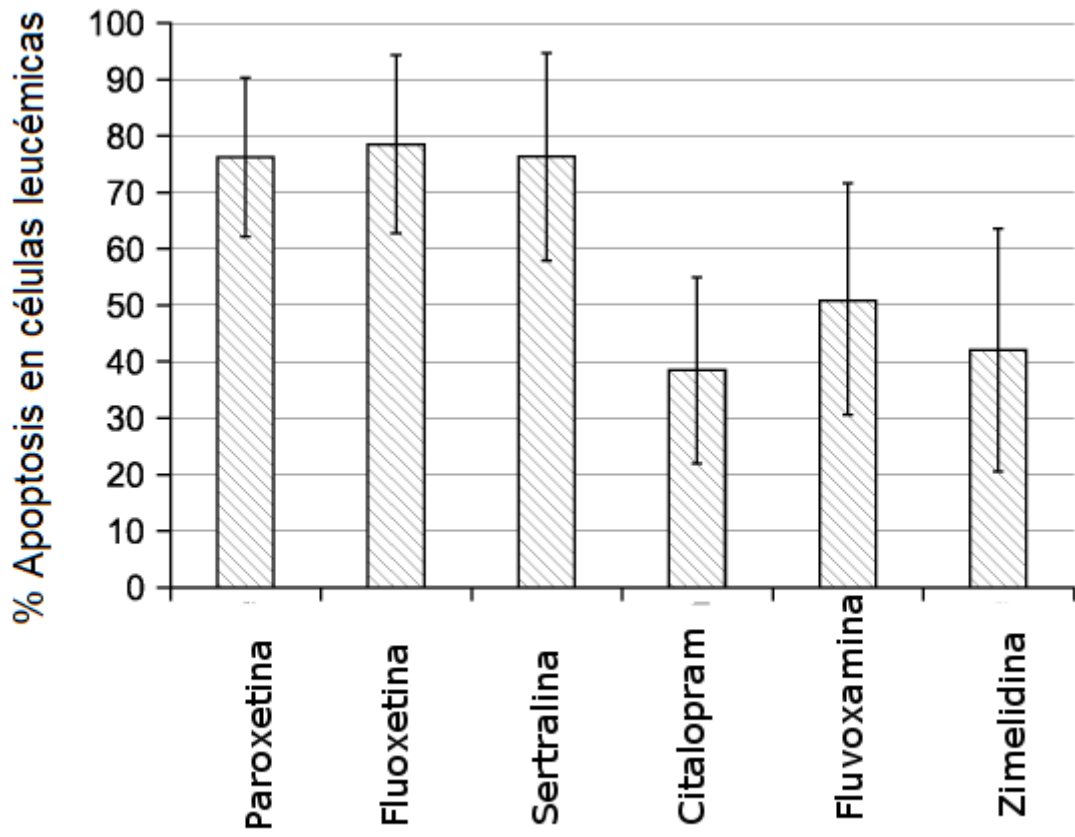


FIG. 9

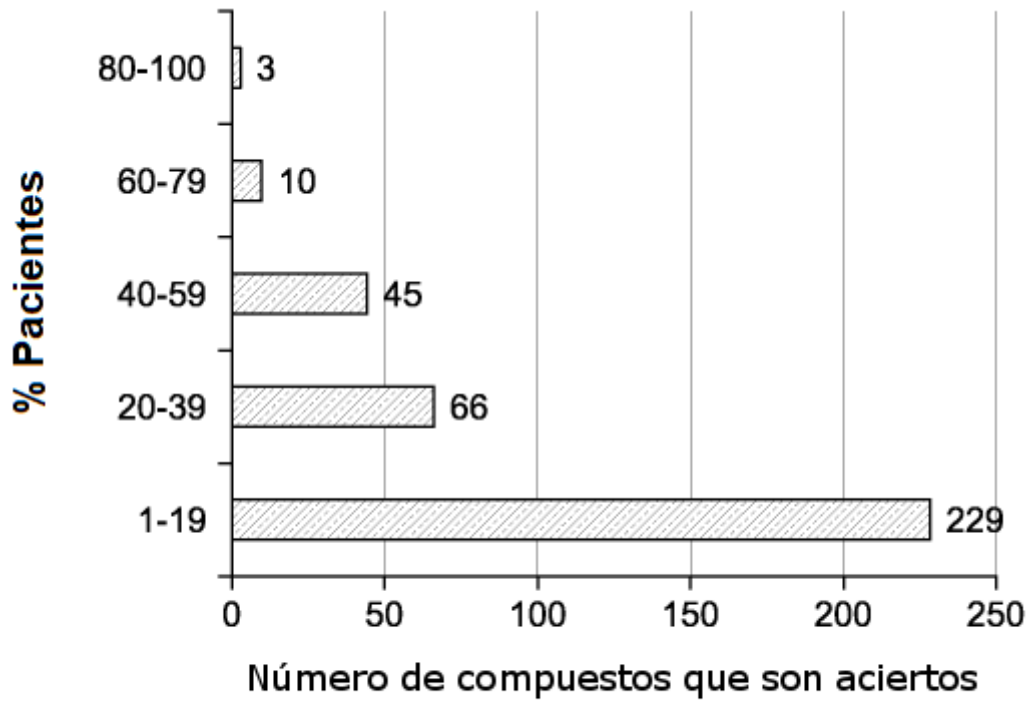


FIG. 10

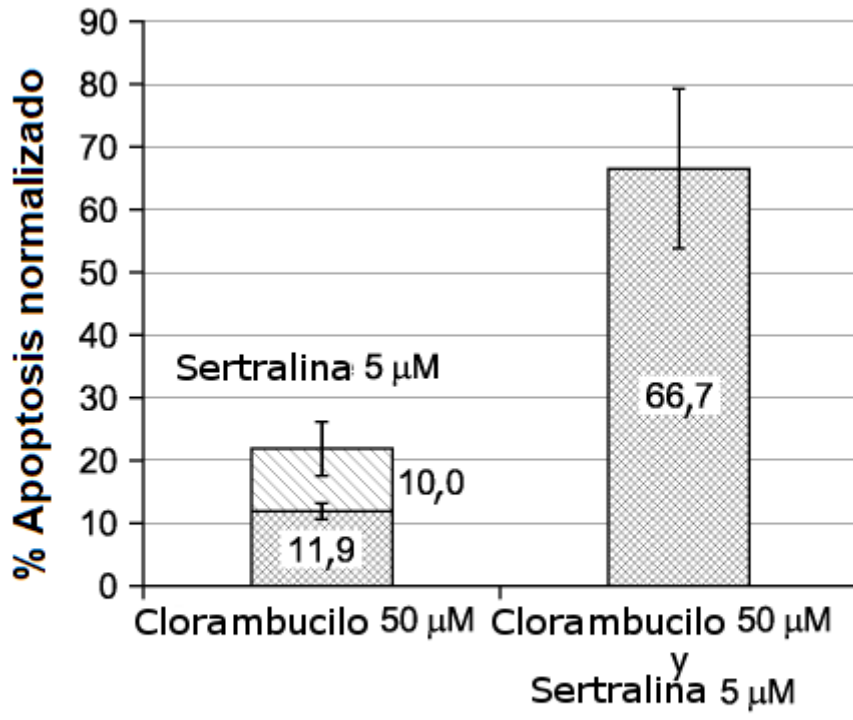


FIG. 11

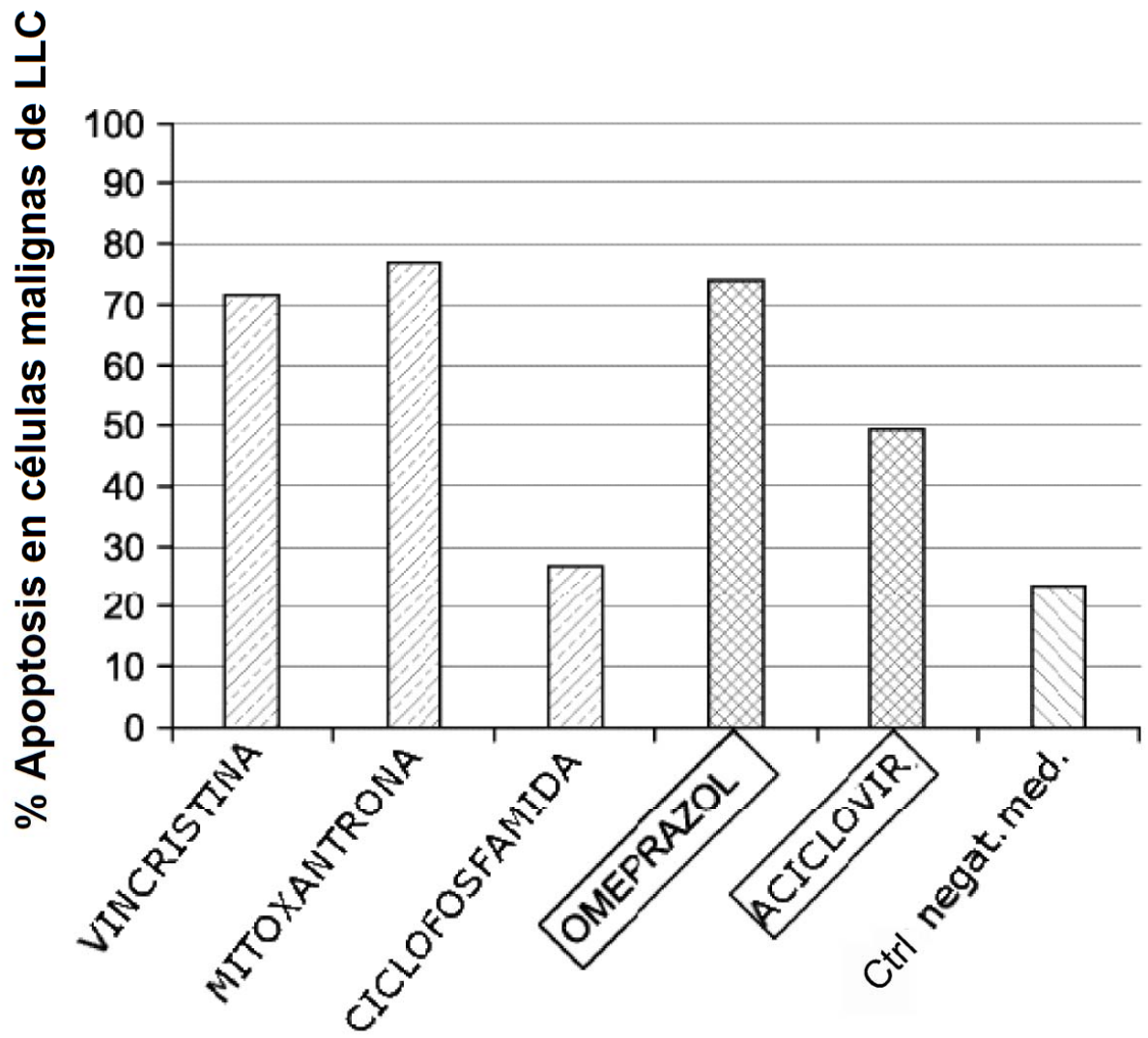


FIG. 12

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10 µm	CLORAMBUCILO=CH				1µm	FLUDARABINA =FU				
B		30 µm	MAFOSFAMIDA =MA				1 µm	DOXORRUBICINA =DO				VIVIA007 50 µM
C		1 µm	VINCRISTINA =VI				30 µm	PREDNISOLONA =PR				
D		1 µm	MITOXANTRONA =MI				1µm	2-CLORO- DESOXIADENOSINA =2Cda				
E		3 µm	FLAVOPIRIDOL=FL				30 µm	MELFALAN =ME				ESTAUIROSPORINA 50 Mm
F		300 µm	ME-PREDNISOLONA=MEPR				120 µm	BENDAMUSTINA =BE				
G			CHOP: MA+DO+VI+PR					MA+DO+VI				
H			CA: MA+DO+PR					COP/CVP: MA+VI+PR				

