

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 625**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2011 PCT/EP2011/004710**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12038068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011 E 11773381 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2619576**

54 Título: **Medios y métodos para la predicción de la respuesta a un tratamiento de un paciente con cáncer**

30 Prioridad:

24.09.2010 EP 10010537

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

05.04.2021

73 Titular/es:

GRABE, NIELS (25.0%)

Neckarstrasse 1

69493 Hirschberg, DE;

HALAMA, NIELS, DR. (25.0%);

JÄGER, DIRK (25.0%) y

ZÖRNIG, INKA (25.0%)

72 Inventor/es:

GRABE, NIELS;

HALAMA, NIELS, DR.;

JÄGER, DIRK y

ZÖRNIG, INKA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 816 625 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

Medios y métodos para la predicción de la respuesta a un tratamiento de un paciente con cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la predicción de la eficacia de un tratamiento en pacientes con enfermedades malignas.

10 De manera más precisa, esta invención se refiere a la predicción de la eficacia de un tratamiento en pacientes con cáncer, basada en la cuantificación precisa de varios marcadores biológicos que están relacionados con la respuesta inmunitaria innata y adaptativa de dicho paciente frente a dicho cáncer.

15 Antecedentes de la invención

Los estadios avanzados del cáncer representan un problema médico terapéutico desafiante con un mal pronóstico para el paciente. Estos pacientes a menudo requieren múltiples tratamientos médicos e intervenciones y, en la mayoría de los casos, el tratamiento es puramente empírico. A medida que aumentan los costes del tratamiento con terapias novedosas, la necesidad de herramientas de diagnóstico fiables para guiar las decisiones de tratamiento es primordial. Puesto que el cáncer es la segunda causa principal de muerte en el mundo occidental y en las sociedades en proceso de envejecimiento donde el cáncer se vuelve más prevalente, se están invirtiendo grandes esfuerzos y recursos financieros en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos y de diagnóstico. Sin embargo, la etapa esencial para la multitud de nuevas terapias disponibles es la selección eficaz de pacientes para una quimioterapia adecuada. En la actualidad, la mayoría de los marcadores actualmente conocidos de la eficacia de la quimioterapia son poco fiables.

25 La clasificación convencional de los tumores malignos se basa en el sistema TGM. El sistema de clasificación TGM (para "Tumor-Ganglio-Metástasis") utiliza el tamaño del tumor, la presencia o ausencia de tumor en los 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). Utilizando este sistema, el estadio asignado constituye la base para la selección de la terapia apropiada y también con fines de pronóstico. Específicamente, en los cánceres colorrectales, el sistema TGM permite distinguir entre (T) el grado de invasión de la pared intestinal, que varía de T0 a T4, (G) el grado de afectación de los ganglios linfáticos, que varía de G0 a G3 y (M) el grado de metástasis, que varía de M0 a M1.

35 Las clasificaciones clínicas anteriores son útiles en la situación clínica, pero son completamente imperfectas para predecir el resultado de la terapia prevista.

Hasta ahora no se ha propuesto que la presencia, o el nivel de expresión de varios marcadores biológicos de la respuesta inmunitaria del huésped junto con la aparición de un cáncer en un estadio dado del desarrollo del cáncer estuviera asociado con la respuesta general al tratamiento (es decir, eficacia del tratamiento). Para las estrategias inmunoterapéuticas, se asumió esta asociación de una respuesta inmunitaria preexistente con una mejor eficacia terapéutica (véase a continuación). Para la quimioterapia, la radioterapia y otras formas de intervención farmacológica, no se ha demostrado esta asociación.

45 Por tanto, no existe ningún informe de métodos fiables de predicción del pronóstico del cáncer que utilicen exclusivamente marcadores biológicos de la respuesta inmunitaria del huésped para estimar la eficacia de la quimioterapia. Tampoco existe un método fiable para la predicción del resultado del tratamiento en pacientes con cáncer.

50 El documento WO 2007/045996 A1 se refiere al pronóstico del resultado de un cáncer en el paciente, cuyo pronóstico se basa en la cuantificación de uno o varios marcadores biológicos que son indicativos del nivel de la respuesta inmunitaria adaptativa de dicho paciente frente a ese cáncer. El método de predicción se basa en la determinación manual del número de células inmunitarias en muestras de tumores.

55 Morris *et al.* (2008, Clin Cancer Res., vol 14: 1413-1417) utilizaron un análisis en el entorno del tratamiento adyuvante para afirmar que los linfocitos infiltrados en el tumor y la perforación en el cáncer de colon predicen una respuesta positiva a la quimioterapia con 5-fluorouracilo. Esto, sin embargo, no se puede concluir a partir de los datos, puesto que los autores solo analizaron la situación del tratamiento adyuvante (lo cual equivale a una situación donde los pacientes no tienen células tumorales o solo unas pocas células tumorales en su cuerpo, lo que hace que la relación entre la actividad inmunitaria y el tumor sea imposible de comprobar), por lo que no está claro cómo la respuesta inmunitaria adaptativa influye en el resultado de la quimioterapia a la luz de solo la quimioterapia a corto plazo y los largos periodos de seguimiento.

65 Halama *et al.* (2009, Cancer Immunity Vol. 9:1-6) se refieren a la localización y determinación de la densidad de los linfocitos infiltrados en el tumor (LIT) en tumores primarios de cáncer colorrectal metastásico humano y una posible asociación con la respuesta del paciente a una terapia contra el cáncer. El número de LIT se determina en pequeñas

secciones de área seleccionadas arbitrariamente del tumor primario sin los medios técnicos descritos en la patente.

El documento US 2005/0260646 A1 se refiere al pronóstico del cáncer, en particular la respuesta a la quimioterapia, basada en la expresión de ciertos conjuntos de genes, incluyendo FHIT; MTA1; ErbB4; FUS; BBC3; IGF1R; CD9 y otros. Se determina o bien el transcrito de ARN o bien el producto de la expresión de los genes. Por tanto, no se hace ninguna relación entre la respuesta inmunitaria del huésped y el tratamiento.

Además, no existe, hoy en día, un marcador fiable disponible que permita la predicción del resultado del tratamiento en todas las entidades cancerosas investigadas. Esto también es cierto para los enfoques inmunoterapéuticos, donde tampoco se dispone de un buen factor predictivo del resultado del tratamiento.

Principalmente, la disponibilidad de métodos de predicción mejorados permitiría una mejor selección de pacientes para tratamientos terapéuticos apropiados, especialmente en la situación de un tratamiento paliativo. Otras intervenciones terapéuticas importantes que podrían mejorarse mediante una mejor selección de pacientes son las inmunoterapias. Las inmunoterapias son todas las terapias que modifican bien directa o indirectamente la respuesta inmunitaria o bien el sistema inmunitario de un paciente. Para numerosos cánceres, incluidos los cánceres colorrectales, la selección de un tratamiento terapéutico apropiado es hoy puramente empírico. El 55 % de los pacientes con cáncer colorrectal que se someten a un tratamiento paliativo de quimioterapia tienen una respuesta a la quimioterapia. El resto de estos pacientes solo experimenta efectos secundarios de la terapia. El estado de la mutación genómica para KRAS es el único marcador predictivo de un régimen de tratamiento basado en anticuerpos, según lo notificado por Moroni *et al.* (2005, Lancet Oncol, vol 6: 279-86). Por tanto, el tratamiento guiado conduciría a mejores resultados mediante la reducción de la toxicidad y la reducción de efectos secundarios innecesarios.

Sumario de la invención

Por tanto, en vista del estado de la técnica, existe una necesidad de medios y métodos para predecir la respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer, incluidos los cánceres colorrectales, que sean más precisos y más fiables que los métodos disponibles en este momento, que son esencialmente, si no exclusivamente, métodos de estadificación clínicopatológica o datos genómicos. Por consiguiente, el problema técnico de la presente invención es, por lo tanto, cumplir con la necesidad establecida en la técnica anterior.

La presente invención aborda esta necesidad y, por tanto, proporciona como solución al problema técnico realizaciones relativas a los medios y métodos para predecir la respuesta de un paciente a la quimioterapia. Estas realizaciones se reflejan en las reivindicaciones y se describen en detalle en el presente documento.

En particular, la presente invención proporciona un método novedoso para la predicción de la eficacia del tratamiento en un paciente con cáncer. De manera más específica, la presente invención proporciona medios y métodos para predecir una respuesta potencial de un paciente con cáncer a la quimioterapia. Este método novedoso se basa en la detección y/o la cuantificación, en el sitio del tumor, de uno o más marcadores biológicos indicativos de la presencia o, alternativamente, del nivel de (presencia de) (células o) la respuesta inmunitaria adaptativa e innata de dicho paciente frente a dicho cáncer.

De manera más específica, se ha descubierto de manera sorprendente que una determinación precisa de una respuesta inmunitaria in situ de un paciente a los cánceres, y especialmente a los cánceres colorrectales, puede utilizarse como un parámetro para predecir la respuesta clínica posterior al tratamiento, independientemente del grado de invasión del tumor local y diseminación a los ganglios linfáticos regionales o el régimen de tratamiento administrado. Dicho tratamiento también puede comprender inmunoterapia adoptiva en la que los propios glóbulos blancos de un individuo se acoplan con un factor de crecimiento producido naturalmente para mejorar su capacidad de lucha contra el cáncer.

En concreto, en sus investigaciones, los presentes inventores descubrieron que la cuantificación inmunohistoquímica de células inmunitarias en una sección de tejido tumoral, en particular, mediante tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos mediante el uso de al menos un marcador biológico que es indicativo de la respuesta inmunitaria de un paciente contra el cáncer es potencialmente predictiva de la respuesta del paciente a la quimioterapia. Específicamente, una comparación del valor de cuantificación con un valor de referencia predeterminado de dicho marcador biológico puede indicar potencialmente si un paciente puede o no responder a la quimioterapia. De hecho, un valor superior al valor de referencia puede indicar que el paciente respondería a la quimioterapia. Sin embargo, un valor inferior al valor de referencia puede indicar que el paciente no respondería a la quimioterapia. Igualmente, para algunos marcadores biológicos, un valor inferior al valor de referencia puede indicar que el paciente respondería a la inmunoterapia o a la quimioterapia. Sin embargo, para algunos marcadores biológicos, un valor superior al valor de referencia puede indicar que el paciente no respondería a la quimioterapia.

Con más detalle, los presentes inventores descubrieron un sistema de puntuación para lesiones primarias o metastásicas del cáncer colorrectal humano que utiliza el análisis inmunohistoquímico de la sección de tejido completo como herramienta para predecir la respuesta a un tratamiento en estos pacientes. Por consiguiente, desarrollaron un sistema de puntuación para diferenciar entre pacientes con densidades altas o bajas de LIT y para separar a los

pacientes que respondieron a la quimioterapia de los que no respondieron a la quimioterapia. Se utilizó un conjunto independiente de pacientes ("conjunto de validación") para validar el sistema de puntuación con respecto a la predicción de la respuesta. Los análisis de particiones recursivas mediante árboles de inferencia condicional de las densidades de LIT observadas (CD3, CD8, granzima B) de las 22 lesiones metastásicas en el conjunto de entrenamiento revelaron la siguiente regla de predicción: se predice que pacientes que tienen un recuento de células CD3 por encima de 600 células/mm² responden a la terapia (P<0,001). Dado que un no respondedor fue clasificado erróneamente como respondedor, la regla se extendió utilizando los datos de CD8 y granzima B del paciente. La regla finalmente derivada requería un recuento de células CD3 por encima de aproximadamente 600/mm² y o bien una densidad de CD8 superior a aproximadamente 200/mm² o bien una densidad de granzima B superior a aproximadamente 30/mm² para predecir la respuesta al tratamiento.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención es un método para predecir si un paciente con cáncer con un tumor sólido responde a un tratamiento con quimioterapia, que comprende las etapas que consisten en:

- proporcionar una muestra de tumor previamente tomada de dicho paciente, en donde la muestra de tumor es una sección del tumor y comprende especialmente el margen invasivo; y
- determinar, en la sección del tumor, el número de células positivas para CD3 por milímetro cuadrado y o bien el número de células positivas para CD8 por milímetro cuadrado, o bien el número de células positivas para granzima B o ambos, en donde el número de células se determina con inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando una tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos en la sección de tejido completo; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia, en donde un número de células positivas para CD3 por mm² y células positivas para CD8/mm² y/o células positivas para granzima B/mm² por encima de un umbral predefinido para cada uno de CD3, CD8 y granzima B es indicativo de que dicho paciente responde a dicha quimioterapia.

Un aspecto adicional de la invención es un agente quimioterapéutico seleccionado entre carboplatino, paclitaxel, soferanib o 5-FU para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer con un tumor sólido, en donde el uso comprende

- (a) proporcionar una muestra de tumor tomada previamente de dicho paciente, en donde la muestra de tumor es una sección del tumor y comprende el margen invasivo;
- (b) determinar, en la sección del tumor, el número de células positivas para CD3 por milímetro cuadrado y o bien el número de células positivas para CD8 por milímetro cuadrado, o bien el número de células positivas para granzima B o ambos, en donde el número de células se determina con inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando una tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia;
- (c) seleccionar de dicho paciente con cáncer si el número de células positivas para CD3/mm² y o bien el número de células positivas para CD8/mm² o bien el número de células positivas para granzima B/mm² está por encima de un umbral predefinido para cada uno de CD3, CD8 y granzima B; y
- (d) administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico.

