

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 219**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016** **PCT/US2016/058281**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017** **WO17070585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016** **E 16858377 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3365063**

54 Título: **Método de puntuación de una muestra que comprende tejido tumoral**

30 Prioridad:

**23.10.2015 US 201562245858 P**  
**24.11.2015 US 201562259319 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**24.09.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BORDEAUX, JENNIFER;**  
**DAKAPPAGARI, NAVEEN;**  
**TRAN, THAI;**  
**LITTLE, BRIAN y**  
**KIM, JU YOUNG**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 979 219 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de puntuación de una muestra que comprende tejido tumoral

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

## ANTECEDENTES

10 [0001] La presente invención se refiere a un método para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con cáncer. En el documento WO2015/088930 se describen métodos de puntuación de tejido tumoral en los que las imágenes se analizan mediante un método aleatorio de obtención de muestras de las regiones de interés.

## RESUMEN

15 [0002] La invención se refiere a un método para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con cáncer, que comprende: (i) usar la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células, donde un primer miembro del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo miembro del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y (ii) registrar la puntuación, donde dicha puntuación, al compararla con un valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a inmunoterapia, en donde el paso de determinación comprende: (a) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (b) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador un margen suficiente para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador; y (c) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial; donde el paso (b) comprende i. generar una máscara de todas las células que dan positivo para el primer biomarcador; y ii. dilatar la máscara de todas las células que dan positivo para el primer biomarcador para generar una máscara dilatada representativa de una proximidad predeterminada dentro de la cual puede encontrarse una célula con interacción que da positivo para el segundo biomarcador.

40 [0003] En algunas formas de realización, el paso (c) del método comprende además i. generar una máscara de todas las células que dan positivo para el segundo biomarcador; ii. combinar la máscara de todas las células que dan positivo para el segundo biomarcador y la máscara dilatada para generar una máscara de interacción que identifica células que dan positivo para el segundo biomarcador y están dentro de la proximidad predeterminada de una célula que da positivo para el primer biomarcador; y iii. usar la máscara de interacción para generar un compartimento de interacción de todas las células de todos los campos de visión seleccionados que expresan el segundo biomarcador ubicadas proximalmente a las células que expresan el primer biomarcador; en donde un área total del compartimento de interacción es la primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células comprende una célula tumoral y el segundo miembro del al menos un par de células comprende una célula no tumoral. En algunas formas de realización, la célula no tumoral comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el primer y segundo miembros del al menos un par de células comprenden células inmunitarias. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células comprende una célula tumoral, una célula mieloide o una célula estromal y el segundo miembro del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, la célula tumoral, la célula mieloide o la célula estromal expresa PD-L1 y la célula inmunitaria expresa PD-1. En algunas formas de realización, la proximidad espacial se evalúa en una escala de píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial entre el al menos un par de células varía de aproximadamente 1 píxel a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial entre el al menos un par de células varía de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . El paso de determinación comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde la selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador un margen suficiente para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las

señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, cada uno de los marcadores de fluorescencia se dirige a un biomarcador específico. En algunas formas de realización, la pluralidad de marcadores de fluorescencia comprende un primer marcador de fluorescencia para el primer biomarcador y un segundo marcador de fluorescencia para el segundo biomarcador. En algunas formas de realización, el margen oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, las células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador están a menos de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador. En algunas formas de realización, la primera área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células no tumorales de cada uno de los campos de visión seleccionados. En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador. En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados. En algunas formas de realización, la segunda área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el factor predeterminado es  $10^4$ . En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa un primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, Galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL y combinaciones de estos, y el segundo miembro del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28 y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa PD-L1 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa PD-1. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa PD-L1 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa CD80. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa CTLA-4 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa CD80. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa PD-L2 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa PD-1. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa CTLA-4 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa CD86. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa LAG-3 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa HLA-DR. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa TIM-3 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa Galectina 9. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa 41BBL y el segundo miembro del al menos un par de células expresa 4.1BBL. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa OX40 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa OX40L. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa CD40 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa CD40L. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa ICOS y el segundo miembro del al menos un par de células expresa ICOSL. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa GITR y el segundo miembro del al menos un par de células expresa GITRL. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa HLA-DR y el segundo miembro del al menos un par de células expresa TCR. En algunas formas de realización, el valor umbral oscila de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000. En algunas formas de realización, el valor umbral es aproximadamente 900 más o menos 100. En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende terapia de punto de control inmunitario. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con la cuantificación de la expresión del primer biomarcador o la cuantificación de la expresión del segundo biomarcador. En algunas formas de realización, la potencia predictiva se cuantifica como un valor predictivo positivo, un valor predictivo negativo, o una combinación de estos. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 65 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 70 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 75 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 65 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 80 % o superior.

[0004] En otro aspecto, en el presente documento se divulgan métodos para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas de entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponibles de una muestra que comprende tejido tumoral, donde dicha muestra se obtiene de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador específico en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador específico un margen suficiente para englobar células localizadas proximalmente que expresan un segundo biomarcador específico; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador específico y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico,

por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, cada uno de los marcadores de fluorescencia se dirige a un biomarcador específico. En algunas formas de realización, la pluralidad de marcadores de fluorescencia comprende un primer marcador de fluorescencia para el primer biomarcador y un segundo marcador de fluorescencia para el segundo biomarcador. En algunas formas de realización, uno o más marcadores de fluorescencia comprenden un fluoróforo conjugado con un anticuerpo que tiene una afinidad de unión por un biomarcador específico u otro anticuerpo. En algunas formas de realización, cada marcador de fluorescencia comprende un fluoróforo seleccionado independientemente de uno o más del grupo que consiste en DAPI, Cy<sup>®</sup> 2, Cy<sup>®</sup> 3, Cy<sup>®</sup> 3,5, Cy<sup>®</sup> 5, FITC, TRITC, un colorante 488, un colorante 555, un colorante 594 y Texas Red. En algunas formas de realización, el margen oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, las células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador específico están a menos de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 50 µm de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador específico. En algunas formas de realización, la primera área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células no tumorales de cada uno de los campos de visión seleccionados. En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador específico. En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados. En algunas formas de realización, la segunda área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el factor predeterminado es 10<sup>4</sup>. En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial (SPS) se determina mediante la siguiente ecuación:

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

en donde A<sub>I</sub> es un área de interacción total (área total de células que expresan el segundo biomarcador específico y abarcada por señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a células que expresan el primer biomarcador específico) y A<sub>C</sub> es el área total de células que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador específico. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con la cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o la cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico. En algunas formas de realización, la potencia predictiva se cuantifica como un valor predictivo positivo, un valor predictivo negativo, o una combinación de estos. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 65 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 70 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 75 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 65 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 80 % o superior.

[0005] En algunas formas de realización, el primer biomarcador específico comprende un marcador tumoral y no tumoral y el segundo biomarcador específico comprende un marcador no tumoral.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0006]

La Fig. 1 muestra un ejemplo no limitativo de un resumen de anticuerpos y reactivos de detección usados en la preparación de muestras de tejido para la obtención de imágenes y el análisis.

La Fig. 2a muestra un ejemplo no limitativo de todos los núcleos detectados con DAPI dentro de una imagen.

La Fig. 2b muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria dilatada de todas las células de la Fig. 2a.

La Fig. 3a muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de S 100 detectada con colorante 488.

La Fig. 3b muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de toda el área tumoral de la figura 3a.

La Fig. 3c muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de todas las células tumorales de la figura 3a.

La Fig. 3d muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de todas las células no tumorales de la figura 3a.

La Fig. 4a muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de PD-L1 detectada con Cy<sup>®</sup> 5.

La Fig. 4b muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células que dan positivo para PD-L1 de la Fig. 4a.

La Fig. 5a muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de PD-1 detectada con Cy<sup>®</sup> 3.5.

La Fig. 5b muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células no tumorales que dan positivo para PD-1 de la figura 5a.

La Fig. 6a muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de interacción de todas las células que dan positivo para PD-L1 y las células vecinas más cercanas.

La Fig. 6b muestra un ejemplo no limitativo de un compartimento de interacción de las células que dan positivo para PD-1 en estrecha proximidad a las células que dan positivo para PD-L1.

La Fig. 7a muestra un ejemplo no limitativo de puntuaciones de interacción de 26 pacientes con melanoma.

La Fig. 7b muestra un ejemplo no limitativo de las puntuaciones máximas de interacción de los 26 pacientes de la Fig. 7a.

La Fig. 8 muestra resultados de análisis basados en la formación de imágenes de portaobjetos completo en lugar de un algoritmo de enriquecimiento.

La Fig. 9 muestra una comparación de las puntuaciones de interacción con la supervivencia libre de progresión de los 26 pacientes. Nota: \* indica la prueba de rango logarítmico no corregida.

La Fig. 10 muestra una comparación de la expresión de PD-L1 con supervivencia libre de progresión de los pacientes.

La Fig. 11 muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de señales de fluorescencia correspondiente a células que dan positivo para PD-L1 (rojo), células que dan positivo para PD-1 (amarillo), todas las células tumorales (verde) y todas las células (azul) para un paciente que responde a la inmunoterapia.

La Fig. 12 muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de señales de fluorescencia correspondiente a células que dan positivo para PD-L1 (rojo), células que dan positivo para PD-1 (amarillo), todas las células tumorales (verde) y todas las células (azul) para un paciente que no responde a la inmunoterapia.

La Fig. 13 muestra puntuaciones representativas de la interacción PD-1/PD-L1 de 38 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas.

La Fig. 14 es un diagrama de flujo de un proceso para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral, según una forma de realización a modo de ejemplo.

La Fig. 15 es un diagrama de flujo de un proceso para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral, según una segunda forma de realización a modo de ejemplo.

La Fig. 16 es un diagrama de bloques de un controlador configurado para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con cáncer, según una forma de realización a modo de ejemplo.

La Fig. 17 es un diagrama de flujo de los pasos de procesamiento de imágenes usados para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral, según una forma de realización a modo de ejemplo.

La Fig. 18 muestra una comparación de la expresión de PD-L1 determinada usando el ensayo de IHC con 22C3 aprobado por la FDA con supervivencia libre de progresión de los pacientes. Nota: \* indica que el valor p se determinó usando la prueba de rango logarítmico no corregida.

La Fig. 19a muestra un ejemplo no limitativo de puntuaciones de interacción de 34 pacientes con melanoma adicionales.

La Fig. 19b muestra una comparación de las puntuaciones de interacción con la supervivencia libre de progresión de los pacientes de la Fig. 19a.

Fig. 19c muestra las puntuaciones de interacción de los pacientes de la Fig. 7 y los pacientes de la Fig. 19a.

La Fig. 19d muestra una comparación de las puntuaciones de interacción con la supervivencia libre de progresión de los pacientes de la Fig. 19c. Nota: \* indica que el valor p se determinó usando la prueba de rango logarítmico no corregida.

La Fig. 19e muestra una comparación de las puntuaciones de interacción con la supervivencia global (OS) de los pacientes de la Fig. 19c. Nota: \* indica que el valor p se calculó usando la prueba de rango logarítmico no corregida.

La Fig. 20 muestra un ejemplo no limitativo de puntuaciones de interacción CTLA-4/CD80 de 29 pacientes con melanoma metastásico.

La Fig. 21 muestra un ejemplo no limitativo de puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 de 29 pacientes con carcinoma testicular.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0007] La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

[0008] Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se entenderá por los expertos en la técnica y variará en cierta medida dependiendo del contexto en el que se use. Si hay usos del término que no están claros para los expertos en la técnica, dado el contexto en el que se usa, "aproximadamente" significará hasta más o menos el 10 % del término particular.

[0009] Debe interpretarse que el uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de los elementos (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. La mención de intervalos de valores en el presente documento está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en el presente documento.

[0010] El término "tratar" o "tratamiento" se refiere a la administración de una terapia en una cantidad, manera o modo eficaz para mejorar una afección, síntoma o parámetro asociado con un trastorno o para prevenir la progresión de un trastorno, ya sea en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable por un

experto en la técnica. Una cantidad, manera o modo eficaz puede variar dependiendo del sujeto y puede adaptarse al paciente.

[0011] En un aspecto, en el presente documento se proporcionan métodos para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con cáncer.

[0012] En algunas formas de realización, la muestra puede teñirse usando una pluralidad de marcadores de fluorescencia con afinidad por biomarcadores específicos. Se puede obtener una imagen digital de la muestra teñida, y luego la imagen se analiza basándose en la ubicación de los marcadores de fluorescencia. En lugar del análisis de imagen completa, los campos de visión pueden priorizarse según el número de células que expresan un primer biomarcador de interés. Un número predeterminado de campos de visión puede analizarse adicionalmente para detectar señales de fluorescencia. En algunas formas de realización, el uso de cuatro tipos diferentes de marcadores de fluorescencia genera una imagen de señales de fluorescencia correspondientes a un primer biomarcador de interés y una imagen de señales de fluorescencia correspondientes a un segundo biomarcador de interés, así como una imagen de señales de fluorescencia correspondientes a un biomarcador expresado por todas las células y una imagen de señales de fluorescencia correspondientes a un biomarcador expresado por células tumorales. En formas de realización adicionales, las imágenes de señales de fluorescencia se manipulan para generar una o más máscaras de señales de fluorescencia correspondientes a células dentro de la imagen. En algunas formas de realización, la máscara o máscaras de señales de fluorescencia comprenden una o más seleccionadas del grupo que consiste en una máscara de todas las células dentro de la imagen, una máscara de todas las células tumorales dentro de la imagen, una máscara de todas las células no tumorales dentro de la imagen, una máscara de todas las células que expresan un primer biomarcador de interés dentro de la imagen, una máscara de todas las células que expresan un segundo biomarcador de interés dentro de la imagen y una máscara de interacción que representa todas las células que expresan un primer biomarcador de interés dentro de la imagen, así como células ubicadas proximalmente que expresan un segundo biomarcador de interés. En otras formas de realización adicionales, la máscara de interacción se usa para generar un compartimento de interacción de las células de todos los campos de visión seleccionados que expresan el segundo biomarcador de interés ubicadas proximalmente a las células que expresan el primer biomarcador de interés. El área total del compartimento de interacción puede usarse para generar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células, donde un primer miembro del al menos un par de células expresa el primer biomarcador y un segundo miembro del al menos un par de células expresa el segundo biomarcador, que es diferente del primer biomarcador. En algunas formas de realización, la puntuación indica la probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a la inmunoterapia. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador de interés o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador de interés.

[0013] Por consiguiente, en algunas formas de realización, en el presente documento se proporcionan métodos para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con cáncer, que comprenden: (i) usar la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células, donde un primer miembro del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo miembro del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y (ii) registrar la puntuación, donde dicha puntuación, en comparación con un valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a inmunoterapia, donde el paso de determinación comprende: (a) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza seleccionar campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (b) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador un margen suficiente para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador; y (c) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial; donde el paso (b) comprende i. generar una máscara de todas las células que dan positivo para el primer biomarcador; y ii. dilatar la máscara de todas las células que dan positivo para el primer biomarcador para generar una máscara dilatada representativa de una proximidad predeterminada dentro de la cual puede encontrarse una célula con interacción positiva para el segundo biomarcador. En algunas formas de realización, el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador.

[0014] En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células comprende una célula tumoral y el segundo miembro del al menos un par de células comprende una célula no tumoral. En algunas formas de realización, la célula no tumoral es una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, la célula no tumoral es una célula estromal.

[0015] En algunas formas de realización, el primer y segundo miembros del al menos un par de células comprenden células inmunitarias.

5 [0016] En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células comprende una célula tumoral, una célula mieloide o una célula estromal y el segundo miembro del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, la célula tumoral, la célula mieloide o la célula estromal expresa PD-L1 y la célula inmunitaria expresa PD-1.

10 [0017] En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células comprende una célula tumoral y el segundo miembro del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células comprende una célula mieloide y el segundo miembro del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células comprende una célula estromal y el segundo miembro del al menos un par de células comprende una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa PD-L1 y la célula inmunitaria expresa PD-1.

[0018] En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa un primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, Galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, el segundo miembro del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28 y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa un primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, Galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL y combinaciones de estos, y el segundo miembro del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28 y combinaciones de estos.