FIG. 13A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		300 μ m 5,4 μ m	PENTOSTATINA + 2-desoxiadenosina						MA+VI			VIVIA007 50 μ M
B				MA+DO					MA+PR			
C				2Cda+MA					FL+MA			
D				CH+PR					MA+MI			
E				DO+PR					VI+PR			ESTAUIROSPORINA 50 mM
F				DO+VI					FL+MI			
G				PE+MA								
H				FL+MA+MI					DO+VI+PR			

FIG. 13B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		RITUXIMAB RECIENTE=RI					ALEMTUZUMAB RECIENTE=AL					
B			MA+RI					FL+AL				VIVIA007 50 μ M
C			FU+RI					ME+AL				ESTAUROSPORINA 50 mM
D			PE+RI					FL+ME+AL				
E			FL+MA+RI					PE+MA+RI				
F			RI (congelado)					AL (congelado)				
G												
H												

FIG. 13C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		10 µm	Dexametasona = D				400 µm	Prednisona = P					
B		30 µm	Melfalán = M				100 µm	Ciclofosfamida = C					
C		10 µm	Doxorrubina = A				100 µm	Vincristina = Vi					
D		100 µm	Carbustina = BCNU-B				100 µm	Bortezomib = V					
E		100 µm	Talidomida = T				100 µm	Lenalidomida = L					
F		100 µm	Panabinostat = Pa				10 µm	Taneisomicina = Tn					
G		10 µm	Perifosina = Pe				10 µm	Vorinostat = Vo					
H		10 µm	Rapamicina = Ra				10 µm	Everolimus = Ev					
		DMSO 0,34 %											
													VIVIA007 50 µM
													ESTAUROSPORINA 50 mM

FIG. 14A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10 μm	Temsirolimus= Te				10 μm	Tipifarnib= Ti				
B		10 μm	Cisplatino = cP				100 μm	Etoposido = E				VIVIA007 50 μM
C			MP	MP				LD	LD			
D			VD	VD				TD	TD			ESTAUIROSPORINA 50 mM
E			CP	CP				MPT	MPT			
F			MPL	MPL				VMP	VMP			
G			VAD	VAD				VTP	VTP			
H			VTD	VTD				VCD	VCD			

FIG. 14B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				VCP					VDTcPACE			
B				VDLcPACE					LCD			VIVIA007 50 μ M
C				LAD					TCD			
D				VAMP					RVCD			ESTAUROSPORINA 50 mM
E				VBCMP					VBAD			
F				VAD								
G												
H												

FIG. 14C

	12	VIVIA007 50 μ M				ESTAUIROSPORINA 50 mM			
	11								
	10								
	9	ML	VP	AD	VP	VC	CP	VcP	TcP
	8								
	7								
	6								
	5								
	4	MT	VM	VA	VT	TP	CD	VL	DcP
	3								
	2								
	1	DMSO 0,34 %							
A									
B									
C									
D									
E									
F									
G									
H									

FIG. 14D

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	DMSO 0,34 %												
B												VIVIA007 50 μ M	
C				cPC					cPE				ESTAUIROSPORINA 50 mM
D				VE					DE				
E				TE					LcP				
F				LA					LC				
G				LE					TC				
H				AM					AP				

FIG. 14E

	12	VIVIA007 50 μ M				ESTAUROSPORINA 50 mM			
	11								
	10								
	9	ViC	ViP	BM	ViA	BA			
	8								
	7								
	6								
	5								
	4	ViB	ViM	BC	BP	ViD	BD		
	3								
	2								
	1	DMSO 0,34 %							
A									
B									
C									
D									
E									
F									
G									
H									

FIG. 14F

Pocillo 1 Metotrexato	Pocillo 2 6-Mercaptopurina	Pocillo 3 Citarabina	Pocillo 4 Daunorubicina	Pocillo 5 Adriamicina	Pocillo 6 Mitoxantrona	Pocillo 7 Etopósido	Pocillo 8 Tenipósido	Pocillo 9 Ciclofosfamida	Pocillo 10 Ifosfamida
Pocillo 11 Vincristina	Pocillo 12 Vindesina	Pocillo 13 Asparaginasa	Pocillo 14 Imatinib	Pocillo 15 Rituximab	Pocillo 16 Prednisona	Pocillo 17 Hidrocortisona	Pocillo 18 Dexametasona	Pocillo 19 Leucovorina	Pocillo 20 Mesna
Pocillo 21 Omeprazol	Pocillo 22 Ondansetrón	Pocillo 23 Alopurinol	Pocillo 24 Filgrastima	Pocillo 25 V + DNR + P	Pocillo 26 V + P + M + ARA-C	Pocillo 27 V + DNR + L- ASA + CF + P	Pocillo 28 MTX + ARA-C + HC (intratecal)	Pocillo 29 DXM + V + MTX + ARA-C	Pocillo 30 DXM + V + MTX + CF + L-ASA + M
Pocillo 31 DXM + ARA- C + VM-26 + L-ASA	Pocillo 32 MTX + VM-26 + ARA-C + 6MP	Pocillo 33 V + DNR + CF + L-ASA + DXM	Pocillo 34 MTX + 6MP	Pocillo 35 MTX + 6MP + V + L-ASA + P	Pocillo 36 DXM + V + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 37 DXM + V + MTX + CF + L- ASA + M + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC + Mesna	Pocillo 38 DXM + ARA-C + VM-26 + L- ASA + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + FECC	Pocillo 39 MTX + VM-26 + ARA-C + 6MP + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 40 V + DNR + CF + L- ASA + DXM + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + FECC + Mesna
Pocillo 41 MTX + 6MP + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 42 MTX + 6MP + V + L-ASA + P + ARA- C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 43 V + DNR + P + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + FECC	Pocillo 44 V + P + M + ARA-C + MTX + HC + O + Allop + Om + FECC	Pocillo 45 V + DNR + L- ASA + CF + P + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC + Mesna	Pocillo 46 V + DNR + ARA-C + IMAT + P	Pocillo 47 MTX + VM-26 + ARA-C + IMAT	Pocillo 48 V + DNR + CF + L-ASA + DXM + IMAT	Pocillo 49 V + DNR + ARA-C + IMAT + P + MTX + HC + O + Allop + Om + FECC	Pocillo 50 MTX + VM- 26 + ARA- C + IMAT + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC

FIG. 15

Pocillo 51 V + DNR + CF + L-ASA + DXM + IMAT + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF + Mesna	Pocillo 52 CF + P	Pocillo 53 R + DXM + V + IFOS + MTX + VM-26 + ARA-C	Pocillo 54 V + R + DXM + CF + MTX + ADRIA	Pocillo 55 V + R + DXM + VIND + MTX + VP-16 + ARA-C	Pocillo 56 R + DXM + IFOS + MTX + ARA-C + VM-26	Pocillo 57 R + DXM + MTX + CF + ADRIA	Pocillo 58 CF + P + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF + Mesna	Pocillo 59 R + DXM + V + IFOS + MTX + VM-26 + HC + O + Foli + Allop + ADRIA + Om + FECC + Mesna	Pocillo 60 R + DXM + VM-26 + HC + O + Foli + Allop + Om + FECC + Mesna
Pocillo 61 R + DXM + VIND + MTX + VP-16 + ARA-C + HC + O + Foli + Allop + Om + FECC	Pocillo 62 R + DXM + MTX + IFOS + ARA-C + HC + O + Foli + Allop + Om + FECC + Mesna	Pocillo 63 R + DXM + V + MTX + CF + ADRIA + ARA-C + HC + O + Foli + Allop + Om + FECC + Mesna	Pocillo 64 V + M + MTX + DXM	Pocillo 65 V + MTX + ARA-C + DXM	Pocillo 66 V + MTX + L- ASA + DXM	Pocillo 67 M + MTX + ARA-C + DXM	Pocillo 68 M + MTX + L- ASA + DXM	Pocillo 69 6MP + ARA-C + MTX	Pocillo 70 6-MP + L- ASA + MTX
Pocillo 71 IMAT + V + DNR	Pocillo 72 IMAT + V + ARA-C	Pocillo 73 IMAT + L-ASA + V	Pocillo 74 IMAT + CF + V	Pocillo 75 R + CF + P	Pocillo 76 R + V + IFOS	Pocillo 77 R + V + MTX	Pocillo 78 R + V + MTX + ARA-C + VM- 26	Pocillo 79 R + VIND + VP-16	Pocillo 80 R + MTX + IFOS + VP-16 + ARA-C
Pocillo 81 V + M + MTX + DXM + ARA-C + O + Foli + Allop + Om + FECC	Pocillo 82 V + MTX + ARA-C + DXM + O + Allop + Om + Foli + FECC	Pocillo 83 V + MTX + L- ASA + DXM + ARA-C + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 84 M + MTX + ARA-C + DXM + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 85 M + MTX + L-ASA + DXM + ARA-C + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 86 6MP + ARA-C + MTX + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 87 6MP + L-ASA + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 88 IMAT + V + DNR + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 89 R + V + MTX + ARA-C + HC + Allop + Foli + FECC	Pocillo 90 R + V + MTX + ARA-C + VM-26 + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC

FIG. 15 Continuación

Pocillo 91 R + VIND + MTX VP-16 + MTX + ARA-C HC + O + Foli + Allop + Om + FECC Allop + Foli + Om + Mesna Om + FECC	Pocillo 92 R + MTX + IFOS + VP-16 + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC + Mesna	Pocillo 93 IMAT + V + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 94 IMAT + V + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + FECC	Pocillo 95 IMAT + CF + V + MTX + ARA-C + HC + O + Foli + Allop + Om + FECC + Mesna	Pocillo 96 R + CF + P + MTX + ARA-C + HC + O + Foli + Allop + Om + FECC + Mesna
---	--	--	--	--	--

FIG. 15 Continuación

1º Aplicar fármacos individualmente:			2º Combinar fármacos siguiendo diferentes <u>Pethema SMD/98</u>	
Pocillo 1 Eritropoyetina	Pocillo 2 Filgrastima	Pocillo 3 Talidomida	Pocillo 19 Fluda + ARA-C + Ida + FECG	Pocillo 20 Fluda + ARA-C
Pocillo 4 Ciclosporina	Pocillo 5 Timoglobulina	Pocillo 6 Trióxido arsénico	Pocillo 21 Fluda + Ida	Pocillo 22 Fluda + FECG
Pocillo 7 Azacitidina	Pocillo 8 Decitabina	Pocillo 9 Fludarabina	Pocillo 23 ARA-C + Ida	Pocillo 24 ARA-C + FECG
Pocillo 10 Etopósido	Pocillo 11 Citarabina	Pocillo 12 Idarrubicina	Pocillo 25 Ida + FECG	Pocillo 26 ARA-C + Ida + FECG
Pocillo 13 Carboplatino	Pocillo 14 Prednisona	Pocillo 15 Ondansetrón	Pocillo 27 Fluda + ARA-C + Ida + FECG + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 28 Fluda + ARA-C + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
Pocillo 16 Omeprazol	Pocillo 17 Alopurinol	Pocillo 18 Cotrimoxazol + Ácido fólico	Pocillo 29 Fluda + Ida + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 30 Fluda + FECG + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
Cetlam SMD < 65 años			Pocillo 31 ARA-C + Ida + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 32 ARA-C + FECG + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
Pocillo 37 Ida + ARA-C + VP-16	Pocillo 38 Ida + VP-16		Pocillo 33 Ida + FECG + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 34 ARA-C + Ida + FECG + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
Pocillo 39 ARA-C + VP-16	Pocillo 40 Ida + ARA-C + VP-16 + Ondan + Om + Alop		Pocillo 35 Carbop + FECG	Pocillo 36 Carbop + FECG + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
Pocillo 41 Ida + VP-16 + Ondan + Om + Alop	Pocillo 42 ARA-C + VP-16 + Ondan + Om + Alop		Fluda: fludarabina ARA-C: Citarabina Ida: Idarrubicina FECG: Filgrastima Carbop: Carboplatino	
VP - 16: Etopósido			<u>Pethema ATG-CsA 2002</u>	
3º Combinaciones de otros fármacos utilizados en				
Pocillo 52 Azacitidina + Ondans + Om + Alop	Pocillo 53 Decitabina + Ondans + Om + Alop		Pocillo 43 ATG + CsA + Pred	Pocillo 44 ATG + CsA
Pocillo 54 EPO + Filgrastima	Pocillo 55 Talidomida + Ondans + Om + Alop		Pocillo 46 CsA + Pred	Pocillo 47 ATG + Paracet + Polar
Pocillo 56 Trióxido arsénico + Ondan + Om + Alop			Pocillo 48 ATG + CsA + Pred + Ondan + Om + Alop	Pocillo 50 ATG + Pred + Ondan + Om + Alop
EPO: Eritropoyetina			Pocillo 51 CsA + Pred + Ondan + Om + Alop	
			ATG: Globulina de conejo antimimocítica de timoglobulina CsA: Ciclosporina Pred: Prednisona	

FIG. 16

Pocillo 1 Daunorrubina	Pocillo 2 Idarrubicina	Pocillo 3 ARA-C	Pocillo 4 Mitoxantrona	Pocillo 5 Etopósido	Pocillo 6 Fludarabina	Pocillo 7 Dauno + ARA-C	Pocillo 8 Ida + ARA-C	Pocillo 9 Fluda + ida + ARA-C + FECG	Pocillo 10 Fluda + ida
Pocillo 11 Fluda + ARA-C	Pocillo 12 Fluda + FECG	Pocillo 13 Fluda + Ida + FECG	Pocillo 14 Fluda + ARA-C + FECG	Pocillo 15 Ida + ARA-C + VP16	Pocillo 16 Ida + VP16	Pocillo 17 VP16 + ARA-C	Pocillo 18 Mitox + ARA-C	Pocillo 19 Dauno + Om + Ondans + Alop	Pocillo 20 Ida + Om + Ondans + Alop
Pocillo 21 ARA-C + Om + Ondans	Pocillo 22 Mitox + Om + Ondans + Alop	Pocillo 23 VP16 + Om + Ondans + Alop	Pocillo 24 Fluda + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 25 Dauno + ARA-C + Om + Ondans + Alop	Pocillo 26 Ida + ARA-C + Om + Ondans + Alop	Pocillo 27 Fluda + Ida + ARA-C + FECG + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 28 Fluda + Ida + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 29 Fluda + ARA-C + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 30 Fluda + FECG + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF
Pocillo 31 Fluda + Ida + FECG + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 32 Fluda + ARA-C + FECG + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 33 Ida + ARA-C + VP16 + Om + Ondans + Alop	Pocillo 34 Ida + VP16 + Om + Ondans + Alop	Pocillo 35 VP16 + ARA-C + Om + Ondans + Alop	Pocillo 36 Mitox + ARA-C + Om + Ondans + Alop	Pocillo 37 Amascrina	Pocillo 38 Carboplatino	Pocillo 39 AMSA + ARA-C	Pocillo 40 ARA-C + Ida + GCSF
Pocillo 41 Ida + FECG	Pocillo 42 Carbop + FECG	Pocillo 43 AMSA + Om + Ondans + Alop	Pocillo 44 Carbop + Om + Ondans + Alop	Pocillo 45 AMSA + ARA-C + Om + Ondans + Alop	Pocillo 46 ARA-C + Ida + GCSF + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 47 Ida + Om + Ondans + Alop	Pocillo 48 Carbop + FECG + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	Pocillo 49 Dauno lipo	Pocillo 50 Dauno lipo + ARA-C
Pocillo 51 Mitox + ARA-C + VP16	Pocillo 52 Mitox + VP16	Pocillo 53 Dauno lipo + Mitox	Pocillo 54 Dauno lipo + VP16	Pocillo 55 Dauno lipo + Om + Ondans + Alop	Pocillo 56 Dauno lipo + ARA-C + Om + Ondans + Alop	Pocillo 57 Mitox + ARA-C + VP16 + Om + Ondans + Alop	Pocillo 58 Mitox + VP16 + Om + Ondans + Alop	Pocillo 59 Dauno lipo + Mitox + Om + Ondans + Alop	Pocillo 60 Dauno lipo + VP16 + Om + Ondans + Alop
Pocillo 61 Dauno + Fluda	Pocillo 62 Dauno + Carbop	Pocillo 63 Dauno lipo + Fluda	Pocillo 64 Dauno lipo + Carbop	Pocillo 65 Fluda + Carbop	Pocillo 66 Dauno + Mitox	Pocillo 67 Dauno + VP16	Pocillo 68 Dauno + AMSA	Pocillo 69 Ida + Mitox	Pocillo 70 Ida + AMSA

FIG. 17

Pocillo 71 Ida + Carbop	Pocillo 72 Fluda + Mitox	Pocillo 73 Fluda + VP-16	Pocillo 74 Mitox + AMSA	Pocillo 75 Mitox + Carbop	Pocillo 76 VP-16 + AMSA	Pocillo 77 VP-16 + Carbop	Pocillo 78 AMSA + Fluda	Pocillo 79 6-Mercaptopurina	Pocillo 80 Hidroxiurea
Pocillo 81 Ondansetrón	Pocillo 82 Alopurinol	Pocillo 83 Omeprazol	Pocillo 84 GCSF	Pocillo 85 Cotrimoxazole	Pocillo 86 Om + Ondans + Alop	Pocillo 87 Om + Ondans + Alop + Ctori + AcF	Pocillo 88 GO	Pocillo 89 GO + ARA-C	Pocillo 90 GO +Ida+ ARA-C
Pocillo 91 GO	Pocillo 92 GO+Om+ Ondans+Alop	Pocillo 93 GO+ARA-C+ Om + Ondans + Alop	Pocillo 94 GO + Ida+ ARA-C + Om + Ondans + Alop	Pocillo 95 GO + Ida+ Om + Ondans + Alop					

FIG. 17 Continuación

Pocillo 1 Tretoina	Pocillo 2 Idarrubicina	Pocillo 3 Mitoxantrona	Pocillo 4 Citarabina	Pocillo 5 6- Mercaptopurina	Pocillo 6 Metotrexato	Pocillo 7 Ondansetrón	Pocillo 8 Allopurinol	Pocillo 9 Omeprazol	Pocillo 10 Dexametasona
Pocillo 11 ATRA+ Ida	Pocillo 12 ATRA + Ida+ Ondans + Alop + Om	Pocillo 13 ATRA + Ida + Ondans + Alop + Om 9+ Dexa	Pocillo 14 ATRA + Mitox	Pocillo 15 ATRA + Ida + ARA-C	Pocillo 16 ATRA + ARA-C	Pocillo 17 Ida + ARA-C	Pocillo 18 Ida + Mitox	Pocillo 19 ATRA + Mitox + Ondans + Alop + Om	Pocillo 20 ATRA +A Ida + ARA-C + Ondans + Alop + Om
Pocillo 21 ATRA +ARA-C + Ondans + Alop + Om	Pocillo 22 Ida + ARA-C + Ondans + Alop + Om	Pocillo 23 Ida + Mitox + Ondans + Alop + Om	Pocillo 24 6-MP + MTX + ATRA	Pocillo 25 6-MP + MTX	Pocillo 26 ATRA+ 6-MP	Pocillo 27 ATRA + MTX	Pocillo 28 6-MP + MTX + ATRA + Om	Pocillo 29 6-MP + MTX + Om	Pocillo 30 ATRA + 6 - MP + Om
Pocillo 31 ATRA+ MTX + Om	Pocillo 32 ARA-C + Mitox + ATRA	Pocillo 33 ARA-C + Mitox	Pocillo 34 ARA-C+ Mitox + ATRA + Ondans + Alop + Om	Pocillo 35 ARA-C + Mitox + Ondans + Alop + Om	Pocillo 36 + ATRA + Dauno	Pocillo 37 ATRA + VP-16	Pocillo 38 ATRA + Fluda	Pocillo 39 ATRA + Carbop	Pocillo 40 Dauno lipo
Pocillo 41 ATRA + Dauno + Ondans + Alop + Om	Pocillo 42 ATRA+ VP-16 + Ondans + Alop + Om	Pocillo 43 ATRA+ Fluda + Ondans + Alop + Om + Cotri + FAC	Pocillo 44 ATRA + Carbop + Ondans + Alop + Om	Pocillo 45 ATRA + Dauno lipo + Ondans + Alop+ Om					

