

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 762**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2018** **PCT/EP2018/070248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2019** **WO19020728**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2018** **E 18743530 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025** **EP 3658915**

54 Título: **Nuevas subpoblaciones de fibroblastos asociados al cáncer como marcadores de pronóstico para tratamientos de inmunoterapia**

30 Prioridad:

**28.07.2017 EP 17306013**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.06.2025**

73 Titular/es:

**INSTITUT CURIE (50.00%)**  
**26 rue d'Ulm**  
**75005 Paris, FR y**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA**  
**RECHERCHE MÉDICALE (50.00%)**

72 Inventor/es:

**COSTA, ANA;**  
**KIEFFER, YANN;**  
**GIVEL, ANNE-MARIE;**  
**PELON, FLORIANE;**  
**VINCENT-SALOMON, ANNE y**  
**MECHTA-GRIGORIOU, FATIMA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

### Observaciones:

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

ES 3 025 762 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

Nuevas subpoblaciones de fibroblastos asociados al cáncer como marcadores de pronóstico para tratamientos de inmunoterapia

### Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular de la oncología. Proporciona nuevos métodos y marcadores de pronóstico para tratamientos de inmunoterapia.

### Antecedentes de la invención

Con 8,8 millones muertes en 2015, el cáncer es la segunda causa principal de muerte en todo el mundo, de hecho, casi 1 de cada 6 muertes es debida al cáncer. La prevalencia del cáncer también es extremadamente alta, ya que más de 15 millones de casos nuevos se diagnostican cada año, y se espera que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente el 70% durante las próximas 2 décadas. Entre los cánceres más comunes, los cánceres de pulmón representan 1,69 millones de muertes al año, el cáncer colorrectal 774.000 muertes al año, y el cáncer de mama 571.000 muertes al año.

Hoy en día existen muchas opciones de tratamiento para el cáncer, que incluyen, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y cuidado paliativo. La elección del mejor tratamiento depende del tipo, la ubicación y el grado del cáncer, así como la salud y preferencias del paciente. Sin embargo, todavía existe una proporción importante de cánceres, especialmente cánceres en estadio terminal y/o metastásicos, que siguen siendo resistentes al tratamiento.

En las últimas décadas, la inmunoterapia se ha convertido en una parte importante de las estrategias de tratamiento del cáncer. La inmunoterapia del cáncer se basa en el uso del sistema inmunitario para tratar el cáncer. Entre la diversidad de tratamientos de inmunoterapia que se han desarrollado con el tiempo, las terapias con inhibidores del punto de control inmunitario son particularmente prometedoras. Sin embargo, no todos los cánceres están respondiendo con la misma eficacia a los tratamientos de inmunoterapia. De hecho, algunos cánceres desarrollan un microentorno inmunosupresor que les permiten escapar de los tratamientos de inmunoterapia.

Así, todavía existe una fuerte necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan detectar entornos inmunosupresores en cánceres y así predecir la eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en un cáncer dado. Eso permitirá seleccionar tratamientos de inmunoterapia para pacientes que realmente se beneficiarán de ellos. También hay una necesidad persistente de desarrollar nuevas estrategias para vencer entornos inmunosupresores, haciendo así que los tratamientos de inmunoterapia, y en particular los tratamientos con inhibidores del punto de control inmunitario, sean más eficaces y estén disponibles para todos los pacientes. La presente invención busca cumplir estas y otras necesidades.

### Sumario de la invención

El cáncer es una enfermedad sistémica que engloba múltiples componentes de tanto las propias células tumorales como las células hospedadoras del estroma. Es ahora evidente que las células del estroma en el microentorno tumoral desempeñan una función importante en el desarrollo del cáncer. El estroma del cáncer incluye fibroblastos asociados al cáncer (CAF), células endoteliales vasculares, células inmunitarias y matriz extracelular. Los CAF son el componente más frecuente del estroma tumoral, constituyen la mayor parte del estroma del cáncer y afectan al microentorno tumoral de forma que promueven el inicio, la angiogénesis, la invasión y la metástasis del cáncer.

Los presentes inventores se han centrado en los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) y descubrieron nuevas subpoblaciones de CAF que desempeñaban funciones esenciales en el establecimiento de un microentorno inmunosupresor en el sitio tumoral. De hecho, han descubierto que diferentes subpoblaciones de CAF actúan sobre la inmunidad adaptativa de linfocitos T, aumentando la retención de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en la superficie de células del estroma y estimulando su estado de activación en linfocitos T reguladores CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Se sabe que los linfocitos T reguladores CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> son actores clave en el establecimiento de entornos inmunosupresores en tumores. Los entornos inmunosupresores son sensibles al desarrollo de resistencias a los tratamientos de inmunoterapia del cáncer, y en particular a tratamientos inhibidores del punto de control inmunitario. Los inventores identificaron marcadores que caracterizan la inmunosupresión mediada por CAF: DPP4, OX40L, CD73, PDL2 y B7H3. De hecho, demostraron que los CAF OX40L<sup>+</sup> y CAF PDL2<sup>+</sup> aumentan específicamente la retención de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en la superficie de células del estroma. También mostraron que los CAF DPP4<sup>+</sup>, CAF CD73<sup>+</sup> y los CAF B7H3<sup>+</sup> estimulan específicamente la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en linfocitos T reguladores CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>.

La materia de la presente invención se define por las reivindicaciones.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de selección de un paciente afectado con un tumor para un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, en donde el método comprende:

- 5 (a) detectar CAF (fibroblasto asociado al cáncer) DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario es inversamente proporcional al nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en la muestra de cáncer;
- 10 (c) seleccionar pacientes con nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a su nivel de referencia como adecuados para un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, y/o seleccionar pacientes con un nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a su nivel de referencia para un tratamiento del cáncer que excluye el inhibidor del punto de control inmunitario.

15 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir la respuesta de un sujeto afectado con un tumor sólido a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, en donde el método comprende:

- (a) detectar CAF (fibroblasto asociado al cáncer) DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;
- 20 (b) determinar el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario es inversamente proporcional al nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en la muestra de cáncer;
- (c) comparar el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer con un nivel de referencia, en donde el nivel inferior a su nivel de referencia es predictivo de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, y/o el nivel superior a su nivel de referencia es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario en el cáncer de dicho paciente.

25 Particularmente, el método comprende además:

- 30 (a) detectar CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer de dicho paciente, y
- (b) determinar el nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario es inversamente proporcional a los niveles de CAF DPP4<sup>+</sup>, y: CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer,
- 35 (c) seleccionar pacientes con nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> y: CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a su nivel de referencia como adecuado para un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, y/o seleccionar pacientes con un nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> y: CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> superior a su nivel de referencia para un tratamiento del cáncer que excluye el inhibidor del punto de control inmunitario.

40 En un aspecto adicional, la invención también se refiere a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario para su uso en el tratamiento de un cáncer sólido en un paciente, en donde el paciente se ha seleccionado para el tratamiento con un método del primer aspecto, en donde el paciente presenta un cáncer.

- 45 (b) nivel(es) de CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> inferior(es) a su nivel de referencia.

50 Preferentemente, el tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario se selecciona del grupo que consiste en terapias anti-CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), tales como ipilimumab, inhibidores de PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada), tal como nivolumab, pembrolizumab o BGB-A317, inhibidores de PDL1 (ligando de muerte celular programada), tales como atezolizumab, avelumab o durvalumab, inhibidores de LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos), tales como BMS-986016, inhibidores de TIM-3 (inmunoglobulina de linfocitos T y 3 que contiene dominio de mucina), inhibidores de TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM), inhibidores de BLTA (atenuador de linfocitos B y T), inhibidores de IDO1, tales como epacadostat, o una combinación de los mismos.

55 En particular, la terapia con anti-CTLA-4 es ipilimumab, el inhibidor de PD-1 es nivolumab, pembrolizumab o BGB-A317, el inhibidor de PDL1 es atezolizumab, avelumab o durvalumab, el inhibidor de LAG-3 es BMS-986016, el inhibidor de IDO1 es epacadostat.

60 Más preferentemente, el tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario es un inhibidor de PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) o un inhibidor de PDL1 (ligando de muerte celular programada).

Preferentemente, en la invención, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup> en la muestra de cáncer y el (los) nivel(es) de referencia son porcentaje(s) de referencia.

Preferentemente, el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> en la muestra de cáncer se calcula como el porcentaje de células CAF DPP4<sup>+</sup>, basado en el número total de células en la muestra de cáncer.

Preferentemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, osteosarcoma, melanoma, cáncer hipofaríngeo, cáncer de esófago, cáncer endometrial, cáncer de cuello uterino, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de colon o colorrectal, tumores neuroendocrinos, cáncer de músculo, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer uterino, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pediátrico, preferentemente el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer pancreático y cáncer pediátrico.

Más preferentemente, el cáncer es un cáncer de ovario, preferentemente un cáncer de ovario mesenquimatoso, en particular cáncer de ovario de gran malignidad del tipo seroso, o un cáncer de mama, preferentemente un cáncer de mama invasivo y/o sus metástasis, en particular metástasis axilares.

### Breve descripción de los dibujos

#### Figura 1: Mecanismo de inmunosupresión impulsado por CAF

**A-D. Retención de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en CAF mediante OX40L (TNFSF4) y PD-L2 (PDCD1LG2).** **A.** Fotomicrografía representativa de CAF cocultivados con linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que muestran dos tipos de interacción de linfocitos T con CAF: interacciones de intervalo de tiempo corto (indicadas por flechas largas) e interacciones de intervalo de tiempo largo (indicadas por flechas cortas). Aumentos, 20X **B.** Curvas de Kaplan-Meier de un experimento representativo de CAF transfectados transitoriamente con siCTR que compara la interacción de intervalo de tiempo corto (línea inferior) y de intervalo de tiempo largo (línea superior) entre CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mediada por la probabilidad de los linfocitos T de permanecer en CAF (eje vertical) con el tiempo (h, horas, eje horizontal). El valor de *p* es de la prueba del orden logarítmico (Izquierda). Número de interacciones entre CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> considerando los intervalos de tiempo cortos y largos (derecha). **C.** Curvas de Kaplan-Meier de un experimento representativo que compara CAF transfectados transitoriamente con siCTR (línea superior) y siTNFSF4 (OX40L) y siPDCD1LG2 (PD-L2) (líneas inferiores) considerando las interacciones de intervalo de tiempo corto (arriba) o de intervalo de tiempo largo (abajo) entre CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, mediadas por la probabilidad de los linfocitos T a permanecer en CAF (eje vertical) con el tiempo (h, horas, eje horizontal). El valor de *p* es de la prueba del orden logarítmico. **D.** Gráfico de barras que muestra la frecuencia de interacciones estables entre CAF transfectados transitoriamente con siCTR, siTNFSF4 (OX40L) y siPDCD1LG2 (PD-L2) y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (un experimento representativo). La frecuencia de interacciones estables se calcula como la relación entre el número de interacciones considerando el intervalo de tiempo largo y el número de interacciones considerando el intervalo de tiempo corto (izquierda). Gráfico de barras que muestra el porcentaje de contactos persistentes entre las interacciones de intervalo de tiempo corto entre CAF transfectados transitoriamente con siCTR, siTNFSF4 (OX40L) y siPDCD1LG2 (PD-L2) y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (derecha). Las barras de error indican media  $\pm$  e.e.m. Los valores de *p* se basan en la prueba de la *t* de Student. **E-G. Activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> por CAF mediante CD276 (B7H3), NT5E (CD73) y DPP4.** **E.** Gráficos representativos de citometría de flujo para CD25 y FOXP3 de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tras el cocultivo con CAF transfectados transitoriamente con siCTR o siCD276 (B7H3), siNT5E (CD73) o siTNFSF4 (OX40L). Se determinó la selección de CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> según el isotipo (caja de isotipo) y se dividió en dos clases según el nivel de FOXP3<sup>+</sup> (FOXP3<sup>bajo/med</sup> o FOXP3<sup>alto</sup>). Los porcentajes de linfocitos T en cada puerta se indican para siCTR (no subrayado) y para siCD276 (B7H3), siNT5E (CD73) o siTNFSF4 (OX40L) (subrayado). **F.** Porcentaje de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> entre CD25<sup>+</sup> vivos que comparan CAF transfectados transitoriamente con siCTR y siCD276, siNT5E, siDPP4 o siTNFSF4 para FOXP3<sup>alto</sup>. **G.** Porcentaje de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> entre CD25<sup>+</sup> vivos que comparan CAF transfectados transitoriamente con siCTR y siCD276, siNT5E, siDPP4 o siTNFSF4 para FOXP3<sup>bajo/med</sup>. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba del orden con signo de Wilcoxon para datos emparejados. *n*  $\geq$  6 experimentos independientes.

#### Figura 2: Eficiencia del silenciamiento por RT-qPCR

**A.** Niveles de ARNm de TNFSF4 (OX40L) y PDCD1LG2 (PD-L2) en CAF transfectados transitoriamente con siCTR, siTNFSF4 (OX40L) y siPDCD1LG2 (PD-L2), respectivamente, se monitorizaron por RT-qPCR. Se usa *ciclofilina B* como control interno para la expresión de ARNm total. Las barras de error indican el e.e.m. (*n*  $\geq$  4 experimentos independientes). **B.** Niveles de ARNm de CD276 (B7H3), NT5E (CD73), DPP4 y TNFSF4 (OX40L) en CAF transfectados transitoriamente con siCTR, siCD276 (B7H3), siNT5E (CD73), siDPP4 y siTNFSF4 (OX40L), respectivamente, se monitorizaron por RT-qPCR. Se usa *ciclofilina B* como control interno para la expresión de ARNm total. Las barras de error indican el e.e.m. (*n*  $\geq$  6 experimentos independientes).

#### Figura 3: Mecanismo de inmunosupresión impulsada por CAF en HGSO

**Activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> por CAF mediante CD276 (B7H3) y NT5E (CD73)** A. Gráficos de citometría de flujo representativos para CD25 y FOXP3 de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tras el cocultivo con CAF transfectados transitoriamente con siCTR, siCD276 (B7H3) o siNT5E (CD73). La selección de CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> se determinó según el isotipo y se dividió en dos clases según el nivel de FOXP3<sup>+</sup> como en la Figura 1E (FOXP3<sup>bajo/med</sup> o FOXP3<sup>alto</sup>). Los porcentajes de linfocitos T en la puerta de FOXP3<sup>alto</sup> se indican para siCTR (no subrayado) y para siCD276 (B7H3) y siNT5E (CD73) (subrayado). B. El porcentaje de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> entre los CD25<sup>+</sup> vivos que comparan los CAF transfectados transitoriamente con siCTR y siCD276 y siNT5E para FOXP3<sup>alto</sup>. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba del orden con signo de Wilcoxon para datos emparejados. *n* ≥ 2 experimentos independientes.

#### Figura 4: Identificación de células positivas para cada uno de los 5 marcadores

Gráficos de barras de valores del log expresión normalizados para DPP4, OX40L (TNFSF4), CD73 (NT5E), PDL2 (PDCD1LG2) y B7H3 (CD276). Cada barra representa el valor de expresión para una célula. Las células con expresión normalizada superior a 3 (representada por la línea discontinua) se consideraron positivas para el gen. Los datos son de la secuenciación de ARN realizada en 96 células procedentes de 2 pacientes con cáncer de mama (subtipo Lum A).

#### Figura 5: Marcadores de CAF-S1 implicados en la inmunosupresión son indicativos de respuesta a inmunoterapia mientras que PD-1, PD-L1, PD-L2, linfocitos T CD25, CD4, CD8 y marcadores de citotoxicidad CD8 no lo son.

A. Gráficos de barras de valores del log expresión normalizados para marcadores de CAF-S1 implicados en la inmunosupresión (FAP, DPP4, JAM2, OX40L, CD73 y B7-H3) según respuesta a la terapia anti-PD-1. B. Gráficos de barras de valores del log expresión normalizados para PD-1, PD-L1 y PD-L2 según la respuesta a terapia anti-PD-1. C. Gráficos de barras de valores del log expresión normalizados para CD25, CD4, CD8A, CD8B, FOXP3, GZMA, GZMB y PRF1 según la respuesta a terapia anti-PD-1. Los valores de *p* son de la prueba de la *t* de dos muestras de Welch.

#### Figura 6: Una diferencia del distintivo de CAF-S4, CAF-S1 es indicativo de la respuesta a inmunoterapia y especialmente dos subpoblaciones de CAF-S1: subpoblaciones 1 y 3.

A. Gráficos de barras de puntuaciones del log expresión normalizadas para el distintivo del gen CAF-S1 (izquierda) y distintivo del gen CAF-S4 (derecha) según la respuesta a terapia anti-PD-1. B. Los gráficos de barras de las puntuaciones del log expresión normalizadas para las 6 subpoblaciones de CAF-S1 según respuesta a terapia anti-PD-1. Los valores de *p* son de la prueba de la *t* de dos muestras de Welch.

#### Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto nuevas subpoblaciones de fibroblastos asociados al cáncer (CAF) que desempeñan una función crucial en el establecimiento de un microentorno inmunosupresor en el sitio tumoral aumentando su retención de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en la superficie de células del estroma y estimulando su estado de activación en linfocitos T reguladores CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Se sabe que los linfocitos T reguladores CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> son actores clave en el establecimiento de un entorno inmunosupresor, que es responsable del desarrollo de resistencias a tratamientos de inmunoterapia. Los inventores han así identificado cinco subpoblaciones de CAF útiles para caracterizar un entorno inmunosupresor: CAF DPP4<sup>+</sup>, CAF CD73<sup>+</sup> y CAF B7H3<sup>+</sup> que estimulan específicamente la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en linfocitos T reguladores CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, y CAF OX40L<sup>+</sup> y CAF PDL2<sup>+</sup> que aumentan específicamente la retención de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en la superficie de células del estroma.

#### Definiciones

El término "cáncer" o "tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de células causantes del cáncer, tales como proliferación incontrolada, y/o inmortalidad, y/o potencial metastásico, y/o crecimiento rápido y/o tasa de proliferación, y/o ciertas características morfológicas. Este término se refiere a cualquier tipo de tumor maligno (primario o metástasis) en cualquier tipo de sujeto. Puede referirse a tumor sólido, así como a tumor hematopoyético.

El término "muestra de cáncer", como se usa en el presente documento, significa cualquier muestra que contenga células tumorales y células del estroma de cáncer, en particular fibroblastos asociados al cáncer (CAF), derivados de un sujeto. Preferentemente, la muestra de cáncer contiene ácidos nucleicos y/o proteínas. La muestra se puede tratar antes de su uso.

Los tejidos cancerosos están compuestos de células cancerosas y las células del estroma de cáncer circundantes, que incluyen fibroblastos asociados al cáncer (CAF), células endoteliales vasculares y células inmunitarias, además de la matriz extracelular. Como se usa en el presente documento, el término "fibroblasto asociado al cáncer" o "CAF" se refiere a los fibroblastos presentes en el estroma de cánceres. Los CAF son células del estroma CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>.

CD31-CD29<sup>+</sup>. Los CAF son uno de los componentes del estroma más abundantes con una morfología similar a la de los miofibroblastos.

Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" son intercambiables y se refieren a un animal, preferentemente a un mamífero, incluso más preferentemente a un humano. Sin embargo, el término "sujeto" también puede referirse a animales no humanos, en particular mamíferos, tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos, entre otros.

Como se usa en el presente documento, el término "marcador" o "biomarcador" se refiere a un parámetro biológico medible que ayuda a predecir la aparición de un cáncer o la eficiencia de un tratamiento del cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "diagnóstico" se refiere a la determinación en cuanto a si un sujeto es probable que se vea afectado por un cáncer. El experto hace frecuentemente un diagnóstico basándose en uno o más marcadores de diagnóstico, cuya presencia, ausencia o cantidad es indicativa de la presencia o ausencia del cáncer. Por "diagnóstico" también pretende referirse a la provisión de información útil para el diagnóstico.

Como se usa en el presente documento, el término "mal pronóstico" se refiere a una disminución de la supervivencia del paciente y/o a una progresión temprana de la enfermedad y/o un aumento de la reaparición de la enfermedad y/o un aumento de la aparición de metástasis.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento", "tratan" o "que tratan" se refiere a cualquier acto previsto para mejorar el estado de salud de pacientes, tales como terapia, prevención, profilaxis y retardo de la enfermedad. En ciertas realizaciones, dicho término se refiere a la mejora o erradicación de una enfermedad o síntomas asociados a una enfermedad. En otras realizaciones, este término se refiere a minimizar la propagación o el empeoramiento de la enfermedad resultante de la administración de uno o más agentes terapéuticos a un sujeto con dicha enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento del cáncer terapéutico usando el sistema inmunitario para rechazar el cáncer. El tratamiento terapéutico estimula el sistema inmunitario del paciente para atacar las células tumorales malignas. Incluye inmunización del paciente con antígenos tumorales (por ejemplo, administrando una vacuna contra el cáncer), en cuyo caso el propio sistema inmunitario del paciente está entrenado para reconocer células tumorales ya que las dianas pueden ser destruidas, o administración de moléculas que estimulan el sistema inmunitario, tales como citocinas, o administración de anticuerpos terapéuticos como fármacos, en cuyo caso el sistema inmunitario del paciente es reclutado por los anticuerpos terapéuticos para destruir las células tumorales. En particular, los anticuerpos se dirigen contra antígenos específicos, tales como los antígenos poco usuales que se presentan sobre las superficies de tumores.

Una parte importante del sistema inmunitario es su capacidad para distinguir entre las células normales del cuerpo y las que considera "extrañas", en particular células cancerosas. Esto permite al sistema inmunitario atacar a las células cancerosas mientras dejan las células normales solas. Para hacer esto, el sistema inmunitario usa "puntos de control", estos puntos de control son moléculas en ciertas células inmunitarias que necesitan activarse (o inactivarse) para empezar una respuesta inmunitaria. Las células cancerosas encuentran algunas veces formas de usar estos puntos de control para evitar ser atacados por el sistema inmunitario. Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario" se refiere a un tratamiento de inmunoterapia que se dirige a estos puntos de control para permitir o facilitar el ataque de células cancerosas por el sistema inmunitario.

Los términos "magnitud", "cantidad" y "nivel" se usan indistintamente en el presente documento y pueden referirse a una cuantificación absoluta de una molécula en una muestra, o a una cuantificación relativa de una molécula en una muestra, es decir, con respecto a otro valor, tal como con respecto a un valor de referencia como se enseña en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, los términos "principio activo", "ingrediente activo", "componente farmacéutico activo", "agente terapéutico", "compuesto antitumoral" y "agente antitumoral" son equivalentes y se refieren a un componente que tiene un efecto terapéutico.

Como se usa en el presente documento, el término "efecto terapéutico" se refiere a un efecto inducido por un principio activo o por una composición farmacéutica según la divulgación, capaz de prevenir o retardar la aparición o el desarrollo de un cáncer, o de curar o atenuar los efectos de un cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un principio activo que previene, retira o reduce los efectos perjudiciales de la enfermedad.

En el presente documento, el término «aproximadamente» se refiere a un intervalo de valores de  $\pm 10\%$  del valor especificado. Por ejemplo, «aproximadamente 50» comprenden valores de  $\pm 10\%$  de 50, es decir, valores en el intervalo entre 45 y 55. Preferentemente, el término «aproximadamente» se refiere a un intervalo de valores de  $\pm 5\%$  del valor especificado.

Como se usa en el presente documento, los términos "dipeptidil peptidasa 4", "DPP4", "DPPIV", "CD26", "ADABP", "ADCP2" o "TP103" son equivalentes y se refieren al producto del gen DPP4 humano (Gene ID: 1803, UniGene Hs. 368912). Esta proteína es un receptor de la glucoproteína de la superficie celular implicado en la señal coestimulante esencial para la activación de linfocitos T mediada por el receptor de linfocitos T (TCR) (número de acceso de UniProt: P27487). La entrada de GenBank de la secuencia del ARNm de la proteína DPP4 humana es M80536.1.

Como se usa en el presente documento, los términos "ligando OX40", "OX40L", "miembro 4 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral", "TNFSF4", "glucoproteína activada transcripcionalmente por 1TAX", "TXGP1", "GP34", "CD134L", "TNLG2B" o "CD252" son equivalentes y se refieren al producto del gen OX40L humano (Gene ID: 7292, UniGene Hs.181097). Esta proteína es una citocina que se une a TNFRSF4 (número de acceso UniProt: P23510). La entrada de GenBank de la secuencia del ARNm de la proteína OX40L humana es D90224.1.

Como se usa en el presente documento, los términos "5'-nucleotidasa (EC: 3.1.3.5)", "ecto 5'-nucleotidasa", "5'-NT", "NT5E", "CD73", "NT5" o "NTE" son equivalentes y se refieren al producto del gen NT5E humano (Gene ID: 4907, UniGene Hs.153952). Esta proteína hidroliza nucleótidos extracelulares en nucleósidos permeables de la membrana (número de acceso UniProt: P21589). La entrada GenBank de la secuencia del ARNm de la proteína NT5E humana es X55740.1.

Como se usa en el presente documento, los términos "ligando 2 de muerte celular programada 1", "PDCD1LG2", "ligando 2 de muerte celular programada 1", "PDL2", "ligando 2 de PD-1", "butirofilina B7-DC" o "CD273" son equivalentes y se refieren al producto del gen PDCD1LG2 humano (Gene ID: 80380, UniGene Hs.532279). Esta proteína participa en la señal coestimulante de linfocitos T (número de acceso UniProt: Q9BQ51). La entrada de GenBank de la secuencia del ARNm de la proteína PDCD1LG2 humana es AF329193.1.

