

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 957**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2011 PCT/EP2011/070661**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12069462**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2011 E 11788121 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2643698**

54 Título: **Biomarcadores para la predicción de la eficacia de una inmunoterapia contra el cáncer**

30 Prioridad:

24.11.2010 US 416981 P
15.12.2010 GB 201021289
16.12.2010 US 423652 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2016

73 Titular/es:

IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es:

WEINSCHENK, TONI;
SINGH, HARPREET;
FRITSCH, JENS y
MAHR, ANDREA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 592 957 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

Biomarcadores para la predicción de la eficacia de una inmunoterapia contra el cáncer

La presente invención se refiere a métodos para predecir el efecto de una inmunoterapia contra el cáncer en un paciente basándose en nuevos biomarcadores. La presente invención se refiere además a un pronóstico del resultado basado en dichos biomarcadores. La presente invención se refiere además a grupos de biomarcadores destinados al uso en los métodos anteriores.

Así pues, la solicitud reivindica las prioridades de GB1021289.6, presentada el 15 de diciembre de 2010; US 61/416,981, presentada el 24 de noviembre de 2010; y US 61/423,652, presentada el 16 de diciembre de 2010. Esta solicitud incluye un listado de secuencias con 50 secuencias.

Antecedentes de la invención

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores y antígenos específicos de tumores ha propiciado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de los linfocitos T citotóxicos (CTL) entre poblaciones de células infiltradas en los tumores o a partir de la sangre periférica apunta a que dichos leucocitos desempeñan un papel importante en la defensa inmunitaria natural contra el cáncer (Cheever et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1993 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; *J Immunol.* 1999, 162(2):989-94). En concreto, en dicha respuesta desempeñan un importante papel los linfocitos T CD8-positivos (CD8+), los cuales reconocen complejos constituidos por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y por péptidos formados habitualmente por 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas citosólicas o de productos ribosómicos defectuosos (DRiP) (Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. *Nature* 2000; 404(6779):770-774). Las moléculas MHC humanas también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: las moléculas MHC de clase I, presentes en la mayoría de las células nucleadas y que presentan péptidos procedentes de la proteólisis de proteínas endógenas, DRiP y péptidos más grandes. Las moléculas MHC de clase II, presentes predominantemente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan péptidos de proteínas exógenas que son captados por las APC, y posteriormente procesados (Cresswell P. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:259-93). Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los CTL CD8+ portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T colaboradores CD4+ portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Para que un péptido desencadene una respuesta inmunitaria celular, debe unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula de MHC y de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de 8, 9 ó 10 residuos de aminoácido y contienen en sus secuencias residuos conservados («anclajes») que interaccionan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. Así pues, cada alelo de MHC tiene un «motivo de unión» que determina los péptidos que pueden unirse específicamente a la hendidura de unión (Rammensee H. G., Bachmann J. and Stevanovic, S.; *MHC Ligands and Peptide Motifs*, Chapman & Hall 1998). Para desencadenar una reacción inmunitaria los péptidos no sólo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas de MHC, sino que también deben ser reconocidos por linfocitos T portadores de TCR específicos. Otro prerrequisito para conseguir reacciones inmunitarias eficientes es la ausencia de tolerancia inmunitaria contra el antígeno.

Los antígenos asociados a tumores (TAA) de los que derivan los epítomos reconocidos por los CTL pueden ser moléculas de cualquier clase de proteína, como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., que están reguladas al alza en las células tumorales. Además, los antígenos pueden ser específicamente tumorales, es decir estar presentes únicamente en células tumorales, como por ejemplo productos de genes mutados o de marcos de lectura abiertos (ORF) alternativos, o del empalme de proteínas (Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ. *Science* 2004 Apr 23; 304 (5670):587-90). Otra clase importante de antígenos son los antígenos específicos de tejido, como los antígenos «cáncer-testículo» (CT) que se expresan en diferentes tipos de tumores y en el tejido sano de los testículos.

Por consiguiente, los TAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados, entre otros, en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales (Lemmel C, Weik S., Eberle U., Dengjel J., Kratt T., Becker H. D., Rammensee H. G., Stevanovic S. *Nat. Biotechnol.* 2004 Apr.; 22(4):450-4, T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M.

Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. *Cancer Res.* 62 (20):5818-5827, 2002).

5 No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o líneas de células tumorales humanas no aporta suficiente información sobre si el antígeno correspondiente es una diana útil para una inmunoterapia basada en los linfocitos T. Esto es así porque los linfocitos T dotados de los TCR correspondientes sólo a) presentan y b) reconocen una subpoblación particular de epítomos de tales antígenos. Además, es necesario que la tolerancia inmunitaria frente a ese epítomo en particular sea nula o insignificante. Por tanto, es importante seleccionar sólo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

10 Los linfocitos T colaboradores desempeñan una función importante en la coordinación de las funciones efectoras de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos de linfocitos T colaboradores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T colaboradores del tipo T_{H1} apoyan las funciones efectoras de los CTL CD8+, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales en cuya superficie presentan complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítomos de linfocitos T cooperadores asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden actuar como principios activos farmacéuticos de composiciones vacunales que estimulen las respuestas inmunitarias antitumorales.

15 Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjuntamente y de forma sinérgica al efecto antitumoral, la identificación y la caracterización de TAA que sean reconocidos por los CTL CD8+ (ligando: molécula MHC de clase I + epítomo peptídico) y de TAA que lo sean por los linfocitos T colaboradores CD4+ (ligando: molécula MHC de clase II + epítomo peptídico) son importantes para el desarrollo de vacunas antitumorales efectivas y de un tratamiento efectivo basado en dichas vacunas.

20 En Europa, el carcinoma de células renales (CCR) se encuentra entre los siete tipos de cáncer más frecuentes en los varones, pues aparecen 29.600 nuevos casos cada año (3,5% de todos los tipos de cáncer). En las mujeres, el CCR ocupa el duodécimo lugar, con 16.700 casos al año (2,3% de todos los casos de cáncer). El CCR es raro antes de los 40 años, y a partir de esa edad es dos veces más frecuente en hombres que en mujeres. La incidencia por edad aumenta rápidamente desde menos de 2 por 100.000/año en pacientes menores de 40 años hasta 38 por 100.000/año en el grupo de edad de 65–69 años. A partir de esa edad, aumenta hasta 46 por 100.000/año en los mayores de 75 años.

25 Entre el 25–30% de los pacientes con CCR presentan metástasis evidentes en la presentación inicial. Cerca de un tercio de los pacientes con CCR desarrollarán enfermedad metastásica con el tiempo. Así pues, casi el 50–60% de los pacientes con CCR acaban presentando enfermedad metastásica. Entre los afectados por la enfermedad metastásica, aproximadamente el 75% presenta metástasis pulmonares, el 36% afectación de ganglios linfáticos y/o partes blandas, el 20% afectación ósea y el 18% afectación hepática.

30 El CCR es el carcinoma más letal entre los tumores genitourinarios, con una tasa de supervivencia a cinco años del 65% en comparación con una tasa de supervivencia a cinco años del 82% y 100% en el cáncer de vejiga y de próstata, respectivamente (Datos de EE.UU. 1972-2001). Las tasas medias de supervivencia a 5 años (hasta 1999) y después del diagnóstico (1990–1994) del cáncer renal ascendieron aproximadamente al 58% en Europa, y el CCR fue clasificado por varios autores únicamente como un cáncer con pronóstico moderado. En conjunto, el CCR es mortal casi en el 80% de los pacientes. Esta figura indica la gran necesidad médica de un seguimiento y de un tratamiento clínico efectivo y precoz de las recidivas.

35 La supervivencia depende en gran medida del estadio en que se diagnostica el tumor: la supervivencia a 5 años es de apenas el 12% en los pacientes que presentan lesiones con metástasis a distancia y del 80% en aquellos que presentan tumores localizados.

40 En el mundo, el carcinoma colorrectal (CRC) es el tercer tipo de cáncer más común. El cáncer de colon y recto es responsable de cerca de un millón de nuevos casos cada año, y a diferencia de la mayoría de los otros tumores, tiene una incidencia similar en hombres y mujeres (relación 1,2:1). En Europa, el CRC es el segundo cáncer más frecuente y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en hombres y mujeres, con aproximadamente 380.000 nuevos casos y cerca de 200.000 muertes relacionadas con la enfermedad cada año. La tasa de incidencia bruta en 2002 en hombres y mujeres fue de 88,3 y 84,0/100.000, respectivamente; la mortalidad bruta ascendió a 34,8 y 35,2/100.000, respectivamente. Estos datos reflejan con claridad la relevancia del CRC como una enorme fuente de carga personal y social.

45 El CRC es un cáncer de la población anciana, ya que la media de edad en el momento de la manifestación de la enfermedad es de 69 años en los hombres y 75 en las mujeres. Aparte de los factores relacionados con la alimentación y el estilo de vida (obesidad, sedentarismo, tabaquismo, consumo regular de alcohol, etc.), otros factores de riesgo son la presencia en la familia del CRC, tipos hereditarios de CRC (poliposis adenomatosa familiar [FAP], FAP atenuada [poliposis adenomatosa atenuada del colon; AAPC], carcinoma colorrectal hereditario sin

poliposis [HNPCC], síndromes de poliposis hamartomatosa) y las enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

El CRC aparece sobre todo en forma de adenocarcinoma en las membranas mucosas del recto, colon sigmoide, colon transverso/descendente y colon ascendente/ciego. El carcinoma colorrectal se puede curar con cirugía primaria cuando se encuentra en un estadio temprano. En cambio, las metástasis a distancia se diseminan a los ganglios linfáticos regionales y al hígado, a los pulmones y a otros órganos, como el SNC. Debido a los síntomas inespecíficos, el CRC se diagnostica con frecuencia en un estadio relativamente tardío y aproximadamente el 25% de los pacientes con CRC presenta ya enfermedad metastásica (CRCm) cuando visitan por primera vez al médico. Otro 30% de los pacientes diagnosticados *de novo* con un CRC localizado resecable acaban desarrollando después recidivas metastásicas.

La patente EP2105740 describe que algunas proteínas, tales como la apolipoproteína AI (APOA1), son reguladas por la sobreexpresión de c-myc en sujetos que sufren o son susceptibles al cáncer. Por consiguiente, la patente EP2105740 describe el uso del biomarcador APOA1 en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento del tratamiento contra el cáncer, en particular del cáncer de pulmón, pero no en una predicción de la efectividad de un tratamiento, y mucho menos de una inmunoterapia.

La patente WO 2009/090553 concierne al diagnóstico de pacientes con cáncer basado en bibliotecas de etiquetas de secuencias expresadas (EST) que corresponden al ARNm humano derivado de células cancerosas, en las cuales se analizan secuencias modificadas de AA localizadas en el extremo C-terminal de las proteínas (denominados péptidos post-stop). ApoA1 y CCL17 pertenecen a los 1596 péptidos reivindicados. También se concibe un método para evaluar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento contra el cáncer basado en la detección de al menos un polipéptido que incluye a APoA1 y a CCL17.

La patente US 2009/035801 da a conocer la identificación de 12 biomarcadores que incluye la ApoA1 y la albúmina para determinar la gravedad de la enfermedad y supervisar la respuesta terapéutica de los pacientes con cáncer de mama.

La patente US 2010/240546 concierne a la identificación de 22 biomarcadores entre los cuales se encuentra la ApoA1 y menciona un método para determinar la efectividad de un tratamiento en un paciente diagnosticado con tejidos pulmonares cancerosos, que comprende medir la expresión de al menos un biomarcador, incluido la ApoA1.

La patente WO2010/076322 describe un método para predecir una respuesta y/o un efecto beneficioso derivado de la quimioterapia en un paciente afectado por cáncer que implica: (i) clasificar un tumor en al menos dos clases; (ii) determinar en una muestra de tumor la expresión de al menos un gen marcador indicativo de una respuesta a la quimioterapia para un tumor de cada clase; (iii) y dependiendo de dicha expresión génica, predecir dicha respuesta y/o beneficio; en que un gen marcador es el CXCL13. La patente WO2010/076322 tampoco describe una predicción de la efectividad de un tratamiento, y mucho menos de una inmunoterapia.

De forma similar, la patente WO2010/003773 describe métodos para predecir un resultado de cáncer en un paciente aquejado por esta enfermedad, paciente al que se le habría diagnosticado previamente afectación ganglionar y habría recibido quimioterapia citotóxica; en que un gen marcador es el CXCL13. La patente WO2010/003773 no describe una predicción de la efectividad de una inmunoterapia.

La EP 1 777 523 A1 concierne al pronóstico del resultado de un cáncer en un paciente, donde dicho pronóstico se basa en la cuantificación de uno o varios marcadores biológicos que son indicativos de la presencia, o alternativamente del nivel de la respuesta inmunitaria adaptativa de dicho paciente contra dicho cáncer. En conjunto, se describe un número extremadamente grande de marcadores. Además, la EP 1 777 523 A1 se refiere al pronóstico (pero no a la predicción) del resultado de un cáncer en un paciente, basado en la detección y/o la cuantificación de uno o más marcadores biológicos indicativos de la presencia, o alternativamente del nivel de la respuesta inmunitaria adaptativa de dicho paciente contra dicho cáncer en el sitio del tumor.

A pesar de los recientes avances en el diagnóstico y el tratamiento de muchos tipos de cáncer descritos arriba, como por ejemplo el CCR y el CRC, todavía se necesitan marcadores biológicos que puedan ser utilizados para conseguir un mejor diagnóstico, y en particular una predicción de si cabe esperar un efecto beneficioso de una inmunoterapia con el fin de mejorar la supervivencia y ajustar mejor el tratamiento de las personas que lo precisan. Por otra parte, los marcadores también deben permitir hacer una predicción del resultado de dicho tratamiento contra el cáncer. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar los respectivos marcadores biológicos y métodos diagnósticos, predictivos y pronósticos.

En un primer aspecto de la presente invención, dicho objeto se consigue proporcionando un método para predecir un efecto beneficioso de una inmunoterapia en un paciente con cáncer tal y como se define en las reivindicaciones anexas.

En esta forma de realización, la invención se refiere a marcadores univariados (también llamados «sencillos» o «individuales») para la predicción de un efecto, en particular de un efecto beneficioso de una inmunoterapia en un paciente con cáncer tal y como se describe en la presente memoria, como una supervivencia general más larga, la

aparición de una sola o de múltiples respuestas de linfocitos T inducidas por la inmunoterapia, retardo en el crecimiento del tumor, disminución del tamaño del tumor o una supervivencia sin progresión más larga.

En el contexto de la presente invención, los términos «marcador», «biomarcador», «analito» o «parámetro» se usan indistintamente, y todos se refieren al marcador o marcadores que son analizados en el contexto del método o métodos acordes con la presente invención.