Otro aspecto de la invención es un método de identificación selectiva de un agente quimioterapéutico terapéuticamente eficaz para un paciente con cáncer que comprende las siguientes etapas que consisten en:

- (a) proporcionar células tumorales de una muestra de tumor tomada previamente de dicho paciente, en donde dicha muestra de tumor se caracteriza por la infiltración de un número de células por milímetro cuadrado positivas para CD3 y o bien para CD8 o bien para granzima B, que está por encima de los umbrales predefinidos para cada marcador de superficie celular, según lo determinado por inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos en una sección de la muestra de tumor que comprende el margen invasivo; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia;
- (b) poner en contacto las células tumorales con uno o más agentes quimioterapéuticos; y
- (c) evaluar si dichos uno o más agentes quimioterapéuticos afectan a las células tumorales, en donde dicho cáncer es el cáncer colorrectal, los umbrales predefinidos son 600 células/mm² para CD3, 200 células/mm² para CD8 y 30 células/mm² para granzima B.

Se debe indicar que, tal como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un", "uno/una", y "el/la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la

referencia a "un reactivo" incluye uno o más de dichos reactivos diferentes y la referencia "al método" incluye una referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la materia que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

- 5 A menos que se indique lo contrario, se ha de entender que la expresión "al menos" precediendo a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie.

10 A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que le siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, el término "comprenden" y sus variantes tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento integrante o de etapa, o grupo de elementos integrantes o de etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento integrante o etapa, o grupo de elementos integrantes o de etapas. Cuando se utiliza en el presente documento, la expresión "que comprende" puede sustituirse con la expresión "que contiene" o, a veces, cuando se utiliza en el presente documento, con la expresión "que tiene".

15 Cuando se utiliza en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de las reivindicaciones. Cuando se utiliza en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye los materiales o las etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada caso, en el presente documento, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser reemplazada por cualquiera de los otros dos términos.

20 Como se describe en el presente documento, "realización preferida" significa "realización preferida de la presente invención". Igualmente, como se describe en el presente documento, "diversas realizaciones" y "otra realización" significan "diversas realizaciones de la presente invención" y "otra realización de la presente invención", respectivamente.

Descripción detallada de la invención

30 Los presentes inventores descubrieron que existe una relación muy significativa (p. ej., valores de P bajos) entre (i) la densidad y la ubicación de las células infiltradas en el tumor (LIT) en tumores según lo detectado en secciones de tejido de portaobjetos completos y (ii) el resultado clínico del tratamiento, que abarca SLP y RT. Esta correlación altamente significativa ha sido descubierta mediante el uso de marcadores biológicos de la respuesta inmunitaria, ya sea en base a (i) ensayos de inmunquímica en secciones de tejido de portaobjetos completos o (ii) análisis de la expresión de proteínas (citocina y quimiocina) (basado en análisis de formación de imágenes anteriores que abarcan análisis de la sección de tejido de portaobjetos completos, expresión de ARNm).

35 Específicamente, como se ha mencionado anteriormente, los presentes inventores han descubierto que existe una correlación significativa entre la densidad de las células inmunitarias, en particular las células T, más particularmente las células T infiltradas en el tumor (LIT), en el

40 sitio del tumor y la respuesta a una terapia, en particular la respuesta a la quimioterapia. En efecto, se demostró que una respuesta duradera a la quimioterapia está altamente correlacionada con una alta densidad de los biomarcadores células CD3+, y o bien células CD8+, o bien células granzima-B+ o ambos en el sitio del tumor, ya sea en la parte central del tumor o en el margen invasivo del mismo.

45 Es más, se ha descubierto que la determinación de la presencia de altas densidades de células CD3+ y o bien células CD8+, o bien células granzima-B+ o ambas en el sitio del tumor está altamente correlacionada con períodos más largos de respuesta a la quimioterapia. Otros biomarcadores adicionales incluyen MIG, IP10 y/o fractalquina. También, se descubrió que las citocinas y quimiocinas analizadas en el sitio del tumor primario y en las metástasis son biomarcadores útiles adicionales para el pronóstico y la respuesta al tratamiento. Estos incluyen, interferón gamma, RANTES, y VEGF.

50 De manera más específica, también se descubrió que el nivel de interferón gamma es predictivo de la respuesta al tratamiento. De manera similar, la relación de interferón gamma a RANTES también es importante: una cantidad de interferón gamma superior a RANTES es un buen factor predictivo de la respuesta al tratamiento. El nivel de la cantidad necesaria para una buena respuesta al tratamiento varía entre las entidades cancerosas, pero en algunas realizaciones de la invención, el nivel debe ser superior a 1000 ng/ml.

60 Igualmente, se ha demostrado que los infiltrados de células inmunitarias relacionados están asociados con un cierto tipo de perfil de citocinas y quimiocinas dentro del tejido. El perfil específico se correlacionó con la densidad y el tipo de infiltrado. El tejido tumoral necesario para este análisis es pequeño y, por lo tanto, proporciona una base elegante para diagnósticos mínimamente invasivos, evitando intervenciones clínicas masivas.

65 Como se ha mencionado anteriormente, se ha descubierto de manera sorprendente que una determinación precisa de una respuesta inmunitaria *in situ* de un paciente a cánceres sólidos malignos, y especialmente a cánceres colorrectales, puede utilizarse como parámetro para predecir la respuesta clínica posterior al tratamiento,

independientemente del grado de invasión del tumor local y diseminación a los ganglios linfáticos regionales o el régimen de tratamiento administrado.

La correlación estadísticamente muy significativa entre (i) la presencia de células inmunitarias específicas de un paciente en la sección completa del sitio del tumor y (ii) la eficacia del tratamiento es aún más sorprendente, puesto que, de acuerdo con el conocimiento de la técnica anterior, la presencia de células inmunitarias infiltrantes en cánceres de mamíferos se asoció con resultados muy variables y no se demostró una relación con el tratamiento.

La correlación altamente significativa que se descubrió de manera sorprendente por los presentes inventores permite una fácil determinación de la eficacia de un tratamiento dado en un paciente con cáncer.

Como se detallará más adelante en el presente documento, al determinar la correlación estadística entre (i) la presencia o el nivel de uno o más marcadores biológicos de la respuesta inmunitaria, como se desvela en la presente solicitud y (ii) la eficacia real del tratamiento del cáncer en pacientes, que abarca la supervivencia libre de progresión (SLP) y la respuesta a la terapia (RT), se obtuvieron valores de P significativos según la invención.

Mediante el análisis de marcadores biológicos de la respuesta inmunitaria mediante análisis inmunohistoquímico de formación de imágenes de portaobjetos completos, ya sea (i) en el centro del tumor (CT), (ii) en el entorno celular que rodea el tumor, que también puede denominarse "margen invasivo (MI) o (iii) tanto en CT como en MI, los presentes inventores también descubrieron una serie de combinaciones significativas de marcadores. La correlación estadística más alta para los valores de pacientes individuales se descubrió cuando los marcadores biológicos se cuantificaron en el margen invasivo (MI).

Además de los hallazgos mencionados anteriormente, los presentes inventores han observado una mejora significativa del etiquetado fluorescente ("inmunofluorescencia"). En particular, los presentes inventores combinaron la tecnología de inmunofluorescencia con inmunohistoquímica convencional. Por consiguiente, el portaobjetos con tejido se incubó con un anticuerpo marcado con fluorescencia y se sometió posteriormente a técnicas de tinción inmunohistoquímica convencionales. Después de eso, el portaobjetos se escanea primero con un escáner de fluorescencia seguido de campo claro convencional. Las imágenes resultantes se superponen luego con un programa de software. Este análisis proporciona una cuantificación precisa de los biomarcadores aplicados en los medios y métodos de la presente invención.

Igualmente, en vista del hecho de que la cuantificación distinta de biomarcadores en regiones dadas se basa en la captura por microdissección láser, la cuantificación precisa de los niveles de proteínas puede correlacionarse con la densidad de las células inmunitarias. Esa alta resolución espacial es, por lo tanto, una etapa importante en el análisis de la muestra de tumor.

Generalmente, este procedimiento mencionado anteriormente permite medir simultáneamente diferentes estructuras diana marcadas con fluorescencia mientras se conserva la morfología como se observa en la inmunohistoquímica convencional. De hecho, se ha descubierto, de acuerdo con la invención, que el tipo, la densidad, y la ubicación de las células inmunitarias en pacientes con cáncer, como se ensayó con este nuevo procedimiento, produce un carácter distintivo predictivo integral que es superior e independiente de los disponibles actualmente.

También se ha descubierto que la detección de una fuerte respuesta inmunitaria en el sitio del tumor era un marcador fiable para una pluralidad de cánceres, tales como los cánceres de colon y los cánceres de recto. Por consiguiente, los métodos de predicción de la presente invención son particularmente adecuados para predecir si un paciente con cáncer que padece cáncer de colon y/o cáncer de recto puede responder a la quimioterapia.

Por lo tanto, es importante, como se describe en el presente documento, realizar un análisis de portaobjetos completos/sección de tejido completo para el análisis de biomarcadores o utilizar este análisis de portaobjetos completos para un perfil de citocinas/quimiocinas o proteínas. Solo este enfoque combinado permite la cuantificación fiable de biomarcadores. Por tanto, se ha demostrado por primera vez según la invención que la cuantificación de dichos biomarcadores basada en secciones de tejido completo permite la predicción precisa de la respuesta al tratamiento o el tiempo de progresión bajo tratamiento en pacientes con cáncer.

Por lo tanto, realizar la predicción con los métodos de la presente invención, ayudará a identificar aquellos pacientes que probablemente no responderán al tratamiento. Por lo tanto, los pacientes podrían recibir una opción de tratamiento adecuada basada en el método de la invención. Por otro lado, el método descrito probablemente identifica a los pacientes que pueden beneficiarse de la terapia (adyuvante), incluyendo la inmunoterapia.

Dicho lo anterior, el método de la invención no se limita a pacientes con enfermedad incurable, sino que también se puede aplicar a pacientes que se sometieron a un tratamiento curativo. P. ej., en el cáncer colorrectal, los pacientes en estadio III generalmente reciben tratamiento adyuvante, mientras que la mayoría de estos pacientes solo experimentan efectos secundarios sin un beneficio de pronóstico clínico.

Esencialmente, se ha descubierto que la detección de los biomarcadores CD3, y o bien CD8 o bien granzima B o ambos, en el sitio del tumor se correlaciona significativamente con una respuesta al tratamiento (específicamente

tratamiento de quimioterapia o inmunoterapia) y mejor supervivencia libre de progresión bajo tratamiento. Particularmente, se descubrió que un número de al menos 600 células positivas para CD3/mm², de al menos 200 células positivas para CD-8/mm² y/o de al menos 30 células positivas para granzima B/mm² es indicativo de si un paciente con cáncer colorrectal puede responder favorablemente a la quimioterapia.

Resumiendo, los presentes inventores han descubierto una correlación significativa entre

- los biomarcadores CD3, y o bien CD8 o bien granzima B o ambos, y
- una supervivencia libre de progresión (bajo terapia) o respuesta a la quimioterapia,

con valores de P tan bajos como $P < 0,001$.

Los biomarcadores se analizan en una sección de tejido completo (que abarca tanto el centro del tumor como el margen invasivo) aplicando una combinación de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica convencional.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir si un paciente con cáncer con un tumor sólido responde al tratamiento con quimioterapia que comprende las etapas que consisten en proporcionar una muestra de tumor previamente tomada de dicho paciente, en donde la muestra de tumor es una sección del tumor y comprende el margen invasivo; y determinar, en la sección del tumor, el número de células positivas para CD3 por milímetro cuadrado y o bien el número de células positivas para CD8 por milímetro cuadrado, o bien el número de células positivas para granzima B o ambos, en donde el número de células se determina con inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando una tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos en la sección de tejido completo; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia, en donde un número de células positivas para CD3 por mm² y células positivas para CD8/mm² y/o células positivas para granzima B/mm² por encima de un umbral predefinido para cada uno de CD3, CD8 y granzima B es indicativo de que dicho paciente responde a dicha quimioterapia.

Como se pretende en el presente documento, la "respuesta inmunitaria" abarca la presencia o la actividad, incluyendo el nivel de activación, de células del sistema inmunitario y moléculas de señalización relacionadas con el sistema inmunitario del paciente huésped con cáncer localmente en el sitio del tumor o generalmente, p. ej., en el suero.

Como se pretende en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria de dicho paciente frente a dicho tumor" abarca cualquier forma de respuesta inmunitaria de dicho paciente a través de la acción directa o indirecta, o ambas, con respecto a dicho cáncer.

La respuesta inmunitaria significa la respuesta inmunitaria del paciente huésped con cáncer en reacción al tumor y abarca la presencia, el número de, o alternativamente la actividad de células y moléculas de señalización relacionadas que participan en la respuesta inmunitaria del huésped que incluye: citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores de crecimiento de células madre.

La respuesta inmunitaria abarca una multitud de subtipos celulares diferentes, así como una enorme cantidad de moléculas de señalización (citocinas, quimiocinas, otras moléculas de señalización). Como se utiliza en el presente documento, los linfocitos T abarcan linfocitos T auxiliares, incluidos subconjuntos de células de linfocitos T auxiliares Th1 y Th2, pero también linfocitos T citotóxicos. Además del linaje de células T, también el linaje de células B, los linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, células dendríticas, células supresoras derivadas de mieloides, células dendríticas líticas, fibroblastos, células endoteliales.

