

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 883**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6841 (2008.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016 PCT/US2016/058277**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17070581**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016 E 16858373 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3365000**

54 Título: **Método de deducción de un valor de positividad de biomarcador en porcentaje para células seleccionadas presentes en un campo de visión**

30 Prioridad:

23.10.2015 US 201562245853 P

29.02.2016 US 201662301035 P

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

18.03.2021

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

BORDEAUX, JENNIFER;

DAKAPPAGARI, NAVEEN;

TRAN, THAI y

KIM, JU YOUNG

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 812 883 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 deducción de un valor de positividad de biomarcador en porcentaje para células seleccionadas presentes en un campo de visión

ANTECEDENTES

5 [0001] La presente invención se refiere generalmente al campo del tratamiento para el cáncer.

[0002] La WO2015/124777 divulga un método de análisis de imágenes médicas para identificar células tumorales positivas para un biomarcador. El método comprende la lectura de imágenes digitales que representan la misma área de un primer portaobjetos, que comprende células tumorales múltiples teñidas con una primera tinción selectiva para núcleos y con una segunda tinción selectiva para un biomarcador particular, indicativo de una célula tumoral perteneciente a un subtipo de cáncer particular. Las posiciones de los núcleos y las membranas celulares se comparan de manera que una célula tumoral positiva para un biomarcador es una combinación de un núcleo identificado y una membrana celular identificada que rodea el núcleo identificado.

15 [0003] La US7565247 divulga una evaluación rápida de la localización de biomarcadores marcados con fluorescencia en células usando la obtención de imágenes digitales. Típicamente los núcleos celulares se tiñen y se segmentan (localizan) usando un método de umbral para producir una máscara binaria, donde los objetos son blancos y el fondo negro. Los objetos blancos se evalúan según criterios morfológicos para clasificarlos como objetos (núcleos) o no, y las ubicaciones se almacenan. Varios análisis pueden aplicarse entonces a los objetos auténticos.

RESUMEN

20 [0004] Se describen en la presente, en un aspecto, métodos de deducción de un valor para el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células u, opcionalmente, uno o más subconjuntos de las mismas presentes en un campo de visión, que comprenden:

25 (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;

(ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de subconjunto;

(iii) opcionalmente, construir una tercera máscara de las terceras señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un primer biomarcador de interés;

30 (iv) combinar dichas máscaras primera y segunda de manera que se proporcione una cuarta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de subconjunto;

(v) opcionalmente, combinar dichas máscaras primera y tercera de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión,

35 que expresan también el primer biomarcador de interés;

(vi) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la cuarta máscara entre el área total de la primera máscara;

(vii) opcionalmente, combinar dichas máscaras cuarta y quinta de manera que se proporcione una sexta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión,

40 que

(a) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés; o
 (b) expresan el biomarcador de subconjunto en ausencia del primer biomarcador de interés;
 y

45 (viii) opcionalmente, deducir un valor de PBP para el primer subconjunto de todas las células que o (a) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés o (b) expresan el biomarcador de subconjunto en ausencia del primer biomarcador de interés, dividiendo el área total de la sexta máscara entre el área total de la cuarta máscara.

[0005] En algunas formas de realización, se realizan todos los pasos opcionales enumerados. En algunas formas de realización, el método comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- (x) combinar dichas máscaras primera y séptima de manera que se proporcione una octava máscara que comprende señales fluorescentes representativas de un segundo subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan también el segundo biomarcador de interés;
- (xi) combinar dichas máscaras cuarta y octava de manera que se proporcione una novena máscara que comprende señales fluorescentes representativas del segundo subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés; y
- (xii) deducir un valor de PBP para el segundo subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés dividiendo el área total de la novena máscara entre el área total de la cuarta máscara.

[0006] En algunas formas de realización, el método comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- (x) sustraer dicha segunda máscara de dicha primera máscara de manera que se proporcione una octava máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células que no expresan el biomarcador de subconjunto en el campo de visión;
- (xi) combinar dichas máscaras séptima y octava de manera que se proporcione una novena máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto en el campo de visión; y
- (xii) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la novena máscara entre el área total de la octava máscara.

[0007] En algunas formas de realización, el método comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés
- (x) combinar dichas máscaras sexta y séptima de manera que se proporcione una octava máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células que

- (a) expresan el biomarcador de subconjunto, el primer biomarcador de interés y el segundo biomarcador de interés en el campo de visión;
- (b) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés en ausencia del segundo biomarcador de interés en el campo de visión; o
- (c) expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés en ausencia del primer biomarcador de interés en el campo de visión;
- y

- (xii) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el primer biomarcador de interés o el segundo biomarcador de interés, o una combinación de los mismos, al igual que el biomarcador de subconjunto, dividiendo el área total de la octava máscara entre el área total de la cuarta máscara.

[0008] En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-L1, galectina 9 y MHC. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-1, TIM-3 y TCR. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador de interés es diferente del primer biomarcador de interés y comprende un biomarcador seleccionado de CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador de interés es

diferente del primer biomarcador de interés y comprende un biomarcador seleccionado de PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células tumorales. En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células no tumorales. En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células T. En algunas formas de realización, las células T expresan CD3. En algunas formas de realización, las células T expresan CD8. En algunas formas de realización, las células T expresan CD4. En algunas formas de realización el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células mieloides. En formas de realización adicionales, las células mieloides son células supresoras de origen mieloides. En formas de realización adicionales, las células mieloides son macrófagos asociados a tumores. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa solo en células tumorales. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa solo en células no tumorales. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa en células T. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto comprende CD3. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto comprende CD19. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa en células mieloides. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa en células supresoras de origen mieloides. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa en macrófagos asociados a tumores. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende Ki67 y dicho primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células positivas para CD8. En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles.

[0009] Se describen en la presente, en otro aspecto, métodos de deducción de un valor para el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células u, opcionalmente, uno o más subconjuntos de las mismas presentes en un campo de visión, que comprenden:

- (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de subconjunto;
- (iii) opcionalmente, construir una tercera máscara de las terceras señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un primer biomarcador de interés;
- (iv) combinar dichas máscaras primera y segunda de manera que se proporcione una cuarta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de subconjunto;
- (v) opcionalmente, combinar dichas máscaras primera y tercera de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de un primer subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan también el primer biomarcador de interés;
- (vi) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la cuarta máscara entre el área total de la primera máscara;
- (vii) opcionalmente, combinar dichas máscaras cuarta y quinta de manera que se proporcione una sexta máscara que comprende señales fluorescentes representativas del primer subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés; y
- (viii) opcionalmente, deducir un valor de PBP para el primer subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés dividiendo el área total de la sexta máscara entre el área total de la cuarta máscara.

[0010] En algunas formas de realización, se realizan todos los pasos opcionales enumerados. En algunas formas de realización, el método comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- (x) combinar dichas máscaras primera y séptima de manera que se proporcione una octava máscara que comprende señales fluorescentes representativas de un segundo subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan también el segundo biomarcador de interés;
- (xi) combinar dichas máscaras cuarta y octava de un modo que proporcione una novena máscara que comprende señales fluorescentes representativas del segundo subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés; y
- (xii) deducir un valor de PBP para el segundo subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés dividiendo el área total de la novena máscara entre el área total de la cuarta máscara.

[0011] En algunas formas de realización, el método comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- (x) sustraer dicha segunda máscara de dicha primera máscara de manera que se proporcione una octava máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células que no expresan el biomarcador de subconjunto en el campo de visión;
- (xi) combinar dichas máscaras séptima y octava de manera que se proporcione una novena máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto en el campo de visión; y
- (xii) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la novena máscara entre el área total de la octava máscara.

[0012] En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GTR, ICOS, CD28, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GTR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-L1, galectina 9 y MHC. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-1, TIM-3 y TCR. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador de interés es diferente del primer biomarcador de interés y comprende un biomarcador seleccionado de PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GTR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células tumorales. En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células no tumorales. En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células T. En algunas formas de realización, las células T expresan CD3. En algunas formas de realización, las células T expresan CD8. En algunas formas de realización, las células T expresan CD4. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa solo en células tumorales. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa en células T. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto comprende CD3. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto comprende CD19. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende Ki67 y dicho primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células positivas para CD8. En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles.

[0013] En otro aspecto, se describen en la presente métodos que controlan el progreso de un paciente diagnosticado con cáncer y sometido a inmunoterapia, que comprenden:

- (i) usar al menos dos muestras que comprenden tejido tumoral tomado de un paciente canceroso a lo largo de al menos dos puntos temporales, uno antes y uno después del inicio de la inmunoterapia, deduciendo un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células no tumorales que expresan un biomarcador de interés para cada una de dichas al menos dos muestras para obtener al menos un primer valor de PBP y al menos un segundo valor de PBP;
- (ii) registrar dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde un cambio entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP es indicativo de una eficacia de dicha inmunoterapia.

[0014] En algunas formas de realización, el cambio es una reducción entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde la reducción es indicativa de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, el cambio es un aumento entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde el aumento es indicativo de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, dicha inmunoterapia comprende la terapia de punto de control inmunitario.

[0015] En otro aspecto, se describen en la presente métodos que controlan el progreso de un paciente diagnosticado con cáncer y sometido a inmunoterapia, que comprende:

- (i) usar al menos dos muestras que comprenden tejido tumoral tomado de un paciente canceroso a lo largo de al menos dos puntos temporales, uno antes y uno después del inicio de la inmunoterapia, deduciendo un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células tumorales que expresan un

biomarcador de interés para cada una de dichas al menos dos muestras para obtener al menos un primer valor de PBP y al menos un segundo valor de PBP;

- 5 (ii) registrar dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde un cambio entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP es indicativo de una eficacia de dicha inmunoterapia.

10 En algunas formas de realización, el cambio es una reducción entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde la reducción es indicativa de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, el cambio es un aumento entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde el aumento es indicativo de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, dicha inmunoterapia comprende la terapia de punto de control inmunitario.

[0016] En otro aspecto, se describen en la presente métodos de deducción de un valor para el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células tumorales presentes en un campo de visión, que comprenden:

- 15 (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador tumoral;
- 20 (iii) combinar dichas máscaras primera y segunda de manera que se proporcione una tercera máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células tumorales en el campo de visión;
- (iv) construir una cuarta máscara de las terceras señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de interés;
- (v) combinar dichas máscaras tercera y cuarta de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células tumorales en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de interés; y
- 25 (vi) deducir un valor de PBP para todas las células tumorales que expresan el biomarcador de interés dividiendo el área total de la quinta máscara entre el área total de la tercera máscara.

30 En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, galectina 9 y MHC. En algunas formas de realización, el campo de visión comprende, además, células no tumorales. En algunas formas de realización, las células no tumorales comprenden células inmunitarias y células del estroma. En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles.

[0017] En otro aspecto, se describen en la presente métodos de deducción de un valor para el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células no tumorales presentes en un campo de visión, que comprenden:

- 35 (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador tumoral;
- 40 (iii) sustraer dicha segunda máscara de dicha primera máscara de manera que se proporcione una tercera máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células no tumorales en el campo de visión;
- (iv) construir una cuarta máscara de las señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de interés;
- (v) combinar dichas máscaras tercera y cuarta de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células no tumorales en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de interés; y
- 45 (vi) deducir un valor de PBP para todas las células no tumorales que expresan el biomarcador de interés dividiendo el área total de la quinta máscara entre el área total de la tercera máscara.

50 En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de

55 realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL,

ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, las células no tumorales comprenden células inmunitarias y células del estroma. En algunas formas de realización, las células no tumorales comprenden células mieloides.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0018]

- La **figura 1** muestra un ejemplo no limitativo de una visión de conjunto de anticuerpos y reactivos de detección usados en la preparación de las muestras de tejido para la obtención de imágenes y su análisis.
- 10 La **figura 2a** muestra un ejemplo no limitativo de todos los núcleos detectados con DAPI en una imagen. La **figura 2b** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria dilatada de todas las células en la imagen de la **figura 2a**.
- La **figura 3a** muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de S100 detectado con colorante 488. La **figura 3b** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de toda el área tumoral en la imagen de la **figura 3a**.
- 15 La **figura 3c** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de todas las células tumorales en la imagen de la **figura 3a**. La **figura 3d** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de todas las células no tumorales en la imagen de la **figura 3a**.
- La **figura 4a** muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de PD-L1 detectado con Cy@ 5. La **figura 4b** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células positivas para PD-L1 en la imagen de la **figura 4a**.
- 20 La **figura 4c** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de todas las células tumorales positivas para PD-L1 en la imagen de la **figura 4a**. La **figura 4d** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de todas las células no tumorales positivas para PD-L1 en la imagen de la **figura 4a**.
- 25 La **figura 5a** muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de PD-1 detectado con Cy@ 3.5. La **figura 5b** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células no tumorales positivas para PD-1 en la imagen de la **figura 5a**.
- La **figura 6a** muestra un ejemplo no limitativo de valores del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células que expresan PD-L1 en muestras de tejido de 21 pacientes con melanoma, clasificadas por expresión creciente de PD-L1.
- 30 La **figura 6b** muestra un ejemplo no limitativo de valores de PBP para todas las células no tumorales que expresan PD-1 en muestras de tejido de los mismos 21 pacientes con melanoma, clasificadas por expresión creciente de PD-1.
- 35 La **figura 7** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de las señales fluorescentes correspondientes a células positivas para PD-L1 (en rojo), células positivas para PD-1 (en amarillo), todas las células tumorales (en verde) y todas las células (en azul) para un respondedor positivo a la inmunoterapia.
- La **figura 8** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara de las señales fluorescentes correspondientes a células positivas para PD-L1 (en rojo), células positivas para PD-1 (en amarillo), todas las células tumorales (en verde) y todas las células (en azul) para un respondedor negativo a la inmunoterapia.
- 40 La **figura 9** muestra valores del % de positividad de biomarcador (PBP) para PD-L1 y PD-1 de 38 pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas.
- La **figura 10** muestra una comparación del % de positividad para PD-L1 según se determina por un método de recuento de células automatizado frente a un método descrito en la presente.
- 45 La **figura 11** es un diagrama de flujo de un proceso para deducir un valor de positividad de biomarcador, según una forma de realización ejemplar. La **figura 12** es un diagrama de flujo de un proceso para deducir un valor de positividad de biomarcador, según una segunda forma de realización ejemplar.
- 50 La **figura 13** es un diagrama de bloques de un controlador configurado para deducir un valor de positividad de biomarcador, según una forma de realización ejemplar. La **figura 14** es un diagrama de flujo de los pasos de procesamiento de imagen usados para deducir un valor de positividad de biomarcador, según una forma de realización ejemplar.
- La **figura 15** muestra otro ejemplo no limitativo de una visión de conjunto de anticuerpos y reactivos de detección usados en la preparación de las muestras de tejido para la obtención de imágenes y su análisis.
- 55 La **figura 16a** muestra un ejemplo no limitativo de un ejemplo no limitativo de todos los núcleos detectados con DAPI en una imagen. La **figura 16b** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria dilatada de todas las células en la imagen de la **figura 16a**.
- La **figura 17a** muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de PD-1 detectado con Cy@ 5. La **figura 17b** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células positivas para PD-1 en la imagen de la **figura 17a**.
- 60 La **figura 18a** muestra un ejemplo no limitativo de una imagen de CD3 detectado con Cy@ 3.

- La **figura 18b** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células positivas para CD3 en la imagen de la **figura 18a**.
- La **figura 19** muestra un ejemplo no limitativo de una máscara binaria de todas las células que son doblemente positivas para PD-1 y CD3.
- 5 La **figura 20a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células T CD3+ en muestras de tejido de pacientes con DLBCL (n = 43).
- La **figura 20b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células T CD3+/PD1+ en muestras de tejido de pacientes con DLBCL (n = 43).
- 10 La **figura 21a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de CD25 en tejidos de NSCLC, gástrico y melanoma.
- La **figura 21b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de FoxP3 en tejidos de NSCLC, gástrico y melanoma.
- La **figura 22** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células T CD25+/FoxP3+ en tejidos de NSCLC, gástrico y melanoma.
- 15 La **figura 23a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de CD4 en tejidos de NSCLC, gástrico y melanoma.
- La **figura 23b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de CD8 en tejidos de NSCLC, gástrico y melanoma.
- 20 La **figura 24a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa del fenotipo CD11b+/HLA-DR- en tejidos de melanoma metastásico.
- La **figura 24b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa del fenotipo CD11b+/IDO-1+/HLA-DR- en tejidos de melanoma metastásico.
- La **figura 25a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa del fenotipo IDO-1+/HLA-DR+ en tejidos de melanoma metastásico.
- 25 La **figura 25b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa del fenotipo CD11b+/IDO-1+/HLA-DR+ en tejidos de melanoma metastásico.
- La **figura 26a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa del fenotipo CD11b+/CD33+/ARG1+ en tejidos de NSCLC.
- 30 La **figura 26b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa del fenotipo CD11b+/HLA-DR+/IDO-1+ en tejidos de NSCLC.
- La **figura 27** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa del fenotipo CD11b+/HLA-DR-/IDO-1+ en tejidos de NSCLC.
- La **figura 28** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células T CD8+Ki67+ en tejidos de melanoma metastásico.
- 35 La **figura 29a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células CD163+ en los tejidos de melanoma metastásico.
- La **figura 29b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células CD68+ en tejidos de melanoma metastásico.
- La **figura 29c** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células CD163+CD68+ en tejidos de melanoma metastásico.
- 40 La **figura 30a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células T positivas para LAG-3 en tejidos de DLBCL y NET.
- La **figura 30b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de células T positivas para TIM-3 en tejidos de DLBCL y NET.
- 45 La **figura 31a** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de CTLA-4 en células T en tejidos de melanoma.
- La **figura 31b** muestra un ejemplo no limitativo de evaluación cuantitativa de CD80 en tejidos de melanoma.
- La **figura 32** muestra una clasificación tumoral representativa basada en su textura inmunitaria.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 50 [0019] Varias formas de realización se describen de ahora en adelante. Debe observarse que las formas de realización específicas no pretenden ser una descripción exhaustiva o una limitación a los aspectos más amplios mencionados en la presente. Un aspecto descrito en conjunción con una forma de realización particular no se limita necesariamente a esa forma de realización y se puede practicar con cualquier/cualesquiera otra(s) forma(s) de realización.
- 55 [0020] Como se utiliza en la presente, "aproximadamente" será entendido por personas expertas en la materia y variará hasta cierto punto dependiendo del contexto donde se use. Si hay usos del término que no están claros para las personas expertas en la materia, dado el contexto donde se usa, "aproximadamente" significará hasta más o menos un 10% del término particular.
- 60 [0021] El uso de los términos "una" y "un" y "el" y "la" y referentes similares en el contexto de descripción de los elementos (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) deben interpretarse para cubrir tanto

5 el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente o sea claramente contradicho por el contexto. La enumeración de rangos de valores en la presente pretende meramente servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado incluido en el rango, a menos que se indique lo contrario en la presente, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se enumeraran individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente o, de otro modo, sea claramente contradicho por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal(es) como") provisto en la presente, pretende meramente aclarar mejor las formas de realización y no plantea una limitación en el alcance de las reivindicaciones a menos que se indique lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación debería interpretarse como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial.

15 [0022] El término "tratar" o "tratamiento" se refiere a la administración de una terapia en una cantidad, manera o modo eficaz para mejorar una afección, un síntoma o un parámetro asociados a un trastorno o para evitar la progresión de un trastorno, ya sea en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable para una persona experta en la materia. Una cantidad, manera o modo eficaz puede variar dependiendo del sujeto y puede personalizarse para el paciente.

20 [0023] Los tumores se pueden clasificar en función de su contextura inmunitaria como "calientes" (inflamados) o "fríos" (no inflamados) (véase la **figura 32**). Aunque se puede esperar que los pacientes que tienen tumores calientes respondan a ciertas inmunoterapias y vivan potencialmente más tiempo que los pacientes que tienen tumores fríos, previamente no estaba claro para las personas expertas en la materia qué biomarcadores se correlacionan con la respuesta y la supervivencia.

25 [0024] Para abordar esta cuestión, algunas formas de realización de los métodos descritos en la presente ayudan a la identificación de los pacientes con cáncer que responden a una o más inmunoterapias a través de la expresión de biomarcadores de agotamiento inmunitario (por ejemplo, PD-1 y PD-L1) y pacientes con cáncer que no responden (es decir, no respondedores) a través de la presencia de tipos celulares que se sabe que causan una supresión inmunitaria (por ejemplo, CD11b, HLA-DR, IDO-1, ARG1) o células tumorales altamente proliferativas desprovistas de la expresión del MHC de clase I (por ejemplo, Ki67+, B2M-). En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente comprenden el uso de ensayos inmunohistoquímicos multiplex (por ejemplo, ensayos FIHC multiplex) basados en los patrones específicos de supresión o activación inmunitaria. En la siguiente tabla se muestran ejemplos no limitativos de ensayos FIHC multiplex basados en los patrones específicos de supresión o activación inmunitaria.

Objetivo	Ensayo FIHC multiplex
Supresión de células T	CD3 + PD-1 + PD-L1 Marcador tumoral (CK o S100) + PD-1 + PD-L1 CD3 + LAG3 + TIM3 CD3+ CD25 + FOXP3 CTLA-4 + CD80
Supresión mieloide	CD11b + HLA-DR(-) IDO-1 (TAM) CD11b + HLA-DR (+) ARG1 (fMDSC)
Activación de células T	CD3 + CD8 + Ki67 CD3 + CD8 + granzima B
Recuento de células inmunitarias	CD3 + CD4 + CD8 Marcador tumoral (CK o S100) + CD16 + CD56 Marcador tumoral (CK o S100) + CD68 + CD163
Identificación de tumores fríos	Marcador tumoral (CK o S100) + CD3 (-) B2M (-) Ki67 (+)

[0025] En un aspecto, se proporcionan en la presente métodos de deducción de un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células u, opcionalmente, uno o más subconjuntos de las mismas, presentes en un campo de visión de una muestra de tejido tomada de un paciente canceroso.

35 [0026] En algunas formas de realización, la muestra se puede teñir usando una pluralidad de marcadores fluorescentes con afinidad por biomarcadores específicos. Puede obtenerse una imagen digital de la muestra teñida y analizarse adicionalmente la imagen en función de la ubicación de los marcadores fluorescentes. Antes que un análisis de imagen completa, se pueden priorizar campos de visión en función del número de células que expresan un primer biomarcador de interés. Entonces pueden analizarse adicionalmente un número predeterminado de

campos de visión para las señales fluorescentes. En algunas formas de realización, el uso de cuatro tipos diferentes de marcadores fluorescentes genera una imagen de señales fluorescentes correspondientes a un primer biomarcador de interés y una imagen de señales fluorescentes correspondientes a un segundo biomarcador de interés, así como a una imagen de señales fluorescentes correspondientes a un biomarcador expresado por todas las células y una imagen de señales fluorescentes correspondientes a un biomarcador de subconjunto (por ejemplo, un biomarcador expresado por las células tumorales). En formas de realización adicionales, las imágenes de señales fluorescentes se manipulan para generar una o más máscaras de señales fluorescentes correspondientes a las células de la imagen. En algunas formas de realización, la una o más máscaras de señales fluorescentes comprenden una o más seleccionadas del grupo que consiste en una máscara de todas las células de la imagen, una máscara de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto (por ejemplo, todas las células tumorales) de la imagen, una máscara de todas las células que no expresan el biomarcador de subconjunto (por ejemplo, todas las células no tumorales) de la imagen, una máscara de todas las células que expresan un primer biomarcador de interés de la imagen, y una máscara de todas las células que expresan un segundo biomarcador de interés de la imagen. Las áreas de estas máscaras se pueden usar para deducir un valor de PBP según se desee. En algunas formas de realización, se deduce un valor de PBP para todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto. En algunas formas de realización, se deduce un valor de PBP para un primer subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés. En algunas formas de realización, se deduce un valor de PBP para un segundo subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés. En algunas formas de realización, se deduce un valor de PBP para un segundo subconjunto de todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto.

