

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 423**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2013 PCT/EP2013/051008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13107900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2013 E 13701044 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2805165**

54 Título: **Métodos para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido basándose en la densidad de linfocitos B**

30 Prioridad:

**20.01.2012 EP 12305072  
20.02.2012 US 201261600752 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.06.2018**

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;  
BINDEA, GABRIELA y  
FRIDMAN, HERVÉ**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 671 423 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 para predecir el tiempo de supervivencia de un pariente que padece un cáncer sólido basándose en la densidad de linfocitos B

5

**Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a métodos y kits para el pronóstico de tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido.

10

**Estado de la técnica**

El cáncer es una enfermedad compleja que implica interacciones entre el sistema inmunológico y el tumor <sup>1</sup>. La correlación entre una reacción inmunológica de adaptación intra- y peri-tumoral "elevada" en el carcinoma colorrectal y un buen pronóstico se informó previamente. Por el contrario, una densidad de linfocitos T "baja" se correlacionó con un mal pronóstico <sup>2-4</sup>. De hecho, de todos los diversos criterios clínicos e histopatológicos disponibles en la actualidad <sup>5, 6</sup>, se mostró que el infiltrado de linfocitos T inmunitario era el criterio predictivo más importante para supervivencia <sup>2, 7-9</sup>. Esto también está apoyado por modelos de ratón de inmunovigilancia e inmunoedición <sup>10-12</sup>. Los avances recientes en inmunología celular y biología tumoral están dirigiendo nuevos enfoques para terapia de linfocitos adoptiva <sup>13</sup> con resultados prometedores <sup>14</sup>. Sin embargo todavía existe la necesidad de otros métodos fiables que puedan ayudar a los médicos a predecir el resultado de un cáncer en un paciente.

15

20

Ladanyi *et al.*, (Cancer Immunology, vol. 60, n.º 12, 2011; pp. 1729-1738) evalúa el impacto del pronóstico de densidad de linfocitos B en melanoma cutáneo.

25

Mahmoud *et al.*, (Breast Cancer Research and Treatment, vol. 132, n.º 2, 2001, pp. 545-553) evalúa la significancia del pronóstico de linfocitos B en carcinoma invasivo de mama.

30

El documento EP1777523 desvela métodos para determinar el pronóstico de un paciente que padece cáncer, métodos mencionados que comprenden la cuantificación, dentro del tumor, de al menos un marcador biológico que es indicativo del estado de la respuesta inmunológica de adaptación de dicho paciente contra el cáncer.

35

Nelson *et al.*, (Journal of Immunology, vol. 185, n.º 9, 2010, pp. 4977-4982) es una revisión que comparar las respuestas de linfocitos B en cáncer, autoinmunidad y trasplante, con el objeto de dilucidar los mecanismos usados por los linfocitos B para facilitar las respuestas de los linfocitos T a largo plazo.

Fridman *et al.*, (Curr. Top. Microbiol. Immunol., 344, 2011, pp. 1-24) discute las interacciones de tumor-inmunológicas en cánceres humanos.

40

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido que comprende las etapas que consisten en i) determinar la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor (im) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente, ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de referencia determinado previamente y un mal pronóstico cuando la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de referencia determinado previamente.

45

**50 Descripción detallada de la invención:**

La invención se define con las reivindicaciones.

55

Aplicando análisis de integración, los inventores investigaron la expresión genética y densidades celulares de 28 tipos de células diferentes que comprendían la mayoría de las subpoblaciones de células inmunológicas innatas y de adaptación en tumores. Encontraron grupos de células inmunológicas asociadas con un estadio específico del tumor. Entre ellas, los linfocitos B y T se organizan dentro de una red núcleo y son las células inmunológicas más destacadas que se correlacionan con la progresión del tumor y un pronóstico favorable. Más particularmente, los inventores demostraron que los pacientes con alta densidad de linfocitos B cells en el margen invasivo del tumor presentaban una supervivencia libre de enfermedad prolongada mientras que los pacientes con baja densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor presentaban un mal pronóstico. La combinación de marcador de linfocitos B con al menos un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en CD3, CD8 y CDR45RO en al menos una región del tumor (im y/o ct) también proporcionaba una diferenciación de pacientes mejor.

60

65

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido que comprende las etapas que consisten en determinar la densidad de

linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor (im) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente; determinar la densidad de un tipo de célula adicional seleccionado entre linfocitos T citotóxicos CD8+ o linfocitos T de memoria CD45RO+ en el margen invasivo del tumor (im) y en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente; comparar cada densidad con un valor de punto de corte; y proporcionar:

a) un buen pronóstico cuando la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte, la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es mayor que el valor de punto de corte, y la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es mayor que el valor de punto de corte;

b) un pronóstico intermedio cuando:

- la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte, la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es menor que el valor de punto de corte, y la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es mayor que el valor de punto de corte; o
- la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte, la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es mayor que el valor de punto de corte, y la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es menor que el valor de punto de corte; o
- la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte, la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es mayor que el valor de punto de corte, y la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es mayor que el valor de punto de corte; o
- la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte, la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es menor que el valor de punto de corte, y la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es menor que el valor de punto de corte; o
- la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte, la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es menor que el valor de punto de corte, y la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es mayor que el valor de punto de corte; o
- la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte, la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es mayor que el valor de punto de corte, y la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es menor que el valor de punto de corte;

c) un mal pronóstico cuando la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte, la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es menor que el valor de punto de corte, y la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es menor que el valor de punto de corte.

La presente invención también se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece cáncer colorrectal que comprende las etapas que consisten en i) determinar la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor (im) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de referencia determinado previamente y un mal pronóstico cuando la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de referencia determinado previamente.

En una realización el paciente padece un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer cortical adrenal, cáncer anal, cáncer de conductos biliares (por ejemplo, cáncer perifilar, cáncer de conductos biliares distal, cáncer de conductos biliares intrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de huesos (por ejemplo, osteoblastoma, osteocrondroma, hemangioma, fibroma condromixoide, 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, astocitoma, 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 gigante, hiperplasia de ganglios linfáticos angiofolicular), cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cancer de endometrio (por ejemplo, adenocarcinoma endometrial, adenocantoma, adenocarcinoma seroso papilar, células transparentes), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células microcíticas), 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 de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado (por ejemplo, hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer de pulmón de

células no microcíticas), mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales (por ejemplo, esteseoneuroblastoma, granuloma de la línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de la glándula pituitaria, 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 de testículo (por ejemplo, seminoma, cáncer de células germinales no seminoma), cáncer de timo, cáncer de tiroides (por ejemplo, carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, carcinoma escasamente diferenciado, carcinoma tiroideo medular, linfoma tiroideo), cáncer vaginal, cáncer vulvar, y cáncer de útero (por ejemplo, leiomyosarcoma uterino).

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra de tejido tumoral" tiene su significado general en la técnica e incluye partes o trozos de tejido que se han extraído incluyendo después de una resección de tumor quirúrgica o después de la recogida de una muestra de tejido para biopsia. La muestra de tejido tumoral comprenderá el margen invasivo que rodea el tumor, y puede comprender o no el centro del tumor. Como se usa en el presente documento el "margen invasivo" tiene su significado general en la técnica y se refiere al entorno celular que rodea tumor. La muestra de tejido tumoral se puede someter, por supuesto, a una diversidad de técnicas preparativas y de almacenamiento después de la recogida bien conocidas (por ejemplo, fijación, almacenamiento, congelación, etc.) antes de determinar la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor (im). Por lo general, la muestra de tejido tumoral se puede embeber en parafina o se puede congelar.

