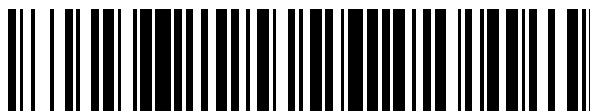


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 165**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2014 PCT/EP2014/064886**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007625**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2014 E 14738509 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3022561**

54 Título: **Método para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido**

30 Prioridad:

15.07.2013 EP 13306004

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

21.04.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (25.0%)
12, Rue de l'Ecole de Médecine
75006 Paris 6, FR;**

**ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(25.0%);**

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%) y
SORBONNE UNIVERSITÉ (25.0%)**

72 Inventor/es:

**SAUTES-FRIDMAN, CATHERINE;
FRIDMAN, WOLF-HERVÉ;
DIEU-NOSJEAN, MARIE-CAROLINE y
GOC, JÉRÉMY**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

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

ES 2 755 165 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido.

10 Estado de la técnica

Como se indica en Dieu-Nosjean et al. (J Clin Oncol 26:4410-4417. 2008), el cáncer de pulmón es la causa más común de muertes relacionadas con el cáncer en el mundo. Aproximadamente 80 % a 90 % de los casos implican cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que incluyen adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas. Solo los pacientes cuyos tumores pueden ser completamente reseccionados tienen una probabilidad significativa de elevada supervivencia. Sin embargo, hasta 30 % de pacientes con enfermedad de estadio I experimentan reaparición después de la cirugía. La correlación entre células inmunitarias infiltrantes de tumor y el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón es discutible.

Un tumor está compuesto por células malignas, del estroma, endoteliales e inmunitarias que forman una red heterogénea y presentan complejas interacciones. Aunque la erradicación del tumor por el sistema inmunitario es frecuentemente ineficiente, existe evidencia de que muchos cánceres en desarrollo no son ignorados por el sistema inmunitario. Las regresiones tumorales espontáneas que ocurren concomitantemente con las manifestaciones autoinmunitarias y la mayor incidencia de tumores en pacientes inmunodeprimidos son indicaciones de la participación del sistema inmunitario en el rechazo tumoral. R ratones deficientes en funciones inmunitarias desarrollan espontáneamente tumores. La densidad de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) con fenotipos citotóxicos y de memoria es altamente predictiva del buen desenlace clínico en muchos tumores sólidos. Sin embargo, aunque el pronóstico está relacionado con la recirculación de células inmunitarias efectoras, todavía no está claro dónde tiene lugar la activación de la respuesta inmunitaria específica: en el tumor, el ganglio linfático drenante, o ambos.

Ahora está bien establecido que las respuestas inmunitarias pueden tener lugar a distancia de órganos linfoides secundarios, en estructuras linfoides terciarias (TLS). Dieu-Nosjean et al. han observado que estas estructuras de tipo ganglio linfático se pueden desarrollar en pacientes con cáncer de pulmón. Se han denominado "tejidos linfoides asociados a bronquios inducidos por tumor" (Ti-BALT) ya que nunca se encontraron en los tejidos no tumorales de pacientes con NSCLC. Además, Dieu-Nosjean et al. han demostrado que la densidad de DC maduras, una población que fue selectivamente detectada en Ti-BALT, está asociada con un desenlace clínico favorable en pacientes con NSCLC de fase inicial (Dieu-Nosjean et al., J. Clin. Oncol., 2008), y en fase metastásica (Remark et al., Clin Cancer Res. 2013 Jun 19), sugiriendo que representan un sitio de activación para linfocitos T específicos de tumor.

La presencia de TLS se ha informado en otros tumores humanos, por ejemplo, cáncer colorrectal (Coppola et al., Am J Pathol., 2011;179(1):37-45; McMullen et al., Clin Exp Immunol. 2010;161(1):81-8), cáncer de mama (Gobert et al., Cancer Res 2009; 69(5) 2000-2009; Martinet et al., Cancer Res. 2011;71(17) 5678-87; Gu-Trantien et al., J Clin Invest. 2013;123(7):2873-92) y melanoma (Martinet et al., Cancer Res. 2011;71(17) 5678-87; Cipponi et al., Cancer Res. 2012;72(16):3997-4007) que indica que las estructuras linfoides ectópicas surgen en muchos tumores sólidos.

Remark (REMARK et al., Clinical Cancer Research, 2013, p. 4079-4091) desvela el impacto pronóstico de la cuantificación de células CD8+ y DC-LAMP+ en metástasis colorrectales y de carcinoma de células renales.

Pagès (PAGES et al, Oncogene, 2010, vol. 29, no 8, pp. 1093-1102) desvela el impacto pronóstico de la infiltración tumoral por linfocitos T de memoria, particularmente de los tipos Th1 y citotóxicos.

Kawai (KAWAI et al., Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2008, vol. 113, no 6, p. 1387-1395) desvela el impacto pronóstico de la infiltración tumoral por macrófagos y linfocitos T CD8+ en nidos de cáncer durante el cáncer de pulmón de células no pequeñas de estadio IV.

Objeto de la invención

La invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido, que comprende la cuantificación de la densidad celular de células CD8+ y células dendríticas DC-LAMP+ presentes en una muestra de tejido tumoral de dicho paciente, en donde una alta densidad de células CD8+ y células dendríticas DC-LAMP+ indica que el paciente tiene un pronóstico favorable, una alta densidad de células CD8+ y una baja densidad de células dendríticas DC-LAMP+ indica que el paciente tiene un mal pronóstico, y una

baja densidad de células CD8+ y células dendríticas DC-LAMP+ indica que el paciente tiene el peor pronóstico. Dicho método se usa en combinación con la clasificación de estadificación tumor-ganglio-metástasis (TNM).

El método satisface una necesidad en la técnica que se sentía desde hace tiempo y en curso para predecir correctamente y con exactitud la evolución o el probable desenlace de cáncer en un paciente, como se refleja en el tiempo de supervivencia. La capacidad de hacer esto permite a los profesionales médicos adaptar individualmente los protocolos de tratamiento para el cáncer a pacientes particulares. Los pacientes que, según el presente método, tienen una alta probabilidad de un buen desenlace de terapia pueden no necesitar recibir los tratamientos más agresivos para experimentar un desenlace favorable, y así pueden evitar o minimizar los efectos secundarios asociados a dichos tratamientos, mientras que los pacientes con un mal pronóstico se pueden tratar agresivamente en la etapa más precoz de la enfermedad o por otra terapia distinta a la usada.

Además, la combinación del presente método y la clasificación UICC-TNM, que es el método de estadificación actualmente usado, conduce a un método para el pronóstico de supervivencia con exactitud incluso mayor.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido, que comprende las siguientes etapas:

- a) cuantificar, en una muestra de tejido tumoral de dicho paciente, la densidad celular de células CD8+,
 - b) cuantificar, en una estructura linfóide inducida por tumor de dicho paciente, la densidad celular de células dendríticas DC-LAMP+,
 - c) comparar los valores de densidad celular obtenidos en la etapa a) y b) con valores de referencia predeterminados para cada tipo de células en cada localización, y
 - d) proporcionar un pronóstico favorable del tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de células CD8+ y células dendríticas DC-LAMP+ es superior a dichos valores de referencia predeterminados,
- proporcionar un mal pronóstico del tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de células CD8+ y células dendríticas DC-LAMP+ es inferior a dichos valores de referencia predeterminados, o proporcionar un pronóstico intermedio del tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de un marcador es superior a dicho valor de referencia predeterminado y la densidad celular del otro marcador es inferior a dicho valor de referencia predeterminado siendo dicho método usado en combinación con la clasificación de estadificación TNM.

