

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Generación de modelos preclínicos predictivos para la
evaluación de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes
con carcinoma de pulmón no microcítico con mutación en
KRAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Patricia Yagüe Sanz

Directores

Luis Paz-Ares Rodríguez
Irene Ferrer Sánchez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Generación de modelos preclínicos predictivos para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico con mutación en KRAS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Patricia Yagüe Sanz

DIRECTORES

Prof. Luis Paz-Ares Rodríguez
Dra. Irene Ferrer Sánchez

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Generación de modelos preclínicos predictivos para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico con mutación en KRAS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Patricia Yagüe Sanz

DIRECTORES

Prof. Luis Paz-Ares Rodríguez
Dra. Irene Ferrer Sánchez

Madrid, 2021

Trabajo realizado bajo el amparo científico de la Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Pulmón H2O-CNIO, perteneciente al Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre, al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y al CIBERONC, para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.

El proyecto ha sido financiado con un contrato i-PFIS: Doctorados IIS-empresa en Ciencias y Tecnologías de la Salud del Instituto de Salud Carlos III (IFI16/00017).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi director de Tesis, **Luis**, por darme la oportunidad de trabajar con él y realizar la tesis en su laboratorio. Por proporcionarme en estos años todos los medios necesarios para desarrollar habilidades y capacidad científica, por sus valiosos consejos, por ser el claro ejemplo de que trabajando duro se llega alto, y por su genialidad. No hay nada que le defina mejor; quiero agradecer también a mi directora, **Irene**, por guiarme y enseñarme en este camino, por confiar en mí incluso más de lo que yo confiaba en mí misma, e intentar que viera siempre el vaso medio lleno. *¡Ha sido un final duro, pero lo hemos conseguido!*; muchas gracias a mi tutor, **José Javier Fernández Ruiz**, por estar siempre disponible y por toda su ayuda con todos los temas de la universidad.

Agradecer a mis compañeros del laboratorio del CNIO. A **Lauri** le tengo que agradecer TODO, porque ella sabe mejor que nadie y de primera mano que el camino no ha sido fácil. Ella ha sido el pilar fundamental en mi día a día, he tenido su ayuda constante y me ha animado en todo momento. *¡¡Lo que me has tenido que aguantar!!*, *¿Qué voy a hacer yo sin ti?*; a **Alba** (y a Illustrator y a GraphPad y a SPSS), gracias por responder y estar inmediatamente cada vez que le he dicho: “Alba...necesito tu ayuda...”. Alba tiene un talento innegable y no tengo dudas de que va a llegar a ser una científica magnífica; a **Santi**, gracias por los buenos momentos. Estoy segura de que todo lo bueno está por llegarle así que: *¡prepárate que eres el siguiente!*; a mis tocayas, a **Patri C** y **Patri P**, por su cariño y apoyo. Patri C gracias por esos mensajes en los momentos complicados; gracias **Ali**, porque entre tanto trato borde y antipático entre nosotras solo había cariño, y así me lo ha demostrado, mucho. *¿Con quién me voy a meter a partir de ahora? ¿Quién me va a dibujar cosas indecentes?*; gracias **Cris**, por las conversaciones de desahogo a últimas horas del día en el laboratorio, sobre todo en esta última etapa en el que todo se veía negro. *Por todos tus consejos, más que necesarios.*

Agradecer a todos mis compañeros del laboratorio del H12O, **Javier**, **Ángel**, **Juanma**, **Itziar**, **Arantxa**, **Álvaro**...y en especial a **Rocío** y a **Nuria**, por lo que me han ayudado en lo científico, pero también con sus detallitos en los correos y envíos que te alegran los días; a **David**, por todo lo que ha aportado a esta tesis, por su paciencia infinita intentando que entendiera la bioinformática. Todo el éxito con tu proyecto. Al **grupo de colon**, a las Beas, por acogernos tan bien en cada una de nuestras visitas al H12O; a **Teresa Agulló**, por su interés y palabras de cariño siempre; me gustaría agradecer también a **José Luis Solorzano**, por acercarme al mundo del microscopio, las tinciones y la histología. Quiero agradecerle todo el tiempo que me ha dedicado porque cada vez que le he pedido ayuda siempre ha estado al momento. *¡Me has enseñado tanto y con tanto cariño!*

Durante estos 5 años han pasado por el laboratorio personas muy especiales, así como personas de otros laboratorios que también han contribuido -de mil formas- en esta tesis. **Lorena**, que aunque estuvo poco tiempo fue suficiente para hacerse un hueco. *Gracias por tu entusiasmo, tus divertidas historias que amenizaban el camino Chamartín-CNIO y por los ánimos que me has dado en estos últimos meses*; agradecer a mi **Mery**, que no puede ser más especial. Por su pasión por la ciencia, que me trasmite día a día, por su optimismo y coraje. Es un ejemplo de superación tanto en lo profesional como en lo personal. Por todo lo que me enseñó entonces y todo lo que me sigue enseñando (incluso en sus audios eternos). Gracias por hacerme saber que siempre vas a estar ahí. *¡Vales oro!*

a **Ana María**, porque, aunque llegó ya en la recta final de esta etapa, cuando estaba “pretésica” perdida, no huyó sino que ha sido la primera en echarme una mano. Por ese dominio de la estética (*a mi no me pusieron de eso al nacer*) pero sobre todo por su calidez, templanza y consejos que me han ayudado tanto; a **Raúl**, ¡que decirle!: *¡¡Pasa menos horas en el CNIO!!* Ha sido la mejor compañía en esas horas en las que no queda nadie por los pasillos. *Te espera un futuro brillante*. Gracias a **Isidoro**, aunque solo estuvo de manera presencial en la primera etapa de esta tesis ha estado disponible todo el tiempo para prestarme su ayuda. Me enseñó que la constancia era algo fundamental, que había que tener iniciativa y que había que “apretar, apretar y apretar” para conseguir los objetivos. *¡Y aquí estamos!*; **Gloria** también debe tener un huequecito en estos agradecimientos, porque irradia felicidad, animándonos y amenizando las tardes en el CNIO; agradecer a **María, Marina, Fer, al grupo de hematológicos** y, en especial a **Lu**, por los momentos compartidos.

Me gustaría agradecer igualmente a todas aquellas personas que, fuera del ámbito CNIO, también han sido fundamentales.

Gracias a las de la universidad. A **Judit**, a **Carla**, porque todo es mejor cuando sé que puedo contar con vosotras. A mi **Sarita**, a mi siamesa en la carrera y para el resto de vida. Dos repelentes que no podíamos separarnos ni para hacer un trabajo. Con los años (bastantes ya), y a pesar de la distancia que nos separa ahora, siempre está a mi lado. Por sus palabras de cariño, por esa forma tan suya de llamarme que me hace sacar una sonrisa de manera inmediata - y por todas las visitas exprés en la estación de Atocha, por escuchar mis eternos dramas, ser apoyo y animarme siempre. A la **Dra. Martínez**, porque durante estos años hemos estado en una situación parecida, nos comprendíamos perfecta y mutuamente y sabía darme el consejo justo en cada momento. Porque vale mucho y no tengo ninguna duda que, a partir de ahora, sólo le queda triunfar.

A mis amigos de toda la vida, a **Henar**, a **Moni** y, en especial, a Miguel, porque no hay mejores momentos de desconexión que con ellos. **Miguel**, eres la persona que, fuera del CNIO, más se ha preocupado por mis experimentos y preguntado con tanto interés a pesar de que lo suyo son los cables y las conexiones. Pero ese interés se multiplicaba cuando se preocupaba por como estaba yo, más allá de todo esto. *Millones de gracias. Te has ganado el título de persona favorita con creces. Tienes un corazón enorme y te mereces todos los logros que has conseguido.*

A **mis padres y a mi hermano**, porque no puedo ser más afortunada. Puede que todavía no entiendan muy bien que es eso de la Biotecnología, pero ello no ha impedido que me apoyarán incondicionalmente. Ha sido una época complicada, con constantes altibajos emocionales. *Gracias por motivarme y estar cada minuto a mi lado. Habéis dado todo porque tuviera la mejor preparación y, si esto es posible, ¡es todo gracias a vosotros!*

“La gota horada la piedra, no por su fuerza, sino por su constancia.”

(Ovidio)

I. RESUMEN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo debido, al menos parcialmente, a la escasez de terapias eficaces. Este hecho es particularmente relevante en algunos subtipos moleculares como el que presenta mutaciones en *KRAS*, que es el gen conductor mutado más frecuente en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), y que subyace al 20-30% de los adenocarcinomas de pulmón. A pesar de los esfuerzos en este sentido durante las últimas 4 décadas todavía no contamos con estrategias terapéuticas específicas válidas en este contexto. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para estos pacientes y para ello es necesario generar nuevos y mejores modelos preclínicos realmente predictivos de respuesta que permitan testar de forma óptima y eficaz. Los modelos derivados de tumores de pacientes, como los xenoinjertos derivados de paciente (PDX) *in vivo* y los organoides *in vitro* recapitulan más fielmente la complejidad y heterogeneidad del cáncer humano que otros modelos, y pudieran representar mejores herramientas experimentales no solo para testar nuevas terapias sino también para la búsqueda de biomarcadores de respuesta, y, por tanto, favorecer la implementación de la medicina de precisión en el CPNM.

En esta tesis, hemos generado y caracterizado tres colecciones de modelos preclínicos de CPNM: dos de modelos *in vivo*, modelos PDX y modelos PDX humanizados, y una colección de modelos 3D *in vitro* para el cribado de fármacos, compuesta por organoides derivados de PDX (PDXDO). Hemos demostrado que los 45 modelos PDX establecidos conservan a lo largo de los pases las características histológicas y moleculares de los tumores de los pacientes de los que derivan. Además, nuestra colección de modelos PDX representa fielmente la diversidad de las alteraciones moleculares que se encuentran en la clínica, y pudieran predecir la respuesta a los fármacos utilizados en la práctica clínica. Del mismo modo, los PDXDO mantienen la morfología y el perfil molecular de los tumores de los que derivan, tanto la presencia de las alteraciones genómicas conductoras de cada modelo PDX, como su frecuencia alélica, lo que demuestra la conservación de la heterogeneidad del tumor en el cultivo *in vitro*. Adicionalmente, desarrollamos modelos PDX humanizados en los que poder testar combinaciones con inmunoterapia, en los que confirmamos la infiltración de células T humanas en los tumores y una reducción del crecimiento tumoral con el tratamiento con anticuerpos contra el receptor de muerte programada (PD-1).

Una vez generadas, caracterizadas y demostrado el papel predictivo de respuesta de nuestras tres colecciones de modelos preclínicos, fueron utilizadas para testar y analizar la respuesta a dos combinaciones terapéuticas dirigidas al adenocarcinoma de pulmón con mutación en *KRAS*, que incluían el inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas 4 y 6 (CDK4/6) más un inhibidor de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) o un anticuerpo anti-PD-1.

La combinación del inhibidor de CDK4/6 con el inhibidor de ERK1/2, demostró ser más eficaz que el tratamiento de los fármacos en monoterapia. *In vitro*, en todos los

PDXDO de adenocarcinoma, la combinación reducía la proliferación y la activación de las vías de señalización implicadas. Del mismo modo, *in vivo*, en los PDX utilizados, el tratamiento con ambos fármacos producía una reducción significativa del crecimiento tumoral comparado con los tratamientos en monoterapia. Además, la combinación era también efectiva en aquellos modelos *in vitro* e *in vivo* que presentaban resistencia al inhibidor de CDK4/6 en monoterapia. El tratamiento en combinación aumentaba a nivel transcriptómico la inhibición de todas las vías implicadas en ciclo celular en mayor medida que el tratamiento en monoterapia, y revertía la activación mediada por el tratamiento con el inhibidor de CDK4/6 en monoterapia sobre las vías de PI3K y WNT, lo que podría subyacer a la sinergia.

Sin embargo, la otra combinación testada, el inhibidor de CDK4/6 con un anticuerpo anti-PD-1, no mostró mayor eficacia en comparación con el inhibidor de CDK4/6 en monoterapia en ninguno de nuestros modelos *in vitro* e *in vivo* humanizados, ni tampoco en un modelo murino inmunocompetente, siendo la reducción del volumen tumoral similar al tratamiento en monoterapia.

En resumen, hemos generado tres colecciones de modelos preclínicos como herramienta para testar nuevas estrategias terapéuticas potenciales para los pacientes con CPNM. Nuestra colección de modelos PDXDO permite hacer cribados masivos *in vitro* en modelos que reproducen la heterogeneidad de los pacientes, para posteriormente confirmar la eficacia de las mejores estrategias en nuestras colecciones de modelos PDX y PDX humanizados *in vivo*. Adicionalmente, hemos demostrado la eficacia de la combinación del inhibidor CDK4/6 con el inhibidor de ERK1/2 en nuestros modelos preclínicos de adenocarcinoma de pulmón con *KRAS* mutado y hemos sugerido un mecanismo que podría subyacer a tal sinergia e identificado algunos biomarcadores predictivos de sensibilidad.

II. SUMMARY

Lung cancer is the leading cause of death due to cancer, among other reasons due to the lack of effective therapies for some subtypes, such as adenocarcinoma with mutation in the gene homologous to the Kirsten rat sarcoma viral oncogene (*KRAS*), which accounts for 20-30% of these cases. Despite advances in research and the development of new targeted therapies, there are still no effective targeted therapies approved in the clinic for patients with *KRAS*-mutated lung adenocarcinoma. Therefore, there is a need to develop new therapeutic strategies for these patients and for this it is necessary to generate new and better preclinical models that are truly predictive of response that allow these new potential therapeutic strategies to be optimally tested. Models derived from patient tumors, such as PDX *in vivo* and organoids *in vitro*, more accurately recapitulate the complexity and heterogeneity of human cancer than other models, and could represent better experimental tools not only for testing new therapies but also for the search for biomarkers of response, and, therefore, favor the implementation of precision medicine in NSCLC.

In the current study, we have generated and characterized three collections of preclinical NSCLC models: an *in vitro* model for drug screening, patient-derived xenograft (PDX) derived organoids (PDXDO), and two *in vivo* models, PDX models and humanized PDX models.

We have shown that the 45 established PDX models preserve the histological and molecular characteristics of the tumors of the patients from which they are derived throughout passages. Furthermore, our collection of PDX models faithfully represents the diversity of molecular alterations found in the clinic, and could predict the response to the drugs used in clinical practice. Similarly, PDXDOs maintain the morphology and molecular profile of the tumors from which they derive, including both the presence of the driving genomic alterations of each PDX model and their allelic frequency, which demonstrates the conservation of tumor heterogeneity in *in vitro* culture. Additionally, we develop humanized PDX models in which we can test combinations with immunotherapy, where we have confirmed the infiltration of human T cells in tumors and a reduction in tumor growth on treatment with antibodies against the programmed death receptor (PD-1).

Once the response predictive role of our three collections of preclinical models had been generated, characterized and demonstrated, they were used to test and analyze the response to two therapeutic combinations directed at lung adenocarcinoma with a *KRAS* mutation, which included the inhibitor of cyclins-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6) plus an inhibitor of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) or an anti-PD-1 antibody.

The combination of the CDK4/6 inhibitor with the ERK1/2 inhibitor proved to be more effective than the treatment of any the drugs alone. *In vitro*, in all adenocarcinoma PDXDOs, the combination reduced proliferation and activation of the signaling pathways involved. Likewise, *in vivo*, in the PDXs used, treatment with both drugs produced a significant reduction in tumor growth compared to monotherapy treatments. Furthermore, the combination was also effective in those *in vitro* and *in vivo* models that showed resistance

to the CDK4/6 inhibitor in monotherapy. The combination treatment increased the inhibition of all the pathways involved in the cell cycle at a transcriptomic level to a greater extent than the treatment in monotherapy, and reversed the activation mediated by the treatment with the CDK4/6 inhibitor in monotherapy on the PI3K and WNT pathways, which could explain the underlying synergy.

However, the other combination tested, the CDK4/6 inhibitor plus an anti-PD-1 antibody, did not show greater efficacy compared to the CDK4/6 inhibitor in monotherapy in any of our humanized *in vitro* and *in vivo* models nor in an immunocompetent murine model, where the reduction in tumor volume being similar to monotherapy treatment.

In summary, we have generated three collections of preclinical models that may serve as valuable tools to test potential new therapeutic strategies for patients with NSCLC. Our collection of PDXDO models allows massive *in vitro* screening of models that reproduce the heterogeneity of patients, to later confirm the efficacy of the best strategies in our collections of PDX and humanized PDX models *in vivo*. Additionally, we have demonstrated the efficacy of combining the CDK4/6 inhibitor with the ERK1/2 inhibitor in our preclinical models of *KRAS* mutated lung adenocarcinoma and have suggested a mechanism that could underlie such a synergy and identified some predictive biomarkers of sensitivity.

III. ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	IX
I. RESUMEN.....	XV
II. SUMMARY.....	XIX
III. ÍNDICE DE CONTENIDO.....	XXIII
IV. ÍNDICE DE FIGURAS.....	XXXI
V. ÍNDICE DE TABLAS	XXXVII
VI. ABREVIATURAS.....	XLI
INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer	3
1.1. Control del ciclo celular: insensibilidad a señales antiproliferativas.....	5
1.2. Evasión del sistema inmune.....	7
2. Cáncer de pulmón	9
2.1. Incidencia y mortalidad.....	9
2.2. Clasificación del cáncer de pulmón	10
2.2.1. Subtipos histológicos	10
2.2.2. Caracterización molecular del CPNM	11
2.3. Tratamiento actual y nuevas estrategias para el CPNM	15
2.3.1. Terapias dirigidas a dianas moleculares específicas	16
2.3.2. Inmunoterapia.....	19
3. Modelos preclínicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> como herramienta para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas de precisión.....	20
3.1. Modelos <i>in vitro</i> : 2D y 3D	21
3.2. Modelos <i>in vivo</i> : Xenoinjertos, modelos murinos genéticamente modificados GEMMs, PDX y PDX humanizados.....	22
Xenoinjertos.....	22
Modelos murinos genéticamente modificados (GEMMs).....	23
Xenoinjertos derivados de pacientes (PDX)	23
Xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) humanizados.....	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Reactivos Biológicos	33
1.1. Anticuerpos	33

1.2.Sondas para la reacción en cadena de la polimerasa “digital droplet” (ddPCR)	34
1.3.Fármacos	35
2.Modelos animales y técnicas de experimentación animal	36
2.1.Generación de una colección de modelos PDX de cáncer de pulmón	36
2.1.1.Descripción de la cohorte de pacientes.....	36
2.1.2.Establecimiento de los modelos PDX	37
2.1.3.Caracterización de los modelos PDX	38
2.1.4.Utilización de los modelos PDX como modelos preclínicos para testar estrategias terapéuticas.....	38
2.2.Generación de una colección de modelos PDX humanizados de cáncer de pulmón	40
2.2.1.Modelos PDX humanizados con PBMCs aisladas de pacientes sanos.....	40
2.2.2.Modelos PDX humanizados con CD34+ aisladas de sangre de cordón umbilical (SCU)	41
2.2.3.Modelos PDX humanizados como modelos preclínicos para testar estrategias de inmunoterapia.....	43
2.3.GEMMs de cáncer de pulmón	43
2.3.1.Modelo de adenocarcinoma de pulmón: <i>KRAS knockin-p53 knockout</i>	43
2.3.2.Utilización del modelo inmunocompetente <i>KRAS knockin-p53 knockout</i> como modelo preclínico para testar estrategias de inmunoterapia	44
3.Modelos celulares y ensayos <i>in vitro</i> utilizando cultivos 3D: PDXDO	45
3.1.Establecimiento de PDXDO.....	45
3.2.Caracterización de los PDXDO.....	46
3.3.Utilización de los modelos PDXDO como modelo <i>in vitro</i> para testar diferentes estrategias terapéuticas.....	46
3.3.1.Cálculo de la IC ₅₀ para determinar la sensibilidad a diferentes fármacos	46
3.3.2.Estudios de eficacia por microscopía confocal.....	47
3.3.3.Caracterización molecular mediante secuenciación (WES, WTS) y Western Blot (WB)47	
3.4.Establecimiento de PDXDO en co-cultivos con células inmunes como modelo <i>in vitro</i> para testar estrategias de inmunoterapia	48
3.4.1.Aislamiento y activación de linfocitos T	48
3.4.2.Co-cultivos de células T activadas y PDXDO	48
4.Técnicas de biología molecular.....	49
4.1.Tinción de inmunofluorescencia.....	49
4.2.Extracción de proteínas	49
4.3.Western Blot (WB)	50
4.4.Tinciones de Inmunohistoquímica	51
4.5.Hibridación <i>In situ</i>	53

4.6.Extracción de ADN	53
4.7.Secuenciación completa del exoma (WES)	54
4.8.Digital Droplet PCR (ddPCR).....	54
4.9.Extracción de ARN	54
4.10.Secuenciación completa del transcriptoma (WTS)	55
5.Análisis bioinformáticos	55
5.1.Análisis de exomas	55
5.2.Análisis del transcriptoma	56
6.Análisis estadísticos.....	57
6.1.Análisis estadísticos de los ensayos <i>in vitro</i>	57
6.2.Análisis estadísticos de los ensayos <i>in vivo</i>	57
7.Aspectos éticos.....	58
7.1.Comités éticos de pacientes.....	58
7.2.Comités éticos de animales	58
RESULTADOS	59
1.Generación y caracterización de una amplia colección de modelos PDX de CPNM como herramienta preclínica de evaluación <i>in vivo</i> de nuevas estrategias terapéuticas	61
1.1.Características clínicas de la colección de modelos PDX de CPNM	61
1.2.Caracterización del crecimiento de los modelos PDX de CPNM	64
1.3.Caracterización morfológica de la colección de modelos PDX de CPNM.....	64
1.4.Caracterización genómica de la colección de modelos PDX de CPNM	72
1.5.Caracterización transcriptómica de los modelos PDX de CPNM.....	75
1.6.Estudio de la respuesta a quimioterapia y terapias dirigidas de los modelos PDX de adenocarcinoma.....	77
2.Generación y caracterización de una amplia colección de modelos PDXDO de CPNM como herramienta preclínica de evaluación <i>in vitro</i> de nuevas estrategias terapéuticas	79
2.1.Caracterización morfológica de los PDXDO de adenocarcinoma de pulmón	80
2.2.Caracterización genómica de los PDXDO de adenocarcinoma de pulmón.....	82
2.3.Estudio de la respuesta de los PDXDO de adenocarcinoma de pulmón a quimioterapia y terapias dirigidas.....	84

3. Generación y caracterización de modelos PDX humanizados de CPNM como herramienta preclínica <i>in vivo</i> para la evaluación de estrategias de inmunoterapia.....	86
3.1. Generación y caracterización de modelos PDX humanizados con células PBMCs	86
3.2. Generación y caracterización de modelos PDX humanizados con células CD34+ .	87
3.2.1. Aislamiento de las células CD34+ a partir de sangre de cordón umbilical y análisis de su pureza.....	87
3.2.2. Humanización y análisis del porcentaje de humanización tras la inyección de células CD34+ en ratones NSG.....	89
4. Evaluación de nuevas estrategias terapéuticas en modelos PDXDO, PDX, PDX humanizados y GEMMs de CPNM con KRAS mutado	92
4.1. Evaluación de la combinación de CDK4/6i con ERK1/2i.....	92
4.1.1. Evaluación de la combinación CDK4/6i con ERK1/2i <i>in vitro</i>	92
4.1.2. Evaluación de la combinación CDK4/6i con ERK1/2i <i>in vivo</i>	98
4.2. Evaluación de la combinación CDK4/6i con inmunoterapia	102
4.2.1. Evaluación de la combinación CDK4/6i con inmunoterapia <i>in vitro</i>	102
4.2.2. Evaluación de la combinación CDK4/6 i con inmunoterapia <i>in vivo</i> en modelos PDX humanizados con PBMCs.....	104
4.2.3. Evaluación de la combinación de CDK4/6i con inmunoterapia <i>in vivo</i> en modelos PDX humanizados con células CD34+.....	106
4.2.4. Evaluación de la combinación de CDK4/6i con inmunoterapia <i>in vivo</i> en ratones GEMMs.....	109
5. Estudio farmacodinámico e identificación de biomarcadores predictivos de respuesta para las nuevas estrategias terapéuticas testadas.....	110
5.1. Estudio de la resistencia intrínseca e identificación de biomarcadores predictivos de respuesta al inhibidor de CDK4/6.....	111
5.2. Estudio de los efectos biológicos del inhibidor de CDK4/6 en monoterapia y en combinación con el inhibidor ERK1/2.....	112
DISCUSIÓN.....	117
1. Modelos preclínicos que recapitulan la heterogeneidad del CPNM en clínica	119
2. Identificación de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con adenocarcinoma de pulmón con KRAS mutado mediante el uso de modelos preclínicos más representativos.....	129
2.1. CDK4/6i y ERK1/2i: una estrategia terapéutica eficaz	132
2.2. CDK4/6i e inmunoterapia, ¿terapia combinatoria idónea?	134
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA.....	141

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación del ciclo celular.	6
Figura 2. Puntos de control del sistema inmune y fármacos dirigidos a estas dianas.	8
Figura 3. Clasificación histológica del cáncer de pulmón y frecuencia de las alteraciones moleculares en los oncogenes conductores más relevantes en el adenocarcinoma de pulmón.	12
Figura 4. Vía de señalización de <i>KRAS</i>	14
Figura 5. Esquema de tratamiento en primera y segunda línea de los pacientes con CPNM con mutación dirigida. Y opciones de tratamiento para pacientes con mutación no dirigida.	17
Figura 6. Modelos preclínicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> como herramienta para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas de precisión.	21
Figura 7. Esquema de establecimiento y caracterización de la colección de PDX.	38
Figura 8. Esquema del proceso de humanización con células CD34+.	41
Figura 9. Esquema del proceso infección de adenovirus e inducción de adenocarcinomas de pulmón.	44
Figura 10. Evolución del crecimiento de los tumores PDX a lo largo de lo pases.	66
Figura 11. Caracterización histológica de los modelos PDX de adenocarcinoma establecidos.	67
Figura 12. Caracterización histológica de los modelos PDX epidermoides establecidos.	67
Figura 13. Caracterización histológica de los modelos PDX de carcinoma de célula grande establecidos.	68
Figura 14. Análisis del componente epitelial humano y del estroma murino de los modelos PDX.	69
Figura 15. Análisis del índice de proliferación de los tumores PDX.	71
Figura 16. Caracterización de la expresión de PD-L1 en los modelos PDX de adenocarcinoma.	72
Figura 17. Caracterización genómica de relevancia clínica de nuestros modelos PDX de adenocarcinoma.	74
Figura 18. Evolución de las frecuencias alélicas de las mutaciones conductoras de los modelos adenocarcinoma.	75
Figura 19. Caracterización transcriptómica de vías de señalización con relevancia clínica de los modelos PDX de adenocarcinoma.	76
Figura 20. Caracterización proteómica de los modelos PDX de adenocarcinoma.	77
Figura 21. Ejemplos de tratamientos preclínicos en los modelos PDX con diferente sensibilidad a la quimioterapia y a las terapias dirigidas.	79
Figura 22. Caracterización morfológica de los PDXDO de adenocarcinoma de pulmón.	81
Figura 23. Análisis del componente epitelial humano y del estroma murino de los modelos PDXDO.	82
Figura 24. Caracterización genómica de los modelos PDXDO de adenocarcinoma mediante secuenciación de exoma y ddPCR.	83
Figura 25. Evolución de las frecuencias alélicas de las mutaciones conductoras de los modelos de adenocarcinoma.	84

Figura 26. Estudio del efecto sinérgico o aditivo de diferentes terapias en combinación utilizando nuestra colección de modelos PDXDO.....	86
Figura 27. Caracterización de los modelos PDX humanizados con células PBMCs.	88
Figura 28. Efecto del donante en la humanización de los ratones.....	90
Figura 29. Caracterización de los modelos humanizados con células CD34+.....	92
Figura 30. Sensibilidad de los PDXDO al tratamiento con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores.....	93
Figura 31. Cuantificación de la proliferación de los PDXDO tratados con con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores.....	95
Figura 32. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores sobre las principales vías de señalización en los PDXDO.	96
Figura 33. Cuantificación de las variaciones de expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular y en vías oncogénicas en los PDXDO tras el tratamiento con CDK4/6i, ERK1/2i o con la combinación de ambos inhibidores.	97
Figura 34. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores en modelos PDX con mutaciones en KRAS.....	99
Figura 35. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores sobre las principales vías de señalización.....	100
Figura 36. Cuantificación de las variaciones de expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular y en vías oncogénicas en los tumores PDX tras el tratamiento con CDK4/6i, ERK1/2i o con la combinación de ambos inhibidores..	101
Figura 37. Evaluación en un modelo de co-cultivo <i>in vitro</i> de la eficacia del tratamiento con CDK4/6i, de un anticuerpo anti-PD-1 (pembrolizumab) y de la combinación de ambos inhibidores.....	103
Figura 38. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CTLA-4 y de la combinación de los tratamientos en modelos PDX humanizados con PBMCs.....	105
Figura 39. Efecto del tratamiento de CDK4/6i, del anticuerpo anti-PD-1 y de la combinación de ambos fármacos en modelos PDX humanizados con células CD34+..	107
Figura 40. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, del anticuerpo anti-PD-1 y de la combinación de ambos tratamientos sobre la activación de vías de señalización en el modelo <i>in vivo</i> humanizado.....	108
Figura 41. Infiltración de células inmunes en los tumores de los modelos PDX humanizados tratados con CDK4/6i, anticuerpo anti-PD-1 y de la combinación de ambos fármacos..	108
Figura 42. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, un anticuerpo anti-PD-1 y ambos fármacos en combinación en un modelo animal genéticamente modificado de adenocarcinoma de pulmón inducido por la mutación de KRAS y el silenciamiento de TP53.	109
Figura 43. Análisis mediante tinción de H&E e IHQ de tumores desarrollados tras la inducción con AdenoCre en los pulmones de ratones KRAS ^{LSLG12Vgeo/+} ;P53 ^{LoxP/LoxP} y tratados con CDK4/6i, un anticuerpo anti-PD-1 y ambos fármacos en combinación... ..	110

Figura 44. Análisis de los biomarcadores predictivos de respuesta a CDK4/6i a nivel transcriptómico.....112
Figura 45. Análisis transcriptómico de los PDXDO tratados con CDK4/6i.....113
Figura 46. Análisis transcriptómico de los PDXDO con el tratamiento de la combinación de CDK4/6i con ERK1/2i.....114
Figura 47. Análisis transcriptómico de los PDXDO tratados con el CDK4/6i en monoterapia y en combinación con el ERK1/2i.....115

V. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para las diferentes técnicas (WB; IHQ; IF y CF).....	33
Tabla 2. Sondas utilizadas para la técnica de ddPCR.....	35
Tabla 3. Fármacos utilizados en los tratamientos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	35
Tabla 4. Resumenn de las características clínicas de los pacientes de los que se han establecido los modelos PDX.....	37
Tabla 5. Condiciones de cultivos en función del ensayo a realizar.....	45
Tabla 6. Condiciones específicas de cada anticuerpo para las tinciones de IHQ.....	52
Tabla 7. Resumen de las características clínicas generales de la cohorte de pacientes utilizada, y de la colección de PDX establecida.....	62
Tabla 8. Características clínicas de los 45 pacientes de los que se han establecido los modelos PDX.....	63
Tabla 9. Evaluación del crecimiento de cada modelo PDX de CPNM establecido..	65
Tabla 10. Sensibilidad de los modelos PDX a los tratamientos estándar en clínica.....	78
Tabla 11. Sensibilidad de los modelos PDXDO a quimioterapia y a terapias dirigidas.	85
Tabla 12. Análisis de la humanización en los diferentes experimentos y efecto en el éxito de injerto del tumor de los modelos PDX TP57, TP143 y TP79..	90
Tabla 13. Características de colecciones de PDX de CPNM.....	120

VI. ABREVIATURAS

2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
ADC	Adenocarcinoma
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNcf	ADN circulante
AF	Alexa Fluor
ALK	Quinasa de linfoma anaplásico
AKT	Quinasa de proteínas B
APC	aloficocianina
APCs	Célula presentadora de antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCL-2	Proteína Linfoma de células B
BRAF	Homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf
BRG	<i>C;129S4-Rag2^{tm1Flv}Il2rg^{tm1Flv}</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CCL	Carcinoma de célula grande
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
CDK	Ciclina dependiente de quinasa
CDKN2A	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A
CDK4/6	Ciclina dependiente de quinasa 4 y 6
CDX	Xenograft derivado de líneas celulares
CF	Citometría de Flujo
CI	Índice de combinación
CK	Citoqueratina
CMH	Células madre hematopoyéticas
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CPM	Cáncer de pulmón microcítico
CPNM	Cáncer de pulmón no microcítico
CST	Cell Signaling Technology
CT	Tomografía computarizada
CTLA-4	Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico
CUL3	Culina 3
Cy	Cianina
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenil indol
ddPCR	Del inglés <i>digital droplet PCR</i>
DNMT	ADN metil transferasas
DNP	Dinitrofenol

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EdU	5-etinil-2'-deoxiuridina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
EML-4	Proteína asociada a microtúbulo de equinodermo 4
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERBB2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)
ERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2
ESC	Carcinoma epidermoide
Exf	Exfumador
EZR	Ezrina
E2F	Factor de transcripción E2F
F	Fumador
FBS	Suero fetal bovino
FGFR	Receptor de factor de crecimiento fibroblástico
FIG	Proteína fusionada en el glioblastoma
FMO	Control de fluorescencia menos uno
FOXO	Proteína de cabeza de zorro
G1/S	del inglés <i>Growth 1/ Síntesis</i> , fase de crecimiento 1/Fase de Síntesis
GAPs	Proteínas activadoras de GTPasas
GDP	Guanosina difosfato
GEFs	Factores de intercambio de nucleótido de guanina
GEMM	Modelo murino genéticamente modificado
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
GTP	Guanosina trifosfato
H	Hombre
Hu	Humano
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HH3	Histona H3
HRP	Peroxidasa de rábano
Hu-NSG	NSG humanizado
HUVR	Hospital Universitario Virgen del Rocío
H12O	Hospital Universitario 12 de Octubre
H&E	Hematoxilina & Eosina
IBIS	Instituto de Investigación Biomédica de Sevilla
IC ₅₀	Concentración para la inhibición del 50% del crecimiento
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-2	Interleuquina-2

JNK	Quinasa del dominio C-terminal de c-Jun
KDEL2	Receptor 2 de retención de proteína del lumen del retículo endoplasmático
KEAP1	Proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch
Ki67	Antígeno nuclear ki67
KRAS	Homólogo al oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten
LKB1	Quinasa hepática B1 (STK11)
LRIG3	Proteína 1 con repeticiones ricas en leucina y dominios parecidos a inmunoglobulina
LSL	Del inglés <i>lox-STOP-lox</i>
M	Mujer
m(Ab)	anticuerpo murino
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	MAPK quinasa de ERK
MET	Receptor del factor de crecimiento hepático
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mTOR	Diana en mamíferos de la rapamicina
Mut	Mutación
MYC	Homólogo del oncogene viral de mielociomatosis aviar V-Myc
NCBI	Del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF1	Neurofibromina 1
NFE2L2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
NF-κB	Factor nuclear κB
NK	Del inglés <i>Natural Killer</i>
NOG	NODShi.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Sug}
No hu-NSG	NSG no humanizados
NOTCH1	Del inglés <i>Notch homolog 1</i>
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl}
ns	no significativo
NTRK	Tirosina quinasa neurotrófica
PARP	Polimerasa Poli-ADP ribosa
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Receptor de muerte programada
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
PDK1	Quinasa piruvato deshidrogenasa 1
PDX	Xenoinjerto derivado de paciente
PDXDO	Organoides derivados de PDX
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído

PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PI3KCA	Subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,3-bifosfato 3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol difosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PLC-E	Fosfolipasa C gamma
PVDF	Fluoruro de polivilideno
Px	Pase
RAF1	Homólogo 1 del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf
RALGDS	Estimulador de disociación de nucleótidos de guanina RAL
RAS	Oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata
RB	Proteína del retinoblastoma
RET	oncogén reorganizado durante la transfección
RIN	Número de integridad del ARN
ROS1	Proto-oncogén tirosina proteína quinasa 1
rpm	revoluciones por minuto
RSK1	Quinasa ribosomal S6
RTU	Del inglés Ready to Use
S6	Proteína ribosomal S6
SCU	Sangre de cordón umbilical
SDC4	Sindecán-4
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Erros estándar de la media
SLC34A2	proteína de transporte de fosfato dependiente de sodio 2B
SMA	Actina del músculo liso
SOX2	Del inglés <i>Sex determining Region Y-box 2</i>
SPOP	Del inglés <i>Speckle-type POZ protein</i>
ssGSEA	Del inglés <i>single sample Gene Set Enrichment Analysis</i> , análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de una sola muestra
STK11	Serina/Treonina quinasa 11
TBS	Del inglés <i>tris-buffered saline</i> , solución salina tamponada con Tris
TBST	TBS-Tween20
TCGA	Del inglés <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCR	Receptor de células T
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TKI	Inhibidor de tirosina quinasa
TMB	Carga mutacional del tumor
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TNM	Tumor, nódulo, metástasis
TopoIIα	Topoisomerasa II alpha
TP53	Proteína tumoral p53

TPM	Transcritos por millón
TPM3	Tropomiosina 3
TSP	Tromboespondina
TTF1	Factor de transcripción tiroidea 1
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Del inglés <i>Western Blot</i>
WES	Del inglés <i>whole exome sequencing</i> (Secuenciación completa del exoma)
WNT	Del inglés <i>Wingless-Type family gene</i>
WT	Del inglés <i>Wild type</i>
WTS	Del inglés <i>whole transcriptome sequencing</i> (Secuenciación completa del transcriptoma)

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo y por tanto uno de los mayores problemas de salud en la actualidad (Siegel et al., 2021). En condiciones normales, las células cuentan con un estricto control de la entrada al ciclo celular y de su división, asegurando de esta manera, la homeostasis tisular. Sin embargo, todas las células están sometidas a agentes ambientales y a fallos propios de la maquinaria de división y reparación celular, que pueden provocar alteraciones genéticas que pueden modificar su comportamiento y fisiología. Cuando estas alteraciones se producen en proto-oncogenes, genes supresores de tumores o genes de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), pueden conferir a las células capacidades que les permiten iniciar la carcinogénesis (Bailey et al., 2018). Así, el cáncer es el resultado de la acumulación de diferentes alteraciones genéticas, perpetuadas durante las divisiones celulares. El tumor resultante es frecuentemente heterogéneo desde el punto de vista genético, y tal heterogeneidad intratumoral juega un papel importante en la progresión del tumor, en la resistencia a las terapias anti-tumorales y en la recurrencia de la enfermedad.

Las alteraciones moleculares del cáncer subyacen a las pragmáticamente reconocidas diez señas de identidad del cáncer (“hallmarks of cancer”), que suelen estar presentes (al menos la mayoría) en todas las neoplasias humanas. Estas incluyen (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011):

1. **Señalización proliferativa sostenida:** en las células tumorales las señales mitogénicas están desreguladas y adquieren la capacidad de mantener la señalización proliferativa con independencia del entorno. Entre estos mecanismos está el aumento de la expresión de factores de crecimiento, aumento de la expresión de receptores, la alteración estructural de los receptores o su activación constitutiva que los hace independientes del ligando.
2. **Insensibilidad a señales anti-proliferativas:** para asegurar la homeostasis, los genes supresores de tumores actúan frenando la proliferación e induciendo senescencia o apoptosis en las células cuando es necesario. Dos supresores canónicos, retinoblastoma (RB) y la proteína tumoral 53 (TP53), actúan como puntos de control de la proliferación celular. Las células tumorales con defectos en la función de la vía RB se hacen insensibles al control por esta vía permitiendo una proliferación celular persistente.
3. **Resistencia a la apoptosis:** el programa apoptótico actúa como barrera natural para la patogénesis del cáncer. El desencadenante apoptótico que transmite las señales entre los reguladores y los efectores está controlado por miembros pro y anti-apoptóticos como la familia de proteínas reguladoras Bcl-2. Entre las causas mayoritarias por las que las células tumorales son capaces de adquirir resistencia a la apoptosis está la pérdida funcional de TP53, que es el regulador pro-apoptótico

más importante, y se encuentra mutado en más del 50% de los tumores (Sherr & McCormick, 2002).

4. **Potencial replicativo ilimitado:** las células normales tienen un número limitado de ciclos replicativos. Estos ciclos se encuentran regulados por la escasa actividad de la telomerasa que poseen las células y el acortamiento de los telómeros que ocurre en cada división celular, que desencadena procesos de parada celular o senescencia. Las células tumorales son capaces de escapar del estado de senescencia y convertirse en inmortales, entre otros motivos, por expresar altos niveles de telomerasa (Blasco, 2005).
5. **Promoción de la angiogénesis:** Durante la progresión tumoral se promueve la angiogénesis como consecuencia del desequilibrio entre los factores inductores o inhibidores de los procesos angiogénicos. El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y la trombospondina (TSP) son algunos de los inductores que estimulan a las células endoteliales vasculares, haciendo que estos procesos estén continuamente activos. De esta forma, se da lugar a nuevos vasos que ayudan a mantener la proliferación y los requerimientos celulares tumorales (H. L. Goel & Mercurio, 2013).
6. **Invasión de tejidos y formación de metástasis:** El escape de las células tumorales al torrente circulatorio, la invasión de otros tejidos y la formación de las metástasis se ve favorecido por cambios en la morfología de las células tumorales y alteraciones en la adhesión de las células entre sí y con la matriz extracelular. Estas alteraciones se producen mediante la pérdida de expresión de proteínas de adhesión como E-cadherina (van Roy, 2014) y el aumento de expresión de proteínas de migración como N-cadherina. Estos cambios inician el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) por el que las células adquieren la capacidad de diseminarse favoreciendo la expansión tumoral (Dongre & Weinberg, 2019).
7. **Modificación del metabolismo energético:** Para mantener una tasa de replicación alta, la falta de nutrientes, la hipoxia y la acidificación del pH en el tumor hacen que sea necesario un cambio metabólico en la célula tumoral. El ajuste metabólico reconocido como “efecto Warburg”, reprograma el metabolismo celular de la glucosa a través de la glicolisis, incluso en condiciones aeróbicas (Warburg, 1956).
8. **Evasión del control inmune:** a través de la inmunovigilancia, el sistema inmune es capaz de detectar y erradicar las células tumorales. Sin embargo, estas células tumorales pueden evadir el sistema inmune a través de diferentes mecanismos como la infra-expresión de antígenos o de moléculas presentadoras, o la desregulación de los puntos de control inmune (p.e. señalización inhibitoria PD-L1/PD-1) (Pardoll, 2012).
9. **Inestabilidad génica y aumento de la mutabilidad:** ciertos genotipos mutantes en células neoplásicas confieren ventajas adaptativas y proliferativas a unos clones

frente a otros, lo que permite su crecimiento y preponderancia en el tumor. La existencia de mutaciones en los genes encargados de la reparación del ADN, o de la represión de su expresión por modificaciones epigenéticas favorecen la inestabilidad genética y aumentan la mutabilidad de las células facilitando la progresión tumoral (Turajlic et al., 2019).

10. **Inflamación:** La inflamación asociada al tumor produce factores de crecimiento que promueven la progresión del cáncer y su supervivencia, así como factores que favorecen la angiogénesis (Coussens & Werb, 2002). Adicionalmente favorece la expresión de enzimas que modifican la matriz extracelular facilitando la invasión y metástasis (Grivennikov et al., 2010).

A continuación, se describen en detalle las dos señas del cáncer en las que nos centraremos en este trabajo y las dianas terapéuticas implicadas en ellas.

1.1. Control del ciclo celular: insensibilidad a señales antiproliferativas

La desregulación del ciclo celular permite la proliferación descontrolada de las células tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011). La vía de Retinoblastoma/Factor de transcripción E2F (RB/E2F) es una de las vías más importantes en el control del ciclo celular, y está frecuentemente alterada en cáncer (Figura 1). Las señales mitogénicas que llegan al núcleo celular dan lugar a la síntesis de ciclina D1, que se une a CDK4/6, formando complejos activos que fosforilan parcialmente a RB. La fosforilación parcial provoca la liberación de parte del factor de transcripción E2F, al que se mantiene unido en condiciones normales. E2F inicia la síntesis de ciclina E que se une a CDK2, y fosforila e inactiva completamente RB. Es en este momento cuando E2F induce la expresión de los genes necesarios para iniciar la transición de la fase de crecimiento 1 a la Fase de Síntesis (G1/S) y la replicación del ADN. Las proteínas INK4 (p16, p15, p18 y p19) y CIF/KIP (p21, p27 y p57) pueden inhibir las quinasas CDK4/6 o CDK2, respectivamente, respondiendo a señales anti-mitogénicas específicas. Posteriormente, CDK2 es activada por la ciclina A para impulsar la transición de la fase S a la mitosis. Además, las ciclinas A y B activan a CDK1 al final de la interfase para comenzar la mitosis. Es decir, las CDKs están presentes a lo largo de todas las fases del ciclo para regular el proceso (Malumbres & Barbacid, 2009). Sin embargo, la delección de estos genes en modelos murinos ha demostrado que no son esenciales por sí mismas, ya que dan lugar a genotipos viables. Sin embargo, sí provocan defectos importantes en el desarrollo de los diferentes tipos celulares, y demuestran la existencia de mecanismos compensatorios entre las diferentes CDKs (Malumbres et al., 2004).

El análisis molecular de los tumores de pacientes ha demostrado que los reguladores del ciclo celular están frecuentemente mutados en cáncer. Entre las alteraciones más frecuentes destacan la sobreexpresión de ciclinas y CDKs como resultado de amplificaciones cromosómicas, y la pérdida de expresión de los inhibidores de CDKs por

deleciones en los genes que codifican estas proteínas o por modificaciones epigenéticas (Beroukhim et al., 2010; Malumbres & Barbacid, 2001).

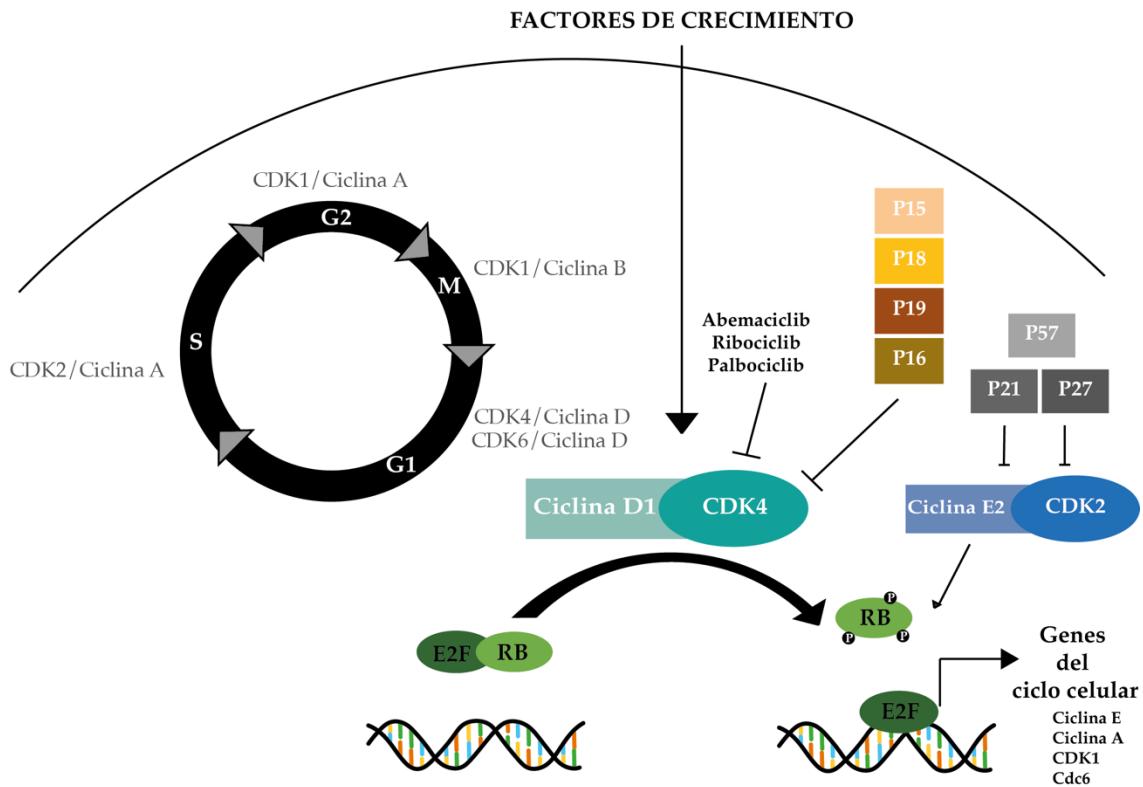


Figura 1. Regulación del ciclo celular. Complejos CDKs/Ciclinas que participan en cada fase del ciclo celular y estado de fosforilación del supresor tumoral retinoblastoma (RB) a la entrada al ciclo celular. CDK (ciclina dependiente de quinasa).

La fosforilación de RB por CDK4/6 es el primer evento que ocurre para iniciar el ciclo celular, el primer punto de control. Se ha demostrado que CDK4 regula también otros procesos como la apoptosis, el metabolismo de las células y la inmunogeneidad tumoral. Respecto a este último proceso, se ha descrito que la inhibición de CDK4 lleva asociada una disminución de la expresión de las ADN metiltransferasas (DNMT) y un aumento de la producción de interferón tipo III (IFN). El IFN promueve un aumento de la presentación de antígenos, la cual activa las células T citotóxicas y suprime las T reguladoras a través de p21 que para su ciclo celular. Además, se ha demostrado que la combinación de inhibidores de CDK4/6 con inhibidores de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) o de la proteína quinasa activada por mitógenos (MEK), incrementa la infiltración de células T CD8+ y células *natural killer* (NK) en cáncer de mama y en adenocarcinoma de pulmón (Ruscetti et al., 2018). Asimismo, los inhibidores de CDK4/6, degradan la proteína Speckle-type POZ (SPOP), bloqueando la degradación de PD-L1 por el proteosoma e incrementando así los niveles de PD-L1 en la célula (Deng et al., 2018; Schaer et al., 2018; Uzhachenko et al., 2021).

Los niveles de ciclina D1 se ven aumentados como respuesta a las señales mitogénicas que activan la vía de RAS y la vía de la quinasa de proteínas B (AKT). Se ha testado la inhibición de estas vías en combinación con inhibidores de CDK4/6 y se han reportado beneficios terapéuticos en ensayos preclínicos (Teo et al., 2017). Actualmente se están realizando ensayos clínicos con la combinación de inhibidores de CDK4/6 y de PI3K (NCT03065062). La inhibición del homólogo 1 del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf (RAF1) desregula la expresión de ciclina E, bloqueando el ciclo celular en fase G1 en líneas celulares de cáncer de pulmón (Takezawa et al., 2009). RAF1 también puede ser traslocado al núcleo, donde está implicado en la fosforilación de RB junto a CDK4 (S. Wang et al., 1998). Otro de los efectores implicado en el ciclo celular es ERK. Se ha reportado que su inhibición induce un aumento de expresión de p27 y la parada del ciclo celular (Gysin et al., 2005).

Actualmente existen inhibidores de CDK4/6, como ribociclib, palbociclib o abemaciclib, que han sido aprobados por las agencias reguladoras para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama. Estos inhibidores, con ciertas diferencias entre ellos, presentan un perfil de efectos secundarios razonables, particularmente trombocitopenia, neutropenia y diarrea (Dickler et al., 2017). La combinación de estos inhibidores con otras terapias efectivas sinérgicas, idealmente con patrones de toxicidad no superponibles, podría permitir reducir la dosis empleada de estos inhibidores, optimizando su tolerabilidad. Además, estudios recientes han mostrado la existencia de mecanismos de resistencia a estos inhibidores (McCartney et al., 2019). Por estos motivos, es necesario centrar los esfuerzos en buscar otras estrategias terapéuticas dirigidas a las vías anteriormente descritas, que combinadas con la inhibición de CDK4/6 aumenten su eficacia terapéutica y evadan la resistencia a estos inhibidores.

1.2. Evasión del sistema inmune

Las células inmunes forman parte del microambiente tumoral (Balkwill et al., 2012) y ejercen un papel importante en la progresión del cáncer (Thorsson et al., 2018). El sistema inmune ejerce una vigilancia inmunitaria constante sobre los tejidos y es capaz de reconocer y eliminar las células cancerosas. Sin embargo, las células tumorales pueden desarrollar mecanismos para escapar de la vigilancia del sistema inmune (Figura 2).

Las células tumorales liberan antígenos que son capturados y procesados por las células presentadoras de antígenos (APCs) y presentados a los linfocitos T en los ganglios linfáticos. Los linfocitos T activados se dirigen hacia el tumor donde tiene lugar el reconocimiento por parte del receptor de células T (TCR) de los antígenos tumorales y el inicio de los procesos citotóxicos para lisar las células tumorales (Motz & Coukos, 2013). Los tumores pueden suprimir esta respuesta inmunitaria por varias vías. En primer lugar, modificando o disminuyendo la expresión de antígenos, siempre que no se comprometa la progresión del tumor, o a través de la pérdida de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Marincola et al., 2000; McGranahan et al., 2017). En segundo

lugar, las células tumorales pueden provocar una maduración anormal de las células dendríticas. Estas células dendríticas defectuosas serían incapaces de secretar las citoquinas esenciales para el reclutamiento de los linfocitos T (Gabrilovich, 2004). En tercer lugar, las propias células tumorales pueden modificar la producción de citoquinas encargadas de reclutar los linfocitos T efectores, por modificación post-traducional (Loos et al., 2009; Molon et al., 2011).

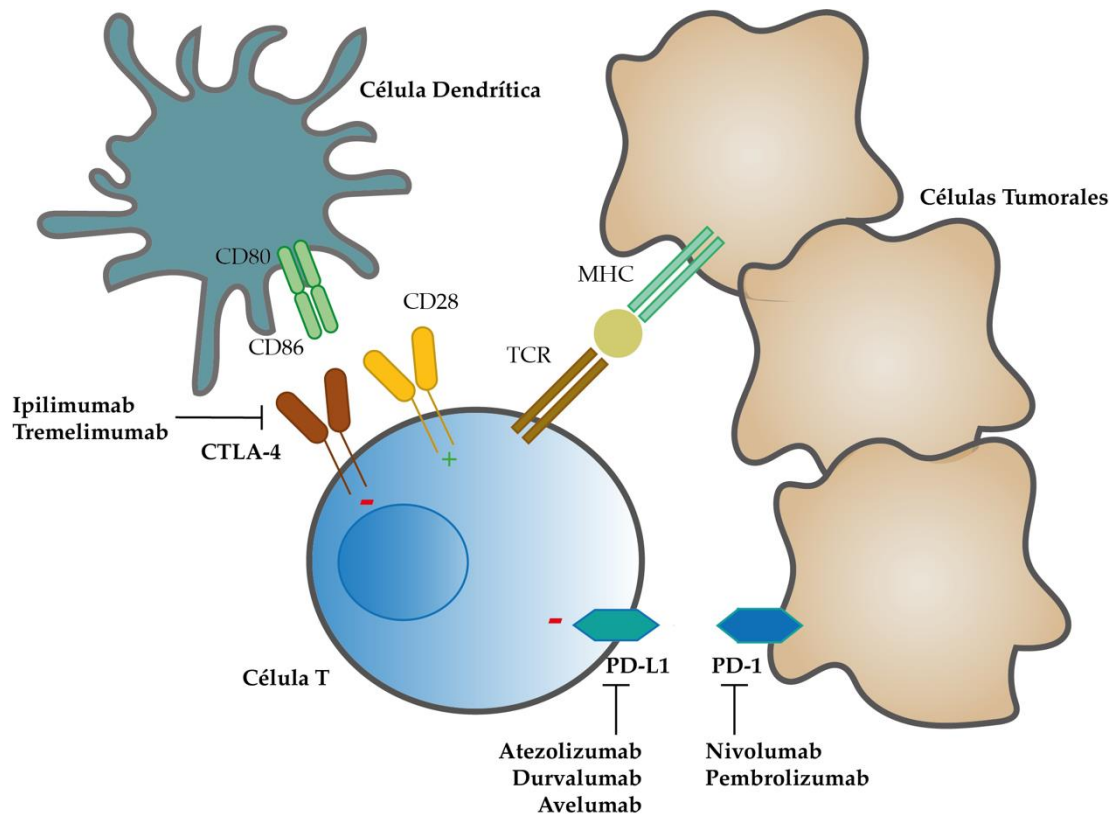


Figura 2. Puntos de control del sistema inmune y fármacos dirigidos a estas dianas. La unión del receptor de muerte programada (PD-1) con su ligando, PD-L1 produce la inhibición de la actividad de las células T. La unión de la molécula CD28 con CD80/86 activa las células T, sin embargo, la unión con el antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) produce la inhibición de la actividad inmune. Los anticuerpos dirigidos frente a PD-L1, PD-1 y CTLA-4 ayudan a activar el sistema inmune. MHC (complejo mayor de histocompatibilidad); TCR (receptor de células T).

Adicionalmente, existen mecanismos inmunosupresores en el tumor que se dirigen a los linfocitos T (He & Xu, 2020). Los más conocidos son mediados por la expresión de ligandos inmunosupresores en la membrana tumoral como el antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico (CTLA-4) y PD-1 (Ribas & Wolchok, 2018) (Figura 2). CTLA-4 es una proteína intracelular que tras la interacción TCR-antígeno, y de una señal co-estimuladora a través del *cluster* de diferenciación 28 (CD28), se traslada a la superficie de la célula. En la superficie compete con la molécula co-estimuladora CD28 por la unión con los ligandos CD80 y CD86 e inicia una señalización inhibitoria de la célula T (Chambers et al., 2001). En el caso de PD-1, la inhibición de la actividad de las células T se produce por la unión con su ligando, PD-L1. La estrategia terapéutica implica el bloqueo de estos puntos de control

inmunitario a través de anticuerpos monoclonales frente a PD-1/PD-L1 o CTLA-4. Estos anticuerpos han demostrado aumentar la supervivencia global en pacientes con diferentes neoplasias incluyendo el cáncer de pulmón, lo que ha supuesto su aprobación por las agencias reguladoras y promovido su uso clínico (Bagchi et al., 2021; Paz-Ares et al., 2018; Upadhaya et al., 2021).

2. Cáncer de pulmón

2.1. Incidencia y mortalidad

El cáncer de pulmón representa el tipo de cáncer más frecuente en hombres y el tercero en mujeres, con 2 millones de casos nuevos diagnosticados al año a nivel mundial (Siegel et al., 2021). A pesar de que, desde mediados de la década de 2000, la incidencia ha disminuido de forma constante en torno al 2% anual, sigue representando el 11,4% del número total de nuevos casos de cáncer (American Cancer Society, 2021). Adicionalmente, el cáncer de pulmón representa la principal causa de muerte por cáncer (casi un cuarto del total), con más del 7% de diferencia respecto al cáncer de próstata y el cáncer de mama que representan la segunda causa de muerte en hombres y mujeres, respectivamente (Siegel et al., 2021). La tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con cáncer de pulmón es del 21%. Esta baja tasa refleja la gran proporción de pacientes diagnosticados con tumores no reseables, cuya supervivencia relativa a 5 años es de solo el 6%. Únicamente el 17% de los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados en estadio localizado, cuando el tumor todavía es reseable y su tasa de supervivencia a 5 años es del 59% (Siegel et al., 2021). Sin embargo, el 50% de estos pacientes acaban recidivando.

En España, el cáncer de pulmón es el cuarto tipo de cáncer con más incidencia, el segundo en hombres y el tercero en mujeres. Es la principal causa de mortalidad por cáncer, suponiendo un 20,3% del total de las muertes por cáncer. En 2021 se estima que el cáncer de pulmón será el responsable de una cuarta parte de las muertes por cáncer en varones (17.346 fallecimientos, 25,6%), seguido a distancia por los cánceres colorrectales (9.640 fallecimientos, 14,2%). En mujeres, el cáncer de pulmón será la tercera causa de muerte por cáncer (5.584 fallecimientos, 12,3%) (Sociedad Española de Oncología Médica SEOM, 2021).

Los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón incluyen el consumo de tabaco, al que se le atribuye el 82% de las muertes por cáncer de pulmón (Siegel et al., 2021). La exposición ambiental, como la exposición ocupacional a radón, a amianto o metales pesados, o a la contaminación atmosférica, representa otro factor relevante (Spyratos et al., 2013). Además, la aparición del cáncer de pulmón está estrechamente relacionada con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que a su vez está asociada al tabaquismo (Houghton, 2013). El cáncer de pulmón no relacionado con el tabaco da lugar a unas 20.000 muertes al año en Estados Unidos (Siegel et al., 2021).

2.2. Clasificación del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es un grupo heterogéneo de enfermedades tanto a nivel histológico como a nivel molecular, lo que ha llevado a clasificarlo en diferentes subtipos atendiendo a sus características histopatológicas.

2.2.1. Subtipos histológicos

Según sus características histológicas, el cáncer de pulmón puede dividirse en dos grandes grupos: el cáncer de pulmón microcítico (CPM) y no microcítico (CPNM), que representan el 15% y el 85% de los casos, respectivamente (Figura 3). A su vez, atendiendo a características histológicas y el tipo de células de las que se ha originado, el CPNM puede subclasificarse en adenocarcinoma, carcinoma epidermoide, carcinoma de células grandes y otros minoritarios (Herbst et al., 2008)(The WHO classification, 2021).

Adenocarcinoma: representa el 40% de todos los casos de cáncer de pulmón, y es el subtipo de CPNM más frecuente. El adenocarcinoma de pulmón se caracteriza por presentar diferenciación glandular, producción de mucina y la expresión de marcadores como TTF-1 o NapsinA en el 85% de los casos, que ayudan a su clasificación en muestras de tumores poco diferenciados. El adenocarcinoma de pulmón suele formar una masa de localización periférica en las vías respiratorias distales. Los tumores se clasifican según su patrón de crecimiento que puede ser lepidico, acinar, papilar, micropapilar, sólido y mucinoso. La mayoría de los adenocarcinomas invasivos se componen de subtipos morfológicos mixtos. La clasificación según el patrón tiene valor pronóstico, siendo los adenocarcinomas lepidicos los de pronóstico más favorable y los adenocarcinomas sólidos y micropapilares los de peor pronóstico (Zheng, 2016). En el adenocarcinoma lepidico y el adenocarcinoma sólido o mucinoso son frecuentes las mutaciones en *EGFR* y *KRAS*, respectivamente (Travis et al., 2015; Zappa & Mousa, 2016; Zheng, 2016).

Carcinoma epidermoide: representa el 30% de los tumores de pulmón, el segundo más prevalente, y es casi exclusivo de fumadores. Los carcinomas epidermoides suelen aparecer en la parte central del pulmón, a lo largo de las principales vías respiratorias. Entre las características morfológicas para el reconocimiento de este subtipo tumoral se encuentra la queratinización, los núcleos hiper cromáticos y los puentes intercelulares. Carecen de producción de mucina o patrón glandular, en contraste con los adenocarcinomas. El carcinoma escamoso se subdivide en tres grupos: queratinizantes, no queratinizantes y basaloides. Sin embargo, esta clasificación no tiene ningún valor pronóstico. Cuando el tumor está poco diferenciado, se utilizan marcadores específicos de células escamosas para su clasificación morfológica: p40, citoqueratina 5/6 (CK5/6), CK5 y p63 (Zheng, 2016). El pronóstico global del carcinoma epidermoide es peor que el del adenocarcinoma (Zappa & Mousa, 2016).

Carcinoma de células grandes: comprende sólo el 15% de los casos de cáncer de pulmón. Se clasifican en este subtipo aquellos tumores que no presentan unas características histológicas para ser clasificado dentro de alguno de los otros dos subtipos histológicos de CPNM (adenocarcinomas o carcinoma epidermoide). El carcinoma de células grandes suele localizarse en la periferia. Las células tumorales son grandes y de forma poligonal con núcleos pleomórficos y vesiculares. Las células tumorales forman láminas o nidos sólidos sin patrón. Es un subtipo de mal pronóstico.