FIG. 18

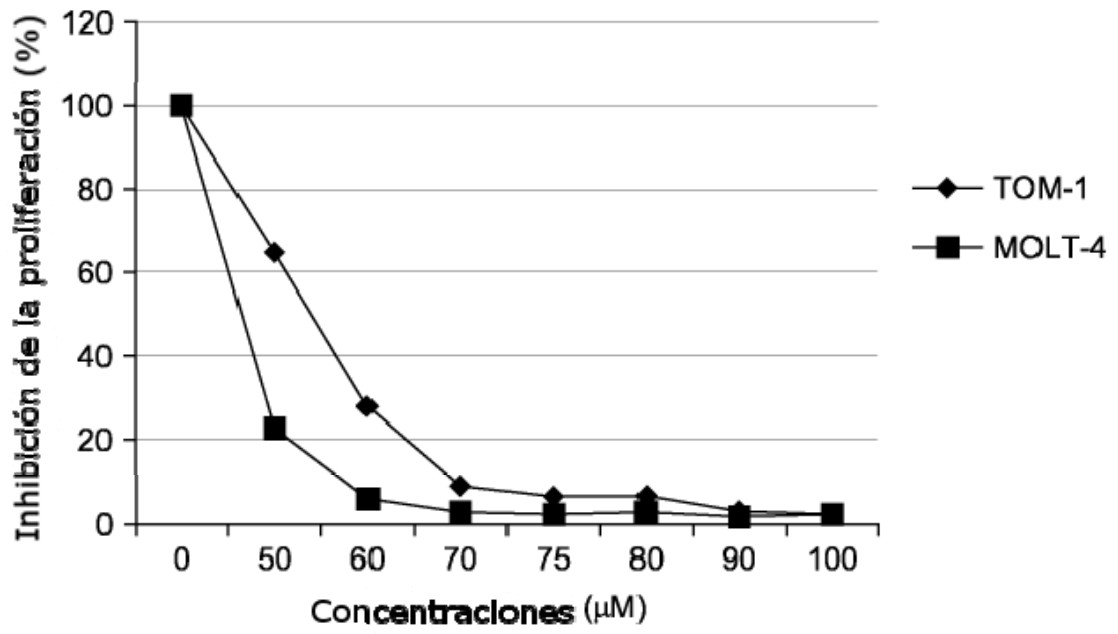


FIG. 19

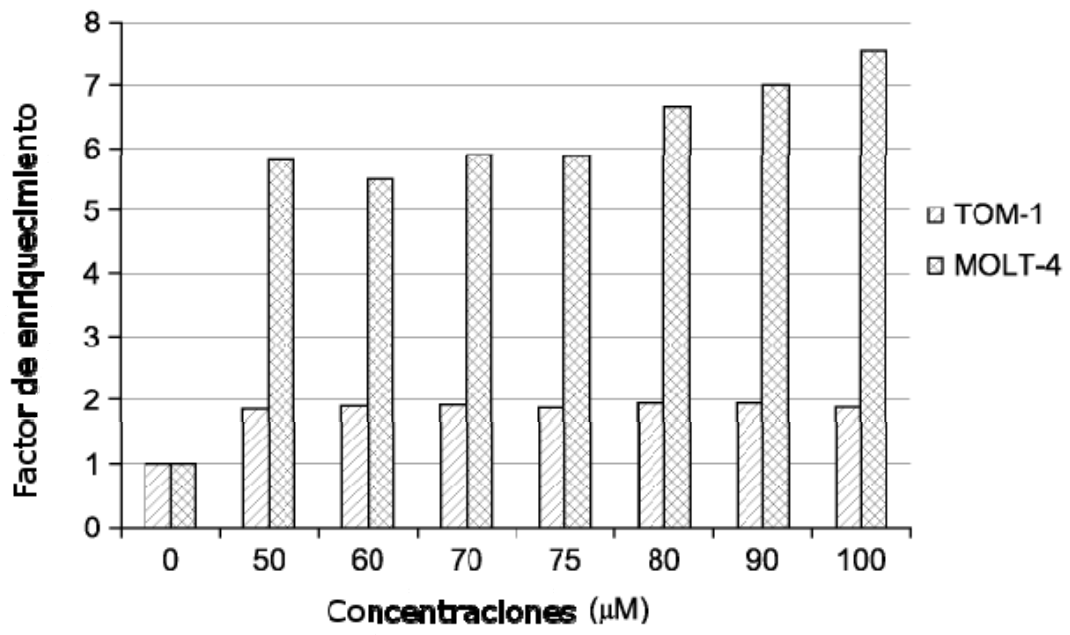


FIG. 20

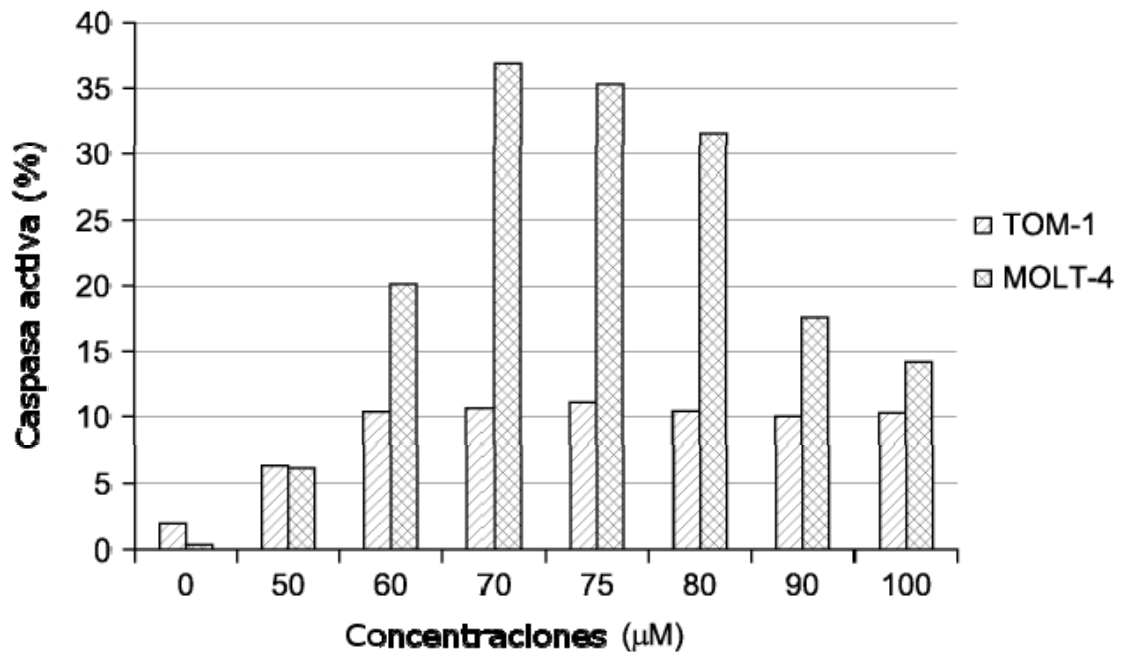


FIG. 21

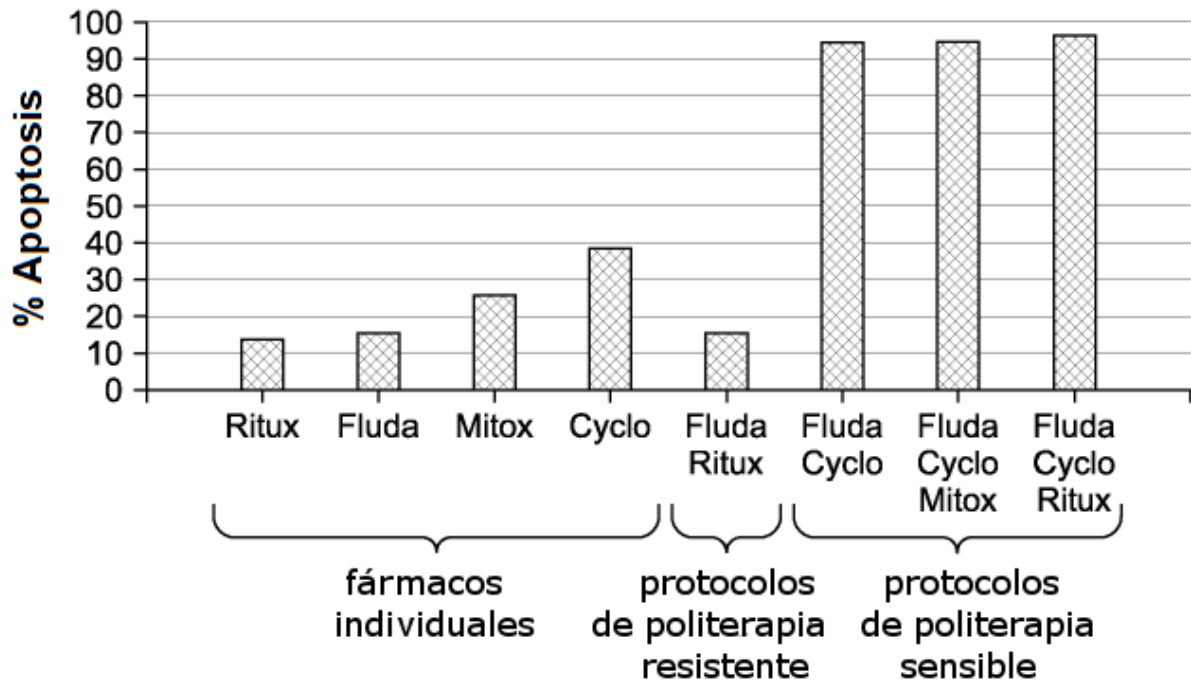


FIG. 22

(μ M)	Fludarabina	Ciclofosfamida
1	1	30
2	0,33	10
3	0,11	3,33
4	0,037	1,11
5	0,012	0,37

