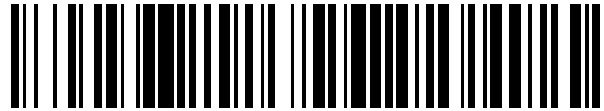


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 165**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2006 E 11180206 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2420837**

54 Título: **Procedimiento in vitro para el pronóstico de la progresión de un cáncer usando CD45 como marcador**

30 Prioridad:

02.02.2006 US 764356 P
19.10.2005 EP 05292200

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2014

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR

72 Inventor/es:

GALON, JÉRÔME;
PAGES, FRANCK y
FRIDMAN, WOLF-HERMAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 470 165 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 usando CD45 como marcador

Sector de la invención

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

- 5 Más precisamente, esta 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, o alternativamente el nivel de, la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra dicho cáncer.

Antecedentes de la invención

- 10 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 de la aplicación exitosa 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 actualmente son muy poco fiables.

- 15 En la actualidad, los tumores malignos se clasifican generalmente según el sistema TNM. El sistema de clasificación TNM (para "Tumor-Node-Metastasis", "Tumor-Ganglio-Metástasis") utiliza el tamaño del tumor, la presencia o ausencia de tumores en ganglios 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 la selección de una terapia apropiada y para propósitos de pronóstico. 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, 20 (N) el grado de implicación de ganglios linfáticos, que oscila entre N0 y N3 y (M) el grado de metástasis, que oscila entre M0 y M1.

- 25 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 un 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.

- 30 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 del cáncer, incluyendo para el diagnóstico o pronóstico de cánceres colorrectales.

- 35 En este contexto, diversos trabajos de la técnica anterior se dirigieron hacia la demostración de una relación entre (i) la presencia de, o el nivel de expresión de, diversos marcadores biológicos de la respuesta inmune del huésped 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 adecuadas.

- 40 De forma ilustrativa, Nistico et al. (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 del tumor y de la localización de linfocitos T CD3+, 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 45 inmunoterapéuticas más específicas y más eficaces contra el cáncer de mama.

- Philips et al. (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 α 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 en la comprensión de las interacciones huésped-tumor, con el objetivo de mejorar las estrategias inmunoterapéuticas de forma destacada. 50

Maki et al. (2004, *J. Gastroenterology and 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 ζ 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 et al. (1999, *British Journal of Cancer*, Vol. 79 (7/8): 1127-1132) también habían informado acerca de una expresión reducida de CD3 ζ 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 ζ .

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 et al. (2002, *Clinical Cancer Research*, Vol. 8: 3137-3145)). Prado-García et al. (2005, *Lung Cancer*, Vol. 47: 361-371) que realizaron observaciones similares, habían estudiado mecanismos de evasión de adenocarcinoma de pulmón midiendo 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 et al. (2003, *British Journal of Cancer*, Vol. 88: 223-230) que realizaron observaciones similares, determinaron un subconjunto extendido 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 et al. (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 estadística significativa entre (i) la presencia de, o el nivel de expresión de, estos marcadores biológicos 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 et al. (2002, *Cancer*, Vol. 94 (5): 1437-1442) demostraron que la expresión reducida de CD3- ζ se correlacionaba de forma negativa con la implicación de los ganglios linfáticos, la profundidad de la invasión, y el estadio clínico del carcinoma gástrico. De forma destacable, estos autores habían demostrado que una expresión reducida de CD3- ζ se correlacionaba con una tasa de supervivencia a los 5 años reducida de los pacientes, pero sólo para pacientes a los que se les había diagnosticado "Estadio IV" de carcinoma gástrico.

Oshokiri et al. (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+ intratumoral demostraba una correlación significativa con (i) metástasis de ganglio 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 bien 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 et al. (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 a los 5 años, independientemente del estadio de Dukes y la edad.

De forma adicional, Zhang et al. (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

5 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 de 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 total 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.

10 Aunque los trabajos de la técnica anterior dieron a conocer la buena correlación mencionada anteriormente entre (i) la presencia de, o el nivel de, algunos marcadores biológicos 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 clínico-patológicos 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 et al. (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 et al. (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 et al. (2003, *Supra*) dieron a conocer la proporción CD4+/CD8+ como un 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 clínico-patológicos convencionales.

15 Sólo Oshikiri et al. (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 et al. sólo utilizaron dicho marcador biológico como una confirmación de una estadificación de cáncer anterior mediante un procedimiento de estadificación clínico-patológico convencional. Adicionalmente, los valores de correlación estadística encontrados por Oshikiri et al. (2003) entre (a) el número de células T CD8+ intratumorales y (b) diversos parámetros clínicos como (i) metástasis de ganglios 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 técnica que utilizaran este marcador biológico para un pronóstico del cáncer exacto y fiable sin la utilización concomitante de datos estadificación clínico-patológicos convencionales.

20 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 clínico-patológicos concomitantes generados mediante procedimientos de estadificación de cáncer convencionales.

25 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.

30 Por lo tanto, existe en la técnica 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 clínico-patológicos de estadificación.

35 De forma destacable, la disponibilidad de procedimientos de pronóstico mejorados permitiría una selección mejor de pacientes para tratamientos terapéuticos apropiados, incluyendo antes y después de cirugía. 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 reseccionado. 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 ganglios linfáticos, dada la toxicidad de dicho tratamiento y su carencia de beneficios para los otros pacientes.

40

45

50

Resumen de la invención

La presente invención se refiere al procedimiento como se define en la reivindicación 1.

Descripción de las figuras

55 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+/mm² 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 ($P < 0,05$).

5 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+/mm², n=176, línea superior), y en CD45RO-lo (<250 células CD45RO+/mm², 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).

10 Figura 5. La significancia de todos los cortes se representó en función del número de CD3_{CT}/mm² (negro), y CD3_{IM}/mm² (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).

15 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_{CT}^{Hi}) y densidad alta de CD3 en el borde invasivo (CD3_{IM}^{Hi}) (gris grueso), CD3_{CT} alta y CD3_{IM} baja (gris delgado), CD3_{CT} baja y CD3_{IM} alta (negro delgado), y CD3_{CT} baja y CD3_{IM} baja (negro grueso), en 415 pacientes con cáncer colorrectal (prueba estadística de rango logarítmico, $P < 10^{-4}$ para OS y DFS; ** $P < 10^{-4}$, * $P < 0,05$). 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

(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.

25 (8b): Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la DFS según los estadios de Dukes (tal como en 8a) y para la presencia de CD3_{CT} baja más CD3_{IM} baja (líneas gruesas, n=93) o CD3_{CT} alta más CD3_{IM} alta (líneas delgadas, n=109).

30 (8c): Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la DFS según los estadios de Dukes y para la presencia de CD3_{CT} baja más CD3_{IM} baja más CD45RO_{CT} baja más CD45RO_{IM} baja (líneas gruesas, n=25) o CD3_{CT} alta más CD3_{IM} alta más CD45RO_{CT} alta más CD45RO_{IM} alta (líneas delgadas, n=87). ** $P < 10^{-4}$.

(8d): Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la OS según los estadios de Dukes y para la presencia de CD3_{CT} baja más CD3_{IM} baja más CD45RO_{CT} baja más CD45RO_{IM} baja (líneas gruesas, n=25) o CD3_{CT} alta más CD3_{IM} alta más CD45RO_{CT} alta más CD45RO_{IM} alta (líneas delgadas, n=87).

35 Figura 9: Valores de P de rango logarítmico para la duración de la DFS según la presencia de densidad alta de CD3+ (CD3^{Hi}, grupo A) y densidad baja de CD3+ (CD3^{Lo}, grupo B) en el centro del tumor (negro), y en el borde invasivo del tumor (gris). Se representan las densidades de células CD3+ (célula/mm²), y el número de pacientes en cada grupo (A y B). Los valores de P son significativos para un intervalo grande de cortes (50-1.000 células/mm² en el centro del tumor, y 80-1.300 células/mm² 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.

40 Figura 10: (Fig. 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. (Fig. 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_{CT}^{Lo}CD3_{IM}^{Lo}, líneas gruesas, n=93; CD3_{CT}^{Hi}CD3_{IM}^{Hi}, 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. (Fig. 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_{CT}^{Lo}CD3_{IM}^{Lo} más CD45RO_{CT}^{Lo}CD45RO_{IM}^{Lo}, líneas gruesas, n=16; CD3_{CT}^{Hi}CD3_{IM}^{Hi} más CD45RO_{CT}^{Hi}CD45RO_{IM}^{Hi}, líneas delgadas, n=88). Los valores de corte fueron 250, 640, 60, y 190 para CD3_{CT}, CD3_{IM}, CD45RO_{CT}, y CD45RO_{IM}, respectivamente. Prueba estadística de rango logarítmico, ** $P < 10^{-4}$.

55 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 de rango logarítmico, $P < 0,001$ para todas las comparaciones).

5 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+ en 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 de rango logarítmico, $P < 0,001$ para todas las comparaciones).

15 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 de rango logarítmico, $P < 0,001$ 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/IM-lo estaban libres de la enfermedad después de sólo 2 años.

25 Figura 14: curvas de Kaplan-Meier que 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 de rango logarítmico, $P < 0,001$ para todas las comparaciones).

Descripción detallada de la invención

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, o alternativamente el nivel de, la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra dicho cáncer.

Actualmente se ha demostrado de forma sorprendente, según la 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 ganglios linfáticos regionales.

35 Esta correlación altamente significativa estadísticamente entre (i) el nivel de la respuesta inmune adaptativa del 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.

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

45 Tal como se detallará a continuación, cuando se ha determinado una correlación estadística entre (i) la presencia de, o el nivel de, uno o más marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa, tal como se describe en la 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 invención, que se pueden comparar con valores de P de 5×10^{-2} a 1×10^{-3} que se daban a conocer en diversos trabajos de la técnica anterior, tales como, de forma ilustrativa, los de Zhang et al. (2003, *Supra*), Diederischen et al. (2003, *Supra*) u Oshikiri et al. (2003, *Supra*).

55 El solicitante ha descubierto que existe una relación altamente significativa (por ejemplo, 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 inmunquímica o bien (ii) análisis de expresión génica.

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.

5 Mediante el análisis de marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa mediante análisis inmunohistoquímico (i) en el centro del tumor (CT), (ii) en el entorno 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).

10 En primer lugar, se ha descubierto, según la 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.

15 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.

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).

20 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).

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 ganglios 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 linfovasculares 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 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 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, o el nivel de, marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa, tiene un valor de pronóstico que es superior e independiente de aquellos de procedimientos de estadificación del cáncer clínico-patológicos 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 clínico-patológicos 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 invención, que la detección de una respuesta inmune adaptativa fuerte en el sitio del tumor se correlacionaba altamente con un tiempo largo de supervivencia libre de enfermedad (DFS) y tiempo largo de supervivencia total (OS) de los pacientes.

Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención consiste en un procedimiento *in vitro* como se define en la reivindicación 1.

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

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

10 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).

Por lo tanto, los criterios utilizados según el procedimiento de pronóstico del cáncer de la 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).

15 Por lo tanto, se ha descubierto por primera vez, según la 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 clínico-patológicos aportados por procedimientos de estadificación del cáncer convencionales.

20 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.

30 La realización del procedimiento de pronóstico del cáncer de la 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.

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 un 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 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 que rodea directamente al tumor, pudiendo ser dicho tejido denominado más específicamente “borde invasivo” del tumor, (iv) islotes linfoides muy cercanos al tumor, (v) los ganglios linfáticos localizados muy cerca del tumor, (vi) una muestra de tejido tumoral recogida antes de cirugía (para el seguimiento de pacientes después del tratamiento, por ejemplo), y (vii) una metástasis distante.

45 Una muestra de tejido tumoral, independientemente de si se obtiene a partir del centro del tumor, del borde invasivo del tumor, o de los ganglios 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 después de una resección del tumor quirúrgica o después de la recogida 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 recogida muy 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 someterse a técnicas preparativas y de almacenamiento posteriores a la recogida, por ejemplo, fijación.

Tal como se pretende en esta descripción, la “respuesta inmune adaptativa” engloba la presencia o la actividad, incluyendo el nivel de activación, de células del sistema inmune del paciente con cáncer huésped localmente en el sitio del tumor.

10 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.

15 La respuesta inmune adaptativa significa la respuesta inmune específica del paciente con cáncer huésped contra el tumor y engloba la presencia de, o el número de, o alternativamente la actividad de, células implicadas en la respuesta inmune específica del huésped que incluye:

Tal como se utiliza en esta descripción, los linfocitos T engloban linfocitos T cooperadores, que incluyen subgrupos de células de linfocitos T cooperadores Th1 y Th2.

Tal como se utiliza en esta descripción, los linfocitos T también engloban linfocitos T citotóxicos.

Inmunidad adaptativa

20 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 ese antígeno.

25 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 continúa desarrollándose toda la vida y aumenta las futuras respuestas a un determinado antígeno.

30 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.

35 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 estas células se multiplicarán y aportarán “memoria” al sistema inmune. Esto 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.

Sistema inmune adaptativo

45 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:

50 El sistema inmune humoral, que 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 principales de células T:

5 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 a esa 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.

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

15 Células T citotóxicas: una célula T citotóxica (o TC) 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 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 el interior de la célula diana, haciendo que ésta se expanda y finalmente sufra lisis. Las TC también liberan granzima, una serin 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+.

25 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 profesionales (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 interleuquina2 (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+.

35 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

40 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 ganglios 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.

45 Tal como se pretende en esta descripción, un “marcador biológico” comprende cualquier parámetro detectable, mensurable 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 invención cuando se encuentra una buena correlación estadística entre (i) un incremento o una 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 cada marcador y, por lo tanto, determinar la relevancia estadística de dicho marcador como un “marcador biológico”, según la invención, se puede utilizar uno cualquiera de los procedimientos estadísticos conocidos por un experto en la técnica. De forma ilustrativa, se pueden utilizar procedimientos estadísticos que utilizan las curvas de Kaplan-Meier y/o análisis univariable usando el ensayo de rango logarítmico 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 univariable y multivariable (por ejemplo, ensayo de rango logarítmico y ensayo de Cox, respectivamente) comprende un “marcador biológico” utilizable en el procedimiento para el pronóstico del cáncer de la invención.

55

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

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

5 Los marcadores biológicos también incluyen la presencia de, o la cantidad de, cualquier material biológico 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, o la cantidad de, ARN mensajero (ARNm) transcrito a partir de ADN genómico que codifica proteínas que se producen específicamente por células del sistema inmune, en el sitio del tumor.

10 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 ganglios linfáticos más cercanos, o de forma alternativa, ARNm que codifica dichos antígenos de superficie.

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

20 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 invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica todos los linfocitos T y las células NKT.

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 invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica linfocitos T citotóxicos.

25 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 invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica linfocitos T de memoria o linfocitos T efectores de memoria.

30 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.

Descripción del procedimiento *in vitro* para el pronóstico del cáncer

Etapas a) del procedimiento

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

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

40 (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.

(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.

45 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 específico de la respuesta inmune adaptativa. En general, se ensaya una combinación, como mínimo, de dos 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 específico, 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 cm^2 o 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 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 recogen 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 inventores creen que la relevancia estadística alta que han descubierto entre (i) los valores de cuantificación de los marcadores biológicos de interés, 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 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 multivariable, 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 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 en 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 la etapa a) del procedimiento de pronóstico del cáncer según la invención, el marcador o marcadores biológicos se cuantifican en (i) una muestra de tejido del centro del tumor y en (ii) una muestra de tejido a partir del tejido que rodea directamente el tumor, tejido que puede denominarse más específicamente como el "borde invasivo" del tumor. En estas realizaciones, el valor de cuantificación que se obtiene, al final de la etapa a), para cada muestra de tejido tumoral (i) o (ii), se compara, en la etapa b) del procedimiento, con los valores de referencia correspondientes, determinados previamente para cada una de las muestras de tejido tumoral (i) a (ii), 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 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 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.

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

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

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

15 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;

20 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 dicha colección de muestras de tejido tumoral;

25 c) calcular, a partir 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.

30 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.

35 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.

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 de "corte" que se pueden determinar tal como se describe a continuación.

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

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;

45 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);

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

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

(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;

5 (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;

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;

10 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);

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

15 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.

20 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 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 invención, el valor obtenido en la etapa a) con el intervalo de valores que delimitan dicho valor de "corte", para un marcador biológico específico. 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 más alto (por ejemplo, en general, el valor de P mínimo que se encuentra).

35 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 específico 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 relacionada 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).

45 De hecho, para llevar a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer según la 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 cualquiera de los procedimientos para la obtención de valores de referencia predeterminados que se han descrito anteriormente, para una pluralidad de marcadores biológicos.

50 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 absoluto o tiempo de supervivencia libre de enfermedad largo.

5 En algunas realizaciones, el valor predeterminado de referencia comprende un valor de "corte", tal como se ha descrito anteriormente, valor de "corte" 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+/mm² 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+/mm² 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 50 células CD3+/mm² a 1.000 células CD3+/mm² para una cuantificación en el centro del tumor (CT) y de 80 células CD3+/mm² a 1.300 células CD3+/mm² para una cuantificación en el borde invasivo (IM).

15 Los valores de corte óptimos basados en pruebas de rango logarítmico, para densidades de células CD3, CD8, CD45RO, GZMB fueron 370, 80, 80, 30 células/mm² en el centro del tumor, respectivamente, y 640, 300, 190, 60 células/mm² en el borde invasivo, respectivamente, tal como se muestra en los ejemplos de esta descripción.

20 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.

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 invención comprende comparar, para cada marcador biológico ensayado, respectivamente:

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

30 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 específico 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 específico el mismo número de etapas de comparación que el número de lugares del tumor en el que dicho marcador biológico específico se cuantifica. Especialmente para las situaciones en las que se cuantifica un marcador biológico específico de forma separada tanto en el CT como en el IM en la etapa a), entonces la etapa b) comprende, para dicho marcador biológico específico, dos etapas de comparación, respectivamente:

- 40 (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
- (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).

45 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 de rango logarítmico de *P*, tal como se describe en los ejemplos de esta descripción.

