

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 837 015**

(51) Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)
G06T 7/00 (2007.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G16H 30/20 (2008.01)
G16H 40/63 (2008.01)
G16H 50/30 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016 PCT/US2016/058278**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17070582**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016 E 16858374 (8)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 3365682**

(54) Título: **Sistema de derivación de proximidades espaciales entre células**

(30) Prioridad:

23.10.2015 US 201562245933 P
24.11.2015 US 201562259326 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2021

(73) Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

(72) Inventor/es:

BORDEAUX, JENNIFER y
LITTLE, BRIAN

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 837 015 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

Sistema de derivación de proximidades espaciales entre células

5 [0001] La presente invención se refiere en general al campo del tratamiento del cáncer. En la patente WO 2015/088930 A1 se describe un ensayo de inmunohistoquímica para detectar y cuantificar pares espacialmente proximales de células que expresan la molécula PD-1 (células PD-1+) y células que expresan los ligandos de muerte programada (células PD-L+) en tejidos tumorales, y el uso del ensayo para generar biomarcadores de proximidad que predicen qué pacientes con cáncer tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con un antagonista de PD-1. La divulgación también proporciona métodos para analizar muestras de tumores en busca de biomarcadores de proximidad, así como métodos para tratar a sujetos con un antagonista de PD-1 en función de los resultados de la prueba.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 [0002] La presente invención se refiere a un sistema de obtención de imágenes según la reivindicación 1 para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral procedente de un paciente con cáncer. Otras formas de realización se describen en las reivindicaciones dependientes.

20 [0003] En el presente documento, en un aspecto, se describen sistemas de obtención de imágenes para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral procedente de un paciente con cáncer, donde el sistema de obtención de imágenes comprende un dispositivo de obtención de imágenes que comprende un paso para posicionar la muestra en un campo de obtención de imágenes, una fuente de radiación electromagnética para dirigir la radiación electromagnética hacia la muestra y un detector configurado para detectar la radiación electromagnética de la muestra, y un controlador. El controlador comprende una interfaz de usuario para intercambiar información entre un operador y el controlador; y un circuito de procesamiento configurado para ejecutar instrucciones almacenadas en un medio legible por ordenador. Las instrucciones están configuradas para hacer que el controlador: (i) reciba información sobre la radiación electromagnética detectada desde el dispositivo de obtención de imágenes; (ii) genere datos de imagen en función de la radiación electromagnética detectada; (iii) analice los datos de imagen para determinar una puntuación representativa de la proximidad entre al menos un par de células, donde un primer elemento del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo elemento del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y (iv) registre la puntuación, donde la puntuación, cuando se compara con un valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la inmunoterapia.

35 [0004] En algunas formas de realización, la puntuación es representativa de una proximidad entre al menos un par de células y es representativa de un grado en el que el par de células está dentro de una proximidad predeterminada entre sí. En algunas formas de realización, la proximidad se evalúa en una escala de píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 1 píxel a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 5 píxeles a aproximadamente 40 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 50 µm. En algunas formas de realización, la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 2,5 µm a aproximadamente 20 µm.

45 [0005] En algunas formas de realización, la puntuación se calcula obteniendo una proximidad entre los límites del par de células. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula obteniendo una proximidad entre los centros de masa del par de células. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula usando lógica de límites basada en un perímetro alrededor de una primera célula seleccionada del par de células. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula determinando una intersección en los límites del par de células. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula determinando un área de superposición del par de células.

55 [0006] En algunas formas de realización, la generación de los datos de imagen comprende: (i) separar la información sobre la radiación electromagnética detectada en datos de imagen sin mezclar; y (ii) proporcionar los datos a través de una pluralidad de canales de datos, en los que los datos de imagen sin mezclar en un primer canal de datos describen señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador y los datos de imagen sin mezclar en un segundo canal de datos describen señales de fluorescencia atribuibles al segundo biomarcador.

60 [0007] De acuerdo con la presente invención, el análisis de los datos comprende: (i) dilatar, usando un dilatador del circuito de procesamiento, señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador del primer canal de datos en un margen predeterminado que se selecciona de modo que abarque células ubicadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador para generar una máscara del primer marcador dilatada; (ii) determinar un área de interacción, en donde el área de interacción es una primera área total para todas las células que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir, usando una calculadora de interacción del circuito de

procesamiento, el área de interacción por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial.

5 [0008] Según la presente invención, el factor de normalización es un área total para todas las células que tienen capacidad para expresar el segundo biomarcador. En algunas formas de realización, el factor de normalización es un área total para todas las células que están en el campo de visión. En algunas formas de realización, el área de interacción se determina combinando la máscara del primer marcador dilatada con una máscara representativa de las células que expresan el segundo biomarcador, determinada a partir de señales del segundo canal de datos.

10 En algunas formas de realización, un tercer canal de datos describe señales de fluorescencia atribuibles a núcleos celulares y un cuarto canal de datos describe señales de fluorescencia atribuibles al área tumoral de la muestra. En algunas formas de realización, el área total para todas las células que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador se determina combinando una máscara celular representativa de todas las células de la muestra, según señales del tercer canal de datos, y una máscara del área tumoral representativa del área tumoral de la muestra, según señales del cuarto canal de datos. En algunas formas de realización, la combinación de la máscara celular y la máscara del área tumoral comprende la retirada de la máscara del área tumoral de la máscara celular.

15 [0009] En algunas formas de realización, el circuito de procesamiento está configurado además para hacer que el controlador: (i) obtenga datos de imagen con un bajo aumento representativas de la concentración del primer o segundo biomarcador en la imagen; (ii) identifique áreas que incluyen la mayor concentración del primer o segundo biomarcador; (iii) seleccione un número predeterminado de áreas que incluyen la concentración más alta del primer o segundo biomarcador; (iv) envíe instrucciones al dispositivo de obtención de imágenes para obtener datos de imagen de gran aumento para el número predeterminado de áreas; en donde los datos de imagen de gran aumento se proporcionan al controlador para su análisis y uso para determinar la puntuación.

20 [0010] En algunas formas de realización, el bajo aumento es menor o igual a un aumento de 10x y el gran aumento es superior a 10x. En algunas formas de realización, el bajo aumento es un aumento de 10x y el gran aumento es de 40x. En algunas formas de realización, el bajo aumento es un aumento de 10x y el gran aumento es de 20x. En algunas formas de realización, el bajo aumento es un aumento de 4x y el gran aumento es de 40x. En algunas formas de realización, el bajo aumento es un aumento de 4x y el gran aumento es de 20x.

25 [0011] En algunas formas de realización, el controlador asocia la puntuación con metadatos asociados con las imágenes de la muestra. En algunas formas de realización, el controlador genera un informe que incluye la puntuación. En algunas formas de realización, el controlador proporciona la puntuación a un operador para que determine la estrategia de inmunoterapia. En algunas formas de realización, el controlador registra la puntuación en una base de datos. En algunas formas de realización, el controlador asocia la puntuación con el historial médico de un paciente.

30 [0012] En algunas formas de realización, la fuente de radiación electromagnética es una fuente de radiación electromagnética incoherente seleccionada del grupo que consiste en una lámpara incandescente, una lámpara fluorescente o un diodo. En algunas formas de realización, la fuente de radiación electromagnética es una fuente de radiación electromagnética coherente. En algunas formas de realización, el sistema comprende además elementos ópticos de acondicionamiento de radiación electromagnética colocados para dirigir la radiación electromagnética desde la fuente de radiación electromagnética hacia la muestra. En algunas formas de realización, los elementos ópticos de acondicionamiento de radiación electromagnética incluyen un elemento de filtro espectral ajustable configurado para proporcionar iluminación a la muestra usando diferentes bandas de longitud de onda de radiación electromagnética.

35 [0013] En algunas formas de realización, el sistema comprende además elementos ópticos de recogida de la radiación electromagnética configurados para recibir radiación electromagnética emitida desde la muestra y dirigir la radiación electromagnética emitida como radiación electromagnética de salida hacia el detector. En algunas formas de realización, los elementos ópticos de recogida de radiación electromagnética incluyen un elemento de filtro espectral ajustable configurado para seleccionar bandas de longitud de onda de radiación electromagnética particulares de la radiación electromagnética de la muestra.

40 [0014] En algunas formas de realización, el detector comprende al menos un sensor CCD. En algunas formas de realización, el detector comprende un tubo fotomultiplicador. En algunas formas de realización, el detector está configurado para generar una señal eléctrica correspondiente a la radiación electromagnética de la muestra y comunicar la señal eléctrica al controlador.

45 [0015] En algunas formas de realización, el controlador está configurado además para enviar señales eléctricas a uno o más de entre la plataforma, la fuente de radiación electromagnética y el detector para ajustar al menos una propiedad de la plataforma, la fuente de radiación electromagnética y/o el detector. En algunas formas de realización, el sistema comprende además un dispositivo de visualización para mostrar información al operador. En algunas formas de realización, la información presentada es uno de entre parámetros del sistema, propiedades

del sistema e imágenes capturadas de la muestra. En algunas formas de realización, el controlador muestra la puntuación en el dispositivo de visualización.

- [0016] En algunas formas de realización, la información sobre la radiación electromagnética detectada a partir del dispositivo de obtención de imágenes es una pluralidad de imágenes espectrales. En algunas formas de realización, la pluralidad de imágenes espectrales corresponde cada una a una longitud de onda diferente de radiación electromagnética emitida por la muestra y detectada por el detector. En algunas formas de realización, cada longitud de onda de radiación electromagnética emitida por la muestra corresponde a un fluoróforo diferente añadido a la muestra para identificar características específicas en la muestra.

[0017] En algunas formas de realización, el sistema proporciona un poder predictivo superior en comparación con la cuantificación de la expresión del primer biomarcador o la cuantificación de la expresión del segundo biomarcador. En algunas formas de realización, el poder predictivo se cuantifica como un valor predictivo positivo, un valor predictivo negativo o una combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 65 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 70 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 75 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 65 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 80 % o más.

[0018] En otro aspecto, en el presente documento se describen métodos para puntuar una muestra de tejido, que comprenden: (i) el uso de un sistema de obtención de imágenes para obtener datos de imagen para la muestra de tejido procedente de un paciente con cáncer, donde el sistema de obtención de imágenes comprende una carcasa que comprende una plataforma para colocar la muestra en un campo de obtención de imágenes, una fuente de radiación electromagnética para dirigir la radiación electromagnética a la muestra y un detector para recoger la salida de radiación electromagnética; y un controlador que comprende una memoria y un circuito de procesamiento que tiene módulos de procesamiento de imágenes; (ii) el análisis, utilizando los módulos de procesamiento de imágenes, de los datos de imagen para determinar una puntuación representativa de la proximidad entre un par de células, donde un primer elemento del par de células expresa un primer biomarcador y un segundo elemento del par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y (iii) el registro de la puntuación en la memoria, puntuación que, cuando se compara con un valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la inmunoterapia.

[0019] En algunas formas de realización, la puntuación es representativa de la proximidad entre el par de células, es representativa de un grado en el que el par de células está dentro de una proximidad predeterminada entre sí. En algunas formas de realización, el análisis de los datos de imagen comprende evaluar la proximidad en una escala de píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 1 píxel a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 5 píxeles a aproximadamente 40 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 50 µm. En algunas formas de realización, la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 2,5 µm a aproximadamente 20 µm. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula obteniendo una proximidad entre los límites del par de células. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula obteniendo una proximidad entre los centros de masa del par de células. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula usando lógica de límites basada en un perímetro alrededor de una primera célula seleccionada del par de células. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula determinando una intersección en los límites del par de células. En algunas formas de realización, la puntuación se calcula determinando un área de superposición del par de células.

[0020] En algunas formas de realización, la generación de los datos de imagen comprende: (i) separar la información sobre la radiación electromagnética detectada en datos de imagen sin mezclar; y (ii) proporcionar los datos a través de una pluralidad de canales de datos, en donde los datos de imagen sin mezclar en un primer canal de datos describen señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador y los datos de imagen sin mezclar en un segundo canal de datos describen señales de fluorescencia atribuibles al segundo biomarcador.

[0021] De acuerdo con la presente invención, el análisis de los datos de imagen comprende: (i) dilatar, usando un dilatador del circuito de procesamiento, señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador del primer canal de datos en un margen predeterminado que se selecciona para que abarque células ubicadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador para generar una máscara del primer marcador dilatada; (ii) determinar un área de interacción, en la que el área de interacción es una primera área total para todas las células que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir, usando una calculadora de interacción del circuito de procesamiento, el área de interacción por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial.

[0022] Según la presente invención, el factor de normalización es un área total para todas las células que tienen capacidad para expresar el segundo biomarcador. En algunas formas de realización, el factor de normalización es

- un área total para todas las células que están en el campo de visión. En algunas formas de realización, la determinación del área de interacción comprende combinar la máscara del primer marcador dilatada con una máscara representativa de las células que expresan el segundo biomarcador, determinada a partir de señales del segundo canal de datos. En algunas formas de realización, un tercer canal de datos describe señales de fluorescencia atribuibles a núcleos celulares y un cuarto canal de datos describe señales de fluorescencia atribuibles al área tumoral de la muestra.
- [0023] En algunas formas de realización, el método comprende además determinar el área total para todas las células que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador mediante la combinación de una máscara celular representativa de todas las células de la muestra, basada en señales del tercer canal de datos, y una máscara del área tumoral representativa del área tumoral en la muestra, basada en señales del cuarto canal de datos. En algunas formas de realización, la combinación de la máscara celular y la máscara del área tumoral comprende la retirada de la máscara del área tumoral de la muestra celular.
- [0024] En algunas formas de realización, los métodos comprenden además (i) el uso del sistema de obtención de imágenes para obtener imágenes de datos con un bajo aumento representativas de la concentración del primer o segundo biomarcador en la imagen; (ii) la identificación de áreas que incluyen la mayor concentración del primer o segundo biomarcador; (iii) la selección de un número predeterminado de áreas que incluyen la concentración más alta del primer o segundo biomarcador; (iv) el envío de instrucciones al dispositivo de obtención de imágenes para obtener datos de imagen de gran aumento para el número predeterminado de áreas; y (iv) en donde los datos de imagen de gran aumento se proporcionan al controlador para su análisis y uso para determinar la puntuación.
- [0025] En algunas formas de realización, el bajo aumento es menor o igual a un aumento de 10x y el gran aumento es superior a 10x. En algunas formas de realización, el bajo aumento es un aumento de 4x y el gran aumento es de 20x.
- [0026] En algunas formas de realización, los métodos comprenden además asociar la puntuación con metadatos asociados con las imágenes de la muestra. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además generar un informe que incluye la puntuación. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además proporcionar la puntuación a un profesional para que determine la estrategia de inmunoterapia. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además registrar la puntuación en una base de datos. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además asociar la puntuación con el historial médico de un paciente. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además mostrar la puntuación en un dispositivo de visualización.
- [0027] En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con la cuantificación de la expresión del primer biomarcador o la cuantificación de la expresión del segundo biomarcador. En algunas formas de realización, el poder predictivo se cuantifica como un valor predictivo positivo, un valor predictivo negativo o una combinación de estos. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 65 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 70 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 75 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 65 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 80 % o más.
- [0028] En otro aspecto, en el presente documento se describen sistemas de puntuación de muestras de tejido que comprenden: (i) un dispositivo de obtención de imágenes que obtiene datos de imagen de una muestra de tejido procedente de un paciente con cáncer; y (ii) un controlador que recibe datos de imagen del dispositivo de obtención de imágenes y analiza los datos para determinar una puntuación representativa de la proximidad entre un par de células, donde un primer elemento del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo elemento del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; (iii) donde la puntuación, cuando se compara con un valor umbral, es indicativa de la probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la inmunoterapia.
- [0029] En algunas formas de realización, el dispositivo de obtención de imágenes comprende una plataforma para colocar la muestra en un campo de obtención de imágenes, una fuente de radiación electromagnética para dirigir la radiación electromagnética hacia la muestra y un detector configurado para detectar la radiación electromagnética de la muestra.
- [0030] En algunas formas de realización, la radiación electromagnética se selecciona del grupo que consiste en luz visible y no visible. En algunas formas de realización, la luz visible comprende bandas de luz visible que tienen longitudes de onda comprendidas entre aproximadamente 380 nm y aproximadamente 720 nm. En algunas formas de realización, la luz visible comprende bandas de luz visible que tienen longitudes de onda comprendidas entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 700 nm. En algunas formas de realización, la luz visible comprende bandas de luz visible que tienen longitudes de onda comprendidas entre aproximadamente 380 nm y aproximadamente 720 nm.

[0031] En algunas formas de realización, la radiación electromagnética emitida o de salida comprende una o más bandas de luz visible del grupo que consiste en bandas que incluyen longitudes de onda en el rango de aproximadamente 440 nm a aproximadamente 480 nm, de aproximadamente 490 nm a aproximadamente 550 nm, de aproximadamente 505 nm a aproximadamente 535 nm, de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 595 nm, de aproximadamente 585 nm a aproximadamente 630 nm, de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 640 nm y de aproximadamente 650 nm a aproximadamente 710 nm. En algunas formas de realización, la radiación electromagnética se selecciona del grupo que consiste en luz visible y no visible. En algunas formas de realización, la luz visible comprende bandas de luz visible que tienen longitudes de onda comprendidas entre aproximadamente 380 nm y aproximadamente 720 nm. En algunas formas de realización, la luz visible comprende bandas de luz visible que tienen longitudes de onda comprendidas entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 700 nm. En algunas formas de realización, la luz visible comprende bandas de luz visible que tienen longitudes de onda comprendidas entre aproximadamente 380 nm y aproximadamente 720 nm.

[0032] En algunas formas de realización, el sistema proporciona un poder predictivo superior en comparación con la cuantificación de la expresión del primer biomarcador o la cuantificación de la expresión del segundo biomarcador. En algunas formas de realización, el poder predictivo se cuantifica como un valor predictivo positivo, un valor predictivo negativo o una combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 65 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 70 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 75 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 65 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 80 % o más.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 [0033]

La FIG. 1 es un diagrama de bloques de un dispositivo de obtención de imágenes para obtener datos de imagen de una muestra.

30 La FIG. 2 es un diagrama de bloques de un controlador configurado para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral procedente de un paciente con cáncer, según una forma de realización ejemplar.

La FIG. 3 es un diagrama de flujo de un proceso para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral, según una forma de realización ejemplar.

35 La FIG. 4 es un diagrama de flujo de un proceso para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral, según una segunda forma de realización ejemplar.

La FIG. 5 es un diagrama de flujo de los pasos de procesamiento de imágenes utilizados para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral, según una forma de realización ejemplar.

40 La FIG. 6 muestra un ejemplo no limitativo de una descripción general de anticuerpos y reactivos de detección utilizados en la preparación de muestras de tejido para la obtención de imágenes y su análisis.

La FIG. 7a muestra un ejemplo no limitativo de todos los núcleos detectados con DAPI dentro de una imagen.

45 La FIG. 7b muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria dilatada de todas las células de la FIG. 7a.

La FIG. 8a muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de S100 detectada con tinte 488.

La FIG. 8b muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de toda el área tumoral de la FIG. 8a.

45 La FIG. 8c muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de todas las células tumorales de la FIG. 8a.

La FIG. 8d muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de todas las células no tumorales de la FIG. 8a.

La FIG. 9a muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de PD-L1 detectada con Cy® 5.

La FIG. 9b muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células positivas para PD-L1 de la FIG. 9a.

50 La FIG. 10 a muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de PD-1 detectada con Cy® 3.5.

La FIG. 10b muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células no tumorales positivas para PD-1 de la FIG. 10 a.

La FIG. 11a muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de interacción de todas las células positivas para PD-L1 y las células adyacentes más cercanas.

55 La FIG. 11b muestra un ejemplo no limitativo de un compartimento de interacción de las células positivas para PD-1 en proximidad de las células positivas para PD-L1.

La FIG. 12a muestra un ejemplo no limitativo de puntuaciones de interacción de 26 pacientes con melanoma.

La FIG. 12b muestra un ejemplo no limitativo de las puntuaciones máximas de interacción de los 26 pacientes de la FIG. 12a.

60 La FIG. 13 muestra resultados de análisis basados en la obtención de imágenes de portaobjetos completos en lugar de un algoritmo de enriquecimiento.

La FIG. 14 muestra una comparación de las puntuaciones de interacción con la supervivencia sin progresión de los 26 pacientes. Nota: * indica una prueba de los rangos logarítmicos sin corregir.

La FIG. 15 muestra una comparación de la expresión de PD-L1 con la supervivencia sin progresión de los pacientes.