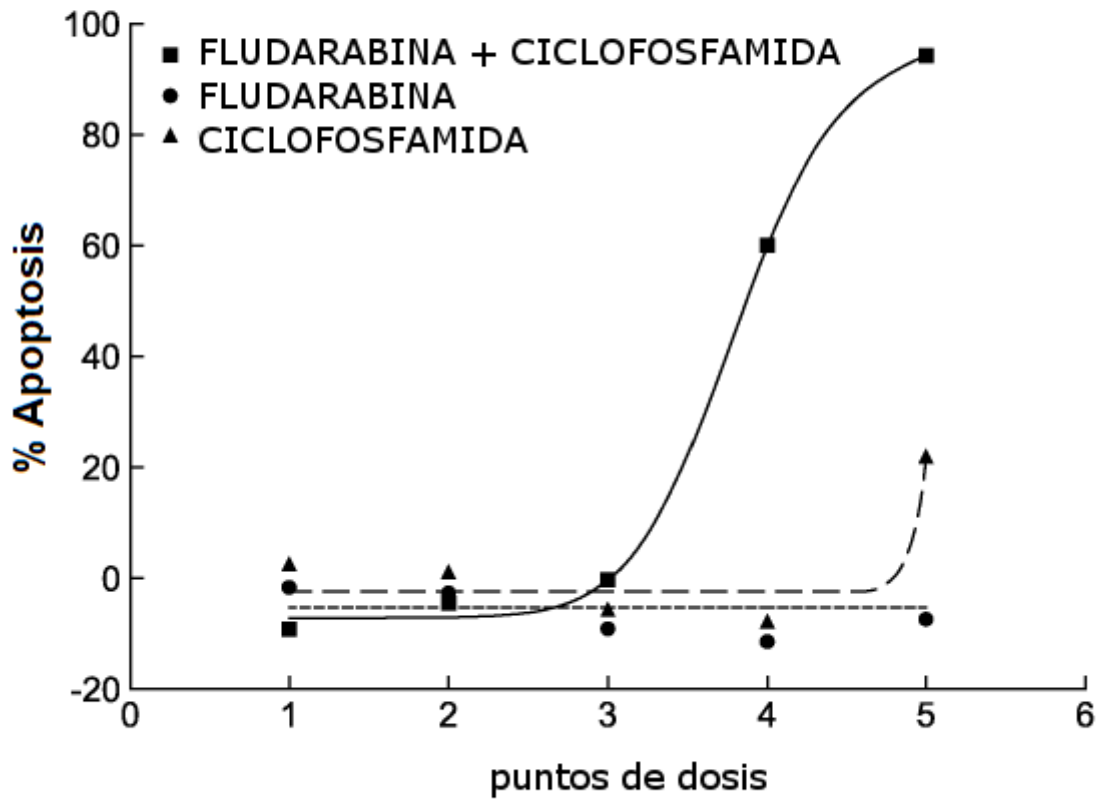


FIG. 23

(μM)	Fludarabina	Ciclosfosfàmidà	Mitoxantrona
1	1	30	1
2	0,33	10	0,33
3	0,11	3,33	0,11
4	0,037	1,11	0,037

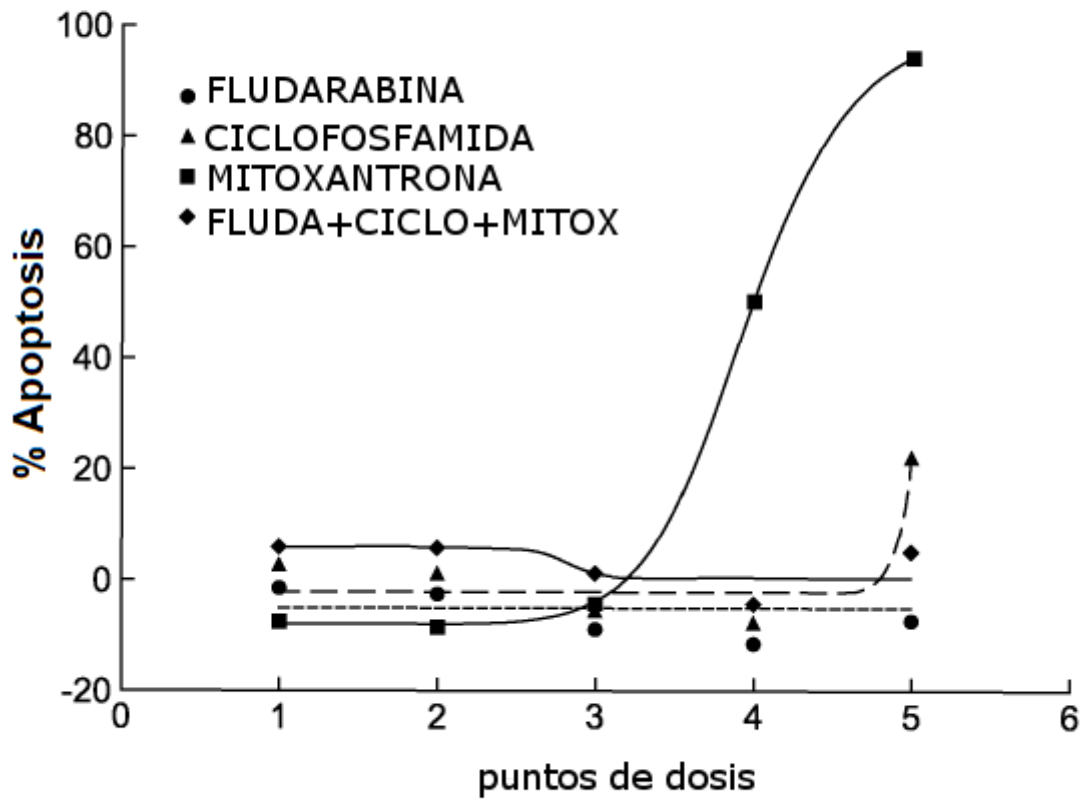


FIG. 24

(μ M)	Fludarabina	Ciclofosfamida	Rituximab
1	1	30	30
2	0,33	10	10
3	0,11	3,33	3,33
4	0,037	1,11	1,11
5	0,012	0,37	0,37

