

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 783**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06809203 .0**  
96 Fecha de presentación: **28.09.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1943520**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO IN VITRO PARA EL PRONÓSTICO DE LA PROGRESIÓN DE UN CÁNCER Y EL RESULTADO EN UN PACIENTE Y MEDIOS PARA LLEVAR A CABO DICHO PROCEDIMIENTO.**

30 Prioridad:  
**19.10.2005 EP 05292200**  
**02.02.2006 US 764356 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.02.2012**

73 Titular/es:  
**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE)**  
**101, RUE DE TOLBIAC**  
**75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:  
**GALON, Jérôme;**  
**PAGES, Franck y**  
**FRIDMAN, Wolf-Herman**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

**ES 2 374 783 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento *in vitro* para el pronóstico de la progresión de un cáncer y el resultado en un paciente y medios para llevar a cabo dicho procedimiento.

5

**SECTOR DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere al sector del pronóstico del resultado de un cáncer en un paciente.

Más específicamente, la presente invención se refiere al pronóstico del resultado de un cáncer en un paciente, cuyo pronóstico se basa en la cuantificación de uno o varios marcadores biológicos que son indicativos de la presencia de respuesta inmune adaptativa o de forma alternativa, del nivel de la misma, de dicho paciente contra dicho cáncer.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Dado que el cáncer es la segunda causa de mortalidad, en particular en Europa y en Estados Unidos, se están invirtiendo una gran cantidad de esfuerzos y recursos económicos en el desarrollo de estrategias terapéuticas nuevas. Sin embargo, la necesidad de herramientas de diagnóstico y pronóstico fiables es una etapa limitante del progreso de la aplicación satisfactoria de una terapia de cáncer. La mejor forma de manifestarlo es mediante el hecho de que la mayor parte de los marcadores de cáncer conocidos son muy poco fiables.

En la actualidad, los tumores malignos se clasifican generalmente según el sistema TNM. El sistema de clasificación TNM de "Tumor-Node-Metastasis" ("Tumor-Ganglio-Metástasis") utiliza el tamaño del tumor, la presencia o ausencia de tumores en nódulos linfáticos regionales, y la presencia o ausencia de metástasis distantes, para asignar un estadio al tumor (AJCC Cancer Staging Manual ("Manual de estadificación del cáncer de la AJCC"), Lippincott, 5ª edición, págs. 171-180, 1997). El estadio asignado se utiliza como base para objetivos de selección de una terapia y un pronóstico adecuados. Cuando se aplica para la estadificación de cánceres colorrectales, el sistema TNM permite la distinción entre (T) el grado de invasión de la pared intestinal, que oscila entre T0 y T4, (N) el grado de implicación de nódulos linfáticos, que oscila entre N0 y N3 y (M) el grado de metástasis, que oscila entre M0 y M1.

Para cánceres colorrectales, también se puede asignar un estadio al tumor según la clasificación de Dukes. La clasificación de Dukes permite la distinción, como mínimo, entre cuatro estadios de tumor principales, respectivamente (A) tumor confinado en la pared del intestino, (B) extensión del tumor a través de la pared del intestino, (C) implicación de ganglios regionales y (D) existencia de metástasis distante.

Sin embargo, las clasificaciones clínicas anteriores, aunque son útiles, son imperfectas y no permiten pronóstico fiable del resultado de los cánceres. Esto es particularmente cierto para los cánceres asignados como clase B de Dukes, que son de una gran variedad de gravedad.

En lugar de la estadificación clínica convencional, en la técnica se han dado a conocer una gran cantidad de marcadores biológicos, entre los que se incluyen genes y proteínas, que serían potencialmente útiles para el diagnóstico o el pronóstico de una gran variedad de cánceres. De forma destacable, se han dado a conocer diversos procedimientos para proporcionar patrones de expresión génica que serían potencialmente útiles como herramientas para el diagnóstico o pronóstico, incluyendo el diagnóstico o pronóstico de cánceres colorrectales.

En este contexto, diversos trabajos de la técnica anterior se dirigieron hacia la demostración de una relación entre (i) la presencia de diversos marcadores biológicos, o el nivel de expresión de los mismos, del huésped de la respuesta inmune y (ii) la existencia de un cáncer o el estadio de desarrollo de un cáncer, principalmente con el objetivo de descifrar los mecanismos que sustentan la evasión de la respuesta inmune por parte de los tejidos tumorales, y finalmente con el objetivo de sugerir estrategias de inmunoterapia contra el cáncer.

De forma ilustrativa, Nistico y otros (1999, Int. J. Cancer, Vol. 84: 598-603) sugirieron la existencia de una respuesta inmune espontánea contra el producto del oncogén *erbB-2* en una paciente con cáncer de mama HLA-A2 positivo, la eficacia de la cual sería dependiente de la expresión de la molécula HLA de clase I y de la localización de linfocitos CD3+T, es decir, en tejido intratumoral (IT) o peritumoral (PT). Según dichos autores, estos resultados podrían conducir a la identificación de nuevos parámetros que podrían ser útiles para definir estrategias inmunoterapéuticas más específicas y más eficaces contra el cáncer de mama.

Philips y otros (2004, British Journal of Surgery, Vol. 91: 469-475) han demostrado que linfocitos infiltrantes de tumor en cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélites estaban activados y eran citotóxicos, mediante el ensayo de (i) las proporciones de ARNm de CD8 / CD3 y (ii) la producción de CD3, CD4, CD8, IL-2R $\alpha$  y la proteína Granzima B en el tejido tumoral, aunque no existía una correlación significativa entre los números de copia del ARNm de los marcadores de células T y los conteos inmunohistoquímicos. Dichos autores sugirieron que en cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélites, se podían producir péptidos mutados inmunogénicos, que inducirían una respuesta inmune antitumoral, y concluían que dicho modelo de cáncer podría ayudar a la comprensión de las interacciones huésped-tumor, con el objetivo de mejorar las estrategias inmunoterapéuticas de forma destacada.

Maki y otros (2004, *J. Gastroenterology y Hepatology*, Vol. 19: 1348-1356) habían demostrado un deterioro del sistema inmune celular en pacientes con carcinoma hepatocelular, que se evaluaba por una expresión reducida de las proteínas CD3 $\zeta$  y CD28 por parte de las células T, así como por una actividad caspasa-3 aumentada en células T con modulación descendente por CD28, sugiriendo la existencia de apoptosis de células T en pacientes HCC. Según dichos autores, se podría establecer una nueva modalidad de terapia inmune antitumoral, que estaría dirigida a la activación de dichas células T y a evitar su apoptosis. Grujil y otros (1999, *British Journal of Cancer*, Vol. 79 (7 / 8): 1127-1132) también habían informado acerca de una expresión reducida de CD3 $\zeta$  en carcinoma cervical infiltrante de células T. Dichos autores sugirieron que a efectos de que las estrategias de vacunación fueran satisfactorias, debería ser esencial identificar, en primer lugar, y contrarrestar los mecanismos que conducen a esta pérdida de CD3 $\zeta$ .

El deterioro de la respuesta inmune del huésped, mediante la evaluación de la expresión de las proteínas CD3, CD4, CD8 y ligando Fas en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), también se demostró en pacientes con carcinoma oral (Reichert y otros (2002, *Clinical Cancer Research*, Vol. 8: 3137-3145)). Prado-García y otros (2005, *Lung Cancer*, Vol. 47: 361-371) realizaron observaciones similares, habían estudiado mecanismos de evasión de adenocarcinoma de pulmón, midieron los porcentajes de células CD3+, CD4+ y CD8+ en sangre periférica y la efusión pleural, y adicionalmente la expresión de proteínas CD27, CD28, CD45RO, CD45RA, granzima A, Fas y perforina en los subconjuntos de células T CD8+. Dichos autores habían encontrado un bloqueo de la respuesta inmune y sugirieron que eran necesarios estudios adicionales para la comprensión de los diversos mecanismos mediante los cuales las células de adenocarcinoma inhiben las células T CD8+ en los procesos de iniciación, crecimiento e invasión del carcinoma de pulmón, con el objetivo de desarrollar tratamientos mejorados para enfermedades malignas de pulmón.

Kuss y otros (2003, *British Journal of Cancer*, Vol. 88: 223-230) que realizaron observaciones similares, determinaron un subconjunto de células T efectoras CD8+CD45RO-CD27 dotadas de una señalización TcR disfuncional, en pacientes con carcinoma de células escamosas. Estos autores sugirieron estudios adicionales para confirmar directamente la hipótesis que uniría los defectos de señalización observados con la apoptosis y la rápida renovación de linfocitos en pacientes con cáncer.

Además, Valmori y otros (2002, *Cancer Research*, Vol. 62: 1743-1750) han descubierto la presencia de un subconjunto de células T CD45RA+CCR7-CD8+ PBL que tiene una actividad citolítica en pacientes con melanoma. Dichos autores sugirieron que una vacunación antitumoral mejorada debería estar dirigida hacia la estimulación y mantenimiento de dicha respuesta inmune efectora en un estadio temprano de la evolución de la enfermedad, en un momento en el que una respuesta de este tipo podría ser eficaz para erradicar una enfermedad residual mínima y para evitar recaídas.

Los trabajos anteriores que se han descrito en esta descripción dan a conocer la utilización de numerosos marcadores biológicos de la respuesta inmune en el curso de la comprensión de los mecanismos de la respuesta inmune contra diversos cánceres. Sin embargo, estos trabajos anteriores no dan a conocer datos relacionados con una relación significativa estadística entre (i) la presencia de estos marcadores biológicos, o el nivel de expresión de los mismos, y (ii) un pronóstico del resultado de la enfermedad.

Otros estudios han presentado datos que establecen una correlación estadística entre la expresión de marcadores biológicos de la respuesta inmune del huésped y el resultado de diversos cánceres.

De forma ilustrativa, Ishigami y otros (2002, *Cancer*, Vol. 94 (5): 1437-1442) demostraron que la expresión reducida de CD3- $\zeta$  se correlacionaba de forma negativa con la implicación de los nódulos linfáticos, la profundidad de la invasión, y el estadio clínico del carcinoma gástrico. De forma destacable, estos autores habían demostrado que la CD3- $\zeta$  se correlacionaba con una tasa de supervivencia de 5 años reducida de los pacientes, pero sólo para pacientes a los que se les había diagnosticado "Estadio IV" de carcinoma gástrico.

Oshokiri y otros (2003, *Journal of Surgical Oncology*, Vol. 84: 224-228) demostraron una unión estadística entre la infiltración de un nido de células cancerígenas por células T CD8+ y la supervivencia de pacientes afectados con carcinoma del conducto biliar extrahepático (EBDC). Dichos autores demostraron que la inmunoreactividad de células T CD8+ demostraba una correlación significativa con (i) metástasis de nódulo linfático menor, (ii) invasión venosa y perineural reducida, y (iii) valores de estadificación pTNM mejores. De este modo, dichos autores demostraron que el nivel de infiltración de células T CD8+ se correlacionaba con el procedimiento clínico-patológico pTNM convencional y que dicho marcador biológico era fiable para la predicción de la supervivencia de pacientes con EBDC.

Además, Diederischen y otros (2003, *Cancer Immunol. Immunother.*, Vol. 52: 423-428) demostraron que los pacientes colorrectales con proporciones CD4+ / CD8+ bajas en TIL tenían una evolución clínica mejor, con una supervivencia significativamente mayor de 5 años, independientemente del estadio de Dukes y la edad.

De forma adicional, Zhang y otros (2003, *New England Journal of Medicine*, Vol. 348(3): 203-213) demostraron, mediante inmunotinción para CD, que la presencia o ausencia de células T intratumorales se correlaciona con el resultado clínico de carcinoma de ovario avanzado después de quimioterapia citorrreductora y adyuvante. Estos resultados se obtuvieron a través de ensayos de inmunotinción de criosecciones de tumor con anticuerpos monoclonales contra CD3, CD4, CD8, CD83, CD45, CD45RO, CD19, CD57 y CD11c, así como a través e citometría de flujo de células procedentes de muestras de tumor frescas utilizando anticuerpos monoclonales contra HLADR, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45, IgG1 e IgG2a. Dichos autores habían detectado la presencia o ausencia de células T infiltrantes de tumor CD3+ dentro de islotes de células de tumor y en estroma peritumoral. Dichos autores han descubierto que los pacientes cuyos tumores contenían células T tenían tanto una duración media de (i) supervivencia libre de progresión y (ii) supervivencia global que era estadísticamente superior a la de pacientes cuyos tumores no contenían células T. Dichos autores sugirieron validar adicionalmente la utilización de detección de células T intratumorales en la clasificación y tratamiento de pacientes con carcinoma de ovario.

Aunque los trabajos de la técnica anterior dieron a conocer la buena correlación mencionada anteriormente entre (i) la presencia de algunos marcadores biológicos, o el nivel de los mismos, de la respuesta inmune y (ii) el resultado de cánceres, los resultados de la mayor parte de estos estudios de la técnica anterior también demuestran que la utilización de dichos marcadores biológicos se consideraba exclusivamente como una confirmación de una estadificación de cáncer con procedimientos de estadificación clinicopatológicos convencionales, o como una información adicional a dichos procedimientos de estadificación de cáncer convencionales. Por ejemplo, se encontró que el marcador biológico utilizado por Ishigami y otros (2002, *Supra*) era utilizable exclusivamente en pacientes con carcinoma gástrico a los que ya se les había diagnosticado como "Estadio IV" de la enfermedad. De forma similar, Zhang y otros (2003, *Supra*) concluyeron que eran necesarios estudios prospectivos para validar la detección de células T (CD3+) intratumorales en la clasificación y tratamiento de pacientes con carcinoma de ovario. De forma similar, Diederichsen y otros (2003, *Supra*) dieron a conocer la proporción CD4+ / CD8+ como marcador biológico que tenía un valor de pronóstico de supervivencia en cáncer colorrectal: Sin embargo, dichos autores no sugirieron que dicho marcador biológico podría ser suficiente por sí mismo para el pronóstico del cáncer sin datos de estadificación simultáneos generados mediante procedimientos de estadificación clinicopatológicos.

Sólo Oshikiri y otros (2003, *Supra*) consideraron que el marcador biológico que ellos habían utilizado, concretamente la infiltración de un nido de células cancerosas por células T CD8+, consistiría en un marcador fiable para una supervivencia más larga de pacientes con EBDC, dado que, de forma destacable, dicho marcador se correlacionaba bien con valores de estadificación pTNM. Sin embargo, Oshikiri y otros sólo utilizaron dicho marcador biológico como una confirmación de una estadificación de cáncer anterior mediante un procedimiento de estadificación clinicopatológico convencional. Adicionalmente, los valores de correlación estadística encontrados por Oshikiri y otros (2003) entre (a) el número de células T CD8+ intratumorales y (b) diversos parámetros clínicos como (i) metástasis de nódulos linfáticos menor ( $P=0,005$ ), (ii) invasión venosa reducida ( $P=0,0021$ ), (iii) invasión perineural reducida ( $P=0,0083$ ) y (iv) valores de estadificación pTNM mejores ( $P=0,0356$ ), fueron objetivamente demasiado bajos para sugerir a los expertos en la materia que utilizaran este marcador biológico para un pronóstico del cáncer exacto y fiable sin la utilización concomitante de datos estadificación clinicopatológicos convencionales.

Ishigami y otros (*Cancer*, vol. 94, No. 5, 2002) dan a conocer la presencia de linfocitos intratumorales que expresan la cadena zeta de CD3 en pacientes con carcinoma gástrico. Nagtegaal y otros (*BMC Cancer*, 1:7, 2001) dan a conocer la detección intratumoral y peritumoral de linfocitos utilizando, entre otros, CD3 y CD8 como marcadores en pacientes con cáncer rectal. Johnson y otros (*Lung Cancer* 27, 2000) dieron a conocer la importancia del pronóstico de infiltrados de células inmunes en carcinoma primario de pulmón, utilizando, entre otros, CD3 y CD8 como marcadores.

Por lo tanto, no existe descripción en la técnica de procedimientos fiables para el pronóstico del cáncer que utilicen exclusivamente marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa del huésped, sin la necesidad de datos clinicopatológicos concomitantes generados mediante procedimientos de estadificación de cáncer convencionales.

Además, actualmente no existe ningún marcador fiable disponible que permita la predicción del resultado del cáncer, en un estadio temprano (estadio I / II) de pacientes con cáncer colorrectal.

Por lo tanto, existe en este sector la necesidad de procedimientos mejorados de pronóstico del resultado de cánceres, incluyendo cánceres colorrectales, que estadifiquen la enfermedad de una forma más precisa y más fiable que los procedimientos disponibles actualmente, que son básicamente, si no exclusivamente, procedimientos clinicopatológicos de estadificación.

De forma destacable, la disponibilidad de procedimientos de pronóstico mejorados permitiría una selección mejor de pacientes para tratamientos terapéuticos adecuados, incluyendo cirugía anterior o posterior. De hecho, para un gran número de cánceres que incluyen cánceres colorrectales, la selección de un tratamiento terapéutico adecuado después de la cirugía está guiada por los datos histopatológicos obtenidos mediante el análisis del tejido tumoral resecionado. De forma ilustrativa, para cánceres colorrectales, los tratamientos de quimioterapia adyuvante se prescriben en la mayor parte de los casos cuando se diagnostica la implicación de nódulos linfáticos, dada la toxicidad de dicho tratamiento y su carencia de beneficios para los otros pacientes.

**CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a:

1. Un procedimiento *in vitro* para el pronóstico de pacientes de la progresión de un cáncer, procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- a) la cuantificación, en una muestra de tejido tumoral de dicho paciente, como mínimo, de dos marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra el cáncer; y
- b) la comparación del valor obtenido en la etapa a) para cada uno de dichos marcadores biológicos con un valor de referencia predeterminado para el mismo marcador biológico; dicho valor de referencia predeterminado se correlaciona con un pronóstico específico de la progresión de dicho cáncer,

en el que dichos, como mínimo, dos marcadores biológicos se cuantifican, en la etapa a), en muestras de tumor recogidas de dos regiones del tumor, respectivamente (i) el centro del tumor (CT) y (ii) el borde invasivo del tumor (IM);

en el que dichos, como mínimo, dos marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra el cáncer comprenden CD3 y CD45RO.

2. El procedimiento *in vitro*, según el punto 1, en el que la etapa a) se lleva a cabo mediante la cuantificación, como mínimo, de tres marcadores biológicos distintos, respectivamente CD3, CD45RO y, como mínimo, un marcador biológico adicional seleccionado del grupo que comprende CD8 y GZMB.

3. El procedimiento *in vitro*, según el punto 1, en el que la etapa a) se lleva a cabo mediante la cuantificación de los cuatro marcadores biológicos distintos que comprenden CD3, CD45RO, CD8 y GZMB.

4. El procedimiento *in vitro*, según cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que la etapa a) se lleva a cabo mediante la cuantificación de dicho, como mínimo, un marcador biológico en una sección de tejido tumoral mediante inmunodetección, separadamente tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el borde invasivo (IM).

**DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **figura 1** muestra los resultados de la expresión de genes relacionados inflamatorios, inmunosupresores e inmune adaptativos en series de 75 cánceres colorrectales según el estado VELIPI y la recaída. Los niveles de expresión de ARNm relativos se normalizaron al nivel de ARNm 18S para cada muestra. Los niveles se representan por el número de veces que incrementan (%) en comparación con el grupo de referencia de pacientes positivos para invasión (VELIPI+) que experimentaban recaída. \*\*: P<0,05 en comparación con el grupo de referencia.

La **figura 2** muestra la media  $\pm$  SEM de células CD45RO+ / mm<sup>2</sup> en los diferentes grupos de pacientes (estadios N y M, según la estadificación TNM (AJCC / UICC), na: no aplicable). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando un ensayo Mann-Whitney. \* Representa diferencias significativas (P<0,05).

La **figura 3** muestra las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia total (OS) y supervivencia libre de enfermedad (DFS) en CD45RO-hi (>250 células CD45RO+ / mm<sup>2</sup>, n=176, línea superior), y en CD45RO-lo (<250 células CD45RO+ / mm<sup>2</sup>, n=160, línea inferior).

La **figura 4** muestra una comparación de las densidades de población inmune en el centro (CT) y en el borde invasivo (IM) de los tumores de pacientes con recaída (histograma negro) o sin recaída (histograma blanco).

**Figura 5.** La significancia de todos los cortes se representó en función del número de CD3<sub>CT</sub> / mm<sup>2</sup> (negro), y CD3<sub>IM</sub> / mm<sup>2</sup> (verde) para la supervivencia total. También se representan cortes para el 25, 50 y 75% del grupo para las dos regiones. Los valores de P por encima de la línea horizontal (P=0,05) son todos significativos.

La **figura 6** muestra la representación de la DFS media de pacientes con densidades altas (histogramas inferiores) o densidades bajas (histogramas superiores) de células inmunes adaptativas en cada región del tumor (CT o IM).

La **figura 7** muestra las curvas de Kaplan-Meier para la duración de DFS (7A) y OS (7B) según la presencia de densidad alta de CD3 en el centro del tumor (CD3<sub>CT</sub><sup>Hi</sup>) y densidad alta de CD3 en el borde invasivo (CD3<sub>IM</sub><sup>Hi</sup>) (gris grueso), CD3<sub>CT</sub> alta y CD3<sub>IM</sub> baja (gris delgado), CD3<sub>CT</sub> baja y CD3<sub>IM</sub> alta (negro delgado), y CD3<sub>CT</sub> baja y CD3<sub>IM</sub> baja (negro grueso), en 415 pacientes con cáncer colorrectal (prueba estadística de log-rank, P<10<sup>-4</sup> para OS y DFS; \*\* P<10<sup>-4</sup>, \* P<0,05). La figura 7C muestra los análisis combinados de las regiones del tumor de marcadores inmunes adaptativos. Se representa la DFS media de pacientes con densidades altas (histogramas

inferiores) o densidades bajas (histogramas superiores) de células inmunes adaptativas en las dos regiones del tumor (CT más IM).

**Figura 8**

- 5 (8a): Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la DFS según los estadios de Dukes (Dukes A: línea roja (n=75), B: verde (n=137), C: azul (n=99), y D: negra (n=95)) en 415 pacientes con cáncer colorrectal.  
 (8b): Curvas Kaplan-Meier para la duración de la DFS según los estadios de Dukes (tal como en 8a) y respecto a la presencia de CD3<sub>CT</sub> baja más CD3<sub>IM</sub> baja (líneas gruesas, n=93) o CD3<sub>CT</sub> alta más CD3<sub>IM</sub> alta (líneas delgadas, n=109).  
 10 (8c) : Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la DFS según los estadios de Dukes y respecto a la presencia de CD3<sub>CT</sub> baja más CD3<sub>IM</sub> baja más CD45RO<sub>CT</sub> baja más CD45RO<sub>IM</sub> baja (líneas gruesas, n=25) o CD3<sub>CT</sub> alta más CD3<sub>IM</sub> alta más CD45RO<sub>CT</sub> alta más CD45RO<sub>IM</sub> alta (líneas delgadas, n=87). \*\* P<10<sup>-4</sup>.  
 (8d): Curvas Kaplan-Meier para la duración de la OS según los estadios de Dukes y para la presencia de CD3<sub>CT</sub> baja más CD3<sub>IM</sub> baja más CD45RO<sub>CT</sub> baja más CD45RO<sub>IM</sub> baja (líneas gruesas, n=25) o CD3<sub>CT</sub> alta más CD3<sub>IM</sub> alta más CD45RO<sub>CT</sub> alta más CD45RO<sub>IM</sub> alta (líneas delgadas, n=87).

**Figura 9:** Valores de P Log-rank para la duración de la DFS según la presencia de densidad alta de CD3+ (CD3<sup>Hi</sup>, grupo A) y densidad baja de CD3+ (CD3<sup>Lo</sup>, grupo B) en el centro del tumor (negro), y en el borde invasivo del tumor (gris). Se representan las densidades de células CD3+ (célula / mm<sup>2</sup>), y el número de pacientes en cada grupo (A y B). Los valores de P son significativos para un intervalo grande de cortes (50-1000 células / mm<sup>2</sup> en el centro del tumor, y 80-1300 células / mm<sup>2</sup> en el borde invasivo del tumor). Los resultados obtenidos son fácilmente reproducibles por otros grupos como un gran intervalo de valores de corte, (centrado en el corte con un valor de P mínimo que se determinó) y discriminaba el resultado de paciente.

**Figura 10: (figura 10-A)** Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM (Estadios I: línea roja (n=75), II: verde (n=137), III: azul (n=99), y IV: negra (n=95)) en pacientes con CRC.

**(figura 10-B)** Las curvas de Kaplan-Meier ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM (tal como en el panel A) y respecto a la densidad de células CD3+ en regiones de tumor combinadas (CD3<sub>CT</sub><sup>Lo</sup>CD3<sub>IM</sub><sup>Lo</sup>, líneas gruesas, n=93; CD3<sub>CT</sub><sup>Hi</sup>CD3<sub>IM</sub><sup>Hi</sup>, líneas delgadas, n=109). El subgrupo de pacientes que no parecían tener una reacción inmune coordinada in situ en regiones del tumor (Hi / Lo o Lo / Hi para densidades de células CD3+) presentaban curvas de Kaplan-Meier similares al grupo entero.

**(figura 10-C)** Las curvas de Kaplan-Meier ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM y respecto a la densidad de células CD3+ y CD45RO+ en regiones de tumor combinadas (CD3<sub>CT</sub><sup>Lo</sup>CD3<sub>IM</sub><sup>Lo</sup> más CD45RO<sub>CT</sub><sup>Lo</sup>CD45RO<sub>IM</sub><sup>Lo</sup>, líneas gruesas, n=16; CD3<sub>CT</sub><sup>Hi</sup>CD3<sub>IM</sub><sup>Hi</sup> más CD45RO<sub>CT</sub><sup>Hi</sup>CD45RO<sub>IM</sub><sup>Hi</sup>, líneas delgadas, n=88). Los valores de corte fueron 250, 640, 60, y 190 para CD3<sub>CT</sub>, CD3<sub>IM</sub>, CD45RO<sub>CT</sub>, y CD45RO<sub>IM</sub>, respectivamente. Prueba estadística Log-rank, \*\* P<10<sup>-4</sup>.

**Figura 11:** Se representan curvas de Kaplan-Meier que ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad **(A)**, supervivencia específica de enfermedad **(B)**, y supervivencia total **(C)** según la organización de células CD8+ dentro de las regiones del tumor (CT e IM). La presencia de densidades altas de células CD8+ en las dos regiones del tumor (CD8-CT / IM-hi, rojo), de densidades heterogéneas de células CD8+ en las dos regiones del tumor (CD8-CT / IM-het, verde), de densidades bajas de células CD8+ en las dos regiones del tumor (CD8-CT / IM-lo, negro), en pacientes con un estadio I / II de cáncer de colon (izquierda) y cáncer de recto (derecha) (prueba estadística log-rank, P<0,001 para todas las comparaciones).

**Figura 12.** Se representan curvas de Kaplan-Meier que ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad **(A)**, supervivencia específica de enfermedad **(B)**, y supervivencia total **(C)** según la organización de células CD45RO+ dentro de las regiones del tumor (CT e IM). La presencia de densidades altas de células CD45RO+ las dos regiones del tumor (CD8-CT / IM-hi, rojo), de densidades heterogéneas de células CD45RO+ en las dos regiones del tumor (CD45RO-CT / IM-het, verde), de densidades bajas de células CD45RO+ en las dos regiones del tumor (CD45RO-CT / IM-lo, negro), en pacientes con estadio I / II de cáncer de colon (izquierda) y cáncer de recto (derecha) (prueba estadística log-rank, P<0,001 para todas las comparaciones).

**Figura 13:** Se representan curvas de Kaplan-Meier que ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según la organización de células CD45RO+ y CD8+ dentro de las regiones del tumor (CT e IM). La presencia de densidades altas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO / CD8-CT / IM-hi, rojo), de densidades heterogéneas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO / CD8-CT / IM-het, verde), de densidades bajas de células CD45RO+ y CD8+ en la región CT (CD45RO-CT-lo / CD8-CT-lo, azul), de densidades bajas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO / CD8-CT / IM-lo, negro), en 272 pacientes con estadio I / II de cáncer colorrectal (prueba estadística log-rank, P<0,001 para todas las comparaciones). Se representa todo el grupo de pacientes con estadio I / II de cáncer colorrectal (línea negra punteada).

Por lo tanto, >95% de los pacientes CD45RO / CD8-CT / IM-hi estaban libres de la enfermedad después de 18 años, mientras que el 0% de pacientes CD45RO / CD8-CT / IMlo estaban libres de la enfermedad después de sólo 2 años.

5 **Figura 14:** Las curvas de Kaplan-Meier ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según el nivel de expresión génica de 6 marcadores (PDCD1LG1, VEGF, TNFRSF6B, IRF1, IL18RA, SELL). Se representan cuatro combinaciones. (Prueba estadística log-rank,  $P < 0,001$  para todas las comparaciones).

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención da a conocer un procedimiento nuevo para el pronóstico de la aparición de un cáncer en un paciente, basándose dicho procedimiento nuevo en la detección y / o la cuantificación, en el sitio del tumor, de uno o más marcadores biológicos indicativos de la presencia de respuesta inmune adaptativa, o de forma alternativa, del nivel de la misma, de dicho paciente contra dicho cáncer.

15 Actualmente se ha demostrado de forma sorprendente, según la presente invención, que una determinación precisa de la respuesta inmune adaptativa *in situ* hacia cánceres malignos, y especialmente, hacia cánceres colorrectales, se puede utilizar como único parámetro para la predicción del resultado clínico posterior de pacientes con cáncer, sin tener en cuenta la extensión de la invasión del tumor local y la propagación a nódulos linfáticos regionales.

20 Esta correlación altamente significativa estadísticamente entre (i) el nivel de la respuesta inmune adaptativa de un paciente en el sitio del tumor y (ii) el resultado de la enfermedad es tanto más sorprendente teniendo en cuenta que según el conocimiento de la técnica anterior, la presencia de células inmunes infiltrantes en cánceres de mamíferos suponía resultados altamente variables, que oscilaban desde procesos inflamatorios perjudiciales hasta respuestas inmunes adaptativas beneficiosas.

25 Además, dicha correlación altamente significativa que se ha descubierto de forma sorprendente según la presente invención actualmente permite la determinación de pronóstico del resultado de un cáncer en un paciente sin una necesidad adicional de datos clinicopatológicos que se aportan mediante los procedimientos de estadificación de cáncer clinicopatológicos convencionales conocidos en la técnica, tales como los procedimientos de Dukes o Gruji.

30 Tal como se detallará a continuación, cuando se ha determinado una correlación estadística entre (i) la presencia de uno o más marcadores biológicos, o el nivel de los mismos, de la respuesta inmune adaptativa, tal como se describe en la presente especificación y (ii) el resultado real del cáncer en los pacientes, que abarca la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y la supervivencia total (OS), se han obtenido valores de P superiores a  $10^{-8}$ , según la presente invención, que se pueden comparar con valores de P de  $5 \times 10^{-2}$  a  $1 \times 10^{-3}$  que se daban a conocer en diversos trabajos de la técnica anterior, tales como, de forma ilustrativa, los de Zhang y otros (2003, *Supra*), Diederischen y otros (2003, *Supra*) u Oshikiri y otros (2003, *Supra*).

35 El presente solicitante ha descubierto que existe una relación altamente significativa (es decir, valores de P bajos) entre (i) el tipo, densidad, y localización de células inmunes dentro de los tumores y (ii) el resultado clínico de los pacientes, que abarca la DFS y OS. Esta correlación altamente significativa se ha descubierto cuando se utilizaban, para el ensayo de marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa, (i) ensayos de inmunohistoquímica o bien (ii) análisis de expresión génica.

40 Mediante el análisis de marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa mediante el análisis de la expresión génica en la totalidad de una muestra de tejido tumoral, se encontró un elevado número de combinaciones significativas de marcadores, incluyendo numerosas combinaciones significativas, como mínimo, de dos marcadores, con valores de P de aproximadamente  $10^{-4}$ , o inferiores.

45 De forma importante, en esta descripción se ha identificado un grupo dominante de genes comodulados para la inmunidad adaptativa de  $T_{H1}$ , incluyendo dicho grupo TBX1 (factor de transcripción 21 de la caja T), IRF1 (factor 1 regulador del interferón), IFNG (gamma-Interferón), CD3Z (CD3ζ), CD8, GLNY (granulinsina) y GZMB (granzima B). Además, se ha descubierto una correlación entre la expresión de dichos genes y la recurrencia del tumor.

50 Otro grupo de genes altamente significativo, según la presente invención, incluye PDCD1LG1, VEGF, TNFRSF6B, IRF1, IL18RA y SELL.

55 Mediante el análisis de marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa mediante análisis inmunohistoquímico (i) en el centro del tumor (CT), (ii) en el entrono celular alrededor del tumor, que puede también denominarse como "borde invasivo" (IM) o bien (iii) tanto en CT como en IM, también se encontraron numerosas combinaciones significativas de marcadores. Los valores de correlación estadística más altos se encontraron cuando los marcadores biológicos se cuantificaron tanto en el centro del tumor (CT) como en el borde invasivo (IM).

60 En primer lugar, se ha descubierto, según la presente invención, que existe una correlación elevada entre una densidad alta de células T en el sitio del tumor y un resultado favorable de la enfermedad. En particular, se ha

demostrado que un resultado positivo del cáncer está altamente correlacionado con la cuantificación de una densidad alta de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor, en la parte central del tumor o bien en el borde invasivo del mismo.

5 En segundo lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor se correlaciona altamente con una recurrencia del cáncer reducida y / o recurrencia del cáncer retardada y / o una carencia de recurrencia del cáncer.

10 En tercer lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor se correlaciona altamente con metástasis distante concomitante reducida, o una carencia de metástasis distante concomitante (estadios M).

15 En cuarto lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor se correlaciona altamente con metástasis temprana reducida, o una carencia de metástasis temprana (VE o LI o PI).

20 En quinto lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor se correlaciona altamente con una invasión reducida de los nódulos linfáticos regionales con células tumorales (estadios N).

25 En sexto lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor se correlaciona altamente con una invasión reducida a través de la pared intestinal (estadios T).

30 De forma más general, se ha descubierto que la ausencia de diseminación temprana del tumor que se manifiesta mediante embolia tumoral en estructuras linfovascuales y perineurales está asociada marcadamente con la presencia de una respuesta inmune *in situ* fuerte, ilustrándose dicha respuesta inmune fuerte, de forma destacable, por las densidades altas de células inmunes encontradas en el sitio del tumor, así como por el alto nivel de expresión de diversos genes asociados con inmunidad en el sitio del tumor.

35 Adicionalmente, se ha descubierto, según la presente invención, que la detección de una respuesta inmune adaptativa fuerte en dos regiones distintas del tumor, el centro del tumor (CT) más el borde invasivo del tumor (IM), se correlacionaba altamente con un tiempo largo de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia total de los pacientes, y era significativamente más informativa para el pronóstico de la progresión del cáncer de un paciente.

40 De forma importante, en la presente invención se ha descubierto una correlación elevada entre (i) la densidad celular de un tipo específico de células que forma el sistema inmune, tal como se ensaya en un ensayo inmunohistoquímico utilizando un único marcador biológico, y (ii) la DFS u OS, con valores de P, como mínimo, tan bajos como  $10^{-7}$ , cuando dicho marcador biológico se ensaya tanto en el centro del tumor (CT) como en el borde invasivo (IM).

45 De forma general; se ha descubierto, según la presente invención, que el tipo, la densidad y la localización de células inmunes en pacientes con cáncer, tal como se ensaya a través de la presencia de marcadores biológicos, o el nivel de los mismos, de la respuesta inmune adaptativa, tiene un valor de pronóstico que es superior e independiente de aquellos de procedimientos de estadificación del cáncer clinicopatológicos convencionales, entre los que se incluyen las clasificaciones de Dukes y la UICC-TNM.

50 Aún de forma más específica, la presente invención da a conocer actualmente procedimientos de pronóstico y medios técnicos para la predicción del resultado de un cáncer en un paciente, en particular para cánceres en un estadio temprano de la enfermedad, que se ha probado que son mucho más exactos que los de procedimientos de estadificación del cáncer clinicopatológicos convencionales, y aún de forma especial para cánceres clasificados inicialmente como estadio I / III, según la clasificación de Dukes.

55 Por lo tanto, se ha descubierto, según la presente invención, que la detección de una respuesta inmune adaptativa fuerte en el sitio del tumor se correlacionaba ampliamente con un tiempo de supervivencia libre de enfermedad (DFS) y tiempo de supervivencia total (OS) de los pacientes largo.

Por lo tanto, la presente invención comprende un procedimiento *in vitro*, tal como se resume en las reivindicaciones.

60 De forma inesperada, se ha descubierto, según la presente invención, que una respuesta inmune adaptativa fuerte coordinada se correlaciona con un pronóstico del cáncer igualmente favorable.

65 También de forma inesperada, se ha descubierto que dicha correlación encontrada, según la presente invención, era independiente de la invasión del tumor a través de la pared intestinal y la extensión a los nódulos linfáticos locales (clasificación de Dukes A, B, C).

En cambio, se ha descubierto, de forma sorprendente, que una respuesta inmune adaptativa *in situ* débil se

correlaciona con un mal pronóstico, incluso en pacientes con una invasión del tumor mínima (Clasificación de Dukes A).

5 Los criterios utilizados según el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención, concretamente el estado de la respuesta inmune adaptativa del paciente con cáncer, no sólo parecen diferentes de los de T, N, M y la clasificación de Dukes sino que también son más precisos en la predicción de la enfermedad (tiempo del intervalo libre de enfermedad y de supervivencia).

10 De este modo, se ha descubierto por primera vez, según la presente invención, que la medición del nivel de la respuesta inmune adaptativa de un paciente con cáncer se puede utilizar como única medición para la predicción del resultado de la enfermedad de cáncer, sin ningún requisito de datos adicionales, y particularmente, sin ningún requisito de datos clinicopatológicos aportados por procedimientos de estadificación del cáncer convencionales.

15 De hecho, aunque varios trabajos de la técnica anterior habían apuntado la posible relevancia del marcador o marcadores de la respuesta inmune adaptativa para el pronóstico del cáncer, dichos trabajos anteriores contenían sólo datos que podrían utilizarse como confirmación o como información adicional de los datos del pronóstico proporcionados por los procedimientos de estadificación del cáncer convencionales. De este modo, ningún trabajo de la técnica anterior dio a conocer o sugirió ningún procedimiento de pronóstico del cáncer *in vitro* fiable o reproducible, que se basara exclusivamente en la medición de uno o más marcadores biológicos indicativos de la respuesta inmune adaptativa de los pacientes con cáncer.

También se ha descubierto que la detección de una respuesta inmune adaptativa fuerte en el sitio del tumor era un marcador fiable para una gran variedad de cánceres, tales como cánceres de colon y cánceres de recto.

25 La realización del procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención también puede indicar, con más precisión que los procedimientos de la técnica anterior, los pacientes con un riesgo elevado de recurrencia del tumor, los cuales pueden beneficiarse de terapia adyuvante, que incluye la inmunoterapia.

30 Tal como se pretende en esta descripción, la expresión "pronóstico de la progresión de un cáncer" abarca el pronóstico, en un paciente en el que ya se ha diagnosticado la existencia de un cáncer, de diversos hechos, que incluyen:

(i) las posibilidades de existencia de metástasis;

35 (ii) las posibilidades de existencia de recurrencia locoregional del cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal; y

(iii) las posibilidades de existencia de uno tiempo largo libre de enfermedad (DFS) y / o un tiempo largo de supervivencia total (OS); es decir, un tiempo de DFS o un tiempo de OFS de 5 años o más después de los ensayos con el procedimiento de pronóstico *in vitro* según la presente invención.

40 Tal como se pretende en esta descripción, una "muestra de tejido tumoral" abarca (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido a partir del tejido directamente que rodea al tumor, pudiendo ser dicho tejido denominado más específicamente "borde invasivo" del tumor, (iv) islotes linfoides muy cercanos al tumor, (v) los nódulos linfáticos localizados muy cerca del tumor, (vi) una muestra de tejido tumoral recogida con una cirugía anterior (para el seguimiento de pacientes después del tratamiento, por ejemplo), y (vii) una metástasis distante.

50 Preferentemente, cuando la etapa a) comprende el análisis de la expresión de uno o más genes, es decir, uno o más marcadores biológicos pertinentes, la cuantificación de la expresión de dicho uno o más genes se lleva a cabo a partir de la totalidad de la muestra de tejido tumoral.

55 Preferentemente, cuando la etapa a) comprende el cálculo de densidades de células inmunes específicas, mediante ensayos inmunohistoquímicos para uno o más marcadores biológicos expresados por células, entonces la cuantificación de dicho uno o más marcadores biológicos se lleva a cabo de forma separada, como mínimo, en dos muestras de tejido tumoral distintas, entre las muestras del tejido tumoral numeradas anteriormente como (i) hasta (vi). De la forma más preferente, según la presente realización, la cuantificación de dicho uno o más marcadores biológicos se lleva a cabo de forma separada tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el borde invasivo (IM).

60 Una muestra de tejido tumoral, independientemente de si se obtiene a partir del centro del tumor, del borde invasivo del tumor, o de los nódulos linfáticos más cercanos, engloba trozos o cortes de tejido que se han eliminado del centro del tumor o del borde invasivo que rodea el tumor, incluyendo el seguimiento de una resección del tumor quirúrgica o el seguimiento de la recolecta de una muestra tumoral para biopsia, para una cuantificación adicional de uno o más marcadores biológicos, de forma destacable, a través de procedimientos de histología o inmunohistoquímica, mediante procedimientos de citología de flujo y mediante procedimientos de análisis de la expresión de genes o proteínas, incluyendo el análisis genómico y proteómico. Podrá apreciarse que las muestras de tejido tumoral se pueden utilizar en el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención. En estas

- realizaciones, el nivel de expresión del marcador biológico se puede calcular mediante el cálculo de la cantidad (por ejemplo, la cantidad o concentración absoluta) del marcador biológico en una muestra de tejido tumoral, por ejemplo, un frotis de tejido tumoral obtenido a partir de un paciente. La muestra de células, por supuesto, puede someterse a una serie de técnicas preparativas y de almacenamiento posteriores a la recolecta bien conocidas (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos y/o proteínas, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de valorar la cantidad de marcador biológico en la muestra. De forma similar, los frotis de tejido tumoral también pueden estar sometidos a técnicas preparativas y de almacenamiento posteriores a la recolecta, por ejemplo, fijación.
- 5
- 10 Tal como se pretende en esta descripción, la “respuesta inmune adaptativa” engloba la presencia de la actividad, incluyendo el nivel de actividad, de células del sistema inmune del paciente con cáncer huésped localmente en el sitio del tumor.
- 15 Tal como se pretende en esta descripción, la expresión “la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente *contra* dicho tumor” engloba cualquier respuesta inmune adaptativa de dicho paciente a través de la acción directa (dependiente de TCR) o indirecta (independiente de TCR), o de ambas, hacia dicho cáncer.
- 20 La respuesta inmune adaptativa significa la respuesta inmune específica del paciente con cáncer huésped contra el tumor y engloba la presencia de gran cantidad de células, implicadas en la respuesta inmune del huésped o, de forma alternativa, de la actividad de las mismas, que incluye:
- 25 Tal como se utiliza en esta descripción, linfocitos T engloban linfocitos T cooperadores, que incluyen subgrupos de células de linfocitos T cooperadores Th1 y Th2.
- 30 Tal como se utiliza en esta descripción, linfocitos T también engloba linfocitos T citotóxicos.

