

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 122**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2020** **PCT/EP2020/055649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2020** **WO20178313**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2020** **E 20707117 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3935391**

54 Título: **Biomarcadores para carcinoma de células renales**

30 Prioridad:

05.03.2019 EP 19305252

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2024

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (20.0%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (20.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (20.0%);
UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR (20.0%) y
UNIVERSITY OF LIVERPOOL (20.0%)

72 Inventor/es:

BIKFALVI, ANDREAS;
COOLEY, LINDSAY;
SOULEYREAU, WILFRIED;
PAGES, GILLES;
FALCIANI, FRANCESCO;
DUFIES, MAEVA y
CLARKE, KIM

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 984 122 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

Biomarcadores para carcinoma de células renales

5 **Campo**

El campo de la invención es predecir el tiempo de supervivencia para pacientes con carcinoma de células renales.

10 **Antecedentes**

El carcinoma de células renales (RCC) abarca un grupo heterogéneo de cánceres derivados de células epiteliales tubulares renales y presenta una mortalidad mundial de más de 140.000 personas al año. La enfermedad abarca múltiples subtipos histológicos y moleculares, de los cuales el RCC de células claras (ccRCC) es el más común. La incidencia y la prevalencia del RCC están creciendo, junto con aumentos en factores de riesgo relacionados tales como hipertensión, diabetes y obesidad. Sin embargo, las tasas de mortalidad apenas han mejorado en los últimos 20 años según los datos de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER). Se notifica una tendencia creciente continua tanto en la incidencia como en la mortalidad incluso en pacientes con enfermedad localizada. Estos datos están en marcado contraste con la notable mejora de las tasas de supervivencia en otros muchos cánceres y destacan el RCC como uno de los cánceres en los que los enfoques terapéuticos actuales no han logrado conseguir los avances esperados. Por tanto, se requieren urgentemente enfoques novedosos para este problema. Cuando enfermedad se localiza en el riñón, la resección quirúrgica es la opción preferida. Sin embargo, las opciones terapéuticas para la enfermedad metastásica son limitadas. El ccRCC metastatiza en primer lugar a los pulmones (en segundo lugar al hígado y al hueso), y la supervivencia a los 5 años es menor del 10 %. Además, el 40 % de los pacientes con enfermedad aparentemente localizada también experimentarán recidiva más adelante con enfermedad localizada o metastásica. La recidiva localizada también es difícil de tratar, difícil de predecir y presenta un mal pronóstico.

Los desafíos asociados con el tratamiento de RCC incluyen altos niveles de resistencia a los fármacos quimioterápicos tradicionales. La mayoría de las terapias dirigidas disponibles en la actualidad se centran en la inhibición de la angiogénesis impulsada por el eje VEGF/VEGFR. Aunque se ha progresado en la prolongación de la vida en cierto modo, tales terapias rara vez son curativas y actuarán principalmente para "inhibir" la enfermedad, lo que hace casi inevitable la resistencia eventual a los fármacos. El alto coste y la alta tasa de fracaso de este enfoque son significativos. Los tratamientos de segunda línea incluyen inhibidores de mTOR y agentes inmunoterápicos. Estos pueden ser exitosos, pero sólo son eficaces para un subconjunto limitado de pacientes. La fisiopatología del RCC todavía está lejos de entenderse, y existe una clara necesidad de identificar los mecanismos clave en la progresión de RCC con el fin de abrir vías terapéuticas novedosas dirigidas a diferentes aspectos de la biología del RCC. Además, el tratamiento clínico del RCC se ve dificultado por la falta de biomarcadores relevantes. En la actualidad, no hay biomarcadores moleculares completamente validados para el RCC en la práctica clínica. La respuesta a los tratamientos disponibles actualmente y la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo son muy variables y difíciles de predecir. En la actualidad, el diagnóstico, el pronóstico y las decisiones clínicas del paciente se realizan basándose en información histológica tal como el grado de Fuhrman y el estadio tumoral. La selección de terapia se basa en una guía limitada y la respuesta a tratamientos previos. A este respecto, el tratamiento clínico del RCC se retrasa con respecto a otros cánceres para los cuales el conocimiento molecular es inestimable a la hora de guiar las decisiones clínicas, por ejemplo, el estado de receptores hormonales en el cáncer de mama.

El documento WO2017118634 da a conocer un método para predecir el tiempo de supervivencia de un sujeto que padece carcinoma de células renales que comprende las etapas de: i) cuantificar el porcentaje de células T CD8+ que expresan conjuntamente PD-1 y Tim-3 en una muestra de tejido tumoral obtenida del sujeto, ii) comparar el porcentaje cuantificado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado correspondiente y iii) concluir que el sujeto tendrá un tiempo de supervivencia corto cuando el porcentaje de células T CD8+ que expresan conjuntamente PD-1 y Tim-3 es mayor que su valor de referencia predeterminado correspondiente o concluir que el sujeto tendrá un tiempo de supervivencia largo cuando el porcentaje de células T CD8+ que expresan conjuntamente PD-1 y Tim-3 es menor que su valor de referencia predeterminado correspondiente.

Se notificó el factor del complemento B como biomarcador de RCC (Cooper, S. J., et al. "Current status of biomarker discovery in human clear cell renal cell carcinoma", J Mol Biomark Diagn 2 (2012): 005).

60 **Sumario de la invención**

La presente invención se define por las reivindicaciones. En su sentido general, la presente invención se refiere a:

- 65 - un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un carcinoma de células renales (RCC) que comprende i) determinar el nivel de expresión de factor del complemento B (CFB) en

una muestra obtenida del paciente, ii) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa i) con un valor de referencia predeterminado y en el que una diferencia entre el nivel de expresión determinado y dicho valor de referencia predeterminado es indicativa de si el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo o corto, en el que un nivel de expresión de CFB que es mayor que el valor de referencia predeterminado indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto,

- el uso del método de la presente invención para seleccionar un régimen terapéutico o determinar si un determinado régimen terapéutico es más apropiado para un paciente que se ha identificado que tiene un mal pronóstico, y

- el uso del método de la presente invención para la monitorización de RCC en un paciente, en el que, si en una primera prueba se identifica que el paciente tiene un mal pronóstico, el paciente puede seleccionarse para que se le administre una terapia antineoplásica, y si en una segunda prueba se identifica que el paciente tiene un buen pronóstico, el paciente puede seleccionarse para que se le administre una terapia antineoplásica a una dosis de mantenimiento.

La siguiente descripción detallada, las figuras y el ejemplo no se encuentran dentro del alcance de la presente invención y se presentan únicamente con fines de comprensión e ilustración. Esto incluye cualquier realización o ejemplo donde no se use CFB como biomarcador.

Además, cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento mediante terapia o a métodos de diagnóstico in vivo se refiere a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en dichos métodos. Los compuestos, etc., para su uso en tales métodos no se reivindican como tal.

Descripción detallada

Métodos para predecir el tiempo de supervivencia y usos de los mismos:

El primer objeto dado a conocer en el presente documento se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un carcinoma de células renales (RCC) que comprende i) determinar el nivel de expresión de CFB en una muestra obtenida del paciente, ii) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa i) con un valor de referencia predeterminado y en el que una diferencia entre el nivel de expresión determinado y dicho valor de referencia predeterminado es indicativa de si el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo o corto.

Tal como se usa en el presente documento, el término "carcinoma de células renales" o "RCC" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un cáncer originado a partir de las células epiteliales tubulares renales en el riñón. Según las características patológicas, el cáncer se clasifica en de tipo células claras, de tipo células granulares, de tipo cromóforo, de tipo husillo, de tipo asociado a quistes, de tipo procedente de quistes, de tipo quístico o de tipo papilar. En particular, el carcinoma de células renales (RCC) se encuentra en estadio I, II, III o IV tal como se determina por la clasificación TNM, pero, sin embargo la presente divulgación es útil precisamente para predecir el tiempo de supervivencia de pacientes cuando dicho cáncer se ha clasificado como estadio II o III mediante la clasificación TNM, es decir, carcinoma de células renales (RCC) no metastásico.

El método dado a conocer en el presente documento es particularmente adecuado para predecir la duración de la supervivencia global (OS), la supervivencia libre de progresión (PFS) y/o la supervivencia libre de enfermedad (DFS) del paciente con cáncer. Los expertos en la técnica reconocerán que el tiempo de supervivencia OS se basa generalmente en, y se expresa como, el porcentaje de personas que sobreviven un determinado tipo de cáncer durante una cantidad de tiempo específica. Los parámetros estadísticos del cáncer a menudo usan una tasa de supervivencia a los cinco años global. En general, las tasas de OS no especifican si los supervivientes al cáncer todavía están sometiéndose a tratamiento a los cinco años o si se han vuelto libres de cáncer (han logrado la remisión). La DFS proporciona información más específica y es el número de personas con un cáncer particular que logran la remisión. Además, las tasas de supervivencia libre de progresión (PFS) (el número de personas que todavía padecen cáncer, pero su enfermedad no progresa) incluye personas que pueden haber tenido cierto éxito con el tratamiento, pero el cáncer no ha desaparecido completamente. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "tiempo de supervivencia corto" indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia que será menor que la mediana (o media) observada en la población general de pacientes que padecen dicho cáncer. Que el paciente tenga un tiempo de supervivencia corto quiere decir que el paciente tendrá un "mal pronóstico". A la inversa, la expresión "tiempo de supervivencia largo" indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia que será mayor que la mediana (o media) observada en la población general de pacientes que padecen dicho cáncer. Que el paciente tenga un tiempo de supervivencia largo quiere decir que el paciente tendrá un "buen pronóstico".

Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica obtenida con el propósito de evaluación in vitro.

En particular, la muestra biológica es una muestra tisular. El término "muestra tisular" incluye cortes de tejidos tales como muestras de biopsia o autopsia y cortes congelados tomados con fines histológicos. En particular, la muestra tisular puede ser el resultado de una biopsia realizada en el RCC del paciente.

En particular, la muestra biológica es una muestra de líquido corporal. Ejemplos de líquidos corporales son sangre, suero, plasma, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido, líquido cerebroespinal, esputo, secreciones de garganta y faringe y otras secreciones de membranas mucosas, líquidos sinoviales, ascitis, líquido lagrimal, líquido linfático y orina. Más particularmente, la muestra es una muestra de sangre. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra de sangre" se refiere a una muestra de sangre completa, a una muestra de suero y a una muestra de plasma. Una muestra de sangre puede obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo venopunción o un pinchazo en el dedo. Las muestras de suero y de plasma pueden obtenerse mediante métodos de centrifugación conocidos en la técnica. La muestra puede diluirse con un tampón adecuado antes de llevar a cabo el ensayo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "IL-34" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la interleucina-34 que se caracteriza por la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1.

```
SEQ ID NO : 1 >sp|Q6ZMJ4|IL34_HUMANA Interleucina-34 OS=Homo sapiens
OX=9606 GN=IL34 PE=1 SV=1
MPRGFTWLRYLGI FLGVALGNEPLEMWPLTQNEECTVTGFLRDKLQYRSRLQYMKHYFPI
NYKISVPYEGVFRIANVTRLQRAQVSERELRYLWVLVLSLATESVQDVLLEGHPWSWKYLQ
EVETLLLNQQGLTDEVS PKVESVLSLLNAPGPNLKLVRPKALLDNCFRVMELLYCSCC
KQSSVLNWQDCEVPSPQSCSPESLQYAATQLYPPPPWSPSSPPHSTGSRVPVRAQGEGL
LP
```

Tal como se usa en el presente documento, el término "SAA2" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína amiloide A-2 sérica que se caracteriza por la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:2.

```
SEQ ID NO: 2 >sp|P0DJI9|SAA2_HUMANA Proteína amiloide A-2 sérica OS=Homo
sapiens OX=9606 GN=SAA2 PE=1 SV=1
MKLLTGLVFCSLVLSVSSRSFFSFLGEAFDGMWRAYSMDREANYIGSDKYFHARGNY
DAAKRGPGGAWAAEVISNARENIQRLTGRGAEDSLADQAANKWGRSGRDPNHFRPAGLPE
KY
```

Tal como se usa en el presente documento, el término "PONL1" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína similar a podocano 1 que se caracteriza por la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:3.

```
SEQ ID NO:3 >sp|Q6PEZ8|PONL1_HUMANA Proteína similar a podocano 1 OS=Homo
sapiens OX=9606 GN=PODNL1 PE=2 SV=2
MAESGLAMWPSLLLLLLLLPGPPPVGLEDAAFPHLGESLQPLPRACPLRCS CPRVDTVDC
DGLDLRVFPDNITRAAQHLSLQNNQLQELPYNELSRLSGLRTLNLHNNLISSEGLPDEAF
ESLTQLQHLCVAHNKLSVAPQFLPRSLRVADLAANQVMEIFPLTFGEKPAIRSVYLHNNQ
LSNAGLPPDAFRGSEAIATLSLSNNQLSYLPPLPSLERLHLQNNLISKVPRGALS RQT
QLRELYLQHNQLTDSGLDATTFSKLHSLEYLDLSHNQLTTPAGLPRTLAILHLGRNRI
QVEAARLHGARGRLRYLLLQHNQLGSSGLPAGALRPLRGLHTLHLYGNGLDRVPPALPRRL
RALVLPHNHVAALGARDLVATPGLTELNLAYNRLASARVHHRAFRRLRALRSLDLAGNQL
TRLPMGLPTGLRTLQLQRNQLRMLEPEPLAGLDQLRELSLAHNRLRVGDIGPGTWHELQA
LQVRHRLVSHTVPRAPPSPCLPCHVPNIVSW
```

Tal como se usa en el presente documento, el término "CFB" tiene su significado general en la técnica y se refiere al factor del complemento B que se caracteriza por la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:4.

```
SEQ ID NO:4 >sp|P00751|CFAB_HUMANO Factor del complemento B OS=Homo sapiens
OX=9606 GN=CFB PE=1 SV=2
MGSNLSPLQCLMPFILGLLSGGVTTTPWSLARPOGSCSLEGVEIKGGSFRLQLQEGQALEY
VCPSGFYYPYPVQTRTCRSTGSWSTLKTQDQKTVRKAECRAIHCPRPHDFENG EYWPRSPY
YNVSDEISFHCYDGYTLRGSANRTCQVNGRWSGQTAICDNGAGYCSNPGIPIGTRKVGSO
YRLEDSVTYHCSRGLTLRGSQRRTCQEGGSWSGTEPSCQDSFMYDTPQEVAAFLSSLTE
TIEGVDAEDGHGPGEQQKRKIVLDPSGSMNIYLVLDGSDSIGASNFTGAKKCLVNLIEKV
ASYGVKPRYGLVTYATYPKIWVKVSEADSSNADWVTKQLNEINYEDHKLKSGTNTKKALQ
AVYSMMSWPDVPEGWNRTRHVIIIMTDGLHNMGGDPITVIDEIRDLLYIGKDRKNPRE
DYLDVYVFGVGPLVNQVINALASKKDNEQHVFKVKDMENLEDVFYQMIDESQSLSLSCGM
VWEHRKGTDYHKQPWQAKISVIRPSKGHESCMGAVVSEYFVLTAHCFTVDDKEHSIKVS
VGGEKRDLEIEVVLPHPNYNINGKKEAGIPEFYDYDVALIKLKNKLKYGQTIRPICLPCT
EGTTRALRLPPTTTCQQQKEELLPAQDIKALFVSEEEKLTRKEVYIKNGDKKGCSCERDA
QYAPGYDKVKDISEVVTPrFLCTGGVSPYADPNTCRGDSGGPLIVHKRSRFIQGVVISWG
VVDVCKNQKRQKQVPAHARDFHINLFQVLPWLKEKLQDEDLGL
```

La medición del nivel de biomarcador en la muestra, en particular en la muestra de sangre, se lleva a cabo normalmente usando protocolos convencionales conocidos en la técnica.

Por ejemplo, el método puede comprender poner en contacto la muestra de sangre con una pareja de unión que puede interaccionar selectivamente con el biomarcador en la muestra. En particular, las parejas de unión son anticuerpos tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o incluso aptámeros. Por ejemplo, la unión puede detectarse a través del uso de un inmunoensayo competitivo, un sistema de ensayo no competitivo usando técnicas tales como inmunotransferencias de tipo Western, un radioinmunoensayo, un ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), un inmunoensayo de tipo “sándwich”, un ensayo de inmunoprecipitación, una reacción de precipitinas, una reacción de precipitinas de difusión en gel, un ensayo de inmunodifusión, un ensayo de aglutinación, un ensayo de fijación del complemento, un ensayo inmunoradiométrico, un inmunoensayo fluorescente, un inmunoensayo de proteína A, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo inmunohistoquímico, un ELISA de competencia o de tipo sándwich, un radioinmunoensayo, un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western, un ensayo inmunohistológico, un ensayo inmunocitoquímico, un ensayo de inmunotransferencia por puntos, un ensayo de polarización por fluorescencia, un ensayo de proximidad por centelleo, un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea, un análisis IAsys y un análisis BIAcore. De manera general, los ensayos mencionados anteriormente implican la unión de la pareja (es decir, anticuerpo o aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la divulgación incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microtitulación); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotizado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares. Una prueba bioquímica a modo de ejemplo para identificar proteínas específicas emplea un formato de prueba estandarizado, tal como una prueba ELISA, aunque la información proporcionada en el presente documento puede aplicarse al desarrollo de otras pruebas bioquímicas o diagnósticas y no se limita al desarrollo de una prueba ELISA (véase, por ejemplo, Molecular Immunology: A Textbook, editado por Atassi et al. Marcel Dekker Inc., Nueva York y Basilea 1984, para una descripción de las pruebas ELISA). Por tanto, puede usarse el método ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un conjunto de anticuerpos que reconocen el biomarcador. Luego se añade una muestra que contiene o que se sospecha que contiene el biomarcador a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, puede(n) lavarse la(s) placa(s) para retirar los restos no unidos y añadirse una molécula de unión secundaria marcada de manera detectable. Se permite que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica. La medición del nivel del biomarcador (con o sin métodos basados en inmunoensayo) también puede incluir la separación de los compuestos: centrifugación basada en el peso molecular del compuesto; electroforesis basada en la masa y la carga; HPLC basada en la hidrofobia; cromatografía de exclusión molecular basada en el tamaño; y afinidad en fase sólida basada en la afinidad del compuesto por la fase sólida particular que se usa. Una vez separadas, dichas una o dos proteínas biomarcadoras pueden identificarse basándose en el “perfil de separación” conocido, por ejemplo, el tiempo de retención, para ese compuesto y medirse usando técnicas convencionales. Alternativamente, los compuestos separados pueden detectarse y medirse, por ejemplo, mediante un espectrómetro de masas. Normalmente, los niveles de inmunorreactividad del biomarcador en una muestra pueden medirse mediante un ensayo inmunométrico basándose en una técnica de tipo “sándwich” de doble anticuerpo, con un anticuerpo monoclonal específico para el biomarcador (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan). En particular, dichos medios para medir el nivel de biomarcador son, por ejemplo, i) un tampón del biomarcador, ii) un anticuerpo monoclonal que interacciona específicamente con el biomarcador, iii) un anticuerpo conjugado con enzima específico para el biomarcador y un valor de referencia predeterminado del biomarcador.

En particular, el valor de referencia predeterminado es un valor de umbral o un valor de corte. Normalmente, un "valor de umbral" o "valor de corte" puede determinarse de manera experimental, empírica o teórica. Un valor de umbral también puede seleccionarse de manera arbitraria basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, tal como reconocería un experto habitual en la técnica. Por ejemplo, puede usarse una medición retrospectiva del nivel de expresión del biomarcador en muestras del sujeto históricas debidamente almacenadas en banco para establecer el valor de referencia predeterminado. El valor de umbral debe determinarse con el fin de obtener la sensibilidad y la especificidad óptimas según la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falso positivo y falso negativo). Normalmente, la sensibilidad y la especificidad óptimas (y, por tanto, el valor de umbral) pueden determinarse usando una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) basándose en los datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar el nivel de expresión del biomarcador en un grupo de referencia, puede usarse un análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de los niveles de expresión medidos del/de los gen(es) en muestras que van a someterse a prueba y, por tanto, obtenerse un patrón de clasificación que tiene significación para la clasificación de muestras. El nombre completo de la curva ROC es curva de rendimiento diagnóstico, que también se conoce como curva de eficacia diagnóstica. Se usa principalmente para pruebas diagnósticas bioquímicas clínicas. La curva ROC es un indicador exhaustivo que refleja las variables continuas de la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre la sensibilidad y la especificidad con el método de composición de imágenes. Se establece una serie de diferentes valores de corte (umbrales o valores críticos, valores límite entre resultados normales y anómalos de la prueba diagnóstica) como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego se usa la sensibilidad como coordenada vertical y se usa la especificidad como coordenada horizontal para trazar una curva. Cuanto mayor es el área bajo la curva (AUC), mayor es la precisión del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más próximo a la parte izquierda superior lejana del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene tanto valores altos de sensibilidad como valores altos de especificidad. El valor de AUC de la curva ROC está entre 1,0 y 0,5. Cuando $AUC > 0,5$, va mejorándose el resultado de diagnóstico a medida que AUC se aproxima a 1. Cuando AUC está entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando AUC está entre 0,7 y 0,9, la precisión es moderada. Cuando AUC es mayor de 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Pueden usarse software o sistemas existentes en la técnica para el trazado de la curva ROC, tales como: software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0, ROCPOWER.SAS, DESIGNROC.FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATE-ROC.SAS, GB STAT VI0.0 (Dynamic Microsystems, Inc., Silver Spring, Md., EE. UU.), etc.

En particular, el valor de referencia predeterminado se determina llevando a cabo un método que comprende las etapas de a) proporcionar una colección de muestras; b) proporcionar, para cada muestra proporcionada en la etapa a), información relativa al resultado clínico real para el sujeto correspondiente (es decir, la duración de la supervivencia); c) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios; d) determinar el nivel de expresión del biomarcador para cada muestra contenida en la colección proporcionada en la etapa a); e) clasificar dichas muestras en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico proporcionado en la etapa c), respectivamente: (i) un primer grupo que comprende muestras que presentan un valor de cuantificación para el nivel que es menor que dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de cuantificación; (ii) un segundo grupo que comprende muestras que presentan un valor de cuantificación para dicho nivel que es mayor que dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de cuantificación; mediante lo cual se obtienen dos grupos de muestras para dicho valor de cuantificación específico, en el que las muestras de cada grupo se enumeran por separado; f) calcular la significación estadística entre (i) el valor de cuantificación obtenido en la etapa e) y (ii) el resultado clínico real de los pacientes de los cuales derivan las muestras contenidas en los grupos primero y segundo definidos en la etapa f); g) reiterar las etapas f) y g) hasta someter a prueba cada valor de cuantificación arbitrario proporcionado en la etapa d); h) establecer que dicho valor de referencia predeterminado consiste en el valor de cuantificación arbitrario para el cual se ha calculado la significación estadística más alta (más significativa) en la etapa g).

Por ejemplo, el nivel de expresión del biomarcador se ha evaluado para 100 muestras de 100 pacientes. Las 100 muestras se clasifican según el nivel de expresión del biomarcador. La muestra 1 tiene el nivel más alto y la muestra 100 tiene el nivel más bajo. Una primera agrupación proporciona dos subconjuntos: por un lado la muestra n.º 1 y por otro lado las otras 99 muestras. La siguiente agrupación proporciona por un lado las muestras 1 y 2 y por otro lado las 98 muestras restantes, etc., hasta la última agrupación: por un lado las muestras 1 a 99 y por otro lado la muestra n.º 100. Según la información relativa al resultado clínico real para el sujeto correspondiente, se preparan curvas de Kaplan-Meier para cada uno de los 99 grupos de dos subconjuntos. Además, para cada uno de los 99 grupos, se calculó el valor de p entre ambos subconjuntos. Luego se selecciona el valor de referencia predeterminado de manera que la discriminación basada en el criterio del valor de p mínimo es la más fuerte. Dicho de otro modo, el nivel de expresión del biomarcador correspondiente al límite entre ambos subconjuntos para el cual el valor de p es mínimo se considera como valor de referencia predeterminado.

Un nivel de expresión del biomarcador que es mayor que el valor de referencia predeterminado indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto.

- Cabe señalar que el valor de referencia predeterminado no tiene por qué ser el valor mediana de los niveles de expresión del gen. Por tanto, en particular, el valor de referencia predeterminado permite de ese modo la discriminación entre un mal pronóstico y un buen pronóstico para el paciente. En la práctica, generalmente se obtienen altos valores de significación estadística (por ejemplo, bajos valores de P) para un intervalo de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos y no sólo para un único valor de cuantificación arbitrario. Por tanto, en lugar de usar un valor de referencia predeterminado definido, se proporciona un intervalo de valores. Por tanto, se establece de manera arbitraria un valor de significación estadística mínimo (umbral mínimo de significación, por ejemplo, valor de P umbral máximo) y se conserva un intervalo de una pluralidad de valores de cuantificación arbitrarios para los cuales el valor de significación estadística calculado en la etapa g) es mayor (más significativo, por ejemplo, valor de P más bajo), de modo que se proporciona un intervalo de valores de cuantificación. Este intervalo de valores de cuantificación incluye un valor de "corte" tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, el resultado puede determinarse comparando el nivel de expresión del biomarcador con el intervalo de valores que se identifican. En particular, un valor de corte consiste de ese modo en un intervalo de valores de cuantificación, por ejemplo, centrados en el valor de cuantificación para el cual se encuentra el valor de significación estadística más alto (por ejemplo, generalmente el valor de p mínimo que se encuentra). Por ejemplo, en una escala hipotética de 1 a 10, si el valor de corte ideal (el valor con la significación estadística más alta) es 5, un intervalo adecuado (a modo de ejemplo) puede ser desde 4 hasta 6. Por ejemplo, un paciente puede evaluarse comparando los valores obtenidos mediante la medición del nivel de expresión del biomarcador, donde valores mayores de 5 revelan un mal pronóstico y valores menores de 5 revelan un buen pronóstico. En particular, un paciente puede evaluarse comparando los valores obtenidos mediante la medición del nivel de expresión del biomarcador y comparando los valores en una escala, donde valores por encima del intervalo de 4-6 indican un mal pronóstico y valores por debajo del intervalo de 4-6 indican un buen pronóstico, indicando los valores que se encuentran dentro del intervalo de 4-6 una predicción (o pronóstico) intermedia.
- En particular, se determinan los niveles de expresión de 2 biomarcadores en la muestra. En particular, se determinan los niveles de expresión de CFB y SAA2 en la muestra.