El método de la invención es particularmente adecuado durante el periodo de duración de supervivencia libre de enfermedad (DFS) o la supervivencia global (OS).

Como se usa en el presente documento, el término "linfocitos B" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una célula producida en la médula ósea que expresa anticuerpos unidos a membrana específicos para un antígeno. Después de la interacción con el antígeno se diferencia en una célula plasmática que secreta anticuerpos específicos para el antígeno o en un linfocito B de memoria. "Células B" y "linfocitos B" se usan indistintamente. Por lo general, los linfocitos B se caracterizan por la expresión de marcadores de linfocitos B en su superficie celular. Como se usa en el presente documento, la expresión " marcador de linfocitos B" se refiere a moléculas de superficie sobre los linfocitos B que son específicas para linfocitos B en particular. Los marcadores de linfocitos B adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, IgG de superficie, cadenas kappa y lambda, Ig-alfa (CD79alfa), Ig-beta (CD79beta), CD19, B220 (CD45R), CD20, CD21, CD22, CD23, CD27, o cualquier otro antígeno CD específico para linfocitos B. Por lo general un linfocito B es una célula CD20+.

La determinación de la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor se puede determinar mediante cualquier método bien conocido en la técnica. Por lo general, los métodos de este tipo comprenden poner en contacto la muestra de tejido tumoral con al menos un agente de unión selectivo capaz de interactuar de forma selectiva con los linfocitos B. El agente de unión selectivo puede ser anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, anticuerpos sintéticos, u otros agentes específicos de proteínas tales como ácido nucleico o aptámeros peptídicos. Por lo general, el agente de unión selectivo se une a cualquiera de los marcadores de linfocitos B, tales como un anticuerpo específico para cualquiera de estas moléculas. Los agentes de unión selectivos para linfocitos B preferentes se unen a CD19, CD20, CD21, CD22 o CD37. Los agentes de unión selectivos para linfocitos B particularmente precedentes se unen a CD20. En la técnica anterior se han descrito varios anticuerpos y muchos anticuerpos también están disponibles en el mercado tal como se describe en la sección de EJEMPLOS. Para la detección del anticuerpo que hace que la presencia de los linfocitos B sea detectable mediante microscopía o un sistema de análisis automatizado, los anticuerpos se pueden etiquetar directamente con etiquetas detectables tales como enzimas, cromógenos o sondas fluorescentes o se pueden detectar indirectamente con un anticuerpo secundario conjugado con etiquetas detectables.

El método preferente de acuerdo con la presente invención es la inmunohistoquímica. Por lo general, la muestra de tejido tumoral se incuba primero con anticuerpos etiquetados dirigidos contra un marcador de linfocitos B de interés (por ejemplo, CD20). Después de lavar, los anticuerpos etiquetados que se unen a dicho marcador de linfocitos B de interés se revelan con la técnica apropiada, dependiendo del tipo de etiqueta que lleva el anticuerpo etiquetado, por ejemplo una etiqueta radiactiva, fluorescente o enzimática. De forma simultánea se puede realizar un etiquetado múltiple. Como alternativa, el método de la presente invención puede usar un anticuerpo secundario acoplado a un sistema de amplificación (para intensificar la señal de tinción) y moléculas enzimáticas. Los anticuerpos secundarios acoplados de ese tipo están disponibles en el mercado, por ejemplo en Dako, sistema EnVision. Se puede usar contratinción, por ejemplo H&E, DAPI, Hoechst. Otros métodos de tinción se pueden conseguir usando cualquier método o sistema adecuado tal como podría ser evidente para alguien con experiencia en la materia, incluyendo sistemas automatizados, semiautomatizados o manuales.

Como se usa en el presente documento, la densidad de linfocitos B se puede expresar como el número de estas células de las que se hace el recuento por una unidad de área superficial de muestra de tejido, por ejemplo como el número de linfocitos B de los que se hace un recuento por  $\text{cm}^2$  o  $\text{mm}^2$  de área superficial de muestra de tejido tumoral. Como se usa en el presente documento, la densidad de linfocitos B también se puede expresar como el número de linfocitos B por una unidad de volumen de muestra, por ejemplo como el número de linfocitos B por  $\text{cm}^3$

de muestra de tejido tumoral. Como se usa en el presente documento, la densidad de linfocitos B también puede consistir en el porcentaje de linfocitos B por células totales (establecido en un 100 %).

Los valores de referencia determinados previamente usados para comparación consisten en valores de punto de "corte" que se pueden determinar como se describe en lo sucesivo en el presente documento. Cada valor de referencia (punto de "corte") para cada marcador biológico se puede determinar previamente realizando un método que comprende las etapas de

- a) proporcionan una colección de muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer;
- b) proporcional, para cada muestra de tejido tumoral que se proporciona en la etapa a), información con respecto al resultado clínico real para el correspondiente paciente con cáncer (es decir, la duración de la supervivencia libre de enfermedad (DFS) o la supervivencia global (OS));
- c) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios;
- d) determinar la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor para cada muestra de tejido tumoral contenida en la colección que se proporciona en la etapa a);
- e) clasificar dichas muestras de tejido tumoral en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico que se proporciona en la etapa c), respectivamente: (i) un primer grupo que comprende muestras de tejido tumoral que presentan un valor de cuantificación para dicha densidad que es menor que dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en la serie mencionada de valores de cuantificación; (ii) un segundo grupo que comprende muestras de tejido tumoral que presentan un valor de cuantificación de dicha densidad que es mayor que el valor de cuantificación arbitrario mencionado contenido en la serie mencionada de valores de cuantificación; de modo que se obtienen dos grupos de muestras de tejido tumoral para el valor de cuantificación específico mencionado, en el que las muestras de tejido tumoral de cada grupo se enumeran por separado;
- f) calcular la significancia estadística entre (i) el valor de cuantificación obtenido en la etapa e) y (ii) el resultado clínico real de los pacientes a partir de los que se obtienen las muestras de tejido tumoral contenidas en el primer y segundo grupos que se definen en la etapa f);
- g) repetir las etapas f) y g) hasta que se someta a ensayo cualquier valor de cuantificación arbitrario que se proporcionan en la etapa d);
- h) establecer el valor de referencia mencionado determinado previamente (valor de punto de "corte"), que consiste en el valor de cuantificación arbitrario para el que se ha calculado la significancia estadística más elevada (más significativa) en la etapa g).

Como se ha desvelado anteriormente, dicho método permite el establecimiento de un solo valor de punto de "corte" que permite la diferenciación entre pronóstico malo y bueno. Prácticamente, como se desvela en los ejemplos en el presente documento, los valores de significancia estadística elevados (por ejemplo, valores de P bajos) generalmente se obtienen para un intervalo de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no solo para un solo valor de cuantificación arbitrario. Por lo tanto, en una realización alternativa del método para determinar los valores de punto de "corte" mencionados anteriormente, un valor de significancia estadística mínima (umbral mínimo de significancia, por ejemplo valor de P de umbral máximo) se establece de forma arbitraria y el intervalo de valores de cuantificación arbitrarios para los que el valor de significancia estadística se calculó en la etapa g) es más elevado (más significativo, por ejemplo, valor de P menor) se mantienen, de modo que se proporciona un intervalo de valores de cuantificación. Dicho intervalo de valores de cuantificación consiste en un valor de punto de "corte" de acuerdo con la invención. De acuerdo con esta realización específica de un valor de punto de "corte", el pronóstico del resultado clínico bueno o malo clínico se puede determinar mediante la comparación de la densidad de células B que se determina en la etapa i) con el intervalo de valores que delimitan el valor de punto de "corte" mencionado. En ciertas realizaciones, un valor de punto de corte que consiste en un intervalo de valores de cuantificación, consiste en un intervalo de valores centrado en el valor de cuantificación para el que se encuentra el valor de significancia estadística más elevado (por ejemplo, generalmente el valor de P mínimo que se encuentra).