***Inmunidad adaptativa***

- 35 En comparación con la inmunidad innata, la inmunidad adquirida (adaptativa) se desarrolla cuando el cuerpo se expone a varios antígenos y se construye una defensa que es específica de este antígeno.
- 40 La respuesta inmune adaptativa es específica de antígeno y puede tardar días o más tiempo en desarrollarse. Los tipos de células con papeles críticos en la inmunidad adaptativa son células presentadoras de antígeno que incluyen macrófagos y células dendríticas. La estimulación de subtipos de células T, la activación de células B y la producción de anticuerpos, dependientes de antígeno, y la activación de macrófagos y de células NK desempeñan papeles importantes en la inmunidad adaptativa. La respuesta inmune adaptativa también incluye el desarrollo de memoria inmunológica, un proceso que continua desarrollándose toda la vida y aumenta las futuras respuestas a un determinado antígeno.
- 45 Los linfocitos, un tipo especial de glóbulos blancos, contienen subgrupos, los linfocitos B y T, que son elementos clave en las respuestas inmunes adquiridas. Los linfocitos B (también denominados células B) producen anticuerpos. Los anticuerpos se unen a un antígeno específico y facilitan al fagocito destruir el antígeno. Los linfocitos T (células T) atacan antígenos directamente, y aportan control de la respuesta inmune. Se desarrollan células B y células T que son específicas de UN tipo de antígeno. Cuando existe exposición a un antígeno diferente, se forman células B y células T diferentes.
- 50 A medida que los linfocitos se desarrollan, normalmente aprenden a reconocer los tejidos del mismo cuerpo (propios), como diferentes de tejidos y partículas que no se encuentran normalmente en el cuerpo (no propios). Una vez se forman células B y células T, algunas de esas células se multiplicarán y aportarán “memoria” al sistema inmune. Esto le permite al sistema inmune responder de forma más rápida y más eficaz la próxima vez que un individuo se expone al mismo antígeno, y en muchos casos evitarán que el individuo se ponga enfermo. Por ejemplo, la inmunidad adaptativa explica por qué un individuo que ha tenido varicela se denomina “inmune” a sufrir de nuevo varicela.
- 55 *Sistema inmune adaptativo*
- 60 El sistema inmune adaptativo, también denominado sistema inmune adquirido, explica el hecho interesante de que cuando la mayor parte de los mamíferos sobreviven a una infección inicial por un patógeno, generalmente se vuelven inmunes a una enfermedad posterior provocada por el mismo patógeno. Este hecho lo explota la medicina moderna mediante la utilización de las vacunas. El sistema inmune adaptativo se basa en células inmunes denominadas leucocitos (o glóbulos blancos) que son producidos por células madre en la médula ósea. El sistema inmune se puede dividir en dos partes. Muchas especies, entre las que se incluyen los mamíferos, tienen el siguiente tipo:
- 65 El sistema inmune humoral actúa contra las bacterias y virus en los líquidos corporales (tales como la sangre). Sus medios primarios de acción son las inmunoglobulinas, también denominadas anticuerpos, que son producidos por

las células B (B significa que se desarrollan en la médula ósea).

El sistema inmune celular, que se encarga de otras células que son infectadas por virus. Esto lo realizan las células T, también denominadas linfocitos T (T significa que se desarrollan en el timo). Hay dos tipos de células principales T:

Las células T citotóxicas (células TC) reconocen células infectadas utilizando los receptores de células T para probar la superficie de otras células. Si reconocen una célula infectada, liberan granzimas para señalar una célula para que se vuelva apoptótica ("se suicide"), matando, de este modo, esa célula y cualquier virus que esté en proceso de creación.

Las células T cooperadoras (células TH) interactúan con macrófagos (que ingieren material peligroso) y también producen citoquinas (interleuquinas) que inducen la proliferación de células B y T.

Además, existen células T reguladoras (células Treg) que son importantes para la inmunidad mediada por células.

Células T citotóxicas : una célula T citotóxica (o TC) es una célula T (un tipo de glóbulo blanco) que en su superficie tiene receptores de antígeno que se pueden unir a fragmentos de antígenos expuestos por las moléculas MHC de clase I de células tumorales y células somáticas infectadas por virus. Una vez activadas por un complejo MHC-antígeno, las células TC liberan la proteína perforina, que forma poros en la membrana plasmática de la célula diana; esto provoca que el agua y los iones fluyan hacia la célula diana, haciendo que ésta se expanda y finalmente sufra lisis. Las TC también liberan granzima, una serín proteasa que puede entrar en las células diana a través del poro formado por la perforina e induce apoptosis (muerte celular). La mayor parte de las células TC presentan en su superficie celular la proteína CD8, que tiene atracción por partes de la molécula MHC de clase I. Esta afinidad mantiene la célula TC y la célula diana unidas íntimamente durante la activación específica de antígeno. Las células TC con proteína superficial CD8 se denominan células T CD8+.

Células T cooperadoras (o TH): una célula T cooperadora (o TH) es una célula T (un tipo de glóbulo blanco) que tiene en su superficie receptores de antígeno que se pueden unir a fragmentos de antígenos expuestos por las moléculas MHC de clase II que se encuentran sobre las células presentadoras de antígeno (APC). Una vez unida al antígeno, la célula TH prolifera y se diferencia en células TH activadas y células TH de memoria. Las células TH activadas secretan citoquinas, proteínas o péptidos que estimulan otros linfocitos; la más común es la interleuquina-2 (IL-2), que es un potente factor de crecimiento de las células T. Las células TH activadas, que proliferan se pueden diferenciar en dos subtipos principales de células, células Th1 y Th2. Estos subtipos se definen en base a las citoquinas específicas producidas. Las células Th1 producen gamma-interferón e interleuquina 12, mientras que las células Th2 producen interleuquina-4, interleuquina-5 e interleuquina-13. Las células TH de memoria son específicas del primer antígeno que encuentran y se pueden llamar durante la segunda respuesta inmune. La mayor parte de las células TH presentan en su superficie celular la proteína CD4, que tiene atracción hacia partes de la molécula MHC de clase II. Esta afinidad mantiene la célula TH y la célula diana unidas íntimamente durante la activación específica de antígeno. Las células TH con una proteína de superficie CD4 se denominan células T CD4+. La disminución del número de células T CD4+ es el mecanismo primario mediante el cual el VIH causa el SIDA.

**Otras definiciones de términos relevantes**

Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión "sitio del tumor" significa el propio tejido tumoral, así como el tejido que se encuentra en contacto íntimo con el tejido tumoral, que incluye el borde invasivo del tumor y los nódulos linfáticos regionales que son los más cercanos al tejido tumoral o al borde invasivo del tumor.

Tal como se pretende en esta descripción, el "estado" de la respuesta inmune adaptativa engloba (i) la existencia de una respuesta inmune específica contra el cáncer en el sitio del tumor así como (ii) el nivel dicha respuesta inmune específica.

Tal como se pretende en esta descripción, un "marcador biológico" comprende cualquier parámetro detectable, medible o cuantificable que sea indicativo del estado de la respuesta inmune adaptativa de un paciente con cáncer contra el tumor. Un marcador se vuelve un "marcador biológico" con el objetivo de llevar a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención cuando se encuentra una buena correlación estadística entre (i) un incremento o disminución del valor de la cuantificación para dicho marcador y (ii) la progresión del cáncer real observada en los pacientes. Para calcular los valores de correlación ensayados para dicho marcador y, por lo tanto, determinar la relevancia estadística de dicho marcador como "marcador biológico", según la presente invención, se puede utilizar cualquiera de los procedimientos estadísticos conocidos por un experto en la materia. De forma ilustrativa, se pueden utilizar procedimientos estadísticos que utilizan las curvas de Kaplan-Meier y / o un modelo de riesgos proporcionales de Cox, tal como se muestra en los ejemplos de esta descripción. Cualquier marcador para el cual se determine un valor de P inferior a 0,05, e incluso preferentemente, inferior a  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ó  $10^{-7}$  (según análisis univariado y multivariado (por ejemplo, prueba log-rank y prueba de Cox, respectivamente)) comprende un "marcador biológico" utilizable en el procedimiento para el pronóstico del cáncer de la presente invención.

Los marcadores biológicos incluyen la presencia de células del sistema inmune, o el número o densidad de las mismas, en el sitio del tumor.

5 Los marcadores biológicos también incluyen la presencia de proteínas, o la cantidad de las mismas, producidas de forma específica por células del sistema inmune en el sitio del tumor.

10 Los marcadores biológicos también incluyen la presencia de cualquier material biológico, o la cantidad del mismo, que sea indicativo del nivel de expresión de genes relacionados con el aumento de una respuesta inmune específica del huésped, en el sitio del tumor. De este modo, los marcadores biológicos incluyen la presencia de ARN mensajero (ARNm), o la cantidad del mismo, transcrito a partir de ADN genómico que codifica proteínas que se producen específicamente por células del sistema inmune, en el sitio del tumor.

15 Los marcadores biológicos, por lo tanto, incluyen antígenos de superficie que se expresan de forma específica por células del sistema inmune, entre las que se incluyen linfocitos B, linfocitos T, monocitos / macrófagos, células dendríticas, células NK, células NKT, y células NK-DC, que se reclutan dentro del tejido tumoral o en su proximidad, incluyendo dentro del borde invasivo del tumor y los nódulos linfáticos más cercanos, o de forma alternativa, ARNm que codifica dichos antígenos de superficie.

20 De forma ilustrativa, los antígenos de superficie utilizados como marcadores biológicos incluyen CD3, CD4, CD8 y CD45RO que son expresados por células T o subgrupos de células T.

25 Por ejemplo, si la expresión del antígeno CD3, o la expresión del ARNm del mismo, se utiliza como marcador biológico, la cuantificación de este marcador biológico, en la etapa a) del procedimiento según la presente invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica todos los linfocitos T y las células NKT.

30 Por ejemplo, si la expresión del antígeno CD8, o la expresión del ARNm del mismo, se utiliza como marcador biológico, la cuantificación de este marcador biológico, en la etapa a) del procedimiento según la presente invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica linfocitos T citotóxicos.

35 Por ejemplo, si la expresión del antígeno CD45RO, o la expresión del ARNm del mismo, se utiliza como marcador biológico, la cuantificación de este marcador biológico, en la etapa a) del procedimiento según la presente invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica linfocitos T de memoria o linfocitos T efectores de memoria.

También de forma ilustrativa, las proteínas utilizadas como marcadores biológicos también incluyen proteínas citolíticas producidas de forma específica por células del sistema inmune, tal como la perforina, granzulina y también granzima-B.

40 ***Descripción general del procedimiento in vitro para el pronóstico del cáncer con fines ilustrativos.***

*Etapas a) del procedimiento*

45 Al final de la etapa a) del procedimiento según la presente invención, se obtiene un valor de cuantificación para cada uno, como mínimo, de un marcador biológico que se utiliza.

Tal como se ha especificado anteriormente, las realizaciones específicas de la etapa a) incluyen:

50 (i) cuantificación de uno o más marcadores biológicos mediante procedimientos inmunoquímicos, que engloban la cuantificación de uno o más marcadores de proteína de interés mediante procedimientos inmunohistoquímicos *in situ* en una muestra de tejido tumoral, por ejemplo, utilizando anticuerpos dirigidos específicamente contra cada uno de dichos uno o más marcadores de proteína. En algunas realizaciones, los valores de cuantificación resultantes comprenden la densidad de células que expresan cada uno de los marcadores de proteína en la muestra de tejido tumoral que se está analizando.

55 (ii) cuantificación de uno o más marcadores biológicos mediante el análisis de la expresión de genes, que engloba la cuantificación de uno o más ARNm marcadores de interés, por ejemplo, llevando a cabo un análisis por PCR, PCR en tiempo real Taqman.

60 De este modo, en algunas realizaciones del procedimiento, la etapa a) comprende la cuantificación, en una muestra de tejido tumoral, de las células que expresan un marcador biológico determinado de la respuesta inmune adaptativa. En general, se ensaya una combinación, como mínimo, de marcadores biológicos. En estas realizaciones de la etapa a) del procedimiento, el valor obtenido al final de la etapa a) comprende el número o la densidad de células del sistema inmune, o subgrupos de células del mismo, que están contenidas en dicha muestra de tejido tumoral y que expresan un marcador biológico determinado, por ejemplo, entre la combinación de marcadores biológicos. En estas realizaciones, lo que se obtiene al final de la etapa a) consiste en los valores de la

densidad de células encontrados para cada marcador biológico que se incluye en la combinación de marcadores. Tal como se utiliza en esta descripción, la densidad de células de interés se puede expresar como el número de estas células de interés que se cuenta por unidad de área superficial de la muestra de tejido, por ejemplo, como el número de estas células de interés que se cuentan por  $\text{cm}^2$  o  $\text{mm}^2$  de área superficial de muestra de tejido. Tal como se utiliza en esta descripción, la densidad de células de interés también se puede expresar como el número de estas células de interés por unidad de volumen de muestra, por ejemplo, como el número de células de interés por  $\text{cm}^3$  de muestra. Tal como se utiliza en esta descripción, la densidad de células de interés también puede comprender el porcentaje de un subgrupo de células determinado (por ejemplo, células T CD3+) por células totales o subpoblación de células total (establecido en el 100%). Por ejemplo, en una realización del procedimiento, en primer lugar las células se recolectan mediante dispersión mecánica a partir de la muestra de tejido tumoral y, a continuación, las células de interés se cuentan mediante citometría de flujo, opcionalmente después del marcado, por ejemplo, mediante anticuerpos específicos de antígeno marcados en la superficie, antes de la determinación de la densidad de células. Los presentes inventores creen que la relevancia estadística alta que han descubierto entre (i) los valores de cuantificación de los marcadores de interés biológicos, y (ii) el resultado de la enfermedad del cáncer, cuando se calculan dichos valores de cuantificación mediante procedimientos inmunohistoquímicos, se puede explicar, como mínimo, mediante:

- un procedimiento de cuantificación altamente preciso para cada marcador, tal como la numeración de células que expresan marcadores por área superficial de un trozo de tejido tumoral, tal como se lleva a cabo a partir de un gran número de distintas áreas superficiales de dicho trozo de tejido tumoral; y
- una cuantificación separada de dicho marcador en más de un tipo de muestra de tejido, por ejemplo, una cuantificación combinada de dicho marcador biológico tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el borde invasivo (IM), entendiéndose que la relevancia estadística se calcula, a continuación, por ejemplo, mediante análisis multivariado, empezando desde la combinación de los valores de cuantificación que se miden.

En algunas otras realizaciones del procedimiento, la etapa a) comprende la cuantificación, en una muestra de tejido tumoral, del nivel de expresión de uno o más genes marcadores de la respuesta inmune adaptativa (por ejemplo, la cantidad de los ARNm específicos correspondientes). En general, se lleva a cabo el cálculo del nivel de expresión para una combinación, como mínimo, de dos genes marcadores. En estas realizaciones de la etapa a) del procedimiento, lo que se obtiene al final de la etapa a) consiste en los valores del nivel de expresión encontrados para cada una de las proteínas marcadoras producidas de forma específica por las células del sistema inmune, que se incluyen en la combinación de marcadores.

Dicho nivel de expresión también se puede expresar como cualquier unidad arbitraria que refleje la cantidad de ARNm que codifica dicha proteína de interés que se ha detectado en la muestra de tejido, tal como la intensidad de una señal radioactiva o de fluorescencia emitida por el material de ADNc generado mediante análisis por PCR del contenido de ARNm de dicha muestra de tejido, incluyendo análisis por PCR a tiempo real del contenido de ARNm de la muestra de tejido.

De forma alternativa, dicho nivel de expresión se puede expresar como cualquier unidad arbitraria que refleje la cantidad de proteína de interés que se ha detectado en la muestra de tejido, tal como la intensidad de una señal radioactiva o de fluorescencia emitida por un anticuerpo marcado unido de forma específica a la proteína de interés. De forma alternativa, el valor obtenido al final de la etapa a) puede consistir en una concentración de una o más proteínas de interés que se podrían medir mediante varios procedimientos de detección de proteínas bien conocidos en la técnica, tales como ELISA, SELDI-TOF, FACS o transferencia Western.

En algunas realizaciones de la etapa a) del procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención, el marcador o marcadores biológicos se cuantifican de forma separada en una o más muestras de tejido tumoral del paciente con cáncer, seleccionado del grupo que comprende (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido a partir del tejido directamente que rodea el tumor, que puede denominarse más específicamente como el "borde invasivo" del tumor (iv) los nódulos linfáticos localizados en la proximidad del tumor, (v) una biopsia del tumor llevada a cabo en una cirugía anterior (para el seguimiento de pacientes después del tratamiento, por ejemplo), y (vi) una metástasis distante. En estas realizaciones, el valor de cuantificación que se obtiene, al final de la etapa a), para cada muestra de tejido tumoral (i), (ii) o (iii), se compara, en la etapa b) del procedimiento, con los valores de referencia correspondientes, determinados previamente para cada muestra de tejido tumoral (i) a (vi), respectivamente. La obtención, en la etapa a) del procedimiento, de más de un valor de cuantificación para cada marcador biológico que se utiliza permite un pronóstico del cáncer final más exacto en comparación a cuando se determina sólo un valor de cuantificación por marcador biológico.

En otras realizaciones del procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención, se obtienen valores de cuantificación para más de un marcador biológico, en la etapa a) del procedimiento. En estas realizaciones, la etapa b) se lleva a cabo comparando, para cada marcador biológico utilizado, (i) el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para este marcador biológico con (ii) el valor de referencia predeterminado para el mismo marcador biológico.

En otras realizaciones adicionales del procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención, la etapa a) se lleva a cabo obteniendo los valores de cuantificación para más de una muestra de tejido tumoral para un único marcador biológico y la etapa a) se lleva a cabo obteniendo valores de cuantificación para más de un marcador biológico, comparándose, a continuación, dichos valores de cuantificación, en la etapa b), con los valores de referencia predeterminados correspondientes.

En realizaciones preferentes del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, la etapa a) se selecciona entre el grupo que comprende:

a1) la cuantificación de dicho, como mínimo, un marcador biológico en una sección de tejido tumoral mediante inmunodetección, de forma separada tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el borde invasivo (IM); y

a2) la cuantificación de dicho, como mínimo, un marcador biológico en la totalidad de la muestra de tejido tumoral mediante análisis de la expresión génica.

Según una primera realización específica del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, la etapa a1) se lleva a cabo mediante la cuantificación, como mínimo, de dos marcadores biológicos diferentes, de forma separada, tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el borde invasivo (IM).

Cuando en el procedimiento *in vitro* de la presente invención, la etapa a) comprende la etapa a1), entonces la etapa b) se lleva a cabo comparando (i) cada valor de cuantificación obtenido para el mismo marcador biológico, respectivamente, en el CT y el IM con (ii) los valores de referencia correspondientes, respectivamente para el CT y el IM.

Según una segunda realización específica del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, la etapa a2) se lleva a cabo mediante la cuantificación, como mínimo, de cinco marcadores biológicos diferentes en la totalidad de la muestra de tejido.

Cuando en el procedimiento *in vitro* de la presente invención, la etapa a) comprende etapa a2), entonces la etapa b) se lleva a cabo comparando (i) cada valor de cuantificación obtenido para cada marcador biológico de dicha combinación, como mínimo, de cinco marcadores biológicos diferentes.

Etapa b) del procedimiento

En la etapa b) del procedimiento, para cada marcador biológico utilizado, el valor que se obtiene al final de la etapa a) se compara con un valor de referencia para el mismo marcador biológico, y cuando se requiere, con valores de referencia para el centro del tumor (CT) y el borde invasivo (IM), para dicho mismo marcador biológico. De este modo, se predetermina dicho valor de referencia para el mismo marcador biológico y ya se sabe que es indicativo de un valor de referencia que es pertinente para la discriminación entre un nivel bajo y un nivel alto de la respuesta inmune adaptativa de un paciente contra el cáncer, para dicho marcador biológico. Dicho valor de referencia predeterminado para dicho marcador biológico se correlaciona con un pronóstico del cáncer bueno, o, a la inversa, se correlaciona con un pronóstico del cáncer malo.

Primera realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

Cada valor de referencia para cada marcador biológico se puede predeterminar llevando a cabo un método que comprende las etapas:

a) disponer, como mínimo, una colección de muestras de tejido tumoral seleccionadas del grupo que comprende:

i) una colección de muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer clasificados como Tis, o T1, o T2, o T3 o T4 y N0, o N1, o N2, o N3 y M0 o M1, y sin metástasis temprana (VE o LI o PI) o con metástasis temprana, que se han sometido a un tratamiento contra el cáncer, y posteriormente no han tenido una recaída del cáncer ni una recurrencia del cáncer después del tratamiento contra el cáncer;

ii) una colección de muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer clasificados como Tis, o T1, o T2, o T3 o T4 y N0, o N1, o N2, o N3 y M0 o M1, y sin metástasis temprana (VE o LI o PI) o con metástasis temprana, que se han sometido a un tratamiento contra el cáncer, y posteriormente han tenido recaídas del cáncer o recurrencias después del tratamiento contra el cáncer.

b) cuantificar, para cada muestra de tejido tumoral que está comprendida en una colección de muestras de tejido tumoral obtenidas en la etapa a), dicho marcador biológico, por lo cual se obtiene una colección de los valores de cuantificación para dicho marcador biológico y para la dicha colección de muestras de tejido tumoral;

c) calcular, de dicha colección de valores de cuantificación obtenidos al final de la etapa b), el valor de

cuantificación promedio para dicho marcador biológico, por lo cual se obtiene un valor de referencia predeterminado para dicho marcador biológico que se correlaciona con un pronóstico del cáncer específico.

5 El "tratamiento contra el cáncer" al que se hace referencia en la definición de la anterior etapa a) se refiere a cualquier tipo de terapia del cáncer a la que se han sometido pacientes con cáncer previamente a la recolección de las muestras de tejido tumoral, entre las que se incluyen la radioterapia, quimioterapia y cirugía, por ejemplo, resección quirúrgica del tumor.

10 Según el procedimiento para obtener los valores de referencia predeterminados anteriores, se puede obtener más de un valor de referencia predeterminado para un único marcador biológico. Por ejemplo, para un único marcador biológico, el procedimiento anterior permite la determinación, como mínimo, de cuatro valores de referencia predeterminados para el mismo marcador biológico, respectivamente un valor de referencia predeterminado calculado a partir del el valor de cuantificación promedio obtenido cuando se empieza, en la etapa a), con cada colección (i) y (ii) de muestras de tejido tumoral que se han descrito anteriormente.

15 Segunda realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

Los valores de referencia utilizados para la comparación en la etapa b) del procedimiento también pueden comprender valores límite o de "corte" que se pueden determinar tal como se describe a continuación.

20 Cada valor de ("corte") de referencia para cada marcador biológico se puede predeterminar llevando a cabo un procedimiento que comprende las etapas:

25 a) seleccionar un marcador biológico para el cual se va a determinar un valor de referencia;

b) proporcionar una colección de muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer;

30 c) proporcionar, para cada muestra tumoral provista en la etapa b), información relacionada con el resultado clínico real para el paciente con cáncer correspondiente;

d) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios para dicho marcador biológico seleccionado en la etapa a);

35 e) cuantificar dicho marcador biológico en cada muestra de tejido tumoral que está comprendida en la colección provista en la etapa b);

f) clasificar dichas muestras de tumor en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico provisto en la etapa c), respectivamente:

40 (i) un primer grupo que comprende muestras de tumor que presentan un valor de cuantificación para dicho marcador que es inferior a dicho valor de cuantificación arbitrario que está comprendido en dicha serie de valores de cuantificación;

45 (ii) un segundo grupo que comprende muestras de tumor que presentan un valor de cuantificación para dicho marcador que es superior a dicho valor de cuantificación arbitrario que está comprendido en dicha serie de valores de cuantificación;

50 por lo cual se obtienen dos grupos de muestras de tumor para dicho valor de cuantificación específico, en las que las muestras de tumor de cada grupo se enumeran de forma separada;

g) calcular la significancia estadística entre (i) el valor de cuantificación para dicho marcador biológico obtenido en la etapa e) y (ii) el resultado clínico real de los pacientes de los cuales provienen las muestras de tumor que están comprendidas en el primer y segundo grupo definido en la etapa f);

55 h) repetir las etapas f) y g) hasta que se ensayen todos los valores de cuantificación arbitrarios provistos en la etapa d);

60 i) establecer que dicho valor de referencia (valor de "corte") comprende el valor de cuantificación arbitrario para el cual se ha calculado el valor de significancia estadística más alto (el más significativo) en la etapa g).

El procedimiento anterior comprende establecer un valor de "corte" en el valor medio de los conjuntos de datos y se describe con detalle en los ejemplos de esta descripción.

65 Tal como se ha descrito anteriormente, dicho procedimiento permite establecer un valor de "corte" único que permite la discriminación entre un pronóstico del resultado malo y bueno. En la práctica, tal como se describe en los ejemplos de esta descripción, generalmente se obtienen valores de significancia estadística elevados (por ejemplo,

valores de P bajos) para un intervalo de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no sólo para un único valor de cuantificación arbitrario. De este modo, en una realización alternativa del procedimiento para la determinación de los valores de "corte" anteriores, se establece de forma arbitraria un valor de significancia estadística mínimo (umbral mínimo de significancia, por ejemplo, umbral máximo de valor de P) y se guarda el intervalo de valores de cuantificación arbitrarios para los cuales el valor de significancia estadística calculado en la etapa g) es superior (más significativo, por ejemplo, valor de P inferior), por lo cual se aporta un intervalo de valores de cuantificación. Dicho intervalo de valores de cuantificación comprende un valor de "corte" según la presente invención. Según esta realización específica de un valor de "corte", se puede determinar un pronóstico del resultado clínico malo o bueno comparando, en la etapa b) del procedimiento de pronóstico de la presente invención, el valor obtenido en la etapa a) con el intervalo de valores que delimitan dicho valor de "corte", para un marcador biológico determinado. En algunas realizaciones, un valor de corte que comprende un intervalo de valores de cuantificación para el marcador biológico considerado, comprende un intervalo de valores centrados en el valor de cuantificación para el cual se encuentra el valor de significancia estadística (por ejemplo, en general, el valor de P mínimo que se encuentra).

En algunas realizaciones preferentes del procedimiento para la predeterminación de un valor de corte que se ha descrito anteriormente, dicho marcador biológico comprende la densidad de células que expresan un marcador de proteína determinado en la muestra de tumor. De forma adicional, para un único marcador de proteína, se pueden determinar los valores de corte, como mínimo, para dos marcadores biológicos distintos, respectivamente (i) un primer valor de corte determinado para un primer marcador biológico que comprende la densidad de células que expresan dicho marcador de proteína en el centro del tumor (CT) y (ii) un segundo valor de corte determinado para un segundo marcador biológico que comprende la densidad de células que expresan dicho marcador de proteína en el borde invasivo (IM).

En algunas realizaciones preferentes de la etapa c) del procedimiento para la determinación de los valores de corte anteriores, dicha información relacionado con el resultado clínico real de los pacientes se selecciona del grupo que comprende (i) la duración de la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y (ii) la supervivencia total (OS).

De hecho, para llevar a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención, es preferible la disponibilidad de un valor de referencia predeterminado para más de un marcador biológico. De este modo, en general, se determina, como mínimo, un valor de referencia predeterminado para una pluralidad de marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmune adaptativa contra el cáncer que se engloban en esta descripción, simplemente repitiendo uno de los procedimientos para la obtención de valores de referencia predeterminados que se han descrito anteriormente, para una pluralidad de marcadores biológicos.

Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que el marcador biológico comprende un antígeno de superficie expresado por células del sistema inmune, tal como el antígeno CD3, y en las que en la etapa a) del procedimiento de pronóstico del cáncer se lleva a cabo un análisis por citometría de flujo de la densidad de células CD3+ en el sitio del tumor, el valor de referencia predeterminado puede comprender el valor de densidad de células, incluyendo el porcentaje de células específicas (por ejemplo, CD3+) por células totales o subpoblación de células total (establecido en el 100%), que se correlaciona con un pronóstico del cáncer malo, por ejemplo, recaídas o recurrencias, tiempo de supervivencia corto, etc., o, en cambio, puede comprender el valor de densidad de células que se correlaciona con un pronóstico del cáncer bueno, por ejemplo, sin metástasis temprana, sin metástasis en todo el tiempo de supervivencia libre de enfermedad time o en un periodo de tiempo largo de la misma.

En algunas realizaciones, el valor predeterminado de referencia comprende un valor de "corte", tal como se ha descrito anteriormente, que comprende un valor de cuantificación promedio para el marcador biológico de interés que discrimina entre un pronóstico del cáncer malo y un pronóstico del cáncer bueno. De forma ilustrativa, para el cáncer colorrectal humano, se ha descubierto que, cuando se utiliza análisis por inmunohistoquímica de las células CD3+ en el sitio del tumor como marcador biológico, el valor de referencia de corte predeterminado puede ser de aproximadamente 300 células CD3+ / mm<sup>2</sup> para una muestra de tejido tumoral recogida del centro del tumor, y que el valor de referencia de corte predeterminado puede ser de aproximadamente 600 células CD3+ / mm<sup>2</sup> para una muestra de tejido tumoral recogida del borde invasivo. En otras realizaciones en las que el valor de corte comprende un intervalo de valores que delimitan valores de cuantificación de CD3+ bajos y altos, dicho valor de corte oscila, de forma óptima, entre valores de cuantificación de 50 células CD3+ / mm<sup>2</sup> a 1000 células CD3+ / mm<sup>2</sup> para una cuantificación en el centro del tumor (CT) y de 80 células CD3+ / mm<sup>2</sup> a 1300 células CD3+ / mm<sup>2</sup> para una cuantificación en el borde invasivo (IM).

Los valores de corte óptimos basados en pruebas log-rank, para densidades de células CD3, CD8, CD45RO, GZMB fueron 370, 80, 80, 30 células / mm<sup>2</sup> en el centro del tumor, respectivamente, y 640, 300, 190, 60 células / mm<sup>2</sup> en el borde invasivo, respectivamente, tal como se muestra en los ejemplos de esta descripción.

Según las realizaciones anteriores, se obtiene un pronóstico del cáncer malo si el valor de cuantificación generado para el marcador biológico CD3+ es inferior al valor de referencia de corte predeterminado, cuando la comparación se lleva a cabo en la etapa b) del procedimiento. En cambio, se obtiene un pronóstico del cáncer bueno si el valor de cuantificación generado para el marcador biológico CD3+ es superior al valor de referencia de corte predeterminado, cuando la comparación se lleva a cabo en la etapa b) del procedimiento.

Tercera realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

5 También de forma ilustrativa, en realizaciones en las que el marcador biológico comprende el nivel de expresión de un gen relacionado con la respuesta inmune del cuerpo humano, el valor de referencia predeterminado puede comprender el valor de expresión génica que se correlaciona con un pronóstico del cáncer malo, por ejemplo, recaídas o recurrencias, tiempo de supervivencia corto, etc., o, al contrario, puede comprender un valor de expresión génica que se correlaciona con un pronóstico del cáncer bueno, por ejemplo, sin metástasis o con tiempo de supervivencia libre de enfermedad largo. El valor de expresión génica puede expresarse como cualquier unidad arbitraria. Por ejemplo, el valor de expresión génica puede expresarse como la diferencia (deltaCT) entre (i) la cantidad del ARNm específico de marcador biológico y (ii) la cantidad de un ARNm no relacionado, encontrado en la muestra de tejido tumoral, tal como, por ejemplo, el ARNm 18S ribosómico. De forma ilustrativa, para el cáncer colorrectal humano, la diferencia entre (i) la cantidad del ARNm específico de marcador biológico y (ii) la cantidad de un ARNm no relacionado puede asignarse de forma arbitraria para comprender el deltaCT y la media de todos los valores del grupo de referencia (por ejemplo, para pacientes que han experimentado procesos de metástasis temprana (VELIPI) y recaídas, establecidos en el "100%"). En estas realizaciones, el valor de cuantificación generado para un ARNm específico de gen particular, en la etapa a) del procedimiento, es superior al 100%, entonces se obtiene un pronóstico del cáncer mejor que con el valor de referencia predeterminado. Por ejemplo, esto se muestra en los ejemplos de esta descripción, cuando se utiliza de forma destacada ARNm específico de CD8 $\alpha$ , ARNm específico de GZMB y ARNm específico de GLNY.

Comparación o comparaciones llevadas a cabo en la etapa b)

25 Tal como ya se ha especificado, y tal como se muestra en los ejemplos de la presente descripción, la etapa b) del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención comprende comparar, para cada marcador biológico ensayado, respectivamente:

- (i) el valor de cuantificación encontrado en la etapa a) para dicho marcador biológico; y
- 30 (ii) el valor de referencia correspondiente que ya se ha predeterminado para dicho marcador biológico.

Cuando dos o más marcadores biológicos se cuantifican en la etapa a), entonces la etapa b) comprende dos o más etapas de comparación del tipo que se ha definido anteriormente.

35 Además, cuando un marcador biológico determinado se cuantifica en la etapa a) en diversos lugares del tumor, y especialmente de forma separada tanto en el centro del tumor (CT) como en el borde invasivo (IM), entonces la etapa b) comprende para dicho marcador biológico determinado el mismo número de etapas de comparación que el número de lugares del tumor en el que dicho marcador biológico determinado se cuantifica. Especialmente para las situaciones en las que se cuantifica un marcador biológico determinado de forma separada tanto en el CT como en el IM en la etapa a), entonces la etapa b) comprende, para dicho marcador biológico determinado, dos etapas de comparación, respectivamente:

- (i) una primera etapa de comparación entre el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para dicho marcador biológico en el CT, con el valor de referencia predeterminado en el CT para dicho marcador biológico; y
- 45 (ii) una segunda etapa de comparación entre el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para dicho marcador biológico en el IM, con el valor de referencia predeterminado en el IM para dicho marcador biológico.

De este modo, la etapa b) comprende el mismo número de etapas de comparación únicas que el número de valores de cuantificación que se obtienen en la etapa a).

Dicha etapa de comparación b), independientemente de si la etapa a) comprende la etapa a1) (procedimientos inmunológicos) o la etapa a2) (análisis de la expresión génica) tal como se ha definido anteriormente, también comprende, preferentemente, el cálculo de una relevancia estadística de la pluralidad de valores de cuantificación de marcador medidos en la etapa a), después de su comparación con los valores de referencia correspondientes, por ejemplo, utilizando una prueba log-rank de P, tal como se describe en los ejemplos de esta descripción.

De forma más simple, dicha etapa de comparación b) puede incluir una clasificación de los valores de cuantificación medidos en la etapa a), para cada marcador biológico, y opcionalmente también para cada tipo de tejido tumoral ensayado, en dos grupos, respectivamente: (i) un primer grupo denominado "Hi" cuando el valor de cuantificación para dicho marcador biológico, opcionalmente en dicho tipo de tejido tumoral, es superior al valor de referencia correspondiente predeterminado y (ii) un segundo grupo denominado "Lo" cuando el valor de cuantificación para dicho marcador biológico, opcionalmente en dicho tipo de tejido tumoral, es inferior al valor de referencia correspondiente predeterminado. Si el resultado de la etapa de comparación b) comprende exclusivamente valores "Hi" para cada marcador ensayado, entonces se determina un pronóstico del resultado favorable para dicho cáncer. En cambio, si el resultado de la etapa de comparación b) comprende exclusivamente valores "Lo" para cada

5 marcador ensayado, entonces se determina un pronóstico del resultado malo para dicho cáncer. Se determinan conclusiones intermedias para pacientes "heterogéneos", en los que, en la etapa de comparación b), los valores de cuantificación "Hi" se encuentran para uno o más de los marcadores biológicos ensayados y los valores de cuantificación "Lo" se encuentran para los marcadores restantes de la combinación de marcadores biológicos ensayados, tal como se describe en los ejemplos de esta descripción.

10 Los presentes inventores creen que un motivo adicional para explicar la elevada relevancia estadística del procedimiento de pronóstico *in vitro* según la presente invención, para predecir el resultado de un cáncer, comprende el tamaño del grupo de los pacientes que se han ensayado, que proporciona unos valores de referencia muy exactos, por ejemplo, valores de "corte" muy exactos; permitiendo una discriminación reproducible y exacta entre pacientes con pronóstico bueno y pacientes pronóstico malo.

15 De este modo, en una realización de las más preferentes del procedimiento *in vitro* según la presente invención, el valor de referencia predeterminado para cada marcador biológico determinado, y opcionalmente el tipo de tejido tumoral, que se utiliza en la etapa de comparación b) se calcula en base a los valores de cuantificación para dicho marcador, y opcionalmente dicho marcador en dicho tipo de tejido tumoral, que se miden anteriormente en muestras de tejido tumoral que provienen de una población grande de individuos con cáncer.

20 La exactitud de un determinado valor de referencia predeterminado aumenta con el número de muestras de tejido que se utilizan para obtener los valores de cuantificación para un marcador biológico determinado y, de este modo, para calcular un valor promedio (el valor de referencia predeterminado) que se asocia con un resultado del cáncer determinado. De este modo, otra explicación para la elevada exactitud del procedimiento de pronóstico *in vitro* según la presente invención también reside en la elevada relevancia de los valores de referencia predeterminados, con los cuales se comparan los valores de cuantificación, en la etapa b) del procedimiento. De la forma más preferente, en vista de la obtención de valores de referencia predeterminados altamente relevantes para cada marcador biológico de interés, dichos valores de referencia predeterminados comprenden el valor promedio de una pluralidad de valores de cuantificación de dicho marcador medidos en muestras de tejido que provienen de la misma pluralidad de pacientes con cáncer que experimentaron un resultado clínico específico.

30 De la forma más preferente, para calcular unos valores de referencia predeterminados exactos, dichos valores de referencia se predeterminan a partir, como mínimo, de 50 valores de cuantificación, para un marcador biológico determinado, utilizando, de este modo, muestras de tejido que provienen, como mínimo, de 50 pacientes con cáncer que han experimentado un resultado clínico malo o bueno determinado, por ejemplo, DFS u OFS de más de 5 años después del diagnóstico. En realizaciones preferentes, se obtiene un valor de referencia predeterminado, como mínimo, a partir de 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 o más valores de cuantificación para un marcador biológico determinado.

40 De forma ilustrativa, los valores de referencia predeterminados que se dan a conocer en los ejemplos de esta descripción se han obtenido a partir de muestras de tejido que provienen de un grupo de aproximadamente 500 pacientes con cáncer.

45 La posibilidad según la presente invención de ensayar grupos grandes de pacientes, es decir, un gran número de muestras de tejido, se proporcionó de forma destacada por la utilización de una técnica micromatriz de tejido que se detalla con más detalle en la presente especificación.

En los ejemplos de esta descripción se describen con total detalle realizaciones específicas de los procedimientos utilizados para llevar a cabo la etapa b).

#### 50 Etapa c) opcional del procedimiento

El procedimiento de pronóstico del cáncer *in vitro* de la presente invención puede comprender adicionalmente una etapa c) en la que se consigue el resultado del pronóstico *per se*.

55 De este modo, el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención puede comprender una etapa c) adicional en la que, dependiendo del marcador o marcadores biológicos utilizados:

60 (i) se determina un pronóstico bueno de un paciente para la progresión del cáncer, sin recaída del cáncer o sin recurrencia del cáncer, cuando el valor o valores de cuantificación obtenidos en la etapa a) para un marcador biológico determinado, o una combinación determinada de marcadores biológicos, es superior o inferior, respectivamente, al valor o valores de referencia predeterminados correspondientes; o bien

65 (ii) se determina un pronóstico malo de un paciente para la progresión del cáncer, con recaída del cáncer o con recurrencia del cáncer, cuando el valor o valores de cuantificación obtenidos en la etapa a) para un marcador biológico determinado, o una combinación determinada de marcadores biológicos, es superior o inferior a dicho valor o valores de referencia predeterminados correspondientes.

De forma alternativa, el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención puede comprender una etapa c) adicional en la que, dependiendo del marcador o marcadores biológicos utilizados:

5 (i) se determina un pronóstico bueno de un paciente para la progresión del cáncer, con un valor alto de supervivencia libre de enfermedad (DFS) o un valor alto de supervivencia total (OS), cuando el valor o los valores de cuantificación obtenidos en la etapa a) para un marcador biológico determinado, o una combinación determinada de marcadores biológicos, es superior o inferior al valor o valores de referencia predeterminados correspondientes; o bien

10 (ii) se determina un pronóstico malo de un paciente para la progresión del cáncer, con un valor bajo de supervivencia libre de enfermedad (DFS) o un valor bajo de supervivencia total (OS), cuando el valor o los valores de cuantificación obtenidos en la etapa a) para un marcador biológico determinado, o una combinación determinada de marcadores biológicos, es superior o inferior, respectivamente, a dicho valor o valores de referencia predeterminados correspondientes;

Habitualmente, para la mayor parte de los marcadores biológicos utilizados en esta descripción, el valor de cuantificación aumenta con un incremento de la respuesta inmune adaptativa contra el cáncer. Por ejemplo, cuando el marcador biológico que se cuantifica en la etapa a) comprende una proteína o un gen que se expresan específicamente por células del sistema inmune, el valor de cuantificación de dicho marcador aumenta con el nivel de la respuesta inmune adaptativa contra el cáncer del paciente ensayado. Por lo tanto, cuando se lleva a cabo la etapa b) del procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención, se determina un pronóstico bueno cuando el valor de cuantificación para un marcador biológico determinado que se obtiene en la etapa a) es superior al valor de referencia predeterminado correspondiente, de forma destacada en realizaciones en las que el valor de referencia predeterminado comprende un valor de corte. En cambio, un pronóstico malo se determina cuando el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para un marcador biológico determinado es inferior al valor de referencia predeterminado correspondiente, de forma destacada en realizaciones en las que el valor de referencia predeterminado comprende un valor de corte.