El método de pronóstico según la invención se puede usar solo o en combinación con cualquier otro método ya usado en la evaluación del pronóstico de cánceres sólidos, que incluye, pero no se limita a, parámetros de estadio, demografía y antropométricos, resultados de pruebas rutinarias clínicas o de laboratorio, que incluye tamaño del tumor, presencia o ausencia de émbolos tumorales, y presencia o ausencia de invasión de ganglios linfáticos.

Por estructura linfóide inducida por tumor se indica la organización de leucocitos infiltrantes de tumor en estructura de tipo ganglio linfático (también denominadas estructuras linfoides terciarias) en el estroma de la masa tumoral y está compuesta por agrupaciones de linfocitos T de células dendríticas maduras (áreas de linfocitos T) y folículos de linfocitos B (áreas de linfocitos B). Normalmente, dependiendo de la sección tumoral, solo se puede observar una de las dos áreas o ambas áreas. Esta organización se denominó Ti-BALT de tejidos linfoides asociados a bronquios inducidos por tumor en cáncer de pulmón.

Por células dendríticas maduras se indica una población de células dendríticas que son profesionales de la presentación de antígenos procesados a linfocitos T. Las células dendríticas maduras que infiltran el tumor se localizan selectivamente en contacto con linfocitos T, en las áreas ricas en linfocitos T de la estructura linfóide inducida por tumor.

El método de la invención se usa en combinación con la clasificación de estadificación TNM del tumor (clasificación UICC-TNM, 2009), como la combinación de DCs DC-LAMP+, células CD8+ y el estadio de tumor constituye un método de pronóstico incluso más poderoso para supervivencia global.

En una realización de la invención, el paciente es un paciente con un tumor de tamaño pequeño, es decir, el estadio patológico T del cáncer del paciente es pT1.

En una realización alternativa, el paciente es un paciente con un tumor de tamaño intermedio, es decir, el estadio patológico T del cáncer del paciente es pT2.

En otra realización más, el paciente es un paciente con un tumor de tamaño grande, es decir, el estadio patológico T del cáncer del paciente es pT3 o pT4.

En otra realización, el cáncer no se diseminó a los ganglios linfáticos cercanos, es decir, el estadio patológico N del

cáncer del paciente es pN0.

En otra realización más, el cáncer no se diseminó a los ganglios linfáticos cercanos, es decir, el estadio patológico N del cáncer del paciente es pN1 o pN2.

5

En otra realización, el tumor del paciente metastatizó, el estadio patológico M del cáncer es pM1.

En otra realización, el tumor del paciente no metastatizó, el estadio patológico M del cáncer es pM0.

10

En otra realización, el paciente es un paciente con un estadio precoz de cáncer, tal como cáncer de estadio I.

En otra realización más, el paciente es un paciente con un cáncer de estadio II.

15

En otra realización más, el paciente es un paciente con un cáncer de estadio avanzado, tal como un cáncer de estadio III.

En una realización de la invención, el paciente es un paciente con estadio precoz de cáncer que no recibió ningún neo-adyuvante, ni terapia adyuvante, tal como quimioterapia y/o radioterapia.

20

En una realización alternativa de la invención, el paciente es un paciente con estadio avanzado de cáncer que recibe terapia adyuvante con o sin terapia neo-adyuvante, tal como quimioterapia y/o radioterapia.

Los estadios de múltiples cánceres se definen, por ejemplo, en UICC. TNM Clasificación of Malignant Tumours. 7^a ed. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittetipo Ch: New York, 2009.

25

Normalmente, la muestra de tejido tumoral se selecciona del grupo que consiste en (i) una muestra tumoral primaria global (en conjunto), (ii) una muestra de nido tumoral, (iii) una muestra de estroma de la sección tumoral completa y (iv) una muestra de estructura linfoide inducida por tumor.

30

Los nidos de células son pequeños focos o acumulación de un tipo de célula que es diferente de las otras células en el tejido. Por tanto, los nidos tumorales son una acumulación de células tumorales rodeadas por células no cancerosas.

35

El estroma es la trama conjuntiva de soporte de una célula biológica, tejido u órgano. En los tumores, las células del estroma son células no tumorales. Comprende tejido conjuntivo, vasos, leucocitos y matriz extracelular.

En una realización más preferida, las células CD8⁺ se cuantifican en una muestra de estroma de la sección tumoral completa.

40

La supervivencia definida en el método de la invención puede ser la supervivencia global (OS), la supervivencia sin enfermedad (DFS), o la supervivencia específica de enfermedad (DSS). En una realización preferida, la supervivencia es la supervivencia global (OS).

45

Los ejemplos de cánceres sólidos con estructuras linfoides inducidas por tumor son cánceres de pulmón, cánceres colorrectales y cánceres de mama.

En una realización preferida, el cáncer sólido es un cáncer de pulmón.

En una realización más preferida, el cáncer sólido es un cáncer de pulmón de células no pequeñas.

50

Normalmente, la densidad de células CD8⁺ y la densidad de células dendríticas DC-LAMP⁺ se pueden medir, por ejemplo, por inmunohistoquímica realizada en secciones tumorales (secciones de tejido congeladas o incorporadas en parafina) de muestra obtenida por biopsia.

55

En una realización del método de la invención, las células CD8⁺ se enumeran en los nidos tumorales y el estroma de la sección tumoral completa con el software Calopix (Tribvn), y se expresa como un número absoluto de células positivas/ μm^2 de área superficial del tumor, con EEM calculado.

60

En una realización de la invención, las células dendríticas DC-LAMP⁺ se detectan por inmunohistoquímica con un anticuerpo contra la molécula DC-LAMP (CD208). Se cuentan las células dendríticas maduras en la sección tumoral completa. La densidad de células se puede expresar como el número de células que se cuentan por una unidad de área superficial de la sección de tumor, por ejemplo, como el número de células que se cuentan por campo de potencia intermedio (aumento original x100) o μm^2 de área superficial del tumor.

65

Normalmente, los valores de referencia predeterminados para la densidad celular de células CD8⁺ y para la densidad celular de células dendríticas se pueden determinar aplicando métodos estadísticos en estudios a gran escala en pacientes con cáncer.

La divulgación se refiere a un compuesto anticanceroso para su uso en un método de tratamiento por terapia adyuvante de un paciente que padece un cáncer sólido, en donde dicho método comprende las siguientes etapas:

- 5 a) identificar un paciente con un mal pronóstico de supervivencia con un método de pronóstico de la invención, y
- b) tratar con el compuesto anticanceroso el paciente identificado.

10 Normalmente, los compuestos anticancerosos son un agente citotóxico, o un fármaco citotóxico o un radioisótopo citotóxico. Los ejemplos de los fármacos citotóxicos son, sin limitación, sales de platino, taxanos, derivados y análogos de la vinca, gemcitabina, metotrexato, doxorubicina, citotoxina tal como exotoxina de *Pseudomonas*, proteína G e inhibidores de receptores acoplados a proteína G. Los radioisótopos citotóxicos comunes son, por ejemplo, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ⁷⁷Lu, ⁶⁷Cu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹²Bi y ²¹³Bi.