El "estado" de la respuesta inmunitaria abarca (i) la existencia y cantidad de una población de células inmunitarias específicas o nivel de citocinas/quimiocinas en respuesta al cáncer en el sitio del tumor y el tejido circundante.

Descripción del método *in vitro* para la predicción de la respuesta a un tratamiento en pacientes con cáncer

Etapas a) del método

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

Las realizaciones específicas de la etapa a) incluyen: cuantificar las células positivas para CD3 y o bien las células positivas para CD8 o bien las células positivas para granzima B o ambas por inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia en secciones del tumor completas (análisis de portaobjetos completos) de una muestra de tejido tumoral, por ejemplo utilizando anticuerpos dirigidos específicamente contra cada uno de los marcadores de proteína. 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. El uso simultáneo de anticuerpos marcados con fluorescencia y de la inmunohistoquímica convencional puede utilizarse para detectar subconjuntos

específicos de células inmunitarias en el mismo portaobjetos con tejido.

Por tanto, la etapa a) consiste en cuantificar, en una muestra de tejido tumoral, las células que expresan un marcador biológico específico de la respuesta inmunitaria adaptativa. Generalmente, una combinación de al menos dos marcadores biológicos, positivos para CD3 y o bien positivos para CD8 o positivos para granzima B o ambos, es examinada. 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 las células del sistema inmunitario, o subconjuntos celulares del mismo, que están contenidos en la muestra de tejido tumoral (incluyendo información espacial como la localización precisa, p. ej., el margen invasivo) y que expresan un marcador biológico específico, por ejemplo entre la combinación de marcadores biológicos. Lo que se obtiene al final de la etapa a) consiste en los valores de densidad celular encontrados para cada marcador biológico adicional incluido en la combinación de marcadores. Como se utiliza en el presente documento, la densidad de las células de interés puede expresarse como el número de estas células de interés que se cuentan por una unidad de área de superficie de la muestra de tejido, p. ej., como el número de estas células de interés que se cuentan por mm² de área superficial de la muestra de tejido. Como se utiliza en el presente documento, la densidad de las células de interés puede también expresarse como el número de estas células de interés por una unidad de volumen de muestra. Como se utiliza en el presente documento, la densidad de las células de interés también puede consistir en el porcentaje de un subconjunto celular específico (p. ej., células T CD3+) por células totales o subpoblación celular total (establecido en 100 %). Esto también puede ser representado por una relación (p. ej., células CD3:CD8). Los inventores creen que la alta relevancia estadística que han descubierto entre (i) los valores de cuantificación de los marcadores biológicos de interés, y (ii) la respuesta al tratamiento del paciente con cáncer puede explicarse mediante un método de cuantificación muy preciso para cada marcador biológico, similar a la numeración de las células que expresan marcadores por área de superficie de un corte de tejido tumoral en secciones de tejido completo; esto incluye el centro del tumor y el margen invasivo y el tejido circundante. La relevancia estadística se basa entonces en un área amplia, haciendo posible sólidas deducciones estadísticas.

A diferencia de las micromatices de tejido (MMT), las secciones de tejido completo se evalúan en el método inventado. Esto permite una cuantificación sólida para un paciente individualizado. Halama *et al.* (2010), *Anal Quant Cytol. Histol.*;32:333-40., han demostrado que solo un enfoque estadísticamente sólido que incorpora el análisis de sección de tejido completo puede proporcionar una base para las predicciones individualizadas.

En ciertas realizaciones de la etapa a) del proceso de predicción inventado, se cuantifican los marcadores biológicos por separado en más de una muestra de tejido tumoral del paciente con cáncer, seleccionada entre el grupo que consiste en (a) un tumor primario global (en su conjunto), (b) una sección de tejido completo, que contiene el centro del tumor así como el tejido que rodea directamente el tumor (específicamente llamado el "margen invasivo" del tumor) en conjunto con (i) islotes linfoides en proximidad con el tumor, (ii) los ganglios linfáticos ubicados en proximidad con el tumor, (iii) una muestra de tejido tumoral recogida antes de la cirugía (para el seguimiento de los pacientes después del tratamiento, por ejemplo), y una muestra (iv) de una metástasis distante, que también abarca la lesión metastásica así como el tejido normal adyacente (también llamado "margen invasivo"). En estas realizaciones, el valor de densidad que se obtiene, al final de la etapa a), para cada uno de los tumores: muestras de tejido (a,b, i-iv), se compara, en la etapa b) del método, con los valores de referencia correspondientes previamente determinados para cada una de las muestras de tejido tumoral (a, b, i-iv), respectivamente. Obteniendo, en la etapa a) del método, más de un valor de cuantificación para cada marcador biológico que se utiliza, se permite una predicción más precisa de la respuesta al tratamiento que cuando se determina solo un valor de cuantificación por marcador biológico.

La etapa a) del método de predicción de la respuesta al tratamiento *in vitro* de la invención, comprende cuantificar al menos un marcador biológico en una sección de tejido tumoral completo por detección por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

Según una primera realización específica del método de predicción de la respuesta al tratamiento *in vitro* de la invención, la etapa a) se realiza cuantificando al menos dos marcadores biológicos distintos, por separado tanto (i) en el centro del tumor (CT) y (ii) como el margen invasivo (MI).

Etapa b) del método

En la etapa b) del método, para cada marcador 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 sea necesario, con valores de referencia. El valor de referencia para el mismo marcador biológico está así predeterminado y ya se sabe que es indicativo de un valor de referencia que es pertinente para discriminar entre un nivel bajo y un nivel alto de la respuesta inmunitaria de un paciente con cáncer, para dicho marcador biológico. Dicho valor de referencia predeterminado para dicho marcador biológico se correlaciona con una buena respuesta al tratamiento en un paciente con cáncer, o por el contrario está correlacionado con el fracaso del tratamiento en un paciente con cáncer.

Realizaciones para predeterminar un valor de referencia

Los valores de referencia para cada marcador biológico pueden predeterminarse llevando a cabo un método que comprende las etapas que consiste en:

a) proporcionar al menos una recogida de muestras de tejido tumoral seleccionadas entre el grupo que consiste en:

a) recoger muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer clasificados como Tis, o T1, o T2, o T3 o T4 y G0, o G1, o G2, o G3 y M0 o M1, y sin metástasis temprana o con metástasis temprana, que no se han sometido a un tratamiento contra el cáncer;

b) cuantificar, para cada muestra de tejido tumoral comprendida en la recogida de muestras de tejido tumoral proporcionadas en la etapa a), el marcador biológico, mediante lo cual se obtiene una recogida de valores de cuantificación para dicho marcador biológico y para dicha recogida de muestras de tejido tumoral y se recopilan los datos clínicos correspondientes sobre la respuesta al tratamiento y la supervivencia libre de progresión bajo tratamiento;

c) calcular, a partir de la recogida de valores cuantificados obtenidos al final de la etapa b), el valor medio de cuantificación para el marcador biológico en asociación con los datos clínicos, por lo que luego se obtiene un valor de referencia predeterminado para dicho marcador biológico que se correlaciona con una respuesta específica al tratamiento.

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 contra el cáncer al que se someten los pacientes con cáncer después de recoger las muestras de tejido tumoral, incluyendo radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia, p. ej., tratamiento con anticuerpos.

Según el método anterior para obtener valores de referencia predeterminados, 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 dos valores de referencia predeterminados para el mismo marcador biológico. Otras formas de determinar el valor de referencia incluyen el cálculo del valor en la media de los conjuntos de datos y se desvela completamente en el ejemplo. Se pueden utilizar modelos estadísticos conocidos para generar valores de referencia claros para una buena respuesta al tratamiento o una peor respuesta al tratamiento (p. ej., análisis de curva ROC).

Los valores de referencia utilizados para comparación en la etapa b) del método, son valores de "corte".

Como se ha desvelado anteriormente, el método permite el establecimiento de un único valor de "corte" que permite la discriminación entre un resultado malo y bueno del tratamiento (p. ej., respuesta o no respuesta al tratamiento). En la práctica, como se desvela en los ejemplos del presente documento, los valores de alta significación estadística (p. ej., valores de P bajos) se obtienen generalmente para un intervalo de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no solo para un único valor de cuantificación arbitrario. No obstante, este intervalo dinámico de valores se puede utilizar en el proceso de predicción. En ciertas realizaciones, un valor 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 significación estadística más alto (p. ej., generalmente el valor de P mínimo que se encuentra).

El método para predeterminar un valor de corte que se ha descrito anteriormente, el marcador biológico consiste en la densidad de células que expresan un marcador de proteína específico en la muestra de tumor. Adicionalmente, para un único marcador de proteína cuantificado, se pueden determinar valores de corte para al menos dos marcadores biológicos distintos, respectivamente (i) un primer valor de corte determinado para un primer marcador biológico que consiste en la densidad de células que expresan dicho marcador de proteína en la sección de tejido completo y (ii) un segundo valor de corte determinado para un segundo marcador biológico que consiste en la cuantificación de los niveles de proteína en una región dada.

Se pueden combinar combinaciones de cuantificaciones para densidades celulares y niveles de proteínas ya que para cada uno de los biomarcadores evaluados se obtiene un valor de referencia diferencial. Por lo tanto, las combinaciones binarias producirán cuatro clases diferentes de predicciones. Por lo tanto, un mayor número de combinaciones producirá ciertos patrones de densidades celulares y niveles de proteínas concomitantes (niveles de citocinas y/o quimiocinas) que distinguen a los pacientes con una respuesta al tratamiento de aquellos que no responden al tratamiento.

En ciertas realizaciones preferidas del método anterior para determinar los valores de corte, la información relacionada con el resultado clínico actual de los pacientes se selecciona entre el grupo que consiste en (i) la duración de la supervivencia libre de progresión bajo tratamiento y (ii) la respuesta al tratamiento.

De hecho, para realizar el método predictivo según la invención, se prefiere la disponibilidad de un valor de referencia predeterminado para más de dos marcadores biológicos. Por tanto, generalmente, se determina al menos un valor de referencia predeterminado para una pluralidad de marcadores biológicos indicativos del estado de la respuesta inmunitaria en reacción al cáncer que se abarcan en el presente documento, simplemente reiterando uno cualquiera de los métodos para obtener valores de referencia predeterminados que se han descrito anteriormente, para una pluralidad de marcadores biológicos.

El valor de referencia predeterminado consiste en un valor de "corte", como ya se ha desvelado anteriormente, cuyo valor de "corte" consiste en un valor de cuantificación estadística para el marcador biológico de interés que discrimina entre una respuesta mala y buena al tratamiento.

5 De manera ilustrativa, para las lesiones metastásicas de cáncer colorrectal humano, se identificó un sistema de puntuación mediante análisis inmunohistoquímico de la sección de tejido completo. Se desarrolló un sistema de puntuación para diferenciar entre pacientes con densidades de LIT altas o bajas y para separar a los pacientes que respondieron a la quimioterapia de los que no respondieron a la quimioterapia. Se utilizó un conjunto independiente de pacientes ("conjunto de validación") para validar el sistema de puntuación con respecto a la predicción de la respuesta. Los análisis de particiones recursivas mediante árboles de inferencia condicional de las densidades de LIT observadas (CD3, CD8, granzima B) de las 22 lesiones metastásicas en el conjunto de entrenamiento revelaron la siguiente regla de predicción: se predice que pacientes que tienen un recuento de células CD3 por encima de 600 células/mm² responden a la terapia (P<0,001). Dado que un no respondedor fue clasificado erróneamente como respondedor, la regla se extendió utilizando los datos de CD8 y granzima B del paciente. La regla finalmente derivada requería un recuento de células CD3 por encima de aproximadamente 600/mm² y o bien una densidad de CD8 superior a aproximadamente 200/mm² o bien una densidad de granzima B superior a aproximadamente 30/mm² para predecir correctamente la respuesta al tratamiento. El sistema de puntuación resultante tiene un intervalo de 0 a 4, con pacientes con una puntuación de 0-2 que no responden al tratamiento y tienen períodos más cortos de supervivencia libre de progresión. Los pacientes con una puntuación de 3 o 4 tienen una respuesta al tratamiento según lo medido objetivamente con los criterios RECIST. Los pacientes con una puntuación de 4 tuvieron un mayor período de supervivencia libre de progresión que los pacientes con una puntuación de 3. Por consiguiente, el número de células positivas para CD3, positivas para CD8 y/o positivas para granzima B puede traducirse en un sistema de puntuación. Específicamente, una puntuación de 0-2 se traduce en un número de células positivas para CD3 por debajo de 600 células/mm² y un número de células positivas para CD8 por debajo de 200 células/mm² y/o un número de células positivas para granzima B por debajo de 30 células/mm². Por ende, en un aspecto alternativo, la presente invención proporciona un método para predecir si un paciente con cáncer responde al tratamiento con quimioterapia, que comprende determinar en una muestra de tumor de dicho paciente el número de células que son positivas para CD3 y positivas para CD8 y/o positivas para granzima B, en donde una puntuación de 3 o 4 es indicativa de que dicho paciente responde a la quimioterapia. Por el contrario, la presente invención también proporciona un método para predecir si un paciente con cáncer responde al tratamiento con quimioterapia, que comprende determinar en una muestra de tumor de dicho paciente el número de células que son positivas para CD3 y positivas para CD8 y/o positivas para granzima B, en donde una puntuación de 0-2 indica que dicho paciente no responde a la quimioterapia y/o tiene períodos más cortos de supervivencia libre de progresión.