50 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 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.
- 5
- 10 Los inventores creen que un motivo adicional para explicar la elevada relevancia estadística del procedimiento de pronóstico *in vitro* según la 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 con pronóstico malo.
- 15 De este modo, en una realización de las más preferentes del procedimiento *in vitro* según la invención, el valor de referencia predeterminado para cada marcador biológico específico, 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 valor de referencia predeterminado específico aumenta con el número de muestras de tejido que se utilizan para obtener los valores de cuantificación para un marcador biológico específico y, de este modo, para calcular un valor promedio (el valor de referencia predeterminado) que se asocia con un resultado del cáncer específico. De este modo, otra explicación para la elevada exactitud del procedimiento de pronóstico *in vitro* según la 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.
- 25
- 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 específico, 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 específico, por ejemplo, DFS u OFS de más de 5 años después del diagnóstico. En realizaciones preferentes, se obtiene un valor de referencia predeterminado, como
- 35 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 específico.
- 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
- 40 pacientes con cáncer.
- La posibilidad según la 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).
- 45
- Etapa c) del procedimiento
- El procedimiento de pronóstico del cáncer *in vitro* de la invención comprende adicionalmente una etapa c) en la que se proporciona el resultado del pronóstico *per se*.
- De este modo, el procedimiento de pronóstico del cáncer de la invención comprende una etapa c) adicional en la que, dependiendo del marcador o marcadores biológicos utilizados:
- 50
- (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 específico, o una combinación específica de marcadores biológicos, es superior o inferior, respectivamente, al valor o valores de referencia predeterminados correspondientes; o bien
- 55
- (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 específico, o una combinación específica 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 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 específico, o una combinación específica 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 específico, o una combinación específica de marcadores biológicos, es superior o inferior, respectivamente, a dicho valor o valores de referencia predeterminados correspondientes;

15 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
20 etapa b) del procedimiento de pronóstico del cáncer de la invención, se determina un pronóstico bueno cuando el valor de cuantificación para un marcador biológico específico 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 específico 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.

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

30 Cuando se lleva a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la 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.

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

35 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.

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 invención, puede variar de forma destacada según el tipo de técnica de cuantificación que se lleva a cabo en la etapa a).

40 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 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
45 utilizando un método inmunohistoquímico para la cuantificación de un marcador biológico, y utilizando una combinación de tres marcadores biológicos distintos, o más.

50 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 inventores creen que la relevancia altamente estadística (valor de P inferior a 10^{-3}) se consigue cuando la etapa
55 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 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, tejido que puede denominarse más específicamente el "borde invasivo" del tumor, (iv) los ganglios linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (v) una biopsia de tumor realizada antes de la cirugía (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 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 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.

Preferentemente, dicho, como mínimo, un marcador biológico, que se cuantifica en la etapa a) es 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.

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

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.

30 Aunque el procedimiento de pronóstico del cáncer según la 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 inventores creen que el procedimiento de pronóstico del cáncer de la 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 las células del sistema inmune.

35 De este modo, el procedimiento de pronóstico del cáncer según la 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 condromixóide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de célula gigante del hueso, cordoma, 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), cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer endometrial (por ejemplo, adenocarcinoma endometrial, adenocantoma, adenocarcinoma papilar seroso, célula clara), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, fibroma de célula pequeña), tumores carcinoides gastrointestinales (por ejemplo, coriocarcinoma, corioadenoma destruens), 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, esteseuroblastoma, 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, rhabdomyosarcoma (por ejemplo, rhabdomyosarcoma embrionario, rhabdomyosarcoma alveolar, rhabdomyosarcoma 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 anaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma medular tiroideo), cáncer vaginal, cáncer vulvar, y cáncer uterino (por ejemplo, leiomyosarcoma uterino).

55

En la presente especificación, el nombre de cada uno de los distintos 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 experto en la técnica 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 realizaciones adicionales más del procedimiento, como ya se ha mencionado anteriormente, los valores de cuantificación para una combinación de marcadores biológicos se obtienen en la etapa a) del procedimiento de pronóstico de cáncer de la invención.

Por lo tanto, el procedimiento de pronóstico de cáncer de la invención puede llevarse a cabo con una combinación de marcadores biológicos. El número de marcadores biológicos utilizado sólo está limitado por el número de marcadores biológicos distintos de interés que están disponibles prácticamente en el momento de llevar a cabo el procedimiento. Sin embargo, un número demasiado alto de marcadores biológicos incrementará significativamente la duración del procedimiento sin mejorar significativamente simultáneamente la determinación del pronóstico final.

Habitualmente, en las realizaciones en las que se lleva a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la invención con una combinación de marcadores biológicos, no se cuantifican más de 50 marcadores biológicos distintos en la etapa a). En la mayor parte de las realizaciones, 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, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50 marcadores biológicos distintos. Sin embargo, como ya se ha mencionado previamente en la presente especificación, el número de marcadores combinados que se requieren para conseguir una relevancia estadística alta (por ejemplo, P menor de 10^{-3}), dependerá del tipo de técnica para cuantificar dicha combinación de marcadores biológicos, en la etapa a) del procedimiento de pronóstico *in vitro*.

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

En el procedimiento de la invención el marcador biológico es CD45RO.

De forma ilustrativa, 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, ó 28 marcadores biológicos distintos, marcadores biológicos que 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, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, 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 invención con técnicas inmunohistoquímicas.

Procedimientos generales para la cuantificación de marcadores biológicos

Para llevar a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la invención se puede utilizar uno cualquiera de los procedimientos conocidos por los expertos en 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 una cualquiera de las técnicas estándares y no estándares (emergentes) muy 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.

- 5 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 cualquiera de una 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 invención también abarca hibridomas producidos mediante este procedimiento y anticuerpos producidos utilizando dichos hibridomas. También se pueden utilizar anticuerpos policlonales.

25 La expresión de un marcador biológico de la 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 de ácidos nucleicos, 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 marcadora o un fragmento de la misma, incluyendo una proteína marcadora que ha experimentado toda o una parte de su modificación normal posterior a la traducción.

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 marcador, 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.

45 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.

55 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, tejido que puede denominarse más específicamente el "borde invasivo" del tumor, (iv) los ganglios linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (v) una biopsia de tumor realizada antes de la cirugía (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 invención pueden utilizarse para detectar ARNm, proteína, 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 interaccionen 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 experto en la técnica, o pueden obtenerse a partir de preparaciones biológicas adecuadas. Para el objetivo de detección de la 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.

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). 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.

A efectos de llevar a cabo 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 que no han formado complejos (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.

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 marcadores detectables que se han discutido en esta descripción y que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

También es posible detectar directamente la formación del complejo marcador/sonda sin manipulación o marcado adicional de cada componente (marcador o sonda), por ejemplo, utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (véase, por ejemplo, Lakowicz et al., Patente de Estados Unidos No. 5.631.169; Stavrianopoulos, et al., 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 la 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 debe 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).

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 et al., 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 en tiempo real entre moléculas biológicas.

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 que forman un complejo se separan de los componentes que no forman un complejo 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 que no forman un complejo 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 que forman un complejo de las que no forman un complejo. 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 que no forman un complejo relativamente más pequeños. De forma similar, las propiedades de carga relativamente diferente del complejo marcador/sonda si se compara con los componentes que no forman un complejo se pueden explotar para diferenciar el complejo de los componentes que no forman un complejo, por ejemplo, a través de la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Los expertos 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 que forman un complejo de los componentes no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., 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 expertos en 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 et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York 1987-1999). De forma adicional, se pueden procesar fácilmente grandes cantidades de muestras de tejido utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en 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 ó 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 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 gel 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 matriz de chip génico Affymetrix. Un experto 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 et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Replicasa Q-Beta (Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197), replicación por círculos rodantes (Lizardi et al., 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 expertos en 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' ó 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 aproximadamente 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 muestra de células o de tejido se prepara/procesa mediante métodos histológicos conocidos. A continuación, la muestra se inmoviliza sobre un soporte, habitualmente un portaobjetos de vidrio 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 del marcador 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 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; así 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 manera tal 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 experto 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 invención.

5 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 y modificadas, poliacrilamidas, gabbros y magnetita.

10 Un experto en la técnica conocerá muchos otros transportadores adecuados 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 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 invención.

20 Cuantificación de marcadores biológicos por micromatrices de tejido

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

25 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 et al. (Nature Medicine en 1998) dan a conocer la técnica de forma destacada.

30 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.

35 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 ganglios 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 portaobjetos de TMA resultantes con los mismos tejidos en las mismas posiciones de coordenadas. Los portaobjetos 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.

45 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 único bloque de parafina 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 de tejido, las cuales, a continuación, se pueden utilizar para diferentes análisis genéticos.

50 Además de la velocidad aumentada de los análisis, las micromatrices de tejido también pueden asegurar la reproducibilidad y fiabilidad del procedimiento de pronóstico del cáncer según la 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 de tejido que se exponen en dicho bloque de parafina receptor se cortan en secciones, habitualmente secciones de 2-5 µm, 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.

10 Cuantificación de marcadores biológicos por inmunohistoquímica sobre portaobjetos 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 cualquiera de los procedimientos de inmunohistoquímica conocidos en la técnica.

15 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, tejido que se puede denominar más específicamente "borde invasivo" del tumor y (iv) los ganglios 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).

20 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.

25 Cuantificación de marcadores biológicos por procedimientos de citometría de flujo

En algunas realizaciones, se puede cuantificar un marcador biológico, o un conjunto de marcadores biológicos, con uno 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.

30 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.

35 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

40 En algunas realizaciones, se puede cuantificar un marcador biológico, o un conjunto de marcadores biológicos, con uno cualquiera de los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos 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 (CT), (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente el tumor, tejido que se puede denominar más específicamente "borde invasivo" del tumor, (iv) los ganglios linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor y (vi) una metástasis distante

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

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

50 Para llevar a cabo uno 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

invención, se requieren un par de cebadores que se hibriden específicamente con el ARNm diana o con el ADNc diana.

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

5 En algunas realizaciones, para cada uno de los marcadores biológicos de la 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/cgi-bin/Primer-Viewer>.

10 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 et al., cuya descripción entera se incorpora en esta descripción como referencia.

15 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 et al., (Kinetics PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions, *Bio/Technology*, vol. 11, págs. 1026-1030 (1993)), Ishiguro et al., (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 et al., (Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid cycle DNA Amplification, *Biotechniques*, vol. 22, págs. 130-138 (1997.))

20 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., et al., *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., et al., *Anal. Biochem.* 189: 202-208 (1990); y Pang, S., et al., *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.

30 Además, es difícil utilizar los procedimientos convencionales de cuantificación por PCR, tales como electroforesis en gel o hibridación por captura en placas para determinar que todas las muestras se analizan, de hecho, durante la fase log de la reacción, tal como requiere el procedimiento.

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., et al., *BioTechniques* 14: 70-81 (1993); y Piatak, M. J., et al., *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 que la molécula diana.

40

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

45 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 informadora fluorescente que aumenta a medida que el producto de PCR se acumula con cada ciclo de amplificación. Las moléculas informadoras 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 Taqman®).

50 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 et al., la descripción completa de la cual se incorpora en esta descripción como referencia.

55 De forma ilustrativa, para la cuantificación de marcadores biológicos de la 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, tejido que se puede denominar de forma más específica "borde invasivo" del tumor, (iv) los ganglios linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (v) una biopsia de tumor llevada a cabo antes de la cirugía (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 el ADNc resultante 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.

- 5 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.

10 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” (“UICC TNM classification of malignant tumors”). 6ª ed. Nueva York: Wiley-Liss, 2002), tal como se describe en la tabla 1. Se definió la invasión metastásica 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 microentorno tumoral” (“Tumor 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 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 linfovascuales, invasión del tumor perineural (VELIPI). Se registraron los datos sobre quimioterapia adyuvante y paliativa. Se administró quimioterapia adyuvante basada en 5-fluorouracilo (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 de los pacientes 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 del tumor, 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. 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 los 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 tumoral y el estroma peritumoral en cinco campos de potencia media (microscopio Nikon, objetivo x 20). La densidad de infiltrado inmune registrada como 1 (débil), 2 (moderada) ó 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 ó 3, se observó en el 18%, 60% y 22% de las series, respectivamente.

(c) ganglios 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 ganglio linfático preexistente. Se requirieron dos agregados linfoides grandes en una sección para la presencia de esta característica (resultado 2). 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 ganglios 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 N₂ 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 en tiempo real 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 N₂ 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 ("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 en tiempo real 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 inmunes se midieron como un porcentaje del número total de todas las células y un porcentaje del número total 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, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and 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, Francia), 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 reseccionaron 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 µm/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 univariable utilizando la prueba de rango logarítmico (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 las covariables encontradas significativas en el análisis univariable. Se utilizaron los mismos ensayos para calcular el efecto de la densidad de CD45RO (número de células/mm²) sobre la supervivencia total y libre de enfermedad, solo o junto con las covariables de estadificación (T, N, M) del tumor, ganglio 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 fluorouracilo (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 microentorno tumoral" ("Tumor MicroEnvironment Database") disponible bajo petición, en un tercer nivel de arquitectura utilizando Java-2 Enterprise-Edition (J2EE) para integrar los datos clínicos, y los datos de tecnologías de alto rendimiento.

20 A.4. Histopatología

Análisis de PCR Taqman en tiempo real

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

25 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

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 (AE1/AE3) y citoqueratina-8 (Neomarkers, Fremont, CA). Se aplicaron el sistema Envision+ (esqueleto polimérico conjugado a enzima acoplado con anticuerpos secundarios) y DAB-chromogen (Dako, Copenhagen, 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 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) (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.

40 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.

Análisis estadístico

45 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 et al., 2002, Faseb J, Vol. 16 : 61). Se utilizó el paquete pvcluster R para validar los agrupamientos "clusters" formados.

50 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 proporciones de supervivencia a los 2, 4 y 5 años para la OS y DFS. La prueba de rango logarítmico se utilizó para comparar la supervivencia libre de enfermedad y total entre pacientes 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/ mm^2 en el centro del tumor y 640, 300, 190 y 60 células/ 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 de rango logarítmico de DFS se corrigieron utilizando la fórmula propuesta por Altman et al. (D.G.

Altman et al., 1994, J. Natl Cancer Inst, Vol. 86: 829). De forma adicional, los valores de *P* de rango logarítmico de la DFS y OS se calcularon utilizando la validación cruzada 2 veces (D. Faraggi et al., 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).

5 Se aplicó un modelo de riesgos proporcionales de Cox multivariable al marcador de regiones combinadas CD3_{CT}CD3_{IM} 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
10 Holländer et al. (N. Hollander et al., 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).

15 En todo el texto, un 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

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

1.1 Invasión metastásica temprana y resultado clínico

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

25 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).

30 Además, la presencia de más de una señal de invasión metastásica 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 de rango logarítmico, *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 todas las covariables significativas sobre la supervivencia se ensayó simultáneamente utilizando un modelo de riesgos proporcionales de Cox. El análisis multivariable, ajustando a la
35 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).

1.2 Infiltración de células inmunes, inflamación, invasión metastásica temprana y pronóstico

40 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.

45 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 (TGFβ, IL-10, B7-H3, y CD32b) y el estado VELIPI o la recaída (figura 1 y datos no mostrados).

50 Las células T se diferencian en células T_H1 o T_H2 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+, granulicina+, 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 figura1, CD8α, granulicina, 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).

Además, los tumores negativos a VELIPI de pacientes que no habían tenido recaída tenían un aumento significativo de los mediadores de T_H1 , T-bet, IRF-1, e IFN- γ en comparación con tumores positivos a VELIPI de pacientes que habían recaído ($P<0,05$). En cambio, el factor de transcripción de T_H2 , GATA-3, no aumentó en ningún grupo de pacientes (figura 1).

5 Ejemplo 2: Fenotipos de células inmunes infiltrantes de tumor

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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

Ejemplo 3: Células T de memoria efectoras y supervivencia

35 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 ($R^2=0,914$, $P<0,001$).

40 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 ganglios linfáticos (N-) y negativos para metástasis (M-) ($P<0,001$).

Los estadios avanzados de invasión de ganglios linfáticos (N2, N3) estaban asociados a densidades bajas de CD45RO en los tumores (figura 2).

45 El análisis de riesgos proporcionales de Cox multivariable 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 de rango logarítmico, $P<0,001$). 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.

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.

5 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+ infiltrantes se correlacionaba con un resultado clínico bueno.

10 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.

15 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 metastásica temprana.

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

20 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.

25 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.

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

35 Por el contrario, no se expresaron de forma diferencial ni mediadores proinflamatorios ni moléculas inmunosupresoras. En los tumores con señales tempranas de invasión metastásica, 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, activación y diferenciación de células T estaban aumentados en tumores que carecían de estas señales.

40 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 metastásica temprana, estadio patológico y supervivencia.

45 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 metastásica temprana y supervivencia prolongada.

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

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).

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 co-modulados, compuesto de genes relacionados a T_H1 (Tbet, IRF-1, IFN γ) e inmuno-adaptativos (CD3 ζ , CD8, GLNY, GZMB), y dos agrupamientos que se refieren a mediadores proinflamatorios e inmunosupresores.

5 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 β).

10 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 homogéneo 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.

15 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.

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

20 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 6.640 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.

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 (CT o IM) significativamente más alta (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 la discriminación de los pacientes en cuanto a tiempos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total (1.600 pruebas de rango logarítmico). 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 de rango logarítmico 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 $1,4 \times 10^{-6}$) (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 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 significativamente 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.

55 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 inmunes 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).

5 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
10 estratificaron a los 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).

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 a los ganglios linfáticos locales (Clasificación de Dukes A, B, C). En cambio, una respuesta inmune adaptativa débil *in situ* se correlacionaba con un pronóstico muy malo, incluso en
15 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 linfovascular y perineural) y de invasión de los ganglios linfáticos estaba asociada con la presencia de una densidad fuerte de células T de memoria efectoras intratumorales (T_{EM}).

En el presente ejemplo también se determina si la evaluación adicional de la densidad de células de memoria (CD45RO+) respecto a la densidad de células T CD3+ en las dos regiones del tumor también discrimina a los
20 pacientes con riesgo de recurrencia de tumor. CD3_{CT}/CD3_{IM}/CD45RO_{CT}/CD45RO_{IM} 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).

25 En la presente descripción, utilizando la medición cuantitativa de alto rendimiento de parámetros inmunes celulares y moleculares, se caracterizaron las fuerzas inmunológicas en el microentorno 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
30 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 metastásica de las células tumorales.