30 En los ejemplos de la presente descripción se describen totalmente realizaciones específicas de los procedimientos utilizados para llevar a cabo la etapa c).

#### **Combinaciones de marcadores biológicos**

35 Cuando se lleva a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención con más de un marcador biológico, el número de marcadores biológicos distintos que se cuantifican en la etapa a) es habitualmente inferior a 100 marcadores distintos, y en la mayor parte de las realizaciones, inferior a 50 marcadores distintos.

40 De forma ventajosa, cuando se busca cribado de un elevado número de muestras, el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención se lleva a cabo utilizando hasta 20 marcadores biológicos distintos.

Cuanto más elevado es el número de marcadores biológicos distintos que se cuantifican en la etapa a) del procedimiento, más exacto será el pronóstico final del cáncer.

45 El número de marcadores biológicos distintos que es necesario para obtener un pronóstico del cáncer exacto y fiable, utilizando el procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, puede variar de forma destacada según el tipo de técnica de cuantificación que se lleva a cabo en la etapa a).

50 De forma ilustrativa, se descubrió una significancia estadística alta con una combinación de un número pequeño de marcadores biológicos, cuando la etapa a) se lleva a cabo mediante detección inmunohistoquímica *in situ* de marcadores de proteína de interés, dado que la cuantificación separada de dichos marcadores se lleva a cabo tanto en el centro del tumor (CT) como en el borde invasivo (IM). De forma ilustrativa, se obtuvo una significancia estadística alta con una combinación de dos a diez marcadores biológicos, tal como se describe en los ejemplos de esta descripción. Sin pretender seguir ninguna teoría particular, los presentes inventores creen que la relevancia altamente estadística (valor de P inferior a  $10^{-3}$ ) para el pronóstico del cáncer se consigue cuando la etapa a) se lleva a cabo utilizando un método inmunohistoquímico para la cuantificación de un marcador biológico, y utilizando de una combinación de tres marcadores biológicos distintos, o más.

60 Aún de forma ilustrativa, también se descubrió una significancia estadística alta con un número pequeño de marcadores biológicos, cuando la etapa a) se lleva a cabo mediante análisis de la expresión génica de marcadores de genes de interés, aunque la técnica de análisis de la expresión génica se lleva a cabo en la totalidad de la muestra de tumor. En la tabla 4 se muestran de forma destacada realizaciones ilustrativas de varias combinaciones altamente significativas de dos marcadores de genes. Sin pretender quedar limitados por ninguna teoría particular, los presentes inventores creen que la relevancia altamente estadística (valor de P inferior a  $10^{-3}$ ) se consigue cuando la etapa a) se lleva a cabo utilizando un análisis de la expresión génica para la cuantificación de un marcador biológico, y utilizando una combinación de diez marcadores biológicos distintos, y más preferentemente, una

combinación de quince marcadores biológicos distintos, de la forma más preferente, veinte marcadores biológicos distintos, o más.

5 Tal como se muestra en los ejemplos de esta descripción, se puede obtener un pronóstico fiable del cáncer cuando se cuantifica un único marcador biológico en la etapa a) del procedimiento, tal como se ilustra, por ejemplo, con la cuantificación de los marcadores biológicos CD3+, CD8+, CD45RO, GZM-B, GLNY, TBX21, IRF1, IFNG, CXCL9 y CXCL10.

10 De este modo, en realizaciones preferentes del procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención, la muestra de tejido tumoral a la que se hace referencia en la etapa a) se selecciona del grupo que comprende (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente el tumor que puede denominarse más específicamente el "borde invasivo" del tumor, (iv) los nódulos linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (v) una biopsia de tumor realizada mediante cirugía anterior (para el seguimiento de pacientes después de un tratamiento, por ejemplo) y (vi) una metástasis distante.

15 De la forma más preferente, cuando el procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención se lleva a cabo con marcadores biológicos que comprenden las densidades de células que expresan proteínas específicas, entonces la etapa a) se lleva a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas y se miden las densidades de células (i) en el centro del tumor (CT), (ii) en el borde invasivo (IM) o (iii) de forma separada tanto en el CT como en el IM.

20 De la forma más preferente, cuando el procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención se lleva a cabo con marcadores biológicos que comprenden el nivel de expresión de genes de interés, entonces la etapa a) se lleva a cabo a mediante procedimientos de análisis de la expresión génica, tales como análisis por PCR Taqman a tiempo real, empezando desde el tejido tumoral entero que se recogió inicialmente del paciente con cáncer, por ejemplo, tejido tumoral que provenía de una resección de tumor durante una operación quirúrgica.

25 Preferentemente, el como mínimo, un marcador biológico indicativo del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra el cáncer, que se cuantifica en la etapa a), comprende, como mínimo, un marcador biológico expresado por una célula del sistema inmune seleccionada del grupo que comprende linfocitos B, linfocitos T, monocitos / macrófagos, células dendríticas, células NK, células NKT, y células NK-DC.

30 Preferentemente, dicho, como mínimo, un marcador biológico, que se cuantifica en la etapa a), se selecciona del grupo que comprende:

35 (i) el número o la densidad de células del sistema inmune que comprende la muestra de tejido tumoral y que expresan dicho marcador biológico, generalmente un marcador de proteína; y

40 (ii) el nivel de expresión de un ácido nucleico de interés en la muestra de tejido tumoral, generalmente la cantidad de ARNm codificado por un marcador de gen determinado.

En algunas realizaciones del procedimiento, dicho, como mínimo, un marcador biológico comprende la densidad de linfocitos T presentes en el sitio del tumor.

45 En otras realizaciones, dicho, como mínimo, un marcador biológico comprende el valor de cuantificación de una proteína expresada por las células del sistema inmune presentes en el sitio del tumor.

50 En realizaciones adicionales del procedimiento, dicho, como mínimo, un marcador biológico comprende el valor de cuantificación de la expresión de genes expresados de forma específica por células del sistema inmune presentes en el sitio del tumor.

55 En las tablas 2, 8, 9 y 10 se muestra una lista de los marcadores biológicos adicionales preferentes que se pueden utilizar para llevar a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer según las reivindicaciones. Las tablas 2, 9 y 10 comprenden, para cada marcador biológico indicado, el número de acceso de sus secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos, tal como están disponibles en la base de datos del GenBank International.

60 Aunque el procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención se ha ensayado para el cáncer colorrectal, dicho procedimiento se puede aplicar a una amplia variedad de cánceres. Sin pretender seguir ninguna teoría particular, los presentes inventores creen que el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención se puede llevar a cabo de forma satisfactoria para pronosticar la progresión de cualquier cáncer que se desarrolle a partir de un tumor central al cual tengan acceso células del sistema inmune.

65 De este modo, el procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención es potencialmente útil para determinar el pronóstico de pacientes para la progresión de un cáncer seleccionado del grupo que comprende cáncer adrenocortical, cáncer anal, cáncer del conducto biliar (por ejemplo, cáncer perihilar, cáncer del conducto biliar distal, cáncer del conducto biliar intrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de huesos (por ejemplo,

osteoblastoma, osteocondroma, hemangioma, fibroma condromixioide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de célula gigante del hueso, cordoma, linfoma, mieloma múltiple), cáncer de cerebro y sistema nervioso central (por ejemplo, meningioma, astrocitoma, oligodendrogliomas, ependimoma, gliomas, meduloblastoma, ganglioglioma, Schwannoma, germinoma, craneofaringioma), cáncer de mama (por ejemplo, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma lobular *in situ*, ginecomastia), enfermedad de Castleman (por ejemplo, hiperplasia gigante de nódulo linfático, hiperplasia angiofolicular de nódulo linfático), cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer endometrial (por ejemplo, adenocarcinoma endometrial, adenocantoma, adenocarcinoma papilar seroso, célula clara), cáncer de esófago, cáncer de vesicular biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de célula pequeña), tumores carcinoides gastrointestinales (por ejemplo, coriocarcinoma, corioadenoma destruens), enfermedad de Hodgkin's, linfoma no de Hodgkin's, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (por ejemplo, cáncer de célula renal), cáncer laríngeo e hipofaríngeo, cáncer de hígado (por ejemplo, hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de célula pequeña de pulmón, cáncer de célula no pequeña de pulmón), mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de seno de la cavidad nasal y paranasal (por ejemplo, esteseoneuroblastoma, granuloma de línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomiosarcoma (por ejemplo, rabdomiosarcoma embrionario, rabdomiosarcoma alveolar, rabdomiosarcoma pleomórfico), cáncer de glándula salivar, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, cáncer de piel sin melanoma), cáncer de estómago, cáncer testicular (por ejemplo, seminoma, cáncer de célula germinal no seminoma), cáncer de timo, cáncer tiroideo (por ejemplo, carcinoma folicular, carcinoma anaplástico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma medular tiroideo, linfoma tiroideo), cáncer vaginal, cáncer vulvar, y cáncer uterino (por ejemplo, leiomiomasarcoma uterino).

En la presente especificación, el nombre de cada uno de los marcadores biológicos de interés hace referencia al nombre reconocido internacionalmente del gen correspondiente, tal como se encuentra en las bases de datos de secuencias de genes y secuencias de proteínas reconocidas internacionalmente, que incluyen la base de datos del HUGO Gene Nomenclature Committee, que está disponible de forma destacada en la siguiente dirección de Internet:

<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/index.html>

En la presente especificación, el nombre de cada uno de los diversos marcadores biológicos de interés también puede hacer referencia al nombre reconocido internacionalmente del correspondiente gen, tal como se encuentra en la base de datos de secuencias de genes y secuencias de proteínas Genbank reconocida internacionalmente.

Mediante estas bases de datos de secuencias reconocidas internacionalmente, un especialista en la material puede recuperar las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos correspondientes a cada uno de los marcadores biológicos de interés descritos en esta descripción.

En algunas realizaciones del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, en las que la etapa a) se lleva a cabo mediante la cuantificación de marcadores biológicos con técnicas inmunohistoquímicas, la utilización de una combinación de un número bajo de marcadores puede ser suficientemente informativa, específicamente si los marcadores biológicos se cuantifican de forma separada, tanto en el centro del tumor (CT) como en el borde invasivo (IM).

En otras realizaciones del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, en las que la etapa a) se lleva a cabo mediante la cuantificación de marcadores biológicos con técnicas de análisis de la expresión génica, se requiere generalmente la utilización de una combinación de un número superior de marcadores, por ejemplo, como mínimo, aproximadamente 10 marcadores biológicos distintos.

También en realizaciones adicionales del procedimiento, el dicho, como mínimo, un marcador biológico se selecciona del grupo que comprende CD3, CD8, GZMB, CD45RO, GLNY, TBX21, IRF1, IFNG, CXCL9, CXCL10, CD4, CXCR3, CXCR6, IL-18, IL-18Rbeta, Fractalkina, IL-23, IL-31, IL-15, IL-7, MIG, Perforina, Trαβ, TCRγδ, LAT, ZAP70, CD5 y CD2. Estos marcadores biológicos se cuantifican preferentemente en la etapa a) del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, mediante procedimientos inmunológicos, que incluyen procedimientos inmunohistoquímicos *in situ*. Los valores de cuantificación se pueden expresar como la densidad promedio de células que expresan una proteína marcador de interés que está comprendida por área superficial de una sección de tejido de la muestra de tejido tumoral.

De forma ilustrativa, tal como se resume en las reivindicaciones, en la etapa a) se cuantifica una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 marcadores biológicos distintos, los cuales se seleccionan del grupo que comprende CD3, CD8, GZMB, CD45RO, GLNY, TBX21, IRF1, IFNG, CXCL9, CXCL10, CD4, CXCR3, CXCR6, IL-18, IL-18Rbeta, Fractalkina, IL-23, IL-31, IL-15, IL-7, MIG, Perforina, TCRαβ, TCRγδ, LAT, ZAP70, CD5 y CD2. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente en la etapa a) del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención con técnicas inmunohistoquímicas.

También de forma ilustrativa, tal como se resume en las reivindicaciones, una combinación de 2 o más marcadores biológicos distintos que se pueden cuantificar en la etapa a) del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención se pueden seleccionar del grupo que comprende CCR5, CR7, CD103, CD119, CD120a, CD120b, CD122, CD127, CD134, CD14, CD152, CD154, CD178, CD183, CD184, CD19, CD1a, CD210, CD25, CD26, CD27, CD28, CD3, CD32, CD4, CD44, CD45, CD45Ra, CD45Ro, CD47, CD49d, CD5, CD54, CD56, CD62L, CD69, CD7, CD8, CD80, CD83, CD86, CD95, CD97, CD98, CXCR6, GATR, HLA-DR, ICOS, IFN $\gamma$ R11, IL-18R $\alpha$ , KIR-NKAT2, PD1, TCR $\alpha\beta$  y TGFRII. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente en la etapa a) del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, con técnicas inmunohistoquímicas. La tabla 3 en esta descripción comprende una lista de anticuerpos dirigidos específicamente contra cada una de estas proteínas marcadores.

De forma ilustrativa, la combinación de dos marcadores biológicos, tal como en las reivindicaciones, se puede seleccionar del grupo que comprende CDBA-TBX21, CD3Z-CD8A, CD3Z-TBX21, B7H3-TGFB1, IFNG-TBX21, CD4-CD8A, CD8A, IFNG, CD4-TBX21, CD3Z-CD4, CD4-TGFB1, CD8A-GLNY, IFNG-IRF1, GLNY-IFNG, IRF1-TBX21, IL8-PTGS2, GLNY-TBX21, CD3Z-GLNY, CD3Z-IFNG, GZMB-IFNG, GLNY-IRF1, IL10-TGFB1, CDBA-IL10, CD4-IL10, CD8A-GZMB, GZMB-TBX21, CD3Z-GZMB, CD4-IRF1, GNLY-GZMB, B7H3-IL10, CD4-GZMB, GZMB-IRF1, IL10-TBX21, CD4-IFNG, B7H3-CD4, CDBA-TGFB1, CD3Z-IL10 y CD4-GNLY. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente en la etapa a) del procedimiento de pronóstico *in vitro* de la presente invención, con técnicas de análisis de expresión génica.

**Procedimientos generales para la cuantificación de marcadores biológicos según las reivindicaciones**

Para llevar a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención se puede utilizar cualquiera de los procedimientos conocidos por los especialistas de la técnica para la cuantificación de tipos celulares, un marcador biológico de tipo proteína o de tipo ácido nucleico englobado en esta descripción. De este modo se puede aplicar fácilmente cualquiera de las técnicas estándares y no estándares (emergentes) conocidas en la técnica para la detección y cuantificación de una proteína o un ácido nucleico en una muestra.

Dichas técnicas incluyen la detección y cuantificación de marcadores biológicos de tipo ácido nucleico con sondas o cebadores nucleicos.

Dichas técnicas también incluyen la detección y cuantificación de marcadores biológicos de tipo proteína con cualquier tipo de molécula ligando que se une específicamente a los mismos, entre las que se incluyen ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos seleccionados para unirse a través del procedimiento bien conocido Selex) y anticuerpos que incluyen fragmentos de anticuerpo. En algunas realizaciones en las que el marcador biológico de interés comprende una enzima, estos procedimientos de detección y cuantificación también pueden incluir detección y cuantificación de la actividad enzimática correspondiente.

De forma destacada, actualmente hay anticuerpos disponibles para la mayor parte de marcadores biológicos descritos en la presente especificación, si no para todos, entre los que se incluyen los marcadores biológicos que se enumeran en la tabla 2.

Además, en situaciones en las que no hay todavía un anticuerpo disponible para un marcador biológico determinado, o en situaciones en las que se busca la producción de anticuerpos adicionales para un marcador biológico determinado, con las técnicas convencionales se pueden obtener fácilmente anticuerpos para dichos marcadores biológicos determinados, entre las que se incluyen la generación de hibridomas productores de anticuerpos. En este procedimiento, se sintetiza o se aísla una proteína o un péptido que comprende la totalidad de una proteína marcador biológico, o un segmento de la misma (por ejemplo, mediante purificación de una célula en la cual se expresa o mediante transcripción y traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o el péptido *in vivo* o *in vitro* utilizando procedimientos conocidos). Un vertebrado, preferentemente un mamífero tal como un ratón, rata, conejo u oveja, se inmuniza utilizando la proteína o el péptido. El vertebrado puede, opcionalmente (y preferentemente) inmunizarse, como mínimo, una vez más con la proteína o el péptido, de modo que el vertebrado muestra una respuesta inmune robusta a la proteína o el péptido. Del vertebrado inmunizado se aíslan esplenocitos y se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar hibridomas, utilizando cualquier variedad de procedimientos bien conocidos en la técnica. A continuación, los hibridomas formados de esta manera se criban utilizando procedimientos estándares para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con la proteína marcador biológico o un fragmento de la misma. La presente invención también abarca hibridomas producidos mediante este procedimiento y anticuerpos producidos utilizando dichos hibridomas. También se pueden utilizar anticuerpos policlonales.

La expresión de un marcador biológico de la presente invención se puede calcular mediante cualquiera de una gran variedad de procedimientos bien conocidos para la detección de la expresión de un ácido nucleico o proteína transcritos. Entre los ejemplos no limitativos de dichos procedimientos se incluyen procedimientos inmunológicos para la detección de proteínas secretadas, de la superficie celular, citoplasmáticas o nucleares, procedimientos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad proteica, procedimientos de hibridación, procedimientos de

transcripción inversa de ácidos nucleicos, y procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos.

En una realización preferente, se calcula la expresión de un marcador utilizando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo, anticuerpo unido a esqueleto polimérico, o anticuerpo marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando {por ejemplo, biotina-estreptavidina}), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena simple, un dominio hipervariable de un anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína marcador o un fragmento de la misma, incluyendo una proteína marcador que ha experimentado toda su modificación post-traduccional, o una parte de la misma.

En otra realización preferente, se calcula la expresión de un marcador mediante la preparación de ARNm / ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) a partir de células en una muestra de tejido tumoral de un paciente, y mediante la hibridación del ARNm / ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un ácido nucleico, o un fragmento del mismo. Opcionalmente el ADNc puede amplificarse utilizando cualquiera de una variedad de procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa anteriormente a la hibridación con el polinucleótido de referencia; preferentemente, no se amplifica.

En una realización relacionada, una mezcla de polinucleótidos transcritos obtenida a partir de la muestra se pone en contacto con un sustrato que tiene fijado en el mismo un polinucleótido complementario a una parte de un ácido nucleico marcador biológico, u homólogo, como mínimo, a la misma (por ejemplo, como mínimo, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500, o más residuos de nucleótidos). Si los polinucleótidos complementarios u homólogos son detectables de forma diferencial sobre el sustrato (por ejemplo, detectables utilizando diferentes cromóforos o fluoróforos, o fijados a diferentes posiciones seleccionadas), se pueden calcular de forma simultánea los niveles de expresión de una serie de marcadores utilizando un sustrato único (por ejemplo, un "chip genético" micromatriz de polinucleótidos fijado en posiciones seleccionadas). Cuando se utiliza un procedimiento de cálculo de la expresión de un marcador que implica la hibridación de un ácido nucleico con otro, es preferente que la hibridación se lleve a cabo en condiciones de hibridación astringentes.

Un procedimiento de ejemplo para la detección y / o cuantificación de una proteína o ácido nucleico marcador biológico en una muestra de tejido tumoral implica la obtención de una muestra de tejido tumoral (por ejemplo, (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente el tumor el cual puede denominarse más específicamente "borde invasivo" del tumor, (iv) los nódulos linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (v) una biopsia de tumor realizada en una cirugía previa (para el seguimiento de pacientes después de un tratamiento, por ejemplo), y (vi) una metástasis distante, de un paciente con cáncer. Dicho procedimiento incluye etapas adicionales de poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar el polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico, o ADNc). De este modo, los procedimientos de detección de la presente invención pueden utilizarse para detectar ARNm, ADNc, o ADN genómico, por ejemplo, en una muestra de tejido tumoral *in vitro*. Por ejemplo, entre las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm se incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Entre las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína marcador biológico se incluyen ensayos inmunoabsorbentes unidos a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína marcador incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína o un fragmento de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en un individuo se puede detectar mediante técnicas de imagen estándares.

Un principio general de dichos ensayos de detección y / o cuantificación implica la preparación de una muestra o mezcla de reacción que puede contener un marcador biológico, y una sonda, en condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para permitir que el marcador y la sonda interactúen y se unan, formando de este modo un complejo que se puede eliminar y / o detectar en la mezcla de reacción.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "sonda" se refiere a cualquier molécula que es capaz de unirse selectivamente a una molécula diana escogida específicamente, por ejemplo, un transcrito de nucleótido o una proteína codificados por un marcador biológico, o correspondientes al mismo. Las sondas se pueden sintetizar por cualquier especialista de la técnica, o pueden obtenerse a partir de preparaciones biológicas adecuadas. Para el objetivo de detección de una molécula diana, las sondas se pueden diseñar específicamente para ser marcadas, tal como se describe en esta descripción. Entre los ejemplos de moléculas que se pueden utilizar como sondas se incluyen, pero sin limitación a las mismas, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos, y moléculas orgánicas.

Estos ensayos de detección y / o cuantificación de un marcador biológico se pueden llevar a cabo de diversas maneras.

Por ejemplo, un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de este tipo implicaría anclar la sonda sobre un soporte de fase sólida, al que también se hace referencia como sustrato, y detectar complejos de marcador diana / sonda anclados sobre la fase sólida al final de la reacción. En una realización de un procedimiento de este tipo, se puede anclar una muestra de un individuo, en la que se va a ensayar la cuantificación del marcador biológico, sobre un

soporte transportador o de fase sólida. En otra realización, es posible la situación inversa, en la que la sonda se puede anclar a una fase sólida y se puede dejar una muestra de un individuo que reaccione como un componente no anclado del ensayo.

- 5 Existen muchos procedimientos establecidos para anclar componentes de ensayo a una fase sólida. Entre éstos se incluyen, sin limitación, moléculas de marcador o sonda que están inmovilizadas mediante conjugación de biotina y estreptavidina. Dichos componentes de ensayo biotinilados se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) utilizando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, un kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), e inmovilizar en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical).
- 10 En algunas realizaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados se pueden preparar previamente y almacenar.

Otros transportadores adecuados o soportes en fase sólida para dichos ensayos incluyen cualquier material capaz de unir la clase de molécula a la que pertenece el marcador o la sonda. Entre los soportes o transportadores bien conocidos se incluyen, aunque sin limitación, vidrio, poliestireno, nailon, polipropileno, nailon, polietileno, dextrano, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, gabbros, y magnetita.

15

A efectos de dirigir ensayos con las estrategias mencionadas anteriormente, el componente no inmovilizado se añade a la fase sólida después de que el segundo componente se ancle. Después de completarse la reacción, se pueden eliminar los componentes no complejados (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado en la fase sólida. La detección de complejos marcador / sonda anclados a la fase sólida se puede conseguir en numerosos procedimientos resumidos en esta descripción.

20

En una realización preferente, la sonda, cuando es el componente del ensayo no anclado, se puede marcar con el objetivo de la detección y lectura del ensayo, directa o bien indirectamente, con marcas detectables que se han discutido en esta descripción y que son bien conocidas por los especialistas de la técnica.

25

También es posible detectar directamente la formación del complejo marcador / sonda sin manipulación o marcado de cada componente (marcador o sonda), por ejemplo, utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (véase, por ejemplo, Lakowicz y otros, patente de Estados Unidos No. 5.631.169; Stavrianopoulos, y otros, patente de Estados Unidos No. 4.868.103). Se selecciona una etiqueta de fluoróforo sobre la primera molécula "donadora" de tal modo que tras la excitación con luz incidente de longitud de onda adecuada, su energía fluorescente emitida será absorbida por una etiqueta fluorescente en una segunda molécula "aceptora", que a su vez es capaz de tener fluorescencia debido a su energía absorbida. De forma alternativa, la molécula de proteína "donadora" puede simplemente utilizar la energía de fluorescencia natural de los residuos de triptófano. Las etiquetas se seleccionan de forma que emitan diferentes longitudes de onda de luz, de modo que la etiqueta de molécula "aceptora" se puede diferenciar de la de la "donadora". Dado que la eficacia de la transferencia de energía entre las etiquetas está relacionada con la distancia que separa las moléculas, se pueden calcular las relaciones espaciales entre las moléculas. En una situación en la cual tiene lugar unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la etiqueta de molécula "aceptora" en el ensayo puede ser máxima. De forma conveniente, se puede medir un suceso de unión FRET a través de medios de detección fluorométricos estándar bien conocidos en la técnica (por ejemplo, utilizando un fluorímetro).

30

35

40

En otra realización, la determinación de la capacidad de una sonda de reconocer un marcador se puede conseguir sin marcar cada componente del ensayo (sonda o marcador) utilizando una tecnología tal como el análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (véase, por ejemplo, Sjolander, S. y Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo y otros, 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). Tal como se utiliza en esta descripción, el "BIA" o la "resonancia de plasmones superficiales" es una tecnología para el estudio de interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los elementos que interaccionan (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativos de un suceso de unión) dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmones superficiales (SPR)), que da como resultado una señal detectable que se puede utilizar como una indicación de las reacciones a tiempo real entre moléculas biológicas.

45

50

De forma alternativa, en otra realización, se pueden llevar a cabo ensayos de diagnóstico y pronóstico análogos con marcador y sonda como solutos en una fase líquida. En un ensayo de este tipo, el marcador y la sonda complejados se separan de los componentes no complejados por cualquiera de una diversidad de técnicas estándares, entre las que se incluyen, sin limitación: centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En la centrifugación diferencial, los complejos marcador / sonda se pueden separar de los componentes del ensayo no complejados a través de una serie de etapas de centrifugación, debido a un equilibrio de sedimentación diferente de complejos basado en sus tamaños y densidades diferentes (véase, por ejemplo, Rivas, G., y Minton, A. P., 1993, Trends Biochem Sci. 18(8):284-7). También se pueden utilizar técnicas cromatográficas estándar para separar las moléculas complejadas de las no complejadas. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel separa moléculas en base a su tamaño, y a través de la utilización de una resina de filtración en gel adecuada en un formato de columna, por ejemplo, el complejo relativamente más grande se puede separar de los componentes no complejados relativamente más pequeños. De forma similar, las propiedades de carga relativamente diferente del complejo

55

60

65

marcador / sonda si se compara con los componentes no complejados se pueden explotar para diferenciar el complejo de los componentes no complejados, por ejemplo, a través de la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Los especialistas en la técnica conocen bien dichas resinas y técnicas cromatográficas (véase, por ejemplo, Heegaard, N. H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11 (1-6):141-8; Hage, D. S., y Tweed, S. A. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997 Oct. 10; 699(9-2):499-525). También se puede utilizar la electroforesis en gel para separar componentes del ensayo complejados de los componentes no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel y otros, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987-1999). En esta técnica, los complejos de proteína o ácido nucleico se separan en base al tamaño o la carga, por ejemplo. A efectos de mantener la interacción de unión durante el proceso electroforético, habitualmente son preferentes materiales de la matriz de gel y condiciones no desnaturizantes en ausencia de un agente reductor. También se puede utilizar la técnica SELDI-TOF sobre una matriz o perlas acoplados con la superficie activa, o no, o superficie recubierta con anticuerpo, o perlas.

Los especialistas de la técnica conocerán bien las condiciones adecuadas para el ensayo particular y los componentes del mismo.

En una realización particular, el nivel de ARNm marcador se puede determinar tanto en formatos *in situ* como *in vitro* en una muestra biológica utilizando procedimientos conocidos en la técnica. El término "muestra biológica" se pretende que incluya tejidos, células, fluidos biológicos y aislados de los mismos, aislados de un individuo, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro del individuo. Muchos procedimientos de detección de expresión utilizan ARN aislado. Para los procedimientos *in vitro*, se puede utilizar cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione contra el aislamiento de ARNm para la purificación de ARN de cáncer colorrectal (véase, por ejemplo, Ausubel y otros, ed. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999). De forma adicional, se pueden procesar fácilmente grandes cantidades de muestras de tejido utilizando técnicas bien conocidas por los especialistas de la técnica, tales como, por ejemplo, el procedimiento de aislamiento del ARN de etapa única de Chomczynski (1989, patente de Estados Unidos No. 4.843.155).

El ARNm aislado se puede utilizar en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero sin que ello sea limitativo, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y paneles de sondas. Un procedimiento de diagnóstico preferente para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que se puede hibridar al ARNm codificado por el gen que se está detectando. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido, como mínimo, de 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones astringentes a un ARNm o ADN genómico que codifica un marcador de la presente invención. En la presente descripción se describen otras sondas adecuadas para utilizar en los ensayos de pronóstico de la presente invención. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el marcador en cuestión se está expresando.

En un formato, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, haciendo pasar el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gen a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, la sonda o sondas se inmovilizan sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la sonda o sondas, por ejemplo, en una en una matriz de chip génico Affymetrix. Un especialista en la técnica puede adaptar fácilmente los procedimientos de detección del ARNm para utilizar en la detección del nivel de ARNm codificado por los marcadores de la presente invención.

Un procedimiento alternativo para la determinación del nivel de marcador de ARNm en una muestra implica el procedimiento de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante PCRrt (la realización experimental presentada en Mullis, 1987, patente de Estados Unidos No. 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193), replicación en secuencia automantenida (Guatelli y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh y otros, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Replicasa Q-Beta (Lizardi y otros, 1988, Bio / Tecnología 6:1197), replicación por círculos rodantes (Lizardi y otros, patente de Estados Unidos No. 5.854.033) o cualquier otro procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de las moléculas amplificadas mediante técnicas bien conocidas por los especialistas de la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico, si dichas moléculas están presentes con valores muy bajos. Tal como se utiliza en esta descripción, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden alinearse con regiones 5' o 3' de un gen (hebras más y menos, respectivamente, o viceversa) y contener una región corta en el medio. En general, los cebadores de amplificación tienen de 10 a 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. En condiciones adecuadas y con los reactivos adecuados, dichos cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para procedimientos *in situ*, el ARNm no necesita aislarse del cáncer colorrectal antes de la detección. En dichos procedimientos, una célula o muestra de tejido se prepara / procesa mediante métodos histológicos conocidos. A continuación, la muestra se inmoviliza sobre un soporte, habitualmente un portaobjetos y, a continuación, se pone en contacto con una sonda que puede hibridarse a un ARNm que codifica el marcador.

Como alternativa para hacer determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluto del marcador, las determinaciones se pueden basar en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un marcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un gen constitutivo "housekeeping" que se expresa de forma constitutiva. Entre los genes adecuados para la normalización se incluyen genes constitutivos, tales como el gen de actina, gen 18S ribosómico, gen GAPD, o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de un paciente, con respecto a otra muestra, por ejemplo, una muestra que no es de cáncer colorrectal, o entre muestras de diferentes fuentes.

De forma alternativa, el nivel de expresión se puede aportar como un nivel de expresión relativo. Para determinar un nivel de expresión relativo de un marcador, se determina el nivel de expresión para 10 o más muestras de aislados de células normales frente a aislados de células con cáncer, preferentemente 50 o más muestras, antes de la determinación del nivel de expresión para la muestra en cuestión. Se determina el nivel de expresión promedio de cada uno de los genes ensayados en el número de muestras más grande y se utiliza como nivel de expresión de línea de base para el marcador. A continuación el nivel de expresión del marcador determinado para la muestra de ensayo (nivel absoluto de expresión) se divide por el valor de expresión promedio obtenido para ese marcador. Esto proporciona un nivel de expresión relativo.

Tal como ya se ha mencionado anteriormente en la presente descripción, un agente preferente para la detección y / o la cuantificación de una proteína marcador biológico cuando se lleva a cabo un procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención es un anticuerpo que se une de forma específica a dicha proteína marcador biológico o a un fragmento de la misma, preferentemente un anticuerpo con una etiqueta detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferentemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento o derivado del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab').sub.2). El término "marcado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende englobar tanto un marcado directo de la sonda o del anticuerpo por acoplamiento (es decir, unión de forma física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo; como un marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Entre los ejemplos de marcado indirecto se incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente y el marcado final de una sonda de ADN con biotina, de tal como que puede detectarse con estreptavidina marcada de forma fluorescente.

Para determinar si una muestra contiene una proteína marcador biológico que se une a un anticuerpo determinado se pueden utilizar una variedad de formatos. Entre los ejemplos de dichos formatos se incluyen, aunque sin limitación, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencia Western y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Un especialista en la técnica puede adaptar fácilmente los procedimientos conocidos de detección y / o cuantificación de proteínas / anticuerpos para la utilización en el procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención.

En un formato, se pueden utilizar anticuerpos, o fragmentos o derivados de anticuerpo, en procedimientos tales como transferencias Western, SELDI-TOF (llevado a cabo con perlas acopladas a anticuerpo o matriz) o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas: en dichas utilizaciones, es preferente generalmente inmovilizar el anticuerpo o bien las proteínas sobre un soporte sólido. Entre los soportes de fase sólida o los transportadores adecuados se incluye cualquier soporte capaz de unir un antígeno o anticuerpo. Entre los soportes o transportadores bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales o modificadas, poliacrilamidas, gabbros y magnetita.

Un especialista de la técnica conocerá muchos otros transportadores para la unión de un anticuerpo o antígeno, y será capaz de adaptar dicho soporte para la utilización con la presente invención. Por ejemplo, una proteína aislada de cáncer colorrectal se puede hacer correr en un gel de electroforesis de poliacrilamida e inmovilizar en un soporte de fase sólida, tal como nitrocelulosa. A continuación, el soporte se puede lavar con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo marcado de forma detectable. A continuación, el soporte en fase sólida se puede lavar con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. A continuación, se puede detectar la cantidad de etiqueta no unida sobre el soporte sólido mediante medios convencionales.

A continuación, se describen los procedimientos más preferentes para la cuantificación de un marcador biológico para el objetivo de llevar a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención.

#### ***Cuantificación de marcadores biológicos por micromatrices de tejido***

En algunas realizaciones, un marcador biológico, o un grupo de marcadores biológicos, se puede cuantificar con cualquiera de los métodos de micromatrices de tejido conocidos en la técnica.

Las micromatrices de tejido se producen mediante un método de relocalización del tejido a partir de bloques de parafina histológica convencional, de modo que se puede ver el tejido de múltiples pacientes o bloques en el mismo portaobjetos. Esto se realiza utilizando una aguja para hacer una biopsia de secciones histológicas estándares y

colocando la muestra en una matriz sobre un bloque de parafina como recipiente. Esta técnica fue descrita originariamente por Wan en 1987 (Wan, Fortuna y Furmanski; Journal of Immunological Methods). En algunas realizaciones de micromatrices de tejido, las muestras de tejido se colocan en posiciones específicas fijadas espacialmente en un bloque. Kononen y otros (Nature Medicine en 1998) dan a conocer la técnica de forma destacada.

La técnica de la matriz de tejido implica adquirir muestras cilíndricas mínimas, pequeñas, de especies de tejido embebidas en parafina. A continuación, estos cilindros se exponen en una rejilla de alta densidad, sistemática en otro bloque de parafina.

Por ejemplo, muestras de tejido tumoral, incluyendo las que están en forma de muestras de biopsia (i) del centro del tumor, (ii) del borde invasivo o (iii) de los nódulos linfáticos regionales, se obtienen de bloques de tejido de tumor, embebidos en parafina, fijados en formalina, a partir de un número adecuado de individuos. Éstas se transfieren a un bloque de TMA. Se pueden generar múltiples bloques de TMA al mismo tiempo. Cada bloque de TMA se puede seccionar hasta 300 veces, con todos los trozos de TMA resultantes con los mismos tejidos en las mismas posiciones coordinadas. Los trozos individuales se pueden utilizar para una serie de análisis moleculares, tales como la tinción H&E para establecer la morfología del tejido, hibridación de ARNm *in situ*, inmunohistoquímica de proteínas o análisis del ADN para alteraciones genéticas.

Dado que estas muestras de tejido tumoral cilíndricas son pequeñas (0.4-1 mm de diámetro x 3-4 mm de altura), se pueden exponer hasta mil tejidos en un bloque de parafina simple mientras se minimiza el daño y la necesidad del tejido. Además, estos bloques de parafina se pueden cortar de forma transversal en cientos de secciones de micromatrices, las cuales, a continuación, se pueden utilizar para diferentes análisis genéticos.

Además de la velocidad aumentada de los análisis, las micromatrices de tejido pueden asegurar la reproducibilidad y fiabilidad del procedimiento de pronóstico del cáncer según la presente invención, ya que se manipulan, preparan y tiñen cientos de muestras de tejido diferentes de una manera virtualmente idéntica, paralela, todos en el mismo portaobjetos (Kallioniemi, O.; Wagner, U.; Kononen, J. y Sauter, G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. Human Molecular Genetics (2001), 10, 657-662.).

Habitualmente, las áreas representativas del tumor se retiran de bloques de tejido tumoral embebido en parafina, por lo que se obtienen muestras de tejido tumoral. A continuación, dichas muestras de tejido tumoral se transfieren a otro bloque de parafina receptor en el que estas muestras se puntean. A continuación, los puntos de muestra que se exponen en dicho bloque de parafina recipiente se cortan en secciones, habitualmente secciones de 2-5  $\mu\text{m}$ , para análisis posterior.

Habitualmente, para un análisis posterior, se incuba en primer lugar una sección delgada de la matriz, concretamente la micromatriz de tejido, con anticuerpos marcados dirigidos contra un marcador biológico de interés. Después del lavado, los anticuerpos marcados que se unen a dicho marcador biológico de interés se revelan mediante la técnica adecuada, dependiendo del tipo de etiqueta que transporta el anticuerpo marcado, por ejemplo, etiqueta radioactiva, fluorescente o enzimática. También se puede llevar a cabo el marcado múltiple de forma simultánea, especialmente en realizaciones en la que se utiliza más de un anticuerpo específico de proteína, para el objetivo de cuantificar más de un marcador biológico.

En los ejemplos de esta descripción se describen realizaciones ilustrativas de cuantificación de marcadores biológicos utilizando micromatrices de tejido.

#### ***Cuantificación de marcadores biológicos por inmunohistoquímica sobre muestras de tejido convencionales (especímenes embebidos en parafina o congelados)***

En algunas realizaciones, un marcador biológico, o un conjunto de marcadores biológicos, se pueden cuantificar con uno o más de los procedimientos de inmunohistoquímica conocidos en la técnica.

A continuación, el análisis se puede llevar a cabo sobre (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente el tumor, el cual se puede denominar más específicamente "borde invasivo" del tumor y (iv) los nódulos linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (vi) una metástasis distante

En regiones de tumor combinadas también, y preferentemente, se pueden llevar a cabo análisis (definidos anteriormente).

Habitualmente, para un análisis posterior, se incuba en primer lugar una sección delgada del tumor, con anticuerpos marcados dirigidos contra un marcador biológico de interés. Después del lavado, los anticuerpos marcados que se unen a dicho marcador biológico de interés se revelan mediante la técnica adecuada, dependiendo del tipo de etiqueta que transporta el anticuerpo marcado, por ejemplo, etiqueta radioactiva, fluorescente o enzimática. También se puede llevar a cabo el marcado múltiple de forma simultánea.

**Cuantificación de marcadores biológicos por procedimientos de citometría de flujo**

5 En algunas realizaciones, se puede cuantificar un marcador biológico, o un conjunto de marcadores biológicos, con cualquiera de los procedimientos de citometría de flujo conocidos en la técnica.

Por ejemplo, en primer lugar se extraen células comprendidas en la muestra de tejido tumoral que se está ensayando mediante dispersión mecánica y se preparan suspensiones de células en un medio líquido.

10 A continuación, las células obtenidas de este modo se incuban durante el periodo de tiempo adecuado con anticuerpos dirigidos especialmente contra el marcador o marcadores biológicos que se van a cuantificar.

Después del lavado de la suspensión de células, a efectos de eliminar los anticuerpos no unidos, las células resultantes se analizan llevando a cabo una citometría de flujo, en vista de la cuantificación del porcentaje del número total de células presente en la suspensión de células que expresan cada uno de dichos marcadores biológicos.

En los ejemplos de esta descripción se describen realizaciones ilustrativas de cuantificación de marcadores biológicos utilizando procedimientos de citometría de flujo.

**Cuantificación de marcadores biológicos por amplificación de ácidos nucleicos**

En algunas realizaciones, se puede cuantificar un marcador biológico, o un conjunto de marcadores biológicos, con cualquiera de los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica.

25 A continuación, el análisis se puede llevar a cabo sobre (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor (CT), (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente el tumor, el cual se puede denominar más específicamente "borde invasivo" del tumor y (iv) los nódulos linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (vi) una metástasis distante

30 En regiones de tumor combinadas también, y preferentemente, se pueden llevar a cabo análisis (definidos anteriormente) después de la microdissección del tumor.

35 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento altamente sensible y potente para la cuantificación de dichos marcadores biológicos.

Para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos que sea adecuado para cuantificar un marcador biológico cuando se lleva a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención, se requieren un par de cebadores que se hibriden específicamente con el ARNm diana o con el ADN diana.

Se pueden diseñar un par de cebadores que se hibridan específicamente con el marcador biológico de ácido nucleico diana de interés mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica.

45 En algunas realizaciones, para cada uno de los marcadores biológicos de la presente invención, como mínimo, un par de cebadores específicos, así como la sonda de ácido nucleico de detección correspondiente, ya se han referenciado y descrito totalmente en la base de datos pública de cebadores de PCR cuantitativa ("Quantitative PCR primer database"), de forma destacada en la siguiente dirección de Internet: <http://lpgws.nci.nih.gov/cgibin/Primer-Viewer>.

50 En otras realizaciones, se puede diseñar un par específico de cebadores utilizando el método que se da a conocer en la patente de Estados Unidos No. 6.892.141 de Nakae y otros, cuya descripción entera se incorpora en esta descripción como referencia.

55 En la técnica se conocen muchas adaptaciones específicas de la técnica de PCR, tanto para detecciones cualitativas como cuantitativas. En particular, se conocen procedimientos que utilizan tintes fluorescentes para detectar y cuantificar productos de PCR amplificados. Anteriormente también se ha descrito la amplificación y detección *in situ*, también conocida como PCR homogénea. Véase, por ejemplo, Higuchi y otros, (Kinetics PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions, Bio / Technology, vol. 11, págs. 1026-1030 (1993)), Ishiguro y otros, (Homogeneous quantitative Assay of Hepatitis C Virus RNA by Polymerase Chain Reaction in the Presence of a Fluorescent Intercalater, Anal. Biochemistry 229, págs. 20-213 (1995)), y Wittwer y otros, (Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid cycle DNA Amplification, Biotechniques, vol. 22, págs. 130-138 (1997.))