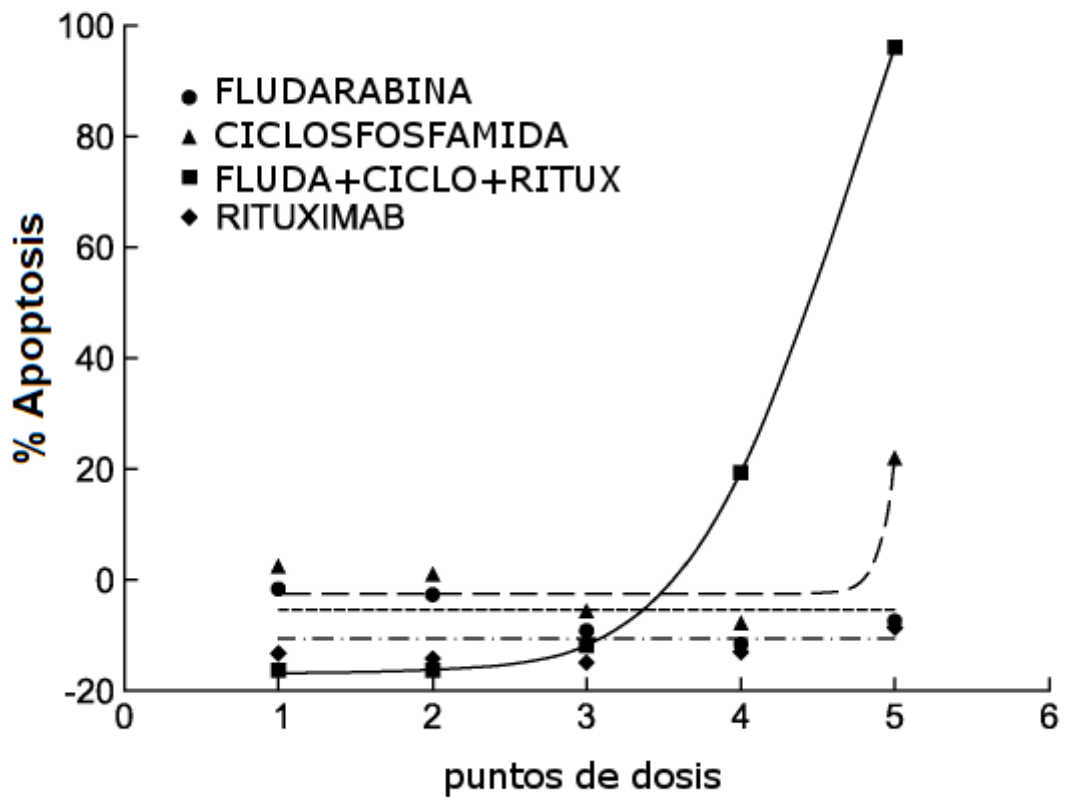


FIG. 25

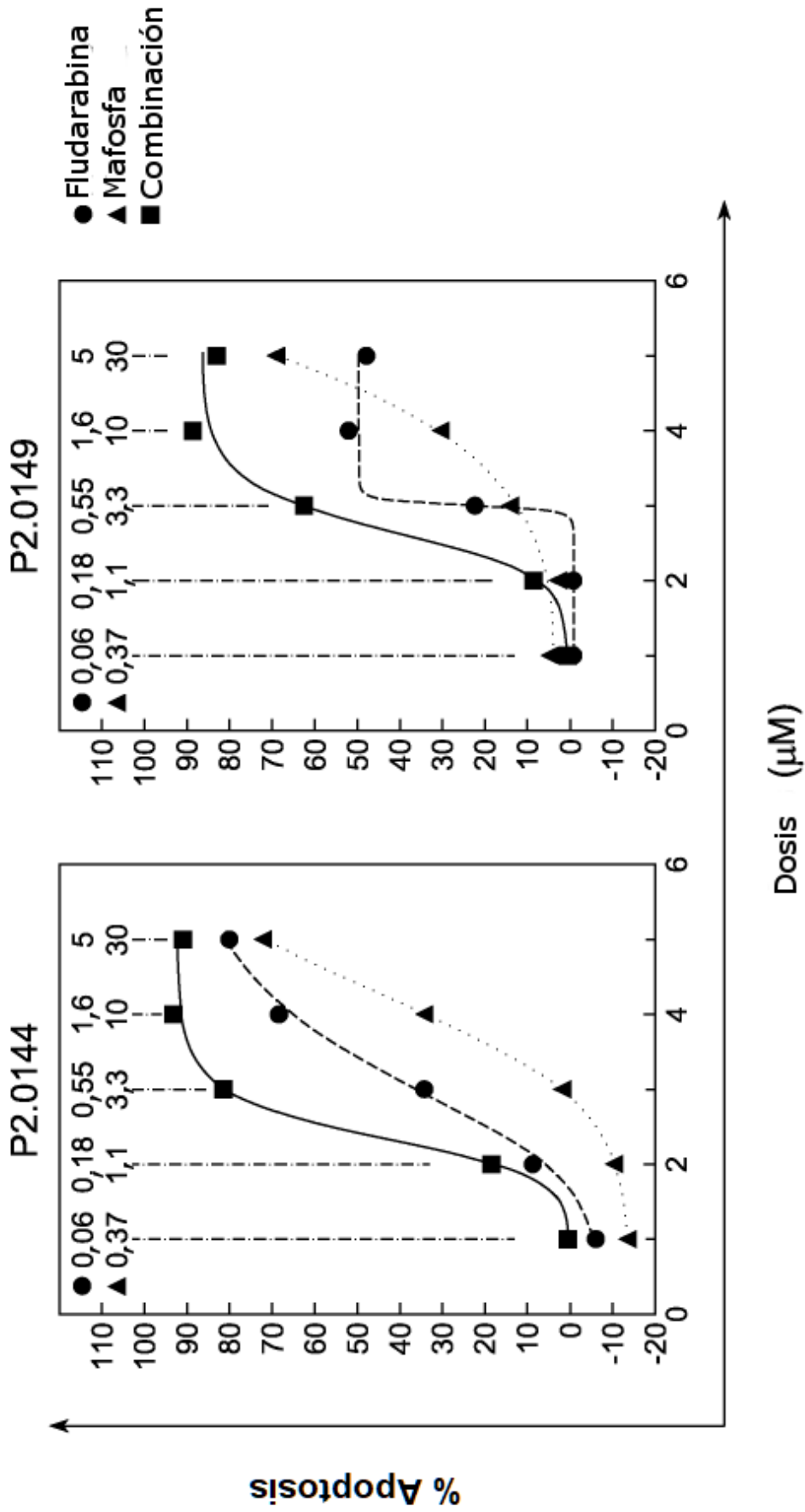


FIG. 26

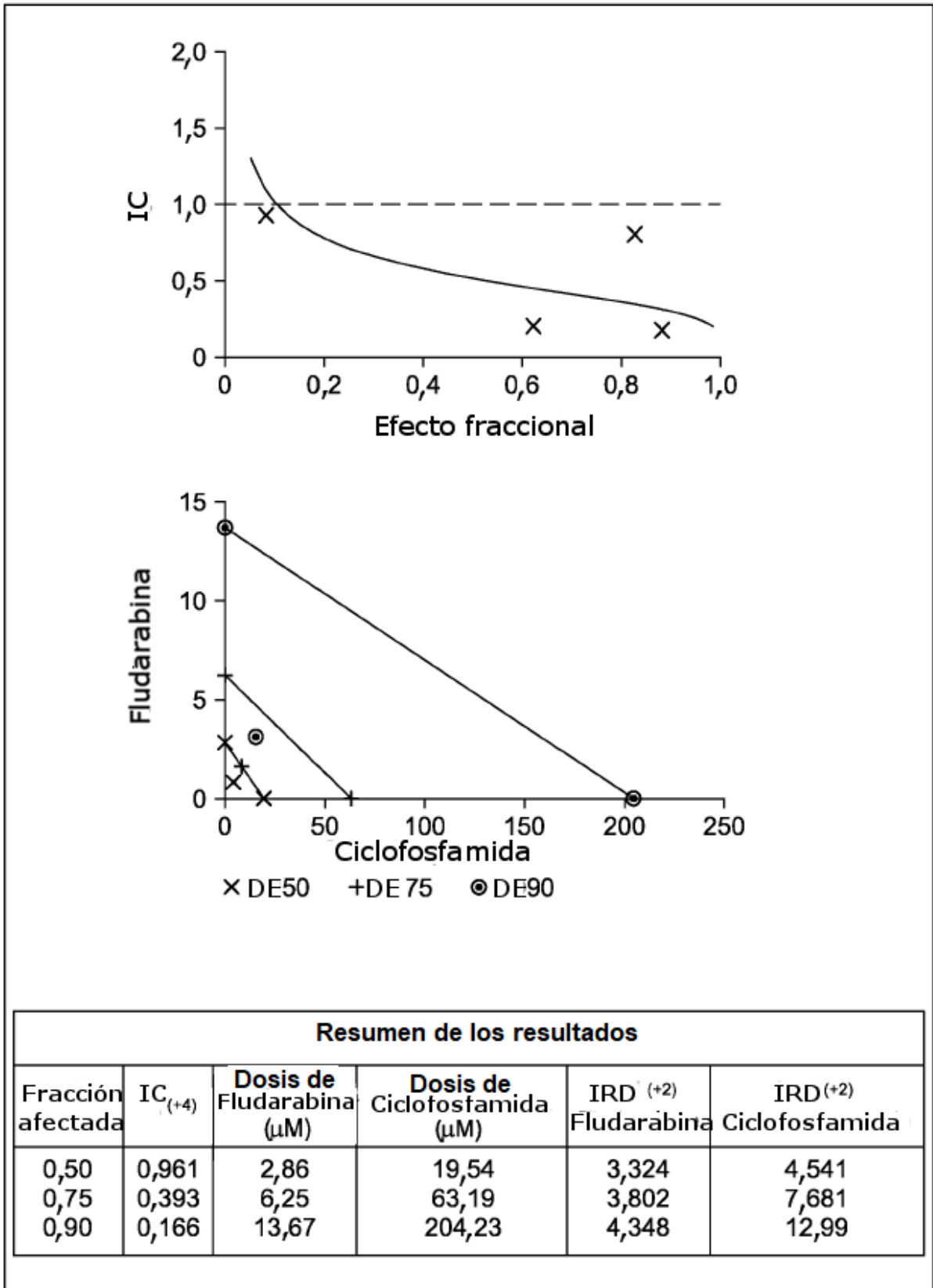


FIG. 27

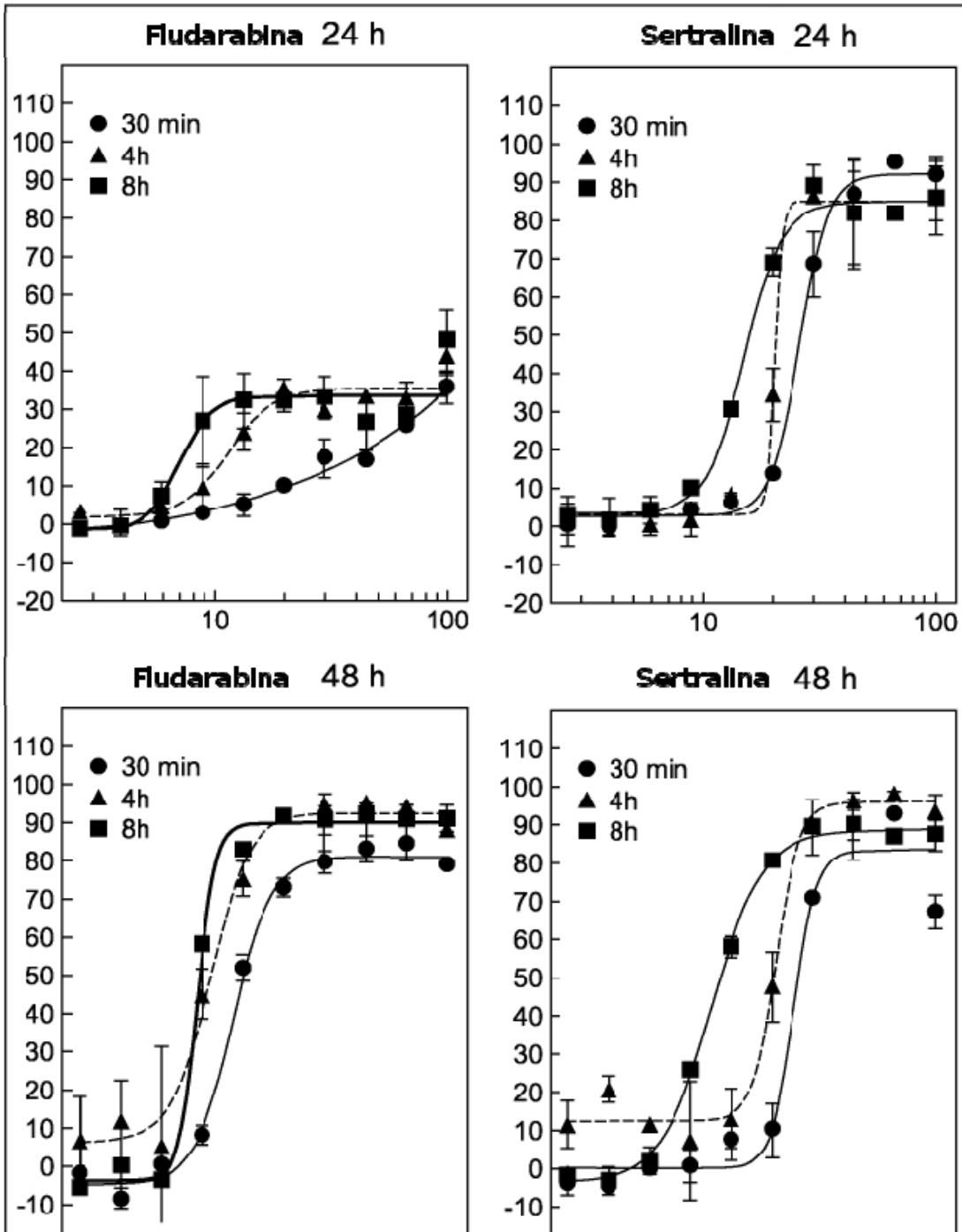


FIG. 28

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15
2		2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,9	2,10	2,11	2,12	2,13	2,14	2,15
3			3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	3,10	3,11	3,12	3,13	3,14	3,15
4				4,5	4,6	4,7	4,8	4,9	4,10	4,11	4,12	4,13	4,14	4,15
5					5,6	5,7	5,8	5,9	5,10	5,11	5,12	5,13	5,14	5,15
6						6,7	6,8	6,9	6,10	6,11	6,12	6,13	6,14	6,15
7							7,8	7,9	7,10	7,11	7,12	7,13	7,14	7,15
8								8,9	8,10	8,11	8,12	8,13	8,14	8,15
9									9,10	9,11	9,12	9,13	9,14	9,15
10										10,11	10,12	10,13	10,14	10,15
11											11,12	11,13	11,14	11,15
12												12,13	12,14	12,15
13													13,14	13,15
14														14,15

FIG. 29

	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
	2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,9	2,10	2,11	2,12	2,13	2,14	

	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	3,10	3,11	3,12	3,13	3,14	3,15	5,7	5,8	5,9	5,10	5,11	5,12	5,13	5,14	5,15
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
	4,5	4,6	4,7	4,8	4,9	4,10	4,11	4,12	4,13	4,14		6,7	6,8	6,9	6,10	6,11	6,12	6,13	6,14	