35 De conformidad con los hallazgos anteriores, los pacientes con una respuesta a la quimioterapia tenían niveles más altos de fractalquina, RANTES, MIF y MIG en el tejido tumoral subyacente.

Los valores de corte óptimos basados en pruebas de agrupamiento no supervisado y particiones recursivas, para las densidades de células CD3, CD8 y granzima B en el margen invasivo de metástasis hepáticas fueron de 600/mm² para la densidad de células CD3 y o bien una densidad de CD8 superior a 200/mm² o una densidad de granzima B superior a 30/mm².

45 Como alternativa, la presente invención también proporciona un método para predecir si un paciente con cáncer no responde al tratamiento con quimioterapia, que comprende determinar en una muestra de tumor de dicho paciente el número de células que son positivas para CD3 y positivas para CD8 y/o positivas para granzima B, en donde un número de células positivas para CD3 y positivas para CD8 y/o positivas para granzima B, que está por debajo de un número predeterminado de dichas células, lo cual es indicativo de pacientes que responden a la quimioterapia, es indicativo de que dicho paciente no responde a la quimioterapia. Los valores de corte preferidos basados en pruebas de agrupamiento no supervisado y particiones recursivas, para las densidades de células CD3, CD8 y granzima B en el margen invasivo de metástasis hepáticas son de 600/mm² para la densidad de células CD3 y o bien una densidad de CD8 superior a 200/mm² o una densidad de granzima B superior a 30/mm². Una combinación de marcadores asociada con una mala respuesta al tratamiento es una combinación donde VEGF, IL-8 son altos (en concentración) e interferón gamma, MIG, IP-10 y fractalquina son bajos (en concentración).

55 Según las realizaciones anteriores, se espera un fracaso en la respuesta al tratamiento si el valor de cuantificación generado para la cuantificación de la densidad celular en la etapa a) es inferior a los valores de referencia de corte predeterminados o alternativamente se pueden combinar tanto la cuantificación celular como los niveles de proteína, dando lugar a complejos patrones de predicción de la respuesta con resultados compuestos de cualquiera de la cuantificación de las células o mediciones del nivel de proteínas. Por el contrario, se espera una respuesta al tratamiento del cáncer si los valores de cuantificación generados para las densidades celulares son superiores al valor de referencia de corte predeterminado o las concentraciones de proteínas medidas son superiores al valor de referencia de corte predeterminado, cuando la comparación se lleva a cabo en la etapa b) del método.

65 Para profundizar en la concentración de proteínas o mediciones del nivel de proteínas, en realizaciones donde el marcador biológico consiste en el nivel de una proteína relacionada con la respuesta inmunitaria del cuerpo humano, el valor de referencia predeterminado puede consistir en el nivel de proteínas que se correlaciona con el fracaso del

tratamiento, p. ej., progresión de la enfermedad maligna bajo terapia, un corto tiempo de supervivencia libre de progresión, o, por el contrario, puede consistir en el nivel de proteína que se correlaciona con una buena respuesta al tratamiento, p. ej., no hay de ningún modo carga tumoral (radiográfica) o metástasis o un largo intervalo libre de progresión bajo tratamiento. El nivel de proteínas o el valor de concentración de proteínas puede expresarse como cualquier unidad arbitraria.

Comparación(es) realizada(s) en la etapa b)

Como ya se ha especificado, y como se muestra en los ejemplos en el presente documento, la etapa b) del método de predicción de la respuesta al tratamiento *in vitro* de la invención consiste en comparar, para cada marcador biológico ensayado, respectivamente: (a) el valor de cuantificación encontrado en la etapa a) para el marcador biológico, dependiente de la tecnología utilizada ya sea densidades celulares cuantificadas en secciones de tejido completo, concentraciones de proteínas cuantificadas o la combinación de ambos enfoques técnicos; y (b) el correspondiente valor de referencia que ya está predeterminado para el marcador biológico.

Las combinaciones complejas de las tecnologías utilizadas para la etapa a) pueden ser puestas en conjunto en una puntuación meta, es decir, un sistema de puntuación donde el resultado de diferentes mediciones tiene un peso predefinido. P. ej., una densidad celular de >1000 células positivas para CD3+/mm² dentro del tumor primario Y un nivel de proteínas de >30.000 ng/ml de RANTES suman una puntuación de "3", que, en una escala de 0-3, es la puntuación más alta posible y está asociada con la respuesta al tratamiento (véase también a continuación).

Por lo tanto, en la etapa b), se realiza el mismo número de etapas únicas de comparación que el número de valores de cuantificación que se obtienen en la etapa a). También es posible debido a la falta de tejido realizar evaluaciones solo en las regiones disponibles, p. ej., el centro del tumor.

La etapa de comparación b), independientemente de si la etapa a) consiste en la etapa i) de inmunohistoquímica o la nueva tecnología de combinar inmunofluorescencia e inmunohistoquímica convencional en el mismo corte o etapa ii) de análisis del nivel de proteínas o iii) una combinación de ambos métodos, preferentemente también comprende el cálculo de una relevancia estadística de la pluralidad de los valores de cuantificación de los marcadores medidos en la etapa a), tras su comparación con los valores de referencia correspondientes, p. ej., utilizando un método estadístico similar la prueba de rango logarítmico P.

En otra realización de la invención, la etapa de comparación b) puede incluir una clasificación binaria de los valores de cuantificación medidos en la etapa a), para cada marcador biológico, y opcionalmente también para cada región separada de tejido tumoral ensayado (es decir, centro del tumor, margen invasivo, tejido normal adyacente), en dos grupos, respectivamente: (i) un primer grupo denominado "Alto" cuando el valor de cuantificación para el marcador biológico, opcionalmente en dicha región de tejido (tumor), es superior al valor de referencia correspondiente predeterminado y (ii) un segundo grupo denominado "Bajo" cuando el valor de cuantificación para el marcador biológico, opcionalmente en dicha región de tejido (tumor), es inferior al valor de referencia correspondiente predeterminado. Lo que se deduce de esto es que, si el resultado de la etapa de comparación b) consiste exclusivamente en valores "Altos" para cada marcador ensayado, entonces se determina una respuesta favorable al tratamiento para el paciente con cáncer. Por el contrario, si el resultado de la etapa de comparación b) consiste exclusivamente en valores "Bajos" para cada marcador ensayado, entonces se determina un fracaso del tratamiento para el paciente con cáncer. Se determinan conclusiones intermedias para pacientes "heterogéneos", en donde, en la etapa de comparación b), se encuentran valores de cuantificación "Altos" para uno o más de los marcadores biológicos ensayados y valores de cuantificación "Bajos" para los marcadores restantes de la combinación de marcadores biológicos ensayados como se desvela en los ejemplos del presente documento. Para estos pacientes "heterogéneos", el tratamiento a la respuesta debe definirse de antemano y puede resultar en un sistema de puntuación.

Lo más preferentemente, en vista de obtener valores de referencia predeterminados altamente relevantes para cada marcador biológico de interés, dichos valores de referencia predeterminados consisten en el valor medio de una multitud de valores de cuantificación de portaobjetos completos de dicho marcador medido en muestras de tejido procedentes del mismo gran número de pacientes que tienen cáncer que tuvieron un resultado clínico específico, es decir, respuesta al tratamiento o fracaso del tratamiento.

La alta exactitud del método descrito radica en la alta precisión y la medición sólida de grandes áreas de tejido, a saber, a través de la cuantificación del portaobjetos completo. La combinación de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica convencional hace que la tecnología sea aún más atractiva, ya que este enfoque salva tejido y aumenta el valor de información de un único portaobjetos.

Lo más preferentemente, para evaluar valores de referencia predeterminados precisos, dichos valores de referencia están predeterminados a partir de al menos 30 valores de cuantificación, para un marcador biológico específico, utilizando por tanto muestras de tejido procedentes de al menos 30 pacientes que tienen cáncer que tienen un resultado clínico definido, p. ej., respuesta al tratamiento o fracaso del tratamiento. En realizaciones preferidas, se obtiene un valor de referencia predeterminado de al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380,

390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 o más valores de cuantificación para un marcador biológico específico.

5 La tecnología de micromatrices de tejidos no es adecuada para las predicciones de pacientes individuales y, por lo tanto, solo se puede utilizar en la determinación de valores de referencia en grandes cohortes de pacientes, pero no para predicciones de pacientes individuales. El tamaño del área de superficie de tejido de las micromatrices de tejido típicas es demasiado pequeño para un análisis estadísticamente sólido.

10 (Opcional) Etapa c) del método

Como se ha descrito anteriormente, el método de predicción *in vitro* para el resultado del tratamiento de pacientes con cáncer en esta invención puede comprender además una etapa c) en donde se proporciona el resultado de predicción *per se*.

15 (i) Se determina una buena respuesta al tratamiento para el paciente con cáncer (con intervalos más largos de supervivencia libre de progresión bajo tratamiento), cuando el valor o valores de cuantificación obtenidos en la etapa a) para un marcador biológico específico, o una combinación específica de marcadores biológicos adicionales, es superior o inferior, respectivamente, al valor o valores de referencia predeterminados correspondientes; o (ii) se determina un fracaso del tratamiento para un paciente con cáncer (o un intervalo más corto de supervivencia libre de progresión bajo tratamiento), cuando el valor o valores de cuantificación obtenidos en la etapa a) para un marcador biológico específico, o una combinación específica de marcadores biológicos, es superior o inferior, a dichos valor o valores de referencia predeterminados correspondientes.

20 Dadas las explicaciones anteriores, el impacto y la relación del nivel de proteínas medido o la densidad celular deben estar relacionados con el resultado clínico, es decir, la respuesta al tratamiento. Las poblaciones de células inhibitoras o proteínas son favorables para el paciente cuando están presentes en pequeñas cantidades o cantidades menores. Por lo tanto, la cuantificación o sistema de puntuación debe incorporar esta noción.

25 Las realizaciones específicas de los métodos utilizados para realizar la etapa c) se detallan completamente en los ejemplos del presente documento. Por ejemplo, un paciente con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal tiene 800 linfocitos CD3+ y 400 células CD8+/mm² en el margen invasivo de la lesión hepática. Por lo tanto, se predice que este paciente tenga una respuesta a la quimioterapia o a la inmunoterapia. Un paciente similar con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal tiene 105 células CD3+/mm² y 290 células CD8+/mm² y 39 células granzima B+/mm² en el margen invasivo. Por lo tanto, se predice que este paciente no tendrá respuesta a la quimioterapia. De forma similar, se predice que un paciente con CXCL9 o CXCL10 de una concentración superior a 20 ng/ml de tejido en el margen invasivo tendrá una respuesta al tratamiento.

35 Combinaciones de marcadores biológicos

40 Los marcadores biológicos también incluyen la presencia o la cantidad de proteínas, que son producidas específicamente por células del sistema inmunitario en el sitio del tumor. También los marcadores biológicos son proteínas que influyen en el sistema inmunitario o modulan el sistema inmunitario.

45 Por tanto, los marcadores biológicos incluyen antígenos de superficie que son expresados específicamente por células del sistema inmunitario, incluyendo p. ej., linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas de monocitos/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales, y linfocitos citolíticos naturales-células DC, fibroblastos, células endoteliales, que se reclutan dentro del tejido tumoral o en el tejido adyacente, incluso dentro del margen invasivo del tumor y en los ganglios linfáticos más cercanos.

50 La diferencia entre "pronóstico" y "respuesta al tratamiento" es un concepto clave en oncología. Si bien los pacientes pueden tener un buen pronóstico, aún pueden no tener respuesta al tratamiento y experimentar solo efectos secundarios. Por lo tanto, es esencial predecir el pronóstico o la supervivencia general de un paciente y predecir por separado el resultado del tratamiento y la respuesta al tratamiento.

55 Como se muestra en los ejemplos en el presente documento, se puede obtener una predicción fiable al cuantificar un único marcador biológico en la etapa a) del método, como se ilustra, por ejemplo, con la cuantificación de CD3, CD8 y/o GZM-B, y los marcadores biológicos adicionales RANTES, MIF y MIG.

60 Lo más preferentemente, cuando el método de predicción de la respuesta *in vitro* de la presente invención se realiza con marcadores biológicos adicionales que consisten en las densidades de células que expresan proteínas específicas, entonces la etapa a) se realiza mediante técnicas inmunohistoquímicas (es decir, inmunohistoquímica convencional del nuevo método descrito en el presente documento) y las densidades celulares se miden (i) en el centro del tumor, (ii) en el margen invasivo, (iii) en el tejido normal adyacente o (iii) por separado en el centro del tumor, en el margen invasivo o en el tejido normal adyacente.

65 Lo más preferentemente, cuando el método *in vitro* para la predicción de la respuesta se realiza con marcadores

biológicos que consisten en el nivel de concentración de proteínas de interés, entonces la etapa a) se realiza a través de métodos de análisis de proteínas, como ELISA o mediciones de proteínas acopladas a perlas multiplex, comenzando por el tejido tumoral completo que se extrajo inicialmente del paciente con cáncer (y preparaciones histológicas posteriores), p. ej., tejido tumoral procedente de una resección tumoral durante una operación quirúrgica.

