

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 322**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2016** E 16169813 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018** EP 3139170

54 Título: **Procedimiento de evaluación de un paciente que padece glioblastoma aplicable a un tratamiento de inmunoterapia a base de vacunas tumorales de células dendríticas**

30 Prioridad:

**10.08.2015 TW 104125986**

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

**08.02.2019**

73 Titular/es:

**CHINA MEDICAL UNIVERSITY HOSPITAL  
(100.0%)  
No. 2, Yude Road North District  
Taichung City 404, TW**

72 Inventor/es:

**CHO, DER-YANG;  
CHIU, SHAO-CHIH y  
JAN, CHIA-ING**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 699 322 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de evaluación de un paciente que padece glioblastoma aplicable a un tratamiento de inmunoterapia a base de vacunas tumorales de células dendríticas

5

## ANTECEDENTES

Campo técnico

10 **[0001]** La presente descripción se refiere a un método de evaluación de un paciente de cáncer que es aplicable a ser tratado con una inmunoterapia. Más particularmente, la presente divulgación se refiere al método de evaluación de un paciente con glioblastoma multiforme que es aplicable para ser tratado con una inmunoterapia basada en una vacuna de tumor de células dendríticas.

15 Descripción de la técnica relacionada

**[0002]** Un glioblastoma multiforme (GBM) es un astrocitoma de un glioma, tal como se conoce como astrocitoma de grado IV en la clasificación de la OMS. El GBM es el tumor cerebral primario maligno más frecuente y más agresivo en los seres humanos.

20

**[0003]** Las prácticas convencionales para tratamientos de GBM implican una cirugía, una terapia de radiación y una quimioterapia. Las células gliales en un cerebro son un tipo de las unidades constitutivas de un sistema nervioso, las células gliales cubren los axones y brindan funciones tales como soporte, suplemento nutricional, mantenimiento constante del entorno y aislamiento. Sin embargo, debido a que el axón es muy largo, las células tumorales se propagarán a lo largo del axón a un lugar distante una vez que las células gliales se vuelvan cancerosas; es decir, el GBM tiene una infiltración muy alta, que se refiere a una migración de células de sus fuentes a otro lugar. La cirugía no pudo eliminar una parte de infiltración distante de las células tumorales y, por lo tanto, la quimioterapia y/o la radioterapia son necesarias para destruir las células tumorales residuales en la parte de infiltración distante después de la cirugía. Sin embargo, la presencia de células madre cancerosas con radiorresistencia y quimiorresistencia provoca una alta tasa de recurrencia después de dichos tratamientos.

25

30

**[0004]** En los últimos años, algunos biomarcadores se han utilizado para diagnosticar cánceres, determinar las terapias adyuvantes, o pronósticos de estimación en los pacientes, además de chequeos generales y etapas clínicas tradicionales. Por ejemplo, el receptor de estrógeno (ER) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) se utilizan como biomarcadores para elegir fármacos terapéuticos en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama. Debido a la alta malignidad, la alta tasa de recurrencia después de los tratamientos y la alta tasa de mortalidad, es importante desarrollar un método para tratar el GBM, o el método para predecir una tasa de supervivencia en el paciente después del tratamiento. Por lo tanto, los médicos pueden preparar planes de tratamiento más apropiados para pacientes individuales en clínica para mejorar la tasa de supervivencia después del tratamiento.

35

40

**[0005]** Fong *y col.* (PLos ONE: 04/2012; 7 (4): e32614) describe el marcador de superficie de punto de control inmunitario CTLA-4 en células T como un biomarcador para predecir y monitorear el tratamiento de GBM con vacunación contra la DC, en donde la expresión más baja se asocia con un buen pronóstico.

45

## RESUMEN

**[0006]** Según un aspecto de la presente descripción, un método de evaluación de un paciente con glioblastoma multiforme que es aplicable a un tratamiento de inmunoterapia basada en una vacuna tumoral de células dendríticas incluye los siguientes pasos. Se proporciona una muestra, en donde se obtuvo una muestra del paciente con glioblastoma multiforme. Se proporciona una etapa de detección, en donde los niveles de expresión de los biomarcadores PD-1 y CD8 se detectan y luego se calcula un valor base a partir de los niveles de expresión. Se proporciona un paso de comparación, en el que el valor base se compara con un umbral. El paciente con glioblastoma multiforme puede ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna contra el tumor de células dendríticas cuando el valor de la base es inferior al umbral.

50

55

**[0007]** La muestra es un tejido tumoral o una sangre.

**[0008]** En un ejemplo, el tejido tumoral puede ser una sección de tejido o una micromatriz de tejido.

60

**[0009]** En un ejemplo, el nivel de expresión del biomarcador puede detectarse mediante la realización de inmunohistoquímica.

**[0010]** En un ejemplo, el paso de detección incluye además calcular un valor de señal mediante un método de puntuación H o un método de procesamiento de imágenes.

65

[0011] La etapa de detección incluye la división del valor de la señal de PD-1 por el valor de la señal de la CD8 para obtener el valor base.

5 [0012] En un ejemplo, el método de procesamiento de imágenes puede utilizar un modelo de color de RGB (rojo/verde/azul), un modelo de color de CMYK (cian/magenta/amarilla/clave) o un modelo de color HSI (tono/saturación/intensidad) para analizar una imagen de la muestra.

10 [0013] También se describe pero no se reivindica, una tasa de supervivencia en un paciente glioblastoma multiforme después de un tratamiento puede ser pronosticado por un método que incluye las etapas de la siguiente manera. Se proporciona una etapa de obtención de muestras, en donde se obtiene una muestra del paciente con glioblastoma multiforme. Se proporciona un paso de detección, en el que se detecta un nivel de expresión de un biomarcador y luego el nivel de expresión se calcula como un valor base, en el que el biomarcador se selecciona de un grupo que consiste en PD-1, PD-L1, CD8 y combinación de los mismos. Se proporciona un paso de comparación, en el que el valor base se compara con un umbral. Se determina que el paciente con glioblastoma multiforme tiene un buen pronóstico después del tratamiento cuando el valor de base es inferior al umbral.

[0014] El tratamiento puede ser seleccionado de un grupo que consiste en una cirugía, una radioterapia, una quimioterapia, una inmunoterapia, y la combinación de las mismas.

20 [0015] La inmunoterapia puede basarse en una vacuna de tumor de células dendríticas.

[0016] La muestra es un tejido tumoral o una sangre.

25 [0017] El tejido tumoral puede ser un corte de tejido o una micromatriz de tejido.

[0018] El nivel de expresión del biomarcador puede detectarse mediante la realización de inmunohistoquímica.

30 [0019] El paso de detección adicional puede incluir el cálculo de un valor de señal mediante un método de puntuación H o un método de procesamiento de imagen.

[0020] El paso de detección incluye además la división del valor de la señal de PD-1 por el valor de la señal de la CD8 para obtener el valor base.

### 35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021] La presente divulgación puede entenderse más completamente leyendo la siguiente descripción detallada de la realización, con referencia a los dibujos adjuntos de la siguiente manera:

40 La Fig. 1 es un diagrama de flujo que muestra un método para evaluar un paciente con glioblastoma multiforme (GBM) aplicable para tratamiento con un tratamiento de inmunoterapia basado en una vacuna de tumor de células dendríticas de acuerdo con una realización de la presente divulgación;

45 La Fig. 2 es un diagrama de flujo que muestra un método para pronosticar una tasa de supervivencia en el paciente con GBM después de un tratamiento;

La Fig. 3 es un conjunto de micrografías de inmunohistoquímica, en donde (A) representa PD-1, (B) representa PD-L1 y (C) representa CD8;

50 La Fig. 4 es un conjunto de micrografías que muestran los niveles de expresión de PD-L1, en donde (A) es la micrografía que muestra un bajo nivel de expresión de PD-L1 en un tejido cerebral normal, (B) es la micrografía que muestra un alto nivel de expresión del PD-L1 en un tejido cerebral del paciente con GBM, (C) es una micrografía convertida en color que muestra el bajo nivel de expresión de PD-L1 en el tejido cerebral normal, y (D) es una micrografía convertida en color mostrando el alto nivel de expresión de PD-L1 en el tejido cerebral del paciente con GBM;

55 La Fig. 5 es una curva de supervivencia general de los pacientes con GBM que se clasifican según el nivel de expresión de PD-L1, donde (A) representa la curva de supervivencia general de los pacientes con GBM sin tratar con la vacuna del tumor de células dendríticas, (B) representa la curva de supervivencia general de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas;

60 La Fig. 6 es una curva de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con GBM que se clasifica según el nivel de expresión de PD-L1, donde (A) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con GBM sin tratar con la vacuna de tumor de células dendríticas, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas;

65

La Fig. 7 es un conjunto de curvas de supervivencia de todos los pacientes con GBM, en donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad;

La Fig. 8 es un conjunto de curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además clasificada según el nivel de expresión del CD8, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad;

La Fig. 9 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además se clasifican según el nivel de expresión de PD-1, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad;

La Fig. 10 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además se clasifican en función de una relación del nivel de expresión de PD-1 al nivel de expresión de CD8, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad;

La Fig. 11 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además se clasifican según el nivel de expresión de PD-1 y el nivel de expresión de PD-L1, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad;

La Fig. 12 es un diagrama de correlación entre el PD-1 y un tiempo de supervivencia general;

La Fig. 13 es un diagrama de correlación entre el PD-1 y un tiempo de supervivencia libre de enfermedad;

La Fig. 14 es un diagrama de correlación entre la relación del nivel de expresión de PD-1 al nivel de expresión de CD8 y el tiempo de supervivencia general;

La Fig. 15 es un diagrama de correlación entre la relación del nivel de expresión de PD-1 al nivel de expresión de CD8 y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad;

La Fig. 16 es un diagrama de correlación entre la relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8 de células mononucleares de sangre periférica y la relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8 de linfocitos infiltrantes de tumores;

La Fig. 17 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además se clasifica en función del nivel de expresión de PD-1 de las células mononucleares de sangre periférica, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad; y

La Fig. 18 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además se clasifica en función de la relación del nivel de expresión de PD-1 al nivel de expresión del CD8 de las células mononucleares de sangre periférica, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0022]** Se proporciona un método de evaluación de un paciente glioblastoma multiforme (GBM), que es aplicable a ser tratado con un tratamiento de inmunoterapia basado en una vacuna tumoral de células dendríticas. Los niveles de expresión de los biomarcadores PD-1 y CD8 de una muestra del paciente con GBM se detectan mediante inmunohistoquímica. El nivel de expresión de los biomarcadores se realiza mediante un análisis semicuantitativo mediante un método de puntuación H o un método de procesamiento de imágenes para evaluar si el paciente con GBM es aplicable para ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna de tumor de células dendríticas, y puede aplicarse además para pronosticar la tasa de supervivencia en el paciente con GBM después del tratamiento. Las siguientes son descripciones de los términos específicos utilizados en la especificación:

**[0023]** El término "biomarcador" se refiere a una sustancia que es capaz de indicar ciertos estados o condiciones biológicas. El biomarcador puede usarse como un indicador para evaluar o medir objetivamente los procesos biológicos normales, los procesos patógenos o las respuestas a un tratamiento.

**[0024]** El término "PD-1 (muerte celular programada-1)", también conocido como CD279 (grupo de diferenciación 279), es una proteína que en los humanos está codificada por un gen *PDCD1*. El PD-1 es un receptor de la superficie celular que pertenece a una superfamilia de inmunoglobulinas y se expresa en células T y células pro-B.

**[0025]** El término "PD-L1 (muerte celular programada-1)", también conocido como CD274 (grupo de diferenciación 274) o B7-H1 (B7 homólogo 1), es una proteína que en los humanos está codificada por un gen *CD274*. La PD-L1 es

una proteína transmembrana tipo 1 de 40 kDa que se ha especulado para jugar un papel importante en la supresión del sistema inmunológico durante eventos particulares como el embarazo, aloinjertos tisulares, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades como la hepatitis. El PD-L1 puede ser transmitido por un inmunoreceptor inhibitorio a través de la transmisión de una señal de regulación negativa para suprimir parcialmente las respuestas inmunitarias y mantener una tolerancia inmunitaria de los sistemas periféricos, en donde el PD-1 es uno de los inhibidores inmunoreceptores. Normalmente, un sistema inmunológico reacciona a antígenos extraños donde hay cierta acumulación en los ganglios linfáticos o el bazo, lo que desencadena la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> específicas de antígeno. La formación del complejo PD-1/PD-L1 transmite una señal inhibitoria que reduce la proliferación de estas células T CD8<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos y, además, la PD-1 también es capaz de controlar la acumulación de células T específicas de antígenos extraños en los ganglios linfáticos a través de la regulación del gen Bcl-2.

**[0026]** El término "CD8 (grupo de diferenciación 8)" es una glicoproteína de transmembrana. El CD8 es un marcador de superficie celular de células T citotóxicas que sirve como un co-receptor para el receptor de células T (TCR). El CD8 se une a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y es específico para la proteína MHC de clase I.

**[0027]** La Fig. 1 es un diagrama de flujo que muestra el método para evaluar al paciente con GBM que se puede tratar con un tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna de tumor de células dendríticas de acuerdo con una realización de la presente divulgación. En la Fig. 1, el método para evaluar al paciente con GBM que es aplicable para ser tratado con un tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna 100 del tumor de células dendríticas incluye una etapa de obtención de muestras 110, una etapa de detección 120 y una etapa de comparación 130.

**[0028]** En primer lugar, se proporciona la etapa de obtención de muestras 110, en la que la muestra se obtiene del paciente con GBM. La muestra puede ser un tejido tumoral o una sangre, en donde el tejido tumoral puede ser una sección de tejido congelado, una sección de tejido incrustada en parafina o una micromatriz de tejido.

**[0029]** En segundo lugar, se proporciona la etapa de detección 120, en la que se detecta el nivel de expresión de un biomarcador y luego se calcula el nivel de expresión del biomarcador como un valor base. En más detalles, el biomarcador se selecciona de un grupo que consiste en PD-1, PD-L1, CD8 y una combinación de los mismos. El nivel de expresión del biomarcador se detecta mediante inmunohistoquímica, y luego el nivel de expresión del biomarcador se realiza mediante análisis semicuantitativo mediante un método de puntuación H o un método de procesamiento de imágenes para calcular un valor de señal. Cuando se mide el nivel de expresión del PD-1 y el nivel de expresión del PD-L1, el valor base es el valor de la señal medido en el análisis semicuantitativo. Cuando se mide la relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8, el valor base es la relación del valor de la señal del nivel de expresión de PD-1 al valor de la señal del nivel de expresión de CD8. El método de procesamiento de imágenes puede utilizar un modelo de color RGB (rojo/verde/azul), un modelo de color CMYK (cian/magenta/amarillo/clave) o un modelo de color HSI (tono/saturación/intensidad) para analizar una imagen de la muestra.

**[0030]** Finalmente, se proporciona el paso de comparación 130, en el que el valor de base se compara con un umbral. El paciente con GBM puede ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna contra el tumor de células dendríticas cuando el valor de la base es inferior al umbral. El umbral se ajustará de acuerdo con el método de cálculo del valor base en el paso de detección.

**[0031]** La Fig. 2 es un diagrama de flujo que muestra un método para pronosticar una tasa de supervivencia en el paciente con GBM después del tratamiento. En la Fig. 2, el método para pronosticar la tasa de supervivencia en un paciente con glioblastoma multiforme después de un tratamiento incluye la etapa 210 de obtención de muestras, la etapa 220 de detección y la etapa 230 de comparación.

**[0032]** Se proporciona la muestra de la obtención de la etapa 210, en la que la muestra se obtiene del paciente GBM. La muestra puede ser el tejido tumoral o la sangre, en donde el tejido tumoral puede ser la sección de tejido congelado, la sección de tejido incrustada en parafina o la micromatriz de tejido.