En el contexto de la presente invención, una «predicción» o un «marcador predictivo» se basará en marcadores acordes con la presente invención que ofrecen información acerca de la efectividad de una inmunoterapia contra el cáncer, como por ejemplo, el uso de una vacuna o vacunas tal y como se describe en la presente memoria.

CXCL13/BCA-1, ApoA1, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, CD95/Fas, ASAT/SGOT, CCL17/TARC, acilcarnitinas de cadena corta y CA19-9 han sido identificados como predictores de la supervivencia general, y en algunos casos de las respuestas de los linfocitos T, utilizando análisis univariados.

Se prefiere un método acorde con la presente divulgación, en que dicho marcador es seleccionado entre ApoA1 y/o CCL17/TARC. Los niveles de CCL17/TARC superiores a la mediana de la población en estudio respectiva y los niveles de ApoA1 superiores a la mediana, indicada por el proveedor del ensayo, (p. ej. Rules Based Medicine (RBM), 0,288 mg/ml) son positivos.

No obstante, en el ámbito de la presente invención también quedan incluidas combinaciones de los marcadores, como por ejemplo: ApoA1 y CCL17/TARC; ApoA1 y CXCL13/BCA-1; ApoA1, CXCL13/BCA-1 y monocitos; ApoA1, CCL17/TARC, CXCL13/BCA-1 y monocitos; CCL17/TARC, ApoA1 y monocitos; CCL17/TARC, ApoA1 y CXCL13/BCA-1; ApoA1 y monocitos. Todas estas combinaciones de marcadores se prefieren particularmente.

La ApoA1 es la principal proteína de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y puede ser medida como sustituta de las HDL en los análisis clínicos. En condiciones normales, las HDL poseen propiedades anti-ateroscleróticas, antioxidantes, antitrombóticas y antiinflamatorias. Con todo, en condiciones inflamatorias/oxidativas crónicas (como p. ej. en infecciones crónicas, enfermedades autoinmunitarias, síndrome metabólico y cáncer), las HDL pierden estas propiedades y adquieren propiedades pro-inflamatorias. En las HDL pro-inflamatorias (pHDL), la ApoA1 –una proteína de fase aguda negativa– está reducida y abundan otras proteínas como la amiloide A sérica (SAA) –una proteína de fase aguda positiva. Por ello, los niveles bajos de ApoA1 son indicativos de condiciones inflamatorias u oxidativas crónicas, y pueden a su vez promover tales estados, lo que es sabido que favorece el desarrollo de cáncer. En muchos tipos de cáncer se han descrito niveles reducidos de ApoA1, al igual que en los pacientes con CCR de la cohorte del estudio IMA901-202 (fase II). Resulta destacable que la proteína relacionada ApoA2 haya sido descrita como de pronóstico positivo en el CCR metastásico, y que un modelo de ratón demostrara una implicación funcional de la ApoA1 en la supresión de la progresión del cáncer (Su et al., 2010; Vermaat et al., 2010). Además de sus efectos promotores del cáncer, también se sabe que las reacciones de fase aguda y las condiciones oxidativas crónicas perjudican a las respuestas inmunitarias adaptativas (Haeryfar and Berczi, 2001; Muller et al., 2008; Vallejo et al., 2004).

La CCL17/TARC es una quimiocina que ha sido clasificada en un principio como una quimiocina atractora de linfocitos TH2, pero que también tiene otras dianas celulares, como los linfocitos T efectoras/de memoria de tipo TH1 y TH2, en particular los dirigidos a la piel, un subgrupo de linfocitos T CD8+, linfocitos T de memoria TH17, células NK y NKT, células dendríticas, etc. Los estudios en ratones demuestran que la expresión intratumoral de CCL17/TARC es favorable para el rechazo inmunitario. Las concentraciones en suero pueden indicar la actividad de las células dendríticas mieloides, los macrófagos y los monocitos, que son las principales fuentes de esta quimiocina. Se ha demostrado que la producción estable de CCL17 por parte de las células dendríticas es un prerrequisito para que desempeñen su singular función, consistente en desencadenar respuestas independientes de antígeno en los linfocitos T. En contraste con afecciones como la dermatitis atópica y algunas otras enfermedades alérgicas o autoinmunitarias, donde la CCL17/TARC está potenciada patológicamente y se considera indicativa del aumento de la actividad TH2, los niveles de CCL17/TARC se situaron dentro de intervalos normales en la población del estudio IMA901-202, y equilibrados con las citocinas de TH1 como la IL-12 y el IFN-gamma.

En el contexto de la presente invención, los niveles de ApoA1 y de CCL17/TARC superiores a la mediana de los niveles hallados en pacientes con CCR avanzado se consideran favorables para el éxito terapéutico. Se ha predicho que los pacientes con al menos un factor por encima de los valores de corte indicados (estadísticamente alrededor del 75%) muestran un mejor resultado clínico después de la vacunación con la vacuna contra el cáncer IMA901 (Immatics Biotechnologies, Tubinga, Alemania), en comparación con los pacientes cuyos dos factores están por debajo de los valores de corte. Se predice que los pacientes cuyos dos factores superen los valores de corte indicados (estadísticamente en torno al 25%) serán los que obtengan más provecho del tratamiento. El LIN (límite inferior de normalidad) de la ApoA1 depende del ensayo utilizado para el análisis. Utilizando la tecnología multiplex de microperlas Luminex (RBM), el LIN es 0,288 mg/ml. Con otros ensayos diferentes, el LIN tiene que ajustarse con la información indicada por el proveedor, o realizando experimentos que comparen el nuevo ensayo con el ensayo de referencia, o bien mediante la medición de un número estadísticamente relevante de muestras de donantes sanos. La mediana de los niveles de CCL17/TARC y/o ApoA1 en una población de pacientes determinada depende de la población y del ensayo utilizado para la cuantificación.

- Los métodos de medición preferidos para los marcadores, y específicamente para ApoA1 y CCL17/TARC, se escogen entre ensayos inmunológicos como ELISA, inmunoensayos multiplex con microperlas, chips o placas, proteómica, o de espectrometría de masas, bioensayos, electroforesis, inmunonefelometría, inmunoturbidimetría, ensayos enzimáticos, ensayos colorimétricos o fluorométricos p. ej. evaluables por fotometría, y análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los neutrófilos, eosinófilos y monocitos se pueden determinar por FACS o mediante otros ensayos hematológicos clínicamente establecidos. La ApoA1 está estrechamente correlacionada con el HDL-colesterol y también puede ser determinada por todos los métodos utilizados para determinar el HDL-colesterol.
- Además, la quimiocina de linfocitos B de tipo 1 (CXCL13/BCA-1) ha sido identificada como un marcador. La CXCL13/BCA-1 parece ser necesaria para la organización de la síntesis de linfocitos en los órganos linfoides. Los niveles elevados están asociados con metástasis y mal pronóstico en algunas entidades tumorales y probablemente también con una deficiente respuesta inmunitaria antitumoral.
- Los eosinófilos, cuyos niveles en porcentaje y en cifras absolutas han sido identificados como marcadores, tal vez puedan, a la luz de los informes contradictorios sobre sus efectos, desempeñar papeles diversos y opuestos en el cáncer. El reclutamiento de los eosinófilos hacia el tumor parece ser positivo en varios casos. En el caso del melanoma, se ha descubierto que existe reclutamiento de eosinófilos hacia el sitio de inyección de GM-CSF.
- Los monocitos, cuyos niveles en porcentaje y en cifras absolutas han sido identificados como marcador, son reclutados a los sitios inflamados o los sitios en que se administra el GM-CSF. Son capaces de diferenciarse en macrófagos o en células dendríticas y pueden actuar como células APC. Pueden sustituir a las células dendríticas emigradas de los tejidos, como las células de Langerhans. En cambio, los niveles elevados de monocitos han sido descritos como un factor negativo en el cáncer y la terapia con IL-2 del CCR, presumiblemente debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la inhibición de las células NK y los linfocitos T.
- El CD95/Fas soluble se genera por empalme alternativo y compite con el CD95 unido a membrana por la unión de CD95L/FasL. Así pues, podría evitar la apoptosis de los linfocitos T, p. ej. en el sitio del tumor (contraataque tumoral). También podría contrarrestar las funciones no apoptóticas de la vía de señalización del CD95, las cuales promueven la motilidad y la invasividad de las células cancerosas. El CD95 también podría estar relacionado con los eosinófilos, al evitar su apoptosis. En cambio, el CD95 puede también inhibir la muerte de las células tumorales mediada por el CD95L a manos de los linfocitos T; en algunas entidades se correlaciona con una alta carga tumoral y un pronóstico peor.
- Los neutrófilos son un marcador pronóstico negativo del cáncer. En particular, una alta relación de neutrófilos respecto a los linfocitos indica un pronóstico negativo en varios tipos de cáncer. Esto apunta a una influencia predictiva negativa sobre la inmunoterapia contra el cáncer. Los neutrófilos pueden contrarrestar las reacciones inmunitarias al inhibir a los linfocitos T y las células NK.
- Cuando la tasa de filtración glomerular (GFR) es reducida se observa un aumento de las acilcarnitinas de cadena corta, lo cual indica un daño importante en el riñón que puede provocar una reducción del acceso de las células sanguíneas al tumor (Wanner 1988). Por otro lado, en los pacientes con cáncer se han descrito niveles inferiores de acilcarnitinas ácido-solubles (libres y de cadena corta) a los de los controles (Sachean 1987).
- El CA19-9 es un epítipo de la estructura sializada Lewis A, un antígeno glucídico de mucinas como la MUC1. Su presencia en el suero podría estar correlacionada con la expresión de MUC1 en el tumor y, por tanto, con la presencia de uno de los antígenos vacunales. En cambio, los marcadores tumorales en suero suelen ser marcadores pronósticos negativos.
- La ASAT/SGOT es una enzima implicada en el metabolismo de los aminoácidos. Como en el caso de las LDH, su aumento en el suero sirve como indicador de un recambio celular acelerado, tal y como sucede cuando existen daños en el hígado y en otros órganos, así como en el cáncer. Nuestros resultados confirman que la presencia de niveles altos de ASAT/SGOT y de LDH son factores pronósticos negativos en el cáncer, pero inesperadamente también parecen ser un factor predictivo positivo para el resultado de las inmunoterapias. El motivo no se conoce con certeza todavía. Se puede especular que la muerte de células en el tumor, especialmente en forma de necrosis, favorece las reacciones inmunitarias en el sitio del tumor.
- En otro aspecto del mismo, el método acorde con la presente invención comprende además: c) determinación de al menos un marcador seleccionado entre el grupo consistente en albúmina y bilirrubina directa en dicha muestra de dicho paciente con cáncer, en el que un nivel más elevado que la mediana (+/-10%) de una población de pacientes con cáncer determinada es indicador de un efecto beneficioso de una inmunoterapia administrada a dicho paciente, o d) determinación del nivel del marcador interleucina-33 (IL-33) en dicha muestra de dicho paciente con cáncer, en el que un nivel inferior a la mediana (+/-10%) de una población de pacientes con cáncer determinada es indicador del efecto beneficioso de una inmunoterapia administrada a dicho paciente.
- En este aspecto de la presente invención, los marcadores indicados se utilizan a fin de proporcionar un apoyo a los marcadores univariados señalados antes en el primer aspecto de la presente invención. Los marcadores, por tanto, se utilizan con el objetivo de crear un conjunto o panel de marcadores «multivariable» para el diagnóstico.

También se da a conocer un método acorde con la presente invención, en el que dicho conjunto o panel de marcadores multivariados consiste en los marcadores CXCL13/BCA-1, ApoA1, neutrófilos, eosinófilos (en porcentaje y en cifras absolutas), monocitos (en porcentaje y en cifras absolutas), CD95/FAS, ASAT/SGOT, CCL17/TARC, LDH, Thr, IL-6, acilcarnitinas de cadena corta, albúmina, bilirrubina, IgE, IL-33, MMP-3 y CA19-9.

- 5 A efectos de la presente invención el valor de referencia del marcador es un valor umbral propio de cada marcador que define si un paciente se beneficiará de una terapia inmunológica. Dependiendo de si el marcador es un marcador negativo o positivo, un valor superior o inferior al valor de referencia en el paciente indica si la inmunoterapia resulta beneficiosa. En una forma de realización el valor de referencia es +/-10% de la mediana de la concentración observada en una población determinada de pacientes con cáncer. Más preferible es que el valor de referencia sea, dependiendo de si es un valor negativo o positivo, el cuartil superior o inferior, el quintil superior o inferior o el decil superior o inferior de una población determinada de pacientes con cáncer. Lo más preferible es que el valor de referencia de un marcador negativo, hasta donde se puede considerar que los pacientes obtendrán un provecho del tratamiento, es el percentil 70, el percentil 80, y como opción más preferida el percentil 90. En el caso de los marcadores positivos lo más preferido es que el valor de referencia, a partir del cual se considera que los pacientes obtienen provecho del tratamiento, sea el percentil 30, el percentil 20, y como opción más preferida el percentil 10.

Otro aspecto importante de la presente invención se refiere a un método acorde con la presente invención, en el que dicha inmunoterapia comprende una vacunación con una vacuna contra el cáncer, opcionalmente junto con un adyuvante, como por ejemplo el GM-CSF.

- 20 La inmunoterapia y las vacunas respectivas aparecen descritas en el estado actual de la técnica; la inmunoterapia en pacientes con cáncer tiene por objeto activar específicamente células del sistema inmunitario, sobre todo los llamados linfocitos T citotóxicos (CTL, también llamados «células asesinas» o linfocitos T CD8+), contra las células tumorales pero no contra el tejido sano. Las células tumorales difieren de las células sanas por la expresión de proteínas asociadas a tumor y específicas de tumor. Las moléculas HLA situadas en la superficie de la célula presentan partes del contenido celular al exterior, lo cual permite a los CTL distinguir una célula sana de una célula tumoral. Esto se lleva a cabo descomponiendo todas las proteínas del interior de la célula en péptidos cortos que a continuación se ligan a moléculas HLA y se presentan en la superficie celular. Los péptidos que son presentados en las células tumorales, pero nada o muy poco en las células sanas del cuerpo, se denominan péptidos asociados a tumor (TUMAP). Los antígenos de los que derivan los epítomos reconocidos por los linfocitos T específicos de tumor pueden ser moléculas de cualquier tipo de proteína, como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc.

