

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 384**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2015 PCT/GB2015/053571**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16083791**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2015 E 15804189 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3224624**

54 Título: **Puntuación de la infiltración linfocitaria de los tumores**

30 Prioridad:

24.11.2014 GB 201420859

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

11.11.2019

73 Titular/es:

**THE INSTITUTE OF CANCER RESEARCH: ROYAL
CANCER HOSPITAL (100.0%)
123 Old Brompton Road
London SW7 3RP, GB**

72 Inventor/es:

YUAN, YINYIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 730 384 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

Puntuación de la infiltración linfocitaria de los tumores

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al análisis de tumores y al pronóstico del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos de análisis de tumores para determinar un pronóstico en cáncer.

10 **Antecedentes**

El cáncer es una enfermedad compleja y dinámica y se han desarrollado muchas formas diferentes de analizar y clasificar los tumores con el objetivo de determinar el grado de progresión o capacidad de invasión del tumor y el pronóstico para el paciente, e informar sobre las decisiones de tratamiento.

15 Los procedimientos de análisis de tumores incluyen la evaluación de la morfología celular en tumores (realizada normalmente por anatomopatólogos), medición de la expresión génica en tumores (por ejemplo, mediante análisis de micromatrices), determinación del estado de mutación génica en células tumorales y evaluación de la expresión de proteínas dentro de tumores (por ejemplo, mediante evaluación inmunohistoquímica de secciones de tumores). Estos procedimientos de análisis de tumores son importantes no solo para predecir el resultado clínico, sino también para indicar las decisiones sobre la terapia del paciente.

Más recientemente, se ha hecho evidente que el estado inmunológico de los tumores puede proporcionar información pronóstica útil. Cada vez hay más evidencia que apoya la importancia clínica de la respuesta inmunitaria en muchos tipos de cáncer (Galon et al. 2006, Denkert et al. 2010, Loi et al.). Estudios consistentes han indicado asociaciones entre la actividad inmune y el resultado de la enfermedad, así como la respuesta al tratamiento (Galon et al. 2006, Denkert et al. 2010, Loi et al., Liu et al., Lee et al., DeNardo et al.).

Además, la evidencia creciente de los ensayos clínicos apoya el potencial de las terapias que apuntan a la actividad inmunológica en ciertos tipos de cáncer (Robert et al., Stagg et al.). Este es quizás el mejor ejemplo de ello en el melanoma en estadio tardío, en el que los ensayos clínicos recientes han demostrado una mayor ventaja de supervivencia en pacientes que reciben el anticuerpo monoclonal ipilimumab, que está dirigido al receptor de la proteína CTLA4 que se expresa en la superficie de los linfocitos T (Robert et al.). Esto ha conducido al desarrollo de procedimientos más estandarizados para caracterizar el infiltrado inmune de tumores en cánceres como la "evaluación inmunitaria" que pretende cuantificar el infiltrado inmune *in situ* además de los parámetros clínicos estandarizados para ayudar al pronóstico y la selección de pacientes para inmunoterapia en cánceres colorrectales (Galon et al. 2014).

Sin embargo, para facilitar la estandarización y la reproducibilidad de la puntuación inmunitaria de la infiltración, se necesitan con urgencia enfoques objetivos (Galon et al. 2014). Además, estos enfoques deben tener en cuenta la complejidad de la infiltración inmunitaria en los tumores. La abundancia, la heterogeneidad espacial y el tipo de células inmunitarias son los parámetros clave de la infiltración inmunitaria (Galon et al. 2014, Fridman et al.). Por ejemplo, se ha demostrado que las ubicaciones espaciales de las células inmunitarias son útiles para predecir el pronóstico del cáncer colorrectal (Galon et al. 2006). De hecho, la "puntuación inmunitaria" patológica se basa en la numeración de dos poblaciones de linfocitos (células CD8+ y CD45RO+), tanto en el núcleo del tumor como en el margen invasivo que maximiza la potencia pronóstica (Galon et al. 2014).

Asimismo, se ha demostrado en estudios a gran escala de cáncer de mama que la evaluación patológica de los linfocitos de infiltración tumoral basados en biopsias con aguja gruesa teñidas con hematoxilina y eosina (H y E) es un factor pronóstico importante para la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en 1.058 muestras de cáncer de mama (Denkert et al., 2010). Recientemente, un estudio prospectivo demostró que en el cáncer de mama negativo para HER2, los linfocitos estromales pueden ser un factor predictivo independiente de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (Issa-Nummer et al.). Por lo tanto, la organización espacial de la infiltración linfocitaria en el contexto de las células cancerosas cercanas es una importante característica clínico-patológica de los tumores.

55 Galon et al. 2014 se refiere a una metodología llamada "puntuación inmunitaria" para cuantificar el infiltrado de células inmunes *in situ*. 2013 se refiere a procedimientos de análisis de imágenes digitales para integrar la abundancia celular, métrica de distancia, relaciones de vecindad y heterogeneidad de la muestra en la evaluación integral de los infiltrados inmunes.

60 En el cáncer de mama triple negativo (TNBC), una respuesta inmunitaria activa se ha asociado a un pronóstico favorable (Loi et al., Denkert et al.). Un estudio de inmunohistoquímica a gran escala de 3.400 muestras de cáncer de mama ha demostrado que el TNBC es el único subtipo de cáncer de mama que demuestra una relación significativa entre las células inmunitarias positivas para CD8 y un buen pronóstico (Liu et al.). La evaluación de la infiltración linfocitaria basada en secciones de H y E de todo el tumor se ha asociado a un resultado favorable en 256 pacientes después de la quimioterapia basada en antraciclina (Loi et al.). Un estudio prospectivo reciente mostró que la presencia de linfocitos infiltrantes de tumores en tumores residuales después de la quimioterapia neoadyuvante predice un buen

pronóstico en TNBC (Dieci et al.). Dada la actual falta de tratamiento molecular dirigido y el mal resultado clínico de TNBC, esto puede sugerir nuevas oportunidades terapéuticas para este tipo de tumor agresivo (Stagg et al.). Por ejemplo, la acumulación de datos sugiere que las antraciclinas median su acción a través de la activación de las respuestas de los linfocitos T CD8+, por lo tanto, la combinación con ciertas inmunoterapias podría ser especialmente efectiva para el TNBC (Stagg et al.).

Sin embargo, a pesar de estos avances en la comprensión de la importancia de la infiltración inmunitaria en el cáncer, hay una falta de enfoques reproducibles para evaluar objetivamente la infiltración inmunitaria basada en secciones patológicas.

Sumario de la invención

La infiltración linfocitaria en los tumores a menudo se asocia a un pronóstico favorable y predice la respuesta a la quimioterapia en muchos tipos de cáncer. Sin embargo, no se comprende bien porque los altos niveles de heterogeneidad espacial y molecular dentro de los tumores dificultan el análisis mediante la evaluación patológica tradicional.

La identificación de los tipos de células por los anatomopatólogos en la evaluación de la infiltración inmunitaria proporciona información cualitativa en escalas ordinales gruesas. Dicha información no es adecuada para analizar grandes colecciones de datos, en parte porque la gran cantidad de aportes humanos requeridos hace que los estudios a gran escala requieran mucho tiempo y dinero, en parte porque la naturaleza subjetiva de la evaluación causa un grado inaceptable de variabilidad en la información y en parte porque los datos cualitativos generados no se prestan para el análisis estadístico.

El inventor ha ideado un procedimiento robusto y reproducible para evaluar objetivamente la infiltración inmunitaria en tumores. El procedimiento se realiza en una imagen tumoral en la que se han identificado linfocitos y células cancerosas.

El procedimiento puede realizarse en imágenes de cortes de tumores teñidos con hematoxilina y eosina (H y E). Las secciones teñidas con H y E y las imágenes de secciones teñidas con H y E, a menudo están fácilmente disponibles como parte de los conjuntos de datos recopilados para grupos de estudio de cáncer, tal como el grupo METABRIC (Curtis, 2012) y el grupo Cancer Genome Atlas (TCGA) (TCGA, 2012), lo que hace que los procedimientos de la presente invención sean fácilmente adaptables para su uso para analizar tumores de diversos tipos de cáncer. El procedimiento puede comprender una etapa de tratar una sección de tumor con una tinción, tal como H y E, en el que la presencia de estructuras subcelulares, tales como los núcleos, crea complejos entre la tinción y la estructura subcelular.

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir la infiltración inmunitaria en un tumor. En particular, un procedimiento para determinar una medición objetiva de la infiltración inmunitaria en un tumor, referido en el presente documento como RLIT. La RLIT (relación de linfocitos intratumorales) es la proporción de linfocitos intratumorales a células cancerosas en el tumor expresada como una fracción decimal. Por ejemplo, una relación de 11 linfocitos intratumorales a 1000 células cancerosas corresponde a una RLIT de 0,011.

El procedimiento de la invención en su sentido general es un procedimiento implementado por ordenador *ex vivo* para medir la infiltración inmunitaria en un tumor, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar una imagen del tumor en el que se han identificado linfocitos y células cancerosas; obtener una medición de linfocitos respecto al cáncer para cada linfocito, que comprende aplicar una estimación de la densidad para obtener un modelo de la densidad de células cancerosas; y determinar la proximidad de cada linfocito a la densidad de células cancerosas; clasificar una subpoblación de los linfocitos como linfocitos intratumorales según su relación linfocito a cáncer, en el que un linfocito se clasifica como linfocito intratumoral si su medición de linfocito a cáncer supera un valor umbral; cuantificar los linfocitos intratumorales y las células cancerosas en la imagen del tumor; y calcular la relación de linfocitos intratumorales (RLIT) como la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas, en el que la RLIT es una medida de la infiltración inmunitaria en el tumor.

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar un valor de corte para la RLIT para su uso en la determinación de un pronóstico en cáncer, en el que una RLIT por debajo del valor de corte indica un mal pronóstico. El procedimiento comprende determinar la RLIT para una pluralidad de tumores, en el que cada tumor es de un paciente con cáncer respectivo en una cohorte de pacientes con cáncer y seleccionar un valor de corte para la RLIT en el que los pacientes con una RLIT más baja que el valor de corte tienen un peor pronóstico en comparación con los pacientes con una RLIT igual a o más alta que el valor de corte.

En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona un procedimiento para determinar un valor de corte de la RLIT para un tipo o subtipo de cáncer, para su uso en proporcionar un pronóstico en un paciente con cáncer que tiene ese tipo de cáncer, comprendiendo el procedimiento:

medir la infiltración inmunitaria en un tumor de cada miembro de una cohorte de pacientes con cáncer que tienen el tipo o subtipo de cáncer de acuerdo con los procedimientos de la invención, calculando así la RLIT para cada tumor;

5 relacionar la RLIT para cada tumor con el resultado clínico de cada paciente con cáncer en la cohorte de pacientes con cáncer; y seleccionar un valor de corte para la RLIT, en el que una RLIT igual o inferior al valor de corte se asocia a un resultado clínico significativamente peor en la cohorte de pacientes con cáncer que una RLIT por encima del valor de corte

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para proporcionar un pronóstico en cáncer. En particular, un procedimiento para utilizar la RLIT como biomarcador pronóstico para un paciente con cáncer. El procedimiento puede comprender medir la RLIT de un tumor de un paciente con cáncer y usar la RLIT para determinar un pronóstico para el paciente. El procedimiento puede comprender determinar la RLIT en un tumor de un paciente con cáncer y usar la RLIT para determinar un pronóstico para el paciente, en el que una RLIT por debajo de un valor de corte predeterminado indica un mal pronóstico.

En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona un procedimiento para proporcionar un pronóstico en un paciente con cáncer, comprendiendo el procedimiento:

20 medir la infiltración inmunitaria en un tumor del paciente con cáncer de acuerdo con los procedimientos de la invención, calculando de este modo la RLIT para el tumor, en el que una RLIT por debajo de un valor de corte predeterminado de RLIT indica un mal pronóstico.

25 La presente invención proporciona además un antagonista de CTLA4, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que el paciente de cáncer tiene cáncer de mama triple negativo, en el que, en el procedimiento, el régimen terapéutico comprende la administración de un antagonista de CTLA4, y en el que el paciente con cáncer se trata de acuerdo con el régimen terapéutico si la RLIT determinada de acuerdo con la reivindicación 1 está por encima de un valor de corte predeterminado.

30 **Sumario de las figuras**

Figura 1. Heterogeneidad intratumoral de las células cancerosas y las distribuciones de linfocitos.

35 **A.** Paisajes en 3D que ilustran la heterogeneidad espacial de las células cancerosas y los linfocitos en una sección de tumores de mama de H y E. La altura de las colinas en el paisaje 3D representa la densidad de las células. **B.** El análisis combinado de la distribución espacial del cáncer y los linfocitos puede conducir a la cuantificación de la infiltración linfocitaria. Se muestra una pequeña imagen de H y E y el mapa 3D de densidad de cáncer correspondiente, que facilitan la medición de la proximidad espacial al cáncer para cada linfocito en la imagen.

Figura 2. Cuantificación de la heterogeneidad intratumoral de la infiltración linfocitaria.

40 **A.** Representación esquemática de la cartera computacional ilustrada con una pequeña región de una sección de H y E de cáncer de mama: Imagen de H y E; células clasificadas utilizando análisis automatizado de imágenes; un mapa de la densidad del cáncer basado en el resultado del análisis de imagen para cuantificar las relaciones espaciales inmunes al cáncer. **B.** El descubrimiento de tres categorías de linfocitos con agrupamiento no supervisado basado en las proximidades espaciales de los linfocitos al cáncer en una subpoblación de muestras de TNBC. Estos datos se utilizaron para predecir las categorías de todos los linfocitos en todas las muestras de TNBC. **C.** El número óptimo de agrupaciones K como lo sugiere BIC a lo largo de 200 muestreos aleatorios es 3 en el 97 % del tiempo y 5 (3 %). Las curvas BIC para el muestreo 200 se muestran a la izquierda y el diagrama de cajas muestra las medias de los grupos para $K = 3$ soluciones en 200 muestreos a la derecha. **D.** Ilustración de la distancia a la d_{min} de la célula cancerosa más cercana y de la distancia al centroide de la región del casco convexo formada por 10 células cancerosas cercanas $d_{centroid}$. **E.** Gráficos de cajas para mostrar las diferencias entre las clases de linfocitos en términos de d_{min} y $d_{centroid}$ (valores de p por prueba de t). **F.** Gráfico de dispersión que muestra d_{min} y $d_{centroid}$ para 1.000 linfocitos seleccionados al azar, coloreado basado en las tres clases; elipses discontinuas que muestran tres grupos ajustados a d_{min} y $d_{centroid}$.

Figura 3. Un ejemplo representativo que ilustra tres clases de linfocitos en el mapa de densidad de cáncer de un tumor (sección media).

55 **A.** Mapa de densidad del cáncer y la distribución espacial de tres clases de linfocitos (puntos espaciales coloreados según las clases). Las líneas de contorno negras indican umbrales de corte para las tres clases de linfocitos según la densidad del cáncer. **B.** Histograma que muestra los tres tipos de linfocitos en esta muestra. **C.** Una imagen de mayor resolución de una región en esta muestra; los códigos de color siguen a A.

Figura 4. Asociación entre RLIT y parámetros clínicos de TNBC.

65 **A.** Proporciones de tres clases de linfocitos en 181 TNBC. **B.** Diagrama del triángulo para mostrar la composición de los linfocitos para cada tumor (cada punto negro representa un tumor; las líneas finas marcan el 50 % del eje correspondiente). **C.** Diagrama de cajas para mostrar la correlación entre las puntuaciones patológicas y la RLIT; valor de p de la prueba de JT; n = número de paciente es cada grupo; los bigotes se extienden a 1,5 rango

intercuartílico. **D.** Asociación entre la RLIT y el tamaño del tumor, estado de nodo y mutaciones *TP53*; los bigotes se extienden a 1,5 rango intercuartílico. **E.** Distribución de la RLIT en dos cohortes con cortes óptimos marcados como líneas rojas discontinuas. **F.** Las curvas de Kaplan-Meier para ilustrar las probabilidades de supervivencia específicas de la enfermedad de los grupos de pacientes en dos cohortes de TNBC estratificadas por RLIT utilizando el valor de corte seleccionado en la cohorte 1. Los números en la leyenda muestran el número de pacientes en cada grupo y los números entre paréntesis muestran el número de muertes específicas por enfermedad. **G.** El uso de la Cohorte 2 como la cohorte de descubrimiento y la Cohorte 1 como la cohorte de validación produjeron un corte óptimo similar.

Figura 5. Comparación de RLIT con otras firmas inmunitarias.

Los valores óptimos de corte se seleccionaron en la cohorte 1 y se probaron en la cohorte 2 para **A.** Abundancia de linfocitos basados en imágenes (Lym); **B.** Firma inmune de la expresión génica por Calabro et al. (18); **C.** Ascierto et al. (19); **D.** Firma de *IL8* (20); **E.** expresión de *CXCL13*. **F.** Comparación de cortes óptimos seleccionados en dos cohortes. Los datos se centraron en 0 y se escalaron para tener la desviación estándar 1 y los puntos de corte se asignaron a los datos escalados. Las firmas cerca de la línea diagonal tienen cortes similares en dos cohortes.

Figura 6. Módulos genéticos asociados a RLIT.

A. Las curvas de Kaplan-Meier para ilustrar las diferencias en la supervivencia específica de la enfermedad de grupos de pacientes de igual tamaño estratificados en función de la expresión de genes clave en tres módulos. **B.** Curvas de Kaplan-Meier para ilustrar las diferencias en la supervivencia específica de la enfermedad de los grupos de pacientes estratificados con expresión de *CTLA4* por los 25 percentiles más bajos, 50 en el medio y 25 más altos, RLIT, y *CTLA4* e RLIT combinados. La diferencia de supervivencia entre la estratificación alta y baja de *CTLA4* dentro del grupo alto de RLIT se da como un valor de *p*.

Figura 7. Las curvas de Kaplan-Meier para ilustrar las probabilidades de supervivencia específicas de la enfermedad de los grupos de pacientes en dos cohortes de TNBC estratificadas por RLAT (adyacente) y RLTD (distal).

Las firmas se dicotomizaron usando un corte seleccionado en un rango de percentiles basado en la cohorte 1 (las columnas izquierda y central) y se probaron en la cohorte 2 (la columna derecha). Las líneas discontinuas en los gráficos de la izquierda marcan el umbral de significación de $p = 0,05$, y las líneas verticales continuas muestran los mejores cortes. Para las curvas de Kaplan-Meier, los números en la leyenda muestran el número de pacientes en cada grupo y los números entre paréntesis muestran el número de muertes específicas por enfermedad.

Figura 8. Las curvas de Kaplan-Meier para ilustrar las probabilidades de supervivencia específicas de la enfermedad de los grupos de pacientes en dos cohortes de TNBC estratificadas por RLAT (adyacente) y RLTD (distal).

Las firmas se dicotomizaron usando un corte seleccionado en un rango de percentiles basado en la cohorte 2 (las columnas izquierda y derecha) y se probaron en la cohorte 1 (la columna derecha).

Figura 9. Las curvas de Kaplan-Meier ilustran las probabilidades de supervivencia específicas de la enfermedad de los grupos de pacientes en dos cohortes de TNBC estratificadas por nueve firmas inmunitarias.

Las firmas se dicotomizaron usando un corte seleccionado en un rango de percentiles basado en la cohorte 1 (las columnas izquierda y central) y se probaron en la cohorte 2 (la columna derecha). Las líneas discontinuas en los gráficos de la izquierda marcan el umbral de significación de $p = 0,05$, y las líneas verticales continuas muestran los mejores cortes. Para las curvas de Kaplan-Meier, los números en la leyenda muestran el número de pacientes en cada grupo y los números entre paréntesis muestran el número de muertes específicas por enfermedad.

Figura 10. Las curvas de Kaplan-Meier ilustran las probabilidades de supervivencia específicas de la enfermedad de los grupos de pacientes en dos cohortes de TNBC estratificadas por nueve firmas inmunitarias.

Las firmas se dicotomizaron usando un corte seleccionado en un rango de percentiles basado en la cohorte 2 (las columnas izquierda y derecha) y se probaron en la cohorte 1 (la columna derecha). Las líneas discontinuas en los gráficos de la izquierda marcan el umbral de significación de $p = 0,05$, y las líneas verticales continuas muestran los mejores cortes. Para las curvas de Kaplan-Meier, los números en la leyenda muestran el número de pacientes en cada grupo y los números entre paréntesis muestran el número de muertes específicas por enfermedad.

Figura 11. Los diagramas de dispersión muestran la correlación entre la RLIT y la expresión de los genes asociados a RLIT en TNBC.

Figura 12. Compare el valor pronóstico de los 100 genes principales asociados a RLIT y la RLIT al incluir ambos en el modelo de análisis multivariado de Cox, un gen cada vez.

Cada punto denota análisis para un gen, los valores trazados son $-\log$ (valor *p* del rango logarítmico) para el análisis.

Figura 13. Las curvas de Kaplan-Meier ilustran las diferencias en la supervivencia específica de la enfermedad de los pacientes con TNBC estratificados con otros parámetros conocidos, incluyendo PAM50 (Perou et al., 2000), evaluación patológica de la infiltración linfocitaria (IL), el tamaño del tumor y el grado.

5 **Figura 14. Las curvas de Kaplan-Meier ilustran las diferencias en la supervivencia general a 5 años de los pacientes con cáncer de ovarios de los grupos de pacientes estratificados por RLIT, por "Lym" (Yuan et al., 2012), por lymPath (abundancia de linfocitos evaluada por el anatomopatólogo), grado tumoral, tipo histológico o estadificación tumoral.**

10 **Figura 15. A. Histograma que muestra la agrupación de células de tumores TNBC en agrupación que tiene una expresión de CTLA4 relativamente alta y una agrupación que tiene una expresión de CTLA4 relativamente baja. B. Curva de Kaplan-Meier que ilustra la diferencia en la supervivencia entre los pacientes con baja expresión de CLTA4 y alta expresión de CTLA4.**

15 Descripción detallada de la invención

Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas anteriormente.

20 El inventor ha ideado una nueva forma de modelar estadísticamente la heterogeneidad espacial de los linfocitos en los tumores, que permite la determinación de una medida cuantitativa de infiltración inmunitaria (RLIT). La RLIT (relación de linfocitos intratumorales) es la proporción de linfocitos intratumorales a células cancerosas en un tumor. Esta medida cuantitativa de la infiltración inmunitaria (RLIT) ha mejorado el poder predictivo en el pronóstico del cáncer en comparación con los indicadores previos de infiltración inmunitaria. Esta medición de la infiltración inmunitaria se
25 desarrolló basándose en un estudio de tumores de pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) del conjunto de datos METABRIC, pero es generalmente más útil y aplicable a otros subtipos de cáncer de mama y otros tipos de cáncer. La naturaleza generalizable de la RLIT se demuestra mediante los datos en el presente documento que muestran que la RLIT también es un indicador pronóstico en el cáncer de ovarios.

30 En el presente documento se describe el primer estudio que identifica estadísticamente las categorías de linfocitos en función de la heterogeneidad espacial del tumor y demuestra sus implicaciones clínicas utilizando muestras de un gran número de pacientes. Esto permite una forma de modelar la heterogeneidad espacial en tumores que aborda la necesidad de medir la heterogeneidad de la infiltración linfocitaria en tumores. La capacidad para generar evaluaciones cuantitativas reproducibles brindan nuevas oportunidades para incorporar la infiltración inmunitaria en la estadificación
35 del cáncer (es decir, la clasificación de los tumores), como en el uso de puntuación inmunitaria para el cáncer colorrectal (Galon, 2014).

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir la infiltración inmunitaria en tumores. En particular, un procedimiento para determinar una medición objetiva de la infiltración inmunitaria en un tumor (RLIT), cuya medida es
40 la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas.

En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona un procedimiento implementado por ordenador *ex vivo* para medir la infiltración inmunitaria en un tumor, comprendiendo el procedimiento:

45 proporcionar una imagen del tumor en el que se han identificado linfocitos y células cancerosas;
obtener una medición de linfocitos respecto al cáncer para cada linfocito, que comprende aplicar una estimación de la densidad para obtener un modelo de la densidad de células cancerosas; y determinar la proximidad de cada linfocito a la densidad de células cancerosas; clasificar una subpoblación de los linfocitos como linfocitos intratumorales según su relación linfocito a cáncer, en el que un linfocito se clasifica como linfocito intratumoral si su medición de linfocito a cáncer supera un valor umbral;
50 cuantificar los linfocitos intratumorales y las células cancerosas en la imagen del tumor; y calcular la relación de linfocitos intratumorales (RLIT) como la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas, en el que la RLIT es una medida de la infiltración inmunitaria en el tumor.

Los procedimientos descritos en el presente documento se realizan utilizando una imagen tumoral en la que se han
55 identificado linfocitos y células cancerosas. Los linfocitos y las células cancerosas se pueden haber identificado mediante el análisis automatizado de imágenes.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender además una etapa de identificación de células cancerosas y linfocitos en una imagen tumoral mediante análisis de imagen automatizado. Los procedimientos
60 pueden comprender los pasos para generar una imagen tumoral y luego identificar linfocitos y células cancerosas en la imagen tumoral mediante análisis de imagen automatizado.

La etapa de la identificación de células cancerosas y linfocitos en un tumor mediante el análisis automatizado de
65 imágenes puede basarse en las diferentes morfologías nucleares de las células cancerosas y los linfocitos. Esta etapa se puede realizar en secciones de tumores, tales como portaobjetos de la sección de tumor entero. La sección del tumor puede estar teñida con H y E. Los tipos y / o ubicaciones espaciales de al menos aproximadamente 10.000

células pueden registrarse en esta etapa. Los tipos y / o ubicaciones espaciales de al menos aproximadamente 20.000, al menos de aproximadamente 50.000, al menos de aproximadamente 90.000, al menos 100.000, al menos de aproximadamente 110.000, de aproximadamente 10.000 a 150.000, de aproximadamente 50.000 a 120.000 o de aproximadamente 100.000 a 120.000 células pueden registrarse en esta etapa. Los tipos y / o ubicaciones espaciales de, o aproximadamente 90.000, aproximadamente 100.000 o aproximadamente 110.000 células pueden registrarse en esta etapa. Las células pueden ser linfocitos. Esta etapa puede usar cualquier herramienta de análisis de imágenes automatizada capaz de identificar linfocitos y células cancerosas. La herramienta de análisis de imagen automatizada puede ser la herramienta descrita en Yuan et al., 2012.

La herramienta de análisis de imágenes descrita en Yuan et al., 2012, que se incorpora por referencia en su totalidad en la presente memoria, identifica el cáncer, los linfocitos y las células estromales que abarcan los fibroblastos y las células endoteliales se basan en sus morfologías nucleares en los portaobjetos de la sección de tumores completos de H y E. El componente principal de esta herramienta es un clasificador entrenado por anatomopatólogos en regiones tumorales seleccionadas al azar y validada en 564 tumores de mama con 90 % de precisión. La herramienta de análisis de imágenes descrita en Yuan et al clasifica las células en tres categorías: cáncer, linfocitos o células estromales basados en características morfológicas utilizando una máquina de vectores de soporte.

La herramienta de análisis de imágenes descrita en Yuan et al., 2012 identificó células cancerosas por sus núcleos redondos, normalmente grandes ($> 10 \mu\text{m}$). La clase de estroma se entrenó en núcleos de células estromales en forma de huso (que probablemente sean fibroblastos) y puede abarcar otras células estromales con una morfología similar, tal como las células endoteliales. La clase de linfocitos se entrenó en células inmunes con la morfología distintiva de los linfocitos: núcleos pequeños ($< 8 \mu\text{m}$) oscuros y poco citoplasma.

La herramienta de análisis de imágenes descrita en Yuan et al se entrenó utilizando imágenes de tumores de mama. Las herramientas automatizadas de análisis de imágenes, como las descritos en Yuan et al 2012, pueden ser entrenadas en tipos de cáncer distintos al cáncer de mama (incluidos los tipos y subtipos de cáncer mencionados en el presente documento) para identificar linfocitos y células cancerosas en los tumores de otros tipos de cáncer.

En la técnica se conocen varias herramientas automatizadas de análisis de imágenes. Por ejemplo, las herramientas descritas en Failmezger et al (CRImage), en particular Janowczyk et al, y Basavanhally et al, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Cualquier herramienta de este tipo puede ser adecuada para, o adaptada para, utilizar en los procedimientos descritos en el presente documento.

Como resultado del análisis automatizado de imágenes, los tipos y las ubicaciones espaciales de un gran número de células se registran en cada imagen del tumor. El análisis de imágenes automatizado puede permitir el mapeo de distribuciones espaciales de todos, o esencialmente todos, células cancerosas y linfocitos dentro de una imagen tumoral.

Después de una etapa para identificar las células cancerosas y los linfocitos mediante el análisis automático de imágenes, se analizan las relaciones espaciales de linfocitos y células cancerosas.

Los procedimientos descritos en el presente documento comprenden una etapa para obtener una medición de linfocitos a cáncer para cada linfocito. Esto proporciona una medida cuantitativa de la proximidad de cada linfocito a las células cancerosas y la ubicación espacial en relación con las células cancerosas.

La etapa para obtener una medición de linfocitos a cáncer para cada linfocito se puede llevar a cabo utilizando el conducto estadístico que se ilustra en la Fig. 1B. En primer lugar, para perfilar globalmente la distribución espacial de las células cancerosas, se cuantifica la densidad celular del cáncer, por ejemplo, utilizando una estimación de kernel (Hastie et al, 2001). Como alternativa, se puede usar una estimación de cambio media (Cheng, 1995) o una estimación de espacio de escala (Witkin, 1983). Esto construye un "paisaje de cáncer" donde las colinas indican regiones tumorales densamente pobladas con células cancerosas. La altura de una colina se correlaciona con la densidad del cáncer (densidad del tumor) en una ubicación específica en el tumor (Fig.1B). En segundo lugar, por cada linfocito, su proximidad espacial al cáncer se cuantifica directamente con el paisaje de densidad del cáncer en su ubicación específica para proporcionar una medición de "linfocitos a cáncer" para cada linfocito. De este modo, se obtiene una medición cuantitativa de la proximidad espacial a las células cancerosas para cada linfocito (Fig. 1B).

En los estudios descritos en el presente documento (véase la Sección Experimental), se identificaron células cancerosas y linfocitos, y luego se cuantificaron sus relaciones espaciales utilizando un procedimiento de densidad del núcleo. Después, utilizando aprendizaje no supervisado, se identificaron tres categorías de linfocitos (intratumorales, tumor adyacente y tumor distal) según sus proximidades espaciales y su posicionamiento espacial en relación con las células cancerosas. Estas categorías de linfocitos son consistentes con un esquema de cuantificación patológica que considera compartimentos de estroma intratumoral, estroma adyacente y estroma distante (Mahmoud, 2011). Estadísticamente, estos grupos son estables, notificados como la solución de agrupamiento óptima el 97 % del tiempo en muestras repetidas.