[0027] Por consiguiente, en algunas formas de realización, se proporcionan en la presente métodos de deducción de un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células u, opcionalmente, uno o más subconjuntos de las mismas presentes en un campo de visión, que comprenden:

- (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de subconjunto;
- (iii) opcionalmente, construir una tercera máscara de las terceras señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un primer biomarcador de interés;
- (iv) combinar dichas máscaras primera y segunda de manera que se proporcione una cuarta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de subconjunto;
- (v) opcionalmente, combinar dichas máscaras primera y tercera de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el primer biomarcador de interés;
- (vi) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la cuarta máscara entre el área total de la primera máscara;
- (vii) opcionalmente, combinar dichas máscaras cuarta y quinta de manera que se proporcione una sexta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que
 - (a) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés; o
 - (b) expresan el biomarcador de subconjunto en ausencia del primer biomarcador de interés;
 y
 - (viii) opcionalmente, deducir un valor de PBP para el primer subconjunto de todas las células que o (a) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés o (b) expresan el biomarcador de subconjunto en ausencia del primer biomarcador de interés, dividiendo el área total de la sexta máscara entre el área total de la cuarta máscara.

[0028] En algunas formas de realización, no se realizan los pasos opcionales. En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la cuarta máscara y el área total de la primera máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la sexta máscara y el área total de la cuarta máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la primera máscara, el área total de la cuarta máscara y el área total de la sexta máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5 μm de ancho.

[0029] En algunas formas de realización, se proporcionan en la presente métodos de deducción de un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células u, opcionalmente, uno o más subconjuntos de las mismas presentes en un campo de visión, que comprenden:

- (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- 5 (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de subconjunto;
- (iii) opcionalmente, construir una tercera máscara de las terceras señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un primer biomarcador de interés;
- 10 (iv) combinar dichas máscaras primera y segunda de manera que se proporcione una cuarta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de subconjunto;
- (v) opcionalmente, combinar dichas máscaras primera y tercera de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el primer biomarcador de interés;
- 15 (vi) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la cuarta máscara entre el área total de la primera máscara;
- (vii) opcionalmente, combinar dichas máscaras cuarta y quinta de manera que se proporcione una sexta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés; y
- 20 (viii) opcionalmente, deducir un valor de PBP para el primer subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés dividiendo el área total de la sexta máscara entre el área total de la cuarta máscara.

En algunas formas de realización, no se realizan los pasos opcionales. En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la cuarta máscara y el área total de la primera máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la sexta máscara y el área total de la cuarta máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la primera máscara, el área total de la cuarta máscara y el área total de la sexta máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5 μm de ancho.

[0030] En algunas formas de realización, se proporcionan en la presente métodos de deducción de un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células u, opcionalmente, uno o más subconjuntos de las mismas presentes en un campo de visión, que comprenden:

- (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- 35 (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de subconjunto;
- (iii) construir una tercera máscara de las terceras señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un primer biomarcador de interés;
- 40 (iv) combinar dichas máscaras primera y segunda de manera que se proporcione una cuarta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de subconjunto;
- (v) combinar dichas máscaras primera y tercera de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende señales fluorescentes representativas de un primer subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan también el primer biomarcador de interés;
- 45 (vi) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la cuarta máscara entre el área total de la primera máscara;
- (vii) combinar dichas máscaras cuarta y quinta de manera que se proporcione una sexta máscara que comprende señales fluorescentes representativas del primer subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés; y
- 50 (viii) deducir un valor de PBP para el primer subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés dividiendo el área total de la sexta máscara entre el área total de la cuarta máscara.

En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la cuarta máscara y el área total de la primera máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la sexta máscara y el área total de la cuarta máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la primera máscara, el área total de la cuarta máscara y el área total de la sexta máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5 μm de ancho.

[0031] En algunas formas de realización, el método comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- 5 (x) combinar dichas máscaras primera y séptima de manera que se proporcione una octava máscara que comprende señales fluorescentes representativas de un segundo subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan también el segundo biomarcador de interés;
- (xi) combinar dichas máscaras cuarta y octava de manera que se proporcione una novena máscara que comprende señales fluorescentes representativas del segundo subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés; y
- 10 (xii) deducir un valor de PBP para el segundo subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés dividiendo el área total de la novena máscara entre el área total de la cuarta máscara.

En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la novena máscara y el área total de la cuarta máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5 μm de ancho.

15 [0032] En algunas formas de realización, el método comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- 20 (x) sustraer dicha segunda máscara de dicha primera máscara de manera que se proporcione una octava máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células que no expresan el biomarcador de subconjunto en el campo de visión;
- (xi) combinar dichas máscaras séptima y octava de manera que se proporcione una novena máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto en el campo de visión; y
- 25 (xii) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la novena máscara entre el área total de la octava máscara.

[0033] En algunas formas de realización, el método comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- 30 (x) combinar dichas máscaras sexta y séptima de manera que se proporcione una octava máscara que comprende señales fluorescentes representativas de todas las células que

- (a) expresan el biomarcador de subconjunto, el primer biomarcador de interés y el segundo biomarcador de interés en el campo de visión;
- 35 (b) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés en ausencia del segundo biomarcador de interés en el campo de visión; o
- (c) expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés en ausencia del primer biomarcador de interés en el campo de visión;
- y

- 40 (xii) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el primer biomarcador de interés o el segundo biomarcador de interés, o una combinación de los mismos, al igual que el biomarcador de subconjunto, dividiendo el área total de la octava máscara entre el área total de la cuarta máscara.

En algunas formas de realización, el método comprende, además, ciclos adicionales de pasos análogos a los pasos (ix), (x) y (xii) con respecto a uno o más biomarcadores adicionales de interés (por ejemplo, un tercer biomarcador de interés).

45 [0034] En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la novena máscara y el área total de la octava máscara se miden en píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5 μm de ancho.

[0035] En algunas formas de realización, un subconjunto de células identificadas por un biomarcador de subconjunto 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 identificadas por un biomarcador de subconjunto 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 identificadas por un

50

biomarcador de subconjunto 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 identificadas por un biomarcador de subconjunto 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 identificadas por un biomarcador de subconjunto y un no subconjunto de células corresponden a células mieloides y células no mieloides, respectivamente o viceversa.

[0036] En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células tumorales. En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células no tumorales. En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células no tumorales y tumorales.

[0037] En algunas formas de realización, el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células T. En algunas formas de realización, las células T expresan CD3. En algunas formas de realización, las células T expresan CD8. En algunas formas de realización, las células T expresan CD4.

[0038] En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un 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, ICOS, CD28, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un 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 y GITRL. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, galectina 9 y MHC. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende PD-L1.

[0039] En algunas formas de realización, el segundo biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-1, TIM-3 y TCR. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador de interés comprende PD-1.

[0040] En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés y el segundo biomarcador de interés son diferentes entre sí y comprenden un 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, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés y el segundo biomarcador de interés son diferentes entre sí y comprenden un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86.

[0041] En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un 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, ICOS, CD28, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86; y el segundo biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de PD-1, TIM-3 y TCR. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende PD-L1 y el segundo biomarcador de interés comprende PD-1. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende PD-L1 y el segundo biomarcador de interés comprende CD80. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende CTLA-4 y el segundo biomarcador de interés comprende CD80. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende PD-L2 y el segundo biomarcador de interés comprende PD-1. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende CTLA-4 y el segundo biomarcador de interés comprende CD86. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende LAG-3 y el segundo biomarcador de interés comprende HLA-DR. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende TIM-3 y el segundo biomarcador de interés comprende galectina 9. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende 41BB y el segundo biomarcador de interés comprende 4.1BBL. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende OX40 y el segundo biomarcador de interés comprende OX40L. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende CD40 y el segundo biomarcador de interés comprende CD40L. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende ICOS y el segundo biomarcador de interés comprende ICOSL. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende GITR y el segundo biomarcador de interés comprende GITRL. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende HLA-DR y el segundo biomarcador de interés comprende TCR. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende CD25 y el segundo biomarcador de interés comprende FoxP3. En

algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende CD4 y el segundo biomarcador de interés comprende CD8. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende CD3 y el segundo biomarcador de interés comprende PD-1. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende CD56 y el segundo biomarcador de interés comprende CD16. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende HLA-DR y el segundo biomarcador de interés comprende IDO-1. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende CD33 y el segundo biomarcador de interés comprende ARG1.

[0042] En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto solo se expresa en células tumorales. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa solo en células no tumorales. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa en células T. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto comprende CD3. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto comprende CD19. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto comprende CD45. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto se expresa en células mieloides. En algunas formas de realización, el biomarcador de subconjunto comprende CD11b.

[0043] En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende Ki67 y el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células positivas para CD8.

[0044] En algunas formas de realización, las señales fluorescentes son de cuatro marcadores fluorescentes, cada uno específico para un biomarcador diferente. En formas de realización adicionales, un primer marcador fluorescente se asocia al primer biomarcador de interés, un segundo marcador fluorescente se asocia al segundo biomarcador de interés, un tercer marcador fluorescente se asocia a un tercer biomarcador de interés y un cuarto marcador fluorescente se asocia a un cuarto biomarcador de interés. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un marcador tumoral y no tumoral. En algunas formas de realización, el segundo biomarcador de interés comprende un marcador no tumoral. En algunas formas de realización, el primer biomarcador de interés comprende un marcador tumoral y no tumoral y el segundo biomarcador de interés comprende un marcador no tumoral. En algunas formas de realización, el tercer biomarcador de interés es expresado por todas las células. En algunas formas de realización, el cuarto biomarcador de interés se expresa solo en células tumorales. En algunas formas de realización, el tercer biomarcador de interés es expresado por todas las células y el cuarto biomarcador de interés se expresa solo en células tumorales. En algunas formas de realización, el cuarto biomarcador de interés es el biomarcador de subconjunto. En algunas formas de realización, el tercer biomarcador de interés es expresado por todas las células y el cuarto biomarcador de interés es el biomarcador de subconjunto. En algunas formas de realización, uno o más marcadores fluorescentes comprenden un fluoróforo conjugado a un anticuerpo con una afinidad de unión por un biomarcador específico u otro anticuerpo. En algunas formas de realización, uno o más marcadores fluorescentes son fluoróforos con afinidad por un biomarcador específico.

[0045] Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero de forma no limitativa, fluoresceína, 6-FAM, rodamina, Texas Red, California Red, iFluor594, tetrametilrodamina, una carboxirrodamina, carboxirrodamina 6F, carboxirrodol, carboxirrodamina 110, Cascade Blue, Cascade Yellow, cumarina, Cy2®, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy7®, Cy-Chrome, DyLight® 350, DyLight® 405, DyLight® 488, DyLight® 549, DyLight® 594, DyLight® 633, DyLight® 649, DyLight® 680, DyLight® 750, DyLight® 800, ficoeritrina, PerCP (peridina clorofila a proteína), 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® 350, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético, BODIPY® FL, BODIPY® FL-Br2, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY® TR, OPAL™ 520, OPAL™ 540, OPAL™ 570, OPAL™ 620, OPAL™ 650, OPAL™ 690 y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, el fluoróforo se selecciona del grupo consistente en DAPI, Cy® 2, Cy® 3, Cy® 3,5, Cy® 5, Cy® 7, FITC, TRITC, un colorante 488, un colorante 555, un colorante 594, Texas Red y cumarina. Los ejemplos de un colorante 488 incluyen, pero de forma no limitativa, Alexa Fluor® 488, OPAL™ 520, DyLight® 488 y CF™ 488A. Los ejemplos de un colorante 555 incluyen, pero de forma no limitativa, Alexa Fluor® 555. Los ejemplos de un colorante 594 incluyen, pero de forma no limitativa, Alexa Fluor® 594.

[0046] Como se utiliza en la presente, un "campo de visión" se refiere a una sección de una imagen digital de un portaobjetos completo de una muestra de tejido. En algunas formas de realización, la imagen de un portaobjetos completo tiene 2-200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de un portaobjetos completo tiene 10-200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de un portaobjetos completo tiene 30-200 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de un portaobjetos completo tiene 10-150 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de un portaobjetos completo tiene 10-100 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de un portaobjetos completo tiene 10-50 campos de visión

predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de un portaobjetos completo tiene 10-40 campos de visión predeterminados. En algunas formas de realización, la imagen de un portaobjetos completo tiene 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100, incluidos incrementos en los mismos, campos de visión predeterminados.

5 [0047] En métodos descritos en la presente, el paciente canceroso es un mamífero. En algunas formas de realización, el mamífero es 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.

[0048] En métodos descritos en la presente, se toma tejido tumoral de un paciente canceroso. El tipo de cáncer incluye, pero de forma no limitativa, cánceres de: el sistema circulatorio, por ejemplo, el corazón (sarcoma [angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomyosarcoma, liposarcoma], mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma), el mediastino y la pleura, y otros órganos intratorácicos, tumores vasculares y tejido vascular asociado a tumores; la vía respiratoria, por ejemplo, la cavidad nasal y el oído medio, los senos accesorios, la laringe, la tráquea, el bronquio y el pulmón, tales como el cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC), el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), el carcinoma broncogénico (de células escamosas, de células pequeñas indiferenciadas, de células grandes indiferenciadas, adenocarcinoma), el carcinoma alveolar (bronquiolar), el adenoma bronquial, el sarcoma, el linfoma, el hamartoma condromatoso, el mesotelioma; el sistema gastrointestinal, por ejemplo, el esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomyosarcoma, linfoma), el estómago (carcinoma, linfoma, leiomyosarcoma), gástrico, el páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), el intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomyoma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), el intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma veloso, hamartoma, leiomyoma); el tracto genitourinario, por ejemplo, el riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), la vejiga y/o la uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), la próstata (adenocarcinoma, sarcoma), el testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma); el hígado, por ejemplo, hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma, tumores endocrinos pancreáticos (tales como feocromocitoma, insulinoma, tumor productor de péptido intestinal vasoactivo, tumor de células de los islotes y glucagonoma); el hueso, por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, cordoma de tumor de células gigantes maligno, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosas), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; el sistema nervioso, por ejemplo, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, cáncer de cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), las meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cáncer cerebral (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); el sistema reproductivo, por ejemplo, ginecológico, el útero (carcinoma endométrico), el cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), los ovarios (carcinoma ovárico [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma sin clasificar], tumores de células de la granulosa-tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), la vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), la vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioides (rabdomyosarcoma embrionario), las trompas de Falopio (carcinoma) y otros sitios asociados a los órganos genitales femeninos; la placenta, el pene, la próstata, el testículo y otros sitios asociados a los órganos genitales masculinos; el sistema hematológico, por ejemplo, la sangre (leucemia mielóide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin [linfoma maligno]; la cavidad bucal, por ejemplo, el labio, la lengua, la encía, la base de la boca, el paladar y otras partes de la boca, la glándula parótida y otras partes de las glándulas salivales, la amígdala, la orofaringe, la nasofaringe, el seno piriforme, la hipofaringe y otros sitios en el labio, la cavidad bucal y la faringe; la piel, por ejemplo, melanoma maligno, melanoma cutáneo, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, nevos displásicos de lunares, lipoma, angioma, dermatofibroma y queloides; las glándulas suprarrenales: neuroblastoma; y otros tejidos, incluidos el tejido conjuntivo y blando, el retroperitoneo y el peritoneo, el ojo, melanoma intraocular, y los anexos, la mama, la cabeza y/o el cuello, la región anal, la tiroides, la paratiroides, la glándula suprarrenal y otras glándulas endocrinas y estructuras relacionadas, neoplasma maligno secundario y no especificado de los ganglios linfáticos, neoplasma maligno secundario de los sistemas respiratorio y digestivo y neoplasma maligno secundario de otros sitios, o una combinación de uno o más de los mismos.

[0049] Los ejemplos de inmunoterapia incluyen, pero de forma no limitativa, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab o trastuzumab), anticuerpos monoclonales conjugados (por ejemplo, ibritumomab tiuxetán, brentuximab vedotina o ado-trastuzumab emtansina), anticuerpos monoclonales biespecíficos (blinatumomab), inhibidores de punto de control inmunitario (por ejemplo, ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab o durvalumab), talidomida, lenalidomida, pomalidomida e imiquimod y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende la terapia de punto de control inmunitario.

[0050] En otro aspecto, se proporcionan en la presente métodos de deducción de un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células tumorales presentes en un campo de visión, que comprenden:

- 5 (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador tumoral;
- 10 (iii) combinar dichas máscaras primera y segunda de manera que se proporcione una tercera máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células tumorales en el campo de visión;
- (iv) construir una cuarta máscara de las terceras señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de interés;
- (v) combinar dichas máscaras tercera y cuarta de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células tumorales en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de interés; y
- 15 (vi) deducir un valor de PBP para todas las células tumorales que expresan el biomarcador de interés dividiendo el área total de la quinta máscara entre el área total de la tercera máscara.

[0051] En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la quinta máscara y el área total de la tercera máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5 μm de ancho. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, galectina 9 y MHC. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende PD-L1. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende galectina 9. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende MHC. En algunas formas de realización, el campo de visión comprende, además, células no tumorales. En algunas formas de realización, las células no tumorales comprenden células inmunitarias y células del estroma.

[0052] En otro aspecto, se proporcionan en la presente métodos de deducción de un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células no tumorales presentes en un campo de visión, que comprenden:

- 30 (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador tumoral;
- (iii) sustraer dicha segunda máscara de dicha primera máscara de manera que se proporcione una tercera máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células no tumorales en el campo de visión;
- 35 (iv) construir una cuarta máscara de las señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de interés;
- (v) combinar dichas máscaras tercera y cuarta de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células no tumorales en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de interés; y
- 40 (vi) deducir un valor de PBP para todas las células no tumorales que expresan el biomarcador de interés dividiendo el área total de la quinta máscara entre el área total de la tercera máscara.

[0053] En algunas formas de realización, el área total se mide en píxeles. En algunas formas de realización, el área total de la quinta máscara y el área total de la tercera máscara se miden cada una en píxeles. En algunas formas de realización, un píxel tiene 0,5 μm de ancho. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GTR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GTR, ICOS, CD28, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GTR, ICOS y CD28. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende PD-L1. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende PD-1. En algunas formas de realización, las células no tumorales comprenden células inmunitarias y células del estroma.

[0054] En otro aspecto, se describen en la presente métodos que controlan el progreso de un paciente diagnosticado con cáncer y sometido a inmunoterapia, que comprenden:

(i) usar al menos dos muestras que comprenden tejido tumoral tomado de un paciente canceroso a lo largo de al menos dos puntos temporales, uno antes y uno después del inicio de la inmunoterapia, deduciendo un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células no tumorales que expresan un biomarcador de interés para cada una de dichas al menos dos muestras para obtener al menos un primer valor de PBP y al menos un segundo valor de PBP;

(ii) registrar dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde un cambio entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP es indicativo de una eficacia de dicha inmunoterapia.

[0055] En algunas formas de realización, el cambio es una reducción entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde la reducción es indicativa de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, el cambio es un aumento entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde el aumento es indicativo de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende la terapia de punto de control inmunitario. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, ICOS, CD28, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80, CD86, PD-1, TIM-3 y TCR. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un 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, ICOS, CD28, PD-1, TIM-3 y TCR. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende PD-L1. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende PD-1.

[0056] En otro aspecto, se describen en la presente métodos que controlan el progreso de un paciente diagnosticado con cáncer y sometido a inmunoterapia, que comprenden:

(i) usar al menos dos muestras que comprenden tejido tumoral tomado de un paciente canceroso a lo largo de al menos dos puntos temporales, uno antes y uno después del inicio de la inmunoterapia, deduciendo un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células tumorales que expresan un biomarcador de interés para cada una de dichas al menos dos muestras para obtener al menos un primer valor de PBP y al menos un segundo valor de PBP;

(ii) registrar dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde un cambio entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP es indicativo de una eficacia de dicha inmunoterapia.

[0057] En algunas formas de realización, el cambio es una reducción entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde la reducción es indicativa de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, el cambio es un aumento entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde el aumento es indicativo de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, galectina 9 y MHC. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende PD-L1. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende galectina 9. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende MHC. En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende la terapia de punto de control inmunitario.

[0058] En otro aspecto, se describen en la presente métodos que controlan la modulación de las células inmunitarias de un paciente diagnosticado con cáncer y sometido a inmunoterapia, que comprenden:

(i) usar al menos dos muestras que comprenden tejido tumoral tomado de un paciente canceroso a lo largo de al menos dos puntos temporales, uno antes y uno después del inicio de la inmunoterapia, deduciendo un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células no tumorales que expresan un biomarcador de interés para cada una de dichas al menos dos muestras para obtener al menos un primer valor de PBP y al menos un segundo valor de PBP;

(ii) registrar dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde un cambio entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP es indicativo de una eficacia de dicha inmunoterapia.

[0059] En algunas formas de realización, el cambio es una reducción entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde la reducción es indicativa de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, el cambio es un aumento entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde el aumento es indicativo de una eficacia positiva de dicha inmunoterapia. En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende la terapia de punto de control inmunitario. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, ICOS, CD28, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80, CD86, PD-1, TIM-3 y TCR. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende un 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, ICOS, CD28, PD-1, TIM-3 y TCR. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende PD-L1. En algunas formas de realización, el biomarcador de interés comprende PD-1.

[0060] En otro aspecto, se describen en la presente métodos para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, donde el método comprende (i) deducir un primer valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células tumorales o todas las células no tumorales presentes en un campo de visión según un método descrito en la presente; (ii) registrar el primer valor de PBP; (iii) administrar al menos una primera dosis de inmunoterapia al paciente; (iv) deducir un segundo valor de PBP para todas las células tumorales o todas las células no tumorales presentes en un campo de visión según un método descrito en la presente después de la administración de la al menos primera dosis; (v) registrar el segundo valor de PBP; (vi) calcular el cambio entre el primer valor de PBP y el segundo valor de PBP; y (vii) ajustar la dosis posterior de inmunoterapia que se administra al paciente. En algunas formas de realización, ajustar la dosis posterior comprende una o más acciones seleccionadas del grupo que consiste en aumentar la dosis de inmunoterapia, disminuir la dosis de inmunoterapia; aumentar un período de tiempo entre dosis de inmunoterapia; disminuir el período de tiempo entre dosis de inmunoterapia; reemplazar la inmunoterapia con otra inmunoterapia; reemplazar la inmunoterapia con una no inmunoterapia; y terminar la inmunoterapia.

[0061] En otro aspecto, se describen en la presente métodos para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, donde el método comprende (i) deducir un primer valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células tumorales o todas las células no tumorales presentes en un campo de visión según un método descrito en la presente; (ii) registrar el primer valor para PBP; (iii) administrar al menos una primera dosis de inmunoterapia al paciente como parte de un régimen de dosificación; (iv) deducir un segundo valor de PBP para todas las células tumorales o todas las células no tumorales presentes en un campo de visión según un método descrito en la presente después de la administración de la al menos primera dosis; (v) registrar el segundo valor de PBP; (vi) calcular el cambio entre el primer valor de PBP y el segundo valor de PBP; y (vii) administrar una dosis posterior de la inmunoterapia sin una alteración del régimen de dosificación.

[0062] La **figura 11** es un diagrama de flujo que representa los pasos de una forma de realización de un método para deducir un valor del % de positividad de biomarcador (PBP). En el paso 1101, se obtienen los datos de la imagen y, en el paso 1102, los datos de la imagen se desmezclan de manera que los datos específicos para varios tipos de señales fluorescentes se separan en canales diferentes. En el paso 1103, se utilizan datos de un primer canal para generar una máscara de todas las células. En el paso 1104, se utilizan datos de un segundo canal para generar una máscara del área en un campo de visión que expresa un biomarcador de subconjunto, por ejemplo, esta máscara de subconjunto puede ser una máscara de un área tumoral presente en un campo de visión. En el paso 1105, la máscara de todas las células y la máscara de subconjunto (por ejemplo, una máscara de área tumoral) se combinan para generar una máscara de todas las células de un subconjunto.