**[0033]** Se proporciona la etapa de detección 220, en la que el nivel de expresión del biomarcador se mide y luego el nivel de expresión del biomarcador se calcula como el valor base. En más detalles, el biomarcador se selecciona de un grupo que consiste en PD-1, PD-L1, CD8 y la combinación de los mismos. La invención reivindicada utiliza la relación PD-1/CD8 como biomarcador. El nivel de expresión del biomarcador se detecta mediante inmunohistoquímica, y luego el nivel de expresión del biomarcador se realiza mediante el análisis semicuantitativo mediante el método de puntuación H o el método de procesamiento de imágenes para calcular el valor de la señal. Cuando se mide el nivel de expresión del PD-1 y el nivel de expresión del PD-L1, el valor base es el valor de la señal medido en el análisis semicuantitativo. Cuando se mide la relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8, el valor base es la relación del valor de la señal del nivel de expresión de PD-1 al valor de la señal del nivel de expresión de CD8. El método de procesamiento de imágenes puede utilizar el modelo de color RGB (rojo/verde/azul), el modelo de color CMYK (cian/magenta/amarillo/clave) o el modelo de color HSI (tono/saturación/intensidad) para analizar la imagen de la muestra.

**[0034]** Se proporciona la etapa de comparación 230, en la que el valor de base se compara con el umbral. Se determina que el paciente con GBM tiene un buen pronóstico después del tratamiento cuando el valor base es más bajo que el umbral. El umbral se ajustará de acuerdo con el método de cálculo del valor base en el paso de detección. El tratamiento puede seleccionarse de un grupo que consiste en una cirugía, una radioterapia, una quimioterapia, una inmunoterapia y la combinación de los mismos. En particular, la inmunoterapia puede basarse en la vacuna del tumor de células dendríticas.

**[0035]** Ahora se hará referencia en detalle a las presentes realizaciones de la presente divulgación, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se utilizan los mismos números de referencia en los dibujos y la descripción para referirse a las mismas partes o similares.

**Ejemplos**

**I. El paciente GBM**

**[0036]** Este programa de ensayos clínicos está aprobado por la Universidad Médica de China y el Comité de Ética de Investigación del Hospital, en donde los sujetos son los pacientes con GBM. El programa de ensayos clínicos rastrea las condiciones del paciente GBM durante diez años.

**[0037]** Hay 35 pacientes con diagnóstico de GBM que participan en este programa de ensayo clínico durante 2005-2014. La distribución por edades de los pacientes con GBM oscila entre los 27 y los 78 años (media 50,97 años). La tabla 1 muestra las características clínicas de los pacientes con GBM. Las variables en este programa de ensayo clínico son el sexo, la edad y el tratamiento, en donde el tratamiento incluye la radioterapia, la quimioterapia, la cirugía, la quimiorradioterapia concurrente y la inmunoterapia. En cuanto al género como variable, hay 17 pacientes masculinos y 18 pacientes femeninos en 35 pacientes con GBM. En cuanto a la edad como variable, hay 8 pacientes mayores o iguales a 60 años, y 27 pacientes menores de 60 años. En cuanto al tratamiento como variable, hay 26 pacientes tratados con radioterapia, 23 pacientes tratados con quimioterapia, 10 pacientes tratados con cirugía, 14 pacientes tratados con quimiorradioterapia concurrente y 21 pacientes tratados con inmunoterapia en 35 GBM. pacientes

Tabla 1 Las características clínicas de los pacientes con GBM.

Variable	Número	Porcentaje (%)
<b>Género</b>		
Masculino	17	48,57
Hembra	18	51,43
<b>Edad (años)</b>		
> 60	8	22,86
<60	27	77,14
<b>Tratamiento</b>		
<b>Radioterapia</b>		
No	9	25,71
Sí	26	74,29
<b>Temozolomida</b>		
No	12	34,29
Sí	23	65,71
<b>Cirugía de cuchillo gamma</b>		
No	25	71,43
Sí	10	33,33
<b>Quimiorradioterapia concurrente</b>		
No	19	57,48
Sí	14	42,42
<b>Inmunoterapia autóloga de células dendríticas/antígeno tumoral</b>		
No	14	40
Sí	21	60

**II. Nivel de expresión del biomarcador detectado por inmunohistoquímica.**

**1. La muestra es el tejido tumoral.**

**[0038]** La muestra en este ejemplo es el tejido tumoral. El tejido tumoral del paciente con GBM se obtiene mediante métodos de biopsia convencionales. El tejido tumoral puede ser las secciones de tejido congelado, las secciones de tejido incrustadas en parafina o la micromatriz de tejido. Las muestras se realizan por inmunohistoquímica para detectar los niveles de expresión de los biomarcadores del PD-1, el PD-L1 y el CD8.

**[0039]** La inmunohistoquímica se realiza de la siguiente manera. Si la muestra es un tejido embebido en parafina, la sección de tejido embebido en parafina con 1-2 µm de espesor se pone en un revestimiento de deslizamiento con organosilano. Para facilitar la inmunohistoquímica posterior, la sección de tejido incluida en parafina se seca luego durante la noche (50-55°C) para disolver la parafina y fortalecer la adhesión entre el portaobjetos y la sección de tejido. Antes de la inmunohistoquímica, la sección de tejido incrustada en parafina se realiza una etapa de desparafinación para eliminar la parafina en el tejido y los espacios intercelulares, y luego se realiza la inmunohistoquímica. Si la muestra es la sección de tejido congelado, la sección de tejido congelado con un espesor de 2-4 µm se realiza directamente mediante inmunohistoquímica. Los anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica son PD-1 (Leica), PD-L1 (Abcam) y CD8 (Leica), y una dilución es 1:200, 1:100 y 1:100 respectivamente. La sección de tejido se recupera con una solución tampón de EDTA a 100°C durante 20 minutos y luego se hibrida con el anticuerpo primario a temperatura ambiente durante 1 hora. La sección de tejido se conjuga con el anticuerpo secundario DAB (para detectar PD-L1) o el anticuerpo secundario AP (para detectar PD-1 y CD8) para detectar los resultados de la tinción. Después de la detección, la hematoxilina contrasta con la parte del tejido.

**[0040]** La Fig. 3 es un conjunto de micrografías de inmunohistoquímica, en donde (A) representa el PD-1, (B) representa el PD-L1 y (C) representa el CD8. Una ampliación de la micrografía es de 400 X. En la Fig. 3, los núcleos se presentan azules, las partes que expresan el PD-L1 se presentan marrones oscuro y las partes que expresan el PD-1 y el CD8 se presentan rojas en las secciones de tejido cerebral teñidas de los pacientes con GBM.

## 2. La muestra es la sangre

**[0041]** La muestra en este ejemplo es la sangre, que llega desde el paciente GBM. La sangre se fabrica como un bloque celular y luego se realiza una inmunohistoquímica para detectar los niveles de expresión de los biomarcadores de la PD-1 y el CD8.

**[0042]** El bloque de células se realiza de acuerdo con los siguientes pasos. La sangre del paciente se coloca en tubos de microcentrifuga y se fija en formalina durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, el material se centrifuga durante 30 segundos a 15.000 rpm y el sobrenadante se desecha cuidadosamente mediante pipeteo, dejando un sedimento de células fijadas con formalina. El sedimento de células fijadas con formalina se resuspende con un volumen mínimo de 3% (p/v) de solución de agarosa a muy baja temperatura de gelificación a temperatura ambiente y se centrifuga durante 30 segundos a 15.000 rpm. El sobrenadante se desecha cuidadosamente mediante pipeteo y la suspensión de células de agarosa resultante se deja solidificar durante 10 a 20 minutos a -20°C. Cada uno de los botones celulares de agarosa solidificada se transfiere a la tapa del tubo de microcentrifuga. Luego, la tapa con un botón de célula de agarosa en la parte inferior se llena con una solución estándar de agarosa al 3%. El disco de gel de agarosa resultante se retira de la tapa y luego se somete a procesamiento de tejido para incrustación en parafina para obtener el bloque celular.

**[0043]** El bloque de células realiza además inmunohistoquímica. Los anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica son PD-1 (Leica) y CD8 (Leica), y una dilución es 1:200 y 1:100 respectivamente. El bloque celular se recupera con una solución tampón de EDTA a 100°C durante 20 minutos y luego se hibrida con el anticuerpo primario a temperatura ambiente durante 1 hora. El bloque celular se conjuga con el anticuerpo secundario AP para detectar los resultados de la tinción. Después de la detección, la hematoxilina contrasta con el bloque celular.

## III. Análisis de resultados de la muestra de tejido tumoral.

### 1. Diagnóstico de la sección de tejido del paciente con GBM.

**[0044]** Un diagnóstico histopatológico de la MBG se basa típicamente en un patrón de tejido en vez de en una identificación de ciertos tipos de células. Se requiere la presencia de células gliales altamente anaplásicas, actividad mitótica y proliferación vascular y/o necrosis. Para este propósito, se definen seis tipos de células diferentes: célula anaplásica pequeña (SAC), célula fibrilada pequeña (SFC), astrocito fibrilado (FA), astrocito pleomórfico (PA), astrocito gemistocítico (GA) y célula extraña grande (LBC). Además, se observan dos patrones de tinción PD-L1, patrón de tinción fibrilar (fibrilar) y patrón de tinción membranosa (membranosa), en secciones de tejido teñido inmunohistoquímico.

**[0045]** La tabla 2 muestra los resultados de diagnóstico de las secciones de tejido teñidas con inmunohistoquímica en pacientes con 35 GBM de este programa de ensayo clínico. Un patólogo analiza las secciones de tejido teñidas con inmunohistoquímica sin conocer los resultados diagnósticos durante el diagnóstico histopatológico. En la tabla 2, 35 pacientes que participan en este programa de ensayo clínico son todos los pacientes con GBM.

Tabla 2 Los resultados del diagnóstico de los pacientes con GBM.

ID	Composicion citologica	Patrón de tinción	ID	Composicion citologica	Composicion citologica
1	FA	Fibrilar	19	FA	FA
2	FA	Fibrilar	20	SFC	FA
3	Pensilvania	Membranoso	21	Georgia	Pensilvania
4	FA	Fibrilar	22	Pensilvania	FA
5	FA	Fibrilar	23	FA	FA
6	Pensilvania	Fibrilar	24	Pensilvania	Pensilvania
7	Pensilvania	Membranoso	25	FA	Pensilvania
8	SFC	Fibrilar	26	Pensilvania	SFC
9	SFC	Fibrilar	27	LBC	SFC
10	LBC	Fibrilar	28	SFC	LBC
11	FA	Fibrilar	29	FA	Fibrilar
12	SAC	Membranoso	30	SFC	Membranoso
13	FA	Fibrilar	31	FA	Fibrilar
14	PA	Membranoso	32	GA	Fibrilar
15	FA	Fibrilar	33	FA	Membranoso
16	PA	Membranoso	34	PA	Fibrilar
17	FA	Membranoso	35	PA	Fibrilar
18	PA	Fibrilar			

**2. Análisis semicuantitativo.**

[0046] Se realizan además los resultados del diagnóstico de secciones de tejido manchado de inmunohistoquímica en 35 pacientes con GBM por análisis semicuantitativo por el método de puntuación H o el método de procesamiento de imágenes.

**2.1 Método de puntuación H**

**2.1.1 PD-L1**

[0047] En el método de puntuación H, el nivel de expresión de PD-L1 se analiza mediante la estimación de una intensidad de tinción de la PD-L1 en la membrana celular de la MBG en 25 campos de alta potencia (ampliación 400 X), y se clasifica como 0, 1 y 2. Los criterios de la clasificación son los siguientes: 0 representa que ninguna célula GBM está teñida de color, 1 representa que la célula GBM está teñida con una intensidad de color débil o moderada en la membrana celular intacta o en el citoplasma, y 2 representa que las células GBM se tiñen con una fuerte intensidad de color en la membrana celular intacta o en el citoplasma.

[0048] El número de células GBM manchadas se estima como un porcentaje (número de células teñidas/número total de células X 100%), y el valor de la señal (HSCORE) en el método de puntuación H se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula I:

$$HSCORE = \sum (i \times P_i) \dots \dots \dots \text{formula I}$$

, donde i representan la intensidad de tinción del biomarcador (0, 1 o 2), y Pi representan el porcentaje de células GBM teñidas (varió de 0% a 100%), en donde el valor de la señal varía de 0 a 200. El umbral es 80 en el método de puntuación H para estimar el nivel de expresión de PD-L1. Cuando el valor de señal calculado en el método de puntaje H es mayor o igual a 80, se define como un nivel de expresión alto del PD-L1 (PD-L1 alto). Cuando el valor de señal calculado en el método de puntuación H es menor que 80, se define como un nivel de expresión bajo del PD-L1 (PD-L1 bajo).

**2.1.2 PD-1 y CD8**

[0049] En el método de puntuación H, el nivel de expresión de PD-1 y el nivel de expresión de CD8 se analizan mediante el recuento del número de células teñidas en 25 campos de alta potencia (ampliación 400 X), y el número de células contadas en 25 campos de alta potencia luego se suman para obtener el valor de la señal. Después de que el cálculo de las secciones de tejido teñidas con inmunohistoquímica en todos los pacientes con GBM tratados con la inmunoterapia se basa en la vacuna contra el tumor de células dendríticas (n=21), se puede calcular una



mediana. El umbral es la mediana en el método de puntuación H para estimar el nivel de expresión de PD-1 y el nivel de expresión de CD8. Cuando el valor de la señal calculado en el método del puntaje H es mayor o igual que la mediana, se define como el nivel de expresión alto del biomarcador. Cuando el valor de señal calculado en el método de puntuación H es menor que la mediana, se define como el nivel de expresión bajo del biomarcador.

**[0050]** La Tabla 3 muestra datos estadísticos en el método de puntuación H, en donde los elementos analizados son los números de células que expresaron el PD-1 o el CD8 en los pacientes con GBM tratados con el tratamiento de inmunoterapia que se basa en la vacuna del tumor de células dendríticas, y la relación del nivel de expresión de PD-1 al nivel de expresión de CD8 (la relación PD-1/CD8). La mediana para CD8, PD-1 y la relación PD-1/CD8 es 231, 26 y 0,13, respectivamente. Cuando el valor de señal calculado en el método de puntuación H es mayor o igual a 231, se define como el nivel de expresión alto del CD8 (CD8 alto). Cuando el valor de señal calculado en el método de puntuación H es menor que 231, se define como el nivel de expresión bajo de CD8 (bajo CD8). Cuando el valor de la señal calculado en el método de puntuación H es mayor o igual a 26, se define como el nivel de expresión alto del PD-1 (PD-1 alto). Cuando el valor de señal calculado en el método de puntuación H es menor que 26, se define como el nivel de expresión bajo del PD-1 (PD-1 bajo). Cuando la relación entre el valor de la señal del PD-1 y el valor de la señal del CD8 calculado en el método del puntaje H es mayor o igual a 0,13, se define como una alta relación PD-1/CD8. Cuando la relación entre el valor de la señal del PD-1 y el valor de la señal del CD8 calculado en el método del puntaje H es menor que 0,13, se define como una baja relación PD-1/CD8.

Tabla 3

Biomarcador	Media	Mediana	Rango intercuartil	DE
CD8	358,00	231,00	177,00-532,00	271,66
PD-1	84,52	26,00	8,50-125,00	120,00
PD-1/CD8	0,24	0,13	0,03-0,42	0,24

## 2.2 Método de procesamiento de imágenes

**[0051]** Aunque el nivel de expresión del PD-L1 puede ser analizado por el método de puntuación H, el método de puntuación H es un análisis cuantitativo de imagen artificial de modo que la definición del nivel de expresión de PD-L1 es que consume tiempo o tiene inexactitudes causadas por una interpretación artificial. Además, la intensidad de las células teñidas es difícil de cuantificar, solo depende de la interpretación artificial subjetiva para determinar la intensidad de la tinción. El nivel de expresión de PD-L1 también se analiza de manera semicuantitativa mediante el método de procesamiento de imágenes en la presente divulgación; por lo tanto, las definiciones del alto nivel de expresión del PD-L1 y el bajo nivel de expresión del PD-L1 son más objetivas.

