

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 722**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2013 PCT/EP2013/066425**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023706**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2013 E 13745117 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2880180**

54 Título: **Métodos y kits para cribar pacientes con cáncer**

30 Prioridad:

06.08.2012 EP 12305975

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

05.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 702 722 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y kits para cribar pacientes con cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos y kits para cribar pacientes con un cáncer, particularmente para determinar si un paciente con un cáncer se beneficiaría de un tratamiento antitumoral.

Antecedentes de la invención

Hoy, los cánceres se clasifican generalmente según el sistema UICC-TNM. El sistema de estadificación TNM (por "Tumor-Nódulo-Metástasis") usa el tamaño del tumor, la presencia o ausencia de tumor en nódulos linfáticos regionales, y la presencia o ausencia metástasis distantes, para asignar un estadio y un resultado al tumor.

10 El sistema TNM se desarrolló a partir de la observación de que los pacientes con tumores pequeños tienen un mejor pronóstico que aquellos con tumores de mayor tamaño en el sitio primario. En general, los pacientes con tumores confinados en el sitio primario tienen un mejor pronóstico que aquellos con implicación de los nódulos linfáticos regionales, que, a su vez, es mejor que para aquellos con una diseminación distante de la enfermedad desde una parte del cuerpo a otra. De acuerdo con esto, los cánceres se estadifican habitualmente en cuatro niveles. El cáncer en Estadio I es un cáncer muy localizado sin cáncer en los nódulos linfáticos. El cáncer en Estadio II se ha diseminado cerca de donde empezó el cáncer. El cáncer en Estadio III se ha diseminado a los nódulos linfáticos. El cáncer en Estadio IV se ha diseminado a una parte distante del cuerpo. El estadio asignado se usa como una base para la selección de la terapia apropiada y para propósitos de pronóstico. Por ejemplo, la quimioterapia se recomienda siempre para los pacientes con cánceres en estadio IV. Por el contrario, no hay directrices relevantes para prescribir quimioterapia para pacientes con un cáncer en estadio I o II de UICC-TNM. De acuerdo con esto, existe una necesidad de herramientas de diagnóstico fiables para guiar las decisiones sobre el tratamiento, lo que es más todavía una etapa esencial para la multitud de nuevas terapias disponibles es la selección eficiente de pacientes para una terapia para el cáncer adecuada.

25 En los seres humanos, la regulación de la expresión génica se refiere al control de la cantidad y momento de la aparición del producto funcional de un gen. El control de la expresión génica es vital para permitir que una célula produzca productos génicos cuando se necesitan. La manera en la que la información en los genes se convierte en productos génicos está regulada. Brevemente, la regulación consiste en un equilibrio entre las acciones de activadores e inhibidores.

30 EP 1 777 523 describe métodos para determinar el resultado de un cáncer en un paciente, que están basados 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 frente a dicho cáncer.

WO2005/024043 describe el uso de las micromatrices de Affimetrix U133A y U133B que comprenden genes de las respuestas inmune adaptativa e inmunosupresora.

35 WO2012/038068 describe la predicción de la eficacia de un tratamiento en pacientes con cáncer mediante la cuantificación de marcadores de la respuesta inmune adaptativa e innata de dicho paciente frente al cáncer.

Pages et al (Seminars in Immunopathology; vol. 33, no. 4, p. 317-319, 2011), Kristoffer Watten Brudvik et al (Cancer in Immunology, Immunotherapy, Vol. 61, no. 7, p. 1045-1053, 2011) y Pages et al (Oncogene, vol. 29, no. 8, p. 1093-1102, 2010) discuten la relación entre cáncer y el sistema inmune.

40 Deschoomeester et al (Cancer Microenvironment; Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society, vol. 4, no. 3, p. 377-392, 2011) discuten la relevancia en el pronóstico y el papel de la inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal.

Después de investigaciones exhaustivas, para pacientes sin metástasis distantes (Estadio IV), los inventores han encontrado:

45 1. Que un paciente con bajos niveles de expresión para los genes de la respuesta inmune adaptativa y altos niveles de expresión para los genes representativos de la respuesta inmunosupresora no solo tendrá un mal pronóstico (p. ej., un tiempo corto de supervivencia sin enfermedad), sino que tampoco mejorará significativamente su supervivencia en caso de tratamiento.

2. que un paciente con altos niveles de expresión para los genes de la respuesta inmune adaptativa y bajos niveles de expresión para los genes representativos de la respuesta inmunosupresora no solo tendrá un buen pronóstico (p.

ej., un tiempo largo de supervivencia sin enfermedad), sino que además no mejorará significativamente su supervivencia en caso de tratamiento.

3. que un paciente con altos niveles de expresión para los genes de la respuesta inmune adaptativa y altos niveles de expresión para los genes representativos de la respuesta inmunosupresora mostrará un pronóstico intermedio, pero un tratamiento antitumoral afectará significativamente su supervivencia (p. ej., de un pronóstico intermedio a un buen pronóstico).

Los dos primeros grupos de pacientes deben considerarse como "malos respondedores" (es decir, el tratamiento tendrá un impacto limitado (o moderado) en su supervivencia), mientras el tercer grupo de pacientes debe considerarse como "buenos respondedores".

10 **Resumen de la invención**

La invención se define por las reivindicaciones.

Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, un método y kits para cribar pacientes con un cáncer, particularmente para determinar si un paciente con un cáncer se beneficiaría de un tratamiento antitumoral.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a un método para evaluar la capacidad de respuesta de un paciente que padece un cáncer sólido al tratamiento anticanceroso, que comprende

i) determinar en una muestra tumoral obtenida de un paciente un nivel de expresión de al menos un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa humana y un nivel de expresión de al menos un gen representativo de la respuesta inmunosupresora humana,

20 ii) comparar los niveles de expresión de dicho al menos un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa humana y dicho al menos un gen representativo de la respuesta inmunosupresora humana determinados en la etapa i) con valores de referencia predeterminados seleccionados, de manera que dichos valores de referencia predeterminados separan un panel de pacientes con un cáncer en dos agrupaciones según el nivel de expresión de dichos genes y la supervivencia de pacientes según los análisis de las curvas de Kaplan Meier y valores p según rango logarítmico asociados,

25 iii) concluir si el paciente tiene una respuesta inmune adaptativa buena (nivel mayor que el valor de referencia predeterminado) o mala (nivel menor que el valor de referencia predeterminado) y una buena o mala respuesta inmunosupresora; y

30 iv) determinar si el paciente recibirá ventajosamente un tratamiento antitumoral (respondedor al tratamiento antitumoral) a la vista de dichas respuestas inmune adaptativa e inmunosupresora buenas o malas.

Un paciente que tiene una buena respuesta inmune adaptativa y una buena respuesta inmunosupresora podría beneficiarse de un tratamiento antitumoral.

35 En una realización de la invención, el paciente sometido al método anterior padece un cáncer sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer cortical adrenal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar (p. ej., cáncer perifilar, cáncer del conducto biliar distal, cáncer del conducto biliar intrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de hueso (p. ej., osteoblastoma, osteocondroma, hemangioma, fibroma condromixóide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de células gigantes de hueso, cordoma), cáncer de cerebro y del sistema nervioso central (p. ej., meningioma, astrocitoma, oligodendrogliomas, ependimoma, gliomas, meduloblastoma, ganglioglioma, Schwannoma, germinoma, craneofaringioma), cáncer de mama (p. ej., carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma lobular in situ, ginecomastia), enfermedad de Castleman (p. ej., hiperplasia de nódulo linfático gigante, hiperplasia de nódulo linfático angiofoliolar), cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer endometrial (p. ej., adenocarcinoma endometrial, adenocantoma, adenocarcinoma seroso papilar, de células claras), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células pequeñas), tumores carcinoides gastrointestinales (p. ej., coriocarcinoma, corioadenoma destruens), enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (p. ej., cáncer de células renales), cáncer laríngeo e hipofaríngeo, cáncer de hígado (p. ej., hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia focal nodular, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas), mesotelioma, plasmocitoma, cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal (p. ej., esteseuroblastoma, granuloma de la línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, 40 cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma (p. ej., rhabdomyosarcoma embrionario, rhabdomyosarcoma alveolar, rhabdomyosarcoma pleomórfico), cáncer de las glándulas salivares, cáncer de piel (p. ej., melanoma, cáncer

de piel no melanoma), cáncer de estómago, cáncer testicular (p. ej., seminoma, cáncer de células germinales no seminoma), cáncer de timo, cáncer de tiroides (p. ej., carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma de tiroides medular), cáncer vaginal, cáncer vulvar, y cáncer uterino (p. ej., leiomioma uterino).

5 El término "muestra tumoral" significa cualquier muestra de tejido derivada del tumor del paciente. La muestra de tejido se obtiene para el propósito de la evaluación in vitro. La muestra puede ser fresca, congelada, fijada (p. ej., fijada con formalina), o embebida (p. ej., embebida en parafina). En una realización particular, la muestra resulta de una biopsia realizada en una muestra tumoral del paciente. Un ejemplo es una biopsia endoscópica realizada en el intestino del paciente que padece cáncer colorrectal.

10 En las condiciones preferidas de implementación de la invención, un nivel de expresión EL₁ de un único gen representativo de la respuesta inmune adaptativa humana y de un único gen representativo de la respuesta inmunosupresora humana (una pareja de genes) se evalúa en el método de la invención. Preferiblemente, se usan uno a tres genes de cada una y más preferiblemente uno o dos genes de cada una. Un número limitado de genes de cada clase proporciona resultados buenos y fiables y es fácil de implementar. Particularmente, un único valor de referencia es suficiente para cada uno de ambos genes. Cuanto mayor es el número de genes, más sofisticado es el valor de referencia. Los ejemplos de determinación de valores de referencia se proporcionan posteriormente en la presente memoria.

15 El uso de más genes que una o dos parejas de genes es más difícil de implementar y más costoso y largo, pero sin embargo proporciona otras ventajas. Por ejemplo, si la evaluación del nivel de expresión de un gen es errónea, el resultado global se compensa por la reserva de los otros genes de la misma clase (respuesta inmune adaptativa o inmunosupresora humana).

20 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "gen representativo de la respuesta inmune adaptativa" se refiere a cualquier gen que es expresado por una célula que es un actor de la respuesta inmune adaptativa en el tumor o que contribuye al asentamiento de la respuesta inmune adaptativa en el tumor. La respuesta inmune adaptativa, también denominada "respuesta inmune adquirida", comprende la estimulación dependiente de antígeno de subtipos de células T, activación de las células B y producción de anticuerpos. Por ejemplo, las células de la respuesta inmune adaptativa incluyen, pero no están limitadas a, células T citotóxicas, células T de memoria, células Th1 y Th2, macrófagos activados y células dendríticas activadas, células NK y células NKT. De acuerdo con esto, un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa puede seleccionarse típicamente de la agrupación de los genes co-modulados para la inmunidad adaptativa Th1, para la respuesta citotóxica, o para la respuesta de memoria, y puede codificar un marcador de la superficie de las células Th1, una interleuquina (o un receptor de interleuquina), o una quimioquina o (un receptor de quimioquina).

Los genes representativos de la respuesta inmune adaptativa son

35 - la familia de quimioquinas y receptores de quimioquina que consiste en: CXCL13, CXCL9, CCL5, CCR2, CXCL10, CXCL11, CXCR3, CCL2 y CX3CL1,

- la familia de citoquinas que consiste en: IL15,

- la familia de TH1 que consiste en: IFNG, IRF1, STAT1, STAT4 y TBX21

- la familia de receptores de membrana de linfocitos que consiste en: ITGAE, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CD247, CD69 e ICOS,

40 - la familia de moléculas citotóxicas que consiste en: GNLY, GZMH, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM y PRF1, y la quinasa LTK.

Los genes representativos de la respuesta inmune adaptativa que proporcionan los mejores resultados para la respuesta de un paciente al tratamiento como se muestra posteriormente en la presente memoria en la tabla 5, se reportan en la Tabla 1:

45 Tabla 1

CCL5
CCR2
CD247
CD3E
CD3G
CD8A

CX3CL1
CXCL11
GZMA
GZMB
GZMH
GZMK
IFNG
IL15
IRF1
ITGAE
PRF1
STAT1
TBX21

5 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "gen representativo de la respuesta inmunosupresora" se refiere a cualquier gen que es expresado por una célula que es un actor de la respuesta inmunosupresora en el tumor o que contribuye al asentamiento de la respuesta inmunosupresora en el tumor. Por ejemplo, la respuesta inmunosupresora comprende

- co-inhibición de la estimulación dependiente de antígeno de los subtipos de células T: genes CD276, CTLA4, PDCD1, CD274, o VTCN1 (B7H4),
- inactivación de macrófagos y células dendríticas e inactivación de células NK: genes TSLP, CD1A, o VEGFA
- expresión de marcador de células madre de cáncer, diferenciación y/o oncogénesis: PROM1, IHH.
- 10 - expresión de proteínas inmunosupresoras producidas en el entorno tumoral: genes PF4, REN, VEGFA.

Por ejemplo, las células de la respuesta inmunosupresora incluyen células dendríticas inmaduras (CDIA), células T reguladoras (células Treg) y células Th17 que expresan el gen IL17A.

15 De acuerdo con esto, un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa puede seleccionarse típicamente del grupo de los genes inmunes adaptativos co-modulados, mientras los genes inmunosupresores, pueden ser representativos de la inactivación de células inmunes (p. ej., células dendríticas) y pueden contribuir a la inducción de una respuesta inmunosupresora.

El gen representativo de la respuesta inmunosupresora se selecciona del grupo que consiste en genes reportados en la Tabla 2 a continuación en la presente memoria:

Tabla 2

CD274
CTLA4
IHH
IL17A
PDCD1
PF4
PROM1
REN
TSLP
VEGFA

20 Dichos genes proporcionan los mejores resultados para la respuesta de un paciente al tratamiento como se muestra posteriormente en la presente memoria en la tabla 5.

25 Según la invención, se miden los niveles de expresión de un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa seleccionado del grupo que consiste en GNLY, CXCL13, CX3CL1, CXCL9, ITGAE, CCL5, GZMH, IFNG, CCR2, CD3D, CD3E, CD3G, CD8A, CXCL10, CXCL11, GZMA, GZMB, GZMK, GZMM, IL15, IRF1, LTK, PRF1, STAT1, CD69, CD247, ICOS, CXCR3, STAT4, CCL2 y TBX21 y de un gen representativo de la respuesta inmunosupresora seleccionado del grupo que consiste en PF4, REN, VEGFA, TSLP, IL17A, PROM1, IHH, CD1A, CTLA4, PDCD1, CD276, CD274, y VTCN1 (B7H4).

30 Como algunos genes se encuentra que son frecuentemente más significativos cuando se combinan un gen adaptivo y un gen inmunosupresor (como se ilustra en la Figura 9), los genes más preferidos son:

- genes representativos de la respuesta inmune adaptativa: CD3G, CD8A, CCR2 y GZMA

- genes representativos de la respuesta inmunosupresora: REN, IL17A, CTLA4 y PDCD1.

Según la presente invención, un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y un gen representativo de la respuesta inmunosupresora se seleccionan respectivamente de los grupos que consisten en los genes de las Tablas 1 y 2 anteriores.

En las condiciones más preferidas para implementar la invención, se selecciona una pareja de genes de las combinaciones de genes de la tabla 5 posteriormente en la presente memoria. Son más preferidas las combinaciones de genes de ambos tipos de la figura 9 unidos por líneas gruesas.

Se prefieren las combinaciones nos. 2, 3, 7, 8, 9, 10, 15, 41, 43, 44, 55, 56, y 66 de la tabla 5 posteriormente en la presente memoria. Otras parejas preferidas son las combinaciones nos. 2, 3, 7, 8, 9, 10, 15, 41, 43, 44, 55, 56, y 66 de la tabla 5 posteriormente en la presente memoria y CD3G-VEGF, CD3E-VEGF y CD8A-VEGF.

Las combinaciones preferidas de dos parejas de genes (total de 4 genes) son

- CCR2, CD3G, IL17A y REN y

- CD8A, CCR2, REN y PDCD1.

La elección precisa de los genes seleccionados para uso en el presente proceso puede depender del tipo de tratamiento contemplado para el paciente. Por ejemplo, los genes seleccionados del grupo que consiste en CX3CL1 IL15, CD247, CD3G, CD8A, PRF1, CCL5 y TBX21 para la respuesta inmunosupresora, preferiblemente CX3CL1 e IL15 y el gen CTLA4 para la respuesta inmune adaptativa se preferirán cuando se contempla para un paciente un tratamiento usando un fármaco tal como un anticuerpo monoclonal que funciona mediante la activación del sistema inmune tal como Ipilimumab, también conocido como MDX-010 o MDX-101, comercializado como Yervoy®.

Los genes seleccionados del grupo que consiste en IL15 y GZMA para la respuesta inmune adaptativa, y el gen VEGFA para la respuesta inmunosupresora se preferirán cuando se contempla para un paciente un tratamiento tal como un anticuerpo que inhibe el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A) tal como bevacizumab comercializado como Avastin®.

Se aplican consideraciones similares, por ejemplo, para la pareja de genes GZMA - PDCD1 (también designada como CD279), cuando se contempla para un paciente un tratamiento tal como un anticuerpo que está dirigido a PD-1 tal como BMS-936558.

En la presente memoria descriptiva, el nombre de cada uno de los genes de interés se refiere al nombre reconocido internacionalmente del gen correspondiente, como se encuentra en bases de datos de secuencias de genes y secuencias de proteínas reconocidas internacionalmente, incluyendo la base de datos del Comité de Nomenclatura de Genes HUGO que está disponible principalmente en la siguiente dirección de Internet: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/index.html>. En la presente memoria descriptiva, el nombre de cada uno de los genes de interés también puede referirse al nombre reconocido internacionalmente del gen correspondiente, como se encuentra en la base de datos de secuencias de genes reconocida internacionalmente Genbank. A través de estas bases de datos de secuencias reconocidas internacionalmente, un experto en la técnica puede averiguar el ácido nucleico para cada uno de los genes de interés descritos en la presente memoria.

El método de pronóstico de cáncer de la invención puede realizarse con una combinación de genes siempre que la combinación comprenda al menos un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y al menos un gen representativo de la respuesta inmunosupresora. El número de genes que puede usarse en el presente método solo está limitado por el número de genes de interés biológico distintos que están disponibles prácticamente en el momento de llevar a cabo el método. De acuerdo con esto, en una realización, 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 genes distintos, preferiblemente una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 genes y más preferiblemente una combinación de 2, 3, 4, 5, o 6 genes. Sin embargo, el número de genes combinados que se requiere para alcanzar una alta relevancia estadística (p. ej., un valor P menor de 10^{-3}), dependerá de la técnica usada para cuantificar la combinación de genes. El número de genes usado como genes representativos de la respuesta inmune adaptativa y el número de genes usado como genes representativos de la respuesta inmunosupresora puede ser el mismo o diferente.

En las condiciones preferidas de implementación de la invención, se usa un número de genes aproximadamente equilibrado de cada clase (respuesta inmune adaptativa y respuesta inmunosupresora), por ejemplo 2 de cada una, o tres de cada una, o 5 de una clase y 6 de la otra clase.

La determinación de un nivel de expresión de un gen en una muestra tumoral obtenida de un paciente puede implementarse por un panel de técnicas muy conocidas en la técnica.

Típicamente, un nivel de expresión de un gen se evalúa determinando la cantidad de ARNm producido por ese gen. Un objeto de la presente solicitud es, por lo tanto, un método para evaluar la capacidad de respuesta al tratamiento anticanceroso de pacientes con un cáncer definido anteriormente, que comprende determinar un nivel de expresión ELA de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana o el nivel de expresión ELI de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana mediante la determinación de la cantidad del ARNm correspondiente a dichos genes.

Los métodos para determinar una cantidad de ARNm son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (p. ej., célula o tejido preparado del paciente) se extrae en primer lugar según métodos estándar, por ejemplo, usando enzimas líticas o disoluciones químicas o se extrae con resinas de unión a ácidos nucleicos según las instrucciones del fabricante. El ARNm así extraído se detecta entonces por hibridación (p. ej., análisis por transferencia Northern) y/o amplificación (p. ej., RT-PCR). Preferiblemente, se prefiere la RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. La RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real es particularmente ventajosa.

Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA), secuenciación del ARN cuantitativa de nueva generación (NGS).

Los ácidos nucleicos (polinucleótidos) que comprenden al menos 10 nucleótidos y que presentan complementariedad u homología de secuencia con el ARNm de interés en la presente memoria encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que no es necesario que dichos ácidos nucleicos sean completamente idénticos, pero son típicamente al menos aproximadamente 80 % idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente 85 % idénticos e incluso más preferiblemente 90-95 % idénticos. En determinadas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. En la técnica se conoce una amplia variedad de indicadores apropiados, incluyendo, ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros (p. ej., avidina/biotina).

Las sondas comprenden típicamente ácidos nucleicos monocatenarios con una longitud de entre 10 y 1000 nucleótidos, por ejemplo, de entre 10 y 800, más preferiblemente de entre 15 y 700, típicamente de entre 20 y 500 nucleótidos. Los cebadores típicamente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, con una longitud de entre 10 y 25 nucleótidos, diseñados para concordar perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, que se va a amplificar. Las sondas y cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con los que hibridan, es decir, hibridan preferiblemente en condiciones de hibridación de alta astringencia (correspondientes a la temperatura de fusión más alta T_m , p. ej., formamida al 50 %, 5x o 6x SCC. SCC es NaCl 0.15 M, Na-citrato 0.015 M).

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

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

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

La hibridación in situ (ISH) implica poner en contacto una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., secuencia de ácido nucleico genómico diana) en el contexto de una preparación de cromosomas en metafase o interfase (tal como una muestra de células o tejido montada en un portaobjetos) con una sonda marcada que puede hibridar específicamente o que es específica para la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., secuencia de ácido nucleico genómico diana). Los portaobjetos se pretratan opcionalmente, p. ej., para eliminar parafina u otros materiales que puedan interferir con una hibridación uniforme. La muestra y la sonda se tratan ambas, por ejemplo, por calentamiento para desnaturalizar los ácidos nucleicos bicatenarios. La sonda (formulada en un tampón de hibridación adecuado) y la muestra se combinan, en condiciones y durante un tiempo suficiente como para permitir que ocurra la hibridación (típicamente para alcanzar el equilibrio). La preparación de cromosomas se lava

para eliminar el exceso de sonda, y la detección del marcaje específico de la diana en el cromosoma se realiza usando técnicas estándar.