Como se usa en el presente documento, los términos "antígeno CD276", "CD276", "4lg-B7-H3", "homólogo 3 de B7" o "B7H3" son equivalentes y se refieren al producto del gen B7H3 humano (Gene ID: 80381, UniGene Hs.744915). Esta proteína puede participar en la regulación de la respuesta inmunitaria de linfocitos T (número de acceso UniProt: Q5ZPR3). La entrada de GenBank de la secuencia del ARNm de la proteína B7H3 humana es AF302102.1.

Como se usa en el presente documento, los términos "JAM2" o "molécula 2 de adhesión de la unión" o "CD322" son equivalentes y se refieren al producto del gen JAM2 humano (Gene ID: (humano) 58494). Esta proteína puede desempeñar una función en los procesos de recirculación de linfocitos a órganos linfoides secundarios (UniProt ID: (humano) P57087). La entrada de GenBank de la secuencia de la secuencia de ADN es, por ejemplo, NC\_000021.8, NT\_011512.12 y NC\_018932.2.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen inmuno-específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo engloba no solo las moléculas de anticuerpo completo, sino también fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno, así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En particular, el anticuerpo según la divulgación puede corresponder a un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano), o un fragmento de anticuerpo monoclonal. El término anticuerpo se refiere a anticuerpos clásicos, así como a anticuerpos de cadena pesada y fragmentos y derivados de los mismos, tales como fragmentos (VHH)2 y anticuerpos de un solo dominio.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo clásico" se refiere a una glucoproteína grande en forma de Y que normalmente está hecha de dos cadenas pesadas grandes unidas entre sí por enlaces disulfuro, estando cada cadena pesada unida a una cadena ligera pequeña por un enlace disulfuro. Cada cadena está compuesta de dominios estructurales, es decir, dominios de inmunoglobulina. Estos dominios contienen aproximadamente 70-110 aminoácidos y se clasifican en dominios variables (IgV) y constantes (IgC). Los anticuerpos son capaces de reconocer una molécula única, es decir, un antígeno, un epítipo o un ligando, a través de sus regiones variables ubicadas en la punta de la "Y" de un anticuerpo clásico. En mamíferos placentarios hay cinco isotipos de anticuerpos clásicos conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM que se clasifican según el tipo de sus cadenas pesadas indicadas por las letras griegas:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Los anticuerpos clásicos pueden polimerizarse, en particular para formar dímeros o pentámeros.

Como se usa en el presente documento, el término "cadena pesada" se refiere a un polipéptido constituido de dos regiones, la región constante formada de tres o cuatro dominios constantes de inmunoglobulina que dependen del tipo de cadena pesada y la región variable formada de un único dominio variable de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término "cadena ligera" se refiere a un polipéptido constituido de dos regiones, la región constante formada de un único dominio constante de inmunoglobulina y la región variable formada de un único dominio variable de inmunoglobulina. En mamíferos existen dos tipos de cadena ligera de la inmunoglobulina, que se denominan lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ).

Como se usa en el presente documento, el término "dominio variable" se refiere al dominio de inmunoglobulina de una cadena pesada o ligera que es responsable de unirse a un antígeno. Un dominio variable comprende varios bucles denominados regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR) que son responsables de unirse al antígeno.

Como se usa en el presente documento, "VH" se refiere al dominio variable de una cadena pesada.

Como se usa en el presente documento, el término "región Fc (fragmento cristalizante)" se refiere a la parte de la cadena pesada correspondiente a los dos o tres primeros dominios constantes de inmunoglobulina (dependiendo del tipo de cadena pesada) presente en la base de la "Y" en un anticuerpo clásico. La región Fc contiene un sitio de glucosilación conservado implicado en diferentes interacciones.

Un "fragmento de anticuerpo" de anticuerpos clásicos comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, F(ab)3, Fv (normalmente los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo), Fv de una sola cadena (scFv), di-scFvs o sc(Fv)2, dsFv, Fd (normalmente el dominio VH y CH1), dAb (normalmente un dominio VH), CDR, VH, VL, minicuerpos, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "Fab" indica un fragmento monovalente de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, y que consiste en dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas (VL y VH), el dominio constante de la cadena ligera (CL) y el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1), dominios que se pueden obtener cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del fragmento F(ab')2.

El término "Fv" se refiere a la parte aminoterminal del fragmento Fab y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada.

El término "F(ab')2" se refiere a un fragmento bivalente de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión al antígeno, que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra.

El término "Fd" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios VH y CH1.

El término "dAb" (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546) se refiere a un anticuerpo variable de un solo dominio, es decir, un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio VH o VL.

Un polipéptido Fv de una sola cadena ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que se expresa normalmente a partir de una fusión de gen que incluye VH y VL que codifica genes unidos por un conector que codifica el péptido. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes pueden formar cualquiera espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, tales como di-scFv, o se pueden generar acoplando scFv monovalentes por un conector peptídico, tal como sc(Fv)2 divalente.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio VH conectado a un dominio VL en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios de complementariedad de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. El diacuerpo puede ser mono- o bi-específico.

Se pueden generar fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos por técnicas conocidas. Los fragmentos de anticuerpos son porciones de unión al antígeno de un anticuerpo, tales como F(ab')2, Fab, Fv, scFv y similares. Otros fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: los fragmentos F(ab')2 que se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab' que se pueden generar reduciendo puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')2. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión Fab' (Huse et al., 1989, Science, 246:1274-1281) para permitir la rápida y fácil identificación de fragmentos Fab' monoclonales con la especificidad deseada.

Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo de cadena pesada" o "HCAb" se refieren a inmunoglobulinas que carecen de cadenas ligeras y consisten en dos cadenas pesadas. Estos anticuerpos no se basan en la asociación de dominios variables de la cadena pesada y ligera para la formación del sitio de unión al antígeno, sino que en su lugar el dominio variable de las cadenas pesadas de polipéptidos solas forma naturalmente el sitio de unión al antígeno completo. Cada cadena pesada comprende una región constante y un dominio variable que permite la unión a un antígeno específico, epítopo o ligando. Como se usa en el presente documento, los HCAb engloban los anticuerpos de cadena pesada del tipo camélido en los que cada cadena pesada comprende un dominio variable llamado VHH y dos dominios constantes. Dichos anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra un antígeno específico se pueden obtener a partir de camélidos inmunizados. Los camélidos engloban dromedario, camello, lama



y alpaca. Los HCAb de camélido se han descrito por Hamers-Casterman et al., Nature, 1993, 363:446. Otros ejemplos de HCAb son estructuras de tipo inmunoglobulina (Ig-NAR) de peces cartilaginosos. Los anticuerpos de cadena pesada se pueden humanizar usando métodos bien conocidos.

Los términos "anticuerpo de un solo dominio", "sdAb" y "nanocuerpo" se usan indistintamente y tienen el mismo significado. Como se usa en el presente documento, el término anticuerpo de un solo dominio se refiere a un único dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada, que es capaz de unirse a un antígeno, un epítipo o un ligando solo, es decir, sin el requisito de otro dominio de unión. Un anticuerpo de un solo dominio puede ser o puede derivar de VHH y V-NAR. V-NAR se refiere al dominio variable encontrado en estructuras de tipo inmunoglobulina (Ig-NAR) descubiertas en peces cartilaginosos, tales como tiburones. Como alternativa, el anticuerpo de un solo dominio se puede obtener a partir de VH humano por camelización, en particular con mutaciones F37, E44, R45 y F47. Para una revisión sobre los anticuerpos de un solo dominio, se puede hacer referencia a Saerens et al., Current Opinion in Pharmacology, 2008, 8:600-608. En un aspecto preferido, el anticuerpo de un solo dominio según la divulgación es un anticuerpo de un solo dominio sintético.

Como se usa en el presente documento, el término "sintético" significa que dicho anticuerpo no ha sido obtenido a partir de fragmentos de anticuerpos que existen de forma natural, sino que se produjo a partir de ácidos nucleicos recombinantes que comprenden secuencias codificantes artificiales (véase el documento de patente WO 2015/063331).

El término "VHH", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en el dominio VH del anticuerpo de cadena pesada de camélido. Los fragmentos VHH se pueden producir a través de tecnología de ADN recombinante en varios hospedadores microbianos (bacterianos, levadura, moho), como se describe en el documento de patente WO 94/29457. Alternativamente, los dominios de unión se pueden obtener por modificación de los fragmentos de VH de anticuerpos clásicos mediante un procedimiento denominado "camelización", descrito por Davies et al., 1995. Los dímeros de fragmentos de VHH, es decir, (VHH)<sub>2</sub>, se pueden generar fusionando dos secuencias que codifican fragmentos VHH, extremo con extremo, por ejemplo, por PCR. Preferentemente, el fragmento (VHH)<sub>2</sub> es monoespecífico. Los dos VHH de (VHH)<sub>2</sub> también pueden reconocer dos antígenos diferentes, es decir, los (VHH)<sub>2</sub> pueden ser biespecíficos.

El dominio variable de un anticuerpo de la divulgación comprende al menos tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que determinan su especificidad de unión. Preferentemente, en un dominio variable, las CDR se distribuyen entre regiones estructurales (FR). El dominio variable contiene así al menos 4 regiones estructurales intercaladas por 3 regiones CDR, que dan lugar a la siguiente estructura de dominio variable de anticuerpo típico: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Las CDR y/o FR del anticuerpo de un solo dominio de la divulgación pueden ser fragmentos o derivados de un dominio variable de anticuerpo que existe de forma natural o pueden ser sintéticas.

Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo quimérico, genéticamente manipulado, en el que las CDR de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de ratón (anticuerpo donante), se injertan en un anticuerpo humano (anticuerpo aceptor). Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene CDR de un anticuerpo donante y región estructural de la región variable y regiones constantes, cuando están presentes, de un anticuerpo humano.

Asimismo, un "anticuerpo camelizado" es un anticuerpo que tiene CDR de un anticuerpo donante, preferentemente un donante humano, y región estructural de la región variable y regiones constantes, cuando están presentes, de un anticuerpo de camélido.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de anticuerpo de una composición de un solo aminoácido, que se dirige contra un antígeno específico y que se puede producir por un único clon de linfocitos B o hibridoma, o por métodos recombinantes. El uso de componentes de anticuerpo derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los posibles problemas asociados a la inmunogenicidad de regiones constantes murinas. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales de roedor contra antígenos específicos por métodos conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975), y Coligan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991)).

Los anticuerpos según la divulgación se pueden producir por cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, tanto sola como en combinación. Los anticuerpos de la divulgación se pueden obtener produciendo y cultivando hibridomas. Véase también el documento de patente WO 2015/063331 para la producción de anticuerpos sintéticos de un solo dominio.

Los términos "kit", "producto" o "preparación combinada", como se usan en el presente documento, definen especialmente un "kit de partes" en el sentido que los compañeros de combinación (a) y (b), como se define en la presente solicitud, pueden administrarse independientemente o usando diferentes combinaciones fijas con cantidades diferentes de los compañeros de combinación (a) y (b), es decir, simultáneamente o en diferentes momentos de tiempo. Las partes del kit de partes se pueden administrar entonces simultáneamente o cronológicamente escalonadas, que

es en diferentes momentos de tiempo para cualquier parte del kit de partes. Se puede variar relación de las cantidades totales entre el compañero de combinación (a) y el compañero de combinación (b) a administrar en la preparación combinada. Los componentes de combinación (a) y (b) se pueden administrar por la misma vía o por diferentes vías.

5 Como se usa en el presente documento, el término "simultánea" se refiere a una composición farmacéutica, un kit, un producto o un preparado combinado según la divulgación en el que los principios activos se usan o administran simultáneamente, es decir, al mismo tiempo.

10 Como se usa en el presente documento, el término "secuencial" se refiere a una composición farmacéutica, un kit, un producto o un preparado combinado según la divulgación en el que los principios activos se usan o administran uno detrás de otro, es decir, uno después del otro. Preferentemente, cuando la administración es secuencial, todos los principios activos se administran en menos de aproximadamente una hora, preferentemente menos de aproximadamente 10 minutos, incluso más preferentemente en menos de aproximadamente un minuto.

15 Como se usa en el presente documento, el término "separado" se refiere a una composición farmacéutica, un kit, un producto o un preparado combinado según la divulgación en el que los principios activos se usan o administran en distintas horas del día. Preferentemente, cuando la administración es separada, los principios activos se administran con un intervalo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, preferentemente con un intervalo de aproximadamente 1 hora y 15 horas, más preferentemente con un intervalo de aproximadamente 1 hora y 8 horas, incluso más preferentemente con un intervalo de aproximadamente 1 hora y 4 horas.

Los métodos de la invención como se divulgan a continuación pueden ser métodos *ex vivo* o *in vitro*, preferentemente métodos *in vitro*.

25 En la presente solicitud, cualquier aspecto divulgado en la presente solicitud y que comprende la lista "DPP4, y/o CD73, y/o B7H3, y/o OX40L, y/o JAM2, y/o PDL2" se puede leer con una cualquiera de las siguientes combinaciones:

- DPP4;
- 30 • CD73;
- B7H3;
- OX40L;
- 35 • JAM2;
- PDL2;
- 40 • DPP4 y CD73;
- DPP4 y B7H3;
- DPP4 y OX40L;
- 45 • DPP4 y JAM2;
- DPP4 y PDL2;
- 50 • CD73 y B7H3;
- CD73 y OX40L;
- CD73 y JAM2;
- 55 • CD73 y PDL2;
- B7H3 y OX40L;
- 60 • B7H3 y JAM2;
- B7H3 y PDL2;
- OX40L y JAM2;

65

- OX40L y PDL2;
- JAM2 y PDL2;
- 5 • DPP4 y CD73 y B7H3;
- DPP4 y CD73 y OX40L;
- 10 • DPP4 y CD73 y JAM2;
- DPP4 y CD73 y PDL2;
- DPP4 y B7H3 y OX40L;
- 15 • DPP4 y B7H3 y JAM2;
- DPP4 y B7H3 y PDL2;
- 20 • DPP4 y OX40L y JAM2;
- DPP4 y OX40L y PDL2;
- DPP4 y JAM2 y PDL2;
- 25 • CD73 y B7H3 y OX40L;
- CD73 y B7H3 y JAM2;
- CD73 y B7H3 y PDL2;
- 30 • CD73 y OX40L y JAM2;
- CD73 y OX40L y PDL2;
- 35 • CD73 y JAM2 y PDL2;
- B7H3 y OX40L y JAM2;
- B7H3 y OX40L y PDL2;
- 40 • B7H3 y JAM2 y PDL2;
- OX40L y JAM2 y PDL2;
- 45 • DPP4 y CD73 y B7H3 y OX40L;
- DPP4 y CD73 y B7H3 y JAM2;
- DPP4 y CD73 y B7H3 y PDL2;
- 50 • DPP4 y CD73 y OX40L y JAM2;
- DPP4 y CD73 y OX40L y PDL2;
- 55 • DPP4 y CD73 y JAM2 y PDL2;
- DPP4 y B7H3 y OX40L y JAM2;
- DPP4 y B7H3 y OX40L y PDL2;
- 60 • DPP4 y B7H3 y JAM2 y PDL2;
- DPP4 y OX40L y JAM2 y PDL2;

- CD73 y B7H3 y OX40L y JAM2;
- CD73 y B7H3 y OX40L y PDL2;
- 5 • CD73 y B7H3 y JAM2 y PDL2;
- B7H3 y OX40L y JAM2 y PDL2;
- 10 • DPP4 y CD73 y B7H3 y OX40L y JAM2;
- DPP4 y CD73 y B7H3 y OX40L y PDL2;
- DPP4 y CD73 y B7H3 y JAM2 y PDL2;
- 15 • DPP4 y B7H3 y OX40L y JAM2 y PDL2;
- CD73 y B7H3 y OX40L y JAM2 y PDL2;
- DPP4 y CD73 y B7H3 y OX40L y JAM2 y PDL2.

20 En la presente solicitud, cualquier aspecto divulgado en la presente solicitud y que comprende la lista "DPP4, y/o CD73, y/o B7H3, y/o OX40L, y/o PDL2" se puede leer con una cualquiera de las siguientes combinaciones:

- 25 • DPP4;
- CD73;
- B7H3;
- 30 • OX40L;
- PDL2;
- DPP4 y CD73;
- 35 • DPP4 y B7H3;
- DPP4 y OX40L;
- 40 • DPP4 y PDL2;
- CD73 y B7H3;
- CD73 y OX40L;
- 45 • CD73 y PDL2;
- B7H3 y OX40L;
- 50 • B7H3 y PDL2;
- OX40L y PDL2;
- DPP4 y CD73 y B7H3;
- 55 • DPP4 y CD73 y OX40L;
- DPP4 y CD73 y PDL2;
- 60 • DPP4 y B7H3 y OX40L;
- DPP4 y B7H3 y PDL2;
- DPP4 y OX40L y PDL2;

- CD73 y B7H3 y OX40L;
- CD73 y B7H3 y PDL2;
- 5 • CD73 y OX40L y PDL2;
- B7H3 y OX40L y PDL2;
- 10 • DPP4 y CD73 y B7H3 y OX40L;
- DPP4 y CD73 y B7H3 y PDL2;
- DPP4 y CD73 y OX40L y PDL2;
- 15 • DPP4 y B7H3 y OX40L y PDL2;
- CD73 y B7H3 y OX40L y PDL2;
- 20 • DPP4 y CD73 y B7H3 y OX40L y PDL2;

En la presente solicitud, cualquier aspecto divulgado en la presente solicitud y que comprende la lista "DPP4, y/o CD73, y/o B7H3, y/o OX40L, y/o JAM2" se puede leer con una cualquiera de las siguientes combinaciones:

- 25 • DPP4;
- CD73;
- B7H3;
- 30 • OX40L;
- JAM2;
- 35 • DPP4 y CD73;
- DPP4 y B7H3;
- DPP4 y OX40L;
- 40 • DPP4 y JAM2;
- CD73 y B7H3;
- 45 • CD73 y OX40L;
- CD73 y JAM2;
- B7H3 y OX40L;
- 50 • B7H3 y JAM2;
- OX40L y JAM2;
- 55 • DPP4 y CD73 y B7H3;
- DPP4 y CD73 y OX40L;
- DPP4 y CD73 y JAM2;
- 60 • DPP4 y B7H3 y OX40L;
- DPP4 y B7H3 y JAM2;

- DPP4 y OX40L y JAM2;
- CD73 y B7H3 y OX40L;
- 5 • CD73 y B7H3 y JAM2;
- CD73 y OX40L y JAM2;
- 10 • B7H3 y OX40L y JAM2;
- DPP4 y CD73 y B7H3 y OX40L;
- DPP4 y CD73 y B7H3 y JAM2;
- 15 • DPP4 y CD73 y OX40L y JAM2;
- DPP4 y B7H3 y OX40L y JAM2;
- CD73 y B7H3 y OX40L y JAM2;
- 20 • DPP4 y CD73 y B7H3 y OX40L y JAM2;

Se entenderá que estas listas se refieren a cualquier aspecto relacionado con el (los) marcador(es) citado(s) anteriormente, tales como, pero no se limitan a, población de CAF positiva para dicho(s) marcador(es), nivel de CAF asociado a dicho(s) marcador(es), porcentaje de células o CAF asociados a dicho(s) marcador(es), o nivel de expresión de dicho(s) marcador(es).

En el primer aspecto que no está reivindicado, la presente divulgación se refiere a un método de selección de un paciente afectado con un tumor para un tratamiento de inmunoterapia o para predecir la respuesta de un sujeto afectado con un tumor a un tratamiento de inmunoterapia, en donde el método comprende:

- (a) detectar CAF (fibroblasto asociado al cáncer) DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;
- 35 (b) determinar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia es inversamente proporcional al (a los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer;
- 40 (c) opcionalmente, seleccionar pacientes con bajo(s) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia, y seleccionar pacientes con alto(s) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.
- 45 Opcionalmente, el método puede comprender además una etapa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente antes de la etapa (a).

En un aspecto particular, los pacientes se seleccionan en la etapa (c) como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco, de los niveles seleccionados del grupo constituido por nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, nivel de CAF OX40L<sup>+</sup>, nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, nivel de CAF JAM2<sup>+</sup>, nivel de CAF PDL2<sup>+</sup> y nivel de CAF B7H3<sup>+</sup>, son bajos.

En otro aspecto particular, los pacientes se seleccionan en la etapa c) para un tratamiento del cáncer, con la exclusión de una inmunoterapia, cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco de los niveles seleccionados del grupo constituido por nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, nivel de CAF OX40L<sup>+</sup>, nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, nivel de CAF JAM2<sup>+</sup>, nivel de CAF PDL2<sup>+</sup> y nivel de CAF B7H3<sup>+</sup>, son altos.

El tratamiento contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y cuidado paliativo, o una combinación de los mismos.

#### **Detección de subpoblaciones de CAF**

El método divulgado, pero no reivindicado, en el presente documento comprende una etapa de detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente.

Como se usa en el presente documento, el término "CAF DPP4+" o "fibroblasto asociado al cáncer DPP4+" se refiere a una subpoblación de CAF que expresan DPP4. Otros CAF no expresan DPP4. Por lo tanto, en una realización preferida, la detección de CAF DPP4+ se basa en la detección de CAF que expresan DPP4. Sin embargo, también se podrían usar otros marcadores específicos de CAF DPP4+ para detectarlos.

Como se usa en el presente documento, el término "CAF OX40L+" o "fibroblasto asociado al cáncer OX40L+" se refiere a una subpoblación de CAF que expresan OX40L. Otros CAF no expresan OX40L. Por lo tanto, en una realización preferida, la detección de CAF OX40L+ se basa en la detección de CAF que expresan OX40L. Sin embargo, también se podrían usar otros marcadores específicos de CAF OX40L+ para detectarlos.

Como se usa en el presente documento, el término "CAF CD73+" o "fibroblasto asociado al cáncer CD73+" se refiere a una subpoblación de CAF que expresan CD73. Otros CAF no expresan CD73. Por lo tanto, en una realización preferida, la detección de CAF CD73+ se basa en la detección de CAF que expresan CD73. Sin embargo, también se podrían usar otros marcadores específicos de CAF CD73+ para detectarlos.

Como se usa en el presente documento, el término "PDL2+ CAFs" o "fibroblasto asociado al cáncer PDL2+" se refiere a una subpoblación de CAF que expresan PDL2. Otros CAF no expresan PDL2. Por lo tanto, en una realización preferida, la detección de CAF PDL2+ se basa en la detección de CAF que expresan PDL2. Sin embargo, también se podrían usar otros marcadores específicos de CAF PDL2+ para detectarlos.

Como se usa en el presente documento, el término "CAF B7H3+" o "fibroblasto asociado al cáncer B7H3+" se refiere a una subpoblación de CAF que expresan B7H3. Otros CAF no expresan B7H3. Por lo tanto, en una realización preferida, la detección de CAF B7H3+ se basa en la detección de CAF que expresan B7H3. Sin embargo, también se podrían usar otros marcadores específicos de CAF B7H3+ para detectarlos.

Como se usa en el presente documento, el término "CAF JAM2+" o "fibroblasto asociado al cáncer JAM2+" se refiere a una subpoblación de CAF que expresan JAM2. Otros CAF no expresan JAM2. Por lo tanto, en una realización preferida, la detección de CAF JAM2+ se basa en la detección de CAF que expresan JAM2. Sin embargo, también se podrían usar otros marcadores específicos de CAF JAM2+ para detectarlos.

Se considera que un CAF expresa DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 cuando el nivel del ARNm del mismo, y/o el nivel de la proteína del mismo, y/o el nivel de actividad de la proteína del mismo, por ejemplo el nivel de una actividad enzimática, es significativamente diferente del nivel del ruido de fondo correspondiente, por ejemplo el nivel medido en las mismas condiciones pero en ausencia de células, y/o del nivel de la condición de control correspondiente, por ejemplo el nivel medido en las mismas condiciones pero con células que se sabe que no expresan DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3, respectivamente.

Un CAF se considera que no expresa DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 cuando el nivel del ARNm del mismo, y/o el nivel de proteína del mismo, y/o el nivel de actividad de la proteína del mismo, por ejemplo el nivel de una actividad enzimática, no es significativamente diferente del nivel del ruido de fondo correspondiente, por ejemplo el nivel medido en las mismas condiciones pero en ausencia de células, y/o del nivel de la condición de control correspondiente, por ejemplo, el nivel medido en las mismas condiciones pero con células que se sabe que no expresan DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3.

La medición del nivel de expresión de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 en un CAF se puede implementar mediante una variedad de técnicas bien conocidas por el experto. En particular, la medida del nivel de expresión de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 en CAF se puede basar en la detección de ARNm, proteína o actividad de proteína DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3, en particular actividad enzimática.

En un aspecto, el nivel de expresión de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 en un CAF se determina midiendo la expresión de sus ARNm. Los métodos de determinación de la cantidad de ARNm en una célula son bien conocidos por el experto en la técnica. El ARNm se puede detectar por hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia Northern), en particular por el método Nanostring y/o por amplificación (por ejemplo, RT-PCR), en particular por RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. Otros métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación de desplazamiento de cadenas (SDA) y amplificación basada en secuencias del ácido nucleico (NASBA).

La RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real es particularmente ventajosa. Se pueden usar sondas Taqman específicas del transcrito de proteína de interés. En una realización preferida, el nivel de expresión de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2, B7H3 y cualquier otra proteína de interés se determina midiendo la cantidad de su ARNm, preferentemente por RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, o por RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real.

Como se usa en el presente documento, los términos "RT-PCR cuantitativa", "qRT-PCR", "RT-PCR en tiempo real" y "RT-PCR cuantitativa en tiempo real" son equivalentes y se pueden usar indistintamente. Se puede usar (y modificar

según se necesite) cualquiera de una variedad de protocolos publicados de RT-PCR cuantitativa para su uso en el presente método. Los procedimientos adecuados de RT-PCR cuantitativa incluyen, pero no se limitan a, los presentados en la patente de EE. UU. n.º 5.618.703 y en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0048542.