En consecuencia, los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender una etapa para obtener

- una medición de linfocitos a cáncer para cada linfocito utilizando una estimación de la densidad, tal como una estimación del núcleo, para modelar la distribución espacial de las células cancerosas. El procedimiento comprende una etapa para determinar la proximidad de cada linfocito al cáncer al determinar la densidad de las células cancerosas en la ubicación de cada linfocito, para dar una medición de linfocitos a cáncer para cada linfocito. Luego, los linfocitos se agrupan de acuerdo con sus mediciones de linfocitos a cáncer. Un procedimiento de aprendizaje no supervisado, tales como la agrupación de mezcla de Gauss, se pueden usar para agrupar los linfocitos de acuerdo con su proximidad al cáncer. El número de grupos puede ser 2, 3, 4 o más.
- En el estudio de TNBC descrito en el presente documento (véase la Sección Experimental), cuando los linfocitos se agruparon de acuerdo con sus mediciones de linfocitos a cáncer, el número de grupos fue de tres ($k = 3$), correspondiente a los linfocitos intratumorales (LIT), linfocitos tumorales adyacentes (LTA) y linfocitos tumorales distales (LTD).
- En TNBC, Los linfocitos que tienen una medición de linfocitos a cáncer por encima del valor umbral de 0,10507473 se clasificaron como LIT, Los linfocitos que tenían una medición de linfocitos a cáncer por debajo del valor umbral de 0,10507473 y por encima del valor umbral de 0,03662728 se clasificaron como LTA y los linfocitos que tenían una medición de linfocitos por cáncer por debajo del valor de umbral de 0,03662728 se clasificaron como LTD. En la determinación de la RLIT, la distinción importante es entre los linfocitos intratumorales (LIT) y los linfocitos no intratumorales (L no IT). Así en TNBC, los linfocitos que tenían una medición de linfocitos a cáncer igual o superior al valor umbral de 0,10507473 se clasificaron como LIT, y los linfocitos restantes se clasificaron como L no IT.
- En el estudio de cáncer de ovario descrito en el presente documento, cuando los linfocitos se agruparon de acuerdo con sus mediciones de linfocitos a cáncer, el número de grupos fue dos ($k = 2$), que corresponde a los linfocitos intratumorales y los linfocitos no intratumorales.
- En el cáncer de ovario, los linfocitos que tenían una medición de linfocitos a cáncer por encima del valor umbral de 0,03114299 se clasificaron como LIT. Los linfocitos que tienen una medición de linfocitos a cáncer por debajo de este valor de umbral se clasificaron como L no IT.
- Como alternativa al uso de la densidad del cáncer en una ubicación de linfocitos para obtener una medición de linfocitos a tumores que sea indicativa de la proximidad de los linfocitos al cáncer (es decir, la proximidad de los linfocitos al cáncer), la etapa para obtener una medición de linfocitos a cáncer para cada linfocito se puede realizar basándose en una medida de distancia entre un linfocito y una o más células cancerosas, tal como la distancia euclidiana. A continuación, los linfocitos se agrupan de acuerdo con sus mediciones de linfocitos a cáncer, tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, utilizando un procedimiento de aprendizaje no supervisado, tal como la agrupación de mezcla gaussiana. En este contexto, cuando la medición de linfocitos a cáncer es indicativa de la distancia (en lugar de la proximidad) al cáncer, un linfocito puede clasificarse como un LIT si tiene una medición de linfocito a cáncer por debajo de un valor de umbral.
- Los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender clasificar los linfocitos como linfocitos intratumorales. Es decir, los procedimientos pueden comprender clasificar un subconjunto de células identificadas como linfocitos en la imagen del tumor como linfocitos intratumorales. La clasificación de los linfocitos puede comprender determinar si la medición de linfocitos a cáncer está por encima de un cierto valor de umbral. El valor umbral, por ejemplo en TNBC, puede ser de aproximadamente 0,1, de aproximadamente 0,105 o de aproximadamente 0,10507473. El valor umbral, por ejemplo en el cáncer de ovario, puede ser de aproximadamente 0,03, de aproximadamente 0,0311 o de aproximadamente 0,03114299.
- Los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender la determinación de un valor umbral para una medición de linfocitos a cáncer, para usar en la clasificación de un linfocito como un linfocito intratumoral o un linfocito no intratumoral. Por ejemplo, cuando la medición de linfocitos a cáncer es indicativa de la proximidad de los linfocitos al cáncer, el linfocito puede clasificarse como un linfocito intratumoral si tiene una medición de linfocitos a cáncer por encima del valor umbral de medición de linfocitos a cáncer. Determinar un valor de umbral para una medición de linfocitos a cáncer puede incluir determinar mediciones de linfocitos a cáncer para una población de linfocitos y agrupar los linfocitos mediante aprendizaje no supervisado, y tomar el valor mínimo del grupo más proximal de cáncer (el grupo con mediciones más altas) como el valor de umbral para clasificar los linfocitos intratumorales. Un linfocito puede clasificarse como un linfocito intratumoral si tiene una medición de linfocito a cáncer por encima (o igual o superior a) del valor de umbral.
- La determinación del valor de umbral puede comprender además probar la estabilidad de la agrupación mediante el muestreo de la población de linfocitos, agrupar la población muestreada de linfocitos y determinar que la solución de agrupamiento ($k = x$ donde x es el número de agrupamientos) es estable. El número de agrupaciones es estable cuando k para la población muestreada es la misma para 200 muestras repetidas al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 97 % del tiempo.
- Además, el inventor ha mostrado diferencias significativas entre las categorías de linfocitos tanto en la distancia espacial a la célula cancerosa más cercana como en la posición espacial de las células cancerosas circundantes,

apoyando su relevancia biológica. Por ejemplo, en el estudio actualmente divulgado de tumores de pacientes con TNBC del conjunto de datos METABRIC, un linfocito intratumoral está en un promedio de 7 μm de distancia de una célula cancerosa y 3 μm desde el centroide de la región del casco convexo formado por células cancerosas cercanas. Un linfocito de tumor adyacente también puede estar cerca de las células cancerosas más cercanas, pero estaría más lejos del centroide de la región del casco convexo porque no está rodeado por células cancerosas. Por lo tanto, el nuevo enfoque de clasificación divulgado en el presente documento se basa en medidas espaciales que dan cuenta del posicionamiento espacial de las células cancerosas y, al mismo tiempo, son lo suficientemente eficientes computacionalmente para analizar secciones de tumores completos. En comparación con una medida informada anteriormente de la abundancia de linfocitos como resultado directo del análisis de imágenes (Yuan, 2012), una ventaja de este nuevo enfoque es que explica la heterogeneidad espacial de la infiltración inmunitaria, que se reconoce como una propiedad importante de la infiltración inmunitaria (Galon, 2006) pero rara vez se analiza cuantitativamente.

Tras la etapa de clasificar los linfocitos como linfocitos intratumorales, se calcula la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas. Esta relación es la RLIT (la relación de linfocitos intratumorales), que es una medida objetiva y cuantitativa de la infiltración inmunitaria en tumores. La RLIT es la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas en el tumor expresada como una fracción decimal. Por ejemplo, una RLIT de 0,011 representa un 1,1 % de linfocitos intratumorales a células cancerosas, es decir, una proporción de 11 linfocitos intratumorales a 1000 células cancerosas.

El inventor ha demostrado que la RLIT es un indicador pronóstico robusto y potente en el cáncer de mama triple negativo (TNBC), como se tratará a continuación, y también en cáncer de ovario. Dado que la infiltración inmunitaria está implicada en muchos tipos de cáncer, como se analiza a continuación con más detalle, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal (Galon, 2014), melanoma y cáncer de pulmón no microcítico, la RLIT también puede usarse como un indicador de pronóstico en varios tipos de cáncer.

Para el pronóstico en el TNBC, el valor de corte de RLIT de 0,011 se seleccionó basándose en imágenes de tumores de la cohorte METABRIC. Los pacientes cuyos tumores tenían un RLIT por debajo del valor de corte de 0,011 tuvieron un resultado clínico significativamente peor en términos de supervivencia específica de la enfermedad en comparación con los pacientes cuyos tumores tenían un RLIT por encima del valor de corte.

Para el pronóstico en el cáncer de ovario, el valor de corte de la RLIT de 0,06086 se seleccionó en función de las imágenes de tumores de una cohorte de tumores no publicados. Los pacientes cuyos tumores tenían un RLIT por debajo del valor de corte tuvieron un resultado clínico significativamente peor en términos de supervivencia general en comparación con los pacientes cuyos tumores tenían una RLIT por encima del valor de corte.

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar un valor de corte para la RLIT para su uso en la determinación de un pronóstico en cáncer, en el que una RLIT por debajo del valor de corte indica un mal pronóstico. El procedimiento comprende determinar la RLIT para una pluralidad de tumores, en el que cada tumor es de un paciente con cáncer respectivo en una cohorte de pacientes con cáncer, y seleccionando un valor de corte para la RLIT en donde los pacientes con un RLIT igual o inferior al valor de corte tienen un pronóstico significativamente peor en comparación con los pacientes con RLIT por encima del valor de corte.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para determinar un valor de corte de RLIT para un tipo o subtipo de cáncer, para usar en proporcionar un pronóstico en un paciente con cáncer que tenga ese tipo o subtipo de cáncer, comprendiendo el procedimiento:

medir la infiltración inmunitaria en un tumor de cada miembro de una cohorte de pacientes con cáncer que tienen el tipo o subtipo de cáncer de acuerdo con los procedimientos de la invención, calculando así la RLIT para cada tumor;

relacionar la RLIT para cada tumor con el resultado clínico de cada paciente con cáncer en la cohorte de pacientes con cáncer; y seleccionar un valor de corte para la RLIT, en el que una RLIT igual o inferior al valor de corte se asocia a un resultado clínico significativamente diferente en la cohorte de pacientes con cáncer que una RLIT por encima del valor de corte.

Una RLIT igual o inferior al valor de corte puede estar asociado a un resultado clínico significativamente peor que una RLIT por encima del valor de corte. Una RLIT igual o inferior al valor de corte puede estar asociado a un resultado clínico significativamente mejor que una RLIT por encima del valor de corte.

La selección del valor de corte para RLIT sirve para dicotomizar el rango continuo de valores de RLIT para las imágenes de tumores de una cohorte de pacientes. El valor de corte de la RLIT se selecciona de manera que haya una diferencia significativa en el resultado clínico entre los pacientes con una RLIT por debajo del límite y los pacientes con una RLIT por encima del valor de corte. En general, el valor de corte de RLIT se selecciona de modo que los pacientes que tienen un RLIT inferior o igual al valor de corte (es decir, los pacientes que tienen un tumor con una RLIT inferior o igual al valor de corte) tienen un pronóstico significativamente peor que los pacientes que tienen una RLIT que está por encima del valor de corte (es decir, pacientes que tienen un tumor con una RLIT igual o superior al valor de corte).

En el contexto de la presente invención, una diferencia significativa en el pronóstico se refiere a un resultado clínico que es significativamente diferente según la prueba de rango log. Preferentemente $p < 0,0500$, $p < 0,0250$, $p < 0,0100$, $p < 0,0090$, $p < 0,0065$, $p < 0,0010$ o $p < 0,0001$ de acuerdo con la prueba de rango de registro.

5 La selección del valor de corte de RLIT puede comprender identificar un valor de RLIT en el que aproximadamente del 20 % al 80 % de la cohorte de pacientes tiene una RLIT por debajo de ese valor. La selección del valor de corte de RLIT puede comprender identificar un valor de RLIT en el que aproximadamente del 20 % al 80 % de la cohorte de
10 pacientes tiene una RLIT por debajo de ese valor y en el que los pacientes que tienen una RLIT por debajo del valor de corte tienen un pronóstico significativamente peor que los pacientes tener una RLIT que esté por encima del valor de corte.

15 El resultado clínico puede ser la supervivencia específica de la enfermedad, supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global, supervivencia libre de recaída, supervivencia libre de progresión, tasa de supervivencia o tiempo de supervivencia. El resultado clínico puede ser la supervivencia específica de la enfermedad. La supervivencia específica de la enfermedad se puede definir con el tiempo como máximo 5 años o 10 años desde el diagnóstico y el evento como muerte por cáncer (la supervivencia específica de la enfermedad a 5 años y la supervivencia específica a la enfermedad de 10 años respectivamente). La supervivencia general se puede definir con el tiempo como máximo 5 años o 10 años desde el diagnóstico y el evento como muerte por cualquier causa. La supervivencia sin recaída se
20 puede definir con el tiempo como máximo 10 años desde el diagnóstico y el evento como recaída del tumor. Un mal pronóstico se refiere a una predicción de un mal resultado clínico, mientras que un pronóstico positivo se refiere a una predicción de un resultado clínico positivo.

25 Los procedimientos descritos en el presente documento pueden utilizar una cohorte de pacientes con cáncer del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) como la cohorte de "descubrimiento". Este conjunto de datos, con sus datos de perfilado molecular de H y E y pareados, será una cohorte extremadamente útil para validar la utilidad de RLIT y para seleccionar y refinar los valores de corte de RLIT para uso en procedimientos de pronóstico y / o terapéuticos. El TCGA ha elegido los cánceres para el estudio en función de criterios que incluyen un pronóstico desfavorable y el impacto general en la salud pública, y la disponibilidad de muestras de tejido normal y tumor humano que cumplan con los
30 estándares de TCGA para la calidad y cantidad del consentimiento del paciente.

35 Los experimentos desvelados en el presente documento muestran la utilidad de RLIT en el TNBC y en cáncer de ovario. La RLIT es una medida generalizable para las LIT y, por lo tanto, será útil como una medida de la infiltración inmunitaria en otros tipos / subtipos de cáncer, especialmente dado que la evaluación manual de la ITLS ha notificado valor en muchos tipos / subtipos de cáncer.

40 Tal como ya se ha mencionado anteriormente, la infiltración inmunitaria está implicada en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, melanoma y cáncer de pulmón no microcítico, la RLIT también puede usarse como un indicador de pronóstico en varios tipos de cáncer.

45 La infiltración inmunitaria está implicada en muchos cánceres, incluido el cáncer de mama (incluido el carcinoma ductal de mama y el carcinoma lobular de mama) (Dieci 2014; Loi S 2013; Kruger JM 2013; Liu S, 2012; Ascierto ML 2012, Rody A, 2011; Mahmoud SMA, 2011; Denkert C, 2010; Ueno T, 2000) cáncer del sistema nervioso central (incluido el glioblastoma multiforme y el glioma de grado inferior) (Kmieciak J, 2013; Yang I, 2010; McNamara MG, 2014; Crane CA, 2014; Bambury RM; Alexiou GA, 2013; Vauleon E, 2013) cáncer endocrino (incluyendo carcinoma adrenocortical, carcinoma tiroideo papilar, paraganglioma y feocromocitoma) (Papewalis C; Huang CT; Mukherji B) cáncer gastrointestinal (incluido el colangiocarcinoma, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma hepatocelular del hígado, adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer de estómago-esófago) (Kono K, 20116; Wu G; Gao Q; Hiraoka N) cáncer ginecológico (incluyendo cáncer cervical (Zhang Y, 2014; Ancuta E, 2009), cistadenocarcinoma seroso ovárico (Townsend KN, 2013; Milne K., 2009; Clarke B, 2009), carcinosarcoma uterino, carcinoma de endometrio del cuerpo uterino) (Ohno S, 2004) cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma uveal) (Spanos WC, 2009; Pretscher D, 2009) cáncer hematológico (incluida la leucemia mieloide aguda, timoma, linfoma) (Yong AS, 2011; Dave SS, 2004;) cáncer de piel (incluido el melanoma cutáneo) (Tjin EP, 2014; Erdag G, 2012; Bystryń JC, 1992; Halliday G, 1995) cáncer de tejidos blandos (incluido el sarcoma) (Kim JR, 2016; Sorbye SW 2011; Fiorelli V, 1998) cáncer torácico (incluido el adenocarcinoma de pulmón, el carcinoma de células escamosas de pulmón, el mesotelioma) (Suzuki K, 2013; Welsh TJ, 2005; Villegas FR, 2002; Hegmans JP, 2006; Dieu-Nosjean MC) cáncer urológico (incluido el carcinoma renal de células cromóforas, carcinoma renal de células claras, carcinoma renal papilar, adenocarcinoma de próstata, cáncer de células germinales de testículo, carcinoma de vejiga urotelial) (Davidsson S, 2013; Thompson RH, 2007; Webster WS, 2006; Gannon PO, 2009; Sjødahl G, 2014).
60

Los procedimientos de la presente invención pueden aplicarse en cualquiera de los tipos o subtipos de cáncer mencionados anteriormente.

65 La RLIT es un indicador cuantitativo objetivo de la infiltración linfocitaria en tumores. El inventor ha demostrado la importancia de utilizar una medida cuantitativa de la infiltración linfocitaria para predecir el resultado clínico en el cáncer.

La RLIT es una nueva medida espacial y cuantitativa de linfocitos intratumorales (LIT). Esta medida es un predictor consistente, estable e independiente de la supervivencia específica de la enfermedad en dos cohortes independientes de 181 pacientes con TNBC en total. Esta medida puede usar un valor de corte de 0,011 (1.1 % de linfocitos intratumorales a células cancerosas) que dicotomiza la puntuación de la RLIT. El ~ 20 % de los pacientes con TNBC con puntuaciones de RLIT más bajas que este límite tienen una supervivencia específica de la enfermedad significativamente peor que los pacientes con puntuaciones más altas, y esta asociación es independiente de los parámetros clínicos estándar. Tomados en conjunto, estos datos apoyan la utilidad de RLIT como biomarcador pronóstico para el cáncer, incluyendo TNBC. En consecuencia, en el presente documento se describe un sistema de puntuación objetivo y completamente automatizado para la evaluación estandarizada de la infiltración inmunitaria que se puede usar en el contexto de ensayos clínicos y posteriormente ayuda al proceso de toma de decisiones sobre el tratamiento.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención puede comprender además usar la RLIT como un biomarcador pronóstico. El procedimiento puede comprender medir la RLIT de un tumor de un paciente con cáncer y usar la RLIT para determinar un pronóstico para el paciente. El procedimiento puede comprender determinar la RLIT en un tumor de un paciente con cáncer y usar la RLIT para determinar un pronóstico para el paciente, en el que una RLIT por debajo de un valor de corte predeterminado indica un mal pronóstico. El procedimiento puede comprender determinar la RLIT en un tumor de un paciente con cáncer y usar la RLIT para determinar un pronóstico para el paciente, en el que una RLIT por encima de un valor de corte predeterminado indica un mal pronóstico.

En particular, un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para proporcionar un pronóstico en un paciente con cáncer, comprendiendo el procedimiento:

medir la infiltración inmunitaria en un tumor del paciente con cáncer de acuerdo con un procedimiento de la invención, calculando de este modo la RLIT para el tumor, en el que una RLIT por debajo de un valor de corte predeterminado de RLIT indica un mal pronóstico.

Un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para proporcionar un pronóstico en un paciente con cáncer, que comprende un procedimiento implementado por ordenador *ex vivo* que comprende:

proporcionar una imagen del tumor en el que se han identificado linfocitos y células cancerosas; obtener una medición de linfocitos respecto al cáncer para cada linfocito, que comprende aplicar una estimación de la densidad para obtener un modelo de la densidad de células cancerosas; y determinar la proximidad de cada linfocito a la densidad de células cancerosas; clasificar un subconjunto de linfocitos como linfocitos intratumorales según su medición de linfocitos a cáncer, en el que un linfocito se clasifica como linfocito intratumoral si su medición de linfocitos a cáncer está por encima de un valor umbral; cuantificar los linfocitos intratumorales y las células cancerosas en la imagen del tumor; y calcular la relación de linfocitos intratumorales (RLIT) como la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas, en el que la RLIT es una medida de infiltración inmunitaria en el tumor, y en el que una RLIT por debajo de un valor de corte predeterminado de RLIT indica un mal pronóstico.

El inventor ha demostrado que la RLIT es un predictor independiente del resultado clínico en el cáncer. Es decir, la RLIT predice el resultado clínico sin utilizar ningún otro biomarcador (como un biomarcador de expresión génica) o un indicador clínico (como el tamaño del tumor). Por ejemplo, el inventor ha demostrado que la RLIT es un factor predictivo independiente del resultado clínico en el cáncer de mama triple negativo (TNBC) y en el cáncer de ovario. Por ejemplo, en los estudios descritos en el presente documento no hubo correlación entre la RLIT y el tamaño del tumor, el estado del ganglio y el estado de mutación TP53 (Fig. 4D) y, por tanto, la RLIT es independiente de dichos indicadores y biomarcadores clínicos. Preferentemente, si la RLIT está por debajo de un valor de corte predeterminado (o igual o por debajo de un valor de corte predeterminado), esto indica un mal pronóstico (es decir, un mal resultado clínico). Un mal pronóstico, o un mal resultado clínico, puede ser una mala supervivencia específica de la enfermedad.

En el presente contexto, una RLIT por debajo de un valor de corte predeterminado puede denominarse una RLIT baja, o RLIT baja. Por el contrario, una RLIT por encima de un valor de corte predeterminado puede denominarse una RLIT alta o ILTR alta. Un valor de corte predeterminado para una RLIT puede simplemente referirse en el presente documento como un valor de corte de la RLIT.

Un mal pronóstico significa que el paciente tiene un peor pronóstico que un paciente con un valor de RLIT por encima del valor de corte de RLIT. Por ejemplo, un pronóstico desfavorable puede significar que se espera que el paciente tenga un tiempo de supervivencia específico de la enfermedad más corto que un paciente con un valor de RLIT por encima del valor límite de RLIT. Un mal pronóstico puede significar que el paciente tiene un peor pronóstico que un paciente con un valor de RLIT por encima del valor de corte de RLIT. La relación de riesgo entre el grupo de pacientes que tiene una RLIT por debajo del valor de corte de RLIT y el grupo que tiene una RLIT por encima del valor de corte de RLIT puede ser de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4, puede ser desde aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,36, puede ser aproximadamente 0,25 o puede ser aproximadamente 0,36. Esto significa que un paciente con una RLIT más alta que el valor de corte tiene de 0,25-0,36 veces menos probabilidades de morir de cáncer de mama que un paciente con una RLIT más baja que el valor de corte. Un mal pronóstico puede significar que

un paciente tiene una probabilidad de supervivencia de aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 49 %, cinco años desde el diagnóstico o diez años desde el diagnóstico. Un buen pronóstico puede significar que un paciente tiene una probabilidad de supervivencia de aproximadamente el 80 % cinco años desde el diagnóstico o diez años desde el diagnóstico.

5 Un valor de corte de RLIT predeterminado puede ser de aproximadamente 0,011, o aproximadamente 0,061. El valor de corte puede ser de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,070, desde aproximadamente 0,010 hasta aproximadamente 0,070, de aproximadamente -0,010 a aproximadamente 0,012, o de aproximadamente -0,050 a aproximadamente 0,070. Un valor de corte de RLIT predeterminado para TNBC puede ser de aproximadamente 0,011 y para el cáncer de ovario puede ser de aproximadamente 0,061.

15 La RLIT se probó en dos cohortes independientes de TNBC y demostró ser predictiva de la supervivencia específica de la enfermedad. Cuando se usó la Cohorte 1 de TNBC como la cohorte de descubrimiento, se seleccionó un valor de corte de RLIT de 0,011 (es decir, los pacientes que tenían una RLIT por debajo de este valor mostraron una supervivencia significativamente más específica para la enfermedad que los pacientes que tenían una RLIT por encima de este valor) y en la cohorte 2 y una RLIT por debajo de 0,011 se asociaron a una supervivencia significativamente más específica de la enfermedad que los pacientes con una RLIT por encima de 0,011 (prueba del rango logarítmico $p = 0,0063$, Fig. 4F). Asimismo, cuando se utilizó la cohorte 2 de TNBC como cohorte de descubrimiento, se seleccionó un límite de RLIT de 0,011, y en la cohorte 1 un RLIT de menos de 0,011 se asoció con una supervivencia significativamente más específica de la enfermedad que los pacientes con un RLIT de más de 0,011 ($p = 0,0037$, Fig. 4F).

25 La potencia pronóstica de RLIT se compara favorablemente con el de los indicadores de pronóstico publicados previamente. La RLIT es un indicador de pronóstico más potente que el indicador "Lym" publicado anteriormente (un indicador basado en imágenes de tumores de la abundancia de linfocitos; Yuan et al., 2012) y varios indicadores publicados basados en firmas genéticas (Calabro et al., Ascierto et al., Rody et al, Ma et ál., Gu-Trantien et al).

30 El mismo enfoque de selección de corte utilizado para seleccionar el corte de RLIT se utilizó para probar el poder de pronóstico de "Lym" (una medida basada en imágenes de la abundancia de linfocitos en secciones de tumores) y varias firmas de expresión génica en TNBC y en cáncer de ovario. Ninguno de estos otros indicadores pronósticos se correlacionó consistentemente con el pronóstico tanto en la cohorte 1 como en la cohorte 2. Por el contrario, la RLIT estratificó de forma consistente a los pacientes en dos grupos de resultados clínicos diferentes. (Véase las Fig. 4, Fig. 5., Fig. 14)

35 En comparación con las firmas de expresión génica publicadas, la RLIT fue también la única firma que mostró una correlación significativa con la supervivencia específica de la enfermedad en el modelo multivariado de riesgos proporcionales de Cox junto con los parámetros clínicos estándar del estado ganglionar y el tamaño del tumor en ambas cohortes, se usó cualquier cohorte como la cohorte de descubrimiento (tablas 1 a 3).

40 Usando muestras de ambas cohortes TNBC, RLIT tiene un valor p del rango logarítmico de $2,1 \times 10^{-4}$ y un HR 0,32 (0,17-0,58). Para probar la robustez del modelo de Cox en la determinación del valor pronóstico de RLIT, se usó el análisis bootstrap en datos perturbados al azar y el análisis de regresión univariable y multivariable se repitió 1.000 veces. En el 95,6 % y el 94,7 % de los casos, la RLIT se mantuvo significativamente asociado al pronóstico en los análisis univariados y multivariados, respectivamente. Tomados en conjunto, estos datos apoyan la estabilidad y la robustez de la RLIT como un biomarcador pronóstico independiente en el TNBC.

50 La RLIT mide la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas, por lo tanto, es diferente del enfoque de evaluación patológica descrito en estudios anteriores (Denkert, 2010; Loi, 2013; Deici, 2014), donde se informó la proporción de nidos tumorales infiltrados por linfocitos. Estos estudios previos concuerdan con los resultados descritos en el presente documento, porque muestran que los linfocitos de infiltración de tumores están significativamente correlacionados con un resultado favorable en TNBC. Estos enfoques anteriores, como los experimentos indicados en el presente documento, se basaron en muestras patológicas teñidas con H y E y, por lo tanto, respaldan la posición de que las medidas de infiltración linfocitaria pueden ser una herramienta útil para ayudar a las decisiones clínicas en el TNBC.

55 A diferencia de los procedimientos de la invención (que se basan en el análisis de imágenes automatizado), los procedimientos anteriores se basan en la evaluación de secciones de tumores por parte de anatomopatólogos (Denkert, 2010; Loi, 2013; Deici, 2014; Salgado, 2014). Los procedimientos anteriores que analizan las proporciones de nidos tumorales infiltrados por linfocitos son, por lo tanto, subjetivos y, por lo tanto, están sujetos a sesgos y variabilidad, y generan resultados de manera relativamente lenta con mayores costes asociados, Los procedimientos anteriores son, por lo tanto, inadecuados para análisis a gran escala.

65 El enfoque adoptado en la presente invención, de identificación de subtipos de linfocitos por análisis de imagen, Contrasta con los enfoques anteriores para evaluar la infiltración inmunitaria en tumores. Los enfoques anteriores que utilizan el análisis de imágenes (Yuan, 2012) solo han tenido en cuenta la abundancia de linfocitos en los tumores, mientras que los enfoques que intentan tomar en cuenta las ubicaciones espaciales de los linfocitos (Denkert, 2010;

Loi, 2013; Deici, 2014) han utilizado solo procesos basados en procedimientos manuales (anatomopatólogos) y se han basado en la evaluación cualitativa y subjetiva de las constelaciones de células cancerosas y sus relaciones con los linfocitos (la presencia del "nido" de las células cancerosas y la proporción de nidos que contienen linfocitos). En contraste, el presente inventor ha adoptado el enfoque de usar técnicas de análisis de imágenes para identificar subtipos de linfocitos dentro de tumores y usar la abundancia relativa de un subtipo de linfocitos (LIT) a células cancerosas como una medida cuantitativa objetiva de la infiltración inmunológica. Las técnicas de análisis de imágenes de la presente invención son Preferentemente técnicas automatizadas o implementadas por ordenador, facilitando así el análisis de grandes números (del orden de 100.000, Preferentemente al menos 10.000, al menos 50.000, o al menos 100.000) de linfocitos por imagen de tumor y permitiendo análisis a gran escala de cohortes de pacientes que tienen varios tipos y subtipos de cáncer.

A diferencia de los procedimientos de la invención, que predicen con fuerza el resultado clínico, las puntuaciones patológicas de la infiltración inmunitaria (incluida la evaluación patológica de la infiltración linfocitaria) no se correlacionaron significativamente con el pronóstico (Figura 13). Las puntuaciones patológicas analizadas incluyeron PAM50 (Perou et al., 2000), evaluación patológica de la infiltración linfocitaria, el tamaño del tumor y el grado. La evaluación patológica de la infiltración linfocitaria para los fines de este estudio se puntuó como ausente, leve o severa: Ausente si no había linfocitos, leve si hubo una ligera dispersión de linfocitos, y grave si hubo un infiltrado linfocitario prominente.

Los procedimientos pronósticos de la invención, que se basan en un indicador objetivo de la infiltración de células inmunes obtenida por un procedimiento automatizado, tienen varias ventajas sobre los procedimientos de pronóstico anteriores para el uso en el cáncer. Tal y como se ha explicado anteriormente, La RLIT tiene mayor poder predictivo que varios biomarcadores de cáncer e indicadores de pronóstico conocidos anteriormente y un mayor poder predictivo que las puntuaciones patológicas de infiltración inmunológica. Debido a que la RLIT se determina utilizando procedimientos automatizados, proporciona una medición objetiva de la infiltración de células inmunitarias en el cáncer (es decir, no está sujeta a sesgos subjetivos o errores humanos, lo que provoca variabilidad en los resultados), no requiere puntuaciones por un anatomopatólogo (y, por lo tanto, no requiere formación para los anatomopatólogos ni seguimiento de nuevas pautas) y es de coste relativamente bajo y rápido de obtener, lo que lo hace adecuado para el análisis a gran escala de datos de cáncer. Aunque la detección de firmas basadas en firmas de expresión génica puede ser automatizada, la RLIT, debido a que puede convenientemente basarse en imágenes de tumores como las secciones teñidas con H y E (las copias se pueden compartir y almacenar de manera fácil y económica a largo plazo), es un biomarcador de menor costo y más conveniente que los biomarcadores basados en firmas de expresión génica (que requieren acceso a muestras biológicas conservadas). La RLIT basada en imágenes supera a varias firmas basadas en la expresión génica utilizando el procedimiento de selección de corte óptimo. Además, Considerando el coste de la adquisición de datos de micromatrices, los enfoques basados en la RLIT descritos en el presente documento abren una nueva vía para el análisis a gran escala sobre muestras patológicas fácilmente disponibles.

Tabla 1. Resultados de regresión de Cox univariados y multivariados para la RLIT y otras firmas en dos cohortes de TNBC.

Las secciones sombreadas muestran resultados de regresión multivariada. Uni-: Regresión univariable de Cox; HR: Cociente de riesgo; IC: intervalo de confianza del 95 % inferior y superior; Conc: Concordancia; 0 (0-Inf): donde el modelo de Cox no pudo converger. Los valores P que pasan el umbral significativo de 0,05 se muestran en negrita.							
		Cohorte 1			Cohorte 2		
		HR(CI)	p	Conc	p	HR(CI)	Conc
LIT	Uni-	0,36 (0,17-0,77)	0,0063	0,601	0,25 (0,09-0,69)	0,0036	0,659
	LIT	0,32 (0,15-0,7)	0,0042	0,668	0,15 (0,05-0,43)	0,00051	0,76
	Ganglio	0,63 (0,29-1,4)	0,26		4,93 (1,61-15,08)	0,0052	
	Tamaño	2,62 (1,27-5,41)	0,0092		2,07 (0,9-4,74)	0,087	
Lin	Uni-	0,47 (0,21-1,02)	0,051	0,574	0,41 (0,12-1,43)	0,15	0,575
	Lin	0,48 (0,22-1,05)	0,066	0,656	0,23 (0,05-1,02)	0,053	0,735
	Ganglio	0,69 (0,32-1,5)	0,35		4,65 (1,46-14,81)	0,0092	
	Tamaño	2,35 (1,16-4,77)	0,018		1,66 (0,65-4,25)	0,29	

(continuación)

		Cohorte 1			Cohorte 2		
		HR(CI)	p	Conc	p	HR(CI)	Conc
Calabro	Uni-	0,25 (0,12-0,52)	5,2x10⁻⁵	0,66	0,5 (0,18-1,39)	0,18	0,587
	Calabro	0,27 (0,13-0,56)	3,8x10⁻⁴	0,703	0,41 (0,14-1,19)	0,1	0,744
	Ganglio	0,75 (0,35-1,6)	0,45		4,57 (1,45-14,37)	0,0093	
	Tamaño	2,26 (1,07-4,76)	0,032		1,91 (0,82-4,46)	0,13	
Ascierto	Uni-	0,34 (0,15-0,77)	0,0066	0,621	1,23 (0,4-3,83)	0,72	0,51
	Ascierto	0,39 (0,17-0,88)	0,024	0,671	1,18 (0,37-3,72)	0,78	0,735
	Ganglio	0,85 (0,39-1,84)	0,68		3,6 (1,21-10,7)	0,021	
	Tamaño	2,06 (1,02-4,16)	0,044		2,16 (0,86-5,45)	0,1	
IL8	Uni-	3,09 (1,46-6,51)	0,0018	0,615	0 (0-Inf)	0,0099	0,645
	IL8	2,79 (1,32-5,92)	0,0073	0,679	0 (0-Inf)	1	0,808
	Ganglio	0,81 (0,37-1,75)	0,59		3,14 (1,06-9,34)	0,039	
	Tamaño	2,23 (1,08-4,63)	0,031		1,75 (0,71-4,28)	0,22	
CXCL13	Uni-	0,21 (0,1-0,46)	1,5x10⁻⁵	0,69	0,76 (0,28-2,1)	0,6	0,545
	CXCL13	0,24 (0,11-0,54)	4,5x10⁻⁴	0,721	0,83 (0,29-2,37)	0,73	0,739
	Ganglio	0,69 (0,32-1,49)	0,35		3,61 (1,22-10,71)	0,021	
	Tamaño	1,71 (0,83-3,55)	0,15		2,12 (0,86-5,22)	0,1	

Tabla 2. Resultados de la regresión de Cox univariados y multivariados para la RLIT y otras ocho firmas usando los valores de corte óptimos seleccionados en la cohorte 1 y validados en la cohorte 2. Uni-: Regresión univariable de Cox; Multi-: Regresión multivariable de Cox; HR: Cociente de riesgo; IC: intervalo de confianza del 95 % inferior y superior; Conc: Concordancia; Inf: El modelo de Cox no pudo converger.