15 A continuación, la invención se ilustrará por medio de los siguientes ejemplos y figuras.

Descripción de las figuras

20 **Figura 1: Supervivencia global para la cohorte completa de pacientes con NSCLC, así como para pacientes estratificados por densidad celular de DC y CD8+**

Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global para 342 pacientes con NSCLC: (A) todos los pacientes, y (B) pacientes dependiendo de la puntuación de DC/CD8. Se evaluaron las diferencias entre grupos de pacientes usando la prueba del orden logarítmico. Se corrigieron los valores de p del rango logarítmico usando la fórmula propuesta por Altman et al. (Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. Medical Statistics Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, London, England. J Natl Cancer Inst. 1994 Jun 1;86(11):829-35.)

30 **Figura 2: Supervivencia global para pacientes con NSCLC según el estadio T y puntuación de DC/CD8 por estadio T**

Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global para 359 pacientes con NSCLC dependiendo del estadio patológico T (A), y puntuación de DC/CD8 entre los estadios T1 (B), T2 (C) y T3 (D). Se evaluaron las diferencias entre grupos de pacientes usando la prueba del orden logarítmico. Se corrigieron los valores de p del rango logarítmico usando la fórmula propuesta por Altman et al.

35 **Figura 3: Supervivencia global para pacientes con NSCLC según el estadio N y puntuación de DC/CD8 por estadio N**

Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global para 359 pacientes con NSCLC dependiendo del estadio patológico N (A), y puntuación de DC/CD8 entre estadios N0 (B) y N positivo (C). Se evaluaron las diferencias entre grupos de pacientes usando la prueba del orden logarítmico. Se corrigieron los valores de p del rango logarítmico usando la fórmula propuesta por Altman et al.

45 **Figura 4: Supervivencia global para pacientes con NSCLC según émbolos y puntuación de DC/CD8 con o sin émbolos**

Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global para 338 pacientes con NSCLC dependiendo de los émbolos (A), y puntuación de DC/CD8 entre pacientes sin (B) o con émbolos (C). Se evaluaron las diferencias entre grupos de pacientes usando la prueba del orden logarítmico. Se corrigieron los valores de p del rango logarítmico usando la fórmula propuesta por Altman et al.

50 **Figura 5: Supervivencia global para pacientes con NSCLC según estadio de pTNM y puntuación de DC/CD8 por estadio de pTNM**

Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global para 372 pacientes con NSCLC dependiendo del estadio patológico de TNM (A), y puntuación de DC/CD8 entre el estadio I (B), estadio II (C), y estadio III (D). Se evaluaron las diferencias entre grupos de pacientes usando la prueba del orden logarítmico. Se corrigieron los valores de p del rango logarítmico usando la fórmula propuesta por Altman et al.

Ejemplos

Ejemplo 1

60 Pacientes

Se obtuvieron muestras de tumor de pulmón frescas (n=54 pacientes), congeladas (n=28 pacientes) e incorporadas en parafina (n=376 pacientes) de pacientes con NSCLC que se sometieron a una resección quirúrgica completa de sus tumores de pulmón en el Institut Mutualiste Montsouris o Hotel Dieu Hospital (París, Francia). Se recuperaron retrospectivamente 376 pacientes con NSCLC (estadios I a IV, clasificación UICC TNM 2009) operados entre el 15 de junio de 2001 y el 26 de noviembre de 2004. La clasificación del grado de tumor se hizo siguiendo la

recomendación de la 7ª edición de la clasificación TNM de tumores malignos publicada por la International Union Against Cancer y el American Joint Committee on Cancer (Sobin, Cancer, 2010). No fueron aptos los pacientes que recibieron quimioterapia neo-adyuvante o radioterapia. El tiempo de observación de la cohorte fue el intervalo entre la cirugía y el último contacto (último seguimiento o muerte del paciente). Al finalizar el estudio, el seguimiento clínico mínimo fue 90 meses para el último paciente incluido en la cohorte. Los datos sobre los desenlaces a largo plazo se obtuvieron retrospectivamente por consulta de los padrones municipales o la familia de los pacientes. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de los pacientes antes de la inclusión en el estudio prospectivo. El protocolo fue autorizado por el comité ético local (Nº: 2008-133 y 2012-0612) en aplicación del artículo L.1 121-1 de la ley francesa.

Citometría de flujo

Se disociaron mecánicamente especímenes de tumor de pulmón fresco y se aislaron células mononucleares como se ha descrito previamente (De Chaisemartin, L. et al., Cancer Res 71, 6391-6399 (2011)). Se tiñeron las células mononucleares con múltiples paneles de anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes. Brevemente, después de la saturación con 2 % de suero humano, se incubaron las células mononucleares con los anticuerpos primarios o controles de isotipo apropiados durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Se lavaron las células y se fijaron en 0,5 % de formaldehído antes del análisis en un citómetro LSRII o Fortessa (BD Biosciences). Se analizaron los datos de citometría de flujo con los software Diva (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star, Inc).

Inmunohistoquímica

Para cada tumor de pulmón incorporado en parafina, dos observadores (un patólogo experto y un investigador cualificado para identificar las características patológicas de NSCLC) seleccionaron la sección de tumor que contenía un área de tumor representativa con parénquima pulmonar adyacente, y la mayor densidad de células inmunitarias sobre la sección de tejido teñida con hematoxilina y eosina. Brevemente, se desparafinaron, rehidrataron y pretrataron en tampón apropiado secciones de tejido en serie de 5 µm para la recuperación de antígeno. Entonces, las secciones se incubaron con 5 % de suero humano durante 30 minutos antes de añadir los anticuerpos primarios apropiados seguido por anticuerpos secundarios. Se reveló la actividad enzimática, como se ha descrito (Dieu-Nosjean. et al. J. Clin. Oncol 26, 4410-4417 (2008)). Las imágenes se adquirieron usando un Nanozoomer (Hamamatsu) operado con el software NDPview.

Método para la cuantificación de células

Se contaron semicuantitativamente DCs DC-LAMP+ (puntuación 0, 1, 2, 3 y 4 para ninguna, densidad muy baja, débil, intermedia y alta de células positivas, respectivamente) en cada campo de potencia intermedia (IPF) en las áreas tumorales de toda la sección de tejido y se expresaron como puntuación media por IPF, con EEMs calculados. El número de DCs maduras DC-Lamp⁺ fue más bajo que el número de células descritas anteriormente, que permitió a los inventores realizar un recuento cuantitativo. Las células teñidas se expresaron como células medias por IPF, con EEMs calculados.

Se enumeraron las células CD8+ en los nidos tumorales y el estroma de la sección tumoral completa con el software Calopix, y se expresaron como un número absoluto de células positivas/µm² de las áreas de interés (Tribvn), con EEMs calculados. Se revisaron tanto la inmunotinción como la cuantificación por al menos dos observadores independientes.

Análisis estadístico

Los inventores usaron la prueba de Mann-Whitney para comparar la densidad de células inmunitarias infiltrantes en los diferentes tumores. Se evaluaron las correlaciones por la prueba de Spearman. Se estimaron las curvas de OS por el método de Kaplan-Meier y se calcularon las diferencias entre los grupos de pacientes usando la prueba del orden logarítmico. El inicio del seguimiento para OS fue el tiempo de cirugía. Junto con las densidades de DC maduras y linfocitos T CD8+, se probaron los siguientes parámetros clínicos disponibles: estadio de TNM 2009, estadio T, estadio N, tabaquismo, tipo histológico, subtipo de adenocarcinoma, émbolos e invasión pleural. Con respecto a las densidades celulares inmunitarias, se usó el enfoque de "valor P mínimo" para determinar el corte para la mejor separación de pacientes con referencia a su desenlace de OS (enfoque orientado por el desenlace). Debido a que los valores de p obtenidos podrían ser sobreestimados, se corrigieron los valores de P del rango logarítmico de OS usando la fórmula propuesta por Altman et al. o usando validaciones cruzadas 10 veces. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05. Los parámetros identificados en el análisis monofactorial como resultado posiblemente influyente (P<0,05) se introdujeron en un modelo de regresión multifactorial de riesgos proporcionales de Cox. Todos los análisis se realizaron con Prism 5 (GraphPad), Statview (Abacus Systems) y R (<http://www.r-project.org/>). La matriz de correlación se hizo usando agrupación jerárquica con el software Genesis (Institute for Genomics and Bioinformatics, Gratz, Austria; Sturn et al., Bioinformatics, 2002).

