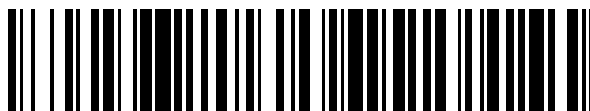


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 560**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2006** **E 16171155 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 3088894**

54 Título: **Uso de IRF-1 en un método in vitro para el pronóstico de la progresión y del resultado de un cáncer en un paciente**

30 Prioridad:

19.10.2005 EP 05292200
02.02.2006 US 764356 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2018

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 (AP-HP) (33.3%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 674 560 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

Uso de IRF-1 en un método *in vitro* para el pronóstico de la progresión y del resultado de un cáncer en un paciente

5 **Sector de la técnica**

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

10 Más precisamente, esta invención se refiere al pronóstico del resultado de un cáncer en un paciente, cuyo pronóstico se basa en la cuantificación de uno o varios marcadores biológicos que son indicativos de la presencia de, o alternativamente el nivel de, la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra dicho cáncer.

Estado de la técnica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

De forma adicional, Zhang et al. (2003, New England Journal of Medicine, Vol. 348 (3): 203-213) demostraron,

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

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

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

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

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

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

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

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de pacientes respecto de la progresión de un tumor tal como se define en las reivindicaciones.

Descripción de las figuras.

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

La figura 2 muestra la media $\pm$ SEM de células CD45RO+/mm² en los diferentes grupos de pacientes (estadios N y M, según la estadificación TNM AJCC/UICC, na: no aplicable). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando un ensayo Mann-Whitney. * Representa diferencias significativas ($P < 0,05$).

La figura 3 muestra las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia total (OS) y supervivencia libre de enfermedad (DFS) en CD45RO-hi (>250 células CD45RO+/mm², n=176, línea superior), y en CD45RO-lo (<250 células CD45RO+/mm², n=160, línea inferior).

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

Figura 5. La significancia de todos los cortes se representó en función del número de CD3_{CT}/mm² (negro), y CD3_{IM}/mm² (verde) para la supervivencia total. También se representan cortes para el 25, 50 y 75% del grupo para las dos regiones. Los valores de P por encima de la línea horizontal ($P = 0,05$) son todos significativos.

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

La figura 7 muestra las curvas de Kaplan-Meier para la duración de DFS (7A) y OS (7B) según la presencia de densidad alta de CD3 en el centro del tumor (CD3_{CT}^{Hi}) y densidad alta de CD3 en el borde invasivo (CD3_{IM}^{Hi}) (gris grueso), CD3_{CT} alta y CD3_{IM} baja (gris delgado), CD3_{CT} baja y CD3_{IM} alta (negro delgado), y CD3_{CT} baja y CD3_{IM} baja (negro grueso), en 415 pacientes con cáncer colorrectal (prueba estadística de rango logarítmico, $P < 10^{-4}$ para OS y DFS; ** $P < 10^{-4}$, * $P < 0,05$). La figura 7C muestra los análisis combinados de las regiones del tumor de marcadores inmunes adaptativos. Se representa la DFS media de pacientes con densidades altas (histogramas inferiores) o densidades bajas (histogramas superiores) de células inmunes adaptativas en las dos regiones del tumor (CT más IM).

Figura 8

(8a): Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la DFS según los estadios de Dukes (Dukes A: línea roja (n=75), B: verde (n=137), C: azul (n=99), y D: negra (n=95)) en 415 pacientes con cáncer colorrectal.

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

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

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

Figura 9: Valores de P de rango logarítmico para la duración de la DFS según la presencia de densidad alta de CD3+ (CD3^{Hi}, grupo A) y densidad baja de CD3+ (CD3^{Lo}, grupo B) en el centro del tumor (negro), y en el borde invasivo del tumor (gris). Se representan las densidades de células CD3+ (célula / mm²), y el número de pacientes en cada grupo (A y B). Los valores de P son significativos para un intervalo grande de cortes (50-1.000 células/mm² en el centro del tumor, y 80-1.300 células/mm² en el borde invasivo del tumor). Los resultados obtenidos son fácilmente reproducibles por otros grupos como un gran intervalo de valores de corte, (centrado en el corte con un valor de P mínimo que se determinó) y discriminaba el resultado de paciente.

Figura 10: (Fig. 10-A) Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM (Estadios I: línea roja (n=75), II: verde (n=137), III: azul (n=99), y IV: negra (n=95)) en pacientes con CRC. (Fig. 10-B) Las curvas de Kaplan-Meier ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM (tal como en el panel A) y respecto a la densidad de células CD3+ en regiones de tumor combinadas (CD3_{CT}^{Lo}CD3^{Lo}, líneas gruesas, n=93; CD3_{CT}^{Hi}CD3^{Hi}, líneas delgadas, n=109). El subgrupo de pacientes que no parecían tener una reacción inmune coordinada in situ en regiones del tumor (Hi/Lo o Lo/Hi para densidades de células CD3+) presentaban curvas de Kaplan-Meier similares al grupo entero. (Fig. 10-C) Las curvas

de Kaplan-Meier ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM y respecto a la densidad de células CD3+ y CD45RO+ en regiones de tumor combinadas (CD3_{CT}^{Lo}CD3_{IM}^{Lo} más CD45RO_{CT}^{Lo}CD45RO_{IM}^{Lo}, líneas gruesas, n=16; CD3_{CT}^{Hi}CD3_{IM}^{Hi} más CD45RO_{CT}^{Hi}CD45RO_{IM}^{Hi}, líneas delgadas, n=88). Los valores de corte fueron 250, 640, 60, y 190 para CD3_{CT}, CD3_{IM}, CD45RO_{CT}, y CD45RO_{IM}, respectivamente. Prueba estadística de rango logarítmico, ** $P < 10^{-4}$.

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

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

Figura 13: Se representan curvas de Kaplan-Meier que ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según la organización de células CD45RO+ y CD8+ dentro de las regiones del tumor (CT e IM). La presencia de densidades altas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO/CD8-CT/IM-hi, rojo), de densidades heterogéneas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO/CD8-CT/IM-het, verde), de densidades bajas de células CD45RO+ y CD8+ en la región CT (CD45RO-CT-lo/CD8-CT-lo, azul), de densidades bajas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO/CD8-CT/IM-lo, negro), en 272 pacientes con estadio I/II de cáncer colorrectal (prueba estadística de rango logarítmico, $P < 0,001$ para todas las comparaciones). Se representa todo el grupo de pacientes con estadio I/II de cáncer colorrectal (línea negra punteada). Por lo tanto, >95% de los pacientes CD45RO/CD8-CT/IM-hi estaban libres de la enfermedad después de 18 años, mientras que el 0% de pacientes CD45RO/CD8-CT/IM-lo estaban libres de la enfermedad después de solo 2 años.

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

Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

Tal como se detallará a continuación, cuando se ha determinado una correlación estadística entre (i) la presencia de, o el nivel de, uno o más marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa, tal como se describe en la especificación y (ii) el resultado real del cáncer en los pacientes, que abarca la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y la supervivencia total (OS), se han obtenido valores de P superiores a 10^{-8} , que se pueden comparar con valores de P de 5×10^{-2} a 1×10^{-3} que se daban a conocer en diversos trabajos de la técnica anterior, tales como, de

forma ilustrativa, los de Zhang et al. (2003, *Supra*), Diederischen et al. (2003, *Supra*) u Oshikiri et al. (2003, *Supra*).

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

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

De forma importante, se ha identificado en esta descripción una agrupación dominante de genes co-modulados para la inmunidad adaptativa de T_H1 , agrupación que incluye TBX1 (factor de transcripción 21 de la caja T), IRF1 (factor regulador de interferón 1), IFNG (interferón gamma), CD3Z (CD3 ζ), CD8, GNLY (granulinsina) y GZMB (granzima B). Además, se ha encontrado una correlación inversa entre la expresión de estos genes y la recurrencia tumoral.

Otra agrupación de genes altamente significativa incluye PDCD1LG1, VEGF, TNFRSF6B, IRF1, IL8RA Y SELL.

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

En primer lugar, se ha descubierto que existe una correlación elevada entre una densidad alta de células T en el sitio del tumor y un resultado favorable de la enfermedad. En particular, se ha demostrado que un resultado positivo del cáncer está altamente correlacionado con la cuantificación de una densidad alta de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor, en la parte central del tumor o bien en el borde invasivo del mismo.

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

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

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

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

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

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

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

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

cuando dicho marcador biológico se ensaya tanto en el centro del tumor (CT) como en el borde invasivo (IM).

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

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

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

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

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

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

En cambio, se ha descubierto, de forma sorprendente, que una respuesta inmune adaptativa *in situ* débil se correlaciona con un mal pronóstico, incluso en pacientes con una invasión del tumor mínima (clasificación A de Dukes).

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

Por lo tanto, se ha descubierto por primera vez, según la invención, que la medición del nivel de la respuesta inmune adaptativa de un paciente con cáncer se puede utilizar como única medición para la predicción del resultado de la enfermedad de cáncer, sin ningún requisito de datos adicionales, y particularmente, sin ningún requisito de datos clínico-patológicos aportados por procedimientos de estadificación del cáncer convencionales.

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

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

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

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

(i) las posibilidades de existencia de metástasis;

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

(iii) las posibilidades de existencia de un tiempo largo libre de enfermedad (DFS) y/o un tiempo largo de

supervivencia total (OS); es decir, un tiempo de DFS o un tiempo de OFS de 5 años o más después de los ensayos con el procedimiento de pronóstico *in vitro* según la invención.

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

Preferiblemente, cuando la etapa a) consiste en el análisis de la expresión de uno o más genes, es decir, uno o más marcadores biológicos pertinentes, entonces la cuantificación de la expresión de los mencionados uno o más genes se realiza a partir de la muestra de tejido completa.

Preferiblemente, cuando la etapa a) consiste en la evaluación de las densidades celulares inmunes específicas, por ensayos inmunohistoquímicos para uno o más marcadores biológicos expresados en células, entonces la cuantificación del mencionado uno o más marcadores biológicos se realiza separadamente en, como mínimo, dos muestras de tejido tumoral distintas, entre las muestras de tejido tumoral numeradas (i) a (vi) anteriormente. Lo más preferiblemente, según esta realización, la cuantificación del mencionado uno o más marcadores biológicos se realiza separadamente tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el borde invasivo (IM).

Una muestra de tejido tumoral, independientemente de si se obtiene a partir del centro del tumor, del borde invasivo del tumor, o de los ganglios linfáticos más cercanos, engloba trozos o cortes de tejido que se han eliminado del centro del tumor o del borde invasivo que rodea el tumor, incluyendo después de una resección del tumor quirúrgica o después de la recogida de una muestra tumoral para biopsia, para una cuantificación adicional de uno o más marcadores biológicos, de forma destacable, a través de procedimientos de histología o inmunohistoquímica, mediante procedimientos de citología de flujo y mediante procedimientos de análisis de la expresión de genes o proteínas, incluyendo el análisis genómico y proteómico. Podrá apreciarse que las muestras de tejido tumoral se pueden utilizar en el procedimiento de pronóstico del cáncer de la presente invención. En estas realizaciones, el nivel de expresión del marcador biológico se puede calcular mediante el cálculo de la cantidad (por ejemplo, la cantidad o concentración absoluta) del marcador biológico en una muestra de tejido tumoral, por ejemplo, un frotis de tejido tumoral obtenido a partir de un paciente. La muestra de células, por supuesto, puede someterse a una serie de técnicas preparativas y de almacenamiento posteriores a la recogida muy conocidas (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos y/o proteínas, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de valorar la cantidad de marcador biológico en la muestra. De forma similar, los frotis de tejido tumoral también pueden someterse a técnicas preparativas y de almacenamiento posteriores a la recogida, por ejemplo, fijación.

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

Tal como se pretende en esta descripción, la expresión "la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra dicho tumor" engloba cualquier respuesta inmune adaptativa de dicho paciente a través de la acción directa (dependiente de TCR) o indirecta (independiente de TCR), o de ambas, hacia dicho cáncer.

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

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

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

Inmunidad adaptativa

En comparación con la inmunidad innata, la inmunidad adquirida (adaptativa) se desarrolla cuando el cuerpo se expone a varios antígenos y se construye una defensa que es específica de ese antígeno.

La respuesta inmune adaptativa es específica de antígeno y puede tardar días o más tiempo en desarrollarse. Los tipos de células con papeles críticos en la inmunidad adaptativa son células presentadoras de antígeno que incluyen macrófagos y células dendríticas. La estimulación de subtipos de células T, la activación de células B y la producción de anticuerpos, dependientes de antígeno, y la activación de macrófagos y de células NK desempeñan papeles importantes en la inmunidad adaptativa. La respuesta inmune adaptativa también incluye el desarrollo de memoria inmunológica, un proceso que continúa desarrollándose toda la vida y aumenta las futuras respuestas a un

determinado antígeno.

Los linfocitos, un tipo especial de glóbulos blancos, contienen subgrupos, los linfocitos B y T, que son elementos clave en las respuestas inmunes adquiridas. Los linfocitos B (también denominados células B) producen anticuerpos. Los anticuerpos atacan a un antígeno específico y facilitan al fagocito destruir el antígeno. Los linfocitos T (células T) atacan antígenos directamente, y aportan control de la respuesta inmune. Se desarrollan células B y células T que son específicas de UN tipo de antígeno. Cuando existe exposición a un antígeno diferente, se forman células B y células T diferentes.

A medida que los linfocitos se desarrollan, normalmente aprenden a reconocer los tejidos del mismo cuerpo (propios), como diferentes de tejidos y partículas que no se encuentran normalmente en el cuerpo (no propios). Una vez se forman células B y células T, algunas de estas células se multiplicarán y aportarán "memoria" al sistema inmune. Esto permite al sistema inmune responder de forma más rápida y más eficaz la próxima vez que un individuo se expone al mismo antígeno, y en muchos casos evitarán que el individuo se ponga enfermo. Por ejemplo, la inmunidad adaptativa explica por qué un individuo que ha tenido varicela se denomina "inmune" a sufrir de nuevo varicela.

Sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo, también denominado sistema inmune adquirido, explica el hecho interesante de que cuando la mayor parte de los mamíferos sobreviven a una infección inicial por un patógeno, generalmente se vuelven inmunes a una enfermedad posterior provocada por el mismo patógeno. Este hecho lo explota la medicina moderna mediante la utilización de las vacunas. El sistema inmune adaptativo se basa en células inmunes denominadas leucocitos (o glóbulos blancos) que son producidos por células madre en la médula ósea. El sistema inmune se puede dividir en dos partes. Muchas especies, entre las que se incluyen los mamíferos, tienen el siguiente tipo:

El sistema inmune humoral, que actúa contra las bacterias y virus en los líquidos corporales (tales como la sangre). Sus medios primarios de acción son las inmunoglobulinas, también denominadas anticuerpos, que son producidos por las células B (B significa que se desarrollan en la médula ósea).

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

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

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

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

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

Células T cooperadoras (o TH): una célula T cooperadora (o TH) es una célula T (un tipo de glóbulo blanco) que tiene en su superficie receptores de antígeno que se pueden unir a fragmentos de antígenos expuestos por las moléculas MHC de clase II que se encuentran sobre las células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Una vez unida al antígeno, la célula TH prolifera y se diferencia en células TH activadas y células TH de memoria. Las células TH activadas secretan citoquinas, proteínas o péptidos que estimulan otros linfocitos; la más común es la interleuquina2 (IL-2), que es un potente factor de crecimiento de las células T. Las células TH activadas, que proliferan se pueden diferenciar en dos subtipos principales de células, células Th1 y Th2. Estos subtipos se definen en base a las citoquinas específicas producidas. Las células Th1 producen gamma-interferón e interleuquina 12, mientras que las células Th2 producen interleuquina-4, interleuquina-5 e interleuquina-13. Las células TH de

memoria son específicas del primer antígeno que encuentran y se pueden llamar durante la segunda respuesta inmune. La mayor parte de las células TH presentan en su superficie celular la proteína CD4, que tiene atracción hacia partes de la molécula MHC de clase II. Esta afinidad mantiene la célula TH y la célula diana unidas íntimamente durante la activación específica de antígeno. Las células TH con una proteína de superficie CD4 se denominan células T CD4+. La disminución del número de células T CD4+ es el mecanismo primario mediante el cual el VIH causa el SIDA.

Otras definiciones de términos relevantes

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

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

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

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

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

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

Etapas a) del procedimiento

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

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

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

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

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

para cada una de las proteínas marcadoras producidas de forma específica por el sistema inmune, que se incluyen en la combinación de marcadores.

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

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

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

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

Etapa b) del procedimiento

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

Primera realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

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

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

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

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

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

c) calcular, a partir de dicha colección de valores de cuantificación obtenidos al final de la etapa b), el valor de cuantificación promedio para dicho marcador biológico, por lo cual se obtiene un valor de referencia predeterminado para dicho marcador biológico que se correlaciona con un pronóstico del cáncer específico.

65 El "tratamiento contra el cáncer" al que se hace referencia en la definición de la anterior etapa a) se refiere a cualquier tipo de terapia del cáncer a la que se han sometido pacientes con cáncer previamente a la recolección de

las muestras de tejido tumoral, entre las que se incluyen la radioterapia, quimioterapia y cirugía, por ejemplo, resección quirúrgica del tumor.

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

Segunda realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

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

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

- a) seleccionar un marcador biológico para el cual se va a determinar un valor de referencia;
- b) proporcionar una colección de muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer;
- c) proporcionar, para cada muestra tumoral provista en la etapa b), información relacionada con el resultado clínico real para el paciente con cáncer correspondiente;
- d) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios para dicho marcador biológico seleccionado en la etapa a);
- e) cuantificar dicho marcador biológico en cada muestra de tejido tumoral que está comprendida en la colección provista en la etapa b);
- f) clasificar dichas muestras de tumor en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico provisto en la etapa c), respectivamente:
 - (i) un primer grupo que comprende muestras de tumor que presentan un valor de cuantificación para dicho marcador que es inferior a dicho valor de cuantificación arbitrario que está comprendido en dicha serie de valores de cuantificación;
 - (ii) un segundo grupo que comprende muestras de tumor que presentan un valor de cuantificación para dicho marcador que es superior a dicho valor de cuantificación arbitrario que está comprendido en dicha serie de valores de cuantificación;

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

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

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

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

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

Tal como se ha descrito anteriormente, dicho procedimiento permite establecer un valor de "corte" único que permite la discriminación entre un pronóstico del resultado malo y bueno. En la práctica, tal como se describe en los ejemplos de esta descripción, generalmente se obtienen valores de significancia estadística elevados (por ejemplo, valores de P bajos) para un intervalo de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no solo para un único valor de cuantificación arbitrario. De este modo, en una realización alternativa del procedimiento para la determinación de los valores de "corte" anteriores, se establece de forma arbitraria un valor de significancia estadística mínimo (umbral mínimo de significancia, por ejemplo, umbral máximo de valor de P) y se guarda el intervalo de valores de cuantificación arbitrarios para los cuales el valor de significancia estadística calculado en la etapa g) es superior

(más significativo, por ejemplo, valor de P inferior), por lo cual se aporta un intervalo de valores de cuantificación. Dicho intervalo de valores de cuantificación comprende un valor de "corte" según la invención. Según esta realización específica de un valor de "corte", se puede determinar un pronóstico del resultado clínico malo o bueno comparando, en la etapa b) del procedimiento de pronóstico de la invención, el valor obtenido en la etapa a) con el intervalo de valores que delimitan dicho valor de "corte", para un marcador biológico específico. En algunas realizaciones, un valor de corte que comprende un intervalo de valores de cuantificación para el marcador biológico considerado, comprende un intervalo de valores centrados en el valor de cuantificación para el cual se encuentra el valor de significancia estadística más alto (por ejemplo, en general, el valor de P mínimo que se encuentra).

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

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

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

En algunas realizaciones, el valor predeterminado de referencia comprende un valor de "corte", tal como se ha descrito anteriormente, valor de "corte" que comprende un valor de cuantificación promedio para el marcador biológico de interés que discrimina entre un pronóstico del cáncer malo y un pronóstico del cáncer bueno.

Tercera realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

También, de forma ilustrativa, en realizaciones en las que el marcador biológico consiste en el nivel de expresión de un gen relacionado con la respuesta inmune del cuerpo humano, el valor de referencia predeterminado puede consistir en el valor de la expresión génica que se correlaciona con un mal pronóstico del cáncer, por ejemplo, recaídas o recurrencias, tiempo de supervivencia corto, etc., o al contrario puede consistir en el valor de la expresión génica que se correlaciona con un buen pronóstico del cáncer, por ejemplo, no metástasis en absoluto o tiempo de supervivencia libre de enfermedad largo. El valor de la expresión génica puede expresarse como cualquier unidad arbitraria. Por ejemplo, el valor de la expresión génica puede expresarse como la diferencia (deltaCT) entre (i) la cantidad del ARNm específico del marcador biológico y (ii) la cantidad de un ARNm no relacionado, encontrado en la muestra de tejido tumoral, tal como por ejemplo el ARNm 18S ribosómico. De forma ilustrativa, para el cáncer colorrectal humano, la diferencia entre (i) la cantidad del ARNm específico del marcador biológico y (ii) la cantidad de un ARNm no relacionado puede asignarse arbitrariamente para consistir en el deltaCT y en la media de todos los valores del grupo de referencia (por ejemplo, para pacientes que han experimentado etapas tempranas de procesos de metástasis (VELIPI) y recaídas, ajustado a "100%"). En estas realizaciones, el valor de cuantificación generado para un ARNm específico de un gen particular, en la etapa a) del procedimiento, es más de 100%, entonces se obtiene un mejor pronóstico del cáncer que con el valor de referencia predeterminado. Por ejemplo, esto se muestra en los ejemplos de esta descripción, cuando se usa de forma destacada ARNm específico de CD8 α , ARNm específico de GZM-B y ARNm específico de GNLY.

Comparación o comparaciones llevadas a cabo en la etapa b)

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

(i) el valor de cuantificación encontrado en la etapa a) para dicho marcador biológico; y

(ii) el valor de referencia correspondiente que ya se ha predeterminado para dicho marcador biológico.

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

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

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

(ii) una segunda etapa de comparación entre el valor de cuantificación obtenido en la etapa a) para dicho marcador biológico en el IM, con el valor de referencia predeterminado en el IM para dicho marcador biológico.

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

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

De forma más simple, dicha etapa de comparación b) puede incluir una clasificación de los valores de cuantificación medidos en la etapa a), para cada marcador biológico, y opcionalmente también para cada tipo de tejido tumoral ensayado, en dos grupos, respectivamente: (i) un primer grupo denominado "Hi" cuando el valor de cuantificación para dicho marcador biológico, opcionalmente en dicho tipo de tejido tumoral, es superior al valor de referencia correspondiente predeterminado y (ii) un segundo grupo denominado "Lo" cuando el valor de cuantificación para dicho marcador biológico, opcionalmente en dicho tipo de tejido tumoral, es inferior al valor de referencia correspondiente predeterminado. Si el resultado de la etapa de comparación b) comprende exclusivamente valores "Hi" para cada marcador ensayado, entonces se determina un pronóstico del resultado favorable para dicho cáncer. En cambio, si el resultado de la etapa de comparación b) comprende exclusivamente valores "Lo" para cada marcador ensayado, entonces se determina un pronóstico del resultado malo para dicho cáncer. Se determinan conclusiones intermedias para pacientes "heterogéneos", en los que, en la etapa de comparación b), los valores de cuantificación "Hi" se encuentran para uno o más de los marcadores biológicos ensayados y los valores de cuantificación "Lo" se encuentran para los marcadores restantes de la combinación de marcadores biológicos ensayados, tal como se describe en los ejemplos de esta descripción.

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

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

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

De la forma más preferente, para calcular unos valores de referencia predeterminados exactos, dichos valores de referencia se predeterminan a partir, como mínimo, de 50 valores de cuantificación, para un marcador biológico específico, utilizando, de este modo, muestras de tejido que provienen, como mínimo, de 50 pacientes con cáncer que han experimentado un resultado clínico malo o bueno específico, por ejemplo, DFS u OFS de más de 5 años después del diagnóstico. En realizaciones preferentes, se obtiene un valor de referencia predeterminado, como

mínimo, a partir de 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 o más valores de cuantificación para un marcador biológico específico.

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

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

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

Etapa c) opcional del procedimiento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Combinaciones de marcadores biológicos

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

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

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

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

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

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

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

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

- 45 De la forma más preferente, cuando el procedimiento de pronóstico *in vitro* de la invención se lleva a cabo con marcadores biológicos que consisten en el nivel de expresión de genes de interés, entonces la etapa a) se lleva a cabo mediante procedimientos de análisis de la expresión génica, como análisis por PCR Taqman en tiempo real, empezando a partir del tejido tumoral completo que se recogió inicialmente del paciente con cáncer, por ejemplo, un tejido tumoral que se origina de una resección tumoral durante una operación quirúrgica.

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

- 55 Preferentemente, dicho, como mínimo, un marcador biológico, que se cuantifica en la etapa a) es el nivel de expresión de un ácido nucleico de interés en la muestra de tejido tumoral, generalmente la cantidad de ARNm codificado por un marcador génico específico.

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

- 65 En realizaciones adicionales del procedimiento, dicho, como mínimo, un marcador biológico consiste en el valor de

cuantificación de la expresión de un gen expresado específicamente por células del sistema inmune presentes en el sitio del tumor.

Una lista de los marcadores biológicos preferidos que pueden usarse para llevar a cabo el procedimiento de pronóstico de cáncer de la invención se listan en las Tablas 2, 4, 8, 9 y 10. Las Tablas 2, 9 y 10 contienen, para cada marcador biológico que se lista, el número de acceso a sus secuencias de ácido nucleico y aminoácidos, según está disponible en la base de datos Internacional GenBank.

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

De este modo, el procedimiento de pronóstico del cáncer según la invención es potencialmente útil para determinar el pronóstico de pacientes para la progresión de un cáncer seleccionado del grupo que comprende cáncer adrenocortical, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y sistema nervioso central, cáncer de mama, enfermedad de Castleman, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer laríngeo e hipofaríngeo, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de seno de la cavidad nasal y paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándula salivar, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer tiroideo, cáncer vaginal, cáncer vulvar y cáncer uterino.