[0019] En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa PD-L1 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa PD-1. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa PD-L1 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa CD80. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa CTLA-4 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa CD80. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa PD-L2 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa PD-1. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa CTLA-4 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa CD86. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa LAG-3 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa HLA-DR. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa TIM-3 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa Galectina 9. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa 41BBL y el segundo miembro del al menos un par de células expresa 4.1BBL. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa OX40 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa OX40L. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa CD40 y el segundo miembro del al menos un par de células expresa CD40L. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa ICOS y el segundo miembro del al menos un par de células expresa ICOSL. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa GITR y el segundo miembro del al menos un par de células expresa GITRL. En algunas formas de realización, el primer miembro del al menos un par de células expresa HLA-DR y el segundo miembro del al menos un par de células expresa TCR.

[0020] En algunas formas de realización, el primer biomarcador expresado por el primer miembro del al menos un par de células y el segundo biomarcador expresado por el segundo miembro del al menos un par de células interactúan entre sí. En algunas formas de realización, el primer biomarcador expresado por el primer miembro del al menos un par de células y el segundo biomarcador expresado por el segundo miembro del al menos un par de células no interactúan entre sí.

[0021] En algunas formas de realización, la proximidad espacial entre el al menos un par de células varía de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 2,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 2,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 45  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 2,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 2,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 2,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 2,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 2,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 2,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 5  $\mu\text{m}$  y

aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 45  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre 5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ . En algunas formas de realización, la proximidad espacial es de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50  $\mu\text{m}$ .

[0022] En algunas formas de realización, la proximidad espacial entre el al menos un par de células varía de aproximadamente 1 píxel a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 90 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 píxeles. En algunas formas de realización, la proximidad espacial es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho.

[0023] El paso de determinación comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde la selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador un margen suficiente para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial.

[0024] En algunas formas de realización, el paso de determinación comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador a menos de entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial.

[0025] En algunas formas de realización, el paso de determinación comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer



biomarcador en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador; y (iii) dividir una primera área total, medida en píxeles, para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial.

[0026] En algunas formas de realización, el paso de determinación comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde la selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles para abarcar células que expresan el segundo biomarcador a menos de entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir una primera área total, medida en píxeles, para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial.

[0027] En algunas formas de realización, uno o más marcadores de fluorescencia comprenden un fluoróforo conjugado con un anticuerpo que tiene una afinidad de unión por un biomarcador específico u otro anticuerpo. En algunas formas de realización, uno o más marcadores de fluorescencia son fluoróforos con afinidad por un biomarcador específico.

[0028] Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, 6-FAM, rodamina, Texas Red, California Red, iFluor594, tetrametilrodamina, una carboxirrodamina, carboxirrodamina 6F, carboxirrodol, carboxirrodamina 110, Cascade Blue, Cascade Yellow, cumarina, Cy2<sup>®</sup>, Cy3<sup>®</sup>, Cy3.5<sup>®</sup>, Cy5<sup>®</sup>, Cy5.5<sup>®</sup>, Cy7<sup>®</sup>, Cy-Chrome, DyLight<sup>®</sup> 350, DyLight<sup>®</sup> 405, DyLight<sup>®</sup> 488, DyLight<sup>®</sup> 549, DyLight<sup>®</sup> 594, DyLight<sup>®</sup> 633, DyLight<sup>®</sup> 649, DyLight<sup>®</sup> 680, DyLight<sup>®</sup> 750, DyLight<sup>®</sup> 800, Ficoeritrina, PerCP (proteína clorofila a peridina), PerCP-Cy5.5, JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), NED, ROX (5-(y -6)-carboxi-X-rodamina), HEX, Lucifer Yellow, Marina Blue, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Alexa Fluor<sup>®</sup> 350, Alex Fluor<sup>®</sup> 430, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, Alexa Fluor<sup>®</sup> 532, Alexa Fluor<sup>®</sup> 546, Alexa Fluor<sup>®</sup> 568, Alexa Fluor<sup>®</sup> 594, Alexa Fluor<sup>®</sup> 633, Alexa Fluor<sup>®</sup> 647, Alexa Fluor<sup>®</sup> 660, Alexa Fluor<sup>®</sup> 680, ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético, BODIPY<sup>®</sup> FL, BODIPY<sup>®</sup> FL-Br2, BODIPY<sup>®</sup> 530/550, BODIPY<sup>®</sup> 558/568, BODIPY<sup>®</sup> 630/650, BODIPY<sup>®</sup> 650/665, BODIPY<sup>®</sup> R6G, BODIPY<sup>®</sup> TMR, BODIPY<sup>®</sup> TR, OPAL<sup>™</sup> 520, OPAL<sup>™</sup> 540, OPAL<sup>™</sup> 570, OPAL<sup>™</sup> 620, OPAL<sup>™</sup> 650, OPAL<sup>™</sup> 690, y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en DAPI, Cy<sup>®</sup> 2, Cy<sup>®</sup> 3, Cy<sup>®</sup> 3.5, Cy<sup>®</sup> 5, Cy<sup>®</sup> 7, FITC, TRITC, un colorante 488, un colorante 555, un colorante 594, Texas Red y cumarina. Los ejemplos de un colorante 488 incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, DyLight<sup>®</sup> 488, y CF<sup>™</sup> 488A. Los ejemplos de un colorante 555 incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor<sup>®</sup> 555. Los ejemplos de un colorante 594 incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor<sup>®</sup> 594.

[0029] Como se usa en el presente documento, un "campo de visión" se refiere a una sección de una imagen digital de portaobjetos completo de una muestra de tejido. En algunas formas de realización, la imagen de portaobjetos completo tiene 2-200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de portaobjetos completo tiene 10-200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de portaobjetos completo tiene 30-200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de portaobjetos completo tiene 10-150 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de portaobjetos completo tiene 10-100 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de portaobjetos completo tiene 10-50 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de portaobjetos completo tiene 10-40 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de portaobjetos completo tiene 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100, incluyendo los incrementos entre estos números, campos de visión predeterminados.

[0030] En algunas formas de realización, las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador se dilatan un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 70 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 píxeles. En algunas formas de realización, el margen es de

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

[illegible]

aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador. En algunas formas de realización, la dilatación de las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador abarca células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador a menos de entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador. En algunas formas de realización, la dilatación de las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador abarca células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador a menos de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador en las células localizadas proximalmente está en contacto directo con el primer biomarcador.

[0032] En algunas formas de realización, la primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador, se mide en píxeles.

[0033] En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células no tumorales de cada uno de los campos de visión seleccionados. En algunas formas de realización, la segunda área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, tanto la primera área total como la segunda área total se miden en píxeles.

[0034] En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador. En algunas formas de realización, la segunda área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, tanto la primera área total como la segunda área total se miden en píxeles.

[0035] En algunas formas de realización, el factor de normalización es una segunda área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados. En algunas formas de realización, la segunda área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, tanto la primera área total como la segunda área total se miden en píxeles.

[0036] En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 4500. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 4000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 3500. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 3000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 2500. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 2000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 1500. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900 o 5000, incluyendo los incrementos entre estos números. En algunas formas de realización, la puntuación umbral es de aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900 o 5000, incluyendo los incrementos entre estos números, más o menos 100.

[0037] En algunas formas de realización, el factor predeterminado es de aproximadamente 10 a aproximadamente  $10^5$ . En algunas formas de realización, el factor predeterminado es de aproximadamente  $10^2$  hasta aproximadamente  $10^5$ . En algunas formas de realización, el factor predeterminado es de aproximadamente  $10^3$  hasta aproximadamente  $10^5$ . En algunas formas de realización, el factor predeterminado es de aproximadamente  $10^4$  hasta aproximadamente  $10^5$ . En algunas formas de realización, el factor predeterminado es aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000 o  $10^5$ , incluyendo los incrementos entre estos números.

[0038] En algunas formas de realización, la potencia predictiva se cuantifica como un valor predictivo positivo, un valor predictivo negativo, o una combinación de los mismos. Se calcula un valor predictivo positivo dividiendo el número de pacientes que responden al tratamiento con puntuaciones por encima de la puntuación umbral entre el número total de pacientes que responden al tratamiento. Se calcula un valor predictivo negativo dividiendo el número de pacientes que no responden al tratamiento con puntuaciones por debajo de la puntuación umbral entre el número total de pacientes que no responden al tratamiento.

[0039] En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es superior al 60 %. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 65 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 70 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 75 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es del 80 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo positivo es de aproximadamente el 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %, incluyendo los incrementos entre estos números.

[0040] En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 60 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 65 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 70 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 75 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es del 80 % o superior. En algunas formas de realización, el valor predictivo negativo es de aproximadamente el 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %, incluyendo los incrementos entre estos números.

[0041] En los métodos descritos en la presente memoria, el paciente con cáncer es un mamífero. En algunas formas de realización, el mamífero es un ser humano. En algunas formas de realización, el mamífero no es humano. En formas de realización adicionales, el mamífero es un ratón, una rata, una cobaya, un perro, un gato o un caballo.

[0042] En los métodos descritos en la presente memoria, el tejido tumoral se obtiene de un paciente con cáncer. El tipo de cáncer incluye, pero no se limita a, cánceres del aparato circulatorio, por ejemplo, de corazón (sarcoma [angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma], mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma), de mediastino y pleura, y de otros órganos intratorácicos, tumores vasculares y tejido vascular asociado a tumores; de las vías respiratorias, por ejemplo, de la cavidad nasal y del oído medio, de los senos paranasales, de laringe, de tráquea, de los bronquios y de pulmón tales como cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma broncogénico (de células escamosas, células pequeñas no diferenciadas, células grandes no diferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; del sistema gastrointestinal, por ejemplo, de esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomioma, linfoma), de estómago (carcinoma, linfoma, leiomioma), gástrico, de páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), del intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), del intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma); del aparato genitourinario, por ejemplo, de riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilms [nefroblastoma], linfoma, leucemia), de vejiga y/o de uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma), de próstata (adenocarcinoma, sarcoma), de testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatosos, lipoma); de hígado, por ejemplo, hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma, tumores endocrinos pancreáticos (tales como feocromocitoma, insulinooma, tumor secretor de péptido intestinal vasoactivo, tumor de células de los islotes y glucagonoma); de hueso, por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, cordoma, tumor maligno de células gigantes, osteocondroma (exosteoblastoma osteocartilaginoso), condroma benigno condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; del sistema nervioso, por ejemplo, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, cáncer de cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), de las meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cáncer de cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); del aparato reproductor, por ejemplo, ginecológico, de útero (carcinoma de endometrio), de cuello uterino (carcinoma de cuello uterino, displasia cervical pretumoral), de ovario (carcinoma de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de las células de la granulosa, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), de vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), de vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioides (rabdomiosarcoma embrionario), de las trompas de Falopio (carcinoma) y otros sitios asociados con los órganos genitales femeninos; de pene, de próstata, de testículo y otros sitios asociados con los órganos genitales masculinos; del sistema hematológico, por ejemplo, de sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin [linfoma maligno]; de la cavidad oral por ejemplo, de labio, de lengua, de encía, del suelo de la boca, de paladar y de otras partes de la boca, de la glándula parótida y otras partes de las glándulas salivales, de amígdala, orofaringe, nasofaringe, seno piriforme, hipofaringe y otros sitios en el labio, la cavidad oral y la faringe; de piel, por ejemplo, melanoma maligno, melanoma cutáneo, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, nevus displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma y queloides; de

las glándulas suprarrenales: neuroblastoma; y de otros tejidos que incluyen tejido conectivo y blando, de retroperitoneo y peritoneo, de ojo, melanoma intraocular y anexos, de mama, de cabeza y/o cuello, de la zona anal, de las glándulas tiroideas, paratiroides, suprarrenal y otras glándulas endocrinas y estructuras relacionadas, neoplasias malignas secundarias y no especificadas de los ganglios linfáticos, neoplasia maligna secundaria de los sistemas respiratorio y digestivo y neoplasia maligna secundaria de otros sitios, o una combinación de uno o más de estos.

[0043] Los ejemplos de inmunoterapia incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab o trastuzumab), anticuerpos monoclonales conjugados (por ejemplo, ibritumomab tiuxetán, brentuximab vendotin o ado-trastuzumab emtansina), anticuerpos monoclonales biespecíficos (blinatumomab), inhibidores de puntos de control inmunitario (por ejemplo, ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab o durvalumab), talidomida, lenalidomida, pomalidomida e imiquimod, y combinaciones de estos. En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende una terapia de puntos de control inmunitario.

[0044] En otro aspecto, en este documento se describen métodos para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponibles a partir de una muestra que comprende tejido tumoral, donde dicha muestra se toma de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador específico en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador específico para abarcar células localizadas proximalmente que expresan un segundo biomarcador específico; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador específico y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador específico, con una puntuación de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, el método proporciona una capacidad predictiva superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.

[0045] En otro aspecto, en este documento se describen métodos para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas de entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponibles de una muestra que comprende tejido tumoral, muestra obtenida de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador para abarcar células que expresan un segundo biomarcador a menos de entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, con un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, el método proporciona una capacidad predictiva superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.

[0046] En otro aspecto, en este documento se describen métodos para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponibles a partir de una muestra que comprende tejido tumoral, muestra obtenida de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador en un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles para abarcar células localizadas proximalmente que expresan un segundo biomarcador; y (iii) dividir una primera área total, medida en píxeles, para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, el método proporciona una

capacidad predictiva superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.

[0047] En otro aspecto, en este documento se describen métodos para determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células seleccionadas entre una pluralidad de células presentes en un número predeterminado de campos de visión disponibles a partir de una muestra que comprende tejido tumoral, muestra procedente de un paciente con cáncer, donde el método comprende: (i) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral procedente del paciente con cáncer, que se tiñe con un pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde dicha selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan un primer biomarcador en comparación con otros campos de visión; (ii) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador en un margen que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles para abarcar las células que expresan un segundo biomarcador a menos de entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador; y (iii) dividir una primera área total, medida en píxeles, para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para obtener una puntuación de proximidad espacial. En algunas formas de realización, el método proporciona una capacidad predictiva superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador específico o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador específico.

[0048] En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial (SPS) se determina mediante la siguiente ecuación:

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

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

[0049] En algunas formas de realización, la puntuación de proximidad espacial se determina mediante la siguiente ecuación:

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

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

[0050] La Fig. 14 es un diagrama de flujo que representa los pasos de una forma de realización de un método para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con cáncer. En el paso 1401 se obtienen datos de imagen, y en el paso 1402 los datos de imagen se desmezclan de manera que los datos específicos para diversos tipos de señales de fluorescencia se separan en diferentes canales. En el paso 1403, los datos de un primer canal se usan para generar una máscara de todas las células que dan positivo para un primer biomarcador (máscara del primer biomarcador). La máscara de todas las células se dilata a continuación (paso 1404) para generar una máscara dilatada representativa de una proximidad predeterminada dentro de la cual se puede encontrar una célula con interacción (que da positivo para un segundo biomarcador). En algunas formas de realización, la máscara del primer biomarcador se dilata entre 1 y 100 píxeles. En el paso 1405, los datos de un segundo canal se usan para generar una máscara de todas las células que dan positivo para el segundo biomarcador (máscara del segundo biomarcador). En el paso 1406, la máscara del primer biomarcador y la máscara del segundo biomarcador se combinan para generar una máscara de interacción que identifica células que dan positivo para el segundo biomarcador que están dentro de la proximidad predeterminada de una célula que da positivo para el primer biomarcador. En el paso 1407, se calcula una puntuación de proximidad espacial basándose en el área de la máscara de interacción.

[0051] La Fig. 15 es un segundo diagrama de flujo que representa los pasos de una segunda forma de realización de un método para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con

cáncer. En el paso 1501 se obtienen datos de imagen, y en el paso 1502 los datos de imagen se desmezclan de manera que los datos específicos para diversos tipos de señales de fluorescencia se separan en diferentes canales. En el paso 1503, los datos de un primer canal se usan para generar una máscara de todas las células presentes en el campo de visión, y en el paso 1504 los datos de un segundo canal se usan para generar una máscara de un área de subconjunto, tal como el área tumoral, en el campo de visión. En el paso 1505, la máscara de todas las células se combina con la máscara del área de subconjunto para generar una máscara de células del subconjunto y una máscara de células que no son del subconjunto. En algunas formas de realización, las células del subconjunto son células tumorales y las células que no son del subconjunto son células no tumorales. En el paso 1506, los datos de un tercer canal se usan para generar una máscara de todas las células que dan positivo para un primer biomarcador (máscara del primer biomarcador). La máscara de todas las células positivas se dilata a continuación (paso 1507) para generar una máscara dilatada representativa de una proximidad predeterminada dentro de la cual se puede encontrar una célula con interacción (a saber, una célula que da positivo para un segundo biomarcador). En algunas formas de realización, la máscara del primer biomarcador se dilata entre 1 y 100 píxeles. En el paso 1508, los datos de un cuarto canal se usan para generar una máscara de todas las células que dan positivo para el segundo biomarcador (máscara del segundo biomarcador). En el paso 1509, la máscara dilatada y la máscara del segundo biomarcador se combinan para generar una máscara de interacción que identifica células que dan positivo para el segundo biomarcador y están dentro de la proximidad predeterminada de una célula que da positivo para el primer biomarcador. En el paso 1510, se calcula una puntuación de proximidad espacial dividiendo el área de la máscara de interacción por un área de todas las células que son capaces de dar positivo para el segundo biomarcador (las células del subconjunto) o por un área de todas las células (como se indica por las líneas de puntos en el diagrama de flujo de Fig. 15, que representa el uso de cualquiera de las entradas). En algunas formas de realización, las células que son capaces de dar positivo para el segundo biomarcador son células tumorales o células no tumorales.