Por ejemplo, una sonda biotinilada puede detectarse usando avidina marcada con fluoresceína o avidina-fosfatasa alcalina. Para la detección de fluorocromos, el fluorocromo puede detectarse directamente, o las muestras pueden incubarse, por ejemplo, con avidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La amplificación de la señal de FITC puede realizarse, si es necesario, por incubación con anticuerpos antiavidina de cabra conjugados con biotina, lavado y una segunda incubación con avidina conjugada con FITC. Para la detección por actividad enzimática, las muestras pueden incubarse, por ejemplo, con estreptavidina, lavarse, incubarse con fosfatasa alcalina conjugada con biotina, lavarse de nuevo y preequilibrarse (p. ej., en tampón de fosfatasa alcalina (AP)). Para una descripción general de los procedimientos de hibridación in situ, véase, p. ej., la Pat. U.S. No. 4 888 278.

En la técnica se conocen numerosos procedimientos para FISH, CISH, y SISH. Por ejemplo, los procedimientos para realizar FISH se describen en las Pat. U.S. Nos. 5 447 841; 5 472 842; y 5 427 932; y, por ejemplo, en Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:2934-2938, 1986; Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9138-9142, 1988; y Lichter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9664-9668, 1988. CISH se describe, p. ej., en Tanner et al., Am. J. Pathol. 157: 1467-1472, 2000 y Pat. U.S. No. 6 942 970. En la Pat. U.S. No. 6 280 929 se proporcionan métodos de detección adicionales.

Pueden emplearse numerosos reactivos y esquemas de detección conjuntamente con los procedimientos FISH, CISH, y SISH para mejorar la sensibilidad, resolución u otras propiedades deseables. Como se ha discutido anteriormente, las sondas marcadas con fluoróforos (incluyendo marcadores fluorescentes y QUANTUM DOTS®) pueden detectarse ópticamente directamente cuando se realiza FISH. Alternativamente, la sonda puede marcarse con una molécula no fluorescente, tal como un hapteno (tal como los siguientes ejemplos no limitativos: biotina, digoxigenina, DNP, y varios oxazoles, pirrazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofurazanos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenonas, cumarina, compuestos basados en cumarina, Podofilotoxina, compuestos basados en Podofilotoxina, y combinaciones de los mismos), ligando u otro resto detectable indirectamente. Las sondas marcadas con dichas moléculas no fluorescentes (y las secuencias de ácido nucleico diana a las que se unen) pueden detectarse poniendo en contacto la muestra (p. ej., la muestra de células o tejido a la que se une la sonda) con un reactivo de detección marcado, tal como un anticuerpo (o receptor, u otro compañero de unión específico) específico para el hapteno o ligando elegido. El reactivo de detección puede marcarse con un fluoróforo (p. ej., QUANTUM DOT®) o con otro resto detectable indirectamente, o puede ponerse en contacto con uno o más agentes de unión específicos adicionales (p. ej., anticuerpos secundarios o específicos), que pueden marcarse con un fluoróforo.

En otros ejemplos, la sonda, o agente de unión específico (tal como un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo primario, receptor u otro agente de unión) se marca con una enzima que es capaz de convertir una composición fluorogénica o cromogénica en una señal fluorescente detectable, coloreada o detectable de otra forma (p. ej., como en deposición de partículas de metal detectables en SISH). Como se ha indicado anteriormente, la enzima puede unirse directamente o indirectamente mediante un conector a la sonda o reactivo de detección relevante. Los ejemplos de reactivos adecuados (p. ej., reactivos de unión) y químicas (p. ej., química del conector y unión) se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente U.S. Nos. 2006/0246524; 2006/0246523, y 2007/0117153.

Los expertos en la técnica apreciarán que mediante la selección apropiada de parejas de sonda marcada-agente de unión específico, pueden producirse esquemas de detección múltiples para facilitar la detección de múltiples secuencias de ácido nucleico diana (p. ej., secuencias de ácido nucleico genómico diana) en un único ensayo (p. ej., en una única muestra de células o tejido o en más de una muestra de células o tejido). Por ejemplo, una primera sonda que corresponde a una primera secuencia diana puede marcarse con un primer hapteno, tal como biotina, mientras una segunda sonda que corresponde a una segunda secuencia diana puede marcarse con un segundo hapteno, tal como DNP. Después de la exposición de la muestra a las sondas, las sondas unidas pueden detectarse poniendo en contacto la muestra con un primer agente de unión específico (en este caso, avidina marcada con un primer fluoróforo, por ejemplo, un primer QUANTUM DOT® espectralmente distinto, p. ej., que emite a 585 nm) y un segundo agente de unión específico (en este caso, un anticuerpo anti-DNP, o fragmento de anticuerpo, marcado con un segundo fluoróforo (por ejemplo, un segundo QUANTUM DOT® espectralmente distinto, p. ej., que emite a 705 nm)). Pueden añadirse parejas adicionales de sondas/agente de unión al esquema de detección múltiple usando otros fluoróforos espectralmente distintos. Pueden considerarse numerosas variaciones de directo e indirecto (una etapa, dos etapas o más), todas las cuales son adecuadas en el contexto de las sondas y ensayos descritos.

Las sondas comprenden típicamente ácidos nucleicos monocatenarios con una longitud de entre 10 y 1000 nucleótidos, por ejemplo, de entre 10 y 800, más preferiblemente de entre 15 y 700, típicamente de entre 20 y 500. Los cebadores típicamente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, con una longitud de entre 10 y 25 nucleótidos, diseñados para concordar perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, que se va a amplificar. Las sondas y cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con los que hibridan, es decir, hibridan preferiblemente en condiciones de hibridación de alta astringencia (correspondientes a la temperatura de fusión más alta T_m, p. ej., formamida al 50 %, 5x o 6x SCC. SCC es NaCl 0.15 M, Na-citrato 0.015 M).

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

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

En otra realización preferida, el nivel de expresión se determina por análisis de chips de ADN. Dicho chip de ADN o micromatriz de ácido nucleico consiste en diferentes sondas de ácido nucleico que se unen químicamente a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o un lecho dimensionado como una microesfera. Un microchip puede estar constituido por polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos tales como ADNc u oligonucleótidos que pueden tener aproximadamente 10 a aproximadamente 60 pares de bases. Para determinar el nivel de expresión, una muestra de un sujeto de ensayo, opcionalmente sometida en primer lugar a una transcripción inversa, se marca y se pone en contacto con la micromatriz en condiciones de hibridación, lo que da lugar a la formación de complejos entre los ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de las sondas unidas a la superficie de la micromatriz. Los complejos hibridados marcados se detectan entonces y pueden cuantificarse o semicuantificarse. El marcaje puede conseguirse por varios métodos, p. ej., usando un marcaje radiactivo o fluorescente. Están disponibles para el experto en la técnica muchas variantes de la tecnología de hibridación en micromatrices (véase, p. ej., la revisión de Hoheisel, Nature Reviews, Genetics, 2006, 7:200-210).

El nivel de expresión de un gen puede expresarse como nivel de expresión absoluto o nivel de expresión normalizado. Pueden usarse ambos tipos de valores en el presente método. El nivel de expresión de un gen se expresa preferiblemente como nivel de expresión normalizado cuando se usa PCR cuantitativa como método de evaluación el nivel de expresión porque pequeñas diferencias al comienzo de un experimento podrían proporcionar grandes diferencias después de un número de ciclos.

Típicamente, los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un gen por comparación de su expresión con la expresión de un gen que no es relevante para determinar el estadio del cáncer del paciente, p. ej., un gen constitutivo que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes constitutivos tales como el gen de actina ACTB, gen ribosomal 18S, GUSB, PGK1 y TFRC. Esta normalización permite comparar el nivel de expresión de una muestra, p. ej., la muestra de un paciente, con el nivel de expresión de otra muestra, o comparar muestras de diferentes fuentes.

El presente método incluye comparar los niveles de expresión $ELA_1 - ELA_n$ y $ELI_1 - ELI_n$ determinados en la etapa i) con valores de referencia predeterminados $ELRA_1 - ELRA_n$ y $ELRI_1 - ELRI_n$ (denominados colectivamente ELR). Los valores de referencia predeterminados $ELRA_1 - ELRA_n$ y $ELRI_1 - ELRI_n$ pueden ser un valor definido o un intervalo de valores.

Por ejemplo, si el nivel de expresión ELA_1 de una muestra tumoral de un paciente para los genes considerados es mayor que el valor de referencia predeterminado correspondiente (o intervalo de valores) $ELRA_1$; el paciente se considerará como un "buen respondedor" ("Alto" o cualquier evaluación tal como "positivo", etc.) y se considerará como "mal respondedor" ("Bajo" o cualquier evaluación tal como "negativo", etc.), si ELA_1 es menor que $ELRA_1$. Se aplican consideraciones similares a $ELI_1 - ELI_n$ y $ELRI_1 - ELRI_n$.

Los valores de referencia predeterminados usados para comparación pueden consistir en valores "de corte" que pueden determinarse como se describe en WO2007045996.

Los valores de referencia predeterminados usados para comparación pueden consistir en valores "de corte" que pueden determinarse como se describe a continuación en la presente memoria. Cada valor de referencia ("de corte") ELR para cada gen puede determinarse llevando a cabo un método que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una colección de muestras de tejido tumoral de pacientes que padecen cáncer;
- b) determinar el nivel de expresión del gen relevante para cada muestra de tejido tumoral contenida en la colección proporcionada en la etapa a);
- c) ordenar las muestras de tejido tumoral según dicho nivel de expresión
- d) clasificar dichas muestras de tejido tumoral en parejas de subconjuntos de números de miembros crecientes, respectivamente decrecientes, ordenados según su nivel de expresión,

- e) proporcionar, para cada muestra de tejido tumoral proporcionada en la etapa a), información respecto al resultado clínico real para el paciente con cáncer correspondiente (es decir, la duración de la supervivencia sin enfermedad (SSE) o la supervivencia global (SG) o ambas);
- 5 f) para cada pareja de subconjuntos de muestras de tejido tumoral, obtener un porcentaje de la curva de supervivencia de Kaplan Meier;
- g) para cada pareja de subconjuntos de muestras de tejido tumoral calcular la significancia estadística (valor p) entre ambos subconjuntos
- h) seleccionar como valor de referencia ELR para el nivel de expresión, el valor del nivel de expresión para el que el valor p es el menor.
- 10 Puede construirse un intervalo de confianza alrededor del valor del nivel de expresión así obtenido, por ejemplo, $ELR \pm 5$ o 10 %.
- Por ejemplo, se ha evaluado el nivel de expresión de un gen G1 para 100 muestras de cáncer de 100 pacientes. Las 100 muestras se ordenaron según el nivel de expresión del gen G1. La muestra 1 tiene el mayor nivel de expresión y la muestra 100 tiene el menor nivel de expresión. Una primera agrupación proporciona dos subconjuntos: por un lado, la muestra Nr 1 y, por otro lado, las otras 99 muestras. La siguiente agrupación proporciona, por un lado, las muestras 1 y 2 y, por otro lado, las 98 muestras restantes, etc., hasta la última agrupación: por un lado, las muestras 1 a 99 y, por otro lado, la muestra Nr 100. Según la información respecto al resultado clínico real para el paciente con cáncer correspondiente, se preparan curvas de Kaplan Meier para cada uno de los 99 grupos de dos subconjuntos. También se calculó, para cada uno de los 99 grupos, el valor p entre ambos subconjuntos.
- 15 El valor de referencia ELR se selecciona de manera que la discriminación basada en el criterio del valor p mínimo es la más fuerte. En otros términos, el nivel de expresión correspondiente al límite entre ambos subconjuntos para el que el valor p es mínimo se considera como el valor de referencia. Debe indicarse que, según los experimentos realizados por los inventores, el valor de referencia ELR no es necesariamente el valor mediano de niveles de expresión.
- 20 En el trabajo rutinario, el valor de referencia ELR (valor de corte) puede usarse en el presente método para discriminar muestras tumorales y, por lo tanto, los pacientes correspondientes.
- Las curvas de Kaplan-Meier de porcentaje de supervivencia como una función del tiempo se usan comúnmente para medir la fracción de pacientes que viven durante una determinada cantidad de tiempo después del tratamiento y son muy conocidas para el experto en la técnica. El valor p se usa convencionalmente en el ensayo de la significancia estadística.
- 25 El experto en la técnica también entiende que la misma técnica de evaluación del nivel de expresión de un gen debería usarse preferiblemente para obtener el valor de referencia y posteriormente para la evaluación del nivel de expresión de un gen de un paciente sometido al método de la invención.
- 30 Dichos valores de referencia predeterminados del nivel de expresión pueden determinarse para cualquier gen definido anteriormente y pueden usarse en el método de la invención para cribar pacientes con un cáncer. Un valor de referencia ELRA para uno o para cada uno de varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y un valor de referencia ELRI para uno o para cada uno de varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana son necesarios para implementar el método de la invención.
- 35 Una muestra de tejido tumoral de un paciente que padece cáncer puede someterse a determinación de los niveles de expresión ELA_1 - ELA_n y ELI_1 - ELI_n respectivamente de los genes GA_1 - GA_n y GI_1 - GI_n usando la misma técnica que la técnica usada para obtener los valores de referencia $ELRA_1$ - $ELRA_n$ y $ELRI_1$ - $ELRI_n$, por ejemplo, determinando la cantidad de ARNm (por ejemplo, usando PCR cuantitativa) producida por el gen relevante. Pueden usarse diferentes técnicas para obtener los datos relevantes para dos genes diferentes o varios genes diferentes. Sin embargo, preferiblemente, se implementa una misma técnica, preferiblemente seleccionada entre las citadas previamente o usada en los ejemplos posteriormente en la presente memoria.
- 40 Si, por ejemplo, ELA_1 es mayor que $ELRA_1$, se considera que el paciente es un buen respondedor respecto a la respuesta inmune adaptativa humana y un mal respondedor si ELA_1 es menor que $ELRA_1$. De forma similar, si ELI_1 es mayor que $ELRI_1$, se considera que el paciente es un buen respondedor respecto a la respuesta inmunosupresora humana y un mal respondedor si ELI_1 es menor que $ELRI_1$.
- 45 Debe indicarse en particular el hecho de que, según la técnica de evaluación del nivel de expresión, un valor numérico menor que el valor de referencia puede significar realmente que el nivel de expresión es mayor que el nivel de referencia. Por ejemplo, en los ejemplos posteriores en la presente memoria, usando PCR en tiempo real, un
- 50

valor dCt menor que el valor de referencia relevante significa que la señal se detectó antes, es decir: el nivel de expresión del gen es mayor que el nivel de referencia.

El método para cribar pacientes que es el contenido de la presente invención tiene propiedades y cualidades muy ventajosas.

5 El método permite, en particular, a partir del conocimiento de la respuesta del paciente respecto a la respuesta inmune adaptativa humana y la respuesta inmunosupresora humana, realizar una buena evaluación del pronóstico respecto a SSE y SG de un paciente, independientemente del tipo, origen o estadio del cáncer, como se pone de manifiesto en la sección experimental.

10 El ajuste de un único valor "de corte" permite la discriminación entre un pronóstico malo y bueno con respecto a SSE y SG para un paciente. Prácticamente, se obtienen generalmente valores con una alta significancia estadística (p. ej., valores P bajos) para un intervalo de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no solo para un único valor de cuantificación arbitrario. Así, en una realización alternativa de la invención, en lugar de usar un valor de referencia definido ELR, se proporciona un intervalo de valores.

15 Por lo tanto, un valor mínimo de significancia estadística (umbral mínimo de significancia, p. ej., umbral máximo del valor P) se ajusta arbitrariamente y se retiene un intervalo de una pluralidad de valores de cuantificación arbitrarios para los que el valor de significancia estadística calculado en la etapa g) es mayor (más significativo, p. ej., valor P menor), de manera que se proporciona un intervalo de valores de cuantificación. Este intervalo de valores de cuantificación incluye un valor "de corte" como se ha descrito anteriormente. Según esta realización específica de un
20 valor "de corte", puede determinarse un pronóstico de resultado clínico malo o bueno comparando el nivel de expresión con el intervalo de valores que se identifican. En determinadas realizaciones, un valor de corte consiste así en un intervalo de valores de cuantificación, p. ej., centrados en el valor de cuantificación para el que se encuentra el valor de significancia estadística más alto (p. ej., generalmente, el valor P mínimo que se encuentra). Por ejemplo, en una escala hipotética de 1 a 10, si el valor de corte ideal (el valor con la significancia estadística más alta) es 5, un intervalo adecuado (ejemplar) puede ser de 4-6.

25 Por lo tanto, un paciente puede evaluarse comparando los valores obtenidos midiendo el nivel de expresión de un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y un gen representativo de la respuesta inmunosupresora, donde los valores mayores de 5 revelan un buen pronóstico (por el contrario, un mal pronóstico cuando el gene es representativo de la respuesta inmunosupresora) y los valores menores de 5 revelan un mal pronóstico; (por el contrario, un buen pronóstico cuando el gene es representativo de la respuesta inmunosupresora). En otra
30 realización, un paciente puede evaluarse comparando los valores obtenidos midiendo el nivel de expresión de un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y un gen representativo de la respuesta inmunosupresora y comparando los valores en una escala, donde los valores por encima del intervalo de 4-6 indican un buen pronóstico (por el contrario, un mal pronóstico cuando el gen es representativo de la respuesta inmunosupresora) y los valores por debajo del intervalo de 4-6 indican un mal pronóstico (por el contrario, un buen pronóstico cuando el gen es representativo de la respuesta inmunosupresora), indicando los valores que se encuentran en el intervalo de 4-6 un pronóstico intermedio.

40 El método según la invención comprende la etapa de concluir que un paciente recibiría ventajosamente un tratamiento antitumoral si el paciente es un buen respondedor para cada una de la respuesta inmune adaptativa humana y respuesta inmunosupresora humana. Según otra realización más de la invención, el método comprende la etapa de concluir que un paciente no recibiría ventajosamente un tratamiento antitumoral si el paciente no es un buen respondedor para ambas de la respuesta inmune adaptativa humana y respuesta inmunosupresora humana.

45 En una realización particular, el método de la invención comprende etapas de comparación, que incluyen una clasificación de los valores de cuantificación medidos para el nivel de expresión de un gen en dos posibilidades, respectivamente: (i) una primera posibilidad donde el valor de cuantificación para el nivel de expresión es mayor que el valor de referencia predeterminado correspondiente (la primera posibilidad se denomina "Hi", por ejemplo) y (ii) una segunda posibilidad, donde el valor de cuantificación para el nivel de expresión es menor que el valor de referencia predeterminado correspondiente (la segunda posibilidad se denomina "Lo", por ejemplo).

50 Del ejemplo se deduce que, si el resultado de la etapa de comparación consiste en un valor "Hi" para el gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y un valor "Lo" para el gen representativo de la respuesta inmunosupresora, entonces se proporciona un buen pronóstico y el tratamiento proporcionará un impacto limitado (o moderado) en la supervivencia el paciente (es decir, un "mal respondedor al tratamiento antitumoral"). De la misma forma, si el resultado de la etapa de comparación consiste en un valor "Lo" para el gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y un valor "Hi" para el gen representativo de la respuesta inmunosupresora, entonces se proporciona un mal pronóstico y el tratamiento proporcionará un impacto limitado (o moderado) en la
55 supervivencia del paciente (es decir, un "mal respondedor al tratamiento antitumoral"). A la inversa, si el resultado de

5 la etapa de comparación consiste en un valor "Hi" para el gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y un valor "Hi" para el gen representativo de la respuesta inmunosupresora, entonces se proporciona un pronóstico intermedio y el tratamiento proporcionará un impacto significativo en la supervivencia del paciente (es decir, un "buen respondedor al tratamiento antitumoral"). Para los pacientes sin metástasis distantes (ilustrado para los pacientes en estadio II/III), los diferentes escenarios se resumen en la Tabla 3 a continuación en la presente memoria.

Tabla 3: Resultados para una combinación de dos genes (un único gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y un único gen representativo de la respuesta inmunosupresora).

Resultado	Pronóstico	Respuesta al tratamiento	Puntuación
"Hi" para el gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y valor "Lo" para el gen representativo de la respuesta inmunosupresora	Buen pronóstico	Mal respondedor al tratamiento antitumoral	2
"Hi" para el gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y valor "Hi" para el gen representativo de la respuesta inmunosupresora	Pronóstico intermedio	Buen respondedor al tratamiento antitumoral	0
"Lo" para el gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y valor "Lo" para el gen representativo de la respuesta inmunosupresora	Mal pronóstico intermedio	Mal respondedor al tratamiento antitumoral	0
"Lo" para el gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y valor "Hi" para el gen representativo de la respuesta inmunosupresora	Mal pronóstico	Mal respondedor al tratamiento antitumoral	-2

10 También puede calcularse una puntuación compuesta de las clasificaciones. Por ejemplo, se adjudica un coeficiente positivo (p. ej., +1) cuando el nivel de expresión del gen representativo de la respuesta inmune adaptativa es mayor que el valor de referencia predeterminado y se adjudica un coeficiente negativo (p. ej., -1) cuando el nivel de expresión del gen representativo de la respuesta inmune adaptativa es menor que el valor de referencia predeterminado. A la inversa, se adjudica un coeficiente positivo (p. ej., +1) cuando el nivel de expresión del gen representativo de la respuesta inmunosupresora es menor que el valor de referencia predeterminado y se adjudica un coeficiente negativo (p. ej., -1) cuando el nivel de expresión del gen representativo de la respuesta inmunosupresora es mayor que el valor de referencia predeterminado.

15 El cálculo de una puntuación es particularmente adecuado para facilitar la comprensión de los resultados de la etapa de comparación cuando se usa una combinación de más de 2 genes.

20 Típicamente, cuanto más cerca está dicha puntuación del valor 0, mayor será el efecto positivo que tendrá el tratamiento en la supervivencia del paciente (es decir, el paciente se beneficiaría del tratamiento).

El presente método permite, por lo tanto, definir *inter alia* un nuevo grupo de pacientes que no se había identificado hasta ahora, es decir, pacientes cuyo cáncer será tratado con éxito con un tratamiento anticanceroso.

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

30 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un agente quimioterapéutico, un agente radioterapéutico, o un agente inmunoterapéutico, preferiblemente el último, para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer en estadio I-III que se ha considerado como un buen respondedor al tratamiento antitumoral según el método de la invención anterior.

35 El término "agente quimioterapéutico" se refiere a compuestos químicos que son efectivos para inhibir el crecimiento tumoral. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforarnida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos

enediina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina (11 y caliqueamicina 211, véase, p. ej., Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caninomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idanrrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalarnicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptomgrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores del ácido fólico tales como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentoestatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogenanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilarnina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobromtol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-1 1; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido, y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

El término "agente inmunoterapéutico", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto, composición o tratamiento que indirectamente o directamente aumenta, estimula o incrementa la respuesta inmune del cuerpo frente a células cancerosas y/o que disminuye los efectos secundarios de otras terapias anticancerosas. La inmunoterapia es así una terapia que directamente o indirectamente estimula o aumenta las respuestas del sistema inmune frente a células cancerosas y/o disminuye los efectos secundarios que pueden haber sido causados por otros agentes anticancerosos. La inmunoterapia también se refiere en la técnica como terapia inmunológica, terapia biológica, terapia modificadora de la respuesta biológica y bioterapia. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos comunes conocidos en la técnica incluyen, pero no están limitados a, citoquinas, vacunas del cáncer, anticuerpos monoclonales y adyuvantes distintos de citoquinas. Alternativamente, el tratamiento inmunoterapéutico puede consistir en administrar al paciente una cantidad de células inmunes (células T, células NK, células dendríticas, células B...).