En el procedimiento de la invención, dicho como mínimo un marcador biológico es IRF1. Los marcadores biológicos distintos adicionales pueden seleccionarse del grupo que consiste en los marcadores biológicos siguientes:

(i) *Varios marcadores biológicos*

ICAM-2/CD102, 4-1BB/TNFRSF9, IFN-gamma R1, IFN-gamma R2, B7-1/CD80, IL-1 RI, IL-2 R alfa, BLAME/SLAMF8, IL-2 R beta, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, IL-7 R alfa, CCR9, CXCR1/IL-8 RA, CD2, CD3épsilon, CD3zeta, CD3gamma, CD4, CD4+/45RA-, IL-12 R beta 1, CD4+/45RO-, IL-12 R beta 2, CD4+/CD62L-/CD44, CD4+/CD62L+/CD44IL-17, CD5, Integrina alfa 4/CD49d, CD6, integrina alfa E/CD103, CD8, Integrina alfa M/CD11b, CD8+/45RA-, Integrina alfa X/CD11c, CD8+/45RO-, Integrina beta 2/CD18, CD27/TNFRSF7, LAG-3, CD28, LAIR1, CD30/TNFRSF8, LAIR2, CD31/PECAM-1, Ligando CD40/TNFSF5, NCAM-L1, CD43, NTB-A/SLAMF6, CD45, CD83, CD84/SLAMF5, RANK/TNFRSF11A, L-Selectina, CD229/SLAMF3, SIRP beta 1, CD69, SLAM, Cadena gamma Común/IL-2 R gamma, CRACC/SLAMF7, CX3CR1, CXCR3, CXCR4, CXCR6, TNF RI/TNFRSF1A, TNF RII/TNFRSF1B, Fas/TNFRSF6, Ligando Fas/TNFSF6, TSLP, TSLP R, ICAM-1/CD54, IL-2, IFN-gamma, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13,

(ii) *Marcadores biológicos de células Th1/Th2:*

IL-2R Cadena beta Común, Cadena gamma Común/IL-2 R gamma, IFN-gamma, IFN-gamma R1, IL-12, IFN-gamma R2, IL-12 R beta 1, IL-2, IL-12 R beta 2, IL-2 R alfa, IL-2 R beta, IL-24, TNF RI/TNFRSF1A, TNF RII/TNFRSF1B, IL-4 R, TNF-beta/TNFSF1B,

(iii) *Marcadores biológicos de la familia de los Interferones:*

IFN alfa, IFN beta, IFN-alfa/beta R1, IFN-alfa/beta R2, IFN-gamma R1, IFN-gamma R2, IFN-alfa A, IFN-alfa/beta R2, IFN-alfa B2, IFN-beta, IFN-alfa C, IFN-gamma, IFN-alfa D, IFN-alfa G, IFN-omega, IFN-alfa H2,

(iv) *Marcadores biológicos de la Familia del Receptor de Cadena gamma Común:*

Cadena gamma Común/IL-2 R gamma, IL-7 R alfa, IL-2, IL-9, IL-2 R alfa, IL-9 R, IL-2 R beta, IL-15, IL-15 R alfa, IL-21, IL-7, IL-21 R, IL-31,

(v) *Marcadores biológicos de Quimioquinas y Receptores CX3C:*

Ligandos Quimioquina CX3C, CX3CL1/Fractalkina,

Receptores de Quimioquina CX3C, CX3CR1,

(vi) *Marcadores biológicos de Quimioquinas y Receptores CXC,*

Ligandos Quimioquina CXC, CXCL13/BLC/BCA-1, CXCL11/I-TAC, CXCL14/BRAK, CXCL8/IL-8, CINC-1, CXCL10/IP-10/CRG-2, CINC-2, CINC-3, CXCL16, CXCL15/Lungkina, CXCL5/ENA, CXCL9/MIG, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, GRO, CXCL4/PF4, CXCL1/GRO alfa, CXCL12/SDF-1, CXCL2/GRO beta, Quimioquina-1 de Timo, CXCL3/GRO gamma,

Receptores de Quimioquina CXC, CXCR6, CXCR3, CXCR1/IL-8 RA, CXCR4, CXCR2/IL-8 RB, CXCR5,

(vii) Marcadores biológicos de Quimioquinas y Receptores CC,

Ligandos Quimioquina CC, CCL21/6Ckina, CCL12/MCP-5, CCL6/C10, CCL22/MDC, CCL28, CCL3L1/MIP-1 alfa Isoforma LD78 beta, CCL27/CTACK, CCL3/MIP-1 alfa, CCL24/Eotaxina-2, CCL4/MIP-1 beta, CCL26/Eotaxina-3, CCL15/MIP-1 delta, CCL11/Eotaxina, CCL9/10/MIP-1 gamma, CCL14a/HCC-1, MIP-2, CCL14b/HCC-3, CCL19/MIP-3 beta, CCL16/HCC-4, CCL20/MIP-3 alfa, CCL1/I-309/TCA-3, CCL23/MPIF-1, MCK-2, CCL18/PARC, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCL17/TARC, CCL7/MCP-3/MARC, CCL25/TECK, CCL13/MCP-4CC Receptores de Quimioquina, CCR1, CCR7, CCR2, CCR8, CCR3, CCR9, CCR4, D6, CCR5, HCR/GRAM-A/B, CCR6

(viii) Marcadores biológicos de Inhibidores de Quimioquina CC

CCI, Homólogos de Quimioquina Virales CC, MCV-tipo-II, MIP-II, MIP-I, MIP-III

(ix) Marcadores biológicos de Quimioquinas y Receptores C

La subfamilia C (gamma) carece del primer y tercer residuos de cisteína. La linfotactina (también conocida como SCM-1 alfa) y SCM-1 beta son actualmente los dos únicos miembros de la familia. Ambos tienen actividad quimiotáctica para linfocitos y células NK.

Ligandos Quimioquina C, XCL1/Linfotactina

Receptores de Quimioquina C, XCR1

(x) Marcadores biológicos de otras interleuquinas

IL-12, IL-12 R beta 1, IL-12 R beta 2, IL-27, IL-15, IL-31

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

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

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

En realizaciones aún adicionales del procedimiento, como ya se ha mencionado anteriormente, los valores de cuantificación para una combinación de marcadores biológicos se obtienen en la etapa a) del procedimiento de pronóstico de cáncer de la invención.

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

Habitualmente, en las realizaciones en las que se lleva a cabo el procedimiento de pronóstico del cáncer de la invención con una combinación de marcadores biológicos, no se cuantifican más de 50 marcadores biológicos distintos en la etapa a). En la mayor parte de las realizaciones, se cuantifica una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50 marcadores biológicos distintos. Sin embargo, como ya se ha mencionado previamente en la presente especificación, el número de marcadores combinados que se requieren para conseguir una relevancia estadística alta (por ejemplo, P menor de 10^{-3}), dependerá del tipo de técnica para cuantificar dicha combinación de marcadores biológicos, en la etapa a) del procedimiento de pronóstico *in vitro*.

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

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

Procedimientos generales para la cuantificación de marcadores biológicos

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

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

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

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

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

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

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

marcador que ha experimentado toda o una parte de su modificación normal posterior a la traducción.

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

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

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

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

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

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

Por ejemplo, un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de este tipo implicaría anclar la sonda sobre un soporte de fase sólida, al que también se hace referencia como sustrato, y detectar complejos de marcador diana/sonda anclados sobre la fase sólida al final de la reacción. En una realización de un procedimiento de este tipo, se puede anclar una muestra de un individuo, en la que se va a ensayar la cuantificación del marcador biológico, sobre un soporte transportador o de fase sólida. En otra realización, es posible la situación inversa, en la que la sonda se puede anclar a una fase sólida y se puede dejar una muestra de un individuo que reaccione como un componente no anclado del ensayo.

Existen muchos procedimientos establecidos para anclar componentes de ensayo a una fase sólida. Entre éstos se incluyen, sin limitación, moléculas de marcador o sonda que están inmovilizadas mediante conjugación de biotina y estreptavidina. Dichos componentes de ensayo biotinilados se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) utilizando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, un kit de biotilación, Pierce Chemicals,

Rockford, Ill.), e inmovilizar en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). En algunas realizaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados se pueden preparar previamente y almacenar.

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

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

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

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

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

De forma alternativa, en otra realización, se pueden llevar a cabo ensayos de diagnóstico y pronóstico análogos con marcador y sonda como solutos en una fase líquida. En un ensayo de este tipo, el marcador y la sonda que forman un complejo se separan de los componentes que no forman un complejo por cualquiera de una diversidad de técnicas estándares, entre las que se incluyen, sin limitación: centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En la centrifugación diferencial, los complejos marcador/sonda se pueden separar de los componentes del ensayo que no forman un complejo a través de una serie de etapas de centrifugación, debido a un equilibrio de sedimentación diferente de complejos basado en sus tamaños y densidades diferentes (véase, por ejemplo, Rivas, G., y Minton, A. P., 1993, Trends Biochem Sci. 18 (8):284-7). También se pueden utilizar técnicas cromatográficas estándar para separar las moléculas que forman un complejo de las que no forman un complejo. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel separa moléculas en base a su tamaño, y a través de la utilización de una resina de filtración en gel adecuada en un formato de columna, por ejemplo, el complejo relativamente más grande se puede separar de los componentes que no forman un complejo relativamente más pequeños. De forma similar, las propiedades de carga relativamente diferente del complejo marcador/sonda si se compara con los componentes que no forman un complejo se pueden explotar para diferenciar el complejo de los componentes que no forman un complejo, por ejemplo, a través de la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Los especialistas en la técnica conocen bien dichas resinas y técnicas cromatográficas (véase, por ejemplo, Heegaard, N. H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11 (1-6):141-8; Hage, D. S., y Tweed, S. A. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997 Oct. 10; 699 (9-2):499-525). También se puede utilizar la electroforesis en gel para separar componentes del ensayo que forman un complejo de los componentes no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., ed., Current

Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987-1999). En esta técnica, los complejos de proteína o ácido nucleico se separan en base al tamaño o la carga, por ejemplo. A efectos de mantener la interacción de unión durante el proceso electroforético, habitualmente son preferentes materiales de la matriz de gel y condiciones no desnaturizantes en ausencia de un agente reductor. También se puede utilizar la técnica SELDI-TOF sobre una matriz o perlas acoplados con la superficie activa, o no, o superficie recubierta con anticuerpo, o perlas.

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

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

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

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

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

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

Como alternativa para hacer determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluto del marcador, las determinaciones se pueden basar en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un marcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un gen constitutivo "housekeeping" que se expresa de forma constitutiva. Entre los genes adecuados para la normalización se incluyen genes constitutivos, tales como el gen de

actina, gen 18S ribosómico, gen GAPD, o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de un paciente, con respecto a otra muestra, por ejemplo, una muestra que no es de cáncer colorrectal, o entre muestras de diferentes fuentes.

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

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

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

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

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

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

Cuantificación de marcadores biológicos por micromatrices de tejido

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

Las micromatrices de tejido se producen mediante un método de relocalización del tejido a partir de bloques de parafina histológica convencional, de modo que se puede ver el tejido de múltiples pacientes o bloques en el mismo portaobjetos. Esto se realiza utilizando una aguja para hacer una biopsia de secciones histológicas estándares y colocando la muestra en una matriz sobre un bloque de parafina como recipiente. Esta técnica fue descrita originariamente por Wan en 1987 (Wan, Fortuna y Furmansk; Journal of Immunological Methods). En algunas realizaciones de micromatrices de tejido, las muestras de tejido se colocan en posiciones específicas fijadas espacialmente en un bloque. Kononen et al. (Nature Medicine en 1998) dan a conocer la técnica de forma destacada.

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

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

Dado que estas muestras de tejido tumoral cilíndricas son pequeñas (0,4-1 mm de diámetro x 3-4 mm de altura), se pueden exponer hasta mil tejidos en un único bloque de parafina mientras se minimiza el daño y la necesidad del tejido. Además, estos bloques de parafina se pueden cortar de forma transversal en cientos de secciones de micromatrices de tejido, las cuales, a continuación, se pueden utilizar para diferentes análisis genéticos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cuantificación de marcadores biológicos por procedimientos de citometría de flujo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

También se han desarrollado un gran número de otros procedimientos para cuantificar ácidos nucleicos (Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98: 503-517, 1975; Sharp, P. A., et al., Methods Enzymol. 65: 750-768, 1980; Thomas, P. S., Proc. Nat. Acad. Sci., 77: 5201-5205, 1980). Más recientemente, se han desarrollado procedimientos de PCR y RT-PCR que son capaces de medir la cantidad de un ácido nucleico en una muestra. Una estrategia, por ejemplo, mide la cantidad de producto de PCR en la fase log de la reacción antes de la formación de mesetas de productos de reacción (Kellogg, D. E., et al., Anal. Biochem. 189: 202-208 (1990); y Pang, S., et al., Nature 343: 85-89 (1990)). Habitualmente se utiliza una secuencia de genes comprendida en todas las muestras en una cantidad relativamente constante para la normalización de la eficacia de la amplificación de muestras. Esta estrategia, sin embargo, presenta varios inconvenientes. El procedimiento requiere que cada muestra tenga cantidades de entrada iguales

del ácido nucleico y que la eficacia de la amplificación entre las muestras sea idéntica hasta el momento del análisis. Además, es difícil utilizar los procedimientos convencionales de cuantificación por PCR, tales como electroforesis en gel o hibridación por captura en placas para determinar que todas las muestras se analizan, de hecho, durante la fase log de la reacción, tal como requiere el procedimiento.

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

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

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

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

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

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

Monitorización de los tratamientos anticancerosos

La monitorización de la influencia de agentes (por ejemplo, compuestos fármaco) en el nivel de expresión de un marcador biológico de la invención puede aplicarse para la monitorización del estado de la respuesta inmune adaptativa del paciente con el tiempo. Por ejemplo, la eficacia de un agente para afectar la expresión de un marcador biológico puede monitorizarse durante tratamientos de sujetos que reciben tratamientos anticancerosos.

Además se desvela un procedimiento para monitorizar la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro candidato a fármaco) que comprende las etapas de (i) detectar, en una muestra pre-administración obtenida de un sujeto antes de la administración del agente, el nivel de expresión de uno o más marcadores biológicos seleccionados de la invención; (ii) detectar, en una o más muestras post-administración obtenidas del sujeto, el nivel de expresión del o de los marcadores biológicos; (iii) comparar el nivel de expresión del o de los marcadores biológicos en la muestra pre-administración con el nivel de expresión del o de los marcadores en la muestra o muestras post-administración; y (iv) determinar si la administración del agente al sujeto tiene que alterarse en consecuencia. Por ejemplo, la expresión disminuida del gen o genes del marcador biológico durante el curso del tratamiento puede ser indicativa de una dosificación ineficaz y la conveniencia de incrementar la dosificación. A la inversa, una expresión incrementada del gen o genes del marcador biológico puede ser indicativa de un tratamiento eficaz y no se necesita cambiar la dosificación.

Como ya se ha mencionado previamente en la presente especificación, la realización del procedimiento de pronóstico de cáncer de la invención puede indicar, con más precisión que los procedimientos de la técnica anterior, aquellos pacientes con alto riesgo de recurrencia del tumor que pueden beneficiarse de terapia adyuvante,

incluyendo inmunoterapia.

Por ejemplo, si, al final del procedimiento de pronóstico de cáncer de la invención, se determina un buen pronóstico de ausencia de metástasis o un pronóstico de un periodo largo de tiempo de supervivencia libre de enfermedad, entonces el tratamiento anticanceroso posterior no comprenderá ninguna quimioterapia adyuvante.