Por tanto, en realizaciones preferidas de los métodos de predicción de la respuesta según la presente invención, la muestra de tejido tumoral a la que se hace referencia en la etapa a) se selecciona entre el grupo que consiste en (a) un tumor primario (global) (como un todo), (b) una sección de tejido completo, que contiene el centro del tumor así como el tejido que rodea directamente el tumor (específicamente llamado el "margen invasivo" del tumor) en conjunto con (i) islotes linfoides en proximidad con el tumor, (ii) los ganglios linfáticos ubicados en la proximidad con el tumor, (iii) una muestra de tejido tumoral recogida antes de la cirugía (para el seguimiento de los pacientes después del tratamiento, por ejemplo), y una muestra (iv) de una metástasis distante, que también abarca la lesión metastásica así como el tejido normal adyacente.

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

- (i) el número o la densidad de células del sistema inmunitario contenidas en la muestra de tejido tumoral y que expresan el dicho marcador biológico, generalmente un marcador proteico; y
- (ii) el nivel o concentración de una proteína de interés en la muestra de tejido tumoral o una región dada de la muestra de tejido (tumor).

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

En ciertas realizaciones diferentes, dicho al menos un marcador biológico adicional consiste en el valor de cuantificación de una proteína expresada por células del sistema inmunitario presentes en el sitio del tumor como un todo o en una región específica en la muestra de tejido (tumor). En realizaciones adicionales de la invención, dicho al menos un marcador biológico adicional consiste en el valor de cuantificación de la concentración de una proteína expresada específicamente por células del sistema inmunitario presentes en el sitio del tumor.

Aunque el método de predicción de la respuesta según la presente invención se ha ensayado para el cáncer colorrectal, dicho método puede aplicarse a todas las demás entidades cancerosas. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, los inventores creen que los métodos de predicción de la respuesta de la invención pueden llevarse a cabo con éxito para la predicción del resultado del tratamiento de cualquier paciente con cáncer que se desarrolle a partir de un tumor al que tengan acceso las células del sistema inmunitario.

Deduciéndose de la declaración anterior, el método de predicción de la respuesta para pacientes con cáncer según la presente invención es potencialmente útil para determinar el resultado del tratamiento (clínico) de pacientes de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer cortical suprarrenal, cáncer de ano, cáncer de conducto biliar (p. ej., cáncer periférico, cáncer de conducto biliar distal, cáncer de conducto biliar intrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de huesos (p. ej., osteoblastoma, osteocondroma, hemangioma, fibroma condromixóide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor óseo de células gigantes, cordoma, linfoma, mieloma múltiple), cánceres de cerebro y del sistema nervioso central (p. ej., meningioma, astrocitoma, oligodendrogliomas, ependimoma, gliomas, meduloblastoma, ganglioglioma, schwannoma, germinoma, craneofaringioma), cáncer de mama (p. ej., carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular, infiltrante, carcinoma lobular in situ, ginecomastia), enfermedad de Castleman (p. ej. hiperplasia de ganglio linfático gigante, hiperplasia de ganglio linfático angiofoliular), cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer endometrial (p. ej. adenocarcinoma endometrial, adenocantoma, adenocarcinoma seroso papilar, células claras), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células pequeñas), tumores carcinoides gastrointestinales (p. ej., coriocarcinoma, corioadenoma destruens), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer renal (por ejemplo, cáncer de células renales), cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado (p. ej., hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas), mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de cavidad nasal y de seno paranasal (p. ej., estesioblastoma, granuloma de la línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de la hipófisis, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, (p. ej. rhabdomyosarcoma embrionario, rhabdomyosarcoma alveolar, rhabdomyosarcoma pleomórfico), cáncer de las glándulas salivales, cáncer de piel (p. ej. melanoma, cáncer de piel no melanoma), cáncer de estómago, cáncer testicular (p. ej., seminoma, cáncer de células germinales no seminoma), cáncer de timo, cáncer de tiroides (p. ej., carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma medular de tiroides, linfoma de tiroides), cáncer de vagina, cáncer de vulva y cáncer de útero (p. ej., leiomyosarcoma de útero). Se incluyen cánceres primarios y metástasis, así como cánceres de origen primario desconocido.

Por tanto, el método de predicción de la respuesta al tratamiento del cáncer de la invención puede realizarse con una combinación de marcadores biológicos. El número de marcadores biológicos utilizados solo está limitado por el número

de marcadores biológicos distintos de interés que están prácticamente disponibles en el momento de llevar a cabo el método. Sin embargo, un número demasiado alto de marcadores biológicos aumentará significativamente la duración del método sin mejorar simultáneamente de manera significativa la determinación de la respuesta.

5 Habitualmente, en las realizaciones en donde el método de predicción de la respuesta de la invención se realiza con una combinación de marcadores biológicos, no se cuantifican más de 50 marcadores biológicos distintos en la etapa a). En la mayoría 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 anteriormente en la presente memoria descriptiva, el número de marcadores combinados que se requieren para alcanzar una alta relevancia estadística (p. ej. P inferior a 0,001 dependerá del tipo de técnica para cuantificar la dicha combinación de marcadores biológicos, en la etapa a) del método de predicción de la respuesta al tratamiento *in vitro*.

15 En ciertas realizaciones del método de predicción de la respuesta al tratamiento *in vitro* de la invención, en donde la etapa a) se realiza mediante la cuantificación de marcadores biológicos con técnicas inmunohistoquímicas, entonces el uso de una combinación de un número bajo de marcadores puede ser suficientemente informativo, específicamente si los marcadores biológicos se cuantifican por separado en el centro del tumor, en el margen invasivo o en el tejido normal adyacente.

20 De manera 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 distintos se cuantifican en la etapa a).

Los marcadores biológicos potenciales adicionales son: 18s, ACE, ACTB, AGTR1, AGTR2, APC, APOA1, ARF1, AXIN1, BAX, BCL2, BCL2L1, CXCR5, BMP2, BRCA1, BTLA, C3, CASP3, CASp9, CCL1, CCL11, CCL13, CCL16, 25 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, 30 CTLA4, CTNN81, CTSC, CX3CL1, CX3CRI, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, 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, GZMH, GZMK, HLA-B, HLA-C, HLA-, MA, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DPA1, HLA-DQA2, HLA- 35 DRA, HLX1, HMOX1, HRAS, HSPB3, HUWE1, ICAM1, ICAM-2, ICOS, ID1, ifna1, ifna17, ifna2, ifna5, ifna6, ifna8, IFNAR1, IFNAR2, IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IGF1, IHH, IKKBK, IL10, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL17, IL17R, IL17RB, IL18, IL1A, IL1B, IL1RI, 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 mucoso humano, antígeno 1, polipéptido alfa), gen hCG33203, ITGB3, 40 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, SERPINE1, SFRP1, SIRP 45 beta 1, SKI, SLAMF1, SLAMF6, SLAMF7, SLAMF8, SMAD2, SMAD4, 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, TGFBR1, TGFBR2, TIMP3, TLR1, TLRO1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF11A, TNFRSF18, TNFRSF1A, TNFRSF1B, OX-40, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, 50 TNFSF10, TNFSF6, TOB1, TP53, TSLP, VCAM1, VEGF, WIF1, WNT1, WNT4, XCL1, XCR1, ZAP70 y ZIC2.

En ciertas realizaciones del método, se utiliza una combinación de dos marcadores biológicos en la etapa a), que también puede denominarse en el presente documento un "conjunto" de marcadores biológicos.

55 En vista del hecho de que los presentes inventores han descubierto por primera vez que la medida del nivel de la respuesta inmunitaria o los parámetros inmunitarios de un paciente que tiene cáncer se puede utilizar como la única medida para predecir el resultado del tratamiento de la enfermedad cancerosa, sin ningún requisito de datos adicionales, la presente invención se refiere en un segundo aspecto a un método para predecir si un paciente con cáncer responde a un tratamiento con quimioterapia.

60 La presente invención también se refiere a un método para predecir si un paciente con cáncer no responde al tratamiento con quimioterapia.

65 Cuando se utiliza en el presente documento, el término terapia contra el cáncer incluye radioterapia y quimioterapia, prefiriéndose la quimioterapia.

En el contexto de la presente invención, las células positivas para CD3, positivas para CD8 y/o positivas para granzima B son preferentemente células inmunitarias, más preferentemente células T que incluyen células T citotóxicas, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales y/o linfocitos citolíticos naturales-células dendríticas. (LCN-CD).

Como se pretende en el presente documento, predicción de la respuesta al tratamiento o resultado del tratamiento en un paciente con cáncer" o "que responde al tratamiento" abarca la predicción del resultado del tratamiento, en un paciente en donde ya se ha diagnosticado la aparición de un cáncer, que incluye las posibilidades de respuesta al tratamiento, p. ej., reducción de la carga tumoral.

Por consiguiente, los métodos de la presente invención también permiten determinar si una terapia con una quimioterapia puede o no ser eficaz durante el transcurso de la terapia. La probabilidad de que la quimioterapia sea eficaz depende del número de células positivas para CD3, CD8 y/o granzima B como se describe en el presente documento.

Del mismo modo, los métodos de la presente invención también permiten determinar si un paciente puede responder o no favorablemente a una quimioterapia durante el transcurso de la terapia (es decir, los métodos de la presente invención permiten controlar el efecto terapéutico de una quimioterapia).

El término "puede responder favorablemente", cuando se utiliza en el contexto de la presente solicitud, significa que (a) una célula o células tumorales y/o un subconjunto de células tumorales, preferentemente células tumorales o un subconjunto de células tumorales de un paciente que está sometido a quimioterapia es más probable que sean susceptibles a dicha quimioterapia. La probabilidad de que (a) una célula o células tumorales y/o un subconjunto de células tumorales (preferentemente obtenidas de un paciente) puedan responder favorablemente depende preferentemente del número de células positivas para CD3, CD8 y/o granzima B como se describe en el presente documento.

De manera similar, los métodos de la presente invención también permiten determinar si una quimioterapia debe interrumpirse y/o cambiarse o no para aplicar una terapia diferente. La decisión sobre si una quimioterapia debe interrumpirse y/o cambiarse se toma en función del número de células positivas para CD3, CD8 y/o granzima B como se describe en el presente documento.

Por consiguiente, en relación con los métodos de la presente invención, se prevé que se obtenga una muestra de un paciente que puede ser tratado con una quimioterapia antes del tratamiento, durante el tratamiento y/o después del tratamiento. Preferentemente, la muestra se obtiene antes del tratamiento a fin de determinar si un paciente puede ser susceptible o no al tratamiento con una quimioterapia, si un paciente puede o no responder favorablemente al tratamiento con una quimioterapia, o si un paciente puede beneficiarse o no del tratamiento con una quimioterapia.

Resumiendo, los métodos de la presente invención pueden considerarse de manera equivalente como métodos para predecir si un paciente puede ser susceptible o no a la quimioterapia, si un paciente puede responder favorablemente a la quimioterapia, o si un paciente puede beneficiarse o no de la quimioterapia.

El término "potencialmente", cuando se utiliza en el contexto de un efecto terapéutico, significa que una quimioterapia - aunque la quimioterapia se considera que tiene un efecto terapéutico basado en el resultado de los métodos de la presente invención - no necesariamente tiene que ser terapéuticamente eficaz. Esto se debe a que - como se explica por sí mismo - los métodos de la presente invención no pueden proporcionar una predicción 100 % segura de si un paciente puede ser susceptible o no a la quimioterapia, ya que factores individuales como la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, la interacción farmacológica pueden influir en si un paciente será o no susceptible a la quimioterapia.

Sin embargo, si en una muestra de tumor de un paciente el número de células positivas para CD3 y positivas para CD8 y/o positivas para granzima B está por encima de un número predeterminado de dichas células, lo cual es indicativo de que los pacientes responden (o en algunos casos no responden) a la quimioterapia, la probabilidad de que dicho paciente responda a la quimioterapia o a la inmunoterapia como se describe en el presente documento, es mayor del 50 %. Preferentemente, la probabilidad es más del 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, más preferentemente mayor del 95 %.

De manera más específica, si en una muestra de tumor de un paciente, el número de células positivas para CD3 es de al menos aproximadamente 600 células/mm² y el número de células positivas para CD8 es de al menos aproximadamente 200 células/mm² y/o el número de células positivas para granzima B es de al menos aproximadamente 30 células/mm², la probabilidad de que dicho paciente responda a la quimioterapia, preferentemente quimioterapia o inmunoterapia como se describe en el presente documento, es mayor del 50 % en comparación con un paciente, una muestra de tumor de la que no tiene los valores indicados de células CD3 y células CD8 y/o células granzima B (es decir, la muestra de tumor tiene valores más bajos). Preferentemente, la probabilidad es más del 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, más preferentemente mayor del 95 %.

El término "tumor", como se utiliza en el presente documento, se refiere a todos los crecimientos y proliferaciones de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Dentro del contexto de la presente invención, el tratamiento de linfomas malignos, es decir, cánceres, resulta preferido.

5 Por tanto, los usos y métodos de la invención se pueden utilizar para tratar tumores sólidos. El término "tratar" o "tratamiento" como se utiliza en el presente documento, significa reducir, estabilizar o inhibir la progresión de un síntoma, tal como el tamaño del tumor, el número de metástasis u otros síntomas que son causados por/asociados con la presencia y/o progresión de un tumor.

10 Una lista ejemplar no limitativa de enfermedades cancerosas y tumores, que pueden tratarse con quimioterapia, se ha proporcionado anteriormente en el presente documento en el contexto del método de predicción de la respuesta. Estos tumores descritos en el presente documento pueden ser metastásicos o no metastásicos.