Por lo general, el valor de referencia determinado previamente puede consistir en el valor de densidad de linfocitos B (por ejemplo, densidad de células CD20+), por células totales (establecido en un 100 %), que se correlaciona con un mal pronóstico (por ejemplo, un tiempo de supervivencia libre de enfermedad corto), o por el contrario puede consistir en el valor de densidad de linfocitos B que se correlaciona con un buen pronóstico (por ejemplo, un tiempo de supervivencia libre de enfermedad a largo).

En una realización particular las etapas de comparación pueden incluir una clasificación de los valores de cuantificación medidos para la densidad celular en dos grupos, respectivamente: (i) un primer grupo denominado "Hi" cuando el valor de cuantificación para la densidad celular es mayor que el valor de referencia correspondiente determinado previamente e (ii) un segundo grupo denominado "Lo" cuando el valor de cuantificación para la densidad celular es menor que el valor de referencia correspondiente determinado previamente. A partir del ejemplo surge que si el resultado de la etapa de comparación consiste en un valor de "Hi", entonces se proporciona un buen pronóstico (Figura 1). Por el contrario, si el resultado de la etapa de comparación consiste en un valor de "Lo", entonces se proporciona un mal pronóstico (Figura 1). De acuerdo con la tabla 1 también se puede determinar una puntuación.

El método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en i) determinar la densidad

de al menos un tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) y/o en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente.

- 5 El tipo de célula adicional se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T, entre un subconjunto particular de linfocitos T que incluye linfocitos T citotóxicos o linfocitos T de memoria.

10 Como se usa en el presente documento, el término "linfocitos T" tiene su significado general en la técnica e incluye células dentro del linaje de los linfocitos T, incluyendo timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros y similares. Por lo general, los linfocitos T se caracterizan por la expresión de marcadores de linfocitos T en su superficie celular. Como se usa en el presente documento, la expresión "marcador de linfocitos T" se refiere a moléculas de superficie en los linfocitos T que son específicas para los linfocitos T en particular. Los marcadores de linfocitos T adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, CD3, CD4, CD8, CD45RO de superficie o cualquier otro antígeno CD específico para linfocitos T. Por lo general un linfocito T es una célula CD3+.

20 Como se usa en el presente documento la expresión "linfocitos T citotóxicos" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un linfocito T, que activado una vez por un complejo de MHC-antígeno, lidera la proteína perforina, que forma poros en la membrana plasmática de la célula diana; esto hace que los iones y el agua fluyan en la célula diana, haciendo que se expanda y opcionalmente se alise. Los linfocitos T citotóxicos también liberan granzima, una serina proteasa que puede entrar en las células diana a través del poro formado por la perforina e induce apoptosis (muerte celular). La mayoría de los linfocitos T citotóxicos tienen presente la proteína CD8 en la superficie celular, que es atraída a porciones de la molécula MHC de la Clase I. Por lo general un linfocito T citotóxicos es una célula CD8+.

25 Como se usa en el presente documento la expresión "linfocito T de memoria" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un subconjunto de linfocitos T que son específicos para el antígeno que encuentran en primer lugar y a los que se puede recurrir durante la respuesta inmunitaria secundaria. Los linfocitos T de memoria se caracterizan por la expresión en su superficie celular de CDR45RO. Por lo general un linfocito T de memoria es una célula CD45RO+.

35 El método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en i) determinar la densidad de linfocitos T en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente.

El método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en i) determinar la densidad de linfocitos T en el margen invasivo (im) del tumor en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente.

40 La invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en i) determinar la densidad de linfocitos T en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente ii) determinar la densidad de linfocitos T en el margen invasivo (im) del tumor en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e iii) comparar dichas densidades con valores de referencia determinados previamente.

45 En una realización particular el método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en determinar la densidad de linfocitos T citotóxicos en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente.

50 En una realización particular el método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en determinar la densidad de linfocitos T citotóxicos en el margen invasivo (im) del tumor en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente.

55 En una realización particular el método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en i) determinar la densidad de linfocitos T citotóxicos en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente ii) determinar la densidad de linfocitos T citotóxicos en el margen invasivo (im) del tumor en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e iii) comparar dichas densidades con valores de referencia determinados previamente.

60 En una realización particular el método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en determinar la densidad de linfocitos T citotóxicos en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente.

65 En una realización particular el método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten

en determinar la densidad de linfocitos T de memoria en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente.

5 En una realización particular el método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en determinar la densidad de linfocitos T de memoria en el margen invasivo (im) del tumor en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e ii) comparar dicha densidad con un valor de referencia determinado previamente.

10 En una realización particular el método de la invención puede comprender adicionalmente las etapas que consisten en i) determinar la densidad de linfocitos T de memoria en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente ii) determinar la densidad de linfocitos T de memoria en el margen invasivo (im) del tumor en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente e iii) comparar dichas densidades con valores de referencia determinados previamente.

15 Para dichas densidades celulares adicionales las etapas de comparación también pueden incluir una clasificación de los valores de cuantificación medidos para cada densidad celular en dos grupos, respectivamente: (i) Un primer grupo denominado "Hi" cuando el valor de cuantificación para la densidad celular es mayor que el valor de referencia correspondiente determinado previamente e (ii) un segundo grupo denominado "Lo" cuando el valor de cuantificación para la densidad celular es menor que el valor de referencia correspondiente determinado previamente.

20 Una puntuación que es una combinación compuesta de clasificación dada para la densidad de linfocitos B y para las densidades adicionales también se puede calcular cómo se representa en las tablas 1-9 para hacer más fácil la comprensión del resultado de la etapa de comparación.

25 Los métodos de la invención tienen una precisión más elevada que los métodos de clasificación usados en la actualidad (por ejemplo, UICC-TNM). Por consiguiente, los métodos de la invención se pueden aplicar para monitorizar la eficacia de tratamientos anticáncer. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método para monitorizar la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente que comprende las etapas de (i) predecir el tiempo de supervivencia del paciente antes de la administración de dicho agente mediante la realización del método de acuerdo con la invención, ii) predecir el tiempo de supervivencia del paciente después de la administración de dicho agente mediante la realización del método de acuerdo con la invención, iii) comparar el tiempo de supervivencia de la etapa a) con el tiempo de supervivencia de la etapa b) e iv) y proporcionar la conclusión de que el agente es eficaz para el tratamiento del cáncer cuando el tiempo de supervivencia de la etapa b) es mayor que el tiempo de supervivencia de la etapa a). En el caso en el que la conclusión es negativa, entonces el médico puede adaptar el tratamiento mediante la prescripción de una dosificación diferente o mediante la prescripción de otro agente a administrar. Los métodos de la invención también pueden ser particularmente adecuados para la determinación de si el paciente se podrá considerar como un paciente que responde al tratamiento (por ejemplo, un agente de inmunoterapia). Por lo general, cuando se proporciona un buen pronóstico con los métodos de la invención, el paciente puede cumplir los requisitos para el tratamiento. Los métodos de la invención también pueden ser particularmente adecuados para determinar si la terapia con adyuvantes (por ejemplo, quimioterapia) será necesaria o no. Por ejemplo, cuando se proporciona un buen pronóstico con el método de la invención, el tratamiento anticáncer posterior puede no comprender ninguna quimioterapia adyuvante. Sin embargo cuando se proporciona un mal pronóstico con el método de la invención, entonces el paciente se puede tener en cuenta para la quimioterapia adyuvante.

