

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 176**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2013 PCT/EP2013/064808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009535**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013 E 13735334 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2872646**

54 Título: **Métodos de predicción del tiempo de supervivencia y de la respuesta al tratamiento de un paciente que padece un cáncer sólido con un distintivo de al menos 7 genes**

30 Prioridad:

**12.07.2012 EP 12305836**

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

**28.12.2017**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)  
101 Rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%) y  
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GALON, JÉRÔME;  
PAGES, FRANCK;  
MLECNIK, BERNHARD y  
BINDEA, GABRIELA**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 648 176 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

Métodos de predicción del tiempo de supervivencia y de la respuesta al tratamiento de un paciente que padece un cáncer sólido con un distintivo de al menos 7 genes

### Sector de la técnica

La presente invención se refiere a métodos y kits de predicción del tiempo de supervivencia y de la respuesta de un paciente que padece un cáncer sólido.

### Estado de la técnica

El cáncer sigue siendo un grave problema de salud pública en los países desarrollados. Por consiguiente, para ser el de mayor eficacia, el tratamiento del cáncer no solo requiere la detección y el tratamiento precoz o la extirpación del tumor maligno, sino una evaluación fiable de la gravedad del tumor maligno y una predicción de la probabilidad de reaparición del cáncer. La fase de un cáncer indica hasta qué punto se ha extendido. La determinación de la fase es importante debido a que el tratamiento se suele decidir de acuerdo con la fase de un cáncer. Hasta la fecha, los cánceres se clasifican en general según el sistema UICC-TNM. El sistema de clasificación TNM (de "Tumor-Nodo-Metástasis") usa el tamaño del tumor, la presencia o ausencia del tumor en los ganglios linfáticos regionales, y la presencia o ausencia de metástasis distantes, para asignar una fase al tumor. El sistema TNM se desarrolló a partir de la observación de que los pacientes con tumores pequeños tienen mejor pronóstico que aquellos con tumores de mayor tamaño en el sitio primario. En general, los pacientes con tumores confinados al sitio primario tienen mejor pronóstico que aquellos con los ganglios linfáticos regionales afectados, que, a su vez, es mejor que para aquellos con una propagación distante de la enfermedad a otros órganos. Por consiguiente, el cáncer puede dividirse, en general, en cuatro fases. La fase I es cáncer muy localizado sin cáncer en los ganglios linfáticos. El cáncer de fase II se ha extendido en mayor profundidad en el órgano primario, normalmente, son tumores T3, T4. El cáncer de fase III se ha extendido a los ganglios linfáticos. El cáncer de fase IV se ha extendido a otra parte del cuerpo. La fase asignada se usa como base para la selección de terapia apropiada y para fines de pronóstico. Por ejemplo, la quimioterapia siempre se recomienda para cánceres en estadio IV. Por el contrario, no existen pautas relevantes para prescribir quimioterapia a pacientes con cáncer en fase II o III según el UICC-TNM. Por consiguiente, existe la necesidad de herramientas de diagnóstico confiables para guiar las decisiones de tratamiento, ya que una etapa esencial para la multitud de nuevas terapias disponibles es la selección eficiente de pacientes para una terapia adecuada contra el cáncer.

Las clasificaciones TNM anteriores, aunque van a ser útiles, son imperfectas y no permiten un pronóstico fiable del desenlace de los cánceres. Recientemente, Galon *et al.*, sugirieron que analizar la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria adaptativa dentro del tumor puede ser adecuado para predecir el desenlace de un cáncer en un paciente (documento WO2007045996). Así pues, proporcionan una lista de genes y una combinación de los mismos que pueden ser útiles para el pronóstico en pacientes de la progresión del cáncer. Sin embargo, los métodos representados en dicho documento no señalan las combinaciones particulares de genes que proporcionan un mejor rendimiento que el que hace la clasificación TNM para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente con cáncer y para predecir la respuesta al tratamiento del paciente.

Pagès *et al* (*Journal of Clinical Ontology*, vol. 27, n.º 35, páginas 5944-5951, 2009), desvela que la localización y las densidades de los linfocitos T citotóxicos y de memoria en el tumor permiten predecir el desenlace de un cáncer.

### Objeto de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

### Descripción detallada de la invención

La solicitud de patente internacional WO2007045996 se refiere a una selección general de los genes más importantes (~300) que describen el microentorno del tumor, que se realizó sin considerar combinaciones entre ellos. Para limitar el número de distintivos, solo se usaron de 7 a 21 genes, que permanecieron con un rango logarítmico altamente significativo después de realizar 100 veces la validación cruzada en una cohorte de pacientes. Los genes se seleccionan del grupo que consiste en CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX2. Por ejemplo, el número posible de distintivos no redundantes de alrededor de 21 de los 300 genes descritos en la solicitud de patente internacional WO2007045996 supera los 1,0E+37. Los inventores demuestran que la identificación de un distintivo de 21 genes proporciona una mayor sensibilidad y selectividad que la clasificación UICC-TNM. Validan los distintivos en diferentes tipos de cáncer. Además, los inventores demostraron que el mismo distintivo es adecuado para predecir la capacidad de respuesta del paciente a un tratamiento.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente,

el nivel de expresión génica de al menos 7 genes seleccionados del grupo que consiste en CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- 5
- proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
  - proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- 10
- proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- 15
- proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
  - proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- 20
- proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.
- 25

Con respecto al pronóstico intermedio, cada vez que el nivel de expresión de un gen es superior a su valor de referencia predeterminado, el pronóstico será más favorable para el paciente.

- 30
- El paciente puede padecer un cáncer sólido. Por lo general, el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de las vías biliares (por ejemplo, cáncer perifilar, cáncer de vías biliares distales, cáncer de vías biliares intrahepáticas), cáncer de vejiga, cáncer de huesos (por ejemplo, osteoblastoma, osteocondroma, hemangioma, fibroma condromixioide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de células gigantes del hueso, cordoma, linfoma, mieloma múltiple), cáncer de cerebro y del sistema nervioso central (por ejemplo, meningioma, astrocitoma, oligodendrogliomas, ependimoma, gliomas, meduloblastoma, ganglioglioma, Schwannoma, germinoma, craneofaringioma), cáncer de mama (por ejemplo, carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma lobular in situ, ginecomastia), enfermedad de Castleman (por ejemplo, hiperplasia de ganglios linfáticos gigantes, hiperplasia angiofolicular de los ganglios linfáticos), cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio (por ejemplo, adenocarcinoma endometrial, adenocarcinoma, adeno carcinoma seroso papilar, célula transparente), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células pequeñas), tumores carcinoides gastrointestinales (por ejemplo, coriocarcinoma, corioadenoma destruens), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (por ejemplo, cáncer de células renales), Cáncer laríngeo e hipofaríngeo, cáncer de hígado (por ejemplo, hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón no microcítico), mesotelioma, plasmacitoma, cavidad nasal y cáncer del seno paranasal (por ejemplo, estenoneuroblastoma, granuloma de línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaringe, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer pituitario, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma (por ejemplo, rhabdomyosarcoma embrionario, rhabdomyosarcoma alveolar, rhabdomyosarcoma pleomórfico), cáncer de glándulas salivales, cáncer de piel (por ejemplo melanoma, cáncer de piel no melanoma), cáncer de estómago, cáncer testicular (por ejemplo, seminoma, cáncer de células germinativas no seminoma), cáncer de timo, cáncer de tiroides (por ejemplo, carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma tiroideo medular, linfoma de tiroides), cáncer vaginal, cáncer vulvar y cáncer uterino (por ejemplo, leiomyosarcoma uterino). En una realización particular, el cáncer es un cáncer colorrectal.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

La expresión "muestra tumoral" significa cualquier muestra de tumor tisular derivada del paciente. Dicha muestra de tejido se obtiene para los fines de la evaluación *in vitro*. La muestra puede ser recién preparada, congelada, fija (por ejemplo, fijada con formalina) o embebida (por ejemplo, embebida en parafina). En una realización particular, la muestra tumoral puede resultar del tumor extirpado del paciente. En otra realización, la muestra tumoral puede resultar de una biopsia realizada en el tumor primario del paciente o realizada en una muestra metastásica distante del tumor primario del paciente. Por ejemplo, una biopsia endoscópica realizada en el intestino del paciente afectado por un cáncer colorrectal.

- 65
- Todos los genes que pertenecen a la invención son conocidos en sí, y se enumeran en las siguientes Tablas A:

Gen	Nombre	ID del gen
CCR2	receptor 2 de quimiocina (motivo C-C)	729230
CD3D	molécula CD3d, delta (complejo CD3-TCR)	915
CD3E	molécula CD3e, épsilon (complejo CD3-TCR)	916
CD3G	molécula CD3g, gamma (complejo CD3-TCR)	917
CD8A	molécula CD8a	925
CXCL10	ligando 10 de quimiocina (motivo C-X-C)	3627
CXCL11	ligando 11 de hemocina (motivo C-X-C)	6373
GZMA	granzima A (granzima 1, esterasa serina 3 asociada a los linfocitos T citotóxicos)	3001
GZMB	granzima B (granzima 2, esterasa serina 1 asociada a los linfocitos T citotóxicos)	3002
GZMK	granzima K (granzima 3, triptasa II)	3003
GZMM	granzima M (linfocito metasa 1)	3004
IL15	interleucina 15	3600
IRF1	factor 1 regulador de interferón	3659
PRF1	perforina 1 (proteína de formación de poros)	5551
STAT1	transductor de señales y activador de la transcripción 1, 91 kDa	6772
CD69	molécula CD69	969
ICOS	coestimulante de linfocitos T inducible	29851
CXCR3	receptor 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	2833
STAT4	transductor de señales y activador de la transcripción 4	6775
CCL2	ligando 2 de quimiocina (motivo C-C)	6347
TBX21	Caja-T 21	30009
CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21		

Por lo tanto, la presente invención puede incluir:

- 5 - determinar el nivel de expresión de CCR2 (EL<sub>CCR2</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CCR2 (ELR<sub>CCR2</sub>);
- determinar el nivel de expresión de CD3D (EL<sub>CD3D</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CD3D (ELR<sub>CD3D</sub>);
- determinar el nivel de expresión de CD3E (EL<sub>CD3E</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CD3E (ELR<sub>CD3E</sub>);
- 10 - determinar el nivel de expresión de CD3G (EL<sub>CD3G</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CD3G (ELR<sub>CD3G</sub>);
- determinar el nivel de expresión de CD8A (EL<sub>CD8A</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CD8A (ELR<sub>CD8A</sub>);
- determinar el nivel de expresión de CXCL10 (EL<sub>CXCL10</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CXCL10 (ELR<sub>CXCL10</sub>);
- 15 - determinar el nivel de expresión de CXCL11 (EL<sub>CXCL11</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CXCL11 (ELR<sub>CXCL11</sub>);
- determinar el nivel de expresión de GZMA (EL<sub>GZMA</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para GZMA (ELR<sub>GZMA</sub>);
- 20 - determinar el nivel de expresión de GZMB (EL<sub>GZMB</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para GZMA (ELR<sub>GZMB</sub>);
- determinar el nivel de expresión de GZMK (EL<sub>GZMK</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para GZMK (ELR<sub>GZMK</sub>);
- determinar el nivel de expresión de GZMM (EL<sub>GZMM</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para GZMM (ELR<sub>GZMM</sub>);
- 25 - determinar el nivel de expresión de IL15 (EL<sub>IL15</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado

para IL15 (ELR<sub>IL15</sub>);

- determinar el nivel de expresión de IRF1 (EL<sub>IRF1</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para IRF1 (ELR<sub>IRF1</sub>);
- determinar el nivel de expresión de PRF1 (EL<sub>PRF1</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para PRF1 (ELR<sub>PRF1</sub>);
- determinar el nivel de expresión de STAT1 (EL<sub>STAT1</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para STAT1 (ELR<sub>STAT1</sub>);
- determinar el nivel de expresión de CD69 (EL<sub>CD69</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CD69 (ELR<sub>CD69</sub>);
- determinar el nivel de expresión de ICOS (EL<sub>ICOS</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para ICOS (ELR<sub>ICOS</sub>);
- determinar el nivel de expresión de CXCR3 (EL<sub>CXCR3</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CXCR3 (ELR<sub>CXCR3</sub>);
- determinar el nivel de expresión de STAT4 (EL<sub>STAT4</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para STAT4 (ELR<sub>STAT4</sub>);
- determinar el nivel de expresión de CCL2 (EL<sub>CCL2</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para CCL2 (ELR<sub>CCL2</sub>);
- determinar el nivel de expresión de TBX21 (EL<sub>TBX21</sub>) y comparar dicho nivel con el nivel de referencia predeterminado para TBX21 (ELR<sub>TBX21</sub>).

La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de mama que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, GZMB, GZMK, STAT1, ICOS, STAT4 y TBX21; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
- proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer mama que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, CD69, ICOS, CXCR3 y STAT4; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
- proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de cuello uterino que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CD3E, CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
- proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un carcinoma hepatocelular que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD8A, CXCL10, GZMA, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, CXCR3 y STAT4; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
  - proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- 5 - proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

10 La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de pulmón que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, STAT4 y CCL2; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- 15 - proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
  - proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- 20 - proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

25 La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un melanoma que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IRF1, PRF1, CD69, ICOS, CXCR3 and TBX21; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- 30 - proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
  - proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- 35 - proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

40 La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de ovario que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- 45 - proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
  - proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- 50 - proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

55 La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de ovario que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CD3E, CD3G, CXCL10, CXCL11, GZMB, GZMK, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, CCL2, y TBX21; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- 60 - proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
  - proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- 65 - proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

65 La presente invención también se refiere a un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de páncreas que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel

de expresión génica de CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, STAT4 y TBX21; e ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii)

- 5 - proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) son superiores a sus valores de referencia predeterminados, o
- proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados; o
- 10 - proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado del nivel de expresión es superior a su valor predeterminado y al menos un valor del nivel de expresión determinado es inferior a su valor predeterminado.

La medición del nivel de expresión de un gen se puede realizar mediante una variedad de técnicas bien conocidas en la materia.

15 Por lo general, el nivel de expresión de un gen puede determinarse mediante la determinación de la cantidad de ARNm. Los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (por ejemplo, células o tejidos preparados a partir del paciente) se extrae primero de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, usando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae mediante resinas de unión a ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se detecta el ARNm extraído mediante hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia Northern, hibridación *in situ*) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR).

20 Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA).