**[0052]** Una transformación de espacio de color utilizando el modelo de color RGB en este ejemplo para destacar características de los objetos requeridos en imágenes en color. En primer lugar, las micrografías se capturan en 25 campos de alta potencia (ampliación 400 X). En el cálculo de la intensidad de la tinción, las micrografías se convierten de un digital rojo-verde-azul a un canal rojo para obtener un valor RGB. El umbral es de 25.000 en el método de procesamiento de imágenes para estimar el nivel de expresión de PD-L1. Cuando el valor RGB calculado en el método de procesamiento de imágenes es mayor o igual a 25.000, se define como el nivel de expresión alto del PD-L1 (PD-L1 alto). Cuando el valor RGB calculado en el método de procesamiento de imágenes es inferior a 25.000, se define como el nivel de expresión bajo del PD-L1 (PD-L1 bajo). El modelo de color RGB utilizado en el método de procesamiento de imágenes es una realización de la presente divulgación, pero la presente divulgación no se limita a esta realización. El modelo de color CMYK (cian/magenta/amarillo/clave) o el modelo de color HSI (tono/saturación/intensidad) también se puede utilizar en el método de procesamiento de imágenes.

**[0053]** La Fig. 4 es un conjunto de micrografías que muestra los niveles de expresión de PD-L1, donde (A) es la micrografía que muestra el bajo nivel de expresión de PD-L1 en un tejido cerebral normal, (B) la micrografía que muestra un alto nivel de expresión del PD-L1 en un tejido cerebral del paciente con GBM, (C) es una micrografía convertida en color que muestra el bajo nivel de expresión de PD-L1 en el tejido cerebral normal, y (D) es una micrografía convertida en color que muestra el alto nivel de expresión de PD-L1 en el tejido cerebral del paciente con GBM. Los núcleos están marcados como cruces verdes, que representan el número de células en la micrografía. La parte roja de la micrografía representa la expresión de PD-L1. En las Figs. 4(A) y 4(B), el número de células calculado es 260 y el valor RGB es 3938 en la micrografía. Debido a que el valor RGB es menor a 25.000, se define como el nivel de expresión bajo del PD-L1 (PD-L1 bajo). En las Figs. 4(C) y 4(D), el número de células calculado es 307 y el valor RGB es 75347 en la micrografía. Debido a que el valor RGB es menor a 25.000, se define como el nivel de expresión alto del PD-L1 (PD-L1 alto).

## 3. Análisis estadístico.

### 3.1 Análisis de supervivencia.

**[0054]** Los pacientes con 35 GBM se clasifican en el alto nivel de expresión del biomarcador y el bajo nivel de

expresión del biomarcador según el análisis semicuantitativo. El análisis estadístico también se realiza mediante el uso de GraphPad PRISM 4.05 (San Diego, CA, EE.UU.) Y SAS 9.01. El tiempo de supervivencia se analiza mediante la estimación de Kaplan-Meier, y se analiza una estadística significativa del tiempo de supervivencia mediante una prueba de log rank. Un valor de  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativo en todos los análisis estadísticos de este ejemplo.

**[0055]** Un análisis de la supervivencia es un análisis estadístico común de ensayos clínicos en varios tipos de cáncer, y es una estadística que se ocupa de variable de tiempo. En más detalles, el análisis de supervivencia se ocupa del análisis de la duración del tiempo hasta que suceden uno o más eventos. En este ejemplo se utilizan dos índices de evaluación de la variable de tiempo, la supervivencia general (OS) y la supervivencia libre de enfermedad (DFS). El evento es "muerte" en el índice de evaluación de la supervivencia general, y un período de tiempo desde un sujeto participante en el ensayo clínico hasta que se observe la muerte. El evento es una "recurrencia del tumor" en el índice de evaluación de la supervivencia libre de enfermedad, y el tiempo desde que el sujeto participó en el ensayo clínico hasta que se observa la recurrencia del tumor.

**[0056]** La Fig. 5 es una curva de supervivencia general de los pacientes con GBM que se clasifican en función del nivel de expresión de PD-L1, donde (A) representa la curva de supervivencia general de los pacientes con GBM sin tratar la vacuna de tumor de células dendríticas, (B) representa la curva de supervivencia general de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas. La Fig. 6 es una curva de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con GBM que se clasifica según el nivel de expresión de PD-L1, donde (A) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con GBM sin tratamiento con la vacuna de tumor de células dendríticas, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas. La Fig. 7 es un conjunto de curvas de supervivencia de todos los pacientes con GBM, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad. La Fig. 8 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además clasificada según el nivel de expresión del CD8, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad. La Fig. 9 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además se clasifican según el nivel de expresión de PD-1, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad. La Fig. 10 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además se clasifican en función de una relación del nivel de expresión de PD-1 al nivel de expresión de CD8, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad. La Fig. 11 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además se clasifican según el nivel de expresión de PD-1 y el nivel de expresión de PD-L1, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad. Hay 35 pacientes con GBM en este ejemplo, en donde 14 pacientes con GBM no reciben tratamiento con la vacuna contra el tumor de células dendríticas, y 21 pacientes con GBM son tratados con la vacuna contra el tumor de células dendríticas. Un punto hueco en la figura representa un punto temporal en una ocurrencia de datos censurados.

**[0057]** En la Fig. 5, un tiempo de supervivencia general en el paciente GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-L1 es más largo que en el paciente GBM que tiene el nivel de expresión alto de la PD-L1 independientemente del paciente MBG tratado con o sin la vacuna tumoral de células dendríticas. El valor de  $p$  analizado por la prueba de log rank es 0,184 entre el nivel de expresión bajo de PD-L1 y el nivel de expresión alto de PD-L1 en pacientes con GBM sin tratamiento con la vacuna de tumor de células dendríticas. El valor de  $p$  es 0,138 entre el bajo nivel de expresión de PD-L1 y el alto nivel de expresión de PD-L1 en los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas.

**[0058]** En la Fig. 6, el momento de la recidiva del tumor en el paciente GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-L1 es más largo que en el paciente GBM que tiene el nivel de expresión alto de la PD-L1 independientemente del paciente con GBM tratado con o sin la vacuna de tumor de células dendríticas. El valor de  $p$  analizado por la prueba de log rank es 0,771 entre el nivel de expresión bajo de PD-L1 y el nivel de expresión alto de PD-L1 en pacientes con GBM no tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas. El valor de  $p$  es 0,743 entre el bajo nivel de expresión de PD-L1 y el alto nivel de expresión de PD-L1 en los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas.

**[0059]** Hay cuatro grupos en la Fig. 7. En un grupo 1, el paciente GBM tiene la baja expresión de PD-L1 y se trata con la vacuna tumor de células dendríticas. En un grupo 2, el paciente con GBM tiene la alta expresión de PD-L1 y se trata con la vacuna de tumor de células dendríticas. En un grupo 3, el paciente con GBM tiene la baja expresión de PD-L1 y no se trata con la vacuna contra el tumor de células dendríticas. En un grupo 4, el paciente con GBM tiene la alta expresión de PD-L1 y no se trata con la vacuna contra el tumor de células dendríticas. En la Fig. 7 (A), la supervivencia general en el paciente con GBM tratado con la vacuna contra el tumor de células dendríticas (el grupo 1 y el grupo 2) es mayor que en el paciente con GBM sin tratamiento con la vacuna contra el tumor de células dendríticas (el grupo 3 y el grupo 4). Además, la supervivencia general en el paciente con GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-L1 es más larga que en el paciente con GBM que tiene el alto nivel de expresión de PD-L1

independientemente del paciente con GBM tratado con o sin vacuna tumoral de células dendríticas. El valor  $p$  analizado por la prueba de log rank es el siguiente: el valor  $p$  es menor que 0,001 entre los cuatro grupos, el valor  $p$  es menor que 0,001 entre el grupo 3 y el grupo 1, el valor  $p$  es menor que 0,001 entre el grupo 4 y el grupo 2, y el valor de  $p$  es menor que 0,001 entre el grupo 3 y el grupo 2.

5 **[0060]** En la Fig. 7 (B), un tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el paciente GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas (el grupo 1 y el grupo 2) es más largo que en el paciente GBM no tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas (el grupo 3 y el grupo 4). Además, el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el paciente con GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-L1 es más largo que en el paciente con GBM que tiene el alto nivel de expresión de PD-L1 independientemente del paciente con GBM tratado con o sin la vacuna contra el tumor de células dendríticas. El valor  $p$  analizado por la prueba de log rank es el siguiente: el valor  $p$  es 0,004 entre cuatro grupos, el valor  $p$  es 0,016 entre el grupo 3 y el grupo 1, el valor  $p$  es 0,020 entre el grupo 4 y el grupo 2 y el valor  $p$  es 0,048 entre el grupo 3 y el grupo 2.

15 **[0061]** En la Fig. 8, no hay diferencias en el tiempo de supervivencia general y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre el paciente GBM que tiene el bajo nivel de expresión de CD8 y el paciente GBM que tiene el nivel de expresión alto de la CD8, en el que el paciente con GBM se trata con la vacuna de tumor de células dendríticas. El valor de  $p$  es 0,734 entre el nivel de expresión bajo del CD8 y el nivel de expresión alto del CD8 en el tiempo de supervivencia general, y el valor  $p$  es 0,792 entre el bajo nivel de expresión del CD8 y el alto nivel de expresión del CD8 en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad.

20 **[0062]** En la Fig. 9, hay una diferencia significativa ( $p = 0,004$ ) en el tiempo de supervivencia general entre el paciente GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-1 y el paciente GBM que tiene el alto nivel de expresión de PD-1, en donde el paciente con GBM se trata con la vacuna de tumor de células dendríticas. También existe la diferencia ( $p = 0,146$ ) en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre el bajo nivel de expresión de PD-1 y el alto nivel de expresión de PD-1 en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas.

25 **[0063]** En la Fig. 10, cuando un criterio de análisis es la relación del nivel de expresión de PD-1 para el nivel de expresión de CD8 (la relación PD-1/CD8), el tiempo de supervivencia general en el paciente GBM que tiene la baja proporción de PD-1/CD8 es más larga que en el paciente con GBM que tiene la alta proporción de PD-1/CD8, en donde el paciente con GBM se trata con la vacuna contra el tumor de células dendríticas. El valor de  $p$  es 0,006. El tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el paciente con GBM que tiene la baja relación PD-1/CD8 también es más prolongado que en el paciente con GBM que tiene la alta relación PD-1/CD8. El valor de  $p$  es 0,158.

30 **[0064]** Para examinar el efecto del nivel de expresión de PD-1 y el nivel de expresión de PD-L1 sobre el tiempo de supervivencia general y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes de GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas. Hay cuatro grupos en la Fig. 11. En un grupo 5, el paciente con GBM tiene la baja expresión de PD-1 y la baja expresión de PD-L1. En un grupo 6, el paciente con GBM tiene la alta expresión del PD-1 y la baja expresión del PD-L1. En un grupo 7, el paciente con GBM tiene la baja expresión del PD-L1 y la alta expresión del PD-L1. En un grupo 8, el paciente con GBM tiene la alta expresión de PD-1 y la alta expresión del PD-L1. En la Fig. 11 (A), el grupo con el tiempo de supervivencia general más largo es el paciente con GBM que tiene la expresión baja de PD-1 y la expresión baja de PD-L1 (grupo 5). En vista del nivel de expresión de PD-1, el tiempo de supervivencia general en los pacientes con GBM que tienen el nivel de expresión bajo del PD-1 (grupo 5 y grupo 7) es más largo que el de los pacientes con GBM que tienen el nivel alto de expresión. El nivel de expresión del PD-1 (grupo 6 y grupo 8). Sin embargo, en vista del nivel de expresión de PD-L1, el tiempo de supervivencia general en los pacientes con GBM que tienen la expresión alta de PD-1 y la baja expresión de PD-L1 (grupo 6) es más corto que en los pacientes con GBM que tienen la baja expresión de PD-L1 y la alta expresión de PD-L1 (grupo 7). Indica que el nivel de expresión de PD-1 es más importante que el nivel de expresión de PD-L1 en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas. El valor  $p$  analizado por la prueba de log rank es el siguiente: el valor  $p$  es 0,007 entre cuatro grupos, el valor  $p$  es 0,046 entre el grupo 5 y el grupo 6, el valor  $p$  es 0,851 entre el grupo 5 y el grupo 7, el valor  $p$  es 0,018 entre el grupo 5 y el grupo 8, el valor  $p$  es 0,317 entre el grupo 6 y el grupo 7, el valor  $p$  es 0,142 entre el grupo 6 y el grupo 8, y el valor  $p$  es 0,129 entre el grupo 7 y el grupo 8.

35 **[0065]** En la Fig. 11(B), el grupo tiene el tiempo más largo de supervivencia libre de enfermedad es el paciente GBM que tiene la baja expresión de PD-1 y la baja expresión de PD-L1 (grupo 5). Las diferencias entre los cuatro grupos no son significativas en el análisis de supervivencia libre de enfermedad. Aunque el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con GBM que tienen el bajo nivel de expresión de PD-1 (grupo 5 y grupo 7) es más largo que en los pacientes con GBM que tiene el alto nivel de expresión de PD-1 (grupo 6 y grupo 8), las diferencias son insignificantes. El valor  $p$  analizado por la prueba de log rank es el siguiente: el valor  $p$  es 0,341 entre cuatro grupos, el valor  $p$  es 0,809 entre el grupo 5 y el grupo 6, el valor  $p$  es 0,388 entre el grupo 5 y el grupo 7, el valor  $p$  es 0,274 entre el grupo 5 y el grupo 8, el valor  $p$  es 0,317 entre el grupo 6 y el grupo 7, el valor  $p$  es 0,330 entre el grupo 6 y el grupo 8, y El valor  $p$  es 0,129 entre el grupo 7 y el grupo 8.

40 **[0066]** Los resultados del análisis de supervivencia indican que tanto el tiempo de supervivencia general y la enfermedad libre de tiempo de supervivencia en el paciente GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-L1 son más largos que los del paciente GBM que tiene el nivel de alta expresión de PD-L1 independientemente del paciente

con GBM tratado con o sin la vacuna de tumor de células dendríticas. En particular, la diferencia es más significativa en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas. Indica que el paciente con GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-L1 es aplicable para ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna contra el tumor de células dendríticas, y tiene un mejor pronóstico después del tratamiento. Además, el tiempo de supervivencia general y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el paciente con GBM que tiene el bajo nivel de expresión del PD-1 son más largos que los del paciente con GBM que tiene el alto nivel de expresión del PD-1, en donde el paciente con GBM se trata con la vacuna contra el tumor de células dendríticas. El tiempo de supervivencia general y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el paciente con GBM que tiene la baja relación PD-1/CD8 son más largos que los del paciente con GBM que tiene la alta relación PD-1/CD8, en donde el paciente con GBM se trata con la vacuna contra el tumor de células dendríticas. Los resultados sugieren que el paciente con GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-1 o la baja proporción de PD-1/CD8 es aplicable para ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna de tumor de células dendríticas, y tiene un mejor pronóstico después del tratamiento, especialmente la inmunoterapia basada en la vacuna del tumor de células dendríticas.

**3.2 Análisis de la evaluación del efecto del tratamiento.**

**[0067]** La prueba de log rank sólo se utiliza para determinar si las diferencias son significativas entre los diferentes grupos, pero no se puede estimar un efecto del tratamiento. Por lo tanto, en este ejemplo se usa un modelo de riesgo proporcional de Cox para estimar el efecto del tratamiento.

**[0068]** La tabla 4 muestra una relación de riesgo (HR) y un intervalo de confianza (IC) del 95% en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas. Cuando la relación de riesgo es mayor que 1, indica que el porcentaje de muerte en el paciente que expresa el biomarcador es mayor que en el paciente que no expresa el biomarcador. Además, cuando el HR es mayor que 1, el valor *p* es menor que 0,05 y el IC del 95% es menor que 1, indica que el biomarcador tiene una diferencia estadísticamente significativa. En la Tabla 4, el efecto del PD-1 en el tiempo de supervivencia general tiene un valor estadístico significativo. El porcentaje de ocurrencia de muerte en el paciente con GBM que tiene el alto nivel de expresión del PD-1 es 4,72 veces mayor que en el paciente con GBM que tiene el bajo nivel de expresión del PD-1. El resultado sugiere que el PD-1 es un factor de afectación esencial en el tiempo de supervivencia general en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas.