1 - Alta densidad de DC maduras predice altos niveles de infiltración de linfocito T CD8+ en tumores de pulmón

Los inventores observaron una estrecha asociación entre la densidad de DC maduras con la función citotóxica-efectora, los inventores investigaron además la relación entre la infiltración de DC maduras y linfocitos T CD8⁺. Puesto que se espera que los linfocitos T CD8⁺ establezcan un contacto con células tumorales para ejercer su función citolítica, los inventores discriminaron los linfocitos T CD8⁺ presentes en los nidos tumorales y en el estroma en el siguiente análisis.

En una serie retrospectiva de 376 pacientes con NSCLC (estadios I a IV, clasificación de UICC TNM 2009), los inventores cuantificaron los linfocitos T CD8⁺ del estroma (CD8_s), linfocitos T CD8⁺ del nido tumoral (CD8_T) y DC DC-Lamp⁺ maduras. Como se ha observado previamente en tumores de pulmón de estadio precoz, los inventores confirmaron que las DC maduras se recirculan selectivamente en las áreas ricas en linfocitos T de TLS adyacentes a vasos PNA^d y folículos de linfocitos B en tumores de pulmón de todos los estadios.

Según los resultados anteriores, los inventores observaron una mayor densidad de tanto células CD8_T como CD8_s entre tumores DC-Lamp^{Hi} frente a DC-Lamp^{Lo} (media=254 frente a 138 CD8_T/mm², $P=0,0003$; media=843 frente a 553 CD8_s/mm² $P<0,0001$, respectivamente). Por consiguiente, la subestratificación de pacientes DC-Lamp^{Hi} y DC-Lamp^{Lo} según densidades de células CD8_s y CD8_T reveló que 84 % de los pacientes DC-Lamp^{Hi} fueron CD8^{Hi} en al menos una región, y en particular 55 % fueron altos en ambas regiones. Estas proporciones se redujeron enormemente en pacientes DC-Lamp^{Lo} con 61 % de CD8^{Hi} en al menos una región, y solo 33 % en ambas regiones. De forma interesante, los pacientes con tumores CD8_{sLo}/CD8^{Hi} fueron raros en ambos grupos DC-Lamp, según el tráfico de linfocitos T infiltrante del estroma a los nidos tumorales. Las principales diferencias entre pacientes DC-Lamp^{Hi} frente a DC-Lamp^{Lo} se refirieron al porcentaje de pacientes CDS_s^{Hi}CDS_T^{Hi} y CD8_{sLo}CD8_{TLo} mientras que los porcentajes de grupos mixtos (CD8_s^{Hi}CD8_{TLo} y CD8_{sLo}CD8_T^{Hi}) fueron bastante invariables.

Por completo, estos resultados demuestran que una alta densidad de DC maduras está estrechamente relacionada con una fuerte infiltración de linfocitos T CD8⁺.

2 - La densidad de DC maduras está asociada con la infiltración de linfocitos T CD8⁺ de diferenciación precoz y de memoria efectora en tumores de pulmón humano

Los inventores realizaron análisis de citometría de flujo a gran escala en 54 NSCLC humanos recién reseccionados para caracterizar el infiltrado inmunitario según la densidad de DC maduros DC-Lamp⁺. Los inventores observaron un porcentaje significativo más alto de linfocitos T totales CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺, una tendencia no significativa para linfocitos B CD19⁺ y ninguna diferencia para células NK CD3⁺CD56⁺ entre células mononucleares totales entre pacientes con una alta densidad de DC-Lamp⁺ DC (pacientes DC-Lamp^{Hi}) frente a pacientes con una baja densidad de DC DC-Lamp⁺ (pacientes DC-Lamp^{Lo}). Los tumores DC-Lamp^{Hi} tuvieron una cantidad significativamente mayor de linfocitos T CD62L⁺CD4⁺ y CD62L⁺CD8⁺ que los tumores DC-Lamp^{Lo}, según la localización selectiva de linfocitos T CD62L⁺ dentro de TLS. Los inventores también observaron un aumento significativo y concomitante de los linfocitos T CD62L⁺CD4⁺ y CD62L⁺CD8⁺ experimentados por antígeno, que representan la mayoría de TIL entre células mononucleares totales, entre tumores DC-Lamp^{Hi} frente a DC-Lamp^{Lo}. En comparación con tumores DC-Lamp^{Lo}, los tumores DC-Lamp^{Hi} estuvieron más infiltrados por linfocitos T CD38⁺ o CD69⁺ CD8⁺ activados y por las cuatro subpoblaciones principales de linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD28⁺).

En general, estos resultados demuestran que los tumores DC-Lamp^{Hi} tienen mayores números de linfocitos T intactos y de diferenciación precoz asociados a TLS, así como un mayor número de linfocitos T no TLS de memoria efectora activados, que tumores DC-Lamp^{Lo}.

3 - La densidad de TLS DC permite la identificación de pacientes CD8^{Hi} y CD8^{Lo} con alto riesgo de muerte

Puesto que los inventores observaron que altas densidades de linfocitos T CD8⁺ se detectaron en ambos grupos de pacientes DC-Lamp^{Hi} y DC-Lamp^{Lo}, los inventores evaluaron a continuación el valor pronóstico de cada variable sola y en combinación.

Las curvas de Kaplan-Meier indican que las densidades de DC maduras ($P=9,1 \times 10^{-05}$), células CD8_s ($P=0,0019$) y células CD8_T ($P=0,0228$) se correlacionaron con supervivencia global (OS) más larga.

Puesto que la presencia de DC maduras y células CD8⁺ en los tumores influye positivamente en el desenlace de los pacientes con cáncer de pulmón, los inventores estratificaron los pacientes en 4 grupos según la densidad alta o baja de cada marcador (DC-Lamp^{Hi}/CD8^{Hi}, DC-Lamp^{Hi}/CD8^{Lo}, DC-Lamp^{Lo}/CD8^{Hi} y DC-Lamp^{Lo}/CD8^{Lo}). Los inventores observaron que el grupo de pacientes con tumores DC-Lamp^{Hi} independientemente de la densidad de células CD8_s tenía el riesgo de muerte más bajo ($P=3,4 \times 10^{-07}$, la mediana de OS fue 92 meses para pacientes DC-Lamp^{Hi}/CD8_s^{Hi} y 100 meses para pacientes DC-Lamp^{Hi}/CD8_s^{Lo}), como se observó para pacientes DC-Lamp^{Hi}. De forma interesante, solo los pacientes DC-Lamp^{Hi} presentan una supervivencia mejorada en comparación con la cohorte completa. A diferencia, los pacientes con una baja densidad de tanto células dendríticas como CD8_s estuvieron en el mayor riesgo de muerte (la mediana de OS fue 22 meses) en comparación con cada marcador

inmunitario solo (OS media DC-Lamp^{Lo}=36 meses, OS media CD8^{sLo}=40 meses). Los pacientes con tumores DC-Lamp^{Lo}/CD8^{sHi} estuvieron en un riesgo de muerte intermedio (mediana de OS=41 meses). Se obtuvieron los mismos resultados cuando el análisis se realizó en la combinación de DC-Lamp con células CD8^T (datos no mostrados). Análisis adicionales con 100 repeticiones de validaciones cruzadas dos veces confirmaron el alto valor pronóstico y significativo de la puntuación de DC-Lamp/CD8^s (99/100 pruebas validadas de forma cruzada, mediana del valor de $p= 4,7 \times 10^{-04}$). Usando análisis de regresión multifactorial de Cox, el estadio de pTNM y la puntuación de DC-Lamp/CD8^s fueron los únicos criterios significativamente e independientemente asociados a OS (HR=1,70 y 0,71, y $P=2,83 \times 10^{-07}$ y $4,50 \times 10^{-07}$, respectivamente).