- 35 Sin embargo, la sensibilización de un tipo de CTL no suele bastar para erradicar todas las células tumorales. Los tumores mutan mucho y, por tanto, son capaces de responder rápidamente a los ataques de los CTL cambiando su patrón de proteínas para no ser reconocidos por estos. A fin de contrarrestar los mecanismos de evasión tumoral, en la vacunación se emplean diversos péptidos específicos. De este modo se puede desplegar un amplio ataque simultáneo contra el tumor por parte de varios clones de CTL a la vez. Así se puede reducir la posibilidad de que el tumor eluda la respuesta inmunitaria. Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente en un estudio clínico que trataba pacientes con melanoma avanzado. Con pocas excepciones, los pacientes que presentaban al menos tres respuestas de linfocitos T distintas, manifestaron respuestas clínicas objetivas o enfermedad estable así como un aumento de la supervivencia, mientras que a la vasta mayoría de los pacientes con menos de tres respuestas de los linfocitos T se les diagnosticó enfermedad en progresión (Banchereau et al., 2001).

- 40 El tratamiento/composición preferida usada en el contexto de los métodos de la presente invención es una vacuna antitumoral basada en péptidos. Otros tratamientos preferidos incluyen vacunas basadas en ADN o ARN, por ejemplo tal y como se describe en Weide et al. (Weide B, Garbe C, Rammensee HG, Pascolo S. Immunol. Lett. 2008 Jan 15;115(1):33-42. Epub 2007 Oct 26), vacunas basadas en células dendríticas, vacunas con lisados de células o líneas celulares de tumores primarios, o componentes seleccionados de células tumorales como proteínas enteras o proteínas de choque térmico. El medicamento puede administrarse directamente al paciente, es decir en el órgano afectado o sistémicamente por vía i.d., i.m., s.c., i.p., oral e i.v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administran al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente, que después se le vuelven a administrar. Los antígenos vacunales, p. ej. péptidos, pueden ser sustancialmente puros, o combinados con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o emplearse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o ser administrados con un sistema adecuado, como por ejemplo liposomas. Los péptidos también se pueden conjugar con un portador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véanse WO 95/18145 y Longenecker et al (1993)). Los péptidos también se pueden etiquetar, o formar proteínas de fusión o moléculas híbridas, entre otros. Se espera que los péptidos cuyas secuencias se ofrecen en la presente invención estimulen a los linfocitos CD4+ o CD8+. No obstante, la estimulación de los CTL CD8+ es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T colaboradores CD4+. Así pues, los epítomos de MHC de clase I que estimulan a los CTL CD8+, el compañero de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4+. Los epítomos que estimulan a los CD4+ son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en el toxoide tetánico. En una forma de realización preferida el péptido es una proteína de fusión, que en particular comprende los aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR. En una realización el péptido de la invención es una proteína humana truncada o una proteína de fusión de un fragmento de proteína y

otra porción polipeptídica, siempre que la porción humana incluya una o varias secuencias de aminoácidos de la presente invención. Para su uso, la vacuna también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes preferidos son imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, interferón-alfa, oligonucleótidos CpG y derivados, poli-(I:C) y derivados, ARN, sildenafilo, y formulaciones de partículas con PLG o virosomas. Como se ha mencionado, el medicamento se destina a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o a la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, sabores, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed. 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de las enfermedades cancerosas, como por ejemplo el CCR y el CRC. En las tablas siguientes 1A a 1D se enumeran a título de ejemplo diferentes combinaciones de péptidos que pueden ser utilizadas para elaborar vacunas en el contexto de la presente invención, y que aquí se designan como IMA901, IMA910, IMA941 e IMA950, respectivamente.

Tabla 1A. IMA901 (p. ej. usada en el CCR)

SEQ ID N.º	Abrev.	Proteína	Secuencia
1	MMP-001	Metaloproteinasa de matriz 7	SQDDIKGIQKLYGKRS
2	ADF-002	Adipofilina	VMAGDIYSV
3	ADF-001	Adipofilina	SVASTITGV
4	APO-001	Apolipoproteína L1	ALADGVQKV
5	CCN-001	Ciclina D1	LLGATCMFV
6	GUC-001	GUCY1A3	SVFAGVVGW
7	K67-001	KIAA0367	ALFDGDPHL
8	MET-001	Protooncogén c-met	YVDPVITSI
9	MUC-001	MUC1	STAPPVHNV
10	RGS-001	RGS 5	LAALPHSCL

Tabla 1B. IMA 910 (p. ej. usada en el cáncer de colon)

SEQ ID N.º	Abrev.	Secuencia
11	C20-001	ALSNLEVTL
12	NOX-001	ILAPVILYI
13	ODC-001	ILDQKINEV
14	PCN-001	KLMDLDVEQL
15	TGFBI-001	ALFVRL LALA
16	TOP-001	KIFDEILVNA
17	TGFBI-004	TPPIDAHTRNLLRNH
18	CEA-006	SPQYSWRINGIPQQHT
5	CCN-001	LLGATCMFV
9	MUC-001	STAPPVHNV
1	MMP-001	SQDDIKGIQKLYGKRS

(continuación)

SEQ ID N.º	Abrev.	Secuencia
19	CEA-004	YLSGANLNL
8	MET-001	YVDPVITSI

Tabla 1C. IMA941 (p. ej. usada en el cáncer gástrico)

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia
20	CDC2-001	LYQILQGIVF
21	ASPM-002	SYNPLWLRI
22	UCHL5-001	NYLPFIMEL
23	MET-006	SYIDVLPEF
24	PROM1-001	SYIIDPLNL
25	UQCRB-001	YYNAAGFNKL
26	MST1R-001	NYLLYVSNF
27	PPAP2C-001	AYLVYTDRL
28	SMC4-001	HYKPTPLYF
29	MMP11-001	VWSDVTPLTF

5

Tabla 1D. IMA950 (p. ej. usada en el glioblastoma)

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia
30	CSP-001	TMLARLASA
31	FABP7-001	LTFGDVVAV
32	NLGN4X-001	NLDTLMTYV
33	TNC-001	AMTQLLAGV
34	NRCAM-001	GLWHHQTEV
35	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
36	BCA-002	ALWAWPSEL
37	MET-005	TFSYVDPVITSISPKYG

Tabla 1E. IMA990a (p. ej. usada en el cáncer de próstata)

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia
38	PSA-001	FLTPKKLQCV
39	PSA-002	KLQCVDLHV
40	PSA-003	VISNDVCAQV*
41	PSCA-001	ALQPGTALL*

(continuación)

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia
42	PSCA-002	AILALLPAL
43	PSMA-001	LLHETDSAV*
44	PSMA-002	ALFDIESKV
45	Survivina-004	ELTLGEFLKL
46	Survivina-005	TLPPAWQPFL
47	TRP-P8-001	GLMKYIGEV
48	PROSTEIN-001	CLAAGITYV
49	PSMA-001	NYTLRVDCTPLMYSL
50	Survivina-001	TLGEFLKLDREKAKN
* Opcionalmente excluido		

Por consiguiente, en otro aspecto preferido del método acorde con la presente invención, dicha vacuna contra el cáncer se escoge entre una vacuna contra el cáncer que comprende al menos uno de los péptidos inmunógenos seleccionados del grupo de las SEQ ID N° 1 a 37, por ejemplo que comprenda las SEQ ID N° 1 a 10; SEQ ID N° 11 a 19 y 1, 5, 8 y 9; SEQ ID N° N.º 20 a 29, y SEQ ID N° 30 a 37.

En otro aspecto del método acorde con la presente invención, dicho paciente es tratado o ha sido tratado previamente. Tales tratamientos previos pueden comprender por ejemplo cirugía con intención curativa, radioterapia y/o quimioterapia. Un tratamiento previo preferido es una terapia con un agente antitumoral seleccionado entre citocinas, e inhibidores de tirosina cinasa (TKI), como sorafenib y sunitinib, y ciclofosfamida. En este aspecto, dicho tratamiento contra el cáncer puede seleccionarse entre las terapias descritas arriba, pero se prefiere una inmunoterapia, preferiblemente que comprenda el uso de una vacuna antitumoral, opcionalmente junto con GM-CSF.

Los cánceres a tratar pueden ser todos los cánceres que responden a la inmunoterapia, y preferiblemente escogidos entre carcinoma de células renales (CCR), cáncer colorrectal (CRC), cáncer gástrico (CG), melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), glioblastoma, y en general adenocarcinoma de cualquier tipo.

Las muestras que son analizadas en el contexto de la presente invención se pueden seleccionar entre: sangre completa, sangre periférica o fracciones de las mismas, suero, capa leucocitaria, tejido tumoral, linfa, orina, médula ósea, plasma EDTA, plasma heparinizado, plasma citrato, sangre completa heparinizada, y sangre completa heparinizada congelada. La elección de la muestra a analizar también dependerá del marcador o marcadores que deben analizarse, y de que el experto escoja la muestra adecuada en consonancia.

En una forma de realización preferida del mismo, el método acorde con la presente invención puede comprender además el pronóstico de un efecto de la inmunoterapia antitumoral en un paciente, en que dicho paciente preferiblemente ha sido tratado previamente con ciclofosfamida (como se describe arriba). En el contexto de la presente invención, un «pronóstico» o un «marcador pronóstico» debe estar basado en marcadores tal y como se mencionan en la presente memoria que aportan información sobre un efecto basado en un tratamiento quimioterápico común o regular contra el cáncer, como por ejemplo, taxoles, compuestos de platino y otros agentes habituales en la quimioterapia contra el cáncer. El efecto pronosticado se puede seleccionar entre la supervivencia general, la aparición de una y/o múltiples respuestas de los linfocitos T frente a la inmunoterapia, retardo en el crecimiento del tumor o supervivencia sin progresión. Así pues, los marcadores de la presente invención se pueden utilizar en escenarios «mixtos» de usos predictivos y pronósticos.

En otro aspecto de la presente invención, el método acorde con la presente invención comprende además la monitorización del efecto de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho paciente, que comprende repetir la etapa de determinación a) y/o b), y opcionalmente c) y/o d), tal y como se describe en la presente memoria al menos en una ocasión. Normalmente se lleva a cabo un seguimiento regular durante el tratamiento, como por ejemplo en intervalos semanales, quincenales o incluso mensuales.

Se prefiere un método acorde con la presente invención, en que dicha determinación comprende al menos un método seleccionado entre inmunoensayos, inmunoensayos con microperlas, inmunoensayos multiplex, ELISA, ensayos con micromatrices, ensayos epigenéticos, análisis de expresión, análisis de FACS, espectrometría de masas, métodos de hematología clínica, y otros ensayos clínicos ordinarios como electroforesis,

inmunonefelometría, inmunoturbidimetría, ensayos enzimáticos, ensayos colorimétricos o fluorométricos. Todos estos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica y están descritos en la bibliografía.

En estos aspectos terapéuticos de la presente invención, los métodos acordes con la presente invención se utilizan con el propósito de proporcionar mejores opciones terapéuticas para la terapia contra el cáncer, en particular en la inmunoterapia. Los métodos acordes con la invención proporcionan información adicional y predictiva precoz o predictiva y pronóstica respecto a la necesidad y el efecto de un tratamiento inmunológico contra el cáncer, lo que permite tomar decisiones más informadas sobre el tratamiento futuro de dicho cáncer. Así pues, se prefiere un método acorde como arriba, que además comprende la monitorización del efecto de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho paciente, repitiendo al menos una vez dicho paso de determinación.

Como se ha descrito arriba, los tratamientos o pretratamientos preferidos aparte de las vacunas inmunoterapéuticas descritas arriba se seleccionan entre un agente antitumoral escogido entre citocinas, sorafenib, sunitinib, ciclofosfamida e inhibidores de tirosina cinasa (TKI). Los tipos de cáncer tratados pueden ser todos los cánceres que responden a la inmunoterapia, y preferiblemente escogidos entre el carcinoma de células renales (CCR), cáncer colorrectal (CRC), cáncer gástrico (CG), melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), glioblastoma y adenocarcinoma.

La invención se describirá ahora de manera más detallada en los ejemplos con referencia a la lista de secuencias.

En las Figuras:

La **Figura 1** muestra un análisis de Kaplan-Meier del efecto de (A) ApoA1, (B) CXCL13/BCA-1, (C) monocitos y (D) CCL17/TARC sobre la supervivencia general en todos los pacientes y subgrupos. En todos los parámetros, la cifra superior muestra la supervivencia de todos los pacientes que presentan valores altos (líneas rojas) y bajos (líneas verdes) del parámetro. La cifra inferior indica un análisis de subgrupo (+CY frente a -CY) de los pacientes con valores altos del parámetro (líneas rojas frente a líneas azules) y de los pacientes con valores bajos del parámetro (líneas verdes frente a líneas amarillas).

La **Figura 2A** muestra la distribución de los valores de los biomarcadores univariados ApoA1, CXCL13/BCA-1, monocitos y CCL17/TARC, tal y como se indican en la figura, del grupo -CY (gris) y +CY (negro), que muestra ausencia de respuesta de los linfocitos T (no), respuesta a un solo péptido (1) o bien respuesta a varios péptidos (>1). Las barras de error representan el error estándar de la media.

La **Figura 2B** muestra una forma distinta de representar la distribución de los valores del biomarcador multivariable en pacientes del grupo -CY (gris) y +CY (negro), que muestra ausencia de respuesta de los linfocitos T (no), respuesta de un solo péptido (1) o bien respuesta de varios péptidos (>1). Los puntos representan valores individuales, las líneas representan la media.

La **Figura 3** muestra el análisis de Kaplan-Meier del efecto de una combinación de ApoA1 y CCL17/TARC sobre la supervivencia general en todos los pacientes y subgrupos. En A), la población positiva para el biomarcador se definió como la integrada por los pacientes que presentaban al menos uno de los dos parámetros dentro del rango positivo (puntuación = 1 ó 2), mientras que los pacientes negativos para el biomarcador no debían presentar ningún parámetro dentro del rango positivo (puntuación = 0). En B), la población positiva para el biomarcador se definió como consistente únicamente en aquellos pacientes cuyos dos parámetros estaban dentro del rango positivo (puntuación = 2), mientras que los pacientes que presentaban un parámetro situado en el rango negativo (puntuación = 0 ó 1) se consideraron como negativos para el biomarcador. Las cifras superiores muestran la supervivencia de todos los pacientes positivos para el biomarcador (líneas verdes) frente a los pacientes negativos para el biomarcador (líneas rojas). Las cifras inferiores muestran los análisis de subgrupo (+CY frente a -CY) de los pacientes positivos para el biomarcador (líneas verdes frente a líneas amarillas) y de los pacientes negativos para el biomarcador (líneas rojas frente a líneas azules).

La **Figura 4A** muestra la media del marcador consistente en la combinación de ApoA1 y CCL17/TARC, en pacientes del grupo -CY (gris) y +CY (negro), que muestra ausencia de respuesta de los linfocitos T (no), respuesta a un solo péptido (1) o bien respuesta a varios péptidos (>1). Las barras de error representan el error estándar de la media. La **Figura 4B** muestra una forma distinta de representar la distribución de los valores del biomarcador binario en pacientes del grupo -CY (gris) y +CY (negro), que muestra ausencia de respuesta de los linfocitos T (no), respuesta a un solo péptido (1) o bien respuesta a varios péptidos (>1). Los puntos representan valores individuales, las líneas representan la media.