- La FIG. 16 muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de señales de fluorescencia correspondiente a células positivas para PD-L1 (rojo), células positivas para PD-1 (amarillo), todas las células tumorales (verde) y todas las células (azul) para una respuesta positiva a la immunoterapia.
- 5 La FIG. 17 muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de señales de fluorescencia correspondiente a células positivas para PD-L1 (rojo), células positivas para PD-1 (amarillo), todas las células tumorales (verde) y todas las células (azul) para una respuesta negativa a la immunoterapia.
- 10 La FIG. 18 muestra puntuaciones representativas de la interacción PD-1/PD-L1 en 38 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 15 La FIG. 19 muestra una comparación de la expresión de PD-L1 determinada usando el ensayo IHC 22C3 aprobado por la FDA con la supervivencia sin progresión de los pacientes. Nota: * indica que el valor p se determinó mediante una prueba de los rangos logarítmicos sin corregir.
- 20 La FIG. 20a muestra un ejemplo no limitativo de puntuaciones de interacción de 34 pacientes con melanoma adicionales.
- 25 La FIG. 20b muestra una comparación de las puntuaciones de interacción con la supervivencia sin progresión de los pacientes de la FIG. 20a.
- 30 La FIG. 20c muestra las puntuaciones de interacción de los pacientes de las Figs. 12a y 12b y los pacientes de la FIG. 20a.
- 35 La FIG. 20d muestra una comparación de las puntuaciones de interacción con la supervivencia sin progresión de los pacientes de la FIG. 20c. Nota: * indica que el valor p se determinó mediante una prueba de los rangos logarítmicos sin corregir.
- 40 La FIG. 20e muestra una comparación de las puntuaciones de interacción con la supervivencia global (SG) de los pacientes de La FIG. 20c. Nota: * indica que el valor p se calculó utilizando una prueba de los rangos logarítmicos sin corregir.
- 45 La FIG. 21 muestra un ejemplo no limitativo de puntuaciones de interacción CTLA-4/CD80 de 29 pacientes con melanoma metastásico.
- 50 La FIG. 22 muestra un ejemplo no limitativo de puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 de 29 pacientes con carcinoma testicular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 30 [0034] A continuación se describen varias formas de realización. Cabe señalar que las formas de realización específicas no pretenden ser una descripción exhaustiva o una limitación de los aspectos más amplios descritos en este documento. Un aspecto descrito junto con una forma de realización particular no se limita necesariamente a esa forma de realización y se puede poner en práctica con cualquier otra forma de realización.
- 35 [0035] Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" será entendido por personas con conocimientos de la materia y variará hasta cierto punto dependiendo del contexto en el que se use. Si hay usos del término que no son claros para las personas con conocimientos de la materia, dado el contexto en el que se usa, "aproximadamente" significará hasta más o menos del 10 % del término particular.
- 40 [0036] El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referencias similares en el contexto de la descripción de los elementos (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse como inclusivo tanto del singular como del plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. La mención de rangos de valores en el presente documento está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto indique claramente lo contrario. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplificador (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento está destinado simplemente a ilustrar mejor las formas de realización y no supone una limitación en el alcance de las reivindicaciones a menos que se indique lo contrario. Ninguna expresión de la especificación debe interpretarse como indicativa de que cualquier elemento no reivindicado es esencial.
- 55 [0037] El término "tratar" o "tratamiento" se refiere a la administración de una terapia en una cantidad, manera o modo efectivo para mejorar un estado, síntoma o parámetro asociado con un trastorno o para prevenir la progresión de un trastorno, ya sea en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable para un experto en la técnica. Una cantidad, manera o modo eficaz puede variar según el sujeto y puede adaptarse al paciente.
- 60 [0038] En un aspecto, se proporcionan sistemas para realizar métodos de puntuación de una muestra que comprende tejido tumoral procedente de un paciente con cáncer.
- 65 [0039] La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo de obtención de imágenes 100 para adquirir múltiples imágenes resueltas espectralmente de una muestra. Una fuente de radiación electromagnética (REM) 102 proporciona radiación electromagnética para acondicionar los elementos ópticos 104. En algunas formas de realización, la radiación electromagnética es luz visible. La fuente de REM 102 puede ser una fuente de

- luz incoherente, como una lámpara incandescente, una lámpara fluorescente o un diodo. La fuente de REM 102 también puede ser una fuente coherente, tal como una fuente láser, y la fuente coherente puede proporcionar onda continua (CW) o luz pulsada. La fuente de REM 102 puede contener múltiples elementos de fuente de luz para producir luz que tiene un rango de longitudes de onda (por ejemplo, múltiples diodos). La luz puede ser de onda continua (CW) o luz controlada por tiempo (es decir, pulsada). Además, se puede proporcionar luz en una parte seleccionada del espectro electromagnético. Por ejemplo, la luz puede tener una longitud de onda central y/o una distribución de longitudes de onda que esté dentro de las zonas ultravioleta, visible, infrarroja u otras del espectro.
- En algunas formas de realización, la luz tiene longitudes de onda que oscilan entre aproximadamente 380 nm y aproximadamente 720 nm. La fuente de REM 102 también puede incluir varios elementos ópticos tales como lentes, espejos, placas de ondas y cristales no lineales, todos los cuales pueden usarse para producir luz con las características seleccionadas. En general, la fuente de REM 102 incluye elementos ópticos y dispositivos configurados para proporcionar luz con las propiedades espectrales, espaciales y, en algunas formas de realización, temporales deseadas.
- [0040] Los elementos ópticos de acondicionamiento 104 se puede configurar para que transformen la radiación electromagnética, como la luz visible, de varias formas. Por ejemplo, los elementos ópticos de acondicionamiento 104 pueden filtrar espectralmente la luz para proporcionar luz de salida en una zona de longitud de onda seleccionada del espectro. Alternativamente, o además, los elementos ópticos de acondicionamiento pueden ajustar la distribución espacial de la luz y las propiedades temporales de la luz. La radiación electromagnética incidente, o luz incidente, se genera por la acción de los elementos de los elementos ópticos de acondicionamiento 104 en la REM.
- [0041] La luz incidente se orienta para que incida sobre la muestra 108 montada en la plataforma de iluminación 106. La plataforma 106 puede proporcionar medios para asegurar la muestra 108, tales como clips de montaje u otros dispositivos de sujeción. Alternativamente, la plataforma 106 puede incluir una pista o cinta móvil en la que se fijan una pluralidad de muestras 108. Se puede configurar un mecanismo impulsor para que mueva la pista con el fin de hacer pasar sucesivamente la pluralidad de muestras, una a una, a través de una zona de iluminación en la plataforma 106, donde la luz incidente incide sobre la muestra. La plataforma 106 puede incluir además ejes de traslación y mecanismos para desplazar la muestra 108 con respecto a una posición fija de la plataforma de iluminación 106. Los mecanismos de traslación pueden funcionar manualmente (por ejemplo, varillas roscadas) o pueden moverse automáticamente mediante activación eléctrica (por ejemplo, controladores motorizados, actuadores piezoelectrinos).
- [0042] En respuesta a la radiación electromagnética incidente, como la luz visible, la radiación electromagnética emitida emerge de la muestra 108. La luz emitida se puede generar de varias formas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la luz emitida corresponde a una parte de la luz incidente transmitida a través de la muestra 108. En otras formas de realización, la luz emitida corresponde a una parte de la luz incidente reflejada por la muestra. En otras formas de realización adicionales, la muestra 108 puede absorber luz incidente, y la luz emitida corresponde a la emisión de fluorescencia de la muestra 108 en respuesta a la luz incidente. En otras formas de realización adicionales, la muestra 108 puede ser luminescente y puede producir luz emitida incluso en ausencia de luz incidente. En algunas formas de realización, la luz emitida puede incluir luz producida mediante dos o más de los mecanismos anteriores.
- [0043] Los elementos ópticos colectores 110 están situados de modo que reciban la radiación electromagnética emitida, tal como la luz emitida, por la muestra 108. Los elementos ópticos colectores 110 pueden configurarse para colimar la luz emitida cuando la luz es divergente, por ejemplo. Los elementos ópticos colectores 110 también pueden configurarse para filtrar espectralmente la luz emitida. Las operaciones de filtrado pueden ser útiles, por ejemplo, para aislar una parte de la luz emitida que surge a través de uno de los mecanismos mencionados anteriormente de la luz que surge a través de otros procesos. Además, los elementos ópticos colectores 110 se pueden configurar para que modifiquen las propiedades espaciales y/o temporales de la luz emitida para propósitos particulares en formas de realización. Los elementos ópticos recolectores de luz 110 transforman la luz emitida en luz de salida que incide en el detector 112.
- [0044] Los elementos ópticos de acondicionamiento 104 y los elementos ópticos colectores 110 pueden incluir una variedad de elementos ópticos para manipular las propiedades de la luz incidente y emitida por una muestra de interés. Por ejemplo, los elementos ópticos de acondicionamiento 104 y los elementos ópticos colectores 110 pueden incluir cada uno elementos de filtro espectral para seleccionar bandas de longitud de onda particulares de la luz incidente y emitida. Los elementos de filtro espectral pueden incluir, por ejemplo, filtros de interferencia montados en un filtro. En algunas formas de realización, se pueden usar elementos de filtro ajustables basados en máscaras de cristal líquido para cambiar las propiedades espectrales de la luz incidente o emitida. Los dispositivos basados en cristal líquido pueden ser controlados por el controlador 150 a través de la interfaz de comunicaciones 152.
- [0045] Los elementos ópticos de acondicionamiento 104 y los elementos ópticos colectores 110 también pueden incluir elementos tales como máscaras de luz espaciales, moduladores de luz espaciales y formadores de pulsos ópticos para manipular la distribución espacial de la luz incidente sobre una muestra, o emitida desde esta. Los

moduladores de luz espacial y otros dispositivos adaptativos también se pueden controlar a través de la interfaz de comunicaciones 152 mediante el controlador 150.

5 [0046] Finalmente, los elementos ópticos de acondicionamiento 104 y los elementos ópticos colectores 110 pueden incluir otros elementos ópticos comunes tales como espejos, lentes, divisores de haz, placas de ondas y similares, configurados para conferir características seleccionadas a la luz incidente o emitida.

10 [0047] En general, el detector 112 incluye uno o más dispositivos de medición configurados para detectar y capturar la luz emitida por una muestra como múltiples imágenes de la muestra. En formas de realización, el detector 112 se puede configurar para que mida las propiedades espaciales y/o temporales y/o espectrales de la luz. El detector 112 puede incluir dispositivos tales como conjuntos de CCD y tubos fotomultiplicadores, junto con sus respectivos sistemas de control, para adquirir las imágenes. El detector 112 genera una señal eléctrica que corresponde a la luz de salida y se comunica al controlador 150. Los dispositivos ópticos adaptativos del detector 112 pueden, en general, ser controlados por el controlador 150 a través de la interfaz de comunicaciones 152.

15 [0048] El controlador 150 incluye una interfaz de comunicaciones 152 y un circuito de procesamiento 156. Además de recibir señales correspondientes a la luz de salida detectada por el detector 112, el controlador 150 envía señales eléctricas al detector 112 para ajustar varias propiedades del detector 112, a través de la interfaz de comunicaciones 152. Por ejemplo, si el detector 112 incluye un sensor CCD, el controlador 150 puede enviar señales eléctricas al detector 112 para controlar el tiempo de exposición, el área activa, los ajustes de ganancia y otras propiedades del sensor CCD.

20 [0049] El controlador 150 también se comunica con la fuente de REM 102, los elementos ópticos de acondicionamiento 104, la plataforma 106 y los elementos ópticos colectores 110 a través de la interfaz de comunicaciones 152. El sistema de control 114 proporciona señales eléctricas a cada uno de estos elementos del sistema 100 para ajustar varias propiedades de los elementos. Por ejemplo, las señales eléctricas proporcionadas a la fuente de luz 102 se pueden usar para ajustar la intensidad, la longitud de onda, la velocidad de repetición u otras propiedades de la luz 122. Cuando la luz producida por la fuente de REM 102 es pulsada (es decir, controlada por tiempo), varias propiedades de los pulsos de luz se pueden manipular de acuerdo con las señales de control proporcionadas a la fuente de REM 102 desde el controlador 150 a través de la interfaz de comunicaciones 152. Las señales proporcionadas a los elementos ópticos de acondicionamiento de luz 104 y los elementos ópticos colectores de luz 110 pueden incluir señales para configurar propiedades de dispositivos que luz (por ejemplo, moduladores de luz espacial) y para configurar dispositivos de filtrado espectral, por ejemplo. Las señales proporcionadas a la plataforma de iluminación 106 pueden permitir el posicionamiento de la muestra 108 en relación con la plataforma 106 y/o el desplazamiento de las muestras a la posición para su iluminación en la plataforma 106, por ejemplo.

25 [0050] La interfaz de comunicaciones 152 puede incluir interfaces por cable o inalámbricas (por ejemplo, enchufes, antenas, transmisores, receptores, transceptores, terminales de cables, etc.) para realizar comunicaciones de datos con varios sistemas, dispositivos o redes. Por ejemplo, la interfaz de comunicaciones 152 puede incluir una tarjeta Ethernet y un puerto para enviar y recibir datos a través de una red de comunicaciones basada en Ethernet y/o un transceptor WiFi para comunicarse a través de una red de comunicaciones inalámbrica. La interfaz de comunicaciones 152 puede configurarse para que se comunique a través de redes de área local o redes de área amplia (por ejemplo, Internet, una WAN de un edificio, etc.) y puede usar una variedad de protocolos de comunicaciones (por ejemplo, BACnet, IP, LON, etc.).

30 [0051] El controlador 150 también puede comunicarse, a través de la interfaz de comunicaciones 152, con una interfaz de usuario 154. La interfaz de usuario 154 puede ser un dispositivo de visualización para mostrar propiedades y parámetros del sistema, y para visualizar imágenes capturadas de la muestra 108. La interfaz de usuario 154 se proporciona para facilitar la interacción del operador con el dispositivo de obtención de imágenes 100 y su control. El circuito de procesamiento 156 incluye un dispositivo de almacenamiento, como la memoria 160, para almacenar datos de imagen capturados usando el detector 112, y también incluye software informático que incorpora instrucciones al procesador 158 que hacen que el procesador 158 lleve a cabo funciones de control, como las comentadas anteriormente y más adelante, por ejemplo. Además, las instrucciones de software hacen que el procesador 158 manipule matemáticamente las imágenes capturadas por el detector 112. El procesamiento y cálculo de las imágenes se describen con mayor detalle en este documento, y son realizados por el procesador 116 del dispositivo de obtención de imágenes 100 o un sistema informático externo asociado con el dispositivo de obtención de imágenes 100, tal como el controlador 200 representado en la FIG. 2 y descrito a continuación.

35 [0052] En muchas formas de realización, el sistema 100 está configurado para adquirir múltiples imágenes espectrales de la muestra 108. Las múltiples imágenes espectrales pueden corresponder a la iluminación de la muestra 108 en una variedad de longitudes de onda de luz seleccionadas, y a la detección de una intensidad de luz transmitida a través de la muestra o reflejada por esta. Alternativamente, las múltiples imágenes espectrales pueden corresponder a la iluminación de la muestra 108 con luz que tiene propiedades espectrales similares, y la recogida de múltiples imágenes de la muestra 108, donde cada imagen corresponde a una longitud de onda diferente de luz emitida. Los elementos de filtrado espectral en los elementos ópticos de

acondicionamiento 104 y los elementos ópticos colectores 110 se utilizan generalmente para obtener los datos resueltos espectralmente.

[0053] En algunas formas de realización, las imágenes de la muestra 108 se pueden recopilar en secuencia, con ajustes en la configuración de los componentes ópticos (por ejemplo, filtros ópticos) entre imágenes capturadas sucesivas. En otras formas de realización, se pueden capturar múltiples imágenes simultáneamente usando sistemas de detección configurados para detectar múltiples vistas de la muestra. Por ejemplo, los sistemas de detección pueden configurarse para que proyecten diferentes vistas de la muestra correspondientes a diferentes longitudes de onda de iluminación o emisión en un detector como una cámara CCD, y las múltiples vistas pueden capturarse simultáneamente.

[0054] En algunas formas de realización, los elementos ópticos de acondicionamiento 104 incluyen un elemento de filtro espectral ajustable, tal como una rueda de filtros o un filtro espectral de cristal líquido. El elemento de filtro puede configurarse para que ilumine la muestra 108 utilizando diferentes bandas de longitud de onda de luz. La fuente de REM 102 puede proporcionar luz con una amplia distribución de componentes de longitud de onda espectral. Una zona seleccionada de esta amplia distribución de longitud de onda puede pasar como luz incidente por el elemento de filtro en los elementos ópticos de acondicionamiento 104, y orientarse para que incida en la muestra 108. El detector 112 registra una imagen de luz transmitida a través de la muestra 108. Posteriormente, la longitud de onda de la banda de paso del filtro en los elementos ópticos de acondicionamiento 104 se cambia para proporcionar luz incidente con una longitud de onda diferente, y se registra una imagen de luz transmitida a través de la muestra 108 (y que corresponde a la nueva longitud de onda de la luz incidente). También se puede registrar un conjunto similar de imágenes resueltas espectralmente empleando una fuente de REM 102 que tenga múltiples elementos de fuente que generen luz de diferentes longitudes de onda, y encendiendo y apagando alternativamente los diferentes elementos de fuente de luz para proporcionar luz incidente con diferentes longitudes de onda.

[0055] Como se ha descrito anteriormente, la luz emitida a partir de la muestra 108 también puede corresponder a la luz incidente que se refleja en la muestra 108. Además, la luz emitida puede corresponder a la emisión de fluorescencia de la muestra 108 si la muestra incluye estructuras químicas fluorescentes. Para algunas muestras, la luz emitida puede incluir contribuciones de múltiples fuentes (es decir, transmisión y fluorescencia) y los elementos de filtrado espectral en los elementos ópticos de acondicionamiento de luz 110 pueden usarse para separar estas contribuciones a la señal.

[0056] En general, tanto los elementos ópticos de acondicionamiento 104 como los elementos ópticos colectores 110 incluyen elementos de filtro espectral configurables. Por lo tanto, la resolución espectral se puede proporcionar en el lado de excitación de la muestra 108 (por ejemplo, a través de los elementos ópticos de acondicionamiento 104) o en el lado de emisión de la muestra 108 (por ejemplo, a través de los elementos ópticos colectores 110), o ambos. En cualquier caso, el resultado de la recogida de múltiples imágenes resueltas espectralmente de la muestra 108 es un "apilamiento de imágenes", en el que cada imagen del apilamiento es una imagen bidimensional de la muestra correspondiente a una longitud de onda particular. Conceptualmente, el conjunto de imágenes se puede visualizar en forma de una matriz tridimensional, donde dos de las dimensiones de la matriz son la longitud espacial y el ancho de cada una de las imágenes, y la tercera dimensión de la matriz es la longitud de onda espectral (emisión o excitación) a que corresponde a la imagen. Por esta razón, el conjunto de imágenes resueltas espectralmente puede denominarse "cubo espectral" de imágenes. Como se usa en el presente documento, un "píxel" en tal conjunto de imágenes (o apilamiento de imágenes o cubo espectral) se refiere a una ubicación espacial común para cada una de las imágenes. Por consiguiente, un píxel de un conjunto de imágenes incluye un valor asociado a cada imagen en la ubicación espacial correspondiente al píxel.

[0057] Pueden emplearse otras configuraciones de obtención de imágenes espetrales que son conocidas en la técnica, de acuerdo con los requisitos de la muestra en cuestión.

[0058] Si bien cada imagen espectral descrita anteriormente por lo general se refiere a una longitud de onda o rango de longitudes de onda particular (por ejemplo, una banda espectral), de manera más general, cada imagen espectral puede corresponder a un índice espectral que puede incluir una o más bandas de longitud de onda, o una distribución espectral más compleja. Por ejemplo, dicha imagen se puede generar utilizando un filtro de peine espectral. Generalmente, el cubo de imágenes incluirá varias imágenes espetrales, por ejemplo, 10 o más. Sin embargo, en algunas formas de realización, el cubo de imágenes puede incluir menos imágenes, por ejemplo, solo dos o tres imágenes espetrales. Un ejemplo es una imagen de color rojo-verde-azul (RGB), en la que cada píxel incluye un valor asociado con la fuerza de cada uno de los colores rojo, verde y azul. Dicha información puede mostrarse como una imagen de un solo color, en lugar de como un conjunto de imágenes separadas; sin embargo, el contenido de la información es el mismo que en el conjunto de imágenes, por lo que se usa la expresión "imágenes espetrales" para hacer referencia a ambos casos.

[0059] El dispositivo de obtención de imágenes 100 puede incluir una amplia variedad de elementos ópticos y dispositivos para capturar imágenes y generar datos de imagen 130 de una muestra que se usan en algoritmos de análisis de muestras posteriores, tales como métodos y algoritmos para calificar una muestra que comprende tejido

tumoral procedente de un paciente con cáncer, como se describe en este documento. Tales dispositivos de imagen se describen en la patente de EE. UU. n.º 7,555,150 titulada "Classifying Image Features".

