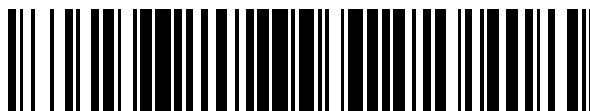


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 975**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2012 PCT/IB2012/055334**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2012 E 12838648 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2764099**

54 Título: **Composición de ECM, plataforma de microentorno tumoral y métodos de las mismas**

30 Prioridad:

04.10.2011 IN CH33102011

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

26.03.2018

73 Titular/es:

**MITRA RXDX INDIA PRIVATE LIMITED (100.0%)
V-18, Vaswani Ashtoonwoods, Kariyammana
Agrahara, Outer Ring Road
Bangalore, 560037, IN**

72 Inventor/es:

**SUNDARAM, MALLIKARJUN;
MAJUMDER, BISWANATH;
JAIN, MISTI;
THIAGARAJAN, SARAVANAN;
PINTO, DENCY y
RADHAKRISHNAN, PADHMA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 660 975 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de ECM, plataforma de microentorno tumoral y métodos de las mismas

5 Campo técnico

La presente solicitud se refiere al campo del cáncer y el desarrollo de agentes de pronóstico y terapéuticos para cáncer. De forma más específica, la invención proporciona una composición de Matriz Extra Celular [ECM], plataforma de microentorno tumoral para cultivar tejido tumoral métodos de las mismas.

10 La presente divulgación se refiere a un 'Indicador de respuesta clínica' y su aplicación en diversos cánceres para quimioterapia, fármacos dirigidos, fármacos biológicos y agentes de amplio espectro que tienen efecto antitumoral. La presente divulgación se refiere adicionalmente a un método para cultivo de tejido tumoral a largo plazo, en el que dicho cultivo proporciona ligandos humanos y microentorno de tejido tumoral para imitar sistemas de señalización fisiológicamente relevantes. La divulgación se refiere adicionalmente a un método a identificación sistemática de tejido tumoral para la presencia de marcadores específicos para determinar la viabilidad de dichas células la indicación de estado tumoral. La divulgación también se refiere a un método para predecir la respuesta de un sujeto tumoral y método de identificación sistemática o desarrollo de agente anticáncer.

20 Antecedentes y técnica anterior de la divulgación

Diversas herramientas de separación de pacientes conocidas en la técnica se clasifican ampliamente como sigue a continuación:

25 Biomarcadores:

Existen diversos biomarcadores que se basan en el análisis de tumor, tejido normal, suero, orina, saliva del paciente así como otras partes del cuerpo y/o material secretado/excretado. Por ejemplo: Her2 es una proteína así como un marcador basado en gen que separa los pacientes que sobreexpresan la proteína Her2 de los que la subexpresan. Se ha realizado investigación clínica detallada que a su vez muestra que los pacientes que tienen niveles más elevados de la proteína Her2 responden de forma significativamente mejor al anticuerpo monoclonal Herceptin. En este contexto, Her2 ha sido aprobado como un "Biomarcador" para predecir el resultado del tratamiento con Herceptin para el paciente en consideración. Existen otros biomarcadores tales como EGFR, C-MET cuya presencia o ausencia, o el perfil de expresión se usa para predecir la eficacia de los fármacos dirigidos en consideración.

35 Para el uso de un biomarcador, es necesario definir tanto el eje de un plano XY; es decir, es necesario definir la cantidad o calidad del biomarcador en un eje, como la respuesta clínica en el otro eje. Antes de usar el biomarcador, es necesario desarrollar una amplia cantidad de datos para la combinación fija de la calidad y/o cantidad del biomarcador así como el resultado clínico. Una vez que se ha desarrollado una base de datos, para un nuevo paciente para la misma enfermedad y el mismo fármaco, la medición de la calidad o cantidad del biomarcador se puede usar para calcular el resultado clínico si al paciente se le administra ese fármaco en particular. Por lo tanto un enfoque dirigido por biomarcador está muy limitado por muchos factores de entrada tales como el fármaco usado, la enfermedad en la que se usa, y el biomarcador que se usa.

45 Quimiomarcadores:

Existen ensayos que se usan para predecir la eficacia de agentes quimioterapéuticos tales como Cisplatino en diferentes cánceres. Estos ensayos miden la presencia o ausencia, por el alcance de la presencia de supuestos marcadores. Los quimiomarcadores sufren las mismas deficiencias de los biomarcadores.

50 Patología actual o anterior del paciente:

Los pacientes positivos para HPV que también tienen carcinoma de células escamosas de Cabeza y Cuello responden a la quimioterapia mejor que los pacientes con carcinoma de células escamosas de Cabeza y Cuello negativos para HPV. En este caso, el estado de HPV de los pacientes se usa como un calibre para predecir su respuesta a fármacos para carcinoma de células escamosas de Cabeza y Cuello en el caso en el que desarrollen carcinoma de células Escamosas de Cabeza y Cuello. En esta categoría de pronóstico existe una cantidad de información limitada disponible. Esta información está basada en gran medida en la correlación y no basada necesariamente en la causalidad.

60 Ensayo de quimiosensibilidad:

En esta categoría de ensayos, la muestra de tumor de pacientes se toma, homogeneizada en células tumorales, y este sistema se trata con diversos agentes quimioterapéuticos en un sistema *in vitro*. Como alternativa, la muestra de tumor del paciente se trata con diversos agentes quimioterapéuticos en un sistema *in vitro* sin homogeneización. Estos ensayos *in vitro* aparecen con diferentes nombres (por ejemplo, ensayo de monocapa o ensayo clonogénico

65

de Oncotest GMBH, ensayo de quimiosensibilidad de Chemofx, ensayo de Resistencia Extrema a Fármacos (EDR) de Oncotech).

5 La deficiencia fundamental de este modelo es que el microentorno tumoral del paciente no se captura en estos ensayos de quimiosensibilidad. Por ejemplo, en varias bibliografías se ha reivindicado que los sistemas basados en células o tejidos *in vitro* no son representativos de resultado clínico.

Sistema de xenoinjerto *in vitro* e *in vivo* basado en línea celular

10 En los últimos tiempos, se ha publicado una enorme cantidad de bibliografía sobre ensayo preclínico *in vitro* y *in vivo* de crecimiento tumoral basándose en la inhibición del crecimiento tumoral así como para predecir la eficacia clínica. todos los métodos de la técnica anterior presentan limitaciones inherentes de los mismos ya que no son capaces de imitar el microentorno local de las muestras de tumor y en consecuencia una mala correlación con respecto al resultado clínico que previene su uso como ensayos fiables para predecir resultados clínicos.

15 Solamente un 10 % de todos los fármacos para cáncer que entran en ensayos clínicos en fase I entran en el mercado de forma satisfactoria. Esta tasa de éxito baja es una de las principales razones por las que el coste de los fármacos de oncología es exorbitantemente elevado; la tasa de éxito baja se puede atribuir a la baja potencia de predicción de los ensayos *in vitro* e *in vivo* actuales en el campo de la oncología. Hasta recientemente, los estudios convencionales basados en monocapas de células en 2D han demostrado sus limitaciones significativas en la arquitectura tisular en red de tres dimensiones (3-D) de componentes de la matriz extracelular, interacciones de célula a célula y de célula a matriz que gobierna la diferenciación, proliferación y función de las células *in vivo*, de hecho, se pierde bajo la condición de monocapa en 2D simplificada. En ausencia de estructura específica así como pérdida de componentes del estroma y otras células asociadas con tumores, los ensayos funcionales para estudiar la señalización tumoral y las otras asociadas con el mantenimiento, inicio y progresión tumorales no se pueden estudiar de forma precisa. Sin embargo, los modelos de la técnica anterior presentan puntos débiles por qué no usan el microentorno tumoral intacto; esto conduce a pérdida de función y también a cambio en sistemas de señalización que resultan de la falta de ligandos obtenidos a partir de ser humano en el medio celular usado. Más recientemente, El éxito limitado de los inhibidores de molécula pequeña actuales en muchos cánceres humanos epiteliales de desarrollar mejores técnicas para predecir de forma más precisa la respuesta a la terapia, preferentemente adaptados al cáncer individual y su genética única y alteraciones epigenéticas. Las interacciones de tumor-estroma se han reconocido desde hace tiempo como aspectos importantes en la patogénesis y diseminación de la neoplasia. La evidencia significativa que apoya el papel de tejidos peri-tumorales en el mantenimiento del tumor incluye la presencia de mutaciones genéticas en el estroma de varios tipos de cánceres y el papel desempeñado por células del estroma en la adquisición de resistencia a terapia. Para que un tumor cultivado sea representativo de cáncer real, es esencial que el tumor, a medida que prolifera *in vitro*, mantenga su organización y estructura tisulares, sus propiedades oncogénicas, sus funciones diferenciadas, y cualquier heterogeneidad celular que pueda haber estado presente *in vivo*. Si los tumores humanos que crecen *in vitro* pueden satisfacer los criterios mencionados anteriormente y, además, se pueden cultivar la frecuencia elevada durante largos periodos de tiempo en cultivo, deberían demostrar que son valiosos para estudios básicos en biología del cáncer así como para ensayo clínicamente relevante.

45 Los estudios proporcionados en la presente divulgación abordan la cuestión importante de si los tumores humanos pueden satisfacer ciertamente los criterios mencionados anteriormente *in vitro*. Los estudios previos que usaran sistemas de cultivo celular primario convencionales y xenoinjertos subcutáneos u ortotópicos basados en línea celular han avanzado la comprensión del comportamiento tumoral; sin embargo con estos métodos presentan limitaciones inherentes en la evaluación del papel del microentorno tumoral en la modulación de la carcinogénesis y progresión tumoral a medida que los modelos basados en línea celular se han reconocido ampliamente como modelos homogéneos y esa es una de las razones fundamentales por las que no representan a de forma adecuada una enfermedad heterogénea tal como cáncer. Por el contrario, la presente divulgación se refiere al desarrollo de un enfoque de biología de sistemas para crear una herramienta de separación de pacientes *in vitro* que imita el microentorno tumoral humano en placa y por lo tanto da como resultado aplicaciones potenciales en diferentes campos de tratamiento de cáncer, tanto en pronóstico así como en biología de traducción. La presente divulgación también confirma la hipótesis con varios ejemplos tanto para pronóstico así como para aplicaciones de biología de traducción. Además, el uso de la herramienta de separación de pacientes de la presente divulgación también se puede aplicar en el desarrollo de aplicaciones de pronóstico, diagnóstico de complementario, y biología de traducción para trastornos autoinmunes y enfermedades inflamatorias.

60 El documento de la técnica anterior de bibliografía de no patente de CHRIS S. HUGHES *ET AL*, "Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture", PROTEOMICS, (20100516), vol. 10, n.º 9 e Información de Apoyo desde la que numerosos tipos de células requieren una superficie para de unión para crecer y proliferar. Ciertas células, en particular células primarias y células madre, necesitan el uso de matrices de crecimiento especializadas junto con condiciones de medios de cultivo específicas para mantener las células en un estado no diferenciado. Una mezcla de proteína gelatinosa obtenida a partir de células tumorales de ratón y comercializada como Matrigel se usa comúnmente como una matriz de la membrana basal para células madre porque mantiene las células madre en un estado no diferenciado. Sin embargo, el Matrigel no es una matriz bien definida, y por lo tanto

puede producir una fuente de variabilidad en resultados experimentales. En este estudio, los inventores presentan un análisis proteómico en profundidad de Matrigel usando un método de exclusión iterativa dinámico acoplado con protocolos de fraccionamiento que implican precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión por tamaño, y SDS-PAGE de una dimensión. La capacidad para identificar la masa baja y componentes de abundancia del Matrigel ilustra la utilidad de este método para el análisis de la matriz extracelular, así como la complejidad de la propia matriz.

El documento de la técnica anterior de bibliografía de no patente de SANDRA Z HASLAM *ET AL*, "Tumour-stroma interactions: Reciprocal regulation of extracellular matrix proteins and ovarian steroid activity in the mammary gland", BREAST CANCER RESEARCH, (20010802), vol. 3, n.º 6 es una revisión que se centra en las interacciones entre proteínas de la matriz extracelular (ECM) obtenidas a partir del estroma, integrinas y proliferación dependiente de hormonas del ovario y células mamarias neoplásicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios *in vitro* muestran que la fibronectina es necesaria para la proliferación inducida por progesterona de células del epitelio mamario normal y que las proteínas de la ECM específicas también regulan interacciones entre factores de crecimiento y hormonas del ovario. Los estudios con líneas de células de cáncer de mama humano han mostrado que la laminina inhibe la proliferación inducida por estrógenos y la transcripción mediada por elemento de respuesta a estrógenos *in vitro* y también inhibe la proliferación inducida por estrógenos *in vivo*. De forma recíproca, los esteroides del ovario regulan la expresión de proteínas de la ECM y sus receptores celulares, integrinas, durante el desarrollo de las glándulas mamarias *in vivo*. La integrina específica de fibronectina, $\alpha_5\beta_1$ está regulada por esteroides del ovario y su expresión está correlacionada de forma positiva con estadios de desarrollo de proliferación máxima. Estos estudios sugieren que la regulación coordinada de la capacidad de respuesta de las hormonas del ovario y la expresión de ECM/integrina puede ser fundamental para el desarrollo de las glándulas mamarias normales y el crecimiento y la progresión del cáncer de mama.

El documento de la técnica anterior de bibliografía de no patente de N. E. CAMPBELL *ET AL*, "Extracellular Matrix Proteins and Tumor Angiogenesis", JOURNAL OF ONCOLOGY, (20100101), vol. 72, n.º 6, doi:10.1016/S0945-053X(02)00010-0, ISSN 1687-8450, páginas 787 - 13 es una revisión que se centra en el papel que la matriz extracelular y las proteínas de la ECM desempeñan en la regulación de la angiogénesis tumoral. La mayor parte de la masa de un tumor sólido está formada por el estroma que está dedicado en gran medida a la matriz extracelular. Dentro de esta matriz se encuentran hospedadores de las proteínas matricelulares que regulan la expresión y función de una miríada de proteínas que regulan procesos tumorigénicos. Uno de los procesos que es fundamental para el crecimiento y la progresión tumorales es la angiogénesis, o la formación de nuevos vasos sanguíneos de vasculatura preexistente. Dentro de la matriz extracelular se encuentran proteínas estructurales, un hospedador de proteasas y factores residentes pro- y anti-angiogénicos que controlan la angiogénesis tumoral de una manera estrechamente regulada.

Breve descripción de las figuras adjuntas

Para que la divulgación se puede entender fácilmente y se pueda poner en efecto práctico. A continuación se hará referencia a las realizaciones a modo de ejemplo como se ilustra con referencia a las figuras adjuntas. La figura junto con una descripción detallada que sigue a continuación, se incorporan y forman parte de la memoria descriptiva, y sirven para ilustrar adicionalmente las realizaciones y explicar diversos principios y ventajas, de acuerdo con la presente divulgación en la que:

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático que representa el desarrollo y validación de la tecnología de "Indicador de Respuesta Clínica".

La Figura 2 muestra la importancia de factores paracrinos en el modelo de explante.

La Figura 3A muestra la importancia de la matriz Extracelular en el modelo de explante y 3B muestra la importancia del microentorno en el modelo de explante.

La Figura 4A-G muestra que los ligandos autólogos y la Matriz Extra Celular Matrix mantienen el microentorno y la red de señalización de tumores de paciente en cultivo. Aumento de la imagen: 20X.

La Figura 5A-C muestra la composición de la ECM y sus efectos en la viabilidad y en la proliferación.

La Figura 6 muestra la comparación de los efectos de TPM diferentes en la proliferación y activación de proteínas de señalización de cáncer.

La Figura 7A-C muestra que los pasajes iniciales de xenoinjertos de tumor humano mantienen las características moleculares de los tumores del paciente original.

La Figura 8A-C muestra que el tumor del paciente y el xenoinjerto obtenido a partir del mismo presentan resultados de respuesta idénticos a los de la terapia anticáncer cuando se somete al ensayo en un modelo de cultivo de explante tumoral.

La Figura 9A-H muestra que los efectos antitumorales de TPF y Cetuximab en cultivo de explante tumoral del paciente son similares a la respuesta de los xenoinjertos de tumor humano como se somete a ensayo mediante experimentos de eficacia *in vivo*.

La Figura 10 muestra la correlación de la plataforma de respuesta a fármaco guiada por "Indicador de Respuesta Clínica" con eficacia *in vivo*.

La Figura 11 muestra un diagrama esquemático que representa el desarrollo y la validación de tecnología de "Indicador de Respuesta Clínica".

La Figura 12 muestra la validación clínica del análisis de "indicador de respuesta clínica" en Cáncer de Cabeza y Cuello. La puntuación de M se calcula usando el "indicador de respuesta clínica" y el resultado predicho se correlaciona con el resultado clínico del paciente. Para 30 tumores de pacientes se obtiene una puntuación de M mayor que 60 y se predice que estos pacientes tienen una respuesta completa y aproximadamente un 90 % de estos pacientes ciertamente presentaban resultados clínicos de emparejamiento de análisis de "indicador de respuesta clínica". Del mismo modo, se predice que aproximadamente 29 pacientes con una puntuación de menor que 25 son pacientes que no responden y un 100 % de los pacientes no mostraban respuesta después del tratamiento.

La Figura 13A-S muestra los datos de eficacia obtenidos con el Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" para pacientes con cáncer tratados con fármacos o combinaciones de fármacos.

Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a una composición de Matriz Extra Celular [ECM] que comprende Los componentes colágeno 1, colágeno 3, colágeno 4, colágeno 6, Fibronectina, Vitronectina, Cadherina, Filamina A, Vimentina, Laminina, Decorina, Tenascina C, Osteopontina.

La presente divulgación también se refiere a una composición de este tipo, que comprende adicionalmente uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Proteínas de la membrana basal, Proteínas citoesqueléticas y Proteínas de matriz.

La presente divulgación también se refiere a un método para obtener una composición de Matriz Extra Celular [ECM] como se ha mencionado anteriormente, comprendiendo dicho método:

combinar los componentes de la ECM, colágeno 1, colágeno 3, colágeno 4, colágeno 6, Fibronectina, Vitronectina, Cadherina, Filamina A, Vimentina, Laminina, Decorina, Tenascina C, Osteopontina. La presente divulgación también se refiere un método de este tipo, en el que los componentes comprenden adicionalmente uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en proteína de la membrana Basal, proteína Citoesquelética y proteína de Matriz para obtener la composición de ECM.

La presente divulgación también se refiere a una plataforma de microentorno tumoral para cultivar tejido tumoral, comprendiendo dicha microentorno la composición de ECM como se ha mencionado anteriormente, medio de cultivo opcionalmente junto con suero, plasma o PBMC autólogas y fármaco.

La presente divulgación también se refiere a un método para obtener una plataforma de microentorno tumoral para cultivar tejido tumoral, comprendiendo dicho método una operación de revestimiento de plataforma con composición de ECM como se ha mencionado anteriormente y añadir medio de cultivo opcionalmente junto con suero, plasma o PBMC autólogas y fármaco, a la plataforma para obtener la plataforma de microentorno tumoral.

La presente divulgación también se refiere a un método de cultivo organotípico de tejido tumoral, comprendiendo dicho método la operación de cultivar el tejido tumoral en una plataforma de microentorno tumoral como se ha mencionado anteriormente para obtener el cultivo organotípico.

La presente divulgación también se refiere a un método para predecir la respuesta de un sujeto tumoral a fármaco(s), comprendiendo dicho método las operaciones de:

- a. cultivar el tejido tumoral del sujeto en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 3, para obtener tejido tumoral cultivado;
- b. tratar el tejido tumoral cultivado con el fármaco(s) y realizar el ensayo;
- c convertir la lectura del ensayo en métrica numérica para obtener un índice de sensibilidad y a partir de ese momento, predecir la respuesta del sujeto al fármaco(s); y
- d. opcionalmente, correlacionar el índice de sensibilidad con la respuesta clínica del sujeto al fármaco(s).

La presente divulgación también se refiere a un método para predecir la respuesta de un sujeto tumoral a fármaco(s), comprendiendo dicho método las operaciones de:

- a. cultivar el tejido tumoral del sujeto en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 3, para obtener tejido tumoral cultivado;
- b. tratar el tejido tumoral cultivado con el fármaco(s);
- c. evaluar la respuesta tumoral al fármaco con la pluralidad de ensayos para obtener puntuación de evaluación para cada uno de la pluralidad de ensayos;
- d. Asignar una puntuación de coeficiente de ponderación para cada uno de la pluralidad de ensayos;
- e. multiplicar la puntuación de evaluación de cada uno de la pluralidad de ensayos con la puntuación del coeficiente de ponderación del ensayo correspondiente de la pluralidad de ensayos para obtener una puntuación de ensayo independiente para cada uno de la pluralidad de ensayos;

- f. combinar la puntuación de ensayo independiente de cada uno de la pluralidad de ensayos para obtener un índice de sensibilidad y a partir de ese momento predecir la respuesta del sujeto al fármaco(s); y
- g. opcionalmente, correlacionar el índice de sensibilidad con la respuesta clínica del sujeto al fármaco(s).

5 La presente divulgación también se refiere a un método de identificación sistemática o desarrollo de agente anticáncer, comprendiendo dicho método las operaciones de:

- a. cultivar tejido tumoral del sujeto en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 3, para obtener tejido tumoral cultivado;
- 10 b. tratar el tejido tumoral cultivado con el agente, evaluando la respuesta tumoral al agente mediante ensayo para determinar el efecto de dicho agente en la célula tumoral.

La presente divulgación también se refiere a un método para identificar sistemáticamente células tumorales para marcadores específicos, comprendiendo dicho método las operaciones de:

- 15 a. cultivar tejido tumoral del sujeto en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 3, para obtener tejido tumoral cultivado;
- b. tratar el tejido tumoral cultivado con fármaco(s) y evaluar la respuesta tumoral al fármaco mediante ensayo; y
- 20 c. realizar análisis de micromatriz y Ácido Nucleico para identificar sistemáticamente los biomarcadores.

En otra realización de la composición de ECM, la composición es específica de tumor; y en la que el colágeno 1 se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml o aproximadamente 50 µg/ml; el colágeno 3 se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 0,1 µg/ml o aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente 100 µg/ml; el colágeno 4 se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml o aproximadamente 250 µg/ml; el colágeno 6 se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 0,1 µg/ml o aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml; la Fibronectina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml o aproximadamente 500 µg/ml; la Vitronectina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 95 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml; la Cadherina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 5 µg/ml; la Filamina A se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml; la Vimentina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml; la Laminina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml; la Decorina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 10 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml; la Tenascina C se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 10 µg/ml o aproximadamente 25 µg/ml; y la Osteopontina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente 5 µg/ml.

Además en otra realización de la divulgación, dicho tejido tumoral se obtiene a partir de una fuente seleccionada entre el grupo que comprende sistema nervioso central, médula ósea, sangre, bazo, timo, corazón, glándula mamaria, hígado, páncreas, tiroides, músculo esquelético, riñón, pulmón, intestino, estómago, esófago, ovario, vejiga, testículo, útero, tejido del estroma y tejido conectivo o cualquier combinación de los mismos, y el tumor o el tejido tumoral se obtiene por vía quirúrgica o mediante biopsia o como xenoinjerto o cualquier combinación de los mismos; y el tumor o el tejido tumoral se divide en pequeños trozos de secciones de aproximadamente 100 µm a aproximadamente 3000 µm.

Además en otra realización de la divulgación, en la plataforma de microentorno tumoral mencionada anteriormente el tejido tumoral se obtiene a partir de una fuente seleccionada entre el grupo que comprende sistema nervioso central, médula ósea, sangre, bazo, timo, corazón, glándula mamaria, hígado, páncreas, tiroides, músculo esquelético, riñón, pulmón, intestino, estómago, esófago, ovario, vejiga, testículo, útero, tejido del estroma y tejido conectivo o cualquier combinación de los mismos; en la que el tumor o el tejido tumoral se obtiene por vía quirúrgica o mediante biopsia o como xenoinjerto o cualquier combinación de los mismos; y el tumor o el tejido tumoral se divide en pequeños trozos de secciones de aproximadamente 100 µm a aproximadamente 3000 µm; en la que el cultivo del tejido tumoral se realiza a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C; durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 a 10 días, preferentemente a aproximadamente de 3 a 7 días; y con CO₂ aproximadamente al 5 %; y en la que la plataforma de revestimiento se

selecciona entre el grupo que comprende placa, base, matraz, placa de cultivo, placa de Petri y placa de cultivo de Petri.

5 Además en otra realización de la divulgación, la plataforma de microentorno mencionada anteriormente es para mantener las redes de señalización de células tumorales; y para mantener un microentorno de tejido intacto, arquitectura celular e integridad de interacción del estroma tumoral.

10 Además en otra realización de la divulgación, el medio de cultivo se seleccionan entre el grupo que comprende Medio de Eagle Modificado con Dulbecco [DMEM] o RPMI 1640 [Medio del Roswell Park Memorial Institute] a una concentración que varía de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 100 %, preferentemente a aproximadamente un 80 % 2 ml; FBS inactivado por calor (Suero Bovino Fetal) a una concentración que varía de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente 40 %, preferentemente a aproximadamente un 2 % en p/p; Penicilina-Estreptomicina a una concentración que varía de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 %, preferentemente a aproximadamente un 1 % en p/p; piruvato sódico a una concentración que varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, preferentemente a aproximadamente 100 mM; el aminoácido no esencial es L-glutamina a una concentración que varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, preferentemente a aproximadamente 5 mM; y HEPES ((ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) a una concentración que varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, preferentemente a aproximadamente 10 mM; el suero, se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, preferentemente a aproximadamente un 2 %.

25 Además en otra realización de la divulgación, en los métodos mencionados anteriormente con el tumor se selecciona entre el grupo que comprende estómago, colon, cabeza y cuello, cerebro, cavidad oral, mama, gástrico, gastrointestinal, esofágico, colorrectal, pancreático, pulmón, hígado, riñón, ovario, útero, hueso, próstata, testículo, glioblastoma, astrocitoma, melanoma, tiroides, vejiga, pulmón de células no microcíticas, pulmón de células microcíticas, cánceres hematológicos incluyendo AML, leucemia mieloide aguda, CML, leucemia mielógena crónica, ALL, leucemia linfocítica aguda, TALL, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, NHL, linfoma no Hodgkins, DBCL, linfoma difuso de linfocitos B, CLL, leucemia linfocítica crónica, y mieloma múltiple o cualquier combinación de los mismos.

30 Además en otra realización de la divulgación, en los métodos mencionados anteriormente, el ensayo se selecciona entre el grupo que comprende ensayo para viabilidad celular, muerte celular, proliferación celular, morfología tumoral, contenido del estroma tumoral, metabolismo celular, senescencia o cualquier combinación de los mismos; y en el que el ensayo para la viabilidad celular y el metabolismo celular se selecciona entre el grupo que comprende ensayo de WST, ensayo de absorción de ATP y ensayo de absorción de glucosa; el ensayo para la muerte celular se selecciona entre el grupo que comprende ensayo de LDH, ensayo de caspasa 3 activada, ensayo de caspasa 8 activada y ensayo de Óxido Nítrico Sintasa, TUNEL; el ensayo para la proliferación celular se selecciona entre el grupo que comprende ensayo de Ki67, ensayo de proporción de ATP/ADP y ensayo de absorción de glucosa; y el ensayo para la morfología tumoral y el estroma tumoral es H y E, tinción con Hematoxilina y Eosina; o cualquier combinación de los mismos.

45 Además en otra realización de la divulgación, el método se usa para decidir el tratamiento para el sujeto entre el grupo que comprende quimioterapia, terapia dirigida, cirugía, radiación o cualquier combinación de los mismos; y en el que el índice de sensibilidad se correlaciona con la respuesta clínica completa, respuesta clínica parcial y sin respuesta clínica cuando el índice de sensibilidad es mayor que 60, entre 20 y 60 y menor que 20 respectivamente.

50 Además en otra realización de la divulgación, en los métodos mencionados anteriormente, la asignación de una puntuación de coeficiente de ponderación para cada uno de la pluralidad de ensayos se basa en la naturaleza del fármaco usado.

55 Además en otra realización de la divulgación, en los métodos mencionados anteriormente, la micromatriz y el análisis de Ácido Nucleico de ADN, ARN o micro ARN se realiza para detectar la modulación de la ruta antes y después del tratamiento con fármacos; y en los que la micromatriz y el análisis de Ácido Nucleico se confirma usando un ensayo seleccionado entre el grupo que comprende PCR en tiempo real, RTPCR, ensayo inmunohistoquímico, IHC, análisis y formación de perfiles fosfoproteómicos.

Visión de conjunto del Presente Método

60 La visión de conjunto del protocolo usado en la presente divulgación se proporciona como sigue a continuación:

La primera etapa es la recogida de la muestra de tejido y la recogida de la muestra de sangre después de obtener el consentimiento informado del paciente. Las muestras se obtienen a través de colaboración clínica usando procedimientos aprobados por el IRB. Una vez que el tumor se obtiene a partir de la fuente del paciente respectivo, esta se somete a cualquiera de los métodos de explantes y/o xenoinjerto.

65

En el método de tratamiento de explantes, el "Indicador de Respuesta Clínica" se realiza para evaluación de la respuesta en tumor de paciente primario.

5 Como alternativa, cuando la fuente del tumor es un xenoinjerto, el tumor de ratones se extirpa y adicionalmente se somete a análisis de explante como se describe a continuación. En otra realización con el tumor se obtiene y se implanta en los ratones, a partir de ese momento se permite que crezca, a continuación se extirpa y a continuación se somete al presente análisis de "Indicador de Respuesta Clínica".

10 Después de obtener la muestra de tejido, ésta se divide para obtener diversas entradas de a) ensayo de de explante, b) Ensayos basados en Histología tales como IHC (inmunohistoquímica) /H y E, y c) análisis de eficacia de xenoinjertos obtenidos a partir de tumor primario.

15 A) La muestra de tejido proporcionada para análisis de explante se trocea usando Vibratomo de Leica para generar secciones de un grosor de aproximadamente 100-3000 μm . Estas secciones se cultivan en placas revestidas con la composición de ECM específica para el tipo de cáncer por cuadruplicado con medio que contiene sueros autólogos y también diversos fármacos opcionalmente, durante un periodo de tiempo de aproximadamente 48-96 horas. El medio con fármaco y enriquecido con suero/plasma/PBMC/ligandos obtenidos a partir de suero se cambia cada 24 horas. Después de este periodo de tiempo, el análisis de MTT/WST se realiza para evaluar el porcentaje de viabilidad celular (ensayo de criterio de valoración). El sobrenadante del medio de cultivo se retira cada 24 horas y se evalúa para proliferación (usando experimentos de utilización de ATP y glucosa) y muerte celular (mediante evaluación de ensayos de lactato deshidrogenasa y mediciones de caspasa-3 y caspasa 8) para dar tendencias de respuesta cinética. Los resultados se cuantifican frente a un control sin tratar con fármaco. La pérdida significativa de la viabilidad celular/proliferación en comparación con control sin tratar es indicativo de respuesta a fármaco/combinación y también aumento de la muerte celular. Las secciones de tejido tanto tratadas como no tratadas también se proporcionan para evaluación histológica al final del periodo de cultivo.

20 B) Los tejidos proporcionados para evaluación histológica se evalúan para apoptosis mediante el ensayo de TUNEL y de caspasa 3 activada. También se evalúa la proliferación celular para marcadores de proliferación convencionales tales como Ki67. También se realiza de forma rutinaria tinción con H y E para evaluar figuras mitóticas, necrosis y características totales generales del tejido.

25 C) Los tumores seleccionados se implantan en ratones inmunocomprometidos como un xenoinjerto para generar banco de tumores con el fin de expansión tisular y mantenimiento a través de paso en serie en ratones inmunocomprometidos.

35 En un enfoque específico, el estudio de xenoinjerto se realiza para validar la respuesta de "Indicador de Respuesta Clínica". La muestra dada para estudio de xenoinjerto se usa para implantar aproximadamente 3-5 ratones SCID inmunocomprometidos para generar xenoinjertos de tumor primario que posteriormente se someten a cálculo de la eficacia del fármaco. Como se ha reflejado anteriormente, la metodología de xenoinjerto no es un procedimiento de rutina, pero es una parte de la validación de la presente respuesta de "Indicador de Respuesta Clínica". Como parte del análisis de respuesta de "Indicador de Respuesta Clínica", se observa que los agentes quimioterapéuticos y terapias dirigidas sometidos a ensayo en sistema de explante y xenoinjerto son idénticos al régimen prescrito por el médico para el paciente a partir del que se obtiene el tejido tumoral.

40 Independientemente del tipo de cáncer sólido sometido a ensayo, se sigue el mismo procedimiento como se ha mencionado anteriormente. La única diferencia en el procedimiento entre los diferentes tipos de cánceres sólidos es el panel de fármacos sometidos a ensayo y la composición de ECM de la placa revestida. Además, los ligandos obtenidos a partir del suero son únicos para cada paciente sometido a ensayo en el modelo de explante.

45 Una vez que el volumen del tejido tumoral de xenoinjerto alcanza aproximadamente 500 mm^3 , el sistema de explante se valida adicionalmente sometiendo a el ensayo el tejido del sistema de explante idéntico al tejido del paciente precursor y se correlacionan los datos de eficacia de todas estas lecturas preclínicas, es decir, lecturas del sistema de xenoinjerto, sistema de explante y sistema de tejido de paciente precursor. El tiempo necesario para generar datos clínicos y datos de eficacia para xenoinjertos obtenidos a partir de tumor primario es entre 3-8 meses. Sin embargo, el tiempo de cambio para el análisis de explante y evaluación histológica es de aproximadamente 1 semana.

50 D) Todos los resultados preclínicos, tales como viabilidad celular, muerte celular por apoptosis, por citotoxicidad, y también estado de proliferación por último se integran para dar una puntuación individual denominada puntuación de M. Esta puntuación de M se construyó inicialmente usando una población base de entrenamiento. Se encontró que una puntuación de M baja es indicativa de mala respuesta mientras que una puntuación de M elevada corresponde a mejor respuesta en entorno clínico. Esto se valida adicionalmente usando una población base de validación de ~ 100 tumores de cabeza y cuello, en la que la puntuación de M para los tumores se genera y se correlaciona con los resultados clínicos.

65 El resultado preclínico de "Indicador de Respuesta Clínica" se obtiene en aproximadamente una semana y el resultado clínico se recoge después de aproximadamente 6 meses de terapia. A partir de ese momento, los

resultados obtenidos a partir de los resultados preclínicos y clínicos se correlacionan. El mismo procedimiento preclínicos de "Indicador de Respuesta Clínica" se usa para identificar pacientes que responden y pacientes que no responden; y se compara con el resultado clínico en múltiples cánceres sólidos.

5 En un método a modo de ejemplo, en conjunto con los ensayos para "Indicador de Respuesta Clínica", las muestras de tejido también se pueden evaluar para determinar el material genético del tejido tumoral para comprender la biología del tumor. El tejido tumoral se somete a aislamiento de ácido nucleico para evaluar análisis de micromatriz de ARN y ARNm, análisis genético para mutaciones específicas, secuenciación de exoma de ADN y formación de perfiles genéticos.