En particular, una puntuación que es una combinación de los niveles de expresión de los diferentes biomarcadores se determina y compara con el valor de referencia predeterminado, en donde una diferencia entre dicha puntuación y dicho valor de referencia predeterminado es indicativa de si el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo o corto.

En particular, el método dado a conocer en el presente documento comprende el uso de un algoritmo de clasificación normalmente seleccionado de análisis discriminante lineal (LDA), análisis de datos topológicos (TDA), redes neurales, algoritmo de máquina de vectores de soporte (SVM) y el algoritmo de bosques aleatorios (RF) tal como se describe en el ejemplo. En particular, el método dado a conocer en el presente documento comprende la etapa de determinar la respuesta del paciente usando un algoritmo de clasificación. Tal como se usa en el presente documento, el término "algoritmo de clasificación" tiene su significado general en la técnica y se refiere a clasificación multivariable y métodos de árboles de regresión y clasificación bien conocidos en la técnica tal como se describe en los documentos US 8.126.690; WO2008/156617. Tal como se usa en el presente documento, el término "máquina de vectores de soporte (SVM)" es una máquina de aprendizaje universal útil para el reconocimiento de patrones, cuya superficie de decisión está parametrizada por un conjunto de vectores de soporte y un conjunto de pesos correspondientes, y se refiere a un método de procesamiento no por separado, sino procesamiento simultáneo, de una pluralidad de variables. Por tanto, la máquina de vectores de soporte es útil como herramienta estadística para la clasificación. La máquina de vectores de soporte mapea de manera no lineal su espacio de entrada n-dimensional en un espacio de características dimensionales altas, y presenta una interfaz óptima (plano de división óptimo) entre las características. La máquina de vectores de soporte comprende dos fases: una fase de entrenamiento y una fase de pruebas. En la fase de entrenamiento, se producen los vectores de soporte, mientras que la estimación se realiza según una regla específica en la fase de pruebas. En general, las SVM proporcionan un modelo para su uso en la clasificación de cada uno de n pacientes en dos o más categorías de enfermedad basándose en un vector k-dimensional (denominado k-tupla) de mediciones de biomarcador por sujeto. Una SVM transforma en primer lugar las k-tuplas usando una función de núcleo en un espacio de la misma dimensión o superior. La función de núcleo proyecta los datos en un espacio donde las categorías pueden separarse mejor usando hiperplanos de lo que sería posible en el espacio de datos original. Para determinar los hiperplanos con los cuales discriminar entre categorías, puede elegirse un conjunto de vectores de soporte, que se encuentran más cerca del límite entre las categorías de enfermedad. Luego se selecciona un hiperplano mediante técnicas de SVM conocidas, de manera que la distancia entre los vectores de soporte y el hiperplano es máxima dentro de los límites de una función de coste que penaliza predicciones incorrectas. Este hiperplano es el que separa de manera óptima los datos en términos de predicción (Vapnik, 1998 Statistical Learning Theory. Nueva York: Wiley). Luego se clasifica cualquier observación nueva como perteneciente a una cualquiera de las categorías de interés, basándose en donde la observación se encuentra en relación con el hiperplano. Cuando se consideran más de dos categorías, el procedimiento se lleva a cabo por pares para todas las categorías y se combinan esos resultados para crear una regla para discriminar entre todas las categorías. Tal como se usa en el presente documento, el término "algoritmo de bosques aleatorios" o "RF" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un algoritmo de clasificación tal como se describe en los documentos US 8.126.690; WO2008/156617. El bosque aleatorio es un

clasificador basado en árboles de decisión que se construye usando un algoritmo originalmente desarrollado por Leo Breiman (Breiman L, "Random forests", Machine Learning 2001, 45:5-32). El clasificador usa un gran número de árboles de decisión individuales y decide la clase eligiendo el modo de las clases según determinan los árboles individuales. Los árboles individuales se construyen usando el siguiente algoritmo: (1) suponer que el número de casos en el conjunto de entrenamiento es N y que el número de variables en el clasificador es M; (2) seleccionar el número de variables de entrada que se usarán para determinar la decisión en un nodo del árbol; este número, m, debe ser mucho menor que M; (3) elegir un conjunto de entrenamiento eligiendo N muestras a partir del conjunto de entrenamiento con reemplazo; (4) para cada nodo del árbol, seleccionar aleatoriamente m de las M variables en las que se basará la decisión en ese nodo; (5) calcular la mejor división basándose en estas m variables en el conjunto de entrenamiento. En particular, la puntuación se genera mediante un programa informático.

En particular, el método dado a conocer en el presente documento comprende a) cuantificar el nivel de una pluralidad de biomarcadores en la muestra; b) implementar un algoritmo de clasificación en los datos que comprenden la pluralidad de biomarcadores cuantificados para obtener una salida de algoritmo; c) determinar el pronóstico a partir de la salida de algoritmo de etapa b).

El algoritmo dado a conocer en el presente documento puede realizarse mediante uno o más procesadores programables que ejecutan uno o más programas informáticos para realizar funciones operando en datos de entrada y generando una salida. El algoritmo también puede realizarse por, y el aparato también puede implementarse como, circuitos lógicos de propósito especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de puertas lógicas programable en campo) o un ASIC (circuito integrado de aplicación específica). Los procesadores adecuados para la ejecución de un programa informático incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores de propósito tanto general como especial, y uno cualquiera o más procesadores de cualquier clase de ordenador digital. Generalmente, un procesador recibirá instrucciones y datos desde una memoria de sólo lectura o una memoria de acceso aleatorio, o ambas. Los elementos esenciales de un ordenador son un procesador para llevar a cabo instrucciones y uno o más dispositivos de memoria para almacenar instrucciones y datos. Generalmente, un ordenador también incluirá, o estará acoplado operativamente para recibir datos de o transferir datos a, o ambos, uno o más dispositivos de almacenamiento masivo para almacenar datos, por ejemplo, discos magnéticos, discos magnetoópticos o discos ópticos. Sin embargo, un ordenador no necesita disponer de tales dispositivos. Además, un ordenador puede incorporarse en otro dispositivo. Los medios legibles por ordenador adecuados para almacenar datos e instrucciones de programa informático incluyen todas las formas de memoria no volátil, medios y dispositivos de memoria, incluyendo a modo de ejemplo dispositivos de memoria de semiconductor, por ejemplo, EPROM, EEPROM y dispositivos de memoria flash; discos magnéticos, por ejemplo, discos duros internos o discos extraíbles; discos magnetoópticos; y discos CD-ROM y DVD-ROM. El procesador y la memoria pueden complementarse mediante, o incorporarse en, circuitos lógicos de propósito especial. Para proporcionar interacción con un usuario, los métodos dados a conocer en el presente documento pueden implementarse en un ordenador que dispone de un dispositivo de visualización, por ejemplo, en ejemplos no limitativos, un monitor CRT (tubo de rayos catódicos) o LCD (pantalla de cristal líquido), para presentar la información al usuario, y un teclado y un dispositivo de puntero, por ejemplo, un ratón o una bola de seguimiento, mediante el cual el usuario puede proporcionar entrada al ordenador. También pueden usarse otras clases de dispositivos para proporcionar interacción con un usuario; por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de retroalimentación sensorial, por ejemplo, retroalimentación visual, retroalimentación auditiva o retroalimentación táctil; y la entrada a partir del usuario puede recibirse en cualquier forma, incluyendo entrada acústica, de voz o táctil. Por consiguiente, en particular, el algoritmo puede implementarse en un sistema informático que incluye un componente de lado de servidor, por ejemplo, como un servidor de datos, o que incluye un componente de soporte intermedio, por ejemplo, un servidor de aplicación, o que incluye un componente de lado de usuario, por ejemplo, un ordenador de cliente que tiene una interfaz gráfica de usuario o un navegador de la Web a través del cual un usuario puede interactuar con una implementación dada a conocer en el presente documento, o cualquier combinación de uno o más de tales componentes de lado de servidor, soporte intermedio o lado de usuario. Los componentes del sistema pueden estar interconectados mediante cualquier forma o medio de comunicación de datos digitales, por ejemplo, una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN") y una red de área amplia ("WAN"), por ejemplo, Internet. El sistema informático puede incluir clientes y servidores. Un cliente y un servidor están generalmente en remoto uno con respecto al otro y normalmente interactúan a través de una red de comunicación. La relación de cliente y servidor surge en virtud de programas informáticos que se ejecutan en los respectivos ordenadores y que tienen una relación cliente-servidor entre sí.

En particular, en vista de las opciones limitadas actualmente para el tratamiento del RCC, el grupo de biomarcadores tal como se da a conocer en el presente documento es útil para identificar pacientes con un mal pronóstico, en particular pacientes con RCC localizados que es probable que experimenten recidiva y metástasis. Por consiguiente, puede administrarse terapia a un sujeto identificado con un mal pronóstico, por ejemplo, terapia sistemática. En particular, el método dado a conocer en el presente documento puede usarse para identificar pacientes que necesitan un seguimiento frecuente por parte de un médico o clínico para monitorizar la progresión de la enfermedad de RCC. El cribado de pacientes para identificar pacientes que presentan un mal pronóstico usando el grupo de biomarcadores tal como se da a conocer en el presente documento también es útil para

identificar pacientes más adecuados o susceptibles para su inscripción en un ensayo clínico para evaluar una terapia para el RCC, lo que permitirá análisis de subgrupos y estudios de seguimiento más eficaces. Además, la expresión del grupo de biomarcadores tal como se da a conocer en el presente documento puede monitorizarse en pacientes inscritos en un ensayo clínico para proporcionar una medida cuantitativa para la eficacia terapéutica de la terapia objeto del ensayo clínico.

Esta divulgación también proporciona un método para seleccionar un régimen terapéutico o determinar si un determinado régimen terapéutico es más apropiado para un paciente que se ha identificado que tiene un mal pronóstico tal como se identifica mediante los métodos tal como se dan a conocer en el presente documento. Por ejemplo, puede examinarse con antelación un régimen terapéutico antineoplásico agresivo en el que un paciente presenta un mal pronóstico, donde se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antineoplásico al paciente para tratar el RCC. En particular, puede monitorizarse el RCC de un paciente usando los métodos y los biomarcadores tal como se dan a conocer en el presente documento, y si en una primera prueba (es decir, inicial) se identifica que el paciente tiene un mal pronóstico, puede administrarse una terapia antineoplásica al paciente, y en una segunda prueba (es decir, prueba de seguimiento) se identifica que el paciente tiene un buen pronóstico, puede administrarse una terapia antineoplásica a una dosis de mantenimiento al paciente. El método dado a conocer en el presente documento es particularmente adecuado para determinar qué pacientes responderán o experimentarán un resultado de tratamiento positivo a un tratamiento.

En general, una terapia se considera para "tratar" el RCC si proporciona uno o más de los siguientes resultados de tratamiento: reducir o retrasar la recidiva del RCC después de la terapia inicial; aumentar la mediana del tiempo de supervivencia; o disminuir las metástasis. En particular, una terapia antineoplásica es, por ejemplo, pero sin limitarse a, la administración de un agente quimioterápico, radioterapia, etc. Tales terapias antineoplásicas se dan a conocer en el presente documento, así como otras que son bien conocidas por los expertos habituales en la técnica y están abarcadas para su uso en la presente divulgación. El término "agente antineoplásico" o "fármaco antineoplásico" es cualquier agente, compuesto o entidad que podría afectar negativamente al cáncer en el paciente, por ejemplo, destruyendo las células cancerosas, induciendo apoptosis en las células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo el número de células metastásicas, reduciendo el tamaño tumoral, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo el riesgo sanguíneo a un tumor o a las células cancerosas, fomentando una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión del cáncer o aumentando la esperanza de vida del paciente con cáncer. La terapia antineoplásica incluye agentes biológicos (bioterapia), agentes quimioterápicos y agentes radioterápicos. En particular, la terapia antineoplásica incluye un régimen quimioterápico que comprende además radioterapia. En particular, el tratamiento antineoplásico comprende la administración de un fármaco quimioterápico, solo o en combinación con resección quirúrgica del tumor. En particular, el tratamiento comprende radioterapia y/o resección quirúrgica de las masas tumorales.

El término "agente quimioterápico" o "agente de quimioterapia" se usan indistintamente en el presente documento y se refiere a un agente que puede usarse en el tratamiento de cánceres y neoplasias. En particular, un agente quimioterápico puede estar en forma de un profármaco que puede activarse a una forma citotóxica. Los agentes quimioterápicos se conocen habitualmente por expertos habituales en la técnica y se abarcan para su uso en la presente divulgación. Por ejemplo, los fármacos quimioterápicos para el tratamiento de tumores incluyen, pero no se limitan a: temozolomida (Temodar), procarbazona (Matulane) y lomustina (CCNU). La quimioterapia administrada por vía intravenosa (i.v., mediante una aguja insertada en una vena) incluye vincristina (Oncovin o Vincasar PFS), cisplatino (Platinol), carmustina (BCNU, BiCNU) y carboplatino (Paraplatin), metotrexato (Rheumatrex o Trexall), irinotecán (CPT-11); erlotinib; oxaliplatino; antraciclinas-idarrubicina y daunorubicina; doxorubicina; agentes alquilantes tales como melfalán y clorambucilo; cis-platino, metotrexato y alcaloides tales como vindesina y vinblastina.

En particular, se administran agentes anti-VEGF a los pacientes. Tal como se usa en el presente documento, el término "agente anti-VEGF" se refiere a cualquier compuesto o agente que produce un efecto directo sobre las rutas de señalización que fomentan el crecimiento, la proliferación y la supervivencia de una célula mediante la inhibición de la función de la proteína VEGF, incluyendo la inhibición de la función de proteínas receptoras de VEGF. El término "agente" o "compuesto", tal como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula orgánica o inorgánica, incluyendo ácidos nucleicos modificados y no modificados tales como ácidos nucleicos antisentido, agentes de iARN tales como ARNip o ARNhc, péptidos, peptidomiméticos, receptores, ligandos y anticuerpos. Los inhibidores de VEGF preferidos incluyen, por ejemplo, AVASTIN® (bevacizumab), un anticuerpo monoclonal anti-VEGF de Genentech, Inc., de South San Francisco, Calif., VEGF Trap (Regeneron/Aventis). Los inhibidores de VEGF adicionales incluyen CP-547,632 (clorhidrato de amida de ácido 3-(4-bromo-2,6-difluoro-benciloxi)-5-[3-(4-pirrolidin-1-il-butyl)-ureido]-isotiazol-4-carboxílico; Pfizer Inc., NY), AG13736, AG28262 (Pfizer Inc.), SU5416, SU11248 y SU6668 (anteriormente Sugen Inc., ahora Pfizer, Nueva York, N.Y.), ZD-6474 (AstraZeneca), ZD4190 que inhibe VEGF-R2 y VEGF-R1 (AstraZeneca), CEP-7055 (Cephalon Inc., Frazer, Pa.), PKC 412 (Novartis), AEE788 (Novartis), AZD-2171, NEXAVAR® (BAY 43-9006, sorafenib; Bayer Pharmaceuticals y Onyx Pharmaceuticals), vatalanib (también conocido como PTK-787, ZK-222584; Novartis & Schering AG), MACUGEN® (pegaptanib octasódico, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech), IM862 (glufanida disódica, Cytran Inc., de Kirkland, Wash., EE. UU.), anticuerpo

monoclonal selectivo de VEGFR2 DC101 (ImClone Systems, Inc.), angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme (Boulder, Colo.) y Chiron (Emeryville, Calif.), Sirna-027 (un inhibidor de VEGFR1 basado en ARNip, Sirna Therapeutics, San Francisco, Calif.), caplostatina, ectodominios solubles de los receptores de VEGF, Neovastat (AEterna Zentaris Inc.; Quebec City, Calif.), y combinaciones de los mismos. En particular, el agente anti-VEGF es sunitinib (comercializado como Sutent por Pfizer y previamente conocido como SU11248) que es un inhibidor de tirosina cinasa receptora (RTK) oral, de molécula pequeña y dirigido a múltiples dianas que fue aprobado por la FDA para el tratamiento de carcinoma de células renales (RCC).

Los compuestos usados junto con los métodos de tratamiento dados a conocer en el presente documento se administran y dosifican según la buena práctica médica, teniendo en cuenta la afección clínica del sujeto individual, el sitio y el método de administración, la programación de la administración, la edad, el sexo y el peso corporal del paciente y otros factores conocidos por los profesionales médicos. Por tanto, la "cantidad farmacéuticamente eficaz" para los fines en el presente documento se determina mediante consideraciones tal como se conocen en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para lograr una mejora incluyendo, pero sin limitarse a, una tasa de supervivencia mejorada o una recuperación más rápida, o la mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas por los expertos en la técnica. De nuevo, las reivindicaciones no se refieren ni a métodos de tratamiento ni a compuestos para su uso en un tratamiento como tal, sino más bien a la selección y monitorización de terapias.

La divulgación también proporciona kits diagnósticos y experimentales (no reivindicados) que incluyen anticuerpos para determinar el nivel de expresión de proteína codificado por al menos 2 o al menos 3 biomarcadores tal como se da a conocer en el presente documento, con el fin de determinar el pronóstico del paciente que padece cáncer. En tales kits, los anticuerpos pueden dotarse de un medio para unirse a superficies de sustrato o restos marcadores detectables. Alternativamente, los kits pueden incluir los anticuerpos ya unidos a sustratos o restos marcadores. Los kits pueden incluir además muestras biológicas de referencia, así como reactivos de control positivo y/o negativo, así como otros reactivos para adaptar el uso de los anticuerpos a las técnicas experimentales y/o diagnósticas particulares según se desee. Los kits pueden prepararse para su uso in vivo o in vitro, y pueden adaptarse particularmente para la realización de cualquiera de los métodos dados a conocer en el presente documento, tal como ELISA. Por ejemplo, pueden fabricarse kits que contienen el anticuerpo unido a placas de microtitulación de múltiples pocillos.

La divulgación se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la presente divulgación.

Figuras

Figura 1. Expresión de interleucina-34 (IL34) en muestras de ratón y ser humano. (A) La expresión de IL34 aumenta en líneas celulares de ratón haciéndose cada vez más agresivas mediante pases in vivo. (B) Secreción de proteína IL34 en medio acondicionado de líneas celulares del pase 6 (riñón, pulmón y cola). (C-D) La expresión de IL34 alta frente a baja predice la supervivencia global (C) y libre de progresión (D) en la cohorte de pacientes con ccRCC de TCGA. (E-G) En muestras tisulares de pacientes de UroCCR, el ARN de IL34 se sobreexpresa en riñón con tumor frente a sano (e), aumenta con el grado de Fuhrman grade (F) y se correlaciona con una supervivencia global del paciente reducida. (H-I) La puntuación de tinción de IL34 se correlaciona con el grado de Fuhrman (i) y es predictiva de la supervivencia libre de progresión (j).

Figura 2. Deleción de IL34 mediante Crispr-Cas9 y respuesta al tratamiento con Sutent. (A) La deleción de IL34 a través de tres constructos de Crispr-Cas9 diferentes (CrisprIL34-1a, 1b, 1c) en células RENCA inhibe fuertemente la formación de tumores primarios frente al control (Crispr-LacZ), lo que conduce a un peso tumoral reducido. (B-C) La deleción de IL34 a través de tres constructos de Crispr-Cas9 diferentes en células RENCA inhibe fuertemente la formación de metástasis experimental (inyección en la vena de la cola, b). Las metástasis representan un % reducido del área tisular pulmonar (B) y presentan números reducidos de células MMR+ (macrófagos de tipo 2, C). (D) Los niveles plasmáticos de IL34 aumentan considerablemente en un subconjunto de pacientes a los que se les administra terapia con Sutent de primer ciclo para las metástasis. (E) En un modelo de xenoinjerto de ratón, los tumores subcutáneos de ratones tratados con Sutent (sunitinib) frente a control de vehículo (CT) mostraron niveles aumentados de ARN de IL34. Los cebadores de qPCR específicos de especie muestran una regulación por incremento en los compartimentos tanto de ser humano (célula tumoral) como de ratón (célula estromal) (E-F).

Figura 3. Expresión de proteína amiloide A2 sérica (SAA2) en muestras de RCC de ratón y ser humano. (A) La expresión de ARNm de SAA2 está regulada por incremento con el pase en líneas celulares de pulmón (datos transcriptómicos). (B-C) La expresión de SAA2 alta frente a baja predice la supervivencia global (B) y libre de progresión (C) en la cohorte con ccRCC de TCGA. (D-E) El ARNm de SAA2 presenta una alta expresión tanto en riñón sano como en tejido tumoral (D); sin embargo, la expresión en muestras tumorales aumenta con el grado (E) en muestras tisulares de pacientes de UroCCR. (F-G) La expresión de ARNm es predictiva de una supervivencia global (F) y libre de progresión (G) acortadas en la cohorte de pacientes de UroCCR.

Figura 4. Proteína amiloide A2 sérica (SAA2) en muestras de plasma/suero de pacientes. (A-C) Pacientes de UroCCR, plasma recogido de 47 pacientes antes de la resección quirúrgica del tumor primario. Se aumenta el nivel plasmático medio de SAA2 en pacientes con metástasis concomitantes (M1) o pacientes sin metástasis que las desarrollan posteriormente (pacientes con progresión de la enfermedad M0) frente a pacientes sin metástasis que no progresan durante el seguimiento (pacientes sin progresión de la enfermedad M0). Un mayor nivel plasmático predice una supervivencia libre de progresión (B) y global (C) acortadas. (D-F) SUVEGIL, 11 pacientes, después de la resección quirúrgica del tumor primario. Muestras de suero recogidas en el momento de diagnóstico con metástasis y después de un ciclo de tratamiento con Sutent. Los pacientes que no mostraron progresión después del tratamiento tendían a mostrar una disminución del nivel de SAA2 después del tratamiento (D), mientras que los pacientes cuyas metástasis progresaron (pacientes que no responden al tratamiento) mostraron niveles aumentados (E, F).

Figura 5. Expresión de factor del complemento B (CFb) en muestras de RCC de ratón y ser humano. (A) La expresión de ARNm de CFb está regulada por incremento con el pase en líneas celulares de pulmón y cola (datos de qPCR). (B) Se aumenta la expresión de ARNm de CFb en células RENCA aisladas de metástasis frente a sus tumores primarios de origen (muestras emparejadas). (C, D) La expresión de CFb alta frente a baja predice la supervivencia global (C) y libre de progresión (D) en la cohorte con ccRCC de TCGA. (E-G) El ARNm de CFb se sobreexpresa en muestras tisulares de UroCCR tumorales frente a sanas y predice una supervivencia global (F) y libre de progresión (G) acortadas.

Figura 6. Factor del complemento B (CFb) en muestras de plasma/suero de pacientes. (A) Pacientes de UroCCR, plasma recogido de 47 pacientes antes de la resección quirúrgica del tumor primario. Se aumenta el nivel plasmático medio de CFb en pacientes con metástasis concomitantes (M1) o pacientes sin metástasis que progresan posteriormente (pacientes con progresión de la enfermedad M0) frente a pacientes sin metástasis que no progresan durante el seguimiento (pacientes sin progresión de la enfermedad M0). (B) Pacientes de UroCCR, plasma recogido de N=20 pacientes aproximadamente 1 mes después de la cirugía para la extirpación del tumor primario. De nuevo, el nivel plasmático de CFb es mayor en pacientes con metástasis (M1) frente a aquellos sin ellas (M0). (C) SUVEGIL, 11 pacientes, después de la resección quirúrgica del tumor primario. Muestras de suero recogidas en el momento de diagnóstico con metástasis y después de un ciclo de tratamiento con Sutent. Los pacientes cuyo nivel sérico de CFb aumentó después del tratamiento presentaron una progresión más rápida que aquellos cuyo nivel disminuyó. (D) SUVEGIL, 11 pacientes, divididos en tres grupos según el aumento/la disminución tanto en SAA2 como en CFb como análisis combinatorio. Los pacientes con disminución de una de las proteínas muestran el mejor resultado y los pacientes con un aumento de ambas muestran el peor resultado.

Figura 7. Expresión de proteína similar a podocano 1 (Podnl1) en muestras de RCC de ratón y ser humano. (A, B) La expresión de ARNm de Podnl1 está regulada por incremento con el pase en líneas celulares de riñón (microalineamiento, datos de qPCR). (C) La expresión de ARNm de Podnl1 se aumenta en células RENCA aisladas de tumores primarios frente al cultivo in vitro, pero no se aumenta adicionalmente en células tumorales metastásicas (muestras emparejadas). (D, E) La expresión de Podnl1 alta frente a baja predice la supervivencia global (D) y libre de progresión (E) en la cohorte con ccRCC de TCGA. (F, G) El ARNm de Podnl1 se sobreexpresa en muestras tisulares de UroCCR tumorales frente a sanas y predice una supervivencia global (F) y libre de progresión (G) acortadas.

Figura 8. Relevancia clínica de SAA2 y CFB después del tratamiento antiangiogénico (cohortes SUVEGIL-TORAVA). (A y B) Correlación entre los niveles plasmáticos de SAA2 en el momento de diagnóstico y la supervivencia (OS y PFS) en pacientes después del tratamiento con sunitinib (nivel plasmático en el momento de diagnóstico menor o mayor que un corte para SAA2 (269 µg/ml) [OS: HR(rango logarítmico)=5,557; PFS: HR(rango logarítmico)=7,669]. (C) Correlación entre los niveles plasmáticos de SAA2 en el momento de diagnóstico y la PFS en pacientes después del tratamiento con sunitinib o bevacizumab (nivel plasmático en el momento de diagnóstico menor o mayor que un corte del tercer cuartil para SAA2 (269 µg/ml; HR(rango logarítmico)=1,987). (D) Correlación entre los niveles plasmáticos de CFB en el momento de diagnóstico y la PFS en pacientes después del tratamiento con sunitinib o bevacizumab (nivel plasmático en el momento de diagnóstico menor o mayor que un corte del tercer cuartil para CFB (310 µg/ml; HR(rango logarítmico)=3,113). (E y F) PFS (E) y OS (F) de pacientes tratados o bien con sunitinib o bien con bevacizumab y estratificados según los niveles plasmáticos tanto de SAA2 como de CFB. Se identificaron tres subgrupos: i) CFB bajo y SAA2 baja, ii) CFB bajo y SAA2 alta o CFB alto y SAA2 baja, iii) CFB alto y SAA2 alta (bajo-baja frente a alto-alta; OS: HR(rango logarítmico)=5,086; PFS: HR(rango logarítmico)=4,196).