Sin embargo, si, al final del procedimiento de pronóstico de cáncer de la invención, se determina un mal pronóstico con metástasis o un mal pronóstico con un periodo corto de tiempo de supervivencia libre de enfermedad, entonces se administra al paciente la composición apropiada de quimioterapia adyuvante.

Además, si, al final del procedimiento de pronóstico de cáncer de la invención, se determina un mal pronóstico con metástasis o un mal pronóstico con un periodo corto de tiempo de supervivencia libre de enfermedad, entonces se administra al paciente la composición inmunoestimulante apropiada, incluyendo una composición farmacéutica que comprende una citoquina o quimioquina inmunoestimulante, incluyendo interleuquinas.

Las citoquinas o quimioquinas inmunoestimulantes preferidas se seleccionan del grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, G-CSF, IL-15, GM-CSF, IFN- γ , CXCL9, CXCL10, Fractalkina, MIG, IFN α , IL-18, IL-12, IL-23 e IL-31.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante, sin estar de ninguna manera limitada a, los ejemplos siguientes.

Ejemplos

A. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS DE LOS EJEMPLOS

Material y procedimientos de los ejemplos 1 a 4.

A.1. Pacientes y bases de datos

Se revisaron todos los casos de cáncer colorrectal (n=959) que se sometieron a una resección primaria del tumor en el Hospital Laennec/HEGP entre 1986 y 2004. El tiempo de observación en este grupo no seleccionado fue el intervalo entre diagnóstico y último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se controlaron en el último seguimiento para los pacientes que no habían tenido recaída o que habían muerto. La duración media del seguimiento fue de 44,5 meses. Seis pacientes de los que se había perdido el seguimiento se excluyeron del análisis. Se registraron los descubrimientos histopatológicos y clínicos según el sistema de estadificación UICC-TNM (Sobin LH, Wittekind C, (editores). "Clasificación UICC-TNM de tumores malignos" ("UICC TNM classification of malignant tumors"). 6ª ed. Nueva York: Wiley-Liss, 2002), tal como se describe en la tabla 1. Se definió la invasión metastásica temprana como la presencia de embolia vascular (VE), invasión linfática (LI), o invasión perineural (PI). Un tumor positivo a VELIPI tenía, como mínimo, uno de estos descubrimientos patológicos, mientras que un tumor negativo a VELIPI no tenía ninguno de estos tres descubrimientos. Los estados TNM y VELIPI de los tumores se determinaron a partir de informes histopatológicos en el momento de la resección. Se construyó una base de datos segura basada en Web, TME.db "Base de datos de microentorno tumoral" ("Tumor MicroEnvironment Database"), en un tercer nivel de arquitectura utilizando Java-2 Enterprise-Edition (J2EE) para integrar conjuntos de datos clínicos, y los resultados de tecnologías de alto rendimiento.

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

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

Los descubrimientos clínicos, tratamiento, informe histopatológico y datos del seguimiento se recogieron de forma prospectiva y se actualizaron (mediante A.B) y se incluyeron en la TME.db. La base de datos es accesible bajo solicitud a zlatko.trajanoski@tugraz.at. El tiempo de observación estuvo en el intervalo entre diagnóstico y último

contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se fueron controlando en el último seguimiento para pacientes sin recaída, o muerte. La duración media del seguimiento fue de 44,5 meses. Los valores mín:máx hasta la progresión/muerte o último seguimiento fueron (0:214) meses, respectivamente. Se excluyeron del análisis seis pacientes de los que se perdió el seguimiento. El tiempo de recurrencia o tiempo libre de enfermedad se definió como el periodo de tiempo desde la fecha de la cirugía hasta la fecha confirmada de recaída del tumor para pacientes con recaída y desde la fecha de la cirugía hasta la fecha del último seguimiento para pacientes libres de enfermedad.

A.2. Histopatología

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

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

(a) infiltrados linfoides tumorales:

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

(b) reacción linfóide en el borde invasivo:

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

(c) ganglios linfoides que rodean la periferia del tumor:

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

Análisis por PCR Taqman en tiempo real

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

Se congelaron de forma inmediata muestras de tejido durante los 15 minutos siguientes a la cirugía y se almacenaron en N₂ líquido. Se extrajo el ARN de especímenes de tumor congelados seleccionados al azar (n=100) a partir del grupo. Se aisló el ARN total mediante homogeneización con un kit de aislamiento RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Se evaluaron la integridad y la cantidad del ARN en un bioanalizador-2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Setenta y cinco muestras tenían una calidad y cantidad de ARN suficiente para el análisis con matriz de baja densidad ("análisis Low-Density-Array"). Todas estas muestras, representativas del grupo, se evaluaron bien en cuanto al análisis de la expresión génica. Se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR según las instrucciones del fabricante (Applied-Biosystems, Foster City, CA). Se realizó una PCR TaqMan en tiempo real cuantitativa utilizando matrices de densidad baja y el sistema de PCR robótico 7900 (Applied-Biosystems) (véase la lista de genes en la tabla 2 para más detalles). Los cebadores y sondas de 18S y GAPDH se utilizaron como controles internos. Los datos se analizaron utilizando el SDS Software v2.2 (Applied-Biosystems).

Se congelaron de forma inmediata muestras de tejido durante los 15 minutos siguientes a la cirugía y se

almacenaron en N₂ líquido. Se extrajo el ARN de especímenes de tumor congelados seleccionados al azar (n=100) a partir del grupo (n=959). Se aisló el ARN total mediante homogeneización con un kit de aislamiento RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Se evaluaron la integridad y la cantidad del ARN en un bioanalizador-2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Setenta y cinco muestras tenían una calidad y cantidad de ARN suficiente para el análisis con matriz de baja densidad ("análisis Low-Density-Array"). Todas estas muestras, representativas del grupo, se evaluaron bien en cuanto al análisis de la expresión génica. Se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR según las instrucciones del fabricante (Applied-Biosystems, Foster City, CA). Se realizó una PCR TaqMan en tiempo real cuantitativa utilizando matrices de densidad baja y el sistema de PCR robótico 7900 (Applied-Biosystems) (véase la lista de genes en la tabla 2 para más detalles). Los cebadores y sondas de 18S y GAPDH se utilizaron como controles internos. Los datos se analizaron utilizando el SDS Software v2.2 (Applied-Biosystems).

Análisis por citometría de flujo a gran escala

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

Construcción de una micromatriz de tejido

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

Inmunohistoquímica

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

Análisis estadístico

Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para evaluar la influencia de signos patológicos de invasión metastásica temprana (VELIPI) sobre la supervivencia total y libre de enfermedad. Se calculó la significancia de diversos parámetros clínicos mediante análisis univariable utilizando la prueba de rango logarítmico (tabla 1). Se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para ensayar la influencia simultánea sobre la supervivencia (supervivencia total y libre de enfermedad) de todas las covariables encontradas significativas en el análisis univariable. Se utilizaron los mismos ensayos para calcular el efecto de la densidad de CD45RO (número de células/mm²) sobre la supervivencia total y libre de enfermedad, solo o junto con las covariables de estadificación (T, N, M) del tumor, ganglio y metástasis. La prueba t anova y la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney fueron las pruebas paramétricas y no paramétricas utilizadas para identificar marcadores con una expresión significativamente diferente entre los tumores positivos a VELIPI y negativos a VELIPI. Se determinó la normalidad del logaritmo de los niveles de expresión génica y de las densidades de CD45RO utilizando la prueba de Shapiro. Se utilizó la prueba de Wilcoxon para calcular la significancia de la diferencia entre supervivencias promedio entre diferentes grupos de pacientes. Todas las pruebas fueron bilaterales. Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo estadísticamente. Se informó de todos los valores de P sin ajustes de corrección múltiples. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico R y Statview.

Material y procedimientos del ejemplo 5**A.3. Pacientes y bases de datos**

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

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

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

20 El tiempo de observación en estos grupos fue el intervalo entre el diagnóstico y el último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se controlaron en el último seguimiento para pacientes sin recaída, o muerte. La duración media del seguimiento de la serie principal fue de 45,3 meses. Los valores mín:máx hasta la progresión/muerte o último seguimiento fueron (0:166) meses, respectivamente. El tiempo de recurrencia o tiempo libre de enfermedad se definió como el intervalo desde la fecha de cirugía hasta la fecha de recaída de tumor confirmada para pacientes con recaída y desde la fecha de cirugía hasta la fecha del último seguimiento para pacientes libres de enfermedad. Los descubrimientos histopatológicos y clínicos se registraron según el sistema de estadificación UICC-TNM (L. Sobin, C. Wittekind, "clasificación TNM de tumores malignos" ("TNM classification of malignant tumors"). 6a, Ed. (Wiley-Liss, Nueva York, 2002). La recuperación de los pacientes después de la cirugía se realizó en el Laennec-HEGP, Avicenne y hospitales asociados para todos los pacientes según la práctica general para pacientes con CRC. Se administró quimioterapia adyuvante a pacientes con estadio III de CRC, con estadio II de alto riesgo de CRC, y quimioterapia paliativa a pacientes con cánceres colorrectales avanzados (estadio IV) y a pacientes sin resección completa del tumor. La quimioterapia adyuvante se basó en fluorouracilo (FU). Los datos de seguimiento se recogieron de forma prospectiva y se actualizaron. Se construyó una base de datos segura basada en Web, TME.db "Base de datos de microentorno tumoral" ("Tumor MicroEnvironment Database") disponible bajo petición, en un tercer nivel de arquitectura utilizando Java-2 Enterprise-Edition (J2EE) para integrar los datos clínicos, y los datos de tecnologías de alto rendimiento.

A.4. Histopatología***Análisis de PCR Taqman en tiempo real***

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

Construcción de micromatriz de tejido

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

Inmunoquímica

55 Se incubaron secciones de micromatrices de tejido (60 minutos a temperatura ambiente) con anticuerpos monoclonales contra CD3 (SP7), CD8 (4B11), CD45RO (OPD4), GZMB (GrB-7), citoqueratina (AE1/AE3) y citoqueratina-8 (Neomarkers, Fremont, CA). Se aplicaron el sistema Envision+ (esqueleto polimérico conjugado a enzima acoplado con anticuerpos secundarios) y DAB-chromogen (Dako, Copenhagen, Dinamarca). Se revelaron tinciones dobles con anticuerpos secundarios conjugados con fosfato y FastBlue-chromogen. Para tinciones simples, se contratiñeron secciones de tejido con hematoxilina de Harris. Como controles negativos se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón del mismo isotipo. Se analizaron las muestras con una terminal de análisis por imagen (Spot Browser®, ALPHELYS). Se obtuvieron las imágenes de puntos de alta resolución policromáticas (740x540 pixel, resolución 1,181 m/pixel) (aumento x100 veces). Se registró la densidad como el número de células positivas por unidad de área superficial de tejido. Para cada duplicado, se utilizó la densidad promedio para el análisis estadístico.

65 Para cada tumor, el duplicado de puntos mostró un buen nivel de homogeneidad de densidades de células teñidas

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

5 **Análisis estadístico**

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

Se utilizaron los estimadores de Kaplan Meier de supervivencia para visualizar las curvas de supervivencia y para obtener los estimadores de la media, percentil 75 y proporciones de supervivencia a los 2, 4 y 5 años para la OS y DFS. La prueba de rango logarítmico se utilizó para comparar la supervivencia libre de enfermedad y total entre pacientes en diferentes grupos. Para los marcadores medidos con RT-PCR, el nivel de expresión medio se tomó como corte para dicotomizar las variables. Para los cuatro marcadores estudiados adicionalmente en dos regiones diferentes (CT e IM) utilizando TMA (CD3, CD45RO, CD8, GZM) se aplicó la estrategia del "valor de p mínimo" para obtener el corte que proporcionaba la mejor separación entre los grupos de pacientes relacionado con su resultado de supervivencia libre de enfermedad. Los valores de corte para densidades de células CD3, CD8, CD45RO, GZMB fueron 370, 80, 80, 30 células/mm² en el centro del tumor y 640, 300, 190 y 60 células/mm² en el borde invasivo, respectivamente. Dado que los valores de *P* obtenidos de este modo pueden presentar una sobrevaloración severa, los valores de *P* de rango logarítmico de DFS se corrigieron utilizando la fórmula propuesta por Altman et al. (D.G. Altman et al., 1994, J. Natl Cancer Inst, Vol. 86: 829). De forma adicional, los valores de *P* de rango logarítmico de la DFS y OS se calcularon utilizando la validación cruzada 2 veces (D. Faraggi et al., 1996, Stat Med, Vol. 15 : 2203) después de la realización de 100 repeticiones (con y sin estratificar las variables de agrupamiento). Los valores de *p* medios se resumen en las tablas 13-14 (S4-S5) y 16-17 (S7-S8).

Se aplicó un modelo de riesgos proporcionales de Cox multivariable al marcador de regiones combinadas CD3_{CT}CD3_{IM} para determinar su proporción de riesgo después del ajuste mediante marcadores tumorales histopatológicos tradicionales. El modelo de Cox se aplicó solo a pacientes con estadios I, II, III de UICC-TNM para garantizar una función de riesgo de línea de base común. Las proporciones de riesgos a partir del modelo de DFS se corrigieron utilizando un factor de contracción estimado de la validación cruzada "leave-one-out" tal como sugirieron Hollander et al. (N. Hollander et al., 2004, Stat Med, Vol. 23: 1701). En las tablas 14-15 y 18-19 se presentan los modelos que utilizan la media como corte. Adicionalmente, los marcadores de interés fueron un factor de pronóstico independiente cuando se consideraban los marcadores de interés en su escala continua original (no se muestran los datos).

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

40 **B. RESULTADOS**

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

1.1 Invasión metastásica temprana y resultado clínico

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 2: Fenotipos de células inmunes infiltrantes de tumor

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

Las células T, células B, células NK, células NKT, y macrófagos se analizaron en relación con el estado VELIPI de los tumores. Las células T CD3+ fueron la más extendidas de las células inmunes infiltrantes de tumor. Las células T CD3+, CD3+CD4+, y CD3+CD8+ aumentaron significativamente (aumento de 2,6, 2,5, 4,9 veces, respectivamente, $P<0,05$) en tumores negativos a VELIPI en comparación con tumores positivos a VELIPI.