10 En un método a modo de ejemplo, el desarrollo del fármaco/firma tumoral/resistencia a fármaco y diagnóstico complementario se realiza de la siguiente manera. Mediante comparación del perfil genético de muestras de tumor sin tratar con las de las muestras tratadas, se deducen las rutas que se han visto afectadas debido a un tratamiento con fármaco. Al observar el perfil de ARNm total, se correlacionan las rutas que se han modulado como resultado del tratamiento y su efecto en la respuesta al fármaco. La secuencia de ADN de los pacientes que responden y de los pacientes que no responden se comparan para obtener una firma para cualquiera del paciente que responde o del paciente que no responde. De este modo, se deduce una firma para cualquier resultado. En el caso de resistencia a fármacos, el material genético se aísla a partir de las células resistentes en los explantes y se mira la modulación de la ruta en comparación con las muestras sin tratar para comprender la biología más allá de la resistencia. Para el desarrollo de diagnóstico complementario, la lectura del explante se usa para separar pacientes que responden y pacientes que no responden, y la información genética subyacente se usa para reducir está a la firma genética para uso como un diagnóstico complementario para un tratamiento con fármaco en particular.

25 En un método a modo de ejemplo, una de las ventajas del "Indicador de Respuesta Clínica" es la capacidad para mantener intacto tanto el microentorno del tejido como la arquitectura celular, a la vez que también se conserva la integridad de la interacción de tumor-estroma. Es en este contexto biofísico y bioquímico en el que las células presentan específica de tejido y órgano auténticos. En el presente documento, se describe un método de cultivo de explante usando trozos de tejido para mantener la arquitectura y el microentorno celular. El medio de cultivo también se suplementa adicionalmente con ligandos obtenidos a partir del paciente para imitar las rutas de señalización fisiológicamente relevantes similares a las del entorno nativo. Además, el sistema de plataforma de ensayo de explante utiliza la composición de ECM que específica para ese tipo de cáncer. De este modo, el sistema de explante es un sistema que imita el entorno hospedador nativo tanto como sea posible. Este sistema único permite a los inventores dirigirse a cuestiones específicas relacionadas con la señalización tumoral y el efecto de inhibidores de molécula pequeña que se dirigen a rutas específicas dentro del entorno tumoral.

35 En un método a modo de ejemplo, se realiza un método de creación de microentorno de tumor local *in vitro* que imita el microentorno tumoral del paciente. Se realiza un método para cultivo organotípico a largo plazo para tejido tanto tumoral como del estroma, en el que dicho cultivo proporciona ligandos humanos para imitar sistemas de señalización fisiológicamente relevantes. Se realiza un cultivo organotípico que comprende efectores inmunológicos humanos y factores angiogénicos para copiar el fenotipo microentorno de tejido del hospedador. En el cultivo organotípico el tejido tumoral se obtiene a partir de tumores sólidos que incluyen tumores de cabeza y cuello (HNSCC), cerebro, cavidad oral, mama, gástrico, esofágico, colorrectal (CRC), pancreático, pulmón, hígado, riñón, ovario, útero, hueso, próstata, testículo, y otros tejidos de origen humano o de ratón así como cánceres hematológicos que incluyen leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (TALL), linfoma no Hodgkins (NHL), linfoma de linfocitos B difusos (DLBCL) y leucemia linfocítica crónica (CLL). El cultivo organotípico es para mantener la viabilidad y la red de señalización del tejido tumoral mediante cultivo de dicho tejido en placas revestidas previamente con un cóctel de proteínas extra celulares o de Matriz Extra Celular definida específicos para el estadio tipo de cáncer obtenido a partir de un tipo de tejido seleccionado entre el grupo que consiste en cánceres de cabeza y cuello, cavidad oral, mama, ovario, útero, gastrointestinal, colorrectal, pancreático, próstata, glioblastoma, astrocitoma, melanoma, tiroides, riñón, vejiga, pulmón de células no microcíticas, pulmón de células microcíticas, hígado, hueso y otros tejidos de origen humano o de ratón.

55 En otro método, el cultivo organotípico se suplementa con ligandos aislados de suero humano, en los que el suero es suero humano autólogo, suero humano heterólogo. Además, el cultivo organotípico se suplementa con suero humano autólogo con suero humano heterólogo o con ligandos aislados de plasma humano autólogo o con ligandos aislados de plasma humano heterólogo o con ligandos aislados de sangre humana autóloga o con ligandos aislados de sangre humana heteróloga o con ligandos aislados de suero, plasma o sangre no humanos o con las PBMC aisladas a partir de sangre autóloga.

60 Además en otro método, el cultivo organotípico también se suplementa con factores inmunológicos aislados de sangre humana de modo que es de sangre humana autóloga o de sangre humana heteróloga. El cultivo organotípico se suplementa con plasma humano autólogo o con plasma humano heterólogo o con sangre humana autóloga o con sangre humana heteróloga o con factores inmunológicos aislados de un suero, plasma o sangre no humano. El cultivo organotípico también se suplementa con factores angiogénicos aislados de suero humano tales como suero

humano autólogo, suero humano heterólogo. El cultivo organotípico se suplementa con factores angiogénicos aislados de suero, plasma o sangre no humanos o con factores angiogénicos disponibles en el mercado.

Además en otro método, el tejido en dicho cultivo organotípico es viable durante más de 7 días en cultivo. Las condiciones de cultivo y el tejido tumoral mencionados también se usan para estudiar redes de señalización. Además, el tejido tumoral en el cultivo organotípico se extirpa y se procesa para mantener una viabilidad tisular máxima. El cultivo organotípico mencionado también se usa para identificación sistemática, cultivo y expansión *ex vivo* de células cancerosas. En otra realización, también se realiza procesamiento y crioconservación adicionales del cultivo organotípico resultante.

En otro método, la aplicación del presente microentorno tumoral se encuentra en la selección de la opción de tratamiento óptima para el paciente en investigación. El microentorno tumoral también se usa en - selección de fármacos anticáncer para el paciente en investigación, selección de fármacos anticáncer para combinar con los fármacos que se han seleccionado para el paciente en investigación, decidir la opción de tratamiento para el paciente entre quimioterapia, terapia dirigida, cirugía, radiación o una combinación de las mismas, decidir si el paciente responderá a quimioterapia, terapia dirigida, cirugía, radiación o una combinación de las mismas, selección de fármacos que no son para el cáncer para el tratamiento del paciente con cáncer en investigación.

En otro método, la aplicación del presente microentorno tumoral se encuentra en el desarrollo de fármacos anticáncer. El microentorno tumoral también se usa - en el desarrollo pre clínico o clínico de fármacos anticáncer, para identificar tipos de cánceres para los que el fármaco anticáncer en investigación tiene actividad óptima, para identificar los fármacos para tratamiento de referencia óptimo que se pueden combinar con el fármaco anticáncer en investigación para proporcionar actividad óptima, para identificar las dosis óptimas para el fármaco anticáncer en investigación para proporcionar actividad óptima, para identificar las dosis óptimas para fármacos de tratamiento de referencia que se pueden combinar con el fármaco anticáncer en investigación para proporcionar actividad óptima, para identificarlos pacientes óptimos a los que se les puede administrar el fármaco anticáncer en investigación para proporcionar una actividad óptima ya sea solo o en combinación con fármacos para tratamiento de referencia.

En otro método, la aplicación del presente microentorno tumoral se encuentra en el desarrollo de ensayos de diagnóstico complementarios para quimioterapias, fármacos dirigidos. El microentorno tumoral también se usa - en el desarrollo de ensayos de diagnóstico complementarios para agentes quimioterapéuticos o fármacos dirigidos incluyendo agentes biológicos, para establecer los pacientes "que responden y que no responden" a agentes quimioterapéuticos y fármacos dirigidos incluyendo agentes biológicos, formación de perfiles moleculares de los pacientes "que responden y que no responden" seleccionados para agentes quimioterapéuticos o fármacos dirigidos incluyendo agentes biológicos, que se usan para desarrollar el ensayo de diagnóstico complementario para seleccionar previamente los pacientes que probablemente respondan al agente quimioterapéutico o fármacos dirigidos incluyendo agentes biológicos, como un ensayo de diagnóstico complementario funcional para seleccionar previamente los pacientes que probablemente respondan al agente quimioterapéutico o fármacos dirigidos incluyendo agentes biológicos.

Además en otro método, la aplicación de la presente herramienta de separación de paciente también se encuentra en el desarrollo de fármacos para enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios en el desarrollo de ensayos de diagnóstico complementarios para los fármacos usados para enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios.

En otro ejemplo, se presenta un método a identificar sistemáticamente células tumorales para la presencia de marcadores específicos, en el que el método comprende IHC y otras técnicas; y determinar la viabilidad de dichas células, en las que el crecimiento y la proliferación son indicativos de estado tumoral.

En otro ejemplo, se presenta un método a identificar sistemáticamente agentes para su efecto en el tumor, en el que el método comprende la operación de poner en contacto agentes candidatos con un cultivo y determinar el efecto de dicho agente en las células tumorales en dicho cultivo.

En otro ejemplo, los métodos/aplicaciones mencionadas anteriormente usan trozos de tejido que son de origen humano o de origen animal. Además, dicho tejido es del sistema nervioso central, médula ósea, sangre (por ejemplo, monocitos), bazo, timo, corazón, glándulas mamarias, hígado, páncreas, tiroides, músculo esquelético, riñón, pulmón, intestino, estómago, esófago, ovario, vejiga, testículo, útero o tejido conectivo. En lo sucesivo, en los métodos mencionados anteriormente dichas células son células madre o las células son de más de un órgano o las células son de un órgano u órganos sanos o las células son de un órgano u órganos enfermos que se han alterado genéticamente o las células son de un órgano de animal transgénico.

En otro ejemplo, la presente divulgación se refiere a un método para identificar sistemáticamente células tumorales para marcadores específicos que comprenden las operaciones de - cultivar el tejido tumoral del sujeto en la presente plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 3 y tratar el tejido tumoral cultivado con el fármaco(s) para evaluar la respuesta del tumoral fármaco mediante una pluralidad de ensayos para obtener una puntuación de evaluación para cada uno de la pluralidad de ensayos. A partir de ese momento se realiza análisis de

micromatriz de ARNm y micro ARN para detectar la ruta de modulación después del tratamiento en comparación con el perfil de tratamiento previo para identificar supuestos biomarcadores; la confirmación de lo mismo de dianas se realiza usando RTPCR e IHC.

- 5 Los siguientes ejemplos elaboran e ilustran adicionalmente los aspectos de la presente divulgación. Sin embargo, no se debería interpretar que estos ejemplos limitan el alcance de la presente divulgación.

Ejemplos

10 La presente divulgación presenta los diversos aspectos de la invención a modo de los siguientes ejemplos ilustrativos, en los que el ejemplo 1 se refiere a preparación y revestimiento de una composición de ECM adecuada sobre placas celulares que se usa en el presente análisis de "Indicador de Respuesta Clínica". El montaje del sistema de análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" se elabora en el Ejemplo 2. Los Ejemplos 1 y 2 también ilustran la significancia del revestimiento de las placas para el presente análisis con ECM específica de cáncer y adición de ligandos obtenidos a partir de suero en el presente proceso de "Indicador de Respuesta Clínica". El Ejemplo 3 proporciona el protocolo de Explante (es decir, el protocolo del "Indicador de Respuesta Clínica") en el que la fuente del tejido tumoral puede ser de cualquier del paciente o xenoinjerto del mismo; y la metodología para generar el tejido tumoral de xenoinjerto se proporciona en el Ejemplo 4. El Ejemplo 5 presenta el protocolo usado para determinar la eficacia terapéutica de fármacos en xenoinjertos de tumor de ratones SCID/atímicos, para validar los resultados obtenidos con el Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica". El sistema de "Indicador de Respuesta Clínica" a continuación se somete a validación pre clínica como se ilustra en el Ejemplo 6 y la validación clínica en el Ejemplo 14. Los protocolos de los ensayos usados en el Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" se han proporcionado el Ejemplo 7 y el concepto de puntuación de M se presenta en el Ejemplo 8. El sistema de "Indicador de Respuesta Clínica" se somete ensayo adicionalmente para predecir la respuesta de múltiples cánceres sólidos en los Ejemplos 9, 13 y 14. El Ejemplo 10 muestra todo el protocolo de "Indicador de Respuesta Clínica" en comparación con los resultados obtenidos con resultados clínicos para validar el presente análisis. El Ejemplo 11 Y 12 proporcionan datos experimentales para mostrar que el presente análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" es Un indicador de respuesta mejor que las líneas celulares de los biomarcadores respectivamente.

30 Ejemplo 1: Preparación y Revestimiento de Composición de ECM Adecuada en Placas Celulares

La fuente del tumor es tejido tumoral primario de paciente, obtenido mediante protocolos convencionales. Como alternativa, el tejido tumoral humano primario se implanta por vía subcutánea en ratones SCID inmunocomprometidos para generar xenoinjertos de tumor humano primario para una diversidad de cánceres sólidos. Después de una medición del volumen tumoral de aproximadamente 1000 mm³, el tumor se extirpa del xenoinjerto. La ECM se aísla de del tumor del paciente o del tejido tumoral de xenoinjerto de acuerdo con el protocolo que se proporciona a continuación.

40 Aislamiento de ECM humana y su caracterización

Los tejidos tumorales recién retirados por vía quirúrgica se diseccionan, se cortan en secciones de 1-2 mm, y se suspenden en solución de dispasa (Stem cell Technologies Inc.) y se incuban durante 15 min a 48 °C. Los tejidos se homogenizan en una solución de tampón con alto contenido de sales que contiene Tris 0,05 M a pH 7,4, cloruro sódico 3,4 M, 4 mM de EDTA, 2 mM de N-etilmaleimida y proteasa (Roche) e inhibidores de fosfatasa (Sigma). La mezcla homogeneizada se centrifuga a 7000 g durante 15 min y el sobrenadante se descarta. Sedimento se incuba en tampón de urea 2 M (cloruro sódico 0,15 M y Tris 0,05 M a pH 7,4) y se agita durante la noche a 48 °C. A continuación la mezcla se centrifuga finalmente a 14.000 g durante 20 min, y se vuelve a suspender en el tampón de urea 2 M y se almacena a -80 °C en alícuotas. El cálculo de proteínas se realiza usando el kit de ensayo de proteína DC (Lowry modificado, Bio-Rad) para calcular la cantidad de proteínas de ECM aisladas para cuantificación. El revestimiento de las placas de cultivo tisular se realiza con extractos de proteína a 37 °C durante 3 h.

Después del aislamiento de la ECM de una diversidad de tejidos tumorales para diferentes indicaciones, la composición de estas ECM se analiza mediante espectrometría de masas, cuyos resultados se ilustran en las tablas 1A a 1G. La distribución y la abundancia de las diferentes composiciones de la Matriz Extra Celular aislada de diferentes tumores primarios (cánceres de HNSCC, estómago, pancreático y colon) se representan en las Tablas 1A a 1G. Las muestras se purifican y se someten a análisis de LCMS. La abundancia de las proteínas de matriz principales se indica para cada tipo de tumor. Como se ilustra en las tablas mencionadas anteriormente, los componentes requeridos para el revestimiento de la ECM son específicos para cada tipo de cáncer. Por lo tanto, todos los datos mencionados anteriormente ayudan a identificar la composición de la ECM a revestir en los pocillos hacia el tipo de tumor/cáncer específico. Las concentraciones de los componentes requeridas en la mezcla de ECM Se proporcionan en la tabla 1 que sigue a continuación, que es un resumen de las tablas 1A a 1G.

Tabla 1: Concentración de los componentes de la composición de ECM

S. Nº	Listado de Hu-ECM	Concentración del revestimiento (µg/ml)
1	colágeno 1	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferentemente aproximadamente 5, aproximadamente 20 y aproximadamente 50
2	colágeno 3	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferentemente aproximadamente 0,1, aproximadamente 1 y aproximadamente 100
3	colágeno 4	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500, preferentemente aproximadamente 5, aproximadamente 20 y aproximadamente 250
4	colágeno 6	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500, preferentemente aproximadamente 0,1, aproximadamente 1 y aproximadamente 10
5	FN	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 750, preferentemente aproximadamente 5, aproximadamente 20 y aproximadamente 500
6	VN	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 95, preferentemente aproximadamente 5 y aproximadamente 10
7	Cadherina	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500, preferentemente aproximadamente 1 y aproximadamente 5
8	Filamina A	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500, preferentemente aproximadamente 5 y aproximadamente 10
9	Vimentina	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferentemente aproximadamente 1 y aproximadamente 10
10	Laminina	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferentemente aproximadamente 5, aproximadamente 10 y aproximadamente 20
11	Decorina	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferentemente aproximadamente 10 y aproximadamente 20
12	Tenascina C	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500, preferentemente aproximadamente 10 y aproximadamente 25
13	Osteopontina	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 150, preferentemente aproximadamente 1 y aproximadamente 5

Después de evaluar la ECM de diferentes tipos de tumores de xenoinjerto primario en comparación con el Tumor del donante primario, también se realizan experimentos de revestimiento para someter a ensayo las ECM del mismo tipo de cáncer sólido (por ejemplo Colon) pero aisladas de diferentes xenoinjertos de tumor primario (diferentes donantes primarios). Las placas de ECM revestidas de formas diferentes también se analizan con respecto su capacidad para proporcionar soporte/armazón para los tejidos sometidos a ensayo en explantes. Todos los datos mencionados anteriormente se cotejan para llegar a la ECM final que se va a revestir en la placa hacia tipo de tumor/cáncer específico.

La viabilidad de los tejidos tumorales en la Matriz ECM revestida de forma diferencial se supervisa durante un periodo de tiempo de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 días a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Tabla 1A: ESTÓMAGO

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores gástricos y analizados con LCMS.			
S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
1	B1	Cadena de colágeno alfa-1 (I)	0,7-49,5

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores gástricos y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
2	B2	Cadena de colágeno alfa-2 (I)	0,4-39,8
3	B15	Cadena de colágeno alfa-1 (III)	1,1-38,3
4	B33	Proteína de fusión COL1A1 y PDGFB	0,8-21
5	B34	Isoforma 1 de tuberina	0,5-15
6	B35	Isoforma 4 de tuberina	1-19,3
7	B36	Isoforma 5 de tuberina	0,3-35,8
8	B37	Precursor de isoforma 1 de protocadherina alfa-8	0,9-6,3
9	B38	Precursor de isoforma 2 de protocadherina alfa-8	0-3,5
10	B39	Precursor de isoforma 2 de integrina alfa-M	1-44,4
11	B40	Precursor de isoforma 1 de integrina alfa-M	1,5-12,7
1	C1	Actina, citoplasmática 1	0,2-25
2	C2	Actina, citoplasmática 2	0,4-37
3	C3	Actina, un músculo cardiaco	2-33,7
4	C4	Actina, un músculo esquelético	0,2-21,3
5	C9	Citoqueratina, tipo 1	0,1-35,5
6	C10	Citoqueratina, tipo 2	0,6-21,7
7	C19	Actina, músculo liso aórtico 1	0,4-28,9
8	C20	Actina, precursor de isoforma 2 de músculo liso gamma-entérico	0,2-19,2
9	C21	Actina, músculo liso aórtico 2	0-9,7
10	C30	Distonina	0,2-11,3
1	R23	Proteína S100-A8	1-20,3
2	R25	Anexina A1	3-15,1
3	R34	Proteína S100-A9	2,8-12,8
4	R64	Hialuronano sintasa 2	0,2-8,6
5	R65	Proteína similar a MICAL C-terminal	0,1-6,6
6	R66	Proteína 1 similar a canal de cloruro CLIC	1-16,6
7	R67	Receptor alfa-1 de la familia GDNF	0,2-23,7
8	R68	Componente A 1 de geranilgeraniltransferasa de proteínas Rab	0,9-25,7

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores gástricos y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
9	R69	Basonuclina-1	0,9-30,9
10	R70	Factor 2-alfa quinasa 4 de inicio de traducción eucariota	0,9-13,8
11	R71	Diacilglicerol quinasa delta	0,8-5,2
12	R72	Proteasa similar a AMSH	0,8-18,3
13	R73	Tau-tubulina quinasa 1	0,7-6,1
14	R74	Proteína quinasa 2 asociada a Rho	0,6-26
15	R75	Desacetilasa sirtuina-1 dependiente de NAD	0,8-11,1
16	R76	Glucógeno fosforilasa, forma cerebral	0,6-5
17	R77	Proteína 1 de unión a oxisterol	0,2-10,6
1	O6	Histona H4	0,5-3,6
2	O35	Miembro F de la familia del dominio de POTE anquirina	0,2-8
3	O37	Miembro E de la familia del dominio de POTE anquirina	0,7-6
4	O38	Isoforma 2 del miembro I de la familia del dominio de POTE anquirina	0,7-7,6
5	O41	Proteína sin caracterizar	0,1-5,2
6	O42	Preproteína de albúmina de suero	0,4-8,1
7	O43	Precursor de la alfa-1-glicoproteína ácida	0,2-14
8	O44	Precursor del miembro 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas	0,2-20,4
9	O45	Isoforma 1 de Limkaína-b1	0,1-9
10	O46	Isoforma 3 de Limkaína-b1	0,1-9
11	O47	Isoforma 2 de Limkaína-b1	0,1-9,2
12	O48	Inhibidor de la proteína de crecimiento 2	0,1-9,9
13	O49	Subunidad gamma-2 de hemoglobina	0,5-4,6
14	O50	Subunidad épsilon de hemoglobina [<i>Homo sapiens</i>]	0,5-18,6
15	O51	Subunidad delta de hemoglobina	0,5-22,5
16	O52	Subunidad beta de hemoglobina	0,5-17,2
17	O53	Subunidad gamma-1 de hemoglobina	0,5-31,1
18	O54	Enzima 7 activante de modificador similar a ubiquitina	0,1-39
19	O70	Proteína 2 que contiene dominio NudC	0,2-36,6

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores gástricos y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
20	O71	Proteína 1 apoptogénica, mitocondrial	0,2-8,6
21	O78	Proteína de unión a ribosoma	0,8-30,4
22	O80	Proteína C15orf2	0,1-21
23	O81	Proteína 1 que contiene el dominio L1 ribosómico	0,9-51,4
24	O82	Proteínas de unión a nucleótido de guanina	0,8-38,3
25	O83	Factor similar a Krueppel	0,1-14,3
26	O84	Cadena beta de receptor de linfocitos T	0,1-5

Tabla 1B: CRC

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores colorrectales y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 7)
1	M1	Miosina 1	0,3-25,5
2	M9	Miosina 9	0,2-12,4
3	M24	Isoforma 9 de fibronectina	0,4-20,7
4	M25	Isoforma 10 de fibronectina	0,3-23,1
5	M26	Preproteína de isoforma 4 de fibronectina	0,2-11,2
6	M31	Isoforma DPI de Desmoplaquina	0,1-15,6
7	M37	Mucina-12	0,2-33,7
8	M38	Elemento de superficie de contacto 1 de microfibrillas de elastina	0-11,6
9	M39	Isoforma b de oscurina	0,2-12,3
10	M40	Isoforma a de oscurina	0,1-22,2
11	M41	Isoforma 2 de la proteína 2 de conector que contiene el dominio CAP-Gly 2	0,1-20,1
12	M42	Isoforma 1 de la proteína 2 de conector que contiene el dominio CAP-Gly 1	0,2-4,8
13	M43	Precursor de la isoforma 1 de la proteína 1 similar a oscurina	0,1-5
14	M44	Precursor de la isoforma 2 de la proteína 1 similar a oscurina	0,1-13,5
15	M45	Precursor de la isoforma 3 de la proteína 1 similar a oscurina	0,1-17,4
1	B1	Cadena de colágeno alfa-1 (I)	1,1-28,3

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores colorrectales y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 7)
2	B2	Cadena de colágeno alfa-2 (I)	0,9-42,8
3	B3	Isoforma 1 de la cadena de colágeno alfa-3 (VI)	0-22,5
4	B15	Cadena de colágeno alfa-1 (III)	0,9-36,7
5	B17	Proteína 3 de membrana asociada a vesículas	0,6-9,2
6	B37	Precursor de la isoforma 1 de protocadherina alfa-8	4,6-5,7
7	B38	Precursor de la isoforma 2 de protocadherina alfa-8	0,8-5,2
8	B42	Precursor de la isoforma B de la cadena de colágeno alfa-6(IV)	0,3-2,3
9	B43	Precursor de la isoforma A de la cadena de colágeno alfa-6(IV)	0,4-1,9
10	B44	Colágeno, tipo XXII, alfa 1	0,1-14,5
11	B45	Precursor de la estabilina-2	0,1-3,5
12	B46	Isoforma 1 de la semaforina-4G	0,2-13,8
13	B47	Isoforma 2 de la semaforina-4G	0,2-22,7
14	B48	Precursor de la Protocadherina Fat 1	0,9-34,6
15	B49	Tetraespanina-11	0,2-4,2
16	B50	Cadena de colágeno alfa-1(XX)	0,3-18,6
1	C1	Actina, citoplasmática 1	0,2-30,9
2	C2	Actina, citoplasmática 2	0,1-19,2
3	C4	Actina, un músculo esquelético	0,1-23,8
4	C6	Tubulina-a	0,3-29,9
5	C7	Tubulina, b	0,3-14,8
6	C10	Citoqueratina, tipo 2	1,1-35,2
7	C12	Proteína de 69 KDa	0,5-17,7
8	C15	Coronina 1 A	0,3-24,8
9	C16	Placoglobina de unión	0,3-9,9
10	C18	Isoforma 1 de la Filamina-A	0,9-15,8
11	C22	Vimentina	0,2-25,5
12	C23	Plastina 2	0,2-22,4
13	C28	Dineína	0,2-37,8
14	C35	Polipéptido pesado de neurofilamentos	0,5-13,6

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores colorrectales y analizados con LCMS.

S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 7)
1	R1	Calmodulina	0,1-18,7
2	R24	Proteína 137 dedos de cinc supuesta	0,5-25,9
3	R28	Homólogo del factor 1 de autorregulación epidérmica deformado	0,6-16,6
4	R29	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, específica de testículo	0,6-19,5
5	R30	Factor MAFK de transcripción	0,6-5,4
6	R31	Triptófano 2,3-dioxigenasa	0,5-8,8
7	R32	Proteína asociada a la membrana eritrocitaria	0,2-14,6
8	R33	Alquildihidroxiacetonafofosfato sintasa	0,2-15,4
9	R37	Proteína vehículo mitocondrial de unión a calcio	0,3-17,3
10	R74	Proteína quinasa 2 asociada a Rho	0,6-18,1
11	R79	Preproteína de Tripsina-1	0,3-32,9
12	R83	Proteína 7 de unión a cromodominio de helicasa-ADN	0,1-10,1
13	R86	Isoforma 1 del factor de transcripción BBX de caja HMG	14,5
14	R87	Familia que contiene el dominio de homología de pleckstrina	0,2-21,9
15	R88	Exonucleasa GOR	0,3-33,8
16	R89	Isoforma 1 de neurobeaquina	0,4-18,9
17	R90	Proteína 2 de tipo neuralizado	0,4-11,2
18	R91	2',5'-fosfodiesterasa 12	0,3-25,7
19	R92	E3 ubiquitina-proteína de ligasa similar a NEDD	0,3-27,8
20	R93	Isoforma 1 de la proteína 84 de dedos de cinc	0,1-22,9
21	R94	Proteína ER de homeostasis de calcio	0,2-9,5
22	R95	Subunidad grande de la ADN primasa	0,2-20,4
23	R96	Proteína 22 activante de la Rho GTPasa	0,9-28,6
24	R97	Isoforma 2 de la proteína Niban	0,4-38,8
25	R98	ARF-GAP con proteína 3 que contiene repetición ANK y dominio PH, superenrollado	0,4-14
26	R99	Serina proteasa HTRA1	0,2-11,7
27	R100	Molécula inhibitoria apoptótica Fas	0,3-16,2
28	R101	Aspartato aminotransferasa, citoplasmática	0,1-16

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores colorrectales y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 7)
29	R102	Isoforma b de la proteína quinasa quinasa quinasa 4 activada por mitógenos	0,2-22,2
30	R103	Proteína quinasa C delta	0,1-9,9
1	O20	Subunidades de Hb (alfa)	0,2-15,2
2	O23	Región de la cadena C de Ig a-1	0,1-27,8
3	O41	Proteína sin caracterizar	0,3-17,5
4	O42	Preproteína de albúmina de suero	0,7-14,2
5	O51	Subunidad delta de hemoglobina	0,1-17,4
6	O52	Subunidad beta de hemoglobina	0,1-28,5
7	O53	Subunidad gamma-1 de hemoglobina	0,1-15,2
8	O55	Proteína 6B similar a antígeno paraneoplásico	0,1-16,1
9	O56	Proteína 6A similar a antígeno paraneoplásico	0,5-16,1
10	O57	Proteína BRX1 de biogénesis de ribosoma	0-15,4
11	O83	Factor similar a Krueppel	0,3-19,4
12	O94	Isoforma gamma de proteína X similar a Max	0,5-13
13	O95	Unión 1 a ribonucleoproteína PTB	0,3-9,3
14	O96	Miembro 8 de la subfamilia de casete de unión a ATP	0,1-13,0
15	O97	Homólogo del ciclo 7 de la división celular	0,9-3
16	O98	Neurolisina, precursor mitocondrial	0,1-23,6
17	O99	Proteína LOC254778 hipotética	0,5-18,1
18	O101	Proteína vehículo de fosfato, precursor de la isoforma b mitocondrial	0,1-27,8
19	O102	Proteína 1 de unión a quinasa 1 de unión a TANK	0,1-26,2
20	O103	KRT8P11, pseudogén 11 de la queratina 8	0,9-7
21	O104	Proteína 1 que contiene el dominio SAM radical, precursor mitocondrial	0,3-20
22	O105	PRO2619	0,5-8,4

Tabla 1C: CaBr

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de mama y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
1	M15	Troponina C, músculo esquelético	0,1-11,9

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de mama y analizados con LCMS.

S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
2	M33	Lumicano	0,5-26,7
3	M34	Isoforma c de decorina	0-14,2
4	M35	Isoforma a de decorina	0,4-6
1	B1	Cadena de colágeno alfa-1 (I)	0,8-43,6
2	B2	Cadena de colágeno alfa-2 (I)	0,1-40,9
3	B3	Isoforma 1 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	0,3-25,9
4	B5	Isoforma 4 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	0,1-15,8
5	B6	Isoforma 2C2 de cadena de Colágeno alfa-2 (VI)	0,5-35,2
6	B7	Isoforma 2C2A' de cadena de Colágeno alfa-2 (VI)	0,4-14,9
7	B8	Isoforma 2C2A de cadena de Colágeno alfa-2 (VI)	0,5-39,8
8	B15	Cadena de colágeno alfa-1 (III)	0,4-12,6
9	B20	Isoforma 5 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	0,8-6,6
10	B21	Isoforma de cadena larga de colágeno alfa-1 (XII)	0,2-4,5
11	B22	Isoforma de cadena corta de colágeno alfa-1 (XII)	0,6-14,4
12	B23	Cadena de colágeno alfa-1 (XIV)	0,1-14,3
13	B24	Cadena de colágeno alfa-1 (VI)	0,6-23,8
14	B25	Homólogo 3 de la familia de fermitina	0-5
15	B26	Isoforma 1 del homólogo 1 de proteína que contiene el dominio PH expresado en la zona ventricular	0,5-11,5
16	B27	Isoforma 2 de protocadherina gamma-B6	0,1-8,4
17	B28	Isoforma 1 de protocadherina gamma-B6	0,1-17,4
18	B29	Isoforma 1 de proteína que contiene el dominio PH expresado en la zona ventricular	1-8,7
19	B30	Isoforma 2 del homólogo 1 de proteína que contiene el dominio PH expresado en la zona ventricular	0,9-6,9
20	B31	Proteína transmembrana 63C	0,7-8,3
21	B32	Factor Von Willebrand, tipo C	2,1-8
1	C8	Actina, precursor de la isoforma 1 del músculo liso gamma-entérico	0,9-48
2	C9	Citoqueratina, tipo 1	0,9-26
3	C10	Citoqueratina, tipo 2	3,0-51

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de mama y analizados con LCMS.

S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
4	C22	Vimentina	0,3-15
5	C25	Isoforma meta-VCL de la vinculina	0,1-22,3
6	C26	Isoforma VCL de la vinculina	0,2-12,2
7	C27	Fostensina	0,8-13,6
8	C28	Dineína	1-14,7
9	C29	Proteína 2 de fibra densa externa	0,2-6,2
1	R9	Fructosa bifosfatoaldolasa A	0,5-8
2	R10	Piruvato Quinasa	1,6-15,2
3	R22	Olfactomedina-4	0,7-15,4
4	R25	Anexina A1	0,5-9,3
5	R26	Creatina Quinasa tipo M	2,2-10
6	R27	Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa 1, precursor mitocondrial	0,5-13,6
7	R28	Homólogo del factor 1 de autorregulación epidérmica deformada	0,1-11,3
8	R48	Factor de crecimiento II de tipo insulínico	0,4-13
9	R49	DDAH2	0,2-8,9
10	R50	Fumarato hidratasa, precursor mitocondrial	0,3-6,6
11	R51	Coactivador 5 de receptor nuclear	0,9-9,3
12	R52	Proteína BEX5	1-13,8
13	R53	Proteína THEMIS	0,2-9,8
14	R54	Factor de transcripción de oligodendrocitos	0,5-17,7
15	R55	Subunidad alfa de la proteína de tipo 8 de canales de sodio	0,1-9,2
16	R56	Factor de transcripción HIVEP2	0,9-10
17	R57	Serina/treonina-proteína quinasa SMG1	1-20,1
18	R58	Proteína 4B activante de la Ras GTPasa supuesta	0,7-8,7
19	R59	Proteína 4 activante de la Ras GTPasa	0,3-13,7
20	R60	Proteína 3 similar a humanina	1,6-8
21	R61	Proteína Nkx-6.1 de homeocaja	2-16,9
22	R62	Sepiapterina reductasa	3,2-16,9
23	R63	Adenilato ciclasa 3	1-9,4

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de mama y analizados con LCMS.

S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
1	O8	Histona H1	0,3-9,8
2	O41	Proteína sin caracterizar	0-14,9
3	O42	Preproproteína de albúmina de suero	1,2-17,2
4	O60	Proteína L20 ribosómica 39S	0,4-15,5
5	O66	Proteína similar a SMG1 sin caracterizar supuesta	1,5-35
6	O67	Isoforma 1 del factor 1 de citoquina similar a cardiotrofina	2-9,4
7	O68	Dominio de repetición de anquirina 13B	0,9-12,1
8	O69	Miembro de la familia LGI de repetición rico en leucina	1,4-23
		Precursor 2	
9	O70	Proteína 2 que contiene el dominio NudC	0,5-12,1
10	O71	Proteína 1 apoptogénica, mitocondrial	1-14,2
11	O72	Proteína L39 ribosómica 60S	4-23,7
12	O73	Subunidad de complejo de estimulación de anafase	0-14,1
13	O74	Proteína tumoral controlada por vía de traducción	0,9-6
14	O75	Subunidad del factor eIF-2B de inicio de la traducción	1-8,6
15	O76	Proteína de interacción con Rab5 supuesta	0,5-8
16	O77	Inhibidor de la tripsina secretora pancreática	0,1-7,2

Tabla 1D: H y N

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y analizados con LCMS.

S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
1	M1	Miosina 1	0,5-27
2	M2	Miosina 2	0,1-6,4
3	M9	Miosina 9	0,2-11
4	M17	Isoforma 1 de fibronectina	0,1-7
5	M18	Isoforma 3 de fibronectina	0-28
6	M19	Isoforma 4 de fibronectina	0,1-12,5
7	M20	Isoforma 5 de fibronectina	0,1-9,3
8	M21	Isoforma 6 de fibronectina	0,1-10,5
9	M22	Isoforma 7 de fibronectina	0,1-10,5

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y analizados con LCMS.