25 Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que presentan complementariedad u homología de secuencia con el ARNm de interés en el presente documento encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que dichos ácidos nucleicos no necesitan ser idénticos, pero normalmente son al menos aproximadamente un 80 % idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferentemente son un 85 % idénticos e incluso más preferentemente son un 90-95 % idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación.

30 Por lo general, las sondas de ácido nucleico incluyen uno o más marcadores, por ejemplo, para permitir la detección de una molécula de ácido nucleico diana usando las sondas desveladas. En diversas aplicaciones, tales como los procedimientos de hibridación *in situ*, una sonda de ácido nucleico incluye un marcador (por ejemplo, un marcador detectable). Un "marcador detectable" es una molécula o un material que puede usarse para producir una señal detectable que indique la presencia o la concentración de la sonda (en particular, la sonda unida o hibridada) en una muestra. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico marcada proporciona un indicador de la presencia o de la concentración de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) (a la que la molécula de ácido nucleico específica marcada de forma única está unida o hibridada) en una muestra. Un marcador asociado con una o más moléculas de ácido nucleico (tales como una sonda generada por los métodos desvelados) puede detectarse directa o indirectamente. Un marcador puede detectarse mediante cualquier mecanismo conocido o por descubrir, incluyendo la absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (incluyendo fotones de radiofrecuencia, de frecuencia de microondas, de frecuencia de infrarrojo, de frecuencia visible y de frecuencia ultravioleta). Las marcadores detectables incluyen moléculas y materiales coloreados, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra para proporcionar una diferencia detectable (tal como, mediante la conversión de una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o mediante la producción de un precipitado o el aumento de la turbidez de la muestra), haptenos que pueden detectarse mediante interacciones de unión de anticuerpos y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos.

35 Los ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen moléculas fluorescentes (o fluorocromos). Numerosos fluorocromos son conocidos por los expertos en la materia, y pueden seleccionarse, por ejemplo, de Life Technologies (anteriormente Invitrogen), por ejemplo, véase, "The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies". Los ejemplos de fluoróforos particulares que se pueden unir (por ejemplo, conjugar químicamente) a una molécula de ácido nucleico (tal como una región de unión específica de forma única) se proporcionan en la patente de EE.UU. n.º 5.866.366 de Nazarenko *et al.*, tales como ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico, acridina y derivados tales como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5-disulfonato (amarillo Lucifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antilranilamida, Amarillo brillante, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcoularina (Cumarina 151); cianosina; 4',6-diarininidin-2-fenilindol (DAPI); 5',5"-dibromoprogralol-sulfonaftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamin-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-

diisotiocianatodihidroestilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamin]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenilo-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorrotazina)-2-yDarnino-fluoresceína (DTAF), 27'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y QFITC Q(RITC); 2',7'-difluorofluoresceína (OREGON GREEN®); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de verde malaquita; 4-metilumbeliferona; ftaleína de orto-cresol; nitrorosina; pararosanilina; Rojo fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil-1-pireno; Rojo reactivo 4 (Rojo brillante Cibacron 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, verde rodamina, sulforodamina B, sulforrodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonilo de sulforodamina 101 (Rojo Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); rodamina de tetrametilo; isotiocianato de rodamina de tetrametilo (TRITC); riboflavina; derivados del ácido rosólico y del quelato de terbio. Otros fluoróforos adecuados incluyen quelatos de europio reactivos con tiol que emiten a aproximadamente 617 nm (Heyduk y Heyduk, *Analyt. Biochem.* 248:216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274:3315-22, 1999), así como GFP, Lissamine™, dietilaminocoumarina, clorotriazinilo de fluoresceína, naftofluoresceína, 4,7-diclorodamina y xanteno (como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.800.996 de Lee *et al.*) y sus derivados. También se pueden usar otros fluoróforos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, los disponibles en Life Technologies (Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, Oregón)) y que incluyen la serie de colorantes ALEXA FLUOR® (por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 5.696.157, 6.130.101 y 6.716.979), la serie de colorantes BODIPY (colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 4.774.339, 5.187.288, 5.248.782, 5.274.113, 5.338.854, 5.451.663 y 5.433.896), Azul Cascada (un derivado reactivo de amina del pireno sulfonado descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.132.432) y Azul Marino (patente de EE.UU. n.º 5.830.912).

Además de los fluorocromos descritos anteriormente, un marcador fluorescente puede ser una nanopartícula fluorescente, tal como un nanocristal semiconductor, por ejemplo, un QUANTUM DOT™ (obtenido, por ejemplo, en Life Technologies (QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Eugene, Oregón); véase también, la patente de EE.UU. n.º 6.815.064; 6.682.596; y 6.649.138). Los nanocristales semiconductores son partículas microscópicas que tienen propiedades ópticas y/o eléctricas dependientes del tamaño. Cuando los nanocristales semiconductores se iluminan con una fuente de energía primaria, se produce una emisión secundaria de energía de una frecuencia que corresponde a la holgura del material semiconductor usado en el nanocristal semiconductor. Esta emisión puede detectarse como luz coloreada de una longitud de onda o fluorescencia específica. En la patente de EE.UU. n.º 6.602.671, se describen nanocristales semiconductores con diferentes características espectrales. Los nanocristales semiconductores que pueden acoplarse a una variedad de moléculas biológicas (incluyendo los dNTP y/o ácidos nucleicos) o sustratos mediante técnicas descritas, por ejemplo, en Bruchez *et al.*, *Science* 281: 20132016, 1998; Chan *et al.*, *Science* 281:2016-2018, 1998; y la patente de EE.UU. n.º 6.274.323. Por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 6.927.069; 6.914.256; 6.855.202; 6.709.929; 6.689.338; 6.500.622; 6.306.736; 6.225.198; 6.207.392; 6.114.038; 6.048.616; 5.990.479; 5.690.807; 5.571.018; 5.505.928; 5.262.357 y en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0165951, así como en la publicación PCT n.º 99/26299 (publicada el 27 de mayo de 1999), se desvela la formación de nanocristales semiconductores de diversas composiciones. Se pueden producir poblaciones separadas de nanocristales semiconductores que se pueden identificar en función de sus diferentes características espectrales. Por ejemplo, se pueden producir nanocristales semiconductores que emiten luz de diferentes colores basándose en su composición, tamaño o tamaño y composición. Por ejemplo, los puntos cuánticos que emiten luz a diferentes longitudes de onda basándose en el tamaño (565 nm, 655 nm, 705 nm o 800 nm de longitudes de onda de emisión), que son adecuados como marcadores fluorescentes en las sondas desveladas en el presente documento se encuentran disponibles de Life Technologies (Carlsbad, Calif).

Los marcadores adicionales incluyen, por ejemplo, radioisótopos (tales como <sup>3</sup>H), quelatos metálicos tales como quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o paramagnéticos como Gd<sup>3+</sup> y liposomas.

Los marcadores detectables que pueden usarse con moléculas de ácido nucleico también incluyen enzimas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa o beta-lactamasa.

Como alternativa, se puede usar una enzima en un esquema de detección metalográfico. Por ejemplo, los procedimientos de hibridación en plata *in situ* (SISH) implican esquemas de detección metalográficos para la identificación y localización de una secuencia de ácido nucleico diana genómica hibridada. Los métodos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, en combinación con un ion metálico hidrosoluble y un sustrato inactivo rédox de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo rédox por la enzima, y el agente activo rédox reduce el ion metálico, haciendo que forme un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0100976, la publicación de PCT n.º 2005/003777 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/0265922). Los métodos de detección metalográficos también incluyen el uso de una enzima oxido-reductasa (tal como la peroxidasa de rábano picante) junto con un ion metálico hidrosoluble, un agente oxidante y un agente reductor, nuevamente para formar un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.670.113).

Las sondas preparadas usando los métodos desvelados pueden usarse para la detección de ácidos nucleicos, tales como procedimientos de ISH (por ejemplo, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), hibridación cromogénica *in situ* (CISH) e hibridación de plata *in situ* (SISH) o hibridación genómica comparativa. (CGH).

5 La hibridación *in situ* (ISH) implica poner en contacto una muestra que contiene secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico genómico diana) en el contexto un preparado cromosómico de metafase o interfase (tal como una muestra de célula o tejido montada en un portaobjetos) con una sonda marcada hibridable específicamente o específica para la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica). Opcionalmente, los portaobjetos se tratan previamente, por ejemplo, para eliminar la parafina u  
10 otros materiales que puedan interferir con la hibridación uniforme. Tanto la muestra como la sonda se tratan, por ejemplo, calentando para desnaturalizar los ácidos nucleicos bicatenarios. La sonda (formulada en un tampón de hibridación adecuado) y la muestra se combinan, en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que se produzca la hibridación (normalmente hasta alcanzar el equilibrio). El preparado cromosómico se lava para eliminar el exceso de sonda, y la detección del marcaje específico de la diana cromosómica se realiza usando  
15 técnicas convencionales.

Por ejemplo, una sonda biotinilada puede detectarse usando avidina marcada con fluoresceína o fosfatasa alcalina con avidina. Para la detección de fluorocromo, el fluorocromo se puede detectar directamente, o las muestras se pueden incubar, por ejemplo, con avidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La amplificación de la  
20 señal de FITC puede efectuarse, si es necesario, mediante incubación con anticuerpos antiavidina de cabra conjugados con biotina, lavado y una segunda incubación con avidina conjugada con FITC. Para la detección mediante la actividad enzimática, las muestras pueden incubarse, por ejemplo, con estreptavidina, lavarse, incubarse con fosfatasa alcalina conjugada con biotina, lavarse de nuevo y preequilibrarse (por ejemplo, en tampón de fosfatasa alcalina (AP)). Para una descripción general de los procedimientos de hibridación *in situ*, véase, por  
25 ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.888.278.

En la técnica, se conocen numerosos procedimientos para FISH, CISH y SISH. Por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.447.841; 5.472.842; y 5.427.932; y, por ejemplo, en Pirkel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:2934-2938, 1986; Pinkel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:9138-9142, 1988; y Lichter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:9664-9668, 1988, se describen procedimientos de realización de FISH. CISH se describe, por ejemplo, en Tanner *et al.*, *Am. J. Pathol.* 157:1467-1472, 2000 y, en la patente de EE.UU. n.º 6.942.970. Se proporcionan métodos de detección  
30 adicionales en la patente de EE.UU. n.º 6.280.929.

Se pueden emplear numerosos reactivos y esquemas de detección junto con los procedimientos de FISH, CISH y SISH para mejorar la sensibilidad, resolución u otras propiedades deseables. Como se ha tratado anteriormente, las sondas marcadas con fluoróforos (incluyendo los colorantes fluorescentes y QUANTUM DOTS®) pueden detectarse ópticamente directamente cuando se realiza el FISH. Como alternativa, la sonda puede marcarse con una molécula no fluorescente, tal como un hapteno (tal como los siguientes ejemplos no limitantes: biotina, digoxigenina, DNP y diversos oxazoles, pirrazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofurazanos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenonas, cumarina, compuestos basados en coumarina, podofilotoxina, compuestos basados en podofilotoxina y combinaciones de los mismos), ligando u otro resto detectable indirectamente. Las sondas marcadas con dichas moléculas no fluorescentes (y las secuencias de ácido nucleico diana a las que se unen) pueden detectarse luego al poner en contacto la muestra (por ejemplo, la muestra celular o de tejido a la que está unida la sonda) con un reactivo de detección marcado, tal como un anticuerpo (o receptor, u otra pareja de unión específica) específico para el hapteno o el ligando seleccionado. El reactivo de detección puede marcarse con un fluoróforo (por ejemplo, QUANTUM DOT®) o con otro resto detectable indirectamente, o puede ponerse en contacto con uno o más agentes de unión específicos adicionales (por ejemplo, anticuerpos secundarios o específicos), que pueden marcarse con una fluoróforo.  
45

En otros ejemplos, la sonda o el agente de unión específica (tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo primario, receptor u otro agente de unión) se marca con una enzima que es capaz de convertir una composición fluorogénica o cromogénica en un fluorescente detectable, coloreado o señal detectable de otro modo (por ejemplo, como en la deposición de partículas metálicas detectables en SISH). Como se ha indicado anteriormente, la enzima se puede unir directa o indirectamente a través de un enlazador a la sonda relevante o al reactivo de detección. Los ejemplos de reactivos adecuados (por ejemplo, reactivos de unión) y productos químicos (por ejemplo, productos químicos enlazadores o de unión) se describen en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2006/0246524; 2006/0246523, y 2007/0117153.  
50

Los expertos en la materia apreciarán que seleccionando apropiadamente pares de agentes de unión específicos de sondas marcadas, pueden producirse esquemas de detección múltiple para facilitar la detección de múltiples secuencias de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico genómicas diana) en un solo ensayo (por ejemplo, en una sola muestra celular o tisular, o en más de una muestra celular o tisular). Por ejemplo, una primera sonda que corresponde a una primera secuencia diana puede marcarse con un primer hapteno, tal como biotina, mientras que una segunda sonda que corresponde a una segunda secuencia diana puede marcarse con un segundo hapteno, tal como DNP. Tras la exposición de la muestra a las sondas, las sondas unidas pueden detectarse poniendo en contacto la muestra con un primer agente de unión específico (en este caso, avidina  
60  
65

5 marcada con un primer fluoróforo, por ejemplo, un primer QUANTUM DOT® espectralmente distinto, por ejemplo, que emite a 585 nm) y un segundo agente de unión específico (en este caso, un anticuerpo anti-DNP, o fragmento de anticuerpo, marcado con un segundo fluoróforo (por ejemplo, un segundo QUANTUM DOT® espectralmente distinto, por ejemplo, que emite a 705 nm). Se pueden agregar pares adicionales de sondas/agentes de unión al esquema de detección múltiple usando otros fluoróforos espectralmente distintos. Se pueden prever numerosas variaciones de directo e indirecto (una etapa, dos etapas o más), siendo todas ellas adecuadas en el contexto de las sondas y de los ensayos desvelados.

10 Las sondas normalmente comprenden ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 y 1.000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de entre 10 y 800, más preferentemente de entre 15 y 700, normalmente de entre 20 y 500. Los cebadores normalmente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, de entre 10 y 25 nucleótidos de longitud, diseñados para coincidir perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, para amplificarse. Las sondas y los cebadores son "específicos" de los ácidos nucleicos a los que se hibridan, es decir, se hibridan preferentemente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondientes a la temperatura de fusión más alta  $T_f$ , por ejemplo, formamida al 50 %, SCC x5 o x6. SCC es NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M).