Otros tipos de CPNM: el carcinoma adenoescamoso representa < 5% de todos los cánceres de pulmón, y presenta un patrón mixto con características del adenocarcinoma y del carcinoma epidermoide, con una representación de al menos del 10% de cada subtipo. Los carcinomas pleomórficos, de células fusiformes y de células gigantes son tipos raros de CPNM, que representan menos del 3% de los cánceres de pulmón. El carcinosarcoma se compone de CPNM y con zonas que reflejan elementos sarcomatosos. El blastoma pulmonar y los carcinomas surgidos en las glándulas bronquiales son otros subtipos poco frecuentes. Cabe destacar, el carcinoma neuroendocrino de célula grande con una frecuencia de aproximadamente del 3%. Este subtipo, antes clasificado dentro del carcinoma de células grandes, es de mal pronóstico, con mayor incidencia en varones y fumadores, y de localización periférica. Se caracteriza por mostrar células grandes con abundante citoplasma, áreas necróticas, una alta tasa mitótica y características neuroendocrinas (Travis et al., 2015) (The WHO classification, 2021).

2.2.2. Caracterización molecular del CPNM

Atendiendo a las características moleculares, el cáncer de pulmón es una enfermedad muy heterogénea (Heist & Engelman, 2012). Los diferentes subtipos histológicos presentan patrones de aberraciones moleculares subyacentes característicos.

Caracterización molecular de los adenocarcinomas

En el adenocarcinoma, las alteraciones moleculares más frecuentes incluyen mutaciones del gen supresor tumoral *TP53*, el oncogén *KRAS* y el gen para la quinasa serina/treonina 11 (*STK11*), que ocurren en el 46%, 33% y 17% de los casos, respectivamente. Entre las mutaciones en genes menos frecuentes, pero con importancia en la clínica, que encontramos en este subtipo histológico se incluyen genes supresores de tumores como el gen para la proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch (*KEAP1*) (17%), neurofibromina 1 (*NF1*) (11%), *RB1* (4%) y el gen que codifica el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A*) (4%). También son relevantes las mutaciones en oncogenes como *EGFR* (14%), el homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf (*BRAF*) (2%), el gen que codifica para la subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,3-bisfosfato 3-quinasa (*PIK3CA*) (1%), el receptor del factor de crecimiento hepático (c-*MET*) (3%) y el gen para el receptor de crecimiento epidérmico humano 2 (*HER2*) (2%). Otras alteraciones genéticas importantes

en el adenocarcinoma son las traslocaciones del oncogén reorganizado durante la transfección (*RET*) (2%), el gen para la tirosina quinasa neurotrófica (*NTRK*) (<1%) y las traslocaciones del gen para la quinasa de linfoma anaplásico (*ALK*). De estas, la fusión de *ALK* con el gen de la proteína asociada a microtúbulo de equinodermo 4 (*EML-4*) es la más común, se encuentra en el 3% de los pacientes y es más frecuente en no fumadores (Shaw et al., 2009). Otras traslocaciones importantes son: las fusiones de proto-oncogén tirosina proteína quinasa 1 (*ROS1*) con genes como el gen para la proteína fusionada en el glioblastoma (*FIG*), el gen que codifica para el receptor 2 de retención de proteína del lumen del retículo endoplasmático (*KDEL2*), el gen de la tropomiosina 3 (*TPM3*), Sindecán-4 (*SDC4*), el gen para la proteína 1 con repeticiones ricas en leucina y dominios parecidos a inmunoglobulina (*LRIG3*), Ezrina (*EZR*), el gen para la proteína de transporte de fosfato dependiente de sodio 2B (*SLC34A2*) y *CD74*, en el 2% de los casos. Cabe destacar también las amplificaciones de *TTF1* (14%) y el gen para la telomerasa transcriptasa inversa (*TERT*) (18%) (Shea et al., 2016; Swanton & Govindan, 2016) (Figura 3).

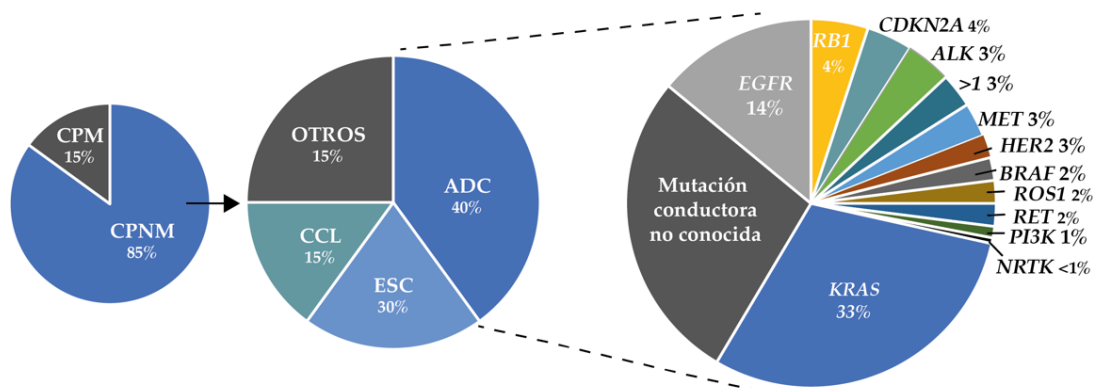


Figura 3. Clasificación histológica del cáncer de pulmón y frecuencia de las alteraciones moleculares en los oncogenes conductores más relevantes en el adenocarcinoma de pulmón. CPM (Cáncer de pulmón microcítico); CPNM (cáncer de pulmón no microcítico); ADC (adenocarcinoma); CCL (carcinoma de célula grande); ESC (carcinoma epidermoide); EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico); *BRAF* (Homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf); *MET* (factor de transición epitelio-mesénquima); *PI3K* (fosfatidilinositol 3 quinasa); *ALK* (quinasa de linfoma anaplásico); *RB1* (retinoblastoma); *CDKN2A* (Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A); *HER2* (receptor de crecimiento epidérmico humano 2); *ROS1* (proto-oncogén tirosina proteína quinasa 1); *RET* (oncogén reorganizado durante la transfección); *KRAS* (Homólogo al oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten); >1 (más de 1 mutación); *NTRK* (Tirosina quinasa neurotrófica).

Las mutaciones conductoras en oncogenes generalmente son mutuamente excluyentes (Pikor et al., 2013) y tienen gran relevancia en clínica por su frecuencia y por la posibilidad de uso clínico de inhibidores dirigidos frente a estas dianas.

En el caso de *EGFR*, las mutaciones activadoras ocurren en mayor frecuencia en mujeres, en no fumadores y en poblaciones asiáticas. Las mutaciones activan el receptor, siendo las más frecuentes las que ocurren en los exones del 19 al 21 del dominio tirosina quinasa (deleción delE746-A750 en el exón 19 y la mutación L858R). Estas alteraciones

genéticas, junto a la mutación T790M en el exón 20 presente en el 50% de los pacientes con resistencia a los inhibidores de EGFR (Yu et al., 2013), tienen valor predictivo en clínica frente a la respuesta frente a los inhibidores tirosin-quinasa (TKI) (Kobayashi et al., 2005).

Centrándonos en las mutaciones en *KRAS*, y a diferencia de las alteraciones en *EGFR*, son más frecuentes en pacientes fumadores. Varios estudios asocian las alteraciones de *KRAS* con una peor supervivencia en pacientes con adenocarcinoma (Meng et al., 2013; Pan et al., 2016). El gen *KRAS* es un miembro de la familia de genes *RAS* (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS*) que codifica para una proteína de membrana con actividad guanosina trifosfatasa (GTPasa) (Malumbres & Barbacid, 2003). Estas proteínas tienen dos dominios: el dominio G donde se va a unir guanósín trifosfato/ guanósín difosfato (GTP/GDP), y una zona variable de anclaje de la proteína a la membrana. Las proteínas RAS presentan dos estados: estado inactivo, con GDP unido, y estado activo, con GTP unido (McCormick, 1989). Las proteínas G monoméricas, como es el caso de RAS, tienen una actividad GTPasa muy baja en comparación con las proteínas G heteroméricas y necesitan de otras proteínas como las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs). Las GAPs se unen a la forma activa y promueven la hidrólisis de GTP, haciendo que se produzca un cambio rápido del estado activo al estado inactivo (unido a GDP) (Trahey & McCormick, 1987). Adicionalmente, la activación de la proteína RAS es regulada por factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEFs). Los GEFs son factores que ayudan al intercambio GDP-GTP, y favorecen que la proteína G inactiva libere GDP y se una GTP (Bos et al., 2007; Jones et al., 1991). Los estímulos extracelulares que llegan a la membrana celular dan lugar a la formación activa de la proteína RAS gracias a la proteína GEF que tienen unida, provocando la activación de diferentes vías de señalización que están implicadas en importantes procesos celulares. Entre los efectores de las proteínas RAS encontramos: RAF, PI3K, estimulador de disociación de nucleótidos de guanina RAL (RALGDS) y Fosfolipasa C (PLC-E) (Malumbres & Barbacid, 2003). La vía RAF/MEK/ERK se inicia con la fosforilación de RAF que concluye con la activación de ERK que modifica factores de transcripción o proteínas remodeladoras implicadas en proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Las mutaciones de RAS conducen a la estabilización de la unión a GTP y hacen que la vía de señalización de ERK esté constitutivamente activa. La segunda vía de señalización AKT comienza con la activación de PI3K que convierte fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-triifosfato (PIP3). El PIP3 activa la quinasa piruvato deshidrogenasa 1 (PDK1), que a su vez fosforila a AKT. Entre los sustratos de AKT se encuentran la diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR), la proteína de cabeza de zorro (FOXO) y el factor nuclear κ B (NF- κ B). El efector RALGDS/RA activa la vía de señalización de las quinasas Jun (JNK) que activan genes implicados en la progresión del ciclo celular y la supervivencia (Figura 4).

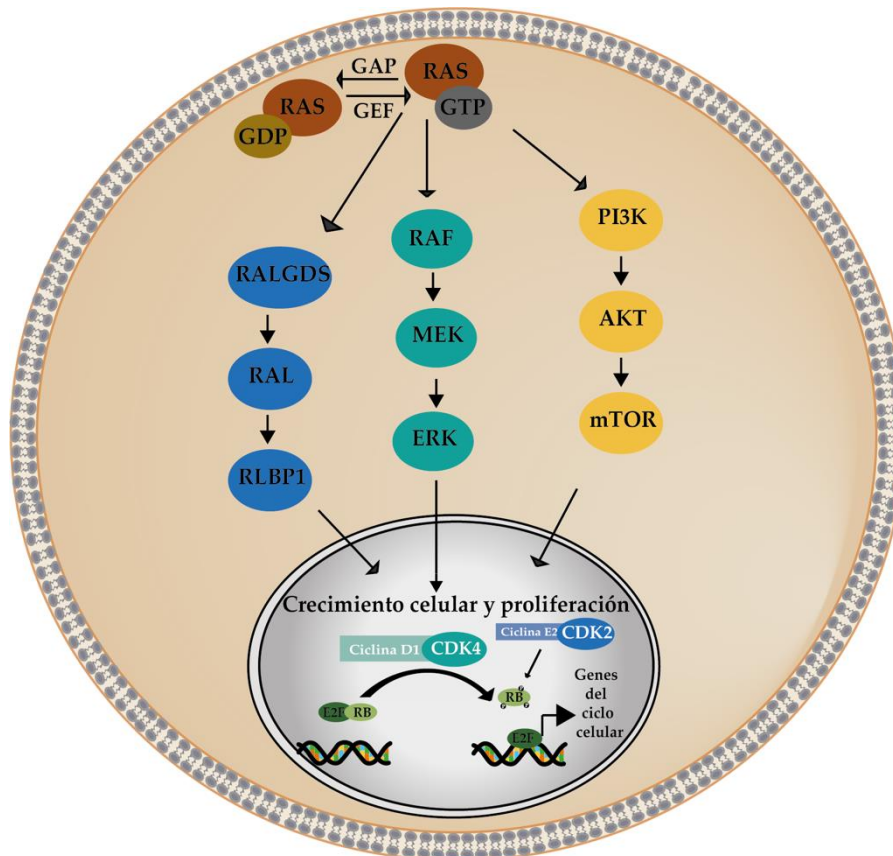


Figura 4. Vía de señalización de KRAS. Los estímulos extracelulares activan la proteína codificada por el oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata (RAS) gracias a los factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) que cataliza el intercambio de guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP), dando lugar a la activación de diferentes vías de señalización. Entre los efectores de las proteínas RAS encontramos: homólogo 1 del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf (RAF1), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y el estimulador de disociación de nucleótidos de guanina RAL (RALGDS). Estas vías activan genes implicados en la progresión del ciclo celular y la supervivencia. RLBP1 (proteína de unión a retinaldehído 1); MEK (MAPK quinasa de ERK); ERK (quinasa regulada por señales extracelulares); AKT (quinasa de proteínas B); mTOR (diana en mamíferos de la rapamicina).

Las mutaciones en *KRAS* suelen ser sustituciones de una sola base que producen la activación de las vías anteriormente descritas, teniendo una gran importancia en la carcinogénesis y transformación celular. Las mutaciones más frecuentes se encuentran en los codones 12 y 13 (95% de las mutaciones), siendo las mutaciones G12C (39%), G12V (20%), G12D (18%) y G12A (11%) las más comunes en cáncer de pulmón (Dogan et al., 2012). Las mutaciones en estos codones afectan a la actividad GTPasa y a la unión de proteínas efectoras (Al-Mulla et al., 1999). Esto ha llevado a algunos estudios a sugerir una relación entre las mutaciones de *KRAS* y la activación de vías de señalización específicas, debido a las asociaciones alteradas con los efectores. La mutación G12A se relaciona con una mayor activación de la vía PI3K/AKT y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), mientras que la mutación G12V se relaciona con una activación de RALGSD y una menor activación de AKT (Ihle et al., 2012). Es relevante destacar que diferentes

estudios clínicos han reportado peores datos de supervivencia asociados a mutaciones G12C y G12V frente a otras mutaciones en *KRAS* (Ihle et al., 2012; Nadal et al., 2014).

Las co-mutaciones dentro de los pacientes con mutación en *KRAS* son muy importantes porque condicionan su biología, pronóstico y respuesta a diferentes estrategias terapéuticas. Entre las alteraciones genéticas co-ocurrentes encontramos co-mutaciones en *STK11/LKB1*, en *TP53*, o inactivación de *CDKN2A/B* junto con una baja expresión del factor de transcripción *NKX2-1*. Estas dan lugar a tumores con diferentes microambientes inmunes y distintas respuestas frente a inmunoterapia (Skoulidis et al., 2015).

Caracterización molecular en el carcinoma epidermoide

En el caso del carcinoma epidermoide se han reportado diferentes mutaciones que afectan particularmente a genes supresores de tumores. Es frecuente la mutación en el gen supresor tumoral *TP53*, que ocurre en el 90% de los casos. Asimismo, se han encontrado otras alteraciones moleculares frecuentes y que afectan a diferentes vías implicadas en el ciclo celular como *CDKN2A/RB1* y *PI3K/AKT*, en la diferenciación de células escamosas (Sex determining Region Y-box 2 (*SOX2*) /*TP63*/ Homólogo 1 *Notch* (*NOTCH1*)) o de respuesta a estrés oxidativo (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide (*NFE2L2*) / *KEAP1* / *Culina 3* (*CUL3*)). Otras alteraciones frecuentes son las amplificaciones de genes como *SOX2* y *PIK3CA* que afectan a más del 30% de los pacientes (Cancer Genome Atlas Research Network, 2012; Swanton & Govindan, 2016) y amplificaciones en el receptor de factor de crecimiento fibroblástico (*FGFR*) (20%) (Dienstmann et al., 2014). La incidencia de aberraciones genómicas que induzcan adicción oncogénica como las descritas en el adenocarcinoma (por ejemplo, mutaciones en *EGFR*) es mínima, salvo las excepciones de las mutaciones del exón 14 de *MET* y las de *BRAF*.

2.3. Tratamiento actual y nuevas estrategias para el CPNM

En los últimos años, merced a la disponibilidad de tecnologías en el campo de la secuenciación masiva, se ha profundizado en el estudio y clasificación molecular de los tumores de pulmón, facilitando una medicina más personalizada en la clínica. Este mejor conocimiento molecular de los tumores ha facilitado la implementación de la medicina de precisión para algunos pacientes, aquellos que presentan alteraciones moleculares para las que existen terapias dirigidas. No obstante, los síntomas del cáncer de pulmón tienden a aparecer en estadios avanzados de la enfermedad, y son pocos los pacientes diagnosticados en estadios tempranos cuando las posibilidades de tratamientos eficaces son mayores. Por tanto, hay una necesidad de mejorar el diagnóstico temprano de pacientes con cáncer de pulmón y de desarrollar estrategias de tratamiento más eficaces sistémicamente para los sujetos con enfermedad avanzada.

El tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón es diferente en función del estadio en el que se diagnostica la enfermedad y de su perfil histológico y molecular. Para los

pacientes diagnosticados en un estadio temprano (I-III A), el tratamiento recomendado es la cirugía con o sin quimioterapia, dependiendo del riesgo de recidiva (Canadian Task Force on Preventive Health Care, 2016; Postmus et al., 2017). Los pacientes con tumores localmente avanzados (estadio III) no resecables, son tratados con quimioterapia en combinación con radioterapia (Kris et al., 2017), seguido de tratamiento con el inhibidor de PD-L1 durvalumab, en caso de respuesta favorable a la terapia de inducción (Antonia et al., 2017, 2018; Faivre-Finn et al., 2021). Realmente diferentes opciones de inmunoterapia adyuvante y neoadyuvante están siendo evaluadas en etapas más tempranas de la enfermedad. Recientemente Felip et al. han comunicado los resultados del estudio IMpower010 mostrando un beneficio en términos de supervivencia libre de enfermedad con atezolizumab tras la quimioterapia adyuvante en tumores de estadio II-III A con expresión de PD-L1 > 1% (Felip et al., 2021).

En el caso de los pacientes diagnosticados en estadio avanzado (IV), que representan más del 61% de todos los pacientes (Siegel et al., 2021), el 25-69% poseen mutaciones genéticas específicas, dependiendo de las características epidemiológicas, y son potenciales beneficiarios de terapias dirigidas a las dianas moleculares desreguladas (Hirsch et al., 2017). Cuando no se identifican dianas apropiadas con tratamiento específico, la primera línea de tratamiento sistémico incluye un régimen con platinos asociado a inmunoterapia (inhibidor de PD-1/PD-L1) en el caso de pacientes con una expresión de PD-L1 tumoral menor del 50%. Para aquellos pacientes con una expresión de PD-L1 mayor o igual al 50%, el tratamiento es la inmunoterapia en monoterapia, y en casos concretos quimioterapia más inmunoterapia (Hirsch et al., 2017; Planchard et al., 2018) (Figura 5).

A continuación, se detallan las terapias dirigidas y las estrategias de inmunoterapia aprobadas en clínica.

2.3.1. Terapias dirigidas a dianas moleculares específicas

Las terapias dirigidas son el tratamiento en primera línea en pacientes con estadio avanzado con aberraciones activadoras en *EGFR*, *ALK*, *ROS*, y *BRAF*. Aunque su aprobación está pendiente por algunas agencias reguladoras, también se admite la indicación de tratamiento específico en pacientes con CPNM con mutaciones de *MET* y traslocaciones de *RET* o *NTRK* (Planchard et al., 2018) (Figura 5).

Los TKIs de EGFR de primera generación (erlotinib, gefitinib) han demostrado beneficios en la supervivencia libre de progresión en múltiples ensayos clínicos en los que se ha comparado con quimioterapia (Tan et al., 2016). Los TKIs de segunda generación (afatinib, dacomitinib) demostraron también una mejora en la supervivencia libre de progresión frente al tratamiento con quimioterapia, sin embargo, presentaban más efectos adversos que los de primera generación (Park et al., 2016). De modo universal los pacientes acaban progresando a los TKIs debido a la resistencia intrínseca o adquirida. El mecanismo

de resistencia más frecuente (ocurre en el 50% de los pacientes que progresan) es la adquisición de una segunda mutación en *EGFR*, la mutación T790M (Kobayashi et al., 2005). Por este motivo, se han desarrollado TKIs de tercera generación (osimertinib) diseñados para inhibir la activación del receptor aún en presencia de la mutación secundaria. Osimertinib ha demostrado un aumento en la supervivencia libre de progresión y en la supervivencia global en aquellos pacientes con progresión previamente tratados con TKIs de primera y segunda generación (Jänne et al., 2015), así como en pacientes no tratados previamente con estos inhibidores (Ramalingam et al., 2020) (Figura 5).

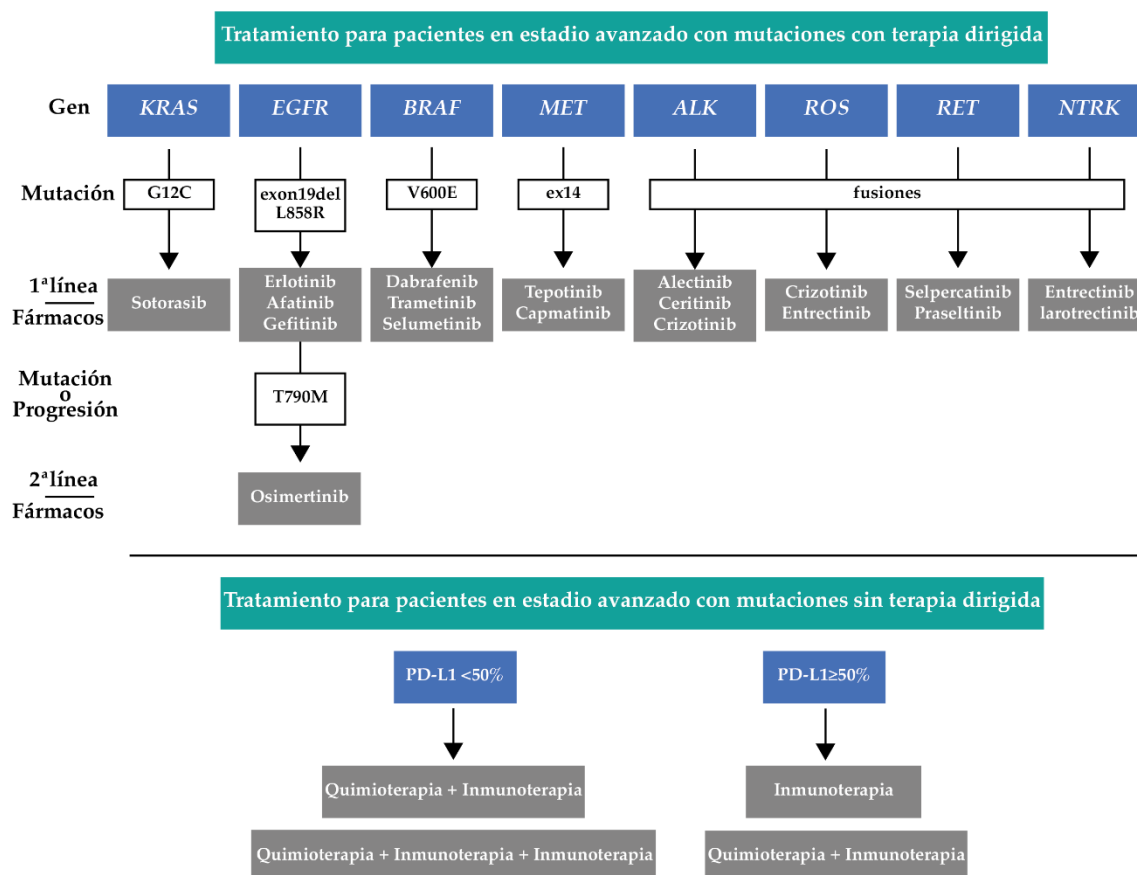


Figura 5. Esquema de tratamiento en primera y segunda línea de los pacientes con CPNM con mutación dirigida. Y opciones de tratamiento para pacientes con mutación no dirigida. *KRAS* (Homólogo al oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten); *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico); *BRAF* (Homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf); *MET* (factor de transición epitelio-mesénquima); *ALK* (quinasa de linfoma anaplásico); *ROS1* (proto-oncogén tirosina proteína quinasa 1); *RET* (oncogén reorganizado durante la transfección); *NTRK* (Tirosina quinasa neurotrófica); PD-L1 (Ligando 1 de muerte programada).

Los pacientes con fusiones de *ALK* también son tratados en primera línea con terapias dirigidas. Crizotinib (inhibidor de 1ª generación), ceritinib, alectinib y brigatinib (inhibidores de 2ª generación) y lorlatinib (inhibidor de 3ª generación) son algunos de los inhibidores aprobados por las agencias reguladoras para el tratamiento de estos pacientes. En el caso de crizotinib, además de la indicación para las fusiones de *ALK*, también se utiliza para tratar pacientes con fusiones en *ROS1* y *MET* (Planchard et al., 2018) (Figura 5).

Los ensayos clínicos han mostrado que el tratamiento con crizotinib aumenta la supervivencia libre de progresión y la tasa de respuesta objetiva en comparación con quimioterapia basada en platinos (Solomon et al., 2014).

Otros pacientes candidatos a recibir terapia dirigida como tratamiento en primera línea son los pacientes con mutaciones en *BRAF* y en concreto con la mutación más común, V600E (Paik et al., 2011). Inhibidores específicos de *BRAF* como dabrafenib o vemurafenib han mostrado eficacia clínica para los pacientes con cáncer de pulmón (Gautschi et al., 2015).

Para los pacientes con fusiones en *RET*, han sido aprobados dos fármacos, selpercatinib (Drilon et al., 2020) y pralseltinib (Gainor et al., 2021), con una eficacia duradera y con escasos efectos secundarios en pacientes con CPNM (Figura 5). Para pacientes con fusiones en *NTRK*, se ha aprobado el uso de inhibidores específicos de esta fusión como larotrectinib o fármacos aprobados para inhibir otras fusiones como las de *ROS* o *ALK*, como es el caso de entrectinib (Doebele et al., 2020) (Figura 5). Sin embargo, ya se han detectado mecanismos de resistencia a estos inhibidores (Drilon et al., 2017) y ya se están probando inhibidores de nueva generación (repotrectinib, selitrectinib) (Drilon et al., 2018). Para los pacientes con mutaciones en el gen *HER2* se están desarrollando nuevos fármacos que están siendo testados en ensayos clínicos como trastuzumab deruxtecan, un inmunocóncugado dirigido a *HER2* para pacientes con CPNM cuyos resultados demuestran unas tasas de respuesta superiores al 60% (B. T. Li et al., 2021).

En contraste con los casos arriba expuestos, el abordaje terapéutico de la mutación en *KRAS* supone un desafío para la clínica. Después de 40 años sin éxito en el desarrollo de una terapia eficaz, recientemente se han diseñado inhibidores covalentes alostéricos para el alelo G12C, que se unen a *RAS*-GDP (estado inactivo) (Ostrem et al., 2013). El inhibidor ARS 853 y análogos como ARS 1620, han mostrado actividad antitumoral *in vitro e in vivo* (Janes et al., 2018). Actualmente existen ensayos clínicos en Fase III con los inhibidores AMG 510 (sotorasib) (Canon et al., 2019), aprobado este mismo año para el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón (Reck et al., 2021; Skoulidis et al., 2021), y con el MRTX849 (adagrasib) (KRYSTAL-12) (Hallin et al., 2020). Los resultados preliminares de estos ensayos clínicos muestran la eficacia clínica de estos inhibidores específicos de la mutación G12C en pacientes que presentan dicha mutación. Actualmente se están investigando otros inhibidores específicos de *KRAS* G12C como JNJ-74699157 (ARS 3248), GDC-6036, JDQ443, D-1553 en fase I (NCT04449874, NCT04699188, NCT04585035) que ya han demostrado eficacia preclínica. Sin embargo, y al igual que ocurre con otras terapias dirigidas, con el tiempo aparecen mecanismos de resistencia que limitan su uso más prolongado en clínica. Entre las mutaciones adquiridas más frecuentes se encuentran, las alteraciones adquiridas en otros codones de *KRAS*, la amplificación de *MET*, mutaciones activadoras en *NRAS*, *BRAF*, *MAP2K1* y *RET* o fusiones oncogénicas que implican a *ALK*, *RET*, *BRAF*, *RAF1* y *FGFR3* (Awad et al., 2021). Para ello se están estudiando posibles combinaciones con inhibidores dirigidos a otros efectores que puedan evadir dichas resistencias.

Otra de las estrategias para abordar el tratamiento de los pacientes con mutaciones en *KRAS* se centra en dirigirse a efectores de la vía de señalización de *KRAS* como BRAF, MEK o mTOR. Los inhibidores de BRAF o MEK muestran actividad antitumoral frente a esta mutación en líneas celulares y modelos murinos, sin embargo, en clínica han mostrado eficacia limitada. No se ha observado ningún beneficio de estos inhibidores frente a otras terapias aprobadas como docetaxel, además de presentar toxicidad significativa en los pacientes (Blumenschein et al., 2015; Jänne et al., 2017; Planchard et al., 2016). En el caso de los inhibidores de mTOR, los ensayos con ridaforolimus han reportado escasos beneficios clínicos (Riely et al., 2012). Estos resultados reflejan que los modelos preclínicos usados no pronostican la respuesta en los pacientes. Los inhibidores de ERK1/2, como ulixertinib (Sullivan et al., 2018) o LY3214996 (NCT02857270) tampoco han resultado eficaces en clínica.

En general, hasta ahora el uso de inhibidores frente a una sola diana terapéutica de la vía de *KRAS* no ha presentado los beneficios esperados. Por este motivo, actualmente los esfuerzos se están centrando en estudiar la combinación de fármacos frente a diferentes efectores para conseguir así un beneficio mayor. Así, conseguir el bloqueo completo de la vía de *KRAS* o descubrir interacciones letales sintéticas entre *KRAS* mutado y otras proteínas de las que las células tumorales sean dependientes, son algunas de las estrategias estudiadas. Una combinación prometedora para los pacientes con adenocarcinoma de pulmón con mutación en *KRAS* era el tratamiento con inhibidores frente a MEK y PI3KCA (Engelman et al., 2008). Varios ensayos clínicos han testado esta combinación (NCT01390818, NCT01363232) pero la toxicidad ha sido significativa (Schram et al., 2018).

En cuanto a las interacciones letales entre *KRAS* mutado y otras proteínas, se ha visto que tiene gran importancia la interacción con CDK4 (Puyol et al., 2010). La ablación genética y farmacológica de CDK4 demostró la letalidad sintética específica del tumor de pulmón en modelos de ratón modificados genéticamente en *KRas*. Ya existen varios inhibidores de CDK4, como palbociclib y abemaciclib que se están testando para el tratamiento de cáncer de pulmón. El ensayo de fase III JUNIPER mostró mejores resultados en supervivencia libre de progresión y tasa de respuesta objetiva en pacientes con *KRAS* mutado en la rama de abemaciclib que en la de erlotinib (Goldman et al., 2016). Palbociclib también se está evaluando clínicamente en combinación con inhibidores de MEK para el CPNM con mutación de *KRAS* (NCT02022982) o con inmunoterapia (NCT02779751).

2.3.2. Inmunoterapia

El uso de la inmunoterapia en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón avanzado ha tenido un gran impacto en los últimos años, incorporándose en el tratamiento de algunos pacientes como primera línea (Figura 5). El primer ensayo clínico con pembrolizumab en pacientes con CPNM demostró que pacientes fumadores tenían un mayor beneficio con esta terapia. En consonancia, el subgrupo con *KRAS* mutado mostraba

mejor respuesta (Rizvi et al., 2015). Estos tumores se asocian al hábito tabáquico, a una elevada carga mutacional (Spigel et al., 2016), abundante infiltración de células T (Calles et al., 2015) y una alta expresión de PD-L1 (Calles et al., 2015; Huynh et al., 2016).

Por otra parte, se ha visto que las co-mutaciones tienen un papel fundamental en el microambiente inmune de los tumores y por tanto impactan en la respuesta a la inmunoterapia. Skoulidis reportó que los tumores *KRAS* mutados con alteraciones en *TP53* mostraban una mayor infiltración de células T y otros marcadores inmunes, mientras que los tumores *KRAS* mutados deficientes en *LKB1* presentaban un microambiente inmunitario tumoral más limitado (Skoulidis et al., 2015). En un análisis retrospectivo de los pacientes con adenocarcinomas con mutación en *KRAS* incluidos en el ensayo de fase III CheckMate 057 se demostró que las tasas de respuesta eran significativamente menores en pacientes con tumores con co-mutaciones en *KRAS* y *STK11*. Adicionalmente presentaban peores datos de supervivencia libre de progresión, que los pacientes con tumores con mutaciones en *KRAS* y *TP53* (Skoulidis et al., 2018).

Además, se ha visto que ciertos fármacos también afectan al microambiente inmune del tumor y podrían afectar a la respuesta del tumor a la inmunoterapia. Por ejemplo, estudios preclínicos han demostrado que los inhibidores CDK4/6 como abemaciclib, no sólo tienen capacidad de parar el ciclo celular, sino que también ejercen un efecto sobre el microambiente inmune del tumor, facilitando la respuesta inmune al mismo y aumentando la expresión de PD-L1. Por lo tanto, la combinación de estos inhibidores con inmunoterapia pudiera resultar en una certera estrategia terapéutica (Petroni et al., 2020; Schaer et al., 2018).

3. Modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo* como herramienta para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas de precisión

La tasa de éxito en la aprobación para uso clínico de nuevos fármacos, que ya presentaron previamente eficacia preclínica, es globalmente del 13,4% (Dimasi et al., 2013), siendo la oncología la disciplina que presenta las tasas de fracaso más altas (Wong et al., 2019). Una de las principales razones de esta elevada tasa de fracaso es la insuficiencia de modelos preclínicos realmente predictivos de la respuesta en los pacientes, especialmente para enfermedades tan heterogéneas a nivel molecular como el CPNM. Actualmente, solo una proporción limitada de pacientes portadores de una mutación conductora accionable puede beneficiarse de terapias dirigidas (Yuan et al., 2019), y normalmente solo durante un tiempo limitado, puesto que la mayoría de los pacientes tratados con estas terapias acaban desarrollando resistencia al tratamiento. En este contexto, resulta necesario disponer de nuevas estrategias terapéuticas eficaces que puedan cubrir a un mayor número de pacientes (J. Dong et al., 2019). Para ello, es esencial el establecimiento de nuevos modelos experimentales preclínicos predictivos de respuesta apropiados para probar nuevas estrategias terapéuticas.

A continuación, se describen los modelos preclínicos más relevantes para uso investigacional en cáncer de pulmón (Figura 6).

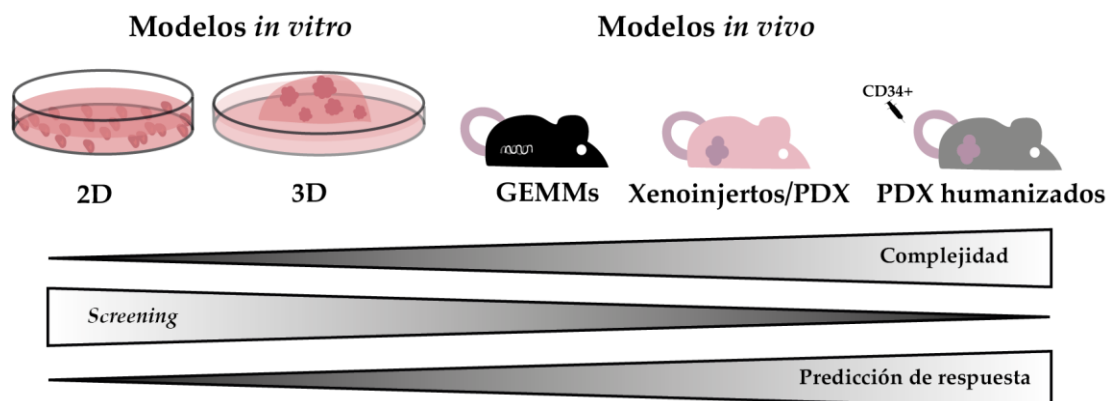


Figura 6. Modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo* como herramienta para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas de precisión. 2D (dos dimensiones); 3D (tres dimensiones); GEMMs (modelos murinos genéticamente modificados); PDX (Xenoinjerto derivado de paciente).

3.1. Modelos *in vitro*: 2D y 3D

Para la experimentación *in vitro* disponemos de líneas celulares establecidas o de cultivos primarios en dos dimensiones (2D) y en tres dimensiones (3D, organoides) (Figura 6).

Las líneas celulares establecidas creciendo en formato 2D es el modelo *in vitro* preclínico más sencillo y habitualmente usado para el *screening* de fármacos. El interés por relacionar las alteraciones moleculares y la sensibilidad a fármacos ha llevado a testar miles de ellos en paneles amplios de líneas celulares establecidas que han facilitado el estudio de los mecanismos de acción de nuevas terapias dirigidas (Garnett et al., 2012; Sos et al., 2009). Entre las ventajas de las líneas celulares están su fácil manejo y el bajo coste del mantenimiento de los cultivos, así como, la capacidad de manipulación genética para el silenciamiento o sobreexpresión de los genes de interés. La homogeneidad que presentan estos cultivos permite una gran reproducibilidad en los experimentos. Sin embargo, no reflejan la heterogeneidad intratumoral, aquella por la que coexisten en el tumor células con firmas moleculares o genéticas distintas y que pueden ir evolucionando a lo largo de la enfermedad (McGranahan et al., 2015; Zhan et al., 2014). Cabe destacar la ausencia de microambiente en estos cultivos, y aunque existe la posibilidad de co-cultivarlas posterior y puntualmente con otros tipos celulares, la ausencia constante de microambiente afecta al crecimiento de las células tumorales. Los múltiples pasajes que sufren estas células en cultivo favorecen la adquisición de nuevas mutaciones, dejando de presentar las características originales de las células tumorales de las que derivan. Si bien este modelo *in vitro* preclínico sigue siendo valioso para identificar, estudiar y validar dianas terapéuticas, es necesaria

una validación posterior en modelos preclínicos más complejos que predigan más fielmente la respuesta en los pacientes (Gillet et al., 2011).

En la última década, con el objeto de mejorar los sistemas preclínicos *in vitro* y que estos presenten mayor homología con los tejidos de origen, se han desarrollado cultivos 3D, esferoides y organoides. Los organoides son estructuras multicelulares en 3D, que son establecidas *in vitro* e intentan imitar la estructura y organización de un órgano o un tumor. Los primeros cultivos de organoides fueron establecidos de células madre intestinales cultivadas en condiciones idóneas para la proliferación y diferenciación, embebidas en una matriz extracelular y con diversos factores de crecimiento (Sato et al., 2009). Desde entonces, se han generado organoides de una variedad de tejidos humanos sanos, así como de tejido tumoral de diferentes órganos: colon (Sato et al., 2011; van de Wetering et al., 2015), páncreas (Boj et al., 2015; L. Huang et al., 2015), próstata (Drost et al., 2016; Gao et al., 2014), mama (Sachs et al., 2018), intestino (Yan et al., 2018), pulmón (Sachs et al., 2019), vejiga (Mullenders et al., 2019), ovario (Kopper et al., 2019), riñón (Schutgens et al., 2019) e hígado (W. Li et al., 2019). Una de las características importantes de los organoides derivados de tumores de pacientes es su capacidad de retener la heterogeneidad intratumoral (L. Huang et al., 2015; Sachs et al., 2018; van de Wetering et al., 2015; Yan et al., 2018). Entre las desventajas encontramos que la variabilidad en estos experimentos es más alta comparando con los experimentos en líneas celulares establecidas, debido en parte a la heterogeneidad del cultivo. Otra limitación de estos cultivos, a pesar de su organización tridimensional, es la incapacidad de mimetizar el microambiente y la vasculatura de los tumores. Sin embargo, esta limitación se puede mitigar co-cultivando con diferentes tipos celulares como células inmunes (Dijkstra et al., 2018). En resumen, los organoides derivados de tumores de pacientes pueden potenciar los programas de desarrollo de fármacos y optimizar la tasa de identificación de moléculas que luego muestren eficacia en clínica. Permiten realizar cribados masivos de fármacos, para después validar en modelos animales solo aquellos que presenten mayor efectividad *in vitro*.

3.2. Modelos *in vivo*: Xenoinjertos, modelos murinos genéticamente modificados GEMMs, PDX y PDX humanizados

Los modelos animales son modelos más complejos biológicamente, y que por tanto reflejan más fielmente la complejidad de los tumores de los pacientes. No obstante, son modelos más costosos y cuyo uso debe cumplir con todos los requerimientos de la regulación ética de la experimentación animal, lo que imposibilita su uso para realizar *screening* masivos de fármacos (Figura 6).

Xenoinjertos

Las líneas celulares establecidas se implantan en ratones inmunodeficientes de manera ectópica (subcutánea) u ortotópica (en el mismo lugar del tumor) generando modelos CDX.

Este modelo animal es el más simple, fácil de establecer y el más utilizado como modelo animal preclínico. Pese a ello, las desventajas comentadas para las líneas celulares establecidas se trasladan a los CDX, ya que no pueden reproducir la heterogeneidad del tumor y acumulan nuevas mutaciones que no presentaba el tumor original (Daniel et al., 2009). Aunque estos modelos, a diferencia de los cultivos celulares, sí pueden recapitular parcialmente el microambiente del tumor, aunque los ratones carezcan de sistema inmune (o presenten deficiencias notables).

Modelos murinos genéticamente modificados (GEMMs)

En los GEMMs, el genoma es manipulado genéticamente para introducir mutaciones, deletar o sobreexpresar genes. Los modelos GEMMs para el CPNM que existen actualmente son principalmente del subtipo adenocarcinoma. El primer modelo murino genéticamente modificado de adenocarcinoma de pulmón se desarrolló generando alelos mutantes de *Kras* que tras recombinación somática espontánea codificaban una oncoproteína *KrasG12D* funcional (Johnson et al., 2001). Sin embargo, desarrollaban otros tipos tumorales adicionales a los adenocarcinomas en el pulmón. Por lo tanto, se desarrollaron modelos en los cuales el alelo endógeno *KrasG12D* se expresaba controlado por la recombinación mediada por Cre (Jackson et al., 2001). Así, la expresión podía hacerse selectivamente en el pulmón utilizando la inhalación intranasal de partículas adenovirales que expresaban esta recombinasa. Otros laboratorios han generado modelos con otras mutaciones frecuentes en *Kras* como el modelo *KrasG12V* (Guerra et al., 2003). Para agilizar la iniciación de los tumores se han utilizado otras mutaciones adicionales en genes que aceleran su desarrollo, por ejemplo, GEMMs con alelos *KrasG12D* o *KrasG12V* junto con alelos *knock-out* condicionales de *p53* (*p53lox*) (Kwon & Berns, 2013). Para la validación de algunas dianas terapéuticas se han introducido otras mutaciones en efectores de la vía de *Kras* o de otras proteínas con las que interacciona como es el caso de *CDK4* (Puyol et al., 2010).

Las principales ventajas de estos modelos animales para la investigación en cáncer son su idoneidad para estudiar la carcinogénesis, estudiar en profundidad los mecanismos de iniciación y progresión de los tumores en el lugar de origen (ortotópico), así como las funciones específicas de genes individuales. Estos modelos cuentan con el sistema inmune y la vasculatura propia del huésped que ayuda al desarrollo de los tumores en condiciones más reales. Con todo, no son modelos capaces de reproducir la heterogeneidad de los tumores humanos, mostrando menor complejidad genómica, que los hace menos predictivos de respuesta a los diferentes fármacos (Herter-Sprue et al., 2013).

Xenoinjertos derivados de pacientes (PDX)

Aunque los dos modelos animales hasta ahora descritos han ayudado a testar gran cantidad de fármacos, el escaso valor predictivo de estos modelos comparando con los resultados obtenidos en la clínica ha llevado a desarrollar modelos PDX. Estos modelos, en

los últimos años, han incrementado enormemente su uso en la investigación traslacional y en el desarrollo de la medicina de precisión. Los modelos PDX son generados por la implantación de pequeñas piezas de tejido tumoral obtenidas al tiempo de cirugías curativas o biopsias diagnósticas en ratones inmunodeprimidos. La implantación, al igual que ocurría con los CDX, puede ser subcutánea o ortotópica.

Actualmente se dispone de colecciones de modelos PDX establecidos de diferentes tipos tumorales incluyendo cáncer colorrectal (Julien et al., 2012), cáncer de mama (Bruna et al., 2016; Derose et al., 2011), cáncer de páncreas (M. P. Kim et al., 2009), cáncer de pulmón (Fichtner et al., 2008; John et al., 2011; X. chao Zhang et al., 2013), cáncer de próstata (Y. Wang et al., 2005) y cáncer de ovario (George et al., 2017), entre otros. La tasa de éxito de injerto varía entre modelos, siendo el cáncer colorrectal el que posee una tasa más alta (mayor del 80%) y el CPNM el que presenta la más baja (entorno al 25%) (Hidalgo et al., 2014). La baja tasa de éxito de injerto, junto a los largos tiempos de establecimiento para algunos tipos de tumores son las principales desventajas de este modelo. Pero una vez los modelos son establecidos, son una herramienta muy valiosa para la investigación preclínica y clínica, ya que estos modelos conservan las características histológicas, biológicas y genéticas de los tumores de los que derivan, y tales características se mantienen a lo largo de los pasajes (Derose et al., 2011; Julien et al., 2012). En estos modelos, la arquitectura del tumor se conserva, manteniendo el microambiente del tumor original en los primeros pasajes. A lo largo de los pasajes el estroma humano es sustituido por estroma murino (Julien et al., 2012; Peng et al., 2013), lo que podría modificar la respuesta a algunos fármacos (Morgan et al., 2017). No obstante, varios estudios han comprobado su valor predictivo de la eficacia de fármacos y del resultado en la clínica (Kang et al., 2018; Martin et al., 2016; E. L. Stewart et al., 2015).

Xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) humanizados

Una limitación de los modelos preclínicos PDX, es que, al tratarse de modelos inmunodeprimidos, necesarios para el éxito del injerto, carecen parcial o totalmente del sistema inmune. Esto supone limitaciones en el testaje de determinadas estrategias terapéuticas como la inmunoterapia. Con el objeto de paliar este problema, en los últimos años se han desarrollado modelos murinos de PDX humanizados. Estos modelos proporcionan una herramienta para estudiar las interacciones tumor-sistema inmunitario *in vivo* y testar estrategias de inmunoterapia. Actualmente, hay diferentes estrategias para el desarrollo de modelos PDX humanizados. Existen tres principales cepas de ratón que son usadas en la humanización: NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl} (NSG), NODShi.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug} (NOG) y cepas C;129S4-Rag2^{tm1Flv}Il2rg^{tm1Flv} (BRG) (Shultz et al., 2012). Estas cepas difieren en las capacidades de éxito del injerto del sistema inmune humano, siendo los NSG la cepa que soportan mayores niveles de injerto de células madre hematopoyéticas (CMH) e injertos de médula ósea (McDermott et al., 2010; Shultz et al., 2012). Estas cepas de ratón han sido optimizadas para usos concretos mediante

modificaciones genéticas para producir una variedad de citoquinas humanas que estimulan la diferenciación de linajes hematopoyéticos humanos adicionales. Por ejemplo, la cepa NOG-GM3 que expresa la interleuquina 3 (IL-3) humana (Nicolini et al., 2004).

Existen tres estrategias para repoblar el sistema inmune en los ratones inmunodeficientes: injerto de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Mosier et al., 1988), injerto de tejido fetal o células madre hematopoyéticas (Lapidot et al., 1992). El modelo humanizado más sencillo de generar se establece con la inyección intraperitoneal o intravenosa de PBMCs procedentes del paciente o de individuos sanos. Este modelo presenta altos niveles de injerto de células T pero no de células B. Su mayor limitación es la aparición a las 3-4 semanas de la inyección de la enfermedad de huésped contra injerto. Aun así, es un modelo útil para realizar experimentos a corto plazo y para determinados tipos de estudios, como el seguimiento del reclutamiento de linfocitos T hacia los tumores por parte de los anticuerpos terapéuticos (Bacac et al., 2016; Rius Ruiz et al., 2018). También se han establecido modelos PDX humanizados de cáncer de pulmón inyectando PBMCs para estudiar la eficacia de la inmunoterapia dirigida a PD-L1/PD-1, en los que se vio una reducción del volumen tumoral en los ratones tratados (Lin et al., 2018).

Otra estrategia relevante consiste en la implantación de fragmentos de hígado fetal humano y fragmentos de timo bajo la cápsula renal de ratones inmunodeprimidos. Esta estrategia es la más compleja técnicamente y requiere de gran experiencia de manipulación, pero da lugar a una reconstitución completa del sistema inmune humano en el ratón (Cutz et al., 2006). No obstante, la estrategia más utilizada es la inyección intravenosa de CMH, de células CD34+, aisladas a partir de sangre de cordón umbilical o de médula ósea. La inyección de CMH humanas CD34+ en estos ratones da lugar a la generación de diversos linajes celulares, células T y células B restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad, así como a cantidades limitadas de monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Ito et al., 2002). Estos modelos PDX humanizados han sido utilizados en los últimos años para testar diferentes inmunoterapias. Rosato et al. desarrollaron modelos humanizados para testar anticuerpos anti-PD-1 en tumores derivados de pacientes con cáncer de mama triple negativos. Estos investigadores observaron células inmunes humanas infiltradas en el tumor y una reducción significativa del crecimiento de este tras el tratamiento, observaciones que no se produjeron en modelos PDX no humanizados (Rosato et al., 2018). Resultados similares se observaron en ratones humanizados con CD34+ injertados con CDX o PDX de cáncer de pulmón. El tratamiento con pembrolizumab redujo el crecimiento del tumor y aumentó la infiltración de células CD8+ en los tumores tras el tratamiento, comparado con ratones no humanizados (M. Wang et al., 2018).

Teniendo en cuenta todos los datos de los que disponemos sobre el CPNM y la escasez relativa de terapias efectivas, el desarrollo de herramientas experimentales alternativas es necesario para evaluar nuevas estrategias terapéuticas y validar nuevos biomarcadores que ayuden a mejorar la supervivencia de estos pacientes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer de pulmón es la neoplasia más mortal debido, al menos parcialmente, a la escasez de terapias eficaces. Este hecho es particularmente relevante en algunos subtipos moleculares como el que presenta mutaciones en *KRAS*, que suponen el 20-30% de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón y que todavía no cuenta con estrategias terapéuticas específicas válidas. Necesitamos nuevos y mejores modelos preclínicos que permitan testar de forma óptima nuevas estrategias terapéuticas potenciales. Tales modelos deberían facilitar asimismo la identificación de biomarcadores predictivos de respuesta, y, por tanto, favorecer la implementación de la medicina de precisión en el CPNM.

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Generación y caracterización de una amplia colección de modelos PDX de CPNM como herramienta preclínica de evaluación *in vivo* de nuevas estrategias terapéuticas.
2. Generación y caracterización de una amplia colección de modelos PDXDO de CPNM como herramienta preclínica de evaluación *in vitro* de nuevas estrategias terapéuticas.
3. Generación y caracterización de modelos PDX humanizados de CPNM como herramienta preclínica *in vivo* para la evaluación de estrategias de inmunoterapia.
4. Evaluación de nuevas estrategias terapéuticas en modelos PDXDO, GEMM, PDX y PDX humanizados de CPNM con *KRAS* mutado.
5. Estudio farmacodinámico e identificación de biomarcadores predictivos de respuesta para las nuevas estrategias terapéuticas testadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos Biológicos

1.1. Anticuerpos

Para la detección de las proteínas de interés se utilizaron anticuerpos para las técnicas *Western Blot* (WB), inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia (IF) y citometría de flujo (CF) (Tabla 1).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para las diferentes técnicas (WB; IHQ; IF y CF)

Anticuerpo	Clon	Tipo	Casa comercial	Referencia	Técnica	Dilución
Primario						
AKT	-	Policlonal	CST	9272	WB	1:1000
β -actina	-	Policlonal	Abcam	Ab8227	WB	1:5000
Caspasa 3	-	Policlonal	CST	9662	WB	1:1000
Caspasa 3	C92-605	Monoclonal	BD	559565	IF	1:400
Caspasa 3 activa	-	Policlonal	CST	9661	IHQ	1:200
CD20	L26	Monoclonal	DAKO	IR604	IHQ	RTU
CD25-APC	BC96	Monoclonal	Biologend	302610	CF	1:300
CD3	-	Policlonal	DAKO	IR503	IHQ	RTU
CD3-PerPCy5.5	UCHT1	Monoclonal	Biologend	300430	CF	1:300
CD34-AF488	581	Monoclonal	StemCell	60013AD	CF	1:300
CD4	4B12	Monoclonal	DAKO	IR649	IHQ	RTU
CD4-BV421	OKT4	Monoclonal	Biologend	317434	CF	1:300
CD45	2B11+PD7-26	Monoclonal	DAKO	IR751	IHQ	RTU
CD45	MEM-28	Monoclonal	abcam	Ab8216	IF	1:300
huCD45-PE	HI30	Monoclonal	Biologend	304008	CF	1:300
mCD45-AF488	30-F11	Monoclonal	Biologend	103122	CF	1:300
CD56	123C3	Monoclonal	DAKO	IR628	IHQ	RTU
CD68	KP1	Monoclonal	DAKO	IR609	IHQ	RTU
CD69-APC-Cy7	FN50	Monoclonal	Biologend	310914	CF	1:300
CD8	C8/144B	Monoclonal	DAKO	IR623/IS623	IHQ	RTU
CD8-PE/Cy7	SK1	Monoclonal	Biologend	344712	CF	1:300
CDK4	D9G3E	Monoclonal	CST	12790	WB	1:1000
CDK6	DCS83	Monoclonal	CST	3136	WB	1:1000
Ciclina D1	72-13G	Monoclonal	SCB	Sc-450	WB	1:1000
Ciclina D1	SP4	Monoclonal	DAKO	M3635	IHQ	1:150
CK18	CK2	Monoclonal	Millipore	MAB3404-C	IF	1:300
EGFR	D38B1	Monoclonal	CST	4267	WB	1:1000

Anticuerpo	Clon	Tipo	Casa comercial	Referencia	Técnica	Dilución
Primario						
ERK	-	Policlonal	CST	9102	WB	1:1000
HH3	-	Policlonal	CST	9715	WB	1:1000
ki67	MIB-1	Monoclonal	DAKO	IR626	IHQ	RTU
P16	D7C1M	Monoclonal	CST	80772	WB	1:1000
P27	D69C12	Monoclonal	CST	3686	WB	1:1000
pAKT	-	Policlonal	CST	9271	WB	1:1000
PDL1	E1L3N	Monoclonal	CST	13684	IHQ/WB	1:75/1:1000
pEGFR	-	Policlonal	CST	2234	WB	1:1000
pERK	-	Policlonal	CST	9101	WB	1:1000
pHH3	D7N8E	Monoclonal	CST	53348	WB	1:1000
pRB	D20B12	Monoclonal	CST	8516	WB	1:1000
pRSK	-	Policlonal	CST	9341	WB	1:1000
pS6	D57.2.2E	Monoclonal	CST	4858	WB	1:1000
RB	G3-245	Monoclonal	BD	554136	WB	1:1000
RSK	32D7	Monoclonal	CST	9355	WB	1:1000
S6	5G10	Monoclonal	CST	2217	WB	1:1000
SMA	1A4	Monoclonal	DAKO	IR611	IHQ	1:4
TopoII α	F-12	Monoclonal	SCB	Sc-365916	WB	1:500
TTF-1	SPT24	Monoclonal	LEICA	TTF-1-L-CE	IHQ	1:2
Vimentina	D21H3	Monoclonal	CST	5741	IF	1:250
Secundario Conjugado						
Anti-conejo	HRP	-	CST	7074	WB	1:10000
Anti-ratón	HRP	-	CST	7076	WB	1:10000
Anti-ratón	AF555	Policlonal	Thermofisher	A31570	IF	1:1000
Anti-ratón	AF647	Policlonal	Thermofisher	A21235	IF	1:1000
Anti-conejo	AF488	Policlonal	Thermofisher	A11008	IF	1:1000
Anti-conejo	AF555	Policlonal	Thermofisher	A27039	IF	1:1000

Abreviaturas: CST (Cell Signaling Technology); WB (western blot); IHQ (inmunohistoquímica); IF (inmunofluorescencia); citometría de flujo (CF); RTU (*ready to use*); HRP (peroxidasa de rábano); AF (Alexa Fluor); APC (alofiocianina); PE (ficoeritrina); Cy (cianina).

1.2. Sondas para la reacción en cadena de la polimerasa “digital droplet” (ddPCR)

Se realizaron ensayos de ddPCR, para la detección de mutaciones génicas específicas para los cuales se emplearon las siguientes sondas (*BioRad*) (Tabla 2).

Tabla 2. Sondas utilizadas para la técnica de ddPCR

Gen	Mutación	Mut/wt	Ref.	Casa comercial
<i>EGRF</i>	L858R	Mut/wt	dHsaMDV2010021	BioRad
<i>EGFR</i>	T790M	Mut/wt	dHsaMDV2010019	BioRad
<i>KRAS</i>	G12D	mut	dHsaCP2000001	BioRad
<i>KRAS</i>	G12D	wt	dHsaCP2000002	BioRad
<i>KRAS</i>	G12C	Mut/wt	dHsaMDV2010007	BioRad
<i>KRAS</i>	G12A	Mut/wt	dHsaMDV2510586	BioRad

Abreviaturas: Mut (mutación); WT (salvaje, *wild type*)

1.3. Fármacos

Los fármacos que se utilizaron para los ensayos *in vitro* e *in vivo* y su forma de uso se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Fármacos utilizados en los tratamientos *in vitro* e *in vivo*

Fármaco	Casa Comercial	Tipo de Terapia	Mecanismo	Concentración <i>in vitro</i>	Esquema terapéutico <i>in vivo</i>
Abemaciclib LY2835219	Lilly	Terapia dirigida	Inhibidor de CDK4/6	10µM	50mg/kg- 6días/semana- 28días
Carboplatino	Accord Healthcare	Quimioterapia	Antineoplásico alquilante ADN	[1000-0,05µM]	25mg/kg- 2días/semana- 28días
Cisplatino	Accord Healthcare	Quimioterapia	Antineoplásico alquilante ADN	[1000-0,05µM]	-
Docetaxel	Accord Healthcare	Quimioterapia	Antineoplásico antimicrotubular	[1000-0,05µM]	-
Erlotinib	Roche	Terapia dirigida	Inhibidor de EGFR	[300-0,01µM]	50mg/kg- 5días/semana- 28 días
Ipilimumab	Bristol Myers	Inmunoterapia	Anticuerpo anti-CTLA-4	-	10mg/kg- 2días/semana- 28 días
LY3214996	Lilly	Terapia dirigida	Inhibidor de ERK1/2	10µM	50mg/kg- 6días/semana- 28 días
Osimertinib	Astra-Zeneca	Terapia dirigida	Inhibidor de EGFR	[300-0,01µM]	20mg/kg- 5días/semana- 28 días
Pembrolizumab	Merck Sharp	Inmunoterapia	Anticuerpo anti-PD-1	25mg/ml	1 ^a : 10mg/kg Resto:5mg/kg- 2días/semana- 28 días
Paclitaxel	Accord Healthcare	Quimioterapia	Antineoplásico Antimicrotubular	[1000-0,05µM]	-
InVivoMAb anti-mouse PD-1	Bio-X-Cell	Inmunoterapia	Anticuerpo anti-PD-1	-	200ug/ratón

Abreviaturas: ADN (ácido desoxirribonucleico); CDK4/6 (ciclina dependiente de quinasa 4/6); CTLA-4 (antígeno-4 asociado al linfocito T); PD-1 (receptor de muerte programada)

2. Modelos animales y técnicas de experimentación animal

Todos los experimentos descritos en esta tesis han sido aprobados por los comités éticos del Instituto de Investigación Biomédica de Sevilla (IBIS), Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), el Instituto Carlos III y la Comunidad de Madrid (ref: SSA/SI/MD/pdm, PROEX 084/15, PROEX 313/19) de acuerdo con las directrices establecidas según los principios internacionales para la investigación biomédica con animales y cuidado animal. Los ratones fueron alojados en condiciones libres de patógenos en el animalario del CNIO (AAALAC, JRS:dpR 001659).

2.1. Generación de una colección de modelos PDX de cáncer de pulmón

2.1.1. Descripción de la cohorte de pacientes

Se utilizó una cohorte de 124 pacientes diagnosticados de CPNM de estadio temprano y candidatos a cirugía curativa entre 2013-2019 en el Hospital Virgen del Rocío (HUVR, Sevilla) y el Hospital Universitario 12 de Octubre (H12O, Madrid). El proyecto de investigación fue aprobado por el comité ético de los dos hospitales (ID de aprobación:2012PI/241 (HUVR) y CEIm 20/090 (H12O)). Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito, previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de los hospitales. De esta cohorte se extrajeron muestras de tejido fresco, con las que se establecieron los PDX, y muestras embebidas en parafina, para su caracterización.

Las características clínico-patológicas se obtuvieron de la historia del paciente y fueron registradas en una base de datos que incluía los siguientes parámetros: edad, sexo, estado general, estadio TNM (Tumor, nódulo, metástasis), tratamiento recibido, tabaquismo, EPOC, supervivencia global y supervivencia libre de progresión. Estos datos se utilizaron en nuestros análisis posteriores.

Tabla 4. Resumen de las características clínicas de los pacientes de los que se han establecido los modelos PDX

		Colección PDX
Muestras (n)		45
Histología	Adenocarcinoma	15
	Carcinoma epidermoide	27
	Carcinoma de célula grande	3
Estadio	I	12
	II	18
	III	13
	IV	2
Género	Hombre	40
	Mujer	5
Edad		67 [44-81]
Hábito tabáquico	No fumador	0
	Ex-fumador	6
	Fumador	39

2.1.2. Establecimiento de los modelos PDX

Se recogieron muestras de pacientes con CPNM sometidos a una intervención quirúrgica en el HUVR o en el H12O. Los PDX se establecieron implantando pequeños fragmentos de estos tumores (<3mm³) embebidos en matrigel (#354234, Corning) por vía subcutánea en ambos flancos de ratones hembra atímicos (Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}, nude,#069, Envigo), de 5-6 semanas de edad. Dependiendo del tamaño de la muestra del tumor recibida, se implantaron de 1 a 3 ratones por paciente, utilizando anestesia por inhalación de isoflurano y analgesia con buprenorfina. Cuando el tumor creció en el ratón receptor y superó un volumen de 800-1000mm³, se extrajo y troceó en pequeños fragmentos para reimplantarlos por vía subcutánea en otros tres ratones. Este primer tumor creciendo en el primer ratón implantado se consideró pase 0 (P0), mientras que las generaciones posteriores se numeraron consecutivamente por el número de reimplantes (P1, P2 y así sucesivamente). Los modelos PDX se consideraron establecidos cuando los tumores crecieron como mínimo hasta el pase 2 (P2). En todos los pases, se conservaron los fragmentos tumorales congelados, tanto en condiciones que permitieron la posterior descongelación y re-implante, como para extraer ácido ribonucleico (ARN), ADN y proteína. Además, se conservaron muestras parafinadas para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico. El material almacenado en cada pase se utilizó posteriormente para caracterizar los modelos histológica y molecularmente (Figura 7).