[0052] En algunas formas de realización, un subconjunto de células y un no subconjunto de células corresponden a células tumorales y células no tumorales, respectivamente o viceversa. En algunas formas de realización, un subconjunto de células y un no subconjunto de células corresponden a células viables y células no viables, respectivamente o viceversa. En algunas formas de realización, un subconjunto de células es un subconjunto de células viables y un no subconjunto de células consiste en las células viables no incluidas en el subconjunto de células viables. En algunas formas de realización, un subconjunto de células y un no subconjunto de células corresponden a células T y células no T, respectivamente o viceversa. En algunas formas de realización, un subconjunto de células y un no subconjunto de células corresponden a células mieloides y células no mieloides, respectivamente o viceversa.

[0053] En alguna forma de realización, la puntuación de proximidad espacial es representativa de una proximidad de un par de células. En algunas formas de realización, la proximidad de un par de células puede determinarse por una proximidad entre los límites del par de células, una proximidad entre los centros de masa del par de células, usando lógica de límites basada en un perímetro alrededor de una primera célula seleccionada del par de células, determinando una intersección en los límites del par de células y/o determinando un área de solapamiento del par de células.

[0054] En alguna forma de realización, la puntuación de proximidad espacial está asociada con metadatos asociados con las imágenes de la muestra, incluidos en un informe generado, proporcionados a un operador para determinar la estrategia de inmunoterapia, registrados en una base de datos, asociados con el historial médico de un paciente y/o mostrados en un dispositivo de visualización.

[0055] En los métodos descritos en este documento, la manipulación de las imágenes digitales puede llevarse a cabo mediante un sistema informático que comprende un controlador, tal como el controlador ilustrado en el diagrama de bloques de la figura 16, según un ejemplo de realización. Se muestra que el controlador 200 incluye una interfaz de comunicaciones 202 y un circuito de procesamiento 204. La interfaz de comunicaciones 202 puede incluir interfaces cableadas o inalámbricas (por ejemplo, enchufes, antenas, transmisores, receptores, transceptores, terminales de cable, etc.) para llevar a cabo comunicaciones de datos con varios sistemas, dispositivos o redes. Por ejemplo, la interfaz de comunicaciones 202 puede incluir una tarjeta Ethernet y un puerto para enviar y recibir datos a través de una red de comunicaciones basada en Ethernet y/o un transceptor WiFi para comunicarse a través de una red de comunicaciones inalámbrica. La interfaz de comunicaciones 202 puede configurarse para comunicarse a través de redes de área local o redes de área amplia (por ejemplo, Internet, la WAN de un edificio, etc.) y puede usar una variedad de protocolos de comunicaciones (por ejemplo, BACnet, IP, LON, etc.).

[0056] La interfaz de comunicaciones 202 puede ser una interfaz de red configurada para facilitar las comunicaciones de datos electrónicos entre el controlador 200 y varios sistemas o dispositivos externos (por ejemplo, el dispositivo de obtención de imágenes 102). Por ejemplo, el controlador 200 puede recibir datos de imagen para los campos de visión seleccionados desde el dispositivo de obtención de imágenes 102, para analizar los datos y calcular la puntuación de proximidad espacial (SPS).

[0057] Todavía en referencia a la figura 16, se muestra que el circuito de procesamiento 204 incluye un procesador 206 y una memoria 208. El procesador 206 puede ser un procesador para fines generales o específicos, un circuito integrado para aplicaciones específicas (ASIC), una o más matrices de puertas programables *in situ* (FPGA), un grupo de componentes de procesamiento u otros componentes de procesamiento adecuados. El procesador 506 puede configurarse para ejecutar un código informático o instrucciones almacenadas en la memoria 508 o recibidas de otros medios legibles por ordenador (por ejemplo, CDROM, almacenamiento en red, un servidor remoto, etc.).

[0058] La memoria 208 puede incluir uno o más dispositivos (por ejemplo, unidades de memoria, dispositivos de memoria, dispositivos de almacenamiento, etc.) para almacenar datos y/o código informático para completar y/o facilitar los diversos procesos descritos en la presente divulgación. La memoria 208 puede incluir una memoria de acceso aleatorio (RAM), memoria de solo lectura (ROM), almacenamiento en disco duro, almacenamiento temporal, memoria no volátil, memoria *flash*, memoria óptica o cualquier otra memoria adecuada para almacenar objetos de *software* y/o instrucciones informáticas. La memoria 208 puede incluir componentes de base de datos, componentes de código de objeto, componentes de *script* o cualquier otro tipo de estructura de información para soportar las diversas actividades y estructuras de información descritas en la presente divulgación. La memoria 508 puede estar conectada de forma comunicable al procesador 206 a través del circuito de procesamiento 204 y puede incluir un código informático para ejecutar (por ejemplo, mediante el procesador 206) uno o más procesos descritos en el presente documento.

[0059] Todavía en referencia a la figura 16, se muestra que el controlador 200 recibe la entrada de un dispositivo de obtención de imágenes 102. El dispositivo de obtención de imágenes adquiere todos los datos de imagen y los registra, junto con todos los metadatos que los describen. El dispositivo de obtención de imágenes serializará entonces los datos en un flujo que puede ser leído por el controlador 200. El flujo de datos puede acomodar cualquier tipo de flujo de datos binarios como el sistema de archivos, un RDBM o comunicaciones TCP/IP directas. Para el uso del flujo de datos, se muestra que el controlador 200 incluye un desmezclador espectral 210. El desmezclador espectral 210 puede recibir datos de imagen de un dispositivo de obtención de imágenes 102 en el que realiza la desmezcla espectral para desmezclar una imagen que presenta varias longitudes de onda en canales discretos individuales cada banda de longitudes de onda. Por ejemplo, los datos de imagen pueden "desmezclarse" en canales separados para cada uno de los diversos fluoróforos usados para identificar células o proteínas de interés en la muestra de tejido. El fluoróforo, solo a modo de ejemplo, puede ser uno o más del grupo que consiste en DAPI, Cy® 2, Cy® 3, Cy® 3,5, Cy® 5, FITC, TRITC, un colorante 488, un colorante 555, un colorante 594 y Texas Red. En un ejemplo, uno de los canales puede incluir datos de imagen que están dentro de una banda predeterminada que rodea una longitud de onda de 461 nm (la longitud de onda de emisión máxima para DAPI), para identificar núcleos en la imagen. Otros canales pueden incluir datos de imagen para diferentes longitudes de onda para identificar diferentes partes de la muestra de tejido utilizando diferentes fluoróforos.

[0060] También se muestra que el controlador 200 incluye varios enmascaradores, tales como el enmascarador de células 212, el enmascarador de subconjunto 216, el enmascarador del primer biomarcador 22 y el enmascarador del segundo biomarcador 224. Estos u otros enmascaradores que pueden incluirse en el controlador 200 en otras formas de realización se utilizan para recibir una señal desmezclada del desmezclador espectral 210 y crear una máscara para la célula o área de interés particular, dependiendo del fluoróforo utilizado para identificar ciertas características de interés en la muestra de tejido. Para crear una máscara, los enmascaradores (tales como el enmascarador de células 212, el enmascarador de área de subconjunto 216, el enmascarador del primer biomarcador 22 y el enmascarador del segundo biomarcador 224) reciben datos de imagen relacionados con la intensidad de cada píxel en el campo de visión. La intensidad de los píxeles es directamente proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida por la muestra, que, a su vez, es directamente proporcional a la cantidad de biomarcador de proteína en la muestra (cuando se usa un fluoróforo para identificar un biomarcador en particular). Se puede establecer un umbral absoluto en función de los valores que existen en los píxeles de la imagen. Todos los píxeles que sean mayores o iguales al valor de umbral se asignarán a 1,0, o "activados", y todos los demás píxeles se asignarán a 0,0 o "desactivados". De esta manera, se crea una máscara binaria para identificar la parte de célula o tejido de interés en el campo de visión. En otras formas de realización, se crea una máscara utilizando un límite inferior en el que todos los píxeles con una intensidad igual o superior a un límite inferior se aceptan y se utilizan como valor de píxel para la máscara. Si la intensidad está por debajo del límite inferior, el valor de píxel se establece en 0,0 o "desactivado".

[0061] En el diagrama de flujo de ejemplo para el enmascaramiento que se muestra en la figura 17, se muestra que los canales de DAPI y de colorante 488 (para identificar núcleos y áreas tumorales, respectivamente) utilizan el protocolo del límite inferior (pasos 1710, 1712, 1720, 1722), mientras que los canales de Cy5 y Cy3.5 (para identificar biomarcadores) utilizan un protocolo de valor umbral (pasos 1730, 1740), para proporcionar las salidas de la máscara. En asociación con el protocolo de límite inferior, también hay un paso de histograma para determinar el límite inferior. En particular, *umbral de histograma* (paso 1712, 1722) produce un umbral de una imagen de entrada pero usa una escala móvil para determinar el punto en el que se produce el umbral. Las entradas son la imagen actual y un *porcentaje de umbral* definido por el usuario. Este último se utiliza para determinar en qué porcentaje de la intensidad total debe establecerse el nivel de umbral. En primer lugar, la



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

[0062] Los pasos identificados como los pasos 1714, 1716, 1724, 1726, 1728, 1732, 1734, 1736, 1742, 1744 en la figura 17 representan pasos intermedios que ocurren en los enmascaradores iniciales, como el enmascarador celular 212, el enmascarador de área de subconjunto 216, el enmascarador del primer biomarcador 222 y el enmascarador del segundo biomarcador 224. Estos pasos se definen como sigue:

[0063] *Dilatar* aumenta el área de las zonas más brillantes de una imagen. Se necesitan dos entradas para *dilatar*. La primera es la imagen actual implícita y la segunda es el número de *iteraciones* para dilatar. Se supone que solo se utilizan imágenes binarias para la primera entrada. El procedimiento se realizará en imágenes continuas, pero la salida no será una *dilatación* válida. El procedimiento de *dilatar* comienza encontrando primero la máxima intensidad de píxeles en la imagen. Posteriormente, cada píxel de la imagen se examina una vez. Si el píxel por examen tiene una intensidad igual a la intensidad máxima, ese píxel se dibujará en la imagen de salida como un círculo con radio de *iteraciones* y centrado en el píxel original. Todos los píxeles de ese círculo tendrán una intensidad igual a la intensidad máxima. Todos los demás píxeles se copian en la imagen de salida sin modificaciones.

[0064] El procedimiento *llenar agujeros* llenará las zonas "vacías" de una imagen con píxeles a la máxima intensidad. Estas zonas vacías son aquellas que tienen una intensidad mínima y cuya área de píxeles (*tamaño*) es la especificada por el usuario. La imagen actual y el *tamaño* son las dos entradas necesarias. Al igual que *dilatar*, este procedimiento solo debe aplicarse a imágenes binarias.

[0065] *Erosionar* procesa imágenes de la misma manera que *dilatar*. Toda la funcionalidad es la misma que *dilatar* excepto en que el primer paso determina la intensidad mínima en la imagen, solo se alteran los píxeles que coinciden con la intensidad más baja y los círculos utilizados para aumentar la intensidad de los píxeles de intensidad mínima encontrados se rellenan con el valor de intensidad más bajo. Al igual que *dilatar*, este procedimiento solo debe aplicarse a imágenes binarias.

[0066] *Eliminar objetos*. Se esperan dos entradas: la imagen actual y el *tamaño del objeto*. *Eliminar objetos* es lo contrario del procedimiento *llenar agujeros*. Cualquier zona que contenga solo píxeles con la máxima intensidad que llene un área menor que la entrada *tamaño del objeto* se ajustará a la intensidad mínima y, por tanto, se "eliminará". Este procedimiento solo debe aplicarse a imágenes binarias; la aplicación a imágenes continuas puede producir resultados inesperados.

[0067] La salida en los pasos finales 1718, 1729, 1738, y 1746 son la máscara de células resultante, la máscara de subconjunto de área (o, en este ejemplo particular, la máscara del área tumoral), la máscara de células del biomarcador 1 y la máscara de células del biomarcador 2, respectivamente. En la figura 17 se muestran además las combinaciones de estas máscaras resultantes para calcular la puntuación de proximidad espacial. Estas combinaciones se describen a continuación con referencia a los enmascaradores de combinación del controlador 200, representados en la figura 16.

[0068] Se muestra que el controlador 200 incluye enmascaradores de combinación, tales como el enmascarador de células del subconjunto 218, el enmascarador de células que no son del subconjunto 220 y el enmascarador de interacción 230. El enmascarador de células del subconjunto realiza una operación Y, como se muestra en el paso 1752 de la figura 17, para combinar la salida del enmascarador de células 212 (que representa todas las células de la imagen) con la salida del enmascarador de área de subconjunto 216. Por consiguiente, el enmascarador de células del subconjunto genera una máscara de todas las células del subconjunto de la imagen. En algunas formas de realización, las células del subconjunto son células tumorales. Esta misma combinación, al usar una operación *Fuera* realizada por el enmascarador 220 de células que no son del subconjunto, como se muestra en el paso 1754 de la figura 17, genera una máscara de todas las células que no son del subconjunto en la imagen de muestra. En algunas formas de realización, las células que no pertenecen a un subconjunto son células que no son tumorales.

[0069] Antes de combinarse con otra máscara, la máscara del primer biomarcador (del enmascarador del primer biomarcador 222) se dilata con el dilatador 226. La máscara dilatada representa un área que rodea a las células que expresan un primer biomarcador, para identificar un espacio en el que las células que expresan el segundo biomarcador estarían dentro de una proximidad adecuada para interactuar con la célula que expresa el primer biomarcador. Esto está representado por los pasos 1756 y 1758 de la figura 17. El diagrama de flujo de la figura 17 muestra la dilatación que tiene lugar en dos pasos, 1756 y 1758. Esto puede ser necesario cuando hay un límite para las iteraciones máximas en cada paso. Por ejemplo, puede haber un máximo de 10 iteraciones

(correspondientes a un aumento de 10 píxeles), por lo que, cuando se necesita un aumento de 20 píxeles, la dilatación debe dividirse en dos pasos subsiguientes.

[0070] Dentro del enmascarador del segundo biomarcador 224, la máscara de biomarcador puede combinarse con la máscara de células que no pertenecen a un subconjunto descrita anteriormente, usando una operación Y, como se muestra en el paso 1760 de la figura 17, para generar una máscara de todas las células que no pertenecen a un subconjunto que dan positivo para el primer biomarcador. A continuación, esta máscara se combina (paso 1762) en el enmascarador de interacción 230 con la máscara dilatada del dilatador 226 para generar una máscara de interacción. La máscara de interacción identifica las células no tumorales que son que dan positivo para el segundo biomarcador y que también están dentro del área de interacción, o que se superponen a la máscara dilatada. Estas células identificadas, entonces, representan las células que podrían interactuar con las células que dan positivo para el primer biomarcador, resultando así en una mayor respuesta a la terapia.

[0071] Para calcular una puntuación de proximidad espacial (SPS), el área de la máscara de interacción se determina en píxeles en el evaluador de área 232. En algunas formas de realización, el área de todas las células que son capaces de expresar el segundo biomarcador se determina en píxeles en el evaluador de área 234. Las células que son capaces de expresar el segundo biomarcador pueden ser células tumorales o células no tumorales. En algunas formas de realización, el área de todas las células del campo de visión se determina en píxeles en el evaluador de área 234. Una puntuación de interacción, o proximidad espacial, se determina en la calculadora de interacción 236 dividiendo el área del evaluador de área 232 por el área del evaluador de área 234 y multiplicando por un factor predeterminado. Como se ha descrito anteriormente, en una forma de realización, la ecuación ejecutada por la calculadora de interacción 236 es:

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

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

[0072] El procedimiento Y se modela según una operación Y binaria, pero difiere de manera significativa. Y acepta la imagen actual y un usuario seleccionado como resultado. La salida es una imagen creada al realizar una multiplicación de las intensidades normalizadas de píxeles coincidentes de las dos imágenes de entrada. En algunos casos, los datos de intensidad de la imagen ya están normalizados. Por lo tanto, el procedimiento Y es simplemente una multiplicación por píxeles de las dos imágenes. Las dos entradas necesarias para *Fuera* son la imagen actual y un resultado seleccionado por el usuario. *Fuera* elimina la segunda imagen de la primera según la fórmula  $A * (1 - B/B_{\max})$ , donde A es la imagen actual, B la imagen seleccionada por el usuario para eliminar y  $B_{\max}$  es la intensidad máxima de B. Nótese que la división de B por  $B_{\max}$  normaliza B.