En conjunto, estos datos demuestran que DC-Lamp solo es un buen marcador para la identificación de pacientes con un desenlace favorable mientras que la combinación de CD8 con DC-Lamp permite la identificación de pacientes con el mayor riesgo de muerte. Finalmente, la puntuación de DC-Lamp/CD8^s y el estadio de pTNM constituyen dos factores de pronóstico independientes y poderosos.

15 Ejemplo 2

Pacientes

Se obtuvieron muestras de tumor de pulmón incorporadas en parafina (n=372 tumores) de pacientes con NSCLC (estadios I a IV, clasificación de UICC TNM 2009), que se sometieron a una resección quirúrgica completa de sus tumores de pulmón en el Institut Mutualiste Montsouris o Hotel Dieu Hospital (París, Francia). Fueron aptos pacientes con un estado de rendimiento del Grupo de Oncología Cooperativo del Este (Finkelstein et al., Am J Clin Oncol, 1988) ≤ 1 . La clasificación del grado de tumor grade se hizo siguiendo la recomendación de la 7^a edición de la clasificación de TNM de tumores malignos publicada por la International Union Against Cancer y el American Joint Committee on Cancer (Sobin, Cancer, 2010). Se recuperaron retrospectivamente pacientes operados entre el 15 de junio de 2001 y el 31 de diciembre de 2004. No fueron aptos los pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante o radioterapia. El tiempo de observación de la cohorte fue el intervalo entre el diagnóstico y el último contacto (último seguimiento o muerte del paciente). Al finalizar el estudio, el seguimiento clínico mínimo fue 90 meses para el último paciente incluido en la cohorte. Los datos sobre los desenlaces a largo plazo se obtuvieron retrospectivamente por consulta de los padrones municipales o la familia de los pacientes. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de los pacientes antes de la inclusión en el estudio prospectivo. El protocolo fue autorizado por el comité ético local (Nº: 2008-133 y 2012-0612) y por Assistance Publique-Hopitaux de Paris (AP-HP), en aplicación del artículo L.1 121-1 de la ley francesa.

35 1 - Parámetros clínico-patológicos de la cohorte

Se enrolaron un total de 372 pacientes operados para un NSCLC (todos los estadios) en un estudio retrospectivo. La supervivencia global de la cohorte completa se muestra en la Fig. 1A. Como se describe en la bibliografía, el estadio patológico T (pT), estadio N (pN), estadio TNM (pTNM) (7^a edición, 2010) y los émbolos tumorales se correlacionaron significativamente con la supervivencia global.

2 - El estadio T predice mejor el desenlace clínico de pacientes con NSCLC cuando se combina con la densidad de DC maduras y células CD8+

El estadio patológico T es uno de los métodos de referencia en la clínica. Como se ha establecido bien, pT se asoció a supervivencia más larga de pacientes con NSCLC (Fig. 2A, $P < 0,0001$). Los inventores quisieron entonces comparar el valor de pronóstico del estadio T según la densidad de DC DC-Lamp+ y linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor

Puesto que se demostró previamente que la presencia de DC maduras y linfocitos T CD8⁺ se asociaba a desenlace clínico favorable en pacientes con NSCLC (véase el Ejemplo 1), los inventores estratificaron los pacientes en 4 grupos según las densidades alta/baja de DC maduras DC-Lamp+ y linfocitos T del estroma CD8⁺ (DC CD8_{Hi} Hi, DC CD8_{Hi} Lo, DC CD8_{Lo} Hi, DC CD8_{Lo} Lo). Como se observó previamente, el porcentaje de pacientes con tumores "DC CD8_{Hi} Lo" fue muy escaso, que hizo muy difícil el análisis estadístico con este grupo, y la interpretación muy limitada. La Figura 1B mostró que la combinación DC/CD8 se correlaciona con una supervivencia global favorable ($P < 0,0001$). Entonces, los inventores estudiaron el impacto de la puntuación de DC/CD8 sobre los pacientes estratificados por estadio pT.

Entre el estadio pT1, las curvas de Kaplan-Meier indicaron que la densidad de las células inmunitarias no se correlacionaron significativamente con la supervivencia (Fig. 2B). Los pacientes con alta densidad de al menos un tipo de célula inmunitaria (pacientes DC CD8_{Hi} Hi, DC CD8_{Hi} Lo o DC CD8_{Lo} Hi) tuvieron la misma supervivencia global (OS) que los pacientes pT1 (alrededor 100 meses). A diferencia, los pacientes con tumores DC CD8_{Lo} Lo tuvieron un peor pronóstico en comparación con los pacientes pT1 (la OS media fueron 68 y 99 meses, respectivamente). Esta tendencia llegó a ser incluso más significativa en el estadio pT2 (OS media=23 y 64 meses para pacientes DC CD8_{Lo} Lo y pacientes pT2, respectivamente).

Entre el estadio pT2, la combinación DC/CD8 permitió la identificación de grupos de pacientes con supervivencia a largo plazo (OS media para pacientes DC CD8_Hi Hi fue 85 meses) y supervivencia a corto plazo (OS media para pacientes DC CD8_Lo Lo fue 23 meses), mientras que los pacientes con tumores DC CD8_Lo Hi tuvieron la misma OS media que los pacientes pT2 (OS media=69 y 64 meses, respectivamente). Entre el estadio pT3, la alta densidad de tanto DC como linfocitos T CD8⁺ predijo mejor un desenlace favorable (OS media=69 meses) que la baja densidad de DC independientemente de la densidad de linfocitos T CD8⁺ (OS media=23 y 15 meses para pacientes DC CD8_Lo Hi y DC CD8_Lo Lo, respectivamente) o pacientes de estadio pT3 (OS media=24 meses). La principal diferencia entre estadios pT2 y pT3 en términos de supervivencia fue el grupo de pacientes con tumores DC CD8_Lo Hi que cambiaron de un riesgo de muerte de intermedio a alto, respectivamente, y tuvieron exactamente el mismo desenlace que los grupos de pacientes pT2 y pT3.

En conjunto, estos datos indicaron que la combinación de la densidad de tanto DC como CTL, y el estadio pT predice mejor la supervivencia global de pacientes con NSCLC que el tratamiento de referencia el estadio pT solo.