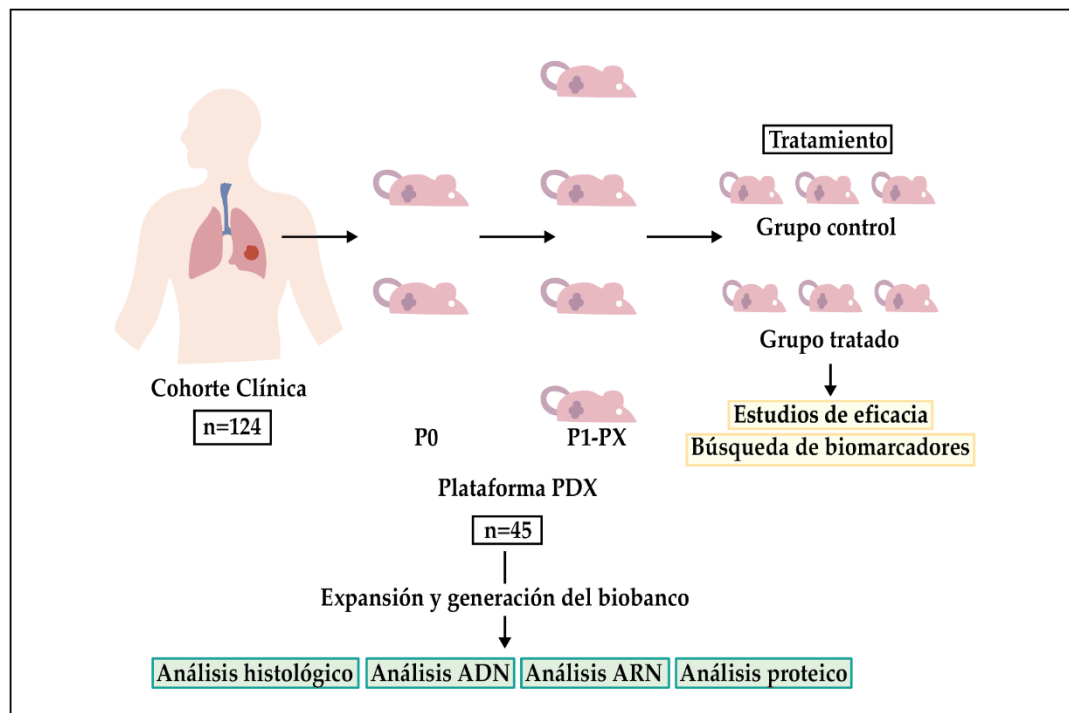


Figura 7. Esquema de establecimiento y caracterización de la colección de PDX. Los modelos PDX se establecieron implantando fragmentos de tumor en ratones *nude* (P0). Cuando el tumor creció hasta un volumen superior a 800mm³, se trocó y se implantó en otros ratones (P1) y así sucesivamente (Px) para mantener la colección o para realizar tratamientos. Se recogieron y conservaron muestras del paciente y de los tumores PDX de las sucesivas generaciones para caracterizar los modelos establecidos. ADN (ácido desoxirribonucleico); ARN (ácido ribonucleico).

2.1.3. Caracterización de los modelos PDX

Los modelos PDX se caracterizaron morfológicamente utilizando tinciones de hematoxilina & eosina (H&E) (ver apartado 4.4.). Se realizó un estudio molecular a nivel proteico utilizando tinciones de IHQ (ver apartado 4.4) y WB (ver apartado 4.3), y a nivel genómico por secuenciación del exoma completo (*whole exome sequencing* (WES)) (ver apartado 4.7.) y ddPCR (ver apartado 4.8.). Con las muestras de ARN se analizó el transcriptoma completo (*whole transcriptome sequencing* (WTS)) (ver apartado 4.10).

2.1.4. Utilización de los modelos PDX como modelos preclínicos para testar estrategias terapéuticas

Para realizar los tratamientos de eficacia de los diferentes fármacos en PDX, los modelos se amplificaron previamente en 4-5 ratones (implantando muestra fresca o congelada). Cuando los tumores implantados alcanzaron un volumen de 1000mm³, fueron extraídos y troceados para ser re-implantados por vía subcutánea en ambos flancos de ratones hembra atímicos de 6 semanas de edad. Los tumores se midieron dos veces por

semana después de la implantación. Cuando los volúmenes de los tumores alcanzaron los 200 mm³, los ratones se distribuyeron entre el grupo control (tratado con el mismo vehículo usado para los fármacos) y los grupos de tratamiento, con 5-6 ratones por grupo, siendo el tamaño de los tumores de los dos grupos de similar media y desviación estándar. Los ratones se pesaron una vez por semana para controlar la toxicidad del tratamiento, y se sacrificaron al final de este. En ese momento se recogieron y almacenaron muestras de los tumores y de otros tejidos como hígado, bazo, pulmón, timo y ganglios linfáticos que fueron fijados con formalina y embebidos en parafina (bloques realizados por la unidad de histopatología del IBIS y CNIO). Otros fragmentos de los tumores fueron congelados para su posterior extracción de ADN, ARN y proteína. Además, se recogió 1 ml de sangre directamente del corazón de los ratones tratados, para aislar el plasma o para su análisis por citometría de flujo.

En concreto, se administraron los siguientes fármacos (tabla 3):

- **Abemaciclib** se administró 6 veces por semana (de lunes a sábado), a una dosis de 50 mg de abemaciclib/kg/día en un esquema de tratamiento de 28 días de duración, a menos que el experimento tuviera que interrumpirse anteriormente debido a un crecimiento tumoral excesivo. Se administró por vía oral. El vehículo utilizado fue hidroxietilcelulosa al 1%.
- **LY3214996** se administró 6 veces por semana (de lunes a sábado), a una dosis de 50 mg de LY3214996/kg/día en un esquema de tratamiento de 28 días de duración, a menos que el experimento tuviera que interrumpirse anteriormente debido a un crecimiento tumoral excesivo. Se administró por vía oral. El vehículo utilizado fue hidroxietilcelulosa al 1%.
- El **carboplatino** se administró por vía intraperitoneal, 2 veces por semana, a una dosis de 25 mg de carboplatino/kg/día. El vehículo utilizado fue hidroxipropilmetilcelulosa al 0,1%.
- **Erlotinib** se administró 5 veces por semanas (de lunes a viernes), a una dosis de 50 mg de erlotinib/kg/día en un esquema de tratamiento de 28 días de duración. Se administró por vía oral. El vehículo utilizado fue hidroxipropilmetilcelulosa al 0,1%.
- **Osimertinib** se administró 5 veces por semanas (de lunes a viernes), a una dosis de 20 mg de erlotinib/kg/día en un esquema de tratamiento de 28 días de duración. Se administró por vía oral. El vehículo utilizado fue hidroxipropilmetilcelulosa al 0,1%.
- **Ipilimumab** se administró por vía intraperitoneal 2 veces por semana, a una dosis de 10mg de ipilimumab/kg/día. El vehículo utilizado fue solución salina.
- **Pembrolizumab** se administró por vía intraperitoneal 2 veces por semana, la primera dosis administrada a una concentración de 10mg de pembrolizumab /kg/día, siendo el resto de las dosis a 5mg de pembrolizumab/kg/día. El vehículo utilizado fue solución salina.

- **InVivoMAb anti-mouse PD-1** se administró por vía intraperitoneal 2 veces por semana, a una dosis de 200ug/ratón. El vehículo utilizado fue solución salina.

2.2. Generación de una colección de modelos PDX humanizados de cáncer de pulmón

Para la generación de los modelos animales humanizados se utilizaron nuestros modelos PDX creciendo en ratones atímicos (*nude*), de los que se extrajeron los tumores y se re-implantaron en ratones inmunodeprimidos de la cepa *NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG)* (#005557, Charles River Laboratories). Los ratones fueron humanizados a posteriori cuando utilizamos PBMCs aisladas de sangres de pacientes sanos, o bien el implante se hizo en ratones previamente humanizados cuando utilizamos células CD34+ aisladas de sangre de cordón umbilical (SCU).

2.2.1. Modelos PDX humanizados con PBMCs aisladas de pacientes sanos

En este modelo de humanización, se implantaron fragmentos de los tumores PDX en ratones NSG de 5-6 semanas de edad. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 200mm³, se inyectaron 10 millones de PBMCs previamente aisladas de capas leucocitarias obtenidas de donantes sanos del Centro de transfusiones de la Comunidad de Madrid. Para el aislamiento de las PBMCs, la sangre se diluyó en solución tampón fosfato salino (PBS) en un ratio 2:1 (sangre:PBS) y se transfirió a un falcon de 50ml con 15ml de Ficoll-Plus-Paque (#70-1440-02, GE Healthcare). Tras una centrifugación a 400g durante 30 minutos sin frenado, la interfase se recogió en un tubo limpio y las células se lavaron para eliminar todos los posibles restos de Ficoll. Los eritrocitos se lisaron con la solución de lisis de eritrocitos (#00-4333-57, Invitrogen) previamente atemperada, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 400g durante 5 minutos y se lavaron con PBS para posteriormente ser contadas.

A las 24 horas de la inyección de las PBMCs, los ratones se distribuyeron entre el grupo control y los grupos de tratamiento, con 5-6 ratones por grupo, siendo el tamaño de los tumores de los dos grupos de similar media y desviación estándar. Al igual que con los PDX en ratones *nude*, los ratones se pesaron una vez por semana y se sacrificaron al final del tratamiento, tras lo cual se extrajeron y almacenaron muestras de los tumores y otros tejidos.

2.2.2. Modelos PDX humanizados con CD34+ aisladas de sangre de cordón umbilical (SCU)

El método de humanización por CD34+ consta de 3 fases principales (Figura 8):

Aislamiento de células CD34+ procedentes de sangres de cordones umbilicales

Se aislaron CMH de muestras de SCU obtenidas de donaciones al Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. La sangre se diluyó 1:1 en PBS, se transfirió a un falcon de 50ml con 10ml de Ficoll y se centrifugó a 300g durante 30 minutos sin frenado. La interfase se recogió con pipetas pasteur y se realizó un lavado con PBS. Los eritrocitos se lisaron incubando 10 minutos con 4ml de solución de lisis de eritrocitos previamente atemperada a 37°C. Tras la incubación y un lavado con PBS, se contaron las células. Se añadieron 300µl de solución autoMacs (PBS, 0,5% de albumina de suero bovino (BSA) y 2mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), 100µl de reactivo de bloqueo (FcR blocking) y 100µl de bolas magnéticas anti-CD34 (anti-CD34 beads) por cada $1 \cdot 10^8$ células (#130-046-702, Miltenyi). Las células se incubaron con la combinación durante 30 minutos a 4°C y se separaron usando el equipo AutoMacs (Miltenyi). Previamente a la incubación se recogió una alícuota de la muestra (pre-enriquecimiento) para cuantificar por citometría de flujo el porcentaje de células CD34+ que contenía nuestra muestra y comprobar si la separación había sido correcta. Al tratarse de una selección positiva y una fracción que se encuentra en un porcentaje muy bajo en la muestra, el programa elegido en el AutoMacs fue possel_S. Se recogió una alícuota de la fracción negativa y una alícuota de 20.000 células de la fracción positiva (fracción que contiene las células CD34+) para comprobar por citometría de flujo la pureza de la muestra conseguida. El resto de la fracción positiva se congeló en un vial con 500µl de medio de congelación (CryoStor CS10, #07959, StemCell technologies) en *Mr.Frosty* a -80°C durante 24h y en N₂ hasta su uso.

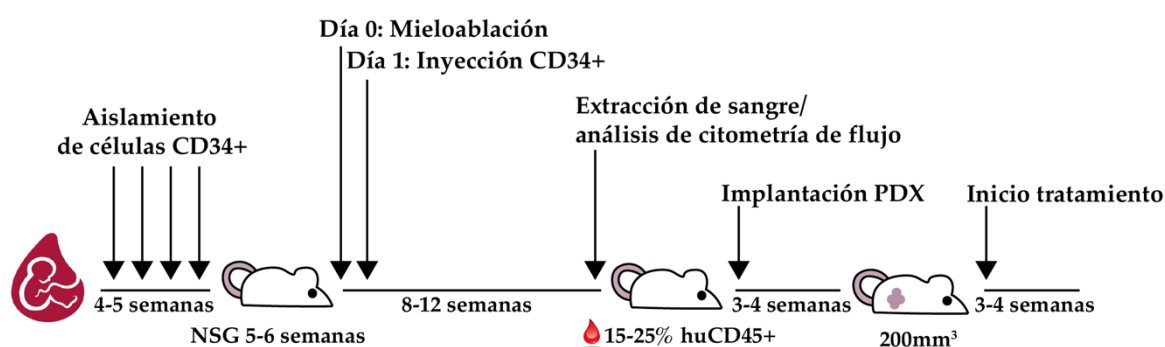


Figura 8. Esquema del proceso de humanización con células CD34+. Las células CD34+ se aislaron de muestras de sangre de cordón umbilical (SCU). Los ratones NSG hembra de 5-6 semanas de edad se sometieron a mieloablación 24 horas antes de la inyección de las células CD34+. Tras 3 meses, se extrajeron 50µl de sangre por vena facial y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células huCD45+ en sangre. A los ratones humanizados (>15% de huCD45+) se les implantó un fragmento de tumor PDX y cuando los tumores alcanzaron un volumen de 200mm³ se inició el tratamiento.

Determinación de la de pureza de enriquecimiento en CD34 + por citometría de flujo

Las alícuotas pre-enriquecimiento, fracción negativa y fracción positiva recogidas durante el aislamiento de las células CD34+ se lavaron con PBS y se bloquearon con solución de bloqueo (FcR blocking Reagent, #130-059-901, Miltenyi) durante 20 minutos, se lavaron con PBS centrifugando a 1.200 revoluciones por minuto (rpm) 5 minutos, y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con el marcador de viabilidad *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (#L34965, Invitrogen) a una dilución 1:1.000 en PBS. A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 100µl de anticuerpo huCD34-AF488 a una dilución 1:300, 30 minutos en hielo y en oscuridad. Las células se lavaron de nuevo y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3% y se conservaron a 4°C hasta ser analizadas en el citómetro.

En todos los experimentos se utilizó una muestra control sin anticuerpo primario y un control de fluorescencia menos uno (FMO). Todas las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences) y se adquirieron al menos 10.000 eventos. Los análisis se realizaron con el software de análisis de citómetros de flujo FlowJo versión 10.2.

Humanización de ratones NSG: Inyección y evaluación del porcentaje de humanización

Los ratones NSG hembra de 5-6 semanas de edad se sometieron a mieloablación 24 horas antes de la inyección de las células CD34+. Para ello se administró 15mg/kg de busulfan intraperitonealmente.

Los viales de células CD34+ aisladas se descongelaron a 37°C y, sin mezclar viales de diferentes cordones, se transfirieron a tubos de 15ml con medio de descongelación (PBS + 2% suero fetal bovino (FBS) + 10U/ml ADNasaI). Las células se centrifugaron a 400g durante 10 minutos, se resuspendieron en el mismo medio y se contaron. Se recogieron 20.000 células de cada muestra de cordón para re-evaluar la viabilidad y pureza de las muestras por citometría. La tinción de las células se realizó según el protocolo descrito en el apartado 2.2.1.

Se calculó el número de células necesario para preparar diluciones de 100.000 células CD34+ por cada 100µl de PBS considerando el número total de células, la viabilidad y el porcentaje de pureza de CD34+ obtenido en el análisis de citometría de flujo tras la descongelación. Se inyectaron 100µl por ratón vía vena de cola usando agujas de 27G.

Trascurridas 8-12 semanas, se extrajo una muestra de sangre de cada ratón. La sangre extraída de los ratones humanizados (50µl) por vena facial y recogida en tubos EDTA, se transfirió a tubos de 15ml para lisar los eritrocitos con 2ml de la solución de lisis de eritrocitos, previamente atemperada. Las muestras se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió con PBS y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células se bloquearon durante 20 minutos con solución de bloqueo, se lavaron e incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con el marcador de viabilidad *LIVE/DEAD Fixable Aqua*

Dead Cell Stain Kit. Después, las células se tiñeron con los anticuerpos primarios conjugados con el fluoróforo en solución FACs (0,1%BSA en PBS) durante 30 minutos a 4°C: huCD45-PE, mCD45-AF488, CD3-PerPCy5.5, CD4-Brilliant Violet 421, CD8-PE/Cy7 usados a una dilución 1:300 (Tabla 1). Las células se lavaron de nuevo y se fijaron con PFA al 3% y se conservaron a 4°C hasta ser analizadas en el citómetro.

Todas las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences) y los análisis se realizaron con el software de análisis de citómetros de flujo FlowJo versión 10.2.

2.2.3. Modelos PDX humanizados como modelos preclínicos para testar estrategias de inmunoterapia

Los ratones NSG humanizados (con un porcentaje de humanización confirmado mayor del 15-25% de células huCD45+) y ratones NSG no humanizados (tras la inyección no exitosa de células CD34+ que se utilizaron como control del tratamiento) recibieron implantes de fragmentos de tumores de PDX, que igual que para los tratamientos con PDX en ratones inmunodeprimidos, fueron previamente amplificados en ratones *nude*. En el caso de no obtener un número suficiente de ratones no humanizados, se utilizaron ratones NSG que no habían seguido el protocolo de humanización para incluirlos en el grupo de tratamiento no humanizados. El protocolo de implantación, determinación del crecimiento de los tumores y el tratamiento se realizó de modo similar al descrito por los PDX en ratones inmunodeprimidos (apartado 2.1.4).

2.3. GEMMs de cáncer de pulmón

2.3.1. Modelo de adenocarcinoma de pulmón: *Kras knockin-p53 knockout*

El modelo animal *knock-out p53^{LoxP}* (The Jackson Laboratory) se cruzó con los modelos inducibles *knock-in* para *Kras^{LSLG12V}* (Guerra et al., 2003) para obtener el genotipo usado en nuestros ensayos *Kras^{LSLG12Vge/+;p53^{loxP/loxP}}*. Estos ratones fueron cedidos por el Dr. Mariano Barbacid.

El modelo *Kras^{LSLG12V}* y el modelo *p53^{loxP}* contienen un cassette lox-STOP-lox (LSL) que previene la expresión del alelo mutante. La coenzima recombinasa Cre, expresada en los pulmones tras la infección con adenovirus por vía intranasal, realiza cortes en los fragmentos loxP que flanquean el elemento STOP del gen *Kras* y el gen *Tp53*. El elemento STOP se elimina y de este modo se induce la expresión de la mutación de *Kras* y el silenciamiento de *Tp53*, induciendo el desarrollo de adenocarcinomas en el pulmón (Figura 9).

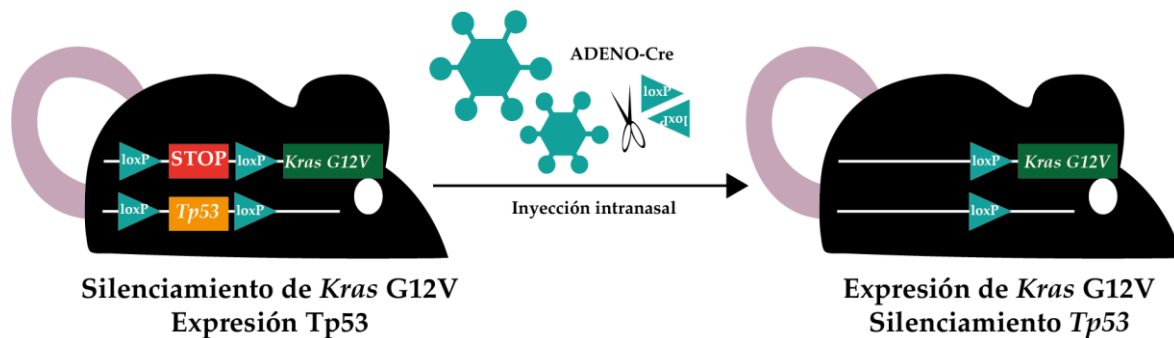


Figura 9: Esquema del proceso infección de adenovirus e inducción de adenocarcinomas de pulmón. La infección con adenovirus por vía intranasal, realiza cortes en los fragmentos loxP que flanquean el elemento STOP del gen *Kras* y del gen *Tp53* del modelo $Kras^{LSLG12V_{geo}/+};p53^{loxP/loxP}$. Así se produce la expresión de *Kras* G12V y el silenciamiento de *Tp53*, promoviendo el desarrollo de adenocarcinomas en el pulmón.

Para la inducción de adenocarcinomas de pulmón se utilizaron ratones del modelo $Kras^{LSLG12V_{geo}/+};p53^{loxP/loxP}$ de 8 semanas de edad. Los ratones se inocularon intranasalmente con 1×10^6 partículas de adenocore (ad5CMVcre, VVC-U of Iowa-5, Universidad de Iowa) por ratón, en un volumen de 60 μ l de virus diluidos en PBS. Los animales fueron previamente anestesiados con una solución 1:1 de ketamina y xilacina.

A los 6-9 meses de la infección se realizaron pruebas de imagen por micro-CT (tomografía computarizada) con el equipo CompaCT scanner (SEDECAL Madrid SapinGE) para confirmar la existencia de tumores antes de iniciar los tratamientos. Los estudios de imagen se realizaron por el personal de la Unidad de Imagen Molecular del CNIO. El volumen de los tumores se calculó a partir de las medidas de los tumores obtenidas por el software GE MicroView software v2.2. siguiendo la siguiente fórmula: ancho x ancho x largo /2.

2.3.2. Utilización del modelo inmunocompetente *Kras knockin-p53 knockout* como modelo preclínico para testar estrategias de inmunoterapia

Los ratones que presentaron tumores en el micro-CT comenzaron el tratamiento al día siguiente, considerando la medida del micro-CT como medida cero. Los ratones se distribuyeron en 4 grupos de 6 ratones por grupo, y se verificó que el tamaño de los tumores de los grupos tenía similar media y desviación estándar. El grupo control fue tratado con el vehículo. Los grupos tratados fueron, uno con el inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib), por vía oral, a una concentración de 50mg/kg/día, 6 días por la semana; otro con *In vivo*MAB anti-mouse *PD1* intraperitonealmente, a una concentración de 200ug/ratón, 2 dosis por semana; y el último, con la combinación de ambos fármacos con la misma pauta que en monoterapia. Los ratones se pesaron una vez por semana para medir la posible toxicidad de los fármacos. Tras 21 días de tratamiento, se realizó un micro-CT para obtener el volumen final de los tumores y se sacrificaron los ratones. En la necropsia, se recogió muestra de sangre para analizar el hemograma, muestras de diferentes tejidos (hígado,

pulmón y ganglios linfáticos) para analizar una posible toxicidad de los fármacos, y muestras de los tumores de pulmón. Cuando el tumor tuvo un tamaño adecuado, se troceó para su conservación a -80°C . Las muestras de los tejidos fueron fijados en formalina e incluidos en bloques de parafina para análisis posteriores.

Las muestras parafinadas obtenidas fueron analizadas para estudiar la expresión proteica mediante tinciones de IHQ. Por otra parte, el tamaño de los tumores se representó relativizando cada medida del volumen tumoral final con respecto a la inicial, y se representó la media y el error medio para cada grupo de animales. También se calculó el incremento en el número de tumores en los diferentes ratones y se representó el número inicial y el número final de tumores en cada condición.

3. Modelos celulares y ensayos *in vitro* utilizando cultivos 3D: PDXDO

3.1. Establecimiento de PDXDO

Los tumores PDX fueron extraídos de los ratones cuando alcanzaron un volumen mayor de 800mm^3 . El tumor se troceó con el bisturí en trozos de aproximadamente 3mm^3 y fueron digeridos enzimáticamente con colagenasa (1,2 mg/ml, #C9891, Sigma) en medio Básico (Advanced DMEM/F12 (#12634010, Gibco), 1x HEPES (#15630106, Gibco), 1x Glutamina (#G8541, Sigma) a 37°C durante 60 minutos. Tras la incubación, los trozos de tumor digeridos se filtraron utilizando filtros de $70\mu\text{m}$, y se centrifugaron las células disgregadas a 1.500 rpm durante 5min. Tras dos lavados con medio Básico, se contaron las células y se resuspendieron en Matrigel (libre de rojo fenol y con factores de crecimiento reducidos, #12634010, Gibco). Las cúpulas de matrigel se sembraron en las placas correspondientes según el experimento a realizar. A continuación, se detalla la cantidad de matrigel utilizado para cada placa, el número de células sembradas y el ensayo que se realizó con cada una de ellas (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de cultivos en función del ensayo a realizar

Placa de cultivo	Volumen de Matrigel	Nº de células/pocillo	Ensayos realizados
P12	150 μl	60.000	WB
P24	50 μl	20.000	IHQ
P96	36 μl	10.000	IC ₅₀
P384	9 μl	5.000	IC ₅₀ screening
Cámaras-8-pocillos	40 μl	40.000	IF/confocal

Abreviaturas: WB (western blot); IHQ (inmunohistoquímica); IC₅₀ (Concentración de inhibición del 50% del crecimiento); IF (inmunofluorescencia)

Las cúpulas se dejaron solidificar a 37°C y 5% de CO₂ en el incubador durante 10 minutos y se añadió medio completo (Medio Básico suplementado con 2% FBS, 3ng/ml

factor de crecimiento epidermoide (EGF) (#PMG8041, Life Technologies), 5µg/ml insulina humana (#I3536, Sigma), 1µg/ml hidrocortisona (#H0888, Sigma), 1x B27 (#17504-044, Life technologies)) hasta cubrir las cúpulas. El medio se renovó cada 4 días.

Para realizar los pases de los PDXDO, se retiró el medio y se disgregó el matrigel usando 1ml de solución "Cell Recovery" (#354253, Corning) por pocillo en frío. Se levantaron las cúpulas de matrigel por pipeteo, se recogieron en un tubo y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Tras la incubación, se realizaron 2 lavados con PBS, centrifugando los organoides a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, los PDXDO se disgregaron añadiendo 500µl de "TrypLE" (#12605010, Thermofisher) e incubando 5 minutos a 37°C. Una vez disgregados, las células se lavaron con medio Básico a 1.200 rpm durante 5 minutos y se sembraron en matrigel siguiendo el protocolo anteriormente descrito en este mismo apartado. El pase de los PDXDO se realizó para analizar su histología en el pase 2.

3.2. Caracterización de los PDXDO

Los PDXDO fueron caracterizados morfológicamente tras tinción con H&E, y la expresión de proteínas de interés fue caracterizada por tinción de IHQ (ver apartado 4.4.) comparada con las del PDX del que derivaban. Asimismo, los PDXDO se caracterizaron molecularmente a nivel genómico analizando la presencia y conservación de la frecuencia alélica de la mutación característica de cada modelo por ddPCR (ver apartado 4.8).

3.3. Utilización de los modelos PDXDO como modelo *in vitro* para testar diferentes estrategias terapéuticas

Una vez formados los organoides, fueron tratados con los fármacos en monoterapia o en combinación, usando el vehículo como control. La respuesta a los fármacos testados se analizó mediante diferentes estudios descritos a continuación.

3.3.1. Cálculo de la IC₅₀ para determinar la sensibilidad a diferentes fármacos

Para determinar la sensibilidad a diferentes fármacos se empleó un ensayo de citotoxicidad, que nos permitió el cálculo de IC₅₀, concentración de fármaco a la que se inhibe el 50% del crecimiento celular. Las células se sembraron en gotas de 9µl de matrigel por pocillo en placas de 384 pocillos (#153764, Corning), 2 filas de 12 columnas para cada fármaco a testar. Se añadieron concentraciones de fármaco decrecientes en las primeras 10 columnas, la columna 11 se trató con el vehículo, y la columna 12 se dejó sin tratar (columnas control). En el caso de la determinación de la sensibilidad de fármacos en combinación, las 10 primeras columnas se trataron con concentraciones decrecientes de ambos fármacos. Tras 72h de incubación a 37°C y 5% CO₂, se eliminó el medio de las placas

y se añadió 100µl de Cell Titer Glo (#G7571, Promega) preparado según indicaciones del fabricante. Las placas se incubaron en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos para posteriormente realizar la lectura de luminiscencia con el espectrofotómetro Victor Multilabel Plate Reader (PerkinElmer). Los datos se analizaron con el software bioestadístico GraphPad Prism para calcular la IC₅₀. Para determinar el efecto de la combinación de dos fármacos, se utilizó la fórmula del método de Chou-Talalay (Chou, 2010). Esta fórmula calcula el índice de combinación (CI), comparando la sensibilidad a los dos fármacos en combinación con respecto a la sensibilidad de los fármacos por separado, e informa sobre si la combinación de dos fármacos tiene un efecto antagónico (CI>1), aditivo (CI=1), o sinérgico (CI<1). La fórmula empleada para su cálculo es la siguiente:

$$CI = (IC_{50} \text{ Fármaco 1 en combinación} / IC_{50} \text{ Fármaco 1 en monoterapia}) + (IC_{50} \text{ Fármaco 2 en combinación} / IC_{50} \text{ Fármaco 2 en monoterapia})$$

3.3.2. Estudios de eficacia por microscopía confocal

Se sembraron 40.000 células/pocillo en cámaras de 8 pocillos. Una vez formados, se trataron los PDXDO con el inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib) 10µM, o con el inhibidor de ERK1/2 (LY3214996) 10µM o con la combinación de ambos fármacos durante 48 horas, más 10µM de la solución con 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) para cuantificar la viabilidad de las células. Tras las 48 horas de tratamiento, se realizaron dos lavados con PBS de los pocillos. Los pocillos de la cámara de 8 pocillos se fijaron durante 30 minutos con PFA al 4%, y se dejaron en PBS a 4°C hasta realizar la tinción de inmunofluorescencia para analizar por microscopía confocal (ver apartado 4.1).

3.3.3. Caracterización molecular mediante secuenciación (WES, WTS) y Western Blot (WB)

Para realizar los estudios moleculares, se trataron los PDXDO con el inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib, 10µM), o con el inhibidor de ERK1/2 (LY3214996 10µM) o con la combinación de ambos fármacos durante 48 horas. Tras esas 48 horas, se retiró el medio y se disgregó el matrigel usando 1ml de solución "Cell Recovery" (#354253, Corning) por pocillo en frío. Se levantaron las cúpulas de matrigel por pipeteo, se recogieron en un tubo y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Tras la incubación, se realizaron 2 lavados con PBS, centrifugando las células a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El pellet de organoides se utilizó para la extracción de proteína (ver apartado 4.2.), ADN (ver apartado 4.6.) o ARN (ver apartado 4.9) para posteriormente realizar la caracterización molecular mediante secuenciación (WES, WTS) y WB (ver apartados 4.7, 4.10 y 4.3 respectivamente).

3.4. Establecimiento de PDXDO en co-cultivos con células inmunes como modelo *in vitro* para testar estrategias de inmunoterapia

3.4.1. Aislamiento y activación de linfocitos T

Las PBMCs de la sangre se aislaron de capas leucocitarias obtenidas de donantes sanos del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. La sangre se diluyó en PBS en una ratio 2:1 (sangre: PBS) y se realizó un paso previo de enriquecimiento en células T. Para el enriquecimiento en células T, la sangre diluida se incubó con 1ml del cocktail de enriquecimiento de células T RosetteSep (#15021, stemcell) durante 30 minutos y se transfirió a un falcon de 50ml con 15ml de Ficoll-Plus-Paque (#70-1440-02, GE Healthcare). Tras una centrifugación a 400g durante 30 minutos sin frenado, la interfase se recogió en un tubo limpio y las células se lavaron para eliminar todos los posibles restos de Ficoll. Los eritrocitos se lisaron con la solución de lisis de eritrocitos (#00-4333-57, Invitrogen) previamente atemperada, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 400g durante 5 minutos y se lavaron con PBS para posteriormente ser contadas.

Los linfocitos T aislados se activaron con una combinación de 25 μ l/ml CD3/CD28/CD2 (25 μ l/ml de medio, #10970, stemcell) e 1 μ g/ml IL-2 (#78036, Stemcell) durante 72h de incubación a 37°C y 5%CO₂. Tras este periodo, se recogió una alícuota del pocillo control (sin activar) y del pocillo activado para confirmar la activación por citometría de flujo. En este caso el panel que se utilizó para la caracterización de los linfocitos aislados fue: CD3, CD4, CD8, CD25 y CD69. El protocolo de citometría de flujo utilizado fue el previamente descrito (ver apartado 2.2.2.).

3.4.2. Co-cultivos de células T activadas y PDXDO

Una vez formados los PDXDO en cámaras de 8 pocillos y las células T activadas, se calculó el número de células CD8+ considerando el número total de células, la viabilidad y el porcentaje de CD8+ en la muestra. Se añadieron las células T al medio de los PDXDO en proporción 1:1 (célula T: célula tumoral) y se incubaron 72 horas junto a los fármacos (el inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib, 10 μ M) o anti-PD-1 (pembrolizumab, 25mg/ml) o la combinación de ambos fármacos), llevando controles sin células inmunes. Tras las 72 horas de tratamiento, se realizaron dos lavados con PBS de los pocillos. Los pocillos se fijaron durante 30 minutos con PFA al 4%, y se dejaron en PBS hasta realizar la tinción de inmunofluorescencia para analizar por microscopía confocal (ver apartado 4.1).

4. Técnicas de biología molecular

4.1. Tinción de inmunofluorescencia

Los PDXDO tratados en las cámaras de 8 pocillos con los fármacos e incubados con EdU se fijaron durante 30 minutos con PFA al 4%. Tras la incubación, los pocillos se lavaron 2 veces con PBS al 3% de BSA y los PDXDO se permeabilizaron con una solución de PBS al 0,5% de Tritón X-100 incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados y se incubaron con 150µl del cocktail de reacción Click-iT (*Click-iT EdU Cell Proliferation Kit for Imaging*, #C10337, Invitrogen), preparado según indicaciones del fabricante, durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. En este ensayo, el EdU incorporado al ADN sintetizado se marcó con un fluoróforo AF488 en una reacción específica. Se eliminó el cocktail, se lavaron los pocillos de nuevo y se incubaron 1 hora con solución de bloqueo (PBS al 3% BSA y 0,2% Tritón X-100) para después incubarse con los anticuerpos primarios CK18 y Caspasa 3 a una dilución 1:400 (Tabla 1) o/n a 4°C, en el caso de los tratamientos con el inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib) y el inhibidor de ERK1/2 (LY3214996). En el caso de los co-cultivos se incubó con caspasa 3 y CD45 en las mismas condiciones. Tras dos lavados con PBS al 3% de BSA, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con AF555 y anti-ratón conjugado con AF647 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, #62248, Invitrogen) durante 5 minutos, a una dilución 1:10.000. Las cámaras se desmontaron, se lavaron con PBS y los cubres se montaron con medio de montaje Prolong (#39930, Invitrogen).

Las imágenes se obtuvieron usando el microscopio confocal (Leica TCS-SP5) y las cuantificaciones se realizaron con el software Image J por el personal de la Unidad de Microscopia Confocal del CNIO. Se cuantificaron las células EdU positivas frente al número total de células en una media de 4 imágenes por condición de cada uno de los experimentos (tomadas con objetivo 20x).

4.2. Extracción de proteínas

Para la extracción proteica de los tumores de los modelos PDX se utilizó el equipo TissueLyser (Qiagen). Los fragmentos tumorales fueron troceados y conservados en nitrógeno líquido hasta la lisis (apartado 1.1). Se añadió solución RIPA (#R0278, Sigma) complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini sin EDTA, #4693159001, Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (#4906837001, PhosSTOP EASYpack, Roche) al trozo de tumor, y se disgregó mecánicamente con el TissueLyser durante 5 minutos a 50 Hz. Las muestras se incubaron durante dos horas en frío agitando con vórtex cada 15 minutos. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar las membranas y otros restos celulares no digeridos.

Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo, conservando los sobrenadantes de todas las muestras a -80°C .

Para la obtención de extractos proteicos de los PDXDO, los pellets obtenidos en el apartado 3.3.3. se resuspendieron en $200\mu\text{l}$ de solución RIPA complementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasas, incubando las muestras 1 hora en hielo y agitando con vortex cada 15 minutos. Las muestras se centrifugaron y conservaron según lo descrito para las muestras proteicas extraídas de los tumores.

La cantidad de proteína total obtenida de las muestras se cuantificó con el método de Bradford (Bio-Rad), añadiendo $1\mu\text{l}$ del extracto proteico en $200\mu\text{l}$ del reactivo Bradford 1X (#5000205, Bio-Rad). La medición se realizó con una lectura de la absorbancia a 595nm con el espectrofotómetro Victor Multilabel Plate Reader (PerkinElmer). Se utilizó BSA para generar una curva estándar a partir de la cual extrapolamos la concentración de nuestras muestras.

4.3. Western Blot (WB)

Para realizar los WBs, se prepararon alícuotas de $50\mu\text{g}$ de los extractos proteicos de los tumores y $25\mu\text{g}$ de los extractos proteicos de los PDXDO. Se añadió solución de carga Laemmli 5X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, dodecilsulfato sódico (SDS) 1%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.0025% (Sigma-Aldrich)) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C .

Las muestras desnaturalizadas se cargaron en los geles de poliacrilamida-SDS junto con una muestra de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color, #1610374, Bio-Rad) como patrón de peso molecular de proteínas. El gel separador se preparó a una concentración de poliacrilamida de entre 7,5-15% de concentración a partir de acrilamida:bisacrilamida 37, 5:1 40% (#1610148, Bio-Rad), dependiendo del tamaño de las proteínas a detectar. El gel concentrador de las muestras se preparó a una concentración del 4% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó con el sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) a 100V utilizando como tampón de electroforesis 1X Tris HCl 0.13 M , glicina 0.95 M , SDS 0.5% (#1610772, Bio-Rad).

Las proteínas separadas en los geles por peso molecular se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivilideno (PVDF) (#10600021, GE Healthcare) previamente activada con metanol utilizando el equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). La transferencia se realizó a un amperaje constante de 200 mA durante 90 minutos en frío en tampón de transferencia TrisHCl 0.025 M , glicina 0.2 M (#1610771, Bio-Rad) al 20% de metanol (Merck Millipore).

Las membranas se bloquearon durante 1 hora en agitación con la solución de bloqueo (solución salina tamponada con Tris (TBS), 0.1% de Tween20 (#P7949, Sigma-Aldrich), 2% BSA) y se incubaron con la dilución correspondiente del anticuerpo primario en la solución

de bloqueo en agitación a 4°C durante 12 horas. Los anticuerpos y las diluciones utilizadas se detallan en la tabla 1.

Tras el periodo de incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TBS al 0.1% de Tween20, y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a una dilución 1:10.000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección, después de realizar los lavados de nuevo con TBS-Tween, se realizó con una reacción quimioluminiscente con el reactivo ECL (#170-5061, Bio-Rad) detectada por el equipo ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) usando diferentes tiempos de exposición dependiendo del anticuerpo.

Las bandas de proteína se cuantificaron con el software ImageLab 5.0 (Bio-Rad). Se determinó el volumen de las bandas de la proteína de interés y se normalizó con el volumen de la banda control de la misma membrana (β -actina).

4.4. Tinciones de Inmunohistoquímica

Los tumores de pacientes, los tumores y otros tejidos extraídos de los PDX y las cúpulas de matrigel con los PDXDO se fijaron en formalina neutra al 10% (formaldehído al 4% en solución), se incluyeron en parafina y se cortaron a 3 μ m en microtomo, se montaron en portaobjetos superfrost®plus y se secaron durante la noche. Las tinciones de los bloques de pacientes se realizaron en el H120, y las tinciones de los tejidos de ratón y los cultivos de PDXDO en la unidad de histopatología del CNIO.

Para los diferentes métodos de tinción, los portaobjetos se desparafinaron en xileno y se rehidrataron mediante una serie de etanol graduado hasta el agua. Se tiñeron secciones consecutivas con H&E, y se realizaron varias reacciones de inmunohistoquímica en una plataforma de inmunotinción automatizada (Autostainer Link AS48, Agilent; Discovery XT-ULTRA, Ventana-Roche; Bond Max, Leica), como se detalla en la tabla adjunta (Tabla 6). Se necesitaron sistemas de visualización (también detallados en el cuadro) conjugados con peroxidasa. En el caso de las tinciones de tejidos de modelos PDX y para evitar la tinción inespecífica del componente murino, se elimina el paso del post-primario en aquellos anticuerpos hechos en especies distintas del ratón. Para estos últimos, se ajusta la reacción modificando las condiciones de la recuperación antigénica. Para el revelado cromogénico se utilizó diaminobenzidina (DAB) y los núcleos se contratiñeron con hematoxilina de *Carazzi*.

Todos los portaobjetos fueron deshidratados, aclarados y montados con un medio de montaje permanente para su evaluación microscópica. En cada tinción se incluyeron secciones de control positivo que se sabía que eran positivas para el anticuerpo primario. Las imágenes se tomaron con un microscopio de campo claro (*Leica Biosystems*). Las cuantificaciones fueron realizadas por el patólogo (Dr. José Luis Solorzano).

Tabla 6. Condiciones específicas de cada anticuerpo para las tinciones de IHQ

Anticuerpo	Recuperación de antígenos/ Dilución	Sistema de visualización	Plataforma automática	PDX/Humano /Ratón
CD20	Solución pH alto RTU	Anti-ratón + polímero Novolink (no post-primario)	AS-Link 48	PDX
CD4	Solución pH alto	Anti-ratón + polímero Novolink polymer (no post-primario)	AS-Link 48	PDX
CD56	Solución pH alto RTU	Anti-ratón + polímero Novolink (no post-primario)	AS-Link 48	PDX
CD68	Solución pH alto RTU	Anti-ratón + OmniMap anti-conejo+ (no post-primario)	Discovery XT	PDX
CD8	Solución pH alto	Anti-ratón + Novolink polymer (no post-primario)	AS-Link 48	PDX
CD45 ALC	RiboCC RTU	Anti-ratón + OmniMap anti-conejo + ChromoMap DAB	Discovery XT	PDX
ki67	CC1 RTU	Anti-ratón + OmniMap anti-conejo + ChromoMap DAB	Discovery XT	PDX
ki67	Solución pH bajo RTU	EnVision FLEX+	AS-Link 48	Humano
P63	ER1 pH6 20' prediluido	Anti-ratón + Bond Polymer Refine Detection (post-primario 8')	Bond III Leica	PDX
P63	ER2 pH9 20' prediluido	Anti-ratón + Bond Polymer Refine Detection (post-primario 8')	Bond III Leica	Humano
PD-L1	Solución pH bajo 1/75	Novolink polymer (no post-primario)	AS-Link 48	PDX
PD-L1	Solución pH bajo 1/150	EnVision FLEX+Rabbit	AS-Link 48	Humano
SMA	Solución pH bajo 1/75	Novolink polymer (post-primario)	AS-Link 48	Ratón
SMA	Solución pH alto 1/4	Anti-ratón + Novolink polymer (no post-primario)	AS-Link 48	PDX
SMA	Solución pH alto RTU	EnVision FLEX	AS-Link 48	Humano
TTF-1	ER1 pH6 5'1/100	Anti-ratón + Bond Polymer Refine Detection (post-primario 8')	Bond III Leica	PDX
TTF-1	ER1 pH6 10'1/100	Anti-ratón + Bond Polymer Refine Detection (post-primario 8')	Bond III Leica	Humano

Abreviaturas: RTU (Ready To Use); ER (recuperación de epitopo); CC (líquido de recuperación)

4.5. Hibridación *In situ*

Los tumores de los PDX y los PDXDO se analizaron para cuantificar el componente humano mediante hibridación *in situ* con la sonda ALUII, un oligómero que corresponde a porciones de secuencias Alu específicas para humanos.

En cuanto a la hibridación *in situ* con la sonda ALUII, se utilizó una plataforma automática (Ventana Discovery ULTRA, Roche). Tras la desparafinación y rehidratación, se realizó primero la recuperación de antígenos con el tampón seleccionado (ULTRA CC2, 5424542001, Ventana, Roche) y Discovery Protease III (760-2020, Ventana, Roche). A continuación, los portaobjetos se incubaron con la sonda de control positivo AluII (Ventana, Roche 05272041001) marcada con dinitrofenol (DNP). Después de la sonda, fueron necesarios tres lavados y se incubaron con anti-DNP (780-4335., Ventana, Roche). Se utilizó el sistema de visualización (OmniMap anti-conejo, Ventana, Roche) conjugado con peroxidasa. Para el revelado cromogénico se usó DAB (ChromoMap DAB, Ventana, Roche) y se realizó una contra-tinción en los núcleos con hematoxilina de Carazzi.

Todos los portaobjetos fueron deshidratados, aclarados y montados con un medio de montaje permanente para su evaluación microscópica. En cada tinción se incluyeron secciones de control positivo previamente verificadas.

4.6. Extracción de ADN

La extracción de ADN de los PDXDO y de las muestras tumorales de los PDX se realizó con el protocolo del kit de QIAGEN (#51306). Las muestras tumorales se disgregaron con el equipo TissueLyser durante 5 minutos a 50Hz en solución de lisis del kit de QIAGEN junto con la proteinasa K y se incubaron a 56°C en agitación 24 horas. Los PDXDO se incubaron con la solución de lisis 10 minutos a 56°C sin la disgregación mecánica por tissulyser. Este kit purifica el ADN por columnas a través de intercambio aniónico, sin el uso de fenol ni cloroformo, que permiten la unión del ADN mientras proteínas y otros metabolitos pasan a través de la columna sin adherirse. Tras varios lavados, el ADN se eluyó usando el tampón correspondiente.

Para la extracción de ADN del plasma sanguíneo, las sangres se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos. El plasma sobrenadante se recogió en un nuevo tubo y se centrifugó a 5.000 rpm durante 20 minutos. A continuación, se procedió a la extracción del ADN circulante (ADNcf) con el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (#55114, Qiagen).

La concentración de ADN extraído se determinó en el equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Las muestras utilizadas para la secuenciación del exoma o para el análisis por ddPCR fueron cuantificadas por el Fluorometro Qubit 4 (Invitrogen) con el Kit Qubit™ dsDNA HS Assay (#Q32854, Invitrogen).

4.7. Secuenciación completa del exoma (WES)

Las muestras de ADN extraídas como se indica en el apartado 4.6. de los PDX y PDXDO fueron secuenciadas (WES) usando el protocolo SureSelect XT Human All Exon V6 (Agilent). Se analizó la calidad de las muestras con el equipo Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific), siendo necesario 1 µg de ADN. El ADN se fragmentó en fragmentos de entre 150-200 pb con el equipo Covaris. De nuevo, se analizó la pureza del ADN fragmentado con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent) para pasar posteriormente por la reparación de los extremos de los fragmentos. El ADN se recogió usando bolas magnéticas AMPure XP beads para conservar la pureza. En el siguiente paso, se añadió una cola de bases A al extremo 3' de los fragmentos de ADN. Tras recoger las muestras asegurando la pureza de nuevo con bolas magnéticas, los fragmentos de ADN se ligaron a los adaptadores con el consiguiente paso de purificación. La librería de ADN creada ligada a sus adaptadores fue amplificada por PCR. La calidad del ADN obtenido se midió con el Bioanalyzer 2100 (Agilent).

Por último, la secuenciación se realizó en una plataforma NovaSeq 6000 (Illumina) con recorridos de 150 pb por pares y fue externalizada a la compañía Macrogen.

4.8. Digital Droplet PCR (ddPCR)

El ADN fue extraído de los PDXDO, de las muestras tumorales y de las sangres de los PDX según el protocolo descrito previamente (ver apartado 4.6.). En el estudio de ddPCR, el ADN se cuantificó utilizando Qubit 4 (Invitrogen), con Qubit dsDNA Hs Assay. Se mezcló el ADN de la plantilla (5 µL 1 ng/µL), 1 x Bio-Rad Residual DNA Quantification Supermix, la sonda FAM/HEX (Tabla 2) y el agua irradiada con UV (ultravioleta) hasta un volumen final de 20 µL en una placa de PCR de 96 pocillos. La placa de 96 pocillos se colocó en el generador automático de gotas (BioRad). La emulsión de gotas generada se transfirió a otra placa PCR de 96 pocillos y se amplificó en un termociclador (C1000 Touch Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module, BioRad). Tras la amplificación, las placas se transfirieron al lector de gotas QX 200 (BioRad) y se analizó la presencia de la mutación en estudio y se cuantificó la frecuencia alélica usando el software QX (Bio-Rad).

4.9. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de los PDXDO y de las muestras tumorales de los PDX se siguió el protocolo del kit RNeasy Mini Kit (#74104, Qiagen). Las muestras tumorales fueron previamente disgregadas con el equipo TissueLyser en la solución de extracción del kit durante 5 min a 50Hz. Las muestras de PDXDO fueron directamente incubadas con el kit de extracción. El kit RNeasy utiliza una membrana de sílice para la purificación del ARN. La concentración de ARN extraído se determinó en el equipo Quantifluor (Promega) con el kit Quantifluor RNA System (#E3310, Promega).

4.10. Secuenciación completa del transcriptoma (WTS)

Con las muestras de ARN extraídas de los PDXDO y de las muestras tumorales de los PDX, como se indica en el apartado 4.9., se analizó el transcriptoma completo siguiendo el protocolo TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit Library (Illumina). Tras la extracción se analizó la pureza del ARN con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent), siendo necesario 1µg de ARN de alta calidad, con un valor de Número de Integridad del ARN (RIN) mayor o igual a 7.

Las moléculas de ARN mensajero (ARNm) que contienen la fracción poly-A se purifican del ARN total utilizando bolas magnéticas unidas a un oligo de poly-T. Tras la purificación, el ARNm se fragmentó utilizando cationes divalentes a temperatura elevada.

Los fragmentos de ARN se transcribieron a ADN complementario (ADNc) de una sola hebra utilizando transcriptasa inversa y cebadores aleatorios. La síntesis de la segunda hebra del ADNc se realizó por la Polimerasa I y la ARNasa H e incorporando uridina trifosfato (dUTP). Tras la síntesis de las dos hebras, se añadió a los extremos 3' de los fragmentos de ADN un nucleótido A para permitir la ligación del adaptador. Los productos de la ligación fueron amplificados por PCR y purificados. El producto final se envió a MacroGen para su secuenciación.

5. Análisis bioinformáticos

Los análisis bioinformáticos de los datos obtenidos de la secuenciación del exoma y el ARNseq de las muestras de los PDX y de los PDXDO basales y tratados se realizaron con la supervisión del bioinformático del laboratorio (David Gomez).

5.1. Análisis de exomas

Los datos crudos de la secuenciación fueron previamente filtrados usando la herramienta Fastp. Las lecturas se clasificaron en lecturas humanas y de ratón usando el programa xengsort utilizando los genomas humano y murino disponibles en la base de datos pública GENCODE.

Las lecturas clasificadas como humanas se alinearon con el genoma humano de referencia GRCh38 del *National Center for Biotechnology information* (NCBI) utilizando BWA-MEM (H. Li, 2013). Los alineamientos generados se utilizaron como input de tres programas de llamadas de variantes o *variant calling* diferentes: Mutect2, VarDict (Lai et al., 2016) y FreeBayes (Garrison & Marth, 2012) empleados para detectar variantes somáticas pequeñas: variantes de un solo nucleótido, variantes de múltiples nucleótidos y pequeñas inserciones y deleciones.

La llamada de variantes se realizó utilizando únicamente las muestras tumorales a excepción de unos pocos casos (6 de 45) donde la muestra normal pareada derivada del paciente también estaba disponible para restar las variantes germinales. A continuación, se anotaron las variantes con ANNOVAR (K. Wang et al., 2010) y con scripts propios. Estos scripts incorporan información de diferentes bases de datos para ayudar a la interpretación de dichas variantes, de tal forma que se pudiera discernir entre variantes somáticas reales y polimorfismos u artefactos. Se consultaron dos tipos principales de bases de datos. El primer tipo consistente en bases de datos de variantes genéticas germinales: gnomAD (Karczewski et al., 2017), CSVS (Peña-Chilet et al., 2021) y una base de datos propia de pacientes del H12O no relacionada con cáncer. El segundo tipo lo conforman bases de datos de variación somática propia de tumores: COSMIC (Tate et al., 2019), MSK-IMPACT (Cheng et al., 2015), Catalog of Validated Oncogenic Mutations (Tamborero et al., 2018) y Cancer Gene Census (Sondka et al., 2018). El listado final de variantes candidatas se verificó manualmente utilizando el software IGV (Integrative Genomics Viewer).

Las variaciones en el número de copias se estimaron ejecutando CNVkit (Talevich et al., 2016), utilizando todas las muestras de exoma de tumores PDX como línea base sobre la que calcular ganancias o pérdidas.

Finalmente se obtuvieron los gráficos con dichas variantes de una lista curada manualmente de 58 genes de cáncer de pulmón con la función Waterfall de GenVisR (Skidmore et al., 2016). Estos 58 genes fueron seleccionados utilizando la base de datos del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), eligiendo los más frecuentemente mutados, aquellos clínicamente relevantes en CPNM y aquellas mutaciones con terapia dirigida. La lista con los 58 genes se indica a continuación: AKT1, AKT2, AKT3, ALK, ARID1A, BRAF, CCND1, CDKN2A, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GATA3, GNA11, GNAQ, GNAS, HLA-A, HRAS, IDH1, IDH2, KEAP1, KIT, KMT2B, KMT2D, KRAS, KSR1, MAP2K1, MET, MGA, MYC, NF1, NFE2L2, NFE2L3, NOTCH1, NRAS, NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PPP2R1A, PTEN, RB1, RBM10, RET, RIT1, ROS1, SETD2, SMARCA4, STK11, TP53, TSC1, TSC2, U2AF1, STK11.

5.2. Análisis del transcriptoma

Los datos crudos de la secuenciación fueron posteriormente filtrados usando la herramienta Fastp. Las lecturas se clasificaron en lecturas humanas y de ratón usando el programa xengsort utilizando los genomas humano y murino disponibles en la base de datos pública GENCODE.

Se utilizó la herramienta Salmon (Patro et al., 2017) para cuantificar la expresión de los transcritos utilizando los datos de WTS. La abundancia de cada gen fue cuantificada para obtener un valor de transcritos por millón (TPM) y las lecturas que mapean a cada transcrito a través de tximport (Soneson et al., 2015).

Para resumir la expresión génica de cada muestra de PDX en las principales vías de señalización activadas en cáncer, ejecutamos el algoritmo PROGENy (Schubert et al., 2018). Este método incorpora el conocimiento previo para inferir las actividades de las vías. En PROGENy utilizamos la abundancia de expresión normalizada y, obtuvimos puntuaciones de las vías activas del cáncer que luego se transformaron en z y se visualizaron con pheatmap (Kolde, 2015).

Para el análisis de las muestras de los tratamientos en PDXDO, se realizó un enriquecimiento funcional en cada una de las muestras de forma individual (*single simple gsea, ssgsea*) con un paquete llamado singscore, escogiendo las rutas en msigdb. Los resultados de los análisis se visualizaron con pheatmap.

6. Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas SPSS (IBM) y GraphPad Prism 6.0. Para comprobar que los grupos de datos se ajustaban a la normalidad, se empleó la prueba de Saphiro-Wilk. Los conjuntos de datos con una distribución normal se muestran como media \pm error estándar de la media (SEM), para los conjuntos de datos que no se ajustan a una distribución normal se representa la mediana y el rango. Las comparaciones entre el éxito del injerto y las características de los pacientes se evaluaron mediante pruebas de χ^2 . Las comparaciones entre el tiempo de crecimiento y las características de subtipo histológico y estadio de los PDX se evaluaron mediante pruebas ANOVA. Los p-valores obtenidos de las pruebas estadísticas que se detallan se consideraron estadísticamente significativos cuando su valor estaba por debajo de 0.05. Siendo el p-valor $p < 0.0001$ (****), $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*), $p > 0.05$ (ns, no significativo).

6.1. Análisis estadísticos de los ensayos *in vitro*

Para los experimentos *in vitro*, las comparaciones entre las diferentes condiciones se realizaron con la prueba T no pareada para las muestras que mostraban normalidad y la prueba de Welch para las muestras con distribución normal pero con varianzas diferentes. Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras que no se ajustaban a una distribución normal.

6.2. Análisis estadísticos de los ensayos *in vivo*

Para los experimentos *in vivo*, se analizaron las diferencias en el crecimiento de los tumores de las diferentes ramas de tratamiento de cada ensayo usando la prueba T no pareada para las muestras que mostraban normalidad y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras que no se ajustaban a una distribución normal.

7. Aspectos éticos

En este proyecto se siguen los estándares de calidad ética y científica requeridos para el diseño, ejecución y análisis de estudios que involucren la participación de seres humanos y animales. Toda la experimentación realizada en esta tesis está regulada y aprobada por los comités éticos correspondientes.

7.1. Comités éticos de pacientes

El proyecto de investigación fue aprobado por el comité ético del hospital (ID de aprobación:2012PI/241 (Sevilla) y CEIm 20/090 (Madrid)). Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito, previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de los Hospitales (HUVR y H12O).

7.2. Comités éticos de animales

A continuación, se citan los comités éticos aprobados para el uso de animales en los experimentos realizados en esta tesis doctoral.

- Para establecer la colección de PDX se aprobó el proyecto con ref: SSA/SI/MD/pdm y el PROEX 084/15.
- Para el tratamiento de los modelos PDX inmunodeprimidos se aprobaron los PROEX 173/18.
- Para el establecimiento y tratamiento de los modelos humanizados se aprobaron los PROEX 067/19 y PROEX 173/20.

RESULTADOS

1. Generación y caracterización de una amplia colección de modelos PDX de CPNM como herramienta preclínica de evaluación *in vivo* de nuevas estrategias terapéuticas

Se recogieron 124 muestras tumorales en fresco de pacientes con CPNM resecaos entre 2013 y 2019, y se implantaron por vía subcutánea en ratones atímicos. Los tumores que crecieron fueron extraídos, y los fragmentos re-implantados en nuevos ratones y así sucesivamente hasta llegar como mínimo a pase 2 (P2), cuando se consideró que los modelos estaban establecidos. En cada pase se recogieron muestras de los tumores para su posterior caracterización. Además, se recogieron los datos clínicos más relevantes de los pacientes.

1.1. Características clínicas de la colección de modelos PDX de CPNM

Partiendo de 124 muestras recogidas, conseguimos establecer con éxito 45 modelos PDX de cáncer de pulmón no microcítico, que incluyeron 15 modelos de adenocarcinomas (33,3%), 27 de carcinomas epidermoides (60%) y 3 modelos de carcinoma de célula grande (6,7%) (Tabla 7). La tasa de éxito, considerando conjuntamente las tres histologías, fue del 36,3% (45/124). Centrándonos en la colección de muestras de pacientes que dió lugar a los 45 modelos PDX establecidos, cuyas características clínicas se detallan en la tabla 8, observamos que nuestros pacientes presentaban una mediana de 67 años (rango: 44-81), y los estadios eran tempranos mayoritariamente, repartidos en estadio I el 26,7% de los casos (12/45), estadio II en el 40% (18/45), estadio III en el 28,9% (13/45), y estadio IV en el 4,4% (2/45) de los casos. Analizando las tasas de éxito de establecimiento de los modelos por histología notamos que la tasa de éxito fue menor para el adenocarcinoma (24,6%; 15/61), que para el carcinoma epidermoide (47,4%; 27/57) y el carcinoma de célula grande (50%; 3/6) (Tabla 7). También observamos que la probabilidad de éxito de injerto fue dependiente del género y del hábito tabáquico, siendo mayor en varones y en fumadores, no habiéndose establecido ningún modelo de pacientes no fumadores (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de las características clínicas generales de la cohorte de pacientes utilizada, y de la colección de PDX establecida. El éxito de injerto indica el número de modelos establecidos entre el total de muestras implantadas para cada una de las características. Las comparaciones entre el éxito de injerto y las características de los pacientes se evaluaron mediante pruebas de χ^2 . Un p valor < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

		Cohorte de pacientes	Colección PDX	Éxito de injerto (%)	p-valor
Muestras (n)		124	45	36,3%	
Histología	Adenocarcinoma	61 (49,2%)	15 (33,3%)	24,6%	0,028
	Carcinoma epidermoide	57 (46%)	27 (60%)	47,4%	
	Carcinoma de célula grande	6 (4,8%)	3 (6,7%)	50%	
Estadio	I	45 (36,3%)	12 (26,7%)	26,7%	0,349
	II	44 (35,5%)	18 (40%)	40,9%	
	III	30 (24,2%)	13 (28,9%)	43,3%	
	IV	5 (4%)	2 (4,4%)	40%	
Género	Hombre	98 (79%)	40 (88,9%)	40,8%	0,042
	Mujer	26 (21%)	5 (11,1%)	19,2%	
Edad		66 [33-84]	67 [44-81]	-	
Hábito de fumar	No fumador	11 (8,9%)	0 (0%)	0%	0,031
	Ex-fumador	14 (11,3%)	6 (13,3%)	42,9%	
	Fumador	99 (79,8%)	39 (86,7%)	39,4%	

Tabla 8. Características clínicas de los 45 pacientes de los que se han establecido los modelos PDX.

Modelo PDX	Género	Edad	Hábito tabáquico	paq/año	Subtipo	Estadio	TNM
TP1	H	72	F	20	ESC	IIA	T2a N1M0
TP3	H	50	F	61	ESC	IA	T2a N0M0
TP6	H	79	F	80	CCL	IIB	T2b N1M0
TP13	H	80	F	95	ESC	IIA	T1b N1 M0
TP17	H	76	F	96	ESC	IIA	T1b N1 M0
TP21	H	71	F	60	ESC	IIIA	T3 N1 M0
TP24	H	81	F	66	ESC	IIB	T2a N1 M0
TP26	H	71	F	78	ESC	IIA	T2a N1 Mx
TP34	H	75	F	-	ESC	IIIA	T4a N0 M0
TP37	H	56	F	40	ESC	IB	T2a N0 M0
TP40	H	61	F	80	ADC	IIIA	T2a N2 M0
TP42	H	72	F	65	ESC	IIA	T2 N1 M0
TP43	H	65	F	71	ADC	IV	-
TP44	M	56	F	54	ESC	IIA	T2a N1 M0
TP45	H	74	F	70	ESC	IIA	T2a N1 M0
TP52	H	65	F	43	ESC	IIIA	T3 N1 M0
TP53	H	76	F	65	ESC	IB	T2a N0 M0
TP55	H	56	F	45	ESC	IIA	T2a N1 M0
TP57	H	70	F	40	ADC	IB	T2aN0M0
TP60	H	61	F	40	ADC	IIIA	T3 N1 M0
TP63	H	79	F	80	ADC	IIIA	T3 N0 M0
TP64	H	68	F	-	ESC	IIB	T3 N0 M0
TP65	H	65	F	50	ESC	IIIA	T3 N1 M0
TP67	H	67	F	131	ESC	IA	T1b N0 M0
TP70	M	62	F	36	ADC	IB	T2a N0 M0
TP71	H	72	F	135	ESC	IIIA	T2a N2 M0
TP79	H	80	F	-	ADC	IIB	T2b N1 M0
TP80	H	74	F	53	ADC	IV	T3 N0 M0
TP90	H	65	F	-	ESC	IB	T2a N0 M0
TP91	H	65	F	50	ADC	IIIA	T1b N2 V1
TP96	H	65	F	96	ESC	IB	T2a N0 M0
TP99	M	44	F	17	CCL	IIB	T3 N0 M0
TP100	H	65	F	55,5	CCL	IIA	T2a N1 M0
TP103	H	62	Exf	20	ADC	IIA	T2a N1 M0
TP106	H	68	Exf	90	ESC	IIB	T3 N0 M0
TP107	H	73	F	50	ESC	IB	T2a N0 M0
TP109	H	75	F	30	ESC	IB	T2a N0
TP111	H	56	F	58	ESC	IIIA	T3 N1 M0
TP114	H	71	F	80	ESC	IIB	T3 N0 M0
TP118	M	66	F	4	ADC	IIA	T1bN1
TP126	M	67	F	55	ADC	IB	T2aN0
TP134	H	63	Exf	60	ADC	IB	-
TP143	H	53	Exf	-	ADC	IIIA	T4N1M0
TP148	H	51	Exf	20	ADC	IIIB	T4N2M0
TP154	H	77	Exf	30	ESC	IIIA	T4N0M0

Abreviaturas: H (hombre); M (mujer); F (fumador); Exf (exfumador); ADC (adenocarcinoma); ESC (carcinoma epidermoide); CCL (carcinoma de célula grande); paq (paquetes); - dato no disponible.