	Cohort1			Cohort2		
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-LIT	0,36(0,17-0,77)	0,0063	0,601	0,25(0,09-0,69)	0,0036	0,659
Multi-LIT	0,32(0,15-0,7)	0,0042	0,668	0,15(0,05-0,43)	0,00051	0,76
Multi-nodo	0,63(0,29-1,4)	0,26		4,93(1,61-15,08)	0,0052	
Multi-tamaño	2,62(1,27-5,41)	0,0092		2,07(0,9-4,74)	0,087	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-Lym	0,47(0,21-1,02)	0,051	0,574	0,41(0,12-1,43)	0,15	0,575
Multi-Lym	0,48(0,22-1,05)	0,066	0,656	0,23(0,05-1,02)	0,053	0,735
Multi-nodo	0,69(0,32-1,5)	0,35		4,65(1,46-14,81)	0,0092	
Multi-tamaño	2,35(1,16-4,77)	0,018		1,66(0,65-4,25)	0,29	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-Calabro	0,25(0,12-0,52)	5.20E,-05	0,66	0,5(0,18-1,39)	0,18	0,587
Multi-Calabro	0,27(0,13-0,56)	0,00038	0,703	0,41(0,14-1,19)	0,1	0,744
Multi-nodo	0,75(0,35-1,6)	0,45		4,57(1,45-14,37)	0,0093	
Multi-tamaño	2,26(1,07-4,76)	0,032		1,91(0,82-4,46)	0,13	

(continuación)

	Cohort1			Cohort2		
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-IL8	3,09(1,46-6,51)	0,0018	0,615	0(0-Inf)	0,0099	0,645
Multi-IL8	2,79(1,32-5,92)	0,0073	0,679	0(0-Inf)	1	0,808
Multi-nodo	0,81(0,37-1,75)	0,59		3,14(1,06-9,34)	0,039	
Multi-tamaño	2,23(1,08-4,63)	0,031		1,75(0,71-4,28)	0,22	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-Bcell	0,6(0,25-1,48)	0,26	0,557	0,51(0,12-2,27)	0,37	0,539
Multi-Bcell	0,57(0,23-1,4)	0,22	0,655	0,48(0,11-2,17)	0,34	0,747
Multi-nodo	0,7(0,32-1,5)	0,35		3,77(1,27-11,2)	0,017	
Multi-tamaño	2,38(1,19-4,76)	0,014		2,07(0,86-5)	0,11	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-Bcell.IL8	0,52(0,24-1,11)	0,086	0,581	1,1(0,41-2,95)	0,86	0,482
Multi-Bcell.IL8	0,53(0,25-1,12)	0,097	0,648	1,22(0,42-3,53)	0,71	0,743
Multi-nodo	0,74(0,34-1,6)	0,44		3,76(1,24-11,41)	0,02	
Multi-tamaño	2,36(1,17-4,76)	0,016		2,21(0,88-5,54)	0,091	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni ascierto	0,34(0,15-0,77)	0,0066	0,621	1,23(0,4-3,83)	0,72	0,51
Multi-Ascierto	0,39(0,17-0,88)	0,024	0,671	1,18(0,37-3,72)	0,78	0,735
Multi-nodo	0,85(0,39-1,84)	0,68		3,6(1,21-10,7)	0,021	
Multi-tamaño	2,06(1,02-4,16)	0,044		2,16(0,86-5,45)	0,1	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-CXCR3	0,3(0,14-0,64)	9.00E,-04	0,618	0,82(0,3-2,25)	0,7	0,535
Multi-CXCR3	0,31(0,15-0,66)	0,0026	0,683	0,79(0,25-2,45)	0,68	0,73
Multi-nodo	0,86(0,39-1,87)	0,7		3,81(1,24-11,72)	0,02	
Multi-tamaño	2,24(1,13-4,44)	0,02		2,07(0,82-5,18)	0,12	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-CXCL13	0,21(0,1-0,46)	1.50E,-05	0,69	0,76(0,28-2,1)	0,6	0,545
Multi-CXCL13	0,24(0,11-0,54)	0,00045	0,721	0,83(0,29-2,37)	0,73	0,739
Multi-nodo	0,69(0,32-1,49)	0,35		3,61(1,22-10,71)	0,021	
Multi-tamaño	1,71(0,83-3,55)	0,15		2,12(0,86-5,22)	0,1	

Tabla 3. Resultados de la regresión de Cox univariados y multivariados para la RLIT y otras ocho firmas usando los valores de corte óptimos seleccionados en la cohorte 2 y validados en la cohorte 1. Uni-: Regresión univariable de Cox; Multi-: Regresión multivariable de Cox; HR: Cociente de riesgo; IC: intervalo de confianza del 95 % inferior y superior; Conc: Concordancia.

	Cohort1			Cohort2		
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-LIT	0,45(0,21-0,96)	0,033	0,587	0,26(0,1-0,71)	0,0048	0,656
Multi-LIT	0,38(0,17-0,84)	0,016	0,654	0,16(0,05-0,48)	0,001	0,76
Multi-nodo	0,62(0,28-1,37)	0,23		4,64(1,52-14,15)	0,007	
Multi-tamaño	2,62(1,27-5,39)	0,0088		2,07(0,89-4,83)	0,091	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-Lym	0,91(0,43-1,91)	0,8	0,524	0,35(0,13-0,98)	0,038	0,63
Multi-Lym	0,92(0,43-1,95)	0,82	0,627	0,29(0,1-0,85)	0,024	0,778
Multi-nodo	0,72(0,33-1,58)	0,41		3,82(1,29-11,38)	0,016	
Multi-tamaño	2,33(1,18-4,64)	0,015		1,85(0,73-4,73)	0,2	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-Calabro	0,53(0,24-1,2)	0,12	0,578	0(0-Inf)	0,04	0,608
Multi-Calabro	0,56(0,24-1,28)	0,17	0,667	0(0-Inf)	1	0,799
Multi-nodo	0,67(0,31-1,46)	0,31		4,12(1,39-12,23)	0,011	
Multi-tamaño	2,17(1,11-4,24)	0,023		1,91(0,8-4,55)	0,14	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-IL8	1,76(0,86-3,6)	0,12	0,575	0,18(0,05-0,63)	0,0026	0,692
Multi-IL8	1,74(0,84-3,59)	0,14	0,65	0,21(0,06-0,77)	0,018	0,795
Multi-nodo	0,8(0,37-1,73)	0,57		3,76(1,25-11,34)	0,019	
Multi-tamaño	2,29(1,17-4,51)	0,016		1,87(0,68-5,17)	0,23	

(continuación)

	Cohort1			Cohort2		
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-Bcell	0,74(0,35-1,59)	0,44	0,541	0,41(0,09-1,82)	0,23	0,557
Multi-Bcell	0,75(0,35-1,6)	0,45	0,63	0,33(0,07-1,5)	0,15	0,763
Multi-nodo	0,72(0,33-1,55)	0,39		4,24(1,41-12,76)	0,01	
Multi-tamaño	2,33(1,17-4,61)	0,016		1,94(0,81-4,67)	0,14	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-Bcell.IL8	0,82(0,35-1,92)	0,65	0,511	0,45(0,16-1,31)	0,13	0,599
Multi-Bcell.IL8	0,75(0,32-1,76)	0,51	0,629	0,59(0,2-1,76)	0,34	0,753
Multi-nodo	0,73(0,34-1,59)	0,43		3,28(1,08-9,94)	0,036	
Multi-tamaño	2,4(1,2-4,83)	0,014		2,18(0,85-5,6)	0,11	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni ascierto	0,83(0,39-1,78)	0,64	0,52	2,26(0,82-6,23)	0,11	0,63
Multi-Ascierto	1(0,46-2,16)	0,99	0,619	2,6(0,87-7,82)	0,089	0,773
Multi-nodo	0,73(0,34-1,59)	0,43		3,22(1,08-9,61)	0,036	
Multi-tamaño	2,33(1,16-4,66)	0,017		2,46(0,91-6,62)	0,075	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-CXCR3	0,56(0,24-1,29)	0,17	0,569	0(0-Inf)	0,029	0,618
Multi-CXCR3	0,62(0,26-1,48)	0,28	0,658	0(0-Inf)	1	0,805
Multi-nodo	0,68(0,32-1,49)	0,34		4,17(1,41-12,38)	0,01	
Multi-tamaño	2,16(1,09-4,28)	0,028		1,89(0,8-4,46)	0,15	
	HR(CI)	valor p	conc	HR(CI)	valor p	conc
Uni-CXCL13	0,35(0,17-0,75)	0,0043	0,605	2,21(0,71-6,86)	0,16	0,595
Multi-CXCL13	0,38(0,18-0,79)	0,01	0,663	3,38(0,92-12,45)	0,067	0,773
Multi-nodo	0,69(0,32-1,49)	0,35		3,71(1,24-11,1)	0,019	
Multi-tamaño	2,29(1,11-4,72)	0,026		2,71(0,94-7,8)	0,064	

La RLIT como evaluación no sesgada de la infiltración inmunitaria puede facilitar el descubrimiento de correlaciones moleculares con este fenómeno clínicamente importante. Aunque la expresión de muchos genes relacionados con el sistema inmunológico en tumores se asoció significativamente con la RLIT, no está claro si estos genes se expresan en células cancerosas o linfocitos. Esto se debe a que los datos de la micromatriz se obtuvieron utilizando materiales de tumor completo sin microdissección.

5

Los datos en el presente documento muestran que la expresión de ARN de la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA4), un receptor de la familia de las inmunoglobulinas y el objetivo de ipilimumab, se asoció significativamente con la RLIT, así como con una supervivencia más prolongada específica de la enfermedad en I TNBC. Esto es consistente con la observación reciente en los cánceres de pulmón de células no pequeñas de que la sobreexpresión de CTLA4 se asocia a una tasa de mortalidad reducida (Salvi, 2012). CTLA4 se expresa en células tumorales en diferentes tipos de cáncer (Contardi, 2005). En el cáncer de mama, se expresa tanto en las células tumorales como en linfocitos T y se ha informado previamente una correlación inversa entre la expresión de CTLA4 y el resultado clínico (es decir, una expresión alta de CTLA4 asociado a un resultado clínico deficiente) en 60 pacientes con diferentes subtipos de cáncer de mama (Mao, 2010), que contrasta con los datos de TNBC (véase a continuación) y que, por lo tanto, resalta los nuevos conocimientos moleculares sobre el cáncer producidos por RLIT. Un estudio reciente mostró que la expresión de ARNm in situ de otro receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas, *PDL1*, se asocia a un aumento de la infiltración inmunitaria y una supervivencia sin recidiva favorable en diferentes subtipos de cáncer de mama (Schalper, 2014).

10

15

20

Tomados en conjunto, los datos en el presente documento apoyan el potencial de las terapias dirigidas a CTLA4 en TNBC. CTLA4 es un regulador negativo de las células T, y por lo tanto su expresión reduce la destrucción de células cancerosas mediada por células T. Los datos en el presente documento muestran una asociación positiva entre la expresión de CTLA4 y la RLIT, consistente con la expresión LIT de CTLA4. La expresión de CTLA4 en los LIT puede explicar por qué en muchos tumores las células cancerosas no se eliminaron incluso en presencia de un alto número de LIT. El uso de antagonistas de CTLA4 para inhibir la tolerancia inmune al cáncer y para activar los LIT puede ser una estrategia de tratamiento eficaz para TNBC.

25

30

La agrupación no supervisada con modelos de mezcla de Gauss para la expresión de CTLA4 en todos los 1.980 tumores METABRIC reveló dos agrupaciones, uno con alto y otro con bajo nivel de expresión de CTLA4 (Fig. 15 A). Usando esta definición de agrupación para los tumores TNBC, encontramos que los pacientes con TNBC con un nivel más alto de expresión de CTLA4 tienen una supervivencia significativamente mejor específica de la enfermedad que los pacientes con un nivel más bajo de expresión de CTLA4 ($p = 0,018$, HR = 0,61, CI = 0,41-0,92, Fig. 15 B).

El análisis del módulo genético también reveló varios estrechamente conectados, módulos funcionalmente relacionados. Por ejemplo, un módulo contiene APOBEC3G (apolipoproteína B MRNA, enzima de edición, polipéptido catalítico similar a 3G), que se sabe que juega un papel importante en la inmunidad adaptativa e innata y se ha investigado ampliamente en infecciones virales (Mangeat, 2003), pero su papel en el cáncer de mama no ha sido investigado en detalle. Es un miembro de la enzima de edición de ARNm de apolipoproteína B, La familia de complejos de edición tipo polipéptido catalítico junto con APOBEC3B, que se descubrió que era una fuente de mutagénesis en muchos tipos de cáncer importantes, incluido el cáncer de mama (Kuong, 2013). En las muestras de TNBC en el presente documento estudiadas, La expresión de APOBEC3G está significativamente correlacionada con un pronóstico favorable (log-rank $p = 0,02$) pero no con otros miembros de APOBEC, incluyendo APOBEC3B ($p = 0,29$). APOBEC3G se expresa principalmente en linfocitos T CD4 +, Macrófagos y células dendríticas (Monajemi, 2012). Los datos actuales revelaron una fuerte asociación entre APOBEC3G y el gen de la célula asesina natural NKG7 y las interleucinas en este módulo y respaldan la importancia de APOBEC3G en TNBC.

Las asociaciones entre la RLIT y genes inmunológicamente relevantes, las rutas y los módulos respaldan la validez de la RLIT como medida de la infiltración linfocitaria y revelan las crregulaciones de los genes inmunitarios clave.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar un pronóstico en un paciente con cáncer de mama triple negativo, comprendiendo el procedimiento, determinar el nivel de expresión de APOBEC3G en una muestra de tumor obtenida del paciente, en donde el aumento de la expresión y / o la expresión de APOBEC3G indica un pronóstico positivo.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar un pronóstico en un paciente con cáncer de mama triple negativo, comprendiendo el procedimiento, determinar el nivel de expresión de CTLA4 en una muestra de tumor obtenida del paciente, en donde el aumento de la expresión de CTLA4 indica un pronóstico positivo. El aumento de la expresión de CTLA4 puede ser expresión de CTLA4 por encima del percentil medio (50) para TNBC, o puede ser expresión de CLTA4 por encima del percentil (25) para TNBC. El aumento de la expresión de CTLA4 puede ser una expresión de CTLA4 que sea alta en relación con uno o más genes "de mantenimiento", como la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Un procedimiento para determinar un pronóstico basado en la RLIT como se describe en el presente documento puede comprender además una etapa para medir la expresión de CTLA4 en un tumor obtenido del paciente con cáncer. El paciente con cáncer puede ser un paciente TNBC. La etapa de medir la expresión de CTLA4 puede implicar la hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, análisis basados en micromatrices) o técnicas inmunohistoquímicas. En tales procedimientos, la combinación de una RLIT por encima de un valor de corte predeterminado y un aumento de la expresión de CTLA4 indica un pronóstico positivo. El valor de corte predeterminado para la RLIT puede ser de aproximadamente 0,03 o de aproximadamente 0,032.

La RLIT es un indicador cuantitativo objetivo de la infiltración linfocitaria en tumores. Esta medida cuantitativa de la infiltración inmunitaria es útil para guiar las decisiones de tratamiento en el cáncer.

En consecuencia, un aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento de uso de la RLIT para predecir si un paciente con cáncer responderá o no a una terapia.

Dicho procedimiento puede ser un procedimiento para predecir si un paciente con cáncer responderá a un régimen terapéutico, comprendiendo el procedimiento medir la infiltración inmunitaria en un tumor del paciente con cáncer de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento, en el que una RLIT por encima de un valor de corte de RLIT indica que es probable que el paciente responda al régimen terapéutico.

La RLIT es útil para informar decisiones de tratamiento para pacientes con cáncer. En consecuencia, un aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un paciente con cáncer, en el que se ha determinado que la RLIT del tumor está por debajo, o por encima, de un valor de corte predeterminado. El paciente con cáncer puede ser un individuo del que se ha obtenido una imagen de un tumor. El procedimiento puede comprender determinar la RLIT en un tumor del paciente. El procedimiento de tratamiento puede comprender la administración de un régimen terapéutico.

El régimen terapéutico puede ser radioterapia o quimioterapia o cualquier combinación de estos. Un régimen terapéutico que comprende quimioterapia puede comprender quimioterapia basada en antraciclina. Un régimen terapéutico puede comprender la administración de un agente terapéutico. En consecuencia, un aspecto de la presente divulgación proporciona un agente terapéutico para uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con cáncer, en el que se ha obtenido un pronóstico para el paciente con cáncer usando un procedimiento como se divulga en el presente documento.

La RLIT proporciona información para predecir un pronóstico a largo plazo y para notificar las decisiones de tratamiento al paciente. Así, si un paciente tiene una RLIT baja y es probable que tenga un mal pronóstico, este paciente puede recibir un tratamiento más intensivo (por ejemplo, más ciclos de quimioterapia) que un paciente con una RLIT alta.

En consecuencia, un aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente con cáncer de acuerdo con un régimen terapéutico, comprendiendo el procedimiento analizar una imagen tumoral del paciente con cáncer según un procedimiento descrito en el presente documento y tratar al paciente con cáncer según el régimen terapéutico dependiendo de si la RLIT está por debajo o por encima de un valor de corte predeterminado.

La RLIT combinada con la expresión de CTLA4 proporciona más información de pronóstico. La expresión relativamente alta de CTLA4 puede estar asociado a una RLIT alta y la inhibición de CTLA4 puede activar los linfocitos T para destruir las células cancerosas. Por lo tanto, para un paciente que tiene una RLIT por encima de un valor de corte predeterminado y que tiene una expresión aumentada de CTLA4, el régimen terapéutico puede comprender la administración de un antagonista de CTLA4. El antagonista de CTLA4 puede ser un anticuerpo, por ejemplo ipilimumab.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona un antagonista de CTLA4 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que se ha determinado que un tumor del paciente tiene una RLIT alta. Un aspecto de la presente invención proporciona un antagonista de CTLA4 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que se ha determinado que un tumor del paciente tiene una RLIT por encima de un valor de corte predeterminado de RLIT de acuerdo con un procedimiento de la invención. El cáncer puede ser un tipo o subtipo específico de cáncer y el valor de corte de RLIT predeterminado puede ser el valor de corte determinado para una cohorte de pacientes que tienen ese tipo o subtipo de cáncer. El subtipo de cáncer puede ser el cáncer de mama. El antagonista de CTLA4 puede ser un anticuerpo, que puede ser un anticuerpo anti-CTLA4. El anticuerpo anti-CTLA4 puede ser ipilimumab (también conocido como MDX-010 y MDX-101). El paciente con cáncer puede ser un paciente con TNBC y la terapia puede ser ipilimumab.

Los procedimientos de pronóstico y terapéuticos descritos en el presente documento pueden comprender además reseccionar quirúrgicamente un tumor de un paciente con cáncer, medir la infiltración inmunitaria en el tumor de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento, y determinar un pronóstico y / o tratar al paciente con cáncer de acuerdo con un régimen terapéutico basado en la RLIT del tumor. Un tumor resecado quirúrgicamente es un tumor extirpado quirúrgicamente. El procedimiento para medir la infiltración inmunitaria puede usar una sección de tumor completo.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar la eficacia de un régimen terapéutico. El procedimiento puede comprender determinar la RLIT de una biopsia de tumor obtenida de un paciente antes de someterse al régimen terapéutico, determinar la RLIT de una biopsia de tumor obtenida del paciente después de someterse al agente terapéutico y asociar una RLIT incrementada con eficacia terapéutica (es decir, un efecto terapéutico).

Los procedimientos de análisis de tumores de acuerdo con la divulgación pueden modificarse para proporcionar información adicional sobre los subtipos de linfocitos y su relevancia en el cáncer. Se sabe que los linfocitos en los tumores abarcan diversas subclases, incluidas linfocitos T auxiliares, linfocitos T reguladoras, células asesinas naturales y linfocitos B con implicaciones sofisticadas para la respuesta al tratamiento (Fridman, 2012; Gu-Trantien, 2013; Andre, 2013). Se puede realizar un análisis inmunohistoquímico de secciones de tumores con marcadores de células inmunes, para lo cual se podrían desarrollar procedimientos automatizados de análisis de imágenes inmunohistoquímicas y modelos estadísticos para discernir las interacciones entre el cáncer y la respuesta inmune antitumoral.

En el contexto de los procedimientos y agentes terapéuticos descritos en el presente documento, Una sección patológica puede ser una sección de tumor. Una sección de tumor puede ser una sección de tumor completo. Una sección de tumor completo es normalmente una sección cortada de un tumor resecado quirúrgicamente, representando así las características de todo el tumor. Por lo tanto, una sección de todo el tumor puede ser una sección resecada quirúrgicamente. Una sección patológica puede ser una biopsia obtenida de un tumor. La sección patológica está, preferentemente, teñida. La tinción facilita el análisis morfológico de las secciones del tumor coloreando las células, las estructuras subcelulares y los orgánulos. Se puede utilizar cualquier tipo de tinción, siempre que la tinción facilite el análisis morfológico. La sección patológica se puede teñir con hematoxilina y eosina (H y E). La tinción de H y E es la tinción más utilizada en histopatología para el diagnóstico médico, particularmente para el análisis de secciones de biopsia de cánceres sospechosos por anatomopatólogos. Por lo tanto, las secciones patológicas teñidas con H y E generalmente están disponibles como parte de grandes conjuntos de datos recopilados para el estudio del cáncer. La aplicabilidad de los presentes procedimientos a las secciones patológicas teñidas con H y E los hace particularmente adaptables para su uso en el análisis de conjuntos de datos de muchos tipos y subtipos de cáncer para determinar el valor pronóstico de RLIT y para determinar los valores de corte de RLIT para uso en los procedimientos descritos en el presente documento.

La referencia en el presente documento a la RLIT de un tumor también se refiere a la RLIT de una sección patológica, sección de tumor o imagen del tumor.

La referencia en el presente documento a un valor de RLIT que está por debajo de un valor de corte también puede

referirse a que un valor de RLIT sea igual o inferior a un valor de corte.

En el presente contexto, el término imagen de tumor se refiere a una imagen de un tumor de un paciente. Una imagen de tumor puede ser una imagen de una sección patológica o de una sección de tumor. En la presente divulgación, se puede hacer referencia a un paciente que tiene una RLIT (por ejemplo, una RLIT por debajo de un valor de corte predeterminado), lo que significa que se ha determinado que una imagen de un tumor de ese paciente tiene una RLIT. La imagen del tumor puede ser de una sección de un tumor resecado quirúrgicamente, o puede ser una biopsia de un tumor.

En el presente contexto, la proporción de linfocitos intratumorales a células cancerosas (RLIT) es la proporción en la sección patológica, en un tumor, en una biopsia del tumor, en una sección del tumor o en una imagen del tumor, sección de tumor o sección patológica. El término RLIT también puede atribuirse a un paciente. Un paciente que tiene una RLIT de un valor particular se refiere a un paciente de quien una sección patológica tiene una RLIT de un valor particular.

Los términos "infiltración linfocitaria" e "infiltración inmunitaria" se usan indistintamente en el presente documento.

En el presente contexto, "automatizado" se refiere a procesos que operan independientemente del control o entrada externa (humana). En el presente contexto, un proceso automatizado puede ser un proceso implementado por ordenador. Los procedimientos de la presente invención son procedimientos implementados por ordenador. Los procedimientos de la presente invención pueden ser procedimientos completamente automatizados, es decir, pueden operar independientemente del control humano o de la entrada en su totalidad. Los procedimientos de la presente invención pueden comprender una etapa de identificación de linfocitos y células cancerosas mediante análisis automatizado de imágenes. Los procedimientos de la presente invención pueden realizarse en una imagen de tumor en la que los linfocitos y las células cancerosas se han identificado mediante análisis de imagen automatizado.

Los procedimientos de la presente invención se realizan en secciones patológicas, tales como secciones de tumores. Los procedimientos de la presente invención son, por lo tanto, procedimientos *ex vivo*, es decir, los procedimientos de la presente invención no se practican en el cuerpo humano.

Un paciente con cáncer en el contexto de la presente invención es un individuo que tiene cáncer o que ha sido diagnosticado con cáncer. La referencia al cáncer puede ser una referencia a un tipo o subtipo particular de cáncer. El paciente de cáncer puede haber sido sometido a quimioterapia basada en antraciclina, inmunoterapia o una terapia de combinación que comprende quimioterapia basada en antraciclina e inmunoterapia. El paciente con cáncer puede tener cáncer de mama, cáncer colorrectal, melanoma o cáncer de pulmón no microcítico. El paciente con cáncer puede tener el subtipo de cáncer de mama conocido como cáncer de mama triple negativo. El cáncer de mama triple negativo se puede definir como un cáncer de mama que es negativo para los receptores de estrógeno (ER) y HER2. (TNBC a veces se define como cáncer de mama que es negativo para los receptores de estrógeno (ER), HER2 y receptores de progesterona (PR), pero dado que los cánceres que son negativos para ER son normalmente también negativos para PR, en el presente contexto, TNBC se define como el cáncer de mama que es negativo para ER y HER2.

En el contexto de la presente invención, la referencia al tratamiento de un paciente con cáncer se refiere al tratamiento del cáncer en un paciente.

El paciente con cáncer puede tener, o el tipo o subtipo de cáncer puede seleccionarse de, cáncer de mama (incluyendo carcinoma de mama ductal de mama y carcinoma lobular de mama), cáncer del sistema nervioso central (incluyendo glioblastoma multiforme y glioma de grado inferior), cáncer endocrino (incluyendo carcinoma adrenocortical, carcinoma tiroideo papilar, paraganglioma y feocromocitoma), cáncer gastrointestinal (incluido colangiocarcinoma, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma hepatocelular del hígado, adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer de estómago-esófago), cáncer ginecológico (incluyendo cáncer cervical, cistoadenocarcinoma seroso ovárico, carcinosarcoma uterino, carcinoma endometrial del cuerpo uterino), cáncer de cabeza y cuello (incluido carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma uveal), cáncer hematológico (incluida leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide aguda), cáncer de piel (incluido melanoma cutáneo), cáncer de tejidos blandos (incluido sarcoma), cáncer torácico (incluido adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de pulmón, mesotelioma) y cáncer urológico (incluido carcinoma renal de células cromóforas, carcinoma renal de células claras, carcinoma renal papilar, adenocarcinoma de próstata, cáncer de células germinales de testículo, carcinoma de vejiga urotelial). Cada uno de estos cánceres es objeto de estudio como parte del proyecto Atlas del genoma del cáncer.

En el presente contexto, el término "firmas inmunitarias" se utiliza para abarcar todos los biomarcadores relacionados con las respuestas inmunitarias e incluye las firmas de expresión génica estudiadas en el presente documento, así como otros biomarcadores que incluyen el biomarcador "Lym" (Yuan et al. 2012) y la RLIT.

Todas y cada una de las combinaciones compatibles de las realizaciones descritas anteriormente se describen explícitamente en el presente documento, como si todas y cada una de las combinaciones fueran citadas individual y explícitamente.

Varios aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación.

5 "y/o" cuando se usa en el presente documento debe tomarse como descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin la otra. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B e (iii) A y B, como si cada uno de ellos se expusiera individualmente en el presente documento.

10 A menos que el contexto indique otra cosa, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención, y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

Sección experimental

15 **Procedimientos**

Estudios de cáncer de mama

20 **Muestras clínicas**

El conjunto completo de muestras de METABRIC (Curtis et al.) contiene 1.980 tumores primarios de mama congelados de cinco hospitales contribuyentes. Entre estos, 1.026 de los 1.047 tumores de tres hospitales tienen secciones de H y E sin artefactos graves, mientras que todas las muestras de H y E de los otros dos hospitales están altamente fragmentadas debido al almacenamiento congelado a largo plazo. Por lo tanto, solo se consideraron los 1.026 tumores para este estudio (mediana de seguimiento a largo plazo de 68,3 meses). En promedio, se obtuvieron tres secciones de tumores en diferentes ubicaciones de cada tumor primario y se colocaron en el mismo portaobjetos (Yuan et al., 2012). Los materiales tumorales intercalados entre estas secciones se seccionaron, se mezclaron y se usaron para realizar el perfil molecular, maximizando así la relevancia biológica de los múltiples tipos de datos que se generan. Más detalles sobre el procedimiento experimental, los protocolos de tinción y perfilado molecular se pueden encontrar en Yuan et al 2012. Los datos de expresión génica para el mismo conjunto de tumores se perfilaron utilizando la plataforma Illumina HT-12. El estado de ER se determinó en función de la distribución bimodal de los datos de micromatrices de expresión de ESR1 y el estado de amplificación de Her2 en función de los datos de micromatrices SNP6 de los mismos tumores. En total, hubo 181 ER-negativos, Las muestras Her2-negativas y estas se definieron como triple negativo / TNBC. Las muestras de dos de los tres hospitales se fusionaron para formar la cohorte 1 (89 muestras) y las muestras del otro hospital se fusionaron para formar la cohorte 2 (92 muestras) con el fin de obtener un tamaño de población similar en cada cohorte. La infiltración inmunitaria se puntuó para 112 de las 181 muestras por los anatomopatólogos del consorcio METABRIC en tres categorías: ausente, leve y severa. Ausente si no había linfocitos, leve si hubo una ligera dispersión de linfocitos, y grave si hubo un infiltrado linfocitario prominente. Las puntuaciones patológicas de la infiltración inmunitaria no se correlacionaron significativamente con el pronóstico (Figura 13).

Análisis de imágenes de H y E

45 La precisión de la herramienta automatizada de análisis de imágenes para las imágenes de la sección de congelación de tumores mamarios de H&E se había validado previamente según las puntuaciones de los tumores patológicos y la evaluación célula por célula (Yuan et al., Natrajan et al.). Para muestras de METABRIC, esta herramienta logró una precisión de validación cruzada del 90 % para la clasificación celular y una alta correlación con las puntuaciones patológicas de las proporciones celulares (cor = 0,98) (Yuan et al.). Esta herramienta se usó para clasificar todos los núcleos celulares en 181 secciones de tumor completo TNBC, resultando en un promedio de 81.810 (desviación estándar 80.330) células cancerosas, 15.500 (25.133) linfocitos y 14.090 (14.180) células estromales para cada imagen. Los linfocitos tienen una morfología típica de pequeños núcleos basófilos redondos y homogéneos, de este modo, se pueden diferenciar de forma fiable de otros tipos de células en el cáncer. Dado que este análisis se basa en la morfología nuclear solo en la H y E, es probable que los linfocitos identificados sean una mezcla de tipos de células inmunitarias, incluidos los linfocitos T y B.