Los agentes inmunoterapéuticos pueden no ser específicos, es decir, refuerzan el sistema inmune generalmente de manera que el cuerpo humano se vuelve más efectivo para luchar contra el crecimiento y/o diseminación de las células cancerosas, o pueden ser específicos, es decir, dirigidos a las células cancerosas en sí mismas. Los regímenes de inmunoterapia pueden combinar el uso de agentes inmunoterapéuticos no específicos y específicos.

Los agentes inmunoterapéuticos no específicos son sustancias que estimulan o mejoran indirectamente el sistema inmune. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos se han usado solos como una terapia principal para el tratamiento del cáncer, así como además de una terapia principal, en cuyo caso el agente inmunoterapéutico no específico funciona como un adyuvante para aumentar la efectividad de otras terapias (p. ej., vacunas del cáncer). Los agentes inmunoterapéuticos no específicos también pueden funcionar en este último contexto para reducir los efectos secundarios de otras terapias, por ejemplo, la supresión de la médula ósea inducida por determinados agentes quimioterapéuticos. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos pueden actuar en células clave del sistema inmune y causar respuestas secundarias, tales como la producción incrementada de citoquinas e inmunoglobulinas. Alternativamente, los agentes pueden comprender en sí mismos citoquinas. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos se clasifican generalmente como citoquinas o adyuvantes distintos de citoquinas.

Varias citoquinas han encontrado aplicación en el tratamiento del cáncer bien como inmunoterapias generales no específicas diseñadas para reforzar el sistema inmune, o como adyuvantes proporcionados con otras terapias. Las citoquinas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, interferones, interleuquinas y factores estimulantes de colonias.

5 Los interferones (IFN) contemplados por la presente invención incluyen los tipos comunes de IFN, IFN-alfa (IFN- α), IFN-beta (IFN- β) e IFN-gamma (IFN- γ). Los IFN pueden actuar directamente en las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando su crecimiento, estimulando su desarrollo en células con un comportamiento más normal y/o incrementando su producción de antígenos haciendo así que las células cancerosas sean más fáciles de reconocer y destruir por el sistema inmune. Los IFN también pueden actuar indirectamente en las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando la angiogénesis, reforzando el sistema inmune y/o estimulando a las células asesinas naturales (NK), células T y macrófagos. El IFN-alfa recombinante está disponible comercialmente como Roferon (Roche Pharmaceuticals) e Intron A (Schering Corporation). El uso de IFN-alfa solo o en combinación con otros inmunoterapéuticos o con quimioterapéuticos, ha mostrado eficacia en el tratamiento de varios cánceres incluyendo melanoma (incluyendo melanoma metastásico), cáncer renal (incluyendo cáncer renal metastásico), cáncer de mama, cáncer de próstata, y cáncer de cuello uterino (incluyendo cáncer de cuello uterino metastásico).

10 Las interleuquinas contempladas por la presente invención incluyen IL-2, IL-4, IL-11 e IL-12. Los ejemplos de interleuquinas recombinantes disponibles comercialmente incluyen Proleuquina® (IL-2; Chiron Corporation) y Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Wash.) está ensayando actualmente una forma recombinante de IL-21, que también se contempla para uso en las combinaciones de la presente invención. Las interleuquinas, solas o en combinación con otros inmunoterapéuticos o con quimioterapéuticos, han mostrado eficacia en el tratamiento de varios cánceres incluyendo cáncer renal (incluyendo cáncer renal metastásico), melanoma (incluyendo melanoma metastásico), cáncer de ovario (incluyendo cáncer de ovario recurrente), cáncer de cuello uterino (incluyendo cáncer de cuello uterino metastásico), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, y cáncer de próstata.

25 Las interleuquinas también han demostrado una buena actividad en combinación con IFN-alfa en el tratamiento de varios cánceres (Negrier et al., Ann Oncol. 2002 13(9): 1460-8; Tourani et al., J. Clin. Oncol. 2003 21(21):398794).

30 Los factores estimulantes de colonias (CSF) contemplados por la presente invención incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF o filgrastim), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF o sargramostim) y eritropoyetina (epoetina alfa, darbepoyetina). El tratamiento con uno o más factores de crecimiento puede ayudar a estimular la generación de nuevas células sanguíneas en pacientes que están sometidos a quimioterapia tradicional. De acuerdo con esto, el tratamiento con CSF puede ser útil para disminuir los efectos secundarios asociados con la quimioterapia y puede permitir el uso de dosis mayores de los agentes quimioterapéuticos. Varios factores estimulantes de colonias recombinantes están disponibles comercialmente, por ejemplo, Neupogen® (G-CSF; Amgen), Neulasta (pelfilgrastim; Amgen), Leuquina (GM-CSF; Berlex), Procrit (eritropoyetina; Ortho Biotech), Epogen (eritropoyetina; Amgen), Arnesp (eritropoyetina). Los factores estimulantes de colonias han mostrado eficacia en el tratamiento del cáncer, incluyendo melanoma, cáncer colorrectal (incluyendo cáncer colorrectal metastásico), y cáncer de pulmón.

40 Los adyuvantes distintos de citoquinas adecuados para uso en las combinaciones de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, Levamisol, hidróxido de alúmina (alúmina), bacilo de Calmette-Guerin (ACG), adyuvante incompleto de Freund (IFA), QS-21, DETOX, hemocianina de lapa (KLH) y dinitrofenilo (DNP). Los adyuvantes distintos de citoquinas en combinación con otros inmuno y/o quimioterapéuticos han demostrado eficacia frente a varios cánceres incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon y cáncer colorrectal (Levamisol); melanoma (BCG y QS-21); cáncer renal y cáncer de vejiga (BCG).

45 Además de tener dianas específicas o no específicas, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser activos, es decir, estimular la respuesta inmune propia del cuerpo, o pueden ser pasivos, es decir, comprender componentes del sistema inmune que se generaron de forma externa al cuerpo.

50 La inmunoterapia específica pasiva implica típicamente el uso de uno o más anticuerpos monoclonales que son específicos para un antígeno particular encontrado en la superficie de una célula cancerosa o que son específicos para un factor de crecimiento celular particular. Los anticuerpos monoclonales pueden usarse en el tratamiento del cáncer de varias maneras, por ejemplo, para aumentar la respuesta inmune de un sujeto a un tipo de cáncer específico, para interferir con el crecimiento de las células cancerosas tomando como diana factores de crecimiento celular específicos, tales como los implicados en la angiogénesis, o mediante el aumento de la administración de otros agentes anticancerosos a las células cancerosas cuando se unen o conjugan con agentes tales como agentes quimioterapéuticos, partículas radiactivas o toxinas.

5 Los anticuerpos monoclonales usados actualmente como agentes inmunoterapéuticos para el cáncer que son adecuados para su inclusión en las combinaciones de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), cetuximab (C-225, Erbitux®), bevacizumab (Avastin®), gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®), y BL22. Los anticuerpos monoclonales se usan en el tratamiento de un amplio rango de cánceres incluyendo cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama avanzado metastásico), cáncer colorrectal (incluyendo cáncer colorrectal avanzado y/o metastásico), cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, melanoma y tumores cerebrales. Otros ejemplos incluyen anticuerpos anti-CTLA4 (p. ej., Ipilimumab), anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-PDL1, anticuerpos anti-TIMP3, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7H3, anticuerpos anti-B7H4 o anticuerpos anti-B7H6.

10 Los anticuerpos monoclonales pueden usarse solos o en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos o agentes quimioterapéuticos.

15 La inmunoterapia específica activa implica típicamente el uso de vacunas del cáncer. Se han desarrollado vacunas del cáncer que comprenden células cancerosas completas, partes de células cancerosas o uno o más antígenos derivados de células cancerosas. Las vacunas del cáncer, solas o en combinación con uno o más agentes inmuno o quimioterapéuticos se están investigando en el tratamiento de varios tipos de cáncer incluyendo melanoma, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer colorrectal, y cáncer de pulmón. Los inmunoterapéuticos no específicos son útiles en combinación con vacunas del cáncer con el fin de aumentar la respuesta inmune del cuerpo.

20 El tratamiento inmunoterapéutico puede consistir en una inmunoterapia adoptiva como se describe por Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley y Steven A. Rosenberg "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews Immunology, Volumen 12, abril 2012). En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos circulantes del paciente, o linfocitos infiltrado en el tumor, se aíslan in vitro, se activan con linfoquinas tales como IL-2 o se les introducen genes para la necrosis tumoral, y se readministran (Rosenberg et al., 1988; 1989). Los linfocitos activados son, lo más preferiblemente, las propias células del paciente que se aislaron previamente de una muestra de sangre o tumor y se activaron (o "expandieron") in vitro. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanoma y carcinoma renal.

25 El término "agente radioterapéutico", tal y como se usa en la presente memoria, se pretende que se refiera a cualquier agente radioterapéutico que un experto en la técnica sabe que es efectivo para tratar o mejorar el cáncer, sin limitación. Por ejemplo, el agente radioterapéutico puede ser un agente tal como los administrados en braquiterapia o terapia con radionúclidos. Dichos métodos pueden comprender además opcionalmente la administración de una o más terapias para el cáncer adicionales, tales como, pero no limitado a, quimioterapias, y/o otra radioterapia.

30 Un objeto adicional de la invención se refiere al uso de kits para llevar a cabo los métodos de la invención, en donde dichos kits comprenden medios para medir el nivel de expresión de las agrupaciones de genes de la invención en la muestra obtenida del paciente.

35 Un kit puede incluir sondas, cebadores macromatrices o micromatrices como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el kit puede comprender un conjunto de sondas como se ha definido anteriormente, compuestas habitualmente de ADN, y que pueden premarcarse. Alternativamente, las sondas pueden no estar marcadas y los ingredientes para el marcaje pueden incluirse en el kit en contenedores separados. Un kit puede comprender además reactivos de hibridación u otros reactivos y materiales envasados adecuadamente necesarios para el protocolo de hibridación particular, incluyendo matrices de fase sólida, si es aplicable, y estándares. Alternativamente, el kit de la invención puede comprender cebadores de amplificación que pueden premarcarse o pueden contener un resto para purificación por afinidad o unión. El kit puede comprender además reactivos de amplificación y también otros reactivos y materiales envasados adecuadamente necesarios para el protocolo de amplificación particular.

40 Como un ejemplo, sobre la base de los datos estadísticos de la Tabla 5, un kit compuesto por los 3 genes adaptativos, CD3G + CCR2 + GZMA y los 3 genes supresores REN + PDCD1 + VEGF, será particularmente adecuado para predecir una respuesta a la terapia, incluyendo tratamiento anti-VEGF (Avastina) en particular con la combinación GZMA/VEGF, tratamiento anti-PD1 en particular con las combinaciones CD3G/PDCD1, CCR2/PDCD1, GZMA/PDCD1, o quimioterapia adyuvante como se ilustra por los valores P en la Tabla 5.

45 La invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos. Estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras

Las Figuras 1, 2 y 3 representan curvas de Kaplan Meier (porcentaje de supervivencia sin enfermedad frente al tiempo en meses) concernientes a 73 parejas de subconjuntos tales como los mencionados en la preparación 1, para los genes CD3G, GZMH e ITGAE y para su valor de referencia óptimo correspondiente.

5 Las Figuras 4, 5 y 6 representan curvas de valores p (escala del eje de ordenadas 1e-04 a 1e-00), frente a los valores del nivel de expresión (eje horizontal como abscisa). Las líneas verticales que cruzan el eje de las x (a 22.26 y a 21.05 en la Figura 4) representan los puntos de corte óptimo y mediano, respectivamente. RR óptima representa el valor de la Relación de Riesgo (en las curvas de supervivencia sin enfermedad) en el punto de corte óptimo.

10 La Figura 7 representa una curva de Kaplan Meier para supervivencia sin enfermedad (SSE) de pacientes con cáncer colorrectal en Estadio II/III. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes se sometieron a quimioterapias (QUIMIO) y los otros dos subconjuntos no se trataron (NO). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes (CD8A y CTLA4) comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

15 La Figura 8 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer colorrectal en Estadio IV. Dos subconjuntos de pacientes se sometieron a quimioterapias (QUIMIO) y los otros dos subconjuntos no se trataron (NO). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

La Figura 9 ilustra combinaciones de genes de ambos tipos. Las líneas representan correlaciones entre dos genes que muestran similitudes en el patrón de la expresión génica entre pacientes.

20 La Figura 10 representa una curva de Kaplan Meier para supervivencia sin enfermedad (SSE) de pacientes con cáncer colorrectal en Estadio I, II, III. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes se sometieron a quimioterapias (QUIMIO) y los otros dos subconjuntos no se trataron (NO). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes (CD8A y VEGFA) comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

25 La Figura 11 representa una curva de Kaplan Meier para la supervivencia global (SG) de pacientes con cáncer colorrectal en Estadio II/III. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes se sometieron a quimioterapias (QUIMIO) y los otros dos subconjuntos no se trataron (NO). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes (CD3E y VEGFA) comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

La Figura 12 representa una curva de Kaplan Meier para supervivencia sin enfermedad (SSE) de pacientes con cáncer colorrectal en Estadio II/III. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes se sometieron a quimioterapias (QUIMIO) y los otros dos subconjuntos no se trataron (NO). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes (CD3G y VEGFA) comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

30 La Figura 13 representa una curva de Kaplan Meier para supervivencia sin enfermedad (SSE) de pacientes con cáncer colorrectal en Estadio I, II, III. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes se sometieron a quimioterapias (QUIMIO) y los otros dos subconjuntos no se trataron (NO). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes (CD3G y VEGFA) comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

35 Las Figuras 14-18 representan curvas de Kaplan Meier para la supervivencia global (SG) de pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano (I, II). Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes se sometieron a quimioterapias (ACT) y los otros dos subconjuntos no se trataron (OBS). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes (Figura 14: PDCD1 y CCL2, Figura 15: PDCD1 y CD247, Figura 16: PDCD1 y CD3E, Figura 17: VEGFA y CD3E, Figura 18: PDCD1 y CXCL10) comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

40 La Figura 19 representa una curva de Kaplan Meier para supervivencia sin enfermedad (SSE) de pacientes con cáncer de ovario en estadio avanzado. Todos los pacientes se sometieron a quimioterapia. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes con respuesta completa (RC) y los otros dos subconjuntos sin respuesta completa (IR). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes (CD1A y CCL2) comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

45 La Figura 20 representa una curva de Kaplan Meier para supervivencia sin enfermedad (SSE) de pacientes con cáncer de ovario en estadio avanzado. Todos los pacientes se sometieron a quimioterapia. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes con respuesta completa (RC) y los otros dos subconjuntos sin respuesta completa (IR). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes (CD1A y CX3CL1) comparado con todos los otros pacientes ("Otros").

50 La Figura 21 representa una tabla de contingencia del Ensayo Exacto de Fisher de pacientes con melanoma en estadio tardío (III-IV). Todos los pacientes se sometieron a quimioterapia. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes con respuesta completa (RC) y los otros dos subconjuntos sin respuesta completa (PR, SD, PD). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes comparado con todos los otros pacientes

("Otros"). Se ilustran ejemplos representativos de pacientes HiHi tales como: REN/CCL5, CTLA4/CCL5, VEGFA/CD3E, CD276/CD8A, CTLA4/CD8A, PDCD1/STAT1, PDCD1/CXCL10, VEGFA/CXCL10, CD274/CXCL11, CTLA4/CXCL9.

Ejemplo 1

- 5 1. Determinar si un paciente es un buen respondedor o un mal respondedor para cada una de respuesta inmune adaptativa humana y respuesta inmunosupresora humana.

Se ha evaluado el nivel de expresión de genes CD3G (gen representativo de la respuesta inmune adaptativa) y de REN (gen representativo de la respuesta inmunosupresora) en una muestra de tumor colorrectal de un paciente como sigue:

- 10 El paciente tenía un cáncer colorrectal en Estadio II.

Una muestra de tejido de este tumor se congeló rápidamente en los 15 minutos posteriores a la cirugía y se almacenó en nitrógeno líquido. El ARN total del tumor se aisló por homogeneización con el kit de aislamiento RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). La integridad y la cantidad del ARN se evaluaron en un bioanalizador-2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Los experimentos de RT-PCR se realizaron según las instrucciones del fabricante (Applied-Biosystems, Foster City, CA).

15 La PCR TaqMan cuantitativa en tiempo real se realizó usando Matrices de Baja Densidad y el sistema de PCR en tiempo real robótico 7900 (Applied-Biosystems). Se usaron cebadores y sonda de ARN ribosomal 18S como control interno.

20 Los análisis de expresión génica se realizaron usando valores Ct (ciclo umbral) normalizados respecto al ARN ribosomal 18S (dCt).

Los datos se analizaron usando el Software SDS v2.2 (Applied-Biosystems) y el módulo estadístico TME.

Los resultados son como sigue:

CD3G: dCt= 20.13

REN: dCt= 20.15

- 25 Un valor dCt menor que el valor de referencia relevante significa que la señal se detectó antes, es decir: la expresión del gen es Alta.

Un valor dCt mayor que el valor de referencia relevante significa que la señal se detectó después, es decir: la expresión del gen es Baja.

- 30 Los resultados anteriores se compararon con los siguientes valores de referencia previamente determinados: ELR_{CD3G}: 22.26 y ELR_{REN}: 21.48.

Como el resultado dCt para CD3G es menor que el valor de referencia: ELR_{CD3G}, la muestra se considera como "alta" respecto a este criterio. Como el resultado dCt para REN también es menor que el valor de referencia: ELR_{REN}, la muestra se considera como "alta" respecto a este criterio.

- 35 Por lo tanto, el paciente se considera como un buen respondedor para la respuesta inmune adaptativa humana y como un buen respondedor para la respuesta inmunosupresora humana.

2. Determinar si el paciente se beneficiaría de un tratamiento tal como quimioterapia (tratamiento de atención estándar para pacientes en estadio tardío (estadio IV)) o tratamiento con mAb anti-PDL1 = si el paciente es un buen respondedor al tratamiento antitumoral

- 40 Como el resultado de la etapa de comparación consiste en un valor "Hi" para CD3G y un valor "Hi" para REN, entonces se proporciona un pronóstico intermedio y el tratamiento contemplado con quimioterapia o tratamiento con mAb anti-PDL1 o cualquier otro tratamiento eficiente proporcionará probablemente un impacto significativo en la supervivencia del paciente.

Por lo tanto, el paciente debería ser tratado y los posibles efectos secundarios del tratamiento están justificados por el beneficio para el paciente en términos de supervivencia.

- 45 Ejemplo 2

1. Determinar si un paciente es un buen respondedor o un mal respondedor para cada una de la respuesta inmune adaptativa humana y la respuesta inmunosupresora humana.

Se ha evaluado el nivel de expresión de genes CD3G y REN en una muestra de tumor colorrectal de un segundo paciente según el procedimiento del ejemplo 1:

5 El paciente tenía cáncer colorrectal en Estadio II.

Los resultados son como sigue:

CD3G: dCt= 25.33

REN: dCt= 31.51

Los resultados anteriores se compararon con los mismos valores de referencia determinados como anteriormente.

10 Como el resultado para CD3G es mayor que el valor de referencia ELR_{CD3G}, la muestra se considera como "Baja" respecto a ese criterio. Como el resultado para REN es mayor que el valor de referencia: ELR_{REN}, la muestra se considera como "Baja" respecto a ese criterio.

Por lo tanto, el paciente se considera como un mal respondedor para la respuesta inmune adaptativa humana y como un mal respondedor para la respuesta inmunosupresora humana.

15 2. Determinar si el paciente se beneficiaría de un tratamiento tal como quimioterapia o tratamiento con mAb anti-PDL1

Como el resultado de la etapa de comparación consiste en un valor "Lo" para CD3G y un valor "Lo" para REN, entonces se proporciona un mal pronóstico y el tratamiento antitumoral contemplado con quimioterapia o tratamiento con mAb anti-PDL1 no proporcionaría un impacto significativo en la supervivencia del paciente.

20 Por lo tanto, no hay o hay poco interés terapéutico en tratar al paciente con quimioterapia o tratamiento con mAb anti-PDL1 porque el tratamiento no tendría efectos valiosos en la supervivencia e induciría efectos secundarios indeseables.

Preparación 1

25 Los valores de referencia usados para la comparación que consisten en valores "de corte" pueden predeterminarse, por ejemplo, como se describe a continuación en la presente memoria.

30 Las muestras de ARN analizadas fueron de 108 pacientes diferentes. Estos pacientes se usaron para experimentos de expresión génica (cohorte Taqman). El tiempo de observación en las cohortes fue el intervalo entre el diagnóstico y el último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se censuraron en el último seguimiento para los pacientes son recidiva o muerte. Los valores min:máx hasta la progresión/muerte o último seguimiento fueron (0 a 136) meses, respectivamente. Tres pacientes para los que no estaban disponibles los datos de seguimiento se excluyeron de los análisis de supervivencia. El tiempo hasta la recurrencia o tiempo sin enfermedad se definió como el intervalo desde la fecha de la cirugía hasta la fecha de la recidiva tumoral confirmada para pacientes recidivantes y desde la fecha de la cirugía hasta la fecha del último seguimiento para pacientes sin enfermedad.

35 Los descubrimientos histopatológicos y clínicos se puntuaron según el sistema de estadificación UICC-TNM. La vigilancia de los pacientes después de la cirugía se realizó en los Hospitales Laennec-HEGP para todos los pacientes según la práctica general para los pacientes con CRC. Se administró o no quimioterapia adyuvante a los pacientes con CRC en estadio II y III, y quimioterapia paliativa a los pacientes con cánceres colorrectales avanzados (estadio IV) y a pacientes sin la resección completa del tumor. La quimioterapia adyuvante se basó en fluorouracilo (FU). Los datos de seguimiento se recogieron prospectivamente y se actualizaron. Se construyó una base de datos basada en la Web segura, TME.db (Tumor MicroEnvironment Database), en una arquitectura con 3 capas usando Java-2 Enterprise-Edition (J2EE) para integrar los datos clínicos y los datos de tecnologías de alto rendimiento.

