

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 844 799**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2016** **PCT/US2016/027014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16168133**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2016** **E 16780526 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **16.10.2024** **EP 3283882**

54 Título: **Biomarcadores sanguíneos de sensibilidad tumoral a antagonistas de PD-1**

30 Prioridad:

17.04.2015 US 201562149333 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
16.01.2025

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME LLC (100.00%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065, US

72 Inventor/es:

AYERS, MARK;
LUNCEFORD, JARED;
LOBODA, ANDREY;
NEBOZHYN, MICHAEL;
MCCLANAHAN, TERRILL, K. y
HIRSCH, HEATHER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 844 799 T5

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores sanguíneos de sensibilidad tumoral a antagonistas de PD-1

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere de forma general al tratamiento del cáncer. En particular, la invención se refiere a métodos para identificar pacientes que probablemente experimenten una respuesta antitumoral al tratamiento con un antagonista de la muerte programada 1 (PD-1).

10 Antecedentes de la invención

El PD-1 es conocido como una molécula importante en la regulación inmunitaria y el mantenimiento de la tolerancia periférica. El PD-1 se expresa moderadamente en linfocitos T, B y NKT sin exposición previa y se regula positivamente mediante la señalización del receptor de linfocitos T/B en linfocitos, monocitos y células mieloides (1).

Dos ligandos conocidos para PD-1, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC), se expresan en cánceres humanos que surgen en varios tejidos. En grandes conjuntos de muestras de, por ejemplo, cánceres de ovario, renal, colorrectal, pancreático, hígado y melanoma, se demostró que la expresión de PD-L1 se correlacionaba con un mal pronóstico y una reducción de la supervivencia global independientemente del tratamiento posterior (2-13). De forma similar, se descubrió que la expresión de PD-1 en los linfocitos que se infiltran en el tumor marca los linfocitos T disfuncionales en el cáncer de mama y el melanoma (14-15) y se correlaciona con un mal pronóstico en el cáncer renal (16). Por lo tanto, se ha propuesto que las células tumorales que expresan PD-L1 interactúan con los linfocitos T que expresan PD-1 para atenuar la activación de los linfocitos T y la evasión de la vigilancia inmunitaria, contribuyendo así a una respuesta inmunitaria deteriorada contra el tumor.

Varios anticuerpos monoclonales que inhiben la interacción entre PD-1 y uno o ambos de sus ligandos PD-L1 y PD-L2 están en desarrollo clínico para el tratamiento del cáncer. Estos incluyen nivolumab y pembrolizumab, que son anticuerpos que se unen a PD-1 y MPDL3280A, que se une a PD-L1. Si bien los estudios clínicos con estos anticuerpos han producido respuestas antitumorales duraderas en algunos tipos de cáncer, un número significativo de pacientes no mostró una respuesta antitumoral. Por lo tanto, existe la necesidad de herramientas de diagnóstico para identificar qué pacientes con cáncer tienen más probabilidades de lograr un beneficio clínico con el tratamiento con un antagonista de PD-1.

Un área activa en la investigación del cáncer es la identificación de patrones de expresión génica, comúnmente conocidos como firmas genéticas o firmas moleculares, que son característicos de tipos o subtipos particulares de cáncer y que pueden estar asociados con resultados clínicos. Por ejemplo, las solicitudes de patente internacional en trámite con la presente PCT/US14/070236, PCT/US14/070232 y PCT/US14/070237, cada una de las cuales se presentó el 15 de diciembre de 2014, describen diversas firmas genéticas para tejido tumoral que son biomarcadores predictivos de pacientes que producen una respuesta antitumoral después del tratamiento posterior con el antagonista de PD-1 pembrolizumab. Sin embargo, para evitar el requisito de que el tejido tumoral pruebe a un paciente en busca de un biomarcador predictivo, sería deseable identificar biomarcadores en sangre que se puedan utilizar antes o durante el tratamiento con un antagonista de PD-1 para identificar a los pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse o ser resistentes a tal inmunoterapia.

El documento US2015/071910 (Kowanetz Marcin *et al.*) describe la determinación de los biomarcadores CD8 derivados de la sangre, INF, EOMES, Granzima-A, CAC19 y diversas combinaciones y el uso de marcadores para predecir la respuesta al tratamiento del cáncer.

El documento WO2014/009535 (Inst Nat Sante Rech Med) describe el uso de firmas genéticas para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido.

Sumario de la invención

La invención se establece en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona firmas genéticas basadas en sangre inicial y en el tratamiento que son biomarcadores predictivos de la sensibilidad tumoral a la terapia con un antagonista de PD-1. Cada uno de estos biomarcadores sanguíneos comprende una firma genética, es decir, un conjunto específico de genes y una puntuación de firma genética, que es un compuesto aritmético de los niveles de expresión de ARN normalizados de todos los genes de la firma que se han medido en el ARN intracelular aislado de una muestra de sangre.

En algunas realizaciones, el biomarcador de firma genética es un biomarcador en tratamiento y el paciente es positivo para el biomarcador si la puntuación de firma genética de una muestra de sangre obtenida después de que el paciente haya recibido al menos una dosis del antagonista de PD-1 es mayor que la puntuación de firma genética para una muestra de sangre inicial del paciente, por ejemplo, antes del tratamiento con el antagonista de PD-1.

En una realización, la firma genética en un biomarcador en tratamiento comprende PD-L1 y al menos otros cuatro genes que se coexpresan con PD-L1, es decir, una firma genética de PD-L1. En una realización, el conjunto de genes en un biomarcador de firma genética de PD-L1 en el tratamiento comprende una firma de cinco o seis genes que se muestra en las Tablas 1A y 1B a continuación, respectivamente. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de cada gen en una firma genética de PD-L1 se evalúa midiendo el nivel de cada transcrito diana enumerado en la Tabla 1A o Tabla 1B.

Tabla 1: Firmas genéticas de PD-L1 ilustrativas

Tabla 1A		Tabla 1B	
Firma de cinco genes	Transcrito diana	Firma de seis genes	Transcrito diana
PD-L1	NM_014143	PD-L1	NM_014143
PD-L2	NM_025239	PD-L2	NM_025239
LAG3	NM_002286	LAG3	NM_002286
STAT1	NM_007315	STAT1	NM_007315
CXCL10	NM_001565	CXCL10	NM_001565
		CLEC10a	NM_182906

En otra realización, la firma genética en un biomarcador en tratamiento comprende un conjunto específico de al menos aproximadamente 5 a aproximadamente 10 de los genes enumerados en la Tabla 2 a continuación. Cada uno de los genes de la Tabla 2 tiene una relación biológica con la señalización de interferón-gamma (IFNG) y, por tanto, se denomina en el presente documento como un gen relacionado con IFNG. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de cada gen en una firma genética de IFNG se evalúa midiendo el nivel del correspondiente transcrito diana enumerado en la Tabla 2A. En las Tablas 2B, 2C y 2D a continuación se muestran ejemplos de firmas genéticas de IFNG que pueden comprender biomarcadores basados en sangre de la invención.

Tabla 2: Genes relacionados con IFNG y firmas genéticas ilustrativas de IFNG

Tabla 2A		Tabla 2B	Tabla 2C	Tabla 2D
Gen relacionado con IFNG	Transcrito diana	Firma de diez genes	Firma de seis genes	Firma de cinco genes
CCL4	NM_002984.2			
CCL5	NM_002985.2			
CCR5	NM_000579.1	CCR5		
CD2	NM_001767.2			
CD86	NM_175862.3			
CIITA	NM_000246.3			
CXCL9	NM_002416.1	CXCL9	CXCL9	CXCL9
CXCL10	NM_001565.1	CXCL10	CXCL10	CXCL10
CXCL11	NM_005409.3	CXCL 11		
GZMA	NM_006144	GZMA		
HLA-DRA	NM_019111.3	HLA-DRA	HLA-DRA	HLA-DRA
IDO1	NM_002164.3	IDO1	IDO1	IDO1
IFNG	NM_000619.2	IFNG	IFNG	
KLRK1	NM_007360.1			
PRF1	NM_001083116	PRF1		
STAT1	NM_007315.2	STAT1	STAT1	STAT1

En otra realización, la firma genética en un biomarcador en tratamiento comprende una combinación de una firma de

PD-L1 enumerada en la Tabla 1 y una firma de IFNG enumerada en la Tabla 2. En una realización, esta firma de combinación PD-L1/IFNG consta de CCR5, CLEC10a, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, LAG3, PD-L1, PD-L2, PRF1 y STAT1.

- 5 En algunas realizaciones, la firma genética basada en sangre en un biomarcador inicial comprende uno o más de los genes de la vía de fosforilación oxidativa (OxPhos) enumerados en la Tabla 3 a continuación, y en una realización comprende de 2 a 6, de 3 a 7, de 4 a 8, de 5 a 10 o de 6 a 11 genes de la Tabla 3.

Tabla 3. Genes ilustrativos para las firmas genéticas de OxPhos

Símbolo	Nombre del gen de Entrez
ATP5G2	ATP sintasa, transportador de H ⁺ , complejo Fo mitocondrial, subunidad C2
ATP5G3	ATP sintasa, transportador de H ⁺ , complejo Fo mitocondrial, subunidad C3
ATP5J2	ATP sintasa, transportador de H ⁺ , complejo Fo mitocondrial, subunidad F2
COX7C	citocromo c oxidasa subunidad VIIc
NDUFA12	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 12
NDUFA13	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 13
NDUFA3	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 3, 9kDa
NDUFA7	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 7, 14.5kDa
NDUFB11	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 11, 17.3kDa
NDUFB4	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 4, 15kDa
NDUFS5	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Proteína Fe-S 5, 15 kDa

10 Para evaluar si es probable que el tumor de un paciente responda a un antagonista de PD-1, la puntuación calculada para una muestra de sangre inicial obtenida del paciente se compara con una puntuación de referencia para la firma genética de OxPhos que ha sido preseleccionada para dividir al menos a la mayoría de los que responden a la terapia con el antagonista PD-1 de al menos la mayoría de los que no responden a la terapia anti-PD-1. Si el paciente tiene una puntuación de firma genética de OxPhos inicial que es igual o mayor que la puntuación de firma genética de OxPhos de referencia, es menos probable que el paciente responda al antagonista de PD-1 que si la puntuación del paciente es menor que la puntuación de referencia. En algunas realizaciones, un paciente con una puntuación de firma genética de OxPhos inicial que es menor que la puntuación de referencia se clasifica como positivo para un biomarcador de firma genética de OxPhos y un paciente con una puntuación de firma genética de OxPhos inicial que es mayor que la puntuación de referencia se clasifica como negativo para un biomarcador de firma genética de OxPhos.

Los inventores contemplan que determinar las puntuaciones de firma para las firmas genéticas basadas en sangre descritas en el presente documento será útil en varias aplicaciones clínicas y de investigación.

25 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para analizar en un paciente la presencia o ausencia de un biomarcador durante el tratamiento que predice que es probable que el paciente tenga una respuesta antitumoral al tratamiento con un antagonista de PD-1. El método comprende (a) obtener una muestra de un ARN intracelular total que se ha aislado de una muestra de sangre inicial recogida del paciente, (b) medir el nivel de expresión de ARN crudo de referencia en el ARN aislado para cada gen en una firma genética, (c) normalizar los niveles de expresión de ARN crudo iniciales medidos (d) calcular una puntuación de firma inicial para la firma genética a partir de los niveles de expresión de ARN normalizados, (e) obtener una muestra de ARN intracelular total que se ha aislado de una muestra de sangre extraída del paciente después de la dosis, (f) medir el nivel de expresión de ARN crudo posterior a la dosis en el ARN aislado para cada gen en la firma genética, (g) normalizar cada uno de los niveles de expresión de ARN crudo medidos después de la dosis (h) calcular una puntuación de firma posterior a la dosis para la firma genética a partir de los niveles de expresión de ARN normalizados, (i) calcular una puntuación de firma posterior a la dosis para la firma genética a partir de los niveles de expresión de ARN medidos y (j) comparar la puntuación posterior a la dosis con la puntuación inicial, y (k) clasificar al paciente como biomarcador positivo o biomarcador negativo; en el que el paciente se clasifica como biomarcador positivo si la puntuación de firma posterior a la dosis es mayor que la puntuación de firma inicial del paciente y el paciente se clasifica como biomarcador negativo si la puntuación de firma posterior a la dosis es igual o menor que la puntuación de firma inicial, en donde las etapas b-d se pueden realizar antes, concurrentemente con, o después de las etapas f-h, y en donde la firma genética comprende un conjunto de genes seleccionados del grupo que consiste en:

- (ii) PD-L1, PD-L2, LAG3, STAT1, CXCL10 y CLEC10a;
- (ii) CCR5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, PRF1 y STAT1; y
- (iii) CCR5, CLEC10a, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, LAG3, PD-L1, PD-L2, PRF1 y STAT1.

En una realización, la muestra de sangre posterior a la dosis se obtiene después de una dosis única del antagonista de PD-1. En una realización, el antagonista de PD-1 se administra al paciente el día 1 de un ciclo de 2 o 3 semanas, y la muestra de sangre posterior a la dosis se obtiene el último día del primer ciclo o el primer día del segundo ciclo, antes de la administración de la segunda dosis. En otra realización, la muestra de sangre posterior a la dosis se obtiene después de una segunda dosis o una dosis posterior del antagonista de PD-1.

En otro aspecto, la invención proporciona un antagonista de PD-1 para su uso en un método de tratamiento de un paciente diagnosticado con un tumor que comprende:

- (a) tomar una muestra de sangre inicial del paciente,
- (b) administrar al menos una dosis del antagonista de PD-1 al paciente,
- (c) tomar una muestra de sangre del paciente después de la dosis,
- (d) obtener una puntuación de firma para un biomarcador de firma genética en cada una de las muestras de sangre iniciales y posteriores a la dosis, y
- (e) tratar al paciente con un régimen terapéutico que comprende el antagonista de PD-1 si la puntuación de firma posterior a la dosis es mayor que la puntuación de firma inicial o tratar al sujeto con un régimen terapéutico que no incluye un antagonista de PD-1 si la puntuación posterior a la dosis es igual o menor que la puntuación inicial;

en donde la firma genética comprende un conjunto de genes seleccionados del grupo que consiste en:

- (ii) PD-L1, PD-L2, LAG3, STAT1, CXCL10 y CLEC10a;
- (ii) CCR5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, PRF1 y STAT1; y
- (iii) CCR5, CLEC10a, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, LAG3, PD-L1, PD-L2, PRF1 y STAT1.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que da positivo en un biomarcador de sangre, en donde la composición comprende un antagonista de PD-1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, y en donde el biomarcador en sangre inicial es un biomarcador en tratamiento que comprende una firma genética seleccionada del grupo que consiste en:

- (ii) PD-L1, PD-L2, LAG3, STAT1, CXCL10 y CLEC10a;
- (ii) CCR5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, PRF1 y STAT1; y
- (iii) CCR5, CLEC10a, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, LAG3, PD-L1, PD-L2, PRF1 y STAT.

La descripción describe una composición farmacéutica que comprende un antagonista de PD-1 para su uso en el tratamiento de un cáncer en pacientes que (a) dan positivo para un biomarcador de firma genética de PD-L1 o IFNG durante el tratamiento o (b) dan positivo para un biomarcador de firma genética de OxPhos inicial.

La descripción describe un producto farmacéutico que comprende una composición farmacéutica e información de prescripción. La composición farmacéutica comprende un antagonista de PD-1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La información de prescripción establece que la composición farmacéutica está indicada para su uso en el tratamiento de un cáncer en pacientes que (a) dan positivo en la prueba del biomarcador de firma genética PD-L1 o IFN- γ durante el tratamiento o (b) dan positivo en la prueba del biomarcador de firma genética de OxPhos inicial.

La descripción describe un kit útil para analizar una muestra de sangre para determinar una puntuación para una firma genética de PD-L1, IFN- γ u OxPhos en la muestra. El kit comprende un primer conjunto de sondas para detectar la expresión de cada gen en la firma genética. La firma genética puede ser cualquiera de las firmas genéticas enumeradas en la Tabla 1 y la Tabla 2, y el kit comprende, para cada transcrito diana en la firma genética, al menos una sonda para el transcrito diana. El kit también puede comprender un segundo conjunto de sondas para detectar la expresión de un conjunto de genes de normalización. El conjunto de genes de normalización consta de cualquier número de genes entre 10 y 1000, por ejemplo, este conjunto de genes puede constar de al menos 10, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 genes. En un ejemplo, el kit comprende un conjunto de sondas para detectar la expresión de cada uno de los 680 genes enumerados en la Tabla 4 a continuación. El kit también puede comprender una pluralidad de muestras de sangre de control que se pueden analizar para determinar la expresión de la firma genética de interés y los genes de normalización de la misma manera que la muestra de sangre de prueba.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, determinar la puntuación para una firma genética de interés en una muestra de sangre comprende realizar la normalización cuantitica de los valores de expresión de ARN sin procesar para los genes en la firma genética en relación con la distribución de los valores de

expresión de ARN sin procesar para un conjunto de al menos 200, 250, 300, 350, 400 o 600 genes de normalización, seguido de una transformación log10 posterior. En una realización, el conjunto de genes de normalización comprende los genes característicos y otros genes. En una realización, el conjunto de genes de normalización consta de los 680 genes de la Tabla 4 a continuación.

En todos los aspectos y realizaciones anteriores de la invención, el antagonista de PD-1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y, preferentemente, también inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunas realizaciones, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 o a PD-L1 y bloquea la unión de PD-L1 con PD-1. En una realización, el antagonista de PD-1 es pembrolizumab o nivolumab.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el paciente tiene cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de riñón de células claras, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma escamocelular de pulmón, melanoma maligno, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico (CPM) o cáncer de mama triple negativo. En una realización, el paciente tiene melanoma avanzado sin tratamiento previo con ipilimumab, mientras que en otra realización el paciente tiene melanoma avanzado refractario a ipilimumab.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 es un gráfico de dispersión que muestra que se detectaron niveles mayores estadísticamente significativos de ARNm de PD-1 y ARNm de PD-L1 en muestras de sangre obtenidas de una cohorte de 44 pacientes con melanoma que habían sido tratados con una dosis única de pembrolizumab (la Cohorte MEL) en comparación con los niveles de PD-1 y PD-L1 detectados en muestras de sangre inicial de la cohorte.

Las FIGURAS 2A y 2B son diagramas de caja que muestran el cambio posterior a la dosis única (PD) en las puntuaciones para las firmas genéticas ilustrativas de PD-L1 (FIG. 2A) e IFNG (FIG. 2B) analizadas en ARN aislado de muestras de sangre recolectadas de 43 pacientes en la Cohorte MEL (eje y) representadas frente a las determinaciones de respuesta para la cohorte que se realizaron después del tratamiento continuo con pembrolizumab, con pacientes que tenían enfermedad estable o enfermedad progresiva agrupados como sin respuesta (SR) y pacientes que tenían una respuesta parcial agrupados con pacientes que tenían una respuesta completa (RP + RC).

Las FIGURAS 3A y 3B son diagramas de caja que muestran los cambios posteriores a la dosis única (PD) en las puntuaciones para las mismas firmas genéticas y pacientes que en las FIG. 2A y 2B y los pacientes clasificados por clasificaciones de respuesta de enfermedad progresiva (EP), enfermedad estable (EE), respuesta parcial (RP) o respuesta completa (RC).

Las FIGURAS 4A y 4B ilustran los resultados de supervivencia para subconjuntos de la cohorte MEL con un cambio posterior a la dosis en la puntuación para una firma genética de PD-L1 ilustrativa que estaba por encima (línea discontinua) o por debajo (línea continua) de la mediana del cambio posterior a la dosis para toda la cohorte, con la FIG. 4A que muestra la duración de la supervivencia sin progresión (SSP) y la FIG. 4B que muestra la duración de la supervivencia global (SG).

Las FIGURAS 5A y 5B ilustran los resultados de supervivencia para subconjuntos de la cohorte MEL como en la FIG. 1 que tenían un cambio posterior a la dosis en la puntuación para una firma genética de IFNG ilustrativa que estaba por encima (línea discontinua) o por debajo (línea continua) de la mediana del cambio posterior a la dosis para la cohorte, con la FIG. 5A que muestra la duración de la supervivencia sin progresión (SSP) y la FIG. 5B que muestra la duración de la supervivencia global (SG).

La FIGURA 6 ilustra la correlación entre los cambios posteriores a la dosis (PD) en las puntuaciones de los pacientes determinadas usando secuenciación de ARN para las firmas genéticas de IFNG y PD-L1 ilustrativas en muestras de sangre inicial y posteriores a la dosis obtenidas de la cohorte MEL.

Las FIGURAS 7A, 7B y 7C son gráficos en cascada que muestran cambios posteriores a la dosis en las puntuaciones de firma para firmas genéticas ilustrativas en el tratamiento determinadas para muestras de sangre (eje Y) de 43 pacientes individuales en la cohorte MEL (eje X) que tenían una respuesta objetiva (RP o RC) (MRO = 1) o no tuvo una respuesta objetiva (MRO = 0) al tratamiento con pembrolizumab, con datos para la firma de 10 genes de IFNG (Figura 7A), la firma de 6 genes de PD-L1 (Figura 7B) y una firma de 14 genes compuesta por genes únicos en las firmas de IFNG y PD-L1. FIG. 7C.

La FIGURA 8 ilustra la concordancia entre las puntuaciones en la cohorte MEL para una firma genética de PD-L1 ilustrativa (FIG. 8A) y una firma genética de IFNG ilustrativa (FIG. 8B) que se determinaron con valores de expresión de ARN medidos usando la plataforma NanoString® (eje y) o la plataforma Illumina® SeqARN (eje x).

La FIGURA 9 es un diagrama de caja que muestra los cambios posteriores a la dosis única (PD) en las

puntuaciones en la cohorte MEL para una firma genética de IFNG ilustrativa para los subconjuntos de la cohorte que dieron negativo (IHQ-) o positivo (IHQ+) para la expresión en tumor de PD-L1 inicial mediante análisis inmunohistoquímico utilizando un ensayo clínico prototipo desarrollado por Dako.

- 5 La FIGURA 10 es un diagrama de caja que muestra la distribución de puntuaciones para una firma genética ilustrativa de OxPhos en 43 pacientes de la cohorte MEL cuya mejor respuesta objetiva a la terapia con pembrolizumab fue RP o RC (MRO = 1) o no tenían RP o RC (MRO = 0).
- 10 La FIGURA 11 es un gráfico en cascada de puntuaciones de firmas individuales para una firma inicial del gen OxPhos ilustrativa (eje Y) en 43 pacientes de la cohorte MEL (eje X) que tuvieron una respuesta objetiva (RP o RC) o no tuvieron una respuesta objetiva al tratamiento con pembrolizumab.

Descripción detallada

- 15 **Abreviaturas.** A lo largo de la descripción detallada y de los ejemplos de la invención, se utilizarán las siguientes abreviaturas:

MRO	Mejor respuesta objetiva
CDR	Región determinante de la complementariedad
CHO	Ovario de hámster chino
RC	Respuesta Completa
SSE	Supervivencia sin enfermedad
FR	Región marco
IFNG o IFN-γ	Interferón gamma
irRC	Criterios de respuesta inmunitaria
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RO	Respuesta objetiva
SG	Supervivencia global
EP	Enfermedad Progresiva
PD-1	Muerte programada 1
PD-L1	Ligando 1 de muerte celular programada 1
PD-L2	Ligando 2 de muerte celular programada 1
SSP	Supervivencia sin progresión (SSP)
RP	Respuesta parcial
C2S	Una dosis cada dos semanas
C3S	Una dosis cada tres semanas
RECIST	Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos
EE	Enfermedad estable
VH	Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
VK	Región variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina

I. DEFINICIONES

- 20 Para que la invención se entienda más fácilmente, a continuación se definen específicamente algunos términos técnicos y científicos. A menos que se defina específicamente en otra parte del presente documento, todos los demás términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, incluyendo en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como "un", "una", "el" y "la" incluyen sus referencias plurales correspondientes a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.
- 30 "Aproximadamente" cuando se usa para modificar un parámetro definido numéricamente (por ejemplo, la puntuación de firma genética para una firma genética tratada en el presente documento, o la dosis de un antagonista de PD-1, o la duración del tratamiento con un antagonista de PD-1) significa que el parámetro puede variar hasta un 10 % por encima o por debajo del valor numérico establecido para ese parámetro. Por ejemplo, una firma genética que consiste en aproximadamente 10 genes puede tener entre 9 y 11 genes. De forma similar, una puntuación de firma genética
- 35 de referencia de aproximadamente 2,462 incluye puntuaciones de y cualquier puntuación entre 2,2158 y 2,708.
- La "administración" y el "tratamiento", como se aplica a un animal, células hospedadoras de ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, a un órgano o a un líquido biológico, se refiere al contacto de un agente farmacéutico exógeno, terapéutico, diagnóstico o composición con el animal, células hospedadoras de ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o líquido biológico. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un líquido, donde el líquido está en contacto con la célula. "Administración" y
- 40 "tratamiento" también significa tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, mediante un reactivo, diagnóstico, compuesto de unión, o por otra célula. El término "sujeto" incluye cualquier organismo, preferentemente

un animal, más preferentemente un mamífero (por ejemplo, rata, ratón, perro, gato, conejo) y, lo más preferentemente, un ser humano. El término "paciente" se refiere a un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que presente la actividad biológica o de unión deseada. Por lo tanto, se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), humanizados, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos camelizados de dominio único. Los "anticuerpos precursores" son anticuerpos obtenidos mediante la exposición de un sistema inmunitario a un antígeno antes de la modificación de los anticuerpos para un uso previsto, tal como la humanización de un anticuerpo para su uso como terapéutico humano.