[0060] Antes de la obtención de imágenes de una muestra, la muestra de tejido puede teñirse usando una pluralidad de sondas de fluorescencia con afinidad por biomarcadores específicos. Se puede obtener una imagen digital de la muestra teñida, y la imagen se puede analizar adicionalmente basándose en la ubicación de las sondas de fluorescencia. En lugar del análisis de la imagen completa, el circuito de procesamiento 156 del dispositivo de obtención de imágenes 100 puede incluir software para hacer que el controlador 150 realice una selección del campo de visión. En ese caso, los campos de visión se pueden priorizar en función del número de células que expresan un primer biomarcador de interés. A continuación, se puede analizar adicionalmente un número predeterminado de campos de visión en busca de señales de fluorescencia. En algunas formas de realización, el uso de cuatro tipos diferentes de sondas de fluorescencia genera una imagen de señales de fluorescencia correspondiente a un primer biomarcador de interés y una imagen de señales de fluorescencia correspondiente a un segundo biomarcador de interés, así como una imagen de señales de fluorescencia correspondiente a un biomarcador expresado por todas las células y una imagen de señales de fluorescencia correspondiente a un biomarcador expresado por células tumorales.

[0061] La manipulación de los datos de imagen del dispositivo de obtención de imágenes 100, para marcar la muestra de tejido como se describe en este documento, puede llevarse a cabo mediante el controlador 200, que se muestra esquemáticamente en la FIG. 2. Se muestra que el controlador 200 incluye una interfaz de comunicaciones 202 y un circuito de procesamiento 204. El circuito de procesamiento 204 está configurado para implementar pasos para puntuar la muestra de tejido. Se contempla que los elementos y funciones del controlador 200 pueden incluirse en el controlador 150 del dispositivo de obtención de imágenes 100, o pueden estar presentes en un sistema informático separado del dispositivo de obtención de imágenes 100.

[0062] En algunas formas de realización, las imágenes de señales de fluorescencia se manipulan para generar una o más máscaras de señales de fluorescencia correspondientes a células dentro de la imagen. En algunas formas de realización, dicha una o más máscaras de señales de fluorescencia comprenden una o más seleccionadas del grupo que consiste en una máscara de todas las células dentro de la imagen, una máscara de todas las células tumorales dentro de la imagen, una máscara de todas las células no tumorales dentro la imagen, una máscara de todas las células que expresan un primer biomarcador de interés dentro de la imagen, una máscara de todas las células que expresan un segundo biomarcador de interés dentro de la imagen y una máscara de interacción que representa todas las células que expresan un primer biomarcador de interés dentro de la imagen, así como células localizadas proximalmente que expresan un segundo biomarcador de interés. En otras formas de realización adicionales, la máscara de interacción se usa para generar un compartimento de interacción de las células de todos los campos de visión seleccionados que expresan el segundo biomarcador de interés que estaban localizadas proximalmente a las células que expresan el primer biomarcador de interés. El área total del compartimento de interacción puede usarse para generar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células, donde un primer elemento del al menos un par de células expresa el primer biomarcador y un segundo elemento del al menos un par de células expresa el segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador. En algunas formas de realización, la puntuación indica la probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la immunoterapia. En algunas formas de realización, el sistema proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de expresión del primer biomarcador de interés o una cuantificación de expresión del segundo biomarcador de interés.

[0063] La FIG. 3 es un diagrama de flujo que representa los pasos de una forma de realización de un método para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral procedente de un paciente con cáncer. En el paso 301 se obtienen datos de imagen, tales como datos de imagen 130. Los datos de imagen pueden obtenerse mediante un dispositivo de obtención de imágenes, tal como el dispositivo de obtención de imágenes 100. En el paso 302, los datos de imagen se desmezclan, de manera que los datos específicos de varios tipos de señales de fluorescencia se separan en diferentes canales. En el paso 303, los datos de un primer canal se utilizan para generar una máscara de todas las células que son positivas para un primer biomarcador (máscara del primer marcador). A continuación, se dilata la máscara de todas las células (paso 304) para generar una máscara dilatada representativa de una proximidad predeterminada dentro de la cual se puede encontrar una célula que interactúa (positiva para un segundo biomarcador). En algunas formas de realización, la máscara del primer marcador se dilata entre 1 y 100 píxeles. En el paso 305, los datos de un segundo canal se utilizan para generar una máscara de todas las células que son positivas para el segundo biomarcador (máscara del segundo marcador). En el paso 306, la máscara del primer marcador y la máscara del segundo marcador se combinan para generar una máscara de interacción que identifica las células que son positivas para el segundo biomarcador que están dentro de la proximidad predeterminada de una célula positiva para el primer biomarcador. En el paso 307 se calcula una puntuación de proximidad espacial basándose en el área de la máscara de interacción.

[0064] La FIG. 4 es un segundo diagrama de flujo que representa los pasos de una segunda forma de realización de un método para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral procedente de un paciente con cáncer. En el paso 401 se obtienen los datos de imagen y en el paso 402 los datos de imagen se desmezclan, de modo que los datos específicos de varios tipos de señales de fluorescencia se separan en diferentes canales. En el paso

403, los datos de un primer canal se usan para generar una máscara de todas las células que están en el campo de visión y en el paso 404 los datos de un segundo canal se usan para generar una máscara de un subconjunto de área, como el área tumoral en el campo de visión. En el paso 405, la máscara de todas las células se combina con la máscara del área de subconjunto para generar una máscara de subconjunto de células y una máscara de no subconjunto de células. En algunas formas de realización, las células del subconjunto son células tumorales y las células que no pertenecen al subconjunto son células no tumorales. En el paso 406, los datos de un tercer canal se utilizan para generar una máscara de todas las células que son positivas para un primer biomarcador (máscara del primer marcador). A continuación, se dilata la máscara de todas las células positivas (paso 407) para generar una máscara dilatada representativa de una proximidad predeterminada dentro de la cual se puede encontrar una célula que interactúa (es decir, una célula que es positiva para un segundo biomarcador). En algunas formas de realización, la máscara del primer marcador se dilata entre 1 y 100 píxeles. En el paso 408, los datos de un cuarto canal se utilizan para generar una máscara de todas las células que son positivas para el segundo biomarcador (máscara del segundo marcador). En el paso 409, la máscara del primer marcador dilatada y la máscara del segundo marcador se combinan para generar una máscara de interacción que identifica las células que son positivas para el segundo biomarcador y están dentro de la proximidad predeterminada de una célula positiva para el primer biomarcador. En el paso 410, se calcula una puntuación de proximidad espacial dividiendo el área de la máscara de interacción por un área de todas las células del subconjunto, o de todas las células (como se indica mediante las líneas de puntos en el diagrama de flujo de la Figura 15 que representa el uso de cualquier entrada). En algunas formas de realización, el subconjunto de células son células que pueden ser positivas para el segundo biomarcador. En algunas formas de realización, las células que pueden ser positivas para el segundo biomarcador son células tumorales o células no tumorales.

[0065] En algunas formas de realización, un subconjunto de células y un no subconjunto de células corresponde a células tumorales y células no tumorales, respectivamente o viceversa. En algunas formas de realización, un subconjunto de células y un no subconjunto de células corresponde a células viables y células no viables, respectivamente o viceversa. En algunas formas de realización, un subconjunto de células es un subconjunto de células viables y un no subconjunto de células consiste en las células viables no incluidas en el subconjunto de células viables. En algunas formas de realización, un subconjunto de células y un no subconjunto de células corresponde a células T y células no T, respectivamente o viceversa. En algunas formas de realización, un subconjunto de células y un no subconjunto de células corresponde a células mieloides y células no mieloides, respectivamente o viceversa.

[0066] En alguna forma de realización, la puntuación de proximidad espacial es representativa de la proximidad de un par de células. En algunas formas de realización, la proximidad de un par de células puede determinarse por una proximidad entre los límites del par de células, una proximidad entre los centros de masa del par de células, utilizando la lógica de límites basada en un perímetro alrededor de una primera célula seleccionada del par de células, determinando una intersección en los límites del par de células y/o determinando un área de superposición del par de células.

[0067] En alguna forma de realización, la puntuación de proximidad espacial se asocia con metadatos asociados con las imágenes de la muestra, se incluye en un informe generado, se proporciona a un operador para que determine la estrategia de inmunoterapia, se registra en una base de datos, se asocia al historial médico de un paciente y/o se visualiza en un dispositivo de visualización.

[0068] En algunas formas de realización, el sistema proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de expresión del primer biomarcador de interés o una cuantificación de expresión del segundo biomarcador de interés.

[0069] En los métodos descritos en este documento, la manipulación de las imágenes digitales puede llevarse a cabo mediante un sistema informático que comprende un controlador, como el controlador ilustrado en el diagrama de bloques de la FIG. 2, según una forma de realización. Se muestra que el controlador 200 incluye una interfaz de comunicaciones 202 y un circuito de procesamiento 204. La interfaz de comunicaciones 202 puede incluir interfaces por cable o inalámbricas (por ejemplo, enchufes, antenas, transmisores, receptores, transceptores, terminales de cable, etc.) para realizar comunicaciones de datos con varios sistemas, dispositivos o redes. Por ejemplo, la interfaz de comunicaciones 202 puede incluir una tarjeta Ethernet y un puerto para enviar y recibir datos a través de una red de comunicaciones basada en Ethernet y/o un transceptor WiFi para comunicarse a través de una red de comunicaciones inalámbrica. La interfaz de comunicaciones 202 puede configurarse para comunicarse a través de redes de área local o redes de área amplia (por ejemplo, Internet, una WAN de un edificio, etc.) y puede usar una variedad de protocolos de comunicaciones (por ejemplo, BACnet, IP, LON, etc.).

[0070] La interfaz de comunicaciones 202 puede ser una interfaz de red configurada para facilitar las comunicaciones de datos electrónicos entre el controlador 200 y varios sistemas o dispositivos externos (por ejemplo, el dispositivo de obtención de imágenes 100). Por ejemplo, el controlador 200 puede recibir datos de imagen para los campos de visión seleccionados desde el dispositivo de obtención de imágenes 100, para analizar los datos y calcular la puntuación de proximidad espacial (PPE).

- [0071] Todavía en referencia a la FIG. 2, se muestra que el circuito de procesamiento 204 incluye un procesador 206 y una memoria 208. El procesador 206 puede ser un procesador para fines generales o para fines específicos, un circuito integrado de aplicación específica (ASIC), una o más matrices de puertas programable *in situ* (FPGA), un grupo de componentes de procesamiento u otros componentes de procesamiento adecuados. El procesador 5 506 puede configurarse para que ejecute código informático o instrucciones almacenadas en la memoria 508 o recibidas de otros medios legibles por ordenador (por ejemplo, CDROM, almacenamiento en red, un servidor remoto, etc.).
- [0072] La memoria 208 puede incluir uno o más dispositivos (por ejemplo, unidades de memoria, dispositivos de 10 memoria, dispositivos de almacenamiento, etc.) para almacenar datos y/o código informático para completar y/o facilitar los diversos procesos descritos en la presente divulgación. La memoria 208 puede incluir una memoria de acceso aleatorio (RAM), memoria de solo lectura (ROM), almacenamiento en disco duro, almacenamiento temporal, memoria no volátil, memoria *flash*, memoria óptica o cualquier otra memoria adecuada para almacenar software y/o instrucciones informáticas. La memoria 208 puede incluir componentes de base de datos, 15 componentes de código de objeto ejecutable, componentes de *script* o cualquier otro tipo de estructura de información para soportar las diversas actividades y estructuras de información descritas en la presente divulgación. La memoria 508 se puede conectar de forma comunicable al procesador 206 a través del circuito de procesamiento 204 y puede incluir un código informático para ejecutar (por ejemplo, mediante el procesador 206) uno o más procesos descritos en este documento.
- [0073] También en referencia a la FIG. 2, se muestra que el controlador 200 recibe información de entrada de un dispositivo de obtención de imágenes 100. El dispositivo de obtención de imágenes adquiere todos los datos de obtención de imágenes y los registra, junto con todos los metadatos que los describen. El dispositivo de obtención de imágenes serializará entonces los datos en un flujo que puede ser leído por el controlador 200. El flujo de datos 20 puede acomodar cualquier tipo de flujo de datos binarios como el sistema de archivos, un SGBDR o comunicaciones directas TCP/IP. Para el uso del flujo de datos, se muestra que el controlador 200 incluye un desmezclador espectral 210. El desmezclador espectral 210 puede recibir datos de imagen de un dispositivo de obtención de imágenes 100 al que realiza la desmezcla espectral para desmezclar una imagen que presenta varias longitudes de onda en canales individuales distintos para cada banda de longitudes de onda. Por ejemplo, los 25 datos de imagen se pueden "desmezclar" en canales separados para cada uno de los diversos fluoróforos usados para identificar células o proteínas de interés en la muestra de tejido. El fluoróforo, solo a modo de ejemplo, puede ser uno o más del grupo que consiste en DAPI, Cy® 2, Cy® 3, Cy® 3.5, Cy® 5, FITC, TRITC, un tinte 488, un tinte 555, un tinte 594 y Texas Red. En un ejemplo, uno de los canales puede incluir datos de imagen que están dentro 30 de una banda predeterminada que rodea una longitud de onda de 461 nm (la longitud de onda de emisión máxima para DAPI), para identificar núcleos en la imagen. Otros canales pueden incluir datos de imágenes para diferentes longitudes de onda para identificar diferentes partes de la muestra de tejido utilizando diferentes fluoróforos.
- [0074] También se muestra que el controlador 200 incluye varios generadores de máscara, tales como el generador de máscara de células 212, el generador de máscara de subconjunto 216, el generador de máscara del primer biomarcador 22 y el generador de máscara del segundo biomarcador 224. Estos u otros generadores de máscara que pueden incluirse en el controlador 200 en otras formas de realización se utilizan para recibir una señal no mezclada del desmezclador espectral 210 y crear una máscara para la célula o área de interés particular, dependiendo del fluoróforo utilizado, para identificar ciertas características de interés en la muestra de tejido. Para 35 crear una máscara, los generadores de máscara (tales como el generador de máscara de células 212, el generador de máscara de área de subconjunto 216, el generador de máscara del primer biomarcador 22 y el generador de máscara del segundo biomarcador 224) reciben datos de imagen relacionados con la intensidad de cada píxel en el campo de visión. La intensidad de los píxeles es directamente proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida por la muestra, que, a su vez, es directamente proporcional a la cantidad de biomarcador proteico en la muestra (cuando se usa un fluoróforo para identificar un biomarcador particular). Puede establecerse un umbral absoluto 40 en función de los valores que existen en los píxeles de la imagen. Todos los píxeles que sean mayores o iguales al valor umbral se asignarán a 1,0, o "activados", y todos los demás píxeles se asignarán a 0,0 o "desactivados". De esta manera, se crea una máscara binaria para identificar la parte de la célula o tejido de interés en el campo 45 de visión. En otras formas de realización, se crea una máscara utilizando un límite inferior en el que todos los píxeles con una intensidad igual o superior a un límite inferior se aceptan y se utilizan como valor de píxel para la máscara. Si la intensidad está por debajo del límite inferior, el valor de píxel se establece en 0.0 o "desactivado".
- [0075] En el diagrama de flujo de ejemplo para la generación de máscaras que se muestra en la FIG. 5, se muestra 50 que los canales para señales de fluorescencia que identifican núcleos y áreas tumorales (como los canales para DAPI y tinte 488, respectivamente) utilizan el protocolo del límite inferior (pasos 510, 512, 520, 522), mientras que los canales para identificar biomarcadores (como Canales Cy5 y Cy3.5) utilizan un protocolo de valor umbral (pasos 530, 540), para proporcionar las salidas de máscara. En asociación con el protocolo de límite inferior, también hay 55 un paso de histograma para determinar el límite inferior. En particular, el *umbral de histograma* (paso 512, 522) produce un umbral de una imagen de entrada pero usa una escala móvil para determinar el punto en el que se produce el umbral. Las entradas son la imagen actual y un *porcentaje umbral* definido por el usuario. Este último se utiliza para determinar a qué porcentaje de la intensidad total debe establecerse el nivel de umbral. En primer lugar, la intensidad de cada píxel se suma a una intensidad total. El *porcentaje umbral* se multiplica por esta

intensidad total para obtener una suma de corte. Finalmente, todos los píxeles se agrupan por intensidad (en un histograma) y sus intensidades se suman de menor a mayor (barra por barra) hasta que se alcanza la suma de corte. La última intensidad de píxel más alta del proceso es el umbral de la imagen actual. Todos los píxeles con intensidades superiores a ese valor tienen sus intensidades configuradas al máximo, mientras que todos los demás están configurados al mínimo.

[0076] Los pasos identificados como los pasos 514, 516, 524, 526, 528, 532, 534, 536, 542, 544 en la FIG. 5 representan los pasos intermedios que se dan en los generadores de máscara iniciales, como el generador de máscara de células 212, el generador de máscara de área de subconjunto 216, el generador de máscara del primer biomarcador 222 y el generador de máscara del segundo biomarcador 224. Estos pasos se definen como sigue:

[0077] *Dilatar* aumenta el área de las zonas más brillantes de una imagen. Se necesitan dos entradas para *dilatar*. La primera es la imagen actual implícita y la segunda es el número de *iteraciones* por dilatar. Se supone que solo se utilizan imágenes binarias para la primera entrada. El procedimiento funcionará en imágenes continuas, pero la salida no será válida. El proceso de *dilatar* comienza encontrando primero la máxima intensidad de píxeles en la imagen. Posteriormente, cada píxel de la imagen se examina una vez. Si el píxel bajo investigación tiene una intensidad igual a la intensidad máxima, ese píxel se dibujará en la imagen de salida como un círculo con radio *iteraciones* y centrado en el píxel original. Todos los píxeles de ese círculo tendrán una intensidad igual a la intensidad máxima. Todos los demás píxeles se copian en la imagen de salida sin modificaciones.

[0078] El procedimiento *rellenar huecos* llenará zonas "vacías" de una imagen con píxeles a máxima intensidad. Estas zonas vacías son aquellas que tienen una intensidad mínima y cuya área de píxeles (*Tamaño*) es la especificada por el usuario. El *tamaño* y la imagen actual y son las dos entradas necesarias. Al igual que el proceso *dilatar*, este procedimiento solo debe aplicarse a imágenes binarias.

[0079] *Erosionar* procesa imágenes de la misma manera que *dilatar*. Toda la funcionalidad es la misma que *dilatar*, excepto en que el primer paso determina la intensidad mínima en la imagen, solo se alteran los píxeles que coinciden con la intensidad más baja y los círculos utilizados para el "blooming" de los píxeles de intensidad mínima encontrados se rellenan con el valor de intensidad más bajo. Al igual que el proceso *dilatar*, este procedimiento solo debe aplicarse a imágenes binarias.

[0080] *Eliminar objetos*. Se esperan dos entradas: la imagen actual y el *tamaño del objeto*. *Eliminar objetos* es lo contrario del procedimiento *llenar huecos*. Cualquier zona que contenga solo píxeles con una intensidad máxima que llene un área inferior a la entrada *tamaño del objeto* se ajustará a la intensidad mínima y, por tanto, se "eliminará". Este procedimiento solo debe aplicarse a imágenes binarias; la aplicación a imágenes continuas puede producir resultados inesperados.

[0081] La salida en los pasos finales 518, 529, 538 y 546 son la máscara de célula resultante, la máscara de subconjunto de área (o, en este ejemplo particular, la máscara del área tumoral), la máscara de célula del biomarcador 1 y la máscara de célula del biomarcador 2, respectivamente. En la FIG. 5 se describen además las combinaciones de estas máscaras resultantes para calcular la puntuación de proximidad espacial. Estas combinaciones se describen a continuación con referencia a los generadores de máscara de combinación del controlador 200, representados en la FIG. 2.

[0082] Se muestra que el controlador 200 incluye generadores de máscara de combinación, tales como generador de máscara de célula de subconjunto 218, generador de máscara de célula de no subconjunto 220 y generador de máscara de interacción 230. El generador de máscara de célula de subconjunto realiza una operación Y, como se muestra en el paso 552 de la FIG. 5, para combinar la salida del generador de máscara de célula 212 (representativa de todas las células en la imagen) con la salida del generador de máscara de área de subconjunto 216. Por consiguiente, el generador de máscara de subconjunto de célula genera una máscara de todas las células de subconjunto en la imagen. En algunas formas de realización, el subconjunto de células son células tumorales. Esta misma combinación, usando una operación *Fuera* realizada por el generador de máscara 220 de célula de no subconjunto como se muestra en el paso 554 en la FIG. 5, genera una máscara de todas las células que no pertenecen a un subconjunto en la imagen de muestra. En algunas formas de realización, las células que no pertenecen al subconjunto son células que no son tumorales.

[0083] Antes de combinarse con otra máscara, la máscara del primer marcador (del generador de máscara del primer biomarcador 222) se dilata con el dilatador 226. La máscara dilatada representa un área que rodea a las células que expresan un primer biomarcador, para identificar un espacio en el que las células que expresan el segundo biomarcador estarían dentro de una proximidad adecuada para interactuar con la célula que expresa el primer biomarcador. Esto está representado por los pasos 556 y 558 de la FIG. 5. El diagrama de flujo de la FIG. 5 muestra la dilatación que tiene lugar en dos pasos, 556 y 558. Esto puede ser necesario cuando hay un límite para las iteraciones máximas en cada paso. Por ejemplo, puede haber un máximo de 10 iteraciones (correspondiente a un aumento de 10 píxeles), por lo que, cuando se necesita un aumento de 20 píxeles, la dilatación debe dividirse en dos pasos posteriores.