35 Sin embargo, la correlación de la expresión de los marcadores inmunes adaptativos *in situ*, moléculas asociadas a T_{H1} 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
40 capacidad de protección antitumoral de larga duración de estas células, tal como se muestra en un modelo en ratones¹⁸.

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.

45 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
50 hacia el ganglio o ganglios 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
55 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 extenso 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

5 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 microentorno 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 co-modulados para la inmunidad adaptativa de T_{H1} (factor de transcripción 21 de la caja T (T-bet), factor 1 regulador del interferón (IRF1), IFN γ , CD3 ζ , CD8, granulinsina (GLNY), granzima B (GZMB)). Una estructura en árbol jerárquica clasificando a 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 recurrido, 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 re-análisis 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 entre los pacientes, 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) ($100 \times CV$ 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% de 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 en las dos regiones del tumor se correlacionaba con un pronóstico favorable sin tener en cuenta la extensión local del tumor y la invasión a ganglios 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 limitación de la diseminación del tumor 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 multivariable, después de ajustar la invasión del tumor (estadio T), la diferenciación del tumor y la invasión de ganglios 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 de 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).

- 5 Además, tal como se muestra en las figuras 11 y 12, el procedimiento de pronóstico *in vitro* según la 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 invención es altamente fiable para el pronóstico del resultado de cánceres en pacientes que han sufrido cánceres en un estadio temprano.

- 10 También de forma adicional, tal como ilustra la figura 14, se ha demostrado que el procedimiento de pronóstico *in vitro* según la invención permite un pronóstico exacto del resultado de cánceres, utilizando, como el uno o más marcadores biológicos, una combinación o 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.

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

Se descubrió una correlación positiva entre la presencia de marcadores para la polarización de T_{H1} , 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 et al., 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 a los pacientes con riesgo alto que son los que más se podrían beneficiar de las terapias adyuvantes.

Tabla 1 : Supervivencia Libre de enfermedad y Total (n= 959 pacientes)									
	N. de pacientes	Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS)			Supervivencia Total (OS)			Valor P	
		Índice a 5 años %	Media de meses	Valor P	Índice a 5 años %	Media de meses	Valor P		
Etapa T				<0.001	s			<0.001	s
pTis	39	48.7	55.7			48.7	55.7		
pT1	54	42.6	52.2			44.4	53.8		
pT2	156	40.4	43.6			44.2	49.1		
pT3	502	23.7	16.5			26.7	25.8		
pT4	208	16.8	1.6			17.8	16.8		
Etapa N				<0.001	s			<0.001	s
N0	568	35.4	34.6			38.6	43.1		
N+	384	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
RC	243	23.9	14.5			24.7	19.7		
TC	51	7.8	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			36.5	40.4		
Diferenciación				0.26	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		
N. de ganglios linfáticos analizados				0.11	ns			0.69	ns
<8	426	34.0	31.0			37.1	40.0		
≥8	533	21.4	12.9			23.5	23.2		
VE				<0.001	s			<0.001	s
No	797	31.0	23.6			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		
VE+LI				<0.001	s			<0.001	s
No	884	28,3	19,7			31,2	31,0		
Sí	75	12,0	0,2			9,3	11,9		
VE or LI				<0.001	s			<0.001	s
No	716	31,6	24,4			35,2	35,0		
Sí	243	13,6	3,7			12,8	16,3		
VE+LI+PI				<0.001	s			<0.001	s
No	911	28,0	19,5			30,7	30,5		
Sí	48	8,3	0,1			6,3	9,5		
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		

RC: Colon Derecho, TC: Colon Transversal, LC: Colon Izquierdo, SC: Colon Sigmoide, R: Recto
 VE: Embolia Vasculat, LI: Invasión Linfática, PI: Invasión Perineural
 Prueba de Rango Logarítmico del valor P

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
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, alfa polipéptido (p32)	NM_001768	2p12
GNLY	Granulisina	NM_006433	2p12-q11
BIRC5	5 que contiene la repetición IAP de baculovirus (survivina)	NM_001168	17q25
		NM_198053	
CD3Z	antígeno CD3Z, zeta polipéptido (complejo TIT3)	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 phamingen
CD103	Integrina alfa E	Ber-ATC8	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
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 phamingen
CD14	CD14	M5E2	IgG2a	APC	ratón	BD phamingen
CD152	CTLA-4	BNI3	IgG2a	APC	ratón	BD phamingen
CD154	CD40L	TRAP1	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD178	FasL	NOK1	IgG1	-	ratón	BD phamingen
CD183	CXCR3	1C6 / CXCR3	IgG1	APC	ratón	BD phamingen
CD184	CXCR4	12G5	IgG2a	APC	ratón	BD phamingen
CD19	CD19	H1B19	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD1a	CD1a	HI149	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD210	IL-10R-alfa	3F9	IgG2a	PE	rata	BD phamingen
CD25	IL-2R-alfa	M-A251	IgG1	APC	ratón	BD phamingen
CD26	Dipeptidil-peptidasa IV	M-A261	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD27	CD27	M-T271	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD28	CD28	CD28,2	IgG1	APC	ratón	BD phamingen
CD3	CD3c	UCHT1	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD3	CD3c	UCHT1	IgG1	CyCr	ratón	BD phamingen
CD3	CD3e	S4,1	IgG2a	PE-Cy5	ratón	serotec
CD32	FcγRII	AT10	IgG1	FITC	ratón	serotec
CD4	CD4	RPA-T4	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD4	CD4	RPA-T4	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD44	CD44	G44-26	IgG2b	APC	ratón	BD phamingen
CD45	CD45	HI30	IgG1	CyCr	ratón	BD phamingen
CD45Ra	CD45Ra	HI100	IgG2b	FITC	ratón	BD phamingen
CD45Ro	CD45Ro	UCHTL1	IgG2a	APC	ratón	BD phamingen
CD47	CD47	B6H12	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD49d	VLA-4	9F10	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD5	CD5	UCHT2	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD54	ICAM-1	HA58	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD56	CD56	B159	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD62L	L-selectina	Dreg56	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD69	CD69	FN50	IgG1	APC	ratón	BD phamingen
CD7	CD7	M-T701	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD8	CD8	RPA-T8	IgG1	APC	ratón	BD phamingen
CD8	CD8	HIT8a	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD80	B7,1	L307,4	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD83	CD83	HB15e	IgG1	PE	ratón	BD phamingen
CD86	B7,2	FUN-1	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD95	Fas	DX2	IgG1	APC	ratón	BD phamingen
CD97	CD97	VIM3b	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CD98	CD98	UM7F8	IgG1	FITC	ratón	BD phamingen
CXCR6	CXCR6	56811	IgG2b	PE	ratón	R&D systems
GITR	GITR	polidonal	IgG	-	cabra	R&D systems
HLA-DR	HLA-DR	G46,6(L243)	IgG2a	FITC	ratón	BD phamingen
ICOS	ICOS	C394,4A	IgG	PE	ratón	clinisciences

Tabla 3: Lista de anticuerpos (continuación)

Anticuerpo	Nombre común	Clon	Isotipo	Fluoróforo	especie	Fabricante
IFN γ RII	IFN γ RII	polidonal	IgG	-	cabra	R&D systems
IL-18R α	IL-18R α	70625	IgG1	PE	ratón	R&D systems
KIR-NKAT2	KIR-NKAT2	DX27	IgG2a	FITC	ratón	BD phamingen
PD1	PD1	J116	IgG1	PE	ratón	clinsciences
Estreptavidina	Estreptavidina	-	-	APC -	-	BD phamingen
TCR $\alpha\beta$	TCR $\alpha\beta$	T10B9.A1-31	IgM	FITC	ratón	BD phamingen
TGFRII	TGFRII	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
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

Tabla 4: Análisis de correlación

Genes	Correlación	95% CI	P
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

Tabla 4: Análisis de correlación

Genes	Correlación	95% CI	P
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 / 0.301)	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

Tabla 5		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	Hi	129	60,93	50,78	45,31	49,2	1,53 E-04
	Lo	185	40,64	29,41	24,59	16,6	
CD3-CT	Hi	192	60,41	48,95	43,75	45,9	3,90 E-08
	Lo	165	28,91	19,87	16,26	5,9	
CD3-IM	Hi	178	59,77	49,72	44,69	47,8	3,37 E-08
	Lo	175	35,42	24,57	20,00	12,9	
GZM-CT/IM	HiHi	95	62,74	51,96	46,07	51,4	3,67 E-07
	LoLo	80	39,43	29,57	25,35	12,9	
CD45RO-CT/IM	HiHi	151	60,26	52,31	47,68	51,6	4,57 E-10
	LoLo	41	16,66	11,90	9,52	1,8	
CD8-CT/IM	HiHi	96	65,62	55,20	50,00	59,2	4,61 E-08
	LoLo	93	30,85	21,27	17,02	5,9	
CD3-CT/IM	HiHi	109	69,72	61,46	55,04	66,2	5,20 E-11
	LoLo	93	27,95	19,35	13,97	5,9	

Tabla 6

Tabla 6		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	HiHi	109	72,48	64,22	55,96	63,9	5,07 E-08
	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	P
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 _{CT} /CD3 _M	0,570	(0,450-0,721)	2,8 E-06
Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	P
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 _{CT} /CD8 _M	0,614	(0,480-0,786)	1,1 E-04
Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	P
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 _{CT} /CD45RO _M	0,564	(0,439-0,723)	6,2 E-06
Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	P
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 _{CT} /GZMB _M	0,591	(0,459-0,76)	4,3 E-05

*M estratificada

Tabla 7: Análisis de riesgos proporcionales multivariado para la OS

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	P
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 _{CT} /CD3 _M	0,726	(0,587-0,897)	3,0 E-03

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	P
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 _{CT} /CD8 _M	0,712	(0,571-0,888)	2,5 E-03

Variable*	Proporción de riesgos	95% CI	P
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 _{CT} /CD45RO _M	0,703	(0,558-0,885)	2,8 E-03

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 _{CT} /GZMB _M	0,905	(0,722-1,14)	3,9 E-01

Tabla 8

Combinaciones genéticas	Estado 1	Estado 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. de relapso	Valor de P logRank	LOLO frente a combinación	HHH 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
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

TABLA 8 (Continuación 1)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	Ho. sin relapso	Ho. de relapso	Valor de P logRank	LOL O frente a combinación	HIFI frente a combinación
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		0,00411737
STAT1 IRF1	1	1	25	21	7	0,00017203	0,00136119	1
STAT1 IRF1	0	0	68,96551724	9	20	0,00017203		0,00136119
GATA3 CD8A	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		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		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		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		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		3,28E-04
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

TABLA 8 (Continuación 2)

Combinaciones genéticas	Estado 1	Estado 2	Porcentaje relapso	Ho. sin relapso	Ho. de relapso	Valor de P logRank	LOL O frente a combinación	HRH frente a combinación
GPLY CD4	1	0	22,22222222	14	4	0,00023630	2,62E-04	0,22728471
GPLY 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 GPLY	1	1	30,3030303	23	10	0,00027678	0,00119011	1
TNFRSF6B GPLY	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 PDCD1LG1	1	1	31,70731707	28	13	0,00031033	0,00180905	1
PDCD1LG2 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 IRF1	1	0	57,14285714	9	12	0,00031619	0,24654453	0,05090421
TBX21 PDCD1LG1	1	1	27,77777778	26	10	0,00033814	8,35E-04	1
TBX21 PDCD1LG1	0	0	68,57142857	11	24	0,00033814	1	8,35E-04
TNF GPLY	1	1	34,48275862	19	10	0,00033997	4,10E-04	1
TNF GPLY	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
PDCD1LG1 IRF1	1	0	55,55555556	4	5	0,00035285	0,45891075	0,24655356

TABLA 8 (Continuación 3)

Combinaciones genéticas	Estado 1	Estado 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. de relapso	Valor de P logRank	LOL frente a combinación	HHI 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

TABLA 8 (Continuación 4)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. de relapso	Valor de P logRank	LOL frente a combinación	H1H1 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 PDCCD1	1	1	27,02702703	27	10	0,00047832	9,77E-04	1
PDCD1LG1 PDCCD1	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
PDCCD1 GNLY	1	1	31,42857143	24	11	0,00058024	6,84E-04	1
PDCCD1 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

TABLA 8 (Continuación 5)

Combinaciones genéticas	Estadio 1	Estadio 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. de relapso	Valor de P logRank	LOLO frente a combinación	HHH 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
TGFBI GNLY	1	1	29,03225806	22	9	0,00071504	0,00204606	1
TGFBI 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

TABLA 8 (Continuación 6)

Combinaciones genéticas	Estado 1	Estado 2	Porcentaje relapso	No. sin relapso	No. de 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
TNFRSF8 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	71,42857143	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	0,3996356
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 tum 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

TABLA 9 (Continuación 1)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
BMP2	BMP2	Vía TGF	Proteína 8a morfogenética 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
BTLA	BTLA	Inmunidad adaptativa	Asociado a linfocitos B y T	NM_181780
C3	C3	C3		NM_000064
CASP3	apoptosis	apoptosis		NM_004346
CASP9	caspasa 9, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis, Gen hCG25367 Anotación Celera			NM_001229.2
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

TABLA 9 (Continuación 2)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
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	ligando CCR4, MDC, T-reg espec	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	Eotaxina-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	Eotaxina-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-1a	vía de quimioquina	SCYA3	NM_002983
CCL5	Rantes	vía de quimioquina	SCYA5	NM_002985
CCL7	MCP-3	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 7	NM_006273
CCL8	MCP-2	vía de quimioquina	Quimioquina (motivo C-C) ligando 8	NM_005623
CCNB1		ciclo celular		NM_031966

TABLA 9 (Continuación 3)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
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 glóbulos rojos de oveja	Inmunidad adaptativa		NM_001767

TABLA 9 (Continuación 4)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
CD226	PTA1; DNAM1; DNAM-1; TLISA1 Resumen: CD226 es una glicoproteína de ~ 65 kDa expresada en la superficie de células NK, plaquetas, monocitos y un subconjunto de células T. Es un miembro de la super familia Ig que contiene 2 dominios similares a Ig del conjunto V y está codificada por un gen sobre el cromosoma 18q22.3. CD226 media la adhesión a otras células que contienen un ligando no identificado y el entrecruzamiento de CD226 con anticuerpos causa la activación celular	adhesión, activación		NM_006566

TABLA 9 (Continuación 5)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
CD244	receptor 2B4 de células asesinas naturales CD244			NM_016382
PDCD1LG1	B7H1	Inmunidad adaptativa		NM_014143
CD28	CD28	Inmunidad adaptativa		NM_006139
CD34	CD34	CD34		NM_001773
CD36	antígeno CD36 (receptor de colágeno tipo I, receptor de trombospondina)			NM_0010015 47 NM_0010 01548 NM_0 00072
CD38	CD38	Inmunidad adaptativa		NM_001775
CD3E	antígeno CD3E, polipéptido épsilon (com- plejo TiT3) TIT3	Inmunidad adaptativa		NM_000733
CD3G	antígeno CD3G, polipéptido gamma (com- plejo TiT3)	Inmunidad adaptativa		NM_000073
CD3Z	antígeno CD3Z, polipéptido zeta (com- plejo TiT3)	Inmunidad adaptativa		NM_000734
CD4	CD4 antigen (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 adaptativa		NM_001251
CD69		Inmunidad adaptativa		NM_001781

TABLA 9 (Continuación 6)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
CLIP	antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo de histocompatibilidad principal, asociado a antígeno clase II)	vía MHC		NM_001025158 NM_001025159 NM_004355
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 1, tipo 1, E-cadherina E (epitelial)	adhesión, metástasis	Embolo	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)	

TABLA 9 (Continuación 7)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
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 2B (p15, inhibe CDK4)	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

TABLA 9 (Continuación 8)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
CREBBP		vía CK	Histona acetiltransferasa	NM_004380
CRLF2	TSLP R	Inmunidad adaptativa		NM_022148 NM_001012288
CSF1	factor estimulante de colonias 1 (macrófago)		CSF-1	NM_000757
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 ADH T	NM_148170.2 NM_001814.2
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

TABLA 9 (Continuación 9)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
CXCL10	IP10	vía de 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 derivado de célula estromal 1)	NM_199168 NM_000609
CXCL13	BLC	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 13 (quimioatrayente de células B)	NM_006419
CXCL14	BRAK	vía de quimioquina	Quimioquinas y receptores CXC	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

TABLA 9 (Continuación 10)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
CXCL6	GCP-2	vía de quimioquina	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimio-táctica de granulocito 21)	NM_002993
CXCL9	MIG	vía de quimioquina	Quimioquinas y receptores CXC	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	delecionado en carcinoma colorrectal, Gen hCG1811785 Anotación Celera	metástasis		NM_005215.1
DCN	DCN	vía TGF	Decorina Inh TGF	NM_133503 NM_133504 NM_133505 NM_001920
DEFA6	Defensina alfa 6, sobre expresión en colon K	Defensa	sobreexpresión en colon K	NM_001926
DICER1	Dicer1, Dcr-1 homólogo (Drosophila)	vía MRNA		NM_030621; NM_177438
DKK1		vía wnt	dickkopf homólogo 1 (Xenopus laevis)	NM_012242

TABLA 9 (Continuación 11)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
			células hematopoyéticas, rol inh prolif T	
Dok-2	P56Dok-2, FRIP	vía TCR	expresado en las T, rol inh prolif T	NM_201349 NM_003974
DOK6				NM_152721
DVL1	homólogo de DHS1 (dishevelled)	homólogo de DS1 (dishevelled)		NM_181870 NM_182779 NM_004421
E2F4	E2F4	Vía TGF	E2F factor de transcripción 4, unión p107/p130	NM_001950
EBI3				NM_005755
ECE1	ECE-1	ECE-1	ECE	NM_001397
ECGF1	metástasis	metástasis		NM_001953
EDN1	endotelina 1, Gen hCG37405 Anotación Celera	EDN1,hCG37405		NM_001955.2
EGF			factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastona)	NM_001963
EGFR		CADENA predicha	receptor del factor de crecimiento epidérmico (homólogo del oncogén de leucemia eritroblástica (v-erb-b), aviar)	NM_005228
EIF4E			factor de inicio de la traducción eucariota 4E	
CD105	angiogénesis Endoglina	angiogénesis		NM_000118