La **Figura 5** muestra un análisis de Kaplan-Meier del efecto del biomarcador multivariable sobre la supervivencia general. La cifra superior indica la supervivencia de todos los pacientes que presentan valores altos (líneas rojas) y bajos (líneas verdes) del parámetro. La cifra inferior indica un análisis de subgrupo (+CY frente a -CY) de los pacientes con valores altos del parámetro (líneas rojas frente a líneas azules) y de los pacientes con valores bajos del parámetro (líneas verdes frente a líneas amarillas). Para separar los pacientes con valores altos y bajos del biomarcador se utilizó el valor de 0,019076043 puntos como valor de corte.

La **Figura 6A** muestra los valores medios del biomarcador multivariable en pacientes del grupo -CY (gris) y +CY

5 (negro), que muestra ausencia de respuesta de los linfocitos T (no), respuesta de un solo péptido (1) o bien respuesta de varios péptidos (>1). Las barras de error representan el error estándar de la media. La **Figura 6B** muestra una forma distinta de representar la distribución de los valores del biomarcador multivariable en pacientes del grupo -CY (gris) y +CY (negro), que muestra ausencia de respuesta de los linfocitos T (no), respuesta de un solo péptido (1) o bien respuesta de varios péptidos (>1). Los puntos representan valores individuales, las líneas representan la media.

Las **SEQ ID N.º 1 a 50** muestran las secuencias de aminoácidos de los péptidos tal y como se enumeran arriba en las Tablas 1A a 1E.

Tabla 2

Biomarcadores univariables	Cocientes de riesgos instantáneos (HR) y valores p de la prueba de rangos logarítmicos			
	ApoA1	CXCL13/BCA-1	Monocitos	CCL17/TARC
Todos los pacientes, positivos para el biomarcador frente a negativos	0,42 (0,01)	0,39 (0,006)	0,44 (0,012)	0,41 (0,011)
Grupo +CY, positivos para el biomarcador frente a negativos	0,3 (0,017)	0,25 (0,004)	0,24 (0,001)	0,18(0,003)
-Grupo -CY, positivos para el biomarcador frente a negativos	0,6(0,253)	0,7 (0,448)	0,93 (0,874)	0,67 (0,392)
Grupo de positivos para el biomarcador, comparación del grupo +CY con respecto al grupo -CY	0,36 (0,061)	0,35 (0,051)	0,29 (0,014)	0,22 (0,017)
Grupo de negativos para el biomarcador, comparación del grupo +CY con respecto al grupo -CY	0,84 (0,696)	1,07 (0,876)	1,31 (0,538)	0,85 (0,715)
Interacción	0,43 (0,24)	0,3271 (0,13)	0,22 (0,03)	0,26 (0,094)
El parámetro es favorable si los valores son altos/bajos	altos	bajos	altos	altos
Valor de corte (<i>cutoff</i>)	0,264 mg/ml (MEDIANA)	64,21 pg/ml (MEDIANA)	7,7% (MEDIANA)	161,99 pg/ml (MEDIANA)

10 La **Tabla 2** muestra los cocientes de riesgos instantáneos (HR) y los valores p de la prueba de rangos logarítmicos (análisis de riesgos proporcionales de Cox) para la predicción de la supervivencia general mediante los biomarcadores univariables en todos los pacientes y en los subgrupos +/-CY, los HR y los valores p de la prueba de rangos logarítmicos del efecto del tratamiento previo con ciclofosfamida en los pacientes positivos y negativos para el biomarcador, y los del efecto de interacción de los biomarcadores con el tratamiento previo con ciclofosfamida.

Tabla 3

Valores p (prueba de la t de Welch)	ApoA1	CXCL13/BCA-1	Monocitos	CCL17/TARC
Todos los pacientes, respondedores	0,016	0,28	0,24	0,032
Todos los pacientes, respondedores a varios péptidos	0,000074	0,031	0,34	0,0028
Grupo +CY, respondedores	0,014	0,064	0,0021	0,013
Grupo +CY, respondedores a varios péptidos	0,42	0,29	0,37	0,53
-Grupo -CY, respondedores	0,034	0,15	0,065	0,017

(continuación)

Valores p (prueba de la t de Welch)	ApoA1	CXCL13/BCA-1	Monocitos	CCL17/TARC
-Grupo -CY, respondedores a varios péptidos	0,00014	0,13	0,73	0,068
El parámetro es favorable si los valores son altos/bajos	altos	bajos	altos	altos

5 La **Tabla 3** muestra los valores p calculados con el análisis estadístico univariable (prueba de la t de Welch) correspondientes a la predicción de las respuestas de linfocitos T y de las respuestas a varios péptidos de estos mismos linfocitos mediante los parámetros seleccionados para todos los pacientes y los subgrupos +/-CY.

Tabla 4

Biomarcador multivariable (OSCY_CHEAP_UNIF_20)	Cocientes de riesgos instantáneos (IC 95%) y valores p de la prueba de rangos logarítmicos
Todos los pacientes, Positivos para el biomarcador frente a negativos	0,47; P=0,041
Grupo +CY, Positivos para el biomarcador frente a negativos	0,07; P=0,000008
-Grupo -CY, Positivos para el biomarcador frente a negativos	1,58; P=0,203
Grupo positivo para el biomarcador, Rama +CY frente a rama -CY	0,08 (0,02-0,38); P=0,000135
Grupo de negativos para el biomarcador, comparación del grupo +CY con respecto al grupo -CY	2,5 (0,95-6,58); P=0,055
Interacción	0,032 (0,0055-0,1863); P=0,000128
El parámetro es favorable si los valores son altos/bajos	altos
Valor de corte (<i>cutoff</i>)	0,019076043 puntos

10 La **Tabla 4** muestra los cocientes de riesgos instantáneos (HR) y los valores p de la prueba de rangos logarítmicos correspondientes a la predicción de la supervivencia general mediante el biomarcador multivariable en todos los pacientes y en los subgrupos +/-CY, los HR y los valores p de la prueba de rangos logarítmicos para el efecto del tratamiento previo con ciclofosfamida en los pacientes positivos y negativos para el biomarcador, y del efecto de interacción del biomarcador con el tratamiento previo con ciclofosfamida.

Ejemplos

1. Introducción

15 IMA901 es una vacuna basada en péptidos diseñada para estimular reacciones específicas de linfocitos T contra complejos péptido-MHC presentes en el CCR. El estudio IMA901-202 (fase II) empleó análisis univariados y multivariados para identificar parámetros que solos o en combinación sirvan como biomarcadores predictivos del éxito en términos de inducción de la respuesta inmunitaria y prolongación de la supervivencia general del tratamiento IMA901 en pacientes con CCR metastásico.

20 Con ese fin, se analizaron cerca de 450 parámetros (parámetros relacionados con el paciente o con el tumor así como analitos medidos en suero u orina y parámetros celulares) utilizando muestras previas al tratamiento de la población del estudio IMA901-202 (fase II). En los análisis multivariados, que seleccionan un conjunto de varios parámetros, se descartaron los parámetros que requerían la preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a fin de limitar los costes de medición en ensayos futuros. Los parámetros fueron analizados para

determinar su asociación con la supervivencia general y las respuestas de los linfocitos T.

5 Puesto que el tratamiento con IMA901 demostró efectos mucho mayores en la supervivencia general tras el tratamiento previo con ciclofosfamida y la presencia de respuestas inmunitarias sólo estuvo asociada con mejoras de la supervivencia general en la rama +CY, esta rama se consideró la rama activa del estudio y se comparó con la rama -CY que actuó a modo de control. Así pues, se escogieron los parámetros que mostraron interacción con el tratamiento previo con ciclofosfamida y/o que predijeron una mejor supervivencia general en la rama +CY frente a la rama -CY. De este modo se evitó la selección de marcadores puramente pronósticos, que por definición se habrían mostrado asociados con la supervivencia general en ambas ramas.

2. Comparación de los pacientes del estudio con donantes sanos de la misma edad

10 Para la comparación de los niveles pretratamiento con donantes sanos, se escogieron únicamente los pacientes por intención de tratar (ITT) menores de 70 años para que fueran equiparables a los donantes sanos control de más edad. Los grupos resultantes de pacientes (N=52) y de donantes sanos (N=22) estaban equilibrados en lo que se refiere a la edad, el sexo y la seropositividad para CMV (citomegalovirus).

3. Materiales y Métodos

15 Obtención de las muestras

Todas las muestras se obtuvieron antes de practicar ninguna intervención terapéutica del estudio, bien tres días antes de la vacunación e inmediatamente antes de la administración de ciclofosfamida en la rama +CY, bien inmediatamente antes de la vacunación. Las muestras de suero se extrajeron con tubos con gel para suero VACUTAINER (Becton Dickinson, 5 ml), se invirtieron y se incubaron durante un mínimo de 30 minutos. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos al menos a 1200 x g, y el suero (aproximadamente 2 ml) se transfirió a un criotubo NUNC (3,6 ml). Los criotubos se conservaron inmediatamente a < -20°C hasta la medición. La sangre con EDTA para el análisis de los parámetros hematológicos se recogió en tubos con EDTA VACUTAINER de 3 ml, que no se centrifugaron y se conservaron a temperatura ambiente hasta el análisis. La orina se recogió poco después de la vacunación. Para el análisis con tiras reactivas se utilizó únicamente orina reciente. El plasma con citrato para el análisis de la coagulación se recogió aproximadamente dos semanas antes de la vacunación. Las muestras se tomaron en tubos con citrato VACUTAINER y se centrifugaron durante 30 minutos al menos a 1200 x g y temperatura ambiente. El plasma sobrenadante se transfirió a microtubos.

Mediciones

30 Los métodos para la medición de los biomarcadores incluyeron ELISA, inmunoensayos multiplex, ensayos epigenéticos, espectrometría de masas, análisis FACS, métodos clínicos rutinarios de hematología, bioquímica clínica y análisis de orina, y otros métodos. Los parámetros finalmente seleccionados se midieron con ensayos multiplex facilitados por RBM (ApoA1, CD95/FAS, IL-6, IgE, MMP-3, CA19-9), Millipore (CXCL13/BCA-1, CCL17/TARC), IL-33), y mediante espectrometría de masas facilitada por Biocrates (treonina, acilcarnitinas de cadena corta). Otros parámetros fueron facilitados por el laboratorio central y se midieron con métodos convencionales de hematología (neutrófilos, eosinófilos, monocitos) y de bioquímica clínica (ASAT/SGOT, LDH, albúmina, bilirrubina).

Evaluación de las respuestas de los linfocitos T

40 Como además de la supervivencia general también tenía que analizarse la aparición de respuestas únicas o múltiples de los linfocitos T para determinar su asociación con los biomarcadores, las respuestas específicas de los linfocitos T se midieron antes y después de la vacunación varias veces utilizando ensayos ELISPOT y tinciones con tetrámeros de los respectivos complejos péptido-MHC.

Análisis estadístico univariable:

45 La asociación de los parámetros con las respuestas de los linfocitos T se evaluó con la prueba de la t de Welch. Se consideraron significativos todos los parámetros predictivos de las respuestas de los linfocitos T en todos los pacientes y/o en el grupo +CY que presentaron un valor $p < 0,05$.

La interacción de los parámetros con el tratamiento previo con CY se evaluó utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox. Los candidatos que mostraron un valor p de la interacción $< 0,05$ a cualquier valor de corte no situado en los extremos de la distribución (es decir, seleccionando o deseleccionando $> \sim 5\%$ de pacientes) se consideraron interesantes.

50 Asimismo, para excluir los parámetros con una interacción significativa debido a la asociación inversa del tratamiento previo con ciclofosfamida con la supervivencia general en el grupo de biomarcador desfavorable, un criterio adicional fue la asociación significativa ($p < 0,05$) con la supervivencia general en el grupo de biomarcador positivo. La asociación significativa ($p < 0,05$) con la supervivencia general en el grupo +CY, pero no en el grupo -CY se consideró como una indicación adicional de la calidad predictiva en vez de diagnóstica de un parámetro.

55

Otros criterios para la selección de parámetros se basaron en su biología y en la persistencia de su patrón de interacción con el tratamiento previo con ciclofosfamida y la asociación con la supervivencia general en la rama +CY pero no en la rama -CY en subgrupos de pacientes, como los tratados previamente con TKI o con citocinas.

5 Se calcularon las correlaciones entre los parámetros. Los parámetros que estuvieron estrechamente correlacionados con otros en el conjunto restante (valor p ajustado < 0,005) quedaron excluidos.

Después de identificar parámetros solos utilizando estos pasos, se analizaron qué combinaciones de tales parámetros eran las mejores con respecto a la predicción de la supervivencia general y las respuestas de los linfocitos T, y para la estabilidad en los subgrupos de pacientes indicados arriba.

Análisis estadístico multivariable:

10 Los biomarcadores multivariables se determinaron siguiendo el modelo de riesgos proporcionales de Cox, cuyas propiedades y extensiones se describen a continuación.

15 Todos los parámetros se consideraron como covariables en el modelo lineal generalizado, aunque transformados linealmente a media cero y varianza unitaria (parámetros «estandarizados») para evitar una influencia indebida en los parámetros que están representados en pequeñas unidades. Sólo se incluyeron los parámetros que no requirieron aislamiento de PBMC a fin de limitar los costes de medición del conjunto. Como la correspondiente máxima verosimilitud parcial problema estaba infradeterminada, es decir, el número de parámetros excedía el número de pacientes, el modelo se aumentó con un prior gaussiano, el cual limita la influencia relativa de cada parámetro en el biomarcador óptimo. También es sabido que la correspondiente optimización máxima a posteriori (MAP) mejora el rendimiento predictivo de los resultados («regularización») en el enfoque de máxima verosimilitud. 20 El modelo se aumentó todavía más con un prior laplaciano, que hace que la optimización utilice únicamente un subconjunto de los parámetros considerados. Esto permitió limitar el número de parámetros incluidos en el biomarcador a 20.