Tabla 4

Variable	Tiempo de supervivencia general			Tiempo de supervivencia libre de enfermedad		
	Valor p	HR	95% CI	Valor p	HR	95% CI
PD-1	0,008*	4,720	1,495-14,898	0,154	2,095	0,759-5,784
PD-L1	0,165	2,120	0,733-6,127	0,501	1,408	0,520-3,808
CD8	0,735	0,843	0,315-2,259	0,792	1,142	0,426-3,062

**3,3 Análisis del coeficiente de correlación.**

**[0069]** Un coeficiente de correlación Pearson se utiliza en este ejemplo para analizar una correlación entre el nivel de expresión del PD-1 y el tiempo de supervivencia general, la correlación entre el nivel de expresión de PD-1 y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad, la correlación entre la relación PD-1/CD8 y el tiempo de supervivencia general, y la correlación entre la relación PD-1/CD8 y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas. El coeficiente de correlación de Pearson se usa para analizar la fuerza de una correlación lineal entre dos variables consecutivas (*x*, *y*), y el coeficiente de correlación de Pearson calculado (*r*) varía de -1 a +1. Cuando la *r* es mayor que 0, hay una correlación positiva entre las dos variables. Es decir, cuando a medida que aumenta *x*, también aumenta *y*, y viceversa. Cuando la *r* es menor que 0, hay una correlación negativa entre las dos variables. Es decir, cuando a medida que aumenta la *x*, la *y* disminuye y viceversa. Un grado de correlación entre dos variables depende de  $|r|$ , donde 1 es una correlación total, 0,7-0,99 es una correlación alta, 0,4-0,69 es una correlación moderada, 0,1-0,39 es una correlación baja, 0,01-0,09 es casi sin correlación, y 0 es sin correlación.

**[0070]** La Fig. 12 es un diagrama de correlación entre el PD-1 y un tiempo de supervivencia general. En la Tabla 5, a continuación, se muestra un coeficiente de correlación entre el PD-1 y el tiempo de supervivencia general. La Fig. 13 es el diagrama de correlación entre el PD-1 y un tiempo de supervivencia libre de enfermedad. El coeficiente de correlación entre el PD-1 y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad se muestra en la Tabla 6 de la siguiente manera. La Fig. 14 es el diagrama de correlación entre la relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8 y el tiempo de supervivencia general. El coeficiente de correlación entre la relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8 y el tiempo de supervivencia general se muestra en la Tabla 7 de la siguiente manera. La Fig. 15 es el diagrama de correlación entre la relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8 y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad. El coeficiente de correlación entre la relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8 y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad se muestra en la Tabla 8 de la siguiente manera.

Tabla 5

		Supervivencia general (mes)	Recuento PD-1
Supervivencia general (mes)	Correlación Pearson	1	-0,446*
	Sig. (dos colas)	-	0,042
	número	21	21
Recuento PD-1	Correlación Pearson	-0,446*	1
	Sig. (dos colas)	0,042	-
	número	21	21

Tabla 6

		Supervivencia general (mes)	Recuento PD-1
Supervivencia libre de enfermedad (mes)	Correlación Pearson	1	-0,338
	Sig. (dos colas)	-	0,067
	número	21	21
Recuento PD-1	Correlación Pearson	-0,338	1
	Sig. (dos colas)	0,067	-
	número	21	21

Tabla 7

		Supervivencia general (mes)	PD-1/CD8
Supervivencia general (mes)	Correlación Pearson	1	-0,677**
	Sig. (dos colas)	-	0,001
	número	21	21
PD-1/CD8	Correlación Pearson	-0,677**	1
	Sig. (dos colas)	0,001	-
	número	21	21

Tabla 8

		Supervivencia general (mes)	PD-1/CD8
Supervivencia libre de enfermedad (mes)	Correlación Pearson	1	-0,377
	Sig. (dos colas)	-	0,092
	número	21	21
PD-1/CD8	Correlación Pearson	-0,377	1
	Sig. (dos colas)	0,092	-
	número	21	21

[0071] En la Fig. 12 y en la Tabla 5, no es la correlación negativa entre el nivel de expresión del PD-1 y el tiempo de supervivencia general. El coeficiente de correlación de Pearson es -0,446; indica que existe una correlación estadísticamente significativa entre el nivel de expresión de PD-1 y el tiempo de supervivencia general. En la Fig. 13 y la Tabla 6, existe una correlación negativa entre el nivel de expresión de PD-1 y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad. El coeficiente de correlación de Pearson es -0,338; indica que existe una baja correlación entre el nivel de expresión del PD-1 y el tiempo de supervivencia de la enfermedad. En la Fig. 14 y la Tabla 7, existe una correlación negativa entre la relación PD-1/CD8 y el tiempo de supervivencia general. El coeficiente de correlación de Pearson es -0,677; indica que existe una correlación estadísticamente significativa entre la relación PD-1/CD8 y el tiempo de supervivencia general. En la Fig. 15 y la Tabla 8, existe una correlación negativa entre la proporción PD-1/CD8 y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad. El coeficiente de correlación de Pearson es -0,377;

indica que existe una baja correlación entre la relación PD-1/CD8 y el tiempo de supervivencia de la enfermedad.

**[0072]** Los resultados del análisis de coeficiente de correlación sugieren que el tiempo de supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad de tiempo es más largo cuando el nivel de expresión del PD-1 es menor en los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas. Además, el tiempo de supervivencia general y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad es más largo cuando la proporción PD-1/CD8 es menor en los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas. Significa que el paciente con GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-1 o la baja proporción de PD-1/CD8 es aplicable para ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna de tumor de células dendríticas, y tiene el mejor pronóstico después del tratamiento, especialmente la inmunoterapia basada en la vacuna del tumor de células dendríticas.

#### 4. Análisis de resultados de la muestra de sangre

##### 4.1 Análisis del coeficiente de correlación

**[0073]** La tabla 9 muestra los resultados del bloque de células teñidas con inmunohistoquímica analizados por el método de puntuación H en 13 pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas, en donde los elementos analizados son los números de células que expresaron el PD-1 o el CD8 en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes con GBM tratados con el tratamiento de inmunoterapia se basan en la vacuna contra tumores de células dendríticas y los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de los pacientes con GBM tratados con el tratamiento de inmunoterapia se basan en la vacuna contra tumores de células dendríticas y relación del nivel de expresión del PD-1 al nivel de expresión del CD8 (relación PD-1/CD8).

**[0074]** En el método de puntuación H, el nivel de expresión de PD-1 y el nivel de expresión de CD8 se analizan mediante el recuento del número de células teñidas en 25 campos de alta potencia (ampliación 400 X), y el número de células contadas en 25 campos de alta potencia luego se suman para obtener el valor de la señal. Después del cálculo del bloqueo de células teñidas con inmunohistoquímica en los pacientes con GBM tratados con la inmunoterapia se basa en la vacuna contra el tumor de células dendríticas (n=13), se puede calcular una mediana. El umbral es la mediana en el método de puntuación H para estimar el nivel de expresión de PD-1 y el nivel de expresión de CD8. Cuando el valor de la señal calculado en el método de la puntuación H es mayor o igual que la mediana, se define como el nivel de expresión alto del biomarcador. Cuando el valor de señal calculado en el método de puntuación H es menor que la mediana, se define como el nivel de expresión bajo del biomarcador. La mediana para CD8, PD-1 y la relación PD-1/CD8 es 231, 26 y 0,13, respectivamente. Cuando el valor de señal calculado en el método de puntuación H es mayor o igual a 231, se define como el CD8 alto. Cuando el valor de señal calculada en el método de puntuación H es menor que 231, se define como el CD8 bajo. Cuando el valor de la señal calculado en el método de puntuación H es mayor o igual a 26, se define como el PD-1 alto. Cuando el valor de la señal calculado en el método de puntuación H es menor que 26, se define como el PD-1 bajo. Cuando la relación entre el valor de la señal del PD-1 y el valor de la señal del CD8 calculado en el método de la puntuación H es mayor o igual a 0,13, se define como una alta relación PD-1/CD8. Cuando la relación entre el valor de la señal del PD-1 y el valor de la señal del CD8 calculado en el método de la puntuación H es menor que 0,13, se define como una baja relación PD-1/CD8.

Tabla 9

ID	PBMC			TIL		
	CD8	PD-1	PD-1/CD8	CD8	PD-1	PD-1/CD8
1	2878	368	0,13	648	0	0,00
3	3410	265	0,08	380	0	0,00
4	2095	830	0,40	80	26	0,33
5	4315	805	0,19	753	7	0,01
9	5890	368	0,06	231	3	0,01
10	1797	202	0,11	218	12	0,06
11	5968	1303	0,22	189	24	0,13
13	4705	823	0,17	195	22	0,11
14	4970	40	0,008	1068	153	0,14
17	2740	513	0,19	764	185	0,24
19	1792	965	0,54	562	343	0,61
20	3868	995	0,26	381	224	0,59
21	3045	635	0,21	43	0	0,00

[0075] En este ejemplo, los resultados del bloque de células manchado por inmunohistoquímica se analizan adicionalmente por el coeficiente de correlación de Pearson para analizar la correlación entre la relación PD-1/CD8 de la PBMC en el paciente GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas y la relación PD-1/CD8 del TIL de en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas. La Fig. 16 es el diagrama de correlación entre la relación PD-1/CD8 de las PBMC en el paciente con GBM tratado con la vacuna del tumor de células dendríticas y la relación PD-1/CD8 del TIL en el paciente con GBM tratado con el tumor de células dendríticas vacuna.

Tabla 10

		Relación PD-1/CD8 (PBMC)	Relación PD-1/CD8 (TIL)
Relación PD-1/CD8 (PBMC)	Correlación Pearson	1	0,752**
	Sig. (dos colas)	-	0,003
	número	13	13
Relación PD-1/CD8 (TIL)	Correlación Pearson	0,752**	1
	Sig. (dos colas)	0,003	-
	número	13	13

[0076] En la Fig. 16 y la Tabla 10, no es la correlación positiva entre la relación PD-1/CD8 de la PBMC en el paciente tratado con GBM con la vacuna de tumor de células dendríticas y la relación PD-1/CD8 de la TIL en el paciente tratado con GBM con la vacuna tumoral de células dendríticas. El coeficiente de correlación de Pearson es de 0,752; indica que existe una alta correlación estadísticamente significativa entre la relación PD-1/CD8 de la PBMC en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas y la relación PD-1/CD8 del TIL en el paciente con GBM tratado con la vacuna tumoral de células dendríticas. El coeficiente de correlación entre la relación PD-1/CD8 de PBMC en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas y la relación PD-1/CD8 del TIL en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas se muestra en Tabla 10 del siguiente modo. Los resultados del análisis del coeficiente de correlación sugieren que el método de evaluación del paciente con GBM que se puede tratar con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna contra el tumor de células dendríticas (y también el método de pronóstico de la tasa de supervivencia en el paciente con GBM después del tratamiento) no solo puede estimarse midiendo el nivel de expresión del biomarcador en el tejido tumoral, sino que también puede estimarse midiendo el nivel de expresión del biomarcador en la sangre.

**4.2 Análisis de supervivencia**

[0077] Los 13 pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas se clasifican en el alto nivel de expresión del biomarcador y el bajo nivel de expresión del biomarcador según el análisis semicuantitativo, en el que la muestra es la sangre. El análisis estadístico también se realiza mediante el uso de GraphPad PRISM 4,05 (San Diego, CA, EE.UU.) y SAS 9,01. El tiempo de supervivencia se analiza mediante la estimación de Kaplan-Meier, y se analiza una estadística significativa del tiempo de supervivencia mediante una prueba de log rank. Un valor de  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativo en todos los análisis estadísticos de este ejemplo.

[0078] Fig. 17 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y clasificados además en función del nivel de expresión de PD-1 de las PBMC, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad. La Fig. 18 es un conjunto de las curvas de supervivencia de los pacientes con GBM tratados con la vacuna de tumor de células dendríticas y además clasificados según la relación PD-1/CD8 de las PBMC, donde (A) representa la curva de supervivencia general, (B) representa la curva de supervivencia libre de enfermedad.

[0079] En la Fig. 17, existe una diferencia significativa ( $p = 0,014$ ) en el tiempo de supervivencia general entre el paciente GBM que tiene el bajo nivel de expresión de PD-1 y el paciente GBM que tiene el alto nivel de expresión de PD-1, en donde el paciente con GBM se trata con la vacuna de tumor de células dendríticas. También existe la diferencia ( $p = 0,232$ ) en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre el bajo nivel de expresión de PD-1 y el alto nivel de expresión de PD-1 en el paciente con GBM tratado con la vacuna de tumor de células dendríticas.

[0080] En la Fig. 18, cuando los criterios de análisis son la relación entre el nivel de expresión de PD-1 para el nivel de expresión de CD8 (la relación PD-1/CD8), el tiempo de supervivencia general en el paciente GBM que tiene la baja proporción de PD-1/CD8 es más largo que en el paciente con GBM que tiene la alta proporción de PD-1/CD8, en donde el paciente con GBM se trata con la vacuna contra el tumor de células dendríticas. El valor de  $p$  es 0,019. El tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el paciente con GBM que tiene la baja relación PD-1/CD8 también es significativo por más tiempo que en el paciente con GBM que tiene la alta relación PD-1/CD8. El valor de  $p$  es 0,024.

[0081] Figs. 17-18 indican además que los resultados del análisis de supervivencia analizados en la sangre de los

pacientes con GBM y los resultados del análisis de supervivencia analizados en el tejido tumoral de los pacientes con GBM son los mismos. Además, indica que el método para evaluar al paciente con GBM que es aplicable a ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna contra el tumor de células dendríticas (y también el método de pronóstico de la tasa de supervivencia en el paciente con GBM después del tratamiento) puede estimarse al medir el nivel de expresión del biomarcador en la sangre de los pacientes con GBM.

**[0082]** En resumen, la presente descripción proporciona el método de evaluación del paciente GBM que es aplicable a ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basada en la vacuna de tumor de células dendríticas mediante la medición de los niveles de expresión de PD-1 y CD8 y el cálculo de la relación PD-1/CD8 en el tejido tumoral o en la sangre. Por lo tanto, el médico puede identificar de manera rápida y objetiva al paciente con GBM que puede ser tratado con el tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna tumoral de células dendríticas en una aplicación clínica. De esta manera, el médico puede excluir al paciente con GBM que no tiene ningún efecto sobre la inmunoterapia basada en la vacuna contra el tumor de células dendríticas para garantizar distribuciones y usos efectivos de los recursos médicos. Como complemento, se puede proporcionar un método de pronóstico de la tasa de supervivencia en el paciente con GBM después del tratamiento midiendo el nivel de expresión de PD-1 o el nivel de expresión de PD-1, o calculando la relación PD-1/CD8 en el tejido tumoral o la sangre. El método puede usarse para predecir la tasa de supervivencia del paciente con GBM después del tratamiento. Por lo tanto, el médico puede determinar si el paciente con GBM necesita tratar con otros medicamentos o planes de tratamiento para mejorar el tiempo de supervivencia general y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en la aplicación clínica.