1.2. Caracterización del crecimiento de los modelos PDX de CPNM

La evaluación del crecimiento de los tumores en los modelos PDX de CPNM en pase 0 (P0), 2 (P2) y en pases intermedios y tardíos ($P > 10$) mostró que cada modelo requirió un tiempo diferente para establecerse, y una tasa de crecimiento específica independiente de la mayoría de los parámetros clínicos de las muestras de los pacientes donantes (Tabla 9). El tiempo de crecimiento promedio desde el implante hasta alcanzar un volumen de 800-1000mm³ fue de 20,6 semanas en P0, y menor en los pases posteriores en todos los modelos. El tiempo de crecimiento hasta alcanzar el mismo volumen disminuyó en 4-8 semanas en todos los modelos PDX en los pases posteriores al P2 comparando con el P0 (Figura 10). El tiempo de crecimiento medio en P0 fue de 22,5 semanas para los modelos de adenocarcinoma y de 19,6 semanas para los modelos de carcinoma epidermoide, diferencia que no fue estadísticamente significativa ($p=0,326$). Los tumores implantados en estadio I mostraron un tiempo de crecimiento en P0 mayor, 27,4 semanas, que los de estadios más avanzados (18,7 semanas para el estadio II, 16,8 semanas para el estadio III, 17 semanas para el estadio IV), aunque tales diferencias no son significativas ($p=0,056$). Considerando que los modelos estaban establecidos en P2, calculamos el tiempo de establecimiento de todos los modelos, siendo el tiempo medio de 49,6 semanas. Por otra parte, no todos los modelos establecidos crecieron de forma homogénea en todos los ratones implantados en pases sucesivos. Después del P2, observamos que algunos modelos presentaban tasas de crecimiento en el pase siguiente superiores al 80%, como por ejemplo TP57 o TP60, y otros modelos con tasas inferiores al 60% (TP80 o TP118) (Tabla 9).

1.3. Caracterización morfológica de la colección de modelos PDX de CPNM

Para evaluar si los modelos PDX conservaban las características morfológicas de los tumores resecados de los que provenían, comparamos la histología de la muestra del tumor del paciente y del PDX correspondiente a lo largo de los diferentes pases (en P2, cuando el PDX se considera establecido, y en pases posteriores). Todos los PDX establecidos conservaban la misma morfología y las principales características histológicas de su correspondiente tumor original (Figura 11-13). Los modelos de adenocarcinoma tenían una morfología acinar (Figura 11), mientras que los modelos de escamoso mantenían rasgos específicos de este subtipo histológico como son las perlas de queratina (Figura 12). Cabe destacar que, en todas las histologías, los modelos mostraron tendencia a desdiferenciarse y volverse más sólidos con el tiempo.

Tabla 9. Evaluación del crecimiento de cada modelo PDX de CPNM establecido. El tiempo de establecimiento fue definido como el tiempo transcurrido entre el implante en el pase 0 y la extracción del tumor en el pase 2. El tiempo de crecimiento fue la media de las semanas que los tumores implantados tardaron en alcanzar un tamaño de 800-1000mm³ en todos los ratones de pase 0 (P0) y de pase 2 (P2). La tasa de crecimiento muestra el porcentaje medio de ratones implantados que presentaron crecimiento tumoral en cada uno de los pases. La barra (/) indica que los modelos no han alcanzado ese pase en el momento del análisis de los datos.

Modelo	Tiempo de establecimiento (en semanas)	Último pase analizado	Tiempo de crecimiento (en semanas)				Tasa de crecimiento (%)
			P0	P2	Pase intermedio (10-30)	Pase tardío (>30)	
TP1	70	14	22	21	28	/	67,6
TP3	81	14	44	17	22	/	70,7
TP6	32	4	11	11	/	/	55,7
TP13	35	31	14	9	9	18	93,7
TP17	32	2	15	8	/	/	75
TP21	44	2	19	9	/	/	86,7
TP24	53	18	18	14	13	/	67,5
TP26	40	2	17	12	/	/	96,9
TP34	57	26	21	18	12	/	81,7
TP37	40	7	14	11	/	/	69
TP40	38	36	25	7	10	10	75,6
TP42	26	2	10	8	/	/	97
TP43	64	31	20	24	9	/	79,4
TP44	37	4	27	37	/	/	56,7
TP45	39	2	18	9	/	/	83,3
TP52	79	5	29	34	/	/	66,7
TP53	87	5	26	35	/	/	69,4
TP55	19	2	6	7	/	/	94,4
TP57	27	42	12	9	6	6	86,4
TP60	26	41	11	7	8	8	89,8
TP63	33	19	7	16	13	/	66,6
TP64	66	20	22	30	16	/	73
TP65	28	22	8	12	4	/	93,8
TP67	73	18	31	14	10	/	77,4
TP70	53	32	24	13	11	/	79,1
TP71	20	5	7	7	/	/	91,7
TP79	46	34	30	8	10	7	73,3
TP80	42	24	14	12	12	/	55,5
TP90	26	25	8	10	12	/	64,9
TP91	35	28	13	10	13	/	80,6
TP96	23	32	8	7	4	10	86,2
TP99	11	4	5	3	/	/	90
TP100	39	2	17	8	/	/	92,6
TP103	41	36	13	9	10	6	71,5
TP106	67	7	29	18	/	/	69,4
TP107	74	44	46	10	4	6	70,5
TP109	49	7	24	11	/	/	79,6
TP111	74	15	27	23	5	/	85,7
TP114	67	22	29	12	12	/	76,4
TP118	130	10	43	43	/	/	36,8
TP126	51	37	34	11	6	15	90,7
TP134	103	7	58	22	/	/	81,6
TP143	39	13	19	8	11	/	72,5
TP148	71	6	15	27	/	/	78,9
TP154	44	4	17	13	/	/	74,2
Media	49,6		20,6	14,8	10,8	9,6	

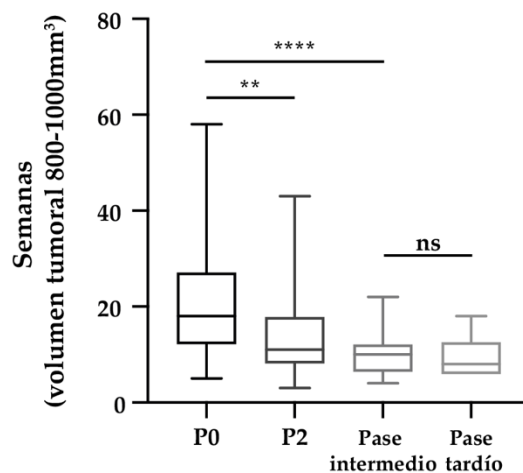


Figura 10. Evolución del crecimiento de los tumores PDX a lo largo de los pases. Las gráficas muestran el promedio de semanas desde el implante hasta alcanzar un tamaño tumoral 800-1000mm³ de todos los ratones del mismo pase para todos los modelos establecidos. Se representa el pase 0 (P0), pase 2 (P2), Pase intermedio (pases de 10 a 30) y pase tardío (pases > de 30). Los valores de p se obtuvieron con la prueba U de Mann-Whitney (****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.01$; ns, $p > 0.05$, no significativo).

Para completar la caracterización morfológica, analizamos la expresión mediante tinción de IHQ de los biomarcadores estándar empleados en la clínica para el diagnóstico diferencial de los distintos subtipos de CPNM. Los resultados verificaron que todos los tumores en los modelos PDX, coincidían con el diagnóstico original tras la resección del tumor. Los tumores de carcinoma de células grandes, definidos como tumores de CPNM que no expresan ninguno de los marcadores de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide, fueron negativos para ambos biomarcadores, TTF1 y p63 (Figura 13). En general, la expresión de estos marcadores en las muestras originales implantadas se conservó a lo largo de los pases en casi todos los tumores analizados de todos los modelos PDX. Las únicas excepciones fueron el modelo de adenocarcinoma TP103, que presentó clones p63-positivos a lo largo de los pases que no se observaron en el tumor del paciente, y el modelo de carcinoma epidermoide TP24, que perdió la expresión de p63 tras el establecimiento del modelo.

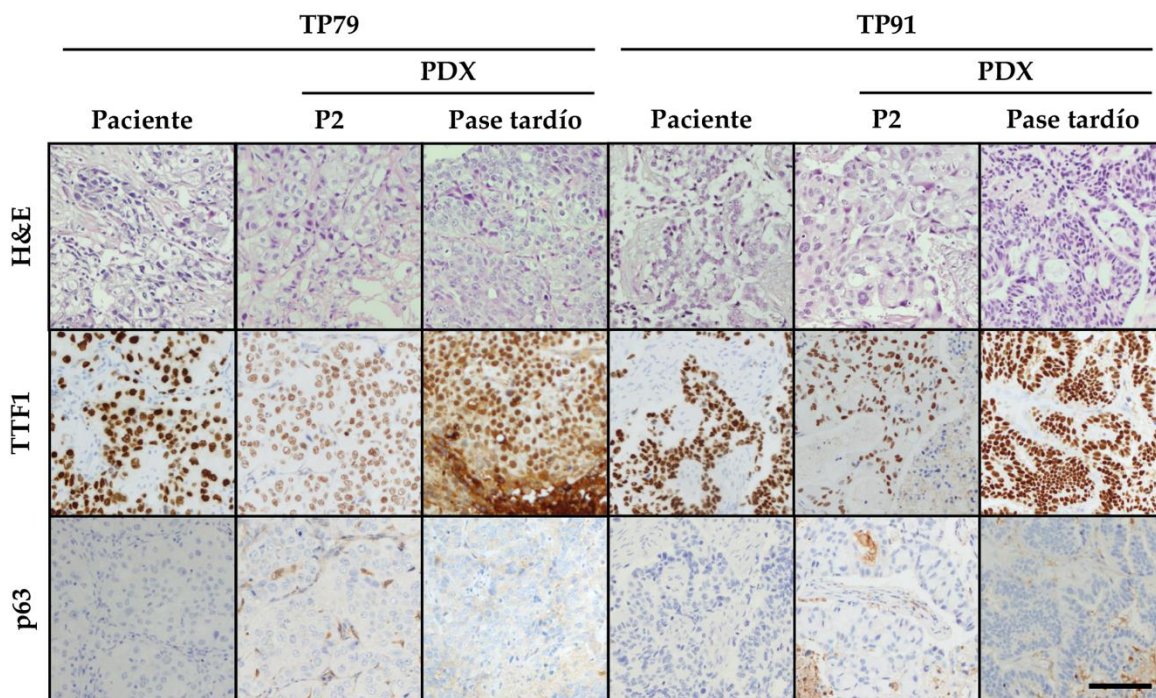


Figura 11. Caracterización histológica de los modelos PDX de adenocarcinoma establecidos. Tinciones de hematoxilina-eosina (H&E), factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y P63 en secciones tumorales del paciente de origen, y en los modelos PDX TP79 y TP91 en pase 2 (P2) y en pase tardío (>10). Barra de escala 0,1mm.

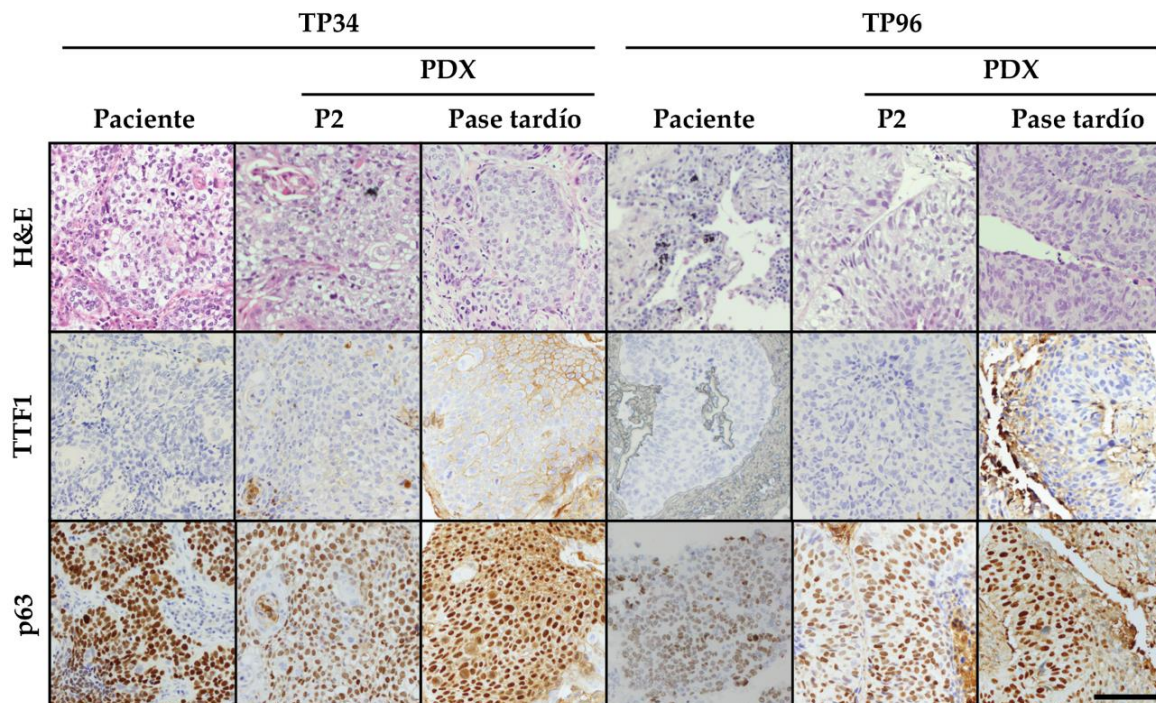


Figura 12. Caracterización histológica de los modelos PDX epidermoides establecidos. Tinciones de hematoxilina-eosina (H&E), factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y P63 en secciones tumorales del paciente de origen, y en los modelos PDX TP34 y TP96 en pase 2 (P2) y en pase tardío (>10). Barra de escala 0,1mm.

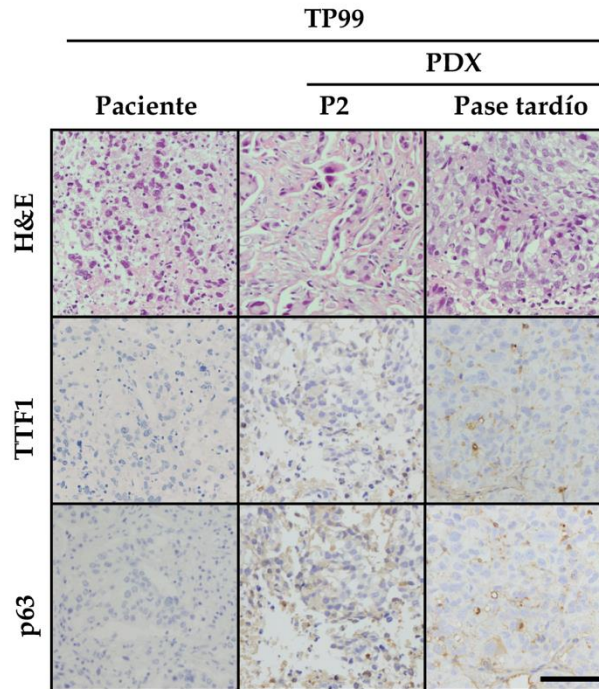


Figura 13. Caracterización histológica de los modelos PDX de carcinoma de célula grande establecidos. Tinción de hematoxilina-eosina (H&E), factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y P63 en secciones tumorales del paciente de origen, y en el modelo PDX TP99 en pase 2 (P2) y en pase tardío (pase 4). Barra de escala 0,1mm.

Determinamos el porcentaje del componente epitelial humano utilizando la tinción positiva para los elementos conservados en primates denominados ALU (positivo para ALUII) (Figura 14A). Además, determinamos el porcentaje del componente estromal murino, mediante la tinción positiva para la actina muscular lisa (mSMA) que marca los fibroblastos (Figura 14B). El porcentaje de componente humano de todos los modelos de la colección presentó una mediana de 95% (rango [45-99]) en el pase 2, y del 93% (rango [50-100]) en el pase tardío, lo que demuestra que se mantiene a lo largo de los pases. El porcentaje de estroma en los modelos también se mantuvo a lo largo del tiempo siendo del 10% (rango [3,5-54]) en pase 2 y del 8% (rango [0-41,5]) en pase tardío. Estos porcentajes fueron ligeramente inferiores a los de las muestras tumorales originales (32,5%; rango [12-58]) (Figura 14B).

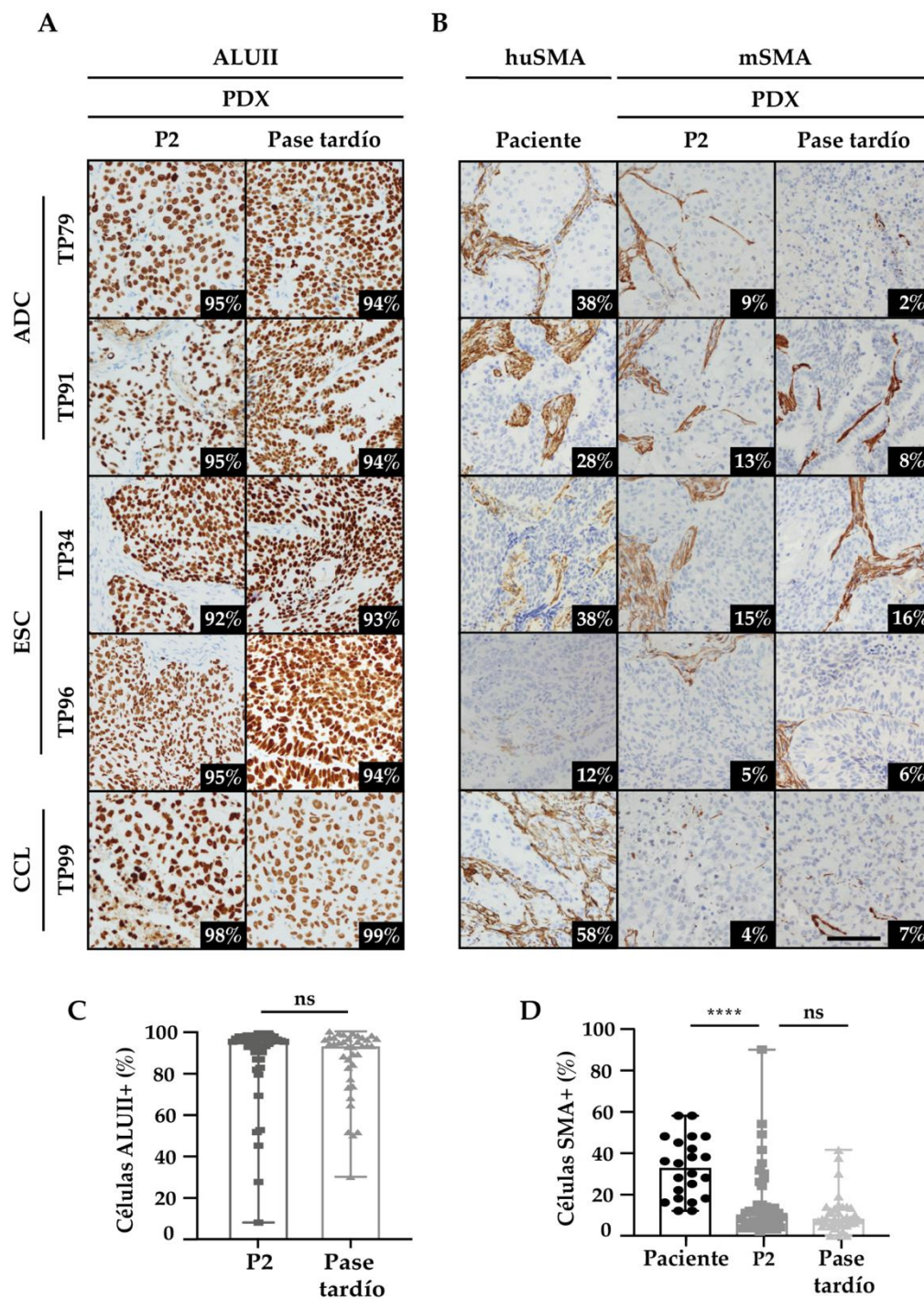


Figura 14. Análisis del componente epitelial humano y del estroma murino de los modelos PDX. A. Tinciones de ALUII en secciones tumorales de los pacientes de origen, y en sus modelos PDX establecidos en fase 2 (P2) y en fase tardío (>10, excepto el TP99 que está representado fase 4). B. Tinciones de actina del músculo liso (SMA) en secciones tumorales de los pacientes de origen (SMA humano; huSMA), y en sus modelos PDX (SMA murino: mSMA) establecidos en fase 2 y en fase tardío. C. Cuantificación promedio de células ALUII positivas en los tumores de los modelos PDX en fase 2 y en fase tardío. D. Cuantificación promedio de células SMA positivas en los tumores de paciente y en los tumores de los modelos PDX en fase 2 y fase tardío. Se muestran modelos PDX representativos de adenocarcinoma (ADC, TP79 y TP91), epidermoides (ESC, TP34 y TP96) y de carcinoma de célula grande (CCL, TP99). Barra de escala 0,1mm. Las gráficas muestran la mediana y rango. Los valores de p se obtuvieron con la prueba U de Mann-Whitney (****, $p < 0,0001$; ns, $p > 0,05$, no significativo).

Además, se tiñó el tejido tumoral para ki67 con el fin de analizar la tasa de proliferación tumoral a lo largo de los pases (Figura 15A) y estudiar si existía una relación entre el nivel de expresión de ki67 y las tasas de crecimiento en cada modelo (Tabla 9). El porcentaje de expresión de ki67 a lo largo de los pases en los modelos PDX no difirió de la muestra original del paciente, observando una media en los adenocarcinomas de 68,8% (rango [50-85]), 75,3% (rango [42,5-92,5]) y 72,5% (rango [42,5-95]) en el paciente, pase 2 y pase tardío, respectivamente. En los escamosos, el porcentaje medio de expresión de ki67 fue de 63,6% (rango [50-80]), 71,1% (rango [30-98]) y 68,5% (rango [42,5-90]) en el paciente, pase 2 y pase tardío, respectivamente (Figura 15B). Así pues, en general, la disminución del tiempo de crecimiento observado en los pases avanzados no correlacionaba con la expresión del marcador de proliferación ki67.

En el caso de los modelos de adenocarcinoma, que son los que utilizaremos para evaluar nuevas estrategias terapéuticas, realizamos una caracterización más profunda a nivel histológico que mostramos a continuación. Comprobamos la expresión de PD-L1, marcador asociado a la respuesta a la inmunoterapia, mediante tinción de IHQ (Figura 16). Observamos que todos los tumores originales de adenocarcinoma sin expresión de PD-L1 en el paciente siguieron siendo negativos para PD-L1 en el PDX. El porcentaje de expresión de PD-L1 de los modelos positivos variaba ligeramente a lo largo de los pases, destacando tres modelos con una mayor variabilidad. El modelo TP118 que presentaba una expresión de PD-L1 inicial del 3% pasó al 60%, el modelo TP70 de una expresión inicial del 1% al 80% y el modelo TP134 que disminuyó su expresión del 65% al 1%.

Globalmente, la caracterización morfológica de marcadores inmunohistoquímicos indicó que los modelos PDX establecidos conservaban las características histológicas originales de la muestra del tumor del paciente tanto en los pases iniciales como en los tardíos.

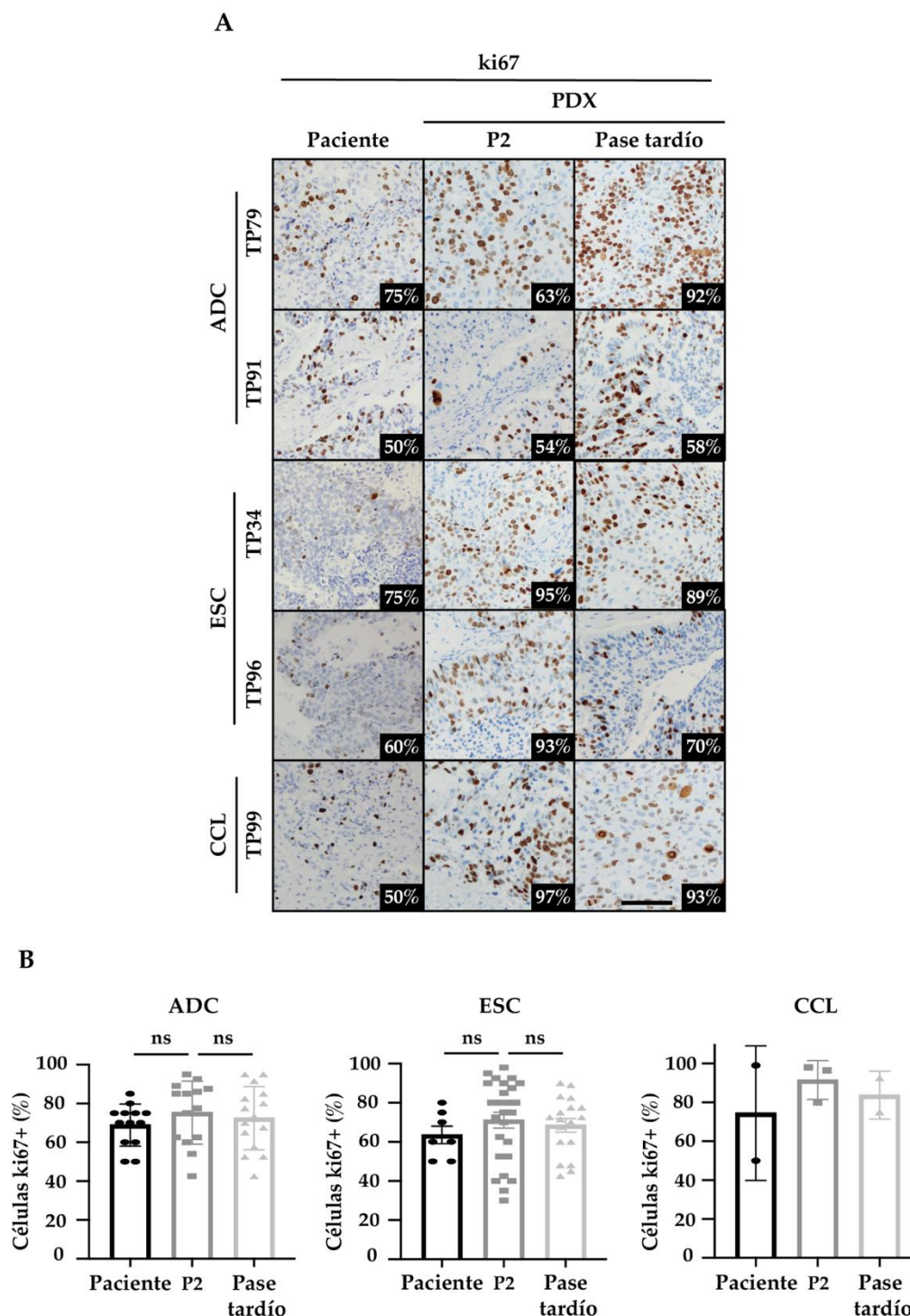


Figura 15. Análisis del índice de proliferación de los tumores PDX. A. Tinciones de ki67 en secciones tumorales de los pacientes de origen, y en sus modelos PDX establecidos en pase 2 (P2) y en pase tardío (>10, excepto el TP99 que está representado *el* pase 4). B. Cuantificación de la proliferación celular de los tumores medida por el porcentaje de células ki67 positivas de los modelos PDX en los distintos pases. Se muestran imágenes de la tinción de ki67 de modelos PDX representativos de adenocarcinoma (ADC, TP79 y TP91), epidermoides (ESC, TP34 y TP96) y de carcinoma de célula grande (CCL, TP99). Barra de escala 0,1mm. Los datos se muestran como media ± SEM. Los valores de p se obtuvieron con la prueba T no pareada (ns, p >0.05, ns no significativo).

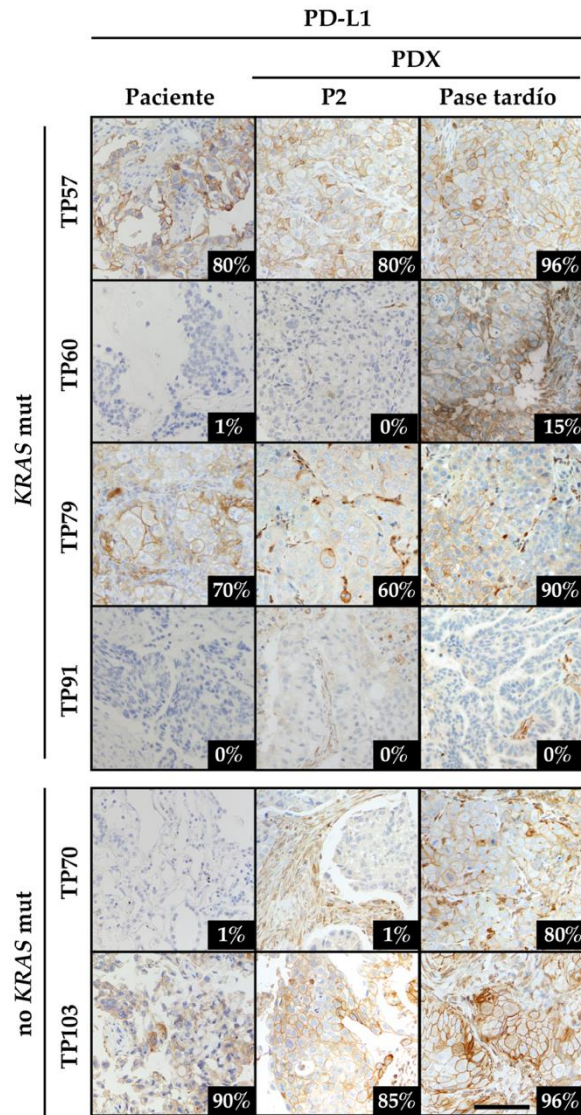


Figura 16. Caracterización de la expresión de PD-L1 en los modelos PDX de adenocarcinoma. Tinciones de ligando 1 de muerte programada (PD-L1) en secciones tumorales de los pacientes de origen, y en sus PDX establecidos en pase 2 (P2) y en pase tardío (>10). Se muestran modelos PDX representativos de adenocarcinoma con *KRAS* mutado (*KRAS* mut; TP57, TP60, TP79 y TP91) y no *KRAS* mutado (no *KRAS* mut; TP70 y TP103). Barra de escala 0,1mm.

1.4. Caracterización genómica de la colección de modelos PDX de CPNM

Realizamos la secuenciación del exoma completo de los 15 modelos PDX de adenocarcinoma utilizando el ADN extraído de los tumores en pase 2. Con la información obtenida nos centramos en las alteraciones genómicas encontradas en un listado de 58 genes que incluye los más frecuentemente mutados en el CPNM y aquellos de mayor relevancia por su posible aplicación clínica (ver apartado 5.1. de la sección materiales y métodos). En la Figura 17 se muestra un oncoplot con las alteraciones genómicas encontradas en 38 de estos 58 genes (Figura 17). Así, cabe destacar las alteraciones moleculares encontradas en los genes: *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *NTRK1*, *PIK3CA*,

ROS1, *TP53* y *STK11*. En nuestros modelos PDX de adenocarcinoma, los genes mutados más recurrentes fueron *TP53* (80%), *KRAS* (53%), *STK11* (20%), *EGFR* (20%), *PIK3CA* (20%), *ERBB2* (13%), *ALK* (13%) y *BRAF* (6%). Además, contamos con modelos PDX que presentan algunas alteraciones genéticas relevantes concurrentes como mutaciones de *KRAS* y *TP53* (33%), de *KRAS* y *STK11* (13%), o de *TP53* y *STK11* (6%) (Figura 17).

Si estudiamos los tipos de mutaciones encontradas en nuestros modelos PDX, observamos que la gran mayoría fueron mutaciones sin sentido (65%), pero también encontramos mutaciones que afectan a sitios de corte alternativo (12%), dobles mutaciones (6%), sinónimas (6%), inserciones o deleciones sin desplazamiento en el marco de lectura (6%), inserciones o deleciones con desplazamiento en el marco de lectura (3%) y mutaciones de ganancia de codón de parada (3%). En lo que respecta a las alteraciones del número de copias, encontramos amplificaciones comunes recurrentes en varios modelos como las de del homólogo del oncogene viral de mielocimatosis aviar *V-Myc* (*MYC*) (40%), *NFE2L3* (20%) y *EGFR* (20%), y pérdida en el número de copias en *FGFR1* en dos modelos (13%) (Figura 17).

Centrándonos en los modelos con mutaciones conductoras en *KRAS* y *EGFR*, encontramos un modelo con la mutación *KRAS*-G12A (12,5%, modelo TP57), un modelo con la mutación *KRAS*-G12D (12,5%, modelo TP143), un modelo con la mutación poco frecuente *KRAS*-G12_G13insAG (12,5%, modelo TP148) y 5 modelos con la mutación *KRAS*-G12C (62,5%, modelos TP60, TP79, TP80, TP91, TP126). Respecto a mutaciones en *EGFR*, identificamos dos modelos con la mutación *EGFR*-L858R (100%, modelo TP118 y modelo TP103) y un modelo que presenta la mutación *EGFR*-T790M (50%, modelo TP103) (Figura 17).

Como parte de nuestro estudio genómico, analizamos si la abundancia o frecuencia alélica de las mutaciones conductoras encontradas en los modelos PDX *KRAS* y *EGFR* mutados se mantenía a lo largo de los pases. Para ello, se analizó mediante ddPCR la presencia de las mutaciones y se calculó su frecuencia alélica tanto en el tumor como en la sangre. Se verificó que todos los modelos mantenían estable la frecuencia alélica en el tumor a lo largo de los pases, a excepción del modelo TP80 que con los pases mostraba un enriquecimiento de la frecuencia alélica para su mutación en *KRAS*-G12C (Figura 18A). Por otro lado, confirmamos la posibilidad de detectar la mutación conductora de los tumores utilizando biopsias líquidas. En todos los modelos fuimos capaces de detectar la mutación conductora en la sangre, sin embargo, vimos que la frecuencia alélica calculada en el tumor y en la sangre difiere en todos los modelos, siendo siempre menor cuando se utiliza el ADNcf aislado de la sangre (Figura 18B).

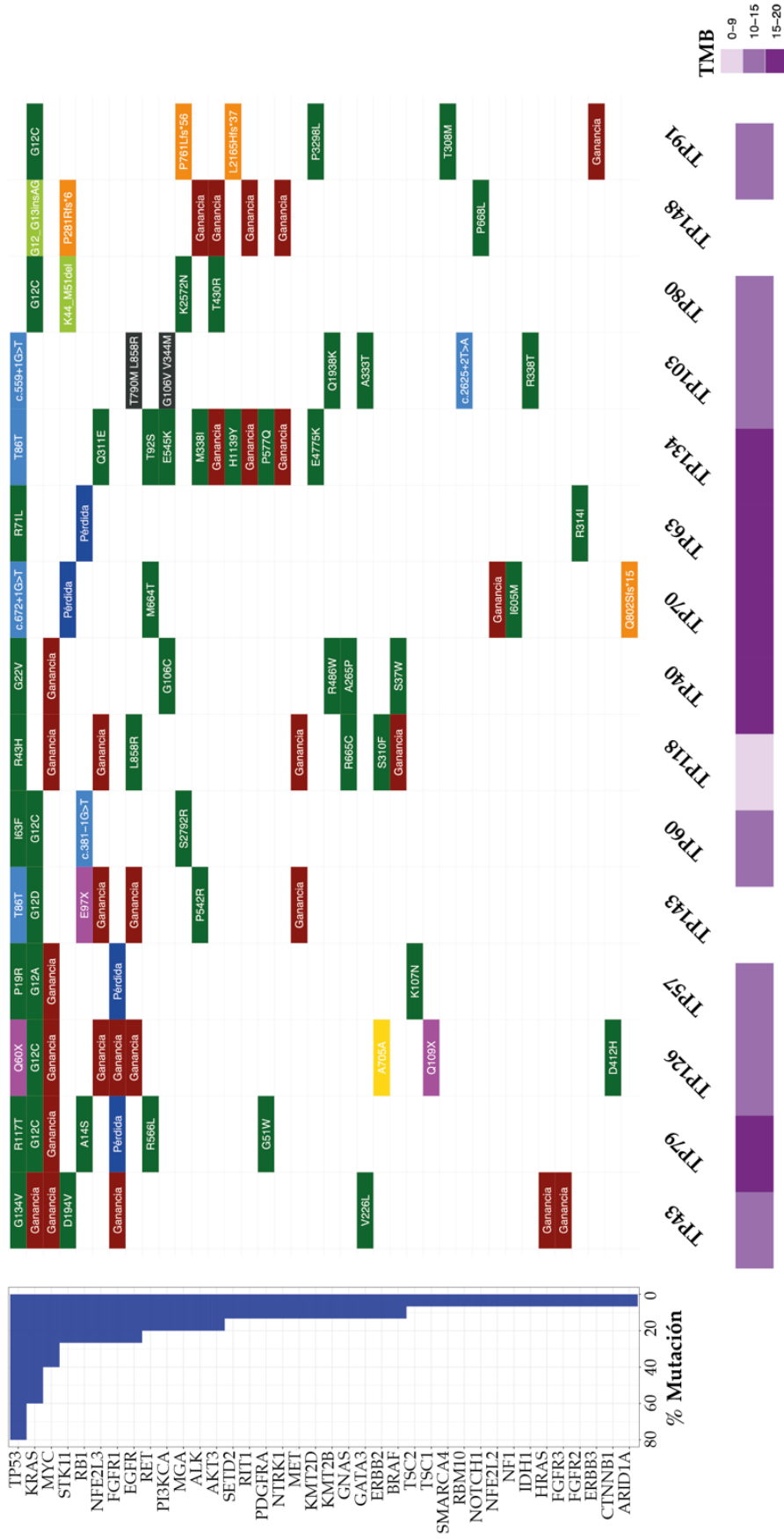


Figura 17. Caracterización genómica de relevancia clínica de nuestros modelos PDX de adenocarcinoma. Se realiza la secuenciación del exoma completo de todos los modelos PDX de adenocarcinoma, pero solo mostramos las alteraciones genómicas encontradas en los 58 genes más frecuentemente alterados y/o más relevantes clínicamente en el cáncer de pulmón. El panel izquierdo muestra la recurrencia de la mutación para cada gen, las mutaciones se muestran en el centro. El panel inferior se utiliza para mostrar el estado TMB calculado. La leyenda describe los tipos de mutación resumidos en diferentes colores: doble mutación (negro); mutaciones de ganancia de codón de parada (rosa); mutaciones con desplazamiento en la pauta de lectura (rojo); mutaciones sin desplazamiento en la pauta de lectura (verde claro); pérdidas (azul claro); mutaciones sin sentido (verde oscuro); ganancia genómica se realizó en los PDX en pase 2.

En el mapa de calor de la Figura 19, se muestra el análisis de los tumores de adenocarcinoma para diferentes vías como la hipoxia, las vías apoptóticas (Trail, p53), la inflamación (TNF α de NF κ B) y las vías oncogénicas (MAP quinasa, VEGF, PI3K, EGFR, JAK-STAT, factor de crecimiento transformante beta (TGF β), WNT). Los modelos PDX de adenocarcinoma con distinto fondo genético dan lugar a perfiles transcriptómicos diferentes, y aunque la variabilidad en la expresión de genes de las diferentes vías seleccionadas es alta, se agruparon en dos grupos. El primer grupo (a la izquierda en la figura 19) que agrupa a modelos sin mutación en *KRAS*. Un segundo grupo (a la derecha en la figura 19) está enriquecido en mutaciones en *KRAS*. En este se reconocen dos subgrupos diferentes: el primero, con mayor variabilidad genética y en el que aparecieron activas las vías del Trail, TGF β y WNT (modelos TP40, TP60 y TP118), y el segundo, enriquecido en mutantes *KRAS* y con expresión de PD-L1 positiva, que presentan mayor activación en las vías JAK-STAT, PI3K, VEGF, EGFR y MAPK (modelos TP126, TP143, TP63, TP57, TP79 y TP91).

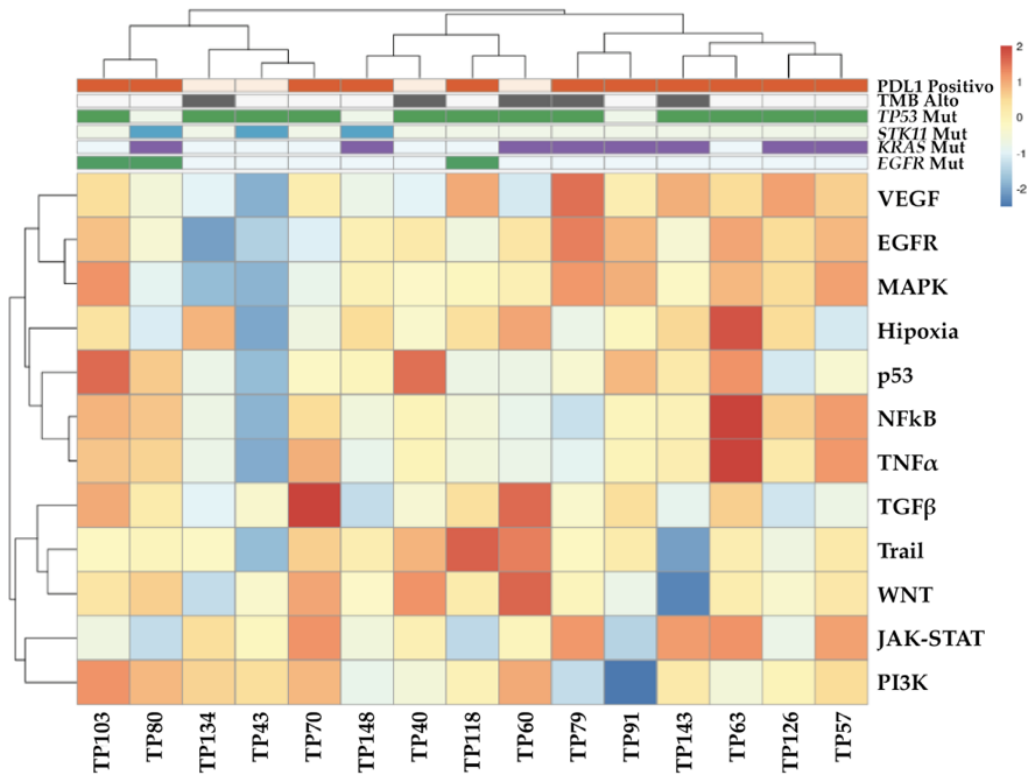


Figura 19. Caracterización transcriptómica de vías de señalización con relevancia clínica de los modelos PDX de adenocarcinoma. Mapa de calor de las puntuaciones agrupadas jerárquicamente de las vías oncogénicas inferidas con PROGENy utilizando el método de correlación de pheatmap. El panel superior muestra las anotaciones: TMB (Carga mutacional tumoral), expresión de ligando 1 de muerte programada (PD-L1), mutaciones y ganancias de número de copias en algunos genes de relevancia clínica. El estudio se realizó con muestras de los modelos PDX de adenocarcinoma en fase 2. La sobreexpresión se muestra en rojo y la disminución de la regulación en azul.

1.6. Estudio de la respuesta a quimioterapia y terapias dirigidas de los modelos PDX de adenocarcinoma

La aplicación más prometedora de una colección de modelos PDX de este tipo es su potencial como herramienta preclínica para evaluar la eficacia de diferentes estrategias terapéuticas y predecir las respuestas que tendrían lugar en la clínica. Para confirmar el papel predictivo de respuesta clínica de nuestra colección de PDX, elegimos los modelos PDX de adenocarcinoma con mutación en *KRAS* y en *EGFR* y comprobamos su respuesta al tratamiento estándar aplicado a estos pacientes en la clínica.

Primero, caracterizamos la activación de las vías intracelulares relevantes aguas abajo de las vías de *KRAS* y *EGFR* en los modelos PDX seleccionados (Figura 20). Se observó una activación de la vía MAPK en los modelos con mutaciones en *KRAS*, aunque existía variabilidad entre los mismos, dependiendo, al menos parcialmente, de las co-mutaciones presentes. En el caso de los modelos *EGFR* mutados, también existían variaciones, siendo el modelo TP103, con doble mutación en *EGFR* (Figura 17), el que presentaba una mayor activación de la vía de *EGFR* (Figura 20).

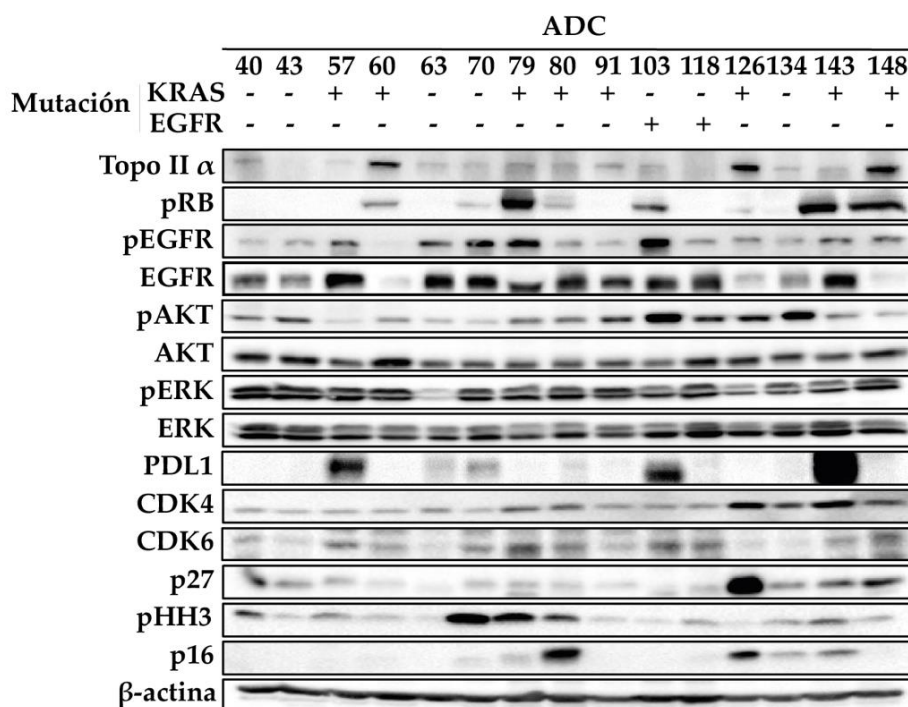


Figura 20. Caracterización proteómica de los modelos PDX de adenocarcinoma. Estudio mediante western blot de la activación de las vías de señalización en todos los modelos PDX de adenocarcinoma, mostrando especial interés los modelos con *KRAS* y *EGFR* mutados. La figura muestra una imagen representativa de 3 tumores analizados por cada modelo PDX. TopoII α (Topoisomerasa II alpha); pRB (retinoblastoma fosforilado); pEGFR (Receptor de factor de crecimiento epidérmico fosforilado); EGFR (Receptor de factor de crecimiento epidérmico); pAKT (Quinasa de proteínas B fosforilada); AKT (Quinasa de proteínas B); pERK (Quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 fosforilada); ERK (Quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2); PD-L1 (Ligando 1 de muerte programada); CDK4 (ciclina dependiente de quinasa 4); CDK6 (ciclina dependiente de quinasa 6); pHH3 (Histona H3 fosforilada).

Posteriormente, se trataron los modelos PDX de adenocarcinoma con mutación en *KRAS* con quimioterapia y los modelos con mutación en *EGFR* con inhibidores de *EGFR* de primera y segunda generación, erlotinib y osimertinib. Los modelos PDX tratados con carboplatino mostraron una sensibilidad diferente entre sí e independiente de la presencia o ausencia de la mutación en *KRAS* (Tabla 10A y Figura 21A).

El modelo TP103 que mantenía ambas mutaciones en *EGFR*, mutaciones L858R y T790M (Figura 17), mostró una respuesta limitada a erlotinib, pero una potente sensibilidad a osimertinib (Tabla 10B y Figura 21B). Es decir, en este caso nuestro estudio preclínico se correlacionó con lo que se esperaba según los datos clínicos, o lo que es lo mismo, el estudio preclínico podría predecir lo que ocurriría en la clínica.

Tabla 10. Sensibilidad de los modelos PDX a los tratamientos estándar en clínica. A. Tratamiento con quimioterapia (carboplatino) en modelos PDX de adenocarcinoma con mutación en *KRAS* (TP57, TP60, TP79, TP80, TP91) y modelos sin mutación en *KRAS* (no mut; TP40 y TP70) **B.** Tratamiento con terapias dirigidas (erlotinib, osimertinib) del modelo TP103 con mutación en *EGFR*. El pase del tto indica el pase del modelo PDX en el que se hizo el tratamiento. El TGI (inhibición del crecimiento tumoral) se calcula como: $1 - (\text{crecimiento promedio relativo final del grupo tratado} / \text{crecimiento promedio relativo final del grupo control}) \times 100$. Las columnas sombreadas describen los datos de los pacientes relacionados con el tratamiento recibido previo o posterior a la cirugía y la supervivencia global en meses de los pacientes de los que proviene cada modelo PDX desde la cirugía; se indica con >45 si el paciente no ha fallecido en el momento de recogida de datos y tiene una supervivencia mayor de 45 meses.

A

Modelo PDX	Mutación KRAS	Tratamiento	TGI	TNM	Tratamiento previo	Tratamiento Posterior	Supervivencia global (meses)
TP40	No Mut	Carboplatino	25,2	T2aN2M0		Cisplatino/ Pemetrexed	54
TP57	G12A	Carboplatino	50,5	T2aN0M0			>45
TP60	G12C	Carboplatino	45	T3N1M0	Carboplatino /Pemetrexed		6
TP70	No Mut	Carboplatino	40,7	T2aN0M0			>45
TP79	G12C	Carboplatino	50,2	T2bN1M0		Cisplatino/ Vinorelbina	>45
TP80	G12C	Carboplatino	29,3	T3N0M0		Erlotinib	11
TP91	G12C	Carboplatino	56,3	T1bN2M1	Cisplatino		21

B

Modelo	Mutación EGFR	Tratamiento	TGI	TNM	Tratamiento previo	Tratamiento Posterior	Supervivencia global (meses)
TP103	L858R/ T790M	Erlotinib Osimertinib	58,9 80,2	T2aN1M0		Osimertinib/ Rifampicina	13

Abreviaturas: No mut (no mutación); TGI (inhibición del crecimiento tumoral); TNM (Tumor, nódulo, metástasis)

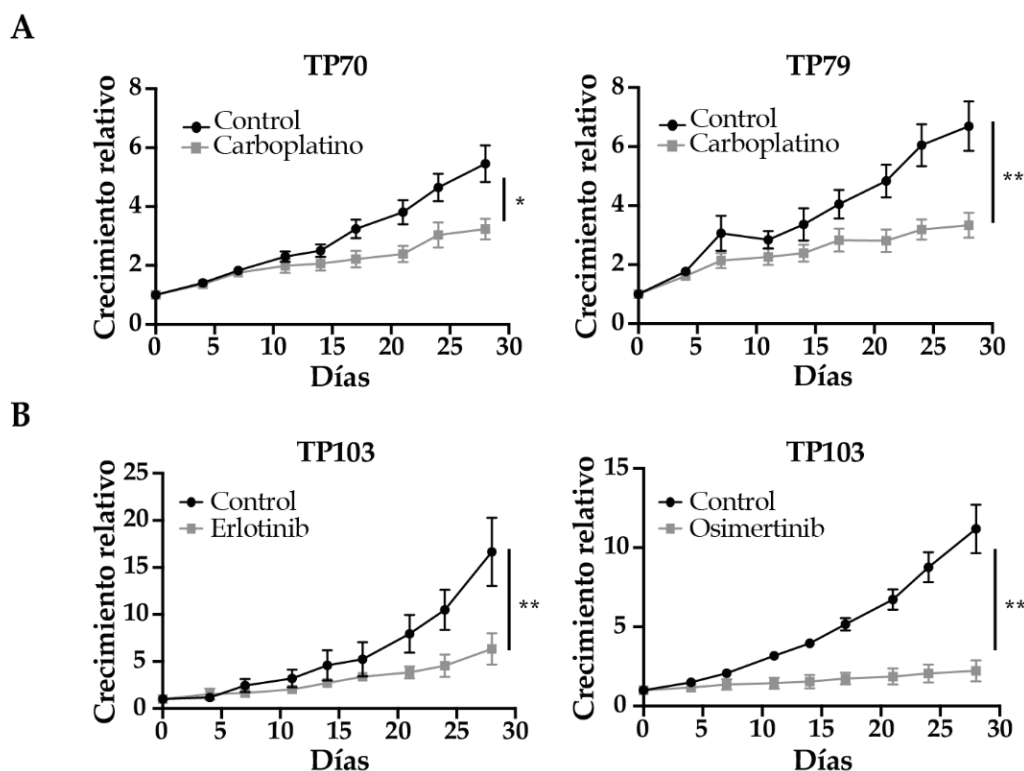


Figura 21. Ejemplos de tratamientos preclínicos en los modelos PDX con diferente sensibilidad a la quimioterapia y a las terapias dirigidas. A. Efecto del carboplatino en el crecimiento tumoral de dos modelos PDX de adenocarcinoma sin mutación en *KRAS* (TP70; n control=9; n carboplatino=7) y con *KRAS* mutado (TP79; n control=9; n carboplatino=8) durante el tratamiento de 28 días con 25 mg/kg de carboplatino administrado 2 veces por semana. **B.** Efecto de erlotinib y osimertinib en el crecimiento tumoral del modelo PDX de adenocarcinoma TP103 (n control Erlotinib=5; n Erlotinib=5; n contro Osimertinib=6; n Osimertinib=7) con doble mutación de *EGFR* durante el tratamiento de 28 días con 50mg/kg de erlotinib y 20mg/kg de osimertinib administrados oralmente 5 días/semana o con vehículo (rama control). Las gráficas muestran la media \pm SEM de las réplicas tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Los valores de p para el ensayo *in vivo* se obtuvieron con la prueba T no pareada para los modelos TP70 y TP103 (erlotinib) y prueba Welch para los modelos TP79 y TP103 (osimertinib) (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

2. Generación y caracterización de una amplia colección de modelos PDXDO de CPNM como herramienta preclínica de evaluación *in vitro* de nuevas estrategias terapéuticas

Hemos generado una colección de modelos PDXDO de 14 de los 15 modelos de adenocarcinoma de nuestros PDX de adenocarcinoma de pulmón siguiendo la metodología previamente descrita. Caracterizamos los 14 modelos PDXDO en diferentes momentos evolutivos para comprobar si conservaban las características histológicas y moleculares de los tumores de los modelos PDX y, por tanto, de los tumores de los pacientes de origen. Además, se evaluó la utilidad de estos modelos 3D como modelo preclínico *in vitro*

intermedio para el estudio de eficacia de nuevas estrategias terapéuticas, el estudio de su mecanismo de acción y para la identificación de biomarcadores predictivos de respuesta.

2.1. Caracterización morfológica de los PDXDO de adenocarcinoma de pulmón

Confirmamos que los PDXDO mantenían la misma histología del tejido tumoral del PDX y, por tanto, del tejido tumoral original del paciente (Figura 22A). Los tumores de adenocarcinoma en los pacientes produjeron patrones acinares, que se mantenían en los PDXDO, aunque estos tendían a mostrar patrones más sólidos, como habíamos reconocido ya en los PDX. A modo de ejemplo cabe mencionar el modelo de PDX TP79 que mostraba un patrón sólido con glándulas mal formadas, que se mantiene en los organoides, el modelo de PDX TP91 que mostraba una morfología glandular que también se mantiene en los organoides, y el modelo PDX TP103 que mostró nidos sólidos con células con citoplasmas claros y eosinófilos *in vivo* e *in vitro*.

Al igual que realizamos para los modelos PDX, analizamos la expresión de diferentes marcadores utilizados para el diagnóstico del adenocarcinoma mediante tinciones de IHQ en los cultivos PDXDO. Observamos que los 14 modelos de adenocarcinoma generados retenían la expresión de TTF1 y las características de diferenciación epitelial de los adenocarcinomas de pulmón, coincidiendo con lo observado en los modelos PDX y en los tumores originales de los pacientes (Figura 22B). Además, mantenían una capacidad de proliferación similar medida por la tinción de ki67 (Figura 22B). Los PDXDO también mantenían, en general, la expresión de PD-L1 (Figura 22B). Además, no solo conservaban la positividad de la expresión de los diferentes marcadores analizados, sino que también conservan la heterogeneidad del modelo PDX.

Por último, analizamos la naturaleza celular de los PDXDO mediante la tinción ALUII, y observamos que el 100% de los casos eran de origen humano (Figura 23A). La tinción por inmunofluorescencia de vimentina demostró que las células murinas estromales fueron escasas en el pocillo, y en ningún caso se encontraron formando parte del organoide; es decir, nuestros PDXDO estaban formados exclusivamente por células tumorales humanas (Figura 23B).

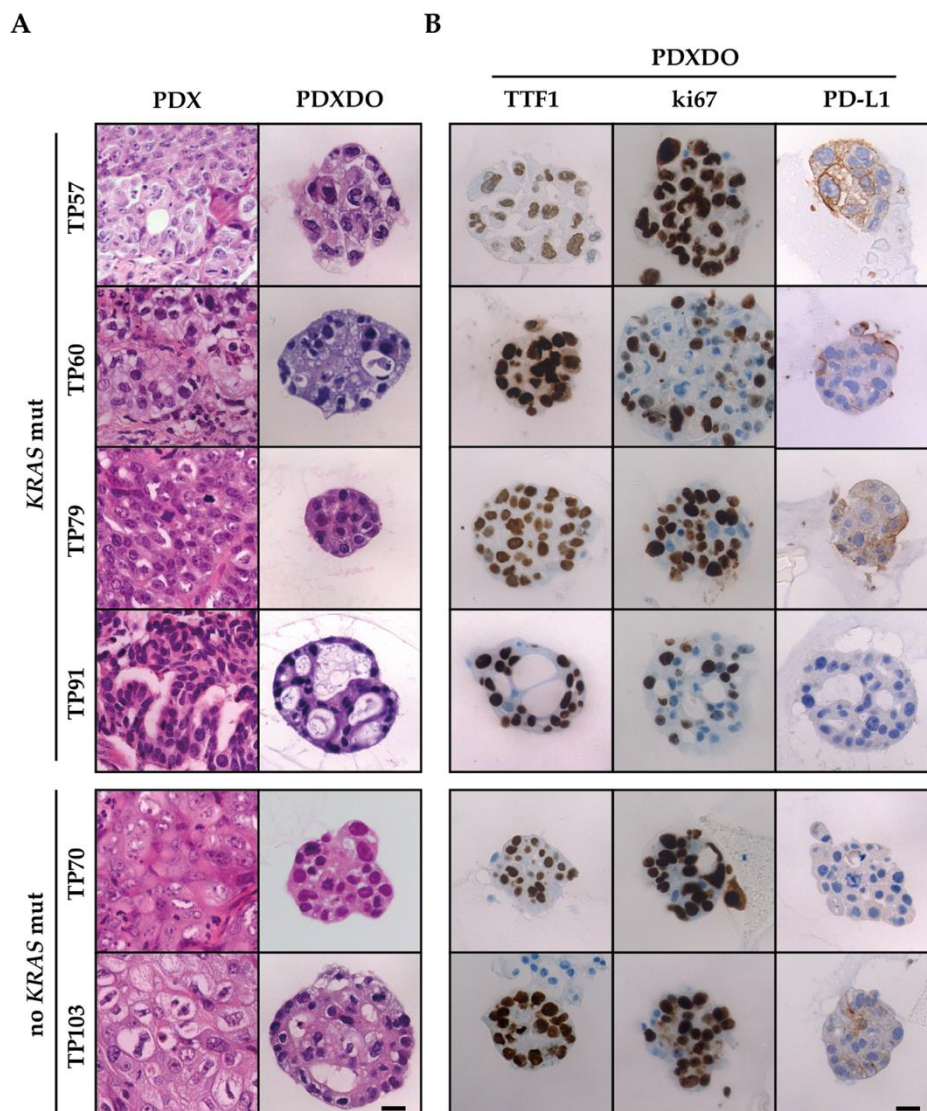


Figura 22. Caracterización morfológica de los PDXDO de adenocarcinoma de pulmón. A. Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) de los cultivos PDXDO en fase 2 y de secciones tumorales representativas de los modelos PDX de los que provienen. **B.** Tinciones de Factor de transcripción tiroidea 1 (TTF1), ki67 y (Ligando 1 de muerte programada) PD-L1 de cultivos PDXDO en fase 2. Se representan 4 modelos con *KRAS* mutado (*KRAS* mut; TP57, TP60, TP79 y TP91) y dos modelos no *KRAS* mutados (no *KRAS* mut; TP70 y TP103). Barra de escala, 0.2mm.

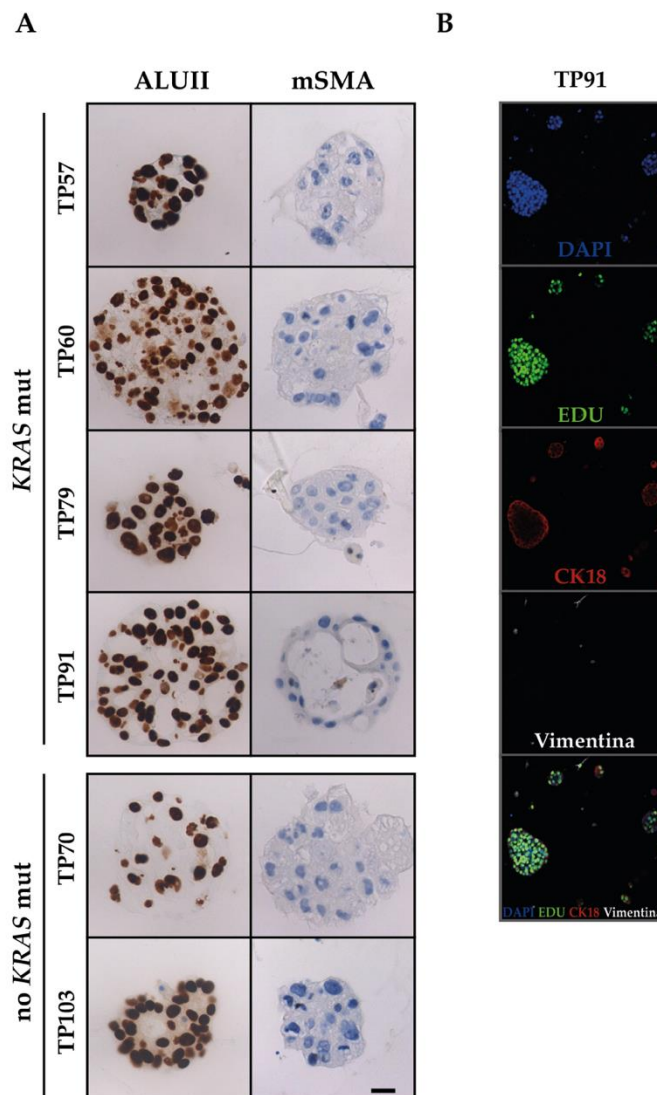


Figura 23. Análisis del componente epitelial humano y del estroma murino de los modelos PDXDO.
A. Tinciones de hibridación *in situ* ALUI y de inmunohistoquímica de actina de músculo liso (SMA murino; mSMA) de cultivos PDXDO en fase 2. Se representan 4 modelos con *KRAS* mutado (*KRAS* mut; TP57, TP60, TP79 y TP91) y dos modelos no *KRAS* mutados (no *KRAS* mut; TP70 y TP103). Barra de escala, 0,2mm **B.** Inmunofluorescencia de cultivos PDXDO del modelo TP91. DAPI (azul), EDU (verde), CK18 (citoqueratina 18, rojo) y vimentina (blanco). Aumento original 20x.

2.2. Caracterización genómica de los PDXDO de adenocarcinoma de pulmón

Para confirmar si los PDXDO conservaban las mismas alteraciones genómicas que presentaban los PDX de los que derivan, secuenciamos el exoma completo de los organoides (Figura 24A) y lo comparamos con el de los PDX (Figura 24B). Comparando los exomas de 7 modelos seleccionados, los 7 *KRAS* mutados, observamos que existía una concordancia del 94,4% en la presencia de las alteraciones genómicas, exceptuando tres variaciones de las 53 encontradas, la pérdida de la mutación en MGA en el modelo TP60 de PDXDO y la ganancia de la mutación en *MET* y *PI3K* en los modelos TP60 y TP57 de

PDXDO, respectivamente. Los cultivos en organoides mantenían, por tanto, en un alto porcentaje las características genómicas de origen (Figura 24B). Al igual que se hizo con los modelos PDX de adenocarcinoma, observamos que todos los PDXDO generados conservaban también la frecuencia alélica de las mutaciones conductoras en *KRAS* y en *EGFR* de los modelos PDX, medida por ddPCR (Figura 25).