25 Además, se quería que el biomarcador multivariable no fuera predictivo en la rama -CY, o como mínimo que fuera menos predictivo en esos pacientes que en los de la rama +CY. Para conseguirlo, los modelos predictivos se optimizaron repetidamente en la rama -CY, y las direcciones resultantes se proyectaron fuera del espacio paramétrico, hasta que sólo quedaron básicamente las direcciones impredictivas. El propio biomarcador se determinó en el subespacio restante de los parámetros en la rama +CY. Con el objetivo de evaluar la precisión predictiva del biomarcador, el proceso de optimización entero se aplicó en la modalidad «dejar uno afuera» (*leave-one-out*). Las predicciones para todos los pacientes se computaron de esa manera, se recopilaron y después se compararon con los tiempos de supervivencia conocidos. 30

Resultados: Análisis univariable

Selección de parámetros

35 De los cerca de 450 parámetros analizados, 59 predijeron significativamente la aparición de respuestas de linfocitos T en todos los pacientes y/o en el grupo de pacientes +CY. 118 parámetros mostraron una interacción significativa con el tratamiento previo con ciclofosfamida en sus valores de corte óptimos. Con los susodichos criterios de predicción de la respuesta de linfocitos T, interacción con el tratamiento previo con ciclofosfamida, mejor asociación con la supervivencia general en el grupo +CY que en el grupo -CY, no redundancia con otros parámetros y presencia de una justificación biológica razonable, pudieron identificarse cuatro parámetros (ApoA1, CXCL13BCA-1, monocitos y CCL17/TARC) como candidatos preferidos a biomarcador univariable.

Definición de valores de corte

40 Para cada uno de los cuatro parámetros identificados tal y como se describe arriba se definió un valor de corte discreto que dejó separado a los pacientes en dos grupos (positivos y negativos para el biomarcador), los cuales evidenciaron un resultado significativamente distinto del tratamiento IMA901. Fue necesario seleccionar los valores de corte, como en el caso de los parámetros, pero asociados con la supervivencia general y con las respuestas de linfocitos T de una manera continua antes que discreta, a fin de poder tomar decisiones terapéuticas del tipo sí/no. Por esa razón, para ser adecuados los valores de corte deben: a) incluir suficientes pacientes, y b) ser objetivos. 45

50 En el caso de la ApoA1, para la cual más del 50% de los pacientes de IMA901-202 manifestaron niveles patológicamente reducidos, el valor de corte escogido fue el LIN determinado en donantes sanos siguiendo las indicaciones del proveedor del ensayo (RBM, 0,288 mg/ml), identificando a los pacientes con niveles normales de ApoA1 como grupo positivo para el biomarcador. Este valor de corte resultó cercano a la mediana de los pacientes del estudio IMA901-202 (0,264 mg/ml). Así pues, este valor de corte es máximamente objetivo y está asociado con la justificación biológica de la ApoA1. Como alternativa, en el caso de la ApoA1 también se utilizó la mediana. En los pacientes de IMA901-902, los demás parámetros se situaron mayoritariamente dentro de los rangos normales. En el caso de estos parámetros, se escogió como valor de corte la mediana de la población del estudio, ya que ésta también es objetiva e incluye a suficientes pacientes (50%). 55

Predicción de la supervivencia general y de las respuestas de linfocitos T por medio de biomarcadores univariados solos

Los análisis de riesgos proporcionales de Cox evidenciaron que los cuatro parámetros seleccionados para los análisis univariados predijeron significativamente la supervivencia general en todos los pacientes y en el subgrupo de pacientes tratados previamente con ciclofosfamida, pero no en el subgrupo que no recibió dicho tratamiento previo (**Tabla 2, Figura 1**). En los grupos positivos para el biomarcador, definido por el valor de corte propio del valor del biomarcador, el tratamiento previo con ciclofosfamida manifestó un efecto positivo significativo ($p < 0,05$) sobre la supervivencia general (CCL17/TARC, monocitos) o una tendencia ($p < 0,1$) hacia un efecto positivo sobre la supervivencia general (ApoA1, CXCL13/BCA-1). El análisis de interacción demostró que el efecto del tratamiento previo con ciclofosfamida difería significativamente ($p < 0,05$) entre los pacientes clasificados como positivos o negativos por sus niveles de monocitos. CCL17/TARC mostró una tendencia a la interacción con el tratamiento previo con ciclofosfamida. ApoA1 y CXCL13/BCA-1 no alcanzaron la significación con los valores de corte escogidos.

Resulta destacable que en el grupo +CY se alcanzara la mejor razón de riesgos (HR) cuando los pacientes se clasificaron en razón a sus niveles CCL17/TARC (**Tabla 2**, HR=0,18, $p=0,003$). Y viceversa, los pacientes positivos para CCL17/TARC fueron los más beneficiados por el tratamiento previo con ciclofosfamida (**Tabla 2**, HR=0,22, $p=0,017$).

CCL17/TARC también resultó excepcional si se tiene en cuenta el hecho de que el 75% de los pacientes positivos para CCL17/TARC que habían sido tratados anteriormente con ciclofosfamida seguían vivos al final del estudio (Figura 1D).

El patrón observado con respecto a la predicción de la supervivencia general permaneció estable en las subpoblaciones de pacientes que habían sido tratados previamente con TKI o citocinas (datos no mostrados).

Con respecto a la predicción de la respuesta de los linfocitos T, CCL17/TARC y ApoA1 resultaron mejores, tanto prediciendo significativamente respondedores en el total de pacientes y en los subgrupos +CY y -CY, como prediciendo a los respondedores a varios péptidos en el total de pacientes. En cambio, CXCL13/BCA-1 y los monocitos fueron débiles predictores de respuesta (**Tabla 3**).

5. Resultados: Análisis multivariable

Selección de parámetros

Se calculó un conjunto biomarcador formado por 20 parámetros que predijera mejor la supervivencia general en el grupo de pacientes +CY que en el grupo -CY tras el tratamiento con IMA901 para toda la población de pacientes del estudio. Los parámetros incluidos en este conjunto se enumeran en la Tabla 4. Éstos incluyen citocinas, quimiocinas y otras proteínas medibles en suero, parámetros celulares medibles mediante ensayos hematológicos ordinarios, y parámetros metabólicos medibles mediante espectrometría de masas. Aparte de la optimización para todos los pacientes (versión de entrenamiento), el conjunto de biomarcadores se calculó utilizando el método de validación cruzada «dejar uno afuera» (versión de la prueba). Este último análisis es más relevante, ya que otorga robustez a los resultados en los estudios de seguimiento. Los datos mostrados en estos experimentos representan los resultados de la prueba.

Tabla 5

Peso	Rango	Nombre del parámetro
-47,3867	1	CXCL13/BCA-
38,38821	2	ApoA1
-38,1861	3	Neutrófilos (%)
34,36199	4	Eosinófilos (%)
34,10915	5	Monocitos (%)
33,89069	6	CD95/FAS
32,72272	7	ASAT/SGOT
32,01683	8	CCL17/TARC
31,7325	9	LDH
31,47377	10	Thr
-31,3839	11	IL-6
-31,2785	12	Acilcarnitinas de cadena corta
30,83843	13	Albúmina

	(continuación)	
Peso	Rango	Nombre del parámetro
30,78772	14	Eosinófilos (abs.)
29,57142	15	Monocitos (abs.)
28,89882	16	Bilirrubina (directa)
28,63935	17	IgE
-27,8701	18	IL-33
27,72058	19	MMP-3
27,204	20	CA19-9

La **Tabla 5** muestra los parámetros incluidos en el biomarcador multivariable de 20 parámetros, y los pesos y rangos indican su importancia relativa en el conjunto.

5 El valor del biomarcador correspondiente a cada paciente es una combinación lineal de los valores medidos en los 20 parámetros que lo forman. Los factores constantes de esta ecuación se escogieron de modo que la mediana de la distribución del biomarcador fuera cercana a cero. Los valores del biomarcador calculados de esta forma siguieron aproximadamente una distribución normal en la población de pacientes de IMA901-902, y se distribuyeron equitativamente entre los pacientes de las ramas +CY y -CY.

10 **Predicción de la supervivencia general y de la respuestas de los linfocitos T mediante el conjunto de parámetros multivariable**

Para demostrar la potencia predictiva del biomarcador, se llevó a cabo un análisis de supervivencia subdividiendo los pacientes en dos grupos según el valor de biomarcador de cada uno. Como valor de corte se escogió la mediana de la distribución de densidad del biomarcador en la población entera de pacientes, que incluye al 50% de los pacientes con valores por encima de este valor de corte en el grupo positivo para el biomarcador. En el grupo de pacientes +CY, los pacientes positivos para el biomarcador resultaron bastante beneficiados de la vacunación, mientras que el biomarcador no mostró efecto alguno en la rama -CY. Y viceversa, en el grupo positivo para el biomarcador, el tratamiento previo con ciclofosfamida propició una supervivencia general significativamente más alta, mientras que el efecto no resultó significativo o incluso mostró una tendencia inversa en el grupo negativo para el biomarcador (**Tabla 4; Figura 5**). Consecuentemente, hubo una interacción altamente significativa entre el biomarcador multivariable y el tratamiento previo con ciclofosfamida.

Aunque el biomarcador no había sido optimizado para predecir respuestas inmunitarias, los inventores analizaron si la distribución de los valores del biomarcador también estaba asociada a la presencia o la ausencia de respuesta de los linfocitos T. Se observó de hecho una tendencia hacia mayores valores del biomarcador en los grupos de respondedores y de no respondedores a varios péptidos, en particular en el grupo de pacientes +CY (**Figura 6**).

25 **Predicción de la supervivencia general y de las respuestas de los linfocitos T mediante una combinación de parámetros**

Los parámetros solos pueden combinarse de modo que los pacientes pueden ser asignados a una puntuación de biomarcador, según los valores de todos los parámetros incluidos en la combinación. En el caso de la combinación de dos parámetros, cada parámetro puede ser positivo o negativo de acuerdo con su valor de corte, y los pacientes pueden tener una puntuación de biomarcador de dos (ambos parámetros positivos), uno (un parámetro positivo) o cero (ningún parámetro positivo) con respecto al marcador combinado.

La combinación de varios parámetros para calcular una puntuación de biomarcador puede ser favorable por varias razones. En primer lugar, esto proporciona una mayor robustez, ya que: a) el problema de los valores de corte fijados pese a la asociación continua de los parámetros con el resultado se solventa en cierta medida, b) se reduce el impacto de los valores atípicos de la medición, y c) el mayor número de parámetros permite adquirir una mejor visión de un mayor número de procesos biológicos que pueden ser relevantes para la inmunidad antitumoral. En segundo lugar, un modelo de puntuaciones aporta más flexibilidad con respecto a la selección de los pacientes: Mientras que un parámetro solo con la mediana como valor de corte objetivaría seleccionar sólo el 50% de los pacientes para el tratamiento, una puntuación de dos parámetros (con el valor de corte de los parámetros solos situado en la mediana de la distribución) dividiría los pacientes en tres grupos. Si sólo quedan excluidos los pacientes sin marcadores positivos (es decir, con una puntuación de biomarcador igual a cero), alrededor del 75% de los pacientes quedaría incluido en el grupo de tratamiento. No obstante, si en este grupo no se alcanza la significación, los pacientes con puntuaciones de cero y uno pueden ser excluidos, lo que deja en el grupo de tratamiento aproximadamente al 25% de pacientes que presentan una puntuación de biomarcador igual a dos.

Por tales razones, se analizó si una combinación de los parámetros solos señalados arriba resultaba mejor en lo que respecta a la supervivencia general y las respuestas de los linfocitos T. Asimismo, se evaluó la estabilidad del efecto

en las subpoblaciones de pacientes indicadas arriba. Varias combinaciones de marcadores resultaron mejores que los parámetros solos en estos aspectos, la mejor de las cuales fue la combinación formada por ApoA1 y CCL17/TARC (Figura 3, Figura 4).

6. Niveles de marcador:

5 6.1 Niveles de ApoA1 en suero

Condición	Fuente	ApoA1 [mg/ml]; Rango o Media +/- DE
Controles sanos	(Riesen, 2008)	1,0-1,5
	Fabricante (RBM)	0,288-1,17
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	0,0808-0,514 (0,264)
	Media +/- DE	0,27 +/- 0,09

6.2 Niveles de CCL17/TARC en suero

Condición	Fuente	TARC [pg/ml]; Rango o Media +/- DE
Controles sanos	(Shimada et al., 2004)	200 +/- 100
	(Fujii et al., 2004)	101 +/- 81
	(Sugawara et al., 2002)	31,9 +/- 14,8
	(Sekiya et al., 2002)	88,8 +/- 58,2
	(Echigo et al., 2006)	93,3 +/- 25,3
	(Saeki and Tamaki, 2006)	215,34 +/- 26,79
Dermatitis atópica	(Leung et al., 2003)	1125-3070 (1469)
	(Shimada et al., 2004)	96400 +/- 38100
	(Sugawara et al., 2002)	325 +/- 287
	(Saeki and Tamaki, 2006)	2338,7 +/- 301,83
Asma	(Sugawara et al., 2002)	271 +/- 264
	(Sekiya et al., 2002)	192,0 +/- 143,6
Rinitis alérgica	(Sugawara et al., 2002)	147 +/- 101
Esclerosis generalizada		313 +/- 294
Dermatomiositis	(Fujii et al., 2004)	262 +/- 291
Lupus eritematoso sistémico		254 +/- 326
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	25,5-623 (162)
	Media +/- DE	174 +/- 118

6.3 Niveles de BCA-1 en suero

Condición	Fuente	BCA-1 [pg/ml]; Rango o Media +/- DE
Controles sanos	(Panse et al., 2008)	~ 40
	(Sansonno et al., 2008)	48,2 +/-11.0
Enfermedad	(Panse et al., 2008), cáncer de mama	~ 80
	Pacientes infectados con HCV con y sin crioglobulinemia mixta	273,6 +/-98; +/-40,2 113,9
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	13,09-1429,6 (64,21)
	Media +/- DE	114,23 +/- 196,98

6.4 Niveles de neutrófilos en cifras absoluta y porcentual

Condición	Fuente	Neutrófilos; Rango o Media +/- DE
Controles sanos	LKF Kiel Laboratory, Alemania	34-71 %;
		1,5-6,2 x 10 ⁹ /L
Enfermedad	(Rashid et al., 2010), cáncer de esófago	58-71 %
	(Rashid et al., 2010), CCR	2,6-15,9 x 10 ⁹ /L
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	47-86,9 (67,3) %;
		2,18-10,39 (4,44) x
		68,05 +/-8,2 %;
	Media +/- DE	4,88 +/-1,86 x 10 ⁹ /L

5 6.5 Niveles de eosinófilos en cifras absoluta y porcentual

Condición	Fuente	Eosinófilos; Rango o Media +/- DE
Controles sanos	LKF Kiel Laboratory, Alemania	0-7 %;
		0,04-0,6 x 10 ⁹ /L
	(Simon and Simon, 2007)	0-0,4 x 10 ⁹ /L
Enfermedad	(Moroni et al., 2000), CCR	0,15 +/-0,1 x 10 ⁹ /L
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	0,2-6,5 (2) %;
		0,02-0,55 (0,12) x 10 ⁹ /L
		2,35 +/-1,62 %
	Media +/- DE	0,16 +/-0,13 x 10 ⁹ /L