3 - Densidad de tanto DC como CTL con el estadio N predice mejor el desenlace clínico de pacientes con NSCLC que el estadio N solo

Los inventores investigaron a continuación la influencia de la puntuación de DC/CD8 sobre el valor de pronóstico del estadio N (Fig. 3). Se conoce que el estadio N es un marcador pronóstico para OS, como se muestra en la Fig. 3A. Entre pacientes sin invasión detectable de ganglios linfáticos, aquellos con alta densidad de DC infiltrantes tuvieron una supervivencia prolongada (OS media fue 99 y 111 meses para pacientes con tumores DC CD8_Hi Hi y DC CD8_Hi Lo, respectivamente), mientras que los pacientes con DC CD8_Lo Lo tuvieron un desenlace muy malo (OS media fue 49 meses), en comparación con la referencia que es pacientes con estadio N0 (OS media=73 meses) (Fig. 3A-B). Los pacientes con DC CD8_Lo Hi tuvieron un comportamiento similar al estadio N0 de referencia (OS media=79 frente a 73 meses, respectivamente). Para pacientes con participación de los ganglios linfáticos (Fig. 3A,C), la situación es incluso más llamativa. Hubo una diferencia importante para OS basado en la estratificación de DC-Lamp. En comparación con la referencia (OS media=25 meses para pacientes N+), los pacientes con alta densidad de DC cualquiera que fuera la densidad de linfocitos T CD8⁺ tuvieron la mayor tasa y supervivencia media (OS de 10 años =45 %, OS media=64 meses para pacientes DC CD8_Hi Hi). Se observó la misma tendencia para pacientes DC CD8_Hi Lo, pero su número era demasiado bajo para llegar a una conclusión). A diferencia, los pacientes con baja densidad de DC tuvieron la peor tasa y desenlace medio (OS de 10 años=5 %, OS media=14 meses). Nuevamente, las curvas de Kaplan-Meier para pacientes DC CD8_Lo Hi y pacientes N+ fueron exactamente similares (Fig. 3A-C).

Estos resultados demostraron claramente que la adición de DC y CD8 con el estadio N (como referencia) permiten una discriminación mejor de pacientes con riesgo de muerte alto frente a bajo, especialmente en el grupo de pacientes con invasión de los ganglios linfáticos.

4 - La combinación de DC, CD8 y émbolos predice mejor la supervivencia global que los émbolos solos

La invasión vascular y linfática es el signo más temprano de extensión de células tumorales en el cuerpo. Este criterio también se evalúa por profesionales clínicos ya que está asociado con mala supervivencia, como se muestra en la Figura 4A. Así, los inventores estudiaron a continuación el valor de pronóstico de la puntuación de DC/CD8 entre pacientes con NSCLC con o sin émbolos (Fig. 4). La combinación DC/CD8 permitió una mejor identificación de pacientes con desenlace favorable frente a peor (Fig. 4B-C) en comparación con pacientes estratificados por émbolos solo (Fig. 4A). Entre pacientes sin ningún émbolo detectable, el grupo de pacientes con baja densidad de ambos tipos inmunitarios de células tenía un OS muy malo (OS media=54 meses), mientras que los otros 3 grupos tenían una OS ligeramente más larga (OS media fue 92, 101 y 111 meses para pacientes DC CD8_Hi Hi, DC CD8_Lo Hi, y DC CD8_Hi Lo, respectivamente), en comparación con el grupo de pacientes con émbolos negativos (OS media=83 meses). Los criterios inmunitarios fueron mucho más predictivos para supervivencia para pacientes con émbolos (Fig. 4C, P<0,0001). Los pacientes con DC CD8_Hi Hi estuvieron en bajo riesgo de muerte (OS media=84 meses), pacientes con DC CD8_Lo Lo estuvieron en riesgo muy alto de mala supervivencia (OS media=16 meses), mientras que los pacientes con densidades mixtas de células inmunitarias tuvieron casi la misma OS media (OS media fue 46 y 32 meses para pacientes DC CD8_Hi Lo y DC CD8_Lo Hi, respectivamente) que los pacientes con émbolos (OS media=40 meses).

Estos datos muestran que la combinación de parámetros de DC, CD8 y émbolos permite una mejor estratificación de pacientes con NSCLC para supervivencia.

5 - Mejor supervivencia de pacientes con NSCLC estratificado por estadio de TNM y puntuación de DC/CD8

Finalmente, los inventores probaron la potencia del valor pronóstico de la nueva clasificación de pTNM (2010) con o sin la puntuación de DC/CD8 (Fig. 5). Como era de esperar, TNM era un marcador de pronóstico para OS (Fig. 5). Como antes, el impacto del pronóstico de pacientes estratificados por la puntuación inmunitaria llegó a ser cada vez más significativa durante la progresión de la enfermedad. Desde el estadio precoz de NSCLC, bajas densidades de células dendríticas y CD8⁺ identificaron pacientes con el peor desenlace (OS media fueron 61 frente a 99 meses

- 5 para pacientes DC CD8_Lo Lo y pacientes de estadio I, respectivamente; Fig. 5A-B) mientras que los 3 otros grupos de pacientes DC/CD8 tuvieron la misma OS media que los pacientes de estadio I. Entre pacientes con el estadio de enfermedad más avanzado, aquellos con alta densidad de DC maduras tuvieron un beneficio importante en términos de supervivencia (OS media=64 meses) en comparación con grupos de DC bajas de pacientes (OS media fue 10 y 13 meses para pacientes DC CD8_Lo Hi y DC CD8_Lo Lo, respectivamente), o pacientes de estadio III (OS media=18 meses) (Fig. 5A,D). Otra vez, sea cual sea el estadio de la enfermedad, los pacientes DC CD8 Lo Hi siempre tuvieron el mismo comportamiento que aquellos con respecto a la referencia.
- 10 En conjunto, la puntuación de DC/CD8 potencia el valor de pronóstico del estadio de TNM. La combinación de la puntuación de DC/CD8 con el estadio de pTNM da una vista más refinada del pronóstico de pacientes con un cáncer sólido con estructuras linfoides inducidas por tumor tales como NSCLC.