S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
10	M23	Isoforma 8 de fibronectina	0,1-3,3
11	M24	Isoforma 9 de fibronectina	0,1-9
12	M25	Isoforma 10 de fibronectina	0,1-8
13	M26	Preproteína de la isoforma 4 de fibronectina	0-5,1
14	M27	Isoforma 14 de fibronectina	0,1-21
15	M28	Isoforma 15 de fibronectina	0,1-4,6
16	M29	Isoforma 13 de fibronectina	0-6,8
17	M30	Isoforma 11 de fibronectina	0,1-12
18	M36	Molécula de adhesión celular 16 relacionada con CEA	0,6-5,4
1	B1	Cadena de colágeno alfa-1 (I)	2,3-21,7
2	B2	Cadena de colágeno alfa-2 (I)	1,4-24,1
3	B3	Isoforma 1 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	1-11,6
4	B4	Isoforma 2 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	1-8,4
5	B5	Isoforma 4 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	1-18,2
6	B6	Isoforma 2C2 de cadena de Colágeno alfa-2 (VI)	0,3-6
7	B7	Isoforma 2C2A' de cadena de Colágeno alfa-2 (VI)	0,3-4,7
8	B8	Isoforma 2C2A de cadena de Colágeno alfa-2 (VI)	0,3-9,5
9	B15	Cadena de colágeno alfa-1 (III)	0,2-13
10	B33	Proteína de fusión COL1A1 y PDGFB	0,2-9
11	B41	Proteína asociada a membrana plasmática de adipocitos	0,5-13,9
1	C1	Actina, citoplasmática 1	1-5,4
2	C2	Actina, citoplasmática 2	0,4-4,6
3	C9	Citoqueratina, tipo 1	0,5-19
4	C10	Citoqueratina, tipo 2	6,6-35,8
5	C12	Proteína de 69 KDa	0,2-7,9
6	C22	Vimentina	0,1-14,8
7	C23	Plastina 2	0,2-6

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y analizados con LCMS.

S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
8	C24	Proteína 10 similar a actina	0,1-10,2
9	C31	Septina-11	0,9-7,2
10	C32	Isoforma 1 de proteína ácida fibrilar glial	0,5-4,1
11	C33	Isoforma 3 de proteína ácida fibrilar glial	0,2-5
12	C34	Isoforma 2 de proteína ácida fibrilar glial	0,1-3,4
1	R22	Olfatomedina-4	1-5,4
2	R35	Proteína UPF0696	0,6-7,6
3	R36	Proteína vecinal del retraso mental 1 del cromosoma frágil X	1,3-7,2
4	R37	Proteína vehículo mitocondrial de unión a calcio	2-7,1
5	R38	Homólogo de la proteína 2 del complejo nucleolar	0,4-6,7
6	R39	Proteína 1 que contiene dominio HIT de dedos de cinc	0,6-5,7
7	R40	Fosfoproteína estable en calor y ácido de 28 kDa	0,5-3,5
8	R41	Proteína 16 similar al factor de ribosilación de ADP	0,3-6,1
9	R42	Factor de transcripción de LBX2	0,2-7
10	R43	Proteína 28B que contiene dominio superenrollado	1-2,5
11	R44	Péptido de jugo gástrico 1	0,2-6,1
12	R45	Supervivencia del factor 30 de corte y empalme relacionado con neuronas motoras	0,1-3
13	R46	Proteína 1 similar a DCN1	0,8-6,9
14	R47	R-espondina-1	0,6-4
15	R77	Proteína 1 de unión a oxisterol	1,8-6,6
16	R78	Isoforma a de la proteína 2 regulada por receptores NMDA	0,5-6,9
17	R79	Preproteína de tripsina-1	0,1-6,4
18	R80	Histona-lisina N-metiltransferasa SUV39H1	0,9-5,2
19	R81	E3 ubiquitina-proteína ligasa RING1	0,6-4,6
20	R82	Subunidad 2 del factor de estimulación de escisión	0,7-4,9

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y analizados con LCMS.

S. Nº	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
21	R83	Proteína 7 de unión a cromodominio-helicasa-ADN	0,9-3,9
22	R84	Factor de traducción GUF1, mitocondrial	0,1-8
23	R85	. Factor de transcripción de CREB/ATF bZIP	0,6-9
1	O8	Histona H1	0,2-12
2	O20	Subunidades de Hb (alfa)	0,3-5,2
3	O26	Beta globina	1,2-7
4	O29	Dermicidina	0,6-4,4
5	O31	Subunidad a de complejo asociado polipéptido	1-8,7
6	O33	Proteína de unión a complemento 1 Q	0,1-7,2
7	O41	Proteína sin caracterizar	1,3-12
8	O42	Preproteína de albúmina de suero	0-6,3
9	O52	Subunidad de hemoglobina beta	0,6-4
10	O58	Proteína 10 relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad	0,6-8
11	O59	Proteína FAM150A	0,6-2
12	O60	Proteína L20 ribosómico 39S	0,5-7
13	O61	Proteína 1 similar a TOMM20	0,5-6,7
14	O62	Proteína L10a ribosómico 60S	0,1-7
15	O63	Proteína UPF0711	0,1-6
16	O64	Homólogo de SWI5	0,1-3
17	O65	Proteína 55 secretora neuroendocrina	0,1-9,2
18	O85	Proteína 93 que contiene repetición de WD	0,9-6,6
19	O86	Subunidad SMARCC2 del complejo SWI/SNF	0,1-5,9
20	O87	Regulador de transcripciones sin sentido	0-4,9
21	O88	Proteína 1 que contiene el dominio MAP7	0,6-5,3
22	O89	Factor nuclear de linfocitos T activados, isoforma A citoplasmática 1	0,5-8
23	O90	Isoforma 2 de la proteína 1 similar a NHS	0,4-1,7
24	O91	Isoforma 2 del factor 4H de inicio de la traducción eucariota	0,6-3,6
25	O92	Preproteína de proteína amiloide A de suero	0,1-5,8

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
26	O93	Homólogo de proteína RAD52 de reparación de ADN	1-8,1

Tabla 1E: páncreas

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores pancreáticos y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
1	M31	Isoforma DPI de Desmoplaquina	0,2-16
2	M32	Isoforma DPII de Desmoplaquina	0,2-13
1	B1	Cadena de colágeno alfa-1 (I)	0,8-12,8
2	B2	Cadena de colágeno alfa-2 (I)	0,6-23,8
3	B3	Isoforma 1 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	0,08-4
4	B4	Isoforma 2 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	0,08-3,4
5	B5	Isoforma 4 de cadena de Colágeno alfa-3 (VI)	0,08-6,5
6	B15	Cadena de colágeno alfa-1 (III)	0,2-8
7	B33	Proteína de fusión COL1A1 y PDGFB	0,3-6
8	B37	Precursor de isoforma 1 de protocadherina alfa-8	0,2-8
9	B38	Precursor de isoforma 2 de protocadherina alfa-8	0,2-7,9
10	B51	Precursor de isoforma alfa-2 de neurexina-2-beta	0,1-7,5
11	B52	Precursor de isoforma alfa-1 de neurexina-2-beta	0,1-9,2
1	C9	Citoqueratina, tipo 1	2,5-42,4
2	C10	Citoqueratina, tipo 2	3,6-63,8
3	C12	Proteína de 69 KDa	0,5-19,3
4	C16	Placoglobina de unión	0,1-8
5	C22	Vimentina	0,4-8,7
6	C32	Isoforma 1 de proteína ácida fibrilar glial	0,5-9,6
7	C33	Isoforma 3 de proteína ácida fibrilar glial	0,2-4,9
8	C34	Isoforma 2 de proteína ácida fibrilar glial	0,3-9,4

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores pancreáticos y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
1	R4	Peptidil-prolilicis-trans isomerasa	0,1-8,1
3	R18	Proteína regulada por glucosa de 78 Kda	0,1-8,6
4	R37	Proteína vehículo mitocondrial de unión a calcio	0,9-5,5
5	R53	Proteína THEMIS	0,3-9,8
6	R104	Proteína de asociación a AMY-1 expresada en testículo 1	0,1-5,1
7	R105	Isoforma 2 de la proteína Meis3 de homeocaja	0,1-6,7
8	R106	Proteína similar a acil-coenzima A oxidasa	0,1-1,3
9	R107	Proteína de unión a ARN de dedos de cinc	0-1,3
10	R108	Miembro 1C de la familia que contiene el dominio Ras-GEF	0,1-4
11	R109	Sacsina	0,3-9,9
12	R110	Hidrolasa de amida de ácido graso	0-9,5
13	R111	Subunidad catalítica de ADN polimerasa zeta	0-2,4
14	R112	Dominio N-terminal de LON peptidasa y proteína 1 de dedos de RING	1,8-8
15	R113	Preproteína de la isoforma 2 de la aciloxiacil hidrolasa	3-20,5
1	O16	HSP de 60 KDA	0-7
2	O20	Subunidades de Hb (alfa)	0,3-5
3	O21	Región de la cadena C de Iq kappa	0,2-7,4
4	O22	Proteína Tro alfa1 H, mieloma	0,35-6,5
5	O23	Región de la cadena C de Ig a-1	0,2-7
6	O24	ARNm de la proteína SNC73	0,1-12,3
7	O41	Proteína sin caracterizar	1,7-20
8	O42	Preproteína de albúmina de suero	3,8-19,3
9	O51	Subunidad delta de hemoglobina	7,8-10,6
10	O52	Subunidad beta de hemoglobina	0,2-13,5
11	O53	Subunidad gamma-1 de hemoglobina	0-4,4
12	O68	Dominio 13B de repetición de anquirina	0-2,8
13	O85	Proteína 93 que contiene repetición de WD	0,6-8,8

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores pancreáticos y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	% intervalo (n = 6)
14	O93	Homólogo de la proteína RAD52 de reparación de ADN	0-2,4
15	O99	Proteína LOC254778 hipotética	0,3-1,8
16	O101	Proteína vehículo de fosfato, precursor de la isoforma b mitocondrial	1,3-7
17	O106	Proteína 3 similar a ELAV	1,7-23,2
18	O107	Péptido señal, proteína 2 que contiene dominio similar a CUB y EGF	1,1-10
19	O108	Proteína 45 asociada a clasificación de proteína vacuolar	0-1,9
20	O109	Proteína 2B de organización del uso mitótico	2-10,9
21	O110	Subunidad 8 del complejo de partícula de proteína de tráfico	0-2,7
22	O111	Isoforma 2 del miembro 1 de la familia AF4/FMR2	0-15,1
23	O112	Isoforma a de la proteína 3 del dominio PDZ y LIM	0,2-11,4
24	O113	Isoforma 2 de la proteína 1 que contiene el dominio COBW	0,5-6
25	O114	Alfa fetoproteína	0,3-14,1

Tabla 1F: OVARIO

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de ovario y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	Porcentaje de abundancia relativa
			468
1	M19	Isoforma 4 de fibronectina	0-22,9
2	M36	Molécula 16 de adhesión celular relacionada con CEA	0,3-13,8
3	M46	Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular	0,5-9,2
1	B15	Cadena de colágeno alfa-1 (III)	0-37,7
2	B36	Isoforma 5 de la tuberina	1-13,3
3	B49	Tetraespanina-11	0,3-23,4
4	B54	Proteína 1 solo del dominio FCH	0,2-5

ES 2 660 975 T3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de ovario y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	Porcentaje de abundancia relativa
			468
5	B55	Proteína 1 del retículo sarcoplasmático de unión	0-11,5
6	B56	Claudina-10	1-12,1
1	C7	Tubulina, beta	0,1-7,8
2	C9	Citoqueratina, tipo 1	2-40,6
3	C10	Citoqueratina, tipo 2	0,7-37,1
1	R115	ARN polimerasa I dirigida por ADN	0,1-16,8
1	O8	Histona H1	0,9-7
2	O63	Proteína UPF0711	0,1-1,2
3	O69	Precursor del miembro 2 de la familia LGI de repetición rico en leucina	1-13,1
4	O74	Proteína tumoral controlada por la traducción	0,5-6,7
5	O99	Proteína LOC254778 hipotética	0-2,4
6	O116	Cadena alfa de receptor de linfocitos T (Mb11a)	0,2-8,8
7	O120	Prorrelaxina H2	0-6,9
8	O121	Interleuquina-22	0,1-12,1
9	O122	Familia 45 antigénica de cáncer/testículo	0,3-11,5

Tabla 1G: CEREBRO

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de glioblastoma y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	Porcentaje de abundancia relativa
			435
1	M15	Troponina C, músculo esquelético	1-12,8
1	B1	Cadena de colágeno alfa-1 (I)	0,6-22,8
2	B2	Cadena de colágeno alfa-2 (I)	0,3-32,5
3	B53	Homólogo C de la proteína lin-7	0,9-13,3

La tabla que sigue a continuación presenta un listado de los componentes de ECM que se han aislado a partir de tumores de glioblastoma y analizados con LCMS.

S. N°	Proteína	Nombre	Porcentaje de abundancia relativa
			435
1	C10	Citoqueratina, tipo 2	3,5-25
2	C36	Isoforma b de la proteína similar a drebrina	1,6-21,6
3	C37	Isoforma a de la proteína similar a drebrina	0,4-11,1
4	C38	Isoforma c de la proteína similar a drebrina	0,1-23,8
1	R36	Proteína vecinal del retraso mental 1 del cromosoma frágil X	1-22,7
2	R114	Proteína 1 que contiene dominio de esclerostina	0,3-25,5
3	R115	ARN polimerasa I dirigida a ADN	0,3-15,4
4	R116	R-espondina-3	1-23,4
1	O7	Histona H2	3,1-20
2	O23	Región C de la cadena de Ig a-1	1-33,4
3	O41	Proteína sin caracterizar	1,5-30,5
4			
5	O115	Región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina	0,4-13,4
6	O116	Cadena del receptor alfa de linfocitos T (Mb11a)	1,3-30
7	O117	Proteína ácida pequeña	0,6-10,3
8	O118	Proteína FAM19A5	3-9,7
9	O119	Proteína FAM220BP supuesta	0,2-18,5

En las tablas 1A a 1G mencionadas anteriormente, las proteínas con el prefijo 'B' son Proteínas de la membrana basal; las proteínas con el prefijo 'C' son Proteínas citoesqueléticas; las proteínas con el prefijo 'R' son proteínas reguladoras; las proteínas con el prefijo 'M' son Proteínas de Matriz; y las proteínas con el prefijo 'O' Son 'otras'.

5

A partir de las tablas 1A a 1G es evidente que las muestras de tumor de diferentes fuentes, en particular Cabeza y Cuello, Estómago, Páncreas, Colon, Esófago y Cerebro tienen viabilidad óptima en placas revestidas con mezcla de ECM formulada de forma específica para el tipo de tumor específico. Por lo tanto la mezcla de ECM se obtiene para cada una de las indicaciones de cáncer sólido que se usan en los explantes.

10

Proceso de Revestimiento

Por lo tanto, una vez que la mezcla de ECM específica para un tumor/cáncer se determina con los aspectos mencionados anteriormente, la mezcla de ECM para el tipo de cáncer específico se prepara añadiendo proteínas de ECM individuales y otros componentes relevantes; y los contenidos se mezclan para formar un cóctel (específico de cáncer). El revestimiento de ECM en placas de aproximadamente 96 pocillos se consigue usando /salpicaduras para revestir uniformemente los lados el pocillo. En otros casos, se añaden aproximadamente 200 µl de extracto de ECM a cada pocillo y se permite que se sequen durante aproximadamente 2 h en una incubadora a aproximadamente 37 °C. Las placas revestidas helaban tres veces con 1X de PBS estéril y se almacenan a aproximadamente -20 °C para almacenamiento largo plazo.

Ejemplo 2: Tratamiento del Explante

Los ligandos de suero autólogo y los ligandos de plasma autólogo y las PBMC autólogas se obtienen a partir del paciente de acuerdo con protocolos convencionales.

Ejemplo 2.1: La adición de ligandos de suero autólogo y revestimiento de ECM recrean el microentorno tumoral en cultivo para imitar la señalización y la viabilidad intracelular del tumor nativo

En otra realización, las Figuras 2, 3(A) y 3(B) ilustran la naturaleza del presente sistema de explantes que se diseña para imitar el microentorno del tumor del hospedador tanto como sea posible. El objetivo principal es mantener la arquitectura del tejido tumoral y aquí es cuando se hace relevante la importancia del componente de la ECM de las placas celulares. Tanto la integridad estructural como la integridad funcional son fundamentales cuando se llega a la comprensión de la biología de la red tumoral y para elucidar la respuesta o resistencia a fármacos. Además, el presente sistema se concibe de modo que tenga como objeto mantener el microentorno del tejido intacto tanto a partir de una perspectiva de señalización así como una estructural. Esto se realiza con medios de suplemento con ligandos obtenidos a partir de suero autólogo en cultivo de explante, que es importante para proporcionar factores que son parte de la red de señalización nativa. Esto es específicamente relevante cuando se llega a someter a ensayo los inhibidores de molécula pequeña o agentes terapéuticos dirigidos o incluso quimioterapias que dan señales de su acción a través de rutas específicas. Al proporcionar un entorno en el que se mantiene tanto la integridad estructural como la integridad de la señalización funcional, el presente modelo de explante muestra una mejora de la viabilidad de los explantes en cultivo y también que este modelo preclínico es clínicamente relevante.

Para mantener intactas las redes de señalización nativas se requiere el cultivo de explantes suplementado con ligandos obtenidos a partir de suero autólogo. La adición de ligandos obtenidos a partir de suero autólogo mantiene la red de señalización fundamental para imitar la en red de señalización nativa (Figura 2). Los Paneles A y B de la Figura 3 son explante cultivados en ausencia de ligandos obtenidos a partir de suero autólogo y los Paneles D Y E son explantes cultivados en medio suplementado con ligandos obtenidos a partir de suero autólogo.

Al realizar IHC para cMet [gen Transformante de MET o MNNG HOS], los explantes cultivados en presencia de ligandos obtenidos a partir de suero autólogo muestran una presencia notablemente aumentada de cMet, lo que testifica el hecho de que el medio suplementado con ligandos obtenidos a partir de suero autólogo contiene factores paracrinos fundamentales para imitar la en red de señalización nativa. La Figura 3A ilustra que las placas revestidas con componentes de la ECM específicos del tipo de cáncer proporcionan un soporte/armazón apropiado para ayudar a mantener intacta la arquitectura tisular que es fundamental para imitar el microentorno del tejido nativo. Los explantes cultivados en placas revestidas con componentes de de la ECM específicos del tipo de cáncer mejoran la viabilidad celular y proporcionan soporte/armazón para mantener la arquitectura tisular. La tinción con H y E del tejido tumoral cultivado en placas con revestimiento de ECM (paneles C y E) y sin (paneles B y D). La Figura 3B muestra que los explantes cultivados en placas revestidas con ECM junto con medio suplementado con ligandos obtenidos a partir de suero autólogo muestran una mejora de la viabilidad celular.

Ejemplo 2.2: Los ligandos autólogos y la composición de Matriz Extra Celular mantienen el microentorno y la red de señalización de tumores de paciente en cultivo

Los tumores de biopsia de pacientes con HNSCC se seccionan (~200 micrómetros) y se cultivan en placas de 96 pocillos con FBS a aproximadamente un 10 % (control) o suero autólogo a aproximadamente un 2 % y FBS a aproximadamente un 8 % (suero autólogo) en medio RPMI durante aproximadamente tres días. La viabilidad celular se mide con el ensayo de WST. El porcentaje de viabilidad celular se calcula y se presenta como representación de Box y Whisker (Figura 4(a)). La línea horizontal en la parte media de la caja indica promedio. Los límites de la parte inferior y superior son los percentiles 25° y 75° respectivamente, la representación de Whiskers en la parte inferior y superior, son los percentiles 5° y 95° respectivamente. ** $P < 0$ comparado con el control.

Los datos de IHC que muestran el efecto específico del suero autólogo en la proliferación de tumores se representa al igual que en la Figura 4(b). Las secciones de tumores se tiñen con H y E y los anticuerpos contra Ki67 Para evaluar los cambios morfológicos y la proliferación celular. El aumento de la imagen es de 20X.

La Figura 4(c) muestra los efectos de la composición de la Matriz Extra Celular en la viabilidad tumoral. La superficie interna de la placa de cultivo se reviste con gelatina, colágeno, matrigel o Matriz Extra Celular (ECM) aislada de HNSCC y las secciones de tumor se cultivan durante 3 días. La viabilidad celular se mide con WST y se calcula el porcentaje de células viables (media \pm e.t.m.). * $P < 0,01$ en comparación con control de T72 (análisis de varianza). $n = 8$. La Figura 4(d) muestra perfiles de IHC de explantes de tumor aproximadamente 3 días después del cultivo en presencia de la composición de ECM. H y E (izquierda) y Ki-67 (derecha). La puntuación de Ki-67 implica el mejor efecto de la composición de ECM en comparación con otros tipos de soporte de matriz como se indica en la Figura 4(e).

La combinación de Suero Autólogo y composición de ECM muestra mayores efectos en la proliferación que el complemento individual, Figura 4(f). Las secciones de tumor se cultivan durante aproximadamente 72 horas con control, suero autólogo (aproximadamente un 2 %), composición de ECM (aproximadamente 100 ug/ml) sola o combinación de ambos. La puntuación de Ki-67 indica el beneficio de la presencia combinada de la composición de ECM y suero autólogo en cultivo. * $P < 0,01$ comparado con el control de T72, ** $P < 0,05$ comparado con la composición de ECM sola y AS solo (análisis de varianza) $n = 5$. Los correspondientes datos de IHC en la Figura 4(g) revelan un aumento similar en células positivas para Ki-67 después de la adición de la composición de ECM y suero autólogo. Los tejidos de tumor se embeben en parafina y se seccionan (5 micrómetros) y anticuerpos anti Ki-67 teñidos.

Ejemplo 2.3: Composición de ECM y sus efectos en la viabilidad y proliferación

La composición de la Matriz Extra Celular (ECM) se reviste sobre placas antes del cultivo de tejido tumoral de acuerdo con el porcentaje de composición de los componentes de ECM indicado en la Figura 5(a). Los explantes se cultivan durante aproximadamente 72 horas en placas revestidas con diferentes dosis (1,10 y 100-g/ml) de ECM aislada de fuentes de tumor humano heterólogo. El porcentaje de viabilidad celular tumoral (media \pm e.t.m) se mide con WST. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado con el control de T0 y T72 respectivamente con ANOVA. Como se puede observar en la Figura 5(b), la ECM aumenta la viabilidad de los tumores de una manera dependiente de la dosis. El mantenimiento de toda la heterogeneidad e integridad intra-tumoral se determina mediante tinción con H y E (parte superior de la Figura 5(c)), y la proliferación de células tumorales (parte inferior de la Figura 5(c)) en entornos de explante se evalúa usando anticuerpos Ki-67. Datos representativos de 5 experimentos independientes realizados por triplicado.

Ejemplo 2.4 Comparación de los efectos de diferente Composición de ECM en proliferación y activación de cáncer

La superficie interna de la placa de cultivo se reviste con gelatina, colágeno, matrigel o Matriz Extra Celular (ECM) aislada de cáncer de colon y las secciones del tumor se cultivan durante 3 días. Los perfiles de IHC (inmunohistoquímica) de explantes tumorales mostrados en la Figura 6(a) indican que las ECM obtenidas del paciente ejercen un efecto mayor sobre la proliferación (Ki67) y la fosforilación de ERK1/2 que la proteína de matriz individual convencional. La Figura 6(b) muestra la puntuación de Ki-67 correspondiente. * $p < 0,01$ comparada con el control de T72, con ANOVA ($n = 5$). La representación de dispersión de la puntuación de Ki-67 presentada en la Figura 6(c) indica que la ECM obtenida a partir de paciente afecta de forma positiva a los explantes en múltiples experimentos independientes realizados en las mismas condiciones. Cada punto representa un experimento ($n = 33$). La línea horizontal representa el promedio de todas las muestras. *** $P < 0,001$ en comparación con el control. Los resultados mencionados anteriormente indican que el cultivo de tumor en presencia de la ECM apropiada mejora la viabilidad y la señalización del tejido tumoral para imitar el micro entorno del tumor del hospedador.

Ejemplo 3

Una vez que el tejido tumoral se obtiene a partir de la fuente de paciente o xenoinjerto, se somete a Protocolo de Explante/"Indicador de Respuesta Clínica" como sigue a continuación:

Protocolo de Explante:

1. Se generan trozos pequeños de aproximadamente 3 x 3 x 3 mm de trozo de tumor (todas de tamaño uniforme y sin masa necrótica).
2. La muestra de tumor se divide en múltiples trozos pequeños usando el Vibratomo de Leica para generar secciones de aproximadamente 100-3000 μ m y se cultiva por triplicado en placas de fondo plano 96 pocillos que previamente se han revestido con la composición de ECM apropiada.
3. Los tejidos tumorales se mantiene en el medio acondicionado de aproximadamente 2 ml (DMEM suplementado con aproximadamente un 2 % de FBS inactivado por calor junto con un 1 % de Penicilina-Estreptomicina, piruvato sódico 100 mM, aminoácido no esencial, L-glutamina 4 mM y HEPES 10 mM. El medio de cultivo se suplementa con aproximadamente un 2 % de ligandos obtenidos a partir de suero o aproximadamente un 2 % de ligandos obtenidos a partir de plasma después de 12 horas o se siembran aproximadamente 100.000 PBMC por 96 pocillo con aproximadamente un 10 % de plasma autólogo y se cultivan

durante aproximadamente 72 h a aproximadamente 37 °C con aproximadamente un 5 % de CO₂ en condiciones húmedas.

4. Cambiar el medio en el momento de la adición de suero/plasma/PBMC.

5. El medio se cambia cada 24 horas junto con suplementos.

6. Se usa en 5 µl de medio consumido para determinar viabilidad celular, metabolismo celular, muerte celular y fisiología celular del tejido tumoral.

7. Al final del periodo de cultivo que varía de aproximadamente 42 horas aproximadamente 120 horas, el tejido se evalúa para diversos parámetros. Después de este periodo, se realiza el análisis de MTT/WST para evaluar el porcentaje de viabilidad celular. El sobrenadante del medio de cultivo se retira cada 24 horas y se evalúa para proliferación (usando experimentos de utilización de ATP y glucosa) y muerte celular (mediante evaluación de ensayos de lactato deshidrogenasa y mediciones de caspasa-3 y caspasa 8) para dar las tendencias de respuesta cinética. Los resultados se cuantifican contra un control sin tratar un fármaco. La pérdida significativa de viabilidad celular/proliferación en comparación con el control sin tratar es indicativo de respuesta ha fármaco/combinación y también el aumento de la muerte celular. Las secciones de tejido tanto tratadas como sin tratar también se proporcionan para IHC y evaluación histológica al final del periodo de cultivo. Los tejidos proporcionados para evaluación histológica se evalúan para apoptosis mediante TUNEL y ensayo de caspasa 3 activada. También se evalúa la proliferación celular para marcadores de proliferación convencionales tales como Ki67. También se realiza tinción con H y E de rutina para evaluar figuras mitóticas, necrosis y características totales generales del tejido.

Ejemplo 4

Una vez que la composición de ECM se determina y se reviste sobre los pocillos, el tumor de la fuente del paciente o de xenoinjerto se somete a análisis de explante. Para generar xenoinjerto tumoral humano para análisis de explante, el tumor se implanta inicialmente en los ratones SCID y a partir de es el momento el tumor extirpado se somete a protocolo de explantes y análisis de "Indicador de Respuesta Clínica". El protocolo para lo mismo se proporciona a continuación:

Implante en Animales y Generación de Xenoinjerto de Tumor:

Preparación de la Muestra:

1. Transferir la muestra de tumor humano recién retirada en un tubo de aproximadamente 50 ml que contiene DPBS (aproximadamente 5 ML).

2. Retirar la muestra seccionar la muestra para una diversidad de experimentos.

3. Transferir la muestra restante a una placa de Petri estéril que contiene aproximadamente 2 ml de DPBS.

4. Cortar el tumor en piezas con una cuchilla de escalpelo estéril de aproximadamente del tamaño de un borrador de lápiz (aproximadamente 5 x 5 x 5 mm). Se debería tener cuidado para hacer las piezas tan uniformes como sea posible. *Preparación del Animal:*

5. Coger los animales usando una forma de sujeción convencional con los dedos índice y medio colocados alrededor del cuello y sobre las patas frontales.

6. Limpiar la superficie de los ratones SCID hembra con edades de 5-6 semanas con aproximadamente un 70 % de ETOH.

Implante demuestra en los ratones:

7. Usar ambos costados para el implante sólido en el espacio subcutáneo.

8. Después de limpiar una superficie de los ratones, éste se coloca (con el lado ventral hacia abajo) en un cono del tamaño de la nariz o con la tapa de la fábula de los ratones con el lado dorsal mirando hacia arriba.

9. Usar una gasa cuadrada saturada con aproximadamente un 70 % (vol/vol) para limpiar el área desde la parte media espinal a la base de la cola para preparar para la inserción de tumor con trócar.

10. Inmediatamente antes del implante bañar/limpiar la pieza de tumor en P/S a aproximadamente 100X.

11. Tomar la pieza sólida de tumor (aproximadamente 5 mm³) en la punta del trócar y empujarla dentro usando fórceps o escalpelo estéril sin dejar que la muestra de tumor se seque.

12. Insertar la punta del trócar en el espacio subcutáneo de los ratones horizontalmente por encima de la base de la cola, cubrir directamente el costado de introducir un bolsillo en el espacio cutáneo e insertar hacia arriba de la parte medial del lado dorsal de ambos costados (uno a la vez) a la vez que se mantiene la parte del embolo y la parte de la aguja en una sección fija y sin dañar el peritoneo.

13. Empujar el trozo de tumor individual (aproximadamente 50 mg o aproximadamente 5 mm³) en el bolsillo creado usando el trócar.

14. Retirar suavemente el trócar sin alterar el material insertado.

15. Marcar los ratones de forma apropiada usando material no tóxico (cabeza/ cuerpo/cola/sin marca, etc.).

Seguimiento del animal:

16. Devolver los ratones a la jaula una limpia.
 17. Primero se observa un tumor palpable (aproximadamente 50 mm³) y a continuación comienza el crecimiento.
 18. Supervisar los ratones diariamente y medir el crecimiento del tumor semanalmente, usando medición con pinzas como se describe a continuación. En resumen, el crecimiento del tumor se supervisa semanalmente mediante formación de imágenes bioluminiscentes o mediciones con pinzas externas (tamaño del tumor = [longitud x ancho x alto] x 0,52) durante aproximadamente 5-16 semanas.
 19. Cuando el tumor alcanza un tamaño máximo de aproximadamente 700 mm³, sacrificar el animal y retirar el tumor y seguir el mismo procedimiento.
 20. Los tumores retirados se dividen en múltiples piezas para diferentes estudios. Adicionalmente, los sitios potenciales de metástasis tales como pulmones y ganglios linfáticos, abdomen y en casos seleccionados cerebro se retiran y se ponen en formalina.
 21. Si el animal tiene un crecimiento del tumor lento, se implanta en estado inicial para rescatar el crecimiento.
 Todos los animales se sacrifican al final de 16 semanas.

Ejemplo 5

El protocolo para validar el 'Indicador de Respuesta Clínica' mediante análisis de xenoinjerto se proporciona a continuación:

Determinación de la Eficacia Terapéutica de Fármacos en Xenoinjertos de Tumor de Ratones Scid/Atímicos: Preparación del Animal:

1. Usar los ratones de P1 o paso posterior (P1 o P_N, N > 1) para estudios de eficacia.

Seguimiento y Dosificación del Animal:

2. Supervisar los ratones diariamente y medir el crecimiento del tumor semanalmente, usando medición con pinzas como se describe a continuación. El volumen del tumor se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = L \times W^2/2;$$

en la que L = longitud (mm), W = ancho (mm).

3. Cuando el tumor alcanza un tamaño de aproximadamente 150-200 mm³, dosificar los animales con el fármaco apropiado (aproximadamente 1 dosis/semana) durante aproximadamente 5 semanas. Supervisar los ratones diariamente y medir el crecimiento del tumor cada dos semanas, usando medición con pinzas como se ha descrito anteriormente.
 4. Seguir los animales durante aproximadamente 4 semanas después del tratamiento para regresión/crecimiento del tumor.
 5. Al final del estudio, sacrificar los ratones de acuerdo con el procedimiento de sacrificio convencional usando cámaras de CO₂ y recoger las muestras de tumor.

El listado detallado de fármacos que se usa para ensayo en la presente divulgación se proporciona en la Tabla 2 que sigue a continuación. El presente listado es solamente para fines ilustrativos y no es limitante ni exhaustivo.