TABLA 9 (Continuación 12)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
ENPEP	glutamil aminopeptidasa (aminopeptidasa A), Gen hCG21423 Anotación Celera	ENPEP,hCG21423		NM_001977.2
ERBB2				NM_001005862 NM_004448
EREG	epiregulina, Gen hCG14966 Anotación Celera	EREG,hCG14966		NM_001432.1
FCGR3A, FCGR3B	CD16	CD16		NM_000569, NM_000570
FN1	Fibronectina (precursor FH)	Fibronectina (precursor FH)	FN, CIG, FINC, LETS	NM_002026.1, NM_054034.1
FOXP3	FOXP3	Inmunidad adaptativa	caja forkhead P3	NM_014009
FYN	FYN	vía TCR	oncogén FYII 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
GLI2		vía hedgehog miembro de la familia GLI-Kruppel GLI2	miembro de la familia GLI-Kruppel GLI2	NM_030379 NM_030380 NM_030381 NM_005270

TABLA 9 (Continuación 13)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
GNLY	Granulisinina (GILY)	Vía citotox	519, LAG2, NKG5, LAG-2, D2S69E, TLA519	NM_012483.1, NM_006433.2
GOLPH4	fosfoproteína de Golgi 4	transportador de Golgi	requerido para el transporte de proteínas del er hasta el complejo de golgi	NM_014498 U55853
GRB2		vía TCR		NM_203506 NM_002086
GSK3B		vía wnt	glucógeno sintasa quinasa 3 beta	NM_002093
GSTP1	anti-oxidante	anti-oxidante		NM_000852
GUSB	GUSB	control endógeno	control endógeno	NM_000181
GZMA		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADH T	NM_006144.2
GZMB	Granzima B (GZMB)	Vía citotox	CCPI, CSPB, CGL-1, CSP-B, CTLA1	NM_004131
GZMH		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADH T	NM_033423.2
GZMK	granzima K (granzima 3; triptasa II), Gen hCG40447 Anotación Celera		micromatriz de ADH T	NM_002104.1
HLA-B	HLA-B	vía MHC	complejo principal de histocompatibilidad, clase I, B	NM_005514
HLA-C	HLA-C	vía MHC	complejo principal de histocompatibilidad, clase I, C	NM_002117

TABLA 9 (Continuación 14)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
HLA-DMA	HLA-DMA	vía MHC	complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DM alfa	NM_006120
HLA-DMB	HLA-DMB	vía MHC	complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DM beta	NM_002118
HLA-DOA	HLA-DOA	vía MHC	complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DO alfa	NM_002119
HLA-DOB	HLA-DOB	vía MHC	complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DO beta	NM_002120
HLA-DPA1	HLA-DPA1	vía MHC	complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DP alfa 1	NM_033554
HLA-DQA2	HLA-DQA2	vía MHC	complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DQ alfa 2	NM_020056
HLA-DRA	HLA-DRA	vía MHC	HLA-DRA	NM_019111

TABLA 9 (Continuación 15)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
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 altos niveles de V12 HRAS- un mutante constitutivamente activo (y así oncogénico) de HRAS- conduce a una detención del crecimiento que es similar en muchos aspectos a la detención que se observa cuando las células humanas alcanzan la senescencia replicativa 68.	mutación y metilación	homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata Harvey v-Har-ras	NM_176795
HSPB3	proteína 3 de choque térmico 27kDa			NM_006308
HUWE1	UREB,1 Proteolisis; Metabolismo y modificación de proteínas	vía MHC	ubiquitina, arf, Proteolisis; Metabolismo y modificación de proteínas	NM_031407
ICAM1	metástasis	metástasis		NM_000201
ICAM-2	CD102	Inmunidad adaptativa		NM_000873
ICOS	ICOS	Inmunidad adaptativa		NM_012092

TABLA 9 (Continuación 16)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
ID1	inhibidor de unión a ADH 1, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante, Gen hCG37143 Anotación Celera	ID1,hCG37143	firma de metástasis	NM_002165.2
ifna1	Ifna1	Vía de interferón	Interferón, alfa 1	NM_024013
ifna17	Ifna17	Vía de interferón	Interferón, alfa 17	NM_021268
ifna2	Ifna2	Vía de interferón	Interferón, alfa 2	NM_000605
ifna5	Ifna5	Vía de interferón	Interferón, alfa 5	NM_002169
ifna6	Ifna6	Vía de interferón	Interferón, alfa 6	NM_021002
ifna8	Ifna8	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

TABLA 9 (Continuación 17)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
IHH		vía de hedgehog homólogo de hedgehog indio (Drosophila)	homólogo de hedgehog indio (Drosophila)	NM_002181
IKBKB	Ikb2	vía CK		AF080158
IL10	IL-10	vía CK		NM_000572
IL12A	IL-12p35	vía CK	interleuquina 12	NM_000882
IL12B	IL-12p40	vía 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 CK	receptor de interleuquina 12, beta 2	NM_001559
IL13	IL-13	vía CK		NM_002188
IL13RA2	receptor de interleuquina 13, alfa 2, Gen hCG20596 Anotación Celera	IL13RA2,hCG20596	firma de metástasis	NM_000640. 2
IL15	IL-15	vía CK		NM_000585
IL15RA	IL-15 R alfa	vía CK	receptor de interleuquina 15, alfa	NM_002189
IL17	IL-17	vía CK	interleuquina 17 (serina esterasa 8 asociada a linfocitos T citotóxicos)	NM_002190
IL17R	IL17R	vía CK	receptor de interleuquina 17	NM_014339
IL17RB	IL17RB	vía CK	receptor B de interleuquina 17	NM_018725 NM_172234
IL18	IL-18	vía CK		NM_001562

TABLA 9 (Continuación 18)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
IL1A	IL-1a	vía CK		NM_000575
IL1B	IL-1b	vía CK		NM_000576
IL1R1	IL-1 RI	Inmunidad adaptativa		NM_000877
IL2	IL-2	vía CK		NM_000586
IL21	IL-21	vía CK	familia del receptor de cadena gamma común	NM_021803
IL21R	IL-21 R	vía CK	familia del receptor de cadena gamma común	NM_181078 NM_181079 NM_021798
IL23A	IL-23	vía CK	subunidad p19 alfa de interleuquina 23	NM_016584
IL23R	IL-23R	vía CK	receptor de interleuquina 23	NM_144701
IL24	IL24	vía CK	interleuquina 24	NM_006850
IL27	IL27	vía CK	interleuquina 27	NM_145659
IL2RA	CD25	vía CK		NM_000417
IL2RB	IL-2 R beta, CD122	vía CK	Inmunidad adaptativa	NM_000878
IL2RG	IL-2 R gamma, CD132	vía CK	Inmunidad adaptativa	NM_000206
IL3	IL-3	vía CK		NM_000588
IL31RA	IL31RA	vía CK	receptor A de interleuquina 31	NM_139017
IL4	IL-4	vía CK		NM_000589
IL4RA	IL-4 R	vía CK	Células Th1/Th2	NM_001008699 NM_000418
IL5	IL-5	vía CK		NM_000879
IL6	IL-6	vía CK		NM_000600
IL7	IL-7	vía CK		NM_000880
IL7RA	IL-7 R alfa	vía CK	Inmunidad adaptativa	NM_002185

TABLA 9 (Continuación 19)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
IL8	CXCL8	vía de inflamación	vía 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 CK		NM_000590
IL9R	IL-9 R	vía CK	Familia del receptor de cadena gamma común	NM_176786
IRF1	factor regulador de interferón 1	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, subunidad alfa 4 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; alfa polipéptido), Gen hCG33203 Anotación Celera	CD103	Inmunidad adaptativa		NM_002208.3

TABLA 9 (Continuación 20)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
ITGB3	integrina, beta 3 (glicoproteína de plaquetas IIIa, antígeno CD61), Gen hCG27604 Anotación Celera	metástasis		NM_000212.2
JAK2	Quinasa Janus 2 (una proteína tirosina quinasa), Gen hCG31308 Anotación Celera	JAK2,hCG31308		NM_004972.2
JAK3		vía de citoquina		NM_000215
KLRB1		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADH 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, miembro 1, Gen hCG2009644 Anotación Celera	AF030313		NM_007360.1
KLRF1		Inmunidad adaptativa	micromatriz de ADH 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

TABLA 9 (Continuación 21)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
KRAS				NM_004985
LAG3	immune	Inmunidad adaptativa	gen 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 galactosidasa, soluble, 9 (galectina 9), Gen hCG1749919 Anotación Celera			NM_009587.1 NM_002308.2
LILRB3	receptor similar a inmunoglobulina de leucocitos, subfamilia B (con dominios TM e ITIM), miembro 3	micromatriz IRT5 Wang	inmunosupresión	
LRP2	MEGALINA		MEGALINA	NM_004525
LTA	TNF-b	vía CK	LT, TNFB, TNFSF1	NM_000595
SLAMF3	CD229	Inmunidad adaptativa		NM_002348
MADCAM1	molécula 1 de adhesión de célula adresina vascular mucosal, Gen hCG20569 Anotación Celera	MADCAM1,hCG20569		NM_130760.1 NM_130761.1
MADH3	MADH-3	Vía TGF	SMAD3, JV15-2	NM_005902
MADH7	MADH-7	Vía TGF	MADH8, SMAD7	NM_005904
MAF	c-maf Th2	vía CK	homólogo de oncogén de fibrosarcoma muculoaponeurótico v-maf (aviar)	NM_005360

TABLA 9 (Continuación 22)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
MAP2K1				NM_002755
MDM2	Mdm2, célula 3T3 transformado minuto doble 2, proteína de unión a p53 (ratón)	vía p53		NM_002392; NM_006878; NM_006879; NM_006880; NM_006881; NM_006882;
MICA	secuencia A relacionada con el polipéptido MHC de clase I	vía MHC	presente en células tum y módulo Citotox	NM_000247
MICB	secuencia B relacionada con el polipéptido MHC de clase I	vía MHC	presente en células tum y módulo Citotox	NM_005931
MKI67	proliferación	proliferación		NM_002417
MMP12	metalopetidasa de matriz 12 (macrófago elastasa)	adhesión, metástasis		NM_002426 L23808
MMP9	metalopetidasa de matriz 9 (gelatinasa B, 92kDa gelatinasa, colagenasa 92kDa tipo IV)	adhesión, metástasis		NM_004994
MTA1	Asociado a metástasis 1, Gen hCG19442, Anotación Celera	metástasis		NM_004689.2

TABLA 9 (Continuación 23)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
MTSS1	Supresor 1 de metástasis, Gen hCG20095122 Anotación Celera	metástasis		NM_014751.2
MYC	MYC	Vía TGF	homólogo del oncogén de mielocitomatosis viral v-myc (avian)	NM_002467
MYD88		vía similar a Toll		NM_002468
MYH6	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 ADH T	NM_005601.3
NLK		vía wnt	quinasa similar a nemo	NM_016231
NOS2A	iNos(Nos2A)	iNos(Nos2A)		NM_000625
P2X7	Receptor purinérgico P2X, canal iónico activado por ligando, 7, Gen hCG1641456 Anotación Celera	P2RX7,hCG1641456		NM_177427.2 NM_002562.4
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

TABLA 9 (Continuación 24)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
PIAS1		vía CK	inhibidor proteico de STAT activado, 1	NM_016166
PIAS2		vía CK	inhibidor proteico de STAT activado, 2	NM_173206 NM_004671
PIAS3		vía CK	inhibidor proteico de STAT activado, 3	NM_006099
PIAS4		vía CK	inhibidor proteico de STAT activado, 4	NM_015897
PLAT	activador de plasminógeno, tejido, Gen hCG17154 Anotación Celera	PLAT,hCG17154		NM_033011.1 NM_000930.2 NM_000931.2
PML	supresor del tumor, señal de interferón			NM_033238 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 citotox.	P1, PFP, HPLH2	NM_005041

TABLA 9 (Continuación 25)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
PROM1	CD133, prominina 1, glicoproteína transmembrana pentaspan		fracción positiva CD133 de médula ósea humana, sangre de cordón y sangre periférica han demostrado que injertan eficazmente en modelos de xenotrasplante y han demostrado que contienen la mayoría de los precursores de granulocitos/macrófagos	NM_006017
PSMB5	proteasoma (prosome, macropaina) subunidad, tipo beta,5	vía MHC		NM_002797
PTCH		vía de hedgehog homólogo fragmentado (<i>Drosophila</i>)		NM_000264
PTGS2	COX-2	vía de inflamación		NM_000963
PTP4A3	proteína tirosina fosfatasa tipo IVA, miembro 3	metástasis		NM_032611.1
PTPN6		vía CK	proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo 6	NM_080548 NM_080549 NM_002831
PTPRC	CD45	CD45		NM_002838, NM_080922, NM_080923, NM_080921
RAB23		vía hedgehog RAB23, miembro familia del oncogén RAS		NM_183227 NM_016277

TABLA 9 (Continuación 26)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
RAC/RHO				NM_018890
RAC2	RAC2	RAC2	sustrato 2 de la toxina botulínica relacionado con ras C3 (familia rho, proteína de unión a GTP pequeña Rac2)	NM_002872
RAF				NM_002880
RB1	retinoblastoma 1 (incluyendo osteosarcoma)	mutación y metilación	ciclo celular	NM_000321;
RBL1	similar a retinoblastoma 1 (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, clade E (nexina, inhibidor de activador de plasminógeno, 1), miembro 1, Gen hCG17353 Anotación Celera	SERPINE1,hCG17353		NM_000602.1

TABLA 9 (Continuación 27)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
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 TGF	SMAD, madres contra el homólogo 2 de DPP (Drosophila)	NM_0010036 52 NM_005901
SMAD4	SMAD4	Vía 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 específica de SMAD, ligasa 1	NM_181349 NM_020429
SOCS1		vía CK	supresor de señalización de citoquina 1	NM_003745
SOCS2		vía CK	supresor de señalización de citoquina 2	NM_003877
SOCS3		vía CK	supresor de señalización de citoquina 3	NM_003955
SOCS4		vía CK	supresor de señalización de citoquina 4	NM_199421 NM_080867

TABLA 9 (Continuación 28)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
SOCS5		vía CK	supresor de señalización de citoquina 5	NM_014011
SOCS6		vía CK	supresor de señalización de citoquina 6	NM_004232
SOCS7		vía CK	supresor de señalización de citoquina 7	NM_014598
SOD1	anti-oxidante	anti-oxidante		NM_000454
SOD2	anti-oxidante	anti-oxidante		NM_0010244 65 NM_0010 24466 NM_0 00636
SOD3	anti-oxidante	anti-oxidante		NM_003102
SOS1		vía TCR		NM_005633
SOX17	SOX17	SOX17	SRY (región determinante de sexo)- caja 17	NM_022454
CD43			Inmunidad adaptativa	NM_003123
ST14	supresión de tumorigenicidad 14 (colon, carcinoma, matritasa, epítina)		proteasa, citotox	NM_021978
STAM	STAM	STAM	molécula adaptadora de transducción de señal (dominio SH3 y motivo ITAM) 1	NM_003473

TABLA 9 (Continuación 29)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
STAT1	STAT1	STAT1	Transductor de señal y activador de transcripción 1, 91kDa	NM_139266 NM_007315
STAT2	STAT2	STAT2	signal transducer and activator of transcription 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	STAT4	Transductor de señal y activador de transcripción 4	NM_003151
STAT5A	STAT5A	STAT5A	Transductor de señal y activador de transcripción 5A	NM_003152
STAT5B	STAT5B	STAT5B	Transductor de señal y activador de transcripción 5B	NM_012448

TABLA 9 (Continuación 30)

Hombre del gen (antiguo)	Hombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
STAT6	STAT6	STAT6	transductor de la señal y activador de transcripción 6, inducido por interleuquina 4	NM_003153
STK36	STK36	STK36	quinasa serina/treonina 36 (homólogo fusionado, <i>Drosophila</i>)	NM_015690
TAP1	transportador 1, cassette de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	vía MHC		NM_000593
TAP2	transportador 2, cassette de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	vía MHC	transportador 2, cassette de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	NM_000544
TBX21	T-bet (TBX21)	Inmunidad adaptativa		NM_013351
TCF7	TCF7	vía 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

TABLA 9 (Continuación 31)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
TGFB1	TGF-b / BIGH3	Vía TGF		NM_000660
TGFBR1	TGFBR1	Vía TGF	factor de crecimiento transformante, beta, receptor I (quinasa similar al receptor de activina A tipoll, 53kDa)	NM_004612
TGFBR2	TGFBR2	Vía TGF	factor de crecimiento transformante, beta, receptor II (70/80kda)	NM_0010248 47 NM_003242
TIMP3	TIMP inhibidor de metalopeptidasa 3 (distrofia Sorsby fundus, pseudoinflamatoria)	Vía TGF	adhesión, metástasis	NM_000362
TLR1	TLR1	vía similar a Toll	receptor similar a toll 1	NM_003263
TLR10	TLR10	vía similar a Toll	receptor similar a toll 10	NM_030956
TLR2	TLR2	vía similar a Toll	receptor similar a toll 2	NM_003264
TLR3	TLR3	vía similar a Toll	receptor similar a toll 3	NM_003265
TLR4	TLR4	vía similar a Toll	receptor similar a toll 4	NM_138554 NM_003266
TLR5	TLR5	vía similar a Toll	receptor similar a toll 5	NM_003268
TLR6	TLR6	vía similar a Toll	receptor similar a toll 6	NM_006068
TLR7	TLR7	vía similar a Toll	receptor similar a toll 7	NM_016562
TLR8	TLR8	vía similar a Toll	receptor similar a toll 8	NM_138636

TABLA 9 (Continuación 32)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
TLR9	TLR9	vía similar a Toll	receptor similar a toll 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(TNFRSF18)	Inmunidad adaptativa		NM_004195
TNFRSF1A	TNF RI	Inmunidad adaptativa		NM_001065
TNFRSF1B	TNF RII	Inmunidad adaptativa		NM_001066
OX-40				NM_003327
TNFRSF5	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		tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	NM_003810
TNFSF6	FasL	vía de apoptosis	FASL, FasL, CD178, CD95L, APT1LG1	NM_000639
TOB1	transductor de ERBB2	vía TCR	transductor de ERBB2, 1	NM_005749
TP53	proteína tumoral p53 (síndrome de Li-Fraumeni)	vía p53		NM_000546

TABLA 9 (Continuación 33)