65 También se han desarrollado un gran número de otros procedimientos para cuantificar ácidos nucleicos (Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98: 503-517, 1975; Sharp, P. A., y otros, Methods Enzymol. 65: 750-768, 1980; Thomas, P. S., Proc. Nat. Acad. Sci., 77: 5201-5205, 1980). Más recientemente, se han desarrollado procedimientos de PCR y RT-

PCR que son capaces de medir la cantidad de un ácido nucleico en una muestra. Una estrategia, por ejemplo, mide la cantidad de producto de PCR en la fase log de la reacción antes de la formación de mesetas de productos de reacción (Kellogg, D. E., y otros, Anal. Biochem. 189: 202-208 (1990); y Pang, S., y otros, Nature 343: 85-89 (1990)). Habitualmente se utiliza una secuencia de genes comprendida en todas las muestras en una cantidad relativamente constante para la normalización de la eficacia de la amplificación de muestras. Esta estrategia, sin embargo, presenta varios inconvenientes. El procedimiento requiere que cada muestra tenga cantidades de entrada iguales del ácido nucleico y que la eficacia de la amplificación entre las muestras sea idéntica hasta el momento del análisis. Además, es difícil utilizar los procedimientos convencionales de cuantificación por PCR, tales como electroforesis en gel o hibridación por captura de platos para determinar que todas las muestras se analizan, de hecho, durante la fase log de la reacción, tal como el procedimiento requiere.

Otro procedimiento denominado (QC)-PCR competitivo cuantitativo, tal como el nombre sugiere, se basa en la inclusión de un competidor como control interno en cada reacción (Becker-Andre, M., Meth. Mol. Cell Biol. 2: 189-201 (1991); Piatak, M. J., y otros, BioTechniques 14: 70-81 (1993); y Piatak, M. J., y otros, Science 259: 1749-1754 (1993)). La eficacia de cada reacción se normaliza con respecto al competidor interno. Habitualmente se añade una cantidad conocida de competidor interno a cada muestra. El producto de PCR diana desconocido se compara con el producto de PCR competidor conocido para obtener una cuantificación relativa. Con esta estrategia general una dificultad se encuentra en el desarrollo de un control interno que amplifica con la misma eficacia de la molécula diana.

Por ejemplo, el procedimiento de amplificación de ácido nucleico que se utiliza puede comprender análisis por PCR cuantitativo en tiempo real.

La PCR en tiempo real o cuantitativa (QPCR) permite la cuantificación de cantidades de partida de plantillas de ADN, ADNc, o ARN. La QPCR se basa en la detección de una molécula donadora "reporter" fluorescente que aumenta a medida que el producto de PCR se acumula con cada ciclo de amplificación. Las moléculas donadoras fluorescentes incluyen tintes que se unen a ADN de doble cadena (es decir, SYBR Green I) o sondas específicas de secuencia (es decir, Molecular Beacons o sondas Tasman®).

Los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos preferentes son los procedimientos de amplificación por PCR cuantitativa, incluyendo el procedimiento de PCR cuantitativa multiplex tal como la técnica dada a conocer en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos No. US 2005 / 0089862, de Therianos y otros, la descripción completa de la cual se incorpora en esta descripción como referencia.

De forma ilustrativa, para la cuantificación de marcadores biológicos de la presente invención, las muestras de tejido tumoral se congelan de forma instantánea inmediatamente después de la recolección de la biopsia. A continuación, se aísla y cuantifica el ARN total de una "muestra de tejido tumoral" (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente el tumor el cual se puede denominar de forma más específica "borde invasivo" del tumor, (iv) los nódulos linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (v) una biopsia de tumor llevada a cabo en una cirugía anterior (para el seguimiento de pacientes después de un tratamiento, por ejemplo), y (vi) una metástasis distante. A continuación, cada muestra del ARN extraído y cuantificado se transcribe de forma inversa y al ADNc se amplifica por PCR, utilizando un par de cebadores específicos para cada marcador biológico que se cuantifica. Se utilizan pares de cebadores de control simultáneamente como controles, tales como pares de cebadores que se hibridan específicamente con ADNc de 18S y ADNc de GADPH, o cualquier otro gen constitutivo "housekeeping" bien conocido.

En los ejemplos de esta descripción se describen realizaciones ilustrativas de cuantificación de marcadores biológicos utilizando procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos.

## **EJEMPLOS**

### **A. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS DE LOS EJEMPLOS**

#### **Material y procedimientos de los ejemplos 1 a 4.**

##### **A.1. Pacientes y bases de datos**

Se revisaron todos los casos de cáncer colorrectal (n=959) que se sometieron a una resección primaria del tumor en el Hospital Laennec / HEGP entre 1986 y 2004. El tiempo de observación en este grupo no seleccionado fue el intervalo entre diagnóstico y último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se controlaron en el último seguimiento para los pacientes que no habían tenido recaída o que habían muerto. La duración media del seguimiento fue de 44,5 meses. Seis pacientes de los que se había perdido el seguimiento se excluyeron del análisis. Se registraron los descubrimientos histopatológicos y clínicos según el sistema de estadificación UICC-TNM (Sobin LH, Wittekind C, (editores). "Clasificación UICC-TNM de tumores malignos" ("Classification UICC TNM of malignant tumors"). 6ª ed. Nueva York: Wiley-Liss, 2002), tal como se describe en la tabla 1. Se definió la invasión

metastática temprana como la presencia de embolia vascular (VE), invasión linfática (LI), o invasión perineural (PI). Un tumor positivo a VELIPI tenía, como mínimo, uno de estos descubrimientos patológicos, mientras que un tumor negativo a VELIPI no tenía ninguno de estos tres descubrimientos. Los estados TNM y VELIPI de los tumores se determinaron a partir de informes histopatológicos en el momento de la resección. Se construyó una base de datos segura basada en Web, TME.db "Base de datos de microambiente tumoral" ("Tumoral MicroEnvironment Database"), en un tercer nivel de arquitectura utilizando Java-2 Enterprise-Edition (J2EE) para integrar conjuntos de datos clínicos, y los resultados de tecnologías de alto rendimiento.

Los registros de 959 pacientes con cáncer colorrectal que se habían sometido a una resección primaria del tumor en el Hospital Laennec / HEGP entre 1986 y 2004 se revisaron de forma retrospectiva representando un grupo de pacientes no seleccionados, continuo y prospectivo. En la tabla 1 se detallan los parámetros histopatológicos convencionales, que incluyen el estadio TNM de AJCC / UICC, estadio de Dukes, tipo de tumor, y grado de diferenciación, embolias linfovasculares, invasión del tumor perineural (VELIPI). Se registraron los datos sobre quimioterapia adyuvante y paliativa. Se administró quimioterapia adyuvante basada en 5-fluorouracil (FU) a 327 pacientes (57 pacientes con estadio II de la enfermedad, 136 con estadio III de la enfermedad y 134 con estadio IV de la enfermedad).

Se llevó a cabo una vigilancia posterior a la cirugía en el Laennec / HEGP y hospitales asociados, para todos los pacientes, según las prácticas generales para pacientes con cáncer de colon, que incluyen examen físico, conteos sanguíneos, ensayos de función hepática, antígeno carcinoembrionario en suero, ultrasonografía y tomografía computarizada abdominal, y rayos X de los pulmones. Se realizó una colonoscopia un año después de la resección y posteriormente una vez cada tres años si todo estaba normal. Si se sospechaba que había recaída, el paciente se sometió a revisión intensiva, que incluía tomografía computarizada abdominal, imagen por resonancia magnética, rayos X del pecho, colonoscopia y biopsia, cuando era aplicable.

Los descubrimientos clínicos, tratamiento, informe histopatológico y datos del seguimiento se recogieron de forma prospectiva y se actualizaron (mediante A.B) y se incluyeron en la TME.db. La base de datos es accesible bajo solicitud a [zlatko.traianoski@tugraz.at](mailto:zlatko.traianoski@tugraz.at). El tiempo de observación estuvo en el intervalo entre diagnóstico y último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se fueron controlando en el último seguimiento para pacientes sin recaída, o muerte. La duración media del seguimiento fue de 44,5 meses. Los valores mín:máx hasta la progresión/muerte o último seguimiento fueron (0:214) meses, respectivamente. Se excluyeron del análisis seis pacientes de los que se perdió el seguimiento. El tiempo de recurrencia o tiempo libre de enfermedad se definió como el periodo de tiempo desde la fecha de la cirugía hasta la fecha confirmada de recaída del tumor para pacientes con recaída y desde la fecha de la cirugía hasta la fecha del último seguimiento para pacientes libres de enfermedad.

## A.2. Histopatología

Todas las secciones H&E de los tumores de cada paciente se reevaluaron a ciegas por dos patólogos (D.D., T.M.) o dos investigadores (F.P., J.G.) especializados en la patología del cáncer de colon, para cada uno de las siguientes: (a) infiltrado linfoide tumoral (b) reacción linfoide en el borde invasivo (de 10 a 20 campos analizados por paciente). Las densidades de estos infiltrados inmunes se registraron independientemente por los investigadores, como débil (resultado 1), moderada (resultado 2), o fuerte (resultado 3), tal como se describe a continuación.

Trescientos setenta y siete tumores seleccionados al azar de los 415 tumores evaluados según TMA se reevaluaron en cuanto a la densidad de células inmunes. La revisión de las secciones de tejido se llevó a cabo de forma independiente por dos patólogos (D.D., T.M.) o dos investigadores (F.P., J.G.) especializados en la patología del cáncer de colon. Se analizaron un promedio de cuatro secciones de tumor primario. Los campos analizados se seleccionaron como representativos de la región y estaban lejos de material necrótico o abscesos. Los infiltrados inmunes se registraron de la siguiente manera:

### (a) infiltrados linfoides tumorales:

La densidad de infiltrados linfoides tumorales se cuantificó contando los linfocitos redondos pequeños distribuidos dentro del epitelio y el estroma peritumoral del tumor en cinco campos de potencia media (microscopio Nikon, objetivo x 20). La densidad de infiltrado inmune registrada como 1 (débil), 2 (moderada) o 3 (fuerte), se observó en el 16%, 62% y 22% de las series, respectivamente.

### (b) reacción linfoide en el borde invasivo:

El corte de linfocitos colindantes con el punto más profundo de avance del tumor (borde invasivo) se consideró como destacado (resultado 3), no destacado (resultado 2) o ausente (resultado 1). La reacción linfoide registrada como 1, 2 o 3, se observó en el 18%, 60% y 22% de las series, respectivamente.

(c) nódulos linfoides que rodean la periferia del tumor

La reacción linfoide de tipo Crohn se definió como agregados linfoides (a menudo con centros germinales) que rodeaban la periferia de un carcinoma invasivo, encontrados habitualmente en la interfase de la muscular propia externa y el tejido fibroadiposo pericólico, no asociados con ninguna mucosa (por ejemplo, origen diverticular) o nódulo linfático preexistente. Se requirió esta característica (resultado 2) a dos agregados linfoides grandes. Más de dos agregados linfoides grandes se refirieron al resultado 3, mientras que sólo uno o una ausencia de agregados linfoides se registró como resultado 1. La densidad de nódulos linfoides registrada como 1, 2 ó 3, se observó en el 38%, 39% y 23% de las series, respectivamente.

#### **Análisis por PCR Taqman en tiempo real**

Se extrajo el ARN total de 100 especímenes de tumor congelados seleccionados al azar a partir de un grupo de 959 casos; se analizó la expresión génica de 75 muestras, de suficiente calidad y cantidad utilizando PCR Taqman en tiempo real cuantitativa (Matrices de baja densidad) y el sistema de PCR robótico 7900 (Applied-Biosystems, Foster City, CA), tal como se describe a continuación.

Se congelaron de forma inmediata muestras de tejido durante los 15 minutos siguientes a la cirugía y se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido. Se extrajo el ARN de especímenes de tumor congelados seleccionados al azar (n=100) a partir del grupo. Se aisló el ARN total mediante homogeneización con un kit de aislamiento RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Se evaluaron la integridad y la cantidad del ARN en un bioanalizador-2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Setenta y cinco muestras tenían una calidad y cantidad de ARN suficiente para el análisis con matriz de baja densidad ("análisis Low-Density-Array"). Todas estas muestras, representativas del grupo, se evaluaron bien en cuanto al análisis de la expresión génica. Se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR según las instrucciones del fabricante (Applied-Biosystems, Foster City, CA). Se realizó una PCR TaqMan en tiempo real cuantitativa utilizando matrices de densidad baja y el sistema de PCR robótico 7900 (Applied-Biosystems) (véase la lista de genes en la tabla 2 para más detalles). Los cebadores y sondas de 18S y GAPDH se utilizaron como controles internos. Los datos se analizaron utilizando el SDS Software v2.2 (Applied-Biosystems).

Se congelaron de forma inmediata muestras de tejido durante los 15 minutos siguientes a la cirugía y se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido. Se extrajo el ARN de especímenes de tumor congelados seleccionados al azar (n=100) a partir del grupo (n=959). Se aisló el ARN total mediante homogeneización con un kit de aislamiento RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Se evaluaron la integridad y la cantidad del ARN en un bioanalizador-2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Setenta y cinco muestras tenían una calidad y cantidad de ARN suficiente para el análisis con matriz de baja densidad ("Low-Density-Array analysis"). Todas estas muestras, representativas del grupo, se evaluaron bien en cuanto al análisis de la expresión génica. Se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR según las instrucciones del fabricante (Applied-Biosystems, Foster City, CA). Se realizó una PCR TaqMan en tiempo real cuantitativa utilizando matrices de densidad baja y el sistema de PCR robótico 7900 (Applied-Biosystems) (véase la lista de genes en la tabla 2 para más detalles). Los cebadores y sondas de 18S y GAPDH se utilizaron como controles internos. Los datos se analizaron utilizando el SDS Software v2.2 (Applied-Biosystems).

#### **Análisis por citometría de flujo a gran escala**

Se extrajeron células por dispersión mecánica de 39 muestras de tumor fresco. Todas las células (incluyendo las células tumorales) se analizaron mediante citometría de flujo. Las células de la mucosa normal de un sitio que estaba lejos del tumor fresco también se analizaron. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con anticuerpos contra los marcadores de células inmunes (véase la tabla 3 para la lista de anticuerpos). Los análisis se llevaron a cabo con un citómetro de flujo de cuatro colores FACScalibur y un software CellQuest (Becton Dickinson, San Diego, CA). Las subpoblaciones se midieron como un porcentaje del número total de todas las células y un porcentaje del número de células CD3+. Se aplicó un agrupamiento jerárquico de enlaces promedio ("Average-linkage hierarchical clustering") y los resultados se registraron utilizando el programa GENESIS (Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. Bioinformatics 2002; 18(1): 207-8; Galon J, Franchimont D, Hiroi N, y otros Gene profiling reveals unknown enhancing y suppressive actions of glucocorticoids on immune cells." Faseb J 2002;16(1): 61-71; software disponible en <http://www.genome.tugraz.at>).

#### **Construcción de una micromatriz de tejido**

Utilizando un instrumento de matriz de tejido (Beecher Instruments, ALPHELYS, Plaisir, France), se eliminaron dos áreas representativas del tumor (centro y borde invasivo) (perforaciones de 0,6 mm y 1 mm de diámetro, respectivamente) a partir de bloques de tejido embebidos en parafina que se prepararon en el momento de la resección. De los carcinomas colónicos que se resecionaron entre 1990 y 2003, el 50 por ciento (415) se seleccionaron al azar para la construcción de micromatrices de tejido. En base a los descubrimientos patológicos T, N, M, VELIPI, los pacientes con estos tumores fueron representativos del grupo entero. Las muestras de tejido expuestas en bloques de parafina receptores se cortaron en secciones de 5 µm para la tinción de hematoxilina de Harris (HE) e inmunohistoquímica.

### **Inmunohistoquímica**

Después de la recuperación de antígenos y la detención de la actividad de la peroxidasa endógena, se incubaron las secciones (60 minutos a temperatura ambiente) con anticuerpos monoclonales contra CD45RO y CD3 (Neomarkers, Fremont, CA). Se aplicaron el sistema Envision+ (esqueleto polimérico conjugado a enzima acoplado con anticuerpos secundarios) y DAB-chromogen (Dako, Copenhagen, Dinamarca). Las secciones de tejido se contratiñeron con hematoxilina de Harris. Como controles negativos se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón del mismo isotipo. Se analizaron las muestras con una terminal de análisis por imagen (Spot Browser®, ALPHELYS). Se obtuvieron las imágenes de puntos de alta resolución policromáticas (740x540 pixel, resolución 1,181  $\mu\text{m}$  / pixel) (aumento x100 veces). Se registraron las mediciones como el número de células positivas por unidad superficial de tejido

### **Análisis estadístico**

Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para evaluar la influencia de signos patológicos de invasión metastásica temprana (VELIPI) sobre la supervivencia total y libre de enfermedad. Se calculó la significancia de diversos parámetros clínicos mediante análisis univariado utilizando la prueba log-rank (tabla 1). Se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para ensayar la influencia simultánea sobre la supervivencia (supervivencia total y libre de enfermedad) de todos los covariados encontrados significativos en el análisis univariado. Se utilizaron los mismos ensayos para calcular el efecto de la densidad de CD45RO (número de células /  $\text{mm}^2$ ) sobre la supervivencia total y libre de enfermedad, solo o junto con los covariados de estadificación (T, N, M) del tumor, nódulo y metástasis. La prueba T anova y la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney fueron las pruebas paramétricas y no paramétricas utilizadas para identificar marcadores con una expresión significativamente diferente entre los tumores positivos a VELIPI y negativos a VELIPI. Se determinó la normalidad del logaritmo de los niveles de expresión génica y de las densidades de CD45RO utilizando la prueba de Shapiro. Se utilizó la prueba de Wilcoxon para calcular la significancia de la diferencia entre supervivencias promedio entre diferentes grupos de pacientes. Todas las pruebas fueron bilaterales. Un valor de  $P < 0,05$  se consideró significativo estadísticamente. Se informó de todos los valores de P sin ajustes de corrección múltiples. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico R y Statview.

### **Material y procedimientos del ejemplo 5**

#### **A.3. Pacientes y bases de datos**

Se revisaron todos los registros de 415 pacientes con cáncer colorrectal (CRC) que se sometieron a resección primaria de su tumor en los Hospitales Laennec-HEGP entre 1990 y 2003. Estos 415 pacientes de los hospitales Laennec-HEGP fueron el principal tema del estudio de los presentes inventores (tabla 11-S1).

Se disponía de muestras de tumor embebidas en parafina de 150 pacientes consecutivos a los que se les había diagnosticado CRC en el hospital Avicenne entre 1996 y 2001. Finalmente, se evaluaron los análisis de supervivencia de 119 pacientes de estas series de validación, cuyo seguimiento no se había perdido y con muestras disponibles de biopsia de las 2 regiones tumorales (puntos de micromatriz de tejido). Estos 119 pacientes fueron el primer conjunto de validación (12, 33, 48, y 26 pacientes con estadios I, II, III, y IV de UICC-TNM, respectivamente) del hospital Avicenne.

Se seleccionaron muestras de tumor congeladas de 75 pacientes de los hospitales Laennec-HEGP para analizar la expresión génica. Estos pacientes son diferentes de los de la serie principal de 415 pacientes. A partir de esta serie de 75 pacientes (6, 17, 24, y 28 pacientes con estadios I, II, III, y IV de UICC-TNM, respectivamente), se evaluaron los análisis de supervivencia de muestras de tumor embebidas en parafina de 69 pacientes, con muestras disponibles de biopsia de las 2 regiones de tumor (puntos de micromatriz de tejido). Estos 69 pacientes de los hospitales Laennec-HEGP fueron el segundo conjunto de validación.

El tiempo de observación en estos grupos fue el intervalo entre el diagnóstico y el último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se controlaron en el último seguimiento para pacientes sin recaída, o muerte. La duración media del seguimiento de la serie principal fue de 45,3 meses. Los valores mín:máx hasta la progresión / muerte o último seguimiento fueron (0:166) meses, respectivamente. El tiempo de recurrencia o tiempo libre de enfermedad se definió como el intervalo desde la fecha de cirugía hasta la fecha de recaída de tumor confirmada para pacientes con recaída y desde la fecha de cirugía hasta la fecha del último seguimiento para pacientes libres de enfermedad. Los descubrimientos histopatológicos y clínicos se registraron según el sistema de estadificación UICC-TNM (L. Sobin, C. Wittekind, "clasificación TNM de tumores malignos" ("TNM classification of malignant tumors"). 6a, Ed. (Wiley-Liss, Nueva York, 2002). La recuperación de los pacientes después de la cirugía se realizó en el Laennec-HEGP, Avicenne y hospitales asociados para todos los pacientes según la práctica general para pacientes con CRC. Se administró quimioterapia adyuvante a pacientes con estadio III de CRC, con estadio II de alto riesgo de CRC, y quimioterapia paliativa a pacientes con cánceres colorrectales avanzados (estadio IV) y a pacientes sin resección completa del tumor. La quimioterapia adyuvante se basó en fluorouracil (FU). Los datos de seguimiento se recogieron de forma prospectiva y se actualizaron. Se construyó una base de datos segura basada en Web, TME.db

“Base de datos de microambiente tumoral” (“Tumoral MicroEnvironment Database”) disponible bajo petición, en un tercer nivel de arquitectura utilizando Java-2 Enterprise-Edition (J2EE) para integrar conjuntos de datos clínicos, y los resultados de tecnologías de alto rendimiento.

#### 5 **A.4. Histopatología**

##### ***Análisis de PCR Taqman en tiempo real***

10 Se llevó a cabo un análisis de PCR Taqman en tiempo real tal como se ha descrito en el apartado de “material y procedimientos de los ejemplos 1 a 4” anterior.

##### ***Construcción de micromatriz de tejido***

15 Se realizó una construcción de micromatriz de tejido, tal como se ha descrito en el apartado de “material y procedimientos de los ejemplos 1 a 4” anterior.

##### ***Inmunoquímica***

20 Se incubaron secciones de micromatrices de tejido (60 minutos a temperatura ambiente) con anticuerpos monoclonales contra CD3 (SP7), CD8 (4B11), CD45RO (OPD4), GZMB (GrB-7), citoqueratina (AE1AE3) y citoqueratina-8 (Neomarkers, Fremont, CA). Se aplicaron el sistema Envision+ (esqueleto polimérico conjugado a enzima acoplado con anticuerpos secundarios) y DAB-chromogen (Dako, Copenhague, Dinamarca). Se revelaron tinciones dobles con anticuerpos secundarios conjugados con fosfato y FastBlue-chromogen. Para tinciones simples, se contratiñeron secciones de tejido con hematoxilina de Harris. Como controles negativos se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón del mismo isotipo. Se analizaron las muestras con una terminal de análisis por imagen (Spot Browser®, ALPHELYS). Se obtuvieron las imágenes de puntos de alta resolución policromáticas (740x540 pixel, resolución 1,181  $\mu\text{m}$  / pixel) (aumento x100 veces). Se registró la densidad como el número de células positivas por unidad de área superficial de tejido. Para cada duplicado, se utilizó la densidad promedio para el análisis estadístico.

30 Para cada tumor, el duplicado de puntos mostró un buen nivel de homogeneidad de densidades de células teñidas en cada región del tumor (CT e IM). Estaban presentes densidades heterogéneas de los infiltrados inmunes (HiLo y LoHi) entre regiones del tumor (CT / IM) en el 37%, 33%, 47%, 36% de los tumores a los que se había evaluado las densidades de células CD3, CD8, CD45RO y GZMB, respectivamente.

##### 35 **Análisis estadístico**

Para visualizar la matriz de correlación presentada en la figura 1 y para llevar a cabo el agrupamiento jerárquico no centrado de Pearson se utilizó un software de agrupamiento Genesis (J. Galon y otros, 2002, Faseb J, Vol. 16 : 61). Se utilizó el paquete pvcluster R para validar los agrupamientos “clusters” formados.

40 Se utilizaron los estimadores de Kaplan Meier de supervivencia para visualizar las curvas de supervivencia y para obtener los estimadores de la media, percentil 75 y porcentajes de supervivencia a los 2, 4 y 5 años para la OS y DFS. La prueba log-rank se utilizó para comparar la supervivencia libre de enfermedad y total en diferentes grupos. Para los marcadores medidos con RT-PCR, el nivel de expresión medio se tomó como corte para dicotomizar las variables. Para los cuatro marcadores estudiados adicionalmente en dos regiones diferentes (CT e IM) utilizando TMA (CD3, CD45RO, CD8, GZM) se aplicó la estrategia del “valor de p mínimo” para obtener el corte que proporcionaba la mejor separación entre los grupos de pacientes relacionado con su resultado de supervivencia libre de enfermedad. Los valores de corte para densidades de células CD3, CD8, CD45RO, GZMB fueron 370, 80, 80, 30 células /  $\text{mm}^2$  en el centro del tumor y 640, 300, 190 y 60 células /  $\text{mm}^2$  en el borde invasivo, respectivamente. Dado que los valores de P obtenidos de este modo pueden presentar una sobrevaloración severa, los valores de P log-rank de DSF se corrigieron utilizando la fórmula propuesta por Altman y otros (D.G. Altman y otros, 1994, J. Natl Cancer Inst, Vol. 86: 829). De forma adicional, los valores de P log-rank de la DFS y OS se calcularon utilizando la validación cruzada 2 veces (D. Faraggi y otros, 1996, Stat Med, Vol. 15 : 2203) después de la realización de 100 repeticiones (con y sin estratificar las variables de agrupamiento). Los valores de p medios se resumen en las tablas 13-14 (S4-S5) y 16-17 (S7-S8).

60 Se aplicó un modelo de riesgos proporcionales de Cox multivariado al marcador de regiones combinadas CD3<sub>CT</sub>CD3<sub>IM</sub> para determinar su proporción de riesgo después del ajuste mediante marcadores tumorales histopatológicos tradicionales. El modelo de Cox se aplicó sólo a pacientes con estadios I, II, III de UICC-TNM para garantizar una función de riesgo de línea de base común. Las proporciones de riesgos a partir del modelo de DFS se corrigieron utilizando un factor de contracción estimado de la validación cruzada “leave-one-out” tal como sugirieron Hollander y otros (N. Hollander y otros, 2004, Stat Med, Vol. 23: 1701). En las tablas 14-15 y 18-19 se presentan los modelos que utilizan la media como corte. Adicionalmente, los marcadores de interés fueron un factor de pronóstico independiente cuando se consideraban los marcadores de interés en su escala continua original (no se muestran los datos).

65

En todo el texto, una valor de  $P < 0,05$  se consideró significativo estadísticamente. Todos los análisis se llevaron a cabo con el software estadístico R (paquete de supervivencia) y Statview.

## B. RESULTADOS

5

### Ejemplo 1 : Correlación entre el resultado clínico y la respuesta inmune adaptativa

#### **1.1 Invasión metastática temprana y resultado clínico**

10 La significancia del pronóstico de la presencia de embolia vascular (VE), invasión linfática (LI), e invasión perineural (PI), que describía la invasión metastática temprana (VELIPI), se investigó mediante análisis univariado de los 959 pacientes con cáncer colorrectal. VE, LI, PI, y VELIPI así como el estadio T, N, M influenciaron significativamente la supervivencia libre de enfermedad y total ( $P < 0,001$ ) (tabla 1).

15 Los índices de supervivencia libre de enfermedad de cinco años fueron del 32,4 por ciento entre pacientes con tumores negativos a VELIPI, y del 12,1 por ciento entre pacientes con tumores positivos a VELIPI, respectivamente. También se observaron diferencias en la duración media de la supervivencia libre de enfermedad (3,3 frente a 26,9 meses para tumores positivos a VELIPI y negativos a VELIPI, respectivamente,  $P < 0,001$ ). Se encontró un patrón similar para la supervivencia total (tabla 1).

20 Además, la presencia de más de una señal de invasión metastática temprana confirió un pronóstico peor que una única señal. Las curvas de Kaplan-Meier sugirieron una supervivencia total y supervivencia libre de enfermedad más largas en pacientes con tumores negativos a VELIPI que en pacientes con tumores positivos a VELIPI (prueba log-rank,  $P < 0,001$ ). VE, LI, o PI se correlacionaban con los estadios N y M ( $P < 0,001$  para todas las comparaciones). La influencia de todos los covariados significativos sobre la supervivencia se ensayó simultáneamente utilizando un modelo de riesgos proporcionales de Cox. El análisis multivariado, ajustando a la estadificación TNM, confirmó que el estado VELIPI se asociaba de forma significativa e independiente a un pronóstico mejor ( $P = 0,04$  y  $P = 0,01$  para supervivencia total y libre de enfermedad, respectivamente). Ajustando para la estadificación de Dukes, el estado VELIPI se asoció independientemente con un pronóstico mejor ( $P = 0,007$  y  $P = 0,002$  para la supervivencia total y libre de enfermedad, respectivamente).

30

#### **1.2 Infiltración de células inmunes, inflamación, invasión metastática temprana y pronóstico**

35 Se evaluaron tumores colorrectales ( $n = 377$ ) de forma histopatológica para un infiltrado de células inmunes dentro del tumor y en el borde invasivo.

La presencia de un infiltrado inmune fuerte (resultado 3) se asoció con tumores negativos a VELIPI.

40 Se midieron los ARNm para moléculas proinflamatorias e inmunosupresoras en 75 tumores colorrectales mediante PCR en tiempo real cuantitativa con matriz de baja densidad. No se encontró ninguna asociación significativa entre el contenido de ARNm para los mediadores proinflamatorios (IL-8, VEGF, CEACAM-1, MMP-7, Cox-2 y trombospondina-1), o para moléculas inmunosupresoras (TGF $\beta$ , IL-10, B7-H3, y CD32b) y el estado VELIPI o la recaída (figura 1 y datos no mostrados).

45 Las células T se diferencian en células T<sub>H1</sub> o T<sub>H2</sub> después de la expresión de T-bet o GATA-3, respectivamente. Las respuestas inmunes protectoras están mediadas por células T de memoria efectoras con el fenotipo CD8+, CD45RO+, CCR7-, CD62L-, perforina+, granulisina+, granzima-B+. Estas células ejercen una función efectora inmediata tras la estimulación con antígeno por los mediadores citotóxicos que se liberan. Tal como se muestra en la figura 1, CD8 $\alpha$ , granulisina, y granzima-B aumentaron en tumores negativos a VELIPI y aumentaron aún más en los tumores de pacientes que no habían recaído, en comparación con tumores positivos a VELIPI de pacientes que habían recaído ( $P < 0,05$ ).

50

Además, los tumores negativos a VELIPI de pacientes que no habían tenido recaída tenían un aumento significativo de los mediadores de T<sub>H1</sub>, T-bet, IRF-1, e IFN- $\gamma$  en comparación con tumores positivos a VELIPI de pacientes que habían recaído ( $P < 0,05$ ). En cambio el factor de transcripción de T<sub>H2</sub>, GATA-3, no aumentó en ningún grupo de pacientes (figura 1).

55

### Ejemplo 2 : Fenotipos de células inmunes infiltrantes de tumor

60 Se analizaron las subpoblaciones de células inmunes de 39 cánceres de colon acabados de reseccionar mediante una citometría de flujo a gran escala. Para perfeccionar el análisis, se midieron 410 combinaciones diferentes de marcadores superficiales mediante FACS, y los resultados se representaron desde la expresión mínima hasta la expresión máxima.

65 Las células T, células B, células NK, células NKT, y macrófagos se analizaron en relación con el estado VELIPI de los tumores. Las células T CD3+ fueron la más extendidas de las células inmunes infiltrantes de tumor. Las células T

CD3+, CD3+CD4+, y CD3+CD8+ aumentaron significativamente (aumento de 2,6, 2,5, 4,9 veces, respectivamente,  $P < 0,05$ ) en tumores negativos a VELIPI en comparación con tumores positivos a VELIPI.

5 El análisis a gran escala de los marcadores fenotípicos y funcionales de subpoblaciones de células T (porcentaje de células positivas en la población total aislada del tumor y dentro de la población de células T CD3+) reveló una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre tumores negativos a VELIPI y positivos a VELIPI para 65 combinaciones diferentes de marcadores. El agrupamiento jerárquico (Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(25): 14863-8) demostró un patrón homogéneo en tumores positivos a VELIPI, mientras que se pudieron distinguir dos subgrupos de tumores negativos a VELIPI.

15 Todos los marcadores (CD45RO, CD45RA, CD27, CD28, CCR7, CD127) del proceso de diferenciación de células T de células vírgenes a células T de memoria efectoras estaban presentes en el agrupamiento de marcadores expresados de forma diferencial. Los marcadores de la migración de células T (CD62L-, CCR7-, CD103, CD49d, CXCR3) y de la activación (HLA-DR, CD98, CD80, CD86, CD134) también se expresaron de forma diferente entre tumores negativos a VELIPI y positivos a VELIPI.

20 Los resultados han demostrado que las células T vírgenes (CD3+CCR7+) eran poco frecuentes en los tumores. Por el contrario, en el camino de diferenciación a partir de células T de memoria tempranas (CD45RO+CCR7-CD28+CD27+) hasta células T de memoria efectoras (CD45RO+CCR7-CD28-CD27-), se detectaron todas las subpoblaciones. En comparación con los tumores positivos a VELIPI, los tumores negativos a VELIPI tenían, de forma significativa, más de estas células T ( $P < 0,05$ ). Los resultados muestran la elevada proporción de células T CD8+ maduras en tumores negativos a VELIPI. Al contrario que en los tumores, la mucosa normal distante de los mismos pacientes, no mostraba diferencias en las subpoblaciones de células T CD8+ según el estado VELIPI.

25 Ejemplo 3 : Células T de memoria efectoras y supervivencia

30 Se realizó el análisis inmunohistoquímico sobre micromatrices de tejido preparadas a partir de 415 cánceres colorrectales. La tinción con un anticuerpo anti-CD3 reveló la presencia de células T tanto dentro del tumor como en el borde invasivo del mismo. Se contaron células CD45RO+ mediante un software de imagen automático. Un estudio de validación mostró una correlación estrecha entre los conteos de células ópticos y automáticos ( $R^2 = 0,914$   $P < 0,001$ ).

35 Los tumores negativos a VELIPI contenían números elevados de células CD45RO en comparación con tumores positivos a VELIPI ( $P = 0,02$ ). Además, una densidad alta de células T de memoria estaba asociada con tumores negativos para nódulos linfáticos (N-) y negativos para metástasis (M-) ( $P < 0,001$ ).

40 Los estadios avanzados de invasión de nódulos linfáticos (N2, N3) estaban asociados a densidades bajas de CD45RO en los tumores (figura2).

45 El análisis de riesgos proporcionales de Cox multivariado demostró que M ( $P < 0,001$ ), N ( $P = 0,002$ ), y T ( $P = 0,004$ ) así como CD45RO ( $P = 0,02$ ) eran factores de pronóstico de supervivencia total independientes. Las curvas de Kaplan-Meier sugirieron una supervivencia total y supervivencia libre de enfermedad más largas (figura 3A, 3B) en pacientes con tumores que contenían una densidad alta de CD45RO que en pacientes con densidad baja (prueba log-rank,  $P < 0,001$ ). Los pacientes cuyos tumores contenían una densidad alta de CD45RO tenían una supervivencia libre de enfermedad promedio de 36,5 meses y una supervivencia total promedio de 53,2 meses, en comparación con los 11,1 y 20,6 meses, respectivamente, entre pacientes con densidad baja de CD45RO ( $P < 0,001$  para todas las comparaciones) (figura 3A, 3B). Los índices de supervivencia total (figura 3A) y supervivencia libre de enfermedad (figura 3B) de cinco años fueron del 46,3 y 43,1 por ciento entre pacientes con tumores que contenían una densidad alta de CD45RO y 23,7 y 21,5 por ciento entre pacientes con tumores que contenían baja densidad de CD45RO.

55 Los resultados de los ejemplos 1 a 3 anteriores muestran que existe una relación entre señales patológicas de invasión metastásica temprana (embolia vascular (VE), invasión linfática (LI), e invasión perineural (PI), denominadas colectivamente VELIPI) y el resultado en 959 cánceres colorrectales.

60 También se ha demostrado la existencia de una asociación entre el estado VELIPI del tumor y la evidencia de una respuesta inmune dentro del tumor. En particular, un análisis de 39 cánceres colorrectales demostró que la presencia de células T de memoria efectoras intratumorales, definidas por los marcadores CD3, CD8, CD45RO, CCR7, CD28, y CD27, se asociaba con tumores negativos a VELIPI. El análisis de 415 tumores colorrectales demostró que una densidad alta de células CD45RO+ se correlacionaba con un resultado clínico bueno.

65 En las series de 959 cánceres colorrectales en esta descripción, una embolia detectada mediante examen patológico meticuloso mostraba una asociación independiente significativa entre el estado VELIPI y la supervivencia total.

En los ejemplos 1 a 3 anteriores, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ARNm para

moléculas proinflamatorias e inmunosupresoras en tumores positivos a VELIPI y negativos a VELIPI, o en tumores de pacientes que tuvieron o no recaída. Estos descubrimientos sugieren que la inflamación no es un factor en la invasión metastática temprana.

5 En cambio, había un ARNm aumentado para productos y marcadores de células T efectoras  $T_H1$  (CD8, T-bet, IRF-1, IFN- $\gamma$ , granulinsina, y granzima-B), y este incremento se asoció con una supervivencia prolongada y carencia de señales patológicas de invasión metastática temprana.

10 Utilizando micromatrices de tejido, en los ejemplos 1 a 3 anteriores se demostró la asociación entre un elevado número de células T CD45RO+ y la ausencia de invasión linfovascular y perineural ( $P < 0,002$ ). Los tumores que contenían una densidad alta de células T de memoria efectoras se asociaron con una supervivencia libre de enfermedad y total más largas que para tumores que carecían de dichas células ( $P < 0,001$ ). La presencia de células T de memoria CD45RO-positivas en el tumor fue un factor de pronóstico independiente.

15 En los ejemplos 1 a 3, la medición cuantitativa de alto rendimiento de las diferencias celulares y moleculares entre cánceres colorrectales permitió una caracterización detallada del microentorno del tumor, y la identificación de asociaciones con el resultado clínico. Los resultados experimentales muestran que el microentorno del tumor y la respuesta inmune del huésped tienen una importancia principal en la progresión del tumor.

20 De este modo, en los ejemplos 1 a 3 anteriores se ha demostrado que el análisis univariado mostró diferencias significativas en supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total según la presencia o ausencia de señales patológicas de invasión metastática temprana ( $P < 0,001$ ). Mediante el análisis de Cox multivariado, el estadio patológico (T, N, M) ( $P < 0,001$ ) y la invasión metastática temprana ( $P = 0,04$ ) se asociaron de forma independiente con la supervivencia. Los tumores que carecían de señales de invasión metastática temprana tenían infiltrados de  
25 células inmunes y ARNm aumentado para productos de células T efectoras  $T_H1$  (CD8, T-bet, IRF-1, IFN- $\gamma$ , granulinsina, y granzima-B).

30 Por el contrario, no se expresaron de forma diferencial ni mediadores proinflamatorios ni moléculas inmunosupresoras. En los tumores con señales tempranas de invasión metastática, o sin las mismas, existieron diferencias significativas para 65 combinaciones de marcadores de células T, y el agrupamiento jerárquico demostró que los marcadores de la migración de células T, activación y diferenciación estaban aumentados en tumores que carecían de estas señales.

35 Estos tumores contenían números aumentados de células T CD8-positivas, que variaban de células T de memoria tempranas (CD45RO+CCR7-CD28+CD27+) a células de memoria efectoras (CD45RO+CCR7-CD28-CD27-). La presencia de células CD45RO+ de memoria infiltrantes, evaluada mediante inmunohistoquímica, se correlacionó con señales de invasión metastática temprana, estadio patológico y supervivencia.

40 Por lo tanto, se ha demostrado que las señales de una respuesta inmune dentro de los cánceres colorrectales están asociadas con la ausencia de evidencia patológica de invasión metastática temprana y supervivencia prolongada.

Ejemplo 4 : Correlación entre (i) respuesta inmune adaptativa y (ii) tiempos de recurrencia y supervivencia

45 Se investigó la orientación funcional de la respuesta del huésped dentro de cánceres colorrectales mediante PCR cuantitativa en tiempo real a través de la evaluación de 18 genes relacionados de forma inmune. Estos genes se expresaban de forma variable entre los 75 tumores estudiados.

50 Los análisis de correlación realizados entre todos los genes (que representaban 153 ensayos de correlación) demostraron 70 combinaciones significativas ( $P < 0,05$ ) que incluían 39 combinaciones altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) (véase tabla 4).

55 Se generó una matriz de correlación seguida de agrupamiento jerárquico no supervisado que ofrecía una forma conveniente de visualizar patrones de similitud y diferencia entre todas las correlaciones. Esto permitió la identificación de un agrupamiento dominante de genes comodulados, compuestos de genes relacionados a  $T_H1$  (T-bet, IRF-1, IFN $\gamma$ ) e inmune-adaptativos (CD3 $\zeta$ , CD8, GLNY, GZMB), y dos agrupamientos que se refieren a mediadores proinflamatorios e inmunosupresores.

60 Los patrones de expresión de las agrupaciones eran casi exclusivos mutuamente en los tumores. Los niveles de expresión de los genes del agrupamiento  $T_H1$  / adaptativo se correlacionaban de forma inversa con recaída, mientras que no pasó con los otros (VEGF, MMP-7, Cox-2, IL-8, Survivina, CEACAM1, TRAIL-R, B7H3, IL-10, TGF $\beta$ ).

65 Una estructura de árbol jerárquica clasificando los 75 cánceres colorrectales según los niveles de ARNm de los genes de la agrupación  $T_H1$  / adaptativo (de niveles de expresión máximos a mínimos) demostraron índices de recurrencia progresivos del 20% al 80%, (prueba exacta de Fisher comparando el grupo 1 y el grupo 2,  $P = 0,016$ ). Los pacientes con un patrón aumentado de expresión génica  $T_H1$  / adaptativo en el tumor se asociaron con el mejor

pronóstico.

En conjunto, estos datos proporcionaron una prueba de un efecto beneficioso de la inmunidad  $T_H1$  / adaptativa *in situ* sobre el resultado clínico.