	7,9	7,10	7,11	7,12	7,13	7,14	7,15	9,11	9,12	9,13	9,14	9,15	11,13	11,14	11,15
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
	8,9	8,10	8,11	8,12	8,13	8,14		10,11	10,12	10,13	10,14		12,13	12,14	13,14

FIG. 30

4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	X	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	X	9	10	11	12	13	14	15	X
1.2.3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2,3,4	1,8,14								X	2,11,14	6,7,9		X	X	X	X	5,6,10		
1.2.4		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2,3,5	1,9,10							X	X	2,12,13	6,7,10			X	X	X	5,6,11		
1.2.5			X	X	X	X	X	X	X	X	X	2,3,6	1,9,11								X	2,12,14	6,7,11			X	X	X	5,6,12		
1.2.6				X	X	X	X	X	X	X	X	2,3,7	1,9,12							X	2,13,14	6,7,12					X	X	5,6,13		
1.2.7					X	X	X	X	X	X	X	2,3,8	1,9,13	X	X	X	X	X	X	X	X	3,4,5	6,7,13						X	5,6,14	
1.2.8						X	X	X	X	X	X	2,3,9	1,9,14	X	X	X	X	X	X	X	X	3,4,6	6,7,14	X	X	X	X	X	X	5,7,8	
1.2.9							X	X	X	X	X	2,3,10	1,10,11	X	X	X	X	X	X	X	X	3,4,7	6,8,9	X	X	X	X	X	X	5,7,9	
1.2.10								X	X	X	X	2,3,11	1,10,12		X	X	X	X	X	X	3,4,8	6,8,10		X	X	X	X	X	5,7,10		
1.2.11									X	X	X	2,3,12	1,10,13			X	X	X	X	X	3,4,9	6,8,11			X	X	X	X	5,7,11		
1.2.12										X	X	2,3,13	1,10,14				X	X	X	X	3,4,10	6,8,12				X	X	X	5,7,12		
1.2.13											X	2,3,14	1,11,12					X	X	X	3,4,11	6,8,13					X	X	5,7,13		
1.2.14			X	X	X	X	X	X	X	X	X	2,4,5	1,11,13						X	X	X	3,4,12	6,8,14					X	5,7,14		
1.3.4				X	X	X	X	X	X	X	X	2,4,6	1,11,14						X	X	3,4,13	6,9,10	X	X	X	X	X	X	5,8,9		
1.3.5					X	X	X	X	X	X	X	2,4,7	1,12,13							X	3,4,14	6,9,11		X	X	X	X	X	5,8,10		
1.3.6						X	X	X	X	X	X	2,4,8	1,12,14	X	X	X	X	X	X	X	3,5,6	6,9,12			X	X	X	X	5,8,11		
1.3.7							X	X	X	X	X	2,4,9	1,13,14		X	X	X	X	X	X	3,5,7	6,9,13				X	X	X	5,8,12		
1.3.8								X	X	X	X	2,4,10	4,5,6			X	X	X	X	X	3,5,8	6,9,14					X	X	5,8,13		
1.3.9									X	X	X	2,4,11	4,5,7			X	X	X	X	X	3,5,9	6,10,11						X	5,8,14		
1.3.10									X	X	X	2,4,12	4,5,8				X	X	X	X	3,5,10	6,10,12		X	X	X	X	X	5,9,10		
1.3.11										X	X	2,4,13	4,5,9				X	X	X	X	3,5,11	6,10,13			X	X	X	X	5,9,11		
1.3.12											X	2,4,14	4,5,10					X	X	X	3,5,12	6,10,14				X	X	X	5,9,12		
1.3.13			X	X	X	X	X	X	X	X	X	2,5,6	4,5,11						X	X	3,5,13	6,11,12					X	X	5,9,13		
1.3.14				X	X	X	X	X	X	X	X	2,5,7	4,5,12							X	3,5,14	6,11,13						X	5,9,14		
1.4.5					X	X	X	X	X	X	X	2,5,8	4,5,13	X	X	X	X	X	X	X	3,6,7	6,11,14		X	X	X	X	X	5,10,11		
1.4.6						X	X	X	X	X	X	2,5,9	4,5,14		X	X	X	X	X	X	3,6,8	6,12,13			X	X	X	X	5,10,12		
1.4.7							X	X	X	X	X	2,5,10	4,6,7			X	X	X	X	X	3,6,9	6,12,14					X	X	5,10,13		
1.4.8								X	X	X	X	2,5,11	4,6,8				X	X	X	X	3,6,10	6,13,14						X	5,10,14		
1.4.9									X	X	X	2,5,12	4,6,9				X	X	X	X	3,6,11	7,8,9			X	X	X	X	5,11,12		
1.4.10										X	X	2,5,13	4,6,10					X	X	X	3,6,12	7,8,10				X	X	X	5,11,13		
1.4.11											X	2,5,14	4,6,11						X	X	3,6,13	7,8,11						X	5,11,14		
1.4.12			X	X	X	X	X	X	X	X	X	2,6,7	4,6,12							X	3,6,14	7,8,12					X	X	5,12,13		
1.4.13				X	X	X	X	X	X	X	X	2,6,8	4,6,13		X	X	X	X	X	X	3,7,8	7,8,13						X	5,12,14		
1.4.14					X	X	X	X	X	X	X	2,6,9	4,6,14			X	X	X	X	X	3,7,9	7,8,14							X	5,13,14	
1.5.6						X	X	X	X	X	X	2,6,10	4,7,8			X	X	X	X	X	3,7,10	7,9,10	X	X	X	X	X	X	8,9,10		
1.5.7							X	X	X	X	X	2,6,11	4,7,9				X	X	X	X	3,7,11	7,9,11		X	X	X	X	X	8,9,11		
1.5.8								X	X	X	X	2,6,12	4,7,10					X	X	X	3,7,12	7,9,12			X	X	X	X	8,9,12		
1.5.9									X	X	X	2,6,13	4,7,11						X	X	3,7,13	7,9,13				X	X	X	8,9,13		
1.5.10											X	2,6,14	4,7,12							X	3,7,14	7,9,14						X	8,9,14		
1.5.11				X	X	X	X	X	X	X	X	2,7,8	4,7,13		X	X	X	X	X	X	3,8,9	7,10,11		X	X	X	X	X	8,10,11		
1.5.12					X	X	X	X	X	X	X	2,7,9	4,7,14			X	X	X	X	X	3,8,10	7,10,12			X	X	X	X	8,10,12		
1.5.13						X	X	X	X	X	X	2,7,10	4,8,9				X	X	X	X	3,8,11	7,10,13				X	X	X	8,10,13		
1.5.14							X	X	X	X	X	2,7,11	4,8,10					X	X	X	3,8,12	7,10,14						X	8,10,14		
1.6.7								X	X	X	X	2,7,12	4,8,11						X	X	3,8,13	7,11,12			X	X	X	X	8,11,12		
1.6.8									X	X	X	2,7,13	4,8,12							X	3,8,14	7,11,13					X	X	8,11,13		
1.6.9										X	X	2,7,14	4,8,13			X	X	X	X	X	3,9,10	7,11,14					X	X	8,11,14		
1.6.10				X	X	X	X	X	X	X	X	2,8,9	4,8,14				X	X	X	X	3,9,11	7,12,13				X	X	X	8,12,13		
1.6.11					X	X	X	X	X	X	X	2,8,10	4,9,10					X	X	X	3,9,12	7,12,14				X	X	X	8,12,14		
1.6.12						X	X	X	X	X	X	2,8,11	4,9,11						X	X	3,9,13	7,13,14					X	X	8,13,14		
1.6.13							X	X	X	X	X	2,8,12	4,9,12							X	3,9,14	9,10,11			X	X	X	X	10,11,12		
1.6.14								X	X	X	X	2,8,13	4,9,13		X	X	X	X	X	3,10,11	9,10,12				X	X	X	X	10,11,13		
1.7.8										X	X	2,8,14	4,9,14						X	X	3,10,12	9,10,13						X	10,11,14		
1.7.9					X	X	X	X	X	X	X	2,9,10	4,10,11							X	X	3,10,13	9,10,14			X	X	X	X	10,12,13	
1.7.10						X	X	X	X	X	X	2,9,11	4,10,12							X	3,10,14	9,11,12						X	10,12,14		
1.7.11							X	X	X	X	X	2,9,12	4,10,13					X	X	X	3,11,12	9,11,13						X	10,13,14		
1.7.12								X	X	X	X	2,9,13	4,10,14						X	X	3,11,13	9,11,14				X	X	X	11,12,13		
1.7.13										X	X	2,9,14	4,11,12							X	3,11,14	9,12,13						X	11,12,14		
1.7.14							X	X	X	X	X	2,10,11	4,11,13						X	X	3,12,13	9,12,14						X	11,13,14		
1.8.9								X	X	X	X	2,10,12	4,11,14							X	3,12,14	9,13,14						X	12,13,14		
1.8.10									X	X	X	2,10,13	4,12,13							X	3,13,14										
1.8.11										X	X	2,10,14	4,12,14	X	X	X	X	X	X	X	5,6,7										
1.8.12									X	X	X	2,11,12	4,13,14			X	X	X	X	X	5,6,8										
1.8.13										X	X	2,11,13	6,7,8				X	X	X	X	5,6,9										