15 Los cebadores o las sondas de ácido nucleico usados en el método de amplificación y detección anterior pueden ensamblarse como un kit. Dicho kit incluye cebadores de consenso y sondas moleculares. Un kit preferido también incluye los componentes necesarios para determinar si se ha producido la amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones de PCR y enzimas; secuencias de control positivo, cebadores de control de la reacción; e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.

20 En una realización particular, los métodos de la invención comprenden las etapas de proporcionar ARN totales extraídos de células del cumulus y someter los ARN a amplificación e hibridación a sondas específicas, más particularmente por medio de una RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa.

25 En otra realización preferida, el nivel de expresión se determina mediante análisis de chip de ADN. Dicho chip de ADN o micromatriz de ácido nucleico consiste en diferentes sondas de ácido nucleico que están unidas químicamente a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla de tamaño microséférico. Un microchip puede estar constituido por polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, materiales basados en sílice o sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos tales como ADNc u oligonucleótidos que pueden ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 pares de bases. Para determinar el nivel de expresión, una muestra de un sujeto de ensayo, opcionalmente sometida primero a una transcripción inversa, se marca y se pone en contacto con la micromatriz en condiciones de hibridación, lo que conduce a la formación de complejos entre ácidos nucleicos diana que son complementarios a secuencias de sonda unidas a la superficie de la micromatriz. A continuación, se detectan los complejos hibridados marcados y se pueden cuantificar o semicuantificar. El marcaje se puede realizar mediante diversos métodos, por ejemplo, usando marcaje radiactivo o fluorescente. Hay muchas variantes de la tecnología de hibridación de micromatriz disponibles para el experto en la materia (véase, por ejemplo, la revisión de Hoheisel, *Nature Reviews, Genetics*, 2006, 7:200-210).

30 El nivel de expresión de un gen puede expresarse como el nivel de expresión absoluta o el nivel de expresión normalizado. Por lo general, los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluta de un gen comparando su expresión con la expresión de un gen que no es relevante para determinar la fase del cáncer del paciente, por ejemplo, un gen constitutivo que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes constitutivos tales como el gen de actina ACTB, el gen 18S ribosómico, GUSB, PGK1 y TFRC. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de paciente, con otra muestra, o entre muestras de diferentes fuentes.

35 Los valores de referencia predeterminados usados para la comparación pueden comprender valores de "umbral" o "límite" que pueden determinarse como se describe en el presente documento. Cada valor de referencia ("límite") para cada gen de interés puede predeterminarse llevando a cabo un método que comprenda las etapas de

- a) proporcionar una colección de muestras de tejido tumoral de pacientes que padecen cáncer;
- 40 b) determinar el nivel de expresión del gen para cada muestra de tejido tumoral contenida en la colección proporcionada en la etapa a);
- c) clasificar las muestras de tejido tumoral de acuerdo con dicho nivel de expresión;
- d) clasificar dichas muestras de tejido tumoral en pares de subconjuntos de número creciente, respectivamente decreciente, de miembros clasificados de acuerdo con su nivel de expresión;
- 45 e) proporcionar, para cada muestra de tejido tumoral proporcionada en la etapa a), información relacionada con el resultado clínico real para el paciente con cáncer correspondiente (es decir, la duración de la supervivencia libre de enfermedad (DFS) o la supervivencia general (SG) o ambas);
- f) para cada par de subconjuntos de muestras de tejido tumoral, obtener un porcentaje de Kaplan Meier de la curva de supervivencia;
- 50 g) para cada par de subconjuntos de muestras de tejido tumoral, calcular la significación estadística (valor  $p$ ) entre ambos subconjuntos;

h) seleccionar como valor de referencia para el nivel de expresión, el valor del nivel de expresión para el que el valor  $p$  es el más pequeño.

Por ejemplo, el nivel de expresión de un gen X se ha evaluado para 100 muestras de cáncer de 100 pacientes. Las 100 muestras se clasifican de acuerdo con su nivel de expresión. La muestra 1 tiene el mejor nivel de expresión y la muestra 100 tiene el peor nivel de expresión. Una primera agrupación proporciona dos subconjuntos: por un lado, la muestra n.º 1 y, por otro lado, las otras 99 muestras. La siguiente agrupación proporciona, por un lado, las muestras 1 y 2 y, por otro lado, las 98 muestras restantes, etc., hasta la última agrupación: por un lado, las muestras 1 a 99 y, por otro lado, la muestra n.º 100. De acuerdo con la información relacionada con el resultado clínico real para el paciente con cáncer correspondiente, se preparan curvas de Kaplan Meier para cada uno de los 99 grupos de dos subconjuntos. También para cada uno de los 99 grupos, se calculó el valor  $p$  entre ambos subconjuntos.

El valor de referencia se selecciona tal como la diferenciación basada en el criterio de que el valor de  $p$  mínimo es el más fuerte. En otros términos, el nivel de expresión correspondiente al límite entre ambos subconjuntos para los cuales el valor de  $p$  es mínimo se considera como el valor de referencia. Cabe señalar que el valor de referencia no es necesariamente el valor mediano de los niveles de expresión.

En el trabajo habitual, el valor de referencia (valor límite) se puede usar en el presente método para diferenciar muestras de tumores y, por lo tanto, los pacientes correspondientes.

Las curvas de Kaplan-Meier del porcentaje de supervivencia en función del tiempo son comúnmente para medir la fracción de pacientes que viven durante un cierto período de tiempo después del tratamiento, y son muy conocidas por los expertos en la materia.

El experto en la materia también entiende que la misma técnica de evaluación del nivel de expresión de un gen debería usarse para obtener el valor de referencia y, posteriormente, para la evaluación del nivel de expresión de un gen de un paciente sometido al método de la invención.

Dichos valores de referencia predeterminados del nivel de expresión pueden determinarse para cualquier gen definido anteriormente.

Dado que los pacientes con un distintivo génico inmune adaptativo alto (A) o bajo (B) tienen un resultado clínico muy diferente y un tiempo de supervivencia muy diferente (valor DE pronóstico potente del distintivo génico inmune adaptativo), es necesario estratificar a los pacientes basándose en este distintivo génico inmune adaptativo (A o B) para predecir los pacientes que se beneficiarán con el tratamiento del cáncer. La comparación de los grupos de pacientes con un distintivo génico inmune adaptativo similar, A o B, permitirá detectar y predecir los pacientes que responderán significativamente al tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la Figura 4 ilustra los pacientes con cáncer colorrectal en etapa IV, en la que el paciente con un distintivo génico inmune adaptativo "A" tiene una supervivencia prolongada y no necesita tratamiento de quimioterapia (no se beneficia del tratamiento de quimioterapia). Se puede observar un efecto beneficioso significativo del tratamiento de quimioterapia en pacientes con un distintivo génico inmune adaptativo "B". La Figura 2 ilustra los pacientes con cáncer colorrectal en fases I/III, donde el paciente con un distintivo génico inmune adaptativo "B" tiene una supervivencia deficiente y no se beneficia del tratamiento quimioterapéutico, mientras que los pacientes con un distintivo génico inmune adaptativo "A" tienen un mejor desenlace cuando reciben tratamiento de quimioterapia. De manera similar a la Figura 2, La Figura 6 ilustra pacientes con cáncer colorrectal en fase II, en la que el paciente con un distintivo génico inmune adaptativo "B" tiene una supervivencia deficiente y no se beneficia del tratamiento quimioterapéutico, mientras que los pacientes con un distintivo génico inmune adaptativo "A" tienen un mejor desenlace cuando reciben tratamiento de quimioterapia. Por consiguiente, el método de la presente invención puede ser adecuado para diferenciar pacientes entre 2 grupos: un primer grupo de pacientes como "malos respondedores" (es decir, el tratamiento tendrá un impacto limitado (o moderado) en su supervivencia) y un segundo grupo como "buenos respondedores" (es decir, el tratamiento tendrá un impacto significativo en su supervivencia).

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de determinación de si un paciente que padece un cáncer responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de al menos 7 genes seleccionados del grupo que consiste en CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores o inferiores a sus valores de referencia predeterminados.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de determinación de si un paciente que padece un cáncer responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente

responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores o inferiores a sus valores de referencia predeterminados.

5 En una realización particular, la invención se refiere a un método de determinación de si un paciente que padece un cáncer colorrectal no metastásico responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o concluir que el paciente no responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados.

15 También se pueden proporcionar conclusiones intermedias cuando al menos un gen es superior a su correspondiente valor de referencia predeterminado. Cada vez que el nivel de expresión de un gen es superior a su valor de referencia predeterminado, mejor será la respuesta del paciente hacia el tratamiento.

20 El método descrito anteriormente es particularmente adecuado para pacientes con cáncer avanzado precoz (fase II de acuerdo con la clasificación TNM) para los que no existen pautas establecidas para el tratamiento. El método descrito anteriormente cubrirá la necesidad al proporcionar una herramienta fiable para determinar si un paciente con un paciente no metastásico podría beneficiarse de un tratamiento.

25 En una realización particular, la invención se refiere a un método de determinación de si un paciente con un cáncer colorrectal metastásico responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o concluir que el paciente no responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados.

35 También se pueden proporcionar conclusiones intermedias cuando al menos un gen es inferior a su correspondiente valor de referencia predeterminado. Cada vez que el nivel de expresión de un gen es inferior a su valor de referencia predeterminado, mejor será la respuesta del paciente hacia el tratamiento.

40 En una realización particular, la invención se refiere a un método de determinación de si un paciente con un cáncer de pulmón no metastásico responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o concluir que el paciente no responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados.

50 En una realización particular, la invención se refiere a un método de determinación de si un paciente con un cáncer de ovario metastásico responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o concluir que el paciente no responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados.

60 El tratamiento puede consistir en radioterapia, quimioterapia o inmunoterapia. El tratamiento puede consistir en una terapia adyuvante (es decir, tratamiento después de la extirpación quirúrgica del tumor primario) de una terapia neoadyuvante (es decir, tratamiento antes de la extirpación quirúrgica del tumor primario).

65 La expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a todos los compuestos químicos que son eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosfarofarida y trimetilolomelamina; acetogeninas (en especial, bullatacina y bullatacinona); una carnptotecina (incluyendo, topotecan análogo sintético); bryostatina; calistatina; CC-

1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongiatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clonafazina, colofosfamida, estrarnustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenestina, prednimusina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedíina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial, caliqueamicina (11 y caliqueamicina 211, véase, por ejemplo, *Agnew Chem Intl. Ed. Engl.* 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo estatinas neocarzinostatina y cromóforos antibióticos relacionados con la cromoproteína enedíina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caninomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idanrbicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalarnicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptomorfina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolnico, aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxate; defofamina; demecolcina; diaziquone; elfornitina, acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentoestatinas; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK<sup>®</sup>; razoxane; rizoxina; sizofiran; espirogenanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilarnina; tricotecenos (en especial, toxina T-2, verracurina A, roridina y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobromtol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida, tiotepa, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina, metotrexato, análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino, vinblastina, platino, etopósido (VP-16), ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, navelbina, novantrona, tenipósido, daunomicina, aminopterina, xeloda, ibandronato, CPT-1 1; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en la presente definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos que incluyen tamoxifeno, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

La expresión "agente inmunoterapéutico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto, una composición o un tratamiento que mejora, estimula o aumenta indirecta o directamente la respuesta inmunitaria del organismo contra células cancerosas y/o que disminuye los efectos secundarios de otras terapias contra el cáncer. Por lo tanto, la inmunoterapia es una terapia que estimula o mejora directa o indirectamente las respuestas del sistema inmunitario a las células cancerosas y/o disminuye los efectos secundarios que pueden haber sido causados por otros agentes contra el cáncer. La inmunoterapia también se denomina en la técnica terapia inmunológica, terapia biológica modificadora de la respuesta biológica y bioterapia. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos comunes conocidos en la materia incluyen, pero sin limitación, citocinas, vacunas contra el cáncer, anticuerpos monoclonales y adyuvantes no citocínicos. Como alternativa, el tratamiento inmunoterapéutico puede consistir en administrar al paciente una cantidad de células inmunes (linfocitos T, NK, células, células dendríticas, linfocitos B).

Los agentes inmunoterapéuticos pueden ser inespecíficos, es decir, estimular el sistema inmunitario en general para que sea más eficaz en la lucha contra el crecimiento y/o la diseminación de células cancerosas, o pueden ser específicos, es decir, dirigidos a las propias células cancerosas, los regímenes de inmunoterapia pueden combinar el uso de agentes inmunoterapéuticos específicos y no específicos.

Los agentes inmunoterapéuticos no específicos son sustancias que estimulan o aumentan indirectamente el sistema inmunitario. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos se han usado solos como la terapia principal para el tratamiento del cáncer, así como además de una terapia principal, en cuyo caso el agente inmunoterapéutico no específico funciona como un adyuvante para mejorar la eficacia de otras terapias (por ejemplo, vacunas contra el cáncer). Los agentes inmunoterapéuticos no específicos también pueden funcionar en este último contexto para reducir los efectos secundarios de otras terapias, por ejemplo, la supresión de la médula ósea inducida por ciertos agentes quimioterapéuticos. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos pueden actuar sobre las células clave del sistema inmunitario y provocar respuestas secundarias, tales como un aumento en la producción de citocinas e inmunoglobulinas. Como alternativa, los agentes pueden comprender ellos mismos citocinas. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos generalmente se clasifican como citocinas o adyuvantes no citocínicos.

Una serie de citocinas ha encontrado aplicación en el tratamiento del cáncer, ya sea como inmunoterapias generales no específicas diseñadas para estimular el sistema inmunitario, o como adyuvantes proporcionados con otras terapias. Las citocinas adecuadas incluyen, pero sin limitación, interferones, interleucinas y factores estimulantes de colonias.

5 Los interferones (IFN) contemplados por la presente invención incluyen los tipos comunes de IFN, IFN-alfa (IFN- $\alpha$ ), IFN-beta (IFN- $\beta$ ) e IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ). Los IFN pueden actuar directamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando su crecimiento, promoviendo su desarrollo en células con un comportamiento más normal y/o aumentando su producción de antígenos, haciendo que las células cancerosas sean más fáciles de reconocer y destruir por el sistema inmunitario. Los IFN también pueden actuar indirectamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando la angiogénesis, reforzando el sistema inmunitario y/o estimulando los linfocitos citolíticos naturales (NK), los linfocitos T y los macrófagos. El IFN-alfa recombinante está disponible en el mercado como Roferon (Roche Pharmaceuticals) e Intron A (Schering Corporation). El uso de IFN-alfa, solo o en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos o con agentes quimioterapéuticos, ha demostrado eficacia en el tratamiento de diversos cánceres, incluyendo el melanoma (incluyendo el melanoma metastásico), cáncer renal (incluyendo el cáncer renal metastásico), cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de cuello uterino (incluyendo el cáncer de cuello uterino metastásico).

