

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 033**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2006 E 18159684 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3364191**

54 Título: **Uso de PDCD1LG1 y CXCL9 como marcadores para el pronóstico del cáncer**

30 Prioridad:

19.10.2005 EP 05292200
02.02.2006 US 764356 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2020

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITE PARIS DESCARTES (33.3%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (AP-HP) (33.3%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 785 033 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de PDCD1LG1 y CXCL9 como marcadores para el pronóstico del cáncer

Campo de la invención

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

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

Maki et al. (2004, J. Gastroenterology and Hepatology, Vol. 19: 1348-1356) habían mostrado una alteración del sistema inmune celular en pacientes con carcinoma hepatocelular, que se evaluaba por una expresión reducida de las

- 5 proteínas CD3 ζ y CD28 por parte de las células T, así como por una actividad incrementada de la caspasa-3 en las células T con modulación descendente por CD28, sugiriendo la existencia de apoptosis de células T en pacientes con HCC. Según estos autores, se podría establecer una nueva modalidad de terapia inmune antitumoral, que estaría dirigida a la activación de dichas células T y a evitar su apoptosis. Grujil et al. (1999, British Journal of Cancer, Vol. 79 (7/8): 1127-1132) también habían informado acerca de una expresión reducida de CD3 ζ en células T infiltrantes de carcinoma cervical. Estos autores sugirieron que, con el fin de que las estrategias de vacunación fueran exitosas, debería ser esencial identificar y contrarrestar, en primer lugar, los mecanismos que dan lugar a esta pérdida de CD3 ζ .
- 10 La alteración de la respuesta inmune del huésped, mediante la evaluación de la expresión de las proteínas CD3, CD4, CD8 y ligando Fas en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), también se mostró en pacientes con carcinoma oral (Reichert et al. (2002, Clinical Cancer Research, Vol. 8: 3137-3145). Prado-García et al. (2005, Lung Cancer, Vol. 47: 361-371) que realizaron observaciones similares, habían estudiado los mecanismos de evasión de adenocarcinoma de pulmón midiendo los porcentajes de células CD3+, CD4+ y CD8+ en sangre periférica y efusión pleural, y adicionalmente la expresión de proteínas CD27, CD28, CD45RO, CD45RA, granzima A, Fas y perforina en los subconjuntos de células T CD8+.
- 15 Estos autores habían encontrado un bloqueo de la respuesta inmune y sugirieron que eran necesarios estudios adicionales para entender los diversos mecanismos mediante los cuales las células de adenocarcinoma inhiben las células T CD8+ en los procesos de iniciación, crecimiento e invasión del carcinoma de pulmón, con el objetivo de desarrollar tratamientos mejorados para enfermedades malignas de pulmón.
- 20 Kuss et al. (2003, British Journal of Cancer, Vol. 88: 223-230) que realizaron observaciones similares, determinaron un subconjunto extendido de células T efectoras CD8+CD45RO-CD27 dotadas de una señalización TcR disfuncional, en pacientes con carcinoma de células escamosas. Estos autores sugirieron estudios adicionales para confirmar directamente la hipótesis que uniría los defectos de señalización observados con la apoptosis y la rápida renovación de linfocitos en pacientes con cáncer.
- 25 Además, Valmori et al. (2002, Cancer Research, Vol. 62: 1743-1750) han descubierto la presencia de un subconjunto de células T PBL CD45RA+CCR7-CD8+ que tiene una actividad citolítica en pacientes con melanoma. Estos autores sugirieron que una vacunación antitumoral mejorada debería estar dirigida hacia la estimulación y mantenimiento de dicha respuesta inmune efectora en un estadio temprano de la evolución de la enfermedad, en un momento en el que dicha respuesta podría ser efectiva para erradicar la enfermedad residual mínima y para evitar recidivas.
- 30 Los trabajos anteriores que se han descrito anteriormente describen la utilización de numerosos marcadores biológicos de la respuesta inmune en el curso de la comprensión de los mecanismos de la respuesta inmune contra diversos cánceres. Sin embargo, estos trabajos anteriores no proporcionan datos relacionados con una relación estadística significativa entre (i) la presencia de, o el nivel de expresión de, estos marcadores biológicos y (ii) un pronóstico del resultado de la enfermedad.
- Otros estudios han presentado datos que establecen una correlación estadística entre la expresión de marcadores biológicos de la respuesta inmune del huésped y el resultado de diversos cánceres.
- 35 De forma ilustrativa, Ishigami et al. (2002, Cancer, Vol. 94 (5): 1437-1442) mostraron que la expresión reducida de CD3- ζ se correlacionaba de forma negativa con la implicación de los ganglios linfáticos, la profundidad de la invasión, y el estadio clínico del carcinoma gástrico. De forma destacable, estos autores habían mostrado que una expresión reducida de CD3- ζ se correlacionaba con una tasa de supervivencia a los 5 años reducida de los pacientes, pero solo para pacientes a los que se les había diagnosticado "Estadio IV" de carcinoma gástrico.
- 40 Oshokiri et al. (2003, Journal of Surgical Ontology, Vol. 84: 224-228) mostraron una unión estadística entre la infiltración de un nido de células cancerígenas por células T CD8+ y la supervivencia de pacientes afectados con carcinoma del conducto biliar extrahepático (EBDC). Estos autores mostraron que la inmunoreactividad de las células T CD8+ intratumorales demostraba una correlación significativa con (i) menos metástasis en los ganglios linfáticos, (ii) invasión venosa y perineural reducida, y (iii) valores de estadificación pTNM mejores. De este modo, estos autores mostraron que el nivel de infiltración de células T CD8+ se correlacionaba bien con el método clínico-patológico pTNM
- 45 convencional y que dicho marcador biológico era fiable para la predicción de la supervivencia de pacientes con EBDC.
- Además, Diederischen et al. (2003, Cancer Immunol. Immunother., Vol. 52: 423-428) mostraron que los pacientes colorrectales con relaciones bajas CD4+/ CD8+ en TIL tenían una evolución clínica mejor, con una supervivencia significativamente mayor a los 5 años, independientemente del estadio de Dukes y la edad.
- 50 De forma adicional, Zhang et al. (2003, New England Journal of Medicine, Vol. 348 (3): 203-213) mostraron, mediante inmunotinción para CD, que la presencia o ausencia de células T intratumorales se correlaciona con el resultado clínico de carcinoma de ovario avanzado después de quimioterapia citorreductora y adyuvante. Estos resultados se obtuvieron a través de ensayos de inmunotinción de criosecciones de tumor con anticuerpos monoclonales contra CD3, CD4, CD8, CD83, CD45, CD45RO, CD19, CD57 y CD11c, así como a través de citometría de flujo de células procedentes de muestras de tumor frescas utilizando anticuerpos monoclonales contra HLADR, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45, IgG1 e IgG2a. Estos autores habían detectado la presencia o ausencia de células T infiltrantes de tumor CD3+ dentro de islotes de células de tumor y en estroma peritumoral. Estos autores han descubierto que los
- 55 pacientes cuyos tumores contenían células T tenían tanto una duración media de (i) supervivencia libre de progresión

y (ii) supervivencia total que era estadísticamente superior a la de pacientes cuyos tumores no contenían células T. Estos autores sugirieron validar adicionalmente la utilización de la detección de células T intratumorales en la clasificación y tratamiento de pacientes con carcinoma de ovario.

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

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

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

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

35 Ohshima et al. (2003, *Leuk Lymphoma*, 44(2):329-336) describen la expresión del receptor de quimioquina CXCR3 y su ligando, mig, en linfomas gástricos y de la zona marginal tiroidea.

Weng et al. (2003, *American Association for Cancer Research. Proceedings of the Annual meeting, AACR, US*, 44: 558) describen la expresión diferencial de CXCL9 (mig), CXCL10(IP-10) y CXCR3 durante la inmunoterapia adoptiva.

Kunz et al. (1999, *J Pathol*, 189(4) :552-558) encontraron que la fuerte expresión del linfoatraxante quimioquina CXC Mig está asociada a una fuerte infiltración de células T en el melanoma maligno humano.

40 Teruya-Feldstein et al. (1997, *Blood*, 90(10): 4099-4105) relatan el papel de Mig e IP-10 en la necrosis tisular y el daño vascular asociados con la enfermedad linfoproliferativa positiva para el virus de Epstein-Barr.

Según Saudemont et al. (2005, *Blood, American Society of Hematology, US*, 105(6): 2428-2435), las células NK que son activadas por CXCL10 pueden matar a las células tumorales durmientes que son resistentes a la lisis mediada por CTL y pueden expresar B7-H1 que estimula a las células T.

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

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

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* como se define en las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

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

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

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

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

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

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

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

Figura 8

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

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

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

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

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

Figura 10: (Fig. 10-A) Curvas de Kaplan-Meier para la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM (Estadios I: línea roja (n=75), II: verde (n=137), III: azul (n=99), y IV: negra (n=95)) en pacientes con CRC. **(Fig. 10-B)** Las curvas de Kaplan-Meier ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM (tal como en el panel A) y respecto a la densidad de células CD3+ en regiones de tumor combinadas (CD3_{CT}^{Lo}CD3^{Lo}, líneas gruesas, n=93; CD3_{CT}^{Hi}CD3_{IM}^{Hi}, líneas delgadas, n=109). El subgrupo de pacientes que no parecían tener una reacción inmune coordinada *in situ* en regiones del tumor (Hi/Lo o Lo/Hi para densidades de células CD3+) presentaban curvas de Kaplan-Meier similares a la cohorte entera. **(Fig. 10-C)** Las curvas de Kaplan-Meier ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad según los estadios UICC-TNM y respecto a la densidad de células CD3+ y CD45RO+ en regiones de tumor combinadas (CD3_{CT}^{Lo}CD3_{IM}^{Lo} más

CD45RO_{CT}^{Lo}CD45RO_{IM}^{Lo}, líneas gruesas, n=16; CD3_{CT}^{Hi}CD3_{IM}^{Hi} más CD45RO_{CT}^{Hi}CD45RO_{IM}^{Hi}, líneas delgadas, n=88). Los valores de punto de corte fueron 250, 640, 60, y 190 para CD3_{CT}, CD3_{IM}, CD45RO_{CT}, y CD45RO_{IM}, respectivamente. Ensayo estadístico de rango logarítmico, ** $P < 10^{-4}$.

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

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

20 **Figura 13:** se representan curvas de Kaplan-Meier que ilustran la duración de la supervivencia libre de enfermedad
según la organización de las células CD45RO+ y CD8+ dentro de las regiones del tumor (CT e IM). La presencia de
densidades altas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO/CD8-CT/IM-hi, rojo), de
densidades heterogéneas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO/CD8-CT/IM-het,
verde), de densidades bajas de células CD45RO+ y CD8+ en la región CT (CD45RO-CT-lo/CD8-CT-lo, azul), de
densidades bajas de células CD45RO+ y CD8+ en las dos regiones del tumor (CD45RO/CD8-CT/IM-lo, negro), en
25 272 pacientes con estadio I/II de cáncer colorrectal (ensayo estadístico de rango logarítmico, $P < 0,001$ para todas las
comparaciones). Se representa toda la cohorte de pacientes con estadio I/II de cáncer colorrectal (línea negra
punteada).

Por lo tanto, >95% de los pacientes CD45RO/CD8-CT/IM-hi estaban libres de la enfermedad después de 18 años,
mientras que el 0% de pacientes CD45RO/CD8-CT/IM-lo estaban libres de la enfermedad después de solo 2 años.

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

Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

50 Tal como se detallará adicionalmente, cuando se ha determinado una correlación estadística entre (i) la presencia de,
o el nivel de, uno o más marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa, tal como se describe en la memoria
descriptiva y (ii) el resultado real del cáncer en los pacientes, que abarca la supervivencia libre de enfermedad (DFS)
y la supervivencia total (OS), se han obtenido según la invención valores de P superiores a 10^{-8} , que se pueden
comparar con valores de P de 5×10^{-2} a 1×10^{-3} que se han descrito en diversos trabajos de la técnica anterior, tales
55 como, de forma ilustrativa, los de Zhang et al. (2003, *Supra*), Diederischen et al. (2003, *Supra*) u Oshikiri et al. (2003,
Supra).

- 5 El solicitante ha descubierto que existe una relación altamente significativa (por ejemplo, valores de P bajos) entre (i) el tipo, densidad, y localización de células inmunes dentro de los tumores y (ii) el resultado clínico de los pacientes, que abarca la DFS y OS. Esta correlación altamente significativa se ha descubierto cuando se utilizaban, para el ensayo de marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa, bien (i) ensayos de inmunología o (ii) análisis de la expresión génica.
- Mediante el análisis de marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa mediante el análisis de la expresión génica en la totalidad de una muestra de tejido tumoral, se encontró un elevado número de combinaciones significativas de marcadores, incluyendo numerosas combinaciones significativas de al menos dos marcadores, con valores de P de aproximadamente 10^{-4} , o inferiores.
- 10 De forma importante, en la presente memoria se ha identificado una agrupación dominante de genes comodulados para la inmunidad adaptativa de T_H1 , agrupación que incluye TBX1 (factor de transcripción 21 de la caja T), IRF1 (factor regulador de interferón 1), IFNG (interferón gamma), CD3Z (CD3 ζ), CD8, GNLY (granulinsina) y GZMB (granzima B). Además, se ha encontrado una correlación inversa entre la expresión de estos genes y la recurrencia tumoral.
- 15 Otra agrupación de genes altamente significativa incluye PDCD1LG1, VEGF, TNFRSF6B, IRF1, IL8RA Y SELL.
- Mediante el análisis de marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa mediante análisis inmunohistoquímico bien (i) en el centro del tumor (CT), (ii) en el entorno celular que rodea el tumor, que puede también denominarse el "margen invasivo" (IM) o (iii) tanto en CT como en IM, también se encontraron numerosas combinaciones significativas de marcadores. Los valores de correlación estadística más altos se encontraron cuando los marcadores biológicos se cuantificaron tanto en el centro del tumor (CT) como en el margen invasivo (IM).
- 20 En primer lugar, se ha descubierto que existe una alta correlación entre una densidad alta de células T en el sitio del tumor y un resultado favorable de la enfermedad. En particular, se ha mostrado que un resultado positivo del cáncer está altamente correlacionado con la cuantificación de una densidad alta de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor, bien en la parte central del tumor o en el margen invasivo del mismo.
- 25 En segundo lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor está altamente correlacionada con una recurrencia reducida del cáncer y/o una recurrencia retardada del cáncer y/o una ausencia de recurrencia del cáncer.
- 30 En tercer lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor está altamente correlacionada con metástasis distantes concomitantes reducidas, o una ausencia de metástasis distantes concomitantes (estadios M).
- En cuarto lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor está altamente correlacionada con metástasis tempranas reducidas, o una ausencia de metástasis tempranas (VE o LI o PI).
- 35 En quinto lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor está altamente correlacionada con una invasión reducida de los ganglios linfáticos regionales con células tumorales (estadios N).
- 40 En sexto lugar, se ha descubierto que la determinación de la presencia de densidades altas de células CD3+, células CD8+, células CD45RO+ o células Granzima-B+ en el sitio del tumor está altamente correlacionada con una invasión reducida a través de la pared intestinal (estadios T).
- De forma más general, se ha descubierto que la ausencia de diseminación temprana del tumor que se manifiesta mediante embolia tumoral en estructuras linfovascuales y perineurales está asociada marcadamente con la presencia de una respuesta inmune *in situ* fuerte, ilustrándose dicha respuesta inmune fuerte, de forma destacable, por las densidades altas de células inmunes encontradas en el sitio del tumor, así como por el alto nivel de expresión de diversos genes asociados con la inmunidad en el sitio del tumor.
- 45 Adicionalmente, se ha descubierto según la invención, que la detección de una respuesta inmune adaptativa fuerte en dos regiones distintas del tumor, el centro del tumor (CT) más el margen invasivo del tumor (IM), estaba altamente correlacionada con un tiempo largo de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia total de los pacientes, y era significativamente más informativa para el pronóstico de la progresión del cáncer de un paciente.
- 50 De forma importante, en la presente memoria se ha descubierto una correlación elevada entre (i) la densidad celular de un tipo específico de células que forma el sistema inmune, tal como se ensaya en un ensayo inmunohistoquímico utilizando un único marcador biológico, y (ii) la DFS u OS, con valores de P de al menos tan bajos como 10^{-7} , cuando dicho marcador biológico se ensaya tanto en el centro del tumor (CT) como en el margen invasivo (IM).
- De forma general; se ha descubierto según la invención, que el tipo, la densidad y la localización de las células inmunes

en los pacientes con cáncer, tal como se ensaya a través de la presencia de, o el nivel de, marcadores biológicos de la respuesta inmune adaptativa, tiene un valor de pronóstico que es superior e independiente de aquellos de métodos de estadificación del cáncer clínico-patológicos convencionales, entre los que se incluyen las clasificaciones de Dukes y la UICC-TNM.

5 Aún de forma más específica, la presente invención proporciona ahora métodos de pronóstico y medios técnicos para la predicción del resultado de un cáncer en un paciente, en particular para cánceres en un estadio temprano de la enfermedad, que se ha probado que son mucho más exactos que los métodos de estadificación del cáncer clínico-patológicos convencionales, y más especialmente para cánceres clasificados inicialmente como Estadio I/III, según la clasificación de Dukes.

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

Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención consiste en un método *in vitro* según la reivindicación 1.

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

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

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

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

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

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

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

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

Tal y como se pretende en la presente memoria, la expresión "pronóstico de la progresión de un cáncer" abarca el pronóstico, en un paciente en el que ya se ha diagnosticado la existencia de un cáncer, de diversos eventos, que incluyen:

(i) las posibilidades de existencia de metástasis;

45 (ii) las posibilidades de existencia de recurrencia loco-regional del cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal; y

(iii) las posibilidades de existencia de un tiempo largo libre de enfermedad (DFS) y/o un tiempo largo de supervivencia total (OS); es decir, un tiempo de DFS o un tiempo de OFS de 5 años o más después de los ensayos con el método de pronóstico *in vitro* según la invención.

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

y (vii) una metástasis distante.

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

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

Una muestra de tejido tumoral, independientemente de si se obtiene a partir del centro del tumor, del margen invasivo del tumor, o de los ganglios linfáticos más cercanos, engloba trozos o cortes de tejido que se han retirado del centro del tumor o del margen invasivo que rodea el tumor, incluyendo después de una resección quirúrgica del tumor o después de la recogida de una muestra tisular para biopsia, para una cuantificación adicional de uno o varios
15 marcadores biológicos, de forma destacable, mediante métodos de histología o inmunohistoquímica, mediante métodos de citometría de flujo y mediante métodos de análisis de la expresión de genes o proteínas, incluyendo el análisis genómico y proteómico. Se apreciará que las muestras de tejido tumoral se pueden utilizar en el método de pronóstico del cáncer de la presente invención. En estas realizaciones, el nivel de expresión del marcador biológico se puede evaluar mediante la evaluación de la cantidad (por ejemplo, la cantidad o concentración absoluta) del
20 marcador biológico en una muestra de tejido tumoral, por ejemplo, un frotis de tejido tumoral obtenido a partir de un paciente. La muestra de células, por supuesto, puede someterse a una variedad de técnicas preparativas y de almacenamiento posteriores a la recogida muy conocidas (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos y/o proteínas, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de evaluar la cantidad de marcador biológico en la muestra. Asimismo, los frotis de tejido tumoral también pueden
25 someterse a técnicas preparativas y de almacenamiento posteriores a la recogida, por ejemplo, fijación.

Tal y como se pretende en la presente memoria, la “respuesta inmune adaptativa” engloba la presencia o la actividad, incluyendo el nivel de actividad, de células del sistema inmune del paciente con cáncer huésped localmente en el sitio del tumor.

- 30 Tal y como se pretende en la presente memoria, la expresión “la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra dicho tumor” engloba cualquier respuesta inmune adaptativa de dicho paciente a través de la acción directa (dependiente de TCR) o indirecta (independiente de TCR), o de ambas, hacia dicho cáncer.

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

- 35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, los linfocitos T engloban linfocitos T cooperadores, que incluyen subgrupos de células de linfocitos T cooperadores Th1 y Th2.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, los linfocitos T también engloban linfocitos T citotóxicos.

Inmunidad adaptativa

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

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

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

- 55 A medida que los linfocitos se desarrollan, normalmente aprenden a reconocer los tejidos del mismo cuerpo (propios), como diferentes de los tejidos y partículas que no se encuentran normalmente en el cuerpo (no propios). Una vez se

forman las células B y células T, algunas de estas células se multiplicarán y aportarán “memoria” al sistema inmune. Esto permite al sistema inmune responder de forma más rápida y más eficaz la próxima vez que un individuo se expone al mismo antígeno, y en muchos casos evitarán que el individuo se ponga enfermo. Por ejemplo, la inmunidad adaptativa explica por qué un individuo que ha tenido varicela se denomina “inmune” a sufrir de nuevo varicela.

5 Sistema inmune adaptativo

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

10

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

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

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

20

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

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

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

30

35 Células T cooperadoras (o TH): una célula T cooperadora (o TH) es una célula T (un tipo de glóbulo blanco) que tiene en su superficie receptores de antígeno que se pueden unir a fragmentos de antígenos expuestos por las moléculas MHC de clase II que se encuentran sobre las células presentadoras de antígeno (APC) profesionales. Una vez unida al antígeno, la célula TH prolifera y se diferencia en células TH activadas y células TH de memoria. Las células TH activadas secretan citoquinas, proteínas o péptidos que estimulan a otros linfocitos; la más común es la interleuquina-2 (IL-2), que es un potente factor de crecimiento de las células T. Las células TH activadas, que proliferan, se pueden diferenciar en dos subtipos principales de células, células Th1 y Th2. Estos subtipos se definen sobre la base de las citoquinas específicas producidas. Las células Th1 producen interferón gamma e interleuquina 12, mientras que las células Th2 producen interleuquina-4, interleuquina-5 e interleuquina-13. Las células TH de memoria son específicas del primer antígeno que encuentran y se pueden llamar durante la segunda respuesta inmune. La mayor parte de las células TH presentan en la superficie celular la proteína CD4, que tiene atracción hacia partes de la molécula MHC de clase II. Esta afinidad mantiene a la célula TH y la célula diana unidas íntimamente entre sí durante la activación específica de antígeno. Las células TH con la proteína CD4 en su superficie se denominan células T CD4+. La disminución en el número de células T CD4+ es el mecanismo primario mediante el cual el VIH causa el SIDA.

40

45

Otras definiciones de términos relevantes

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

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

55

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

15 Los marcadores biológicos incluyen la presencia de, o el número o densidad de, células del sistema inmune en el sitio del tumor.

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

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

25 Los marcadores biológicos incluyen de esta forma antígenos de superficie que son expresados específicamente por células del sistema inmune, incluyendo por los linfocitos B, linfocitos T, monocitos/macrófagos, células dendríticas, células NK, células NKT, y células NK-DC, que se reclutan en el sitio del tumor o en su proximidad cercana, incluyendo en el margen invasivo del tumor y en los ganglios linfáticos más cercanos, o, alternativamente, el ARNm que codifica dichos antígenos de superficie.

30 De forma ilustrativa, los antígenos de superficie de interés utilizados como marcadores biológicos pueden incluir CD3, CD4, CD8 y CD45RO que son expresados por las células T o subconjuntos de células T

Por ejemplo, si la expresión del antígeno CD3, o la expresión del ARNm del mismo, se utiliza como un marcador biológico, la cuantificación de este marcador biológico, en la etapa a) del método según la invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica a todos los linfocitos T y células NKT.

35 Por ejemplo, si la expresión del antígeno CD8, o la expresión del ARNm del mismo, se utiliza como un marcador biológico, la cuantificación de este marcador biológico, en la etapa a) del método según la invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica a los linfocitos T citotóxicos.

40 Por ejemplo, si la expresión del antígeno CD45RO, o la expresión del ARNm del mismo, se utiliza como un marcador biológico, la cuantificación de este marcador biológico, en la etapa a) del método según la invención, es indicativa del nivel de la respuesta inmune adaptativa del paciente que implica a los linfocitos T de memoria o linfocitos T efector de memoria.

De forma ilustrativa adicional, las proteínas utilizadas como marcadores biológicos también pueden incluir proteínas citolíticas producidas específicamente por células del sistema inmune, como perforina, granulinsina y también granzima-B.

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

45 Etapa a) del método

Al final de la etapa a) del método según la invención, se obtiene un valor de cuantificación para cada uno de los marcadores biológicos que se utilizan.

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

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

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

De este modo, en determinadas realizaciones del método, la etapa a) consiste en cuantificar, en una muestra de tejido tumoral, las células que expresan un marcador biológico específico de la respuesta inmune adaptativa. Generalmente, se ensaya una combinación de al menos dos marcadores biológicos. En estas realizaciones de la etapa a) del método, el valor obtenido al final de la etapa a) consiste en el número o la densidad de células del sistema inmune, o subconjuntos de células del mismo, que están contenidas en dicha muestra de tejido tumoral y que expresan un marcador biológico específico, por ejemplo, entre la combinación de marcadores biológicos. En estas realizaciones, lo que se obtiene al final de la etapa a) consiste en los valores de la densidad celular encontrados para cada marcador biológico incluido en la combinación de marcadores. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la densidad de las células de interés puede expresarse como el número de estas células de interés que se cuenta por una unidad de área superficial de muestra de tejido, por ejemplo, como el número de estas células de interés que se cuenta por cm^2 o mm^2 de área superficial de muestra de tejido. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la densidad de las células de interés también puede expresarse como el número de estas células de interés por una unidad de volumen de muestra, por ejemplo, como el número de células de interés por cm^3 de muestra. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la densidad de las células de interés también puede consistir en el porcentaje de un subconjunto de células específico (por ejemplo, células T CD3+) por células totales o subpoblación de células total (ajustado al 100 %). Por ejemplo, en una realización del método, las células se recogen en primer lugar por dispersión mecánica de la muestra de tejido tumoral y las células de interés se cuentan entonces por citometría de flujo, opcionalmente después de marcarlas, por ejemplo, por anticuerpos específicos de antígeno de superficie marcados, antes de determinar la densidad celular. Los inventores creen que la alta relevancia estadística que han encontrado entre (i) los valores de cuantificación de los marcadores biológicos de interés, y (ii) el resultado de la enfermedad cancerosa, cuando dichos valores de cuantificación se evalúan por métodos inmunohistoquímicos puede explicarse al menos por:

- un método de cuantificación altamente preciso para cada marcador, como la numeración de las células que expresan el marcador por área superficial de un corte de tejido tumoral, como se realiza a partir de una pluralidad de diversas áreas superficiales de dicho corte de tejido tumoral; y

- una cuantificación separada combinada de dicho marcador en más de un tipo de muestra de tejido, por ejemplo, una cuantificación combinada de dicho marcador biológico tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el margen invasivo (IM), entendiéndose que se calcula entonces la relevancia estadística, por ejemplo, por análisis multifactorial, empezando a partir de la combinación de los valores de cuantificación que se miden.

En determinadas otras realizaciones del método, la etapa a) consiste en la cuantificación, en una muestra de tejido tumoral, del nivel de expresión de uno o más genes marcadores de la respuesta inmune adaptativa (por ejemplo, la cantidad de los ARNm específicos correspondientes). En general, se lleva a cabo la evaluación del nivel de expresión para una combinación de al menos dos genes marcadores. En estas realizaciones de la etapa a) del método, lo que se obtiene al final de la etapa a) consiste en los valores del nivel de expresión encontrados para cada una de las proteínas marcadoras producidas de forma específica por células del sistema inmune, que se incluyen en la combinación de marcadores.

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

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

En determinadas realizaciones de la etapa a) del método de pronóstico del cáncer según la invención, el o los marcadores biológicos se cuantifican separadamente en una, o más de una, muestra de tejido tumoral del paciente con cáncer, seleccionada del grupo que consiste en (i) un tumor primario global (como un todo), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente al tumor, tejido que puede denominarse más específicamente el "margen invasivo" del tumor (iv) los ganglios linfáticos localizados muy próximos al tumor, (v) una biopsia tumoral realizada antes de la cirugía (para el seguimiento de pacientes después del tratamiento, por ejemplo), y (vi) una metástasis distante. En estas realizaciones, el valor de cuantificación que se obtiene al final de la etapa a), para cada una de las muestras de tejido tumoral (i), (ii) o (iii), se compara, en la etapa b) del método, con los valores de referencia correspondientes determinados previamente para cada una de las muestras de tejido tumoral (i) a (vi), respectivamente. La obtención, en la etapa a) del método, de más de un valor de cuantificación para cada marcador biológico que se usa, permite un pronóstico final del cáncer más exacto que cuando

solo se determina un valor de cuantificación por marcador biológico.

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

5 marcador biológico con (ii) el valor de referencia predeterminado para el mismo marcador biológico.

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

10

En realizaciones preferidas del método de pronóstico *in vitro* de la invención, la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en:

a1) cuantificar el dicho al menos un marcador biológico en una sección de tejido tumoral por inmunodetección, separadamente tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el margen invasivo (IM); y

15 a2) cuantificar el dicho al menos un marcador biológico en la muestra de tejido tumoral completa por análisis de la expresión génica.

Según una primera realización específica del método de pronóstico *in vitro* de la invención, la etapa a1) se realiza cuantificando al menos dos marcadores biológicos distintos, separadamente tanto (i) en el centro del tumor (CT) como (ii) en el margen invasivo (IM).

20 Cuando, en el método *in vitro* de la invención, la etapa a) consiste en la etapa a1), entonces la etapa b) se realiza comparando (i) cada valor de cuantificación obtenido para el mismo marcador biológico, respectivamente en CT e IM con (ii) los valores de referencia correspondientes, respectivamente para CT e IM.

Según una segunda realización específica del método de pronóstico *in vitro* de la invención, la etapa step a2) se realiza cuantificando al menos cinco marcadores biológicos distintos en la muestra de tejido completa.

25 Cuando, en el método *in vitro* de la invención, la etapa a) consiste en la etapa a2), entonces la etapa b) se realiza comparando (i) cada valor de cuantificación obtenido para cada marcador biológico de dicha combinación de al menos cinco marcadores biológicos distintos.

Etapa b) del método

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

30
35

Primera realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

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

40 a) proporcionar al menos una colección de muestras de tejido tumoral seleccionadas del grupo que consiste en:

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

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

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

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

5 El "tratamiento contra el cáncer" al que se hace referencia en la definición de la etapa a) anterior se refiere a cualquier tipo de terapia del cáncer a la que se han sometido los pacientes con cáncer previamente a la recolección de las muestras de tejido tumoral, entre las que se incluyen la radioterapia, quimioterapia y cirugía, por ejemplo, resección quirúrgica del tumor.

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

Segunda realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

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

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

- a) seleccionar un marcador biológico para el cual se va a determinar un valor de referencia;
- 20 b) proporcionar una colección de muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer;
- c) proporcionar, para cada muestra tumoral proporcionada en la etapa b), información relacionada con el resultado clínico real para el paciente con cáncer correspondiente;
- d) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios para dicho marcador biológico seleccionado en la etapa a);
- 25 e) cuantificar dicho marcador biológico en cada muestra de tejido tumoral contenida en la colección proporcionada en la etapa b);
- f) clasificar dichas muestras de tumor en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico proporcionado en la etapa c), respectivamente:
 - 30 (i) un primer grupo que comprende muestras de tumor que presentan un valor de cuantificación para dicho marcador que es inferior a dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de cuantificación;
 - (ii) un segundo grupo que comprende muestras de tumor que presentan un valor de cuantificación para dicho marcador que es superior a dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de cuantificación;
- mediante lo cual se obtienen dos grupos de muestras de tumor para dicho valor de cuantificación específico, en donde las muestras de tumor de cada grupo se enumeran de forma separada;
- 35 g) calcular la significancia estadística entre (i) el valor de cuantificación para dicho marcador biológico obtenido en la etapa e) y (ii) el resultado clínico real de los pacientes de los cuales provienen las muestras de tumor contenidas en el primer y segundo grupo definidos en la etapa f);
- h) repetir las etapas f) y g) hasta que se ensaye cada valor de cuantificación arbitrario proporcionado en la etapa d);
- 40 i) establecer que dicho valor de referencia (valor de "punto de corte") consiste en el valor de cuantificación arbitrario para el cual se ha calculado la significancia estadística más alta (el más significativo) en la etapa g).