Ejemplo

Métodos

Ratones y líneas celulares

Se adquirieron ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad de Charles River Laboratories. Se alojaron los

ratones en la instalación para animales de la Universidad de Burdeos (Animalerie Mutualisée Bordeaux, Francia). Se mantuvieron la línea celular de cáncer renal murino Renca que expresa GFP (RENCA-GFP) y las sublíneas celulares generadas (riñón, cola, pulmón) en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % y se incubaron a 37 °C, el 5 % de CO₂ en una incubadora. Se generaron las líneas celulares Crispr-Cas9_IL34 y CrisprCas9_LacZ usando protocolos convencionales.

Modelos de metástasis experimental y subcapsulares ortotópicos de ratón (inyección en la vena de la cola).

Se implantaron tumores mediante inyecciones subcapsulares de 1×10^5 células RENCA-GFP en el riñón izquierdo de ratones BALB/c de tipo natural. Para las inyecciones intravenosas, se inyectaron 5×10^5 células RENCA-GFP en la vena caudal de ratones BALB/c de tipo natural. Cuando se alcanzaron los criterios de valoración definidos mediante los protocolos aprobados, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tejidos tumorales y los pulmones. Para la inmunohistoquímica, se fijaron los tejidos en paraformaldehído al 4 % (PFA al 4 %, Santa Cruz Biotechnology, sc-281692) durante 2 horas y luego se incubaron durante 72 horas en sacarosa al 30 %. Se congelaron los tejidos en compuesto OCT (compuesto Tissue-Tek OCT, Sakura, 4583). Antes de la incrustación, se inflaron los pulmones con 1 ml de OCT diluido (dilución 1:1 de PBS/OCT). Se conservaron los tejidos congelados a -80 °C. Para el análisis de proteína, ADN y ARN, se ultracongelaron los tejidos en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C.

Disociación de tejidos y purificación de células tumorales

Para la purificación de células tumorales, se cortaron los tejidos en trozos pequeños con un bisturí y se digirieron con colagenasa I y colagenasa II (Liberase TL, Roche, 05401020001) durante 1 hora a 37 °C. Para mejorar adicionalmente la disociación, se filtraron los tejidos digeridos en filtros celulares (100 µm, 70 µm y 40 µm) y se sembraron en medio completo y se incubaron a 37 °C, el 5 % de CO₂. Se comprobaron los cultivos celulares diariamente y se sometieron a pases según fuese necesario. El sobrecrecimiento de células tumorales y la muerte de células primarias dieron como resultado cultivos de células tumorales solamente, verificado mediante visualización de GFP usando microscopía de fluorescencia. Cuando no pudieron observarse visualmente células negativas para GFP, los cultivos celulares se consideraron suficientemente puros. Se recogieron las células RENCA-GFP para su análisis o se reimplantaron en los ratones para un pase in vivo adicional. En algunos casos, se cultivaron las células en medio libre de suero durante 24 h para generar medio acondicionado.

Se realizaron experimentos de xenoinjerto de ratón con células de RCC humano 786-0 inyectadas por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes y tratados con sunitinib (40 mg/kg) según los protocolos publicados (Dufies et al, Cancer Res, marzo de 2017 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3088).

Análisis de la expresión génica

Se extrajo el ARN total usando el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, n.º 74134), según las instrucciones del fabricante. Se usó la matriz genómica completa de ratón de Agilent para el análisis transcriptómico.

Análisis por PCR cuantitativa (qPCR): se sometió a transcripción inversa 1 µg de ARN total para dar ADN complementario (ADNc) usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, 4368814). Se amplificó el ADNc resultante usando cebadores específicos para los genes de interés. Se usó HPRT como control interno.

Se realizaron ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) según las instrucciones del fabricante en medio acondicionado o muestras de plasma o suero de ser humano.

Muestras de pacientes

Banco tisular UroCCR.

Los datos clínicos y las muestras biológicas (muestras de tejido, plasma y orina congeladas/incrustadas en parafina) se obtuvieron de la red de investigación francesa sobre cáncer de riñón www.uroCCR.fr financiada por INCa y ubicada en Burdeos. Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT03293563. Estas muestras se denominan cohorte UroCCR. Las muestras tisulares se obtuvieron de pacientes el día de la cirugía para la extirpación del tumor primario. Las muestras de plasma y orina se obtuvieron o bien el día de la cirugía para el tumor primario o bien en el punto de tiempo aproximadamente un mes después de la cirugía.

Muestras de suero de SUVEGIL.

Muestras de suero del ensayo clínico SUVEGIL (malato de sunitinib en el tratamiento de pacientes con cáncer de riñón, identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00943839). Los pacientes reciben malato de sunitinib oral una vez al día los días 1-28. Los tratamientos se repiten cada 6 semanas en ausencia de progresión de la enfermedad o

toxicidad inaceptable. Las muestras de sangre se recogen al inicio y luego cada 6 semanas para el análisis farmacocinético. En este caso, las muestras sometidas a prueba se obtuvieron en el momento de diagnóstico de metástasis y después del primer ciclo de tratamiento.

5 Inmunoquímica e inmunofluorescencia

Tejidos de ratón: para tejidos de ratón congelados obtenidos de experimentos usando las líneas celulares CrisprCas9_IL34 y CrisprCas9_LacZ, se realizaron cortes de 10 µm con un criostato (Leica CM1900). Para la inmunofluorescencia de tejido congelado, se incubaron los cortes durante 1 hora con un tampón de bloqueo (BSA al 5 % en PBS). Se incubaron los portaobjetos durante la noche con anticuerpo primario (MMR: R&D Systems, AF2535; GFP: Torrey Pines Biolabs, TP401 => tabla) y luego con anticuerpo fluorescente secundario (REFERENCIA => tabla) y DAPI (Roche, 10236276001). Se obtuvieron imágenes usando un escáner de portaobjetos (Hamamatsu, Nanozoomer 2.0HT) y se procesaron usando el software NDP.scan (Hamamatsu). Se usó análisis de imágenes usando el software Fiji (Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. y Frise, E. et al. (2012) Nature methods 9(7): 676-682) para calcular el área de tejido tumoral como porcentaje de área de corte de tejido total (%) basándose en la tinción con GFP. Se calculó la densidad de macrófagos de tipo 2 en tejido tumoral contando el número de células positivas para MMR/área de píxeles usando el módulo "Cell Counter" (Kurt de Vos). Las áreas/recuentos celulares medios se expresan normalizados con respecto a los obtenidos a partir de tumores de control.

Tejidos de ser humano: para los tejidos paraafinizados, se prepararon cortes con un micrótopo. Para los cortes tisulares en parafina, se desparafinizaron, rehidrataron y calentaron los portaobjetos en disolución de recuperación de antígeno pH 6 (tampón citrato de sodio HIER, pH 6; citrato de sodio 10 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 6,0). Para bloquear la actividad peroxidasa endógena, se trataron los portaobjetos con peróxido de hidrógeno al 0,3 %. Después de 1 hora de bloqueo en BSA al 5 % en PBS, se incubaron los portaobjetos durante la noche con anticuerpo primario (véase la tabla) y luego se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado durante 1 h (véase la tabla). Los anticuerpos secundarios se conjugaron con HRP usando la técnica "ABC" (Vectastain PK-6100) y luego se revelaron con un kit de sustrato de peroxidasa (DAB, Vector Laboratories, SK-4100).

Análisis in silico

Se obtuvieron datos transcripcionales y clínicos de pacientes a partir del Atlas de Genoma Humano a través del sitio web de BioPortal, usando la base de datos de carcinoma de células renales de riñón (KIRC). Se realizaron gráficos de Kaplan-Meier que representan la supervivencia global (OS) y la supervivencia libre de progresión (PFS) y todos los análisis estadísticos usando el software GraphPad Prism. Para los análisis de Kaplan-Meier, cuando no se indica el número de pacientes por grupo alto/bajo, el punto de corte es el valor de la mediana.

Resultados:

Los resultados se representan en las figuras 1-7.

Las figuras 1A a 1I muestran la expresión de interleucina-34 (IL34) en muestras de ratón y ser humano. Las figuras 2A a 2F muestran la delección de IL34 mediante Crispr-Cas9 y la respuesta al tratamiento con Sutent. Las figuras 3A a 3G muestran la expresión de proteína amiloide A2 sérica (SAA2) en muestras de RCC de ratón y ser humano. Las figuras 4A a 4F muestran la proteína amiloide A2 sérica (SAA2) en muestras de plasma/suero de pacientes. Las figuras 5A a 5G muestran la expresión de factor del complemento B (CFb) en muestras de RCC de ratón y ser humano. Las figuras 6A a 6D muestran el factor del complemento B (CFb) en muestras de plasma/suero de pacientes. Las figuras 7A a 7G muestran la expresión de proteína similar a podocano 1 (Podn1) en muestras de RCC de ratón y ser humano.

Proteína amiloide A2 sérica (SAA2)

SAA2 es una proteína de fase aguda relacionada con SAA1, que se vinculó previamente con la metástasis. Su expresión estaba regulada por incremento fuertemente con el pase en las líneas celulares de pulmón (datos no mostrados). El análisis in silico de SAA2 de la base de datos KIRC de TCGA fue un factor pronóstico muy potente de OS (figura 3B) y DFS (figura 3C). Además, el análisis también se realizó para los subgrupos M0 y M1 (figura 3E). El análisis de la cohorte de pacientes de UroCCR confirmó el efecto sobre OS y DFS (figura 3G). Los tumores de pacientes con el grado de Fuhrman más alto tenían una expresión de SAA2 significativamente aumentada en comparación con todos los demás grados (datos no mostrados). Se usaron muestras de plasma de grado coincidente a partir de pacientes con y sin metástasis, recogidas antes de la cirugía del tumor primario (datos no mostrados). Los pacientes con metástasis tenían mayores niveles plasmáticos de SAA2. Cuando los pacientes se dividieron en dos grupos de tamaño equivalente, el grupo con mayores niveles de SAA2 tuvo una DFS significativamente más corta (figura 8l complementaria). Un segundo conjunto de muestras de plasma, recogidas en las semanas tras la cirugía para la extirpación del tumor primario, se sometió a prueba para determinar SAA2 (figura 8m complementaria). En este caso, los pacientes con mayor expresión tenían una OS

más corta. Por tanto, los niveles de SAA2 circulante aparecen como un indicador de la progresión metastásica que merece ser evaluada en el momento de diagnóstico. A continuación se usaron muestras de plasma de pacientes con metástasis antes de recibir un primer ciclo de sunitinib o bevacizumab (ensayos clínicos SUVEGIL y TORAVA). Los pacientes tratados únicamente con sunitinib y estratificados según niveles bajos y altos de SAA2 tuvieron OS y supervivencia libre de progresión (PFS) espectacularmente mejores cuando pertenecen al grupo de SAA2 baja (corte de 269 µg/ml) (figuras 8A y 8B). Cuando se analizaron conjuntamente los pacientes tratados con sunitinib y bevacizumab, la PFS tenía una significación limitada (valor de p límite de 0,0507) (figura 8C). La mediana de PFS para pacientes con SAA2 alta fue de 5,35 meses frente a 16,17 meses para el de SAA2 baja. Por tanto, determinar los niveles plasmáticos de SAA2 podría ser una medida útil para decidir una estrategia de tratamiento en RCC.

Factor del complemento B (CFB)

CFB estaba regulado por incremento más fuertemente en el grupo de "pulmón" y en menor medida en el grupo de "cola", considerándose ambos como que recapitulan las características de la metástasis (datos no mostrados). El análisis de TCGA en ccRCC demostró que la expresión de CFB se correlaciona en tumores primarios con DFS y OS acortadas (figura 5D). También se realizó el análisis en los subgrupos M0 y M1 (datos no mostrados). Usando muestras y datos de la cohorte de UroCCR, se demostró que CFB se sobreexpresaba en el tejido tumoral frente al riñón adyacente a nivel de ARNm (figura 5E) y que una expresión aumentada se correlacionaba con DFS y OS reducidas, compatible con los resultados obtenidos con la cohorte de TCGA (figuras 5F y 5G). En cuanto a SAA2, CFB puede medirse en la sangre. Para este propósito, se usaron muestras de plasma de UroCCR recogidas de pacientes o bien antes de la cirugía (tumor primario intacto) o bien en las siguientes semanas después de la cirugía (sin tumor primario presente, pero es posible metástasis in situ). Antes de la cirugía, se observó una tendencia sin alcanzar significación, mientras que, después de la cirugía, los pacientes con metástasis tenían mayores niveles plasmáticos de CFB en comparación con los pacientes sin metástasis (datos no mostrados). Esto sugiere que la medición de CFB circulante puede ser útil como marcador de origen sanguíneo de la metástasis en el seguimiento después de la extirpación quirúrgica del tumor. En cuanto a SAA2, se sometieron a prueba los niveles plasmáticos de CFB en pacientes con metástasis antes del primer ciclo de tratamiento con sunitinib o bevacizumab (ensayos clínicos SUVEGIL y TORAVA). Los pacientes cuyos niveles eran altos (corte de 310 µg/ml) tenían una progresión de la enfermedad más rápida en comparación con los pacientes cuyos niveles eran bajos (CFB alto, 3,58 meses; CFB bajo, 18,7 meses, p=0,0004) (figura 8D). Luego se agrupó la significación de someter a prueba los niveles plasmáticos de SAA2 y CFB (figuras 8E y 8F). Pueden identificarse tres grupos diferentes con supervivencia diferente: grupo 1 (CFB bajo+SAA2 baja, PFS: 19,37 meses, OS: NR), grupo 2 (CFB alto SAA2 baja o CFB bajo SAA2 alta, PFS: 9,87 meses, OS: 20,9 meses), grupo 3 (CFB alto SAA2 alta, PFS: 2,8 meses, OS: 8,33 meses). El grupo 1 tenía la mejor tasa de supervivencia, mientras que el grupo 3 tenía la peor. El grupo 2 tenía un resultado intermedio de supervivencia. Por tanto, el análisis combinado de estos dos marcadores es un potente factor pronóstico del desenlace del paciente después del tratamiento antiangiogénico con sunitinib o bevacizumab.

Proteína similar a podocano 1 (PODNL1)

PODNL1 es un miembro de la familia de proteoglicanos ricos en leucina pequeños (SLRP) de 17 genes. Se secreta extracelularmente y, en la actualidad, su función es desconocida. La alta expresión se ha vinculado previamente con un mal desenlace en cáncer de ovario y glioblastoma. La expresión de PODNL1 estaba regulada por incremento en las presentes líneas celulares de ratón en el subgrupo de "riñón" (datos no mostrados), aunque el aumento era relativamente modesto. Sin embargo, este gen demostró un vínculo muy fuerte con DFS y OS reducidas en la base de datos KIRC de TCGA (figuras 7D y 7E). También se ha realizado este análisis en pacientes M0 y M1 (datos no mostrados). Cuando se usan muestras de UroCCR, PODNL1 se sobreexpresaba a nivel de ARNm en el tejido tumoral frente a sano (figura 7G). En el biobanco de UroCCR, DFS también demostró tendencias diferentes dependiendo de la expresión de PODNL1, aunque estadísticamente no significativa, siendo esto último también el caso para OS (figura 7F). Este interesante gen, en gran medida desconocido, puede desempeñar un papel clave en RCC y se requieren estudios adicionales para investigar esta posibilidad.

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un carcinoma de células renales (RCC) que comprende i) determinar el nivel de expresión de factor del complemento B (CFB) en una muestra obtenida del paciente, ii) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa i) con un valor de referencia predeterminado y en el que una diferencia entre el nivel de expresión determinado y dicho valor de referencia predeterminado es indicativa de si el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo o corto, en el que un nivel de expresión de CFB que es mayor que el valor de referencia predeterminado indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia corto.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de sangre o una muestra de tejido tumoral.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la muestra de sangre es una muestra de suero.
4. Método según la reivindicación 1, en el que se determinan los niveles de expresión de CFB y proteína amiloide A-2 sérica (SAA2) en la muestra.
5. Método según la reivindicación 4, en el que una puntuación que es una combinación de los niveles de expresión de los diferentes biomarcadores se determina y compara con el valor de referencia predeterminado, en el que una diferencia entre dicha puntuación y dicho valor de referencia predeterminado es indicativa de si el paciente tendrá un tiempo de supervivencia largo o corto.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende el uso de un algoritmo de clasificación.
7. Método según la reivindicación 5, en el que el algoritmo es un algoritmo de bosque aleatorio.
8. Uso del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para seleccionar un régimen terapéutico o determinar si un determinado régimen terapéutico es más apropiado para un paciente que se ha identificado que tiene un mal pronóstico.
9. Uso del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la monitorización de RCC en un paciente, en el que, si en una primera prueba se identifica que el paciente tiene un mal pronóstico, el paciente puede seleccionarse para que se le administre una terapia antineoplásica, y si en una segunda prueba se identifica que el paciente tiene un buen pronóstico, el paciente puede seleccionarse para que se le administre una terapia antineoplásica a una dosis de mantenimiento.

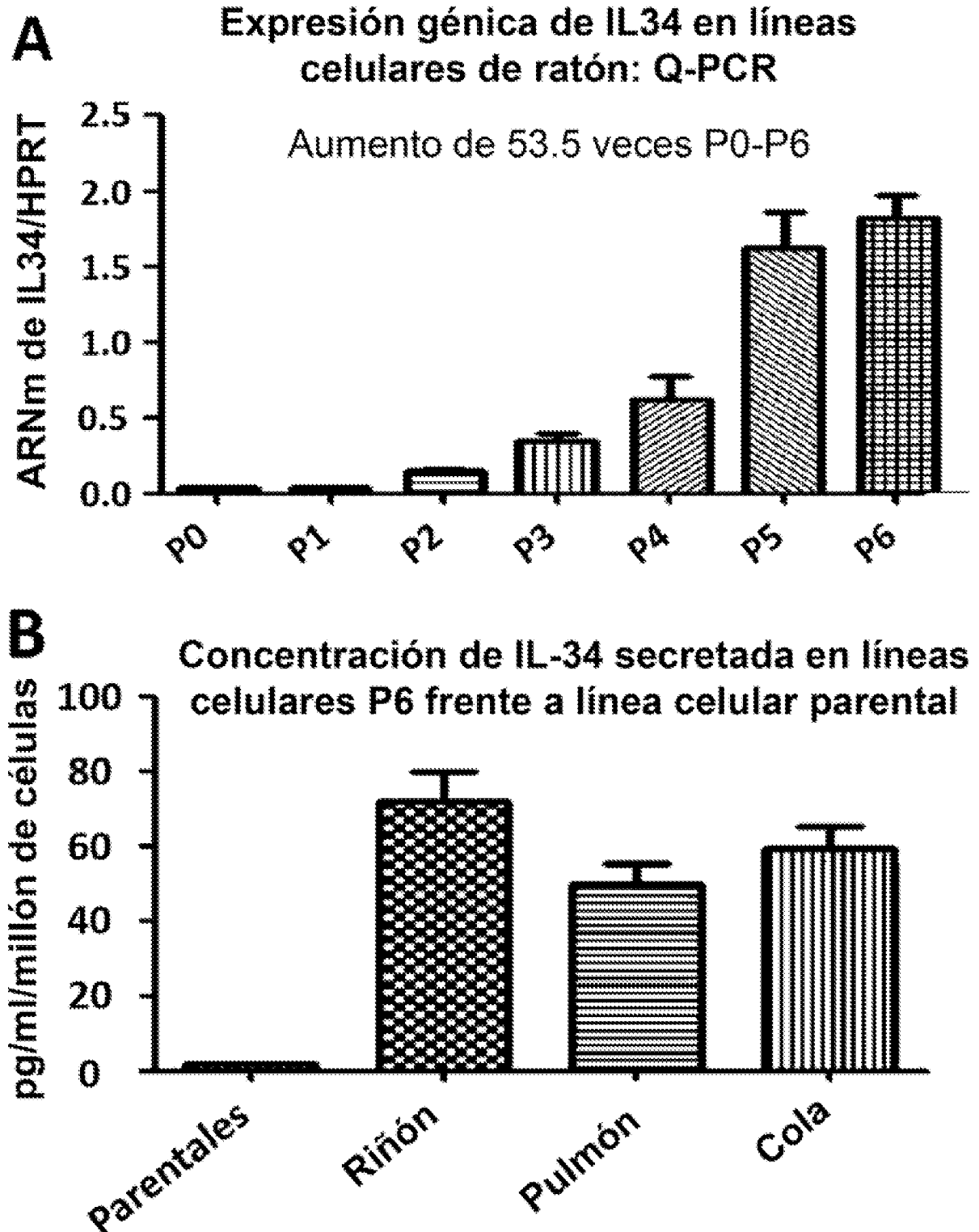


Figura 1A y 1B

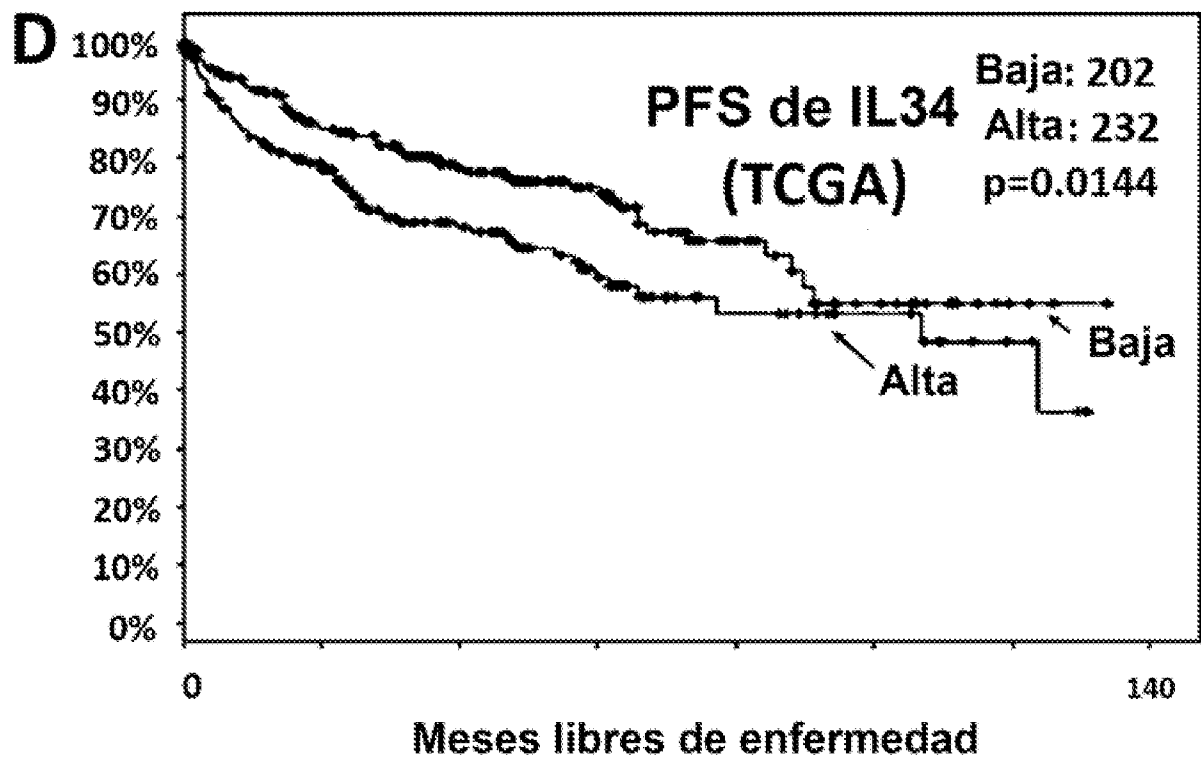
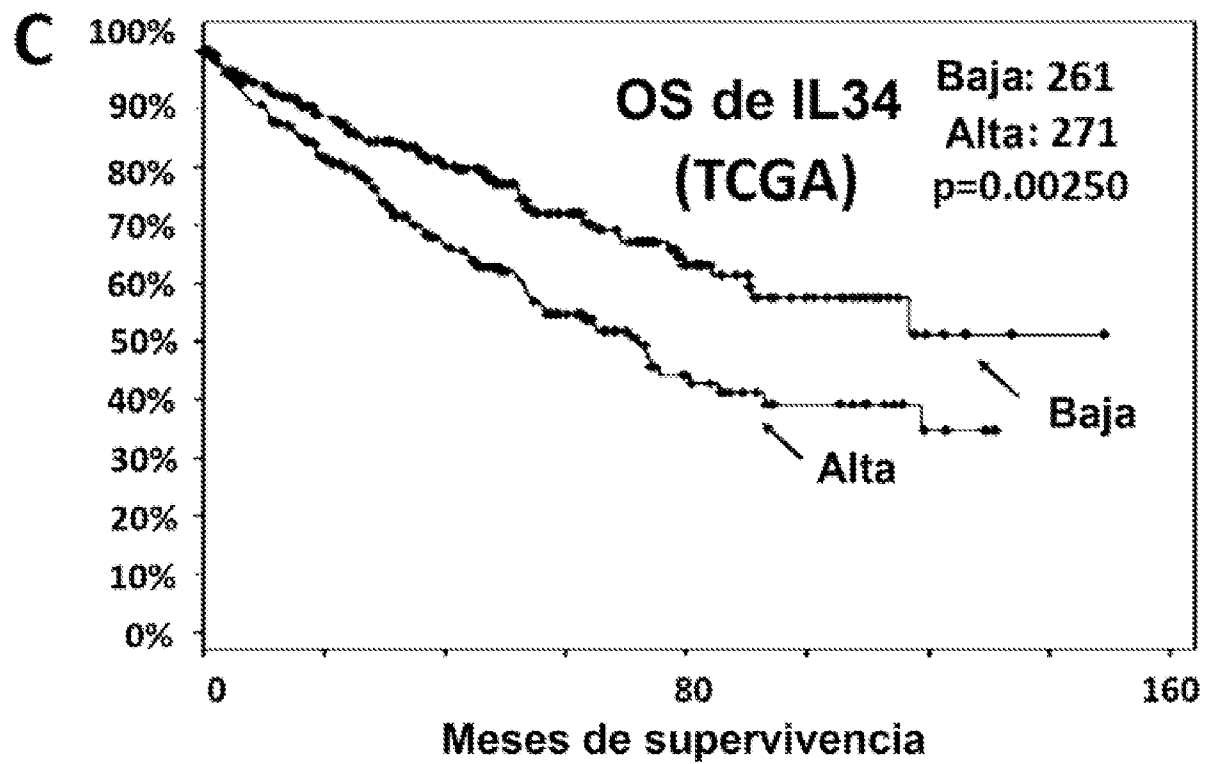