20 Las interleucinas contempladas por la presente invención incluyen IL-2, IL-4, IL-11 e IL-12. Los ejemplos de interleucinas recombinantes disponibles en el mercado incluyen Proleukin<sup>®</sup> (IL-2; Chiron Corporation) y Neumega<sup>®</sup> (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Washington) está ensayando en la actualidad una forma recombinante de IL-21, que también se contempla para su uso en las combinaciones de la presente invención. Las interleucinas, solas o en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos o quimioterapéuticos, han demostrado ser eficaces en el tratamiento de diversos cánceres, incluyendo el cáncer renal (incluyendo el cáncer renal metastásico), melanoma (incluyendo el melanoma metastásico), cáncer de ovario (incluyendo cáncer de ovario recurrente), cáncer de cuello uterino (incluyendo el cáncer de cuello uterino metastásico), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer cerebral y cáncer de próstata.

30 Las interleucinas también han mostrado buena actividad en combinación con IFN- $\alpha$  en el tratamiento de diversos cánceres (Negrier *et al.*, *Ann Oncol.* 200213 (9): 1460-8; Touranietal, *J. Clin Oncol.* 200321 (21): 398794).

35 Los factores estimulantes de colonias (CSF) contemplados por la presente invención incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF o filgrastim), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF o sargramostim) y eritropoyetina (epoyetina alfa, darbepoyetina). El tratamiento con uno o más factores de crecimiento puede ayudar a estimular la generación de nuevas células sanguíneas en pacientes sometidos a quimioterapia tradicional. Por consiguiente, el tratamiento con CSF puede ser útil para disminuir los efectos secundarios asociados con la quimioterapia, y puede permitir el uso de dosis más altas de agentes quimioterapéuticos. Hay varios factores recombinantes de estimulación de colonias disponibles en el mercado, por ejemplo, Neupogen<sup>®</sup> (G-CSF; Amgen), Neulasta (pelfilgrastim; Amgen), Leukine (GM-CSF; Berlex), Procrit (eritropoyetina; Ortho Biotech), Epogen (eritropoyetina; Amgen), Arnesp (eritropoyetina). Los factores estimulantes de colonias han demostrado eficacia en el tratamiento del cáncer, incluyendo el melanoma, el cáncer colorrectal (incluyendo el cáncer colorrectal metastásico) y el cáncer de pulmón.

45 Los adyuvantes no citocínicos adecuados para su uso en las combinaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, levamisol, hidróxido de alumbre (alumbre), bacilo de Calmette-Guerin (ACG), adyuvante de Freund incompleto (IFA), QS-21, DETOX, hemocianina de lapa californiana (KLH) y dinitrofenilo (DNP). Los adyuvantes no citocínicos en combinación con otros inmuno y/o quimioterapéuticos han demostrado eficacia contra diversos cánceres que incluyen, por ejemplo, cáncer de colon y cáncer colorrectal (Levamisol); melanoma (BCG y QS-21); cáncer renal y cáncer de vejiga (BCG).

50 Además de tener dianas específicas o no específicas, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser activos, es decir, estimular la propia respuesta inmunitaria del organismo, o pueden ser pasivos, es decir, comprenden componentes del sistema inmunitario que se generaron en el exterior del organismo.

55 La inmunoterapia específica pasiva, en general, implica el uso de uno o más anticuerpos monoclonales que son específicos de un determinado antígeno que se encuentra en la superficie de una célula cancerosa o que son específicos de un determinado factor de crecimiento celular. Los anticuerpos monoclonales se pueden usar en el tratamiento del cáncer de varias maneras, por ejemplo, para mejorar la respuesta inmunitaria de un sujeto a un tipo específico de cáncer, para interferir con el crecimiento de las células cancerosas dirigiéndose a factores de crecimiento celular específicos, tales los que participan en la angiogénesis o potenciando la administración de otros agentes anticancerosos a las células cancerosas cuando se unen o se conjugan a agentes tales como agentes quimioterapéuticos, partículas radiactivas o toxinas.

65 Los anticuerpos monoclonales usados en la actualidad como agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer que son adecuados para su inclusión en las combinaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, rituximab (Rituxan<sup>®</sup>), trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>), ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>), tositumomab (Bexxar<sup>®</sup>), cetuximab (C-225,

Erbitux®), bevacizumab (Avastin®), gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®) y BL22. Los anticuerpos monoclonales se usan en el tratamiento de una amplia selección de cánceres incluyendo cáncer de mama (incluyendo el cáncer de mama metastásico avanzado), cáncer colorrectal (incluyendo el cáncer colorrectal avanzado y/o metastásico), cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, melanoma y tumores cerebrales.

Otros ejemplos incluyen anticuerpos específicos de una molécula coestimulante. Las moléculas coestimulantes incluyen, por ejemplo, B7-1/CD80, CD28, B7- 2/CD86, CTLA-4, B7-H1/PD-L1, Gi24/Dies 1/VISTA, B7-H2, ICOS, B7-H3 PD-1, B7- H4, PD-L2/B7-DC, B7-H6, PDCD6, BTLA, 4-1 BB/TNFRSF9/CD137, CD40 Ligando/TNFSF5, 4-1BB Ligando/TNFSF9 GITR/TNFRSF18, HVEM/TNFRSF14, CD27/TNFRSF7, LIGHT/TNFSF14, CD27 Ligando/TNFSF7, OX40/TNFRSF4, CD30/TNFRSF8, OX40 Ligando/TNFSF4, CD30 Ligando/TNFSF8, TACI/TNFRSF13B, CD40/TNFRSF5, 2B4/CD244/SLAMF4 CD84/SLAMF5, BLAME/SLAMF8, CD229/SLAMF3, CD2CRACC/SLAMF7, CD2F-10/SLAMF9 NTB-A/SLAMF6, CD48/SLAMF2, SLAM/CD 150, CD58/LFA-3, CD2 Ikaros, CD53 Integrina alfa 4/CD49d, CD82/Kai-1 Integrina alfa 4 beta 1, CD90/Thyl Integrina alfa 4 beta 7/LPAM-1, CD96 LAG-3, CD160 LMIR1/CD300A, CRTAM TCL1A, DAP 12 TCL1B, Dectin-1/CLEC7A TIM-1/KIM- 1/HAVCR, DPPIV/CD26 TIM-4, EphB6 TSLP, HLA Clase I TSLP R, HLA-DR. En particular, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-CTLA4 (por ejemplo, Ipilimumab), anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-PDL1, anticuerpos anti-TIMP3, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7H3, anticuerpos anti-B7H4, anticuerpos anti-TREM, anticuerpos anti-BTLA, anticuerpos anti-LIGHT o anticuerpos anti-B7H6.

Los anticuerpos monoclonales se pueden usar solos o en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos o agentes quimioterapéuticos.

La inmunoterapia específica activa, en general, implica el uso de vacunas contra el cáncer. Se han desarrollado vacunas contra el cáncer que comprenden células cancerosas completas, partes de células cancerosas, o uno o más antígenos derivados de células cancerosas. Se están investigando vacunas contra el cáncer, solas o en combinación con uno o más agentes inmuno- o quimioterapéuticos en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo melanoma, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos son útiles en combinación con las vacunas contra el cáncer para mejorar la respuesta inmunitaria del organismo.

El tratamiento inmunoterapéutico puede consistir en una inmunoterapia adoptiva según lo descrito por Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley y Steven A. Rosenberg "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response", *Nature Reviews Immunology*, volumen 12, abril de 2012). En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos en circulación del paciente o los linfocitos infiltrados en el tumor se aíslan *in vitro*, se activan con linfocinas tales como IL-2 o se transmutan con genes para la necrosis tumoral, y se vuelven a administrar (Rosenberg *et al.*, 1988; 1989). Lo más preferentemente, los linfocitos activados son las propias células del paciente que se aislaron anteriormente de una muestra de sangre o tumor y se activaron (o "expandieron") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanoma y carcinoma renal.

La expresión "agente radioterapéutico", como se usa en el presente documento, pretende referirse a cualquier agente radioterapéutico conocido por los expertos en la materia que sea eficaz para tratar o mejorar el cáncer, sin limitación. Por ejemplo, el agente radioterapéutico puede ser un agente tal como los administrados en braquiterapia o terapia con radionucleidos.

Dichos métodos pueden comprender opcionalmente además la administración de una o más terapias contra el cáncer adicionales, tales como, entre otras, quimioterapias y/u otra radioterapia y/u otra inmunoterapia.

Un objeto adicional de la invención se refiere a kits para realizar los métodos de la invención, en los que dichos kits comprenden medios para medir el nivel de expresión de los 21 genes de la invención en la muestra obtenida del paciente, en los que dichos medios consisten en un conjunto de reactivo específico del conjunto de dichos 21 genes, y en los que los reactivo se seleccionan del grupo que consiste en sondas, cebadores y anticuerpos específicos de cada uno de dichos 21 genes.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un kit para realizar los métodos de la invención que comprende medios para determinar el nivel de expresión de al menos 7 genes seleccionados del grupo que consiste en CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21, en el que dichos medios son reactivos selectivos del grupo que consiste en sondas, cebadores y anticuerpos que son específicos de cada uno de dichos al menos 7 genes.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un kit que comprende medios para determinar el nivel de expresión de al menos 21 genes CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21, en el que dichos medios consisten en un conjunto de reactivo específico del conjunto de dichos 21 genes, y en el que los reactivos se seleccionan del grupo que consiste en sondas, cebadores y anticuerpos que son específicos de cada uno de dichos 21 genes.

Los kits pueden incluir sondas, micromatrices de cebadores o micromatrices como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el kit puede comprender un conjunto de sondas como las definidas anteriormente, en general, hechas de ADN, y que pueden marcarse previamente. Como alternativa, las sondas pueden estar sin marcar y los ingredientes para el marcaje pueden incluirse en el kit, en recipientes separados. El kit puede comprender además reactivos de hibridación u otros reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para el protocolo de hibridación particular, incluyendo matrices en fase sólida, si corresponde, y patrones. Como alternativa, el kit de la invención puede comprender cebadores de amplificación que pueden estar previamente marcados o pueden contener un resto de purificación o de unión por afinidad. El kit puede comprender además reactivos de amplificación y también otros reactivos y materiales envasados adecuadamente que sean necesarios para el protocolo de amplificación particular.

La invención se ilustrará además mediante las siguientes figuras y ejemplos.

### Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra el tiempo de supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal no metastásico separados en 2 grupos: "niveles bajos" para pacientes que tenían una puntuación de 10-110 y "niveles altos" para pacientes que tenían una puntuación de 111-121.

La **Figura 2** muestra el tiempo de supervivencia de pacientes con un cáncer colorrectal no metastásico separados en 2 grupos: "niveles bajos" para pacientes que tenían una puntuación de 10-110 y "niveles altos" para pacientes que tenían una puntuación de 111-121. Los pacientes recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("QUIMIO") o no recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("NO").

La **Figura 3** muestra el tiempo de supervivencia de pacientes (Supervivencia Global (SG)) con cáncer colorrectal metastásico separados en 2 grupos: "niveles bajos" para pacientes que tenían una puntuación de 10-110 y "niveles altos" para pacientes que tenían una puntuación de 111-121.

La **Figura 4** muestra el tiempo de supervivencia de pacientes (Supervivencia Global (SG)) con cáncer colorrectal metastásico separados en 2 grupos: "niveles bajos" para pacientes que tenían una puntuación de 10-110 y "niveles altos" para pacientes que tenían una puntuación de 111-121. Los pacientes recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("QUIMIO") o no recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("NO").

La **Figura 5** muestra el tiempo de supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal no metastásico avanzado precoz (Fase II según TNM) separados en 2 grupos: "niveles bajos" para pacientes que tenían una puntuación de 10-110 y "niveles altos" para pacientes que tenían una puntuación de 111-121.

La **Figura 6** muestra el tiempo de supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal no metastásico avanzado precoz (Fase II según TNM) separados en 2 grupos: "niveles bajos" para pacientes que tenían una puntuación de 10-110 y "niveles altos" para pacientes que tenían una puntuación de 111-121. Los pacientes recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("QUIMIO") o no recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("NO").

La **Figura 7** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de una primera cohorte de pacientes ("Serie IPC") con un cáncer de mama separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para pacientes con una puntuación de 10-110 y "niveles altos" (A) para pacientes con una puntuación de 111-121 determinada con 21 genes. La serie IPC contenía muestras de tumores congeladas obtenidas de 266 pacientes con cáncer de mama precoz que se sometieron a cirugía inicial entre 1992 y 2004. Los datos de expresión génica de 266 cánceres de mama se cuantificaron usando micromatrices de ADN del genoma completo (HG-U133 plus 2.0, Affymetrix). (Sabatier R., Finelli P., Cervera N., Lambaudie E. *et al.* "A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer". *Breast cancer Res Treat*, abril de 2011; 126(2):407-20. PMID: 20490655).

La **Figura 8** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de una primera cohorte de pacientes ("Serie IPC") con un cáncer de mama separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para pacientes con una puntuación de 10-13 y "niveles altos" (A) para pacientes con una puntuación de 14-17 determinada con 7 genes. (CCR2, GZMB, GZMK, ICOS, STAT1, STAT4, TBX21). La serie IPC contenía muestras de tumores congeladas obtenidas de 266 pacientes con cáncer de mama precoz que se sometieron a cirugía inicial entre 1992 y 2004. Los datos de expresión génica de 266 cánceres de mama se cuantificaron usando micromatrices de ADN del genoma completo (HG-U133 plus 2.0, Affymetrix). (Sabatier R., Finelli P., Cervera N., Lambaudie E. *et al.* "A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer". *Breast cancer Res Treat*, abril de 2011; 126(2):407-20. PMID: 20490655).

La **Figura 9** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de una cohorte de pacientes con un cáncer de mama separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-19 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 110-118 determinada con 18 genes (CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, CD69, ICOS, CXCR3, y STAT4). La cohorte comprende 183 tumores de mama del Hospital Central de la Universidad de Helsinki con información sobre supervivencia (Heikkinen T., Greco D., Pelttari L. M., Tommi ska J. *et al.*,

"Variants on the promoter region of PTEN affect breast cancer progression and patient survival". *Breast cancer Res* 2011; 13 (6):R130. PMID: 22171747). Se extrajo el ARN total de los tumores de mama primarios de los 183 pacientes. Las muestras se procesaron e hibridaron con Illumina HumanHT-12 v3 Expression BeadChips.