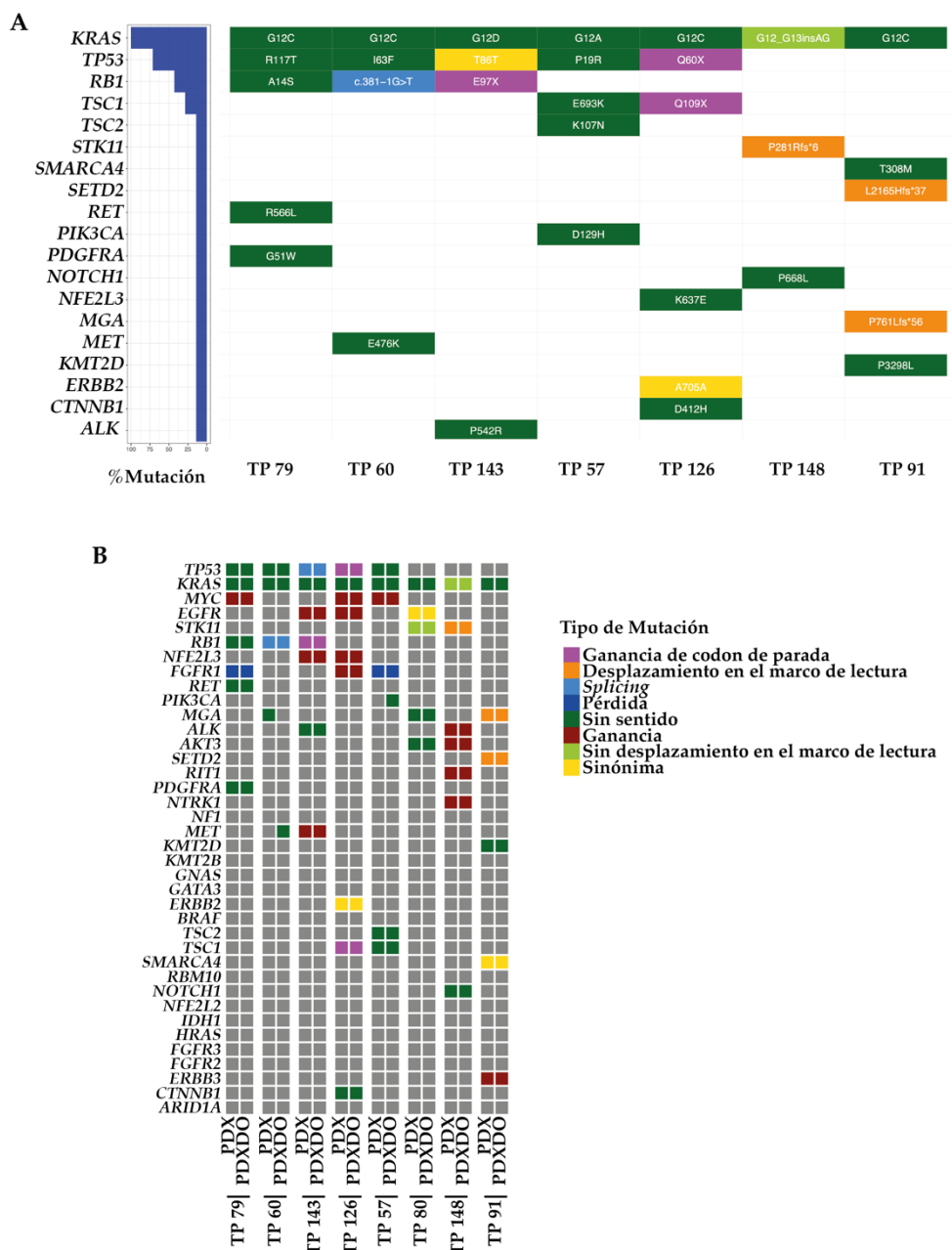


Figura 24. Caracterización genómica de los modelos PDXDO de adenocarcinoma mediante secuenciación de exoma y ddPCR. A. Mediante la secuenciación del exoma determinamos las alteraciones genómicas presentes en los PDXDO en los mismos 58 genes analizados en los PDX. El panel derecho muestra la recurrencia de la mutación para cada gen, y las mutaciones se muestran en el centro. **B.** Resumen comparativo de las alteraciones genómicas presentes en los modelos PDX y los modelos PDXDO. La leyenda describe los tipos de mutación resumidos en diferentes colores: mutaciones de ganancia de codón de parada (rosa); mutaciones con desplazamiento en el marco de lectura (naranja); mutaciones de *splicing* (azul claro); pérdida (azul oscuro); mutaciones sin sentido (verde oscuro); ganancia (rojo); mutaciones sin desplazamiento en el marco de lectura (verde claro); mutaciones sinónimas (amarillo).

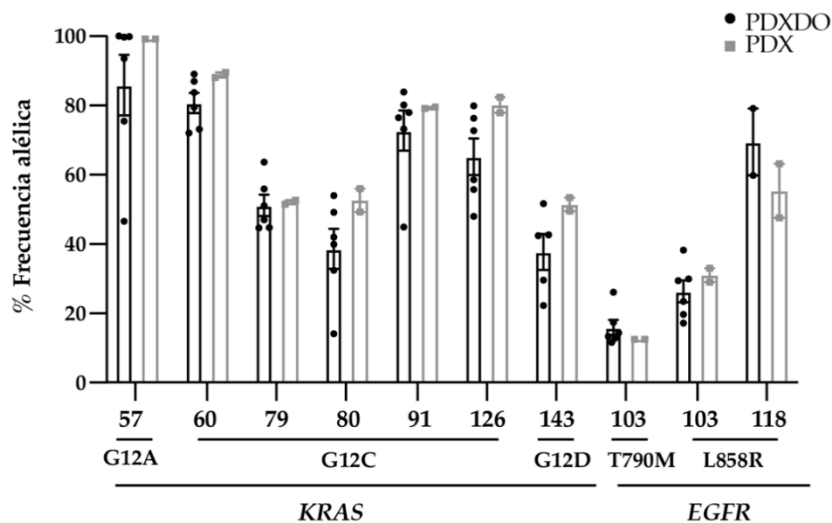


Figura 25. Evolución de las frecuencias alélicas de las mutaciones conductoras de los modelos de adenocarcinoma. Frecuencias alélicas (en %) de la mutación conductora de los modelos *KRAS* y *EGFR* mutados (*KRAS* G12A, G12C o G12D; *EGFR* T790M o L858R) en los cultivos de PDXDO y en los modelos PDX de adenocarcinoma de la colección. La frecuencia alélica se evaluó mediante ddPCR. Los datos muestran la media de 6 ratones en los modelos PDX y la media de 2 cultivos PDXDO en pasajes tardíos. Los datos se muestran como media \pm SEM. Los valores de p se obtuvieron con la prueba U de Mann-Whitney siendo $p > 0.05$ (ns, no significativo) en todos los modelos.

2.3. Estudio de la respuesta de los PDXDO de adenocarcinoma de pulmón a quimioterapia y terapias dirigidas

Para validar si los PDXDO son útiles como herramienta preclínica de estudio de sensibilidad de drogas *in vitro*, se generaron curvas dosis-respuesta para diferentes drogas y se calcularon las IC_{50} , para posteriormente comparar los resultados obtenidos *in vitro* con los obtenidos *in vivo* y ver si se reproducen los mismos resultados.

Se evaluó la respuesta a quimioterapia en modelos con *KRAS* mutado y modelos sin mutación en *KRAS*, y al igual que en los modelos PDX presentaban una sensibilidad a los distintos fármacos independiente de la presencia de mutación en *KRAS*. Adicionalmente, observamos una correlación entre la respuesta *in vivo* e *in vitro*, siendo el modelo TP40 resistente a carboplatino, tanto *in vitro* como *in vivo* (Tabla 11A).

Tabla 11. Sensibilidad de los modelos PDXDO a quimioterapia y a terapias dirigidas. A. Efecto del carboplatino, cisplatino, docetaxel y paclitaxel en los cultivos de PDXDO de modelos con mutación en *KRAS* (*KRAS*-G12C; TP79 y TP91) y en modelos sin mutación en *KRAS* (no mut; TP43 y TP70). **B.** Efecto de osimertinib y erlotinib en los cultivos PDXDO del modelo TP103 con mutación en *EGFR*. Se realizaron ensayos para calcular la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento (IC_{50}) con todos los fármacos anteriormente citados. Los datos se muestran como media \pm SD. Se representa el TGI (inhibición del crecimiento tumoral) del tratamiento *in vivo* en el modelo PDX. El TGI se calcula como: $1 - (\text{crecimiento promedio relativo final del grupo tratado} / \text{crecimiento promedio relativo final del grupo control}) \times 100$

A			IC ₅₀ (μM) (PDXDO)			
Modelo	Mutación <i>KRAS</i>	TGI Carboplatino (PDX)	Carboplatino	Cisplatino	Docetaxel	Paclitaxel
TP79	G12C	50,2	261,7 \pm 50,3	58,6 \pm 9,9	102,1 \pm 21,3	20,5 \pm 0,6
TP91		56,3	287,3 \pm 47	193,3 \pm 48	169,6 \pm 12,9	42,1 \pm 6,2
TP40	no mut	25,2	319,9 \pm 72,5	146,2 \pm 33,9	135,1 \pm 33,4	31,6 \pm 29,1
TP70		40,7	57,9 \pm 2,4	91,5 \pm 6,5	24,5 \pm 21,9	2,3 \pm 0,6

B		TGI (PDX)		IC ₅₀ (μM) (PDXDO)	
Modelo	Mutación <i>EGFR</i>	Erlotinib	Osimertinib	Erlotinib	Osimertinib
TP103	L858R/T790M	58,9	80,2	123,4 \pm 42,9	0,6 \pm 0,1

Se evaluó la respuesta a erlotinib y a osimertinib en el modelo TP103 que presenta la doble mutación de *EGFR*, presentando mayor sensibilidad frente a osimertinib (Tabla 11B), coincidiendo con el resultado obtenido en el tratamiento *in vivo* del mismo modelo y con los datos obtenidos en la clínica (Tabla 10B y Figura 21B).

Estos resultados sugerían que nuestros PDXDO podrían predecir *in vitro* las respuestas farmacológicas obtenidas en los pacientes con el mismo fondo genético, lo que justificaría su uso para realizar estudios de evaluación de nuevas estrategias terapéuticas.

Además, utilizamos la colección de modelos PDXDO para realizar ensayos con dos fármacos en combinación. Así, se utilizaron varios fármacos de quimioterapia en combinación (carboplatino, cisplatino, docetaxel, paclitaxel) y se calculó si presentaban o no efecto sinérgico o aditivo. Comprobamos que, como ocurre en la clínica, las combinaciones de platinos con taxanos presentaban un efecto sinérgico o aditivo en todos los modelos testados. Lo que una vez más validaba la utilización de nuestros modelos PDXDO para el testaje de eficacia de nuevas estrategias terapéuticas, incluidas las terapias en combinación (Figura 26).

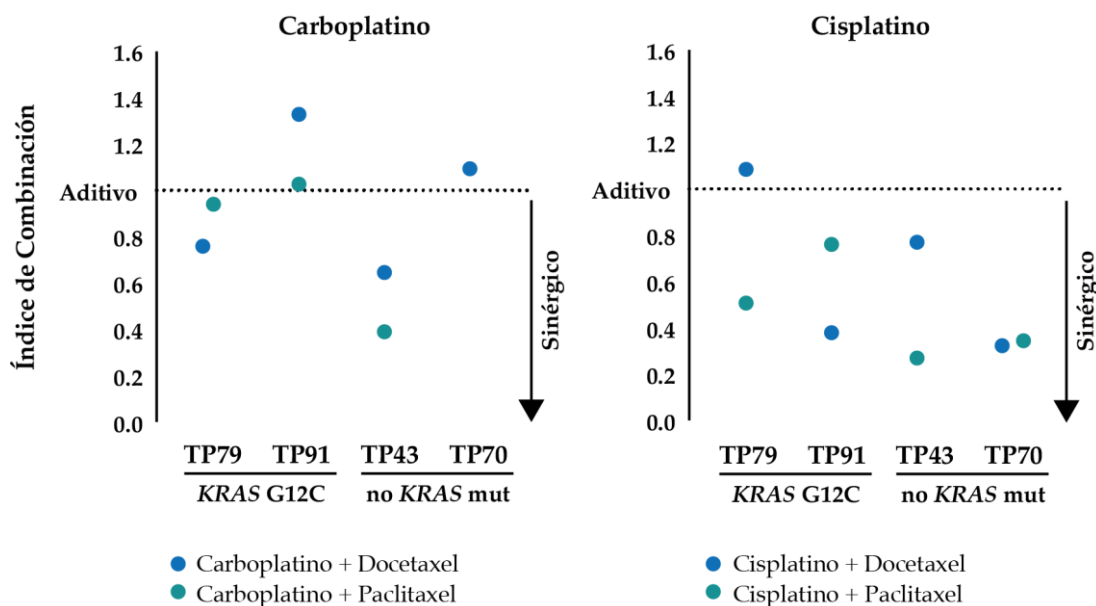


Figura 26. Estudio del efecto sinérgico o aditivo de diferentes terapias en combinación utilizando nuestra colección de modelos PDXDO. Efecto del tratamiento de la combinación de fármacos de quimioterapia: carboplatino + docetaxel, carboplatino + paclitaxel, cisplatino + docetaxel y cisplatino + paclitaxel. Se realizaron ensayos para calcular la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento (IC_{50}) con cada uno de los fármacos en monoterapia y en combinación. Con estos datos de IC_{50} se calculó el índice de combinación (CI₅₀) de la combinación siendo este menor de 1 con efecto sinérgico. Se trataron modelos PDXDO con mutación en *KRAS* (*KRAS*-G12C; TP79 y TP91) y modelos de adenocarcinoma sin mutación en *KRAS* (no *KRAS* mut; TP43 y TP70).

3. Generación y caracterización de modelos PDX humanizados de CPNM como herramienta preclínica *in vivo* para la evaluación de estrategias de inmunoterapia

Una de las mayores limitaciones para los ensayos preclínicos con inmunoterapia es la disponibilidad de modelos experimentales apropiados. Dado que nuestros modelos PDX creciendo en ratones inmunodeprimidos *nude* carecen de gran parte del sistema inmune, generamos modelos PDX humanizados en ratones inmunodeprimidos en los que reemplazamos su sistema inmune parcialmente con la inyección de PBMCs o más completamente con la inyección de células CD34+ aisladas de SCU.

3.1. Generación y caracterización de modelos PDX humanizados con células PBMCs

Para generar este modelo PDX humanizado inyectamos células PBMCs aisladas de capas leucocitarias de muestras de sangre de donantes sanos en ratones NSGs a los que previamente habíamos implantado el tumor de un modelo PDX. Tras 21 días desde la inyección, se determinó el porcentaje de células huCD45+ por citometría de flujo en ratones control a los que no se les había inyectado PBMCs (control no humanizado; no-huNSG), y

en ratones humanizados (huNSG), confirmando que sólo en estos detectábamos células humanas CD45+ en sangre (Figura 27A y 27B). Además, analizamos otras poblaciones inmunes mediante tinciones de IHQ en secciones de bazo de ratones no-huNSG y huNSG, en las que observamos que no se injertaron células mieloides en este modelo (Figura 27C). Estos resultados demostraban que en este modelo de humanización con PBMCs se producía el injerto exclusivamente de células T humanas, por lo que si sería un modelo válido para testar inmunoterapias que contengan anticuerpos dirigidos a PD-1, que se expresa por las células T. También comprobamos la presencia de células inmunes en el interior de los tumores PDX injertados (Figura 27D), mientras que estas células no se observaron en los ratones no-huNSG. Además, analizamos el crecimiento de los tumores en ambos grupos de ratones durante 21 días, y comprobamos que el crecimiento de los tumores se veía reducido en presencia de las células inmunes humanas de manera significativa (Figura 27E).

3.2. Generación y caracterización de modelos PDX humanizados con células CD34+

3.2.1. Aislamiento de las células CD34+ a partir de sangre de cordón umbilical y análisis de su pureza

Utilizamos sangres de cordones umbilicales donados para aislar las células CD34+ utilizando bolas magnéticas y un separador AutoMAcs como se indica en el apartado 2.2.2 de los materiales y métodos. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo las células CD34+ aisladas para cuantificar la pureza conseguida, mediante tinción con un anticuerpo anti-CD34-AF488. Así calculamos que el porcentaje inicial de células CD34+ en SCU era de entorno al 1% (con una desviación estándar del 0,4) y con una media de $6 \cdot 10^5$ células extraídas por SCU. Tras la separación, el porcentaje promedio de pureza obtenido fue del 88,7%, con una desviación de 5,8%. Se estimaron, entonces, un promedio de 7 muestras de SCU necesarias para humanizar un grupo de 40 ratones (10^5 células CD34+/ratón) que utilizaríamos para cada estrategia terapéutica a testar.

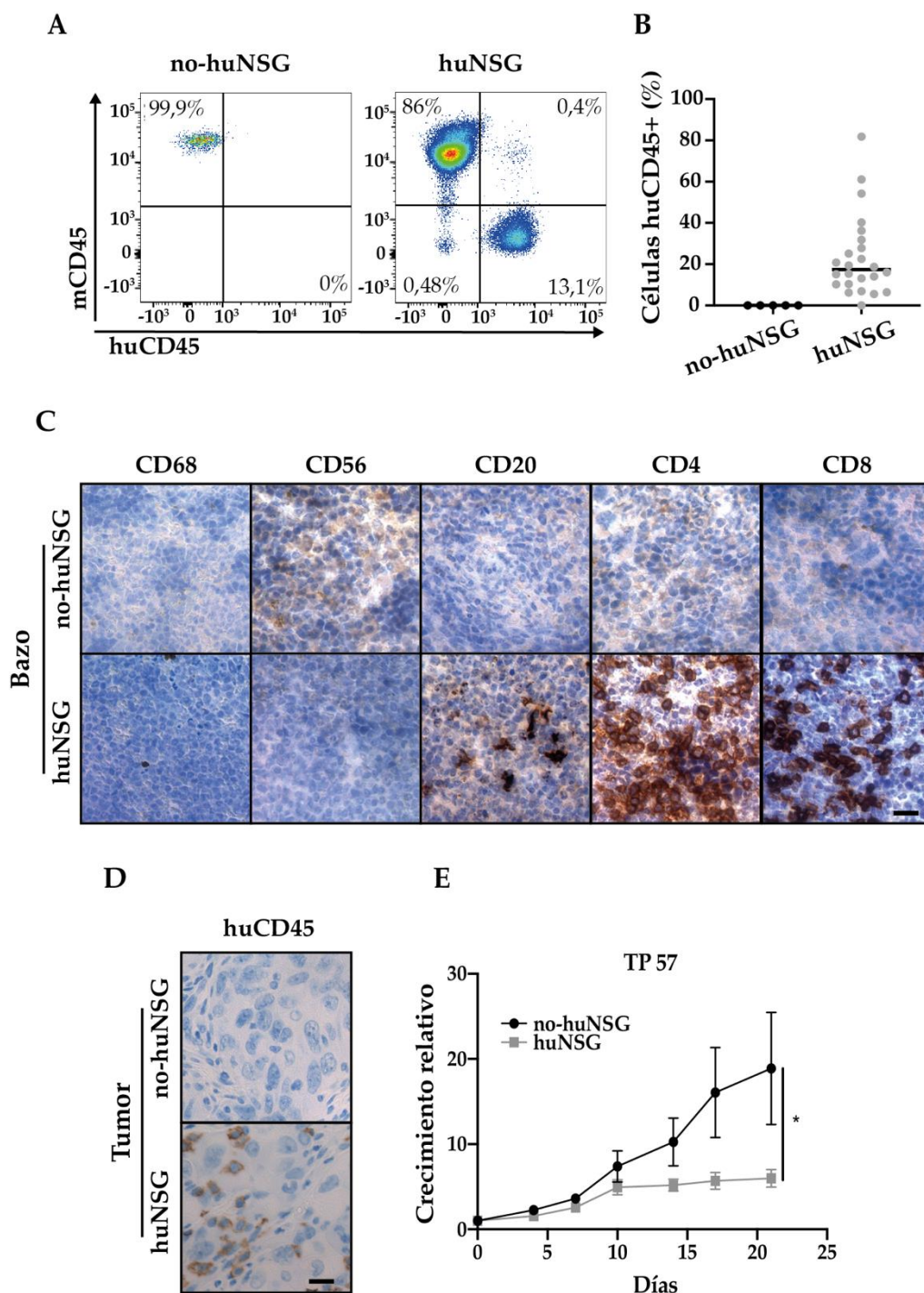


Figura 27. Caracterización de los modelos PDX humanizados con células PBMCs. **A.** Porcentaje de células humanas CD45+ (huCD45) y células murinas CD45+ (mCD45) en sangre en un ratón no humanizado (no-huNSG) y otro humanizado (huNSG) representativos tras 21 días de la inyección con PBMCs. **B.** Porcentaje promedio de células huCD45+ en sangre en los 25 ratones humanizados con PBMCs. **C.** Análisis de la presencia de distintas poblaciones inmunes en bazo de ratones no-huNSG y huNSG por tinción de IHQ tras 21 días de la inyección de PBMCs: marcadores de macrófagos (CD68), células NK (CD56), células B (CD20) y células T (CD4 y CD8). **D.** Análisis por tinción de IHQ de la presencia de células huCD45+ infiltradas en el tumor PDX TP57 tras 21 días de la inyección de PBMCs. **E.** Efecto de la humanización por PBMCs en el crecimiento tumoral del PDX tras los 21 días de la inyección (n=5). Los datos se muestran como media ± SEM. Los valores de p para el ensayo *in vivo* se obtuvieron con la prueba U de Mann-Whitney (*, p < 0.05).

3.2.2. Humanización y análisis del porcentaje de humanización tras la inyección de células CD34+ en ratones NSG

Una vez aisladas las suficientes células CD34+, se inyectaron por vena de cola en grupos de 20 o 40 ratones NSG mielo-ablacionados como se indica en el apartado 2.2.2. de materiales y métodos. Transcurridos 2-3 meses desde la inyección de las células CD34+, evaluamos por citometría de flujo la presencia de células humanas CD45+ (huCD45) en la sangre de los ratones y analizamos el efecto del donante en la humanización de los ratones. Para ello, cuantificamos y representamos los porcentajes de humanización de cada ratón agrupándolos según la sangre de cordón donante utilizada (Figura 28). El porcentaje de humanización fue independiente de la muestra de la que provenían las células CD34+. Solamente en uno de los 3 experimentos de humanización realizados, en el que implantamos el modelo PDX TP79, los ratones humanizados con las células CD34+ provenientes del donante 3 presentan un porcentaje de injerto significativamente superior al resto de donantes (Figura 28C).

En total realizamos tres experimentos de humanización con tres modelos PDX distintos. En los tres casos, las tasas de éxito de injerto del tumor fueron similares a los que veíamos en los ratones *nude* (Tabla 12). En el primer experimento (TP57) se inyectaron 20 ratones con un porcentaje de injerto a los 3 meses del 100%, y con un porcentaje medio de células huCD45 de 50,4%. En el segundo experimento (TP143), el porcentaje de injerto fue de 61,5%, con 37,5% de huCD45. Sin embargo, al analizar los cortes al finalizar el tratamiento, algunos ratones habían perdido la humanización, hallazgo ausente en el caso previo (TP57). Para evitar la deshumanización, en el caso del tercer experimento (TP79) se adelantó a los 2 meses la evaluación de la humanización y el implante del tumor del modelo PDX. Así, durante el tercer mes se completó la humanización mientras crecieron los tumores, y en este caso, se consideró que los ratones estaban humanizados si presentaban un porcentaje mayor del 15% de células huCD45+ a los 2 meses (en vez del 25% que se consideró a los 3 meses). Considerando este porcentaje, 60% de los ratones estaban humanizados con un porcentaje medio de huCD45+ en sangre de 28,6% (Tabla 12).

Confirmamos la presencia de células huCD45+ sólo en los ratones que previamente habían sido inyectados con células CD34+ (Figura 29A). Además, realizamos una caracterización más profunda de la composición de las poblaciones de células humanas en médula ósea y en bazo, observando la presencia de marcadores de macrófagos (CD68), NK (CD56) células B (CD20) y células T (CD4 y CD8) sólo en los ratones huNSG, confirmando la especificidad y el nivel de humanización logrado (Figura 29B). Se implantó entonces el tumor proveniente del mismo modelo PDX (TP57, TP143 y TP79) en ratones huNSG y en no-huNSG. Para determinar el grado de infiltración de células inmunes en los tumores de los PDX realizamos tinciones de IHQ con el marcador de leucocitos, huCD45. Los tumores crecidos en ratones huNSG mostraron células huCD45+ que no se detectaron en los tumores crecidos en ratones no-huNSG. En la figura 29C se muestra la infiltración en el tumor del

modelo TP57 tras 5 meses de la inyección de las células CD34+ (Figura 29C). Esto sugiere que las células inmunes infiltradas derivan de las células CD34+ y no de las células inmunes humanas supervivientes de los tumores originales. Al analizar la velocidad de crecimiento de los tumores en ratones huNSG, no observamos diferencias con los no-huNSG (p.e. TP79; Figura 29D).

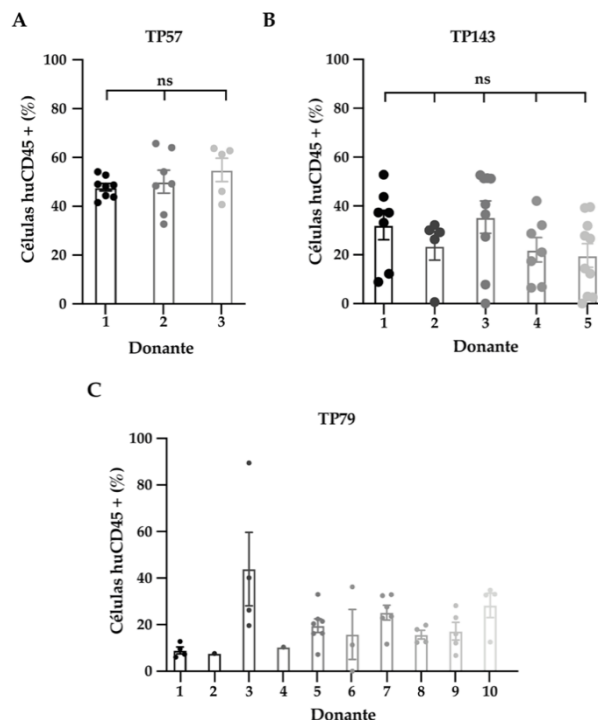
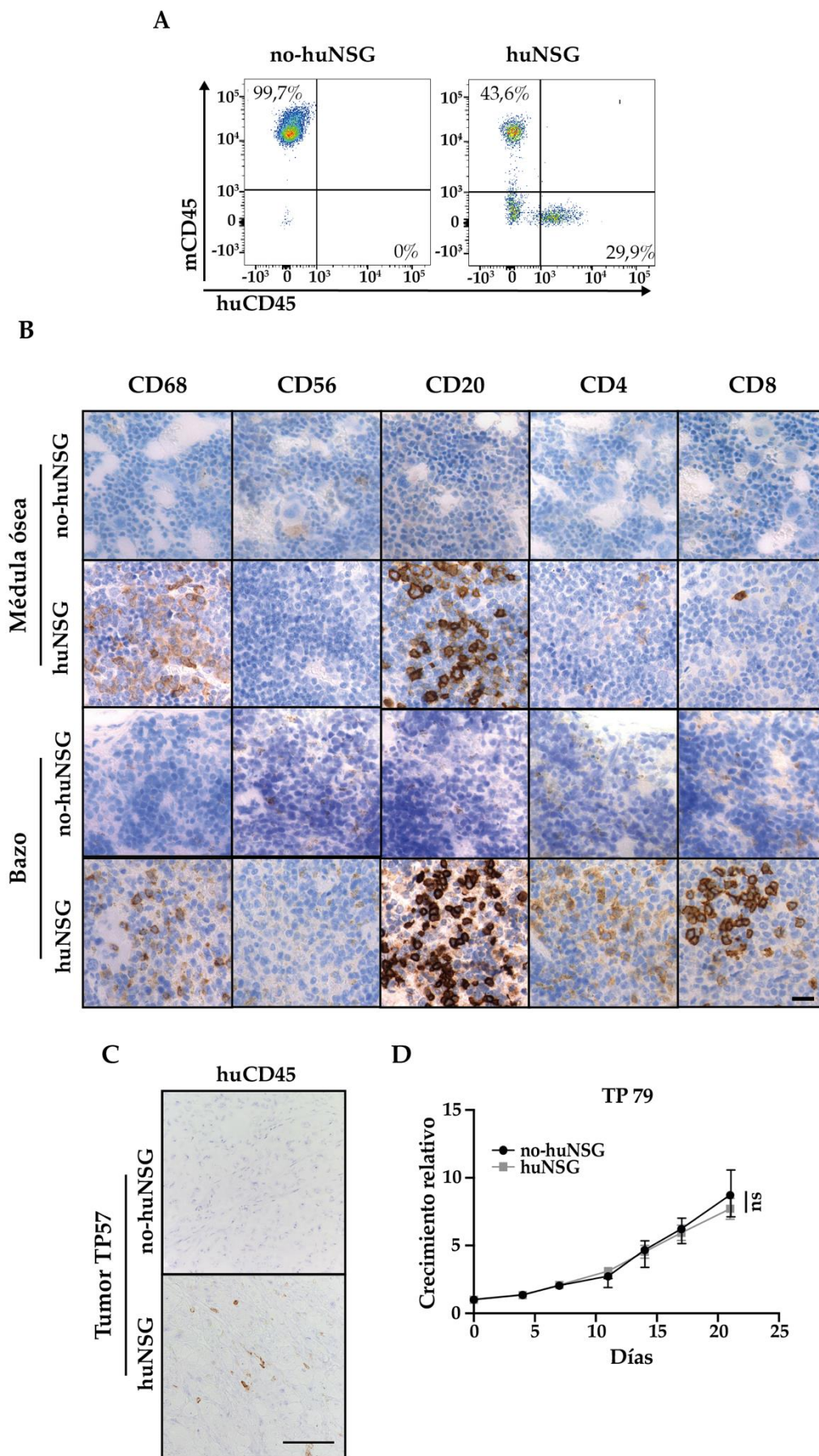


Figura 28. Efecto del donante en la humanización de los ratones. Porcentaje promedio de células humanas CD45 positivas (huCD45+) de los ratones inyectados con células CD34+ provenientes del mismo donante en los 3 experimentos realizados. Cada punto representa un ratón inyectado con las células extraídas del mismo donante. **A.** TP57 **B.** TP143 **C.** TP79. Los datos se muestran como media \pm SEM. El valor de p se obtuvo con la prueba ANOVA para el modelo TP57 y con el método Kruskal Wallis para los modelos TP79 y TP143. (ns, $p > 0.05$, no significativo)

Tabla 12. Análisis de la humanización en los diferentes experimentos y efecto en el éxito de injerto del tumor de los modelos PDX TP57, TP143 y TP79. Las semanas de análisis CF muestra las semanas transcurridas desde la inyección de las células CD34+ hasta que se analizó el porcentaje de células humanas CD45+ (huCD45+) en sangre por citometría de flujo. El éxito de injerto muestra el porcentaje de ratones que presentan crecimiento tumoral de los implantados. Los datos se muestran como media \pm SD

Nº exp.	Modelo	Semanas de análisis CF	n ratones inyectados	n ratones humanizados	Células huCD45+ (% promedio) \pm SD	Éxito de injerto del tumor (% en huNSG)	Éxito de injerto del tumor (% en nude)
1	TP57	12	20	20	50,4 \pm 9,44	90,00	86,40
2	TP143	12	39	24	37,5 \pm 8,99	79,20	72,50
3	TP79	8	40	24	28,6 \pm 14,76	100,00	73,30

Abreviaturas: CF (citometría de flujo); huNSG (ratones humanizados); SD (desviación estándar)



(pie de figura pág. Sig)

Figura 29. Caracterización de los modelos humanizados con células CD34+. **A.** Porcentaje de células humanas CD45+ (huCD45) y células murinas CD45+ (mCD45) en la sangre de un ratón representativo no humanizado (no hu-NSG) y otro humanizado (hu-NSG) tras 3 meses de la inyección de las células CD34+. **B.** Análisis de la presencia de distintas poblaciones inmunes humanas mediante tinciones de IHQ en secciones de médula ósea y bazo de ratones no-huNSG y huNSG de ratones control tras 3 meses de la inyección de las células CD34+: marcadores de macrófagos (CD68), células NK (CD56), células B (CD20) y células T (CD4 y CD8). **C.** Análisis por tinción de IHQ de la presencia de células huCD45+ infiltradas en el tumor del modelo PDX TP57 tras 5 meses de la inyección de células CD34+. **D.** Efecto de la humanización por inyección de células CD34+ en el crecimiento tumoral del modelo TP79. Los datos se muestran como media \pm SEM. Los valores de p para el ensayo *in vivo* se obtuvieron con la prueba T no pareada (ns, no significativo).

4. Evaluación de nuevas estrategias terapéuticas en modelos PDXDO, PDX, PDX humanizados y GEMMs de CPNM con KRAS mutado

Una vez generados y caracterizados los modelos preclínicos, el interés del proyecto se centró en evaluar nuevas estrategias terapéuticas que podrían ser de utilidad para el tratamiento de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón con *KRAS* mutado, basadas en la combinación con el inhibidor de CDK4/6 (CDK4/6i, abemaciclib). Las combinaciones de interés elegidas fueron CDK4/6i en combinación con un inhibidor de ERK1/2 (ERK1/2i, LY3214996), y una segunda combinación de CDK4/6i con inmunoterapia, en concreto con un inhibidor de PD-1 (pembrolizumab). La combinación de CDK4/6i con efectores de la vía de RAF/MEK/ERK es razonable pues la mutación en *KRAS* da lugar a la activación de esta vía de señalización, y la activación de la vía MAPK podría ser un mecanismo de resistencia a CDK4/6i (Tao et al., 2016). Además, varios estudios han descrito que los CDK4/6i pueden potenciar la respuesta inmune (Deng et al., 2018; S. Goel et al., 2017; Schaer et al., 2018).

4.1. Evaluación de la combinación de CDK4/6i con ERK1/2i

Para estudiar la eficacia de la combinación del CDK4/6i con ERK1/2i *in vitro* se utilizaron 13 modelos PDXDO derivados de los modelos PDX de adenocarcinoma. Posteriormente se analizó la respuesta *in vivo* en 4 modelos PDX seleccionados a partir de los ensayos *in vitro*.

4.1.1. Evaluación de la combinación CDK4/6i con ERK1/2i *in vitro*

Primero establecimos las mejores condiciones para evaluar la eficacia de estos compuestos en PDXDO, para ello testamos diferentes concentraciones y diversos ensayos de citotoxicidad. Finalmente analizamos la sensibilidad a CDK4/6i, a ERK1/2i y a la combinación (CDK4/6i + ERK1/2i) cuantificando la proliferación mediante la tinción de inmunofluorescencia con EdU (Figura 30).

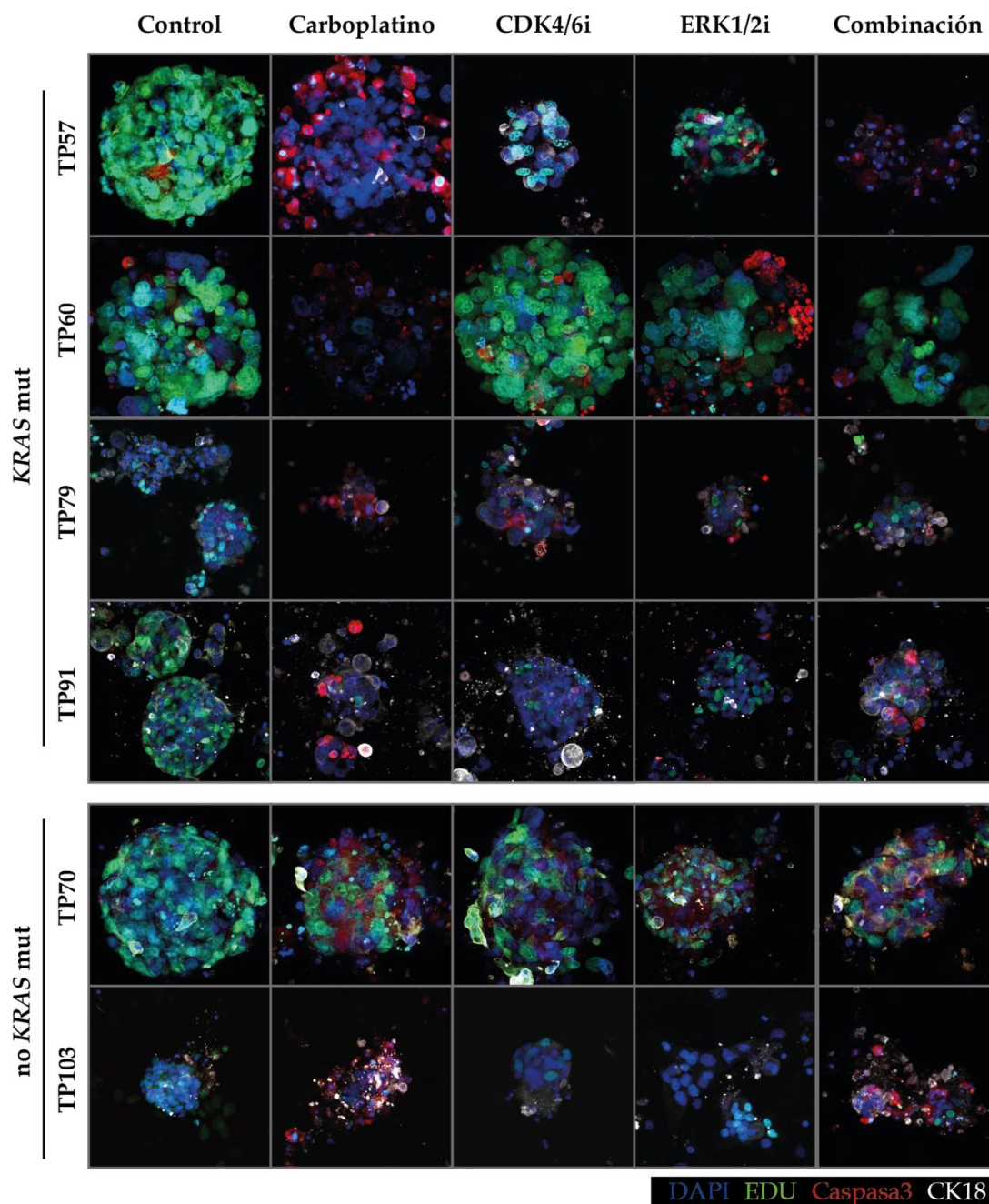


Figura 30. Sensibilidad de los PDXDO al tratamiento con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores. Tinción de inmunofluorescencia de los PDXDO tratados con CDK4/6i 10µM, ERK1/2i 10µM o la combinación de ambos fármacos a esa misma concentración durante 48 horas. Como controles utilizamos PDXDO tratados con el vehículo y con carboplatino (100µM). Todas las condiciones se cultivaron en presencia de EdU (10µM) durante 48h. Los PDXDO se tiñeron con EdU (verde), caspasa 3 (rojo) y citoqueratina 18 (CK18, blanco) y los núcleos con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de 4 modelos de adenocarcinoma con mutación en KRAS (KRAS mut; TP57, TP60, TP79 y TP91) y 2 modelos de adenocarcinoma sin mutación en KRAS (no KRAS mut; TP70 y TP103). Aumento original 20x.

Los cultivos de PDXDO se trataron con 10uM de cada uno de los fármacos en presencia de EdU (10uM) durante 48h, usando el carboplatino como control positivo de citotoxicidad. El tratamiento con CDK4/6i produjo una disminución en el número de células EdU positivas, es decir, una disminución de la proliferación de casi todos los PDXDO respecto al control (Figura 30). El tratamiento con ERK1/2i produjo una reducción en el tamaño de los organoides y un aumento de la caspasa-3 activa en casi todos los PDXDO, aunque no todos los modelos presentaron la misma sensibilidad a los fármacos (Figura 31). Respecto al CDK4/6i, 5 modelos se mostraron particularmente sensibles, tres modelos con *KRAS* mutado, el TP79, TP91 y TP148, y dos con *KRAS* nativo, el TP43 y el TP103. Tres modelos se mostraron resistentes: TP60, TP80 y TP134. En cuanto a ERK1/2i, todos los modelos PDXDO con *KRAS* mutados fueron sensibles y dos de los modelos con *KRAS* nativo eran resistentes (TP70 y TP134). Sin embargo, la combinación de ambos inhibidores mostraba eficacia remarcable en los 13 modelos tratados, independientemente de presentar o no mutación en *KRAS* y de presentar o no resistencia a los CDK4/6i.

A continuación, analizamos la activación de las vías de señalización en las distintas condiciones de tratamiento, y observamos una disminución en la fosforilación de retinoblastoma (pRB), en la fosforilación de la histona H3 (pHH3) y en la topoisomerasa II α (TopoII α), indicadores de la inhibición del ciclo celular producida por el CDK4/6i, en todos los modelos PDXDO, excepto en los tres que presentaban resistencia (TP60, TP80 y TP134) (Figura 32 y 33). El tratamiento con ERK1/2i produjo una disminución de la activación de la vía de ERK1/2 que disminuyó la fosforilación de la quinasa ribosomal S6 (pRSK), excepto en los modelos resistentes TP126, TP70 y TP134 (Figura 32 y 33). Además, con el CDK4/6i, observamos una disminución de la fosforilación de S6 (pS6) en todos los modelos, lo que podía deberse a la inhibición de la actividad de mTOR por CDK4/6i. El inhibidor de ERK1/2 indujo un aumento de p27. La combinación de ambos fármacos resultó en un mayor descenso en la fosforilación de pRB, pRSK y pS6 (Figura 32 y 33).

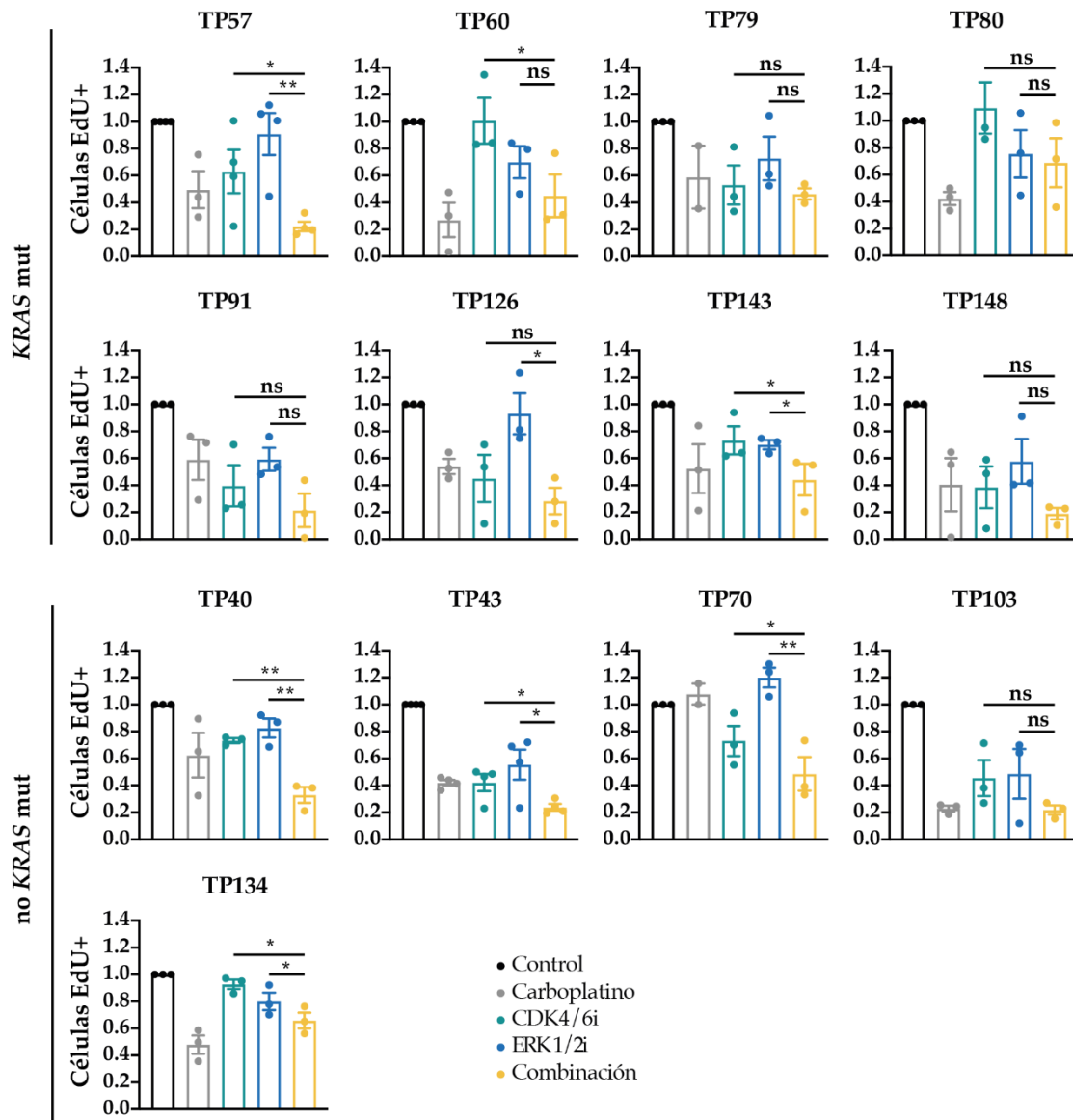


Figura 31. Cuantificación de la proliferación de los PDXDO tratados con con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores. Cuantificación de las células proliferativas medidas por el porcentaje de células EdU positivas tras el tratamiento de la Figura 30. Los PDXDO fueron tratados con CDK4/6i 10µM, ERK1/2i 10µM o la combinación de ambos fármacos a esa misma concentración durante 48 horas. Como controles utilizamos PDXDO tratados con el vehículo y con carboplatino (100µM). Todas las condiciones se cultivaron en presencia de EdU (10µM) durante 48h Los datos muestran la media de 3 réplicas en pases tardíos. Los datos se muestran como media ± SEM, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Los valores de p para el ensayo se obtuvieron con la prueba T (*, p < 0.05; **, p < 0.01; ns p > 0.05, no significativo.).

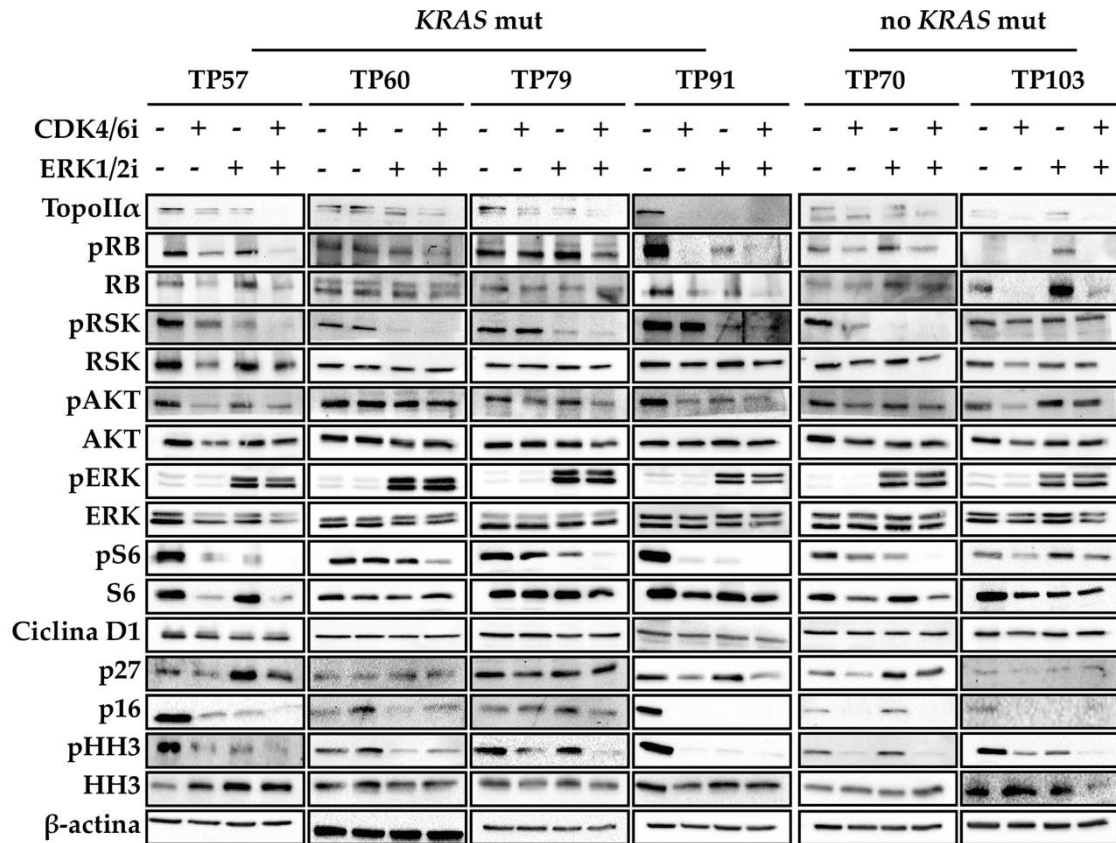


Figura 32. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores sobre las principales vías de señalización en los PDXDO. Western blot de las principales vías de señalización tras el tratamiento de los cultivos de PDXDO con vehículo, CDK4/6i 10 μ M, ERK1/2i 10 μ M o la combinación de ambos fármacos durante 48 horas en 4 modelos de adenocarcinoma con mutación en *KRAS* (*KRAS* mut; TP57, TP60, TP79, TP91) y 2 modelos de adenocarcinoma sin mutación en *KRAS* (no *KRAS* mut; TP70 y TP103). TopoII α (Topoisomerasa II alpha); pRB (Retinoblastoma fosforilado); RB (retinoblastoma); pRSK (quinasa ribosomal 90kDa S6 fosforilada); RSK (quinasa ribosomal 90kDa S6); pAKT (quinasa de proteínas B fosforilada); AKT (quinasa de proteínas B); pERK (quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 fosforilada); ERK (quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2); pS6 (proteína ribosomal S6 fosforilada); S6 (proteína ribosomal S6); pHH3 (Histona H3 fosforilada); HH3 (Histona H3).

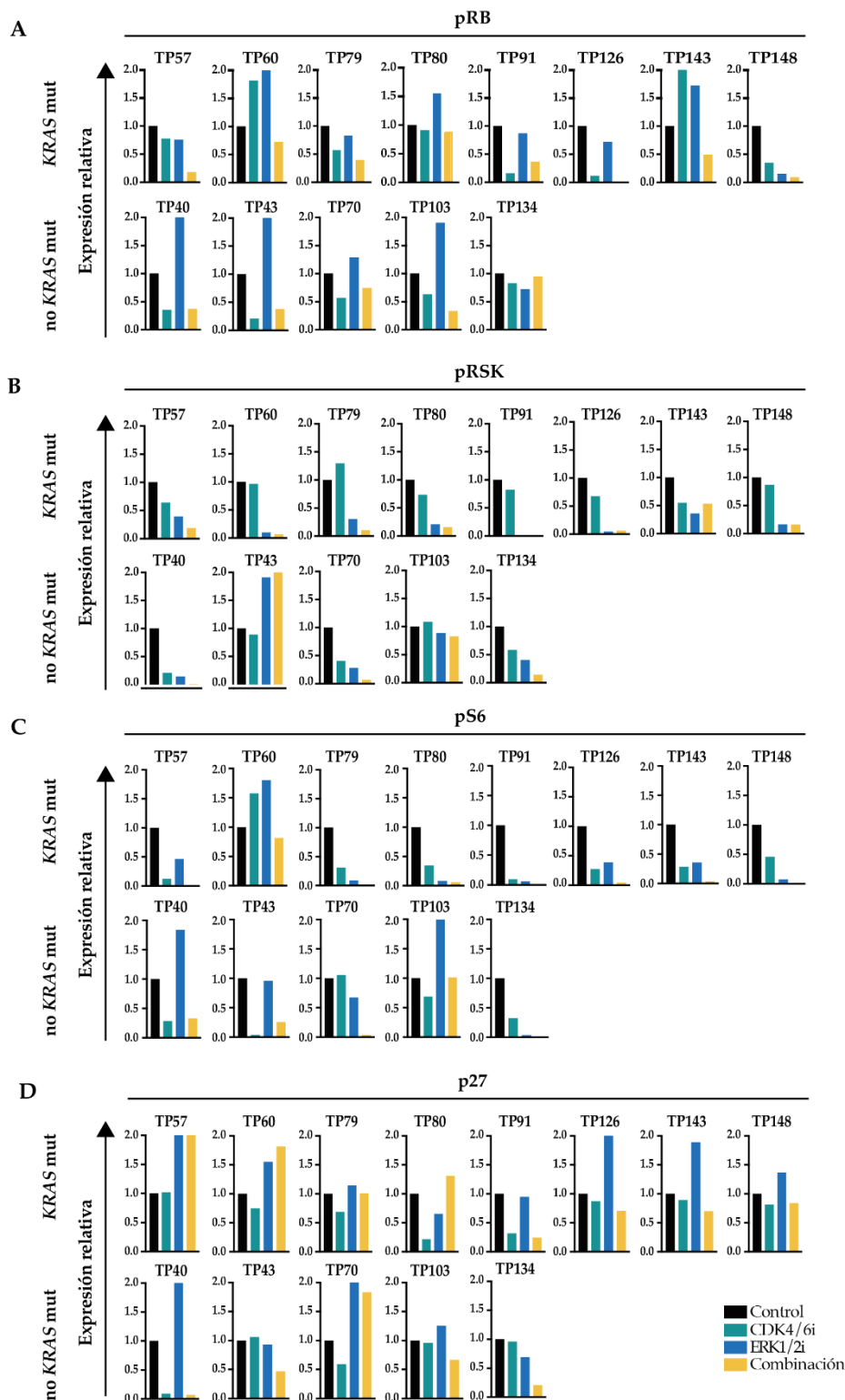


Figura 33. Cuantificación de las variaciones de expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular y en vías oncogénicas en los PDXDO tras el tratamiento con CDK4/6i, ERK1/2i o con la combinación de ambos inhibidores. En el eje vertical se representa la expresión de las proteínas indicadas en cada condición para los modelos con mutación en *KRAS* (*KRAS* mut; TP57, TP60, TP79, TP80, TP91, TP126, TP143, TP148) y sin mutación en *KRAS* (no *KRAS* mut; TP40, TP43, TP70, TP103, TP134). Los datos han sido normalizados a la condición control de cada modelo, que toma el valor 1. **A.** pRB (Retinoblastoma fosforilado) **B.** pRSK (quinasa ribosomal 90kDa S6 fosforilada) **C.** pS6 (proteína ribosomal S6 fosforilada) **D.** p27

4.1.2. Evaluación de la combinación CDK4/6i con ERK1/2i *in vivo*

A continuación, se comprobó la eficacia de la combinación CDK4/6i con ERK1/2i en los modelos PDX *in vivo*. Se eligieron 4 modelos PDX con *KRAS* mutado: tres modelos cuyo PDXDO mostró sensibilidad a CDK4/6i (TP57, TP79 y TP91) y un modelo cuyo PDXDO mostró resistencia (TP60). En los 4 modelos PDX se observó mayor sensibilidad con la combinación con una mayor reducción del crecimiento tumoral respecto a los grupos en monoterapia (Figura 34), al igual que ocurría en los PDXDO. En el caso del TP60, y en correlación con lo que ocurría *in vitro*, los tumores se mostraron resistentes al CDK4/6i, sin embargo, la combinación si fue eficaz en este modelo, aunque no significativamente más eficaz que con el ERK1/2i en monoterapia.

En relación a las rutas de señalización oncogénicas relacionadas con los fármacos, se observó que el CDK4/6i reducía la fosforilación de RB y de HH3 en los modelos TP79 y TP91 (Figura 35, 36C y 36D), pero no en el modelo TP60, resistente al tratamiento (Figura 35 y 36B). En el caso del tratamiento del modelo TP57, a pesar de responder al tratamiento, el análisis por western blot no muestra una disminución en la fosforilación de RB (Figura 36A). Tras la exposición al ERK1/2i, se observaba una reducción de la activación de las rutas de ERK con disminución de la fosforilación de pRSK en los modelos TP60, TP79 y TP91 (Figura 35 y Figura 36B, 36C, 36D), que no se apreció en el modelo TP57 (Figura 36A). La disminución de pS6 no fue tan pronunciada como la que se observa en los PDXDO.

De los 4 tratamientos realizados *in vivo*, tres modelos presentan sensibilidad a CDK4/6i (TP57, TP79 y TP91). En contraste, el modelo PDX TP60 no respondió, correlacionando con los resultados previos *in vitro*. La combinación en los 4 modelos fue más eficaz que la monoterapia tanto *in vivo* como *in vitro*.

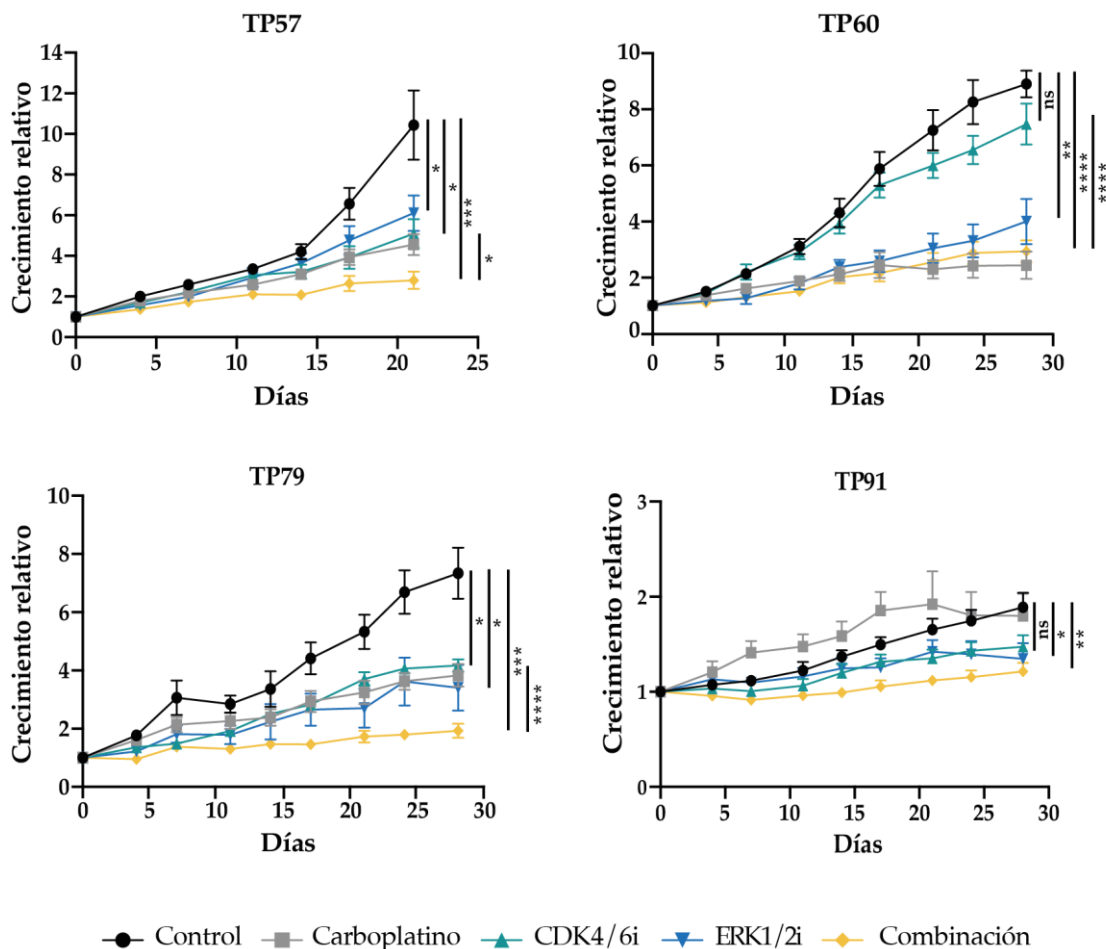


Figura 34. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores en modelos PDX con mutaciones en KRAS. Efecto de la administración de CDK4/6i y ERK1/2i en monoterapia y en combinación en el crecimiento de los tumores de los modelos PDX de adenocarcinoma de pulmón (modelos TP57, TP60, TP79, TP91). Los tratamientos tuvieron una duración de 28 días, a no ser que el rápido crecimiento de los tumores exigiera detenerlo antes (p.e. TP57). Se utilizaron grupos de 5-6 ratones (n=5-9 tumores) por grupo de tratamiento, con administración de vehículo (rama control), y con administración de los fármacos en monoterapia o en combinación. La dosis de CDK4/6i y ERK1/2i, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación, fue de 50 mg/kg/día tratándose de lunes a sábado en ambos casos, por vía oral. La dosis de carboplatino fue de 25 mg/kg, administrado 2 veces por semana. Los datos se muestran como media \pm SEM, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Los valores de p para el ensayo *in vivo* se obtuvieron con la prueba T no pareada (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, $p > 0.05$ no significativo). La estadística se calcula para los tratamientos con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores referidos al control tratado con el vehículo y para la combinación de ambos inhibidores referido al tratamiento con CDK4/6i en monoterapia.