**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Un método para evaluar un paciente con glioblastoma multiforme que es aplicable a un tratamiento de inmunoterapia basado en una vacuna de tumor de células dendríticas (100), comprendiendo el método:
- proporcionar una muestra obtenida del paciente con glioblastoma multiforme (110), en donde la muestra es un tejido tumoral o sangre;
- 10 detectar un nivel de expresión de PD-1 y un nivel de expresión de CD8 y luego calcular un valor base dividiendo el nivel de expresión de PD-1 por el nivel de expresión de CD8 para formar una relación del nivel de expresión de PD-1 a nivel de expresión del CD8 (relación PD-1/CD8); y
- comparar el valor base con un umbral (130),
- en donde, cuando el valor base es inferior al umbral, se evalúa que el paciente con glioblastoma multiforme es aplicable al tratamiento de inmunoterapia basado en la vacuna de tumor de células dendríticas.
- 15
2. El método de la reivindicación 1, en el que el tejido tumoral es una sección de tejido o una micromatriz de tejido.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la detección de los niveles de expresión de PD-1 y CD8 se realiza mediante inmunohistoquímica.
- 20
4. El método de la reivindicación 3, en el que detectar el nivel de expresión comprende además calcular un valor de señal mediante un método de puntuación H o un método de procesamiento de imágenes.
- 25
5. El método de la reivindicación 4, en el que el método de procesamiento de imágenes utiliza un modelo de color RGB (rojo/verde/azul), un modelo de color CMYK (cian/magenta/amarillo/clave) o un modelo de color HSI (tono/saturación/intensidad) para analizar una imagen de la muestra.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