FIG. 31

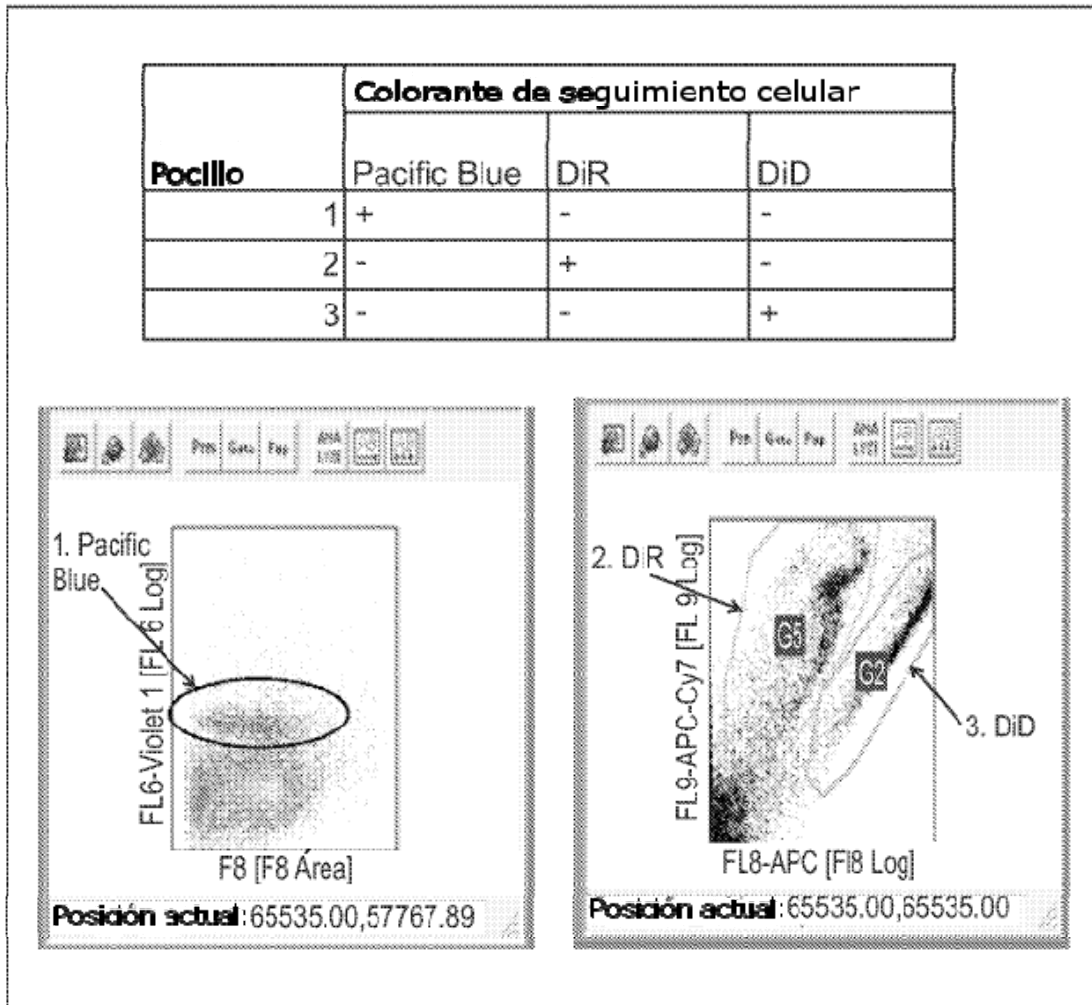


FIG. 32

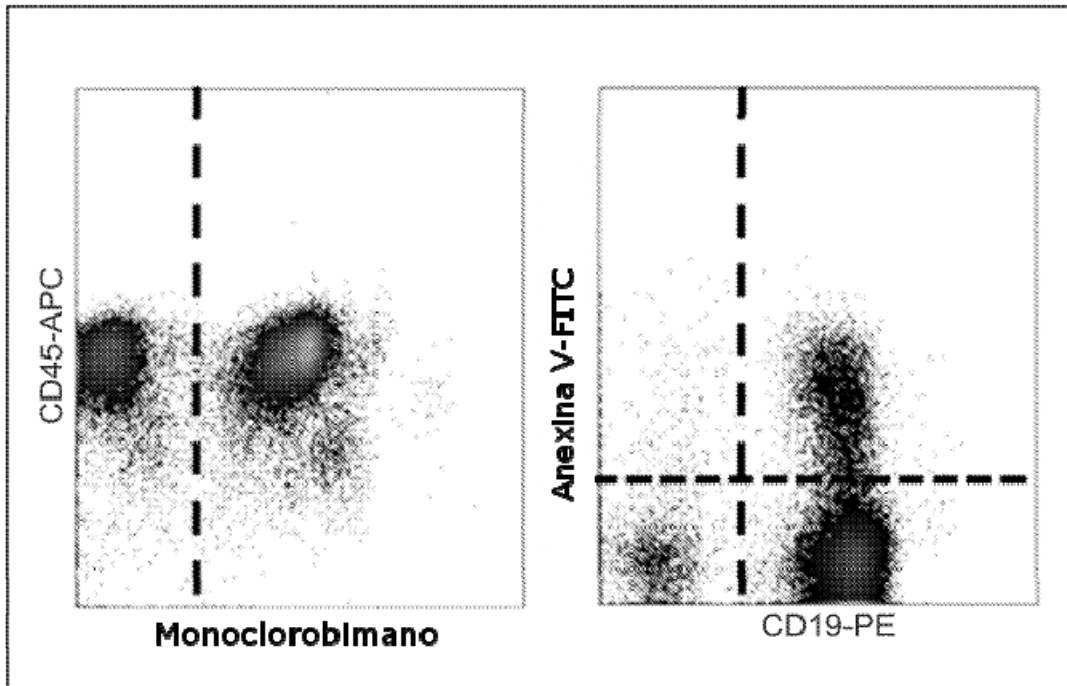


FIG. 33

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2007015926 A [0012]
- US 7459126 B [0037]

Literatura no patente citada en la descripción

- HAMBURGER et al. *Science*, 1977, vol. 197, 461-463 [0003]
- MARIE et al. *Br J Haematol*, 1983, vol. 55, 427-437 [0003]
- SELBY et al. *New Engl J Med*, 1983, vol. 308, 129-134 [0003]
- PIETERS et al. *Blood*, 1990, vol. 76, 2327-2336 [0004]
- SARGENT et al. *Br J Cancer*, 1989, vol. 60, 206-210 [0004]
- CARMICHAEL et al. *Cancer Res*, 1987, vol. 47, 936-942 [0004]
- RHEDIN et al. *Leuk Res*, 1993, vol. 17, 271-276 [0004]
- LARSSON et al. *Int J Cancer*, 1992, vol. 50, 177-185 [0004] [0136]
- BOSANQUET et al. *Br J Haematol*, 2009, vol. 146, 384-395 [0004]
- BOSANQUET et al. *Leuk Res*, 1996, vol. 20, 143-153 [0004]
- WEISENTHAL et al. *Cancer Res*, 1983, vol. 43, 749-757 [0004]
- ARAGANE et al. *J Cell Biol*, 1998, vol. 140, 171-182 [0006]
- HANNUN et al. *Blood*, 1997, vol. 89, 1845-1853 [0006]
- DEL BINO et al. *Cell Prolif*, 1999, vol. 32, 25-37 [0006]
- TABRIZI et al. *Leukemia*, 2002, vol. 16, 1154-1159 [0006]
- LIU et al. *Leukemia*, 2002, vol. 16, 223-232 [0006]
- TABRIZI et al. *Leukemia*, 2002, vol. 16 (6), 1154-9 [0006] [0007]
- KIM et al. *Exp Mol Med*, 2000, vol. 32, 197-203 [0006]
- KONSTANTINOV et al. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, vol. 128, 271-278 [0006]
- OFIR et al. *Cell Death Differ*, 2002, vol. 9, 636-642 [0006]
- KONSTANTINOV et al. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, vol. 128 (5), 271-8 [0006]
- OFIR et al. *Cell Death Differ*, 2002, vol. 9 (6), 636-42 [0006]
- BYRD et al. *Blood*, 2002, vol. 99, 1038-1043 [0006]
- HASENJÄGER et al. *Oncogene*, 2004, vol. 23, 4523-4535 [0006]
- PROKOP et al. *Oncogene*, 2003, vol. 22, 9107-9120 [0006]
- NIMMANAPALLI et al. *Cancer Res*, 2002, vol. 62, 5761-5769 [0007]
- BOSANQUET et al. *Leuk. Res.*, 1996, vol. 20, 143-53 [0008]
- BOSANQUET et al. *J Exp Ther Oncol*, 2004, vol. 4, 145-54 [0008]
- KASPERS GJ. *Methods Mol Med.*, 2005, vol. 110, 49-57 [0009]
- CATOVSKY et al. *Lancet*, 2007, vol. 370, 230-39 [0010]
- BOSANQUET et al. *ASH Annual Meeting Abstracts Blood*, 2006, vol. 108, 94a [0010]
- CHOU et al. *Adv Enzyme Regul*, 1984, vol. 22, 27-55 [0016] [0020] [0058] [0126]
- BOIK et al. *BMC Pharmacol*, 2008, vol. 8, 13 [0016]
- BOIK. *Stat Med*, 2008, vol. 27 (7), 1040-61 [0016]
- PEARSON et al. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2008, vol. 324, 25-51 [0017]
- ITO et al. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2008, vol. 324, 53-76 [0017]
- CHOU et al. *Eur J Biochem*, 1981, vol. 115 (1), 207-16 [0020] [0126]
- WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agent for Research of Cancer. 2008 [0027]
- EuroFlow Consortium. *Cytometry A*, September 2008, vol. 73 (9), 834-46 [0044]
- VAN DONGEN et al. *EHA Congress*, 04 June 2009 [0044]
- DONGEN et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *14th EHA Congress*, 04 June 2009 [0072]
- LEONE et al. *Cancer Invest*, 1991, vol. 9, 491-503 [0136]
- BOSANQUET et al. *Lancet*, 1991, vol. 337, 711-716 [0136]
- HONGO et al. *Cancer*, 1990, vol. 65, 1263-1272 [0136]

10

- Drug resistance in leukemia and lymphoma. Harwood Academic Publishers, 1993, 319 [0136]
- Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Harwood Academic Publishers, 1993, 321-328 [0136]
- LATHAN et al. *Haematol Blood Transfus*, 1990, vol. 33, 295-298 [0136]
- WEISENTHAL LM et al. *Cancer Treat Rep*, 1986, vol. 70, 1283-1295 [0136]
- WEISENTHAL LM et al. *Cancer Res*, 1983, vol. 43, 749-757 [0136]
- KIRKPATRICK DL et al. *Leuk Res*, 1990, vol. 14, 459-466 [0136]
- Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Harwood Academic Publishers, 1993, 279-291 [0136]
- STAIB P et al. *Adv Exper Med Biol*, 1999, vol. 457, 437-444 [0136]
- Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Harwood Academic Publishers, 1993, 365-368 [0136]
- SARGENT JM et al. *Br J Cancer*, 1989, vol. 60, 206-210 [0136]
- STUTE N et al. *Adv Exper Med Biol*, 1999, vol. 457, 445-452 [0136]
- Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Harwood Academic Publishers, 1993, 399-407 [0136]
- BEKSAC M et al. *Med Oncol Tumor Pharmacother*, 1988, vol. 5, 253-257 [0136]
- SANTINI V et al. *Hematol Oncol*, 1989, vol. 7, 287-93 [0136]
- TIDEFELT U et al. *Eur J Haematol*, 1989, vol. 43, 374-384 [0136]
- BOSANQUET et al. *Br J Haematol*, 1999, vol. 106, 474-476 [0136]
- SILBER et al. *Blood*, 1994, vol. 84, 3440-3446 [0136]
- Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Harwood Academic Publishers, 1993, 373-383 [0136]
- SEVIN et al. *Gynec Oncol*, 1988, vol. 31, 191-204 [0136]