El método anterior consiste en establecer un valor de "punto de corte" en la mediana de los conjuntos de datos y se describe con detalle en los ejemplos de la presente memoria.

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

50

(más significativo, por ejemplo, valor de P inferior), mediante lo cual se proporciona un intervalo de valores de cuantificación. Dicho intervalo de valores de cuantificación consiste en un valor de "punto de corte" según la invención. Según esta realización específica de un valor de "punto de corte", se puede determinar un pronóstico del resultado clínico malo o bueno comparando, en la etapa b) del método de pronóstico de la invención, el valor obtenido en la

5 etapa a) con el intervalo de valores que delimitan dicho valor de "punto de corte", para un marcador biológico específico. En determinadas realizaciones, un valor de punto de corte que consiste en un intervalo de valores de cuantificación para el marcador biológico considerado, consiste en un intervalo de valores centrados en el valor de cuantificación para el cual se encuentra el valor de significancia estadística más alto (por ejemplo, en general, el valor de P mínimo que se encuentra).

10 En determinadas realizaciones preferidas del método para la predeterminación de un valor de punto de corte que se ha descrito anteriormente, dicho marcador biológico consiste en la densidad de células que expresan un marcador de proteína específico en la muestra de tumor. De forma adicional, para un único marcador de proteína, se pueden determinar los valores de punto de corte para al menos dos marcadores biológicos distintos, respectivamente (i) un

15 primer valor de punto de corte determinado para un primer marcador biológico que consiste en la densidad de células que expresan dicho marcador de proteína en el centro del tumor (CT) y (ii) un segundo valor de punto de corte determinado para un segundo marcador biológico que consiste en la densidad de células que expresan dicho marcador de proteína en el margen invasivo (IM).

En determinadas realizaciones preferidas de la etapa c) del método para la determinación de los valores de punto de corte anteriores, dicha información relacionada con el resultado clínico real de los pacientes se selecciona del grupo

20 que se en (i) la duración de la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y (ii) la supervivencia total (OS).

De hecho, para llevar a cabo el método de pronóstico del cáncer según la invención, se prefiere la disponibilidad de un valor de referencia predeterminado para más de un marcador biológico. De este modo, en general, se determina al menos un valor de referencia predeterminado para una pluralidad de marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmune adaptativa contra el cáncer que se engloban en la presente memoria, simplemente repitiendo

25 uno cualquiera de los métodos para la obtención de valores de referencia predeterminados que se han descrito anteriormente, para una pluralidad de marcadores biológicos.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones en donde el marcador biológico consiste en un antígeno de superficie expresado por células del sistema inmune, como el antígeno CD3, y en donde en la etapa a) del método de pronóstico del cáncer se lleva a cabo un análisis por citometría de flujo de la densidad de las células CD3+ en el sitio del tumor, el valor de referencia predeterminado puede consistir en el valor de la densidad celular, incluyendo el porcentaje de células específicas (por ejemplo, CD3+) por células totales o subpoblación de células totales (ajustado al 100 %), que se correlaciona con un mal pronóstico del cáncer, por ejemplo, recidivas o recurrencias, tiempo corto de supervivencia, etc., o, por el contrario, puede consistir en el valor de la densidad celular que se correlaciona con un buen pronóstico del cáncer, por ejemplo, ausencia de metástasis temprana, ausencia total de metástasis o tiempo largo de supervivencia libre de enfermedad.

30

35

En determinadas realizaciones, el valor de referencia predeterminado consiste en un valor de "punto de corte", tal como se ha descrito ya anteriormente, valor de "punto de corte" que consiste en un valor de cuantificación promedio para el marcador biológico de interés que discrimina entre un mal pronóstico del cáncer y un buen pronóstico del cáncer. De forma ilustrativa, para el cáncer colorrectal humano, se ha descubierto, cuando se utiliza análisis inmunohistoquímico de células CD3+ en el sitio del tumor como el marcador biológico, que el valor de referencia de punto de corte predeterminado puede ser aproximadamente 300 células CD3+/mm² para una muestra de tejido tumoral recogida del centro del tumor, y que el valor de referencia de punto de corte predeterminado puede ser aproximadamente 600 células CD3+/mm² para una muestra de tejido tumoral recogida del margen de invasión. En otras realizaciones en donde el valor de punto de corte consiste en un intervalo de valores que delimitan valores de cuantificación de CD3+ altos y bajos, dicho valor de punto de corte varía óptimamente de 50 células CD3+/mm² a 1.000 células CD3+/mm² para una cuantificación en el centro del tumor (CT) y de 80 células CD3+/mm² a 1.300 células CD3+/mm² para una cuantificación en el margen invasivo (IM).

40

45

Los valores de punto de corte óptimos basados en ensayos de rango logarítmico, para las densidades celulares de CD3, CD8, CD45RO, GZMB fueron 370, 80, 80, 30 células/mm² en el centro del tumor, respectivamente, y 640, 300, 190, 60 células/mm² en el margen invasivo, respectivamente, como se muestra en los ejemplos de la presente memoria.

50

Según las realizaciones anteriores, se obtiene un mal pronóstico del cáncer si el valor de cuantificación generado para el marcador biológico CD3+ es inferior al valor de referencia de punto de corte predeterminado, cuando la comparación se lleva a cabo en la etapa b) del método. A la inversa, se obtiene un buen pronóstico del cáncer si el valor de cuantificación generado para el marcador biológico CD3+ es superior al valor de referencia de punto de corte predeterminado, cuando la comparación se lleva a cabo en la etapa b) del método.

55

Tercera realización ilustrativa para la predeterminación de un valor de referencia

También, de forma ilustrativa, en realizaciones en las que el marcador biológico consiste en el nivel de expresión de

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

Comparación o comparaciones llevadas a cabo en la etapa b)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La exactitud de un valor de referencia predeterminado específico aumenta con el número de muestras de tejido que se utilizan para obtener los valores de cuantificación para un marcador biológico específico y, de este modo, para calcular un valor promedio (el valor de referencia predeterminado) que se asocia con un resultado del cáncer específico. De este modo, otra explicación para la elevada exactitud del método de pronóstico *in vitro* según la invención también reside en la elevada relevancia de los valores de referencia predeterminados, con los cuales se comparan los valores de cuantificación, en la etapa b) del método. De la forma más preferente, en vista de la obtención de valores de referencia predeterminados altamente relevantes para cada marcador biológico de interés, dichos valores de referencia predeterminados consisten en el valor promedio de una pluralidad de valores de cuantificación de dicho marcador medidos en muestras de tejido que provienen de la misma pluralidad de pacientes con cáncer que
15 experimentaron un resultado clínico específico.
20

De la forma más preferente, para evaluar unos valores de referencia predeterminados exactos, dichos valores de referencia se predeterminan a partir de al menos 50 valores de cuantificación, para un marcador biológico específico, utilizando, de este modo, muestras de tejido que provienen de al menos 50 pacientes con cáncer que han experimentado un resultado clínico malo o bueno específico, por ejemplo, DFS u OFS de más de 5 años después del diagnóstico. En realizaciones preferidas, se obtiene un valor de referencia predeterminado de al menos 60, 70, 80, 90,
25 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 o más valores de cuantificación para un marcador biológico específico.

De forma ilustrativa, los valores de referencia predeterminados descritos en los ejemplos de la presente memoria se han obtenido a partir de muestras de tejido que provienen de una cohorte de aproximadamente 500 pacientes con
30 cáncer.

La posibilidad según la invención de ensayar grandes cohortes de pacientes, es decir, un gran número de muestras de tejido, se proporcionó de forma destacada por la utilización de la técnica de micromatrices de tejido que se detalla con más detalle en la presente memoria descriptiva.

35 En los ejemplos de la presente memoria se describen con total detalle realizaciones específicas de los métodos utilizados para llevar a cabo la etapa b).

Etapa c) opcional del método

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

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

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

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

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

(i) se determina un buen pronóstico de un paciente para la progresión del cáncer, con un valor alto de supervivencia libre de enfermedad (DFS) o un valor alto de supervivencia total (OS), cuando el valor o los valores de cuantificación obtenidos en la etapa a) para un marcador biológico específico, o una combinación específica de marcadores biológicos, es superior a, o inferior a, el valor o valores de referencia predeterminados correspondientes; o bien
55

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

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

En los ejemplos de la presente memoria se describen con total detalle realizaciones específicas de los métodos utilizados para llevar a cabo la etapa c).

20 Combinaciones de marcadores biológicos

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

25 De forma ventajosa, cuando se busca el cribado de muestras con un alto rendimiento, el método de pronóstico del cáncer de la invención se lleva a cabo utilizando hasta 20 marcadores biológicos distintos.

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

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

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

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

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

55 De este modo, en realizaciones preferidas del método de pronóstico del cáncer según la invención, la muestra de tejido tumoral a la que se hace referencia en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en (i) un tumor primario global (como una totalidad), (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente el tumor, tejido que puede denominarse más específicamente el "margen invasivo" del tumor, (iv) los ganglios linfáticos localizados en la zona más próxima del tumor, (v) una biopsia de tumor realizada antes de la

cirugía (para el seguimiento de pacientes después del tratamiento, por ejemplo) y (vi) una metástasis distante.

De la forma más preferente, cuando el método de pronóstico *in vitro* de la invención se lleva a cabo con marcadores biológicos que consisten en las densidades de células que expresan proteínas específicas, entonces la etapa a) se lleva a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas y se miden las densidades celulares (i) en el centro del tumor (CT), (ii) en el margen invasivo (IM) o (iii) separadamente tanto en el CT como en el IM.

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

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

Preferentemente, dicho al menos un marcador biológico adicional, que se cuantifica en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en:

(i) el número o la densidad de células del sistema inmune contenidas en la muestra de tejido tumoral y que expresan dicho arcador biológico, generalmente, un marcador de proteína; y

(ii) el nivel de expresión de un ácido nucleico de interés en la muestra de tejido tumoral, generalmente la cantidad de ARNm codificado por un marcador génico específico.

En determinadas realizaciones del método, dicho al menos un marcador biológico adicional consiste en la densidad de linfocitos T presentes en el sitio del tumor.

En determinadas otras realizaciones, dicho al menos un marcador biológico adicional consiste en el valor de cuantificación de una proteína expresada por las células del sistema inmune presentes en el sitio del tumor.

En realizaciones adicionales del método, dicho al menos un marcador biológico adicional consiste en el valor de cuantificación de la expresión de un gen expresado específicamente por células del sistema inmune presentes en el sitio del tumor.

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

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

De este modo, el método de pronóstico del cáncer según la invención es potencialmente útil para determinar el pronóstico de pacientes para la progresión de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer adrenocortical, cáncer anal, cáncer del conducto biliar (por ejemplo, cáncer perihilar, cáncer del conducto biliar distal, cáncer del conducto biliar intrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de huesos (por ejemplo, osteoblastoma, osteocondroma, hemangioma, fibroma condromixioide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de célula gigante del hueso, cordoma, linfoma, mieloma múltiple), cáncer de cerebro y del sistema nervioso central (por ejemplo, meningioma, astrocitoma, oligodendrogliomas, ependimoma, gliomas, meduloblastoma, ganglioglioma, Schwannoma, germinoma, craneofaringioma), cáncer de mama (por ejemplo, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma lobular *in situ*, ginecomastia), enfermedad de Castleman (por ejemplo, hiperplasia de nódulo linfático gigante, hiperplasia de nódulo linfático angiofollicular), cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer endometrial (por ejemplo, adenocarcinoma endometrial, adenocantoma, adenocarcinoma papilar seroso, célula clara), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de célula pequeña), tumores carcinoides gastrointestinales (por ejemplo, coriocarcinoma, corioadenoma destruens), enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (por ejemplo, cáncer de célula renal), cáncer laríngeo e hipofaríngeo, cáncer de hígado (por ejemplo, hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña), mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de seno de la cavidad nasal y paranasal (por ejemplo, estesionoblastoma, granuloma de línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma, rdbomiosarcoma (por ejemplo, rdbomiosarcoma embrionario, rdbomiosarcoma

alveolar, rhabdomyosarcoma pleomórfico), cáncer de glándula salivar, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, cáncer de piel sin melanoma), cáncer de estómago, cáncer testicular (por ejemplo, seminoma, cáncer de célula germinal no seminoma), cáncer de timo, cáncer tiroideo (por ejemplo, carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma medular tiroideo, linfoma tiroideo), cáncer vaginal, cáncer vulvar, y cáncer uterino (por ejemplo, leiomyosarcoma uterino).

5

Como se resalta en las reivindicaciones, el método según la invención implica al menos dos marcadores biológicos que comprenden PDCD1LG1 y CXCL9. De forma ilustrativa, el al menos un marcador biológico adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en los siguientes marcadores biológicos:

(i) Marcadores biológicos variados

10 ICAM-2/CD102, 4-1BB/TNFRSF9, IFN-gamma R1, IFN-gamma R2, B7-1/CD80, IL-1 RI, IL-2 R alfa, BLAME/SLAMF8, IL-2 R beta, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, IL-7 R alfa, CCR9, CXCR1/IL-8 RA, CD2, CD3épsilon, CD3zeta, CD3gamma, CD4, CD4+/45RA-, IL-12 R beta 1, CD4+/45RO-, IL-12 R beta 2, CD4+/CD62L-/CD44, CD4+/CD62L+/CD44IL-17, CD5, Integrina alfa 4/CD49d, CD6, Integrina alfa E/CD103, CD8, Integrina alfa M/CD11b, CD8+/45RA-, Integrina alfa X/CD11c, CD8+/45RO-, Integrina beta 2/CD18, CD27/TNFRSF7, LAG-3, CD28, LAIR1, 15 CD30/TNFRSF8, LAIR2, CD31/PECAM-1, Ligando CD40/TNFSF5, NCAM-L1, CD43, NTB-A/SLAMF6, CD45, CD83, CD84/SLAMF5, RANK/TNFRSF11A, L-Selectina, CD229/SLAMF3, SIRP beta 1, CD69, SLAM, Cadena gamma Común/IL-2 R gamma, CRACC/SLAMF7, CX3CR1, CXCR3, CXCR4, CXCR6, TNF RI/TNFRSF1A, TNF RII/TNFRSF1B, Fas/TNFRSF6, Ligando Fas/TNFSF6, TSLP, TSLP R, ICAM-1/CD54, IL-2, IFN-gamma, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13,

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

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

(iii) Marcadores biológicos de la familia de los interferones:

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

(iv) Marcadores biológicos de la familia de receptores de cadena gamma común:

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

30 (v) Marcadores biológicos de quimioquinas y receptores CX3C:

Ligandos quimioquina CX3C, CX3CL1/Fractalkina,

Receptores de quimioquina CX3C, CX3CR1,

(vi) Marcadores biológicos de quimioquinas y receptores CXC,

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

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

(vii) Marcadores biológicos de quimioquinas y receptores CC,

40 Ligandos quimioquina CC, CCL21/6Cquina, CCL12/MCP-5, CCL6/C10, CCL22/MDC, CCL28, CCL3L1/MIP-1 alfa Isoforma LD78 beta, CCL27/CTACK, CCL3/MIP-1 alfa, CCL24/Eotaxina-2, CCL4/MIP-1 beta, CCL26/Eotaxina-3, CCL15/MIP-1 delta, CCL11/Eotaxina, CCL9/10/MIP-1 gamma, CCL14a/HCC-1, MIP-2, CCL14b/HCC-3, CCL19/MIP-3 beta, CCL16/HCC-4, CCL20/MIP-3 alfa, CCL1/I-309/TCA-3, CCL23/MPIF-1, MCK-2, CCL18/PARC, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCL17/TARC, CCL7/MCP-3/MARC, CCL25/TECK, CCL13/MCP-4CC,

Receptores de Quimioquina, CCR1, CCR7, CCR2, CCR8, CCR3, CCR9, CCR4, D6, CCR5, HCR/CRAM-A/B, CCR6

45 (viii) Marcadores biológicos de inhibidores de quimioquina CC

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

(ix) Marcadores biológicos de quimioquinas y receptores C

La subfamilia C (gamma) carece del primer y tercer residuos de cisteína. La linfotactina (también conocida como SCM-

1 alfa) y SCM-1 beta son actualmente los dos únicos miembros de la familia. Ambos tienen actividad quimiotáctica para linfocitos y células NK.

Ligandos Quimioquina C, XCL1/Linfotactina

Receptores de Quimioquina C, XCR1

5 (x) Marcadores biológicos de otras interleuquinas

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

10 En la presente memoria descriptiva, el nombre de cada uno de los distintos marcadores biológicos de interés hace referencia al nombre reconocido internacionalmente del gen correspondiente, tal como se encuentra en las bases de datos de secuencias de genes y secuencias de proteínas reconocidas internacionalmente, que incluyen la base de datos del HUGO Gene Nomenclature Committee, que está disponible particularmente en la siguiente dirección de Internet: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/index.html>.

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

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

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

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

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

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

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

45 En más realizaciones adicionales del método, el dicho al menos un marcador biológico adicional se selecciona del grupo que consiste en CD3, CD8, GZMB, CD45RO, GLNY, TBX21, IRF1, IFNG, CXCL10, CD4, CXCR3, CXCR6, IL-18, IL-18Rbeta, Fractalkina, IL-23, IL-31, IL-15, IL-7, MIG, Perforina, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, LAT, ZAP70, CD5 y CD2. Estos marcadores biológicos se cuantifican preferentemente, en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención, por métodos inmunológicos, incluyendo métodos inmunohistoquímicos *in situ*. Los valores de cuantificación pueden expresarse como la densidad media de células que expresan una proteína marcadora de interés contenida por área superficial de una sección de tejido de la muestra del tejido tumoral.

50 De forma ilustrativa, una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 marcadores biológicos adicionales distintos se cuantifica en la etapa a), marcadores biológicos que se seleccionan del grupo que consiste en CD3, CD8, GZMB, CD45RO, GLNY, TBX21, IRF1, IFNG, CXCL10, CD4, CXCR3, CXCR6, IL-18, IL-18Rbeta, Fractalkina, IL-23, IL-31, IL-15, IL-7, MIG, Perforina, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, LAT, ZAP70, CD5 y CD2. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente, en la etapa a)

del método de pronóstico *in vitro* de la invención, con técnicas inmunohistoquímicas.

De forma ilustrativa adicional, una combinación de 2 o más marcadores distintos adicionales que puede cuantificarse en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención puede seleccionarse de 2 o más marcadores biológicos adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en CCR5, CR7, CD103, CD119, CD120a, CD120b, CD122, CD127, CD134, CD14, CD152, CD154, CD178, CD183, CD184, CD19, CD1a, CD210, CD25, CD26, CD27, CD28, CD3, CD32, CD4, CD44, CD45, CD45Ra, CD45Ro, CD47, CD49d, CD5, CD54, CD56, CD62L, CD69, CD7, CD8, CD80, CD83, CD86, CD95, CD97, CD98, CXCR6, GITR, HLA-DR, ICOS, IFN γ R1I, IL-18R α , KIR-NKAT2, PD1, TCR $\alpha\beta$ y TGFRII. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente, en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención, con técnicas inmunohistoquímicas. En la Tabla 3 de la presente memoria está contenida una lista de anticuerpos dirigidos específicamente contra cada una de estas proteínas marcadoras.

Más adicionalmente, las combinaciones de al menos dos marcadores biológicos adicionales engloban combinaciones de dos o más marcadores biológicos distintos seleccionados del grupo de marcadores biológicos que comprende los siguientes marcadores biológicos: factor de transcripción 21 de la caja T (T-bet), factor regulador 1 del interferón (IRF-1), IFN γ , CD3 ζ , CD8, granulinsina (GLNY) y granzima B (GZMB). La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente, en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención, con técnicas inmunohistoquímicas.

De forma ilustrativa, la combinación de dos marcadores biológicos adicionales puede seleccionarse del grupo que consiste en CD8A-TBX21, CD3Z-CD8A, CD3Z-TBX21, B7H3-TGFB1, IFNG-TBX21, CD4-CD8A, CD8A, IFNG, CD4-TBX21, CD3Z-CD4, CD4-TGFB1, CD8A-GLNY, IFNG-IRF1, GLNY-IFNG, IRF1-TBX21, IL8-PTGS2, GLNY-TBX21, CD3Z-GLNY, CD3Z-IFNG, GZMB-IFNG, GLNY-IRF1, IL10-TGFB1, CD8A-IL10, CD4-IL10, CD8A-GZMB, GZMB-TBX21, CD3Z-GZMB, CD4-IRF1, GNLY-GZMB, B7H3-IL10, CD4-GZMB, GZMB-IRF1, IL10-TBX21, CD4-IFNG, B7H3-CD4, CD8A-TGFB1, CD3Z-IL10 y CD4-GLNY. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente, en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención, con técnicas de análisis de la expresión génica.

Otras combinaciones de dos marcadores biológicos adicionales que pueden usarse, opcionalmente con uno o más marcadores biológicos distintos, se listan en la Tabla 4 de la presente memoria. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente, en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención, con métodos de análisis de la expresión génica.

Otras combinaciones más de al menos dos marcadores adicionales que pueden usarse, opcionalmente con uno o más marcadores biológicos distintos, se listan en la Tabla 8 de la presente memoria. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente, en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención, con métodos de análisis de la expresión génica.

Otras combinaciones más de al menos dos marcadores biológicos adicionales engloban combinaciones de dos o más marcadores biológicos distintos seleccionados del grupo de marcadores biológicos que se listan en la in Tabla 9 de la presente memoria, que comprende los siguientes marcadores biológicos: 18s, ACE, ACTB, AGTR1, AGTR2, APC, APOA1, ARF1, AXIN1, BAX, BCL2, BCL2L1, CXCR5, BMP2, BRCA1, BTLA, C3, CASP3, CASP9, CCL1, CCL11, CCL13, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCNB1, CCND1, CCNE1, CCR1, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCRL2, CD154, CD19, CD1a, CD2, CD226, CD244, PDCD1LG1, CD28, CD34, CD36, CD38, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD40LG, CD5, CD54, CD6, CD68, CD69, CLIP, CD80, CD83, SLAMF5, CD86, CD8A, CDH1, CDH7, CDK2, CDK4, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CEACAM1, COL4A5, CREBBP, CRLF2, CSF1, CSF2, CSF3, CTLA4, CTNNB1, CTSC, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CYP1A2, CYP7A1, DCC, DCN, DEFA6, DICER1, DKK1, Dok-1, Dok-2, DOK6, DVL1, E2F4, EBI3, ECE1, ECGF1, EDN1, EGF, EGFR, EIF4E, CD105, ENPEP, ERBB2, EREG, FCGR3A, CGR3B, FN1, FOXP3, FYN, FZD1, GAPD, GLI2, GNLY, GOLPH4, GRB2, GSK3B, GSTP1, GUSB, GZMA, GZMB, GZMH, GZMK, HLA-B, HLA-C, HLA-, MA, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DPA1, HLA-DQA2, HLA-DRA, HLX1, HMOX1, HRAS, HSPB3, HUWE1, ICAM1, ICAM-2, ICOS, ID1, ifna1, ifna17, ifna2, ifna5, ifna6, ifna8, IFNAR1, IFNAR2, IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IGF1, IHH, IKBKB, IL10, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL17, IL17R, IL17RB, IL18, IL1A, IL1B, IL1R1, IL2, IL21, IL21R, IL23A, IL23R, IL24, IL27, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL31RA, IL4, IL4RA, IL5, IL6, IL7, IL7RA, IL8, CXCR1, CXCR2, IL9, IL9R, IRF1, ISGF3G, ITGA4, ITGA7, integrina, alfa E (antígeno CD103, linfocito mucosal humano, antígeno 1; polipéptido alfa), Gen hCG33203, ITGB3, JAK2, JAK3, KLRB1, KLRC4, KLRF1, KLRG1, KRAS, LAG3, LAIR2, LEF1, LGALS9, LILRB3, LRP2, LTA, SLAMF3, MADCAM1, MADH3, MADH7, MAF, MAP2K1, MDM2, MICA, MICB, MKI67, MMP12, MMP9, MTA1, MTSS1, MYC, MYD88, MYH6, NCAM1, NFATC1, NKG7, NLK, NOS2A, P2X7, PDCD1, PECAM-, CXCL4, PGK1, PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4, PLAT, PML, PP1A, CXCL7, PPP2CA, PRF1, PROM1, PSMB5, PTCH, PTGS2, PTP4A3, PTPN6, PTPRC, RAB23, RAC/RHO, RAC2, RAF, RB1, RBL1, REN, Drosha, SELE, SELL, SELP, SERPINA1, SFRP1, SIRP beta 1, SKI, SLAMF1, SLAMF6, SLAMF7, SLAMF8, SMAD2, SMAD3, SMO, SMOH, SMURF1, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7, SOD1, SOD2, SOD3, SOS1, SOX17, CD43, ST14, STAM, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6, STK36, TAP1, TAP2, TBX21, TCF7, TERT, TFRC, TGFA, TGFB1, TGFB1, TGFB2, TIMP3, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8,

5 TLR9, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF11A, TNFRSF18, TNFRSF1A, TNFRSF1B, OX-40, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF10, TNFRSF6, TOB1, TP53, TSLP, VCAM1, VEGF, WIF1, WNT1, WNT4, XCL1, XCR1, ZAP70 y ZIC2. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente, en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención, con métodos de análisis de la expresión génica.

10 Las combinaciones preferidas más adicionales de al menos dos marcadores biológicos adicionales engloban combinaciones de dos o más marcadores biológicos distintos seleccionados del grupo que comprende los siguientes marcadores biológicos: TNFRSF6B, CEACAM1, CD8A, PTGS2, BIRC5, SELL, INDO, IRAK4, TNF, TNFRSF10A, MMP7, LILRB3, CD3Z, TNFRSF8, GAPD, CXCL10, EBAG9, IL8, STAT1, CXCR3, TGFB1, ICOS, CD97, IL18RAP, CXCR6, ART1, IRF1, B7H3, ACE, IL18R1, TBX21, IL18, PDCD1, IFNG, GNLY, GATA3, VEGF, GZMB, LAT, CD4, IRTA2, IL10, TNFRSF4, THSD1 y PDCD1LG2. La cuantificación de este grupo de marcadores biológicos se lleva a cabo preferentemente, en la etapa a) del método de pronóstico *in vitro* de la invención, con métodos de análisis de la expresión génica.

15 Cualquier combinación de al menos dos marcadores biológicos adicionales seleccionados del grupo de marcadores biológicos que se describe en la presente memoria descriptiva está englobada por la invención.

En determinadas realizaciones del método, se usa una combinación de dos marcadores biológicos adicionales en la etapa a), que también puede denominarse en la presente memoria un "conjunto" de marcadores biológicos.

20 Un conjunto específico de marcadores biológicos adicionales, que puede cuantificarse mediante técnicas de análisis de la expresión génica, consiste en el conjunto que consiste en los siguientes marcadores biológicos: VEGF, TNFRSF6B, IRF1, IL8RA y SELL.

Métodos generales para la cuantificación de marcadores biológicos

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

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

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

35 De forma destacada, actualmente hay anticuerpos disponibles para la mayor parte, si no para todos, los marcadores biológicos descritos en la presente memoria descriptiva, entre los que se incluyen los marcadores biológicos que se listan en la Tabla 2.

40 Además, en situaciones en las que no hay todavía un anticuerpo disponible para un marcador biológico determinado, o en situaciones en las que se busca la producción de anticuerpos adicionales para un marcador biológico determinado, con las técnicas convencionales se pueden obtener fácilmente anticuerpos para dichos marcadores biológicos determinados, entre las que se incluyen la generación de hibridomas productores de anticuerpos. En este método, se sintetiza o se aísla una proteína o un péptido que comprende la totalidad de una proteína marcadora biológica, o un segmento de la misma (por ejemplo, mediante purificación a partir de una célula en la cual se expresa o mediante transcripción y traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o el péptido *in vivo* o *in vitro* utilizando métodos conocidos). Un vertebrado, preferentemente un mamífero tal como un ratón, rata, conejo u oveja, se inmuniza utilizando la proteína o el péptido. El vertebrado puede, opcionalmente (y preferentemente) inmunizarse al menos una vez más con la proteína o el péptido, de modo que el vertebrado muestra una respuesta inmune robusta frente a la proteína o el péptido. Del vertebrado inmunizado se aíslan esplenocitos y se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar hibridomas, utilizando cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos en la técnica.

50 A continuación, los hibridomas formados de esta manera se criban utilizando métodos estándares para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con la proteína marcadora biológica o un fragmento de la misma. La invención también abarca hibridomas preparados mediante este método y anticuerpos preparados utilizando dichos hibridomas. También se pueden utilizar anticuerpos policlonales.

55 La expresión de un marcador biológico de la invención se puede evaluar mediante cualquiera de una gran variedad de métodos bien conocidos para la detección de la expresión de un ácido nucleico transcrito o proteína. Entre los ejemplos no limitativos de dichos métodos se incluyen métodos inmunológicos para la detección de proteínas secretadas, de la superficie celular, citoplasmáticas o nucleares, métodos de purificación de proteínas, ensayos de

función o actividad proteica, métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, y métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

5 En una realización preferida, la expresión de un marcador se evalúa utilizando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo, anticuerpo unido a esqueleto polimérico, o anticuerpo marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando {por ejemplo, biotina-estreptavidina}), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena simple, un dominio hipervariable de un anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína marcadora o un fragmento de la misma, incluyendo una proteína marcadora que ha experimentado toda o una parte de su modificación normal posterior a la traducción.

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

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

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

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

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "sonda" se refiere a cualquier molécula que es capaz de unirse selectivamente a una molécula diana escogida específicamente, por ejemplo, un transcrito de nucleótido o una proteína codificada por o correspondiente a un marcador biológico. Las sondas se pueden sintetizar por un experto en la técnica, o pueden obtenerse a partir de preparaciones biológicas adecuadas. Para el objetivo de detección de la molécula diana, las sondas se pueden diseñar específicamente para ser marcadas, tal como se describe en la presente memoria. Entre los ejemplos de moléculas que se pueden utilizar como sondas se incluyen, pero no están limitadas a, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos, y moléculas orgánicas.

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

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

Existen muchos métodos establecidos para anclar componentes de un ensayo a una fase sólida. Entre éstos se incluyen, sin limitación, moléculas marcadoras o de sonda que están inmovilizadas mediante la conjugación de biotina y estreptavidina. Dichos componentes de ensayos biotinilados se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) utilizando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, un kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), e inmovilizado en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). En determinadas realizaciones, las superficies con componentes del ensayo inmovilizados se pueden preparar previamente y almacenarse.

Otros vehículos adecuados o soportes en fase sólida para dichos ensayos incluyen cualquier material capaz de unir la clase de molécula a la que pertenece el marcador o la sonda. Entre los soportes o vehículos bien conocidos se incluyen, pero no están limitados a, vidrio, poliestireno, nailon, polipropileno, nailon, polietileno, dextrano, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, gabbros, y magnetita.

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

En una realización preferida, la sonda, cuando es el componente del ensayo no anclado, se puede marcar con el objetivo de la detección y lectura del ensayo, bien directamente o indirectamente, con marcadores detectables que se discuten en la presente memoria y que son bien conocidos por un experto en la técnica.

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

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

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

un complejo de los componentes no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987-1999). En esta técnica, los complejos de proteína o ácido nucleico se separan en base al tamaño o la carga, por ejemplo. Con el fin de mantener la interacción de unión durante el proceso electroforético, habitualmente se prefieren materiales de la matriz de gel y condiciones no desnaturizantes en ausencia de un agente reductor. También se puede utilizar la técnica SELDI-TOF sobre una matriz o lechos acoplados con la superficie activa, o no, o superficie recubierta con anticuerpo, o lechos.

El experto en la técnica conocerá bien las condiciones adecuadas para el ensayo particular y los componentes del mismo.

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

El ARNm aislado se puede utilizar en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no están limitados a, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. Un método de diagnóstico preferido para la detección de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridar con el ARNm codificado por el gen que se está detectando. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADN de longitud completa, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones astringentes con un ARNm o ADN genómico que codifica un marcador de la presente invención. En la presente memoria se describen otras sondas adecuadas para utilizarse en los ensayos de pronóstico de la invención. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el marcador en cuestión se está expresando.