[0063] En algunas formas de realización, un subconjunto de células identificadas por un biomarcador de subconjunto 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 identificadas por un biomarcador de subconjunto 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 identificadas por un biomarcador de subconjunto 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 identificadas por un biomarcador de subconjunto 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

identificadas por un biomarcador de subconjunto y un no subconjunto de células corresponden a células mieloides y células no mieloides, respectivamente o viceversa.

[0064] En ciertas formas de realización, la combinación de la máscara de todas las células y la máscara de subconjunto puede identificar todas las células tumorales y/o todas las células no tumorales. El proceso se puede realizar solo en un tipo seleccionado de célula de interés, por ejemplo, solo células tumorales o solo células no tumorales. El proceso también puede dirigirse a un análisis de ambos. En el paso 1106, se utilizan datos de un tercer canal para generar una máscara de todas las células que son positivas para un biomarcador (en función de las señales fluorescentes que representan la presencia de un marcador fluorescente con una afinidad de unión al biomarcador de interés particular). En los pasos 1107 y 1108, la máscara de biomarcador generada en el paso 1106 se combina con la máscara de células de un subconjunto generada en el paso 1105. El paso 1107 combina la máscara de biomarcador con la máscara de células de un subconjunto de una primera manera, para generar una máscara de todas las células de un subconjunto que son positivas para el biomarcador. El paso 1108 combina la máscara de biomarcador con la máscara de células de un subconjunto de una segunda manera, para generar una máscara de células de un subconjunto que no son positivas para el biomarcador. Uno o los dos pasos 1107 y 1108 se pueden realizar según las varias formas de realización del método. En el paso 1109/1110, una puntuación PBP se calcula dividiendo el área de las células de un subconjunto de interés (por ejemplo, las células de un subconjunto que son positivas para el biomarcador identificadas por la máscara en el paso 1107 o las células de un subconjunto que no son positivas para el biomarcador identificadas por la máscara en el paso 1108) entre el área total de todas las células de un subconjunto. Uno o los dos pasos 1109 y 1110 se pueden realizar según las varias formas de realización del método.

[0065] La **figura 12** es un diagrama de flujo que representa los pasos de una segunda forma de realización de un método para deducir un valor del % de positividad de biomarcador (PBP). En el paso 1201, se obtienen datos de la imagen y, en el paso 1202, los datos de la imagen se desmezclan de manera que los datos específicos para varios tipos de señales fluorescentes se separan en canales diferentes. En el paso 1203, se utilizan datos de un primer canal para generar una máscara de todas las células. En el paso 1204, se utilizan datos de un segundo canal para generar una máscara de todas las células que son positivas para un biomarcador (en función de las señales fluorescentes que representan la presencia de un marcador fluorescente con una afinidad de unión al biomarcador de interés particular). En el paso 1205, se calcula una puntuación PBP dividiendo el área de las células que son positivas para el biomarcador (que se identifica mediante la máscara creada en el paso 1204) entre el área total de todas las células de interés (del paso 1203). El proceso de la **figura 12** se puede realizar por separado o al mismo tiempo que el método representado en la **figura 11**. En otras palabras, se puede calcular una puntuación PBP para todas las células, todas las células tumorales y todas las células no tumorales, o cualquier combinación de las mismas, combinando los métodos de las **figuras 11 y 12**.

[0066] En los métodos descritos en la presente, la manipulación de las imágenes digitales se puede realizar mediante un sistema informático que comprende un controlador, como el controlador ilustrado en el diagrama de bloques de la **figura 13**, según una forma de realización ejemplar. Se muestra un controlador 200 que 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, clavijas, 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 se puede configurar 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.).

[0067] La interfaz de comunicaciones 202 puede ser una interfaz de red configurada para facilitar las comunicaciones de datos electrónicos entre un controlador 200 y varios sistemas o dispositivos externos (por ejemplo, un dispositivo de imagen 102). Por ejemplo, un controlador 200 puede recibir datos de las imágenes para los campos de visión seleccionados desde el dispositivo de imagen 102, para analizar los datos y calcular la puntuación de proximidad espacial (SPS).

[0068] Todavía en referencia a la **figura 13**, se muestra un circuito de procesamiento 204 que incluye un procesador 206 y una memoria 208. El procesador 206 puede ser un procesador de uso general o para un uso específico, un circuito integrado de aplicación específica (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 206 se puede configurar para ejecutar código máquina o instrucciones almacenadas en la memoria 208 o recibirse de otros medios legibles por ordenador (por ejemplo, CDROM, almacenamiento de red, un servidor remoto, etc.).

[0069] 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 máquina para completar y/o facilitar los varios procesos descritos en la presente descripción. La memoria 208 puede incluir memoria de acceso

aleatorio (RAM), memoria de solo lectura (ROM), almacenamiento de 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 objeto, componentes de *script* o cualquier otro tipo de estructura de información para soportar las varias actividades y estructuras de información descritas en la presente descripción. La memoria 508 se puede conectar comunicablemente al procesador 206 a través de un circuito de procesamiento 204 y puede incluir código máquina para ejecutar (por ejemplo, mediante el procesador 206) uno o más procesos descritos en la presente.

[0070] Todavía en referencia a la **figura 13**, se muestra un controlador 200 que recibe una entrada desde un dispositivo de imagen 102. El dispositivo de imagen adquiere todos los datos de las imágenes y los registra, junto con todos los metadatos que las describen. El dispositivo de imagen serializará entonces los datos en un flujo que puede ser leído por un controlador 200. El flujo de datos puede alojar cualquier tipo de flujo de datos binarios tales como el sistema de archivos, un RDBM o comunicaciones TCP/IP directas. Para el uso del flujo de datos, se muestra un controlador 200 que incluye un desmezclador espectral 210. El desmezclador espectral 210 puede recibir datos de imágenes desde un dispositivo de imagen 102 sobre los que se realiza un desmezclado espectral para desmezclar una imagen que presenta varias longitudes de onda en canales discretos individuales para cada banda de longitudes de onda. Por ejemplo, los datos de imágenes pueden ser "desmezclados" en canales separados para cada uno de los varios 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 consistente en DAPI, Cy® 2, Cy® 3, Cy® 3,5, Cy® 5, FITC, TRITC, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 594 y Texas Red. En un ejemplo, uno de los canales puede incluir datos de imágenes que entran en una banda predeterminada alrededor de una longitud de onda de 461 nm (la longitud de onda de emisión máxima para DAPI), para identificar núcleos en la imagen. Otros canales pueden incluir datos de imágenes para longitudes de onda diferentes con el fin de identificar porciones diferentes de la muestra de tejido usando diferentes fluoróforos.

[0071] También se muestra un controlador 200 que incluye varios enmascaradores, tal como un enmascarador celular 212, un enmascarador de área de subconjunto 216 y un enmascarador de biomarcador 222. Estos, u otros enmascaradores que se pueden incluir en el controlador 200 en otras formas de realización, se usan para recibir una señal desmezclada desde el desmezclador espectral 210 y crear una máscara para la célula o el área de interés particular, dependiendo del fluoróforo usado para identificar ciertas características de interés en la muestra de tejido. Para crear una máscara, los enmascaradores (tales como un enmascarador celular 212, un enmascarador de área de subconjunto 216 y un enmascarador de biomarcador 222) reciben datos de imágenes relacionados con una intensidad de cada píxel en el campo de visión. La intensidad de píxel es directamente proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida por la muestra, que, a su vez, es directamente proporcional a la cantidad de biomarcador proteico en la muestra (cuando se usa un fluoróforo para identificar un biomarcador particular). Se puede establecer un umbral absoluto en función de los valores que existen en los píxeles de una imagen. Todos los píxeles que son mayores o iguales al valor umbral se asignarán a 1,0, o "activados", y todos los demás píxeles se asignarán a 0,0, o "desactivados". De esta manera, se crea una máscara binaria para identificar la porción celular o de tejido de interés en el campo de visión. En otras formas de realización, se crea una máscara usando un límite inferior donde todos los píxeles con una intensidad en o por encima de un límite inferior se aceptan y se usan como el 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".

[0072] En el diagrama de flujo de ejemplo para el enmascaramiento mostrado en la **figura 14**, se muestra que los canales de DAPI y colorante 488 (u otro fluoróforo para identificar núcleos y áreas tumorales, respectivamente) usan el protocolo de límite inferior (pasos 1410, 1412, 1420, 1422), mientras que el canal de Cy5 (u otro fluoróforo para identificar un biomarcador de interés) usa un protocolo de valor umbral (paso 1430), para proporcionar el resultado de la máscara. En asociación con el protocolo de límite inferior, hay también un paso del histograma para determinar el límite inferior. En particular, el *umbral del histograma* (paso 1412, 1422) produce un umbral de una imagen de entrada, pero usa una escala móvil para determinar el punto en el que se aplica el umbral. Las entradas son la imagen actual y un *porcentaje umbral* definido por el usuario. Este último se utiliza para determinar en qué porcentaje de la intensidad total debe establecerse el nivel umbral. En primer lugar, la intensidad de cada píxel se suma en una intensidad total. El *porcentaje umbral* se multiplica por esta intensidad total para obtener una suma de corte. Finalmente, todos los píxeles se reagrupan por intensidad (en un histograma) y sus intensidades se suman desde las más bajas hasta las más altas (intervalo a intervalo) hasta que se consigue la suma de corte. La última intensidad de píxel más alta visitada en el proceso es el umbral para la imagen actual. Las intensidades de todos los píxeles con intensidades mayores a ese valor se establecen en el máximo, mientras que todas las demás se establecen en el mínimo.

[0073] Los pasos identificados como los pasos 1414, 1416, 1424, 1426, 1428, 1432, 1434, 1436 en la **figura 14** representan pasos intermedios que se producen en los enmascaradores iniciales, tales como un enmascarador celular 212 (pasos 1414, 1416), un enmascarador de área de subconjunto 216 (pasos 1424, 1426, 1428) y un enmascarador de biomarcador 222 (pasos 1432, 1434, 1436). Estos pasos se definen de la siguiente manera:

5 [0074] *Dilatar* aumenta el área de las regiones más brillantes en 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 usan imágenes binarias para la primera entrada. El procedimiento operará sobre imágenes continuas, pero el resultado no será un *dilatar* válido. El proceso *dilatar* empieza hallando primero la intensidad de píxel máxima en la imagen. Posteriormente, se examina una vez cada píxel de la imagen. Si el píxel en investigación tiene una intensidad igual a la intensidad máxima, este píxel se representará en la imagen de salida como un círculo con radio de *iteraciones* y centrado en el píxel original. Todos los píxeles en ese círculo tendrán una intensidad igual a la intensidad máxima. Todos los demás píxeles se copian en la imagen de salida sin modificar.

10 [0075] El procedimiento *rellenar agujeros* rellenará regiones "vacías" de una imagen con píxeles con la intensidad máxima. Estas regiones vacías son aquellas que tienen una intensidad mínima y cuya área (*tamaño*) de píxel es la especificada por el usuario. La imagen actual y el *tamaño* son las dos entradas requeridas. Como con *dilatar*, este procedimiento solo debería aplicarse a imágenes binarias.

15 [0076] *Erosionar* procesa las imágenes de la misma forma que *dilatar*. Toda la funcionalidad es la misma que con *dilatar*, excepto porque el primer paso determina la intensidad mínima en la imagen, solo se alteran los píxeles correspondientes a la intensidad más baja y los círculos usados para desarrollar los píxeles de intensidad mínima encontrados se rellenan con el valor de intensidad más baja. Como con *dilatar*, este procedimiento solo debería aplicarse a imágenes binarias.

20 [0077] *Eliminar objetos*. Se esperan dos entradas: la imagen actual y el *tamaño de objeto*. *Eliminar objetos* es lo opuesto al procedimiento *rellenar agujeros*. Cualquier región que solo contenga píxeles con la intensidad máxima que rellenan un área menor al *tamaño de objeto* de entrada se establecerá en la intensidad mínima y "se eliminará" consecuentemente. Este procedimiento solo debería aplicarse a imágenes binarias; la aplicación a imágenes continuas puede producir resultados inesperados.

25 [0078] El resultado en los pasos 1418, 1429 y 1438 son la máscara celular resultante, la máscara de subconjunto (o, en este ejemplo particular, la máscara de área tumoral) y la máscara celular de biomarcador, respectivamente. La **figura 14** representa, además, las combinaciones de estas máscaras resultantes para obtener la información de área relevante para la puntuación PBP. Estas combinaciones se describen a continuación con referencia a los enmascaradores de combinación del controlador 200, representados en la **figura 13**.

30 [0079] Se muestra un controlador 200 que incluye enmascaradores de combinación, tales como un enmascarador de células de un subconjunto 218, un enmascarador de células de no subconjunto 220 y un enmascarador de combinación 230. En algunas formas de realización, las células de un subconjunto identificadas por el enmascarador 218 y las células de no subconjunto identificadas por el enmascarador 220 son células tumorales y células no tumorales, respectivamente. El enmascarador de células de un subconjunto realiza una operación Y, como se muestra en el paso 1452 de la **figura 14**, para combinar el resultado del enmascarador celular 212 (representativo de todas las células en la imagen) con el resultado del enmascarador de área de subconjunto 216. Por consiguiente, el enmascarador de células de un subconjunto genera una máscara de todas las células de un subconjunto de la imagen. Esta misma combinación, usando una operación *Fuera* realizada por el enmascarador de células de no subconjunto 220 como se muestra en el paso 1454 de la **figura 14**, genera una máscara de todas las células de no subconjunto en la imagen de una muestra.

40 [0080] El enmascarador de combinación 230 se configura para combinar dos máscaras de entrada. Como se representa en la **figura 14**, el enmascarador de combinación 230 combina la máscara de biomarcador con una de entre la máscara de células de un subconjunto (del enmascarador de células de un subconjunto 218) o la máscara de células de no subconjunto (del enmascarador de células de no subconjunto 220), o tanto la máscara de biomarcador + la máscara de subconjunto como la máscara de biomarcador + la máscara de no subconjunto. Las líneas punteadas representan que o una o ambas máscaras celulares se pueden combinar con la máscara de biomarcador en el enmascarador de combinación 230. El resultado del enmascarador de combinación 230 es una máscara representativa de todas las células de un subconjunto que son positivas para el biomarcador y/o todas las células de no subconjunto que son positivas para el biomarcador. El enmascarador de combinación 230 puede combinar las máscaras de una manera alterna de modo que el resultado del enmascarador de combinación 230 sea una máscara representativa de las células de un subconjunto que no son positivas para el biomarcador (negativas para el biomarcador). Si las células de interés no están específicamente relacionadas con el subconjunto, por ejemplo tumorales o no tumorales, sino con todas las células, entonces la máscara positiva para un biomarcador no se combina con ninguna máscara adicional y pasa a través del enmascarador de combinación 230 sin modificar.

55 [0081] Para calcular el % de puntuación de positividad de biomarcador (PBP), el área de la máscara positiva para un biomarcador de las células de un subconjunto seleccionado (por ejemplo, todas, tumorales o no tumorales) o máscara negativa para un biomarcador (en cuyo caso la puntuación representa negatividad de biomarcador) se determina en píxeles en el evaluador de área 232. El área total de todas las células seleccionadas (positivas y

negativas para el biomarcador) se determina en píxeles en el evaluador de área 232. Las líneas punteadas que terminan en el evaluador de área 232 indican que las entradas de área total pueden ser una o más de entre la máscara de todas las células, la máscara de células de un subconjunto y la máscara de células de no subconjunto, para calcularse por separado. Una puntuación de porcentaje de positividad de biomarcador se determina en el calculador de positividad 236. En una forma de realización, la puntuación BPB se calcula dividiendo el área de la máscara positiva para un biomarcador de las células seleccionadas del evaluador de área 232 entre el área de la máscara de todas las células seleccionadas del evaluador de área 232 y multiplicando por 100. En una forma de realización, la ecuación ejecutada por el calculador de interacción 236 es:

$$BPB = \frac{A_P}{A_A} \times 100$$

donde A_P es un área positiva para un biomarcador para el tipo seleccionado de célula de un subconjunto (por ejemplo, todas, tumorales o no tumorales) y A_A es el área total de todas las células del tipo de células seleccionado (todas, tumorales, no tumorales). De forma similar, A_N podría reemplazar A_P en la ecuación anterior, donde A_N es un área negativa para un biomarcador para el tipo seleccionado de célula (por ejemplo, todas, tumorales o no tumorales), para determinar una puntuación representativa del porcentaje de negatividad de biomarcador para el tipo de célula de un subconjunto.

[0082] El procedimiento Y se modela después de una operación binaria Y, pero difiere de manera significativa. Y acepta la imagen actual y una resultante seleccionada por un usuario. El resultado es una imagen creada realizando una multiplicación de las intensidades normalizadas de píxeles correspondientes de dos imágenes de entrada. En algunos casos, los datos de intensidad de imagen están ya normalizados. Por lo tanto, el procedimiento Y es simplemente una multiplicación por píxeles de las dos imágenes. Las dos entradas requeridas para *Fuera* son la imagen actual y una resultante seleccionada por un 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 que se va a eliminar y B_{max} es la intensidad máxima de B. Nótese que la división de B entre B_{max} normaliza B.

EJEMPLOS

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

[0083] *Preparación de las muestras.* Se desparafinaron muestras de tejido fijadas en formalina incluidas en parafina (FFPE). Los portaobjetos se rehidrataron entonces a través de una serie de lavados de xileno a alcohol antes de incubar en agua destilada. Se realizó entonces una recuperación antigénica inducida por calor usando condiciones de presión y temperatura elevadas, se dejaron enfriar y se transfirieron a una solución salina tamponada con Tris. Se realizó entonces una tinción donde se efectuaron los pasos siguientes. Primero, se bloqueó la peroxidasa endógena seguido por la incubación con una solución de bloqueo de proteína para reducir la tinción de anticuerpo no específica. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con un anticuerpo primario anti-PD1 de ratón. Luego se lavaron los portaobjetos antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón HRP. Se lavaron los portaobjetos y luego se detectó la tinción de PD-1 usando TSA+ Cy® 3.5 (Perkin Elmer). Cualquier HRP residual se extinguió entonces usando dos lavados de 100 mM de benzohidrazida con 50 mM de peróxido de hidrógeno fresca. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de teñir con un anticuerpo primario anti-PD-L1 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un cóctel de anticuerpo secundario anti-conejo HRP 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 una última vez antes de cubrirse con un cubreobjetos con medios de montaje y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Se muestra una visión de conjunto esquemática de los anticuerpos y los reactivos de detección en **la figura 1**.

[0084] *Obtención de imágenes y análisis de las muestras.* Luego se adquirieron imágenes fluorescentes usando el Vectra 2 Intelligent Slide Analysis System usando la versión 2.0.8 del *software* Vectra (Perkin Elmer). Primero, se obtuvieron imágenes monocromáticas del portaobjetos con un aumento 4x usando DAPI. Un algoritmo automatizado (desarrollado usando inForm) se usó para identificar áreas del portaobjetos que contiene tejido.

[0085] Las áreas del portaobjetos identificadas como que contienen tejido se visualizaron con un aumento 4x para los canales asociados a DAPI (azul), FITC (verde) y Cy® 5 (rojo) para crear imágenes RGB. Estas imágenes con un aumento 4x se procesaron usando un algoritmo de enriquecimiento automatizado (desarrollado usando inForm) en el selector de campo de visión 104 para identificar y clasificar posibles campos de visión con un aumento 20x según la máxima expresión de Cy® 5.

- [0086] Los 40 campos de visión superiores se visualizaron con un aumento 20x a lo largo de longitudes de onda para DAPI, FITC, Texas Red y Cy® 5. Las imágenes sin procesar se revisaron en cuanto a aceptabilidad, y las imágenes que estaban desenfocadas, carecían de células tumorales, estaban altamente necróticas o contenían altos niveles de señal fluorescente no asociada a una localización de anticuerpos esperada (es decir, tinción de fondo) se rechazaron antes del análisis. Las imágenes aceptadas se procesaron usando AQUAduct (Perkin Elmer), donde cada fluoróforo se desmezcló espectralmente mediante un desmezclador espectral 210 en canales individuales y se guardó como un archivo separado.
- [0087] Los archivos procesados se analizaron adicionalmente usando AQUAnalysis™ o a través de un proceso completamente automatizado usando AQUAserve™. Los detalles fueron los siguientes.
- [0088] Cada imagen de DAPI se procesó mediante un enmascarador celular 212 para identificar todos los núcleos celulares incluidos en esa imagen (**fig. 2a**) y luego se dilataron 3 píxeles para representar el tamaño aproximado de una célula completa. Esta máscara resultante representaba todas las células incluidas en esa imagen (**fig. 2b**).
- [0089] El S100 (marcador de célula tumoral para el melanoma) detectado con colorante 488 (**fig. 3a**) se procesó mediante un enmascarador tumoral 216 para crear una máscara binaria de toda el área tumoral dentro de esa imagen (**fig. 3b**). El solapamiento entre esta máscara y la máscara de todas las células creó una nueva máscara para las células tumorales (**fig. 3c**).
- [0090] De forma similar, la ausencia del marcador de célula tumoral en combinación con la máscara de todos los núcleos creó una nueva máscara para todas las células no tumorales (**fig. 3d**), realizada mediante un enmascarador de células no tumorales 220.
- [0091] Cada imagen de Cy® 5 (**fig. 4a**) se procesó mediante un enmascarador de biomarcador 222 para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para PD-L1 (**fig. 4b**). El solapamiento entre la máscara de todas las células tumorales y la máscara de todas las células positivas para PD-L1, usando un enmascarador de combinación 230, creó una nueva máscara de todas las células tumorales positivas para PD-L1 (**fig. 4c**). De forma similar, el solapamiento entre la máscara de todas las células no tumorales y la máscara de todas las células positivas para PD-L1, usando un enmascarador de combinación 230, creó una nueva máscara de todas las células no tumorales positivas para PD-L1 (**fig. 4d**).
- [0092] Cada imagen de Cy® 3.5 (**fig. 5a**) se superpuso con la máscara de todas las células no tumorales para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para PD-1 (**fig. 5b**).
- [0093] Se dedujo el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células tumorales que expresan PD-L1, usando una calculadora de positividad 236, dividiendo el área total, medida en píxeles y determinada por un evaluador de área 232, de la máscara de todas las células tumorales positivas para PD-L1 (**fig. 4c**) entre el área total, medida en píxeles y determinada por un evaluador de área 232, de la máscara de todas las células tumorales (**fig. 3c**). Los valores representativos de PBP para todas las células que expresan PD-L1 se muestran en la **figura 6a** (datos clasificados según la expresión creciente).
- [0094] El PBP para todas las células no tumorales que expresan PD-1 se dedujo dividiendo el área total, medida en píxeles, de la máscara de todas las células no tumorales positivas para PD-1 (**fig. 5b**) entre el área total, medida en píxeles, de la máscara de todas las células no tumorales (**fig. 3d**). Los valores representativos de PBP para todas las células no tumorales que expresan PD-1 se muestran en la **figura 6b** (datos clasificados según la expresión creciente).
- [0095] Las **figuras 7 y 8** muestran ejemplos representativos de máscaras superpuestas que indican células positivas para PD-L1 (en rojo), células positivas para PD-L (en amarillo), células tumorales (S100, en verde) y todas las células (DAPI, en azul). Para un respondedor positivo a la inmunoterapia, la máscara de la **figura 7** indica fácilmente la presencia de células positivas para PD-L1 (en rojo), células positivas para PD-1 (en amarillo) y todas las células tumorales (en verde). En cambio, para un respondedor negativo a la inmunoterapia, la máscara de la **figura 8** indica la presencia de células tumorales (S100, en verde) y todas las células (DAPI, en azul), pero muestra pocas o ninguna célula positiva para PD-L1 (en rojo) o células positivas para PD-1 (en amarillo).