55 **Modelando la heterogeneidad espacial de la interacción inmune del cáncer**

Sea $x = x_1 x_2 \dots$, sea x_n las localizaciones espaciales de n células cancerosas y $y = y_1 y_2 \dots$, sea y_m las ubicaciones espaciales de m células inmunes en una imagen de tumor (por ejemplo, una imagen de sección de tumor de H y E). Usando una función de kernel quártico K se puede establecer

una estimación de la densidad del núcleo sobre la imagen del tumor completo: $f(x) = \frac{\sum_i^n K(x-x_i)}{h}$, donde h es el parámetro de ancho de banda para K .

65 h se optimizó utilizando los criterios de Error de mínimos cuadrados (Berman et al.) en 10 imágenes muestreadas al azar. Por lo tanto, la proximidad espacial al cáncer para una célula inmune i es $s_i = f(y_i)$. Entonces podemos identificar las clases de linfocitos basados en s , $s = s_1 s_2 \dots, s_m$, usando agrupación de mezclas gaussianas sin supervisión

(McLachlan, 2000). Este procedimiento tiene como objetivo identificar múltiples componentes / agrupaciones dentro de los datos con probabilidades que cuantifican la incertidumbre de las observaciones que pertenecen a las agrupaciones.

$$p(s) = \sum_{k=1}^K W_k G(s|\mu_k, \sigma_k),$$

5 donde K es el número de grupos, μ_k y σ_k son la media y la varianza que definen la función de densidad probabilística G para el componente k th, y w_k es el peso de un componente k . Estos parámetros se estimaron mediante Expectativa-Maximización (Dempster, 1977). La selección de modelos con diferentes números de conglomerados se puede hacer
10 usando criterios estadísticos, siendo uno de los más comunes el Criterio de Información Bayesiano (Schwartz, 1978). Se puede utilizar junto con la agrupación de modelos de mezcla para seleccionar el mejor número de agrupaciones K :

$$BIC = 2L(p(s)) + d \log(m)$$

15 donde $L()$ es la función de máxima probabilidad de registro y d es el número de parámetros libres que se deben estimar. Eficazmente, el criterio BIC tiene como objetivo evaluar el error de modelado así como la complejidad del modelo. Cuanto mayor sea el valor de BIC y mejor se considera que es la solución. Para realizar la agrupación, se muestrean aleatoriamente 100.000 células inmunitarias. Su proximidad espacial a los datos del cáncer se utilizó para
20 agrupar con un rango de K diferente, $K=1-5$. Esto se repitió 200 veces el 97 % de cuya solución con tres grupos se consideró óptima por BIC. El μ_k medio de los grupos es consistente (mediana: 0,011, 0,06, 0,13; desviación estándar / SD: 0,002, 0,0047, 0,0045). Posteriormente, se clasificó a todos los linfocitos en todas las muestras de tumores en función de estos grupos. Se usó la proporción de la cantidad de linfocitos intratumorales y la cantidad de células cancerosas como medida final de la infiltración inmunitaria intratumoral:

$$RLIT = \frac{N_{Intro-linfocito\ de\ tumor}}{N_{cancer}}$$

25

Análisis de imágenes y modelado de la heterogeneidad espacial, con más detalle

Datos de imagen

30 CRImage procesa un portaobjetos de H y E dividiéndola primero en subimágenes de 2.000 píxeles por 2.000 píxeles e identificando las células en estas subimágenes. Por lo tanto, las ubicaciones de células para estas subimágenes deben combinarse. Se proporcionan identificaciones de células y ubicaciones espaciales combinadas para todas las secciones H y E de la sección completa de TNC de 181 como archivos de datos R en una carpeta 'CellPosAndMask'.
35 Estos archivos se nombran por su ID de imagen. Cada archivo contiene la x, y las columnas de clase que almacenan las coordenadas x y, así como la clase de cada célula en el portaobjetos grande de H y E. También hay una matriz binaria "máscara" para denotar el área del tejido. La resolución de esta imagen es de 5 μ m por píxel.

Identificar el parámetro de ancho de banda óptimo para calcular la densidad del kernel

40 Al muestrear 10 muestras aleatorias, el error cuadrático medio se calcula en un rango de diferentes anchos de banda h para calcular la densidad del cáncer.

```

45 biblioteca (splancs)
MSE <- NULL
set.seed (10)
ffs <- sample(dir('./data/CellPosAndMask/'), 10)
for (ff in ffs){
50   res <- try(load(paste('./data/CellPosAndMask/', ff, sep="")))
   CellPos[,1] <- as.character(CellPos[, 1])
   CellPos[,2] <- as.numeric(CellPos[, 2])
   CellPos[, 3] <- as.numeric(CellPos[, 3])
   CellPos <- CellPos[rowSums(is.na(CellPos))==0, ]
   CellPos[,3] <- ncol(Mask) - CellPos[, 3] + 1
55   CellPos[,3][ CellPos[,3] > ncol(Mask)] <- ncol(Mask)
   CellPos <- CellPos[CellPos[, 1]!='a',]
   cell.c <- data.frame(x=as.numeric(CellPos[CellPos[, 1]!='c', 2]),
y=as.numeric(CellPos[CellPos[, 1]!='c', 3]))
   cv<- mse2d(as.points(cell.c), poly=cbind(c(0, 0, nrow(Mask), nrow(Mask)), c(0, ncol(Mask),
60   ncol(Mask), 0)), nsmse = 40, range=10)
   MSE <- rbind(MSE, cv$mse)

```

```

}
save(cv, MSE, file='./data/BandwidthSelection.rdata)

```

Se eligió h=5 como el ancho de banda óptimo para una variabilidad más baja del error cuadrático medio.

5 Generar proximidad espacial al cáncer para cada linfocito

Ahora, las puntuaciones espaciales se pueden generar dados los datos de posición de la célula usando la siguiente función getLIT. La función getLIT usa los archivos de posición de la célula para inferir un mapa de densidad de cáncer usando el ancho de banda seleccionado anteriormente.

```

getLIT <- función (ff,...) {
  require(EBImage)
  require(splancs)

  res <- try(load(paste('./data/CellPosAndMask/', ff, '.rdata', sep="")))
  if (class(res)!='try-error'){
    CellPos[,1] <- as.character(CellPos[,1])
    CellPos[,2] <- as.numeric(CellPos[,2])
    CellPos[,3] <- as.numeric(CeilPos[,3])
    CellPos <- CellPos[rowSums(is.na(CellPos))==0, ]
    CellPos[,3] <- ncol(Mask) - CellPos[,3] + 1
    CellPos[,3][ CellPos[,3] > ncol(Mask)] <- ncol(Mask)
    cell.c <- data.frame(x=as.numeric(CellPos[CellPos[,1]=='c',2]),
  25 y=as.numeric(CellPos[CellPos[,1]=='c',3]))
    res <- kernel2d(as.points(cell.c), poly=cbind(c(0, 0, nrow(Mask), nrow(Mask)), c(0,
    ncol(Mask), ncol(Mask), 0)), h0=h, nx=dim(Mask)[1], ny=dim(Mask)[2])
    cell.l <- data.frame(x=as.numeric(CellPos[CellPos[,1]=='l',2]),
  30 y=as.numeric(CellPos[CellPos[,1]=='l',3]))
    z.i <- unlist(sapply(1:length(cell.l$x), function(x) res$z[cell.l$x[x], cell.l$y[x]]))
  }
  z.l
}

```

35 Utilizando esta función, se pueden generar mediciones para cada linfocito para cada tumor.

```

itl <- list()
files <- trait$file
for (ff in files)
  40 itl <- c(itl, list(try(getITL(ff, h=5, w=3, cex=.5, ifPlot=F))))
names(itl) <- files
save(itl, file='./data/ITL.rdata')

```

45 Por defecto, la función getLIT usa los valores de corte (valores de umbral) de 0,10507473 y 0,03662728 para determinar los linfocitos intratumorales (ITL), adyacentes al tumor (LTA) y distales al tumor (LTD). Ahora describiremos cómo se seleccionaron estos puntos de corte.

Identificar subpoblaciones de linfocitos por aprendizaje no supervisado

50 El agrupamiento de la mezcla de Gauss y el BIC implementado en el paquete R mclust se utilizaron para el descubrimiento de subpoblaciones de linfocitos. Se tomaron muestras aleatorias de 100.000 linfocitos del objeto itl y después se agruparon.

```

library(mclust)
load (file='./data/ITL.rdata')
set.seed (11)
x <- sample(as.numeric(unlist(itl)), 100000)
res <- Mclust(x, G=1:5)

```

60 El proceso de muestreo se repitió para generar agrupaciones 200 veces y se evaluó el resultado de Mclust y mclustBIC. Se obtienen valores BIC para estas 200 rondas. La solución de tres grupos k = 3 permanece óptima en el 97 % del tiempo, y k = 5 se eligió el 3 % de las veces. La mediana de las medias de agrupación cuando hay tres agrupamientos son 0,0114, 0,0603 y 0,1322 con una desviación estándar de 0,002 y 0,0047 y 0,0045, respectivamente.

65 Por lo tanto, el resultado de la agrupación de linfocitos a partir de datos muestreados aleatoriamente es estable. Dado que el agrupamiento es estable, los valores de corte se tomaron al valor máximo de la primera y segunda agrupaciones

de una de las pruebas de muestreo como nuestros valores de corte para determinar la clasificación de linfocitos para las muestras restantes.

Generación de RLIT, RLAT y RLTD

5 Posteriormente, los cortes se pueden usar para clasificar cada linfocito en función de sus datos almacenados en el objeto R `itl.mat.l` es una matriz con columnas de 'Distal', 'Adyacente', 'Intra' que indica la cantidad de linfocitos en cada clase para un tumor.

```
10  th=c(0.03662728, 0.10507473)
    mat.l <- NULL
    for (i in 1:length(itl)){
      z.l <- itl[[i]]
      cl <- rep(1,length(z.l))
15  cl[z.l>th[1] & z.l<th[2]] <- 2
      cl[z.l>=th[2]] <- 3
      mat.l <- rbind(mat.l, c(sum(cl==1), sum(cl==2), sum(cl==3)))
    }
20  colnames(mat.l) <- c('Distal', 'Adjacent', 'Intra')
    rownames(mat.l) <- names(itl)
```

La columna Intra de `mat.l` es el número de linfocitos intratumorales. Esto dividido por el número de células cancerosas ($\text{trait } n_{\text{Tumour}}$) es la medida de RLIT

25 **Medición de distancias celulares y disposición espacial**

Para identificar propiedades físicas de los LIT, LTA y LTD que los diferencian, en 10.000 linfocitos muestreados aleatoriamente de 20 tumores, identificamos las 5 células cancerosas más cercanas y el centroide de la región del casco convexo que forman estas células cancerosas. Para cada linfocito, se calculó la distancia desde el linfocito hasta la célula cancerosa más cercana (d_{min}) y se calculó la distancia hasta el centroide del casco convexo del cáncer (d_{centroid}). El centroide de una región del casco convexo se calculó como las posiciones medias del subconjunto de puntos que definen el casco convexo. Las diferencias entre las clases de linfocitos en términos de d_{centroid} y d_{centroid} se evaluaron con la prueba t de Student.

35 **Otras firmas inmunitarias en comparación**

La abundancia de linfocitos basada en el resultado del análisis de la imagen se calculó como:

$$\text{linfocito} = \frac{N_{\text{linfocito}}}{N_{\text{cancer}}}$$

40 Las firmas de expresión génica se calcularon como se describe en los documentos referidos.

Módulos génicos de RLIT

45 La agrupación jerárquica se utilizó para identificar módulos genéticos altamente correlacionados agrupando la matriz de correlación de todos los genes asociados a LIT en 100 agrupaciones. Los módulos se seleccionaron a partir de estos grupos en función de la correlación absoluta de Pearson media superior a 0,75 y el tamaño del grupo superior a cinco.

50 **Comparación de los genes de RLIT y asociados a RLIT**

Para probar si la RLIT tiene un valor adicional para los genes asociados a la RLIT, se realizó un análisis multivariado de regresión de Cox con RLIT emparejado con el perfil de expresión de un gen RLIT. Esto se realizó para todos los primeros 100 genes asociados a RLIT clasificados por correlación. La RLIT se dicotomizó utilizando el umbral informado en el documento, y la expresión génica fue dicotomizada en dos grupos de igual tamaño o tres grupos (25 percentiles inferiores, 50 centrales y 25 superiores). Se produjeron tablas con la relación de riesgos, el valor p del rango log y el intervalo del 95 %. En ambos análisis con dos y tres grupos de pacientes según los datos de expresión génica, los valores p de la RLIT fueron consistentemente más altos que los valores p de los perfiles de expresión génica, además de ser más altos que el nivel de significación de 0,05 ($-\log(p)$ 2,99).

60 **Otros procedimientos estadísticos**

La tendencia monótona entre la RLIT y los parámetros clínicos se probó utilizando la prueba de tendencia Jonckheere-Terpstra (Jonckheere). El análisis de supervivencia se realizó con datos de supervivencia a 10 años específicos del

cáncer de mama. El estimador de Kaplan-Meier se utilizó para la estratificación del paciente y la prueba del rango logarítmico para las diferencias de los grupos. El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox se ajustó a los datos de supervivencia y los índices de riesgo y se calcularon los intervalos de confianza del 95 % para determinar la correlación con la supervivencia específica de la enfermedad, en el que la prueba del rango logarítmico con $p < 0,05$ se consideró significativa. La correlación entre la RLIT y la expresión génica se calculó con la correlación de Pearson y los valores q se calcularon utilizando la corrección de la tasa de descubrimiento falso (FDR) utilizando el 25 % de los datos para ajustar el modelo nulo. Los valores de corte para dicotomizar las firmas inmunitarias se optimizaron por etapas de 20 a 80 percentiles en un intervalo de 1,5. Se seleccionaron los valores de corte que mostraron el mayor significado pronóstico con la prueba del rango logarítmico. Para la prueba de consistencia en la Fig. 5F, cada firma se centró en 0 y se ajustó a la desviación estándar 1. Los cortes óptimos también se asignaron a los nuevos datos antes de la comparación. El conjunto de genes MSigDB versión 4.0 (Subramanian et al.) se usó junto con una prueba hipergeométrica para el análisis de enriquecimiento.

Estudios de cáncer de ovarios

Se obtuvieron muestras de un estudio colaborativo entre el Reino Unido y China que tenía como objetivo estudiar las implicaciones clínicas de la infiltración inmunitaria en un conjunto de 91 pacientes con cáncer de ovario con enfermedad metastásica. Se obtuvieron portaobjetos teñidos con H y E para los tumores primarios, se criaron y se sometieron a análisis de imagen utilizando CRImage. Las células en estas imágenes se clasificaron en las categorías de células cancerosas, linfocitos y células estromales. Una vez que las ubicaciones espaciales de estas células se obtuvieron a partir del análisis de imágenes, se computó la densidad kernel del cáncer para cada imagen y se obtuvieron mediciones de linfocitos a cáncer para cada linfocito. Las medidas se sometieron a agrupamiento y se encontraron dos grupos, es decir, linfocitos intratumorales y no intratumorales. Se calculó la RLIT como la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas para cada paciente. El 29 % de los pacientes con RLIT más baja que un valor de corte de 0,06085726 tiene una supervivencia global significativamente peor que los pacientes con RLIT más alta que el valor de corte (prueba del rango logarítmico de la SG a 10 años $p = 0,024$, HR = 0,51, IC = 0,28-0,92; SG a 5 años $p = 0,045$, HR = 0,54, IC = 0,29-0,99; cifras en ovarios). La supervivencia global se definió utilizando la muerte como un evento independientemente de la causa, ya que esta información no estaba disponible.

Los tumores se clasificaron según el sistema de estadificación FIGO de 1988 (Prat 2013). La infiltración linfocitaria se evaluó en cinco campos de alta potencia, cada campo se puntúa como ausente, leve o severa: Ausente si no había linfocitos, leve si hubo una ligera dispersión de linfocitos, y grave si hubo un infiltrado linfocitario prominente. La mediana de las puntuaciones basadas en el campo se tomó como la puntuación de un tumor.

Resultados

Modelado estadístico de la heterogeneidad espacial de la infiltración inmunitaria - determinación de RLIT

Una herramienta automatizada de análisis de imágenes identificó las células cancerosas, linfocitos y las células estromales que abarcan los fibroblastos y las células endoteliales se basan en sus morfologías nucleares en los portaobjetos de la sección de tumores completos de H y E (Yuan et al. 2012). El componente principal de esta herramienta es un clasificador entrenado por anatomopatólogos en regiones tumorales seleccionadas al azar y validadas en 564 tumores de mama con 90 % de precisión (Yuan et al. 2012). Como resultado del análisis de imágenes, los tipos y las ubicaciones espaciales de un promedio de 110.000 células se registraron en cada sección de tumor de mama. Por lo tanto, esta herramienta totalmente automatizada permitió el mapeo de las distribuciones espaciales de todas las células cancerosas y linfocitos dentro de una sección de tumor, que puede visualizarse posteriormente como un paisaje 3D (Fig. 1A). Las relaciones espaciales de las células inmunitarias y cancerosas se analizan después con una cartera estadística ilustrada en la Fig. 1B. En primer lugar, para perfilar globalmente la distribución espacial de las células cancerosas, la densidad de las células cancerosas se cuantificó utilizando una estimación de kernel (apartado Procedimientos). De manera intuitiva, esto construye un "paisaje de cáncer" donde las colinas indican regiones tumorales densamente pobladas con células cancerosas. Por tanto, la altura de una colina se correlaciona con la densidad del cáncer en una ubicación específica en el tumor (Fig. 1B). En segundo lugar, por cada linfocito, su proximidad espacial al cáncer se puede cuantificar directamente con el paisaje de densidad del cáncer en su ubicación específica. Por lo tanto, se puede obtener de manera eficiente una medición cuantitativa de la proximidad espacial a las células tumorales para cada linfocito (Fig. 1B).

Usando esta estrategia, los inventores cuantificaron la proximidad espacial al cáncer para cada linfocito en 181 muestras de TNBC en el estudio METABRIC (apartado Procedimientos, Fig. 2A). En principio, los linfocitos que difieren en su posicionamiento espacial al cáncer se pueden diferenciar basándose en estas mediciones espaciales cuantitativas. El inventor investigó si los procedimientos de agrupamiento basados en datos según la distribución normal pueden usarse para diferenciar diferentes clases de linfocitos, dado que la distribución espacial celular es un patrón emergido naturalmente. Se empleó la agrupación de modelos de mezcla gaussiana no supervisada Fraley, 2003) para identificar agrupamientos de linfocitos en función de su proximidad espacial al cáncer utilizando un conjunto de entrenamiento de 100.000 linfocitos muestreados al azar (Fig. 2B, Procedimientos). Posteriormente, una solución de tres grupos que identifica tres clases de linfocitos se consideró óptima por el Criterio de Información Bayesiano (Schwartz, 1978) (Fig. 2B). Esta solución de tres clases es consistentemente el 97 % óptimo del tiempo en 200

muestreos repetidos, mientras que la solución de cinco clases se consideró óptima el 3 % del tiempo (procedimientos, Fig. 2C). Además, la estructura de agrupamiento de las soluciones de tres clases fue estable (mediana de la media del agrupamiento: 0,011, 0,06, 0,13; desviación estándar / SD: 0,002, 0,0047, 0,0045); Fig. 2C), lo que indica que se identificaron los mismos grupos en cada muestreo aleatorio. Las tres clases de linfocitos se denominaron Linfocitos intratumorales (LIT), Linfocitos de tumor adyacente (LTA) y Linfocitos de tumor distal (LTD). Posteriormente, se entrenó un clasificador según las clases de linfocitos para predecir los tipos de linfocitos en todas las muestras de TNBC (Procedimientos).

Para entender las diferencias de las nuevas clases de linfocitos propuestas, se derivaron medidas adicionales que se basan en distancias físicas directas. En primer lugar, para cada linfocito se puede cuantificar su distancia a la célula cancerosa más cercana (d_{min} , Procedimientos, Fig. 2D). Se demostró que los LIT tenían una mediana de la distancia de 7 μm (rango intercuartílico 5-10) a la célula cancerosa más cercana, mientras que es de 10 μm (7-11) para los LTA y de 20 μm (14-26) para los LTD (Fig. 2E). La superposición en la distancia a la célula cancerosa más cercana entre los LIT y los LTA sugiere que esta medida no es la diferencia fundamental entre las dos clases. Dado que la medida de densidad kernel según la cual se derivaron las clases de linfocitos es esencialmente un suavizado espacial, el inventor planteó la hipótesis de que la disposición espacial de las células cancerosas que rodean a los linfocitos difiere entre los LTA y los LIT. Para medir la disposición espacial, el inventor examinó la región del casco convexo formada por 5 células cancerosas más cercanas, que es la región más pequeña que cubre estas células (Fig. 2D, Procedimientos). Si un linfocito está rodeado de células cancerosas, debe caer en la región del casco convexo que forman las células cancerosas cercanas y tiene una pequeña distancia al centroide de esta región (Fig. 2D, izquierda). Por el contrario, si las células cancerosas cercanas están a un lado de un linfocito, la distancia entre el linfocito y el centroide de la región del casco convexo del cáncer es probable que sea grande (Fig. 2D, derecha). Por lo tanto, el inventor utilizó la distancia entre un linfocito y el centroide de la región del casco convexo del cáncer como medida cuantitativa de la disposición espacial de las células cancerosas que rodean un linfocito ($d_{centroid}$). Tres clases de linfocitos mostraron diferencias significativas en $d_{centroid}$ con la mediana de $d_{centroid}$ 3,6 μm (2,2-5,1), 7,2 μm (4,5-10,6), 17,7 μm (11,0-26,6) para los LIT, LTA y LTD, respectivamente (Figura 2E). Por lo tanto, d_{min} y $d_{centroid}$ juntos definen mejor y ayudan a la interpretación de las clases de linfocitos (Fig. 2F). Tomados en conjunto, estos datos demostraron que la medida propuesta de la proximidad espacial al cáncer basada en el núcleo puede explicar efectivamente la proximidad espacial y el entorno, y también que las tres clases de linfocitos difieren no solo en la distancia a la célula cancerosa más cercana sino también en las formas en que las células cancerosas cercanas se disponen. Se ilustra un caso representativo que muestra la distribución espacial de los linfocitos en estas tres clases (Fig. 3A-B). Por ejemplo, se puede observar que los LIT se ubican en regiones densamente pobladas con células cancerosas (Fig. 3C).

En las 181 muestras de TNBC, en general, hay más LTA que los otros dos tipos de linfocitos (en promedio 47 % de LTA, 32 % de LIT y 21 % de LTD, Fig. 4A). Los cambios en la abundancia de estas tres clases en 181 muestras se pueden observar en una gráfica de triángulos (Fig. 4B). Cuando la proporción de LIT es baja (0-20 %), en general, hay más LTD (40-60 %) que LTA (30-50 %). A medida que aumenta la cantidad de LIT (20-50 %), los LTA también aumentan (40-60 %) mientras que los LTD disminuyen (10-40 %). Cuando hay una gran cantidad de LIT (> 50%), todavía hay cierta cantidad de LTA (20-40 %) con muy pocos LTD (<10 %). Para resumir el grado de infiltración linfocitaria para un tumor dado, se calculó primero la relación entre el número de LIT y el número de células cancerosas (RLIT; véase el apartado de Procedimientos anteriormente). En las 181 muestras de TNBC, se observó una asociación significativa entre la RLIT y la evaluación patológica de la infiltración linfocitaria de los tumores en categorías de ausentes, leve y grave ($p = 2 \times 10^{-33}$, Fig. 4C). En cuanto a otros parámetros clínicos, no hubo correlación entre la RLIT y el tamaño del tumor, el estado ganglionar y el estado de mutación *TP53* (Fig. 4D). El grado tumoral no se consideró porque el 87 % de las muestras de TNBC son tumores de grado 3. Estos datos respaldan la validez de la RLIT como una medida de la infiltración linfocitaria y su valor potencial, además de los parámetros clínicos conocidos para el TNBC.

50 *La RLIT es una medida estadística de la infiltración linfocitaria y un predictor independiente de la supervivencia específica de la enfermedad en dos cohortes de TNBC.*

Para investigar la importancia clínica de la medida de los LIT inmunitarios propuesta, el inventor analizó la supervivencia específica de la enfermedad en función de los LIT. Las muestras de TNBC se pueden dividir en dos cohortes independientes basadas en hospitales contribuyentes (Procedimientos, $n = 89$ y $n = 92$, distribución de RLIT, Fig. 3E). Para dicotomizar la RLIT continua, el valor de corte óptimo se seleccionó para tener el mejor valor pronóstico en la cohorte 1 como la cohorte de descubrimiento (Procedimientos). El mejor valor de corte se seleccionó de modo que fuera 0,011 y el 20 % de los pacientes tenían una RLIT más baja que este valor de corte. Estos pacientes tienen una supervivencia específica de la enfermedad significativamente peor en comparación con los pacientes con una RLIT más alta en la cohorte 1 (prueba del rango logarítmico $p = 0,0063$, Razón de riesgos HR = 0,36, intervalo de confianza IC del 95 % = 0,17-0,77; la Tabla 1; Fig. 4F). Esta observación fue verificada en la cohorte de validación, Cohorte 2 ($p = 0,0037$, HR = 0,25, IC = 0,09-0,69; Fig. 4F). Se observó una estratificación significativa después del análisis repetido con la cohorte 2 como cohorte de descubrimiento y la cohorte 1 como cohorte de validación (Fig. 3G). Las mismas pruebas se realizaron para la proporción de LTA y LTD a células cancerosas (RLAT y RLTD), pero ninguno mostró una correlación significativa con la supervivencia específica de la enfermedad (cohorte de descubrimiento y validación: RLAT $p = 0,064$ y 0,75; RLTD $p = 0,43$ y 0,25; Fig. 7-8). Posteriormente, los inventores se centraron en la

RLIT. Los pacientes con TNBC con RLIT alta tienen una probabilidad de supervivencia del 80 % a los cinco años desde el diagnóstico en comparación con el 49 % para los pacientes con RLIT baja (estimaciones de supervivencia de Kaplan-Meier, dos cohortes combinadas). La RLIT se comparó con otras ocho firmas inmunitarias. Estos incluyen la firma basada en imagen previamente publicada, abundancia de linfocitos (Lym), definida como la relación entre el número de linfocitos y el número de células cancerosas (Procedimientos) (Yuan et al., 2012). Una diferencia importante entre la RLIT y Lym es que Lym no tiene en cuenta las diferentes clases de linfocitos, mientras que la RLIT considera linfocitos infiltrantes. El resto de las firmas son firmas basadas en la expresión génica publicadas por Calabro et al. (Calabro et al.) que es predictivo del pronóstico de cáncer de mama negativo para ER, una firma de 5 genes de Ascierto et al. (Ascierto et al. '12) que predice la supervivencia sin recurrencia entre los subtipos de cáncer de mama y los linfocitos B, la *IL8* y las firmas combinadas para predecir el pronóstico de TNBC (Rody et al.). También se incluyó la expresión de *CXCR3* y *CXCL13*, ya que se ha demostrado que se correlacionan con el pronóstico del cáncer de mama (Ma et al., Gu-Trantien et al.).

El mismo enfoque de selección del valor de corte se aplicó para probar la asociación entre estas firmas y la supervivencia específica de la enfermedad (Tabla 2). Las firmas que mostraron los mejores valores de pronóstico se muestran en la Fig. 5A-E (todas se proporcionan en la Figura 9) y en la Tabla 1. Ninguna de estas firmas se correlacionó con el pronóstico en ambas cohortes. Este análisis se repitió utilizando la cohorte 2 como la cohorte de descubrimiento para seleccionar los valores de corte óptimos y la cohorte 1 para validación (Figura 10, Tabla 3). En ambos experimentos, solo la RLIT estratificó de forma consistente a los pacientes en dos grupos de resultados diferentes entre las nueve firmas (Figuras 7 y 8). Además, se compararon los mejores valores de corte de RLIT seleccionados en dos cohortes para las nueve firmas (procedimientos, Figura 5F). La RLIT estaba entre las firmas más consistentes en términos de cortes óptimos en dos cohortes, apoyando la consistencia y el uso potencial de RLIT como una medida objetiva para identificar pacientes con baja infiltración linfocitaria.

En comparación con las firmas inmunitarias publicadas, la RLIT fue también la única firma que mostró una correlación significativa con la supervivencia específica de la enfermedad en el modelo multivariado de riesgos proporcionales de Cox junto con los parámetros clínicos estándar del estado ganglionar y el tamaño del tumor en ambas cohortes, se usó cualquier cohorte como la cohorte de descubrimiento (tablas 1 a 3). Usando muestras de ambas cohortes, RLIT tiene un valor p del rango logarítmico de $2,1 \times 10^{-4}$ y un HR 0,32 (0,17-0,58). Para probar la robustez del modelo de Cox en la determinación del valor pronóstico de RLIT, los inventores utilizaron el análisis bootstrap en datos perturbados aleatoriamente y repitieron el análisis de regresión univariable y multivariable 1.000 veces. El 95,6 % y el 94,7 % del tiempo, la RLIT se mantuvo significativamente asociado al pronóstico en los análisis univariados y multivariados, respectivamente. Tomados en conjunto, estos resultados muestran la estabilidad y la robustez de la RLIT como biomarcador de pronóstico independiente en el TNBC.

La heterogeneidad de la RLIT se refleja a nivel transcripcional por la expresión de *CTLA4* y *APOBEC3G*

Para identificar asociaciones moleculares de infiltración inmunitaria y analizar la relevancia biológica de la RLIT, el inventor integró la RLIT basada en imágenes con los datos de expresión génica en micromatriz perfilados para el mismo conjunto de 181 tumores de TNBC. El análisis identificó 307 genes correlacionados positivamente y 105 genes correlacionados negativamente con la RLIT (Corrección de prueba múltiple de tasa de descubrimiento falso, valor $q < 0,05$; Procedimientos). Los genes con las correlaciones más significativas con nuestra firma inmunológica de RLIT incluyen quinasas (*SH3KBP1*, *LCK*, *MAP4K1*) y los receptores (*FCRL3*, *GPR18*, *TNFRSF13B*, *SEMA4D*, *CXCR3*, *IL2RG*), así como la inmunoterapia conocida como CTLA4 diana (Tabla 4). Por lo tanto, correlaciones significativas entre la RLIT y los genes relacionados con el sistema inmunitario demuestran la relevancia biológica de la firma RLIT.

Tabla 4. Los 20 genes principales se correlacionaron positivamente con la RLIT y los 10 genes principales se correlacionaron negativamente con la RLIT (subrayado).