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

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

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

Como una alternativa para hacer determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluto del marcador, las determinaciones se pueden basar en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un marcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un gen constitutivo que se expresa de forma constitutiva. Entre los genes adecuados para la normalización se incluyen genes constitutivos, tales como el gen de actina, gen 18S ribosómico, gen GAPD, o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de un paciente, con otra muestra, por ejemplo, una muestra que no es de cáncer colorrectal, o entre muestras de diferentes fuentes.

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

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

Para determinar si una muestra contiene una proteína marcadora biológica que se une a un anticuerpo dado se pueden emplear una variedad de formatos. Entre los ejemplos de dichos formatos se incluyen, pero no están limitados a, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis por transferencia Western y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los métodos conocidos de detección y/o cuantificación de proteínas/anticuerpos para su utilización en el método de pronóstico del cáncer según la invención.

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

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

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

Cuantificación de marcadores biológicos por micromatrices de tejido

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

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

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

Por ejemplo, se obtienen muestras de tejido tumoral, incluyendo las que están en forma de muestras de biopsia (i) del centro del tumor, (ii) del margen invasivo o (iii) de los ganglios linfáticos regionales, de bloques de tejido de tumor, embebidos en parafina, fijados en formalina, a partir de un número adecuado de individuos. Éstas se transfieren a un

5 bloque de TMA. Se pueden generar múltiples bloques de TMA al mismo tiempo. Cada bloque de TMA se puede seccionar hasta 300 veces, con todos los trozos de TMA resultantes con los mismos tejidos en las mismas posiciones de coordenadas. Los trozos individuales se pueden utilizar para una variedad de análisis moleculares, tales como la tinción H&E para establecer la morfología del tejido, hibridación de ARNm in situ, inmunohistoquímica de proteínas o análisis del ADN para determinar alteraciones genéticas.

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

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

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

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

En los ejemplos de la presente memoria se describen realizaciones ilustrativas de cuantificación de marcadores biológicos utilizando micromatrices de tejido.

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

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

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

Los análisis también, y preferentemente, se pueden llevar a cabo en regiones de tumor combinadas (definidas anteriormente).

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

Cuantificación de marcadores biológicos por métodos de citometría de flujo

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

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

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

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

En los ejemplos de la presente memoria se describen realizaciones ilustrativas de la cuantificación de marcadores biológicos utilizando métodos de citometría de flujo.

Cuantificación de marcadores biológicos por amplificación de ácidos nucleicos

5 En determinadas realizaciones, un marcador biológico, o un conjunto de marcadores biológicos, se pueden cuantificar con uno cualquiera de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica.

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

10 Los análisis también, y preferentemente, se pueden llevar a cabo en regiones de tumor combinadas (definidas anteriormente) después de la microdissección del tumor.

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

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

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

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

En otras realizaciones, se puede diseñar un par específico de cebadores utilizando el método descrito en la Patente de EE. UU. No. 6.892.141 de Nakae et al.

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

30 También se han desarrollado un gran número de otros métodos para cuantificar ácidos nucleicos (Southern, E. M., *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517, 1975; Sharp, P. A., et al., *Methods Enzymol.* 65: 750-768, 1980; Thomas, P. S., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77: 5201-5205, 1980). Más recientemente, se han desarrollado métodos de PCR y RT-PCR que son capaces de medir la cantidad de un ácido nucleico en una muestra. Una estrategia, por ejemplo, mide la cantidad de producto de PCR en la fase log de la reacción antes de la formación de mesetas de productos de reacción (Kellogg, D. E., et al., *Anal. Biochem.* 189: 202-208 (1990); y Pang, S., et al., *Nature* 343: 85-89 (1990)). Habitualmente, se utiliza una secuencia de genes contenida en todas las muestras en una cantidad relativamente constante para la normalización de la eficiencia de la amplificación de muestras. Esta estrategia, sin embargo, presenta varios inconvenientes. El método requiere que cada muestra tenga cantidades de entrada iguales del ácido nucleico y que la eficiencia de la amplificación entre las muestras sea idéntica hasta el momento del análisis. Además, es difícil utilizar los métodos convencionales de cuantificación por PCR, tales como electroforesis en gel o hibridación por captura en placas para determinar que todas las muestras se analizan, de hecho, durante la fase log de la reacción, tal como

45 requiere el método.

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

50

Por ejemplo, el método de amplificación de ácidos nucleicos que se utiliza puede consistir en el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real.

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

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos preferidos son los métodos de amplificación por PCR cuantitativa, incluyendo el método de PCR cuantitativa multiplex tal como la técnica descrita en la Solicitud de Patente publicada de EE. UU. nº US 2005/0089862, de Therianos et al.

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

En los ejemplos de la presente memoria se describen realizaciones ilustrativas de cuantificación de marcadores biológicos utilizando métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

Kits para el pronóstico del cáncer

La invención puede basarse en la utilización de un kit para evaluar el pronóstico de un cáncer en un paciente (por ejemplo, en una muestra tal como una muestra de tejido tumoral de un paciente). El kit comprende una pluralidad de reactivos, cada uno de los cuales es capaz de unirse específicamente a un ácido nucleico o proteína que es un marcador biológico. Los reactivos adecuados para unirse a una proteína marcadora incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y semejantes. Los reactivos adecuados para unirse a un ácido nucleico marcador (por ejemplo, un ADN genómico, un ARNm, un ARNm sometido a corte y empalme, un ADNc, o semejantes) incluyen ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, los reactivos de ácido nucleico pueden incluir oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un sustrato, oligonucleótidos marcados que no están unidos a un sustrato, pares de cebadores de PCR, sondas de balizas moleculares, y semejantes.

De este modo, el método reivindicado puede utilizar un kit para el pronóstico de la progresión de un cáncer en un paciente, kit que comprende medios para cuantificar al menos un marcador biológico indicativo del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra el cáncer.

El kit puede comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para llevar a cabo los métodos de la invención. Como ejemplo, el kit puede comprender fluidos (por ejemplo, tampón SSC) adecuados para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios o para la unión de un anticuerpo a una proteína a la que se une específicamente, uno o más compartimentos de muestra, un material que contiene instrucciones que describen el rendimiento del método de pronóstico del cáncer de la invención, y semejantes.

40 Kits que comprenden anticuerpos

En determinadas realizaciones, el kit comprende uno o una combinación o un conjunto de anticuerpos, estando cada clase de anticuerpos dirigida específicamente contra un marcador biológico descrito en la presente memoria.

Un kit de anticuerpos puede comprender 2 a 20 clases de anticuerpos, estando cada clase de anticuerpos dirigida específicamente contra un marcador biológico de la invención. Por ejemplo, un kit de anticuerpos puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 clases de anticuerpos, estando cada clase de anticuerpos dirigida específicamente contra un marcador biológico como se define en la presente memoria.

En determinadas otras realizaciones, el kit comprende uno o una combinación o un conjunto de pares de ligandos o moléculas solubles específicas que se unen a uno o más de los marcadores biológicos de la invención.

Kits que comprenden cebadores de ácido nucleico

En determinadas otras realizaciones, el kit comprende uno o una combinación o un conjunto de pares de cebadores, hibridando cada clase de par de cebadores específicamente con un marcador biológico de la invención.

Un kit de cebadores puede comprender 2 a 20 clases de pares de cebadores, hibridando cada clase de par de cebadores específicamente con un marcador biológico de la invención. Por ejemplo, un kit de cebadores puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 clases de pares de cebadores, hibridando

cada clase de par de cebadores específicamente con un marcador biológico como se define en la presente memoria.

De forma destacada, al menos un par de cebadores específicos, así como la sonda de ácido nucleico de detección correspondiente, que hibrida específicamente con un marcador biológico de interés, ya ha sido referenciado y descrito totalmente en la base de datos pública de cebadores de PCR cuantitativa ("Quantitative PCR primer database"), de forma destacada en la siguiente dirección de Internet: <http://lpgws.nci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer>.

5

Monitorización de los tratamientos anticancerosos

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

10

En una realización preferida, se proporciona un método para monitorizar la efectividad del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro candidato a fármaco) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra antes de la administración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de uno o más marcadores biológicos seleccionados de la invención en la muestra anterior a la administración; (iii) obtener una o más muestras después de la administración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión del o de los marcadores biológicos en las muestras posteriores a la administración; (v) comparar el nivel de expresión del o de los marcadores biológicos en la muestra anterior a administración con el nivel de expresión del o de los marcadores en la muestra o muestras posteriores a la administración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto de acuerdo con esto. Por ejemplo, la expresión disminuida del gen o genes del marcador biológico durante el curso del tratamiento puede ser indicativa de una dosificación ineficaz y la conveniencia de incrementar la dosificación. A la inversa, una expresión incrementada del gen o genes del marcador biológico puede ser indicativa de un tratamiento eficaz y no se necesita cambiar la dosificación.

15

20

25

Como ya se ha mencionado previamente en la presente memoria descriptiva, la realización del método de pronóstico del cáncer de la invención puede indicar, con más precisión que los métodos de la técnica anterior, aquellos pacientes con alto riesgo de recurrencia del tumor que pueden beneficiarse de terapia adyuvante, incluyendo inmunoterapia.

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

30

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

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

35

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

40

De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona un método para adaptar un tratamiento del cáncer en un paciente con cáncer, en el que dicho método comprende las etapas de:

a) llevar a cabo en al menos una muestra de tejido tumoral recogida de dicho paciente, el método de pronóstico del cáncer que se describe en la presente memoria;

45

b) adaptar el tratamiento del cáncer de dicho paciente con cáncer mediante la administración a dicho paciente de una quimioterapia adyuvante o una terapia inmunoestimulante si se determina un mal pronóstico del cáncer al final de la etapa a).

Otro objetivo consiste en un kit para monitorizar la efectividad del tratamiento (adyuvante o neoadyuvante) de un sujeto con un agente, kit que comprende medios para cuantificar al menos un marcador biológico indicativo del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente contra el cáncer.

50

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

Ejemplos

A. Material y métodos de los ejemplos

Material y métodos de los ejemplos 1 a 4.

A.1. Pacientes y base de datos

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

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

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

Los descubrimientos clínicos, tratamiento, informe histopatológico y datos del seguimiento se recogieron de forma prospectiva y se actualizaron (mediante A.B) y se incluyeron en la TME.db. La base de datos es accesible bajo solicitud a zlatko.trajanoski@tugraz.at. El tiempo de observación fue el intervalo entre el diagnóstico y el último contacto (muerte o último seguimiento). Los datos se fueron controlando en el último seguimiento para pacientes sin recidiva, o muerte. La duración media del seguimiento fue de 44,5 meses. Los valores mín:máx hasta la progresión/muerte o último seguimiento fueron (0:214) meses, respectivamente. Seis pacientes de los que se había perdido el seguimiento se excluyeron del análisis. El tiempo hasta la recurrencia o tiempo libre de enfermedad se definió como el periodo de tiempo desde la fecha de la cirugía hasta la fecha confirmada de recidiva del tumor para pacientes con recidiva y desde la fecha de la cirugía hasta la fecha del último seguimiento para pacientes libres de enfermedad.

40 A.2. Histopatología

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

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

(a) infiltrados linfoides tumorales:

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

(b) reacción linfoide en el margen invasivo:

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

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

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

Análisis por PCR Taqman en tiempo real

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

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

- 30 Se congelaron de forma inmediata muestras de tejido durante los 15 minutos siguientes a la cirugía y se almacenaron en N₂ líquido. Se extrajo el ARN de especímenes de tumor congelados seleccionados al azar (n=100) de la cohorte (n=959). Se aisló el ARN total mediante homogeneización con un kit de aislamiento RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Se evaluaron la integridad y la cantidad del ARN en un bioanalizador-2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Setenta y cinco muestras tenían una calidad y cantidad de ARN suficiente para el análisis con matriz de baja densidad. Todas estas muestras, representativas de la cohorte, se evaluaron por análisis de la expresión génica. Se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR según las instrucciones del fabricante (Applied-Biosystems, Foster City, CA). Se realizó una PCR TaqMan en tiempo real cuantitativa utilizando matrices de baja densidad y el sistema de PCR en tiempo real robótico 7900 (Applied-Biosystems) (véase la lista de genes en la Tabla 2 para más detalles). Los cebadores y sondas de 18S y GAPDH se utilizaron como controles internos. Los datos se analizaron utilizando el software SDS v2.2 (Applied-Biosystems).

Análisis por citometría de flujo a gran escala

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

Construcción de una micromatriz de tejido

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

Harris (HE) e inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

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

Análisis estadístico

Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para evaluar la influencia de signos patológicos de invasión metastásica temprana (VELIPI) sobre la supervivencia total y libre de enfermedad. Se calculó la significancia de diversos parámetros clínicos mediante análisis unifactorial utilizando el ensayo de rango logarítmico (Tabla 1). Se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para ensayar la influencia simultánea sobre la supervivencia (total y libre de enfermedad) de todas las covariables encontradas significativas en el análisis unifactorial. Se utilizaron los mismos ensayos para evaluar el efecto de la densidad de CD45RO (número de células/ mm^2) sobre la supervivencia total y libre de enfermedad, solo o junto con las covariables de estadificación del tumor, ganglio y metástasis (T, N, M). El ensayo t Anova y el ensayo de Wilcoxon-Mann-Whitney fueron los ensayos paramétricos y no paramétricos utilizados para identificar marcadores con una expresión significativamente diferente entre los tumores positivos para VELIPI y negativos para VELIPI. Se determinó la normalidad del logaritmo de los niveles de expresión génica y de las densidades de CD45RO utilizando el ensayo de Shapiro. Se utilizó el ensayo de Wilcoxon para evaluar la significancia de la diferencia entre las supervivencias medias entre diferentes grupos de pacientes. Todos los ensayos fueron bilaterales. Un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Se informó de todos los valores de P sin ajustes de corrección múltiples. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico R y Statview.

Material y métodos del ejemplo 5

A.3. Pacientes y bases de datos

Se revisaron los registros de 415 pacientes con cáncer colorrectal (CRC) que se sometieron a resección primaria de su tumor en los Hospitales Laennec-HEGP entre 1990 y 2003. Estos 415 pacientes de los hospitales Laennec-HEGP fueron el principal objeto de nuestro estudio (Tabla 11-S1).

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

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

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

A.4. Histopatología

Análisis de PCR Taqman en tiempo real

Se llevó a cabo un análisis de PCR Taqman en tiempo real tal como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos de los Ejemplos 1 a 4 anteriores.

5 Construcción de micromatriz de tejido

Se realizó la construcción de una micromatriz de tejido tal como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos de los Ejemplos 1 a 4 anteriores.

Inmunoquímica

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

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

Análisis estadístico

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

30 Se utilizaron los estimadores de Kaplan Meier de supervivencia para visualizar las curvas de supervivencia y para obtener los estimadores de la media, percentil 75 y proporciones de supervivencia a los 2, 4 y 5 años para la OS y DFS. El ensayo de rango logarítmico se utilizó para comparar la supervivencia libre de enfermedad y total entre pacientes en diferentes grupos. Para los marcadores medidos con RT-PCR, el nivel de expresión medio se tomó como punto de corte para dicotomizar las variables. Para los cuatro marcadores estudiados adicionalmente en dos regiones diferentes (CT e IM) utilizando TMA (CD3, CD45RO, CD8, GZM) se aplicó la estrategia del “valor de p mínimo” para obtener el punto de corte que proporcionaba la mejor separación entre los grupos de pacientes en relación con su resultado de supervivencia libre de enfermedad. Los valores de punto de corte para las densidades de células CD3,
35 CD8, CD45RO, GZMB fueron 370, 80, 80, 30 células/ mm^2 en el centro del tumor y 640, 300, 190 y 60 células/ mm^2 en el margen invasivo, respectivamente. Dado que los valores de P obtenidos de este modo podrían presentar una sobrealvaloración severa, los valores de P de rango logarítmico de DFS se corrigieron utilizando la fórmula propuesta por Altman et al. (D.G. Altman et al., 1994, *J. Natl Cancer Inst*, Vol. 86: 829). De forma adicional, los valores de P de rango logarítmico de la DFS y OS se calcularon utilizando una validación cruzada 2 veces posterior (D. Faraggi et al.,
40 1996, *Stat Med*, Vol. 15: 2203). Se realizaron 100 repeticiones (con y sin estratificar las variables de agrupamiento). Los valores de p medios se resumen en las Tablas 13-14 (S4-S5) y 16-17 (S7-S8).

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

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

B. Resultados

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

1.1 Invasión metastásica temprana y resultado clínico

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

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

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

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

Se evaluaron tumores colorrectales ($n=377$) de histopatológicamente para un infiltrado de células inmunes dentro del tumor y en el margen invasivo.

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

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

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

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

Ejemplo 2: Fenotipos de células inmunes infiltrantes en el tumor

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

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

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

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

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

Ejemplo 3: Células T de memoria efectoras y supervivencia

15 Se realizó un análisis inmunohistoquímico sobre micromatrices de tejido preparadas a partir de 415 cánceres colorrectales. La tinción con un anticuerpo anti-CD3 reveló la presencia de células T tanto dentro del tumor como en el margen invasivo del mismo. Se contaron las células CD45RO+ mediante un software de imagen automático. Un estudio de validación mostró una correlación estrecha entre los recuentos de células ópticos y automáticos ($R^2=0,914$, $P<0,001$).

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

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

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

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

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

45 En la serie de 959 cánceres colorrectales de la presente memoria, una embolia detectada mediante un examen patológico meticuloso mostraba una asociación independiente significativa entre el estado VELIPI y la supervivencia total.

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

50 En cambio, había un incremento de ARNm para productos y marcadores de células T efectoras T_H1 (CD8, T-bet, IRF-1, IFN- γ , granulinsina, y granzima-B), y este incremento estaba asociado con una supervivencia prolongada y carencia de signos patológicos de invasión metastásica temprana.

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

para CD45RO en el tumor fue un factor de pronóstico independiente.

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

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

Por el contrario, no se expresaron de forma diferencial ni mediadores proinflamatorios ni moléculas inmunosupresoras. En los tumores con o sin signos tempranos de invasión metastásica, existieron diferencias significativas para 65 combinaciones de marcadores de células T, y el agrupamiento jerárquico mostró que los marcadores de la migración, activación y diferenciación de las células T estaban aumentados en tumores que carecían de estos signos.

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

Por lo tanto, se ha mostrado que los signos de una respuesta inmune dentro de los cánceres colorrectales están asociados con la ausencia de evidencia patológica de invasión metastásica temprana y supervivencia prolongada.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un estudio de validación mostró una correlación estrecha entre los recuentos de células ópticos y automáticos ($R^2 > 0,9$,

$P < 0,001$ para todos los marcadores).

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

Sobre la base de una cuantificación de la señal por ordenador, se creó un medio para ensayar los valores de punto de corte de las densidades de las células teñidas (para todos los marcadores en las dos regiones del tumor) para la discriminación de los pacientes en cuanto a tiempos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total (1.600 ensayos de rango logarítmico). Esto permitió definir los valores de punto de corte óptimos de las densidades de las células inmunes (CD3, CD8, CD45RO, GZMB), y mostrar que había un intervalo grande de valores de punto de corte en las dos regiones del tumor que eran significativos (Figura 5). Según estos valores de punto de corte, se observó que los infiltrados de células inmunes (densidades altas o bajas para CD3, CD8, CD45RO, GZMB) en cada región del tumor (CT o IM) distinguieron de forma marcada a los pacientes ($n=415$) en grupos con supervivencia libre de enfermedad (DFS) mediana diferente (Fig. 5). Los ensayos de rango logarítmico fueron altamente significativos para todos los marcadores estudiados en las dos regiones del tumor para la DFS (valores de P que variaban de $1,5 \times 10^{-4}$ a $1,4 \times 10^{-8}$) (Fig. 5 y Tabla 5) y para la OS (Tabla 6).

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

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

La estadificación convencional del cáncer colorrectal no tiene en cuenta la marcada variabilidad de los resultados que existe dentro de cada estadio. Dado que la naturaleza y la amplitud de la respuesta inmune *in situ* mantenía un valor de pronóstico independiente fuerte, investigamos si la evaluación de esta respuesta inmune coordinada podría predecir aún mejor los resultados de los pacientes en cada estadio. Estratificamos a los pacientes según la clasificación de Dukes (Fig. 8a) y mostraron una influencia de CD3_{CT}/CD3_{IM} en todos los estadios de la enfermedad (Fig. 8b).

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

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

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

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

Sea cual sea el papel de la inmunovigilancia y formación, los presentes datos demuestran claramente el concepto de

que una vez los carcinomas colorrectales humanos se vuelven detectables clínicamente, la inmunidad antitumoral natural *in situ* desempeña un papel principal en el control de la recurrencia del tumor después de la escisión quirúrgica.

5 Las respuestas inmunes adaptativas beneficiosas *in situ* no estaban restringidas a pacientes con una invasión del tumor mínima, lo que indica que las fuerzas inmunológicas *in situ* podían persistir junto con la progresión del tumor. La posibilidad no puede excluir que los linfocitos intratumorales modifican el estroma del tumor o las células tumorales, o ambos, de tal forma que atenúan la capacidad metastásica de las células tumorales.

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

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

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

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

20 Se muestra que el tiempo hasta la recurrencia y el tiempo de supervivencia total están gobernados más por el estado de la respuesta inmune adaptativa local que por la presencia de la diseminación del tumor a través de la pared intestinal y hacia el ganglio o ganglios linfáticos regionales.

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

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

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

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

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

corte en la mediana de los conjuntos de datos (Tablas 14, 15 - S5, S6), proporcionó resultados concordantes en cuanto al valor de pronóstico de cada parámetro inmune.

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

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

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

También de forma adicional, tal y como se ilustra en la Figura 13, se ha probado que el método de pronóstico *in vitro* según la invención es altamente fiable para el pronóstico del resultado de cánceres en pacientes que padecen cánceres en un estadio temprano.

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

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

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

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

La nueva herramienta inmunológica proporcionada por la presente invención puede dar lugar a la revisión de los indicadores actuales del resultado clínico y puede ayudar a identificar a los pacientes con riesgo alto que son los que más se podrían beneficiar de la terapia adyuvante.

Tabla 1: Supervivencia sin Enfermedad y Total (n=959 pacientes)									
	Supervivencia sin Enfermedad (DFS)				Supervivencia Total (OS)				
	N. de pacientes	Tasa a 5 años %	Meses mediana	Valor P *	Tasa a 5 años %	Meses mediana	Valor P *		
Estadio T				<0.001	s			<0.001	s
pT1s	39	48.7	55.7			48.7	55.7		
pT1	54	42.6	52.2			44.4	53.8		
pT2	156	40.4	43.6			44.2	49.1		
pT3	502	23.7	16.5			26.7	25.8		
pT4	208	16.8	1.6			17.8	16.8		
Estadio N				<0.001	s			<0.001	s
N0	568	35.4	34.6			38.6	43.1		
N+	384	15.1	4.3			16.7	16.9		
Estadio M				<0.001	s			<0.001	s
M0	747	34.5	32.6			37.6	41.1		
M+	212	0.5	0.1			0.6	12.3		
Clasificación de Dukes				<0.001	s			<0.001	s
A	83	47.0	55.6			47.0	55.6		
B	438	37.2	39.2			41.1	46.8		
C	227	24.7	18.5			27.3	28.1		
D	212	0.5	0.1			1.0	12.1		
Sexo				0.38	ns			0.47	ns
Masculino	484	25.9	16.4			28.5	29.4		
Femenino	465	28.2	18.3			30.6	27.3		
Localización				0.20	ns			0.14	ns
RC	243	23.9	14.5			24.7	19.7		
TC	51	7.8	9.2			9.8	22.2		
LC	84	28.6	15.3			31.0	27.2		
SC	298	26.8	14.7			29.5	29.5		
R	287	32.4	32.1			36.5	40.4		
Diferenciación				0.26	ns			0.09	ns
Buena	737	30.7	21.7			33.6	33.2		
Moderada	187	14.4	9.3			15.5	17.8		
Baja	35	17.1	2.6			17.1	11.6		
Coloide Mucinoso				0.087	ns			0.270	ns
No	766	28.2	19.5			30.9	30.9		
Sí	193	22.3	14.9			23.8	21.8		
N. de ganglios linfáticos analizado				0.11	ns			0.69	ns
<8	426	34.0	31.0			37.1	40.0		
≥8	533	21.4	12.9			23.5	23.2		
VE				<0.001	s			<0.001	s
No	797	31.0	23.6			33.9	34.1		
Sí	162	7.4	1.4			8.0	13.9		
LI				<0.001	s			<0.001	s
No	803	29.5	21.6			32.1	32.0		
Sí	156	14.1	0.5			16.0	16.1		
PI				<0.001	s			<0.001	s
No	860	29.3	20.7			32.0	32.0		
Sí	99	7.1	0.1			8.1	16.2		
VELIPI (VE o LI o PI)				<0.001	s			<0.001	s
No	702	32.4	26.9			35.5	35.5		
Sí	257	12.1	3.3			13.2	16.8		
VE o LI				<0.001	s			<0.001	s
No	716	31.6	24.4			35.2	35.0		
Sí	243	13.6	3.7			12.8	16.3		
VE y LI				<0.001	s			<0.001	s
No	884	28.3	19.7			31.2	31.0		
Sí	75	12.0	0.2			9.3	11.8		
VE y LI y PI				<0.001	s			<0.001	s
No	911	28.0	19.5			30.7	30.5		
Sí	48	8.3	0.1			6.3	9.5		

RC: colon derecho, TC: colon transverso, LC: colon izquierdo, SC: colon sigmoide, R: recto
 VE: embolia vascular, LI: invasión linfática, PI: invasión perineural
 * valor P ensayo de rango logarítmico

Tabla 2: lista de genes

Gen	Nombre	Número de acc.	Loc Crom..
IL10	interleuquina 10	NM_000572	1q31-q32
IL8	interleuquina 8	NM_000584	4q13-q21
IFNG	interferón, gamma	NM_000619	12q14
TGFB1	factor de crecimiento transformante, beta 1	NM_000660	19q13.2
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (Cox2)	NM_000963	1q25.2
CEACAM1	molécula de adhesión celular 1 relacionada con el antígeno carcinoembrionario	NM_001712	19q13.2
IRF1	factor 1 regulador de interferón	NM_002198	5q31.1
MMP7	metaloproteinasas de matriz 7 (matrilisina, uterina)	NM_002423	11q21-q22
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular	NM_003376	6p12
GZMB	granzima B	NM_004131	14q11.2
TBX21	caja T 21 (T-bet)	NM_013351	17q21.2
B7H3	homólogo 3 de B7	NM_025240	15q23-q24
CD8A	antígeno CD8, polipéptido alfa (p32)	NM_001768	2p12
GNLY	Granulisina	NM_006433	2p12-q11
BIRC5	repetición de IAP baculoviral que contiene 5 (survivina)	NM_001168	17q25
		NM_198053	
CD3Z	antígeno CD3Z, polipéptido zeta (complejo TiT3)	NM_000734	1q22-q23
TNFRSF10A	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 10a	NM_003844	8p21
CD4	antígeno CD4 (p55)	NM_000616	12pter-p12

Tabla 3: lista de anticuerpos

Anticuerpo	Nombre común	Clon	Isotipo	Fluorocromo	especie	Fabricante
CCR5	CCR5	45531	IgG2b	FITC	ratón	R&D systems
CCR7	CCR7	3D12	IgG2a	PE	rata	BD pharmingen
CD103	Integrina alfa E	Ber-ATC8	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD119	IFN-gamma-R1	BB1E2	IgG2a	FITC	ratón	serotec
CD120a	TNFR1	H398	IgG2a	PE	ratón	serotec
CD120b	TNFR2	MR2-1	IgG1	PE	ratón	serotec
CD122	IL-2R-beta	MiK-beta1	IgG2a	FITC	ratón	serotec
CD127	IL-7R-alfa	R34.34	IgG1	PE	ratón	beckman coulter
CD134	OX40L-R	ACT35	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD14	CD14	M5E2	IgG2a	APC	ratón	BD pharmingen
CD152	CTLA-4	BNI3	IgG2a	APC	ratón	BD pharmingen
CD154	CD40L	TRAP1	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD178	FasL	NOK1	IgG1	-	ratón	BD pharmingen
CD183	CXCR3	1C6/CXCR3	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD184	CXCR4	12G5	IgG2a	APC	ratón	BD pharmingen
CD19	CD19	HIB19	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD1a	CD1a	HI149	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD210	IL-10R-alfa	3F9	IgG2a	PE	rata	BD pharmingen
CD25	IL-2R-alfa	M-A251	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD26	Dipeptidil-peptidasa IV	M-A261	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD27	CD27	M-T271	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD28	CD28	CD28.2	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD3	CD3ε	UCHT1	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD3	CD3ε	UCHT1	IgG1	CyCr	ratón	BD pharmingen
CD3	CD3ε	S4.1	IgG2a	PE-Cy5	ratón	serotec
CD32	FcγRII	AT10	IgG1	FITC	ratón	serotec
CD4	CD4	RPA-T4	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD4	CD4	RPA-T4	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD44	CD44	G44-26	IgG2b	APC	ratón	BD pharmingen
CD45	CD45	HI30	IgG1	CyCr	ratón	BD pharmingen
CD45Ra	CD45Ra	HI100	IgG2b	FITC	ratón	BD pharmingen
CD45Ro	CD45Ro	UCHTL1	IgG2a	APC	ratón	BD pharmingen
CD47	CD47	B6H12	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD49d	VLA-4	9F10	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD5	CD5	UCHT2	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD54	ICAM-1	HA58	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD56	CD56	B159	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD62L	L-selectina	Dreg56	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD69	CD69	FN50	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD7	CD7	M-T701	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD8	CD8	RPA-T8	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen

ES 2 785 033 T3

Anticuerpo	Nombre común	Clon	Isotipo	Fluorocromo	especie	Fabricante
CD8	CD8	HIT8a	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD80	B7.1	L307.4	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD83	CD83	HB15e	IgG1	PE	ratón	BD pharmingen
CD86	B7.2	FUN-1	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD95	Fas	DX2	IgG1	APC	ratón	BD pharmingen
CD97	CD97	VIM3b	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CD98	CD98	UM7F8	IgG1	FITC	ratón	BD pharmingen
CXCR6	CXCR6	56811	IgG2b	PE	ratón	R&D systems
GITR	GITR	policlonal	IgG	-	cabra	R&D systems
HLA-DR	HLA-DR	G46.6(L243)	IgG2a	FITC	ratón	BD pharmingen
ICOS	ICOS	C394.4A	IgG	PE	ratón	clinisciencias
IFN γ RII	IFN γ RII	policlonal	IgG	-	cabra	R&D systems
IL-18R α	IL-18R α	70625	IgG1	PE	ratón	R&D systems
KIR-NKAT2	KIR-NKAT2	DX27	IgG2a	FITC	ratón	BD pharmingen
PD1	PD1	J116	IgG1	PE	ratón	clinisciencias
Estreptavidina	Estreptavidina	-	-	APC	-	BD pharmingen
TCR $\alpha\beta$	TCR $\alpha\beta$	T10B9.A1-31	IgM	FITC	ratón	BD pharmingen
TGFR II	TGFR II	25508	IgG1	FITC	ratón	R&D systems