40 a) Se revisaron los registros de pacientes con cáncer colorrectal (CRC) que se sometieron a una resección primaria de su tumor en los Hospitales Laennec-HEGP (París - Francia) entre 1996 y 2004. Se seleccionaron las muestras de tumor congeladas disponibles en los Hospitales Laennec-HEGP de 1996-2004, con ARN con una cualidad y cantidad suficiente (cohorte de validación 1, n=108);

45 b) Se analizaron las muestras de ARN de los 108 pacientes diferentes para determinar el nivel de expresión de los genes CD8A y CTLA4 para cada muestra de tejido tumoral de la colección, usando la técnica del Ejemplo 1 (cohorte Taqman);

c) Las muestras de tejido tumoral se habían ordenado según su nivel de expresión para cada gen;

d) Las 105 muestras de tejido tumoral analizadas se han clasificado en parejas de subconjuntos de número creciente, respectivamente decreciente, de miembros ordenados según su nivel de expresión: Pareja de subconjuntos 1: La muestra que tiene el mejor nivel de expresión del gen CD8A por un lado y todas las demás 104 muestras que tienen un menor nivel de expresión del gen CD8A por otro lado. Después, Pareja de subconjuntos 2: las dos muestras que tienen el mejor nivel de expresión del gen CD8A por un lado y las 103 muestras que tienen un menor nivel de expresión del gen CD8A por otro lado, etc.... y finalmente, pareja de subconjuntos 104: las 104 muestras que tienen el mejor nivel de expresión del gen CD8A por un lado y la muestra que tiene el menor nivel de expresión del gen CD8A por otro lado.

e) Para cada muestra de tejido tumoral, se ha obtenido la información respecto al resultado clínico real para el paciente correspondiente (es decir, la duración de la supervivencia sin enfermedad (SSE) o la supervivencia global (SG) o ambos). El tiempo de observación en las cohortes fue el intervalo entre el diagnóstico y el último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se censuraron en el último seguimiento para los pacientes sin recidiva, o muerte. Los valores min:máx hasta la progresión/muerte o último seguimiento fueron (0:136) meses, respectivamente. Tres pacientes para los que no estaban disponibles los datos de seguimiento se excluyeron de los análisis de supervivencia. El tiempo hasta la recurrencia o tiempo sin enfermedad se definió como el intervalo desde la fecha de la cirugía hasta la fecha de la recidiva tumoral confirmada para pacientes recidivantes y desde la fecha de la cirugía hasta la fecha del último seguimiento para pacientes sin enfermedad;

f) Para cada pareja de subconjuntos, se ha dibujado una curva de Kaplan Meier; las curvas de Kaplan Meier típicas de 73 pacientes diferentes se muestran en las figuras 1, 2 y 3;

g) Para cada pareja de subconjuntos, se ha calculado la significancia estadística (valor p) entre ambos subconjuntos y se reportó en un curva; una curva típica se muestra en la figura 2. La curva es generalmente cóncava y las parejas de subconjuntos de los extremos tienen un valor p alto.

h) Se selecciona un valor de referencia ELR de manera que el valor p es el menor.

Las Figuras 1, 2 y 3 representan curvas de Kaplan Meier (porcentaje de supervivencia sin enfermedad frete al tiempo en meses) concernientes a 73 parejas de subconjuntos tal como se ha mencionado en la preparación 1, para los genes CD3G, GZMH e ITGAE y para el valor de referencia óptimo correspondiente. La significancia entre los grupos de pacientes se calculó usando el ensayo de rango logarítmico. Los valores *P* se corrigieron aplicando el método propuesto por Altman et al (Altman DG, et al J Natl Cáncer Inst 86:829-35, 1994). La relaciones de riesgo (RR) se corrigieron como sugieren Hollander et al (Hollander N, et al Stat Med 23: 1701-13, 2004).

Figura 1: CD3G. Se muestran las curvas para un subconjunto de 60 miembros (nivel de expresión más alto) y un subconjunto de 13 miembros (nivel de expresión más bajo) usando $dCt=20.13$ como valor de referencia para el gen CD3G. Las curvas de Kaplan-Meier para SSE que ilustran las diferencias en recurrencia según la expresión de genes inmunes, revelaron un mejor pronóstico (RR corregida=3.74, $P<0.0005$) asociado con una alta expresión de CD3G en el tumor. La supervivencia mediana fue infinita (no se alcanzó) para pacientes con alta expresión de CD3G, mientras fue solo de 16 meses para pacientes con baja expresión de CD3G.

Figura 2: GZMH. Se muestran curvas para un subconjunto de 55 miembros (nivel de expresión más alto) y un subconjunto de 18 miembros (nivel de expresión más bajo) usando $dCt=22.17$ como valor de referencia para el gen GZMH. Las curvas de Kaplan-Meier para SSE que ilustran las diferencias en recurrencia según la expresión de genes inmunes, revelaron un mejor pronóstico (RR corregida=4.5, $P<0.0005$) asociado con una alta expresión de GZMH en el tumor. La supervivencia mediana fue infinita (no se alcanzó) para pacientes con alta expresión de GZMH, mientras fue solo de 18 meses para pacientes con baja expresión de GZMH.

Figura 3: ITGAE. Se muestran curvas para un subconjunto de 52 miembros (nivel de expresión más alto) y un subconjunto de 21 miembros (nivel de expresión más bajo) usando $dCt=21.89$ como valor de referencia para el gen ITGAE. Las curvas de Kaplan-Meier para SSE que ilustran las diferencias en recurrencia según la expresión de genes inmunes, revelaron un mejor pronóstico (RR corregida=4.21, $P<0.0005$) asociado con una alta expresión de ITGAE en el tumor. La supervivencia mediana fue infinita (no se alcanzó) para pacientes con alta expresión de ITGAE, mientras fue solo de 16 meses para pacientes con baja expresión de ITGAE.

Debe indicarse particularmente el hecho de que, para un mismo grupo de 73 pacientes, dependiendo del gen considerado, el valor de referencia óptimo se obtiene para diferentes parejas de subconjuntos.

En las figuras 4, 5 y 6, el valor p más pequeño se obtiene para la pareja de subconjuntos correspondiente a una cantidad de aproximadamente $dCt=22.26$ para CD3G, de aproximadamente $dCt=22.17$ para GZMH y de aproximadamente $dCt=21.89$ para ITGAE.

ES 2 702 722 T3

La significancia entre los grupos de pacientes se calculó usando el ensayo de rango logarítmico. Los valores *P* y relaciones de riesgo (RR) se corrigieron como previamente. La figura que representa gráficos de valores *P* como una función de los puntos de corte para la expresión génica reveló un rango de puntos de corte significativos ($P < 0.05$), y un pico correspondiente al punto de corte óptimo, que puede usarse adicionalmente como un valor de referencia ELR.

5

Los valores de referencia ELR se obtuvieron según el método anterior para varias combinaciones de genes y paneles de 73 pacientes que padecían cánceres en Estadio II- III y se reportan en la Tabla 4 a continuación en la presente memoria. El primer gen es representativo de la respuesta inmune adaptativa humana y el segundo gen es representativo de la respuesta inmunosupresora humana. En esta tabla, cada gen va seguido de su valor de referencia correspondiente como se obtiene según el procedimiento anterior.

10

Tabla 4

	Genes / puntos de corte dCt
1	CCL5 20.41 - REN 21.48
2	CCR2 32.36 - IL17A 25.51
3	CCR2 32.36 - REN 21.48
4	CD247 21.28 - IL17A 25.51
5	CD247 21.218 - REN 21.48
6	CD3E 18.95 - REN 21.48
7	CD3G 22.26 - IL17A 25.51
8	CD3G 22.26 - REN 21.48
9	CD8A 20.54 - IL17A 25.51
10	CD8A 20.54 - REN 21.48
11	CX3CL1 18.58 - CTLA4 20.20
12	CX3CL1 18.58 - IHH 19.81
13	GZMA 19.62 - PF4 20.02
14	GZMA 19.62 - PROM1 23.16
15	GZMA 19.62 - REN 21.48
16	GZMA 19.62 - TSLP 23.12
17	GZMA 19.62 - VEGF 15.44
18	GZMB 20.24 - REN 21.48
19	GZMH 22.17 - IL17A 25.51
20	GZMH 22.17 - REN 21.48
21	GZMK 22.57 - REN 21.48
22	IFNG 25.03 - IL17A 25.50
23	IL15 23.20 - CD274 23.02
24	IL15 23.20 - CTLA4 20.20
25	IL15 23.20 - IHH 19.81
26	IL15 23.20 - TSLP 23.12
27	IL15 23.20 - VEGF 15.44
28	IRF1 15.49 - REN 21.48
29	ITGAE 21.89 - IL17A 25.51
30	ITGAE 21.89 - REN 21.48
31	PRF1 21.17 - REN 21.48
32	STAT1 16.51 - REN 21.48
33	TBX21 23.47 - REN 21.48
34	GZMK 22.57 - PDCD1 23.04
35	CD247 21.28 - CD274 23.02
36	PRF1 21.17 - PDCD1 23.04
37	CCR2 32.36 - PF4 20.02
38	CD247 21.28 - PDCD1 23.04
39	CD3E 18.95 - PDCD1 23.04
40	CCR2 32.36 - CD274 23.02
41	CCR2 32.36 - PDCD1 23.04
42	CCL5 20.41 - PDCD1 23.04
43	CD3G 22.26 - PDCD1 23.04
44	CD8A 20.54 - PDCD1 23.04
45	TBX21 23.47 - PDCD1 23.04
46	CD3G 22.26 - IHH 19.81
47	CD3G 22.26 - PF4 20.02
48	CD3G 22.26 - PROM1 23.16

49	GZMB 20.24 - PDCD1 23.04
50	GZMH 22.17 - PDCD1 23.04
51	STAT1 16.51 - PDCD1 23.04
52	STAT1 16.51 - PF4 20.02
53	CD247 21.28 - PF4 20.02
54	CD247 21.28 - CTLA4 20.20
55	CD3G 22.26 - CTLA4 20.20
56	CD8A 20.54 - CTLA4 20.20
57	PRF1 21.17 - CTLA4 20.20
58	CCL5 20.41 - CTLA4 20.20
59	TBX21 23.47 - CTLA4 20.20
60	STAT1 16.51 - IHH 19.81
61	CD247 21.28 - IHH 19.81
62	CD247 21.28 - PROM1 23.16
63	PRF1 21.17 - PF4 20.02
64	CD3G 22.26 - TSLP 23.12
65	CCR2 32.36 - IHH 19.81
66	CCR2 32.36 - CTLA4 20.20
67	IFNG 25.03 - CD274 23.02
68	GZMB 20.24 - CTLA4 20.20
69	IFNG 25.03 - PDCD1 23.04
70	CXCL11 20.78 - IL17A 25.51
71	CXCL11 20.78 - REN 21.48

La Tabla 5 a continuación en la presente memoria resume los resultados de una comparación para una misma pareja de genes entre los siguientes grupos de pacientes:

- 5 - pacientes clasificados como "Hi Hi" y sometidos a un tratamiento quimioterapéutico frente a pacientes clasificados como "Hi Hi" pero sin tratamiento quimioterapéutico.
- pacientes no clasificados como "Hi Hi" (= Otros) y sometidos a un tratamiento quimioterapéutico frente a pacientes no clasificados como "Hi Hi" y sin tratamiento quimioterapéutico.

10 Los resultados se expresan en valor p según rango logarítmico y RR corregida (relación de riesgo) para supervivencia sin enfermedad. El rango logarítmico es un ensayo estadístico muy conocido que compara estimaciones de las funciones de riesgo de los dos grupos a cada tiempo de evento observado. El rango logarítmico se construye computando el número de eventos observado y esperado en uno de los grupos a cada tiempo de evento observado y sumando entonces estos para obtener un resumen global a lo largo de todos los puntos de tiempo en los que hay un evento.

La corrección de la Relación de Riesgo se hizo como previamente según Holländer.

15 Tabla 5

	PAREJAS DE GENES	QUIMIO-"HiHi" frente a NO QUIMIO-"HiHi": SSE		QUIMIO-Otros frente a NO QUIMIO-Otros: SSE	
		valor P según rango logarítmico	RR corregida	valor P según rango logarítmico	RR corregida
1	CCL5 - REN	0,0000	infinito	0,0623	0,47
2	CCR2 - IL17A	0,0000	infinito	0,3115	1
3	CCR2 - REN	0,0000	infinito	0,1926	0,76
4	CD247 - IL17A	0,0000	infinito	0,3040	0,99
5	CD247 - REN	0,0000	infinito	0,1222	0,62
6	CD3E - REN	0,0000	infinito	0,0623	0,47
7	CD3G - IL17A	0,0000	infinito	0,3071	0,99
8	CD3G - REN	0,0000	infinito	0,1222	0,62
9	CD8A - IL17A	0,0000	infinito	0,1269	0,59
10	CD8A - REN	0,0000	infinito	0,0623	0,47
11	CX3CL1 - CTLA4	0,0000	infinito	0,0794	0,54
12	CX3CL1 - IHH	0,0000	infinito	0,1108	0,6
13	GZMA - PF4	0,0000	infinito	0,1747	0,72
14	GZMA - PROM1	0,0000	infinito	0,1671	0,71
15	GZMA - REN	0,0000	infinito	0,1229	0,63

ES 2 702 722 T3

16	GZMA - TSLP	0,0000	infinito	0,1796	0,73
17	GZMA - VEGF	0,0000	infinito	0,1458	0,67
18	GZMB - REN	0,0000	infinito	0,0623	0,47
19	GZMH - IL17A	0,0000	infinito	0,1130	0,57
20	GZMH - REN	0,0000	infinito	0,0623	0,47
21	GZMK - REN	0,0000	infinito	0,0855	0,52
22	IFNG - IL17A	0,0000	infinito	0,1999	0,76
23	IL15 - CD274	0,0000	infinito	0,1203	0,62
24	IL15 - CTLA4	0,0000	infinito	0,1632	0,7
25	IL15 - IHH	0,0000	infinito	0,1437	0,66
26	IL15 - TSLP	0,0000	infinito	0,0897	0,56
27	IL15 - VEGF	0,0000	infinito	0,0995	0,58
28	IRF1 - REN	0,0000	infinito	0,0623	0,47
29	ITGAE - IL17A	0,0000	infinito	0,1517	0,67
30	ITGAE - REN	0,0000	infinito	0,1222	0,62
31	PRF1 - REN	0,0000	infinito	0,0855	0,52
32	STAT1 - REN	0,0000	infinito	0,0855	0,52
33	TBX21 - REN	0,0000	infinito	0,0623	0,47
34	GZMK - PDCD1	0,0133	0,09	0,7191	0,01
35	CD247 - CD274	0,0152	0,07	0,8129	0,01
36	PRF1 - PDCD1	0,0152	0,14	0,8072	0
37	CCR2 - PF4	0,0185	1,06	0,8466	0
38	CD247 - PDCD1	0,0195	0,09	0,8878	0,01
39	CD3E - PDCD1	0,0207	0,1	0,8212	0
40	CCR2 - CD274	0,0208	0,07	0,9253	0,07
41	CCR2 - PDCD1	0,0220	0,09	0,8814	2,69
42	CCL5 - PDCD1	0,0225	0,09	0,9771	0,68
43	CD3G - PDCD1	0,0225	0,09	0,9771	0,68
44	CD8A - PDCD1	0,0225	0,09	0,9771	0,68
45	TBX21 - PDCD1	0,0225	0,09	0,9771	0,69
46	CD3G - IHH	0,0258	1,09	0,8280	0
47	CD3G - PF4	0,0258	1,11	0,8697	0,03
48	CD3G - PROM1	0,0305	0,09	0,6688	2,85
49	GZMB - PDCD1	0,0306	0,09	0,7839	3,13
50	GZMH - PDCD1	0,0348	0,09	0,9591	1,53
51	STAT1 - PDCD1	0,0356	0,09	0,9314	1,86
52	STAT1 - PF4	0,0423	1,31	0,9152	1,77
53	CD247 - PF4	0,0431	1,12	0,8630	2,64
54	CD247 - CTLA4	0,0433	0,14	0,5465	1,83
55	CD3G - CTLA4	0,0433	0,14	0,5465	1,83
56	CD8A - CTLA4	0,0433	0,14	0,5465	1,83
57	PRF1 - CTLA4	0,0433	0,14	0,5465	1,83
58	CCL5 - CTLA4	0,0433	0,14	0,5465	1,83
59	TBX21 - CTLA4	0,0433	0,14	0,5465	1,83
60	STAT1 - IHH	0,0438	1,32	0,9720	1,29
61	CD247 - IHH	0,0445	1,15	0,8675	2,51
62	CD247 - PROM1	0,0446	0,1	0,5521	1,9
63	PRF1 - PF4	0,0447	0,37	0,9258	1,55
64	CD3G - TSLP	0,0450	1,15	0,9300	1,93
65	CCR2 - IHH	0,0451	1,15	0,9204	2,11
66	CCR2 - CTLA4	0,0456	0,09	0,4968	1,6
67	IFNG - CD274	0,0463	0,06	0,3146	1,02
68	GZMB - CTLA4	0,0471	0,14	0,5195	1,7
69	IFNG - PDCD1	0,0472	0,14	0,4703	1,51
70	CXCL11 - IL17A	0,0444	0,37	0,2397	1,37
71	CXCL11 - REN	0,0259	0,32	0,7328	6,34

Los resultados obtenidos con otras parejas de genes tales como CD3G-VEGF, CD3E-VEGF y CD8A-VEGF se proporcionan posteriormente en la presente memoria.

Un valor P según rango logarítmico por debajo de 0.05 es significativo.

Una relación de riesgo corregida cuyo valor es infinito revela la ausencia de recurrencia tumoral. El hueco entre las dos curvas es infinito y el valor P es muy significativo.

A la inversa, una relación de riesgo corregida cuyo valor es 1 o cercano a 1 revela que las curvas de ambos subconjuntos de pacientes se superponen. Por lo tanto, como una curva representa a los pacientes tratados y la otra curva representa a los pacientes no tratados, se concluye que tratamiento fue inefectivo.

Análisis de los resultados

Por ejemplo, para la primera pareja de genes (CCL5 - REN)

- El valor P según rango logarítmico de 0.0000 (<0.0001), por lo tanto, por debajo de 0.05 es significativo y el valor de la Relación de Riesgo corregida es infinito lo que significa que para el grupo de pacientes que tienen altos niveles de expresión para ambos genes no hay recurrencia tumoral en el grupo de los pacientes tratados y un tratamiento quimioterapéutico proporcionó una mejoría importante en la afección de los pacientes.

- Por otro lado, para los tres grupos de pacientes que no tienen altos niveles de expresión para ambos genes, el valor de la relación de riesgo corregida es 0.47, cercano a 1, porque las curvas están cerca entre sí (las curvas típicas de esta clase se ilustran en la figura 7 - las tres curvas inferiores), y un valor P no significativo. Por lo tanto, para los pacientes que no tienen altos niveles de expresión para ambos genes, un tratamiento quimioterapéutico no proporcionó mejoría en la afección de los pacientes.

Conclusión: Por lo tanto, los resultados de la Tabla 5 muestran que un valor de referencia para un nivel de expresión para ambos genes de todas las parejas de genes permite determinar si un tratamiento quimioterapéutico proporcionará una mejoría en la afección de un paciente tratado. Estas combinaciones de genes, siguiendo el procedimiento, son, por lo tanto, marcadores predictivos de la respuesta al tratamiento.

La Figura 7 representa una curva de Kaplan Meier para SSE para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer en estadio II/III. Los pacientes de una pareja de subconjuntos (QUIMIO) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (NO = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (14 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (25 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (12 pacientes)

Línea constituida por alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (22 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

- El valor P según rango logarítmico de 0.0000 (<0.0001), por lo tanto, por debajo de 0.05, es significativo y el valor de la relación de riesgo corregida es infinito lo que significa que ninguno de los pacientes "HiHi" que recibieron quimioterapia tuvo recurrencia tumoral durante 120 meses.

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

- Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

Los valores de referencia absolutos son bastante específicos de un método dado para evaluar el nivel de expresión de un gen. Para propósitos de comparación, por supuesto, deberían usarse preferiblemente las mismas unidades. Cuando la técnica usada para determinar niveles de expresión de genes implica un fenómeno exponencial tal como

PCR cuantitativa, debería usarse preferiblemente un valor de referencia corregido. En los presentes experimentos, se usaron los valores normalizados dCt comparado con un gen constitutivo (18S).

La Figura 8 representa una curva de Kaplan Meier para SG para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer en estadio IV, de la clase de la curva de la Figura 7.

5 La leyenda de las curvas es la misma que en la Figura 7:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (9 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (9 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (8 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (3 pacientes)

10 El análisis de las curvas muestra que:

- El grupo de pacientes que tiene altos niveles de expresión para ambos genes tiene la mejor supervivencia, pero en el grupo de pacientes tratados con quimioterapia no hubo mejoría en la afección de los pacientes, comparado con los pacientes no tratados.

15 - Por otro lado, para los dos grupos de pacientes que no tienen altos niveles de expresión para ambos genes, los pacientes no tratados tuvieron el peor resultado (50 % de recurrencia a los 6 meses), mientras los pacientes tratados con quimioterapia tuvieron una supervivencia sin enfermedad prolongada (50 % de recurrencia a los 20 meses), lo que muestra una mejoría en la afección de estos pacientes después del tratamiento.

20 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

25 Los valores de referencia absolutos son bastante específicos de un método dado para evaluar el nivel de expresión de un gen. Para propósitos de comparación, por supuesto, deberían usarse preferiblemente las mismas unidades. Cuando la técnica usada para determinar niveles de expresión de genes implica un fenómeno exponencial tal como PCR cuantitativa, debería usarse preferiblemente un valor de referencia corregido. En los presentes experimentos, se usaron los valores normalizados dCt comparado con un gen constitutivo (18S).

30 La Figura 9 ilustra algunas combinaciones de genes de ambos tipos. Los puntos blancos representan genes representativos de una respuesta inmune adaptativa mientras los puntos negros representan genes representativos de una respuesta inmunosupresora. Las líneas entre los genes de ambos tipos representan correlaciones significativas de las combinaciones de genes. Las líneas gruesas son las más significativas. Un gen que comprende muchas líneas de conexión es más universal que un gen que comprende solo unas pocas líneas o una única línea. Por ejemplo, el gen CD3G representativo de una respuesta inmune adaptativa está ligado con líneas gruesas a cinco genes diferentes representativos de una respuesta inmunosupresora. Por lo tanto, el gen CD3G es un gen representativo de una respuesta inmune adaptativa bastante universal. Por otro lado, PDCD1 está ligado con numerosas líneas gruesas a diferentes genes representativos de una respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto, el gen PDCD1 es un gen representativo de una respuesta inmunosupresora bastante universal.

40 La Figura 10 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer colorrectal en estadio I/III. Los pacientes de una pareja de subconjuntos (QUIMIO) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (NO = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (3 pacientes)

45 Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (11 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (24 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (58 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no -"Hi-Hi".