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

- [0096] Se realizaron procedimientos análogos a los del ejemplo 1, sustituyendo el anti-S100 de ratón marcado directamente con colorante 488 por un anti-pancitoqueratina de ratón marcado directamente con colorante 488 para

muestras de tumores epiteliales. Los valores PBP para PD-1 y PD-L1 se muestran en la **figura 9**. Un subconjunto de estos pacientes mostró altos niveles de interacción receptor-ligando que recuerda a la supresión inmunitaria.

Ejemplo 3. Comparación de técnicas de análisis

[0097] Para generar muestras de control, se cultivaron según las instrucciones del fabricante líneas celulares de linfoma con expresión de PD-L1 (Karpas 299) o falta de expresión (Ramos RA#1) previamente establecida. Las células se contaron entonces y las dos líneas celulares se mezclaron en porcentajes variables para generar una serie de bloques de gránulos de líneas celulares FFPE cuya expresión de PD-L1 varía de 0-100%. Los núcleos (600 μm) de estas mezclas de líneas celulares al igual que de resecciones de tejido de amígdala normal se usaron después para crear una micromatriz tisular (TMA). Luego se tiñó una sección de esta TMA, se visualizó y cada núcleo se puntuó entonces para el % de positividad de PD-L1 usando AQUAnalysis™ (todos los pasos como se describe en el ejemplo 1) y los resultados se muestran en el eje Y de la **figura 10**, donde cada punto representa un único núcleo (campo de visión único).

[0098] Alternativamente, se cuantificó el % de expresión de PD-L1 de las mismas imágenes usando un *software* basado en el recuento de células para la comparación de la siguiente manera. Se usó DAPI para identificar primero cada núcleo celular y se creó entonces un citoplasma morfológico alrededor de los núcleos celulares identificados. Se estableció un umbral de intensidad para identificar células con expresión de PD-L1 en el citoplasma de las células. El número total de células identificadas por encima de este umbral se dividió luego entre el número total de células de la imagen para determinar el % de células positivas para PD-L1 en cada núcleo y los resultados se muestran en el eje X de la **figura 10**. En general, hubo un nivel alto de concordancia entre los dos métodos de recuento de células ($R^2 = 0,86$, pendiente 1,1); sin embargo, había tres valores atípicos perceptibles marcados como A, B, C en la **figura 10** donde el % de positividad de PD-L1 determinado por la puntuación AQUA® fue significativamente mayor que el del método de recuento de células. Los puntos A y B eran núcleos de líneas celulares donde el 100% de las células eran Karpas299 y, así, los valores determinados por la puntuación AQUA® estaban mucho más próximos a los esperados y el método de recuento de células no pudo identificar el citoplasma de las células como positivo para PD-L1. De forma similar, en el punto C, la mezcla celular incluyó un 40% teórico de células Karpas299 donde el valor determinado por la puntuación AQUA® estaba de nuevo mucho más próximo al esperado respecto al método de recuento de células. Estos resultados demostraron la superioridad de los métodos que en la presente se describen respecto al *software* basado en el recuento de células.

Ejemplo 4. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan PD-L1 y células que expresan CD80.

[0099] Se realizan procedimientos análogos a los del ejemplo 1, sustituyendo la tinción y el análisis de PD-1 por la tinción y el análisis de CD80.

Ejemplo 5. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan CTLA-4 y células que expresan CD80.

[0100] *Preparación de las muestras.* Se desparafinaron muestras de tejido fijadas en formalina incluidas en parafina (FFPE), se rehidrataron y se realizó una recuperación antigénica con condiciones de temperatura elevada. Luego se realizó una tinción donde se efectuaron los pasos siguientes. Primero, los tejidos se sometieron a la detección de expresión de CTLA-4 usando 20 pares de sondas de hibridación que abarcan aproximadamente 1kb 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 cualquier HRP residual se extinguió entonces usando dos lavados de 100 mM de benzohidrazida con 50 mM de peróxido de hidrógeno fresca. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de teñir con un anticuerpo primario anti-CD80 de ratón. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón HRP. Los portaobjetos se lavaron y luego la tinción de CD80 se detectó usando TSA-Cy® 5 (Perkin Elmer). Cualquier HRP residual se extinguió entonces usando dos lavados de 100 mM de benzohidrazida con 50 mM de peróxido de hidrógeno fresca. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de teñir con un anticuerpo primario anti-CD3 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un cóctel de anticuerpo secundario 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 una última vez antes de cubrirse con un cubreobjetos con medios de montaje y dejar secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

[0101] Se realizaron procedimientos de obtención de imágenes y análisis análogos a los del ejemplo 1, visualizando a lo largo de longitudes de onda para DAPI, FITC, Cy® 3 y Cy® 5. La expresión de CTLA-4 y CD80 se usó para desarrollar un algoritmo de enriquecimiento para adquirir imágenes a 20x. El análisis se realizó para estudiar la prevalencia de CTLA-4 en células T positivas para CD3 y la expresión de CD80 en muestras tumorales tomadas de pacientes con melanoma metastásico. Los resultados se muestran en las **figuras 31a y 31b**.

Ejemplo 6. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan PD-L2 y células que expresan PD-1.

[0102] 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.

5 **Ejemplo 7. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan CTLA-4 y células que expresan CD86.**

[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 CTLA-4 y CD86.

10 **Ejemplo 8. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan LAG-3 y células que expresan HLA-DR.**

[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 LAG-3 y HLA-DR.

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

15 [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 TIM-3 y galectina 9.

Ejemplo 10. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan 41BB y células que expresan 4.1BBL.

20 [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 41BB y 4.1BBL.

Ejemplo 11. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan OX40 y células que expresan OX40L.

[0107] 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.

25 **Ejemplo 12. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan CD40 y células que expresan CD40L.**

[0108] 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.

30 **Ejemplo 13. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan ICOS y células que expresan ICOSL.**

[0109] 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 14. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan GITR y células que expresan GITRL.

35 [0110] 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 15. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de las imágenes para muestras de tejido con células que expresan HLA-DR y células que expresan TCR.

40 [0111] 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 16. Preparación de las muestras, obtención de imágenes y análisis de CD3 y PD-1 en muestras de tejido de pacientes con linfoma difuso de células β grandes (DLBCL)

[0112] *Preparación de las muestras.* Se desparafinaron muestras de tejido fijadas en formalina incluidas en parafina (FFPE) de pacientes con DLBCL (n = 43). Los portaobjetos se rehidrataron luego a través de una serie de lavados de xileno a alcohol antes de incubar en agua destilada. Se realizó entonces una recuperación antigénica inducida por calor usando condiciones de presión y temperatura elevadas, se dejaron enfriar y se transfirieron a una solución salina tamponada con Tris. Se realizó entonces una tinción donde se efectuaron los pasos siguientes. Primero, se bloqueó la peroxidasa endógena seguido por la incubación con una solución de bloqueo de proteína para reducir la tinción de anticuerpo no específica. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con un anticuerpo primario anti-PD1 de ratón. Luego se lavaron los portaobjetos antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón HRP. Se lavaron los portaobjetos y luego se detectó la tinción de PD-1 usando TSA+ Cy® 3 (Perkin Elmer). Los reactivos de los anticuerpos primario y secundario se eliminaron entonces mediante microondas. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de teñir con un anticuerpo primario anti-CD3 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un cóctel de anticuerpo secundario anti-conejo HRP más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción de CD3 usando TSA-Cy® 5 (Perkin Elmer). Los portaobjetos se lavaron una última vez antes de cubrirse con un cubreobjetos con medios de montaje y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Se muestra una visión de conjunto esquemática de los anticuerpos y los reactivos de detección en la **figura 15**.

[0113] *Obtención de imágenes y análisis de las muestras.* Luego se adquirieron imágenes fluorescentes usando el Vectra 2 Intelligent Slide Analysis System usando la versión 2.0.8 del *software* Vectra (Perkin Elmer). Primero, se obtuvieron imágenes monocromáticas del portaobjetos con un aumento 4x usando DAPI. Un algoritmo automatizado (desarrollado usando inForm) se usó para identificar áreas del portaobjetos que contiene tejido.

[0114] Las áreas del portaobjetos identificadas como que contienen tejido se visualizaron con un aumento 4x para los canales asociados a DAPI (azul), Cy® 3 (verde) y Cy® 5 (rojo) para crear imágenes RGB. Estas imágenes con un aumento 4x se procesaron usando un algoritmo de enriquecimiento automatizado (desarrollado usando inForm) en el selector de campo de visión 104 para identificar y clasificar posibles campos de visión con un aumento 20x según la máxima expresión de Cy® 3.

[0115] Los 40 campos de visión superiores se visualizaron con un aumento 20x a lo largo de longitudes de onda para DAPI, Cy®3 y Cy® 5. Las imágenes sin procesar se revisaron en cuanto a aceptabilidad, y las imágenes que estaban desenfocadas, carecían de células tumorales, estaban altamente necróticas o contenían altos niveles de señal fluorescente no asociada a una localización de anticuerpos esperada (es decir, tinción de fondo) se rechazaron antes del análisis. Las imágenes aceptadas se procesaron usando AQUAduct (Perkin Elmer), donde cada fluoróforo se desmezcló espectralmente mediante un desmezclador espectral 210 en canales individuales y se guardó como un archivo separado.

[0116] Los archivos procesados se analizaron adicionalmente usando AQUAnalysis™ o a través de un proceso completamente automatizado usando AQUAserve™. Los detalles fueron los siguientes.

[0117] Cada imagen de DAPI se procesó mediante un enmascarador celular 212 para identificar todos los núcleos celulares incluidos en esa imagen (**fig. 16a**) y luego se dilataron 2 píxeles para representar el tamaño aproximado de una célula completa. Esta máscara resultante representaba todas las células incluidas en esa imagen (**fig. 16b**).

[0118] Cada imagen de Cy® 5 (**fig. 17a**) se procesó mediante un enmascarador de biomarcador 222 para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para PD-1 (**fig. 17b**).

[0119] Cada imagen de Cy® 3 (**fig. 18a**) se procesó mediante un enmascarador de biomarcador 222 para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para CD3 (**fig. 18b**).

[0120] Las máscaras binarias para todas las células positivas para PD-1 y positivas para CD3 se combinaron para crear una máscara binaria de todas las células que son doblemente positivas para PD-1 y CD3 (**fig. 19**).

[0121] Se dedujo el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células CD3 que expresan PD-1, usando una calculadora de positividad 236, dividiendo el área total, medida en píxeles y determinada por un evaluador de área 232, de la máscara de todas las células positivas para PD-1 (**fig. 17b**) entre el área total, medida en píxeles y determinada por un evaluador de área 232, de la máscara de todas las células positivas para CD3 (**fig. 18b**). Se observó una distribución diferencial de células T agotadas (CD3+/PD1+) en sitios primarios (niveles bajos) frente a sitios secundarios (niveles altos). Los resultados se muestran en las **figuras 20a y 20b**.

Ejemplo 17. Comparación de plataformas

[0122] La precisión de los procedimientos análogos a los de los ejemplos 1 y 16 se confirmó por comparación con la citometría de flujo. Las frecuencias de las células T reguladoras (basadas en la expresión de FoxP3 y CD25) se determinó en sangre completa estimulada con IL-2, TGF β y CD28 durante 5 días en una placa recubierta con CD3.

Plataforma	FoxP3	CD25
Citometría de flujo	22%	66%
Método PBP	24%	66%

5 **Ejemplo 18. Evaluación de células T CD25/FoxP3 en las indicaciones de tumores múltiples**

[0123] Se realizaron procedimientos análogos a los del ejemplo 16 con la identificación adicional de células tumorales con anticuerpos o anti-S100 o anti-citoqueratina detectados con un anticuerpo secundario AlexaFluor488 y visualizados a lo largo de longitudes de onda para DAPI, FITC, Cy@ 3 y Cy@ 5 para la evaluación cuantitativa de CD25 y FoxP3 en tejidos de NSCLC, gástrico y de melanoma. Los tejidos se tiñeron con anticuerpos que reconocen CD25 y FoxP3 y se calculó su expresión en áreas no tumorales como el % de expresión. La prevalencia de células T CD25/FoxP3+ varió de un 1% a un 10% en muestras de tejido archivísticas de pulmón, gástrico y de melanoma. Los resultados se muestran en las **figuras 21 y 22**.

15 **Ejemplo 19. Evaluación de células T CD4/CD8 en las indicaciones de tumores múltiples**

[0124] Se realizaron procedimientos análogos a los del ejemplo 16 con la identificación adicional de células tumorales con anticuerpos o anti-S100 o anti-citoqueratina detectados con un anticuerpo secundario AlexaFluor488 y visualizados a lo largo de longitudes de onda para DAPI, FITC, Cy@ 3 y Cy@ 5 para la evaluación cuantitativa de CD4 y CD8 en tejidos de NSCLC, gástrico y de melanoma. Los tejidos se tiñeron con anticuerpos que reconocen CD4 y CD8 y se calculó su expresión en áreas no tumorales como el % de expresión. Se observó un amplio rango de expresión (10%-50%) para células T CD4+ y CD8+ en secciones secuenciales de las muestras tumorales. Los resultados se muestran en las **figuras 23a y 23b**.

20 **Ejemplo 20. Evaluación de células similares a células supresoras de origen mielóide (MDSC) en muestras tumorales de pacientes diagnosticados con melanoma metastásico o cáncer pulmonar de células no pequeñas.**

[0125] Para identificar células similares a MDSC que expresan marcadores fenotípicos característicos de células mieloides (por ejemplo, CD11b, CD33 y HLA-DR) y marcadores bioquímicos (por ejemplo, ARG1 e IDO-1) que otorgan una función supresora a estas células, se tiñeron las muestras o con CD11b, HLA-DR e IDO o con CD11b, CD33 y ARG1.

[0126] La expresión diferencial de CD11b, HLA-DR e IDO-1 se utilizó para estudiar la presencia de un subconjunto de células mieloides supresoras conocidas como TAM (macrófagos asociados a tumores) en biopsias tumorales de pacientes con melanoma metastásico. Los subfenotipos representativos que pueden ser relevantes para predecir la respuesta a las inmunoterapias contra el cáncer se muestran en las **figuras 24a, 24b, 25a y 25b**.

[0127] La expresión diferencial de CD11b, CD33 y ARG-1 o CD11b, HLA-DR e IDO-1 se utilizó para estudiar la presencia de células similares a MDSC y TAM en muestras tumorales de pacientes con cáncer pulmonar avanzado (NSCLC). Los subfenotipos representativos que pueden ser relevantes para predecir la respuesta a las inmunoterapias contra el cáncer se muestran en las **figuras 26a, 26b y 27**.

[0128] *Preparación de las muestras.* Se desparafinaron muestras de tejido fijadas en formalina incluidas en parafina (FFPE). Los portaobjetos se rehidrataron luego a través de una serie de lavados de xileno a alcohol antes de incubar en agua destilada. Se realizó entonces una recuperación antigénica inducida por calor usando condiciones de presión y temperatura elevadas, se dejaron enfriar y se transfirieron a una solución salina tamponada con Tris. Se realizó entonces una tinción donde se efectuaron los pasos siguientes. Primero, se bloqueó la peroxidasa endógena seguido por la incubación con una solución de bloqueo de proteína para reducir la tinción de anticuerpo no específica. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con un anticuerpo primario o anti-IDO-1 de conejo o anti-CD33 de ratón. Luego se lavaron los portaobjetos antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo

o anti-ratón HRP. Se lavaron los portaobjetos y luego se detectó la tinción anti-IDO-1 o anti-CD33 usando TSA+ Cy® 5 (Perkin Elmer). Cualquier HRP residual se extinguió entonces usando dos lavados de 100 mM de benzohidrazida con 50 mM de peróxido de hidrógeno fresca. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de teñir con un anticuerpo primario anti-HLA-DR de ratón o uno anti-ARG1 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo HRP. Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción anti-HLA-DR o anti-ARG1 usando TSA-Cy® 3 (Perkin Elmer). Los reactivos de los anticuerpos primarios y secundarios se eliminaron entonces mediante microondas. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de teñir con un anticuerpo anti-CD11b de conejo. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con un cóctel de anticuerpo secundario anti-conejo HRP más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y luego se detectó la tinción anti-CD11b usando TSA-AlexaFluor488 (Life Technologies). Los portaobjetos se lavaron una última vez antes de cubrirse con un cubreobjetos con medios de montaje y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

[0129] Se usaron procedimientos análogos a los del ejemplo 16 para la obtención de imágenes y el análisis de las muestras a lo largo de longitudes de onda para DAPI, FITC, Cy® 3 y Cy® 5. Se procesaron imágenes con un aumento 4x usando un algoritmo de enriquecimiento automatizado (desarrollado usando inForm) en el selector de campo de visión 104 para identificar y clasificar posibles campos de visión con un aumento 20x según la máxima expresión de Cy®3 y Cy®5.

[0130] Cada imagen de DAPI se procesó mediante un enmascarador celular 212 para identificar todos los núcleos celulares incluidos en esa imagen y luego se dilataron para representar el tamaño aproximado de una célula completa. Esta máscara resultante representaba todas las células incluidas en esa imagen.

[0131] Cada imagen de AlexaFluor488® se procesó mediante un enmascarador de biomarcador 222 para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para CD11b.

[0132] Cada imagen de Cy® 3 se procesó mediante un enmascarador de biomarcador 222 para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para HLA-DR o CD33.

[0133] Cada imagen de Cy® 5 se procesó mediante un enmascarador de biomarcador 222 para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para IDO-1 o ARG1.

[0134] Las máscaras binarias para todas las células positivas para CD11b y HLA-DR se combinaron para crear una máscara binaria de todas las células que son doblemente positivas para CD11b y HLA-DR o son positivas para CD11b y negativas para HLA-DR.

[0135] Se dedujo el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células CD11b carentes de expresión de HLA-DR, usando una calculadora de positividad 236, dividiendo el área total, medida en píxeles y determinada por un evaluador de área 232, de la máscara de todas las células positivas para CD11b y negativas para HLA-DR entre el área total, medida en píxeles y determinada por un evaluador de área 232, de la máscara de todas las células positivas para CD11b. Los resultados se muestran en la **figura 24a** para muestras tumorales obtenidas de pacientes diagnosticados con melanoma metastásico.

[0136] Las máscaras binarias para todas las células positivas para CD11b, positivas para IDO y positivas para HLA-DR se combinaron para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para CD11b, negativas para HLA-DR y positivas para IDO-1.

[0137] El PBP para todas las células CD11b que expresan IDO-1, pero carecen de expresión de HLA-DR, se dedujo dividiendo el área total, medida en píxeles, de la máscara de todas las células positivas para CD11b, negativas para HLA-DR, positivas para IDO-1 entre el área total, medida en píxeles, de la máscara de todas las células positivas para CD11b. Los resultados se muestran en la **figura 24b** para muestras tumorales obtenidas de pacientes diagnosticados con melanoma metastásico y la **figura 27** para pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar de células no pequeñas.

[0138] Las máscaras binarias para todas las células positivas para HLA-DR y positivas para IDO-1 se combinaron para crear una máscara binaria de todas las células que son doblemente positivas para HLA-DR e IDO-1.

[0139] Se dedujo el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células HLA-DR que expresan IDO-1, usando una calculadora de positividad 236, dividiendo el área total, medida en píxeles y determinada por un evaluador de área 232, de la máscara de todas las células positivas para IDO-1, positivas para HLA-DR entre el área total, medida en píxeles y determinada por un evaluador de área 232, de la máscara de todas las células

positivas para HLA-DR. Los resultados se muestran en la **figura 25a** para muestras tumorales obtenidas de pacientes diagnosticados con melanoma metastásico.

5 [0140] Las máscaras binarias para todas las células positivas para CD11b, positivas para IDO y positivas para HLA-DR se combinaron para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para CD11b, positivas para HLA-DR y positivas para IDO-1.

10 [0141] El PBP para todas las células CD11b que expresan IDO-1 y HLA-DR se dedujo dividiendo el área total, medida en píxeles, de la máscara de todas las células positivas para CD11b, positivas para HLA-DR, positivas para IDO-1 entre el área total, medida en píxeles, de la máscara de todas las células positivas para CD11b. Los resultados se muestran en la **figura 25b** para muestras tumorales obtenidas de pacientes diagnosticados con melanoma metastásico y la **figura 26b** para muestras tumorales obtenidas de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar de células no pequeñas.

[0142] Las máscaras binarias para todas las células positivas para CD11b, positivas para CD33 y positivas para ARG1 se combinaron para crear una máscara binaria de todas las células que son positivas para CD11b, positivas para CD33 y positivas para ARG1.

15 [0143] El PBP para todas las células CD11b que expresan CD33 y ARG1 se dedujo dividiendo el área total, medida en píxeles, de la máscara de todas las células positivas para CD11b, positivas para CD33, positivas para ARG1 entre el área total, medida en píxeles, de la máscara de todas las células positivas para CD11b. Los resultados se muestran en la **figura 26a** para muestras tumorales obtenidas de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar de células no pequeñas.

20 **Ejemplo 21. Evaluación de células T activadas en muestras tumorales de pacientes diagnosticados con melanoma metastásico.**

[0144] Se realizaron procedimientos análogos a los del ejemplo 20 para teñir cada muestra con una combinación de DAPI, CD3, CD8 y Ki67 para identificar subpoblaciones de células T activadas. Se estudió la prevalencia de CD8+Ki67+ en biopsias tumorales obtenidas de pacientes diagnosticados con melanoma metastásico (**fig. 28**).

25 **Ejemplo 22. Evaluación de la prevalencia de macrófagos en muestras tumorales de pacientes diagnosticados con melanoma metastásico.**

30 [0145] Se realizaron procedimientos análogos a los del ejemplo 16 con la identificación adicional de células tumorales con anticuerpos anti-S100 detectados con un anticuerpo secundario AlexaFluor488 y visualizados a lo largo de longitudes de onda para DAPI, FITC, Cy® 3 y Cy® 5 para la evaluación cuantitativa de CD163 y CD68 en tejidos de melanoma. Los tejidos se tiñeron con anticuerpos que reconocen CD163 y CD68 y su expresión en áreas no tumorales se calculó como expresión PBP única o expresión PBP doble. Los resultados se muestran en las **figuras 29a, 29b y 29c**.

Ejemplo 23. Evaluación de la prevalencia de supresión de células T en muestras tumorales de pacientes diagnosticados con linfoma difuso de células β grandes (DLBCL) y tumores neuroendocrinos (NET).

35 [0146] Se realizaron procedimientos análogos a los del ejemplo 1 para teñir las muestras tumorales de DLBCL y NET con un anticuerpo primario anti-LAG-3 de ratón, secundario anti-ratón HRP, detectados con TSA+Cy®3.5, con la HRP restante extinguida con 100 mM de benzohidrazida y 50 mM de peróxido de hidrógeno. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con un anticuerpo primario anti-TIM-3 de conejo, secundario anti-conejo HRP, detectados con TSA-Cy®5. Luego se eliminaron los anticuerpos primarios y secundarios mediante microondas. Los tejidos se tiñeron entonces con un anticuerpo primario anti-CD3 de conejo, secundario anti-conejo HRP más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), detectados con Opal™520. La obtención de imágenes se realizó de manera análoga al ejemplo 1 a lo largo de longitudes de onda para DAPI, FITC, Texas Red y Cy® 5. El análisis se realizó de manera análoga al ejemplo 1 para determinar la prevalencia del PBP de células T que fueron positivas para LAG-3 y TIM-3 respectivamente. Los resultados se muestran en las **figuras 30a y 30b**.

45 [0147] Aunque que se han ilustrado y descrito determinadas formas de realización, debe entenderse que se pueden hacer cambios y modificaciones en las mismas según la técnica en la materia sin apartarse de la invención tal y como se define en las siguientes reivindicaciones.