15 En el contexto de la presente invención, el término "paciente con cáncer" (a veces también denotado como sujeto paciente o paciente con tumor) significa una persona que padece cáncer, por lo que tiene un tumor, pero también incluye una persona en riesgo de tener un tumor o una persona sospechosa de tener un tumor o una persona diagnosticada de padecer un tumor. Preferentemente, dicho sujeto es un mamífero, tal como un ser humano, un caballo, un camello, un perro, un gato, un cerdo, una vaca, una cabra o un ave de corral. Lo más preferido es un sujeto humano. Las composiciones, los compuestos, los usos y los métodos de la presente invención son aplicables tanto a la terapia humana como a aplicaciones veterinarias.

20 Como se pretende en el presente documento, una "muestra de tejido tumoral" o, como también se utiliza de manera equivalente en el presente documento, una "muestra de tumor" abarca (a) un tumor primario global (como un todo), (b) una sección de tejido completo, que contiene el centro del tumor así como el tejido que rodea directamente el tumor (específicamente llamado el "margen invasivo" del tumor) en conjunto con (i) islotes linfoides en proximidad con el tumor, (ii) los ganglios linfáticos ubicados en proximidad con el tumor, (iii) una muestra de tejido tumoral recogida antes de la cirugía (para el seguimiento de los pacientes después del tratamiento, por ejemplo), y una muestra (iv) de una metástasis distante, que también abarca la lesión metastásica así como el tejido normal adyacente (también llamado "margen invasivo").

30 Una "muestra de tumor" (a veces también denotada "muestra de tejido") se deriva preferentemente de un sujeto y se puede obtener mediante una biopsia con aguja, biopsia quirúrgica, una biopsia de médula ósea. Una muestra de tumor, por tanto, también incluye un tumor, partes de un tumor, células tumorales derivadas de un tumor (incluyendo líneas de células tumorales que pueden derivarse de un tumor y que se cultivan en cultivo celular), pero también líneas de células tumorales como tales, y células y/o tejido que se derivan de un sujeto y que se sospecha que son tumorigénicas o incluso cancerosas o que se sospecha que comprenden células tumorigénicas o cancerosas. Una muestra de tejido tumoral también incluye pedazos o cortes de tejido que se han extraído del tumor y/o del tejido circundante, incluyendo la resección quirúrgica del tumor o la recogida de una muestra de tejido por biopsia.

40 Se prevé, por tanto, que la muestra de tumor también pueda comprender células no tumorigénicas. Por ejemplo, las células tumorales y/o las (micro) metástasis están frecuentemente rodeadas de tejido sano, es decir, tejido no tumorigénico, es decir, las células tumorales podrían entonces formar un subconjunto de células dentro del tejido sano. De esa manera, una muestra de tumor podría comprender un subconjunto de células sanas (no tumorigénicas) y un subconjunto de células tumorigénicas. Asimismo, se prevé que se analice una muestra de sangre para determinar la concentración de ciertas citocinas y quimiocinas, por lo que la muestra de sangre no contiene necesariamente células tumorales. Asimismo se prevé que se analice una muestra de sangre para detectar células malignas o tumorales. De este modo, el análisis de células no tumorigénicas y de células tumorigénicas puede proporcionar información sobre el estado inmunitario del paciente.

50 También se prevé que las muestras tumorales puedan procesarse luego para la cuantificación adicional de uno o varios marcadores biológicos, principalmente mediante histología o inmunohistoquímica como se esboza en los métodos descritos anteriormente y mediante métodos de análisis de expresión de proteínas, incluyendo análisis proteómicos. Se apreciará que estas muestras de tejido tumoral pueden utilizarse en el método de predicción de la presente invención. En estas realizaciones, el nivel de expresión del marcador biológico se puede evaluar evaluando la cantidad (p. ej., cantidad absoluta o concentración) del marcador biológico en una muestra de tejido tumoral. La muestra de células puede, por supuesto, someterse a una variedad de técnicas de almacenamiento y preparación posteriores a la recogida bien conocidas (p. ej., extracción, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación de ácidos nucleicos y/o proteínas) antes de evaluar la cantidad de marcador biológico en la muestra.

60 El término "sitio del tumor" se refiere al tejido del tumor en sí, así como al tejido que está en estrecho contacto con el tejido del tumor, incluyendo el margen invasivo del tumor y los ganglios linfáticos regionales que están cerca del tejido del tumor o del margen invasivo del tumor. Este tejido se suele denominar "tejido adyacente".

65 "Determinar el número de células", como se utiliza en el presente documento en el contexto de los métodos de la presente invención, se refiere a determinar cualitativa y/o cuantitativamente, siendo cuantitativamente preferido, determinar el número de células. Se pueden aplicar cualquier técnica que sea adecuada para determinar el número de células, prefiriéndose la tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos. Los portaobjetos

digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes. De esa manera, los marcadores biológicos se evalúan automáticamente. Los algoritmos clasifican la muestra de cada paciente con respecto a su respuesta al tratamiento. El número de células se determina como densidad de células por milímetro cuadrado (mm²). Se prefiere que el número de células se determine mediante inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia. Por consiguiente, es una realización preferida de la presente invención que las células sean detectadas por un anticuerpo marcado o una sonda de ácido nucleico marcada.

En algunas realizaciones preferidas del segundo aspecto, el método comprende además determinar el nivel de al menos un marcador biológico adicional que es indicativo de una respuesta inmunitaria del paciente contra el cáncer, en donde un nivel que está por encima de un nivel predeterminado, que es indicativo de pacientes que no responden a la quimioterapia, es indicativo de que dicho paciente responde a la quimioterapia, preferentemente quimioterapia o inmunoterapia.

Los marcadores biológicos (biomarcadores) se describen en el presente documento en otra parte y, por tanto, se pueden aplicar en dicha realización preferida.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona

Un agente quimioterapéutico seleccionado entre carboplatino, paclitaxel, soferanib o 5-FU para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer con un tumor sólido, en donde el uso comprende

- (a) proporcionar una muestra de tumor tomada previamente de dicho paciente, en donde la muestra de tumor es una sección del tumor y comprende el margen invasivo;
- (b) determinar, en la sección del tumor, el número de células positivas para CD3 por milímetro cuadrado y o bien el número de células positivas para CD8 por milímetro cuadrado, o bien el número de células positivas para granzima B o ambos, en donde el número de células se determina con inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando una tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia;
- (c) seleccionar de dicho paciente con cáncer si el número de células positivas para CD3 /mm² y o bien el número de células positivas para CD8/mm² o bien el número de células positivas para granzima B/mm² está por encima de un umbral predefinido para cada uno de CD3, CD8 y granzima B; y
- (d) administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método de identificación selectiva de un agente quimioterapéutico terapéuticamente eficaz para un paciente con cáncer que comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar células tumorales de una muestra de tumor tomada previamente de dicho paciente, en donde dicha muestra de tumor se caracteriza por la infiltración de un número de células por milímetro cuadrado positivas para CD3 y o bien para CD8 o bien para granzima B, que está por encima de los umbrales predefinidos para cada marcador de superficie celular, según lo determinado por inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos en una sección de la muestra de tumor que comprende el margen invasivo; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia;
- (b) poner en contacto las células tumorales con uno o más agentes quimioterapéuticos; y
- (c) evaluar si dichos uno o más agentes quimioterapéuticos afectan a las células tumorales, en donde dicho cáncer es el cáncer colorrectal, los umbrales predefinidos son 600 células/mm² para CD3, 200 células/mm² para CD8 y 30 células/mm² para granzima B.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos específicos que se pueden aplicar en métodos, usos y kits de la presente invención incluyen: metotrexato; tamoxifeno; fluorouracilo; 5-fluorouracilo; hidroxiaurea; mercaptopurina; cisplatino; carboplatino; daunorrubicina; doxorubicina; etopósido; vinblastina; vincristina; paclitaxel; tioguanina; idarrubicina; dactinomicina; imatinib; gemcitabina; altretamina; asparaginasa; bleomicina; capecitabina; carmustina; cladibrina; ciclofosfamida; citarabina; decarazina; docetaxel; idarrubicina; ifosfamida; irinotecán; fludarabina; mitomicina; mitoxano; mitoxantrona; topotecán; vinorelbina; adriamicina; mitram; imiquimod; alemtuzumab; exemestano; bevacizumab; cetuximab; azacitidina; clofarabina; decitabina; desatinib; dexrazoxano; docetaxel; epirubicina; oxaliplatino; erlotinib; raloxifeno; fulvestrant; letrozol; gefitinib; gemtuzumab; trastuzumab; gefitinib; ixabepilona; lapatinib; lenalidomida; ácido aminolevulínico; temozolomida; nelarabina; sorafenib; nilotinib; pegaspargasa; pemetrexed; rituximab; dasatinib; talidomida; bexaroteno; temsirolimus; bortezomib; vorinostat; capecitabina; ácido zoledrónico; anastrozol; sunitinib; aprepitant y nelarabina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Igualmente, las sustancias de la presente invención se pueden utilizar en combinación con otros agentes que se pueden utilizar para tratar el cáncer, tales como acemanano; aclarrubicina; aldesleucina; alitretinoína; amifostina; amrubicina; amsacrina; anagrelida; arglabina; trióxido de arsénico; BAM 002 (Novelos); bicalutamida; broxuridina;

celmoleucina; cetorelix; cladribina; clotrimazol; DA 3030 (Dong-A); daclizumab; denileucina difitox; deslorelina; dilazep; docosanol; doxercalciferol; doxilfluridina; bromocriptina; citarabina; diclofenaco de HIT; interferón alfa; tretinoína; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; emitefur; epirubicina; epoetina beta; fosfato de etopósido; exisulind; fadrozol; finasterida; fosfato de fludarabina; formestano; fotemustina; nitrato de galio; gemtuzumab zogamicina; combinación de gimeracilo/oteracilo/tegafur; glicopina; goserelina; heptaplatino; gonadotropina coriónica humana; alfa fetoproteína fetal humana; ácido ibandrónico; interferón alfa; interferón alfa natural; interferón alfa-2; interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-NI; interferón alfa-n3; interferón alfacón-1; interferón alfa natural; interferón beta; interferón beta-la; interferón beta-lb; interferón gamma natural; interferón gamma-la; interferón gamma-lb; interleucina-1 beta; iobenguano; irsogladina; lanreotida; LC 9018 (Yakult); lefiunomida; lenograstim; sulfato de lentinano; letrozol; interferón alfa leucocítico; leuprorelina; levamisol + fluorouracilo; liarozol; lobaplatino; lonidamina; lovastatina; masoprocol; melarsoprol; metoclopramida; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario defectuoso; mitoguazona; mitolactol; mitoxantrona; molgramostim; nafarelina; naloxona + pentazocina; nartograstim; nedaplatino; nilutamida; noscapina; nueva proteína estimulante de la eritropoyesis; octreótido NSC 631570; oprelvekina; osaterona; paclitaxel; ácido pamidrónico; peginterferón alfa-2b; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; picibanil; pirarrubicina; anticuerpo policlonal antitímocitos de conejo; interferón alfa-2a de polietilenglicol; porfímero sódico; raltitrexed; rasburicasa; etidronato de renio Re 186; retinamida RJ; romurtida; samario (153 Sm) leixidronam; sargramostim; sizofirano; sobuzoxano; sonermina; cloruro de estroncio-89; suramin; tasonermina; tazaroteno; tegafur; temoporfm; tenipósido; tetraclorodecaóxido; timalfasina; tirotopina alfa; toremifeno; tositumomab-yodo 131; treosulfano; tretinoína; trilostano; trimetrexato; triptorelina; factor de necrosis tumoral alfa natural; ubenimex; vacuna contra el cáncer de vejiga; vacuna de Maruyama; vacuna contra lisado de melanoma; valrubicina; verteporfina; virulizina; estimalámero de zinostatina; abarelix; AE 941 (Aeterna); ambamustina; oligonucleótido antisentido; bcl-2 (Genta); APC 8015 (Dendreon); dexaminoglutetimida; diazicuona; EL 532 (Elan); EM 800 (Endorecherche); eniluracilo; etanidazol; fenretinida; filgrastim SDOI (Amgen); galocitabina; inmunógeno de gastrina 17; terapia génica con HLA-B7 (Vical); factor estimulador de colonia de macrófagos y granulocitos; diclorhidrato de histamina; ibritumomab tiuxetano; ilomastat; IM 862 (Cytran); interleucina-2; iproxifeno; LDI 200 (Milkhaus); leridistim; lintuzumab; anticuerpo monoclonal (MAb) CA 125 (Biomira); MAb contra el cáncer (Japan Pharmaceutical Development); MAb contra HER-2 y Fc (Medarex); MAb 105AD7 idiopático (CRC Technology); MAb CEA idiopático (Trilex); MAb LYM-I-yodo 131 (Techniclone); MAb contra mucina epitelial polimórfica-itrio 90 (Antisoma); marimastat; menogaril; mitumomab; motexafin gadolinio; MX 6 (Galderma); nolatrexed; proteína P 30; pegvisomant; porfiromicina; prinomastat; RL 0903 (Shire); rubitecán; satraplatino; fenilacetato sódico; ácido esparfósico; SRL 172 (SR Pharma); SU 5416 (SUGEN); TA 077 (Tanabe); tetratiomolibdato; taliblastina; trombopoyetina; etiopurpurina de etilo y de estaño; tirapazamina; vacuna contra el cáncer (Biomira); vacuna de melanoma (Universidad de Nueva York); vacuna de melanoma (Instituto Sloan Kettering); vacuna de oncolisado de melanoma (Colegio Médico de Nueva York); vacuna de lisados celulares de melanoma viral (Hospital Royal Newcastle); anticuerpos glicomodificados o valsopodar.