[0084] Dentro del generador de máscara del segundo biomarcador 224, la máscara de biomarcadores se puede combinar con la máscara de células de no subconjunto descrita anteriormente, usando una operación Y, como se muestra en el paso 560 de la FIG. 5, para generar una máscara de todas las células que no pertenecen a un subconjunto que son positivas para el primer biomarcador. A continuación, esta máscara se combina (paso 562) en el generador de máscara de interacción 230 con la máscara dilatada del dilatador 226 para generar una máscara de interacción. La máscara de interacción identifica las células no tumorales que son positivas para el segundo biomarcador y que también se encuentran dentro del área de interacción o que se superponen a la máscara dilatada. Estas células identificadas, por lo tanto, representan las células que podrían interactuar con las células positivas para el primer biomarcador, lo que resulta en una mayor respuesta al tratamiento.

[0085] Para calcular una puntuación de proximidad espacial (PPE), el área de la máscara de interacción se determina en píxeles en el evaluador de área 232. En algunas formas de realización, el área de todas las células que son capaces de expresar el segundo biomarcador se determina en píxeles en el evaluador de área 234. Las células que son capaces de expresar el segundo biomarcador pueden ser células tumorales o células no tumorales.

En algunas formas de realización, el área de todas las células que están en el campo de visión se determina en píxeles en el evaluador de área 234. Una puntuación de interacción, o proximidad espacial, se determina en la calculadora de interacción 236 mediante la división del área del evaluador de área 232 por el área del evaluador de área 234 y la multiplicación por un factor predeterminado. Como se ha descrito anteriormente, en una forma de realización, la ecuación ejecutada por la calculadora de interacción 236 es:

$$PPE = \frac{A_I}{A_C} \times 10^4$$

donde A_I es un área de interacción total (área total de células que expresan el segundo biomarcador específico y abarcada por señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico) y A_C es el factor de normalización. En este caso, la normalización es el área total de células que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador específico. En algunas formas de realización, el factor de normalización es el área total de todas las células tumorales o no tumorales. En algunas formas de realización, el factor de normalización es el área total de todas las células.

[0086] El procedimiento Y se modela a partir de una operación Y binaria, pero difiere de manera significativa. Y acepta la imagen actual y un resultado seleccionado por el usuario. La salida es una imagen creada al realizar una multiplicación de las intensidades normalizadas de píxeles coincidentes de las dos imágenes de entrada. En algunas aplicaciones, los datos de intensidad de la imagen ya están normalizados. Por lo tanto, el procedimiento Y es simplemente una multiplicación por píxeles de las dos imágenes. Las dos entradas necesarias para *Fuera* son la imagen actual y un resultado seleccionado por el usuario. *Fuera* elimina la segunda imagen de la primera de acuerdo con la fórmula $A * (1 - B/B_{max})$, donde A es la imagen actual, B la imagen seleccionada por el usuario para eliminarla y B_{max} es la intensidad máxima de B. Hay que tener en cuenta que la división de B por B_{max} normaliza B.

[0087] En algunas formas de realización, se proporciona un sistema de obtención de imágenes para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral procedente de un paciente con cáncer, donde el sistema de obtención de imágenes comprende un aparato de adquisición de imágenes que comprende una plataforma para colocar la muestra en un campo de imágenes, una fuente de radiación electromagnética para dirigir la radiación electromagnética hacia la muestra y un detector configurado para detectar la radiación electromagnética de la muestra, y un controlador. El controlador comprende una interfaz de usuario para intercambiar información entre un operador y el sistema de control electrónico y un circuito de procesamiento configurado para ejecutar instrucciones almacenadas en un medio legible por ordenador. Las instrucciones hacen que el sistema de control electrónico del sistema de obtención de imágenes: (i) reciba información sobre la radiación electromagnética detectada a partir del aparato de obtención de imágenes; (ii) genere datos de imagen en función de la radiación electromagnética detectada; (iii) analice los datos de imagen para determinar una puntuación representativa de la proximidad entre al menos un par de células, donde un primer elemento del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo elemento del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y (iv) registre la puntuación, la cual, cuando se compara con un valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la inmunoterapia.

[0088] En algunas formas de realización, la puntuación representativa de una proximidad entre al menos un par de células es representativa de un grado en el que el par de células está dentro de una proximidad predeterminada entre sí.

[0089] En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células comprende una célula tumoral y el segundo elemento del al menos un par de células comprende una célula no tumoral. En algunas formas de realización, la célula no tumoral es una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, la célula no tumoral es una célula estromal.

[0090] En algunas formas de realización, el primer y segundo elementos del al menos un par de células comprenden células inmunitarias.

5 [0091] En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células comprende una célula tumoral, una célula mieloide o una célula estromal y el segundo elemento del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, la célula tumoral, la célula mieloide o la célula estromal expresa PD-L1 y la célula inmunitaria expresa PD-1.

10 [0092] En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células comprende una célula tumoral y el segundo elemento del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células comprende una célula mieloide y el segundo elemento del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células comprende una célula estromal y el segundo elemento del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa PD-L1 y la célula inmunitaria expresa PD-1.

15 [0093] En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa un primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, Galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, el segundo elemento del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28 y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa un primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, Galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL y combinaciones de estos, y el segundo elemento del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-1, TIM3, LAG3 , 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28 y combinaciones de estos.

20 [0094] En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa PD-L1 y el segundo elemento del al menos un par de células expresa PD-1. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa PD-L1 y el segundo elemento del al menos un par de células expresa CD80. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa CTLA-4 y el segundo elemento del al menos un par de células expresa CD80. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa PD-L2 y el segundo elemento del al menos un par de células expresa PD-1. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa CTLA-4 y el segundo elemento del al menos un par de células expresa CD86. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa LAG-3 y el segundo elemento del al menos un par de células expresa HLA-DR. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa Galectina 9. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa 41BB y el segundo elemento del al menos un par de células expresa 4.1BBL. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa OX40 y el segundo elemento del al menos un par de células expresa OX40L. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa CD40 y el segundo elemento del al menos un par de células expresa CD40L. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa ICOS y el segundo elemento del al menos un par de células expresa ICOSL. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa GITR y el segundo elemento del al menos un par de células expresa GITRL. En algunas formas de realización, el primer elemento del al menos un par de células expresa HLA-DR y el segundo elemento del al menos un par de células expresa TCR.

30 [0095] En algunas formas de realización, el primer biomarcador expresado por el primer elemento del al menos un par de células y el segundo biomarcador expresado por el segundo elemento del al menos un par de células interactúan entre sí. En algunas formas de realización, el primer biomarcador expresado por el primer elemento del al menos un par de células y el segundo biomarcador expresado por el segundo elemento del al menos un par de células no interactúan entre sí.

35 [0096] En algunas formas de realización, la proximidad espacial entre el al menos un par de células varía de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 50 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 2,5 µm a aproximadamente 50 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 2,5 µm a aproximadamente 45 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 2,5 µm a aproximadamente 40 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 2,5 µm a aproximadamente 35 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 2,5 µm a aproximadamente 30 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 2,5 µm a aproximadamente 25 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 2,5 µm a aproximadamente 20 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 2,5 µm a aproximadamente 15 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 5 µm a aproximadamente 50 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 5 µm a aproximadamente 45 µm. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 5 µm a

- aproximadamente 40 μm . En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 5 μm a aproximadamente 35 μm . En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 5 μm a aproximadamente 30 μm . En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 5 μm a aproximadamente 25 μm . En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 5 μm a aproximadamente 20 μm . En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de 5 μm a aproximadamente 15 μm . En algunas formas de realización, la proximidad espacial es de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 μm .
- [0097] En algunas formas de realización, la proximidad espacial entre el al menos un par de células varía de aproximadamente 1 píxel a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 70 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 90 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5 μm de ancho.
- [0098] En algunas formas de realización, la generación de los datos de imagen comprende (i) separar la información sobre la radiación electromagnética detectada en datos de imagen sin mezclar; y (ii) proporcionar los datos a través de una pluralidad de canales de datos, en donde los datos de imagen sin mezclar en un primer canal de datos describen señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador y los datos de imagen sin mezclar en un segundo canal de datos describen señales de fluorescencia atribuibles al segundo biomarcador.
- [0099] En algunas formas de realización, el análisis de los datos comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de sondas de fluorescencia, cuya selección está sesgada hacia la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en relación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador en un margen suficiente para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, con un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial.
- [0100] En algunas formas de realización, el análisis de los datos comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de sondas de fluorescencia, cuya selección está sesgada hacia la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en relación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador dentro de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 50 μm de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, con un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial.

[0101] En algunas formas de realización, el análisis de los datos comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de sondas de fluorescencia, cuya selección está sesgada hacia la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador con respecto a otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador en un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador; y (iii) dividir una primera área total, medida en píxeles, para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, con un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial.

[0102] En algunas formas de realización, el análisis de los datos comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de sondas de fluorescencia, cuya selección está sesgada hacia la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en relación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador en un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles para abarcar las células que expresan el segundo biomarcador dentro de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 50 µm de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir una primera área total, medida en píxeles, para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, con un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial.

[0103] En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial se determina mediante la siguiente ecuación:

$$30 \quad PPE = \frac{A_I}{A_C} \times 10^4$$

donde A_I es un área de interacción total (área total de células que expresan el segundo biomarcador específico y abarcada por señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico) y A_C es el área total de células que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador específico (el factor de normalización).

[0104] En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial (PPE) se determina mediante la siguiente ecuación:

$$40 \quad PPE = \frac{A_I}{A_{NT}} \times 10^4$$

donde A_I es un área de interacción total (área total de células que expresan el segundo biomarcador específico y abarcada por señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico) y A_{NT} es el área total de células no tumorales.

[0105] En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial se determina mediante la siguiente ecuación:

$$50 \quad PPE = \frac{A_I}{A_T} \times 10^4$$

donde A_I es un área de interacción total (área total de células que expresan el segundo biomarcador específico y abarcada por señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico) y A_T es el área total de todas las células.

[0106] En algunas formas de realización, se utilizan cuatro sondas de fluorescencia, cada una específica para un biomarcador diferente, en el paso de determinación. En formas de realización adicionales, una primera sonda de fluorescencia está asociada con el primer biomarcador, una segunda sonda de fluorescencia está asociada con el segundo biomarcador, una tercera sonda de fluorescencia está asociada con un tercer biomarcador y una cuarta sonda de fluorescencia está asociada con un cuarto biomarcador. En algunas formas de realización, el primer biomarcador comprende un marcador tumoral y no tumoral. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador comprende un marcador no tumoral. En algunas formas de realización, el primer biomarcador comprende un marcador tumoral y no tumoral, y el segundo biomarcador comprende un marcador no tumoral. En algunas formas de realización, todas las células expresan el tercer biomarcador. En algunas formas de realización, el cuarto biomarcador se expresa solo en células tumorales. En algunas formas de realización, el tercer biomarcador es expresado por todas las células y el cuarto biomarcador se expresa solo en células tumorales. En

algunas formas de realización, una o más sondas de fluorescencia comprenden un fluoróforo conjugado con un anticuerpo que tiene afinidad de unión por un biomarcador específico u otro anticuerpo. En algunas formas de realización, una o más sondas de fluorescencia son fluoróforos con afinidad por un biomarcador específico.

- [0107] Los ejemplos de fluoróforos incluyen, entre otros, fluoresceína, 6-FAM, rodamina, Texas Red, California Red, iFluor594, tetrametilrodamina, una carboxirodamina, carboxirodamina 6F, carboxirodamol, carboxirodamina 110, Cascade Blue, Cascade Yellow, cumarina, Cy2®, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy7®, Cy-Chrome, DyLight® 350, DyLight® 405, DyLight® 488, DyLight® 549, DyLight® 594, DyLight® 633, DyLight® 649, DyLight® 680, DyLight® 750, DyLight® 800, ficoeritrina, PerCP (proteína peridinina clorofila), PerCP-Cy5.5, JOE (6-carboxi-4',5'-dcloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), NED, ROX (5-(y-6)- carboxi-X-rodamina), HEX, Lucifer Yellow, Marina Blue, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Alexa Fluor® 350, Alex Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, 7 -ácido amino-4-metilcumarina-3-acético, BODIPY® FL, BODIPY® FL-Br2, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY® TR, OPAL™ 520, OPAL™ 540, OPAL™ 570, OPAL™ 620, OPAL™ 650, OPAL™ 690 y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en DAPI, Cy® 2, Cy® 3, Cy® 3,5, Cy® 5, Cy® 7, FITC, TRITC, un tinte 488, un tinte 555, un tinte 594, Texas Red y cumarina. Los ejemplos de un tinte 488 incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor® 488, DyLight® 488 y CF™ 488A. Los ejemplos de un tinte 555 incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor® 555. Los ejemplos de un tinte 594 incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor® 594.

[0108] Como se usa en este documento, un "campo de visión" se refiere a una sección de una imagen digital de portaobjetos completo de una muestra de tejido. En algunas formas de realización, la imagen del portaobjetos completo tiene 2-200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen del portaobjetos completo tiene de 10 a 200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen del portaobjetos completo tiene 30-200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen del portaobjetos completo tiene de 10 a 150 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen del portaobjetos completo tiene de 10 a 100 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen del portaobjetos completo tiene de 10 a 50 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen del portaobjetos completo tiene de 10 a 40 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de diapositiva completa tiene 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100, incluyendo incrementos en los mismos, campos de visión predeterminados.

- [0109] En algunas formas de realización, las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador se dilatan en un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 70 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 10 a aproximadamente 90 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 píxeles. En algunas formas de realización, un pixel tiene 0,5 µm de ancho.

[0110] En algunas formas de realización, las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles al primer biomarcador abarcan células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador dentro de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 50 µm de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador. En algunas formas de realización, las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles al primer biomarcador abarcan células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador dentro de aproximadamente 2,5 µm a aproximadamente 50 µm de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador. En algunas formas de realización, las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles al primer biomarcador abarcan células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador dentro de aproximadamente 2,5 µm a

total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, tanto la primera área total como la segunda área total se miden en píxeles.

- 5 [0115] En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 4500. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 4000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es aproximadamente 500 a aproximadamente 3500. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 3000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 2500.
- 10 10 En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 2000. En algunos casos, formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 1500. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900 o 5000, incluidos los incrementos en los mismos. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900 o 5000, incluidos los incrementos en los mismos, más o menos 100.
- 15 [0116] En algunas formas de realización, el factor predeterminado es de aproximadamente 10 a aproximadamente 10^5 . En algunas formas de realización, el factor predeterminado es de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^5 . En algunas formas de realización, el factor predeterminado es de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 . En algunas formas de realización, el factor predeterminado es de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 . En algunas formas de realización, el factor predeterminado es aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000 o 10^5 , incluyendo incrementos en estos.
- 20 30 [0117] En algunas formas de realización, el poder predictivo se cuantifica como un valor predictivo positivo, un valor predictivo negativo o una combinación de estos. Un valor predictivo positivo se calcula dividiendo el número de pacientes que responden al tratamiento con puntuaciones superiores a la puntuación umbral entre el número total de pacientes que responden al tratamiento. Un valor predictivo negativo se calcula dividiendo el número de pacientes que no responden al tratamiento con puntuaciones por debajo de la puntuación umbral entre el número total de pacientes que no responden al tratamiento.
- 35 [0118] En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es superior al 60 %. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 65 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 70 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 75 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 80 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %, incluyendo incrementos en estos.
- 40 45 [0119] En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 60 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 65 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 70 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 75 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 80 % o más. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %, incluyendo incrementos en estos.
- 50 55 [0120] En los métodos descritos en el presente documento, el paciente con cáncer es un mamífero. En algunas formas de realización, el mamífero es un ser humano. En algunas formas de realización, el mamífero no es un ser humano. En formas de realización adicionales, el mamífero es un ratón, rata, cobaya, perro, gato o caballo.
- 60 65 [0121] En los métodos descritos en el presente documento, se extrae tejido tumoral de un paciente con cáncer. El tipo de cáncer incluye, pero no se limita a: cánceres del sistema circulatorio, por ejemplo, de corazón (sarcoma [angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdiosarcoma, liposarcoma], mixoma, rhabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma), de mediastino y de pleura, y de otros órganos intratorácicos, tumores vasculares y tejido vascular asociado a tumores; de las vías respiratorias, por ejemplo, de la cavidad nasal y del oído medio, de los senos paranasales, de laringe, de tráquea, de bronquios y de pulmón, como cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), carcinoma broncogénico (de células escamosas, células pequeñas no diferenciadas, células grandes no diferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; del sistema gastrointestinal, por ejemplo, de

esófago (carcina de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiosarcoma, linfoma), de estómago (carcina, linfoma, leiomiosarcoma), gástrico, de páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), de intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Karposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), de intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma veloso, hamartoma, leiomioma); del sistema genitourinario, por ejemplo, de riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), de vejiga y/o uretra (carcina de células escamosas, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma), de próstata (adenocarcinoma, sarcoma), de testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); de hígado, por ejemplo, hepatoma (carcina hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma, tumores endocrinos pancreáticos (tales como feocromocitoma, insulinoma, tumor secretor de péptido intestinal vasoactivo, tumor de células de los islotes y glucagonoma); de huesos, por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticulares), mieloma múltiple, cordoma de tumor maligno de células gigantes, osteocondroma (exosteoblastoma osteocartilaginoso), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; del sistema nervioso, por ejemplo, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, cáncer de cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteíte deformante), de meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cáncer de cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); del aparato reproductor, por ejemplo, ginecológico, de útero (carcina de endometrio), de cuello uterino (carcina de cuello uterino, displasia cervical prematural), de ovario (carcina de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado]), tumores de células de la granulosa y de la teca, tumor de células Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), de vulva (carcina de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), de vagina (carcina de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botriode (rhabdomiosarcoma embrionario), de trompas de Falopio (carcina) y de otros sitios asociados con los órganos genitales femeninos; de placenta, de pene, de próstata, de testículo y otros sitios asociados con los órganos genitales masculinos; del sistema hematológico, por ejemplo, de sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin [linfoma maligno]; de la cavidad oral, por ejemplo, de labio, de lengua, de encía, de suelo de la boca, de paladar y de otras partes de la boca, de glándula parótida y otras partes de las glándulas salivales, de amígdala, de orofaringe, de nasofaringe, de seno piriforme, de hipofaringe y de otras partes del labio, de la cavidad oral y de faringe; de piel, por ejemplo, melanoma maligno, melanoma cutáneo, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Karposi, nevos displásicos lunares, lipoma, angioma, dermatofibroma y queloides; de las glándulas suprarrenales: neuroblastoma; y de otros tejidos, incluyendo tejido conectivo y blando, de retroperitoneo y de peritoneo, de ojo, melanoma intraocular y anexos, de mama, de cabeza y/o de cuello, de la región anal, de tiroides, de paratiroides, de la glándula suprarrenal y de otras glándulas endocrinas y estructuras relacionadas, neoplasia maligna secundaria y no especificada de los ganglios linfáticos, neoplasia maligna secundaria de los sistemas respiratorio y digestivo y neoplasia maligna secundaria de otros sitios, o una combinación de uno o más de estos.

[0122] Los ejemplos de inmunoterapia incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab o trastuzumab), anticuerpos monoclonales conjugados (por ejemplo, ibritumomab tiuxetán, brentuximab vendotina o ado-trastuzumab emtansina), anticuerpos monoclonales biespecíficos (blinatumomab), inhibidores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab o durvalumab), talidomida, lenalidomida, pomalidomida e imiquimod, y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende terapia de puntos de control inmunitario.

[0123] En otro aspecto, en este documento se describen métodos que utilizan un sistema que comprende un dispositivo de obtención de imágenes y un controlador para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponibles a partir de una muestra que comprende tejido tumoral, muestra procedente de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de sondas de fluorescencia, cuya selección está sesgada hacia la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador específico en relación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador específico para abarcar células localizadas proximalmente que expresan un segundo biomarcador específico; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador específico y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico, con una puntuación de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.

- [0124] En otro aspecto, en este documento se describen métodos que utilizan un sistema que comprende un dispositivo de obtención de imágenes y un controlador para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas de entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponibles a partir de una muestra que comprende tejido tumoral, muestra procedente de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de sondas de fluorescencia, cuya selección está sesgada hacia la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador en relación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador para abarcar células que expresan un segundo biomarcador dentro de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 50 µm de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, con un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.
- [0125] En otro aspecto, en el presente documento se describen métodos que utilizan un sistema que comprende un dispositivo de obtención de imágenes y un controlador para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponible a partir de una muestra que comprende tejido tumoral, donde dicha muestra procede de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de sondas de fluorescencia, cuya selección está sesgada hacia la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador en relación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador en un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles para abarcar células localizadas próximamente que expresan un segundo biomarcador; y (iii) dividir una primera área total, medida en píxeles, para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, con un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.
- [0126] En otro aspecto, en el presente documento se describen métodos que utilizan un sistema que comprende un dispositivo de obtención de imágenes y un controlador para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponibles a partir de una muestra que comprende tejido tumoral, donde dicha muestra procede de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de sondas de fluorescencia, cuya selección está sesgada hacia la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador en relación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador en un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles para abarcar las células que expresan un segundo biomarcador dentro de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 50 µm de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir una primera área total, medida en píxeles, para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.
- [0127] En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial (PPE) se determina mediante la siguiente ecuación:

$$PPE = \frac{A_I}{A_{NT}} \times 10^4$$

donde A_I es un área de interacción total (área total de células que expresan el segundo biomarcador específico y abarcada por señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico) y A_{NT} es el área total de células no tumorales.