Tabla 2: Listado de fármacos administrados en el Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica"

Tipo de Cáncer	Sub-Tipo	Combinación de Fármacos (Tratamiento de Referencia)
a) Cáncer de Cabeza y Cuello	Nasofaringe	Cisplatino
		Carboplatino y Paclitaxel
		Cisplatino y 5-FU
	SCC	Cisplatino
		Docetaxel, Cisplatino y 5-FU
		Cetuximab
	Tumor salival	Cisplatino y 5-FU

ES 2 660 975 T3

Tipo de Cáncer	Sub-Tipo	Combinación de Fármacos (Tratamiento de Referencia)
b) Cáncer colorrectal	Extirpable	Oxaliplatino, 5-FU, leucovorina
		5-FU y Leucoverina
	No Extirpable	Oxaliplatino, 5-FU, leucovorina
		5-FU y Leucoverina
		Irinotecán, 5-FU, Leucoverina
		Irinotecán, 5-FU, Leucoverina, Bevacizumab
		Irinotecán y Cetuximab
		Panitumumab
		Epirubicina, Cisplatino y Capecitabina
	Localmente Avanzado	Docetaxel, Cisplatino, 5-FU Infusional
		Epirubicina, Cisplatino y Capecitabina
	Metastásico	Docetaxel, Cisplatino, 5-FU Infusional
c) Cáncer de Estómago y Esófago	Metastásico	Epirubicina, Cisplatino y Capecitabina
	Gástrico, Gastro-esofágico (Her2+)	Herceptin
	Estroma GI	Imatinib
	Estroma GI Resistente a Imatinib	Sunitinib
d) Cáncer de Páncreas, Vesícula Biliar, Biliar	Vesícula Biliar	Cisplatino y Gemcitabina
	Colangiocarcinoma	Cisplatino y Gemcitabina
	Adenocarcinoma	Cisplatino y Gemcitabina
	Carcinoma Pancreático Extraído	5-FU y Leucoverina
	Ca-Páncreas	Erlotinib
e) Cáncer de hígado	Carcinoma Hepatocelular	Sorafenib
f) Cáncer de ovario	Cáncer de células germinales	Bleomicina, Etopósido, Cisplatino

ES 2 660 975 T3

Tipo de Cáncer	Sub-Tipo	Combinación de Fármacos (Tratamiento de Referencia)
	Ca con Recaída sensible a Platino	Trabectedina, PLD Doxorubicina
	Ca resistente a Platino	Docetaxel
	Carcinoma de tejido blando	Trabectedina, PLD Doxorubicina
	Ca avanzado (progreso/recurrencia)	Carboplatino y Gemcitabina.
	Carcinoma peritoneal	Docetaxel
	Carcinoma de Trompas de Falopio	Docetaxel
	Carcinoma epitelial con recaída	Doxirubicina (PLD) y Carboplatino.
	Ca Papilar	Carboplatino y Paclitaxel
	Peritoneal Ca	Carboplatino y Paclitaxel
	Carcinoma de Trompas de Falopio	Carboplatino y Paclitaxel
	Ca epitelial invasivo	Carboplatino y Paclitaxel
g) Cáncer de Mama	Primario	Cisplatino y Gemcitabina
		Ciclofosfamida y Paclitaxel
		Ciclofosfamida, Doxorubicina y Docetaxel
		Docetaxel y Ciclofosfamida
		Docetaxel, Ciclofosfamida, Epirubicina y Fluorouracilo
		Filgrastim, Ciclofosfamida, Doxorubicina y Fluorouracilo
		Filgrastim, Ciclofosfamida, Epirubicina y Fluorouracilo
		Gemcitabina y Docetaxel
	Her2+ primario	Trastuzumab, Ciclofosfamida, Doxorubicina y Paclitaxel
		Ciclofosfamida, Paclitaxel y Trastuzumab
		Docetaxel, Carboplatino y Trastuzumab
		Docetaxel, Trastuzumab, Fluorouracilo, Epirubicina y Ciclofosfamida
	Hormonal	Agonista de LHRH y tamoxifeno

ES 2 660 975 T3

Tipo de Cáncer	Sub-Tipo	Combinación de Fármacos (Tratamiento de Referencia)
		Tamoxifeno
	Ca-Br Inicial	Doxorrubicina y Ciclofosfamida seguido por Paclitaxel Semanalmente
Tipo de Cáncer	Sub Tipo	Combinaciones de fármacos (SOC)
Cáncer de Mama	Ca-Br de Alto riesgo	Ciclofosfamida (oral), Metotrexato y Fluorouracilo
	Localmente avanzado	Doxorrubicina y Ciclofosfamida seguido por Docetaxel (TAXOTERE).
		Ciclofosfamida, Doxorrubicina y Fluorouracilo
		Ciclofosfamida, Epirubicina y Fluorouracilo
		Ciclofosfamida, Epirubicina, Fluorouracilo y Filgrastim (G-CSF)
	Localmente avanzado (Her 2 +)	Doxorrubicina y Ciclofosfamida seguido por Docetaxel (TAXOTERE) y Trastuzumab
	Metastásico	Anastrozol
		Capecitabina
		Ciclofosfamida, Doxorrubicina y Fluorouracilo
		Docetaxel
		Docetaxel y Capecitabina
		Doxorrubicina
		Doxorrubicina y Ciclofosfamida
		Enantato
		Gemcitabina
		Gemcitabina y Paclitaxel
		Paclitaxel
		Vinorelbina
	Metastásico (Her2+)	Trastuzumab
		Trastuzumab y Docetaxel
		Trastuzumab y Paclitaxel
	Metastásico	Trastuzumab y Vinorelbina
	Metástasis ósea	Clodronato
		Pamidronato
	Ca-Br avanzado	Ciclofosfamida, Metotrexato y Fluorouracilo

Tipo de Cáncer	Sub-Tipo	Combinación de Fármacos (Tratamiento de Referencia)
		Exemestano
		Letrozol
		Megestrol
	Ca-Br avanzado (Her2+)	Trastuzumab, Paclitaxel y Carboplatino
	Ca-Br inflamatorio	Ciclofosfamida, Epirrubicina y Fluorouracilo
		Ciclofosfamida, Doxorrubicina y Fluorouracilo
		Filgrastim, Ciclofosfamida, Epirrubicina y Fluorouracilo

Ejemplo 6: Validación preclínica del sistema de explante

5 Se sabe que los xenoinjertos de tumor (HTX) generados a partir de tumores son similares al tumor del paciente y por lo tanto la lectura de la eficacia obtenida a partir de un sistema de este tipo es indicativa de respuesta del paciente a ese tratamiento. En el presente sistema de Explante, la sensibilidad de HTX cuando se trata con combinaciones de fármacos es muy similar al resultado de la respuesta del explante para el mismo tumor lo que indica que el sistema de explante de "Indicador de Respuesta Clínica" tiene un alto grado de capacidad de predicción de la respuesta de los pacientes a fármacos o combinación de fármacos. Lo mismo se ilustra con los siguientes sub-ejemplos.

10 Ejemplo 6.1: Los pasos iniciales de xenoinjertos de tumor humano mantienen las características moleculares de los tumores originales

15 Los pasos iniciales de xenoinjertos de tumor humano mantienen las características moleculares de los tumores originales. La Figura 7(A) ilustra una representación de PCA en 3D generará con el software Genespring GX para mostrar el agrupamiento firme de muestras del mismo origen y paso en serie. La representación muestra aproximadamente 6 grupos distintos que comprenden aproximadamente 4 pares de carcinoma de colon y aproximadamente 2 pares de muestras de HNSCC. El agrupamiento jerárquico de dos dimensiones sin supervisar de cáncer de colon y HNSCC se ilustra en el panel B de la Figura 7.

20 Ejemplo 6.2: El cultivo de explante tumoral obtenido a partir de pasos iniciales de xenoinjerto de tumor humano y tumor de paciente presenta un efecto antitumoral idéntico

25 El cultivo de explante tumoral obtenido a partir de pasos iniciales de xenoinjerto de tumor humano y tumor de paciente presenta un efecto antitumoral idéntico. Los explantes obtenidos a partir de tumores de donantes primarios (P0) y después de los injertos (P1 y P2) generados a partir de los mismos se tratan con TPF (Cisplatino, Docetaxel, 5FU) o DMSO [Dimetil Sulfoxido] como control. Aproximadamente setenta y dos horas después del tratamiento, la viabilidad se mide con WST y el porcentaje de inhibición de la viabilidad se calcula (media ± e.t.m.) usando el correspondiente control de DMSO como un 100 % (Figura 8a). Patrón de inmunorreactividad de Ki-67 de explantes resultantes de tumores P0 y P1, P2 después del tratamiento con TPF. El aumento de la imagen de 200X (Figura 8b). Puntuación de Ki-67 representativa que indica reducción de la proliferación de células dentro de los explantes y se mide basándose en el cálculo de células positivas para Ki-67 Ocampo (media ± e.t.m. de triplicados). **P* < 0,05, ***P* < 0,01 en comparación con el correspondiente control por ANOVA. n = 4 (Figura 8c). Los datos indican que los tumores precursores y los xenoinjertos posteriores mantienen un estado de respuesta idéntica a TPF y se encuentra que los tumores primarios que originalmente eran resistentes mantienen el mismo patrón en xenoinjertos posteriores.

40 Los efectos antitumorales de TPF y Cetuximab en cultivo de explante tumoral son similares a los de los modelos de xenoinjerto de tumor humano. Los tumores de biopsia de pacientes de HNSCC se seccionan (~200 micrómetros) y se cultivan en placas de 96 pocillos revestidas con ECM con aproximadamente un 2 % de suero autólogo y aproximadamente un 8 % de FBS en medio RPMI durante aproximadamente tres días con DMSO (Control) y Docetaxel, Cisplatino y 5-FU (TPF). La viabilidad celular se mide con WST y el porcentaje de viabilidad celular se calcula. La representación en caja en la Figura 9(a) muestra una inhibición significativa de la viabilidad en tumores tratados con TPF. ** *p* < 0,001 en comparación con el control en múltiples donantes (n = 20) mediante ensayo T para muestras emparejadas. La Figura 9(b) muestra el perfil correspondiente de IHC. Las secciones de tumor tratadas

con DMSO (control) y TPF se tiñen con H y E y Ki-67. La representación de dispersión representa muestras de explante que mostraban de manera diferencial respuesta a TPF (veces de inhibición normalizada con respecto a control de T72). Cada punto representa un experimento (n = 50). La línea horizontal representa el promedio de todas las muestras. Los pacientes que no responden tienen niveles muy bajos de inhibición en comparación con los pacientes que responden. La Figura 9(c) muestra inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*. Los mismos tumores del paciente se cultivan en ratones inmunocomprometidos. Los ratones portadores de tumor se tratan diariamente con solución salina normal (Control) y (TPF) durante 21 días. Los volúmenes tumorales se miden en los momentos indicados. Los datos son el volumen tumoral promedio \pm e.t.m. de 6 ratones por grupos. * $p < 0,001$ en comparación con el correspondiente control de vehículo. Los tumores se diseccionan, se pesan y el porcentaje de tumores residuales se calcula. Las características de IHC representativas de tumores al final del tratamiento se ilustran en la Figura 9(d). Los tumores y seccionados de ratones sacrificados de los grupos tanto de control como de TPF se embeben, se seccionan y se tiñen con H y E, Ki-67 y TUNEL como se ha indicado. Barras de escala, 50 μ m e inserciones de 100 μ m.

Los tumores de biopsia de pacientes de HNSCC se seccionan (~200 micrómetros) y se cultivan en placas de 96 pocillos revestidas con ECM con aproximadamente un 2 % de suero autólogo y aproximadamente un 8 % de FBS en medio DMEM durante tres días con DMSO (Control) y Cetuximab. La viabilidad celular se mide con WST. La representación en caja en la Figura 9(e) representa el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular en tumores tratados con Cetuximab en múltiples experimentos en comparación con los correspondientes controles (n = 20). *** $p < 0,001$ en comparación con el control en múltiples donantes calculado mediante ensayo T para muestras emparejadas. Fotografía representativa de IHC, la Figura 9(f) ilustra cambios en proliferación y morfología. Las secciones de tumor tratadas con DMSO (control) y Cetuximab se tiñen con H y E y Ki-67. La representación de dispersión representa muestras de explante que mostraban de manera diferencial respuesta a Cetuximab (veces de inhibición normalizada con respecto a control de T72). Cada punto representa un experimento (n = 40) La línea horizontal representa el promedio de todas las muestras. ** $P < 0,001$ en comparación con control. La Figura 9(g) representa la inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con Cetuximab. Los tumores de HNSCC usados para cultivo de explante de Cetuximab (e) se cultivan en ratones inmunocomprometidos y se tratan con solución salina normal (Control) o Cetuximab (Tratado) tres veces a la semana durante aproximadamente 23 días. Los volúmenes tumorales se miden en los momentos indicados. Los datos son el volumen tumoral promedio \pm e.t.m. de 10 ratones por grupos. * $p < 0,001$ en comparación con el correspondiente control de vehículo. La Figura 9(h) representa datos de IHC que resaltan los cambios moleculares similares a los de la inhibición tumoral *in vivo*. Los tumores se recogen de ratones sacrificados aproximadamente 6 horas después de la última dosis de Cetuximab. Las secciones de tumor se tiñen con H y E, Ki-67, TUNEL y pERK. Barras de escala 50- μ m, e inserciones de 100- μ m.

Ejemplo 6.3: Correlación de la plataforma de respuesta a fármaco guiada por "Indicador de Respuesta Clínica" Con eficacia *in vivo*.

Los datos obtenidos a partir de explantes tratados con TPF/cetuximab se puntúan de manera independiente para evaluar la inhibición de viabilidad, proliferación e inducción de apoptosis. La contribución relativa de cada ensayo se determina como se elabora en el Ejemplo 8. Una puntuación de respuesta de "Indicador de Respuesta Clínica" compuesta final (inhibición) se calcula integrando todos los componentes de la inhibición tumoral y correlacionándolos con los datos de inhibición del crecimiento tumoral obtenidos a partir de estudios de eficacia *in vivo* que usaron los mismos tumores de paciente individual y fármacos en HTX. . El método de coeficiente de correlación de Spearman se usa para calcular la asociación lineal. El valor de R^2 se refiere a la correlación positiva entre respuesta *in vivo* y respuesta guiada por "Indicador de Respuesta Clínica" (n = 15) (Figura 10). El nivel de inhibición tumoral observada en "Indicador de Respuesta Clínica" corresponde a la observada en el modelo de HTX.

Ejemplo 7: Ensayos usados en el protocolo de Explante

Las muestras de tumor obtenidas del paciente o la fuente de xenoinjerto se someten a partir de ese momento al análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" por medio de los siguientes ensayos para obtener la puntuación de M. El concepto de puntuación de M se elabora en el Ejemplo 7.

Ejemplo 7.1: Ensayos para determinar la viabilidad celular

a) ENSAYO DE MTT PARA MEDIR LA VIABILIDAD TISULAR DE EXPLANTE DE TUMOR SÓLIDO

Se usa la versión modificada del ensayo de MTT regular (Veira V *et al*/Max Loda Lab PNAS 2010). En resumen, los tejidos se cortan de manera precisa en secciones iguales con vibratomo (trozos de 400 micrómetros) y se cultivan en RPMI 1640 [RPMI - Roswell Park Memorial Institute] a una concentración que varía de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 100 %, preferentemente a aproximadamente un 80 %; hasta 72 horas. La viabilidad tisular se evalúa usando un ensayo de MTT 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán (Sigma Aldrich) en el momento T0 y también en T72. Los trozos de tejidos se incuban con 5 mg/ml de MTT a 37 °C durante 4 horas, se cosechan, y se extraen con sal precipitada por incubación con HCl 0,1 M-alcohol isopropílico a temperatura ambiente durante 25 min. Un valor de la viabilidad se determina dividiendo la densidad óptica del formazán a 570 nm entre el peso seco de los explantes. Las muestras del valor inicial (T0) se usan como elementos de calibración (13) para normalizar la

variación inter muestra en lecturas de absorbancia, y la viabilidad tisular se expresa como un porcentaje de viabilidad con respecto a muestras en T0. Para diferentes tipos de cáncer, los trozos de tejido en explante se incuban con medio que contiene diferentes fármacos a concentración en plasma máxima hasta 72 horas. Los medios que contienen fármacos se cambian cada 24 horas y MTT se realiza en el momento T72 y T0 como es habitual. Para evaluar la eficacia del fármaco, la viabilidad tisular al final del periodo de estudio se clasifica con respecto a la viabilidad tisular en el momento T0 en el que el tejido no se expone a ningún fármaco.

b) ANÁLISIS DE WST

En resumen, los tejidos se cortan de forma precisa en secciones iguales con vibratomo (trozos de 400 micrómetros) y se cultivan en RPMI 1640 [RPMI - Roswell Park Memorial Institute] a una concentración que varía de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 100 %, preferentemente a aproximadamente un 80 %; hasta 72 horas. La viabilidad tisular se evalúa usando un ENSAYO de WST. Al final del periodo de incubación de 72 horas, se añaden 400 µl de CCK-8 (8 de recuento celular, Dojindo Laboratories, Japón) acaba uno de los pocillos la incubación continuó durante otras 3 h a 37 °C/CO₂ al 5 %. Durante la incubación la placa se agitaba suavemente dentro de la incubadora a aproximadamente 90 rpm en el agitador de micro placas. Al final de aproximadamente 3 h de incubación, los trozos de tejido se retiran con cuidado a los respectivos tubos con formalina al 10 % y se someten a los estudios inmunohistoquímicos. En paralelo, la absorbancia se mide a 450 nm usando un lector de micro placas (Bio-Rad, USA).

c) ENSAYO DE UTILIZACIÓN DE ATP

El 5'-trifosfato de adenosina (ATP) es una molécula fundamental en la clínica de todos los organismos vivos Y se usa para controlar muchos procesos biológicos. La utilización de ATP se estudia usando el Kit de Ensayo de ATP StayBrite™ (BioVision). Un método preciso, fiable para detectar niveles mínimos de ATP es el de Luciferasa/Luciferina. El ensayo está totalmente automatizado para alto rendimiento (1 s/muestra) y es extremadamente sensible y es ideal para detectar la producción de ATP.



Curva Patrón: para calcular el contenido de ATP absoluto en las muestras, se genera una curva patrón de ATP. Añadir aproximadamente 10 µl de solución de reserva de ATP a aproximadamente 990 µl de tampón de lisis para preparar una solución de ATP a aproximadamente 10⁻⁴ M, en un tubo etiquetado como S1, a continuación preparar aproximadamente 3 - 5 más diluciones de 10 veces (es decir, aproximadamente 10 µl + aproximadamente 90 µl de Tampón de Lisis para generar S2, S3, S4, que contienen ATP a aproximadamente 10⁻⁵ M, aproximadamente 10⁻⁶ M, aproximadamente 10⁻⁷ M, etc.).

Medición: Añadir aproximadamente 10 µl de muestra o patrón en placas de 96 pocillos. Añadir aproximadamente 90 µl de la Mezcla de Reacción preparada en los pocillos, mezclar, a continuación hacer una lectura de la luminiscencia (L). (aproximadamente 10 µl de ATP 10⁻⁴ M proporcionan aproximadamente 1 nmol por pocillo, aproximadamente 10 µl de ATP 10⁻⁷ M proporcionan aproximadamente 1 pmol por pocillo, etc.). Para corregir la luminiscencia de fondo, en primer lugar añadir aproximadamente 90 µl de Mezcla de Reacción solo, hacer la lectura de la luminiscencia de fondo (BL), y a continuación añadir aproximadamente 10 µl de muestra o patrón en los pocillos, mezclar, y hacer una lectura de la luminiscencia total (L).

Cálculos: Corregir el fondo restando BL de cada lectura de L para muestras y patrones. Representar la curva patrón. La cantidad de ATP en los oficios de muestra se calcula a partir de la curva patrón usando regresión lineal. La concentración de ATP en las muestras y recalculando usando la siguiente fórmula:

$$C = Sa/Sv \text{ (pmol/}\mu\text{l o nmol/ml, o }\mu\text{M)}$$

En la que: Sa es la cantidad de la muestra (en pmol) de la curva patrón.
Sv es el volumen de la muestra (en µl) añadida a los pocillos de muestra.
Peso molecular del ATP: 507,18 g/mol.

d) ENSAYO DE GLUCOSA (MÉTODO DE GOD-POD)

Se toman aproximadamente 2 µl de sobrenadante de cada pocillo de la placa de ensayo y se añaden a una placa de 96 pocillos. Como patrón, del mismo modo se añaden aproximadamente 2 µl de reactivo patrón de Glucosa (Conc 100 mg/dl) a la placa de 96 pocillos por triplicado. A estos pocillos se les añaden aproximadamente 200 µl de reactivo de Glucosa (Medsorce Ozone) y se incuban durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente. Las absorbancias se miden a aproximadamente 490 nm usando el lector de placas BioRad. Los gráficos se representan y se analizan usando el software Graph Pad Prism.

Ejemplo 7.2: Ensayos para determinar la muerte celular

e) ENSAYO DE LACTATO DESHIDROGENASA

5 La evaluación de la lactosa deshidrogenasa se realiza usando el Kit de Ensayo de Citotoxicidad de LDH (Cayman). En la primera etapa, LDH cataliza la reducción de NAD^+ en NADH y H^+ por oxidación del lactato a piruvato. En la segunda etapa de la reacción, la diaforasa usa el NADH y H^+ recién formados para catalizar la reducción de una sal de tetrazolio (INT) en formazán altamente coloreado que absorbe fuertemente a 490-520 nm. La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de LDH liberado en el medio de cultivo como resultado de la citotoxicidad.

Preparación de la placa: Cada placa debería contener una curva patrón, pocillos sin células, y pocillos que contienen células con tratamiento o vehículo experimental.

15 Las placas de tejido de 96 pocillos se centrifugan a aproximadamente 400xg durante cinco minutos. Usando una placa de 96 pocillos nueva, transferir aproximadamente 100 μl de los patrones preparados anteriormente en los pocillos apropiados. Transferir aproximadamente 100 μl de cada sobrenadante de cada pocillo de las células cultivadas a los correspondientes pocillos en la nueva placa. Añadir aproximadamente 100 μl de Solución de Reacción a cada pocillo usando una pipeteadora de repetición. Incubar la placa con agitación suave en un agitador orbital durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Leer la absorbancia a temperatura ambiente. Leer la absorbancia a aproximadamente 490 nm con un lector de placas.

25 Cálculos: Los valores de absorbancia promedio de los potrillos que contienen medio tampón de ensayo solamente (los blancos) se restan de los valores de absorbancia de todos los demás pocillos. Una curva patrón se representa para absorbancia a 490 nm como una función de la concentración de LDH y la ecuación de la línea se determina. La determinación de la actividad de LDH presente en la muestra se calcula usando la fórmula que sigue a continuación:

$$\text{Actividad de LDH } (\mu\text{U}) = \frac{(A_{490 \text{ nm}} - \text{intersección con y})}{\text{pendiente}}$$

$$\text{Actividad de LDH Total } (\mu\text{U/ml}) \text{ en la muestra} = \frac{\text{Valor del ensayo de actividad de LDH } (\mu\text{U})}{\text{x volumen de muestra sometido a ensayo (normalmente 0,1 ml)}}$$

f) ENSAYO DE CASPASA-3

30 El Kit de Ensayo Fluorométrico de Proteasa de CPP32/Caspasa-3 (BioVision) se usa para evaluar la actividad de la caspasa dependiente de DEVD. El ensayo se basa en la detección de la escisión del sustrato DEVD-AFC (AFC: 7-amino-4-trifluorometil cumarina). El DEVD-AFC emite luz de color azul (λ máx = 400 nm); después de la escisión del sustrato con CPP32 o caspasas relacionadas, la AFC libre emite una fluorescencia de color amarillo-verde (λ máx = 505 nm), que se cuantifica usando un fluorómetro o un lector de placas de microtitulación de fluorescencia. La comparación de la fluorescencia de AFC de una muestra apoptótica con un control no inducido permite la determinación del número de veces de aumento en la actividad de caspasa-3/ CPP32.

Procedimiento de Ensayo

- 40
1. Inducir apoptosis en células con el método deseado. De forma simultánea incubar un cultivo de control sin inducción.
 2. Hacer el recuento de células y sedimentar aproximadamente 1-5 x aproximadamente 10^6 células o usar aproximadamente 20-200 μg de lisados celulares (dependiendo del nivel de apoptosis).
 - 45 Para muestras de tejido, el tejido se homogeneiza en Tampón de Lisis (para 1X volumen de tejido, añadir aproximadamente 3X volúmenes de tampón de lisis) para generar lisado tisular, a continuación seguir el procedimiento del kit. 3. Volver a suspender las células en aproximadamente 50 μl de Tampón de Lisis Celular enfriado.
 4. Incubar las células en hielo durante aproximadamente 10 minutos.
 - 50 5. Añadir aproximadamente 50 μl de 2X de Tampón de Reacción (que contiene DTT 10 mM aproximadamente) a cada muestra.
 6. Añadir aproximadamente 5 μl de sustrato de DEVD-AFC 1 mM aproximadamente (concentración final 50 μM aproximadamente) incubar aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 1-2 horas.
 - 55 7. Leer las muestras en un fluorómetro equipado con un filtro de excitación de 400 nm y un filtro de emisión de 505 nm. Para una preparación de lectura de placas, transferir las muestras a una placa de 96 pocillos. También se puede realizar todo el ensayo directamente en una placa de 96 pocillos. El número de veces de aumento de la actividad de CPP32 se determina comparando sus resultados con el nivel del control sin inducir.

g) ENSAYO DE CASPASA-8

El Kit de Ensayo de Fluorométrico de FLICE/Caspasa-8 (BioVision) se usa para evaluar la actividad de las caspasas que reconocen la secuencia de IETD. El ensayo se basa en la detección de la escisión del sustrato IETD-AFC (AFC: 7-amino-4-trifluorometil cumarina). El IETD-AFC emite luz de color azul (λ máx = 400 nm); después de la escisión del sustrato con FLICE o caspasas relacionadas, la AFC libre emite una fluorescencia de color amarillo-verde (λ máx = 505 nm), que se cuantifica usando un fluorómetro o un lector de placas de microtitulación de fluorescencia. La comparación de la fluorescencia de AFC de una muestra apoptótica con un control no inducido permite la determinación del número de veces de aumento en la actividad de FLICE.

Procedimiento de Ensayo

1. Inducir apoptosis en células con el método deseado. De forma simultánea incubar un cultivo de control sin inducción.
2. Hacer el recuento de células y sedimentar aproximadamente 1-5 x aproximadamente 10^6 células o usar aproximadamente 50-200 μ g de lisados celulares si se ha medido la concentración de proteína.
3. Volver a suspender las células en aproximadamente 50 μ l de Tampón de Lisis Celular enfriado. Incubar las células en hielo durante aproximadamente 10 minutos.
4. Añadir aproximadamente 50 μ l de aproximadamente 2X de Tampón de Reacción (que contiene DTT 10 mM aproximadamente) a cada muestra. Añadir aproximadamente 5 μ l de sustrato de IETD-AFC 1 mM aproximadamente (concentración final 50 μ M). Incubar a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 1-2 horas.
5. Leer las muestras en un fluorómetro equipado con un filtro de excitación de 400 nm y un filtro de emisión de 505 nm. Para una preparación de lectura de placas, transferir las muestras a una placa de 96 pocillos. También se puede realizar todo el ensayo directamente en una placa de 96 pocillos. El aumento de veces en la actividad de FLICE se puede determinar comparando estos resultados con el nivel del control sin inducir.

Ejemplo 7.3: Ensayos para Determinar la Senescencia Celular

h) SENESENCIA ASOCIADA CON TINCIÓN DE BETA-GAL

En el caso de secciones de tejido, tejido congelado de forma instantánea en nitrógeno líquido (LN2) embebido en compuesto con temperatura de corte óptima (OCT) se monta en portaobjetos supercongelados. A continuación las células se incuban a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 20 h con solución de tinción (fosfato sódico y ácido cítrico aproximadamente a 40 mM, pH 6,0, aproximadamente 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-isolil-b-D-galactósido [X-gal, Fisher], ferricianuro potásico a aproximadamente 5 mM, ferricianuro potásico a aproximadamente 5 mM NaCl, aproximadamente 150 mM, $MgCl_2$ aproximadamente 2 mM). Después de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se visualizan con microscopio de campo brillante para tinción de color azul.

Ejemplo 7.4: Ensayos para Evaluación Histológica/ Ensayos de IHC

i) ANÁLISIS INMUNO-HISTOQUÍMICO (IHC)

El tumor se fija en formalina tamponada a aproximadamente un 10 % y se embebe en parafina. Las secciones de tumor se cortan (aproximadamente 5 μ m) y se desparafinizan en xileno seguido por rehidratación en calidades decrecientes de etanol. Las secciones se tiñen con Hematoxilina y Eosina (H y E). La retirada del antígeno se realiza en Solución de Desensambramiento de Antígeno Vector® (basado en Citrato, Vector Laboratories) mediante exposición a microondas calentando durante aproximadamente 30 min. Se permite que las porciones se enfríen y posteriormente se lavan en solución salina tamponada con Tris. La inactivación de la peroxidasa endógena se realiza mediante incubación de las secciones en H_2O_2 a aproximadamente un 3 % durante aproximadamente 15 min. El bloqueo de la proteína se realizará a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h con suero de cabra a aproximadamente un 10 %. Las etapas de incubación posteriores van seguidas por lavados en solución Salina Tamponada con Tris (TBS). Las secciones se incuban con anticuerpo primario en las condiciones mencionadas anteriormente seguido por incubación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Reactivo de Detección de IHC de Refuerzo SignalStain®; Cell Signaling Technology) durante 1 h a TA. El desarrollo cromogénico de la señal se realiza usando 3,3'-diaminobencidina (Kit de Sustrato de Peroxidasa DAB; Vector Laboratories). Se hace una contra tinción de los tejidos con Hematoxilina (solución de Papanicolaous 1a; Merck).

El fosfo-AKT monoclonal de conejo (Ser473; D9E XPTM) y el de Fosfo-AMPKa(Thr172) (clon 40H9, Cell Signaling Technology) se usan a una dilución de aproximadamente 1:50 y aproximadamente 1:100 respectivamente para incubación durante la noche a aproximadamente 4 °C. La Proteína Ribosómica fosfo-S6 monoclonal de conejo (pS6RP) (Ser235/236; D57.2.2E XPTM) y fosfo-PRAS40 (Thr246, C77D7) se obtienen en Cell Signaling Technology y se usan a una dilución de aproximadamente 1:200 a la incubación durante la noche a aproximadamente 4 °C; el GLUT1 policlonal de conejo (Abcam) se usa a una dilución de aproximadamente 1:200 para incubación durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente (TA) que varía de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 35 °C;

el Ki67 policlonal de conejo (Vector Laboratories) se usa a una dilución de aproximadamente 1:600 durante aproximadamente 1 h TA. La inducción de la apoptosis se detecta mediante tinción para Caspasa 3 escindida usando anticuerpo (policlonal de conejo, Cell Signaling Technology) de Caspasa 3 anti-escindida policlonal (Asp175) a una dilución de aproximadamente 1:600 durante aproximadamente 1 h a TA. El control de isotipo de IgG emparejados se usa para cada anticuerpo primario. Cada portaobjetos se examina independientemente por los expertos y la puntuación/clasificación se realiza de acuerdo con la fórmula de puntuación de H.

j) TINCIÓN PARA INMUNOHISTOQUÍMICA DE TEJIDOS FIJADOS - FOSFO ERK/ FOSFO EGFR

El principio básico que respalda esta técnica es la reacción de antígeno-anticuerpo que se amplifica y se visualiza. El antígeno diana puede ser físicamente inaccesible para el anticuerpo debido al tratamiento de la proteína causado durante la fijación. Esto se supera con un procedimiento denominado retirada de antígeno, en el que se usa calor para alterar el plegamiento de la proteína y los antígenos se llegan a hacer más accesibles. La inactivación de la peroxidasa endógena, bloqueo de proteína y bloqueo de biotina endógena son etapas importantes para evitar la tinción de fondo y la unión no específica. Este protocolo estandarizado usa sistema de detección de tres capas que implica al anticuerpo primario (normalmente mAb de conejo/ratón) que se une al antígeno diana; anticuerpo secundario biotinilado (normalmente IgG anti-conejo de cabra) que se une al anticuerpo primario; y el complejo de avidina y biotina (ABC; peroxidasa de rábano picante biotinilada que se une a la avidina para formar un complejo) que se dirige a la biotina unida al anticuerpo secundario. Los anticuerpos ayudan en la detección del antígeno y la amplificación de la señal. La enzima peroxidasa, que está presente en ABC, cataliza una reacción en la que DAB (3,3'-diaminobencidina) produce un precipitado de color marrón que se puede visualizar con un microscopio, detectando por último el antígeno diana.

Procedimiento:

1. La Desparafinización y la Rehidratación se realizan como se muestra a continuación:

a. Xileno - 2 lavados - 6 min cada uno	}	Desparafinización
b. Etanol al 100 % - 1 lavado - 3 min	}	Desxilenización
c. Etanol al 90 % - 1 lavado - 3 min		
d. Etanol al 70 % - 1 lavado - 3 min		
e. Agua corriente (del grifo) 10 min	}	Rehidratación
f. Agua destilada - 1 lavado - 5 min		

2. Esto va seguido por la retirada del antígeno

a. Preparar: aproximadamente 600 ml de agua destilada + aproximadamente 5,6 ml de Solución de Desenmascaramiento de Antígeno (Vector Labs N.º H-3300) en un vaso de precipitados de 1 l.

b. Empapar los portaobjetos en la solución durante aproximadamente 10 minutos.

c. Calentar el microondas los contenidos del vaso de precipitados y los portaobjetos como sigue a continuación:

M-Bajo	: aproximadamente 5 min
Medio	: aproximadamente 5 min
M-Elevado	: aproximadamente 5 min
Elevado	: aproximadamente 5 min

d. Enfriar los portaobjetos a temperatura ambiente colocando el vaso de precipitados en un baño lleno con agua corriente.

e. Lavar los portaobjetos con agua destilada aproximadamente 4 veces durante aproximadamente 5 min cada lavado (Tarro de Coplin).

f. Lavar los portaobjetos en 1X de PBS durante 5 min (Tarro de Coplin).

3. Se realiza inactivación de la peroxidasa endógena

a. Preparación recién producida: aproximadamente 9 ml de H₂O₂ (30 %) + aproximadamente 75 ml de Agua destilada

b. Incubar los portaobjetos en solución de H₂O₂ durante aproximadamente 15 min (Tarro de Coplin).

c. Lavar los portaobjetos en agua corriente del grifo durante aproximadamente 2 min.

d. Lavar los portaobjetos en 1X de PBS durante aproximadamente 7 min (Tarro de Coplin).

e. Rodear el tejido usando un lápiz de Pap hidrófobo (esto se realiza para mantener el volumen de los anticuerpos tan pequeño como sea posible).

4. Se realiza bloqueo de proteína. Esta etapa y las posteriores requieren en una cámara humidificadora (una bandeja con papel de filtro Whatman húmedo).

ES 2 660 975 T3

- a. Preparar suero de cabra aproximadamente al 10 % (250 µl de suero de cabra + 2,5 ml de 1X de PBS)
b. Añadir aproximadamente 75 µl de suero de cabra a cada sección de tejido e incubar durante aproximadamente 1 hora.
c. Descartar el suero. No se requiere lavado.
- 5
5. Se realiza el Bloqueo de Avidina/Biotina (obtenido en Vector Labs N.º SP2001)
- a. Distribuir las cantidades requeridas de Avidina y Biotina en dos tubos Eppendorf.
b. Añadir aproximadamente 75 µl de Avidina a cada sección de tejido e incubar durante aproximadamente 15 min.
c. Descartar la Avidina y aclarar los portaobjetos en 1X de PBS brevemente (Tarro de Coplin).
d. Añadir aproximadamente 75 µl de Biotina a cada sección de tejido e incubar durante aproximadamente 15 min.
e. Aclarar los portaobjetos en 1X de PBS brevemente (Tarro de Coplin).
- 10
6. Se añade Anticuerpo Primario
- a. Preparar Fosfo-Erk/Fosfo-EGFR a aproximadamente 1:200 (obtenido en Cell Signalling Technology N.º 4370/N.º2237) con 1X de PBS.
b. Añadir aproximadamente 75 µl a cada sección de tejido e incubar durante aproximadamente 1 hora.
c. Lavar los portaobjetos tres veces en 1X de PBS durante aproximadamente 3 min cada lavado (Tarro de Coplin).
- 15
7. Esto va seguido por la Anticuerpo Secundario
- a. Preparar IgG anti-Conejo de Cabra a 1:1000 (Vector Labs N.º BA-1000) con 1X de PBS.
b. Añadir aproximadamente 75 µl a cada sección de tejido e incubar durante aproximadamente 30 min.
c. Lavar los portaobjetos tres veces en 1X de PBS minuciosamente durante aproximadamente 5 min cada lavado (Tarro de Coplin).
- 20
8. Se añade Reactivo ABC (obtenido en Vector Labs; IgG de Cabra y Peroxidasa Kit de Vectastáina ABC N.º PK-4005)
- a. Preparar el reactivo: aproximadamente 1 gota de solución A + aproximadamente 1 gota de solución B + aproximadamente 2,5 ml de 1X de PBS. Incubar el reactivo durante aproximadamente 30 min antes de su uso a temperatura ambiente. Cualquier cantidad extra se puede almacenar a aproximadamente 4 °C hasta un mes.
b. Añadir aproximadamente 75 µl de reactivo a cada sección de tejido e incubar durante aproximadamente 30 min.
c. Lavar los portaobjetos tres veces en 1X de PBS durante aproximadamente 5 min cada lavado (Tarro de Coplin).
- 25
- 30
- 35
- 40
9. Sustrato de DAB (Vector Labs N.º SK4100)
Las siguientes etapas se deben realizar en una habitación oscura.
- a. Preparación sustrato de DAB recién preparado: aproximadamente 1 gota de Tampón + aproximadamente 2 gotas de DAB + aproximadamente 1 gota de H₂O₂ en aproximadamente 2,5 ml de agua bidestilada.
b. Añadir aproximadamente 75 µl del reactivo a cada sección de tejido y observar con el microscopio para decidir el tiempo de exposición apropiado.
c. Descartar el reactivo en solución de permanganato potásico y lavar los portaobjetos en agua corriente.
- 45
- 50
10. Los portaobjetos se someten a contratinción usando Hematoxilina
- a. Sumergir los portaobjetos 2-3 veces en hematoxilina.
b. Lavar los portaobjetos en agua corriente del grifo durante aproximadamente 5 min.
c. Lavar los portaobjetos en una solución de carbonato de litio a aproximadamente un 1 % durante aproximadamente 30 segundos.
d. Etanol al 70 % - 1 lavado - aproximadamente 3 min
e. Etanol al 95 % - 1 lavado - aproximadamente 3 min
f. Etanol al 100 % - 2 lavados - aproximadamente 3 min
g. Xileno - 2 lavados - aproximadamente 3 min
- 55
- 60
11. El montaje de los portaobjetos se realiza con DPX (obtenido en Merck N.º 61803502501730)
- a. Montar los portaobjetos con cubreobjetos limpios usando DPX y dejarlos secar.
b. Marcar de forma apropiada.
- 65

k) TINCIÓN DE TUNEL DE TEJIDOS FIJADOS

El marcado del extremo libre por dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) es un método para detectar la fragmentación del ADN mediante marcado del extremo terminal de ácidos nucleicos. El TUNEL se usa para detectar la fragmentación del ADN que resulta de las cascadas de señalización apoptóticas. El ensayo se basa en la presencia de muescas en el ADN que se pueden identificar mediante desoxinucleotidil transferasa terminal o TdT, una enzima que catalizará la adición de los dUTP que están marcados de forma secundaria con un marcador. También puede marcar células que hayan sufrido daño severo en el ADN.