30 La presente divulgación incluye un kit para realizar el método de la presente invención que comprende medios para determinar la densidad celular como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un kit de acuerdo con la divulgación puede comprender uno o una combinación o un conjunto de anticuerpos, cada clase de anticuerpos siendo dirigida de forma específica contra un tipo celular. Los medios adecuados incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, y similares. El kit de la divulgación puede comprender adicionalmente componentes adicionales útiles para realizar los métodos de la invención. A modo de ejemplo, el kit puede comprender fluidos (por ejemplo, tampones), uno o más compartimentos de muestra, un material con instrucciones que describe el rendimiento del método de la invención, y similares.

35 La invención se ilustrará adicionalmente con las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deberían interpretar en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

60 **Descripción de las figuras**

**Figura 1:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células se definió en el valor de p óptimo de la población base.

65 **Figura 2:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con

la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD8 en el centro (ct) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD8 se definió en el valor de p óptimo de la población base.

5 **Figura 3:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD8 en el margen invasivo (im) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD8 se definió en el valor de p óptimo de la población base.

10 **Figura 4:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD3 en el centro (ct) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD3 se definió en el valor de p óptimo de la población base.

15 **Figura 5:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD3 en el margen invasivo (im) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD3 se definió en el valor de p óptimo de la población base.

20 **Figura 6:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD45RO en el centro (ct) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD45RO se definió en el valor de p óptimo de la población base.

25 **Figura 7:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD45RO en el margen invasivo (im) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD45RO se definió en el valor de p óptimo de la población base.

30 **Figura 8:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD8 en el centro (ct) y en el margen invasivo (im) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD8 se definió en el valor de p óptimo de la población base. El grupo "het" ilustra la duración de supervivencia libre de enfermedad de combinaciones de densidad de células Hi o Lo CD20 en el margen invasivo (im) con Hi o Lo CD8 cells en el centro (ct) y en el margen invasivo del tumor (im).

35 **Figura 9:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD3 en el centro (ct) y en el margen invasivo (im) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD3 se definió en el valor de p óptimo de la población base. El grupo "het" ilustra la duración de supervivencia libre de enfermedad de combinaciones de densidad de células Hi o Lo CD20 en el margen invasivo (im) con células Hi o Lo CD3 en el centro (ct) y en el margen invasivo del tumor (im).

40 **Figura 10:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor en combinación con densidad de células CD45RO en el centro (ct) y en el margen invasivo (im) del tumor (población base de ensayo, n = 107). El valor de punto de corte para la densidad de células CD20 y CD45RO se definió en el valor de p óptimo de la población base. El grupo "het" ilustra la duración de supervivencia libre de enfermedad de combinaciones de densidad de células Hi o Lo CD20 en el margen invasivo (im) con células Hi o Lo CD45RO en el centro (ct) y en el margen invasivo del tumor (im).

45 **Figura 11:** curvas de Kaplan Meier que ilustran la duración de supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de células CD20 en el margen invasivo (im) del tumor (población base de validación, n = 415). El valor de punto de corte para la densidad de células se definió en el valor de p óptimo de la población base.

55 **Ejemplo 1**

### **Material y métodos**

60 **Pacientes**

Los pacientes con cáncer colorrectal que se sometieron a una resección primaria en el Hospital Laennec/HEGP (Hospital Europeo George Pompidou) se seleccionaron de forma aleatoria (n = 107). La población base de validación (n = 415) se ha descrito anteriormente (Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 2006; 313: 1960-4.). El tiempo hasta la recurrencia o tiempo sin enfermedad se definió como el periodo de tiempo desde la fecha de la cirugía hasta la



fecha de la recaída del tumor confirmada para pacientes con recaída y a partir de la fecha de la cirugía hasta la fecha del último seguimiento para los pacientes sin enfermedad. Una base de datos basada en Web segura, TME.db, integró los datos clínicos y los datos de las tecnologías de alto rendimiento (36).

## 5 Construcción de micromatrices tisulares

Usando un instrumento de micromatriz tisular (Beecher Instruments, Alphelys, Plaisir, Francia), los investigadores seleccionaron dos áreas del tumor diferentes y representativas. En el centro del tumor (ct) y en el margen invasivo (im) se hizo una punción (0,6 mm y 1 mm de diámetro, respectivamente) a partir de bloques de tejido embebidos en parafina. Se construyeron micromatrices tisulares y se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  para tinción inmunohistoquímica.

### Inmunohistoquímica

Después de la recuperación del antígeno y la inactivación de la actividad de peroxidasa endógena, las secciones se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con anticuerpos contra CD3 (SP7), CD8 (4B11), CD45RO (OPD4) y CD20 (L26; DAKO, Carpintería, CA). Se aplicó el sistema Envision+ (estructura principal del polímero conjugada a enzima acoplada a anticuerpos secundarios) y DAB-cromógeno (Dako, Copenhague, Dinamarca). Se hizo una contratinción de las secciones de tejido con hematoxilina de Harris. Las secciones se analizaron usando una estación de trabajo de análisis de imágenes (SpotBrowser, Alphelys, Plaisir, Francia). La densidad se registró como el número de células positivas por área superficial de tejido ( $\text{mm}^2$ ). Para cada duplicado, la densidad media se usó para análisis estadístico adicional.

### Análisis estadístico

Las curvas de Kaplan-Meier se usaron para evaluar la influencia de los parámetros inmunológicos en la supervivencia libre de enfermedad. La significancia de estos parámetros se calculó con el ensayo de rango logarítmico. Los investigadores aplicaron puntos de corte basándose en la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes usando el enfoque de mediana y "valor de P mínimo" para separar los pacientes en un grupo de Hi y Lo. Para comparaciones por parejas se usó el ensayo de rango de suma de Wilcoxon.  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico R y Statview.

### Resultados

Se realizaron estudios *in situ* usando micromatriz tisular desde el centro y el margen invasivo del tumor. La inmunotinción para linfocitos B (CD20), linfocitos T (CD3), linfocitos T citotóxicos (CD8) y linfocitos T de memoria (CD45RO) se cuantificó con una estación de trabajo de análisis de imágenes dedicada. Una medición precisa de la densidad de células inmunológicas intratumorales se realizó mediante el recuento de las células inmunológicas y midiendo el área superficial del tejido. Los investigadores evaluaron la supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con la densidad de linfocitos B. Las curvas de Kaplan-Meier ilustraron el efecto peyorativo de las células CD20 en la supervivencia del paciente (Figuras 1-10) en combinación o no con densidades de células (CD3) y linfocitos T citotóxicos (CD8) y linfocitos T de memoria (CD45RO). Los pacientes con una densidad de CD20 elevada en el margen invasivo de los tumores presentaban una mejor supervivencia libre de enfermedad los pacientes con densidad de CD20 baja en la región central (Figura 1). La combinación de los marcadores CD20 y CD3, CD8 y CDR45RO definió los grupos de pacientes con resultados muy diferentes. Por ejemplo los pacientes con CD20 Lo (im) y al menos un marcador "Lo" seleccionado entre el grupo que consiste en CD3, CD8 y CDR45RO en al menos una región de los tumores presentaban un resultado impresionante. Por el contrario, los pacientes con CD20 Hi (im) y al menos un marcador "Hi" seleccionado entre el grupo que consiste en CD3, CD8 y CDR45RO en al menos una región de los tumores presentaban un buen resultado (Tabla 11). Los investigadores validaron los resultados mediante el análisis de una población base independiente de 415 pacientes con cáncer colorrectal mediante micromatrices tisulares. Se encontraron resultados similares (Figura 11). Una supervivencia libre de enfermedad mayor se observó entre pacientes con tumor que contenía una densidad elevada de células CD20+ en el margen invasivo de los tumores (Hi CD20 (im)), y en pacientes con al menos un marcador "Hi" seleccionado entre el grupo que consiste en CD3, CD8 y CDR45RO en al menos una región de los tumores (im y/o ct) presentaba el mejor resultado. En ambas poblaciones base se encontraron proporciones de riesgo y valores de P similares.