5 La **Figura 10** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de pacientes que tienen un cáncer de cuello uterino separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-18 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 19-116 determinada con 16 genes (CD3E, CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2, y TBX21). La cohorte comprende 48 cánceres de cuello uterino de mujeres que fueron tratadas en la Universidad de Medicina de Innsbruck entre 1990 y 2006. Las muestras se procesaron e hibridaron con Illumina Infinium 27k Human DNA methylation Beadchip v1.2. (Teschendorff A. E., Jones A., Fiegl H., Sargent A. *et al.* "Epigenetic variability in cells of normal cytology is associated with the risk of future morphological transformation". *Genome Med*, 27 de marzo de 2012; 4(3):24. PMID: 22453031).

15 La **Figura 11** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de pacientes que tienen un carcinoma hepatocelular separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-17 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 18-114 determinada con 14 genes (CCR2, CD3D, CD3E, CD8A, CXCL10, GZMA, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, CXCR3, y STAT4). La cohorte comprende 118 tejidos tumorales extirpados quirúrgicamente de pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) (Hoshida Y, Nijman S. M., Kobayashi M., Chan J A. *et al.* "Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma". *cancer Res*, 15 de septiembre de 2009; 69(18):7385-92. PMID: 19723656).

25 La **Figura 12** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) en pacientes que tienen un cáncer de pulmón separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-110 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 111-121 determinada con 21 genes. Se realizó la determinación del perfil de expresión génica en ARNm aislado de 90 muestras de tumor JBR.10 congeladas (bien de pacientes en observación [OBS] o tratados con adyuvante cisplatino/vinorelbina (ACT)) (Zhu C. Q., Ding K., Strumpf D., Weir B. A. *et al.* "Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non smallcell lung cancer". *J Clin Onco*/10 de octubre de 2010; 28(29): 4417-24. PMID: 20823422). Los datos de expresión génica se cuantificaron usando micromatrices de ADN del genoma completo (HG-U133 plus 2.0, Affymetrix).

35 La **Figura 13** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de pacientes que tienen un cáncer de pulmón separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-18 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 19-117 determinada con 17 genes (CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, STAT4, y CCL2). Se realizó la determinación del perfil de expresión génica en el ARNm aislado de 90 muestras de tumor JBR.10 congeladas (bien de pacientes en observación [OBS] o tratados con adyuvante cisplatino/vinorelbina (ACT)) (Zhu C. Q., Ding K., Strumpf D., Weir B. A. *et al.* "Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer". *J Clin Onco*/10 de octubre de 2010; 28(29): 4417-24. PMID: 20823422). Los datos de expresión génica se cuantificaron usando micromatrices de ADN del genoma completo (HG-U133 plus 2.0, Affymetrix).

45 La **Figura 14** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) en una cohorte de 44 pacientes que tienen un melanoma separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-110 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 111-121 determinada con 21 genes. Los datos se establecieron de la cohorte descrita en Bogunovic D., O'Neill D. W., Belitskaya-Levy I., Vacic v *et al.* "Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance eli ni cal staging in predicting patient survival". *P roc Nat/Acad Sci*, EE.UU. 1 de diciembre de 2009; 106(48): 20429-34. PMID: 19915147.

55 La **Figura 15** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) en una cohorte de 44 pacientes que tienen un melanoma separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-18 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 19-116 determinada con 16 genes (CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IRF1, PRF1, CD69, ICOS, CXCR3 y TBX21). Los datos se establecieron de la cohorte descrita en Bogunovic D., O'Neill D. W., Belitskaya-Levy I., Vacic v *et al.* "Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance eli ni cal staging in predicting patient survival". *Proc Nat/Acad Sci* EE.UU., 1 de diciembre de 2009; 106 (48):20429-34. PMID: 19915147.

60 La **Figura 16** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) en una cohorte de 57 pacientes que tienen un melanoma (melanomas en fase IV) separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-110 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 111-121 determinada con 21 genes. Los datos de expresión génica global proceden de 57 pacientes (Jonsson G., Busch c., Knappskog s., Geisler J. *et al.* "Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome". *Clin cancer Res*, 1 de julio de 2010; 16(13): 3356-67. PMID:

20460471).

La **Figura 17** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de pacientes que tienen un cáncer de ovario separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-18 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 19-117 determinada con 17 genes (CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2, y TBX21). La cohorte comprende dieciséis carcinomas ováricos en fase precoz y dieciséis en fase avanzada, emparejados por subtipo histológico y grado de diferenciación (Zaal A., Peyrot W. J., Berns P. M., van der Burg M. E., Veerbeek J. H., Trimbos J. B., Cadron I., van Diest P. J., van Wieringen W. N., Krijgsman O., Meijer G. A., Piek J. M., Timmers P. J., Vergote I., Verheijen R. H., Ylstra B., Zweemer R. P.; EORTC "GCG Translational Research Group. Genomic aberrations relate early and advanced stage ovarian cancer". *Cell Oncol* (Dordr). Junio de 2012; 35(3):181-8. doi: 10.1007/s13402-012-0077-5. Epub, 12 de mayo de 2012).

La **Figura 18** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de pacientes que tienen un cáncer de ovario separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-16 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 17-113 determinada con 13 genes (CD3E, CD3G, CXCL10, CXCL11, GZMB, GZMK, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, CCL2 y TBX21). La cohorte comprende dieciséis carcinomas ováricos en fase precoz y dieciséis en fase avanzada, emparejados por subtipo histológico y grado de diferenciación (Zaal A., Peyrot W. J., Berns P. M., van der Burg M. E., Veerbeek J. H., Trimbos J. B., Cadron I., van Diest P. J., van Wieringen W. N., Krijgsman O., Meijer G. A., Piek J. M., Timmers P. J., Vergote I., Verheijen R. H., Ylstra B., Zweemer R. P.; EORTC "GCG Translational Research Group. Genomic aberrations relate early and advanced stage ovarian cancer". *Cell Oncol* (Dordr). Junio de 2012; 35(3):181-8. doi: 10.1007/s13402-012-0077-5. Epub 12 de mayo de 2012).

La **Figura 19** muestra el tiempo de supervivencia (DFS en meses) de pacientes que tienen un cáncer de páncreas separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-17 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 18-114 determinada con 14 genes (CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, STAT4, y TBX21). La cohorte comprende 15 pacientes con PDAC primario extirpado del Programa Pancreático de Autopsia Rápida del Centro Médico de Nebraska (NEB) (Stratford J. K., Bentrem D. J., Anderson J. M., Fan c *et al.* "A six-gene signature predicts survival of patients with localized pancreatic ductal adenocarcinoma". *PLoS Med* 13 de Julio de 2010; 7(7) :e1000307. PMID: 20644708).

La **Figura 20** muestra el tiempo de supervivencia de pacientes (Supervivencia Global (SG)) con cáncer de pulmón no metastásico separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para pacientes que tenían una puntuación de 10-110 y "niveles altos" (A) para pacientes que tienen una puntuación de 111-121. Los pacientes recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("QUIMIO") o no recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("NO").

La **Figura 21** muestra el tiempo de supervivencia de pacientes con cáncer de ovario metastásico (fase III/IV) separados en 2 grupos: "niveles bajos" (B) para los pacientes que tienen una puntuación de 10-110 y "niveles altos" (A) para los pacientes que tienen una puntuación de 111-121. Los pacientes recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("QUIMIO") o no recibieron un tratamiento quimioterapéutico ("NO").

**EJEMPLO 1:**

**Material y métodos**

**Pacientes y base de datos:**

Se revisaron los registros de pacientes con cáncer colorrectal (CRC) que se sometieron a una extirpación primaria de su tumor en los Hospitales Laennec-HEGP entre 1996 y 2004 y se describieron previamente (Galon *et al.*, 2006). Se seleccionaron muestras de tumores congelados disponibles de Hospitales Laennec-HEGP desde 1996-2004, con suficiente calidad y cantidad de ARN (cohorte de validación 1, n = 108). Las muestras de ARN analizadas fueron de 108 pacientes diferentes. Estos pacientes se usaron para experimentos de expresión génica (cohorte de Taqman). El tiempo de observación en las cohortes fue el intervalo entre el diagnóstico y el último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos fueron censurados en el último seguimiento para pacientes sin recaída o muerte. Los valores mín:máx hasta la progresión/muerte o el último seguimiento fueron (0:136) meses, respectivamente. Tres pacientes de quienes no se disponía de datos de seguimiento no fueron excluidos del análisis de supervivencia. El tiempo hasta la recurrencia o el tiempo libre de enfermedad se definieron como el intervalo entre la fecha de la cirugía y la fecha de recidiva tumoral confirmada para los pacientes con recaídas y desde la fecha de la cirugía hasta la fecha del último seguimiento para los pacientes libres de enfermedad.

Los hallazgos histopatológicos y clínicos se puntuaron de acuerdo con el sistema de determinación de la fase UICC-TNM. Se realizó la vigilancia posquirúrgica de pacientes en los Hospitales Laennec-HEGP para todos los pacientes de acuerdo con la práctica general de pacientes con CRC. Se administró quimioterapia adyuvante o no a pacientes con CRC en fases II y III, y quimioterapia paliativa a pacientes con cáncer colorrectal avanzado (fase IV) y a

pacientes sin la extirpación completa del tumor. La quimioterapia adyuvante se basó en fluorouracilo (FU). Los datos de seguimiento se recopilaron prospectivamente y se actualizaron. Se construyó una base de datos segura basada en la Web, TME.db (Base de datos Tumor MicroEnvironment), en una arquitectura de 3 niveles usando Java-2 Edición Enterprise (J2EE) para integrar los datos clínicos y los datos de tecnologías de alto rendimiento.

### **Análisis de la expresión génica:**

Las muestras de tejido se congelaron rápidamente en el transcurso de los 15 minutos posteriores a la cirugía y se almacenaron en nitrógeno líquido. Se seleccionaron muestras de tumores congeladas (cohorte 1, n = 108) de pacientes seleccionados aleatoriamente disponibles en Hospitales Laennec-HEGP (1996-2004), con suficiente calidad y cantidad de ARN, para el análisis de expresión génica. Las muestras de ARN analizadas fueron de 108 pacientes diferentes. El ARN total se aisló por homogeneización con el kit de aislamiento RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). La integridad y la cantidad del ARN se evaluaron en un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Los experimentos de RT-PCR se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied-Biosystems, Foster City, CA). La TaqMan-PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando series de baja densidad y el sistema de PCR robótico en tiempo real 7900 (Applied-Biosystems). Se usaron cebadores y la sonda de ARN ribosómico 18S como control interno. Los análisis de expresión génica se realizaron usando valores de Ct (ciclo umbral) normalizados con respecto al ARN ribosómico 18S (ACT). Los datos se analizaron usando el SDS Software v2.2 (Applied-Biosystems) y el módulo estadístico TME.

### **Resultados**

Se determinaron los niveles de expresión (EL) de los genes CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX2 en las muestras tumorales. Los valores de referencia predeterminados (ELR) se determinaron previamente de acuerdo con el documento WO2007045996 y Jérôme Galon, *et al.* ("Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome Science" 313, 1960 (2006); DOI: 10.1126/science.1129139). A continuación, se construyó una puntuación de la siguiente manera: 10 cuando el gen 0 tiene su nivel de expresión más alto que su valor de referencia predeterminado (es decir, todos los genes tienen sus niveles de expresión inferiores a sus niveles de referencia predeterminados) e ln (11-121) cuando n genes tienen su nivel de expresión más alto que su respectivo valor de referencia predeterminado. En aras de la claridad en la interpretación de los resultados, se separaron a los pacientes en 2 grupos: "niveles bajos" para pacientes con una puntuación de 10-110 y "niveles altos" para pacientes con una puntuación de 111-121. A continuación, se trazaron las curvas KM para los 2 grupos de pacientes. Los resultados se representan en las Figuras 1-6. Se determinó que cuanto mayor fuera la puntuación, mayor sería el tiempo de supervivencia de los pacientes, cualquiera que fuera la fase del paciente (pacientes no metastásicos o metastásicos) (Figuras 1, 3 y 4). Curiosamente, para el cáncer colorrectal no metastásico, se determinó que los pacientes que tenían una puntuación alta se beneficiaron ventajosamente de un tratamiento quimioterapéutico en comparación con los pacientes que tenían una puntuación baja (Figura 2). Por el contrario, para el cáncer colorrectal metastásico, se determinó que los pacientes que tenían una puntuación baja se beneficiaban ventajosamente de un tratamiento quimioterapéutico en comparación con los pacientes que tenían una puntuación alta (Figura 4). Curiosamente, para el cáncer colorrectal avanzado no metastásico precoz (fase II) se determinó que los pacientes con una puntuación alta se beneficiaron ventajosamente de un tratamiento quimioterapéutico en comparación con los pacientes que tenían una puntuación baja (Figura 6). Por consiguiente, para dicha categoría de pacientes para los que no existe una pauta actual para seleccionar los pacientes elegibles como pacientes quimioterapéuticos, el distintivo identificado sería muy útil para determinar si un paciente recibiría ventajosamente un tratamiento quimioterapéutico.

### **EJEMPLO 2:**

Se validó el distintivo de 21 genes identificados en el EJEMPLO 1 para predecir el tiempo de supervivencia de pacientes que padecían cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario o cáncer de páncreas (véanse, por ejemplo, las Figuras 7, 12, 14 y 16). También se determinaron los distintivos mínimos de al menos 7 genes (véanse las Figuras 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 18 y 19).

### **EJEMPLO 3:**

La Figura 20 ilustra pacientes con cáncer de pulmón en etapa IB-IIIV (NSCLC), en la que los pacientes con un distintivo genético inmune adaptativo "A" tienen una supervivencia prolongada y no necesitan tratamiento de quimioterapia (ningún beneficio del tratamiento de quimioterapia). Se puede observar un efecto beneficioso significativo del tratamiento de quimioterapia en pacientes con un distintivo genético inmune adaptativo "B".