10 Procedimiento:

1. La primera etapa implica desparafinización y rehidratación

a. Xileno - 2 lavados - 6 min cada uno	}	Desparafinización
b. Etanol al 100 % - 1 lavado - 3 min	}	Desxilenización
c. Etanol al 90 % - 1 lavado - 3 min		
d. Etanol al 70 % - 1 lavado - 3 min		
e. Agua corriente (del grifo) 10 min	}	Rehidratación
f. Agua destilada - 1 lavado - 5 min		

15

2. Esto va seguido por la retirada del antígeno

- a. Preparar Proteinasa K a aproximadamente 1:1000 (Qiagen N.º 19131) con 1X de PBS.
- b. Añadir aproximadamente 50 µl a cada sección de tejido e incubar durante 1 aproximadamente 5 min.
- c. Lavar los portaobjetos en dH₂O dos veces durante aproximadamente 2 min cada lavado (Tarro de Coplin).

20

3. La inactivación se realiza con peroxidasa endógena

- a. Preparación recién producida: aproximadamente 7,5 ml de H₂O₂ (30 %) + aproximadamente 67,5 ml de agua destilada
- b. Incubar los portaobjetos en solución de H₂O₂ durante aproximadamente 5 min (Tarro de Coplin).
- c. Lavar los portaobjetos en agua corriente del grifo durante aproximadamente 2 min.
- d. Lavar los portaobjetos en 1X de PBS dos veces durante aproximadamente 5 min (Tarro de Coplin).
- e. Rodear el tejido usando un lápiz de Pap hidrófobo (esto se realiza para mantener el volumen de anticuerpos/reactivos tan pequeño como sea posible).

25

30

4. A continuación sigue tratamiento con tampón de equilibrio. Esta etapa y las etapas posteriores requieren una cámara humidificada (una bandeja con papel de filtro Whatman húmedo).

35

- a. Añadir aproximadamente 13 µl de tampón de equilibrio a cada sección de tejido e incubar durante al menos aproximadamente 10 segundos (es correcto hasta aproximadamente 60 min).
- b. Descartar el reactivo. No se requiere lavado.

40

5. Se añade la enzima TdT

- a. Diluir la enzima TdT en tampón de reacción en la proporción de aproximadamente 3:7 (por ej: aproximadamente 30 µl de TdT en aproximadamente 70 µl de tampón de reacción).
- b. Añadir aproximadamente 15 µl a cada sección de tejido e incubar durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 37 °C en una cámara humidificada.
- c. Descartar el reactivo.

45

6. Se añade Tampón de Parada/Lavado

- a. Preparar tampón de Parada/Lavado añadiendo aproximadamente 1 ml de tampón de reserva a aproximadamente 34 ml de dH₂O.
- b. Colocar los portaobjetos en el tampón y agitar durante aproximadamente 15 segundos. Incubar durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente.
- d. Lavar los portaobjetos tres veces en 1X de PBS durante aproximadamente 1 min cada lavado (Tarro de Coplin).
- e. Retirar una alícuota de Conjugado de Anti-digoxigenina y colocar a temperatura ambiente.

50

55

7. Se añade Conjugado de Anti-digoxigenina

- 5 a. Añadir 15 µl de conjugado de Anti-digoxigenina a cada sección de tejido e incubar en una cámara humidificada durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente.
b. Lavar los portaobjetos aproximadamente cuatro veces en 1X de PBS durante aproximadamente 2 min cada lavado (Tarro de Coplin).

8. Los portaobjetos se tratan con sustrato de peroxidasa: DAB

- 10 a. Preparar sustrato de DAB - dilución a aproximadamente 1:50 con tampón de dilución de DAB.
b. Añadir aproximadamente 15 µl de reactivo a cada sección de tejido e incubar durante aproximadamente 3-6 min.

15 Observar al microscopio para determinar el tiempo de exposición apropiado.

- c. Lavar los portaobjetos tres veces en dH₂O durante aproximadamente 1 min cada lavado (Tarro de Coplin).
d. Incubar los portaobjetos en dH₂O durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente.

9. Se realiza contratinción usando verde de metilo

- 20 a. Hacer contratinción en verde de metilo a aproximadamente un 0,5 % durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente.
b. Lavar los portaobjetos con aproximadamente 3 cambios de dH₂O en un tarro de Coplin, sumergir el portaobjetos aproximadamente 10 veces cada una en el primer y segundo lavados, seguido por
25 c. Lavar los portaobjetos con 3 cambios de N-Butanol al 100 % en un tarro de Coplin, sumergir el portaobjetos aproximadamente 10 veces cada una en el primer y segundo lavados, seguido por aproximadamente 30 segundos sin agitación en el tercer lavado.

30 10. Montaje

- a. Deshidratar el tejido colocándolo en aproximadamente 2 cambios de Xileno, incubándolo durante aproximadamente 2 min en cada tarro.
35 b. Montar con un cubre objetos de vidrio usando DPX (Merck N.º 61803502501730).

40 I) LA TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA (H Y E) es un método de tinción popular en Histología. La H y E se realiza de forma rutinaria para evaluar figuras mitóticas, necrosis y características totales generales del tejido. El ensayo de tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E) también se usa para determinar el contenido del estroma tumoral.

Ejemplo 7.4: Ensayos para Proliferación Celular.

45 El ensayo de IHC también se usa para los ensayos para marcadores de proliferación convencionales tales como Ki67 y PCNA para determinar la proliferación celular.

Ejemplo 7.6: Ensayos para Ácido nucleico.

50 El aislamiento de ácido nucleico se evalúa adicionalmente en análisis de micromatriz de ARN y ARNmi y análisis genético para mutaciones específicas solamente para muestras seleccionadas. La secuenciación de exoma también se puede realizar ADN solamente para muestra seleccionadas. La formación de perfiles genéticos se usa en casos seleccionados para comprender la biología de un tumor y no como parte del "Indicador de Respuesta Clínica".

m) PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL DE TEJIDOS

55 La purificación del ARN total de tejidos se realiza de acuerdo con el kit de extracción de ARN de Qiagen.

1. Retirar tejidos estabilizados posteriormente de ARN a partir del reactivo usando pinzas.
2. Usar aproximadamente 30-50 mg de tumor.
3. Colocar el tejido pesado en un tubo de aproximadamente 1,2 ml, añadir aproximadamente 350 µl de tampón de RLT al tejido, homogeneizar inmediatamente en un microdesmembrador de tejido aproximadamente 3000 rpm durante aproximadamente 60 segundos.
60 4. Recoger el lisado en un tubo separado, centrifugar durante aproximadamente 3 min a velocidad máxima. Retirar con cuidado el sobrenadante mediante pipeteo, y transferirlo a un nuevo tubo de micro centrifugadora.
5. Añadir aproximadamente 1 volumen (aproximadamente 350 µl) de etanol a aproximadamente un 70 % al lisado aclarado, y mezclar inmediatamente mediante pipeteo.
65

6. Transferir la muestra a una columna de centrifugación RNeasy colocada en un tubo de recogida de aproximadamente 2 ml. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante aproximadamente 15 s a aproximadamente 10000 rpm. Descartar el flujo continuo.

7. Añadir aproximadamente 350 µl de tampón RW1 a la columna de centrifugación RNeasy. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante aproximadamente 15 s a aproximadamente 10000 rpm. Descartar el flujo continuo.

8. Añadir aproximadamente 10 µl de soluciones de reserva de DNasa 1 aproximadamente 70 µl de tampón de RDD. Mezclar volteando el tubo suavemente.

9. Añadir aproximadamente 80 µl de mezcla de incubación de DNasa 1 a la membrana de la columna de centrifugación RNeasy, incubar durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente.

10. Añadir aproximadamente 350 µl de tampón de RW1 a la columna de centrifugación RNeasy. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante aproximadamente 15 s a aproximadamente 10000 rpm. Descartar el flujo continuo

11. Añadir aproximadamente 500 µl de tampón de RPE a la columna de centrifugación RNeasy. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante aproximadamente 15 s a aproximadamente 10000 rpm. Descartar el flujo continuo.

12. Añadir aproximadamente 500 µl de tampón de RPE a la columna de centrifugación RNeasy. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante aproximadamente 2 min a aproximadamente 10000 rpm. Descartar el flujo continuo.

13. Colocar la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo de recogida de 2 ml y descartar el tubo de recogida viejo con el flujo continuo. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar a velocidad máxima durante aproximadamente 1 min

14. Colocar la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml. Añadir aproximadamente 35 µl de agua sin RNasa directamente a la membrana de la columna de centrifugación. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante aproximadamente 1 min a aproximadamente 10000 rpm

15. Eluir el ARN y almacenar aproximadamente -80 °C.

n) AISLAMIENTO DE ARN TOTAL Y MICROMATRIZ

La biopsia de núcleo estabilizada posteriormente de ARN y las correspondientes muestras de xenoinjerto de tumor humano se lisan usando un micro-desmembrador (Sartorius) de acuerdo con el procedimiento de operación convencional. El ARN total aislado de tejidos pulverizados se evalúa posteriormente para integridad con bioanalizador y Nanodrop.

La micromatriz de ARN de tumor (ARNc) se realiza usando la plataforma del sistema de Micromatrices Sure Print G3 Human GE 8x60K de Agilent (Agilent Technologies). Para la micromatriz de ARN se usa un valor de RIN superior a aproximadamente 7 como punto de corte. Aproximadamente alrededor de 200 ng de ARN extraído de muestras de tumor o control emparejado se transcriben por último de forma inversa para generar ARNc amplificado y marcado con cy3/cy5 y se forman perfiles usando Kits y plataforma de Agilent (Agilent Technologies). Los datos de la matriz se normalizan usando el software de extracción Feature y el software Gene-Spring de Agilent. Además el análisis estadístico se realiza usando el software apropiado para este estudio. Los datos expresados como veces de diferencias (para genes tanto regulados positivamente como negativamente) en comparación con un control correspondiente. Cualquier diferencia inferior a aproximadamente 1,5 veces se considera insignificante para validación adicional. Se genera un mapa térmico y la relación (similitud de genes) se esclarece entre diferentes muestras de tumor primario y de xenoinjertos de tumor basándose en su estado de respuesta. La matriz sin supervisar se usa para generar un árbol que muestra la afinidad del tumor primario obtenido a partir de CR, PR o PD con los correspondientes xenoinjertos basándose en la formación de perfiles funcionales en el contexto de respuesta de fármaco. El análisis ANOVA de datos normalizados se realiza para distinguir los genes diferencian entre expresados (a $P < 0,05$) entre dos y entre diferentes tumores y los correspondientes grupos de xenoinjerto.

o) RT-PCR EN TIEMPO REAL

Los genes expresados de forma significativa a partir de micromatriz se confirman por RT-qPCR usando conjuntos de sondas y cebador específicos usando la plataforma de PCR en tiempo real de Stratagene.

p) SECUENCIACIÓN DE EXOMA PARA ANÁLISIS DE MUTACIÓN

Los ADN genómicos se aíslan a partir de tumores HNSCC primarios usando el Kit de Tejido DNAeasy (Qiagen). A continuación la comprobación de calidad de la secuenciación del exoma de los ADN se realiza para análisis de mutación de acuerdo con procedimientos que se han descrito anteriormente. En resumen, los cebadores y nucleótidos marcados de secuenciación específicos que generan secuencias de reacción y de genes específicos y se analizan en la plataforma de Secuenciación de Exoma de Illumina. Se determinan las diferencias en el espectro de mutaciones en los grupos clínicos de pacientes que responden y que no responden al tratamiento.

Ejemplo 8: Generación de algoritmos para predecir resultados clínicos

5 Una vez que el tumor se extirpa del paciente, éste se somete a análisis de explante como se describe en los ejemplos 1-3 con múltiples fármacos (solo o en combinación). La respuesta del tumor al fármaco se evalúa mediante múltiples ensayos como se describe en el Ejemplo 6. En paralelo, los resultados clínicos se miden de acuerdo con protocolos establecidos. Se proporcionan diferentes coeficientes de ponderación a los resultados del ensayo individual de explante de modo que la puntuación combinada que se obtiene tiene una correlación lineal con el resultado clínico observado; es decir, una puntuación combinada elevada (> 60, por ejemplo) se correlaciona con respuesta clínica completa (CR), una puntuación combinada baja (< 20, por ejemplo) se correlaciona con ninguna respuesta clínica (NR).

10 Una vez que se concibe un sistema de puntuación de este tipo, éste se puede usar para predecir la respuesta clínica de un futuro paciente de análisis de explante.

15 Los coeficientes de ponderación proporcionan a los parámetros individuales de modo que los datos promedio ponderados acumulativos tienen buena correlación con el resultado clínico observado. Diferentes algoritmos usan diferentes coeficientes de ponderación individuales (de un 0-100 %) para los parámetros incluidos en la correlación.

20 Además de asignar los coeficientes de ponderación de forma manual (como se muestra en los algoritmos del ejemplo 5 mostrados), también es posible el "Análisis multivariante" usando un ordenador, en el que se asignaron diferentes coeficientes de ponderación para llegar a la mejor fórmula de ajuste que tenga la menor cantidad de desviación entre la respuesta clínica predicha y la respuesta clínica observada.

25 Las puntuaciones sin procesar obtenida con los diversos ensayos de explante se proporcionan en la Tabla 4. Esta también proporciona la lectura clínica (Respuesta Completa, Respuesta Parcial o Sin Respuesta obtenida de acuerdo con los criterios convencionales de PERCIST).

Tabla 4: Datos Experimentales de ensayos de explante y evaluación clínica.

N.º	Análisis de explante				Lectura Clínica	
	Viabilidad	Histología	Proliferación	Apoptosis	RECIST	Representación Numérica
1	5	20	0	120	NR	1
2	27	42	20	100	PR	2
3	32	50	10	100	PR	2
4	58	60	53	154	CR	3
5	22	0	0	150	NR	1
6	25	50	50	70	PR	2
7	21	47	55	80	PR	2
8	48	72	43	120	CR	3
9	9	0	0	100	NR	1
10	24	38	27	120	PR	2
11	19	43	55	80	PR	2
12	27	62	20	75	PR	2
13	16	55	20	68	PR	2
14	32	42	35	70	PR	2
15	35	33	60	65	PR	2
16	27	28	28	72	PR	2
17	29	36	25	80	PR	2

ES 2 660 975 T3

N.º	Análisis de explante				Lectura Clínica	
ID Muestra	Viabilidad	Histología	Proliferación	Apoptosis	RECIST	Representación Numérica
18	23	50	75	75	PR	2
19	19	0	0	100	NR	1
20	22	44	62	50	PR	2
21	27	51	25	65	PR	2
22	25	0	0	100	NR	1
23	35	34	42	25	PR	2
24	20	19	35	55	PR	2
25	5	0	0	25	NR	1
26	27	0	0	42	NR	1
27	8	0	0	50	NR	1
28	35	50	36	50	PR	2
29	18	0	36	18	NR	1
30	36	48	58	30	PR	2
31	29	14	20	55	PR	2
32	32	34	16	20	PR	2
33	44	28	35	30	PR	2
34	24	12	0	50	NR	1
35	52	44	0	20	PR	2
36	29	10	22	42	PR	2
37	21	9	46	0	PR	2
38	66	55	40	74	CR	3
39	41	12	0	20	NR	1
40	11	17	27	54	PR	2
41	15	22	33	35	PR	2
42	7	0	0	30	NR	1
43	15	15	28	36	PR	2
44	62	50	64	70	CR	3
45	36	41	43	24	PR	2
46	24	52	36	45	PR	2

La Tabla 5 proporciona valores numéricos para la lectura clínica observada. Los valores de 3, 2 y 1 se proporcionan para respuesta completa, respuesta parcial y sin respuesta respectivamente. La Tabla 6 muestra los coeficientes de ponderación que se proporcionan para los ensayos de explante en cada uno de los 5 algoritmos representativos.

Estos coeficientes de ponderación se proporcionan basándose en la naturaleza de los fármacos usados en el análisis de explantes. Por ejemplo, a los fármacos de los que se sabe que presentan su actividad por alteración de la proliferación celular se les proporcionan coeficientes de ponderación más elevados para proliferación celular.

5

Tabla 5: Representación numérica de respuesta clínica, respuesta parcial respuesta

Respuesta Completa	3
Respuesta Parcial	2
Sin Respuesta	1

Tabla 6: Coeficientes de ponderación dados a diferentes resultados de ensayo de explante en los 5 algoritmos representativos

Coeficiente de ponderación del Índice de Sensibilidad (%)				
	Viabilidad	Histología	Proliferación	Apoptosis
Método 1	25 %	25 %	25 %	25 %
Método 2	20 %	30 %	25 %	25 %
Método 3	30 %	15 %	25 %	30 %
Método 4	30 %	30 %	30 %	10 %
Método 5	10 %	20 %	30 %	40 %

10

El índice de sensibilidad (es decir, la puntuación de M) para cada paciente se calcula multiplicando la puntuación sin procesar con el correspondiente factor de coeficiente de ponderación y añadiendo los números resultantes, como se ilustra en la Tabla 7. Por ejemplo, el paciente 1 tiene una puntuación del ensayo de explante sin procesar de 5, 20, 0 y 120 para viabilidad, histología, proliferación, y apoptosis respectivamente. con el algoritmo 1 (o método 1), a cada uno de estos factores se le da un coeficiente de ponderación de un 25 %. Por lo tanto, el índice de sensibilidad para el paciente 1 usando el algoritmo 1 se calculará como sigue a continuación:

15

$$\text{Índice de sensibilidad} = (5 \cdot 25\%) + (20 \cdot 25\%) + (0 \cdot 25\%) + (120 \cdot 25\%) = 36$$

20 El Índice de Sensibilidad calculado de este modo se convierte en el resultado clínico predicho (Tabla 8-12) como sigue a continuación:

Si el Índice de Sensibilidad > 60, Resultado clínico predicho = 3 (= Respuesta completa).

Si 20 < Índice de Sensibilidad < 60, resultado clínico predicho = 2 (= Respuesta parcial).

25

Si el Índice de sensibilidad < 20, resultado clínico predicho = 1 (= Sin Respuesta).

Tabla 7: Índice de sensibilidad medido mediante la aplicación de los coeficientes de ponderación para los ensayos de explante tal como se mide con los 5 algoritmos representativos

Índice de Sensibilidad				
Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
36	37	41	20	53
47	48	49	37	57
48	49	50	38	56
81	81	86	67	95
43	42	52	22	62
49	50	49	45	56

ES 2 660 975 T3

Índice de Sensibilidad				
Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
51	52	51	45	60
71	72	72	61	80
27	27	33	13	41
52	53	56	39	66
49	50	50	43	59
46	48	45	40	51
40	42	38	34	46
45	45	46	40	50
48	48	50	45	54
39	39	41	32	46
43	43	44	35	50
56	57	56	52	65
30	29	36	16	42
45	46	44	43	50
42	43	42	37	46
31	30	38	18	43
34	34	34	36	33
32	32	34	28	38
8	7	9	4	11
17	16	21	12	20
15	14	17	7	21
43	44	42	41	44
18	17	20	18	20
43	44	42	46	43
30	29	32	24	34
26	26	25	27	23
34	33	35	35	33
22	21	24	16	25
29	29	28	31	22
26	25	28	23	28
19	18	19	23	18
59	58	60	56	59

Índice de Sensibilidad				
Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
18	17	20	18	15
27	28	29	22	34
26	27	27	25	30
9	9	11	5	13
24	24	25	21	27
62	61	63	60	63
36	36	35	38	34
39	41	38	38	42

El resultado clínico predicho se compara con el resultado clínico observado para medir la potencia predictiva de los algoritmos (Tablas 8-12). Las partes sombreadas representan casos en los que existe un emparejamiento entre el resultado predicho y el resultado observado.

5
 Tabla 8: Eficacia Predictiva del algoritmo 1: Comparación entre "resultado clínico predicho" y "Resultado clínico observado". Si el Índice de sensibilidad > 60, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 3 (es decir, Respuesta Completa). Si el Índice de sensibilidad < 20, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 1 (es decir, Sin Respuesta). Si $20 < \text{Índice de sensibilidad} < 60$, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 2 (es decir, Respuesta Parcial).

10

Algoritmo 1

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico Observado
36	2	1
47	2	2
48	2	2
81	3	3
43	2	1
49	2	2
51	2	2
71	3	3
27	2	1
52	2	2
49	2	2
46	2	2
40	2	2
45	2	2
48	2	2
39	2	2
43	2	2
56	2	2
30	2	1

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico Observado
45	2	2
42	2	2
31	2	1
34	2	2
32	2	2
8	1	1
17	1	1
15	1	1
43	2	2
18	1	2
43	2	2
30	2	2
26	2	2
34	2	2
22	2	1
29	2	2
26	2	2
19	1	2
59	2	3
18	1	1
27	2	2
26	2	2
9	1	1
24	2	2
62	3	3
36	2	2
39	2	2

5 Tabla 9: Eficacia Predictiva del algoritmo 2 - Comparación entre "resultado clínico predicho" y "Resultado clínico observado". Si el Índice de sensibilidad > 60, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 3 (es decir, Respuesta Completa). Si el Índice de sensibilidad < 20, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 1 (es decir, Sin Respuesta). Si $20 < \text{Índice de sensibilidad} < 60$, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 2 (es decir, Respuesta Parcial).

Algoritmo 2

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
37	2	1
48	2	2
49	2	2
81	3	3

ES 2 660 975 T3

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
42	2	1
50	2	2
52	2	2
72	3	3
27	2	1
53	2	2
50	2	2
48	2	2
42	2	2
45	2	2
48	2	2
39	2	2
43	2	2
57	2	2
29	2	1
46	2	2
43	2	2
30	2	1
34	2	2
32	2	2
7	1	1
16	1	1
14	1	1
44	2	2
17	1	1
44	2	2
29	2	2
26	2	2
33	2	2
21	2	1
29	2	2
25	2	2
18	1	2
58	2	3
17	1	1
28	2	2
27	2	2
9	1	1
24	2	2

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
61	3	3
36	2	2
41	2	2

5 Tabla 10: Eficacia Predictiva del algoritmo 3: Comparación entre "resultado clínico predicho" y "Resultado clínico observado". Si el Índice de sensibilidad > 60, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 3 (es decir, Respuesta Completa). Si el Índice de sensibilidad < 20, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 1 (es decir, Sin Respuesta). Si $20 < \text{Índice de sensibilidad} < 60$, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 2 (es decir, Respuesta Parcial).

Algoritmo 3

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
41	2	1
49	2	2
50	2	2
86	3	3
52	2	1
49	2	2
51	2	2
72	3	3
33	2	1
56	2	2
50	2	2
45	2	2
38	2	2
46	2	2
50	2	2
41	2	2
44	2	2
56	2	2
36	2	1
44	2	2
42	2	2
38	2	1
34	2	2
34	2	2
9	1	1
21	1	1
17	1	1
42	2	2

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
20	1	1
42	2	2
32	2	2
25	2	2
35	2	2
24	2	1
28	2	2
28	2	2
19	1	2
60	3	3
20	2	1
29	2	2
27	2	2
11	1	1
25	2	2
63	3	3
35	2	2
38	2	2

Tabla 11: Eficacia Predictiva del algoritmo 4: Comparación entre "resultado clínico predicho" y "Resultado clínico observado". Si el Índice de sensibilidad > 60, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 3 (es decir, Respuesta Completa). Si el Índice de sensibilidad < 20, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 1 (es decir, Sin Respuesta). Si 20 < Índice de sensibilidad < 60, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 2 (es decir, Respuesta Parcial).

5

Algoritmo 4

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
20	2	1
37	2	2
38	2	2
67	3	3
22	2	1
45	2	2
45	2	2
61	3	3
13	2	1
39	2	2
43	2	2
40	2	2
34	2	2

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
40	2	2
45	2	2
32	2	2
35	2	2
52	2	2
16	2	1
43	2	2
37	2	2
18	2	1
36	2	2
28	2	2
4	1	1
12	1	1
7	1	1
41	2	2
18	1	1
46	2	2
24	2	2
27	2	2
35	2	2
16	2	1
31	2	2
23	2	2
23	1	2
56	2	3
18	1	1
22	2	2
25	2	2
5	1	1
21	2	2
60	2	3
38	2	2
38	2	2

Tabla 12: Eficacia Predictiva del algoritmo 5: Comparación entre "resultado clínico predicho" y "Resultado clínico observado". Si el Índice de sensibilidad > 60, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 3 (es decir, Respuesta Completa). Si el Índice de sensibilidad < 20, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 1 (es decir, Sin Respuesta). Si $20 < \text{Índice de sensibilidad} < 60$, al resultado clínico predicho se le da una puntuación de 2 (es decir, Respuesta Parcial).

5

ES 2 660 975 T3

Algoritmo 5

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
53	2	1
57	2	2
56	2	2
95	3	3
62	3	1
56	2	2
60	2	2
80	3	3
41	2	1
66	3	2
59	2	2
51	2	2
46	2	2
50	2	2
54	2	2
46	2	2
50	2	2
65	3	2
42	2	1
50	2	2
46	2	2
43	2	1
33	2	2
38	2	2
11	1	1
20	1	1
21	1	1
44	2	2
20	1	1
43	2	2
34	2	2
23	2	2
33	2	2
25	2	1
22	2	2
28	2	2
18	1	2
59	2	3

Índice de Sensibilidad	Resultado Clínico Predicho	Resultado Clínico
15	1	1
34	2	2
30	2	2
13	1	1
27	2	2
63	3	3
34	2	2
42	2	2

5 En lugar de proporcionar los coeficientes de ponderación manuales en las Tablas 6-13, opcionalmente se puede usar un ordenador para usar un método de análisis de multi-regresión para dar coeficientes de ponderación de este tipo con respecto a los ensayos de explante individuales. En tales casos, el ordenador estará provisto de un ajuste polinómico (ecuación lineal, cuadrática o de orden más elevado) usando los datos de explante observados Y conseguir un resultado clínico predicho que tenga la menor desviación con respecto al resultado clínico observado.

Ejemplo 9: Uso de Sistema de Explante en Múltiples Cánceres Sólidos Para Generar Predicción de Respuesta

10 El ensayo funcional dirigido por "Indicador de Respuesta Clínica" permite una identificación sistemática rápida de un panel de agentes anticáncer. Un panel de agentes anticáncer establecidos y de investigación (tanto citotóxicos como dirigidos) se selecciona principalmente basándose en sus propiedades conocidas de inhibición del crecimiento tumoral. La eficacia *ex vivo* de estos fármacos se somete a ensayo para un panel de estantes obtenidos a partir de
 15 pacientes en ensayo de proliferación (Ki-67) y viabilidad (WST) de 72 horas. El porcentaje de inhibición se determina con referencia al control sin tratar. Los resultados se ilustran en la Figura 11. Una inhibición superior a un 50 % se considera como respuesta completa. Una inhibición inferior a un 50 % pero superior a un 20 % se considera respuesta parcial. En grupos sin respuesta los fármacos que presentan no (de un 0 % a un 20 % la inhibición) se consideran sin respuesta y similares a enfermedades estables. Los fármacos que presentan un aumento de la
 20 proliferación celular para una indicación en particular se consideran como enfermedades progresivas. Los resultados obtenidos indican que el "Indicador de Respuesta Clínica" imita a la muestra de xenoinjerto de tumor. Por lo tanto, esto se valida adicionalmente usando resultados clínicos.

Ejemplo 10

25 Las muestras de tumor se recogen de pacientes junto con su suero de acuerdo con protocolos convencionales. Los pacientes presentaban cualquiera de la evaluación PETCT o CT antes de comenzar el Análisis de explante de "Indicador de Respuesta Clínica". Las muestras recogidas se procesan para Análisis de explante de Indicador de Respuesta Clínica.

30 Se generan piezas pequeñas de 3 x 3 x 3 mm de porciones de tumor. Las muestras de tumor se dividen en múltiples piezas pequeñas usando Vibratomo de Leica para generar secciones de aproximadamente 100-300 µm y se cultivan por triplicado en placas de fondo plano de la tesis pocillos que previamente se han revestido con ECM específica de
 35 cáncer como se indica en el Ejemplo 1. Los tejidos de tumor se mantienen en medio acondicionado de aproximadamente 2 ml (DMEM suplementado con aproximadamente un 2 % de FBS inactivado por calor junto con un 1 % de Penicilina-Estreptomicina, piruvato sódico 100 mM, aminoácido no esencial, L-glutamina 4 mM y HEPES 10 mM. El medio de cultivo se suplementa con aproximadamente un 2 % de suero obtenido a partir de ligandos
 40 después de 12 horas. Los fármacos se añaden opcionalmente al comienzo del cultivo junto con medio o por separado. El medio se cambia en el momento de la adición del suero. En medio también se cambia cada 24 horas junto con suplementos. Se usan aproximadamente 5 µl de medio consumido para determinar viabilidad celular, proliferación celular, histología, y muerte celular del tejido tumoral. Al final del periodo de cultivo que varía en
 45 aproximadamente 72 horas, el tejido se evalúa para los parámetros. Después de este periodo, se realiza el análisis de MTT/WST para evaluar el porcentaje de viabilidad celular. El sobrenadante del medio de cultivo se retira cada 24 horas y se evalúa para proliferación (usando experimentos que utilizan ATP y glucosa) y muerte celular (mediante evaluación de ensayos de lactato deshidrogenasa y mediciones de caspasa-3 y caspasa 8) para dar las tendencias de respuesta cinética. Los resultados se cuantifican frente a un control sin tratar de fármaco. Las secciones de tejido tanto tratadas con fármaco(s) como sin tratar también se proporcionan para IHC y la evaluación histológica al final del periodo de cultivo. Los tejidos proporcionados para evaluación histológica se evalúan para apoptosis mediante TUNEL y ensayo de caspasa 3 activada. También se evalúa la proliferación celular para marcadores de proliferación convencionales tales como Ki67 y PCNA.

Por último, todos los resultados preclínicos, tales como viabilidad celular, muerte celular por apoptosis, evaluación histológica y también estado de proliferación se integran para dar una sola puntuación denominada Índice de Sensibilidad (o puntuación de M), representada en la Tabla 3 que se proporciona a continuación.

5 Los pacientes inscriptos para el presente análisis de explante también tenían tratamiento clínico y se evaluaron para respuesta al final de 6-8 meses con cualquiera de PETCT o CT. El resultado del "Indicador de Respuesta Clínica" (puntuación de M) a continuación se compara con el resultado clínico. Los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla 3 que sigue a continuación.

10 La Tabla 3 indica el tipo de muestra de tumor obtenida a partir de los respectivos pacientes (que tienen uno de los siguientes tipos de cáncer - HNSCC, Glioblastoma, Ca-Ovario, Ca-Mama, Ca-Esófago, CRC, Ca-Páncreas, Ca-Estómago) y el fármaco o combinaciones de fármacos con los que se trata al paciente, tanto para análisis a través de "Indicador de Respuesta Clínica" como para tratamiento clínico.

15 Como es evidente a partir de los resultados obtenidos en la tabla que sigue a continuación, el "Indicador de Respuesta Clínica" ha predicho de forma satisfactoria el resultado clínico con una eficacia de aproximadamente un 100 % para pacientes que no responden y aproximadamente un 88 % para los pacientes que responden.

20 Las muestras de tumor del Paciente 1 que tiene Cáncer de Cabeza y Cuello se tratan con una combinación de Cisplatino + 5FU + Docetaxel con el "Indicador de Respuesta Clínica". Los resultados preclínicos obtenidos mediante análisis de tejidos a través de viabilidad celular, evaluación histológica, proliferación celular y muerte celular por apoptosis se integran para dar un Índice de Sensibilidad (o puntuación de M) de 8. Dado que el índice de sensibilidad del tratamiento preclínico en el Paciente 1 es < 20 ; se predice que el tratamiento tiene malos resultados clínicos cuando al paciente se le administra la misma combinación de fármacos. Esto se valida a partir de los
25 resultados de los datos de RECIST obtenidos para la respuesta clínica cuando al paciente se le da una puntuación de 1, lo que indica sin respuesta clínica.

30 Las muestras de tumor del Paciente 3 que tiene Cáncer de Cabeza y Cuello se tratan con una combinación de Carboplatino y Paclitaxel con el "Indicador de Respuesta Clínica". Los resultados preclínicos obtenidos mediante análisis de tejidos a través de viabilidad celular, evaluación histológica, proliferación celular y muerte celular por apoptosis se integran para dar un Índice de Sensibilidad (o puntuación de M) de 47. Dado que el índice de sensibilidad del tratamiento preclínico en el Paciente 3 es > 20 pero < 60 ; se predice que el tratamiento tiene un resultado clínico parcial cuando al paciente se le administra la misma combinación de fármacos. Esto se valida a partir de los resultados de los datos de RECIST obtenidos para la respuesta clínica cuando al paciente se le da una
35 puntuación de 2, lo que indica una respuesta parcial.

40 Las muestras de tumor del Paciente 38 que tiene Cáncer de Cabeza y Cuello se tratan con una combinación de Cisplatino, 5FU y Docetaxel con el "Indicador de Respuesta Clínica". Los resultados preclínicos obtenidos mediante análisis de tejidos a través de viabilidad celular, evaluación histológica, proliferación celular y muerte celular por apoptosis se integran para dar un Índice de Sensibilidad (o puntuación de M) de 90. Dado que el índice de sensibilidad del tratamiento preclínico en el Paciente 38 es > 60 ; se predice que el tratamiento tiene un resultado clínico completo cuando al paciente se le administra la misma combinación de fármacos. Esto se valida a partir de los resultados de los datos de RECIST obtenidos para la respuesta clínica cuando al paciente se le da una
45 puntuación de 3, lo que indica una respuesta clínica completa.