- 5 [0128] En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial se determina mediante la siguiente ecuación:

$$PPE = \frac{A_I}{A_C} \times 10^4$$

10 donde A_I es un área de interacción total (área total de células que expresan el segundo biomarcador específico y abarcada por señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico) y A_C es el área total de células que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador específico.

- 15 [0129] En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial se determina mediante la siguiente ecuación:

$$PPE = \frac{A_I}{A_T} \times 10^4$$

20 donde A_I es un área de interacción total (área total de células que expresan el segundo biomarcador específico y abarcada por señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico) y A_T es el área total de todas las células.

- 25 [0130] En otro aspecto, se describen métodos que utilizan un sistema que comprende un dispositivo de obtención de imágenes y un controlador para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral de un paciente con cáncer que se utiliza en métodos para tratar el cáncer en el paciente. En algunas formas de realización, los métodos de puntuación de una muestra que comprende tejido tumoral de un paciente con cáncer se realizan antes de la administración de inmunoterapia.

30 [0131] En algunas formas de realización, en el presente documento se describen métodos que utilizan un sistema que comprende un dispositivo de obtención de imágenes y un controlador para tratar el cáncer en un paciente que lo necesite, donde el método comprende: (a) puntuar una muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente, lo que comprende (i) utilizar la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente, y determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células, donde un primer elemento del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo elemento del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y (ii) registrar la puntuación; (b) comparar la puntuación con un valor umbral; y (b) administrar inmunoterapia al paciente si la puntuación, cuando se compara con el valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente responda positivamente a la inmunoterapia. En algunas formas de realización, el paso de determinación es como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.

45 [0132] En algunas formas de realización, en el presente documento se describen métodos para puntuar una muestra de tejido, que comprenden: (i) usar un sistema de obtención de imágenes para obtener datos de imágenes para la muestra de tejido procedente de un paciente con cáncer, donde el sistema de obtención de imágenes comprende: una carcasa que comprende una plataforma para colocar la muestra en un campo de obtención de imágenes, una fuente de radiación electromagnética para dirigir la radiación electromagnética hacia la muestra y un detector para recoger la salida de radiación electromagnética; y un sistema de control electrónico que comprende una memoria y un circuito de procesamiento que tiene módulos de procesamiento de imágenes; (ii) analizar, utilizando los módulos de procesamiento de imágenes, los datos de imagen para determinar una puntuación representativa de la proximidad entre un par de células, donde un primer elemento del par de células expresa un primer biomarcador y un segundo elemento del par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y (iii) registrar la puntuación en la memoria, puntuación que, cuando se compara con un valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la inmunoterapia. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.

60 [0133] En algunas formas de realización, en el presente documento se describen sistemas de puntuación de muestras de tejido que comprenden: un dispositivo de obtención de imágenes que obtiene datos de imagen de una muestra de tejido procedente de un paciente con cáncer; y un controlador que recibe datos de imagen del dispositivo de obtención de imágenes y analiza los datos para determinar una puntuación representativa de una proximidad entre un par de células, donde un primer elemento del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo elemento del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es

diferente del primer biomarcador, en el que la puntuación, cuando se compara con un valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la inmunoterapia.

EJEMPLOS

5

Ejemplo 1. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido de melanoma de pacientes humanos

[0134] *Preparación de la muestra.* Se desparafinaron muestras de tejido fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE). A continuación, los portaobjetos se rehidrataron mediante una serie de lavados con xileno a alcohol antes de incubarlos en agua destilada. A continuación, se realizó la recuperación de antígenos inducida por calor en condiciones de temperatura y presión elevadas, se dejaron enfriar y se transfirieron a solución salina con pH regulado con Tris. Luego se realizó la tinción, para la que se llevaron a cabo los siguientes pasos. Primero, se bloqueó la peroxidasa endógena seguida de incubación con una solución de bloqueo de proteínas para reducir la tinción de anticuerpos inespecíficos. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con un anticuerpo primario anti-PD1 de ratón. A continuación, los portaobjetos se lavaron antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-HRP de ratón. Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción con PD-1 usando TSA+ Cy® 3.5 (Perkin Elmer). A continuación, se inactivó cualquier HRP residual usando dos lavados de benzhidrazida 100 mM reciente con peróxido de hidrógeno 50 mM. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de su tinción con un anticuerpo primario anti-PD-L1 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con una mezcla de anticuerpos secundarios anti-HRP de conejo más anti-S 100 de ratón marcados directamente con colorante 488 y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de PD-L1 usando TSA-Cy® 5 (Perkin Elmer). Los portaobjetos se lavaron por última vez antes de cubrirlos con un medio de montaje y se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. En la FIG. 6 se muestra una descripción esquemática de los anticuerpos y reactivos de detección. Alternativamente, los portaobjetos se tiñeron con anticuerpo primario anti-CD8 en lugar de anticuerpo primario anti-PD1.

[0135] *Imágenes y análisis de las muestras.* A continuación, se adquirieron imágenes de fluorescencia utilizando el sistema de análisis de portaobjetos inteligente Vectra 2 utilizando el software Vectra versión 2.0.8 (Perkin Elmer). En primer lugar, se obtuvieron imágenes monocromáticas del portaobjetos con un aumento de 4x utilizando DAPI. Se utilizó un algoritmo automatizado (desarrollado con inForm) para identificar las áreas del portaobjetos que contenían tejido.

[0136] Se tomaron imágenes de las áreas del portaobjetos identificadas como que contenían tejido con un aumento de 4x para los canales asociados con DAPI (azul), FITC (verde) y Cy® 5 (rojo) para crear imágenes RGB. Estas imágenes con aumento de 4x se procesaron utilizando un algoritmo de enriquecimiento automático (desarrollado con inForm) en el selector de campo de visión 101 para identificar y clasificar los posibles campos de visión con aumento de 20x de acuerdo con la expresión de Cy® 5 más alta.

[0137] Se obtuvieron imágenes de los 40 campos de visión superiores con un aumento de 20x en las longitudes de onda DAPI, FITC, Texas Red y Cy® 5. Se revisaron las imágenes sin procesar para verificar su aceptabilidad, y las imágenes que estaban desenfocadas, carecían de células tumorales, eran altamente necróticas o contenían altos niveles de señal de fluorescencia no asociada con la localización esperada de anticuerpos (es decir, tinción de fondo) se rechazaron antes del análisis. Las imágenes aceptadas se procesaron usando AQUAduct (Perkin Elmer), en donde cada fluoróforo se desmezcló espectralmente mediante el desmezclador espectral 210 en canales individuales y se guardó como un archivo separado.

[0138] Los archivos procesados se analizaron adicionalmente utilizando AQUAnalysis™ o mediante un proceso totalmente automatizado utilizando AQUAserve™. Los detalles fueron los siguientes.

[0139] Cada imagen de DAPI fue procesada por el generador de máscara celular 212 para identificar todos los núcleos celulares dentro de esa imagen (FIG. 7a), y luego dilatada 3 píxeles para representar el tamaño aproximado de una célula completa. Esta máscara resultante representaba todas las células dentro de esa imagen (FIG. 7b).

[0140] El S100 (marcador de células tumorales para melanoma) detectado con tinte 488 (FIG. 8a) fue procesado por el generador de máscara de tumores 216 para crear una máscara binaria de toda el área del tumor dentro de esa imagen (FIG. 8b). La superposición entre esta máscara y la máscara de todas las células creó una nueva máscara para las células tumorales (FIG. 8c), utilizando el generador de máscara de células tumorales 218.

[0141] De manera similar, la ausencia del marcador de células tumorales en combinación con la máscara de todos los núcleos creó una nueva máscara para todas las células no tumorales (FIG. 8d), realizada con el generador de máscara de células no tumorales 220.

[0142] Cada imagen de Cy® 5 (FIG. 9a) fue procesada por el generador de máscara del primer biomarcador 222 y se superpuso con la máscara de todas las células para crear una máscara binaria de todas las células positivas

para PD-L1 (FIG. 9b). La superposición de la máscara de biomarcadores con la máscara de todas las células eliminó los píxeles de ruido que podían identificarse falsamente en la máscara como células positivas de biomarcadores.

5 [0143] Cada imagen de Cy® 3.5 (FIG. 10 a) fue procesada por el generador de máscara del segundo biomarcador 224 para crear una máscara binaria para las células positivas para PD-1 y se superpuso con la máscara de todas las células no tumorales para crear una máscara binaria de todas las células no tumorales positivas para PD-1 (FIG. 10b). La superposición de la máscara de biomarcadores con la máscara de todas las células no tumorales eliminó los píxeles de ruido que podían identificarse falsamente en la máscara como células positivas de biomarcadores.

10 [0144] La máscara binaria de todas las células positivas para PD-L1 se dilató utilizando un segundo dilatador 226 para crear una máscara de interacción que abarcara las células adyacentes más cercanas (por ejemplo, células con PD-1) (FIG. 11a). Esta máscara de interacción se combinó con una máscara binaria de todas las células no tumorales positivas para PD-1 usando el generador de máscara de interacción 230 para crear un compartimento de interacción de las células positivas para PD-1 lo suficientemente cercanas a las células positivas para PD-L1, de modo que PD-1 probablemente esté interactuando con PD-L1 (FIG. 11b).

15 [0145] El área total de todos los campos aceptados (hasta 40 campos de visión) para el compartimento de interacción y el área total de las células no tumorales se calculó en los evaluadores de área 232, 234 respectivamente. El área total de todos los campos de visión aceptados para el compartimento de interacción se dividió por el área total de las células no tumorales y se multiplicó por un factor de 10 000, utilizando la calculadora de interacción 236 para crear un número entero que representa una puntuación de interacción para cada muestra. Las mediciones de PD-L1 y PD-1 fueron altamente reproducibles ($R^2 = 0,98$ y $0,97$, respectivamente). Se observó 20 un amplio rango de puntuaciones de expresión e interacción de PD-L1 y PD-1 en muestras clínicas de archivo ($n = 53$). En una cohorte de 26 pacientes con melanoma avanzado tratados con nivolumab ($n = 5$) o pembrolizumab ($n = 21$), se descubrió que la puntuación de interacción PD-1/PD-L1 distinguía de manera fiable a los respondedores de los no respondedores ($p = 0,01$) mientras que PD-L1 solo ($p = 0,07$) o CD8 solo ($p = 0,23$) no. Además, los pacientes que poseían puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 más altas tuvieron tasas de 25 respuesta superiores (82 % frente a 20 %, $p = 0,01$). Los pacientes con puntuaciones altas de interacción PD-1/PD-L1 presentaron una mediana de supervivencia sin progresión más prolongada ($p = 0,059$) y menos muertes (22 % vs 58 %) en comparación con los pacientes que tenían puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 más bajas. Estos resultados sugieren que este método de puntuación de la muestra de tejido para obtener puntuaciones de 30 interacción PD-1/PD-L1 proporciona un poder predictivo superior (82 % de valor predictivo positivo, 80 % de valor predictivo negativo) en comparación con la expresión de PD-L1 sola.

35 [0146] Las puntuaciones representativas de los 26 pacientes se muestran en la FIG. 12a. Según los datos, se seleccionó un umbral de 800-900 para indicar la probabilidad de respuesta al tratamiento.

40 [0147] Alternativamente, la puntuación de interacción se calculó para cada campo de visión individual y la puntuación máxima para cada paciente se muestra en la FIG. 12b. En función de la puntuación máxima, se seleccionó un umbral de 1900 para indicar la probabilidad de respuesta al tratamiento.

45 [0148] Para evaluar el efecto del algoritmo de enriquecimiento en la puntuación de interacción, los procedimientos mencionados anteriormente se realizaron utilizando imágenes de portaobjetos completos en lugar del algoritmo de enriquecimiento (ver FIG. 13). Cuando se realizó el análisis de la imagen del portaobjetos completo, ya no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes que respondieron a la terapia anti-PDI y los que no. Por lo tanto, no se pudo determinar un umbral con este análisis.

50 [0149] Las puntuaciones de interacción se compararon con la supervivencia sin progresión (SSP) de los pacientes (FIG. 14). Las puntuaciones de interacción de al menos 803 se correlacionaron bien con la supervivencia. En particular, la expresión de PD-L1 no se correlacionó con una mejora de la SSP (FIG. 15).

55 [0150] En las FIGS. 16 y 17 se muestran ejemplos representativos de máscaras superpuestas que indican células positivas para PD-L1 (rojo), células positivas para PD-L (amarillo), células tumorales (S100, verde) y todas las células (DAPI, azul). Para una respuesta positiva a la inmunoterapia, la máscara de la FIG. 16 indica fácilmente la presencia de células positivas para PD-L1 (rojo), células positivas para PD-1 (amarillo) y todas las células tumorales (verde). Por el contrario, para un respondedor negativo a la inmunoterapia, la máscara de la FIG. 17 indica la presencia de células tumorales (S100, verde) y todas las células (DAPI, azul), pero muestra pocas o 60 ninguna célula positiva para PD-L1 (rojo) o células positivas para PD-1 (amarillo). En la FIG. 16 se representa una puntuación de interacción de 2176 (respuesta completa a la inmunoterapia). En la FIG. 17 se representa una puntuación de interacción de 8 (sin respuesta a la inmunoterapia).

65 [0151] Las muestras de tejido también se evaluaron utilizando un método aprobado por la FDA para medir PD-L1 en cáncer de pulmón de células no pequeñas con el clon 22C3 de anticuerpo anti-PD-L1, que no se utiliza actualmente para muestras de tejido de melanoma. La expresión de PD-L1 se comparó con la SSP del paciente y

se muestra en la FIG. 19. Este método no demuestra un valor diagnóstico estadísticamente relevante en comparación con los métodos descritos en este documento que utilizan puntuaciones de interacción.

[0152] Se examinó una cohorte de verificación de 34 pacientes con melanoma metastásico adicionales y se obtuvieron puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 (véase la FIG. 20a). Estas puntuaciones de interacción también se compararon con la supervivencia sin progresión (SSP) de los pacientes (FIG. 20b). Aunque no es estadísticamente significativa ($p = 0,19$), la comparación indica una tendencia a que los pacientes con puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 más altas tengan una SSP más prolongada. La importancia estadística puede ser limitada debido al uso relativamente reciente de estas terapias en la clínica, lo que limita el tiempo de seguimiento para estos pacientes.

[0153] Las puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1, así como la comparación de estas puntuaciones con la SSP del paciente o la supervivencia global (SG) del paciente para la combinación de la cohorte anterior de 26 pacientes con la cohorte de verificación de 34 pacientes se muestran en las FIGS. 20c-20e. El análisis combinado indica claramente que los pacientes con niveles elevados de PD-1/PD-L1 demuestran una respuesta mejorada a las terapias anti-PD-1.

Ejemplo 2. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido de carcinoma de pulmón de células no pequeñas de pacientes humanos.

[0154] Se realizaron procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo el anti-S100 de ratón marcado directamente con el colorante 488 con anti-pancitoqueratina de ratón directamente marcada con el colorante 488 para las muestras de tumores epiteliales. Las puntuaciones de interacción de 38 muestras se muestran en la FIG. 18.

Ejemplo 3. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan PD-L1 y células que expresan CD80.

[0155] *Preparación de la muestra.* Las muestras de tejido incluidas en parafina y fijadas con formalina (FFPE) se desparafinaron, se rehidrataron y la recuperación de antígenos se realizó en condiciones de temperatura elevada. Luego se realizó la tinción, para la que se llevaron a cabo los siguientes pasos. Primero, los tejidos se sometieron a detección de la expresión de CTLA-4 usando 20 pares de sondas de hibridación que abarcaban aproximadamente 1 kb del ARNm de CTLA-4 usando RNAScope® (Advanced Cell Diagnostics). La hibridación *in situ* se visualizó con TSA-Cy®3. Se lavaron los portaobjetos y luego se inactivó cualquier HRP residual usando dos lavados de benzhidrazida 100 mM recién preparada con peróxido de hidrógeno 50 mM. Los portaobjetos se lavaron nuevamente antes de la tinción con un anticuerpo primario anti-CD80 de ratón. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un anticuerpo secundario anti-HRP de ratón. Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de CD80 usando TSA-Cy® 5 (Perkin Elmer). A continuación, se inactivó cualquier HRP residual usando dos lavados de benzhidrazida 100 mM recién preparada con peróxido de hidrógeno 50 mM. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de la tinción con un anticuerpo primario anti-CD3 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con una mezcla de anticuerpos secundarios HRP anti-conejo más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de CD3 usando TSA-AlexaFluor488® (Life Technologies). Los portaobjetos se lavaron por última vez antes de cubrirlos con un medio de montaje y se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente.

[0156] Se realizaron procedimientos de análisis y obtención de imágenes análogos a los del Ejemplo 1, con lo que se obtuvieron imágenes en las longitudes de onda DAPI, FITC, Cy® 3 y Cy® 5. La expresión de CTLA-4 y CD80 se utilizó para desarrollar un algoritmo de enriquecimiento para adquirir imágenes con aumento de 20x. Se realizó un análisis para determinar las puntuaciones de interacción CTLA-4/CD80 midiendo el área total, en píxeles, de las células positivas para CTLA-4 y CD3 dentro de la proximidad de las células positivas para CD80 dividida por el área total, en píxeles, de las células positivas para CD3, multiplicado por un factor de 10 000. Los resultados se muestran en la FIG. 21.

Ejemplo 4. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan CTLA-4 y células que expresan CD80.

[0157] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de CTLA-4 y CD80.

Ejemplo 5. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan PD-L2 y células que expresan PD-1.

[0158] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 por la tinción y el análisis de PD-L2.

Ejemplo 6. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan CTLA-4 y células que expresan CD86.

[0159] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de CTLA-4 y CD86.

Ejemplo 7. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan LAG-3 y células que expresan HLA-DR.

[0160] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de LAG-3 y HLA-DR.

Ejemplo 8. Preparación de la muestra, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan TIM-3 y células que expresan Galectina 9.

[0161] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de TIM-3 y Galectina 9.

Ejemplo 9. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan 41BB y células que expresan 4.1BBL.

[0162] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de 41BB y 4.1BBL.

Ejemplo 10. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan OX40 y células que expresan OX40L.

[0163] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de OX40 y OX40L.

Ejemplo 11. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan CD40 y células que expresan CD40L.

[0164] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de CD40 y CD40L.

Ejemplo 12. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan ICOS y células que expresan ICOSL.

[0165] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de ICOS e ICOSL.

Ejemplo 13. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan GITR y células que expresan GITRL.

[0166] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de GITR y GITRL.

Ejemplo 14. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan HLA-DR y células que expresan TCR.

[0167] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de HLA-DR y TCR.

Ejemplo 15. Preparación de muestras, obtención de imágenes y análisis de imágenes para muestras de tejido con células que expresan PD-1, PD-L1 y CD3.

[0168] Se realizaron procedimientos análogos a los del Ejemplo 1 sin el anticuerpo anti-S100 de ratón. En cambio, después de la detección de PD-L1, los anticuerpos primarios y secundarios se eliminaron mediante microondas. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con anticuerpo primario anti-CD3 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con una mezcla de anticuerpo secundario HRP anti-conejo más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de CD3 con TSA-AlexaFluor488 (Life Technologies). La obtención de imágenes y el análisis fueron análogos al Ejemplo 1, donde la proximidad espacial (por ejemplo, la puntuación de interacción) se calculó dividiendo el área de las células positivas para PD-1 en el área positiva para PD-L1, medida en píxeles, por el área de todas las células nucleadas, medida en píxeles, multiplicado por un factor de 10 000. Las puntuaciones de interacción de 29 muestras se muestran en la FIG. 22.