5 - Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

10 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

15 Los valores de referencia absolutos son bastante específicos de un método dado para evaluar el nivel de expresión de un gen. Para propósitos de comparación, por supuesto, deberían usarse preferiblemente las mismas unidades. Cuando la técnica usada para determinar niveles de expresión de genes implica un fenómeno exponencial tal como PCR cuantitativa, debería usarse preferiblemente un valor de referencia corregido. En los presentes experimentos, se usaron los valores normalizados dCt comparado con un gen constitutivo (18S).

20 La Figura 11 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer colorrectal en estadio II/III. Los pacientes de una pareja de subconjuntos (QUIMIO) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (NO = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (15 pacientes)

25 Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (20 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (11 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (28 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

30 - Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no -"Hi-Hi".

- Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

35 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

40 Los valores de referencia absolutos son bastante específicos de un método dado para evaluar el nivel de expresión de un gen. Para propósitos de comparación, por supuesto, deberían usarse preferiblemente las mismas unidades. Cuando la técnica usada para determinar niveles de expresión de genes implica un fenómeno exponencial tal como PCR cuantitativa, debería usarse preferiblemente un valor de referencia corregido. En los presentes experimentos,

45 se usaron los valores normalizados dCt comparado con un gen constitutivo (18S).

La Figura 12 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer colorrectal en estadio II/III. Los pacientes de una pareja de subconjuntos (QUIMIO) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (NO = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (14 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (22 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (12 pacientes)

5 Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (26 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

10 - Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

En el grupo de pacientes HiHi, la relación de riesgo para SSE entre pacientes no tratados y tratados es 6.36 ($p < 0.05$) y la relación de riesgo para SG entre pacientes no tratados y tratados es 4.81 ($p < 0.05$).

15 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

20

Los valores de referencia absolutos son bastante específicos de un método dado para evaluar el nivel de expresión de un gen. Para propósitos de comparación, por supuesto, deberían usarse preferiblemente las mismas unidades. Cuando la técnica usada para determinar niveles de expresión de genes implica un fenómeno exponencial tal como PCR cuantitativa, debería usarse preferiblemente un valor de referencia corregido. En los presentes experimentos, se usaron los valores normalizados dCt comparado con un gen constitutivo (18S).

25

La Figura 13 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer colorrectal en estadio I/III. Los pacientes de una pareja de subconjuntos (QUIMIO) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (NO = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

30 Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (3 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (12 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (24 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (57 pacientes)

35 El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

40 - Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

45 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

Los valores de referencia absolutos son bastante específicos de un método dado para evaluar el nivel de expresión de un gen. Para propósitos de comparación, por supuesto, deberían usarse preferiblemente las mismas unidades. Cuando la técnica usada para determinar niveles de expresión de genes implica un fenómeno exponencial tal como PCR cuantitativa, debería usarse preferiblemente un valor de referencia corregido. En los presentes experimentos, se usaron los valores normalizados dCt comparado con un gen constitutivo (18S).

La Figura 14 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano (I/II). Los pacientes de una pareja de subconjuntos (ACT) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (OBS = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (7 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (4 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (43 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (36 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

- Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen un mal pronóstico comparado con "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, el grupo que consiste en pacientes HiHi tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) tienen una mejor supervivencia que los pacientes HiHi no tratados.

De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

La Figura 15 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano (I/II). Los pacientes de una pareja de subconjuntos (ACT) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (OBS = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (3 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (4 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (46 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (37 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

- Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es

favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

La Figura 16 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano (I/II). Los pacientes de una pareja de subconjuntos (ACT) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (OBS = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (11 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (7 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (39 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (33 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

- Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen un mal pronóstico comparado con "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) tienen una mejor supervivencia que los pacientes HiHi no tratados.

De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

La Figura 17 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano (I/II). Los pacientes de una pareja de subconjuntos (ACT) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (OBS = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (39 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (33 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (11 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (7 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

- Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

La Figura 18 representa una curva de Kaplan Meier para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano (I/II). Los pacientes de una pareja de subconjuntos (ACT) se sometieron a quimioterapias y los pacientes de una segunda pareja de subconjuntos (OBS = sin quimioterapia) no se trataron. Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

5 Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" tratados (9 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" no tratados (7 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" tratados (41 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" no tratados (33 pacientes)

10 El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

15 - Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen un mal pronóstico comparado con "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) tienen una mejor supervivencia que los pacientes HiHi no tratados.

20 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

25 La Figura 19 representa una curva de Kaplan Meier para SG para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer de ovario avanzado. Los pacientes se sometieron a quimioterapias y se categorizaron cuatro subconjuntos de pacientes. Los pacientes con respuesta completa (RC) y sin respuesta completa (IR). Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" RC (15 pacientes)

Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" IR (8 pacientes)

30 Línea discontinua: pacientes "otros" RC (3 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" IR (2 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

- Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

35 - Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

40 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

45 La Figura 20 representa una curva de Kaplan Meier para SG para cuatro subconjuntos de pacientes con cáncer de ovario avanzado. Los pacientes se sometieron a quimioterapias y se categorizaron cuatro subconjuntos de

pacientes. Los pacientes con respuesta completa (RC) y sin respuesta completa (IR). Cada pareja comprende un subconjunto de pacientes "Hi-Hi" y la otra pareja está constituida por los otros tres grupos de pacientes (Otros).

Leyenda de las curvas:

Línea sólida: pacientes "Hi-Hi" RC (16 pacientes)

5 Línea de puntos: pacientes "Hi-Hi" IR (7 pacientes)

Línea discontinua: pacientes "otros" RC (2 pacientes)

Línea constituida por una alternancia de puntos y líneas: pacientes "otros" IR (3 pacientes)

El análisis de las curvas muestra que:

10 - Las curvas de pacientes "otros" tratados o no tratados son similares. Por lo tanto, el tratamiento antitumoral no proporcionó un efecto beneficioso significativo para los pacientes que pertenecían al grupo de pacientes no "Hi-Hi".

- Las curvas de pacientes "HiHi" tratados o no tratados son diferentes. Los pacientes HiHi no tratados tienen una supervivencia similar que los "Otros" tratados o no tratados. Por el contrario, los pacientes HiHi tratados tienen una supervivencia prolongada. La supervivencia se aumenta considerablemente en el grupo que consiste en pacientes "Hi-Hi" tratados (respondedores al tratamiento antitumoral) en comparación con cualquier otro grupo de pacientes.

15 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

20 La Figura 21 representa una tabla de contingencia del ensayo exacto de Fisher de pacientes con melanoma en estadio tardío (III-IV). Todos los pacientes se sometieron a quimioterapia. Se representan cuatro grupos, dos subconjuntos de pacientes con respuesta completa (RC) y los otros dos subconjuntos sin respuesta completa (PR, SD, PD). Los pacientes HiHi tienen una alta expresión de ambos genes comparado con todos los otros pacientes ("Otros"). Se ilustran ejemplos representativos de pacientes HiHi tales como: REN/CCL5, CTLA4/CCL5, VEGFA/CD3E, CD276/CD8A, CTLA4/CD8A, PDCD1/STAT1, PDCD1/CXCL10, VEGFA/CXCL10, CD274/CXCL11, CTLA4/CXCL9. El ensayo de Fisher significativo ilustra el hecho de que los pacientes con combinaciones de genes HiHi frente a Otros tienen un resultado de la enfermedad diferente y una respuesta diferente al tratamiento. Los pacientes con HiHi tienen una frecuencia incrementada de respuesta completa al tratamiento.

30 De acuerdo con esto, la comparación de los niveles de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de uno o varios genes representativos de la respuesta inmunosupresora humana con valores de referencia predeterminados es un criterio fiable para determinar si un paciente podría ser tratado con éxito frente al cáncer o no, en el sentido de que el equilibrio riesgo-beneficio es favorable para el paciente. Esto ilustra el valor de estratificar a los pacientes con dicha combinación de genes para predecir su respuesta al tratamiento.

35 The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive and mechanistic signatures, Galon J*, Angell HK, Bedognetti D, y Marincola F, Immunity. 2013 julio 39(1), 11-26 muestra adicionalmente una buena asociación entre los resultados obtenidos por los métodos de la presente invención y el resultado favorable de la enfermedad.

REFERENCIAS.

40 A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para evaluar la capacidad de respuesta de un paciente que padece un cáncer sólido a tratamiento antitumoral que comprende las etapas de:

5 i) determinar en una muestra tumoral obtenida de un paciente un nivel de expresión de al menos un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa humana y un nivel de expresión de al menos un gen representativo de la respuesta inmunosupresora humana,

10 ii) comparar la expresión de dicho al menos un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa humana y dicho al menos un gen representativo de la respuesta inmunosupresora humana determinada en la etapa i) con valores de referencia predeterminados seleccionados, de manera que dichos valores de referencia predeterminados separan un panel de pacientes con un cáncer en dos agrupaciones según el nivel de expresión de dichos genes y la supervivencia de pacientes según los análisis de las curvas de Kaplan Meier y valores p según rango logarítmico asociados;

15 iii) concluir si el paciente tiene una respuesta inmune adaptativa buena, cuando el nivel es mayor que el valor de referencia predeterminado, o mala, cuando el nivel es menor que el valor de referencia predeterminado y una buena o mala respuesta inmunosupresora

iv) determinar si el paciente recibirá ventajosamente un tratamiento antitumoral a la vista de dichas respuestas inmune adaptativa e inmunosupresora buenas o malas

en donde el al menos un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa humana se selecciona del grupo que consiste en

CCL5
CCR2
CD247
CD3E
CD3G
CD8A
CX3CL1
CXCL11
GZMA
GZMB
GZMH
GZMK
IFNG
IL15
IRF1
ITGAE
PRF1
STAT1
TBX21

20 y dicho al menos un gen representativo de la respuesta inmunosupresora humana se selecciona del grupo que consiste en

CD274
CTLA4
IHH
IL17A
PDCD1
PF4
PROM1
REN
TSLP
VEGFA

25 2. El método según la reivindicación 1, en donde, en la etapa i), se usan un único gen representativo de la respuesta inmune adaptativa y un único gen representativo de la respuesta inmunosupresora.

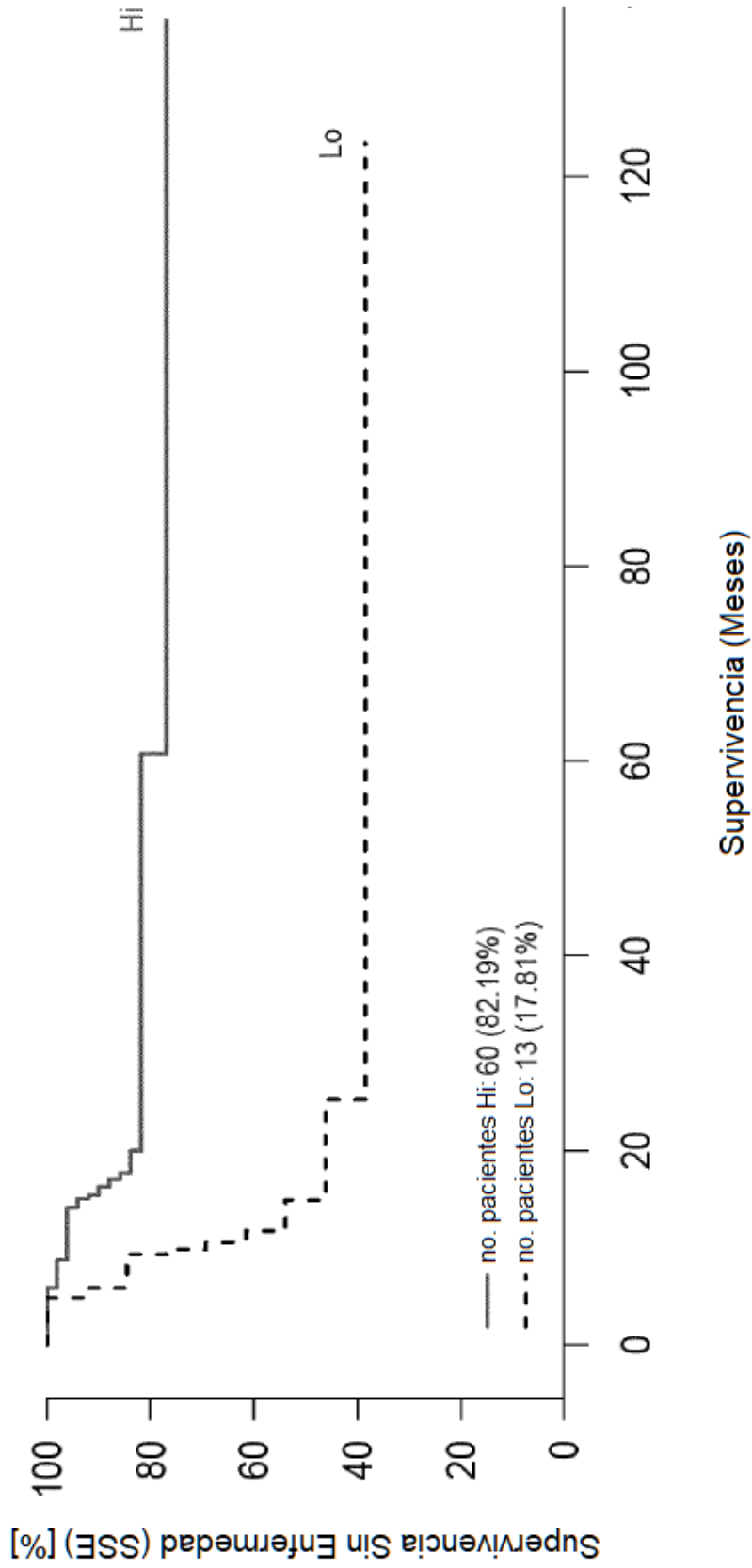
ES 2 702 722 T3

3. El método según una de las reivindicaciones 1 o 2, en donde una pareja de gen representativo de la respuesta inmune adaptativa humana y de gen representativo de la respuesta inmunosupresora humana se selecciona del grupo que consiste en:

CCL5 - REN
CCR2 - IL17A
CCR2 - REN
CD247 - IL17A
CD247 - REN
CD3E - REN
CD3G - IL17A
CD3G - REN
CD8A - IL17A
CD8A - REN
CX3CL1 - CTLA4
CX3CL1 - IHH
GZMA - PF4
GZMA - PROM1
GZMA - REN
GZMA - TSLP
GZMA - VEGF
GZMB - REN
GZMH - IL17A
GZMH - REN
GZMK - REN
IFNG - IL17A
IL15 - CD274
IL15 - CTLA4
IL15 - IHH
IL15 - TSLP
IL15 - VEGFA
IRF1 - REN
ITGAE - IL17A
ITGAE - REN
PRF1 - REN
STAT1 - REN
TBX21 - REN
GZMK - PDCD1
CD247 - CD274
PRF1 - PDCD1
CCR2 - PF4
CD247 - PDCD1
CD3E - PDCD1
CCR2 - CD274
CCR2 - PDCD1
CCL5 - PDCD1
CD3G - PDCD1
CD8A - PDCD1
TBX21 - PDCD1
CD3G - IHH
CD3G - PF4
CD3G - PROM1
GZMB - PDCD1
GZMH - PDCD1
STAT1 - PDCD1
STAT1 - PF4
CD247 - PF4
CD247 - CTLA4
CD3G - CTLA4
CD8A - CTLA4
PRF1 - CTLA4
CCL5 - CTLA4
TBX21 - CTLA4

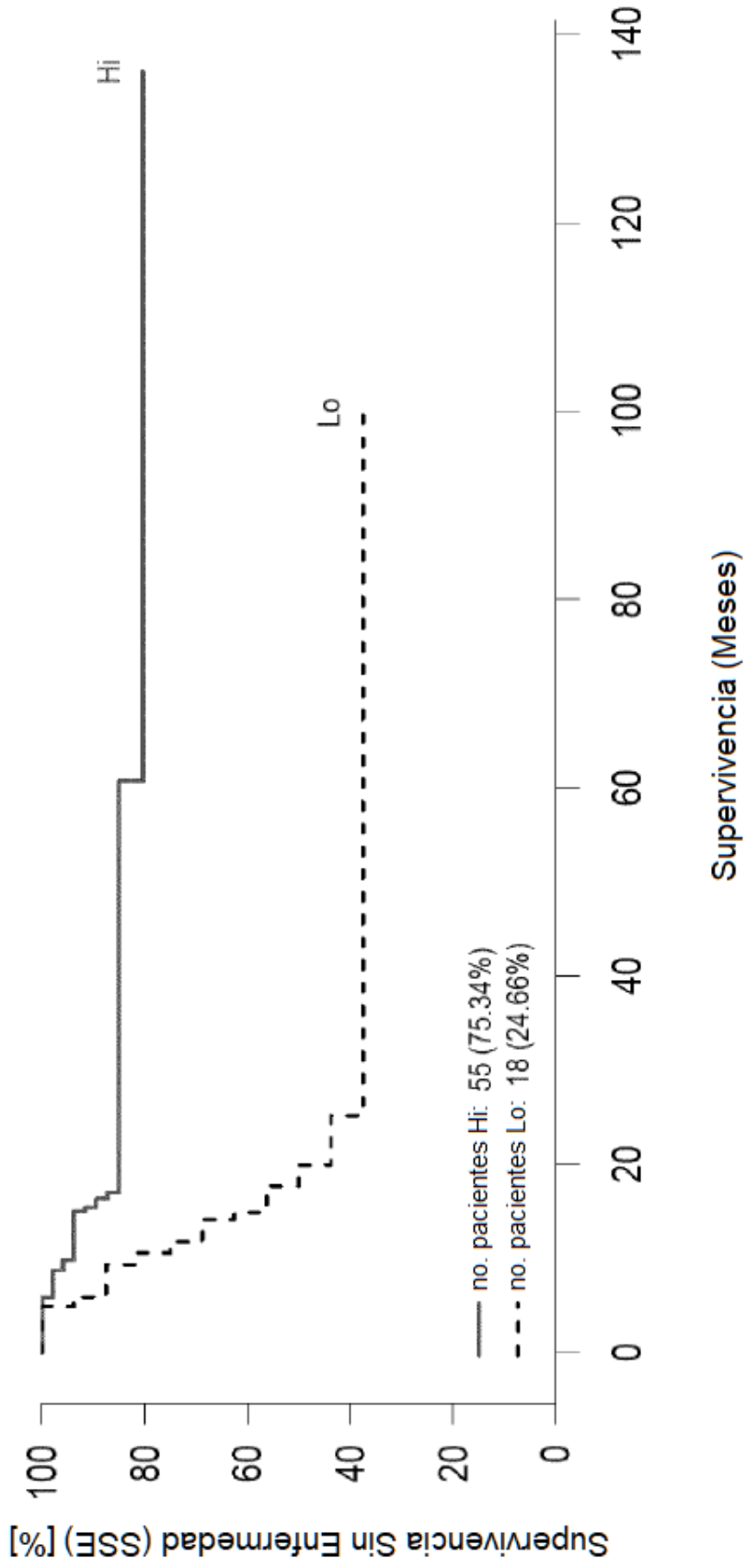
STAT1 - IHH
CD247 - IHH
CD247 - PROM1
PRF1 - PF4
CD3G - TSLP
CCR2 - IHH
CCR2 - CTLA4
IFNG - CD274
GZMB - CTLA4
IFNG - PDCD1
CXCL11 - IL17A
CXCL11 - REN

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho gen de la respuesta inmunosupresora humana es CD274.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho cáncer sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer cortical adrenal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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 la cavidad nasal y seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer vaginal, cáncer vulvar, y cáncer uterino.
6. El método según la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es un cáncer colorrectal.
7. El método según la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es un cáncer de pulmón.
8. El método según la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es un cáncer de ovario.
9. El método según la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es un cáncer de piel, siendo dicho cáncer de piel melanoma.
10. Uso de un kit para implementar la etapa de determinación de un nivel de expresión de al menos un gen representativo de la respuesta inmune adaptativa humana y el nivel de expresión de al menos un gen representativo de la respuesta inmunosupresora humana del método de una de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho kit comprende medios para medir específicamente los niveles de expresión de dicho al menos un gen de la respuesta inmune adaptativa y de dicho al menos un gen de la respuesta inmunosupresora.
11. El uso de un kit según la reivindicación 10, en donde dichos medios consisten en sondas, cebadores y anticuerpos específicos para dicho al menos un gen de la respuesta inmune adaptativa y de dicho al menos un gen de la respuesta inmunosupresora.
12. Un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico o un agente radioterapéutico para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer que se considera como respondedor al tratamiento antitumoral según el método de una de las reivindicaciones 1 a 9.