Tabla 3

ID Muestra	Tipo de Cáncer	Tratamiento	Indicador de Respuesta Clínica				Índice de Sensibilidad	Lectura Clínica RECIST
			Viabilidad	Histología	Proliferación	Apoptosis		
1	HNSCC	Cisplatino + 5FU + Docetaxel	5	20	-100	120	8	1
2	Glioblastoma	Temozolomida	27	42	20	100	49	2
3	HNSCC	Carboplatino + Paclitaxel	32	50	10	100	47	2
4	Ca-Ovario	Capecitabina + Lapatinib	58	60	53	154	88	3
5	Ca-Mama	5FU + Leucovorina	22	-20	-125	150	16	1
6	Ca-Esófago	Cetuximab	25	50	50	70	48	2
7	HNSCC		21	47	55	80	52	2
8	Ca-Mama		48	72	43	120	70	3
9	Ca-Esófago		9	-68	-80	100	10	1
10	CRC	Irinotecán + 5FU	24	38	27	120	57	2
11	Ca-Páncreas	Gemcitabina + Cisplatino	19	43	55	80	51	2
12	Ca-Páncreas	Gemcitabina + Erlotinib	27	62	20	75	41	2
13	Ca-Esófago	5FU + Leucovorina	16	55	20	68	35	2
14	HNSCC	Carboplatino + Paclitaxel	32	42	35	70	46	2
15	Ca-Esófago	Epirrubicina + Cisplatino + Capecitabina	35	33	60	65	53	2
16	Ca-Páncreas	Gemcitabina + Cisplatino	27	28	28	72	42	2
17	CRC	Cetuximab	29	36	25	80	45	2
18	Ca-Mama	Vinorelbina	23	50	75	75	58	2
19	Ca-Páncreas	Gemcitabina + Cisplatino	19	-48	-50	100	35	1
20	Ca-Páncreas	5FU + Leucovorina	22	44	62	50	67	2
21	Ca-Páncreas	Gemcitabina + Erlotinib	27	51	25	65	59	2
22	Ca-Esófago	Epirrubicina + Cisplatino + Capecitabina	25	-35	-70	100	28	1
23	Ca-Mama	Herceptin	35	34	42	25	51	2
24	Ca-Ovario	Bleomicina + Cisplatino + Etopósido	20	19	35	55	55	2

ID Muestra	Tipo de Cáncer	Tratamiento	Indicador de Respuesta Clínica				Índice de Sensibilidad	Lectura Clínica RECIST
			Viabilidad	Histología	Proliferación	Apoptosis		
25	Ca-Mama	Cisplatino + 5FU + Docetaxel	5	-22	-18	25	6	1
26	HNSCC	Cetuximab	27	-46	-35	42	17	1
27	HNSCC	Carboplatino + Paclitaxel	8	-58	-10	50	24	1
28	CRC	Irinotecán + 5FU	35	50	36	50	61	2
29	Ca-Ovario	Carboplatino + Paclitaxel	18	-62	36	18	36	1
30	Ca-Stomach	Epirubicina + Cisplatino + Capecitabina	36	48	58	30	62	2
31	HNSCC	Cisplatino + 5FU + Docetaxel	29	14	20	55	52	2
32	HNSCC	Carboplatino + Paclitaxel	32	34	16	20	34	2
33	Ca-Stomach	5FU + Leucovorina	44	28	35	30	55	2
34	Ca-Mama	Ciclofosfamida + Doxorubicina + Paclitaxel	24	12	-20	50	27	1
35	Ca-Esófago	5FU + Leucovorina	52	44	0	20	36	2
36	Ca-Stomach	Cisplatino + 5FU + Docetaxel	29	10	22	42	47	2
37	HNSCC	Carboplatino + Paclitaxel	21	9	46	0	34	2
38	HNSCC	Cisplatino + 5FU + Docetaxel	66	55	40	74	90	3
39	Ca-Ovario	Carboplatino + Paclitaxel	41	12	-10	20	26	1
40	Ca-Stomach	Epirubicina + Cisplatino + Capecitabina	11	17	27	54	46	2
41	HNSCC	Cetuximab	15	22	33	35	42	2
42	Ca-Esófago	Cisplatino + 5FU + Docetaxel	7	-16	-15	30	11	1
43	Ca-Esófago	Cisplatino + 5FU + Docetaxel	15	15	28	36	40	2
44	Ca-Mama	Ciclofosfamida + Doxorubicina + Paclitaxel	62	50	64	70	98	3
45	Ca-Esófago	Epirubicina + Cisplatino + Capecitabina	36	41	43	24	· · A	2
46	CRC	Irinotecán + 5FU	24	52	36	45	53	2

Ejemplo 11: El "Indicador de Respuesta Clínica" Es un Indicador de Respuesta Mejor Que Los Biomarcadores

5 Como se ha mencionado anteriormente, aunque los biomarcadores se usan en la técnica anterior como herramienta de predicción, existen muchas limitaciones asociadas con los mismos. Estas limitaciones se superan con las herramientas y métodos de la presente divulgación. El "Indicador de Respuesta Clínica" no se limita a los fármacos o la enfermedad que se ha estado usando para la validación inicial. El "Indicador de Respuesta Clínica" es una tecnología de plataforma. Por ejemplo, una vez que se ha desarrollado un "Indicador de Respuesta Clínica" para un modelo de cáncer Colorrectal para un fármaco en particular, por ejemplo 5-FU y se ha mostrado que este modelo es útil para predecir la eficacia de 5-FU, el modelo es compatible para otros fármacos. Esto se debe a que las limitaciones de entrada para el "Indicador de Respuesta Clínica" están relacionadas con el paciente en consideración (o el tumor obtenido a partir del paciente) y no el fármaco.

15 Otra gran diferencia es la diferencia entre biomarcadores "conductores" y "pasajeros". Para muchos fármacos dirigidos, los pacientes se separan basándose en si tienen o no un biomarcador en particular. Sin embargo, la presencia de un biomarcador dado no determina si los pacientes responderán o no al fármaco. Esto se debe a la naturaleza heterogénea del cáncer en el que múltiples factores son responsables de influir en la eficacia de los fármacos. Por el contrario, dado que el "Indicador de Respuesta Clínica" es un enfoque sin sesgar y toma el tejido tumoral como un conjunto para decidir si el paciente responderá al fármaco, éste es más relevante para determinar el resultado clínico real.

20 Aunque los biomarcadores (gen/proteína que se expresan de forma diferencial en pacientes que responden con respecto a pacientes que no responden a un fármaco en particular) están disponibles para una pequeña cantidad de fármacos tales como Herceptin (biomarcador de Her2), no están disponibles para una amplia diversidad de otros fármacos. Cuando están disponibles, presentan una baja correlación con el resultado clínico. Por ejemplo: KRAS, el biomarcador aprobado para Erbitux en el cáncer Colorrectal tiene una potencia predictiva en el intervalo de 10-30 %. Este aspecto de los biomarcadores se ha ilustrado en la Tabla 13.

Tabla 13: Todos los pacientes que no responden están marcados con NR y los pacientes que responden están marcados como R

ID N.º Paciente	Respuesta Clínica	Respuesta de "Indicador de Respuesta Clínica"	Puntuación de M	KRAS	BRAF	PIK3CA	AREG	EREG
1	R	R	62	WT	WT	WT	Bajo	Elevado
2	NR	NR	18	Mut	WT	WT	Elevado	Elevado
3	NR	NR	14	WT	Mut	WT	Bajo	Bajo
4	NR	NR	2	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
5	NR	NR	5	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
6	NR	NR	19	WT	WT	Mut	Bajo	Bajo
7	NR	NR	22	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
8	NR	NR	11	Mut	WT	WT	Bajo	Bajo
9	NR	NR	18	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
10	NR	NR	19	WT	WT	Mut	Bajo	Bajo
11	NR	NR	4	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
12	NR	NR	1	Mut	WT	WT	Bajo	Bajo
13	R	R	72	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
14	R	R	54	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
15	NR	NR	12	WT	Mut	WT	Bajo	Bajo
16	NR	NR	21	Mut	WT	WT	Elevado	Elevado
17	NR	NR	16	WT	WT	WT	Bajo	Bajo

ES 2 660 975 T3

ID N.º Paciente	Respuesta Clínica	Respuesta de "Indicador de Respuesta Clínica"	Puntuación de M	KRAS	BRAF	PIK3CA	AREG	EREG
18	NR	NR	25	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
19	NR	NR	20	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
20	R	R	67	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
21	NR	NR	11	Mut	WT	WT	Bajo	Bajo
22	NR	NR	3	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
23	NR	NR	20	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
24	R	R	66	WT	WT	WT	Elevado	Bajo
25	NR	NR	12	Mut	WT	WT	Elevado	Elevado
26	NR	NR	3	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
27	NR	NR	9	WT	WT	WT	Elevado	Bajo
28	NR	NR	17	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
29	NR	NR	11	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
30	NR	NR	6	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
31	R	R	52	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
32	R	R	41	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
33	R	R	54	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
34	NR	NR	4	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
35	NR	NR	13	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
36	NR	NR	24	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
37	NR	NR	12	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
38	R	R	56	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
39	NR	NR	8	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
40	R	R	63	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
41	R	R	52	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
42	R	R	74	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
43	NR	NR	2	WT	WT	WT	Bajo	Elevado
44	NR	NR	9	WT	WT	WT	Bajo	Elevado
45	NR	NR	17	WT	WT	WT	Elevado	Bajo
46	NR	NR	14	WT	WT	WT	Elevado	Bajo
47	NR	NR	11	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
48	NR	NR	9	WT	WT	WT	Bajo	Bajo
49	R	R	53	WT	WT	WT	Elevado	Elevado

ID N.º Paciente	Respuesta Clínica	Respuesta de "Indicador de Respuesta Clínica"	Puntuación de M	KRAS	BRAF	PIK3CA	AREG	EREG
50	R	R	68	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
51	NR	NR	14	WT	WT	WT	Bajo	Elevado
52	NR	NR	15	WT	WT	WT	Bajo	Bajo

Las muestras sometidas a ensayo para respuesta a Cetuximab en la tabla mencionada anteriormente son muestras de cáncer de colon en estadio III/IV. La mayoría de las muestras sometidas a ensayo que son NR presentaban mutaciones en los genes fundamentales que afectan en la respuesta a Cetuximab, tales como KRAS, BRAF y PIK3CA. En esta ruta tamil están implicados los ligandos de EGFR, Amfirregulina y Epirregulina. Se ha mostrado que la expresión baja de estos ligandos es la causa de NR y se cree que afecta en la respuesta a Cetuximab. Sin embargo, a diferencia de los resultados esperados, existe un subconjunto de muestras que son NR en ausencia de estos biomarcadores. Además, se encontró que unos pocos pacientes, es decir, los pacientes con números 2, 7, 13, 20, 23, 25, 26, 28, 31-42, 49, y 50 eran NR aunque se encuentra que la expresión de ambos ligandos, Amfirregulina y Epirregulina, es elevada. Sin embargo, el resultado del Análisis de explante de "Indicador de Respuesta Clínica" se empareja con el resultado clínico sin ser afectado por la expresión de biomarcadores y ligandos de EGFR.

Por lo tanto, es necesario diferenciar entre un biomarcador "Conductor" y un biomarcador "Pasajero" ya que la presencia de un biomarcador a menudo no es un factor decisivo para decidir si un fármaco podría responder o no en un paciente en particular. Además a menudo los biomarcadores se unen a un fármaco en particular y a un tipo de cáncer en particular. Por el contrario, el presente modelo de "Indicador de Respuesta Clínica" proporciona una lectura funcional específica con respecto al paciente en particular.

Ejemplo 12: El "Indicador de Respuesta Clínica" Es un Indicador de Respuesta Mejor Que Las Líneas Celulares

La deficiencia fundamental con los ensayos *in vitro* de líneas celulares y los modelos de xenoinjerto basados en líneas celulares es que el cáncer es una enfermedad heterogénea mientras que las líneas celulares son homogéneas por definición. Se cree que estos modelos simplifican demasiado el problema.

El uso de Indicadores de Respuesta Clínica de suero/plasma/PBMC/ligandos obtenidos a partir de suero, el uso de matriz extracelular individualizada para el tipo de tumor y matriz extracelular sin alterar de la tejido tumoral autólogo aseguran que los factores de unión paracrinicos apropiados están en su sitio para que las células tumorales permanezcan viables; a su vez esto permite el estudio de rutas de señalización implicadas en el inicio, mantenimiento, progresión y supresión del tumor, y supera los defectos asociados con sistemas de separación de pacientes basados en líneas celulares disponibles en la técnica anterior.

Este aspecto se ha elaborado adicionalmente en la Tabla 14 que sigue a continuación:

Tabla 14: Respuesta a Cetuximab en líneas celulares, en las que Y indica respuesta a Cetuximab, N indica sin respuesta a Cetuximab y ND indica respuesta a Cetuximab no está indicado

S. N°	Línea celular	K-Ras	B-Raf	PIK3Ca	Respuesta a Cetuximab
1	CaC02	WT	WT		Y
2	HT29	WT	MUT	MUT "P449T"	N
3	COLO-205	WT	MUT		N
4	SW480	MUT "C12"	WT		N
5	SW620	MUT "C12"	WT	WT	N
6	HCT116	MUT "C13"	WT	MUT "H1047R"	N
7	LoVo	MUT "C13"	WT	WT	N
8	LS1034	MUT "C146"	WT		N
9	LIM1215	WT	WT	WT	Y
10	GEO	MUT "C12"	WT	WT	Y

S. N°	Línea celular	K-Ras	B-Raf	PIK3Ca	Respuesta a Cetuximab
11	SW403	MUT "C12"	WT	WT	Y
12	SW837	MUT "C12"	WT	WT	Y
13	SW1463	MUT "C12"	WT	WT	ND
14	Gp5d	MUT "C12"	WT	MUT	N
15	Co94	MUT	WT		ND
16	HCA46	WT	WT		ND
17	COLO-741	WT	MUT	WT	ND
18	LS-174T	MUT "C12"	WT	MUT "H1047R"	Y
19	SNG-M	MUT "C12"	WT	MUT "R88Q"	ND
20	NCI-H1975	WT	WT	MUT "G118D"	Y
21	SW948	MUT "C12"	WT	MUT	Y
22	SKCO1	MUT	WT	WT	Y
23	HCT8	MUT	WT		Y
24	COLO-201	WT	MUT		ND
25	COLO-320HSR	WT	WT	WT	ND
26	KM12	WT	WT	WT	Y
27	HCA7	WT	WT		Y
28	HT-55	WT	MUT		ND
29	WIDr	WT	MUT		Y
30	COLO-201	WT	MUT		ND
31	SW48	WT	WT	WT	N
32	SW1417	WT	MUT	WT	ND
33	N87	WT	WT	WT	N
34	HCC70	WT	WT	WT	N
35	COLO-201	WT	MUT		N

Como se ha representado en la Tabla 14 mencionada anteriormente, las líneas celulares representan un modelo muy homogéneo y como tal tienen una utilidad limitada para desarrollo de fármacos. Más de un 80 % de las líneas celulares que son de Tipo Silvestre (WT) para K-RAS y B-RAF y PIK3Ca presentan evidencias de respuesta a cetuximab. Sin embargo, clínicamente, solo un 10-30 % de los pacientes responden al cetuximab. Esta falta de coincidencia se debe a la falta de relevancia clínica del modelo de líneas celulares. En el Ejemplo 11 (Tabla 13) se muestra que el modelo de "Indicador de Respuesta Clínica" es una herramienta preclínica clínicamente importante. Usando un enfoque de biología de sistemas, esta plataforma captura la heterogeneidad inherente de la enfermedad para servir como un indicador mejor del resultado clínico para permitir un desarrollo de fármacos racional.

Ventajas del "Indicador de Respuesta Clínica" con respecto a otra tecnología conocida en la técnica:

- Los modelos de ratones modificados genéticamente usados en la técnica anterior son buenos modelos pero podrían ser útiles solamente cuando se conocen las rutas mediadas por los fármacos. Además, en una diversidad de cánceres, y para una diversidad de fármacos, están implicadas múltiples rutas. Esta es la

deficiencia principal de los modelos de ratones modificados genéticamente. La presente invención usa tejidos sólidos recién preparados obtenidos a partir del paciente. Además, la comunicación de célula-célula no se ve alterada por la presente invención ya que el tejido se procesa para los ensayos. El microentorno local también se mantiene en el caso de ensayos de explante.

5 > Mammaprint (de Agendia) y Oncotype-Dx (de Genomic Health) son ensayos que se usan para clasificar los pacientes en alto riesgo o bajo riesgo basándose en la formación de perfiles genéticos. Mammaprint usa formación de perfiles de expresión de micromatriz de genes seleccionados mientras que Oncotype-Dx usa análisis de RT-PCR de genes seleccionados. Ninguno de estos ensayos están personalizados para el paciente ni dicen cuál es la combinación de fármacos específica más adecuada para el paciente dado. Por el contrario, el "Indicador de Respuesta Clínica" es un ensayo funcional que usa el propio tumor del paciente y el propio microentorno tumoral del paciente para decidir cuál es la combinación óptima de fármacos para ese paciente específico.

10 > Con respecto al ensayo de quimiosensibilidad, la presente divulgación es capaz de superar las deficiencias asociadas con el ensayo mencionado a modo de lo que sigue a continuación: En primer lugar, la presente invención identificó que ciertos factores paracrinos son esenciales para asegurar que la señalización funcional se mantiene en los tejidos tumorales. En segundo lugar, la presente invención descubrió adicionalmente que existe una diferencia en la correlación clínica de los factores paracrinos de este tipo que se obtienen a partir de suero autólogo que los obtenidos a partir de suero heterólogo. En tercer lugar, además de esto, es importante revestir las placas celulares con matriz extracelular que se ha obtenido a partir del mismo subtipo de cáncer. En cuarto lugar, es importante mantener el tejido hasta un tamaño en particular (aproximadamente 100 µm - 300 µm) para asegurar que se produce la cantidad correcta de difusión titular. Tomados en conjunto, la combinación de estos factores da como resultado que el "Indicador de Respuesta Clínica" es un elemento que refleja el resultado clínico de manera fiable.

25 Ejemplo 13: "Indicador de Respuesta Clínica" Con Respecto A Respuesta Clínica Predicha

El estudio clínico se realiza en pacientes que tienen diferentes tipos de tumor para estudiar la respuesta a fármacos para el cáncer específicos o combinaciones de los mismos. Los mismos fármacos y sus combinaciones se usan en el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" de la presente invención. Los resultados obtenidos (Puntuación de M basada en la inhibición de la ruta) se correlacionan con la respuesta clínica del paciente a un fármaco o combinación de fármacos, basándose en estudios realizados en un entorno tumoral personalizado para el paciente específico.

Ejemplo 13.1

35 El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 67 años de edad con Cáncer de Cabeza y Cuello, siendo el sitio del tumor el seno piriforme derecho. La muestra del tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de cirugía. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T3N0M0 y el tipo de muestra se clasificó como primario.

40 La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Cisplatino	66
R _x 3	Cisplatino + 5-Fluorouracilo	37
R _x 4	Cisplatino + Docetaxel + 5-Fluorouracilo	61

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2	Carboplatino + Paclitaxel	23
R _x 5	Cetuximab	19

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(A), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/sus combinaciones en el siguiente orden:

- 5 1) Cisplatino
- 2) Cisplatino + Docetaxel + 5-Fluorouracilo
- 3) Cisplatino + 5-Fluorouracilo.

Ejemplo 13.2

10 El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 55 años de edad con Cáncer de Cabeza y Cuello, siendo el sitio del tumor el seno piriforme derecho. La muestra del tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de cirugía. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T3/4N2cM0 y el tipo de muestra se clasificó como ganglio linfático metastásico.

15 La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Cisplatino	39
R _x 2	Carboplatino + Paclitaxel	74
R _x 4	Cisplatino + Docetaxel + 5-Fluorouracilo	63

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 3	Cisplatino + 5-Fluorouracilo	21
R _x 5	Cetuximab	14

25 Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(B), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 30 1) Carboplatino + Paclitaxel
- 2) Cisplatino + Docetaxel + 5-Fluorouracilo
- 3) Cisplatino

Ejemplo 13.3

35 El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 40 años de edad con Cáncer de Colon, siendo el sitio del tumor el colon rectosigmoideo. La muestra del tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de cirugía. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como Estadio IV y el tipo de muestra se clasificó como metástasis.

40 La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

45 de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1 Oxaliplatino + 5-Fluorouracilo + Leucovorina	64
R _x 3 Irinotecán + 5-Fluorouracilo + Leucovorina	32
R _x 7 Epirrubicina, + Cisplatino + Capecitabina	51

Tabla B: Paciente que no responde

Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2 5-Fluorouracilo + Leucovorina	28
R _x 4 Irinotecán + 5-Fluorouracilo + Leucovorina + Bevacizumab	21
R _x 5 Irinotecán + Cetuximab	12
R _x 6 Panitumumab	19

5 Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(C), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 10
- 1) Oxaliplatino + 5-Fluorouracilo + Leucovorina
 - 2) Epirrubicina + Cisplatino + Capecitabina
 - 3) Irinotecán + 5-Fluorouracilo + Leucovorina

Ejemplo 13.4

15 El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 56 años de edad con Cáncer de Colon, siendo el sitio del tumor la masa perineal (Ca-Recto). La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T3N0M0 y el tipo de muestra se clasificó como Rec.

20 La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

25

Tabla A: Paciente que responde

Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1 Oxaliplatino + 5-Fluorouracilo + Leucovorina	46
R _x 3 Irinotecán + 5-Fluorouracilo + Bevacizumab	61
R _x 4 Irinotecán + 5-Fluorouracilo + Leucovorina	39

Tabla B: Paciente que no responde

Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2 5-Fluorouracilo + Leucovorina	14
R _x 5 Irinotecán + Cetuximab	21
R _x 6 Panitumumab	27
R _x 7 Epirrubicina + Cisplatino, + Capecitabina	18

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(D), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) Irinotecán + 5-Fluorouracilo + Leucovorina
- 2) Oxaliplatino + 5-Fluorouracilo + Leucovorina
- 3) Irinotecán + 5-Fluorouracilo + Leucovorina + Bevacizumab

Ejemplo 13.5

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 49 años de edad con Cáncer de Estómago, siendo el sitio del tumor el píloro del estómago. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor era desconocido y el tipo de muestra se clasificó como rec en ganglios linfáticos metastásico.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Epirrubicina + Cisplatino + Capecitabina	47
R _x 3	Imatinib	66

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2	Herceptin	14
R _x 4	Sunitinib	25

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(E), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) Imatinib
- 2) Epirrubicina + Cisplatino + Capecitabina

Ejemplo 13.6

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer 68 años de edad con Cáncer de Estómago, siendo el sitio del tumor el estómago. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor era desconocido y el tipo de muestras se clasificó como rec.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Epirrubicina + Cisplatino + Capecitabina	56

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2	Herceptin	15
R _x 3	Imatinib	24
R _x 4	Sunitinib	09

5 Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(F), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/las combinaciones de los mismos es la siguiente:

10 1) Epirrubicina + Cisplatino + Capecitabina

Ejemplo 13.7

15 El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer de 45 años de edad con Cáncer Pancreático, siendo el sitio del tumor el hígado. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor era desconocido y el tipo de muestra se clasificó como metástasis.

20 La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Cisplatino + Gemcitabina	37
R _x 3	5-Fluorouracilo + Leucovorina	54

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2	Erlotinib	21

30 Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(G), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

Ejemplo 13.8

35 El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 50 años de edad con Cáncer Pancreático, siendo el sitio del tumor el páncreas. La muestra del tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de cirugía. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T2N0M0 y el tipo de muestra se clasificó como primario.

40 La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del

tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

5

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Cisplatino + Gemcitabina	72

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2	Erlotinib	14
R _x 3	5-FU + Leucovorina	23

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(H), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

10

Ejemplo 13.9:

15 El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer de 40 años de edad con Cáncer de Ovario, siendo el sitio del tumor el ovario. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor era desconocido y el tipo de muestra se clasificó como metástasis.

20 La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

25

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Bleomicina + Etopósido + Cisplatino	76
R _x 2	Trabectedina + PLD Doxorrubicina	36
R _x 4	Carboplatino + Gemcitabina	73

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 3	Docetaxel	26
R _x 5	Doxorrubicina (PLD) + Carboplatino	19
R _x 6	Carboplatino + Paclitaxel	25

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(I), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

30

- 35
- 1) Bleomicina + Etopósido + Cisplatino
 - 2) Carboplatino + Gemcitabina
 - 3) Trabectedina + PLD Doxorrubicina

Ejemplo 13.10

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer de 56 años de edad con Cáncer de Ovario, siendo el sitio del tumor el ovario. La muestra del tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de cirugía. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor era desconocido y el tipo de muestra se clasificó como primario.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _{x1}	Bleomicina + Etopósido + Cisplatino	53
R _{x2}	Trabectedina + PLD Doxorubicina	64
R _{x6}	Carboplatino + Paclitaxel	33

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _{x3}	Docetaxel	19
R _{x4}	Carboplatino + Gemcitabina	12
R _{x5}	Doxorubicina (PLD) + Carboplatino	15

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(J), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) Trabectedina + PLD Doxorubicina
- 2) Bleomicina + Etopósido + Cisplatino
- 3) Carboplatino + Gemcitabina

Ejemplo 13.11

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer de 49 años de edad con Cáncer de Mama, siendo el sitio del tumor el ganglio Linfático Regional (R) de la Mama. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T3N1M0 y el tipo de muestra se clasificó como metástasis y rec.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _{x2}	Ciclofosfamida + Doxorubicina + 5-Fluorouracilo	52
R _{x5}	Docetaxel + Capecitabina	39
R _{x10}	Gemcitabina + Paclitaxel	48

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Anastrozol	20
R _x 3	Capecitabina	26
R _x 4	Docetaxel	26
R _x 6	Doxorrubicina	17
R _x 7	Doxorrubicina + Ciclofosfamida	15
R _x 8	Enantato	08
R _x 9	Gemcitabina	21
R _x 11	Paclitaxel	11
R _x 12	Vinorelbina	19

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(K), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) Ciclofosfamida + Doxorrubicina + 5-Fluorouracilo
- 2) Gemcitabina + Paclitaxel
- 3) Docetaxel + Capecitabina

Ejemplo 13.12

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer de 51 años de edad con Cáncer de Mama, siendo el sitio del tumor la mama. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor era indeterminado y el tipo de muestra se clasificó como primario.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 3	Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Docetaxel	43
R _x 6	Filgrastim + Ciclofosfamida + Doxorrubicina + 5-Fluorouracilo	77
R _x 7	Filgrastim + Ciclofosfamida + Epirubicina, + 5-Fluorouracilo	42
R _x 8	Gemcitabina + Docetaxel	62

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Cisplatino + Gemcitabina	17
R _x 2	Ciclofosfamida + Paclitaxel	23
R _x 4	Docetaxel + Ciclofosfamida	22
R _x 5	Docetaxel + Ciclofosfamida + Epirubicina + 5-Fluorouracilo	19

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(L), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) Filgrastim + Ciclofosfamida + Doxorubicina + 5-Fluorouracilo
- 2) Gemcitabina + Docetaxel
- 3) Ciclofosfamida + Doxorubicina + Docetaxel
- 4) Filgrastim + Ciclofosfamida + Epirubicina + 5-Fluorouracilo

Ejemplo 13.13

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer de 50 años de edad con Cáncer de Hígado, siendo el sitio del tumor el hígado. La muestra del tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de cirugía. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T3NxM1 y el tipo de muestra se clasificó como metástasis.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que no responde	
Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1 Sorafenib	16

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de la tabla mencionada anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(M), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que Sorafenib no es una opción terapéutica óptima para el paciente actual. Para ver si en este paciente se puede usar cualquiera de los otros SOC es necesario realizar ensayos adicionales usando otros agentes anticáncer.

Ejemplo 13.14

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 56 años de edad con Cáncer de Hígado, siendo el sitio del tumor el hígado. La muestra del tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de cirugía. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T4N0M0 y el tipo de muestra se clasificó como primario.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. La tabla A representa los fármacos hacia los que se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde	
Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1 Sorafenib	46

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(N), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que Sorafenib es una opción terapéutica óptima para el tratamiento del paciente.

Ejemplo 13.15

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 56 años de edad con Cáncer Colorrectal, siendo el sitio del tumor la masa perineal. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T₃N₀M₀ y el tipo de muestra se clasificó como recurrente.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del

tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

5

Tabla A: Paciente que responde		
	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Oxaliplatino + 5-	75
R _x 2	Irinotecán + 5-	72
R _x 3	Oxaliplatino + 5-FU	35

Tabla B: Paciente que no responde		
	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 4	Capecitabina + Erbitux	24
R _x 5	Avastin	20

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(O), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

10

- 1) Rx1 -Oxaliplatino + 5-FU + Leucovorina
- 2) Rx2 -Irinotecán + 5-FU + Leucovorina
- 15 3) Rx3 - Oxaliplatino + 5-FU
- 4) Rx4 - Capecitabina + Erbitux
- 5) Rx5 - Avastin

Ejemplo 13.16

20

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en un paciente hombre de 59 años de edad que tenía Cáncer Colorrectal con metástasis (mets) en pulmón, siendo el sitio del tumor la zona rectosigmoidea. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T₄N₂M_x y el tipo de muestra se clasificó como metastásico.

25

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

30

Tabla A: Paciente que responde		
	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Oxaliplatino + Irinotecán	73
R _x 3	5-FU + Leucovorina	29

Tabla B: Paciente que no responde		
	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2	Erbitux + Capecitabina	22
R _x 4	Irinotecán + Erbitux	24

35

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(P), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más

óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) R_{x1} - Oxaliplatino + Irinotecán
- 2) R_{x2} - Erbitux + Capecitabina
- 3) R_{x3} - 5-FU + Leucovorina
- 4) R_{x4} - Irinotecán + Erbitux

Ejemplo 13.17

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer de 45 años de edad que tiene Cáncer Pancreático con metástasis en hígado, siendo el sitio del tumor el páncreas. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T₃N₂M₁ y el tipo de muestra se clasificó como metastásico.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _{x3}	Abraxane	50
R _{x4}	Erlotinib + Gemcitabina	68

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _{x1}	Cisplatino + Gemcitabina	23
R _{x2}	Oxaliplatino, + 5-FU	23
R _{x5}	5-FU + Leucovorina	20

Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(Q), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) R_{x1} - Cisplatino + Gemcitabina
- 2) R_{x2} - Oxaliplatino + 5-FU
- 3) R_{x3} - Abraxane
- 4) R_{x4} - Erlotinib + Gemcitabina
- 5) R_{x5} - 5-FU + Leucovorina

Ejemplo 13.18

El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en una paciente mujer de 49 años de edad que tenía Cáncer de Mama con metástasis, siendo el sitio del tumor el ganglio linfático Regional (Rt Br). La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T₃N₁M₁ y el tipo de muestra se clasificó como recurrente.

La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Ciclofosfamida + Metotrexato + 5-FU	77
R _x 3	Doxorrubicina + Ciclofosfamida + 5-FU	68
R _x 4	Doxorrubicina + Ciclofosfamida + Paclitaxel	70
R _x 7	Doxorrubicina + Ciclofosfamida	29
R _x 8	Doxorrubicina + Capecitabina	32

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 2	Abraxane	20
R _x 5	Avastin	18
R _x 6	Capecitabina + Lapatinib	20

5 Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(R), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) R_x1 - Ciclofosfamida + Metotrexato + 5-FU
- 10 2) R_x2 - Abraxane
- 3) R_x3 - Doxorrubicina + Ciclofosfamida + 5-FU
- 4) R_x4 - Doxorrubicina + Ciclofosfamida + Paclitaxel
- 5) R_x5 - Avastin
- 15 6) R_x6 - Capecitabina + Lapatinib
- 7) R_x7 - Doxorrubicina + Ciclofosfamida
- 8) R_x8 - Docetaxel + Capecitabina

Ejemplo 13.19:

20 El Análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" actual se sometió a ensayo en a 40 años de edad una paciente mujer que tenía Cáncer de Mama con Metástasis de Ganglios Linfáticos Sub Claviculares (mets de SCLN), siendo el sitio del tumor los ganglios linfáticos supraclaviculares. La muestra de tumor se obtuvo con el consentimiento del paciente a través de biopsia. El tumor obtenido se analizó, el estadio del tumor se determinó como T_xN_xM_z y el tipo de muestra se clasificó como metastásico.

25 La muestra del tumor se obtuvo y se sometió al método de la presente divulgación reflejado anteriormente como 'Visión general del presente actual'. A partir de ese momento, los datos obtenidos basándose en la respuesta del tumor con respecto a fármacos específicos se obtienen y se presentan en las tablas que siguen a continuación. Las tablas que siguen a continuación representan la respuesta del paciente hacia los fármacos sometidos a ensayo, de modo que la tabla A representa los fármacos hacia los que se observó la respuesta y la tabla B representa los fármacos hacia los que no se observó respuesta.