Símbolo	Citobanda	Descripción	cor	c
<i>SH3KBP1</i>	Xp22.12b	Proteína 1 de unión al dominio SH3 de quinasa	0,4	0,0011
<i>FCRL3</i>	1q23.1d	Fc receptor similar a 3	0,4	0,0011
<i>LCK</i>	1p35.1 b	proteína tirosina quinasa específica de linfocitos	0,4	0,0011
<i>GPR18</i>	13q32.3a	Receptor 18 acoplado a proteína G	0,39	0,0011
<i>TNFRSF13 B</i>	17p11.2h	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 13B	0,39	0,0011
<i>SEMA4D/CD 100</i>	9q22.2a	dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 4D	0,39	0,0012
<i>MAP4K1</i>	19q13.2a	proteína quinasa quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno 1	0,39	0,0012
<i>RLTPR</i>	16q22.1b	Motivo RGD, repeticiones ricas en leucina, dominio de tropomodulina y rico en prolina que contiene	0,38	0,0012
<i>UBASH3A</i>	21 q22.3b	ubiquitina asociada y dominio SH3 que contiene A	0,38	0,0012
<i>IKZF3</i>	17q12c	Dedo de cinc 3 de la familia IKAROS (Aiolos)	0,38	0,0012

(continuación)

Símbolo	Citobanda	Descripción	cor	c
<i>CYFIP2</i>	5q33.3a+q33.3b	proteína 2 de interacción con FMR1 citoplasmática	0,38	0,0012
<i>CXCR3</i>	Xq13.1d	Receptor 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	0,38	0,0012
<i>CD3E</i>	11q23.3d	Molécula CD3e, epsilon (complejo CD3-TCR)	0,38	0,0012
<i>IL2RG</i>	Xq13.1c	receptor de interleucina 2, gamma	0,38	0,0012
<i>CXCR5</i>	11q23.3e	Receptor 5 de quimiocina (motivo C-X-C)	0,38	0,0014
<i>CTSW</i>	11q13.1d	catepsina W	0,37	0,0018
<i>SH2D1A</i>	Xq25c	Dominio SH2 que contiene 1A	0,37	0,0018
<i>SEPT6</i>	Xq24c	Septina 6	0,37	0,0018
<i>CTLA4</i>	2q33.2a	Proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos	0,37	0,0019
<i>SIRPG</i>	20p13e	proteína gamma reguladora de señal	0,37	0,0019
<i>C10orf141</i>	10q26.2b		-0,4	0,0011
<i>CD151</i>	11p15.5c	Molécula CD151 (grupo sanguíneo de Raph)	-0,39	0,0011
<i>SPP1</i>	4q22.1b	fosfoproteína 1 secretada	-0,39	0,0012
<i>ANXA2</i>	15q22.2a	anexina A2	-0,39	0,0012
<i>P4HA2</i>	5q31.1b	prolil 4-hidroxilasa, polipéptido alfa II	-0,36	0,0022
<i>MUSK</i>	9q31.3b	músculo, esqueléticas, receptor tirosina cinasa	-0,36	0,0023
<i>POFUT2</i>	21 q22.3e	proteína O-fucosiltransferasa 2	-0,36	0,0025
<i>ITGB5</i>	3q21.2a	integrina, beta 5	-0,35	0,004
<i>MXRA7</i>	17q25.1d+q25.2a	remodelación 7 asociada a la matriz	-0,34	0,0046
<i>CALN1</i>	7q11.22c	calneurón 1	-0,34	0,0046

Posteriormente, el análisis de enriquecimiento se realizó en los genes correlacionados positiva y negativamente, respectivamente, contra las categorías de conjuntos de genes MSigDB (Subramanian, 2005), incluidas las vías KEGG (Kanehisa, 2000), las vías canónicas curadas por expertos en dominios y firmas inmunológicas (Procedimientos, figura 11). Los genes correlacionados positivamente con RLIT están enriquecidos con citotoxicidad mediada por células asesinas naturales, receptor de linfocitos T, Procesamiento de antígenos y presentación de las rutas de KEGG, células CD8T, células CD4T y firmas inmunogénicas reguladas por aumento, así como las rutas canónicas de *IL12* y *CD8 TCR*. Por el contrario, los genes correlacionados negativamente con RLIT se enriquecieron con la interacción del receptor ECM y las rutas de KEGG de adhesión focal, los linfocitos T reguladores y las firmas inmunológicas relacionadas con el TGF β , así como las rutas relacionadas con la integrina. El análisis molecular en el nivel de la ruta sugiere que la RLIT se asocia positivamente a actividades inmunes antitumorales en el TNBC.

Para analizar mejor sus relaciones interconectadas y descubrir módulos moleculares de *novo*, se identificaron módulos de genes estrechamente conectados dentro de los genes asociados a RLIT (Figura 11; Procedimientos). Como tales, se identificaron siete módulos de genes correlacionados positivamente (P1-7) y dos módulos de genes correlacionados negativamente con RLIT (N1 y N2). Los genes relacionados con el sistema inmunitario conocidos en los módulos incluyen *IFNG* (P1), *RLPTR* (P3), *GPR18* (P4), *CXCR3* (P5), *MAP4K1* (P6), *CTLA4* (P7), *ANXA2* (N1) y *FAP* (N2). De forma destacable, dos de los módulos contienen *APOBEC3G* (P2) y *CTLA4* (P7), lo que puede sugerir una coregulación entre *APOBEC3G*, *NKG7* e interleucinas, incluidas *IL21R* e *IL18RAP*, así como altas correlaciones entre *CTLA4*, quimioatrayente para linfocitos B *CXCL13* (Denkert) e inmunorreceptor de células *TIGIT* con dominios Ig e ITIM. Además, los perfiles de expresión de estos genes se asociaron significativamente a la supervivencia específica de la enfermedad en TNBC, incluyendo *APOBEC3G*, así como *GPR18* (P4) y *MAP4K1* (P6) clasificados como los genes principales asociados a RLIT (Figura 6B, Figura 12). La expresión de *CTLA4* fue capaz de estratificar a los pacientes en grupos con un pronóstico significativamente diferente, y podría estratificar aún más el grupo alto de RLIT en dos subgrupos con resultados significativamente diferentes ($p = 0,046$, Figura 6C, figura 12). Comparando la RLIT con genes asociados a la RLIT en términos de valor pronóstico, el análisis multivariado mostró que la estratificación de RLIT tiene un valor adicional y en muchos casos superior al de los genes asociados a RLIT (Figura 13, Procedimientos).

Referencias

En el presente documento se cita una serie de publicaciones con el fin de describir y divulgar más completamente la invención y la situación actual de la técnica a la que pertenece la invención. Las citas completas para estas referencias se proporcionan a continuación.

Alexiou GA, Vartholomatos E, Voulgaris S. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*. 2013;115:521-2.

Ancuta E, Ancuta C, Zugun-Eloae F, Iordache C, Chiriac R, Carasevici E. Predictive value of cellular immune

- response in cervical cancer. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie. 2009;50:651-5.
- 5 Andre, F., M. V. Dieci, P. Dubsy, C. Sotiriou, G. Curigliano, C. Denkert and S. Loi (2013). Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer." *Clin Cancer Res* 19(1): 28-33.
- 10 Ascierto, M. L., M. Kmiecik, M. O. Idowu, R. Manjili, Y. Zhao, M. Grimes, C. Dumur, E. Wang, V. Ramakrishnan, X. Y. Wang, H. D. Bear, F. M. Marincola and M. H. Manjili (2012). "A signature of immune function genes associated with recurrence-free survival in breast cancer patients." *Breast Cancer Res Treat* 131(3): 871-880,
- 15 Bambury RM, Teo MY, Power DG, Yusuf A, Murray S, Battley JE, et al. The association of pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio with overall survival in patients with glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*, 2013;114:149-54
- 20 Basavanthally, A. N., S. Ganesan, S. Agner, J. P. Monaco, M. D. Feldman, J. E. Tomaszewski, G. Bhanot and A. Madabhushi (2010). "Computerized image-based detection and grading of lymphocytic infiltration in HER2+ breast cancer histopathology." *IEEE Trans Biomed Eng* 57(3): 642-653.
- 25 Berman, M. and P. Diggle (1989). "Estimating Weighted Integrals of the 2nd-Order Intensity of a Spatial Point Process." *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 51(1):81-92.
- 30 Jonckheere, A. R. (1954). "A test of significance for the relation between m rankings and k ranked categories." *British Journal of Statistical Psychology* 7: 93-100,
- 35 Bystryn JC, Oratz R, Roses D, Harris M., Henn M, Lew R. Relationship between immune response to melanoma vaccine immunization and clinical outcome in stage II malignant melanoma. *Cancer*. 1992;69:1157-64.
- 40 Calabró, A., T. Beissbarth, R. Kuner, M. Stojanov, A Benner, M. Asslaber, F. Ploner, K. Zatloukal, H. Samonigg, A. Poustka and H. Sültmann (2009). "Effects of infiltrating lymphocytes and estrogen receptor on gene expression and prognosis in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 116(1): 69-77.
- 45 Cheng, Yizong (August 1995). "Mean Shift, Mode Seeking, and Clustering". *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence (IEEE)* 17 (8): 790-799.
- 50 Clarke B, Tinker AV, Lee CH, Subramanian S, van de Rijn M, Turbin D, et al. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2009;22:393-402.
- 55 Contardi, E., G. L. Palmisano, P. L. Tazzari, A. M. Martelli, F. Fala, M. Fabbi, T. Kato, E. Lucarelli, D. Donati, L. Polito, A. Bolognesi, F. Ricci, S. Salvi, V. Gargaglione, S. Mantero, M. Alberghini, G. B. Ferrara and M. P. Pistillo (2005). "CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction." *Int J Cancer* 117(4): 538-550,
- 60 Curtis, C., S. P. Shah, S. F. Chin, G. Turashvili, O. M. Rueda, M. J. Dunning, D. Speed, A. G. Lynch, S. Samarajiwa, Y. Yuan, S. Graf, G. Ha, G. Haffari, A. Bashashati, R. Russell, S. McKinney, A. Langerod, A. Green, E. Provenzano, G. Wishart, S. Pinder, P. Watson, F. Markowitz, L. Murphy, I. Ellis, A. Purushotham, A. L. Borresen-Dale, J. D.
- 65 Brenton, S. Tavare, C. Caldas and S. Aparicio (2012). "The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups." *Nature* 486(7403): 346-352.
- 70 Crane CA, Austgen K, Haberthur K, Hofmann C, Moyes KW, Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111:12823-8.
- 75 Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of Survival in Follicular Lymphoma Based on Molecular Features of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *New England Journal of Medicine*, 2004;351:2159-69.
- 80 Davidsson S, Ohlson AL, Andersson SO, Fall K, Meisner A, Fiorentino M, et al. CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3(+) regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26:448-55.
- 85 DeNardo, D. G., D. J. Brennan, E. Rexhepaj, B. Ruffell, S. L. Shiao, S. F. Madden, W. M. Gallagher, N. Wadhvani, S. D. Keil, S. A. Junaid, H. S. Rugo, E. S. Hwang, K. Jirstrom, B. L. West and L. M. Coussens (2011). "Leukocyte

- complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy." *Cancer Discov* 1(1):54-67.
- 5 Denkert, C., S. Loibl, A. Noske, M. Roller, B. M. Muller, M. Komor, J. Budczies, S. Darb-Esfahani, R. Kronenwett, C. Hanusch, C. von Torne, W. Weichert, K. Engels, C. Solbach, I. Schrader, M. Dietel and G. von Minckwitz (2010). "Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer." *J Clin Oncol* 28(1): 105-113.
- 10 Dieci, M. V., C. Criscitiello, A. Goubar, G. Viale, P. Conte, V. Guarneri, G. Ficarra, M. C. Mathieu, S. Delalogue, G. Curigliano and F. Andre (2014). "Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study." *Ann Oncol* 25(3): 611-618.
- 15 Dieu-Nosjean MC, Antoine M Fau - Danel C, Danel C Fau - Heudes D, Heudes D Fau - Wislez M, Wislez M Fau - Poulot V, Poulot V Fau - Rabbe N, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures.
- Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Research*. 2012;72:1070-80
- 20 Failmezger H, Yuan Y, Rueda O and Markowetz F (2012). CRImage: CRImage a package to classify cells and calculate tumour cellularity. R package version 1.14.0,
- 25 Fiorelli V, Gendelman R, Caterina Sirianni M, Chang H-K, Colombini S, Markham PD, et al. γ -Interferon Produced by CD8+ T Cells Infiltrating Kaposi's Sarcoma Induces Spindle Cells With Angiogenic Phenotype and Synergy With Human Immunodeficiency Virus-1 Tat Protein: An Immune Response to Human Herpesvirus-8 Infection? *Blood*. 1998;91:956-67.
- 30 Fraley, C. and A. E. Raftery (2003). "Enhanced model-based clustering, density estimation, and discriminant analysis software: MCLUST." *Journal of Classification* 20(2): 263-286.
- Fridman, W. H., F. Pages, C. Sautes-Fridman and J. Galon (2012). "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome." *Nat Rev Cancer* 12(4): 298-306.
- 35 Gannon PO, Poisson AO, Delvoye N, Lapointe R, Mes-Masson AM, Saad F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *Journal of immunological methods*. 2009;348:9-17.
- 40 Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman and F. Pages (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." *Science* 313(5795): 1960-1964.
- 45 Galon, J., B. Mlecnik, G. Bindea, H. K. Angell, A. Berger, C. Lagorce, A. Lugli, I. Zlobec, A. Hartmann, C. Bifulco, I. D. Nagtegaal, R. Palmqvist, G. V. Masucci, G. Botti, F. Tatangelo, P. Delrio, M. Maio, L. Laghi, F. Grizzi, M. Asslaber, C. D'Arrigo, F. Vidal-Vanaclocha, E. Zavadova, L. Chouchane, P. S. Ohashi, S. Hafezi-Bakhtiari, B. G. Wouters, M. Roehrl, L. Nguyen, Y. Kawakami, S. Hazama, K. Okuno, S. Ogino, P. Gibbs, P. Waring, N. Sato, T. Torigoe, K. Itoh, P. S. Patel, S. N. Shukla, Y. Wang, S. Kopetz, F. A. Sinicrope, V. Scripcariu, P. A. Ascierto, F. M. Marincola, B. A. Fox and F. Pages (2014). "Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours." *J Pathol* 232(2): 199-209.
- 50 Gao Q, Qiu Sj Fau - Fan J, Fan J Fau - Zhou J, Zhou J Fau - Wang X-Y, Wang Xy Fau - Xiao Y-S, Xiao Ys Fau - Xu Y, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection.
- 55 Gu-Trantien, C., S. Loi, S. Garaud, C. Equeter, M. Libin, A. de Wind, M. Ravoet, H. Le Buanec, C. Sibille, G. Manfouo- Foutsop, I. Veys, B. Haibe-Kains, S. K. Singhal, S. Michiels, F. Rothe, R. Salgado, H. Duvillier, M. Ignatiadis, C. Desmedt, D. Bron, D. Larsimont, M. Piccart, C. Sotiriou and K. Willard-Gallo (2013). "CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival." *J Clin Invest* 123(7): 2873-2892.
- 60 Halliday G, Patel A, Hunt M, Tefany F, Barnetson RC. Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: Association with infiltrating CD4+ T cells. *World J Surg*. 1995;19:352-8.
- 65 Hastie R, Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman, *The Elements of Statistical Learning* (Springer, Nueva York, 2001).
- Hegmans JP, Hemmes A, Hammad H, Boon L, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Mesothelioma environment

- comprises cytokines and T-regulatory cells that suppress immune responses. *The European respiratory journal*. 2006;27:1086-95.
- 5 Hiraoka N, Onozato K, Fau - Kosuge T, Kosuge T, Fau - Hirohashi S, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions.
- Huang CT, Oyang YJ, Huang HC, Juan HF. MicroRNA-mediated networks underlie immune response regulation in papillary thyroid carcinoma.
- 10 Issa-Nummer, Y., S. Darb-Esfahani, S. Loibl, G. Kunz, V. Nekljudova, I. Schrader, B. V. Sinn, H. U. Ulmer, R. Kronenwett, M. Just, T. Kuhn, K. Diebold, M. Untch, F. Holms, J. U. Blohmer, J. O. Habeck, M. Dietel, F. Overkamp, P. Krabisch, G. von Minckwitz and C. Denkert (2013). "Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant Gepar- Quinto trial." *PLoS One* 8(12): e79775.
- 15 Janowczyk A, S. C, Madabhushi A. Quantifying local heterogeneity via morphologic scale: Distinguishing tumoral from stromal regions. *Journal of pathology informatics*. 2013(4 Supl):
- 20 Kanehisa, M. and S. Goto (2000). "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes." *Nucleic Acids Research* 28(1): 27-30.
- Kmieciak J, Poli A, Brons NH, Waha A, Eide GE. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *Journal of neuroimmunology*. 2013;264:71-83.
- 25 Kruger, J. M., C. Wemmert, L. Sternberger, C. Bonnas, G. Dietmann, P. Gancarski and F. Feuerhake (2013). "Combat or surveillance? Evaluation of the heterogeneous inflammatory breast cancer microenvironment." *J Pathol* 229(4): 569-578.
- 30 Kuong, K. J. and L. A. Loeb (2013). "APOBEC3B mutagenesis in cancer." *Nat Genet* 45(9): 964-965.
- Monajemi, M., C. F. Woodworth, J. Benkaroun, M. Grant and M. Larijani (2012). "Emerging complexities of APOBEC3G action on immunity and viral fitness during HIV infection and treatment." *Retrovirology* 9: 35.
- 35 Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4(+)/CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55:1064-71.
- 40 Lee, H. J., J. Y. Seo, J. H. Ahn, S. H. Ahn and G. Gong (2013). "Tumor-associated lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients." *J Breast Cancer* 16(1): 32-39.
- Liu, S., J. Lachapelle, S. Leung, D. Gao, W. D. Foulkes and T. O. Nielsen (2012). "CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer." *Breast Cancer Res* 14(2): R48.
- 45 Loi, S., N. Sirtaine, F. Piette, R. Salgado, G. Viale, F. Van Eenoo, G. Rouas, P. Francis, J. P. Crown, E. Hitre, E. de Azambuja, E. Quinaux, A. Di Leo, S. Michiels, M. J. Piccart and C. Sotiriou (2013). "Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98." *J Clin Oncol* 31(7): 860-867.
- 50 McNamara MG, Lwin Z, Jiang H, Templeton AJ, Zadeh G, Bernstein M, et al. Factors impacting survival following second surgery in patients with glioblastoma in the temozolomide treatment era, incorporating neutrophil/lymphocyte ratio and time to first progression. *Journal of neuro-oncology*. 2014;117:147-52.
- 55 Ma, X., K. Norsworthy, N. Kundu, W. H. Rodgers, P. A. Gimotty, O. Goloubeva, M. Lipsky, Y. Li, D. Holt and A. Fulton (2009). "CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model." *Mol Cancer Ther* 8(3): 490-498.
- 60 Mahmoud, S. M. A., E. C. Paish, D. G. Powe, R. D. Macmillan, M. J. Grainge, A. H. S. Lee, I. O. Ellis and A. R. Green (2011). "Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer." *J Clin Oncol* 29(15): 1949-1955.
- Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin and D. Trono (2003). "Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts." *Nature* 424(6944): 99-103.
- 65 Mao, H., L. Zhang, Y. Yang, W. Zuo, Y. Bi, W. Gao, B. Deng, J. Sun, Q. Shao and X. Qu (2010). "New insights of CTLA-4 into its biological function in breast cancer." *Curr Cancer Drug Targets* 10(7): 728-736.

- Milne K, Kobel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, et al. Systematic analysis of immune infiltrates in high- grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS one*. 2009;4:e6412.
- 5 Mittendorf et al (2014) "PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Cancer" *Cancer Immunol Res* 2; 361.
- Mukherji B Fau - Guha A, Guha A Fau - Loomis R, Loomis R Fau - Ergin MT, Ergin MT. Cell-mediated amplification and down regulation of cytotoxic immune response against autologous human cancer.
- 10 Natrajan, R., F. M. Mardakheh, H. Sailem, C. Bakal and Y. Yuan (In preparation). "The Ecosystem Diversity Landscape of Breast Cancer."
- Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, et al. Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Research*. 2004;24:3335-42
- 15 Papewalis C, Kouatchoua C Fau - Ehlers M, Ehlers M Fau - Jacobs B, Jacobs B Fau - Porwol D, Porwol D Fau - Schinner S, Schinner S Fau - Willenberg HS, et al. Chromogranin A as potential target for immunotherapy of malignant pheochromocytoma.
- 20 Perou C, Sorlie T, Eisen M, van de Rijn M, Jeffrey S, Rees C, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-52.
- 25 Prat, J., "Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube and peritoneum." *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2013. (<http://www.ncin.org.uk/view?rid=2515>).
- Pretscher D, Distel LV, Grabenbauer GG, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC cancer*. 2009;9:292.
- 30 Robert C., L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, D. J. M, C. Garbe, C. Lebbe, J. F. Baurain, A. Testori, J. J. Grob, N. Davidson, J. Richards, M. Maio, A. Hauschild, W. H. Miller, Jr., P. Gascon, M. Lotem, K. Harmankaya, R. Ibrahim,
- 35 S. Francis, T. T. Chen, R. Humphrey, A. Hoos and J. D. Wolchok (2011). "Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma." *N Engl J Med* 364(26): 2517-2526.
- Rody, A., U. Holtrich, L. Pusztai, C. Liedtke, R. Gaetje, E. Ruckhaeberle, C. Solbach, L. Hanker, A. Ahr, D. Metzler, K. Engels, T. Karn and M. Kaufmann (2009). "T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers." *Breast Cancer Res* 11(2): R15.
- 40 Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast cancer research: BCR*. 2011;13:R97
- 45 Salgado, R. et al., (2014) "Harmonization of the evaluation of tumour infiltration lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an international TILs-Working Group 2014. *Annals of Oncology*
- Salvi, S., V. Fontana, S. Boccardo, D. F. Merlo, E. Margallo, S. Laurent, A. Morabito, E. Rijavec, M. G. Dal Bello, M. Mora, G. B. Ratto, F. Grossi, M. Truini and M. P. Pistillo (2012). "Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer." *Cancer Immunol Immunother* 61(9): 1463-1472.
- 50 Schalper, K. A., V. Velcheti, D. Carvajal, H. Wimberly, J. Brown, L. Pusztai and D. L. Rimm (2014). "In Situ Tumor PD-L1 mRNA Expression Is Associated with Increased TILs and Better Outcome in Breast Carcinomas." *Clin Cancer Res*.
- 55 Spanos WC, Nowicki P, Lee DW, Hoover A, Hostager B, Gupta A, et al. Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2009; 135:1137-46.
- 60 Sjö Dahl G, Lövgren K, Lauss M, Chebil G, Patschan O, Infiltration of CD3+ and CD68+ cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2014;32:791-7.
- 65 Sorbye SW, Kilvaer T, Valkov A, Donnem T, Smeland E, Al-Shibli K, et al. Prognostic impact of lymphocytes in soft tissue sarcomas. *PLoS one*. 2011;6:e14611.

- Stagg, J. and B. Allard (2013). "Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: latest research and clinical prospects." *Ther Adv Med Oncol* 5(3): 169-181.
- 5 Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43): 15545-15550.
- 10 Suzuki K, Kadota K, Sima CS, Nitadori J, Rusch VW, Travis WD, et al. Clinical impact of immune microenvironment in stage I lung adenocarcinoma: tumor interleukin-12 receptor beta2 (IL-12Rbeta2), IL-7R, and stromal FoxP3/CD3 ratio are independent predictors of recurrence. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31:490-8.
- 15 The Cancer Genome Atlas Network (2012). "Comprehensive molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 490(7418): 61-70.
- Tjin EP, Krebbers G, Meijlink KJ, van de Kastele W, Rosenberg EH, Sanders J, et al. Immune-escape markers in relation to clinical outcome of advanced melanoma patients following immunotherapy. *Cancer immunology research*. 2014;2:538-46.
- 20 Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13:1757-61.
- 25 Townsend KN, Spowart JE, Huwait H, Eshragh S, West NR, Markers of T cell infiltration and function associate with favorable outcome in vascularized high-grade serous ovarian carcinoma. *PloS one*. 2013;8:e82406.
- 30 Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6:3282-9.
- 35 Vauleon E, Tony A, Hamlat A, Etcheverry A, Chiforeanu DC, Menei P, et al. Immune genes are associated with human glioblastoma pathology and patient survival. *BMC medical genomics*. 2012;5:41.
- Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2002;35:23-8.
- 40 Webster WS, Lohse CM, Thompson RH, Dong H, Frigola X, Dicks DL, et al. Mononuclear cell infiltration in clearcell renal cell carcinoma independently predicts patient survival. *Cancer*. 2006;107:46-53.
- 45 Welsh TJ, Green RH, Richardson D, Waller DA, O'Byrne KJ, Bradding P. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23:8959-67.
- Witkin, A. P. "Scale-space filtering", *Proc. 8th Int. Joint Conf. Art. Intell., Karlsruhe, Germany*, 1019-1022, 1983.
- 50 Wu G, Han BI, Fau - Pei X-t, Pei XT. Immune response of dendritic cells acquiring antigens from apoptotic cholangiocarcinoma cells induced by mitomycin.
- 55 Yang I, Tihan T, Han SJ, Wrensch MR, Wiencke J, Sughrue ME, et al. CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2010;17:1381-5.
- Yong AS, Stephens N, Weber G, Li Y, Savani BN, Improved outcome following allogeneic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia is associated with higher expression of BMI-1 and immune responses to BMI-1 protein. *Leukemia*. 2011;25:629-37.
- 60 Yuan, Y., H. Failmezger, O. M. Rueda, H. R. Ali, S. Graf, S.-F. Chin, R. F. Schwarz, C. Curtis, M. J. Dunning, H. Bardwell, N. Johnson, S. Doyle, G. Turashvili, E. Provenzano, S. Aparicio, C. Caldas and F. Markowitz (2012). "Quantitative Image Analysis of Cellular Heterogeneity in Breast Tumors Complements Genomic Profiling." *Science Translational Medicine* 4(157): 157ra143.
- 65 Zhang Y., Wang L, Liu Y, Wang S, Shang P, Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio before platelet- lymphocyte ratio predicts clinical outcome in patients with cervical cancer treated with initial radical surgery. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2014;24:1319-25.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento implementado por ordenador *ex vivo* para medir la infiltración inmunitaria en un tumor, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 proporcionar una imagen del tumor en el que se han identificado linfocitos y células cancerosas; obtener una medición de linfocitos respecto al cáncer para cada linfocito, que comprende aplicar una estimación de la densidad para obtener un modelo de la densidad de células cancerosas; y determinar la proximidad de cada linfocito a la densidad de células cancerosas;
 - 10 clasificar un subconjunto de linfocitos como linfocitos intratumorales según su medición de linfocitos a cáncer, en donde un linfocito se clasifica como linfocito intratumoral si su medición de linfocitos a cáncer está por encima de un valor umbral;
 - 15 cuantificar los linfocitos intratumorales y las células cancerosas en la imagen del tumor; y calcular la relación de linfocitos intratumorales (RLIT) como la relación de linfocitos intratumorales a células cancerosas, en donde la RLIT es una medida de la infiltración inmunitaria en el tumor.

2. Un procedimiento para determinar un valor de corte de RLIT para un tipo o subtipo de cáncer, para usar en proporcionar un pronóstico en un paciente con cáncer que tenga ese tipo o subtipo de cáncer, comprendiendo el procedimiento:
 - 20 medir la infiltración inmunitaria en un tumor de cada miembro de una cohorte de pacientes con cáncer que tienen el tipo o el subtipo de cáncer, de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, calculando así la RLIT para cada tumor; relacionar la RLIT para cada tumor con el resultado clínico de cada paciente con cáncer en la cohorte de pacientes con cáncer; y
 - 25 seleccionar un valor de corte para RLIT, en donde una RLIT igual o inferior al valor de corte se asocia a un resultado clínico significativamente peor en la cohorte de pacientes con cáncer que una RLIT por encima del valor de corte.

3. Un procedimiento para proporcionar un pronóstico en un paciente con cáncer, comprendiendo el procedimiento medir la infiltración inmunitaria en un tumor del paciente con cáncer de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, calculando de este modo la RLIT para el tumor, en el que una RLIT por debajo de un valor de corte predeterminado de RLIT indica un mal pronóstico.

4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de identificación de linfocitos y células cancerosas en una imagen del tumor mediante análisis de imágenes automatizado para proporcionar una imagen del tumor en el que se han identificado linfocitos y células cancerosas.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente de cáncer tiene cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, melanoma o cáncer de pulmón no microcítico.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el paciente de cáncer tiene cáncer de mama que es cáncer de mama triple negativo.

7. El procedimiento de proporcionar un pronóstico en un paciente de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el valor de corte de la RLIT predeterminado es de 0,005 a 0,070;

8. El procedimiento de proporcionar un pronóstico en un paciente de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, comprendiendo además el procedimiento determinar un valor de corte de la ITLR para el tipo o el subtipo de cáncer del paciente mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el valor de corte de RLIT es el valor de corte de RLIT predeterminado para proporcionar un pronóstico para el paciente de cáncer.

9. Un procedimiento para predecir si un paciente con cáncer responderá a un régimen terapéutico, comprendiendo el procedimiento analizar una imagen tumoral del paciente de cáncer de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, en donde una RLIT por encima de un valor de corte de RLIT indica que es probable que el paciente responda al régimen terapéutico.

10. El procedimiento de proporcionar un pronóstico en un paciente de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 o el procedimiento de predecir si un paciente de cáncer responderá a un régimen terapéutico de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el procedimiento comprende además medir la filtración inmunitaria en un tumor resecado quirúrgicamente obtenido del paciente de cáncer.

11. Un antagonista de CTLA4, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, en donde el paciente de cáncer tiene cáncer de mama triple negativo, en donde, en el procedimiento, el régimen terapéutico comprende la administración de un antagonista de CTLA4, y en donde el paciente con cáncer es tratado de acuerdo con el régimen terapéutico si la RLIT determinada de acuerdo

con la reivindicación 1 está por encima de un valor de corte predeterminado.

12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la imagen de un tumor es una imagen de una sección de tumor teñida con hematoxilina y eosina.