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

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

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

Ejemplo 3: Células T de memoria efectoras y supervivencia

Se realizó el análisis inmunohistoquímico sobre micromatrices de tejido preparadas a partir de 415 cánceres colorrectales. La tinción con un anticuerpo anti-CD3 reveló la presencia de células T tanto dentro del tumor como en el borde invasivo del mismo. Se contaron células CD45RO+ mediante un software de imagen automático. Un estudio

de validación mostró una correlación estrecha entre los conteos de células ópticos y automáticos ($R^2=0,914$, $P<0,001$).

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

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

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

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

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

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

En los ejemplos 1 a 3 anteriores, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ARNm para moléculas proinflamatorias e inmunosupresoras en tumores positivos a VELIPI y negativos a VELIPI, o en tumores de pacientes que tuvieron o no recaída. Estos descubrimientos sugieren que la inflamación no es un factor en la invasión metastásica temprana.

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

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

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

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

Por el contrario, no se expresaron de forma diferencial ni mediadores proinflamatorios ni moléculas inmunosupresoras. En los tumores con señales tempranas de invasión metastásica, o sin las mismas, existieron

diferencias significativas para 65 combinaciones de marcadores de células T, y el agrupamiento jerárquico demostró que los marcadores de la migración, activación y diferenciación de células T estaban aumentados en tumores que carecían de estas señales.

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

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

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

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

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

25 Se generó una matriz de correlación seguida de agrupamiento jerárquico no supervisado que ofrecía una forma conveniente de visualizar patrones de similitud y diferencia entre todas las correlaciones. Esto permitió la identificación de un agrupamiento dominante de genes co-modulados, compuesto de genes relacionados a T_H1 (Tbet, IRF-1, IFN γ) e inmuno-adaptativos (CD3 ζ , CD8, GLNY, GZMB), y dos agrupamientos que se refieren a mediadores proinflamatorios e inmunosupresores.

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

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

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

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

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

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

Las 6.640 inmunotinciones correspondientes se analizaron con una terminal de análisis por imagen dedicada para la cuantificación de la señal (puntos capturados), permitiendo mediciones de densidad de células precisas.

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

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

65 En base a una cuantificación de señal por ordenador, se creó una media para ensayar los valores de corte de las densidades de las células teñidas (para todos los marcadores en las dos regiones del tumor) para la discriminación de los pacientes en cuanto a tiempos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total (1.600 pruebas de rango logarítmico). Esto permitió definir los valores de corte óptimos de las densidades de células inmunes (CD3,

CD8, CD45RO, GZMB), y demostrar que había un intervalo grande de valores de corte en las dos regiones del tumor que eran significativos (figura 5). Según estos valores de corte, se observó que los infiltrados de células inmunes (densidades altas o bajas para CD3, CD8, CD45RO, GZMB) en cada región del tumor (CT o IM) distinguieron de forma marcada los pacientes (n=415) en grupos con supervivencia libre de enfermedad (DFS) media diferente (figura 5). Las pruebas de rango logarítmico fueron altamente significativas para todos los marcadores estudiados en las dos regiones del tumor para la DFS (valores de P que oscilaban de $1,5 \times 10^{-4}$ a $1,4 \times 10^{-8}$) (figura 5 y tabla 5) y para la OS (tabla 6).

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

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

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

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

En los ejemplos 1 a 3 anteriores, se demostró que la ausencia de señales tempranas de diseminación tumoral (invasión linfovascular y perineural) y de invasión de los ganglios linfáticos estaba asociada con la presencia de una densidad fuerte de células T de memoria efectoras intratumorales (T_{EM}).

En el presente ejemplo también se determina si la evaluación adicional de la densidad de células de memoria (CD45RO+) respecto a la densidad de células T CD3+ en las dos regiones del tumor también discrimina a los pacientes con riesgo de recurrencia de tumor. CD3_{CT}/CD3_{IM}/CD45RO_{CT}/CD45RO_{IM} estratificaron pacientes de forma destacada en dos grupos con riesgo alto y bajo de recurrencia del tumor (figura 8c). Sorprendentemente, densidades bajas de estos marcadores en las dos regiones del tumor revelaron un resultado similar para pacientes con estadio C, B e incluso A de Dukes, en comparación con pacientes con metástasis distante concomitante (D de Dukes).

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

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

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

o ambos, de tal forma que atenúan la capacidad metastásica de las células tumorales.

Sin embargo, la correlación de la expresión de los marcadores inmunes adaptativos *in situ*, moléculas asociadas a T_{H1} y mediadores citotóxicos con una incidencia de la recurrencia del tumor baja aporta una evidencia del rechazo mediado de forma inmune de células tumorales persistentes después de la cirugía.

De esta forma, el buen valor de pronóstico asociado con la presencia *in situ* de una densidad alta de células T de memoria (células CD45RO positivas), probablemente es el resultado de las propiedades de tráfico críticas y de la capacidad de protección antitumoral de larga duración de estas células, tal como se muestra en un modelo en ratones¹⁸.

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

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

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

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

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

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

Se llevaron a cabo análisis genómicos y de inmunotinción *in situ* sobre 75 y 415 pacientes, respectivamente (tabla 11 - S1). Los datos se introdujeron en una base de datos de microentorno tumoral (TME.db; acceso disponible bajo petición). Los presentes inventores utilizaron PCR en tiempo real cuantitativa para evaluar los niveles de expresión de genes inmunes relacionados con la inflamación, inmunidad adaptativa de T-colaboradora 1 (T_{H1}) e inmunosupresión. Estos genes demostraron patrones de expresión variables en los 75 tumores estudiados. Los análisis de correlación que se llevaron a cabo entre todos los genes demostraron 39 combinaciones altamente significativas ($P < 0,0001$) (tabla 4). Se identificó una agrupación dominante de genes co-modulados para la inmunidad adaptativa de T_{H1} (factor de transcripción 21 de la caja T (T-bet), factor 1 regulador del interferón (IRF1), IFN γ , CD3 ζ , CD8, granulicina (GLNY), granzima B (GZMB)). Una estructura en árbol jerárquica clasificando a los pacientes según los niveles de expresión de los genes de esta agrupación reveló una correlación inversa entre la expresión de estos genes y la recurrencia del tumor (valor de P comparando los grupos de pacientes, todos $P < 0,05$). Estos datos muestran que la inmunidad adaptativa de T_{H1} tiene un efecto beneficioso sobre el resultado clínico.

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

A continuación, se investigó si el análisis combinado de regiones del tumor podría mejorar la predicción de la

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

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

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

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

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

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

Se descubrió una correlación positiva entre la presencia de marcadores para la polarización de T_{H1} , células T citotóxicas y de memoria y una incidencia baja de la recurrencia del tumor.

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para el pronóstico de pacientes para la progresión de un tumor, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
5
a) cuantificar, en una muestra de tejido tumoral de dicho paciente, uno o más marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente frente al cáncer; y
10
b) comparar el valor obtenido en la etapa a) para dicho uno o más marcadores biológicos con un valor de referencia predeterminado para los mismos marcadores biológicos; valor de referencia predeterminado que se correlaciona con un pronóstico específico de progresión de dicho cáncer,
en el que dicho uno o más marcadores biológicos comprenden el nivel de IRF1 expresado por linfocitos T.
15
2. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de tejido tumoral se selecciona del grupo que consiste en (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido a partir del tejido que rodea directamente el tumor, tejido que puede denominarse más específicamente el "borde invasivo" del tumor, (iv) los ganglios linfáticos localizados muy cerca del tumor, (v) una biopsia tumoral realizada antes de la cirugía y (vi) una metástasis distante.
20
3. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que la etapa a) consiste en cuantificar dicho uno o más marcadores biológicos por análisis de expresión génica en una muestra de tejido tumoral total.
25
4. El procedimiento *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa a) se efectúa cuantificando al menos 2 marcadores biológicos distintos seleccionados entre las combinaciones génicas listadas en la tabla 8.
30
5. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer adrenocortical, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer laríngeo e hipofaríngeo, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de seno de la cavidad nasal y paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salivar, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer tiroideo, cáncer vaginal, cáncer vulvar y cáncer uterino.
35
6. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 5 en el que el tumor es un cáncer colorrectal.
40