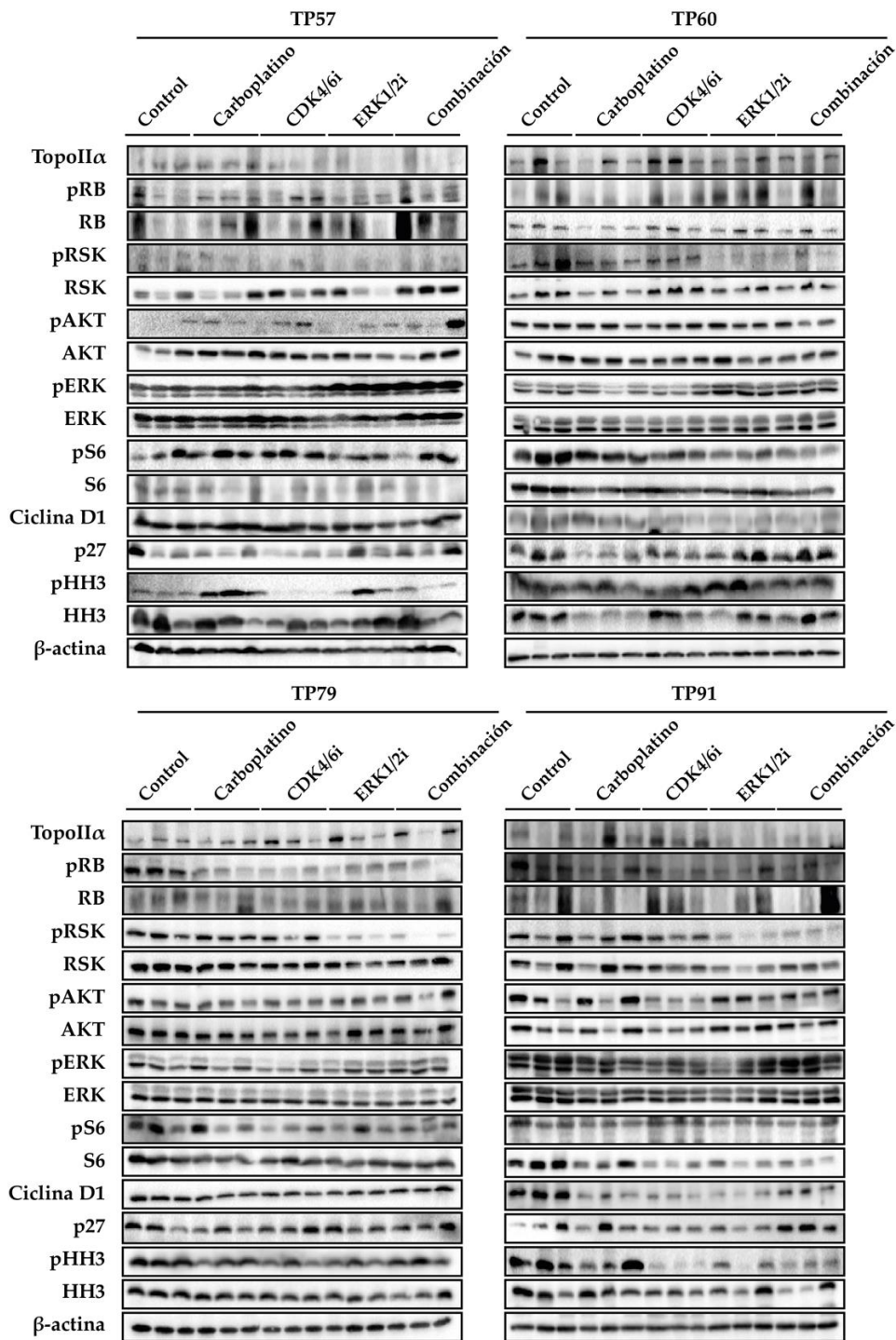


Figura 35. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, con ERK1/2i y con la combinación de ambos inhibidores sobre las principales vías de señalización. Western blot de las principales vías de señalización en muestras tumorales de 3 ratones por condición tras el tratamiento de los modelos PDX durante 28 días (Figura 34). La dosis de CDK4/6i y ERK1/2i, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación, fue de 50 mg/kg/día tratándose de lunes a sábado en ambos casos, por vía oral. TopoIIα (Topoisomerasa II alpha); pRB (Retinoblastoma fosforilado); RB (retinoblastoma); pRSK (quinasa ribosomal 90kDa S6 fosforilada); RSK (quinasa ribosomal 90kDa S6); pAKT (quinasa de proteínas B fosforilada); AKT (quinasa de proteínas B); pERK (quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 fosforilada); ERK (quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2); pS6 (proteína ribosomal S6 fosforilada); S6 (proteína ribosomal S6); pHH3 (Histona H3 fosforilada); HH3 (Histona H3).

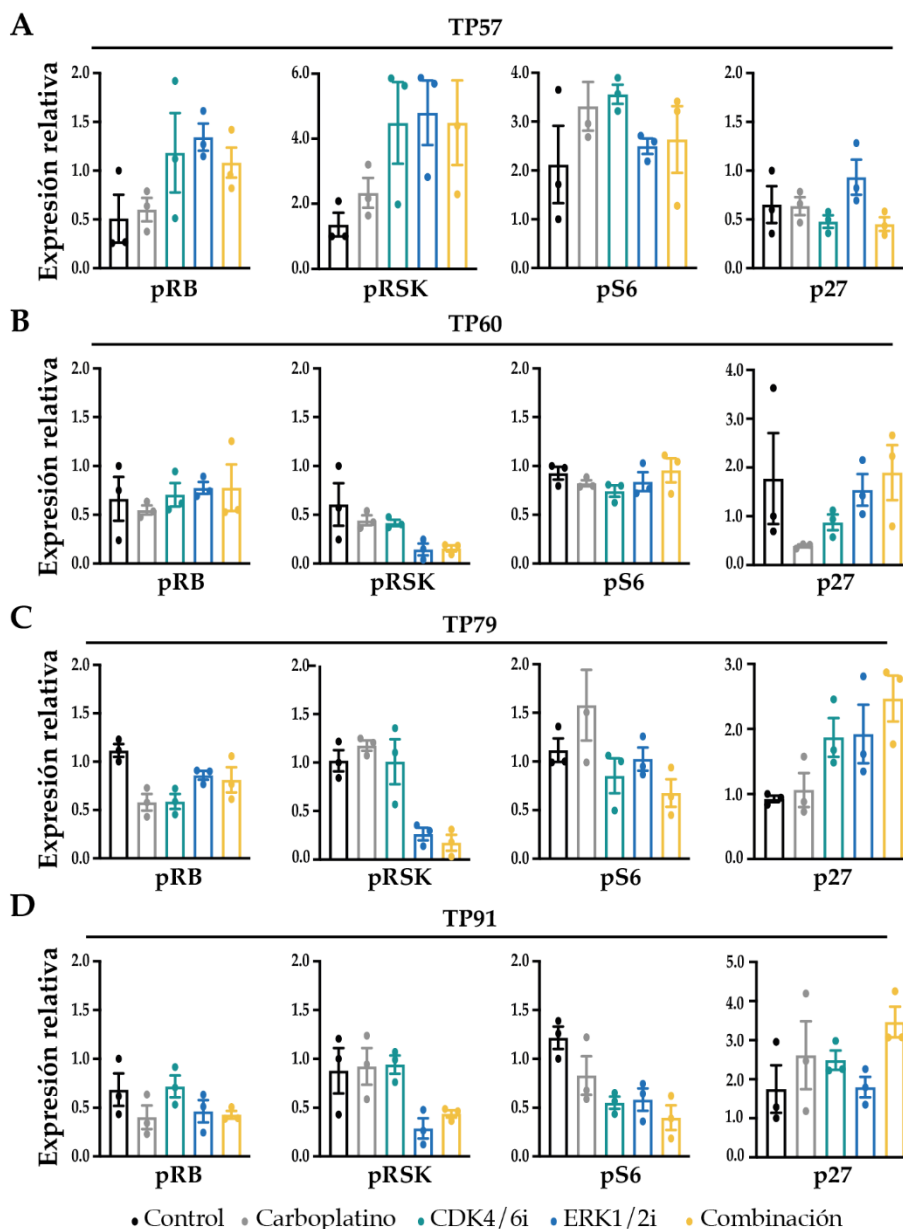


Figura 36. Cuantificación de las variaciones de expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular y en vías oncogénicas en los tumores PDX tras el tratamiento con CDK4/6i, ERK1/2i o con la combinación de ambos inhibidores. En el eje vertical se representa la expresión relativa de pRB (retinoblastoma fosforilado), pRSK (quinasa ribosomal 90kDa S6 fosforilada), pS6 (proteína ribosoma S6 fosforilada) y p27 en cada condición. Los datos se muestran como media \pm SEM, tras haber sido normalizadas a una muestra de la condición control. **A.** Muestras tumorales del tratamiento del modelo PDX TP57. **B.** TP60 **C.** TP79 **D.** TP91.

4.2. Evaluación de la combinación CDK4/6i con inmunoterapia

Para estudiar la eficacia de la combinación de CDK4/6i con fármacos de inmunoterapia *in vitro* se establecieron co-cultivos de PDXDO con linfocitos T. Para validar los tratamientos *in vivo* se utilizaron los modelos PDX humanizados con PBMCs, modelos PDX humanizados con células CD34+ y ratones GEMMs. Los modelos PDX seleccionados fueron de adenocarcinomas con mutación en *KRAS* y expresión tumoral de PD-L1.

4.2.1. Evaluación de la combinación CDK4/6i con inmunoterapia *in vitro*

Se eligió el modelo TP143 con mutación en *KRAS* y con alta expresión de PD-L1 (100% PD-L1+) para establecer co-cultivos de organoides con células T aisladas de sangre de donantes sanos. Tras 3 días con el cocktail de activación, las células T presentaban más del 60% de activación de los linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en comparación con la muestra control. Una vez los PDXDO estaban formados, se añadieron las células T activadas al medio en presencia de CDK4/6i, un anticuerpo anti-PD-1 (pembrolizumab) o ambos fármacos, manteniendo pocillos control sin células T y con células T sin fármacos. Los tratamientos se analizaron con tinciones de IF, confirmando en primer lugar la infiltración de las células T en el matrigel y en los organoides (Flechas amarillas, Figura 37).

Observamos que el tratamiento con el CDK4/6i producía una disminución en la proliferación de los PDXDO que se reflejó en una disminución del número de células positivas para EdU y en un menor tamaño de los organoides tanto en los co-cultivos con células T como los cultivos sin células T. Sin embargo, con la presencia de células T aumentaba el número de células apoptóticas, que medimos con la expresión de caspasa-3. El tratamiento con anti-PD-1 no redujo significativamente la proliferación respecto al control ni se observó un aumento de caspasa-3. El tratamiento de los co-cultivos con CDK4/6i y anti-PD-1 en combinación no mostró una disminución mayor en la proliferación de los PDXDO comparado con el CDK4/6i en monoterapia. Tampoco se observó un aumento en la infiltración de células T (Figura 37B). Teniendo en cuenta estos resultados y la nula eficacia de la combinación *in vitro* se pasó a realizar los tratamientos *in vivo*.

A

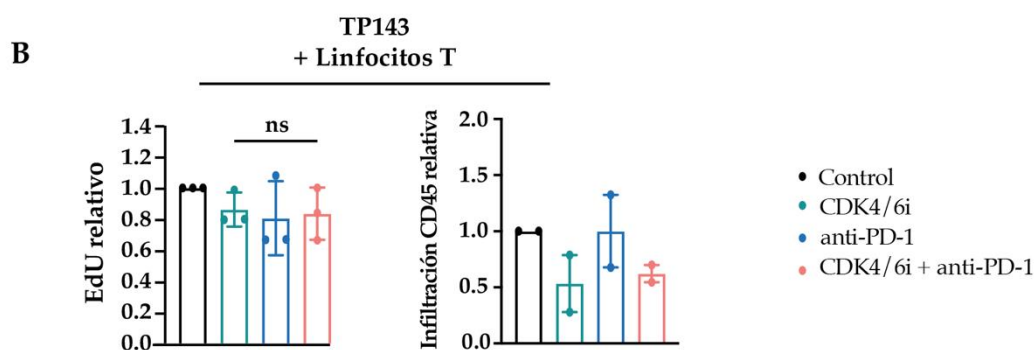
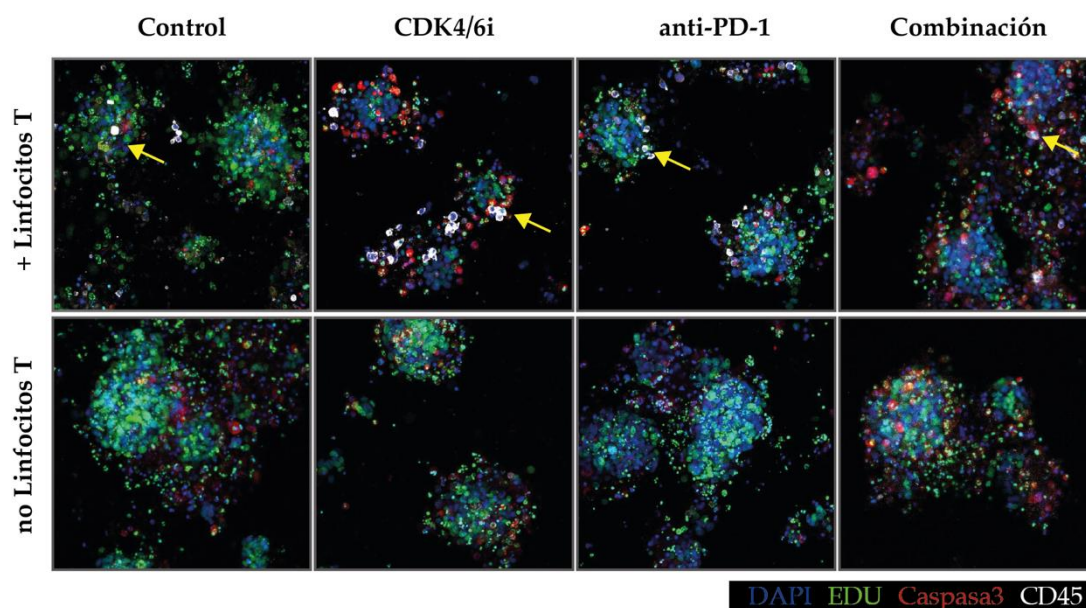


Figura 37. Evaluación en un modelo de co-cultivo *in vitro* de la eficacia del tratamiento con CDK4/6i, de un anticuerpo anti-PD-1 (pembrolizumab) y de la combinación de ambos fármacos. A. Inmunofluorescencia de los co-cultivos de PDXDO con linfocitos T. Los linfocitos previamente activados son añadidos al medio de cultivo junto con el vehículo (rama control), con CDK4/6i 10 μ M, anti-PD-1 (25mg/ml) o la combinación de ambos inhibidores. Todas las condiciones se cultivaron en presencia de EdU (10 μ M) durante 72h. Los PDXDO se tiñeron con EdU (verde), caspasa 3 (rojo) y CD45 (blanco) y los núcleos con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas del modelo de adenocarcinoma con mutación en *KRAS* TP143 con linfocitos T y como control las mismas condiciones sin linfocitos T en el medio de cultivo. Aumento original 20x **B.** Cuantificación de las células proliferativas medidas por el porcentaje de células EdU positivas (panel izquierdo) y de las células T infiltradas en los organoides tras el tratamiento (panel derecho). Los datos muestran la media de 3 réplicas. Los datos se muestran como media \pm SEM, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Los valores de p para el ensayo se obtuvieron con la prueba T (ns, $p > 0.05$, no significativo).

4.2.2. Evaluación de la combinación CDK4/6 i con inmunoterapia *in vivo* en modelos PDX humanizados con PBMCs

Como se ha descrito en el apartado 3.1. de esta sección, el modelo PDX humanizado mediante la inyección intraperitoneal de PBMCs en ratones inmunodeprimidos con tumores PDX sería un modelo adecuado para testar inmunoterapias. Elegimos el modelo PDX TP57 con mutación en *KRAS* y expresión de PD-L1 (96% PD-L1+) para tratar con la combinación anti-PD-1 y anti-CTLA-4 (pembrolizumab y ipilimumab), y la triple combinación CDK4/6i con anti-PD-1 y anti-CTLA-4 (Tabla 3). Observamos que en este modelo PDX humanizado el tratamiento con inmunoterapia no tenía ningún efecto en los tumores, ni en el grupo de ratones tratados con inmunoterapia sola ni en el grupo de los ratones tratados con inmunoterapia en combinación con el CDK4/6i, siendo solo significativa la reducción del crecimiento cuando los ratones son tratados con CDK4/6i, en monoterapia o en la rama de la triple combinación (Figura 38A). Cuando analizamos la activación de las vías de señalización se observó una disminución del ciclo celular con el tratamiento de CDK4/6i (Figura 38B). Al finalizar el tratamiento, se analizó la infiltración de células CD45+ humanas en los tumores de las diferentes condiciones de tratamiento, no observando un aumento de infiltración de células huCD45+ en ninguna condición comparando con los tumores control (Figura 38C; Figura 38D).

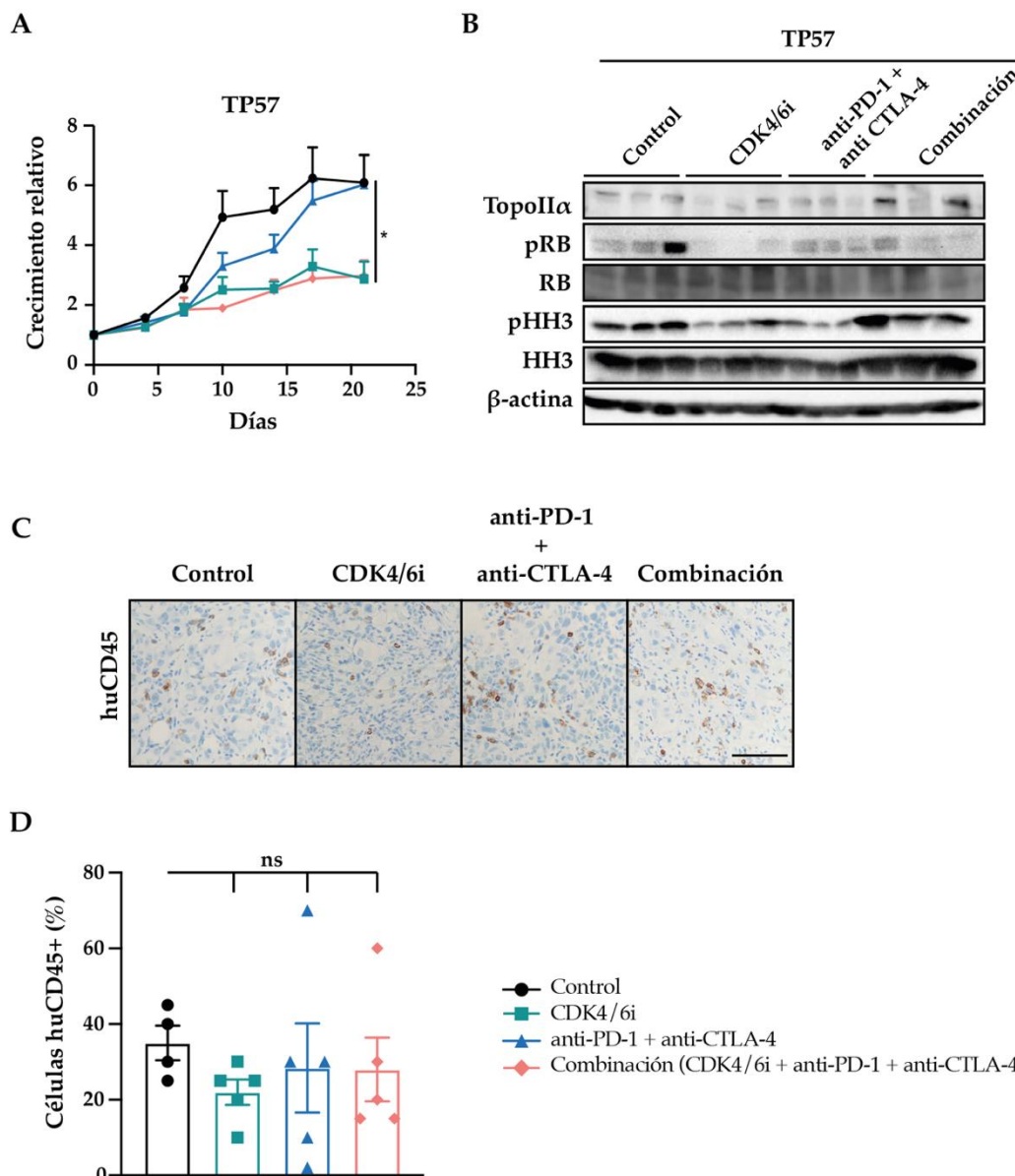


Figura 38. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CTLA-4 y de la combinación de los tratamientos en modelos PDX humanizados con PBMCs. **A.** Los ratones PDX con tumores crecidos con un volumen de 200mm³ fueron inyectados intraperitoneal con PBMCs y tratados a las 24 horas con vehículo (rama control), con CDK4/6i, anti-PD-1 (pembrolizumab), anti-CTLA-4 (ipilimumab) o la triple combinación de CDK4/6i con anti-PD-1 y anti-CTLA-4. El tratamiento duró 21 días. Se utilizaron grupos de 5 ratones por rama de tratamiento, excepto en la rama control n=4. La dosis de CDK4i, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación, fue de 50 mg/kg/día tratándose de lunes a sábado en ambos casos, por vía oral. El anti-PD-1 fue administrado intraperitonealmente dos veces por semana con una dosis inicial de 10mg/kg, siendo el resto de dosis a 5mg/kg. En el caso de anti-CTLA-4 se inyectó dos veces por semana intraperitoneal a 10mg/kg. Los datos se muestran como media ± SEM, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Los valores de p para el ensayo *in vivo* se obtuvieron con la prueba T no pareada (*, p<0.05). **B.** Western blot de la activación de las principales vías de señalización de 3 ratones por condición tras el tratamiento de los modelos PDX durante 21 días. **C.** Tinciones de IHQ para huCD45+ de un tumor representativo de cada condición. **D.** Cuantificación de células huCD45+ infiltradas en los tumores PDX de la condición control y en los tumores tratados con CDK4/6i, anti-PD-1 + anti-CTLA-4 y la combinación de fármacos. Los datos se muestran como media ± SEM. Los valores de p para el ensayo se obtuvieron con la prueba T no pareada (ns, p>0.05, no significativa). Barra de escala 0.1mm.

4.2.3. Evaluación de la combinación de CDK4/6i con inmunoterapia *in vivo* en modelos PDX humanizados con células CD34+

Tras observar que el tratamiento con la inmunoterapia no mostró efecto en los PDX humanizados con PBMCs, decidimos testar la combinación de CDK4/6i con inmunoterapia en el modelo humanizado más complejo generado tras la inyección de células CD34+. En este caso se eligieron 3 modelos PDX con *KRAS* mutado y con alta expresión de PD-L1 (TP57, 96% PD-L1+; TP79, 90% PD-L1+; TP143, 100% PD-L1+). En todos los casos observamos una cierta disminución del crecimiento tumoral en los ratones humanizados cuando son tratados con el anticuerpo anti-PD-1, aunque sólo de manera significativa en el modelo TP143 (Figura 39). El CDK4/6i, al igual que ocurría en los ratones atímicos sin humanizar, produjo una reducción significativa del crecimiento tumoral en todos los modelos PDX testados, sin embargo, en esta ocasión la combinación no resultó en una reducción mayor del crecimiento (Figura 39).

Cuando analizamos la activación de las vías de señalización por western blot observamos una disminución de las vías del ciclo celular bajo el tratamiento con el CDK4/6i (Figura 40). El tratamiento con CDK4/6i no produjo un aumento de la infiltración de células inmunes en el tumor (Figura 41), lo que podría explicar que la combinación no tuviera un mayor efecto en la reducción del crecimiento tumoral en estos modelos PDX humanizados.

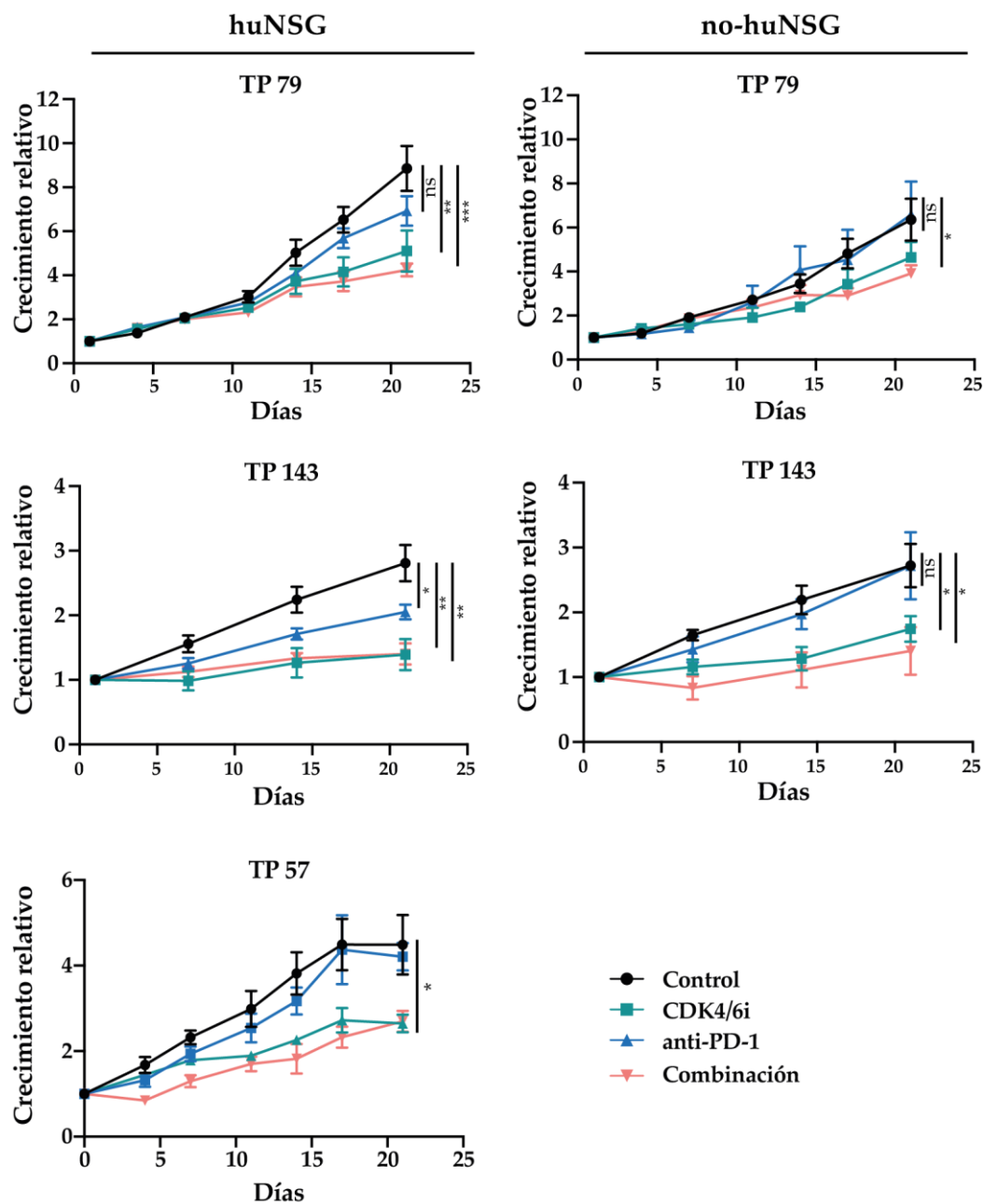


Figura 39. Efecto del tratamiento de CDK4/6i, del anticuerpo anti-PD-1 y de la combinación de ambos fármacos en modelos PDX humanizados con células CD34+. Los ratones humanizados con células CD34+, y con tumores PDX con un volumen de 200mm³ se trataron con vehículo (rama control), con CDK4/6i, anti-PD-1 (pembrolizumab) o la combinación de ambos fármacos. El tratamiento duró 21 días. Se utilizaron grupos de 5 ratones por rama de tratamiento. La dosis de CDK4/6i, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación, fue de 50 mg/kg/día tratándose de lunes a sábado en ambos casos, por vía oral. Anti-PD-1 fue administrado por vía intraperitoneal 2 veces por semana, la primera dosis administrada a una concentración de 10mg de pembrolizumab/kg/día, siendo el resto de dosis a 5mg de pembrolizumab/kg/día. Los datos se muestran como media ± SEM, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Los valores de p para el ensayo *in vivo* se obtuvieron con la prueba U de Mann-Whitney (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ns, p>0.05, no significativo).

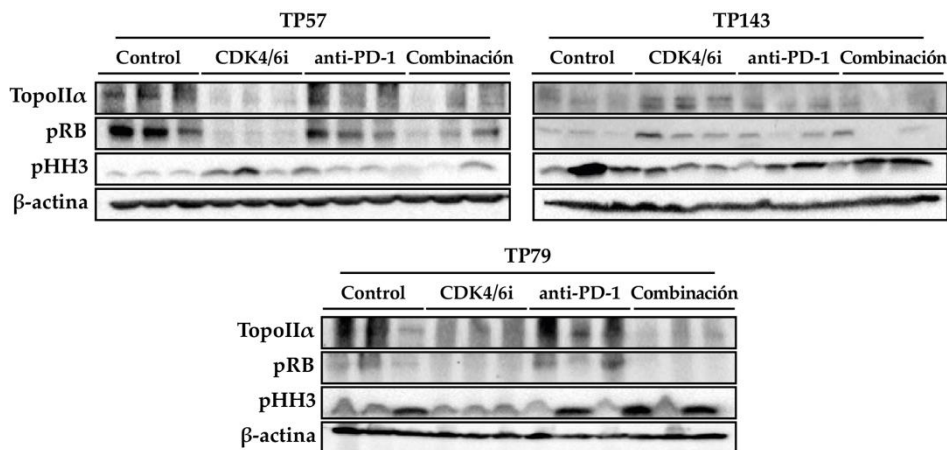


Figura 41. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, del anticuerpo anti-PD-1 y de la combinación de ambos tratamientos sobre la activación de vías de señalización en el modelo *in vivo* humanizado. Western blot de las principales vías de señalización de 3 ratones por condición tras el tratamiento de los modelos PDX humanizados durante 21 días. La concentración del CDK4/6i, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación, fue de 50 mg/kg/día tratándose de lunes a sábado en ambos casos, por vía oral. El anticuerpo anti-PD-1, pembrolizumab, fue administrado por vía intraperitoneal 2 veces por semana, la primera dosis administrada a una concentración de 10mg de pembrolizumab/kg/día, siendo el resto de las dosis a 5mg de pembrolizumab/kg/día. TopoIIα (Topoisomerasa II alpha); pRB (retinoblastoma fosforilado); pHH3 (Histona H3 fosforilada).

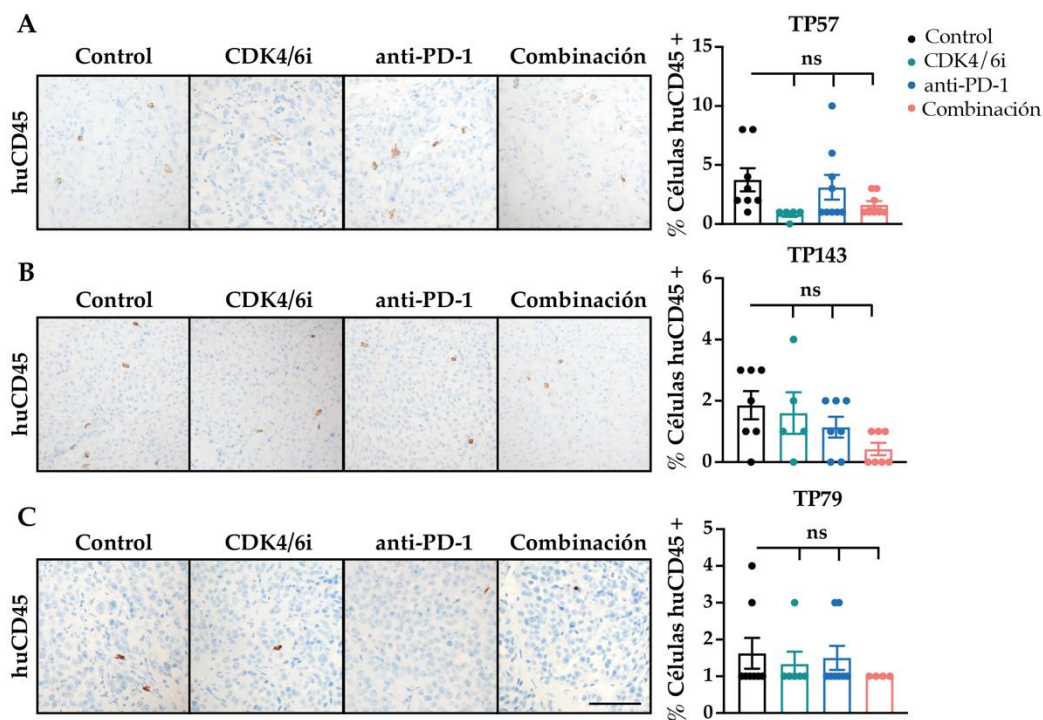


Figura 40. Infiltración de células inmunes en los tumores de los modelos PDX humanizados tratados con CDK4/6i, anticuerpo anti-PD-1 y de la combinación de ambos fármacos. Tinciones de IHQ para huCD45+ de un tumor representativo de cada condición. El panel de la derecha se muestra la cuantificación de células huCD45+ infiltradas en los tumores PDX de la condición control y en los tumores tratados con CDK4/6i, anti-PD-1 y la combinación de ambos fármacos. Los datos se muestran como media ± SEM. Los valores de p para el ensayo se obtuvieron con la prueba U de Mann-Whitney para los modelos TP57 y TP 79 y prueba T no pareada para el modelo TP143 (ns, p>0.05, no significativa). Barra de escala 0.1mm. A. Secciones tumorales representativas del modelo TP57 B.TP143 C.TP79.

4.2.4. Evaluación de la combinación de CDK4/6i con inmunoterapia *in vivo* en ratones GEMMs

Finalmente testamos la combinación del CDK4/6i con inmunoterapia en un modelo animal completamente inmunocompetente, un modelo GEMM inducible de adenocarcinoma de pulmón $KRAS^{LSLG12Vgeo};P53^{LoxP}$. El diseño experimental incluyó 4 grupos de tratamiento: (1) administración de vehículo; (2) administración oral de CDK4/6i (50mg/kg), 6 veces por semana; (3) administración intraperitoneal de anti-PD-1 (200ug/ratón), 2 veces por semana; y (4) combinación de ambos fármacos. El tratamiento duró 21 días.

En los animales tratados con las monoterapias o la combinación no se observó por microCT una disminución significativa en el tamaño de los tumores respecto al control. En el caso de las monoterapias no se produjo un aumento en el número total de los tumores al finalizar el procedimiento, que, sí se indujo con la combinación, al igual que ocurría en los controles (Figura 42A; Figura 42B).

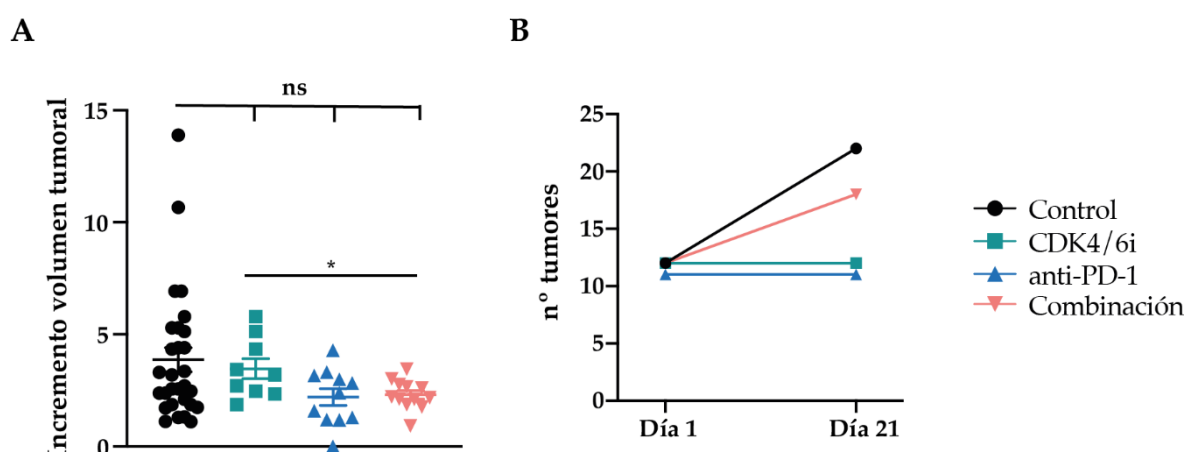


Figura 42. Efecto del tratamiento con CDK4/6i, un anticuerpo anti-PD-1 y ambos fármacos en combinación en un modelo animal genéticamente modificado de adenocarcinoma de pulmón inducido por la mutación de $KRAS$ y el silenciamiento de $TP53$. Se utilizaron grupos de 5 ratones $KRAS^{LSLG12Vgeo/+};P53^{LoxP/LoxP}$ previamente inducidos con adenoCre y confirmada la presencia de tumores por microCT por rama de tratamiento. Las 4 ramas fueron: vehículo (rama control), CDK4/6i, anti-PD-1 y la combinación de ambos. La dosis del CDK4/6i, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación, fue de 50 mg/kg/día tratándose de lunes a sábado en ambos casos, por vía oral. El anticuerpo anti-PD-1, fue administrado por vía intraperitoneal 2 veces por semana, la primera dosis administrada a una concentración de 10mg de pembrolizumab/kg/día, siendo el resto de dosis a 5mg de pembrolizumab/kg/día. Los datos se muestran como media \pm SEM, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Los valores de p para el ensayo *in vivo* se obtuvieron con la prueba U de Mann-Whitney (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). **A.** El tamaño de los tumores al final del procedimiento se relativizó al tamaño inicial y se representó el incremento relativo en el tamaño de los mismos. **B.** Se representó el número de tumores al inicio y al final del tratamiento con CDK4/6i y anti-PD-1 en monoterapia o en combinación medidos por microCT

La infiltración de células CD45+ no se vio aumentada con el tratamiento con CDK4/6i. Tampoco se documentó un incremento en la expresión de PD-L1 (Figura 43).

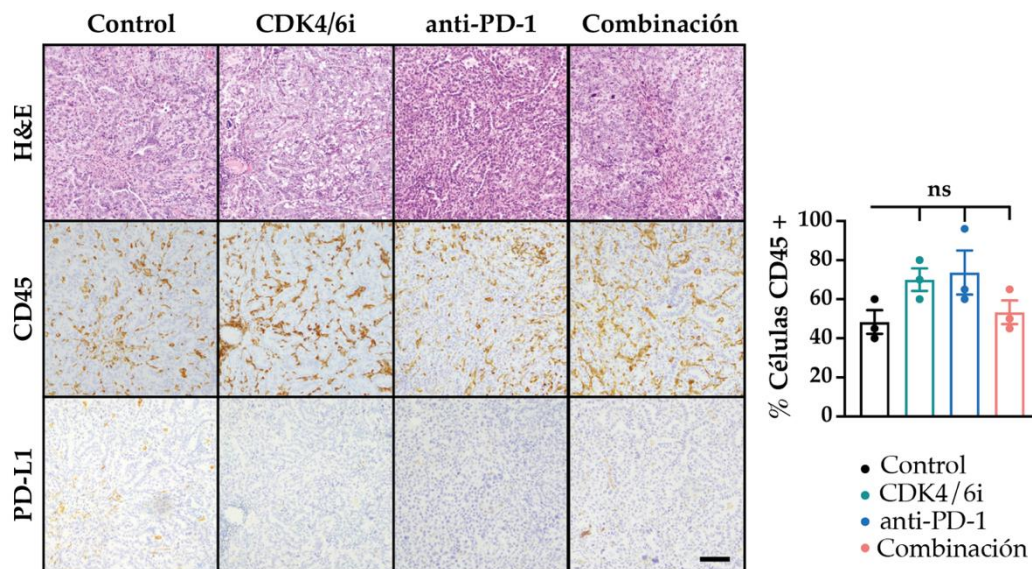


Figura 43. Análisis mediante tinción de H&E e IHQ de tumores desarrollados tras la inducción con AdenoCre en los pulmones de ratones $Kras^{LSLG12V_{geo}/+};p53^{LoxP/LoxP}$ y tratados con CDK4/6i, un anticuerpo anti-PD-1 y ambos fármacos en combinación. Tinción de H&E, CD45 y PD-L1 de los tumores de animales, con administración de vehículo, y con administración de los fármacos en monoterapia o en combinación. El panel de la izquierda muestra la cuantificación de la infiltración en los tumores pulmonares de 3 ratones por condición. Los datos se muestran como media \pm SEM. Los valores de p para el ensayo se obtuvieron con la prueba T no pareada (ns, no significativo). Barra de escala 0.1mm.

5. Estudio farmacodinámico e identificación de biomarcadores predictivos de respuesta para las nuevas estrategias terapéuticas testadas

De las dos estrategias terapéuticas testadas, la combinación del inhibidor de CDK4/6 con el inhibidor de ERK1/2 demostró ser más eficaz que los fármacos en monoterapia. Decidimos por tanto centrarnos en esta combinación, y, por un lado, tratar de identificar biomarcadores predictivos de respuesta a nivel genómico y transcriptómico y por otro, tratar de diseccionar sus efectos farmacodinámicos. Para esto último, se analizó el perfil transcriptómico de los PDXDO tratados con el inhibidor de CDK4/6, el inhibidor de ERK1/2 y la combinación de ambos fármacos.

5.1. Estudio de la resistencia intrínseca e identificación de biomarcadores predictivos de respuesta al inhibidor de CDK4/6

Como se mostró en el apartado 4.1. de esta sección, el tratamiento con la combinación (CDK4/6i con ERK1/2i), redujo la proliferación y viabilidad en los cultivos de los 13 modelos PDXDO tratados, aunque con distinta sensibilidad. Sin embargo, cuando analizamos la respuesta de los fármacos en monoterapia, encontramos que 3 de esos 13 modelos no respondían al inhibidor de CDK4/6 en monoterapia (TP60, TP80, TP134) (Figura 30).

Al analizar el fondo genómico de los modelos que no respondían al inhibidor de CDK4/6 en monoterapia, encontramos ciertas alteraciones moleculares que podrían comportarse como biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento con CDK4/6i. Analizando los datos del exoma de los tres modelos resistentes al tratamiento con CDK4/6i, observamos que, uno de ellos, el modelo TP60 presentaba una mutación en *RB1* y otro, el TP134 presentaba la mutación E545K en el gen *PI3KCA* (Figura 17). Ambas mutaciones ya han sido descritas en la literatura como mecanismos de resistencia a los inhibidores de CDK4/6, lo que valida nuestro estudio. Por otro lado, el tercer modelo resistente el TP80, no presentaba ninguna mutación conocida que confiera resistencia a estos inhibidores, pero presentaba una mutación en *AKT3* con la consiguiente activación de la vía *PI3K*, y una mutación en *MGA* (Figura 17), que es un gen supresor tumoral que inhibe el programa transcripcional MYC y los genes diana del factor de transcripción E2F. Ambas mutaciones podrían estar relacionadas con la resistencia intrínseca de este modelo.

Por otro lado, quisimos buscar a nivel transcriptómico algún biomarcador o una firma transcripcional que ayudaran a predecir la respuesta al tratamiento con el CDK4/6i. Para ello comparamos el perfil transcripcional de las muestras control sin tratar de los PDXDO resistentes y sensibles al inhibidor de CDK4/6, realizando un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de una sola muestra (ssGSEA). Los análisis bioinformáticos revelaron que las vías relacionadas con MYC (MYC TARGETS) y las dianas de E2F (E2F TARGETS) estaban sobre-expresadas significativamente en los modelos resistentes a CDK4/6i al compararlos con los sensibles. Mientras que las vías relacionadas con la respuesta inmune e inflamación (T CELL ACTIVATION; CYTOKINES AND INFLAMMATORY RESPONSE; T CELL RECEPTOR SIGNALING PATHWAY; TNFA SIGNALING PATHWAY), la apoptosis (APOPTOSIS) y la vía de WNT (WNT_UP.V1_UP) estaban infra-expresadas en los modelos resistentes a CDK4/6i (Figura 44). Esta firma transcripcional que define a los modelos resistentes podría ayudar a predecir la resistencia al tratamiento con el inhibidor de CDK4/6.

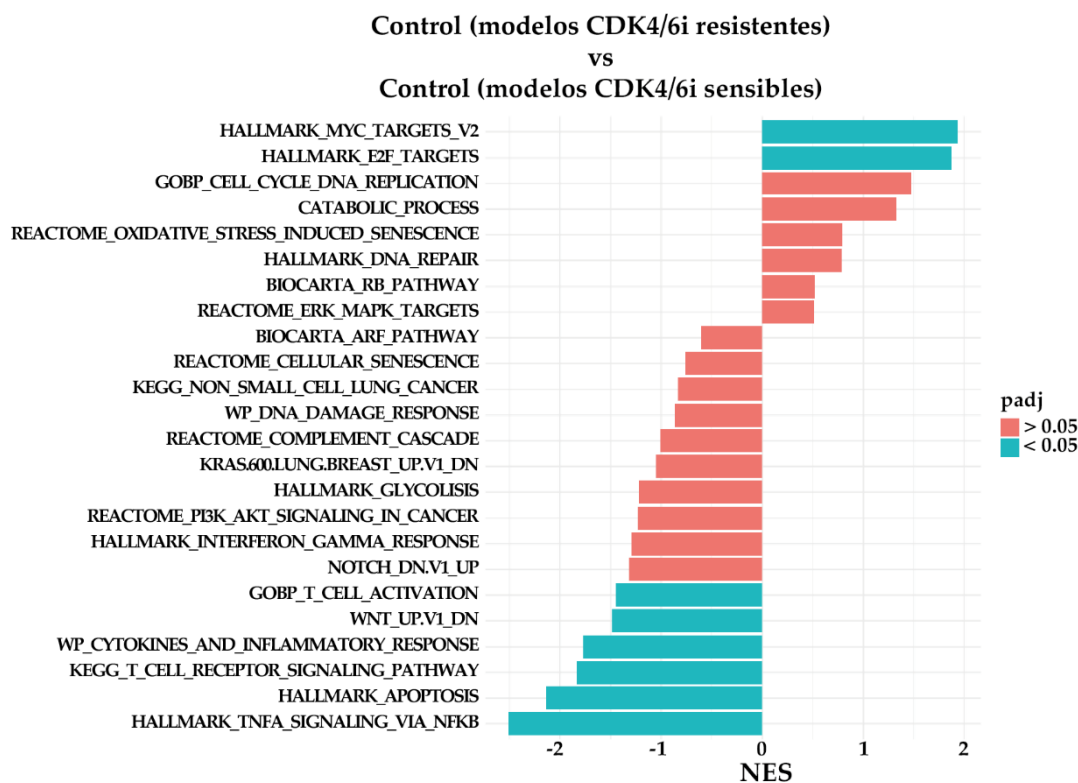


Figura 44. Análisis de los biomarcadores predictivos de respuesta a CDK4/6i a nivel transcriptómico. El gráfico muestra los análisis de FGSEA para los conjuntos de genes seleccionados comparando las muestras control de los modelos PDXDO resistentes a CDK4/6i (TP60, TP80 y TP134) frente a las muestras control de los modelos sensibles a CDK4/6i (TP40, TP43, TP57, TP70, TP79, TP91, TP103, TP126, TP143 y TP148). Se muestran en azul los conjuntos de genes en los que las muestras control de los resistentes están significativamente enriquecidas o tienen su expresión disminuida.

5.2. Estudio de los efectos biológicos del inhibidor de CDK4/6 en monoterapia y en combinación con el inhibidor ERK1/2

Analizamos el transcriptoma completo mediante RNASeq de los cultivos de PDXDO tratados con el inhibidor de CDK4/6, el inhibidor de ERK1/2 y ambos fármacos en combinación, y los comparamos con el transcriptoma de los mismos modelos sin tratar. Primero, utilizando un análisis de ssGSEA comparamos las muestras tratadas con CDK4/6i y sus controles. En el análisis no supervisado las muestras agruparon en dos grupos, un grupo en el que mayoritariamente estaban las muestras tratadas, y otro, en el que mayoritariamente estaban las muestras de los controles sin tratar y cinco muestras tratadas, que incluían las de los tres PDXDO que no responden al tratamiento con el CDK4/6i. Fijándonos en las muestras de los modelos PDXDO tratados con CDK4/6i que sí responden al tratamiento, observamos una reducción de la expresión en aquellos transcritos de genes involucrados en el ciclo celular (RB PATHWAY; E2F TARGETS; CELL CYCLE DNA

REPLICATION), consistente con la parada de ciclo que vimos en los experimentos funcionales (Figura 30-33), y un enriquecimiento de transcritos de respuesta inmune (T CELL ACTIVATION; CYTOKINES AND INFLAMMATORY RESPONSE; T CELL RECEPTOR SIGNALING PATHWAY) (Figura 45). A pesar de la parada de ciclo que observamos en los cultivos, vimos que había algunas vías de señalización relacionadas con proliferación y progresión celular que se mantenían activas como eran las vías de PI3K, ERK y WNT. Por otro lado, observamos que las muestras tratadas con el inhibidor de CDK4/6i de los tres modelos resistentes (TP60, TP80 y TP134), no presentaban reducción en la expresión de los genes involucrados en la proliferación y progresión del ciclo celular (E2F TARGETS; CELL CYCLE DNA REPLICATION), hecho consistente con el efecto biológico observado (Figura 30-33) y presentaban una activación de la vía de MYC que podría estar implicada con la resistencia al tratamiento (Figura 45).

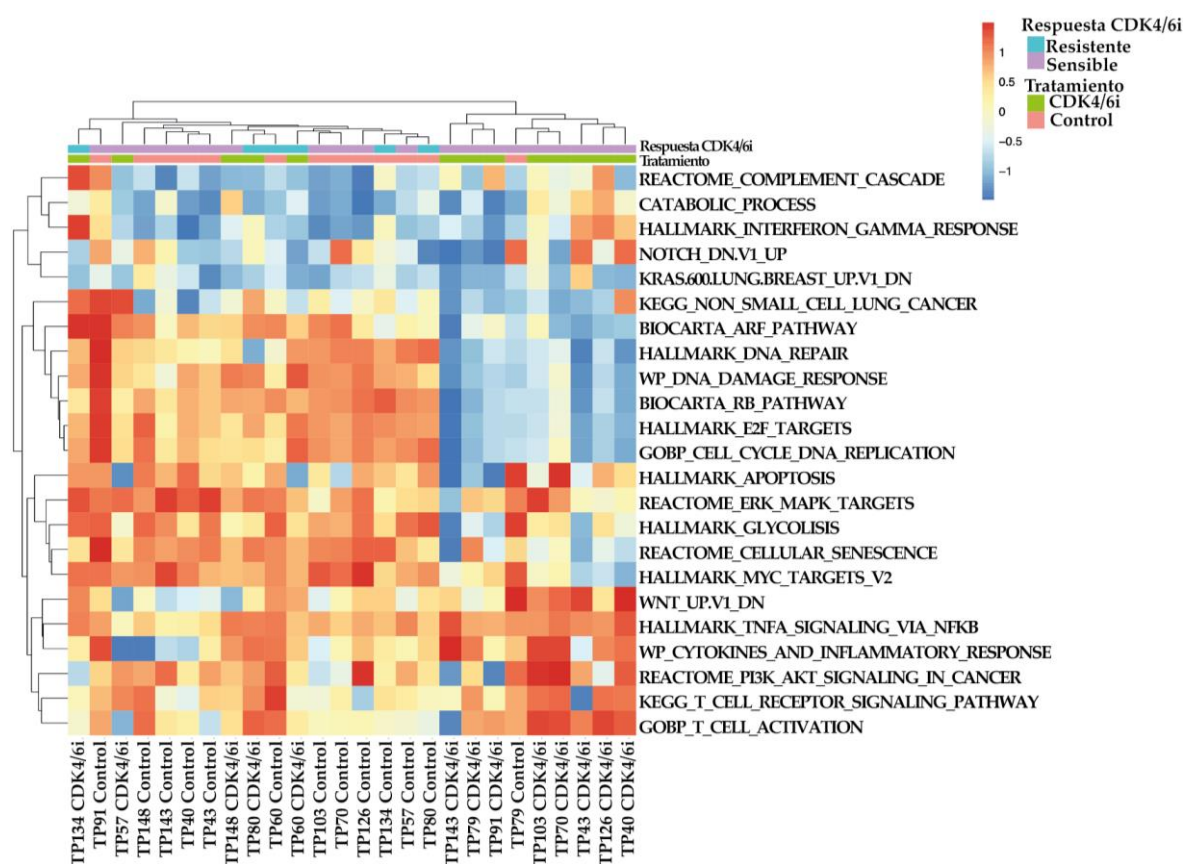


Figura 45. Análisis transcriptómico de los PDXDO tratados con CDK4/6i. Heatmap no supervisado de las puntuaciones de enriquecimiento normalizadas (NES) de los análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de una sola muestra (ssGSEA) para cada grupo de genes (*gene sets*). Cada columna representa muestras individuales de cada modelo PDXDO analizado. Su muestra control (sin tratar) y su muestra CDK4/6i (tras 48 horas de tratamiento). La sobreexpresión se muestra en rojo y la disminución de la regulación en azul. En el panel superior se indica el tratamiento y la sensibilidad de cada muestra. El tratamiento con CDK4/6i se indica en verde y el control en salmón. Indicando las muestras sensibles a CDK4/6i en azul y las resistentes en morado.

También realizamos un análisis con ssGSEA para comparar las muestras tratadas con la combinación con sus controles sin tratar utilizando el mismo grupo de “gene sets” con el que estudiamos el tratamiento con CDK4/6i en monoterapia. En el heatmap no supervisado vimos dos grupos claramente diferenciados, uno que agrupaba las muestras sin tratar y otro que agrupaba las muestras tratadas con la combinación. Al igual que ocurría con el tratamiento de CDK4/6i en monoterapia, en las muestras tratadas con la combinación diferenciamos un grupo de transcritos que mostraban disminuida la expresión y que estaban relacionados con la inhibición del ciclo celular (RB PATHWAY; E2F TARGETS; CELL CYCLE DNA REPLICATION). En este caso, esto ocurría en todas las muestras, incluso en aquellos tres modelos que eran resistentes al tratamiento en monoterapia. Por otro lado, observamos que el tratamiento con la combinación revertía la activación de las vías de PI3K y WNT y la disminución de la inflamación inducida tras el tratamiento con el inhibidor de CDK4/6 en monoterapia, que podría explicar el efecto sinérgico observado (Figura 46).

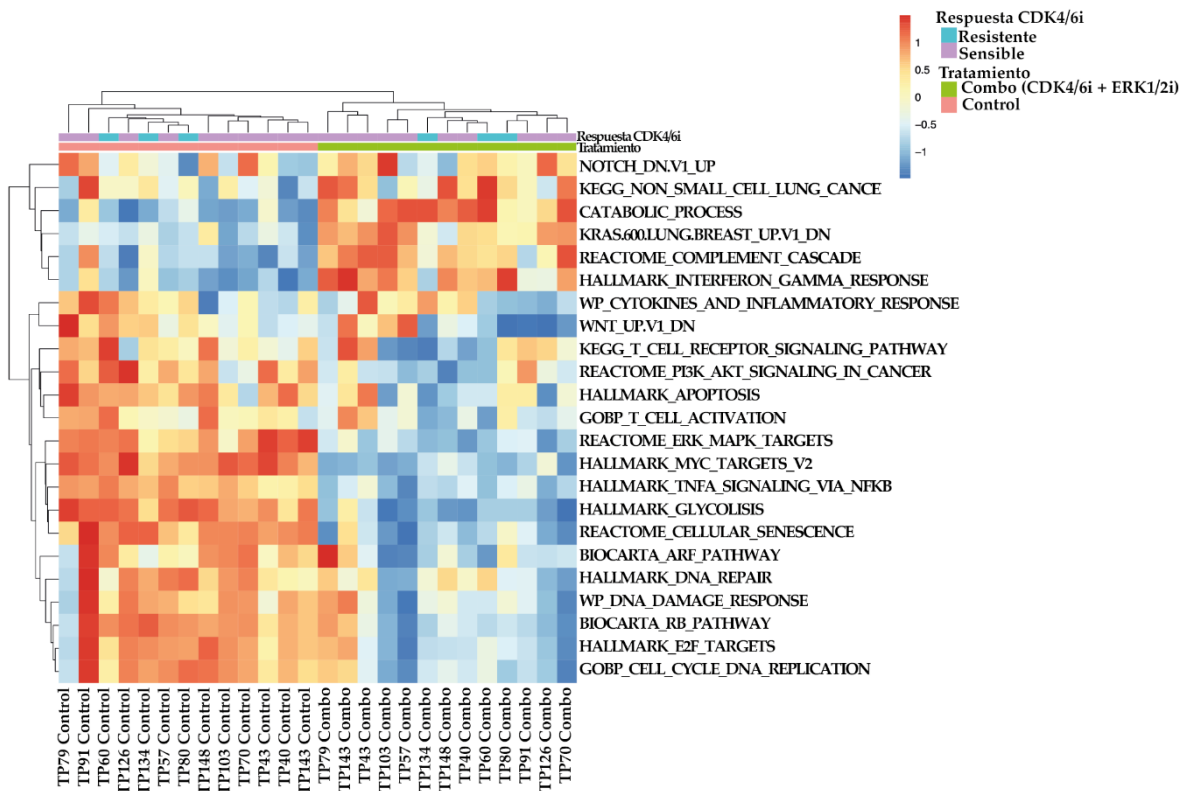


Figura 46. Análisis transcriptómico de los PDXDO con el tratamiento de la combinación de CDK4/6i con ERK1/2i. Heatmap de las puntuaciones de enriquecimiento normalizadas (NES) de los análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de una sola muestra (ssGSEA) para cada grupo de genes (*gene sets*). Cada columna representa muestras individuales de cada modelo PDXDO analizado. Su muestra control (sin tratar) y su muestra Combo (tras 48 horas de tratamiento con la combinación). La sobreexpresión se muestra en rojo y la disminución de la regulación en azul. En el panel superior se indica el tratamiento y la sensibilidad de cada muestra. El tratamiento con la combinación se indica en verde y el control en salmón. Indicando las muestras sensibles a CDK4/6 en azul y las resistentes en morado.

Para profundizar en los hechos que subyacen a la sinergia de la combinación, estudiamos aquellos transcritos que estaban diferencialmente expresados tras el tratamiento con la combinación comparando con los tratados con el CDK4/6i en monoterapia en los 13 modelos de PDXDO. Estos análisis confirmaron que la mayoría de los genes involucrados en la progresión del ciclo celular que estaban inhibidos tras el tratamiento en monoterapia lo estaban en mayor medida tras el tratamiento con la combinación en la mayoría de los PDXDO tratados. Sin embargo, había un grupo de 5 PDXDOs tratados con el CDK4/6i, que incluía a los 3 modelos resistentes, que no mostraban este perfil, sino que mantenían una activación del ciclo celular tras el tratamiento en monoterapia. Además, confirmamos que en las muestras tratadas con el CDK4/6i en monoterapia se activaban las vías de señalización de PI3K, ERK y WNT y que el tratamiento con la combinación contrarrestaba dicha activación, produciendo la inhibiendo estas vías, tanto en los modelos resistentes al CDK4/6i como en los sensibles. La inhibición de estas vías producida por la combinación, incluso en los modelos intrínsecamente resistentes al CDK4/6i, podría explicar el efecto sinérgico observado (Figura 47).

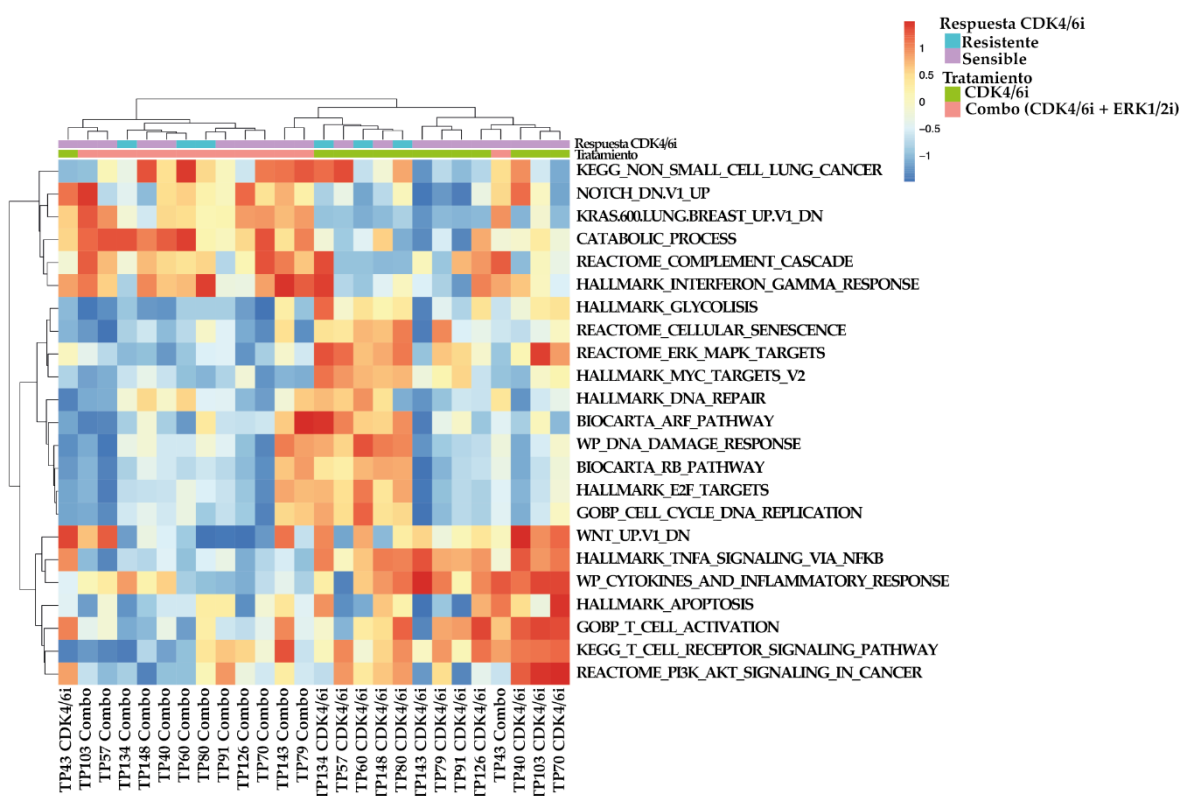


Figura 47. Análisis transcriptómico de los PDXDO tratados con el CDK4/6i en monoterapia y en combinación con el ERK1/2i. Heatmap no supervisado de las puntuaciones de enriquecimiento normalizadas (NES) de los análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de una sola muestra (ssGSEA) para cada grupo de genes (*gene sets*). Cada columna representa muestras individuales de cada modelo PDXDO analizado. Muestra CDK4/6i (tras 48 horas de tratamiento con CDK4/6i) y muestra Combo (tras 48 horas de tratamiento con la combinación). La sobreexpresión se muestra en rojo y la disminución de la regulación en azul. En el panel superior se indica el tratamiento y la sensibilidad de cada muestra. El tratamiento con CDK4/6i se indica en verde y el tratamiento con la combinación en salmón. Indicando las muestras sensibles a CDK4/6i en azul y las resistentes en morado.

DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo generamos y caracterizamos nuevos modelos preclínicos de CPNM predictivos de respuesta *in vitro* (PDXDO) e *in vivo* (PDX y PDX humanizados), y utilizamos estos modelos para testar la eficacia de nuevas estrategias terapéuticas que podrían ser de utilidad para los pacientes con adenocarcinoma de pulmón con *KRAS* mutado. De las dos estrategias testadas, una de ellas demostró eficacia, y estudiamos en mayor profundidad sus efectos biológicos y qué biomarcadores podrían predecir la respuesta.

1. Modelos preclínicos que recapitulan la heterogeneidad del CPNM en clínica

En la primera parte de este proyecto de tesis generamos y caracterizamos nuevos modelos experimentales de cáncer de pulmón que mimetizan mejor la heterogeneidad y las principales características del CPNM, para su uso como herramienta preclínica con la que testar nuevas estrategias terapéuticas e identificar biomarcadores de respuesta. Generamos tres tipos de modelos, que incluye una extensa cohorte de modelos PDX de la que se nutren dos colecciones, una *in vitro* de modelos PDXDO y otra *in vivo* de modelos PDX humanizados.

PDX

En este estudio describimos una colección de 45 modelos PDX de CPNM establecidos con éxito a partir de la implantación de 124 muestras humanas de tejido tumoral primario en ratones atímicos. La tasa de éxito del injerto fue del 36,3% (Tabla 7). Esta tasa fue similar a la de otras colecciones descritas en la literatura, en las que el establecimiento de PDX derivados de tumores frescos de pacientes de CPNM tuvo tasas de éxito que oscilaban entre el 20 y el 40% (Fichtner et al., 2008; John et al., 2011; D. Wang et al., 2017; X. chao Zhang et al., 2013). A destacar que estas colecciones utilizaron ratones NSG, con mayor grado de inmunodepresión que los ratones *nude* utilizados en nuestra cohorte. La cepa de ratones *nude* presenta ventajas en términos de coste y facilidad de mantenimiento en un animalario (Tabla 13). Además, estos ratones requieren condiciones de esterilidad menos estrictas que los ratones NSG, lo que los hace más tolerantes a los agentes farmacológicos y a la manipulación. Si bien la implantación subcutánea es el método más utilizado para el establecimiento de modelos PDX, se ha reportado que el trasplante ortotópico mimetiza mejor el microambiente natural para el crecimiento del tumor (Cuenca et al., 1996; Hoffman, 2015; W. Zhang et al., 2019), para el desarrollo de metástasis (Jarry et al., 2021), y que la implantación ortotópica aumenta las tasas de injerto del tumor (Hidalgo et al., 2014; X. Wang et al., 1992). No obstante, la implantación directa en el pulmón no es muy frecuentemente utilizada en modelos de CPNM debido a la dificultad técnica que conlleva, y a la posterior necesidad de medición del volumen del tumor por técnicas de imagen de las que no se dispone en todos los animalarios. Cabe destacar que se ha descrito una tasa

de injerto en el rango del 90% con otro procedimiento basado en el implante de los tumores en la cápsula renal con muestras de cáncer de pulmón y otros tipos tumorales (Dong et al., 2010).