50 [0148] Las formas de realización, ilustrativamente descritas en la presente, pueden practicarse adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no específicamente descritos en la presente. Así, por ejemplo, los términos "que comprende(n)", "que incluye(n)", "que contiene(n)", etc. deben leerse

ampliamente y sin limitación. Adicionalmente, los términos y expresiones empleados en la presente se han usado como términos de descripción y no de limitación, y se reconoce que varias modificaciones son posibles dentro del alcance de la tecnología reivindicada. Adicionalmente, se entenderá que la expresión "que consiste(n) esencialmente en" incluye aquellos elementos específicamente enumerados y aquellos elementos adicionales que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la tecnología reivindicada. La expresión "que consiste(n) en" excluye cualquier elemento no especificado.

[0149] La presente descripción no debe limitarse en cuanto a las formas de realización particulares descritas en esta aplicación. Se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones sin apartarse de su alcance, como será evidente para las personas expertas en la materia. Métodos y composiciones funcionalmente equivalentes dentro del alcance de la divulgación, además de aquellos enumerados en la presente, serán evidentes para las personas expertas en la materia a partir de las descripciones anteriores. Debe entenderse que esta divulgación no está limitada a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden por supuesto variar. Debe entenderse también que la terminología que en la presente se usa es solo con el fin de describir formas de realización particulares y no pretende ser limitante.

[0150] Además, cuando se describen características o aspectos de la divulgación en términos de grupos de Markush, aquellas personas expertas en la materia reconocerán que la divulgación se describe así también en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

[0151] Como entenderá una persona experta en la materia, para cualquiera y todos los fines, particularmente en cuanto a proporcionar una descripción escrita, todos los rangos descritos en la presente abarcan también cualquier y todos los posibles subrangos y combinaciones de subrangos de los mismos. Puede reconocerse fácilmente que cualquier rango enumerado describe y permite suficientemente que el mismo rango se descomponga en al menos mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. iguales. Como un ejemplo no limitante, cada rango mencionado en la presente puede descomponerse fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también entenderá una persona experta en la materia, todo el lenguaje tal como "hasta", "al menos", "mayor(es) a", "menor(es) a" y similares, incluye el número enumerado y se refiere a rangos que pueden descomponerse posteriormente en subrangos como se ha mencionado anteriormente. Finalmente, como entenderá una persona experta en la materia, un rango incluye cada miembro individual.

[0152] La invención se define en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Método de deducción de un valor para el % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células u, opcionalmente, uno o más subconjuntos de las mismas presentes en un campo de visión, que comprende:

- 5 (i) generar una imagen de las primeras señales fluorescentes representativas de los núcleos de todas las células presentes en un campo de visión, y dilatar las primeras señales fluorescentes hasta el diámetro de una célula entera para construir una primera máscara de todas las células presentes en el campo de visión;
- (ii) construir una segunda máscara de las segundas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un biomarcador de subconjunto;
- 10 (iii) opcionalmente, construir una tercera máscara de las terceras señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un primer biomarcador de interés;
- (iv) combinar dichas máscaras primera y segunda de manera que se proporcione una cuarta máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el biomarcador de subconjunto;
- 15 (v) opcionalmente, combinar dichas máscaras primera y tercera de manera que se proporcione una quinta máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que expresan también el primer biomarcador de interés;
- (vi) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la cuarta máscara entre el área total de la primera máscara;
- 20 (vii) opcionalmente, combinar dichas máscaras cuarta y quinta de manera que se proporcione una sexta máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células en el campo de visión, que
- (a) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés; o
- (b) expresan el biomarcador de subconjunto en ausencia del primer biomarcador de interés; y
- 25 (viii) opcionalmente, deducir un valor de PBP para el primer subconjunto de todas las células que o (a) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés o (b) expresan el biomarcador de subconjunto en ausencia del primer biomarcador de interés, dividiendo el área total de la sexta máscara entre el área total de la cuarta máscara.

2. Método según la reivindicación 1, donde se realizan todos los pasos opcionales enumerados.

3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende, además:

- 30 (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- (x) combinar dichas máscaras primera y séptima de manera que se proporcione una octava máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de un segundo subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan también el segundo biomarcador de interés;
- 35 (xi) combinar dichas máscaras cuarta y octava de manera que se proporcione una novena máscara que comprende las señales fluorescentes representativas del segundo subconjunto de todas las células en el campo de visión, que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés; y
- (xii) deducir un valor de PBP para el segundo subconjunto de todas las células que expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés dividiendo el área total de la novena máscara entre el
- 40 área total de la cuarta máscara.

4. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende, además:

- (ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;
- 45 (x) sustraer dicha segunda máscara de dicha primera máscara de manera que se proporcione una octava máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células que no expresan el biomarcador de subconjunto en el campo de visión;
- (xi) combinar dichas máscaras séptima y octava de manera que se proporcione una novena máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto en el campo de visión; y
- 50 (xii) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el segundo biomarcador de interés pero no expresan el biomarcador de subconjunto dividiendo el área total de la novena máscara entre el área total de la octava máscara.

5. Método según la reivindicación 1, que comprende, además:

(ix) construir una séptima máscara de las cuartas señales fluorescentes representativas de todas las áreas presentes en el campo de visión, que expresan un segundo biomarcador de interés;

5 (x) combinar dichas máscaras sexta y séptima de manera que se proporcione una octava máscara que comprende las señales fluorescentes representativas de todas las células que

(a) expresan el biomarcador de subconjunto, el primer biomarcador de interés y el segundo biomarcador de interés en el campo de visión;

(b) expresan el biomarcador de subconjunto y el primer biomarcador de interés en ausencia del segundo biomarcador de interés en el campo de visión; o

10 (c) expresan el biomarcador de subconjunto y el segundo biomarcador de interés en ausencia del primer biomarcador de interés en el campo de visión;

y

15 (xii) deducir un valor de PBP para todas las células que expresan el primer biomarcador de interés o el segundo biomarcador de interés, o una combinación de los mismos, al igual que el biomarcador de subconjunto, dividiendo el área total de la octava máscara entre el área total de la cuarta máscara.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el primer biomarcador de interés comprende un biomarcador seleccionado de CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde el segundo biomarcador de interés es diferente del primer biomarcador de interés y comprende un biomarcador seleccionado de CD11b, CD33, HLA-DR, IDO-1, ARG1, granzima B, B2M, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HLA-DR, galectina 9, CD80, CD86, 4.1BBL, ICOSL, CD40, OX40L, IDO-1, GITRL, PD-1, TIM3, LAG3, 41BB, OX40, CTLA-4, CD40L, CD28, GITR, ICOS, CD28, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD16, CD56, CD68, CD163, CD80 y CD86.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células tumorales.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el primer subconjunto de todas las células en el campo de visión comprende células no tumorales.

30 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el biomarcador de subconjunto se expresa solo en células tumorales.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el biomarcador de subconjunto se expresa solo en células no tumorales.

35 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el biomarcador de subconjunto comprende CD3 o CD19.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el biomarcador de subconjunto se expresa en células mieloides, células supresoras de origen mieloides o macrófagos asociados a tumores.

14. Método de control del progreso de un paciente diagnosticado con cáncer y sometido a inmunoterapia, que comprende:

40 (i) usar al menos dos muestras que comprenden tejido tumoral tomado de un paciente canceroso a lo largo de al menos dos puntos temporales, uno antes y uno después del inicio de la inmunoterapia, deduciendo un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células no tumorales que expresan un biomarcador de interés para cada una de dichas al menos dos muestras para obtener al menos un primer valor de PBP y al menos un segundo valor de PBP;

45 (ii) registrar dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde un cambio entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP es indicativo de una eficacia de dicha inmunoterapia;

donde dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP se deducen según cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

15. Método de control del progreso de un paciente diagnosticado con cáncer y sometido a inmunoterapia, que comprende:

- 5 (i) usar al menos dos muestras que comprenden tejido tumoral tomado de un paciente canceroso a lo largo de al menos dos puntos temporales, uno antes y uno después del inicio de la inmunoterapia, deduciendo un valor del % de positividad de biomarcador (PBP) para todas las células tumorales que expresan un biomarcador de interés para cada una de dichas al menos dos muestras para obtener al menos un primer valor de PBP y al menos un segundo valor de PBP;
- 10 (ii) registrar dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP, donde un cambio entre dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP es indicativo de una eficacia de dicha inmunoterapia;

donde dicho al menos primer valor de PBP y dicho al menos segundo valor de PBP se deducen según cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