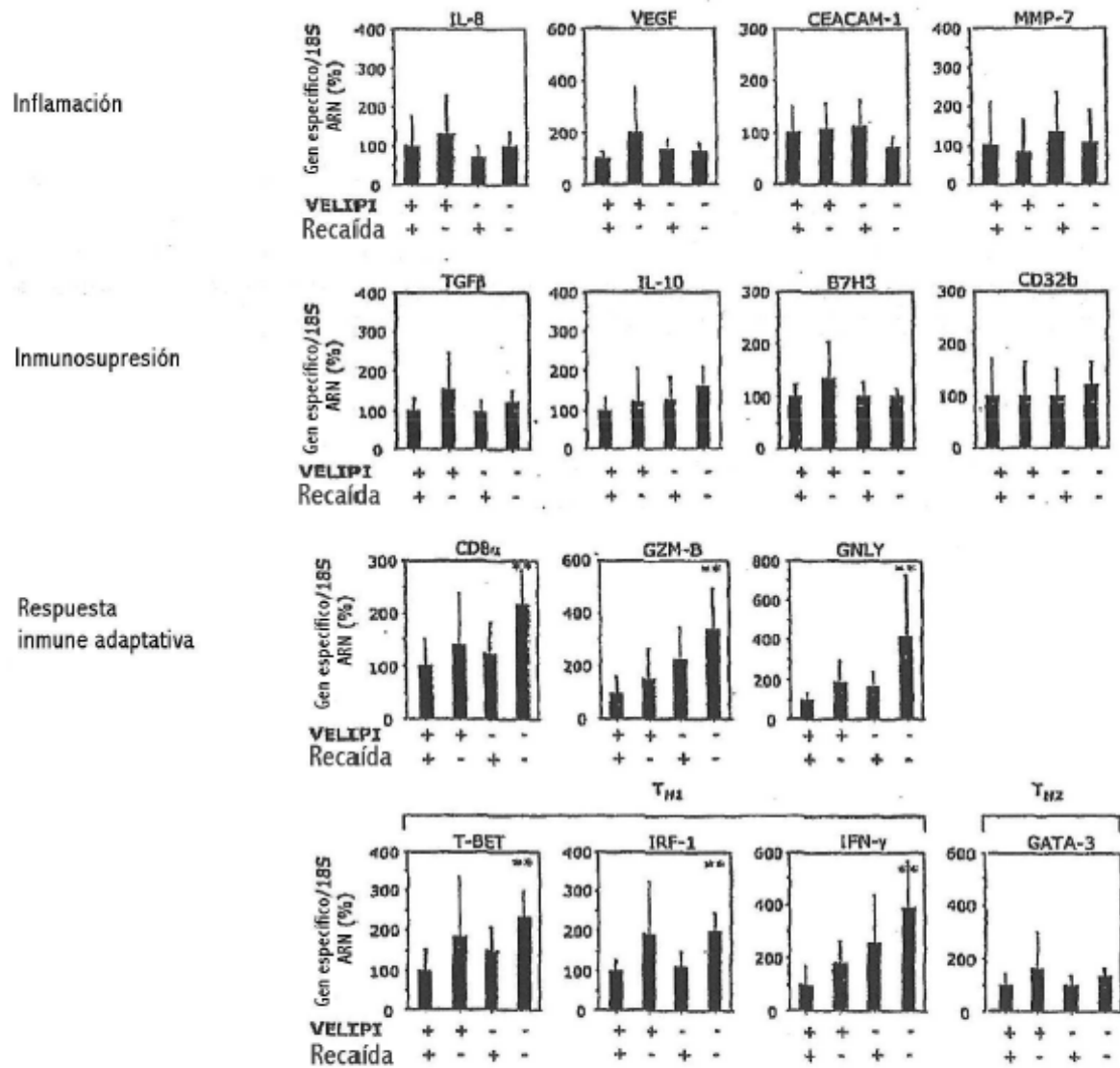


FIGURA 1

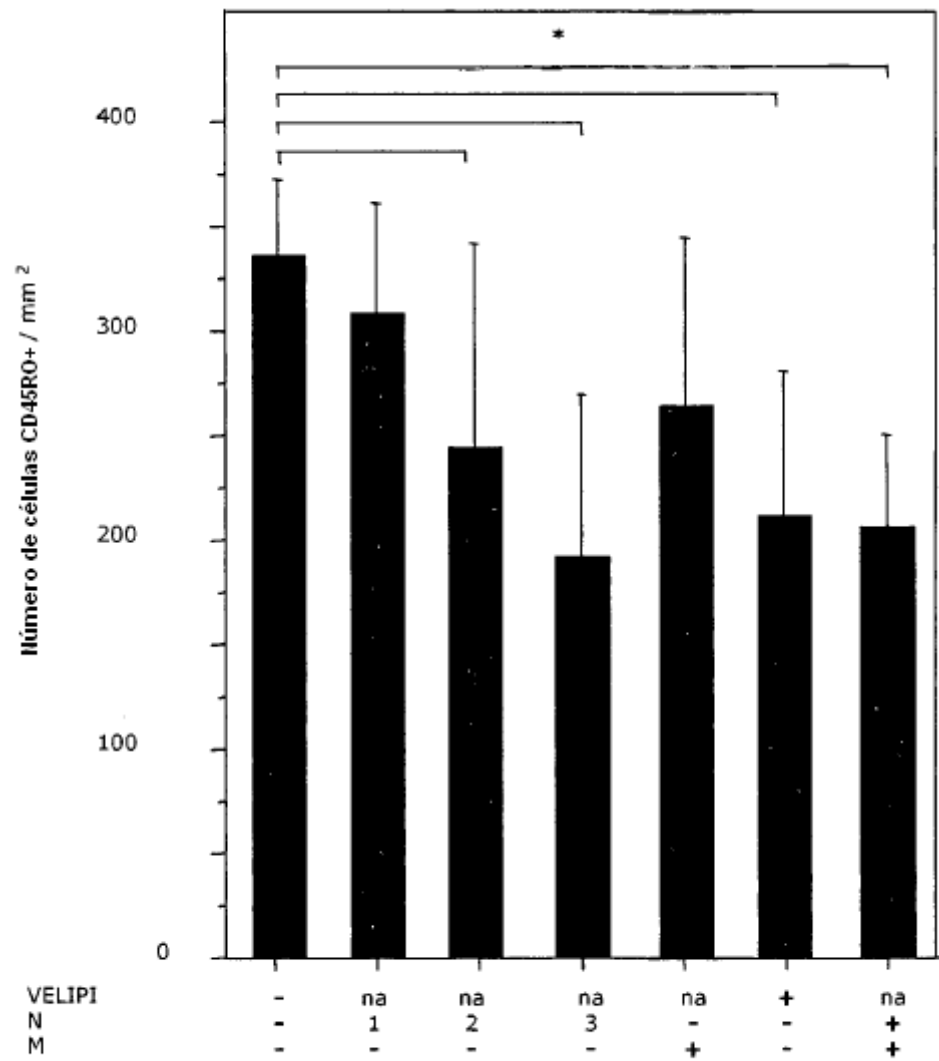


FIGURA 2

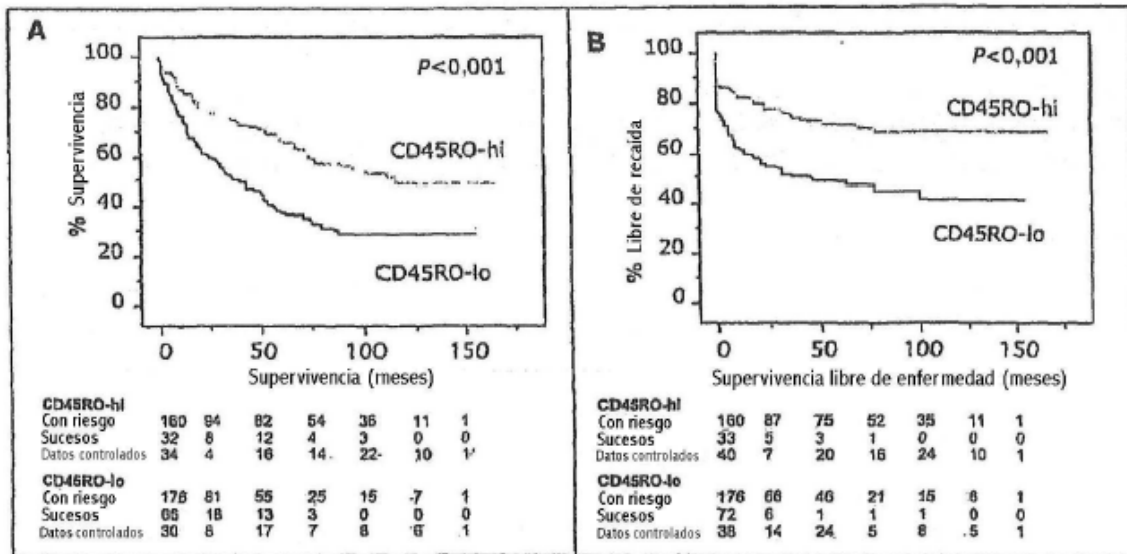


FIGURA 3

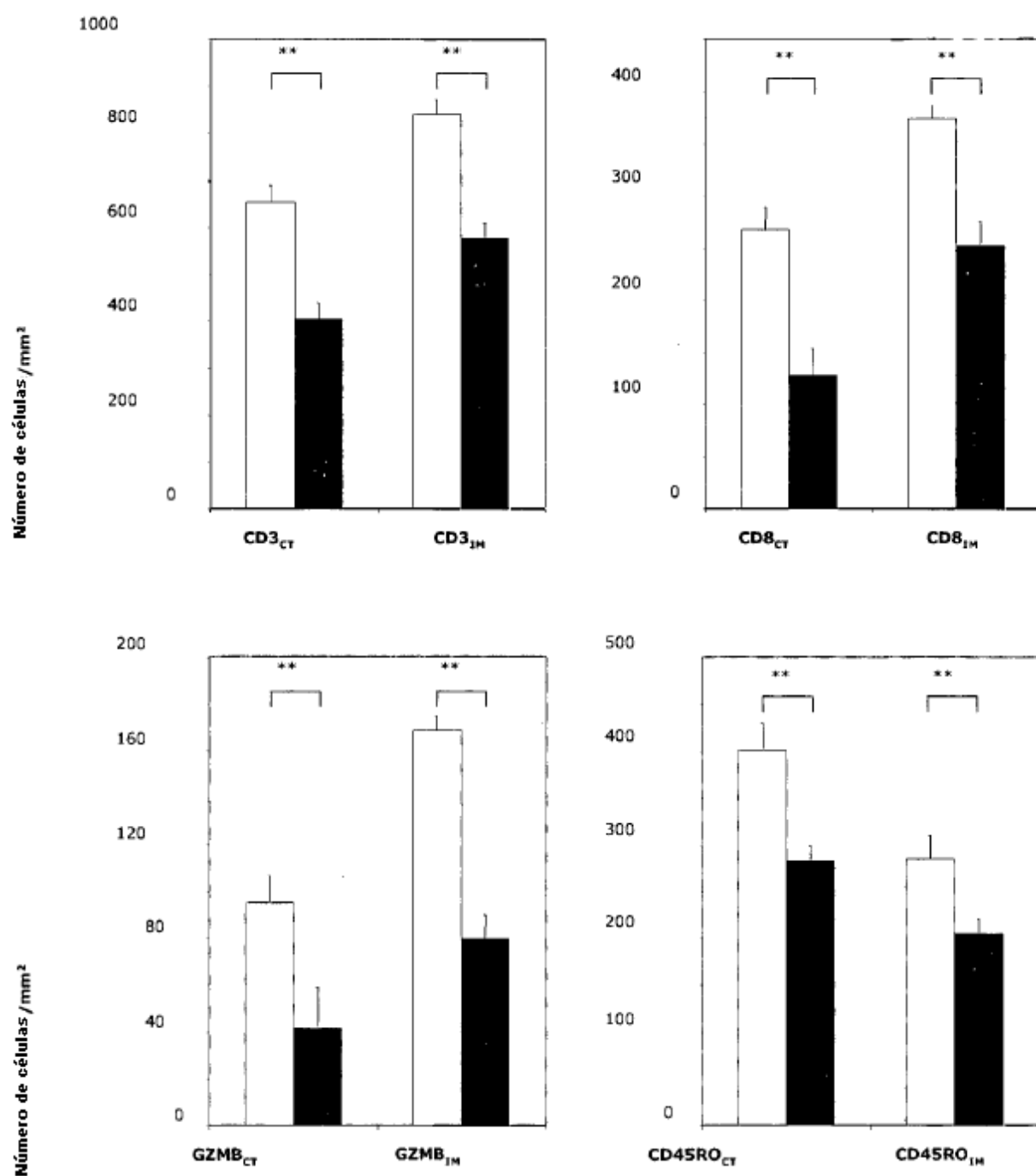


FIGURA 4

C

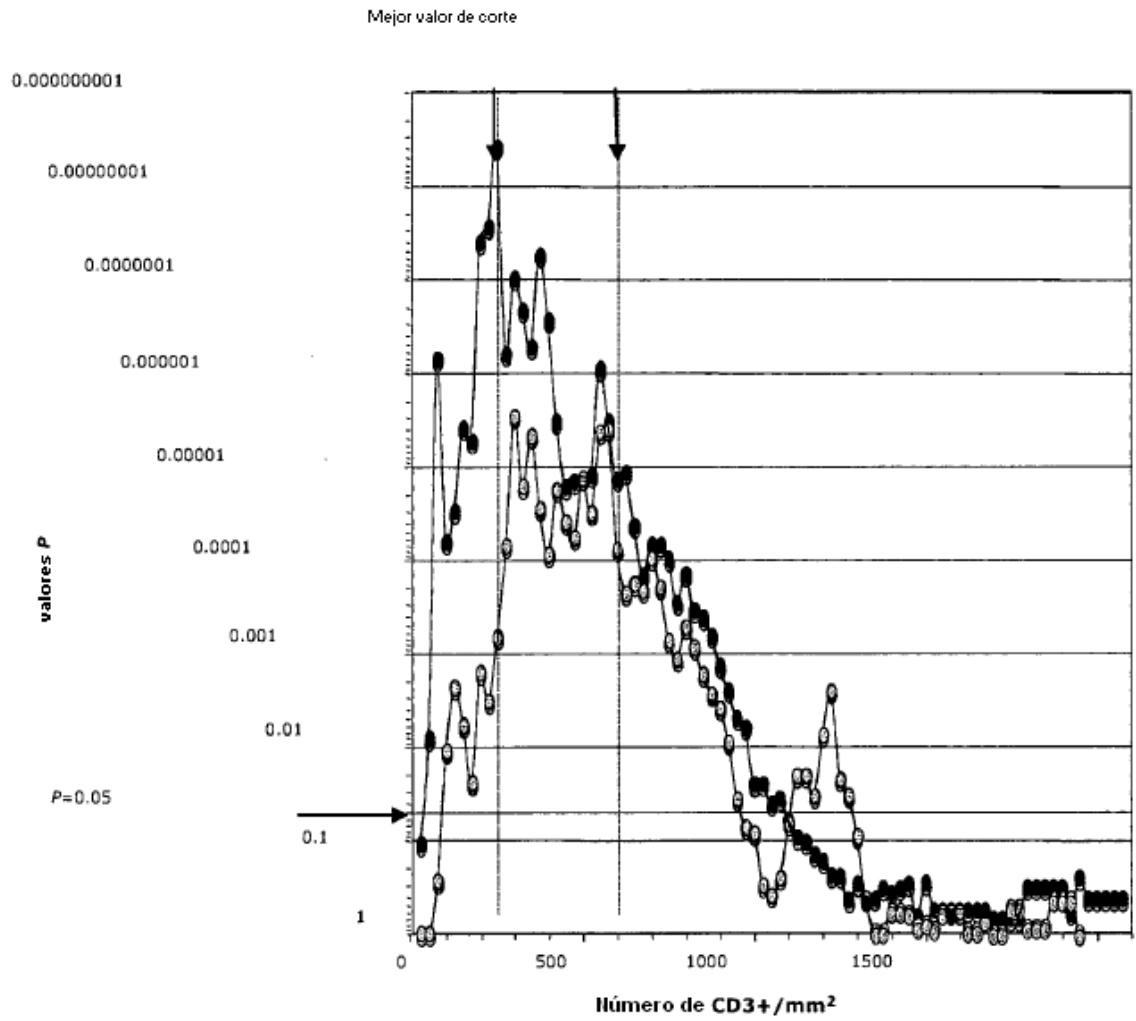


FIGURA 5

Análisis de una región única

valores P

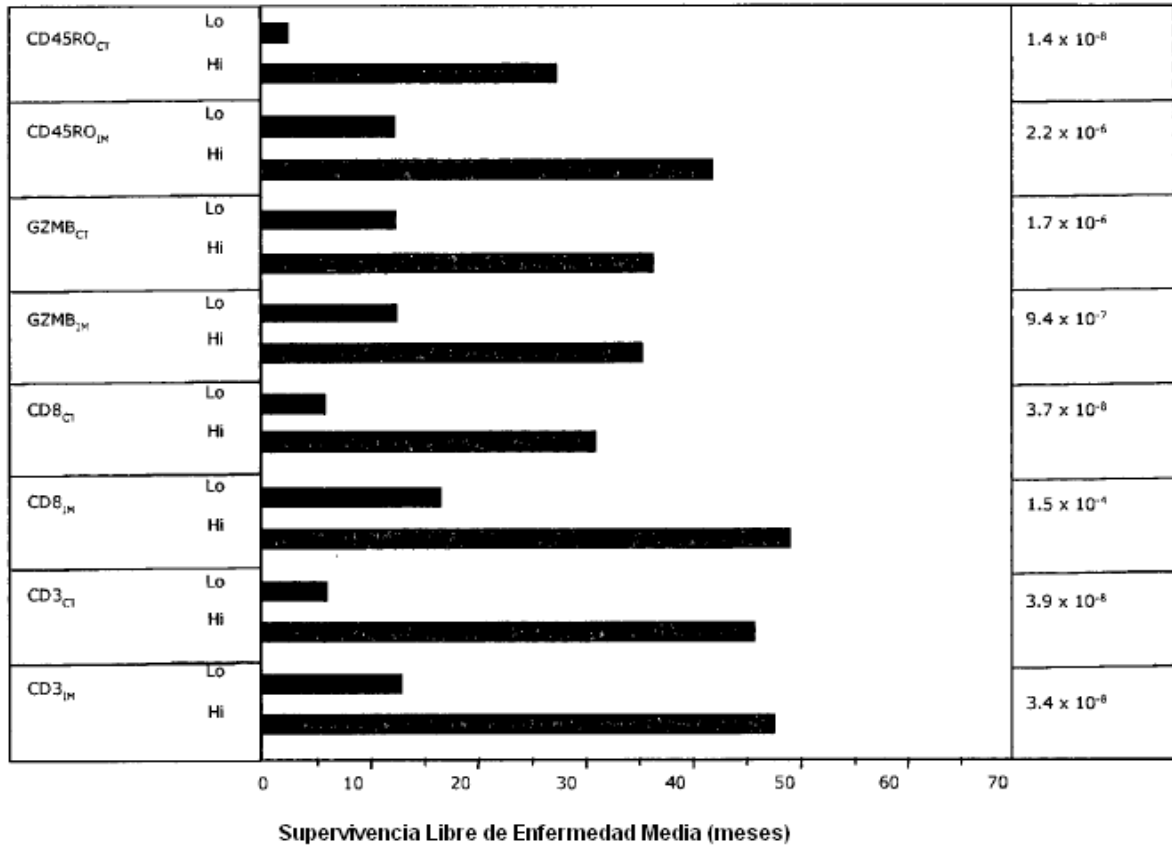