Figura 1C y 1D

E IL-34 en tejido sano frente a tumoral

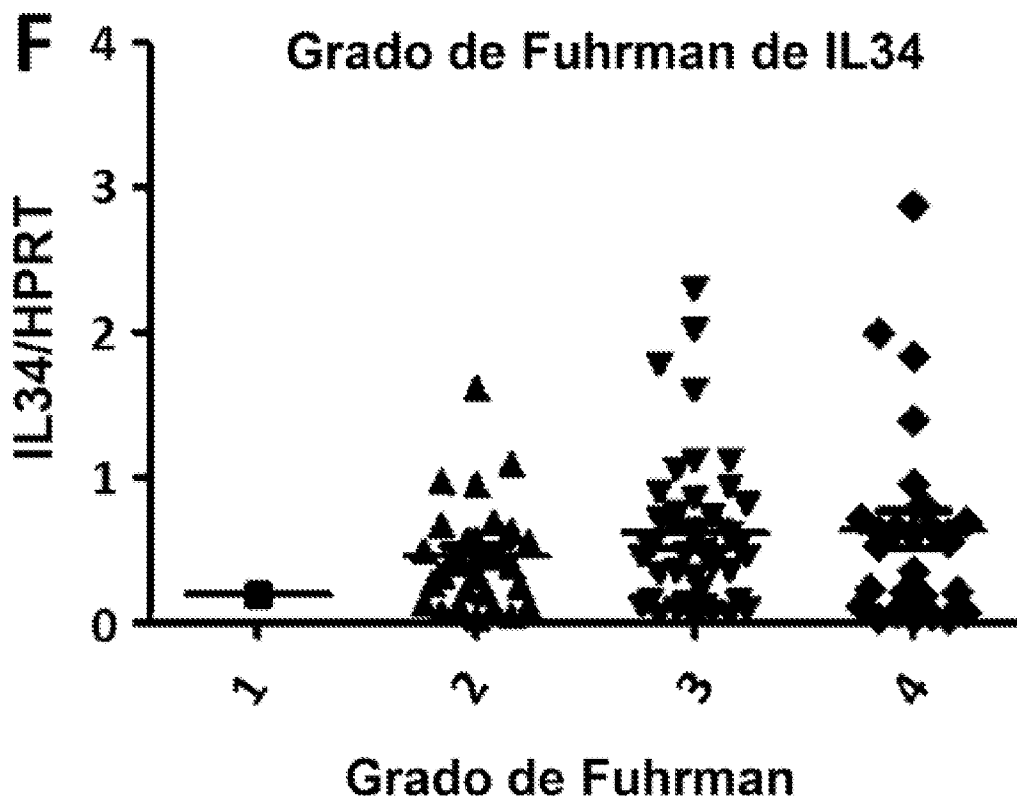
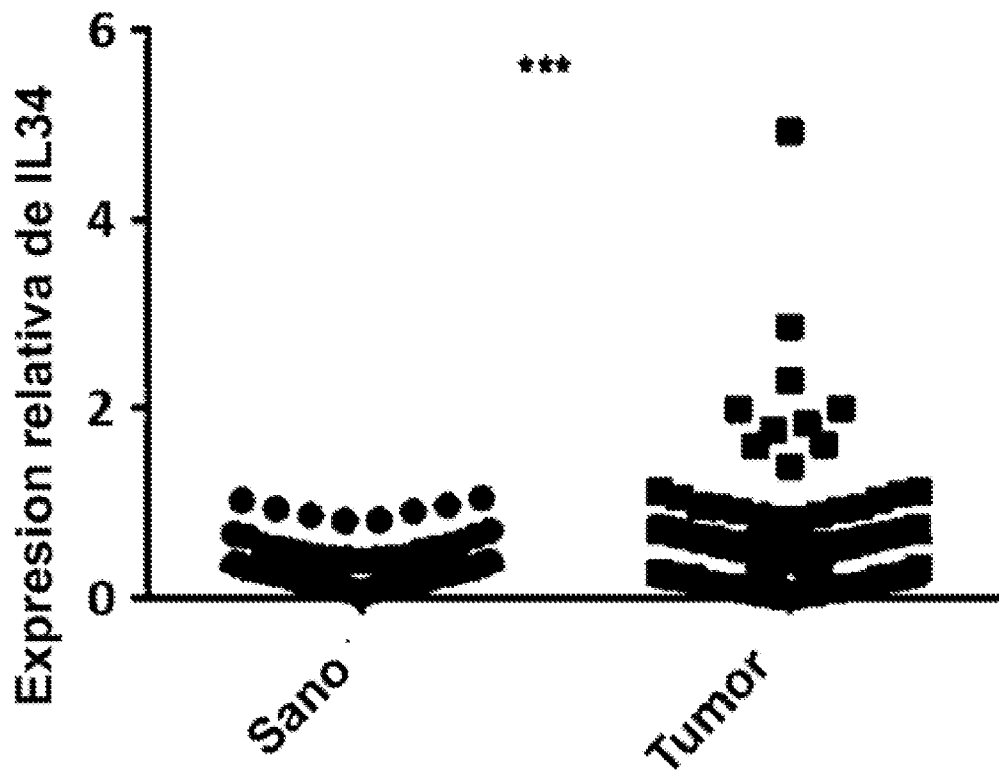


Figura 1E y 1F

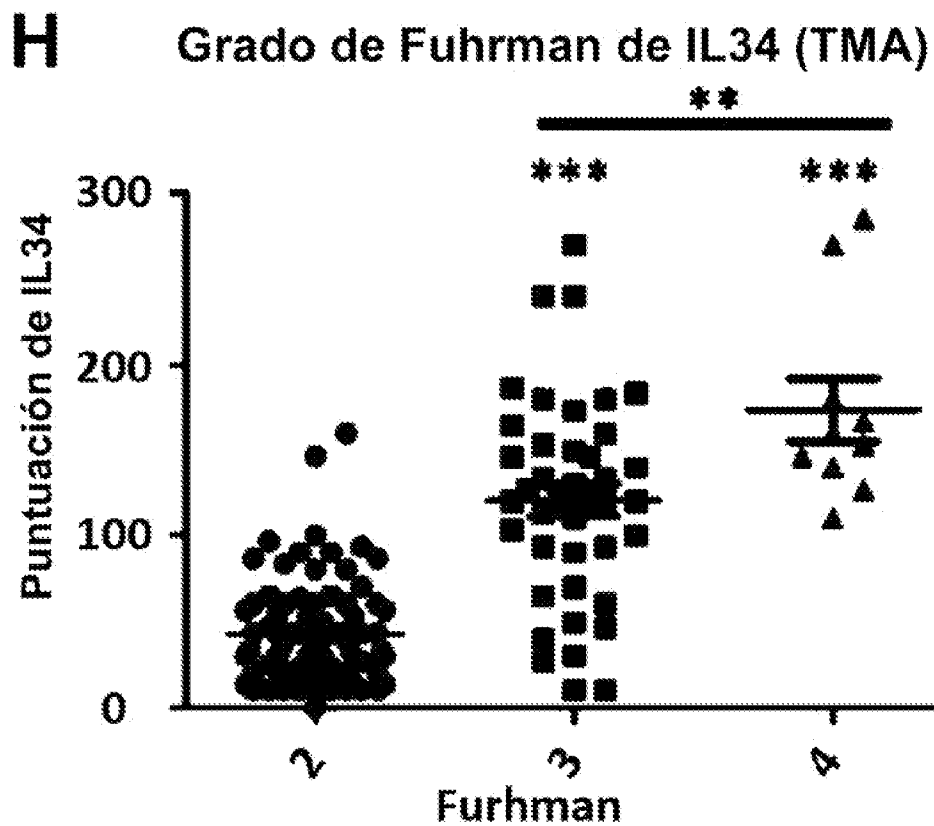
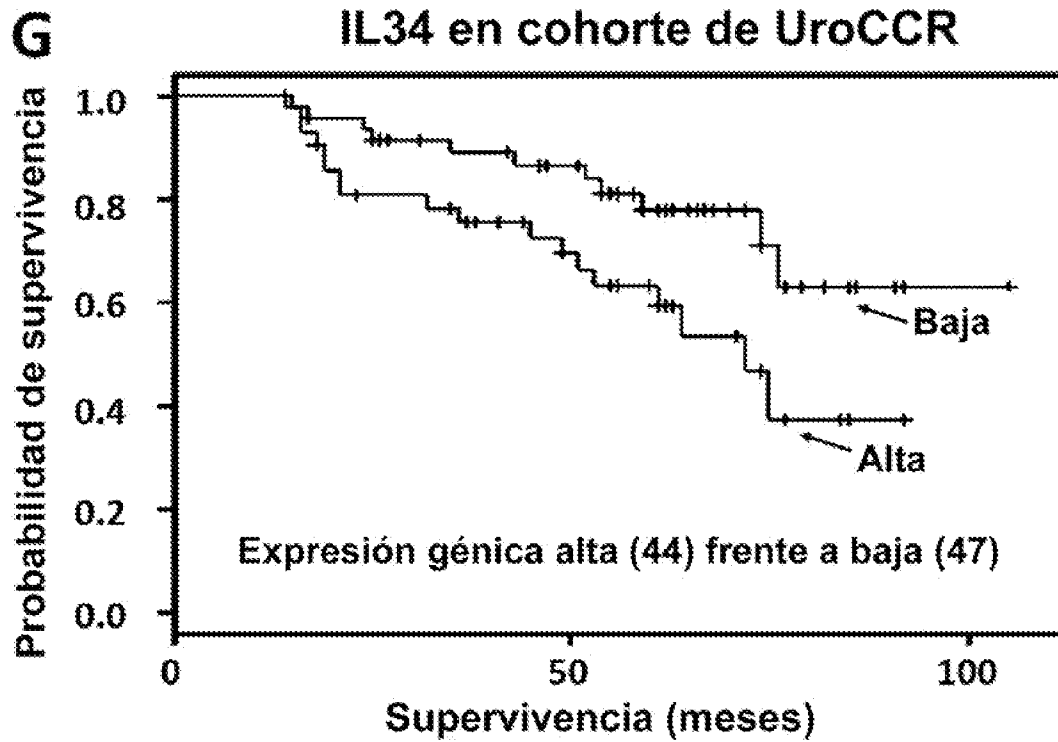


Figura 1G y 1H

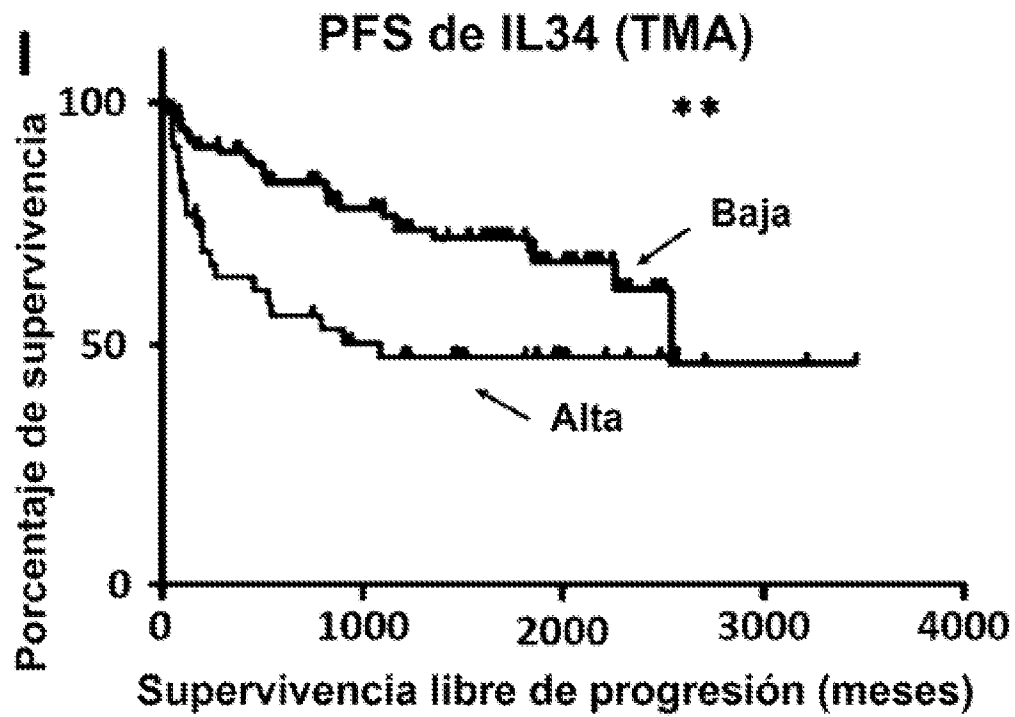


Figura II

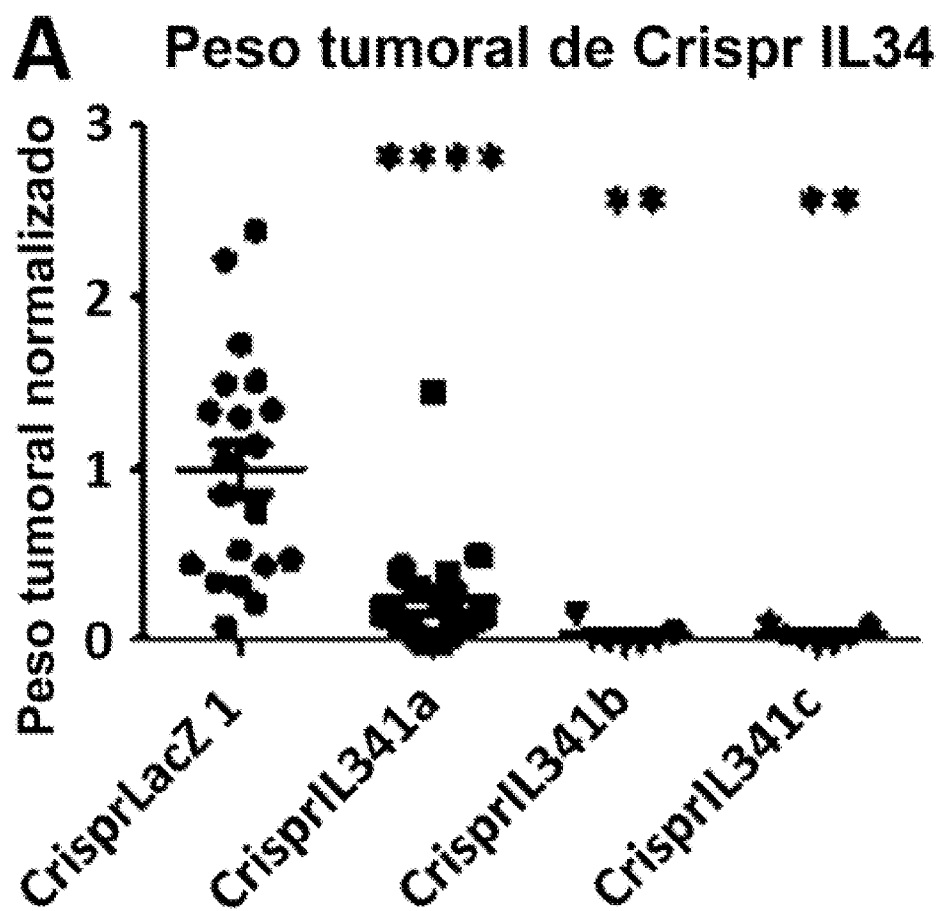


Figura 2A

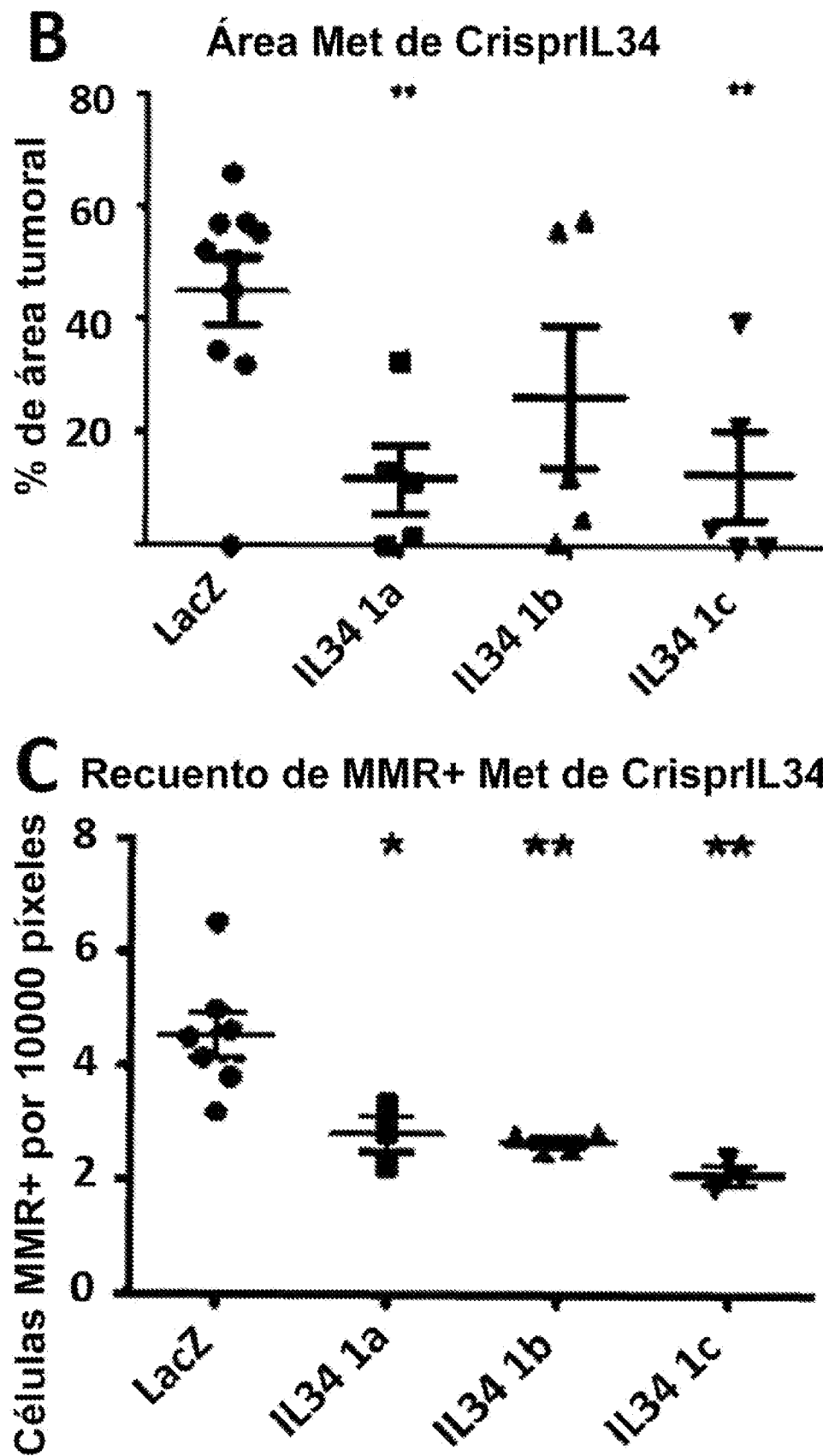
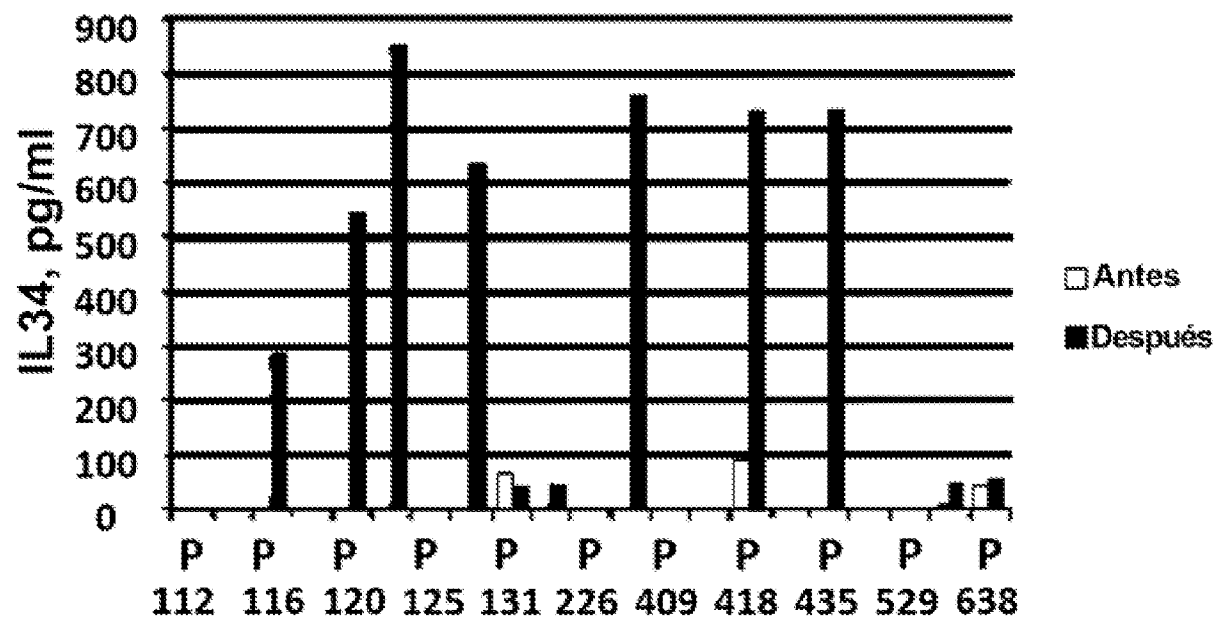


Figura 2B y 2C

D IL34 en plasma en pacientes tratados con Sutent (ciclo 1)



E IL34 tumoral (ser humano)