Tabla 4: análisis de correlación

Genes	Correlación	IC 95 %	valor P
CD8A - TBX21	0,902	(0,848 / 0,938)	<0,0001
CD3Z - CD8A	0,797	(0,694 / 0,868)	<0,0001
CD3Z - TBX21	0,784	(0,676 / 0,859)	<0,0001
B7H3 - TGFB1	0,760	(0,643 / 0,843)	<0,0001
IFNG - TBX21	0,759	(0,635 / 0,844)	<0,0001
CD4 - CD8A	0,738	(0,612 / 0,828)	<0,0001
CD8A - IFNG	0,728	(0,592 / 0,823)	<0,0001
CD4 - TBX21	0,727	(0,597 / 0,820)	<0,0001
CD3Z - CD4	0,719	(0,586 / 0,815)	<0,0001
CD4 - TGFB1	0,678	(0,531 / 0,786)	<0,0001
CD8A - GNLY	0,671	(0,522 / 0,781)	<0,0001
IFNG - IRF1	0,664	(0,505 / 0,779)	<0,0001
GNLY - IFNG	0,663	(0,505 / 0,779)	<0,0001
IRF1 - TBX21	0,656	(0,502 / 0,770)	<0,0001
IL8 - PTGS2	0,643	(0,485 / 0,761)	<0,0001
GNLY - TBX21	0,627	(0,464 / 0,749)	<0,0001
CD3Z - IRF1	0,617	(0,451 / 0,742)	<0,0001
CD8A - IRF1	0,617	(0,451 / 0,742)	<0,0001
CD3Z - GNLY	0,613	(0,446 / 0,739)	<0,0001
CD3Z - IFNG	0,605	(0,428 / 0,737)	<0,0001
GZMB - IFNG	0,604	(0,422 / 0,739)	<0,0001
GNLY - IRF1	0,597	(0,425 / 0,727)	<0,0001
IL10 - TGFB1	0,596	(0,424 / 0,726)	<0,0001
CD8A - IL10	0,586	(0,411 / 0,719)	<0,0001
CD4 - IL10	0,583	(0,408 / 0,717)	<0,0001
CD8A - GZMB	0,574	(0,392 / 0,713)	<0,0001
GZMB - TBX21	0,548	(0,359 / 0,693)	<0,0001
CD3Z - GZMB	0,538	(0,347 / 0,687)	<0,0001
CD4 - IRF1	0,520	(0,330 / 0,670)	<0,0001
GNLY - GZMB	0,520	(0,324 / 0,673)	<0,0001
B7H3 - IL10	0,517	(0,326 / 0,668)	<0,0001
CD4 - GZMB	0,507	(0,309 / 0,663)	<0,0001
GZMB - IRF1	0,504	(0,305 / 0,661)	<0,0001
IL10 - TBX21	0,494	(0,297 / 0,650)	<0,0001
CD4 - IFNG	0,493	(0,289 / 0,655)	<0,0001
B7H3 - CD4	0,475	(0,275 / 0,636)	<0,0001
CD8A - TGFB1	0,466	(0,264 / 0,628)	<0,0001
CD3Z - IL10	0,459	(0,255 / 0,623)	<0,0001
CD4 - GNLY	0,454	(0,250 / 0,619)	<0,0001
TBX21 - TGFB1	0,433	(0,226 / 0,603)	0,0001
GNLY - IL10	0,413	(0,202 / 0,587)	0,0002
CD3Z - TGFB1	0,398	(0,185 / 0,575)	0,0004
IFNG - IL10	0,390	(0,168 / 0,575)	0,0009
B7H3 - VEGF	0,371	(0,155 / 0,554)	0,0011

Tabla 4: análisis de correlación

Genes	Correlación	IC 95 %	valor P
B7H3 - IL8	0,370	(0,152 / 0,553)	0,0012
CEACAM1 - IRF1	0,359	(0,140 / 0,544)	0,0017
IL10 - IRF1	0,355	(0,136 / 0,541)	0,0019
IRF1 - VEGF	0,351	(0,131 / 0,538)	0,0022
B7H3 - MMP7	0,335	(0,112 / 0,526)	0,0038
B7H3 - PTGS2	0,333	(0,112 / 0,523)	0,0037
IRF1 - TGFB1	0,333	(0,111 / 0,523)	0,0038
IL10 - PTGS2	0,325	(0,103 / 0,517)	0,0047
GZMB - IL10	0,320	(0,092 / 0,517)	0,0066
CD4 - VEGF	0,316	(0,093 / 0,509)	0,0062
GZMB - TGFB1	0,306	(0,076 / 0,504)	0,0097
IL8 - MMP7	0,295	(0,068 / 0,493)	0,0116
TBX21 - VEGF	0,294	(0,069 / 0,491)	0,0113
CEACAM1 - VEGF	0,292	(0,066 / 0,489)	0,0119
TGFB1 - VEGF	0,290	(0,065 / 0,488)	0,0124
BIRC5 - IRF1	0,265	(0,037 / 0,466)	0,0234
GNLY - TGFB1	0,257	(0,029 / 0,460)	0,0278
PTGS2 - TGFB1	0,257	(0,028 / 0,459)	0,0281
MMP7 - VEGF	0,251	(0,020 / 0,456)	0,0332
IFNG - TGFB1	0,239	(0,001 / 0,452)	0,0492
IRF1 - TNFRSF10A	0,238	(0,009 / 0,444)	0,042
BIRC5 - PTGS2	0,224	(-0,007 / 0,431)	0,0571
IL8 - TGFB1	0,223	(-0,007 / 0,431)	0,0578
B7H3 - IRF1	0,222	(-0,009 / 0,430)	0,059
MMP7 - TGFB1	0,221	(-0,012 / 0,430)	0,0622
B7H3 - CD8A	0,216	(-0,015 / 0,425)	0,0664
GZMB - VEGF	0,209	(-0,028 / 0,423)	0,0829
CD3Z - VEGF	0,207	(-0,024 / 0,418)	0,0784
IFNG - IL8	0,206	(-0,034 / 0,424)	0,0922
CD3Z - CEACAM1	0,204	(-0,027 / 0,415)	0,0836
CD8A - VEGF	0,203	(-0,028 / 0,414)	0,0846
IL10 - IL8	0,196	(-0,036 / 0,408)	0,0967
BIRC5 - IFNG	0,195	(-0,045 / 0,414)	0,111
GZMB - IL8	0,194	(-0,043 / 0,410)	0,1087
B7H3 - TBX21	0,191	(-0,041 / 0,403)	0,1056
B7H3 - CD3Z	0,188	(-0,044 / 0,401)	0,1109
CD4 - MMP7	0,181	(-0,052 / 0,397)	0,1274
CEACAM1 - TBX21	0,174	(-0,059 / 0,388)	0,1416
GNLY - PTGS2	0,173	(-0,059 / 0,388)	0,1435
MMP7 - PTGS2	0,162	(-0,073 / 0,379)	0,1748
BIRC5 - GZMB	0,161	(-0,077 / 0,381)	0,1842
B7H3 - GZMB	0,160	(-0,078 / 0,381)	0,1862
CD4 - TNFRSF10A	0,160	(-0,072 / 0,377)	0,176
IFNG - TNFRSF10A	0,156	(-0,086 / 0,380)	0,2048

Tabla 4: análisis de correlación

Genes	Correlación	IC 95 %	valor P
GNLY - TNFRSF10A	0,153	(-0,079 / 0,370)	0,1957
TBX21 - TNFRSF10A	0,147	(-0,086 / 0,365)	0,2157
BIRC5 - IL8	0,145	(-0,088 / 0,363)	0,2225
TNFRSF10A - VEGF	0,136	(-0,097 / 0,355)	0,2518
B7H3 - TNFRSF10A	0,135	(-0,098 / 0,355)	0,2541
CD8A - TNFRSF10A	0,134	(-0,099 / 0,354)	0,2577
GZMB - PTGS2	0,134	(-0,104 / 0,358)	0,2702
CEACAM1 - TNFRSF10A	0,133	(-0,100 / 0,352)	0,2641
B7H3 - IFNG	0,126	(-0,116 / 0,353)	0,3088
IFNG - VEGF	0,123	(-0,119 / 0,351)	0,3177
CD3Z - TNFRSF10A	0,117	(-0,117 / 0,338)	0,3269
BIRC5 - CEACAM1	0,109	(-0,124 / 0,331)	0,3597
GNLY - IL8	0,106	(-0,128 / 0,328)	0,3754
IFNG - PTGS2	0,106	(-0,136 / 0,336)	0,3903
GZMB - TNFRSF10A	0,104	(-0,135 / 0,331)	0,3942
CEACAM1 - IFNG	0,093	(-0,148 / 0,325)	0,4506
B7H3 - GNLY	0,090	(-0,143 / 0,313)	0,4514
BIRC5 - GNLY	0,088	(-0,145 / 0,311)	0,4628
CEACAM1 - GZMB	0,087	(-0,151 / 0,316)	0,4736
CEACAM1 - GNLY	0,082	(-0,151 / 0,306)	0,4911
IL10 - MMP7	0,081	(-0,153 / 0,307)	0,499
IL8 - VEGF	0,078	(-0,155 / 0,303)	0,5132
BIRC5 - MMP7	0,077	(-0,157 / 0,304)	0,5192
CD8A - CEACAM1	0,076	(-0,157 / 0,801)	0,5232
TGFB1 - TNFRSF10A	0,071	(-0,162 / 0,296)	0,5538
BIRC5 - VEGF	0,065	(-0,168 / 0,291)	0,5855
IRF1 - PTGS2	0,064	(-0,169 / 0,289)	0,594
IRF1 - MMP7	0,063	(-0,171 / 0,290)	0,6012
PTGS2 - VEGF	0,063	(-0,170 / 0,289)	0,5995
CEACAM1 - MMP7	0,035	(-0,199 / 0,264)	0,7742
IL10 - TNFRSF10A	0,032	(-0,199 / 0,261)	0,786
IL8 - IRF1	0,021	(-0,211 / 0,249)	0,8633
CD4 - CEACAM1	0,014	(-0,217 / 0,243)	0,9088
BIRC5 - TBX21	0,013	(-0,218 / 0,242)	0,9124
IFNG - MMP7	0,009	(-0,231 / 0,249)	0,9402
CD3Z - MMP7	0,005	(-0,227 / 0,236)	0,968
CEACAM1 - PTGS2	-0,001	(-0,231 / 0,229)	0,9923
IL10 - VEGF	-0,004	(-0,234 / 0,226)	0,9721
CD8A - PTGS2	-0,008	(-0,238 / 0,222)	0,9448
GZMB - MMP7	-0,008	(-0,244 / 0,229)	0,947
IL8 - TNFRSF10A	-0,017	(-0,246 / 0,214)	0,8892
GNLY - VEGF	-0,023	(-0,252 / 0,208)	0,8484
PTGS2 - TBX21	-0,036	(-0,264 / 0,196)	0,7631
MMP7 - TBX21	-0,049	(-0,277 / 0,185)	0,6844

Tabla 4: análisis de correlación

Genes	Correlación	IC 95 %	valor P
BIRC5 - CD8A	-0,051	(-0,278 / 0,181)	0,6675
CD3Z - PTGS2	-0,051	(-0,278 / 0,181)	0,6683
BIRC5 - CD3Z	-0,054	(-0,280 / 0,179)	0,6528
B7H3 - CEACAM1	-0,063	(-0,289 / 0,169)	0,5972
PTGS2 - TNFRSF10A	-0,066	(-0,292 / 0,166)	0,5782
CD8A - MMP7	-0,086	(-0,311 / 0,149)	0,4739
B7H3 - BIRC5	-0,095	(-0,318 / 0,138)	0,4236
CD4 - IL8	-0,101	(-0,323 / 0,133)	0,3987
CEACAM1 - IL8	-0,101	(-0,323 / 0,132)	0,3979
CD4 - PTGS2	-0,111	(-0,333 / 0,122)	0,3494
CEACAM1 - IL10	-0,111	(-0,333 / 0,122)	0,3495
IL8 - TBX21	-0,131	(-0,350 / 0,102)	0,2714
BIRC5 - IL10	-0,134	(-0,353 / 0,099)	0,2583
CD8A - IL8	-0,163	(-0,378 / 0,070)	0,1701
MMP7 - TNFRSF10A	-0,217	(-0,427 / 0,015)	0,0668
BIRC5 - TGFB1	-0,218	(-0,426 / 0,013)	0,0643
BIRC5 - CD4	-0,231	(-0,438 / -0,001)	0,0489
CEACAM1 - TGFB1	-0,239	(-0,445 / -0,010)	0,0413
GNLY - MMP7	-0,241	(-0,448 / -0,010)	0,0408
BIRC5 - TNFRSF10A	-0,243	(-0,448 / -0,014)	0,0378
CD3Z - IL8	-0,258	(-0,461 / -0,030)	0,0272

Tabla 5	Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS)					<i>Valor P</i>
	N. de pacientes	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %	Meses mediana	
GZM-CT						1,66 E-06
Hi	163	57,66	46,62	41,71	36,5	
Lo	191	35,93	26,04	21,87	12,4	
GZM-IM						9,42 E-07
Hi	175	56,00	44,57	38,28	36,6	
Lo	129	38,76	31,00	26,36	12,9	
CD45RO-CT						1,43 E-08
Hi	294	51,70	40,81	36,05	27,4	
Lo	67	20,58	11,76	8,82	2,4	
CD45RO-IM						2,16 E-06
Hi	190	56,31	46,84	42,10	42,0	
Lo	178	35,19	24,58	20,11	12,4	
CD8-CT						3,68 E-08
Hi	227	54,18	43,17	38,32	31,1	
Lo	132	27,81	20,30	16,54	5,9	
CD8-IM						1,53 E-04
Hi	129	60,93	50,78	45,31	49,2	
Lo	185	40,64	29,41	24,59	16,6	
CD3-CT						3,90 E-08
Hi	192	60,41	48,95	43,75	45,9	
Lo	165	28,91	19,87	16,26	5,9	
CD3-IM						3,37 E-08
Hi	178	59,77	49,72	44,69	47,8	
Lo	175	35,42	24,57	20,00	12,9	
GZM-CT/IM						3,67 E-07
HiHi	95	62,74	51,96	46,07	51,4	
LoLo	80	39,43	29,57	25,35	12,9	
CD45RO-CT/IM						4,57 E-10
HiHi	151	60,26	52,31	47,68	51,6	
LoLo	41	16,66	11,90	9,52	1,8	
CD8-CT/IM						4,61 E-08
HiHi	96	65,62	55,20	50,00	59,2	
LoLo	93	30,85	21,27	17,02	5,9	
CD3-CT/IM						5,20 E-11
HiHi	109	69,72	61,46	55,04	66,2	
LoLo	93	27,95	19,35	13,97	5,9	

Tabla 5

Tabla 6	Supervivencia total (OS)					Valor P
	N. de pacientes	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %	Meses mediana	
GZM-CT						8,18 E-07
Hi	163	62,58	50,31	43,56	50,2	
Lo	191	48,17	32,46	25,13	21,2	
GZM-IM						1,27 E-02
Hi	175	61,14	48,57	39,43	45,3	
Lo	129	55,04	37,21	29,46	29,1	
CD45RO-CT						3,14 E-09
Hi	294	57,82	45,92	38,78	34,9	
Lo	67	37,31	16,42	11,94	16,4	
CD45RO-IM						7,68 E-04
Hi	190	62,63	50,53	44,21	49,2	
Lo	178	46,63	30,90	23,03	19,8	
CD8-CT						2,66 E-07
Hi	227	59,47	48,02	40,53	42,5	
Lo	132	43,94	25,76	19,70	18,7	
CD8-IM						1,22 E-03
Hi	129	65,63	53,91	46,88	54,8	
Lo	185	54,84	37,10	28,50	29,6	
CD3-CT						7,86 E-08
Hi	192	65,63	55,21	47,40	57,8	
Lo	165	42,42	24,24	18,18	18,6	
CD3-IM						9,08 E-05
Hi	178	64,04	52,25	46,07	52,6	
Lo	175	48,57	32,57	24,00	21,4	
GZM-CT/IM						1,50 E-03
HiHi	95	68,42	55,79	47,37	58,3	
LoLo	80	58,75	37,50	28,75	32,0	
CD45RO-CT/IM						4,12 E-07
HiHi	151	64,24	54,97	49,67	59,6	
LoLo	41	39,02	14,63	12,20	17,7	
CD8-CT/IM						1,21 E-06
HiHi	96	69,79	59,38	52,08	61,2	
LoLo	93	49,46	29,03	21,51	22,3	
CD3-CT/IM						5,07 E-08
HiHi	109	72,48	64,22	55,96	63,9	
LoLo	93	45,16	25,81	16,13	19,3	

Tabla 6

Tabla 7: análisis de riesgo proporcional multifactorial para DFS

Variable*	Relación de riesgo	IC 95%	P
Estadio T	1,780	(1,348-2,362)	5,2 E-05
Estadio N	2,130	(1,481-3,060)	4,5 E-05
Diferenciación	1,110	(0,777-1,584)	5,7 E-01
Patrones CD3 _{CT} /CD3 _{IM}	0,570	(0,450-0,721)	2,8 E-06

Variable*	Relación de riesgo	IC 95%	P
Estadio T	1,700	(1,275-2,268)	3,1 E-04
Estadio N	2,117	(1,449-3,093)	1,1 E-04
Diferenciación	0,969	(0,676-1,389)	8,6 E-01
Patrones CD8 _{CT} /CD8 _{IM}	0,614	(0,480-0,786)	1,1 E-04

Variable*	Relación de riesgo	IC 95%	P
Estadio T	1,880	(1,441-2,452)	3,3 E-06
Estadio N	2,298	(1,599-3,301)	6,8 E-06
Diferenciación	1,035	(0,736-1,457)	8,4 E-01
Patrones CD45RO _{CT} /CD45RO _{IM}	0,564	(0,439-0,723)	6,2 E-06

Variable*	Relación de riesgo	95% CI	P
Estadio T	1,777	(1,334-2,37)	8,5 E-05
Estadio N	2,449	(1,651- 3,63)	8,3 E-06
Diferenciación	1,049	(0,707-1,56)	8,1 E-01
Patrones GZMB _{CT} /GZMB _{IM}	0,591	(0,459-0,76)	4,3 E-05

*M estratificado

Variable	Relación de riesgo	95% CI	P
Estadio T	1,335	(1,052-1,693)	1,7 E-02
Estadio N	1,657	(2,989-6,595)	3,6 E-03
Estadio M	4,440	(1,179-2,328)	1,5 E-13
Diferenciación	1,058	(0,748-1,496)	7,5 E-01
Patrones CD3 _{CT} /CD3 _{IM}	0,726	(0,587-0,897)	3,0 E-03

Variable	Relación de riesgo	95% CI	P
Estadio T	1,376	(1,070-1,769)	1,3 E-02
Estadio N	1,575	(1,100-2,254)	1,3 E-02
Estadio M	4,467	(2,966-6,729)	8,0 E-13
Diferenciación	0,966	(0,679-1,375)	8,5 E-01
Patrones CD8 _{CT} /CD8 _{IM}	0,712	(0,571-0,888)	2,5 E-03

Tabla 7: análisis de riesgo proporcional multifactorial para DFS

Variable	Razón de riesgo	95% CI	P
Estadio T	1,396	(1,114-1,750)	3,7 E-03
Estadio N	1,684	(1,204-2,355)	2,3 E-03
Estadio M	4,160	(2,805-6,170)	1,4 E-12
Diferenciación	0,935	(0,677-1,292)	6,9 E-01
Patrones CD45RO _{CT} /CD45RO _{IM}	0,703	(0,558-0,885)	2,8 E-03

Variable	Razón de riesgo	95% CI	P
Estadio T	1,360	(1,071-1,73)	1,2 E-02
Estadio N	1,710	(1,188-2,46)	3,9 E-03
Estadio M	4,392	(2,866-6,73)	1,1 E-11
Diferenciación	1,094	(0,752-1,59)	6,4 E-01
Patrones GZMB _{CT} /GZMB _{IM}	0,905	(0,722-1,14)	3,9 E-01

Tabla 8

Combinaciones de Genes	Estado1	Estado2	Porcentaje de Recidivas	Nr, No Recidivas	Nr, Recidivas	Valor pRango logaritmico	LOLO frente a Combinación	HiHi frente a Combinación
IRF1 GNLY	1	1	25	27	9	0,00000637	1,26E-04	1
IRF1 GNLY	0	0	71,42857143	10	25	0,00000637	1	1,26E-04
PDCD1LG1 GNLY	1	1	32,43243243	25	12	0,00001957	3,89E-04	1
PDCD1LG1 GNLY	0	0	75	9	27	0,00001957	1	3,89E-04
PDCD1LG2 IRF1	1	1	25,71428571	26	9	0,00003780	2,71E-04	1
PDCD1LG2 IRF1	0	0	70,58823529	10	24	0,00003780	1	2,71E-04
PDCD1LG1 IRF1	1	1	30,23255814	30	13	0,00003942	4,85E-04	1
PDCD1LG1 IRF1	0	0	69,04761905	13	29	0,00003942	1	4,85E-04
PDCD1LG1 GNLY	0	1	40	9	6	0,00005604	0,02553386	0,74929474
PDCD1LG1 GNLY	1	0	40	9	6	0,00005604	0,02553386	0,74929474
IRF1 IL8	1	1	26,66666667	22	8	0,00008324	6,56E-04	1
IRF1 IL8	0	0	72,4137931	8	21	0,00008324	1	6,56E-04
ICOS GNLY	0	1	33,33333333	12	6	0,00009669	0,00648539	1
ICOS GNLY	1	0	47,36842105	10	9	0,00009669	0,069525	0,55885623
ICOS GNLY	1	1	35,29411765	22	12	0,00009903	0,00148605	1
ICOS GNLY	0	0	75	8	24	0,00009903	1	0,00148605
TNFRSF6B IRF1	1	1	27,27272727	24	9	0,00010448	4,71E-04	1
TNFRSF6B IRF1	0	0	71,875	9	23	0,00010448	1	4,71E-04
PDCD1LG2 GNLY	1	1	28,57142857	25	10	0,00010559	7,00E-04	1
PDCD1LG2 GNLY	0	0	70,58823529	10	24	0,00010559	1	7,00E-04
IRTA2 GNLY	1	1	26,92307692	19	7	0,00010819	7,02E-04	1
IRTA2 GNLY	0	0	76	6	19	0,00010819	1	7,02E-04
IRF1 GNLY	1	0	50	8	8	0,00013118	0,20696761	0,11061678

TABLA 8 (Continuación 1)

Combinaciones de Genes	Estado1	Estado2	Porcentaje de Recidivas	Nr, No Recidivas	Nr, Recidivas	Valor pRango logarítmico	LOLO frente a Combinación	HiHi frente a Combinación
IRF1 GNLY	0	1	56,25	7	9	0,00013118	0,34514115	0,05584765
STAT1 PDCD1LG1	1	1	31,03448276	20	9	0,00015364	0,00411737	1
STAT1 PDCD1LG1	0	0	70	9	21	0,00015364	1	0,00411737
STAT1 IRF1	1	1	25	21	7	0,00017203	0,00136119	1
STAT1 IRF1	0	0	68,96551724	9	20	0,00017203	1	0,00136119
GATA3 CD8A	0	1	69,23076923	4	9	0,00018062	0,3355095	0,02232563
GATA3 CD8A	1	0	84,61538462	2	11	0,00018062	0,04841363	0,00103488
GNLY CXCL9	1	1	31,42857143	24	11	0,00018108	0,00167576	1
GNLY CXCL9	0	0	70,58823529	10	24	0,00018108	1	0,00167576
TBX21 GNLY	1	1	30,3030303	23	10	0,00021196	4,58E-04	1
TBX21 GNLY	0	0	75	8	24	0,00021196	1	4,58E-04
TNFRSF6B PDCD1LG1	1	1	31,25	22	10	0,00021333	9,67E-04	1
TNFRSF6B PDCD1LG1	0	0	74,19354839	8	23	0,00021333	1	9,67E-04
IRF1 ICOS	1	1	27,77777778	26	10	0,00021448	0,00164508	1
IRF1 ICOS	0	0	67,64705882	11	23	0,00021448	1	0,00164508
IL8 CD4	1	0	33,33333333	18	9	0,00021968	3,65E-04	0,39718035
IL8 CD4	0	1	37,93103448	18	11	0,00021968	5,91E-04	0,58270625
TBX21 IRF1	1	1	25	27	9	0,00022445	3,28E-04	1
TBX21 IRF1	0	0	68,57142857	11	24	0,00022445	1	3,28E-04
PDCD1LG2 IRF1	0	1	47,05882353	9	8	0,00022793	0,13051259	0,20662362
PDCD1LG2 IRF1	1	0	58,82352941	7	10	0,00022793	0,53057151	0,03154075

TABLA 8 (Continuación 2)

Combinaciones de Genes	Estado1	Estado2	Porcentaje de Recidivas	Nr, No Recidivas	Nr, Recidivas	Valor pRango logarítmico	LOLO frente a Combinación	HiHi frente a Combinación
GPLY CD4	1	0	22,22222222	14	4	0,00023630	2,62E-04	0,22728471
GPLY CD4	0	1	45	11	9	0,00023630	0,03419617	1
MMP7 IRF1	1	1	25	21	7	0,00025303	4,06E-04	1
MMP7 IRF1	0	0	74,07407407	7	20	0,00025303	1	4,06E-04
TNF PDCD1LG1	0	1	29,41176471	12	5	0,00027386	0,00205134	0,75798695
TNF PDCD1LG1	1	0	41,17647059	10	7	0,00027386	0,02760881	1
TNFRSF6B GPLY	1	1	30,3030303	23	10	0,00027678	0,00119011	1
TNFRSF6B GPLY	0	0	71,875	9	23	0,00027678	1	0,00119011
TGFB1 IRF1	1	1	29,03225806	22	9	0,00028329	8,07E-04	1
TGFB1 IRF1	0	0	73,33333333	8	22	0,00028329	1	8,07E-04
PDCD1LG2 PDCD1LG1	1	1	31,70731707	28	13	0,00031033	0,00180905	1
PDCD1LG2 PDCD1LG1	0	0	67,5	13	27	0,00031033	1	0,00180905
TGFB1 IRF1	0	1	38,0952381	13	8	0,00031619	0,02015558	0,5556315
TGFB1 IRF1	1	0	57,14285714	9	12	0,00031619	0,24654453	0,05090421
TBX21 PDCD1LG1	1	1	27,77777778	26	10	0,00033814	8,35E-04	1
TBX21 PDCD1LG1	0	0	68,57142857	11	24	0,00033814	1	8,35E-04
TNF GPLY	1	1	34,48275862	19	10	0,00033997	4,10E-04	1
TNF GPLY	0	0	82,14285714	5	23	0,00033997	1	4,10E-04
PDCD1LG1 IRF1	0	1	44,44444444	5	4	0,00035285	0,24937129	0,45141556
PDCD1LG1 IRF1	1	0	55,55555556	4	5	0,00035285	0,45891075	0,24655356

TABLA 8 (Continuación 3)

Combinaciones de Genes	Estado1	Estado2	Porcentaje de Recidivas	Nr, No Recidivas	Nr, Recidivas	Valor pRango logaritmico	LOLO frente a Combinación	HiHi frente a Combinación
IRF1 CXCL9	1	1	30	28	12	0,00036339	0,00157043	1
IRF1 CXCL9	0	0	66,66666667	13	26	0,00036339	1	0,00157043
TBX21 GNLY	0	1	42,10526316	11	8	0,00037639	0,03467136	0,54586516
TBX21 GNLY	1	0	47,36842105	10	9	0,00037639	0,069525	0,24596116
PTGS2 IRF1	1	1	30,76923077	18	8	0,00038160	0,00500586	1
PTGS2 IRF1	0	0	72	7	18	0,00038160	1	0,00500586
IRF1 ART1	1	0	20	8	2	0,00038775	0,01498501	0,6043956
IRF1 ART1	0	1	66,66666667	3	6	0,00038775	0,4965035	0,31468531
INDO GNLY	1	1	35,29411765	22	12	0,00039262	0,00707271	1
INDO GNLY	0	0	69,6969697	10	23	0,00039262	1	0,00707271
PDCD1LG1 ICOS	1	1	31,57894737	26	12	0,00039662	0,00489333	1
PDCD1LG1 ICOS	0	0	66,66666667	12	24	0,00039662	1	0,00489333
PDCD1LG2 GNLY	0	1	47,05882353	9	8	0,00039685	0,13051259	0,22435124
PDCD1LG2 GNLY	1	0	52,94117647	8	9	0,00039685	0,23279471	0,12613911
TNFRSF6B TBX21	1	1	24	19	6	0,00041496	5,44E-04	1
TNFRSF6B TBX21	0	0	75	6	18	0,00041496	1	5,44E-04
PDCD1 IRF1	1	1	25,64102564	29	10	0,00043410	5,64E-04	1
PDCD1 IRF1	0	0	65,78947368	13	25	0,00043410	1	5,64E-04
IRF1 IFNG	1	1	27,02702703	27	10	0,00043964	7,09E-04	1
IRF1 IFNG	0	0	68,75	10	22	0,00043964	1	7,09E-04
TNF GNLY	0	1	34,7826087	15	8	0,00044402	0,00122608	1
TNF GNLY	1	0	43,47826087	13	10	0,00044402	0,00736128	0,57364958

TABLA 8 (Continuación 4)

Combinaciones de Genes	Estado1	Estado2	Porcentaje de Recidivas	Nr. No Recidivas	Nr. Recidivas	Valor pRango logarítmico	LOLO frente a Combinación	HiHi frente a Combinación
IL8 GNLY	1	1	31,03448276	20	9	0,00046499	0,00136119	1
IL8 GNLY	0	0	75	7	21	0,00046499	1	0,00136119
TNFRSF6B IFNG	1	1	25	21	7	0,00046651	9,10E-04	1
TNFRSF6B IFNG	0	0	72	7	18	0,00046651	1	9,10E-04
PDCD1LG1 PDCD1	1	1	27,02702703	27	10	0,00047832	9,77E-04	1
PDCD1LG1 PDCD1	0	0	66,66666667	12	24	0,00047832	1	9,77E-04
IRTA2 GNLY	0	1	42,30769231	15	11	0,00048486	0,0227009	0,3822739
IRTA2 GNLY	1	0	56	11	14	0,00048486	0,23209547	0,04831826
PDCD1LG1 CXCL9	1	1	34,14634146	27	14	0,00050191	0,0038056	1
PDCD1LG1 CXCL9	0	0	67,5	13	27	0,00050191	1	0,0038056
IL8 ICOS	1	1	39,28571429	17	11	0,00050590	0,00668911	1
IL8 ICOS	0	0	76,92307692	6	20	0,00050590	1	0,00668911
TNF IRF1	1	1	31,42857143	24	11	0,00054072	6,84E-04	1
TNF IRF1	0	0	73,52941176	9	25	0,00054072	1	6,84E-04
IL8 ICOS	0	1	40	15	10	0,00055140	0,01074613	1
IL8 ICOS	1	0	41,66666667	14	10	0,00055140	0,01996838	1
IRF1 IL8	1	0	40,90909091	13	9	0,00057567	0,04324338	0,37231571
IRF1 IL8	0	1	59,09090909	9	13	0,00057567	0,37716737	0,02446738
PDCD1 GNLY	1	1	31,42857143	24	11	0,00058024	6,84E-04	1
PDCD1 GNLY	0	0	73,52941176	9	25	0,00058024	1	6,84E-04
TNFRSF6B CXCL9	1	1	32,14285714	19	9	0,00063900	0,00694187	1

TABLA 8 (Continuación 5)

Combinaciones de Genes	Estado1	Estado2	Porcentaje de Recidivas	Nr. No Recidivas	Nr. Recidivas	Valor pRango logarítmico	LOLO frente a Combinación	HiHi frente a Combinación
TNFRSF6B CXCL9	0	0	71,42857143	8	20	0,00063900	1	0,00694187
GNLY CXCL10	1	1	34,28571429	23	12	0,00064897	0,00374119	1
GNLY CXCL10	0	0	70,58823529	10	24	0,00064897	1	0,00374119
SELL GNLY	1	1	32,14285714	19	9	0,00065255	0,00105233	1
SELL GNLY	0	0	77,77777778	6	21	0,00065255	1	0,00105233
SELL IRF1	1	1	26,66666667	22	8	0,00065555	6,56E-04	1
SELL IRF1	0	0	72,4137931	8	21	0,00065555	1	6,56E-04
MMP7 GNLY	1	1	31,03448276	20	9	0,00067878	0,00136119	1
MMP7 GNLY	0	0	75	7	21	0,00067878	1	0,00136119
PDCD1LG1 EBAG9	1	1	37,93103448	18	11	0,00067896	0,03430795	1
PDCD1LG1 EBAG9	0	0	68,96551724	9	20	0,00067896	1	0,03430795
TGFBI GNLY	1	1	29,03225806	22	9	0,00071504	0,00204606	1
TGFBI GNLY	0	0	70	9	21	0,00071504	1	0,00204606
IL18R1 GNLY	1	1	36,36363636	21	12	0,00075372	0,01304077	1
IL18R1 GNLY	0	0	68,75	10	22	0,00075372	1	0,01304077
IFNG GNLY	1	1	28,57142857	25	10	0,00075584	0,00119534	1
IFNG GNLY	0	0	70	9	21	0,00075584	1	0,00119534
TNFRSF6B PDCD1LG2	1	1	26,66666667	22	8	0,00076477	0,00169422	1
TNFRSF6B PDCD1LG2	0	0	68,96551724	9	20	0,00076477	1	0,00169422
TNFRSF6B PDCD1	1	1	29,62962963	19	8	0,00081540	8,73E-04	1