5

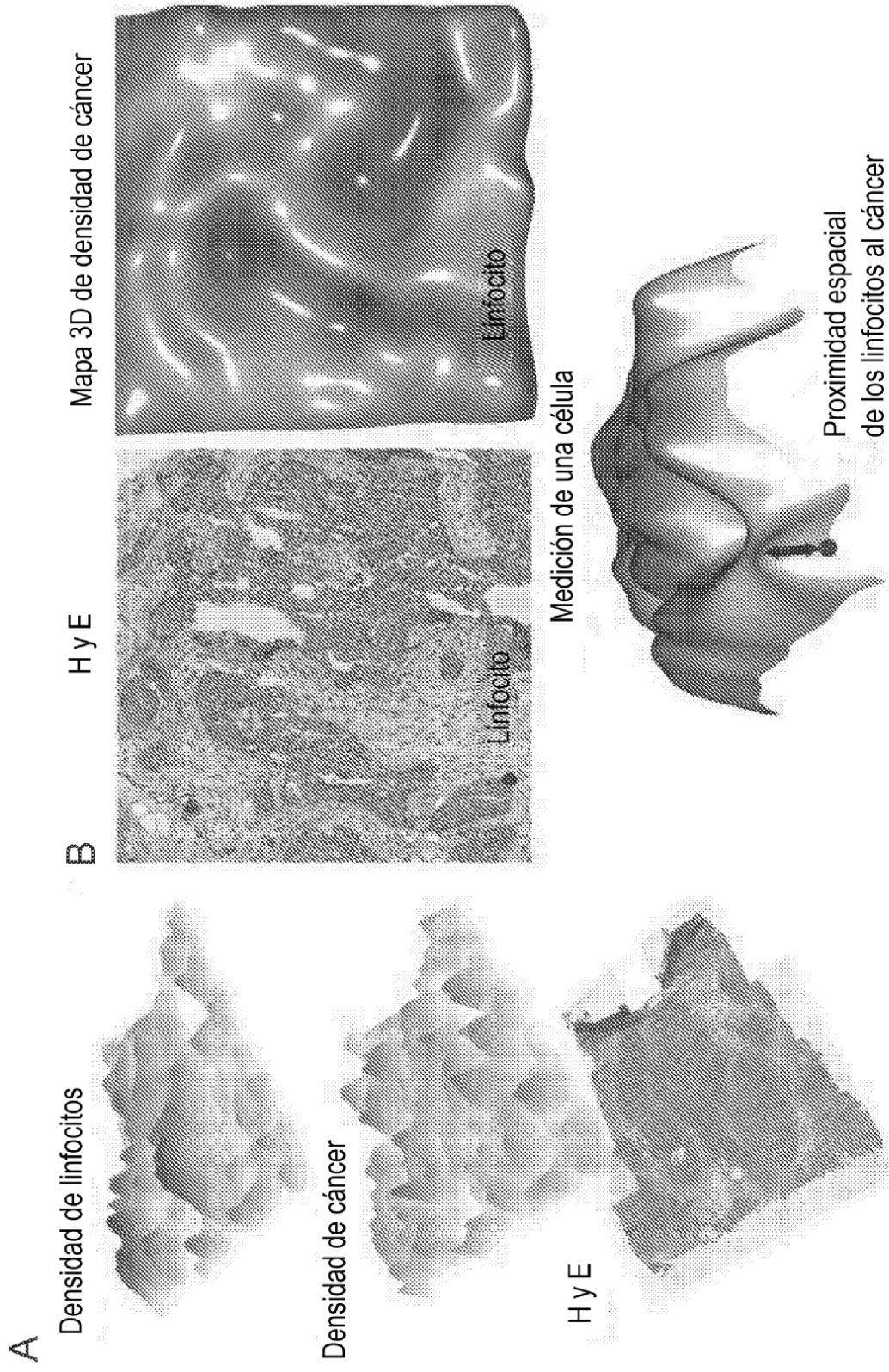


FIG. 1

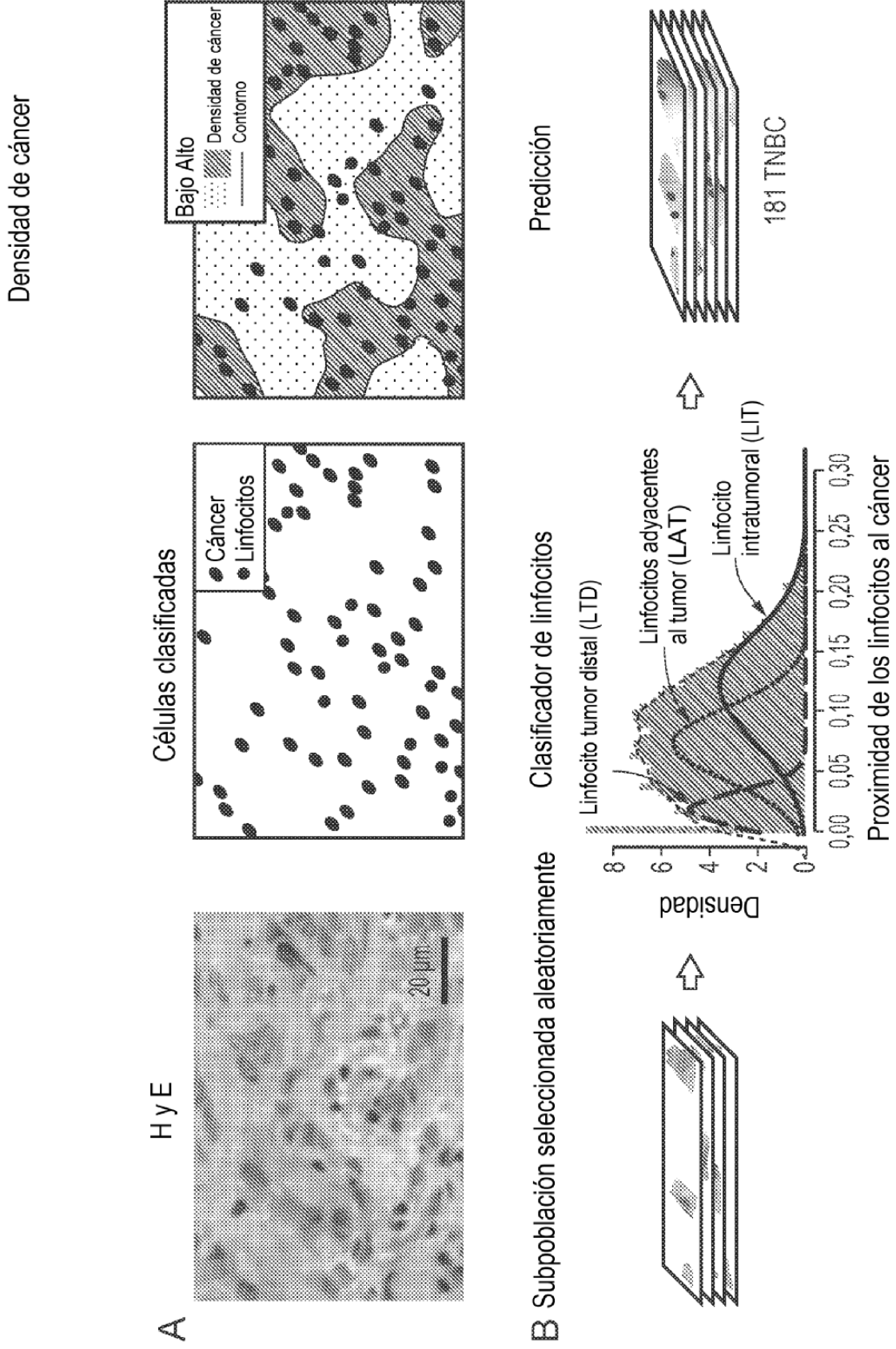


FIG. 2

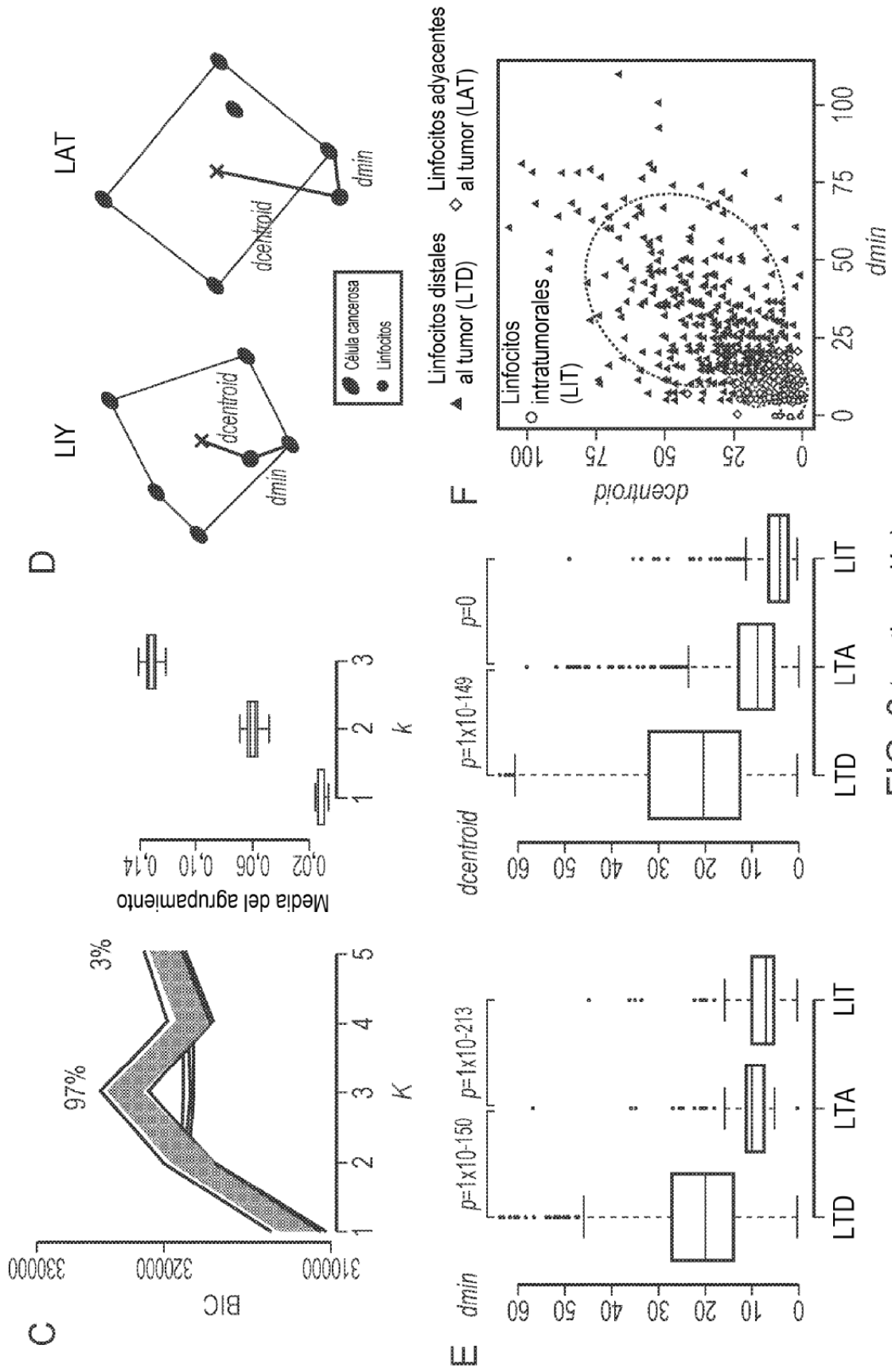


FIG. 2 (continuación)

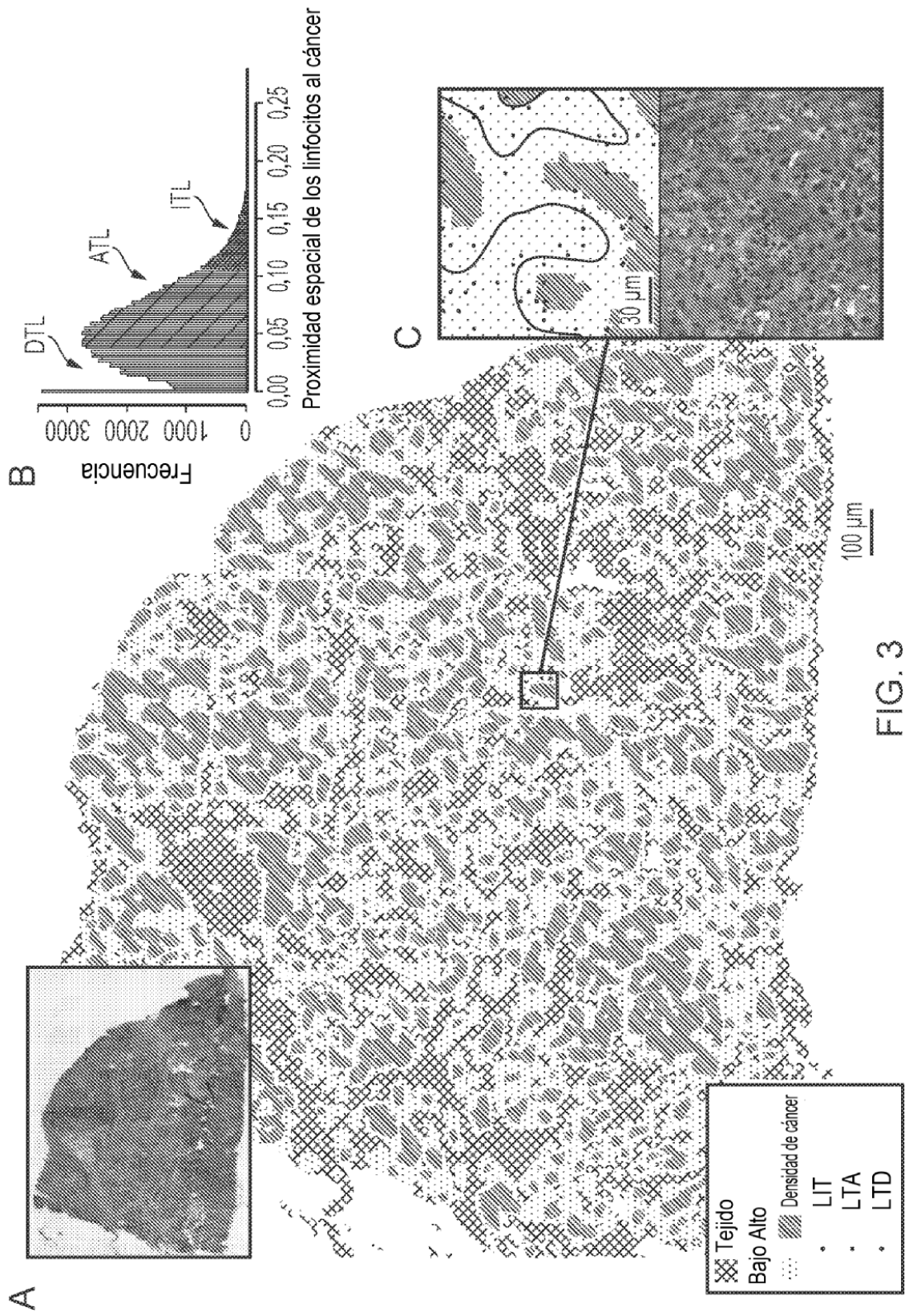


FIG. 3

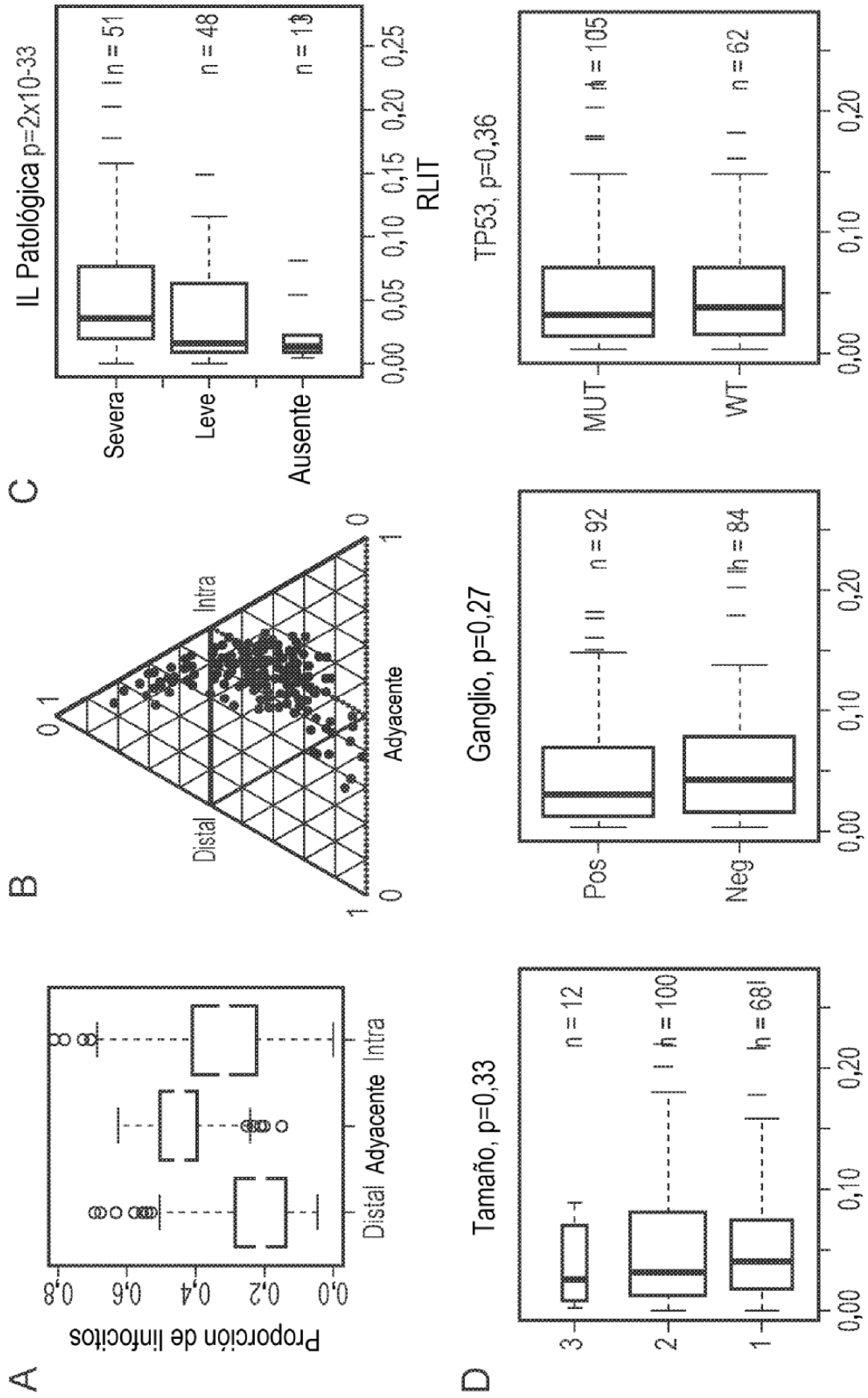


FIG. 4

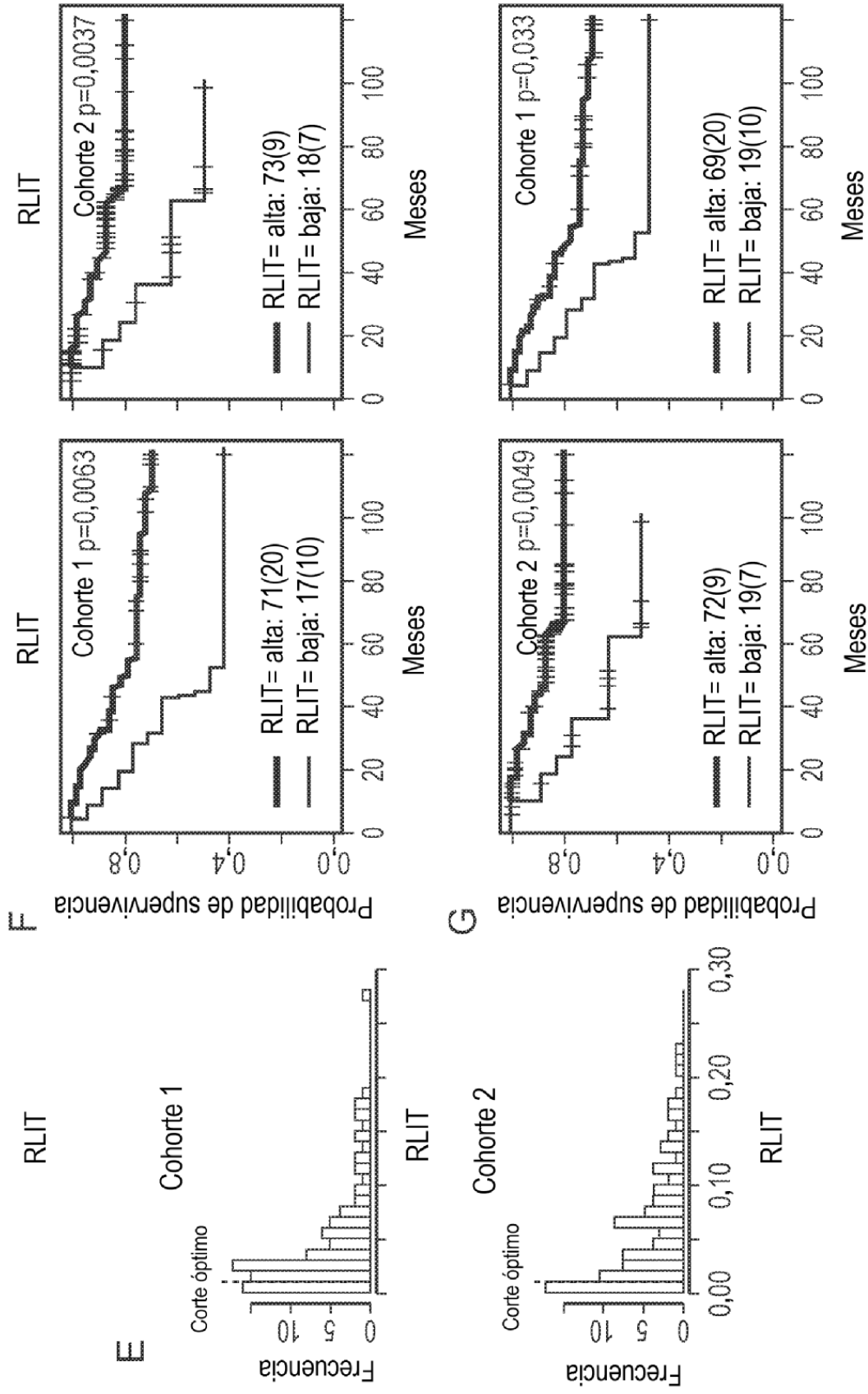


FIG. 4 (continuación)

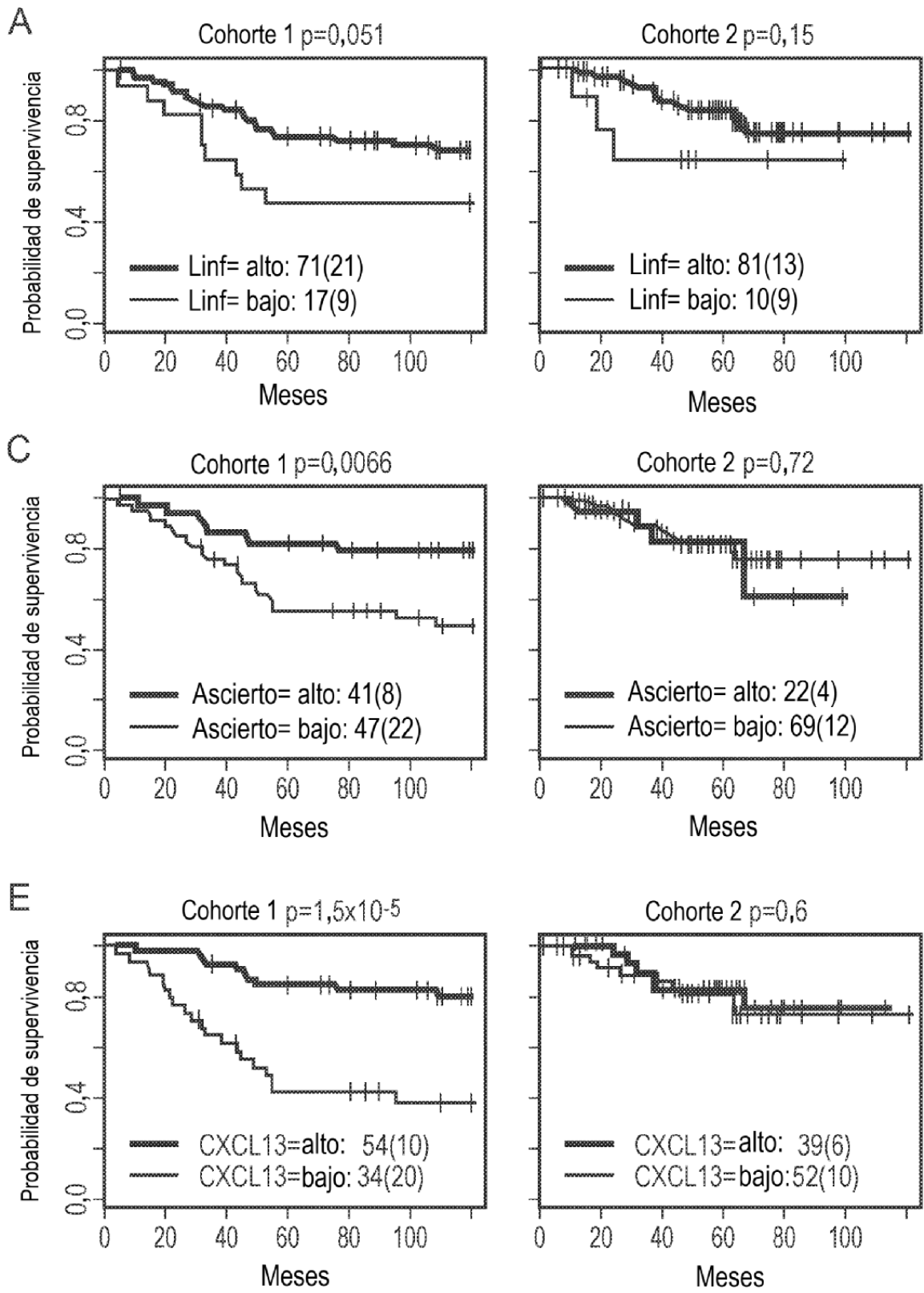


FIG. 5

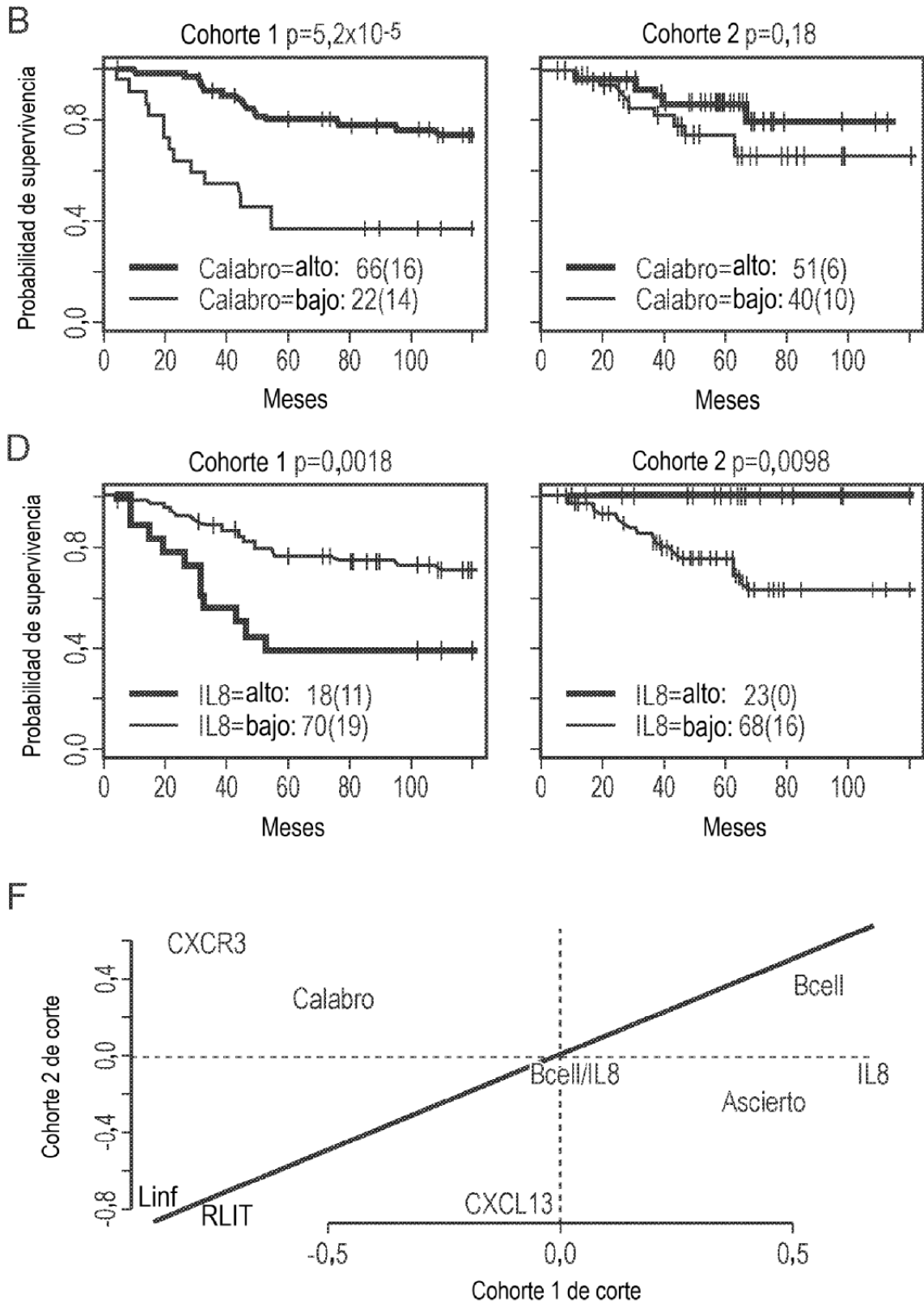


FIG. 5 (continuación)