Tabla A: Paciente que responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 1	Capecitabina + Lapatinib	68
R _x 2	Gemcitabina + Erlotinib	48

Tabla B: Paciente que no responde

	Fármacos Ensayados	Puntuación de M
R _x 3	Herceptin	15
R _x 4	Metotrexato + Ciclofosfamida	19
R _x 5	Avastin	14
R _x 6	5-FU + Carboplatino	17

5 Basándose en la Puntuación de M obtenida a partir de las tablas mencionadas anteriormente y los datos de eficacia ilustrados en la Figura 13(S), el análisis de "Indicador de Respuesta Clínica" sugiere que la opción terapéutica más óptima para el paciente se encuentra en la administración de los fármacos/combinaciones de los mismos en el siguiente orden:

- 1) R_x1 - Capecitabina + Lapatinib
- 2) R_x2 - Gemcitabina + Erlotinib
- 10 3) R_x3 - Herceptin
- 4) R_x4 - Metotrexato + Ciclofosfamida
- 5) R_x5 - Avastin
- 6) R_x6 - 5-FU + Carboplatino

15 Ejemplo 14: "Indicador de Respuesta Clínica" para Someter a Ensayo la Eficacia de Fármacos

La muestra de tumor de Cabeza y Cuello de pacientes inscritos en los ensayos clínicos seleccionada previamente para recibir Cisplatino, Paclitaxel y 5-FU se somete al análisis de "Indicador de Respuesta Clínica". La muestra de cómo se recoge mediante biopsia con punción. El estadio del tumor de la muestra recogida es Estadio clínico II/III. 20 La evaluación del explante de "Indicador de Respuesta Clínica" se realiza para predecir el resultado clínico como se ha explicado en el Ejemplo 5. Los ensayos realizados para llegar a la puntuación de M son WST, KI, y TUNEL. Independientemente, la formación de imágenes de PET-CT se realiza antes y después del tratamiento para evaluar el resultado clínico con respecto a criterios PERCIST y el paciente se somete a ensayos clínicos por la predicción de "Indicador de Respuesta Clínica" se compara con el resultado clínico para evaluar la potencia predictiva del "Indicador de Respuesta Clínica" (Figura 12). 25

En este estudio se inscriben aproximadamente 112 pacientes con tumor de Cabeza y Cuello como se representa en la tabla 15 que se presenta a continuación, en la que el 'Indicador de Respuesta Clínica' se usa para determinar el índice de sensibilidad y para correlacionar al mismo con el resultado clínico. 30

Tabla 15

S/N.º	Tratamiento	Indicador de Respuesta Clínica					Indice de Sensibilidad	Predicción del Índice de Sensibilidad
		Inhibición de la Viabilidad	Inhibición de la proliferación	TUNEL		Indice de Sensibilidad		
				Histología	TUNEL			
1	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	18	25	10	10	16	Enfermedad Progresiva	
2	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	22	12	5	20	15	Enfermedad Progresiva	
3	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	82	82	25	75	66	Respuesta Completa	
4	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	42	50	15	65	43	Respuesta Parcial	
5	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	31	10	5	7	13	Enfermedad Progresiva	
6	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	21	6	9	25	15	Enfermedad Progresiva	
7	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	52	66	75	66	65	Respuesta Completa	
8	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	55	34	42	68	50	Respuesta Parcial	
9	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	87	70	54	92	76	Respuesta Completa	
10	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	65	35	15	45	40	Respuesta Parcial	
11	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	62	76	64	20	56	Respuesta Parcial	
12	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	8	42	10	35	24	Enfermedad Progresiva	
13	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	24	15	18	65	31	Respuesta Parcial	
14	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	59	85	25	90	65	Respuesta Completa	
15	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	31	54	15	48	37	Respuesta Parcial	
16	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	56	55	63	70	61	Respuesta Completa	
17	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	12	8	9	12	10	Enfermedad Progresiva	
18	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	82	100	53	76	78	Respuesta Completa	
19	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	11	83	11	67	43	Respuesta Parcial	
20	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	23	14	22	64	31	Respuesta Parcial	
21	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	47	74	28	57	52	Respuesta Parcial	
22	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	7	0	15	0	6	Enfermedad Progresiva	
23	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	73	87	15	100	69	Respuesta Completa	
24	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	61	35	20	55	43	Respuesta Parcial	

S/N.º	Tratamiento	Indicador de Respuesta Clínica				Indice de Sensibilidad	Predicción del Índice de Sensibilidad
		Inhibición de la Viabilidad	Inhibición de la proliferación	Histología	TUNEL		
25	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	42	82	48	72	61	Respuesta Completa
26	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	52	78	65	100	74	Respuesta Completa
27	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	21	58	33	25	34	Respuesta Parcial
28	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	31	0	5	10	12	Enfermedad Progresiva
29	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	42	72	45	24	46	Respuesta Parcial
30	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	27	77	42	52	50	Respuesta Parcial
31	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	55	65	80	56	64	Respuesta Completa
32	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	47	31	20	47	36	Respuesta Parcial
33	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	66	72	58	100	74	Respuesta Completa
34	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	72	32	29	41	44	Respuesta Parcial
35	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	34	25	19	35	28	Respuesta Parcial
36	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	42	40	15	65	41	Respuesta Parcial
37	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	10	2	5	10	7	Enfermedad Progresiva
38	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	72	21	13	32	35	Respuesta Parcial
39	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	77	57	51	62	62	Respuesta Completa
40	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	18	0	7	12	9	Enfermedad Progresiva
41	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	31	55	24	72	46	Respuesta Parcial
42	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	29	88	32	100	62	Respuesta Completa
43	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	44	27	20	44	34	Respuesta Parcial
44	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	51	55	12	36	39	Respuesta Parcial
45	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	32	42	15	65	39	Respuesta Parcial
46	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	37	85	46	92	65	Respuesta Completa
47	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	10	15	5	0	8	Enfermedad Progresiva
48	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	22	65	26	44	39	Respuesta Parcial

S/N.º	Tratamiento	Indicador de Respuesta Clínica				Indice de Sensibilidad		Predicción del Índice de Sensibilidad
		Inhibición de la Viabilidad	Inhibición de la proliferación	Histología	TUNEL	Indice de Sensibilidad		
49	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	56	65	32	88	60	Respuesta Completa	
50	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	43	32	24	57	39	Respuesta Parcial	
51	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	52	41	22	54	42	Respuesta Parcial	
52	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	48	45	32	65	48	Respuesta Parcial	
53	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	32	23	14	40	27	Respuesta Parcial	
54	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	3	0	2	0	1	Enfermedad Progresiva	
55	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	55	63	31	90	60	Respuesta Completa	
56	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	60	55	41	32	47	Respuesta Parcial	
57	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	45	22	15	45	32	Respuesta Parcial	
58	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	5	15	4	0	6	Enfermedad Progresiva	
59	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	64	42	10	35	38	Respuesta Parcial	
60	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	31	43	25	55	39	Respuesta Parcial	
61	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	22	35	12	0	17	Enfermedad Progresiva	
62	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	15	52	17	64	37	Respuesta Parcial	
63	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	85	58	17	49	52	Respuesta Parcial	
64	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	54	72	42	67	59	Respuesta Parcial	
65	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	7	8	6	30	13	Enfermedad Progresiva	
66	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	42	32	16	65	39	Respuesta Parcial	
67	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	24	42	55	56	44	Respuesta Parcial	
68	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	29	0	5	12	12	Enfermedad Progresiva	
69	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	62	62	32	46	51	Respuesta Parcial	
70	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	16	0	5	25	12	Enfermedad Progresiva	
71	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	67	54	30	45	49	Respuesta Parcial	
72	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	41	76	43	100	65	Respuesta Completa	

SI N.º	Tratamiento	Indicador de Respuesta Clínica				Indice de Sensibilidad	Predicción del Índice de Sensibilidad
		Inhibición de la Viabilidad	Inhibición de la proliferación	Histología	TUNEL		
73	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	58	32	35	85	53	Respuesta Parcial
74	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	0	50	10	20	20	Enfermedad Progresiva
75	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	31	45	31	47	39	Respuesta Parcial
76	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	2	34	20	21	19	Enfermedad Progresiva
77	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	43	45	41	65	49	Respuesta Parcial
78	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	72	65	88	89	79	Respuesta Completa
79	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	25	54	45	43	42	Respuesta Parcial
80	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	14	8	12	30	16	Enfermedad Progresiva
81	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	23	85	21	50	45	Respuesta Parcial
82	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	55	78	57	90	70	Respuesta Completa
83	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	32	64	33	32	40	Respuesta Parcial
84	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	27	88	62	100	69	Respuesta Completa
85	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	64	39	42	32	44	Respuesta Parcial
86	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	25	5	2	15	12	Enfermedad Progresiva
87	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	55	33	21	32	35	Respuesta Parcial
88	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	39	85	65	75	66	Respuesta Completa
89	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	37	47	65	55	51	Respuesta Parcial
90	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	2	3	6	7	5	Enfermedad Progresiva
91	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	11	13	2	15	10	Enfermedad Progresiva
92	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	34	28	25	34	30	Respuesta Parcial
93	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	77	56	32	75	60	Respuesta Completa
94	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	47	67	42	50	52	Respuesta Parcial
95	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	21	22	4	10	14	Enfermedad Progresiva
96	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	72	85	45	72	69	Respuesta Completa

SIN.º	Tratamiento	Indicador de Respuesta Clínica					Indice de Sensibilidad	Predicción del Índice de Sensibilidad
		Inhibición de la Viabilidad	Inhibición de la proliferación	Histología	TUNEL			
97	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	33	75	66	87	65	Respuesta Completa	
98	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	17	0	8	5	8	Enfermedad Progresiva	
99	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	41	37	62	45	46	Respuesta Parcial	
100	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	72	46	31	84	58	Respuesta Parcial	
101	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	50	85	70	100	76	Respuesta Completa	
102	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	32	3	10	5	13	Enfermedad Progresiva	
103	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	65	56	39	45	51	Respuesta Parcial	
104	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	58	72	65	95	73	Respuesta Completa	
105	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	35	100	69	87	73	Respuesta Completa	
106	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	42	33	27	45	37	Respuesta Parcial	
107	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	0	20	5	0	6	Enfermedad Progresiva	
108	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	19	43	42	54	40	Respuesta Parcial	
109	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	18	53	32	48	38	Respuesta Parcial	
110	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	32	15	12	0	15	Enfermedad Progresiva	
111	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	44	85	52	95	69	Respuesta Completa	
112	Cisplatino + Docetaxel + 5FU	21	0	12	0	8	Enfermedad Progresiva	

A partir de la tabla mencionada anteriormente a así como a partir de la figura 12 se puede deducir lo siguiente: el panel izquierdo de la Figura 12 (dosis previa y después de la dosis) presenta las imágenes de CT que muestran la ubicación de los tumores antes y después de quimioterapia. El panel de la parte izquierda superior muestra que el tumor se redujo que la persona presentaba respuesta a la terapia. Al ser evaluado el tumor de esta persona usando huella oncológica recibió una puntuación de M de 62 indicativa de respuesta clínica completa que es alineamiento con el resultado clínico real. El panel de la parte derecha superior muestra la respuesta clínica de las 30 muestras de tumor que tenían una puntuación de $M \geq 60$, más de un 90 % de los pacientes presentaban una respuesta completa, mientras que un 10 % presentaba una respuesta parcial. Sin embargo, ninguno de ellos eran pacientes que no respondían.

Del mismo modo, el panel de la parte izquierda media es una representación de un paciente que responde parcialmente cuya puntuación de M se determina que es 45. Al igual que se predijo para la puntuación de M entre 25 y < 60 el paciente es indicativo de respuesta parcial. De los 53 tumores de pacientes que tenían puntuación de M en esta categoría, más de un 79 % eran pacientes de respuesta parcial con un 8 % teniendo una respuesta completa y un 13 % no teniendo respuesta.

El panel de la parte inferior es representativo de pacientes que no responden, en el que el CT después de la dosis en la parte izquierda muestra que el paciente tiene enfermedad progresiva después del tratamiento y tumor se le obtuvo una puntuación de M de 18 indicativa de sin respuesta. De los 29 pacientes de los que se predijo que no tenían respuesta mediante "Indicador de Respuesta Clínica", un 100 % de los mismos ciertamente no presentaba respuesta lo que indica la potencia de esta tecnología para predecir de forma fiable el resultado clínico.

APLICACIONES

Aplicación de desarrollo farmacológico:

Pacientes de emparejamiento a fármacos: En el contexto del desarrollo farmacológico, es importante conocer qué pacientes responderán más probablemente al fármaco en desarrollo incluso antes de que el fármaco se administre a los pacientes. Además, en el contexto de un cáncer es particularmente importante como es necesario que se decida los fármacos existentes que es necesario combinar con el fármaco en desarrollo en la estrategia de "Combinación" que se usa en el tratamiento para el cáncer. Para decidir qué tipo de cáncer es diana es útil decidir (por ejemplo: cáncer de colon con respecto a cáncer pancreático). En general, es útil para desarrollar una estrategia de ensayo clínico mejor tiene como resultado un tiempo de desarrollo más rápido, costes más bajos y aumento de las posibilidades de éxito.

Aplicación de diagnóstico:

Selección del tratamiento: Es útil como un modelo de diagnóstico para ayudar a los doctores a decidir qué opción de tratamiento, entre las opciones aprobadas en la actualidad, son las más adecuadas para el paciente en investigación. Esto es particularmente útil en pacientes con cáncer secundario (recaída) así como cáncer metastásico, en los que la tasa de éxito del tratamiento actual es $< 20\%$ y varía de paciente a paciente. También es útil para decidir el tratamiento de primera línea en el que la tasa de éxito actual es $\sim 50\%$. La aplicación del diagnóstico de "Indicador de Respuesta Clínica" se ha validado en el contexto de Cáncer de Cabeza y Cuello, cáncer de Mama, cáncer Gástrico, cáncer Pancreático, cáncer Colorrectal, cáncer de Hígado, cáncer de Ovario, cáncer de Esófago, AML y CML. La potencia de la predicción es $\sim 100\%$ en el caso de los pacientes que no responden, $\sim 75\%$ en el caso de los pacientes que responden parcialmente y $\sim 90\%$ en el caso de los pacientes que responden.

Aplicación de biología de traducción:

En el desarrollo de fármacos anticáncer, la identificación del cáncer óptimo para los fármacos que se están desarrollando, selección del fármaco para el Tratamiento de Referencia como una estrategia de Co-desarrollo para los fármacos que se están desarrollando, selección del perfil del paciente que más probablemente responderá al fármaco o combinación de fármacos que se están estudiando, y la identificación de biomarcadores de pronóstico para el fármaco o combinación de fármacos que se están estudiando. Además, la presente invención también utiliza la herramienta de separación de pacientes en desarrollo de herramientas de diagnóstico complementarias para fármacos anticáncer incluyendo agentes quimioterapéuticos, fármacos dirigidos, y agentes biológicos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de Matriz Extra Celular, ECM, que comprende los componentes - colágeno 1, colágeno 3, colágeno 4, colágeno 6, Fibronectina, Vitronectina, Cadherina, Filamina A, Vimentina, Osteopontina, Laminina, Decorina, y Tenascina C.
- 10 2. La composición de ECM como se reivindica en la reivindicación 1 que comprende adicionalmente uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Proteínas de la membrana basal, Proteínas citoesqueléticas y Proteínas de matriz.
- 15 3. Un método para obtener una composición de Matriz Extra Celular como se reivindica en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método combinar los componentes de la ECM - colágeno 1, colágeno 3, colágeno 4, colágeno 6, Fibronectina, VitroNectina, Cadherina, Filamina A, Vimentina, Osteopontina, Laminina, Decorina, Tenascina C para obtener la composición de ECM.
- 20 4. El método como se reivindica en la reivindicación 3, en el que los componentes comprenden adicionalmente uno o más componentes seleccionados entre el grupo consiste en Proteínas de la membrana basal, Proteínas citoesqueléticas y Proteínas de matriz.
- 25 5. Una plataforma de microentorno tumoral para cultivar tejido tumoral, comprendiendo dicho microentorno la composición de ECM como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, medio de cultivo opcionalmente junto con suero, plasma o las PBMC y fármaco.
- 30 6. Un método para obtener una plataforma de microentorno tumoral para cultivar tejido tumoral como se reivindica en la reivindicación 5, comprendiendo dicho método una operación de revestimiento de plataforma con composición de ECM como se reivindica en la reivindicación 1 o 2 y añadir medio de cultivo opcionalmente junto con suero, plasma o las PBMC y fármaco, a la plataforma para obtener la plataforma de microentorno tumoral.
- 35 7. Un método de cultivo organotípico de tejido tumoral, comprendiendo dicho método una operación de cultivo del tejido tumoral en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 5 para obtener el cultivo organotípico.
- 40 8. Un método para predecir la respuesta de un sujeto tumoral a fármaco(s), comprendiendo dicho método las operaciones de:
 - a. cultivar el tejido tumoral del sujeto en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 5, para obtener tejido tumoral cultivado;
 - b. tratar el tejido tumoral cultivado con el fármaco(s) y realizar el ensayo;
 - 45 c. convertir la lectura del ensayo en métrica numérica para obtener un índice de sensibilidad y a partir de ese momento, predecir la respuesta del sujeto al fármaco(s); y
 - d. opcionalmente, correlacionar el índice de sensibilidad con la respuesta clínica del sujeto al fármaco(s).
- 50 9. Un método para predecir la respuesta de un sujeto tumoral a fármaco(s), comprendiendo dicho método las operaciones de:
 - a. cultivar el tejido tumoral del sujeto en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 5, para obtener tejido tumoral cultivado;
 - b. tratar el tejido tumoral cultivado con el fármaco(s);
 - 55 c. evaluar la respuesta tumoral al fármaco con la pluralidad de ensayos para obtener puntuación de evaluación para cada uno de la pluralidad de ensayos;
 - d. asignar una puntuación de coeficiente de ponderación para cada uno de la pluralidad de ensayos;
 - e. multiplicar la puntuación de evaluación de cada uno de la pluralidad de ensayos con la puntuación del coeficiente de ponderación del ensayo correspondiente de la pluralidad de ensayos para obtener una puntuación de ensayo independiente para cada uno de la pluralidad de ensayos;
 - 60 f. combinar la puntuación de ensayo independiente de cada uno de la pluralidad de ensayos para obtener un índice de sensibilidad y a partir de ese momento predecir la respuesta del sujeto al fármaco(s); y
 - g. opcionalmente, correlacionar el índice de sensibilidad con la respuesta clínica del sujeto al fármaco(s).
- 65 10. Un método de identificación sistemática o desarrollo de agente anticáncer, comprendiendo dicho método las operaciones de:
 - a. cultivar tejido tumoral del sujeto en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 5, para obtener tejido tumoral cultivado; y
 - b. tratar el tejido tumoral cultivado con el agente, evaluando la respuesta tumoral al agente mediante ensayo para determinar el efecto de dicho agente en la célula tumoral.

11. Un método para identificar sistemáticamente células tumorales para marcadores específicos, comprendiendo dicho método las operaciones de:

- a. cultivar tejido tumoral del sujeto en una plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 5, para obtener tejido tumoral cultivado;
- b. tratar el tejido tumoral cultivado con fármaco(s) y evaluar la respuesta tumoral al fármaco mediante ensayo; y
- c. realizar análisis de micromatriz y Ácido Nucleico para identificar sistemáticamente los biomarcadores.

12. La composición de Matriz Extra Celular, ECM, como se reivindica en la reivindicación 1, en la que la composición de Matriz Extra Celular, ECM, es específica de tumor; y en la que el colágeno 1 se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml o aproximadamente 50 µg/ml; el colágeno 3 se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 0,1 µg/ml o aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente 100 µg/ml; el colágeno 4 se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml o aproximadamente 250 µg/ml; el colágeno 6 se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 0,1 µg/ml o aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml; la Fibronectina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml o aproximadamente 500 µg/ml; la Vitronectina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 95 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml; la Cadherina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 5 µg/ml; la Filamina A se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml; la Vimentina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml; la Laminina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 5 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml; la Decorina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 10 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml; la Tenascina C se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 10 µg/ml o aproximadamente 25 µg/ml; y la Osteopontina se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml, preferentemente a aproximadamente 1 µg/ml o aproximadamente 5 µg/ml.

13. Los métodos como se reivindica en las reivindicaciones 6 a 11, en los que dicho tejido tumoral se obtiene a partir de una fuente seleccionada entre el grupo que comprende sistema nervioso central, médula ósea, sangre, bazo, timo, corazón, glándula mamaria, hígado, páncreas, tiroides, músculo esquelético, riñón, pulmón, intestino, estómago, esófago, ovario, vejiga, testículo, útero, tejido del estroma y tejido conectivo o cualquier combinación de los mismos; y en los que el tumor o el tejido tumoral se obtiene por vía quirúrgica o mediante biopsia o como xenoinjerto o cualquier combinación de los mismos; y el tumor o el tejido tumoral se divide en pequeños trozos de secciones de aproximadamente 100 µm a aproximadamente 3000 µm.

14. El microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 5 en el que el tejido tumoral se obtiene a partir de una fuente seleccionada entre el grupo que comprende sistema nervioso central, médula ósea, sangre, bazo, timo, corazón, glándula mamaria, hígado, páncreas, tiroides, músculo esquelético, riñón, pulmón, intestino, estómago, esófago, ovario, vejiga, testículo, útero, tejido del estroma y tejido conectivo o cualquier combinación de los mismos; en el que el tumor o el tejido tumoral se obtiene por vía quirúrgica o mediante biopsia o como xenoinjerto o cualquier combinación de los mismos; y el tumor o el tejido tumoral se divide en pequeños trozos de secciones de aproximadamente 100 µm a aproximadamente 3000 µm; en el que el cultivo del tejido tumoral se realiza a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C; durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 a 10 días, preferentemente de aproximadamente 3 a 7 días; y con CO₂ aproximadamente al 5 %; y en el que la plataforma de revestimiento se selecciona entre el grupo que comprende placa, base, matraz, placa de cultivo, placa de Petri y placa de cultivo de Petri.

15. La plataforma de microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 5 en la que dicha plataforma de microentorno es para mantener las redes de señalización de células tumorales; y para mantener un microentorno de tejido intacto, arquitectura celular e integridad de interacción del estroma tumoral.

16. El microentorno tumoral como se reivindica en la reivindicación 5 en el que el medio de cultivo se selecciona entre el grupo que comprende Medio de Eagle Modificado con Dulbecco, DMEM, o 15 RPMI 1640, Medio del Roswell Park Memorial Institute, a una concentración que varía de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 100 %, preferentemente a aproximadamente un 80 %; en el que el medio de cultivo comprende además opcionalmente Suero Bovino Fetal inactivado por calor, PBS, a una concentración que varía de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 40 %, preferentemente a aproximadamente un 2 % en p/p; Penicilina-Estreptomicina a

- una concentración que varía de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 %, preferentemente a aproximadamente un 1 % en p/p; piruvato sódico a una concentración que varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, preferentemente a aproximadamente 100 mM; el aminoácido no esencial es L-glutamina a una concentración que varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, preferentemente a aproximadamente 5 mM; y HEPES ((ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) a una concentración que varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, preferentemente a aproximadamente 10 mM o cualquier combinación de los mismos; y el suero en el medio de cultivo se encuentra en una concentración que varía de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, preferentemente a aproximadamente un 2 %.
- 5
- 10 17. Los métodos como se reivindica en las reivindicaciones 6 a 11, en los que el tumor se selecciona entre el grupo que comprende estómago, colon, cabeza y cuello, cerebro, cavidad oral, mama, gástrico, gastrointestinal, esofágico, colorrectal, pancreático, pulmón, hígado, riñón, ovario, útero, hueso, próstata, testículo, glioblastoma, astrocitoma, melanoma, tiroides, vejiga, pulmón de células no microcíticas, pulmón de células microcíticas, cánceres hematológicos incluyendo AML, leucemia mieloide aguda, CML, leucemia mielógena crónica, ALL, leucemia linfocítica aguda, TALL, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, NHL, linfoma no Hodgkins, DBCL, linfoma difuso de linfocitos B, CLL, leucemia linfocítica crónica, y mieloma múltiple o cualquier combinación de los mismos.
- 15
18. Los métodos como se reivindica en las reivindicaciones 8 a 11, en los que el ensayo selecciona entre el grupo que consiste en ensayo de viabilidad celular, muerte celular, proliferación celular, morfología tumoral, contenido del estroma tumoral, metabolismo celular, senescencia o cualquier combinación de los mismos; y en el que el ensayo para la viabilidad celular y el metabolismo celular se selecciona entre el grupo que comprende ensayo de WST, ensayo de absorción de ATP y ensayo de absorción de glucosa; el ensayo para la muerte celular se selecciona entre el grupo que comprende ensayo de LDH, ensayo de Caspasa 3 Activada, ensayo de Caspasa 8 Activada y ensayo de Óxido Nítrico Sintasa, TUNEL; el ensayo para la proliferación celular se selecciona entre el grupo que comprende ensayo de Ki67, ensayo de proporción de ATP/ADP y ensayo de absorción de glucosa; y el ensayo para la morfología tumoral y el estroma tumoral es H y E, tinción con Hematoxilina y Eosina; o cualquier combinación de los mismos.
- 20
- 25
19. Los métodos como se reivindica en las reivindicaciones 8 y 9, en las que el método se usa para decidir el tratamiento para el sujeto entre el grupo que comprende quimioterapia, terapia dirigida, cirugía, radiación o cualquier combinación de los mismos; y en el que el índice de sensibilidad se correlaciona con la respuesta clínica completa, respuesta clínica parcial y sin respuesta clínica cuando el índice de sensibilidad es mayor que 60, entre 20 y 60 y menor que 20 respectivamente.
- 30
20. El método como se reivindica en la reivindicación 9, en el que la asignación de una puntuación de coeficiente de ponderación para cada uno de la pluralidad de ensayos se basa en la naturaleza del fármaco usado.
- 35
21. El método como se reivindica en la reivindicación 11, en el que el análisis de micromatriz y de ácido nucleico de ADN, ARN o micro ARN se realiza para detectar una modulación de la ruta antes y después del tratamiento con fármaco; y en el que el análisis de micromatriz y de Ácido Nucleico se confirma usando un ensayo seleccionado entre el grupo que comprende PCR en tiempo real, RTPCR, ensayo Inmunohistoquímico, IHC, análisis y formación de perfiles fosfoproteómicos.
- 40