6.6 Niveles de monocitos en cifras absoluta y porcentual

Condición	Fuente	Monocitos; Rango o Media +/- DE
Controles sanos	LKF Kiel Laboratory, Alemania	4-13 %; 0,2-0,9 x 10 ⁹ /L
Enfermedad	(Sasaki et al., 2006), carcinoma hepatocelular	0,03-1,04 x 10 ⁹ /L
	(Donskov et al., 2006), CCR	0,69-0,74 x 10 ⁹ /L
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	3,1-17,7 (7,6) %; 0,2-1,31 (0,48)x 10 ⁹ /L
	Media +/- DE	8,19 +/-3,15%; 0,57 +/-0,25 x 10 ⁹ /L

6.7 Niveles de CD95/FAS soluble en suero

Condición	Fuente	CD95/FAS [ng/ml]; Rango o Media +/- DE
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	4-13 %; 0,2-0,9 x 10 ⁹ /L
	Media +/- DE	0,03-1,04 x 10 ⁹ /L

5 6.8 Niveles de ASAT/SGOT en suero

Condición	Fuente	ASAT/SGOT [U/l]; Rango o Media +/- DE
Controles sanos	LKF Kiel	12-35,4
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	14-109 (23,5)
	Media +/- DE	27,9 +/-17,3

6.9 Niveles de LDH en suero

Condición	Fuente	LDH [U/l]; Rango o Media +/- DE
Controles sanos	LKF Kiel	129-230
Estudio IMA901-202	Rango (mediana)	94-734 (161,5)
	Media +/- DE	190,63 +/-98,97

6.10 Niveles de treonina en suero

10

Thr Mín./Máx.: 21 – 157 µM

Thr Media/DE: 84,5 +/- 24,1 µM

ES 2 592 957 T3

MEDIANA: 82 µM

6.11 Niveles de albúmina en suero

Rangos normales en suero y desviaciones en condiciones patológicas:

Laboratorio: Albúmina 35-50 g/l (3,5-5 g/dl)

5

Parámetro	Media (1.val_float)	unidad	DE (l.val_float)	MÍN. (1.val_float)	MÁX. (1.val_float)	MEDIANA (1val_float)
Albúmina_sangre	39,95	G/l	4,39	26	48	41

6.12 Niveles de bilirrubina directa

Laboratorio: 0 – 5,1 µM Rango en suero en el estudio IMA-901:

Mín./Máx.: 0,5 – 4,4 µM (21 valores distintos)

Media/DE: 2,0 – 0,89 µM

MEDIANA: 1,7 µM

10

6.13 Niveles de MMP-3

Rango en el estudio IMA-901:

Mín./Máx.: 1,85 – 41,2 ng/ml (sólo 3 superaron 17; 58 valores discretos)

Media/DE: 8,5 +/- 6,0 ng/ml

MEDIANA: 6,7 ng/ml

15

Rangos normales en suero: Rango según el fabricante: 0,2 – 2,17 ng/ml

6.14 Niveles de CA19-9

Rango elevado en suero (proveedor)	Parámetro	Media	Unidad	DE	MÍN.	MÁX.	MED.	Recuento
52	Antígeno canceroso_19-9	15,63	U/ml	29,73	0	167	5,94	45

6.15 Niveles de IgE

Parámetro	Media (1.val_float)	Unidad	DE (l.val_float)	MÍN. (1.val_float)	MÁX. (1.val_float)	MEDIANA (1val_float)
IgE	104,09	ng/ml	261,00	0	1362	22,5

Proveedor (RBM): normal hasta 606 ng/ml de IgE

6.16 Niveles de IL-6

Parámetro	Media (1.val_float)	Unidad	DE (l.val 1_float)	MÍN. (1.val_float)	MÁX. (1.val_float)	MEDIANA (1val_float)
IL-6	16,32	pg/ml	67,65	0	532	2,86

Proveedor (RBM): normal hasta 42,6 pg/ml de IL-6

5 6.17 Nivel de IL-33

Parámetro	Media (1.val_float)	Unidad	DE (l.val 1_float)	MÍN. (1.val_float)	MÁX. (1.val_float)	MEDIANA (1val_float)
IL-33	166,95	pg/ml	293,28	55,0672	1867	75,73

rangos normales n.d.

Lista de referencias bibliográficas

- 10 Donskov F, Hokland M, Marcussen N, Torp Madsen HH, von der MH (2006). Monocytes and neutrophils as 'bad guys' for the outcome of interleukin-2 with and without histamine in metastatic renal cell carcinoma--results from a randomised phase II trial. *Br. J Cancer* 94, 218-226.
- Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Sato S (2006). Both Th1 and Th2 chemokines are elevated in sera of patients with autoimmune blistering diseases. *Arch. Dermatol. Res* 298, 38-45.
- 15 Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S (2004). Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol. Sci.* 35, 43-51.
- Haeryfar SM, Berczi I (2001). The thymus and the acute phase response. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 47, 145-156.
- 20 Leung TF, Ma KC, Hon KL, Lam CW, Wan H, Li CY, Chan IH (2003). Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 14, 296-301.
- Moroni M, Porta C, De AM, Quaglioni S, Cattabiani MA, Buzio C (2000). Eosinophils and C4 predict clinical failure of combination immunotherapy with very low dose subcutaneous interleukin-2 and interferon in renal cell carcinoma patients. *Haematologica* 85, 298-303.
- 25 Müller AJ, Sharma MD, Chandler PR, Duhadaway JB, Everhart ME, Johnson BA, III, Kahler DJ, Pihkala J, Soler AP, Munn DH, Prendergast GC, Mellor AL (2008). Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 17073-17078.
- 30 Panse J, Friedrichs K, Marx A, Hildebrandt Y, Luetkens T, Barrels K, Horn C, Stahl T, Cao Y, Milde-Langosch K, Niendorf A, Kroger N, Wenzel S, Leuwer R, Bokemeyer C, Hegewisch-Becker S, Atanackovic D (2008). Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients. *Br. J Cancer* 99, 930-938.
- 35 Rashid F, Waraich N, Bhatti I, Saha S, Khan RN, Ahmed J, Leeder PC, Larvin M, Iftikhar SY (2010). A pre-operative elevated neutrophil: lymphocyte ratio does not predict survival from oesophageal cancer resection. *World J Surg Oncol* 8, 1.
- Riesen, WF (2008). Fettstoffwechsel, Referenzbereich. In *Labor und Diagnose*, L.Thomas, ed. (Frankfurt/Main: THBooks Verlagsgesellschaft mbH), p. 236.

- Saeki H, Tamaki K (2006). Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol. Sci.* 43, 75-84.
- 5 Sansonno D, Tucci FA, Troiani L, Lauletta G, Montrone M, Conteduca V, Sansonno L, Dammacco F (2008). Increased serum levels of the chemokine CXCL13 and up-regulation of its gene expression are distinctive features of HCV-related cryoglobulinemia and correlate with active cutaneous vasculitis. *Blood* 112, 1620-1627.
- Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Kitano S (2006). Prognostic value of preoperative peripheral blood monocyte count in patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery* 139, 755-764.
- 10 Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, Sano Y, Morita A, Matsushima K, Hirai K (2002). Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy* 57, 173-177.
- Shimada Y, Takehara K, Sato S (2004). Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol. Sci.* 34, 201-208.
- Simon D, Simon HU (2007). Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1291-1300.
- 15 Su F, Kozak KR, Imaizumi S, Gao F, Amneus MW, Grijalva V, Ng C, Wagner A, Hough G, Farias-Eisner G, Anantharamaiah GM, Van Lenten BJ, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST, Farias-Eisner R (2010). Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Sugawara N, Yamashita T, Ote Y, Miura M, Terada N, Kurosawa M (2002). TARC in allergic disease. *Allergy* 57, 180-181.
- 20 Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ (2004). T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol. Med* 10, 119-124.
- Vermaat JS, van dT, I, Mehra N, Sleijfer S, Haanen JB, Roodhart JM, Engwegen JY, Korse CM, Langenberg MH, Kruit W, Groenewegen G, Giles RH, Schellens JH, Beijnen JH, Voest EE (2010). Two-protein signature of novel serological markers apolipoprotein-A2 and serum amyloid alpha predicts prognosis in patients with metastatic renal cell cancer and improves the currently used prognostic survival models. *Ann Oncol* 21, 1472-1481.
- 25 Wanner, C., P. Schollmeyer, and W. H. Horl. 1988. Serum carnitine levels and carnitine esters of patients after kidney transplantation: role of immunosuppression. *Metabolism* 37:263-267.
- Longenecker, B. M., M. Reddish, R. Koganty, and G. D. MacLean. 1993. Immune responses of mice and human breast cancer patients following immunization with synthetic sialyl-Tn conjugated to KLH plus detox adjuvant. *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690:276-291.
- 30 Sachan, D. S. and W. L. Dodson. 1987. The serum carnitine status of cancer patients. *J Am Coll.Nutr.* 6:145-150.
- Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman, and J. Fay. 2001a. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 61:6451-6458.
- 35

Listado de secuencias

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Biomarcadores para la predicción de la eficacia de una inmunoterapia contra el cáncer

ES 2 592 957 T3

<130> I32047PCT

<150> US 61/416,981

<151> 24-11-2010

<150> GB 1021289.2

<151> 15-12-2010

<150> US 61/423,652

<151> 16-12-2010

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Lys Leu Tyr Gly Lys Arg Ser
1 5 10 15

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val
1 5

<210> 4

<211> 9

ES 2 592 957 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val

1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Leu Gly Ala Thr Cys Met Phe Val

1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Val Phe Ala Gly Val Val Gly Val

1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 7

Ala Leu Phe Asp Gly Asp Pro His Leu

1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 8

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile

1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 9

ES 2 592 957 T3

Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 10

Leu Ala Ala Leu Pro His Ser Cys Leu
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 11

Ala Leu Ser Asn Leu Glu Val Thr Leu
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 12

Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 13

Ile Leu Asp Gln Lys Ile Asn Glu Val
1 5

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 14

Lys Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln Leu
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

ES 2 592 957 T3

<400> 15

Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 16

Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala
1 5 10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 17

Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg Asn His
1 5 10 15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 18

Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr
1 5 10 15

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 19

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 20

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe
1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 21

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 22

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 23

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 24

Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu Asn Leu
1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 25

Tyr Tyr Asn Ala Ala Gly Phe Asn Lys Leu
1 5 10

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 26

Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe
1 5

<210> 27

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 27

Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 28

His Tyr Lys Pro Thr Pro Leu Tyr Phe
 1 5

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 29

Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Thr Phe
 1 5 10

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 30

Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 31

Leu Thr Phe Gly Asp Val Val Ala Val
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 32

Asn Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val
 1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 33

Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 34

Gly Leu Trp His His Gln Thr Glu Val
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 35

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 36

Ala Leu Trp Ala Trp Pro Ser Glu Leu
1 5

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 37

Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr
1 5 10 15

Gly

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

ES 2 592 957 T3

<400> 38

Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val

1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 39

Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 40

Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val

1 5 10

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 41

Ala Leu Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 42

Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 43

Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val

1 5

ES 2 592 957 T3

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 44

Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 45

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 46

Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu
1 5 10

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 47

Gly Leu Met Lys Tyr Ile Gly Glu Val
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 48

Cys Leu Ala Ala Gly Ile Thr Tyr Val
1 5

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 49

ES 2 592 957 T3

Asn Tyr Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 50

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir un efecto beneficioso de una inmunoterapia en un paciente con cáncer, el cual comprende la determinación del nivel de apolipoproteína A1 (ApoA1) en una muestra obtenida de dicho paciente con cáncer,
 - 5 - en el que todo nivel de dicho marcador que sea al menos un 10% mayor que el nivel mediano de dicho marcador en una población dada de pacientes con cáncer será indicativo de un efecto beneficioso de una inmunoterapia en dicho paciente con cáncer.
 - en el que dicho paciente con cáncer está experimentando un cáncer seleccionado entre el grupo consistente en carcinoma de células renales (CCR), cáncer colorrectal (CRC), cáncer gástrico (CG), melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), glioblastoma, y adenocarcinomas de cualquier tipo;
 - 10 - en el que dicha muestra es seleccionada entre el grupo consistente en sangre completa, sangre periférica, o fracciones de las mismas, suero, capa leucocitaria, tejido tumoral, linfa, orina, médula ósea, plasma con EDTA, plasma heparinizado, plasma con citrato, sangre completa heparinizada, y muestras congeladas de las mismas, como sangre completa heparinizada congelada;
 - 15 - en el que dicha determinación comprende al menos un método seleccionado entre el grupo consistente en inmunoensayos, inmunoensayos con microperlas, inmunoensayos multiplex, ELISA, ensayos con micromatrices, ensayos epigenéticos, análisis de expresión, análisis FACS, métodos establecidos de hematología, proteómica y espectrometría de masas;
 - en el que dicha inmunoterapia comprende la vacunación con una vacuna antitumoral, siendo dicha vacunación como mínimo una vacuna que comprende al menos un péptido inmunogénico seleccionado del grupo consistente en los péptidos conformes a las SEQ ID N.º 1 a 37; y
 - 20 - en el que dicho efecto beneficioso es seleccionado del grupo consistente en la supervivencia general más larga, la aparición de una y/o múltiples respuestas de linfocitos T frente a la inmunoterapia, retardo en el crecimiento del tumor, disminución del tamaño del tumor o supervivencia sin progresión más larga.
- 25 2. Método acorde con la reivindicación 1, que además comprende el paso de determinación del nivel de al menos un marcador seleccionado entre el grupo consistente en quimiocina de linfocitos B (CXCL13/BCA-1), neutrófilos, interleucina-6 (IL-6) y acilcarnitinas de cadena corta en una muestra de dicho paciente con cáncer, en que un nivel de dicho marcador como mínimo un 10% más bajo que la mediana de una población dada de pacientes con cáncer es indicativo de un efecto beneficioso de una inmunoterapia administrada a dicho paciente.
- 30 3. Método acorde con la reivindicación 1 o 2, en que dicha vacuna comprende un adyuvante, como por ejemplo, el GM-CSF.
4. Método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende el paso de determinación del nivel de al menos un marcador seleccionado entre el grupo consistente en albúmina y bilirrubina directa en dicha muestra de dicho paciente, en que un nivel de dicho marcador como mínimo un 10% más bajo que la mediana de dicho marcador en una población dada de pacientes con cáncer es indicativo de un efecto beneficioso de una inmunoterapia administrada a dicho paciente,
 - 35 y, opcionalmente, la determinación del nivel de un marcador que comprende la interleucina-33 (IL-33) en dicha muestra de dicho paciente, en la que un nivel de dicho marcador como mínimo un 10% más bajo que la mediana del nivel de dicho marcador en una población dada de pacientes con cáncer es indicativo de un efecto beneficioso de la inmunoterapia administrada a dicho paciente.
 - 40
5. Método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho paciente es tratado o ha sido tratado previamente con terapias que incluyen cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, como por ejemplo, terapias en las que dicho paciente es tratado o ha sido tratado previamente con un agente contra el cáncer seleccionado entre citocinas, e inhibidores de tirosina cinasa (TKI), como sorafenib y sunitinib, y ciclofosfamida.
- 45 6. Método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende el pronóstico del efecto de dicha inmunoterapia en dicho paciente basándose en dicho método.
7. Método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende la monitorización del efecto de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho paciente basada en dicho método, repitiendo al menos una vez dicho paso de determinación.
- 50 8. Método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que al menos un péptido inmunogénico es seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a 10.
9. Método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que al menos un péptido inmunogénico es seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1, 5, 8, 9, y 11 a 19.
10. Método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que al menos un péptido inmunogénico es
 - 55 seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 20 a 29.
11. Método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que al menos un péptido inmunogénico es

seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 30 a 37.