- [0169] Si bien se han ilustrado y descrito ciertas formas de realización, debe entenderse que se pueden realizar cambios y modificaciones en las mismas de acuerdo con la experiencia en la técnica sin apartarse de la tecnología en sus aspectos más amplios como se define en las siguientes reivindicaciones.
- 5 [0170] Las formas de realización, descritas de manera ilustrativa en el presente documento, pueden ponerse en práctica de manera adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos específicamente en el presente documento. Así, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. se entenderán de forma amplia y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en este documento se han utilizado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la tecnología reivindicada. Además, se entenderá que la frase "que consiste esencialmente en" incluye los elementos específicamente enumerados y aquellos elementos adicionales que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la tecnología reivindicada. La frase "que consiste en" excluye cualquier elemento no especificado.
- 10 [0171] La presente divulgación no debe limitarse en términos de las formas de realización particulares descritas en esta solicitud. Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Los métodos y composiciones funcionalmente equivalentes dentro del alcance de la divulgación, además de los enumerados en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de las descripciones anteriores. Se pretende que tales modificaciones y variaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación debe estar limitada únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los que se tiene derecho con tales reivindicaciones. Debe entenderse que esta divulgación no se limita a métodos, reactivos, composiciones de compuestos o sistemas biológicos particulares, que por supuesto pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir únicamente formas de realización particulares y no pretende ser limitante.
- 15 [0172] Además, cuando las características o aspectos de la divulgación se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la divulgación también se describe en términos de cualquier elemento individual o subgrupo de elementos del grupo Markush.
- 20 [0173] Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los propósitos, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los rangos descritos en el presente documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subrangos y combinaciones de subrangos de los mismos. Se puede reconocer fácilmente que cualquier rango enumerado describe suficientemente y permite que el mismo rango se divida en al menos mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como ejemplo no limitativo, cada rango mencionado en este documento se puede dividir fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior. etc. Como también entenderá un experto en la técnica, todos los lenguajes tales como "hasta", "al menos", "superior a", "inferior a" y similares, incluyen el número mencionado y se refieren a rangos que pueden ser posteriormente divididos en subrangos como se ha descrito anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la técnica, un rango incluye cada elemento individual.
- 25 [0174] Otras formas de realización se exponen en las siguientes reivindicaciones.
- 30
- 35
- 40
- 45

REIVINDICACIONES

1. Sistema de obtención de imágenes para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral procedente de un paciente con cáncer, donde el sistema de obtención de imágenes comprende:
- 5 un dispositivo de obtención de imágenes (100) que comprende una plataforma (106) para colocar la muestra en un campo de obtención de imágenes, una fuente de radiación electromagnética (102) para dirigir la radiación electromagnética hacia la muestra y un detector (112) configurado para detectar radiación electromagnética a partir de la muestra;
- 10 un controlador (200) que comprende una interfaz de usuario (202) para intercambiar información entre un operador y el controlador (200) y un circuito de procesamiento (206) configurado para ejecutar instrucciones almacenadas en un medio legible por ordenador que hace que el controlador (200) del sistema de obtención de imágenes:
- 15 reciba información sobre la radiación electromagnética detectada a partir del dispositivo de obtención de imágenes (100);
 genere datos de imagen en función de la radiación electromagnética detectada;
 analice los datos de imagen para determinar una puntuación representativa de la proximidad entre al menos un par de células, donde un primer elemento del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo elemento del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y registre la puntuación, puntuación que, cuando se compara con un valor umbral, indica la probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la inmunoterapia;
 caracterizado por el hecho de que analizar los datos de imagen comprende:
- 20 dilatar, usando un dilatador (226) del circuito de procesamiento (206), datos de imagen correspondientes a señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador en un margen predeterminado que se selecciona para que abarque datos de imagen de células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador, donde dilatar significa encontrar un píxel en los datos de imagen que tenga una intensidad máxima y reemplazar cada píxel de la imagen que tenga la intensidad máxima por un círculo que tenga un radio igual al margen predeterminado; determinar un área de interacción, en donde el área de interacción es una primera área total para todas las células que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro del radio de señales de fluorescencia dilatadas atribuibles al primer biomarcador; y
 dividir, usando una calculadora de interacción (236) del circuito de procesamiento (206), el área de interacción por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener la puntuación,
- 25 donde el factor de normalización es un área total para todas las células que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador y se determina combinando una máscara celular representativa de todas las células de la muestra, en función de señales de fluorescencia atribuibles a los núcleos celulares, y una máscara del área tumoral representativa del área del tumor en la muestra, según las señales de fluorescencia atribuibles al área del tumor de la muestra.
- 30 2. Sistema de la reivindicación 1, en el que la puntuación representativa de una proximidad entre al menos un par de células es representativa de un grado en el que el par de células está dentro de una proximidad predeterminada entre sí.
- 35 3. Sistema de la reivindicación 2, en el que la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 1 píxel a aproximadamente 100 píxeles; o
 en el que la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 5 píxeles a aproximadamente 40 píxeles; o
 en el que la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 50 µm; o
 en el que la proximidad predeterminada entre el par de células varía de aproximadamente 2,5 µm a aproximadamente 20 µm.
- 40 4. Sistema de la reivindicación 1 en el que la puntuación se calcula realizando al menos un cálculo del grupo que consiste en:
- 45 60 obtener una proximidad entre los límites del par de células,
 obtener una proximidad entre los centros de masa del par de células,
 utilizar lógica de límites basada en un perímetro alrededor de una primera célula seleccionada del par de células,
 determinar una intersección en los límites del par de células, y
 determinar un área de superposición del par de células.
- 55 65

5. Sistema de la reivindicación 1, en el que la generación de datos de imagen comprende:
- 5 separar la información sobre la radiación electromagnética detectada en los datos de imagen sin mezclar; y proporcionar los datos a través de una pluralidad de canales de datos, en donde los datos de imagen sin mezclar en un primer canal de datos describen señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador y los datos de imagen sin mezclar en un segundo canal de datos describen señales de fluorescencia atribuibles al segundo biomarcador.
- 10 6. Sistema de la reivindicación 5, en el que un tercer canal de datos describe señales de fluorescencia atribuibles a núcleos celulares y un cuarto canal de datos describe señales de fluorescencia atribuibles al área tumoral en la muestra.
- 15 7. Sistema de la reivindicación 1, en el que la dilatación de las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador comprende:
- 15 i. generar una máscara de todas las células que son positivas para el primer biomarcador; y
ii. dilatar la máscara de todas las células que son positivas para el primer biomarcador para generar una máscara dilatada representativa de una proximidad predeterminada dentro de la cual se puede encontrar una célula interactiva positiva para el segundo biomarcador; y
- 20 donde la determinación del área de interacción comprende:
- 20 i. generar una máscara de todas las células que son positivas para el segundo biomarcador;
ii. combinar la máscara de todas las células que son positivas para el segundo biomarcador y la máscara dilatada para generar una máscara de interacción que identifica las células que son positivas para el segundo biomarcador y están dentro de la proximidad predeterminada de una célula positiva para el primer biomarcador; y
iii. usar la máscara de interacción para generar un compartimento de interacción de todas las células de todos los campos de visión seleccionados que expresan el segundo biomarcador que estaban localizadas proximalmente a las células que expresan el primer biomarcador;
- 30 donde un área total del compartimento de interacción es el área de interacción.
- 35 8. Sistema de la reivindicación 1, en el que la máscara de combinación de células y la máscara del área tumoral comprende la retirada de la máscara del área tumoral de la máscara celular.
- 35 9. Sistema de la reivindicación 1, en el que el circuito de procesamiento (206) está configurado además para hacer que el controlador (200):
- 40 obtenga datos de imagen con un aumento reducido representativos de la concentración del primer o segundo biomarcador en la imagen; identifique áreas que incluyen la mayor concentración del primer o segundo biomarcador; seleccione un número predeterminado de áreas que incluyen la concentración más alta del primer o segundo biomarcador;
- 45 envíe instrucciones al dispositivo de obtención de imágenes (100) para obtener datos de imagen de gran aumento para el número predeterminado de áreas; y en el que los datos de imagen de gran aumento se proporcionan al controlador (200) para su análisis y uso para determinar la puntuación.
- 50 10. Sistema de la reivindicación 9, en el que el bajo aumento es menor o igual a un aumento de 10x y en el que el gran aumento es superior a 10x.
- 55 11. Sistema de la reivindicación 1, que comprende además elementos ópticos (104) de acondicionamiento de radiación electromagnética colocados para dirigir radiación electromagnética desde la fuente de radiación electromagnética hacia la muestra; y, opcionalmente, que comprende además elementos ópticos (110) de recogida de radiación electromagnética configurados para recibir radiación electromagnética emitida desde la muestra y dirigir la radiación electromagnética emitida como radiación electromagnética de salida hacia el detector (112).
- 60 12. Sistema de la reivindicación 1, en el que la información sobre la radiación electromagnética detectada del dispositivo de obtención de imágenes (100) es una pluralidad de imágenes espectrales.
- 65 13. Sistema de la reivindicación 12, en el que la pluralidad de imágenes espectrales corresponden cada una a una longitud de onda diferente de radiación electromagnética emitida por la muestra y detectada por el detector (112).