## EJEMPLOS

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

[0073] *Preparación de las muestras.* Se desparafinaron muestras de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE). A continuación, los portaobjetos se rehidrataron mediante una serie de lavados de xileno a alcohol antes de incubarlos en agua destilada. A continuación, se realizó la recuperación de antígenos inducida por calor usando condiciones de presión y temperatura elevadas, se dejaron enfriar y se transfirieron a solución salina con pH regulado con Tris. Luego se realizó la tinción, para la que se llevaron a cabo los siguientes pasos. Primero, se bloqueó la peroxidasa endógena y luego se realizó una incubación con una solución de bloqueo de proteínas para reducir la tinción de anticuerpos inespecíficos. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con un anticuerpo primario anti-PD1 de ratón. A continuación, se lavaron los portaobjetos antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-HRP de ratón. Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de PD-1 usando TSA+ Cy@ 3.5 (Perkin Elmer). A continuación, se neutralizó cualquier HRP residual usando dos lavados de 100 mM de benzhidrazida recién preparada con 50 mM de peróxido de hidrógeno. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de la tinción con un anticuerpo primario anti-PD-L1 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un "cóctel" de anticuerpos secundarios anti-HRP de conejo más anti-S100 de ratón marcados directamente con colorante 488 y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de PD-L1 usando TSA-Cy@ 5 (Perkin Elmer). Los portaobjetos se lavaron por última vez antes de cubrirlos con un cubreobjetos y medio de montaje y se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. Se muestra una descripción esquemática de los anticuerpos y reactivos de detección en

la FIG 1. Alternativamente, los portaobjetos se tiñeron con anticuerpo primario anti-CD8 en lugar de anticuerpo primario anti-PD1.

[0074] *Obtención de imágenes y análisis de muestras.* A continuación, se adquirieron imágenes de fluorescencia utilizando el sistema de análisis de portaobjetos inteligente Vectra 2 (Vectra 2 Intelligent Slide Analysis System) utilizando el *software* Vectra versión 2.0.8 (Perkin Elmer). En primer lugar, se obtuvieron imágenes monocromáticas del portaobjetos con un aumento de 4x utilizando DAPI. Se utilizó un algoritmo automatizado (desarrollado con inForm) para identificar las áreas del portaobjetos que contenían tejido.

[0075] Se tomaron imágenes de las áreas del portaobjetos identificadas como que contenían tejido con un aumento de 4x para los canales asociados con DAPI (azul), FITC (verde) y Cy® 5 (rojo) para crear imágenes RGB. Estas imágenes de 4x se procesaron utilizando un algoritmo de enriquecimiento automatizado (desarrollado con inForm) en el selector de campo de visión 104 para identificar y clasificar los posibles campos de visión con aumento de 20x de acuerdo con la expresión de Cy® 5 más alta.

[0076] Se obtuvieron imágenes de los 40 campos de visión superiores con un aumento de 20x en las longitudes de onda de DAPI, FITC, Texas Red y Cy® 5. Las imágenes sin procesar se revisaron para verificar su aceptabilidad, y las imágenes que estaban desenfocadas, que carecían de células tumorales, que eran altamente necróticas o que contenían altos niveles de señal de fluorescencia no asociada con la localización esperada de anticuerpos (es decir, tinción de fondo) se descartaron antes del análisis. Las imágenes aceptadas se procesaron usando AQUAduct (Perkin Elmer), en donde cada fluoróforo se desmezcló espectralmente mediante el desmezclador espectral 210 en canales individuales y se guardó como un archivo separado.

[0077] Los archivos procesados se analizaron adicionalmente utilizando AQUAnalysis™ o mediante un proceso totalmente automatizado utilizando AQUAserve™. Los detalles fueron los siguientes.

[0078] Cada imagen de DAPI fue procesada por el enmascarador de núcleos 212 para identificar todos los núcleos celulares dentro de esa imagen (figura 2a), y luego dilatada 3 píxeles para representar el tamaño aproximado de una célula completa. Esta máscara resultante representaba todas las células dentro de esa imagen (figura 2b).

[0079] S100 (marcador de células tumorales para melanoma) detectada con colorante 488 (figura 3a) fue procesada por el enmascarador de tumores 216 para crear una máscara binaria de toda el área tumoral dentro de esa imagen (figura 3b). La superposición entre esta máscara y la máscara de todas las células creó una nueva máscara para las células tumorales (figura 3c), utilizando el enmascarador de células tumorales 218.

[0080] De manera similar, la ausencia del marcador de células tumorales en combinación con la máscara de todos los núcleos creó una nueva máscara para todas las células no tumorales (figura 3d), realizada con el enmascarador de células no tumorales 220.

[0081] Cada imagen de Cy® 5 (figura 4a) fue procesada por el enmascarador del primer biomarcador 222 y se superpuso con la máscara de todas las células para crear una máscara binaria de todas las células que dan positivo para PD-L1 (figura 4b). La superposición de la máscara de biomarcador con la máscara de todas las células eliminó los píxeles de ruido que podían identificarse falsamente en la máscara como células con positivo para el biomarcador.

[0082] Cada imagen de Cy® 3.5 (figura 5a) fue procesada por el enmascarador del segundo biomarcador 224 para crear una máscara binaria para las células que dan positivo para PD-1 y se superpuso con la máscara de todas las células no tumorales para crear una máscara binaria de todas las células no tumorales que dan positivo para PD-1 (figura 5b). La superposición de la máscara de biomarcador con la máscara de todas las células no tumorales eliminó los píxeles de ruido que podían identificarse falsamente en la máscara como células positivas de biomarcadores.

[0083] La máscara binaria de todas las células que dan positivo para PD-L1 se dilató utilizando un segundo dilatador 226 para crear una máscara de interacción que abarcaba las células adyacentes más cercanas (por ejemplo, células con PD-1) (figura 6a). Esta máscara de interacción se combinó con una máscara binaria de todas las células no tumorales que dan positivo para PD-1 utilizando el enmascarador de interacción 230 para crear un compartimento de interacción de las células que dan positivo para PD-1 lo suficientemente cerca de las células que dan positivo para PD-L1 como para que PD-1 interactuara probablemente con PD-L1 (figura 6b).

[0084] El área total de todos los campos aceptados (hasta 40 campos de visión) para el compartimento de interacción y el área total de las células no tumorales se calculó en los evaluadores de área 232, 234 respectivamente. El área total de todos los campos de visión aceptados para el compartimento de interacción se dividió entre el área total de las células no tumorales y se multiplicó por un factor de 10 000, utilizando la calculadora de interacción 236 para crear un número entero que representara una puntuación de interacción para cada muestra. Las mediciones de PD-L1 y PD-1 fueron altamente reproducibles ( $R^2 = 0,98$  y  $0,97$ ,

respectivamente). Se observó un amplio rango de puntuaciones de expresión e interacción de PD-L1 y PD-1 en muestras clínicas de archivo ( $n = 53$ ). En una cohorte de 26 pacientes con melanoma avanzado tratados con nivolumab ( $n = 5$ ) o pembrolizumab ( $n = 21$ ), se observó que la puntuación de interacción PD-1/PD-L1 distinguía de manera fiable a los que respondían al tratamiento de los que no respondían al tratamiento ( $p = 0,01$ ) mientras que con PD-L1 solo ( $p = 0,07$ ) o CD8 solo ( $p = 0,23$ ) no. Además, los pacientes con puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 más altas tuvieron tasas de respuesta superiores (82 % frente a 20 %,  $p = 0,01$ ). Los pacientes con puntuaciones altas de interacción PD-1/PD-L1 experimentaron una mediana de supervivencia libre de progresión más prolongada ( $p = 0,059$ ) y menos muertes (22 % frente a 58 %) en comparación con los pacientes con puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 más bajas. Estos resultados sugieren que este método de puntuación de la muestra de tejido para obtener puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 proporciona una capacidad predictiva superior (82 % de valor predictivo positivo, 80 % de valor predictivo negativo) en comparación con la expresión de PD-L1 sola.

[0085] Las puntuaciones representativas de los 26 pacientes se muestran en la figura 7a. Según los datos, se seleccionó un umbral de 800-900 para indicar la probabilidad de respuesta al tratamiento.

[0086] Alternativamente, la puntuación de interacción se calculó para cada campo de visión individual y la puntuación máxima para cada paciente se muestra en la figura 7b. En función de la puntuación máxima, se seleccionó un umbral de 1900 para indicar la probabilidad de respuesta al tratamiento.

[0087] Para evaluar el efecto del algoritmo de enriquecimiento en la puntuación de interacción, los procedimientos mencionados anteriormente se realizaron utilizando imágenes de portaobjetos completos en lugar del algoritmo de enriquecimiento (véase la figura 8). Cuando se realizó el análisis de la imagen de portaobjetos completo, ya no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes que respondieron a la terapia anti-PD1 y los que no lo hicieron. Como tal, no se pudo determinar un umbral con este análisis.

[0088] Las puntuaciones de interacción se compararon con la supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes (figura 9). Las puntuaciones de interacción de al menos 803 se correlacionaron bien con la supervivencia. En particular, la expresión de PD-L1 no se correlacionó con una mejor SLP (figura 10).

[0089] En las FIGS. 11 y 12 se muestran ejemplos representativos de máscaras superpuestas que indican células que dan positivo para PD-L1 (rojo), células que dan positivo para PD-1 (amarillo), células tumorales (S100, verde) y todas las células (DAPI, azul). Para un paciente con respuesta positiva a la inmunoterapia, la máscara de la figura 11 indica fácilmente la presencia de células que dan positivo para PD-L1 (rojo), células que dan positivo para PD-1 (amarillo) y todas las células tumorales (verde). Por el contrario, para un paciente sin respuesta a la inmunoterapia, la máscara de la figura 12 indica la presencia de células tumorales (S100, verde) y todas las células (DAPI, azul), pero muestra pocas o ninguna célula positiva para PD-L1 (rojo) o células que dan positivo para PD-1 (amarillo). La figura 11 representa una puntuación de interacción de 2176 (respuesta completa a la inmunoterapia). La figura 12 representa una puntuación de interacción de 8 (sin respuesta a la inmunoterapia).

[0090] Las muestras de tejido también se evaluaron utilizando un método aprobado por la FDA para medir PD-L1 en cáncer de pulmón no microcítico con el clon 22C3 de anticuerpo anti-PD-L1, que no se utiliza actualmente para muestras de tejido de melanoma. La expresión de PD-L1 se comparó con la SLP del paciente y se muestra en la figura 18. Este método no demuestra un valor diagnóstico estadísticamente relevante en comparación con los métodos descritos en este documento que utilizan puntuaciones de interacción.

[0091] Se examinó una cohorte de verificación de 34 pacientes adicionales con melanoma metastásico y se obtuvieron puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 (véase la figura 19a). Estas puntuaciones de interacción también se compararon con la supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes (figura 19b). Aunque no es estadísticamente significativa ( $p = 0,19$ ), la comparación indica una tendencia de que pacientes con puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1 más altas tienen una SLP más prolongada. La importancia estadística puede ser limitada debido al uso relativamente reciente de estas terapias en la clínica, lo que limita el tiempo de seguimiento para estos pacientes.

[0092] Las puntuaciones de interacción PD-1/PD-L1, así como la comparación de estas puntuaciones con la SLP del paciente o la supervivencia global (SG) del paciente para la combinación de la cohorte anterior de 26 pacientes con la cohorte de verificación de 34 pacientes se muestran en las FIG. 19c-19e. El análisis combinado indica claramente que los pacientes con niveles elevados de PD-1/PD-L1 presentan una respuesta mejorada a las terapias anti-PD-1.

**Ejemplo 2. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes obtenidas para muestras de tejido de carcinoma pulmonar no microcítico de pacientes humanos.**

[0093] Se realizaron procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo el anti-S100 de ratón marcado directamente con el colorante 488 con anti-pancitoqueratina de ratón directamente marcado con el colorante 488 para las muestras de tumores epiteliales. Las puntuaciones de interacción de 38 muestras se muestran en la figura 13.

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

[0094] *Preparación de las muestras* Las muestras de tejido incluidas en parafina y fijadas con formalina (FFPE) se desparafinaron, se rehidrataron y la recuperación de antígenos se realizó en condiciones de temperatura elevada. Luego se realizó la tinción, para la que se llevaron a cabo los siguientes pasos. Primero, los tejidos se sometieron a una detección de la expresión de CTLA-4 usando 20 pares de sondas de hibridación que abarcaban aproximadamente 1 kb del ARNm de CTLA-4 usando RNAScope® (Advanced Cell Diagnostics). La hibridación *in situ* se visualizó con TSA-Cy®3. Los portaobjetos se lavaron y luego se neutralizó cualquier HRP residual usando dos lavados de 100 mM de benzhidrazida recién preparada con 50 mM de peróxido de hidrógeno. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de la tinción con un anticuerpo primario anti-CD80 de ratón. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un anticuerpo secundario anti-HRP de ratón. Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de CD80 usando TSA-Cy® 5 (Perkin Elmer). A continuación, se neutralizó cualquier HRP residual usando dos lavados de 100 mM de benzhidrazida recién preparada con 50 mM de peróxido de hidrógeno. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de la tinción con un anticuerpo primario anti-CD3 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un cóctel de anticuerpos secundarios anti-conejo HRP más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de CD3 usando TSA-AlexaFluor488® (Life Technologies). Los portaobjetos se lavaron por última vez antes de cubrirlos con un cubreobjetos y medio de montaje y se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente.

[0095] Se realizaron procedimientos de obtención de imágenes y de análisis análogos a los del Ejemplo 1, obteniendo imágenes en las longitudes de onda de DAPI, FITC, Cy® 3 y Cy® 5. La expresión de CTLA-4 y CD80 se utilizó para desarrollar un algoritmo de enriquecimiento para adquirir imágenes de 20x. Se realizó un análisis para determinar las puntuaciones de interacción CTLA-4/CD80 midiendo el área total, en píxeles, de células positivas CTLA-4 y CD3 dentro de la proximidad de células positivas CD80 dividida por el área total, en píxeles, de las células positivas CD3, multiplicada por un factor de 10,000. Los resultados se muestran en la figura 20.

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

[0096] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de CTLA-4 y CD80.

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

[0097] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 por la tinción y el análisis de PD-L2.

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

[0098] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de CTLA-4 y CD86.

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

[0099] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de LAG-3 y HLA-DR.

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

[0100] Se realizan procedimientos análogos al Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de TIM-3 y Galectina 9.

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

[0101] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de 41BB y 4.1BBL.

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

[0102] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de OX40 y OX40L.

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

[0103] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de CD40 y CD40L.

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

[0104] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de ICOS e ICOSL.

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

[0105] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de GITR y GITRL.

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

[0106] Se realizan procedimientos análogos a los del Ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-L1 y PD-1 por la tinción y el análisis de HLA-DR y TCR.

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

[0107] Se realizaron procedimientos análogos a los del Ejemplo 1 sin el anticuerpo anti-S100 de ratón. En cambio, después de la detección de PD-L1, los anticuerpos primarios y secundarios se eliminaron mediante microondas. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con anticuerpo primario anti-CD3 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un cóctel de anticuerpos secundarios anti-conejo HRP más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de CD3 con TSA-AlexaFluor488 (Life Technologies). La obtención de imágenes y el análisis fueron análogos al Ejemplo 1, donde la proximidad espacial (por ejemplo, la puntuación de interacción) se calculó dividiendo el área de células que dan positivo para PD-1 en el área positiva para PD-L1, medida en píxeles, por el área de todas las células nucleadas, medidas en píxeles, multiplicado por un factor de 10 000. Las puntuaciones de interacción de 29 muestras se muestran en la figura 21.