### Conclusión

En conclusión, los pacientes con una densidad elevada de linfocitos B en el margen invasivo del tumor presentaban una supervivencia libre de enfermedad prolongada mientras que los pacientes con una densidad baja de linfocitos B en el margen invasivo del tumor presentaba un mal pronóstico. La combinación de este marcador con al menos un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en CD3, CD8 y CDR45RO en al menos una región del tumor (im y/o ct) también proporcionaba una mejor diferenciación de los pacientes. A continuación se pueden calcular las puntuaciones inmunológicas de acuerdo con las tablas 1-10.

65

**Tabla 1: puntuaciones para CD20 (im)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
Hi	Hi CD20 (im)	Bueno	1
Lo	Lo CD20 (im)	Malo	0

**Tabla 2: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im) y CD8 (ct)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD8 (ct)	Bueno	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD8 (ct)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD8 (ct)]	intermedio	1
LoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD8 (ct)	Malo	0

5

**Tabla 3: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im) y CD8 (im)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD8 (im)	Bueno	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD8 (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD8 (im)]	intermedio	1
LoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD8 (im)	Malo	0

**Tabla 4: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im) y CD3 (ct)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD3 (ct)	Bueno	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD3 (ct)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD3 (ct)]	intermedio	1
LoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD3 (ct)	Malo	0

**Tabla 5: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im) y CD3 (im)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD3 (im)	Bueno	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD3 (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD3 (im)]	intermedio	1
LoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD3 (im)	Malo	0

10

**Tabla 6: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im) y CD45RO (ct)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD45RO (ct)	Bueno	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD45RO (ct)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD45RO (ct)]	intermedio	1
LoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD45RO (ct)	Malo	0

**Tabla 7: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im) y CD45RO (im)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD45RO (im)	Bueno	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD45RO (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD45RO (im)]	intermedio	1
LoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD45RO (im)	Malo	0

15

**Tabla 8: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im), CD8 (ct) y CD8 (im)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD8 (ct) / Hi CD8 (im)	Bueno	3
Het	[Hi CD20 (im) / Hi CD8 (ct) / Lo CD8 (im)] o [Hi CD20 (im) / Lo CD8 (ct) / Hi CD8 (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD8 (ct) / Hi CD8 (im)]	intermedio	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD8 (ct) / Lo CD8 (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD8 (ct) / Lo CD8 (im)] o [Lo CD20 (im) / Lo CD8 (ct) / Hi CD8 (im)]	intermedio	1
LoLoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD8 (ct) / Lo CD8 (im)	Malo	0

**Tabla 9: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im), CD3 (ct) y CD3 (im)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD3 (ct) / Hi CD3 (im)	Bueno	3

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
Het	[Hi CD20 (im) / Hi CD3 (ct) /Lo CD3 (im)] o [Hi CD20 (im) / Lo CD3 (ct) /Hi CD3 (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD3 (ct) / Hi CD3 (im)]	intermedio	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD3 (ct) / Lo CD3 (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD3 (ct) / Lo CD3 (im)] o [Lo CD20 (im) / Lo CD3 (ct) / Hi CD3 (im)]	intermedio	1
LoLoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD3 (ct) /Lo CD3 (im)	Malo	0

**Tabla 10: puntuaciones para combinaciones de CD20 (im), CD45RO (ct) y CD45RO (im)**

Nombre	Combinación	Pronóstico	Puntuación
HiHiHi	Hi CD20 (im) / Hi CD45RO (ct) /Hi CD45RO (im)	Bueno	3
Het	[Hi CD20 (im) / Hi CD45RO (ct) /Lo CD45RO (im)] o [Hi CD20 (im) / Lo CD45RO (ct) /Hi CD45RO (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD45RO (ct) / Hi CD45RO (im)]	intermedio	2
Het	[Hi CD20 (im) / Lo CD45RO (ct) / Lo CD45RO (im)] o [Lo CD20 (im) / Hi CD45RO (ct) / Lo CD45RO (im)] o [Lo CD20 (im) / Lo CD45RO (ct) / Hi CD45RO (im)]	intermedio	1
LoLoLo	Lo CD20 (im) / Lo CD45RO (ct) /Lo CD45RO (im)	Malo	0

**Tabla 11: Análisis Univariado de supervivencia sin Enfermedad (DFS) entre pacientes con Estadio I/II/III/IV de UICC-TNM**

**cáncer colorrectal (población base 107) de acuerdo con parámetros clínicos o parámetros inmunológicos**

	Supervivencia libre de enfermedad (DFS)			Valor P *
	Precisión Predictiva (%) índice c	Proporción de riesgo Ct	(95% de IC)	
<b>De acuerdo con parámetros clínicos</b>				
CD20-im (Lo = 0, Hi = 1)	60,33	59,7 7	4,04 (2,17-7,56) 1,00 (referencia)	<0,000 1** s
CD20-im-CD8-ct.I 0 1-2 3-CD8-im (LoLoLo = 0, LoLoHi/LoHiLo/HiLoHi/HiHiLo = 1, HiHiHi = 2)	64,01	63,2 9	12,49 (2,46-63,46)*** 2,83 (1,24-6,47)*** 1,00 (referencia)	0,0083 ** s 0,2884 **
CD20-im-CD45RO-ct.I 0 1-2 3-CD45RO-im (LoLoLo = 0, LoLoHi/LoHiLo/HiLoHi/HiHiLo = 1, HiHiHi = 2)	64,62	65,7 8	11,29 (2,56-49,78)*** 3,18 (1,08-9,32)***	0,0047 ** s 0,4915 **

Todas las covariables categóricas se transforman en numéricas antes de que entren en el modelo de Cox. La regla de transformación se indica

al lado del nombre del parámetro. Ct: presentación del índice c dependiente del tiempo.

\*Valor de P de rango Log. \*\*Corrección del valor de P con Altman et al. \*\*\* Corregido por Hollaender et al. s: significativo. IC representa intervalo de confianza.