En general, la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, que son principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi-terminal de la cadena pesada puede definir una región constante que es principalmente responsable de la función efectora. Normalmente, las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Adicionalmente, las cadenas pesadas humanas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véanse, generalmente, Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989).

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, en general, un anticuerpo inalterado tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son, en general, iguales.

Normalmente, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), que se encuentran dentro de regiones marco relativamente conservadas (FR). Las CDR están normalmente alineadas mediante las regiones estructurales, lo que permite la unión a un epítipo específico. En general, del N-terminal al C-terminal, los dominios variables de las cadenas tanto ligera como pesada comprenden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es, generalmente, de acuerdo con las definiciones de Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5ª ed.; NIH Publ. N.º 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 o Chothia, *et al.*, (1989) Nature 342:878-883.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en el dominio variable de cadena ligera y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en el dominio variable de cadena pesada). Véase Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (que definen las regiones CDR de un anticuerpo por secuencia); véase también Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917 (que definen las regiones CDR de un anticuerpo por estructura). Tal como se usa en el presente documento, la expresión restos "estructurales" o "FR" se refiere a los restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable definidos en el presente documento como restos de CDR.

Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otro modo, "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, es decir, fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos que conservan una o más regiones CDR. Los ejemplos de fragmentos de unión de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocaténario, por ejemplo, sc-Fv; nanocuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo que "se une específicamente a" una proteína diana especificada es un anticuerpo que exhibe unión preferente a la diana en comparación con otras proteínas, pero esta especificidad no requiere especificidad de unión absoluta. Un anticuerpo se considera "específico" para su objetivo previsto si su unión es determinante de la presencia de la proteína diana en una muestra, por ejemplo, sin producir resultados no deseados como falsos positivos. Los anticuerpos, o fragmentos de unión de los mismos, útiles en la presente invención se unirán a la proteína diana con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, más preferentemente al menos 20 veces mayor, y lo más preferentemente al menos 100 veces mayor, que la afinidad con proteínas no diana. Tal como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido *que comprende* una secuencia de aminoácidos dada, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una molécula de PD-1 humana madura o PD-L1 humana, si se une a polipéptidos que comprenden esa secuencia pero no se une a

proteínas que carecen de esa secuencia.

"Anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en un anticuerpo derivado de una especie particular (por ejemplo, ser humano) o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en un anticuerpo derivado de otra especie (por ejemplo, ratón) o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

"Anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que comprende solo secuencias de proteínas de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano puede contener cadenas de carbohidratos murinos si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma procedente de una célula de ratón. De forma similar, "anticuerpo de ratón" o "anticuerpo de rata" se refieren a un anticuerpo que comprende solo secuencias de inmunoglobulina de ratón o rata, respectivamente.

"Anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. El prefijo "hum", "hu" o "h" se añade a las designaciones de clones de anticuerpos cuando sea necesario para distinguir los anticuerpos humanizados de anticuerpos de roedores precursores. Las formas humanizadas de anticuerpos de roedores comprenderán en general las mismas secuencias de CDR de los anticuerpos de roedores precursores, aunque se pueden incluir determinadas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado o por otras razones.

"Respuesta antitumoral" cuando se refiere a un paciente con cáncer tratado con un agente terapéutico, tal como un antagonista de PD-1, se refiere al menos a un efecto terapéutico positivo, tal como, por ejemplo, número reducido de células cancerosas, tamaño del tumor reducido, tasa reducida de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, tasa reducida de metástasis tumoral o crecimiento tumoral, o supervivencia sin progresión. Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer se pueden medir de varias formas (Véase, W. A. Weber, J. Null. Med. 50:1S-10S (2009); Eisenhauer *et al.*, citado anteriormente). En algunas realizaciones, se evalúa una respuesta antitumoral a un antagonista de PD-1 utilizando los criterios RECIST 1.1, irRC bidimensional o irRC unidimensional. En algunas realizaciones, una respuesta antitumoral es cualquiera de EE, RP, RC, SSP, SSE. En algunas realizaciones, un biomarcador de firma genética de la invención predice si es probable que un sujeto con un tumor sólido logre una RP o una RC.

"irRC bidimensional" se refiere al conjunto de criterios descritos en Wolchok JD, *et al.* Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. Clin Cancer Res. 2009;15(23):7412-7420. Estos criterios utilizan mediciones tumorales bidimensionales de las lesiones diana, que se obtienen multiplicando el diámetro más largo y el diámetro perpendicular más largo (cm²) de cada lesión.

"Agente bioterapéutico" significa una molécula biológica, tal como un anticuerpo o proteína de fusión, que bloquea la señalización del ligando/receptor en cualquier vía biológica que apoye el mantenimiento y/o el crecimiento del tumor o suprima la respuesta inmunitaria antitumoral.

Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer escamocelular, mieloma, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiple, cáncer gastrointestinal (del tracto), cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello.

"CDR", tal como se usa en el presente documento, significa región(es) determinante(s) de la complementariedad en una región variable de inmunoglobulina, definida mediante el sistema de numeración de Kabat, a menos que se indique otra cosa.

"Agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación: agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de quinasas, alcaloides vegetales que son venenos del huso, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, fotosensibilizadores, anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (MSRE), anti-

progesteronas, reguladores negativos del receptor de estrógenos (RNRE), antagonistas de los receptores de estrógenos, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, antiandrógenos, inhibidores de la aromatasa, inhibidores de EGFR, inhibidores de VEGF, oligonucleótidos antisentido que inhiben la expresión de genes implicados en la proliferación celular anormal o el crecimiento tumoral. Los agentes quimioterapéuticos útiles en los métodos de tratamiento de la presente invención incluyen agentes citostáticos y/o citotóxicos.

"Beneficio clínico", según se aplica en el presente documento, al resultado del tratamiento de un paciente con un tumor con un antagonista de PD-1, significa una o más de enfermedades estables (EE), respuesta parcial (RP) y respuesta completa (RC).

"Chothia", como se usa en el presente documento, significa un sistema de numeración de anticuerpos descrito en Al-Lazikani *et al.*, JMB 273:927-948 (1997).

"Que comprende" o variaciones como "comprender", "comprende" o "comprendido de" se utilizan en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas, pero sin excluir la presencia o adición de características adicionales que puedan mejorar materialmente el funcionamiento o la utilidad de cualquiera de las realizaciones de la invención, salvo que el contexto requiera lo contrario debido al lenguaje expreso o una implicación necesaria.

"Consiste esencialmente en", y variaciones, tales como "consisten esencialmente en" o "que consiste/consisten esencialmente en", tal como se usa a lo largo la memoria descriptiva y las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos enumerado y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a los elementos enumerados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen de dosificación, método o composición especificado. Como ejemplo no limitante, si una puntuación de firma genética se define como la puntuación de expresión de ARN compuesta para un conjunto de genes que consta de una lista específica de genes, el experto en la materia comprenderá que esta puntuación de firma genética podría incluir el nivel de expresión de ARN determinado para uno o más genes adicionales, preferentemente no más de tres genes adicionales, si dicha inclusión no afecta materialmente al poder predictivo.

La expresión "región marco conservada" o "FR, del inglés *Framework Region*", como se usa en el presente documento, significa las regiones variables de inmunoglobulina excluyendo las regiones CDR.

"Homología" se refiere a la similitud de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas cuando están alineadas de manera óptima. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad de monómero de aminoácidos, por ejemplo, si una posición en una CDR de cadena ligera de dos Ab diferentes está ocupada por alanina, entonces los dos Ab son homólogos en esa posición. El porcentaje de homología es el número de posiciones homólogas compartidas por las dos secuencias dividido entre el número total de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si en dos secuencias, 8 de 10 de las posiciones coinciden o son homólogas cuando las secuencias están alineadas de manera óptima, entonces las dos secuencias son 80 % homólogas. Generalmente, la comparación se hace cuando dos secuencias se alinean para proporcionar el máximo porcentaje de homología. Por ejemplo, la comparación se puede realizar mediante un algoritmo BLAST en el que los parámetros del algoritmo se seleccionan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias respectivas en toda la longitud de las secuencias de referencia respectivas.

Las siguientes referencias se refieren a algoritmos BLAST que se utilizan a menudo para el análisis de secuencias: ALGORITMOS BLAST: Altschul, S.F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; SISTEMAS DE PUNTUACIÓN DE ALINEACIONES: Dayhoff, M.O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins" in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), págs. 345-352, Natl Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships" in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3". M.O. Dayhoff (ed.), págs. 353-358, Natl Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915-10919; Altschul, S.F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; DATOS ESTADÍSTICOS DE ALINEACIÓN: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; y Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." en Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) págs. 1-14, Plenum, Nueva York.

"Anticuerpo aislado" y "fragmento de anticuerpo aislado" se refieren al estado de purificación y en tal contexto significa que la molécula nombrada está sustancialmente libre de otras moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales, tales como restos celulares y medios de crecimiento. Generalmente, el término "aislado" no pretende referirse a una ausencia total de dicho material o una ausencia de agua, tampones o sales, a menos que estén presentes en cantidades que interfieran sustancialmente con el uso experimental o terapéutico del compuesto de unión como se describe en el presente documento.

"Kabat", como se usa en el presente documento, significa un sistema de alineación y numeración de inmunoglobulinas iniciado por Elvin A. Kabat ((1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.).

"Anticuerpo monoclonal" o "mAb" o "Mab", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, las moléculas de anticuerpo que comprenden la población son idénticas en cuanto a la secuencia de aminoácidos excepto por posibles mutaciones de origen natural que puede haber en cantidades minoritarias. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales incluyen normalmente una multitud de anticuerpos diferentes que tienen diferentes secuencias de aminoácidos en sus dominios variables, particularmente en sus CDR, que a menudo son específicos para diferentes epítomos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez en Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256: 495 o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de fagotecas de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628 y en Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, por ejemplo. Véase también Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

"Paciente que no responde" cuando se refiere a una respuesta antitumoral específica al tratamiento con un antagonista de PD-1, significa que el paciente no mostró la respuesta antitumoral. En una realización, la respuesta antitumoral es un beneficio clínico y un paciente que no responde es aquel que no logró ningún beneficio clínico. En otra realización, la respuesta antitumoral es RP y un paciente que no respondió no logró una RP.

"Oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que normalmente tiene entre 5 y 100 bases contiguas de longitud, y con mayor frecuencia entre 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 15-50, 15- 40, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-40, 20-30 o 20-25 bases contiguas de longitud.

"Paciente" se refiere a cualquier sujeto humano individual para el que se desea terapia o que está participando en un ensayo clínico, estudio epidemiológico o utilizado como control.

"Antagonista de PD-1" significa cualquier compuesto químico o molécula biológica que bloquea la unión de PD-L1 expresada en una célula cancerosa a PD-1 expresada en una célula inmunitaria (linfocito T, linfocito B o célula NKT) y, preferentemente, también bloquea la unión de PD-L2 expresado en una célula cancerosa a la PD-1 expresada en células inmunitarias. Los nombres o sinónimos alternativos para PD-1 y sus ligandos incluyen: PDCD1, PD1, CD279 y SLEB2 para PD-1; PDCD1L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 y B7-H para PD-L1; y PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btdc y CD273 para PD-L2. En cualquiera de los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención en los que se trata a un individuo humano, el antagonista de PD-1 bloquea la unión de PD-L1 humano a PD-1 humana, y, preferentemente, bloquea la unión de PD-L1 y PD-L2 humanos a PD-1 humana. Las secuencias de aminoácidos de PD-1 humana se pueden encontrar en el locus de NCBI n.º: NP_005009. Las secuencias de aminoácidos de PD-L1 y PD-L2 humanas se pueden encontrar en el locus de NCBI n.º: NP_054862 y NP_079515, respectivamente.

Los antagonistas de PD-1 útiles en cualquiera de los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen un anticuerpo monoclonal (mAb) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 o PD-L1, y, preferentemente se une específicamente a PD-1 humana o PD-L1 humano. El mAb puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, y puede incluir una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en realizaciones preferidas, la región constante humana es una región constante de IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv y Fv.

Los ejemplos de mAb que se unen a PD-1 humano y útiles en los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención, se describen en los documentos US7521051, US8008449 y US8354509. Los mAb anti-PD-1 humana específicos, útiles como antagonista de PD-1 en diversos aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen: pembrolizumab, un mAb IgG4 humanizado con la estructura descrita en la Información sobre medicamentos de la OMS, Vol. 27, n.º 2, páginas 161-162 (2013), nivolumab (BMS-936558), un mAb IgG4 humano con la estructura descrita en la Información sobre medicamentos de la OMS, Vol. 27, n.º 1, páginas 68-69 (2013); pidilizumab (CT-011, también conocido como hBAT o hBAT-1); y los anticuerpos humanizados h409A11, h409A16 y h409A17, que se describen en el documento WO2008/156712.

Los ejemplos de mAb que se unen a PD-L1 humana y son útiles en cualquiera de los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención, se describen en los documentos WO2013/019906, WO2010/077634 A1 y US8383796. Los mAb anti-PD-L1 humanos específicos útiles como antagonista de PD-1 en los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB0010718C y un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 21, respectivamente,

del documento WO2013/019906.

Otros antagonistas de PD-1 útiles en cualquiera de los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen una inmunoadhesina que se une específicamente a PD-1 o PD-L1, y preferentemente se une específicamente a PD-1 humano o PD-L1 humano, por ejemplo, una proteína de fusión que contiene la porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante, tal como una región Fc de una molécula de inmunoglobulina. En los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342 se describen ejemplos de moléculas de inmunoadhesión que se unen específicamente a PD-1. Las proteínas de fusión específicas útiles como antagonista de PD-1 en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención incluyen AMP-224 (también conocida como B7-DCIg), que es una proteína de fusión PD-L2-FC y se une al PD-1 humano.

Los antagonistas de PD-1 adicionales útiles en cualquiera de los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen un biosimilar de pembrolizumab o una variante de pembrolizumab.

Tal como se usa en el presente documento, "biosimilar de pembrolizumab" significa un producto biológico que (a) es comercializado por una entidad distinta de Merck and Co., Inc. o una subsidiaria de la misma y (b) está aprobado por una agencia reguladora en cualquier país para su comercialización como biosimilar de pembrolizumab. En una realización, un biosimilar de pembrolizumab comprende una variante de pembrolizumab como sustancia farmacológica. En una realización, un biosimilar de pembrolizumab tiene la misma secuencia de aminoácidos que pembrolizumab.

Tal como se usa en el presente documento, una "variante de pembrolizumab" significa un anticuerpo monoclonal que comprende secuencias de cadena pesada y cadena ligera que son idénticas a las del pembrolizumab, excepto por tener tres, dos o un sustitución de aminoácidos conservativa en posiciones que se encuentran fuera de las CDR de cadena ligera y seis, cinco, cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos conservativa que se encuentran fuera de las CDR de cadena pesada, por ejemplo, las posiciones variantes están ubicadas en las regiones FR o en la región constante. En otras palabras, pembrolizumab y una variante de pembrolizumab comprenden secuencias CDR idénticas, pero difieren entre sí debido a que tienen una sustitución de aminoácidos conservativa en no más de tres o seis posiciones en sus secuencias de cadena ligera y pesada de longitud completa, respectivamente. Una variante de pembrolizumab es sustancialmente igual que pembrolizumab con respecto a las siguientes propiedades: afinidad de unión a PD-1 y capacidad para bloquear la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1.

"Posterior a la dosis", como se usa en el presente documento, se refiere a un punto de tiempo después de la administración de una primera dosis de un antagonista de PD-1 a un paciente. Por lo tanto, una "muestra de sangre posterior a la dosis" significa que la muestra se toma del paciente después de que se le haya administrado una primera dosis del antagonista de PD-1. De forma similar, administrar un "régimen de tratamiento posterior a la dosis" a un paciente significa un régimen de tratamiento que se inicia después de que el paciente fue tratado con una primera dosis de un antagonista de PD-1 a un paciente. En una realización, el punto de tiempo "posterior a la dosis" se refiere a una acción que se debe tomar después de una dosis posterior del antagonista de PD-1, por ejemplo, una segunda, tercera o cuarta dosis. En una realización, el momento para recolectar una muestra de sangre posterior a la dosis después de la primera dosis no es antes de una semana después de la primera dosis, y normalmente es entre aproximadamente dos semanas y aproximadamente cuatro semanas después de la primera dosis o aproximadamente tres semanas después de la primera dosis.

"Sonda", tal como se usa en el presente documento, significa un oligonucleótido que es capaz de hibridar específicamente en condiciones rigurosas de hibridación con un transcrito expresado por un gen de interés enumerado en cualquiera de las Tablas 1, 2, 3 y 4, y en algunas realizaciones, hibrida específicamente en condiciones rigurosas de hibridación con la región diana enumerada en la Tabla 4 para el gen de interés.

"Criterios de respuesta RECIST 1.1", como se usa en el presente documento, significa las definiciones expuestas en Eisenhauer *et al.*, E.A. *et al.*, *Eur. J Cancer* 45:228-247 (2009) para lesiones diana o lesiones no diana, según sea apropiado, teniendo en cuenta el contexto en el que se mida la respuesta.

"Puntuación de firma genética de OxPhos de referencia", como se usa en el presente documento, significa la puntuación para una firma genética de interés de OxPhos que se ha determinado que divide al menos a la mayoría de los que responden de al menos la mayoría de los que no responden en una población de referencia de pacientes que tienen el mismo tipo de tumor que el paciente de prueba y que han sido tratados con un antagonista de PD-1. Preferentemente, al menos cualquiera del 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 % de los que responden en la población de referencia tendrán una puntuación de firma genética menor que la puntuación de referencia seleccionada, mientras que la puntuación de firma genética de OxPhos de al menos cualquiera del 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 95 % de los que no responden en la población de referencia serán mayores que la puntuación de referencia seleccionada. En algunas realizaciones, el valor predictivo negativo de la puntuación de referencia es mayor que el valor predictivo positivo. En algunas realizaciones, los que responden en la población de referencia se definen como sujetos que lograron una respuesta parcial (RP) o una respuesta completa (RC) según lo medido por los criterios RECIST 1.1 y los que no responden se definen como aquellos que no lograron ninguna respuesta clínica RECIST 1.1. En algunas realizaciones, los sujetos de la población de referencia fueron tratados sustancialmente con la misma terapia anti-PD-

1 que se estaba considerando para el sujeto de prueba, es decir, administración del mismo antagonista de PD-1 usando el mismo régimen de dosificación o sustancialmente similar.

"Muestra" cuando se refiere a una muestra de sangre, tumor o cualquier otro material biológico al que se hace referencia en el presente documento, significa una muestra que se ha extraído del sujeto; por lo tanto, ninguno de los métodos de prueba descritos en el presente documento se realiza en o sobre el sujeto.

"Respuesta sostenida" significa un efecto terapéutico sostenido después de la interrupción del tratamiento con un antagonista de PD-1. En algunas realizaciones, la respuesta sostenida tiene una duración que es al menos la misma que la duración del tratamiento o al menos 1,5, 2,0, 2,5 o 3 veces mayor que la duración del tratamiento.

"Tratar" o "tratamiento" de un cáncer, tal como se usa en el presente documento, significa administrar un antagonista de PD-1, otro agente terapéutico, a un sujeto que tiene un cáncer o se le ha diagnosticado un cáncer, para lograr al menos un efecto terapéutico positivo, tal como, por ejemplo, número reducido de células cancerosas, tamaño del tumor reducido, tasa reducida de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos o tasa reducida de metástasis tumoral o crecimiento tumoral. Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer se pueden medir de varias formas (Véase, W. A. Weber, J. Null. Med. 50:1S-10S (2009); Eisenhauer *et al.*, citado anteriormente). En algunas realizaciones, La respuesta a un antagonista de PD-1 se evalúa utilizando los criterios RECIST 1.1 o irRC. En algunas realizaciones, el tratamiento logrado por una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de PD-1 es cualquiera de RP, RC, SSP, SSE, RO o SG. En algunas realizaciones, un biomarcador de firma genética de la invención predice si es probable que un sujeto con un tumor sólido logre una RP o una RC. El régimen de dosificación de una terapia descrita en el presente documento que es eficaz para tratar a un paciente con cáncer puede variar según factores, tales como el estado de la enfermedad, la edad y el peso del paciente y la capacidad de la terapia para desencadenar una respuesta anticáncer en el sujeto. Si bien en una realización del método de tratamiento, los medicamentos y usos de la presente invención pueden no ser efectivos para lograr un efecto terapéutico positivo en todos los sujetos, debe hacerlo en un número estadísticamente significativo de sujetos según lo determinado por cualquier prueba estadística conocida en la técnica, tal como la prueba t de Student, la prueba de χ^2 , la prueba U de Mann y Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis (prueba H), la prueba de Jonckheere-Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

"Tumor" según se aplica a un sujeto al que se ha diagnosticado o se sospecha que tiene, un cáncer se refiere a una neoplasia o masa tisular maligna o potencialmente maligna de cualquier tamaño, e incluye tumores primarios y neoplasias secundarias. Un tumor sólido es un crecimiento anómalo o masa de tejido que habitualmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran por el tipo de células que los forman. Son ejemplos de tumores sólidos sarcomas, carcinomas y linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) generalmente no forman tumores sólidos (National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms).

"Masa tumoral" también denominada "carga tumoral", se refiere a la cantidad total de material tumoral distribuido por todo el cuerpo. La carga tumoral se refiere al número total de células cancerosas o al tamaño total del o los tumores, a través del cuerpo, incluidos los ganglios linfáticos y la médula ósea. La carga tumoral se puede determinar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, midiendo las dimensiones del o los tumores al extraerlos del sujeto, por ejemplo, usando calibradores, o mientras está en el cuerpo usando técnicas de imagen, por ejemplo, ultrasonidos, gammagrafía ósea, tomografía computarizada (TC) o imágenes por resonancia magnética (RM).

El término "tamaño del tumor" se refiere al tamaño total del tumor que puede medirse como la longitud y LA anchura de un tumor. El tamaño del tumor se puede determinar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, midiendo las dimensiones del o los tumores al extraerlos del sujeto, por ejemplo, usando calibradores, o mientras está en el cuerpo usando técnicas de imagen, por ejemplo, gammagrafía ósea, ultrasonidos, CT o RM.

"Regiones variables" o "región V" como se usa en el presente documento significa el segmento de cadenas de IgG que es variable en secuencia entre diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el resto 109 de Kabat en la cadena ligera y hasta el 113 en la cadena pesada.

II. UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE FIRMA GENÉTICA DE LA INVENCION

Las firmas genéticas de sangre descritas en el presente documento son útiles para identificar a los pacientes con cáncer que tienen más probabilidades de lograr un beneficio clínico del tratamiento con un antagonista de PD-1. Esta utilidad admite el uso de estas firmas de sangre en varias aplicaciones comerciales y de investigación, incluyendo, aunque no de forma limitativa, ensayos clínicos de antagonistas de PD-1 en los que los pacientes se seleccionan basándose en su puntuación de firma genética de OxPhos de referencia o en su puntuación de firma genética PD-L1 o IFNG después de la dosis, métodos y productos de diagnóstico para determinar la puntuación de la firma genética de PD-L1, IFNG u OxPhos o para clasificar a un paciente como positivo o negativo para un biomarcador de firma genética inicial o en tratamiento, métodos de tratamiento personalizados que implican adaptar la terapia con fármacos de un paciente en función de la puntuación del paciente para una firma genética basada en sangre, así como composiciones farmacéuticas y productos farmacéuticos que comprenden un antagonista de PD-1 para su uso en el tratamiento de un cáncer en pacientes con una prueba positiva para un biomarcador inicial o en tratamiento descrito

en el presente documento.

La utilidad de cualquiera de las aplicaciones reivindicadas en el presente documento no requiere que el 100 % de los pacientes que dan positivo en un biomarcador de la invención logren una respuesta antitumoral a un antagonista de PD-1; tampoco requiere que un método o kit de diagnóstico tenga un grado específico de especificidad o sensibilidad para determinar la presencia o ausencia de un biomarcador en cada sujeto, tampoco requiere que un método de diagnóstico reivindicado en el presente documento sea preciso al 100 % para predecir para cada sujeto si es probable que el sujeto tenga una respuesta beneficiosa a un antagonista de PD-1. Por lo tanto, los inventores en el presente documento pretenden que los términos "determinar", "determinación" y "predicción" no se deben interpretar en el sentido de que requieren un resultado definido o cierto; en su lugar, estos términos se deben interpretar en el sentido de que un método reivindicado proporciona un resultado preciso para al menos la mayoría de los sujetos o que el resultado o la predicción para cualquier sujeto dado es más probable que sea correcto que incorrecto.

Preferentemente, la precisión del resultado proporcionado por un método de diagnóstico de la invención es una que un experto en la materia o una autoridad reguladora consideraría adecuada para la aplicación particular en la que se usa el método.

De forma similar, la utilidad de los productos farmacéuticos y métodos de tratamiento reivindicados no requiere que el efecto reivindicado o deseado se produzca en cada paciente con cáncer; todo lo que se requiere es que un médico clínico, al aplicar su juicio profesional de conformidad con todas las normas aplicables, decida que existe una posibilidad razonable de lograr el efecto pretendido de tratar a un paciente determinado de acuerdo con el método reivindicado o con la composición o producto farmacéutico reivindicado.

A. Pruebas de biomarcadores de la invención

Se determina una puntuación para una firma genética basada en sangre utilizando una muestra de sangre extraída de un paciente con un tumor. El tumor puede ser primario o recurrente y puede ser de cualquier tipo (tal como se describió anteriormente), cualquier estadio (por ejemplo, Estadio I, II, III, o IV o un equivalente de otro sistema de estadificación) y/o histología. El sujeto puede ser de cualquier edad, sexo, antecedentes de tratamiento y/o grado y duración de la remisión.

En una realización, la sangre completa se extrae utilizando tubos de ARN PAXgene® Blood RNA Tubes de PreAnalytiX® GmbH (Hombrechtikon, Suiza). El ARN intracelular total se puede aislar de la muestra de sangre usando varios métodos conocidos en la técnica y kits de reactivos disponibles comercialmente, incluidos los kits de ARN PAXgene® Blood RNA de PreAnalytiX® GmbH (Hombrechtikon, Suiza) y los kits TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Globin de Illumina (San Diego, CA).

Una vez que se ha obtenido el ARN total de la muestra de sangre, el ARN se analiza para cuantificar el nivel de expresión de cada uno de los genes que comprenden la firma genética particular que se va a puntuar, por ejemplo, cualquiera de las firmas genéticas enumeradas en la Tabla 1, 2 y 3. La expresión "determinar el nivel de expresión de un gen" tal como se usa en el presente documento se refiere a detectar y cuantificar el ARN transcrito de ese gen. La expresión "transcrito de ARN" incluye ARNm transcrito a partir del gen y/o variantes de corte y empalme específicas del mismo y/o fragmentos de dicho ARNm y variantes de corte y empalme. En algunas realizaciones, los transcritos de ARN que se van a cuantificar son los transcritos enumerados en la Tabla 1 o la Tabla 2 para una de las firmas genéticas ahí enumeradas.

Los expertos en la técnica también conocen varios métodos útiles para detectar y cuantificar el nivel de transcritos de ARN dentro del ARN aislado de sangre completa. Los métodos de detección cuantitativos incluyen, pero sin limitación, matrices (es decir, micromatrices), PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR), ensayos multiplexados, ensayos de protección de nucleasas y análisis de transferencia de Northern. Generalmente, dichos métodos emplean sondas marcadas que son complementarias a una parte de cada transcrito que se va a detectar. Las sondas para su uso en estos métodos se pueden diseñar fácilmente basándose en las secuencias conocidas de los genes y los transcritos expresados por ellas. En algunas realizaciones, las sondas están diseñadas para hibridar con cada uno de los transcritos de firma genética para la firma genética enumerada en la Tabla 1A o la Tabla 2B. Los marcadores adecuados para las sondas son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y radiactivos.

En algunas realizaciones, ensayar una muestra de sangre para una firma genética de la invención emplea detección y cuantificación de niveles de ARN en tiempo real usando amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) combinada con moléculas de detección de balizas moleculares. La NASBA se describe, por ejemplo, en Compton J., Nature 350 (6313):91-92 (1991). La NASBA es un método de amplificación específico de ARN isotérmico de una sola etapa. Generalmente, el método implica las siguientes etapas: el molde de ARN se proporciona a una mezcla de reacción, en donde el primer cebador se une a su sitio complementario en el extremo 3' del molde; la transcriptasa inversa sintetiza la hebra de ADN complementaria opuesta; la ribonucleasa H destruye el molde de ARN (la ribonucleasa H solo destruye el ARN en los híbridos de ARN-ADN, pero no el ARN monocatenario); el segundo cebador se une al extremo 3' de la hebra de ADN y la transcriptasa inversa sintetiza la segunda hebra de ADN; y la

ARN polimerasa T7 se une al ADN de cadena doble y produce una hebra de ARN complementaria que se puede utilizar de nuevo en la etapa 1, de manera que la reacción sea cíclica.

- En otras realizaciones, el formato del ensayo es un formato basado en endonucleasas flap, tal como el ensayo Invader™ (Third Wave Technologies). En el caso de utilizar el método invasor, se prepara una sonda invasora que contiene una secuencia específica de la región 3' para un sitio diana, y una sonda primaria que contiene una secuencia específica de la región 5' para un sitio diana de un molde y una secuencia flap no relacionada. A continuación, se permite que la cleavasa actúe en presencia de estas sondas, la molécula diana, así como una sonda FRET que contiene una secuencia complementaria a la secuencia flap y una secuencia autocomplementaria que está marcada con un colorante fluorescente y un inactivador. Cuando la sonda primaria hibrida con el molde, el extremo 3' de la sonda invasora penetra en el sitio diana, y esta estructura es escindida por la cleavasa dando como resultado la disociación de flap. El flap se une a la sonda FRET y la parte de colorante fluorescente es escindida por la cleavasa, dando como resultado la emisión de fluorescencia.
- En otras realizaciones más, el formato de ensayo emplea captura directa de ARNm con ADN ramificado (QuantiGene™, Panomics) o Hybrid Capture™ (Digene).

- Un ejemplo de una tecnología de matriz adecuada para su uso en la medición de la expresión de los genes en una firma genética es la tecnología de ensayo ArrayPlate™ vendido por HTG Molecular, Tucson Arizona, y descrito en Martel, R.R., *et al.*, Assay and Drug Development Technologies 1(1):61-71, 2002. En resumen, esta tecnología combina un ensayo de protección de nucleasa con detección de matriz. Las células de los pocillos de las microplacas se someten a un ensayo de protección de nucleasa. Las células se lisan en presencia de sondas que se unen a especies de ARNm diana. Tras la adición de nucleasa SI, el exceso de sondas y el ARNm no hibridado se degradan, de modo que solo quedan los dúplex de ARNm:sonda. La hidrólisis alcalina destruye el componente de ARNm de los dúplex, dejando las sondas intactas. Después de la adición de una solución de neutralización, el contenido de la placa de cultivo celular procesada se transfiere a otro ArrayPlate™ llamado ArrayPlate™ programado. ArrayPlates™ contiene una matriz de 16 elementos en la parte inferior de cada pocillo. Cada elemento de la matriz comprende un oligonucleótido de anclaje específico de posición que permanece igual de un ensayo al siguiente. La especificidad de unión de cada uno de los 16 anclajes se modifica con un oligonucleótido, llamado oligonucleótido enlazador de programación, que es complementario en un extremo a un anclaje y en el otro extremo a una sonda de protección de nucleasa. Durante una reacción de hibridación, las sondas transferidas desde la placa de cultivo se capturan mediante un enlazador de programación inmovilizado. Las sondas capturadas se marcan mediante hibridación con un oligonucleótido enlazador de detección, que a su vez está marcado con un conjugado de detección que incorpora peroxidasa. La enzima se suministra con un sustrato quimioluminiscente y la luz producida por la enzima se captura en una imagen digital. La intensidad de la luz en un elemento de la matriz es una medida de la cantidad de ARNm diana correspondiente presente en las células originales.

- A modo de ejemplo adicional, se pueden usar micromatrices de ADN para medir la expresión génica. En resumen, una micromatriz de ADN, también conocida como microplaca de ADN, es una matriz microscópica de fragmentos de ADN, tales como oligonucleótidos sintéticos, dispuestos en un patrón definido sobre un soporte sólido, en donde son susceptibles de análisis mediante métodos de hibridación estándar (véase Schena, BioEssays 18:427 (1996)). Las micromatrices y los métodos ilustrativos para su fabricación y uso se establecen en T.R. Hughes *et al.*, Nature Biotechnology 9:342-347 (2001). Los expertos en la materia conocen numerosas configuraciones de micromatrices y métodos para su producción, y se describen en las patentes de Estados Unidos N.º 5.242.974; 5.384.261; 5.405.783; 5.412.087; 5.424.186; 5.429.807; 5.436.327; 5.445.934; 5.556.752; 5.405.783; 5.412.087; 5.424.186; 5.429.807; 5.436.327; 5.472.672; 5.527.681; 5.529.756; 5.545.531; 5.554.501; 5.561.071; 5.571.639; 5.593.839; 5.624.711; 5.700.637; 5.744.305; 5.770.456; 5.770.722; 5.837.832; 5.856.101; 5.874.219; 5.885.837; 5.919.523; 6.022.963; 6.077.674; y 6.156.501; Shena, *et al.*, Tibtech 6:301-306, 1998; Duggan, *et al.*, Nat. Genet. 2:10-14, 1999; Bowtell, *et al.*, Nat. Genet. 21:25-32, 1999; Lipshutz, *et al.*, Nat. Genet. 21:20-24, 1999; Blanchard, *et al.*, Biosensors and Bioelectronics 77:687-90, 1996; Maskos, *et al.*, Nucleic Acids Res. 2:4663-69, 1993; y Hughes, *et al.*, Nat. Biotechnol. 79:342-347, 2001. Las patentes que describen métodos para usar matrices en diferentes aplicaciones incluyen: las patentes de EE.UU. N.º 5.143.854; 5.288.644; 5.324.633; 5.432.049; 5.470.710; 5.492.806; 5.503.980; 5.510.270; 5.525.464; 5.547.839; 5.580.732; 5.661.028; 5.848.659; y 5.874.219.

- En una realización, una matriz de oligonucleótidos se puede sintetizar sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos ilustrativos incluyen vidrio, plásticos, polímeros, metales, metaloides, cerámicas, compuestos orgánicos, etc. Usando tecnologías de enmascaramiento de microplaca y química fotoprotectora, es posible generar matrices ordenadas de sondas de ácido nucleico. Estas matrices, que se conocen, por ejemplo, como "microplacas de ADN" o matrices poliméricas a muy gran escala (matrices "VLSIPS®"), pueden incluir millones de regiones de sonda definidas sobre un sustrato que tiene un área de aproximadamente 1 cm² a varios cm², incorporando de esta forma de unos pocos a millones de sondas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5.631.734).

- Para comparar los niveles de expresión, los ácidos nucleicos marcados se pueden poner en contacto con la matriz en condiciones suficientes para unirse entre el ácido nucleico diana y la sonda de la matriz. En una realización, se pueden seleccionar las condiciones de hibridación para proporcionar el nivel de especificidad de hibridación deseado; es decir, condiciones suficientes para que se produzca la hibridación entre los ácidos nucleicos marcados y las sondas de la

micromatriz.

La hibridación se puede llevar a cabo en condiciones que permitan esencialmente la hibridación específica. La longitud y el contenido de GC del ácido nucleico determinarán el punto de fusión térmica y, por tanto, las condiciones de hibridación necesarias para obtener la hibridación específica de la sonda al ácido nucleico diana. Estos factores son bien conocidos por la persona experta en la materia, y también se pueden analizar en los ensayos. Una extensa guía relativa a la hibridación de ácidos nucleicos se puede encontrar en Tijssen, *et al.* (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Nucleic Acid Probes, P. Tijssen, ed.; Elsevier, N.Y. (1993)). Los métodos anteriormente descritos darán como resultado la producción de patrones de hibridación de ácidos nucleicos diana marcados sobre la superficie de la matriz. Los patrones de hibridación resultantes de los ácidos nucleicos marcados se pueden visualizar o detectar de diferentes formas, donde la manera de detección concreta seleccionada se basa en la marca concreta del ácido nucleico diana. Los medios de detección representativos incluyen el recuento por centelleo, autorradiografía, medición por fluorescencia, medición calorimétrica, medición de emisión de luz, dispersión de luz, y similares.

Uno de estos métodos de detección utiliza un escáner de matriz que está comercialmente disponible (Affymetrix, Santa Clara, Calif.), por ejemplo, el 417® Arrayer, el escáner 418® Array o el escáner Agilent Gene Array®. El escáner se controla mediante un sistema informático con una interfaz y herramientas informáticas fáciles de usar. La salida puede importarse directamente o leerse directamente en varias aplicaciones informáticas. Los dispositivos de barrido ilustrativos se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.143.854 y 5.424.186.

Un método de ensayo preferido para medir la abundancia de transcritos de biomarcadores incluye el uso del sistema de análisis nCounter® comercializado por NanoString® Technologies (Seattle, Washington, EE.UU.). Este sistema, que es descrito por Geiss *et al.*, Nature Biotechnol. 2(3):317-325 (2008), utiliza un par de sondas, a saber, una sonda de captura y una sonda de reportero, cada una comprendiendo una secuencia de 35 a 50 bases complementaria al transcrito que se va a detectar. La sonda de captura incluye además una secuencia común corta acoplada a una etiqueta de inmovilización, por ejemplo, una etiqueta de afinidad que permite inmovilizar el complejo para la recopilación de datos. La sonda reportera incluye además una señal o marcador detectable, por ejemplo, está acoplado a una etiqueta codificada por colores. Después de la hibridación, el exceso de sondas se elimina de la muestra y los complejos de sonda/diana hibridados se alinean e inmovilizan mediante la afinidad u otra etiqueta en un cartucho. Luego se analizan las muestras, por ejemplo usando un analizador digital u otro procesador adaptado para este propósito. Generalmente, la etiqueta codificada por colores en cada transcrito se cuenta y tabula para cada transcrito diana para producir el nivel de expresión de cada transcrito en la muestra. Este sistema permite medir la expresión de cientos de transcritos de genes únicos en un único ensayo multiplexado utilizando sondas de captura y reporteras diseñadas por NanoString.

En otro método de ensayo preferido, el kit TrueSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Globin comercializado por Illumina (San Diego, CA) se utiliza para aislar el ARN aislado de muestras de sangre completa estabilizadas (por ejemplo, recolectadas con PAXgene® Blood RNA Tubes) y el ARN aislado se secuenciará en una plataforma de secuenciación de última generación (NGS) de Illumina.

Al medir la expresión de los genes en una firma genética descrita en el presente documento, la expresión absoluta de cada uno de los genes en el ARN total aislado de una muestra de sangre se compara con un control; por ejemplo, el control puede ser el nivel medio de expresión de cada uno de los genes, respectivamente, en un grupo de sujetos. Para aumentar la sensibilidad de la comparación, sin embargo, los valores del nivel de expresión se transforman preferentemente de varias formas.

Los valores de expresión sin tratar de los genes en una firma genética descrita en el presente documento se pueden normalizar mediante cualquiera de los siguientes: normalización de cuantiles a una distribución de referencia común, por los niveles medios de ARN de un conjunto de genes constitutivos, por normalización global basada en percentil, por ejemplo, percentil 75, u otros enfoques de normalización biológicamente relevantes conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, el nivel de expresión de cada gen se puede normalizar por el nivel de expresión de ARN promedio de todos los genes en la firma genética, o por el nivel de expresión promedio de un conjunto de genes de normalización, o por el nivel de expresión promedio de los genes de firma y un conjunto de genes de normalización. Por lo tanto, en una realización, los genes en un conjunto de genes de normalización y firma genética están representados por un conjunto de sondas, y el nivel de expresión de ARN de cada uno de los genes de firma está normalizado por el nivel de expresión medio o mediano en todos los genes representados, es decir, en todos los genes de firma y normalización. En una realización específica, la normalización de una medición de la expresión génica de firma se lleva a cabo dividiendo el nivel de ARN medido entre el nivel mediano o medio de expresión de ARN de todos los genes de la Tabla 4. En otra realización específica, los niveles de expresión de ARN de cada gen característico se normalizan dividiendo el nivel de ARN medido entre el nivel medio o mediano de expresión de un conjunto de genes de normalización. En una realización específica, los genes de normalización comprenden genes constitutivos.

La sensibilidad de una puntuación de firma genética se puede incrementar si los niveles de expresión de genes

individuales en la firma genética se comparan con la expresión de los mismos genes en una pluralidad de muestras de sangre combinadas. Preferentemente, la comparación es con el nivel de expresión medio o mediano de cada gen característico en las muestras combinadas. Esto tiene el efecto de acentuar las diferencias relativas en la expresión entre genes en la muestra individual y en las muestras combinadas, haciendo las comparaciones más sensibles y con más probabilidades de producir resultados significativos que el uso de niveles de expresión absolutos por sí solos. Los datos del nivel de expresión se pueden transformar de cualquier forma conveniente; preferentemente, los datos del nivel de expresión para todos los genes se transforman logarítmicamente antes de tomar las medias o las medianas.

Al realizar comparaciones de una muestra individual con muestras combinadas, se pueden utilizar dos enfoques. En primer lugar, los niveles de expresión de los genes de firma en la muestra se pueden comparar con el nivel de expresión de esos genes en las muestras combinadas, en donde el ácido nucleico obtenido de la muestra y el ácido nucleico obtenido de las muestras combinadas hibridan durante el transcurso de un único experimento. Tal enfoque requiere que se genere una nueva cantidad de ácido nucleico de las muestras combinadas para cada comparación o un número limitado de comparaciones y, por lo tanto, está limitado por la cantidad de ácido nucleico disponible. Como alternativa, y preferentemente, los niveles de expresión en una combinación de muestra, ya sean normalizados y/o transformados o no, se almacenan en un ordenador, o en medios legibles por ordenador, para ser utilizados en comparaciones con los datos de nivel de expresión individual de la muestra (es decir, datos de un solo canal).

Al comparar la muestra de sangre de un sujeto con un estándar o control, el valor de expresión de un gen particular en la muestra se compara con el valor de expresión de ese gen en el estándar o control. Para cada gen en una firma genética de la invención, la proporción $\log(10)$ se crea para el valor de expresión en la muestra individual en relación con el estándar o control. Se calcula una puntuación para una firma genética de interés determinando la proporción $\log(10)$ media de los genes en esa firma.

Los expertos en la técnica reconocerán que otros valores de expresión diferencial, además de la proporción $\log(10)$, se puede utilizar para calcular una puntuación de firma, siempre que el valor represente una medida objetiva de la abundancia de transcritos de los genes. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: xdev, logaritmo ponderado por error (proporción) y logaritmo medio restado (intensidad).

Una vez que se obtienen los valores de expresión de ARN normalizados, las puntuaciones de las firmas se pueden calcular de varias formas. Las puntuaciones predictivas se pueden derivar utilizando todos los genes de la firma como un conjunto de covariables de entrada para modelos estadísticos multivariados que determinarán las puntuaciones de la firma utilizando los coeficientes del modelo ajustado, por ejemplo, el predictor lineal en una regresión logística o de Cox. Un ejemplo específico de una estrategia multivariante es el uso de modelos de redes elásticas (Zou y Hastie, 2005, J.R. Statist Soc. B 67(2): 301-320; Simon *et al.*, 2011, J. Statistical Software 39(5): 1-13), que es un enfoque de regresión penalizada que utiliza un híbrido entre las penalizaciones del lazo y la regresión de la cresta, con validación cruzada para seleccionar los parámetros de penalización. Debido a que los niveles de expresión de ARN para la mayoría, si no todo, de los genes de la firma se espera que sean predictivos, en una realización, el parámetro de penalización L1 se puede establecer muy bajo, ejecutando eficazmente una regresión de cresta.

Un enfoque multivariado puede utilizar un metanálisis que combina datos de indicaciones de cáncer o se puede aplicar dentro de una sola indicación de cáncer. En cualquier caso, los análisis utilizarían los niveles de expresión de ARN intratumoral normalizados de los genes distintivos como predictores de entrada, con la respuesta antitumoral como variable dependiente. El resultado de dicho análisis define algorítmicamente la puntuación de la firma para las muestras de sangre de los pacientes utilizados en el ajuste del modelo, así como para muestras de sangre de futuros pacientes, como una combinación numérica de los coeficientes de multiplicación para los niveles de expresión de ARN normalizados de los genes de firma que se espera que sean predictivos de la respuesta antitumoral. La puntuación de firma genética está determinada por la combinación lineal de los genes de firma, según lo dictado por los valores estimados finales de los coeficientes del modelo de red elástica en los valores seleccionados de los parámetros de ajuste. Específicamente, para una muestra de sangre y una firma genética determinadas, el coeficiente estimado para cada gen en la firma se multiplica por el nivel de expresión de ARN normalizado de ese gen en la muestra de sangre y luego los productos resultantes se suman para obtener la puntuación de la firma para esa muestra de sangre. También podrían utilizarse estrategias basadas en modelos multivariados distintas de la red elástica para determinar una puntuación de firma genética.

Una alternativa a estas puntuaciones de firma basados en modelos sería utilizar un enfoque de promediado simple, por ejemplo, la puntuación de firma para cada muestra de sangre se definiría como el promedio de los niveles de expresión de ARN normalizados de esa muestra para cada gen de firma.

En algunas realizaciones, la expresión de genes de firma en el ARN total aislado de una muestra de sangre se detecta utilizando la tecnología Sec-ARN de Illumina (San Diego, CA). La muestra de sangre se procesa para eliminar el ARNm de globina y el ARN ribosómico citoplasmático y mitocondrial, que se puede lograr con el kit TruSeq Stranded Total RNA con Ribo-Zero Globin de Illumina. Los datos de expresión génica generados a partir de la secuenciación del ARN total restante se procesan de la siguiente manera. Los valores de fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM) se transforman usando $\log_{10}(0,01 + \text{FPKM})$ y posteriormente se normalizan mediante el cuartil superior medido sobre aproximadamente 20.000 transcritos correspondientes a genes codificadores de

proteínas. Esta transformación genera valores que están cerca de log10 para valores de entrada grandes y cercanos a la escala lineal para valores bajos (<1), con el beneficio adicional de producir valores cero para valores de entrada cero. Los genes con un recuento máximo inferior a 10 se consideran no detectados de forma fiable y, por tanto, se filtran.

- 5 En algunas realizaciones, la expresión génica se detecta utilizando el sistema de análisis nCounter® comercializado por NanoString® Technologies, y los valores de expresión sin procesar se normalizan mediante la normalización de cuantiles en relación con la distribución de referencia y la posterior transformación log10. La distribución de referencia se genera agrupando los recuentos documentados (es decir, sin procesar) para la muestra de prueba y una o más
- 10 muestras de prueba o de control (preferentemente al menos 2 muestras, más preferentemente al menos cualquiera de 4, 8 o 16 muestras) después de excluir los valores para sondas de control positivo y negativo. Luego, la puntuación de la firma se calcula como la media aritmética de los valores normalizados para cada uno de los genes en la firma genética, por ejemplo, para la firma de diez genes de IFNG, la puntuación de la firma es igual a la media aritmética de los valores de expresión de ARN normalizados para cada IFNG, STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, ID01 y GZMA. En una realización, la distribución de referencia se genera a partir de recuentos de expresión
- 15 sin procesar en un conjunto de muestras de ARN total (por ejemplo, muestras de prueba más control) para los transcritos diana de todos los 680 genes enumerados en la Tabla 4, o un subconjunto de los mismos.