## REIVINDICACIONES

1. Método para puntuar una muestra que comprende tejido tumoral obtenida de un paciente con cáncer que comprende:

- (i) usar la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, determinar una puntuación representativa de una proximidad espacial entre al menos un par de células, donde un primer miembro del al menos un par de células expresa un primer biomarcador y un segundo miembro del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador que es diferente del primer biomarcador; y
- (ii) registrar la puntuación, donde dicha puntuación, en comparación con un valor umbral, es indicativa de una probabilidad de que el paciente con cáncer responda positivamente a inmunoterapia en donde el paso de determinación comprende:

- (a) seleccionar un número predeterminado de campos de visión disponibles de la muestra que comprende tejido tumoral obtenida del paciente con cáncer, que se tiñe con una pluralidad de marcadores de fluorescencia, donde la selección prioriza la selección de campos de visión que contienen un mayor número de células que expresan el primer biomarcador en comparación con otros campos de visión;

- (b) para cada uno de los campos de visión seleccionados, dilatar las señales de fluorescencia atribuibles al primer biomarcador un margen suficiente para abarcar células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador; y

- (c) dividir una primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador, por un factor de normalización, y multiplicar el cociente resultante por un factor predeterminado para llegar a una puntuación de proximidad espacial;

en donde el paso (b) comprende

- i. generar una máscara de todas las células que dan positivo para el primer biomarcador; y

- ii. dilatar la máscara de todas las células que dan positivo para el primer biomarcador para generar una máscara dilatada representativa de una proximidad predeterminada dentro de la cual se puede encontrar una célula con interacción positiva para el segundo biomarcador.

2. Método de la reivindicación 1, donde el paso (c) comprende además

- i. generar una máscara de todas las células que dan positivo para el segundo biomarcador;

- ii. combinar la máscara de todas las células que dan positivo para el segundo biomarcador y la máscara dilatada para generar una máscara de interacción que identifica células que dan positivo para el segundo biomarcador y están dentro de la proximidad predeterminada de una célula que da positivo para el primer biomarcador; y

- iii. usar la máscara de interacción para generar un compartimento de interacción de todas las células de todos los campos de visión seleccionados que expresan el segundo biomarcador situadas proximalmente a las células que expresan el primer biomarcador;

donde un área total del compartimento de interacción es la primera área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados, que expresan el segundo biomarcador y están englobadas dentro de las señales de fluorescencia dilatadas atribuibles a las células que expresan el primer biomarcador.

3. Método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el primer miembro del al menos un par de células comprende una célula tumoral y el segundo miembro del al menos un par de células comprende una célula no tumoral.

4. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la pluralidad de marcadores de fluorescencia comprende un primer marcador de fluorescencia para el primer biomarcador y un segundo marcador de fluorescencia para el segundo biomarcador.

5. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el margen varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 píxeles.

6. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde las células localizadas proximalmente que expresan el segundo biomarcador están a menos de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de una membrana plasmática de las células que expresan el primer biomarcador.

7. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el factor de normalización es una segunda área total para todas las células no tumorales de cada uno de los campos de visión seleccionados.

8. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el factor de normalización es una segunda área total para todas las células de cada uno de los campos de visión seleccionados que tienen la capacidad de expresar el segundo biomarcador.

5 9. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el factor predeterminado es  $10^4$ .

10 10. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el primer miembro del al menos un par de células expresa un primer biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, Galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL y combinaciones de los mismos, y el  
segundo miembro del al menos un par de células expresa un segundo biomarcador seleccionado del grupo que  
consiste en PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28 y combinaciones de los  
mismos.

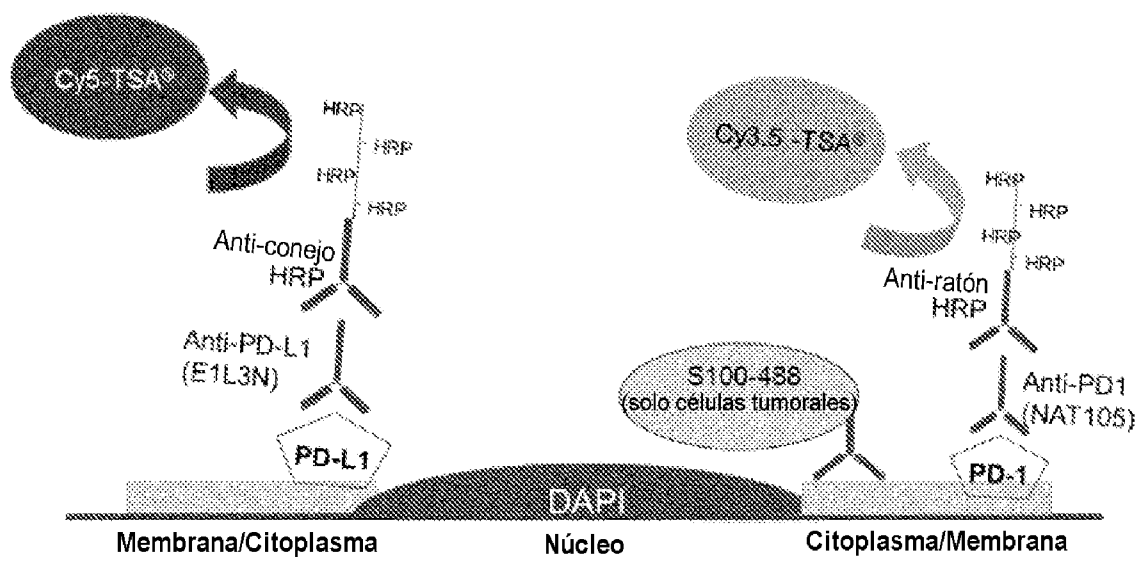
15 11. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el valor umbral varía de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000.

20 12. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el método proporciona un poder predictivo superior en comparación con una cuantificación de la expresión del primer biomarcador o una cuantificación de la expresión del segundo biomarcador, en donde el poder predictivo se cuantifica como un valor predictivo positivo, un valor predictivo negativo o una combinación de los mismos, en donde el valor predictivo positivo se calcula dividiendo el número de pacientes que responden al tratamiento con puntuaciones por encima del valor umbral entre el número total de pacientes que responden al tratamiento, y donde el valor predictivo negativo se calcula dividiendo el número de pacientes que no responden al tratamiento con puntuaciones por debajo del valor umbral entre el número total de pacientes que no responden al tratamiento.

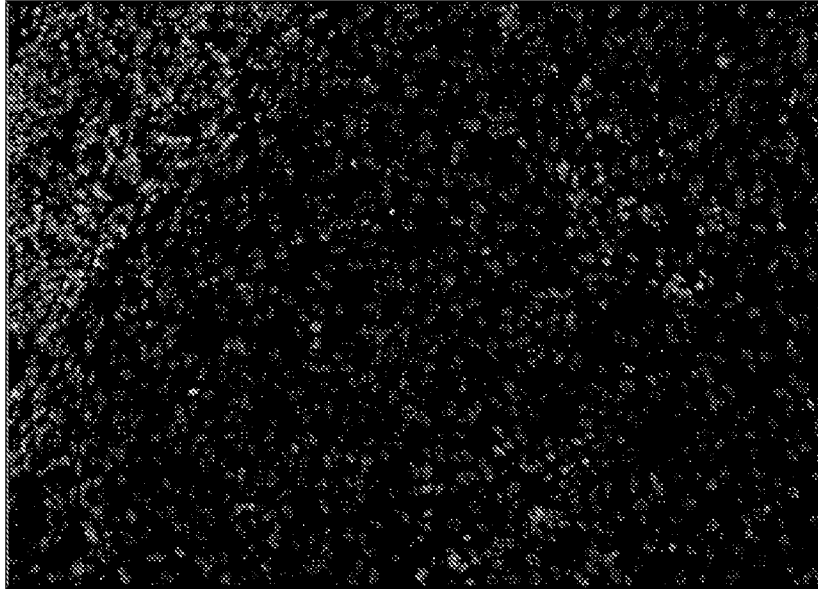
25 13. Método de la reivindicación 12, donde el valor predictivo positivo o el valor predictivo negativo es del 65 % o superior.



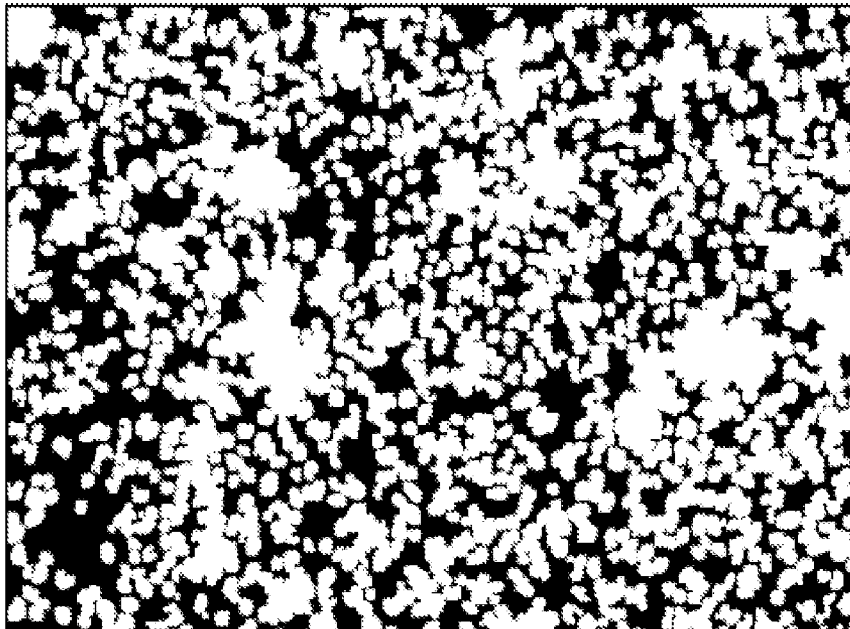
FIG. 1



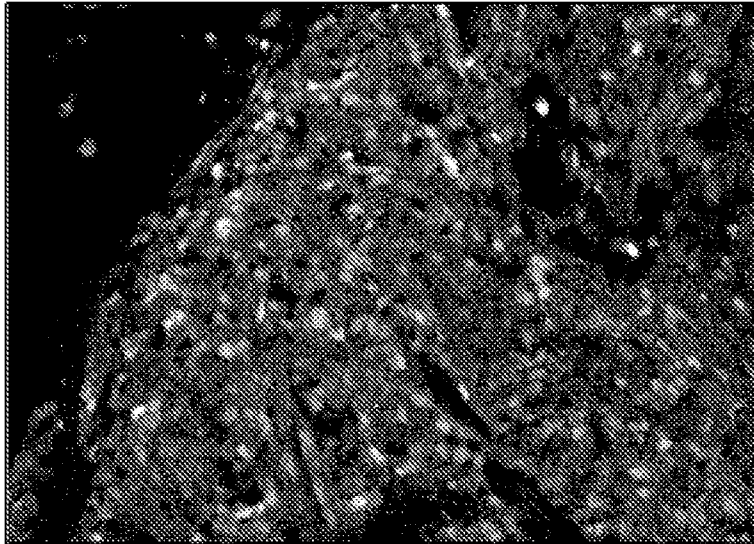
**FIG. 2a**



**FIG. 2b**



**FIG. 3a**



**FIG. 3b**

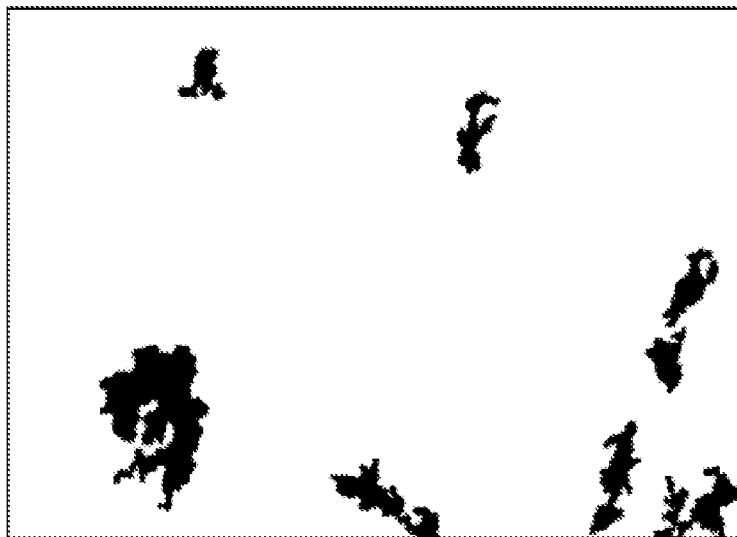


FIG. 3c

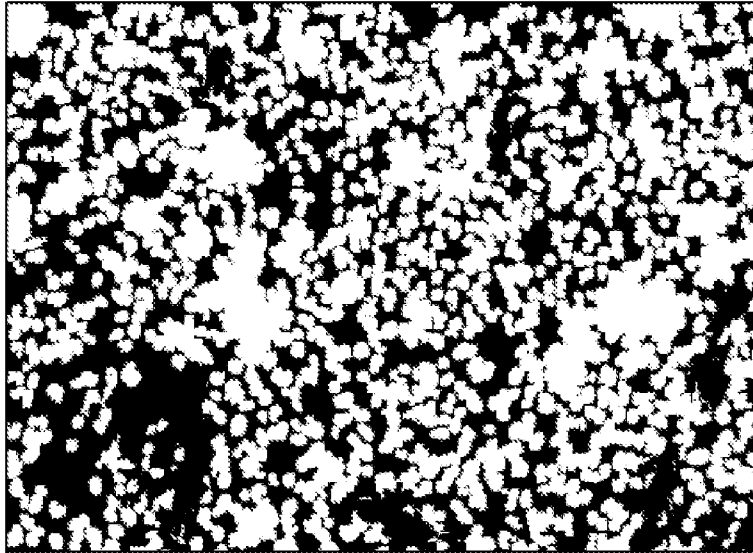
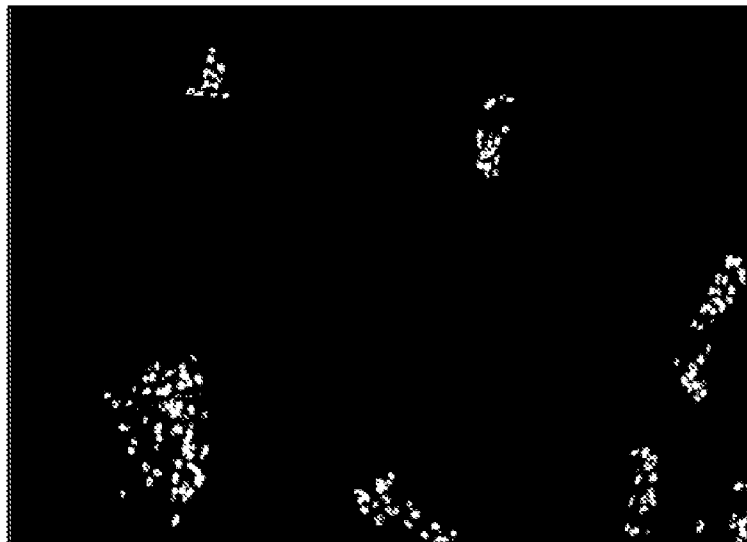
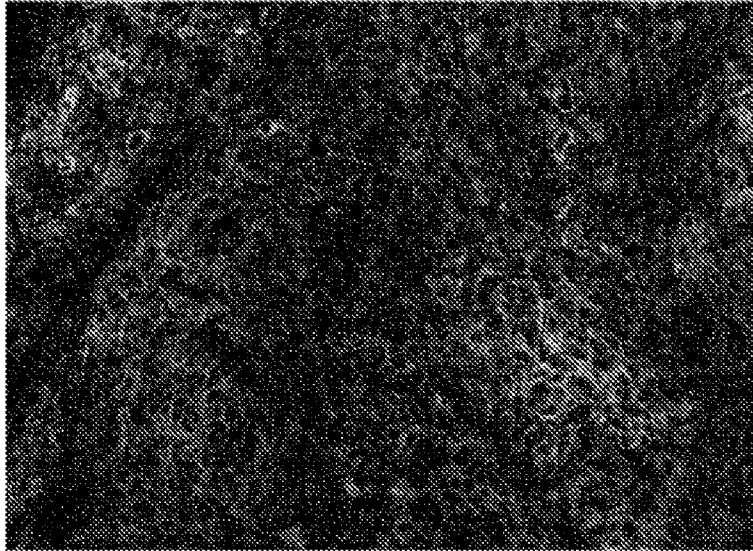