100

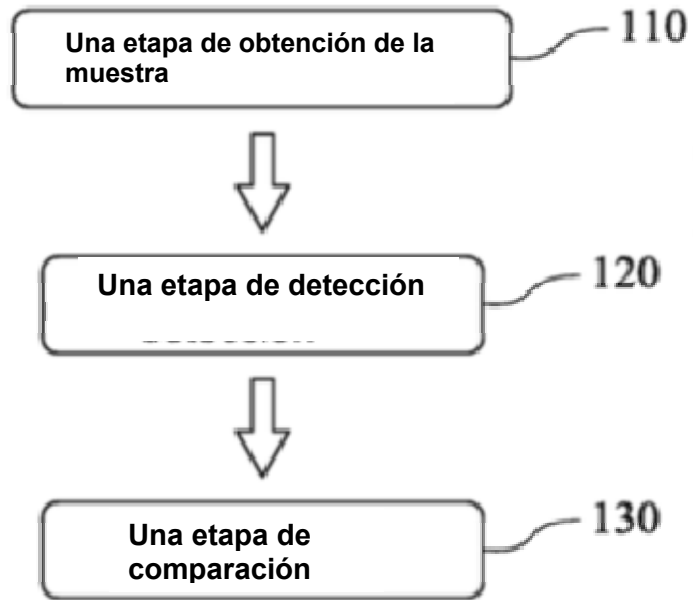


Fig. 1

200

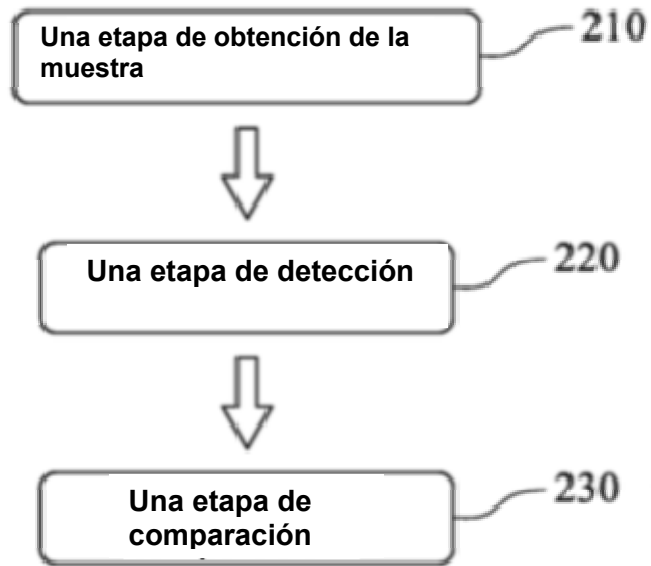


Fig. 2

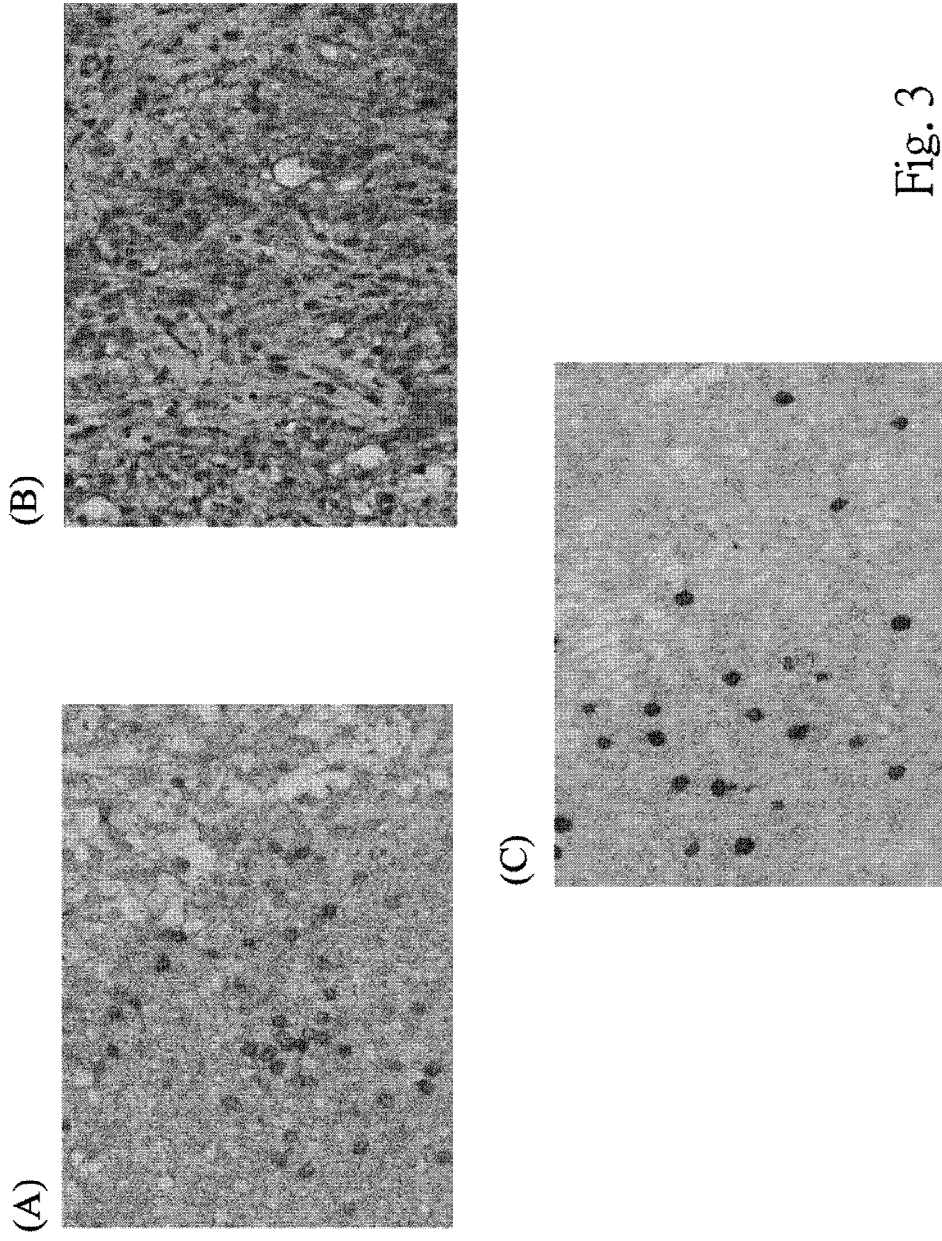


Fig. 3

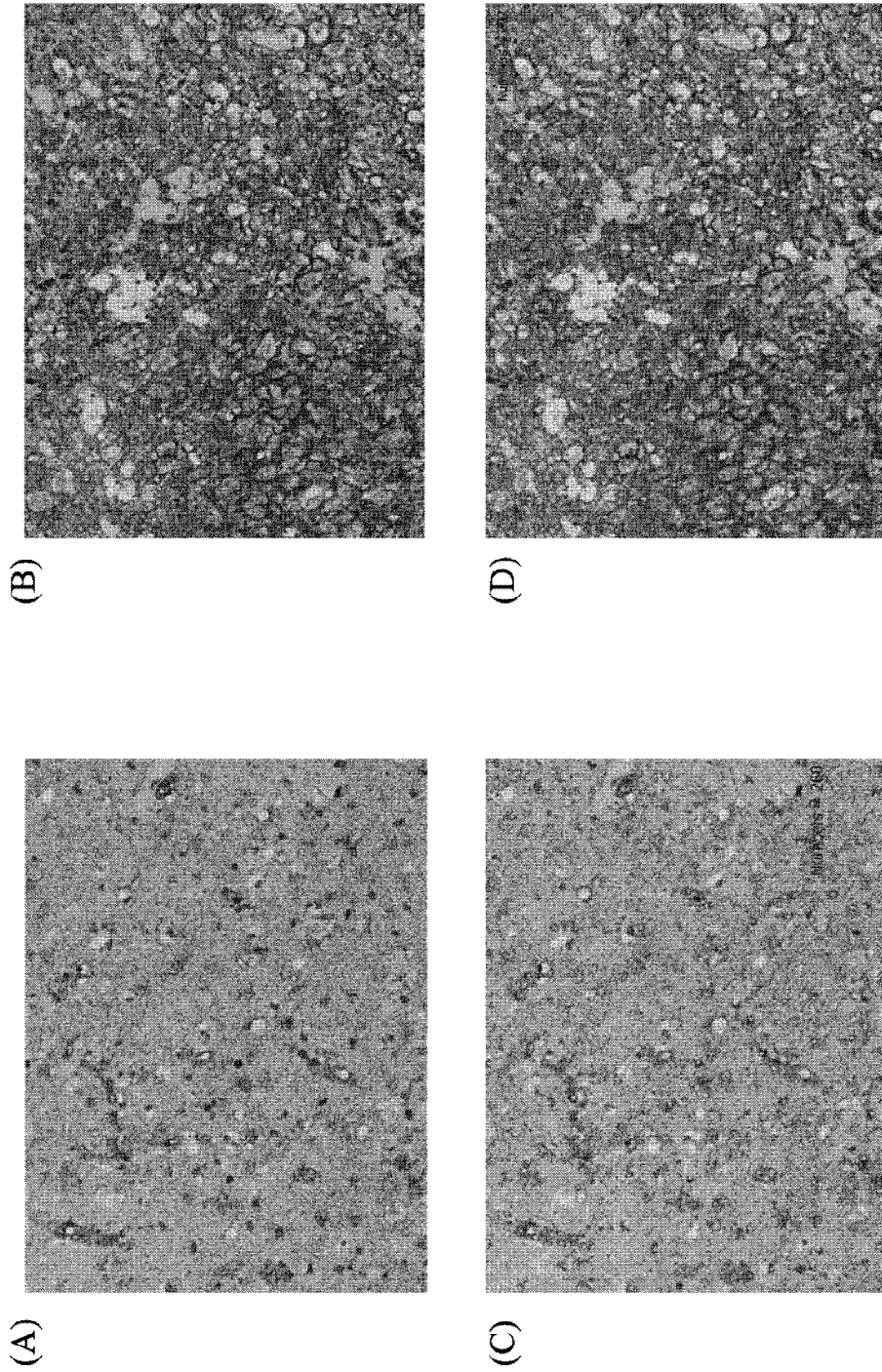


Fig. 4

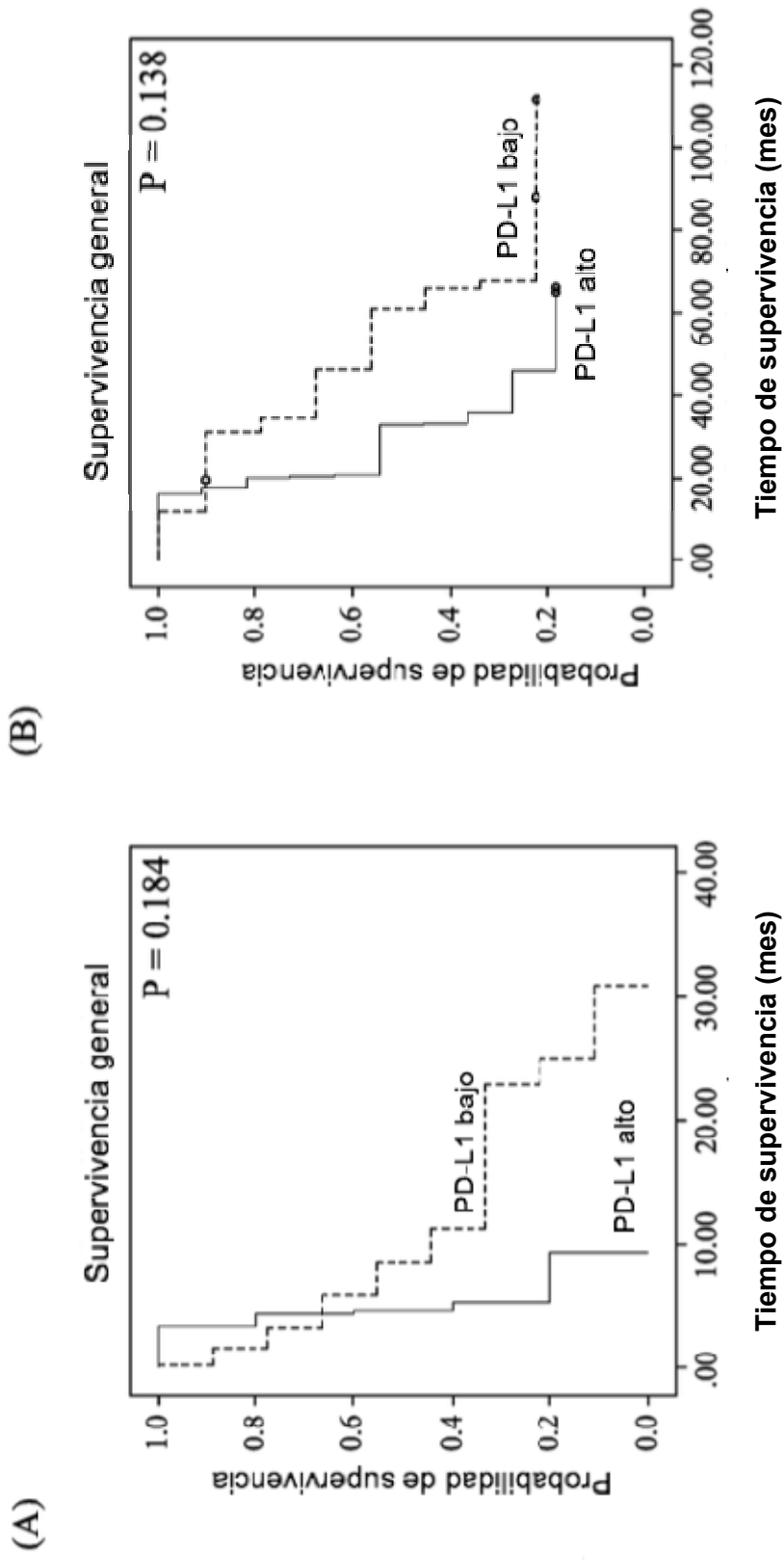


Fig. 5

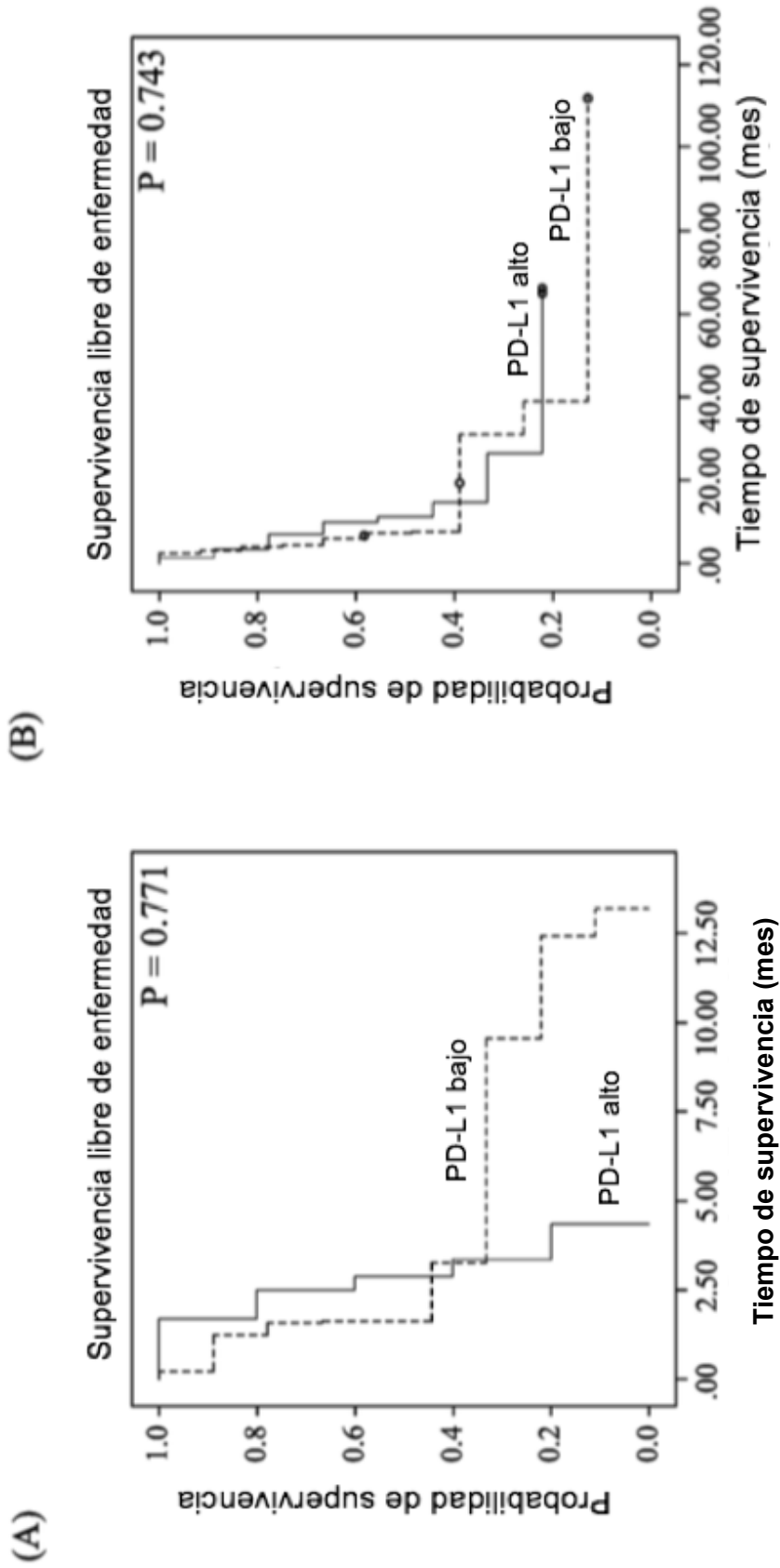


Fig. 6