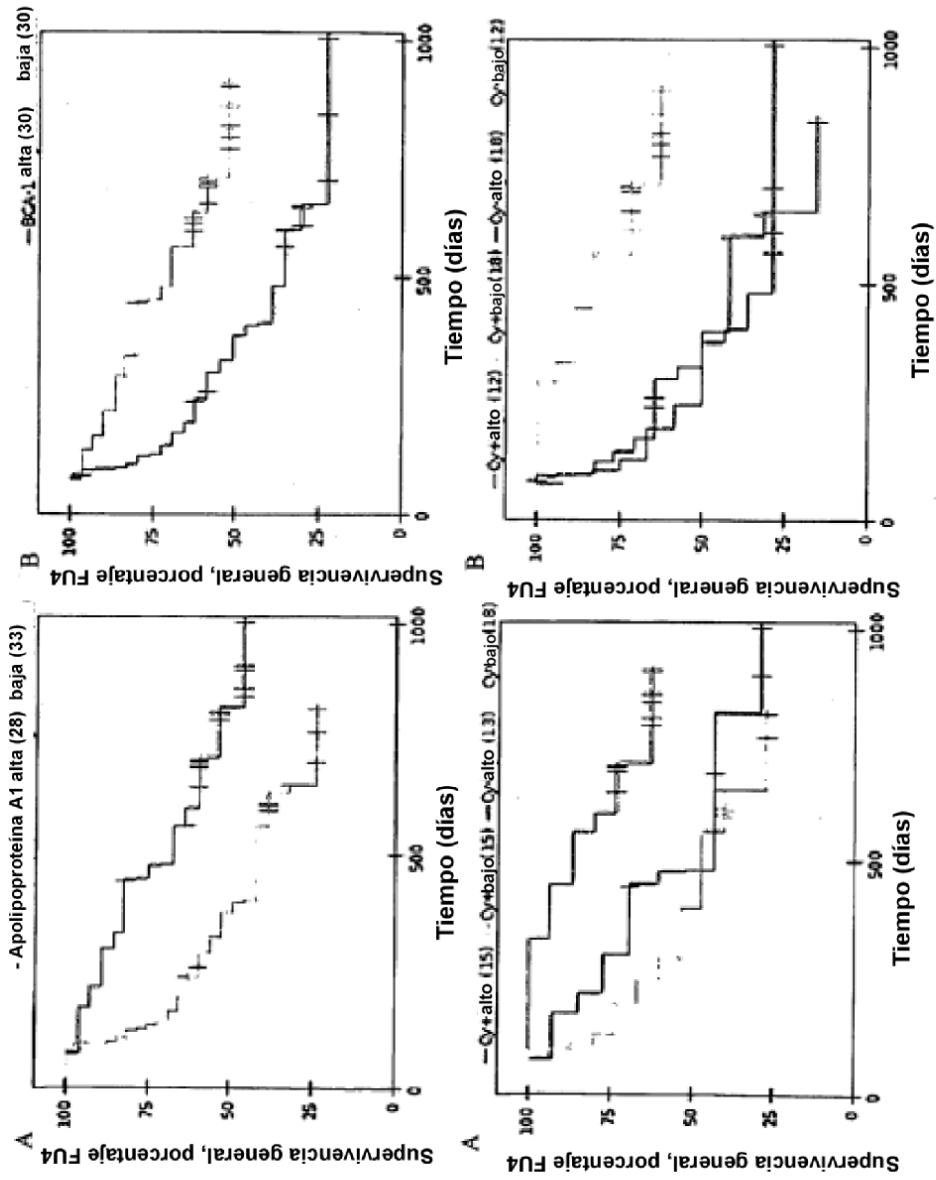


Figura 1

Figura 1 (cont.)

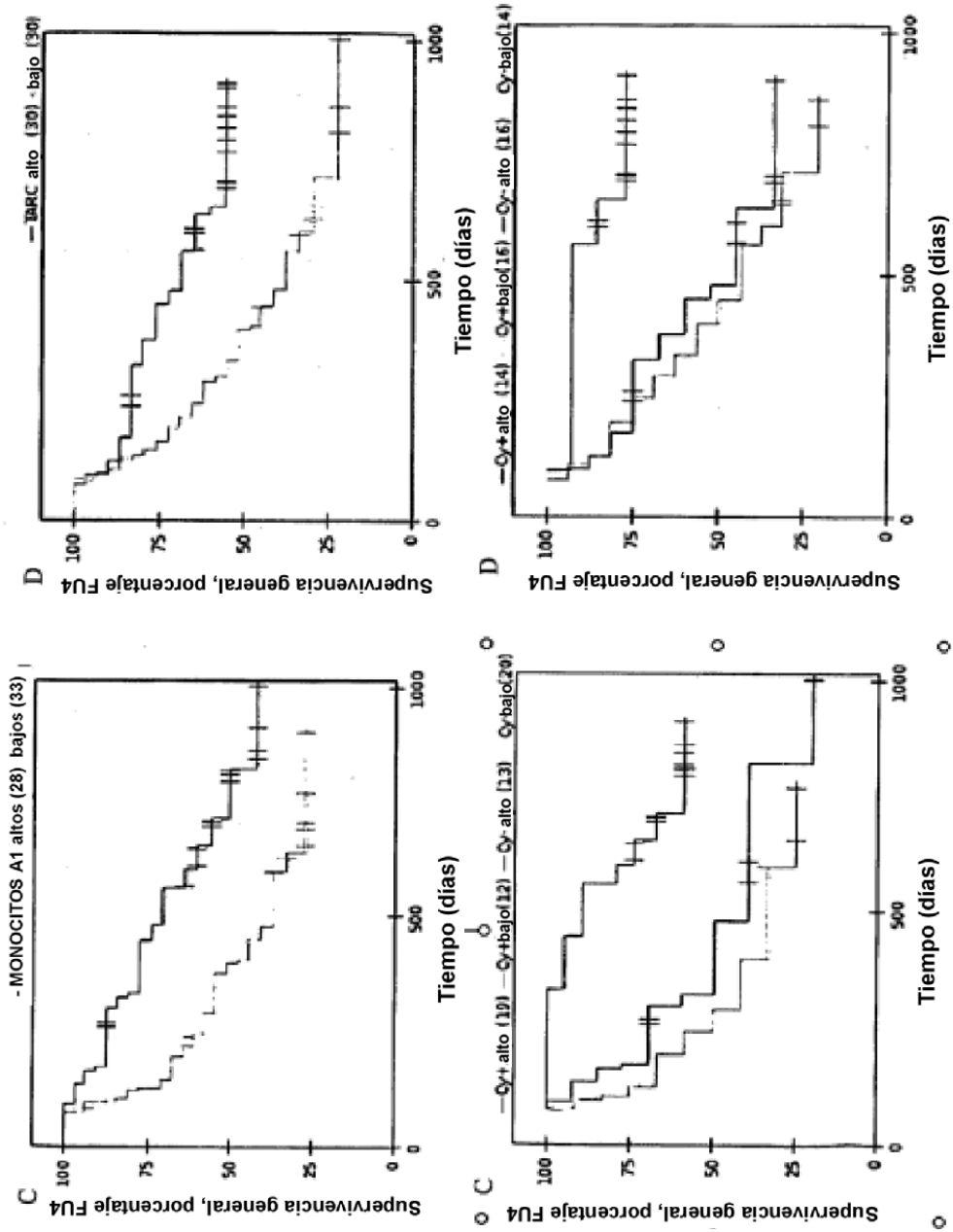
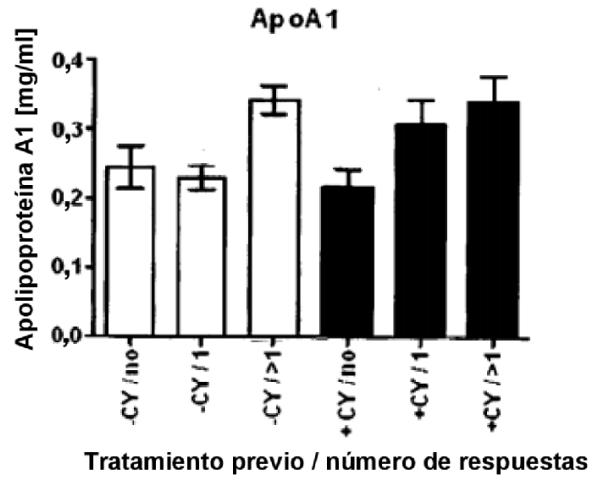
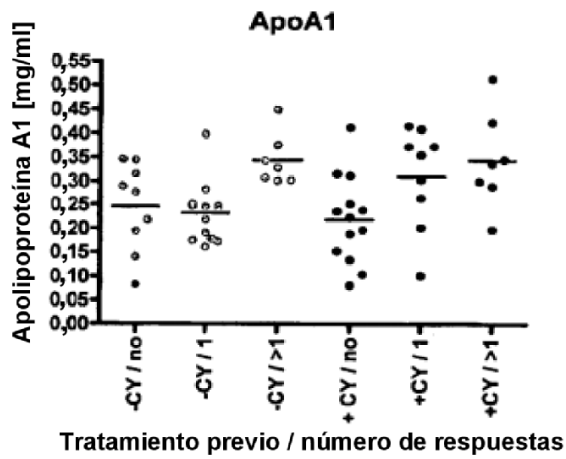


Figura 2

A



B



C

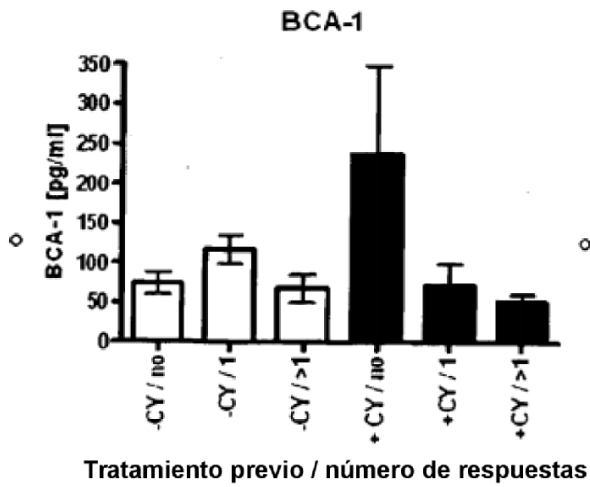
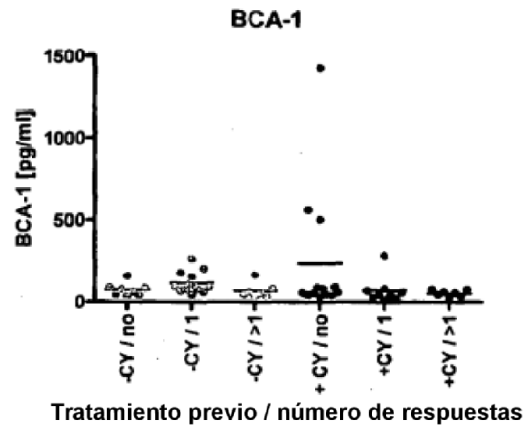
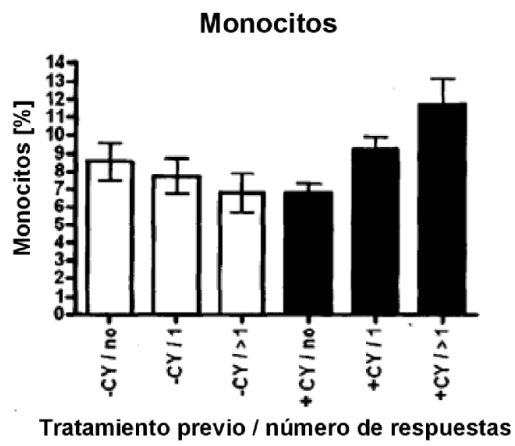


Figura 2 (cont.)