FIG. 1

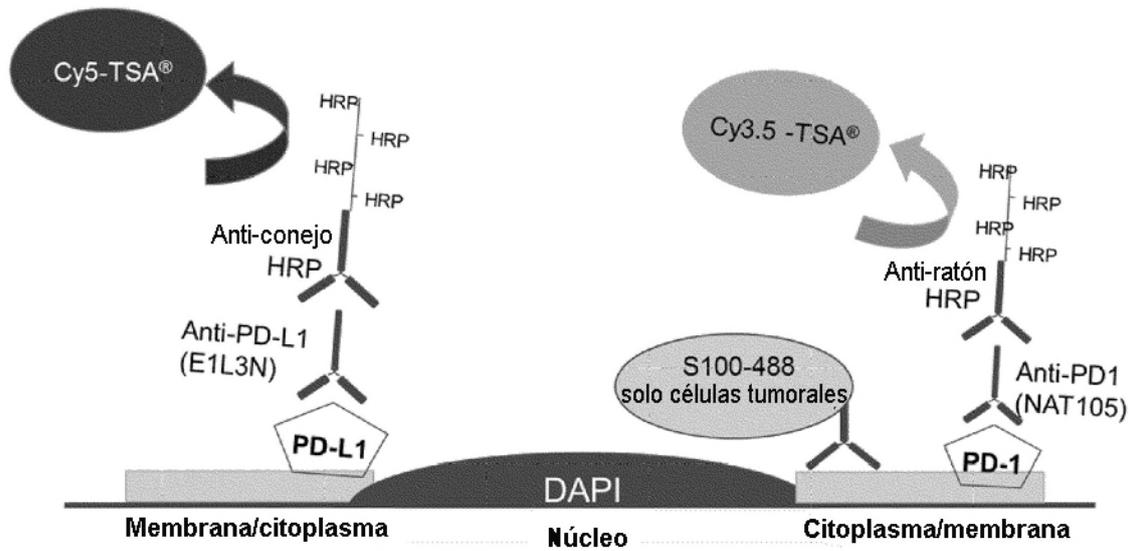


FIG. 2a

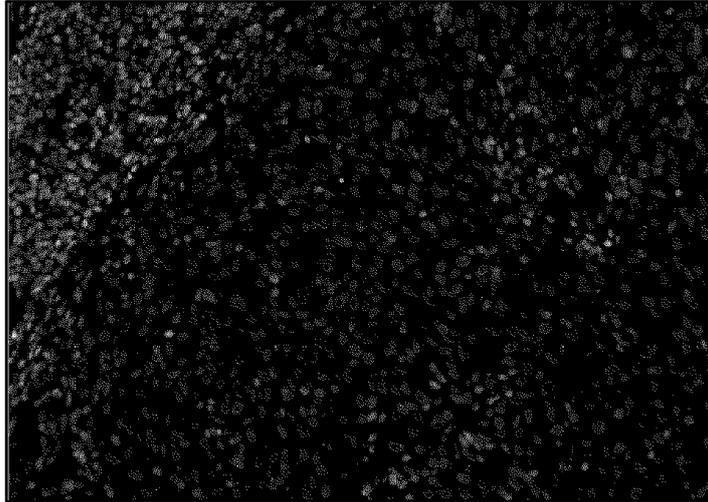


FIG. 2b

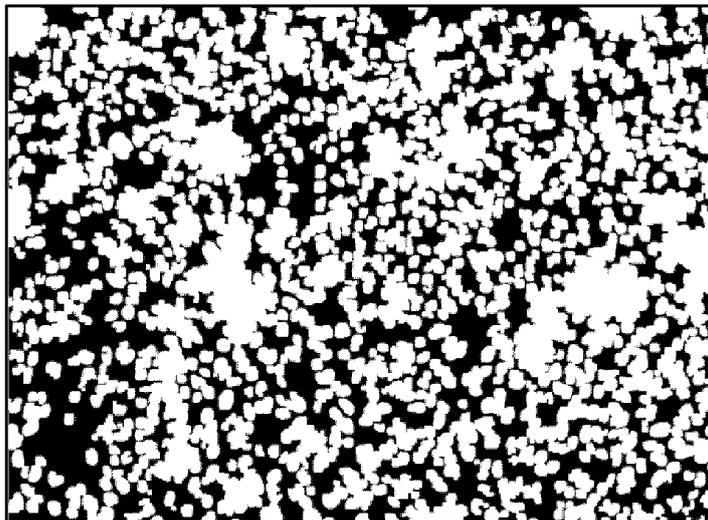


FIG. 3a

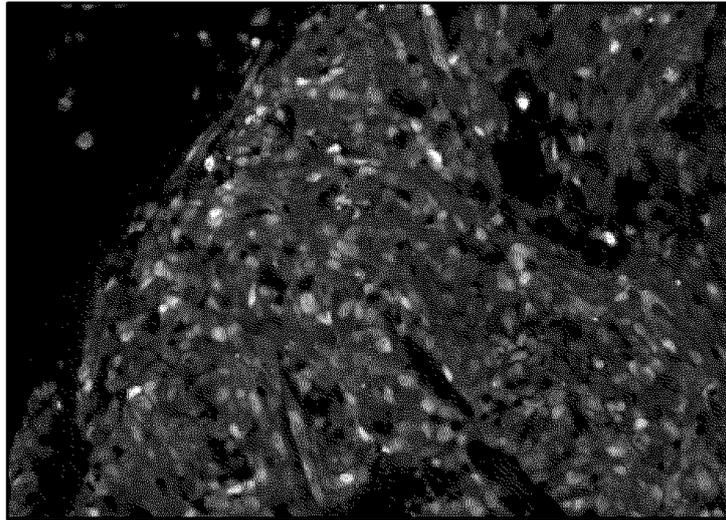


FIG. 3b



FIG. 3c

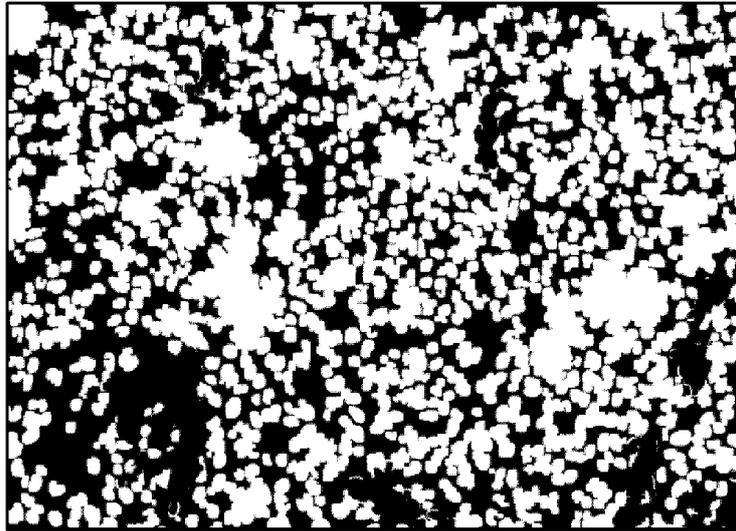


FIG. 3d

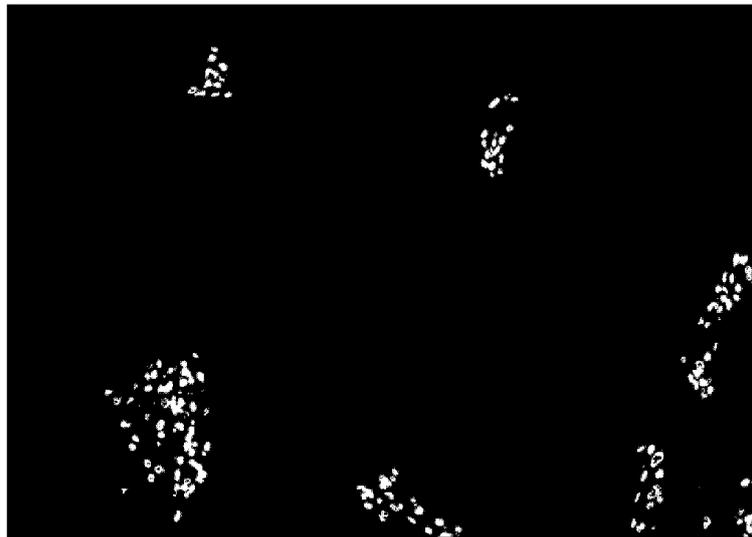


FIG. 4a

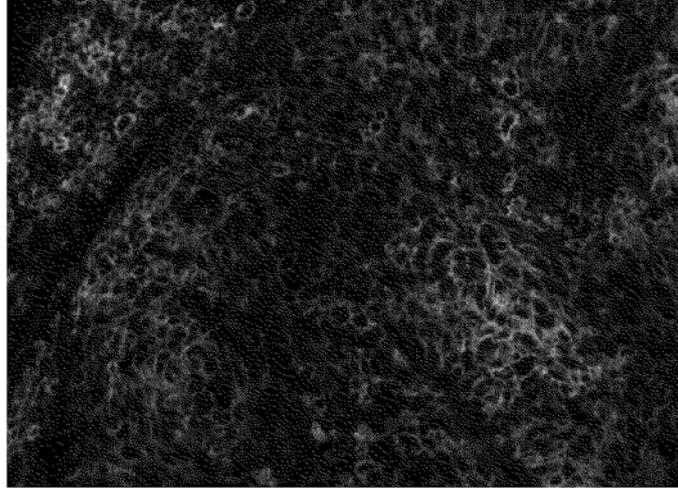


FIG. 4b

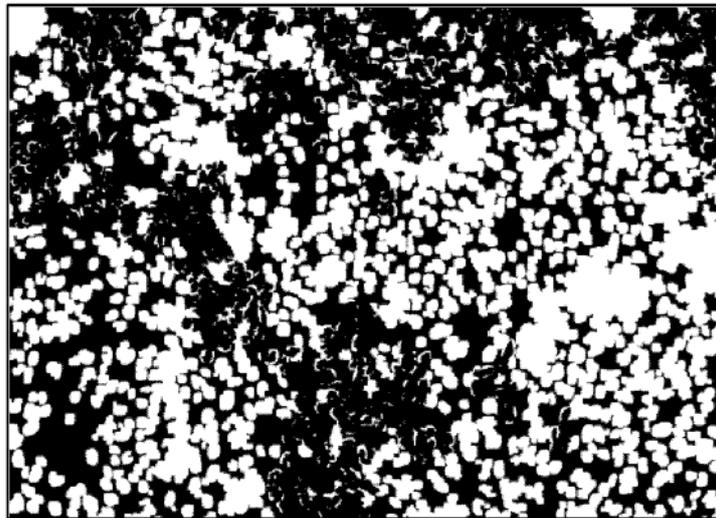


FIG. 4c

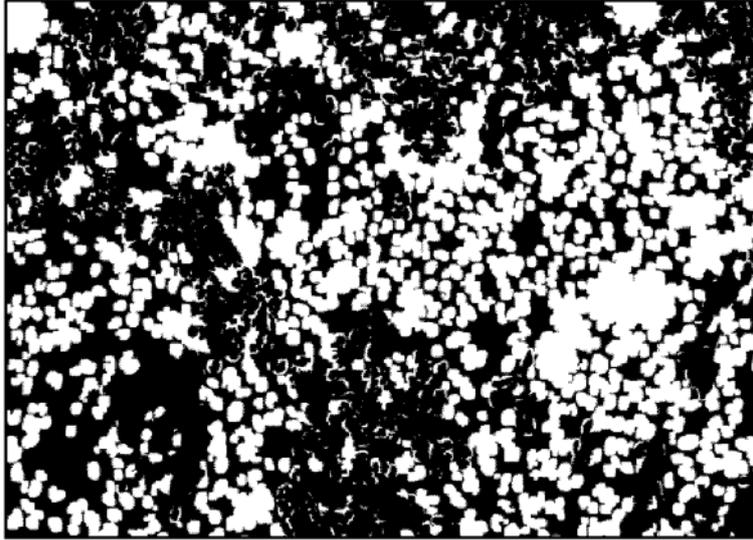


FIG. 4d

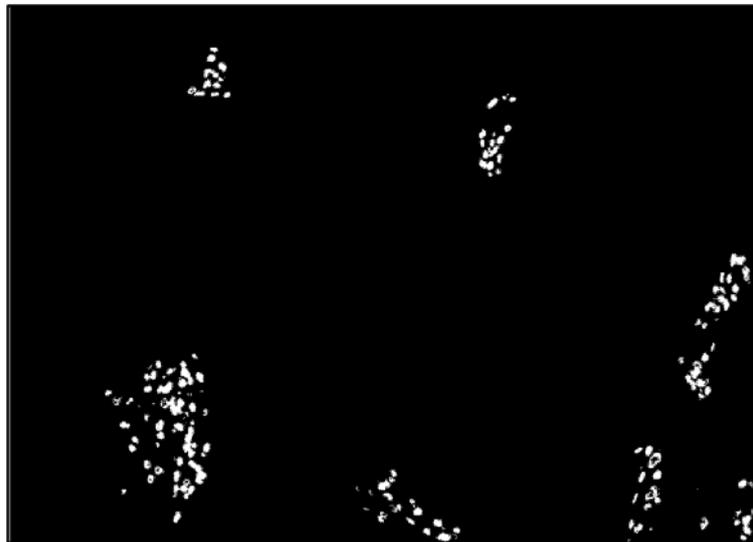


FIG. 5a

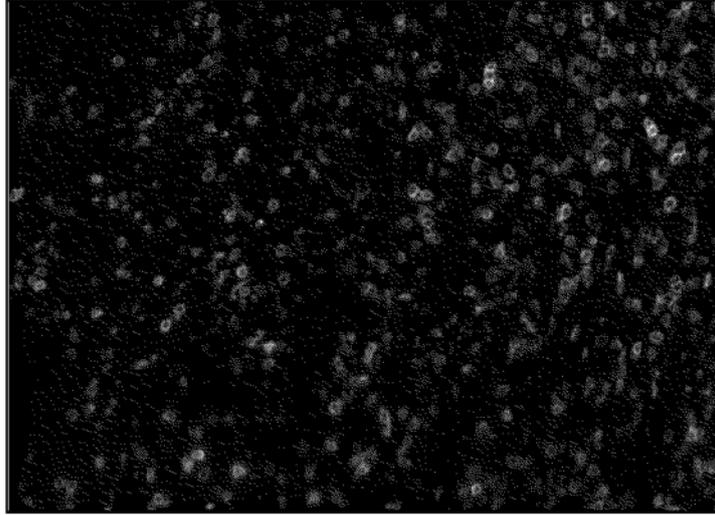


FIG. 5b

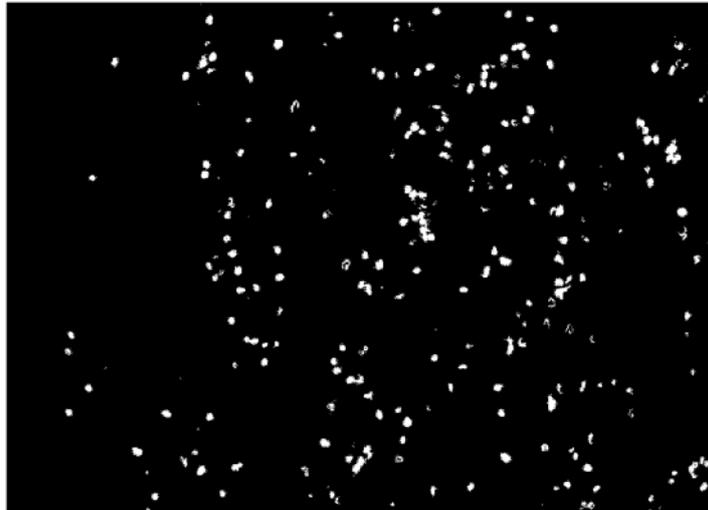


FIG. 6a

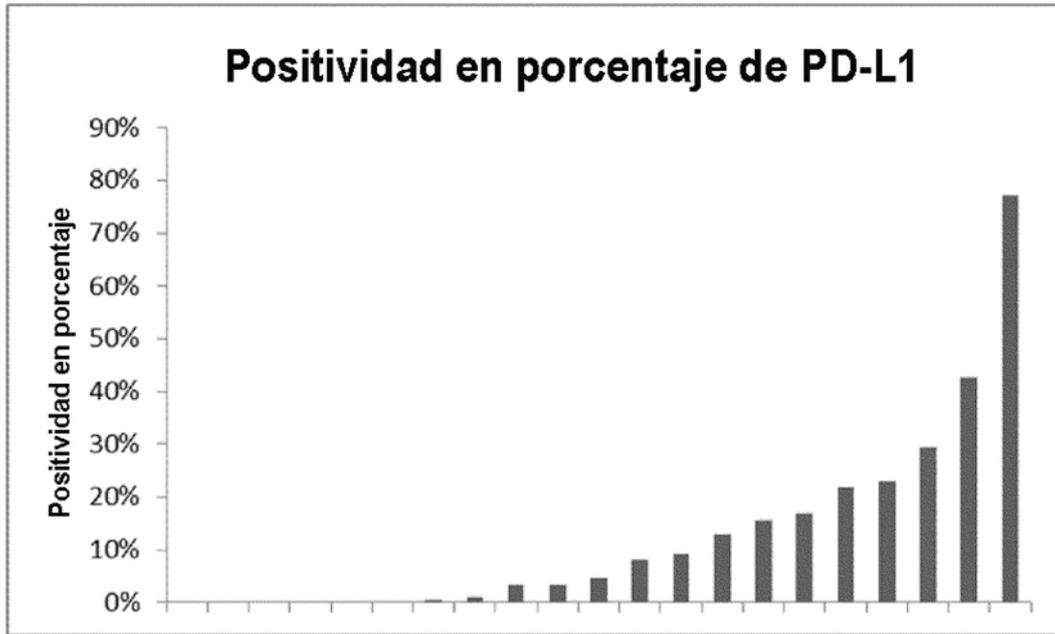


FIG. 6b

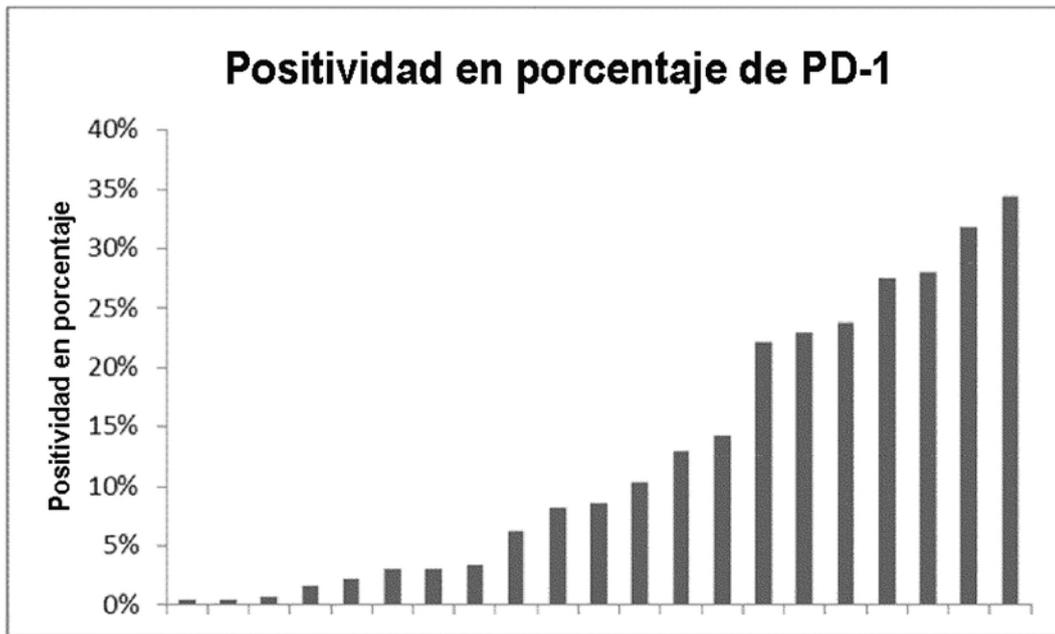


FIG. 7

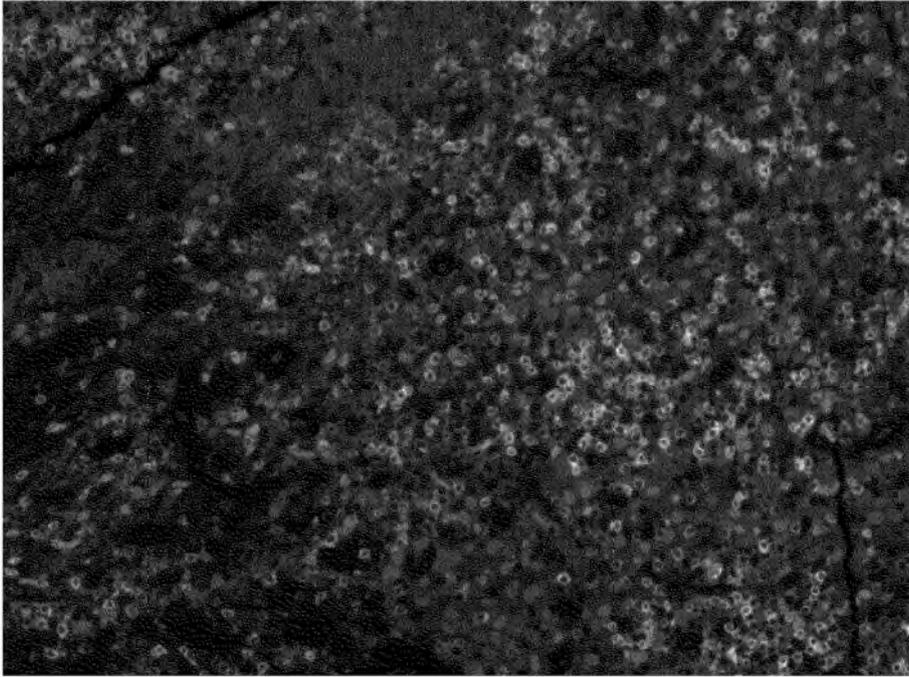


FIG. 8

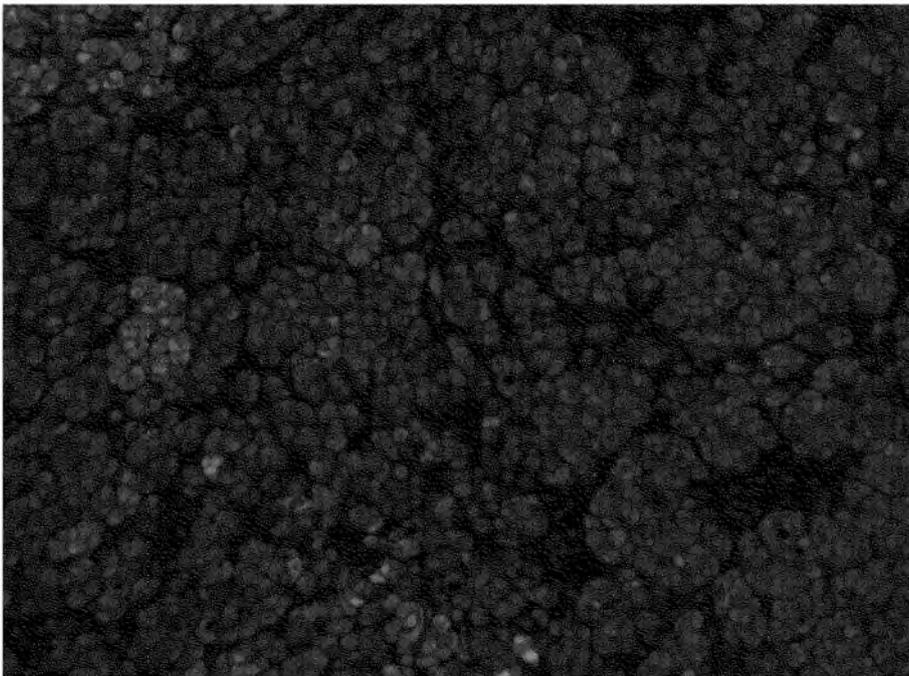