La Figura 21 ilustra pacientes con cáncer de ovario en etapa III/IV (NSCLC), en la que los pacientes con un distintivo genético inmune adaptativo "A" se benefician significativamente del tratamiento quimioterapéutico. Por el contrario, los pacientes con un distintivo genético inmune adaptativo "B" tienen una supervivencia prolongada y no necesitan tratamiento de quimioterapia (no se benefician del tratamiento de quimioterapia)

## REIVINDICACIONES

1. Un método de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de al menos 7 genes seleccionados del grupo que consiste en CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido, que comprende: i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de mama, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, GZMB, GZMK, STAT1, ICOS, STAT4 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de mama, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, CD69, ICOS, CXCR3 y STAT4; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de cuello uterino, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CD3E, CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un carcinoma hepatocelular, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD8A, CXCL10, GZMA, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, CXCR3 y STAT4; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de pulmón, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, STAT4 y CCL2; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de

referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o

el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un melanoma, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IRF1, PRF1, CD69, ICOS, CXCR3 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o

el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de ovario, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o

el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de ovario, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CD3E, CD3G, CXCL10, CXCL11, GZMB, GZMK, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado; o

el método de acuerdo con la reivindicación 1 de predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer de páncreas, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CD3G, CD8A, CXCL11, GZMA, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, ICOS, CXCR3, STAT4 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o proporcionar un mal pronóstico cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados o proporcionar un pronóstico intermedio cuando al menos un valor determinado de nivel de expresión sea superior a su valor predeterminado y al menos un valor determinado de nivel de expresión sea inferior a su valor predeterminado.

3. Un método de determinación de si un paciente que padece cáncer sólido responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de al menos 7 genes seleccionados del grupo que consiste en CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados, en el que dicho cáncer sólido no es un cáncer colorrectal metastásico ni un cáncer pulmonar no metastásico.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 de determinación de si un paciente que padece cáncer sólido responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4 de determinación de si un paciente que padece un cáncer colorrectal no metastásico responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB,

- 5 GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o concluir que el paciente no responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados.
- 10 6. Un método de determinación de si un paciente con un cáncer colorrectal metastásico responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o concluir que el paciente no responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados.
- 15 7. Un método de determinación de si un paciente con un cáncer de pulmón no metastásico responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o concluir que el paciente no responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados.
- 20 25 8. El método de acuerdo con la reivindicación 4 de determinación de si un paciente que padece un cáncer de ovario metastásico responderá a un tratamiento, que comprende i) determinar, en una muestra tumoral obtenida del paciente, el nivel de expresión génica de CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21; ii) comparar cada nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado; e iii) concluir que el paciente responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean superiores a sus valores de referencia predeterminados; o concluir que el paciente no responderá significativamente al tratamiento cuando todos los niveles de expresión determinados en la etapa i) sean inferiores a sus valores de referencia predeterminados.
- 30 35 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que el tratamiento se selecciona del grupo que consiste en radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.
- 40 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que el tratamiento es una terapia adyuvante o neoadyuvante.
- 45 11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el tratamiento es una inmunoterapia con un agente inmunoterapéutico seleccionado del grupo que consiste en citocinas, interleucinas, células inmunes, vacunas contra el cáncer, anticuerpos monoclonales y adyuvantes no citocínicos.
- 50 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo monoclonal.
- 55 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-PDL1, anticuerpos anti-TIMP3, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7H3, anticuerpos anti-B7H4, anticuerpos anti-TREM, anticuerpos anti-BTLA y anticuerpos anti-B7H6.
- 60 14. Uso de un kit que comprende medios para determinar el nivel de expresión de al menos 7 genes seleccionados del grupo que consiste en CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21, para realizar el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dichos medios son reactivos selectivos seleccionados del grupo que consiste en sondas, cebadores y anticuerpos que son específicos de cada uno de dichos al menos 7 genes.
- 65 15. Un kit que comprende medios para determinar específicamente el nivel de expresión de los 21 genes CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, PRF1, STAT1, CD69, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21, en el que dichos medios consisten en un conjunto de reactivo específico del conjunto de dichos 21 genes, y en el que los reactivos se seleccionan del grupo que consiste en sondas, cebadores y anticuerpos específicos de cada uno de dichos 21 genes.