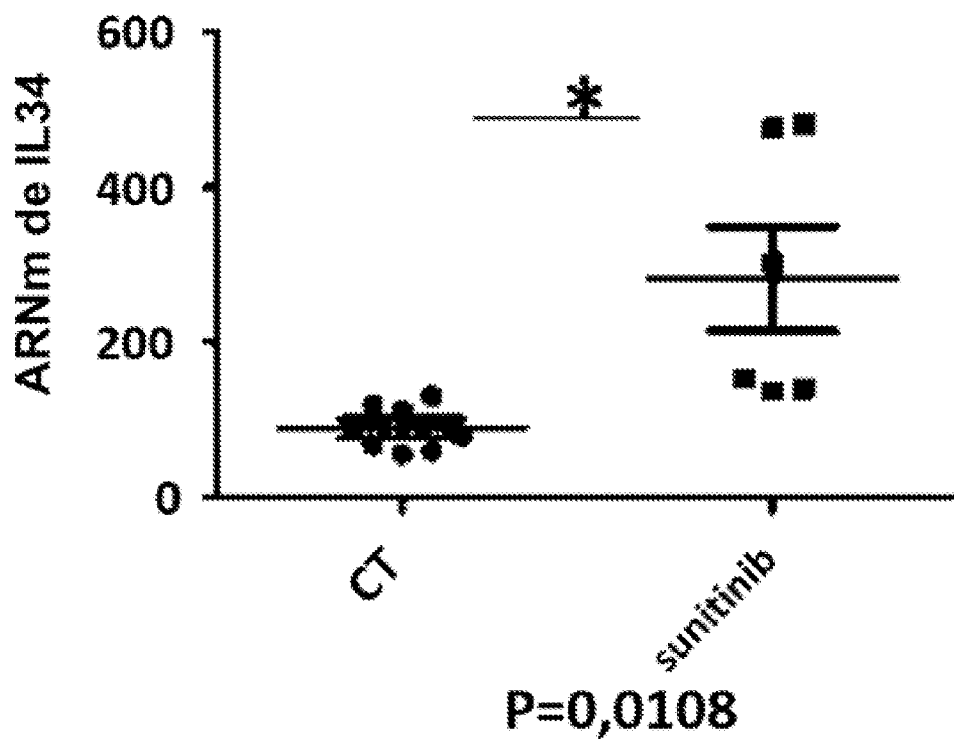


Figura 2D y2E

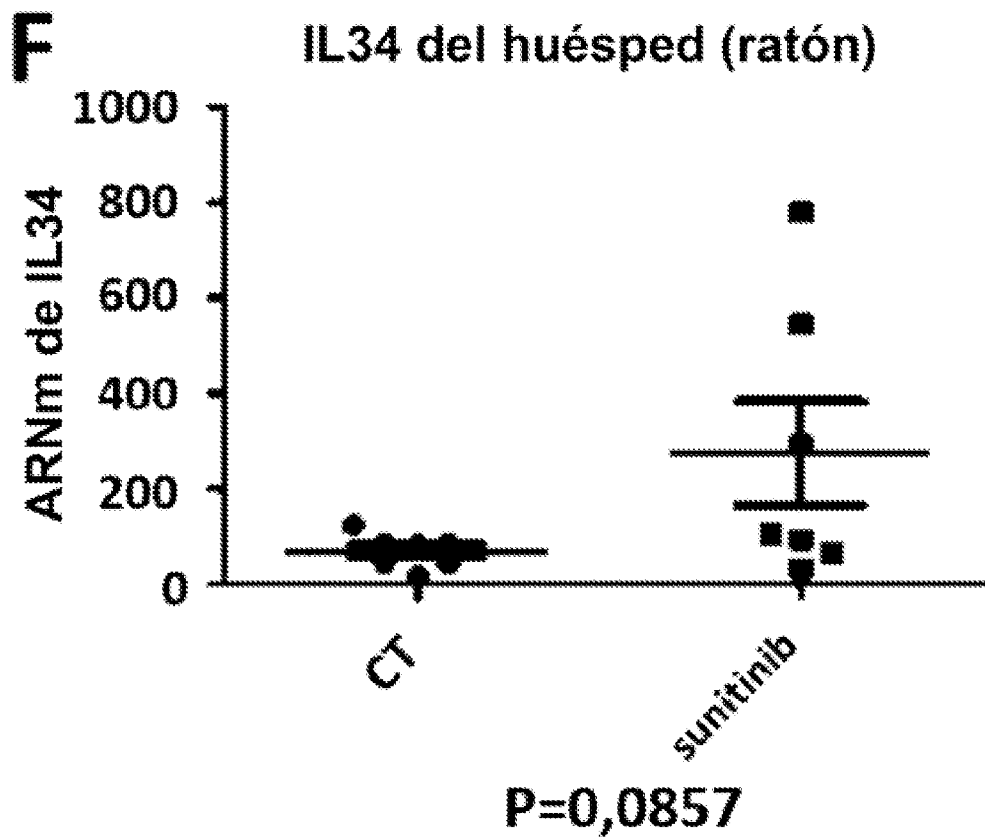


Figura 2F

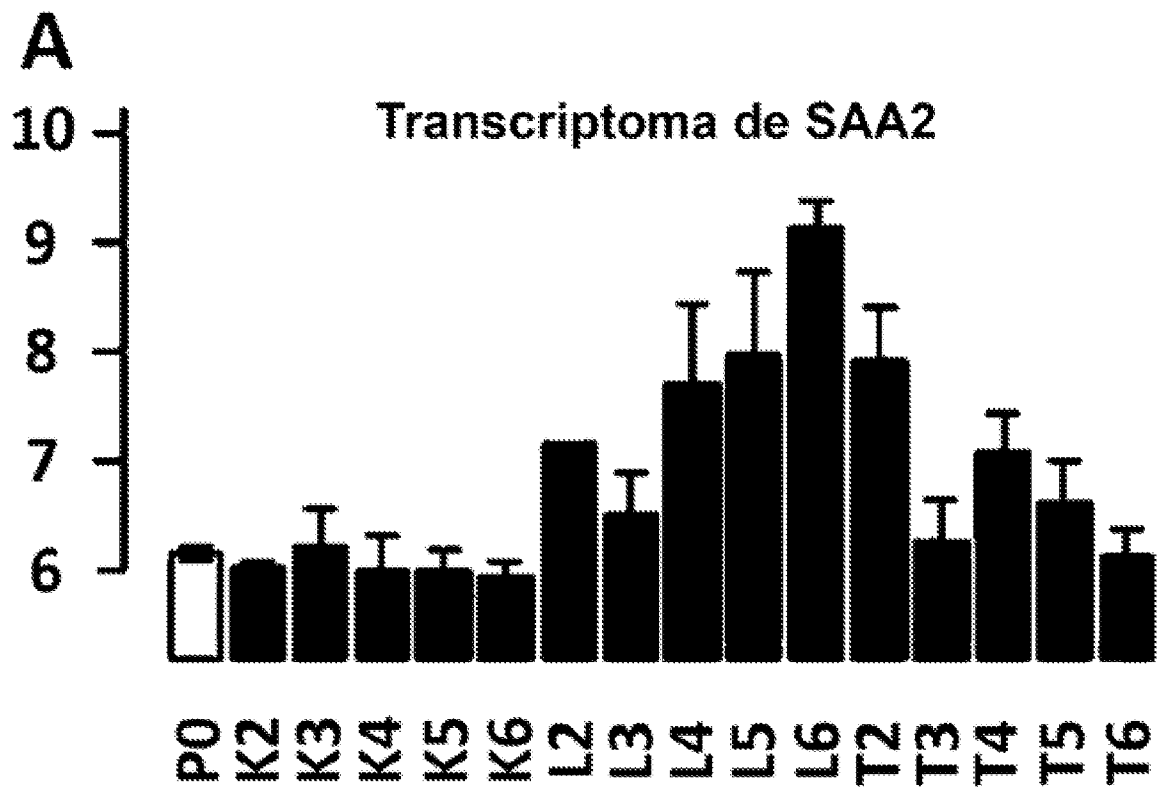


Figura 3A

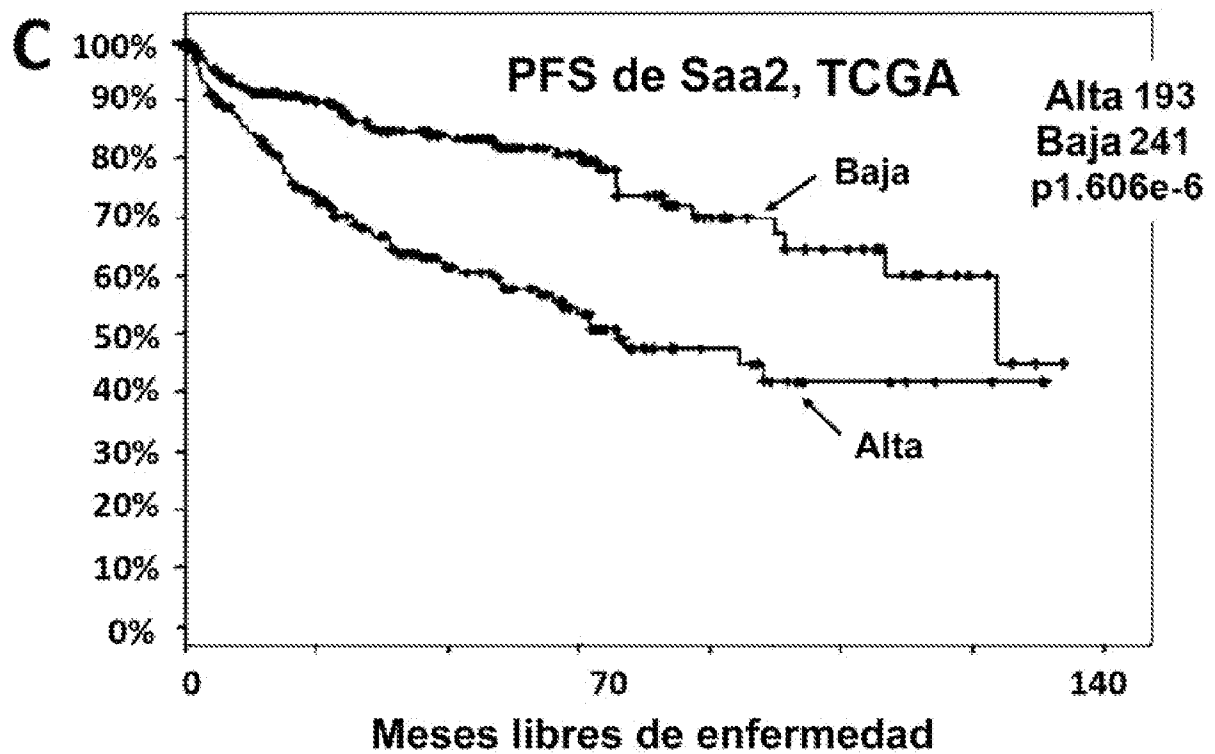
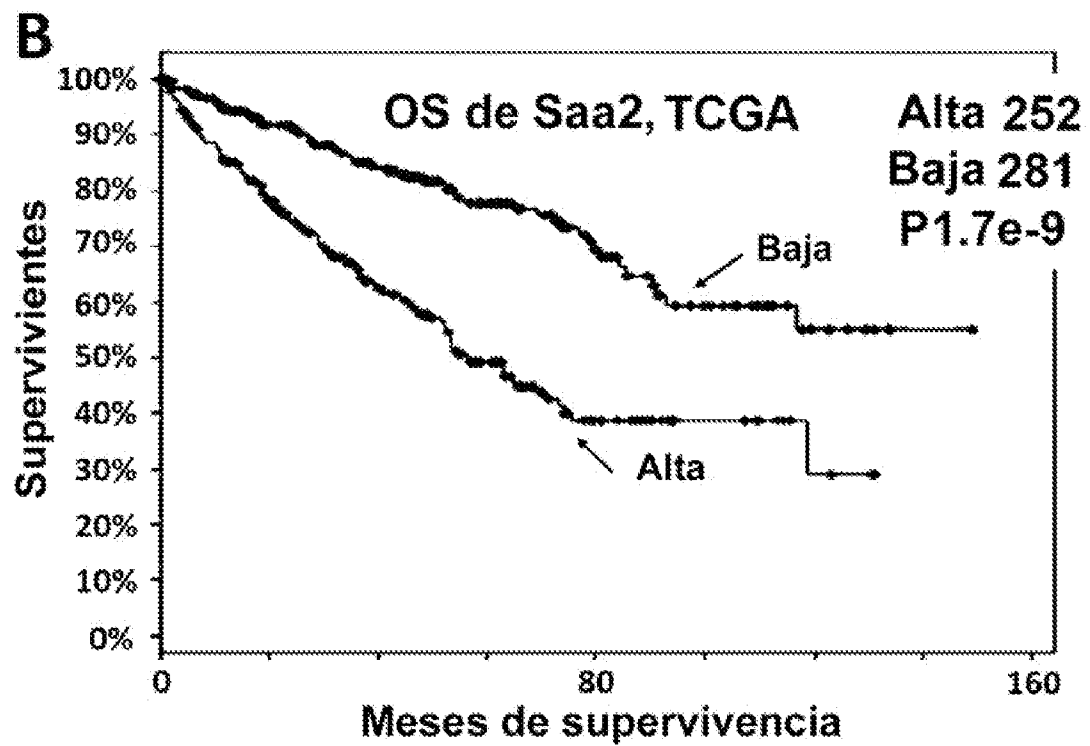


Figura 3B y 3C

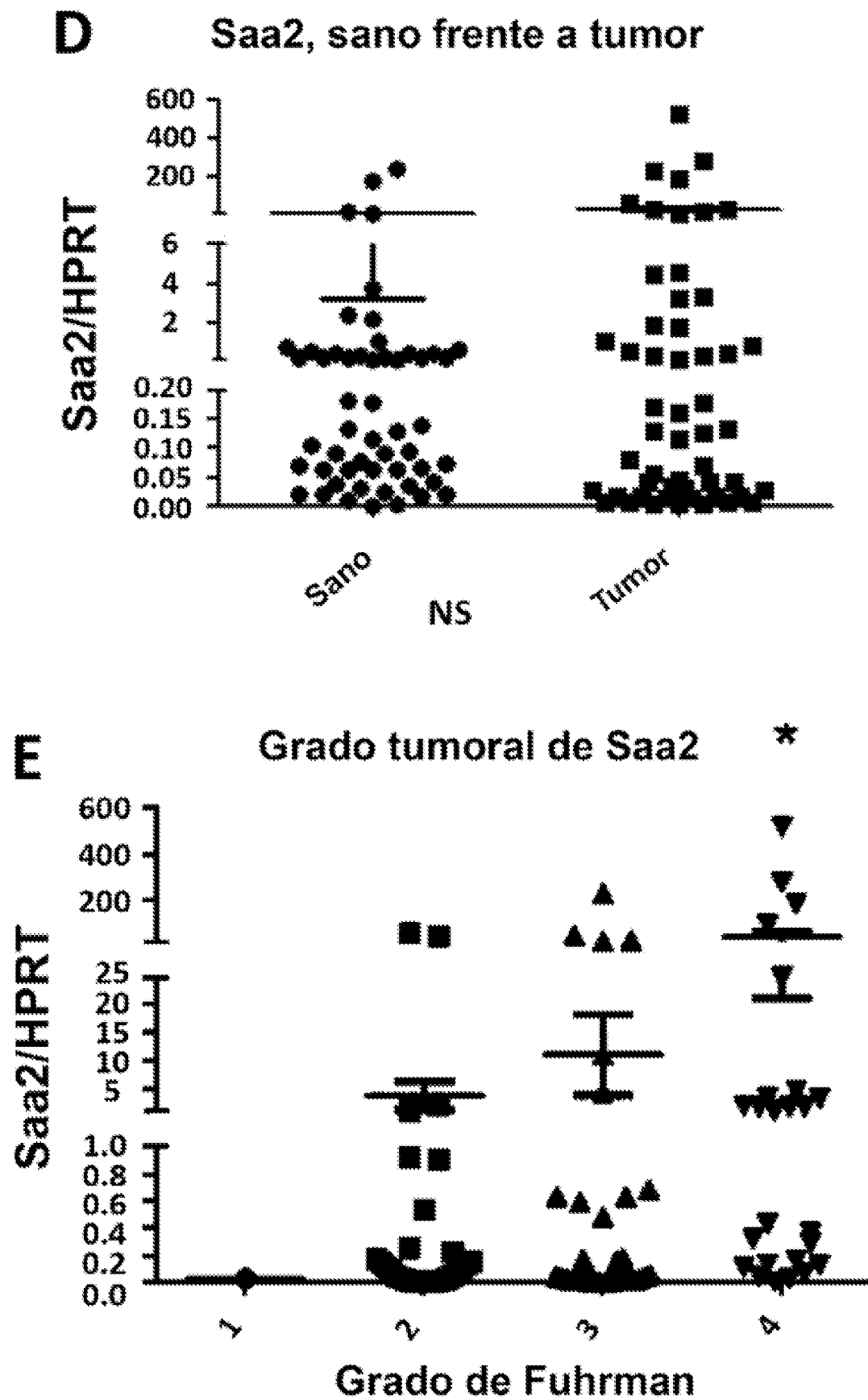


Figura 3D y 3E

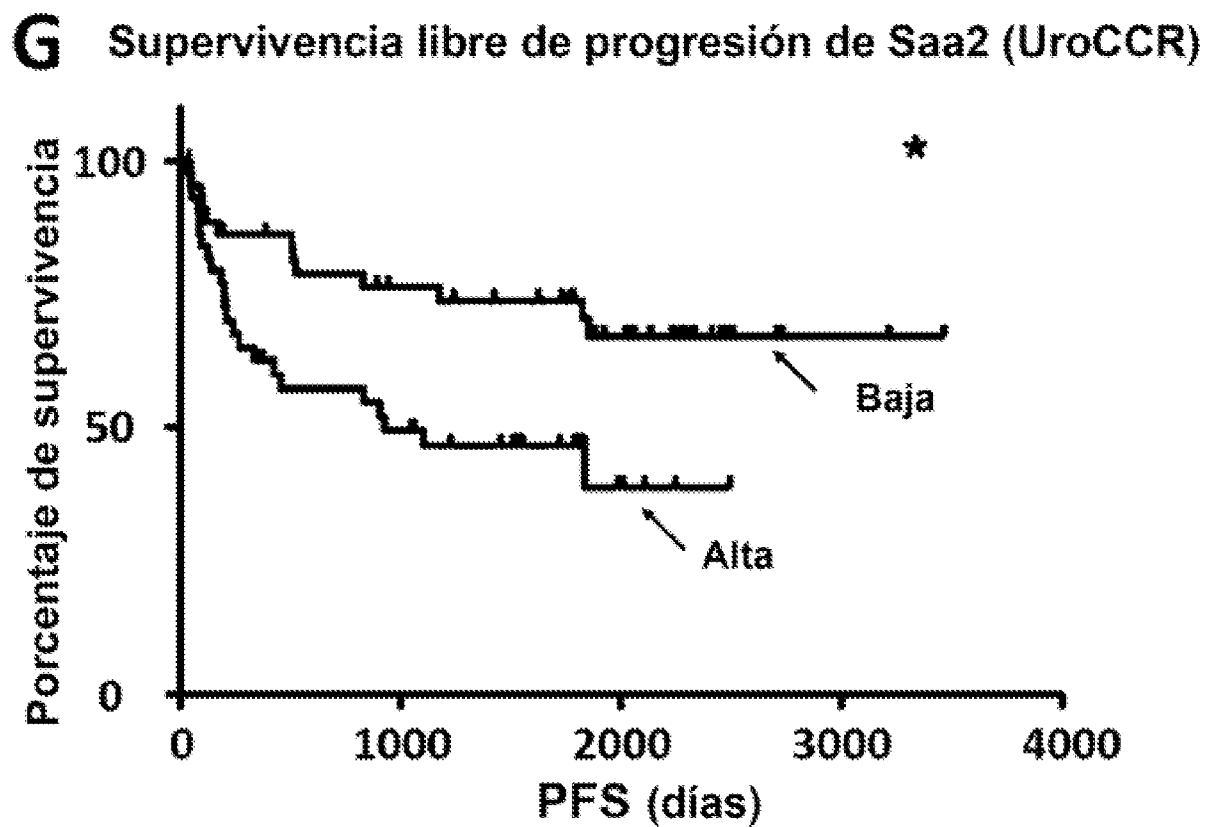
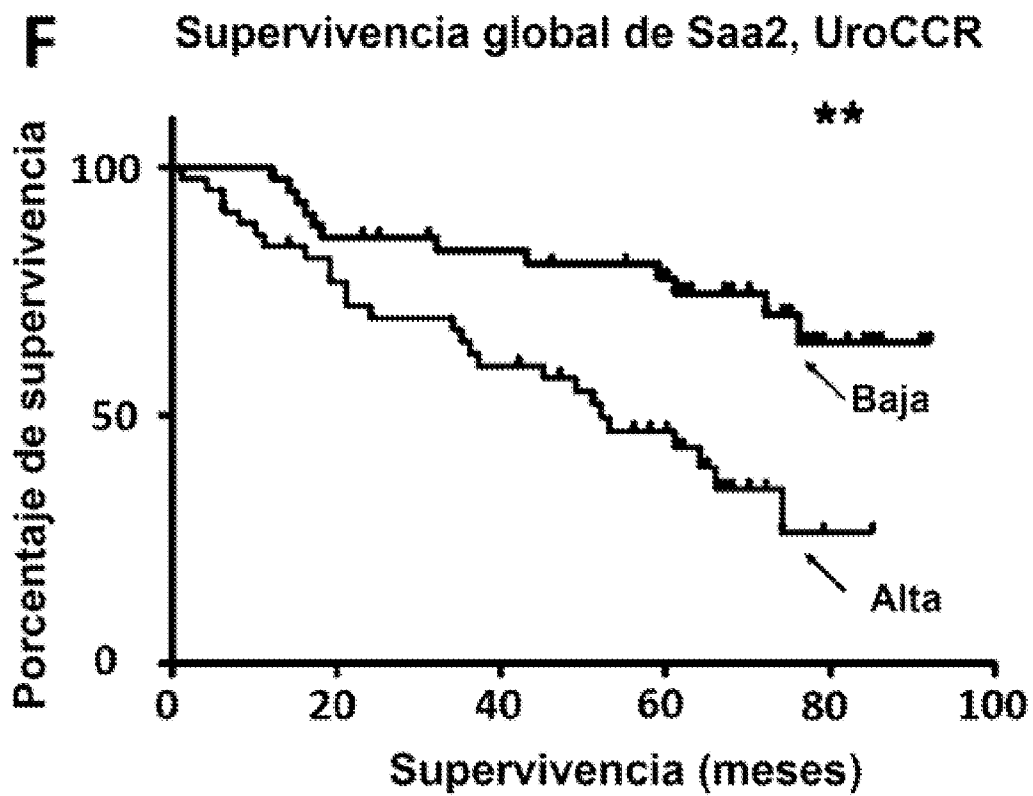


Figura 3F y 3G

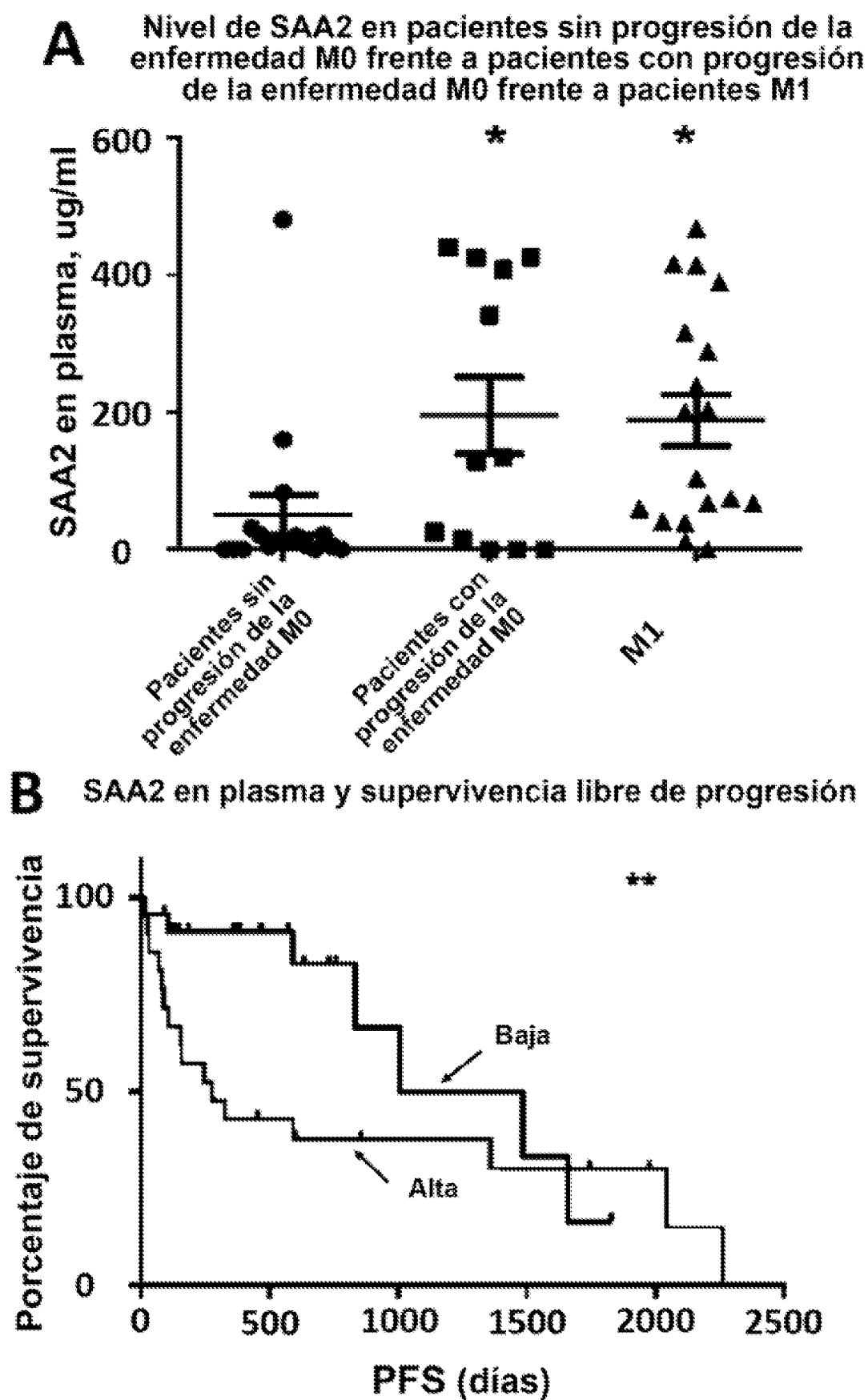


Figura 4A y 4B

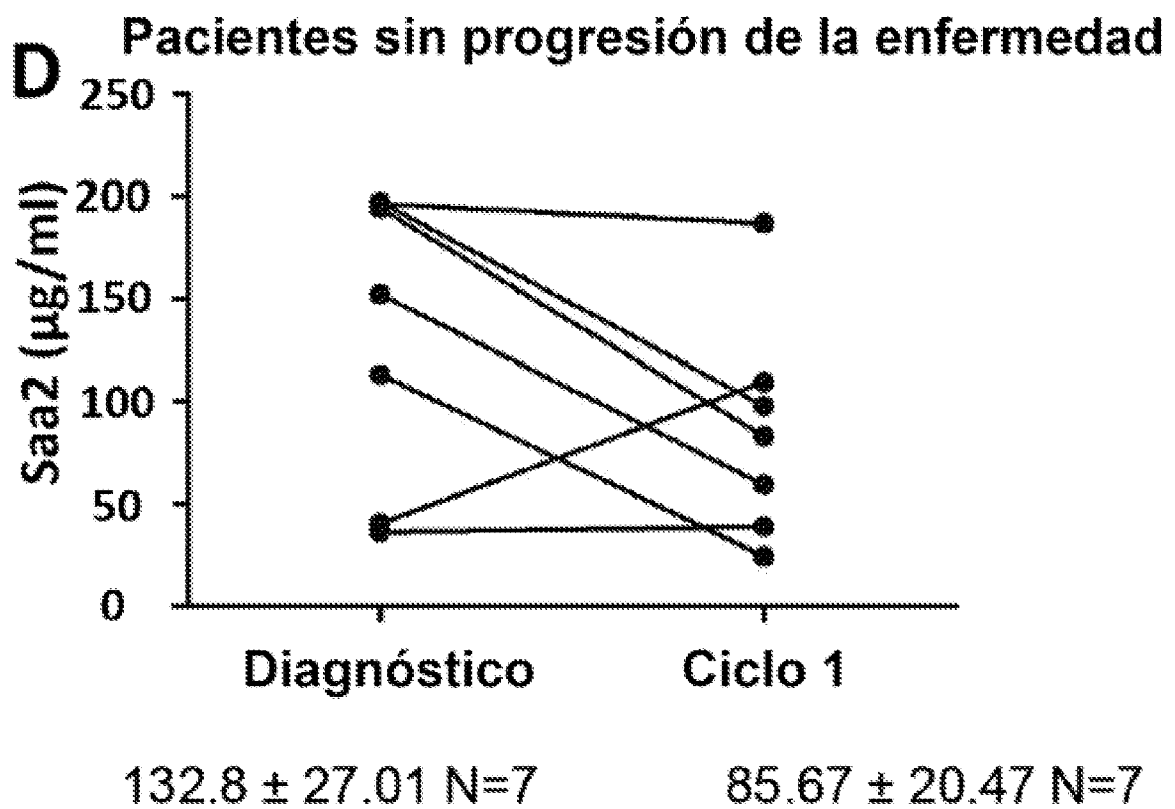
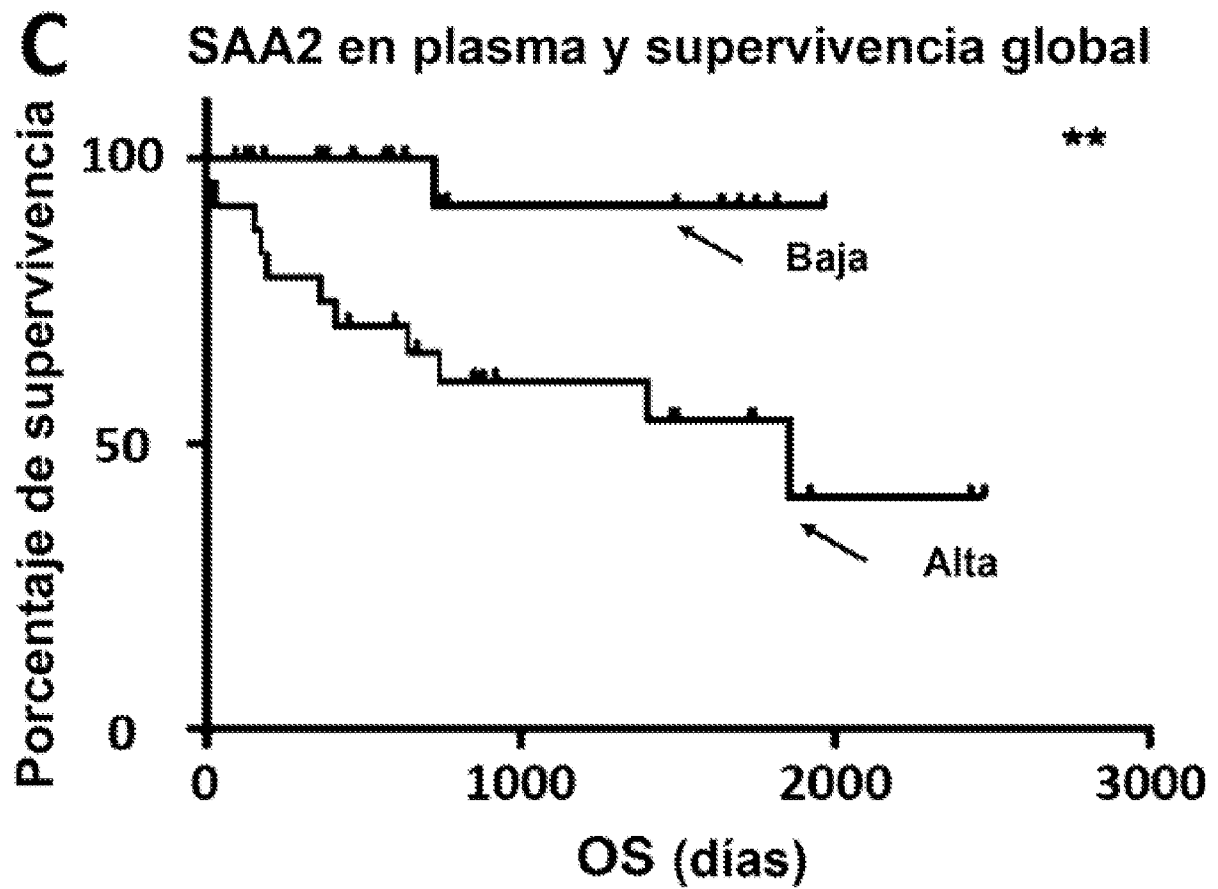