Una vez que se identificó o estratificó a un paciente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención para que responda a la quimioterapia, se pueden seleccionar uno o más agentes quimioterapéuticos que son particularmente adecuados para el tratamiento del cáncer colorrectal o cáncer de recto entre el grupo que consiste en UFT, capecitabina, CPT-II, oxaliplatino, 5FU, infusión continua de 5FU, paclitaxel, docetaxel, ciclofosfamida, metotrexato, doxorubicina, navelbina (iv y oral), epirubicina, mitoxantrona, raloxifeno, cisplatino, mitomicina, carboplatino, gemcitabina, etopósido y topotecán. Estos quimioterapéuticos pueden combinarse con un anticuerpo anti-EPCAM o cualquier otro anticuerpo.

Descripción de las figuras

Figura 1: Imágenes inmunohistológicas de metástasis hepáticas (aumento digital 10x), tinción de CD3 (rojo oscuro) y contratinción de HE. (a + b) muestra los márgenes invasivos de dos metástasis diferentes de dos pacientes diferentes con una densidad diferente de células infiltrantes en el margen invasivo (según lo representado por la puntuación 2 + 1 + 1), con una puntuación 2 + 1 + 1 de 0-2 (TTP 2 y 4 meses), (c + d) muestra 2 metástasis con una puntuación de 2 + 1 + 1 de 3 (TTP 10 y 11 meses), y (e + f) muestra metástasis de dos pacientes diferentes con una puntuación de 2 + 1 + 1 de 4 (TTP 18 y 24 meses).

Figura 2: Tiempo con respecto a la progresión bajo quimioterapia (tratamiento) de los pacientes según el sistema de puntuación 2 + 1 + 1 (basado en el análisis del margen invasivo de las metástasis hepáticas). Cada barra horizontal representa un único paciente, la longitud de la barra representa el tiempo individual respecto a la progresión (en meses). El grupo con puntuación 0-2 corresponde a los pacientes sin respuesta a la quimioterapia, se muestra el tiempo promedio de progresión en meses para cada grupo (los paréntesis muestran el grupo respectivo), las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas.

Figura 3: Gráfico de Kaplan-Meier de las probabilidades supervivencia libre de progresión estimadas en el grupo 0-2 y el grupo 3 + 4. Las flechas pequeñas indican los grupos correspondientes.

Figura 4: Flujo de trabajo para la cuantificación precisa de células inmunitarias y/o moléculas de señalización (cuantificación de proteínas, p. ej., citocinas y quimiocinas).

Figura 5: Posible flujo de trabajo clínico utilizando la invención para identificar pacientes que se benefician de la

quimioterapia.

Figura 6: Regiones principales del tejido tumoral y tejido normal adyacente (representadas en una sección de un único portaobjetos).

5

Figura 7: Método de la presente invención: combinación de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en el mismo portaobjetos (IHQ fluorescente multiplex).

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir si un paciente con cáncer con un tumor sólido responde a un tratamiento con quimioterapia, que comprende las etapas que consisten en:

5

- proporcionar una muestra de tumor previamente tomada de dicho paciente, en donde la muestra de tumor es una sección del tumor y comprende el margen invasivo; y
- determinar, en la sección del tumor, el número de células positivas para CD3 por milímetro cuadrado y o bien el número de células positivas para CD8 por milímetro cuadrado, o bien el número de células positivas para granzima B o ambos, en donde el número de células se determina con inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando una tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos en la sección de tejido completo; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia, en donde un número de células positivas para CD3 por mm² y células positivas para CD8/mm² y/o células positivas para granzima B/mm² por encima de un umbral predefinido para cada uno de CD3, CD8 y granzima B es indicativo de que dicho paciente responde a dicha quimioterapia.

20 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho cáncer es un cáncer metastásico.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho cáncer es el cáncer colorrectal.

25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha muestra de tumor es una muestra de un tumor primario o de una metástasis.

5. El método de la reivindicación 4, en donde la muestra de tumor es una muestra de metástasis hepática.

30 6. El método de la reivindicación 5, en donde dicha muestra de tumor comprende

- (i) islotes linfáticos en proximidad con el tumor;
- (ii) ganglios linfáticos ubicados en proximidad con el tumor; y/o
- (iii) tejido normal adyacente o sangre de la periferia.

35 7. El método de la reivindicación 6, en donde los umbrales predefinidos son 600 células/mm² para CD3, 200 células/mm² para CD8 y 30 células/mm² para granzima B.

40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además determinar el nivel de al menos un marcador biológico adicional que es indicativo de una respuesta inmunitaria del paciente contra el cáncer, en donde un nivel que está por encima de un nivel predeterminado es indicativo de que dicho paciente responde a la quimioterapia; en donde el marcador biológico adicional es el nivel de interferón gamma y un nivel de interferón gamma de por encima de 1000 ng/ml es indicativo de una respuesta a la quimioterapia; en donde el marcador biológico adicional es la relación de interferón gamma a RANTES, y en donde una relación de interferón gamma a RANTES superior a 1 es indicativo de una respuesta a la quimioterapia; en donde el marcador biológico adicional es VEGF y/o IL-8 y en donde una concentración de VEGF y/o IL-8 en una muestra de un paciente que es superior en comparación con un paciente que no padece cáncer es indicativo de una respuesta a la quimioterapia; y/o en donde el marcador biológico adicional es interferón gamma, MIG, IP-10 y/o fractalquina y en donde una concentración de interferón gamma, MIG, IP-10 y/o fractalquina en una muestra de un paciente que es inferior en comparación con un paciente que no padece cáncer, es indicativo de que dicho paciente es indicativo de una respuesta a la quimioterapia.

50 9. Un agente quimioterapéutico seleccionado entre carboplatino, paclitaxel, soferanib o 5-FU para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer con un tumor sólido, en donde el uso comprende

- (a) proporcionar una muestra de tumor tomada previamente de dicho paciente, en donde la muestra de tumor es una sección del tumor y comprende el margen invasivo;
- (b) determinar, en la sección del tumor, el número de células positivas para CD3 por milímetro cuadrado y o bien el número de células positivas para CD8 por milímetro cuadrado, o bien el número de células positivas para granzima B o ambos, en donde el número de células se determina con inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando una tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia;
- (c) seleccionar de dicho paciente con cáncer si el número de células positivas para CD3 /mm² y o bien el número de células positivas para CD8/mm² o bien el número de células positivas para granzima B/mm² está por encima de un umbral predefinido para cada uno de CD3, CD8 y granzima B; y

(d) administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico.

5 10. El agente quimioterapéutico para su uso en el tratamiento de la reivindicación 9, en donde dicho cáncer es el cáncer colorrectal y los umbrales predefinidos de la muestra de tumor son 600 células/mm² para CD3, 200 células/mm² para CD8 y 30 células/mm² para granzima B.

11. Un método de identificación selectiva de un agente quimioterapéutico terapéuticamente eficaz para un paciente con cáncer que comprende las siguientes etapas que consisten en:

- 10 (a) proporcionar células tumorales de una muestra de tumor tomada previamente de dicho paciente, en donde dicha muestra de tumor se caracteriza por la infiltración de un número de células por milímetro cuadrado positivas para CD3 y o bien para CD8 o bien para granzima B, que está por encima de los umbrales predefinidos para cada marcador de superficie celular, según lo determinado por inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia utilizando tecnología de formación de imágenes de portaobjetos completos en una sección de la muestra de tumor que
15 comprende el margen invasivo; en donde los portaobjetos digitalizados microscópicamente que resultan de la formación de imágenes de portaobjetos completos se someten a un procesamiento automático de imágenes; en donde los marcadores biológicos se evalúan automáticamente y; en donde la muestra del paciente se clasifica por medio de algoritmos con respecto a su respuesta al tratamiento con quimioterapia;
- 20 (b) poner en contacto las células tumorales con uno o más agentes quimioterapéuticos; y
(c) evaluar si dichos uno o más agentes quimioterapéuticos afectan a las células tumorales, en donde dicho cáncer es el cáncer colorrectal, los umbrales predefinidos son 600 células/mm² para CD3, 200 células/mm² para CD8 y 30 células/mm² para granzima B.