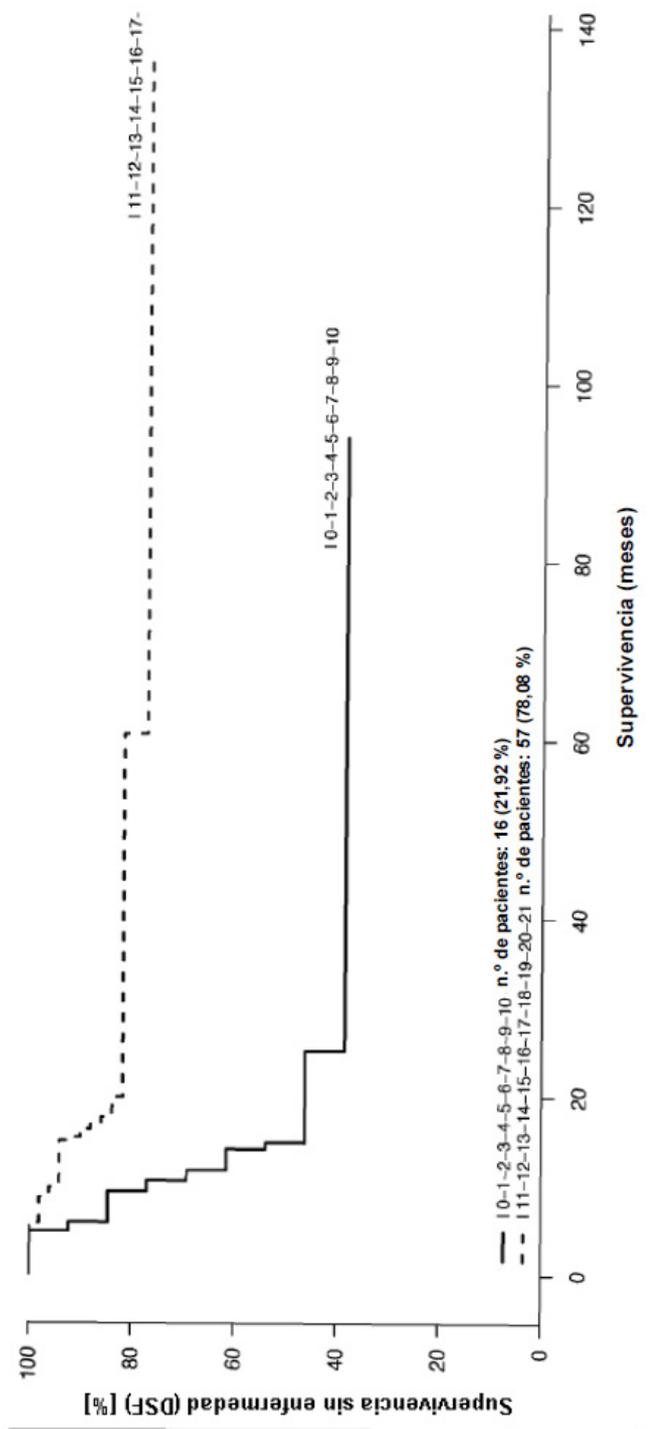


Figura 1

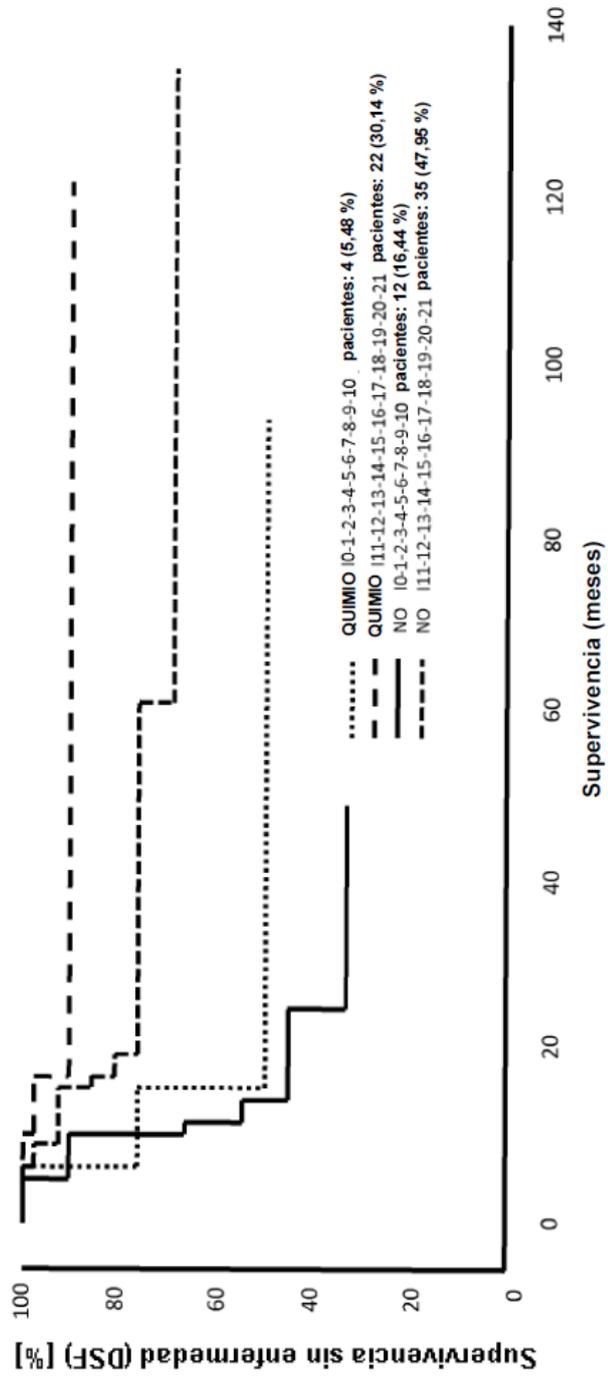


Figura 2

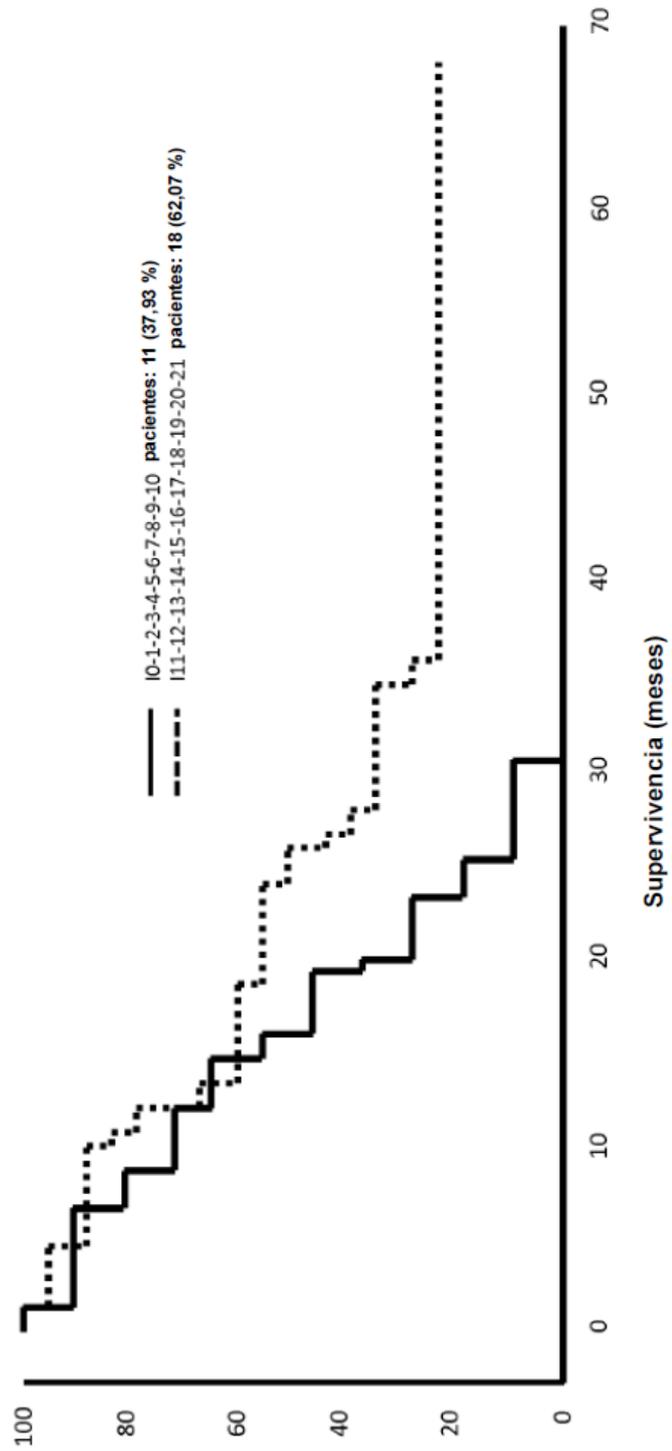


Figura 3

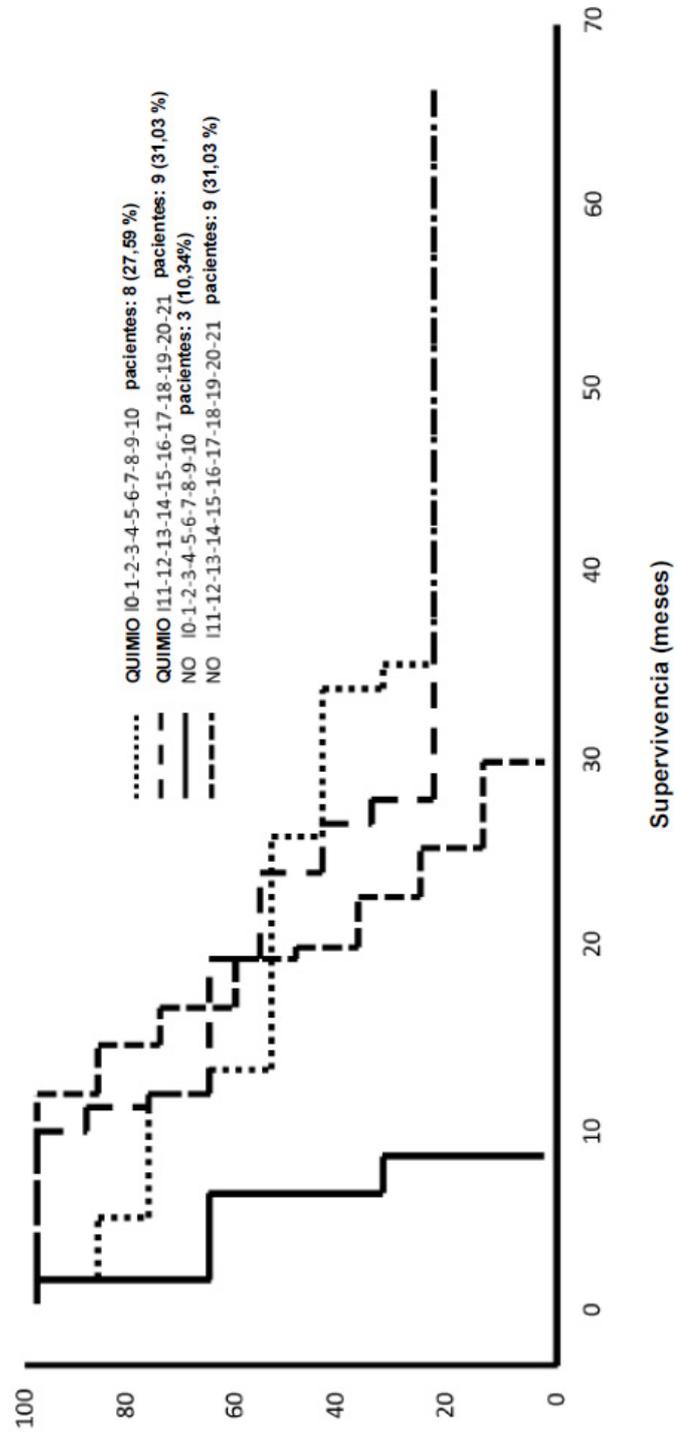


Figura 4

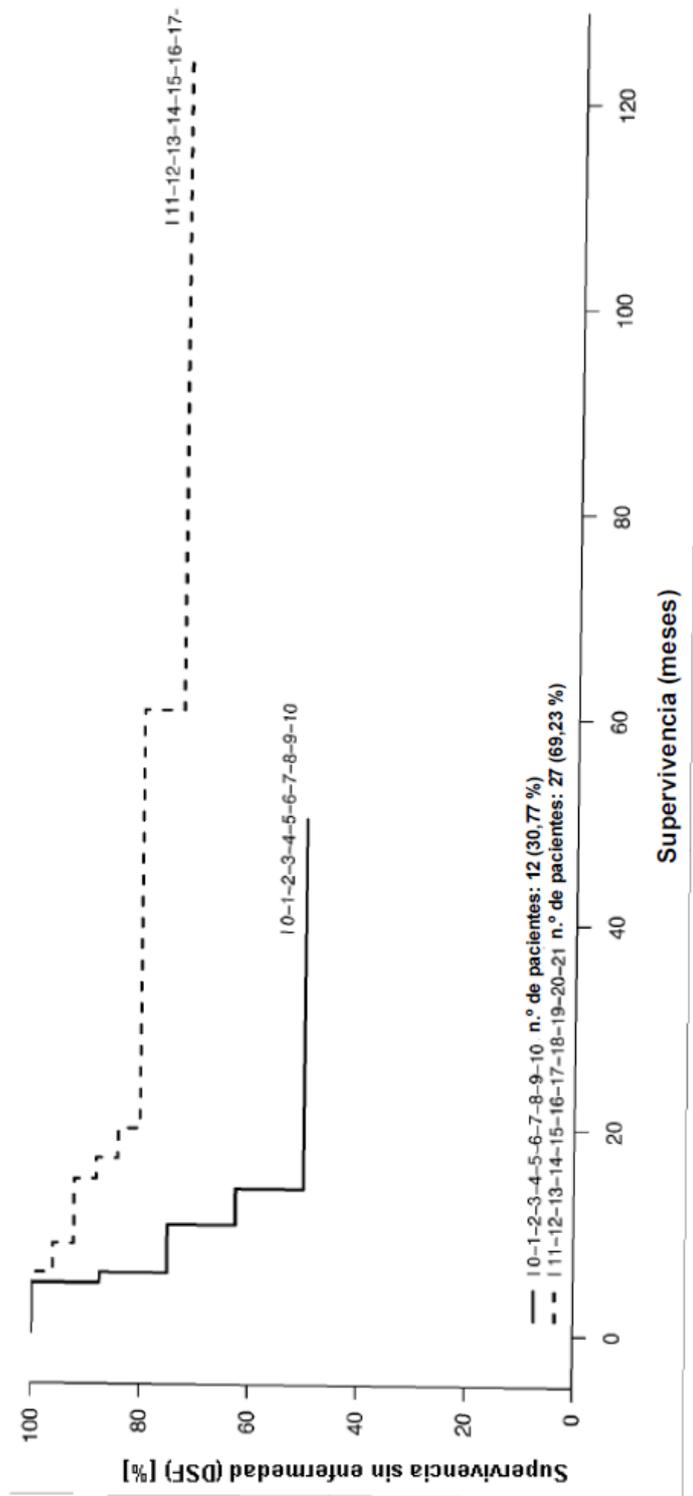


Figura 5

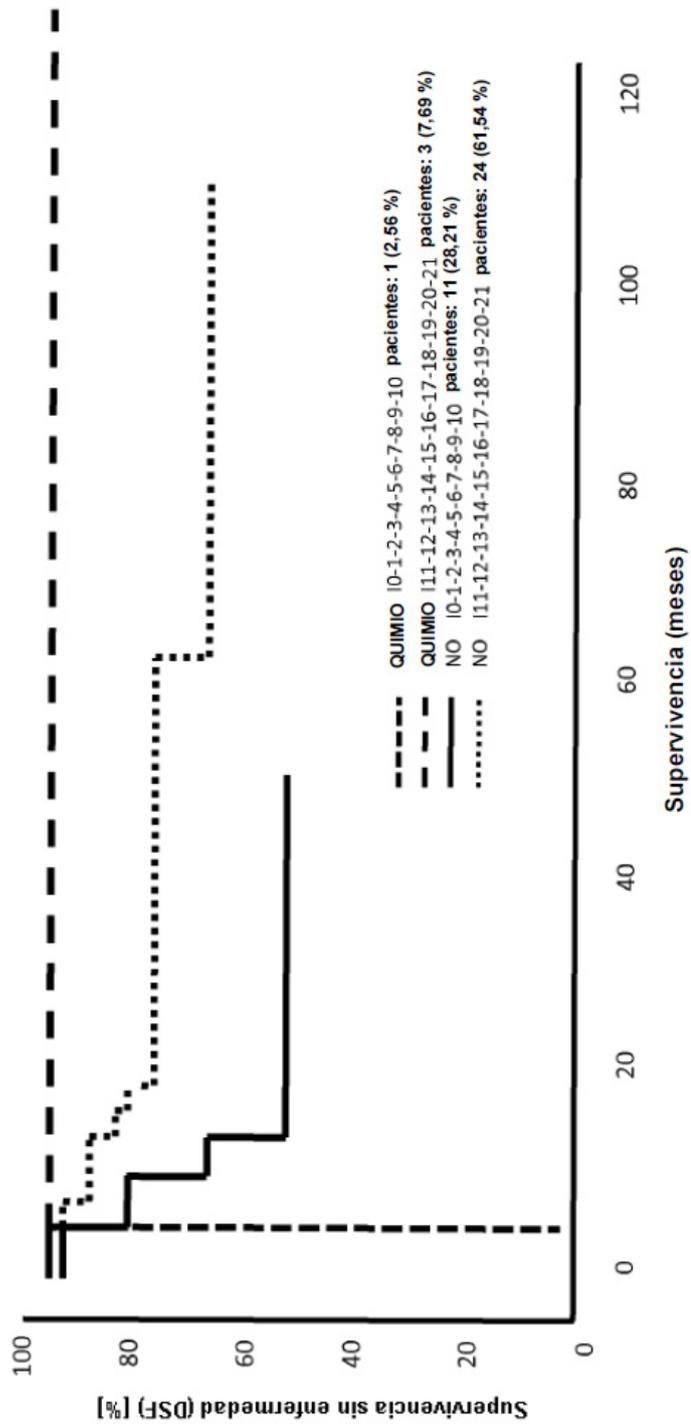


Figura 6

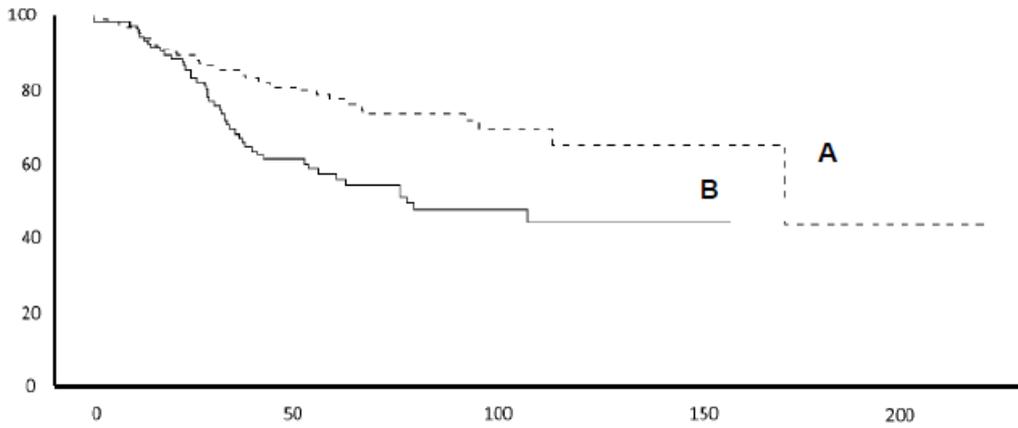


Figura 7

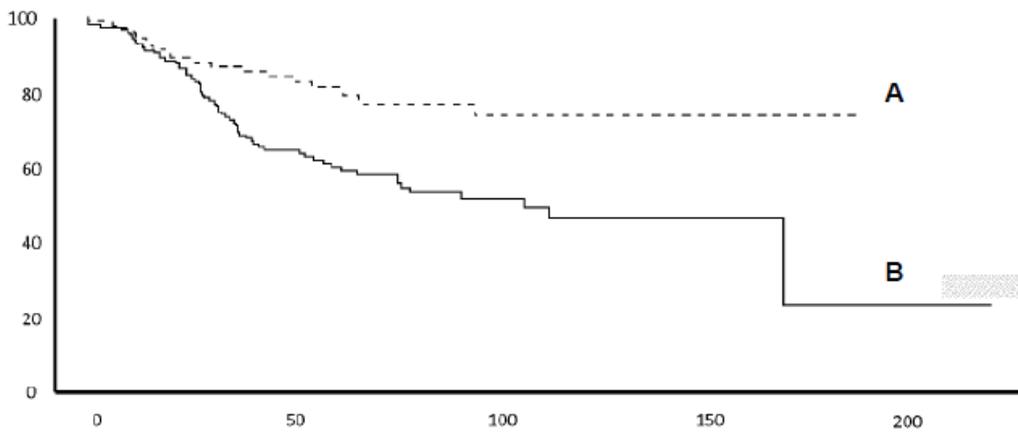


Figura 8

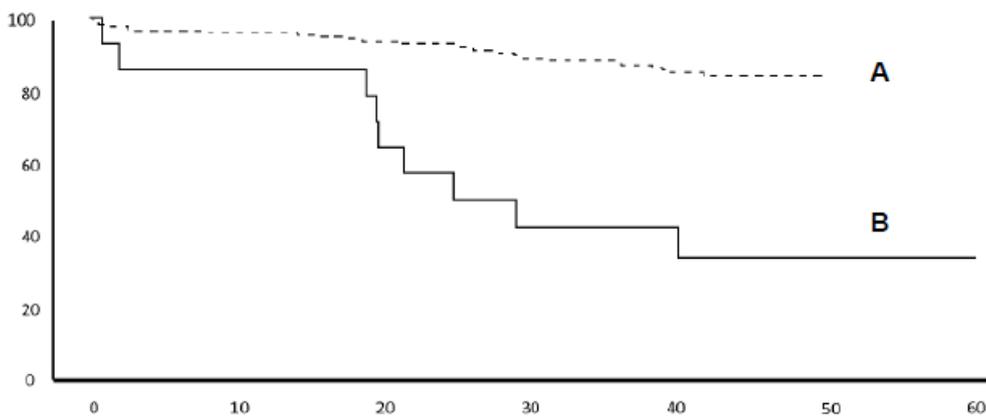


Figura 9

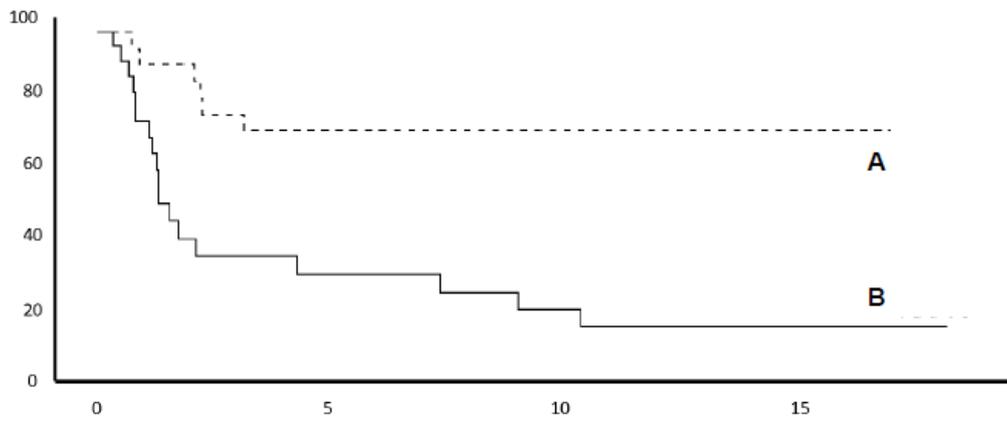


Figura 10

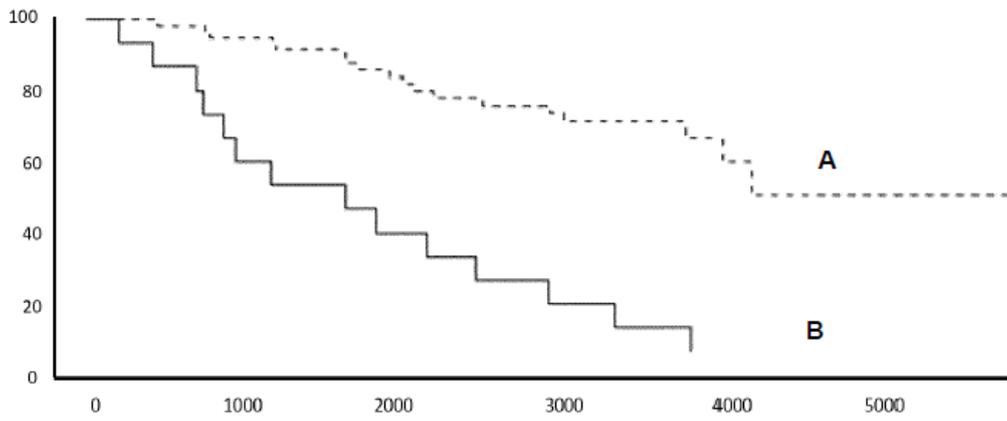