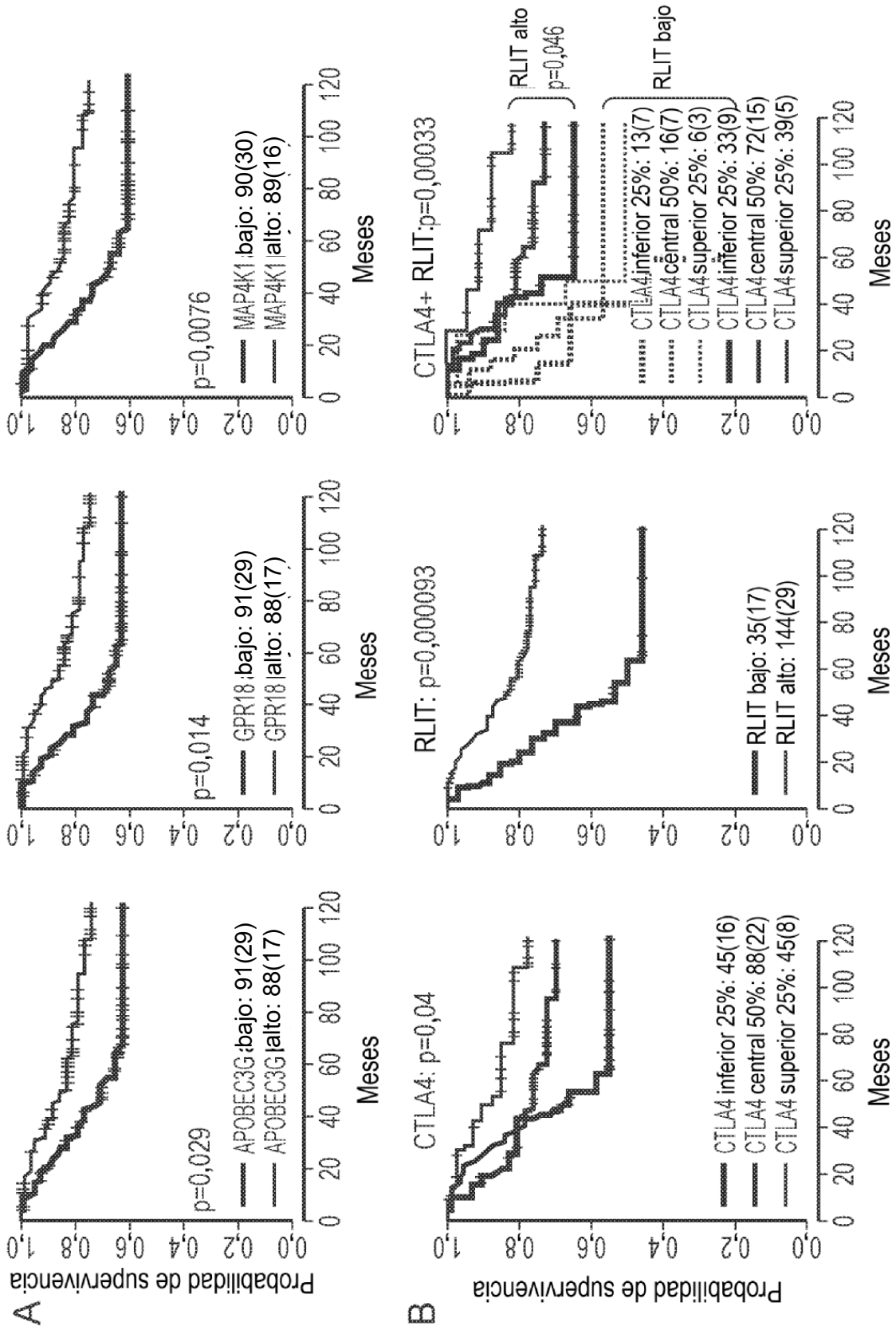


FIG. 6

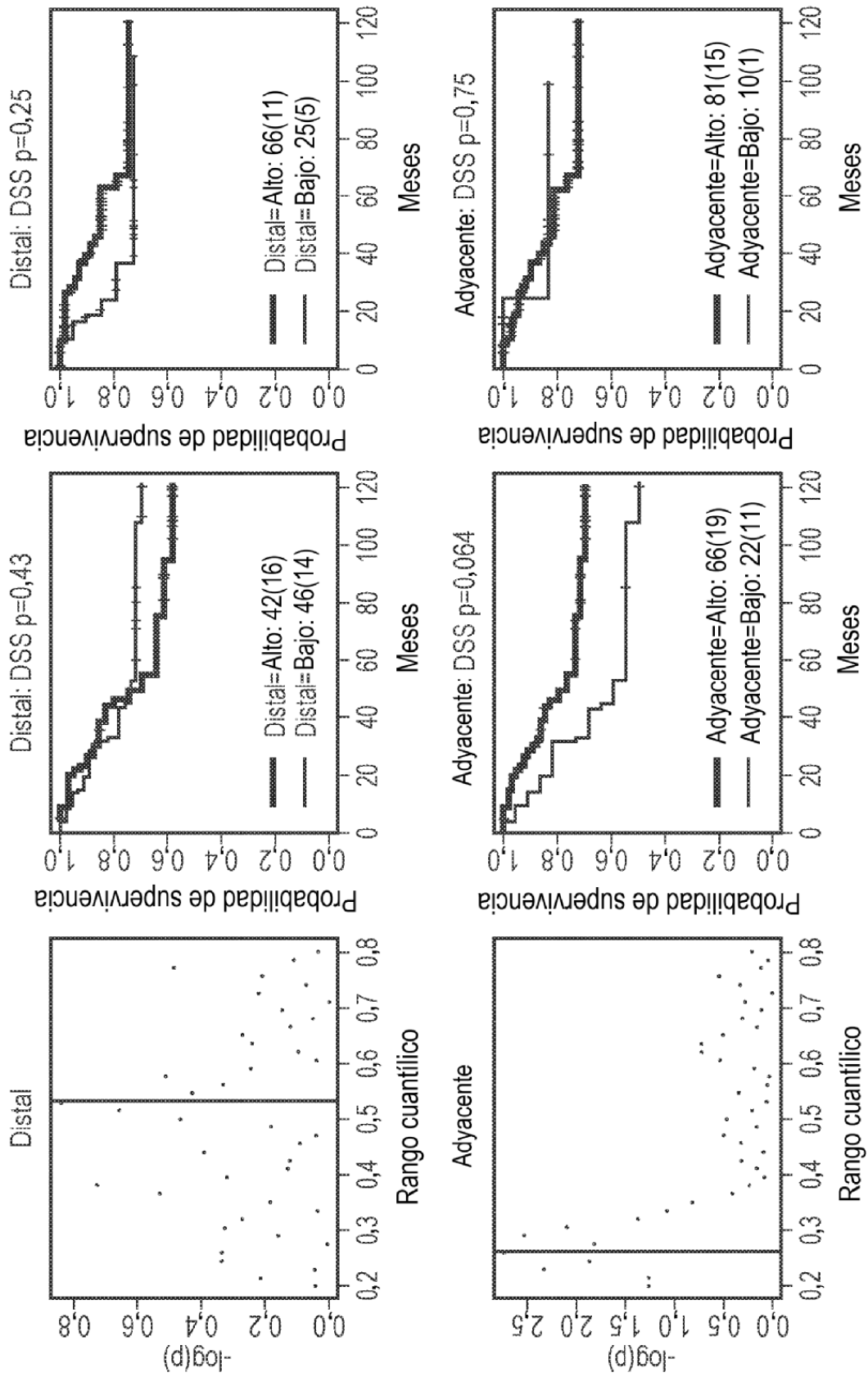


FIG. 7

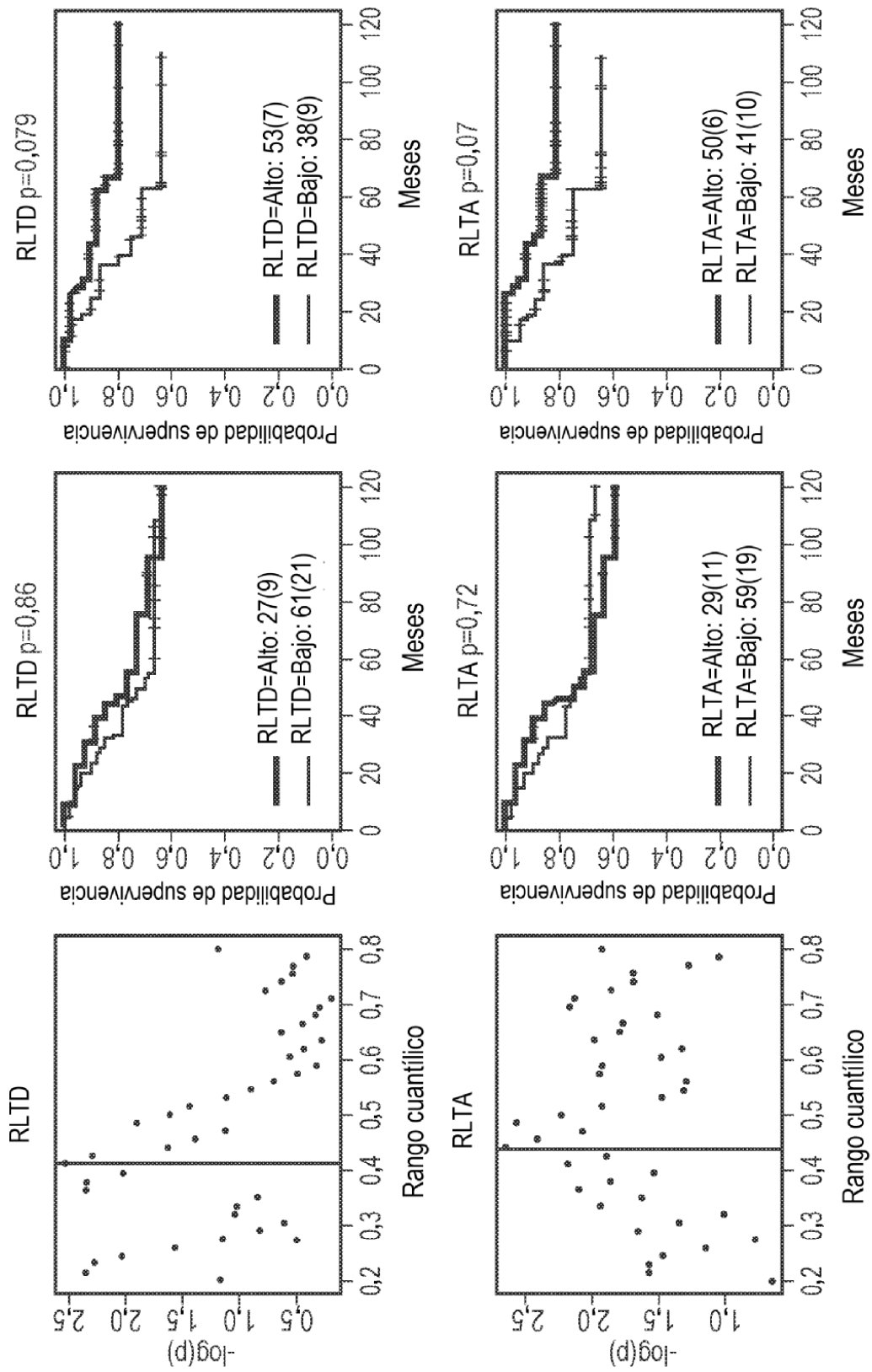


FIG. 8

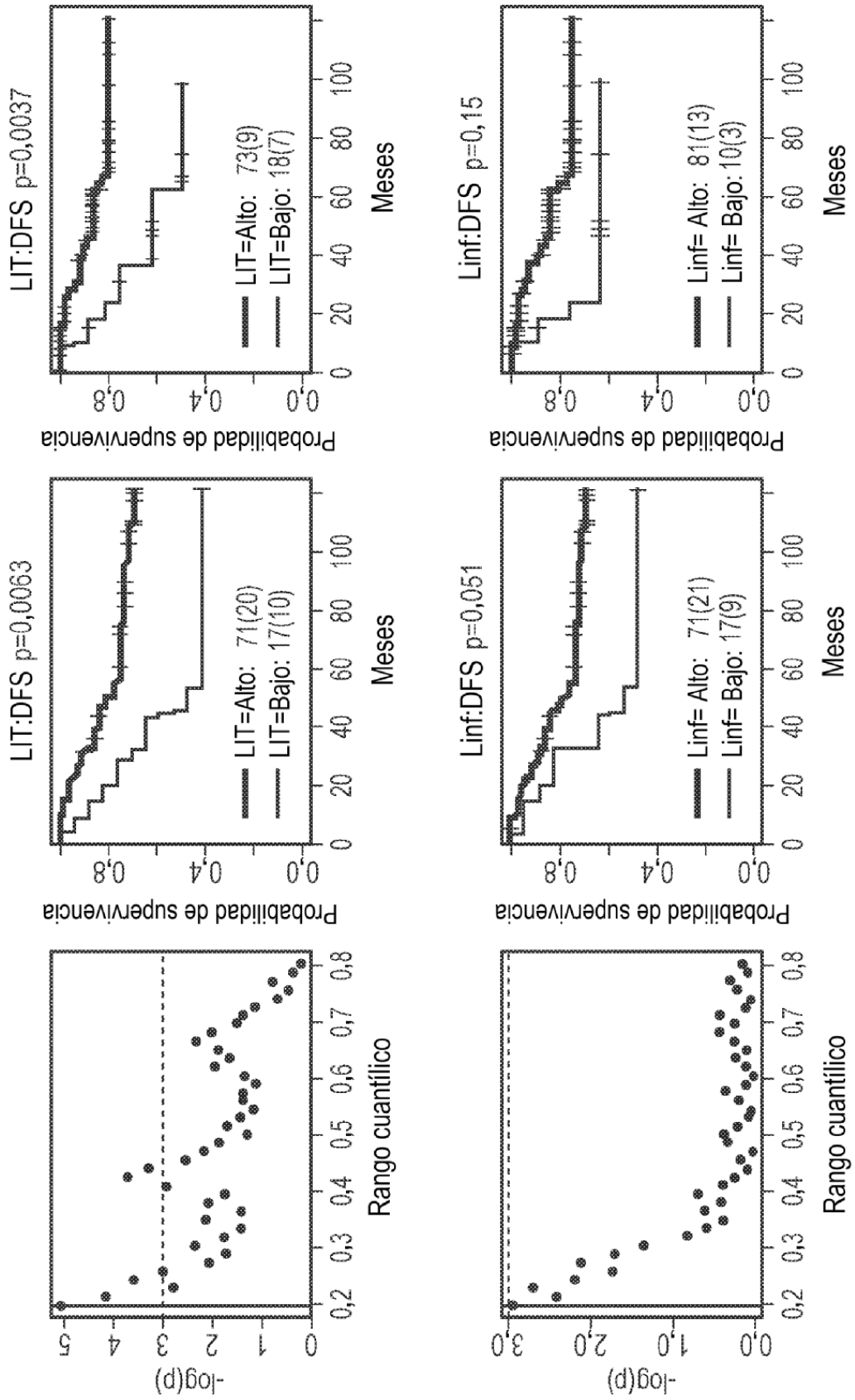


FIG. 9

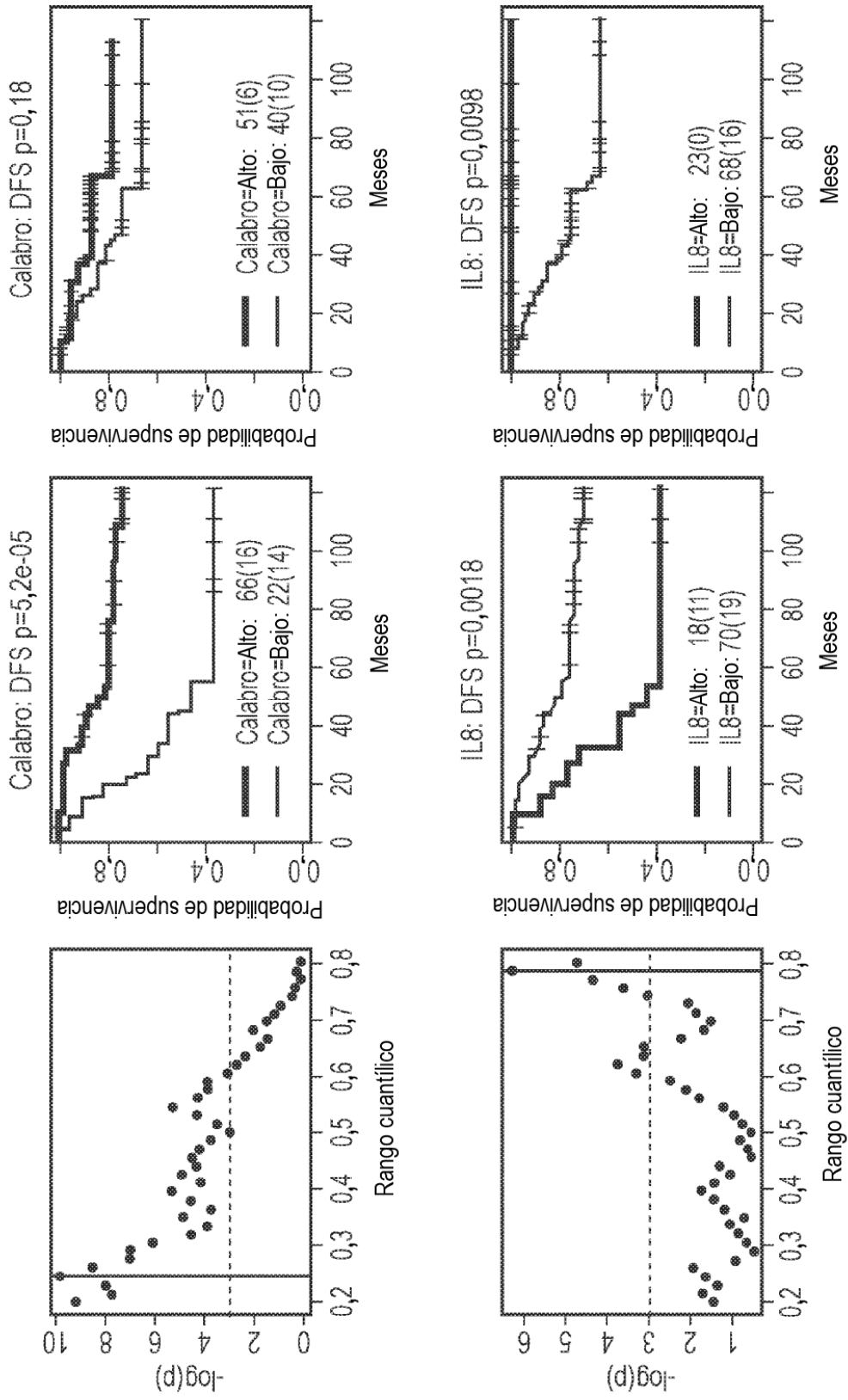


FIG. 9 (continuación)

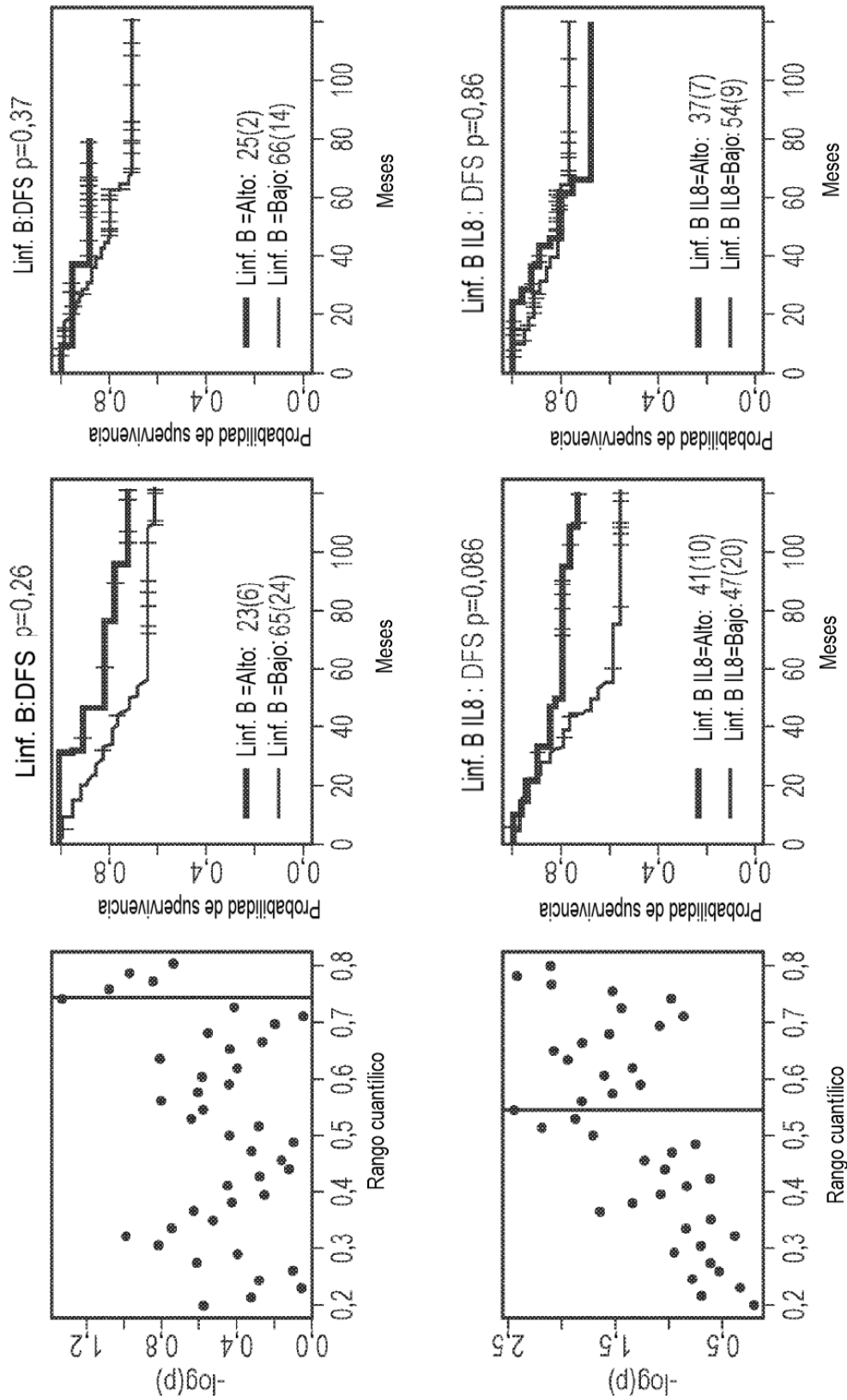


FIG. 9 (continuación)

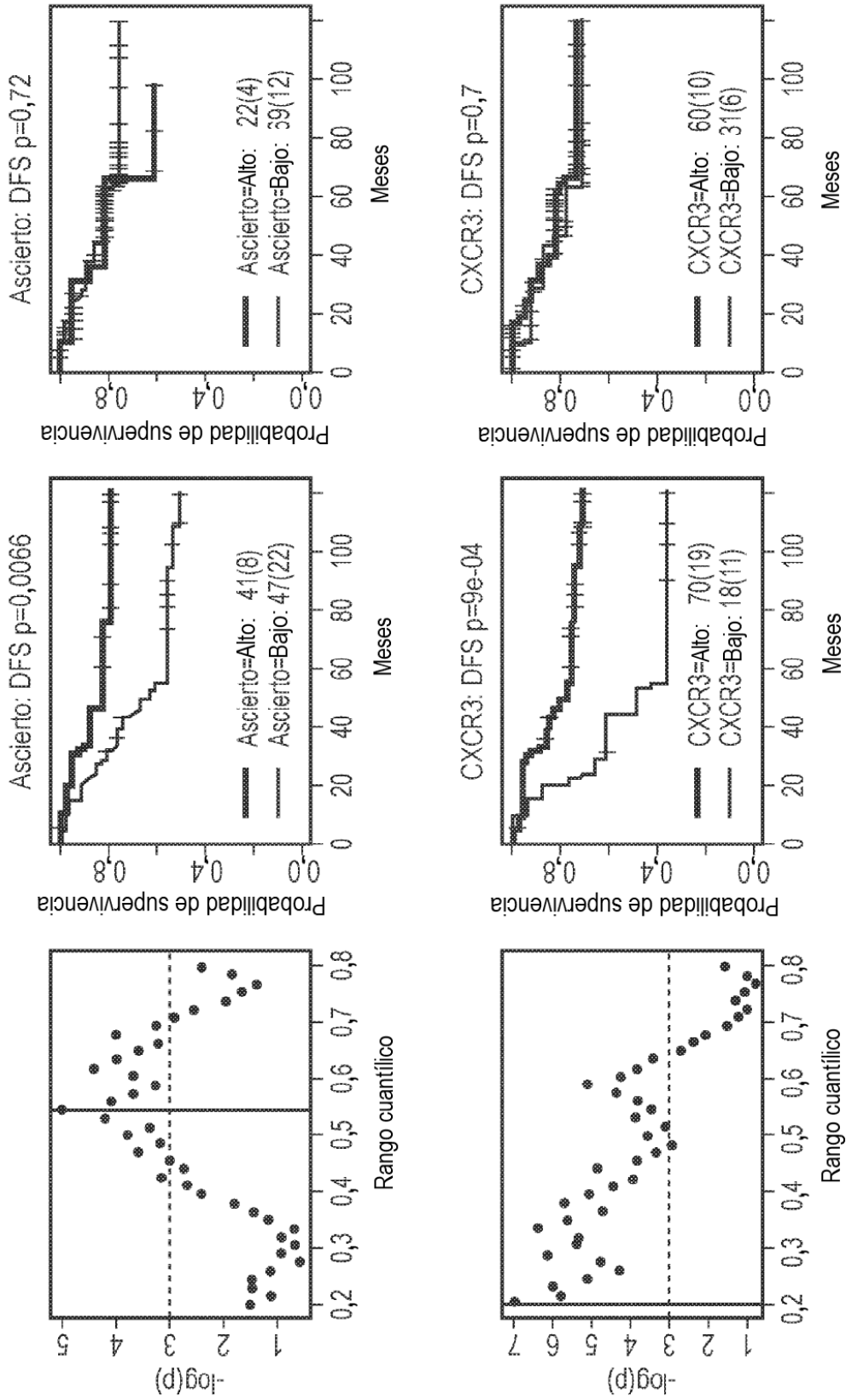


FIG. 9 (continuación)

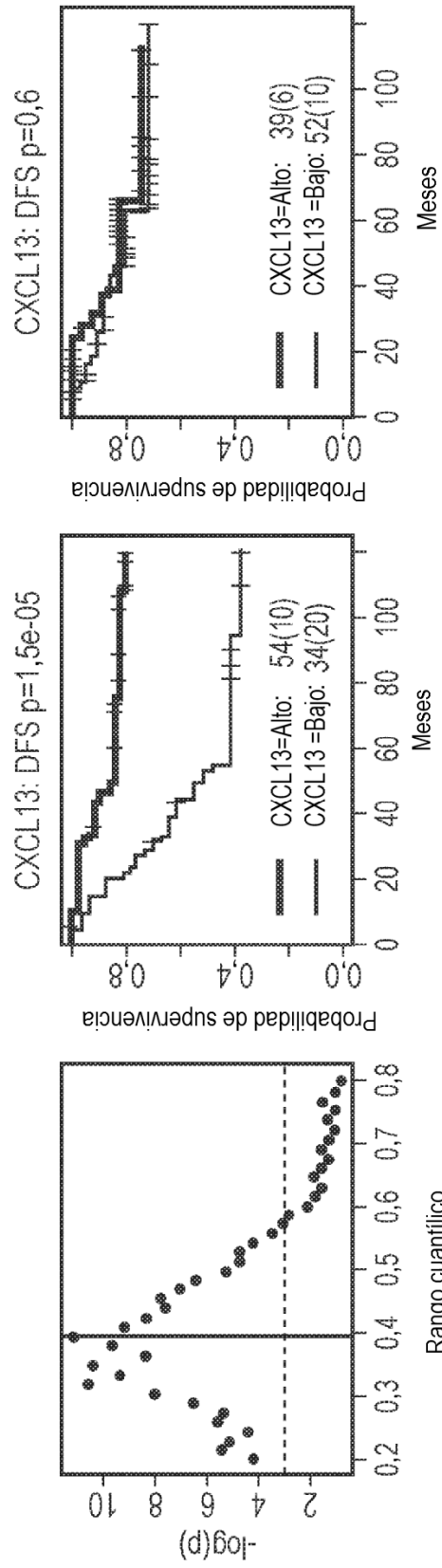


FIG. 9 (continuación)

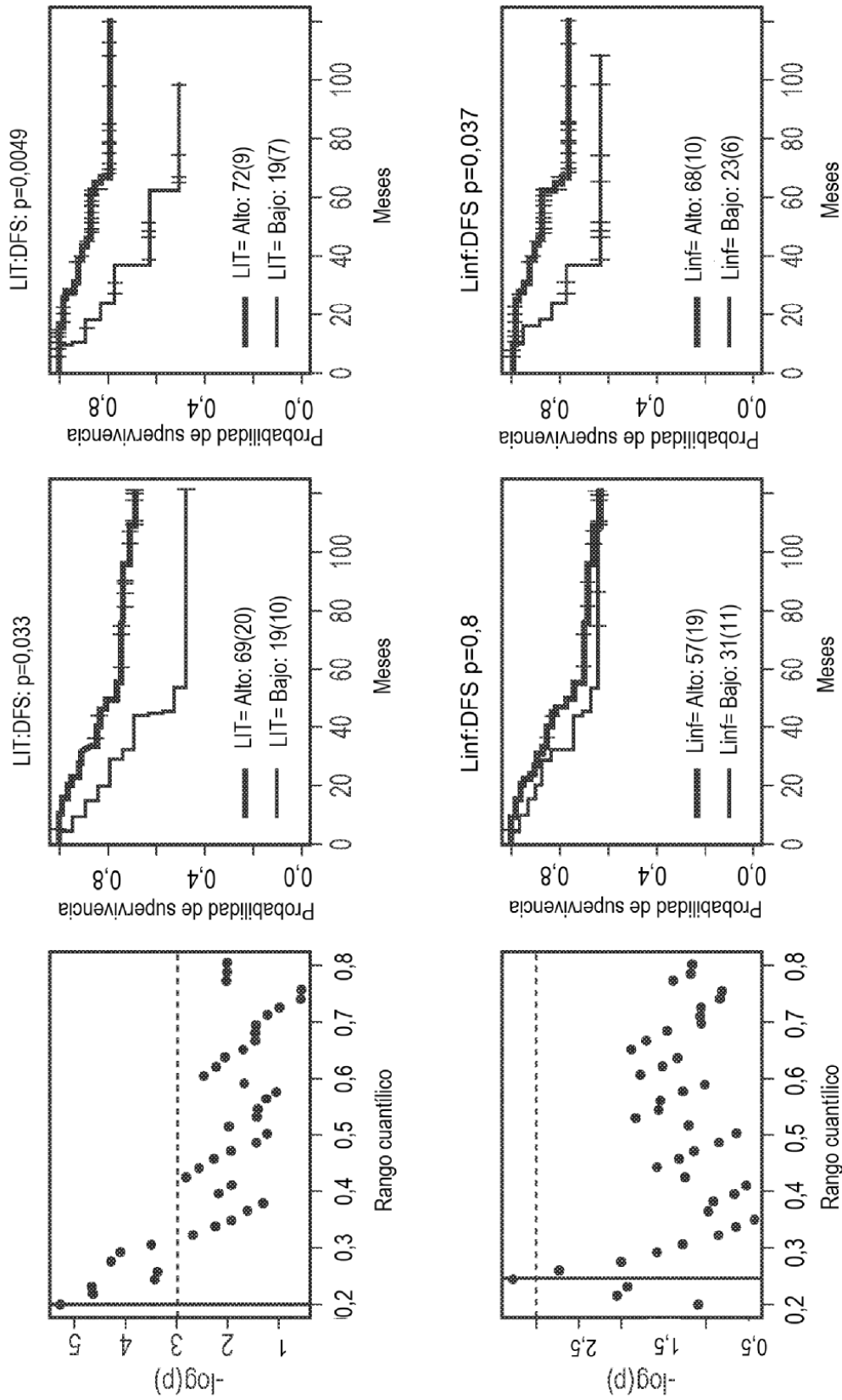


FIG. 10

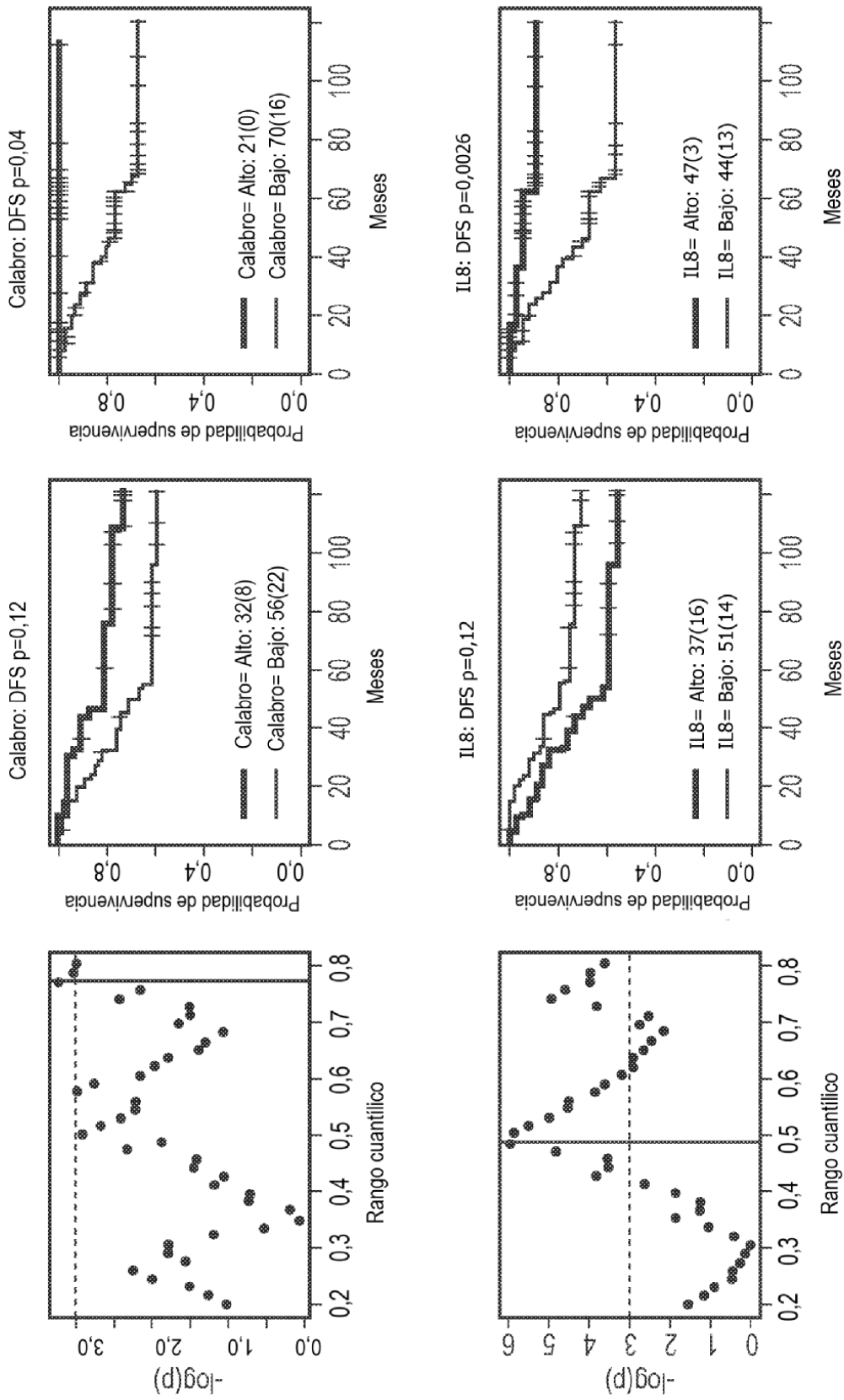


FIG. 10 (continuación)