TABLA 8 (Continuación 6)

Combinaciones de Genes	Estado1	Estado2	Porcentaje de Recidivas	Nr, No Recidivas	Nr, Recidivas	Valor pRango logarítmico	LOLO frente a Combinación	HiHi frente a Combinación
TNFRSF6B PDCC1	0	0	76,92307692	6	20	0,00081540	1	8,73E-04
INDO GNLY	0	1	33,33333333	12	6	0,00081585	0,01830705	1
INDO GNLY	1	0	55,55555556	8	10	0,00081585	0,36715926	0,23851585
TBX21 IL8	1	0	39,28571429	17	11	0,00081677	0,00372377	0,77529553
TBX21 IL8	0	1	46,42857143	15	13	0,00081677	0,00995396	0,40283859
TNFRSF8 IRF1	1	1	25,80645161	23	8	0,00082357	0,00458134	1
TNFRSF8 IRF1	0	0	63,33333333	11	19	0,00082357	1	0,00458134
TNF PDCC1LG1	1	1	37,14285714	22	13	0,00083836	0,00148511	1
TNF PDCC1LG1	0	0	76,47058824	8	26	0,00083836	1	0,00148511
IRF1 EBAG9	1	1	35,71428571	18	10	0,00085969	0,01512429	1
IRF1 EBAG9	0	0	71,42857143	8	20	0,00085969	1	0,01512429
PDCC1LG1 IL18R1	1	1	37,14285714	22	13	0,00087042	0,01603268	1
PDCC1LG1 IL18R1	0	0	67,64705882	11	23	0,00087042	1	0,01603268
IRTA2 IRF1	1	1	33,33333333	22	11	0,00087051	0,00113427	1
IRTA2 IRF1	0	0	75	8	24	0,00087051	1	0,00113427
IRF1 IL18R1	1	1	33,33333333	22	11	0,00087233	0,0063032	1
IRF1 IL18R1	0	0	68,75	10	22	0,00087233	1	0,0063032
LAT IL8	0	1	34,48275862	19	10	0,00091759	0,00148805	0,39963356
LAT IL8	1	0	41,37931034	17	12	0,00091759	0,00461551	0,77997357
SELL GNLY	0	1	37,5	15	9	0,00095410	0,00482852	0,77381721
SELL GNLY	1	0	50	12	12	0,00095410	0,04632871	0,25940735

Tabla 9

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
18s		control endógeno	control endógeno	X03205
ACE	ACE	Tumor	DCP, ACE1, DCP1, CD143, MGC26566	NM_000789
ACTB	Beta Actina	control endógeno	control endógeno	NM_003234
AGTR1	receptor de angiotensina II, tipo 1	angiogénesis	AT1, AG2S, AT1B, AT2R1, HAT1R, AGTR1A, AGTR1B, AT2R1A, AT2R1B	NM_031850. 1, NM_000685. 3
AGTR2	receptor de angiotensina II, tipo 2	angiogénesis	AT2	NM_000686
APC				NM_000038
APOA1	apolipoproteína A-I	Ruta de MHC	presenten células tumorales y modula citotoxicidad, interacción TCRg9d2	NM_000039
ARF1	señalización de p53	supresor tumoral		NM_001658
AXIN1	Axina	Axina		NM_181050 NM_003502
BAX	BAX	Ruta de apoptosis		NM_138763, NM_138765, NM_004324, NM_138761
BCL2	BCL2	Ruta de apoptosis		NM_000633
BCL2L1	BCL-XL	Ruta de apoptosis		NM_001191
CXCR5		ruta de quimioquinas		NM_001716
BMP2	BMP2	Ruta del TGF	Proteína morfogénica ósea 8a	NM_001200
BRCA1				NM_007294 NM_007295 NM_007296 NM_007297 NM_007298 NM_007299 NM_007300 NM_007301 NM_007302 NM_007303 NM_007304 NM_007305 NM_007306
BTLA	BTLA	Inmunidad adaptativa	asociado con linfocitos B y T	NM_181780
C3	C3	C3		NM_000064
CASP3	apoptosis	apoptosis		NM_004346
CASP9		caspasa 9, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis, Gen hCG25367 Anotación Celera		NM_001229.2
CCL1	CCL1	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 1	NM_002981

Tabla 9 (Continuación 1)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
CCL11	Eotaxina	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 11	NM_002986
CCL13	MCP-4	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 13	NM_005408
CCL16	HCC-4	ruta de quimioquinas	Quimioquinas CC y Receptores	NM_004590
CCL17	TARC	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 17	NM_002987
CCL18	PARC	ruta de quimioquinas	Quimioquinas CC y Receptores	NM_002988
CCL19	Mip-3c, MIP-3 beta	ruta de quimioquinas	SCYA19	NM_006274
CCL2	MCP-1	ruta de quimioquinas	SCYA2	NM_002982
CCL20	MIP-3 alfa	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 20	NM_004591
CCL21	6Ckine	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 21	NM_002989
CCL22	ligando de CCR4, MDC, espec de T-reg	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 22	NM_002990
CCL23	MPIF-1	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 23	NM_145898 NM_005064
CCL24	Eotaxin-2	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 24	NM_002991
CCL25	TECK	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 25	NM_148888 NM_005624
CCL26	Eotaxin-3	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 26	NM_006072
CCL27	CTACK	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 27	NM_006664
CCL28	CCL28	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 28	NM_019846 NM_148672
CCL3	Mip-1a	ruta de quimioquinas	SCYA3	NM_002983
CCL5	Rantes	ruta de quimioquinas	SCYA5	NM_002985
CCL7	MCP-3	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 7	NM_006273
CCL8	MCP-2	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-C) 8	NM_005623
CCNB1		ciclo celular		NM_031966
CCND1		ciclo celular		NM_053056
CCNE1		ciclo celular		NM_001238 NM_057182
CCR1		ruta de quimioquinas	Quimioquinas CC y Receptores	NM_001295
CCR10	CCR10	ruta de quimioquinas	receptor de quimioquina (resto C-C) 10	NM_016602
CCR2	CCR2	ruta de quimioquinas		NM_000647

Tabla 9 (Continuación 2)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
CCR3	CCR3	ruta de quimioquinas	receptor de quimioquina (resto C-C) 3	NM_178329 NM_001837
CCR4	CCR4	ruta de quimioquinas	receptor de quimioquina (resto C-C) 4	NM_005508
CCR5	CCR5	ruta de quimioquinas		NM_000579
CCR6	CCR6	ruta de quimioquinas	receptor de quimioquina (resto C-C) 6	NM_031409 NM_004367
CCR7	CCR7	ruta de quimioquinas		NM_001838
CCR8	CCR8	ruta de quimioquinas	receptor de quimioquina (resto C-C) 8	NM_005201
CCR9	CCR9	ruta de quimioquinas	receptor de quimioquina (resto C-C) 9	NM_006641
CCRL2	HCR	ruta de quimioquinas	Quimioquinas CC y Receptores	
CD154	CD154(TNFS F5)	Inmunidad adaptativa		NM_000074
CD19	células B	Inmunidad adaptativa		NM_001770
CD1a	CD1A	Inmunidad adaptativa	antígeno CD1A, un polipéptido	NM_001763
CD2	antígeno CD2 (p50), receptor de glóbulos rojos de oveja	Inmunidad adaptativa		NM_001767

Tabla 9 (Continuación 3)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
CD226	PTA1; DNAM1; DNAM-1; TLISA1 Resumen: CD226 es una glicoproteína de ~65 kDa expresada en la superficie de células NK, plaquetas, monocitos y un subconjunto de células T. Es un miembro de la superfamilia de Ig que contiene 2 dominios semejantes a Ig del conjunto V y está codificada por un gen en el cromosoma humano 18q22.3. CD226 media la adhesión celular a otras células que portan un ligando no identificado y la reticulación de CD226 con anticuerpos causa la activación celular	adhesión, activación		NM_006566
CD244	CD244 receptor de células asesinas naturales 2B4			NM_016382
PDCD1LG1	B7H1	Inmunidad adaptativa		NM_014143
CD28	CD28	Inmunidad adaptativa		NM_006139
CD34	CD34	CD34		NM_001773
CD36	Antígeno CD36 (receptor de colágeno tipo I, receptor de trombospondina)			NM_001001547 NM_001001548 NM_000072
CD38	CD38	Inmunidad adaptativa		NM_001775
CD3E	Antígeno CD3E, polipéptido épsilon (complejo TiT3)	Inmunidad adaptativa		NM_000733
CD3G	Antígeno CD3G, polipéptido gamma (complejo TiT3)	Inmunidad adaptativa		NM_000073
CD3Z	Antígeno CD3Z, polipéptido zeta (complejo TiT3)	Inmunidad adaptativa		NM_000734
CD4	Antígeno CD4 (p55)	Inmunidad adaptativa		NM_000616
CD40LG	TNFSF5	Inmunidad adaptativa	CD40L	NM_000074
CD5		Inmunidad adaptativa		NM_014207
CD54	ICAM-1	Inmunidad adaptativa		NM_000201
CD6		Inmunidad adaptativa		NM_006725

Tabla 9 (Continuación 4)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
CD68	CD68	Inmunidad innata		NM_001251
CD69		Inmunidad adaptativa		NM_001781
CLIP	Antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo mayor de histocompatibilidad, clase II asociado a antígeno)	Ruta de MHC		NM_001025158 NM_001025159 NM_004355
CD80	CD80	Inmunidad adaptativa		NM_005191
CD83		Inmunidad adaptativa		NM_004233
SLAMF5	CD84	Inmunidad adaptativa		NM_003874
CD86	CD86	Inmunidad adaptativa		NM_006889
CD8A	CD8	Inmunidad adaptativa		NM_001768.1
CDH1	cadherina 1, tipo 1, E-cadherina (epitelial)	adhesión, metástasis	Émbolos	NM_004360
CDH7	Adhesión	adhesión		NM_004361
CDK2		ciclo celular		NM_052827 NM_001798
CDK4		ciclo celular		NM_000075
CDKN1A	CIP1 p21	mutación y metilación	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (p21, Cip1)	
DKN1B	KIP1 p27	mutación y metilación	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B (p27, Kip1)	NM_004064
CDKN2A	p16INK4a	mutación y metilación	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (melanoma, p16, inhibe CDK4)	NM_000077; NM_058195; NM_058197;
CDKN2B	CDKN2B		inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2B (p15, inhibe CDK4)	NM_004936
CEACAM1	(CD66a)	Tumor		NM_001024912 NM_001712
COL4A5	Colágeno IV (COL4A5)	Colágeno IV (COL4A5)		NM_033381.1 NM_033380.1, NM_000495.3
CREBBP		Ruta de CK	Histona acetiltransferasa	NM_004380
CRLF2	TSLP R	Inmunidad adaptativa		NM_022148 NM_001012288
CSF1	factor estimulante de colonias 1 (macrófago)		CSF-1	NM_000757
CSF2	CSF-2		CSF-2	NM_000758
CSF3	CSF-3		CSF-3	NM_000759

Tabla 9 (Continuación 5)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
CTLA4	CD152	Inmunidad adaptativa	CD152	NM_005214
CTNNB1	beta-catenina Ruta de wnt catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88kDa	Ruta de wnt	catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88kDa	NM_001904
CTSC		Inmunidad adaptativa	Micromatriz de ADN T	NM_148170.2 NM_001814.2
CX3CL1	Fractalkina	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X3-C) 1	NM_002996
CX3CR1	CX3CR1	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X3-C) 1	NM_001337
CXCL1	GRO alfa	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X-C) 1 (actividad estimulante de crecimiento de melanoma, alfa)	NM_001511
CXCL10	IP10	ruta de quimioquinas	SCYB11	NM_001565
CXCL11	ITAC	ruta de quimioquinas	SCYB11	NM_005409
CXCL12	SDF-1	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X-C) 12 (factor derivado de células estromales 1)	NM_199168 NM_000609
CXCL13	BLC	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X-C) 13 (quimioatrayente de células B)	NM_006419
CXCL14	BRAK	ruta de quimioquinas	Quimioquinas CXC y Receptores	NM_004887
CXCL16	Ligando CXCR6, Th1	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X-C) 16	NM_022059
CXCL2	GRO beta	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X-C) 2	NM_002089
CXCL3	GRO gamma	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X-C) 3	NM_002090
CXCL5	ENA	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X-C) 5	NM_002994
CXCL6	GCP-2	ruta de quimioquinas	Ligando quimioquina (resto C-X-C) 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2)	NM_002993
CXCL9	MIG	ruta de quimioquinas	Quimioquinas CXC y Receptores	NM_002416
CXCR3	CXCR3	ruta de quimioquinas	GPR9	NM_001504
CXCR4	CXCR4	ruta de quimioquinas	Receptor de quimioquina (resto C-X-C) 4	NM_003467
CXCR6	CXCR6	ruta de quimioquinas	Receptor de quimioquina (resto C-X-C) 6	NM_006564

Tabla 9 (Continuación 6)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2		NM_000761
CYP7A1	CYP7A1	CYP7A1		NM_000780
DCC	delecionado en carcinoma colorrectal, Gen hCG1811785 Anotación Celera	metástasis		NM_005215. 1
DCN	DCN	Ruta del TGF	Decorina Inh TGF	NM_133503 NM_133504 NM_133505 NM_001920
DEFA6	Defensina alfa 6, sobreexpresión en colon K	Defensa	sobreexpresión en colon K	NM_001926
DICER1	Dicer1, homólogo de Dcr-1 (Drosophila)	Ruta de ARNm		NM_030621; NM_177438
DKK1		Ruta de wnt	Homólogo de dickkopf 1 (Xenopus laevis)	NM_012242
Dok-1	p62Dok	Ruta de TCR	expresado por células hematopoyéticas, papel inh prolif T	NM_001381
Dok-2	P56Dok-2, FRIP	Ruta de TCR	expresado en T, papel Inh prolif T	NM_201349 NM_003974
DOK6				NM_152721
DVL1	Homólogo de DHS1 (dishevelled)	Homólogo de DHS1 (dishevelled)		NM_181870 NM_182779 NM_004421
E2F4	E2F4	Ruta del TGF	E2F factor de transcripción 4, unión a p107/p130	NM_001950
EBI3				NM_005755
ECE1	ECE-1	ECE-1	ECE	NM_001397
ECGF1	metástasis	metástasis		NM_001953
EDN1	endotelina 1, Gen hCG37405 Anotación Celera	EDN1,hCG37405		NM_001955.2
EGF			factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)	NM_001963
EGFR		STRING predicho	receptor del factor de crecimiento epidérmico (homólogo del oncogén de la leucemia eritroblástica viral (v-erb-b), aviar)	NM_005228
EIF4E			factor de inicio de la traducción eucariota 4E	
CD105	angiogénesis Endogлина	angiogénesis		NM_000118

Tabla 9 (Continuación 7)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
ENPEP	glutamil aminopeptidasa (aminopeptidasa A), Gen hCG21423 Anotación Celera	ENPEP,hCG21423		NM_001977.2
ERBB2				NM_001005862 NM_004448
EREG	epiregulina, Gen hCG14966 Anotación Celera	EREG,hCG14966		NM_001432.1
FCGR3A, FCGR3B	CD16	CD16		NM_000569, NM_000570
FN1	Fibronectina (precursor FN)	Fibronectina (precursor FN)	FN, CIG, FINC, LETS	NM_002026.1, NM_054034.1
FOXP3	FOXP3	Inmunidad adaptativa	caja forkhead P3	NM_014009
FYN	FYN	Ruta de TCR	FYN oncogén relacionado con SRC, FGR, YES	NM_153047 NM_153048 NM_002037
FZD1	frizzled	frizzled	homólogo frizzled 1 (Drosophila)	NM_003505
GAPD	GAPDH	control endógeno	control endógeno	NM_002046
GLI2		ruta de hedgehog miembro de la familia GLI-Kruppel GLI2	miembro de la familia GLI-Kruppel GLI2	NM_030379 NM_030380 NM_030381 NM_005270
GNLY	Granulisina (G NLY)	Ruta citotox	519, LAG2, NKG5, LAG-2, D2S69E, TLA519	NM_012483.1, NM_006433.2
GOLPH4	fosfoproteína de golgi 4	Transportador de Golgi	requerido para el transporte de proteínas desde el re al complejo de golgi	NM_014498 U55853
GRB2		Ruta de TCR		NM_203506 NM_002086
GSK3B		Ruta de wnt	glucógeno sintasa quinasa 3 beta	NM_002093
GSTP1	antioxidante	antioxidante		NM_000852
GUSB	GUSB	control endógeno	control endógeno	NM_000181
GZMA		Inmunidad adaptativa	Micromatriz de ADN T	NM_006144.2
GZMB	Granzima B (GZMB)	Ruta citotox	CCPI, CSPB, CGL-1, CSP-B, CTLA1	NM_004131
GZMH		Inmunidad adaptativa	Micromatriz de ADN T	NM_033423.2
GZMK	granzima K (granzima 3; triptasa II), Gen hCG40447 Anotación Celera		Micromatriz de ADN T	NM_002104.1
HLA-B	HLA-B	Ruta de MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, B	NM_005514

Tabla 9 (Continuación 8)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
HLA-C	HLA-C	Ruta de MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, C	NM_002117
HLA-DMA	HLA-DMA	Ruta de MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DM alfa	NM_006120
HLA-DMB	HLA-DMB	Ruta de MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DM beta	NM_002118
HLA-DOA	HLA-DOA	Ruta de MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DO alfa	NM_002119
HLA-DOB	HLA-DOB	Ruta de MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DO beta	NM_002120
HLA-DPA1	HLA-DPA1	Ruta de MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DP alfa 1	NM_033554
HLA-DQA2	HLA-DQA2	Ruta de MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DQ alfa 2	NM_020056
HLA-DRA	HLA-DRA	Ruta de MHC	HLA-DRA	NM_019111
HLX1	Homeobox 1 semejante a H2.0 1 (Drosophila), Gen hCG25119 Anotación Celera	Th1	Th1	NM_021958.2
HMOX1	HO-1	HO-1		NM_002133
HRAS	expresión de altos niveles de V12 HRAS- un mutante constitutivo y activo (y, por lo tanto, oncogénico) de HRAS - da lugar a una parada prematura del crecimiento que es similar en muchos aspectos a la parada que se observa cuando las células humanas alcanzan la senescencia replicativa 68.	mutación y metilación	v-Ha-ras Homólogo del oncogén del sarcoma en rata viral de Harvey	NM_176795
HSPB3	proteína de choque térmico 3 de 27kDa			NM_006308
HUWE1	UREB1, Proteólisis; Metabolismo y modificación de proteínas	Ruta de MHC	ubiquitina, arf, Proteólisis; metabolismo y modificación de proteínas	NM_031407
ICAM1	metástasis	metástasis		NM_000201

Tabla 9 (Continuación 9)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
ICAM-2	CD102	Inmunidad adaptativa		NM_000873
ICOS	ICOS	Inmunidad adaptativa		NM_012092
ID1	inhibidos de la unión de ADN 1, proteína negativa dominante de hélice-bucle-hélice, Gen hCG37143 Anotación Celera	ID1,hCG371 43	firma de metástasis	NM_002165.2
ifna1	ifna1	Ruta del interferón	Interferón, alfa 1	NM_024013
ifna17	ifna17	Ruta del interferón	Interferón, alfa 17	NM_021268
ifna2	ifna2	Ruta del interferón	interferón, alfa 2	NM_000605
ifna5	ifna5	Ruta del interferón	interferón, alfa 5	NM_002169
ifna6	ifna6	Ruta del interferón	interferón, alfa 6	NM_021002
ifna8	ifna8	Ruta del interferón	interferón, alfa 8	NM_002170
IFNAR1	ifnar1	Ruta del interferón	Receptor de interferón (alfa, beta y omega) 1	NM_000629
IFNAR2	ifnar2	Ruta del interferón	Receptor de interferón (alfa, beta y omega) 2	NM_207584 NM_207585 NM_000874
IFNG	IFN-g	Ruta del interferón	IFG, IFI	NM_000619
IFNGR1	IFN-gamma R1	Ruta del interferón		NM_000416
IFNGR2	IFN-gamma R2	Ruta del interferón		NM_005534
IGF1	factor de crecimiento semejante a insulina 1 (somatomedina C)	ruta de crecimiento		NM_000618
IHH		ruta de hedgehog homólogo indio de hedgehog (Drosophila)	homólogo indio de hedgehog (Drosophila)	NM_002181
IKKB	ikb2	Ruta de CK		AF080158
IL10	IL-10	Ruta de CK		NM_000572
IL12A	IL-12p35	Ruta de CK	interleuquina 12	NM_000882
IL12B	IL-12p40	Ruta de CK	interleuquina 12	NM_002187
IL12RB1	IL-12 R beta 1	Inmunidad adaptativa	receptor de interleuquina 12, beta 1	NM_153701 NM_005535
IL12RB2	IL12RB2	Ruta de CK	receptor de interleuquina 12, beta 2	NM_001559
IL13	IL-13	Ruta de CK		NM_002188
IL13RA2	receptor de interleuquina 13, alfa 2, Gen hCG20596 Anotación Celera	IL13RA2,hC G20596	firma de metástasis	NM_000640.2
IL15	IL-15	Ruta de CK		NM_000585

Tabla 9 (Continuación 10)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
IL15RA	IL-15 R alfa	Ruta de CK	receptor de interleuquina 15, alfa	NM_002189
IL17	IL-17	Ruta de CK	interleuquina 17 (serina esterasa 8 asociada a linfocitos T citotóxicos)	NM_002190
IL17R	IL17R	Ruta de CK	receptor de interleuquina 17	NM_014339
IL17RB	IL17RB	Ruta de CK	receptor B de interleuquina 17	NM_018725 NM_172234
IL18	IL-18	Ruta de CK		NM_001562
IL1A	IL-1a	Ruta de CK		NM_000575
IL1B	IL-1b	Ruta de CK		NM_000576
IL1R1	IL-1 RI	Inmunidad adaptativa		NM_000877
IL2	IL-2	Ruta de CK		NM_000586
IL21	IL-21	Ruta de CK	Familia de receptores de cadena gamma común	NM_021803
IL21R	IL-21 R	Ruta de CK	Familia de receptores de cadena gamma común	NM_181078 NM_181079 NM_021798
IL23A	IL-23	Ruta de CK	interleuquina 23, subunidad alfa p19	NM_016584
IL23R	IL-23R	Ruta de CK	receptor de interleuquina 23	NM_144701
IL24	IL24	Ruta de CK	interleuquina 24	NM_006850
IL27	IL27	Ruta de CK	interleuquina 27	NM_145659
IL2RA	CD25	Ruta de CK		NM_000417
IL2RB	IL-2 R beta, CD122	Ruta de CK	Inmunidad adaptativa	NM_000878
IL2RG	IL-2 R gamma, CD132	Ruta de CK	Inmunidad adaptativa	NM_000206
IL3	IL-3	Ruta de CK		NM_000588
IL31RA	IL31RA	Ruta de CK	receptor A de interleuquina 31	NM_139017
IL4	IL-4	Ruta de CK		NM_000589
IL4RA	IL-4 R	Ruta de CK	Células Th1/Th2	NM_001008699 NM_000418
IL5	IL-5	Ruta de CK		NM_000879
IL6	IL-6	Ruta de CK		NM_000600
IL7	IL-7	Ruta de CK		NM_000880
IL7RA	IL-7 R alfa	Ruta de CK	Inmunidad adaptativa	NM_002185
IL8	CXCL8	ruta de inflamación	Ruta de CK	NM_000584
CXCR1	IL-8 RA	Inmunidad adaptativa		NM_000634
CXCR2	IL-8 RB	ruta de quimioquinas	Quimioquinas CXC y Receptores	NM_001557

Tabla 9 (Continuación 11)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
IL9	IL-9	Ruta de CK		NM_000590
IL9R	IL-9 R	Ruta de CK	Familia de receptores de cadena gamma común	NM_176786
IRF1	factor regulador de interferón 1	Inmunidad adaptativa		NM_002198
ISGF3G	factor de transcripción 3 estimulado por interferón, gamma 48kDa	Ruta del interferón	factor de transcripción 3 estimulado por interferón, gamma 48kDa	NM_006084;
ITGA4	integrina a4b7	adhesión, metástasis	integrina, alfa 4 (antígeno CD49D, subunidad alfa 4 del receptor de VLA-4)	NM_000885
ITGA7	integrina, alfa 7	adhesión, metástasis		NM_002206
integrina, alfa E (antígeno CD103, antígeno 1 de linfocitos mucosales humanos; polipéptido alfa), Gen hCG33203 Anotación Celera	CD103	Inmunidad adaptativa		NM_002208.3
ITGB3	integrina, beta 3 (glicoproteína IIIa de plaquetas, antígeno CD61), Gen hCG27604 Anotación Celera	metástasis		NM_000212.2
JAK2	Quinasa Janus 2 (una proteína tirosina quinasa), Gen hCG31308 Anotación Celera	JAK2,hCG31308		NM_004972.2
JAK3		ruta de citoquinas		NM_000215
KLRB1		Inmunidad adaptativa	Micromatriz ADN T	NM_002258.2
KLRC4	subfamilia C de receptores semejantes a lectina de células asesinas, miembro 4, subfamilia K de receptores semejantes a lectina de células asesinas, miembro 1, Gen hCG2009644 Anotación Celera	AF030313		NM_007360.1

Tabla 9 (Continuación 12)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
KLRF1		Inmunidad adaptativa	Micromatriz ADN T	NM_016523.1
KLRG1	subfamilia G de receptores semejantes a lectina de células asesinas, miembro 1, Gene hCG25214 Anotación Celera	AF097367		NM_005810.3
KRAS				NM_004985
LAG3	inmune	Inmunidad adaptativa	gen de activación de linfocitos 3	NM_002286
LAIR2		Inmunidad adaptativa		NM_002288 NM_021270
LEF1	factor de unión potenciador linfoide 1	factor de unión potenciador linfoide		NM_016269
LGALS9	lectina, unión de galactósido, soluble, 9 (galectina 9), Gen hCG1749919 Anotación Celera			NM_009587.1 NM_002308.2
LILRB3	receptor semejante a inmunoglobulina de leucocitos, subfamilia B (con dominios TM y ITIM), miembro 3	Micromatriz IRT5 Wang	inmunosupresión	
LRP2	MEGALINA		MEGALINA	NM_004525
LTA	TNF-b	Ruta de CK	LT, TNFB, TNFSF1	NM_000595
SLAMF3	CD229	Inmunidad adaptativa		NM_002348
MADCAM1	molécula de adhesión celular adresina mucosal vascular 1, Gen hCG20569 Anotación Celera	MADCAM1,hCG20569		NM_130760.1 NM_130761.1
MADH3	MADH-3	Ruta del TGF	SMAD3, JV15-2	NM_005902
MADH7	MADH-7	Ruta del TGF	MADH8, SMAD7	NM_005904
MAF	c-maf Th2	Ruta de CK	homólogo del oncogén de fibrosarcoma músculo aponeurótico v-maf (aviar)	NM_005360
MAP2K1				NM_002755
MDM2	Mdm2, células 3T3 transformadas doble minuto 2, proteína de unión de p53 (ratón)	ruta de p53		NM_002392; NM_006878; NM_006879; NM_006880; NM_006881; NM_006882;
MICA	secuencia A relacionada con el polipéptido de MHC clase I	Ruta de MHC	presente en células tumorales y modula citotoxicidad	NM_000247

Tabla 9 (Continuación 13)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
MICB	secuencia B relacionada con el polipéptido de MHC clase MHC	Ruta de MHC	presente en células tumorales y modula citotoxicidad	NM_005931
MKI67	proliferación	proliferación		NM_002417
MMP12	metalopectidasa de matriz 12 (elastasa de macrófagos)	adhesión, metástasis		NM_002426 L23808
MMP9	metalopectidasa de matriz 9 (gelatinasa B, 92kDa gelatinasa, 92kDa colagenasa tipo IV)	adhesión, metástasis		NM_004994
MTA1	Asociado con metástasis 1, Gen hCG19442 Anotación Celera	metástasis		NM_004689.2
MTSS1	Supresor de metástasis 1, Gen hCG2009512 Anotación Celera	metástasis		NM_014751.2
MYC	MYC	Ruta del TGF	homólogo del oncogén de la mielocitomatosis viral v-myc (aviar)	NM_002467
MYD88		Ruta semejante a Toll		NM_002468
MYH6	MYH6	MYH6		D00943 (Tarjeta del gen)
NCAM1		Inmunidad adaptativa		
NFATC1	activación T	activación T		NM_172387 NM_172388 NM_172389 NM_172390 NM_006162
NKG7		Inmunidad adaptativa	Micromatriz ADN T	NM_005601.3
NLK		Ruta de wnt	quinasa semejante a nemo	NM_016231
NOS2A	iNos(Nos2A)	iNos(Nos2A)		NM_000625
P2X7	Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando, 7, Gen hCG1641456 Anotación Celera	P2RX7,hCG1641456		NM_177427.2 NM_002562.4
PDCD1	PD-1	Inmunidad adaptativa		NM_005018
PECAM-1	CD31	Inmunidad adaptativa		NM_000442
CXCL4	PF4	ruta de quimioquinas	Quimioquinas CXC y Receptores	NM_002619
PGK1	PGK1	control endógeno	control endógeno	NM_000291
PIAS1		Ruta de CK	proteína inhibidora de STAT activado, 1	NM_016166

Tabla 9 (Continuación 14)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
PIAS2		Ruta de CK	proteína inhibidora de STAT activado, 2	NM_173206 NM_004671
PIAS3		Ruta de CK	proteína inhibidora de STAT activado, 3	NM_006099
PIAS4		Ruta de CK	proteína inhibidora de STAT activado, 4	NM_015897
PLAT	activador de plasminógeno, tejido, Gen hCG17154 Anotación Celera	PLAT,hCG17154		NM_033011.1 NM_000930.2 NM_000931.2
PML		supresor tumoral, señalización del interferón		NM_033238 NM_033239 NM_033240 NM_033242 NM_033244 NM_033245 NM_033246 NM_033247 NM_033249 NM_033250 NM_002675
PP1A	PP1	PP1		NM_021130
CXCL7	NAP-2	ruta de quimioquinas		NM_002704
PPP2CA	PP2A			NM_002715
PRF1	Perforina (PRF 1)	Ruta citotox	P1, PFP, HPLH2	NM_005041
PROM1		CD133, prominina 1, glicoproteína con cinco dominios transmembrana,	Se ha mostrado que fracción positiva para CD133 de médula ósea humana, sangre del cordón y sangre periférica se injerta eficientemente en modelos de xenotrasplante, y se ha mostrado que contiene la mayoría de los precursores de granulocitos/macrófagos,	NM_006017
PSMB5	subunidad de proteasoma (prosoma, macropaina), beta tipo, 5	Ruta de MHC		NM_002797
PTCH		homólogo fragmentado de la ruta hedgehog (Drosophila)		NM_000264
PTGS2	COX-2	ruta de inflamación		NM_000963
PTP4A3	proteína tirosina fosfatasa tipo IVA, miembro 3	metástasis		NM_032611.1