FIG. 9

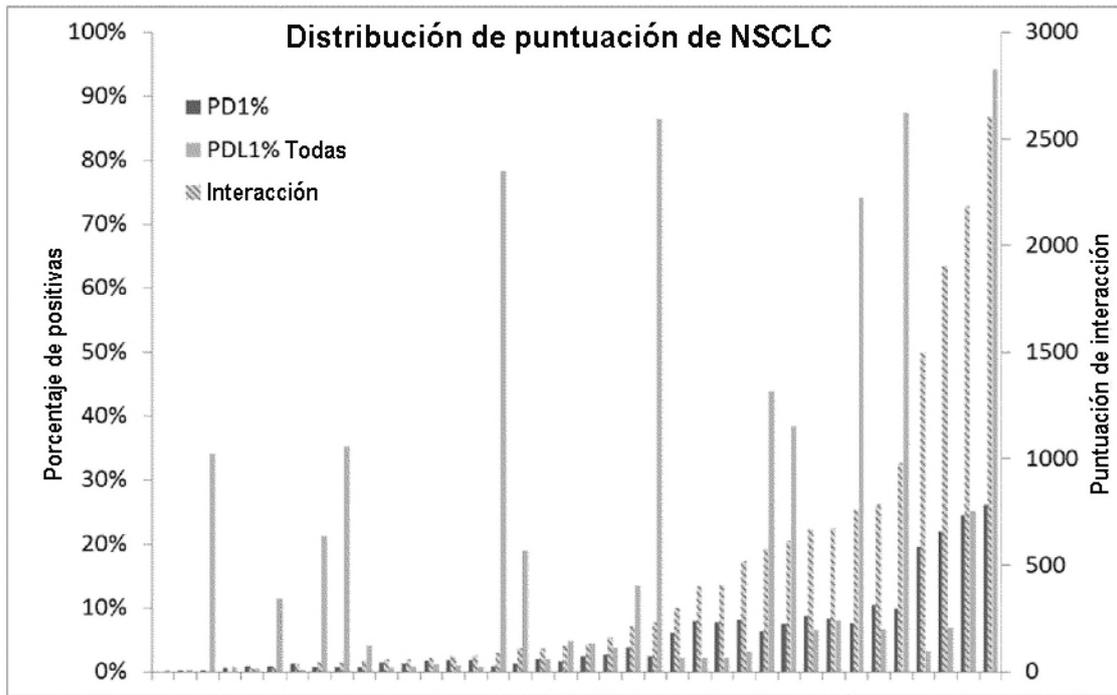


FIG. 10

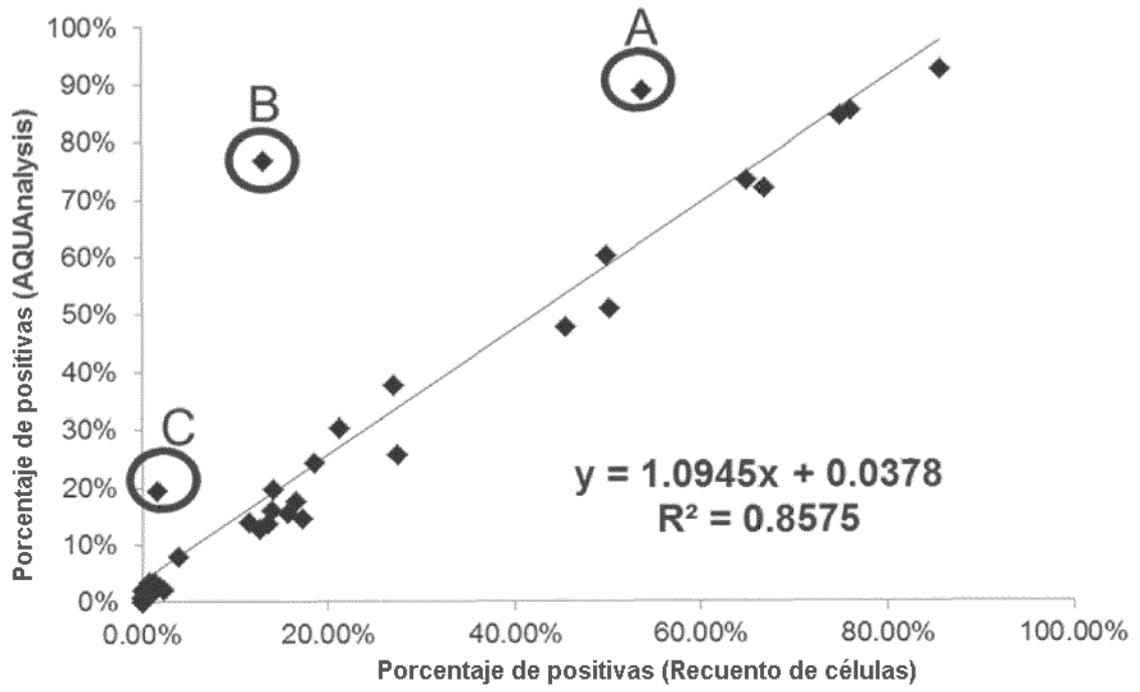


FIG. 11

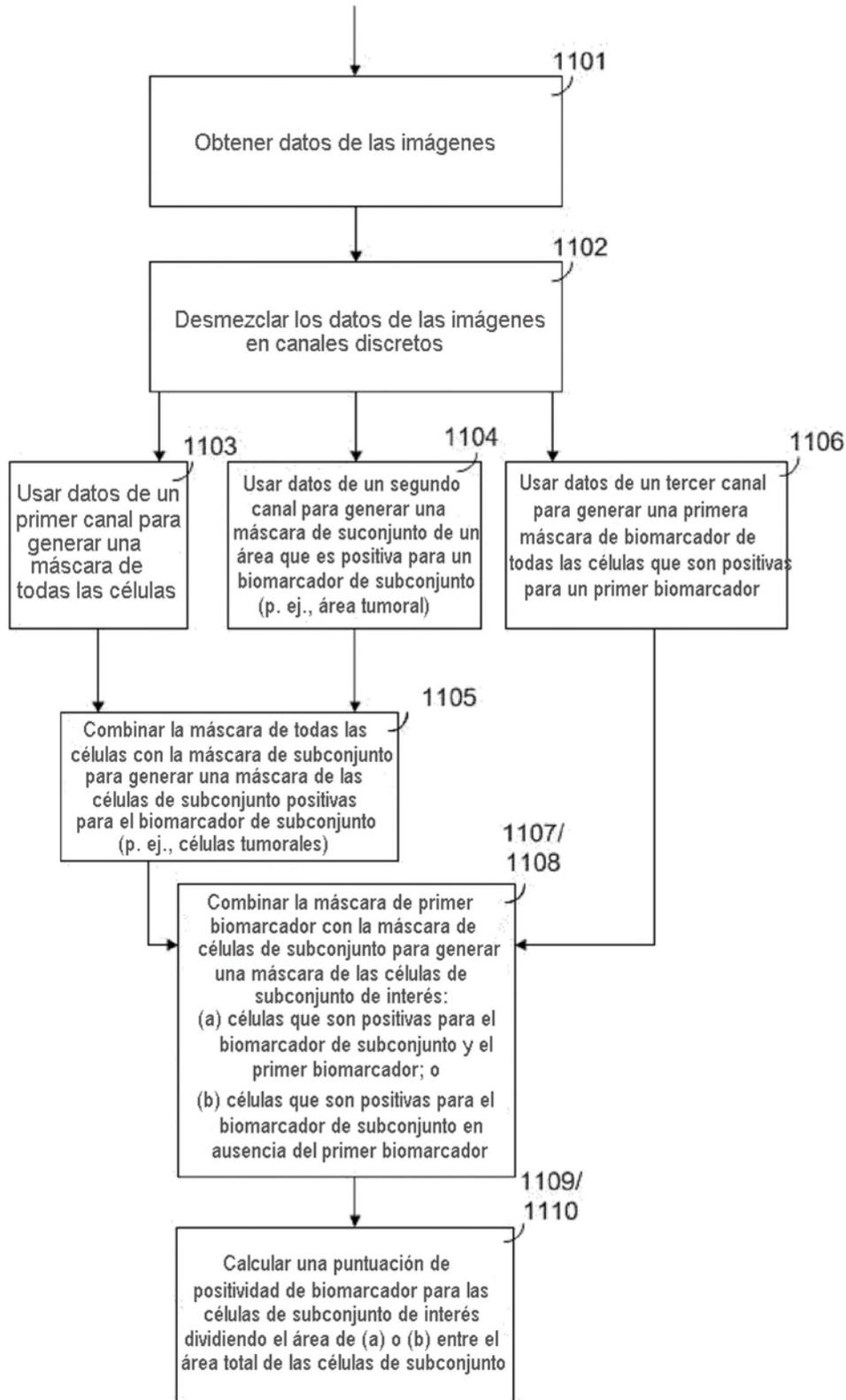


FIG. 12

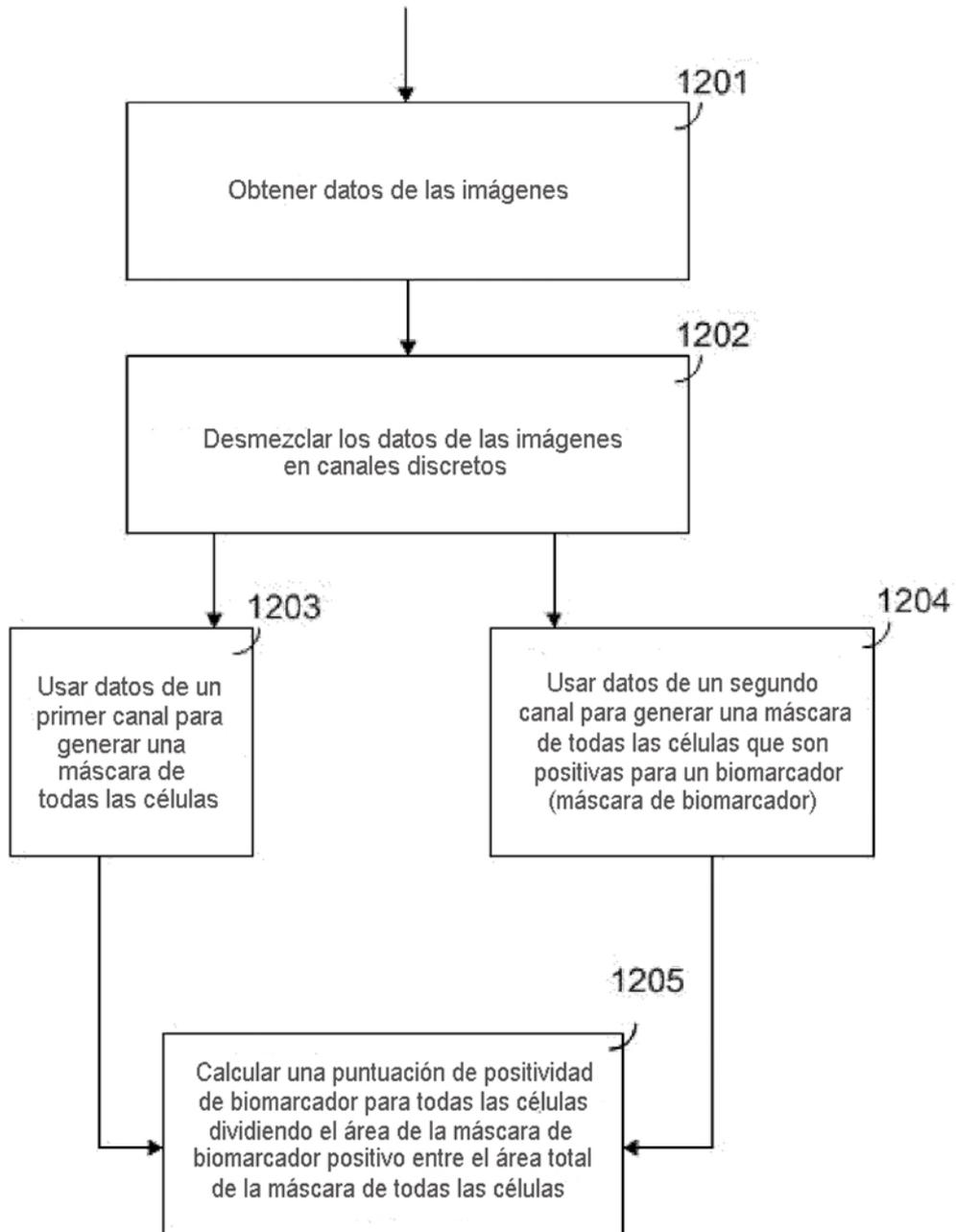


FIG. 13

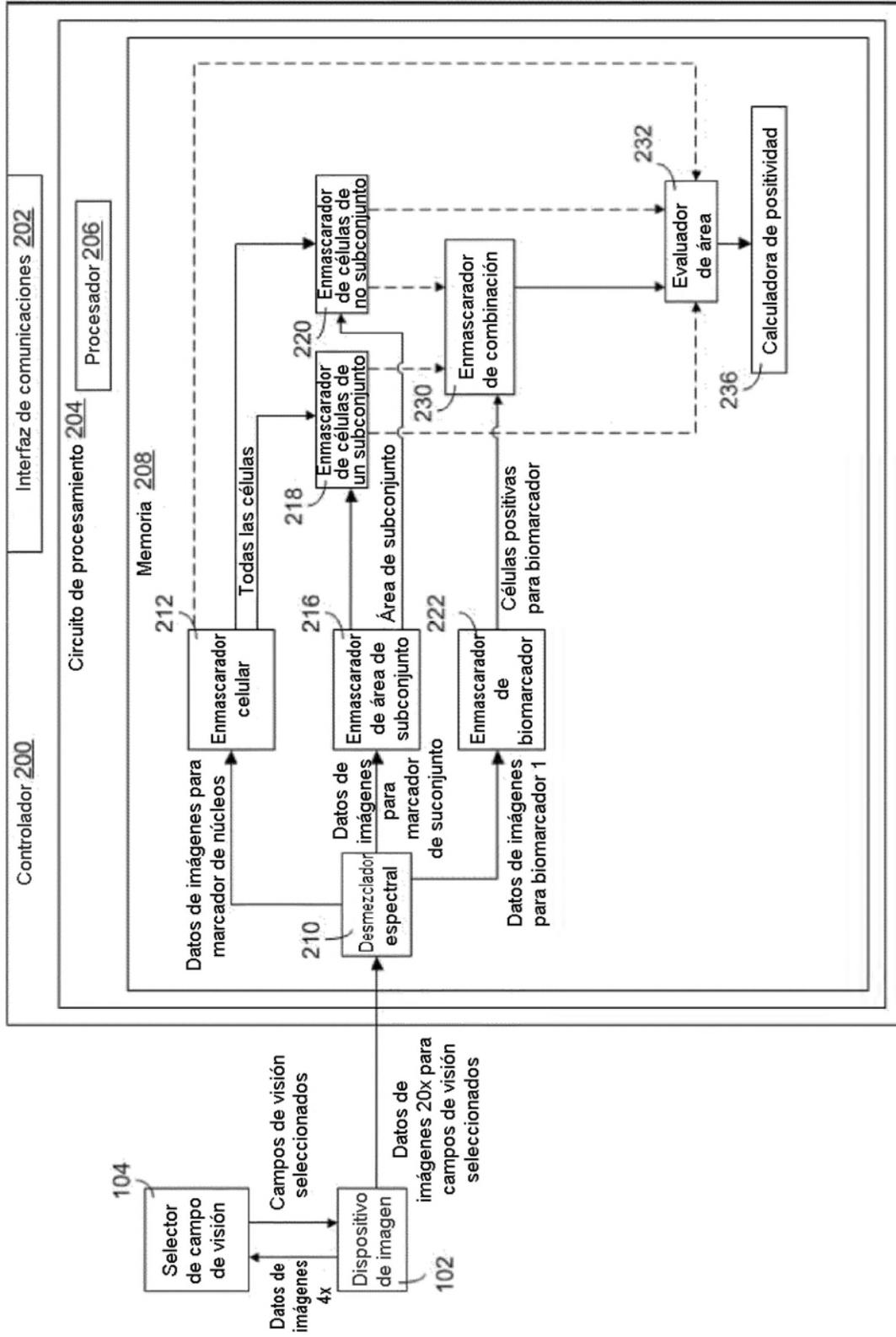


FIG. 14

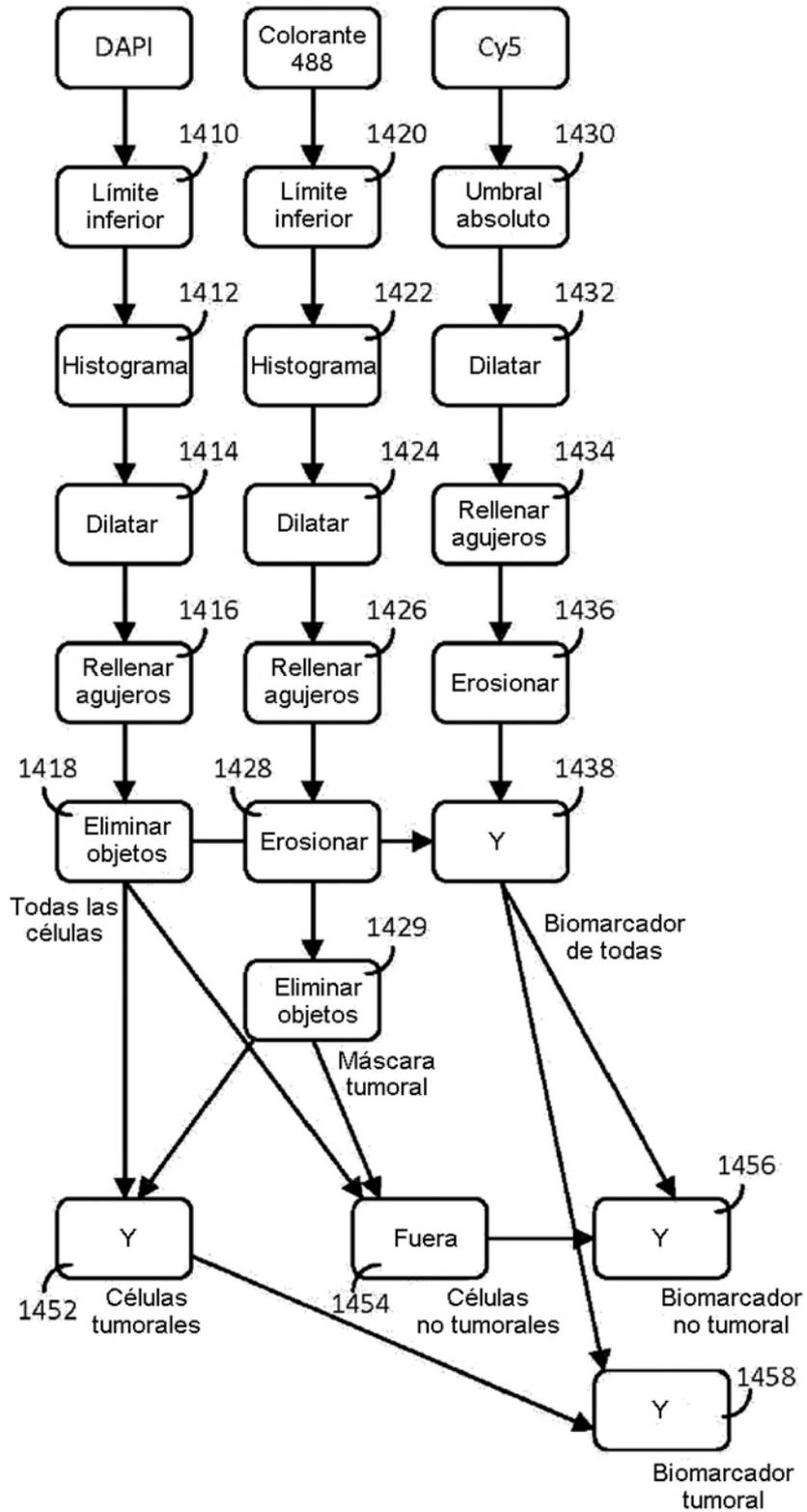


FIG. 15

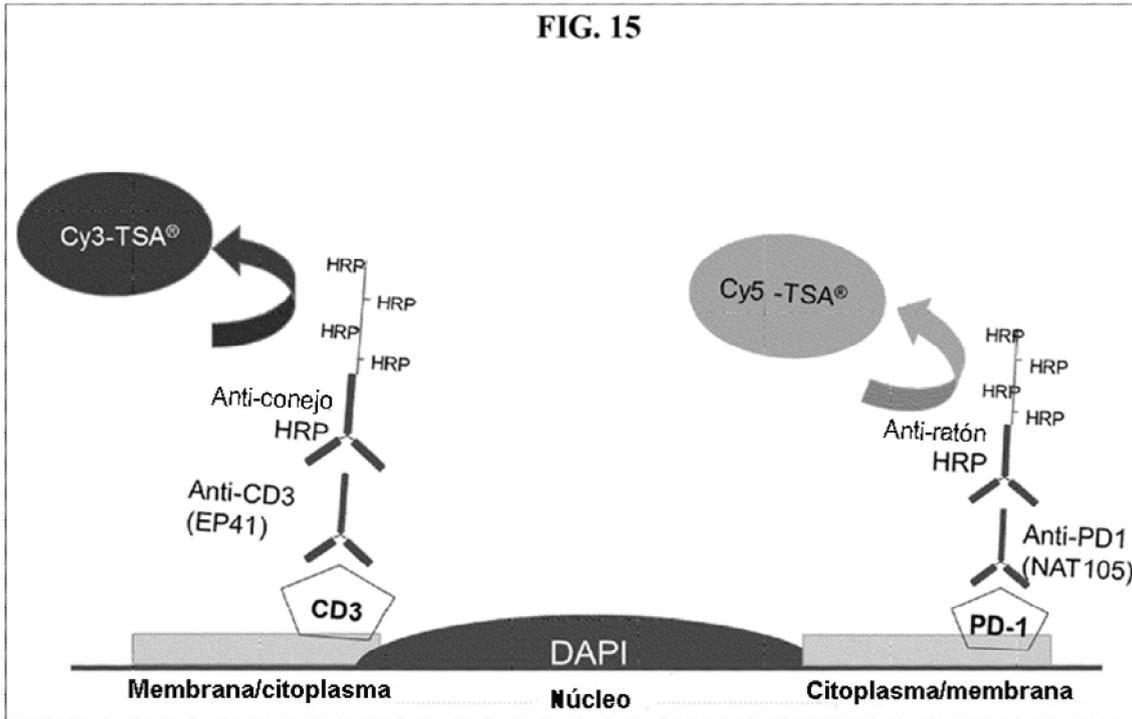


FIG. 16a

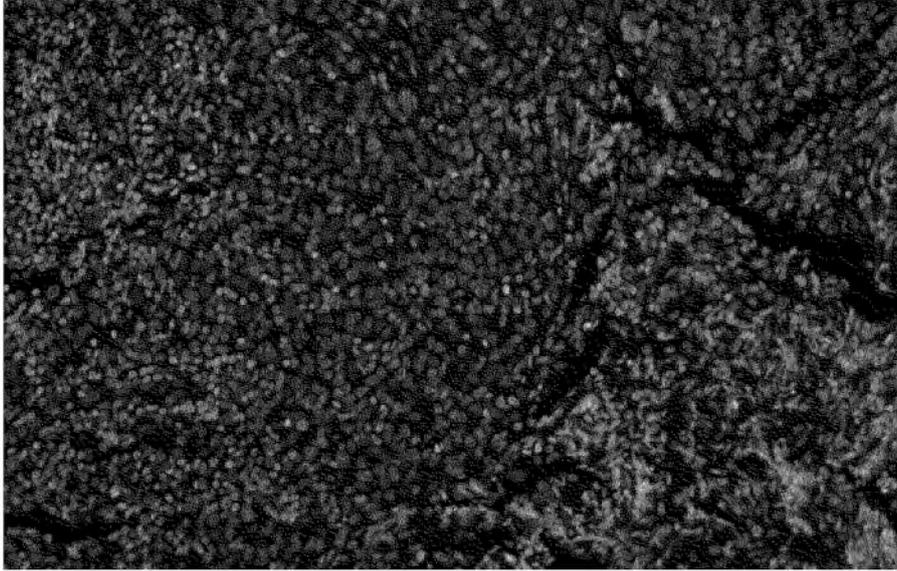


FIG. 16b

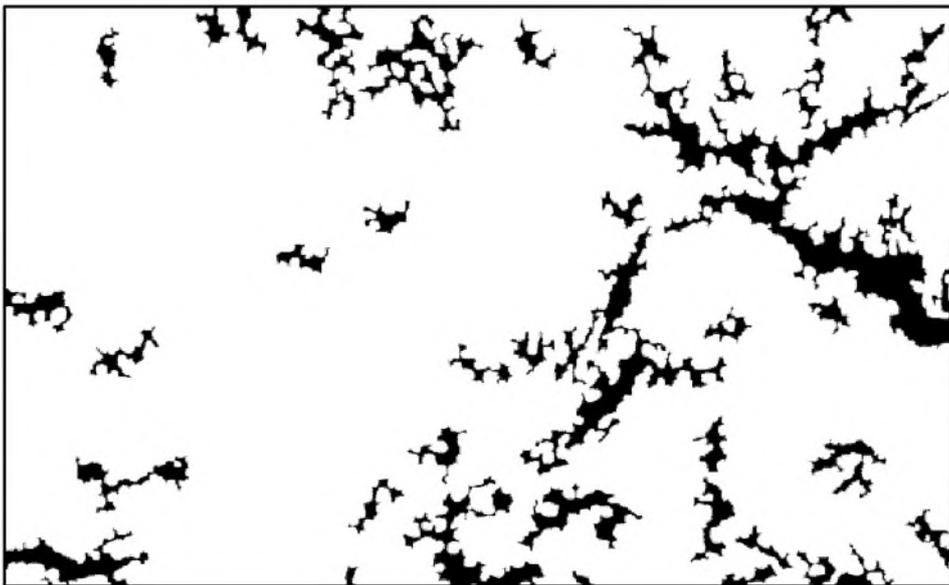


FIG. 17a

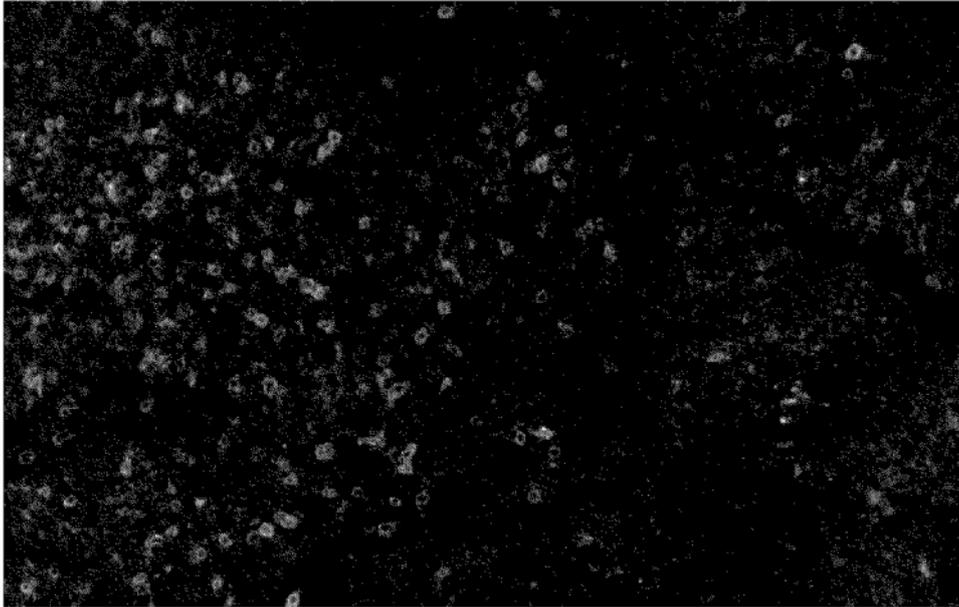


FIG. 17b

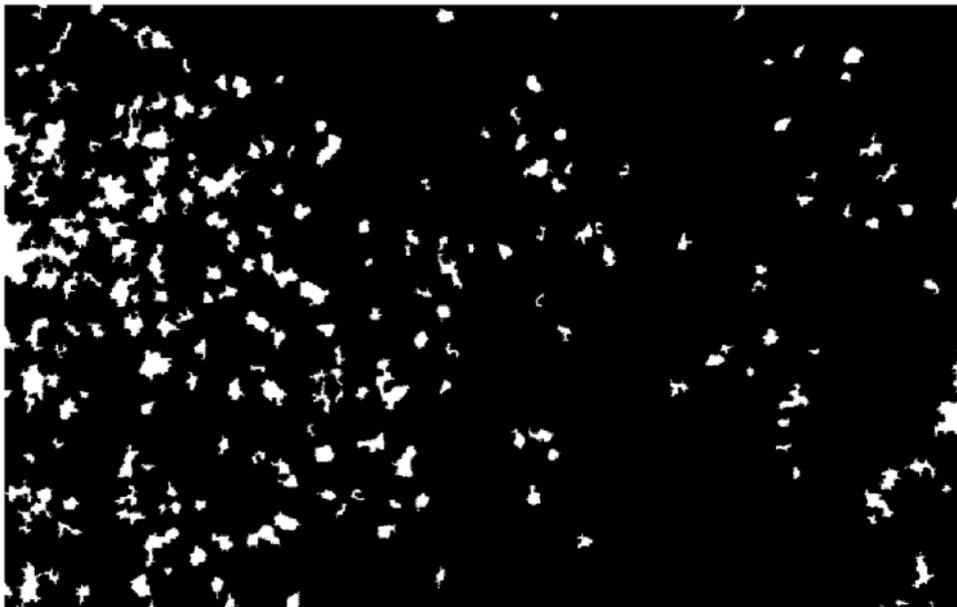


FIG. 18a

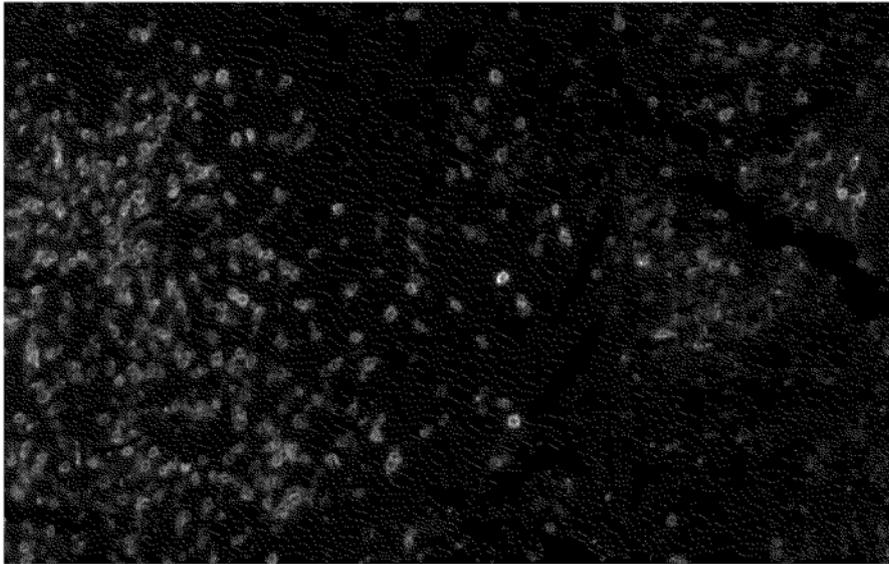


FIG. 18b

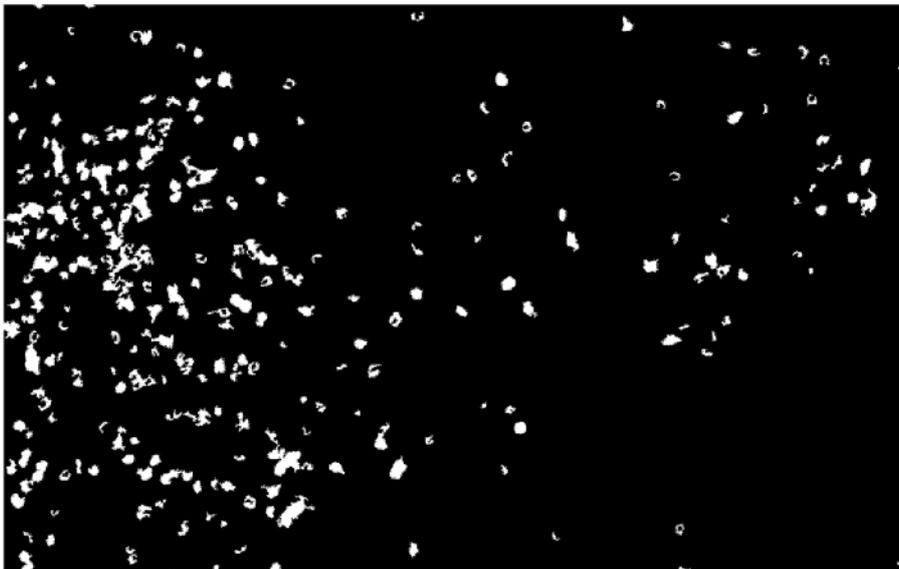


FIG. 19

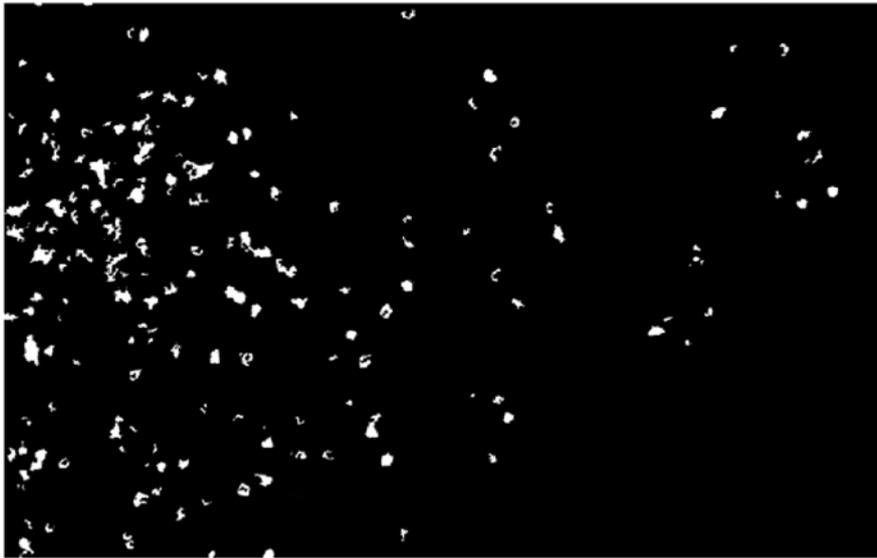


FIG. 20a

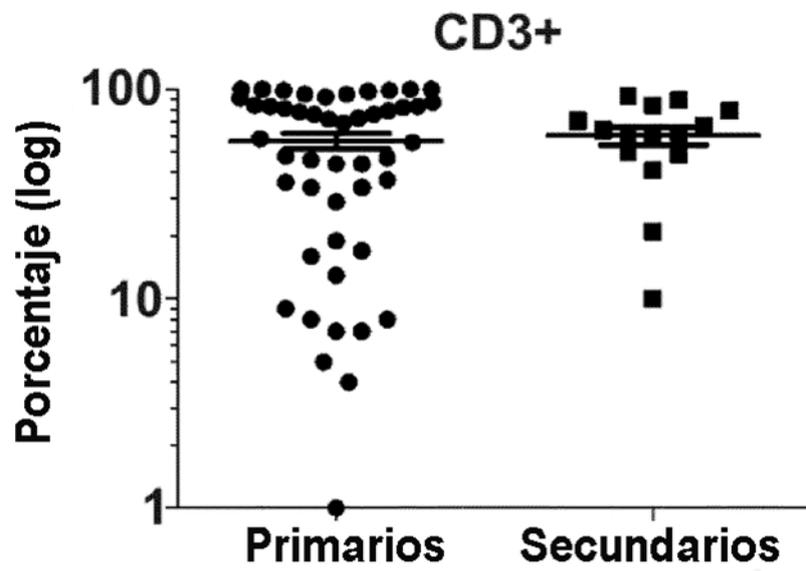


FIG. 21a