5

**REFERENCIAS**

A través de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

10

1. Finn, O.J. Cancer immunology. *N Engl J Med* 358, 2704-2715 (2008).
2. Galon, J., *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964 (2006).
3. Galon, J., Fridman, W.H. y Pages, F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res* 67, 1883-1886 (2007).
- 5 4. Pages, F., *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353, 2654-2666 (2005).
5. Jemal, A., *et al.* Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56, 106-130 (2006).
6. Weitz, J., *et al.* Colorectal cancer. *Lancet* 365, 153-165 (2005).
- 10 7. Bindea, G., Mlecnik, B., Fridman, W.H., Pages, F. y Galon, J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* 22, 215-222 (2010).
8. Pages, F., *et al.* In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27, 5944-5951 (2009).
- 15 9. Atreya, I. y Neurath, M.F. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 561-572 (2008).
10. Koebel, C.M., *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903-907 (2007).
11. Shankaran, V., *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111 (2001).
- 20 12. Smyth, M.J., Dunn, G.P. y Schreiber, R.D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90, 1-50 (2006).
13. June, C.H. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 117, 1204-1212 (2007).
14. June, C.H. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* 117, 1466-1476 (2007).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido que comprende las etapas que consisten en:

- 5
- determinar la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor (im) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente;
  - determinar la densidad de un tipo de célula adicional seleccionado entre linfocitos T citotóxicos CD8+ o linfocitos T de memoria CD45RO+ en el margen invasivo del tumor (im) y en el centro del tumor (ct) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente;
  - comparar cada densidad con un valor de punto de corte; y
  - proporcionar:
- 10

a) un buen pronóstico cuando:

- 15
- a1) la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte; y
  - a2) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es mayor que el valor de punto de corte; y
  - a3) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es mayor que el valor de punto de corte;
- 20

b) un pronóstico intermedio cuando:

- 25
- b1) la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte; y
  - b2) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es menor que el valor de punto de corte; y
  - b3) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es mayor que el valor de punto de corte;
- 30

o

- 35
- b'1) la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte; y
  - b'2) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es mayor que el valor de punto de corte; y
  - b'3) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es menor que el valor de punto de corte;
- 40

o

- 45
- b" 1) la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte;
  - b"2) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es mayor que el valor de punto de corte; y
  - b"3) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es mayor que el valor de punto de corte;
- 50

o

- 55
- bi) la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte;
  - bii) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es menor que el valor de punto de corte; y
  - biii) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es menor que el valor de punto de corte;
- 60

o

- 65
- b'i) la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte;
  - b'ii) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es menor que el valor de punto de corte; y
  - b'iii) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es mayor que el valor de punto de corte;

o

b"i) la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte;

5 b"ii) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es mayor que el valor de punto de corte; y

b"iii) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es menor que el valor de punto de corte;

10 c) un mal pronóstico cuando:

c1) la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte; y

15 c2) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el margen invasivo del tumor (im) es menor que el valor de punto de corte; y

c3) la densidad de dicho tipo de célula adicional en el centro del tumor (ct) es menor que el valor de punto de corte.

20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tipo de célula adicional consiste en células citotóxicas CD8+.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tipo de célula adicional consiste en linfocitos T de memoria CD45RO.

25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho cáncer sólido es cáncer colorrectal.

30 5. Un método para ayudar a predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece cáncer colorrectal que comprende las etapas que consisten en i) determinar la densidad de linfocitos B CD20+ en el margen invasivo del tumor (im) en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de dicho paciente, ii) comparar dicha densidad con un valor de punto de corte e iii) proporcionar un buen pronóstico cuando la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor es mayor que el valor de punto de corte y un mal pronóstico cuando la densidad de linfocitos B en el margen invasivo del tumor es menor que el valor de punto de corte.