Figura 4C y 4D

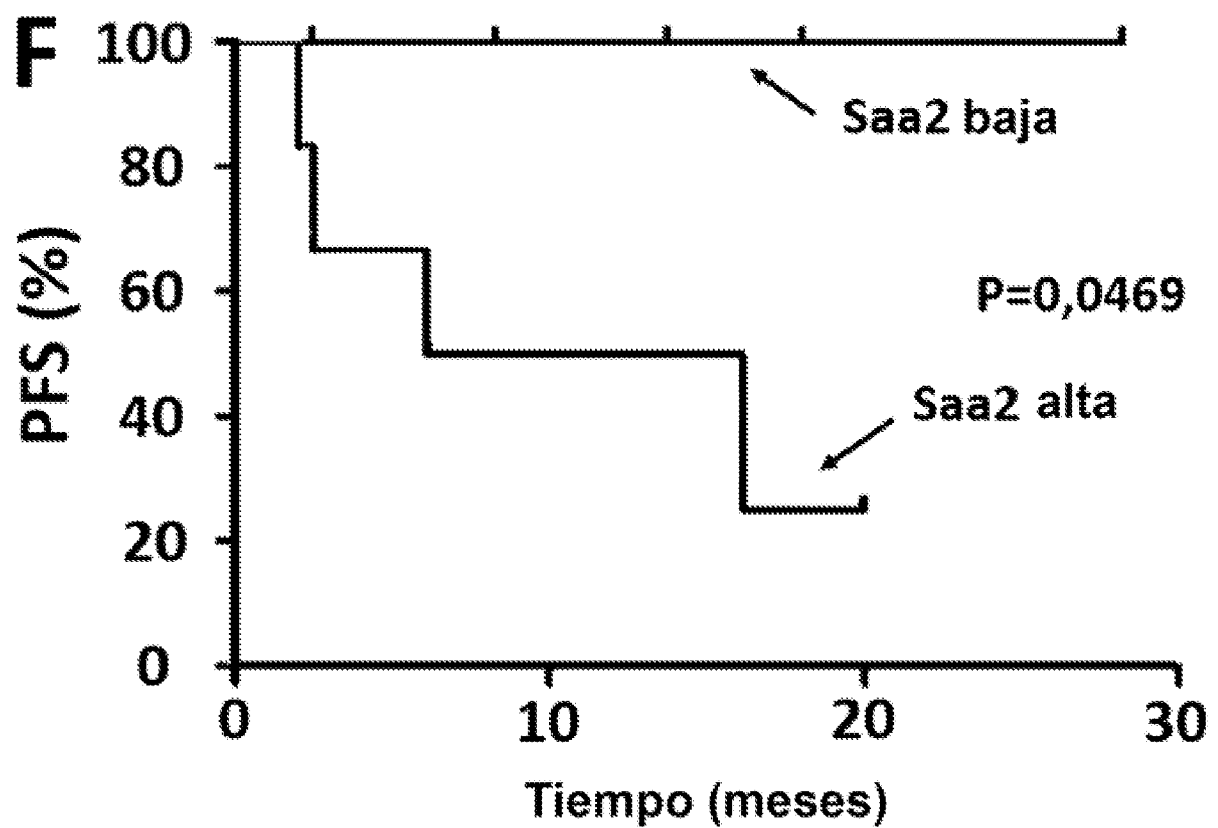
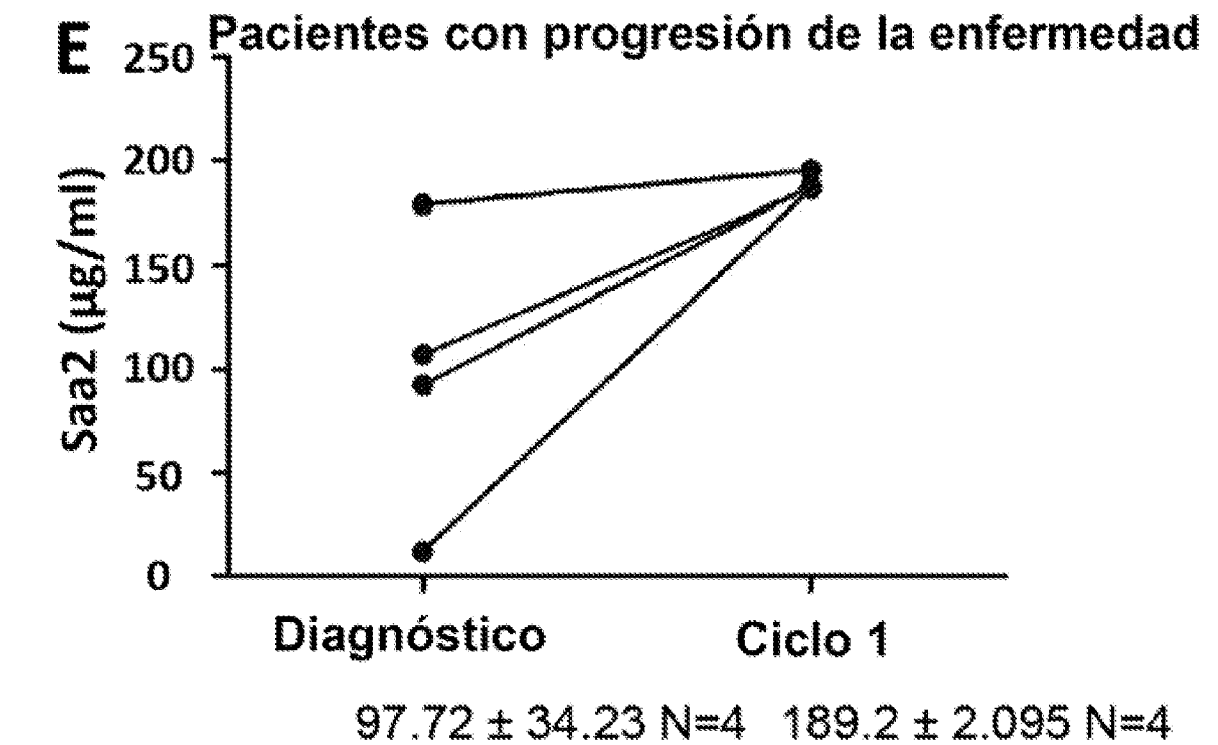
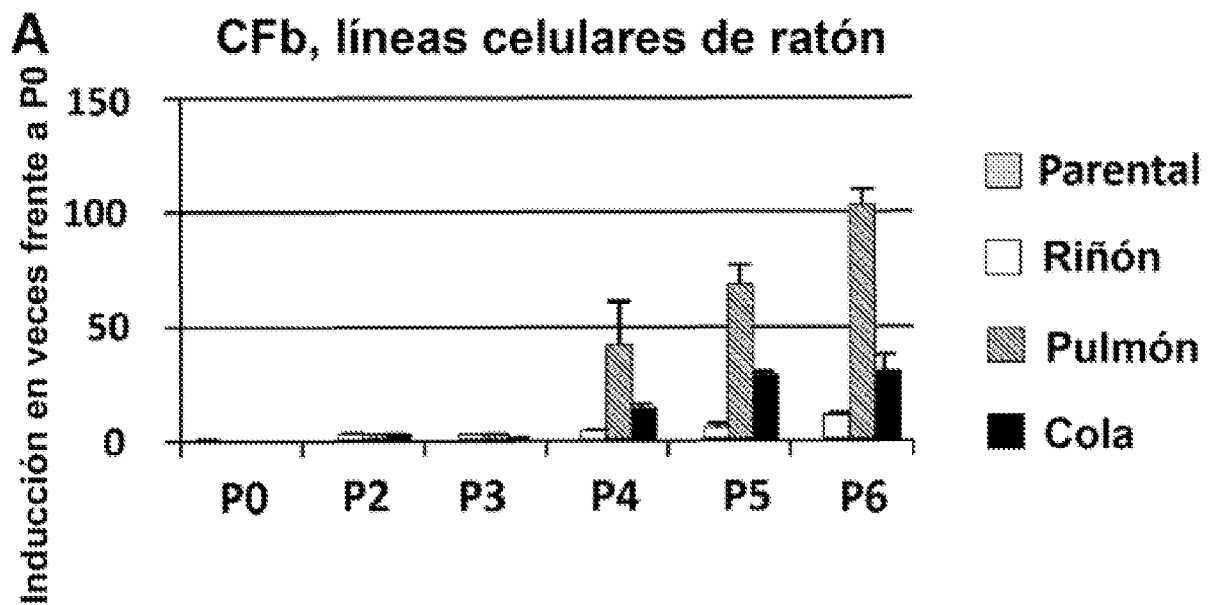


Figura 4E y 4F



B Expresión de CFb en células tumorales primarias frente a metastásicas

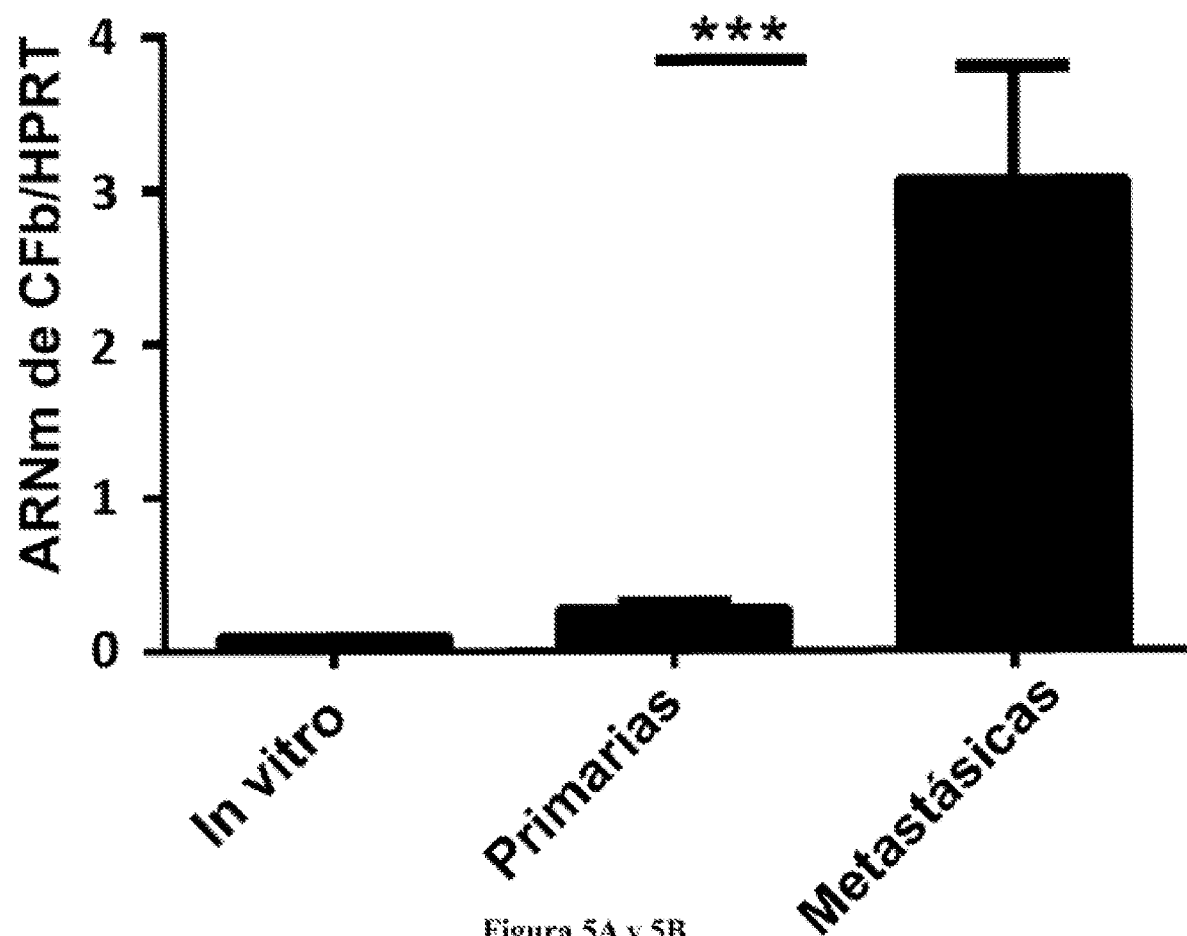


Figura 5A y 5B

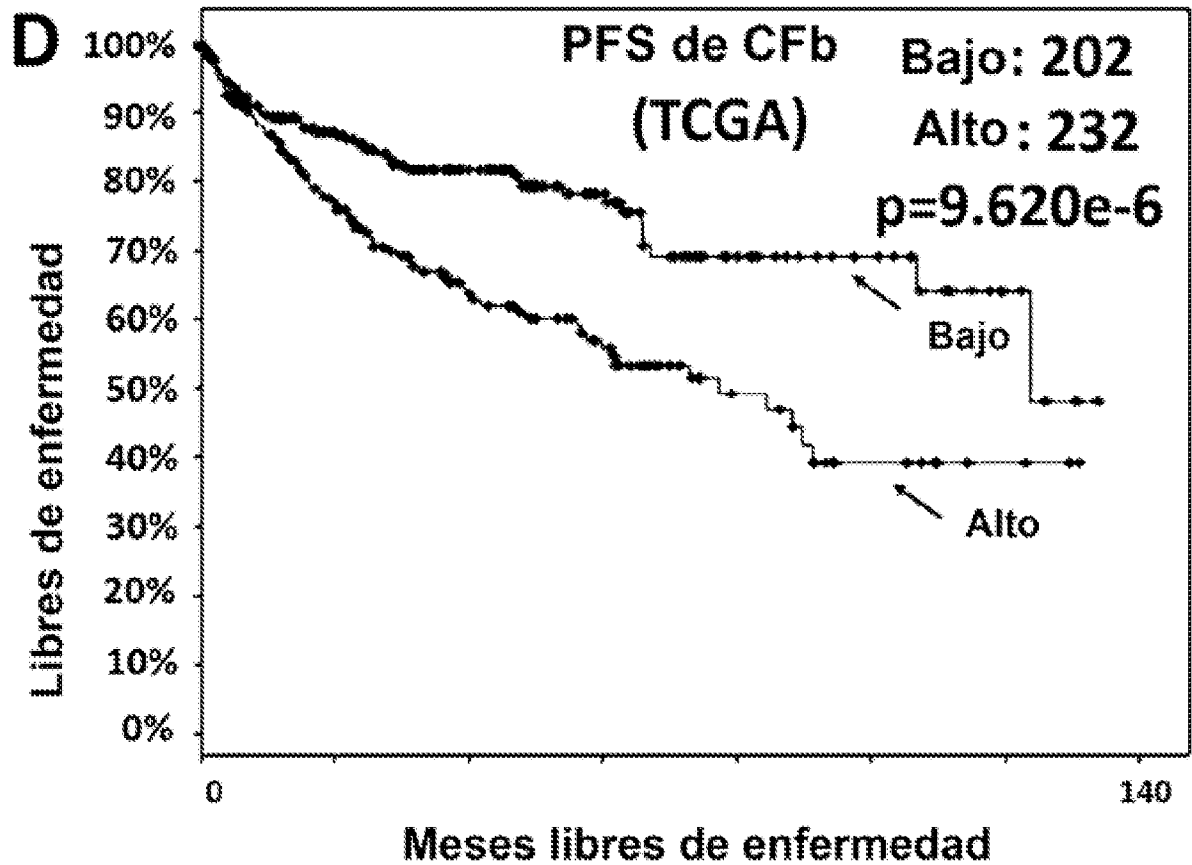
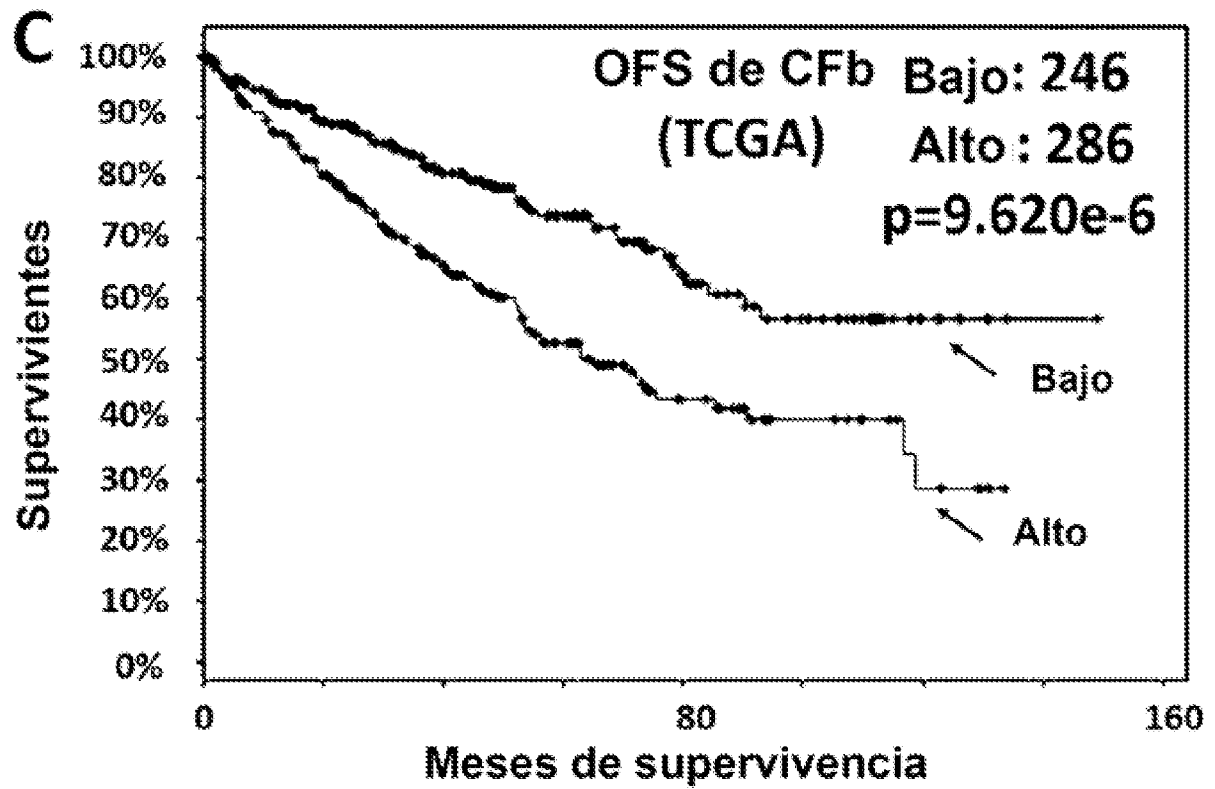


Figura 5C y 5D

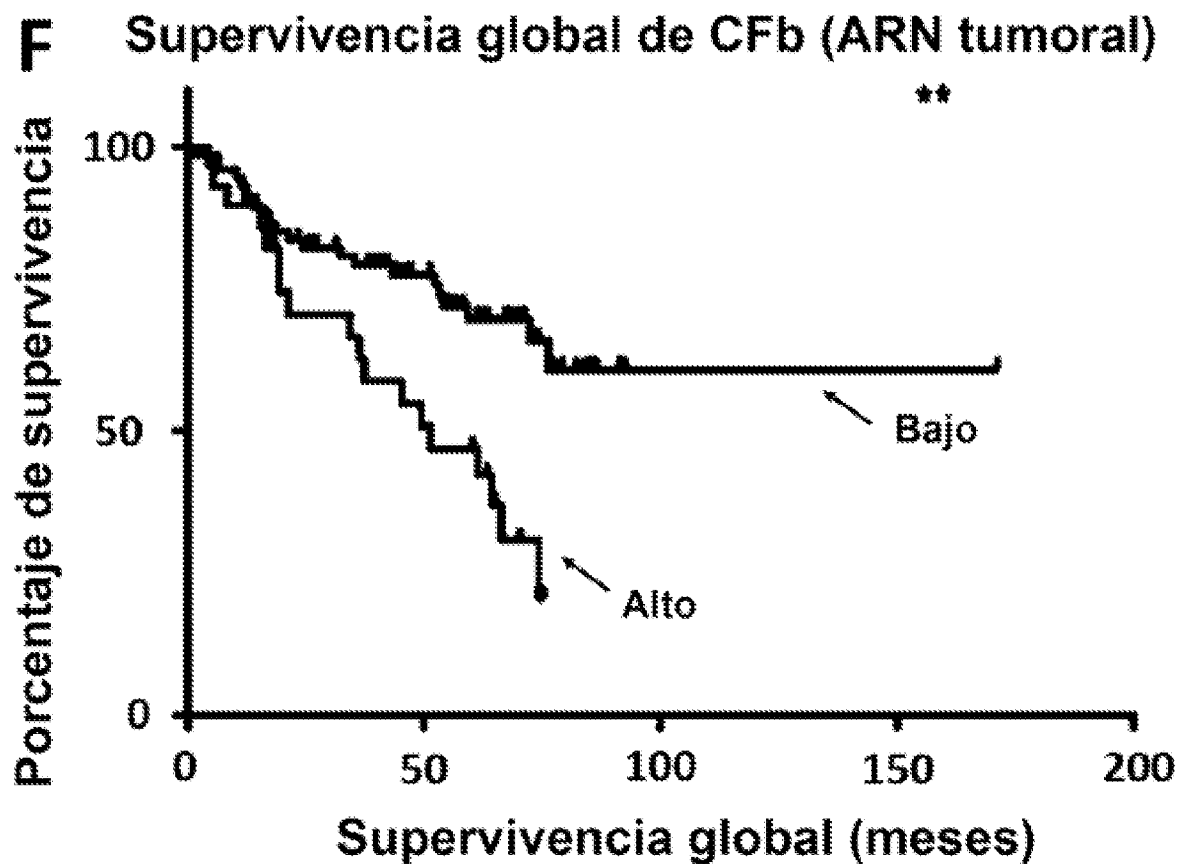
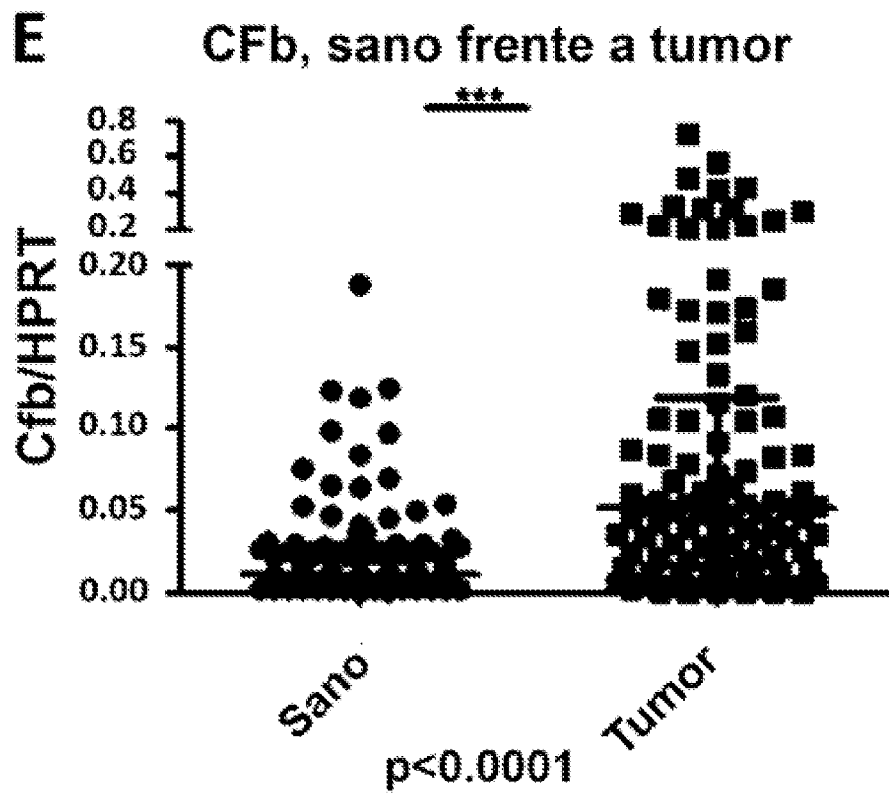