Tabla 13. Características de colecciones de PDX de CPNM

PDX de CPNM	n modelos	n modelos ADC	% éxito total	Cepa ratón	Procedencia muestra	Técnica de implante	Características clinicopatológicas con más éxito de injerto
Yagüe et al., 2021	45	15	36,3	Nude	Cirugía	Subcutánea	Carcinoma epidermoide, varones, fumador, mutaciones en KRAS
Fichtner et al., 2008	25	6	24,5	NOD/SCID	Cirugía	Subcutánea	-
John et al., 2011	63	30	40	NOD/SCID	Cirugía	Subcutánea	Carcinoma epidermoide, varones, mayor tamaño tumoral, mutaciones en KRAS
D. Wang et al., 2017	127	52	29	NOD/SCID	Cirugía	Subcutánea	-
X. chao Zhang et al., 2013	10	1	32,2	NOD/SCID	Cirugía	Subcutánea	Carcinoma epidermoide, varones*, fumador*
Chen et al., 2019	105	-	34	NOD/SCID	Cirugía/Biopsia	Subcutánea	Carcinoma epidermoide, estadio II y III
X. Dong et al., 2010	29	16	90	NOD/SCID	Cirugía	Cápsula renal	-

*Son significativas en el análisis univariante, no son significativas en el análisis multivariante. Abreviaturas: PDX (xenoinjerto derivado de paciente); CPNM (cáncer de pulmón no microcítico); ADC (adenocarcinoma); - dato no analizado.

Los factores que influyen en el crecimiento de los PDX no están del todo claros, sin embargo, nuestros resultados sugieren que características clínicas como el hábito tabáquico, el subtipo histológico del tumor o el género del paciente pueden influir en el éxito del injerto. En nuestra colección, todos los modelos establecidos provienen de tumores de pacientes fumadores, y ninguno de los tumores de pacientes no fumadores dio lugar a un modelo PDX. En cuanto al género, los análisis estadísticos muestran un mayor éxito de injerto con muestras de varones que de mujeres, aunque existe franca relación entre el sexo y el hábito tabáquico. En otras plataformas de PDX de CPNM, el hábito de fumar y el género también tienen un impacto significativo en la probabilidad de éxito del injerto de los

modelos (John et al., 2011; X. chao Zhang et al., 2013) (Tabla 13). Además, obtuvimos mayores tasas de éxito al establecer modelos PDX de carcinoma epidermoide en comparación con los de adenocarcinoma, algo que ya describían en otras colecciones (Chen et al., 2019; John et al., 2011; X. chao Zhang et al., 2013).

La cirugía con o sin quimioterapia adyuvante es el tratamiento estándar para el CPNM en estadios tempranos y localizados. Sin embargo, para el CPNM en estadio avanzado, el tratamiento estándar consiste en tratamientos dirigidos a dianas moleculares, quimioterapia y/o inmunoterapia, y solo rara vez cirugía, lo que dificulta el acceso a material clínico en cantidad suficiente para la generación de modelos PDX derivados de tumores en esos estadios (American Cancer Society, 2021). Aun así, nuestra colección incluye algunos modelos PDX derivados de tumores en estadios III/IV. La mayoría de los estudios publicados se han basado en la utilización de muestras quirúrgicas que proporcionan mayor cantidad de tejido (Tabla 13), sin embargo, la utilización de biopsias tumorales o aspirados de líquido pleural permitirían generar modelos de estadios más avanzados que no suelen researse (Hernández et al., 2019). Aun sabiendo que el éxito de injerto puede reducirse al ser más pequeña la muestra y disminuir las probabilidades de éxito al ser implantando en un menor número de ratones en fase 0, algunos estudios han conseguido aumentar el éxito en la implantación de muestras de líquido pleural y biopsia usando ratones NSG (Chen et al., 2019).

Aunque el establecimiento de PDX es muy exigente en términos de tiempo y recursos, estos modelos proporcionan ventajas potenciales sobre otros modelos preclínicos como los xenoinjertos de líneas celulares, ya que mantienen intactas las características de heterogeneidad intra e intertumoral (Hidalgo et al., 2014). Nuestros modelos recapitulaban la diversidad del cáncer de pulmón, y la evaluación de la histología y las características moleculares a lo largo de los pases confirmó que se conservaban en todos los modelos PDX como ocurría en otras colecciones de PDX de CPNM o de otros tipos tumorales (George et al., 2017; John et al., 2011; Kang et al., 2018; Peng et al., 2013). Cabe señalar, sin embargo, que los tumores injertados en nuestra colección solían mostrar una des-diferenciación histológica y un patrón morfológico más sólido en pases tardíos como también ocurría en otras series (Figura 11-13) (Chen et al., 2019). La expresión diferencial de los marcadores característicos de los diferentes subtipos histológicos, TTF1 o p63, así como la ratio de proliferación medido con el marcador ki67 se conservaban, como también habían demostrado otros estudios (Figura 11-13) (Kang et al., 2018). Además, nuestro análisis de la composición del tumor y su estroma usando hibridación *in situ* con la sonda ALUII y tinción de IHQ de SMA, respectivamente, demostró, como otros autores han sugerido, que el estroma humano desaparece en pases tempranos (P2) y es sustituido por estroma murino (Julien et al., 2012). La proporción de estroma también disminuía en los tumores PDX con respecto a los tumores de los pacientes, aunque una vez establecido el modelo la proporción de estroma en el tumor se mantenía constante con los pases (Figura 14). Estas observaciones

también habían sido apreciadas en otras colecciones de PDX de otros tumores (Julien et al., 2012).

En cuanto a la caracterización molecular, hemos confirmado que nuestra colección de PDX cuenta con modelos que presentan las principales alteraciones moleculares subyacentes a los CPNMs y, en general, en un porcentaje similar al encontrado en los pacientes (Figura 17). A destacar, observamos un notable enriquecimiento en los modelos con mutaciones *TP53* (80%) y *KRAS* (53%) en la colección de PDX de adenocarcinoma, en comparación con la incidencia de estas mutaciones en la población general según los datos del TCGA (el 50% y el 30%, respectivamente, en los países occidentales), y respecto a nuestras cohortes clínicas del hospital Universitario 12 de Octubre (*TP53* (55,6%), *KRAS* (29,6%)). Por el contrario, había un pequeño porcentaje de alteraciones moleculares frecuentes en los pacientes, como las mutaciones en *KEAP1* (18% según el TCGA) o las fusiones en *ALK* (6% según el TCGA), que no estaban representadas en nuestra colección. Estos datos sugieren que hay alteraciones moleculares como las mutaciones en *TP53* y *KRAS* que hacen a los tumores más susceptibles a tener éxito en el establecimiento de los modelos PDX, y otras más resistentes a la implantación. Este efecto no se observó en otras cohortes de PDX de CPNM como la establecida por Fichtner y cols. en la que consiguieron un 24% de modelos con mutación en *KRAS* y 52% con mutación en *TP53* (Fichtner et al., 2008). Por el contrario, otras colecciones sí mostraron mayor probabilidad de éxito en el injerto cuando existían mutaciones activadoras de *KRAS* (John et al., 2011) (Tabla 13) y menor probabilidad de injerto en tumores con mutaciones de *EGFR* (John et al., 2011; Kang et al., 2018). En definitiva, los tumores asociados a características epidemiológicas (tabaquismo, género masculino) o de enfermedad (estadio más avanzado, histología escamosa, aberraciones genómicas de mal pronóstico como las mutaciones en *KRAS*) predictivas de agresividad biológica tienden a ser más fácilmente explantables (Dogan et al., 2012; Pham et al., 2006).

Confirmar que los PDX son modelos estables, cuyas características histológicas y moleculares coinciden con las del paciente del que provienen y se mantienen durante los pases, resultaba necesario para validar la colección como herramienta preclínica. El estudio de estas características en pases tempranos y tardíos indicó que no solo se mantenían las características histológicas, sino también las moleculares. Así, no solo se conservaba la presencia de las aberraciones genómicas sino también su abundancia (medida por ddPCR en el tumor y en biopsia líquida como frecuencia alélica); es decir, se mantenía la heterogeneidad intra-tumoral con los pases (Figura 18). La única excepción la encontramos en el modelo TP80, en el que observábamos un enriquecimiento de su mutación en *KRAS*, que presentaba una frecuencia inicial del 11,8% y en pases tardíos del 43%. En general, en la mayoría de las colecciones de PDX, de cáncer de pulmón u otros tipos tumorales, se conservaban las alteraciones genómicas y las frecuencias alélicas de los tumores originales (Fichtner et al., 2008; Julien et al., 2012). No obstante, algunos estudios han informado del enriquecimiento de mutaciones en algunos PDX, que podría deberse a la amplificación de

clones en el PDX previamente infra-representados en el paciente, o consecuencia de la evolución de los tumores, como sugieren otros estudios (Ding et al., 2010; Kresse et al., 2012).

La disponibilidad de la secuenciación completa del transcriptoma de todos los PDX nos permitió elegir los modelos que estimamos idóneos para la evaluación de las nuevas estrategias terapéuticas testadas en este trabajo, y permitirá seleccionar los modelos más adecuados para cada uno de los proyectos en los que vayamos a usarlos en el futuro, en función de las vías que se pretendan interferir. El análisis del transcriptoma de los modelos PDX de adenocarcinoma con la misma mutación conductora mostró cierta variabilidad entre sí, probablemente por la presencia de otras co-mutaciones. En relación a estos estudios transcriptómicos de los modelos PDX es importante mencionar que el software de inferencia de la actividad de las vías utilizado en este trabajo, PROGENy, proporciona información sobre las vías inflamatorias ($TNF\alpha$, $NF\kappa B$ y $TGF\beta$) que debe considerarse cuidadosamente, ya que nuestros modelos están inmunocomprometidos (Figura 19). En cuanto al estudio de la expresión y la activación de algunas vías de señalización oncogénica, y al contrario de lo descrito en otras colecciones de PDX (Julien et al., 2012), nosotros encontramos ligeras diferencias en la expresión y activación de algunas proteínas con los pasajes, aunque siempre se mantenía una correlación entre la presencia de las mutaciones conductoras y la activación de sus vías de señalización (Figura 20). No obstante, en vista de las ligeras diferencias observadas con los pasajes, establecimos como norma en nuestro laboratorio el analizar mediante western blot el estado de activación del tumor en el mismo pase en el que se inicia cada uno de los tratamientos a testar. Por esta razón siempre se conservan fragmentos de tumor para extracción de proteínas, ADN y ARN en cada pase, por si fuera necesario un análisis más profundo de las características de los tumores.

En cuanto a la utilización de nuestros modelos como herramienta preclínica predictiva de respuesta, hicimos un estudio de eficacia de diferentes fármacos quimioterápicos y de terapias dirigidas para ver si mostraban las respuestas esperadas según la clínica. Nuestros resultados mostraron que la respuesta de los modelos PDX a los fármacos probados fue coherente con los resultados clínicos y con otros datos publicados, donde modelos PDX con mutaciones en *EGFR* (L858R o delección del exón 19) eran sensibles a los TKIs de EGFR como gefitinib y osimertinib (Ercan et al., 2015; Kita et al., 2019). Nuestro modelo TP103 que presentaba las mutaciones L858R y T790M en el gen *EGFR*, mostraba resistencia a los inhibidores de tirosina-quinasa de primera generación (erlotinib) y era sensible a los de tercera generación (osimertinib) (Figura 17; Figura 21; Tabla 10).

El uso de los modelos PDX tiene limitaciones a la hora de hacer cribados masivos de múltiples fármacos (*highthroughput screenings*) por su elevado coste en términos de animales, espacio, tiempo y dinero. Por ello, el desarrollo de una colección de organoides derivados de esos PDX, como se ha reportado en otros tipos tumorales (L. Huang et al., 2020), proporciona una alternativa de análisis *in vitro* previo al modelo *in vivo*, en el que probar

masivamente estrategias terapéuticas para seleccionar las que ameritan la validación posterior.

Otras de las limitaciones de los modelos PDX son la sustitución del estroma humano por el murino, limitando el estudio de las interacciones con el microambiente y las terapias dirigidas a este, y la ausencia de respuestas inmunes por asentar en animales inmunocomprometidos, lo que los hace inapropiados para realizar estudios con inmunoterapia. Para solventar esta limitación, desarrollamos modelos humanizados que recapitulan en mayor medida el sistema inmunitario humano en los mismos modelos PDX.

Organoides

Los organoides derivados de PDX se convierten en una valiosa opción cuando las muestras de tumores de pacientes son escasas o cuando existe gran dificultad de generar líneas celulares, como ocurre con los CPNM (Liu & Tsao, 1993). En este trabajo hemos puesto a punto un método para generar organoides derivados de PDX y su uso como herramienta preclínica para testar *in vitro* múltiples fármacos en monoterapia o en combinación en modelos con diferente fondo genético, en función de las necesidades experimentales o de la naturaleza de la estrategia terapéutica a analizar. En concreto, hemos usado esta colección para testar estrategias terapéuticas en CPNM con mutación en *KRAS*.

Utilizando nuestra colección de modelos PDX de adenocarcinoma de pulmón hemos generado 14 PDXDO con un 100% de éxito (Figura 10). Posteriormente hemos confirmado que estos modelos conservaban las características histológicas y moleculares de los PDX de los que derivan y, por tanto, también de los tumores originales de los pacientes. Este hecho había sido apreciado en otros estudios con organoides generados directamente de muestra de pacientes de cáncer de pulmón (Kim et al., 2019) y otros tipos tumorales (Sachs et al., 2018; van de Wetering et al., 2015), o de PDX (L. Huang et al., 2020). Verificamos que nuestros PDXDO seguían expresando el marcador diferencial de adenocarcinoma TTF1 (Figura 22). Otros autores (Kim et al., 2019; Shi et al., 2020) observaron que sus organoides de adenocarcinoma y cáncer escamoso de pulmón conservaban los marcadores inmunohistoquímicos patognomónicos, TTF1 y p63, respectivamente, e incluso otros como la expresión PD-L1 (Kim et al., 2019). Además, en nuestro caso analizamos el origen de las células que forman el organoide y confirmamos que estaban originados por células epiteliales humanas. El estroma del ratón no es parte constitutiva del organoide (Figura 23A), aunque en los primeros pases se observaron células aisladas en los cultivos (Figura 23B) (Neal et al., 2018).

Además de las características histológicas, confirmamos mediante ddPCR que los PDXDO conservaban las mutaciones conductoras y en la misma frecuencia alélica del PDX de origen (Figura 25). En contraste, Van de Wetering y cols. mostraron un enriquecimiento en algunos clones en el cultivo de organoides respecto a las muestras humanas de partida, que podría ser el resultado del muestreo en la biopsia o indicar una pérdida clonal selectiva

en el cultivo (van de Wetering et al., 2015). Nuestros cultivos al ser generados a partir de muestras de tumores de mayor tamaño (esto está limitado en los organoides originados del tumor humano original) facilita una mejor representación del tumor y puede impedir que ocurra este fenómeno. El disponer de muestra fresca creciendo en ratones ilimitadamente evita el mantener en cultivo continuo los organoides, y por tanto evita la pérdida clonal selectiva en cultivo. Mediante secuenciación de exoma confirmamos que se mantenían las alteraciones en genes conductores y la mayoría de las alteraciones encontradas en los PDX, con sólo un 5,6% de discordancia (Figura 24). Un ejemplo fue el modelo TP60, con pérdida de la mutación en *MGA* y la adquisición de una mutación en *MET*. En otros estudios también han demostrado una alta correlación entre los perfiles genómicos de los organoides y los tumores de origen. Los organoides de cáncer de mama recapitulaban las alteraciones en el número de copias de genes que se encuentran alterados en el cáncer de mama, así como mutaciones en los genes más característicos de esta patología como *CDKN2A* o *ERBB2* (Sachs et al., 2018). Van de Wetering y cols., revelaron que las mutaciones conductoras comunes del cáncer colorrectal se mantuvieron en el cultivo, con sólo el 4% de mutaciones discordantes respecto al tumor primario (van de Wetering et al., 2015). Las líneas de organoides derivados de muestras tumorales de cáncer de próstata albergaban alteraciones en el número de copias de genes altamente representativas de este tipo de cáncer (Gao et al., 2014). En el caso de otros estudios de organoides generados de muestras de cáncer de pulmón, también se verificó que conservaban las principales alteraciones somáticas de los tumores parentales (Shi et al., 2020).

Por último, confirmamos el papel de la colección de PDXDO como herramienta experimental para testar la eficacia de diferentes fármacos con capacidad predictiva de la respuesta en la clínica. En la tabla 11 se muestra una correlación en la respuesta al tratamiento *in vitro* entre los PDXDO y la respuesta de los pacientes (Tabla 11). En el caso concreto del modelo TP103, que presentaba las mutaciones L858R y T790M en *EGFR*, mostraba una sensibilidad a osimertinib similar a la presentada por el PDX del que deriva y a los pacientes con esas mutaciones. En nuestros estudios de eficacia *in vitro*, calculamos la IC_{50} de los fármacos testados y en general, observamos que las concentraciones en estos ensayos eran ligeramente superiores a las calculadas en cultivos 2D de líneas celulares, como ya habían observado otros estudios (Godugu et al., 2013). Probablemente el matrigel del cultivo de los organoides dificulte la difusión del fármaco y la entrada en el propio organoide tumoral e induzca a infravalorar la sensibilidad, aunque este no ha sido nuestro caso. En otros estudios de cultivos de organoides de cáncer de pulmón también relacionaron la sensibilidad a los fármacos con las alteraciones genéticas. A modo de ejemplo, los organoides con mutaciones en *KRAS* no respondieron a Afatinib, en comparación con la línea celular HCC827 que presenta la mutación en *EGFR* (Shi et al., 2020). En otros tipos tumorales, como el cáncer colorrectal, se ha demostrado la factibilidad de hacer ensayos de cribado de fármacos en organoides derivados de pacientes,

proporcionando una correlación entre la sensibilidad y el contexto genético de una amplia serie de fármacos (van de Wetering et al., 2015).

En resumen, los PDXDO pueden ser generados fácilmente de manera sistemática y prácticamente ilimitada a partir de PDX, y retienen las principales características histológicas y moleculares de estos, además de conservar la heterogeneidad intratumoral. Así, hemos conseguido generar una colección de modelos 3D *in vitro* potencialmente útil para el cribado de fármacos, como paso previo a la validación *in vivo*, y para estudiar sus efectos biológicos y marcadores de sensibilidad y resistencia.

PDX Humanizados

Los modelos PDX humanizados amplían potencialmente la utilidad de los PDX al permitir testar estrategias de inmunoterapia, un campo en creciente auge y necesitado de modelos preclínicos adecuados. Para conseguir la humanización pusimos a punto dos métodos diferentes, uno basado en la inyección de PBMCs y otro en la inyección de células CD34+.

El primero de los métodos consiguió, con una sola inyección intravenosa de PBMCs en ratones NSG, un porcentaje de éxito del 33,3%, definido como la tasa de animales con más del 25% de células humanas CD45+ en sangre. De hecho, el rango de huCD45+ en sangre observado se situó entre el 25% y el 81,8% (Figura 27), comparable al de otros estudios (20-60% ; Verma & Wesa, 2020). De las células huCD45+ en circulación, alrededor del 95% eran células T CD3+ a los 21 días. Un problema relevante de este modelo es que la variabilidad en el porcentaje de células huCD45+ es muy elevado. Las PBMCs humanas inyectadas en los ratones receptores se expanden con rapidez, lo que hace que los ratones presenten un número importante de células inmunes en las tres semanas posteriores a la inyección de las PBMCs humanas (Yaguchi et al., 2018), desarrollando un modelo humanizado en un corto periodo de tiempo, con un porcentaje promedio de infiltración de linfocitos T humanos en el tumor alto, de un 28% (Figura 38). El final del tratamiento en nuestros experimentos se estableció a los 21 días, sin observar ningún signo de enfermedad de injerto contra huésped (como pérdida de peso, deshidratación o mal aspecto). Sin embargo, esta es una limitación de estos modelos humanizados en los que la enfermedad de injerto contra huésped ocurre típicamente a las pocas semanas de la inyección de las PBMCs. Con la técnica de humanización basada en PBMCs se consigue un modelo basado en el injerto de células T (T CD4+ y CD8+), según muestran nuestros resultados de citometría y de IHQ (Figura 27). Aunque las PBMCs comprenden células mieloides, células T, células B y células NK, sólo las células T se injertan en este modelo. Una de las ventajas, es la gran cantidad de PBMCs que podemos obtener del mismo paciente con pocos mililitros de sangre. Sin embargo, existe relevante variabilidad según el donante, algo que también ocurre en la clínica donde existe variabilidad en la respuesta de los diferentes pacientes a una misma terapia inmune. Por ello, sería recomendable la realización de los experimentos con donantes diferentes

simultáneamente (Verma & Wesa, 2020), para asegurar que el efecto observado es específico de la terapia testada y no del donante. Cabe destacar que en este modelo observamos una diferencia en el crecimiento de los tumores en ratones humanizados comparando con el grupo control en el que no se inyectaron PBMCs. El alto porcentaje de células T que infiltran estos tumores puede estar induciendo una reacción alérgica. Para evitar este problema, existe la posibilidad de usar PBMCs del mismo paciente del que proviene el tumor del PDX. Las células T maduras no se seleccionan típicamente en el ratón, lo que permite el reconocimiento del MHC de clase I humano. Se podrían extraer muestras de sangre de los pacientes en el momento de la génesis del PDX inicial (P0), y congelar las PBMCs para su eventual uso en experimentos futuros una vez establecidos los modelos PDX, en caso de que en ese momento el paciente no estuviera disponible para la extracción de PBMCs frescas.

En nuestro caso y con los PDX establecidos ya de pacientes de los que no contábamos con sangre congelada, se decidió desarrollar otro método de humanización que diera lugar a ratones con una humanización más completa, con una ventana más amplia de enfermedad de injerto contra huésped y que nos proporcionará una mejor herramienta para el estudio de las inmunoterapias. Para ello utilizamos células CD34+ aisladas de SCU que muestran alta capacidad pluripotencial y de reconstitución del sistema inmune con distintas poblaciones celulares. En este modelo utilizamos también ratones NSG, y conseguimos un 60-100% de animales con un porcentaje de humanización superior a 25%, y un porcentaje promedio de células huCD45+ del 39%, similar al obtenido con injerto con PBMCs pero con una variabilidad menor (Figura 29, Tabla 12). Cuando analizamos las muestras de médula ósea y de bazo, observamos que este modelo aparte de células T, CD4 y CD8, como en la humanización basada en PBMCs, se observaban también macrófagos (CD68) y células B (CD20) (Lux et al., 2014). No observamos, sin embargo, células NK (CD56) que suelen describirse en modelos humanizados con células CD34+ con abundancias bajas en médula ósea (menor del 2%) (Rosato et al., 2018). En los tres modelos PDX humanizados con células CD34+, demostramos la infiltración de células inmunes humanas en los tumores a los 5 meses desde la inyección, en un porcentaje menor (alrededor del 5%) al conseguido con la humanización con PBMCs, pero próximo al porcentaje obtenido en otros estudios (Verma & Wesa, 2020). Los tumores crecidos en ratones humanizados con células CD34+ mostraron un crecimiento similar al que se observaba en los ratones NSG no humanizados (Figura 29). Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios, donde el crecimiento de tumores PDX de cáncer de pulmón no fue significativamente más lento en tumores humanizados en comparación con ratones no humanizados (Meraz et al., 2019). Por otro lado, al igual que ocurre con los modelos humanizados con PBMCs, se observaron diferencias en el porcentaje de humanización dependiendo del donante (Verma & Wesa, 2020). En nuestro caso estas diferencias no eran significativas (Figura 28). Para los modelos humanizados con células CD34+, y del mismo modo que para los modelos humanizados con PBMCs, la situación ideal sería aislar CMH

del mismo paciente con cáncer cuyo PDX se está utilizando, pero considerando el porcentaje tan bajo de células CD34+ que puedan aislarse en sangre periférica se dificultaría realizar estudios preclínicos a gran escala. Este hecho sumado al potencial precario estado de salud de los pacientes y el tiempo que tarda en establecerse el PDX, harían esta opción frecuentemente inviable.

Estos dos modelos de humanización se han utilizado para testar diferentes estrategias de inmunoterapia en distintos estudios. Lin y cols. llevaron a cabo tratamientos *in vivo* en ratones humanizados con PBMCs con pembrolizumab o atezolizumab y describió que los tumores CDX de líneas de cáncer de pulmón (H460 o A549) reducían significativamente su volumen. Sin embargo, los resultados en ratones humanizados con CD34+ no se reprodujeron (Lin et al., 2018). Sanmamed y cols. también demostraron un efecto de los anticuerpos urelumab y nivolumab en ratones humanizados con PBMCs de donantes distintos al tumor, reduciendo significativamente el crecimiento tumoral de xenoinjertos con células de carcinoma colorrectal humano (HT-29) y PDX de carcinoma gástrico. Además, la reducción del volumen tumoral se acompañó de un aumento de células T humanas secretoras de $IFN\gamma$ y una disminución del número de células T reguladoras en el tumor (Sanmamed et al., 2015). En cuanto a los tratamientos en modelos humanizados con células CD34+, Meraz y cols. describieron una disminución significativa en el volumen tumoral de los PDX de cáncer de pulmón en ratones humanizados tratados con pembrolizumab comparado con los ratones no humanizados, en los que no se observó ningún efecto en el crecimiento del tumor (Meraz et al., 2019). Los mismos resultados se obtuvieron en cáncer de mama, demostrando que el tratamiento con anti-PD1 redujo significativamente el crecimiento del tumor en los modelos PDX humanizados y aumentó la supervivencia comparando con modelos no humanizados (Rosato et al., 2018).

En este estudio testamos la respuesta a anti-PD-1 (pembrolizumab) en nuestros modelos PDX humanizados con células CD34+. Con el objeto de evitar variabilidad debida al donante, repartimos los ratones humanizados de cada donante que presentaban crecimiento tumoral aleatoriamente en las diferentes ramas de tratamiento. Los tres PDX elegidos tenían una alta expresión de PD-L1. En los tres experimentos el volumen de los tumores de la rama de inmunoterapia se redujo, aunque solo significativamente en uno de ellos (TP143) (Figura 40). Previamente se ha demostrado la variabilidad en la respuesta de los ratones humanizados a nivolumab con dos donantes diferentes, siendo solo en uno de ellos la reducción del volumen de los tumores significativa (Verma & Wesa, 2020). Wang y cols. también observaron variabilidad de respuesta con los diferentes donantes de células CD34+, lo que está en consonancia con las diferentes tasas de respuesta de los pacientes a la terapia anti-PD-1 en la clínica (M. Wang et al., 2018). Los mecanismos subyacentes a la variación de los donantes en la respuesta al tratamiento con pembrolizumab no están claros, y podrían derivar de la gran variedad del repertorio de células T en la población humana, que da lugar a respuestas antitumorales en algunos pacientes, pero no en todos.

2. Identificación de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con adenocarcinoma de pulmón con KRAS mutado mediante el uso de modelos preclínicos más representativos

En relación con las interacciones letales entre KRAS mutado y otras proteínas, se ha notado la relevancia de la interacción con CDK4 (Puyol et al., 2010). La inactivación genética o la inhibición farmacológica de CDK4 mostró una letalidad sintética específica en modelos tumorales de cáncer de pulmón de ratón modificados genéticamente que poseían la mutación en *KRAS*. En los últimos años, las agencias reguladoras han aprobado el uso de los inhibidores de CDK4/6 (ribociclib, palbociclib y abemaciclib) para el tratamiento del cáncer de mama avanzado y precoz tras los resultados de los ensayos clínicos (p.e. MONALEESA-2, PALOMA-1 y MONARCH-2) donde se mostraban mejoras significativas en la supervivencia libre de progresión y global (Finn et al., 2016; Hortobagyi et al., 2018; Sledge et al., 2017). Patnaik y cols., en un estudio de fase 1b, mostraron que abemaciclib presentaba mayor actividad clínica en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado con mutación en *KRAS* que en aquellos sin esta mutación (Patnaik et al., 2016). En el ensayo clínico aleatorizado de fase III JUNIPER, liderado por nuestro grupo (Goldman et al., 2020), se comparó el tratamiento con abemaciclib frente a erlotinib en pacientes con CPNM avanzado con mutación en *KRAS* tras progresión a quimioterapia. El tratamiento con abemaciclib incrementó la supervivencia libre de progresión (HR = 0.583; $p < .000001$) y la tasa de respuesta objetiva (8.9% and 2.7%; $p = .010$) comparado con el tratamiento con erlotinib, aunque no mostró impacto en la supervivencia de los pacientes, objetivo primario del ensayo. Nuestra hipótesis subsiguiente consideró que únicamente un subgrupo de tumores con mutaciones de *KRAS* presenta respuesta clínicamente relevante con los inhibidores de CDK4/6, y que sería oportuno el estudiar que factores (co-mutaciones, perfil de expresión, etc) podrían condicionar la sensibilidad en este contexto. En los tratamientos de nuestros cultivos de PDXDO con abemaciclib observamos que la sensibilidad era independiente de la presencia de la mutación en *KRAS* (Figura 30).

En el ensayo PALOMA-2 se informó de que más del 30% de los pacientes con cáncer de mama avanzado experimentaron una recidiva del cáncer en los dos años siguientes al tratamiento con inhibidores de CDK4/6 (Finn et al., 2016), y la recidiva temprana fue la norma en el estudio JUNIPER (Goldman et al., 2020). Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a los inhibidores de CDK4/6. Por ejemplo, las aberraciones en genes de vías de señalización celular como la pérdida de RB o la sobreexpresión de ciclina E (Herrera-Abreu et al., 2016). Entre nuestros 13 modelos de PDXDO de adenocarcinoma de pulmón testados encontramos tres modelos que no respondían al tratamiento con el CDK4/6i. De estos tres, el modelo TP60 presentaba una mutación en *RB1* (Figura 17), conocida como patogénica y ya estaba descrita como

mecanismo de resistencia. La activación de la ciclina D1 por señales mitógenas forma complejos con CDK4/6 que van a fosforilar RB y promover la disociación del complejo RB-E2F. Por lo tanto, RB es la primera diana de los inhibidores de CDK4, y su pérdida representa un mecanismo de resistencia, como ya han descrito varios ensayos preclínicos. En líneas celulares de cáncer de ovario resistentes a otro CDK4/6i, palbociclib, se observó pérdida de expresión de *RB1* como responsable de resistencia (Taylor-Harding et al., 2015), al igual que en explantes de xenograft de glioblastoma (Cen et al., 2012). En ensayos clínicos, se ha observado la adquisición de mutaciones en *RB1* tras la exposición a diferentes inhibidores de CDK4/6 (Condorelli et al., 2018). Por otro lado, también se ha descrito que el nivel de expresión de p16 afectaba a la eficacia de la inhibición de CDK4/6. Así Witkiewicz y cols. mostraron que la sobreexpresión de p16 mediaba la resistencia a los inhibidores de CDK4/6 en ausencia de RB (Witkiewicz et al., 2011). Sin embargo, otros dos modelos de nuestra colección de PDX que también presentan mutación en *RB1*, TP79 y TP143, no se mostraron resistentes al CDK4/6i. En concreto, el modelo TP79 presentaba una mutación no patogénica. En el caso del modelo TP143, presentaba sensibilidad reducida en los ensayos funcionales y por western blot no observamos que disminuyeran los niveles de pRB, a pesar de que la mutación se encontraba en una frecuencia alélica del 100% (Figura 30 y 33). Este resultado estaría en consonancia con otros estudios en otros tipos de tumor que sugieren que RB funcional no es un requisito absoluto para que los inhibidores de CDK4/6 muestren efecto. Long y cols. demostraron que para el cáncer de vejiga tanto los tumores RB-positivos como los RB-negativos podían responder al tratamiento (Long et al., 2020) (Castellano *et al.* 2016). En el ensayo JUNIPER, la eficacia terapéutica no se asoció con el estado de expresión de RB, que no se demostró en el 46% de los adenocarcinomas analizados (Goldman et al., 2020).

El segundo modelo resistente, el TP134, presentaba la mutación en *PI3K* E545K (Figura 17), la cual se había descrito en diversos tipos tumorales, como el carcinoma colorrectal, el gástrico, el de mama, el de pulmón o el glioblastoma (Samuels et al., 2004). En cuanto a su papel como mediador de resistencia, en el melanoma con mutación en *NRAS*, la estrategia de combinar inhibidores de MEK y CDK4/6 (MEKi + CDK4i) demostró inicialmente eficacia, el emerger de resistencia vía mutación de *PIK3CA* E545K fue observado tempranamente. Por otro lado, S6K1, una proteína crítica de la vía MAPK, se encontró activada desempeñando un papel en la resistencia secundaria a *PIK3CA* E545K (Romano et al., 2018). A nivel transcripcional, nuestro modelo TP134 mantenía activo el ciclo celular y la activación de *PI3KCA* (Figura 45).

El tercer y último modelo que presentaba resistencia al inhibidor de CDK4/6 fue el modelo TP80. La resistencia no se explicaba, en principio, por ninguno de los mecanismos descritos en la literatura. El modelo TP80 presentaba mutaciones en los genes de *AKT* y *MGA* (Figura 17). La mutación en *AKT* activaría la vía de PI3K, al igual que las mutaciones en otros efectores de esta misma vía, como hemos visto en el análisis del transcriptoma del TP80 (Figura 45). Los inhibidores CDK4/6 activan la vía de PI3K mediante la fosforilación

en AKT en células de cáncer de mama resistentes a ribociclib (Jansen et al., 2017). En el caso del gen *MGA*, supresor tumoral, su mutación se encuentra en varios tipos de cáncer incluido el adenocarcinoma de pulmón (8% de los casos) (Collisson et al., 2014). La introducción de *MGA* en células de adenocarcinoma de pulmón retrasa significativamente su crecimiento (Llabata et al., 2020), y la inactivación de *MGA* acelera la progresión del tumor en modelos murinos de adenocarcinoma de pulmón (Mathsyaraja et al., 2021). *MGA* funciona como un factor de transcripción que suprime el programa transcripcional de *MYC* e inhibe los genes diana de E2F (Hurlin et al., 1999; Ogawa et al., 2002). Estas mutaciones en nuestro modelo podrían estar activando el ciclo celular, activación que no podría revertir el inhibidor de CDK4/6 (Figura 45), aunque sería necesario validar esta hipótesis.

A nivel transcriptómico observamos que los tres modelos resistentes a CDK4/6i presentaban activación de las dianas de *MYC*, en comparación con los 10 modelos sensibles (Figura 44). La activación del ciclo celular por activación de *MYC* puede implicar varios mecanismos, ya que induce a la mayoría de los genes que codifican reguladores que activan el ciclo celular, entre los que se encuentran ciclinas, CDKs y E2F. Además, *MYC* influye en la transición de la fase G, induciendo la degradación de p27, que regula la actividad del complejo ciclina D1-CDK4/6 (Bretones et al., 2015; Obaya et al., 2002).

Los modelos respondedores a CDK4/6i presentaban a nivel transcripcional una reducción de las vías implicadas en la progresión del ciclo celular. A destacar, que, aun tratándose de un modelo preclínico inmunocomprometido, se observaba una activación de genes relacionados con la respuesta inmune. Adicionalmente se observaba un aumento de activación de la vía de WNT al tiempo que otras otras vías como PI3K se mantenían activas. Estos hechos podrían representar un mecanismo de compensación para mantener la proliferación activa (Figura 45). En el caso de WNT, su inhibición reduce la proliferación. Las mutaciones en la vía de WNT en el CPNM son poco frecuentes. En los tumores de pacientes con CPNM, entre el 37% y el 63% se tiñeron positivamente para Wnt-1 mediante IHQ que estaba asociado con mal pronóstico y una mayor expresión de *MYC*, ciclina D1 o ki67 (C. L. Huang et al., 2008; Mazieres et al., 2005; Stewart, 2014; Teng et al., 2010). Dos de nuestros modelos de adenocarcinoma con mutación en β -catenina, TP126 y TP70, presentaban escasa o nula sensibilidad al inhibidor de ERK. Cuando se suprime la expresión de β -catenina en las células de cáncer de pulmón, se produce una regulación a la baja de las dianas transcripcionales de β -catenina (*MYC*, ciclina D1 y CDK4) e inhibición de la proliferación (Han et al., 2008). La activación de esta vía se ha sugerido como mecanismo de resistencia para algunos fármacos (J. Zhao et al., 2013). El oncogén *MYC* se ha identificado como un gen diana en esta vía de señalización. Se ha demostrado que la expresión de *MYC* es reprimida por APC y activada por β -catenina, activando así el ciclo celular de las células de CPNM. Como se ha comentado previamente, la activación de *MYC* puede provenir de distintas vías, y todas contribuir a mantener activo el ciclo celular.

Al objeto de prevenir el desarrollo de resistencias y aumentar la eficacia de los inhibidores de CDK4/6, la combinación con inhibidores frente a efectores de la vía de KRAS

podría justificarse biológicamente. La mutación en *KRAS* da lugar a la activación de las vías de RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR, por tanto, la combinación de los inhibidores de CDK4/6 con efectores de estas vías de señalización podrían ser estrategias oportunas. Además, se ha identificado la activación de la vía MAPK como un mecanismo de resistencia a los inhibidores CDK4/6 (Tao et al., 2016), así como la activación de la vía PIK3/AKT/mTOR (Herrera-Abreu et al., 2016) descrita en el presente estudio (Figura 45).

La falta de disponibilidad de los inhibidores covalentes G12C cuando se inició este proyecto, nos llevó a focalizar las combinaciones de CDK4/6i con ERK1/2i en los modelos de adenocarcinoma de nuestra plataforma de PDX. Los inhibidores covalentes de KRAS-G12C, como sotorasib o adagrasib, han mostrado eficacia en ensayos clínicos en pacientes con CPNM portadores de dicha mutación. Sotorasib ha sido aprobado por las agencias reguladoras para su uso en clínica (Skoulidis et al., 2021). El principal obstáculo de estos inhibidores es la aparición de mecanismos de resistencia adquirida. Zhao y cols. han publicado recientemente la adquisición de mutaciones en *KRAS*, *NRAS* o *BRAF* en pacientes tratados con el inhibidor G12C, y la resistencia podía retrasarse con la combinación con fármacos dirigidos a la vía de ERK como SHOC2, proteína que desempeña un papel clave en la activación de la ERK1, o frente al propio ERK (Y. Zhao et al., 2021). Entre estos mecanismos de resistencias también se ha descrito la activación de RAS por receptores tirosin-quinasas y la fosfatasa SHP2 (Xue et al., 2020). Un cribado de moléculas pequeñas descubrió que los inhibidores de HER, SHP2, mTOR y CDK4/6 aumentaban la tasa de respuesta a MRTX849 en xenoinjertos mutantes de KRAS-G12C (Hallin et al., 2020). La combinación de palbocicib con el inhibidor MRTX849 demostró una inhibición casi completa de pRB en varias líneas celulares, además de inducir la expresión de p27 (Hallin et al., 2020). Adicionalmente, Canon y cols. demostraron que sotorasib producía un microambiente tumoral pro-inflamatorio y actuaba de forma sinérgica con los inhibidores dirigidos a los puntos de control del sistema inmune (Canon et al., 2019). Actualmente existen ensayos clínicos en curso combinando sotorasib/adagrasib con anti-PD1/L1 (NCT03600883, NCT03785249). Comprender los mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a los inhibidores de KRASG12C es crucial para aumentar su eficacia en los pacientes y nuestros modelos preclínicos pueden ayudar a profundizar en estos mecanismos.

2.1. CDK4/6i y ERK1/2i: una estrategia terapéutica eficaz

La vía de ERK está implicada en procesos de progresión, proliferación y migración, entre otros. La vía de ERK se activa en aproximadamente el 30% de los cánceres humanos a través de mutaciones activadoras en genes como RAS o BRAF (Roberts & Der, 2007), y por tanto su inhibición tiene interés como estrategia terapéutica. El inhibidor de ERK1/2, LY3214996, ha demostrado actividad tumoral en modelos tumorales con alteraciones en la vía de ERK, incluso en aquellos con resistencia a los inhibidores MEK y BRAF (Bhagwat et al., 2020).

Para determinar la inhibición de ERK1/2 en los modelos PDXDO se analizó la inhibición de los efectores de ERK, observando la inhibición de la fosforilación de RSK y la disminución de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en los modelos sensibles a ERK1/2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 32 y 35) (Kohler et al., 2021). Bhagwat et al. demostraron una potente inhibición de pRSK1 con el tratamiento con LY3214996 en líneas celulares de distintos tipos tumorales con mutación en *KRAS* o *BRAF*, entre ellas Calu6, línea celular de CPNM con mutación en *KRAS* (Bhagwat et al., 2020). Por otro lado, el tratamiento con LY3214996 activó la vía PI3K (pAKTSer473) como mecanismo compensatorio (Kohler et al., 2021). En nuestros estudios, se ve un aumento de pERK, tanto *in vitro* como *in vivo*, probablemente causado por la pérdida de retroalimentación negativa a través de la inhibición de la fosforilación de CRAF mediada por ERK (Dougherty et al., 2005). A pesar de este aumento de pERK, el tratamiento con ERK1/2i mantuvo el bloqueo de la señalización entre ERK y RSK.

Con otros inhibidores de ERK, se observó que las líneas con mutación en *BRAF* eran más sensibles que aquellas que presentaban mutación en *KRAS* (Morris et al., 2013). En nuestros experimentos *in vitro*, observamos que la respuesta al inhibidor de ERK1/2 era limitada, con una inhibición de la proliferación menor que con el inhibidor de CDK4/6 en muchos modelos y tres de ellos presentaron resistencia (Figura 30). En el estudio clínico en Fase 1 con el inhibidor de ERK1/2 ulixertinib, se observó una respuesta tumoral en pacientes con tumores sólidos con mutación *NRAS* y *BRAF*, pero no en los tumores con mutación *KRAS* (Sullivan et al., 2018).

La eficacia clínica del ERK1/2i LY3214996 está siendo evaluada. Los modelos preclínicos que hemos establecido pueden proporcionarnos una herramienta adecuada para entender los mecanismos de resistencia a esta terapia antes de que surja en la clínica, y permita desarrollar entonces estrategias eficaces para la reversión o prevención clínica de la resistencia intrínseca o adquirida. La combinación de ERK1/2i con otros fármacos dirigidos podría aumentar el beneficio de este inhibidor en los pacientes con cáncer con mutación en *KRAS*. Actualmente se está llevando a cabo un estudio en Fase 1 de LY3214996 administrado solo o en combinación con otros agentes en pacientes con cáncer avanzado/metastásico (NCT02857270), entre los que se encuentra el inhibidor de CDK4/6i, abemaciclib.

Köhler y cols. observaron que la combinación de ambos fármacos mostró una supresión más profunda de la fosforilación de RB, ERK1/2 y S6, así como de los niveles de proteína MYC, que con cualquiera de los dos fármacos por separado (Kohler et al., 2021). En nuestros cultivos de PDXDO comprobamos los mismos efectos, observando una reducción completa de la fosforilación de RB (pRB807-811) por western blot en algunos modelos (Figura 32). El tratamiento con CDK4/6i suprimió la fosforilación de S6, mediante inhibición de la actividad de mTOR por CDK4. Kohler y cols describieron un mayor sinergismo en presencia de co-mutaciones en p53 y LKB1 (Kohler et al., 2021). En nuestros

modelos con co-mutación *LKB1* y *TP53*, TP43 y TP70, la combinación fue efectiva, al igual que los modelos *LKB1* y *KRAS*, como el TP80 o TP148 (Figura 30).

Con ambos fármacos en combinación observamos una mayor inactivación del ciclo celular y por tanto de la progresión celular (Figura 46 y 47). Mediante Western Blot observamos un incremento de p27 tras la exposición al tratamiento combinado, cuando la pérdida de p27 está descrita como un mecanismo de resistencia a los inhibidores de CDK4/6 (Figura 32-33; Figura 35-36). Además, el aumento de la activación de la vía de PI3K fue revertido con la combinación, así como el aumento de la activación de la vía de WNT. Estos datos refrendan el efecto de la combinación sobre la proliferación y la supervivencia celular (Figura 47).

2.2. Combinaciones de CDK4/6i e inmunoterapia

Como ya se comentó en la introducción, varios estudios han descrito que los inhibidores de CDK4/6 producían un aumento de la infiltración de células inmunes en el tumor y un aumento de la expresión de PD-L1, proponiendo la combinación de inhibidores de CDK4/6 con inmunoterapia como una estrategia para tratar a los pacientes oncológicos (Deng et al., 2018; Goel et al., 2017; Schaer et al., 2018). Los análisis transcripcionales del ARN extraído de los cultivos de PDXDO tratados con abemaciclib demostraron el aumento de inflamación de estas muestras (Figura 45).

La primera de las estrategias propuestas fue comprobar *in vitro* si la combinación tenía algún efecto en tumores con *KRAS* mutado con alta expresión de PD-L1. A pesar de obtener una buena infiltración de células T en el matrigel interaccionando con las células tumorales, no se observó un aumento de caspasa 3 en los co-cultivos frente al mismo tratamiento sin la presencia de linfocitos T (Figura 37). En cuanto al tratamiento realizado en los ratones humanizados con las PBMCs y en los que se implantó el modelo PDX TP57, no se obtuvo respuesta en la rama de tratamiento con inmunoterapia respecto al control. Varias causas pudieran subyacer a estos resultados, siendo la variabilidad del donante de las PBMCs la principal causa, como se ha discutido previamente. Un experimento en paralelo con varios donantes diferentes pudiera haber sido oportuno, ya que la humanización podría estar causando un efecto sobre el crecimiento de los tumores que podría enmascarar el efecto específico del fármaco (Figura 27). Cuando se analizó el efecto de la combinación frente a los fármacos de inmunoterapia, en los modelos humanizados con células CD34+, se observó una reducción de los tumores en los modelos humanizados, no aumentando el beneficio frente a la monoterapia. Es importante resaltar que no observamos un aumento de la infiltración de células inmunes en los tumores tratados con el inhibidor CDK4/6, como está descrito en la literatura (Figura 39 y 41).

No obstante, otros estudios han testado la combinación de CDK4/6 con inmunoterapia con resultados positivos en otros tipos tumorales. Los estudios realizados en CDX, PDX y

modelos animales singénicos de cáncer de vejiga sugirieron que la inhibición de la vía CDK4/6, sola o en combinación con la inmunoterapia anti-PD-1, pudiera servir como terapia adecuada para estos pacientes (Long et al., 2020). Resultados similares se han obtenido en modelos murinos singénicos de cáncer de ovario (Q. F. Zhang et al., 2020) o cáncer de mama (Schaer et al., 2018), consiguiendo resultados optimizados con la combinación de abemaciclib y anti-PD1, aumentando la infiltración de células CD4 y CD8, comparado con el tratamiento en monoterapia.

El tratamiento de los ratones genéticamente modificados con mutación en *Kras* (modelo inmunocompetente) con la combinación de CD4/6i y anti-PD-1, tampoco mejoró la eficacia frente al tratamiento en monoterapia. En este sentido debemos de señalar que los niveles de expresión PD-L1 en los tumores originados en los GEMMs son bajos (Figura 43), lo que podía explicar la ausencia de eficacia de la inmunoterapia en este modelo murino (Rosato et al., 2018)

Hay varios ensayos clínicos iniciados para estudiar la combinación, con inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib o palbociclib) e inhibidores de PD-1 o PD-L1 (NCT03147287, NCT03573648, NCT02779751, NCT02778685) la mayoría sin resultados publicados todavía. En concreto, Pujol et al. mostraron los resultados con abemaciclib en combinación con anti-PD-L1 en cáncer de pulmón y no reflejaban mejores resultados que con la monoterapia en concordancia con nuestros resultados (Pujol et al., 2020).

CONCLUSIONES

1. Es factible el establecimiento de una colonia de PDX estable de CPNM. Hemos establecido una colección de 45 modelos PDX (tasa de éxito: 36,6%), que representa los diferentes subtipos histológicos y moleculares de los pacientes con CPNM. Tales características histológicas y moleculares se mantienen a lo largo de los pases, lo que permitirá la utilización de esta herramienta experimental para testar nuevas estrategias terapéuticas en fase preclínica.
2. Es viable la generación de cultivos de PDXDO y PDXDO en co-cultivo con células T a partir de PDX. En nuestra colección la tasa de éxito fue del 100%. Los PDXDO conservan las características histológicas y moleculares de los modelos PDX de los que derivan, y, por tanto, de los tumores de los pacientes donantes. Esta colección de modelos celulares en 3D constituye una herramienta útil para el cribado de fármacos y otras estrategias terapéuticas *in vitro*.
3. La génesis de modelos de PDX humanizados utilizando PBMCs o progenitores hematopoyéticos (CD34+) permiten la evaluación de estrategias de inmunoterapia. En ambos tipos de modelos constatamos la infiltración tumoral de células inmunes humanas en el tumor, que en el caso del modelo de células CD34+ contiene una representación más fisiológica de subtipos celulares inmunes.
4. La combinación del inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib) con el inhibidor de ERK 1/2 (LY3214996) demostró, en nuestros modelos PDXDO y PDX con adenocarcinoma de pulmón con *KRAS* mutado, ser más eficaz que los mismos fármacos en monoterapia. Por el contrario, la combinación del inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib) con inmunoterapia (pembolizumab) no mostró un beneficio mayor que el inhibidor en monoterapia en nuestros modelos.
5. Es viable y de utilidad la utilización estudios genómicos y transcriptómicos en modelos PDXO y PDX para diseccionar los efectos farmacodinámicos de las terapias evaluadas, e identificar biomarcadores predictivos de respuesta. Así comprobamos que la combinación del inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib) con el inhibidor de ERK 1/2 (LY3214996) inhibe el ciclo celular en mayor medida que el tratamiento en monoterapia, y revierte la activación de las vías de PI3K y de WNT observada con el tratamiento en monoterapia con el inhibidor de CDK4/6.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Mulla, F., Milner-White, E. J., Going, J. J., & Birnie, G. D. (1999). Structural differences between valine-12 and aspartate-12 Ras proteins may modify carcinoma aggression. *Journal of Pathology*, 187(4), 433–438. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199903\)187:4<433::AID-PATH273>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199903)187:4<433::AID-PATH273>3.0.CO;2-E)

American Cancer Society. (2021). *Cancer Facts and Figures 2021*. PDF Disponible. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf>

Antonia, S. J., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Kurata, T., Chiappori, A., Lee, K. H., de Wit, M., Cho, B. C., Bourhaba, M., Quantin, X., Tokito, T., Mekhail, T., Planchard, D., Kim, Y.-C., Karapetis, C. S., Hiret, S., ... Özgüroğlu, M. (2018). Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *New England Journal of Medicine*, 379(24), 2342–2350. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1809697>

Antonia, S. J., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Yokoi, T., Chiappori, A., Lee, K. H., de Wit, M., Cho, B. C., Bourhaba, M., Quantin, X., Tokito, T., Mekhail, T., Planchard, D., Kim, Y.-C., Karapetis, C. S., Hiret, S., ... Özgüroğlu, M. (2017). Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(20), 1919–1929. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1709937>

Awad, M. M., Liu, S., Rybkin, I. I., Arbour, K. C., Dilly, J., Zhu, V. W., Johnson, M. L., Heist, R. S., Patil, T., Riely, G. J., Jacobson, J. O., Yang, X., Persky, N. S., Root, D. E., Lowder, K. E., Feng, H., Zhang, S. S., Haigis, K. M., Hung, Y. P., ... Aguirre, A. J. (2021). Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibition in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 384(25), 2382–2393. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2105281>

Bacac, M., Fauti, T., Sam, J., Colombetti, S., Weinzierl, T., Ouaret, D., Bodmer, W., Lehmann, S., Hofer, T., Hosse, R. J., Moessner, E., Ast, O., Bruenker, P., Grau-Richards, S., Schaller, T., Seidl, A., Gerdes, C., Perro, M., Nicolini, V., ... Umaña, P. (2016). A Novel Carcinoembryonic Antigen T Cell Bispecific Antibody (CEA TCB) for the Treatment of Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 22(13), 3286–3297. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1696>

Bagchi, S., Yuan, R., & Engleman, E. G. (2021). Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annual Review of Pathology*, 16, 223–249. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042020>

Bailey, M. H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M. C., Kim, J., Reardon, B., Ng, P. K. S., Jeong, K. J., Cao, S., Wang, Z., Gao, J., Gao, Q., Wang, F., Liu, E. M., Mularoni, L., ... Karchin, R. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*, 173(2), 371–385. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.060>

Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(23), 5591–5596. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>

- Beroukhi, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., McHenry, K. T., Pinchback, R. M., Ligon, A. H., Cho, Y. J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M. S., ... Meyerson, M. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463(7283), 899–905. <https://doi.org/10.1038/nature08822>
- Bhagwat, S. v., McMillen, W. T., Cai, S., Zhao, B., Whitesell, M., Shen, W., Kindler, L., Flack, R. S., Wu, W., Anderson, B., Zhai, Y., Yuan, X. J., Pogue, M., van Horn, R. D., Rao, X., McCann, D., Dropsey, A. J., Manro, J., Walgren, J., ... Peng, S. bin. (2020). ERK Inhibitor LY3214996 Targets ERK Pathway–Driven Cancers: A Therapeutic Approach Toward Precision Medicine. *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(2), 325–336. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0183>
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611–622. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>
- Blumenschein, G. R., Smit, E. F., Planchard, D., Kim, D. W., Cadranel, J., de Pas, T., Dunphy, F., Udud, K., Ahn, M. J., Hanna, N. H., Kim, J. H., Mazieres, J., Kim, S. W., Baas, P., Rappold, E., Redhu, S., Puski, A., Wu, F. S., & Jänne, P. A. (2015). A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Annals of Oncology*, 26(5), 894–901. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv072>
- Boj, S. F., Hwang, C. il, Baker, L. A., Chio, I. I. C., Engle, D. D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvisé, M., Tiriác, H., Spector, M. S., Gracanin, A., Oni, T., Yu, K. H., van Boxtel, R., Huch, M., Rivera, K. D., Wilson, J. P., Feigin, M. E., Öhlund, D., ... Tuveson, D. A. (2015). Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 160(1–2), 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.021>
- Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, 129(5), 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>
- Bretones, G., Delgado, M. D., & León, J. (2015). Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.013>
- Bruna, A., Rueda, O. M., Greenwood, W., Batra, A. S., Callari, M., Batra, R. N., Pogrebniak, K., Sandoval, J., Cassidy, J. W., Tufegdžic-Vidakovic, A., Sammut, S. J., Jones, L., Provenzano, E., Baird, R., Eirew, P., Hadfield, J., Eldridge, M., McLaren-Douglas, A., Barthorpe, A., ... Caldas, C. (2016). A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds. *Cell*, 167(1), 260–274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.041>
- Calles, A., Liao, X., Sholl, L. M., Rodig, S. J., Freeman, G. J., Butaney, M., Lydon, C., Dahlberg, S. E., Hodi, F. S., Oxnard, G. R., Jackman, D. M., & Jänne, P. A. (2015). Expression of PD-1 and Its Ligands, PD-L1 and PD-L2, in Smokers and Never Smokers with KRAS-

Mutant Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(12), 1726–1735.
<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000687>

Canadian Task Force on Preventive Health Care. (2016). Recommendations on screening for lung cancer. *Canadian Medical Association Journal*, 188(6), 425–432.
<https://doi.org/10.1503/cmaj.151421/-/DC1>

Cancer Genome Atlas Research Network. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489(7417), 519–525.
<https://doi.org/10.1038/nature11404>

Canon, J., Rex, K., Saiki, A. Y., Mohr, C., Cooke, K., Bagal, D., Gaida, K., Holt, T., Knutson, C. G., Koppada, N., Lanman, B. A., Werner, J., Rapaport, A. S., San Miguel, T., Ortiz, R., Osgood, T., Sun, J. R., Zhu, X., McCarter, J. D., ... Lipford, J. R. (2019). The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*, 575(7781), 217–223.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1694-1>

Castellano, D., Rubio, C., López-Calderón, F., Segovia, C., Dueñas, M., Martínez-Fernández, M., Otero, I., Manneh, R., De Velasco, G., & Paramio, J. (2016). Cdk4/6 inhibitor activity in metastatic bladder cancer cell lines is independently of RB1 status. *Annals of Oncology* 27 ix1–ix8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw573.007>

Cen, L., Carlson, B. L., Schroeder, M. A., Ostrem, J. L., Kitange, G. J., Mladek, A. C., Fink, S. R., Decker, P. A., Wu, W., Kim, J. S., Waldman, T., Jenkins, R. B., & Sarkaria, J. N. (2012). p16-Cdk4-Rb axis controls sensitivity to a cyclin-dependent kinase inhibitor PD0332991 in glioblastoma xenograft cells. *Neuro-Oncology*, 14(7), 870–881.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/nos114>

Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Egen, J. G., & Allison, J. P. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. *Annual Review of Immunology*, 19, 565–594.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.565>

Chen, Y., Zhang, R., Wang, L., Correa, A. M., Pataer, A., Xu, Y., Zhang, X., Ren, C., Wu, S., Meng, Q. H., Fujimoto, J., Jensen, V. B., Antonoff, M. B., Hofstetter, W. L., Mehran, R. J., Pisimisis, G., Rice, D. C., Sepesi, B., Vaporciyan, A. A., ... Fang, B. (2019). Tumor characteristics associated with engraftment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts in immunocompromised mice. *Cancer*, 125(21), 3738–3748.
<https://doi.org/10.1002/cncr.32366>

Cheng, D. T., Mitchell, T. N., Zehir, A., Shah, R. H., Benayed, R., Syed, A., Chandramohan, R., Liu, Z. Y., Won, H. H., Scott, S. N., Rose Brannon, A., O'Reilly, C., Sadowska, J., Casanova, J., Yannes, A., Hechtman, J. F., Yao, J., Song, W., Ross, D. S., ... Berger, M. F. (2015). Memorial Sloan Kettering-integrated mutation profiling of actionable cancer targets (MSK-IMPACT): A hybridization capture-based next-generation sequencing clinical assay for solid tumor molecular oncology. *Journal of Molecular Diagnostics*, 17(3), 251–264.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.12.006>

- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, 70(2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Collisson, E. A., Campbell, J. D., Brooks, A. N., Berger, A. H., Lee, W., Chmielecki, J., Beer, D. G., Cope, L., Creighton, C. J., Danilova, L., Ding, L., Getz, G., Hammerman, P. S., Hayes, D. N., Hernandez, B., Herman, J. G., Heymach, J. v., Jurisica, I., Kucherlapati, R., ... Cheney, R. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*, 511(7511), 543–550. <https://doi.org/10.1038/nature13385>
- Condorelli, R., Spring, L., O'Shaughnessy, J., Lacroix, L., Bailleux, C., Scott, V., Dubois, J., Nagy, R. J., Lanman, R. B., Iafrate, A. J., Andre, F., & Bardia, A. (2018). Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 29(3), 640–645. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx784>
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
- Cuenca, R. E., Takita, H., & Bankert, R. (1996). Orthotopic engraftment of human lung tumours in SCID mice for the study of metastasis. *Surgical Oncology*, 5(2), 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0960-7404\(96\)80005-3](https://doi.org/10.1016/S0960-7404(96)80005-3)
- Cutz, J. C., Guan, J., Bayani, J., Yoshimoto, M., Xue, H., Sutcliffe, M., English, J., Flint, J., LeRiche, J., Yee, J., Squire, J. A., Gout, P. W., Lam, S., & Wang, Y. Z. (2006). Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancers: Potential models for studying tumor progression-related changes. *Clinical Cancer Research*, 12(13), 4043–4054. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0252>
- Daniel, V. C., Marchionni, L., Hierman, J. S., Rhodes, J. T., Devereux, W. L., Rudin, C. M., Yung, R., Parmigiani, G., Dorsch, M., Peacock, C. D., & Watkins, D. N. (2009). A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Research*, 69(8), 3364–3373. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4210>
- Deng, J., Wang, E. S., Jenkins, R. W., Li, S., Dries, R., Yates, K., Chhabra, S., Huang, W., Liu, H., Aref, A. R., Ivanova, E., Paweletz, C. P., Bowden, M., Zhou, C. W., Herter-Sprie, G. S., Sorrentino, J. A., Bisi, J. E., Lizotte, P. H., Merlino, A. A., ... Wong, K. K. (2018). CDK4/6 inhibition augments antitumor immunity by enhancing T-cell activation. *Cancer Discovery*, 8(2), 216–233. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0915>
- Derose, Y. S., Wang, G., Lin, Y. C., Bernard, P. S., Buys, S. S., Ebbert, M. T. W., Factor, R., Matsen, C., Milash, B. A., Nelson, E., Neumayer, L., Randall, R. L., Stijleman, I. J., Welm, B. E., & Welm, A. L. (2011). Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nature Medicine*, 17(11), 1514–1520. <https://doi.org/10.1038/nm.2454>

- Dickler, M. N., Tolaney, S. M., Rugo, H. S., Cortes, J., Dieras, V., Patt, D., Wildiers, H., Hudis, C. A., O'Shaughnessy, J., Zamora, E., Yardley, D. A., Frenzel, M., Koustenis, A., & Baselga, J. (2017). MONARCH 1, A Phase II Study of Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 Inhibitor, as a Single Agent, in Patients with Refractory HR+/HER2- Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(17), 5218–5224. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0754>
- Dienstmann, R., Rodon, J., Prat, A., Perez-Garcia, J., Adamo, B., Felip, E., Cortes, J., Iafrate, A. J., Nuciforo, P., & Tabernero, J. (2014). Genomic aberrations in the FGFR pathway: Opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Annals of Oncology*, 25(3), 552–563. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt419>
- Dijkstra, K. K., Cattaneo, C. M., Weeber, F., Chalabi, M., van de Haar, J., Fanchi, L. F., Slagter, M., van der Velden, D. L., Kaing, S., Kelderman, S., van Rooij, N., van Leerdam, M. E., Depla, A., Smit, E. F., Hartemink, K. J., de Groot, R., Wolkers, M. C., Sachs, N., Snaebjornsson, P., ... Voest, E. E. (2018). Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell*, 174(6), 1586-1598.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.009>
- Dimasi, J. A., Reichert, J. M., Feldman, L., & Malins, A. (2013). Clinical approval success rates for investigational cancer drugs. *Clinical Pharmacology and Therapeutic*, 94(3), 329–335. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.117>
- Ding, L., Ellis, M. J., Li, S., Larson, D. E., Chen, K., Wallis, J. W., Harris, C. C., McLellan, M. D., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Abbott, R. M., Hoog, J., Dooling, D. J., Koboldt, D. C., Schmidt, H., Kalicki, J., Zhang, Q., Chen, L., Lin, L., ... Mardis, E. R. (2010). Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*, 464(7291), 999–1005. <https://doi.org/10.1038/nature08989>
- Doebele, R. C., Drilon, A., Paz-Ares, L., Siena, S., Shaw, A. T., Farago, A. F., Blakely, C. M., Seto, T., Cho, B. C., Tosi, D., Besse, B., Chawla, S. P., Bazhenova, L., Krauss, J. C., Chae, Y. K., Barve, M., Garrido-Laguna, I., Liu, S. v., Conkling, P., ... Demetri, G. D. (2020). Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *The Lancet Oncology*, 21(2), 271–282. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30691-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30691-6)
- Dogan, S., Shen, R., Ang, D. C., Johnson, M. L., D'Angelo, S. P., Paik, P. K., Brzostowski, E. B., Riely, G. J., Kris, M. G., Zakowski, M. F., & Ladanyi, M. (2012). Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: Higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clinical Cancer Research*, 18(22), 6169–6177. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3265>
- Dong, J., Li, B., Lin, D., Zhou, Q., & Huang, D. (2019). Advances in Targeted Therapy and Immunotherapy for Non-small Cell Lung Cancer Based on Accurate Molecular Typing. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 230. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00230>