D



E



F

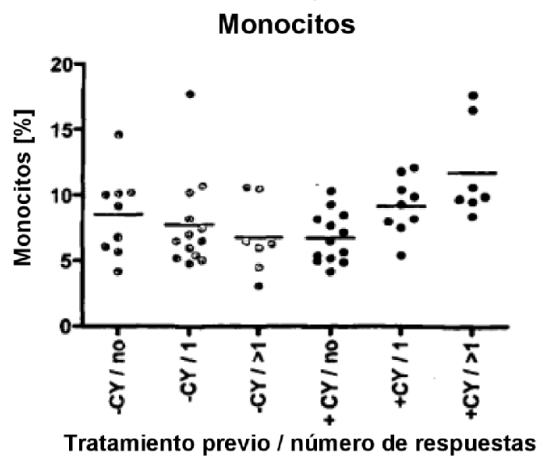
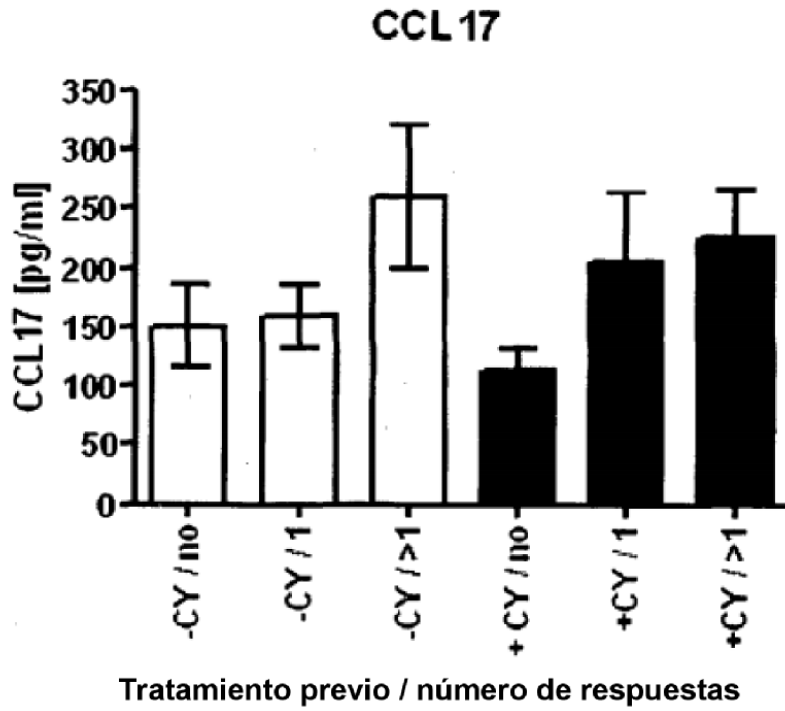
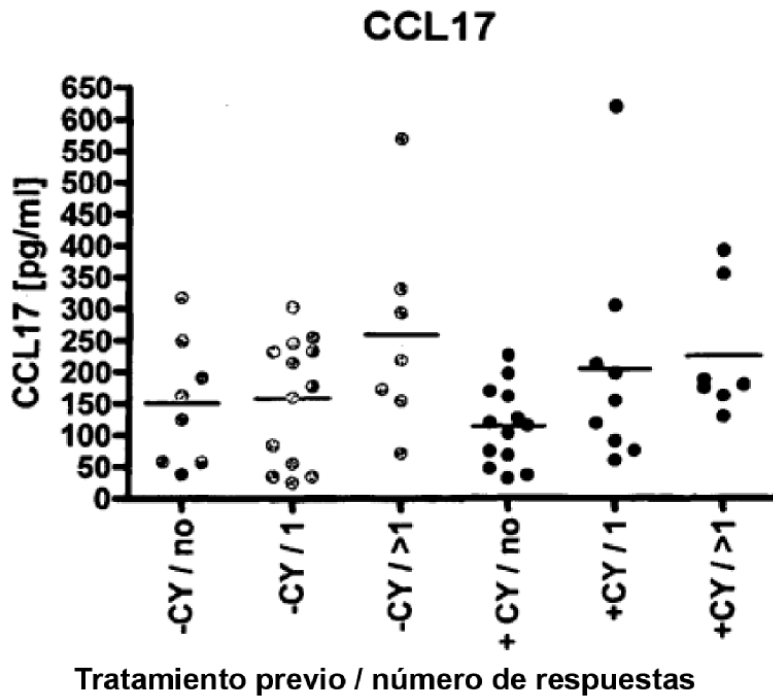


Figura 2 (cont.)

G



H



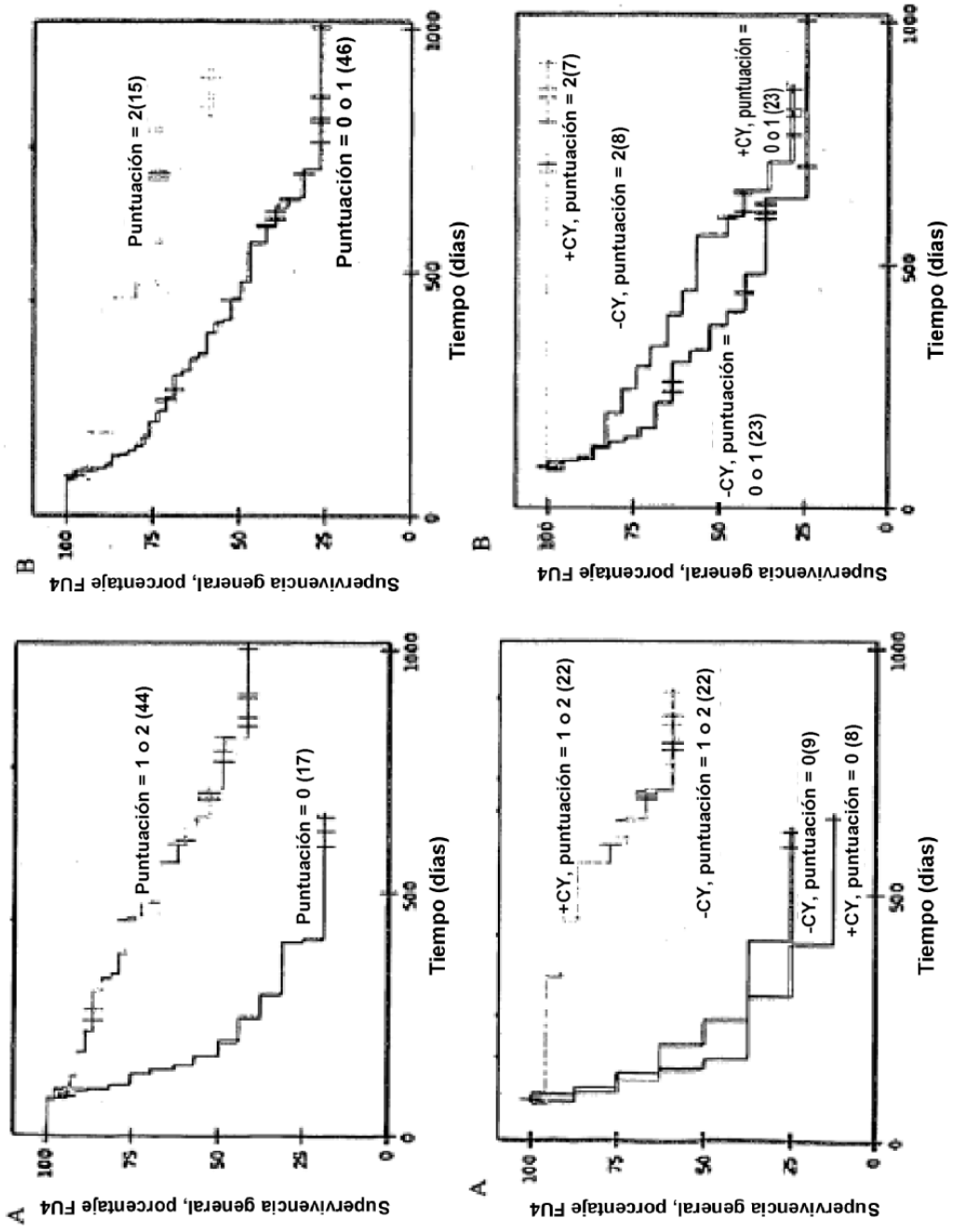
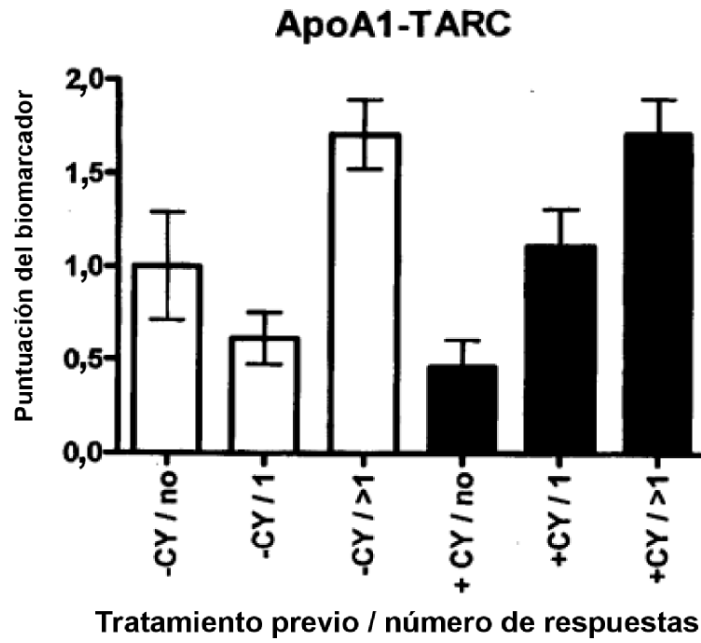


Figura 3

Figura 4

A



B

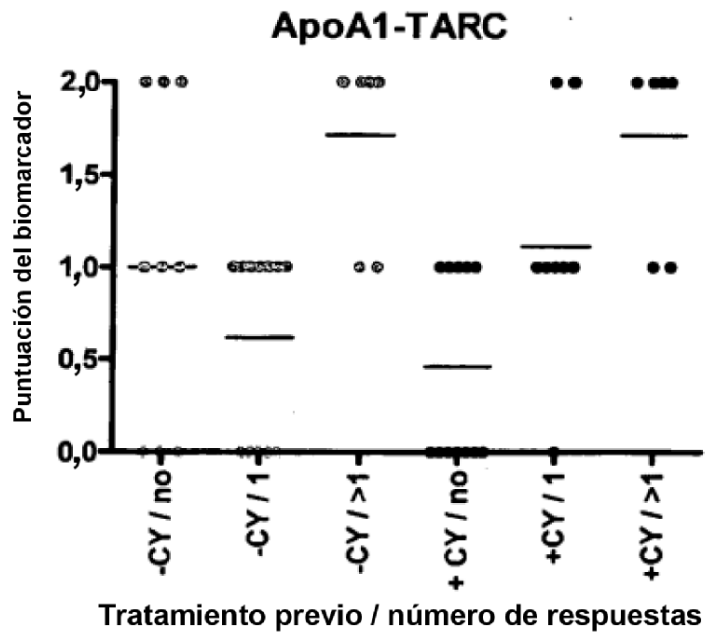
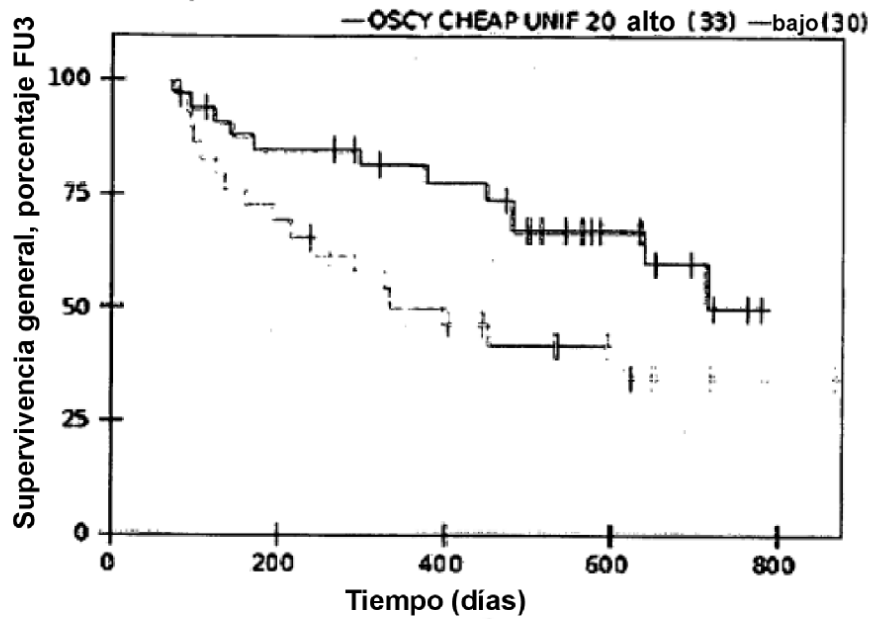


Figura 5

A



B

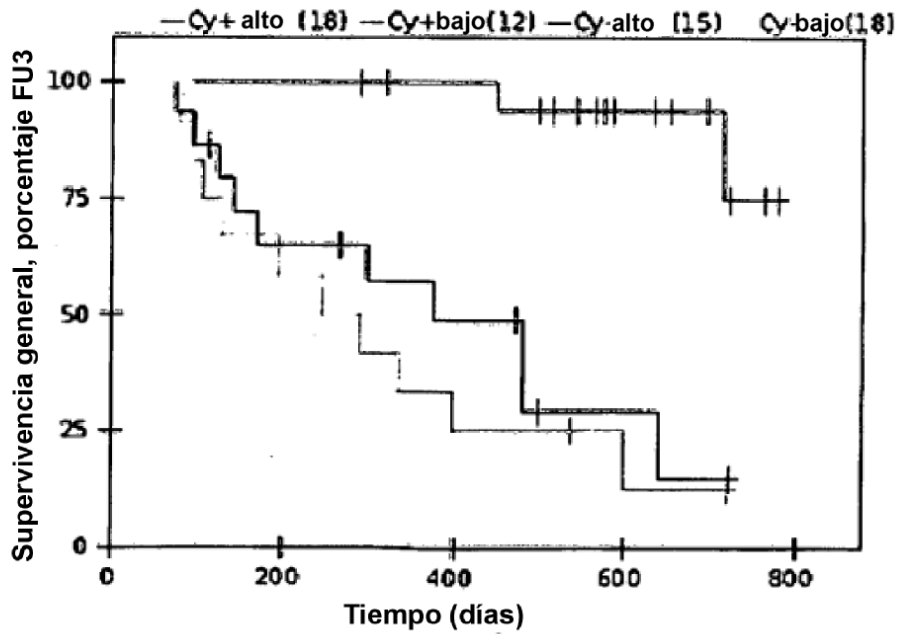
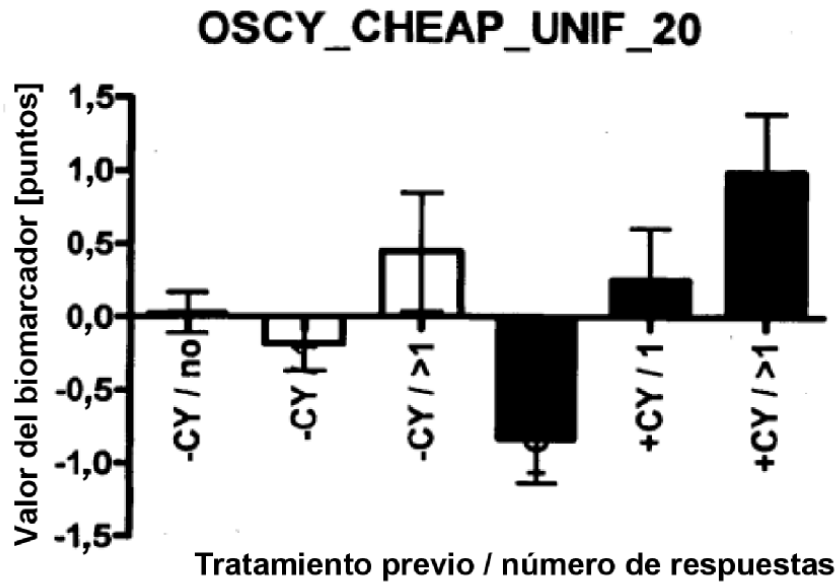


Figura 6

A



B