Tabla 9 (Continuación 15)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
PTPN6		Ruta de CK	proteína tirosina fosfatasa, no de tipo receptor 6	NM_080548 N M_080549 NM_002831
PTPRC	CD45	CD45		NM_002838, NM_080922, NM_080923, NM_080921
RAB23		ruta de hedgehog RAB23, miembro de la familia de oncogenes RAS		NM_183227 NM_016277
RAC/RHO				NM_018890
RAC2	RAC2	RAC2	sustrato 3 de la toxina botulínica C3 relacionado con ras 2 (familia rho, proteína pequeña de unión a GTP Rac2)	NM_002872
RAF				NM_002880
RB1	retinoblastoma 1 (incluyendo osteosarcoma)	mutación y metilación	ciclo celular	NM_000321;
RBL1	semejante a retinoblastoma 1 (p107)	semejante a retinoblastoma 1 (p107)		NM_183404 NM_002895
REN	RENINA (REN)		RENINA (REN)	NM_000537
Drosha	RNASEN, Droshan microARN	microARN		AJ242976
SELE	CD62E (SELE)	metástasis		NM_000450
SELL	CD62L			NM_000655
SELP	CD62E (SELP)	metástasis		NM_003005
SERPINA1	inhibidor de la peptidasa serpina, grupo E (nexina, inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1), miembro 1, Gen hCG17353 Anotación Celera	SERPINA1,hCG17353		NM_000602. 1
SFRP1	frizzled secretada	frizzled secretada		NM_003012
SIRP beta 1		Inmunidad adaptativa		NM_006065
SKI	c-ski(SKI)	c-ski(SKI)	SKV	NM_003036
SLAMF1		Inmunidad adaptativa		NM_003037
SLAMF6	NTB-A	Inmunidad adaptativa		NM_052931
SLAMF7	CRACC	Inmunidad adaptativa		NM_021181
SLAMF8	BLAME	Inmunidad adaptativa		NM_020125
SMAD2	SMAD2	Ruta del TGF	SMAD, madres contra el homólogo de DPP 2 (Drosophila)	NM_0010036 52 NM_0059 01

Tabla 9 (Continuación 16)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
SMAD4	SMAD4	Ruta del TGF	SMAD, madres contra el homólogo de DPP 4 (Drosophila)	NM_005359
SMO, SMOH	SMO	SMO	homólogo suavizado (Drosophila)	NM_005631
SMURF1	SMURF1	SMURF1	proteína ligasa E3 de ubiquitina 1 específica de SMAD	NM_181349 NM_020429
SOCS1		Ruta de CK	supresor de la señalización de citoquinas 1	NM_003745
SOCS2		Ruta de CK	supresor de la señalización de citoquinas 2	NM_003877
SOCS3		Ruta de CK	supresor de la señalización de citoquinas 3	NM_003955
SOCS4		Ruta de CK	supresor de la señalización de citoquinas 4	NM_199421 NM_080867
SOCS5		Ruta de CK	supresor de la señalización de citoquinas 5	NM_014011
SOCS6		Ruta de CK	supresor de la señalización de citoquinas 6	NM_004232
SOCS7		Ruta de CK	supresor de la señalización de citoquinas 7	NM_014598
SOD1	antioxidante	antioxidante		NM_000454
SOD2	antioxidante	antioxidante		NM_0010244 65 NM_001024466 NM_0000636
SOD3	antioxidante	antioxidante		NM_003102
SOS1		Ruta de TCR		NM_005633
SOX17	SOX17	SOX17	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 17	NM_022454
CD43		Inmunidad adaptativa		NM_003123
ST14	supresión de la tumorigenicidad 14 (carcinoma de colon, matriptasa, epitina)	proteasa, citotox		NM_021978
STAM	STAM	STAM	molécula adaptadora de la transducción de señales (dominio SH3 y resto ITAM) 1	NM_003473
STAT1	STAT1	STAT1	Transductor de señales y activador de la transcripción 1, 91kDa	NM_139266 NM_007315

Tabla 9 (Continuación 17)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
STAT2	STAT2	STAT2	transductor de señales y activador de la transcripción 2, 113kDa	
STAT3	STAT3	STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (factor de respuesta de fase aguda)	NM_213662 NM_139276 NM_003150
STAT4	STAT4	STAT4	transductor de señales y activador de la transcripción 4	NM_003151
STAT5A	STAT5A	STAT5A	transductor de señales y activador de la transcripción 5A	NM_003152
STAT5B	STAT5B	STAT5B	transductor de señales y activador de la transcripción 5B	NM_012448
STAT6	STAT6	STAT6	transductor de señales y activador de la transcripción 6, inducido por interleuquina-4	NM_003153
STK36	STK36	STK36	serina/treonina quinasa 36 (homólogo fusionado, Drosophila)	NM_015690
TAP1	transportador 1, casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	Ruta de MHC		NM_000593
TAP2	transportador 2, casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	Ruta de MHC	transportador 2, casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	NM_000544
TBX21	T-bet (TBX21)	Inmunidad adaptativa		NM_013351
TCF7	TCF7	Ruta de wnt	factor de transcripción 7 (específico de células T, caja HMG)	NM_201633 NM_201632 NM_201634 NM_213648 NM_003202
TERT				NM_198255 NM_003219
TFRC	CD71	control endógeno	control endógeno	NM_003234
TGFA				NM_003236
TGFB1	TGF-b / BIGH3	Ruta del TGF		NM_000660
TGFBR1	TGFBR1	Ruta del TGF	receptor del factor de crecimiento transformante, beta I (quinasa semejante al receptor de tipo II de activina A, 53kDa)	NM_004612

Tabla 9 (Continuación 18)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
TGFBR2	TGFBR2	Ruta del TGF	receptor del factor de crecimiento transformante, beta II (70/80kDa)	NM_001024847 NM_003242
TIMP3	TIMP inhibidor de metalopeptidasa 3 (distrofia del fundus de Sorsby, pseudoinflamatoria)	Ruta del TGF	adhesión, metástasis	NM_000362
TLR1	TLR1	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 1	NM_003263
TLR10	TLR10	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 10	NM_030956
TLR2	TLR2	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 2	NM_003264
TLR3	TLR3	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 3	NM_003265
TLR4	TLR4	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 4	NM_138554 NM_003266
TLR5	TLR5	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 5	NM_003268
TLR6	TLR6	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 6	NM_006068
TLR7	TLR7	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 7	NM_016562
TLR8	TLR8	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 8	NM_138636
TLR9	TLR9	Ruta semejante a Toll	receptor semejante a toll 9	NM_017442 NM_138688
TNF	TNF-a	TNF-a	DIF, TNFA, TNFSF2, CAQUECTINA	NM_000594
TNFRSF10A	TRAILR1	ruta de apoptosis		NM_003844
TNFRSF11A	RANK	Inmunidad adaptativa		NM_003839
TNFRSF18	GITR(TNFRS F18)	Inmunidad adaptativa		NM_004195
TNFRSF1A	TNF RI	Inmunidad adaptativa		NM_001065
TNFRSF1B	TNF RII	Inmunidad adaptativa		NM_001066
OX-40				NM_003327
TNFRSF5	CD40	Inmunidad adaptativa		NM_001250, NM_152854
TNFRSF6	Fas	Ruta de apoptosis	FAS, APT1, CD95, APO-1, FASTM	NM_000043
TNFRSF7	CD27	Inmunidad adaptativa		NM_001242
TNFRSF8	CD30	Inmunidad adaptativa		NM_152942 NM_001243
TNFRSF9	4-1BB	Inmunidad adaptativa		NM_001561
TNFSF10	TRAIL		superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10	NM_003810

Tabla 9 (Continuación 19)

nombre del gen (antiguo)	nombre alternativo	ruta del gen	descripción del gen	RefSeq Pública
TNFSF6	FasL	ruta de apoptosis	FASL, FasL, CD178, CD95L, APT1LG1	NM_000639
TOB1	transductor de ERBB2	Ruta de TCR	transductor de ERBB2, 1	NM_005749
TP53	proteína tumoral p53 (síndrome de Li-Fraumeni)	ruta de p53		NM_000546
TSLP		Inmunidad adaptativa		NM_033035 NM_138551
VCAM1	molécula de adhesión de las células vasculares 1, Gen hCG32384 Anotación Celera	MGC99561, NCAM-100, DKFZp779G2333, HGNC:12663	firma de metástasis	NM_001078.2
VEGF	VEGF A	VEGF A		NM_003376
WIF1		ruta de wnt	factor inhibidor 1	NM_007191
WNT1		ruta de wnt	familia de sitio de integración MMTV tipo sin alas, miembro 1	NM_005430
WNT4	familia de sitio de integración MMTV tipo sin alas, miembro 4	ruta de wnt	familia de sitio de integración MMTV tipo sin alas, miembro 4	NM_030761
XCL1	Linfotactina	ruta de quimioquinas	ligando quimioquina (resto C) 1	NM_002995
XCR1		ruta de quimioquinas	receptor de ligando de quimioquina (resto C) 1	NM_001024644 NM_005283
ZAP70	ZAP70	Ruta de TCR	proteína quinasa asociada con la cadena zeta (TCR) de 70kDa	NM_001079
ZIC2		miembro 2 de la familia Zic de la ruta hedgehog (homólogo odd-paired, Drosophila)	Miembro de la familia Zic 2 (homólogo odd-paired, Drosophila)	NM_007129

Tabla 10

No. de acceso	Nombre	Descripción	Tipo	Localización
2 transcritos	TNFRSF6B	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 6b, señuelo	hCG22751:7 transcritos	20q13.3
NM_001712	CEACAM1	Molécula de adhesión celular 1 relacionada con el antígeno carcinoembrionario (glicoproteína biliar)	hCG21881:2 transcritos	19q13.2,
NM_014143	PDCD1LG1	ligando 1 de la muerte celular programada 1	hCG27938:1 transcritos	9p24,
2 transcritos	CD8A	antígeno CD8, polipéptido alfa (p32)	hCG34192:3 transcritos	2p12
NM_000963	PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa)	hCG39885:1 transcritos	1q25.2-q25.3,
NM_001168	BIRC5	repetición de IAP baculoviral que contiene 5 (survivina)	hCG27811:4 transcritos	17q25,
NM_000655	SELL	selectina L (molécula de adhesión de linfocitos 1)	hCG37088:5 transcritos	1q23-q25,
NM_002164	INDO	indolamina-pirrol 2,3 dioxigenasa	hCG27061:2 transcritos	8p12-p11,
NM_016123	IRAK4	quinasa 4 asociada al receptor de interleuquina-1	hCG39494:1 transcritos	4,
NM_000594	TNF	factor de necrosis tumoral (superfamilia de TNF, miembro 2)	hCG43716:1 transcritos	6p21.3,
NM_003844	TNFRSF10A	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 10a	hCG31588:1 transcritos	8p21,
NM_002423	MMP7	Metaloproteinasa de matriz 7 (matrilisina, uterina)	hCG1640914: 1 transcritos	11q21-q22,
NM_006864	LILRB3	Receptor semejante a inmunoglobulina de leucocitos, subfamilia B (con dominios TM y ITIM), miembro 3	hCG2009348: 1 transcritos	19q13.4,
2 transcritos	CD3Z	antígeno CD3Z, polipéptido zeta (complejo TIT3)	hCG1769040: 2 transcritos	1q22-q23,
2 transcritos	TNFRSF8	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 8	hCG25063:1 transcritos	1p36,
NM_002046	GAPD	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	hCG2005673:1 transcritos	12p13,
NM_001565	CXCL10	ligando quimioquina (resto C-X-C) 10	hCG23842:2 transcritos	4q21,
2 transcritos	EBAG9	asociado con el sitio de unión del receptor de estrógeno, antígeno, 9	hCG15046:2 transcritos	8q23,
NM_000584	IL8	interleuquina 8	hCG16372:2 transcritos	4q13-q21
2 transcritos	STAT1	transductor de la señal y activador de la transcripción 1, 91kDa	hCG25794:6 transcritos	2q32.2,
NM_001504	CXCR3	receptor de quimioquina (resto C-X-C) 3	hCG19964:1 transcritos	Xq13,
NM_000660	TGFB1	factor de crecimiento transformante, beta 1 (enfermedad de Camurati-Engelmann)	hCG22321:2 transcritos	19q13.2,

Tabla 10 (Continuación 1)

No. de acceso	Nombre	Descripción	Tipo	Localización
NM_012092	ICOS	coestimulador inducible de las células T	hCG1642889:1 transcritos	2q33,
NM_002416	CXCL9	ligando quimioquina (resto C-X-C) 9	hCG1781951:1 transcritos	4q21,
2 transcritos	CD97	antígeno CD97	hCG27517:5 transcritos	19p13,
NM_003853	IL18RAP	proteína auxiliar del receptor de interleuquina 18	hCG28161:1 transcritos	2p24.3-p24.1
NM_006564	CXCR6	receptor de quimioquina (resto C-X-C) 6	hCG15326:1 transcritos	3p21,
NM_004314	ART1	ADP-ribosiltransferasa 1	hCG16165:1 transcritos	11p15,
NM_002198	IRF1	factor regulador de interferón 1	hCG24115:1 transcritos	5q31.1,
NM_025240	B7H3	homólogo de B7 3	hCG40826:1 transcritos	15q23-q24,
3 transcritos	ACE	enzima convertora de angiotensina I (peptidil-dipeptidasa A) 1	hCG41821:5 transcritos	17q23,
NM_003855	IL18R1	receptor de interleuquina 18 1	hCG28160:3 transcritos	2q12
NM_013351	TBX21	caja T 21	hCG27200:1 transcritos	17q21.2,
NM_001562	IL18	interleuquina 18 (factor inductor de interferón gamma-)	hCG39294:2 transcritos	11q22.2-q22.3
NM_005018	PDCD1	muerte celular programada 1	hCG1776289:1 transcritos	2q37.3,
NM_000619	IFNG	interferón, gamma	hCG15987:1 transcritos	12q14,
2 transcritos	GNLY	Granulicina	hCG32948:3 transcritos	2p12-q11,
NM_002051	GATA3	proteína de unión GATA 3	hCG23634:3 transcritos	10p15,
NM_003376	VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular	hCG18998:7 transcritos	6p12
NM_004131	GZMB	granzima B (granzima 2, serina esterasa 1 asociada con los linfocitos T citotóxicos)	hCG40183:1 transcritos	14q11.2,
NM_014387	LAT	conector para la activación de las células T	hCG2039637:5 transcritos	16q13,
NM_000616	CD4	antígeno CD4 (p55)	hCG25949:2 transcritos	12pter-p12,
NM_031281	IRTA2	asociado con la traslocación del receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas 2	hCG39827:3 transcritos	1q21,
NM_000572	IL10	interleuquina 10	hCG22208:1 transcritos	1q31-q32,
NM_003326	TNFSF4	superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 4 (glicoproteína 1 activada transcripcionalmente 34kDa)	hCG37644:2 transcritos	1q25,

Tabla 10 (Continuación 2)

No. de acceso	Nombre	Descripción	Tipo	Localización
NM_018676	THSD1	trombospondina, tipo I, dominio 1	hCG29569:4 transcritos	13q14.13,
NM_025239	PDCD1LG2	ligando 2 de la muerte celular programada 1	hCG1641650:1 transcritos	9p24.2,

Tabla 11

Tabla S1 : características de las tres cohortes de pacientes

Característica	Cohortes		
	HEGP	Avicenne	HEGP-2
No. de Pacientes			
Estadio del tumor (T)†			
pT1	23	3	2
pT2	69	13	7
pT3	218	76	57
pT4	97	27	9
Estadio ganglionar (N)			
Negativo	241	48	30
Positivo	166	71	43
Nx‡			2
Metástasis distantes (M)			
Ninguna detectada	313	93	47
Presentes	94	26	28
Clasificación UICC-TNM (25)			
I	75	12	6
II	137	33	17
III	100	48	24
IV	95	26	28
Sexo			
Masculino	216	57	42
Femenino	191	62	33
Localización			
Colon	162	35	41
Sigmoide	114	53	25
Recto	131	31	9
Diferenciación			
Buena	312	78	47
Baja	95	41	28

† El estadio se determinó por examen patológico. T1 tumor que invade la submucosa, T2 tumor que invade la muscularis propia, T3 tumor que penetra en la muscularis propia e invade la subserosa, y T4 tumor que invade otros órganos o estructuras o que perfora el peritoneo visceral.

‡ No fue posible determinar el estado ganglionar de dos pacientes.

Tabla 12

Tabla S3: análisis de supervivencia libre de enfermedad para todos los pacientes según los puntos de corte de valor P mínimo

	No. de pacientes	Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS) para todos los pacientes				Valor P*	Valor P ^a	Valor P ^a
		Meses mediana	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %			
GZMB _{CT}								
Lo	191	34.6	53.8	46.1	46.1	1.78 10 ⁻⁴	9.70 10 ⁻⁵	4.85 10 ⁻⁵
Hi	163	NR	76.6	73.1	72.1			
GZMB _M								
Lo	109	20.1	47.1	41.0	41.0	1.99 10 ⁻⁶	1.28 10 ⁻⁵	5.38 10 ⁻⁶
Hi	195	NR	75.4	70.9	70.0			
CD45RO _{CT}								
Lo	45	11.5	27.5	24.0	24.0	4.33 10 ⁻⁵	9.81 10 ⁻⁵	1.27 10 ⁻⁴
Hi	261	NR	72.0	65.5	64.9			
CD45RO _M								
Lo	166	41.5	55.4	47.3	47.3	3.71 10 ⁻⁵	4.29 10 ⁻⁴	4.41 10 ⁻⁴
Hi	145	NR	76.8	72.9	71.9			
CD8 _{CT}								
Lo	132	21.0	46.0	39.1	39.1	5.19 10 ⁻⁶	3.44 10 ⁻⁶	1.45 10 ⁻⁶
Hi	227	NR	74.9	69.5	68.8			
CD8 _M								
Lo	188	45.5	56.4	49.1	49.1	1.03 10 ⁻⁴	1.11 10 ⁻⁵	8.09 10 ⁻⁶
Hi	128	NR	77.6	73.5	72.3			
CD3 _{CT}								
Lo	165	23.1	48.2	43.4	43.4	5.48 10 ⁻⁶	1.38 10 ⁻⁵	1.09 10 ⁻⁵
Hi	192	NR	79.8	72.4	71.6			
CD3 _M								
Lo	175	31.1	51.5	43.5	43.5	4.76 10 ⁻⁶	6.23 10 ⁻⁶	6.32 10 ⁻⁶
Hi	178	NR	78.7	74.7	73.9			
GZMB _{CT/M}								
Lo/Lo	70	20.1	46.3	39.1	39.1	3.32 10 ⁻⁴	8.34 10 ⁻⁵	5.45 10 ⁻⁵
Het	98	77.5	62.2	54.4	54.4			
Hi/Hi	102	NR	80.6	77.8	76.3			
CD45RO _{CT/M}								
Lo/Lo	32	5.85	24.2	24.2	24.2	6.61 10 ⁻⁶	1.05 10 ⁻⁵	1.69 10 ⁻⁶
Het	141	63.26	61.2	50.7	50.7			
Hi/Hi	127	NR	80.3	76.1	76.9			
CD8 _{CT/M}								
Lo/Lo	93	20.1	44.3	35.9	35.9	3.80 10 ⁻⁵	7.70 10 ⁻⁵	5.52 10 ⁻⁵
Het	94	NR	63.8	58.9	58.9			
Hi/Hi	96	NR	81.6	76.1	74.6			
CD3 _{CT/M}								
Lo/Lo	93	17.3	42.8	37.4	37.4	7.56 10 ⁻⁶	1.22 10 ⁻⁷	1.16 10 ⁻⁷
Het	116	68.7	61.7	51.8	51.8			
Hi/Hi	109	NR	87.6	84.0	82.7			

* Valor P de rango logarítmico corregido (Altman et al. 1994), valor P mediano 100*CV rango logarítmico

^a Valor P mediano 100*CV rango logarítmico estratificado

NR: No alcanzado, Het: Hi/Lo y Lo/Hi

Tabla 13

Tabla S4: análisis de supervivencia total para todos los pacientes según los puntos de corte de valor P mínimo

	No. de pacientes	Supervivencia Total (OS) para todos los pacientes				Valor P*	Valor P ^a	Valor P ^a
		Meses mediana	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %			
GZMB _{CT}						8.18 10 ⁻⁷	1.29 10 ⁻⁵	1.16 10 ⁻⁵
Lo	191	42.7	62.2	47.3	40.1			
Hi	163	NR	83.8	76.0	68.4			
GZMB _M						5.55 10 ⁻³	8.39 10 ⁻²	6.77 10 ⁻²
Lo	109	43	68.6	47.3	39.9			
Hi	195	69.9	74.6	66.7	57.8			
CD45RO _{CT}						5.77 10 ⁻⁷	8.99 10 ⁻⁵	6.57 10 ⁻⁵
Lo	45	25.6	55.5	26.9	20.9			
Hi	261	100.7	74.9	66.3	58.7			
CD45RO _{IM}						1.65 10 ⁻⁴	8.20 10 ⁻⁸	1.07 10 ⁻²
Lo	168	46.9	67.1	49.4	42.0			
Hi	145	NR	78.6	73.3	65.5			
CD8 _{CT}						2.66 10 ⁻⁷	6.66 10 ⁻⁵	3.79 10 ⁻⁵
Lo	132	35.1	60.3	41.8	36.5			
Hi	227	NR	79.8	71.0	62.3			
CD8 _M						1.22 10 ⁻³	1.51 10 ⁻²	1.50 10 ⁻²
Lo	186	51.3	70.2	51.6	43.0			
Hi	128	NR	78.4	72.6	66.1			
CD3 _{CT}						7.86 10 ⁻⁶	1.35 10 ⁻⁵	9.65 10 ⁻⁵
Lo	165	33.5	57.9	42.4	35.6			
Hi	192	115.1	83.2	74.3	66.4			
CD3 _{IM}						9.08 10 ⁻⁶	1.83 10 ⁻⁴	1.46 10 ⁻⁴
Lo	175	46.9	65.9	49.3	40.3			
Hi	178	NR	77.3	70.2	64.0			
GZMB _{CT/IM}						2.00 10 ⁻⁴	1.67 10 ⁻²	1.60 10 ⁻²
Lo/Lo	70	50.8	72.4	50.7	45.2			
Het	98	40.3	60.8	48.0	35.4			
Hi/Hi	102	NR	84.1	77.8	70.8			
CD45RO _{CT/IM}						8.56 10 ⁻⁶	3.34 10 ⁻⁸	2.91 10 ⁻⁸
Lo/Lo	32	26.4	60.6	22.5	22.5			
Het	141	51.5	66.3	54.5	44.1			
Hi/Hi	127	NR	81.2	75.1	70.5			
CD8 _{CT/IM}						6.25 10 ⁻⁶	4.69 10 ⁻⁴	4.28 10 ⁻⁴
Lo/Lo	93	35.1	61.2	40.0	33.8			
Het	94	59.6	74.6	61.0	49.3			
Hi/Hi	96	NR	82.3	75.9	69.2			
CD3 _{CT/IM}						3.97 10 ⁻²	2.11 10 ⁻⁶	1.37 10 ⁻⁶
Lo/Lo	93	35.1	59.3	40.7	29.9			
Het	116	57.8	68.0	54.7	49.5			
Hi/Hi	109	NR	86.4	80.8	72.6			

* Valor P de rango logarítmico, valor P mediano 100*CV rango logarítmico

^a Valor P mediana 100*CV rango logarítmico estratificado

NR: No alcanzado, Het: Hi/Lo y Lo/Hi

Tabla 14**Tabla S5: análisis de supervivencia libre de enfermedad para todos los pacientes según mediana de puntos de corte**

	Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS) para todos los pacientes					Valor P^*
	No. de pacientes	Meses mediana	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %	
GZMB _{CT}						9.94 10 ⁻⁷
Lo	190	34.6	53.5	45.7	45.7	
Hi	164	NR	76.8	73.2	72.3	
GZMB _{IM}						1.99 10 ⁻⁶
Lo	152	31.1	51.0	46.6	46.6	
Hi	152	NR	79.5	73.6	72.5	
CD45RO _{CT}						2.21 10 ⁻²
Lo	153	77.4	59.3	54.2	54.2	
Hi	153	NR	72.9	65.8	64.8	
CD45RO _{IM}						1.85 10 ⁻⁴
Lo	158	36.0	53.7	48.0	48.0	
Hi	155	NR	77.0	70.7	69.7	
CD8 _{CT}						3.06 10 ⁻⁷
Lo	180	31.3	51.1	45.4	45.4	
Hi	179	NR	78.0	72.1	71.2	
CD8 _{IM}						2.72 10 ⁻⁴
Lo	157	36.0	56.3	47.7	47.7	
Hi	157	NR	74.3	70.7	69.7	
CD3 _{CT}						1.65 10 ⁻⁶
Lo	179	31.3	52.0	46.7	46.7	
Hi	178	NR	78.7	71.6	70.8	
CD3 _{IM}						2.98 10 ⁻⁸
Lo	177	31.1	51.8	43.6	43.6	
Hi	176	NR	79.1	75.1	74.2	
GZMB _{CT/IM}						5.07 10 ⁻⁶
Lo/Lo	91	23.0	46.6	40.9	40.9	
Het	93	NR	67.2	59.2	59.2	
Hi/Hi	86	NR	82.1	78.7	77.0	
CD45RO _{CT/IM}						7.80 10 ⁻⁴
Lo/Lo	92	35.8	52.6	49.5	49.5	
Het	119	100.2	63.7	54.4	54.4	
Hi/Hi	89	NR	81.7	77.3	75.8	
CD8 _{CT/IM}						7.75 10 ⁻⁷
Lo/Lo	98	20.8	44.9	37.3	37.3	
Het	92	NR	67.8	61.1	61.1	
Hi/Hi	93	NR	79.7	75.4	73.8	
CD3 _{CT/IM}						9.52 10 ⁻⁹
Lo/Lo	98	18.2	44.9	39.7	39.7	
Het	119	66.7	62.5	53.2	53.2	
Hi/Hi	101	NR	87.8	84.0	82.5	

* Valor P de rango logarítmico para mediana de punto de corte

NR: No alcanzado, Het: Hi/Lo y Lo/Hi

Tabla 15

Tabla S6: análisis de supervivencia total para todos los pacientes según mediana de puntos de corte

	No. de pacientes	Supervivencia Total (OS) para todos los pacientes				Valor <i>P</i> [*]
		Meses mediana	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %	
GZMB_{CT}						8.18 10 ⁻⁷
Lo	191	42.7	62.2	47.3	40.1	
Hi	163	NR	83.8	76.0	68.4	
GZMB_{IM}						1.55 10 ⁻²
Lo	152	50.8	67.4	50.7	44.3	
Hi	152	100.8	77.5	68.9	58.2	
CD45RO_{CT}						6.92 10 ⁻⁴
Lo	153	46.9	65.7	49.1	43.6	
Hi	153	111.3	78.6	72.0	62.9	
CD45RO_{IM}						1.49 10 ⁻³
Lo	158	43.1	66.3	48.4	41.5	
Hi	155	115.0	78.6	72.8	64.6	
CD8_{CT}						2.05 10 ⁻⁵
Lo	180	41.7	65.8	45.7	41.1	
Hi	179	NR	79.6	74.9	64.8	
CD8_{IM}						2.16 10 ⁻³
Lo	157	50.8	71.9	51.0	42.0	
Hi	157	NR	75.3	69.5	63.2	
CD3_{CT}						7.04 10 ⁻⁶
Lo	179	39.2	61.5	45.6	38.5	
Hi	178	115.1	82.5	73.7	66.1	
CD3_{IM}						9.38 10 ⁻⁵
Lo	177	46.9	66.4	49.3	40.5	
Hi	176	NR	77.0	70.5	64.2	
GZMB_{CT/IM}						2.88 10 ⁻³
Lo/Lo	92	46.9	67.4	49.6	45.4	
Het	92	51.3	66.9	54.4	39.3	
Hi/Hi	86	115.1	83.9	76.5	69.9	
CD45RO_{CT/IM}						7.43 10 ⁻⁵
Lo/Lo	92	40.3	65.2	45.3	41.0	
Het	119	52.9	66.7	55.1	45.3	
Hi/Hi	89	NR	85.9	83.0	75.4	
CD8_{CT/IM}						1.04 10 ⁻⁴
Lo/Lo	98	36.4	66.0	42.3	36.8	
Het	92	59.6	72.6	58.7	46.9	
Hi/Hi	93	NR	80.2	77.5	70.3	
CD3_{CT/IM}						2.08 10 ⁻³
Lo/Lo	98	35.1	60.3	41.3	31.0	
Het	119	60.0	69.7	56.7	50.5	
Hi/Hi	101	NR	85.4	80.6	73.0	

* Valor *P* de rango logarítmico para mediana de punto de corte

NR: No alcanzado, Het: Hi/Lo y Lo/Hi

Tabla 16

Tabla S7: análisis de supervivencia libre de enfermedad para pacientes I, II, III de UICC-TNM, según los puntos de corte de valor P mínimo

	No. de pacientes	Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS) para pacientes I, II, III de UICC-TNM				Valor P*	Valor P	Valor P ^a
		Meses mediana	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %			
GZMB _{CT}								
Lo	166	NR	77.0	68.2	68.2	9.17 10 ⁻¹	3.87 10 ⁻¹	3.99 10 ⁻¹
Hi	107	NR	87.7	83.7	83.7			
GZMB _{IV}								
Lo	126	NR	74.1	68.7	68.7	3.47 10 ⁻¹	1.51 10 ⁻¹	1.46 10 ⁻¹
Hi	112	NR	83.1	82.5	82.5			
CD45RC _{CT}								
Lo	25	23.1	42.4	37.1	37.1	3.58 10 ⁻³	2.01 10 ⁻³	1.69 10 ⁻³
Hi	218	NR	84.4	77.3	77.3			
CD45RC _{IM}								
Lo	121	NR	74.2	64.4	64.4	3.49 10 ⁻¹	1.66 10 ⁻¹	1.73 10 ⁻¹
Hi	125	NR	85.9	81.5	81.5			
CDB _{CT}								
Lo	85	77.5	64.1	55.7	55.7	5.62 10 ⁻¹	1.76 10 ⁻¹	1.58 10 ⁻¹
Hi	193	NR	88.3	82.0	82.0			
CDB _{IM}								
Lo	138	NR	74.0	65.5	65.5	2.20 10 ⁻¹	1.43 10 ⁻¹	1.81 10 ⁻¹
Hi	111	NR	87.9	82.9	82.9			
CD3 _{CT}								
Lo	69	68.7	62.6	53.8	53.8	1.93 10 ⁻¹	1.22 10 ⁻¹	1.16 10 ⁻¹
Hi	209	NR	87.9	80.9	80.9			
CD3 _{IM}								
Lo	103	NR	72.0	60.5	60.5	4.78 10 ⁻¹	6.23 10 ⁻¹	6.32 10 ⁻¹
Hi	171	NR	88.1	83.3	83.3			
GZMB _{CT/IM}								
Lo/Lo	87	NR	70.4	64.3	64.3	7.81 10 ⁻¹	3.33 10 ⁻¹	3.42 10 ⁻¹
Het	69	NR	81.7	73.2	73.2			
Hi/Hi	58	NR	90.8	85.9	85.9			
CD45RC _{CT/IM}								
Lo/Lo	16	20.1	40.2	40.2	40.2	1.45 10 ⁻²	4.04 10 ⁻²	4.14 10 ⁻²
Het	110	NR	76.8	64.8	64.8			
Hi/Hi	112	NR	88.3	85.9	85.9			
CDB _{CT/IM}								
Lo/Lo	61	35.8	59.0	48.9	48.9	1.94 10 ⁻³	3.52 10 ⁻³	3.84 10 ⁻³
Het	76	NR	82.2	76.2	76.2			
Hi/Hi	87	NR	87.8	81.6	81.6			
CD3 _{CT/IM}								
Lo/Lo	30	23.1	49.9	38.0	38.0	8.57 10 ⁻²	2.49 10 ⁻²	2.93 10 ⁻²
Het	95	NR	76.4	65.6	65.6			
Hi/Hi	124	NR	91.3	87.1	87.1			

* Valor P de rango logarítmico corregido (Altman et al. 1994), valor P mediano 100*CV rango logarítmico

^a Valor P mediana 100*CV rango logarítmico estratificado

NR: No alcanzado, Het: Hi/Lo y Lo/Hi

Tabla 17

Tabla S8: análisis de supervivencia total para pacientes I, II, III de UICC-TNM, según los puntos de corte de valor P mínimo