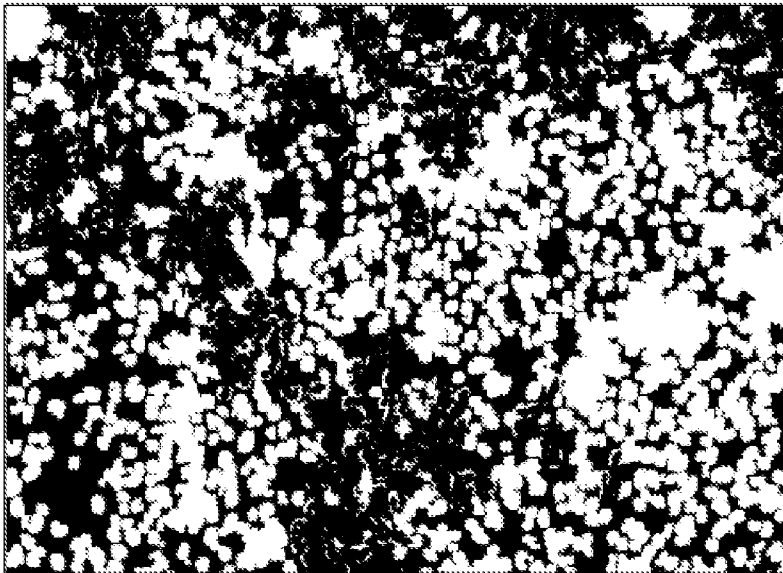
FIG. 3d



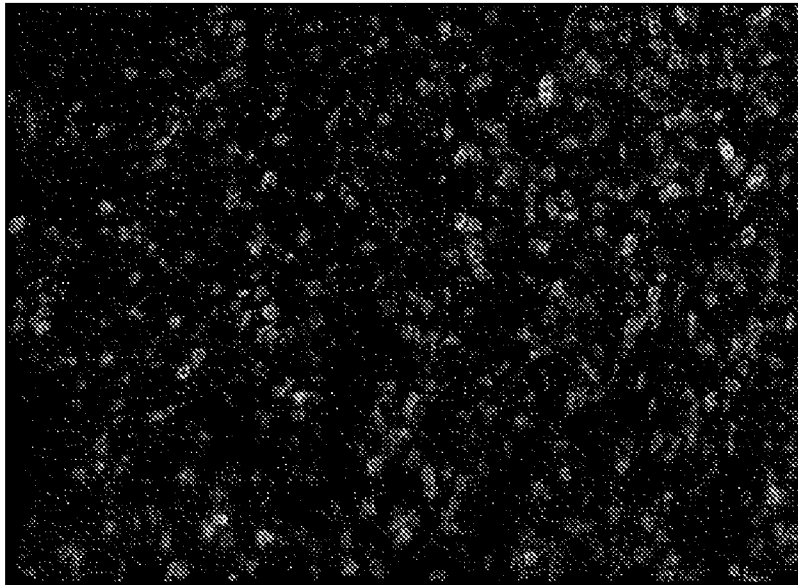
**FIG. 4a**



**FIG. 4b**



**FIG. 5a**



**FIG. 5b**

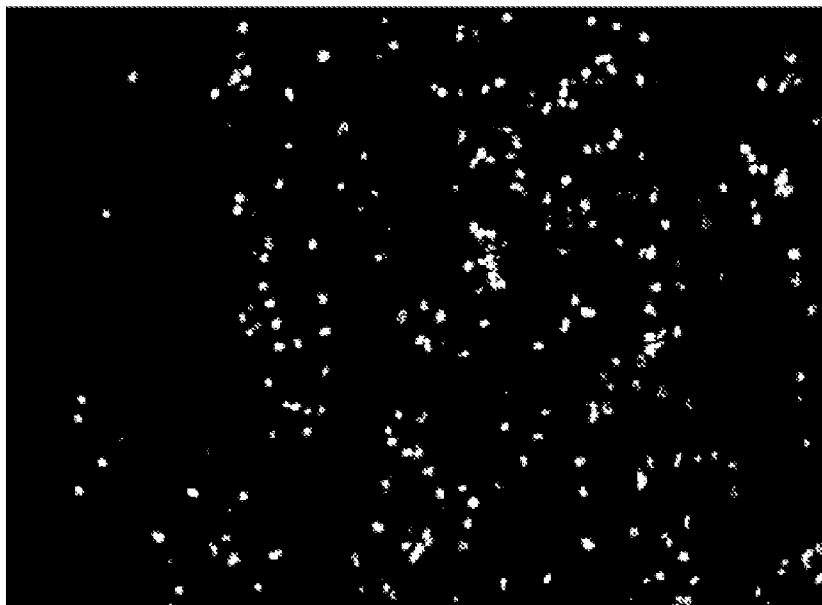


FIG. 6a

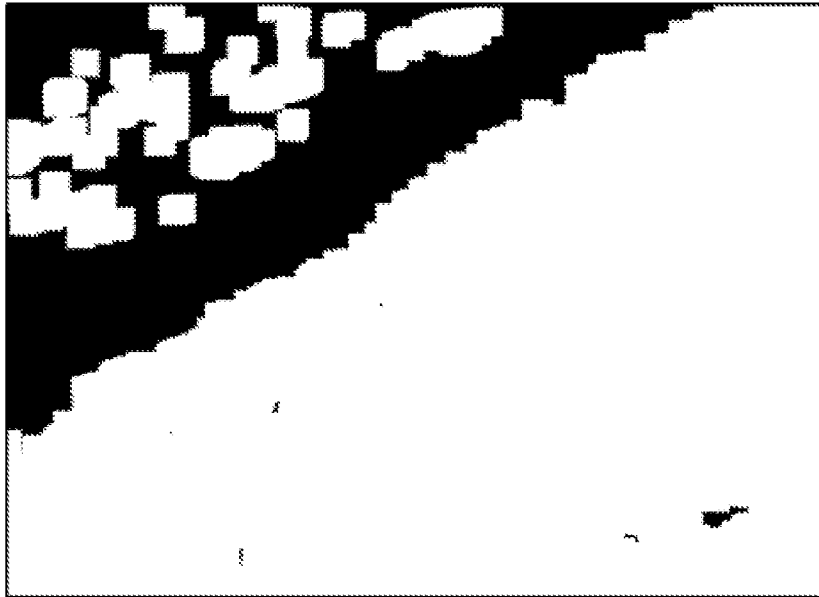


FIG. 6b

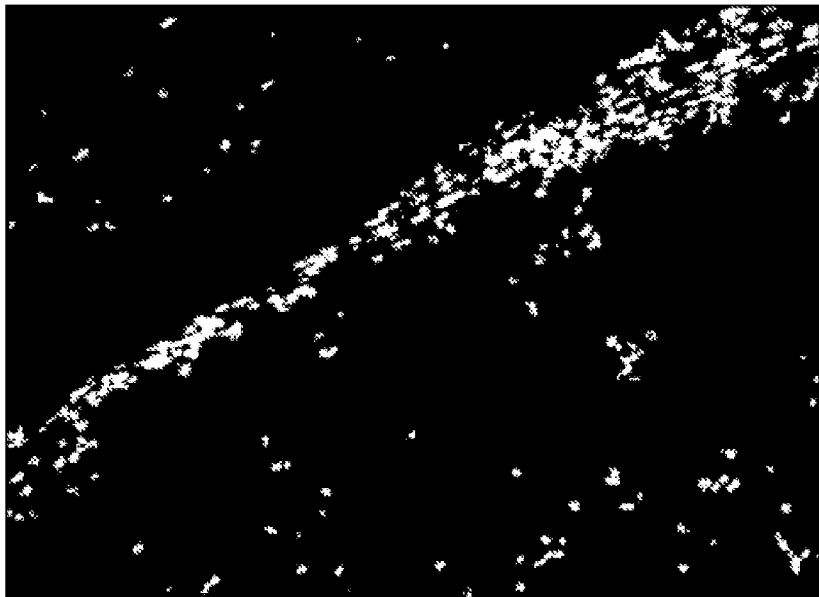


FIG. 7a

### Puntuación de interacción PD1/PD-L1

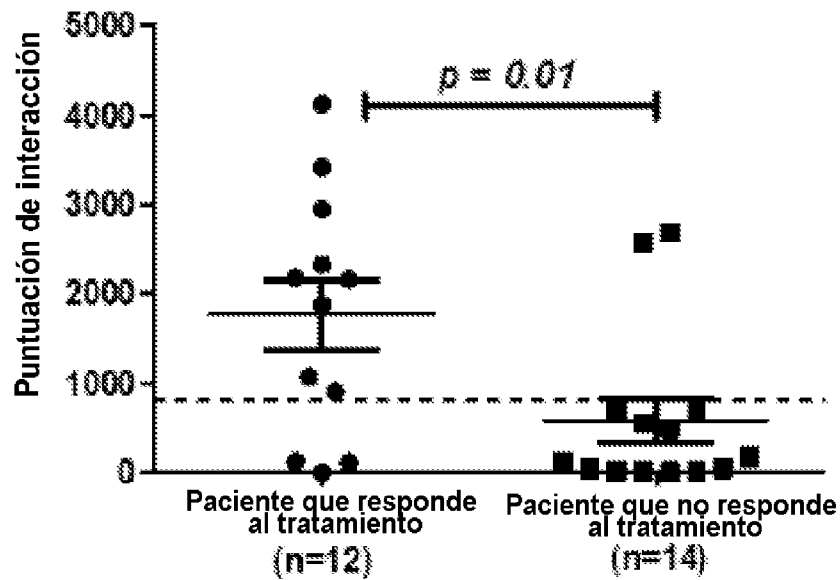
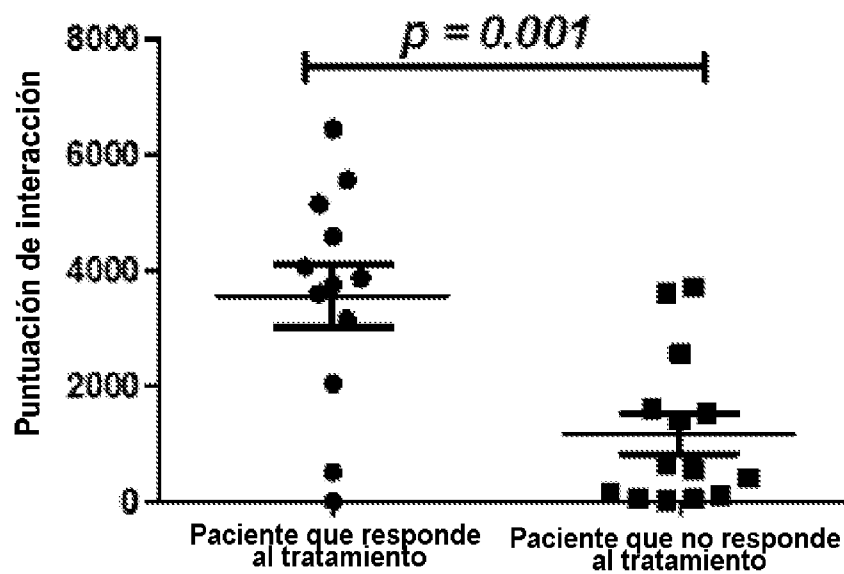


FIG. 7b

### Máxima puntuación de interacción





**FIG. 8**  
**Áreas positivas para PD1 y PDL1**

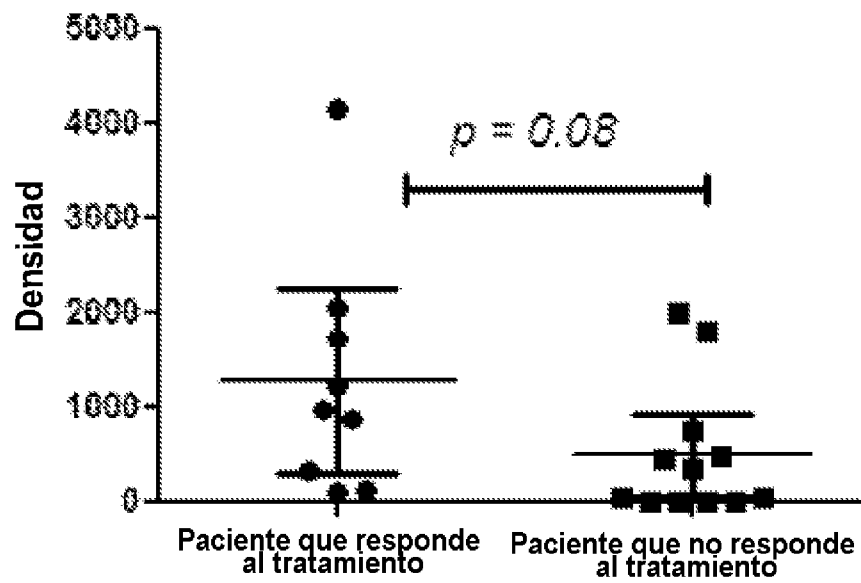


FIG. 9

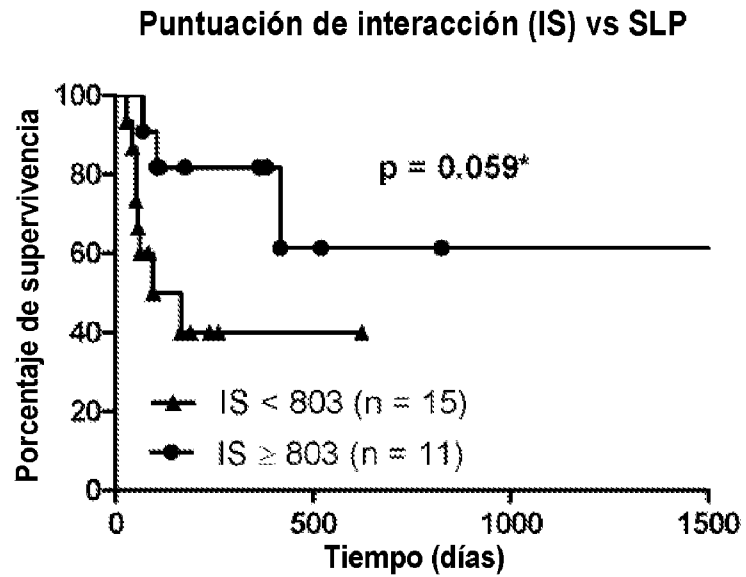
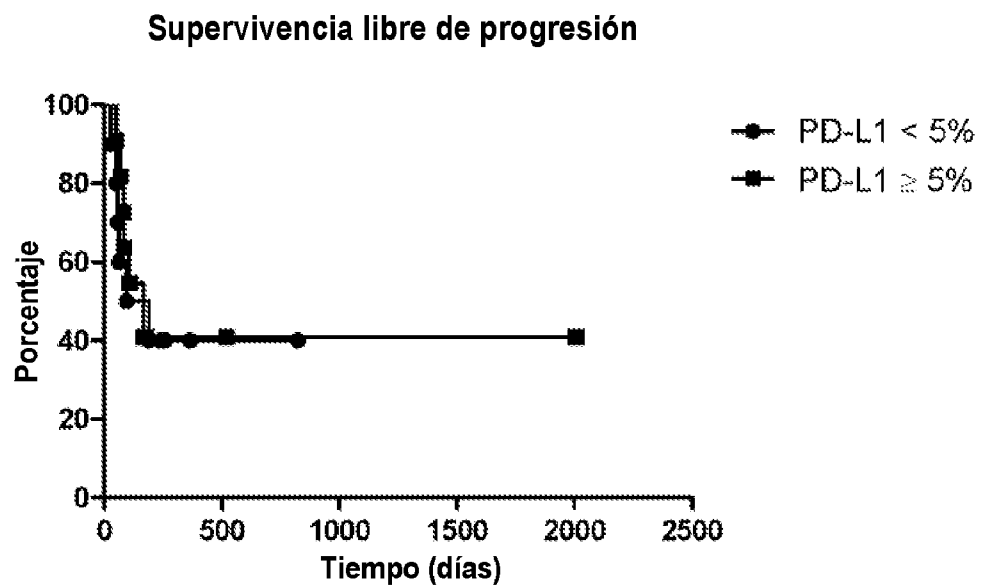
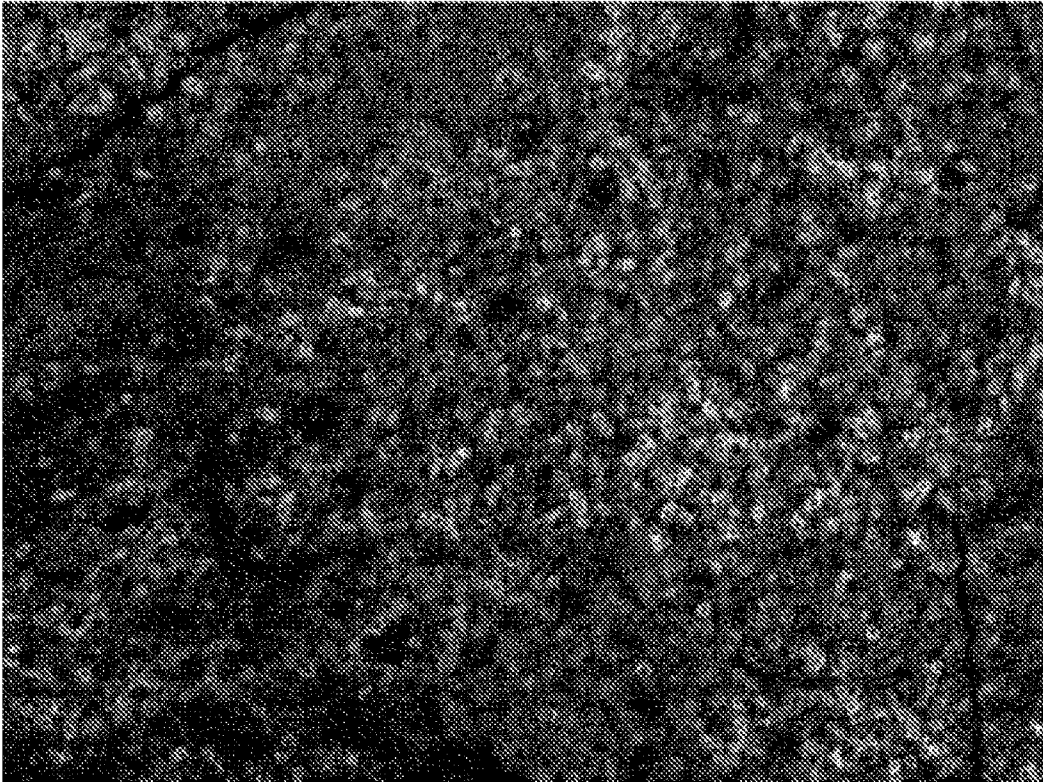