FIGURA 6

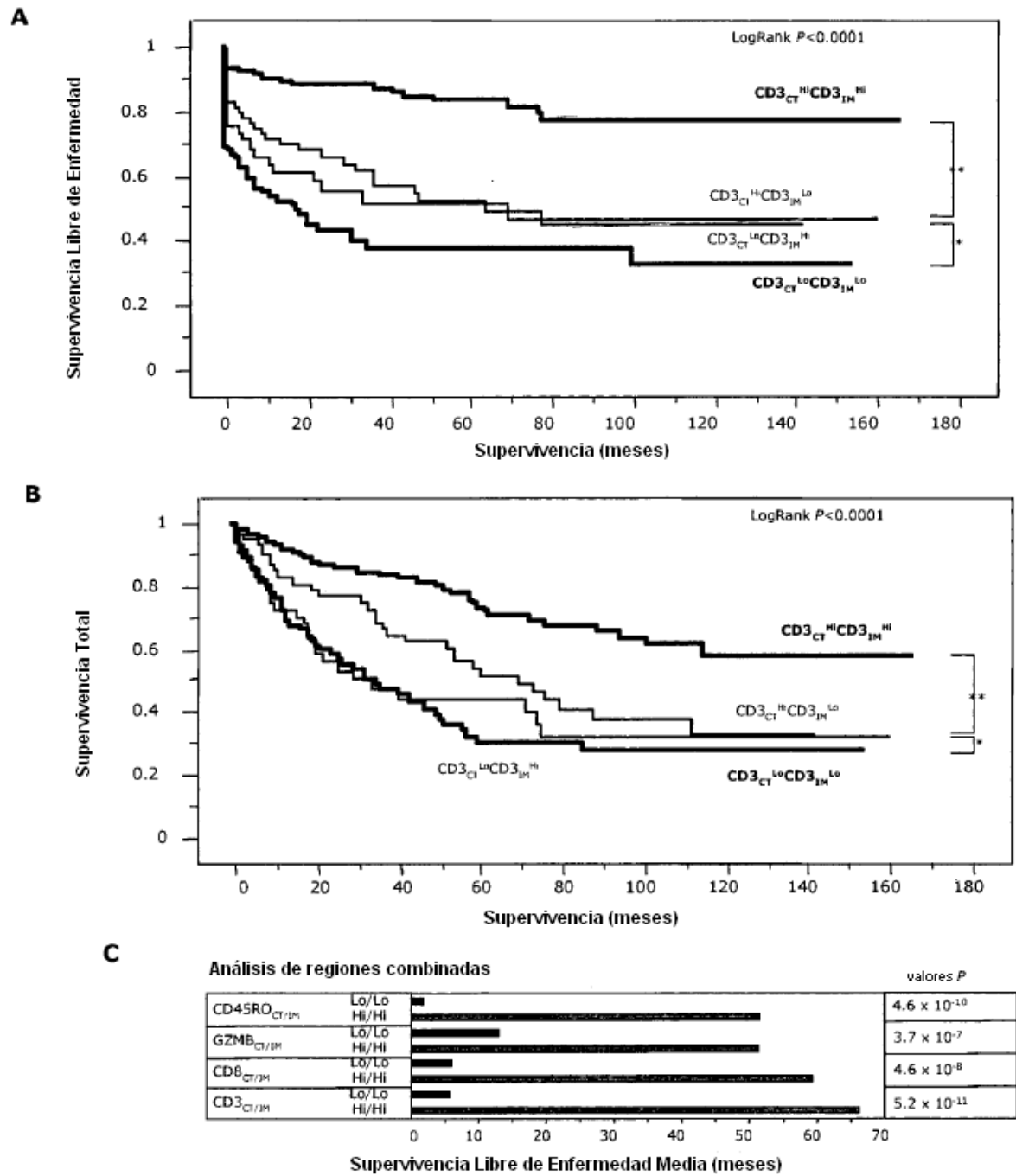


FIGURA 7

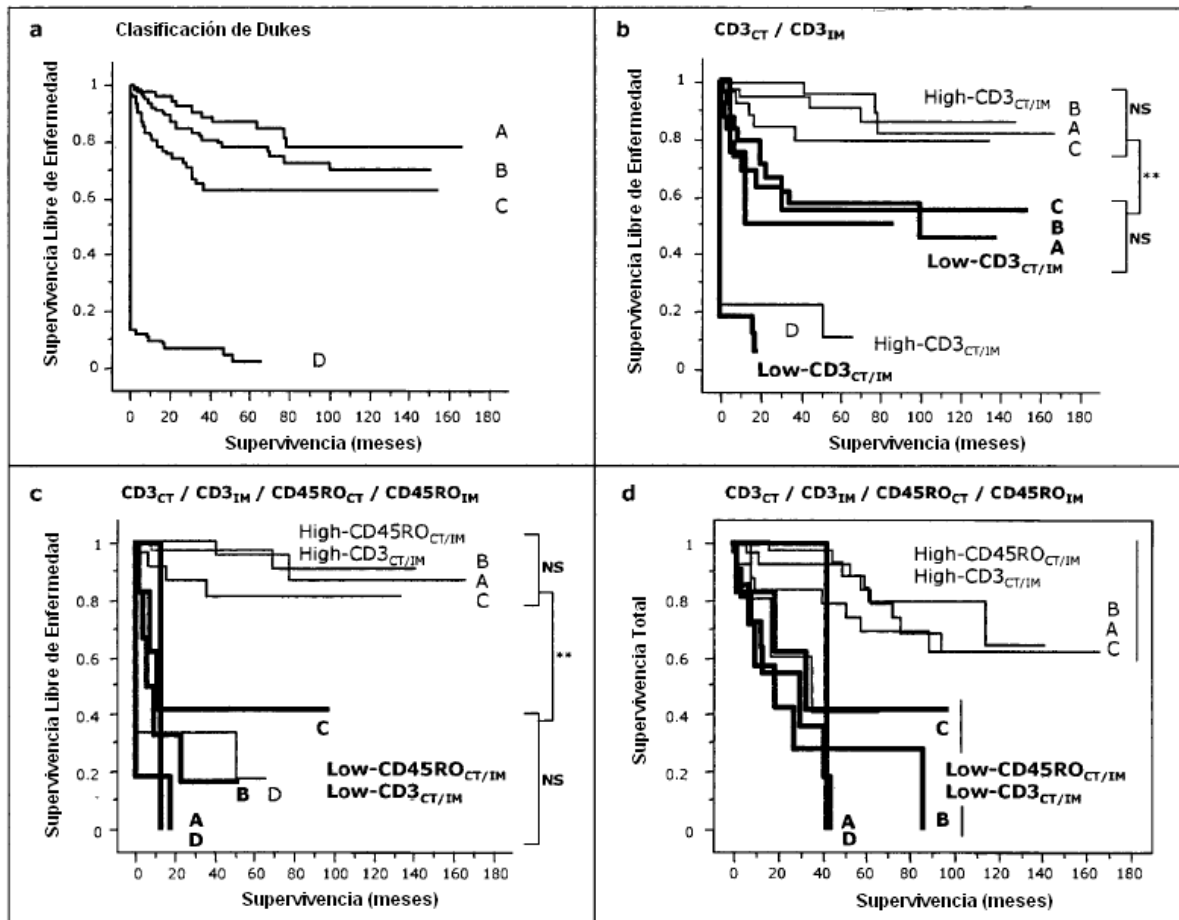


FIGURA 8

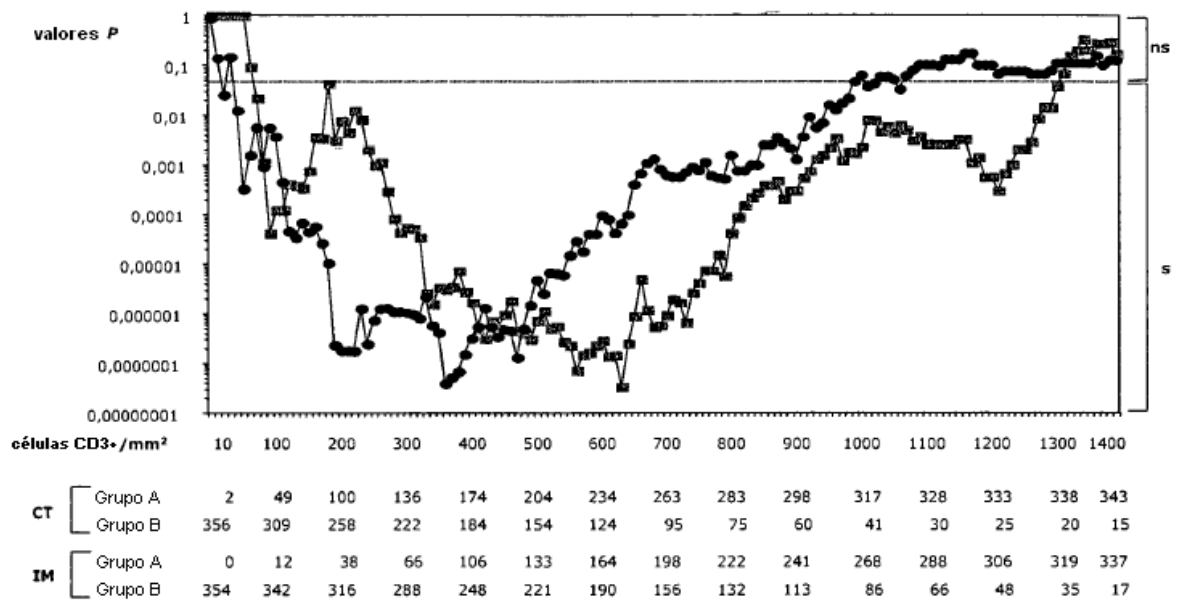


Figura 9

Histopatología
del tumor

Sistema de estadificación
UICC-TNM

Células
inmunes infiltrantes
de tumor

Evaluación
 $CD3_{CT}CD3_{IM}$

Evaluación