	No. de pacientes	Meses mediana	Supervivencia Total (OS) para pacientes I, II, III de UICC-TNM			Valor P*	Valor P	Valor P ^a
			Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %			
GZMB _{CT}								
Lo	166	89.0	83.5	69.2	61.1	1.52 10 ⁻¹	1.13 10 ⁻¹	8.16 10 ⁻²
Hi	107	NR	85.9	79.7	71.5			
GZMB _{IM}								
Lo	128	101.0	81.7	69.1	61.8	5.38 10 ⁻¹	7.30 10 ⁻¹	7.16 10 ⁻¹
Hi	112	115.0	85.6	76.2	64.5			
CD45RO _{CT}								
Lo	25	43.0	69.7	41.8	32.5	2.53 10 ⁻⁴	2.92 10 ⁻³	2.25 10 ⁻³
Hi	218	NR	83.9	75.4	67.8			
CD45RO _{IM}								
Lo	121	101.0	80.1	64.2	56.5	1.22 10 ⁻¹	3.66 10 ⁻¹	4.33 10 ⁻¹
Hi	125	NR	84.2	79.4	70.8			
CD8 _{CT}								
Lo	85	65.3	74.8	56.1	50.2	6.00 10 ⁻⁵	1.09 10 ⁻⁴	1.03 10 ⁻⁴
Hi	193	NR	88.2	81	71.8			
CD8 _{IM}								
Lo	188	76.1	82.4	66.3	57	3.03 10 ⁻²	4.92 10 ⁻¹	4.20 10 ⁻¹
Hi	111	NR	86.8	81.2	73.7			
CD3 _{CT}								
Lo	69	35.5	69.5	47.6	40.1	2.51 10 ⁻⁷	1.65 10 ⁻⁵	1.47 10 ⁻⁵
Hi	209	NR	88.5	81.4	73.2			
CD3 _{IM}								
Lo	109	69.3	80.7	65	53.7	7.55 10 ⁻³	7.61 10 ⁻³	6.25 10 ⁻³
Hi	171	NR	85.9	78.7	71.7			
GZMB _{CT/IM}								
Lo/Lo	87	NR	83.2	69.2	63.3	8.29 10 ⁻²	5.30 10 ⁻¹	4.99 10 ⁻¹
Het	69	69.3	80.8	67.7	51.8			
Hi/Hi	58	NR	85.6	79.2	71.8			
CD45RO _{CT/IM}								
Lo/Lo	10	43.0	73.1	36.5	36.5	1.02 10 ⁻²	4.29 10 ⁻²	3.72 10 ⁻²
Het	110	87.3	80.1	67.3	56.3			
Hi/Hi	112	NR	85.2	80.6	71.8			
CD8 _{CT/IM}								
Lo/Lo	61	56.2	72.7	52.2	45.3	7.02 10 ⁻⁴	1.60 10 ⁻²	1.96 10 ⁻²
Het	76	111.4	88.6	77.3	65.1			
Hi/Hi	87	NR	86.7	81.1	73.6			
CD3 _{CT/IM}								
Lo/Lo	30	35.5	71.4	43.4	32.6	2.90 10 ⁻³	2.72 10 ⁻²	1.21 10 ⁻²
Het	95	72.1	76.6	64.6	54.8			
Hi/Hi	124	NR	90.8	85.9	73.6			

* Valor P de rango logarítmico, valor P mediano 100*CV rango logarítmico

^a Valor P mediana 100*CV rango logarítmico estratificado

NR: No alcanzado, Het: Hi/Lo y Lo/Hi

Tabla 18

Tabla S9: análisis de DFS para pacientes I, II, III de UICC-TNM según mediana de puntos de corte

Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS) para pacientes I, II, III de UICC-TNM						
	No. de pacientes	Meses mediana	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %	Valor P*
GZMB _{CT}						8.07 10 ⁻²
Lo	140	NR	77.8	68.1	68.1	
Hi	133	NR	84.8	80.6	80.6	
GZMB _{IM}						2.26 10 ⁻²
Lo	119	NR	74.7	69.1	69.1	
Hi	119	NR	87.9	81.5	81.5	
CD45RO _{CT}						2.27 10 ⁻¹
Lo	122	NR	76.5	70.7	70.7	
Hi	121	NR	84.1	75.9	75.9	
CD45RO _{IM}						1.96 10 ⁻²
Lo	124	NR	74.6	65.1	65.1	
Hi	122	NR	85.6	81.1	81.1	
CD8 _{CT}						6.53 10 ⁻⁴
Lo	139	NR	73.3	65.1	65.1	
Hi	139	NR	89.4	83.9	83.9	
CD8 _{IM}						3.99 10 ⁻²
Lo	125	NR	75.9	66.5	66.5	
Hi	124	NR	84.7	80.1	80.1	
CD3 _{CT}						4.48 10 ⁻⁴
Lo	139	NR	72.6	66.1	66.1	
Hi	139	NR	91.1	83.1	83.1	
CD3 _{IM}						4.42 10 ⁻⁴
Lo	138	NR	74.4	65.4	65.4	
Hi	136	NR	90.1	84.9	84.9	
GZMB _{CT/IM}						5.63 10 ⁻²
Lo/Lo	72	NR	69.4	61.9	61.9	
Het	74	NR	85.6	77.8	77.8	
Hi/Hi	68	NR	84.1	79.8	79.8	
CD45RO _{CT/IM}						6.94 10 ⁻²
Lo/Lo	71	NR	72.9	67.0	67.0	
Het	100	NR	79.4	68.9	68.9	
Hi/Hi	67	NR	87.6	85.6	85.6	
CD8 _{CT/IM}						3.36 10 ⁻³
Lo/Lo	80	100.3	66.8	57.8	57.8	
Het	65	NR	82.9	75.6	75.6	
Hi/Hi	79	NR	86.4	81.3	81.3	
CD3 _{CT/IM}						6.20 10 ⁻⁵
Lo/Lo	73	100.3	65.4	58.8	58.8	
Het	102	NR	82.4	73.1	73.1	
Hi/Hi	74	NR	94.2	89.1	89.1	

* Valor P de rango logarítmico para mediana de punto de corte

NR: No alcanzado, Het: Hi/Lo y Lo/Hi

Tabla 19**Tabla S10: análisis de OS para pacientes I, II, III de UICC-TNM según mediana de puntos de corte**

	No. de pacientes	Supervivencia Total (OS) para pacientes I, II, III de UICC-TNM				Valor P*
		Meses mediana	Tasa a 2 años %	Tasa a 4 años %	Tasa a 5 años %	
GZMB _{CT}						5.06 10 ⁻²
Lo	140	27.1	81.2	66.7	59.0	
Hi	133	NR	87.8	80.0	71.5	
GZMB _M						7.26 10 ⁻¹
Lo	119	30.4	83.3	70.2	62.5	
Hi	119	115.1	83.7	74.8	63.7	
CD45RO _{CT}						2.13 10 ⁻²
Lo	122	21.4	79.0	63.5	57.1	
Hi	121	NR	86.0	80.8	71.4	
CD45RO _M						1.31 10 ⁻¹
Lo	124	21.4	79.8	64.3	56.8	
Hi	122	NR	84.7	79.7	70.6	
CD8 _{CT}						8.49 10 ⁻³
Lo	139	24.8	82.5	63.9	55.7	
Hi	139	NR	85.9	82.9	74.6	
CD8 _M						7.20 10 ⁻²
Lo	125	30.0	84.2	67.6	57.3	
Hi	124	NR	84.6	78.5	71.8	
CD3 _{CT}						9.15 10 ⁻³
Lo	139	18.9	78.0	62.5	54.8	
Hi	139	NR	89.4	83.0	74.6	
CD3 _M						2.80 10 ⁻²
Lo	136	26.0	82.7	67.1	58.7	
Hi	136	NR	85.3	80.5	72.3	
GZMB _{CT/IM}						6.09 10 ⁻¹
Lo/Lo	72	111.4	82.6	66.9	63.3	
Het	74	76.1	82.3	72.3	54.7	
Hi/Hi	68	115.1	84.5	75.5	69.2	
CD45RO _{CT/IM}						2.48 10 ⁻²
Lo/Lo	71	87.3	78.4	59.2	55.8	
Het	100	74.2	81.1	71.1	58.1	
Hi/Hi	67	NR	87.7	85.7	79.9	
CD8 _{CT/IM}						1.56 10 ⁻²
Lo/Lo	80	59.6	79.3	60.4	49.6	
Het	65	NR	88.5	73.4	64.1	
Hi/Hi	79	NR	83.7	82.2	75.5	
CD3 _{CT/IM}						5.35 10 ⁻³
Lo/Lo	73	59.6	76.0	57.1	48.4	
Het	102	78.8	82.9	73.6	65.0	
Hi/Hi	74	NR	90.3	87.1	78.8	

* Valor P de rango logarítmico para mediana de punto de corte

NR: No alcanzado, Het: Hi/Lo y Lo/Hi

Tablas 20 (S11) y 21 (S12)

Tabla S11a: análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial para DFS en pacientes I, II, III de UICC-TNM según punto de corte de valor P mínimo

Variables	Relación de riesgos	IC 95%	Valor P
Estado T	1,5724	{1,029-2,26}	0,02
Estado N ⁴	1,3283	{0,829-2,151}	0,21
Diferenciación	0,77	{0,42-1,43}	0,44
Patrones CD3 ⁺ CD3 _M	2,3914	{1,60-3,41}	1,410 ⁵
	2,3794	{1,67-3,38}	

* Punto de corte de valor P mínimo con 3 grupos (HHI, Lolo, Hei)

⁴ Método "dejar uno fuera", corrección usando $C=1-\frac{1}{\sum_{i=1}^k \frac{1}{n_i}}$; $\chi^2 = 0,3942654$ (factor de contracción heurístico, Hollander et al). Resultados similares obtenidos usando `bootstrapp`

⁵ Nota: N viola la asunción de riesgos proporcionales. Se realizó un modelo de estratificación por este factor y $CD3^+CD3_M$ permaneció como un factor de pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad. Valores P del modelo estratificado:

T=0,032; Df=0,22; $CD3^+CD3_M=0,4210^5$,
 HR del modelo estratificado: T=1,5724(1,30-1,95); Df=0,728(0,39-1,37);
 $CD3^+CD3_M=2,451(1,71-3,51)$; Factor de contracción: $c=0,9533$

Tabla S11c: análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial para DFS en pacientes I, II, III de UICC-TNM según mediana de punto de corte

Variables	Relación de riesgos	IC 95%	Valor P
Estado T	1,562	{1,074-2,26}	0,02
Estado N	1,492	{0,882-2,53}	0,14
Diferenciación	1,2282	{0,683-2,45}	0,43
Patrones CD3 ⁺ CD3 _M	1,872	{1,311-2,66}	5,510 ⁴

⁵ punto de corte en la mediana, con 3 grupos (HHI, Lolo, Hei)

Tabla S12a: análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial para OS en pacientes I, II, III de UICC-TNM según punto de corte de valor P mínimo

Variables	Relación de riesgos	IC 95%	Valor P
Estado T	1,172	{0,90-1,52}	0,25
Estado N	1,372	{0,90-2,11}	0,15
Diferenciación	1,052	{0,58-1,92}	0,84
Patrones CD3 ⁺ CD3 _M	1,852	{1,42-2,51}	1,210 ⁵

* Punto de corte de valor P mínimo con 3 grupos (HHI, Lolo, Hei)

Tabla S12c: análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial para OS en pacientes I, II, III de UICC-TNM según mediana de punto de corte

Variables	Relación de riesgos	IC 95%	Valor P
Estado T	1,292	{0,912-1,87}	0,20
Estado N	1,482	{0,948-2,22}	0,09
Diferenciación	1,082	{0,639-1,88}	0,75
Patrones CD3 ⁺ CD3 _M	1,482	{1,107-1,92}	7,210 ⁴

⁵ punto de corte en la mediana, con 3 grupos (HHI, Lolo, Hei)

Tabla S11b: análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial para DFS en pacientes I, II, III de UICC-TNM según punto de corte de valor P mínimo

Variables	Relación de riesgos	IC 95%	Valor P
Estado T	1,372	{0,92-2,12}	0,19
Estado N ⁴	1,212	{0,50-2,47}	0,38
Diferenciación	1,022	{0,50-2,08}	0,97
Patrones CD3 ⁺ CD3 _M	5,2694	{2,96-12,93}	1,310 ⁵
	5,9404	{2,83-12,42}	

* Punto de corte de valor P mínimo con 2 grupos (HHI, Lolo)

⁴ Método "dejar uno fuera", corrección usando $C=1-\frac{1}{\sum_{i=1}^k \frac{1}{n_i}}$; $\chi^2 = 0,972126$ (factor de contracción heurístico, Hollander et al). Resultados similares obtenidos usando `bootstrapp`

⁵ Nota: N viola la asunción de riesgos proporcionales. Se realizó un modelo de estratificación por este factor y $CD3^+CD3_M$ permaneció como un factor de pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad. Valores P del modelo estratificado:

T=0,032; Df=0,97; $CD3^+CD3_M=1,3210^5$,
 HR del modelo estratificado: T=1,408(0,88-2,26); Df=0,986(0,48-2,02);
 $CD3^+CD3_M=6,322(2,99-13,35)$; Factor de contracción: $c=0,9572$

Tabla S11d: análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial para DFS en pacientes I, II, III de UICC-TNM según mediana de punto de corte

Variables	Relación de riesgos	IC 95%	Valor P
Estado T	1,484	{0,92-2,30}	0,38
Estado N	2,065	{0,736-5,80}	0,17
Diferenciación	1,532	{0,571-4,11}	0,40
Patrones CD3 ⁺ CD3 _M	4,626	{1,736-12,33}	2,210 ⁵

⁵ punto de corte en la mediana con 2 grupos (HHI, Lolo)

Tabla S12b: análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial para OS en pacientes I, II, III de UICC-TNM según punto de corte de valor P mínimo

Variables	Relación de riesgos	IC 95%	Valor P
Estado T	0,982	{0,69-1,39}	0,91
Estado N	1,372	{0,75-2,52}	0,31
Diferenciación	1,592	{0,97-2,61}	0,07
Patrones CD3 ⁺ CD3 _M	3,712	{1,97-6,97}	4,710 ⁵

* Punto de corte de valor P mínimo con 2 grupos (HHI, Lolo)

Tabla S12d: análisis de riesgos proporcionales de Cox multifactorial para OS en pacientes I, II, III de UICC-TNM según mediana de punto de corte

Variables	Relación de riesgos	IC 95%	Valor P
Estado T	1,282	{0,918-1,86}	0,40
Estado N	1,248	{0,686-2,13}	0,47
Diferenciación	1,482	{0,982-2,45}	0,12
Patrones CD3 ⁺ CD3 _M	2,202	{1,219-3,97}	8,810 ⁴

⁵ punto de corte en la mediana con 2 grupos (HHI, Lolo)

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el pronóstico de pacientes para la progresión de un cáncer, método que comprende las etapas siguientes:

5 a) cuantificar, en una muestra de tejido tumoral de dicho paciente, al menos dos marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmune adaptativa de dicho paciente frente al cáncer; y

b) comparar el valor obtenido en la etapa a) para dichos al menos dos marcadores biológicos con un valor de referencia predeterminado para los mismos marcadores biológicos; valor de referencia predeterminado que se correlaciona con un pronóstico específico de progresión de dicho cáncer,

10 en donde dichos al menos dos marcadores biológicos comprenden PDCD1LG1 y CXCL9.

2. El método *in vitro* según la reivindicación 1, en donde dicha muestra de tejido tumoral se selecciona del grupo que consiste en (i) un tumor primario global, (ii) una muestra de tejido del centro del tumor, (iii) una muestra de tejido del tejido que rodea directamente el tumor, tejido que puede denominarse más específicamente el "margen invasivo" del tumor, (iv) los ganglios linfáticos localizados muy cerca del tumor, (v) una biopsia tumoral realizada antes de la cirugía
15 y (vi) una metástasis distante.

3. El método *in vitro* según la reivindicación 1, en donde la etapa a) consiste en cuantificar dichos al menos dos marcadores biológicos por análisis de la expresión génica en una muestra de tejido tumoral total.

4. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer adrenocortical, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos,
20 cáncer de cerebro y sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer laríngeo e hipofaríngeo, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de seno de la cavidad nasal y paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma,
25 rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salivar, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer tiroideo, cáncer vaginal, cáncer vulvar, y cáncer uterino.