Tabla 4. Conjunto de 680 genes de normalización

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
AAMP	NM_001087.3	412-512
ABCB1	NM_000927.3	3910-4010
ABCF1	NM_001090.2	850-950
ADIPOQ	NM_004797.2	790-890
ADORA2A	NM_000675.3	1095-1195
AGGF1	NM_018046.3	35-135
ALAS1	NM_000688.4	1615-1715
ALB	NM_000477.5	855-955
AMICA1	NM_153206.2	620-720
ANTXR1	NM_018153.3	455-555
ANXA4	NM_001153.2	430-530
AP1M2	NM_005498.4	78-178
AP1S2	NM_003916.3	728-828
AREG	NM_001657.2	547-647
ARG1	NM_000045.2	505-605
ARG2	NM_001172.3	1150-1250
ASCL2	NM_005170.2	1470-1570
ATP6V0D2	NM_152565.1	480-580
ATP8B4	NM_024837.2	95-195
AURKA	NM_003600.2	405-505

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
AURKB	NM_004217.2	615-715
AXL	NM_021913.2	2190-2290
B2M	NM_004048.2	235-335
B3GAT1	NM_018644.3	2388-2488
BATF	NM_006399.3	293-393
BCAM	NM_005581.3	156-256
BCL11A	NM_022893.3	735-835
BCL11B	NM_022898.1	3420-3520
BCL2	NM_000657.2	947-1047
BCL6	NM_138931.1	505-605
BIM	NM_138621.4	257-357
BIRC5	NM_001168.2	1215-1315
BLNK	NM_013314.2	930-1030
BNC1	NM_001717.3	2500-2600
BRAF	NM_004333.3	565-665
BRCA1	NM_007305.2	1275-1375
BRCA2	NM_000059.3	115-215
BST1	NM_004334.2	710-810
BST2	NM_004335.2	560-660
BTLA	NM_181780.2	305-405
BTN1A1	NM_001732.2	756-856
BTN2A1	NM_001197234.1	1088-1188
BTN2A2	NM_181531.2	540-640
BTN3A1	NM_001145009.1	1162-1262
BTN3A2	NM_001197246.1	940-1040
BTN3A3	NM_197974.2	1086-1186
BTNL2	NM_019602.1	961-1061
BTNL8	NM_001040462.2	900-1000
BTNL9	NM_152547.4	1986-2086
BUB1	NM_004336.2	100-200
C10orf54	NM_022153.1	1955-2055
C14orf102	NM_017970.3	3236-3336
Clorf210	NM_182517.2	966-1066
CADM1	NM_014333.3	2840-2940
CASP3	NM_032991.2	685-785
CASP8	NM_001228.4	301-401
CCL19	NM_006274.2	401-501

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
CCL21	NM_002989.2	180-280
CCL24	NM_002991.2	18-118
CCL27	NM_006664.2	304-404
CCL3	NM_002983.2	159-259
CCL4	NM_002984.2	35-135
CCL5	NM_002985.2	280-380
CCL8	NM_005623.2	689-789
CCNB1	NM_031966.2	715-815
CCNB2	NM_004701.2	980-1080
CCR1	NM_001295.2	535-635
CCR2	NM_001123041.2	743-843
CCR3	NM_001837.2	980-1080
CCR4	NM_005508.4	35-135
CCR5	NM_000579.1	2730-2830
CCR6	NM_031409.2	935-1035
CCR7	NM_001838.2	1610-1710
CD14	NM_000591.2	885-985
CD160	NM_007053.2	500-600
CD163	NM_004244.4	1630-1730
CD1D	NM_001766.3	1428-1528
CD2	NM_001767.3	687-787
CD200	NM_005944.5	665-765
CD200R1	NM_138806.3	142-242
CD207	NM_015717.2	995-1095
CD209	NM_021155.2	1532-1632
CD22	NM_001771.2	2515-2615
CD226	NM_006566.2	163-263
CD24	NM_013230.2	95-195
CD244	NM_016382.2	1150-1250
CD247	NM_198053.1	1490-1590
CD27	NM_001242.4	330-430
CD274	NM_014143.3	1245-1345
CD276	NM_001024736.1	2120-2220
CD28	NM_001243078.1	2065-2165
CD300A	NM_007261.3	902-1002
CD300E	NM_181449.1	330-430
CD300LB	NM_174892.2	1530-1630

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
CD300LF	NM_139018.3	774-874
CD33	NM_001177608.1	730-830
CD37	NM_001774.2	844-944
CD38	NM_001775.2	1035-1135
CD3D	NM_000732.4	110-210
CD3E	NM_000733.2	75-175
CD3G	NM_000073.2	515-615
CD4	NM_000616.4	975-1075
CD40	NM_001250.4	1265-1365
CD40LG	NM_000074.2	1225-1325
CD44	NM_001001392.1	429-529
CD47	NM_001777.3	897-997
CD48	NM_001778.2	270-370
CD5	NM_014207.2	1295-1395
CD52	NM_001803.2	200-300
CD55	NM_000574.3	101-201
CD59	NM_000611.4	730-830
CD6	NM_006725.3	1280-1380
CD68	NM_001251.2	1140-1240
CD69	NM_001781.1	460-560
CD7	NM_006137.6	440-540
CD70	NM_001252.2	190-290
CD72	NM_001782.2	1044-1144
CD74	NM_001025159.1	964-1064
CD79A	NM_001783.3	695-795
CD80	NM_005191.3	1288-1388
CD84	NM_001184879.1	1775-1875
CD86	NM_175862.3	1265-1365
CD8a	NM_001768.5	1320-1420
CD8B	NM_172099.2	439-539
CD9	NM_001769.2	405-505
CD96	NM_005816.4	1355-1455
CD97	NM_078481.2	1370-1470
CDC42SE1	NM_001038707.1	2625-2725
CDCA2	NM_152562.2	1750-1850
CDCA3	NM_031299.4	825-925
CDH1	NM_004360.2	1230-1330

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
CDH11	NM_001797.2	1835-1935
CDH17	NM_004063.3	298-398
CDH2	NM_001792.3	941-1041
CDH3	NM_001793.4	3745-3845
CDH5	NM_001795.3	3405-3505
CDKN1A	NM_000389.2	1975-2075
CDKN2A	NM_000077.3	975-1075
CDKN2C	NM_001262.2	1295-1395
CD01	NM_001801.2	125-225
CEACAM1	NM_001712.3	2455-2555
CENPA	NM_001809.3	265-365
CHGA	NM_001275.3	292-392
CHI3L1	NM_001276.2	475-575
CHI3L2	NM_004000.2	1195-1295
CIITA	NM_000246.3	470-570
CLCA1	NM_001285.3	2705-2805
CLCA2	NM_006536.5	2700-2800
CLDN4	NM_001305.3	1242-1342
CLDN7	NM_001307.3	175-275
CLEC10A	NM_182906.2	430-530
CLEC12A	NM_138337.5	768-868
CLEC1B	NM_016509.3	649-749
CLEC2D	NM_001004419.3	4565-4665
CLEC3B	NM_003278.2	607-707
CLEC4A	NM_194448.2	388-488
CLEC4D	NM_080387.4	1575-1675
CLEC4E	NM_014358.2	570-670
CLEC5A	NM_013252.2	615-715
CLEC6A	NM_001007033.1	342-442
CLEC7A	NM_197954.2	55-155
CLEC9A	NM_207345.2	480-580
CLIP3	NM_015526.1	2025-2125
CMKLR1	NM_004072.1	770-870
CPD	NM_001304.4	2585-2685
CRLF2	NM_001012288.1	605-705
CRTAM	NM_019604.2	555-655
CSF1	NM_000757.4	823-923

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
CSF1R	NM_005211.2	3775-3875
CSF2RB	NM_000395.2	3300-3400
CSF3	NM_000759.3	851-951
CSPG4	NM_001897.4	7642-7742
CST6	NM_001323.3	418-518
CST7	NM_003650.3	525-625
CSTB	NM_000100.2	320-420
CTAG1B	NM_001327.2	285-385
CTLA4	NM_005214.3	405-505
CTNNB1	NM_001904.3	2265-2365
CTSB	NM_001908.3	595-695
CTSG	NM_001911.2	160-260
CTSL2	NM_001333.3	2820-2920
CTSS	NM_004079.3	685-785
CTSZ	NM_001336.3	827-927
CX3CL1	NM_002996.3	140-240
CX3CR1	NM_001337.3	1040-1140
CXCL1	NM_001511.1	742-842
CXCL10	NM_001565.1	40-140
CXCL11	NM_005409.4	282-382
CXCL13	NM_006419.2	210-310
CXCL14	NM_004887.4	1125-1225
CXCL2	NM_002089.3	854-954
CXCL3	NM_002090.2	540-640
CXCL9	NM_002416.1	1975-2075
CXCR2	NM_001557.2	2055-2155
CXCR3	NM_001504.1	80-180
CXCR6	NM_006564.1	95-195
CXCR7	NM_020311.1	375-475
DAB1	NM_021080.3	772-872
DAB2IP	NM_138709.1	222-322
DAPK1	NM_004938.2	355-455
DCK	NM_000788.2	310-410
DCT	NM_001922.3	1755-1855
DDR1	NM_001954.4	1342-1442
DEF6	NM_022047.3	2120-2220
DEFB1	NM_005218.3	40-140

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
DEFB4A	NM_004942.2	97-197
DGKZ	NM_001105540.1	2142-2242
DIRAS3	NM_004675.2	950-1050
DOCK5	NM_024940.6	630-730
DPP4	NM_001935.3	2700-2800
DSC1	NM_024421.2	3611-3711
DSC2	NM_024422.3	2200-2300
DSG2	NM_001943.3	235-335
DSG3	NM_001944.2	1630-1730
DST	NM_001723.4	1870-1970
DUSP1	NM_004417.2	987-1087
DUSP6	NM_001946.2	1535-1635
EBAG9	NM_198120.1	407-507
EBI3	NM_005755.2	485-585
ECSCR	NM_001077693.2	415-515
EEF1G	NM_001404.4	1150-1250
EFEMP1	NM_004105.3	1642-1742
EGF	NM_001963.3	3930-4030
EGFR	NM_201282.1	360-460
EGR2	NM_000399.3	1891-1991
ELF3	NM_004433.4	1665-1765
EMILIN2	NM_032048.2	1445-1545
EMR2	NM_013447.2	6010-6110
ENAH	NM_001008493.1	10855-10955
ENTPD1	NM_001098175.1	8830-8930
EOMES	NM_005442.2	1670-1770
EPCAM	NM_002354.1	415-515
EPSTI1	NM_001002264.1	610-710
ERAP1	NM_001040458.1	754-854
ERBB2	NM_004448.2	2380-2480
ESR1	NM_000125.2	2390-2490
EZR	NM_003379.4	290-390
FAM83B	NM_001010872.1	415-515
FAP	NM_004460.2	1490-1590
FAS	NM_152876.1	1740-1840
FASLG	NM_000639.1	625-725
FCER1A	NM_002001.2	114-214

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
FCGR2A	NM_021642.3	60-160
FCGR2B	NM_001002273.1	870-970
FCGR3A	NM_000569.6	1644-1744
FCN1	NM_002003.2	880-980
FCRL1	NM_052938.3	1685-1785
FCRL3	NM_052939.3	165-265
FCRL4	NM_031282.1	2055-2155
FCRL5	NM_031281.2	3654-3754
FCRL6	NM_001004310.2	930-1030
FGF1	NM_033137.1	315-415
FLT1	NM_002019.4	530-630
FN1	NM_212482.1	1776-1876
FOLR1	NM_000802.2	815-915
FOLR2	NM_000803.4	851-951
FOLR3	NM_000804.2	469-569
FOLR4	NM_001199206.1	542-642
FOSL1	NM_005438.2	280-380
FOXP3	NM_014009.3	1230-1330
G6PD	NM_000402.2	1155-1255
GAPDH	NM_002046.3	972-1072
GAS 6	NM_000820.2	1339-1439
GATA3	NM_001002295.1	2835-2935
GBP1	NM_002053.1	2110-2210
GCH1	NM_000161.2	1910-2010
GDF10	NM_004962.2	1638-1738
GF11	NM_005263.2	2235-2335
GJB5	NM_006783.4	488-588
GJB6	NM_006783.4	847-947
GNLY	NM_006433.2	305-405
GOLT1A	NM_198447.1	265-365
GPLD1	NM_001503.2	465-565
GPR18	NM_001098200.1	1060-1160
GRAP2	NM_004810.2	232-332
GRB7	NM_005310.2	1010-1110
GUSB	NM_000181.1	1350-1450
GZMA	NM_006144.2	155-255
GZMB	NM_004131.3	540-640

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
GZMK	NM_002104.2	700-800
HAVCR1	NM_001099414.1	968-1068
HAVCR2	NM_032782.3	955-1055
HCLS1	NM_005335.4	515-615
HCST	NM_001007469.1	132-232
HES4	NM_001142467.1	557-657
HGFAC	NM_001528.2	1377-1477
HHLA2	NM_007072.2	1430-1530
HIF1A	NM_001530.2	1985-2085
HLA-A	NM_002116.5	1000-1100
HLA-B	NM_005514.6	937-1037
HLA-C	NM_002117.4	895-995
HLA-DPB1	NM_002121.4	931-1031
HLA-DQA1	NM_002122.3	261-361
HLA-DRA	NM_019111.3	335-435
HLA-DRB1	NM_002124.1	985-1085
HLA-E	NM_005516.4	1204-1304
HLA-F	NM_001098479.1	575-675
HLA-G	NM_002127.4	1180-1280
HMGA1	NM_145904.1	871-971
HMGB1	NM_002128.4	208-308
HNF1B	NM_000458.1	2000-2100
HNRNPL	NM_001533.2	757-857
HOPX	NM_001145460.1	1117-1217
HPRT1	NM_000194.1	240-340
HSD3B7	NM_001142777.1	2043-2143
ICA1	NM_001136020.1	145-245
ICAM1	NM_000201.2	2253-2353
ICOS	NM_012092.2	640-740
ICOSLG	NM_015259.4	1190-1290
ID2	NM_002166.4	505-605
IDO1	NM_002164.3	50-150
IFI16	NM_005531.1	2255-2355
IFITM1	NM_003641.3	482-582
IFNG	NM_000619.2	970-1070
IFNGR2	NM_005534.3	799-899
IGF1	NM_000618.3	491-591

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
IGJ	NM_144646.3	435-535
IGSF6	NM_005849.2	58-158
IKZF2	NM_016260.2	870-970
IKZF3	NM_183232.2	1176-1276
IL10	NM_000572.2	230-330
IL10RA	NM_001558.2	150-250
IL10RB	NM_000628.3	1760-1860
IL13	NM_002188.2	516-616
IL18	NM_001562.2	48-148
IL18R1	NM_003855.2	2025-2125
IL2	NM_000586.2	300-400
IL21	NM_021803.2	65-165
IL22	NM_020525.4	319-419
IL23R	NM_144701.2	710-810
IL27	NM_145659.3	143-243
IL27RA	NM_004843.2	2965-3065
IL2RA	NM_000417.1	1000-1100
IL2RB	NM_000878.2	1980-2080
IL2RG	NM_000206.1	595-695
IL-32	NM_001012633.1	758-858
IL4	NM_000589.2	625-725
IL6	NM_000600.1	220-320
IL7	NM_000880.2	38-138
IL7R	NM_002185.2	1610-1710
ILDR1	NM_175924.3	1672-1772
ILDR2	NM_199351.2	558-658
ING1	NM_005537.3	2690-2790
ING2	NM_001564.2	445-545
INSR	NM_000208.1	525-625
IQGAP3	NM_178229.4	345-445
IRF1	NM_002198.1	510-610
IRF2	NM_002199.2	1375-1475
IRF3	NM_001571.5	1303-1403
IRF4	NM_002460.1	325-425
IRF5	NM_002200.3	1845-1945
IRF6	NM_006147.2	1430-1530
IRF7	NM_001572.3	1763-1863

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
IRF8	NM_002163.2	253-353
ITGA1	NM_181501.1	1875-1975
ITGA2	NM_002203.2	475-575
ITGAE	NM_002208.4	3405-3505
ITGAL	NM_002209.2	3905-4005
ITGAM	NM_000632.3	515-615
ITGAV	NM_002210.2	2615-2715
ITGAX	NM_000887.3	700-800
ITK	NM_005546.3	3430-3530
ITM2A	NM_004867.4	988-1088
JAK3	NM_000215.2	1715-1815
JAKMIP1	NM_001099433.1	1765-1865
JUP	NM_002230.2	1075-1175
KIF2C	NM_006845.3	1940-2040
KIR2DL1	NM_014218.2	1316-1416
KIR2DL4	NM_001080770.1	841-941
KLK11	NM_006853.2	886-986
KLK5	NM_001077491.1	830-930
KLRB1	NM_002258.2	85-185
KLRC1	NM_002259.3	335-435
KLRC2	NM_002260.3	942-1042
KLRD1	NM_002262.3	542-642
KLRG1	NM_005810.3	65-165
KLRG2	NM_198508.2	1347-1447
KLRK1	NM_007360.1	760-860
KRAS	NM_004985.3	1790-1890
KRT13	NM_002274.3	1548-1648
KRT17	NM_000422.2	514-614
KRT5	NM_000424.2	130-230
KRT6A	NM_005554.3	117-217
KRT6B	NM_005555.3	2095-2195
LAG3	NM_002286.5	1735-1835
LAIR1	NM_002287.3	1195-1295
LAMP1	NM_005561.3	730-830
LAMP 2	NM_002294.2	380-480
LAT	NM_001014987.1	1290-1390
LAT2	NM_014146.3	1863-1963

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
LAX1	NM_001136190.1	315-415
LCK	NM_005356.2	1260-1360
LGALS1	NM_002305.3	60-160
LGALS2	NM_006498.2	314-414
LGALS3	NM_001177388.1	495-595
LGALS3BP	NM_005567.3	1700-1800
LGALS4	NM_006149.3	995-1095
LGALS7	NM_002307.3	246-346
LGALS9	NM_002308.3	935-1035
LIFR	NM_002310.3	2995-3095
LILRA1	NM_006863.1	1719-1819
LILRA2	NM_006866.2	317-417
LILRA3	NM_006865.3	1123-1223
LILRA4	NM_012276.3	1577-1677
LILRA5	NM_181879.2	545-645
LILRA6	NM_024318.2	1900-2000
LILRB1	NM_001081637.1	2332-2432
LILRB2	NM_005874.1	595-695
LILRB3	NM_006864.2	2235-2335
LILRB4	NM_001081438.1	1825-1925
LILRB5	NM_001081442.1	327-427
LMO3	NM_001001395.2	490-590
LSR	NM_205835.3	1888-1988
LST1	NR_029461.1	164-264
LTA	NM_000595.2	885-985
LTB	NM_002341.1	330-430
LTBR	NM_002342.1	1435-1535
LTK	NM_002344.5	564-664
LY6E	NM_002346.2	380-480
LY6G6C	NM_025261.2	170-270
LY6G6D	NM_021246.2	39-139
LY9	NM_001033667.1	260-360
LYPD3	NM_014400.2	1280-1380
MAF	NM_005360.4	2198-2298
MAFB	NM_005461.3	1655-1755
MAGEA1	NM_004988.4	476-576
MAP4K1	NM_007181.3	780-880

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
MARCO	NM_006770.3	1434-1534
MBL2	NM_000242.2	1756-1856
MDM2	NM_006878.2	280-380
MERTK	NM_006343.2	665-765
MICA	NM_000247.1	550-650
MICB	NM_005931.3	1387-1487
MITF	NM_000248.3	3240-3340
MKI67	NM_002417.2	4020-4120
MLANA	NM_005511.1	779-879
MLH1	NM_000249.2	1605-1705
MMP11	NM_005940.3	260-360
MMP13	NM_002427.2	951-1051
MMP9	NM_004994.2	1530-1630
MN1	NM_002430.2	1610-1710
MON1B	NM_014940.2	2880-2980
MRC1	NM_002438.2	525-625
MS4A1	NM_152866.2	620-720
MSH2	NM_000251.1	2105-2205
MSH4	NM_002440.3	472-572
MSLN	NM_013404.3	1178-1278
MTA2	NM_004739.3	615-715
MUC21	NM_001010909.2	2760-2860
MX1	NM_002462.2	1485-1585
MYBL2	NM_002466.2	445-545
MYC	NM_002467.3	1610-1710
MYH4	NM_017533.2	3935-4035
NAPSA	NM_004851.1	511-611
NCAM1	NM_000615.5	1620-1720
NCR1	NM_004829.5	602-702
NCR2	NM_004828.3	306-406
NCR3	NM_147130.1	50-150
NCR3LG1	NM_001202439.1	1294-1394
NFATC1	NM_172389.1	1984-2084
NFIL3	NM_005384.2	1795-1895
NFKB1	NM_003998.2	1675-1775
NKG7	NM_005601.3	632-732
NKX2-1	NM_003317.3	2011-2111

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
NLRP10	NM_176821.3	175-275
NOD1	NM_006092.1	3285-3385
NOS2	NM_000625.4	605-705
NR4A2	NM_006186.3	1380-1480
NT5E	NM_002526.2	1214-1314
OAS2	NM_016817.2	480-580
OAZ1	NM_004152.2	313-413
OSCAR	NM_130771.3	990-1090
OVOL2	NM_021220.2	676-776
P2RY8	NM_178129.3	425-525
PARK7	NM_001123377.1	254-354
PBK	NM_018492.2	755-855
PCSK1	NM_000439.3	2273-2373
PCSK2	NM_002594.2	645-745
PDCD1	NM_005018.1	175-275
PDCD1LG2	NM_025239.3	235-335
PDCD4	NM_014456.3	1115-1215
PDGFRA	NM_006206.3	1925-2025
PECAM1	NM_000442.3	1365-1465
PF4	NM_002619.3	109-209
PGR	NM_000926.4	3246-3346
PHACTR2	NM_001100164.1	8350-8450
PHLDA3	NM_012396.3	532-632
PI3	NM_002638.3	274-374
PIK3CA	NM_006218.2	2445-2545
PIK3CB	NM_006219.1	2945-3045
PIK3CD	NM_005026.3	95-195
PIK3CG	NM_002649.2	2125-2225
PIK3R1	NM_181504.2	1105-1205
PILRA	NM_178273.1	663-763
PILRB	NM_178238.1	1165-1265
PLA2G6	NM_001004426.1	1954-2054
PLAT	NM_000931.2	1334-1434
PLSCR1	NM_021105.2	355-455
POLR1B	NM_019014.3	3320-3420
POLR2A	NM_000937.2	3775-3875
POSTN	NM_001135935.1	910-1010

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
PPARG	NM_015869.3	1035-1135
PPIA	NM_021130.2	925-1025
PPP1R2	NM_006241.4	146-246
PPP1R9A	NM_017650.2	1060-1160
PRC1	NM_199414.1	1927-2027
PRDM1	NM_182907.1	310-410
PRF1	NM_005041.3	2120-2220
PRKCB	NM_212535.1	1750-1850
PROM2	NM_001165977.1	1388-1488
PRR15L	NM_024320.2	1005-1105
PRSS8	NM_002773.3	917-1017
PSMB10	NM_002801.2	221-321
PSMB8	NM_004159.4	1215-1315
PSMB9	NM_002800.4	455-555
PSME1	NM_006263.2	825-925
PSME2	NM_002818.2	315-415
PSTPIP1	NM_003978.3	1339-1439
PSTPIP2	NM_024430.3	885-985
PTEN	NM_000314.3	1675-1775
PTGER2	NM_000956.2	1410-1510
PTGER4	NM_000958.2	1380-1480
PTHLH	NM_198965.1	605-705
PTPN13	NM_080684.2	4890-4990
PTPN22	NM_015967.4	2505-2605
PTPN3	NM_001145372.1	2750-2850
PTPN6	NM_002831.5	1734-1834
PTPN7	NM_002832.3	2960-3060
PTPRC	NM_080923.2	154-254
PTPRCAP	NM_005608.2	668-768
PTPRF	NM_002840.3	6310-6410
PVR	NM_006505.3	604-704
PVRIG	NM_024070.3	1390-1490
PVRL2	NM_002856.2	1337-1437
PVRL3	NM_015480.2	925-1025
PYHIN1	NM_198930.2	533-633
RAB25	NM_020387.2	245-345
RAC2	NM_002872.3	1069-1169