- Dong, X., Guan, J., English, J. C., Flint, J., Yee, J., Evans, K., Murray, N., MacAulay, C., Ng, R. T., Gout, P. W., Lam, W. L., Laskin, J., Ling, V., Lam, S., & Wang, Y. (2010). Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: Promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 16(5), 1442–1451. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2878>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Dougherty, M. K., Müller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., & Morrison, D. K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Molecular Cell*, 17(2), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.055>
- Drilon, A., Nagasubramanian, R., Blake, J. F., Ku, N., Tuch, B. B., Ebata, K., Smith, S., Lauriault, V., Kolakowski, G. R., Brandhuber, B. J., Larsen, P. D., Bouhana, K. S., Winski, S. L., Hamor, R., Wu, W. I., Parker, A., Morales, T. H., Sullivan, F. X., DeWolf, W. E., ... Hyman, D. M. (2017). A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Cancer Discovery*, 7(9), 963–972. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0507>
- Drilon, A., Ou, S. H. I., Cho, B. C., Kim, D. W., Lee, J., Lin, J. J., Zhu, V. W., Ahn, M. J., Camidge, D. R., Nguyen, J., Zhai, D., Deng, W., Huang, Z., Rogers, E., Liu, J., Whitten, J., Lim, J. K., Stopatschinskaja, S., Hyman, D. M., ... Shaw, A. T. (2018). Repotrectinib (TPX-0005) is a Next-Generation ROS1/TRK/ALK Inhibitor that Potently Inhibits ROS1/TRK/ALK Solvent-Front Mutations. *Cancer Discovery*, 8(10), 1227–1236. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0484>
- Drilon, A., Oxnard, G. R., Tan, D. S. W., Loong, H. H. F., Johnson, M., Gainor, J., McCoach, C. E., Gautschi, O., Besse, B., Cho, B. C., Peled, N., Weiss, J., Kim, Y.-J., Ohe, Y., Nishio, M., Park, K., Patel, J., Seto, T., Sakamoto, T., ... Subbiah, V. (2020). Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 383(9), 813–824. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2005653>
- Drost, J., Karthaus, W. R., Gao, D., Driehuis, E., Sawyers, C. L., Chen, Y., & Clevers, H. (2016). Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nature Protocols*, 11(2), 347–358. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.006>
- Engelman, J. A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A. R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S. A., Song, Y., Chirieac, L. R., Kaur, R., Lightbown, A., Simendinger, J., Li, T., Padera, R. F., García-Echeverría, C., Weissleder, R., Mahmood, U., ... Wong, K. K. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature Medicine*, 14(12), 1351–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.1890>

Ercan, D., Choi, H. G., Yun, C. H., Capelletti, M., Xie, T., Eck, M. J., Gray, N. S., & Jänne, P. A. (2015). EGFR mutations and resistance to irreversible pyrimidine-based EGFR inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 21(17), 3913–3923. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2789>

Faivre-Finn, C., Vicente, D., Kurata, T., Planchard, D., Paz-Ares, L., Vansteenkiste, J. F., Spigel, D. R., Garassino, M. C., Reck, M., Senan, S., Naidoo, J., Rimner, A., Wu, Y. L., Gray, J. E., Özgüroğlu, M., Lee, K. H., Cho, B. C., Kato, T., de Wit, M., ... Antonia, S. J. (2021). Four-Year Survival With Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC—an Update From the PACIFIC Trial. *Journal of Thoracic Oncology*, 16(5), 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.12.015>

Felip, E., Altorki, N., Zhou, C., Csósz, T., Vynnychenko, I., Goloborodko, O., Luft, A., Akopov, A., Martinez-Marti, A., Kenmotsu, H., Chen, Y. M., Chella, A., Sugawara, S., Voong, D., Wu, F., Yi, J., Deng, Y., McClelland, M., Bennett, E., ... Wakelee, H. (2021). Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 398(10308), 1344–1357. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02098-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02098-5)

Fichtner, I., Rolff, J., Soong, R., Hoffmann, J., Hammer, S., Sommer, A., Becker, M., & Merk, J. (2008). Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clinical Cancer Research*, 14(20), 6456–6468. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0138>

Finn, R. S., Martin, M., Rugo, H. S., Jones, S., Im, S.-A., Gelmon, K., Harbeck, N., Lipatov, O. N., Walshe, J. M., Moulder, S., Gauthier, E., Lu, D. R., Randolph, S., Diéras, V., & Slamon, D. J. (2016). Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(20), 1925–1936. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1607303>

Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology*, 4(12), 941–952. <https://doi.org/10.1038/nri1498>

Gainor, J. F., Curigliano, G., Kim, D. W., Lee, D. H., Besse, B., Baik, C. S., Doebele, R. C., Cassier, P. A., Lopes, G., Tan, D. S. W., Garralda, E., Paz-Ares, L. G., Cho, B. C., Gadgeel, S. M., Thomas, M., Liu, S. v., Taylor, M. H., Mansfield, A. S., Zhu, V. W., ... Subbiah, V. (2021). Pralsetinib for RET fusion-positive non-small-cell lung cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, phase 1/2 study. *The Lancet Oncology*, 22(7), 959–969. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00247-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00247-3)

Gao, D., Vela, I., Sboner, A., Iaquinta, P. J., Karthaus, W. R., Gopalan, A., Dowling, C., Wanjala, J. N., Undvall, E. A., Arora, V. K., Wongvipat, J., Kossai, M., Ramazanoglu, S., Barboza, L. P., Di, W., Cao, Z., Zhang, Q. F., Sirota, I., Ran, L., ... Chen, Y. (2014). Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*, 159(1), 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.016>

Garnett, M. J., Edelman, E. J., Heidorn, S. J., Greenman, C. D., Dastur, A., Lau, K. W., Greninger, P., Thompson, I. R., Luo, X., Soares, J., Liu, Q., Iorio, F., Surdez, D., Chen, L.,

- Milano, R. J., Bignell, G. R., Tam, A. T., Davies, H., Stevenson, J. A., ... Benes, C. H. (2012). Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature*, 483(7391), 570–575. <https://doi.org/10.1038/nature11005>
- Garrison, E., & Marth, G. (2012). *Haplotype-based variant detection from short-read sequencing*. 1–9. <http://arxiv.org/abs/1207.3907>
- Gautschi, O., Milia, J., Cabarro, B., Bluthgen, M. V., Besse, B., Smit, E. F., Wolf, J., Peters, S., Früh, M., Koeberle, D., Oulkhoudir, Y., Schuler, M., Curioni-Fontecedro, A., Huret, B., Kerjouan, M., Michels, S., Pall, G., Rothschild, S., Schmid-Bindert, G., ... Mazières, J. (2015). Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer results from the European EURAF cohort. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(10), 1451–1457. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000625>
- George, E., Kim, H., Krepler, C., Wenz, B., Makvandi, M., Tanyi, J. L., Brown, E., Zhang, R., Brafford, P., Jean, S., Mach, R. H., Lu, Y., Mills, G. B., Herlyn, M., Morgan, M., Zhang, X., Soslow, R., Drapkin, R., Johnson, N., ... Simpkins, F. (2017). A patient-derived-xenograft platform to study BRCA-deficient ovarian cancers. *JCI Insight*, 2(1), E89760. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89760>
- Gillet, J. P., Calcagno, A. M., Varma, S., Marino, M., Green, L. J., Vora, M. I., Patel, C., Orina, J. N., Eliseeva, T. A., Singal, V., Padmanabhan, R., Davidson, B., Ganapathi, R., Sood, A. K., Rueda, B. R., Ambudkar, S. v., & Gottesman, M. M. (2011). Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), 18708–18713. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111840108>
- Godugu, C., Patel, A. R., Desai, U., Andey, T., Sams, A., & Singh, M. (2013). Algimatrix™ based 3D cell culture system as an in-Vitro tumor model for anticancer studies. *PLoS ONE*, 8(1), E53708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053708>
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 871–882. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>
- Goel, S., Decristo, M. J., Watt, A. C., Brinjones, H., Sceneay, J., Li, B. B., Khan, N., Ubellacker, J. M., Xie, S., Metzger-Filho, O., Hoog, J., Ellis, M. J., Ma, C. X., Ramm, S., Krop, I. E., Winer, E. P., Roberts, T. M., Kim, H. J., McAllister, S. S., & Zhao, J. J. (2017). CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*, 548(7668), 471–475. <https://doi.org/10.1038/nature23465>
- Goldman, J. W., Mazieres, J., Barlesi, F., Dragnev, K. H., Koczywas, M., Göskel, T., Cortot, A. B., Girard, N., Wessler, C., Bischoff, H., Nadal, E., Park, K., Lu, S., Taus, A., Cobo, M., Estrem, S. T., Wijayawardana, S. R., Turner, K., Oakley, G. J., ... Paz-Ares, L. (2020). A Randomized Phase III Study of Abemaciclib Versus Erlotinib in Patients with Stage IV Non-small Cell Lung Cancer With a Detectable KRAS Mutation Who Failed Prior Platinum-Based Therapy: JUNIPER. *Frontiers in Oncology*, 10, 578756. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.578756>

Goldman, J. W., Shi, P., Reck, M., Paz-Ares, L., Koustenis, A., & Hurt, K. C. (2016). Treatment Rationale and Study Design for the JUNIPER Study: A Randomized Phase III Study of Abemaciclib with Best Supportive Care Versus Erlotinib with Best Supportive Care in Patients with Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer with a Detectable KRAS Mutation Whose Disease Has Progressed after Platinum-Based Chemotherapy. *Clinical Lung Cancer*, 17(1), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2015.08.003>

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6, pp. 883–899). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., & Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell*, 4(2), 111–120. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00191-0)

Gysin, S., Lee, S.-H., Dean, N. M., & McMahon, M. (2005). Pharmacologic inhibition of RAF→MEK→ERK signaling elicits pancreatic cancer cell cycle arrest through induced expression of p27Kip1. *Cancer Research*, 65(11), 4870–4880. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2848>

Hallin, J., Engstrom, L. D., Hargi, L., Calinisan, A., Aranda, R., Briere, D. M., Sudhakar, N., Bowcut, V., Baer, B. R., Ballard, J. A., Burkard, M. R., Fell, J. B., Fischer, J. P., Vigers, G. P., Xue, Y., Gatto, S., Fernandez-Banet, J., Pavlicek, A., Velastagui, K., ... Christensen, J. G. (2020). The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discovery*, 10(1), 54–71. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1167>

Han, A., Song, Z., Tong, C., Hu, D., Bi, X., Augenlicht, L. H., & Yang, W. (2008). Sulindac suppresses β -catenin expression in human cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 583(1), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.034>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

He, X., & Xu, C. (2020). Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*, 30(8), 660–669. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0343-4>

Heist, R. S., & Engelman, J. A. (2012). SnapShot: Non-Small Cell Lung Cancer. In *Cancer Cell* (Vol. 21, Issue 3). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.007>

Herbst, R. S., Heymach, J. v., & Lippman, S. M. (2008). Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(13), 1367–1380. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0802714>

Hernandez, M. C., Bergquist, J. R., Leiting, J. L., Ivanics, T., Yang, L., Smoot, R. L., Nagorney, D. M., & Truty, M. J. (2019). Patient-Derived Xenografts Can Be Reliably Generated from Patient Clinical Biopsy Specimens. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 23(4), 818–824. <https://doi.org/10.1007/s11605-019-04109-z>

Herrera-Abreu, M. T., Palafox, M., Asghar, U., Rivas, M. A., Cutts, R. J., Garcia-Murillas, I., Pearson, A., Guzman, M., Rodriguez, O., Grueso, J., Bellet, M., Cortés, J., Elliott, R., Pancholi, S., Baselga, J., Dowsett, M., Martin, L. A., Turner, N. C., & Serra, V. (2016). Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Research*, 76(8), 2301–2313. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0728>

Herter-Sprie, G. S., Kung, A. L., & Wong, K. K. (2013). New cast for a new era: Preclinical cancer drug development revisited. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 123, Issue 9, pp. 3636–3645). <https://doi.org/10.1172/JCI68340>

Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. v., Budinská, E., Byrne, A. T., Caldas, C., Clarke, R. B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G. M., Roman-Roman, S., Seoane, J., Trusolino, L., & Villanueva, A. (2014). Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discovery*, 4(9), 998–1013. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>

Hirsch, F. R., Scagliotti, G. v., Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran, W. J., Wu, Y. L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*, 389(10066), 299–311. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30958-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8)

Hoffman, R. M. (2015). Patient-derived orthotopic xenografts: Better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nature Reviews Cancer*, 15(8), 451–452. <https://doi.org/10.1038/nrc3972>

Hortobagyi, G. N., Stemmer, S. M., Burris, H. A., Yap, Y. S., Sonke, G. S., Paluch-Shimon, S., Campone, M., Petrakova, K., Blackwell, K. L., Winer, E. P., Janni, W., Verma, S., Conte, P., Arteaga, C. L., Cameron, D. A., Mondal, S., Su, F., Miller, M., Elmeliogy, M., ... O'Shaughnessy, J. (2018). Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Annals of Oncology*, 29(7), 1541–1547. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy155>

Houghton, A. M. G. (2013). Mechanistic links between COPD and lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), 233–245. <https://doi.org/10.1038/nrc3477>

Huang, C. L., Liu, D., Ishikawa, S., Nakashima, T., Nakashima, N., Yokomise, H., Kadota, K., & Ueno, M. (2008). Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 44(17), 2680–2688. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.08.004>

Huang, L., Bockorny, B., Paul, I., Akshinthala, D., Frappart, P. O., Gandarilla, O., Bose, A., Sanchez-Gonzalez, V., Rouse, E. E., Lehoux, S. D., Pandell, N., Lim, C. M., Clohessy, J. G., Grossman, J., Gonzalez, R., Pino, S. P. del, Daaboul, G., Sawhney, M. S., Freedman, S. D., ... Muthuswamy, S. K. (2020). PDX-derived organoids model in vivo drug response and secrete biomarkers. *JCI Insight*, 5(21), E135544. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.135544>

Huang, L., Holtzinger, A., Jagan, I., Begora, M., Lohse, I., Ngai, N., Nostro, C., Wang, R., Muthuswamy, L. B., Crawford, H. C., Arrowsmith, C., Kalloger, S. E., Renouf, D. J., Connor, A. A., Cleary, S., Schaeffer, D. F., Roehrl, M., Tsao, M. S., Gallinger, S., ... Muthuswamy, S. K. (2015). Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nature Medicine*, 21(11), 1364–1371. <https://doi.org/10.1038/nm.3973>

Hurlin, P. J., Eiríkur, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Eisenman, R. N. (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *The EMBO Journal*, 18(24), 7019–7028. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.7019>

Huynh, T. G., Morales-Oyarvide, V., Campo, M. J., Gainor, J. F., Bozkurtlar, E., Uruga, H., Zhao, L., Gomez-Caraballo, M., Hata, A. N., Mark, E. J., Lanuti, M., Engelman, J. A., & Mino-Kenudson, M. (2016). Programmed cell death ligand 1 expression in resected lung adenocarcinomas: Association with immune microenvironment. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(11), 1869–1878. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.08.134>

Ihle, N. T., Byers, L. A., Kim, E. S., Saintigny, P., Lee, J. J., Blumenschein, G. R., Tsao, A., Liu, S., Larsen, J. E., Wang, J., Diao, L., Coombes, K. R., Chen, L., Zhang, S., Abdelmelek, M. F., Tang, X., Papadimitrakopoulou, V., Minna, J. D., Lippman, S. M., ... Powis, G. (2012). Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: Implications for signaling and clinical outcome. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(3), 228–239. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr523>

Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T., & Nakahata, T. (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100(9), 3175–3182. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0207>

Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., & Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes and Development*, 15(24), 3243–3248. <https://doi.org/10.1101/gad.943001>

Janes, M. R., Zhang, J., Li, L. S., Hansen, R., Peters, U., Guo, X., Chen, Y., Babbar, A., Firdaus, S. J., Darjania, L., Feng, J., Chen, J. H., Li, S., Li, S., Long, Y. O., Thach, C., Liu, Y., Zariw, A., Ely, T., ... Liu, Y. (2018). Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell*, 172(3), 578-589.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.006>

Jänne, P. A., van den Heuvel, M. M., Barlesi, F., Cobo, M., Mazieres, J., Crinò, L., Orlov, S., Blackhall, F., Wolf, J., Garrido, P., Poltoratskiy, A., Mariani, G., Ghiorghiu, D., Kilgour, E., Smith, P., Kohlmann, A., Carlile, D. J., Lawrence, D., Bowen, K., & Vansteenkiste, J. (2017). Selumetinib plus docetaxel compared with docetaxel alone and progression-free survival in patients with KRAS-mutant advanced non-small cell lung cancer: The SELECT-1 randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 317(18), 1844–1853. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.3438>

Jänne, P. A., Yang, J. C.-H., Kim, D.-W., Planchard, D., Ohe, Y., Ramalingam, S. S., Ahn, M.-J., Kim, S.-W., Su, W.-C., Horn, L., Haggstrom, D., Felip, E., Kim, J.-H., Frewer, P., Cantarini, M., Brown, K. H., Dickinson, P. A., Ghiorghiu, S., & Ranson, M. (2015). AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(18), 1689–1699. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1411817>

Jansen, V. M., Bholra, N. E., Bauer, J. A., Formisano, L., Lee, K. M., Hutchinson, K. E., Witkiewicz, A. K., Moore, P. D., Estrada, M. V., Sánchez, V., Ericsson, P. G., Sanders, M. E., Pohlmann, P. R., Pishvaian, M. J., Riddle, D. A., Dugger, T. C., Wei, W., Knudsen, E. S., & Arteaga, C. L. (2017). Kinome-wide RNA interference screen reveals a role for PDK1 in acquired resistance to CDK4/6 inhibition in ER-positive breast cancer. *Cancer Research*, 77(9), 2488–2499. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2653>

Jarry, U., Bostoën, M., Pineau, R., Chaillot, L., Mennessier, V., Montagne, P., Motte, E., Gournay, M., le Goff, A., Guillaudeux, T., & Pedeux, R. (2021). Orthotopic model of lung cancer: isolation of bone micro-metastases after tumor escape from Osimertinib treatment. *BMC Cancer*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08205-9>

John, T., Kohler, D., Pintilie, M., Yanagawa, N., Pham, N. A., Li, M., Panchal, D., Hui, F., Meng, F., Shepherd, F. A., & Tsao, M. S. (2011). The ability to form primary tumor xenografts is predictive of increased risk of disease recurrence in early-stage non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(1), 134–141. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2224>

Johnson, J. I., Decker, S., Zaharevitz, D., Rubinstein, L. v., Venditti, J. M., Schepartz, S., Kalyandrug, S., Christian, M., Arbuck, S., Hollingshead, M., & Sausville, E. A. (2001). Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British Journal of Cancer*, 84(10), 1424–1431. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1796>

Jones, S., Vignais, M.-L., & Broach, J. R. (1991). The CDC25 protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to ras. *Molecular and Cellular Biology*, 11(5), 2641–2646. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.5.2641-2646.1991>

Julien, S., Merino-Trigo, A., Lacroix, L., Pocard, M., Goéré, D., Mariani, P., Landron, S., Bigot, L., Nemati, F., Dartigues, P., Weiswald, L. B., Lantuas, D., Morgand, L., Pham, E., Gonin, P., Dangles-Marie, V., Job, B., Dessen, P., Bruno, A., ... Berthet, C. (2012). Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the

clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(19), 5314–5328. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0372>

Kang, H. N., Choi, J. W., Shim, H. S., Kim, J., Kim, D. J., Lee, C. Y., Hong, M. H., Park, S. Y., Park, A. Y., Shin, E. J., Lee, S. Y., Pyo, K. H., Yun, M. R., Choi, H. M., Lee, S. S., Kim, S. Y., Lee, H., Paik, S., Cho, B. C., ... Kim, H. R. (2018). Establishment of a platform of non-small-cell lung cancer patient-derived xenografts with clinical and genomic annotation. *Lung Cancer*, 124, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.08.008>

Karczewski, K. J., Weisburd, B., Thomas, B., Solomonson, M., Ruderfer, D. M., Kavanagh, D., Hamamsy, T., Lek, M., Samocha, K. E., Cummings, B. B., Birnbaum, D., Daly, M. J., & MacArthur, D. G. (2017). The ExAC browser: Displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D840–D845. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw971>

Kim, M., Mun, H., Sung, C. O., Cho, E. J., Jeon, H. J., Chun, S. M., Jung, D. J., Shin, T. H., Jeong, G. S., Kim, D. K., Choi, E. K., Jeong, S. Y., Taylor, A. M., Jain, S., Meyerson, M., & Jang, S. J. (2019). Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nature Communications*, 10(1), 3991. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11867-6>

Kim, M. P., Evans, D. B., Wang, H., Abbruzzese, J. L., Fleming, J. B., & Gallick, G. E. (2009). Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nature Protocols*, 4(11), 1670–1680. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.171>

Kita, K., Fukuda, K., Takahashi, H., Tanimoto, A., Nishiyama, A., Arai, S., Takeuchi, S., Yamashita, K., Ohtsubo, K., Otani, S., Yanagimura, N., Suzuki, C., Ikeda, H., Tamura, M., Matsumoto, I., & Yano, S. (2019). Patient-derived xenograft models of non-small cell lung cancer for evaluating targeted drug sensitivity and resistance. *Cancer Science*, 110(10), 3215–3224. <https://doi.org/10.1111/cas.14171>

Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Jänne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B. E., Eck, M. J., Tenen, D. G., & Halmos, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 352(8), 786–792. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044238>

Kohler, J., Zhao, Y., Li, J., Gokhale, P. C., Tiv, H. L., Knott, A. R., Wilkens, M. K., Soroko, K. M., Lin, M., Ambrogio, C., Musteanu, M., Ogino, A., Choi, J., Bahcall, M., Bertram, A. A., Chambers, E. S., Paweletz, C. P., Bhagwat, S. v., Manro, J. R., ... Anne, P. A. J. (2021). ERK inhibitor LY3214996-based treatment strategies for RAS-driven lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(4), 641–654. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0531>

Kolde, R. (2015). *pheatmap: Pretty Heatmaps*. R Package Version 1.0.8. <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/pheatmap.pdf>

- Kopper, O., de Witte, C. J., Löhmußaar, K., Valle-Inclan, J. E., Hami, N., Kester, L., Balgobind, A. V., Korving, J., Proost, N., Begthel, H., van Wijk, L. M., Revilla, S. A., Theeuwssen, R., van de Ven, M., van Roosmalen, M. J., Ponsioen, B., Ho, V. W. H., Neel, B. G., Bosse, T., ... Clevers, H. (2019). An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nature Medicine*, 25(5), 838–849. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0422-6>
- Kresse, S. H., Meza-Zepeda, L. A., Machado, I., Llombart-Bosch, A., & Myklebost, O. (2012). Preclinical xenograft models of human sarcoma show nonrandom loss of aberrations. *Cancer*, 118(2), 558–570. <https://doi.org/10.1002/cncr.26276>
- Kris, M. G., Gaspar, L. E., Chaft, J. E., Kennedy, E. B., Azzoli, C. G., Ellis, P. M., Lin, S. H., Pass, H. I., Seth, R., Shepherd, F. A., Spigel, D. R., Strawn, J. R., Ung, Y. C., & Weyant, M. (2017). Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancers: American Society of Clinical Oncology/Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 35(25), 2960–2974. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.4401>
- Kwon, M. chul, & Berns, A. (2013). Mouse models for lung cancer. *Molecular Oncology*, 7(2), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.010>
- Lai, Z., Markovets, A., Ahdesmaki, M., Chapman, B., Hofmann, O., McEwen, R., Johnson, J., Dougherty, B., Barrett, J. C., & Dry, J. R. (2016). VarDict: A novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Research*, 44(11), 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw227>
- Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D. E., & Dick, J. E. (1992). Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science*, 255(5048), 1137–1141. <https://doi.org/10.1126/science.1372131>
- Li, B. T., Smit, E. F., Goto, Y., Nakagawa, K., Udagawa, H., Mazières, J., Nagasaka, M., Bazhenova, L., Saltos, A. N., Felip, E., Pacheco, J. M., Pérol, M., Paz-Ares, L., Saxena, K., Shiga, R., Cheng, Y., Acharyya, S., Vitazka, P., Shahidi, J., ... Jänne, P. A. (2021). Trastuzumab Deruxtecan in HER2 -Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer . *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2112431>
- Li, H. (2013). *Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM*. 00(00), 1–3. <http://arxiv.org/abs/1303.3997>
- Li, W., Yang, L., He, Q., Hu, C., Zhu, L., Ma, X., Ma, X., Bao, S., Li, L., Chen, Y., Deng, X., Zhang, X., Cen, J., Zhang, L., Wang, Z., Xie, W. F., Li, H., Li, Y., & Hui, L. (2019). A Homeostatic Arid1a-Dependent Permissive Chromatin State Licenses Hepatocyte Responsiveness to Liver-Injury-Associated YAP Signaling. *Cell Stem Cell*, 25(1), 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.06.008>
- Lin, S., Huang, G., Cheng, L., Li, Z., Xiao, Y., Deng, Q., Jiang, Y., Li, B., Lin, S., Wang, S., Wu, Q., Yao, H., Cao, S., Li, Y., Liu, P., Wei, W., Pei, D., Yao, Y., Wen, Z., ... Li, P. (2018).

Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy. *MAbs*, 10(8), 1301–1311. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1518948>

Liu, C., & Tsao, M.-S. (1993). Proto-oncogene and growth factor/receptor expression in the establishment of primary human non-small cell lung carcinoma cell lines. *American Journal of Pathology*, 142(2), 413–423.

Llabata, P., Mitsuishi, Y., Choi, P. S., Cai, D., Francis, J. M., Torres-Diz, M., Udeshi, N. D., Golomb, L., Wu, Z., Zhou, J., Svinkina, T., Aguilera-Jimenez, E., Liu, Y., Carr, S. A., Sanchez-Cespedes, M., Meyerson, M., & Zhang, X. (2020). Multi-omics analysis identifies MGA as a negative regulator of the MYC pathway in lung adenocarcinoma. *Molecular Cancer Research*, 18(4), 574–584. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0657>

Long, Q., Ma, A. H., Zhang, H., Cao, Z., Xia, R., Lin, T. Y., Sonpavde, G. P., de Vere White, R., Guo, J., & Pan, C. X. (2020). Combination of cyclin-dependent kinase and immune checkpoint inhibitors for the treatment of bladder cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(11), 2305–2317. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02609-5>

Loos, T., Mortier, A., & Proost, P. (2009). Chapter 1. Isolation, identification, and production of posttranslationally modified chemokines. *Methods in Enzymology*, 461(B), 3–29. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)05401-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05401-9)

Lux, A., Seeling, M., Baerenwaldt, A., Lehmann, B., Schwab, I., Repp, R., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Hartmann, A., Heidkamp, G., Dudziak, D., & Nimmerjahn, F. (2014). A humanized mouse identifies the bone marrow as a niche with low therapeutic IgG activity. *Cell Reports*, 7(1), 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.041>

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 222–231. <https://doi.org/10.1038/35106065>

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer*, 3, 459–465.

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>

Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaría, D., Galá, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., & Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-Type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*, 118(4), 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.002>

Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J., And, +, & Ferrone~, S. (2000). Escape of Human Solid Tumors from T-cell Recognition: Molecular Mechanisms and Functional Significance. In *ADVANCES IN IMMUNOLOGY* (Vol. 74, pp. 181–273). [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60911-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60911-6)

- Martin, P., Stewart, E., Pham, N. A., Mascaux, C., Panchal, D., Li, M., Kim, L., Sakashita, S., Wang, D., Sykes, J., Friess, T., Shepherd, F. A., Liu, G., & Tsao, M. S. (2016). Cetuximab Inhibits T790M-Mediated Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor in a Lung Adenocarcinoma Patient-Derived Xenograft Mouse Model. *Clinical Lung Cancer*, 17(5), 375-383.e2. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.01.002>
- Mathsyaraja, H., Catchpole, J., Freie, B., Eastwood, E., Babaeva, E., Geuenich, M., Cheng, P. F., Ayers, J., Yu, M., Wu, N., Moorthi, S., Poudel, K. R., Koehne, A., Grady, W., Houghton, A. M., Berger, A. H., Shiio, Y., Macpherson, D., & Eisenman, R. N. (2021). Loss of MGA repression mediated by an atypical polycomb complex promotes tumor progression and invasiveness. *ELife*, 10(E64212). <https://doi.org/10.7554/eLife.64212>
- Mazieres, J., He, B., You, L., Xu, Z., & Jablons, D. M. (2005). Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Letters*, 222(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.040>
- McCartney, A., Migliaccio, I., Bonechi, M., Biagioni, C., Romagnoli, D., de Luca, F., Galardi, F., Risi, E., de Santo, I., Benelli, M., Malorni, L., & di Leo, A. (2019). Mechanisms of Resistance to CDK4/6 Inhibitors: Potential Implications and Biomarkers for Clinical Practice. *Frontiers in Oncology*, 9, 666. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00666>
- McCormick, F. (1989). ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell*, 56(1), 5–8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90976-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90976-8)
- McDermott, S. P., Eppert, K., Lechman, E. R., Doedens, M., & Dick, J. E. (2010). Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood*, 116(2), 193–200. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-271841>
- McGranahan, N., Favero, F., de Bruin, E. C., Birkbak, N. J., Szallasi, Z., & Swanton, C. (2015). Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution. *Science Translational Medicine*, 7(283), 283ra54. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1408>
- McGranahan, N., Rosenthal, R., Hiley, C. T., Rowan, A. J., Watkins, T. B. K., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Veeriah, S., van Loo, P., Herrero, J., Swanton, C., Jamal-Hanjani, M., Shafi, S., Czyzewska-Khan, J., Johnson, D., Laycock, J., Bosshard-Carter, L., Gorman, P., Hynds, R. E., ... Dessimoz, C. (2017). Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell*, 171(6), 1259–1271. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.001>
- Meng, D., Yuan, M., Li, X., Chen, L., Yang, J., Zhao, X., Ma, W., & Xin, J. (2013). Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer*, 81(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.03.019>
- Meraz, I. M., Majidi, M., Meng, F., Shao, R. P., Ha, M. J., Neri, S., Fang, B., Lin, S. H., Tinkey, P. T., Shpall, E. J., Morris, J., & Roth, J. A. (2019). An improved patient-derived xenograft humanized mouse model for evaluation of lung cancer immune responses. *Cancer Immunology Research*, 7(8), 1267–1279. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0874>

- Molon, B., Ugel, S., del Pozzo, F., Soldani, C., Zilio, S., Avella, D., de Palma, A., Mauri, P. L., Monegal, A., Rescigno, M., Savino, B., Colombo, P., Jonjic, N., Pecanic, S., Lazzarato, L., Fruttero, R., Gasco, A., Bronte, V., & Viola, A. (2011). Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 1949–1962. <https://doi.org/10.1084/jem.20101956>
- Morgan, K. M., Riedlinger, G. M., Rosenfeld, J., Ganesan, S., & Pine, S. R. (2017). Patient-Derived Xenograft Models of Non-Small Cell Lung Cancer and Their Potential Utility in Personalized Medicine. *Frontiers in Oncology*, 7, 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00002>
- Morris, E. J., Jha, S., Restaino, C. R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., Long, B., Liu, J., DiNunzio, E., Windsor, W., Zhang, R., Zhao, S., Angagaw, M. H., Pinheiro, E. M., Desai, J., ... Samatar, A. A. (2013). Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discovery*, 3(7), 742–750. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0070>
- Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M., & Wilson, D. B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*, 335(6187), 256–259. <https://doi.org/10.1038/335256a0>
- Motz, G. T., & Coukos, G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity*, 39(1), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.005>
- Mullenders, J., de Jongh, E., Brousalı, A., Roosen, M., Blom, J. P. A., Begthel, H., Korving, J., Jonges, T., Kranenburg, O., Meijer, R., & Clevers, H. C. (2019). Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(10), 4567–4574. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803595116>
- Nadal, E., Chen, G., Prensner, J. R., Shiratsuchi, H., Sam, C., Zhao, L., Kalemkerian, G. P., Brenner, D., Lin, J., Reddy, R. M., Chang, A. C., Capellà, G., Cardenal, F., Beer, D. G., & Ramnath, N. (2014). KRAS-G12C mutation is associated with poor outcome in surgically resected lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(10), 1513–1522. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000305>
- Neal, J. T., Li, X., Zhu, J., Giangarra, V., Grzeskowiak, C. L., Ju, J., Liu, I. H., Chiou, S. H., Salahudeen, A. A., Smith, A. R., Deutsch, B. C., Liao, L., Zemek, A. J., Zhao, F., Karlsson, K., Schultz, L. M., Metzner, T. J., Nadauld, L. D., Tseng, Y. Y., ... Kuo, C. J. (2018). Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*, 175(7), 1972–1988. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.021>
- Nicolini, F. E., Cashman, J. D., Hogge, D. E., Humphries, R. K., & Eaves, C. J. (2004). NOD/SCID mice engineered to express human IL-3, GM-CSF and Steel factor constitutively mobilize engrafted human progenitors and compromise human stem cell regeneration. *Leukemia*, 18(2), 341–347. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403222>

Obaya, A. J., Kottenko, I., Cole, M. D., & Sedivy, J. M. (2002). The proto-oncogene c-myc acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G1 phase progression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 31263–31269. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202528200>

Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D. M., & Nakatani, Y. (2002). A Complex with Chromatin Modifiers That Occupies E2F- and Myc-Responsive Genes in G0 Cells. *Science*, 296(5570), 1132–1136. <https://doi.org/10.1126/science.1069861>

Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A., & Shokat, K. M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, 503(7477), 548–551. <https://doi.org/10.1038/nature12796>

Paik, P. K., Arcila, M. E., Fara, M., Sima, C. S., Miller, V. A., Kris, M. G., Ladanyi, M., & Riely, G. J. (2011). Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 2046–2051. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.1280>

Pan, W., Yang, Y., Zhu, H., Zhang, Y., Zhou, R., & Sun, X. (2016). KRAS mutation is a weak, but valid predictor for poor prognosis and treatment outcomes in NSCLC: A meta-analysis of 41 studies. *Oncotarget*, 7(7), 8373–8388. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7080>

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

Park, K., Tan, E. H., O'Byrne, K., Zhang, L., Boyer, M., Mok, T., Hirsh, V., Yang, J. C. H., Lee, K. H., Lu, S., Shi, Y., Kim, S. W., Laskin, J., Kim, D. W., Arvis, C. D., Kölblbeck, K., Laurie, S. A., Tsai, C. M., Shahidi, M., ... Paz-Ares, L. (2016). Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, 17(5), 577–589. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30033-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30033-X)

Patnaik, A., Rosen, L. S., Tolaney, S. M., Tolcher, A. W., Goldman, J. W., Gandhi, L., Papadopoulos, K. P., Beeram, M., Rasco, D. W., Hilton, J. F., Nasir, A., Beckmann, R. P., Schade, A. E., Fulford, A. D., Nguyen, T. S., Martinez, R., Kulanthaivel, P., Li, L. Q., Frenzel, M., ... Shapiro, G. I. (2016). Efficacy and safety of Abemaciclib, an inhibitor of CDK4 and CDK6, for patients with breast cancer, non-small cell lung cancer, and other solid tumors. *Cancer Discovery*, 6(7), 740–753. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0095>

Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>

Paz-Ares, L., Luft, A., Vicente, D., Tafreshi, A., Gümüş, M., Mazières, J., Hermes, B., Çay Şenler, F., Csósz, T., Fülöp, A., Rodríguez-Cid, J., Wilson, J., Sugawara, S., Kato, T., Lee, K. H., Cheng, Y., Novello, S., Halmos, B., Li, X., ... Kowalski, D. M. (2018). Pembrolizumab

plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(21), 2040–2051. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1810865>

Peña-Chilet, M., Roldán, G., Perez-Flrido, J., Ortuño, F. M., Carmona, R., Aquino, V., Lopez-Lopez, D., Loucera, C., Fernandez-Rueda, J. L., Gallego, A., García-García, F., González-Neira, A., Pita, G., Núñez-Torres, R., Santoyo-López, J., Ayuso, C., Minguez, P., Avila-Fernandez, A., Corton, M., ... Dopazo, J. (2021). CSVS, a crowdsourcing database of the Spanish population genetic variability. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1130–D1137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa794>

Peng, S., Creighton, C. J., Zhang, Y., Sen, B., Mazumdar, T., Myers, J. N., Woolfson, A., Lorenzi, M. v., Bell, D., Williams, M. D., & Johnson, F. M. (2013). Tumor grafts derived from patients with head and neck squamous carcinoma authentically maintain the molecular and histologic characteristics of human cancers. *Journal of Translational Medicine*, 11(1), 198. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-198> Erratum in: *J Transl Med*. 2014;12:67. Lai, Stephen Y [added]

Petroni, G., Formenti, S. C., Chen-Kiang, S., & Galluzzi, L. (2020). Immunomodulation by anticancer cell cycle inhibitors. *Nature Reviews Immunology*, 20(11), 669–679. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0300-y>

Pham, D. K., Kris, M. G., Riely, G. J., Sarkaria, I. S., McDonough, T., Chuai, S., Venkatraman, E. S., Miller, V. A., Ladanyi, M., Pao, W., Wilson, R. K., Singh, B., & Rusch, V. W. (2006). Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), 1700–1704. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.3224>

Pikor, L. A., Ramnarine, V. R., Lam, S., & Lam, W. L. (2013). Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*, 82(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.07.025>

Planchard, D., Besse, B., Groen, H. J. M., Souquet, P. J., Quoix, E., Baik, C. S., Barlesi, F., Kim, T. M., Mazieres, J., Novello, S., Rigas, J. R., Upalawanna, A., D’Amelio, A. M., Zhang, P., Mookerjee, B., & Johnson, B. E. (2016). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAFV600E-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 17(7), 984–993. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30146-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30146-2)

Planchard, D., Popat, S., Kerr, K., Novello, S., Smit, E. F., Faivre-Finn, C., Mok, T. S., Reck, M., van Schil, P. E., & Hellmann, M. D. (2018). Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Updated version published 15 September 2020 by the ESMO Guidelines Committee. In *Ann Oncol* (Issue 4, pp. 192–237). <https://doi.org/https://www.esmo.org/guidelines/lung-and-chest-tumours/clinical-practice-living-guidelines-metastatic-non-small-cell-lung-cancer>

Postmus, P. E., Kerr, K. M., Oudkerk, M., Senan, S., Waller, D. A., Vansteenkiste, J., Escriu, C., & Peters, S. (2017). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC):

ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 28(4), iv1–iv21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx222>

Pujol, J.L., Vansteenkiste, J.F., Paz-Ares, L.G., Gregorc, V., Mazieres, J., Awad, M.M., Janne P.A., Chisamore, M.J., Hossain, A., Chen, Y., & Beck, J.T. (2020). A phase Ib study of abemaciclib in combination with pembrolizumab for patients (pts) with stage IV Kirsten rat sarcoma mutant (KRAS-mut) or squamous non-small cell lung cancer (NSCLC) (NCT02779751): Interim results. *Journal of Clinical Oncology*, 38(15_suppl), 9562-9562 DOI:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.9562

Puyol, M., Martín, A., Dubus, P., Mulero, F., Pizcueta, P., Khan, G., Guerra, C., Santamaría, D., & Barbacid, M. (2010). A Synthetic Lethal Interaction between K-Ras Oncogenes and Cdk4 Unveils a Therapeutic Strategy for Non-small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Cell*, 18(1), 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.025>

Ramalingam, S. S., Vansteenkiste, J., Planchard, D., Cho, B. C., Gray, J. E., Ohe, Y., Zhou, C., Reungwetwattana, T., Cheng, Y., Chewaskulyong, B., Shah, R., Cobo, M., Lee, K. H., Cheema, P., Tiseo, M., John, T., Lin, M.-C., Imamura, F., Kurata, T., ... Soria, J.-C. (2020). Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR -Mutated Advanced NSCLC. *New England Journal of Medicine*, 382(1), 41–50. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1913662>

Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csoszi, Fulop, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leal, T.A., Riess, J. W., Jensen, E., Zhao, B., ... Brahmer, J. R. (2021). Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score \geq 50%. In *J Clin Oncol* (Vol. 39, Issue 21, pp. 2339–2349). <https://doi.org/10.1200/JCO.21.00174>

Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359(6382), 1350–1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>

Riely, G.J., Brahmer, J.R., Planchard, D. (2012). A randomized discontinuation phase II trial of ridaforolimus in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with KRAS mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 30 (15_suppl), 7531-7533. DOI:10.1200/jco.2012.30.15_suppl.7531

Rius Ruiz, I., Vicario, R., Moranco, B., Bernadó Morales, C., Arenas, E. J., Herter, S., Freimoser-Grundschober, A., Somandin, J., Sam, J., Ast, O., Martínez Barriocanal, Á., Luque, A., Escorihuela, M., Varela, I., Cuartas, I., Nuciforo, P., Fasani, R., Peg, V., Rubio, I., ... Arribas, J. (2018). p95HER2-T cell bispecific antibody for breast cancer treatment. *Science Translational Medicine*, 10(461), Ea1445. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat1445>

Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmir, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., ... Chan, T. A. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230), 124–128. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>

Roberts, P. J., & Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22), 3291–3310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>

Romano, G., Chen, P. L., Song, P., McQuade, J. L., Liang, R. J., Liu, M., Roh, W., Duose, D. Y., Carapeto, F. C. L., Li, J., Teh, J. L. F., Aplin, A. E., Chen, M., Zhang, J., Lazar, A. J., Davies, M. A., Futreal, P. A., Amaria, R. N., Zhang, D. Y., ... Kwong, L. N. (2018). A preexisting rare PIK3CA e545k subpopulation confers clinical resistance to MEK plus CDK4/6 inhibition in NRAS melanoma and is dependent on S6K1 signaling. *Cancer Discovery*, 8(5), 556–567. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0745>

Rosato, R. R., Dávila-González, D., Choi, D. S., Qian, W., Chen, W., Kozielski, A. J., Wong, H., Dave, B., & Chang, J. C. (2018). Evaluation of anti-PD-1-based therapy against triple-negative breast cancer patient-derived xenograft tumors engrafted in humanized mouse models. *Breast Cancer Research*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1037-4>

Ruscetti, M., Leibold, J., Bott, M. J., Fennell, M., Kulick, A., Salgado, N. R., Chen, C.-C., Ho, Y.-J., Sanchez-Rivera, F. J., Feucht, J., Baslan, T., Tian, S., Chen, H.-A., Romesser, P. B., Poirier, J. T., Rudin, C. M., de Stanchina, E., Manchado, E., Sherr, C. J., & Lowe, S. W. (2018). NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination. *Science*, 362(6421), 1416–1422. <https://doi.org/10.1126/science.aas9090>

Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., Balgobind, A. V., Wind, K., Gracanin, A., Begthel, H., Korving, J., van Boxtel, R., Duarte, A. A., Lelieveld, D., van Hoeck, A., Ernst, R. F., Blokzijl, F., Nijman, I. J., Hoogstraat, M., ... Clevers, H. (2018). A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, 172(1–2), 373–386.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>

Sachs, N., Papaspyropoulos, A., Zomer-van Ommen, D. D., Heo, I., Böttinger, L., Klay, D., Weeber, F., Huelsz-Prince, G., Iakobachvili, N., Amatngalim, G. D., Ligt, J., Hoeck, A., Proost, N., Viveen, M. C., Lyubimova, A., Teeven, L., Derakhshan, S., Korving, J., Begthel, H., ... Clevers, H. (2019). Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *The EMBO Journal*, 38(4), E100300. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100300>

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2004). High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*, 304(5670), 554. <https://doi.org/10.1126/science.1096502>

Sanmamed, M. F., Rodriguez, I., Schalper, K. A., Oñate, C., Azpilikueta, A., Rodriguez-Ruiz, M. E., Morales-Kastresana, A., Labiano, S., Pérez-Gracia, J. L., Martín-Algarra, S., Alfaro, C., Mazzolini, G., Sarno, F., Hidalgo, M., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., & Melero, I. (2015). Nivolumab and Urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2-/-IL2R γ null immunodeficient mice. *Cancer Research*, 75(17), 3466–3478. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3510>

Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., van Es, J. H., van den Brink, S., van Houdt, W. J., Pronk, A., van Gorp, J., Siersema, P. D., & Clevers, H. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, *141*(5), 1762–1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, *459*(7244), 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>

Schaer, D. A., Beckmann, R. P., Dempsey, J. A., Huber, L., Forest, A., Amaladas, N., Li, Y., Wang, Y. C., Rasmussen, E. R., Chin, D., Capen, A., Carpenito, C., Staschke, K. A., Chung, L. A., Litchfield, L. M., Merzoug, F. F., Gong, X., Iversen, P. W., Buchanan, S., ... Kalos, M. (2018). The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Reports*, *22*(11), 2978–2994. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.053>

Schram, A. M., Gandhi, L., Mita, M. M., Damstrup, L., Campana, F., Hidalgo, M., Grande, E., Hyman, D. M., & Heist, R. S. (2018). A phase Ib dose-escalation and expansion study of the oral MEK inhibitor pimasertib and PI3K/MTOR inhibitor voxtalisib in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer*, *119*(12), 1471–1476. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0322-4>

Schubert, M., Klinger, B., Klünemann, M., Sieber, A., Uhlitz, F., Sauer, S., Garnett, M. J., Blüthgen, N., & Saez-Rodriguez, J. (2018). Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression. *Nature Communications*, *9*(20). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02391-6>

Schutgens, F., Rookmaaker, M. B., Margaritis, T., Rios, A., Ammerlaan, C., Jansen, J., Gijzen, L., Vormann, M., Vonk, A., Viveen, M., Yengej, F. Y., Derakhshan, S., de Winter-de Groot, K. M., Artegiani, B., van Boxtel, R., Cuppen, E., Hendrickx, A. P. A., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Heitzer, E., ... Clevers, H. (2019). Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling. *Nature Biotechnology*, *37*(3), 303–313. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0048-8>

Shaw, A. T., Yeap, B. Y., Mino-Kenudson, M., Digumarthy, S. R., Costa, D. B., Heist, R. S., Solomon, B., Stubbs, H., Admane, S., McDermott, U., Settleman, J., Kobayashi, S., Mark, E. J., Rodig, S. J., Chirieac, L. R., Kwak, E. L., Lynch, T. J., & Iafrate, A. J. (2009). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(26), 4247–4253. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.6993>

Shea, M., Costa, D. B., & Rangachari, D. (2016). Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, *10*(2), 113–129. <https://doi.org/10.1177/1753465815617871>

Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00102-2)

Shi, R., Radulovich, N., Ng, C., Liu, N., Notsuda, H., Cabanero, M., Martins-Filho, S. N., Raghavan, V., Li, Q., Mer, A. S., Rosen, J. C., Li, M., Wang, Y. H., Tamblyn, L., Pham, N. A., Haibe-Kains, B., Liu, G., Moghal, N., & Tsao, M. S. (2020). Organoid cultures as preclinical models of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 26(5), 1162–1174. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1376>

Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, V. J., & Greiner, D. L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. *Nature Reviews Immunology*, 12(11), 786–798. <https://doi.org/10.1038/nri3311>

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>

Skidmore, Z. L., Wagner, A. H., Lesurf, R., Campbell, K. M., Kunisaki, J., Griffith, O. L., & Griffith, M. (2016). GenVisR: Genomic Visualizations in R. *Bioinformatics*, 32(19), 3012–3014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw325>

Skoulidis, F., Byers, L. A., Diao, L., Papadimitrakopoulou, V. A., Tong, P., Izzo, J., Behrens, C., Kadara, H., Parra, E. R., Canales, J. R., Zhang, J., Giri, U., Gudikote, J., Cortez, M. A., Yang, C., Fan, Y., Peyton, M., Girard, L., Coombes, K. R., ... Heymach, J. v. (2015). Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discovery*, 5(8), 860–877. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1236>

Skoulidis, F., Goldberg, M. E., Greenawalt, D. M., Hellmann, M. D., Awad, M. M., Gainor, J. F., Schrock, A. B., Hartmaier, R. J., Trabucco, S. E., Gay, L., Ali, S. M., Elvin, J. A., Singal, G., Ross, J. S., Fabrizio, D., Szabo, P. M., Chang, H., Sasson, A., Srinivasan, S., ... Heymach, J. v. (2018). STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discovery*, 8(7), 822–835. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0099>

Skoulidis, F., Li, B. T., Dy, G. K., Price, T. J., Falchook, G. S., Wolf, J., Italiano, A., Schuler, M., Borghaei, H., Barlesi, F., Kato, T., Curioni-Fontecedro, A., Sacher, A., Spira, A., Ramalingam, S. S., Takahashi, T., Besse, B., Anderson, A., Ang, A., ... Govindan, R. (2021). Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *New England Journal of Medicine*, 384(25), 2371–2381. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2103695>

Sledge, G. W., Toi, M., Neven, P., Sohn, J., Inoue, K., Pivot, X., Burdaeva, O., Okera, M., Masuda, N., Kaufman, P. A., Koh, H., Grischke, E.-M., Frenzel, M., Lin, Y., Barriga, S., Smith, I. C., Bourayou, N., & Llombart-Cussac, A. (2017). JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 2875–2884. <https://doi.org/10.1200/JCO>

- Sociedad Española de Oncología Médica SEOM. (2021). *Las cifras del cáncer en España 2021*. PDF Disponible. https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espnaha_2021.pdf
- Solomon, B. J., Mok, T., Kim, D.-W., Wu, Y.-L., Nakagawa, K., Mekhail, T., Felip, E., Cappuzzo, F., Paolini, J., Usari, T., Iyer, S., Reisman, A., Wilner, K. D., Tursi, J., & Blackhall, F. (2014). First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer . *New England Journal of Medicine*, 371(23), 2167–2177. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1408440>
- Sondka, Z., Bamford, S., Cole, C. G., Ward, S. A., Dunham, I., & Forbes, S. A. (2018). The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 18(11), 696–705. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0060-1>
- Soneson, C., Love, M. I., & Robinson, M. D. (2015). Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*, 4(1521). <https://doi.org/10.12688/f1000research.7563.1>
- Sos, M. L., Michel, K., Zander, T., Weiss, J., Frommolt, P., Peifer, M., Li, D., Ullrich, R., Koker, M., Fischer, F., Shimamura, T., Rauh, D., Mermel, C., Fischer, S., Stückerath, I., Heynck, S., Beroukhim, R., Lin, W., Winckler, W., ... Thomas, R. K. (2009). Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1727–1740. <https://doi.org/10.1172/JCI37127>
- Spigel, D.R., Schrock, A.B., Fabrizio, D., Frampton, G.M., Sun, J., He, J., Gowen, K., Johnson, M.L., Bauer, T.M., Kalemkerian, G.P., Raez, L.E., Ou, S.H. I., Ross, J.S., Stephens, P.J., Miller, V.A. & Ali, S.M. (2016) Total mutation burden (TMB) in lung cancer (LC) and relationship with response to PD-1/PD-L1 targeted therapies. *Journal of Clinical Oncology* 34 (15_suppl), 9017-9017 https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.9017
- Spyratos, D., Zarogoulidis, P., Porpodis, K., Tsakiridis, K., Machairiotis, N., Katsikogiannis, N., Kougioumtzi, I., Dryllis, G., Kallianos, A., Rapti, A., Li, C., & Zarogoulidis, K. (2013). Occupational exposure and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 5(Suppl4), S440–S445. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.07.09>
- Stewart, D. J. (2014). Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(1). <https://doi.org/10.1093/jnci/djt356>
- Stewart, E. L., Mascaux, C., Pham, N. A., Sakashita, S., Sykes, J., Kim, L., Yanagawa, N., Allo, G., Ishizawa, K., Wang, D., Zhu, C. Q., Li, M., Ng, C., Liu, N., Pintilie, M., Martin, P., John, T., Jurisica, I., Leighl, N. B., ... Tsao, M. S. (2015). Clinical utility of patient-derived xenografts to determine biomarkers of prognosis and map resistance pathways in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(22), 2472–2480. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.1492>
- Sullivan, R. J., Infante, J. R., Janku, F., Lee Wong, D. J., Sosman, J. A., Keedy, V., Patel, M. R., Shapiro, G. I., Mier, J. W., Tolcher, A. W., Wang-Gillam, A., Sznol, M., Flaherty, K., Buchbinder, E., Carvajal, R. D., Varghese, A. M., Lacouture, M. E., Ribas, A., Patel, S. P., ... Li, B. T. (2018). First-in-class ERK1/2 inhibitor ulixertinib (BVD-523) in patients with MAPK

mutant advanced solid tumors: Results of a phase I dose-escalation and expansion study. *Cancer Discovery*, 8(2), 184–195. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1119>

Swanton, C., & Govindan, R. (2016). Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 374(19), 1864–1873. <https://doi.org/10.1056/nejmra1504688>

Takezawa, K., Okamoto, I., Yonesaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., & Nakagawa, K. (2009). Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Research*, 69(16), 6515–6521. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1076>

Talevich, E., Shain, A. H., Botton, T., & Bastian, B. C. (2016). CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Computational Biology*, 12(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004873>

Tamborero, D., Rubio-Perez, C., Deu-Pons, J., Schroeder, M. P., Vivancos, A., Rovira, A., Tusquets, I., Albanell, J., Rodon, J., Tabernero, J., de Torres, C., Dienstmann, R., Gonzalez-Perez, A., & Lopez-Bigas, N. (2018). Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0531-8>

Tan, D. S. W., Yom, S. S., Tsao, M. S., Pass, H. I., Kelly, K., Peled, N., Yung, R. C., Wistuba, I. I., Yatabe, Y., Unger, M., Mack, P. C., Wynes, M. W., Mitsudomi, T., Weder, W., Yankelevitz, D., Herbst, R. S., Gandara, D. R., Carbone, D. P., Bunn, P. A., ... Hirsch, F. R. (2016). The International Association for the Study of Lung Cancer Consensus Statement on Optimizing Management of EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Status in 2016. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(7), 946–963. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.008>

Tao, Z., le Blanc, J. M., Wang, C., Zhan, T., Zhuang, H., Wang, P., Yuan, Z., & Lu, B. (2016). Coadministration of trametinib and palbociclib radiosensitizes KRAS-mutant non-small cell lung cancers in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 22(1), 122–133. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0589>

Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., ... Forbes, S. A. (2019). COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D941–D947. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1015>

Taylor-Harding, B., Aspuria, P.-J., Agadjanian, H., Cheon, D.-J., Mizuno, T., Greenberg, D., Allen, J. R., Spurka, L., Funari, V., Spiteri, E., Wang, Q., Orsulic, S., Walsh, C., Karlan, B. Y., & Wiedemeyer, R. W. (2015). Cyclin E1 and RTK/RAS signaling drive CDK inhibitor resistance via activation of E2F and ETS. *Oncotarget*, 6(2), 696–714. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2673>

Teng, Y., Wang, X., Wang, Y., & Ma, D. (2010). Wnt/ β -catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 392(3), 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.028>

Teo, Z. L., Versaci, S., Dushyanthen, S., Caramia, F., Savas, P., Mintoff, C. P., Zethoven, M., Virassamy, B., Luen, S. J., McArthur, G. A., Phillips, W. A., Darcy, P. K., & Loi, S. (2017). Combined CDK4/6 and PI3K α Inhibition is Synergistic and Immunogenic in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*, 77(22), 6340–6352. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2210>

Thorsson, V., Gibbs, D. L., Brown, S. D., Wolf, D., Bortone, D. S., Ou Yang, T. H., Porta-Pardo, E., Gao, G. F., Plaisier, C. L., Eddy, J. A., Ziv, E., Culhane, A. C., Paull, E. O., Sivakumar, I. K. A., Gentles, A. J., Malhotra, R., Farshidfar, F., Colaprico, A., Parker, J. S., ... Shmulevich, Ilya. (2018). The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*, 48(4), 812–830. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.023>

Trahey, M., & McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*, 238(4826), 542–545. <https://doi.org/10.1126/science.2821624>

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. In *Journal of Thoracic Oncology* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1243–1260). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>

Turajlic, S., Sottoriva, A., Graham, T., & Swanton, C. (2019). Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 20(7), 404–416. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0114-6>

Upadhaya, S., Neftelino, S. T., Hodge, J. P., Oliva, C., Campbell, J. R., & Yu, J. X. (2021). Combinations take centre stage in PD1/PDL1 inhibitor clinical trials. In *Nature reviews. Drug discovery* (Vol. 20, Issue 3, pp. 168–169). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00204-y>

Uzhachenko, R. v., Bharti, V., Ouyang, Z., Blevins, A., Mont, S., Saleh, N., Lawrence, H. A., Shen, C., Chen, S. C., Ayers, G. D., DeNardo, D. G., Arteaga, C., Richmond, A., & Vilgelm, A. E. (2021). Metabolic modulation by CDK4/6 inhibitor promotes chemokine-mediated recruitment of T cells into mammary tumors. *Cell Reports*, 35(1), 108944. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108944>

van de Wetering, M., Francies, H. E., Francis, J. M., Bounova, G., Iorio, F., Pronk, A., van Houdt, W., van Gorp, J., Taylor-Weiner, A., Kester, L., McLaren-Douglas, A., Blokker, J., Jaksani, S., Bartfeld, S., Volckman, R., van Sluis, P., Li, V. S. W., Seepo, S., Sekhar Pedamallu, C., ... Clevers, H. (2015). Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, 161(4), 933–945. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.053>

van Roy, F. (2014). Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 121–134. <https://doi.org/10.1038/nrc3647>

Verma, B., & Wesa, A. (2020). Establishment of Humanized Mice from Peripheral Blood Mononuclear Cells or Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem Cells for Immune-Oncology Studies Evaluating New Therapeutic Agents. *Current Protocols in Pharmacology*, 89(1), E77. <https://doi.org/10.1002/cpph.77>

Wang, D., Pham, N. A., Tong, J., Sakashita, S., Allo, G., Kim, L., Yanagawa, N., Raghavan, V., Wei, Y., To, C., Trinh, Q. M., Starmans, M. H. W., Chan-Seng-Yue, M. A., Chadwick, D., Li, L., Zhu, C. Q., Liu, N., Li, M., Lee, S., ... Tsao, M. S. (2017). Molecular heterogeneity of non-small cell lung carcinoma patient-derived xenografts closely reflect their primary tumors. *International Journal of Cancer*, 140(3), 662–673. <https://doi.org/10.1002/ijc.30472>

Wang, K., Li, M., & Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 38(16), 1–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>

Wang, M., Yao, L. C., Cheng, M., Cai, D., Martinek, J., Pan, C. X., Shi, W., Ma, A. H., de Vere White, R. W., Airhart, S., Liu, E. T., Banchereau, J., Brehm, M. A., Greiner, D. L., Shultz, L. D., Palucka, K., & Keck, J. G. (2018). Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB Journal*, 32(3), 1537–1549. <https://doi.org/10.1096/fj.201700740R>

Wang, S., Ghosh, R. N., & Chellappan, S. P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(12), 7487–7498. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7487>

Wang, X., Fu, X., & Hoffman, R. M. (1992). A new patient-like metastatic model of human lung cancer constructed orthotopically with intact tissue via thoracotomy in immunodeficient mice. *Int. J. Cancer*, 51, 992–995. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910510626>

Wang, Y., Revelo, M. P., Sudilovsky, D., Cao, M., Chen, W. G., Goetz, L., Xue, H., Sadar, M., Shappell, S. B., Cunha, G. R., & Hayward, S. W. (2005). Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue. *Prostate*, 64(2), 149–159. <https://doi.org/10.1002/pros.20225>

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 5). <https://publications.iarc.fr/595>

Witkiewicz, A. K., Knudsen, K. E., Dicker, A. P., & Knudsen, E. S. (2011). The meaning of p16ink4a expression in tumors. *Cell Cycle*, 10(15), 2497–2503. <https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16776>

- Wong, C. H., Siah, K. W., & Lo, A. W. (2019). Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics*, *20*(2), 273–286. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxx069>
- Xue, J. Y., Zhao, Y., Aronowitz, J., Mai, T. T., Vides, A., Qeriqi, B., Kim, D., Li, C., de Stanchina, E., Mazutis, L., Risso, D., & Lito, P. (2020). Rapid non-uniform adaptation to conformation-specific KRAS(G12C) inhibition. *Nature*, *577*(7790), 421–425. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1884-x>
- Yaguchi, T., Kobayashi, A., Inozume, T., Morii, K., Nagumo, H., Nishio, H., Iwata, T., Ka, Y., Katano, I., Ito, R., Ito, M., & Kawakami, Y. (2018). Human PBMC-transferred murine MHC class I/II-deficient NOG mice enable long-term evaluation of human immune responses. *Cellular and Molecular Immunology*, *15*(11), 953–962. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.106>
- Yan, H. H. N., Siu, H. C., Law, S., Ho, S. L., Yue, S. S. K., Tsui, W. Y., Chan, D., Chan, A. S., Ma, S., Lam, K. O., Bartfeld, S., Man, A. H. Y., Lee, B. C. H., Chan, A. S. Y., Wong, J. W. H., Cheng, P. S. W., Chan, A. K. W., Zhang, J., Shi, J., ... Leung, S. Y. (2018). A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell*, *23*(6), 882–897.e11. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.016>
- Yu, H. A., Arcila, M. E., Rekhtman, N., Sima, C. S., Zakowski, M. F., Pao, W., Kris, M. G., Miller, V. A., Ladanyi, M., & Riely, G. J. (2013). Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical Cancer Research*, *19*(8), 2240–2247. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2246>
- Yuan, M., Huang, L. L., Chen, J. H., Wu, J., & Xu, Q. (2019). The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1), 61. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0099-9>
- Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, *5*(3), 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>
- Zhan, J., Fujimoto, J., Zhang Jianhua, Wedge, D. C., Song, X., Zhang, J., Seth, S., Chow, C.-W., Cao, Y., Gumbs, C., Gold, K. A., Kalhor, N., Little, L., Mahadeshwar, H., Moran, C., Protopopov, A., Sun, H., Tang, J., Wu, X., ... Futreal, P. A. (2014). Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*, *346*(6206), 256–259. <https://doi.org/10.1126/science.1256930>
- Zhang, Q. F., Li, J., Jiang, K., Wang, R., Ge, J. L., Yang, H., Liu, S. J., Jia, L. T., Wang, L., & Chen, B. L. (2020). CDK4/6 inhibition promotes immune infiltration in ovarian cancer and synergizes with PD-1 blockade in a B cell-dependent manner. *Theranostics*, *10*(23), 10619–10633. <https://doi.org/10.7150/thno.44871>
- Zhang, W., Fan, W., Rachagani, S., Zhou, Z., Lele, S. M., Batra, S. K., & Garrison, J. C. (2019). Comparative Study of Subcutaneous and Orthotopic Mouse Models of Prostate Cancer:

Vascular Perfusion, Vasculature Density, Hypoxic Burden and BB2r-Targeting Efficacy. *Scientific Reports*, 9(1), 11117. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47308-z>

Zhang, X. chao, Zhang, J., Li, M., Huang, X. sui, Yang, X. ning, Zhong, W. zhao, Xie, L., Zhang, L., Zhou, M., Gavine, P., Su, X., Zheng, L., Zhu, G., Zhan, P., Ji, Q., & Wu, Y. long. (2013). Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenograft models with genetic aberrations within EGFR, KRAS and FGFR1: useful tools for preclinical studies of targeted therapies. *Journal of Translational Medicine*, 11(1), 168. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-168>

Zhao, J., Ma, M. Z., Ren, H., Liu, Z., Edelman, M. J., Pan, H., & Mao, L. (2013). Anti-HDGF targets cancer and cancer stromal stem cells resistant to chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 19(13), 3567–3576. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3478>

Zhao, Y., Murciano-Goroff, Y. R., Xue, J. Y., Ang, A., Lucas, J., Mai, T. T., da Cruz Paula, A. F., Saiki, A. Y., Mohn, D., Achanta, P., Sisk, A. E., Arora, K. S., Roy, R. S., Kim, D., Li, C., Lim, L. P., Li, M., Bahr, A., Loomis, B. R., ... Lito, P. (2021). Diverse alterations associated with resistance to KRAS(G12C) inhibition. *Nature*, 599(7886), 679–683. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04065-2>

Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. In *Surgical Oncology Clinics of North America* (Vol. 25, Issue 3, pp. 447–468). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>