5. El método *in vitro* según la reivindicación 4 en donde el cáncer es cáncer colorrectal.

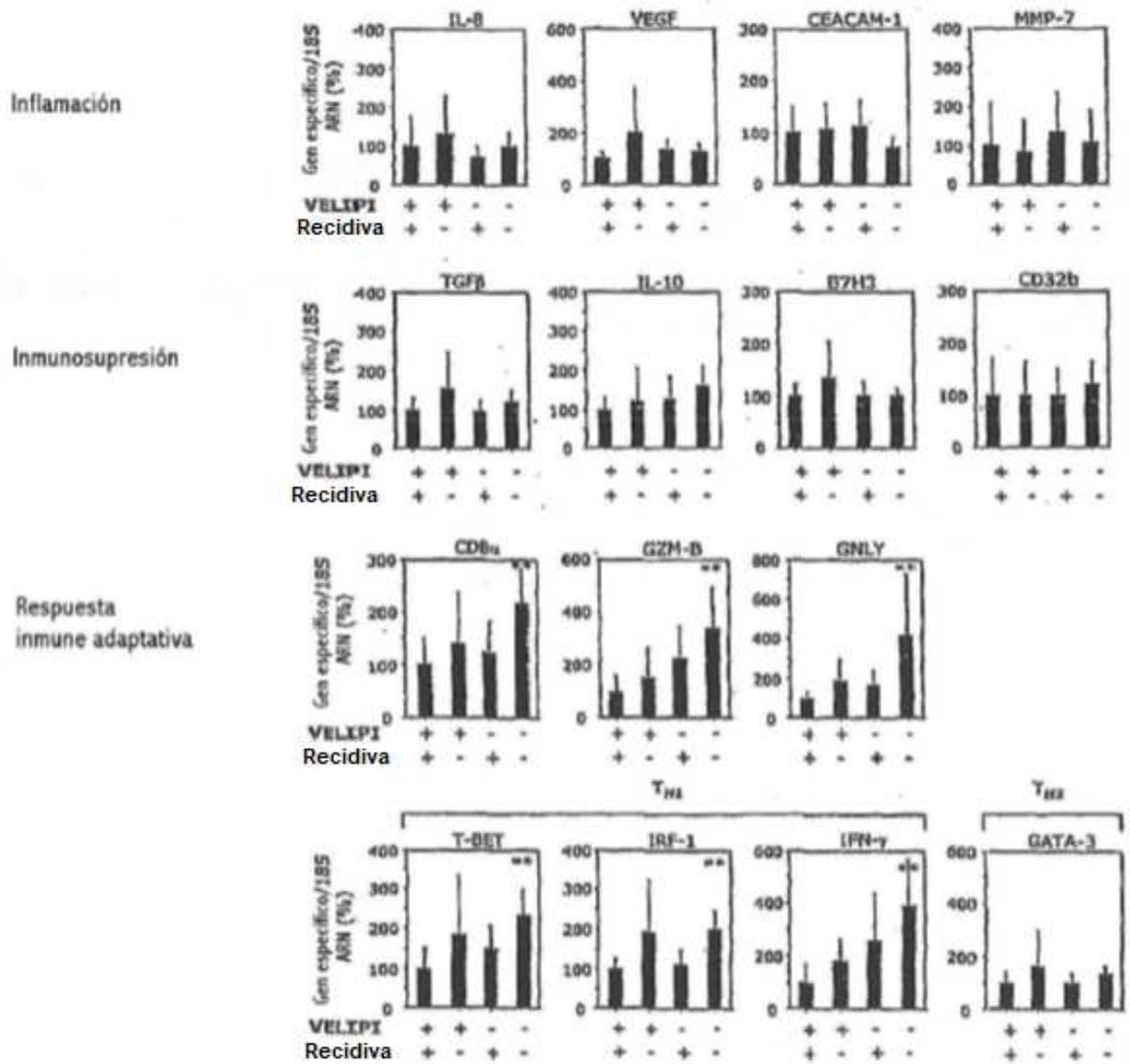


FIGURA 1

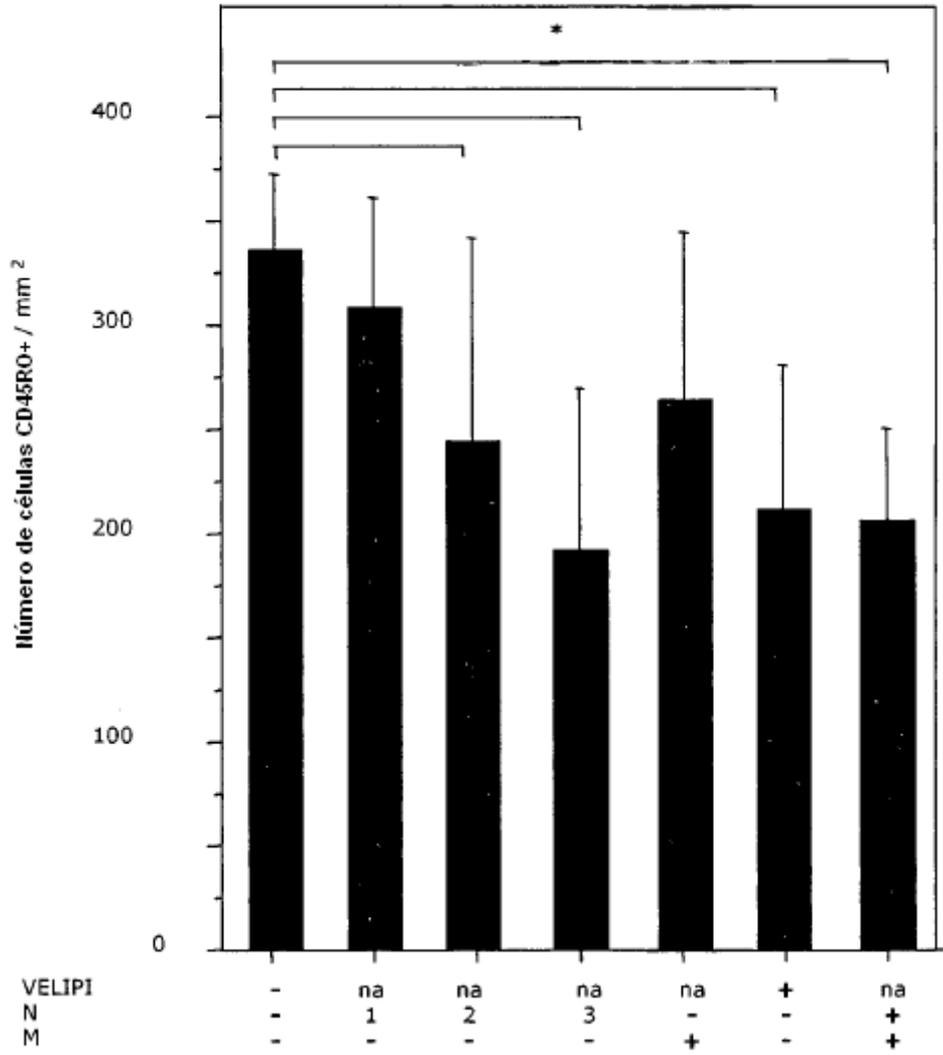


FIGURA 2

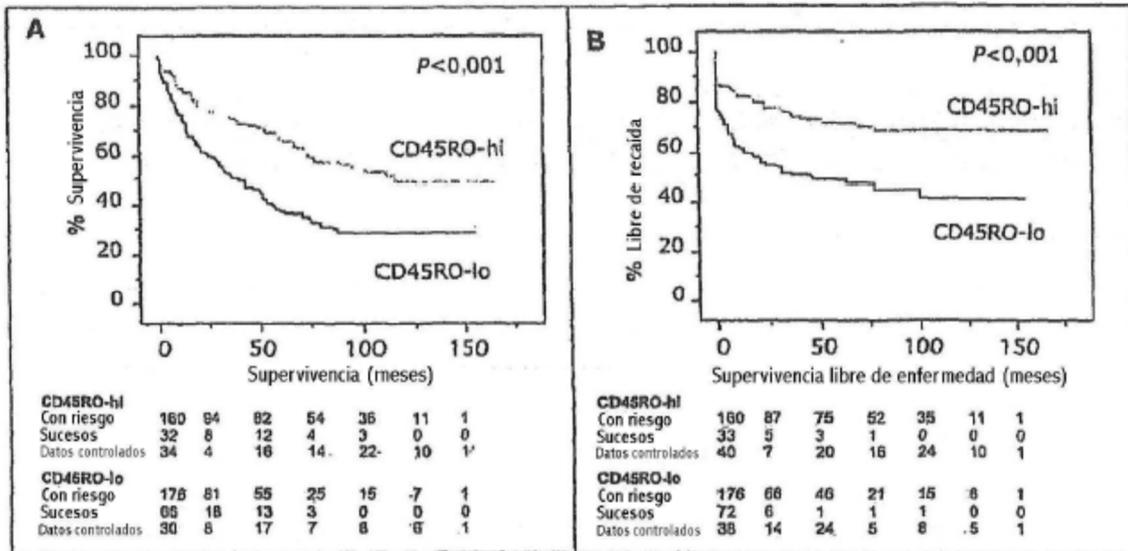


FIGURA 3

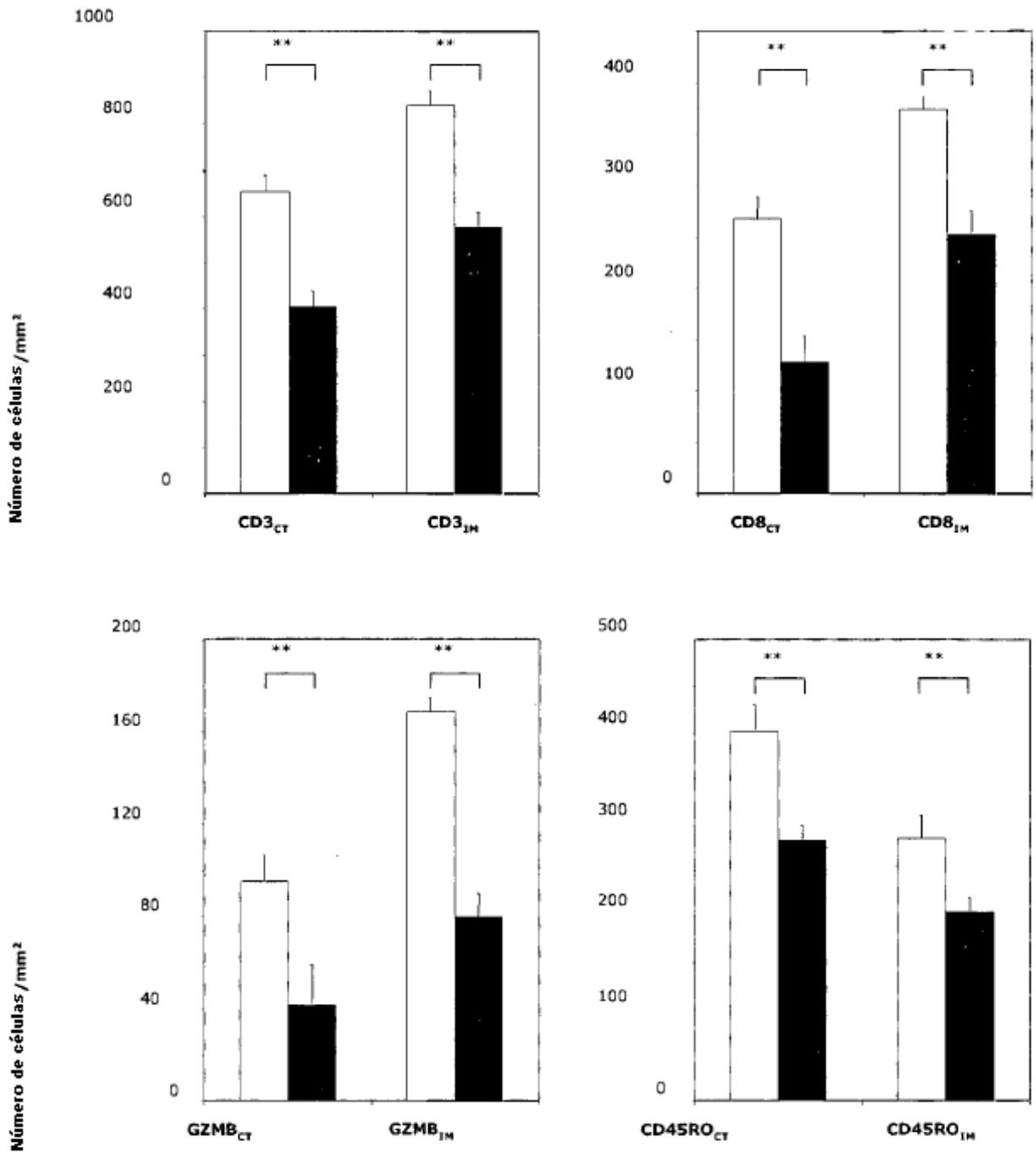


FIGURA 4

C

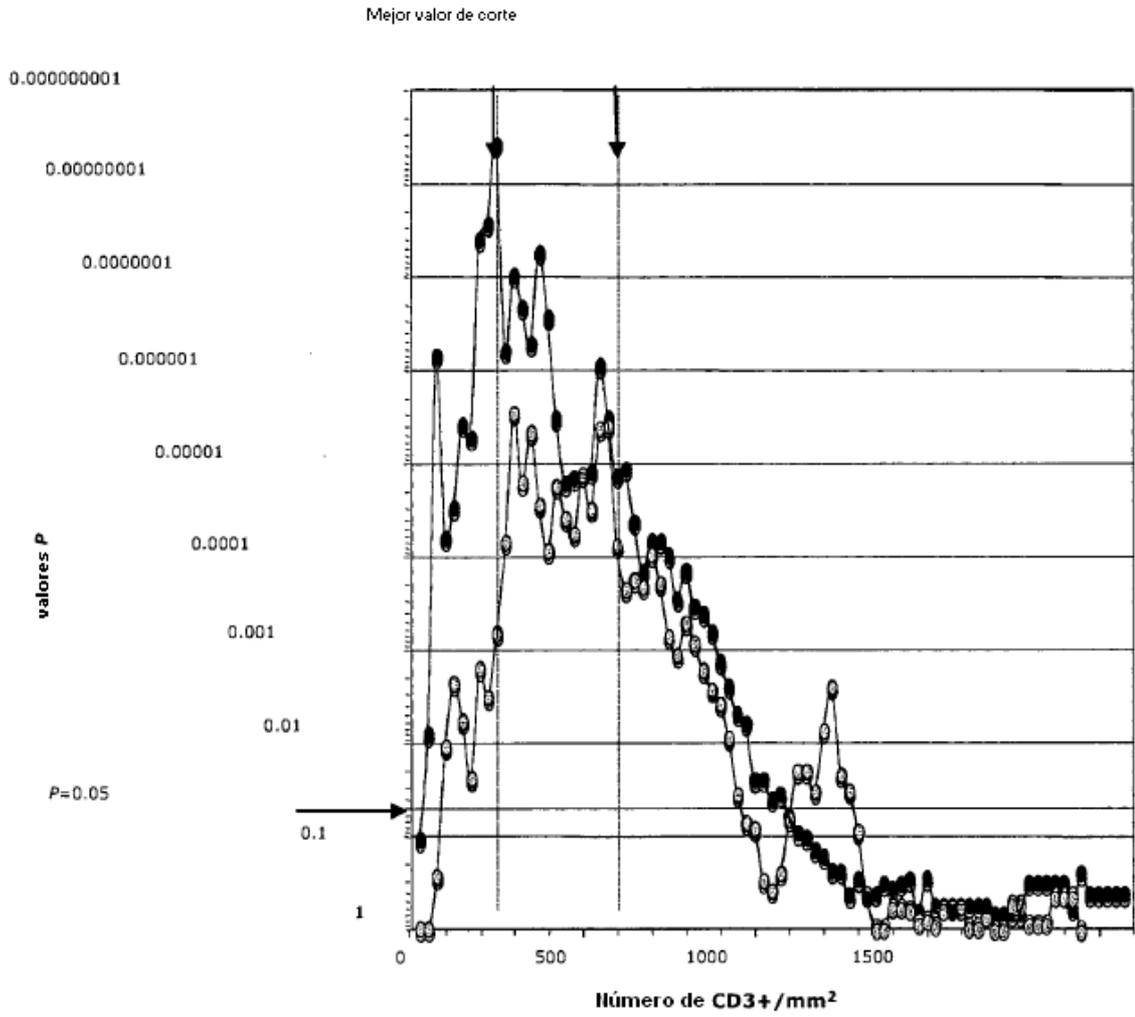


FIGURA 5

Análisis de una región única

valores *P*

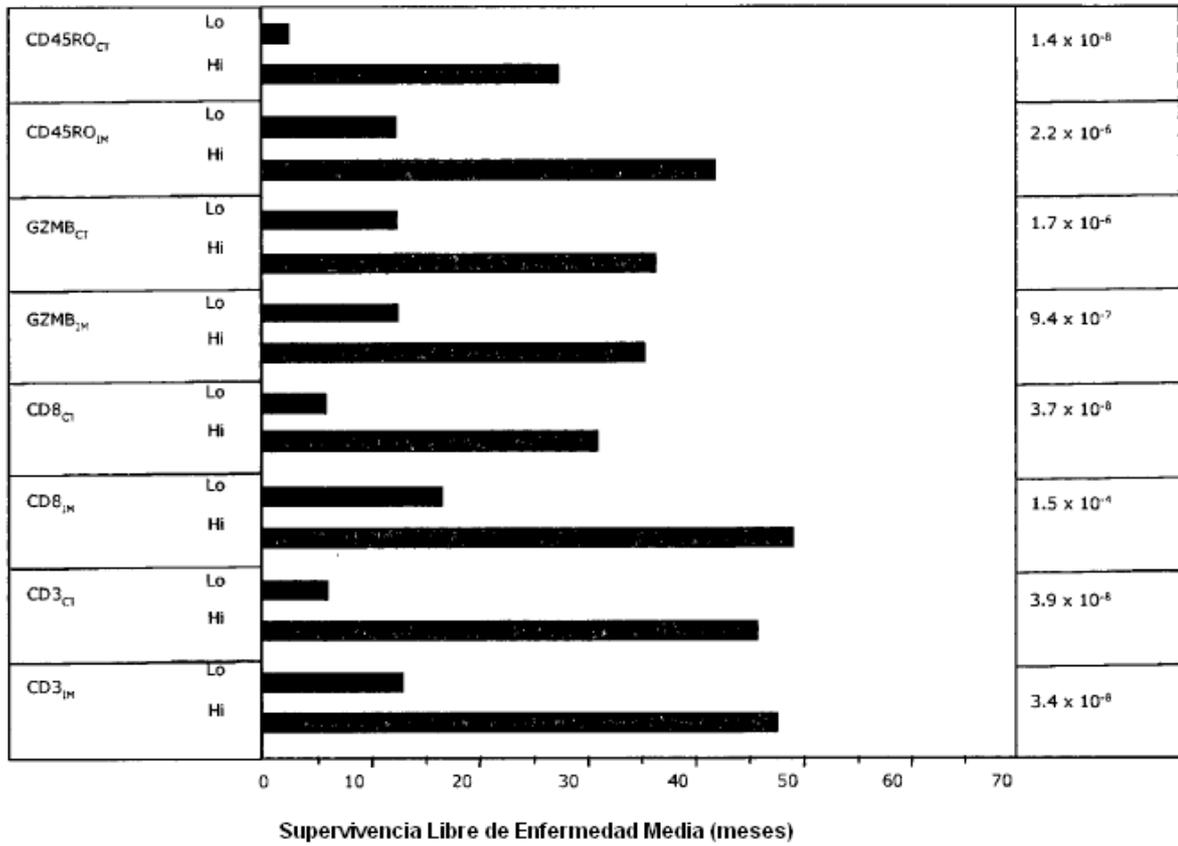


FIGURA 6

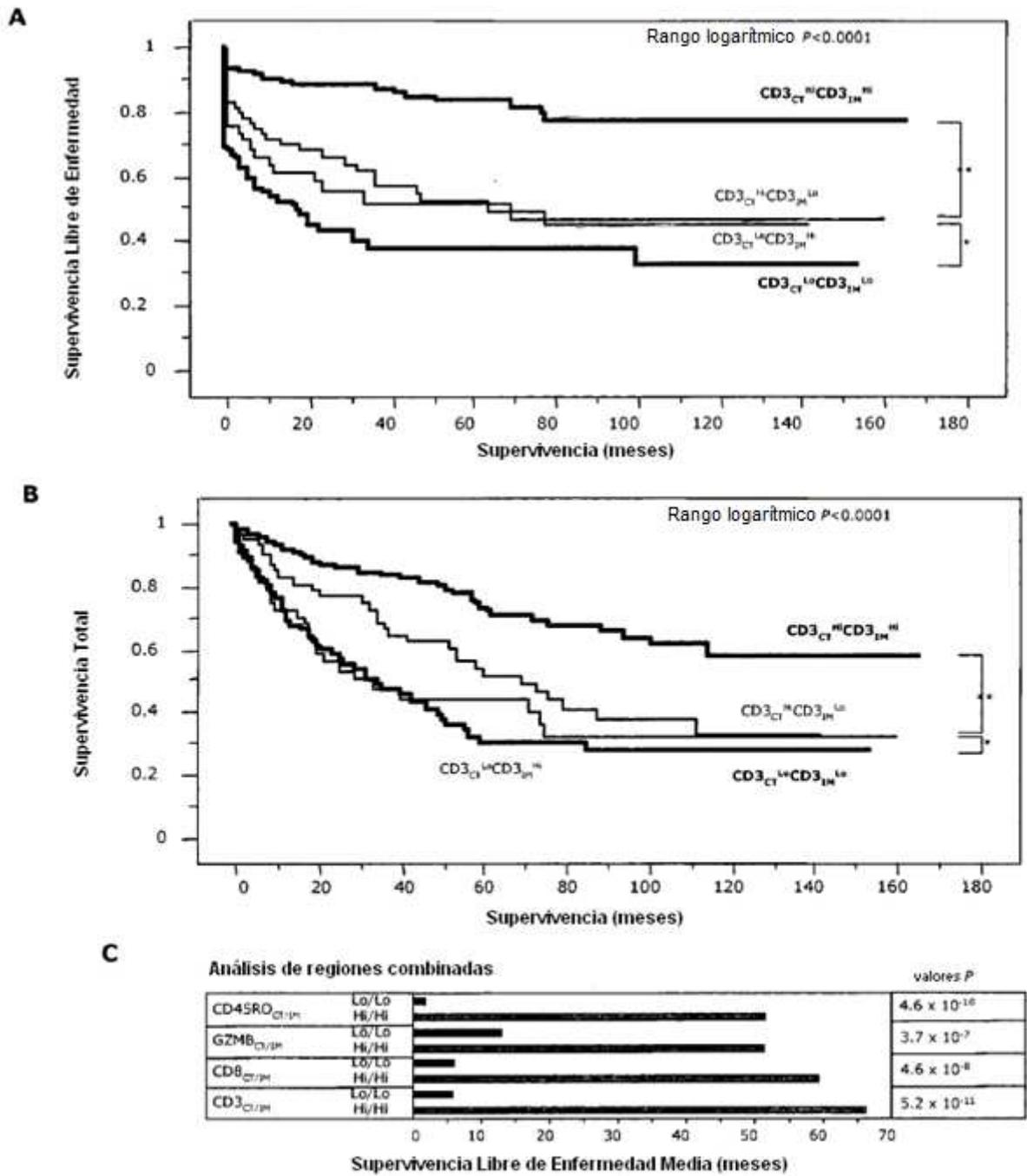


FIGURA 7

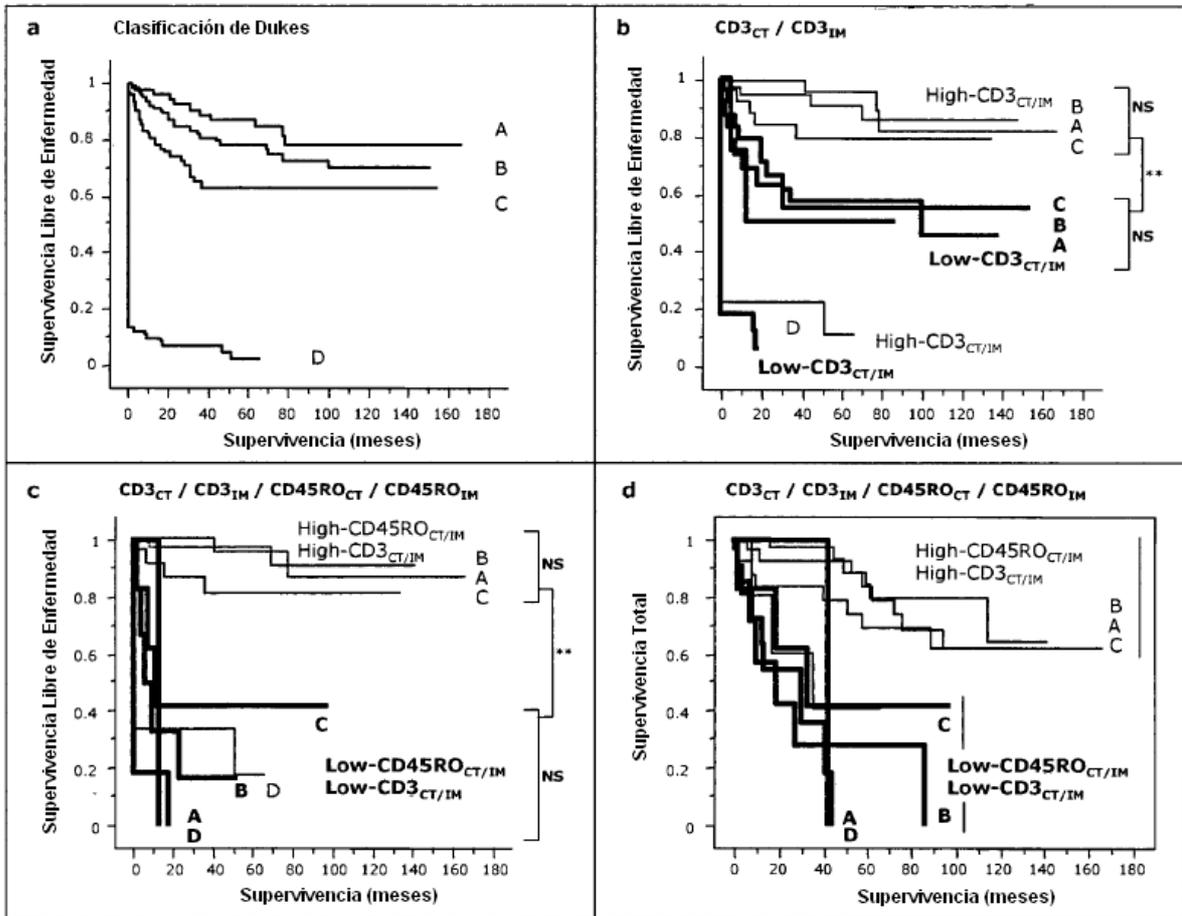
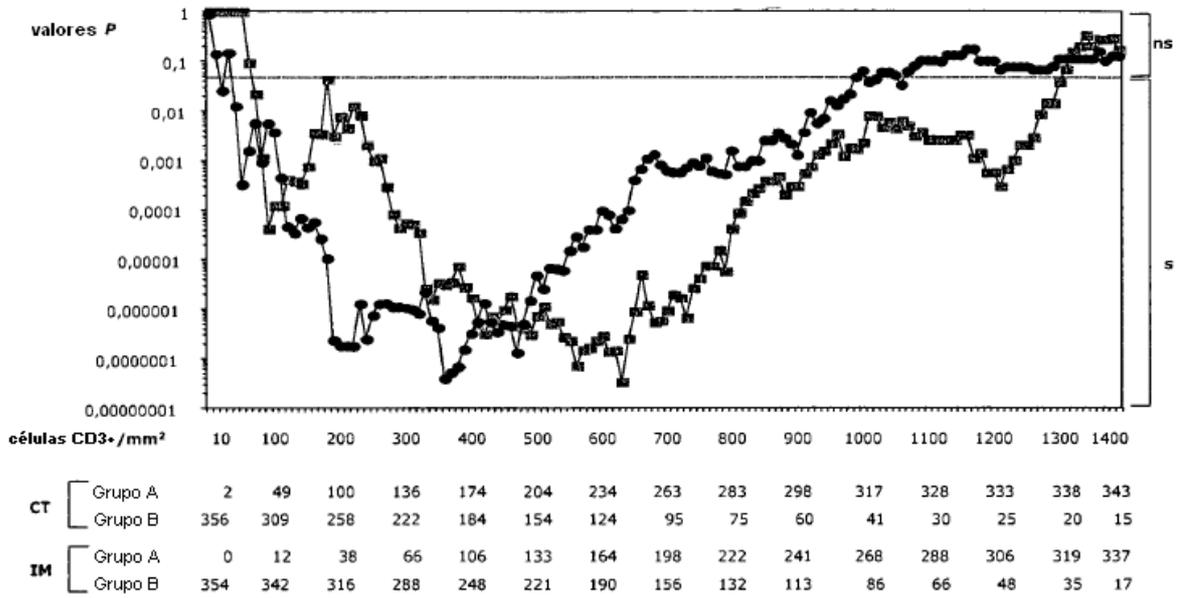
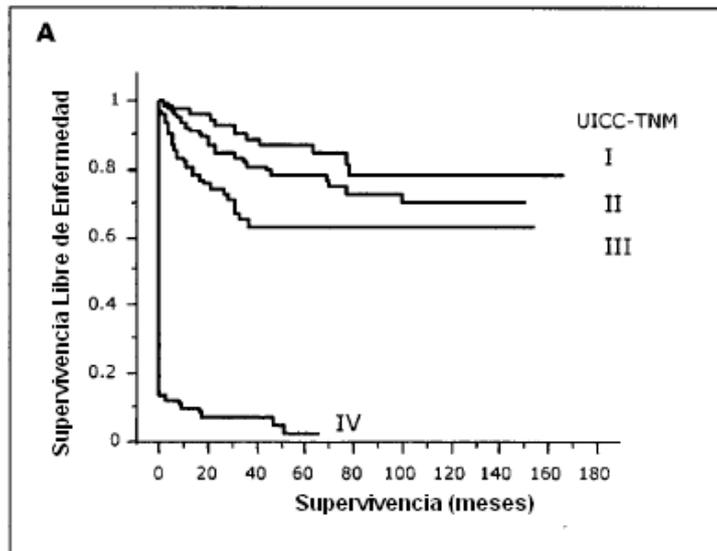


FIGURA 8

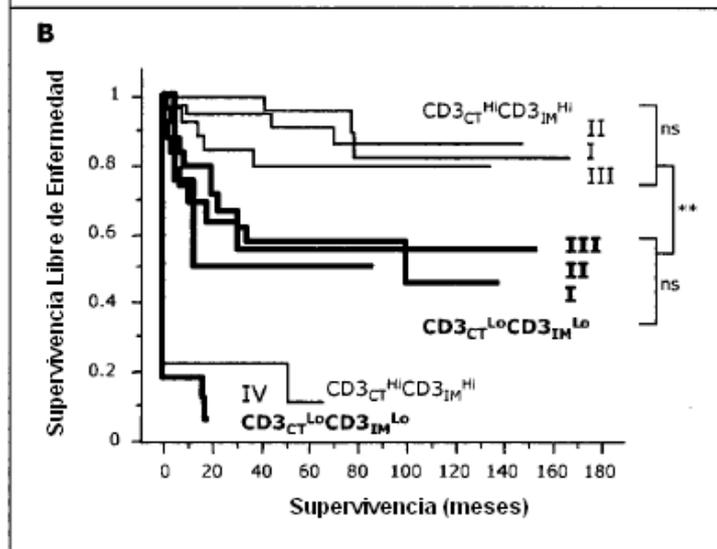
FIGURA 9



Histopatología del tumor
Sistema de estadificación UICC-TNM



Células inmunes infiltrantes de tumor
Evaluación $CD3_{CT}CD3_{IM}$



Evaluación $CD3_{CT}CD3_{IM}$
más
Evaluación $CD45RO_{CT}CD45RO_{IM}$

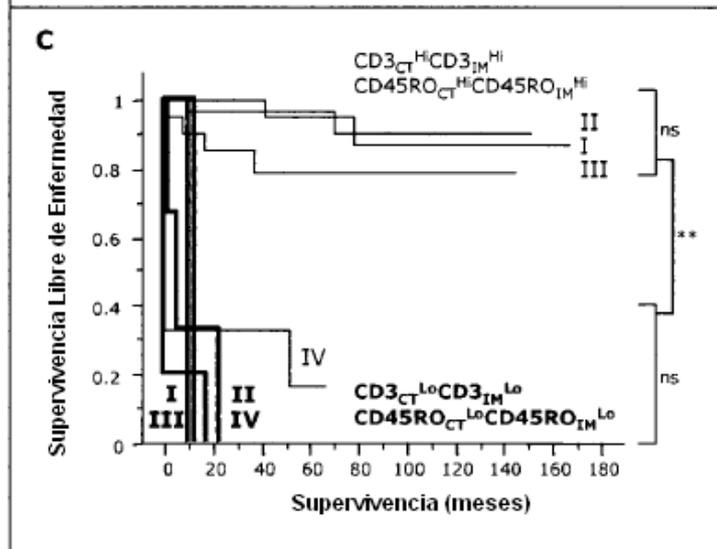


Figura 10

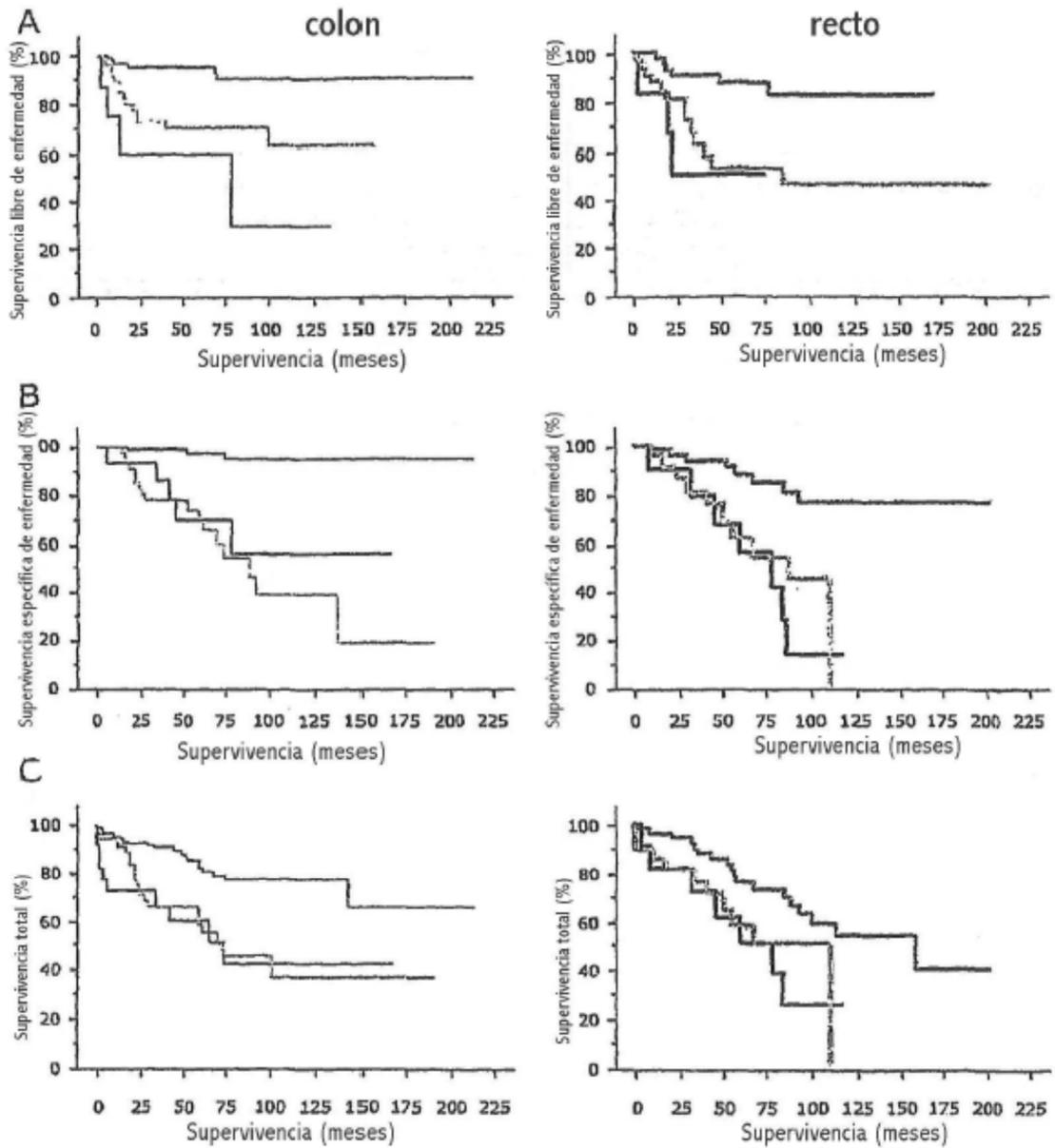


Figura 11

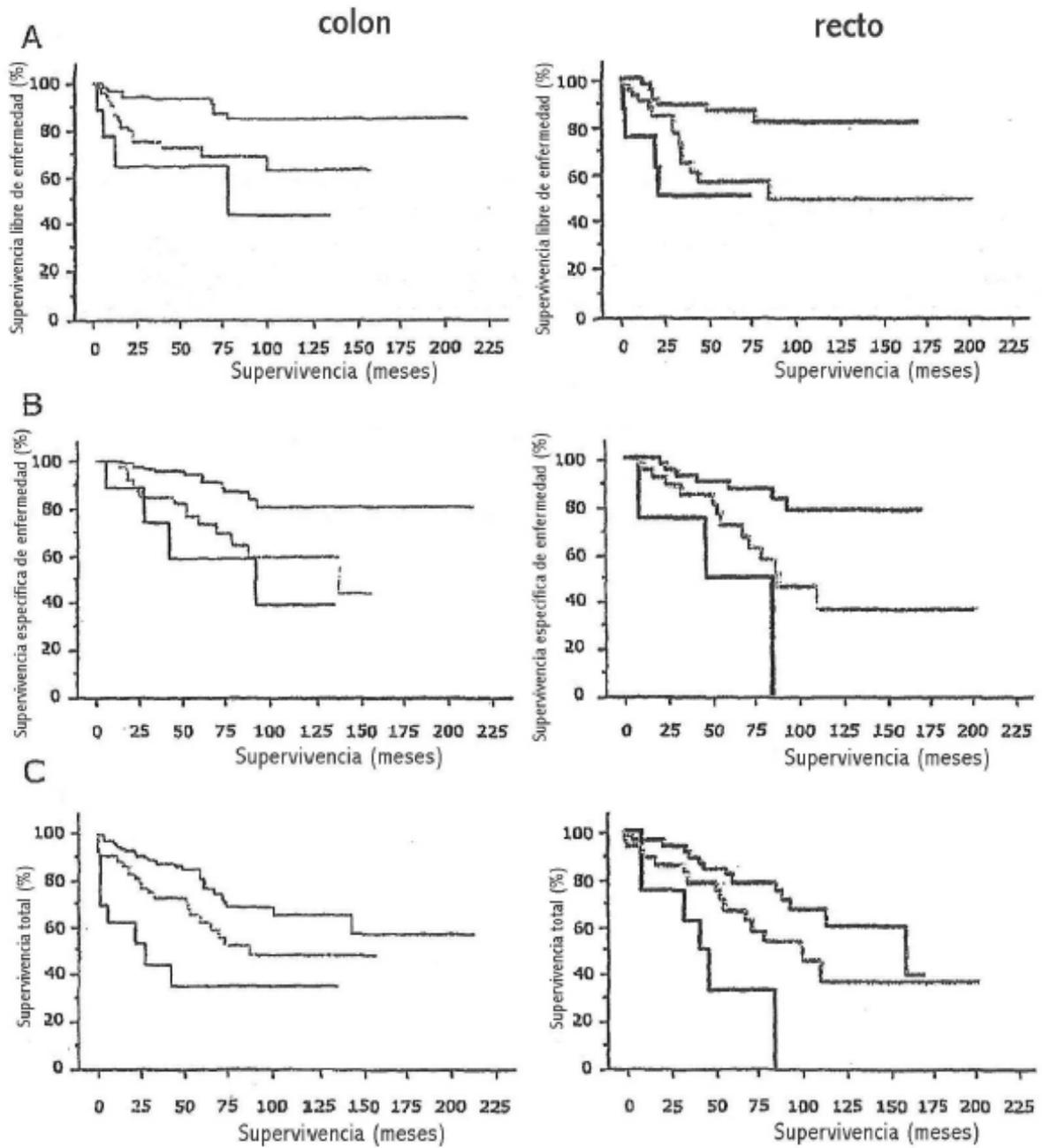


Figura 12

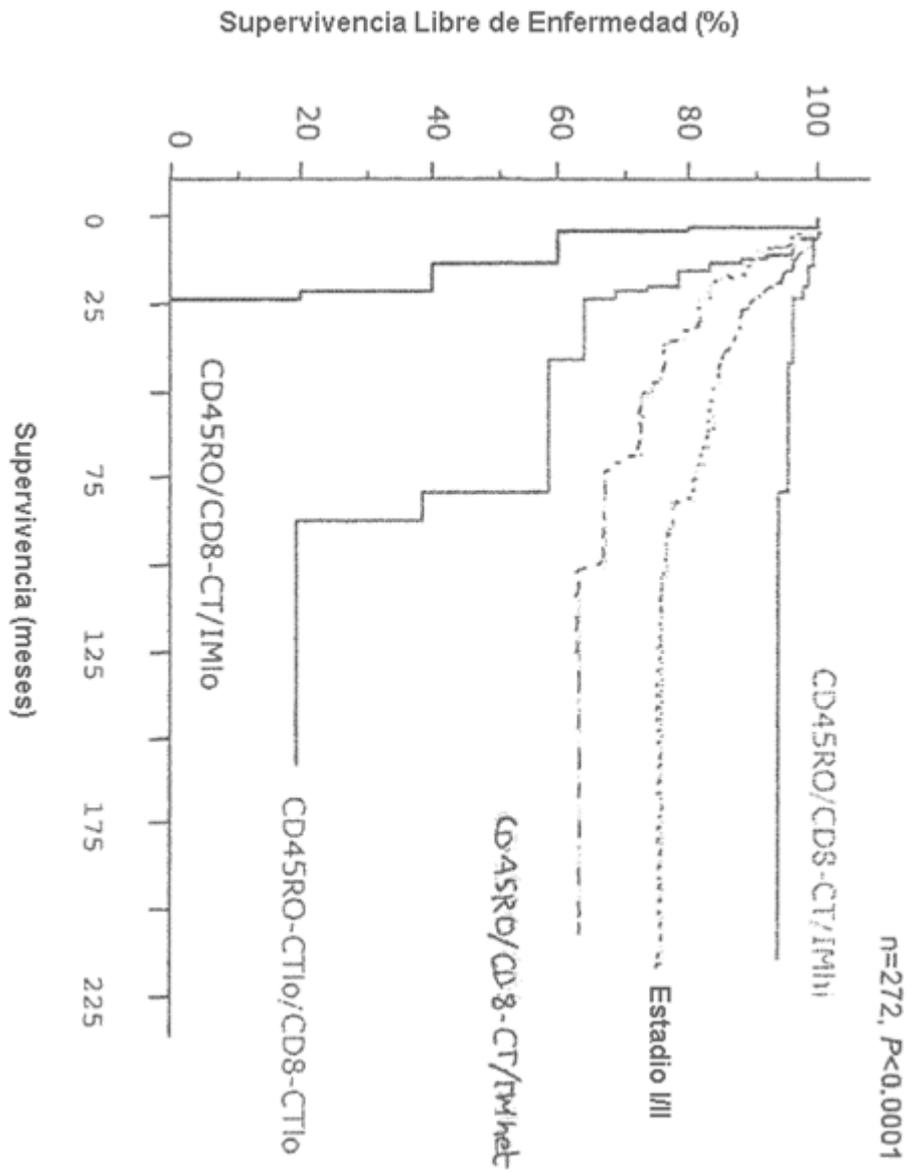


FIGURA 13

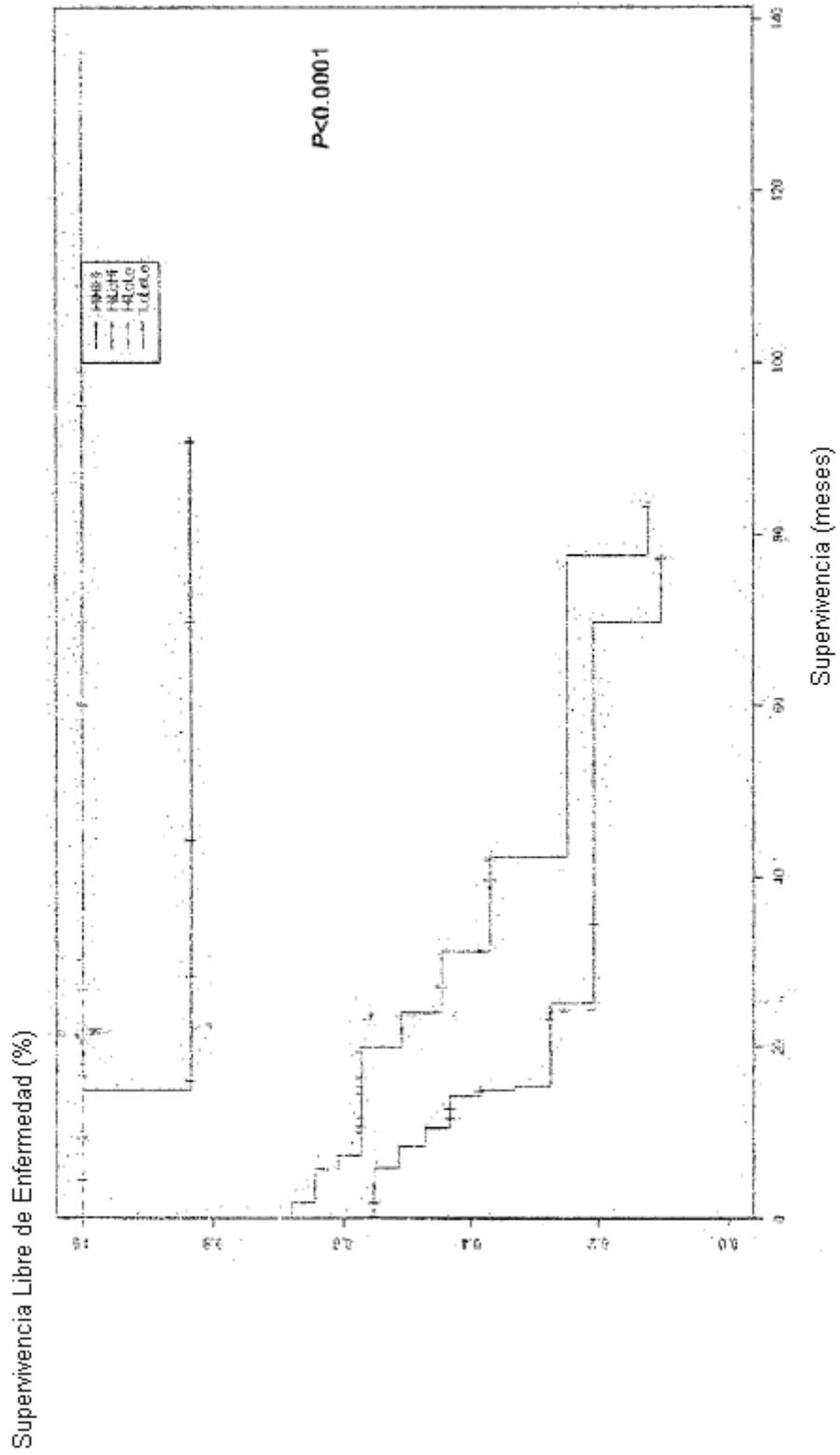


FIGURA 14