En una realización preferida del método mencionado anteriormente, la RT-PCR cuantitativa incluye dos etapas principales, la transcripción inversa (RT) de ARN en ADNc y la amplificación por PCR cuantitativa (reacción en cadena de la polimerasa) del ADNc. La RT-PCR cuantitativa se puede realizar por un procedimiento no acoplado o por uno acoplado. En una RT-PCR cuantitativa no acoplada, la transcripción inversa se realiza independientemente de la amplificación por PCR cuantitativa, en reacciones separadas. Mientras que en una RT-PCR cuantitativa acoplada la transcripción inversa y la amplificación por PCR cuantitativa se realizan en un único tubo de reacción usando una mezcla de reacción común que incluye tanto la transcriptasa inversa como la ADN polimerasa. El método divulgado en el presente documento engloba todas las versiones de RT-PCR cuantitativa.

Los cebadores de RT-PCR cuantitativa que se pueden usar para medir el nivel de expresión de DPP4 en un CAF son, por ejemplo: Directo: 5'-AGTGGCGTGTTCAAGTGTGG-3' (SEQ ID NO: 1) e Inverso: 5'-CAAGGTTGTCTTCTGGAGTTGG-3' (SEQ ID NO: 2).

Los cebadores de RT-PCR cuantitativa que se pueden usar para medir el nivel de expresión de OX40L en un CAF son, por ejemplo: Directo: 5'-CCTCGAATTCAAAGTATCAAAG-3' (SEQ ID NO: 3) e Inverso: 5'-GTGAGGATGAAACCTTTCTCC-3' (SEQ ID NO: 4).

Los cebadores de RT-PCR cuantitativa que se pueden usar para medir el nivel de expresión de CD73 en un CAF son, por ejemplo: Directo: 5'-CTCCTCTCAATCATGCCGCT-3' (SEQ ID NO: 5) e Inverso: 5'-TGGATTCCATTGTTGCGTTCA-3' (SEQ ID NO: 6).

Los cebadores de RT-PCR cuantitativa que se pueden usar para medir el nivel de expresión de PDL2 en un CAF son, por ejemplo: Directo: 5'-ACAGTGCTATCTGAACCTGTG-3' (SEQ ID NO: 7) e Inverso: 5'-GTCATATCAGGTCACCCCTGGC-3' (SEQ ID NO: 8).

Los cebadores de RT-PCR cuantitativa que se pueden usar para medir el nivel de expresión de B7H3 en un CAF son, por ejemplo: Directo: 5'-CTGGCTTTCGTGTGCTGGAGAA-3' (SEQ ID NO: 9) e Inverso: 5'-GCTGTCAGAGTGTTCAGAGGC-3' (SEQ ID NO: 10).

Los cebadores de RT-PCR cuantitativa que se pueden usar para medir el nivel de expresión de JAM2 en un CAF son, por ejemplo: Directo: 5'-CGCCCTGGGCTATCATAAGG-3' (SEQ ID NO: 11) e Inverso: 5'-CAAAGGAGACACTCCGACCC-3' (SEQ ID NO: 12).

En un aspecto más preferido, el nivel de expresión de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 en un CAF se determina midiendo la expresión de su ARNm por un método de secuenciación ARN de una única célula como se describe en la parte experimental.

El método Nanostring también es muy ventajoso. Es un método de hibridación que permite cuantificar ARN sin requerir amplificación lineal ni exponencial. Es un método muy sensible, puesto que solo se necesitan 10 ng de ARNm para realizarlo, lo que permite el análisis de una cantidad limitada de muestras biológicas. El número restringido de etapas de manipulación de muestras junto con la ausencia de reacción enzimática permite cuantificaciones precisas y fisiológicamente correctas. Este método también es extremadamente flexible, puesto que se puede aplicar a diversos tipos de muestras. En una realización preferida, el nivel de expresión de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2, B7H3 y cualquier otra proteína de interés se determina midiendo la cantidad de su ARNm, preferentemente por el método Nanostring.

El método Nanostring necesita el uso de un par de sondas diseñadas específicamente para cada ARNm. La primera sonda, denominada la sonda de captura, se hibrida específicamente con el ARNm diana y lo une a un soporte sólido, preferentemente un puesto de recuento. Preferentemente, la sonda de captura se une a una molécula que permite que la sonda se una al soporte sólido, más preferentemente dicha molécula es biotina, por lo que se inmoviliza el ARNm de interés sobre el puesto de recuento. La segunda sonda, denominada la sonda indicadora, se hibrida específicamente con el ARNm de interés y se une a una marca que permite la detección y cuantificación del ARNm. Preferentemente, esta marca es una marca fluorescente. Más preferentemente, la marca está hecha de una combinación de fluorocromos. Incluso más preferentemente, la marca está hecha de una combinación de 6 fluorocromos elegidos de 4 fluorocromos de diferentes colores, que definen un código específico de cada ARNm diana. Este código de color confiere a la técnica una sensibilidad muy alta y permite el análisis de muestras biológicas de cantidad limitada. Cuando varias sondas indicadoras se usan simultáneamente para determinar las cantidades de varios ARNm, cada sonda indicadora se une a una marca diferente, preferentemente una combinación diferente de 6 fluorocromos elegidos de 4 fluorocromos de diferentes colores.

Preferentemente, la fluorescencia se analiza por un nCounter, un sistema óptico que es capaz de identificar los códigos de color.



Se pueden usar sondas Nanostring tales como NM\_001935.3:2700 (NanoString Technologies) para medir el nivel de expresión de DPP4 en un CAF.

5 Se pueden usar sondas Nanostring tales como NM\_003326.2:545 (NanoString Technologies) para medir el nivel de expresión de OX40L en un CAF.

Se pueden usar sondas Nanostring tales como NM\_002526.2:1214 (NanoString Technologies) para medir el nivel de expresión de CD73 en un CAF.

10 Se pueden usar sondas Nanostring tales como NM\_025239.3:235 (NanoString Technologies) para medir el nivel de expresión de PD-L2 en un CAF.

15 Se pueden usar sondas Nanostring tales como NM\_001024736.1:2120 (NanoString Technologies) para medir el nivel de expresión de B7H3 en un CAF.

Se pueden usar sondas Nanostring tales como NM\_001270407.1 (NanoString Technologies) para medir el nivel de expresión de JAM2 en un CAF.

20 En un aspecto preferido, el nivel de expresión de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 en un CAF se determina midiendo la expresión de sus proteínas respectivas.

25 La cantidad de una proteína se puede medir por cualquier método conocido por el experto. Normalmente, estos métodos comprenden poner en contacto la muestra con un componente de unión capaz de interactuar selectivamente con la proteína presente en la muestra. El componente de unión es, en general, un anticuerpo policlonal o monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal. Dicho anticuerpo se puede producir a través de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Este anticuerpo incluye en particular los producidos por un hibridoma y los producidos por ingeniería genética usando células hospedadoras transformadas con un vector de expresión recombinante que lleva un gen que codifica el anticuerpo. Se puede obtener un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales como sigue:

30 se usa la proteína o fragmentos inmunogénicos de la misma como antígenos para la inmunización según métodos convencionales de inmunización. Los inmunocitos resultantes se fusionan con células parentales conocidas según los métodos de fusión de células convencionales y las células que producen los anticuerpos son así cribadas de las células fusionadas usando métodos de cribado convencionales.

35 El anticuerpo según la divulgación (que no se reivindica) pueden estar marcado y/o fusionado con una entidad de detección. Preferentemente, el anticuerpo según la divulgación está marcado o fusionado con una entidad de detección.

40 En un aspecto preferido, el anticuerpo está marcado. El anticuerpo puede estar marcado con una marca seleccionada del grupo que consiste en una radiomarca, una marca enzimática, una marca fluorescente, una marca de biotina-avidina, una marca quimioluminiscente, y similares. El anticuerpo según la divulgación se puede marcar por técnicas de marcado estándar bien conocidas por el experto en la técnica y los anticuerpos marcados se pueden visualizar usando métodos conocidos. En particular, las marcas proporcionan, en general, señales detectables por fluorescencia, quimioluminiscencia, radiactividad, colorimetría, espectrometría de masas, difracción de rayos X o absorción,

45 magnetismo, actividad enzimática, o similares.

Preferentemente, la marca detectable puede ser una marca luminiscente. Por ejemplo, se pueden usar marcas fluorescentes, marcas bioluminiscentes, marcas quimioluminiscentes y marcadores colorimétricos en la práctica de la divulgación, más preferentemente una marca fluorescente. Preferentemente, la marca está unida en el extremo carboxiterminal del anticuerpo.

50

En otro aspecto preferido, el anticuerpo mencionado anteriormente se puede fusionar con una entidad de detección. La entidad de detección se puede seleccionar del grupo que consiste en una marca, una enzima o una proteína fluorescente. Preferentemente, la entidad de detección está en el extremo carboxiterminal del anticuerpo.

55 La divulgación se refiere a anticuerpos específicos de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 humano.

La cantidad de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2 o B7H3 se puede medir por transferencias Western semicuantitativas, inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA, ensayos de tipo biotina/avidina, radioinmunoensayo, inmunohistoquímica, inmunolectroforesis o inmunoprecipitación, matrices de proteínas o anticuerpos, o citometría de flujo, tal como citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Las reacciones incluyen, en general, revelar marcas tales como marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas, o moléculas colorantes, u otros métodos de detección de la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos reaccionados con él. Preferentemente, el nivel de expresión de proteína se evalúa por

60 FACS o por inmunohistoquímica.

65

La citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) es un tipo especializado de citometría de flujo. Proporciona un método de clasificación de una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula cada vez, basado en la dispersión de la luz específica y las características fluorescentes de cada célula. La suspensión de células es arrastrada en el centro de una estrecha corriente de líquido que circula rápidamente. El flujo está dispuesto de manera que exista una gran separación entre células con respecto a su diámetro. Un mecanismo de vibración provoca que la corriente de células se rompa en gotitas individuales. El sistema se ajusta de manera que exista una baja probabilidad de más de una célula por gotita. Justo antes de que la corriente se rompa en gotitas, el flujo pasa a través de una estación de medida de fluorescencia donde se mide el carácter fluorescente de cada célula de interés. Un anillo de carga eléctrica se coloca justo en el punto donde la corriente se rompe en gotitas. Una carga se coloca en el anillo basándose inmediatamente antes de la intensidad de fluorescencia que se mide, y la carga opuesta es atrapada en la gotita a medida que se rompe de la corriente. Las gotitas cargadas caen entonces a través de un sistema de deflexión electrostática que desvía las gotitas en recipientes basándose en su carga.

La inmunohistoquímica (IHC) se refiere al proceso de obtención selectiva de imágenes de antígenos (por ejemplo, proteínas) en células de una sección de tejido explotando el principio de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos en tejidos biológicos. La visualización de la interacción anticuerpo-antígeno se puede llevar a cabo de varias formas, bien conocidas por el experto en la técnica. En el caso más común, un anticuerpo se conjuga con una enzima, tal como peroxidasa, que puede catalizar una reacción de producción de color o se marca por un fluoróforo, tal como fluoresceína o rodamina. La inmunohistoquímica se puede dividir en dos fases: preparación de muestras y marcado de muestras.

La preparación de la muestra es crítica para mantener la morfología celular, la arquitectura del tejido y la antigenicidad de los epítomos diana. Esto requiere una apropiada recogida, fijación y seccionamiento de tejido. Una disolución de paraformaldehído se usa frecuentemente para fijar el tejido, pero se pueden usar otros métodos. El tejido puede entonces cortarse o usarse completo, dependiendo del fin del experimento o el tejido en sí. Antes de seccionarse, la muestra de tejido se puede incorporar en un medio, como cera de parafina o medio criogénico. Las secciones se pueden cortar en una variedad de instrumentos, lo más comunes un micrótopo, crióstato, o cortador de tejido Compressstome. Los especímenes se cortan normalmente en un intervalo de 3  $\mu\text{m}$ -50  $\mu\text{m}$ . Los cortes se montan a continuación en portaobjetos, se deshidratan usando lavados con alcohol de concentraciones crecientes (por ejemplo, 50%, 75%, 90%, 95%, 100%), y se limpian usando un detergente como xileno antes de obtener imágenes en un microscopio. Dependiendo del método de fijación y la conservación de tejido, la muestra puede requerir etapas adicionales para hacer que los epítomos estén disponibles para la unión del anticuerpo, que incluye desparafinado y recuperación de antígenos. Para los tejidos incorporados en parafina y fijados con formol, la recuperación del antígeno es frecuentemente necesaria e implica el pretratamiento de las secciones con calor o proteasa. Estas etapas pueden hacer la diferencia entre los antígenos diana que se tiñen o no se tiñen. Dependiendo del tipo de tejido y el método de detección de antígenos, se puede necesitar biotina endógena o enzimas para el bloqueo o la extinción, respectivamente, antes de la tinción del anticuerpo. Aunque los anticuerpos muestran avidez preferencial por epítomos específicos, se pueden unir parcialmente o débilmente a sitios en proteínas no específicas (también llamados sitios reactivos) que son similares a los sitios de unión relacionados en el antígeno diana. Para reducir la tinción de fondo en IHC, se incuban muestras con un tampón que bloquea los sitios reactivos a los que los anticuerpos primarios o secundarios se pueden unir de otro modo. Los tampones de bloqueo comunes incluyen suero normal, leche desnatada en polvo, BSA o gelatina. Los métodos de eliminación de la tinción de fondo incluyen dilución de los anticuerpos primarios o secundarios, cambio del tiempo o temperatura de incubación, y uso de un sistema de detección diferente o anticuerpo primario diferente. Si el control de calidad debe ser un mínimo, incluye un tejido que se sabe que expresa el antígeno como control positivo, y controles negativos de tejido que se sabe que no expresan el antígeno, así como el tejido de prueba sondado de la misma forma con omisión del anticuerpo primario (o mejor, absorción del anticuerpo primario).

Para las estrategias de detección inmunohistoquímica, los anticuerpos se clasifican, cuando sea necesario, como reactivos primarios o secundarios. Los anticuerpos primarios se producen contra un antígeno de interés y normalmente no están conjugados (es decir, no marcados), mientras que los anticuerpos secundarios se producen contra inmunoglobulinas de la especie de anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se marca y/o fusiona normalmente con una entidad de detección como se ha descrito anteriormente.

El método directo es un método de tinción de una etapa e implica un anticuerpo marcado que reacciona directamente con el antígeno en secciones de tejido. Aunque esta técnica utiliza solo un anticuerpo y, por lo tanto, es simple y rápida, la sensibilidad es menor debido a la poca amplificación de señal, a diferencia de los enfoques indirectos.

El método indirecto implica un anticuerpo primario no marcado (primera capa) que se une al antígeno diana en el tejido y un anticuerpo secundario marcado (segunda capa) que reacciona con el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario debe producirse contra la IgG de la especie de animal en la que se ha producido el anticuerpo primario. Este método es más sensible que las estrategias de detección directas debido a la amplificación de señales debido a la unión de varios anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario si el anticuerpo secundario está conjugado con el indicador fluorescente o enzimático. Se puede lograr amplificación adicional si el anticuerpo secundario está conjugado con varias moléculas de biotina, que pueden reclutar complejos de enzima unida a avidina, estreptavidina o proteína NeutrAvidin.

Preferentemente, el nivel de expresión de la proteína se evalúa por FACS o por inmunohistoquímica como se describe en la parte experimental.

5 Los anticuerpos que se pueden usar para medir el nivel de expresión de DPP4 en un CAF por FACS o inmunohistoquímica son, por ejemplo: el anticuerpo anti-DPP4/CD26 humano de referencia AF1180 (de R&D Systems), o el anti-CD26 humano de ratón con PE, clon M-A261, de referencia 555437 (de BD Biosciences).

10 Los anticuerpos que se pueden usar para medir el nivel de expresión de OX40L en un CAF son, por ejemplo: el anticuerpo anti-TNFSF4 de referencia HPA059579 (de Sigma), el ligando anti-OX40 humano de ratón BV421, clon ik-1, de referencia 563766 (BD Biosciences).

15 Los anticuerpos que se pueden usar para medir el nivel de expresión de CD73 en un CAF son, por ejemplo: el anti-CD73 humano de ratón BUV737, clon AD2, de referencia 565395 (de BD Biosciences).

Los anticuerpos que se pueden usar para medir el nivel de expresión de JAM2 en un CAF son, por ejemplo: el anticuerpo anti-JAM2 de referencia PA5-21576 (de ThermoFisher), de referencia aa262-274 (de LifeSpan Biosciences), de referencia OAAB10508 (de Aviva Systems Biology).

20 En un aspecto preferido, la detección de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> por FACS en una muestra de cáncer de un paciente puede comprender las siguientes etapas:

• exclusión de las células no CAF, por ejemplo, excluyendo las células CD45<sup>+</sup>, las células EpCAM<sup>+</sup> y las células CD31<sup>+</sup> y así seleccionando las células CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>; y/o

25 • selección de las células CAF, por ejemplo seleccionando las células CD29<sup>+</sup> y/o las células PDGFRb<sup>+</sup>, preferentemente seleccionando las células CD29<sup>+</sup>; y

• opcionalmente, exclusión de las células muertas, por ejemplo, usando un colorante intracelular, tal como el colorante violeta LIVE/DEAD o DAPI y que excluye las células teñidas; y

30 • detección de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en las células obtenidas en la etapa precedente.

35 Un anticuerpo anti-CD45 que se puede usar es, por ejemplo, un anti-CD45-APC-Cy7 (BD Biosciences, n.º BD-557833).

Un anticuerpo anti-EpCAM que se puede usar es, por ejemplo, un anti-EpCAM-PerCR/Cy5.5 (BioLegend, n.º 324214).

40 Un anticuerpo anti-CD31 que se puede usar es, por ejemplo, un anti-CD31-PECY7 (BioLegend, n.º 303118).

Un anticuerpo anti-CD29 que se puede usar es, por ejemplo, un anti-CD29-Alexa Fluor 700 (BioLegend, n.º 303020).

Un anticuerpo anti-PDGFRb que se puede usar es, por ejemplo, un anti-PDGFRb-PE (BioLegend, n.º 400114).

45 En otro aspecto preferido, la detección de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> por inmunohistoquímica en una muestra de cáncer de un paciente puede comprender las siguientes etapas:

50 • identificación de los CAF en la sección de tejido, por ejemplo basándose en criterios morfológicos;

• detección de los CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> entre los CAF, basándose en la inmunotinción con anticuerpos contra DPP4, y/o OX40L, y/o CD73, y/o PDL2, y/o B7H3.

55 En otro aspecto, el nivel de expresión de DPP4 o CD73 en un CAF se determina midiendo la actividad de la proteína, en particular, la actividad enzimática de DPP4 o CD73. La actividad enzimática de una proteína se puede medir por cualquier método conocido por el experto. Normalmente, los ensayos enzimáticos miden cualquiera del consumo de sustrato o producción de producto con el tiempo. Existe un gran número de métodos diferentes de medición de las concentraciones de sustratos y productos, tales como:

60 • experimentos de velocidad inicial en los que una enzima se mezcla con un gran exceso del sustrato. El producto intermedio de enzima-sustrato se forma rápidamente y la reacción logra una cinética de estado estacionario en la que los productos intermedios de enzima-sustrato siguen aproximadamente constantes con el tiempo y la velocidad de reacción cambia relativamente lenta. Se miden las velocidades durante un corto periodo después de la obtención del estado cuasi-estacionario, normalmente monitorizando la acumulación de producto con tiempo. Debido

a que las mediciones se llevan a cabo durante un periodo muy corto y debido al gran exceso de sustrato, se puede hacer la aproximación de que la cantidad de sustrato libre es aproximadamente igual a la cantidad de sustrato inicial.

- experimentos de curvas de progreso en los que los parámetros cinéticos se determinan a partir de expresiones para las concentraciones de especies en función del tiempo. La concentración del sustrato o producto se registran con el tiempo después del transitorio rápido inicial y durante un periodo suficientemente largo para permitir que la reacción se aproxime al equilibrio.

- experimentos de cinética de transitorios, en los que el comportamiento de la reacción se sigue durante el transitorio rápido inicial a medida que el producto intermedio llega al periodo de cinética de estado estacionario.

- experimentos de relajación en los que una mezcla en equilibrio de enzima, sustrato y producto es perturbada, por ejemplo, por una temperatura, presión o salto de pH, y se monitoriza el retorno al equilibrio. El análisis de estos experimentos requiere consideración de la reacción completamente reversible.

Según la naturaleza del sustrato usado, la medición del consumo de sustrato o la producción de producto se puede realizar, por ejemplo, por ensayos espectrofotométricos, por ejemplo, ensayos colorimétricos, ensayos fluorométricos, ensayos calorimétricos, ensayos quimioluminiscentes, ensayos de dispersión de la luz, ensayos de termoforesis a microescala, ensayos radiométricos o ensayos cromatográficos. Preferentemente, la medición del consumo de sustrato o la producción de producto se realiza por un ensayo fluorimétrico.

DPP4 es una serina exopeptidasa que cataliza la liberación de un dipéptido aminoterminal a condición de que el siguiente residuo al último sea prolina, hidroxiprolina, deshidroprolina o alanina. Solo los oligopéptidos en la conformación *trans* son capaces de unirse al sitio activo de DPP4. Para ensayar la actividad enzimática de DPP4, se puede usar un sustrato no fluorescente del que se liberará un producto fluorescente tras la escisión de DPP4. Dicho sustrato puede ser, por ejemplo, H-Gly-Pro-AMC, con AMC (7-amino-4-metil-coumarina) como producto fluorescente de liberación. La actividad enzimática de DPP4 también se puede ensayar por inmunohistoquímica con Gly-Pro-4-metoxi-β-naftilamida como sustrato (véase Lojda Z et al, J Histochem Cytochem, 29: 481-493, 1981).

CD73 es una ecto-5'-nucleotidasa que degrada AMP (monofosfato de adenosina) en adenosina y un fosfato libre. Se puede usar un kit de detección colorimétrica para medir la actividad de la enzima CD73, tal como el kit de Biovision n.º k992-100.

#### **Niveles de subpoblaciones de CAF**

El método divulgado, pero no reivindicado, en el presente documento comprende una etapa de determinar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente.

El nivel de una población de células en una muestra puede ser, por ejemplo, una cantidad de células en esta muestra o cualquier fracción de ella, una relación del número de células de esta población con respecto al número total de células de la muestra o cualquier fracción de ella, o el porcentaje de células de esta población con respecto al número total de células de la muestra o cualquier fracción de ella.

Preferentemente, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente son el (los) porcentaje(s) de estas células con respecto al número total de células de la muestra de cáncer.

Alternativamente, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, en una muestra de cáncer de un paciente son el (los) porcentaje(s) de estas células con respecto a número total de células del estroma en la muestra de cáncer.

Alternativamente, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, en una muestra de cáncer de un paciente son el (los) porcentaje(s) de estas células con respecto a número total de CAF en la muestra de cáncer.

Así, la presente divulgación se refiere a un método (que no se reivindica) para seleccionar un paciente afectado con un tumor para un tratamiento de inmunoterapia o para predecir la respuesta de un sujeto afectado con un tumor a un tratamiento de inmunoterapia, en donde el método comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de

inmunoterapia es inversamente proporcional al (a los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer;

5 (c) opcionalmente, seleccionar pacientes con bajo(s) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, en pacientes particulares sin ningún CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia y seleccionar pacientes con alto(s) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

10 Opcionalmente, el método puede comprender además una etapa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente antes de la etapa (a).

15 En un aspecto particular, los pacientes se seleccionan en la etapa (c) como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco, de los porcentajes seleccionados del grupo constituido por porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup>, porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup>, porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup>, porcentaje CAF PDL2<sup>+</sup>, porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> y porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> son bajos.

20 El tratamiento contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y cuidado paliativo, o una combinación de los mismos.

25 En un aspecto particular, los pacientes se seleccionan en la etapa c) para un tratamiento del cáncer, con la exclusión de una inmunoterapia, cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco de los porcentajes seleccionados del grupo constituido por porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup>, porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup>, porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup>, porcentaje CAF PDL2<sup>+</sup>, porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> y porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> son altos.

#### **Comparación con un nivel de expresión de referencia**

30 Preferentemente, el método comprende además una etapa de comparar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer del paciente con el (los) nivel(es) de referencia. El (Los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> por debajo de su(s) nivel(es) de referencia son predictivos de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia. Por el contrario, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> por encima de su(s) nivel(es) de referencia son predictivos de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de dicho paciente.

40 El método se divulgó en el presente documento para seleccionar un paciente afectado con un tumor para un tratamiento de inmunoterapia o para predecir la respuesta de un sujeto afectado con un tumor a un tratamiento de inmunoterapia, en donde el método comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

45 (b) determinar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia es inversamente proporcional al (a los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer;

50 (c) comparar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer con el (los) nivel(es) de referencia, en donde nivel(es) inferior(es) a su nivel de referencia son predictivos de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia, y/o nivel(es) superior(es) a su(s) nivel(es) de referencia son predictivos de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de dicho paciente; y

55 (d) opcionalmente, seleccionar pacientes con nivel(es) inferior(es) a su(s) nivel(es) de referencia como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia y/o seleccionar pacientes con nivel(es) superior(es) a su(s) nivel(es) de referencia para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

60 Opcionalmente, el método puede comprender además una etapa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente antes de la etapa (a).

65 En un aspecto particular, los pacientes se seleccionan en la etapa (d) como adecuados para una inmunoterapia cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco de los niveles seleccionados del grupo constituido por nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, nivel de CAF OX40L<sup>+</sup>, nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, nivel de CAF PDL2<sup>+</sup>, nivel de CAF JAM2<sup>+</sup> y nivel de CAF B7H3<sup>+</sup> son inferiores a su(s) nivel(es) de referencia.