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
RACGAP1	NM_013277.3	1850-1950
RARRES2	NM_002889.3	365-465
RASAL3	NM_022904.1	2161-2261
RASSF8	NM_007211.2	1235-1335
RECK	NM_021111.2	2135-2235
RETNLB	NM_032579.2	426-526
RGN	NM_152869.2	1560-1660
RGS16	NM_002928.2	205-305
RORA	NM_134261.2	1715-1815
RORC	NM_001001523.1	1350-1450
RPL19	NM_000981.3	315-415
RSAD2	NM_080657.4	473-573
RUNX1	NM_001754.4	635-735
RUNX3	NM_004350.1	2085-2185
S100A2	NM_005978.3	567-667
S100A8	NM_002964.3	115-215
S100A9	NM_002965.2	75-175
SAMD3	NM_001017373.2	780-880
SAMHD1	NM_015474.2	640-740
SART1	NM_005146.3	3025-3125
SART3	NM_014706.3	1195-1295
SASH3	NM_018990.3	1815-1915
SCGB2A2	NM_002411.1	265-365
SCUBE2	NM_020974.1	1835-1935
SDHA	NM_004168.1	230-330
SELL	NR_029467.1	1585-1685
SELPLG	NM_003006.3	2297-2397
SEMA4A	NM_001193300.1	935-1035
SEMA4D	NM_001142287.1	1120-1220
SERPINA1	NM_000295.4	760-860
SERPINB5	NM_002639.4	90-190
SERPINF1	NM_002615.4	888-988
SFN	NM_006142.3	579-679
SFTP1B	NM_001093770.2	1885-1985
SGPP2	NM_152386.2	850-950
SH2D1A	NM_002351.4	495-595
SH2D1B	NM_053282.4	545-645

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
SH2D2A	NM_001161443.1	341-441
SIGLEC10	NM_001171158.1	1425-1525
SIGLEC14	NM_001098612.1	1084-1184
SIGLEC15	NM_213602.2	124-224
SIGLEC5	NM_003830.2	2145-2245
SIGLEC9	NM_001198558.1	1052-1152
SIRPA	NM_080792.2	3115-3215
SIRPB1	NM_006065.2	2130-2230
SIRPG	NM_001039508.1	830-930
SIT1	NM_014450.2	720-820
SLA	NM_001045556.2	980-1080
SLA2	NM_032214.2	1640-1740
SLAMF1	NM_003037.2	580-680
SLAMF6	NM_001184714.1	1032-1132
SLAMF7	NM_021181.3	215-315
SLC2A1	NM_006516.2	2500-2600
SOCS3	NM_003955.3	1870-1970
SPN	NM_003123.3	2345-2445
SRPX	NM_006307.2	1330-1430
STARD10	NM_006645.2	105-205
STAT1	NM_007315.2	205-305
STAT6	NM_003153.3	2030-2130
STK11IP	NM_052902.2	565-665
SYK	NM_003177.3	1685-1785
SYP	NM_003179.2	2265-2365
TAGAP	NM_054114.3	169-269
TARP	NM_001003799.1	560-660
TBC1D10B	NM_015527.3	2915-3015
TBP	NM_001172085.1	587-687
TBX21	NM_013351.1	890-990
TCN2	NM_000355.2	1010-1110
TEK	NM_000459.2	615-715
<i>TERT</i>	NM_198253.1	2570-2670
TF	NM_001063.2	640-740
TGFB1	NM_000660.3	1260-1360
TGFBR2	NM_001024847.1	1760-1860
THEMIS	NM_001010923.2	1700-1800

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
THY1	NM_006288.2	135-235
TIGIT	NM_173799.2	1968-2068
TIMP3	NM_000362.4	1640-1740
TIMP4	NM_003256.2	1000-1100
TMC6	NM_001127198.1	1870-1970
TMEM2	NM_013390.2	1120-1220
TMEM246	NM_032342.1	1108-1208
TMIGD2	NM_144615.2	359-459
TNF	NM_000594.2	1010-1110
TNFAIP3	NM_006290.2	260-360
TNFAIP6	NM_007115.2	250-350
TNFAIP8L2	NM_024575.3	709-809
TNFRSF10B	NM_003842.3	565-665
TNFRSF11A	NM_003839.2	490-590
TNFRSF13B	NM_012452.2	160-260
TNFRSF13C	NM_052945.3	789-889
TNFRSF14	NM_003820.2	916-1016
TNFRSF15	NM_001204344.1	2338-2438
TNFRSF17	NM_001192.2	635-735
TNFRSF18	NM_004195.2	445-545
TNFRSF21	NM_014452.3	735-835
TNFRSF25	NM_001039664.1	158-258
TNFRSF4	NM_003327.2	200-300
TNFRSF8	NM_152942.2	2030-2130
TNFRSF9	NM_001561.4	255-355
TNFSF10	NM_003810.2	115-215
TNFSF11	NM_003701.2	490-590
TNFSF13A	NM_003808.3	810-910
TNFSF13B	NM_006573.4	1430-1530
TNFSF14	NM_003807.2	270-370
TNFSF18	NM_005092.2	175-275
TNFSF4	NM_003326.2	545-645
TNFSF8	NM_001244.3	518-618
TNFSF9	NM_003811.3	398-498
TOX	NM_014729.2	574-674
TOX3	NM_001080430.1	1925-2025
TP63	NM_001114978.1	1175-1275

(continuación)

ID del gen	N.º de registro del NCBI del transcrito diana	Región diana ilustrativa
TRAT1	NM_016388.2	770-870
TREM1	NM_018643.3	375-475
TREM2	NM_018965.2	563-663
TREML1	NM_178174.2	775-875
TREML2	NM_024807.2	2745-2845
TREML4	NM_198153.2	1715-1815
TRIM16	NM_006470.3	84-184
TRIM29	NM_012101.3	2645-2745
TSLP	NM_033035.4	899-999
TSPAN32	NM_005705.4	828-928
TUBB	NM_178014.2	320-420
TYR	NM_000372.4	1195-1295
TYRO3	NM_006293.2	775-875
TYROBP	NM_003332.3	361-461
UBASH3A	NM_001001895.1	1970-2070
UBASH3B	NM_032873.4	2494-2594
UBB	NM_018955.2	795-895
UBE2C	NM_181803.1	269-369
VCAM1	NM_001078.3	2535-2635
VEGFA	NM_001025366.1	1325-1425
VIM	NM_003380.2	694-794
VTCN1	NM_024626.2	1375-1475
WT1	NM_000378.3	2160-2260
XIST	NR_001564.1	1020-1120
ZAP70	NM_001079.3	1175-1275
ZBTB16	NM_006006.4	1585-1685
ZBTB32	NM_014383.1	1620-1720
ZBTB34	NM_001099270.1	406-506
ZEB1	NM_001128128.1	1450-1550
ZEB2	NM_001171653.1	240-340
ZKSCAN5	NM_14569.3	3688-3788

Cada una de las etapas para obtener una muestra de sangre, aislar el ARN total de la misma para un ensayo de biomarcadores de firma genética, la realización del ensayo y la determinación de las puntuaciones de firma genética se pueden realizar por personas/entidades independientes en ubicaciones distintas. Por ejemplo, una enfermera puede obtener una muestra de sangre de un paciente con cáncer y luego enviar la muestra de sangre a un laboratorio, que puede procesar la muestra de sangre para aislar y preparar el ARN total para el ensayo. El ARN total puede analizarse poco después de la preparación o almacenarse para un análisis futuro. El laboratorio que preparó el ARN total puede realizar el ensayo o enviar el ARN preparado a un laboratorio diferente para realizar el ensayo. La puntuación de la firma genética se puede calcular por un profesional capacitado que sea empleado del laboratorio o sea un contratista independiente. Como alternativa, un solo laboratorio de diagnóstico obtiene la muestra de sangre

del médico del sujeto y luego realiza todas las etapas involucradas en la preparación del ARN total, el ensayo del ARN y el cálculo de la puntuación de firma genética para la muestra de sangre.

En algunas realizaciones, las personas involucradas en el aislamiento de ARN total de una muestra de sangre que ensaya el ARN para un biomarcador de firma genética no conocen la identidad del paciente cuya muestra se está analizando; es decir, la muestra recibida por el laboratorio se hace anónima de alguna manera antes de ser enviada al laboratorio. Por ejemplo, la muestra puede estar simplemente identificada por un número o algún otro código (un "ID de muestra") y los resultados del ensayo se notifican a la parte que pide la prueba utilizando el ID de muestra. En realizaciones preferidas, el vínculo entre la identidad de un paciente y la muestra de tejido del paciente es conocido solo por el paciente o por el médico del paciente.

En algunas realizaciones, después de que se hayan obtenido los resultados de la prueba, el laboratorio de diagnóstico genera un informe de prueba, que puede comprender cualquiera o ambas de la siguiente información: (1) la muestra de sangre fue positiva o negativa para el biomarcador y (2) la puntuación de firma genética para la muestra de sangre del paciente y la puntuación de referencia para esa firma genética. El informe de la prueba también puede incluir una lista de genes cuya expresión se analizó en el ensayo.

En otras realizaciones, el informe de prueba también puede incluir orientación sobre cómo interpretar los resultados para predecir si es probable que un paciente responda a un antagonista de PD-1.

En algunas realizaciones, el informe de prueba es un documento escrito preparado por el laboratorio de diagnóstico y enviado al paciente o al médico del paciente en forma impresa o por correo electrónico. En otras realizaciones, el informe de prueba es generado por un programa informático y mostrado en un monitor de vídeo en el consultorio del médico. El informe de prueba también puede comprender una transmisión oral de los resultados de la prueba directamente al paciente o al médico del paciente o a un empleado autorizado en el consultorio del médico. De forma similar, el informe de prueba puede comprender un registro de los resultados de la prueba que el médico hace en el archivo del paciente.

La detección de la presencia o ausencia de una firma genética de la invención basada en sangre se puede realizar utilizando un kit que ha sido especialmente diseñado para este propósito. En una realización, el kit comprende un conjunto de sondas de oligonucleótidos capaces de hibridar con los transcritos diana en la firma genética. El kit puede comprender además sondas de oligonucleótidos capaces de detectar transcritos de otros genes, tales como genes de control o genes utilizados con fines de normalización. El conjunto de sondas de oligonucleótidos puede comprender una matriz ordenada de oligonucleótidos en una superficie sólida, tal como una microplaca, perlas de sílice (tales como la tecnología BeadArray de Illumina, San Diego, CA) o un portaobjetos de vidrio (véase, por ejemplo, los documentos WO 98/20020 y WO 98/20019. En algunas realizaciones, las sondas de oligonucleótidos se proporcionan en una o más composiciones en forma líquida o seca.

Los oligonucleótidos de los kits deben poder hibridar específicamente con una región diana de un polinucleótido, tal como, por ejemplo, un transcrito de ARN o ADNc generado a partir del mismo. Tal como se usa en el presente documento, hibridación específica significa que el oligonucleótido forma una estructura bicatenaria antiparalela con la región diana en determinadas condiciones de hibridación, mientras no se forma tal estructura con regiones no diana cuando se incuba con el polinucleótido en las mismas condiciones de hibridación. La composición y longitud de cada oligonucleótido en el kit dependerá de la naturaleza del transcrito que contiene la región diana, así como del tipo de ensayo a realizar con el oligonucleótido, y el experto en la materia lo determinará fácilmente.

En algunas realizaciones, cada oligonucleótido del kit es un complemento perfecto de su región diana. Se dice que un oligonucleótido es un complemento "perfecto" o "completo" de otra molécula de ácido nucleico si cada nucleótido de una de las moléculas es complementaria del nucleótido en la posición correspondiente de la otra molécula. Si bien se prefieren los oligonucleótidos perfectamente complementarios para detectar transcritos en una firma genética, se contemplan desviaciones de la complementariedad completa cuando tales desviaciones no impiden que la molécula hibride específicamente con la región diana como se define anteriormente. Por ejemplo, una sonda de oligonucleótidos puede tener uno o más nucleótidos no complementarios en su extremo 5' o en su extremo 3', siendo el resto de la sonda completamente complementario a la región diana. Como alternativa, los nucleótidos no complementarios se pueden intercalar en la sonda siempre que la sonda resultante todavía sea capaz de hibridar específicamente con la región diana.

En algunas realizaciones preferidas, cada oligonucleótido del kit hibrida específicamente con su región diana en condiciones rigurosas de hibridación. Las condiciones rigurosas de hibridación dependen de la secuencia y varían según las circunstancias. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente de 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica (Tf) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La Tf es la temperatura (bajo fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico) en la que el 50 % de las sondas complementarias a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Como las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, a Tf, el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio.

Normalmente, las condiciones rigurosas incluyen una concentración de sal de al menos aproximadamente de 0,01 a

1,0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 25 °C para sondas de oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Por ejemplo, condiciones de 5xSSPE (NaCl 750 mM, Fosfato de Na 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4) y una temperatura de 25-30 °C son adecuadas para hibridaciones de sondas específicas de alelos. Se pueden encontrar condiciones más rigurosas en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), capítulos 7, 9 y 11, y en *NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH*, Haymes *et al.*, IRL Press, Washington, D.C., 1985.

Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación rigurosas incluye la hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 4X, a aproximadamente 65-70 °C (o, como alternativa, hibridación en SSC a 4X más formamida al 50 % a aproximadamente 42-50 °C) seguido de uno o más lavados en SSC a 1X, a aproximadamente 65-70 °C. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación muy rigurosas incluye la hibridación en SSC a 1X, a aproximadamente 65-70 °C (o, como alternativa, la hibridación en SSC a 1X más formamida al 50% a aproximadamente 42-50 °C) seguido de uno o más lavados en SSC a 0,3X, a aproximadamente 65-70 °C. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de rigurosidad reducida incluye la hibridación en SSC a 4X, a aproximadamente 50-60 °C (o, como alternativa, hibridación en SSC a 6X más formamida al 50 % a aproximadamente 40-45 °C) seguido de uno o más lavados en SSC a 2X, a aproximadamente 50-60 °C. Las condiciones de rigurosidad con intervalos intermedios a los valores mencionados anteriormente, por ejemplo, a 65-70 °C o a 42-50 °C también se pretende que estén abarcados por la presente invención. SSPE (SSPE a 1x es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM y EDTA 1,25 mM, a pH 7,4) se puede sustituir por SSC (SSC a 1x es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos cada uno después de que se completa la hibridación.

La temperatura de hibridación para los híbridos que se prevé que tiene menos de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5-10 °C menos que la temperatura de fusión (T_f) del híbrido, en donde la T_f se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, la $T_f(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{número de bases A+T}) + 4(\text{número de bases G+C})$. Para híbridos de entre 18 y 49 pares de bases de longitud, $T_f(^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{G+C}) - (600/\text{N})$, en donde N es el número de bases en el híbrido y $[\text{Na}^+]$ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ($[\text{Na}^+]$ para SSC a 1 X = 0,165 M).

Los oligonucleótidos en los kits pueden estar compuestos por cualquier estado de fosforilación de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y derivados de nucleótidos acíclicos y otros derivados funcionalmente equivalentes. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden tener una estructura principal sin fosfato, que puede estar compuesta por enlaces tales como carboximetilo, acetamidato, carbamato, poliamida (ácido péptido nucleico (APN)) y similares (Varma, en *MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, A COMPREHENSIVE DESK REFERENCE*, Meyers, ed., págs. 6 17-20, VCH Publishers, Inc., 1995). Los oligonucleótidos se pueden preparar mediante síntesis química usando cualquier metodología adecuada conocida en la técnica, o se pueden obtener de una muestra biológica, por ejemplo, por digestión por restricción. Los oligonucleótidos pueden contener un marcador detectable, de acuerdo con cualquier técnica conocida en la técnica, incluido el uso de radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, proteínas, haptenos, anticuerpos, etiquetas de secuencia y similares. Los oligonucleótidos del kit se pueden fabricar y comercializarse como reactivos específicos de analito (ASR) o pueden constituir componentes de un dispositivo de diagnóstico aprobado.

Los kits también pueden contener otros reactivos tales como tampón de hibridación y reactivos para detectar cuándo se ha producido la hibridación con una molécula diana específica. Los reactivos de detección pueden incluir oligonucleótidos marcados con biotina o fluorescentes y/o un anticuerpo marcado con enzima y uno o más sustratos que generan una señal detectable cuando la enzima actúa sobre ellos. El experto en la materia entenderá que el conjunto de oligonucleótidos y reactivos para realizar el ensayo se proporcionará en receptáculos separados colocados en el recipiente del kit si es apropiado para preservar la actividad biológica o química y permitir el uso adecuado en el ensayo.

Cada una de las sondas oligonucleotídicas y todos los demás reactivos del kit han sido sometidos a pruebas de calidad para un rendimiento óptimo en un ensayo diseñado para determinar la puntuación de la firma genética de interés en una muestra de sangre. El kit incluye un manual de instrucciones que describe cómo utilizar la puntuación de firma genética determinada para asignar, a la muestra de sangre analizada, la presencia o ausencia de un biomarcador de firma genética que predice la respuesta al tratamiento con un antagonista de PD-1.

B. Composiciones farmacéuticas, productos farmacéuticos y regímenes de tratamiento

Un individuo que será tratado por cualquiera de los métodos y productos descritos en el presente documento es un sujeto humano diagnosticado con un tumor, y las muestras de sangre inicial y posdosis apropiadas están disponibles o se pueden obtener para usar en las pruebas de la presencia o ausencia de cualquiera de los biomarcadores de firma genética descritos en el presente documento.

La muestra de sangre se puede recolectar de un sujeto antes y/o después de la exposición del sujeto a uno o más

regímenes de tratamiento terapéutico, tal como, por ejemplo, un antagonista de PD-1, un agente quimioterapéutico, radioterapia. Por consiguiente, se pueden recolectar muestras de sangre de un sujeto durante un período de tiempo.

Un médico puede utilizar la puntuación de un paciente para una firma genética de la invención como una guía para decidir cómo tratar a un paciente que ha sido diagnosticado con un tipo de cáncer que es susceptible al tratamiento con un antagonista de PD-1 u otro(s) agente(s) quimioterapéutico(s). Por ejemplo, antes del inicio del tratamiento con el antagonista de PD-1 u otro agente quimioterapéutico, el médico normalmente solicitaría una prueba de diagnóstico para determinar si una muestra de sangre inicial obtenida del paciente es positiva o negativa para un biomarcador de firma del gen OxPhos y/o para obtener puntuaciones de firma iniciales para una firma del gen PD-L1 o una firma del gen IFNG. El médico podría entonces ordenar una extracción de sangre posterior después de que el paciente haya sido tratado con una primera dosis del antagonista de PD-1 para usarlo en la obtención de una puntuación de firma posterior a la dosis para una firma de gen PD-L1 o IFNG y así asignar al paciente la presencia o ausencia del biomarcador predictivo. En algunas realizaciones, un médico puede estar considerando si tratar al paciente con un producto farmacéutico que esté indicado para pacientes que dan positivo en el biomarcador de firma genética. Por ejemplo, si el paciente da positivo al biomarcador, el paciente se trata con un régimen terapéutico que incluye al menos el antagonista de PD-1 (opcionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos), y si el resultado del biomarcador es negativo, el paciente se trata con un régimen terapéutico que no incluye ningún antagonista de PD-1.

Al decidir cómo utilizar los resultados de la prueba de firma genética en el tratamiento de cualquier paciente individual, el médico también puede tener en cuenta otras circunstancias relevantes, tales como el estadio del cáncer, el peso, el sexo y la condición general del paciente, incluido ingresar una combinación de estos factores y los resultados de la prueba de biomarcadores de firma genética en un modelo que ayuda a guiar al médico en la elección de una terapia y/o régimen de tratamiento con esa terapia.

El médico puede optar por tratar al paciente que prueba el biomarcador positivo con un régimen de terapia de combinación que incluye un antagonista de PD-1 y uno o más agentes terapéuticos adicionales. El agente terapéutico adicional puede ser, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente bioterapéutico (incluidos, entre otros, anticuerpos contra VEGF, EGFR, Her2/neu, receptores de VEGF, otros receptores de factores de crecimiento, CD20, CD40, CD-40L, CTLA-4, OX-40, 4-1BB e ICOS), un agente inmunogénico (por ejemplo, células cancerosas atenuadas, antígenos tumorales, células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas pulsadas con antígeno o ácidos nucleicos derivados de tumores, citocinas inmunoestimulantes (por ejemplo, IL-2, IFN α 2, GM-CSF) y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes tales como, por ejemplo, GM-CSF).

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos, adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina phil1, véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos del antibiótico enediina de la cromoproteína relacionada), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolin-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, flouxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antiparaneurales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-

- C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO);
- 5 retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (MSRE), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que
- 10 regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, formestano, fadrozol, vorozol, letrozol y anastrozol; y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.
- 15 Cada agente terapéutico en una terapia de combinación usada para tratar a un paciente positivo en el biomarcador puede administrarse solo o en un medicamento (también denominado en el presente documento composición farmacéutica) que comprende el agente terapéutico y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes y diluyentes, de acuerdo con una práctica farmacéutica convencional.
- 20 Cada agente terapéutico en una terapia de combinación utilizada para tratar a un paciente positivo al biomarcador se puede administrar simultáneamente (es decir, en el mismo medicamento), de forma concurrente (es decir, en medicamentos separados administrados uno después del otro en cualquier orden) o secuencialmente en cualquier orden. La administración secuencial es particularmente útil cuando los agentes terapéuticos en la terapia de combinación están en diferentes formas de dosificación (un agente es un comprimido o cápsula y otro agente es un
- 25 líquido estéril) y/o se administran en diferentes pautas posológicas, por ejemplo, un quimioterapéutico que se administra al menos a diario y un bioterapéutico que se administra con menos frecuencia, tal como una vez a la semana, una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas.
- En algunas realizaciones, al menos uno de los agentes terapéuticos en la terapia de combinación se administra usando la misma pauta posológica (dosis, frecuencia y duración del tratamiento) que se emplea normalmente cuando el agente se usa como monoterapia para tratar el mismo cáncer. En otras realizaciones, el paciente recibe una cantidad total menor de al menos uno de los agentes terapéuticos en la terapia de combinación que cuando el agente se usa como monoterapia, por ejemplo, dosis más pequeñas, dosis menos frecuentes y/o duración del tratamiento más corta.
- 30 Cada agente terapéutico en una terapia de combinación usada para tratar a un paciente positivo al biomarcador se puede administrar por vía oral o parenteral, incluidas las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal, tópica y transdérmica.
- 35 A un paciente se le puede administrar un antagonista de PD-1 antes o después de la cirugía para extirpar un tumor y se puede usar antes de, durante o después de la radioterapia.
- 40 En algunas realizaciones, se administra un antagonista de PD-1 a un paciente que no ha sido tratado previamente con un agente bioterapéutico o quimioterapéutico, es decir, es virgen para el tratamiento. En otras realizaciones, el antagonista de PD-1 se administra a un paciente que no logró una respuesta sostenida después de una terapia previa con un agente bioterapéutico o quimioterapéutico, es decir, ha sido tratado anteriormente.
- 45 Una terapia que comprende un antagonista de PD-1 se usa normalmente para tratar un tumor que es lo suficientemente grande como para ser encontrado por palpación o por técnicas de formación de imágenes bien conocidas en la técnica, tales como RM, ecografía o tomografía computarizada. En algunas realizaciones preferidas, la terapia se usa para tratar un tumor en estadio avanzado que tiene dimensiones de al menos aproximadamente 200 mm³, 300 mm³, 400 mm³, 500 mm³, 750 mm³ o hasta 1.000 mm³.
- La selección de un régimen de dosificación (también denominado en el presente documento régimen de administración) para una terapia que comprende un antagonista de PD-1 depende de varios factores, incluyendo la
- 55 tasa de recambio sérico o tisular de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana, tejido u órgano del individuo que está siendo tratado. Preferentemente, un régimen de administración maximiza la cantidad del antagonista de PD-1 que se administra al paciente compatible con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por consiguiente, la cantidad de dosis y la frecuencia de dosificación dependen en parte del antagonista de PD-1 particular, de cualquier otro agente terapéutico que se vaya a utilizar, y de la gravedad del cáncer que se está tratando y las características del paciente. Se dispone de orientación para seleccionar las dosis apropiadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas. Véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000)
- 65

New Engl. J. Med. 343:1594-1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57ª ed.); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57ª edición (noviembre de 2002). El médico puede determinar el régimen de dosificación apropiado, por ejemplo, usando parámetros o factores que se sabe o se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o que se predice que afectan al tratamiento, y dependerán, por ejemplo, el historial clínico del paciente (por ejemplo, terapia previa), el tipo y el estadio del cáncer que se va a tratar y los biomarcadores de respuesta a uno o más de los agentes terapéuticos en la terapia de combinación.