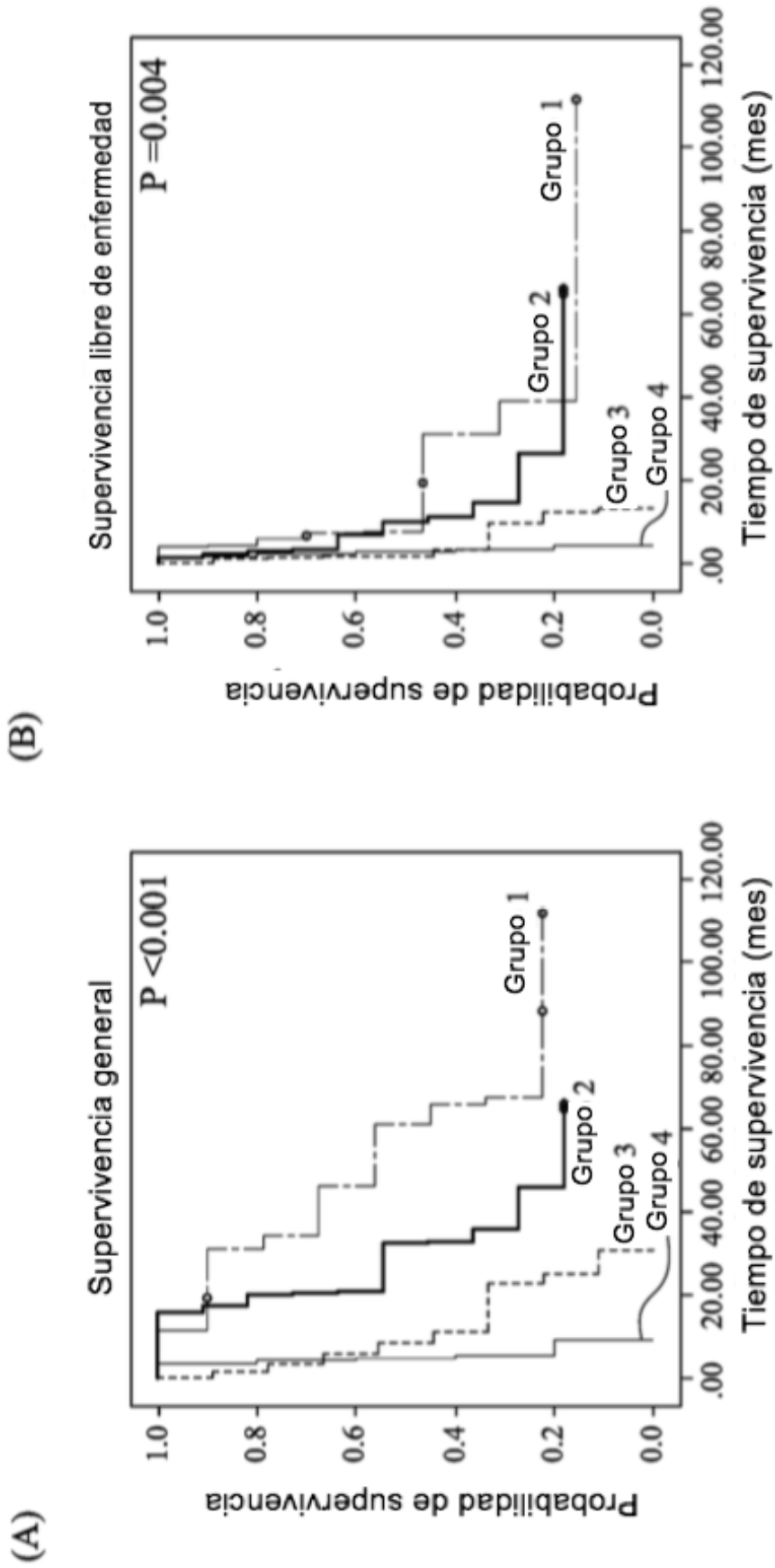


Fig. 7



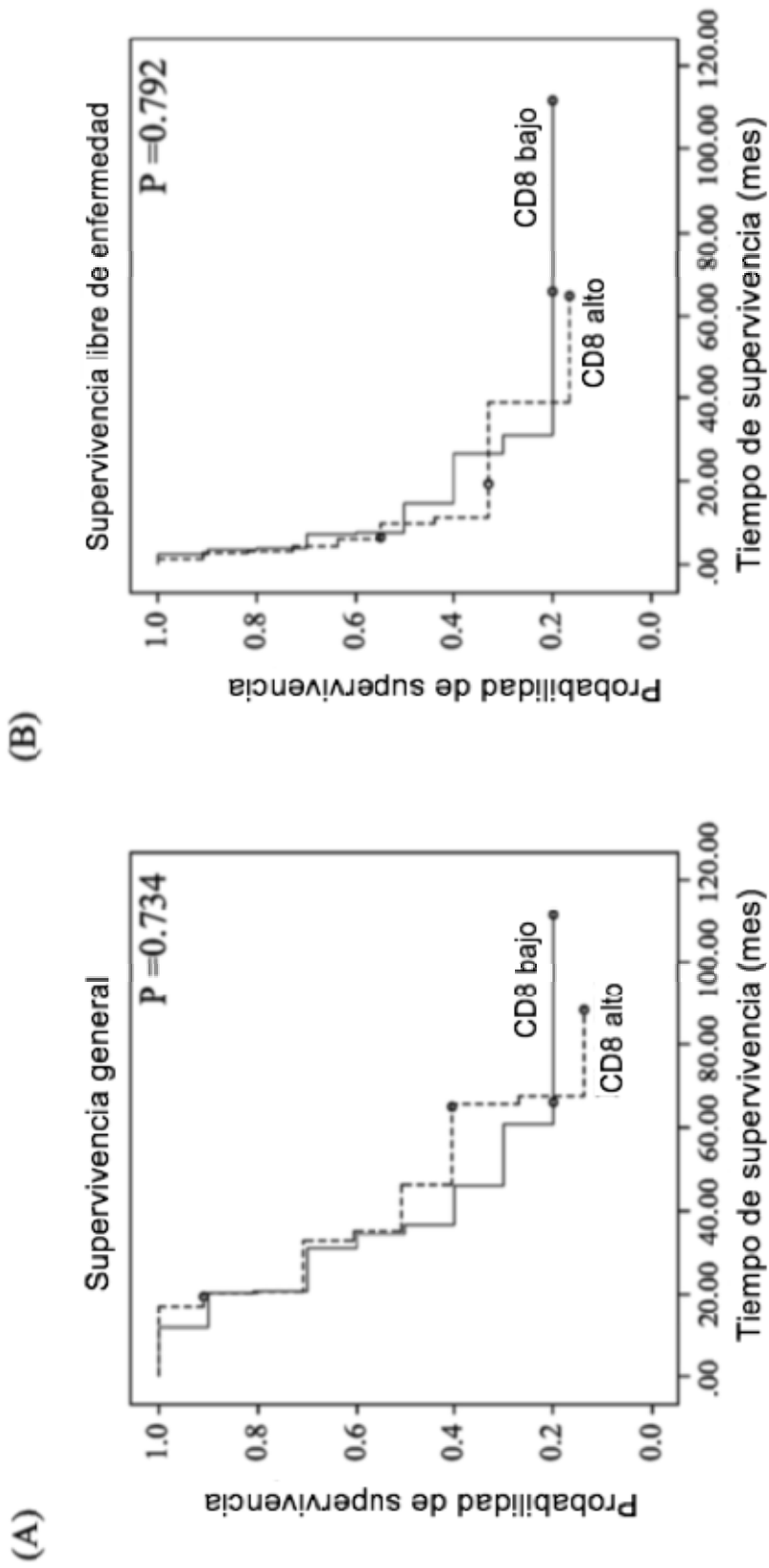


Fig. 8

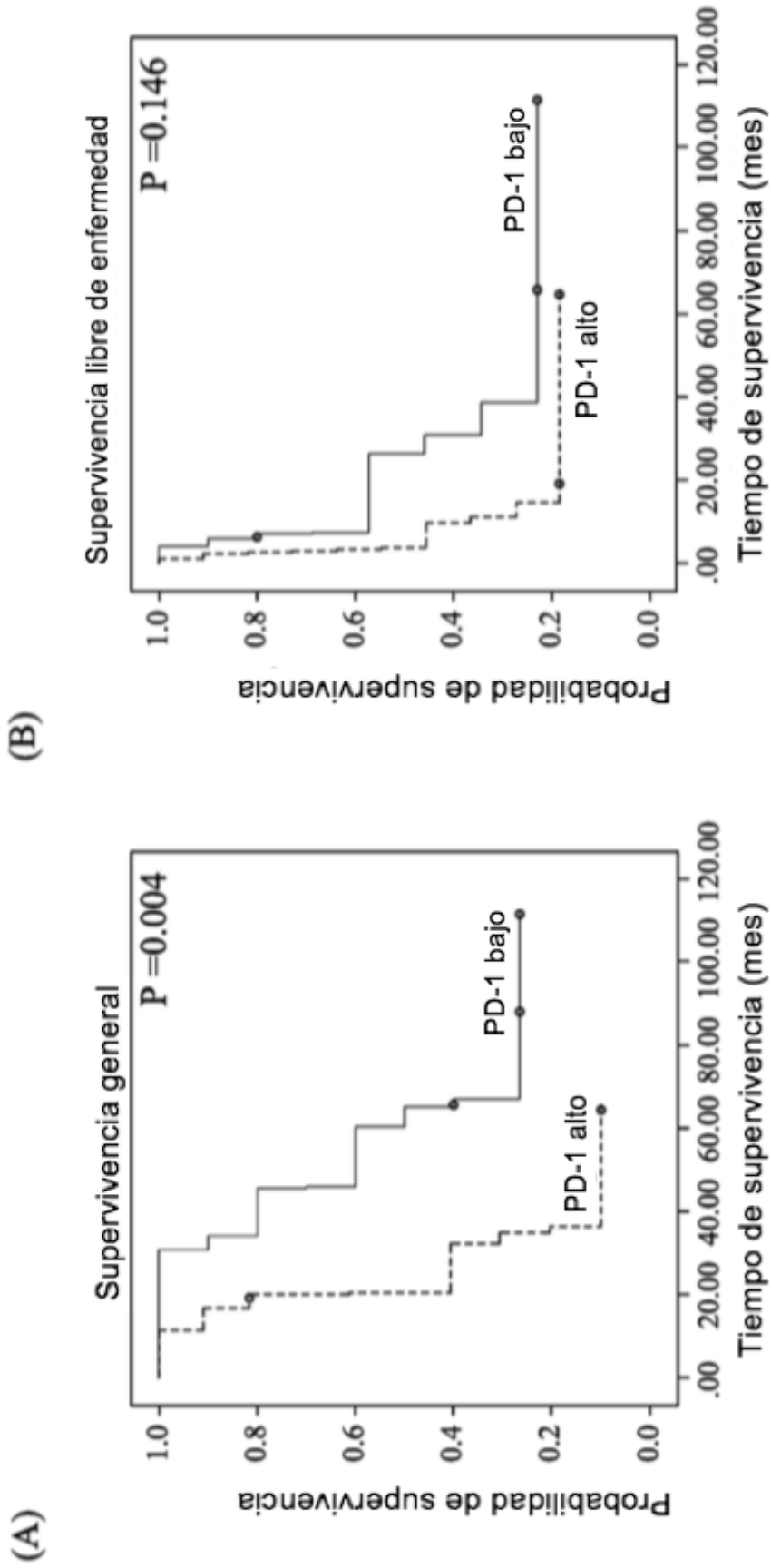


Fig. 9

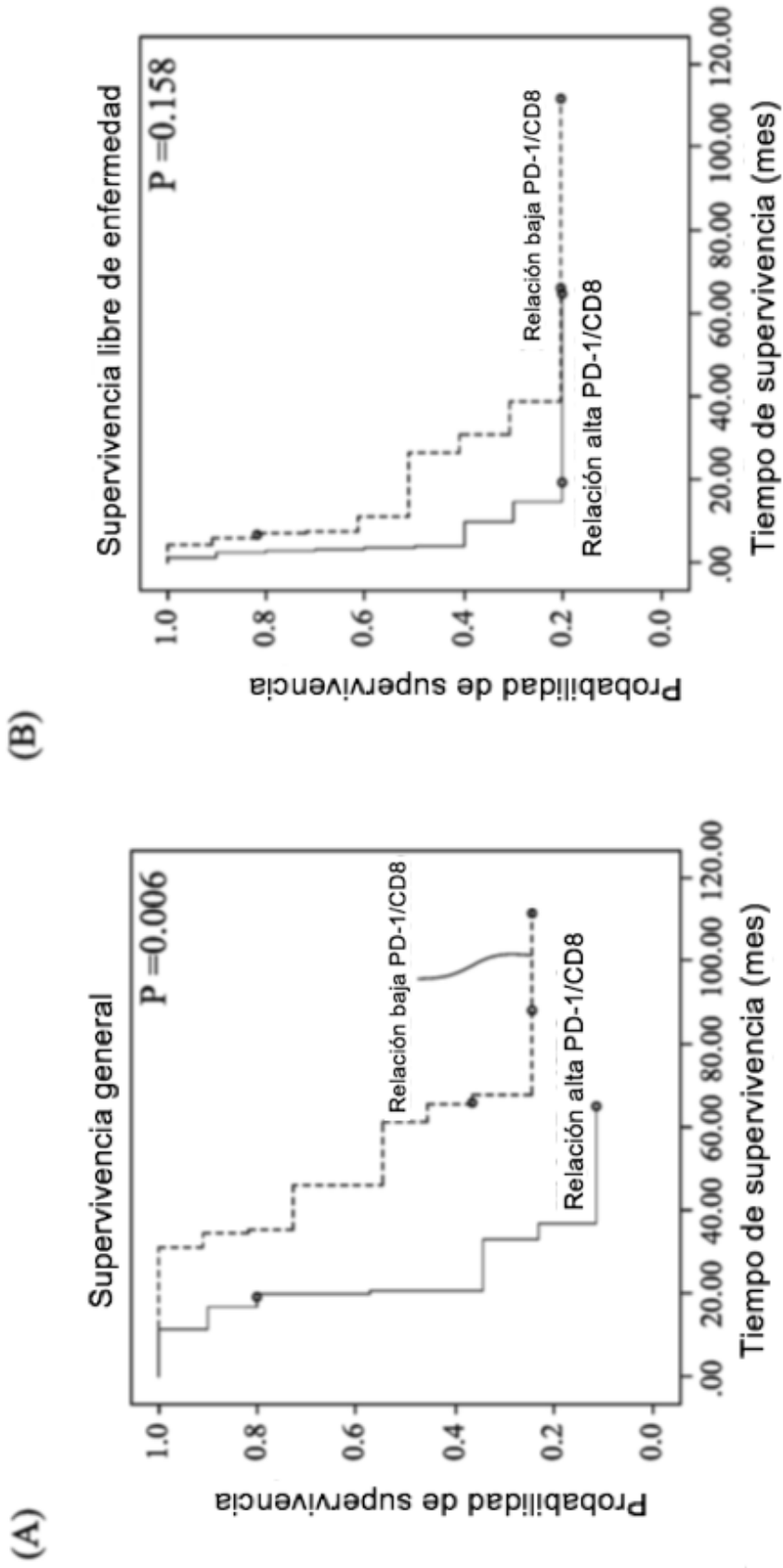


Fig. 10

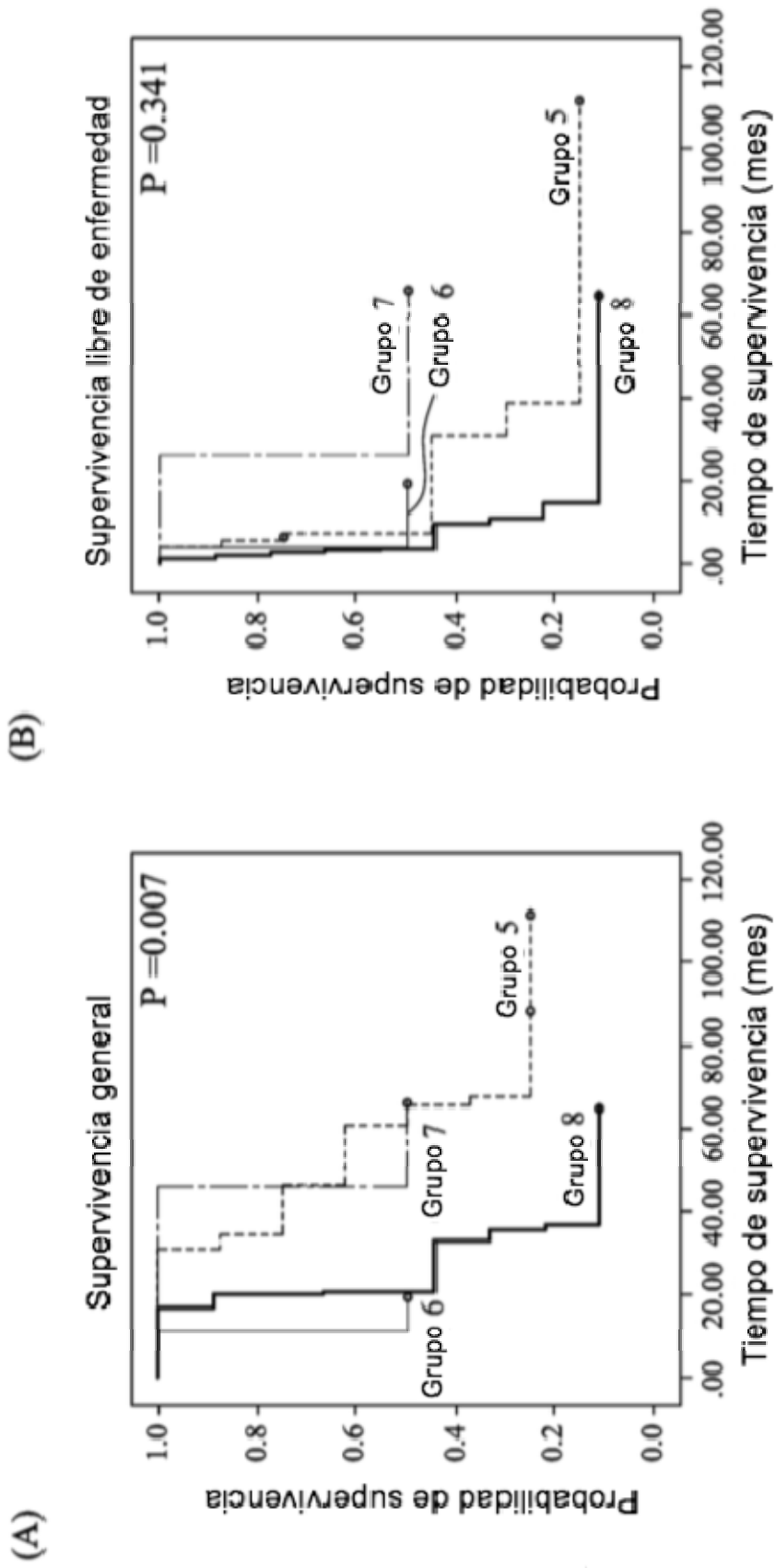


Fig. 11

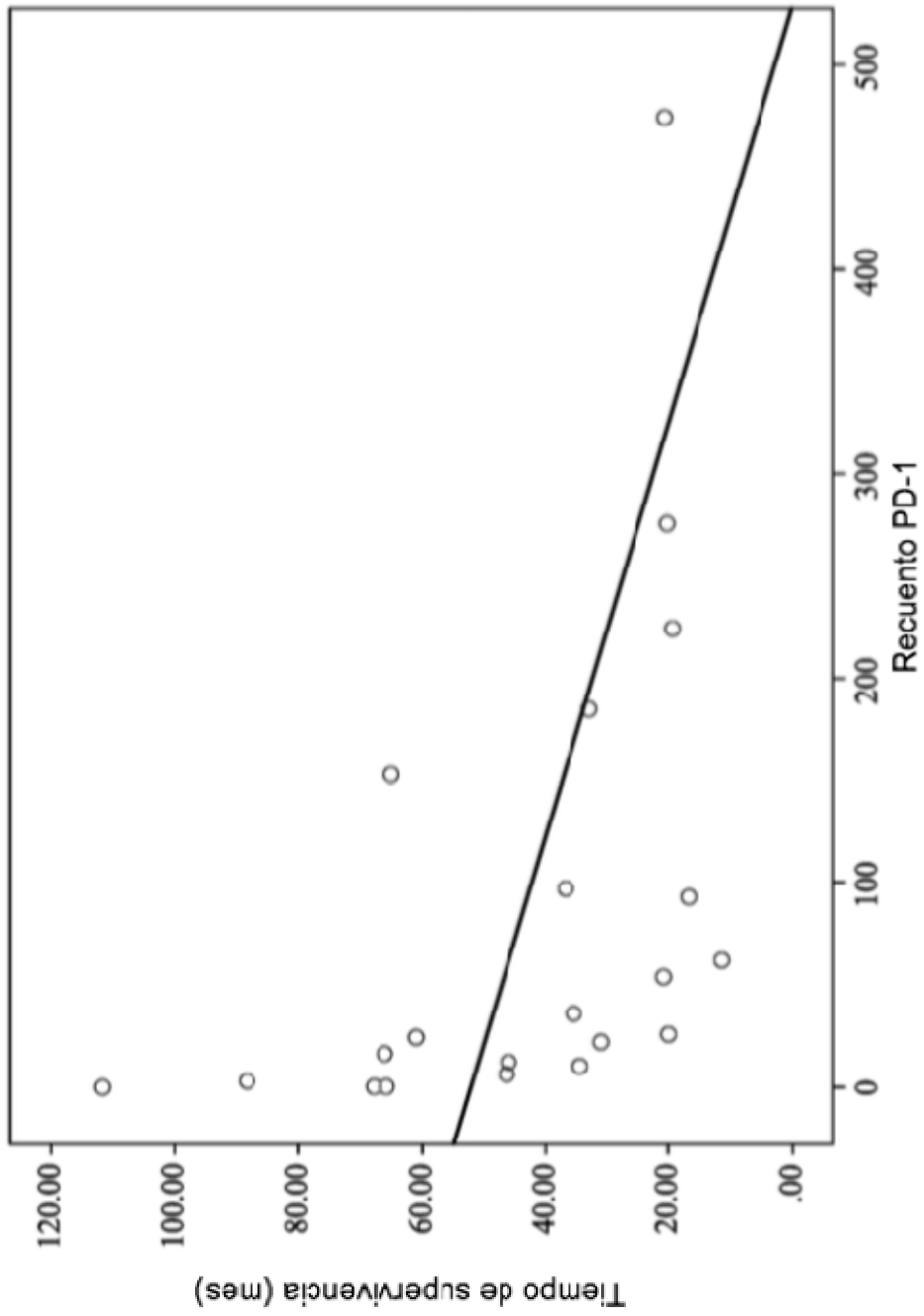


Fig. 12