En otro aspecto particular, los pacientes se seleccionan en la etapa d) para un tratamiento, con la exclusión de una inmunoterapia, cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco de los niveles seleccionados del grupo constituido por nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, nivel de CAF OX40L<sup>+</sup>, nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, nivel de CAF PDL2<sup>+</sup>, nivel de CAF JAM2<sup>+</sup> y nivel de CAF B7H3<sup>+</sup> son superiores a su(s) nivel(es) de referencia.

El tratamiento contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y cuidado paliativo, o una combinación de los mismos.

En un aspecto particular, la presente divulgación se refiere a un método (que no se reivindica) para proporcionar datos útiles para seleccionar un paciente afectado con un tumor para un tratamiento de inmunoterapia o con un tratamiento antitumoral que excluye inmunoterapia o para determinar si un paciente afectado con un tumor es susceptible de beneficiarse de un tratamiento de inmunoterapia o con un tratamiento antitumoral que excluye inmunoterapia, en donde el método comprende proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente, determinar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra, comparar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> con su(s) nivel(es) de referencia, en donde nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> inferiores a su(s) nivel(es) de referencia son predictivos de un tratamiento de inmunoterapia indicado para dicho paciente y opcionalmente seleccionar pacientes con nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> inferiores a su(s) nivel(es) de referencia para un tratamiento de inmunoterapia, y en donde nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> superiores a su(s) nivel(es) de referencia son predictivos de un tratamiento de inmunoterapia que no está indicado para dicho paciente y opcionalmente seleccionar pacientes con nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> superiores al nivel de referencia para un tratamiento antitumoral que excluye inmunoterapia.

Opcionalmente, el método puede comprender además una etapa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente.

Preferentemente, los pacientes se seleccionan para un tratamiento de inmunoterapia cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco de los niveles seleccionados del grupo constituido por nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, nivel de CAF OX40L<sup>+</sup>, nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, nivel de CAF PDL2<sup>+</sup>, nivel de CAF JAM2<sup>+</sup> y nivel de CAF B7H3<sup>+</sup> son inferiores a su(s) nivel(es) de referencia.

Preferentemente, los pacientes se seleccionan para un tratamiento, con la exclusión de un tratamiento de inmunoterapia, cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco de los niveles seleccionados del grupo constituido por nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, nivel de CAF OX40L<sup>+</sup>, nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, nivel de CAF PDL2<sup>+</sup>, nivel de CAF JAM2<sup>+</sup> y nivel de CAF B7H3<sup>+</sup> son superiores a su(s) nivel(es) de referencia.

El tratamiento contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y cuidado paliativo, o una combinación de los mismos.

La presente divulgación también se refiere a un método (que no se reivindica) para seleccionar un paciente afectado con un tumor para un tratamiento de inmunoterapia o para determinar si un paciente afectado con un tumor es susceptible de beneficiarse de un tratamiento de inmunoterapia, en donde el método comprende determinar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente, comparar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> con su(s) nivel(es) de referencia y opcionalmente seleccionar pacientes con nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> inferiores a su(s) nivel(es) de referencia para un tratamiento de inmunoterapia.

Opcionalmente, el método comprende además una etapa previa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente.

Preferentemente, los pacientes se seleccionan para un tratamiento de inmunoterapia cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco de los niveles seleccionados del grupo constituido por nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, nivel de CAF OX40L<sup>+</sup>, nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, nivel de CAF PDL2<sup>+</sup>, nivel de CAF JAM2<sup>+</sup> y nivel de CAF B7H3<sup>+</sup> son inferiores a su(s) nivel(es) de referencia.

La divulgación también se refiere a un método (que no se reivindica) para seleccionar un paciente afectado con un tumor para un tratamiento antitumoral que excluye inmunoterapia o para determinar si un paciente afectado con un tumor es susceptible de beneficiarse de un tratamiento antitumoral que excluye inmunoterapia, en donde el método comprende determinar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente, comparar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> con su(s) nivel(es) de referencia y opcionalmente seleccionar pacientes con nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>,

y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> superiores a su(s) nivel(es) de referencia para un tratamiento antitumoral que excluye inmunoterapia.

5 Opcionalmente, el método comprende además una etapa previa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente.

10 Preferentemente, los pacientes se seleccionan para un tratamiento, con la exclusión de un tratamiento de inmunoterapia, cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente cinco de los niveles seleccionados del grupo constituido por CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> son superiores a su(s) nivel(es) de referencia.

El tratamiento contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y cuidado paliativo.

15 Preferentemente, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente son los porcentajes de estas células con respecto al número total de células en la muestra de cáncer o el (los) porcentaje(s) de estas células con respecto al número total de CAF en la muestra de cáncer. En un aspecto más preferido, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente son los porcentajes de estas células con respecto al número total de células en la muestra de cáncer.

25 Por lo tanto, la divulgación se refiere a un método (que no se reivindica) para seleccionar un paciente afectado con un tumor para un tratamiento de inmunoterapia o para predecir la respuesta de un sujeto afectado con un tumor a un tratamiento de inmunoterapia, en donde el método comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

30 (b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia es inversamente proporcional al (a los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer;

35 (c) comparar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer con el (los) porcentaje(s) de referencia, en donde porcentaje(s) inferior(es) a su(s) porcentaje(s) de referencia son predictivos de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia, y/o porcentaje(s) superior(es) a su(s) porcentaje(s) de referencia son predictivos de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de dicho paciente; y

40 (d) opcionalmente, seleccionar pacientes con porcentaje(s) inferior(es) a su(s) porcentaje(s) de referencia como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia y/o seleccionar pacientes con porcentaje(s) superior(es) a su(s) porcentaje(s) de referencia para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

45 Opcionalmente, el método puede comprender además una etapa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente antes de la etapa (a).

50 Preferentemente, la comparación de los porcentajes de la etapa (c) es predictiva de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia y/o los pacientes se seleccionan en la etapa (d) como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente los cinco porcentajes seleccionados del grupo constituido por el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> son inferiores a sus porcentajes de referencia.

55 Preferentemente, la comparación de los porcentajes de la etapa (c) es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia y/o los pacientes se seleccionan en la etapa (d) para un tratamiento del cáncer, con la exclusión de una inmunoterapia, cuando dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, incluso más preferentemente los cinco porcentajes seleccionados del grupo constituido por el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> son superiores a sus porcentajes de referencia.

60 El tratamiento contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y cuidado paliativo, o una combinación de los mismos.

65 Los métodos para la determinación de niveles de referencia, en particular porcentajes de referencia, se conocen bien por el experto en la técnica. Preferentemente, los porcentajes de referencia se determinan midiendo el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en la muestra de

cánceres de cohortes de pacientes de los que se conoce la sensibilidad al tratamiento de inmunoterapia. Estos porcentajes se pueden determinar como se divulga en la parte experimental o por análisis de cohortes de pacientes. Preferentemente, el análisis de cohortes de pacientes se basa en una inmunoquímica de muestras de cáncer de los pacientes, preferentemente una parte de los pacientes de dicha cohorte son sensibles a la inmunoterapia y una parte de los pacientes de dicha cohorte son insensibles a la inmunoterapia. Alternativamente, los porcentajes de referencia se determinan midiendo el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en el paciente que no padece cáncer.

El porcentaje de referencia para CAF DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 70%, preferentemente entre 5% y 40%, más preferentemente entre 10% y 30%, todavía más preferentemente entre 15% y 25%, aún más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de aproximadamente 20%, incluso más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de 20%. Alternativamente, el porcentaje de referencia para CAF DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 5%, 5% y 10%, 10% y 15%, 15% y 20%, 20% y 25%, 25% y 30%, 30% y 35%, 35% y 40%, 40% y 45%, 45% y 50%, 50% y 60%, y/o 60% y 70%.

En el contexto de la presente invención, se considera que el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> es inferior a su porcentaje de referencia si está al menos, cuando sea aplicable, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 % por debajo del porcentaje de referencia.

En el contexto de la presente invención, se considera que el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> es superior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por encima del porcentaje de referencia.

El porcentaje de referencia para CAF OX40L<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 70%, preferentemente entre 5% y 40%, más preferentemente entre 10% y 30%, todavía más preferentemente entre 15% y 25%, aún más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF OX40L<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de aproximadamente 20%, incluso más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF OX40L<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de 18%. Alternativamente, el porcentaje de referencia para CAF OX40L<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 5%, 5% y 10%, 10% y 15%, 15% y 20%, 20% y 25%, 25% y 30%, 30% y 35%, 35% y 40%, 40% y 45%, 45% y 50%, 50% y 60%, y/o 60% y 70%.

En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> es inferior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 %, cuando sea aplicable, por debajo del porcentaje de referencia.

En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> es superior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por encima del porcentaje de referencia.

El porcentaje de referencia para CAF CD73<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 75%, preferentemente entre 5% y 65%, más preferentemente entre 10% y 60%, todavía más preferentemente entre 20% y 55%, aún más preferentemente entre 40% y 50%, incluso más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF CD73<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de aproximadamente 45%, y en un aspecto más preferido el porcentaje de referencia para CAF CD73<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es del 48%. Alternativamente, el porcentaje de referencia para CAF CD73<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 5%, 5% y 10%, 10% y 15%, 15% y 20%, 20% y 25%, 25% y 30%, 30% y 35%, 35% y 40%, 40% y 45%, 45% y 50%, 50% y 60%, y/o 60% y 75%.

En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> es inferior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10%, cuando sea aplicable, por debajo del porcentaje de referencia.

En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> es superior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por encima del porcentaje de referencia.

El porcentaje de referencia para CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 70%, preferentemente entre 5% y 50%, más preferentemente entre 5% y 40%, todavía más preferentemente entre 5% y 30%, aún más preferentemente entre 5% y 20%, incluso más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de aproximadamente 10%, y en un aspecto más preferido el porcentaje de referencia para CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es del 9%. Alternativamente, el porcentaje de referencia para CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 5%, 5% y 10%, 10% y 15%, 15% y 20%, 20% y 25%, 25% y 30%, 30% y 35%, 35% y 40%, 40% y 45%, 45% y 50%, 50% y 60%, y/o 60% y 70%.

En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> es inferior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por debajo, cuando sea aplicable, del porcentaje de referencia.



En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> es superior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0, 2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por encima del porcentaje de referencia.

El porcentaje de referencia para CAF B7H3<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 70%, preferentemente entre 5% y 50%, más preferentemente entre 10% y 45%, todavía más preferentemente entre 20% y 40%, aún más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF B7H3<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de aproximadamente 30%, incluso más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF B7H3<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de 32%. Alternativamente, el porcentaje de referencia para CAF B7H3<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 5%, 5% y 10%, 10% y 15%, 15% y 20%, 20% y 25%, 25% y 30%, 30% y 35%, 35% y 40%, 40% y 45%, 45% y 50%, 50% y 60%, y/o 60% y 70%. En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> es inferior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por debajo, cuando sea aplicable, del porcentaje de referencia.

En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> es superior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por encima del porcentaje de referencia

El porcentaje de referencia para CAF JAM2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 70%, preferentemente entre 5% y 50%, más preferentemente entre 10% y 45%, todavía más preferentemente entre 20% y 40%, aún más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF JAM2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de aproximadamente 30%, incluso más preferentemente el porcentaje de referencia para CAF JAM2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer es de 35%. Alternativamente, el porcentaje de referencia para CAF JAM2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer comprende entre 1% y 5%, 5% y 10%, 10% y 15%, 15% y 20%, 20% y 25%, 25% y 30%, 30% y 35%, 35% y 40%, 40% y 45%, 45% y 50%, 50% y 60%, y/o 60% y 70%. En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> es inferior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por debajo, cuando sea aplicable, del porcentaje de referencia.

En el contexto de la presente divulgación, se considera que el porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> es superior a su porcentaje de referencia si está al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10% por encima del porcentaje de referencia

En un aspecto, el método de selección de un paciente según la divulgación comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y/o un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y/o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 60%, preferentemente inferior a 50%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, y lo más preferentemente inferior a 1%, y/o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y/o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, y lo más preferentemente inferior a 1%, es predictivo de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia, y en donde un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y/o un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y/o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 50%, y lo más preferentemente superior a 60% y/o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y/o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y lo más

preferentemente superior a 50% y/o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y lo más preferentemente superior a 50% es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de dicho paciente; y

(c) opcionalmente, seleccionar pacientes con un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y/o un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y/o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 60%, preferentemente inferior a 50%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, y lo más preferentemente inferior a 1% y/o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y/o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, y lo más preferentemente inferior a 1%, y/o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, y lo más preferentemente inferior a 1%, as adecuados para un tratamiento de inmunoterapia, y/o seleccionar pacientes con un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y/o un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y/o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 50%, y lo más preferentemente superior a 60% y/o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y/o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y lo más preferentemente superior a 50% y/o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, y lo más preferentemente superior a 50% para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

En un aspecto, el método de selección de un paciente según la divulgación comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 20%, y/o un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 18%, y/o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 48%, y/o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 9%, y/o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 35%, y/o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 32%, es predictivo de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia, y en donde un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 20%, y/o un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 18%, y/o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 48%, y/o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 9%, y/o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 35%, y/o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 32%, es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de dicho paciente; y

(c) opcionalmente, seleccionar pacientes en donde un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 20%, y/o un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 18%, y/o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 48%, y/o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 9%, y/o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 32%, y/o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 35%, como es adecuado para un tratamiento de inmunoterapia, y/o seleccionar pacientes con un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 18%, y/o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 48%, y/o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 9%, y/o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 35%, y/o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 32%, para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

En una realización, el método de selección de un paciente según la invención comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde un porcentaje inferior a 30%, preferentemente inferior a 20%, más preferentemente inferior a 10%, todavía más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, es predictivo de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de

inmunoterapia, y/o en donde un porcentaje superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, incluso más preferentemente superior a 30%, es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de dicho paciente; y

(c) opcionalmente, seleccionar pacientes con un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 30%, preferentemente inferior a 20%, más preferentemente inferior a 10%, todavía más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia y/o seleccionar pacientes con un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, incluso más preferentemente superior a 30% para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

En una realización alternativa, el método de selección de un paciente según la invención comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer en donde un porcentaje inferior a 20% es predictivo de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia, y/o en donde un porcentaje superior a 20% es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de dicho paciente; y

(c) opcionalmente, seleccionar pacientes con un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 20% como adecuados para un tratamiento de inmunoterapia y/o seleccionar pacientes con un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 20% para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

En otra realización más, el método de selección de un paciente según la invención comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, CAF OX40L<sup>+</sup>, CAF CD73<sup>+</sup>, CAF PDL2<sup>+</sup>, CAF JAM2<sup>+</sup> y CAF B7H3<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, CAF OX40L<sup>+</sup>, CAF CD73<sup>+</sup>, CAF PDL2<sup>+</sup>, CAF JAM2<sup>+</sup> y CAF B7H3<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde una combinación de dos, preferentemente de tres, más preferentemente de cuatro, incluso más preferentemente de cinco, de los siguientes:

o un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%;

o un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%; y

o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 60%, preferentemente inferior a 50%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, lo más preferentemente inferior a 1%;

o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%;

o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, lo más preferentemente inferior a 1%;

o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, lo más preferentemente inferior a 1%;

es predictivo de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia, y en donde una combinación de dos, preferentemente de tres, más preferentemente de cuatro, incluso más preferentemente de cinco, de los siguientes:

o un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%;

- o un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%; y
- 5 o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 50%, lo más preferentemente superior a 60%;
- 10 o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%;
- 15 o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, lo más preferentemente superior a 50%;
- 20 o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, lo más preferentemente superior a 50%;
- es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de dicho paciente; y
- (c) opcionalmente, seleccionar pacientes con una combinación de dos, preferentemente de tres, más preferentemente de cuatro, incluso más preferentemente de cinco, de los siguientes:
- 25 o un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%;
- 30 o un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%; y
- 35 o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 60%, preferentemente inferior a 50%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, lo más preferentemente inferior a 1%;
- 40 o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 40%, preferentemente inferior a 30%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%;
- 45 o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, lo más preferentemente inferior a 1%;
- 50 o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 20%, aún más preferentemente inferior a 10%, incluso más preferentemente inferior a 5%, lo más preferentemente inferior a 1%;
- como adecuado para un tratamiento de inmunoterapia, y/o seleccionar pacientes con una combinación de dos, preferentemente de tres, más preferentemente de cuatro, incluso más preferentemente de cinco, de los siguientes:
- 55 o un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%;
- 60 o un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%; y
- o un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 50%, lo más preferentemente superior a 60%;

o un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%;

5 o un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, lo más preferentemente superior a 50%;

10 o un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, aún más preferentemente superior a 30%, incluso más preferentemente superior a 40%, lo más preferentemente superior a 50%;

para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

15 En otra realización más, el método de selección de un paciente comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, B7H3<sup>+</sup>, OX40L<sup>+</sup>, JAM2<sup>+</sup> y PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, CAF CD73<sup>+</sup>, CAF B7H3<sup>+</sup>, CAF OX40L<sup>+</sup>, CAF JAM2<sup>+</sup> y CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la combinación de un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 30%, preferentemente inferior a 20%, más preferentemente inferior a 10%, todavía más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 30%, preferentemente inferior a 18%, más preferentemente inferior a 10%, todavía más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 60%, preferentemente inferior a 48%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 30%, preferentemente inferior a 20%, más preferentemente inferior a 9%, todavía más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 35%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1% y un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 32%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, es predictiva de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia, y en donde la combinación de un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, incluso más preferentemente superior a 30%, y un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 18%, incluso más preferentemente superior a 30%, y un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 30%, aún más preferentemente superior a 48%, incluso más preferentemente superior a 60%, y un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 9%, todavía más preferentemente superior a 20%, incluso más preferentemente superior a 30%, y un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 35%, aún más preferentemente superior a 40% e incluso más preferentemente superior a 50%, y un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 32%, aún más preferentemente superior a 40% e incluso más preferentemente superior a 50%, es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia on el cáncer de dicho paciente; y

(c) opcionalmente, seleccionar pacientes con la combinación de un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 30%, preferentemente inferior a 20%, más preferentemente inferior a 10%, todavía más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 30%, preferentemente inferior a 18%, más preferentemente inferior a 10%, todavía más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 60%, preferentemente inferior a 48%, más preferentemente inferior a 30%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 30%, preferentemente inferior a 20%, más preferentemente inferior a 9%, todavía más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, y un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 35%, más preferentemente inferior a 20%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1% y un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 50%, preferentemente inferior a 40%, más preferentemente inferior a 32%, todavía más preferentemente inferior a 10%, aún más preferentemente inferior a 5%, incluso más preferentemente inferior a 1%, as adecuados para un tratamiento de inmunoterapia, y/o seleccionar pacientes con la combinación de un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 20%, incluso más preferentemente superior a 30%, y un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 18%, incluso más preferentemente superior a 30%, y un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 30%, aún más preferentemente superior a 48%, incluso más preferentemente superior a 60%, y un

porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 9%, todavía más preferentemente superior a 20%, incluso más preferentemente superior a 30%, y un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 35%, aún más preferentemente superior a 40% e incluso más preferentemente superior a 50% y un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 1%, preferentemente superior a 5%, más preferentemente superior a 10%, todavía más preferentemente superior a 32%, aún más preferentemente superior a 40% e incluso más preferentemente superior a 50%, para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

En una realización alternativa, el método de selección de un paciente según la invención comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, CAF OX40L<sup>+</sup>, CAF CD73<sup>+</sup>, CAF PDL2<sup>+</sup>, CAF JAM2<sup>+</sup> y CAF B7H3<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, CAF OX40L<sup>+</sup>, CAF CD73<sup>+</sup>, CAF PDL2<sup>+</sup>, CAF JAM2<sup>+</sup> y CAF B7H3<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la combinación de un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 20%, un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 18%, un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 48%, un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 9%, un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 35%, y un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 32% es predictiva de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento de inmunoterapia, y en donde la combinación de un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 20%, un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 18%, un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 48%, un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 9%, un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 35%, y un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 32% es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento de inmunoterapia on el cáncer de dicho paciente; y

(c) opcionalmente, seleccionar pacientes con la combinación de un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a 20%, un porcentaje de CAF OX40L<sup>+</sup> inferior a 18%, un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> inferior a 48%, un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> inferior a 9%, un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a 35%, y un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> inferior a 32%, as adecuados para un tratamiento de inmunoterapia, y/o seleccionar pacientes con la combinación de un porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a 20%, un porcentaje de OX40L<sup>+</sup> superior a 18%, un porcentaje de CAF CD73<sup>+</sup> superior a 48%, un porcentaje de CAF PDL2<sup>+</sup> superior a 9%, un porcentaje de CAF JAM2<sup>+</sup> superior a 35%, y un porcentaje de CAF B7H3<sup>+</sup> superior a 32%, para un tratamiento del cáncer que excluye inmunoterapia.

## **Cáncer**

El método de la invención tiene como objetivo seleccionar un paciente afectado con un tumor para un tratamiento.

Preferentemente, el tumor es de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cánceres de próstata, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres de riñón, cánceres de ovario, cánceres hepatocelulares, osteosarcomas, melanomas, cánceres hipofaríngeos, cánceres de esófago, cánceres endometriales, cánceres de cuello uterino, cánceres pancreáticos, cánceres de hígado, cánceres de colon o colorrectales, cánceres neuroendocrinos, cánceres de músculo, cánceres suprarrenales, cánceres de tiroides, cánceres uterinos, cánceres de piel, cánceres de vejiga, cánceres de cabeza y cuello, y cánceres pediátricos.

Más preferentemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cánceres colorrectales, cánceres pancreáticos y cánceres pediátricos.

Incluso más preferentemente, el cáncer es un cáncer de ovario, preferentemente un cáncer de ovario mesenquimatoso, en particular un cáncer de ovario de gran malignidad de tipo seroso, o un cáncer de mama, preferentemente un cáncer de mama invasivo y/o sus metástasis, en particular metástasis axilares.

## **Tratamiento de inmunoterapia**

El método de la divulgación predice la eficiencia de un tratamiento de inmunoterapia según el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, en la muestra de cáncer de un paciente y así permite seleccionar pacientes para un tratamiento de inmunoterapia. De hecho, un nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer inferior a su nivel de referencia es predictivo de la eficacia de un tratamiento de inmunoterapia.

Preferentemente, el tratamiento de inmunoterapia se selecciona del grupo que consiste en tratamientos terapéuticos que estimulan al sistema inmunitario del paciente para atacar las células tumorales malignas, inmunización del paciente con antígenos tumorales, terapia adoptiva con linfocitos T, tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, y cualquier combinación de los mismos, preferentemente un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario.

En una realización más preferida, el tratamiento de inmunoterapia es un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en una terapia anti-CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos) tal como ipilimumab, inhibidores de PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada)

tales como nivolumab, pembrolizumab o BGB-A317, inhibidores de PDL1 (ligando de muerte celular programada) tales como atezolizumab, avelumab o durvalumab, inhibidores de LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos) tales como BMS-986016, inhibidores de TIM-3 (inmunoglobulina de linfocitos T y 3 que contiene dominio de mucina), inhibidores de TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM), inhibidores de BLTA (atenuador de linfocitos B y T), inhibidores de IDO1, tales como epacadostat, o una combinación de los mismos.

### **Paciente, pauta y administración**

El paciente es un animal, preferentemente un mamífero, incluso más preferentemente un humano. Sin embargo, el paciente también puede ser un animal no humano, en particular mamíferos, tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, burros, conejos, hurones, jerbos, hámsteres, chinchillas, ratas, ratones, cobayas y primates no humanos, entre otros, que están en necesidad de tratamiento.

El paciente humano divulgado en el presente documento puede ser un humano en el estado prenatal, un recién nacido, un niño, un lactante, un adolescente o un adulto, en particular un adulto de al menos 40 años, preferentemente un adulto de al menos 50 años, todavía más preferentemente un adulto de al menos 60 años, incluso más preferentemente un adulto de al menos 70 años.

Preferentemente, el paciente ha sido diagnosticado con un cáncer.

En un aspecto particular, el paciente ya ha recibido al menos una línea de tratamiento, preferentemente varias líneas de tratamiento.

En otro aspecto particular, el paciente padece un cáncer metastásico o un cáncer en un estadio avanzado.

El tratamiento contra el cáncer, en particular el tratamiento de inmunoterapia divulgado en el presente documento, puede administrarse por cualquier vía de administración convencional, tal como vía de administración tópica, enteral, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

Preferentemente, el tratamiento contra el cáncer, en particular el tratamiento de inmunoterapia, empieza en no más de un mes, preferentemente no más de una semana, después de la determinación del nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>.

El tratamiento contra el cáncer, en particular el tratamiento de inmunoterapia divulgado en el presente documento, se puede administrar como una dosis única o en dosis múltiples.

Preferentemente, el tratamiento se debe administrar regularmente, preferentemente entre cada día y cada mes, más preferentemente entre cada día y cada dos semanas, incluso más preferentemente entre cada día y cada semana.

La duración de tratamiento con el tratamiento contra el cáncer, en particular el tratamiento de inmunoterapia divulgado en el presente documento, comprende preferentemente entre 1 día y 24 semanas, más preferentemente entre 1 día y 10 semanas, incluso más preferentemente entre 1 día y 4 semanas. En un aspecto particular, el tratamiento dura en tanto que el cáncer persista.

La cantidad de tratamiento del cáncer, en particular el tratamiento de inmunoterapia divulgado en el presente documento, a administrar se tiene que determinar por procedimientos convencionales bien conocidos por aquellos expertos habituales en la técnica. Los datos fisiológicos del paciente (por ejemplo, edad, tamaño, peso y condición general física) y las vías de administración se tendrán que tener en cuenta para determinar la dosis apropiada, de modo que se administre al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz.