Los agentes bioterapéuticos utilizados en combinación con un antagonista de PD-1 se pueden administrar mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, diariamente, cada dos días, tres veces a la semana o una vez a la semana, dos semanas, tres semanas, mensualmente, bimensualmente, etc. Una dosis semanal total es, en general, de al menos 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg de peso corporal o más. Véase, por ejemplo, Yang *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold *et al.* (2002) New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu *et al.* (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji *et al.* (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144.

En algunas realizaciones que emplean un mAb anti-PD-1 humano como antagonista de PD-1, el régimen de dosificación comprenderá la administración del mAb anti-PD-1 humano a una dosis de 1, 2, 3, 5 o 10 mg/kg a intervalos de aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días) o aproximadamente 21 días ($\pm$ 2 días) o aproximadamente 30 días ($\pm$ 2 días) durante el curso del tratamiento.

En otras realizaciones que emplean un mAb anti-PD-1 humano como antagonista de PD-1, el régimen de dosificación comprenderá administrar el mAb anti-PD-1 humano a una dosis de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, con aumento de dosis intrapaciente. En otras realizaciones de dosis crecientes, el intervalo entre dosis se acortará progresivamente, por ejemplo, aproximadamente 30 días ($\pm$ 2 días) entre la primera y la segunda dosis, aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días) entre la segunda y la tercera dosis. En determinadas realizaciones, el intervalo de dosificación será de aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días), para las dosis posteriores a la segunda dosis.

En determinadas realizaciones, a un sujeto se le administrará una infusión intravenosa (IV) de un medicamento que comprende cualquiera de los antagonistas de PD-1 descritos en el presente documento, y dicha administración puede ser parte de un régimen de tratamiento que emplea el antagonista de PD-1 como régimen de monoterapia o como parte de una terapia de combinación.

En una realización preferida de la invención, el antagonista de PD-1 es nivolumab, que se administra por vía intravenosa a una dosis seleccionada del grupo que consiste en: 1 mg/kg C2S, 2 mg/kg C2S, 3 mg/kg C2S, 5 mg/kg C2S, 10 mg C2S, 1 mg/kg C3S, 2 mg/kg C3S, 3 mg/kg C3S, 5 mg/kg C3S y 10 mg C3S.

En otra realización preferida de la invención, el antagonista de PD-1 es pembrolizumab, que se administra en un medicamento líquido a una dosis seleccionada del grupo que consiste en 200 mg C3S, 1 mg/kg C2S, 2 mg/kg C2S, 3 mg/kg C2S, 5 mg/kg C2S, 10 mg C2S, 1 mg/kg C3S, 2 mg/kg C3S, 3 mg/kg C3S, 5 mg/kg C3S y 10 mg/kg C3S o equivalentes de cualquiera de estas dosis (por ejemplo, un modelo PK para pembrolizumab estima que la dosis fija de 200 mg C3S proporciona exposiciones que son consistentes con las obtenidas con 2 mg/kg C3S). En algunas realizaciones particularmente preferidas, pembrolizumab se administra como un medicamento líquido que comprende 25 mg/ml de pembrolizumab, sacarosa al 7 % (p/v), Polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) en tampón de histidina 10 mM, pH 5,5, y la dosis seleccionada del medicamento se administra mediante infusión intravenosa durante un período de tiempo de 30 minutos. La dosis óptima de pembrolizumab en combinación con cualquier otro agente terapéutico se puede identificar aumentando la dosis.

La presente invención también proporciona un medicamento que comprende un antagonista de PD-1 como se ha descrito anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando el antagonista de PD-1 es un agente bioterapéutico, por ejemplo, un mAb, el antagonista puede producirse en células CHO usando tecnologías convencionales de cultivo celular y recuperación/purificación.

En algunas realizaciones, un medicamento que comprende un anticuerpo anti-PD-1 como antagonista de PD-1 puede proporcionarse como una formulación líquida o prepararse reconstituyendo un polvo liofilizado con agua estéril para inyección antes de su uso. El documento WO 2012/135408 describe la preparación de medicamentos líquidos y liofilizados que comprenden pembrolizumab que son adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, se proporciona un medicamento que comprende pembrolizumab en un vial de vidrio que contiene aproximadamente 50 mg de pembrolizumab.

Ejemplos

Ejemplo 1. Recolección de muestras de sangre completa y posterior análisis de expresión génica utilizando el sistema NanoString nCounter™ o el sistema NGS TrueSeq de Illumina.

1. Cohorte de pacientes:

Keynote-001 es un estudio de fase 1 patrocinado por Merck Sharp y Dohme Corp. para evaluar la seguridad y eficacia del pembrolizumab como agente único en pacientes con carcinoma metastásico o localmente avanzado progresivo, melanoma y NSCLC. Un objetivo secundario de Keynote-001 es investigar la correlación entre los biomarcadores y la actividad antitumoral de pembrolizumab. La investigación exploratoria de biomarcadores incluyó la recolección de muestras de sangre completa para el perfil de expresión genética. El análisis de expresión génica se realizó en muestras de sangre iniciales y posteriores a la dosis para 44 pacientes con melanoma del estudio Keynote-001. Esta cohorte de 44 pacientes tenía las siguientes características.

El 75 % de los pacientes habían recibido tratamiento previo con ipilimumab. La dosis de pembrolizumab y las pautas de tratamiento variaron entre los pacientes de la siguiente manera:

- 10 mg/kg administrados una vez cada 3 semanas (C3S) (n = 21)
- 10 mg/kg C2S (n = 12)
- 2 mg/kg C3S (n = 11)

La tasa de respuesta objetiva (TRO) para la monoterapia con pembrolizumab en esta cohorte fue del 32 % evaluada según RECIST v1.1 por una revisión central independiente.

2. Muestras de sangre y preparación de ARN

Las muestras de sangre se recolectaron y estabilizaron en PAXgene® Blood RNA Tubes PreAnalytiX® GmbH (Hombrechtikon, Suiza). La muestra de referencia se recogió el día 1 del primer ciclo de tratamiento (antes de la administración de la primera dosis) y la muestra posterior a la dosis se recogió el primer día del segundo ciclo de tratamiento (antes de la administración de la segunda dosis).

Para el análisis de expresión génica en el sistema de análisis nCounter® comercializado por NanoString® Technologies, el ARN se aisló y se purificó a partir de las muestras de sangre recolectadas usando el PAXgene® Blood RNA Kit RUO siguiendo el procedimiento PAXgene Blood RNA del fabricante.

Para el análisis de expresión génica en los sistemas HiSeq 2000 y 2500 de Illumina, el ARN se aisló de los tubos PAXgene Blood RNA y luego se secuenció en un secuenciador de genes Illumina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos, el ARN aislado se procesó adicionalmente para eliminar el ARNm de globina y el ARN ribosómico citoplasmático y mitocondrial, utilizando el ARN total trenzado TruSeq de Illumina con el kit Ribo-Zero Globin. En experimentos anteriores que no usaron ese kit, se aplicaron etapas de filtrado adicionales a los datos de secuenciación para eliminar los artefactos causados por la presencia de globina residual.

3. Análisis de expresión génica de NanoString

Se analizó el ARN total (50 ng-100 ng) aislado de muestras de sangre que se habían obtenido de pacientes antes o después de una dosis de pembrolizumab para determinar la expresión del conjunto de 680 genes en la Tabla 4 anterior utilizando el NanoString **nCounter® Analysis System** y un CodeSet diseñado por NanoString para medir la expresión del conjunto de genes en una única reacción multiplexada para cada muestra. El CodeSet incluyó el transcrito diana enumerado en la Tabla 4 y un par de sondas de captura y reporteras para ese transcrito para cada uno de los 680 genes. Las muestras hibridadas se procesaron en la estación de preparación NanoString nCounter™ usando el protocolo de alta sensibilidad del fabricante donde se eliminaron las sondas de captura y reportera en exceso y se inmovilizaron complejos ternarios específicos del transcrito en un cartucho recubierto con estreptavidina. Las muestras se escanearon con la capacidad de resolución máxima de escaneo utilizando el analizador digital nCounter™.

Para cada muestra de paciente, los datos de recuentos de expresión del transcrito sin procesar se normalizaron realizando una normalización de cuantiles en relación con la distribución de referencia y la posterior transformación log10. La distribución de referencia se generó agrupando los recuentos documentados para todas las muestras después de excluir los valores de las sondas técnicas (tanto de control positivo como negativo), y sin realizar una normalización intermedia basada en las secuencias negativas (ajustadas al fondo) o positivas (sintéticas enriquecidas con titulaciones conocidas).

4. Análisis de expresión de genes de secuencia de ARN

Los valores de fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM) se transforman usando log10 (0,01 + FPKM) y posteriormente se normalizan mediante el cuartil superior medido sobre aproximadamente 20.000 transcritos correspondientes a genes codificadores de proteínas. Esta transformación genera valores cercanos a log10 para valores de entrada grandes y cercanos a la escala lineal para valores bajos (<1). Se consideró que los genes con un recuento máximo inferior a 10 no se detectaron de manera confiable y, por lo tanto, se filtraron. En los experimentos anteriores, los datos normalizados se redujeron dos veces: Primero, ajustando el primer componente principal (que se encuentra altamente correlacionado con la expresión de genes relacionados con la globina: HBA1, HBA2 y HBB), y luego también ajustando el segundo componente principal (que se encontró que está altamente correlacionado con HEMGN y que define un conjunto distinto de diez muestras que no se trataron con el mismo kit

transparente de globina que el resto de las muestras). En el experimento posterior (ARN procesado con TruSeq Stranded Total RNA con kit Ribo-Zero Globin), no se observó una correlación significativa entre los primeros componentes principales y los genes anteriores y, por lo tanto, no se consideró necesaria ninguna etapa adicional para eliminar la tendencia. El análisis de componentes principales no identificó ningún perfil como posibles valores atípicos según los datos de expresión génica. Se observó que la covarianza entre los módulos de sangre (Chausabel y Pulendran) era consistente en varios conjuntos de datos de sangre (tal como se refleja en una evaluación de la cohorte de melanoma de 44 muestras de pacientes, 324 muestras de sangre de melanoma adicionales y 264 muestras de sangre de NSCLC).

5. Puntuación de firma genética

Las puntuaciones para cada firma genética de interés se generaron tomando la media aritmética de la expresión normalizada para cada gen en la firma.

Ejemplo 2. Análisis de las puntuaciones de la firma genética de PD-L1 e IFNG y la respuesta antitumoral en pacientes con melanoma tratados con pembrolizumab.

Se aplicó una prueba de hipótesis formal para asociar las puntuaciones de firma genética con los resultados clínicos, ya que los inventores permanecieron cegados a los datos de resultados clínicos antes de finalizar el plan de análisis estadístico y la construcción de las puntuaciones de firma genética.

La expresión de ARN de PD-1 y PD-L1 medida por SecARN se analizó mediante una prueba t pareada que compara los niveles iniciales y posteriores a la dosis en muestras de sangre en los 44 pacientes con melanoma y los resultados que se muestran en la Figura 1. El eje X muestra valores $-\log(10p)$ de 1, 2, 3, 4, que corresponden con p-valores de 0,1, 0,01, 0,001 y 0,0001 respectivamente. La primera línea vertical de puntos se corresponde con un p-valor de 0,05. El eje Y muestra estimaciones de la tasa de descubrimiento falso por el método Benjamini Hochberg. Se observaron cambios estadísticamente significativos posteriores a la dosis única en la expresión de PD-1 y PD-L1, con p-valores de $p\text{-valor} < 0,001$ y $p\text{-valor} < 0,01$, respectivamente. Sin embargo, los cambios de la expresión de genes individuales después de la dosis para PD-1 y PD-L1 no mostraron una asociación significativa con la ORR.

Los inventores también examinaron los cambios de expresión posteriores a la dosis para una firma de PD-L1 de 6 genes y una firma de IFNG de 10 genes que se había descubierto que era predictiva de la respuesta antitumoral cuando se midió en muestras tumorales iniciales. Se descubrió que los aumentos posteriores a la dosis en sangre para las firmas de IFNG y PD-L1 medidos con NanoString se asociaron positivamente con la respuesta clínica (ORR) a la terapia con pembrolizumab: p-valor de IFNG = 0,042 (FDR = 0,174) y p-valor de PD-L1 = 0,007 (FDR = 0,144) (Véase la Figura 2). Se obtuvieron resultados similares cuando se puntuaron las mismas firmas usando ARN medido con SecARN (comparar las Figuras 2 y 3).

También se descubrió que los cambios posteriores a la dosis para ambas firmas se asociaron con una mejor supervivencia sin progresión (SSP): p-valor de IFNG = 0,010 (FDR = 0,067) y p-valor de PD-L1 = 0,004 (FDR = 0,067) (Véase la Figura 4 y 5).

Estas dos firmas comparten varios genes en común. Para evaluar la relación entre estas dos firmas, se realizó una prueba exacta de Fisher y los resultados se muestran en la Figura 6. Como se muestra en la Figura 6, 23 pacientes tuvieron cambios positivos posteriores a la dosis en las puntuaciones de firma de IFNG y PD-L1, 9 pacientes tuvieron un cambio negativo en la puntuación posterior a la dosis para cada una de las firmas de IFNG y PD-L1, 8 pacientes tuvieron un cambio posdosis negativo en la puntuación de la firma PD-L1 y un cambio positivo en la puntuación de la firma del IFNG, y 4 pacientes tuvieron un cambio positivo después de la dosis en la puntuación de la firma PD-L1 y un cambio negativo en la puntuación de la firma de IFNG.

Se evaluaron otros criterios de valoración clínicos en la cohorte de 44 pacientes con melanoma. No hubo una asociación clara entre los cambios posteriores a la dosis en las firmas de IFNG y PD-L1 con el tratamiento previo con ipilimumab recibido o las diferentes pautas de dosificación de pembrolizumab. En contraste con lo que se había observado en las muestras de tumores iniciales, las puntuaciones iniciales de IFNG y PD-L1 en las muestras de sangre no se asociaron significativamente con una respuesta objetiva o una mejor SSP. Parece haber una posible asociación entre los cambios posteriores a la dosis para la firma genética de IFNG, medidos en la sangre, con aumento de la expresión de PD-L1 medida al inicio del estudio en el tumor.

Después de que los inventores no fueron cegados a los datos de resultados clínicos, se realizaron análisis *a posteriori* para obtener nuevos conocimientos sobre la biología asociada con la resistencia o la falta de respuesta al pembrolizumab. Los genes mejor clasificados (p-valor teórico $< 0,05$) que se identificaron como asociados con la resistencia o la respuesta deficiente se introdujeron en el análisis de la vía del ingenio (IPA) para comprender las posibles conexiones biológicas. El análisis de la vía identificó la desregulación metabólica (fosforilación oxidativa) como una de las principales vías asociadas con una respuesta deficiente al pembrolizumab (ver Figuras 10-11).

Los inventores también examinaron la capacidad predictiva de una firma de IFNG de 6 genes (CXCL9, CXCL10, HLA-

DRA, IDO1, IFNG y STAT1) para predecir la respuesta antitumoral en muestras de sangre de una cohorte de diez pacientes con linfoma de Hodgkin. Las puntuaciones se calcularon como el promedio de los niveles de expresión normalizados de cada uno de los 6 genes de firma. Se aplicó una prueba de rango con signo a las muestras de sangre de los pacientes antes y después de la dosis para probar la significancia y se ajustó por multiplicidad. El conjunto de genes inducidos por IFNG evaluado se incrementó significativamente después de una dosis única de pembrolizumab con un p-valor de 0,0020 (0,0039 adj.).

REFERENCIAS

- 10 1. Sharpe, A.H, Wherry, E.J., Ahmed R., and Freeman G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology* (2007); 8:239-245.
- 15 2. Dong H *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):793-800.
3. Yang *et al.* PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Jun;49(6 (2008): 49: 2518-2525.
- 20 4. Ghebeh *et al.* The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* (2006) 8: 190-198.
5. Hamanishi J *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceeding of the National Academy of Sciences* (2007): 104: 3360-3365.
- 25 6. Thompson RH *et al.* Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. *Clinical genitourin Cancer* (2006): 5: 206-211.
7. Nomi, T. Sho, M., Akahori, T., *et al.* Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* (2007);13:2151-2157.
- 30 8. Ohigashi Y *et al.* Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand 2 expression in human esophageal cancer. *Clin. Cancer Research* (2005): 11: 2947-2953.
- 35 9. Inman *et al.* PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* (2007): 109: 1499-1505.
10. Shimauchi T *et al.* Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and nonneoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell Leukemia/ Lymphoma. *Int. J. Cancer* (2007): 121:2585-2590.
- 40 11. Gao *et al.* Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* (2009) 15: 971-979.
12. Nakanishi J. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* (2007) 56: 1173-1182.
- 45 13. Hino *et al.* Tumor cell expression of programmed cell death-1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* (2010): 00: 1-9.
- 50 14. Ghebeh H. Foxp3+ tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: implication for immunotherapy. *BMC Cancer.* 2008 Feb 23;8:57.
15. Ahmadzadeh M *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* (2009) 114: 1537-1544.
- 55 16. Thompson RH *et al.* PD-1 is expressed by tumor infiltrating cells and is associated with poor outcome for patients with renal carcinoma. *Clinical Cancer Research* (2007) 15: 1757-1761.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar en un paciente la presencia o ausencia de un biomarcador durante el tratamiento que predice que es probable que el paciente tenga una respuesta antitumoral al tratamiento con un antagonista de PD-1, que comprende:

- (a) obtener una muestra de ARN intracelular total que se ha aislado de una muestra de sangre de referencia extraída del paciente,
- (b) medir el nivel de expresión de ARN crudo de referencia en el ARN aislado para cada gen en una firma genética,
- (c) normalizar los niveles de expresión de ARN crudo de referencia medidos
- (d) calcular una puntuación de firma de referencia para la firma genética a partir de los niveles de expresión de ARN normalizados,
- (e) obtener una muestra de ARN intracelular total que se ha aislado de una muestra de sangre extraída del paciente después de la dosis,
- (f) medir el nivel de expresión de ARN crudo posterior a la dosis en el ARN aislado para cada gen en la firma genética,
- (g) normalizar cada uno de los niveles de expresión de ARN crudo medidos después de la dosis;
- (h) calcular una puntuación de firma posterior a la dosis para la firma genética a partir de los niveles de expresión de ARN normalizados
- (i) calcular una puntuación de firma posterior a la dosis para la firma genética a partir de los niveles de expresión de ARN medidos, y
- (j) comparar la puntuación posterior a la dosis con la puntuación de referencia, y
- (k) clasificar al paciente como biomarcador positivo o biomarcador negativo; en donde el paciente es clasificado como biomarcador positivo si la puntuación de firma posterior a la dosis es mayor que la puntuación de firma de referencia del paciente y el paciente es clasificado como biomarcador negativo si la puntuación de firma posterior a la dosis es igual o menor que la puntuación de firma de referencia,

en donde las etapas b-d se pueden realizar antes, de manera concurrente con o después de las etapas f-h, y en donde la firma genética comprende un conjunto de genes seleccionados del grupo que consiste en:

- (i) PD-L1, PD-L2, LAG3, STAT1, CXCL10 y CLEC10a;
- (ii) CCR5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, PRF1 y STAT1; y
- (iii) CCR5, CLEC10a, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, LAG3, PD-L1, PD-L2, PRF1 y STAT1.

2. El método de la reivindicación 1, en donde calcular la puntuación de la firma de referencia comprende determinar la media aritmética de los niveles de expresión de ARN de referencia normalizados para cada uno de los genes en la firma y calcular la puntuación de la firma posterior a la dosis comprende determinar la media aritmética de los niveles de expresión de ARN normalizados posterior a la dosis para cada uno de los genes en la firma.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de sangre posterior a la dosis se recogió después de la administración de una dosis única del antagonista de PD-1 al paciente.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la muestra de sangre posterior a la dosis se recogió entre aproximadamente dos semanas y aproximadamente cuatro semanas después de la administración de la dosis única del antagonista de PD-1.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el antagonista de PD-1 es pembrolizumab.

6. Un antagonista de PD-1 para su uso en un método de tratamiento de un paciente diagnosticado con un tumor, que comprende:

- (a) tomar una muestra de sangre de referencia del paciente,
- (b) administrar al menos una dosis del antagonista de PD-1 al paciente,
- (c) tomar una muestra de sangre del paciente después de la dosis,
- (d) obtener una puntuación de firma para un biomarcador de firma genética en cada una de las muestras de sangre de referencia y posteriores a la dosis, y
- (e) tratar al paciente con un régimen terapéutico que comprende el antagonista de PD-1 si la puntuación de firma posterior a la dosis es mayor que la puntuación de firma inicial o tratar al sujeto con un régimen terapéutico que no incluye un antagonista de PD-1 si la puntuación posterior a la dosis es igual o menor que la puntuación inicial;

en donde la firma genética comprende un conjunto de genes seleccionados del grupo que consiste en:

- (i) PD-L1, PD-L2, LAG3, STAT1, CXCL10 y CLEC10a;
- (ii) CCR5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, PRF1 y STAT1; y
- (iii) CCR5, CLEC10a, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, LAG3, PD-L1, PD-L2, PRF1 y

STAT1.

7. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que da positivo en un biomarcador en sangre, en donde la composición comprende un antagonista de PD-1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, y en donde el biomarcador en sangre es un biomarcador en tratamiento que comprende una firma genética seleccionada del grupo que consiste en:
 - (i) PD-L1, PD-L2, LAG3, STAT1, CXCL10 y CLEC10a;
 - (ii) CCR5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, PRF1 y STAT1; y
 - (iii) CCR5, CLEC10a, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GZMA, HLA-DRA, IDO1, IFNG, LAG3, PD-L1, PD-L2, PRF1 y STAT.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en donde el antagonista de PD-1 es pembrolizumab.