Figura 5E y 5F

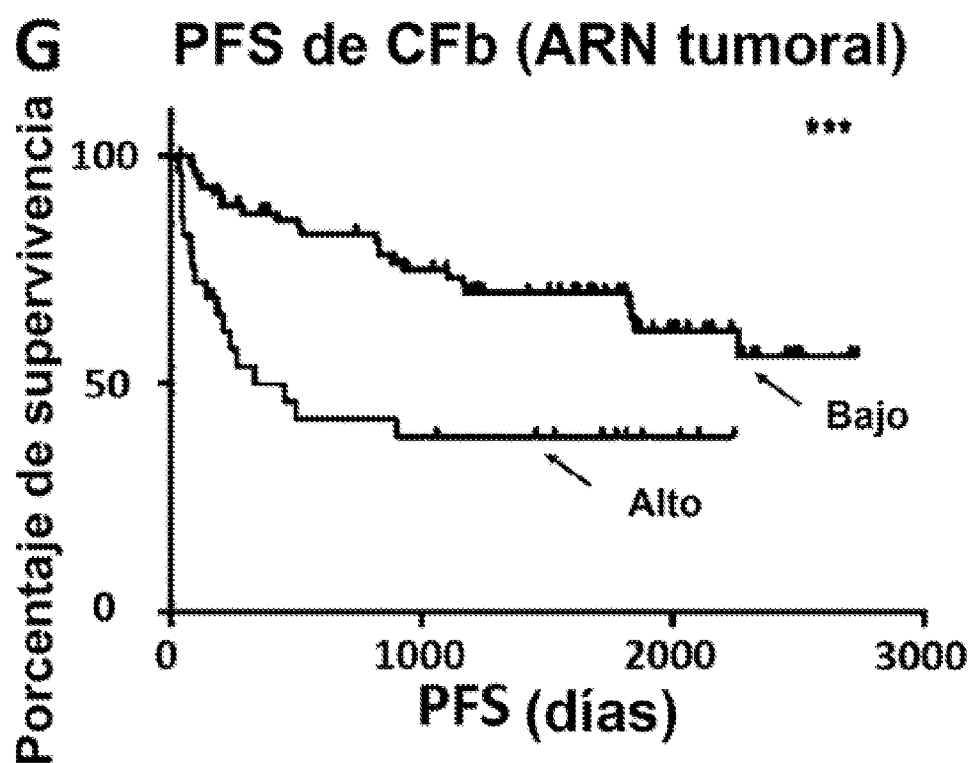
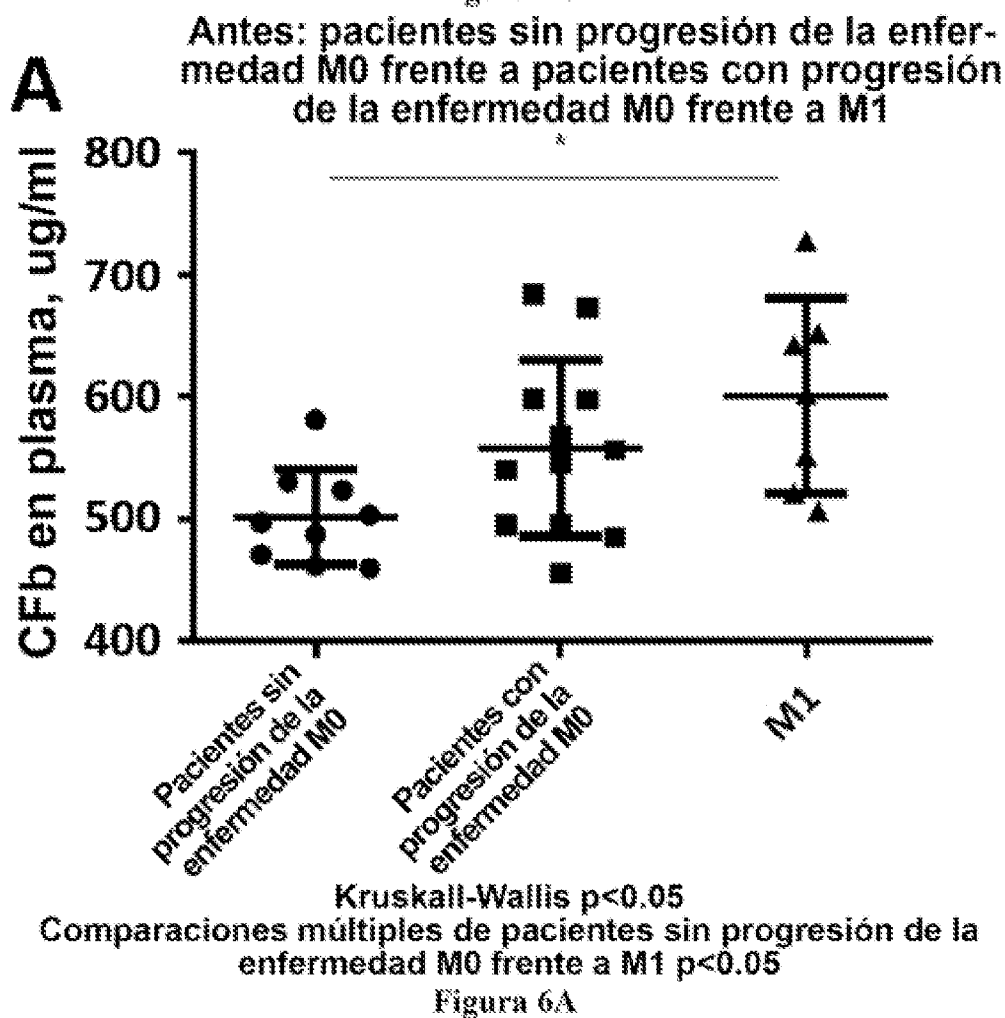


Figura 5G



B Después de la cirugía: M0 frente a M1

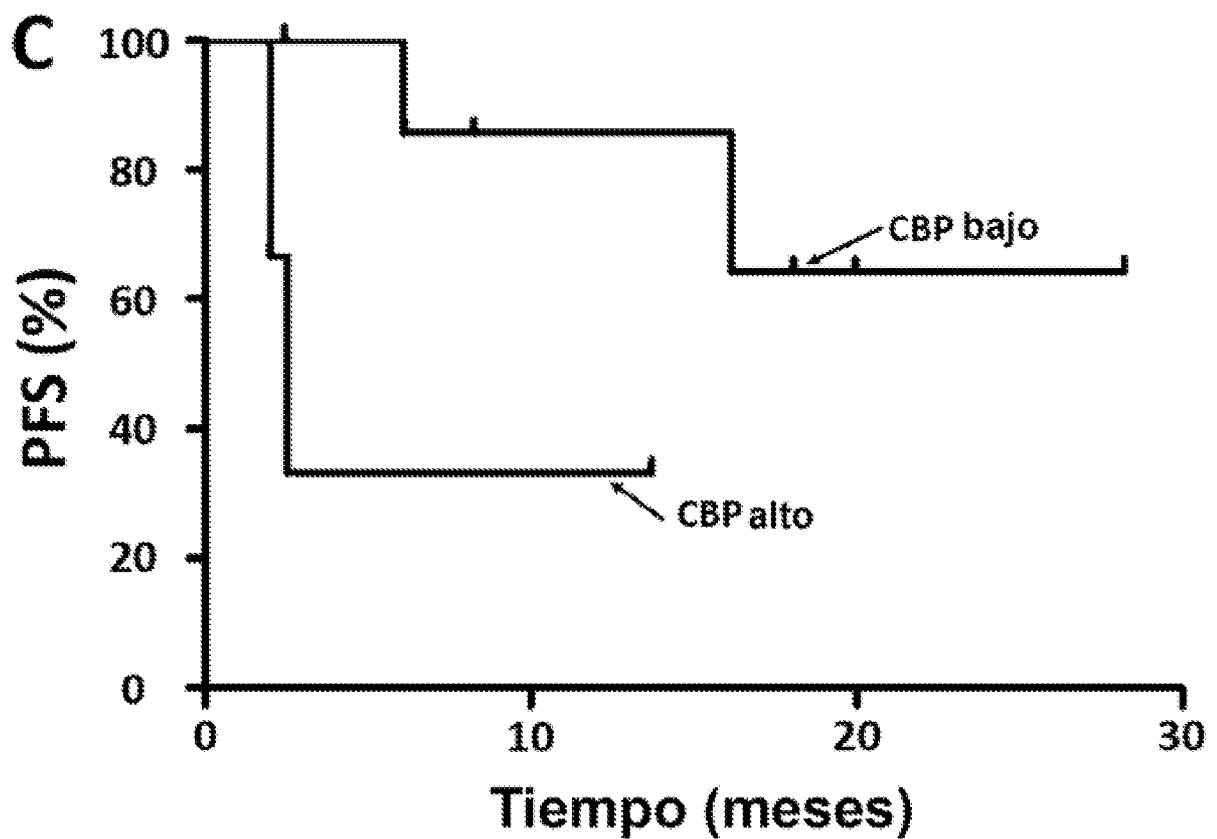
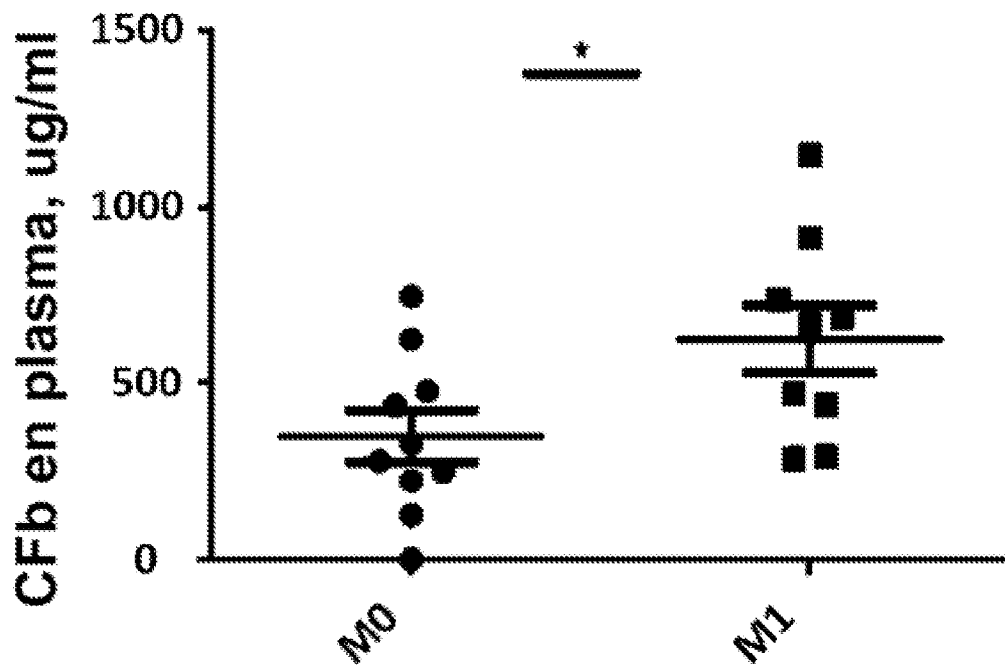


Figura 6B y 6C

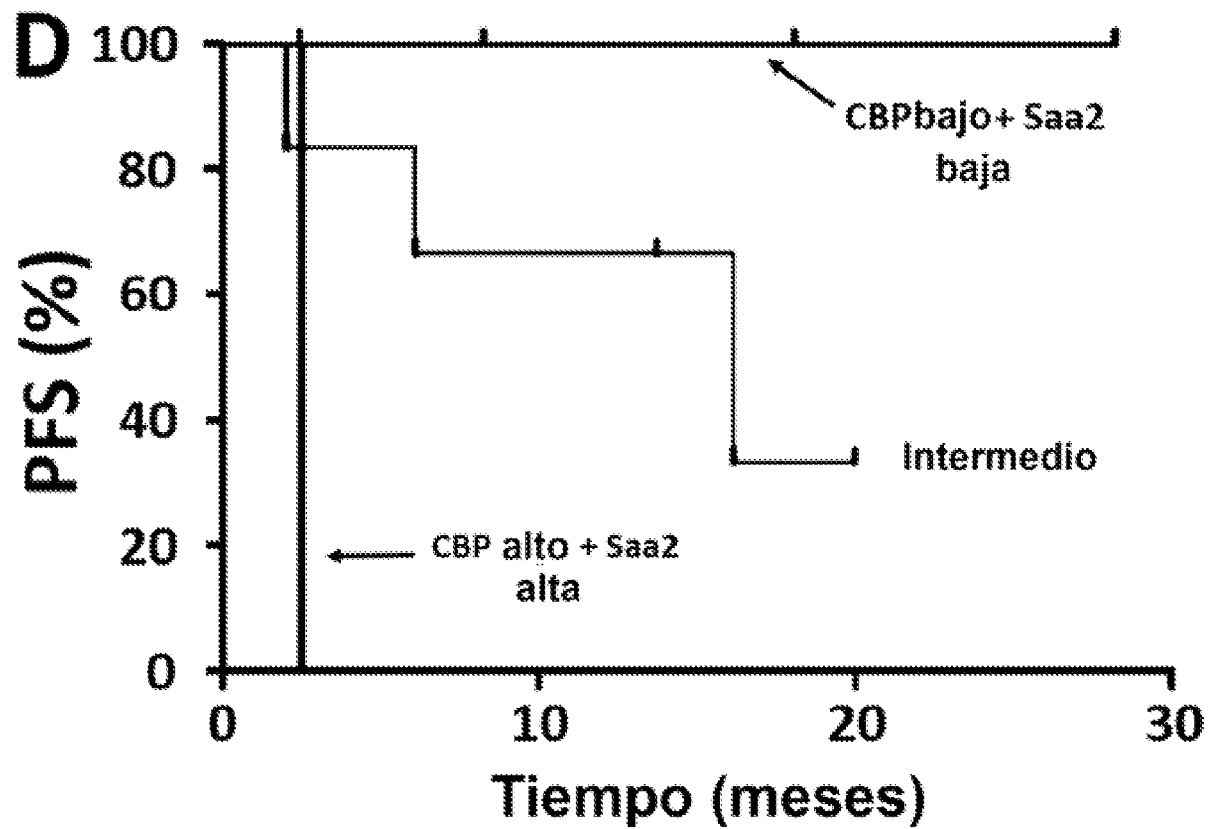


Figura 6D

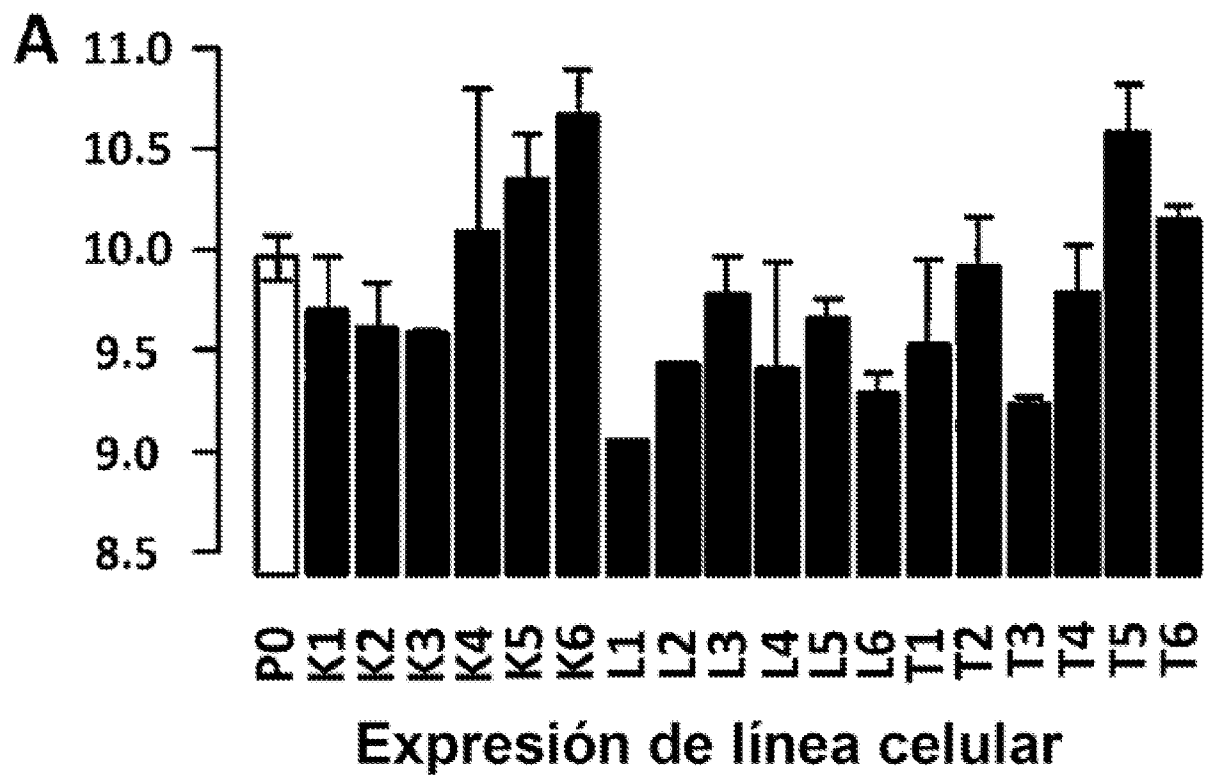


Figura 7A

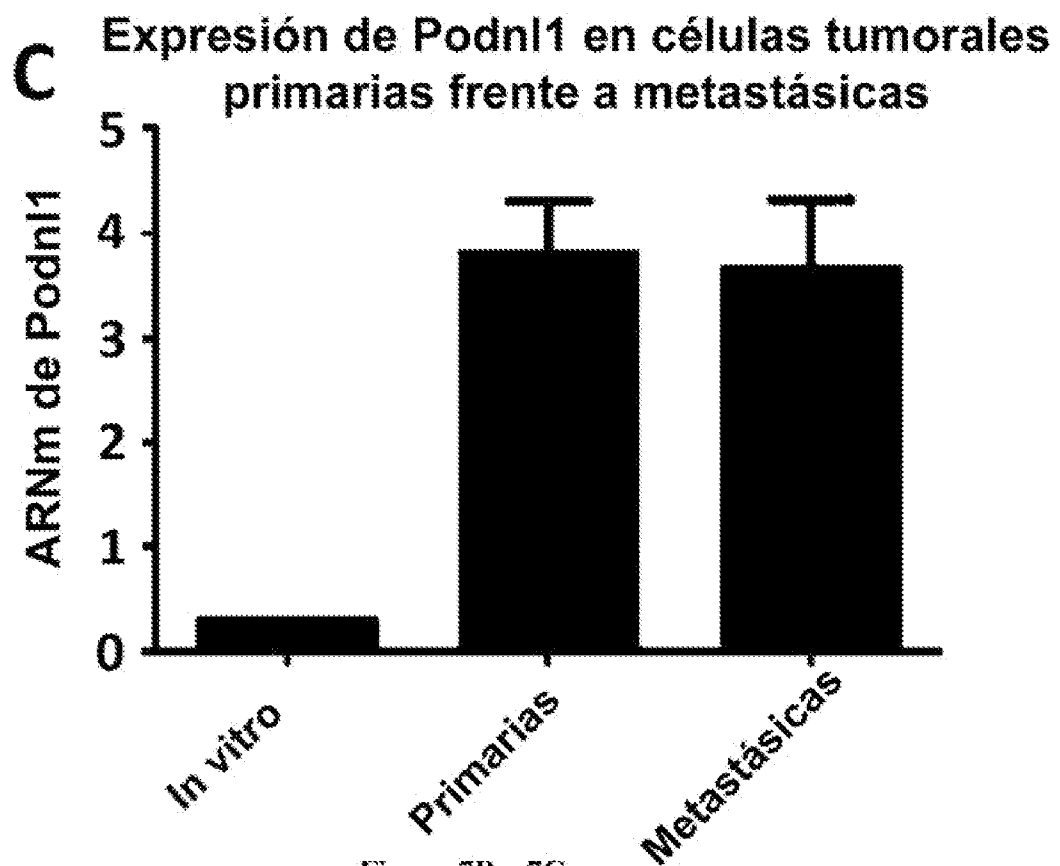
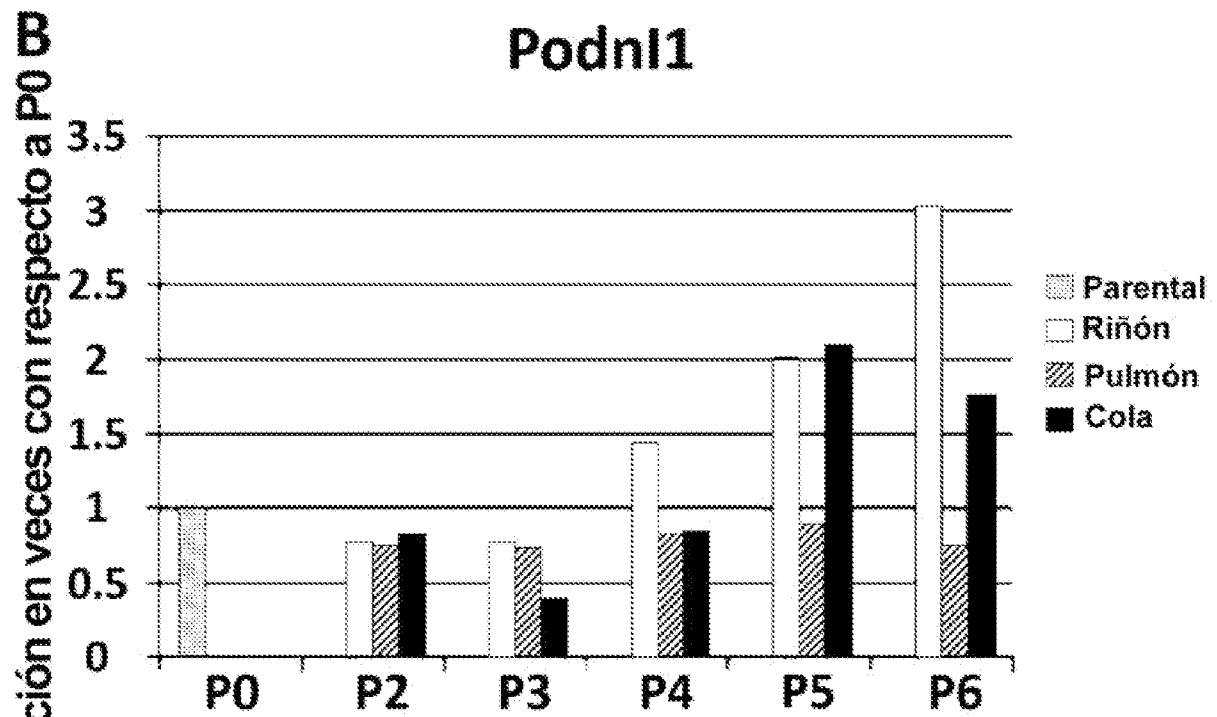