### **Método de determinación del nivel de subpoblaciones de CAF**

La divulgación también se refiere a un método (que no se reivindica) para determinar el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente, en donde el método comprende:

(a) proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente; y

(b) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(c) determinar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer.

El método puede comprender además una etapa de comparar dicho(s) nivel(es) con su(s) nivel(es) de referencia.

Preferentemente, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente son el porcentaje de estas células con respecto al número total de células en la muestra de cáncer o el porcentaje de estas células con respecto al número total de CAF en la muestra de cáncer. En un aspecto más preferido, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente son el porcentaje de estas células con respecto al número total de células en la muestra de cáncer.

La divulgación también se refiere a un método de determinación del nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente, en donde el método comprende:

(a) proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente; y

(b) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente, preferentemente por inmunohistoquímica o FACS como se ha descrito anteriormente;

(c) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer.

El método puede comprender además una etapa de comparar dicho(s) porcentaje(s) con su(s) porcentaje(s) de referencia. Los porcentajes de referencia son como se han descrito anteriormente.

Los CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> se detectan como se ha descrito anteriormente.

#### **Uso de un tratamiento de inmunoterapia y métodos de tratamiento**

En un aspecto particular, la divulgación también se refiere a un tratamiento de inmunoterapia, preferentemente un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente (que no se reivindica) en donde el paciente presenta en una muestra de cáncer:

(a) bajo(s) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, preferentemente CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, opcionalmente CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>;

(b) ningún CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, preferentemente ningún CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, opcionalmente ningún CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>; o

(c) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> inferior(es) a su(s) nivel(es) de referencia, preferentemente de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, opcionalmente de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>.

Preferentemente, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente son el porcentaje de estas células con respecto al número total de células en la muestra de cáncer o el porcentaje de estas células con respecto al número total de CAF en la muestra de cáncer. En un aspecto más preferido, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente son el porcentaje de estas células con respecto al número total de células en la muestra de cáncer.

Por lo tanto, la divulgación también se refiere a un tratamiento de inmunoterapia, preferentemente un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente en donde el paciente presenta en una muestra de cáncer:

(a) bajo(s) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, preferentemente de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, opcionalmente de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>;

(b) ningún CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, preferentemente ningún CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, opcionalmente ningún CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>; o

(c) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> inferior(es) a su(s) porcentaje(s) de referencia, preferentemente de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, opcionalmente de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>.



**Agentes que se dirigen a subpoblaciones de CAF**

5 En otro aspecto, la divulgación también se refiere a un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, que no se reivindica.

10 El agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> se puede seleccionar del grupo que consiste en agentes que inhiben la actividad inmunosupresora de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, anticuerpos que se dirigen a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, opcionalmente conjugados con un fármaco citotóxico, y cualquier combinación de los mismos.

15 En un primer aspecto, el agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> es un agente que inhibe la actividad inmunosupresora de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, tales como inhibidores de DPP4 y/o inhibidores de CD73.

20 Los inhibidores de DPP4 se pueden seleccionar del grupo que consiste en sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptina, gemigliptina, anagliptina, teneligliptina, alogliptina, trelagliptina, omarigliptina, Evogliptin, dutogliptina, berberina, lupeol, y combinación de los mismos.

25 Se pueden seleccionar inhibidores de CD73 del grupo que consiste en S-prima-difosfato de alfa,beta-metilenoadenosina, 5'-(alfa,beta-metilen)difosfato de adenosina, y combinación de los mismos. Los inhibidores de CD73 divulgados en el presente documento también se pueden seleccionar de los inhibidores de CD73 divulgados en los documentos de patente WO 2016/131950 y WO 2017/064043.

30 En un segundo aspecto, el agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> es un anticuerpo que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, tal como anticuerpos anti-DPP4, anticuerpos anti-OX40L, anticuerpos anti-CD73, anticuerpos anti-PDL2, anticuerpos anti-JAM2, anticuerpos anti-B7H3, y combinación de los mismos.

35 El anticuerpo divulgado en el presente documento puede ser cualquier tipo de anticuerpo. En particular, el anticuerpo puede comprender, consistir o consistir esencialmente en un anticuerpo en forma de Y clásico con dos cadenas pesadas y cadenas ligeras, o un fragmento de las mismas. Preferentemente, dicho fragmento comprende la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo. Dicho fragmento se puede seleccionar, sin limitación, del grupo que consiste en Fv, Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, F(ab)3, Fv, Fv de una sola cadena (scFv), di-scFvs o sc(Fv)2, dsFv, Fd, dAb, CDR, VH, VL, minicuerpos, diacuerpos y anticuerpos multispecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

40 El anticuerpo divulgado en el presente documento también puede comprender, consistir o consistir esencialmente en un anticuerpo de cadena pesada. Preferentemente, un anticuerpo de cadena pesada se selecciona de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos o de pescados cartilaginosos. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena pesada derivado de camélidos. El anticuerpo de camélido engloba en particular dromedario, camello, llama y alpaca. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena pesada derivado de llama.

45 En un aspecto preferido, el anticuerpo comprende, consiste o consiste esencialmente en un anticuerpo de un solo dominio o un fragmento del mismo. El anticuerpo de un solo dominio puede derivar de un VHH o un V-NAR, preferentemente de un VHH. En particular, el anticuerpo divulgado en el presente documento puede ser un anticuerpo humanizado de un solo dominio, en particular un VHH humanizado, o un fragmento del mismo.

50 Preferentemente, dicho fragmento del anticuerpo de un solo dominio comprende las tres CDR.

55 Opcionalmente, el anticuerpo divulgado en el presente documento es un anticuerpo de un solo dominio fusionado con una región Fc, preferentemente una región Fc seleccionada del grupo que consiste en regiones IgA, IgD, IgE, IgG e IgM Fc, más preferentemente una región Fc de IgG.

Preferentemente, la región Fc se selecciona de regiones Fc humanas, de ratón y conejo. Incluso más preferentemente, el anticuerpo divulgado en el presente documento es un anticuerpo de un solo dominio fusionado con una región Fc humana, incluso más preferentemente un anticuerpo de un solo dominio fusionado con una región Fc humana de IgG.

60 El anticuerpo divulgado en el presente documento puede ser un anticuerpo monomérico o un anticuerpo multimérico. En particular, el anticuerpo divulgado en el presente documento es un anticuerpo monomérico.

65 El anticuerpo divulgado en el presente documento también puede ser un anticuerpo multimérico. Cuando el anticuerpo es un anticuerpo multimérico clásico en forma de Y, es preferentemente un dímero o un pentámero. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo multimérico de un solo dominio, preferentemente un anticuerpo dimerizado de un solo dominio.

En un anticuerpo multimérico, los dominios variables de los diferentes monómeros pueden ser idénticos (es decir, monoméricos) o diferentes (es decir, heteroméricos). Preferentemente, el anticuerpo multimérico divulgado en el presente documento es monomérico. Cuando el anticuerpo multimérico divulgado en el presente documento es heteromérico, los dominios variables de los diferentes monómeros pueden todos unirse a la misma proteína. Alternativamente, pueden unirse a diferentes proteínas.

El anticuerpo divulgado en el presente documento puede ser monoclonal o policlonal. Preferentemente, el anticuerpo divulgado en el presente documento es monoclonal.

El anticuerpo divulgado en el presente documento comprende al menos un dominio variable. Puede comprender varios dominios variables, en particular cuando el anticuerpo es multimérico.

El anticuerpo divulgado en el presente documento puede presentar la capacidad de inhibir la actividad inmunosupresora de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>. Por ejemplo, puede ser un anticuerpo neutralizante, puede bloquear la unión de DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2, o B7H3, con su componente de unión, por ejemplo, sustrato o receptor.

En un tercer aspecto, el agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> es un anticuerpo que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> y conjuga con un fármaco, preferentemente un fármaco citotóxico.

En un aspecto preferido, el agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> es un anticuerpo anti-DPP4 conjugado con un fármaco, preferentemente un fármaco citotóxico.

En otro aspecto preferido, el agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> es un anticuerpo anti-OX40L conjugado con un fármaco, preferentemente un fármaco citotóxico.

En otro aspecto preferido más, el agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> es un anticuerpo anti-CD73 conjugado con un fármaco, preferentemente un fármaco citotóxico.

Aún en otro aspecto preferido, el agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> es un anticuerpo anti-PDL2 conjugado con un fármaco, preferentemente un fármaco citotóxico.

En otro aspecto preferido, el agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> es un anticuerpo anti-B7H3 conjugado con un fármaco, preferentemente un fármaco citotóxico.

El fármaco divulgado en el presente documento es preferentemente un fármaco citotóxico. Como se usa en el presente documento, el término "fármaco citotóxico" se refiere a una molécula que cuando entra en contacto con una célula, finalmente tras la internalización en la célula, altera una función celular (por ejemplo, crecimiento y/o proliferación y/o diferenciación y/o metabolismo celular, tal como la síntesis de proteína y/o ADN) en una forma perjudicial o conduce a muerte celular. Como se usa en el presente documento, el término "fármaco citotóxico" engloba toxinas, en particular citotoxinas.

El fármaco citotóxico divulgado en el presente documento se puede seleccionar del grupo que consiste en dolastatinas, tales como dolastina 10, dolastina 15, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatina F (MMAF), monometilauristatina-D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE) y éster AE del ácido 5-benzoilvalérico (AEVB), maitansinas tales como ansamitocina, mertansina (también denominada emtansina o DM1) y ravtansina (también denominada soravtansina o DM4), antraciclinas tales como daunorubicina, epirubicina, pirarubicina, idarubicina, zorubicina, cerubidina, aclarubicina, adriblastina, doxorubicina, mitoxantrona, daunoxoma, nemorubicina y PNU-159682, caliqueamicinas tales como caliqueamicina beta 1Br, caliqueamicina gamma 1Br, caliqueamicina alfa 21, caliqueamicina alfa 31, caliqueamicina beta 11, caliqueamicina gamma 1L, caliqueamicina delta 11 y ozogamicina, esperamicinas tales como esperamicina A1, neocarzinostatinas, bleomicina, duocarmicinas tales como CC-1065 y duocarmicina A, pirrolobenzodicepinas tales como antramycin, abeimicina, chicamicina, DC-81, mazetramicina, neotramicinas A y B, porotramicina protractarcina, sibanomicina (DC-102), sibiromicina y tomamicina, dímeros de pirrolobenzodicepina (o PBD), indolino-benzodicepinas, dímeros de indolino-benzodicepina,  $\alpha$ -amanitinas, abraxano, actinomicina, aldesleucina, altretamina, alitretinoína, amsacrina, anastrozol, arsénico, asparaginasa, azacitidina, azatioprina, bexaroteno, bendamustina, bicalutamida, bortezomib, busulfán, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, cloranfenicol, ciclosporina, cidofovir, alquitrán de hulla que contiene productos, colchicina, dacarbazina, dactinomycin, danazol, dasatinib, dietilestilbestrol, dinoprostona, ditranol, dutasterida, dextrazoxano, docetaxel, doxifluridina, erlotinib,

estramustina, etopósido, exemestano, finasterida, flutamida, floxuridina, flucitosina, fludarabina, fluorouracilo, ganciclovir, gefitinib, gemcitabina, goserelina, hidroxiurea, hidroxycarbamida, ifosfamida, irinotecán, imatinib, lenalidomida, leflunomida, letrozol, acetato de leuporelina, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, menotropinas, mifepristona, nafarelina, nelarabin, mostaza nitrogenada, nitrosoureas, oxaliplatino, ozogamicina, paclitaxel, podofilina, pegasparginasa, pemetrexed, pentamidina, pentostatina, procarbazona, raloxifeno, ribavarina, raltitrexed, rituximab, romidepsin, sorafenib, estreptozocina, sunitinib, sirolimus, estreptozocina, temozolomida, temsirolimus, tenipósido, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, tacrolimus, taxotere, taflupósido, toremifeno, tretinoína, trifluridina, triptorelina, valganciclovir, valrubicina, vinblastina, vidaradina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vemurafenib, vismodegib, vorinostat, zidovudina, vedotina, derivados y combinaciones de los mismos.

En un aspecto preferido, los conjugados de anticuerpo-fármaco divulgados en el presente documento comprenden un conector entre el anticuerpo y el fármaco. El conector divulgado en el presente documento puede ser escindible o no escindible, preferentemente, el conector es escindible. Los ejemplos de conectores escindibles divulgados en el presente documento incluyen, sin limitaciones, disulfuros, hidrazonas y péptidos. Los ejemplos de conectores no escindibles divulgados en el presente documento incluyen, sin limitaciones, tioéteres.

En un aspecto particular, el fármaco se asocia a una cisteína o un resto de lisina del anticuerpo. Preferentemente, el fármaco o antígeno está ligado a aminoácidos no naturales que se han incorporado en el anticuerpo.

Los métodos de preparación de conjugados anticuerpo-fármaco se conocen bien por el experto en la técnica.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente, que no se reivindica.

Preferentemente, el cáncer del paciente o una muestra de cáncer de dicho paciente presenta nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> superior(es) a su nivel de referencia.

Preferentemente, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> son el porcentaje de estas células con respecto al número total de células, o con respecto al número total de CAF, en una muestra de cáncer de dicho paciente, y el (los) nivel(es) de referencia son porcentaje(s) de referencia.

Por lo tanto, la divulgación se refiere a un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente, en donde el cáncer del paciente o una muestra de cáncer de dicho paciente presenta porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> superior(es) a sus porcentajes de referencia.

Los porcentajes se determinan como se ha descrito anteriormente, los porcentajes de referencia y el cáncer son como se han definido anteriormente.

La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, preferentemente un inhibidor de DPP4, un inhibidor de CD73, un anticuerpo anti-DPP4, un anticuerpo anti-OX40L, un anticuerpo anti-CD73, un anticuerpo anti-PDL2, un anticuerpo anti-JAM2, un anticuerpo anti-B7H3 o una combinación de los mismos, que no se reivindica, estando los anticuerpos conjugados opcionalmente con un fármaco, preferentemente un fármaco citotóxico, o una combinación de los mismos, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente. Para esta formulación, se pueden usar excipientes convencionales según técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Preferentemente, el cáncer del paciente o una muestra de cáncer de dicho paciente presenta porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, superior(es) a sus porcentajes de referencia. Los porcentajes se determinan como se ha descrito anteriormente, los porcentajes de referencia y el cáncer son como se han definido anteriormente.

La divulgación también se refiere al uso de un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> según la divulgación o de una composición farmacéutica según la divulgación, para la preparación de un medicamento contra el cáncer, que nuevamente no se reivindica.

Preferentemente, el cáncer del paciente o una muestra de cáncer de dicho paciente presenta porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> superior(es) a sus porcentajes de referencia. Los porcentajes se determinan como se ha descrito anteriormente, los porcentajes de referencia y el cáncer son como se han definido anteriormente.

El agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> según la divulgación o una composición farmacéutica según la divulgación se puede administrar por cualquier vía conveniente. Por ejemplo, se puede administrar por una vía sistémica, en particular por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica, preferentemente por intravenosa. También se puede administrar directamente en el órgano o tejido inflamatorio.

El agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> según la invención o una composición farmacéutica según la invención se puede administrar como una dosis única o en dosis múltiples.

El agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> según la invención o una composición farmacéutica según la invención se puede administrar entre cada día y cada mes, preferentemente cada semana o cada dos semanas, más preferentemente cada semana.

La duración del tratamiento con un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> según la invención o con una composición farmacéutica según la invención comprende preferentemente entre 1 y 20 semanas, preferentemente entre 1 y 10 semanas. Alternativamente, el tratamiento puede durar en tanto que el cáncer persista.

La cantidad de agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> según la invención o de una composición farmacéutica según la invención a administrar se tiene que determinar por un procedimiento convencional bien conocido por aquellos expertos habituales en la técnica. Los datos fisiológicos del paciente (por ejemplo, edad, tamaño, y peso) y las vías de administración se tienen que tener en cuenta para determinar la dosis apropiada, de modo que una cantidad terapéuticamente eficaz se administrará al paciente.

La divulgación también se refiere a un producto o kit que comprende a) un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> según la divulgación o una composición farmacéutica según la divulgación, y b) un tratamiento de inmunoterapia como se ha descrito anteriormente, preferentemente un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario como se ha descrito anteriormente, como un preparado combinado para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un cáncer en un paciente, que no se reivindica.

En un producto o kit según la presente divulgación, los principios activos del preparado combinado se pueden administrar simultáneamente, por separado o uno detrás de otro.

Cuando los principios activos del preparado combinado se van a administrar por separado o uno detrás de otro, especialmente cuando se van a administrar por separado, el tratamiento con un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> o con la composición farmacéutica se hace preferentemente antes del tratamiento de inmunoterapia. En ese caso, el producto o kit para su uso puede comprender además una etapa de determinar el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> después de la administración del tratamiento con un agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> o con la composición farmacéutica, pero antes del tratamiento de inmunoterapia, administrándose el tratamiento de inmunoterapia solo si el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> son inferiores a su(s) porcentaje(s) de referencia.

Los principios activos del preparado combinado se pueden administrar al sujeto por la misma vía o por vías de administración diferentes. Las vías de administración dependen normalmente de las composiciones farmacéuticas usadas.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración y la dosis de administración del agente que se dirige a CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup>, la composición farmacéutica o el producto o kit se pueden ajustar por el experto en la técnica según el tipo e intensidad de la infección, y al paciente, en particular su edad, peso, sexo y estado físico general.

### **Métodos de pronóstico**

En otro aspecto, la presente divulgación también se refiere a un método de predicción o monitorización del desenlace clínico de un sujeto afectado con un cáncer (no reivindicado) en donde el método comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde alto(s) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> son predictivos de un mal pronóstico

(c) opcionalmente comparar el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer con el (los) nivel(es) de referencia, en donde nivel(es) superior(es) a su(s) nivel(es) de referencia son predictivos de un mal pronóstico

en donde un mal pronóstico es preferentemente un mal pronóstico de supervivencia, una progresión temprana de la enfermedad, un aumento de la reaparición de la enfermedad, especialmente después de la resección y/o el tratamiento, y/o un aumento de la aparición de metástasis.

Preferentemente, el método comprende además una etapa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente.

El cáncer y el paciente son como se han descrito anteriormente.

El nivel de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> se determinan como se ha descrito anteriormente y los niveles de referencia son como se han descrito anteriormente.

Preferentemente, el (los) nivel(es) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de un paciente son el (los) porcentaje(s) de estas células en relación con el número total de células, o con el número total de CAF, en la muestra de cáncer, y el (los) nivel(es) de referencia son porcentaje(s) de referencia

Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a un método de predicción o monitorización del desenlace clínico de un sujeto afectado con un cáncer, en donde el método comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde alto(s) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> son predictivos de un mal pronóstico.

La divulgación también se refiere a un método de predicción o monitorización del desenlace clínico de un sujeto afectado con un cáncer, en donde el método comprende:

(a) detectar CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;

(b) determinar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer

(c) comparar el (los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer con el (los) porcentaje(s) de referencia, en donde porcentaje(s) superior(es) a su(s) porcentaje(s) de referencia son predictivos de un mal pronóstico;

en donde un mal pronóstico es preferentemente un mal pronóstico de supervivencia, una progresión temprana de la enfermedad, un aumento de la reaparición de la enfermedad, especialmente después de la resección y/o el tratamiento, y/o un aumento de la aparición de metástasis.

Preferentemente, el método comprende además una etapa de proporcionar una muestra de cáncer de dicho paciente.

El cáncer y el paciente son como se han descrito anteriormente. El (Los) porcentaje(s) de CAF DPP4<sup>+</sup>, y/o CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup>, y/o CAF PDL2<sup>+</sup> se determinan como se ha descrito anteriormente. Los porcentajes de referencia son como se han descrito anteriormente.

## **Kits**

En otro aspecto, la divulgación también se refiere al uso de un kit para seleccionar un paciente afectado con un tumor para un tratamiento de inmunoterapia, preferentemente un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, y/o para predecir la eficacia de un tratamiento de inmunoterapia, preferentemente un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, en donde el kit comprende medios de detección seleccionados del grupo que consiste en un par de cebadores, una sonda y un anticuerpo específico de una proteína seleccionada del grupo que consiste en DPP4, OX40L, CD73, PDL2, JAM2, B7H3, y una combinación de los mismos, y, opcionalmente, un folleto que proporciona pautas para usar dicho kit. Ninguno de estos aspectos se reivindica.

Aunque tiene diferentes significados, los términos "que comprende", "que tiene", "que consiste en" y "que contiene" se pueden sustituir entre sí en la presente solicitud.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente divulgación se describirán en los siguientes ejemplos, que se deben considerar como ilustrativos y no limitantes.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1:

#### 10 Materiales y métodos

##### Experimentos de silenciamiento usando ARN interferente pequeño (ARNip)

Para ensayos funcionales, cultivos primarios de CAF se transfectaron con un conjunto de 5 ARNip específicos: siTNFSF4/OX40L (n.º GS7292), siPDCD1LG2/PD-L2 (n.º GS80380), siCD276B7H3 (n.º GS80381), siNT5E/CD73 (n.º GS4907) y siDPP4 (n.º GS1803) o ARNip no de direccionamiento (siCTR, control negativo de AllStarts, n.º 1027281). Todos los ARNip (FlexiTube Gene Solution siRNA n.º 1027416) y siCTR no dirigido fueron de Qiagen. Las transfecciones se llevaron a cabo a una concentración final de 20 nM usando el reactivo de transfección DharmaFECT 1 (Dharmacon, n.º T-2001-02) según las instrucciones del fabricante.

##### 20 Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Se aislaron linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de sangre periférica de donantes sanos obtenidos del "Etablissement Français du Sang", París, banco de sangre de Saint-Antoine Crozatier a través de un convenio con el Instituto Curie (París, Francia). Brevemente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) usando Lymphoprep (STEMCELL, n.º 07861) como se describe previamente y se usaron 500 millones de CMSP para la purificación de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> por separación magnética de células (MACS) con el kit de aislamiento de T-reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> humanos (Miltenyi Biotec, n.º 130-091-301) según las instrucciones del fabricante. La pureza de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificados se determinó por citometría de flujo.

##### 30 Cocultivo de linfocitos T con microscopía de vídeo de lapso de tiempo de CAF

Para experimentos de cocultivo para microscopía de vídeo de lapso de tiempo, los CAF (50-60.000 células) se transfectaron transitoriamente con los ARNip (enumerados anteriormente) y se dispusieron en placas de 12 pocillos en DMEM complementado con 10% de FBS. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> recién purificados se añadieron a células CAF, 30 h después de la transfección, para alcanzar una relación de aproximadamente 1:5 (CAF:linfocitos T). Justo antes de añadir los linfocitos T, los medios se sustituyeron con DMEM complementado con 2,5% de FBS y se dispusieron inmediatamente bajo una cámara acondicionada (37 °C) de un vídeo-microscopio Leica y se registraron durante 28 h. Las microfotografías se capturaron en 5 posiciones representativas diferentes cada 8 minutos para cada pocillo, resultando en 5 vídeos por condición experimental generada usando el software Metamorph.

##### 40 Análisis de vídeos de lapso de tiempo

Se desarrolló una canalización automática, que combina programas adicionales ImageJ y secuencias de comandos R, para definir la colocación entre CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y seguir las trayectorias celulares con el tiempo. La normalización se realizó retirando la mediana del fondo de todos los vídeos. El área de CAF se evaluó entonces usando el programa adicional ImageJ Phantast (<https://github.com/nicjac/PHANTAST-FIJI>) con los siguientes parámetros: sigma=1 y epsilon=0,03. El programa adicional ImageJ Particle Tracker ([http://imagej.net/Particle\\_Tracker](http://imagej.net/Particle_Tracker)) de las herramientas MOSAIC (<http://mosaic.mpi-cbg.de/?q=downloads/imageJ>) se usó para detectar automáticamente linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y rastrear trayectorias de células inmunitarias a través de vídeo. Se usaron los siguientes parámetros: radio=3, corte=3, Per/Abs=0,1, intervalo de enlaces=10, desplazamiento=10. Finalmente, la posición exacta de tanto CAF como linfocitos T se determinó y combinó para cada marco de tiempo que permitió la detección de la colocación de los dos tipos de células. Se consideraron dos tipos de interacciones entre CAF y linfocitos T basándose en dos parámetros, el número de marcos de tiempo (caja) y el número de contactos mínimos (minC) dentro de esta ventana de intervalo de tiempo. Para cada linfocitos T analizado, se definió la interacción persistente con CAF como al menos 8 contactos observados durante una ventana de tiempo de 14 intervalos (caja=14 y minC=8). Todas las interacciones, que incluyen contactos cortos y persistentes, se cuantificaron considerando al menos 1 contacto observado durante una ventana de tiempo de 10 intervalos (caja=10 y minC=1). Se analizaron 4 vídeos correspondientes a 28 h (210 intervalos, 8 min por intervalo) para cada condición.