Nombre del gen (antiguo)	Nombre alternativo	Vía génica	Descripción génica	Sec. Ref. pública
TSLP			Inmunidad adaptativa	NM_033035 NM_138551
VCAM1	molécula de adhesión del endotelio vascular 1, Gen hCG32384 Anotación Celera	MGC99561,I NCAM-100,DKFZp779G2333,HG NC:12663	firma de metástasis	NM_001078. 2
VEGF	VEGF A	VEGF A		NM_003376
WIF1		vía wnt	factor de inhibición 1	NM_007191
WNT1		vía 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 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 TCR	cadena zeta (TCR) proteína quinasa asociada 70kDa	NM_001079
ZIC2		vía 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,

TABLA 10 (Continuación 1)

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	metaloproteinasa 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,

TABLA 10 (Continuación 2)

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	granulisina	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			
Estadio del Tumor (T)†			
pT1	23	3	2
pT2	69	13	7
pT3	218	76	57
pT4	97	27	9
Estado nodal (N)			
Negativo	241	48	30
Positivo	166	71	43
Nx ‡			2
Metástasis distantes (M)			
Ninguna detectada	313	93	47
Presentes	94	26	28
Clasificación UICC-TNM (25)			
I	75	12	6
II	137	33	17
III	100	48	24
IV	95	26	28
Sexo			
Hombre	216	57	42
Mujer	191	62	33
Localización			
Colon	162	35	41
Sigmoides	114	53	25
Recto	131	31	9
Diferenciación			
Bueno	312	78	47
Escaso	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 supervivencia libre de enfermedad para todos los pacientes según los valores de corte mínimos del valor P

Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS) para todos los pacientes								
	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 ^A
GZMB _{CT}						1.78 10 ⁻⁴	9.70 10 ⁻⁶	4.85 10 ⁻⁵
Lo	191	34.6	53.8	46.1	46.1			
Hi	163	NR	76.6	73.1	72.1			
GZMB _{IM}						1.99 10 ⁻⁵	1.28 10 ⁻⁵	5.38 10 ⁻⁶
Lo	109	20.1	47.1	41.0	41.0			
Hi	195	NR	75.4	70.9	70.0			
CD45RO _{CT}						4.33 10 ⁻⁵	9.81 10 ⁻⁵	1.27 10 ⁻⁴
Lo	45	11.5	27.5	24.0	24.0			
Hi	261	NR	72.0	65.5	64.9			
CD45RO _{IM}						3.71 10 ⁻³	4.29 10 ⁻⁴	4.41 10 ⁻⁴
Lo	168	41.5	55.4	47.3	47.3			
Hi	145	NR	76.8	72.9	71.9			
CD8 _{CT}						5.19 10 ⁻⁶	3.44 10 ⁻⁶	1.45 10 ⁻⁶
Lo	132	21.0	46.0	39.1	39.1			
Hi	227	NR	74.9	69.5	68.8			
CD8 _{IM}						1.03 10 ⁻²	1.11 10 ⁻²	8.09 10 ⁻³
Lo	186	45.5	56.4	49.1	49.1			
Hi	128	NR	77.8	73.5	72.3			
CD3 _{CT}						5.48 10 ⁻⁶	1.38 10 ⁻⁵	1.09 10 ⁻⁵
Lo	165	23.1	48.2	43.4	43.4			
Hi	192	NR	79.8	72.4	71.6			
CD3 _{IM}						4.78 10 ⁻⁶	6.23 10 ⁻⁶	6.32 10 ⁻⁶
Lo	175	31.1	51.8	43.5	43.5			
Hi	178	NR	78.7	74.7	73.9			
GZMB _{CT/IM}						3.32 10 ⁻⁴	8.34 10 ⁻⁵	5.45 10 ⁻⁵
Lo/Lo	70	20.1	46.3	39.1	39.1			
Het	98	77.5	62.2	54.4	54.4			
Hi/Hi	102	NR	80.6	77.8	76.3			
CD45RO _{CT/IM}						6.61 10 ⁻⁶	1.05 10 ⁻⁵	1.69 10 ⁻⁵
Lo/Lo	32	5.85	24.2	24.2	24.2			
Het	141	63.28	61.2	50.7	50.7			
Hi/Hi	127	NR	80.3	78.1	76.9			
CD8 _{CT/IM}						3.80 10 ⁻⁵	7.70 10 ⁻⁵	5.52 10 ⁻⁵
Lo/Lo	93	20.1	44.3	35.9	35.9			
Het	94	NR	63.8	58.9	58.9			
Hi/Hi	96	NR	81.6	76.1	74.6			
CD3 _{CT/IM}						7.56 10 ⁻⁸	1.22 10 ⁻⁷	1.16 10 ⁻⁷
Lo/Lo	93	17.3	42.8	37.4	37.4			
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

^A 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 supervivencia total para todos los pacientes según los valores de corte mínimos del valor P

	No. de pacientes	Supervivencia total (OS) para todos los pacientes					Valor de P*	Valor de P	Valor de P [†]
		Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %				
GZMB_{CT}						8.18 10⁻⁷	1.29 10⁻⁵	1.16 10⁻⁵	
Lo	191	42.7	62.2	47.3	40.1				
Hi	163	NR	83.8	76.0	68.4				
GZMB_{IM}						5.55 10⁻³	8.39 10⁻²	6.77 10⁻²	
Lo	109	43	68.6	47.3	39.9				
Hi	195	89.0	74.6	66.7	57.8				
CD45RO_{CT}						5.77 10⁻⁷	8.99 10⁻⁵	6.57 10⁻⁵	
Lo	45	25.6	55.5	26.9	20.9				
Hi	261	100.7	74.9	66.3	58.7				
CD45RO_{IM}						1.65 10⁻³	8.20 10⁻³	1.07 10⁻²	
Lo	168	46.9	67.1	49.4	42.0				
Hi	145	NR	78.6	73.3	65.5				
CD8_{CT}						2.66 10⁻⁷	6.66 10⁻⁶	3.79 10⁻⁶	
Lo	132	35.1	60.3	41.8	36.5				
Hi	227	NR	79.8	71.0	62.3				
CD8_{IM}						1.22 10⁻³	1.51 10⁻²	1.50 10⁻²	
Lo	186	51.3	70.2	51.6	43.0				
Hi	128	NR	78.4	72.6	66.1				
CD3_{CT}						7.86 10⁻⁶	1.35 10⁻⁵	9.65 10⁻⁶	
Lo	165	33.5	57.9	42.4	35.6				
Hi	192	115.1	83.2	74.3	66.4				
CD3_{IM}						9.08 10⁻⁵	1.83 10⁻⁴	1.46 10⁻⁴	
Lo	175	46.9	65.9	49.3	40.3				
Hi	178	NR	77.3	70.2	64.0				
GZMB_{CT/IM}						2.00 10⁻⁴	1.67 10⁻²	1.60 10⁻²	
Lo/Lo	70	50.8	72.4	50.7	45.2				
Het	98	40.3	60.8	48.0	35.4				
Hi/Hi	102	NR	84.1	77.8	70.8				
CD45RO_{CT/IM}						8.56 10⁻⁶	3.34 10⁻⁴	2.91 10⁻⁴	
Lo/Lo	32	28.4	60.6	22.5	22.5				
Het	141	51.5	66.3	54.5	44.1				
Hi/Hi	127	NR	81.2	76.1	70.5				
CD8_{CT/IM}						6.25 10⁻⁶	4.69 10⁻⁴	4.28 10⁻⁴	
Lo/Lo	93	35.1	61.2	40.0	33.8				
Het	94	59.6	74.6	61.0	49.3				
Hi/Hi	96	NR	82.3	75.9	69.2				
CD3_{CT/IM}						3.97 10⁻⁷	2.11 10⁻⁶	1.37 10⁻⁶	
Lo/Lo	93	35.1	59.3	40.7	29.9				
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

† 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 supervivencia libre de enfermedad para todos los pacientes según los valores de cortes medios

Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS) para todos los pacientes						
	No. de pacientes	Medio de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	Valor de P*
GZMB_{CT}						9.94 10⁻⁷
Lo	190	34.6	53.5	45.7	45.7	
Hi	164	NR	76.8	73.2	72.3	
GZMB_{IM}						1.99 10⁻⁶
Lo	152	31.1	51.0	46.6	46.6	
Hi	152	NR	79.5	73.6	72.5	
CD45RO_{CT}						2.21 10⁻²
Lo	153	77.4	59.3	54.2	54.2	
Hi	153	NR	72.9	65.8	64.8	
CD45RO_{IM}						1.85 10⁻⁴
Lo	158	36.0	53.7	48.0	48.0	
Hi	155	NR	77.0	70.7	69.7	
CD8_{CT}						3.06 10⁻⁷
Lo	180	31.3	51.1	45.4	45.4	
Hi	179	NR	78.0	72.1	71.2	
CD8_{IM}						2.72 10⁻⁴
Lo	157	36.0	56.3	47.7	47.7	
Hi	157	NR	74.3	70.7	69.7	
CD3_{CT}						1.65 10⁻⁶
Lo	179	31.3	52.0	46.7	46.7	
Hi	178	NR	78.7	71.6	70.8	
CD3_{IM}						2.98 10⁻⁶
Lo	177	31.1	51.8	43.6	43.6	
Hi	176	NR	79.1	75.1	74.2	
GZMB_{CT/IM}						5.07 10⁻⁶
Lo/Lo	91	23.0	46.6	40.9	40.9	
Het	93	NR	67.2	59.2	59.2	
Hi/Hi	86	NR	82.1	78.7	77.0	
CD45RO_{CT/IM}						7.60 10⁻⁴
Lo/Lo	92	35.8	52.6	49.5	49.5	
Het	119	100.2	63.7	54.4	54.4	
Hi/Hi	89	NR	81.7	77.3	75.8	
CD8_{CT/IM}						7.75 10⁻⁷
Lo/Lo	98	20.8	44.9	37.3	37.3	
Het	92	NR	67.8	61.1	61.1	
Hi/Hi	93	NR	79.7	75.4	73.8	
CD3_{CT/IM}						3.52 10⁻⁹
Lo/Lo	98	18.2	44.9	39.7	39.7	
Het	119	68.7	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

	No. de pacientes	Supervivencia Total (OS) para todos los pacientes				Valor de P*
		Medio de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %	
GZMB_{CT}						8.18 10⁻⁷
Lo	191	42.7	62.2	47.3	40.1	
Hi	163	NR	83.8	76.0	68.4	
GZMB_{IM}						1.55 10⁻²
Lo	152	50.8	67.4	50.7	44.3	
Hi	152	100.8	77.5	68.9	58.2	
CD45RO_{CT}						6.92 10⁻⁴
Lo	153	46.9	65.7	49.1	43.6	
Hi	153	111.3	78.6	72.0	62.9	
CD45RO_{IM}						1.49 10⁻³
Lo	158	43.1	66.3	48.4	41.5	
Hi	155	115.0	78.6	72.8	64.6	
CD8_{CT}						2.05 10⁻⁵
Lo	180	41.7	65.8	45.7	41.1	
Hi	179	NR	79.6	74.9	64.8	
CD8_{IM}						2.16 10⁻³
Lo	157	50.8	71.9	51.0	42.0	
Hi	157	NR	75.3	69.5	63.2	
CD3_{CT}						7.04 10⁻⁶
Lo	179	39.2	61.5	45.6	38.5	
Hi	178	115.1	82.5	73.7	66.1	
CD3_{IM}						9.38 10⁻⁵
Lo	177	46.9	66.4	49.3	40.5	
Hi	176	NR	77.0	70.5	64.2	
GZMB_{CT/IM}						2.88 10⁻³
Lo/LO	92	46.9	67.4	49.6	45.4	
Het	92	51.3	66.9	54.4	39.3	
Hi/Hi	86	115.1	83.9	76.5	69.9	
CD45RO_{CT/IM}						7.43 10⁻⁵
Lo/LO	92	40.3	65.2	45.3	41.0	
Het	119	52.9	66.7	55.1	45.3	
Hi/Hi	89	NR	85.9	83.0	75.4	
CD8_{CT/IM}						1.04 10⁻⁴
Lo/LO	98	36.4	66.0	42.3	36.8	
Het	92	59.6	72.6	58.7	46.9	
Hi/Hi	93	NR	80.2	77.5	70.3	
CD3_{CT/IM}						2.08 10⁻⁶
Lo/LO	98	35.1	60.3	41.3	31.0	
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 supervivencia libre de enfermedad para pacientes con UICC-T1M, I, II, III, según los valores de corte mínimos del valor P

	Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS) para pacientes con UICC-T1M, I, II, III							
	No. de pacientes	Medio 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 ^Δ
GZMB_{CT}								
Lo	166	NR	77.0	68.2	68.2	9.17 10 ⁻¹	3.87 10 ⁻¹	3.99 10 ⁻¹
Hi	107	NR	87.7	83.7	83.7			
GZMB_{IM}								
Lo	126	NR	74.1	68.7	68.7	3.47 10 ⁻¹	1.51 10 ⁻¹	1.46 10 ⁻¹
Hi	112	NR	89.1	82.5	82.5			
CD45RO_{CT}								
Lo	25	23.1	42.4	37.1	37.1	3.58 10 ⁻³	2.01 10 ⁻³	1.69 10 ⁻³
Hi	218	NR	84.4	77.3	77.3			
CD45RO_{IM}								
Lo	121	NR	74.2	64.4	64.4	3.49 10 ⁻¹	1.66 10 ⁻¹	1.73 10 ⁻¹
Hi	125	NR	85.9	81.5	81.5			
CD8_{CT}								
Lo	85	77.5	64.1	55.7	55.7	5.62 10 ⁻⁴	1.76 10 ⁻⁴	1.58 10 ⁻⁴
Hi	193	NR	88.3	82.0	82.0			
CD8_{IM}								
Lo	138	NR	74.0	65.5	65.5	2.20 10 ⁻¹	1.43 10 ⁻¹	1.81 10 ⁻¹
Hi	111	NR	67.9	82.9	82.9			
CD3_{CT}								
Lo	69	68.7	62.6	53.8	53.8	1.93 10 ⁻⁴	1.22 10 ⁻³	1.16 10 ⁻³
Hi	209	NR	87.9	80.9	80.9			
CD3_{IM}								
Lo	103	NR	72.0	60.5	60.5	4.78 10 ⁻⁶	6.29 10 ⁻⁶	6.32 10 ⁻⁶
Hi	171	NR	88.1	83.3	83.3			
GZMB_{CT/IM}								
Lo/Lo	87	NR	70.4	64.3	64.3	7.81 10 ⁻¹	3.33 10 ⁻¹	3.42 10 ⁻¹
Het	69	NR	81.7	73.2	73.2			
Hi/Hi	58	NR	90.8	85.9	85.9			
CD45RO_{CT/IM}								
Lo/Lo	16	20.1	40.2	40.2	40.2	1.45 10 ⁻²	4.04 10 ⁻²	4.14 10 ⁻²
Het	110	NR	76.8	64.8	64.8			
Hi/Hi	112	NR	88.3	85.9	85.9			
CD8_{CT/IM}								
Lo/Lo	61	35.8	59.0	48.9	48.9	1.94 10 ⁻³	3.52 10 ⁻³	3.84 10 ⁻³
Het	76	NR	82.2	76.2	76.2			
Hi/Hi	87	NR	87.8	81.6	81.6			
CD3_{CT/IM}								
Lo/Lo	30	23.1	49.9	38.0	38.0	8.57 10 ⁻⁷	2.49 10 ⁻⁴	2.93 10 ⁻⁴
Het	95	NR	76.4	65.6	65.6			
Hi/Hi	124	NR	91.3	87.1	87.1			

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

Δ 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 supervivencia total para pacientes con UICC-TNM, I, II, III, según los valores de corte mínimos del valor P

	No. de pacientes	Supervivencia Total (OS) para pacientes con UICC-TNM I, II, III				Valor de P*	Valor de P	Valor de P ^a
		Media de meses	Índice a los 2 años %	Índice a los 4 años %	Índice a los 5 años %			
GZMB_{CT}								
Lo	166	89.0	83.5	69.2	61.1	1.52 10 ⁻¹	1.13 10 ⁻¹	8.16 10 ⁻²
Hi	107	NR	85.9	79.7	71.5			
GZMB_{IM}								
Lo	126	101.0	81.7	69.1	61.8	5.38 10 ⁻¹	7.30 10 ⁻¹	7.16 10 ⁻¹
Hi	112	115.0	85.6	76.2	64.5			
CD45RO_{CT}								
Lo	25	43.0	69.7	41.8	32.5	2.53 10 ⁻⁴	2.92 10 ⁻³	2.25 10 ⁻³
Hi	218	NR	83.9	75.4	67.8			
CD45RO_{IM}								
Lo	121	101.0	80.1	64.2	56.5	1.22 10 ⁻¹	3.86 10 ⁻¹	4.33 10 ⁻¹
Hi	125	NR	84.3	79.4	70.8			
CD8_{CT}								
Lo	85	65.3	74.8	56.1	50.2	6.00 10 ⁻⁵	1.09 10 ⁻⁴	1.03 10 ⁻⁴
Hi	193	NR	88.2	81	71.8			
CD8_{IM}								
Lo	138	76.1	82.4	66.3	57.	3.03 10 ⁻²	4.32 10 ⁻¹	4.20 10 ⁻¹
Hi	111	NR	86.8	81.2	73.7			
CD3_{CT}								
Lo	69	35.5	69.5	47.6	40.1	2.51 10 ⁻⁷	1.65 10 ⁻⁵	1.47 10 ⁻⁵
Hi	209	NR	88.5	81.4	73.2			
CD3_{IM}								
Lo	103	69.3	80.7	65	53.7	7.35 10 ⁻³	7.61 10 ⁻²	6.25 10 ⁻²
Hi	171	NR	85.9	78.7	71.7			
GZMB_{CT/IM}								
Lo/Lo	87	NR	83.2	69.2	63.3	8.29 10 ⁻²	5.30 10 ⁻¹	4.99 10 ⁻¹
Het	69	69.3	80.8	67.7	51.8			
Hi/Hi	58	NR	85.6	79.2	71.8			
CD45RO_{CT/IM}								
Lo/Lo	16	43.0	73.1	36.5	36.5	1.02 10 ⁻²	4.39 10 ⁻²	3.72 10 ⁻²
Het	110	87.3	80.1	67.3	56.3			
Hi/Hi	112	NR	85.3	80.8	74.8			
CD8_{CT/IM}								
Lo/Lo	61	56.2	72.7	52.2	45.3	7.02 10 ⁻⁴	1.60 10 ⁻²	1.96 10 ⁻²
Het	76	111.4	88.6	77.3	65.1			
Hi/Hi	87	NR	86.7	81.1	73.6			
CD3_{CT/IM}								
Lo/Lo	30	35.5	71.4	43.4	32.6	2.90 10 ⁻⁸	2.72 10 ⁻⁴	1.21 10 ⁻⁴
Het	95	72.1	76.6	64.6	54.8			
Hi/Hi	124	NR	90.8	85.9	78.6			