FIG. 1

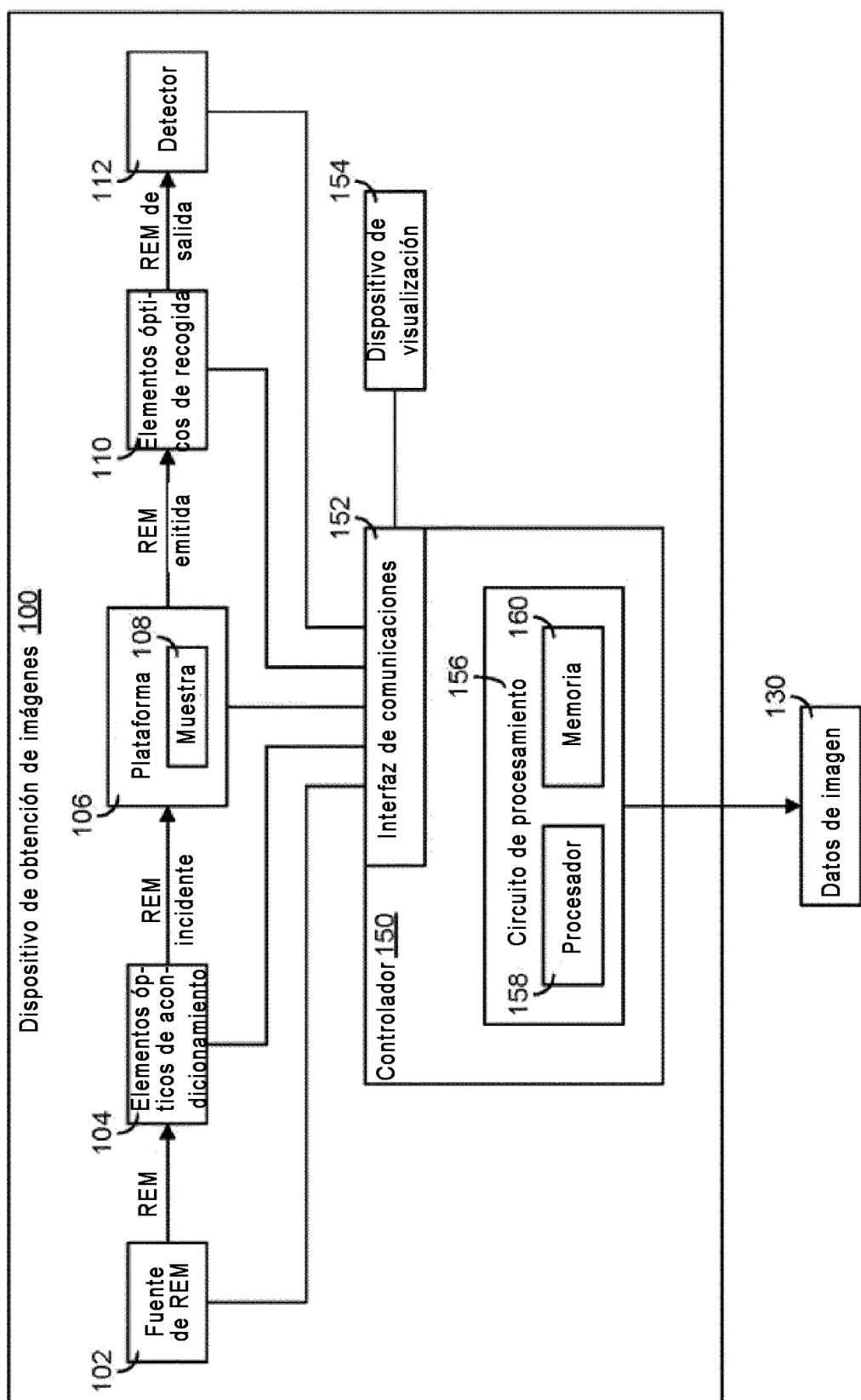


FIG. 2

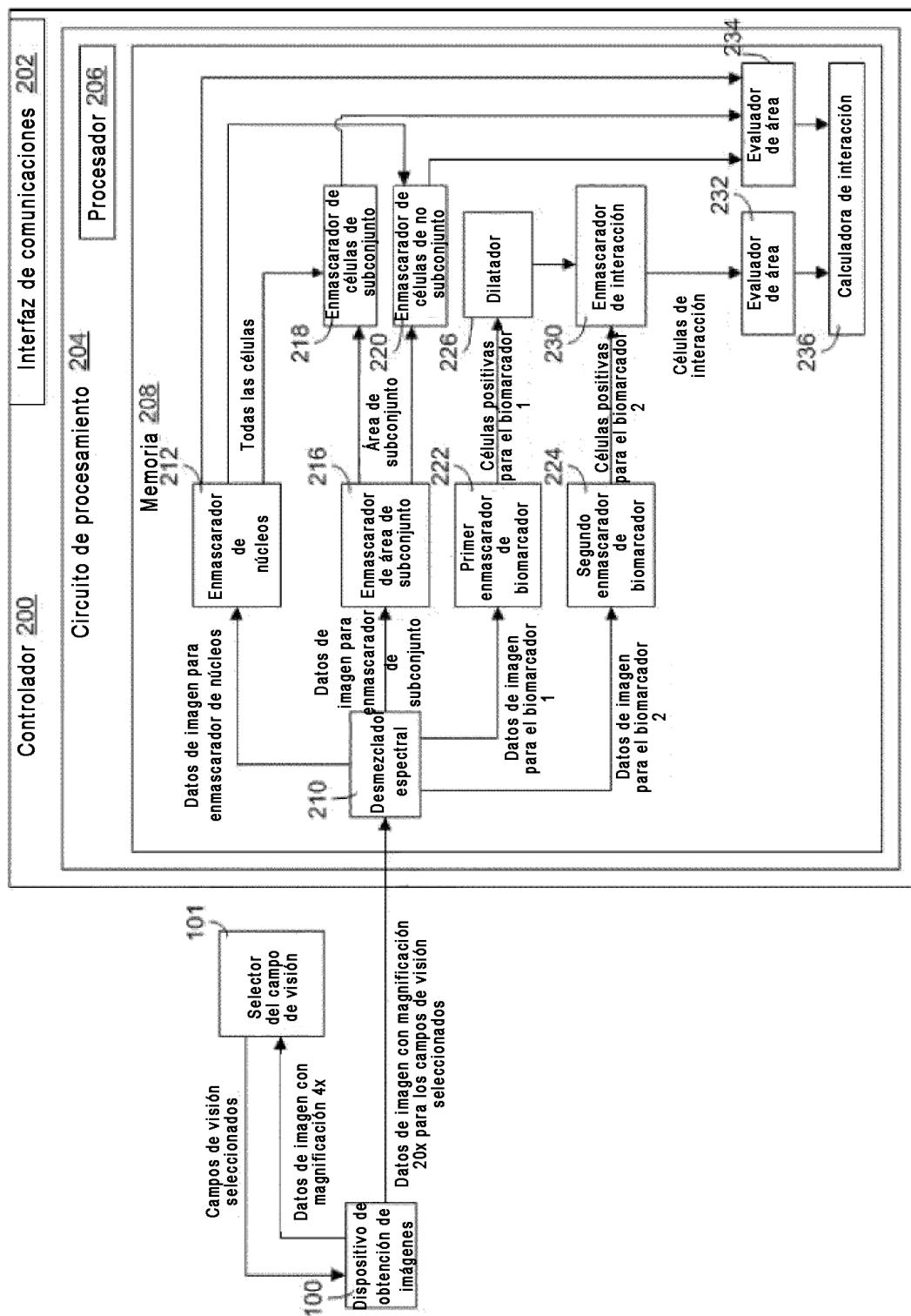


FIG. 3

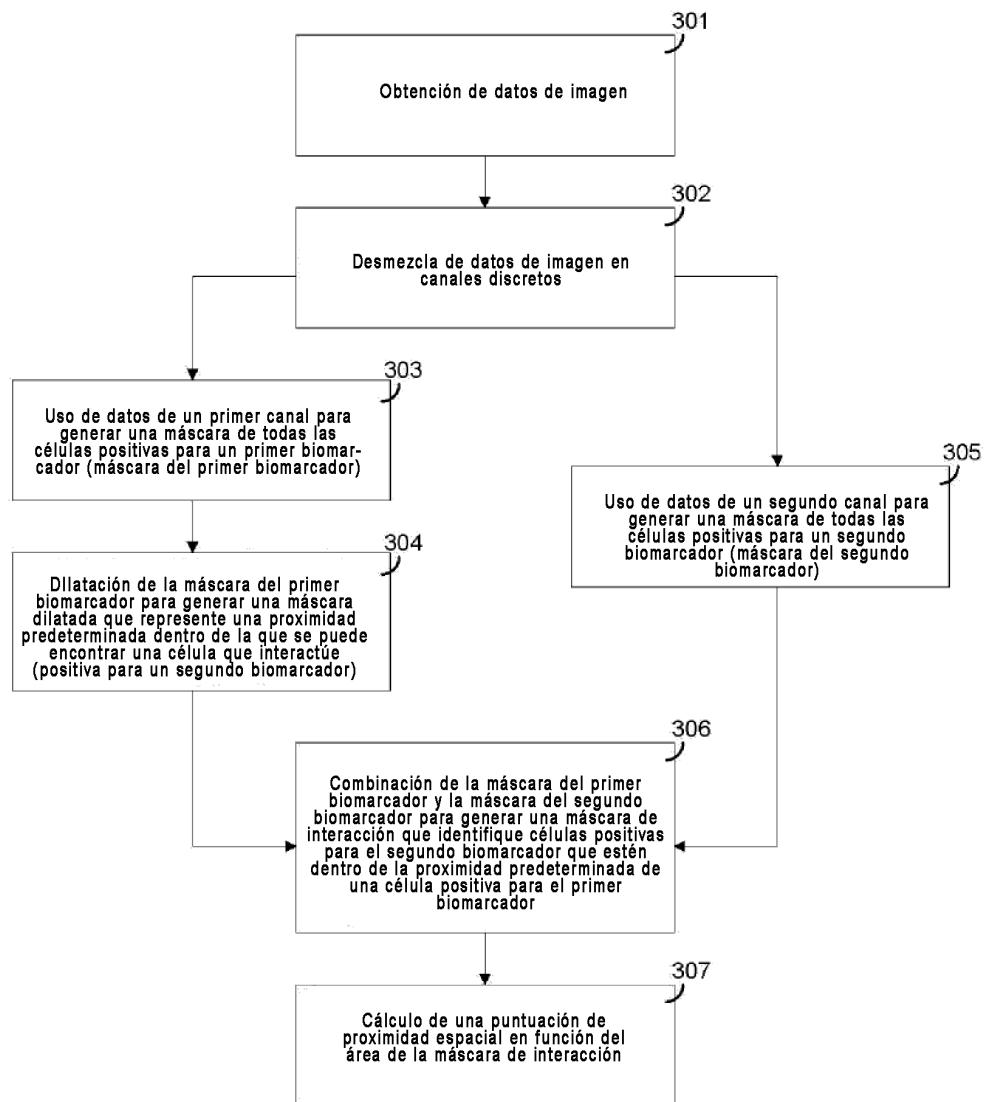


FIG. 4

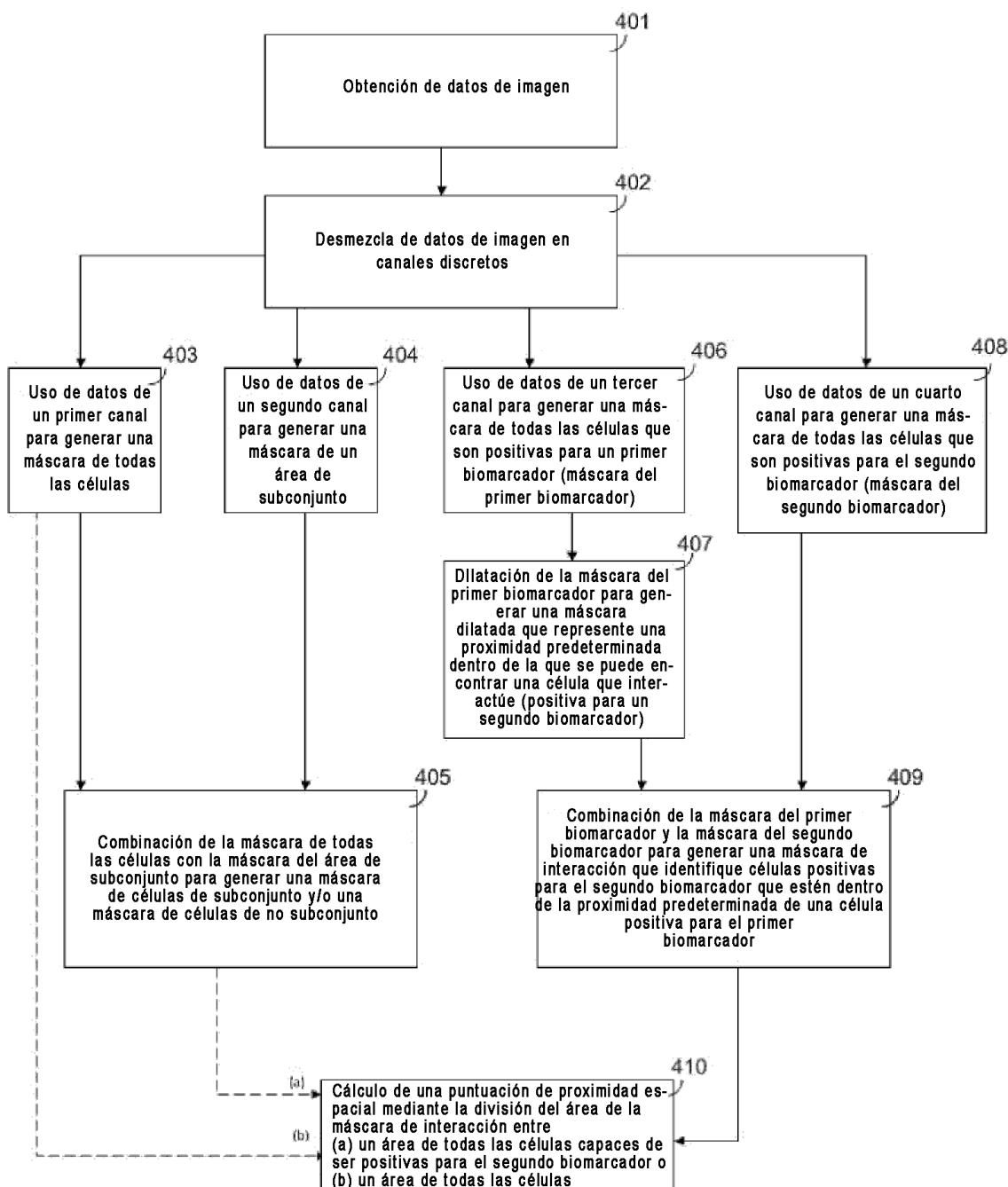


FIG. 5

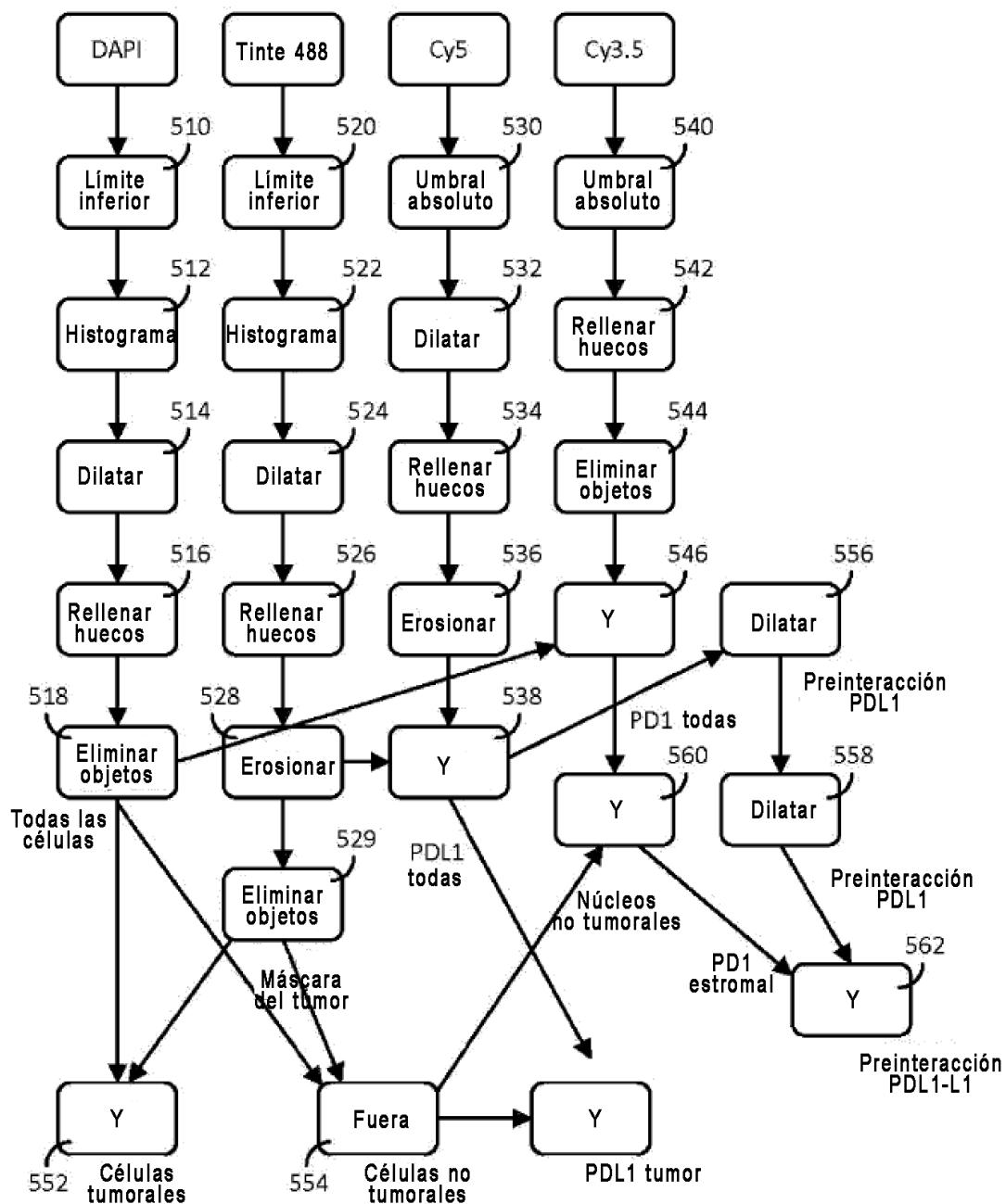


FIG. 6

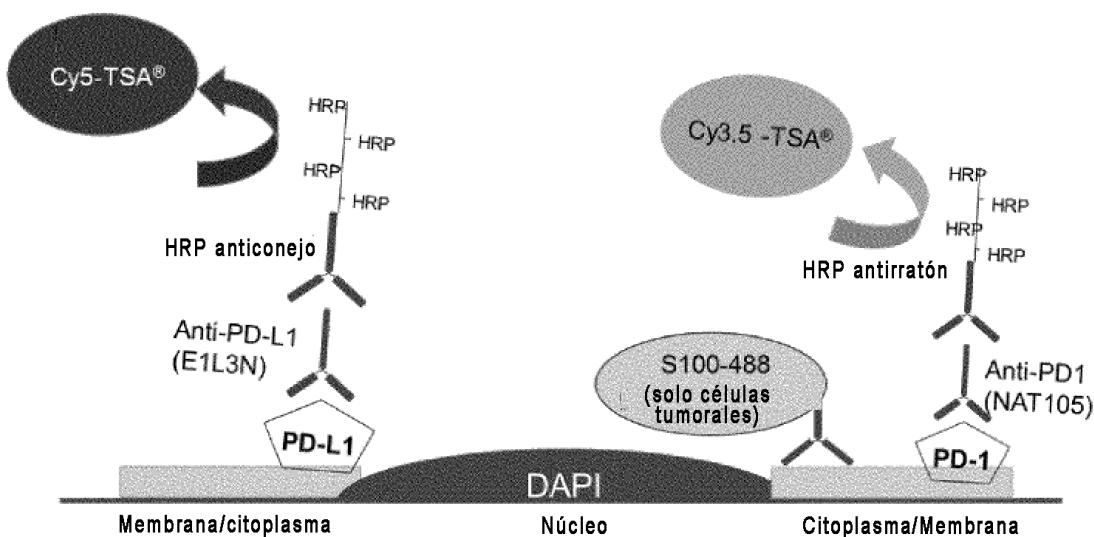


FIG. 22

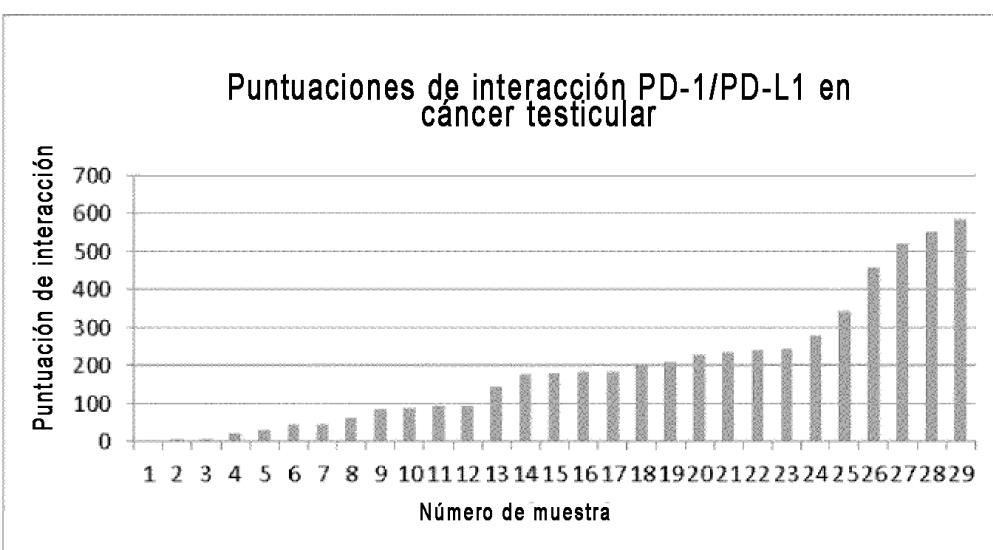


FIG. 7a



FIG. 7b

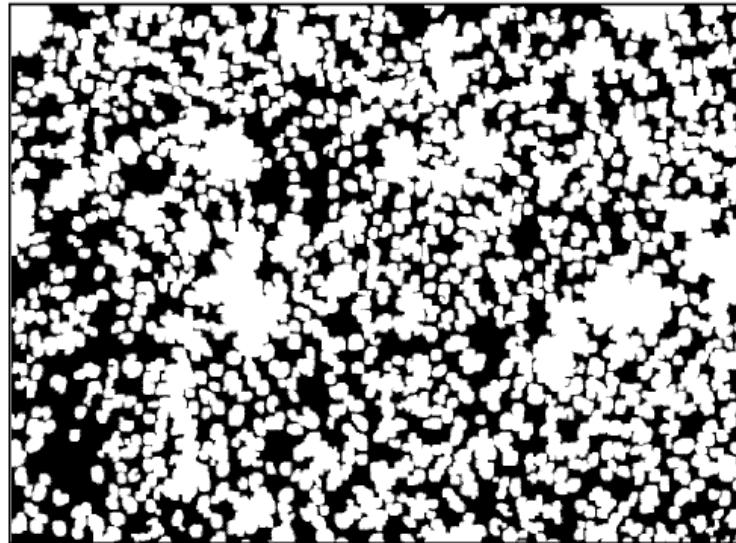


FIG. 8a

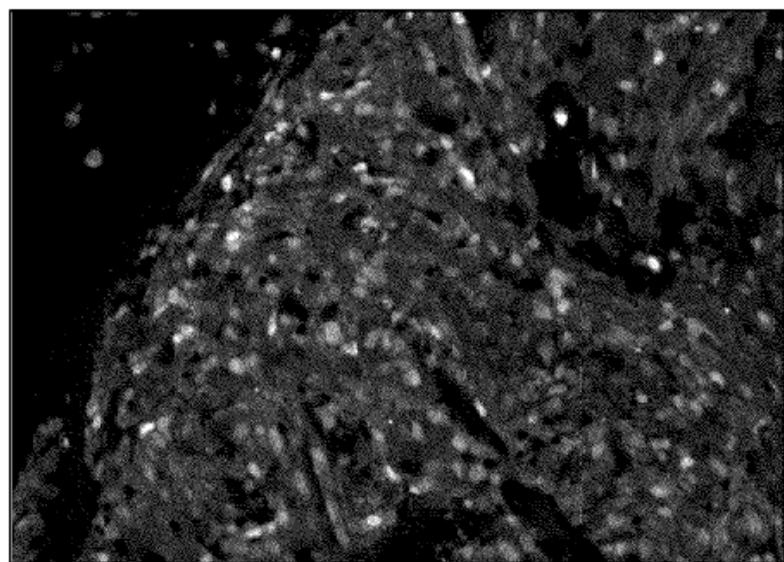


FIG. 8b



FIG. 8c

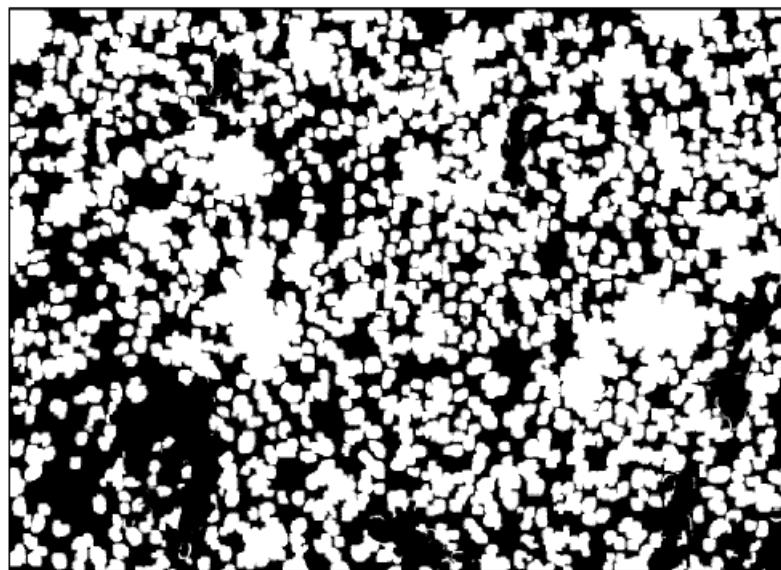


FIG. 8d

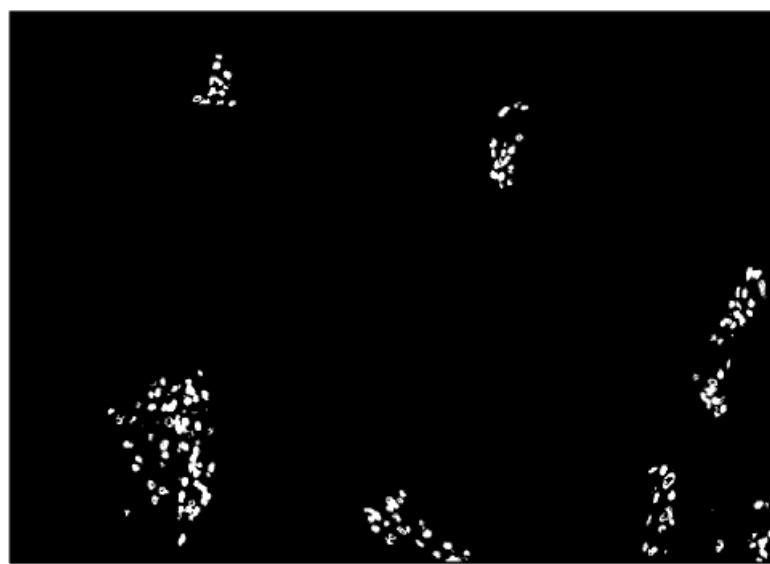


FIG. 9a

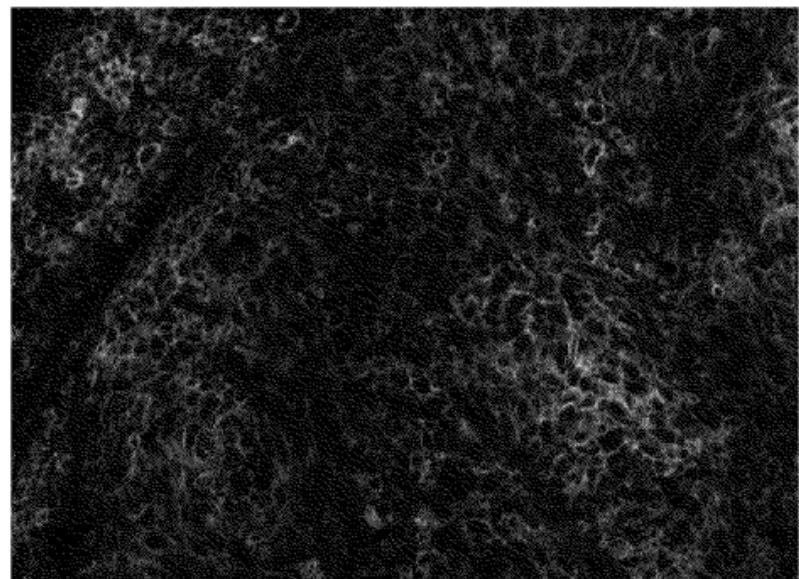


FIG. 9b

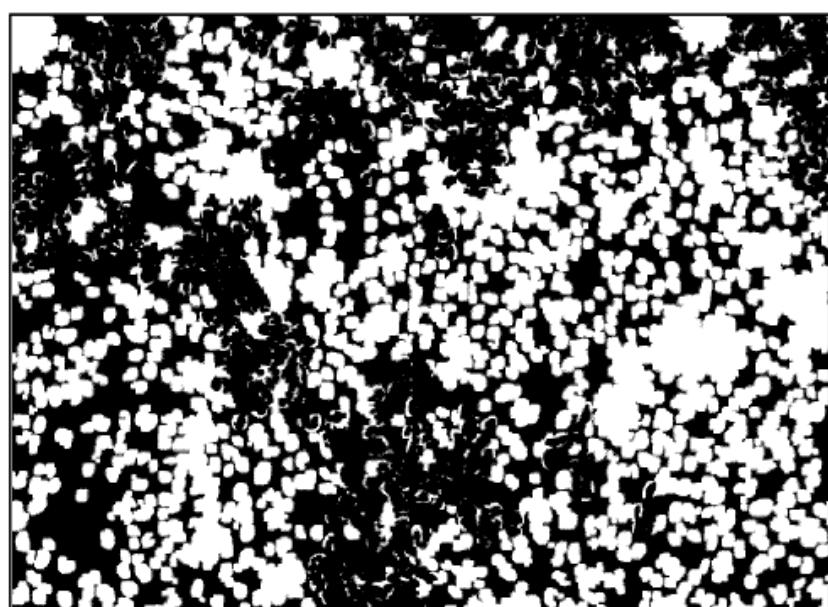


FIG. 10a

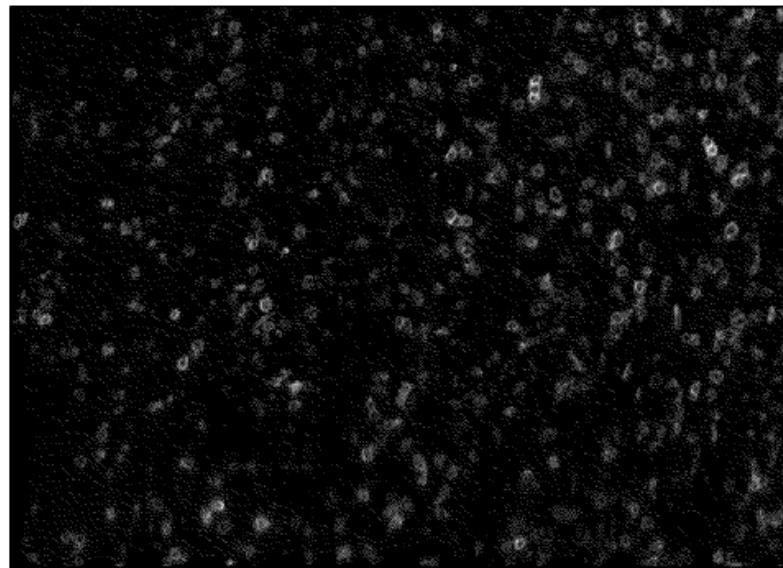


FIG. 10b

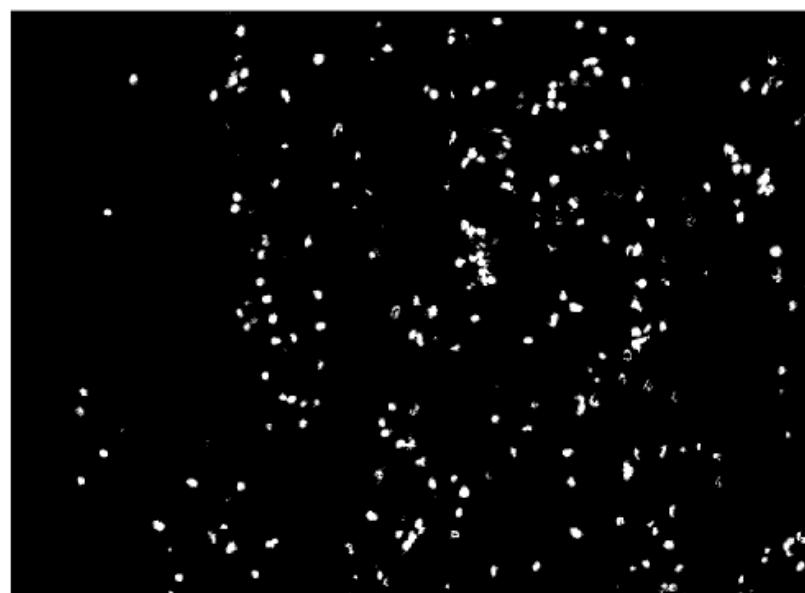


FIG. 11a



FIG. 11b

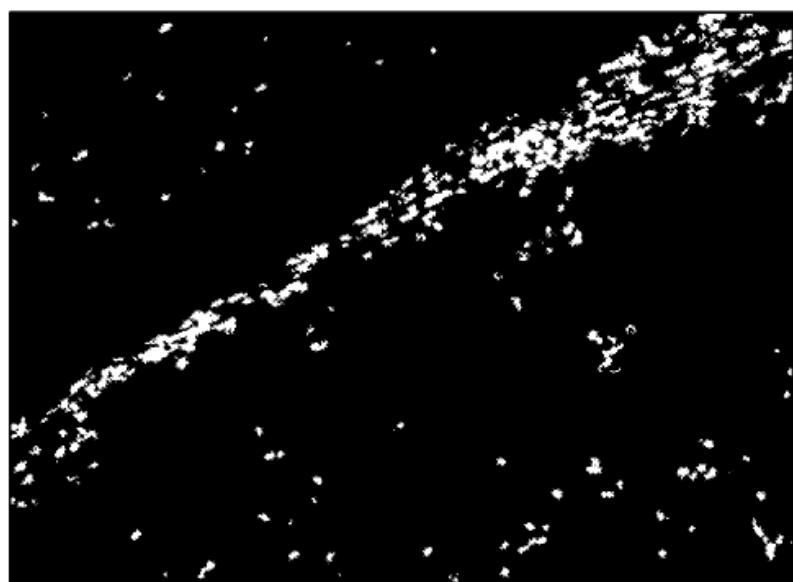