##### 60 Cocultivo de linfocitos T con CAF e inducción de FOXP3

Para estudiar el impacto de CAF sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, se realizaron cocultivos. Se sembraron 50.000 CAF primarios en placas de 24 pocillos en DMEM complementado con 10% de FBS y se usaron ARNip no transfectado o transfectado (siCTR, siCD276/B7H3, siNT5E/CD73, siDPP4 y siTNFSF4/OX40L). El medio se sustituyó por DMEM nuevo complementado con 1% de FBS justo antes de que se añadieran 500.000 linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a CAF, o a CAF + ARNip 30 h después de la transfección. Los cocultivos de CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se incubaron durante

16 h a 37 °C, 3% de O<sub>2</sub>. El control negativo fue la incubación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sin CAF. Después de la incubación, los linfocitos T se recogieron y analizaron por FACS. En resumen, los linfocitos T se incubaron con LIVE/DEAD (Thermo Fisher Scientific) durante 20 min a TA para la exclusión de células muertas. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS+ durante 10 min y se incubaron con una mezcla de anticuerpos en PBS+ que contenía anti-CD45-APC-Cy7, anti-CD3-Alexa Fluor 700 (BD Biosciences, n.º 557943), anti-CD4-APC (Miltényi Biotec, n.º 130-092-374) y anti-CD25-PE (Miltényi Biotec, n.º 130-091-024) durante 15 min a TA. La detección de FOXP3 se realizó usando el FOXP3 staining buffer set kit (eBioscience) para la fijación y permeabilización según las instrucciones del fabricante seguido de incubación con anti-Foxp3-Alexa Fluor 488 (eBioscience, n.º 53-4776) durante 30 min a TA. Para tinción con CD25 y FOXP3, los controles de isotipo correspondientes fueron (n.º 130-092-215 y n.º 53-4321 para CD25 y FOXP3, respectivamente). Los análisis se realizaron en el citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences) y a continuación se analizaron los datos usando FlowJo versión 9.8.1.

## Resultados

Para investigar la interacción dinámica entre fibroblastos CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, los inventores realizaron la microscopía de vídeo de lapso de tiempo durante 48 h de cocultivo de los dos tipos de células (Fig. 1a-d). Primero detectaron una estrecha proximidad entre células CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Fig. 1a), lo que confirma la capacidad de células CAF para atraer a linfocitos T. Se observaron dos tipos de interacción entre fibroblastos CAF y linfocitos T: un contacto de poco tiempo ("ir y venir") que ocurre durante un corto periodo de tiempo (Fig. 1a, flechas largas) y una interacción persistente de al menos 2 h (Fig. 1a, flechas cortas). Se desarrolló una herramienta automatizada que permite definir la colocalización de CAF y las células inmunitarias y determinar las trayectorias celulares con el tiempo. Se analizaron las interacciones entre células inmunitarias y CAF con el tiempo y se expresaron usando curvas de Kaplan-Meier, donde cada acontecimiento representó una pérdida de contacto entre los dos tipos de células (Fig. 1b, c). Usando este método, se determinó que la mediana de tiempo mínima de interacciones persistentes entre fibroblastos CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> puede alcanzar 14 h (Fig. 1b, Izquierda). Además, la frecuencia de interacciones persistentes entre CAF y linfocitos T representó el 20 % de los contactos totales (Fig. 1b, Derecha). Entre los genes altamente expresados por fibroblastos CAF, los inventores identificaron los ligandos TNFSF4/OX40L y PDCD1LG2/PD-L2, como actores clave en estas interacciones a largo plazo entre células del estroma e inmunitarias (Fig. 1c). De hecho, se observó que la mediana del tiempo de interacción entre CAF y linfocitos T disminuyó significativamente, tras el silenciamiento de estas moléculas en células CAF (Fig. 1c y Fig. 2 para la eficiencia de silenciamiento). La frecuencia de contactos persistentes entre CAF y linfocitos T (alrededor del 20% de los contactos totales) siguió siendo equivalente en todas las condiciones (Fig. 1d, Izquierda). Sin embargo, la duración de la retención de linfocitos T se acortó por el silenciamiento de cualquiera de OX40L o PD-L2 en fibroblastos CAF (Fig. 5d, Derecha), indicando así que los fibroblastos CAF retienen linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en su superficie a través de al menos OX40L y PD-L2.

Finalmente, los inventores también demostraron que las células del estroma CAF también podrían potenciar la supervivencia y la diferenciación de linfocitos T en T-reg CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. De hecho, las células CAF aumentaron el número total de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> y potenciaron su supervivencia. Además, el aumento en linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> totales en presencia de células CAF fue independiente de sus función pro-supervivencia, lo que indica que las células CAF no solo potencian la supervivencia de T-reg, sino que también promueven su diferenciación. Y, lo que es más importante, el silenciamiento de CD276/B7H3, NT5E/CD73 o DPP4 en fibroblastos CAF redujo significativamente el impacto de fibroblastos CAF sobre el número total de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, mientras que la inactivación de OX40L no tuvo impacto (Fig. 1f). Además, el impacto de CD73 y DPP4 sobre la activación de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> se observó estrictamente en la población FOXP3<sup>alto</sup>, mientras que B7H3 tuvo un efecto más ancho actuando sobre tanto poblaciones FOXP3<sup>med</sup> y FOXP3<sup>alto</sup> (Fig. 1e-g).

## Ejemplo 2:

### Materiales y métodos

#### Experimentos de silenciamiento usando ARN interferente pequeño (ARNip)

Para ensayos funcionales, se transfectaron cultivos primarios de CAF con un conjunto de 2 ARNip específicos: siCD276/B7H3 (n.º GS80381) y siNT5E/CD73 (n.º GS4907) o ARNip no dirigido (siCTR, control negativo de AllStarts, n.º 1027281). Todos los ARNip (FlexiTube Gene Solution siRNA n.º 1027416) y siCTR no dirigido fueron de Qiagen. Las transfecciones se llevaron a cabo a una concentración final de 20 nM usando el reactivo de transfección DharmaFECT 1 (Dharmacon, n.º T-2001-02) según las instrucciones del fabricante.

#### Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Se aislaron linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de sangre periférica de donantes sanos obtenidos del "Etablissement Français du Sang", París, banco de sangre de Saint-Antoine Crozatier a través de un convenio con el Instituto Curie (París, Francia). Brevemente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) usando Lymphoprep (STEMCELL, n.º 07861) como se describe previamente y se usaron 500 millones de CMSP para la purificación de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> por separación magnética de células (MACS) con el kit de aislamiento de T-reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> humanos

(Miltenyi Biotec, n.º 130-091-301) según las instrucciones del fabricante. La pureza de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificados se determinó por citometría de flujo.

### Cocultivo de linfocitos T con CAF e inducción de FOXP3

Para estudiar el impacto de CAF sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, se realizaron cocultivos. Se sembraron 50.000 CAF primarios en placas de 24 pocillos en DMEM complementado con 10% de FBS y se usaron ARNip no transfectado o transfectado (siCTR, siCD276/B7H3, siNT5E/CD73, siDPP4 y siTNFSF4/OX40L). El medio se sustituyó por DMEM nuevo complementado con 1% de FBS justo antes de que se añadieran 500.000 linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a CAF, o a CAF + ARNip 30 h después de la transfección. Los cocultivos de CAF y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se incubaron durante 16 h a 37 °C, 3% de O<sub>2</sub>. El control negativo fue la incubación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sin CAF. Después de la incubación, los linfocitos T se recogieron y analizaron por FACS. En resumen, los linfocitos T se incubaron con LIVE/DEAD (Thermo Fisher Scientific) durante 20 min a TA para la exclusión de células muertas. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS+ durante 10 min y se incubaron con una mezcla de anticuerpos en PBS+ que contenía anti-CD45-APC-Cy7, anti-CD3-Alexa Fluor 700 (BD Biosciences, n.º 557943), anti-CD4-APC (Miltenyi Biotec, n.º 130-092-374) y anti-CD25-PE (Miltenyi Biotec, n.º 130-091-024) durante 15 min a TA. La detección de FOXP3 se realizó usando el FOXP3 staining buffer set kit (eBioscience) para la fijación y permeabilización según las instrucciones del fabricante seguido de incubación con anti-Foxp3-Alexa Fluor 488 (eBioscience, n.º 53-4776) durante 30 min a TA. Para tinción con CD25 y FOXP3, los controles de isotipo correspondientes fueron (n.º 130-092-215 y n.º 53-4321 para CD25 y FOXP3, respectivamente). Los análisis se realizaron en el citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences) y a continuación se analizaron los datos usando FlowJo versión 9.8.1.

### Resultados

Los inventores encontraron que las células CAF del estroma de HGSOc podrían, por tanto, al igual que en el cáncer de mama, potenciar la supervivencia y la diferenciación de linfocitos T en T-reg CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. De hecho, las células CAF aumentaron el número total de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> y potenciaron su supervivencia. Además, el aumento en linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> totales en presencia de células CAF fue independiente de su función pro-supervivencia, lo que indica que las células CAF no solo potencian la supervivencia de T-reg, sino que también promueven su diferenciación. Y, lo que es más importante, el silenciamiento de CD276/B7H3 y NT5E/CD73 en fibroblastos CAF redujo significativamente el impacto de fibroblastos CAF sobre el número total de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. El impacto de CD73 y NT5E sobre la activación de linfocitos T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> se observó en la población de FOXP3<sup>alta</sup>.

### Ejemplo 3: Cálculo del porcentaje de células CAF positivas para DPP4, OX40L, CD73, PDL2 y B7H3

#### Materiales y métodos

Se analizaron secuencias de ARN de una sola célula en 96 CAF procedentes de 2 pacientes con cáncer de mama (subtipo Lum A).

Se cortaron muestras de tumor de mama humano fresco en trozos pequeños y se realizó una digestión enzimática en medio independiente de CO<sub>2</sub> (Gibco n.º 18045-054) usando 150 µg/ml de liberasa (Roche, n.º 05401020001), y 150 µg/ml de DNase I (Roche n.º 11284932001) durante 30 minutos en una estufa de incubación a 37 °C con agitación (180 rpm). A continuación, las células se filtraron con un filtro de células de 40 µm (Fisher Scientific, n.º 223635447) y se resuspendieron en PBS+ (PBS, Gibco n.º 14190; EDTA 2 mM, Gibco n.º 15575; suero humano 1%, BioWest n.º S4190-100). Las células se tiñeron usando un conjunto de anticuerpos primarios 15 min a temperatura ambiente en PBS+. Se añadió DAPI 3 mM (ThermoFisher scientific n.º D1306) justo antes del análisis de citometría de flujo. Las suspensiones de células se clasificaron en BD FACS Aria.

Las células CAF se recogieron después de la clasificación por FACS en tubos libres de RNasa previamente recubiertos con medio independiente de CO<sub>2</sub> complementado con 15% de suero. Se obtuvieron de dos muestras de cáncer de mama frescas, haciéndose cada experimento (digestión, clasificación, captura y síntesis de ADNc) en días diferentes.

Las células se diluyeron con reactivo de suspensión Fluidigm (4:1) y a continuación se cargaron directamente en una matriz cebada de 17-25 µm C1 Single-Cell auto prep para la secuenciación de ARNm (Fluidigm, n.º 100-5761). La captura de células, lisis, transcripción inversa y amplificación de ADNc se hicieron en un Fluidigm C1 con un kit SMARTer Ultra Low input RNA para el sistema Fluidigm C1 (Clontech, n.º 634833, Fluidigm n.º 100-6201) según los protocolos de los fabricantes. La captura de una sola célula se comprobó manualmente con un microscopio Leica, la calidad del ADNc se comprobó en un LabChip GX (PerkinElmer) y solo el ADNc de buena calidad de células individuales se procesó adicionalmente para la preparación de la biblioteca de ADNc usando el kit de preparación Nextera XT (Illumina). La secuenciación y los análisis adicionales se hicieron en todos los datos, reuniéndose células individuales de los dos tumores. Se secuenciaron muestras en una celda de flujo de ejecución rápida de HiSeq 2500 (Illumina) con una profundidad de secuenciación promedio de 9 millones de lecturas de extremos emparejados. La longitud de las lecturas fue de 100 pb. Las lecturas se mapearon en el genoma humano de referencia (hg19/GRCh37 de UCSC genome release) usando el algoritmo Tophat 2.0.6 con los siguientes parámetros: alineación global, sin desapareamiento en la alimentación de semillas (de tamaño 22), 3 desapareamiento en la longitud de lectura. El



control de calidad se realizó usando el software FastQC. La cuantificación de la expresión en el nivel tanto génico como de transcrito se hizo usando HTSeq-count y featureCounts (implementado en Bioconductor R package Rsubread). Solo los genes con al menos una lectura en al menos una muestra se mantuvieron para los análisis adicionales. La normalización se realizó usando el método implementado en el paquete DESeq2 R.

El porcentaje de células positivas se calculó para cada gen como la relación entre el número de células con log-expresión normalizada superior a 3 y el número total de células.

## Resultados

Basándose en los datos de la secuencia de ARN de una sola célula (véase la Figura 4), se estableció el porcentaje de células DPP4<sup>+</sup>, OX40L<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, PDL2<sup>+</sup> y B7H3<sup>+</sup>.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: CAF DPP4<sup>+</sup>: 19 células de entre 96 con expresión de DPP4 superior a 3, es decir, 20%, CAF OX40L<sup>+</sup>: 17 células de entre 96 con expresión de OX40L superior a 3, es decir, 18%, CAF CD73<sup>+</sup>: 46 células de entre 96 con expresión de NT5E superior a 3, es decir, 48%, CAF PDL2<sup>+</sup>: 9 células de entre 96 con expresión de PDCD1LG2 superior a 3, es decir, 9% y CAF B7H3<sup>+</sup>: 31 células de entre 96 con expresión de CD276 superior a 3, es decir, 32%.

## Ejemplo 4:

### Materiales y métodos

Se recuperaron RNA-Seq de 28 tumores de melanoma pretratamiento (pembrolizumab y nivolumab) (repondedores, n=15; no respondedores, n=13) de Gene Expression Omnibus (GEO) con el número de acceso GSE78220<sup>1</sup>. Los pacientes respondedores incluyeron respuestas completas o parciales a la terapia anti-PD-1, mientras que los pacientes no respondedores se definieron por pacientes que tenían enfermedad progresiva.

Los distintivos de CAF-S1 y CAF-S4 se recuperaron de Costa et al. <sup>2</sup>. Se seleccionaron los 15 primeros genes regulados por incremento en CAF-S1 y regulados por incremento en CAF-S4 y se calculó la media geométrica y se usó para comparar respondedores y no respondedores. Basándose en los datos de RNA-Seq de una sola célula obtenidos en 3000 células CAF-S1 usando la tecnología 10X Genomics Chromium, se identificaron 6 subpoblaciones de CAF-S1 (denominadas las subpoblaciones 0 a 5) (manuscrito en preparación). Se estableció una puntuación para cada grupo de CAF-S1 calculando la media geométrica de los 20 primeros genes regulados por incremento específicamente en cada grupo.

Se evaluó la expresión diferencial entre respondedor y no respondedor usando la prueba de la *t* de dos muestras de Welch. El valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo.

## Resultados

Se analizaron datos transcriptómicos de 28 melanomas pretratamiento que se sometieron a la terapia de inhibición del punto de control anti-PD-1<sup>1</sup>. Se evaluaron diferencias entre pacientes no respondedores (n=13) y respondedores (n=15) para los genes que caracterizan la inmunosupresión mediada por CAF, así como para genes que codifican PD-1, PD-L1, PD-L2 y genes implicados en la respuesta inmunitaria citotóxica (Figura 5). Es interesante señalar que solo los marcadores de CAF mostraron una expresión en exceso significativa en pacientes no respondedores (FAP:  $p=0,04$ ; DPP4:  $p=0,03$ ; JAM2:  $p=0,01$ ). Se investigó si las dos subpoblaciones de CAF activadas (CAF-S1 y CAF-S4) descritas en Costa et al.<sup>2</sup> podrían ser predictivas de la respuesta a inmunoterapia. Los resultados mostraron que solo el distintivo génico representativo del subconjunto de CAF-S1 inmunosupresor era predictivo de la respuesta de inmunoterapia mientras que no se observaron diferencias entre tumores respondedores y no respondedores en el subconjunto de CAF-S4. Para ir más allá, la heterogeneidad dentro del subconjunto de CAF-S1 inmunosupresor se evaluó por RNA-Seq de una sola célula y se identificaron seis agrupaciones (denominadas la subpoblación 0 con la subpoblación 5). Los resultados mostraron que las 2 subpoblaciones entre las 6 fueron significativamente predictivas de la respuesta a inmunoterapia, la subpoblación 1 y 3 (Figura 6). Puesto que los marcadores de CAF-S1 y 4 están presentes en los tumores más agresivos y en pacientes resistentes a inmunoterapia, estos marcadores deben relacionarse de inmediato con un mal pronóstico.

## Referencia

- 1- Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, Berent-Maoz B, Pang J, Chmielowski B, Cherry G, Seja E, Lomeli S, Kong X, Kelley MC, Sosman JA, Johnson DB, Ribas A, Lo RS. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. Cell. 2016 Mar 24;165(1):35-44.
- 2- Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, Sirven P, Magagna I, Fuhrmann L, Bernard C, Bonneau C, Kondratova M, Kuperstein I, Zinovyev A, Givel AM, Parrini MC, Soumelis V, Vincent-Salomon

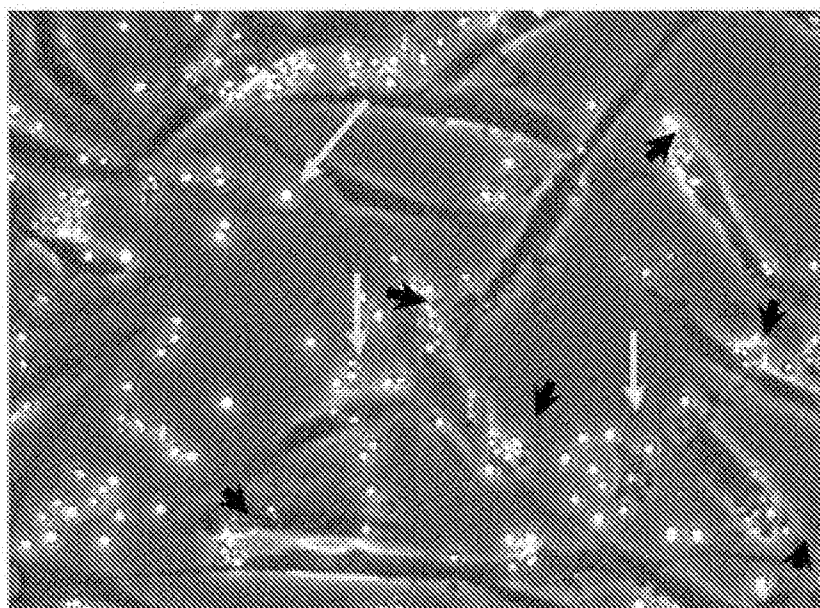
A, Mehta-Grigoriou F. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. Cancer Cell. 2018 Mar 12;33(3):463-479.e10.

# REIVINDICACIONES

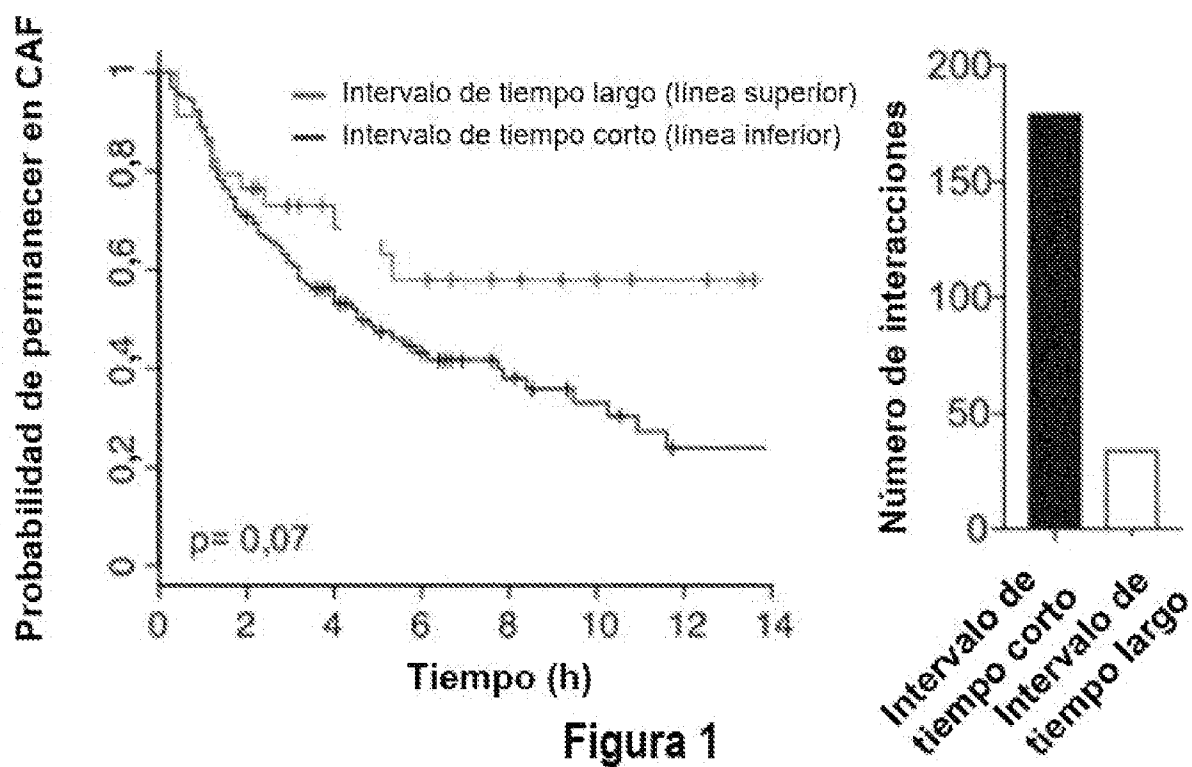
1. Un método *in vitro* de selección de un paciente afectado con un tumor sólido para un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, en donde el método comprende:
  - (a) detectar CAF (fibroblasto asociado al cáncer) DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;
  - (b) determinar el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario es inversamente proporcional al nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en la muestra de cáncer;
  - (c) seleccionar pacientes con nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a su nivel de referencia como adecuados para un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, y/o seleccionar pacientes con un nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> superior a su nivel de referencia para un tratamiento del cáncer que excluye el inhibidor del punto de control inmunitario.
2. Un método *in vitro* de predicción de la respuesta de un sujeto afectado con un tumor sólido a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, en donde el método comprende:
  - (a) detectar CAF (fibroblasto asociado al cáncer) DPP4<sup>+</sup> en una muestra de cáncer de dicho paciente;
  - (b) determinar el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario es inversamente proporcional al nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en la muestra de cáncer;
  - (c) comparar el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer con el nivel de referencia, en donde nivel inferior a su nivel de referencia es predictivo de la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, y/o nivel superior a su nivel de referencia es predictivo de la ineficacia o menor eficacia de un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario en el cáncer de dicho paciente.
3. El método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además:
  - (a) detectar CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer de dicho paciente, y
  - (b) determinar el nivel de CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> en dicha muestra de cáncer, en donde la sensibilidad de dicho paciente a un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario es inversamente proporcional a los niveles de CAF DPP4<sup>+</sup>, y: CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> en la muestra de cáncer,
  - (c) seleccionar pacientes con nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> y: CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> inferior a su nivel de referencia como adecuados para un tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario, y/o seleccionar pacientes con un nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> y: CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> superior a su nivel de referencia para un tratamiento del cáncer que excluye el inhibidor del punto de control inmunitario.
4. Un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso en el tratamiento de un cáncer sólido en un paciente en donde el paciente se ha seleccionado para el tratamiento por un método según la reivindicación 1 o 3, y en donde el paciente presenta en una muestra de cáncer:
  - (a) ningún CAF DPP4<sup>+</sup>; o
  - (b) nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> inferior a su nivel de referencia.
5. El inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 4, en donde el paciente presenta además en una muestra de cáncer:
  - (a) ningún CAF CD73<sup>+</sup>, y/o ningún CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o ningún CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o ningún CAF JAM2<sup>+</sup>, o
  - (b) nivel(es) de CAF CD73<sup>+</sup>, y/o CAF B7H3<sup>+</sup>, y/o CAF OX40L<sup>+</sup>, y/o CAF JAM2<sup>+</sup> inferior(es) a su nivel de referencia.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 4 o 5, en donde el inhibidor del punto de control se selecciona del grupo que consiste en terapias anti-CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), inhibidores de PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada), inhibidores de PDL1 (ligando de muerte celular programada), inhibidores de LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos), inhibidores de TIM-3 (inmunoglobulina de linfocitos T y 3 que contiene dominio de mucina), inhibidores de TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM), inhibidores de BLTA (atenuador de linfocitos B y T), inhibidores de IDO1, o una combinación de los mismos.
7. El método o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 6, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) o un inhibidor de PDL1 (ligando de muerte celular programada).
8. El método o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 6 o 7, en donde la terapia anti-CTLA-4 es ipilimumab, el inhibidor de PD-1 es nivolumab, pembrolizumab o BGB-A317, el inhibidor de PDL1 es atezolizumab, avelumab o durvalumab, el inhibidor de LAG-3 es BMS-986016, el inhibidor de IDO1 es epacadostat.