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

^a 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 DFS para pacientes con UICC-TNM, I, II, III según los cortes medios

Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS) 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*
GZMB_{CT}						8.07 10⁻²
Lo	140	NR	77.8	68.1	68.1	
Hi	133	NR	84.8	80.6	80.6	
GZMB_{IM}						2.26 10⁻²
Lo	119	NR	74.7	69.1	69.1	
Hi	119	NR	87.9	81.5	81.5	
CD45RO_{CT}						2.27 10⁻¹
Lo	122	NR	76.5	70.7	70.7	
Hi	121	NR	84.1	75.9	75.9	
CD45RO_{IM}						1.96 10⁻²
Lo	124	NR	74.6	65.1	65.1	
Hi	122	NR	85.6	81.1	81.1	
CD8_{CT}						6.53 10⁻⁴
Lo	139	NR	73.3	65.1	65.1	
Hi	139	NR	89.4	83.9	83.9	
CD8_{IM}						3.99 10⁻²
Lo	125	NR	75.9	66.5	66.5	
Hi	124	NR	84.7	80.1	80.1	
CD3_{CT}						4.48 10⁻⁴
Lo	139	NR	72.6	66.1	66.1	
Hi	139	NR	91.1	83.1	83.1	
CD3_{IM}						4.42 10⁻⁴
Lo	138	NR	74.4	65.4	65.4	
Hi	136	NR	90.1	84.9	84.9	
GZMB_{CT/IM}						5.63 10⁻²
Lo/Lo	72	NR	69.4	61.9	61.9	
Het	74	NR	85.6	77.8	77.8	
Hi/Hi	68	NR	84.1	79.8	79.8	
CD45RO_{CT/IM}						6.94 10⁻²
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	85.6	85.6	
CD8_{CT/IM}						3.36 10⁻³
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_{CT/IM}						6.20 10⁻⁵
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 OS para pacientes con UICC-T1M, I, II, III según los cortes medios

	Supervivencia Total (OS) para pacientes con UICC-T1M, 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_{CT}						5.06 10⁻²
Lo	140	27.1	81.2	66.7	59.0	
Hi	133	NR	87.8	80.0	71.5	
GZMB_{IM}						7.28 10⁻¹
Lo	119	30.4	83.3	70.2	62.5	
Hi	119	115.1	83.7	74.8	63.7	
CD45RO_{CT}						2.13 10⁻²
Lo	122	21.4	79.0	63.5	57.1	
Hi	121	NR	86.0	80.8	71.4	
CD45RO_{IM}						1.31 10⁻¹
Lo	124	21.4	79.8	64.3	56.8	
Hi	122	NR	84.7	79.7	70.8	
CD8_{CT}						8.49 10⁻³
Lo	139	24.8	82.5	63.9	55.7	
Hi	139	NR	85.9	82.9	74.6	
CD8_{IM}						7.20 10⁻²
Lo	125	30.0	84.2	67.6	57.3	
Hi	124	NR	84.6	78.5	71.5	
CD3_{CT}						9.15 10⁻³
Lo	139	18.9	78.0	62.5	54.8	
Hi	139	NR	89.4	83.0	74.6	
CD3_{IM}						2.80 10⁻²
Lo	138	26.0	82.7	67.1	58.7	
Hi	136	NR	85.3	80.5	72.3	
GZMB_{CT/IM}						6.09 10⁻¹
Lo/Lo	72	111.4	82.6	66.9	63.3	
Het	74	76.1	82.3	72.3	54.7	
Hi/Hi	68	115.1	84.5	75.5	69.2	
CD45RO_{CT/IM}						2.48 10⁻²
Lo/Lo	71	87.3	78.4	59.2	55.8	
Het	100	74.2	81.1	71.1	58.1	
Hi/Hi	67	NR	87.7	85.7	79.9	
CD8_{CT/IM}						1.56 10⁻²
Lo/Lo	80	59.6	79.3	60.4	49.6	
Het	65	NR	88.5	73.4	64.1	
Hi/Hi	79	NR	83.7	82.2	75.5	
CD3_{CT/IM}						5.35 10⁻³
Lo/Lo	73	59.6	76.0	57.1	48.4	
Het	102	78.8	82.9	73.6	65.0	
Hi/Hi	74	NR	90.3	87.1	78.8	

* 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 riesgo proporcional de Cox multivariable

Variable	Proporción de riesgo	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 CD3 _{CT} /CD3 _{TH}	2.391* 2.379†	(1.68-3.41)* (1.67-3.39)†	1.4 10 ⁻⁶

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

† Método leave-one-out, corrección usando $C=1-(SE[coef]/coef)^2=0.9942594$ (factor de corrección heurístico, Höllander et al). Resultados similares obtenidos usando "bootstrap"

* Nota: N viola la suposición de riesgos proporcionales. Se realizó un modelo estratificado por este factor y CD3_{CT}/CD3_{TH} permaneció como un factor de pronóstico independiente para supervivencia libre de enfermedad. Valores P del modelo estratificado:

T=0.01; Diff=0.32; CD3_{CT}/CD3_{TH}=9.4x10⁻⁷.

HR a partir del modelo estratificado: T=1.572(1.10-2.25);

Tabla S11c: Análisis de riesgo proporcional de Cox multivariable para DFS en pacientes con UICC-TNM, I, II, III

Variable*	Proporción de riesgo	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 CD3 _{CT} /CD3 _{TH} §	1.870	(1.311-2.66)	5.5 10 ⁻⁴

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

Tabla S12a: Análisis de riesgo proporcional de Cox multivariable

Variable	Proporción de riesgo	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	(0.69-1.62)	0.84
Patrones CD3 _{CT} /CD3 _{TH}	1.890	(1.42-2.51)	1.2 10 ⁻⁵

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

Tabla S12c: Análisis de riesgo proporcional de Cox multivariable para OS en pacientes con UICC-TNM, I, II, III

Variable	Proporción de riesgo	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 CD3 _{CT} /CD3 _{TH} §	1.460	(1.107-1.92)	7.2 10 ⁻³

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

Tabla S11b: Análisis de riesgo proporcional de Cox multivariable

Variable	Proporción de riesgo	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 CD3 _{CT} /CD3 _{TH}	6.200* 5.940†	(2.96-12.99)* (2.83-12.43)†	1.3 10 ⁻⁶

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

† Método leave-one-out, corrección usando $C=1-(SE[coef]/coef)^2=0.9573126$ (factor de corrección heurístico, Höllander et al). Resultados similares obtenidos usando "bootstrap"

* Nota: N viola la suposición de riesgos proporcionales. Se realizó un modelo estratificado por este factor y CD3_{CT}/CD3_{TH} permaneció como un factor de pronóstico independiente para supervivencia libre de enfermedad. Valores P del modelo estratificado:

T=0.02; Diff=0.97; CD3_{CT}/CD3_{TH}=1.3x10⁻⁶.

HR a partir del modelo estratificado: T=1.408(0.88-2.26);

Tabla S11d: Análisis de riesgo proporcional de Cox multivariable para DFS en pacientes con UICC-TNM, I, II, III

Variable*	Proporción de riesgo	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 CD3 _{CT} /CD3 _{TH} §	4.626	(1.736-12.33)	2.2 10 ⁻³

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

Tabla S12b: Análisis de riesgo proporcional de Cox multivariable

Variable	Proporción de riesgo	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 CD3 _{CT} /CD3 _{TH} §	3.710	(1.97-6.97)	4.7 10 ⁻⁵

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

Tabla S12d: Análisis de riesgo proporcional de Cox multivariable para OS en pacientes con UICC-TNM, I, II, III

Variable	Proporción de riesgo	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 CD3 _{CT} /CD3 _{TH} §	2.200	(1.219-3.97)	8.8 10 ⁻³

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer, en el que dicho procedimiento es mediante la medición del nivel de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente,
- 5 en el que una respuesta inmune adaptativa fuerte se correlaciona con un pronóstico del cáncer favorable y una respuesta inmune adaptativa débil se correlaciona con un pronóstico pobre y en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:
- a. llevar a cabo una cuantificación de la densidad celular de células CD45RO⁺ en muestras de tejido tumoral recogidas de dos regiones separadas del tumor de dicho paciente, respectivamente (i) el centro del tumor (CT) y (ii) el borde invasivo del tumor (IM), y
- 10 b. llevar a cabo las etapas de comparación siguientes:
- i. comparar el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para células CD45RO⁺ en CT con un valor de referencia CT predeterminado para células CD45RO⁺, y
- 15 ii. comparar el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para células CD45RO⁺ en IM con un valor de referencia IM predeterminado para células CD45RO⁺, y
- en el que cuando el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para células CD45RO⁺ en CT es mayor que el valor de referencia CT predeterminado para células CD45RO⁺ y el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para células CD45RO⁺ en IM es mayor que el valor de referencia IM predeterminado para células CD45RO⁺, entonces se determina un pronóstico de resultado favorable para dicho cáncer y cuando el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para células CD45RO⁺ en CT es menor que el valor de referencia CT predeterminado para células CD45RO⁺ y el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para células CD45RO⁺ en IM es menor que el valor de referencia IM predeterminado para células CD45RO⁺, entonces se determina un pronóstico de resultado pobre para dicho cáncer.
- 20
2. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en
- 25 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 condromixoide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de célula gigante del hueso, cordoma, mieloma múltiple), cáncer de cerebro y sistema nervioso central (por ejemplo, meningioma, astocitoma, oligodendrogliomas, ependimoma, gliomas,
- 30 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), cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer endometrial (por ejemplo, adenocarcinoma endometrial, adenocantoma, adenocarcinoma papilar seroso, célula clara), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de célula pequeña), tumores carcinoides gastrointestinales (por ejemplo, coriocarcinoma, corioadenoma destruens), 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, estesioneuoblastoma, granuloma de línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma,
- 35 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 anaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma medular tiroideo), cáncer vaginal, cáncer vulvar, y cáncer uterino (por ejemplo, leiomioma uterino).
- 40
3. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer colorrectal.
4. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cuantificación de la densidad celular se lleva a cabo en la etapa a) por inmunodetección.
- 50 5. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tiempo de supervivencia es Supervivencia libre de enfermedad (DFS).
6. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tiempo de supervivencia es Supervivencia total (OS).
7. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que

la etapa a) se lleva a cabo mediante la cuantificación de, como mínimo, dos marcadores biológicos distintos, respectivamente la densidad celular de células CD45RO⁺ y la densidad celular de células CD8⁺; y

la etapa b) se lleva a cabo comparando los valores de cuantificación obtenidos en la etapa a).