FIG. 10



**FIG. 11**



**FIG. 12**

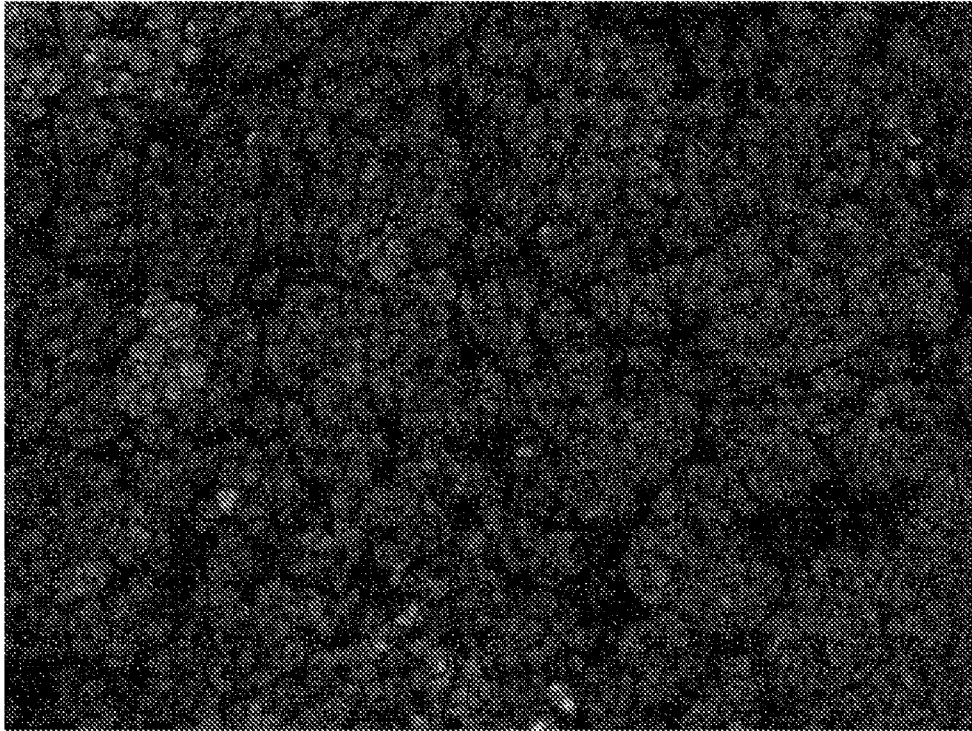


FIG. 13

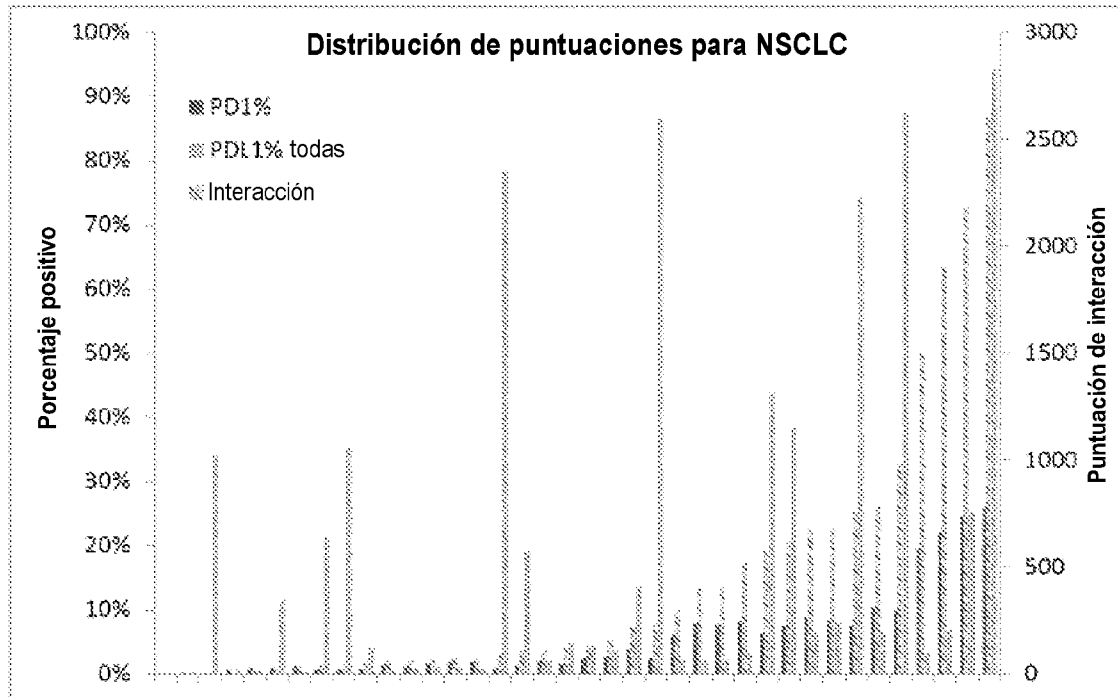


FIG. 14

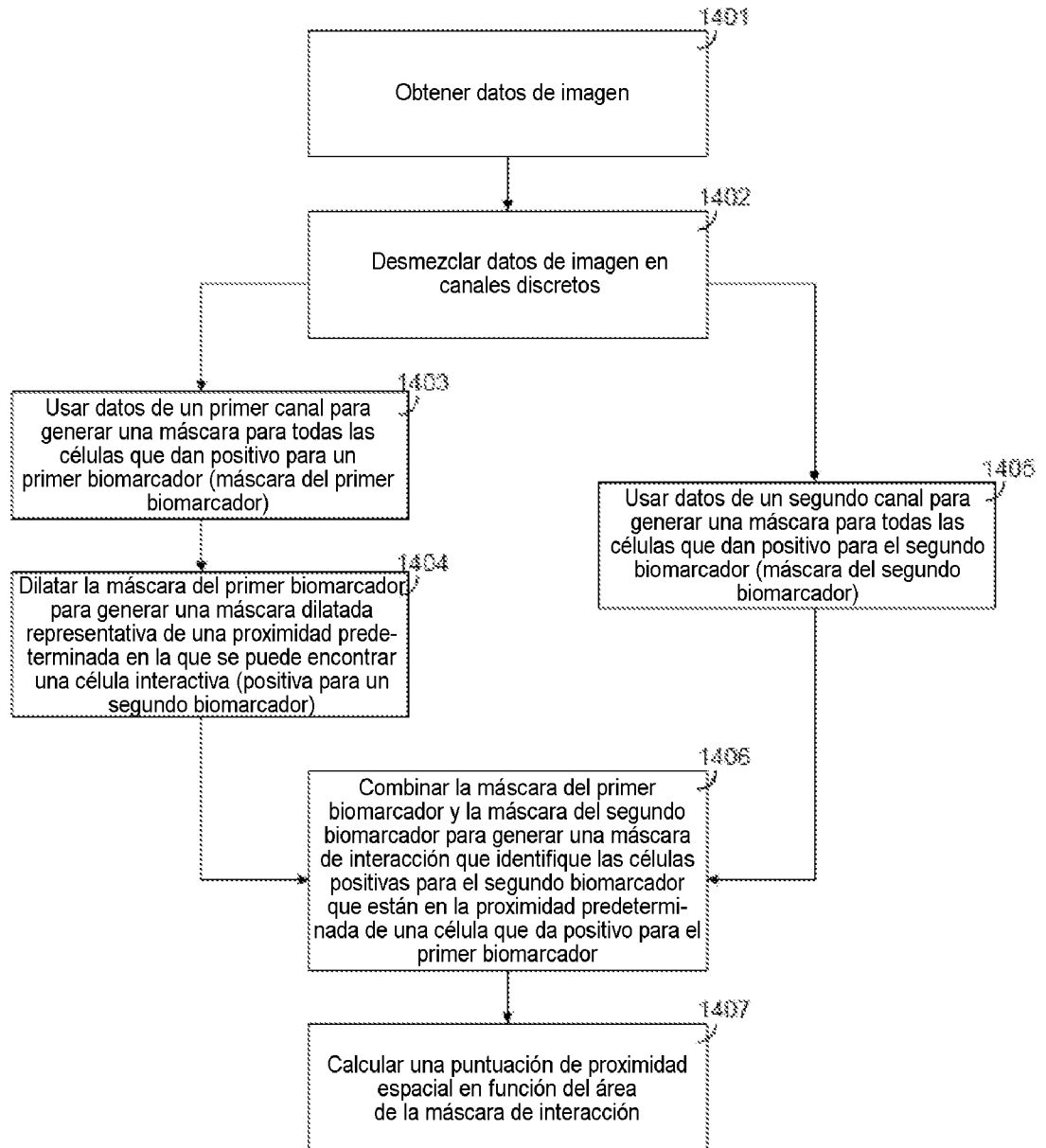


FIG. 15

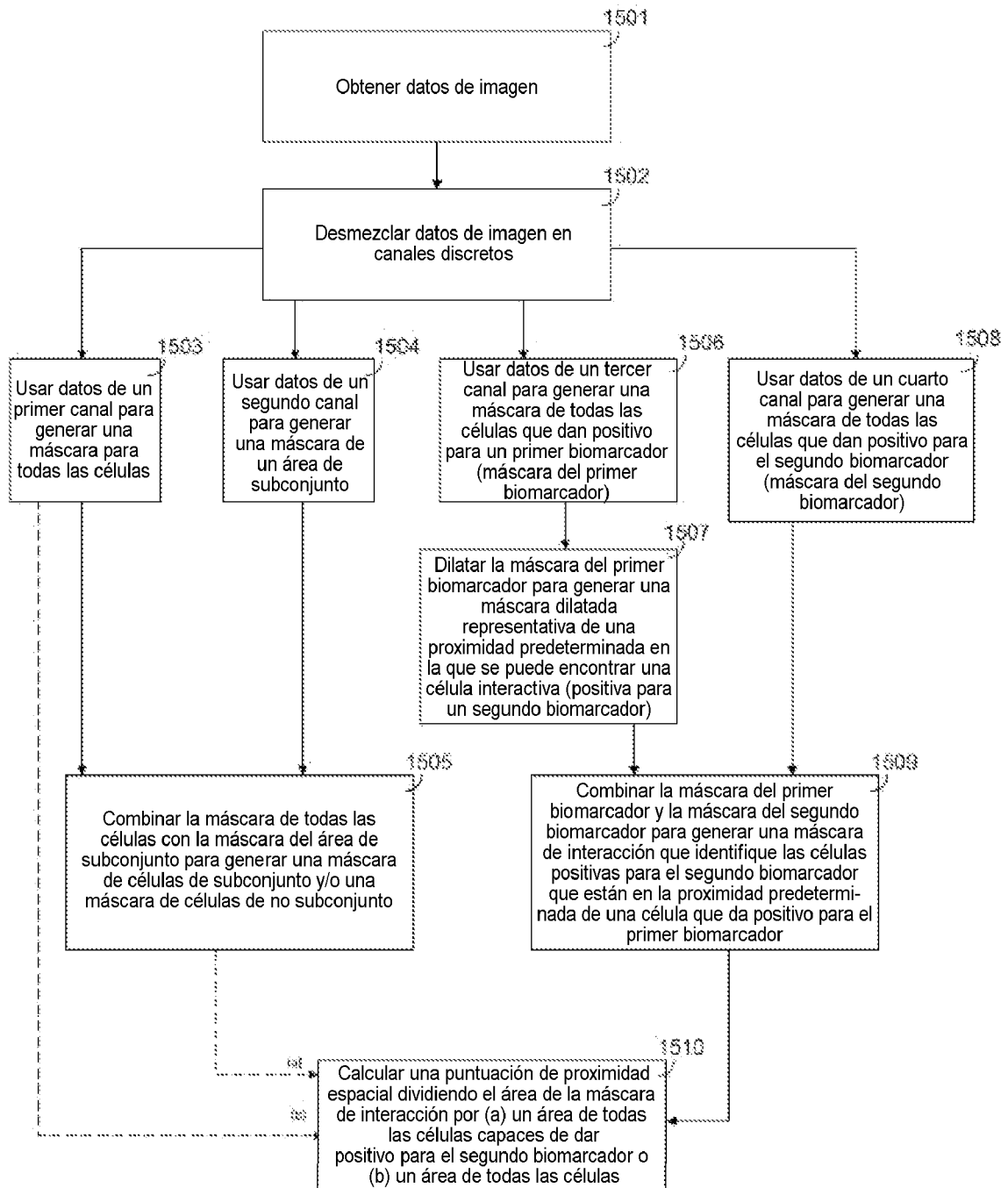


FIG. 16

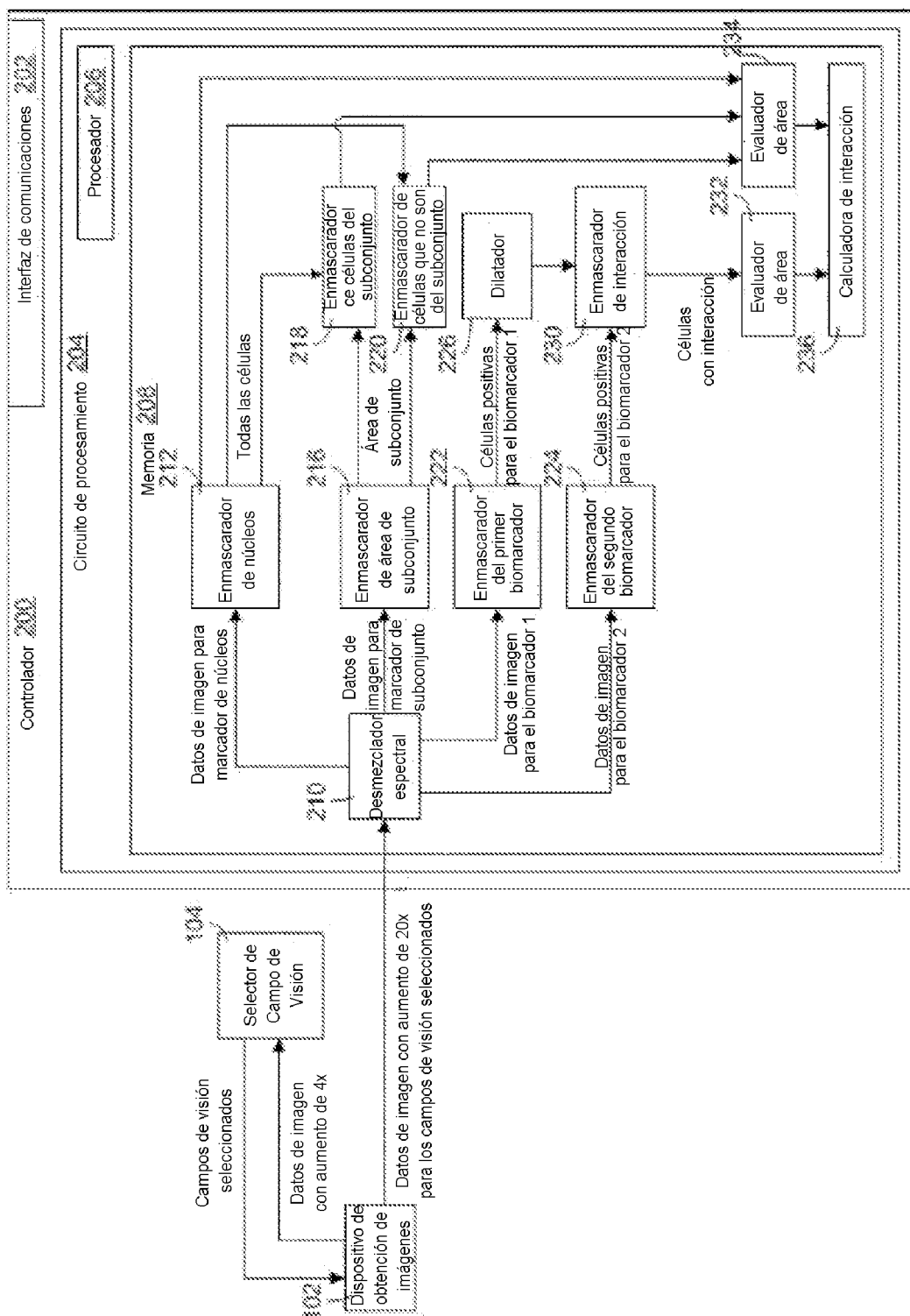




FIG. 17

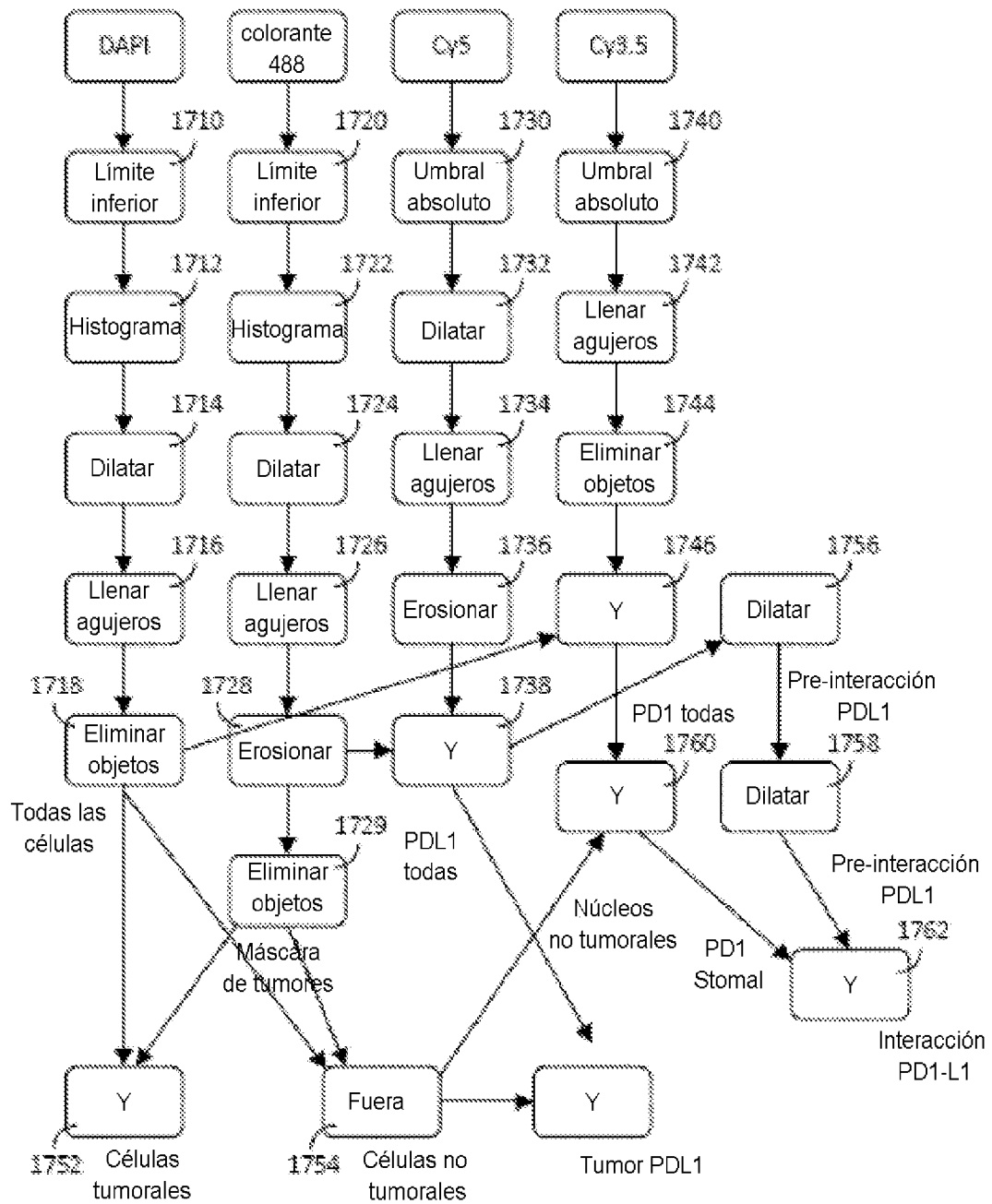


FIG. 18