9. El método de selección de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6-8, o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde el nivel de CAF DPP4<sup>+</sup> es el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> en la muestra de cáncer y el nivel de referencia es el porcentaje de referencia.
- 5 10. El método de selección de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6-8, o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde el porcentaje de CAF DPP4<sup>+</sup> en la muestra de cáncer se calcula como el porcentaje células de CAF DPP4<sup>+</sup> con respecto al número total de células en la muestra de cáncer.
- 10 11. El método de selección de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6-10, o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el cáncer sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, osteosarcoma, melanoma, cáncer hipofaríngeo, cáncer de esófago, cáncer endometrial, cáncer de cuello uterino, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de colon o
- 15 colorrectal, tumores neuroendocrinos, cáncer de músculo, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer uterino, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pediátrico.
12. El método de selección de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6-10, o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el cáncer sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer pancreático y cáncer pediátrico.
- 20 13. El método de selección de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6-10, o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el cáncer es un cáncer de ovario, preferentemente un cáncer de ovario mesenquimatoso, en particular cáncer de ovario de gran malignidad del tipo seroso.
- 25 14. El método de selección de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6-10, o el inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el cáncer es un cáncer de mama, preferentemente un cáncer de mama invasivo y/o su metástasis, en particular metástasis axilares.
- 30

**A**



**B**



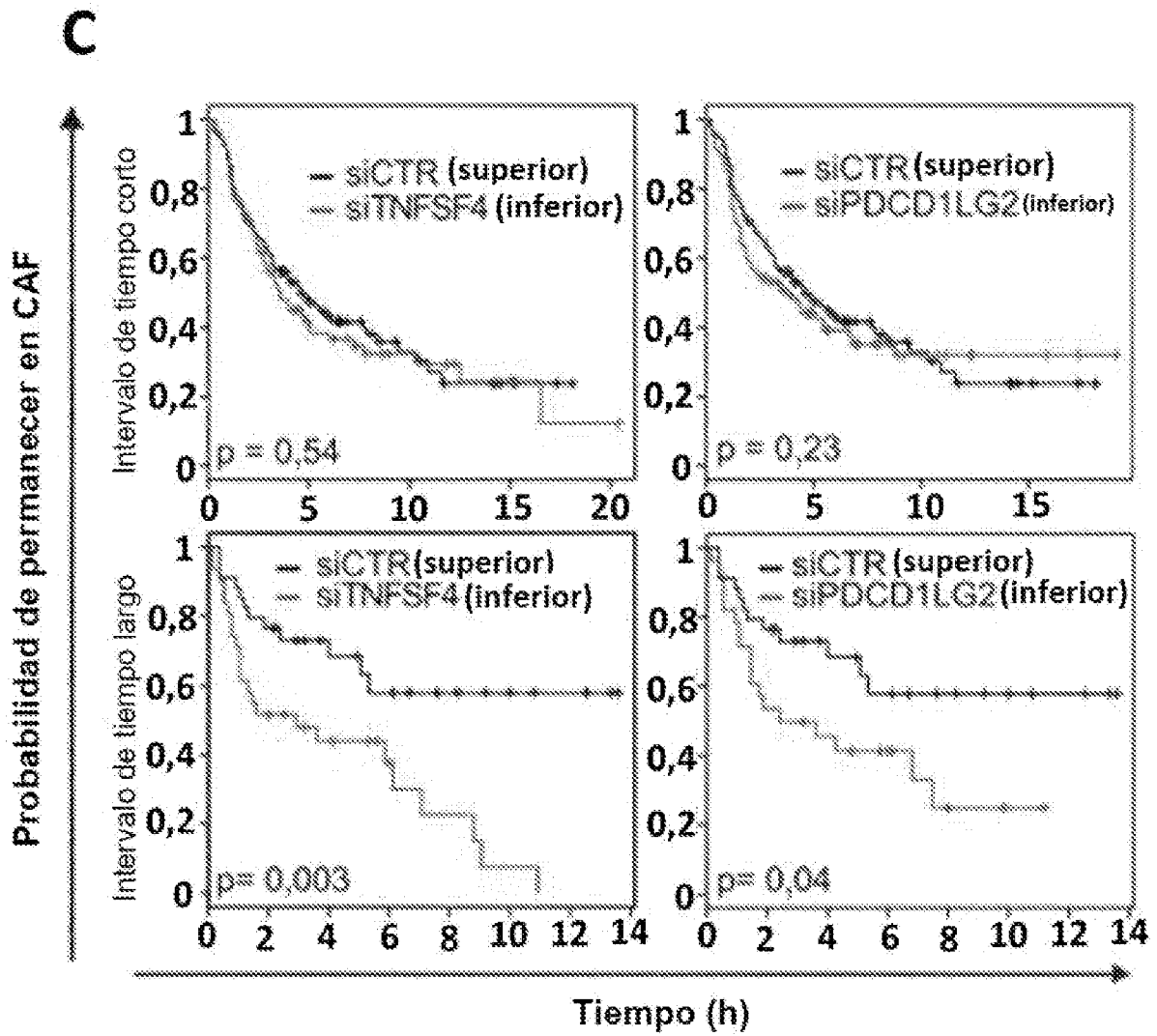
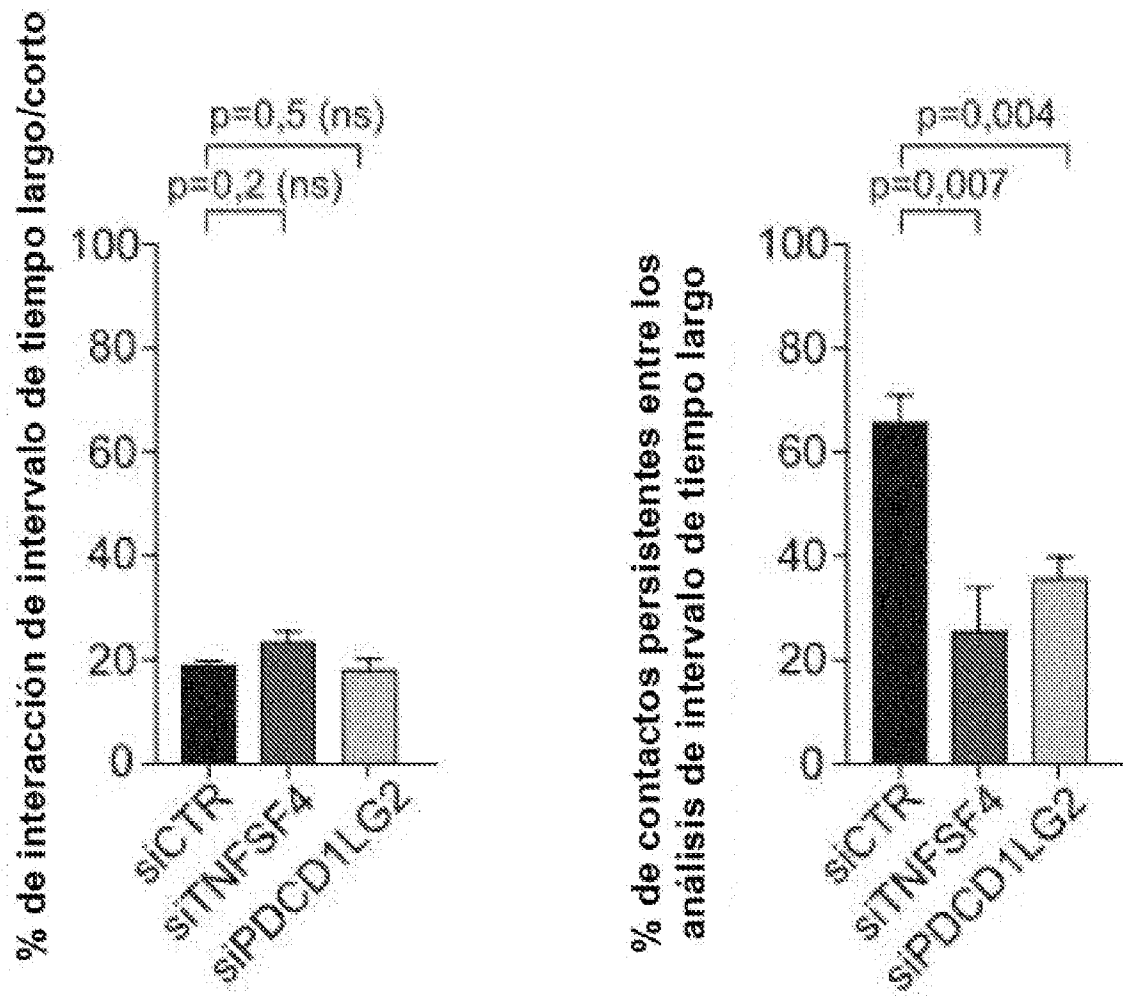


Figura 1 (continuación)

**D**



**Figura 1 (continuación)**

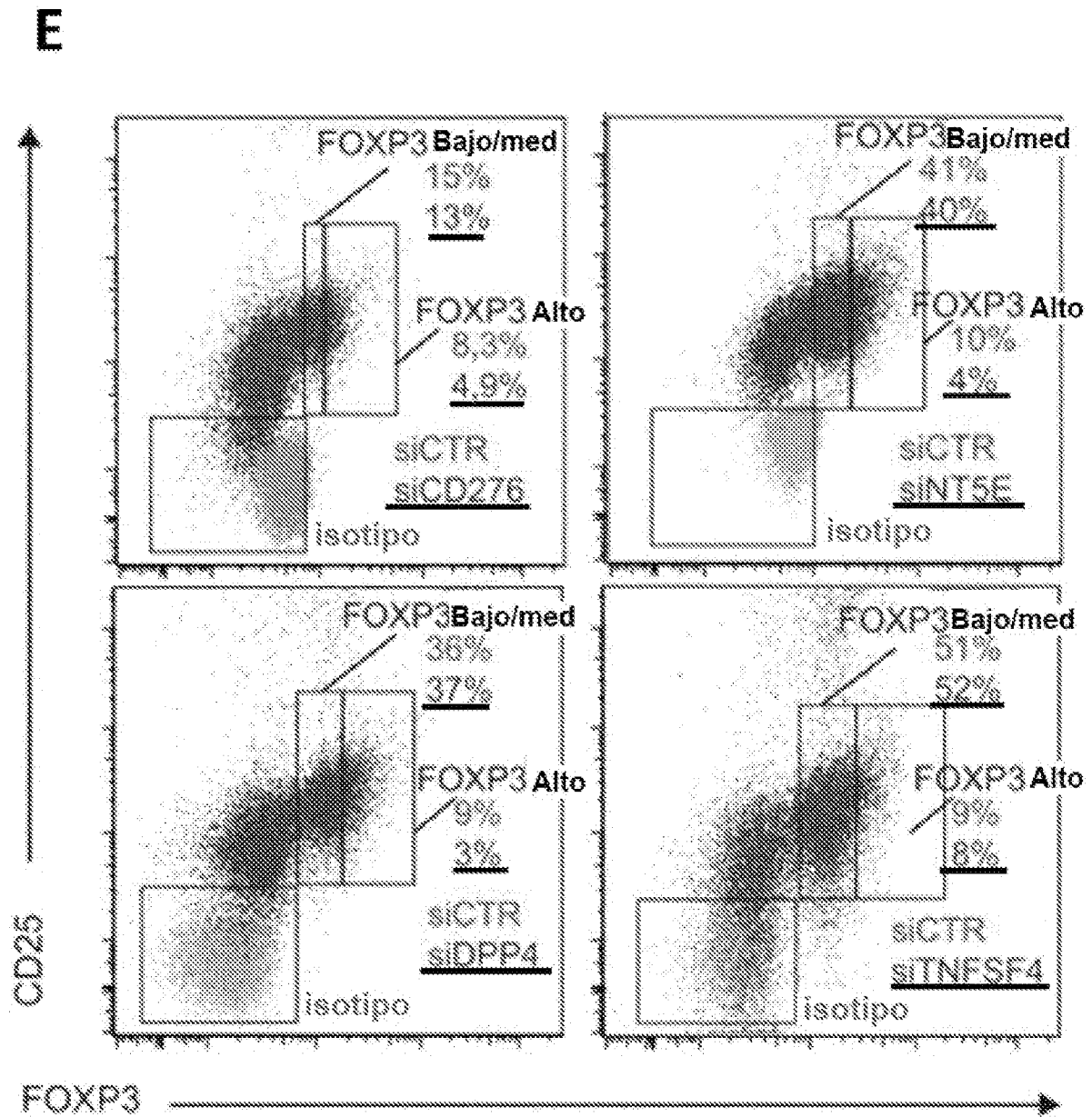
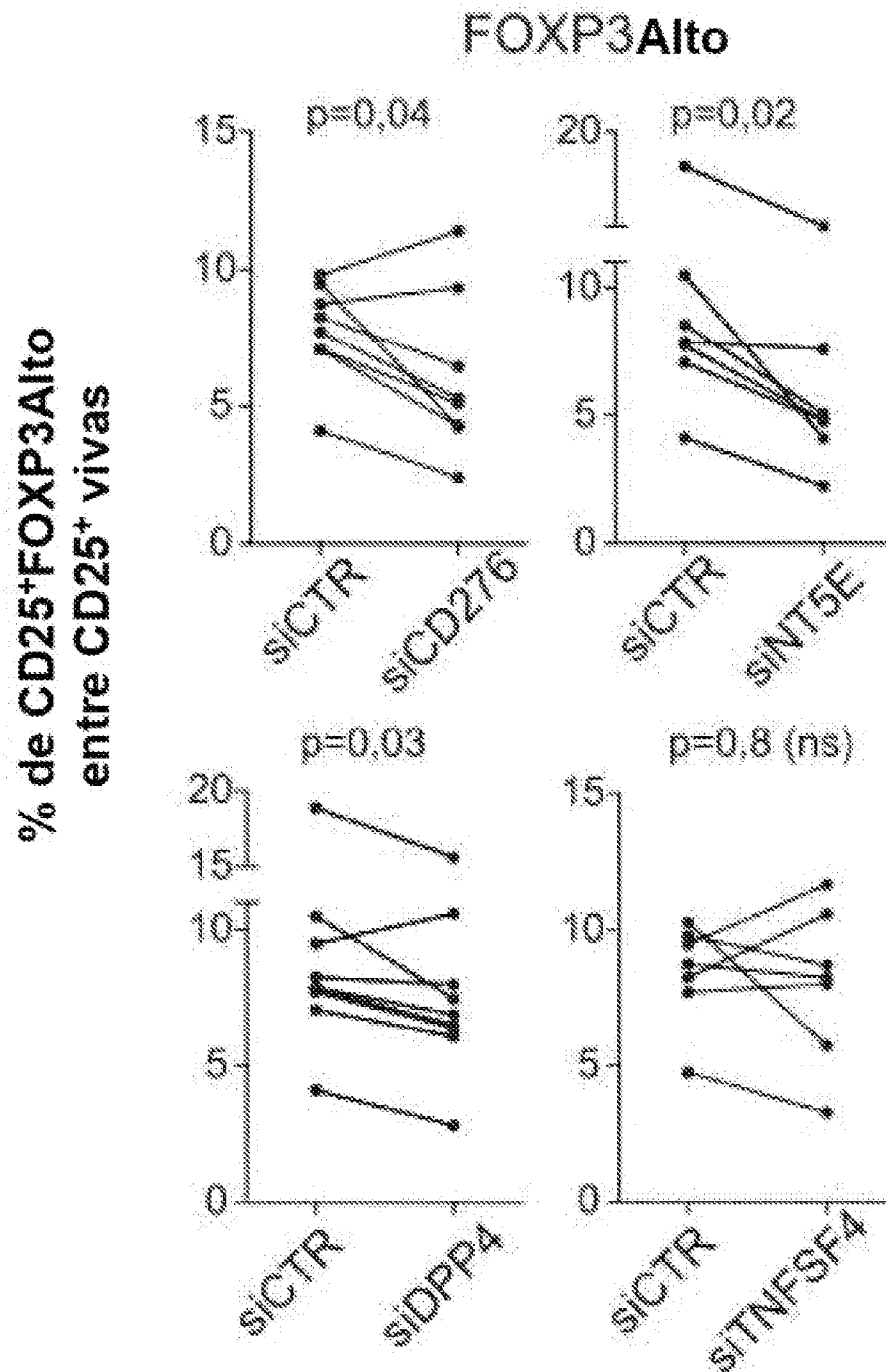


Figura 1 (continuación)



**F**

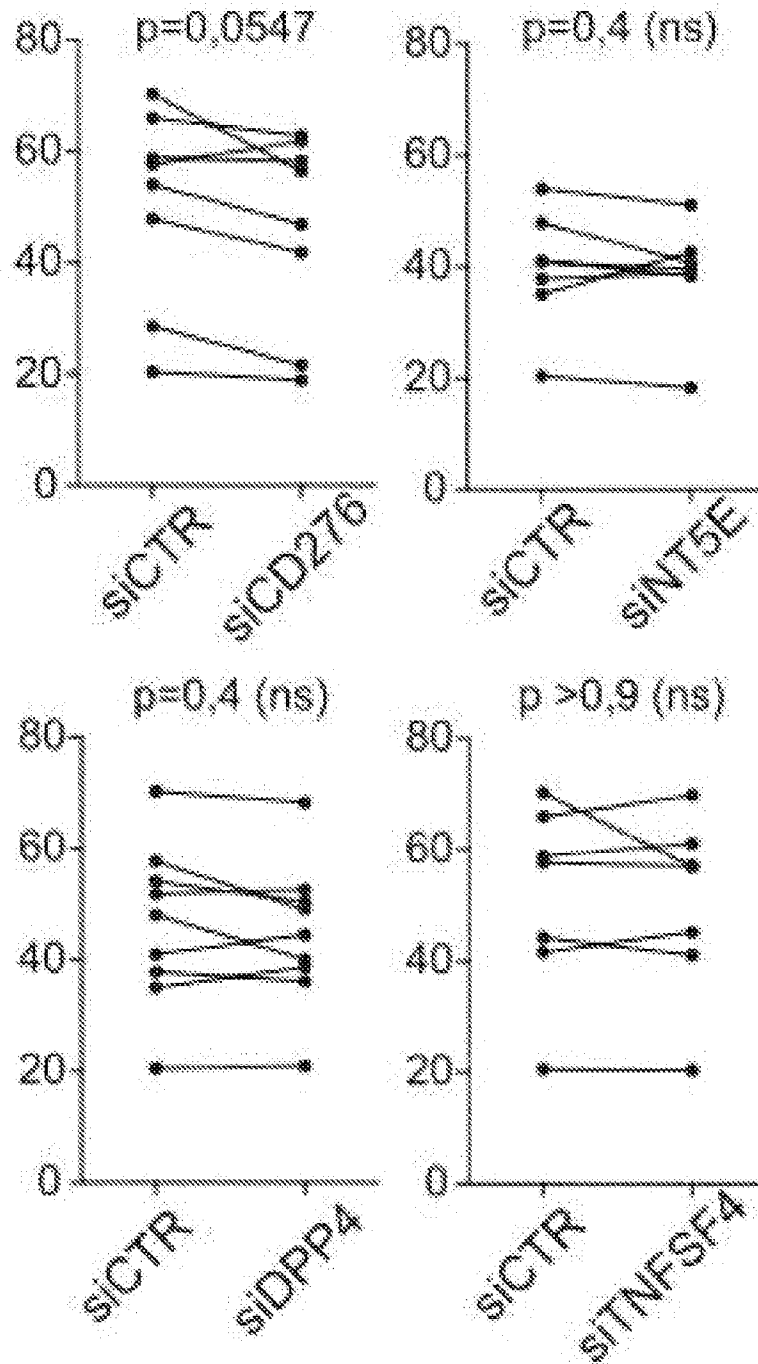


**Figura 1 (continuación)**

**G**

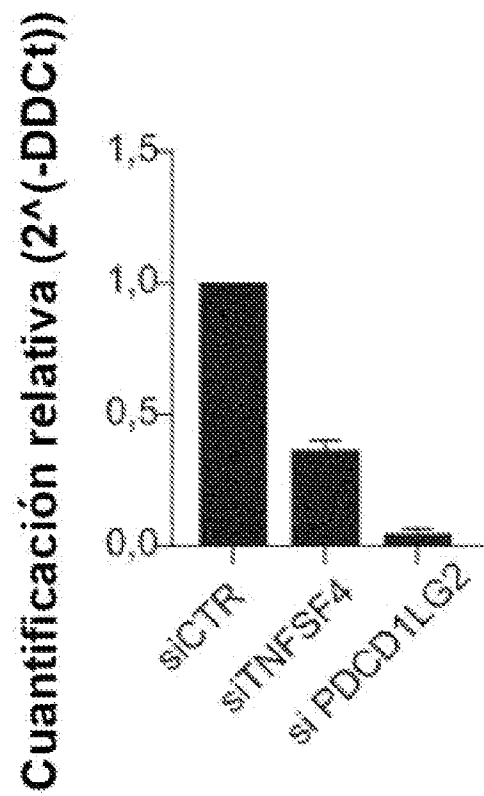
% de CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>Bajo</sup>/Med  
entre CD25<sup>+</sup> vivas