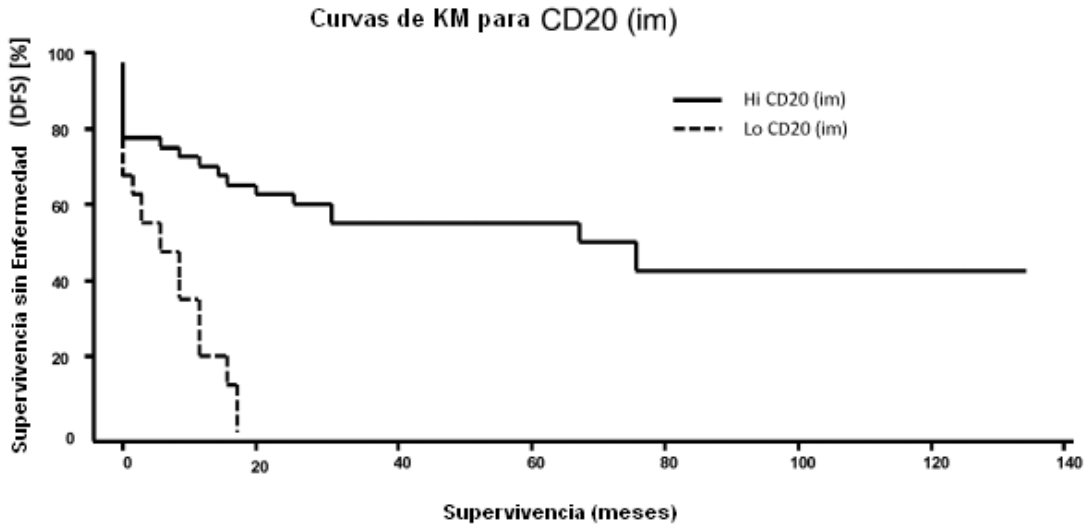


Figura 1

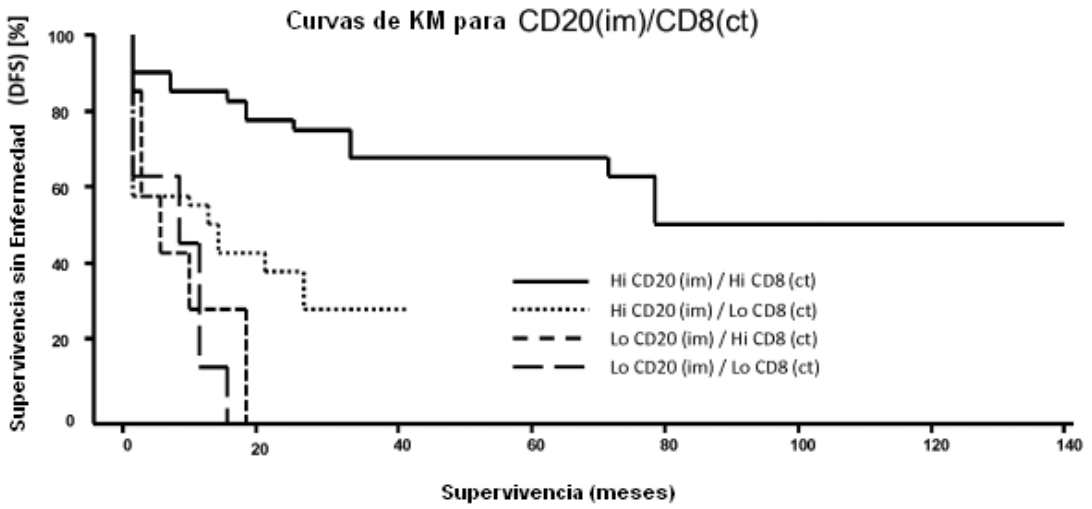


Figura 2

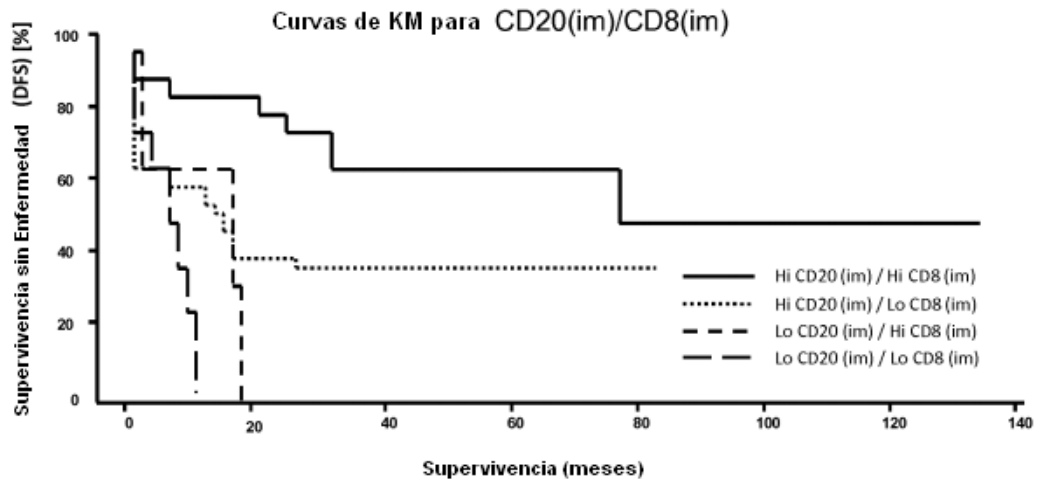


Figura 3

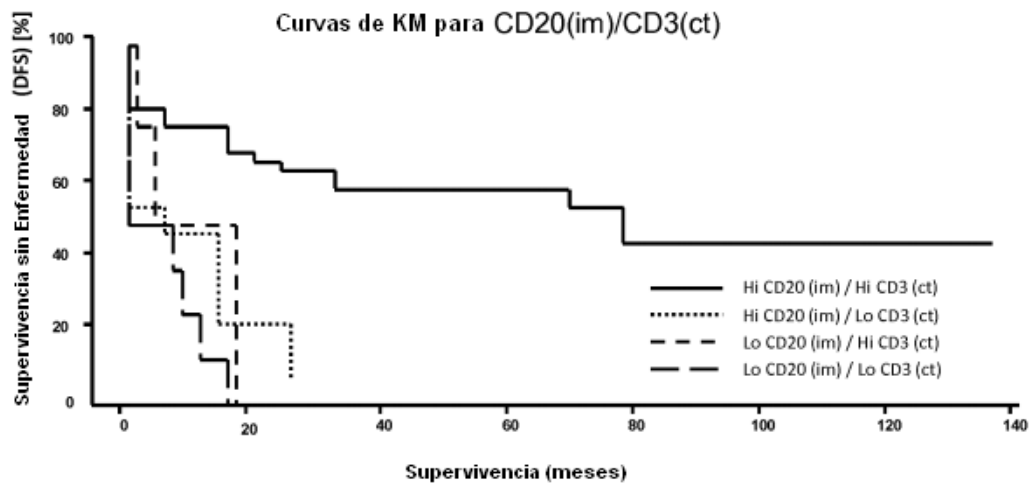


Figura 4



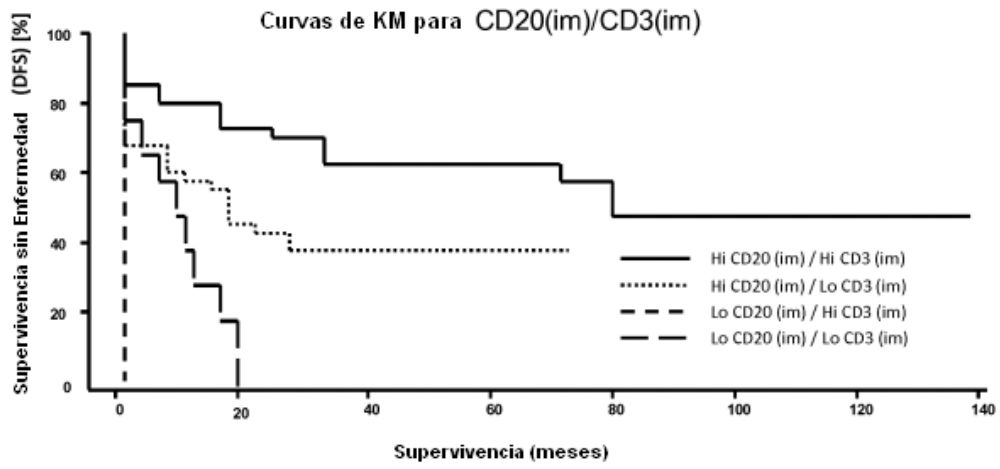


Figura 5

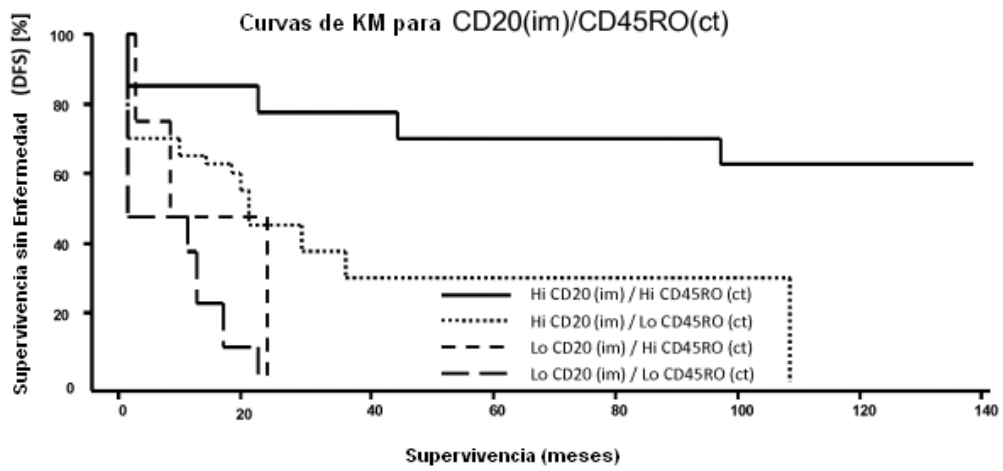