5 A continuación, los resultados finales celulares de los perfiles de expresión génica inmunoadaptativa se calcularon mediante un análisis de micromatrices de tejido basado en inmunohistoquímica de 415 tumores.

10 Además, la distribución de la respuesta inmune adaptativa *in situ* se exploró marcando el centro del tumor (CT) junto con el borde invasivo (IM).

15 En las dos regiones del tumor, la inmunotinción de los linfocitos T totales (CD3), efectores de células T CD8 y la molécula citotóxica asociada (GZMB), y células T de memoria (CD45RO) mostró un amplio espectro de densidades de células inmunes positivas entre todas las muestras ensayadas.

Las 6640 inmunotinciones correspondientes se analizaron con una terminal de análisis por imagen dedicada para la cuantificación de la señal (puntos capturados), permitiendo mediciones de densidad de células precisas.

20 Un estudio de validación mostró una correlación estrecha entre conteos de células ópticos y automáticos ( $R^2 > 0,9$ ,  $P < 0,001$  para todos los marcadores).

25 Las distribuciones de células inmunes en regiones específicas se analizaron en relación al resultado clínico. Los tumores de pacientes sin recaída tenían una densidad de células inmunes (CD3, CD8, CD45RO, GZMB) dentro de cada región del tumor significativamente más alta (CT o IM) (todos  $P < 0,003$ ), que los tumores de pacientes con recaída (figura 4).

30 En base a una cuantificación de señal por ordenador, se creó una media para ensayar los valores de corte de las densidades de las células teñidas (para todos los marcadores en las dos regiones del tumor) para las discriminación de los pacientes en cuanto a tiempos supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total (1600 pruebas log-rank). Esto permitió definir los valores de corte óptimos de las densidades de células inmunes (CD3, CD8, CD45RO, GZMB), y demostrar que había un intervalo grande de valores de corte en las dos regiones del tumor que eran significativos (figura 5). Según estos valores de corte, se observó que los infiltrados de células inmunes (densidades altas o bajas para CD3, CD8, CD45RO, GZMB) en cada región del tumor (CT o IM) distinguieron de forma marcada los pacientes ( $n=415$ ) en grupos con supervivencia libre de enfermedad (DFS) media diferente (figura 5). Las pruebas log-rank fueron altamente significativas para todos los marcadores estudiados en las dos regiones del tumor para la DFS (valores de P que oscilaban de  $1,5 \times 10^{-4}$  a  $1,4 \times 10^{-8}$ ) (figura 5 y tabla 5) y para la OS (tabla 6).

40 Adicionalmente se investigó si la distribución estructural de las poblaciones de células inmunes dentro del tumor (CT / IM) podría influir en el pronóstico. Se analizaron las curvas de Kaplan-Meier para la DFS y OS para pacientes con densidades de altas y bajas de CD3 en las dos regiones del tumor. Esto demostró que densidades de  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$  altas daban como resultado una supervivencia total y libre de enfermedad mejores, en comparación con una densidad alta de CD3 en una única región ( $P < 0,0001$ ) (figura 7A, 7B). El análisis combinado de las regiones CT más IM aumentó aún más las diferencias de medias de DFS entre pacientes con densidades altas y bajas para todos los marcadores inmunes adaptativos (valores de P que oscilaban de  $3,7 \times 10^{-7}$  a  $5,2 \times 10^{-11}$ ), en comparación con el análisis único de regiones CT o IM (figura 6 y figura 7C). De este modo, la DFS media para pacientes bajos y altos fue de 5,9 frente a 45,9 meses para  $CD3_{CT}$ , de 12,9 frente a 47,8 meses para  $CD3_{IM}$  (figura 6), y de 5,9 frente a 66,2 meses para  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$ , respectivamente (figura 7C y tabla 4). Si se toman conjuntamente, estas observaciones indican que los tiempos de supervivencia libre de enfermedad y total se pueden predecir en base a la distribución arquitectónica y de la amplitud de la respuesta inmune adaptativa coordinada *in situ* en distintas regiones del tumor.

50 El pronóstico del cáncer colorrectal actualmente se basa en criterios histopatológicos de invasión tumoral. Los modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox ajustados para estadios de TNM y diferenciación del tumor mostraron que la densidad de  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$  era un pronosticador independiente de la supervivencia libre de enfermedad y total ( $P=2,8 \times 10^{-6}$ ,  $P=3,0 \times 10^{-3}$ , respectivamente) (tabla 5). De forma destacable, la densidad de  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$  fue el parámetro más significativo asociado con supervivencia libre de enfermedad y tuvo un valor de P mejor que el de los estadios T y N para al análisis de la supervivencia total. Además, todos los marcadores inmune adaptativos también presentaron un valor de pronóstico independiente ajustado a los estadios TNM y a la diferenciación del tumor para la supervivencia libre de enfermedad y total (tabla 7).

60 La estadificación convencional del cáncer colorrectal no explica la marcada variabilidad de resultados que aparece dentro de cada estadio. Dado que la naturaleza y la amplitud de la respuesta inmune *in situ* mantenía un valor de pronóstico independiente fuerte, los presentes inventores investigaron si la evaluación de esta respuesta inmune coordinada podría predecir aún mejor los resultados de los pacientes en cada estadio. Los presentes inventores estratificaron pacientes según la clasificación de Dukes (figura 8a) y demostraron una influencia de  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$  en todos los estadios de la enfermedad (figura 8b).

65

De manera inesperada, los presentes inventores descubrieron que una respuesta inmune adaptativa fuerte coordinada *in situ* se correlacionaba con un pronóstico igualmente favorable, independientemente de la invasión del tumor a través de la pared intestinal y la extensión de los nódulos linfáticos locales (Clasificación de Dukes A, B, C). En cambio, una respuesta inmune adaptativa *in situ* se correlacionaba con un pronóstico muy malo, incluso en pacientes con invasión tumoral mínima (clasificación de Dukes A y B) (figura 8b).

En los ejemplos 1 a 3 anteriores, se demostró que la ausencia de señales tempranas de diseminación tumoral (invasión linfocelular y perineural) y de invasión de los nódulos linfáticos estaba asociada con la presencia de una densidad fuerte de células T de memoria efectoras intratumorales (T<sub>EM</sub>).

En el presente ejemplo también se determina si la evaluación adicional de la densidad de célula de memoria (CD45RO+) respecto a la densidad de célula T CD3+ en las dos regiones del tumor también discrimina pacientes con riesgo de recurrencia de tumor. CD3<sub>CT</sub> / CD3<sub>IM</sub> / CD45RO<sub>CT</sub> / CD45RO<sub>IM</sub> estratificaron pacientes de forma destacada en dos grupos con riesgo alto y bajo de recurrencia del tumor (figura 8c). Sorprendentemente, densidades bajas de estos marcadores en las dos regiones del tumor revelaron un resultado similar para pacientes con estadio C, B e incluso A de Dukes, en comparación con pacientes con metástasis distante concomitante (D de Dukes).

En la presente descripción, utilizando la medición cuantitativa de alto rendimiento de parámetros inmunes celulares y moleculares, se caracterizaron las fuerzas inmunológicas en el microambiente del carcinoma colorrectal humano.

Sea cual sea el papel de la inmunorecuperación y estado físico, los datos actuales demuestran claramente el concepto de que una vez los carcinomas colorrectales humanos se vuelven detectables clínicamente, la inmunidad antitumoral natural *in situ* desempeña un papel principal en el control de la recurrencia del tumor después de la escisión quirúrgica.

Las respuestas inmunes adaptativas beneficiosas *in situ* no estaban restringidas a pacientes con una invasión del tumor mínima, indicando que las fuerzas inmunológicas *in situ* podían persistir junto con la progresión del tumor. La posibilidad no puede excluir que los linfocitos intratumorales modifican el estroma del tumor o las células tumorales, o ambos, de tal forma que atenúan la capacidad metastática de las células tumorales.

Sin embargo, la correlación de la expresión de los marcadores inmune adaptativos *in situ*, moléculas asociadas a T<sub>H</sub>1 y mediadores citotóxicos con una incidencia de la recurrencia del tumor baja aporta una evidencia del rechazo mediado de forma inmune de células tumorales persistentes después de la cirugía.

De esta forma, el buen valor de pronóstico asociado con la presencia *in situ* de una densidad alta de células T de memoria (células CD45RO positivas), probablemente es el resultado de las propiedades de tráfico críticas y de la capacidad de protección antitumoral de larga duración de estas células, tal como se muestra en un modelo en ratones<sup>18</sup>.

La presente evaluación de la respuesta inmune adaptativa *in situ* que se realiza utilizando mediciones cuantitativas de densidades de células inmunes tanto en el centro como en el borde del tumor, reveló la importancia de una respuesta inmune adaptativa coordinada para controlar la recurrencia del tumor.

De forma inesperada, los criterios inmunológicos que se utilizan en esta descripción no sólo tuvieron un valor de pronóstico que era superior e independiente a los de las clasificaciones TNM y Dukes, sino que también se correlacionaba con un pronóstico igualmente favorable sin tener en cuenta la invasión del tumor.

El tiempo de recurrencia y el tiempo de supervivencia total se demuestra que están gobernados más por el estado de la respuesta inmune adaptativa local que por la presencia de expansión del tumor a través de la pared intestinal y hacia el nódulo o nódulos linfáticos regionales.

Esta nueva información tiene diversas implicaciones importantes y puede cambiar la comprensión de la evolución de un carcinoma, que incluye carcinoma colorrectal. Además, el criterio que se ha utilizado, debería conducir a una reevaluación de la clasificación utilizada actualmente del carcinoma colorrectal, e indica con más precisión, los pacientes con riesgo alto de recurrencia del tumor, que se podrían beneficiar de terapia adyuvante (que incluye inmunoterapia).

La utilidad de la inmunohistoquímica, combinada con la disponibilidad de un conjunto extensivo de anticuerpos contra los marcadores inmunes, debería facilitar la aplicación de la estrategia de los presentes inventores a otros tumores.

Ejemplo 5 : Resultados adicionales relativos a la correlación entre (i) respuesta inmune adaptativa y (i) tiempos de recurrencia y supervivencia

Se llevaron a cabo análisis genómicos y de inmunotinción *in situ* sobre 75 y 415 pacientes, respectivamente (tabla 11 - S1). Los datos se introdujeron en una base de datos de microambiente tumoral (TME.db; acceso disponible bajo

petición). Los presentes inventores utilizaron PCR en tiempo real cuantitativa para evaluar los niveles de expresión de genes inmunes relacionados con la inflamación, inmunidad adaptativa de T-colaboradora 1 ( $T_H1$ ) e inmunosupresión. Estos genes demostraron patrones de expresión variables en los 75 tumores estudiados. Los análisis de correlación que se llevaron a cabo entre todos los genes demostraron 39 combinaciones altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) (tabla 4). Se identificó una agrupación dominante de genes comodulados para la inmunidad adaptativa de  $T_H1$  (factor de transcripción 21 de la caja T) (T-bet), factor 1 regulador del interferón (IRF1), IFN $\gamma$  CD3 $\zeta$ , CD8, granulinsina (GLNY), granzima B (GZMB)). Una estructura en árbol jerárquica clasificando los pacientes según los niveles de expresión de los genes de esta agrupación reveló una correlación inversa entre la expresión de estos genes y la recurrencia del tumor (valor de P comparando los grupos de pacientes, todos  $P < 0,05$ ). Estos datos muestran que la inmunidad adaptativa de  $T_H1$  tiene un efecto beneficioso sobre el resultado clínico.

A continuación, se utilizaron micromatrices de tejido para investigar la respuesta inmune adaptativa *in situ* en el centro del tumor (CT) y el borde invasivo (IM) de 415 CRC. Se cuantificó la inmunotinción de los linfocitos T totales (CD3), células T CD8 efectoras y su molécula citotóxica asociada (GZMB), y células T de memoria (CD45RO) utilizando una terminal de análisis por imagen dedicada. Los tumores de pacientes sin recurrencia tenían unas densidades de células inmunes (CD3, CD8, GZMB, CD45RO) dentro de cada región del tumor (CT, IM), superiores a las de pacientes cuyos tumores habían recaído, tal como se observó anteriormente en el ejemplo 4 anterior. En cada región del tumor (CT, IM) y para cada marcador (CD3, CD8, GZMB, CD45RO) había una correlación significativa estadísticamente entre la densidad de células inmunes y el resultado de los pacientes para un intervalo grande de valores de corte (figura 9 - S5). En particular, utilizando el corte que dio como resultado el valor de P mínimo para la supervivencia libre de enfermedad, las densidades de células CD3+, CD8+, GZMB+, y CD45RO+ en cada región del tumor (CT e IM) permitió estratificar a los pacientes en grupos con supervivencia libre de enfermedad diferente estadísticamente (valores de P corregidos después (23), que oscilaban desde  $1,0 \times 10^{-2}$  hasta  $4,8 \times 10^{-6}$ ) y supervivencia total (valores de P que oscilaban de  $5,5 \times 10^{-3}$  hasta  $7,9 \times 10^{-8}$ ) (y tablas 12, 13 - S3, S4). Los reanálisis de los datos utilizando 100 repeticiones de validaciones cruzadas 2 veces después (24) (tablas 12, 13 - S3, S4) o estableciendo el corte en la media de los conjuntos de datos (tablas 14, 15 - S5, S6), proporcionó resultados concordantes como valor de pronóstico de cada parámetro inmune.

A continuación, se investigó si el análisis combinado de regiones del tumor podría mejorar la predicción de la supervivencia de los pacientes. Para todos los marcadores de la inmunidad adaptativa (CD3, CD8, GZMB y CD45RO), los análisis combinados de las regiones CT más IM (HiHi frente LoLo) aumentaron las diferencias en los tiempos de supervivencia libre de enfermedad y total comparando el análisis de una región única (Hi frente a Lo) (tablas 12-15 - S3-S6). Los datos también se analizaron utilizando una validación cruzada 2 veces después (24) ( $100^*CV$  para cada marcador), mostrando diferencias altamente significativas (tablas 12, 13 - S3, S4).  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$  se asoció con los valores de P más pequeños para el análisis de supervivencia libre de enfermedad y total ( $P = 7,6 \times 10^{-8}$  y  $P = 4,0 \times 10^{-7}$ , respectivamente) (tablas 12, 13 - S3, S4). Para confirmar estos resultados, se analizó un grupo adicional de pacientes diferente de la primera serie y un tercer grupo de CRC de otro hospital. Para cada grupo se determinaron los valores de corte medios para  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$  (50% of pacientes con una densidad alta y 50% de pacientes con una densidad baja). Los dos grupos independientes confirmaron los datos obtenidos en la primera serie. Todos los análisis estadísticos también se realizaron en el subgrupo de pacientes sin metástasis distante concomitante (estadios I, II, y III de UICC-TNM). Para  $CD3_{CT/IM}$ ,  $CD8_{CT/IM}$  y  $CD45RO_{CT/IM}$  se observaron valores de P significativos para los análisis de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total (tablas 16-19 - S7-S10).

Se determinó si estos criterios inmunes podrían discriminar el resultado de pacientes en cada fase de la progresión del cáncer. Los pacientes se estratificaron según la clasificación UICC-TNM (25) (figura 10A). Una reacción inmune *in situ* fuerte se correlacionaba con un pronóstico favorable sin tener en cuenta la extensión local del tumor y la invasión a nódulos linfáticos regionales (estadios I, II, y III). En cambio, una reacción inmune *in situ* débil en las dos regiones del tumor se correlacionaba con un pronóstico malo incluso en pacientes con una invasión del tumor mínima (estadio I) (figura 10B). Los presentes inventores demostraron recientemente la importancia de la densidad de células T de memoria CD45RO+ en la diseminación del tumor limitante de CRC (22). Los presentes inventores descubrieron que los pacientes con densidades bajas de células CD3+ y células T de memoria CD45RO+ en las dos regiones del tumor (CT e IM) tenían un pronóstico muy malo, similar a los pacientes con metástasis distante concomitante (estadio IV) (figura 10C). En el análisis multivariado, después de ajustar la invasión del tumor (estadio T), la diferenciación del tumor y la invasión de nódulos linfáticos (estadio N), la densidad  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$  (HiHi, heterogénea, LoLo) se mantuvo como un factor de pronóstico independiente con la proporción de riesgos más elevada y el valor de P más bajo en el análisis de supervivencia libre de enfermedad (HR de 2,391;  $P = 1,4 \times 10^{-6}$  corregida después (26)) (tabla 20 - S11). La densidad de  $CD3_{CT} / CD3_{IM}$  fue el único parámetro independiente asociado con la supervivencia total (HR of 1,89  $P = 1,2 \times 10^{-5}$ ) (tabla 21 - S12). Los parámetros histopatológicos no se asociaron más a la supervivencia libre de enfermedad y total en pacientes con densidades altas o bajas coordinadas de los marcadores inmunes en las dos regiones del tumor (HiHi frente a LoLo) (tablas 20 y 21 - S11 y S12).

Además, tal como se muestra en las figuras 11 y 12, el procedimiento de pronóstico *in vitro* según la presente invención puede llevarse a cabo de forma satisfactoria para el pronóstico de varios tipos de cánceres, tal como ilustra la predicción del resultado de cánceres de colon y recto.

También de forma adicional, tal como se ilustra en la figura 13, se ha probado que el procedimiento de pronóstico *in vitro* según la presente invención es altamente fiable para el pronóstico del resultado de cánceres en pacientes que han sufrido cánceres en un estadio temprano.

5 También de forma adicional, tal como ilustra la figura 14, se ha demostrado que el procedimiento de pronóstico *in vitro* según la presente invención permite un pronóstico exacto del resultado de cánceres, utilizando, como el uno o más marcadores biológicos, una combinación de un conjunto de seis marcadores biológicos, concretamente PDCD1LG1, VEGF, TNFRSF6B, IRF1, IL8RA y SELL, que se cuantificaron mediante un procedimiento de análisis de expresión génica, de forma más precisa, análisis por PCR en tiempo real.

10 En resumen, los resultados presentados en el ejemplo 5 muestran que una vez los CRC humanos se vuelven detectables clínicamente, la respuesta inmune adaptativa juega un papel en la prevención de la recurrencia del tumor.

15 Se descubrió una correlación positiva entre la presencia de marcadores para la polarización de T<sub>H</sub>1, células T citotóxicas y de memoria y una incidencia baja de la recurrencia del tumor.

20 De este modo, en esta descripción se encontró que el tipo, la densidad, y la localización de células inmunes en los CRC tenía un valor de pronóstico que era superior e independiente a los de la clasificación de UICC-TNM (L. Sobin y otros, 2002, "Clasificación TNM de tumores malignos" ("TNM classification of malignant tumors"). 6ª, ed., Wiley-Liss, Nueva York). Estos resultados muestran que el tiempo de recurrencia y el tiempo de supervivencia total se gobiernan principalmente por el estado de la respuesta inmune adaptativa local.

25 La nueva herramienta inmunológica dada a conocer por la presente invención puede conducir a la revisión de los indicadores actuales de resultado clínico y puede ayudar a identificar los pacientes con riesgo alto que se podrían beneficiar de la mayor parte de las terapias adyuvantes.

Tabla 1: Supervivencia libre de enfermedad y total (n=959 pacientes)

	No. de pacientes	Supervivencia libre de enfermedad (DFS)			Supervivencia total (OS)		
		Índice a 5 años %	Media de meses	Valor de P*	Índice a 5 años %	Media de meses	Valor de P*
Etapa T				<0,001 s			<0,001 s
pTis	39	48,7	55,7		48,7	55,7	
pT1	64	42,6	52,2		44,4	63,8	
pT2	156	40,4	43,6		44,2	49,1	
pT3	562	23,7	16,5		26,7	25,8	
pT4	208	16,6	1,6		17,6	16,8	
Etapa N				<0,001 s			<0,001 s
N0	568	35,4	34,6		38,8	43,1	
N+	354	15,1	4,3		16,7	16,9	
Etapa M				<0,001 s			<0,001 s
M0	747	34,5	32,6		37,6	41,1	
M+	212	0,5	0,1		0,9	12,3	
Clasificación de Dukes				<0,001 s			<0,001 s
A	83	47,0	55,6		47,0	55,6	
B	438	37,2	39,2		41,1	46,8	
C	227	24,7	19,5		27,3	28,1	
D	212	0,5	0,1		1,0	12,1	
Sexo				0,38 ns			0,47 ns
Hombre	494	25,9	16,4		28,5	29,4	
Mujer	465	28,2	19,3		30,5	27,3	
Localización				0,20 ns			0,14 ns

Tabla 1: Supervivencia libre de enfermedad y total (n=959 pacientes)									
		No. de pacientes	Supervivencia libre de enfermedad (DFS)			Supervivencia total (OS)			
			Índice a 5 años %	Media de meses	Valor de P*	Índice a 5 años %	Media de meses	Valor de P*	
	RC	243	23,9	14,5		24,7	19,7		
	TC	51	7,6	9,2		9,8	22,2		
	LC	84	28,6	15,3		31,0	27,2		
	SC	298	26,8	14,7		29,5	29,5		
	R	287	32,4	32,1		38,5	40,4		
Diferenciación					0,28	ns			0,08 ns
	Bien	737	30,7	21,7		33,6	33,2		
	Moderado	187	14,4	9,3		15,5	17,8		
	Escaso	35	17,1	2,6		17,1	11,6		
Coloide Mucinoso					0,087	ns			0,270 ns
	No	766	28,2	19,5		30,9	30,9		
	Sí	193	22,3	14,9		23,8	21,8		
Número de nudos de linfa analizados					0,11	ns			0,69 ns
	<8	426	34,0	31,0		37,1	40,0		
	≥8	633	21,4	12,9		23,5	23,2		
VE					<0,001	s			<0,001 s
	No	797	31,0	23,8		33,9	34,1		
	Sí	162	7,4	1,4		8,0	13,9		
LI					<0,001	s			<0,001 s
	No	803	29,5	21,6		32,1	32,0		
	Sí	156	14,1	0,5		16,0	16,1		
PI					<0,001	s			<0,001 s
	No	860	29,3	20,7		32,0	32,0		
	Sí	99	7,1	0,1		8,1	16,2		
VELIPI (VE o LI o PI)					<0,001	s			<0,001 s
	No	702	32,4	26,9		35,5	35,5		
	Sí	257	12,1	3,3		13,2	16,8		
VE o LI					<0,001	s			<0,001 s
	No	716	31,8	24,4		35,2	35,0		
	Sí	243	13,6	3,7		12,6	16,3		
VE y LI					<0,001	s			<0,001 s
	No	884	28,3	10,7		31,2	31,0		
	Sí	75	12,0	0,2		9,3	11,9		
VE y LI y PI					<0,001	s			<0,001 s
	No	911	28,0	19,5		30,7	30,5		
	Sí	48	8,3	0,1		0,3	9,6		
					<0,001	s			<0,001 s

RC: Colon derecho, TC: Colon transversal, LC: Colon izquierdo, SC: Colon sigmoide, R: Recto  
 VE: Embolia vascular, LI: Invasión linfática, PI: Invasión Perineural  
 Valor de P prueba logRank

**Tabla 2: Lista de genes**

Gen	Nombre	Número de acceso	Loc. Cr.
IL10	Interleuquina 10	NM_000572	1q31-q32
IL8	Interleuquina 8	NM_000584	4q13-q21
IFNG	Interferón, gamma	NM_000619	12q14
TGFB1	Factor de crecimiento transformante, beta 1	NM_000660	19q13,2

Gen	Nombre	Número de acceso	Loc. Cr.
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (Cox2)	NM_000963	1q25,2
CEACAM1	Molécula de adhesión a célula relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1	NM_001712	19q13,2
IRF1	Factor 1 regulador de interferón	NM_002198	5q31,1
MMP7	Metaloproteinasa 7 de matriz (matrilisina, uterina)	NM_002423	11q21-q22
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	NM_003376	6p12
GZMB	granzima B	NM_004131	14q11,2
TBX21	21 de caja T (T-bet)	NM_013351	17q21,2
B7H3	homólogo 3 de B7	NM_025240	15q23-q24
CD8A	antígeno CD8, alpha polipéptido (p32)	NM_001768	2p12
GNLY	Granulisina	NM_006433	2p12-q11
BIRC5	5 que contiene la repetición IAP de baculovirus (survivina)	NM_001158 NM_198053	17q25
CD3Z	antígeno CD3Z, zeta polipéptido (complejo TTT3)	NM_000734	1q22-q23
TNFRSF10A	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 10a	NM_003844	8p21
CD4	antígeno CD4 (p55)	NM_000616	12pter-p12

**Tabla 3: lista de anticuerpos**

Anticuerpo	Nombre común	Clon	Isotipo	Fluoróforo	especie	Fabricante
CCR5	CCR5	45531	IgG2b	FITC	ratón	R&D systems
CCR7	CCR7	3D12	IgG2a	PE	rata	BD pharmingen
CD103	Integrina alfa E	Ber-ATC8	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD119	IFN-gamma-R1	BB1E2	IgG2a	FITC	ratón	serotec
CD120a	TNFR1	H398	IgG2a	PE	ratón	serotec
CD120b	TNFR2	MR2-1	IgG1	PE	ratón	serotec
CD122	IL-2R-beta	MIK-beta1	IgG2a	FITC	ratón	serotec
CD127	IL-7R-alfa	R34,34	IgG1	PE	ratón	beckman coulter
CD134	OX40L-R	ACT35	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD14	CD14	M5E2	IgG2a	APC	ratón	BD pharmingen
CD152	CTLA-4	BNI3	IgG2a	APC	ratón	BD pharmingen
CD154	CD40L	TRAP1	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD178	FasL	NOK1	IgG1	-	ratón	BD pharmingen
CD183	CXCR3	1C6 / CXCR3	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD184	CXCR4	12G5	IgG2a	APC	ratón	BD pharmingen
CD19	CD19	HIB19	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD1a	CD1a	HI149	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD210	IL-10R-alfa	3F9	IgG2a	PE	rata	BD pharmingen
CD25	IL-2R-alfa	M-A251	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD26	Dipeptidil-peptidasa IV	M-A261	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD27	CD27	M-T271	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD28	CD28	CD28,2	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD3	CD3c	UCHT1	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD3	CD3c	UCHT1	IgG1	CyCr	ratón	BD pharmingen
CD3	CD3e	S4,1	IgG2a	PE-Cy5	ratón	serotec
CD32	FcγRII	AT10	IgG1	FITC	ratón	serotec
CD4	CD4	RPA-T4	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD4	CD4	RPA-T4	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD44	CD44	G44-26	IgG2b	APC	ratón	BD pharmingen
CD45	CD45	HI30	IgG1	CyCr	ratón	BD pharmingen
CD45Ra	CD45Ra	HI100	IgG2b	FITC	ratón	BD pharmingen
CD45Ro	CD45Ro	UCHTL1	IgG2a	APC	ratón	BD pharmingen
CD47	CD47	B6H12	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD49d	VLA-4	9F10	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD5	CD5	UCHT2	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD54	ICAM-1	HA58	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD56	CD56	B159	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD62L	L-selectina	Dreg56	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD69	CD69	FNG50	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD7	CD7	M-T701	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD8	CD8	RPA-T8	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD8	CD8	HIT8a	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen

ES 2 374 783 T3

CD80	B7,1	L307,4	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD83	CD83	HB15e	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD86	B7,2	FUN-1	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD95	Fas	DX2	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD97	CD97	VIM3b	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD98	CD98	UM7F8	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CXCR6	CXCR6	56811	IgG2b	PE	ratón	R&D systems
GITR	GITR	policlonal	IgG	-	cabra	R&D systems
HLA-DR	HLA-DR	G46,6(L243)	IgG2a	FITC	ratón	BD pharmingen
ICOS	ICOS	C394,4A	IgG	PE	ratón	clinisciences
IFN $\gamma$ RII	IFN $\gamma$ RII	policlonal	IgG	-	cabra	R&D systems
IL-18R $\alpha$	IL-18R $\alpha$	70625	IgG1	PE	ratón	R&D systems
KIR-NKAT2	KIR-NKAT2	DX27	IgG2a	FITC	ratón	BD pharmingen
PD1	PD1	J116	IgG1	PE	ratón	clinisciences
Estreptavidina	Estreptavidina	-	-	APC -	-	BD pharmingen
TCR $\alpha\beta$	TCR $\alpha\beta$	T10B9.A1-31	IgM	FITC	ratón	BD pharmingen
TGFR1I	TGFR1I	25508	IgG1	FITC	ratón	R&D systems

**Tabla 4: Análisis de correlación**

Genes	Correlación	95% CI	Valor de P
CD8A - TBX21	0,902	(0,848 / 0,938)	<0,0001
CD3Z - CD8A	0,797	(0,694 / 0,868)	<0,0001
CD3Z - TBX21	0,784	(0,676 / 0,859)	<0,0001
B7H3 - TGFB1	0,760	(0,643 / 0,843)	<0,0001
IFNG - TBX21	0,759	(0,635 / 0,844)	<0,0001
CD4 - CD8A	0,738	(0,612 / 0,828)	<0,0001
CD8A - IFNG	0,728	(0,592 / 0,823)	<0,0001
CD4 - TBX21	0,727	(0,597 / 0,820)	<0,0001
CD3Z - CD4	0,719	(0,586 / 0,815)	<0,0001
CD4 - TGFB1	0,678	(0,531 / 0,786)	<0,0001
CD8A - GNLY	0,671	(0,522 / 0,781)	<0,0001
IFNG - IRF1	0,664	(0,505 / 0,779)	<0,0001
GNLY - IFNG	0,663	(0,505 / 0,779)	<0,0001
IRF1 - TBX21	0,656	(0,502 / 0,770)	<0,0001
IL8 - PTGS2	0,643	(0,485 / 0,761)	<0,0001
GNLY - TBX21	0,627	(0,464 / 0,749)	<0,0001
CD3Z - IRF1	0,617	(0,451 / 0,742)	<0,0001
CD8A - IRF1	0,617	(0,451 / 0,742)	<0,0001
CD3Z - GNLY	0,613	(0,446 / 0,739)	<0,0001
CD3Z - IFNG	0,605	(0,428 / 0,737)	<0,0001
GZMB - IFNG	0,604	(0,422 / 0,739)	<0,0001
GNLY - IRF1	0,597	(0,425 / 0,727)	<0,0001
IL10 - TGFB1	0,596	(0,424 / 0,726)	<0,0001
CD8A - IL10	0,586	(0,411 / 0,719)	<0,0001
CD4 - IL10	0,583	(0,408 / 0,717)	<0,0001
CD8A - GZMB	0,574	(0,392 / 0,713)	<0,0001
GZMB - TBX21	0,548	(0,359 / 0,693)	<0,0001
CD3Z - GZMB	0,538	(0,347 / 0,687)	<0,0001
CD4 - IRF1	0,520	(0,330 / 0,670)	<0,0001
GNLY - GZMB,	0,520	(0,324 / 0,673)	<0,0001
B7H3 - IL10	0,517	(0,326 / 0,668)	<0,0001
CD4 - GZMB	0,507	(0,309 / 0,663)	<0,0001
GZMB - IRF1	0,504	(0,305 / 0,661)	<0,0001
IL10 - TBX21	0,494	(0,297 / 0,650)	<0,0001
CD4 - IFNG	0,493	(0,289 / 0,655)	<0,0001
B7H3 - CD4	0,475	(0,275 / 0,636)	<0,0001
CD8A - TGFB1	0,466	(0,264 / 0,628)	<0,0001
CD3Z - IL10	0,459	(0,255 / 0,623)	<0,0001
CD4 - GNLY	0,454	(0,250 / 0,619)	<0,0001
TBX21 - TGFB1	0,433	(0,226 / 0,603)	0,0001
GNLY - IL10	0,413	(0,202 / 0,587)	0,0002
CD3Z - TGFB1	0,398	(0,185 / 0,575)	0,0004
IFNG - IL10	0,390	(0,168 / 0,575)	0,0009
B7H3 - VEGF	0,371	(0,155 / 0,554)	0,0011

ES 2 374 783 T3

B7H3 - IL8	0,370	(0,152 / 0,553)	0,0012
CEACAM1 - IRF1	0,359	(0,140 / 0,544)	0,0017
IL10 - IRF1	0,355	(0,136 / 0,541)	0,0019
IRF1 - VEGF	0,351	(0,131 / 0,538)	0,0022
B7H3 - MMP7	0,335	(0,112 / 0,526)	0,0038
B7H3 - PTGS2	0,333	(0,112 / 0,523)	0,0037
IRF1 - TGFB1	0,333	(0,111 / 0,523)	0,0038
IL10 - PTGS2	0,325	(0,103 / 0,517)	0,0047
GZMB - IL10	0,320	(0,092 / 0,517)	0,0066
CD4 - VEGF	0,316	(0,093 / 0,509)	0,0062
GZMB - TGFB1	0,306	(0,076 / 0,504)	0,0097
IL8 - MMP7	0,295	(0,068 / 0,493)	0,0116
TBX21 - VEGF	0,294	(0,069 / 0,491)	0,0113
CEACAM1 - VEGF	0,292	(0,066 / 0,489)	0,0119
TGFB1 - VEGF	0,290	(0,065 / 0,488)	0,0124
BIRC5 - IRF1	0,265	(0,037 / 0,466)	0,0234
GNLY - TGFB1	0,257	(0,029 / 0,460)	0,0278
PTGS2 - TGFB1	0,257	(0,028 / 0,459)	0,0281
MMP7 - VEGF	0,251	(0,020 / 0,456)	0,0332
IFNG - TGFB1	0,239	(0,001 / 0,452)	0,0492
IRF1 - TNFRSF10A	0,238	(0,009 / 0,444)	0,042
BIRC5 - PTGS2	0,224	(-0,007 / 0,431)	0,0571
IL8 - TGFB1	0,223	(-0,007 / 0,431)	0,0578
B7H3 - IRF1	0,222	(-0,009 / 0,430)	0,059
MMP7 - TGFB1	0,221	(-0,012 / 0,430)	0,0622
B7H3 - CD8A	0,216	(-0,015 / 0,425)	0,0664
GZMB - VEGF	0,209	(-0,028 / 0,423)	0,0829
CD3Z - VEGF	0,207	(-0,024 / 0,418)	0,0784
IFNG - IL8	0,206	(-0,034 / 0,424)	0,0922
CD3Z - CEACAM1	0,204	(-0,027 / 0,415)	0,0836
CD8A - VEGF	0,203	(-0,028 / 0,414)	0,0846
IL10 - IL8	0,196	(-0,036 / 0,408)	0,0967
BIRC5 - IFNG	0,195	(-0,045 / 0,414)	0,111
GZMB-IL8	0,194	(-0,043 / 0,410)	0,1087
B7H3 - TBX21	0,191	(-0,041 / 0,403)	0,1056
B7H3 - CD3Z	0,188	(-0,044 / 0,401)	0,1109
CD4 - MMP7	0,181	(-0,052 / 0,397)	0,1274
CEACAM1 - TBX21	0,174	(-0,059 / 0,388)	0,1416
GNLY - PTGS2	0,173	(-0,059 / 0,388)	0,1435
MMP7 - PTGS2	0,162	(-0,073 / 0,379)	0,1748
BIRC5 - GZMB	0,161	(-0,077 / 0,381)	0,1842
B7H3 - GZMB	0,160	(-0,078 / 0,381)	0,1862
CD4 - TNFRSF10A	0,160	(-0,072 / 0,377)	0,176
IFNG - TNFRSF10A	0,156	(-0,086 / 0,380)	0,2048
GNLY - TNFRSF10A	0,153	(-0,079 / 0,370)	0,1957
TBX21 - TNFRSF10A	0,147	(-0,086 / 0,365)	0,2157
BIRC5 - IL8	0,145	(-0,088 / 0,363)	0,2225
TNFRSF10A - VEGF	0,136	(-0,097 / 0,355)	0,2518
B7H3 - TNFRSF10A	0,135	(-0,098 / 0,355)	0,2541
CD8A - TNFRSF10A	0,134	(-0,099 / 0,354)	0,2577
GZMB - PTGS2	0,134	(-0,104 / 0,358)	0,2702
CEACAM1 - TNFRSF10A	0,133	(-0,100 / 0,352)	0,2641
B7H3 - IFNG	0,126	(-0,116 / 0,353)	0,3088
IFNG - VEGF	0,123	(-0,119 / 0,351)	0,3177
CD3Z - TNFRSF10A	0,117	(-0,117 / 0,338)	0,3269
BIRC5 - CEACAM1	0,109	(-0,124 / 0,331)	0,3597
GNLY - IL8	0,106	(-0,128 / 0,328)	0,3754
IFNG - PTGS2	0,106	(-0,136 / 0,336)	0,3903
GZMB - TNFRSF10A	0,104	(-0,135 / 0,331)	0,3942
CEACAM1 - IFNG	0,093	(-0,148 / 0,325)	0,4506
B7H3 - GNLY	0,090	(-0,143 / 0,313)	0,4514
BIRC5 - GNLY	0,088	(-0,145 / 0,311)	0,4628
CEACAM1 - GZMB	0,087	(-0,151 / 0,316)	0,4736
CEACAM1 - GNLY	0,082	(-0,151 / 0,306)	0,4911
IL10 - MMP7	0,081	(-0,153 / 0,307)	0,499
IL8 - VEGF	0,078	(-0,155 / 0,303)	0,5132

BIRC5 - MMP7	0,077	(-0,157 / 0,304 )	0,5192
CD8A - CEACAM1	0,076	(-0,157 / 0,3021)	0,5232
TGFB1 - TNFRSF10A	0,071	(-0,162 / 0,296)	0,5538
BIRC5 - VEGF	0,065	(-0,168 / 0,291)	0,5855
IRF1 - PTGS2	0,064	(-0,169 / 0,289)	0,594
IRF1 - MMP7	0,063	(-0,171 / 0,290)	0,6012
PTGS2 - VEGF	0,063	(-0,170 / 0,289)	0,5995
CEACAM1 - MMP7	0,035	(-0,199 / 0,264)	0,7742
IL10 - TNFRSF10A	0,032	(-0,199 / 0,261)	0,786
IL8 - IRF1	0,021	(-0,211 / 0,249)	0,8633
CD4 - CEACAM1	0,014	(-0,217 / 0,243)	0,9088
BIRC5 - TBX21	0,013	(-0,218 / 0,242)	0,9124
IFNG - MMP7	0,009	(-0,231 / 0,249)	0,9402
CD3Z - MMP7	0,005	(-0,227 / 0,236)	0,968
CEACAM1 - PTGS2	-0,001	(-0,231 / 0,229)	0,9923
IL10 - VEGF	-0,004	(-0,234 / 0,226)	0,9721
CD8A-PTGS2	-0,008	(-0,238 / 0,222)	0,9448
GZMB - MMP7	-0,008	(-0,244 / 0,229)	0,947
IL8 - TNFRSF10A	-0,017	(-0,246 / 0,214)	0,8892
GNLY - VEGF	-0,023	(-0,252 / 0,208)	0,8484
PTGS2 - TBX21	-0,036	(-0,264 / 0,196)	0,7631
MMP7 - TBX21	-0,049	(-0,277 / 0,185)	0,6844
BIRC5 - CD8A	-0,051	(-0,278 / 0,181)	0,6675
CD3Z - PTGS2	-0,051	(-0,278 / 0,181)	0,6683
BIRC5 - CD3Z	-0,054	(-0,280 / 0,179)	0,6528
B7H3 - CEACAM1	-0,063	(-0,289 / 0,169)	0,5972
PTGS2 - TNFRSF10A	-0,066	(-0,292 / 0,166)	0,5782
CD8A - MMP7	-0,086	(-0,311 / 0,149)	0,4739
B7H3-BIRC5	-0,095	(-0,318 / 0,138)	0,4236
CD4 - IL8	-0,101	(-0,323 / 0,133)	0,3987
CEACAM1 - IL8	-0,101	(-0,323 / 0,132)	0,3979
CD4 - PTGS2	-0,111	(-0,333 / 0,122)	0,3494
CEACAM1 - IL10	-0,111	(-0,333 / 0,122)	0,3495
IL8 - TBX21	-0,131	(-0,350 / 0,102)	0,2714
BIRC5 - IL10	-0,134	(-0,353 / 0,099)	0,2583
CD8A - IL8	-0,163	(-0,378 / 0,070)	0,1701
MMP7 - TNFRSF10A	-0,217	(-0,427 / 0,015)	0,0668
BIRC5 - TGFB1	-0,218	(-0,426 / 0,013)	0,0643
BIRC5 - CD4	-0,231	(-0,438 / -0,001)	0,0489
CEACAM1 -TGFB1	-0,239	(-0,445 / -0,010)	0,0413
GNLY - MMP7	-0,241	(-0,448 / -0,010)	0,0408
BIRC5-TNFRSF10A	-0,243	(-0,448 / -0,014)	0,0378
CD3Z - IL8	-0,258	(-0,461 / -0,030)	0,0272

Tabla 5

<b>Tabla 5</b>		Supervivencia libre de enfermedad (DFS)					Valor de P
		No. de pacientes	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	Media de meses	
GZM-CT	Hi	163	57,66	46,62	41,71	36,5	1,66 E-06
	Lo	191	35,93	26,04	21,87	12,4	
GZM-IM	Hi	175	56,00	44,57	38,28	36,6	9,42 E-07
	Lo	129	38,76	31,00	26,36	12,9	
CD45RO-CT	Hi	294	51,70	40,81	36,05	27,4	1,43 E-08
	Lo	67	20,58	11,76	8,82	2,4	
CD45RO-IM	Hi	190	56,31	46,84	42,10	42,0	2,16 E-06
	Lo	178	35,19	24,58	20,11	12,4	
CD8-CT	Hi	227	54,18	43,17	38,32	31,1	3,68 E-08
	Lo	132	27,81	20,30	16,54	5,9	
GD8-IM							1,53 E-04

<b>Tabla 5</b>		Supervivencia libre de enfermedad (DFS)					Valor de <i>P</i>
		No. de pacientes	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	Media de meses	
CD3-CT	Hi	129	60,93	50,78	45,31	49,2	3,90 E-08
	Lo	185	40,64	29,41	24,59	16,6	
CD3-IM	Hi	192	60,41	48,95	43,75	45,9	3,37 E-08
	Lo	165	28,91	19,87	16,26	5,9	
GZM-CT/IM	Hi	178	59,77	49,72	44,69	47,8	3,67 E-07
	Lo	175	35,42	24,57	20,00	12,9	
CD45RO-CT/IM	HiHi	95	62,74	51,96	46,07	51,4	4,57 E-10
	LoLo	80	39,43	29,57	25,35	12,9	
CD8-CT/IM	HiHi	151	60,26	52,31	47,68	51,6	4,61 E-08
	LoLo	41	16,66	11,90	9,52	1,8	
CD3-CT/IM	HiHi	96	65,62	55,20	50,00	59,2	5,20 E-11
	LoLo	93	30,85	21,27	17,02	5,9	
	HiHi	109	69,72	61,46	55,04	66,2	
	LoLo	93	27,95	19,35	13,97	5,9	