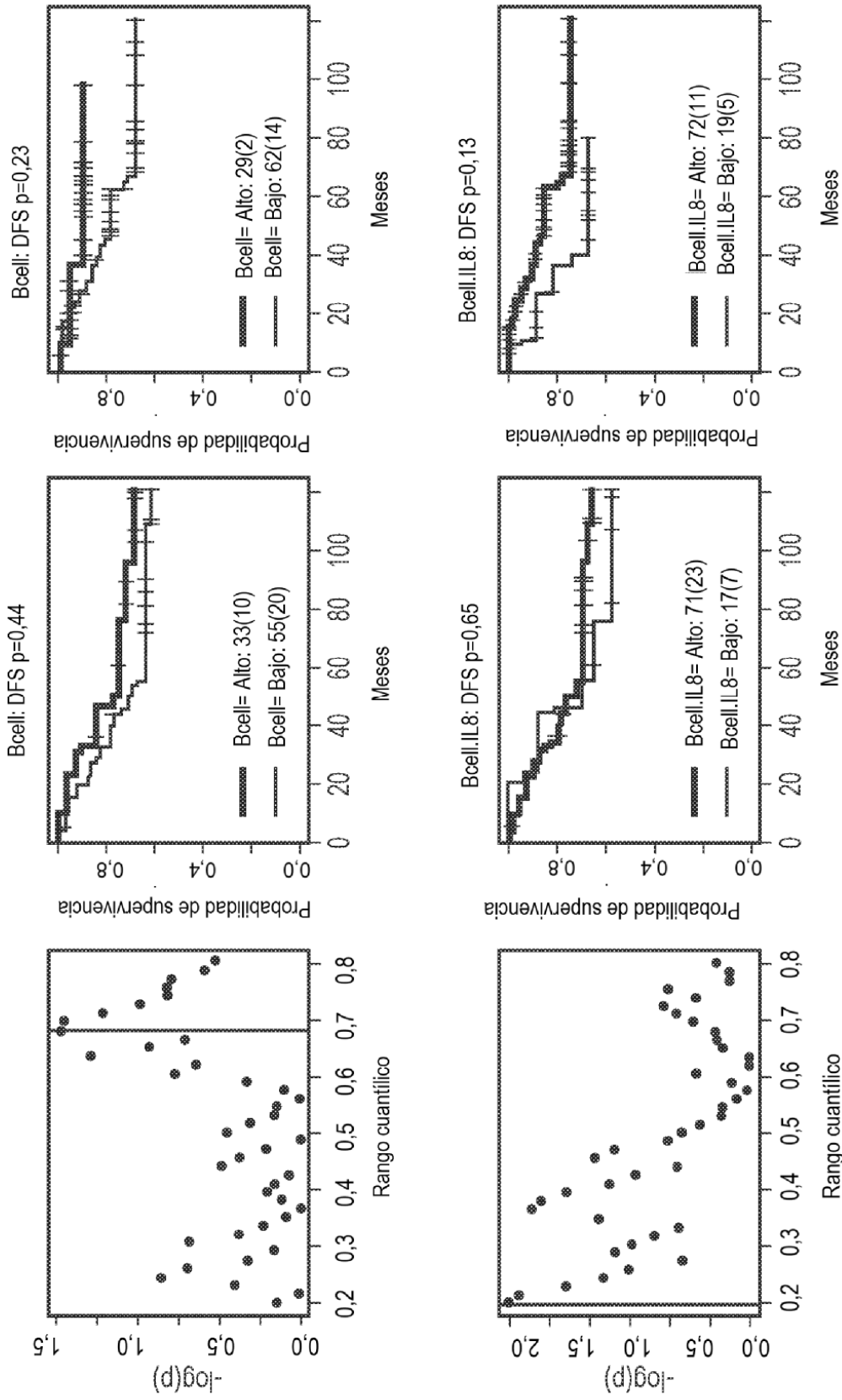


FIG. 10 (continuación)

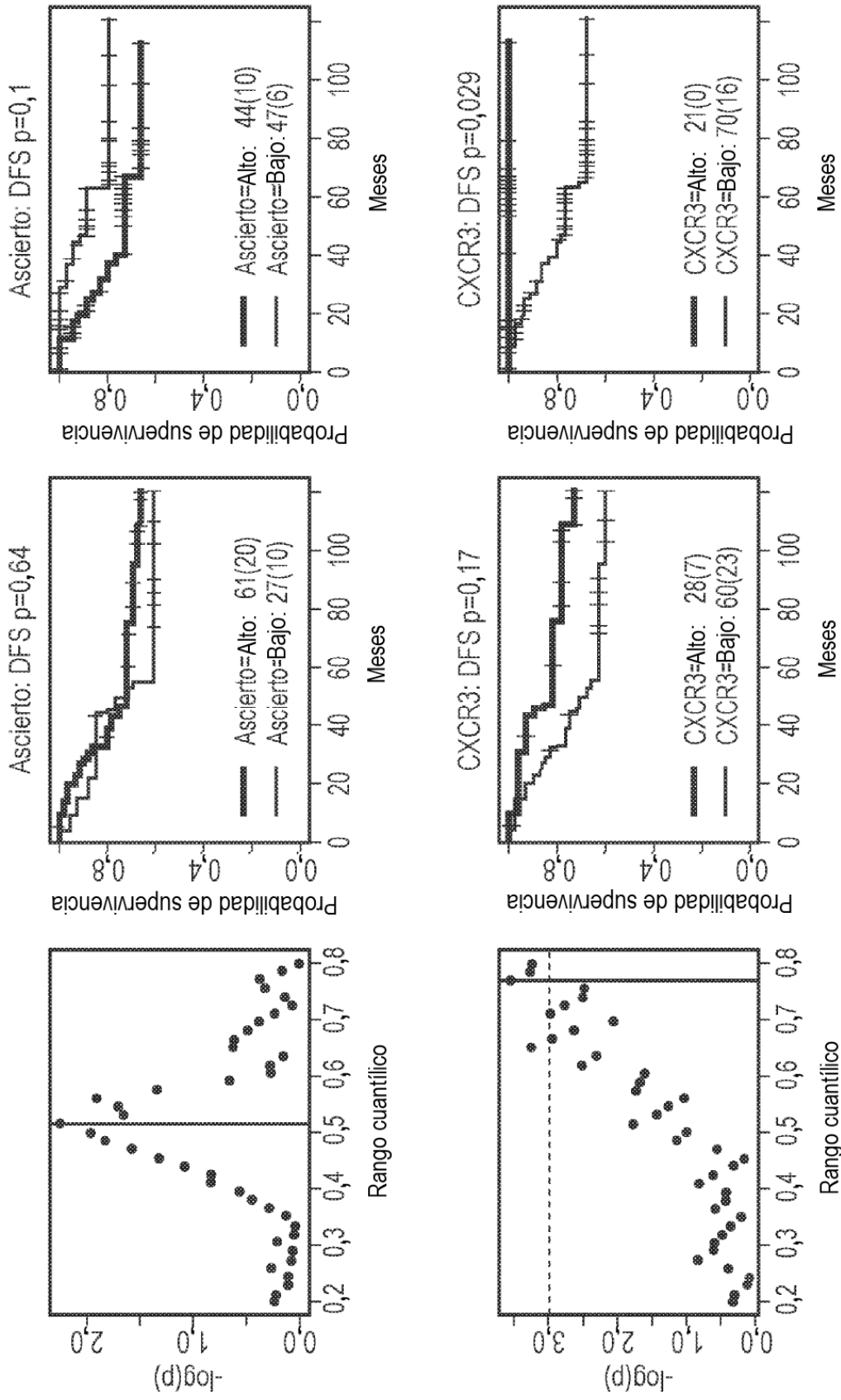


FIG. 10 (continuación)

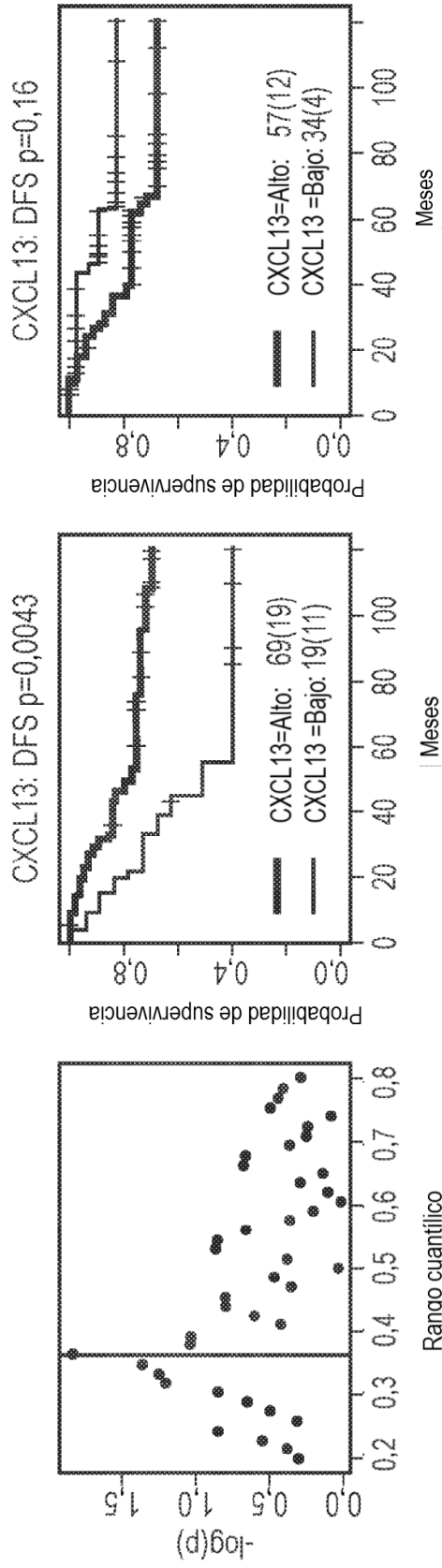


FIG. 10 (continuación)

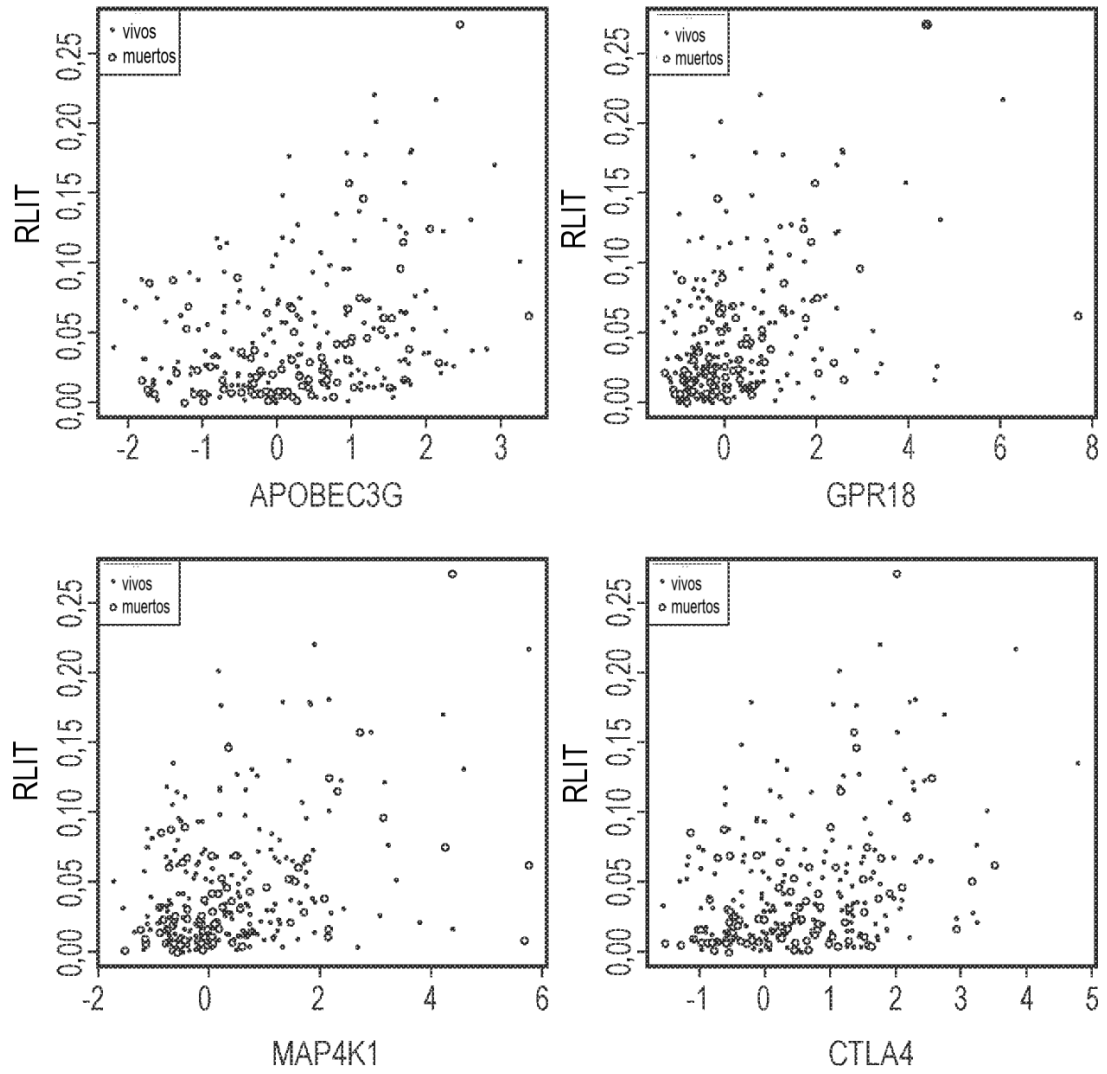


FIG. 11

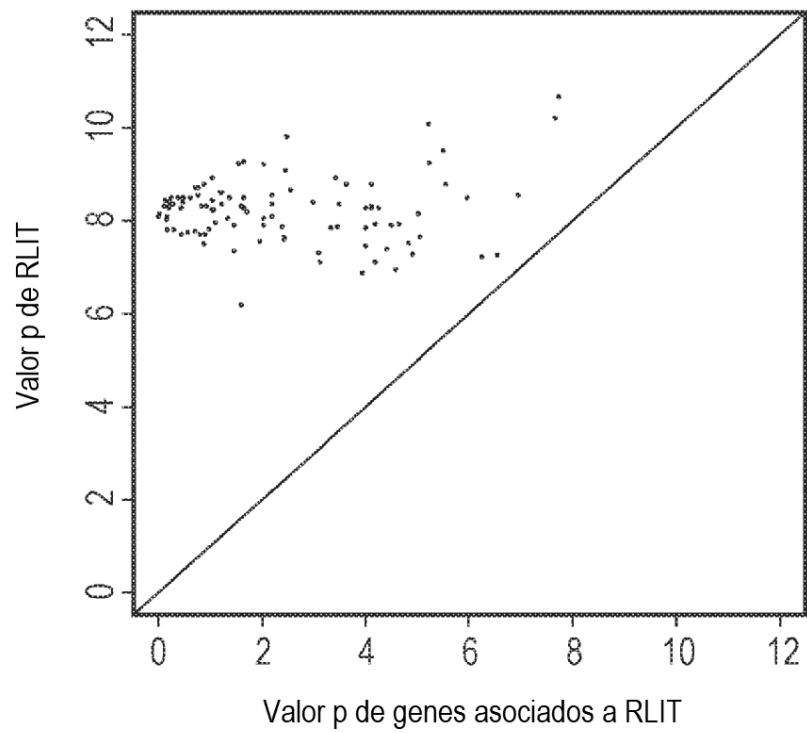
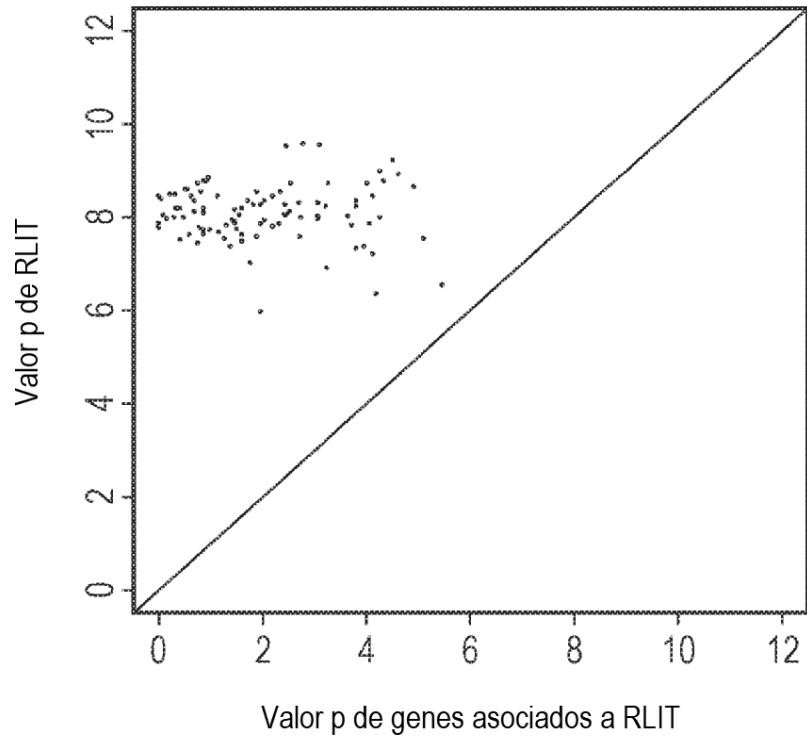


FIG. 12

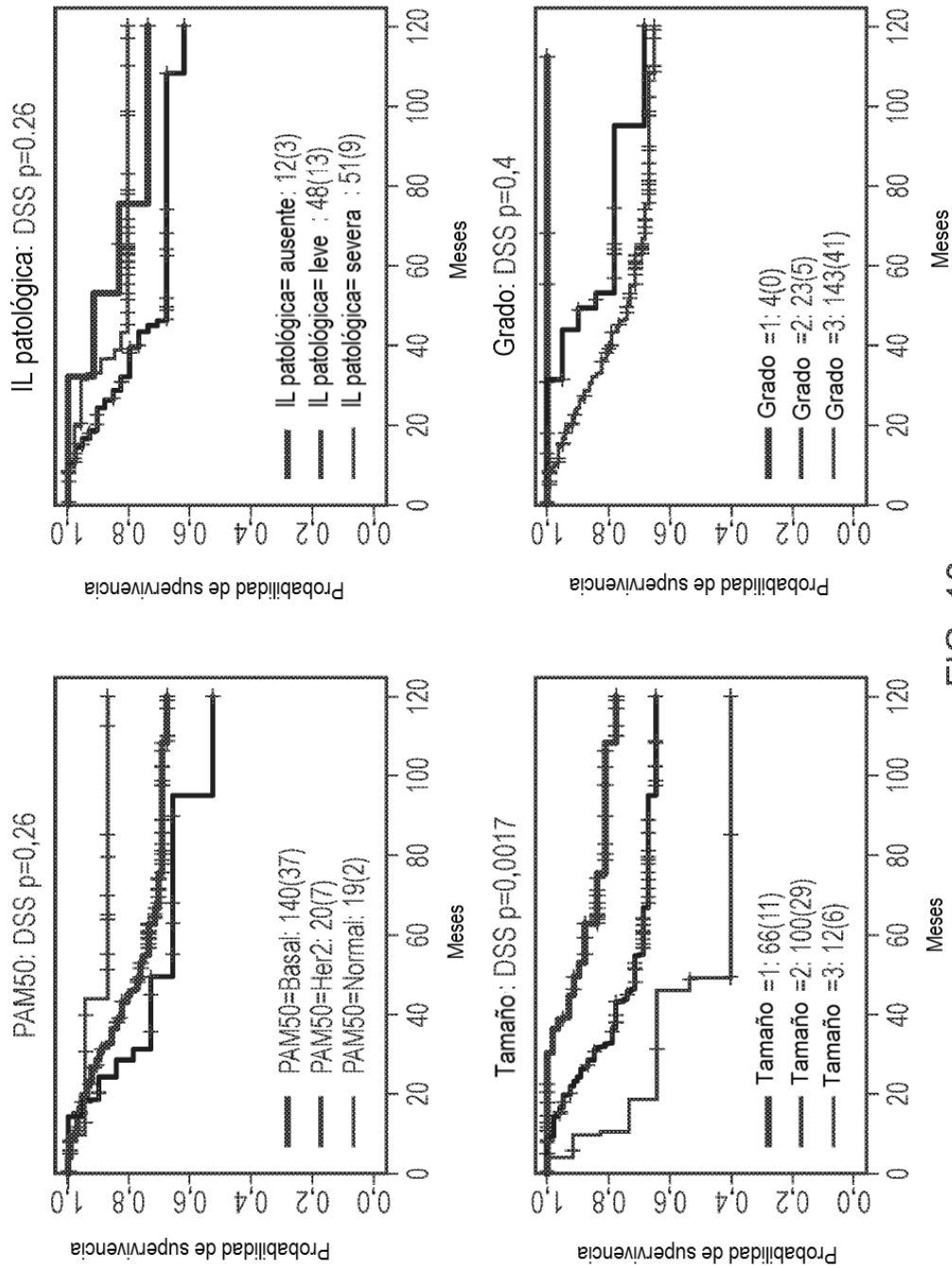


FIG. 13

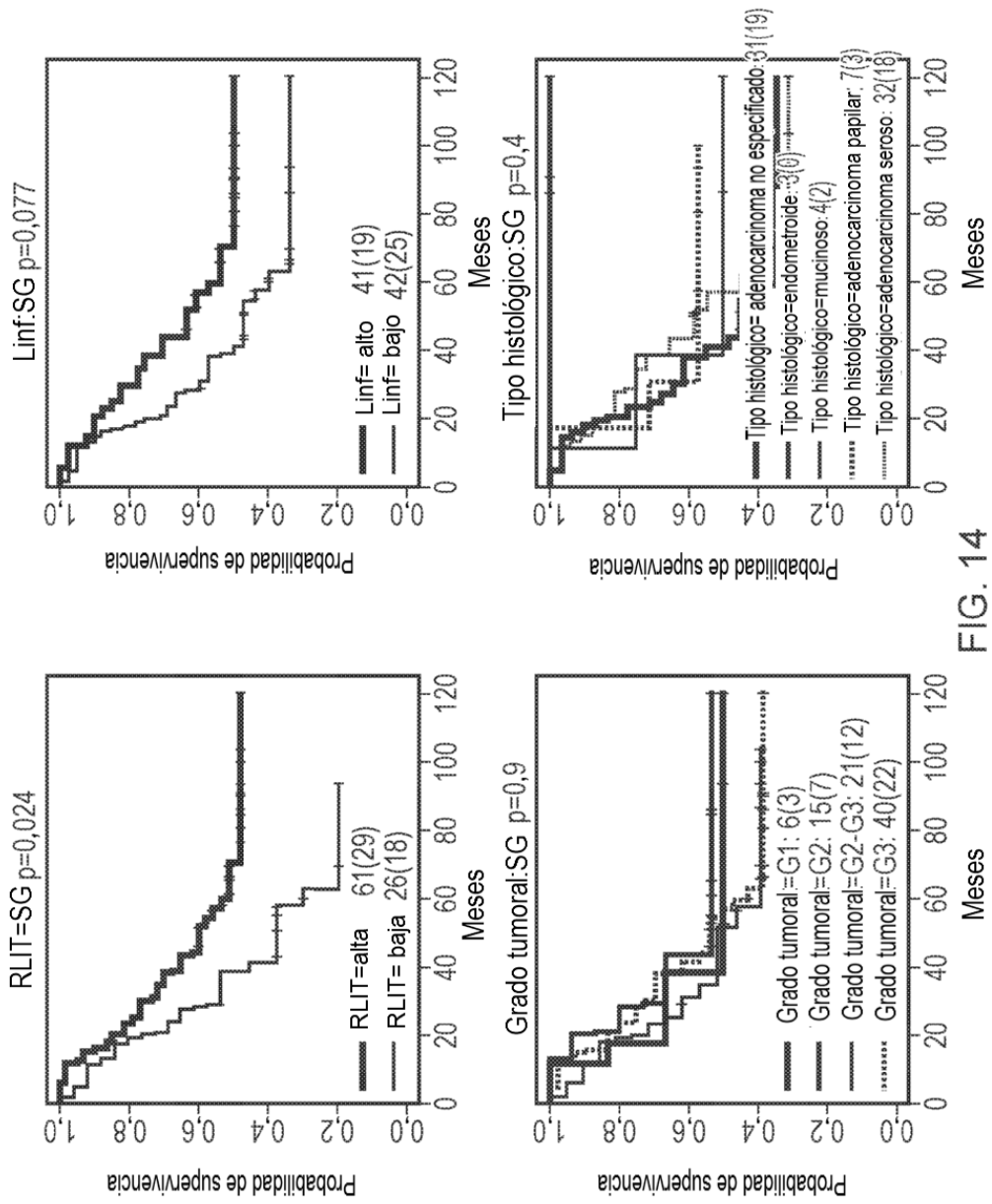


FIG. 14

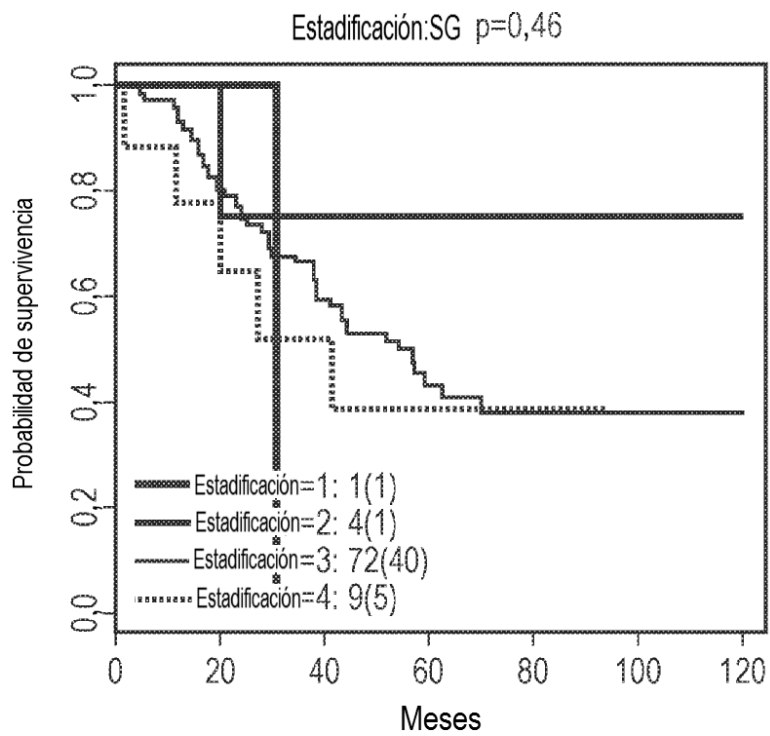
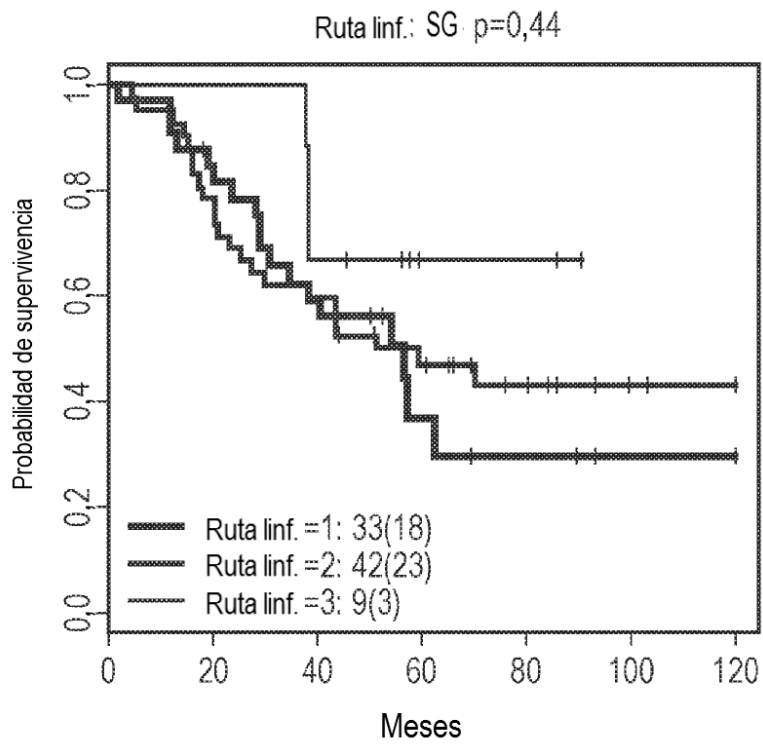


FIG. 14 (continuación)

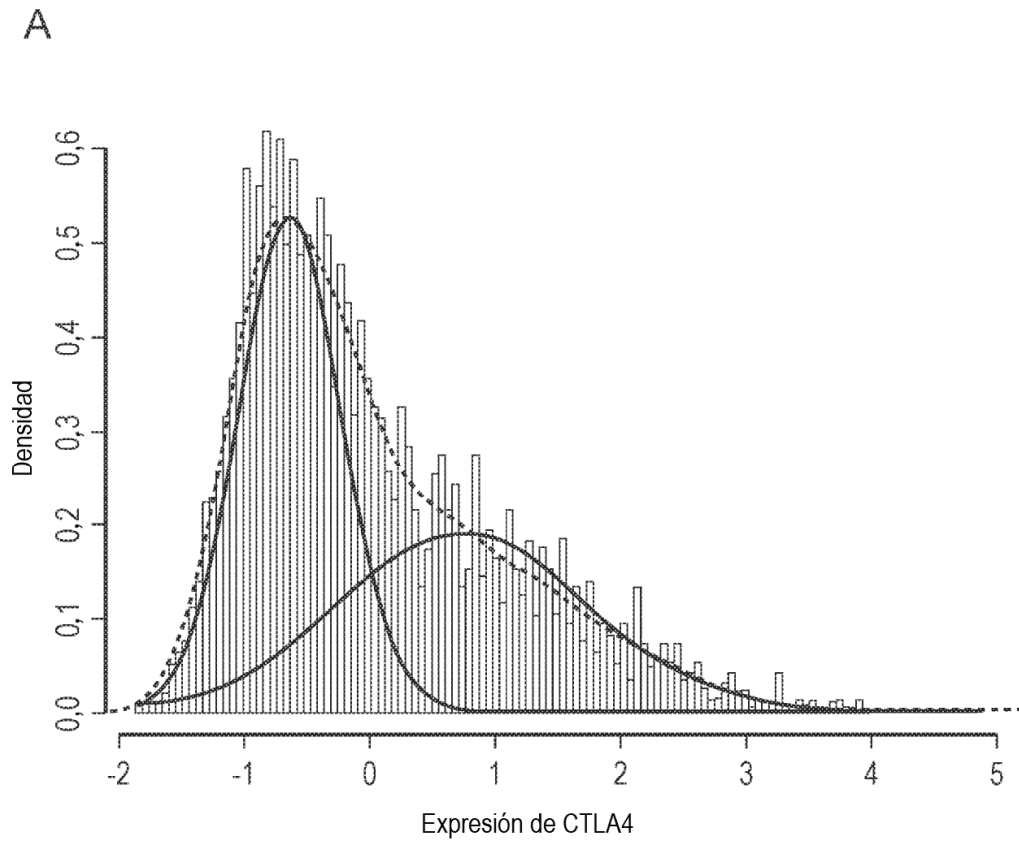


FIG. 15

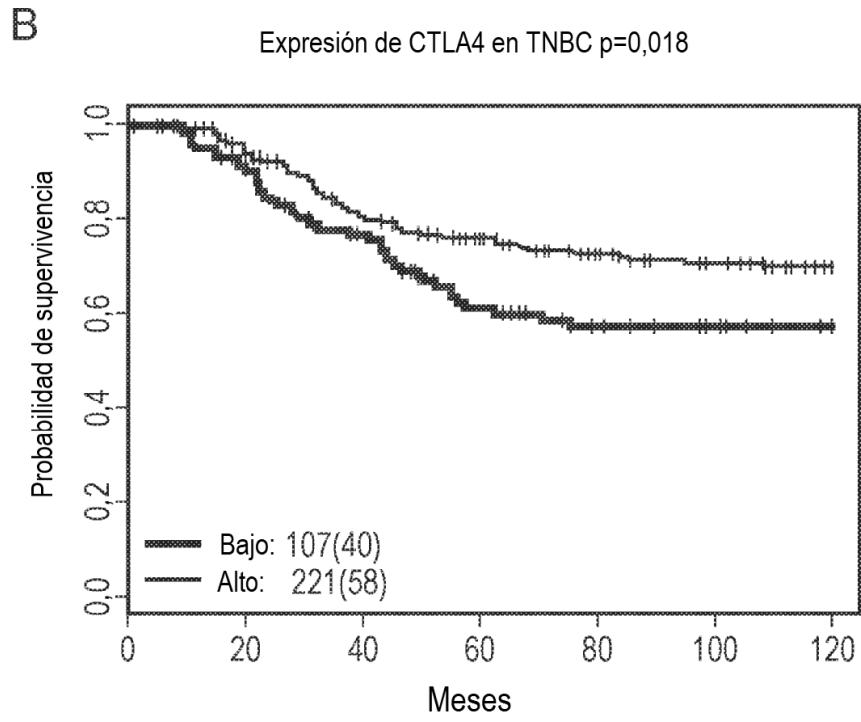


FIG. 15 (continuación)