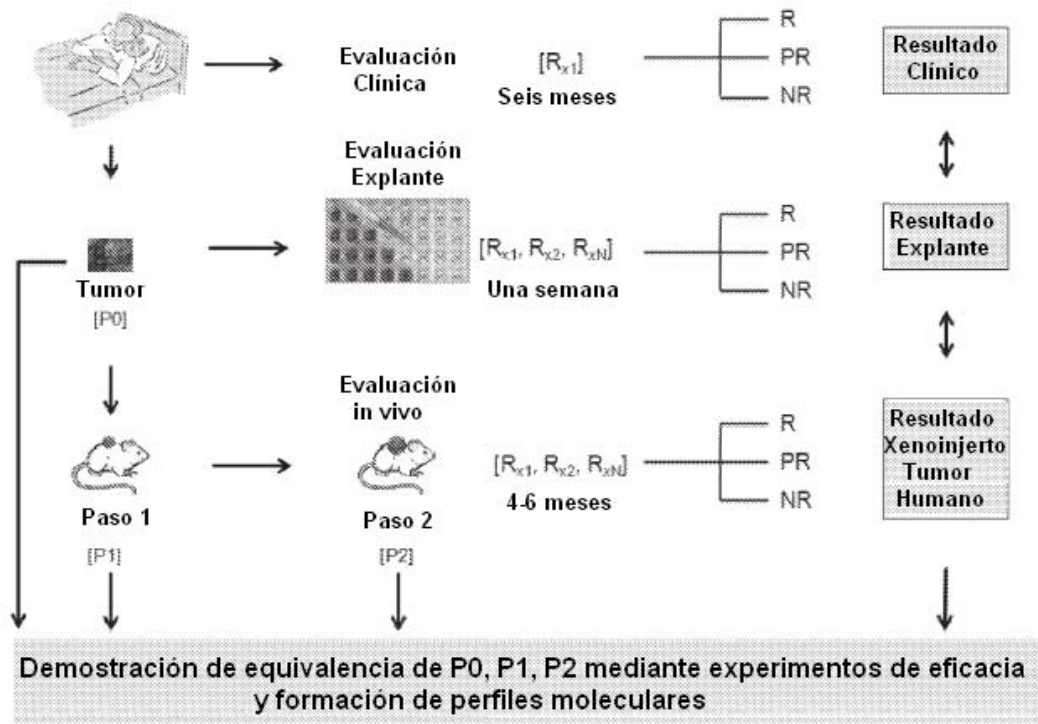


Figura 1

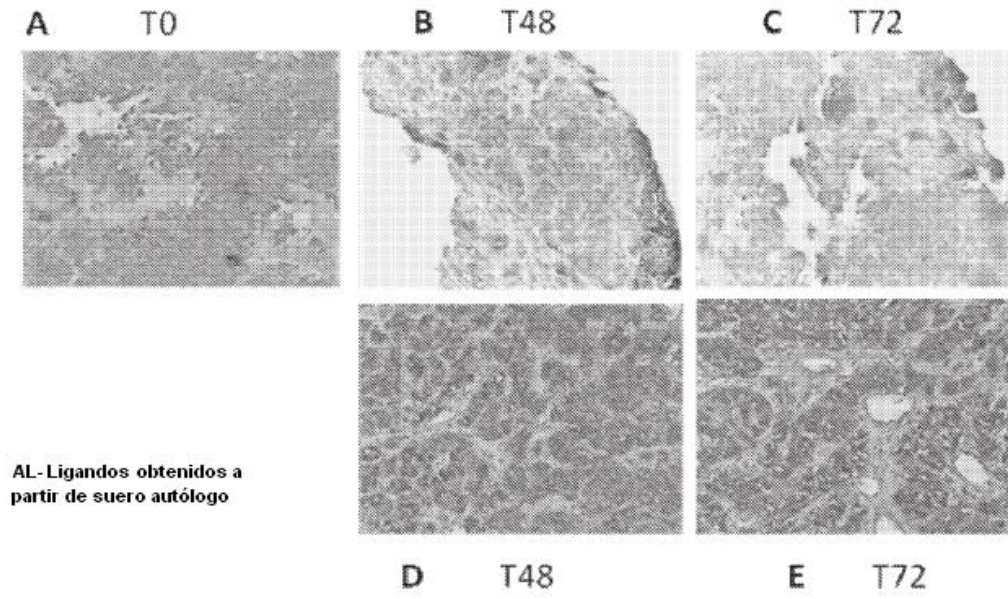


Figura 2

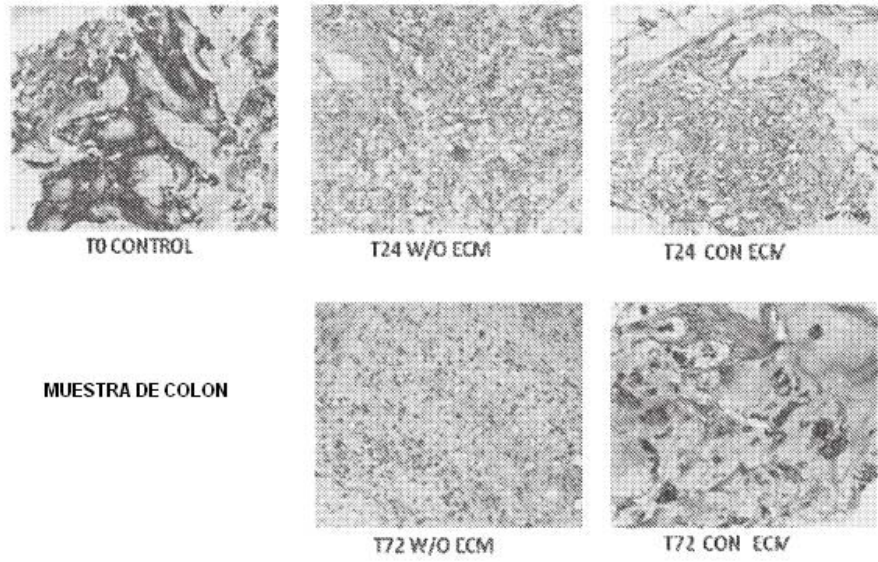


Figura 3A

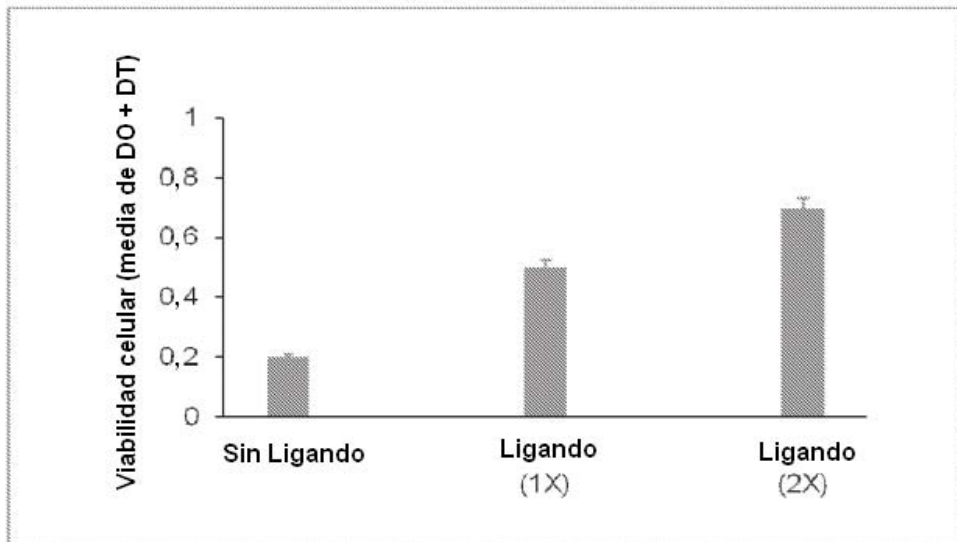


Figura 3B

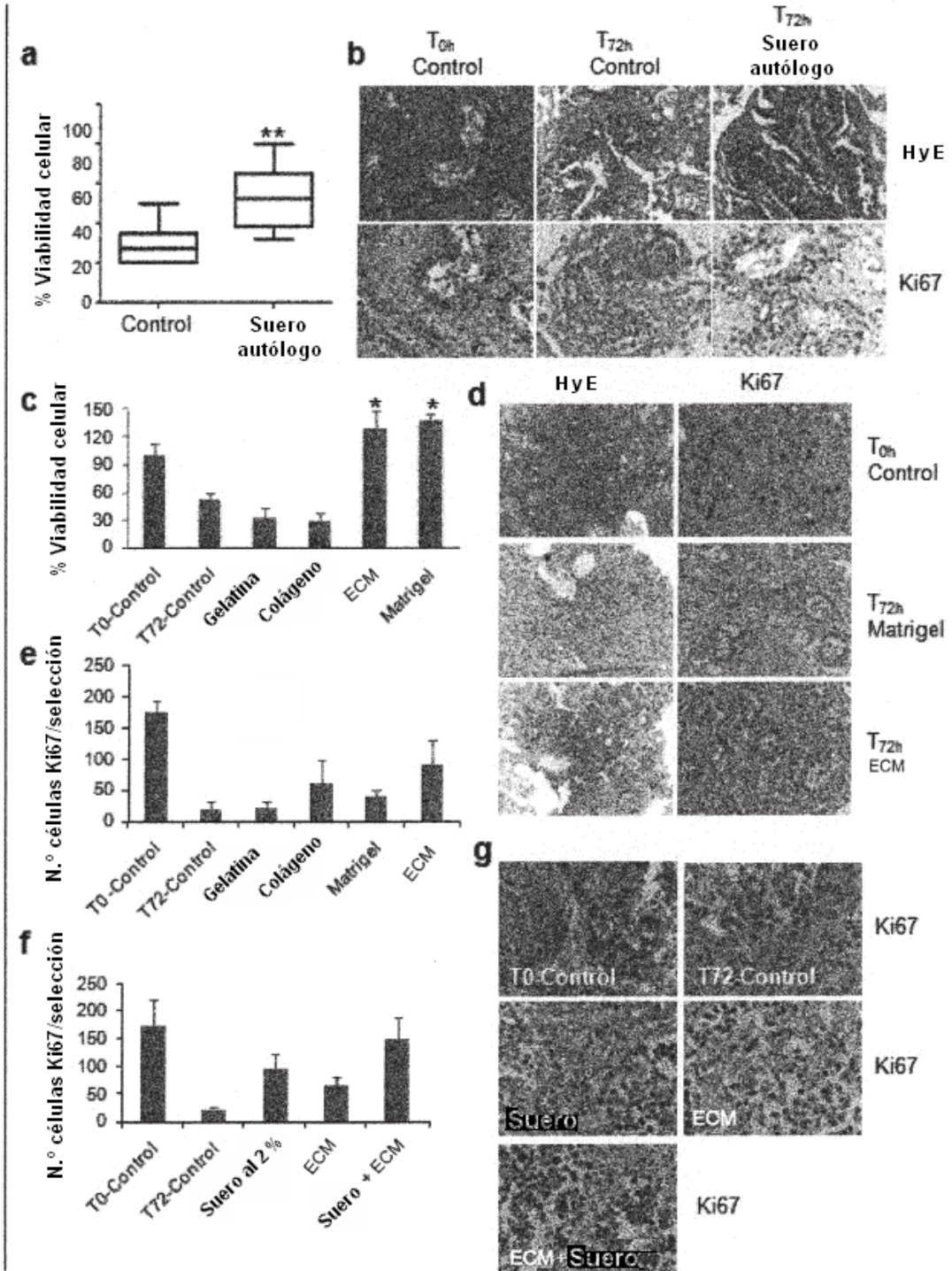


Figura 4

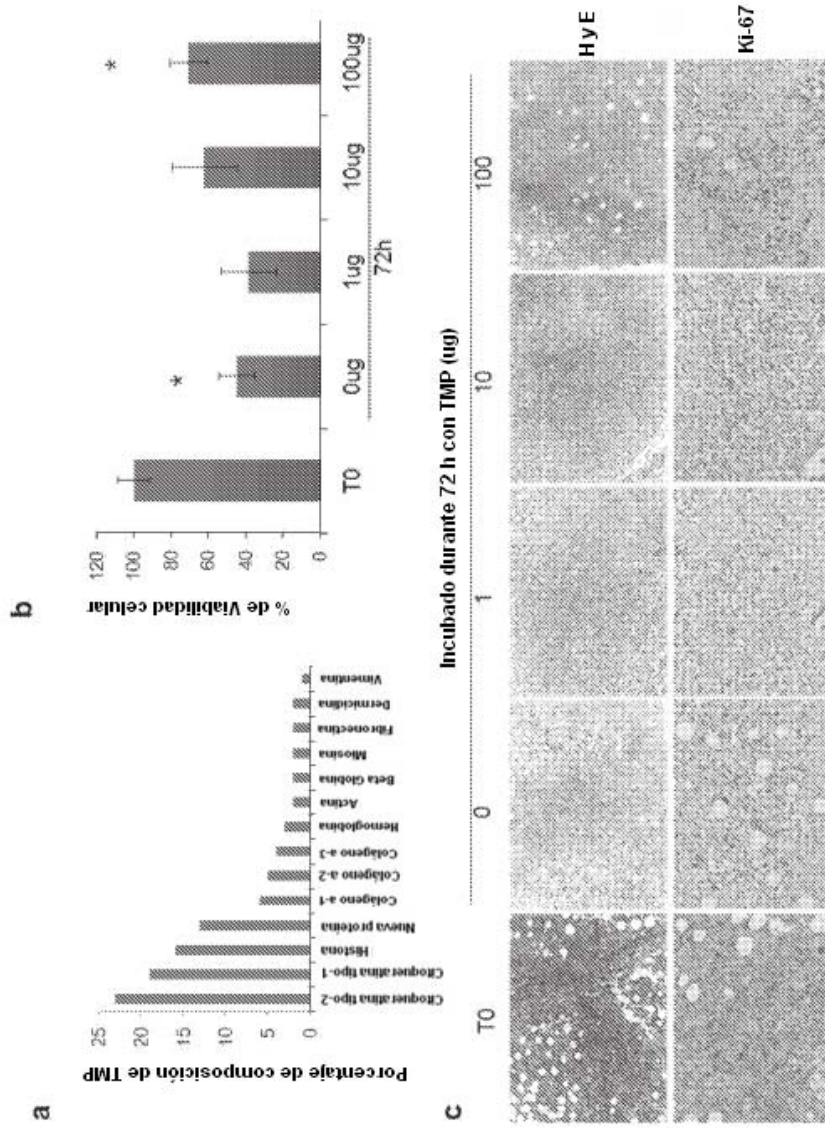


Figura 5

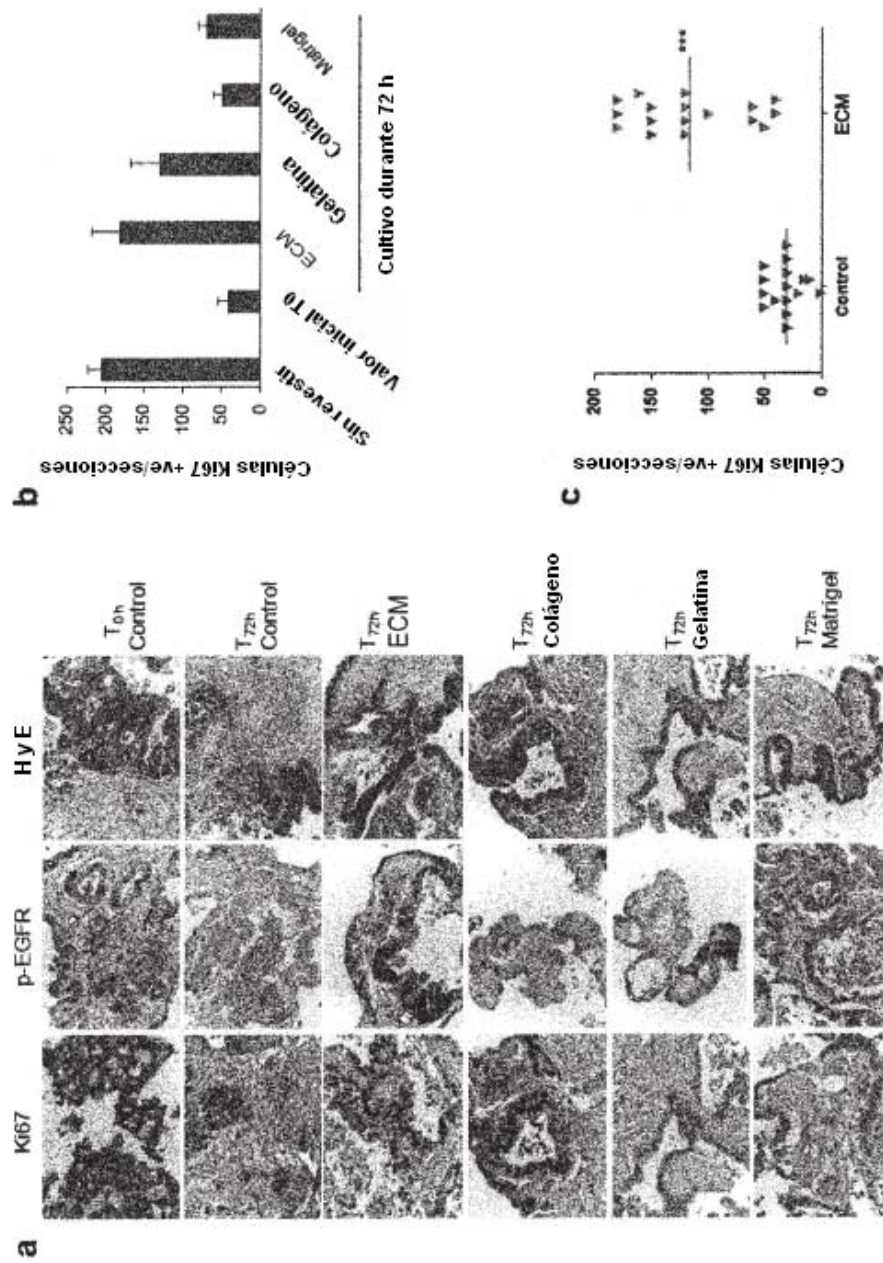


Figura 6

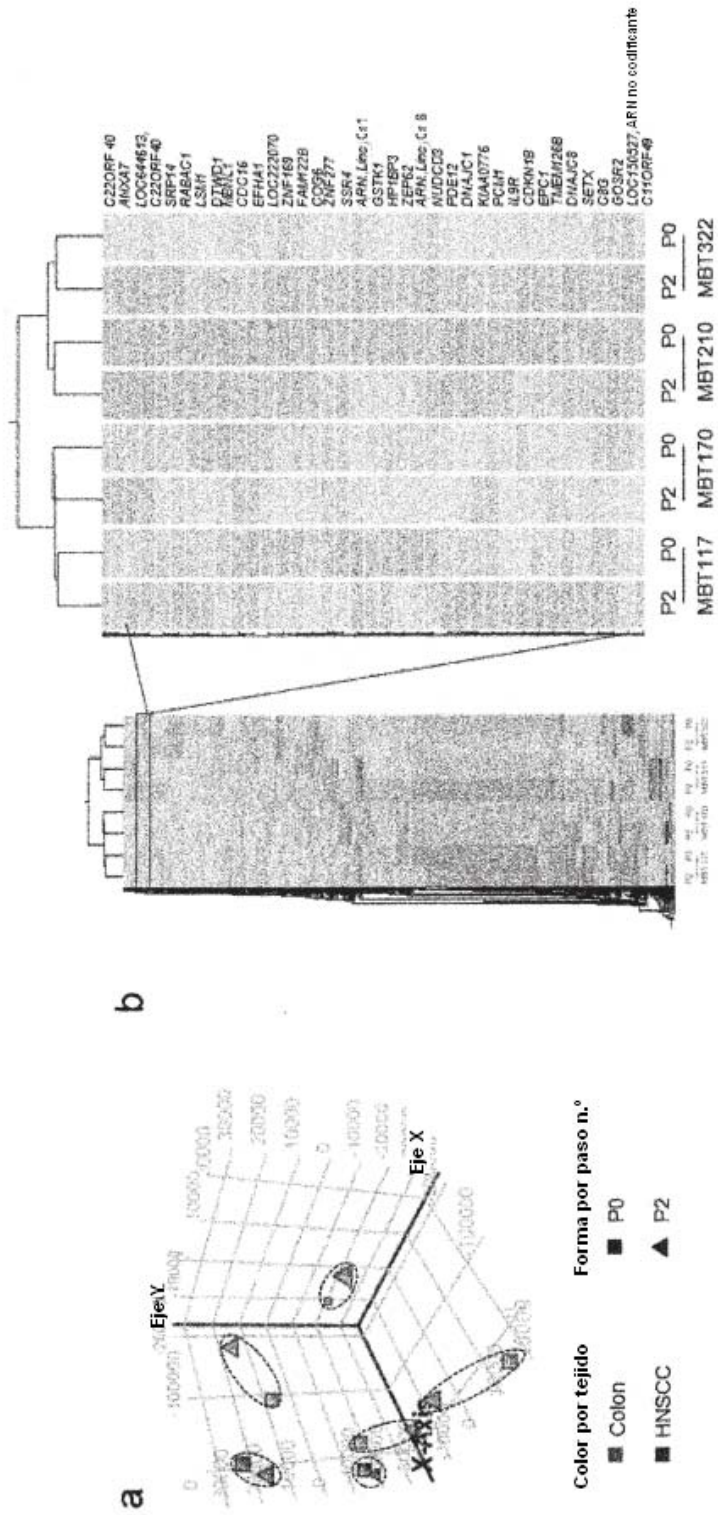


Figura 7

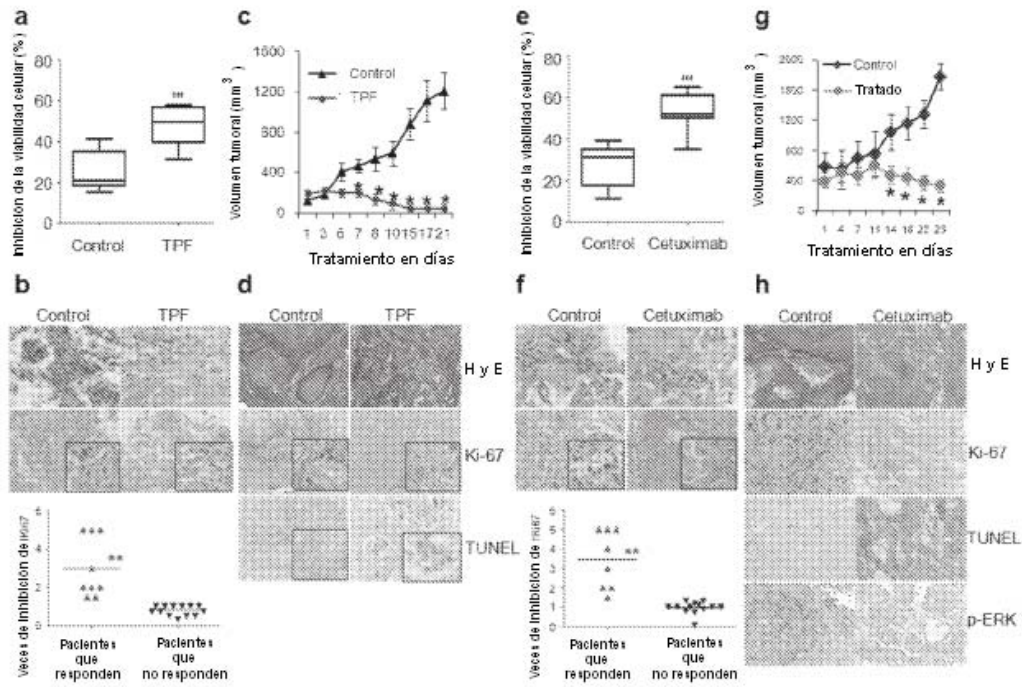


Figura 9

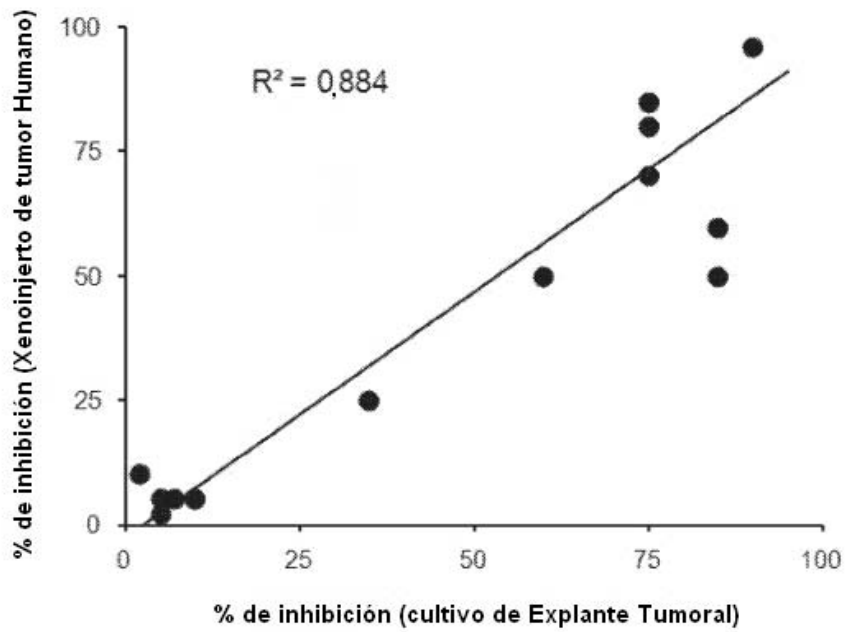


Figura 10

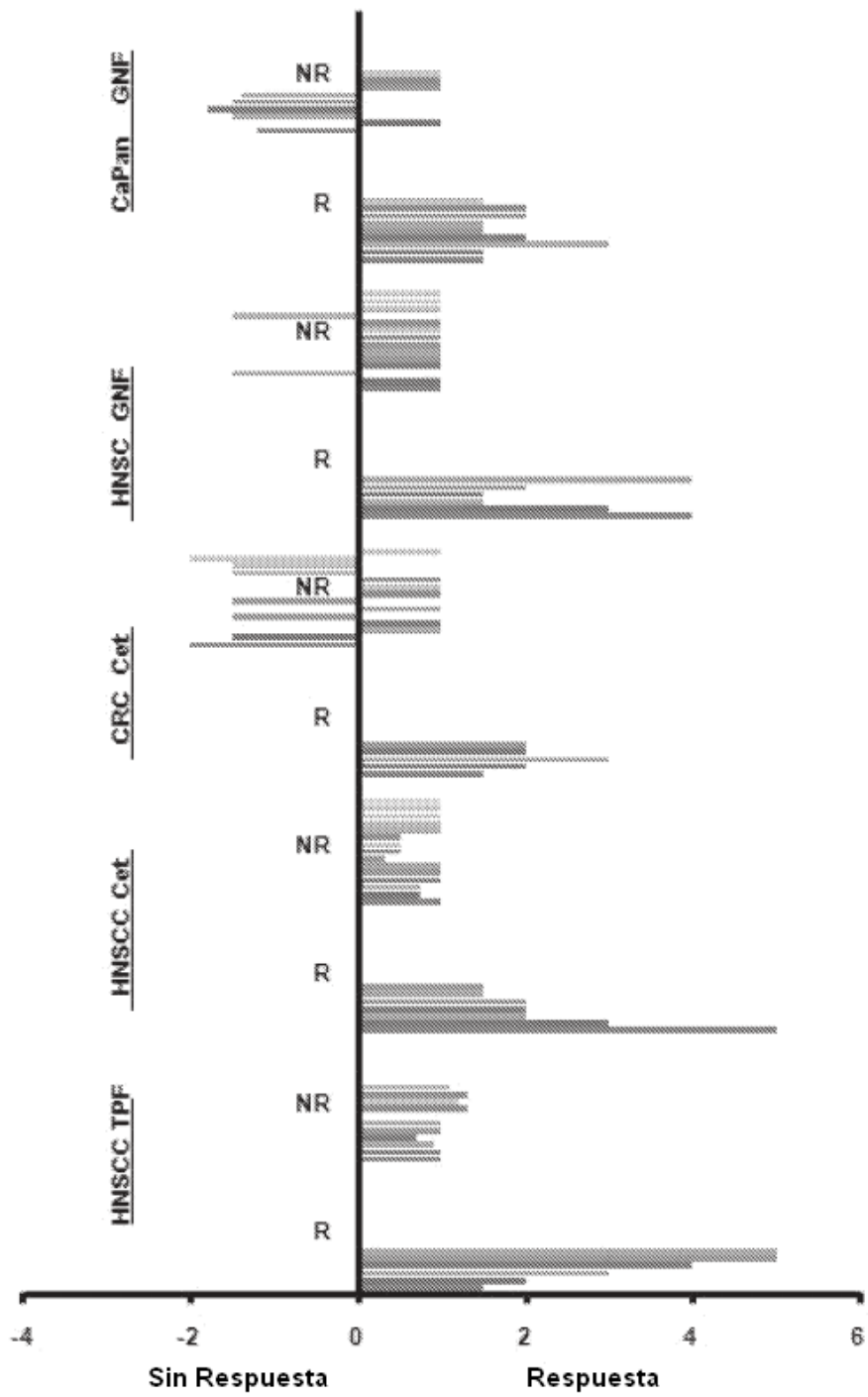


Figura 11

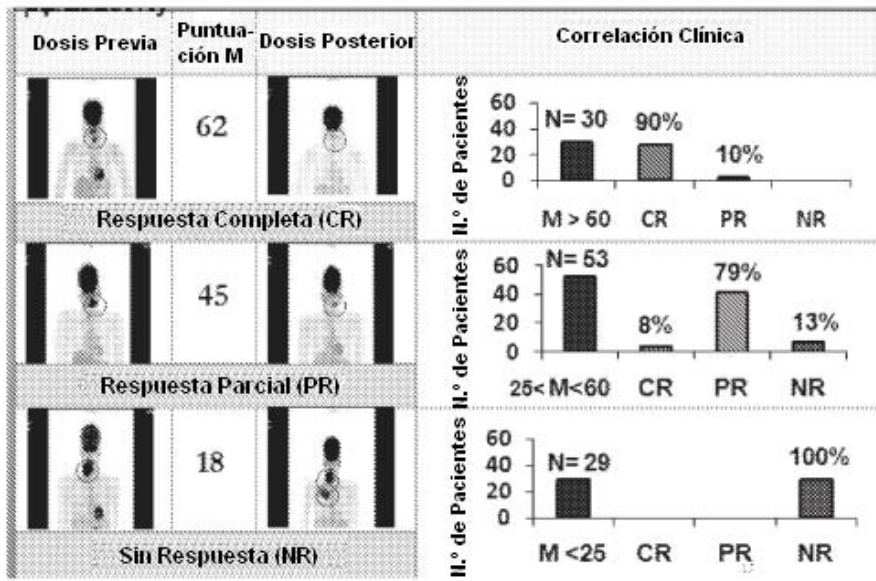


Figura 12

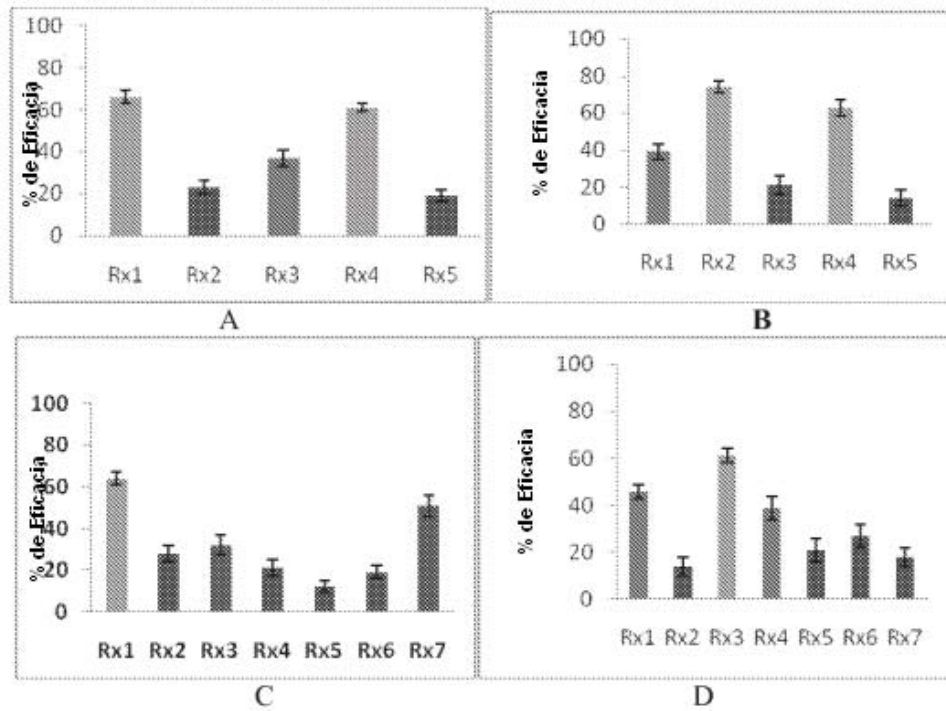


Figura 13

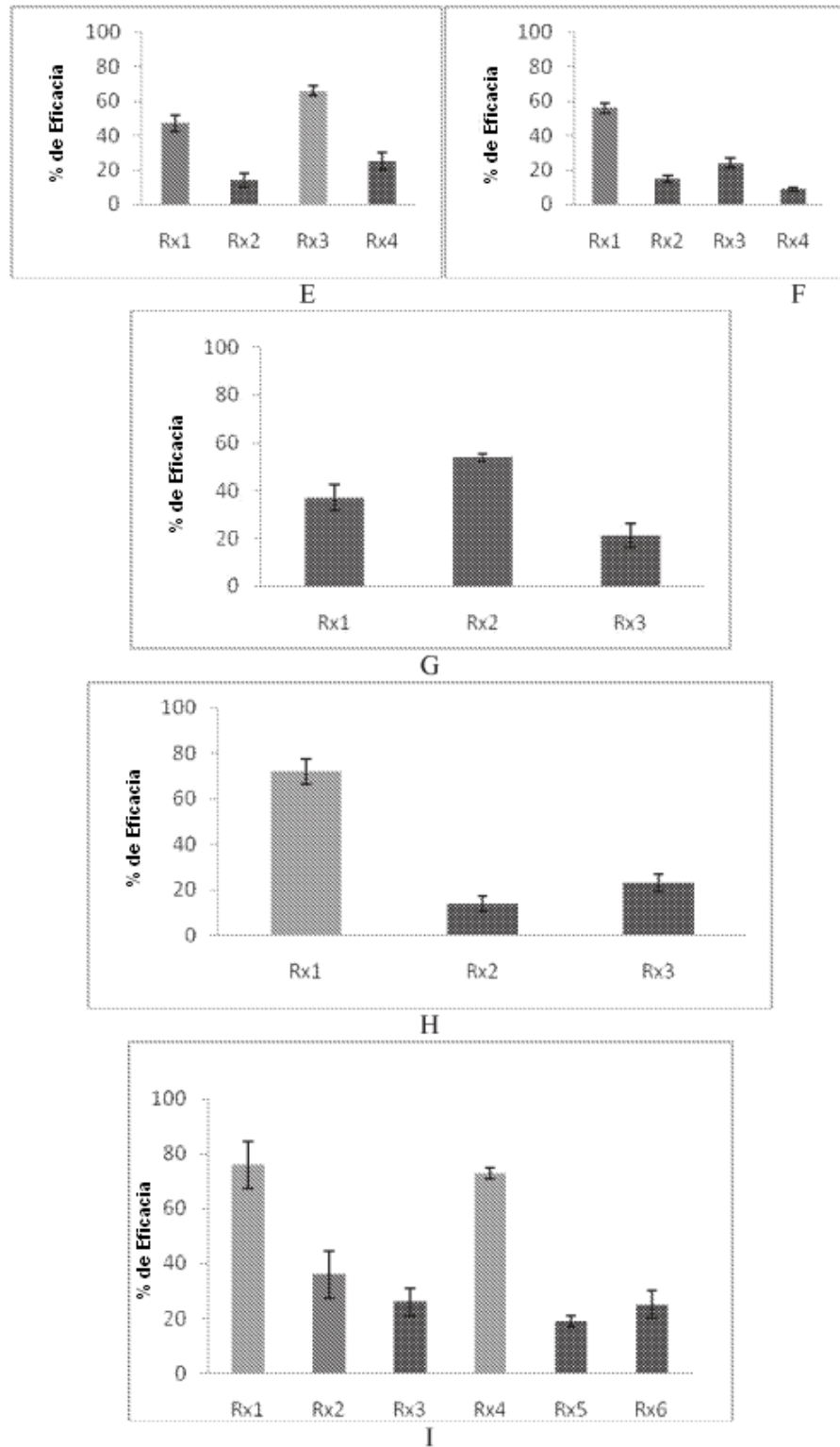


Figura 13

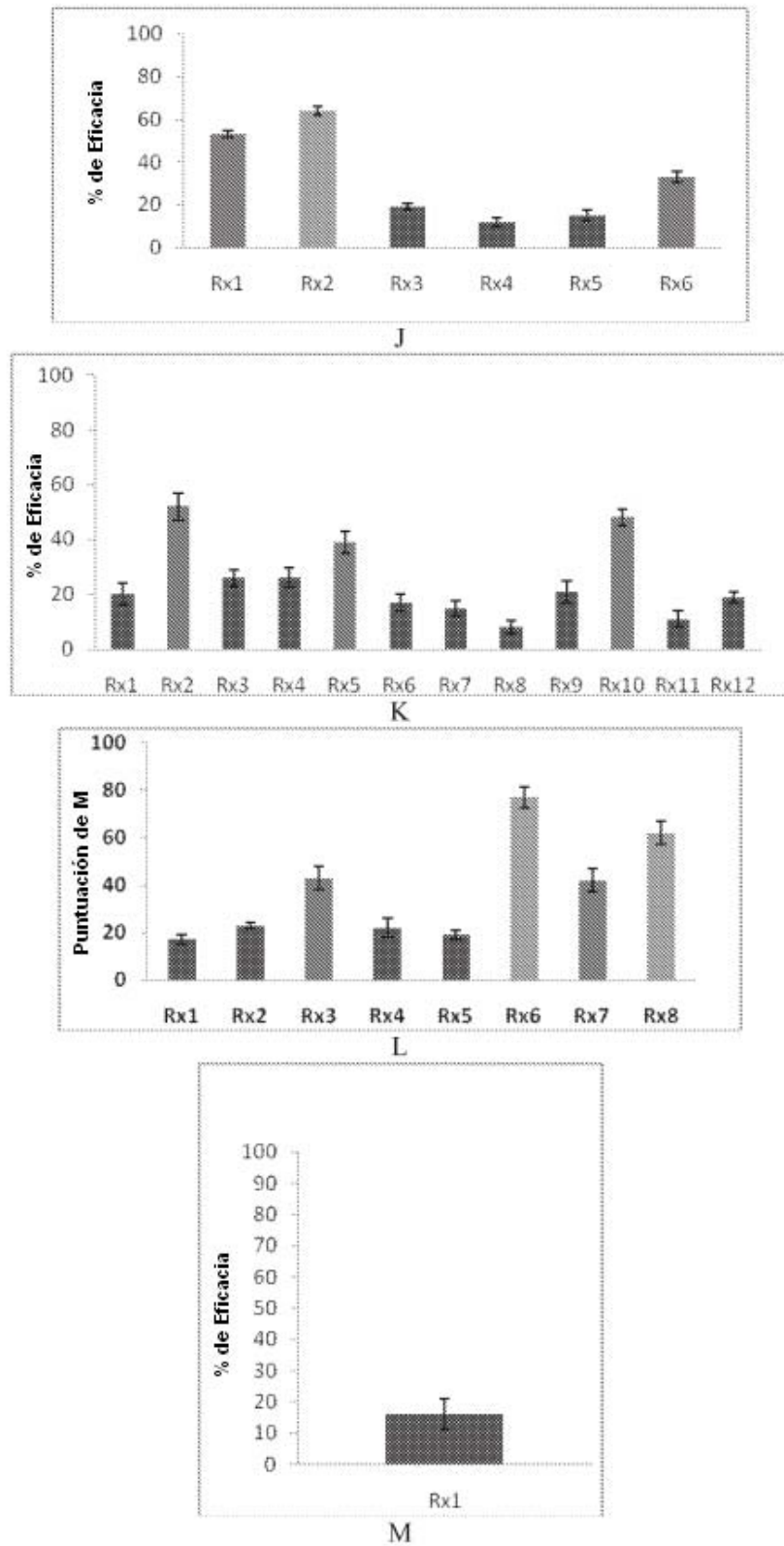


Figura 13

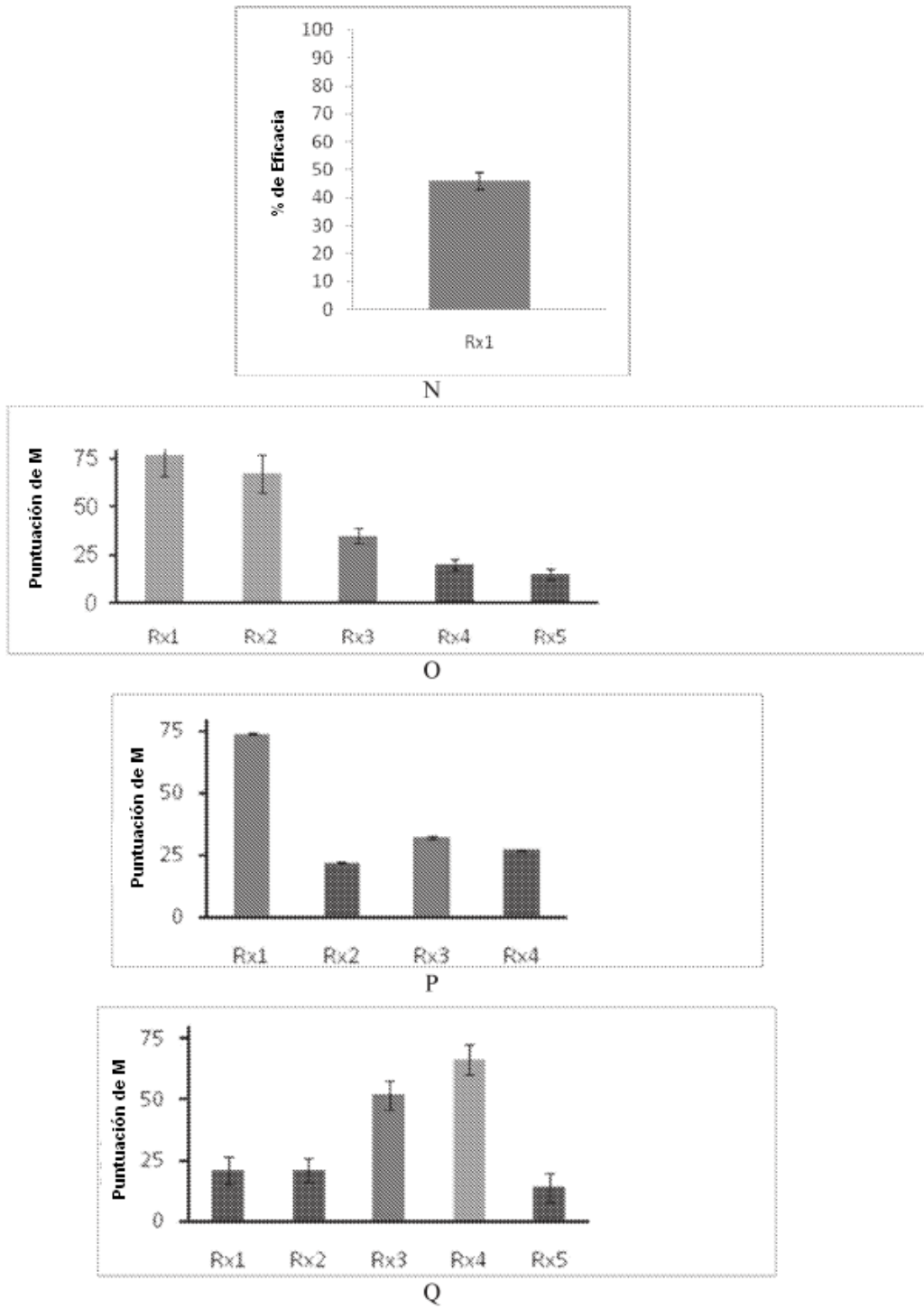


Figura 13

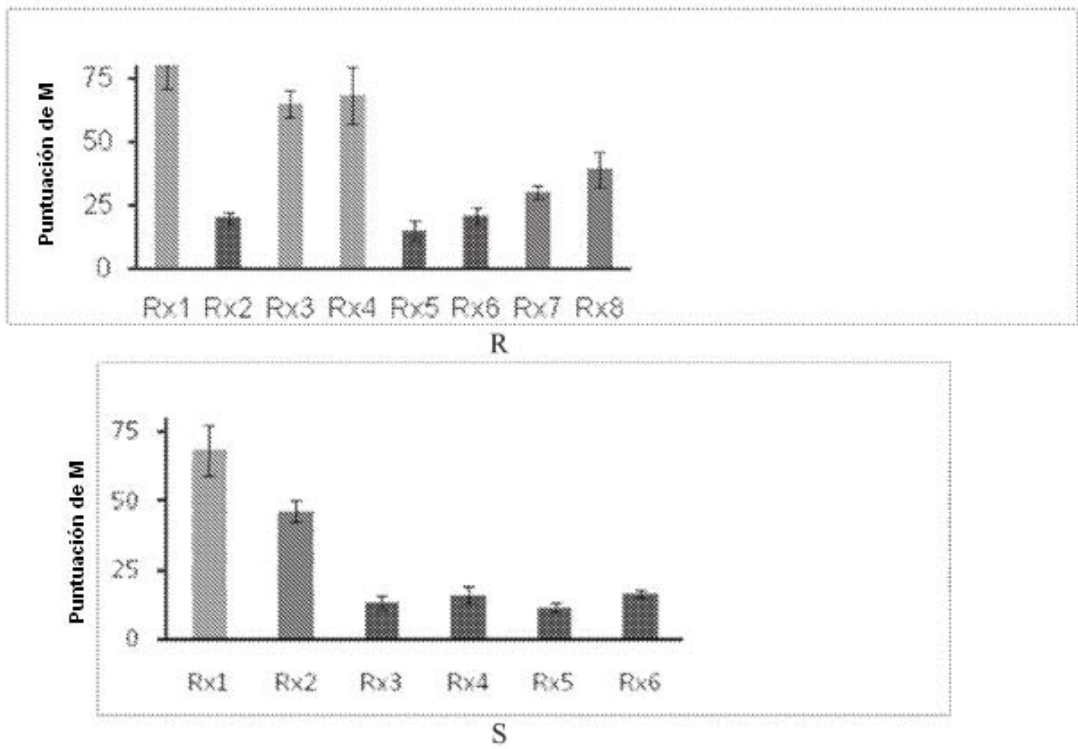


Figura 13