Figura 1

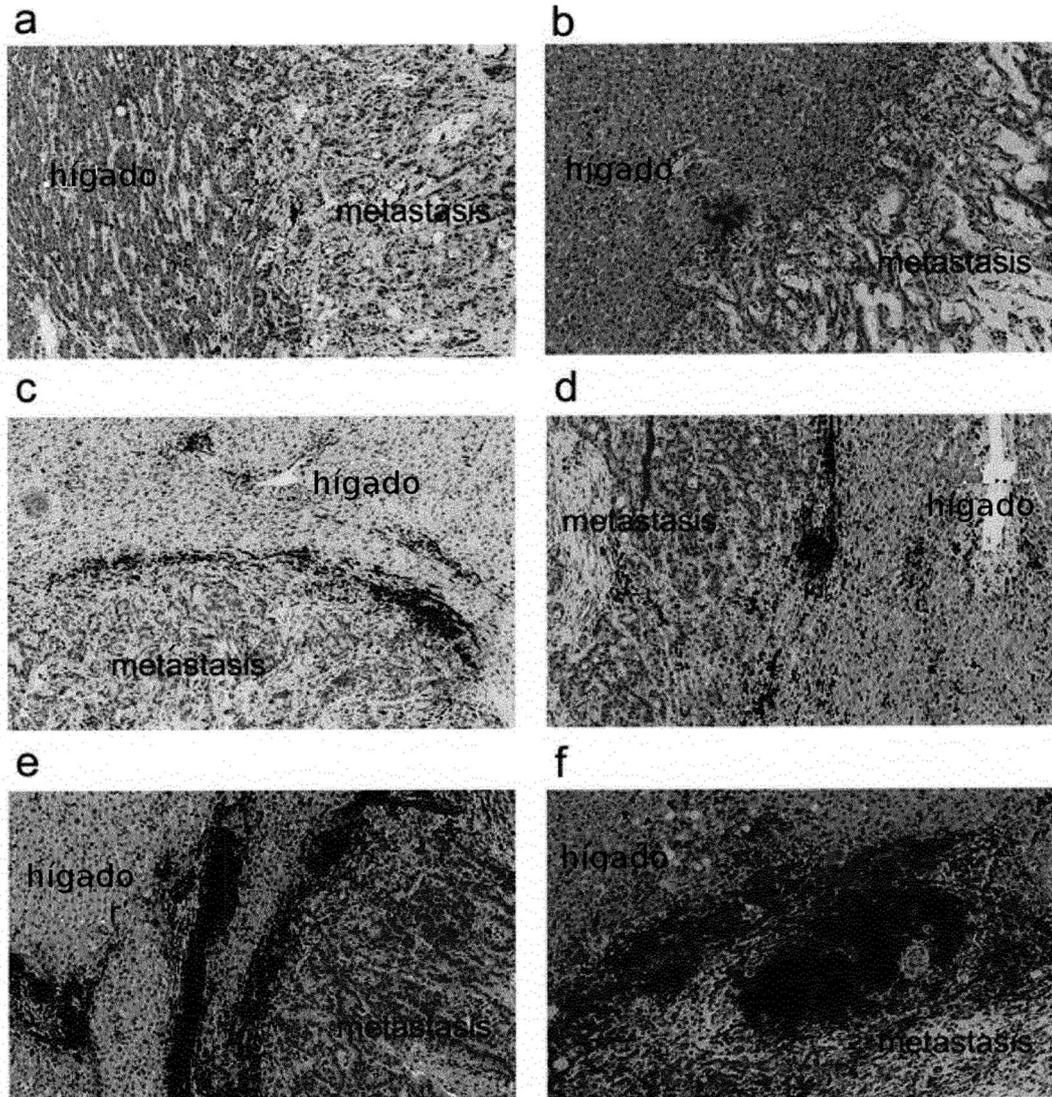


Figura 2

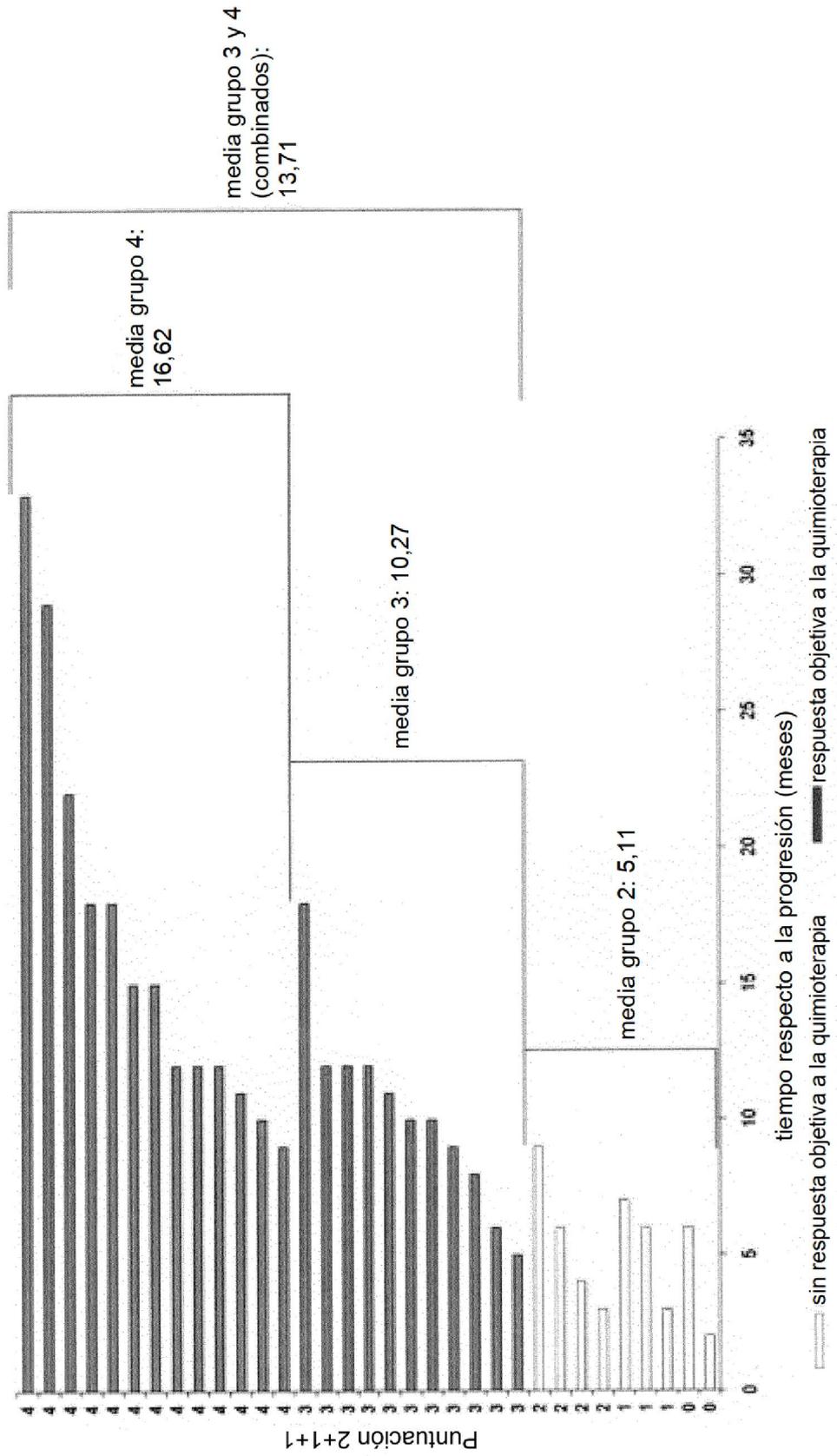


Figura 3

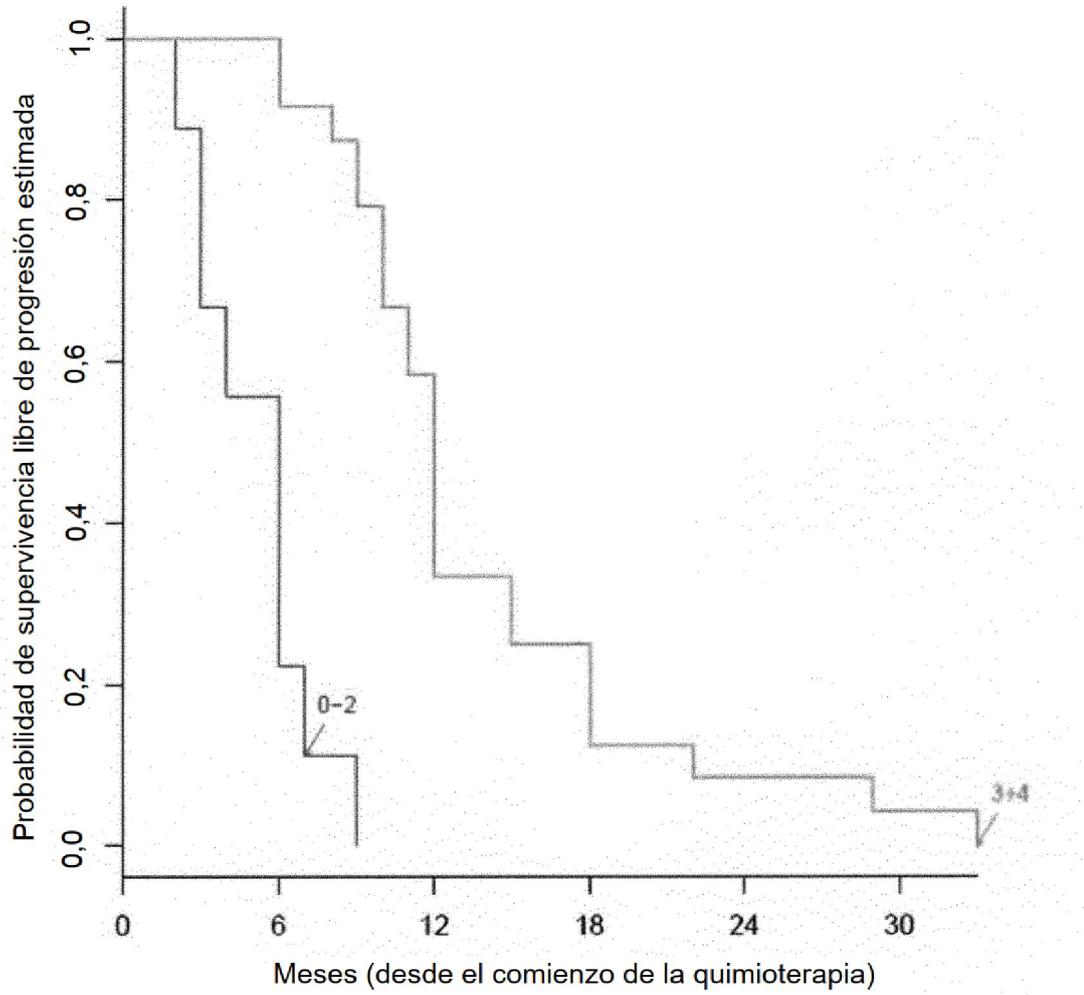


Figura 4

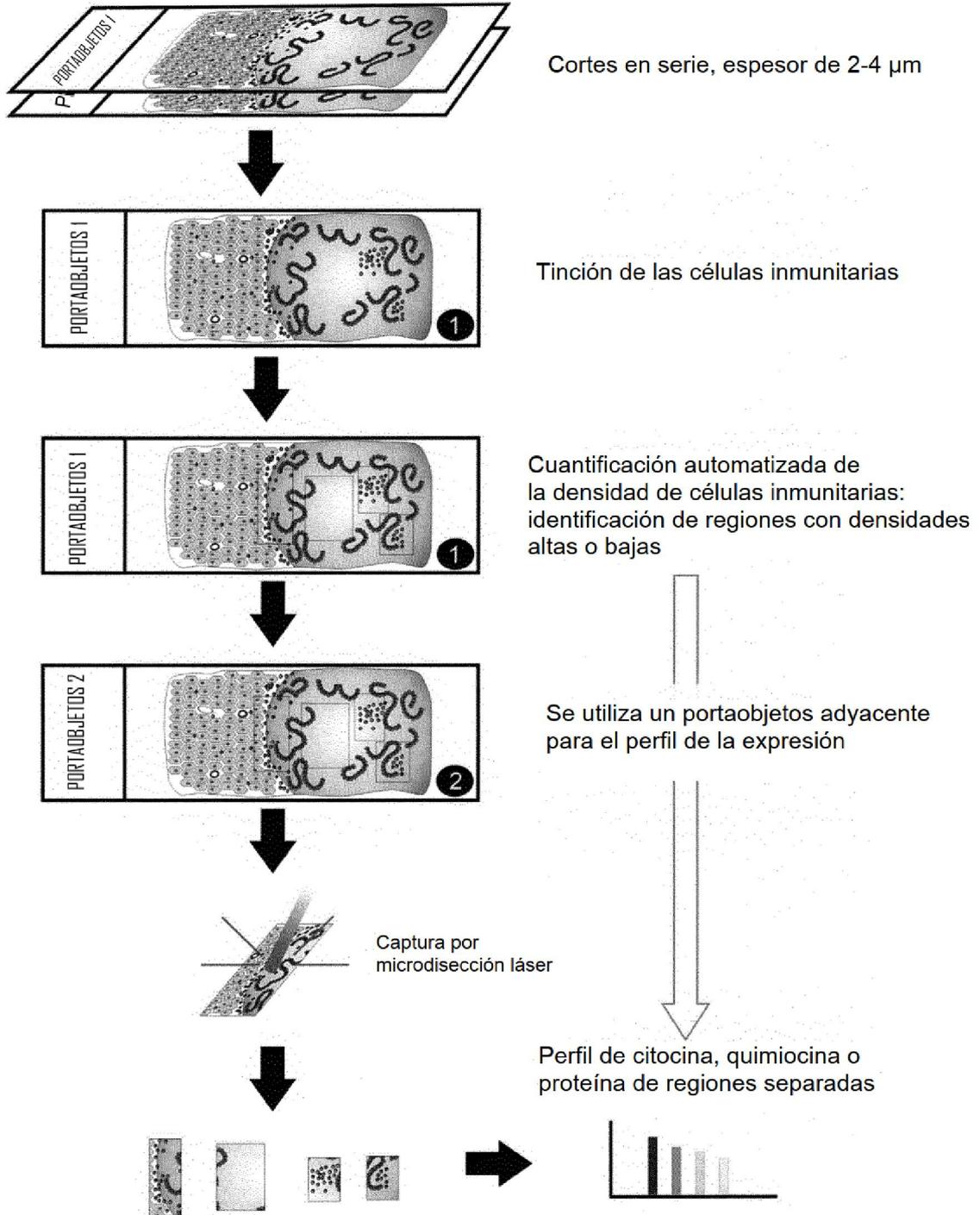


Figura 5

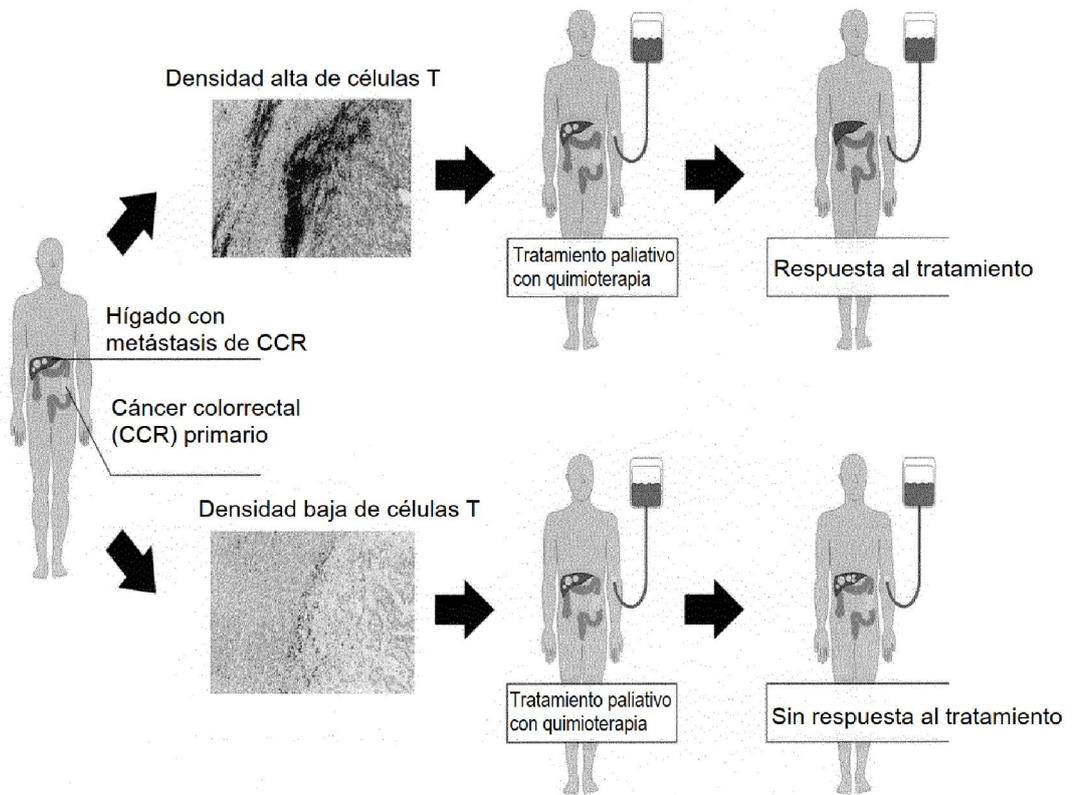


Figura 6

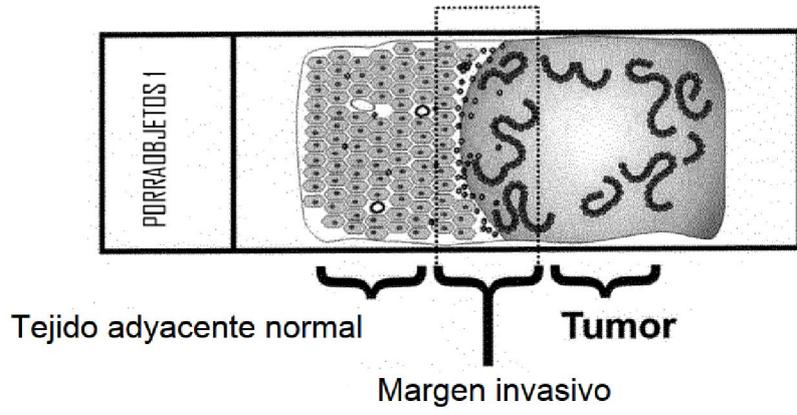


Figura 7

Método: Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica combinadas