Referencias

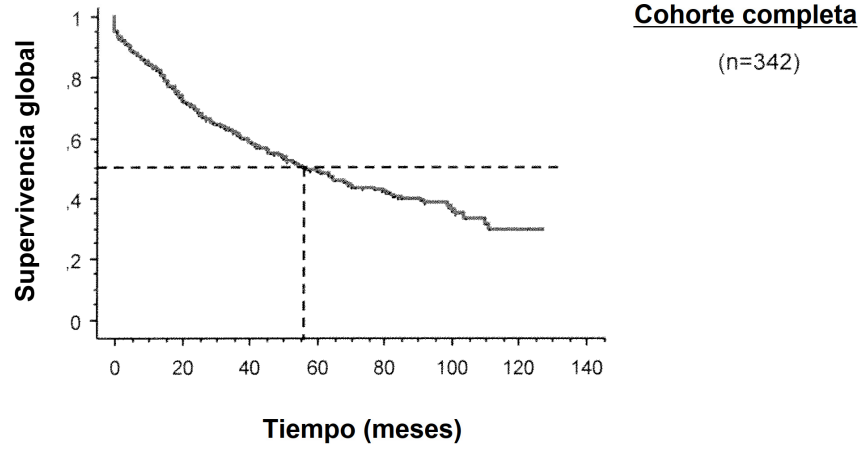
- 15 En toda la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que se refiere la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el pronóstico de supervivencia de un paciente que padece un cáncer sólido, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) cuantificar, en una muestra de tejido tumoral de dicho paciente, la densidad celular de células CD8+,
 b) cuantificar, en una estructura linfoide inducida por tumor de dicho paciente, la densidad celular de células dendríticas DC-LAMP+,
 10 c) comparar los valores de densidad celular obtenidos en la etapa a) y b) con valores de referencia predeterminados para cada tipo de células en cada localización, y
 d) proporcionar un pronóstico favorable del tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de células CD8+ y las células dendríticas DC-LAMP+ es superior a dichos valores de referencia predeterminados,
 15 proporcionar un mal pronóstico del tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de células CD8+ y células dendríticas DC-LAMP+ son inferiores a dichos valores de referencia predeterminados, o proporcionar un pronóstico intermedio del tiempo de supervivencia para dicho paciente cuando la densidad celular de un marcador es superior a dicho valor de referencia predeterminado y la densidad celular del otro marcador es inferior a dicho valor de referencia predeterminado,
 20 en donde el método se usa en combinación con la clasificación de estadificación TNM.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el estadio patológico T del cáncer del paciente es pT1.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el estadio patológico T del cáncer del paciente es pT2.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en donde el estadio patológico T del cáncer del paciente es pT3 o pT4.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el estadio patológico N del cáncer del paciente es pN0.
- 30 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el estadio patológico N del cáncer del paciente es pN1 o pN2.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el paciente es un paciente con cáncer de estadio I.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en donde el paciente es un paciente con cáncer de estadio II o III.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la muestra de tejido tumoral se selecciona del grupo que consiste en (i) una muestra tumoral primaria global (en conjunto), (ii) una muestra de nido tumoral, (iii) una muestra de estroma de la sección tumoral completa y (iv) una muestra de estructura linfoide inducida por tumor.
- 40 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las células CD8+ se cuantifican en una muestra de estroma de la sección tumoral completa.
- 45 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el cáncer sólido es un cáncer de pulmón, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el cáncer sólido es un cáncer de pulmón.
- 50 13. El método de la reivindicación 12, en donde el cáncer sólido es un cáncer de pulmón de células no pequeñas.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la supervivencia es la supervivencia específica de enfermedad (DSS), la supervivencia sin enfermedad (DFS) o la supervivencia global (OS).

Figura 1

A.



Tiempo (meses)	0	20	40	60	80	100	120
en riesgo	323	245	197	161	128	28	6
eventos	18	96	143	175	197	207	211
censurados	1	1	2	6	17	107	125

B.