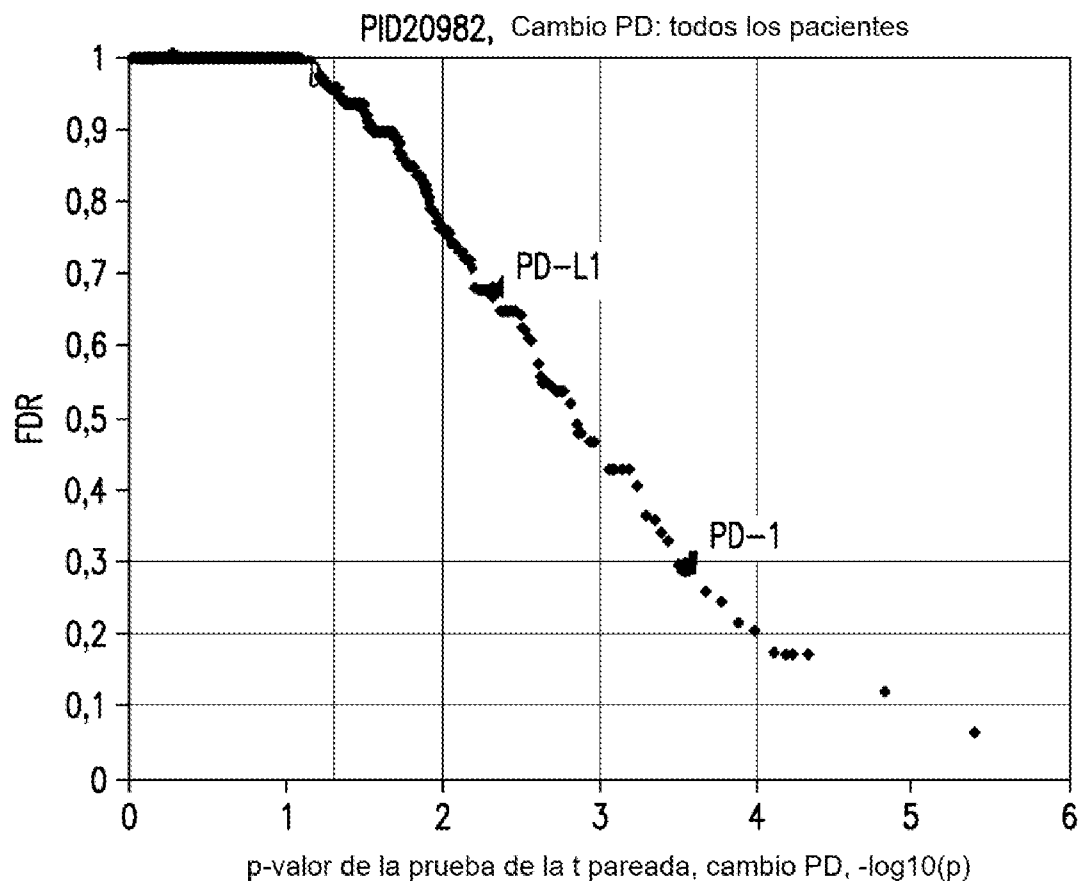


FIG.1

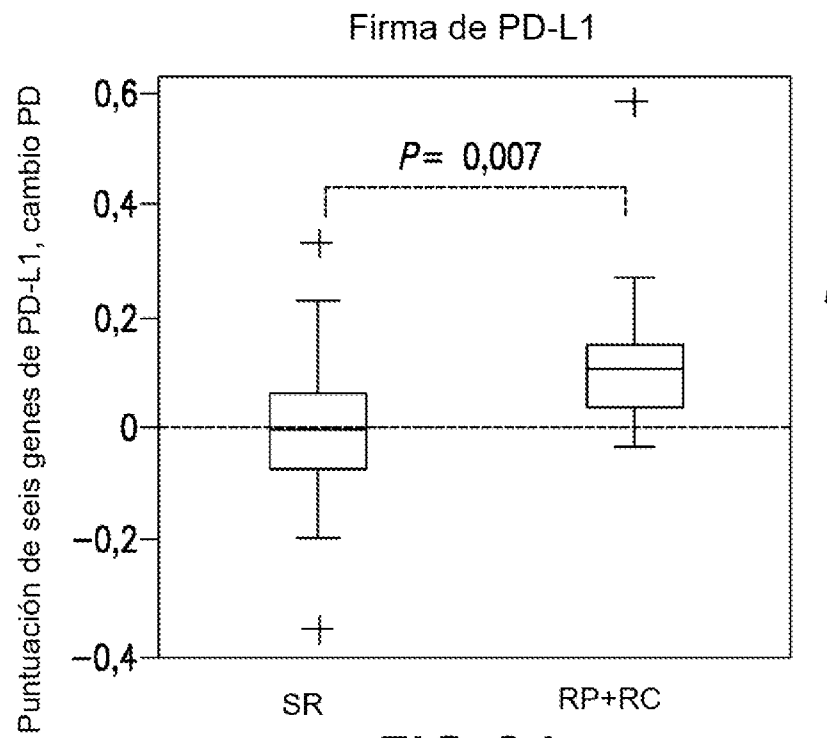


FIG.2A

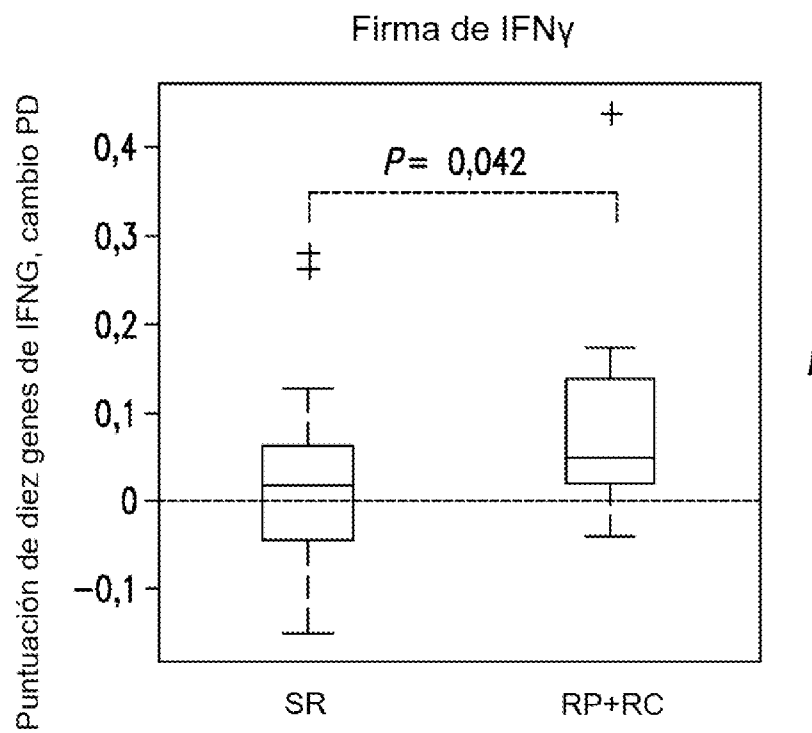


FIG.2B

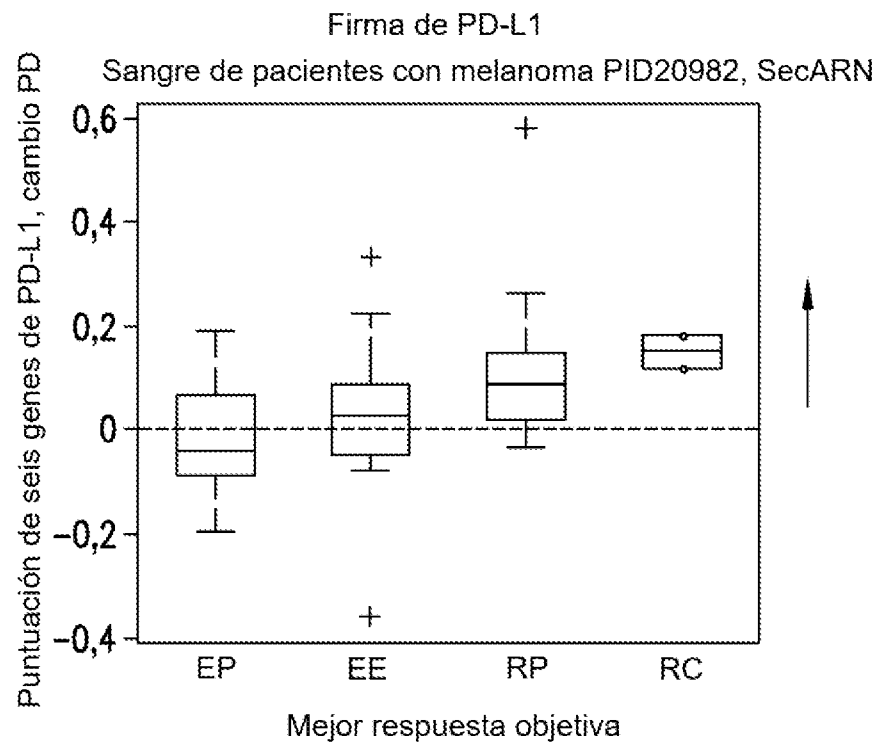


FIG.3A

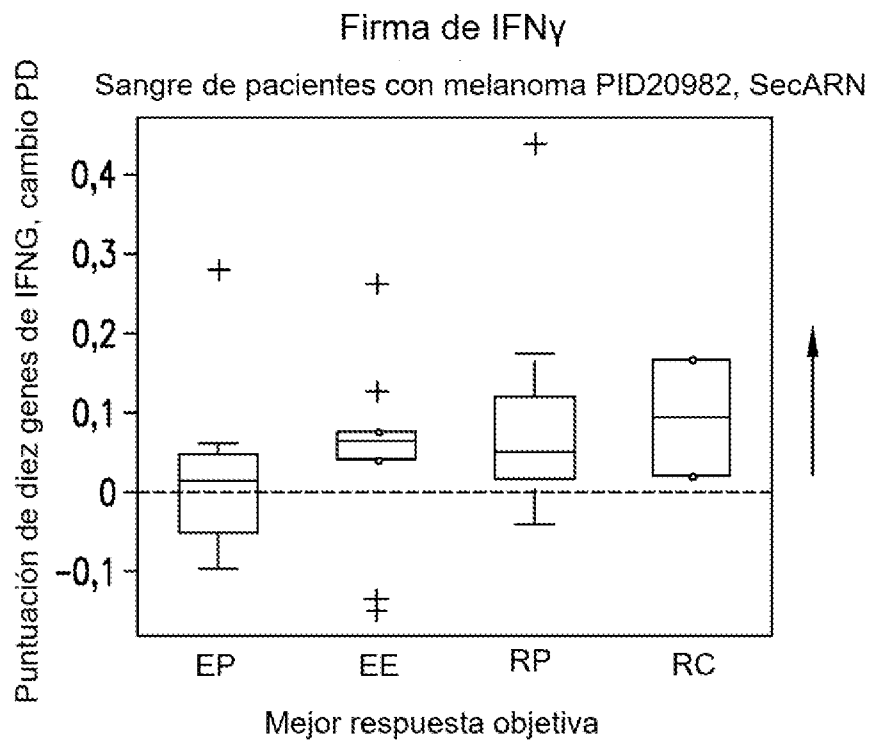


FIG.3B

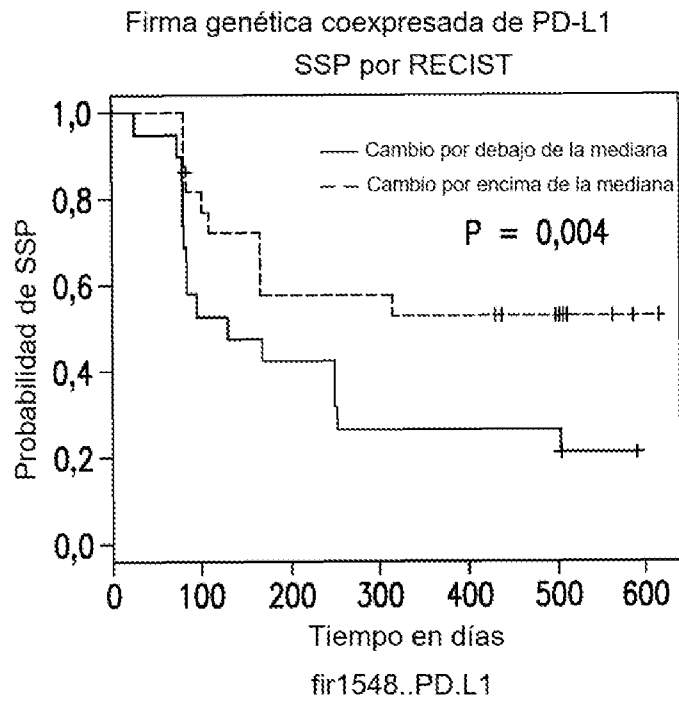


FIG.4A

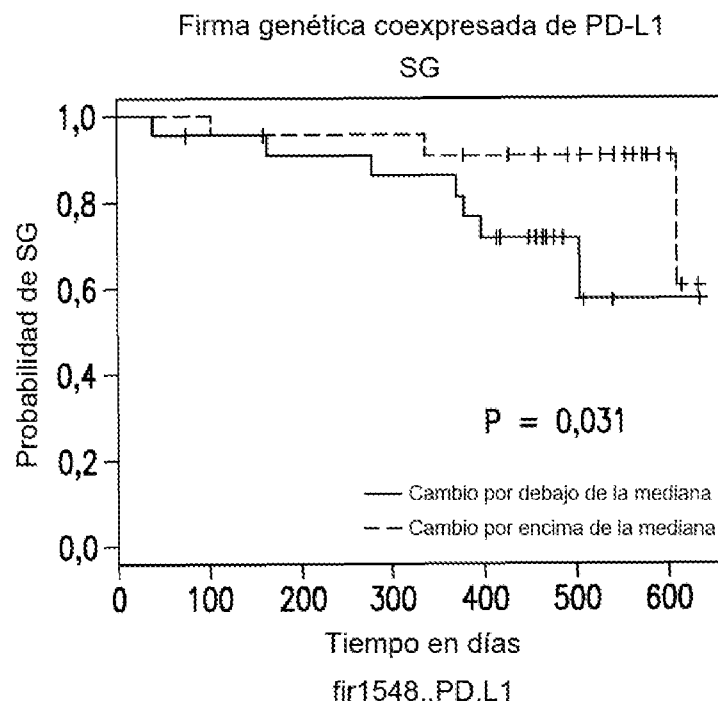
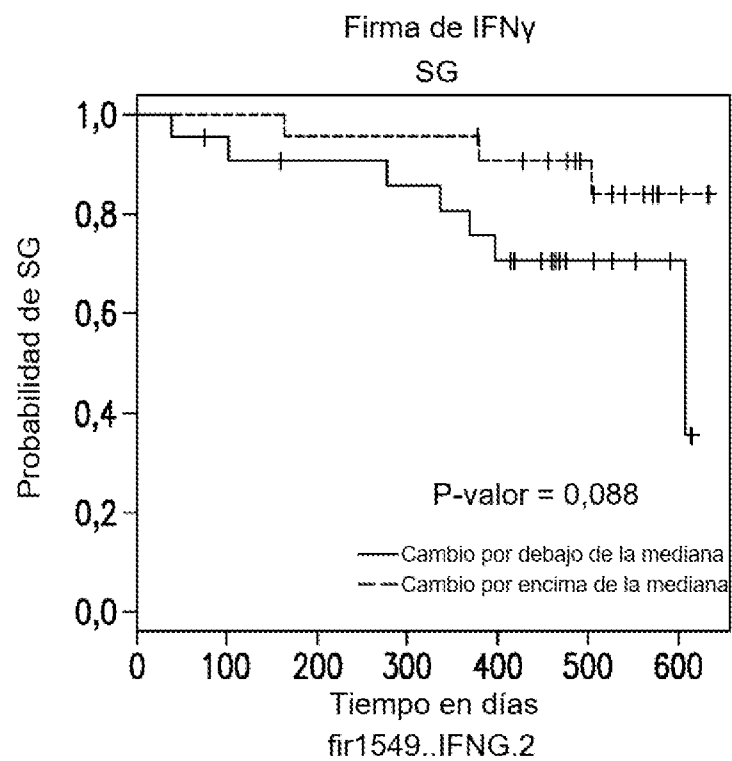
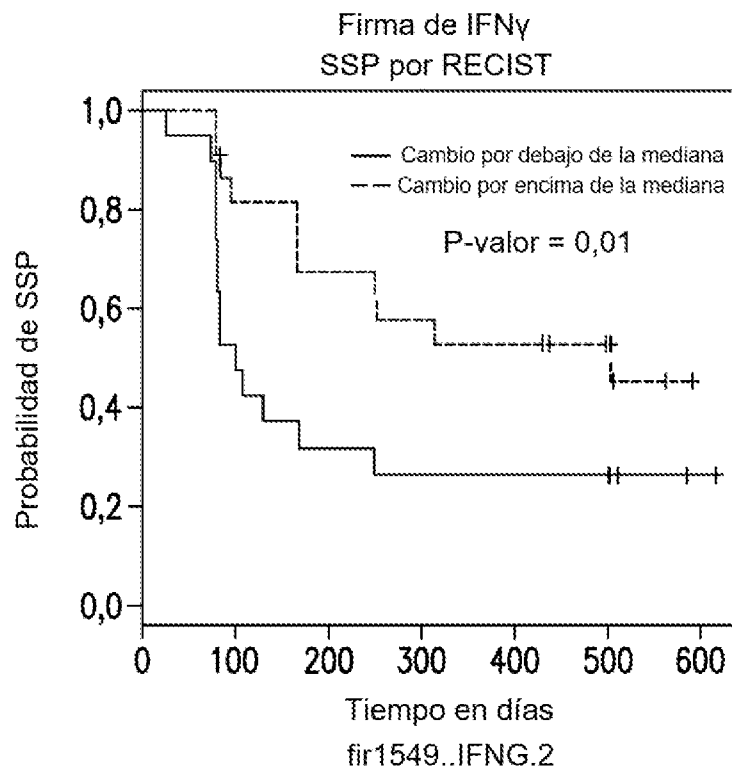


FIG.4B



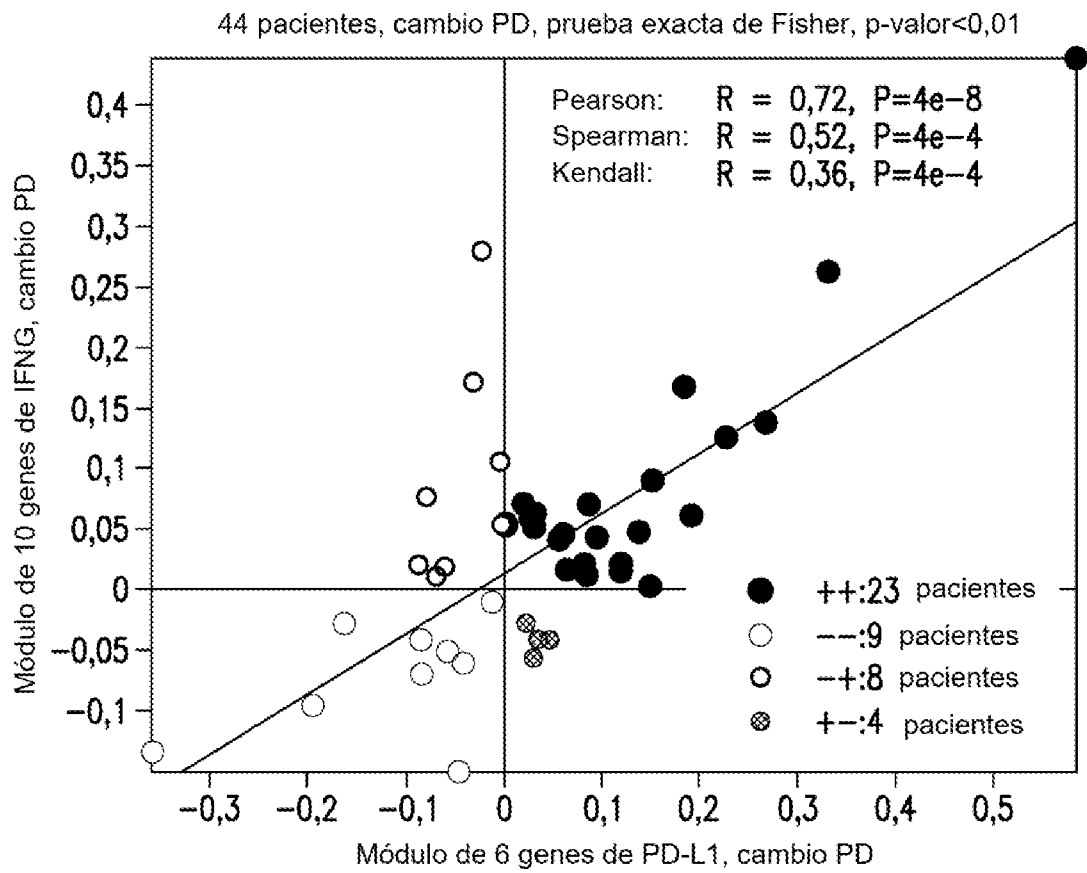


FIG.6

Precisión= 0,56
 Sensibilidad= 0,93
 Especificidad= 0,38
 Significación= $7e-2$
 ABC de COR= 0,69
 VPP= 0,42
 VPN= 0,92
 p-valor de ANOVA= $4e-2$
 p-valor de Wilcoxon= $5e-2$
 Múltiplo de variación= +1,2
 Cambio de la media= +0,1