**FOXP3<sup>Bajo</sup>/Med**

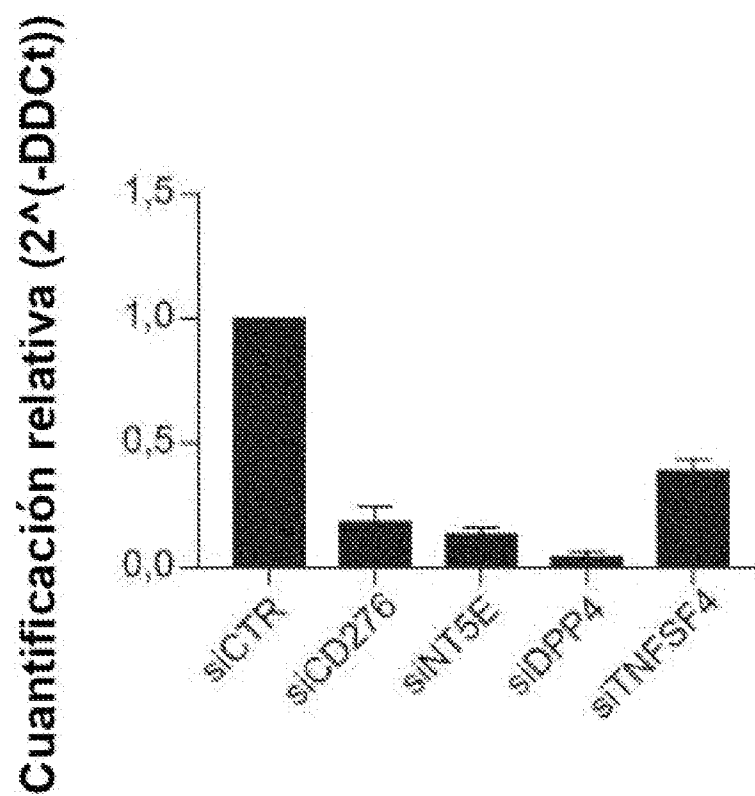


**Figura 1 (continuación)**

**A**

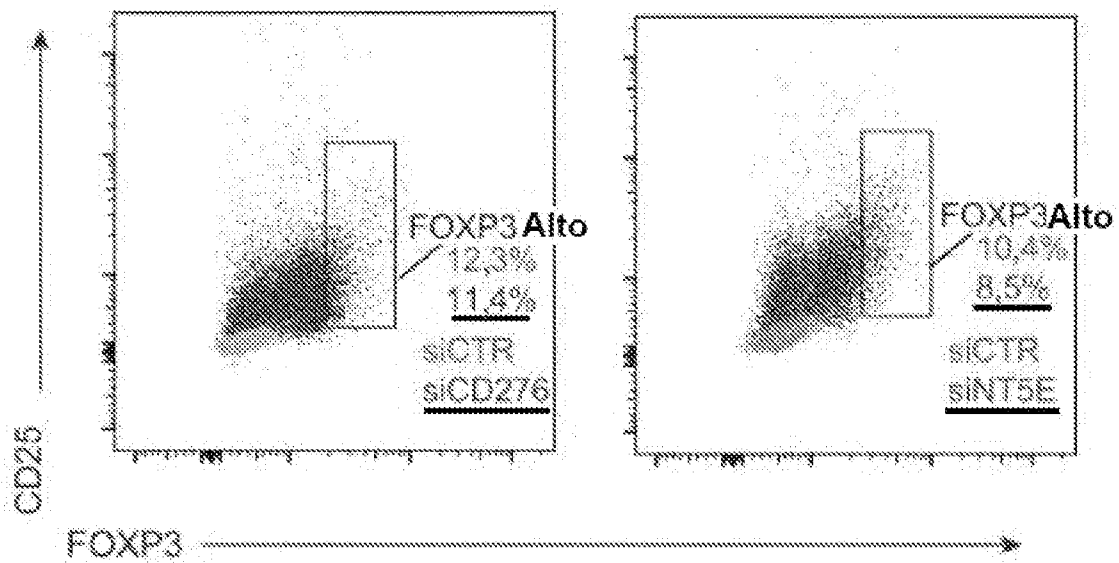


**B**

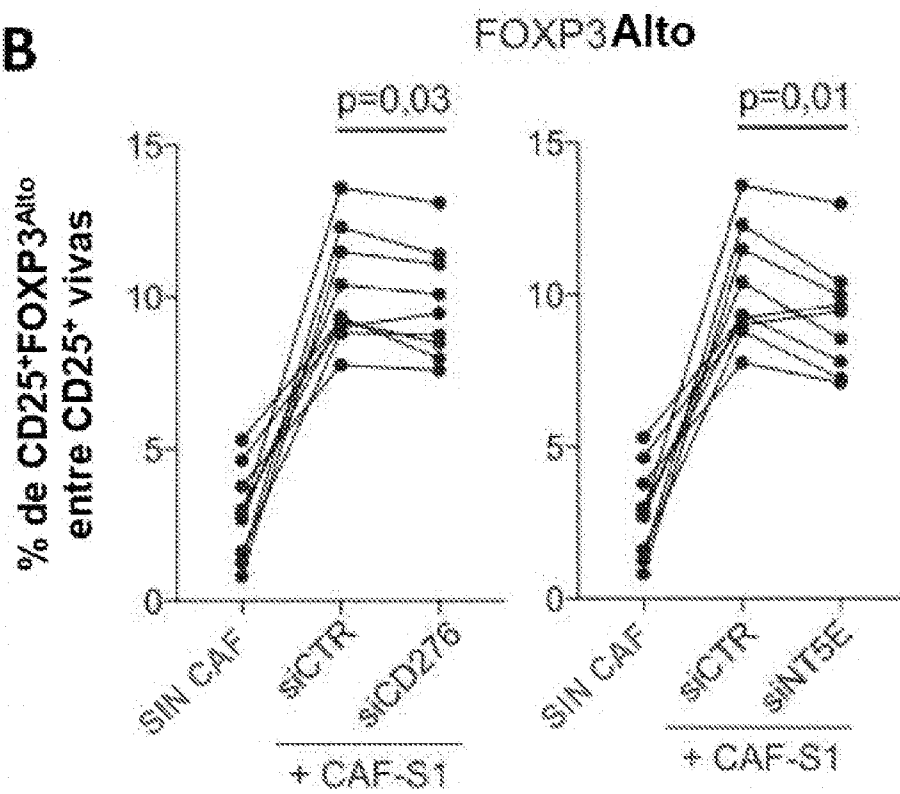


**Figura 2**

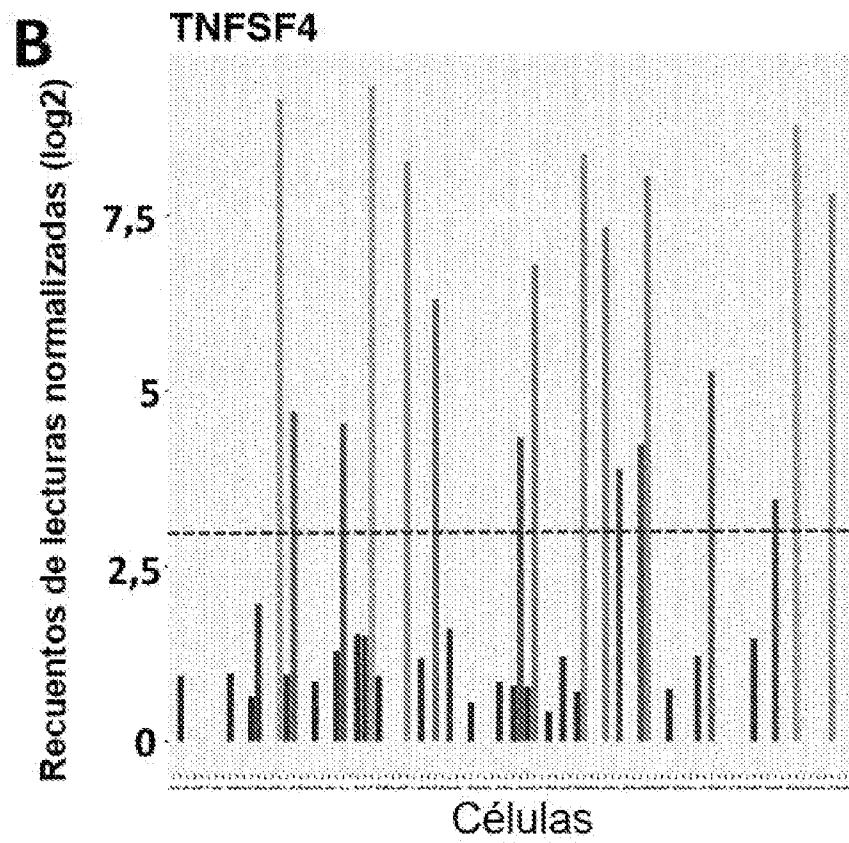
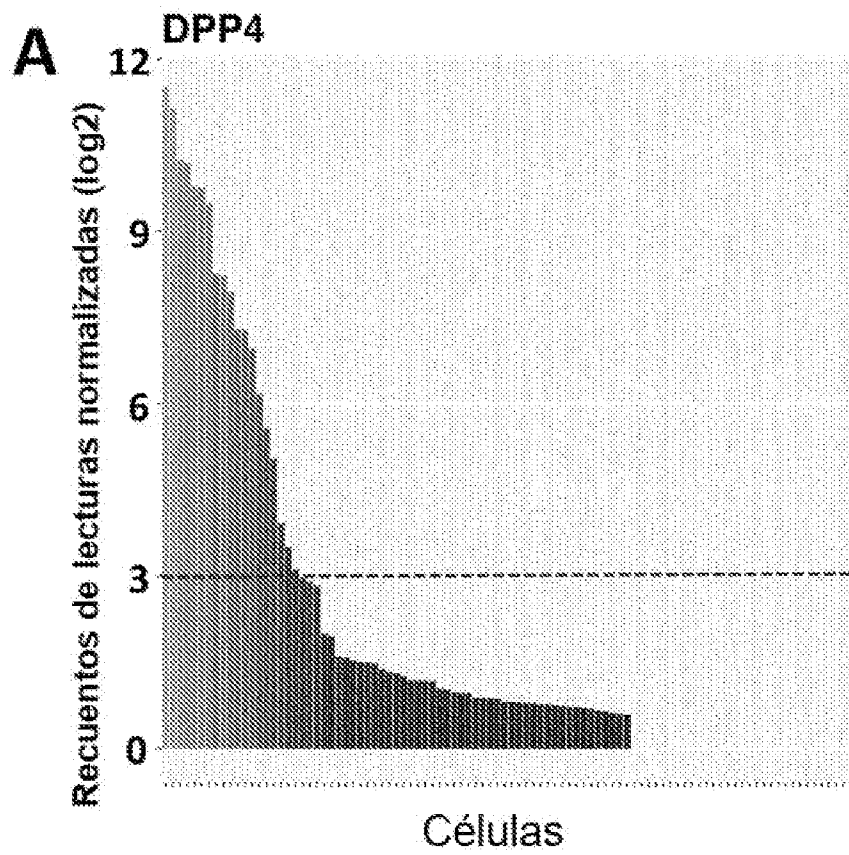
**A**



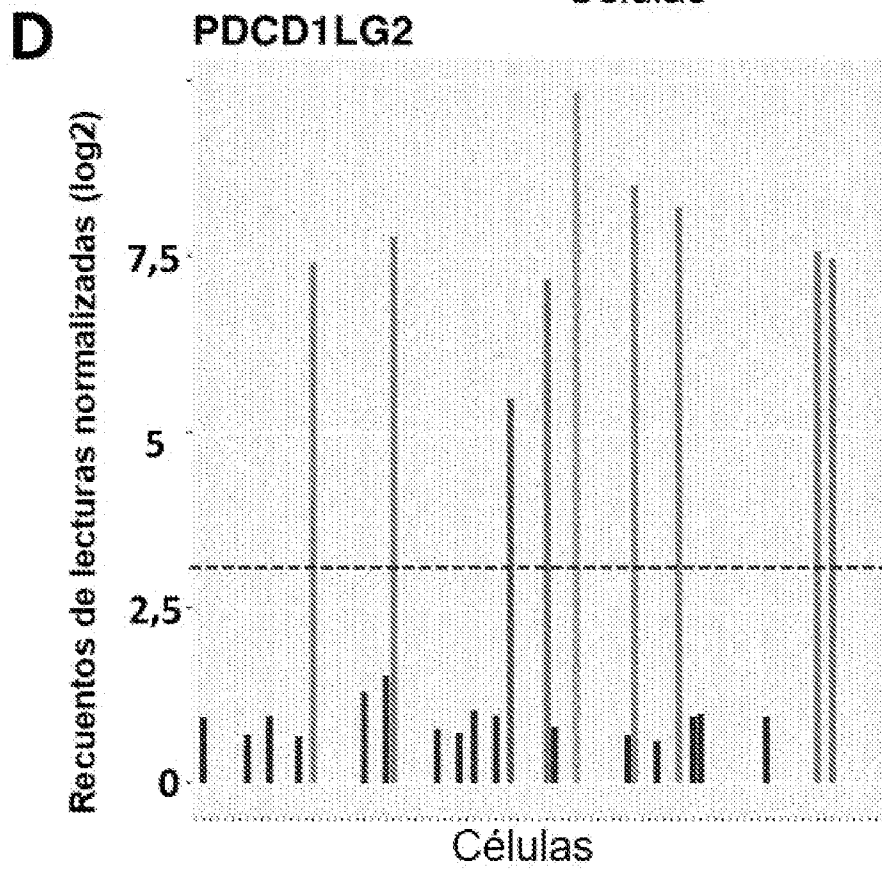
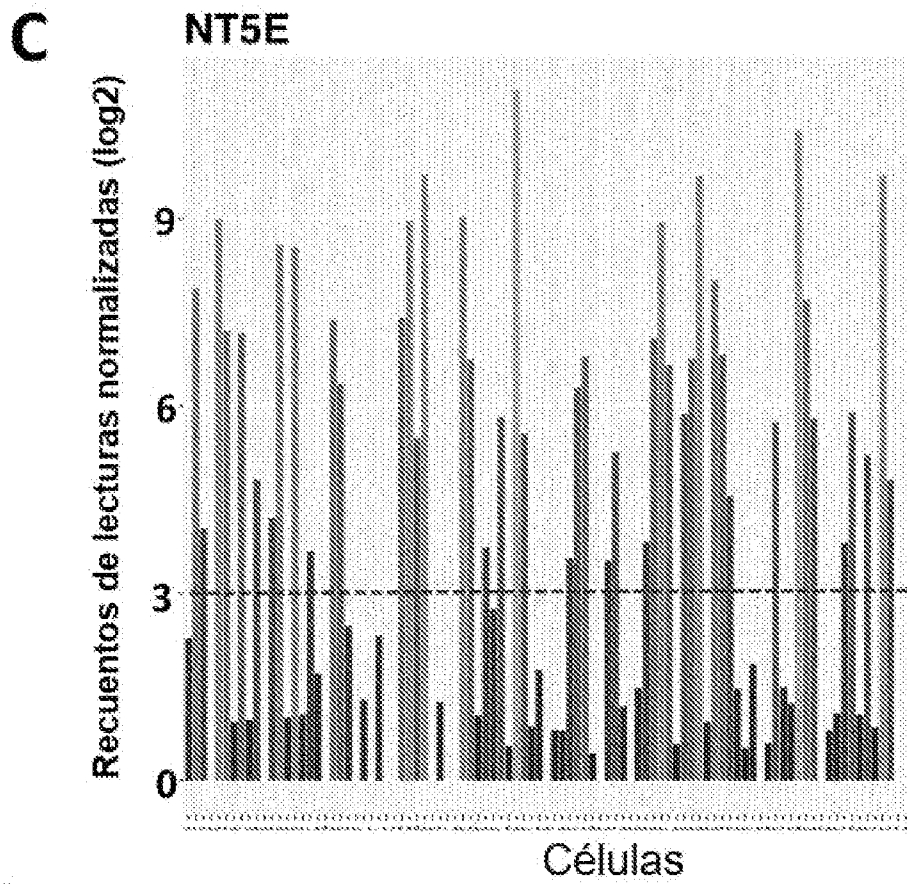
**B**



**Figura 3**

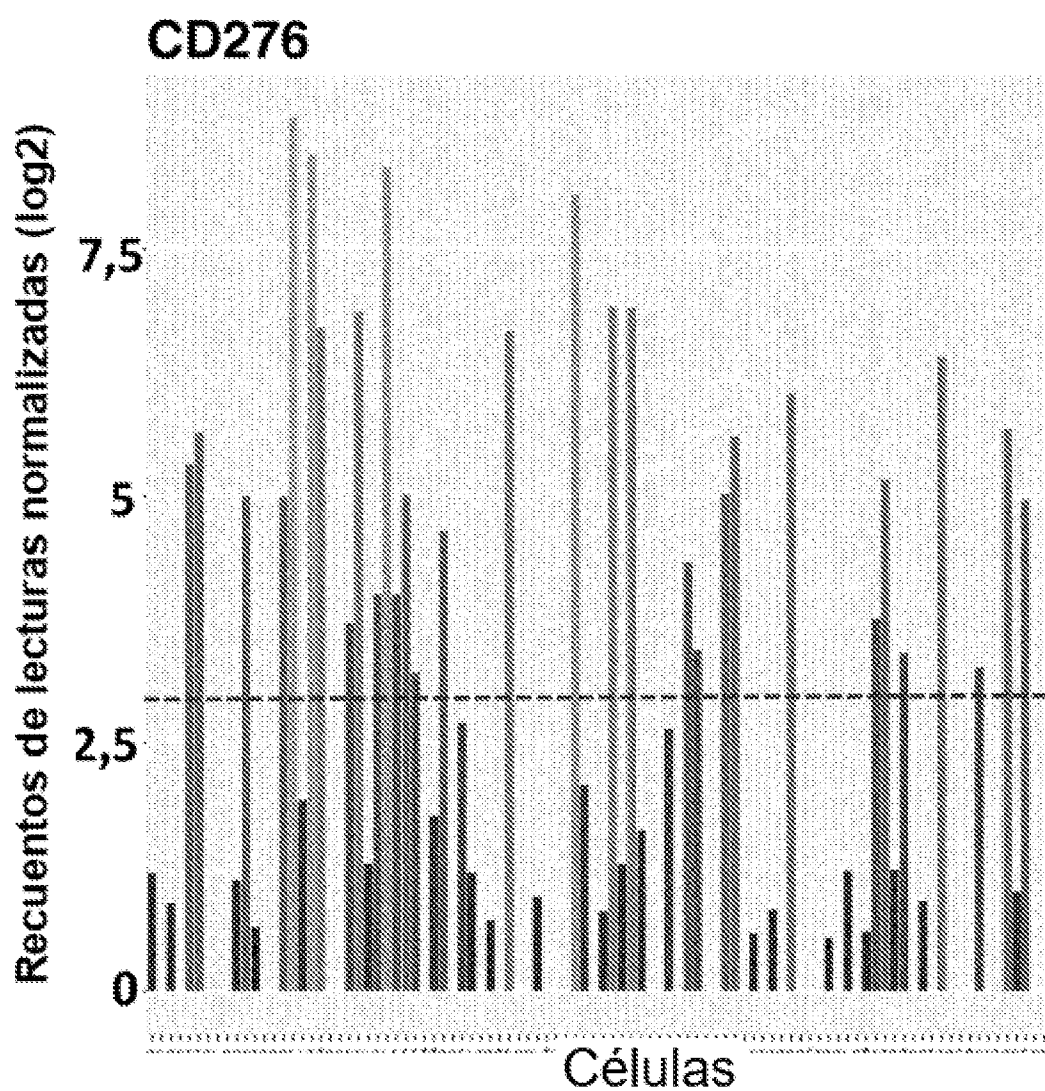


**Figura 4**



**Figura 4 (continuación)**

**E**



**Figura 4 (continuación)**

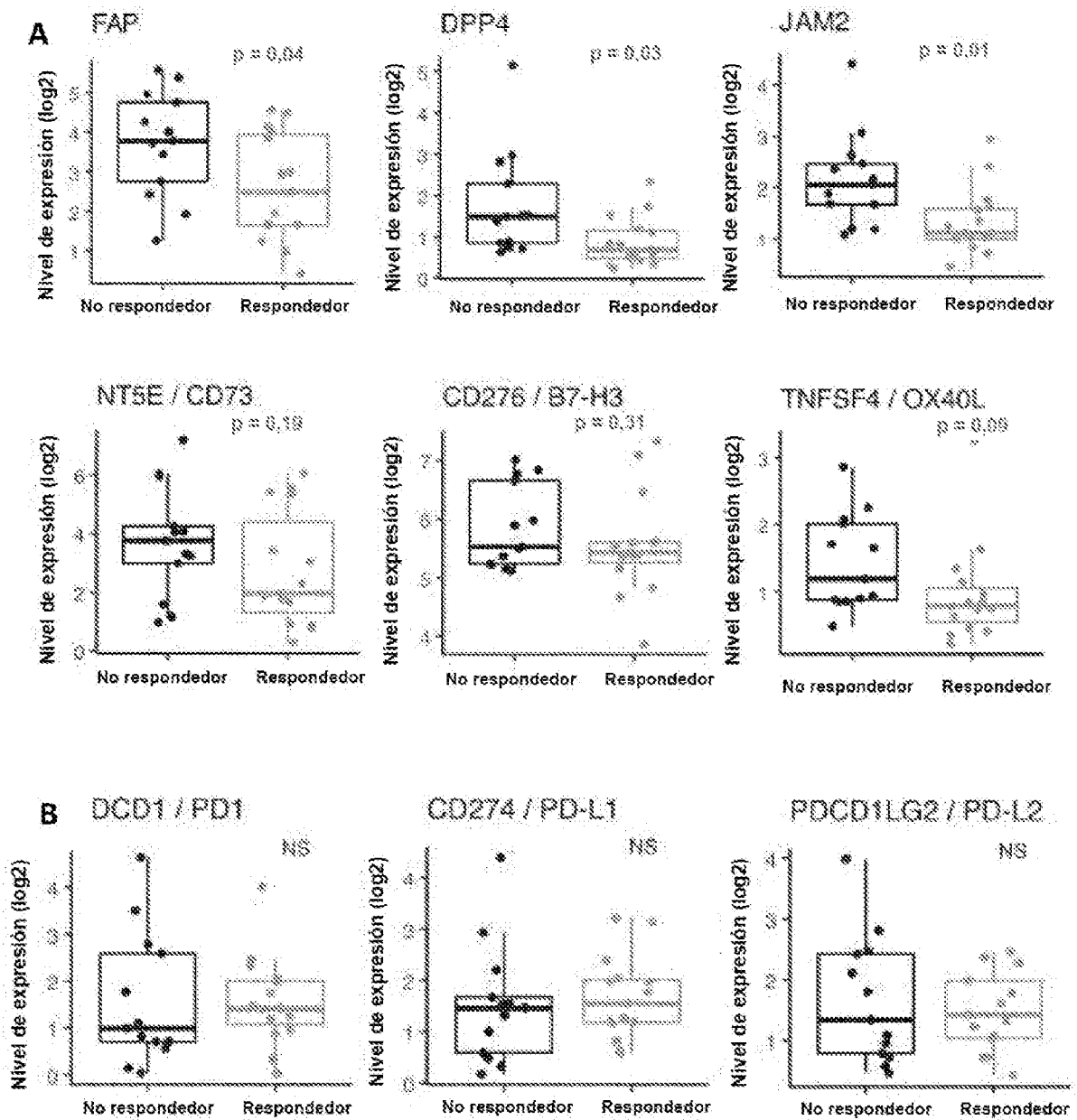
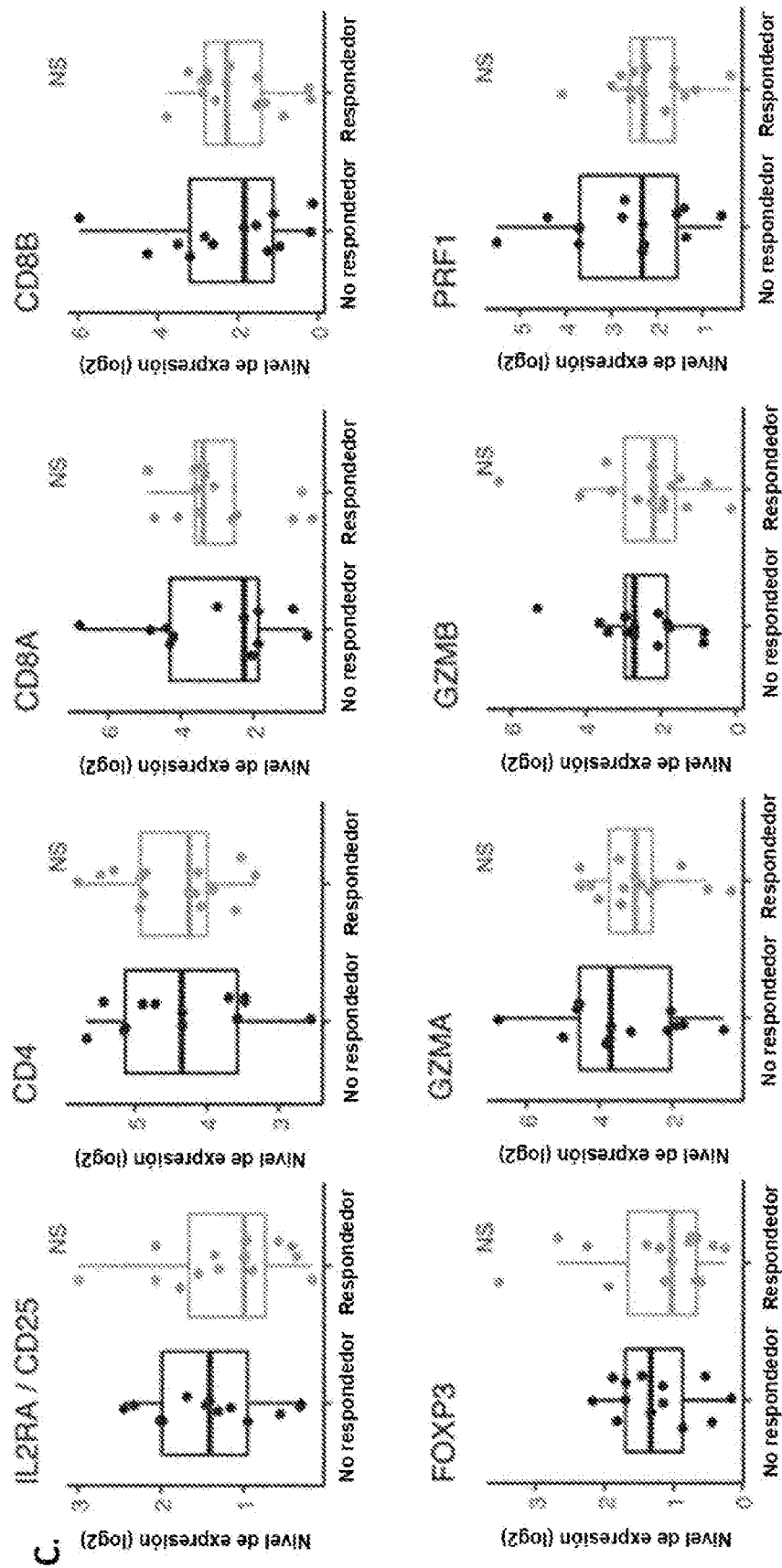
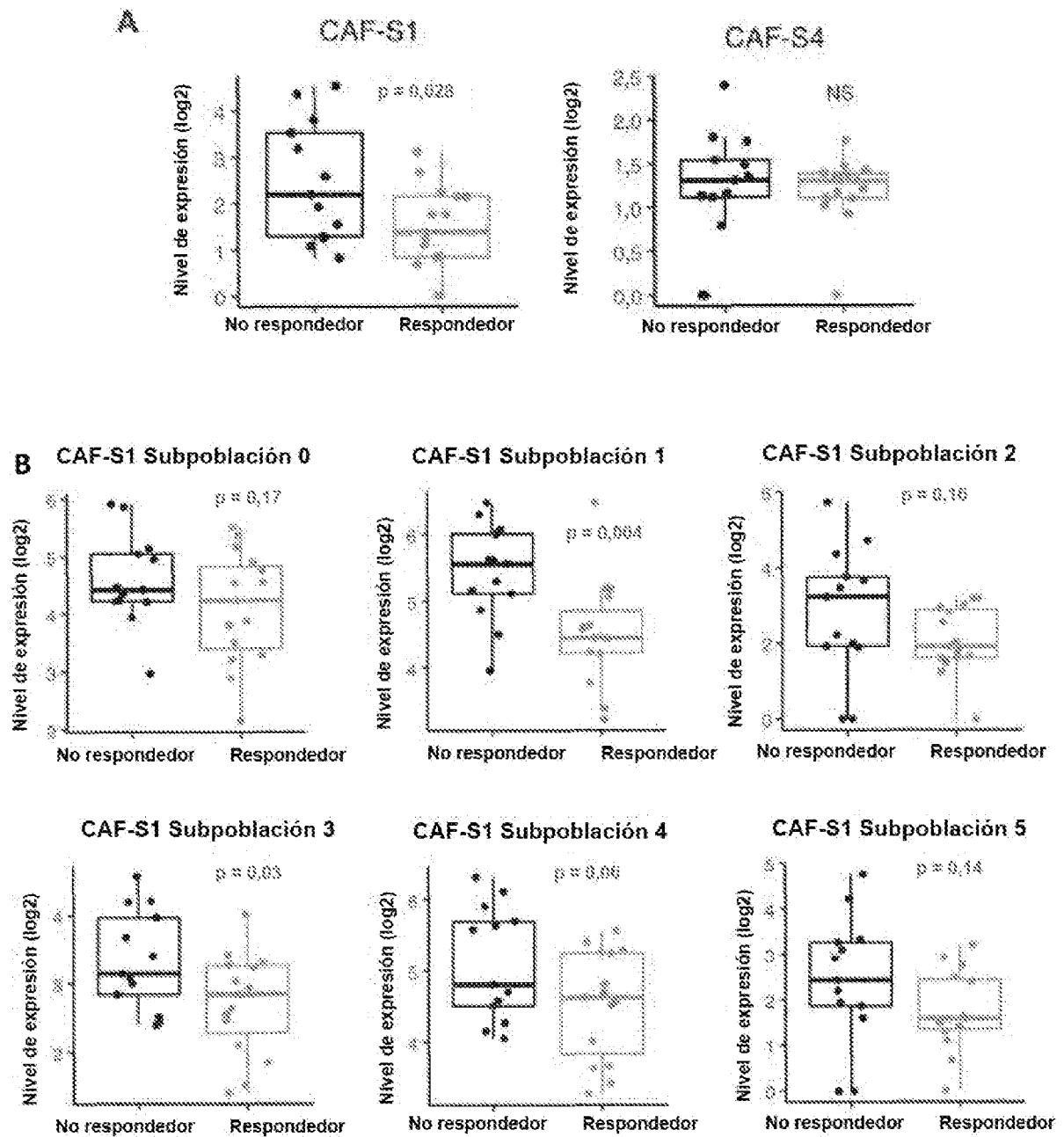


Figura 5





**Figura 5 (continuación)**



**Figura 6**