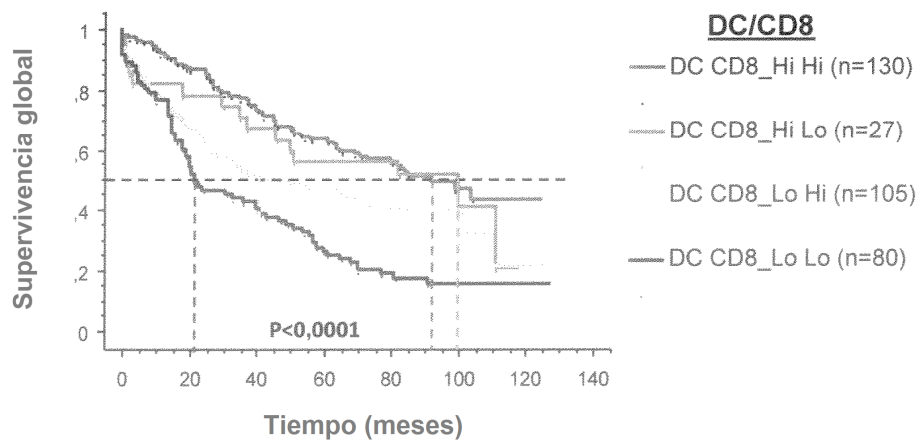


Figura 2

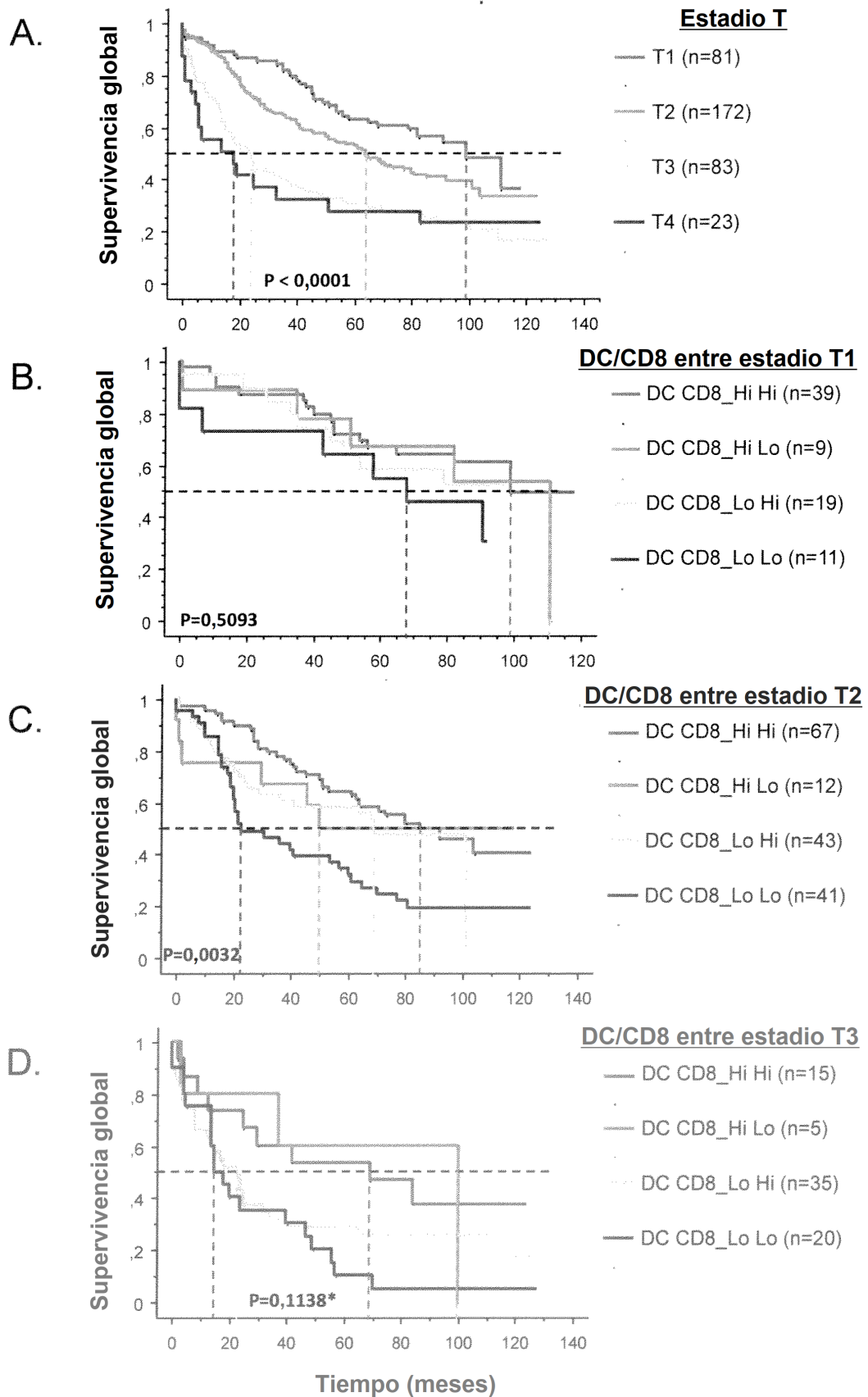


Figura 3

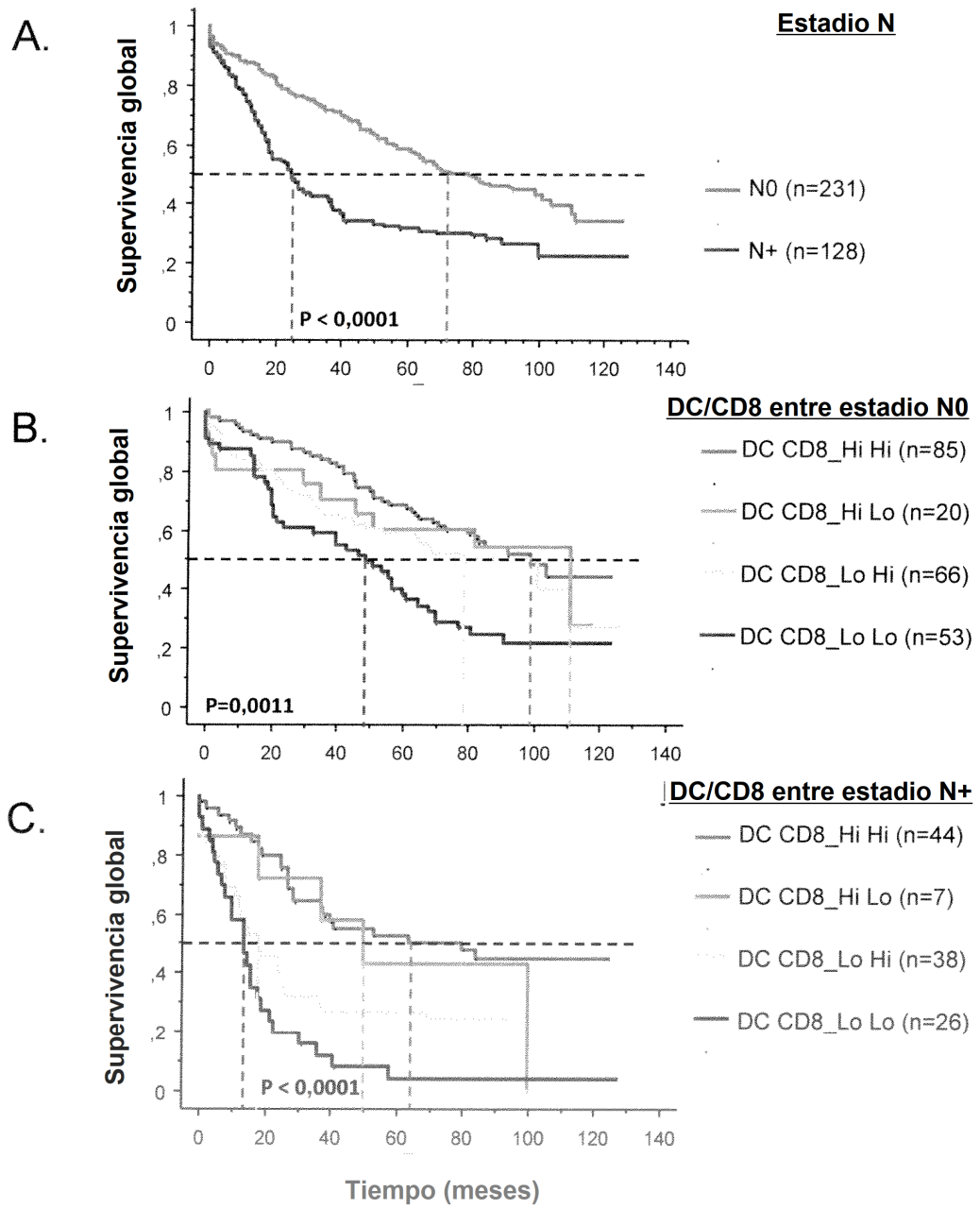


Figura 4

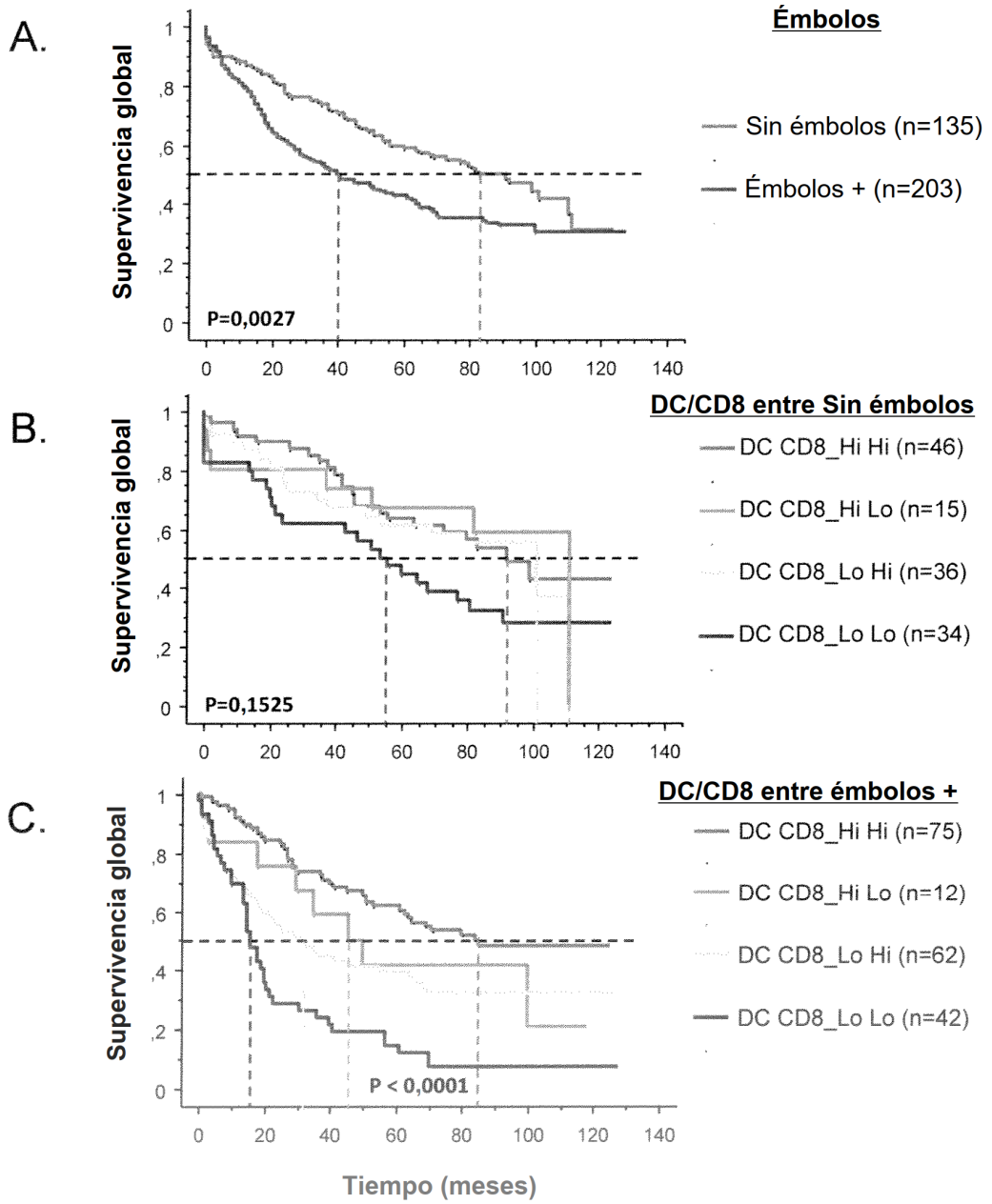


Figura 5