Figura 7B y 7C

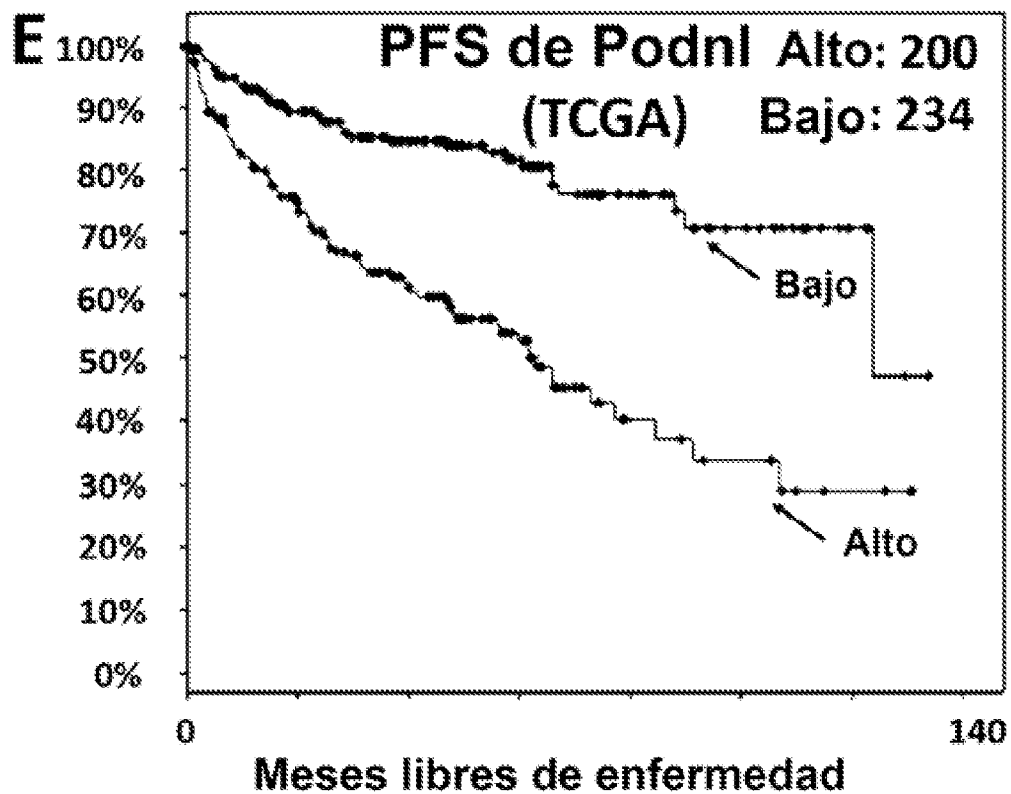
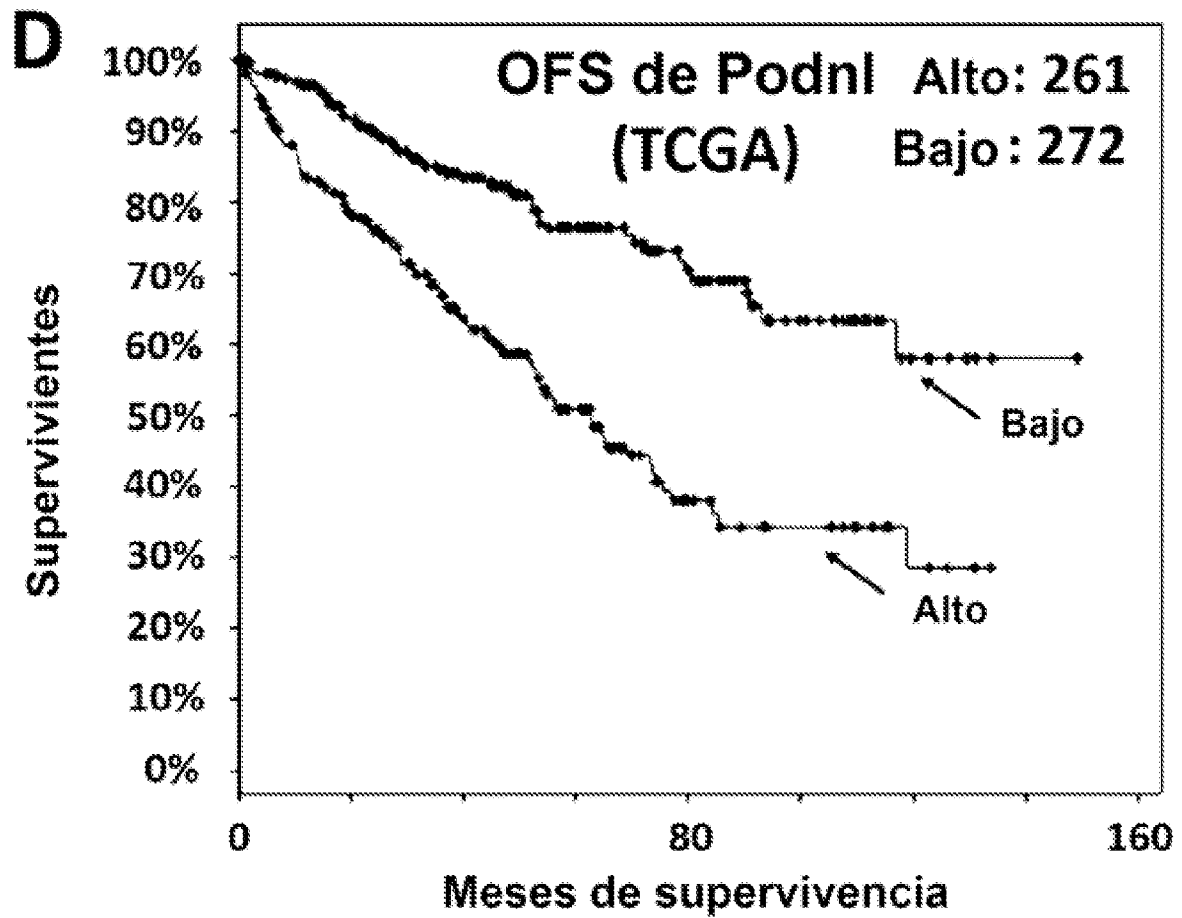
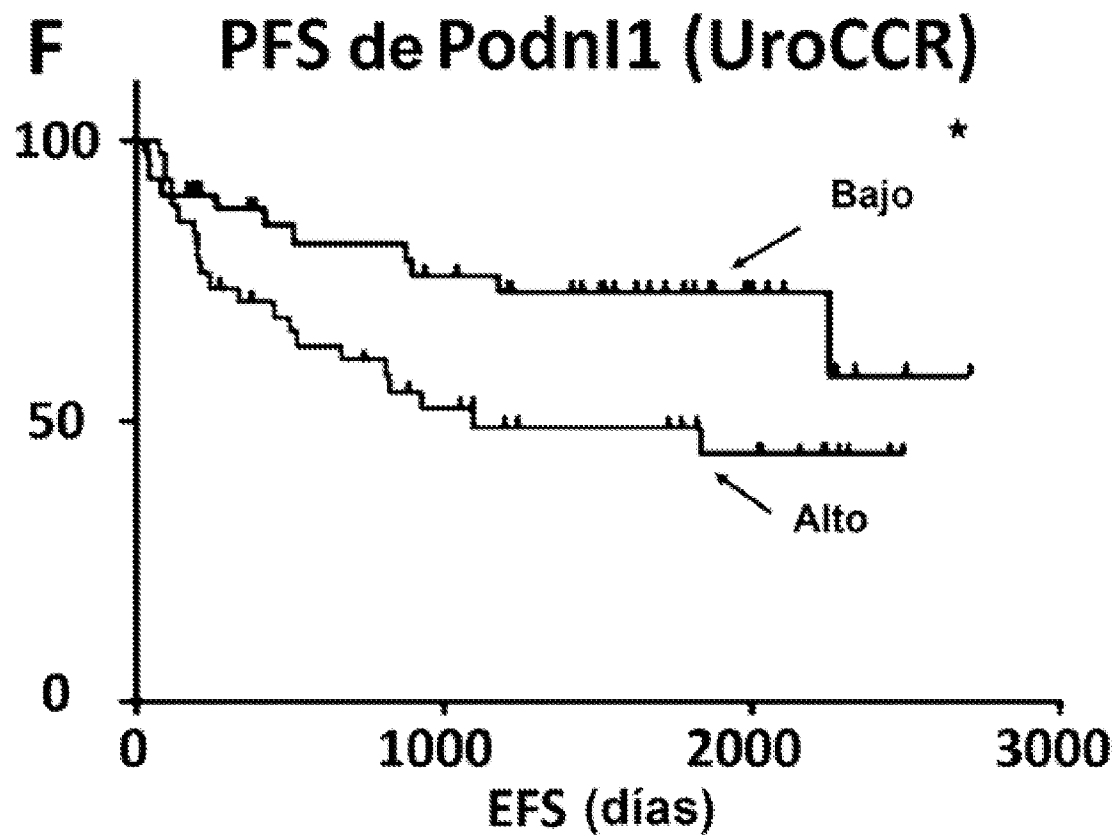


Figura 7D y 7E



G Podnl1, tumores frente a sano

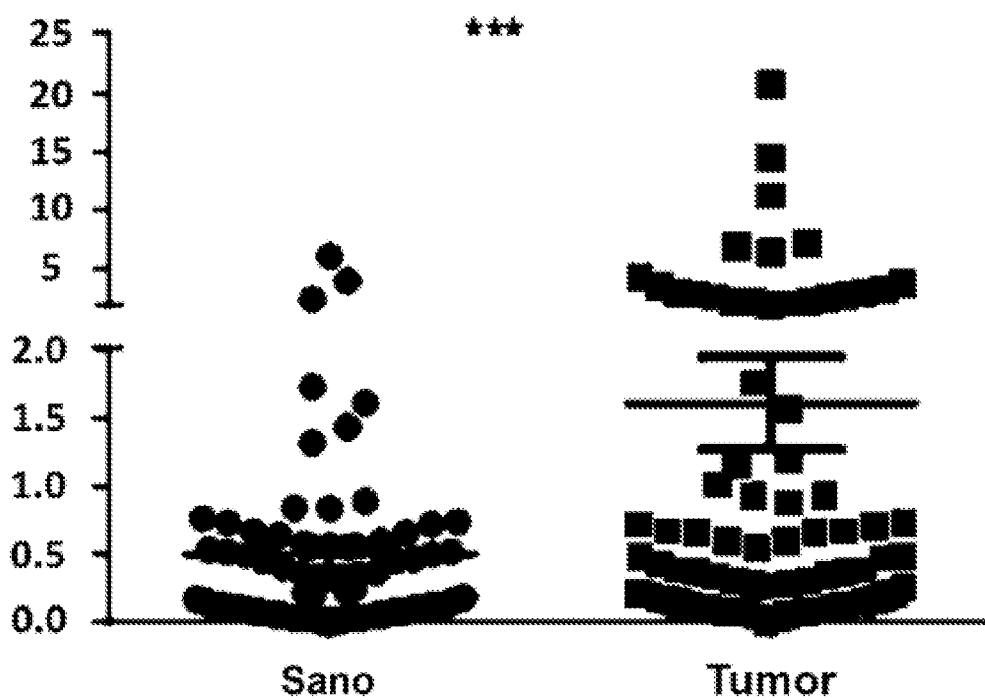


Figura 7F y 7G

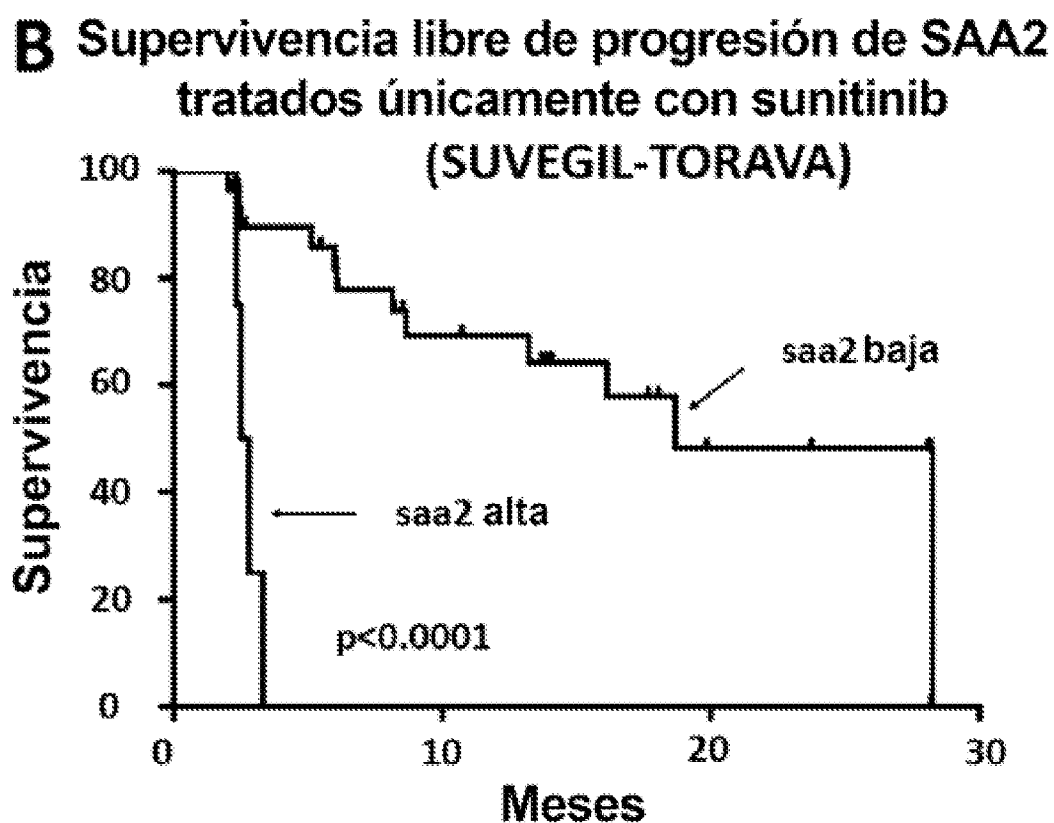
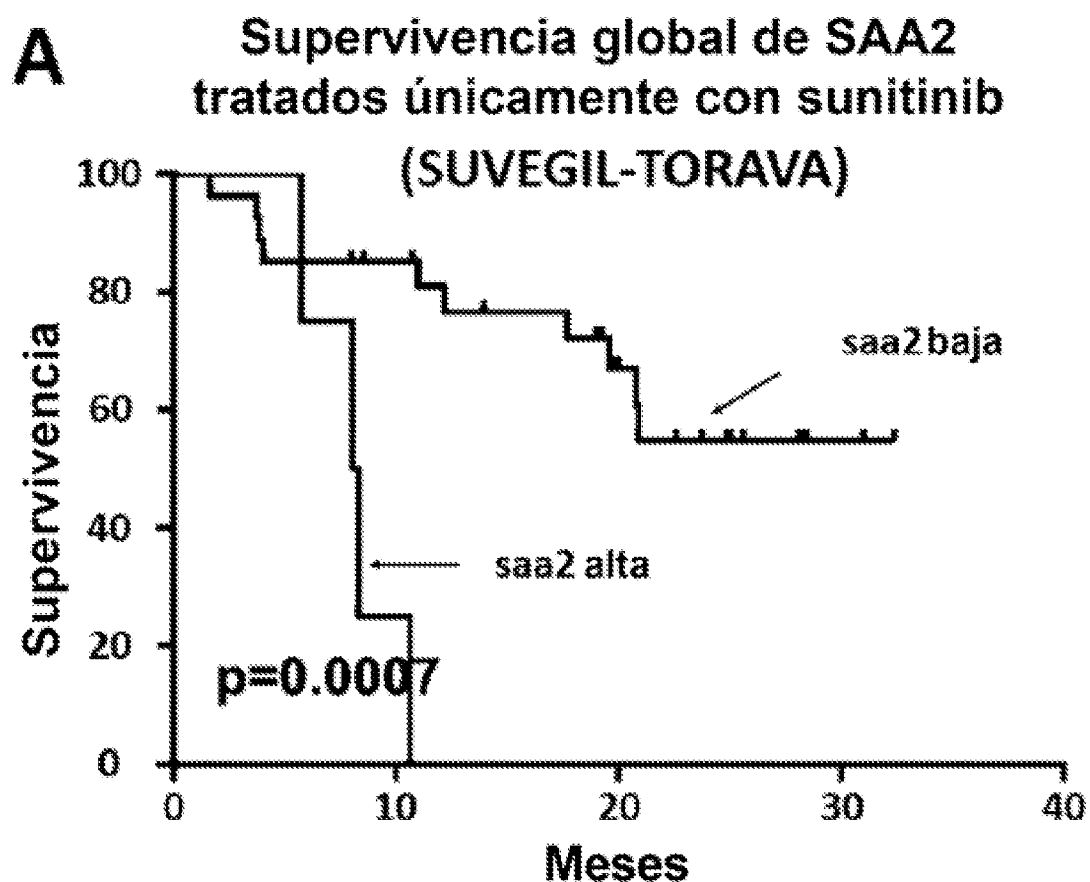


Figura 8A y 8B

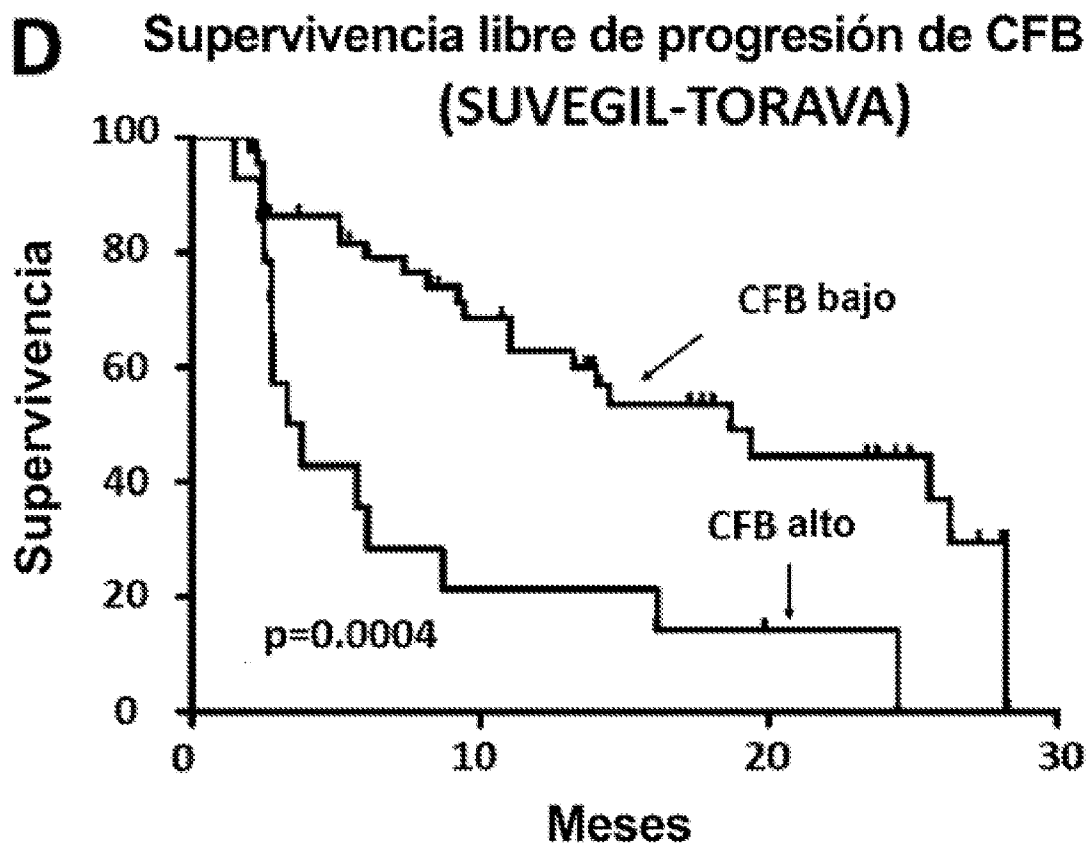
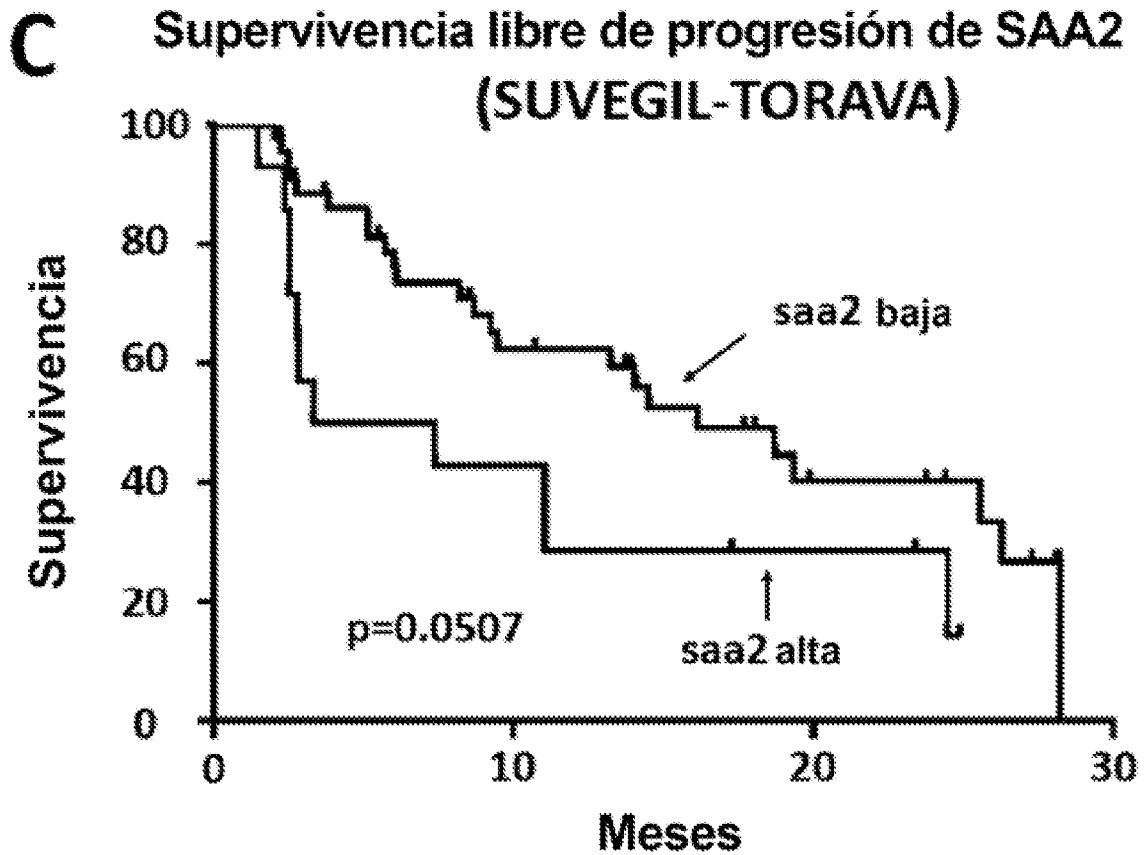


Figura 8C y 8D

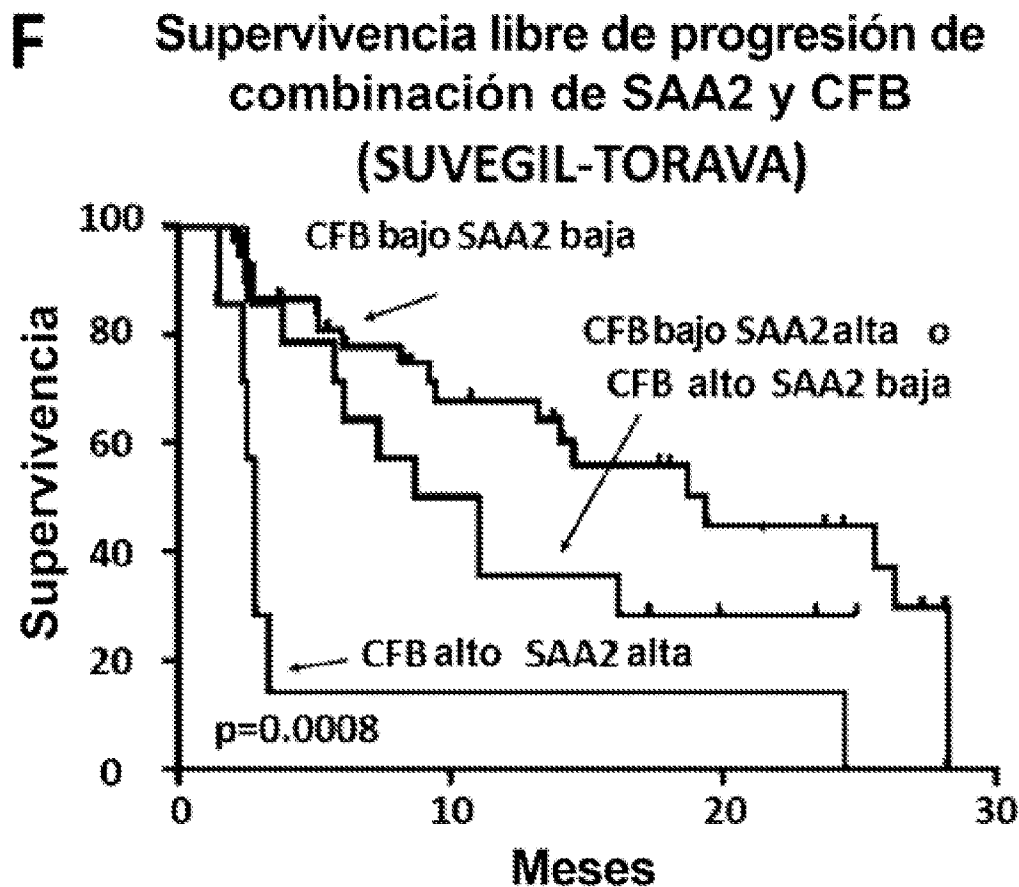
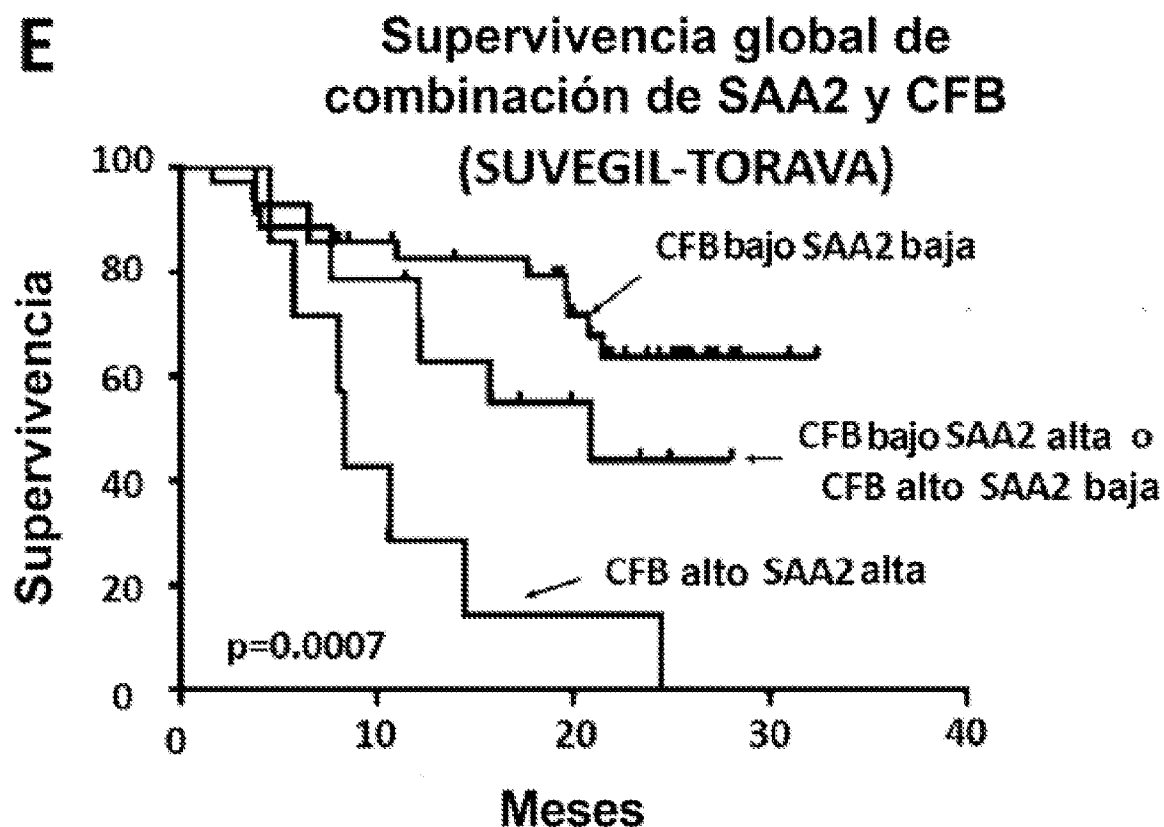


Figura 8E y 8F