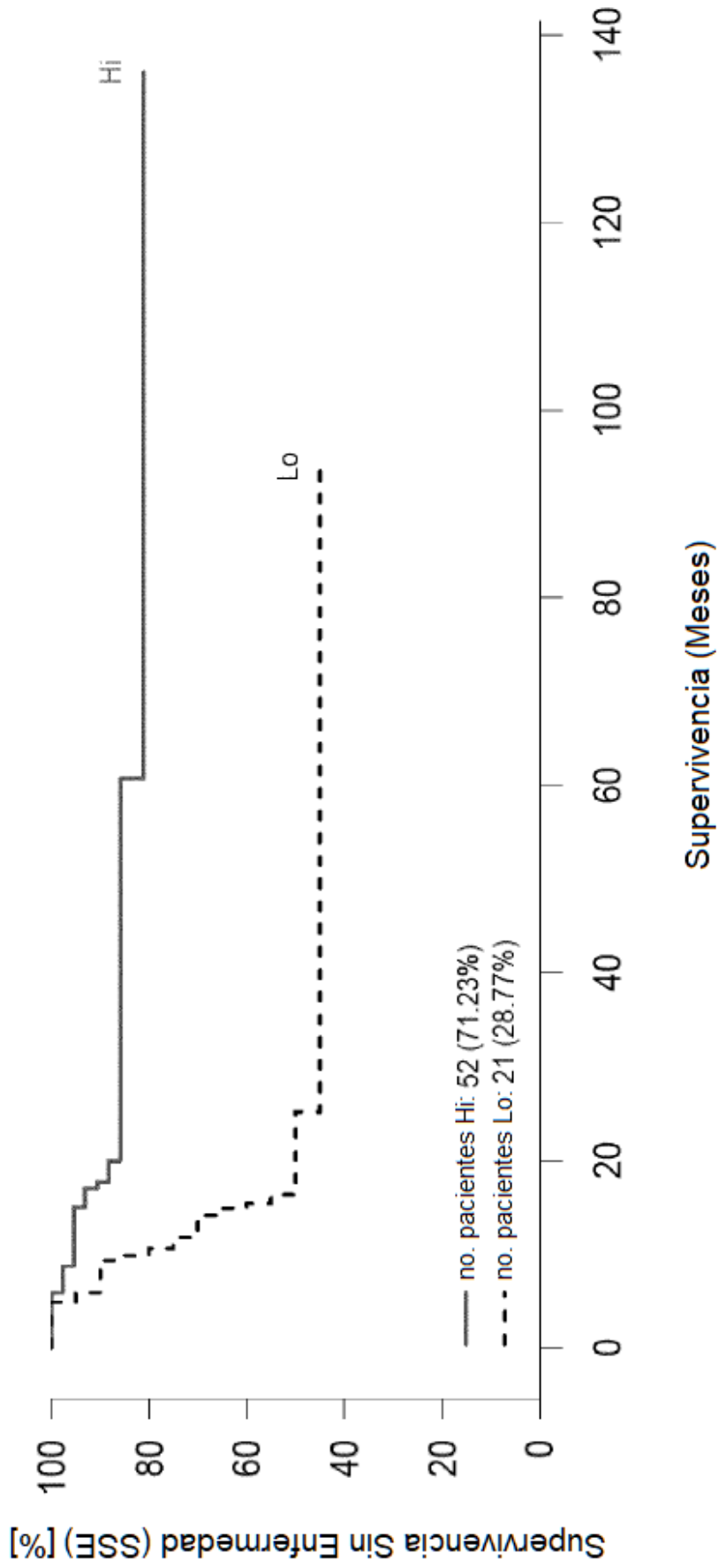
CD3G

Fig. 1



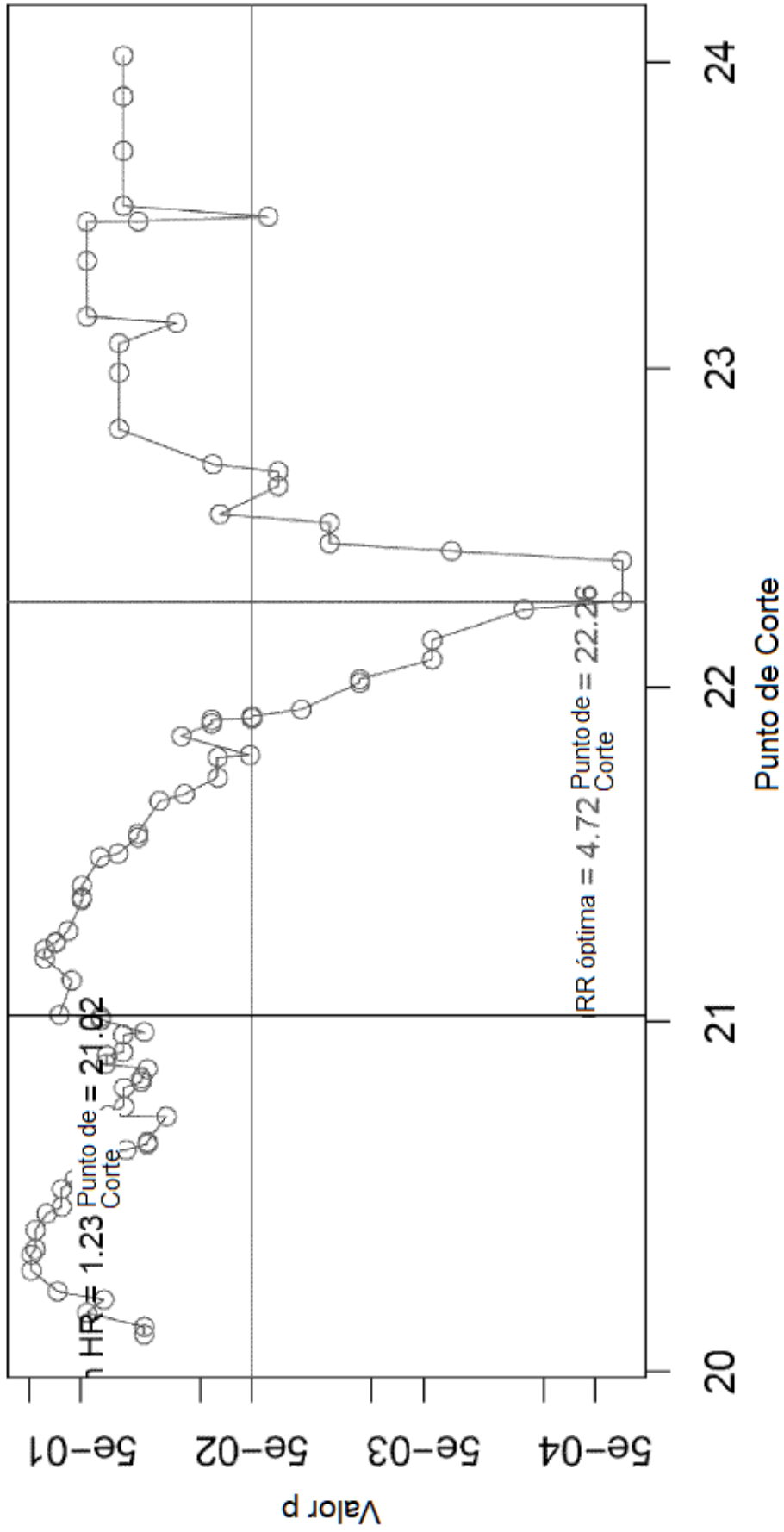
GZMH

Fig. 2



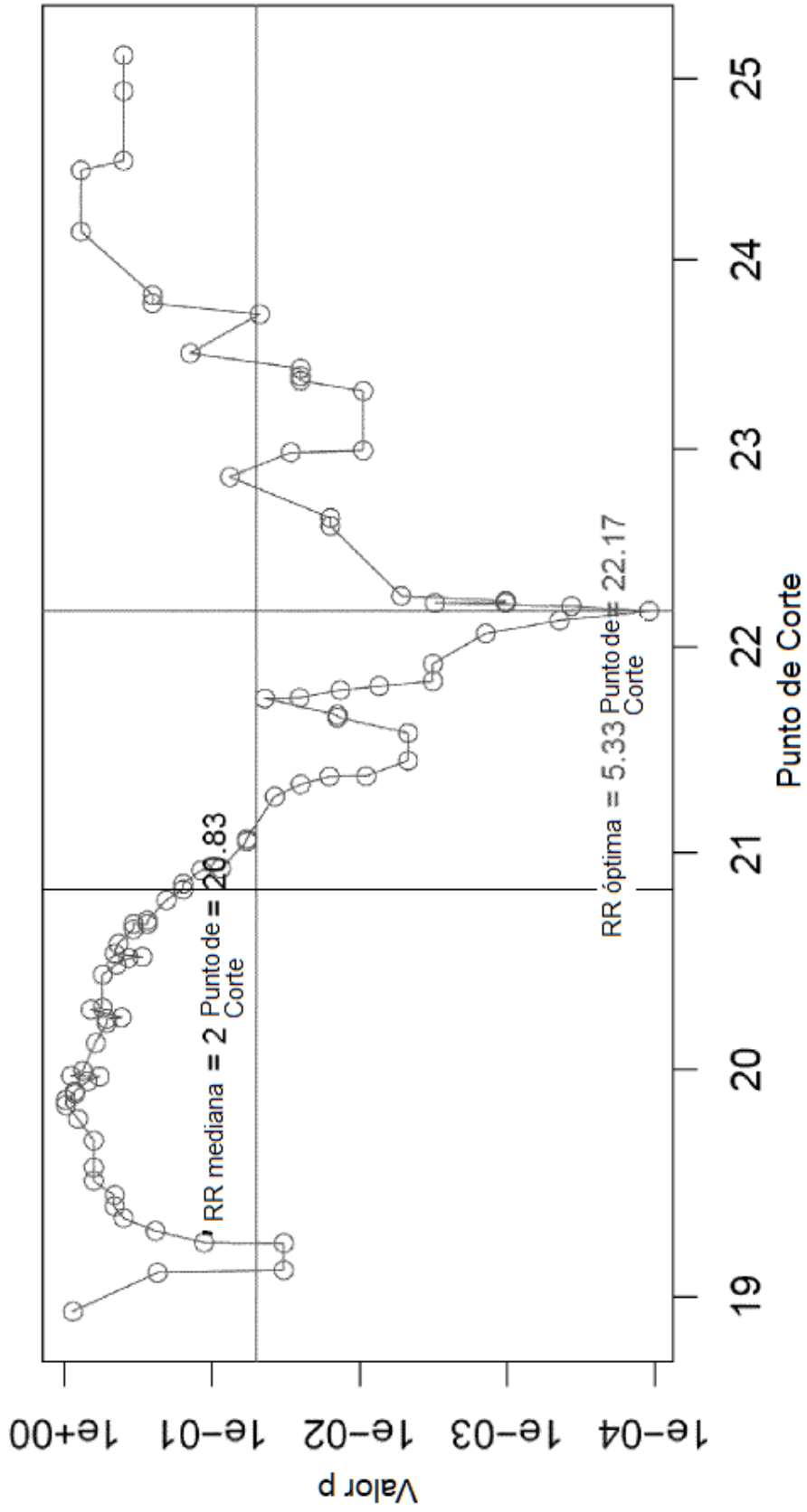
ITGAE

Fig. 3



CD3G

Fig. 4



GZMH

Fig. 5

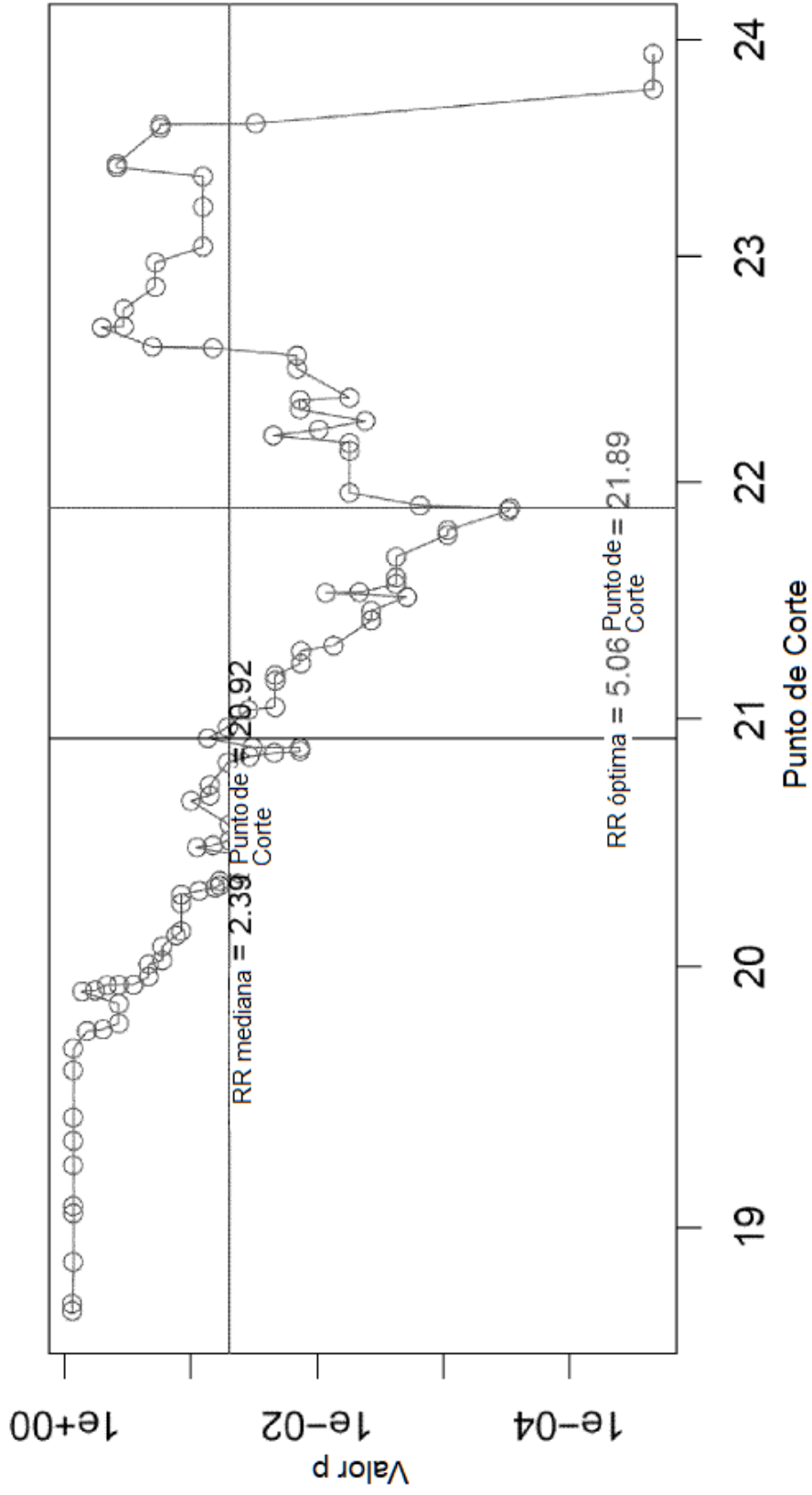


Fig. 6

ITGAE

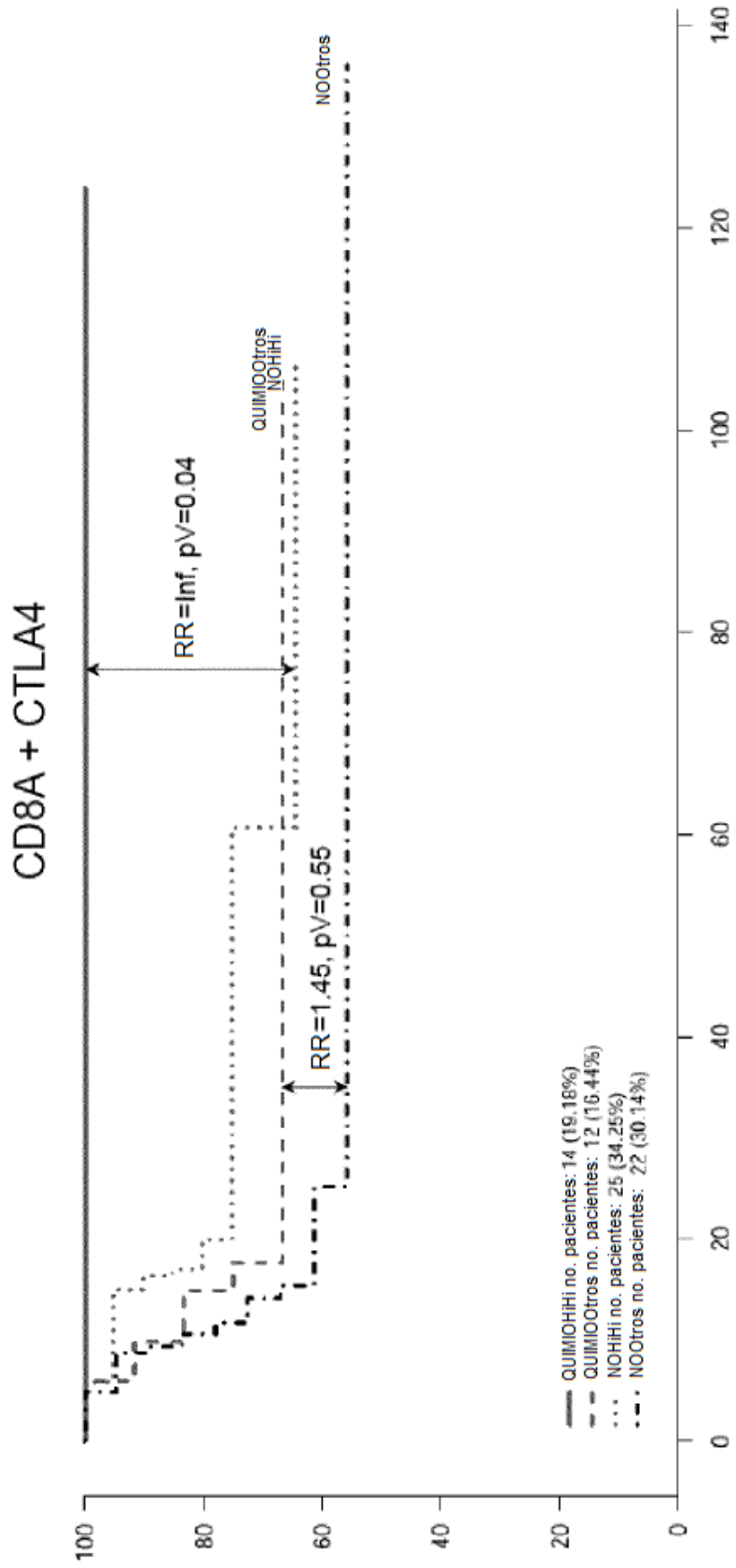


Fig. 7

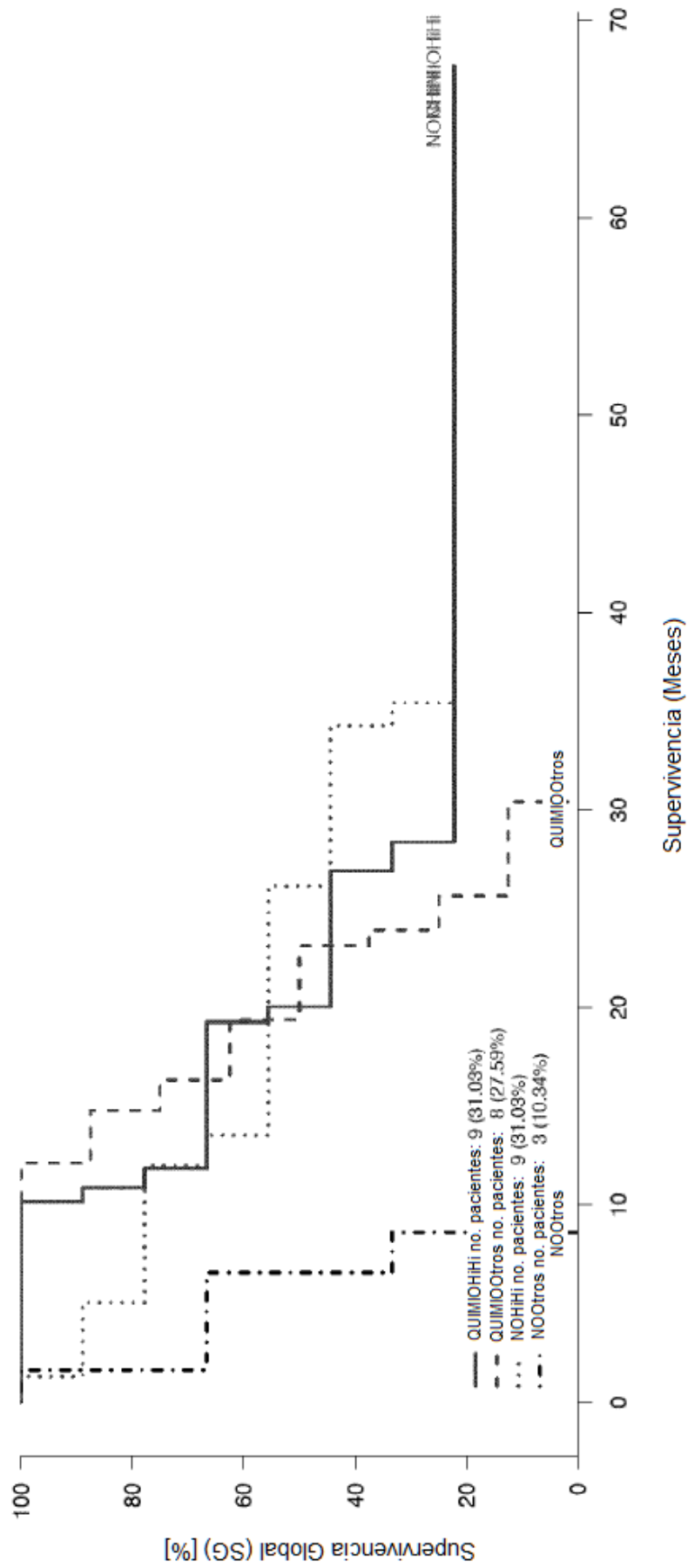


Fig. 8

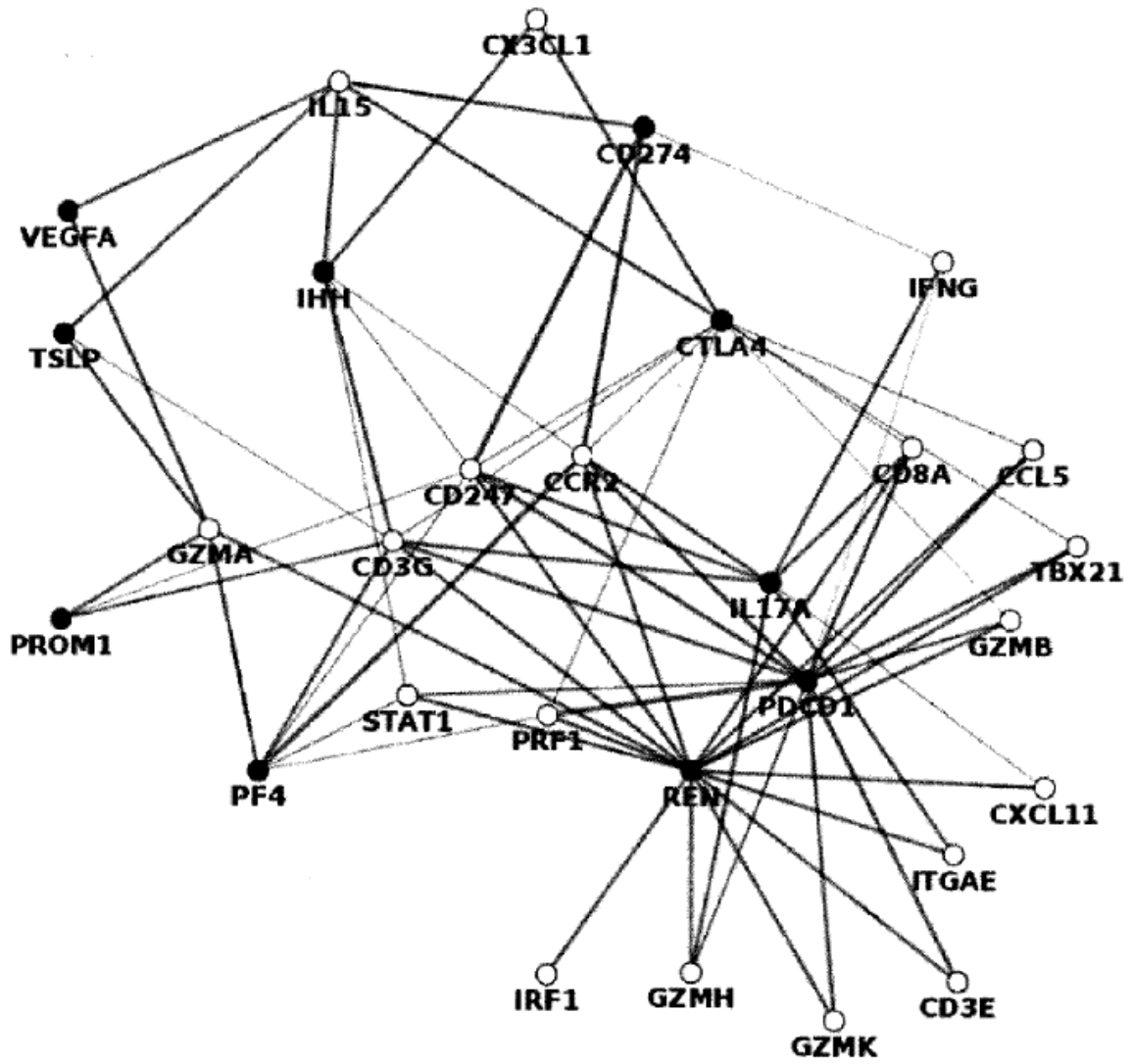


Fig. 9

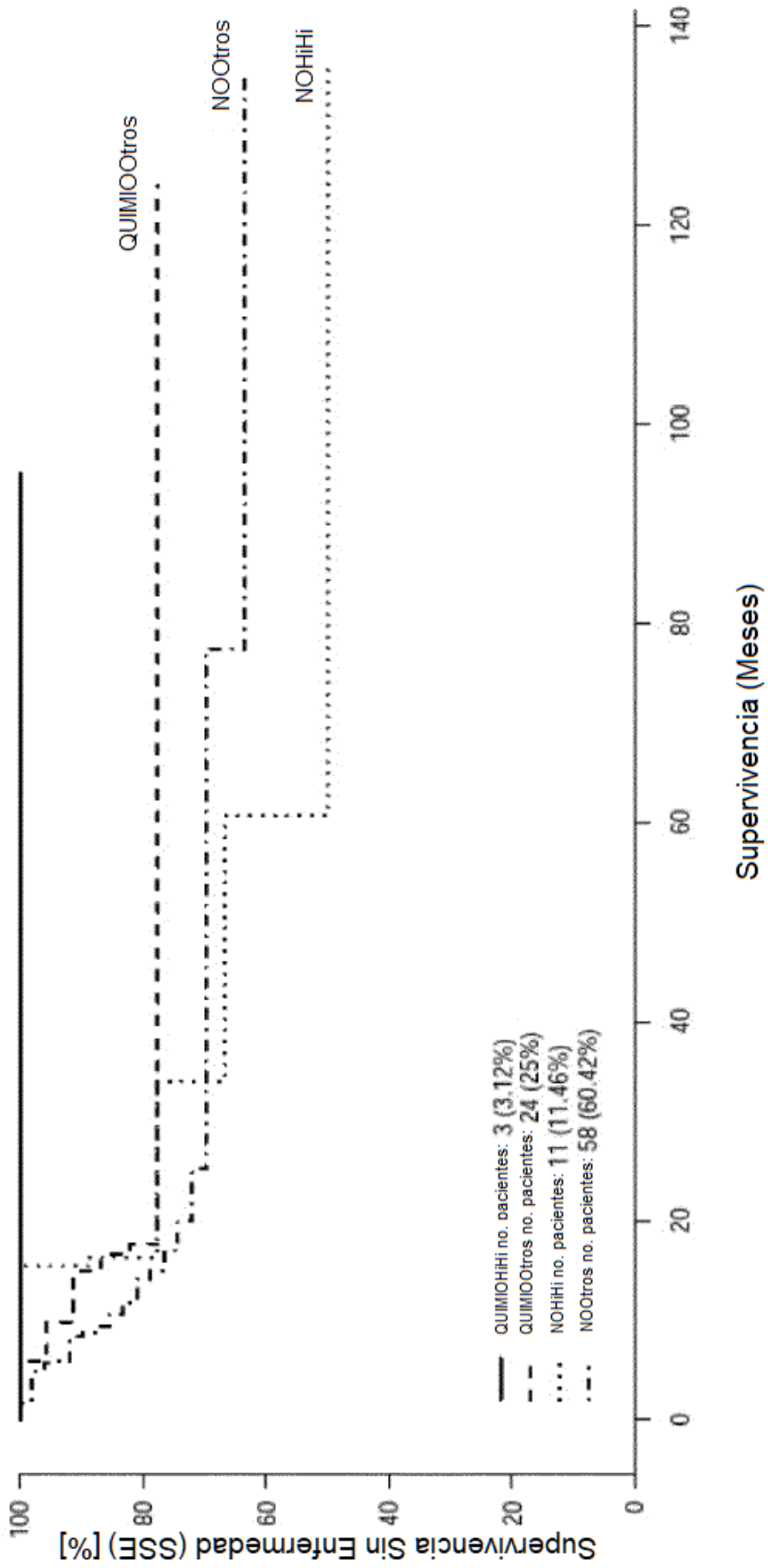


Fig. 10

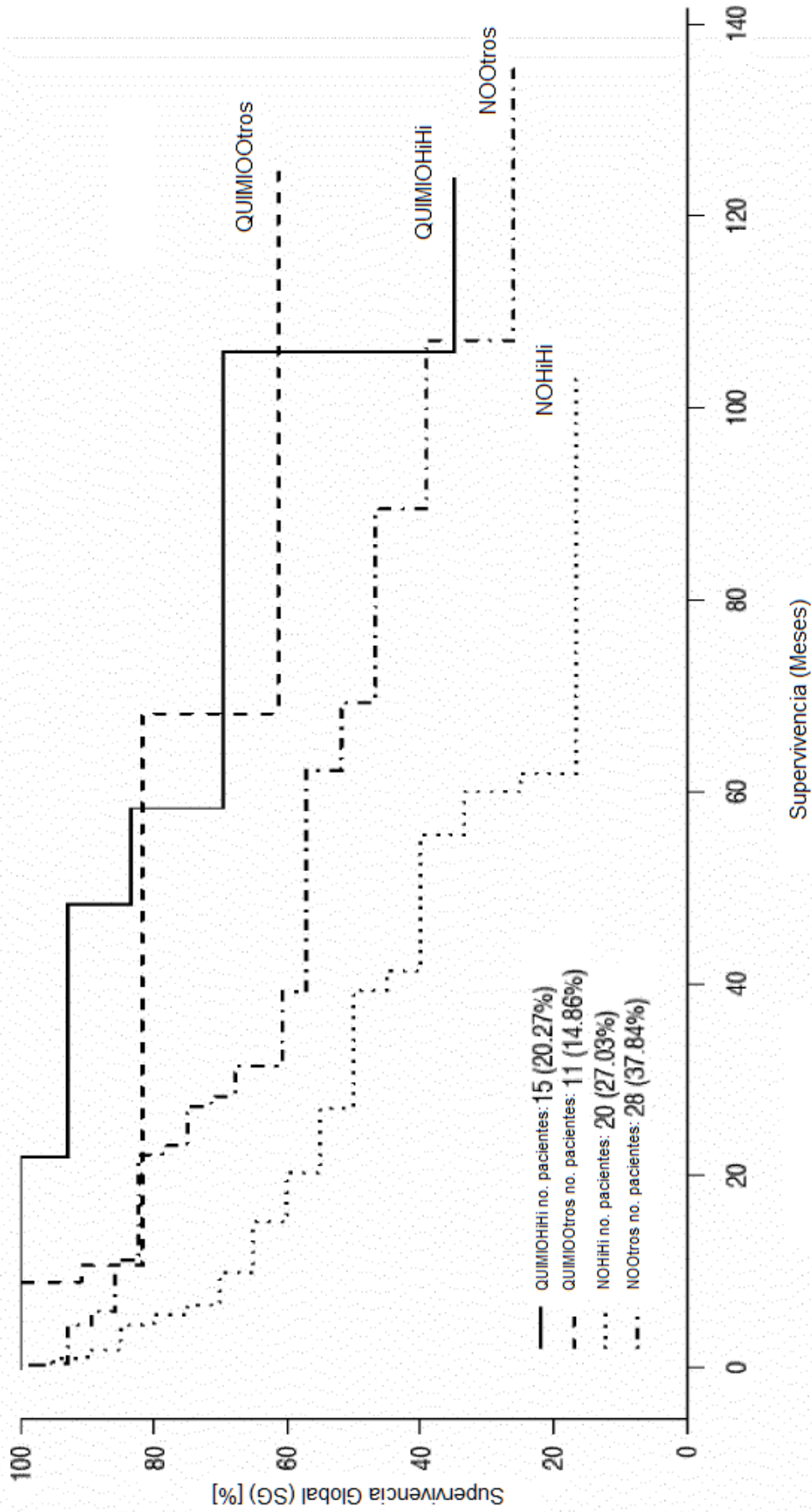


Fig. 11

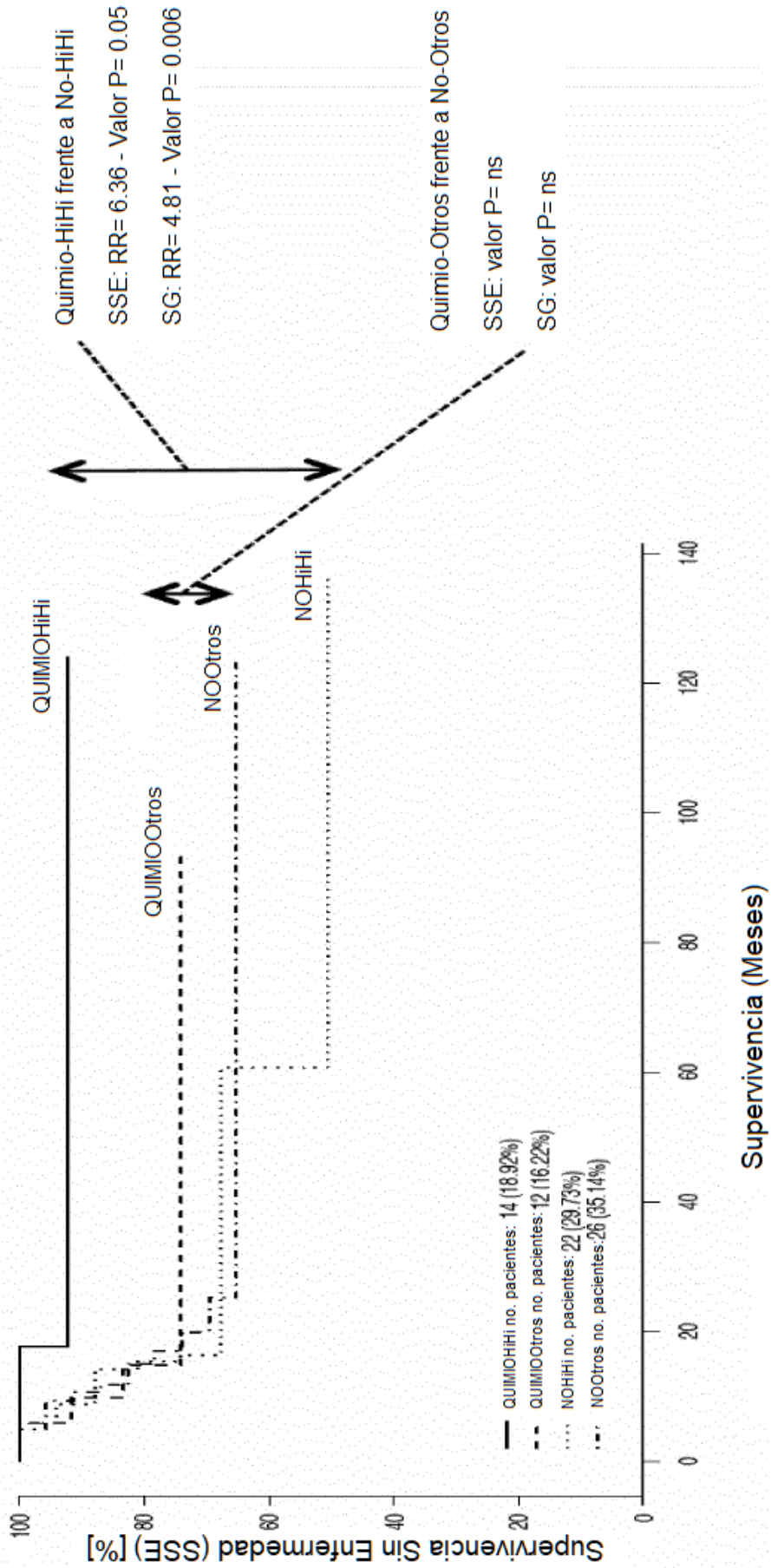


Fig. 12

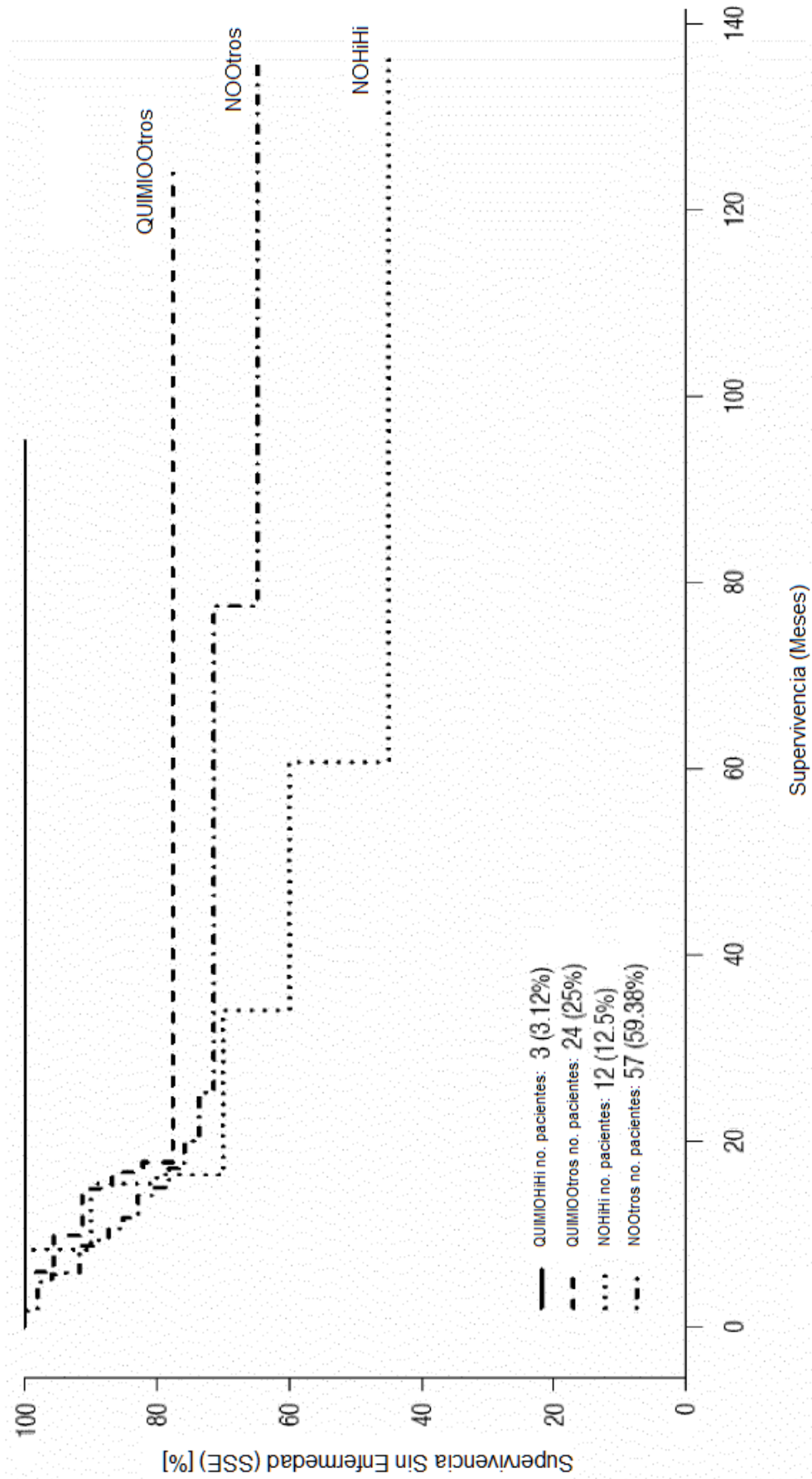


Fig. 13

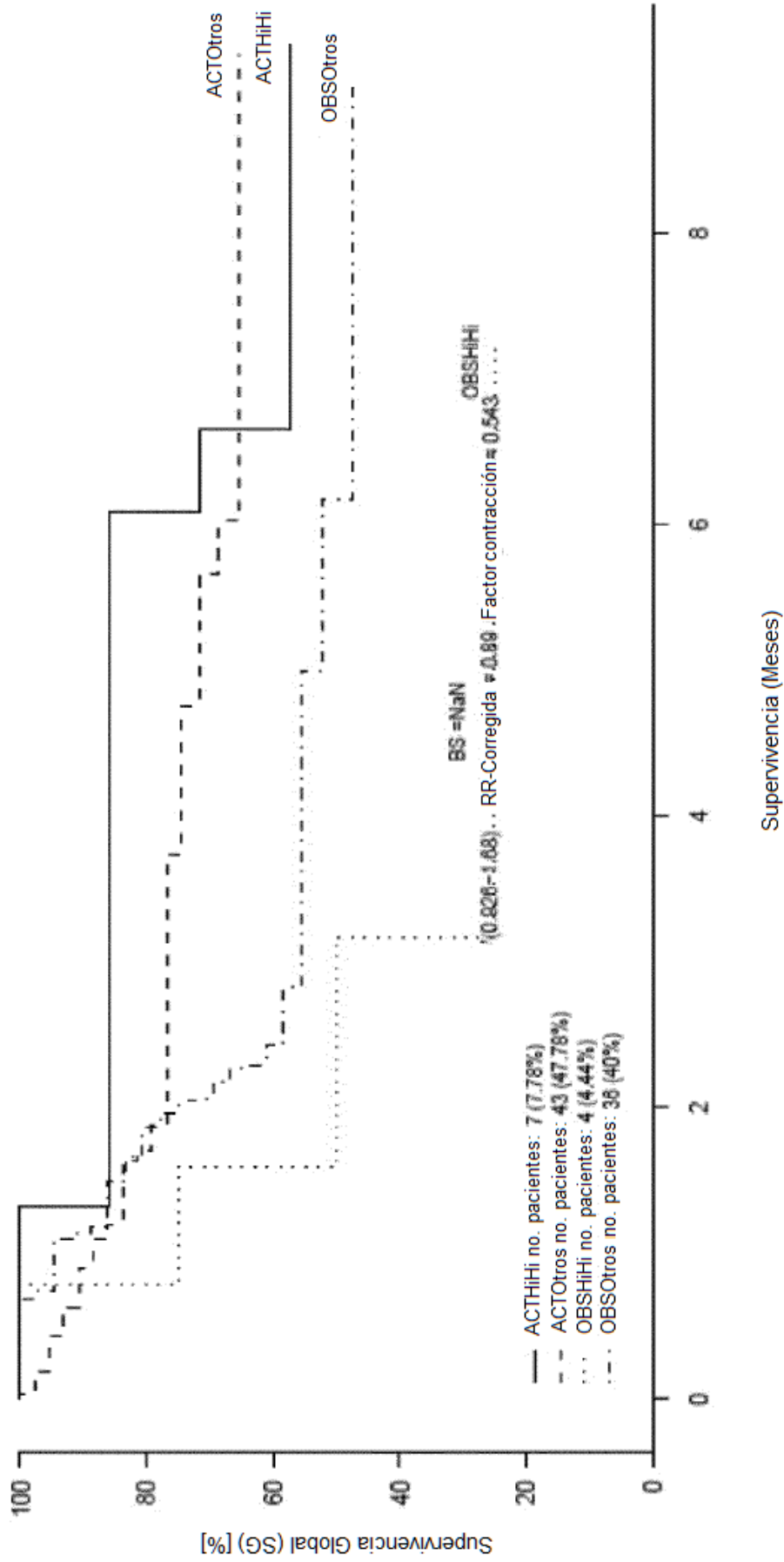


Fig. 14

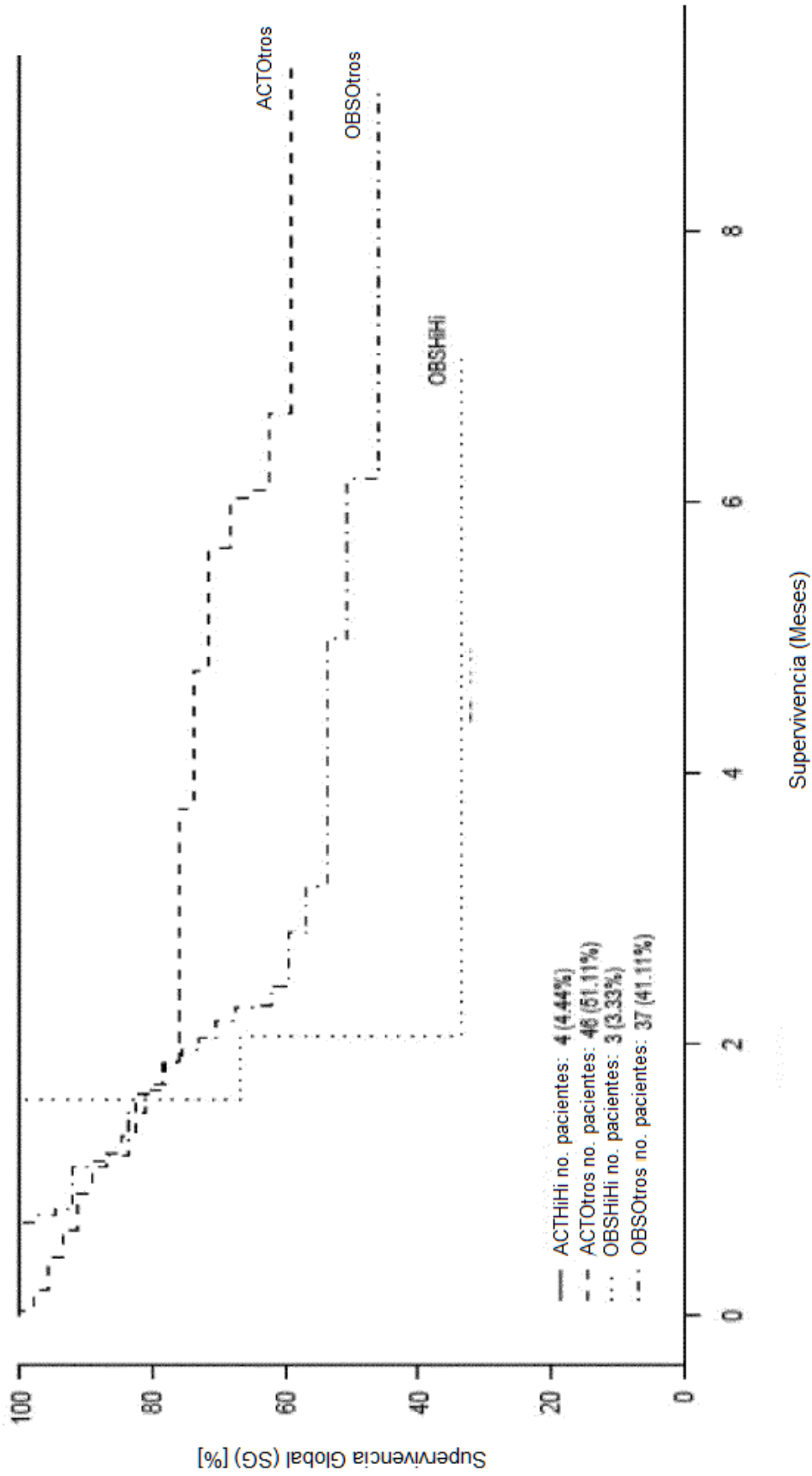


Fig. 15

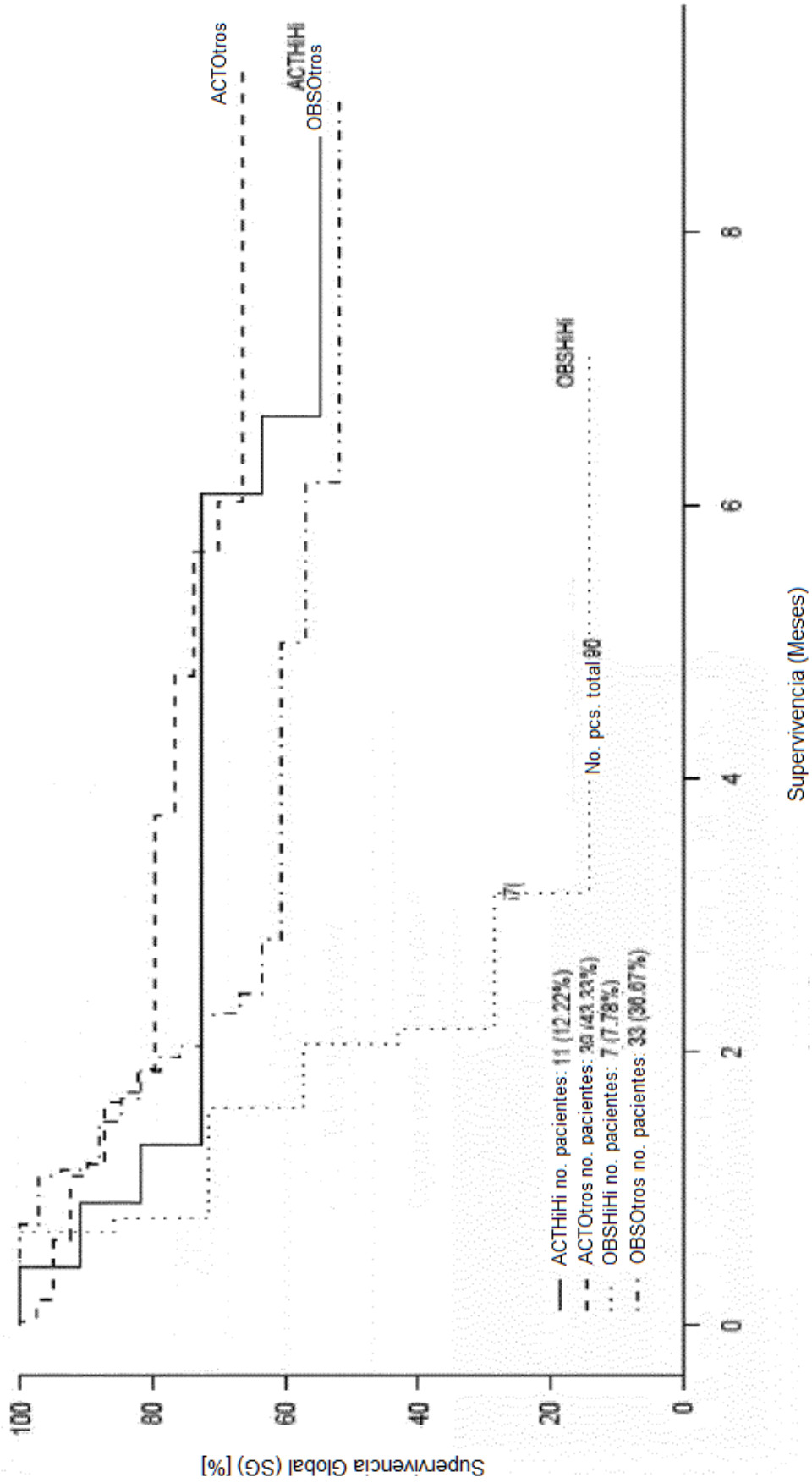


Fig. 16

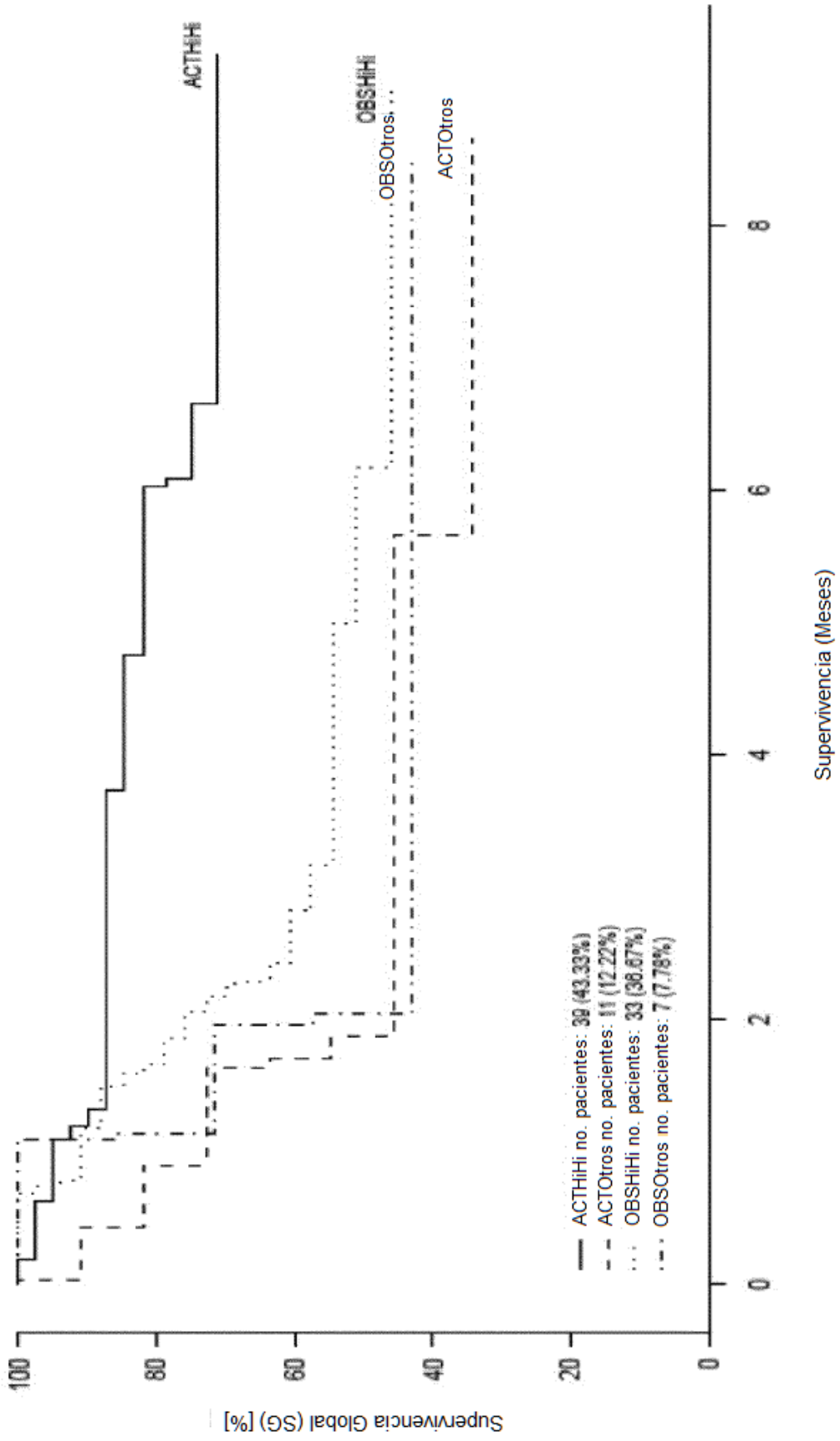


Fig. 17

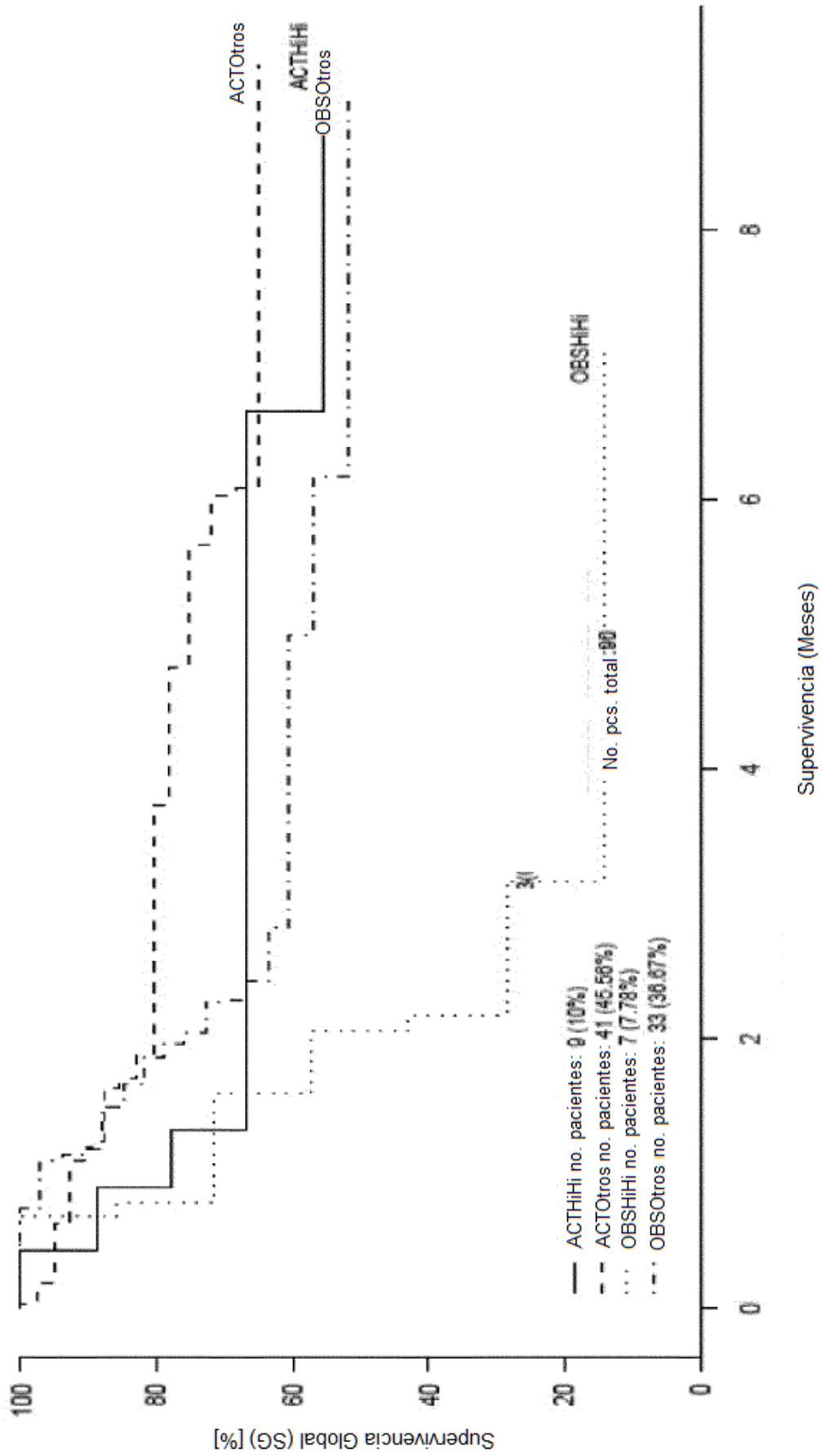


Fig. 18

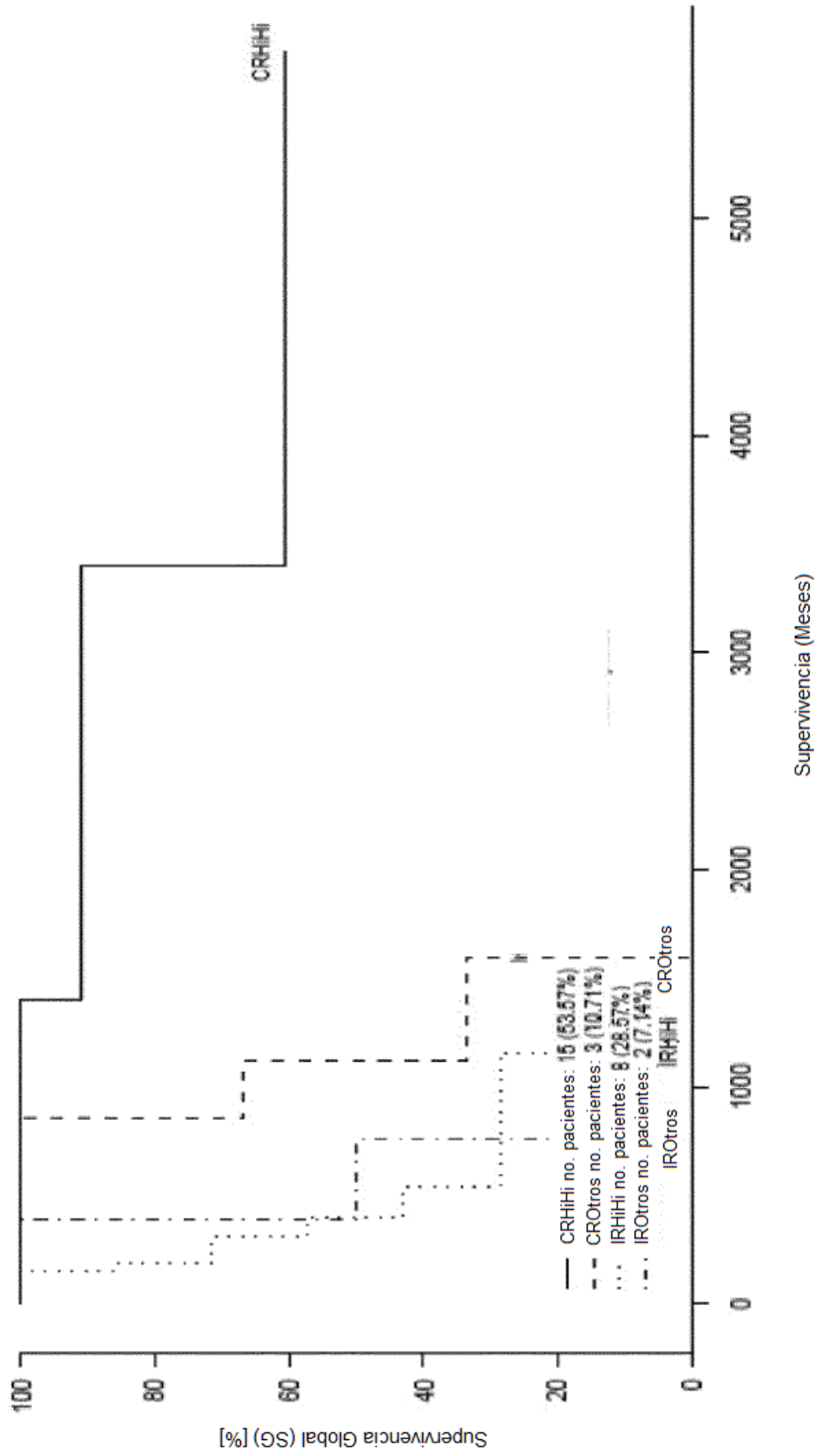


Fig. 19

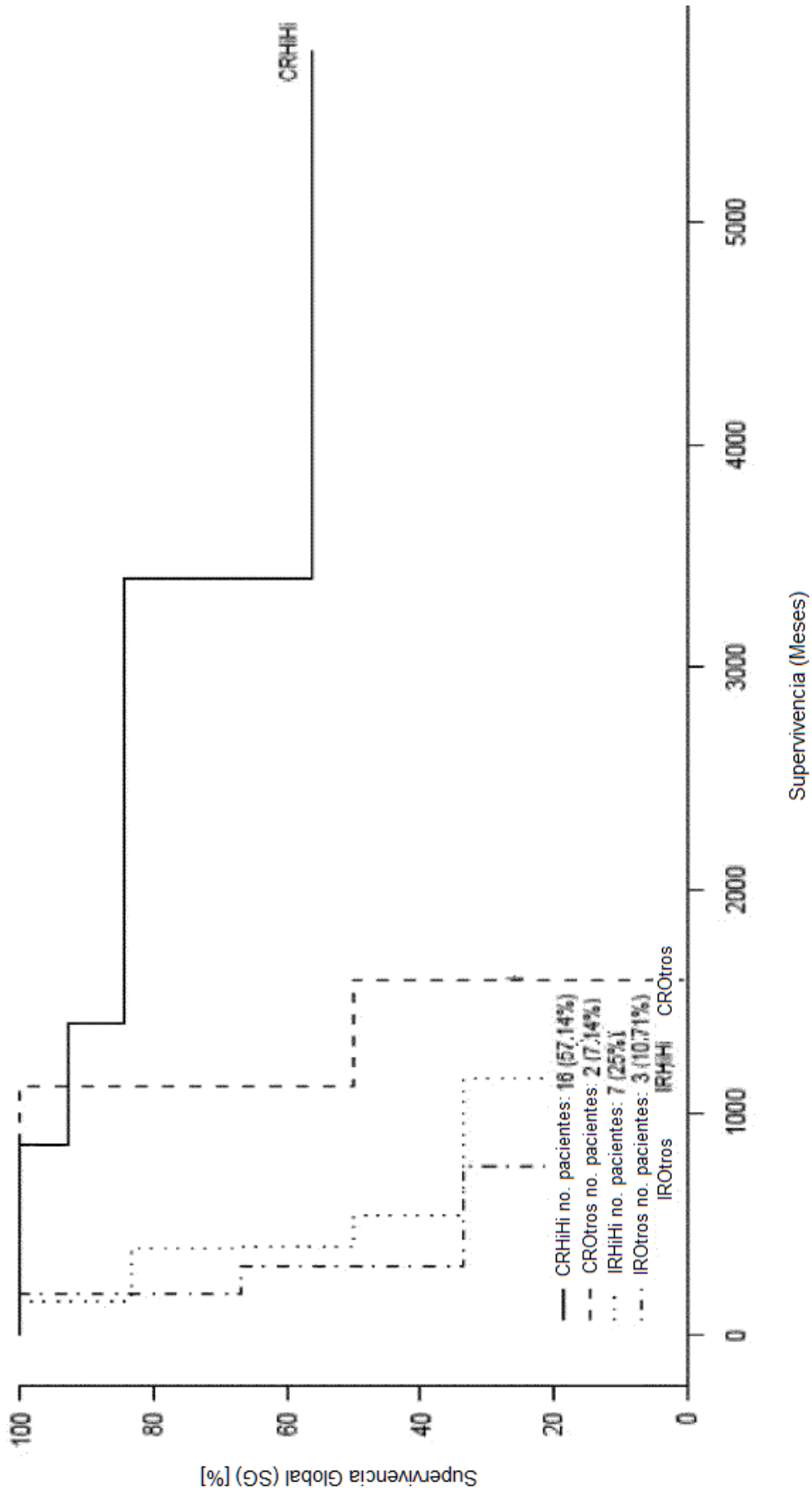


Fig. 20

ES 2 702 722 T3