**Tabla 6**

<b>Tabla 6</b>		Supervivencia total (OS)					Valor de <i>P</i>
		No. de pacientes	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	Media de meses	
GZM-CT	Hi	163	62,58	50,31	43,56	50,2	8,18 E-07
	Lo	191	48,17	32,46	25,13	21,2	
GZM-IM	Hi	175	61,14	48,57	39,43	45,3	1,27 E-02
	Lo	129	55,04	37,21	29,46	29,1	
CD45RO-CT	Hi	294	57,82	45,92	38,78	34,9	3,14 E-09
	Lo	67	37,31	16,42	11,94	16,4	
CD45RO-IM	Hi	190	62,63	50,53	44,21	49,2	7,68 E-04
	Lo	178	46,63	30,90	23,03	19,8	
CD8-CT	Hi	227	59,47	48,02	40,53	42,5	2,66 E-07
	Lo	132	43,94	25,76	19,70	18,7	
GD8-IM	Hi	129	65,63	53,91	46,88	54,8	1,22 E-03
	Lo	185	54,84	37,10	28,50	29,6	
CD3-CT	Hi	192	65,63	55,21	47,40	57,8	7,86 E-08
	Lo	165	42,42	24,24	18,18	18,6	
CD3-IM	Hi	178	64,04	52,25	46,07	52,6	9,08 E-05
	Lo	175	48,57	32,57	24,00	21,4	
GZM-CT/IM	HiHi	95	68,42	55,79	47,37	58,3	1,50 E-03
	LoLo	80	58,75	37,50	28,75	32,0	
CD45RO-CT/IM	HiHi	151	64,24	54,97	49,67	59,6	4,12 E-07
	LoLo	41	39,02	14,63	12,20	17,7	
CD8-CT/IM	HiHi	96	69,79	59,38	52,08	61,2	1,21 E-06
	LoLo	93	49,46	29,03	21,51	22,3	
CD3-CT/IM						5,07 E-08	

<b>Tabla 6</b>	Supervivencia total (OS)					Valor de <i>P</i>
	No. de pacientes	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	Media de meses	
HiHi	109	72,48	64,22	55,96	63,9	
LoLo	93	45,16	25,81	16,13	19,3	

**Tabla 7: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para la DFS**

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	<i>P</i>
Estadio T	1,780	(1,348-2,362)	5,2 E-05
Estadio N	2,130	(1,481-3,060)	4,5 E-05
Diferenciación	1,110	(0,777-1,584)	5,7 E-01
Patrones de CD3 <sub>CT</sub> /CD3 <sub>IM</sub>	0,570	(0,450-0,721)	2,8 E-06

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	<i>P</i>
Estadio T	1,700	(1,275-2,268)	3,1 E-04
Estadio N	2,117	(1,449-3,093)	1,1 E-04
Diferenciación	0,969	(0,676-1,389)	8,6 E-01
Patrones de CD8 <sub>CT</sub> /CD8 <sub>IM</sub>	0,614	(0,480-0,786)	1,1 E-04

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	<i>P</i>
Estadio T	1,880	(1,441-2,452)	3,3 E-06
Estadio N	2,298	(1,599-3,301)	6,8 E-06
Diferenciación	1,035	(0,736-1,457)	8,4 E-01
Patrones de CD45RO <sub>CT</sub> /CD45RO <sub>IM</sub>	0,564	(0,439-0,723)	6,2 E-06

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	<i>P</i>
Estadio T	1,777	(1,334-2,37)	8,5 E-05
Estadio N	2,449	8,3 E-06	(1,651-3,63)
Diferenciación	1,049	(0,707-1,56)	8,1 E-01
Patrones de GZMB <sub>CT</sub> /GZMB <sub>IM</sub>	0,591	(0,459-0,76)	4,3 E-05

\*M estratificada

5

**Tabla 7: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para la OS**

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	<i>P</i>
Estadio T	1,335	(1,052-1,693)	1,7 E-02
Estadio N	1,657	(2,989-6,595)	3,6 E-03
Estadio M	4,440	(1,179-2,328)	1,5 E-13
Diferenciación	1,058	(0,748-1,496)	7,5 E-01
Patrones de CD3 <sub>CT</sub> /CD3 <sub>IM</sub>	0,726	(0,587-0,897)	3,0 E-03

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	<i>P</i>
Estadio T	1,376	(1,070-1,769)	1,3 E-02
Estadio N	1,575	(1,100-2,254)	1,3 E-02
Estadio M	4,467	(2,966-6,729)	8,0 E-13
Diferenciación	0,966	(0,679-1,375)	8,5 E-01
Patrones de CD8 <sub>CT</sub> /CD8 <sub>IM</sub>	0,712	(0,571-0,888)	2,5 E-03

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	<i>P</i>
Estadio T	1,396	(1,114-1,750)	3,7 E-03
Estadio N	1,684	(1,204-2,355)	2,3 E-03
Estadio M	4,160	(2,805-6,170)	1,4 E-12
Diferenciación	0,935	(0,677-1,292)	6,9 E-01
Patrones de CD45RO <sub>CT</sub> /CD45RO <sub>IM</sub>	0,703	(0,558-0,885)	2,8 E-03

ES 2 374 783 T3

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	P
Estadio T	1,360	(1,071-1,73)	1,2 E-02
Estadio N	1,710	(1,188-2,46)	3,9 E-03
Estadio M	4,392	(2,866-6,73)	1,1 E-11
Diferenciación	1,094	(0,752-1,59)	6,4 E-01
Patrones de GZMB <sub>CT</sub> /GZMB <sub>IM</sub>	0,905	(0,722-1,14)	3,9 E-01

Tabla 8

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. relapso	Valor de p logRank	LOLO frente a combinación	HiHi frente a combinación
IRF1 GNLY	1	1	25	27	9	0,00000637	1,26E-04	1
IRF1 GNLY	0	0	71,42857143	10	25	0,00000637	1	1,26E-04
PDCD1LG1 GNLY	1	1	32,43243243	25	12	0,00001957	3,89E-04	1
PDCD1LG1 GNLY	0	0	75	9	27	0,00001957	1	3,89E-04
PDCD1LG2 IRF1	1	1	25,71428571	26	9	0,00003780	2,71E-04	1
PDCD1LG2 IRF1	0	0	70,58823529	10	24	0,00003780	1	2,71E-04
PDCD1LG1 IRF1	1	1	30,23255814	30	13	0,00003942	4,85E-04	1
PDCD1LG1 IRF1	0	0	69,04761905	13	29	0,00003942	1	4,85E-04
PDCD1LG1 GNLY	0	1	40	9	6	0,00005604	0,02553386	0,74929474
PDCD1LG1 GNLY	1	0	40	9	6	0,00005604	0,02553386	0,74929474
IRF1 IL8	1	1	26,66666667	22	8	0,00008324	6,56E-04	1
IRF1 IL8	0	0	72,4137931	8	21	0,00008324	1	6,56E-04
ICOS GNLY	0	1	33,33333333	12	6	0,00009669	0,00648539	1
ICOS GNLY	1	0	47,36842105	10	9	0,00009669	0,069525	0,55885623
ICOS GNLY	1	1	35,29411765	22	12	0,00009903	0,00148605	1
ICOS GNLY	0	0	75	8	24	0,00009903	1	0,00148605
TNFRSF6B IRF1	1	1	27,27272727	24	9	0,00010448	4,71E-04	1
TNFRSF6B IRF1	0	0	71,875	9	23	0,00010448	1	4,71E-04
PDCD1LG2 GNLY	1	1	28,57142857	25	10	0,00010559	7,00E-04	1
PDCD1LG2 GNLY	0	0	70,58823529	10	24	0,00010559	1	7,00E-04

(continuación)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. relapso	Valor de p logRank	LOLO frente a combinación	HiHi frente a combinación
IRTA2 GNLY	1	1	26,92307692	19	7	0,00010819	7,02E-04	1
IRTA2 GNLY	0	0	76	6	19	0,00010819	1	7,02E-04
IRF1 GNLY	1	0	50	8	8	0,00013118	0,20696761	0,11061678
IRF1 GNLY	0	1	56,25	7	9	0,00013118	0,34514115	0,05584765
STAT1 PDCD1LG1	1	1	31,03448276	20	9	0,00015364	0,00411737	1
STAT1 PDCD1LG1	0	0	70	9	21	0,00015364	1	0,00411737
STAT1 IRF1	1	1	25	21	7	0,00017203	0,00136119	1
STAT1 IRF1	0	0	68,96551724	9	20	0,00017203	1	0,00136119
GATA3 CDBA	0	1	69,23076923	4	9	0,00018062	0,3355095	0,02232563
GATA3 CD8A	1	0	84,61538462	2	11	0,00018062	0,04841363	0,00103488
GNLY CXCL9	1	1	31,42857143	24	11	0,00018108	0,00167576	1
GNLY CXCL9	0	0	70,58823529	10	24	0,00018108	1	0,00167576
TBX21 GNLY	1	1	30,3030303	23	10	0,00021196	4,58E-04	1
TBX21 GNLY	0	0	75	8	24	0,00021196	1	4,58E-04
TNFRSF6B PDCD1LG1	1	1	31,25	22	10	0,00021333	9,67E-04	1
TNFRSF6B PDCD1LG1	0	0	74,19354839	8	23	0,00021333	1	9,67E-04
IRF1 ICOS	1	1	27,77777778	26	10	0,00021448	0,00164508	1
IRF1 ICOS	0	0	67,64705882	11	23	0,00021448	1	0,00164508
IL8 CD4	1	0	33,33333333	18	9	0,00021968	3,65E-04	0,39718035
IL8 CD4	0	1	37,93103448	18	11	0,00021968	5,91E-04	0,58270625
TBX21 IRF1	1	1	25	27	9	0,00022445	3,28E-04	1
TBX21 IRF1	0	0	68,57142857	11	24	0,00022445	1	3,28E-04

(continuación)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. relapso	Valor de p logRank	LOLO frente a combinación	HiHi frente a combinación
PDCD1LG2 IRF1	0	1	47,05882353	9	8	0,00022793	0,13051259	0,20662362
PDCD1LG2 IRF1	1	0	58,82352941	7	10	0,00022793	0,53057151	0,03154075
GNLY CD4	1	0	22,22222222	14	4	0,00023630	2,62E-04	0,22728471
GNLY CD4	0	1	45	11	9	0,00023630	0,03419617	1
MMP7 IRF1	1	1	25	21	7	0,00025303	4,06E-04	1
MMP7 IRF1	0	0	74,07407407	7	20	0,00025303	1	4,06E-04
TNF PDCD1LG1	0	1	29,41176471	12	5	0,00027386	0,00205134	0,75798695
TNF PDCD1LG1	1	0	41,17647059	10	7	0,00027386	0,02760881	1
TNFRSF6B GNLY	1	1	30,3030303	23	10	0,00027678	0,00119011	1
TNFRSF6B GNLY	0	0	71,875	9	23	0,00027678	1	0,00119011
TGFB1 IRF1	1	1	29,03225806	22	9	0,00028329	8,07E-04	1
TGFB1 IRF1	0	0	73,33333333	8	22	0,00028329	1	8,07E-04
PDCD1LG2	1	1	31,70731707	28	13	0,00031033	0,00180905	1
PDCD1LG1	0	0	67,5	13	27	0,00031033	1	0,00180905
TGFB1 IRF1	0	1	38,0952381	13	8	0,00031619	0,02015558	0,5556315
TGFB1 IRP1	1	0	57,14285714	9	12	0,00031619	0,24654453	0,05090421
TBX21	1	1	27,77777778	26	10	0,00033814	8,35E-04	1
PDCD1LG1	0	0	68,57142857	11	24	0,00033814	1	8,35E-04
TNF GNLY	1	1	34,48275862	19	10	0,00033997	4,10E-04	1
TNF GNLY	0	0	82,14285714	5	23	0,00033997	1	4,10E-04
PDCD1LG1 IRF1	0	1	44,44444444	5	4	0,00035285	0,24937129	0,45141556
PPCD1LG1 IRF1	1	0	55,55555556	4	5	0,00035285	0,45891075	0,24655356

(continuación)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. relapso	Valor de p logRank	LOLO frente a combinación	HiHi frente a combinación
IRF1 CXCL9	1	1	30	28	12	0,00036339	0,00157043	1
IRF1 CXCL9	0	0	66,66666667	13	26	0,00036339	1	0,00157043
TBX21 GNLY	0	1	42,10526316	11	8	0,00037639	0,03467136	0,54586516
TBX21 GNLY	1	0	47,36842105	10	9	0,00037639	0,069525	0,24596116
PTGS2 IRF1	1	1	30,76923077	18	8	0,00038160	0,00500586	1
PTGS2 IRF1	0	0	72	7	18	0,00038160	1	0,00500586
IRF1 ART1	1	0	20	8	2	0,00038775	0,01498501	0,6043956
IRF1 ART1	0	1	66,66666667	3	6	0,00038775	0,4965035	0,31468531
INDO GNLY	1	1	35,29411765	22	12	0,00039262	0,00707271	1
INDO GNLY	0	0	69,6969697	10	23	0,00039262	1	0,00707271
PDCD1LG1 ICOS	1	1	31,57894737	26	12	0,00039662	0,00489333	1
PDCD1LG1 ICOS	0	0	66,66666667	12	24	0,00039662	1	0,00489333
PDCD1LG2 GNLY	0	1	47,05882353	9	8	0,00039685	0,13051259	0,22435124
PDCD1LG2 GNLY	1	0	52,94117647	8	9	0,00039685	0,23279471	0,12613911
TNFRSF6B TBX21	1	1	24	19	6	0,00041496	5,44E-04	1
TNFRSF6B TBX21	0	0	75	6	18	0,00041496	1	5,44E-04
PDCD1 IRF1	1	1	25,64102564	29	10	0,00043410	5,64E-04	1
PDCD1 IRF1	0	0	65,78947368	13	25	0,00043410	1	5,64E-04
IRF1 IFNG	1	1	27,02702703	27	10	0,00043964	7,09E-04	1
IRF1 IFNG	0	0	68,75	10	22	0,00043964	1	7,09E-04
TNF GNLY	0	1	34,7826087	15	8	0,00044402	0,00122608	1
TNF GNLY	1	0	43,47826087	13	10	0,00044402	0,00736128	0,57364958

(continuación)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. relapso	Valor de p logRank	LOLO frente a combinación	HiHi frente a combinación
IL8 GNLY	1	1	31,03448276	20	9	0,00046499	0,00136119	1
IL8 GNLY	0	0	75	7	21	0,00046499	1	0,00136119
TNFRSF6B IFNG	1	1	25	21	7	0,00046651	9,10E-04	1
TNFRSF6B IFNG	0	0	72	7	18	0,00046651	1	9,10E-04
PDCD1LG1 PDCD1	1	1	27,02702703	27	10	0,00047832	9,77E-04	1
PDCD1LG1 PDCD1	0	0	66,66666667	12	24	0,00047832	1	9,77E-04
IRTA2 GNLY	0	1	42,30769231	15	11	0,00048486	0,0227009	0,3822739
IRTA2 GNLY	1	0	56	11	14	0,00048486	0,23209547	0,04831826
PDCD1LG1 CXCL9	1	1	34,14634146	27	14	0,00050191	0,0038056	1
PDCD1LG1 CXCL9	0	0	67,5	13	27	0,00050191	1	0,0038056
IL8 ICOS	1	1	39,28571429	17	11	0,00050590	0,00668911	1
IL8 ICOS	0	0	76,92307692	6	20	0,00050590	1	0,00668911
TNF IRF1	1	1	31,42857143	24	11	0,00054072	6,84E-04	1
TNF IRF1	0	0	73,52941176	9	25	0,00054072	1	6,84E-04
IL8 ICOS	0	1	40	15	10	0,00055140	0,01074613	1
IL8 ICOS	1	0	41,66666667	14	10	0,00055140	0,01996838	1
IRF1 IL8	1	0	40,90909091	13	9	0,00057567	0,04324338	0,37231571
IRF1 IL8	0	1	59,09090909	9	13	0,00057567	0,37716737	0,02446738
PDCD1 GNLY	1	1	31,42857143	24	11	0,00058024	6,84E-04	1
PDCD1 GNLY	0	0	73,52941176	9	25	0,00058024	1	6,84E-04
TNFRSF6B CXCL9	1	1	32,14285714	19	9	0,00063900	0,00694187	1

(continuación)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. relapso	Valor de p logRank	LOLO frente a combinación	HiHi frente a combinación
TNFRSF6B CXCL9	0	0	71,42857143	8	20	0,00063900	1	0,00694187
GNLY CXCL10	1	1	34,28571429	23	12	0,00064897	0,00374119	1
GNLY CXCL10	0	0	70,58823529	10	24	0,00064897	1	0,00374119
SELL GNLY	1	1	32,14285714	19	9	0,00065255	0,00105233	1
SELL GNLY	0	0	77,77777778	6	21	0,00065255	1	0,00105233
SELL IRF1	1	1	26,66666667	22	8	0,00065555	6,56E-04	1
SELL IRF1	0	0	72,4137931	8	21	0,00065555	1	6,56E-04
MMP7 GNLY	1	1	31,03448276	20	9	0,00067878	0,00136119	1
MMP7 GNLY	0	0	75	7	21	0,00067878	1	0,00136119
PDCD1LG1 EBAG9	1	1	37,93103448	18	11	0,00067896	0,03430795	1
PDCD1LG1 EBAG9	0	0	68,96551724	9	20	0,00067896	1	0,03430795
TGFB1 GNLY	1	1	29,03225806	22	9	0,00071504	0,00204606	1
TGFB1 GNLY	0	0	70	9	21	0,00071504	1	0,00204606
IL18R1 GNLY	1	1	36,36363636	21	12	0,00075372	0,01304077	1
IL18R1 GNLY	0	0	68,75	10	22	0,00075372	1	0,01304077
IFNG GNLY	1	1	28,57142857	25	10	0,00075584	0,00119534	1
IFNG GNLY	0	0	70	9	21	0,00075584	1	0,00119534
TNFRSF6B PDCD1LG2	1	1	26,66666667	22	8	0,00076477	0,00169422	1
TNFRSF6B PDCD1LG2	0	0	68,96551724	9	20	0,00076477	1	0,00169422
TNFRSF6B PDCD1	1	1	29,62962963	19	8	0,00081540	8,73E-04	1

(continuación)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. relapso	Valor de p logRank	LOLO frente a combinación	HiHi frente a combinación
TNFRSF6B PDCD1	0	0	76,92307692	6	20	0,00081540	1	8,73E-04
INDO GNLY	0	1	33,33333333	12	6	0,00081585	0,01830705	1
INDO GNLY	1	0	55,55555556	8	10	0,00081585	0,36715926	0,23851585
TBX21 IL8	1	0	39,28571429	17	11	0,00081677	0,00372377	0,77529553
TBX21 IL8	0	1	46,42857143	15	13	0,00081677	0,00995396	0,40283859
TNFRSF8 IRF1	1	1	25,80645161	23	8	0,00082357	0,00458134	1
FNFRSF8 IRF1	0	0	63,33333333	11	19	0,00082357	1	0,00458134
TNF PDCD1LG1	1	1	37,14285714	22	13	0,00083836	0,00148511	1
TNF PDCD1LG1	0	0	76,47058824	8	26	0,00083836	1	0,00148511
IRF1 EBAG9	1	1	35,71428571	18	10	0,00085969	0,01512429	1
IRF1 EBAG9	0	0	17,42857143	8	20	0,00085969	1	0,01512429
PDCD1LG1 IL18R1	1	1	37,14285714	22	13	0,00087042	0,01603268	1
PDCD1LG1 IL18R1	0	0	67,64705882	11	23	0,00087042	1	0,01603268
IRTA2 IRF1	1	1	33,33333333	22	11	0,00087051	0,00113427	1
IRTA2 IRF1	0	0	75	8	24	0,00087051	1	0,00113427
IRF1 IL18R1	1	1	33,33333333	22	11	0,00087233	0,0063032	1
IRF1 IL18R1	0	0	68,75	10	22	0,00087233	1	0,0063032
LAT IL8	0	1	34,48275862	19	10	0,00091759	0,00148805	0,39963556
LAT IL8	1	0	41,37931034	17	12	0,00091759	0,00461551	0,77997357
SELL GNLY	0	1	37,5	15	9	0,00095410	0,00482852	0,77381721
SELL GNLY	1	0	50	12	12	0,00095410	0,04632871	0,25940735

Tabla 9

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
18s		control endógeno	control endógeno	X03205
ACE	ACE	Tumor	DCP, ACE1, DCP1, CD143, MGC26566	NM_000789
ACTB	Beta actina	control endógeno	control endógeno	NM_003234
AGTR1	receptores de angiotensina II, tipo 1	angiogénesis	AT1, AG2S, AT1B, AT2R1, HAT1R, AGTR1A, AGTR1B, AT2R1A, AT2R1B	NM_031850. 1, NM_000685. 3
AGTR2	receptor de angiotensina II, tipo 2	angiogénesis	AT2	NM_000686
APC				NM_000038
APOA1	apolipoproteína A-I	vía MHC	presente sobre células turn y módulo cytotox, interacción TCRg9d2	NM_000039
ARF1	señalización p53	supresor tumoral		NM_001658
AXIN1	Axin	Axin		NM_181050  NM_003502
BAX	BAX	Vía de Apoptosis		NM_138763, NM_138765, NM_004324, NM_138761
BCL2	BCL2	Vía de apoptosis		NM_000633
BCL2L1	BCL-XL	Vía de apoptosis		NM_001191
CXCR5		Vía de quimioquina		NM_001716
BMP2	BMP2	Vía TGF	Proteína 8a morfogénica ósea	NM_001200
BRCA1				NM_007294  NM_007295  NM_007296  NM_007297  NM_007298  NM_007299  NM_007300  NM_007301  NM_007302  NM_007303  NM_007304  NM_007305  NM_007306

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
BTLA	BTLA	Inmunidad adaptativa	BandT asociado a linfocitos	NM_181780
C3	C3	C3		NM_000064
CASP3	apoptosis	apoptosis		NM_004346
CASP9	caspasa 9, ap peptidasa, cisteína hCG25367 relacionada con apoptosis Anotación Celera de genes			NM_001229.2 NM_001229
CCL1	CCL1	vía de quimioquina	Quimioquina (C-C motivo) ligando 1	NM_002981
CCL11	Eotaxin	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 11	NM_002986
CCL13	MCP-4	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 13	NM_005408
CCL16	HCC-4	vía de quimioquina	Quimioquinas y receptores CC	NM_004590
CCL17	TARC	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 17	NM_002987
CCL18	PARC	vía de quimioquina	Quimioquinas y receptores CC	NM_002988
CCL19	Mip-3c, MIP-3 beta	vía de quimioquina	SCYA19	NM_006274
CCL2	MCP-1	vía de quimioquina	SCYA2	NM_002982
CCL20	MIP-3 alfa	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 20	NM_004591
CCL21	6Cquina	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 21	NM_002989
CCL22	CCR4 ligando, MDC, T-reg spec	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 22	NM_002990
CCL23	MPIF-1	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 23	NM_145898  NM_005064
CCL24	Eotaxin-2	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 24	NM_002991
CCL25	TECK	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 25	NM_148888, NM_005624
CCL26	Eotaxin-3	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 26	NM_006072
CCL27	CTACK	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 27	NM_006664
CCL28	CCL28	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 28	NM_019846  NM_148672
CCL3	Mip-la	vía de quimioquina	SCYA3	NM_002983
CCL5	Rantes	vía de quimioquina	SCYA5	NM_002985
CCL7	MCP-3	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo	NM_006273

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
			C-C) ligando 7	
CCL8	MCP-2	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 8	NM_005623
CCNB1		ciclo celular		NM_031966
CCND1		ciclo celular		NM_053056
CCNE1		ciclo celular		NM_001238  NM_057182
CCR1		vía de quimioquina	Quimioquinas y receptores CC	NM_001295
CCR10	CCR10	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) receptor 10	NM_016602
CCR2	CCR2	vía de quimioquina		NM_000647
CCR3	CCR3	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) receptor 3	NM_178329  NM_001837
CCR4	CCR4	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) receptor 4	NM_005508
CCR5	CCR5	vía de quimioquina		NM_000579
CCR6	CCR6	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) receptor 6	NM_031409  NM_004367
CCR7	CCR7	vía de quimioquina		NM_001838
CCR8	CCR8	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) receptor 8	NM_005201
CCR9	CCR9	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) receptor 9	NM_006641
CCRL2	HCR	vía de quimioquina	Quimioquinas y receptores CC	
CD154	CD154(TNFS F5)	Inmunidad adaptativa		NM_000074
CD19	células B	Inmunidad adaptativa		NM_001770
CD1a	CD1A	Inmunidad adaptativa	antígeno CD1A, un polipéptido	NM_001763
CD2	antígeno CD2 (p50), receptor de glóbulo rojo de oveja	Inmunidad adaptativa		NM_001767
CD226	PTA1; DNAM1; DNAM-1; TLISA1 Resumen: CD226 es una glucoproteína ~65 kDa expresada sobre la superficie de células NK, plaquetas, monocitos y un subgrupo de células T.	adhesión, activación		NM_006566

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
	Es miembro de la superfamilia de Ig que contiene 2 dominios similares a Ig del conjunto V y está codificada por un gen sobre el cromosoma humano 18q22.3. CD226 media la adhesión celular a otras células que contienen un ligando no identificado y en entrecruzamiento de CD226 con anticuerpos provoca la activación celular			
CD244	receptor 2B4de células asesinas naturales CD244			NM_016382
PDCD1LG1	B7H1	Inmunidad adaptativa		NM_014143
CD28	CD28	Inmunidad adaptativa		NM_006139
CD34	CD34	CD34		NM_001773
CD36	Receptor I de trombospondina antígeno CD36 (receptor de tipo colágeno)			NM_0010015 47  NM_0010 01548  NM_0 00072
CD38	CD38	Inmunidad adaptativa		NM_001775
CD3E	Antígeno CD3E, polipéptido epsilon (complejo TiT3)	Inmunidad adaptativa		NM_000733
CD3G	Antígeno CD3G, polipéptido gamma (complejo TiT3)	Inmunidad adaptativa		NM_000073
CD3Z	Antígeno CD3Z, polipéptido zeta (complejo TiT3)	Inmunidad adaptativa		NM_000734
CD4	antígeno CD4 (p55)	Inmunidad adaptativa		NM_000616
CD40LG	TNFSF5	Inmunidad adaptativa	CD40L	NM_000074
CD5		Inmunidad adaptativa		NM_014207
CD54	ICAM-1	Inmunidad adaptativa		NM_000201
CD6		Inmunidad adaptativa		NM_006725
CD68	CD68	Inmunidad innata		NM_001251
CD69		Inmunidad adaptativa		NM_001781

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
CLIP	antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo de histocompatibilidad principal, asociado a antígeno de clase II)	vía de MHC		NM_0010251 58  NM_0010 25159  NM_0 04355
CD80	CD80	Inmunidad adaptativa		NM-005191
CD83		Inmunidad adaptativa		NM_004233
SLAMF5	CD84	Inmunidad adaptativa		NM_003874
CD86	CD86	Inmunidad adaptativa		NM_006889
CD8A	CD8	Inmunidad adaptativa		NM_001768. 1
CDH1	Cadherina de tipo 1, E-cadherina (epitelial)	adhesión, metástasis	Émbolo	NM_004360
CDH7	Adhesión	adhesión		NM_004361
CDK2		ciclo celular		NM_052827  NM 001798
CDK4		ciclo celular		NM_000075
CDKN1A	CIP1 p21	mutación y metilación	inhibidor quinasa dependiente de ciclina 1A	(p21, Cip1)
DKN1B	KIP1 p27	mutación y metilación	inhibidor quinasa dependiente de ciclina 1B (p27, Kip1)	NM_004064
CDKN2A	p16INK4a	mutación y metilación	inhibidor quinasa dependiente de ciclina 2A (melanoma, p16, inhibe CDK4)	NM_000077; NM_058195; NM_058197;
CDKN2B	CDKN2B		inhibidor quinasa dependiente de ciclina 28 (p15, inhibe CDK24)	NM_004936
CEACAM1	(CD66a)	Tumor		NM_0010249 12  NM_0017 12
COL4A5	Colágeno IV (COL4A5)	Colágeno IV (COL4A5)		NM_033381. 1, NM_033380. 1, NM_000495. 3
CREBBP		vía de CK	Histona acetiltransferasa	NM_004380
CRLF2	TSLP R	Inmunidad adaptativa		NM_022148  NM_0010122 88
CSF1	Factor 1 estimulador de colonias (macrófago)		CSF-1	NM_000757

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
CSF2	CSF-2		CSF-2	NM_000758
CSF3	CSF-3		CSF-3	NM_000759
CTLA4	CD152	Inmunidad adaptativa	CD152	NM_005214
CTNNB1	beta-catenina vía de wnt de catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88kDa	vía wnt	catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88kDa	NM_001904
CTSC		Inmunidad adaptativa	micromatriz de DNA T	NM_148170. 2  NM_00181 4.2
CX3CL1	Fractalkina	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X3-C) ligando 1	NM_002996
CX3CR1	CX3CR1	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X3-C) receptor 1	NM_001337
CXCL1	GRO alfa	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa)	NM_001511
CXCL10	IP10	quimioquina	SCYB11	NM_001565
CXCL11	ITAC	vía de quimioquina	SCYB11	NM_005409
CXCL12	SDF-1	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor 1 derivado de célula estromal)	NM_199168  NM_000609
CXCL13	BLC	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 13 (quimioataque de célula B ant)	NM_006419
CXCL14	BRAK	vía de quimioquina	Quimioquinas CXC y receptores	NM_004887
CXCL16	ligando CXCR6, Th1	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 16	NM_022059
CXCL2	GRO beta	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 2	NM_002089
CXCL3	GRO gamma	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3	NM_002090
CXCL5	ENA	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 5	NM_002994
CXCL6	GCP-2	vía de quimioquina	quimioquina (C-X-C)	NM_002993

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
			motivo) ligando 6 (proteína 2 quimiotáctica de granulocito)	
CXCL9	MIG	vía de quimioquina	quimioquinas CXC y receptores	NM_002416
CXCR3	CXCR3	vía de quimioquina	GPR9	NM_001504
CXCR4	CXCR4	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) receptor 4	NM_003467
CXCR6	CXCR6	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) receptor 6	NM_006564
CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2		NM_000761
CYP7A1	CYP7A1	CYP7A1		NM_000780
DCC	Eliminado en carcinoma colorrectal, Gen hCG1811785 Anotación Celera	metástasis		NM_005215. 1
DCN	DCN	vía de TGF	Decorina Inh TGF	NM_33503  NM_133504  NM_133505  NM_001920
DEFA6	Defensina alfa 6, sobreexpresión en colon K	Defensa	sobreexpresión en colon K	NM_001926
DICER1	Dicer1, homólogo de Dcr-1 (Drosophila)	vía de MRNA		NM_030621; NM_177438
DKK1		vía de wnt	homólogo 1 de dickkopf (Xenopus laevis)	NM_012242
Dok-1	p62Dok	vía de TCR	expresado por células hematopoyéticas, rol inh prolif T	NM_001381
Dok-2	P56Dok-2, FRIP	vía de TCR	expresado en las células T, rol Inh prolif T	NM_201349  NM_003974
DOK6				NM_152721
DVL1	homólogo de DHS1 (dishevelled)	homólogo de DHS1 (dishevelled)		NM_181870  NM_182779  NM_004421
E2F4	E2F4	vía de TGF	Factor 4 de transcripción de E2F,	NM_001950

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
			unión a p107/p130	
EBI3				NM_005755
ECE1	ECE-1	ECE-1	ECE	NM_001397
ECGF1	metástasis	metástasis		NM_001953
EDN1	endotelina 1, gen hCG37405 Anotación Celera	EDN1,hCG374 05		NM_001955. 2
EGF			Factor de crecimiento epidérmico (betaurogastrona)	NM_001963
EGFR		STRING predicho	receptor del factor de crecimiento epidérmico (homólogo del oncogén de leucemia viral de eritroblasto (v-erbB), aviar)	NM_005228
EIF4E			Factor 4E de iniciación de la traducción eucariota traducción 4E	
CD105	angiogénesis Endoglina	angiogénesis		NM_000118
ENPEP	Glutamil aminopeptidasa (aminopeptidasa A) Gen Gene hCG21423 Anotación Celera	ENPEP, hCG21423		NM_001977. 2
ERBB2				N_0010058 62  NM_0044 48
EREG	epiregulina,Gen hCG14966 Anotación Celera	EREG, hCG14966		N_001432. 1
FCGR3A, FCGR3B	CD16	CD16		NM_000569,NM 000570
FN1	Fibronectina (precursor de F N)	Fibronectina (precursor de F N)	FN, CIG, FINC, LETS	NM_002026. 1, NM_054034. 1
FOXP3	FOXP3	Inmunidad adaptativa	caja forkhead P3	NM_014009
FYN	FYN	TCR vía	FYN oncogén relacionado con SRC, FGR, YES	NM_153047  NM_153048  NM_002037
FZD1	frizzled	frizzled	homólogo 1 Frizzled (Drosophila)	NM_003505
GAPD	GAPDH	control endógeno	control endógeno	NM_002046

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
GLI2		vía de hedgehog miembro de la familia GLI-Kruppel GLI2	Miembro de la familia GLI-Kruppel GLI2	NM_030379  NM_030380  NM_030381  NM_005270
GNLY	Granulisina (GNLY)	vía citotox	519, LAG2, NKG5, LAG-2, D2S69E, TLA519	NM_012483. 1, NM_006433. 2
GOLPH4	Fosforoproteína de golgi 4	Transportador de Golgi	Requerido para el transporte de proteínas desde allí hasta el complejo de Golgi	NM_014498 U55853
GRB2		vía de TCR		NM_203506  NM_002086
GSK3B		vía de wnt	Glucogen sintasa quinasa 3 beta	NM_002093
GSTP1	antioxidante	antioxidante		NM_000852
GUSB	GUSB	control endógeno	control endógeno	NM_000181
GZMA		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADN T	NM_006144. 2
GZMB	granzima B(GZMB)	vía citotox	CCPI, CSPB, CGL- 1, CSP-B, CTLA1	NM_004131
GZMH		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADN T	NM_033423. 2
GZMK	Granzima K (granzima 3; triptasa II), Gen hCG40447 Anotación Celera		micromatriz de ADN T	NM_002104. 1
HLA-B	HLA-B	vía de MHC	complejo de histocompatibilidad principal , clase I, B	NM_005514
HLA-C	HLA-C	vía de MHC	complejo de histocompatibilidad principal, clase I, C	NM_002117
HLA-DMA	HLA-DMA	vía de MHC	complejo de histocompatibilidad principal , clase II, DM alfa	NM_006120
HLA-DMB	HLA-DMB	vía de MHC	complejo de histocompatibilidad principal , clase II, DM beta	NM_002118
HLA-DOA	HLA-DOA	vía de MHC	complejo de	NM_002119

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
			histocompatibilidad principal , clase II, DO alfa	
HLA-DOB	HLA-DOB	vía de MHC	complejo de histocompatibilidad principal , clase II, DO beta	NM_002120
HLA-DPA1	HLA-DPA1	vía de MHC	complejo de histocompatibilidad principal , clase II, DP alfa 1	NM_033554
HLA-DQA2	HLA-DQA2	vía de MHC	complejo de histocompatibilidad principal , clase II, DQ alfa 2	NM_020056
HLA-DRA	HLA-DRA	MHC vía de	HLA-DRA	NM_019111
HLX1	homeo caja 1 similar a H2.0 (Drosophila), Gen hCG25119 Anotación Celera	Th1	Th1	NM_021958. 2
HMOX1	HO-1	HO-1		NM_002133
HRAS	Expresión de niveles altos de V12 HRAS un mutante de HRAS constitutivo y activo (y por lo tanto oncogénico) conduce a una detención del crecimiento prematuro que es similar en muchos aspectos a la detención que se observa cuando las células humanas alcanzan la senescencia replicativa 68.	mutación y metilación	v-Ha-ras Harvey rata sarcoma viral homolog oncogén	NM_176795
HSPB3	Choque térmico 27kDa proteína 3			NM_006308
HUWE1	UREB1, Proteolisis; metabolismo de proteínas y modificación	vía de MHC	ubiquitina, arf, Proteolisis; metabolismo de	NM_031407

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
			proteínas y modificación	
ICAM1	metástasis	metástasis		NM_000201
ICAM-2	CD102	Inmunidad adaptativa		NM_000873
ICOS	ICOS	Inmunidad adaptativa		NM_012092
ID1	inhibidor de unión a DNA 1, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante, gen hCG37143 Anotación Celera	ID1,hCG371 43	firma de metástasis	NM_002165. 2
ifna1	lfna1	vía de interferón	Interferón, alfa 1	NM_024013
ifna17	lfna17	vía de interferón	Interferón, alfa 17	NM_021268
ifna2	lfna2	vía de interferón	interferón, alfa 2	NM_000605
ifna5	lfna5	vía de interferón	interferón, alfa 5	NM_002169
ifna6	lfna6	vía de interferón	interferón, alfa 6	NM_021002
ifna8	lfna8	vía de interferón	interferón, alfa 8	NM_002170
IFNAR1	ifnar1	vía de interferón	Interferón (alfa, beta y omega) receptor 1	NM_000629
IFNAR2	ifnar2	Vía de interferón	interferón (alfa, beta y omega) receptor 2	NM_207584  NM_207585  NM_000874
IFNG	IFN-g	vía de interferón	IFG, IFI	NM_000619
IFNGR1	IFN-gamma R1	vía de interferón		NM_000416
IFNGR2	IFN-gamma R2	vía de interferón		NM_005534
IGF1	factor de crecimiento 1 similar a insulina (somatomedina C)	vía de crecimiento		NM_000618
IHH	(Drosophila)	vía de hedgehog homólogo de hedgehog indio (Drosophila)	homólogo de hedgehog indio (Drosophila)	NM_002181
IKBKB	Ikb2	vía de CK		AF080158
IL10	IL-10	vía de CK		NM_000572
IL12A	IL-12p35	vía de CK	interleuquina 12	NM_000882
IL12B	IL-12p40	vía de CK	interleuquina 12	NM_002187
IL12RB1	IL-12 R beta 1	Inmunidad adaptativa	receptor de interleuquina 12, beta 1	NM_153701  NM_005535
IL12RB2	IL12RB2	vía de CK	receptor de interleuquina 12, beta	NM_001559

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
			1	
IL13	IL-13	vía de CK		NM_002188
IL13RA2	receptor de interleuquina 13, alfa 2, Gen hCG20596 Anotación Celera	IL13RA2,hC G20596	firma de metástasis	NM_000640. 2
IL15	IL-15	vía de CK		NM_000585
IL15RA	IL-15 R alfa	vía de CK	receptor de interleuquina 15, alfa	NM_002189
IL17	IL-17	vía de CK	interleuquina 17 (serín esterasa 8 asociada a linfocitos T citotóxicos)	NM_002190
IL17R	IL17R	vía de CK	receptor de interleuquina 17	NM_014339
IL17RB	IL17RB	vía de CK	receptor B de interleuquina 17	NM_018725  NM_172234
IL18	IL-18	vía de CK		NM_001562
IL1A	IL-1a	vía de CK		NM_000575
IL1B	IL-1b	vía de CK		NM_000576
IL1R1	IL-1 RI	Inmunidad adaptativa		NM_000877
IL2	IL-2	vía de CK		NM_000586
IL21	IL-21	vía de CK	Familia del receptor de cadena gamma común	NM_021803
IL21R	IL-21 R	vía de CK	Familia del receptor de cadena gamma común	NM_181078  NM_181079  NM_021798
IL23A	IL-23	vía de CK	subunidad p19 alfa de interleuquina 23,	NM_016584
IL23R	IL-23R	vía de CK	receptor de interleuquina 23	NM_144701
IL24	IL24	vía de CK	interleuquina 24	NM_006850
IL27	IL27	vía de CK	interleuquina 27	NM_145659
IL2RA	CD25	vía de CK		NM_000417
IL2RB	IL-2 R beta, CD122	vía de CK	Inmunidad adaptativa	NM_000878
IL2RG	IL-2 R gamma, CD132	vía de CK	Inmunidad adaptativa	NM_000206
IL3	IL-3	vía de CK		NM_000588
IL31RA	IL31RA	vía de CK	receptor A de interleuquina 31	NM_139017
IL4	IL-4	vía de CK		NM_000589

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
IL4RA	IL-4 R	vía de CK	células Th1/Th2	NM_0010086 99  NM_0004 18
IL5	IL-5	vía de CK		NM_000879
IL6	IL-6	vía de CK		NM_000600
IL7	IL-7	vía de CK		NM_000880
IL7RA	IL-7 R alfa	vía de CK	Inmunidad adaptativa	NM_002185
IL8	CXCL8	vía de inflamación	vía de CK	NM_000584
CXCR1	IL-8 RA	Inmunidad adaptativa		NM_000634
CXCR2	IL-8 RB	vía de quimioquina	quimioquinas y receptores CXC	NM_001557
IL9	IL-9	vía de CK		NM_000590
IL9R	IL-9 R	vía de CK	Familia del receptor de cadena gamma común	NM_176786
IRF1	factor 1 regulador de interferón	Inmunidad adaptativa		NM_002198
ISGF3G	factor 3 de transcripción estimulado por interferón, gamma 48kDa	Vía de interferón	factor 3 de transcripción estimulado por interferón, gamma 48kDa	NM_006084
ITGA4	integrina a4b7	adhesión, metástasis	integrina, alfa 4 (antígeno CD49D, alfa 4 subunidad del receptor VLA-4)	NM_000885
ITGA7	integrina, alfa 7	adhesión, metástasis		NM_002206
integrina, alfa E (antígeno CD103, antígeno 1 de linfocito mucosal humano; polipéptido alfa), Gen hCG33203 Anotación Celera	CD103	Inmunidad adaptativa		NM_002208. 3
ITGB3	integrina, beta 3 (glucoproteína IIIa de plaqueta, antígeno	metástasis		NM_000212. 2