Figura 11

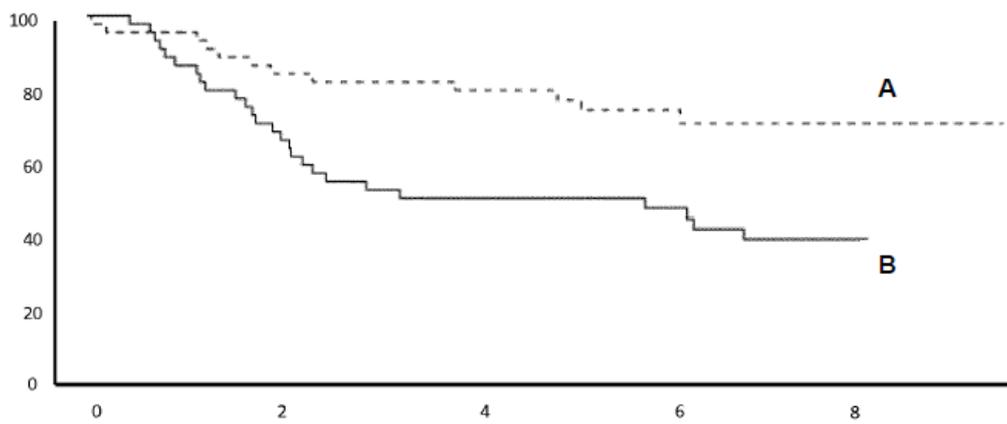


Figura 12

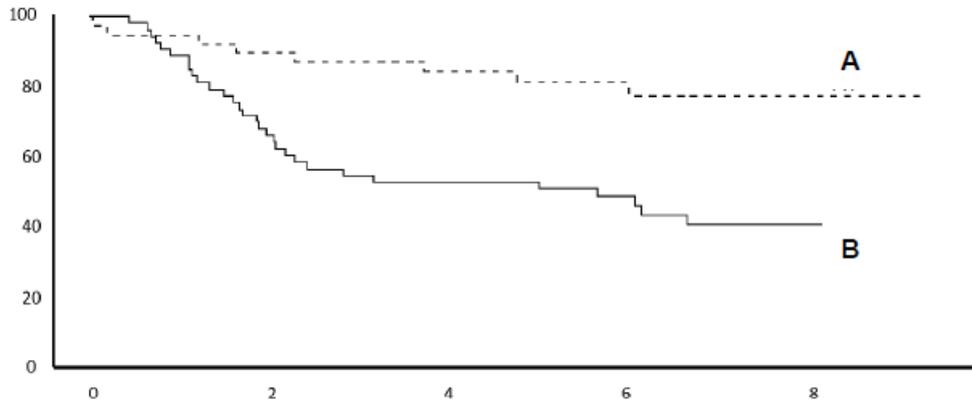


Figura 13

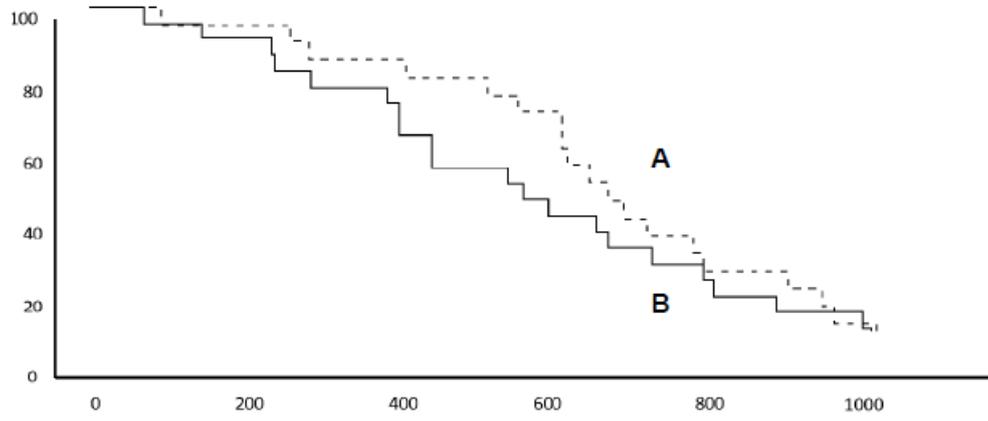


Figura 14

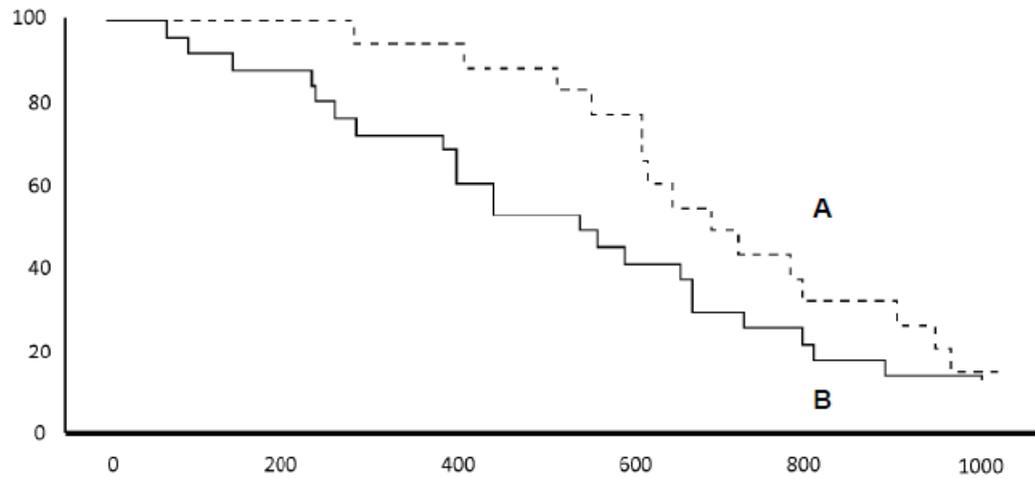


Figura 15

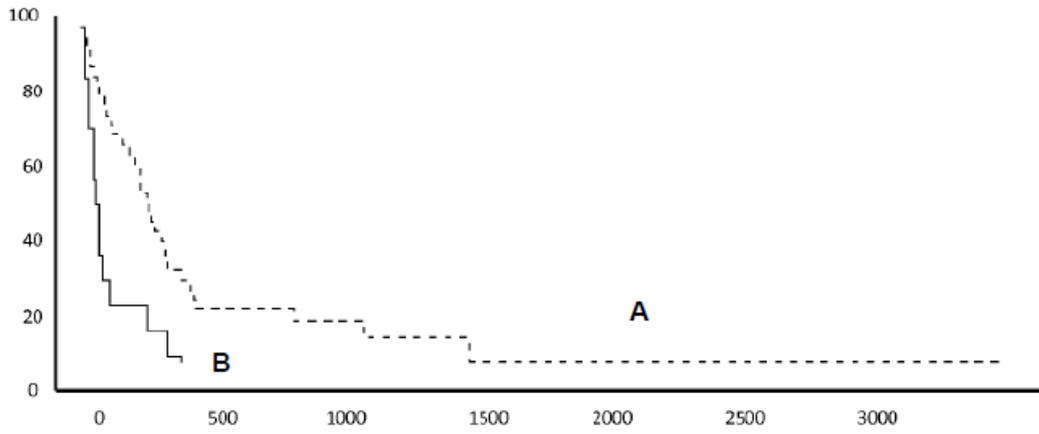


Figura 16

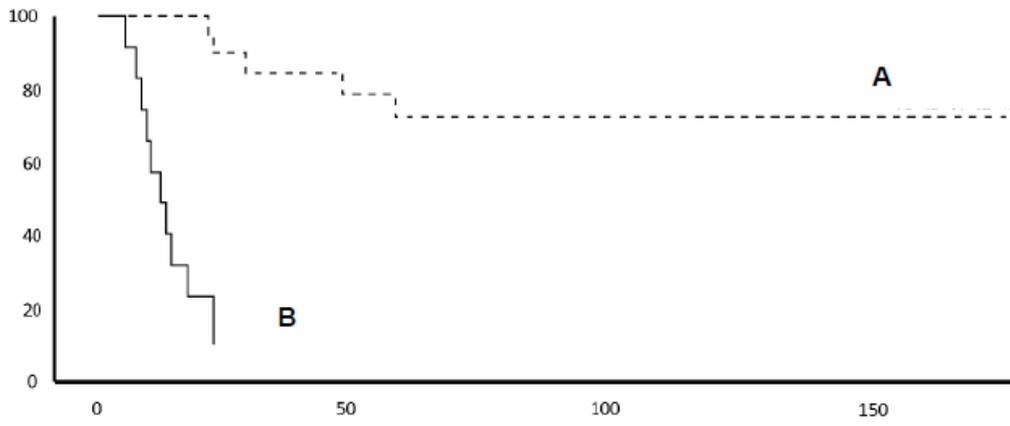


Figura 17

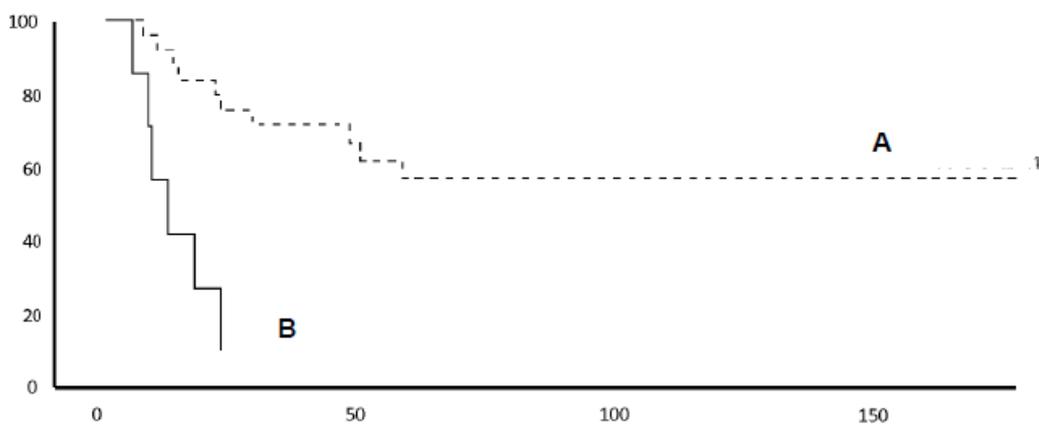


Figura 18

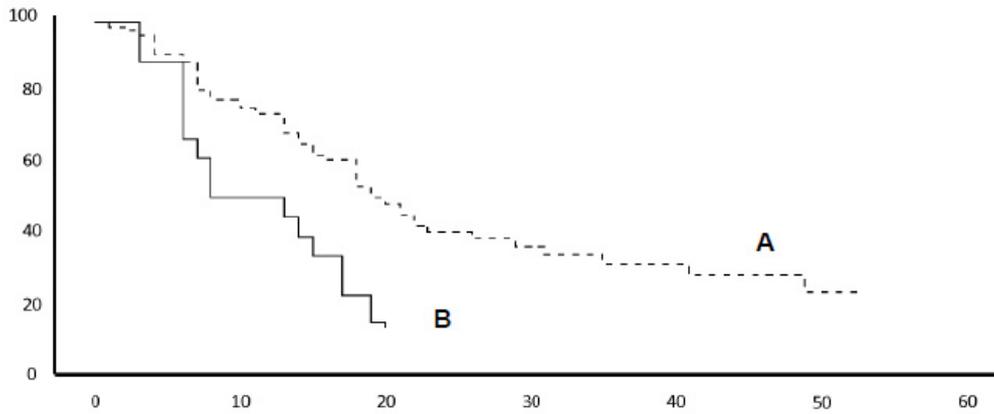


Figura 19

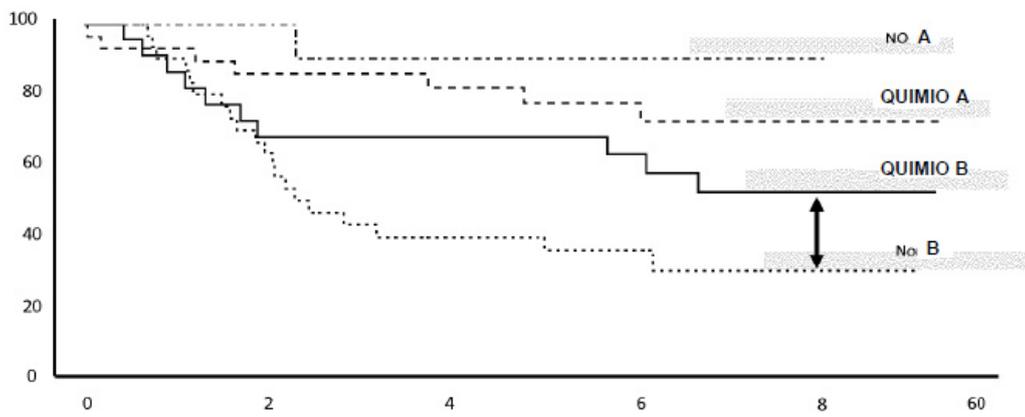


Figura 20

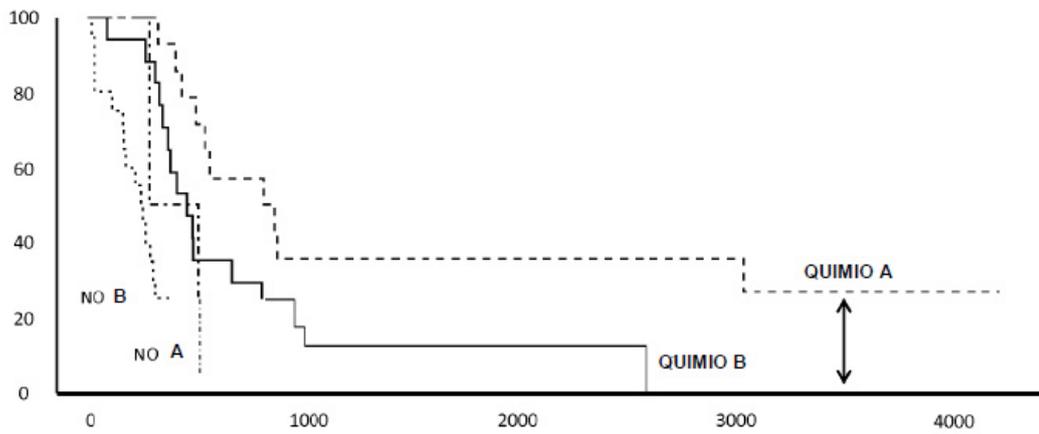


Figura 21