REN-206367-a.corte16RC-20.6-.SG-CCL5-1405-i-a.corte16RC-1341.1-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	7	3	Valor <i>P</i> del ensayo exacto de Fisher= 0.0057**
Otros	9	33	Valor $P\chi^2= 0.0091^{**}$

CTLA4-234895-a.corte16RC-16.6-.SG-CCL5-1405-i-a.corte16RC-1341.1-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	8	4	Valor <i>P</i> del ensayo exacto de Fisher= 0.0041***
Otros	8	32	Valor $P\chi^2= 0.0066^{**}$

VEGFA-211527-x-a.corte16RC-416-.SG-CD3E-205456-a.corte16RC-262.1-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	8	7	Valor <i>P</i> del ensayo exacto de Fisher= 0.0445*
Otros	8	29	Valor $P\chi^2= 0.0557$

CD276-1559583-a.corte16RC-190.5-.SG-CD8A-205758-a.corte16RC-373.2-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	7	4	Valor <i>P</i> del ensayo exacto de Fisher= 0.0227*
Otros	9	32	Valor $P\chi^2= 0.0219^*$

CTLA4-234895-a.corte16RC-16.6-.SG-CD8A-205758-a.corte16RC-373.2-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	8	4	Valor <i>P</i> del ensayo exacto de Fisher= 0.0041***
Otros	8	32	Valor $P\chi^2= 0.0066^{**}$

Fig. 21a

ES 2 702 722 T3