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
	CD61), Gen hCG27604 Anotación Celera			
JAK2	Janus quinasa 2 (una proteína tirosina quinasa), Gen hCG31308 Anotación Celera	JAK2, hCG31308		NM_004972. 2
JAK3		vía de citoquina		N_000215
KLRB1		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADN T	NM_002258. 2
KLRC4	subfamilia C del receptor similar a lectina de célula asesina, miembro 4, subfamilia K del receptor similar a lectina de célula asesina, Gen hCG2009644 Anotación Celera	AF030313		NM_007360. 1
KLRF1		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADN T	NM_016523. 1
KLRG1	subfamilia G del receptor similar a lectina de célula asesina, miembro 1, Gen hCG25214 Anotación Celera	AF097367		NM_005810. 3
KRAS				NM_004985
LAG3	immune	Inmunidad adaptativa	gene 3 de activación de linfocitos	NM_002286
LAIR2		Inmunidad adaptativa		NM_002288  NM_021270
LEF1	Factor de unión 1 al potenciador linfoide	Factor de unión 1 al potenciador linfoide		NM_016269
LGALS9	lectina, unión a galactósido, soluble, 9 (galectina 9), Gen hCG1749919 Anotación Celera			NM_009587. 1  NM_00230 8.2
LILRB3	receptor similar a inmunoglobulina de leucocitos, subfamilia B (con dominios TM y ITIM), miembro 3	micromatriz IRT5 Wang	inmunosupresión	
LRP2	MEGALIN		MEGALIN	NM_004525

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
LTA	TNF-b	vía de CK	LT, TNFB, TNFSF1	NM_000595
SLAMF3	CD229	Inmunidad adaptativa		NM_002348
MADCAM1	molécula 1 de adhesión de célula adreina vascular mucosal, Gen hCG20569 Anotación Celera	ADCAM1,hCG20569		NM_130760.1  NM_13076 1.1
MADH3	MADH-3	vía de TGF	SMAD3, JV15-2	NM_005902
MADH7	MADH-7	vía de TGF	MADH8, SMAD7	NM_005904
MAF	c-maf Th2	vía de CK	homólogo de oncogén de fibrosarcoma musculoaponeurótico v-maf (aviar)	NM_005360
MAP2K1				NM_002755
MDM2	Mdm2, célula 3T3 transformado minuto doble 2, proteína de unión a p53 (ratón)	vía de p53		NM_002392; N_006878; NM_006879; NM_006880; NM_006881; NM_006882
MICA	Secuencia A relacionada con el polipéptido MHC de clase I	vía de MHC	presente en células tum y módulo Cytotox	NM_000247
MICB	Secuencia b relacionada con el polipéptido MHC de clase I	vía de MHC	presente en células tum y módulo Cytotox	NM_005931
MKI67	proliferación	proliferación		NM_002417
MMP12	matriz metalopeptidasa 12 (macrófago elastasa)	adhesión, metástasis		NM_002426 L23808
MMP9	matriz metalopeptidasa 9 (gelatinasa B, 92kDa gelatinasa, 92kDa tipo IV colagenasa)	adhesión, metástasis		NM_004994
MTA1	Asociado a metástasis 1,Gen hCG19442 Anotación Celera	metástasis		NM_004689. 2
MTSS1	Supresor 1 de metástasis, Gen	metástasis		NM_014751. 2

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
	hCG2009512 Anotación Celera			
MYC	MYC	vía de TGF	homólogo de oncogén de mielocitomatosis viral v-myc (aviar)	NM_002467
MYD88		vía similar a peaje		NM_002468
MYTH6	MYH6	MYH6		D00943 (Gene card)
NCAM1		Inmunidad adaptativa		
NFATC1	activación T	activación T		NM_172387  NM_172388  NM_172389  NM_172390  NM_006162
NKG7		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADN T	NM_005601. 3
NLK		vía de wnt	quinasa similar a nemo	NM_016231
NOS2A	iNos(Nos2A)	iNos(Nos2A)		NM_000625
P2X7	Receptor purinérgico P2X, canal de iones puerta para ligando, 7,Gen hCG1641456 Anotación Celera	P2RX7,hCG1641456		NM_177427. 2  NM_00256 2.4
PDCD1	PD-1	Inmunidad adaptativa		NM_005018
PECAM-1	CD31	Inmunidad adaptativa		NM_000442
CXCL4	PF4	vía de quimioquina	quimioquinas y receptores CXC	NM_002619
PGK1	PGK1	control endógeno	control endógeno	NM_000291
PIA51		vía de CK	Inhibidor proteico de STAT activado, 1	NM_016166
PIAS2		vía de CK	Inhibidor proteico de STAT activado, 2	NM_173206  NM_004671
PIAS3		vía de CK	Inhibidor proteico de STAT activado, 3	NM_006099
PIAS4		vía de CK	Inhibidor proteico de STAT activado, 4	NM_015897
PLAT	Activador de plasminógeno, tejido , Gen hCG17154 Anotación Celera	PLAT,hCG17154		NM_033011.1  NM_00093 0.2  NM_000 931.2
PML	supresor del tumor, señal de interferón			NM_033238

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
				NM_033239  NM_033240  NM_033242  NM_033244  NM_033245  NM_033246  NM_033247  NM_033249  NM_033250  NM 002675
PP1A	PP1	PP1		NM_021130
CXCL7	NAP-2	vía de quimioquina		NM_002704
PPP2CA	PP2A			NM_002715
PRF1	Perforina (PRF 1)	vía de Citotox	P1, PFP, HPLH2	NM_005041
PROM1	CD133, prominina 1, glucoproteína de transmembrana pentaspan,		Fracción positiva CD133 de médula ósea humana, sangre del cordón y sangre periférica han demostrado que injertan eficazmente en modelos de xenotransplantes, y han demostrado que contienen la mayor parte de los precursores de granulocitos y macrófagos,	NM_006017
PSMB5	proteasoma (prosome, macropain) subunidad, tipo beta, 5	vía de MHC		NM_002797
PTCH		vía de hedgehog homólogo fragmentado (Drosophila)		NM_000264
PTGS2	COX-2	vía de inflamación		NM_000963
PTP4A3	Proteína tirosina fosfatasa de tipo IVA, miembro 3	metástasis		NM_032611.1
PTPN6		vía de CK	Proteína tirosina fosfatasa, no receptor de tipo 6	NM_080548  N M_080549  NM_002831

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
PTPRC	CD45	CD45		NM_002838, NM_080922, NM_080923, NM_080921
RAB23		vía de hedgehog RAB23, miembro RAS de la familia de oncogén		NM_183227  N M_016277
RAC/RHO				NM_018890
RAC2	RAC2	RAC2	Sustrato 2 de la toxina botulínica relacionada con ras C3, (familia rho, proteína de unión a GTP pequeña Rac2)	NM_002872
RAF				NM_002880
RB1	retinoblastoma 1 (incluye osteosarcoma)	mutación y metilación	ciclo celular	NM_000321;
RBL1	Similar a retinoblastoma1 (p107)	similar a retinoblastoma 1 (p107)		NM_183404  NM_002895
REN	RENIN(REN)		RENIN(REN)	NM_000537
Drosha	RNASEN, Droshan microARN	microARN		AJ242976
SELE	CD62E (SELE)	metástasis		NM_000450
SELL	CD62L			NM_000655
SELP	CD62E (SELP)	metástasis		NM_003005
SERPINE1	Inhibidor de serpin peptidasa, case E (nexina, activador inhibidor de plasminógeno tipo 1), miembro 1, Gen hCG17353 Anotación Celera	SERPINE1,hCG17353		NM_000602. 1
SFRP1	secretada frizzled	secretada frizzled		NM_003012
SIRP beta 1		Inmunidad adaptativa		NM_006065
SKI	c-ski(SKI)	c-ski(SKI)	SKV	NM_003036
SLAMF1		Inmunidad adaptativa		NM_003037
SLAMF6	NTB-A	Inmunidad adaptativa		NM_052931
SLAMF7	CRACC	Inmunidad adaptativa		NM_021181
SLAMF8	BLAME	Inmunidad adaptativa		NM_020125
SMAD2	SMAD2	vía de TGF	SMAD, madres contra el homólogo 2 de	NM_0010036 52  NM_0059 01

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
			DPP (Drosophila)	
SMAD4	SMAD4	vía de TGF	SMAD, madres contra el homólogo 4 de DPP (Drosophila)	NM_005359
SMO, SMOH	SMO	SMO	homólogo suavizado (Drosophila)	NM_005631
SMURF1	SMURF1	SMURF1	Proteína ubiquitina E3 específica de SMAD, ligasa	NM_181349  NM_020429
SOCS1		vía de CK	supresor de señalización de citoquina 1	NM_003745
SOCS2		vía de CK	supresor de señalización de citoquina 2	NM_003877
SOCS3		vía de CK	supresor de señalización de citoquina 3	NM_003955
SOCS4		vía de CK	supresor de señalización de citoquina 4	NM_199421  NM_080867
SOCS5		vía de CK	supresor de señalización de citoquina 5	NM_014011
SOCS6		vía de CK	supresor de señalización de citoquina 6	NM_004232
SOCS7		vía de CK	supresor de señalización de citoquina 7	NM_014598
SOD1	antioxidante	antioxidante		NM_000454
SOD2	antioxidante	antioxidante		NM_0010244 65  NM_0010 24466  NM_0 00636
SOD3	antioxidante	antioxidante		NM_003102
SOS1		vía de TCR		NM_005633
SOX17	SOX17	SOX17	SRY (región Y determinante de sexo)-caja 17	NM_022454
CD43		Inmunidad adaptativa		NM_003123
ST14	Supresión de	proteasa, citotox		NM_021978

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
	tumorigenicidad 14 (carcinoma de colon matriptasa, epitina)			
STAM	STAM	STAM	Molécula adaptadora de transducción de señal (dominio SH3 y motivo ITAM) 1	NM_003473
STAT1	STAT1	STAT1	Transductor de señal y activador de transcripción 1, 91kDa	NM_139266  NM_007315
STAT2	STAT2	STAT2	Transductor de señal y activador de transcripción 2, 113kDa	
STAT3	STAT3	STAT3	Transductor de señal y activador de transcripción, 3 (factor de respuesta de fase aguda)	NM_213662  NM_139276  NM_003150
STAT4	STAT4	TAT4	Transductor de señal y activador de transcripción, 4	NM_003151
STATSA	STATSA	STAT5A	Transductor de señal y activador de transcripción, 5A	NM_003152
STAT5B	STAT5B	STATSB	Transductor de señal y activador de transcripción, 5B	NM_012448
STAT6	STAT6	STAT6	Transductor de señal y activador de transcripción, 6, inducido por interleuquina-4	NM_003153
STK36	STK36	STK36	serina/treonina quinasa 36 (homólogo fusionado, Drosophila)	NM_015690
TAP1	Transportador 1, cassette de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	vía de MHC		NM_000593
TAP2	Transportador 2,	vía de MHCde	Transportador 2,	NM_000544

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
	cassette de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)		cassette de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	
TBX21	T-bet (TBX21)	Inmunidad adaptativa		NM_013351
TCF7	TCF7	vía de wnt	Factor de transcripción 7 (específico de célula T, caja HMG)	NM_201633  NM_201632  NM_201634  NM_213648  NM_003202
TERT				NM_198255  NM_003219
TFRC	CD71	control endógeno	control endógeno	NM_003234
TGFA				NM_003236
TGFB1	TGF-b / BIGH3	vía de TGF		NM_000660
TGFBR1	TGFBR1	vía de TGF	factor de crecimiento, transformante, receptor beta I (quinasa similar al receptor de activina A tipo II, 53kDa)	NM_004612
TGFBR2	TGFBR2	vía de TGF	factor de crecimiento, transformante, receptor II beta (70/80kDa)	NM_0010248 47  NM_0032 42
TIMP3	TIMP inhibidor de metalopeptidasa 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflamatoria)	vía de TGF	adhesión, metástasis	NM_000362
TLR1	LR1	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 1	NM_003263
TLR10	TLR10	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 10	NM_030956
TLR2	TLR2	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 2	NM_003264
TLR3	TLR3	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 3	NM_003265
TLR4	TLR4	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 4	NM_138554  NM_003266
TLR5	TLR5	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 5	NM_003268

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
TLR6	TLR6	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 6	NM_006068
TLR7	TLR7	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 7	NM_016562
TLR8	TLR8	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 8	NM_138636
TLR9	TLR9	vía de tipo peaje	receptor de tipo peaje 9	NM_017442  NM 138688
TNF	TNF-a	TNF-a	DIF, TNFA, TNFSF2, CACHECTIN	NM_000594
TNFRSF10A	TRAILR1	vía de apoptosis		NM_003844
TNFRSF11A	RANK	Inmunidad adaptativa		NM_003839
TNFRSF18	GITR(TNFRS F18)	Inmunidad adaptativa		NM_004195
TNFRSF1A	TNF RI	Inmunidad adaptativa		NM_001065
TNFRSF1B	TNF RII	Inmunidad adaptativa		NM_001066
OX-40				NM_003327
TNFRSFS	CD40	Inmunidad adaptativa		NM_001250, NM 152854
TNFRSF6	Fas	Vía de apoptosis	FAS, APT1, CD95, APO-1,FASTM	NM_000043
TNFRSF7	CD27	Inmunidad adaptativa		NM_001242
TNFRSF8	CD30	Inmunidad adaptativa		NM_152942  NM_ 001243
TNFRSF9	4-1BB	Inmunidad adaptativa		NM_001561
TNFSF10	TRAIL		Superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10	NM_003810
TNFSF6	FasL	vía de apoptosis	FASL, FasL, CD178, CD95L, APT1LG1	NM_000639
TOB1	transductor de ERBB2	vía de TCR	transductor de ERBB2, 1	NM_005749
TP53	proteína tumoral p53 (síndrome Li- Fraumeni)	vía de p53		NM_000546
TSLP		Inmunidad adaptativa NM		NM_033035  NM_38551
VCAM1	Molécula de adhesión de células vasculares 1,Gen hCG32384 Anotación Celera	MGC99561,  NCAM-100,DKFZp779G2333,HG NC: 12663	firma de metástasis	NM_001078. 2
VEGF	VEGF A	VEGF A		NM_003376

ES 2 374 783 T3

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
WIF1		vía de wnt	factor inhibidor1	NM_007191
WNT1		vía de wnt	familia de sitio de integración de MMTV de tipo sin alas, miembro 1	NM_005430
WNT4	familia de sitio de integración de MMTV de tipo sin alas, miembro 4	vía de wnt	familia de sitio de integración de MMTV de tipo sin alas, miembro 4	NM_030761
XCL1	linfotactina	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C) ligando 1	NM_002995
XCR1		vía de quimioquina	quimioquina (motivo C) receptor 1	NM_0010246 44  NM_0052 83
ZAP70	ZAP70	vía de TCR	cadena zeta (TCR) proteína quinasa asociada 70kDa	NM_001079
ZIC2	pareja impar	vía de hedgehog miembro 2 de la familia Zic (homólogo de pareja impar, Drosophila)	miembro 2 de la familia Zic (homólogo de pareja impar, Drosophila)	NM_007129

**Tabla 10**

No. acceso	Nombre	Descripción	Tipo	Localización
2 transcritos	TNFRSF6B	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 6b, cebo	transcritos hCG22751:7	20q13,3
NM_001712	CEACAM1	Molécula 1 de adhesión de células relacionada con antígeno carcinoembrionario (glucoproteína biliar)	transcritos hCG21881:2	19q13,2,
NM_014143	PDCD1LG1	Muerte programada 1 ligando 1	transcritos hCG27938:1	9p24,
2 transcritos	CD8A	antígeno CD8, alfa polipéptido (p32)	transcritos hCG34192:3	2p12
NM_000963	PTGS2	Prostaglandina endoperóxido sintasa 2 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa)	transcritos hCG39885:1	1q25,2-q25,3,
NM_001168	BIRC5	IAP baculoviral que contiene repetición 5 (survivina)	transcritos hCG27811:4	17q25,
NM_000655	SELL	selectina L (molécula 1 de adhesión a linfocitos)	transcritos hCG37088:5	1q23-q25,

ES 2 374 783 T3

No. acceso	Nombre	Descripción	Tipo	Localización
NM_002164	INDO	indolamina-pirrol 2,3 dioxigenasa	transcritos hCG27061:2	8p12-p11,
NM_016123	IRAK4	quinasa 4 asociada al receptor de interleuquina -1	transcritos hCG39494:1	4,
NM_000594 tumor	TNF	factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	transcritos hCG43716:1	6p21,3,
NM_003844	TNFRSF10 A	factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 10a)	transcritos hCG31588:1	8p21,
NM_002423	MMP7	metaloproteinasas 7 de matriz (matrilisina, uterina)	transcritos hCG1640914: 1	11q21-q22,
NM_006864	LILRB3	Receptor similar a inmunoglobulina de leucocitos, subfamilia B (con dominios TM e ITIM), miembro 3	transcritos hCG2009348: 1	19q13.4,
2 transcritos	CD3Z	antígeno CD3Z, polipéptido zeta (TiT3, complejo)	transcritos hCG1769040: 2	1q22-q23,
2 transcritos	TNFRSF8	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 8	transcritos hCG25063:1	1p36,
NM_002046	GAPD	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	transcritos hCG2005673: 1	12p13,
NM_001565	CXCL10	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 10	transcritos hCG23842:2	4q21,
2 transcritos	EBAG9	Asociado al sitio de unión del receptor de estrógeno, antígeno, 9	transcritos hCG15046:2	Bq23,
NM_000584	IL8	interleuquina 8	transcritos hCG16372:2	4q13-q21
2 transcritos	STAT1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1, 91kDa	transcritos hCG25794:6	2q32,2,
NM_001504	CXCR3	quimioquina (motivo C-X-C) receptor 3	transcritos hcG19964:1	Xq13,
NM_000660	TGFB1	factor de crecimiento transformante, beta 1 (enfermedad de Camurati-Engelmann)	transcritos hCG22321:2	19q13,2,
NM_012092	ICOS	Coestimulador de células T inducible	transcritos hCG1642889: 1	2q33,
NM_0.02416	CXCL9	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 9	transcritos hCG1781951: 1	4q21,
2 transcritos	CD97	antígeno CD97	transcritos hCG27517:5	19p13,
NM_003853	IL18RAP	receptor de interleuquina 18 proteína complementaria	transcritos hCG28161:1	2p24,3-p24,1
NM_006564	CXCR6	quimioquina (motivo C-X-C) receptor 6	transcritos hCG15326:1	3p21,
NM_004314	ART1	ADP-ribosiltransferasa 1	transcritos hCG16165:1	11p15,
NM_00219B	IRF1	factor regulador de interferón 1	transcritos hCG24115:1	5q31,1,

ES 2 374 783 T3

No. acceso	Nombre	Descripción	Tipo	Localización
NM_025240	B7H3	homólogo 3 de B7	transcritos hCG40826:1	15q23-q24,
3 transcritos	ACE	enzima conversor de angiotensina I (peptidil-dipeptidasa A) 1	transcritos hCG41821:5	17q23,
NM_003855	IL18R1	receptor 1 de interleuquina 18	transcritos hCG28160:3	2q12
NM_013351	TBX21	caja T 21	transcritos hCG27200:1	17q21,2,
NM_001562	IL18	interleuquina 18 (factor inductor de interferón gamma)	transcritos hCG39294:2	11q22,2-q22,3
NM_005018	PDCD1	muerte celular programada 1	transcritos hCG1776289:1	2q37,3,
NM_000619	IFNG	interferón, gamma	transcritos hCG15987:1	12q14,
2 transcritos	GNLY	granulinsina	transcritos hCG32948:3	2p12-q11,
NM_002051	GATA3	proteína 3 de unión a GATA	transcritos hCG23634:3	10p15,
NM_003376	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	transcritos hCG18998:7	6p12
NM_004131	GZMB	granzima B (granzima 2, serin esterasa 1 asociada a linfocitos T citotóxicos)	hCG40183 : 1 transcritos	14q11,2,
NM_014387	LAT	Enlazador para la activación de células T	transcritos hCG2039637:5	16q13,
NM_C00616	CD4	antígeno CD4 (p55)	transcritos hCG25949:2	12pter-p12,
NM_031281	IRTA2	receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado a translocación 2	transcritos hCG39827:3	1q21,
NM_000572	IL10	interleuquina 10	transcritos hCG22208:1	1q31-q32,
NM_003326	TNFSF4	superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 4 (glucoproteína 1 activada transcripcionalmente, tax 34kDa)	transcritos hCG37644:2	1q25,
NM_018676	THSD1	trombospondina, tipo I, dominio 1	transcritos hCG29569:4	13q14,13,
NM_025239	FDCD1LG2	muerte celular programada 1 ligando 2	transcritos hCG1641650:1	9p24,2,

**Tabla 11**

**Tabla S1:** Características de los tres grupos de pacientes

Característica	Grupos		
	HEGP	Avicenne	HEGP-2
	No. de pacientes		
<b>Estadio del tumor (T)</b>			
pT1	23	3	2
pT2	69	13	7
pT3	218	76	57
pT4	97	27	9
<b>Estado nodal (N)</b>			
Negativo	241	48	30
Positivo	166	71	43
Nx#			2
<b>Metástasis distantes (M)</b>			
Ninguna detectada	313	93	47
Presente	94	26	28
<b>Clasificación UICC-TNM (25)</b>			
I	75	12	6
II	137	33	17
III	100	48	24
IV	95	26	28
<b>Sexo</b>			
Hombre	216	57	42
Mujer	191	62	33
<b>Localización</b>			
Colon	162	35	41
Sigmoide	114	53	25
Recto	131	31	9
<b>Diferenciación</b>			
Buena	312	78	47
Escasa	95	41	28

+ El estadio se determinó mediante examen patológico (p). T1 tumor que invade la submucosa, T2 tumor que invade la muscularis propia, T3 tumor que penetra la muscularis propia e invade la subserosa, y T4 tumor que invade otros órganos o estructuras o que perfora el peritoneo visceral

++ No fue posible determinar el estado nodal de dos pacientes.

**Tabla 12**

**Tabla S3: Análisis de la supervivencia libre de enfermedad para todos los pacientes según los valores de corte mínimos del valor de P**

	No. de pacientes	Supervivencia libre de enfermedad (DSF) para todos los pacientes				Valor de P*	Valor de P	Valor de P <sup>A</sup>
		Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %			
<b>GZMB<sub>CT</sub></b>								
Lo	191	34,6	63,8	46,1	46,1	1,78 10 <sup>-4</sup>	9,70 10 <sup>-5</sup>	4,85 10 <sup>-5</sup>
Hi	163	NR	76,6	73,1	72,1			
<b>GZMB<sub>IM</sub></b>								
Lo	109	20,1	47,3	41,0	41,0	1,99 10 <sup>-5</sup>	1,28 10 <sup>-5</sup>	5,38 10 <sup>-6</sup>
Hi	195	NR	76,4	70,9	70,0			
<b>CD45RO<sub>CT</sub></b>								
Lo	45	11,5	27,5	24,0	24,0	4,33 10 <sup>-5</sup>	9,81 10 <sup>-5</sup>	1,27 10 <sup>-4</sup>
Hi	261	NR	72,0	65,5	64,9			
<b>CD45RO<sub>IM</sub></b>								
Lo	168	21,6	55,4	47,3	47,3	3,71 10 <sup>-3</sup>	4,29 10 <sup>-4</sup>	1,41 10 <sup>-4</sup>
Hi	145	NR	76,8	72,9	71,9			
<b>CD8<sub>CT</sub></b>								
Lo	132	21,0	46,0	39,1	39,1	5,19 10 <sup>-6</sup>	3,44 10 <sup>-6</sup>	1,45 10 <sup>-6</sup>
Hi	227	NR	74,9	69,5	68,3			
<b>CD8<sub>IM</sub></b>								
Lo	136	25,5	56,4	49,1	49,1	1,08 10 <sup>-2</sup>	1,11 10 <sup>-2</sup>	8,09 10 <sup>-3</sup>
Hi	128	NR	77,8	73,6	72,3			
<b>CD3<sub>CT</sub></b>								
Lo	165	23,1	48,2	43,4	43,4	5,48 10 <sup>-6</sup>	1,38 10 <sup>-5</sup>	1,09 10 <sup>-5</sup>
Hi	192	NR	79,8	72,4	71,6			
<b>CD3<sub>IM</sub></b>								
Lo	175	31,1	51,8	43,5	43,5	4,78 10 <sup>-6</sup>	6,23 10 <sup>-6</sup>	6,32 10 <sup>-6</sup>
Hi	179	NR	78,7	74,7	73,9			
<b>GZMB<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	70	20,1	46,3	39,1	39,1	3,32 10 <sup>-4</sup>	8,34 10 <sup>-5</sup>	5,45 10 <sup>-5</sup>
Het	98	77,5	62,2	54,4	54,4			
Hi/Hi	102	NR	80,6	77,8	76,3			
<b>CD45RO<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	32	5,85	24,2	24,2	24,2	6,61 10 <sup>-6</sup>	1,05 10 <sup>-5</sup>	1,69 10 <sup>-5</sup>
Het	141	63,28	61,2	50,7	50,7			
Hi/Hi	127	NR	80,3	78,1	76,9			
<b>CD8<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	93	20,1	44,3	35,9	35,9	3,80 10 <sup>-5</sup>	7,70 10 <sup>-5</sup>	5,52 10 <sup>-5</sup>
Het	94	NR	63,8	58,9	58,9			
Hi/Hi	96	NR	81,6	76,1	74,6			
<b>CD3<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	93	17,3	42,8	37,4	37,4	7,56 10 <sup>-6</sup>	1,22 10 <sup>-7</sup>	1,16 10 <sup>-7</sup>
Het	116	68,7	61,7	51,8	51,8			
Hi/Hi	109	NR	87,6	84,0	82,7			

\* Valor de P log-rank corregido (Altman y otros 1994), media de valores P 100\*CV Log-rank  
<sup>A</sup> Media de valores P 100\*CV Log-rank estratificado  
 NR: No se ha conseguido, Het: HI/Lo y Lo/Hi

**Tabla 13**

**Tabla S4: Análisis de la supervivencia total para todos los pacientes según los valores de corte mínimos del valor de P**

	No. de pacientes	Supervivencia total (OS) para todos los pacientes				Valor de P*	Valor de P	Valor de P <sup>^</sup>
		Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %			
<b>GZMB<sub>CT</sub></b>								
Lo	101	42,7	82,2	47,3	40,1	8,18 · 10 <sup>-7</sup>	1,29 · 10 <sup>-5</sup>	
Hi	163	NR	83,8	76,0	68,4			
<b>GZMB<sub>IM</sub></b>								
Lo	109	43	68,6	47,3	39,9	5,55 · 10 <sup>-3</sup>	8,39 · 10 <sup>-2</sup>	
Hi	195	89,0	74,6	66,7	57,8			
<b>CD45RO<sub>CT</sub></b>								
Lo	45	25,6	55,5	26,9	20,9	5,77 · 10 <sup>-7</sup>	8,99 · 10 <sup>-6</sup>	
Hi	261	100,7	74,9	66,3	58,7			
<b>CD45RO<sub>IM</sub></b>								
Lo	168	46,9	67,1	49,4	42,0	1,65 · 10 <sup>-3</sup>	0,20 · 10 <sup>-2</sup>	
Hi	145	NR	78,6	73,3	65,5			
<b>CD8<sub>CT</sub></b>								
Lo	132	35,1	60,3	41,8	36,5	2,66 · 10 <sup>-7</sup>	6,66 · 10 <sup>-6</sup>	
Hi	227	NR	79,8	71,0	62,3			
<b>CD8<sub>IM</sub></b>								
Lo	186	51,3	70,2	61,6	43,0	1,22 · 10 <sup>-3</sup>	1,51 · 10 <sup>-2</sup>	
Hi	128	NR	78,4	72,6	66,1			
<b>CD3<sub>CT</sub></b>								
Lo	165	33,5	57,9	42,4	35,6	7,86 · 10 <sup>-8</sup>	1,35 · 10 <sup>-6</sup>	
Hi	192	115,1	83,2	74,3	66,4			
<b>CD3<sub>IM</sub></b>								
Lo	175	46,9	65,9	49,3	40,3	9,08 · 10 <sup>-5</sup>	1,83 · 10 <sup>-4</sup>	
Hi	178	NR	77,3	70,2	64,0			
<b>GZMB<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	70	50,8	72,4	50,7	45,2	2,00 · 10 <sup>-4</sup>	1,67 · 10 <sup>-2</sup>	
Het	98	40,3	60,8	48,0	35,4			
Hi/Hi	102	NR	84,1	77,8	70,8			
<b>CD45RO<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	32	28,4	60,6	22,5	22,5	8,56 · 10 <sup>-6</sup>	3,34 · 10 <sup>-4</sup>	
Het	141	51,5	68,3	54,5	44,1			
Hi/Hi	127	NR	81,2	75,1	70,6			
<b>CD8<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	93	35,1	61,2	40,0	33,8	6,25 · 10 <sup>-6</sup>	4,69 · 10 <sup>-4</sup>	
Het	94	59,6	74,8	61,0	49,3			
Hi/Hi	96	NR	82,3	75,9	69,2			
<b>CD3<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	83	35,1	59,3	40,7	29,9	3,97 · 10 <sup>-7</sup>	2,11 · 10 <sup>-6</sup>	
Het	116	57,8	68,0	54,7	49,5			
Hi/Hi	109	NR	86,4	80,8	72,6			

\* Valor de P log-rank, media de valores P 100\*CV Log-rank

<sup>^</sup> Media de valores P 100\*CV Log-rank estratificado

NR: No se ha conseguido, Het: HI/Lo y Lo/HI

**Tabla 14**

**Tabla S5:** Análisis de la supervivencia libre de enfermedad para todos los pacientes según los valores de corte medios

	No. de pacientes	Supervivencia libre de enfermedad (DSF) para todos los pacientes				Valor de P*
		Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	
<b>GZMB<sub>CT</sub></b>						
Lo	190	34,6	53,5	45,7	45,7	9,94 10 <sup>-7</sup>
Hi	164	NR	76,8	73,2	72,3	
<b>GZMB<sub>IM</sub></b>						
Lo	152	31,1	51,0	46,6	46,6	1,99 10 <sup>-6</sup>
Hi	152	NR	79,5	73,6	72,5	
<b>CD45RO<sub>CT</sub></b>						
Lo	153	77,4	59,3	54,2	54,2	2,21 10 <sup>-2</sup>
Hi	153	NR	72,9	65,8	64,8	
<b>CD45RO<sub>IM</sub></b>						
Lo	158	36,0	53,7	48,0	48,0	1,85 10 <sup>-4</sup>
Hi	155	NR	77,0	70,7	69,7	
<b>CD8<sub>CT</sub></b>						
Lo	180	31,3	51,1	45,4	45,4	3,06 10 <sup>-7</sup>
Hi	179	NR	78,0	72,1	71,2	
<b>CD8<sub>IM</sub></b>						
Lo	157	36,0	56,3	47,7	47,7	2,72 10 <sup>-4</sup>
Hi	157	NR	74,3	70,7	69,7	
<b>CD3<sub>CT</sub></b>						
Lo	179	31,3	52,0	46,7	46,7	1,65 10 <sup>-6</sup>
Hi	178	NR	78,7	71,6	70,8	
<b>CD3<sub>IM</sub></b>						
Lo	177	31,1	51,8	43,6	43,6	2,98 10 <sup>-8</sup>
Hi	176	NR	78,1	75,1	74,2	
<b>GZMB<sub>CTIM</sub></b>						
Lo/Lo	91	23,0	46,6	40,9	40,9	5,07 10 <sup>-6</sup>
Het	93	NR	67,2	59,2	59,2	
Hi/Hi	86	NR	82,1	78,7	77,0	
<b>CD45RO<sub>CTIM</sub></b>						
Lo/Lo	92	35,8	52,6	49,5	49,5	7,60 10 <sup>-4</sup>
Het	119	100,2	63,7	54,4	54,4	
Hi/Hi	89	NR	81,7	77,3	75,8	
<b>CD8<sub>CTIM</sub></b>						
Lo/Lo	98	20,8	44,9	37,3	37,3	7,75 10 <sup>-7</sup>
Het	92	NR	67,8	61,1	61,1	
Hi/Hi	93	NR	79,7	75,4	73,8	
<b>CD3<sub>CTIM</sub></b>						
Lo/Lo	98	18,2	44,9	39,7	39,7	3,52 10 <sup>-9</sup>
Het	119	88,7	62,5	53,2	53,2	
Hi/Hi	101	NR	87,8	84,0	82,5	

\* Valor de P log-rank para el corte medio  
NR: No se ha conseguido, Het: HI/Lo y Lo/Hi

**Tabla 15**

**Tabla S6:** Análisis de supervivencia total para todos los pacientes según los valores de corte medios

	Supervivencia total (OS) para todos los pacientes					Valor de P*
	No. de pacientes	Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	
GZMB <sub>CT</sub>						
Lo	191	42,7	62,2	47,3	40,1	8,18 10 <sup>-7</sup>
Hi	163	NR	83,8	76,0	68,4	
GZMB <sub>IM</sub>						
Lo	162	50,8	67,4	50,7	44,3	11,55 10 <sup>-2</sup>
Hi	152	100,6	77,5	68,9	58,2	
CD45RO <sub>CT</sub>						
Lo	153	46,9	65,7	49,1	43,6	6,92 10 <sup>-4</sup>
Hi	153	111,3	78,6	72,0	62,9	
CD45RO <sub>IM</sub>						
Lo	158	43,1	66,3	48,4	41,6	1,49 10 <sup>-3</sup>
Hi	155	115,0	78,6	72,8	64,6	
CD8 <sub>CT</sub>						
Lo	180	41,7	65,8	45,7	41,1	2,05 10 <sup>-5</sup>
Hi	179	NR	79,6	74,9	64,8	
CD8 <sub>IM</sub>						
Lo	157	50,8	71,9	51,0	42,0	2,16 10 <sup>-3</sup>
Hi	157	NR	75,9	69,5	68,2	
CD3 <sub>CT</sub>						
Lo	179	39,2	61,5	45,6	38,5	7,04 10 <sup>-6</sup>
Hi	178	115,1	82,5	73,7	66,1	
CD3 <sub>IM</sub>						
Lo	177	46,9	66,4	49,9	40,5	9,38 10 <sup>-5</sup>
Hi	175	NR	77,0	70,5	64,2	
GZMB <sub>CT/IM</sub>						
Lo/Lo	92	46,9	67,4	49,6	45,4	2,88 10 <sup>-5</sup>
Het	92	51,3	66,9	54,4	39,3	
Hi/Hi	86	115,1	83,9	76,5	69,9	
CD45RO <sub>CT/IM</sub>						
Lo/Lo	92	40,3	65,2	45,3	41,0	7,43 10 <sup>-5</sup>
Het	119	52,9	66,7	55,1	45,3	
Hi/Hi	89	NR	85,9	83,0	75,4	
CD8 <sub>CT/IM</sub>						
Lo/Lo	98	36,4	66,0	42,3	36,8	1,04 10 <sup>-4</sup>
Het	92	59,6	72,6	58,7	46,9	
Hi/Hi	93	NR	80,2	77,5	70,3	
CD3 <sub>CT/IM</sub>						
Lo/Lo	98	35,1	60,3	41,3	31,0	2,08 10 <sup>-6</sup>
Het	119	60,0	69,7	56,7	50,5	
Hi/Hi	101	NR	85,4	80,6	73,0	

\* Valor de P log-rank de valores de corte medios  
NR: No se ha conseguido, Het: HI/Lo y Lo/Hi

**Tabla 16**

**Tabla S7:** Análisis de la supervivencia libre de enfermedad para pacientes con UICC-TNM I, II, III, según los cortes de valores de P mínimos

	Supervivencia libre de enfermedad (DSF) para pacientes con UICC-TNM I, II, III							
	No. de pacientes	Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	Valor de P*	Valor de P	Valor de P <sup>A</sup>
<b>GZMB<sub>CT</sub></b>								
Lo	168	NR	77,0	88,2	88,2	9,17 10 <sup>-1</sup>	3,87 10 <sup>-1</sup>	3,89 10 <sup>-1</sup>
Hi	107	NR	87,7	83,7	83,7			
<b>GZMB<sub>IM</sub></b>								
Lo	126	NR	74,1	89,7	88,7	3,47 10 <sup>-1</sup>	1,51 10 <sup>-1</sup>	1,48 10 <sup>-1</sup>
Hi	112	NR	89,1	82,5	82,5			
<b>CD45RO<sub>CT</sub></b>								
Lo	25	23,1	42,4	37,1	37,1	3,58 10 <sup>-3</sup>	2,01 10 <sup>-3</sup>	1,69 10 <sup>-3</sup>
Hi	218	NR	84,4	77,3	77,3			
<b>CD45RO<sub>IM</sub></b>								
Lo	121	NR	74,2	84,4	84,4	3,49 10 <sup>-1</sup>	1,65 10 <sup>-1</sup>	1,73 10 <sup>-1</sup>
Hi	125	NR	85,6	81,5	81,5			
<b>CD8<sub>CT</sub></b>								
Lo	85	77,5	64,1	55,7	55,7	5,62 10 <sup>-1</sup>	1,76 10 <sup>-1</sup>	1,58 10 <sup>-1</sup>
Hi	193	NR	86,3	82,0	82,0			
<b>CD8<sub>IM</sub></b>								
Lo	138	NR	74,0	85,5	85,5	2,20 10 <sup>-1</sup>	1,43 10 <sup>-1</sup>	1,81 10 <sup>-1</sup>
Hi	111	NR	87,9	82,9	82,9			
<b>CD3<sub>CT</sub></b>								
Lo	69	68,7	62,6	53,8	53,8	1,83 10 <sup>-1</sup>	1,22 10 <sup>-1</sup>	1,18 10 <sup>-1</sup>
Hi	209	NR	87,9	80,9	80,9			
<b>CD3<sub>IM</sub></b>								
Lo	103	NR	72,0	80,5	80,5	4,78 10 <sup>-1</sup>	6,23 10 <sup>-1</sup>	8,32 10 <sup>-1</sup>
Hi	171	NR	88,1	83,3	83,3			
<b>GZMB<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	87	NR	70,4	84,3	84,3	7,81 10 <sup>-1</sup>	3,33 10 <sup>-1</sup>	3,42 10 <sup>-1</sup>
Het	69	NR	81,7	73,2	73,2			
Hi/Hi	58	NR	90,8	85,9	85,9			
<b>CD45RO<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	18	20,1	40,2	40,2	40,2	1,45 10 <sup>-1</sup>	4,04 10 <sup>-1</sup>	4,14 10 <sup>-1</sup>
Het	110	NR	76,8	84,8	84,8			
Hi/Hi	112	NR	88,3	85,9	85,9			
<b>CD8<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	61	35,8	69,0	48,9	48,9	1,84 10 <sup>-3</sup>	3,52 10 <sup>-3</sup>	3,84 10 <sup>-3</sup>
Het	76	NR	82,2	76,2	76,2			
Hi/Hi	87	NR	87,8	81,6	81,6			
<b>CD3<sub>CT/IM</sub></b>								
Lo/Lo	30	23,1	49,9	38,0	38,0	8,57 10 <sup>-1</sup>	2,49 10 <sup>-1</sup>	2,83 10 <sup>-1</sup>
Het	85	NR	76,4	65,6	65,6			
Hi/Hi	124	NR	91,8	87,1	87,1			

\* Valor de P log-rank corregido (Altman y otros 1994), valor de P medio 100\*CV Log-rank

<sup>A</sup> Valor de P medio 100\*CV estratificado Log-rank

NR: No se ha conseguido, Het: HI/Lo y Lo/Hi

Tabla 17

Tabla S8: Análisis de la supervivencia total para pacientes con UICC-TNM I, II, III, según los cortes de valores de P mínimos

	No. de pacientes	Supervivencia total (OS) para pacientes con				UICC-TNM I, II, III	
		Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	Valor de P*	Valor de P <sup>A</sup>
GZM8 <sub>CT</sub>							
Lo	166	80,0	83,6	60,2	81,1	1,52 10 <sup>-1</sup>	1,13 10 <sup>-1</sup> 8,16 10 <sup>-2</sup>
Hi	107	NR	85,9	79,7	71,6		
GZM8 <sub>IM</sub>						5,38 10 <sup>-1</sup>	7,30 10 <sup>-1</sup> 7,16 10 <sup>-1</sup>
Lo	126	101,0	81,7	69,1	81,8		
Hi	132	115,0*	85,8	76,2	84,5		
CD45RO <sub>CT</sub>						2,53 10 <sup>-4</sup>	2,92 10 <sup>-3</sup> 2,25 10 <sup>-3</sup>
Lo	25	43,0	69,7	41,8	32,6		
Hi	218	NR	83,9	75,4	67,8		
CD45RO <sub>IM</sub>						1,22 10 <sup>-1</sup>	3,85 10 <sup>-1</sup> 4,33 10 <sup>-1</sup>
Lo	121	101,0	80,1	64,2	59,6		
Hi	128	NR	84,3	79,4	70,8		
CD8 <sub>CT</sub>						6,00 10 <sup>-5</sup>	1,09 10 <sup>-4</sup> 1,03 10 <sup>-4</sup>
Lo	65	65,3	74,8	59,1	60,2		
Hi	193	NR	88,2	81	71,8		
CD8 <sub>IM</sub>						3,03 10 <sup>-1</sup>	4,32 10 <sup>-1</sup> 4,20 10 <sup>-1</sup>
Lo	136	78,3	82,4	66,3	57		
Hi	111	NR	86,8	81,2	73,7		
CD3 <sub>CT</sub>						2,51 10 <sup>-1</sup>	1,85 10 <sup>-3</sup> 1,47 10 <sup>-3</sup>
Lo	69	35,6	69,5	47,6	40,1		
Hi	209	NR	88,5	81,4	73,2		
CD3 <sub>IM</sub>						7,35 10 <sup>-3</sup>	7,91 10 <sup>-2</sup> 6,25 10 <sup>-2</sup>
Lo	103	69,3	80,7	65	63,7		
Hi	171	NR	85,9	79,7	71,7		
GZ18 <sub>CTNM</sub>						8,29 10 <sup>-2</sup>	5,30 10 <sup>-1</sup> 4,99 10 <sup>-1</sup>
Lo/Lo	87	NR	83,2	69,2	63,3		
Het	69	69,3	80,8	67,7	51,8		
H/HI	58	NR	85,6	79,2	71,8		
CD45RO <sub>CTNM</sub>						1,02 10 <sup>-2</sup>	4,39 10 <sup>-2</sup> 3,72 10 <sup>-2</sup>
Lo/Lo	16	43,0	73,1	36,5	36,6		
Het	110	87,3	80,1	67,3	56,5		
H/HI	112	NR	85,3	80,8	74,8		
CD8 <sub>CTNM</sub>						7,02 10 <sup>-4</sup>	1,60 10 <sup>-2</sup> 1,96 10 <sup>-2</sup>
Lo/Lo	81	58,2	72,7	52,2	45,3		
Het	76	111,4	85,6	77,3	65,1		
H/HI	87	NR	89,7	81,1	73,6		
CD3 <sub>CTNM</sub>						2,90 10 <sup>-3</sup>	2,72 10 <sup>-4</sup> 1,21 10 <sup>-4</sup>
Lo/Lo	30	35,6	71,4	43,4	32,6		
Het	65	72,1	76,6	64,8	54,8		
H/HI	124	NR	80,8	85,9	70,6		