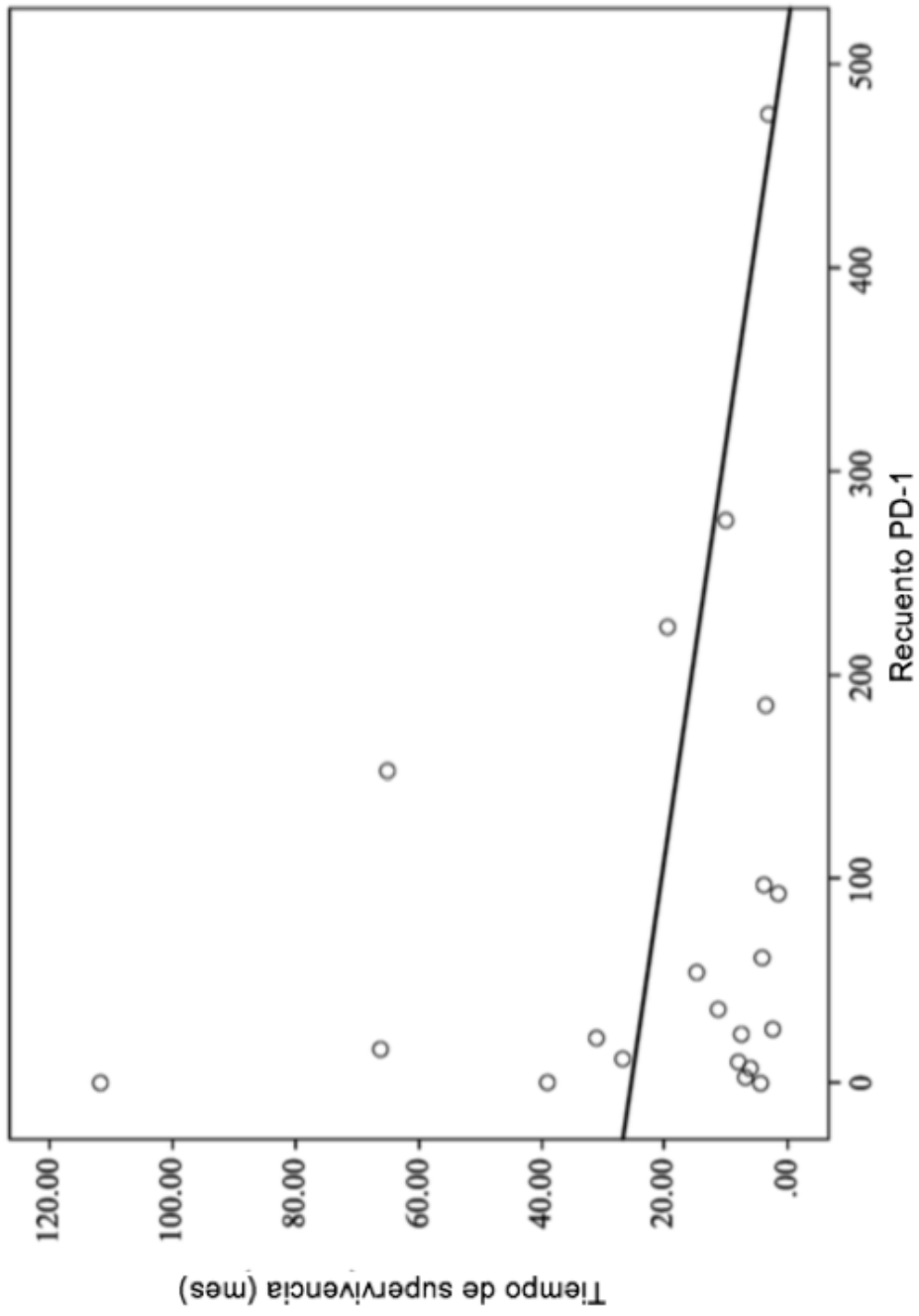


Fig. 13

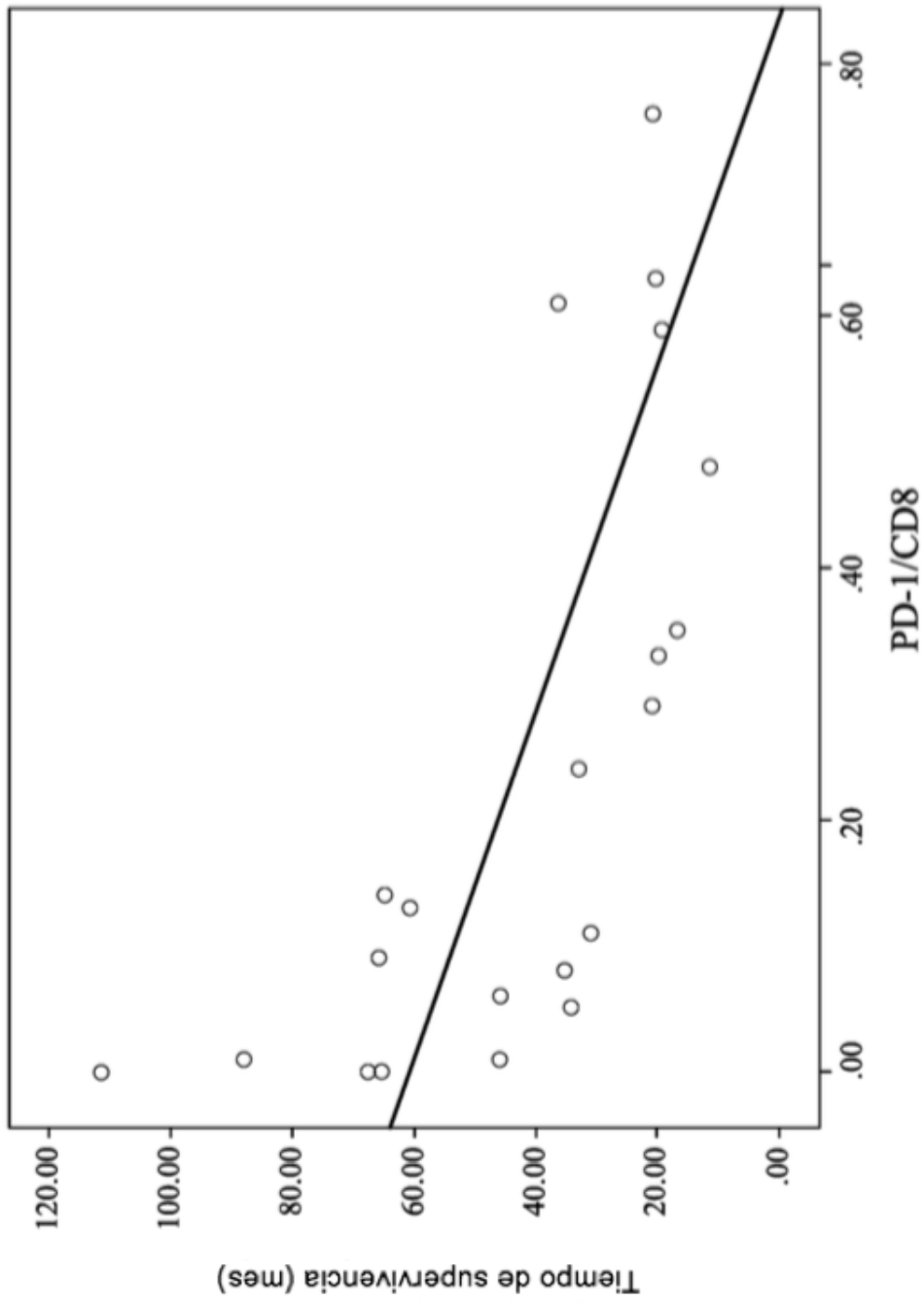


Fig. 14

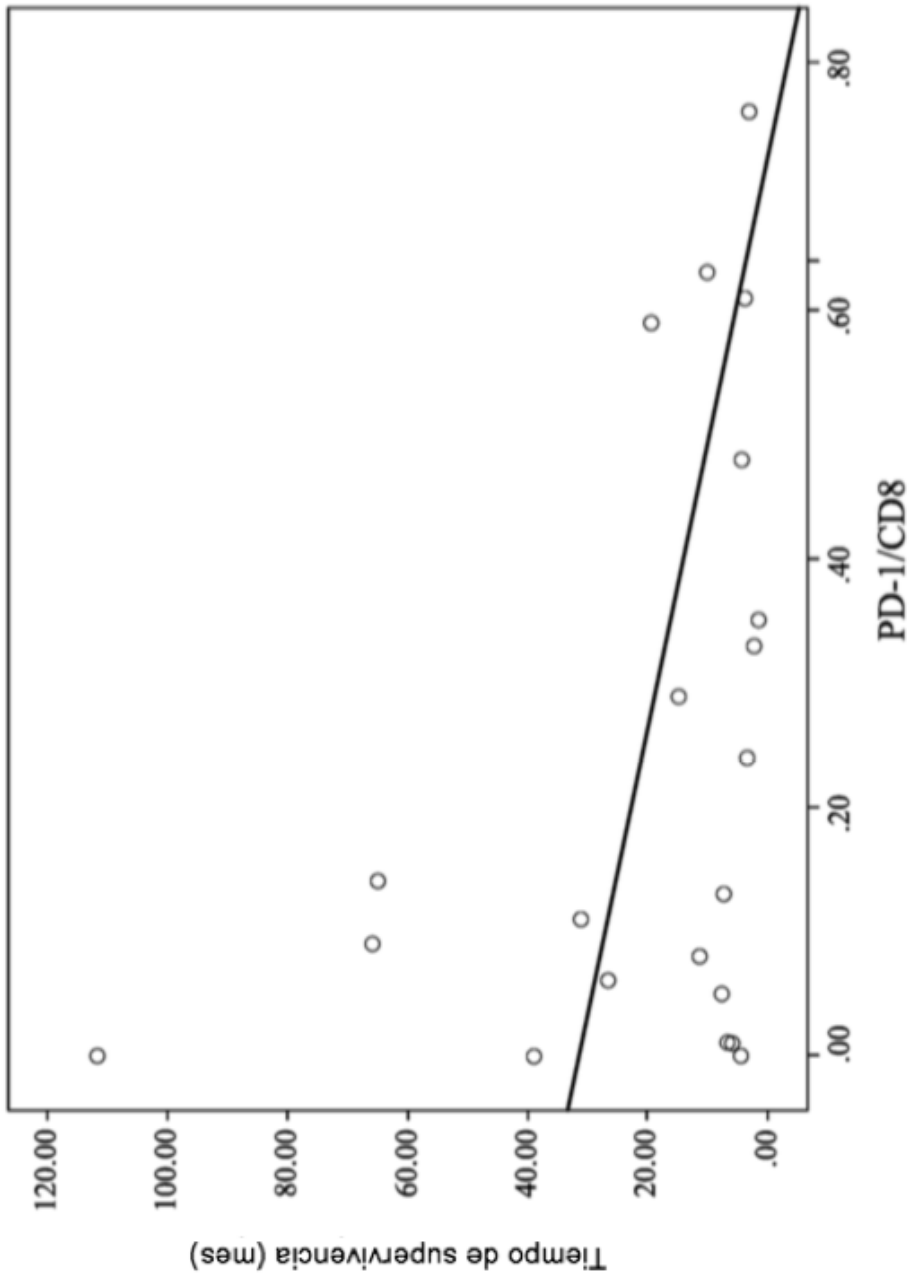


Fig. 15



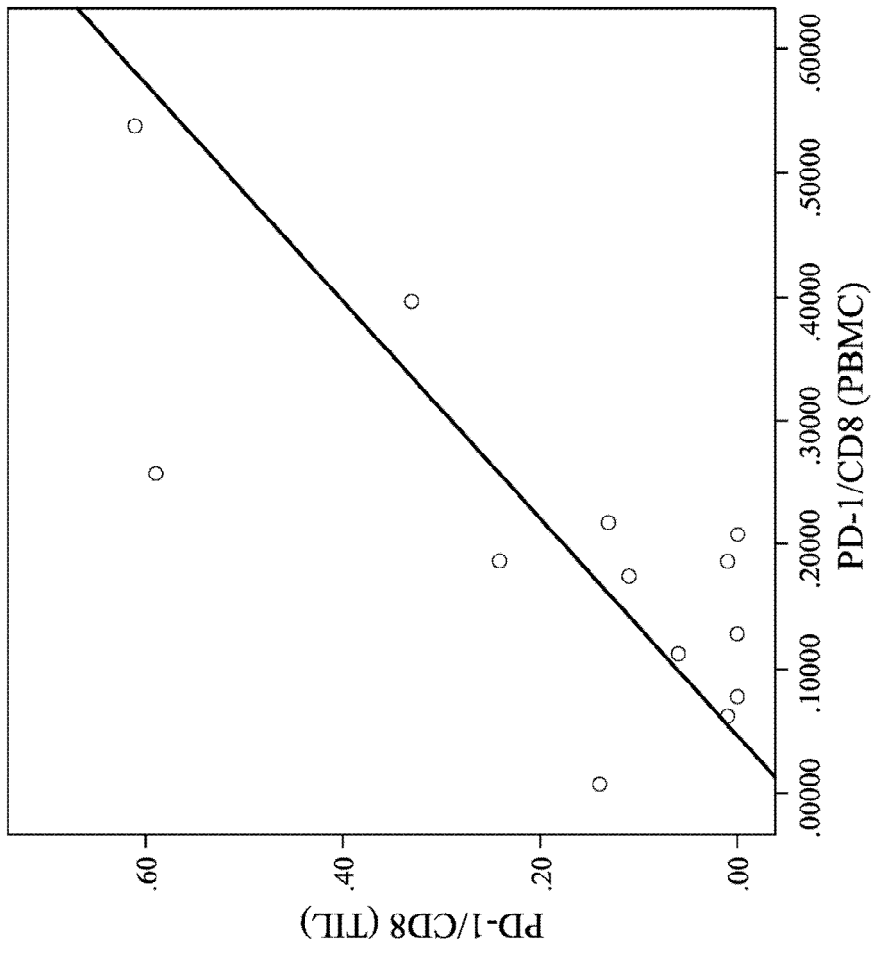


Fig. 16

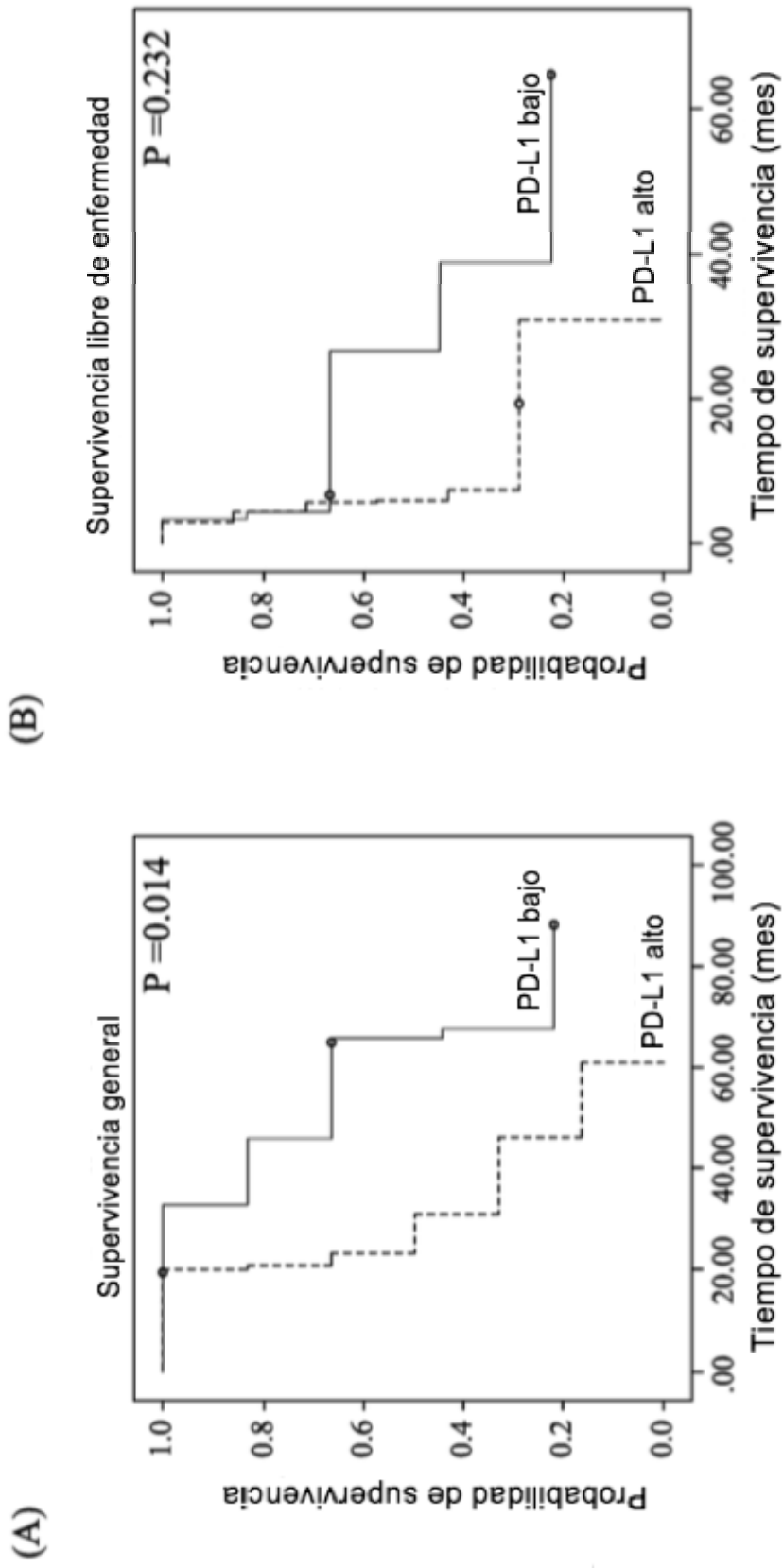


Fig. 17

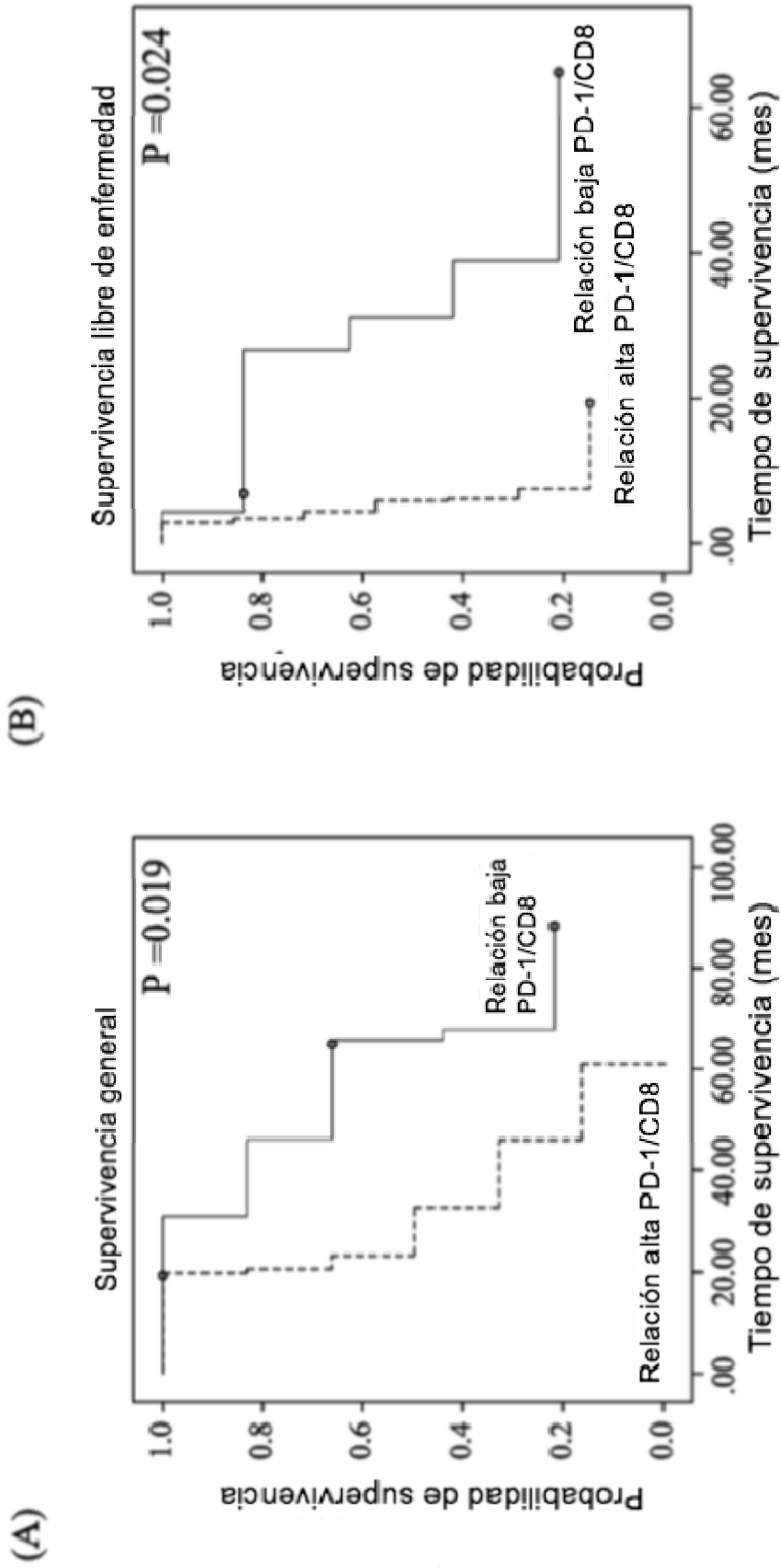


Fig. 18