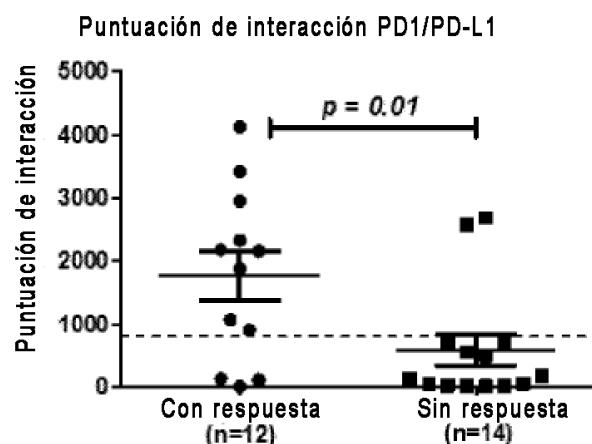
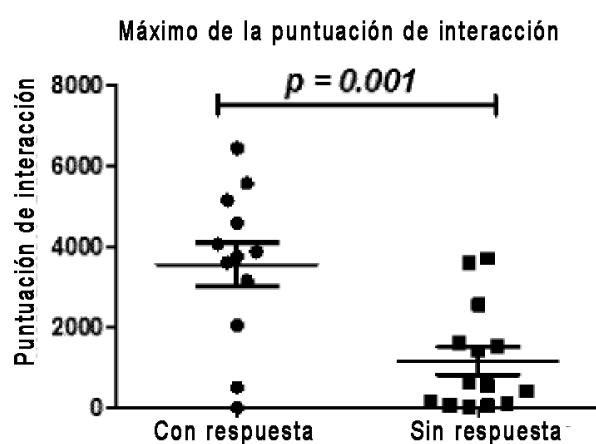
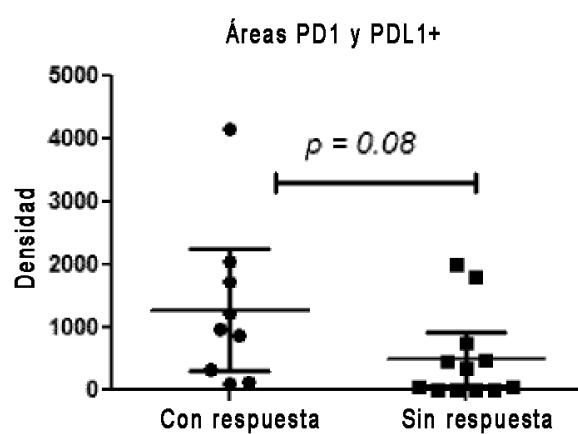
FIG. 12a**FIG. 12b****FIG. 13**

FIG. 14

Puntuación de interacción vs SSP

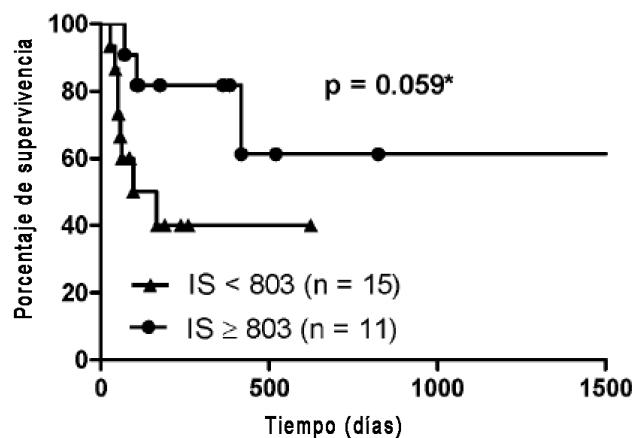


FIG. 15

Supervivencia sin progresión

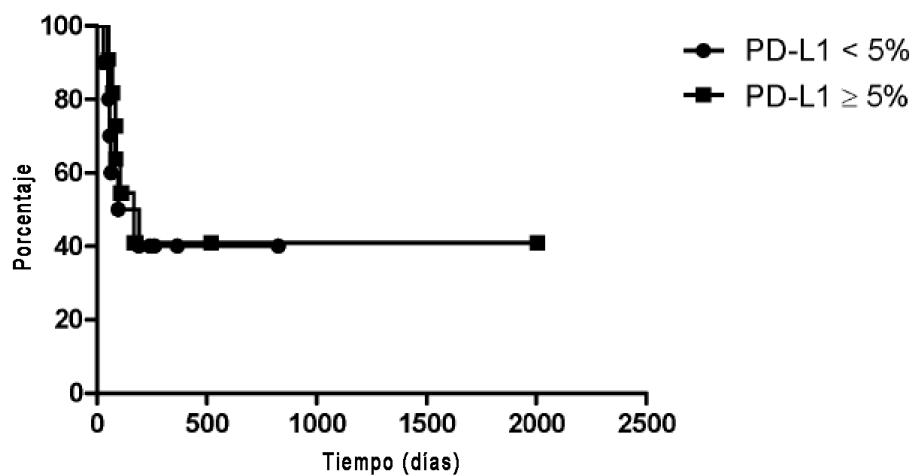


FIG. 16

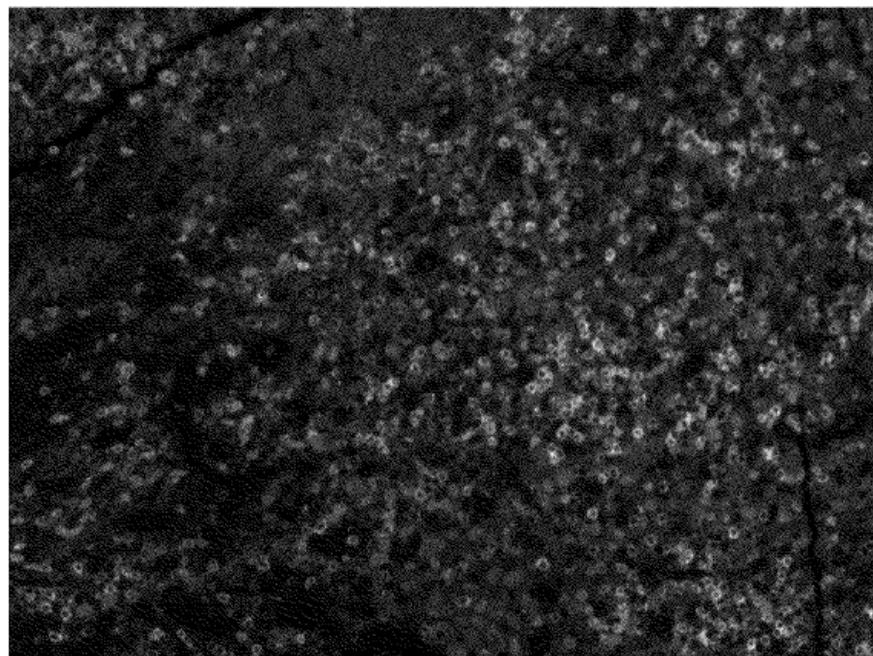


FIG. 17

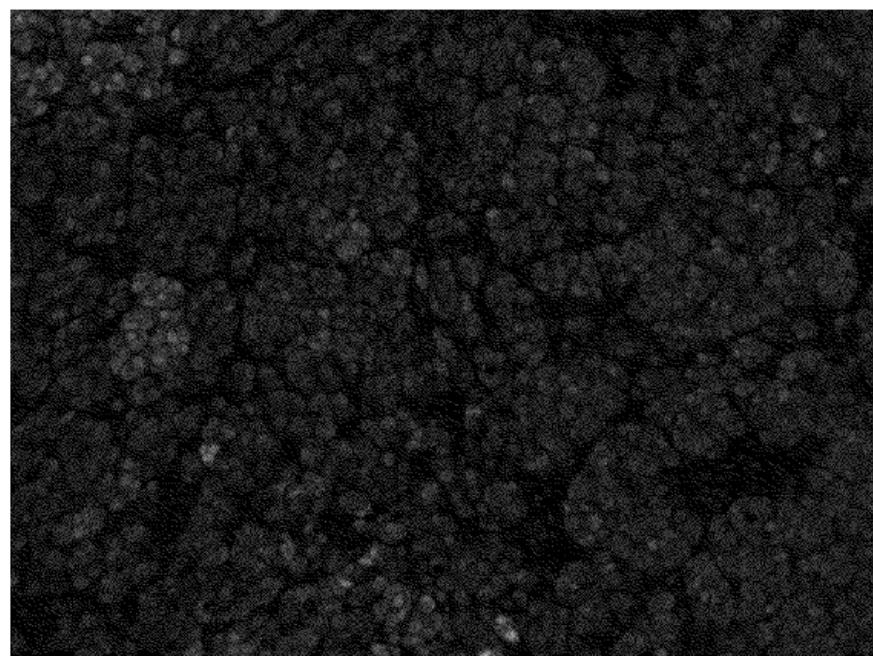


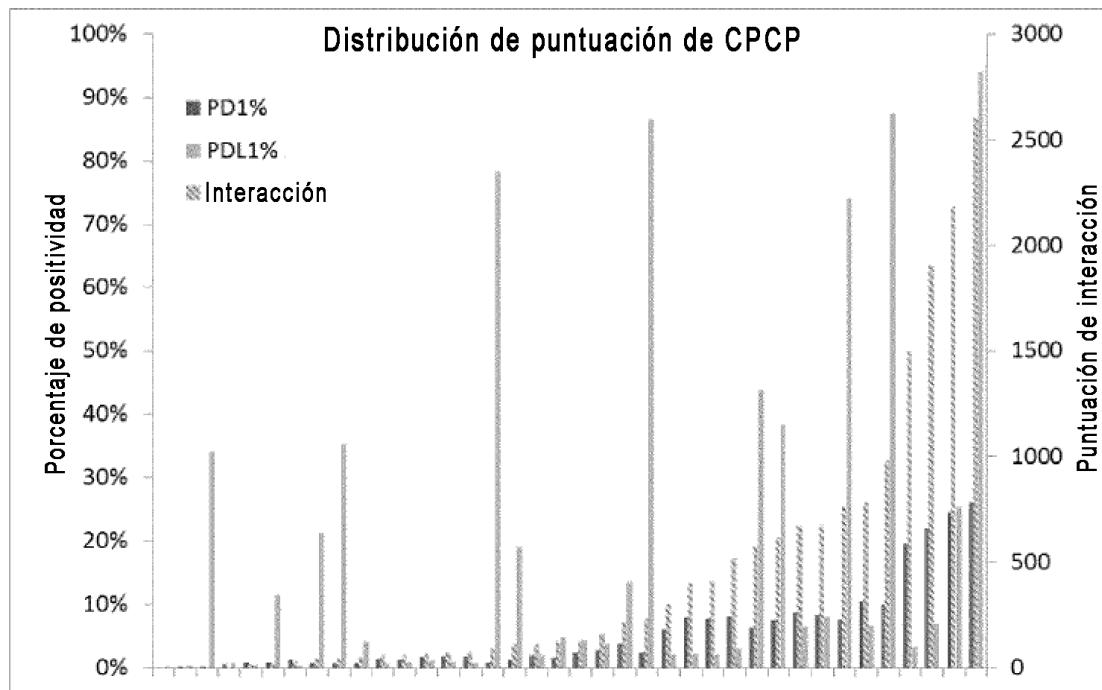
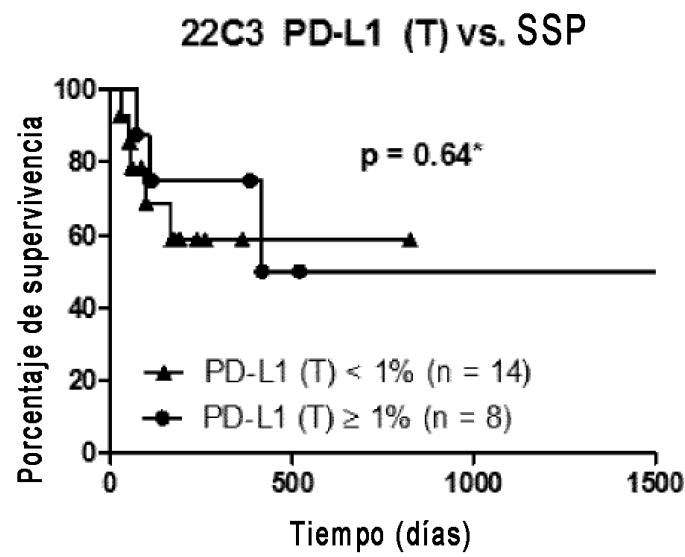
FIG. 18**FIG. 19**

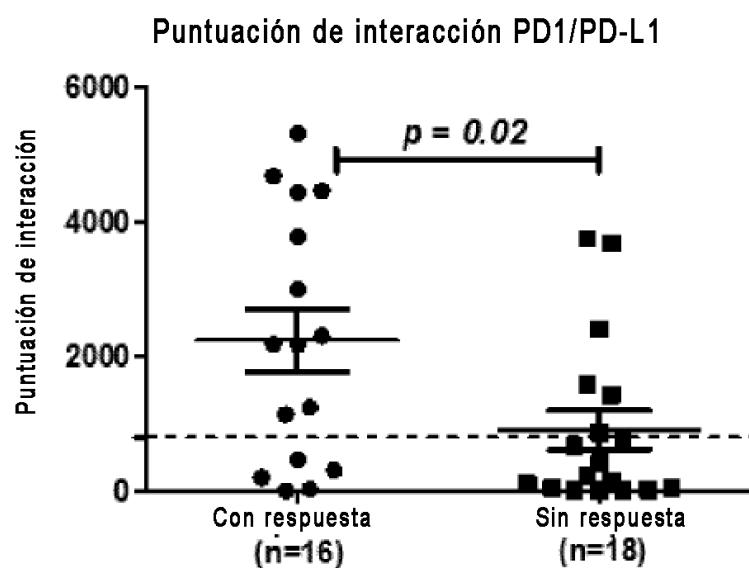
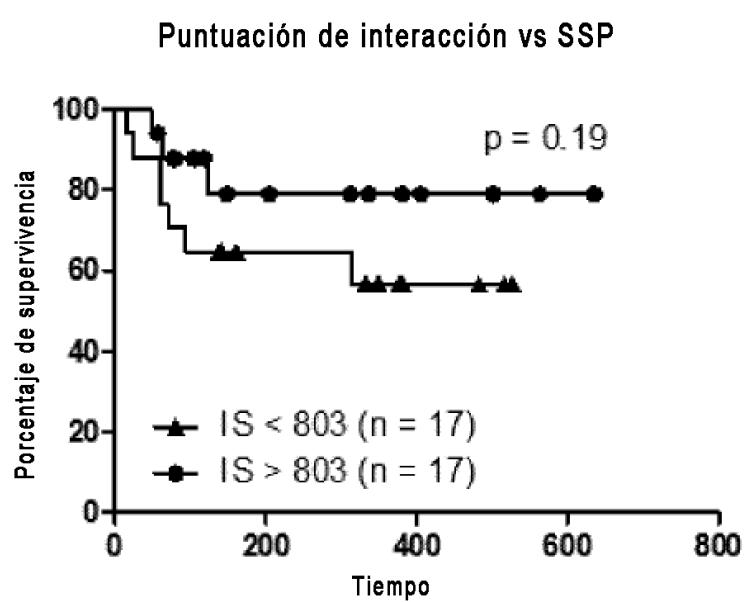
FIG. 20a**FIG. 20b**

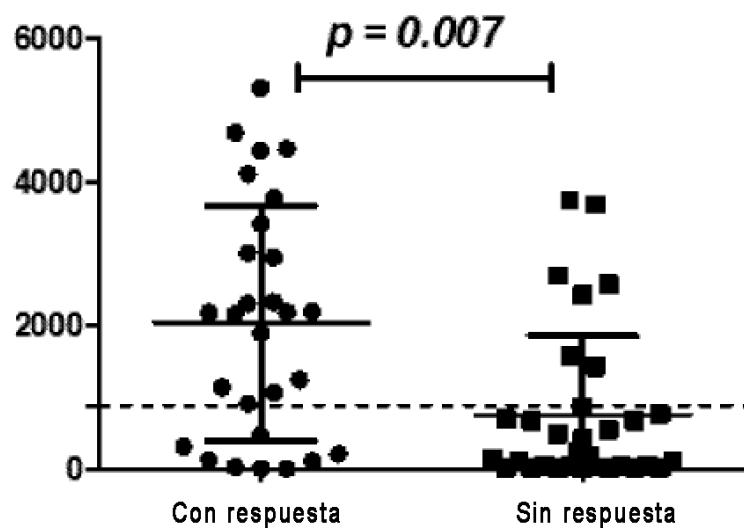
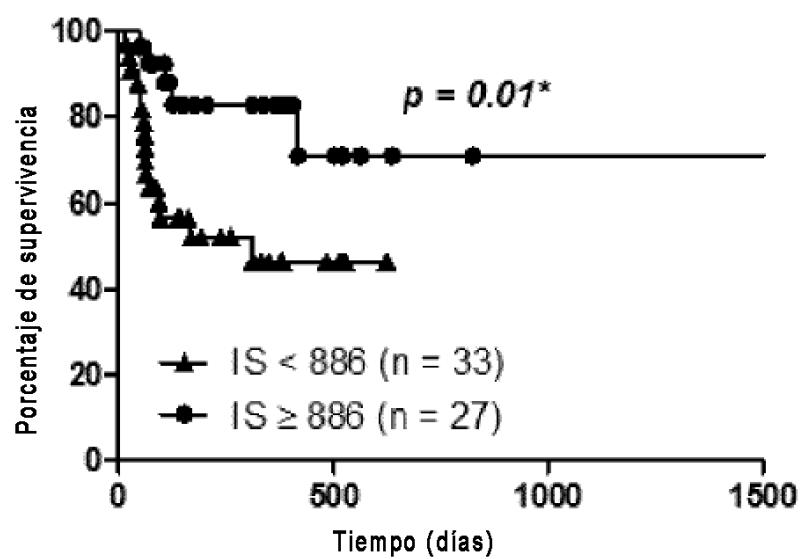
FIG. 20c**Todos los melanomas tratados****FIG. 20d****Puntuación de interacción vs SSP**

FIG. 20e

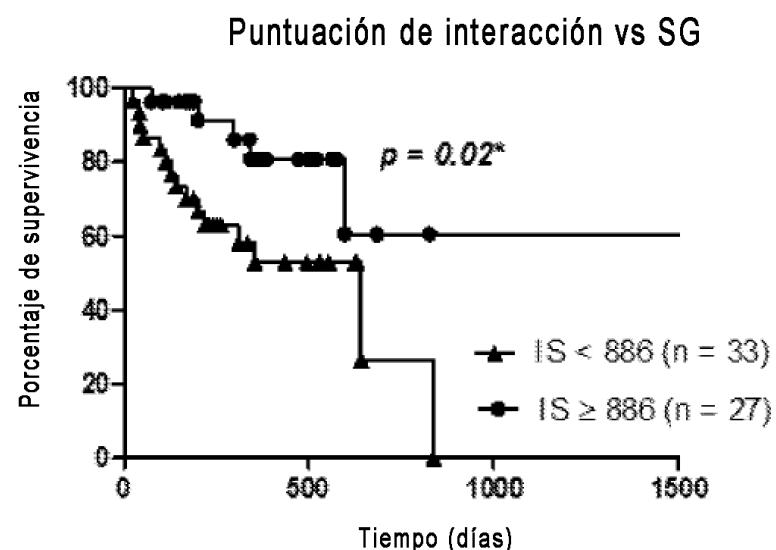


FIG. 21