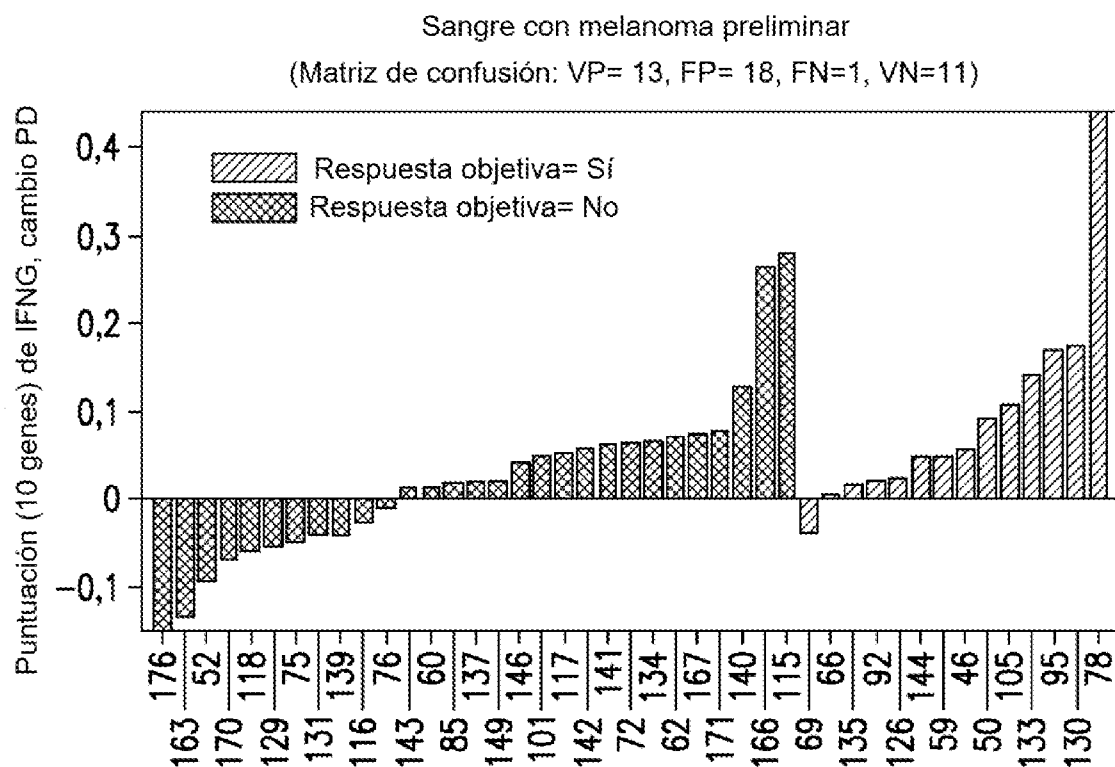


FIG.7A

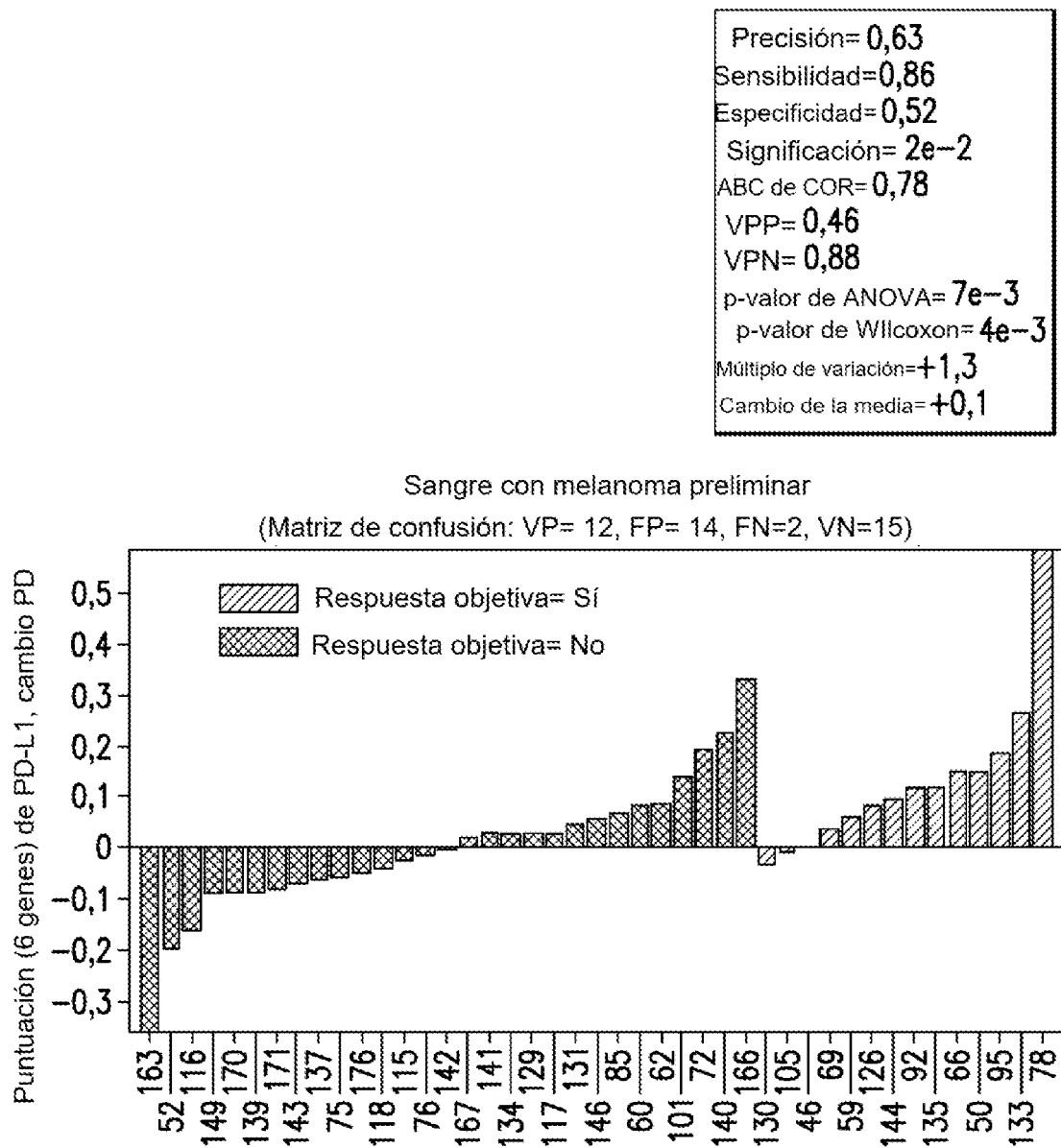


FIG.7B

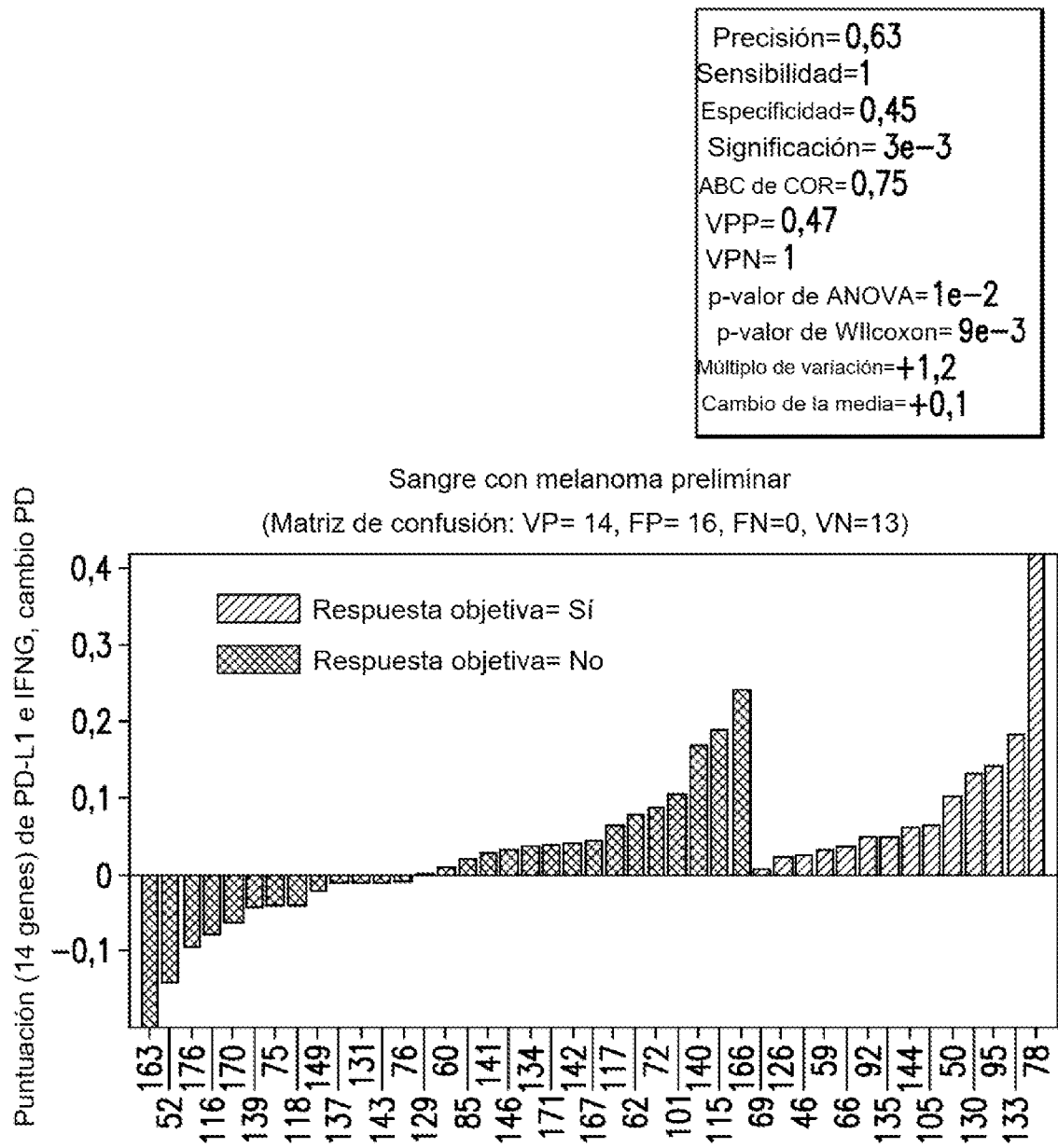


FIG. 7C

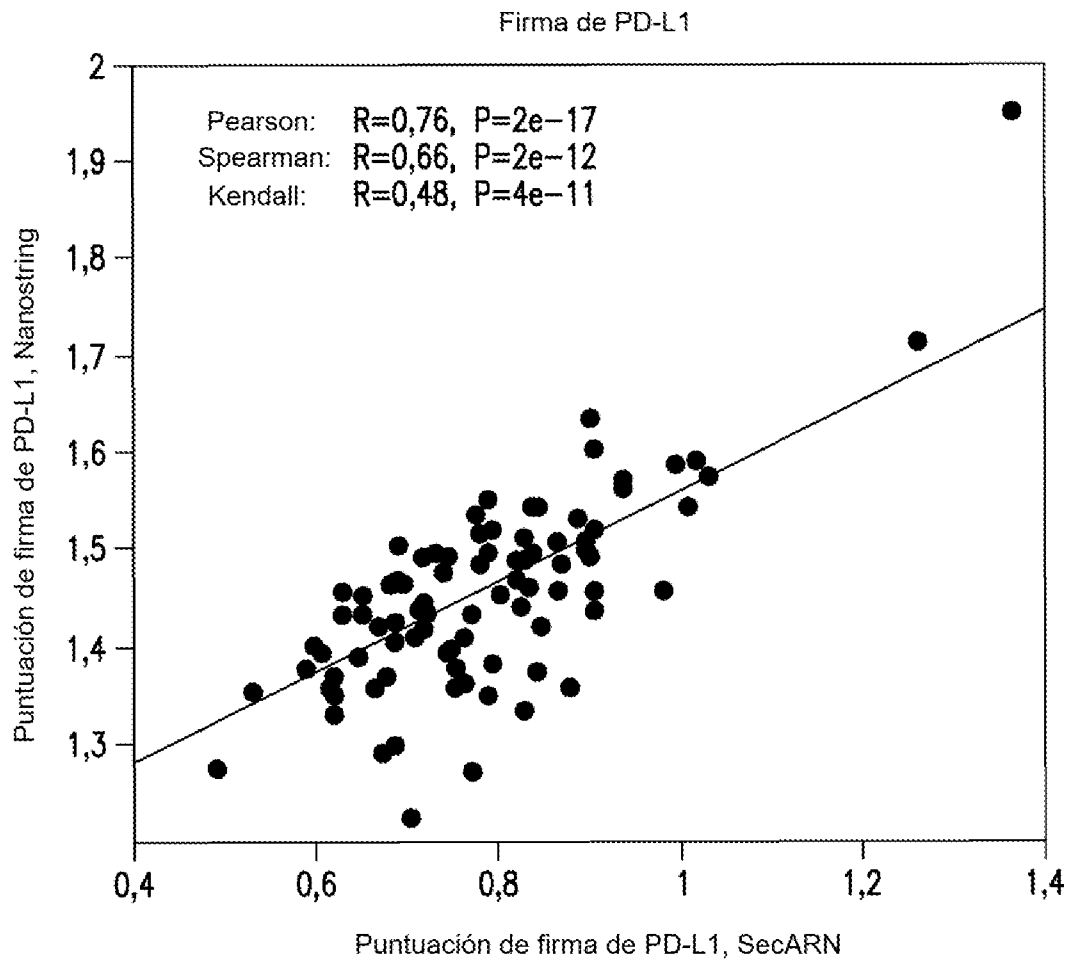


FIG.8A

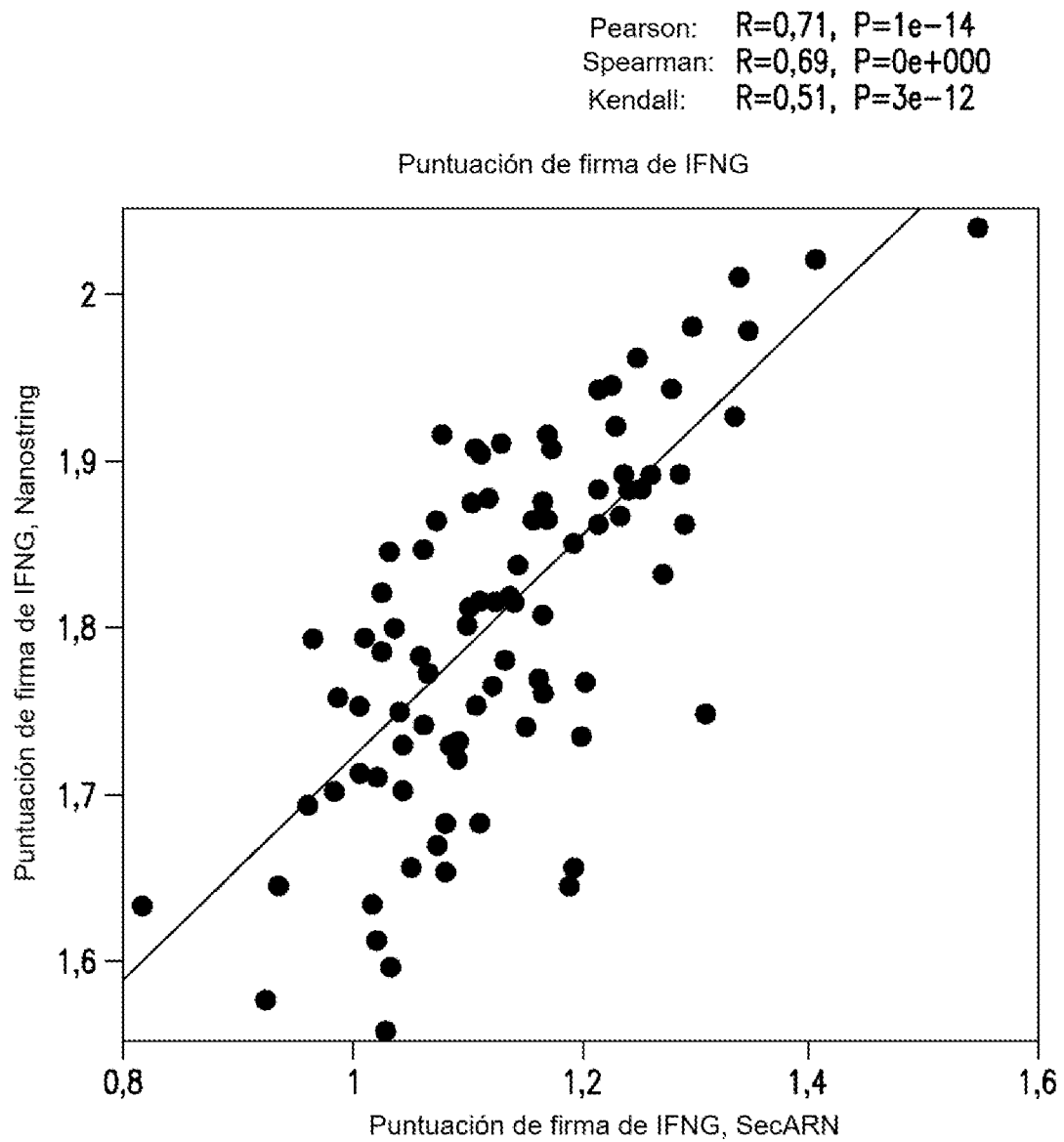


FIG.8B

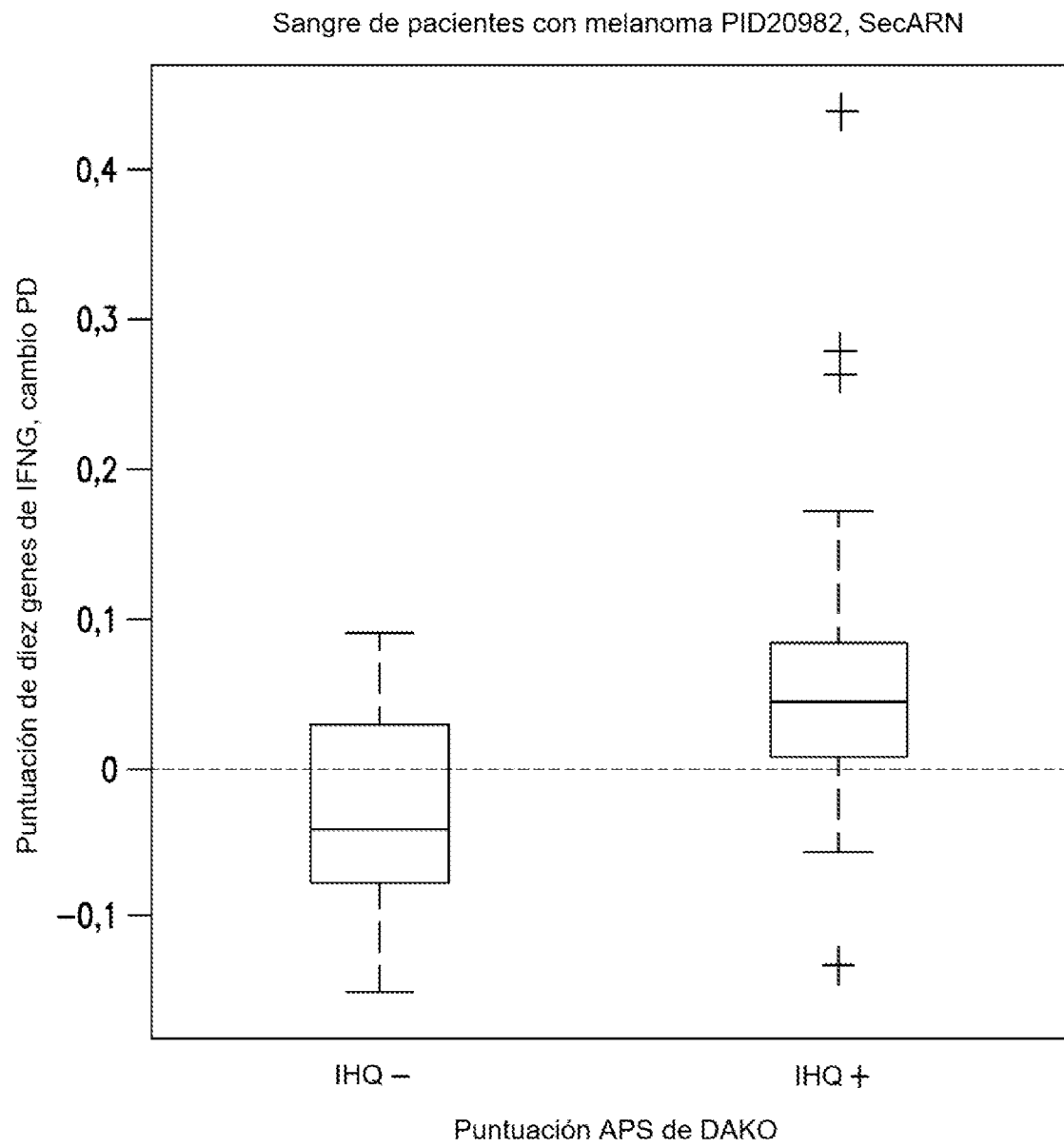


FIG.9

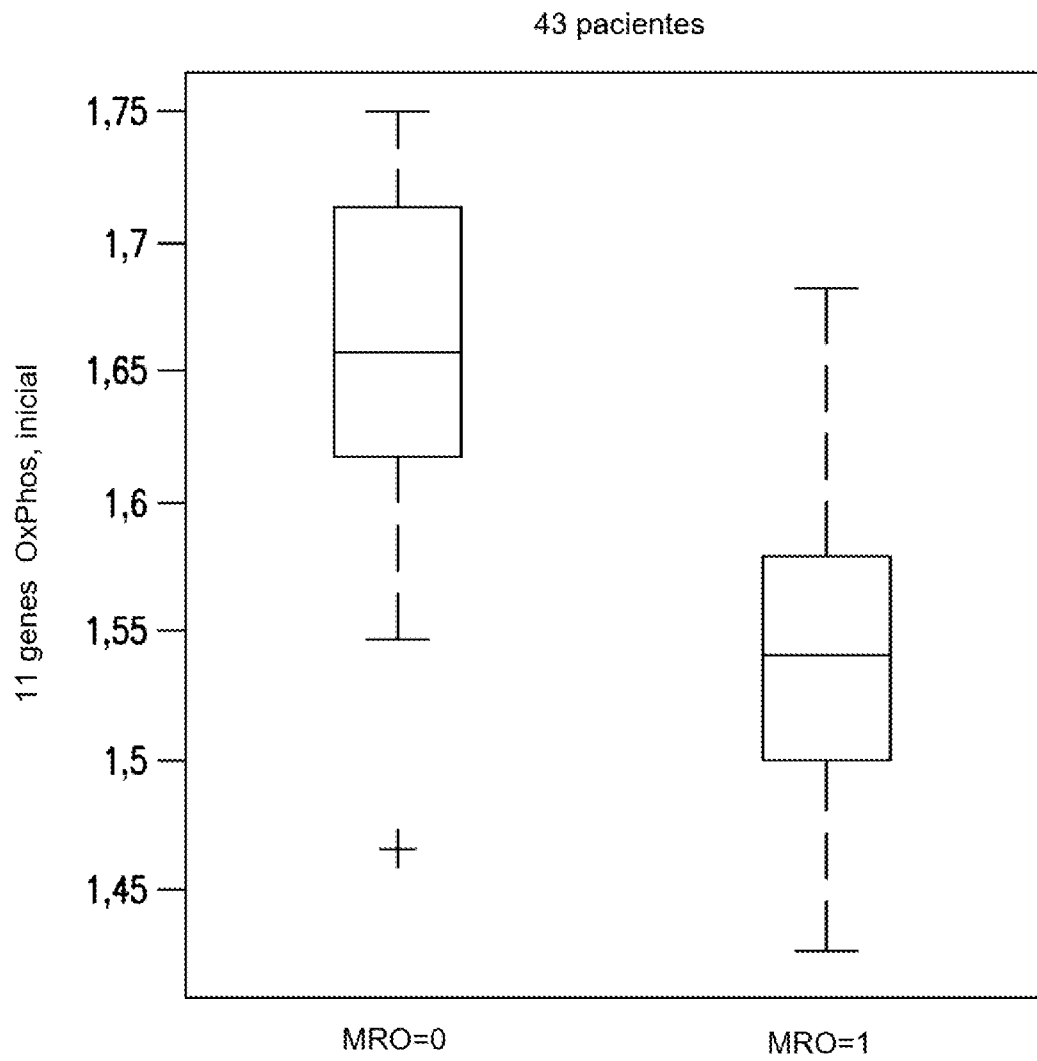


FIG.10

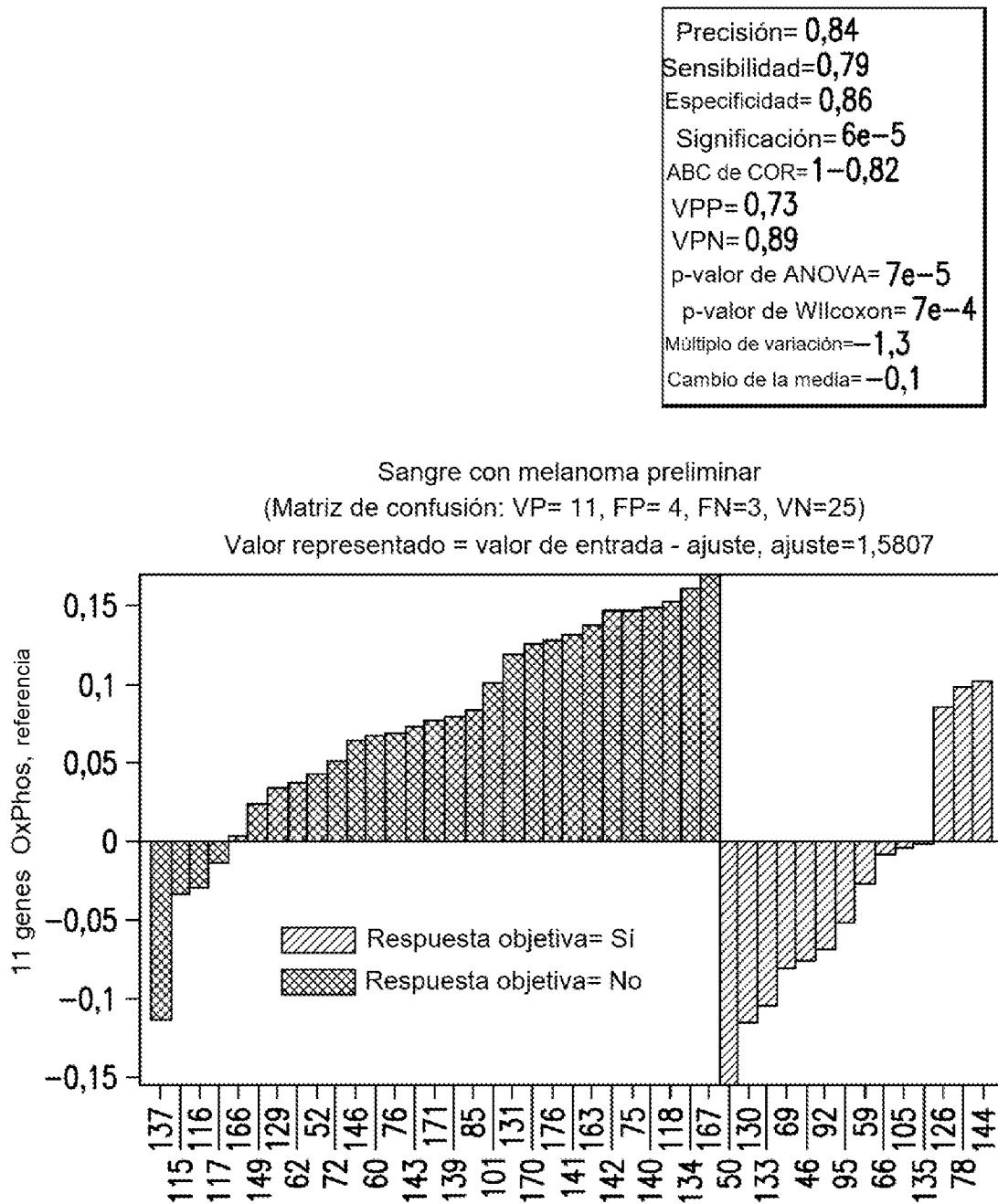


FIG.11