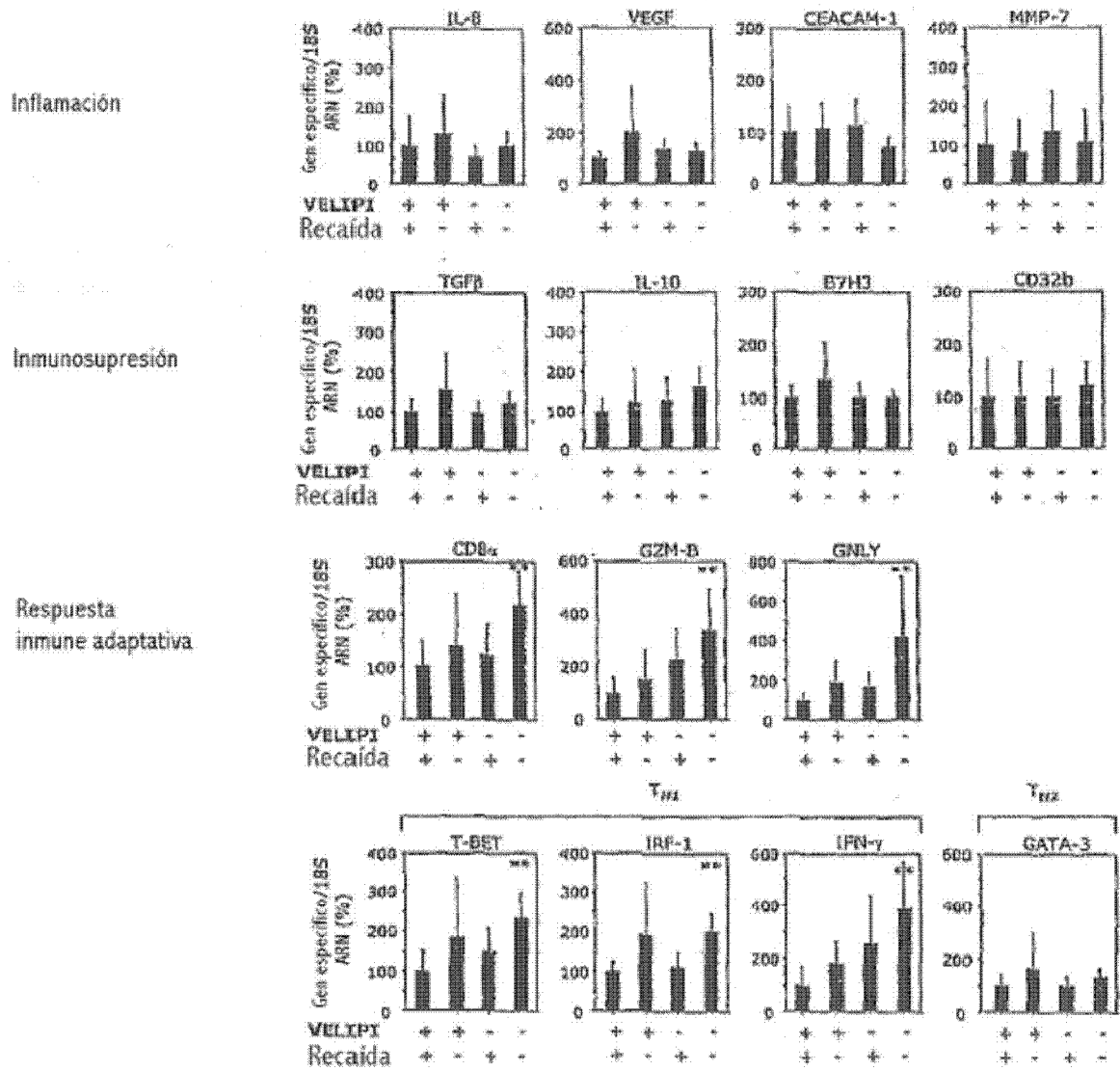


FIGURA 1

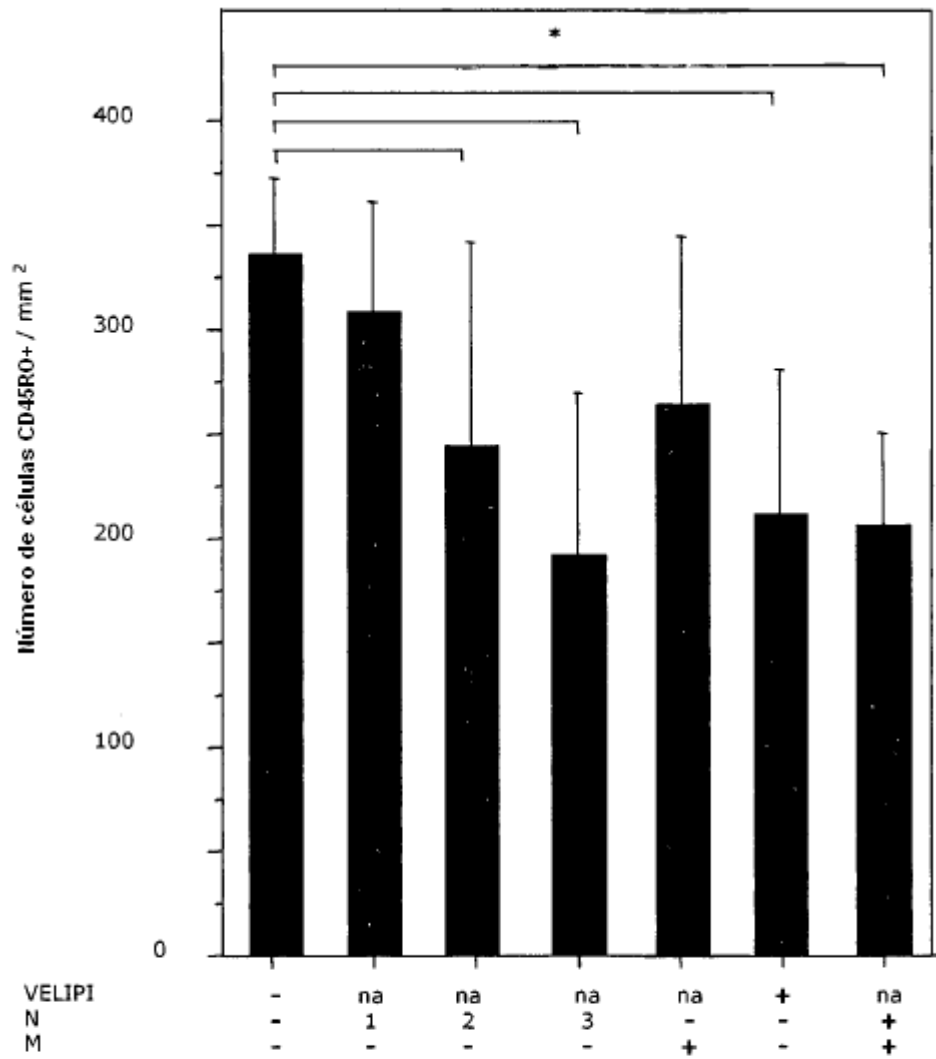


FIGURA 2

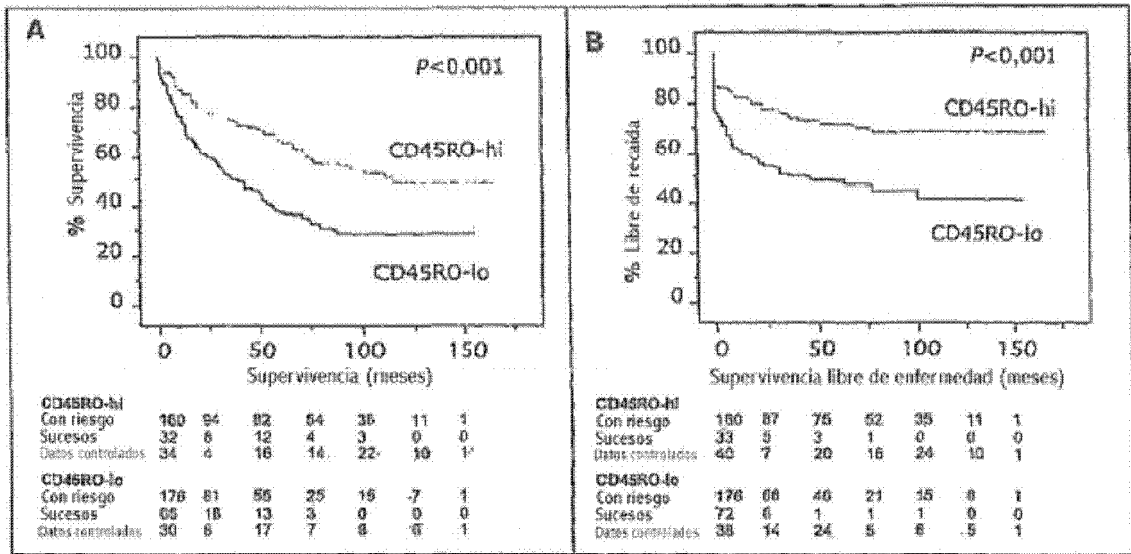


FIGURA 3

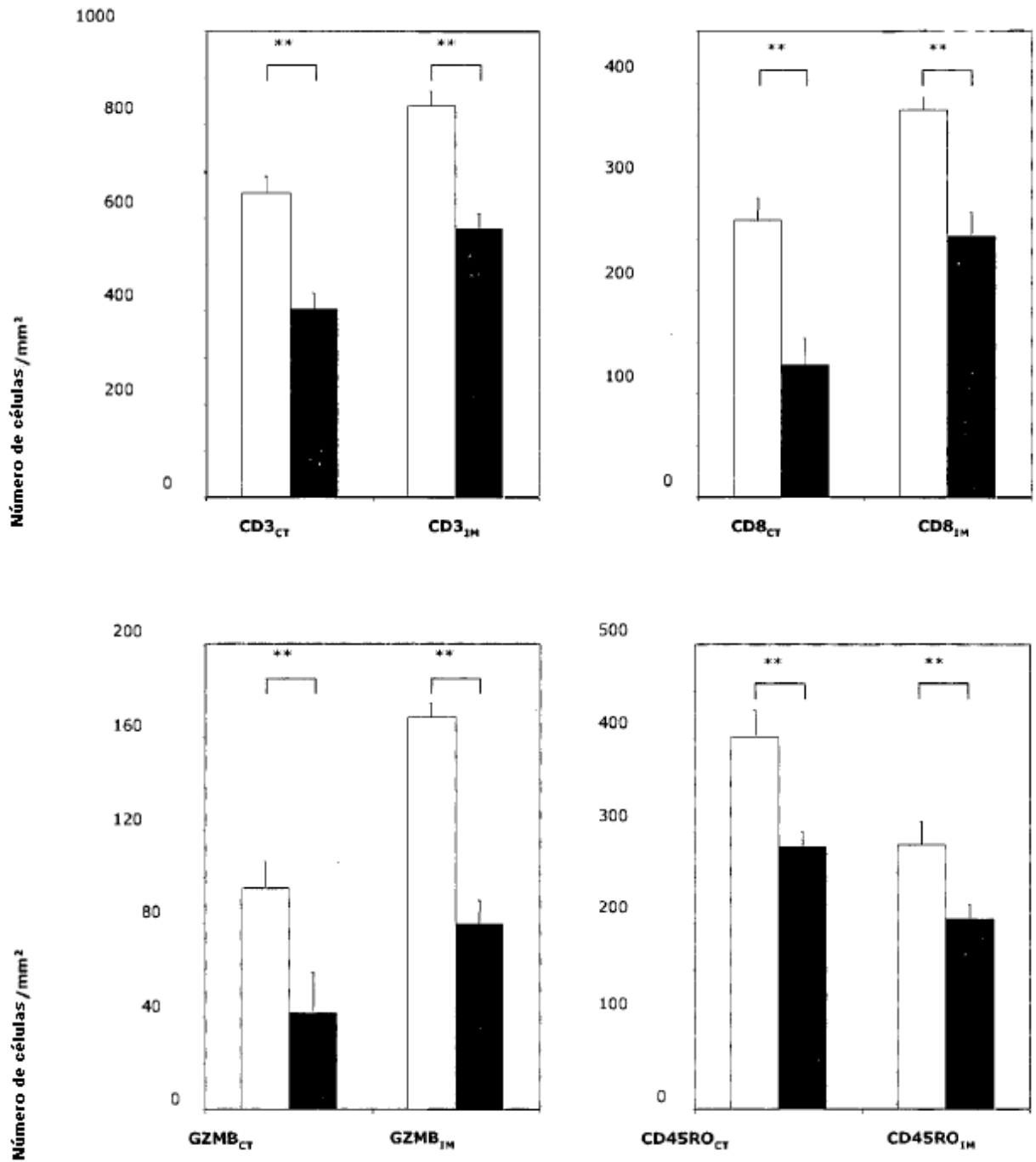


FIGURA 4

C

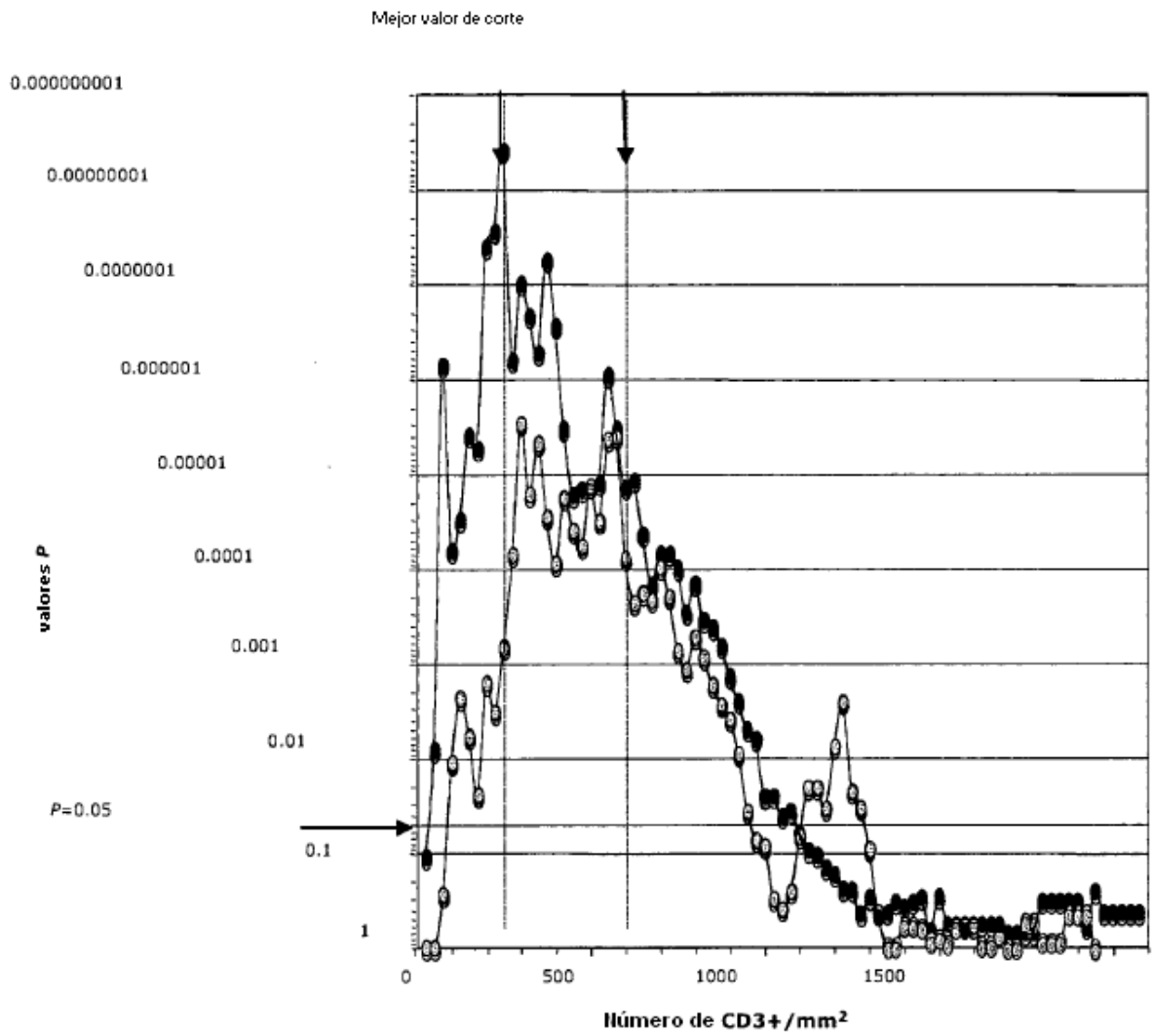


FIGURA 5

Análisis de una región única

valores *P*

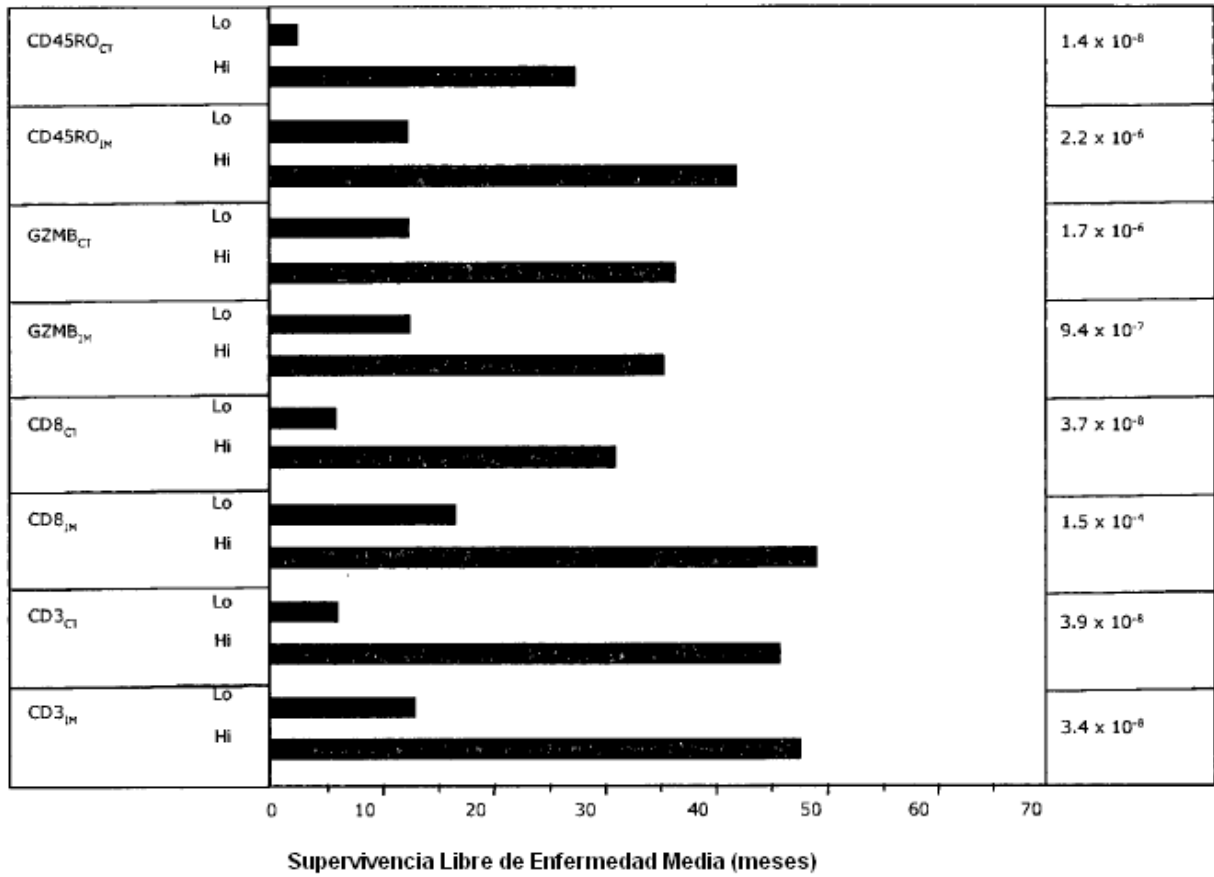


FIGURA 6

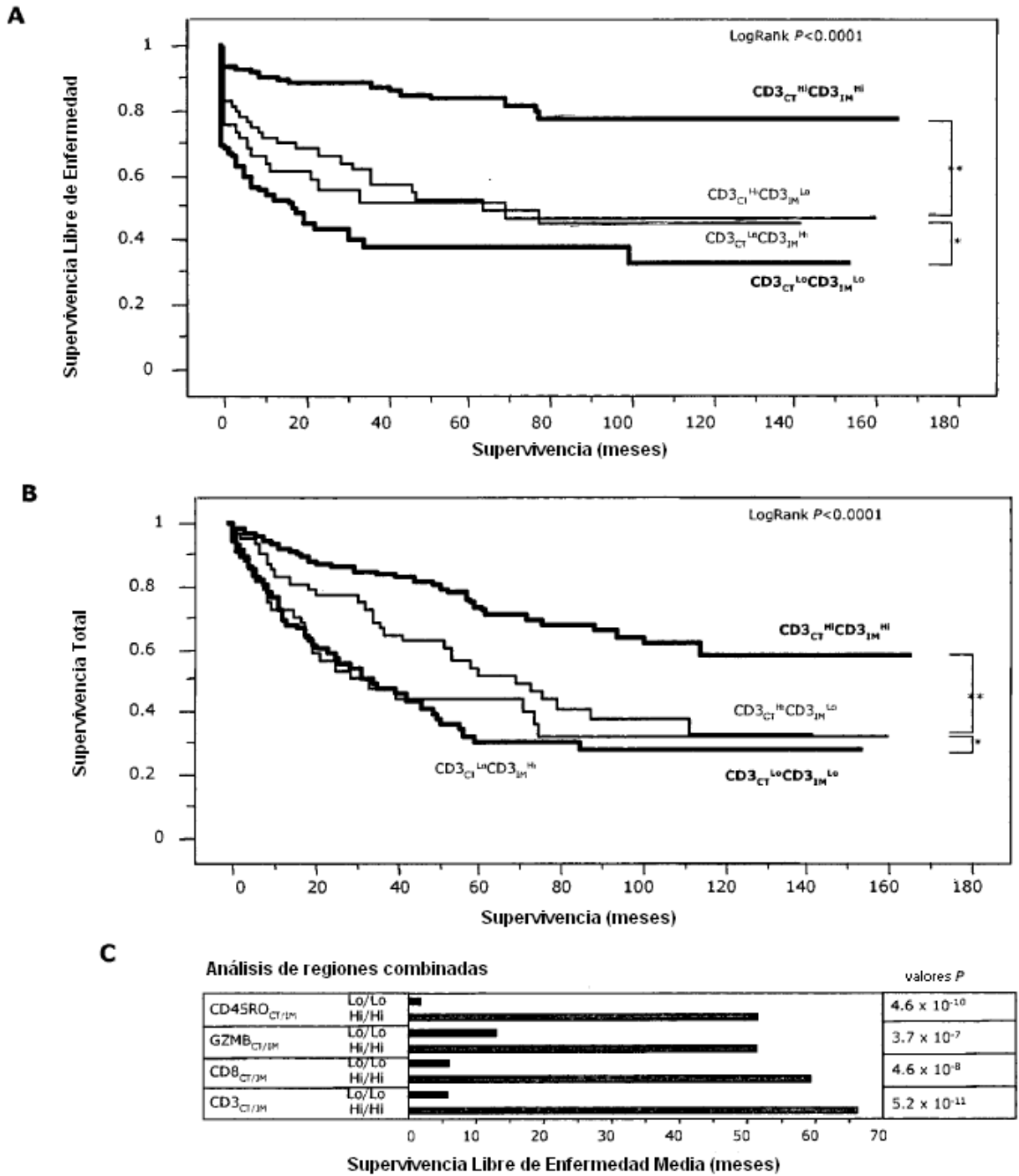