\* Valor de P log-rank, valor de P medio 100\*CV Log-rank

<sup>A</sup> Valor de P medio 100\*CV estratificado Log-rank

NR: No se ha conseguido, Het: HI/Lo y Lo/HI

**Tabla 18**

**Tabla S9:** Análisis de la DFS para pacientes con UICC-TNM I, II, III, según los cortes medios

	Supervivencia libre de enfermedad (DSF) para pacientes con UICC-TNM I, II, III					Valor de P*
	No. de pacientes	Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	
GZMB <sub>CT</sub>						8,07 10 <sup>-2</sup>
Lo	140	NR	77,8	68,1	68,1	
Hi	133	NR	84,8	80,6	80,6	
GZMB <sub>IM</sub>						2,26 10 <sup>-2</sup>
Lo	119	NR	74,7	69,1	69,1	
Hi	119	NR	87,9	81,5	81,5	
CD45RO <sub>CT</sub>						2,27 10 <sup>-1</sup>
Lo	122	NR	76,5	70,7	70,7	
Hi	121	NR	84,1	75,9	75,9	
CD45RO <sub>IM</sub>						1,96 10 <sup>-1</sup>
Lo	124	NR	74,6	65,1	65,1	
Hi	122	NR	85,6	84,1	81,1	
CD8 <sub>CT</sub>						6,53 10 <sup>-1</sup>
Lo	139	NR	73,3	65,1	65,1	
Hi	139	NR	89,4	83,9	83,9	
CD8 <sub>IM</sub>						3,99 10 <sup>-1</sup>
Lo	125	NR	75,9	66,5	66,5	
Hi	124	NR	84,7	80,1	80,1	
CD3 <sub>CT</sub>						4,48 10 <sup>-1</sup>
Lo	139	NR	72,6	66,1	66,1	
Hi	139	NR	91,1	83,1	83,1	
CD3 <sub>IM</sub>						4,42 10 <sup>-1</sup>
Lo	138	NR	74,4	65,4	65,4	
Hi	136	NR	90,1	84,9	84,9	
GZMB <sub>CT/M</sub>						5,63 10 <sup>-2</sup>
Lo/Lo	72	NR	69,4	61,9	61,9	
Het	74	NR	85,6	77,8	77,8	
Hi/Hi	66	NR	84,1	79,8	79,8	
CD45RO <sub>CT/M</sub>						6,94 10 <sup>-2</sup>
Lo/Lo	71	NR	72,9	67,0	67,0	
Het	100	NR	79,4	68,9	68,9	
Hi/Hi	67	NR	87,6	86,6	86,6	
CD8 <sub>CT/M</sub>						3,36 10 <sup>-3</sup>
Lo/Lo	80	100,3	66,8	57,8	57,8	
Het	65	NR	82,9	75,6	75,6	
Hi/Hi	79	NR	86,4	81,3	81,3	
CD3 <sub>CT/M</sub>						6,20 10 <sup>-3</sup>
Lo/Lo	73	100,3	65,4	58,8	58,8	
Het	102	NR	82,4	73,1	73,1	
Hi/Hi	74	NR	94,2	89,1	89,1	

\* Valor de P log-rank para el corte medio  
 NR: No se ha conseguido, Het: HI/Lo y Lo/Hi

**Tabla 19**

**Tabla S10:** Análisis de la OS para pacientes con UICC-TNM I, II, III, según los cortes medios

	No. de pacientes	Supervivencia total (OS) para pacientes con UICC-TNM I, II, III			Valor de P*
		Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	
<b>GZM<sub>CT</sub></b>					
Lo	140	27,1	81,2	66,7	5,06 10 <sup>-2</sup>
Hi	133	NR	87,8	80,0	
<b>GZM<sub>RM</sub></b>					
Lo	119	30,4	83,3	70,2	7,28 10 <sup>-1</sup>
Hi	119	115,1	83,7	74,8	
<b>CD45RO<sub>CT</sub></b>					
Lo	122	21,4	79,0	63,5	2,13 10 <sup>-2</sup>
Hi	121	NR	86,0	80,8	
<b>CD45RO<sub>RM</sub></b>					
Lo	124	21,4	79,8	64,3	1,31 10 <sup>-1</sup>
Hi	122	NR	84,7	79,7	
<b>CD8<sub>CT</sub></b>					
Lo	139	24,8	82,5	63,9	8,49 10 <sup>-3</sup>
Hi	139	NR	85,9	82,9	
<b>CD8<sub>RM</sub></b>					
Lo	125	30,0	84,2	67,6	7,20 10 <sup>-2</sup>
Hi	124	NR	84,6	78,5	
<b>CD3<sub>CT</sub></b>					
Lo	139	18,9	78,0	62,5	9,15 10 <sup>-3</sup>
Hi	139	NR	89,4	83,0	
<b>CD3<sub>RM</sub></b>					
Lo	139	26,0	82,7	67,1	2,80 10 <sup>-2</sup>
Hi	138	NR	85,9	80,5	
<b>GZM<sub>CT/M</sub></b>					
Lo/Lo	72	111,4	82,6	66,9	6,09 10 <sup>-1</sup>
Het	74	76,1	82,3	72,3	
Hi/Hi	68	115,1	84,5	75,5	
<b>CD45RO<sub>CT/M</sub></b>					
Lo/Lo	71	87,3	78,4	69,2	2,48 10 <sup>-2</sup>
Het	100	74,2	81,1	71,1	
Hi/Hi	67	NR	87,7	85,7	
<b>CD8<sub>CT/M</sub></b>					
Lo/Lo	80	59,6	79,3	60,4	1,66 10 <sup>-2</sup>
Het	65	NR	88,5	73,4	
Hi/Hi	79	NR	83,7	82,2	
<b>CD3<sub>CT/M</sub></b>					
Lo/Lo	73	59,6	76,0	57,1	6,35 10 <sup>-3</sup>
Het	102	78,8	82,9	73,6	
Hi/Hi	74	NR	80,3	87,1	

\* Valor de P log-rank para el corte medio  
NR: No se ha conseguido, Het: HI/Lo y Lo/Hi

Tablas 20 (S11) y 21 (S12)

Tabla S11a: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según mínimo valor de P de corte

Variable	Proporción de riesgos	95% CI	valor P
Estadio T	1,574	(1,09-2,26)	0,02
Estadio N	1,398	(0,83-2,36)	0,21
Diferenciación	0,77	(0,42-1,43)	0,41
Patrones de CD3 <sub>cr</sub> /CD3 <sub>m</sub>	2,391*	(1,68-3,41)*	1,41 <sup>§</sup>
	2,379†	(1,67-3,39)†	

\* Corte de valor P mínimo con 3 grupos (HiHi, LoLo, Het)

† Método "leave-one-out", corrección utilizado  $c=0,199326$  (factor de corrección heurístico, Holländer y otros). Análisis con remuestreo "bootstrap" similar.

\* Nota: N viola la suposición de riesgos proporcionales este factor fue llevado a cabo y se obtuvo un factor de pronóstico independiente

T=0,01; Dif=0,22039,4x10

HR del modelo estratificado: T=1,572(1,10-2,25); D CD3<sub>cr</sub>/CD3<sub>m</sub> = 2,451(1,71-3,51). Factor de corrección: c=0,9!

Tabla S11c: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según media

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	valor P
Estadio T	1,560	(1,074-2,26)	0,02
Estadio N	1,490	(0,882-2,53)	0,14
Diferenciación	1,290	(0,682-2,45)	0,43
Patrones de CD3 <sub>cr</sub> /CD3 <sub>m</sub>	1,870	(1,311-2,66)	5,51 <sup>§</sup>

§ Corte en la media, con 3 grupos (HiHi, LoLo, Het)

Tabla S12a: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según el mínimo

Variable	Proporción de riesgos	95% CI	valor P
Estadio T	1,170	(0,90-1,52)	0,25
Estadio N	1,370	(0,90-2,11)	0,15
Diferenciación	1,050	(0,68-1,62)	0,84
Patrones de CD3 <sub>cr</sub> /CD3 <sub>m</sub>	1,890	(1,42-2,51)	1,21 <sup>§</sup>

\* Corte del valor de P mínimo con 3 grupos (HiHi, LoLo, Het)

Tabla S12c: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según la media

Variable	Proporción de riesgos	95% CI	valor P
Estadio T	1,200	(0,912-1,57)	0,20
Estadio N	1,450	(0,940-2,22)	0,09
Diferenciación	1,080	(0,689-1,68)	0,75
Patrones de CD3 <sub>cr</sub> /CD3 <sub>m</sub>	1,460	(1,107-1,92)	7,21 <sup>§</sup>

§ Corte en la media, con 3 grupos (HiHi, LoLo, Het)

Tabla S11b: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según mínimo valor de P de corte

Variable	Proporción de riesgos	95% CI	valor P
Estadio T	1,370	(0,86-2,19)	0,19
Estadio N	1,210	(0,60-2,47)	0,59
Diferenciación	1,020	(0,50-2,08)	0,97
Patrones de CD3 <sub>cr</sub> /CD3 <sub>m</sub>	6,200*	(2,96-12,99)*	1,31 <sup>§</sup>
	5,940†	(2,83-12,43)†	

\* Corte de valor P mínimo con 3 grupos (HiHi, LoLo, Het)

† Método "leave-one-out", corrección utilizado  $c=0,199326$  (factor de corrección heurístico, Holländer y otros). Análisis con remuestreo "bootstrap" similar.

\* Nota: N viola la suposición de riesgos proporcionales este factor fue llevado a cabo y se obtuvo un factor de pronóstico independiente

T=0,02; Dif=0,27043,3x10

HR del modelo estratificado: T=1,408(0,88-2,26); D CD3<sub>cr</sub>/CD3<sub>m</sub> = 6,322(2,99-13,35). Factor de corrección: c=0,!

Tabla S11d: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según media

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	valor P
Estadio T	1,484	(0,361-6,10)	0,58
Estadio N	2,065	(0,736-5,80)	0,17
Diferenciación	1,532	(0,571-4,11)	0,40
Patrones de CD3 <sub>cr</sub> /CD3 <sub>m</sub>	4,626	(1,736-12,33)	2,21 <sup>§</sup>

§ Corte de media, con 2 grupos (HiHi, LoLo)

Tabla S12b: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según el mínimo

Variable	Proporción de riesgos	95% CI	valor P
Estadio T	0,980	(0,69-1,39)	0,91
Estadio N	1,370	(0,75-2,52)	0,31
Diferenciación	1,590	(0,97-2,61)	0,07
Patrones de CD3 <sub>cr</sub> /CD3 <sub>m</sub>	3,710	(1,97-6,97)	4,71 <sup>§</sup>

\* Corte del valor de P mínimo con 2 grupos (HiHi, LoLo)

Tabla S12d: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según la media

Variable	Proporción de riesgos	95% CI	valor P
Estadio T	1,160	(0,818-1,66)	0,40
Estadio N	1,240	(0,696-2,19)	0,47
Diferenciación	1,480	(0,892-2,45)	0,13
Patrones de CD3 <sub>cr</sub> /CD3 <sub>m</sub>	2,200	(1,219-3,97)	8,81 <sup>§</sup>

§ Corte en la media, con 2 grupos (HiHi, LoLo)

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento *in vivo* para el pronóstico de pacientes para la progresión de un cáncer, que comprende las siguientes etapas:

5 a) la cuantificación, en una muestra de tejido tumoral de dicho paciente, como mínimo, de dos marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra el cáncer; y

10 b) la comparación del valor obtenido en la etapa a) para cada uno de dichos, como mínimo, dos marcadores biológicos con un valor de referencia predeterminado para el mismo marcador biológico; cuyo valor de referencia predeterminado se correlaciona con un pronóstico específico de la progresión de dicho cáncer,

15 en el que dichos, como mínimo, dos marcadores biológicos se cuantifican, en la etapa a), en las muestras tumorales recogidas de dos regiones en el tumor, respectivamente (i) el centro del tumor (CT) y (ii) el borde invasivo del tumor (IM);

en el que dichos, como mínimo, dos marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra el cáncer comprenden CD3 y CD45RO.

20 2. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 1, en el que la etapa a) se lleva a cabo cuantificando, como mínimo, tres marcadores biológicos distintos, respectivamente CD3, CD45RO y, como mínimo, un marcador biológico adicional seleccionado del grupo que comprende CDB y GZMB.

25 3. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 1, en el que la etapa a) se lleva a cabo cuantificando los cuatro marcadores biológicos distintos que comprenden CD3, CD45RO, CD8 y GZMB.

30 4. Procedimiento *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa a) es a) la cuantificación de dicho, como mínimo, un marcador biológico en una sección de tejido tumoral mediante inmunodetección, de forma separada tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el borde invasivo (IM).

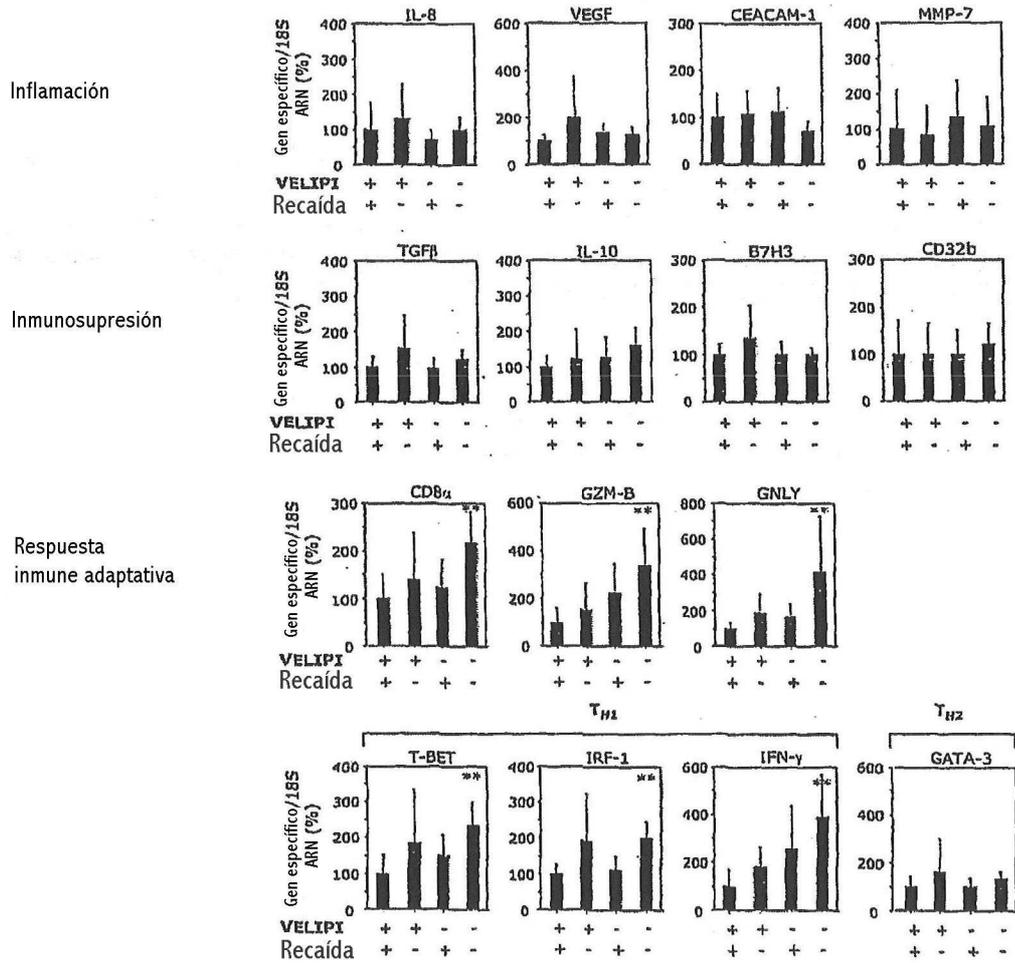


FIGURA 1

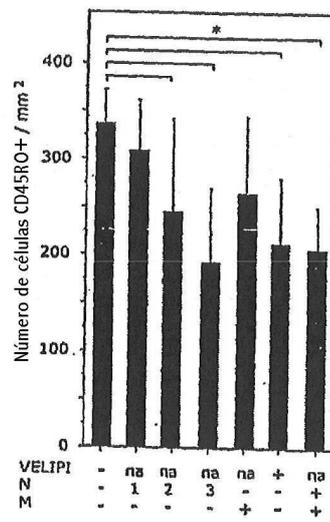


FIGURA 2

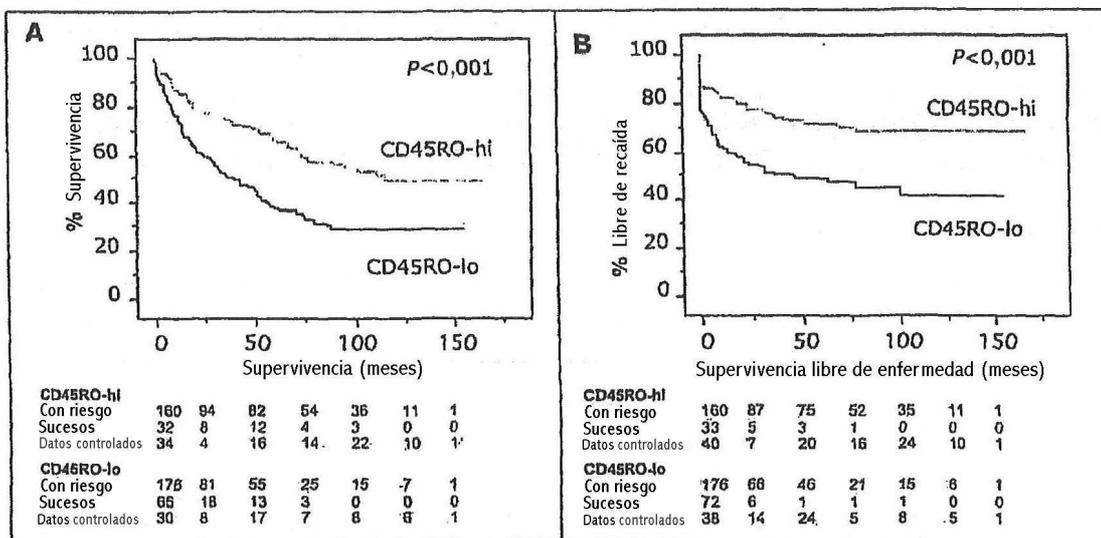


FIGURA 3

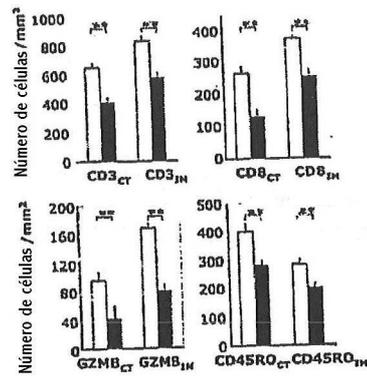


FIGURA 4

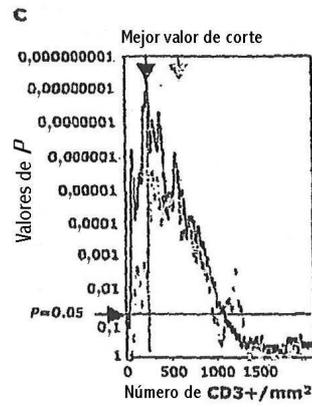


FIGURA 5



FIGURA 6

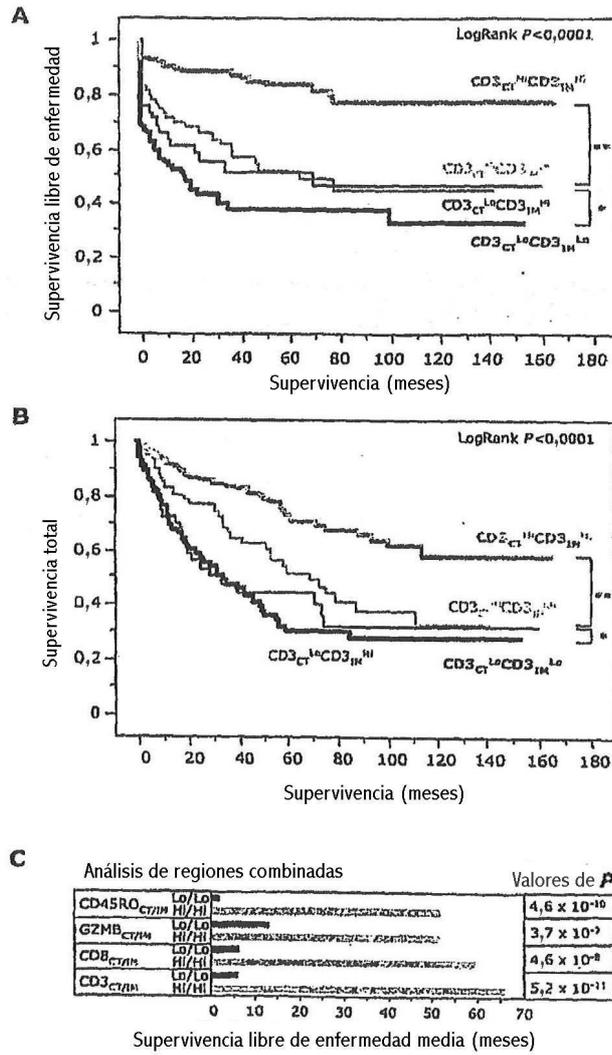


FIGURA 7

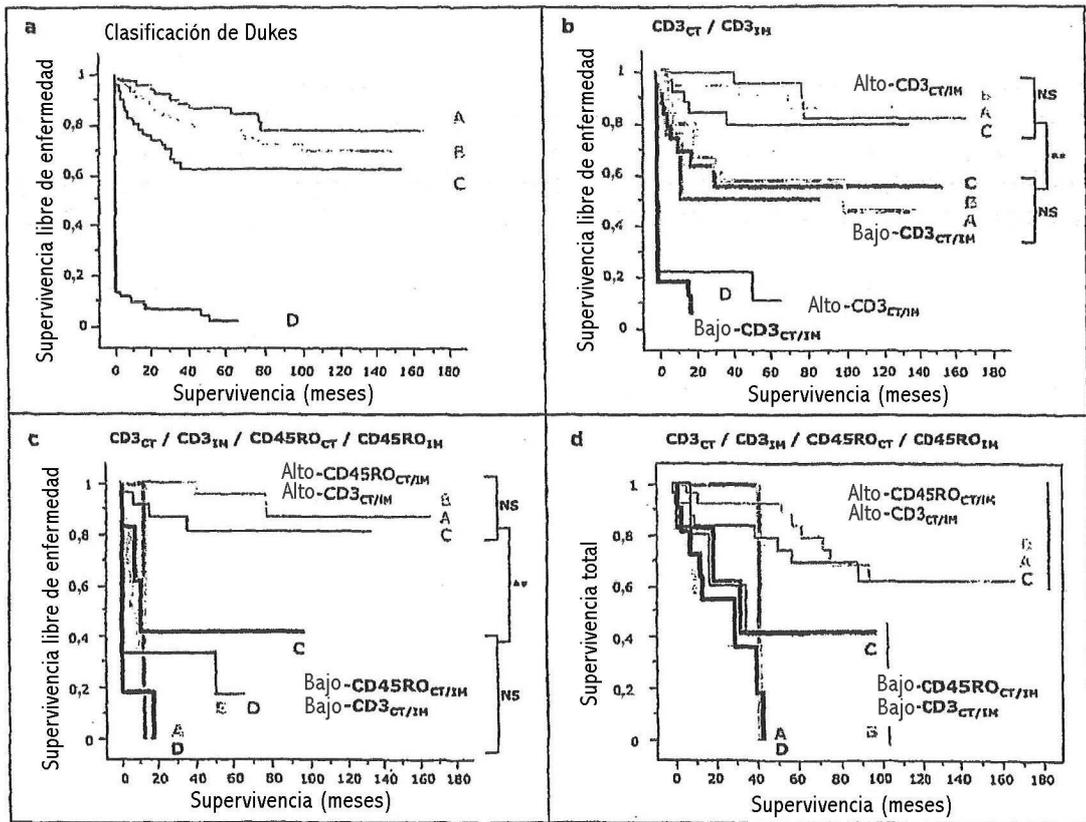
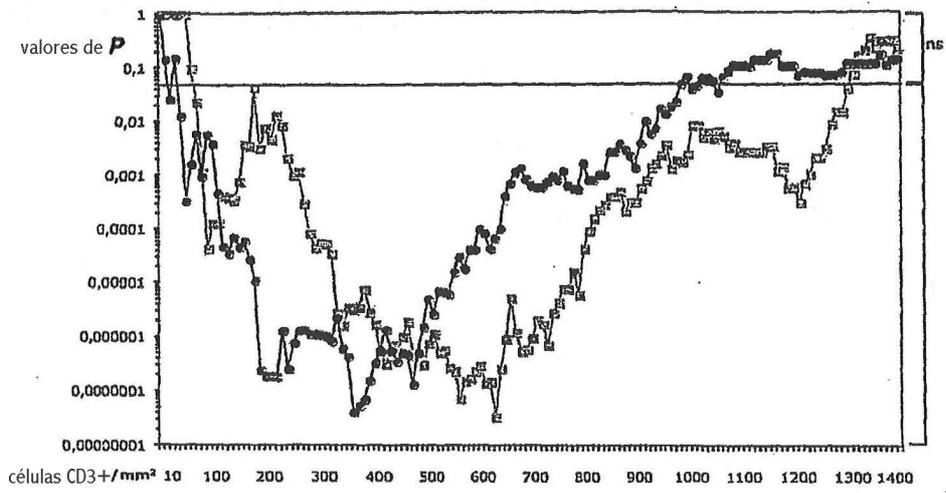


FIGURA 8

FIGURA 9



CT	Grupo A	2	49	100	136	174	204	234	263	283	298	317	328	333	338	343
	Grupo B	356	309	258	222	184	154	124	95	75	60	41	30	25	20	15
IM	Grupo A	0	12	36	66	106	133	164	198	222	241	266	288	306	319	337
	Grupo B	354	342	316	286	248	221	190	156	132	113	86	66	46	35	17

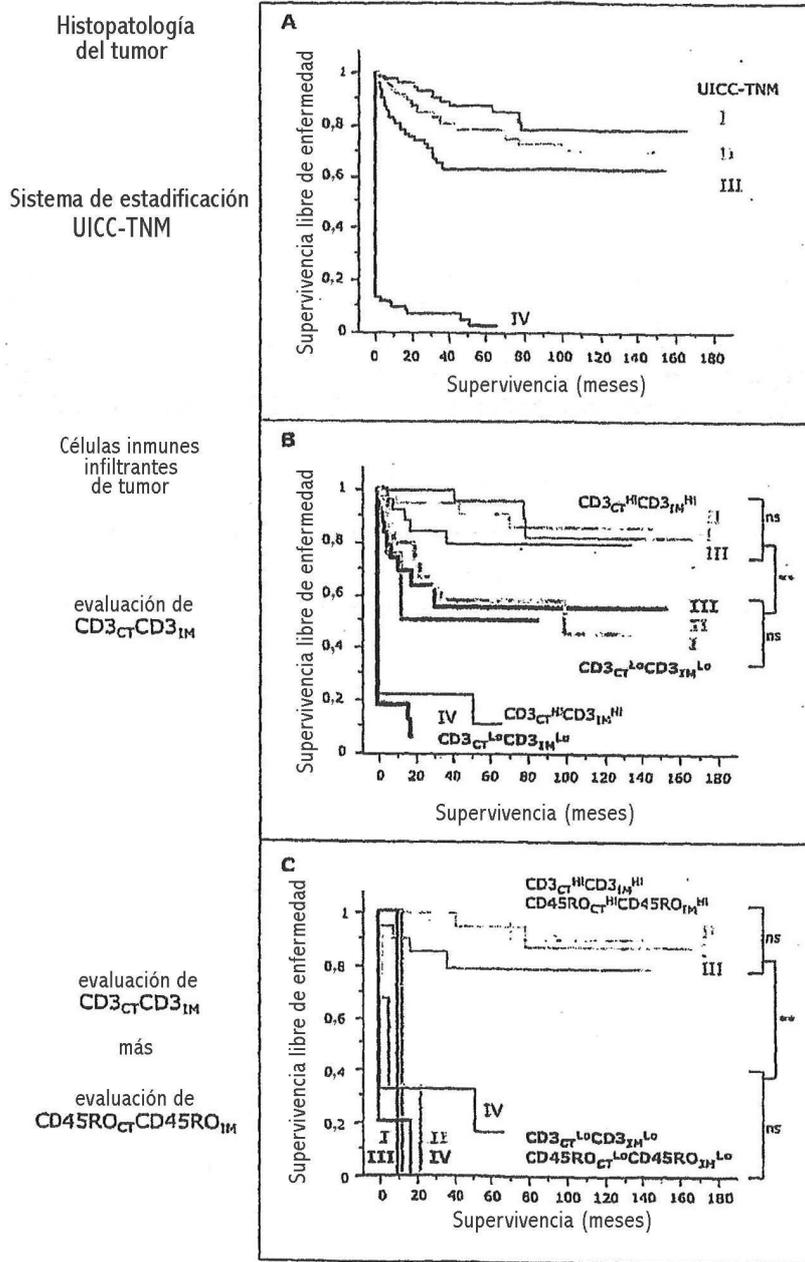


FIGURA 10

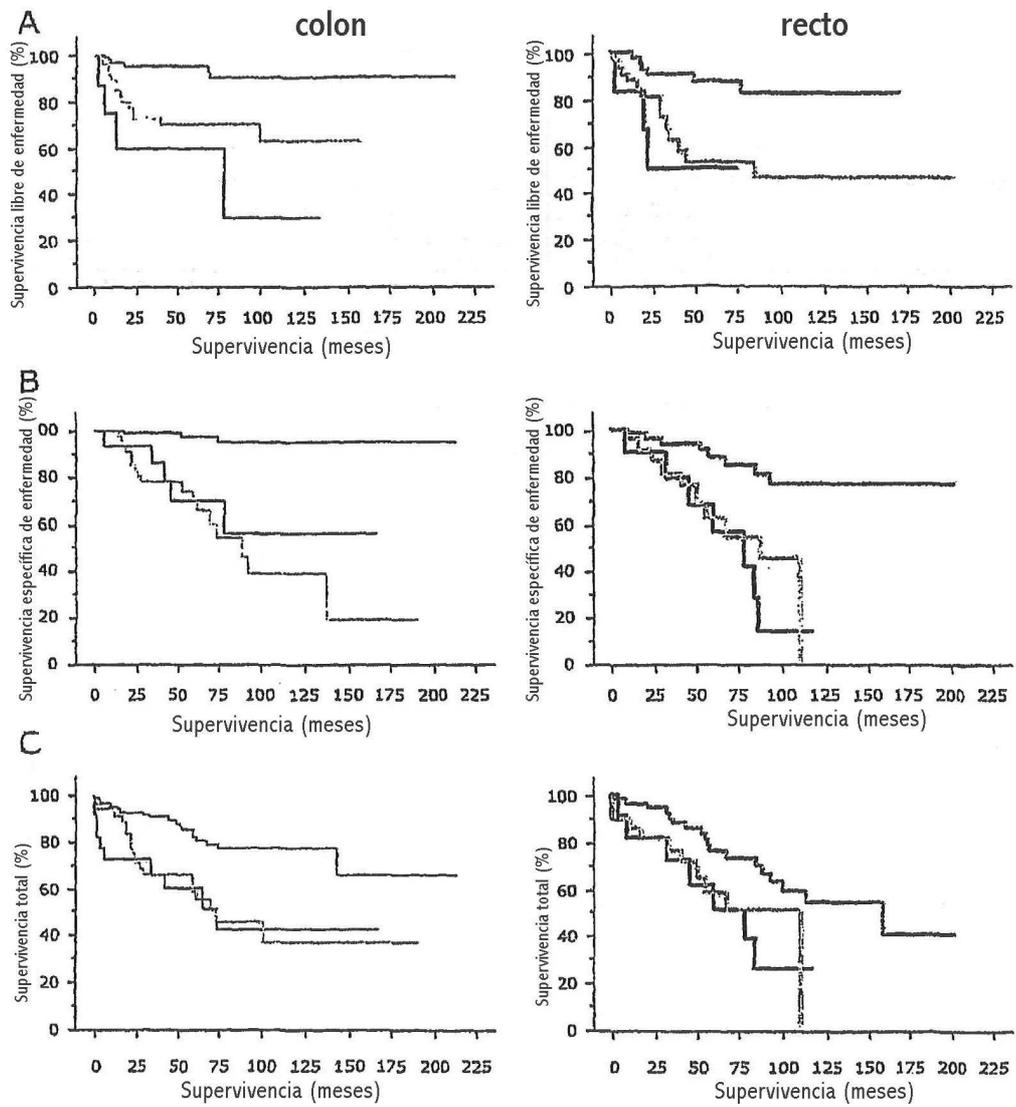


Figura 11

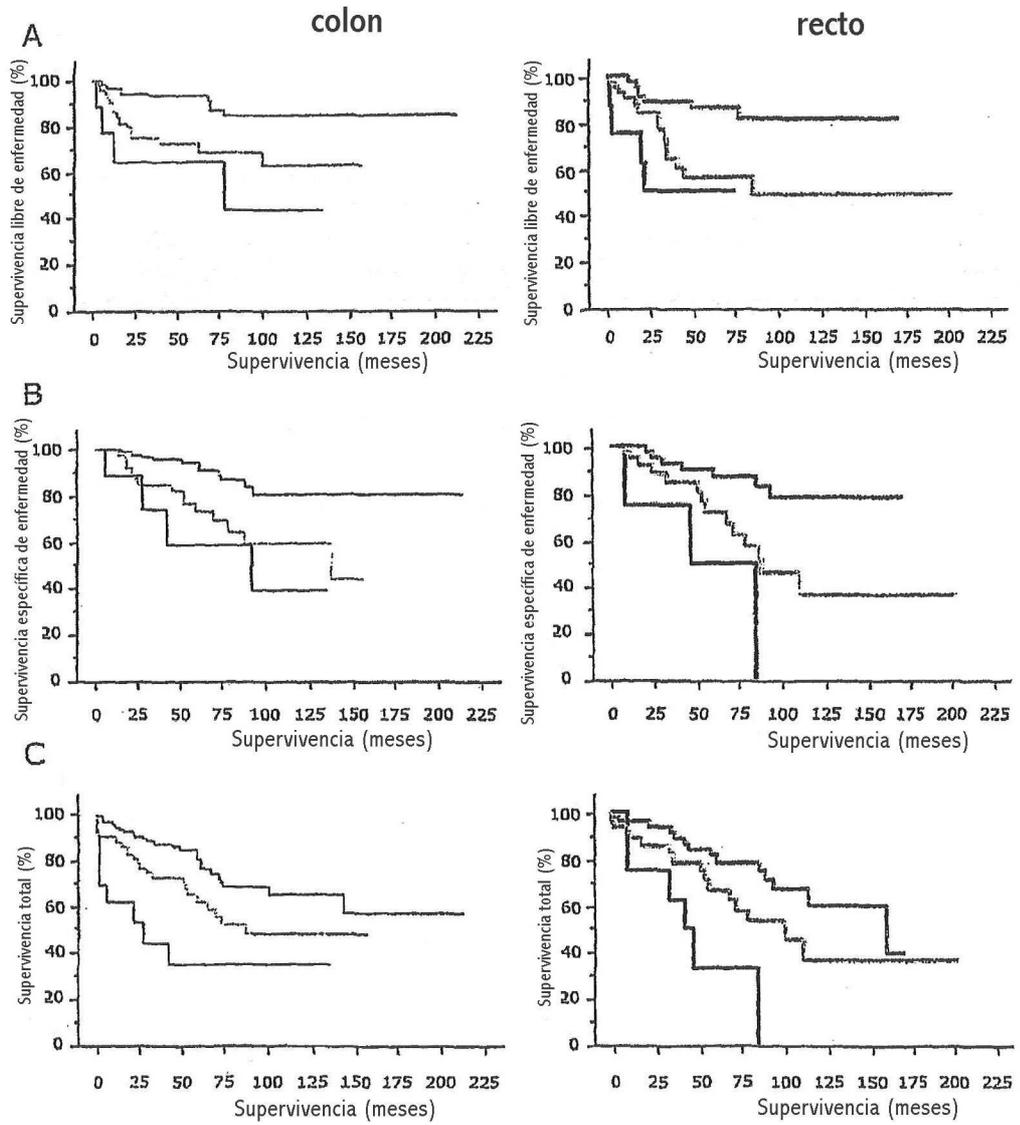


Figura 12

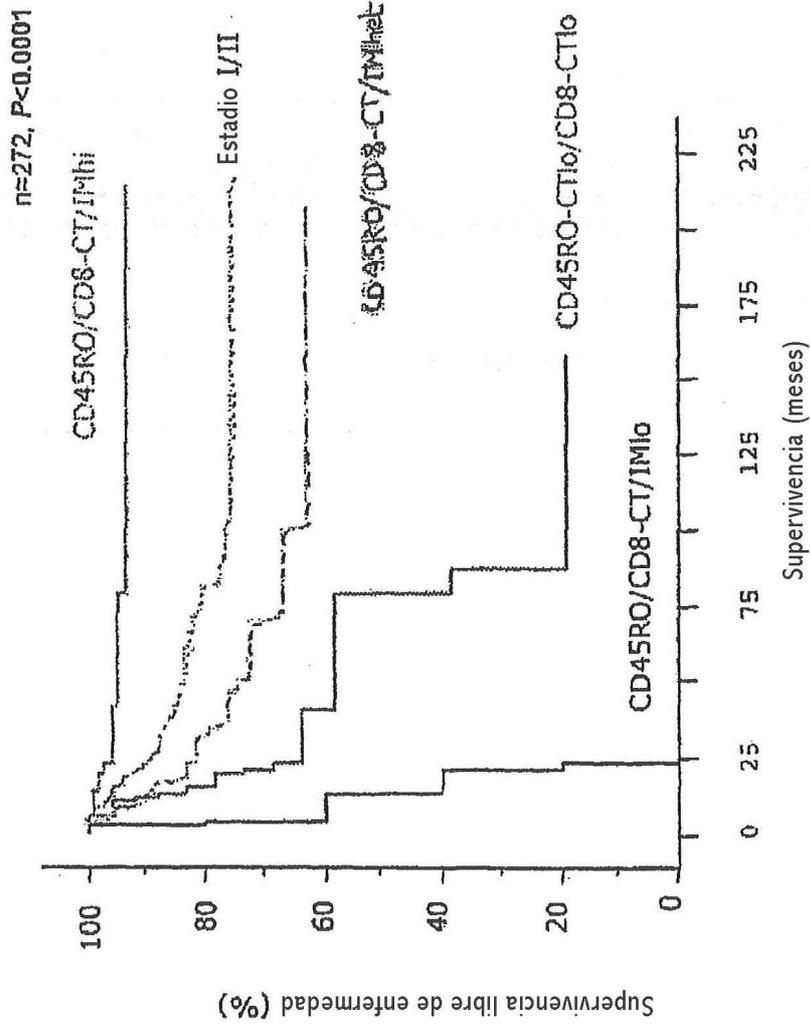


FIGURA 13

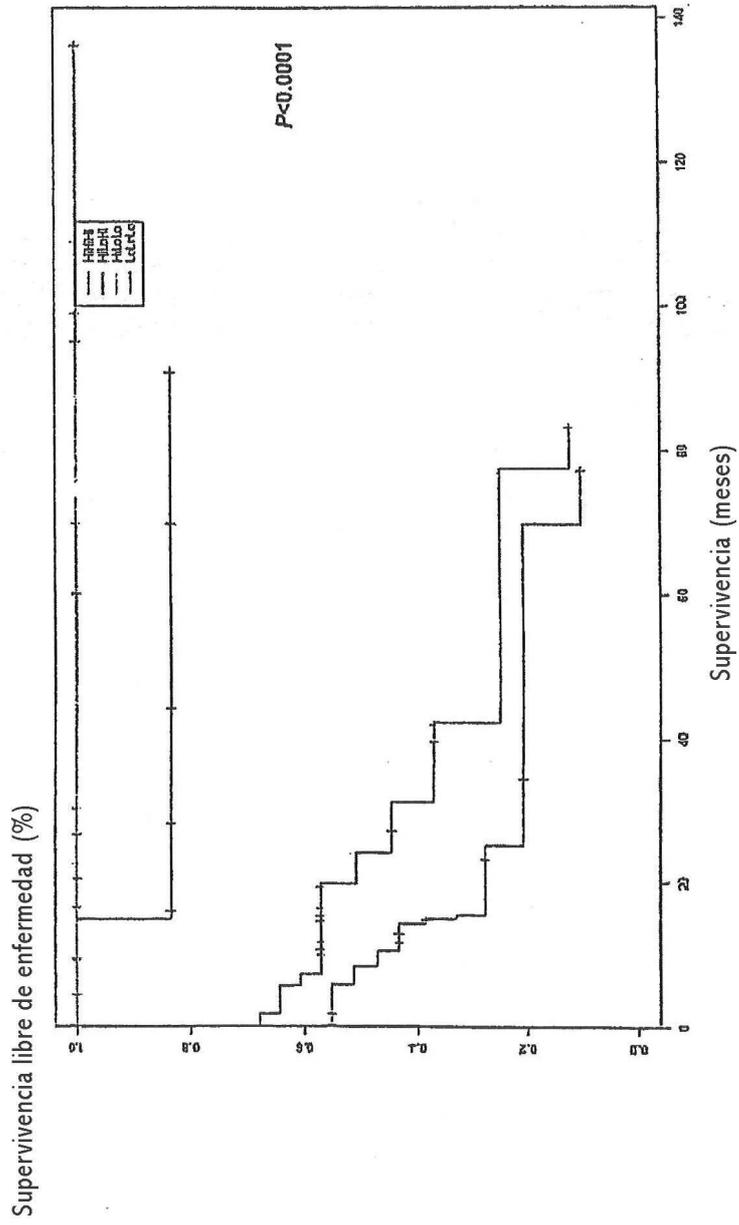


Figura 14