Figura 6

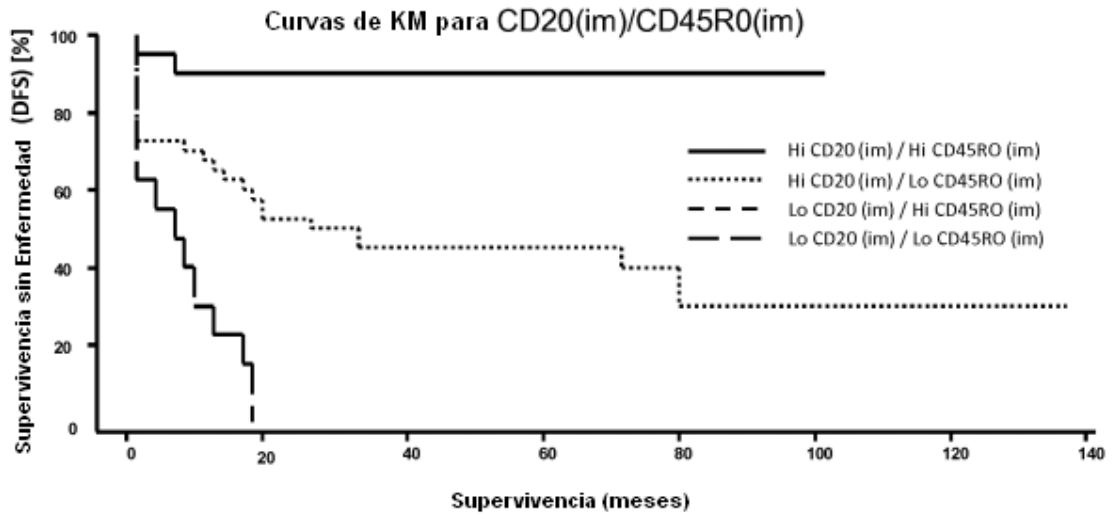


Figura 7

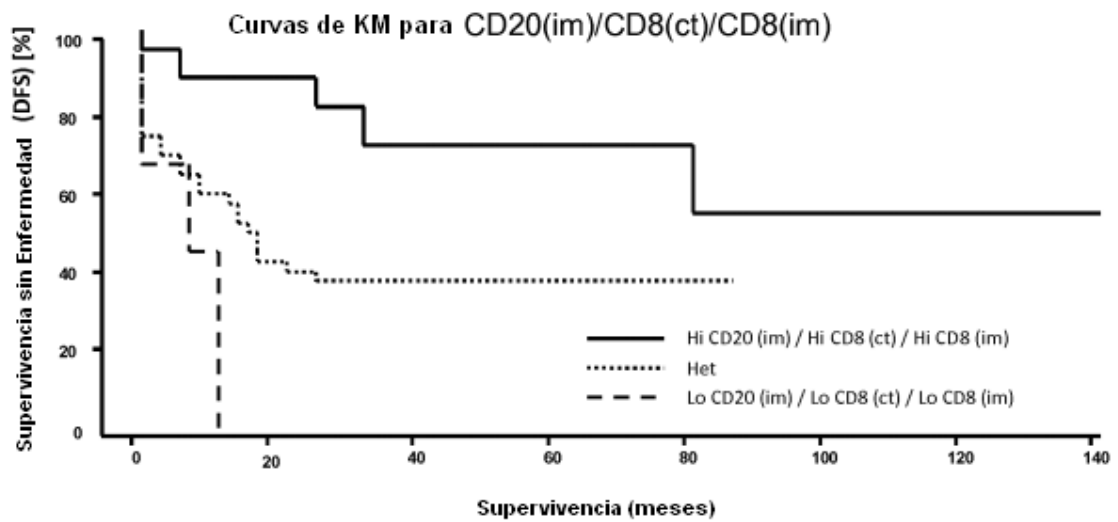


Figura 8

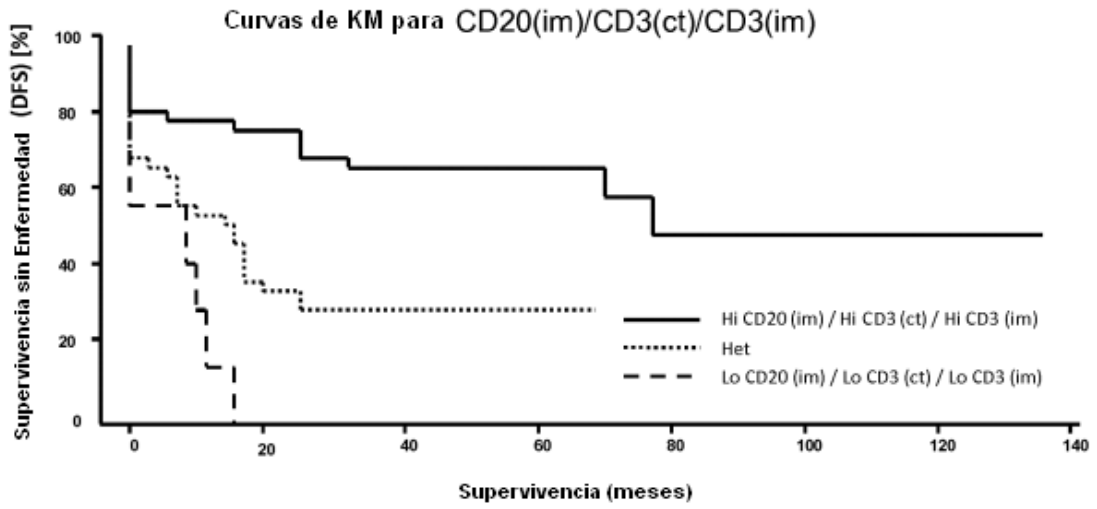


Figura 9

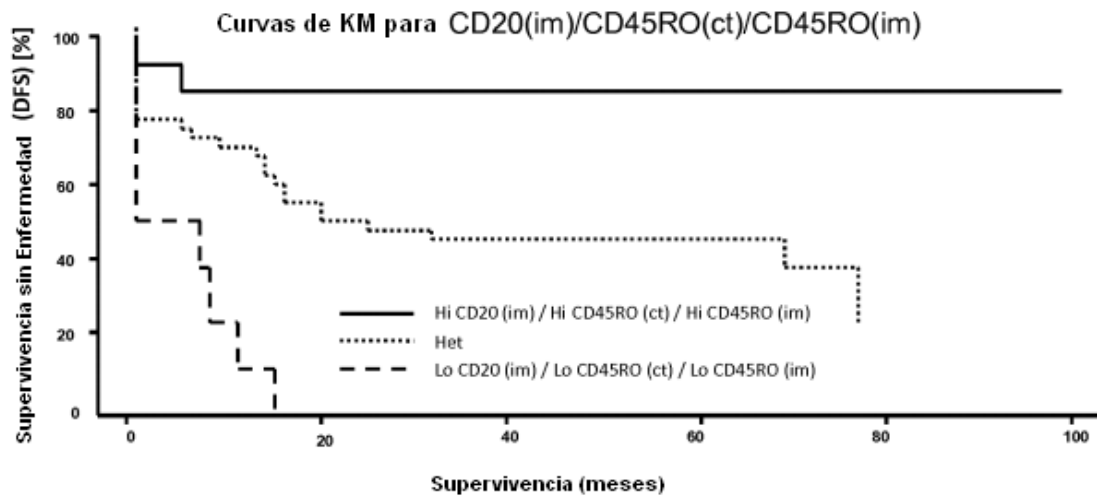


Figura 10

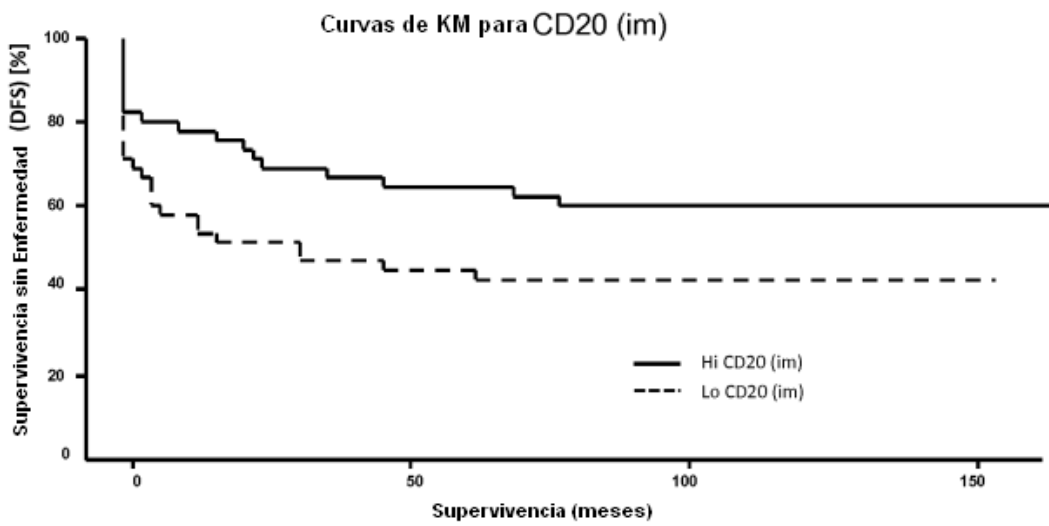


Figura 11