FIGURA 7

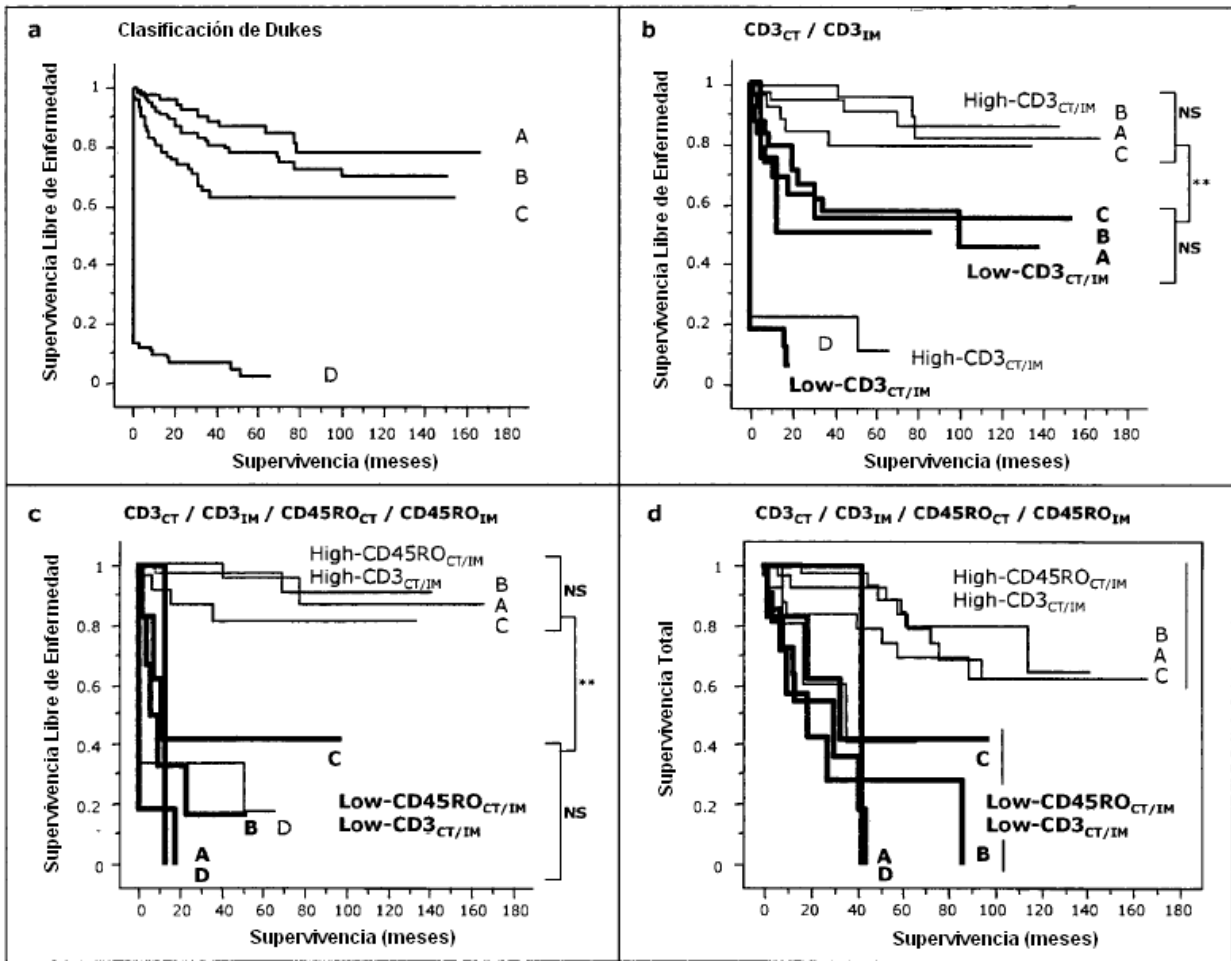


FIGURA 8

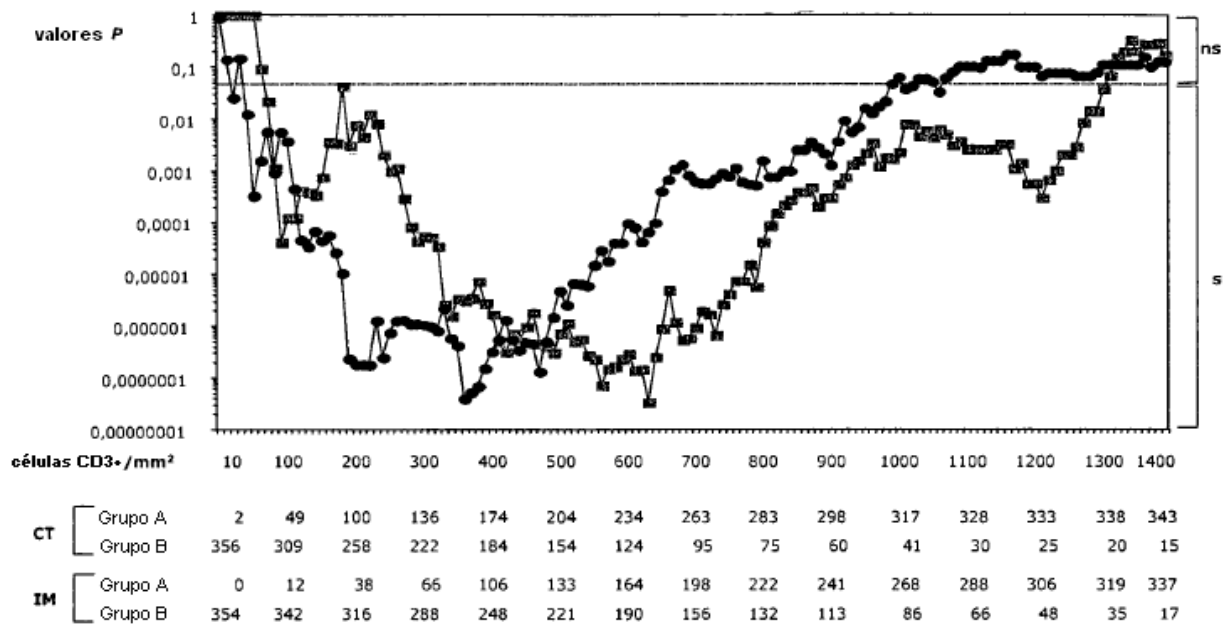


Figura 9

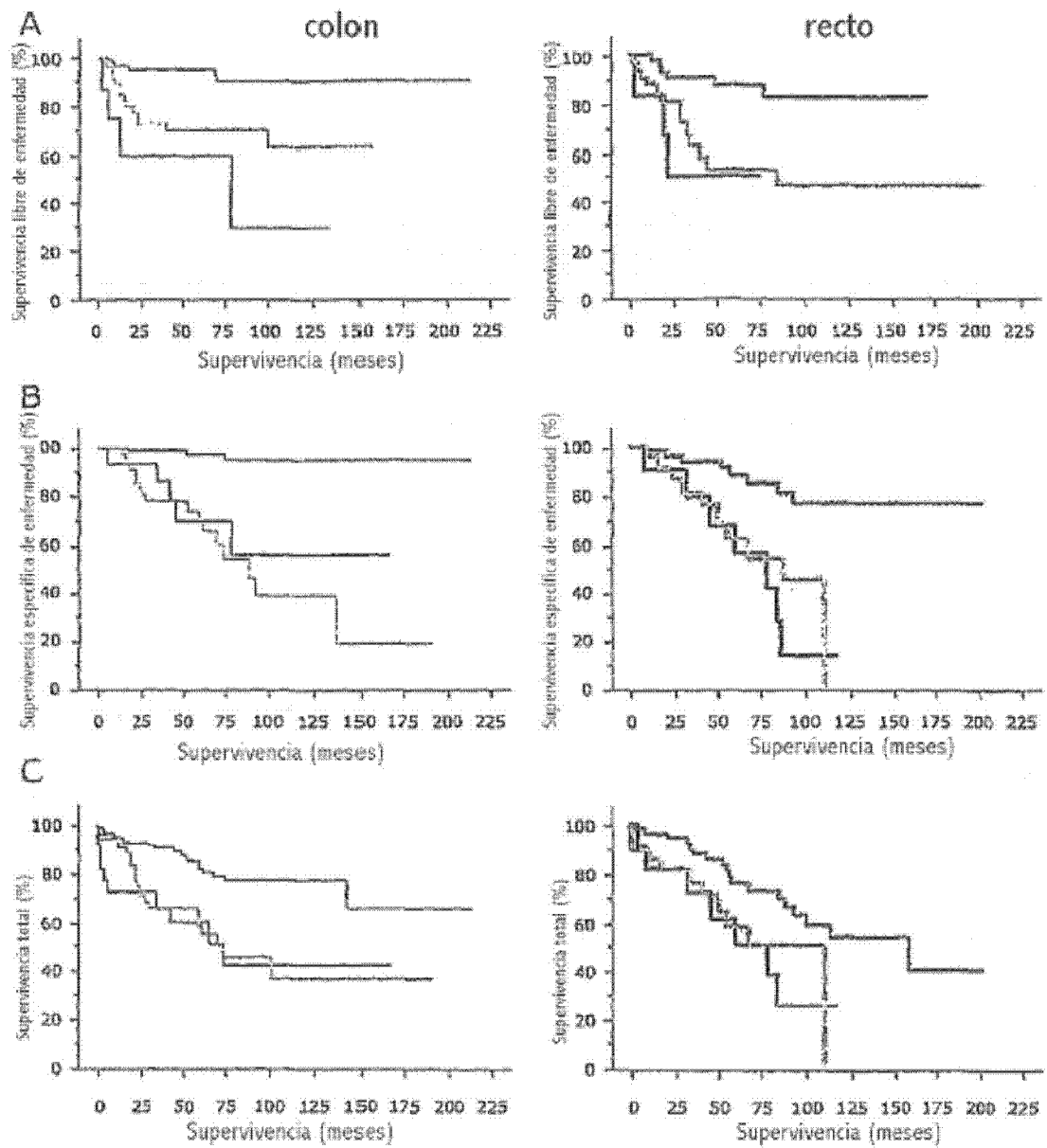


Figura 11

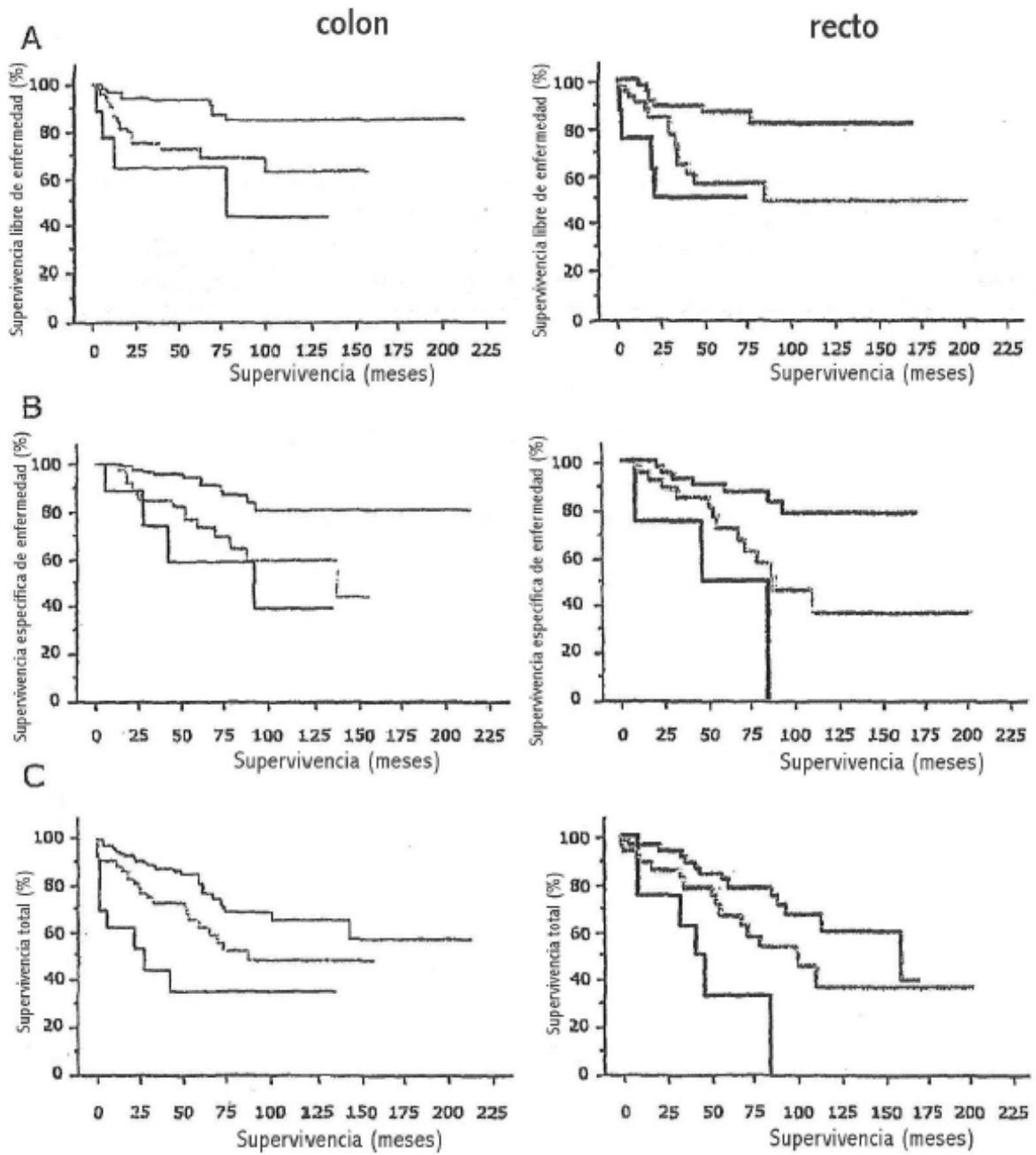


Figura 12

Pacientes con cáncer colorrectal estadio III

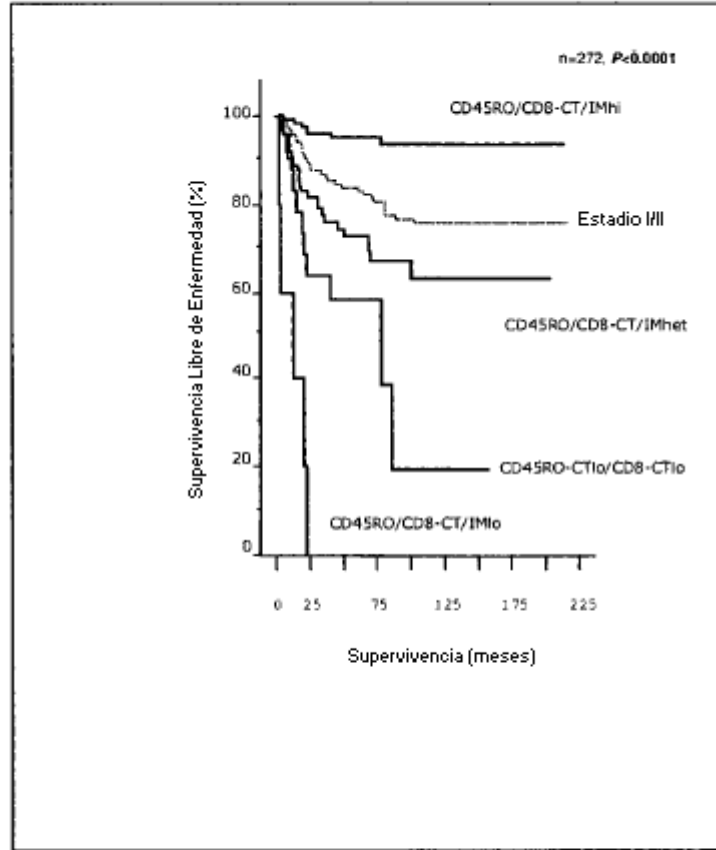


Figura 13

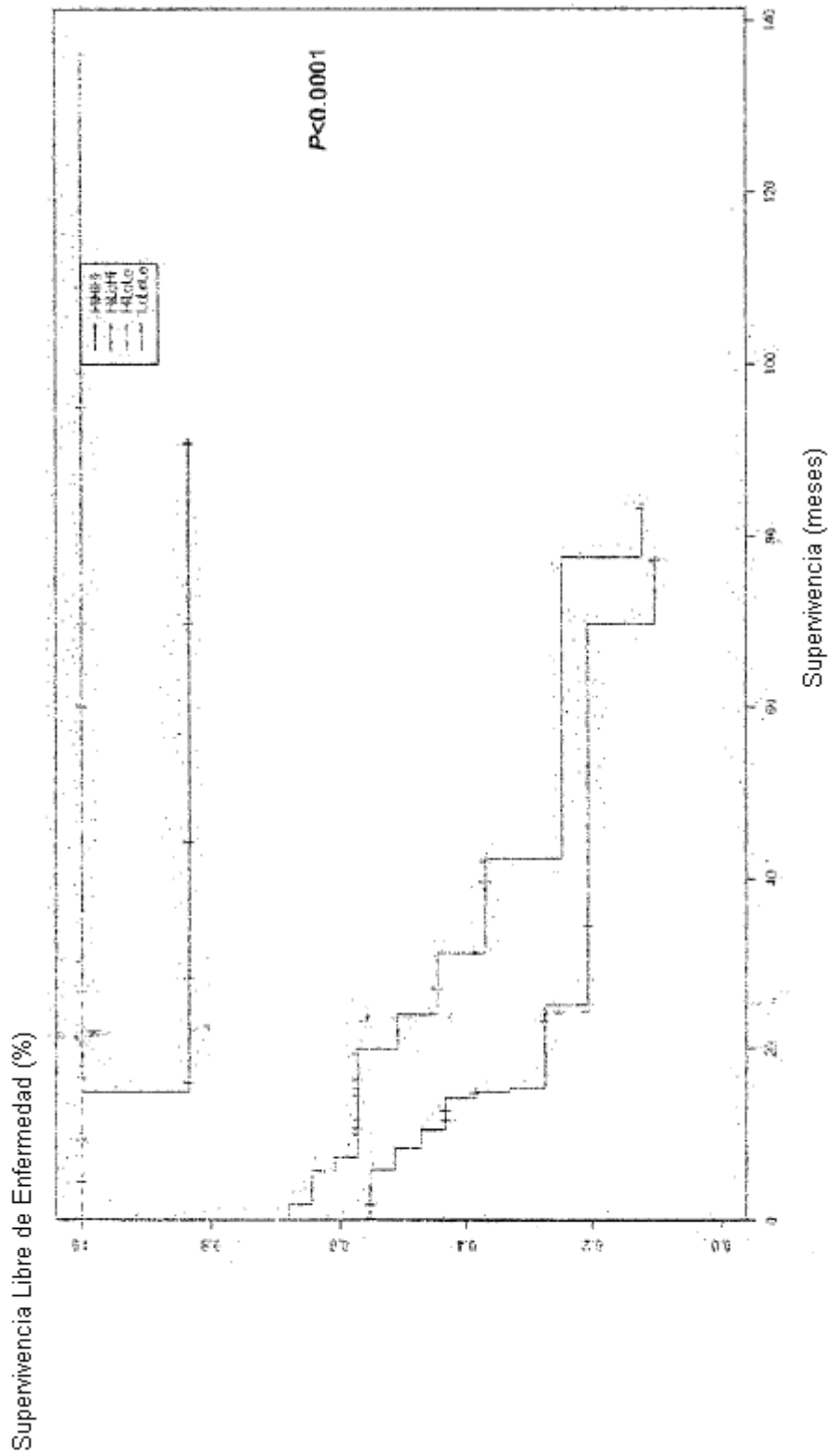


FIGURA 14