 $CD3_{CT}CD3_{IM}$

más

Evaluación
 $CD45RO_{CT}CD45RO_{IM}$

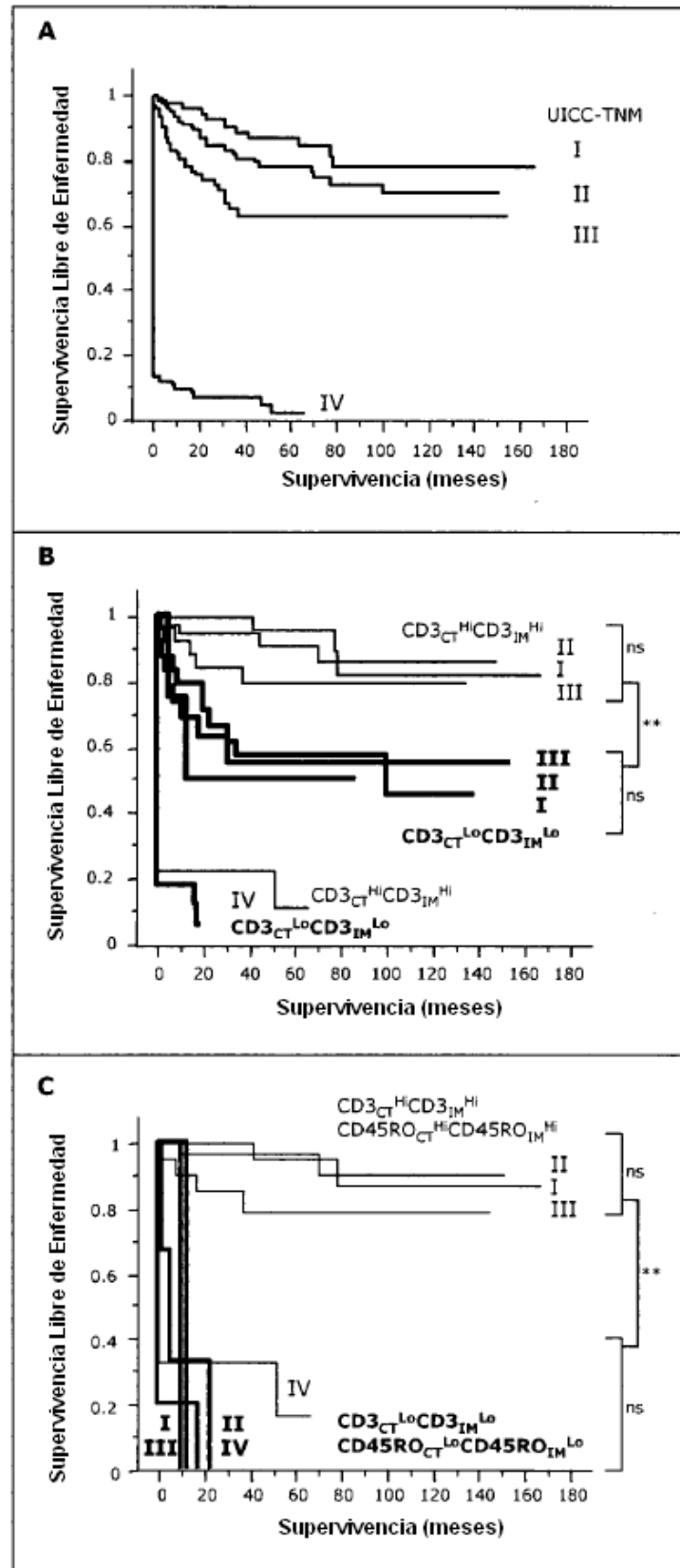


Figura 10

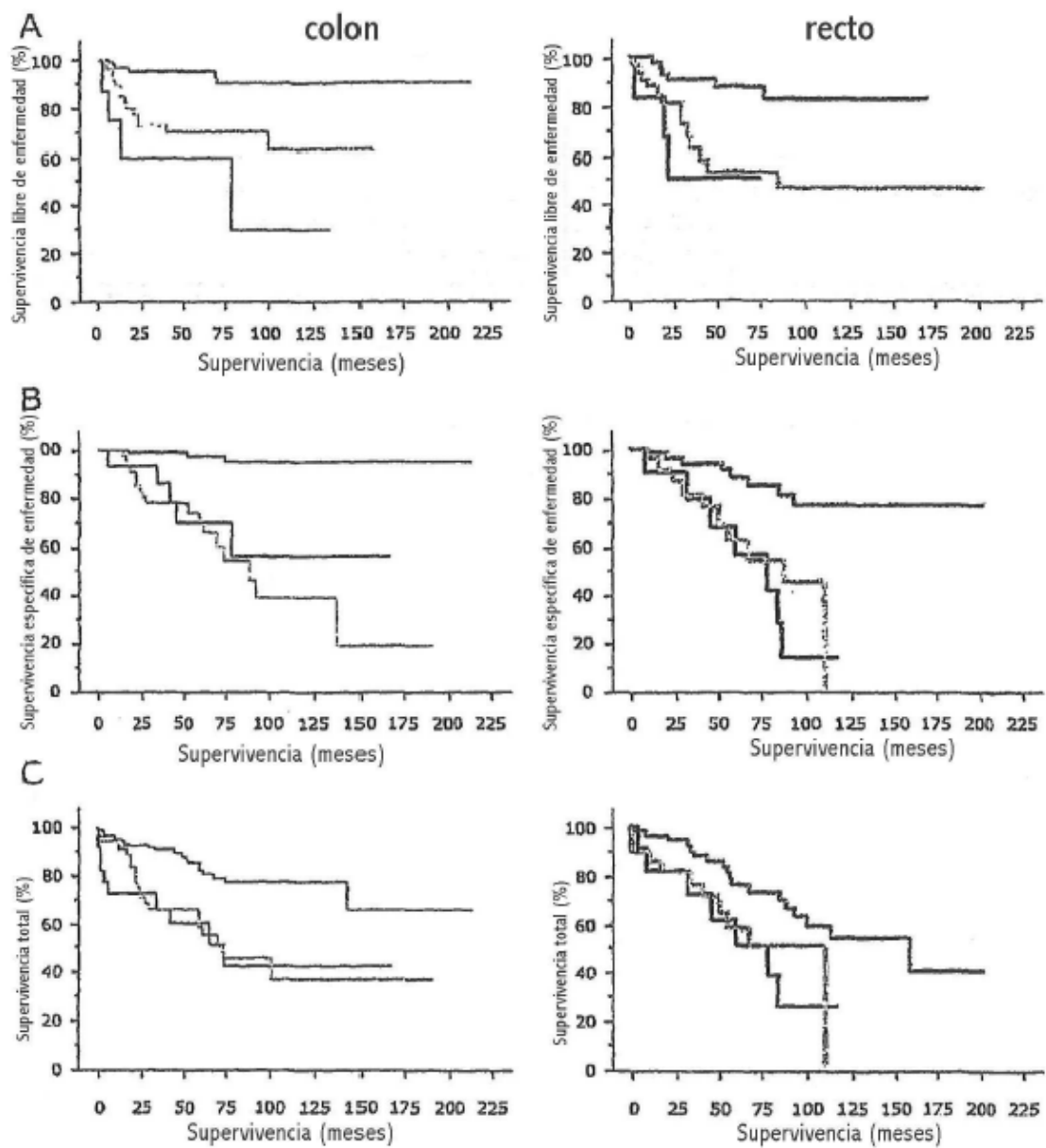


Figura 11

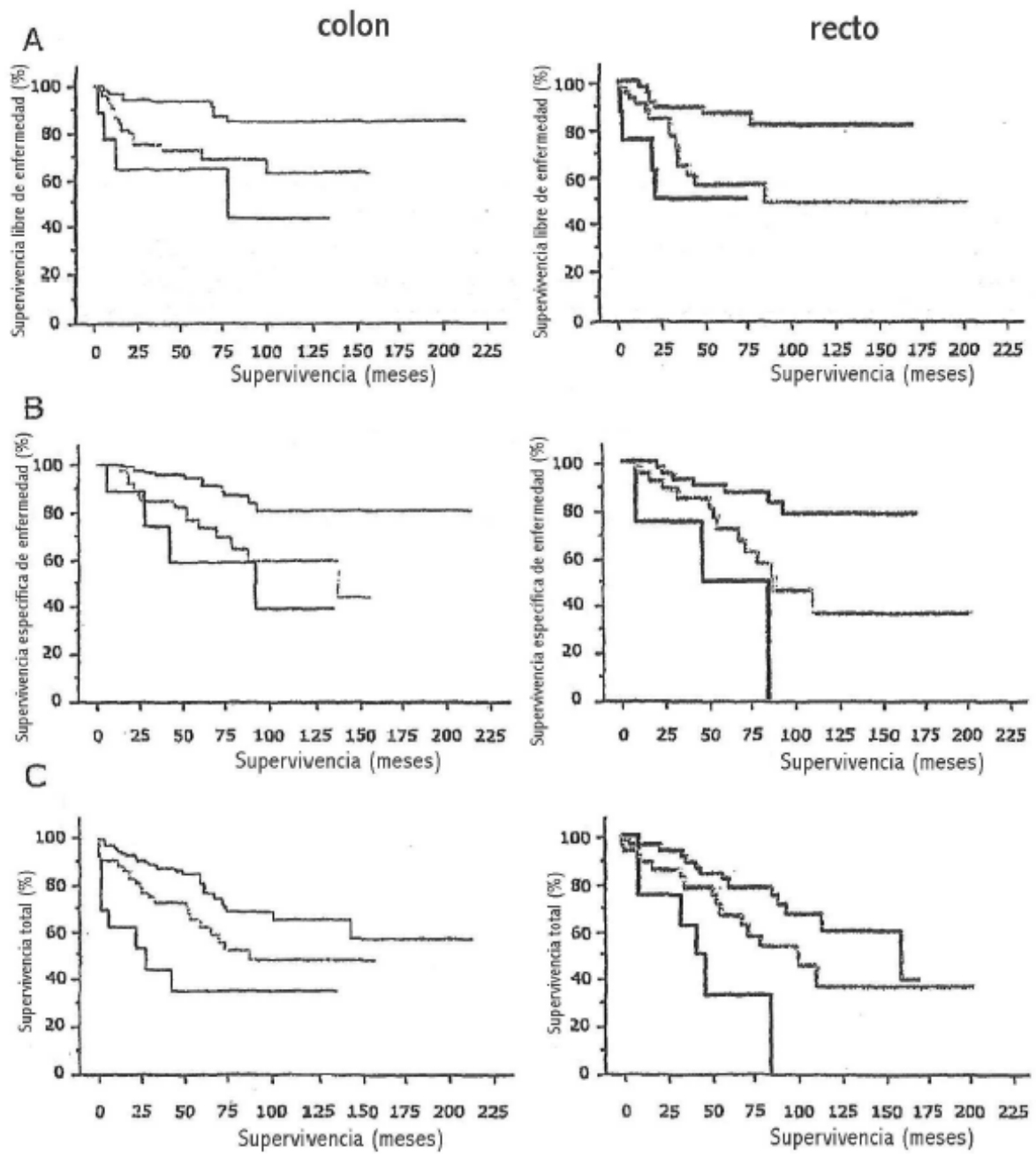


Figura 12

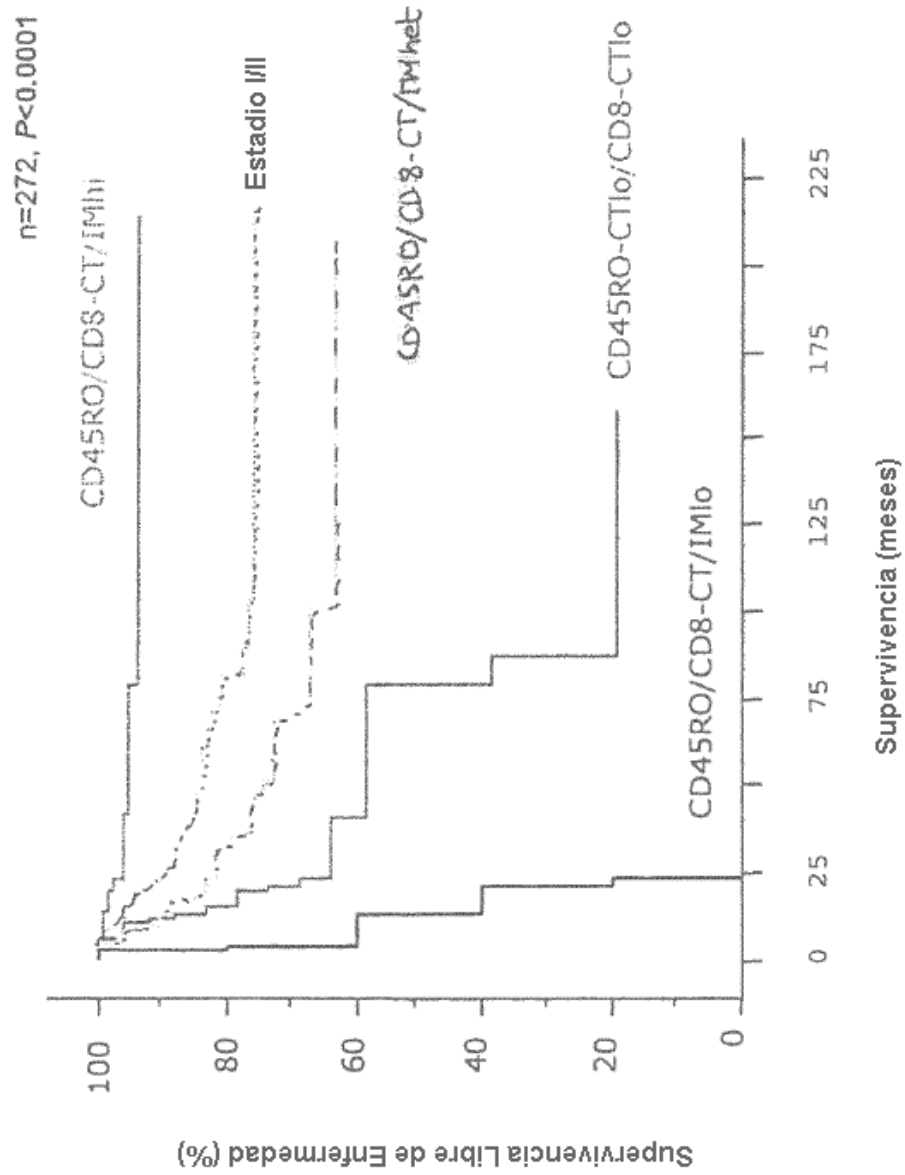


FIGURA 13

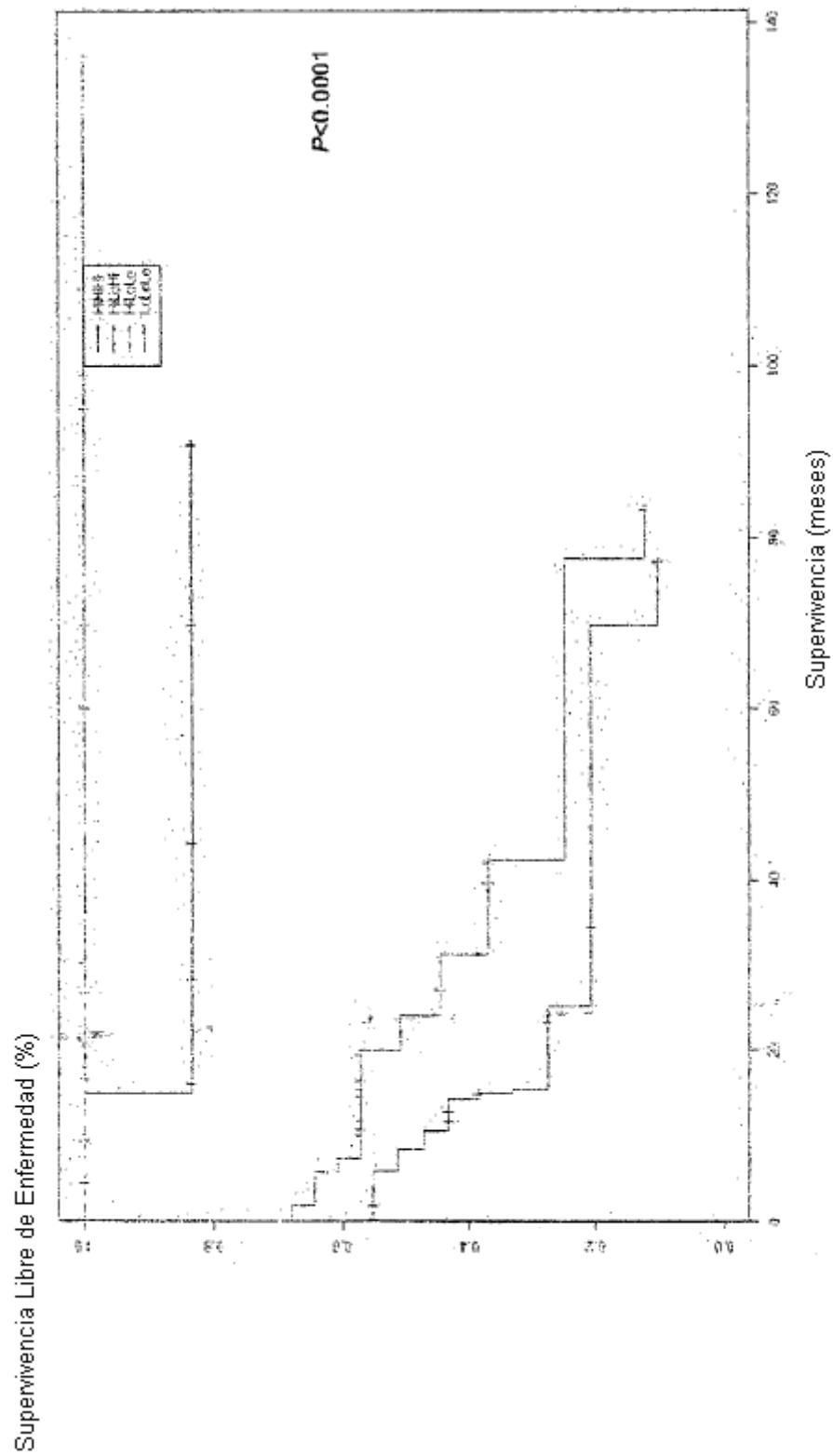


FIGURA 14