PDCD1-207634-a.corte16RC-66-.SG-STAT1-209969-s-a.corte16RC-2576.4-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	6	2	Valor P del ensayo exacto de Fisher= 0.0073**
Otros	10	34	Valor $P \chi^2 = 0.0114^*$

PDCD1-207634-a.corte16RC-66-.SG-CXCL10-204533-a.corte16RC-2974.8-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	7	3	Valor P del ensayo exacto de Fisher= 0.0057**
Otros	9	33	Valor $P \chi^2 = 0.0091^{**}$

VEGFA-210513--s-a.corte16RC-574.4-.SG-CXCL10-204533-a.corte16RC-2974.8-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	8	4	Valor P del ensayo exacto de Fisher= 0.0041***
Otros	8	34	Valor $P \chi^2 = 0.0066^{**}$

CD274-227458-a.corte16RC-272.6-.SG-CXCL11-210163-a.corte16RC-212.2-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	5	1	Valor P del ensayo exacto de Fisher= 0.0081**
Otros	11	35	Valor $P \chi^2 = 0.0126^*$

CTLA4-234895-a.corte16RC-16.6-.SG-CXCL9-203915-a.corte16RC-3106.5-.SG.fusionado

GRUPOS:

	RC	RP-EE-EP	
HiHi	9	3	Valor P del ensayo exacto de Fisher= 4e-04***
Otros	7	33	Valor $P \chi^2 = 6e-04^{***}$

Fig. 21b