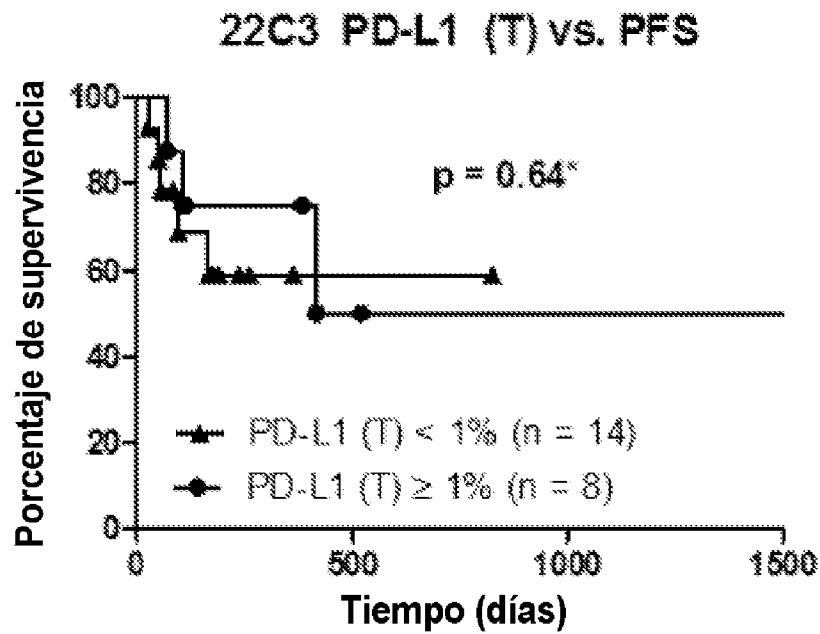


FIG. 19a

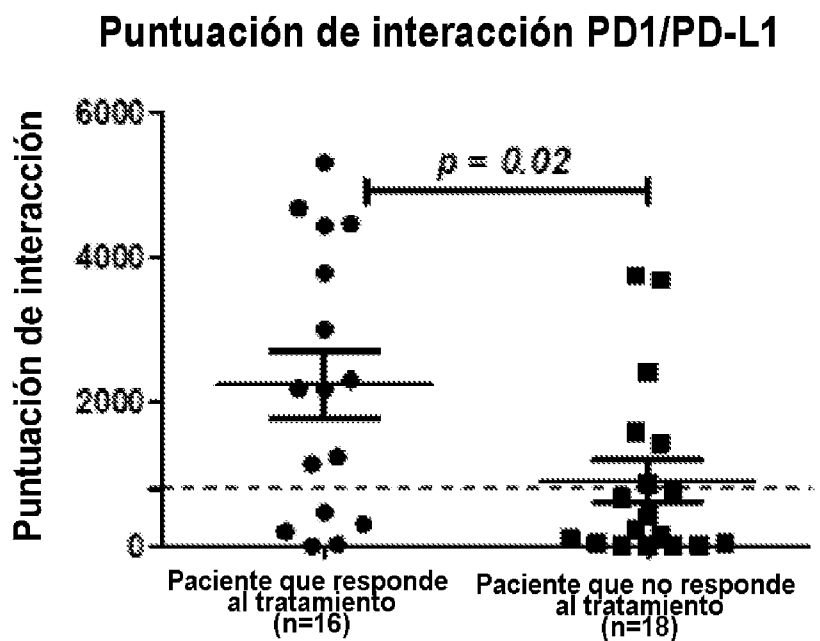


FIG. 19b

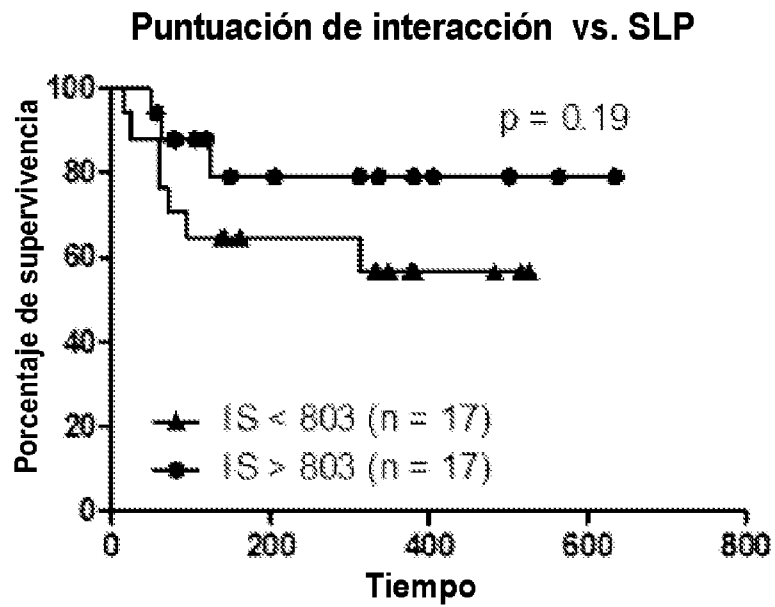


FIG. 19c

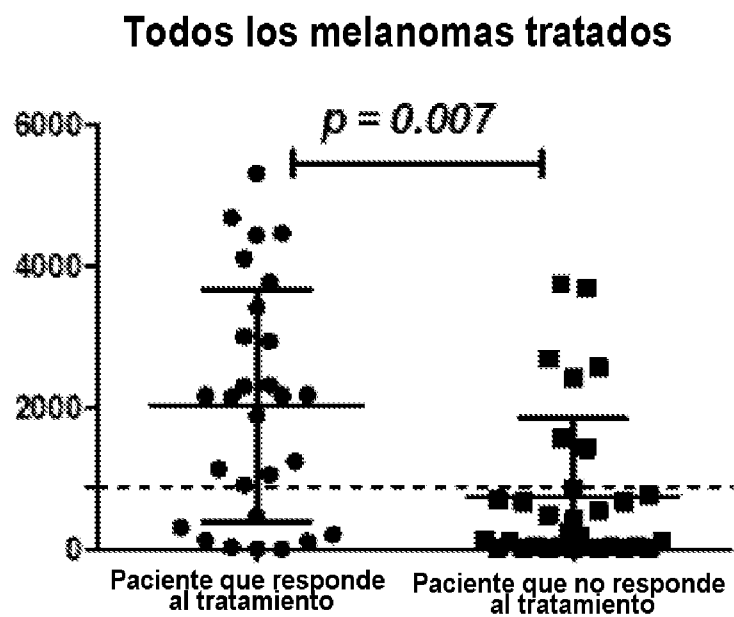


FIG. 19d

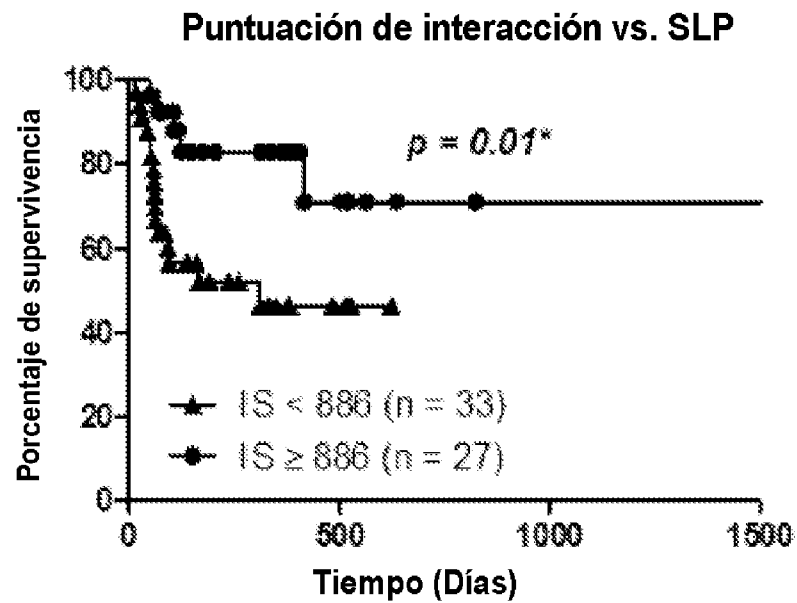


FIG. 19e

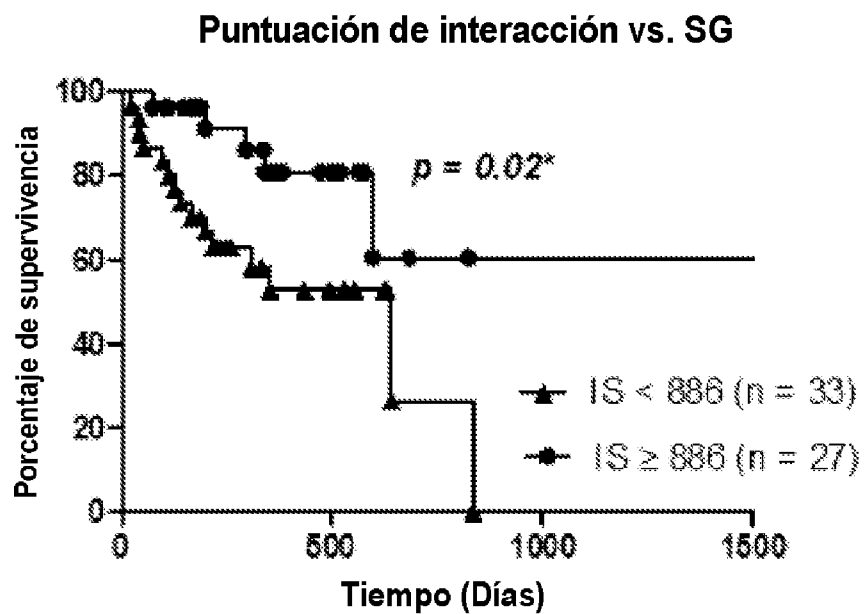


FIG. 20

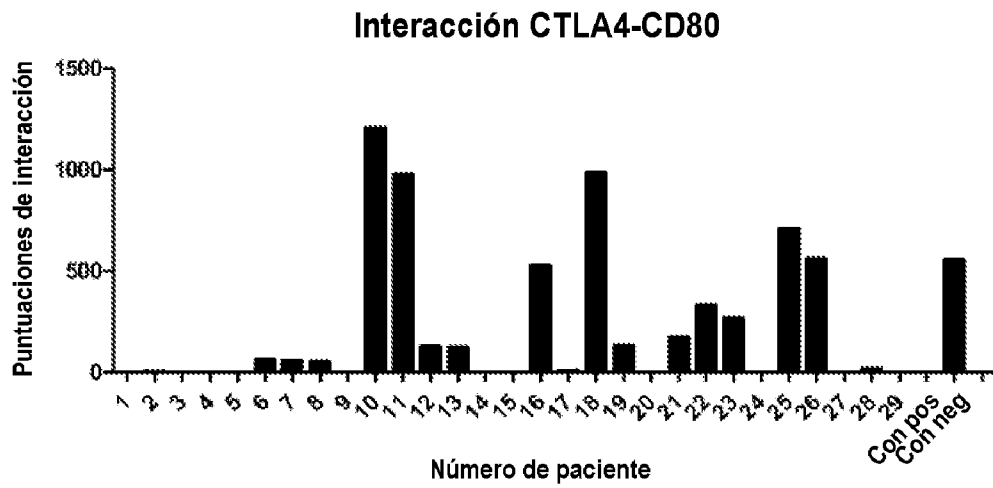


FIG. 21