% células no tumorales positivas para CD25

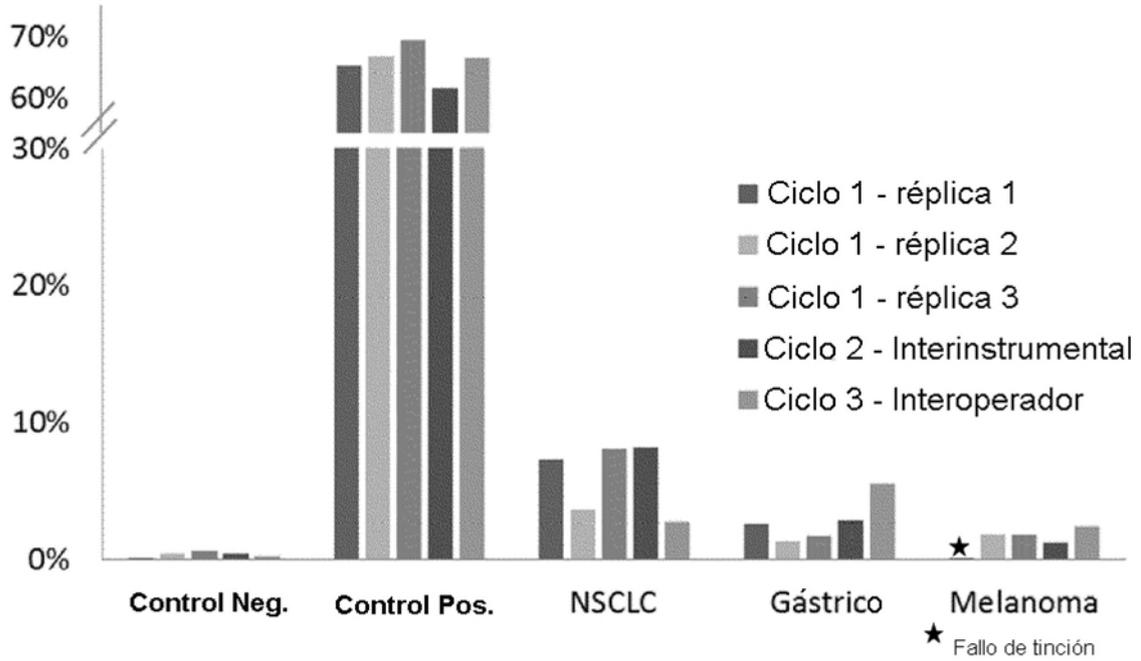


FIG. 21b

% células no tumorales positivas para FoxP3

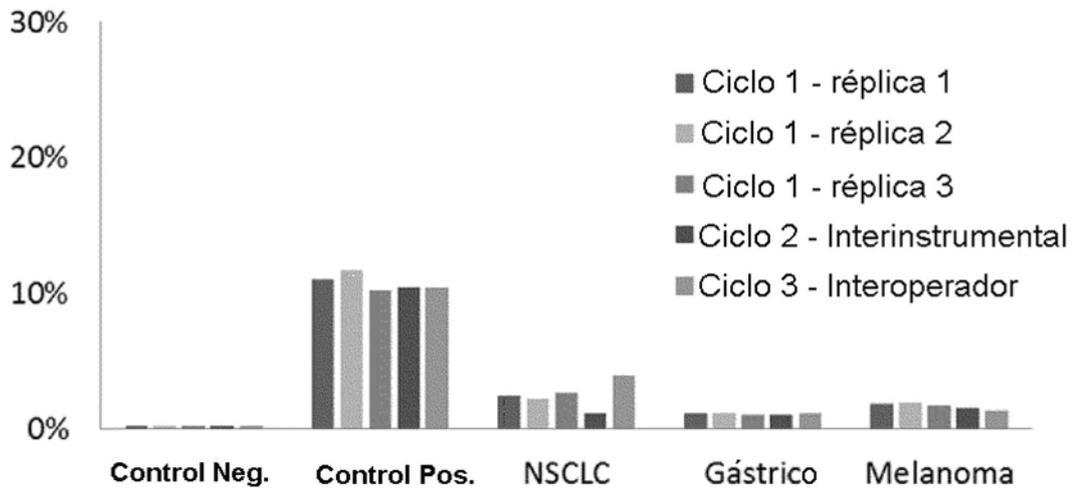


FIG. 22

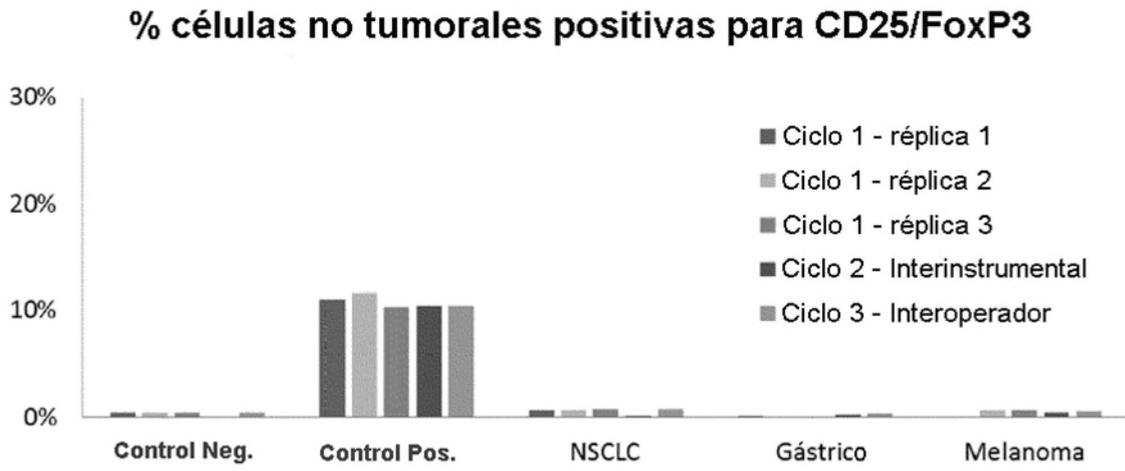


FIG. 32

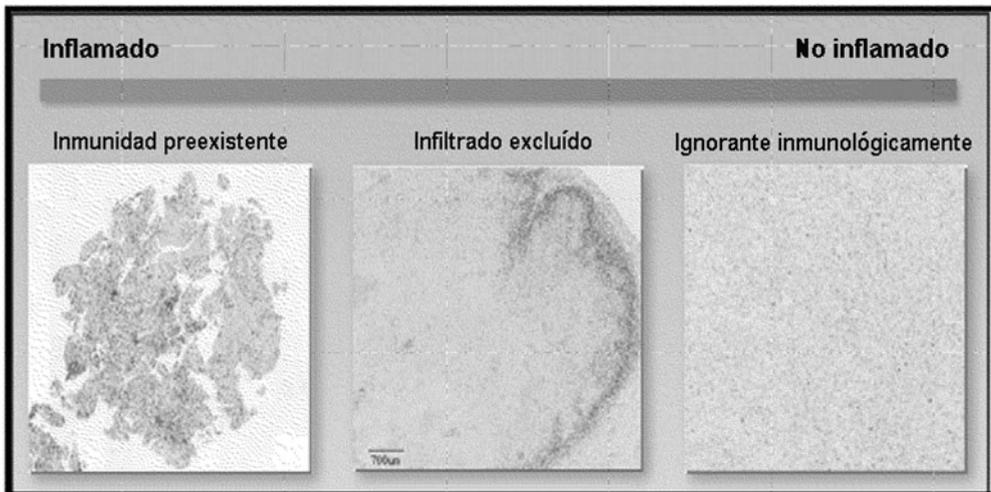


FIG. 23a

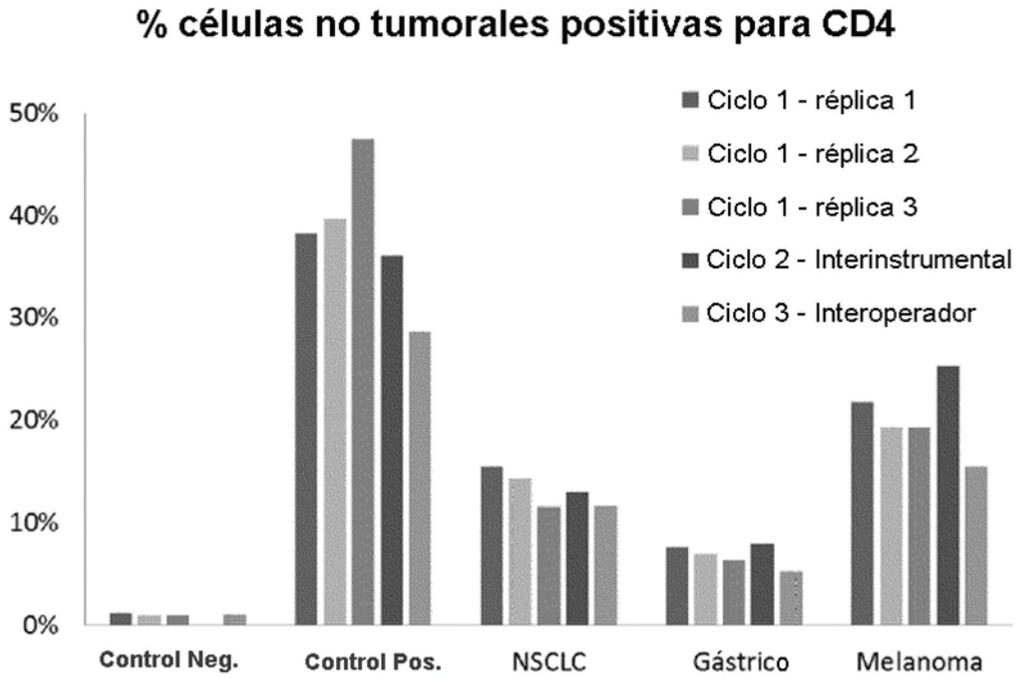


FIG. 23b

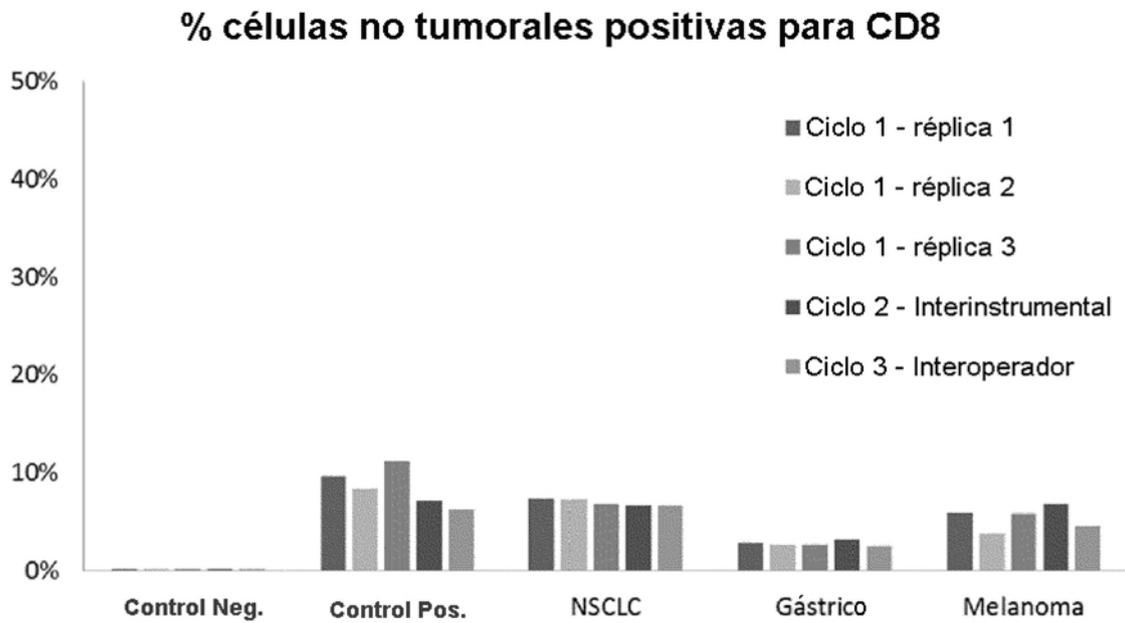


FIG. 24a

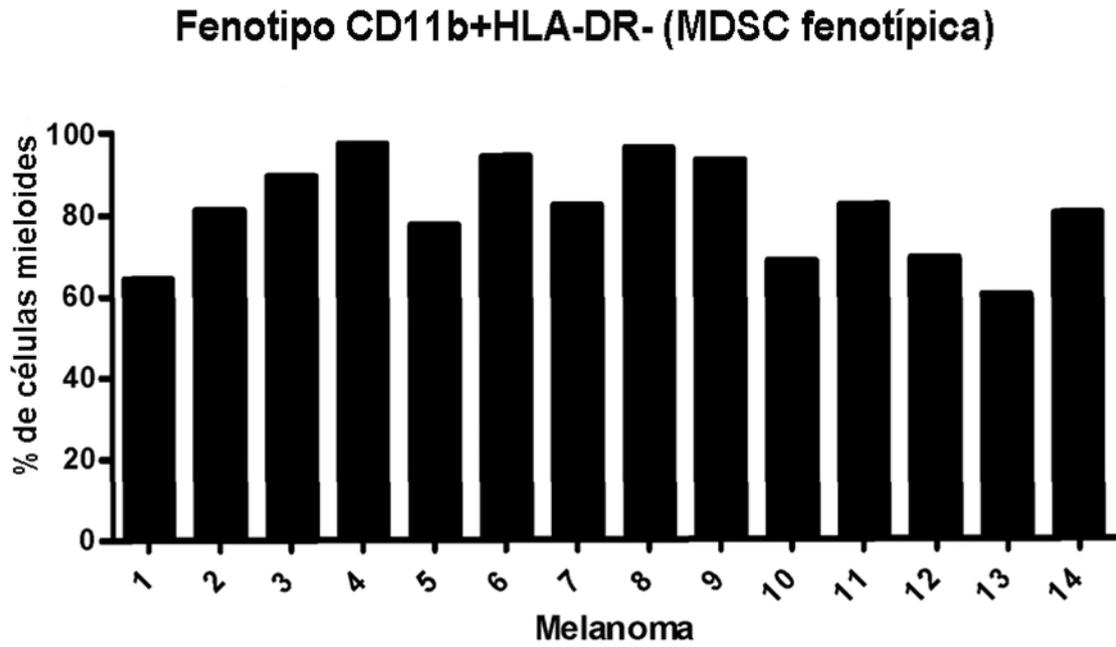


FIG. 24b

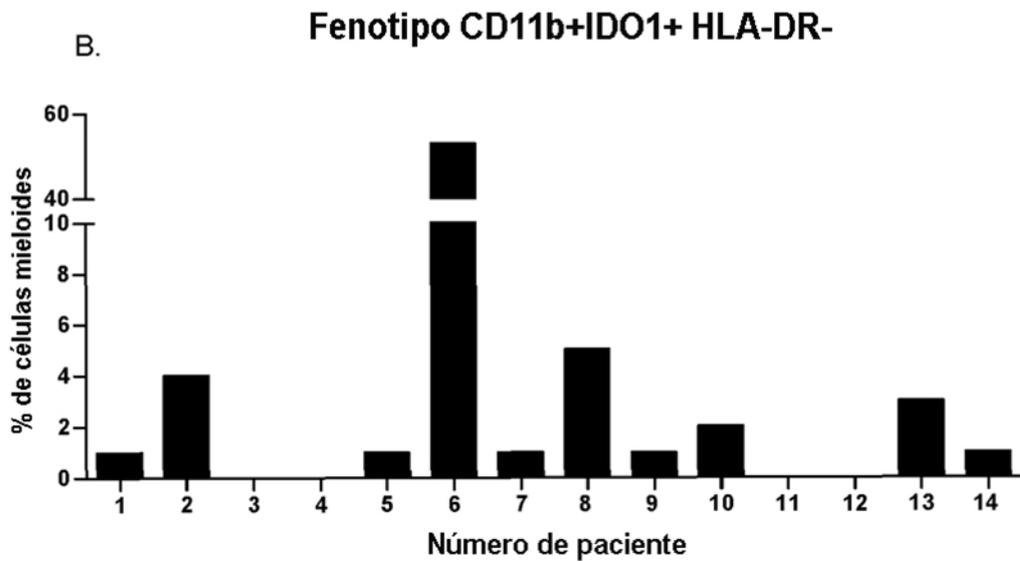


FIG. 25a

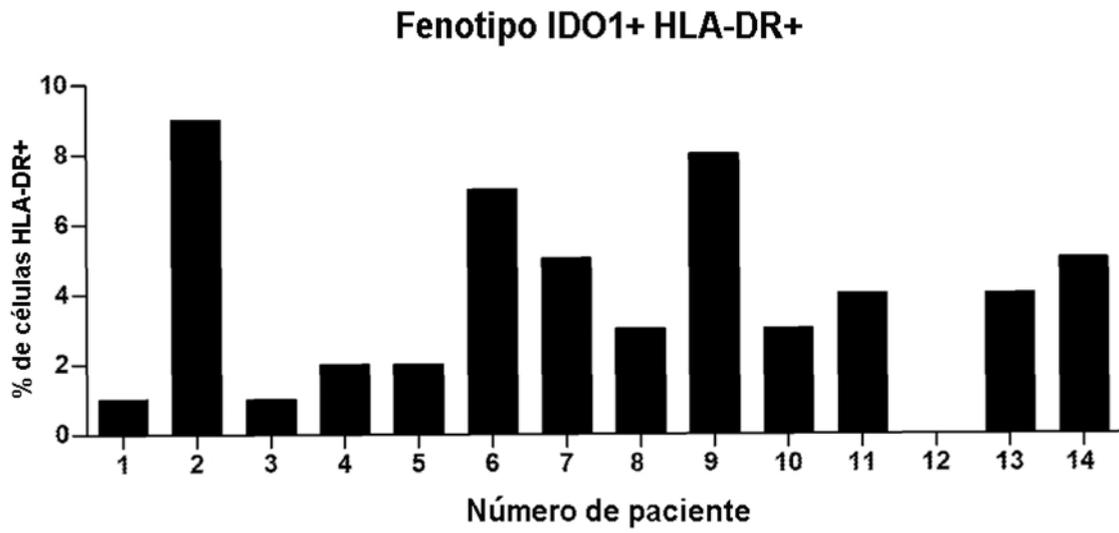


FIG. 25b

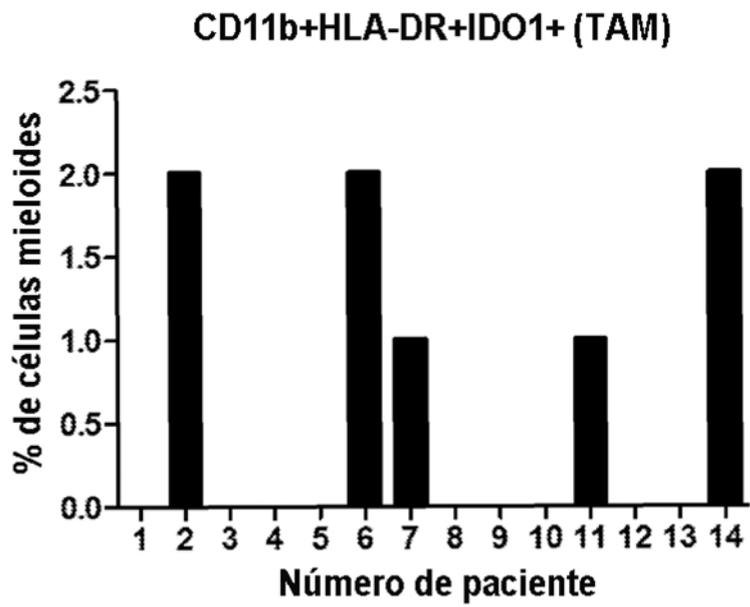


FIG. 26a

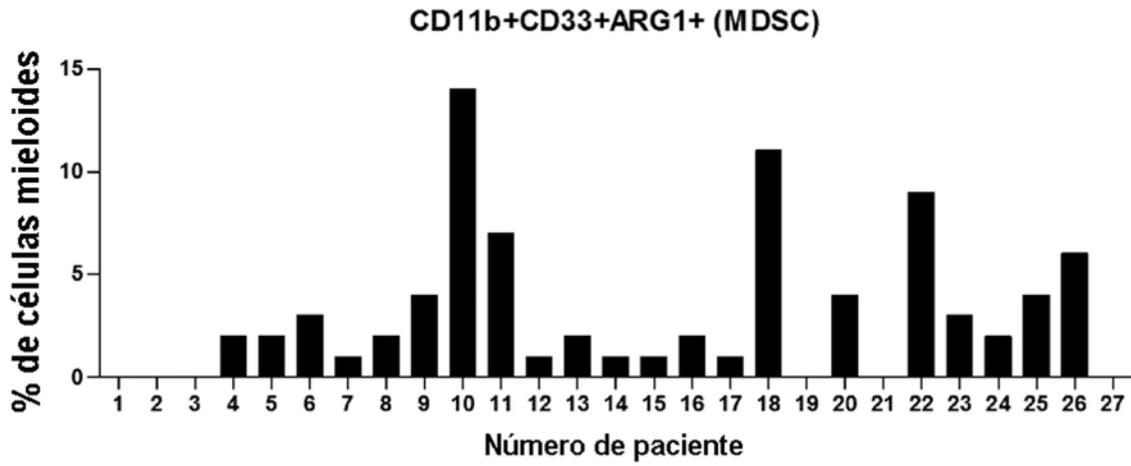


FIG. 26b

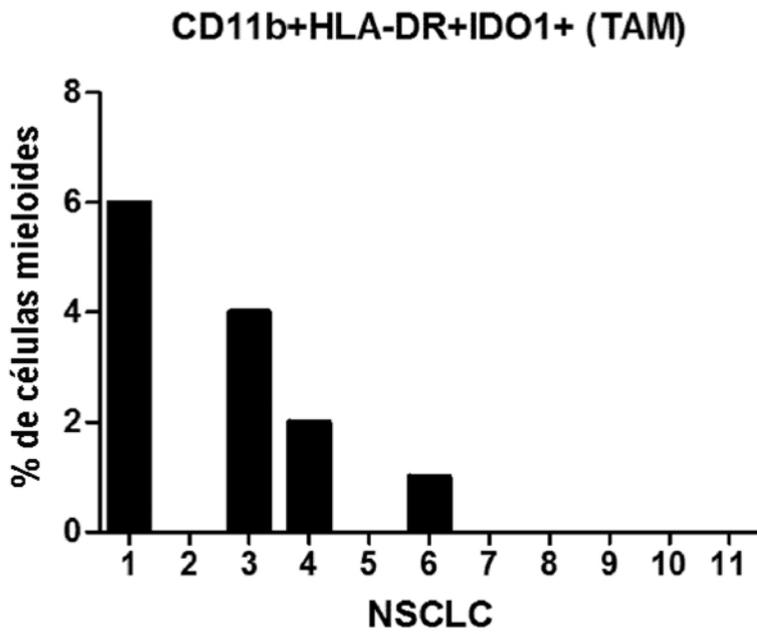


FIG. 27

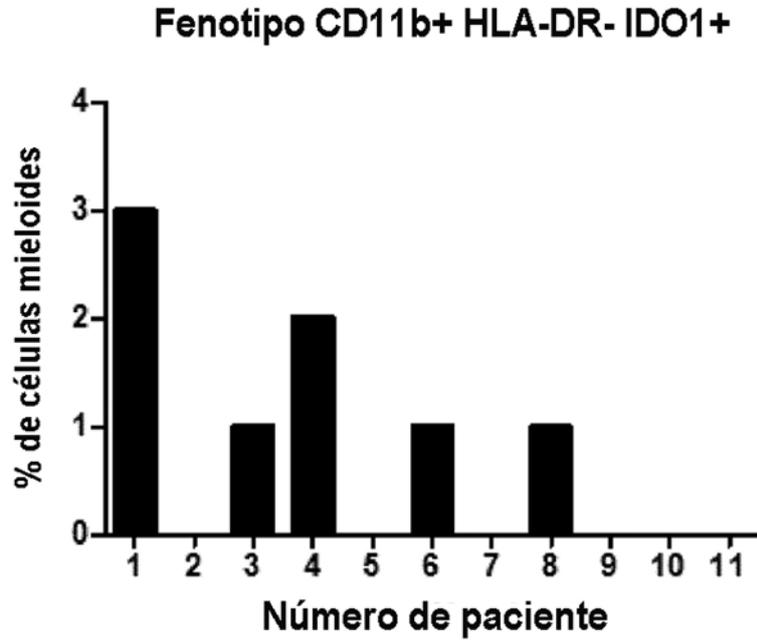


FIG 28

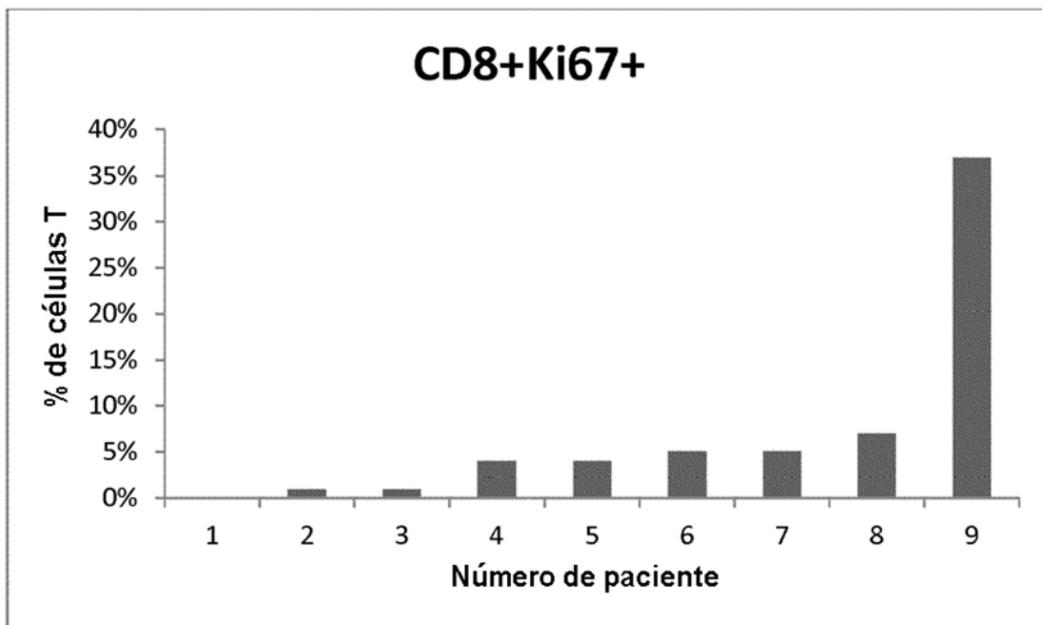


FIG. 29a

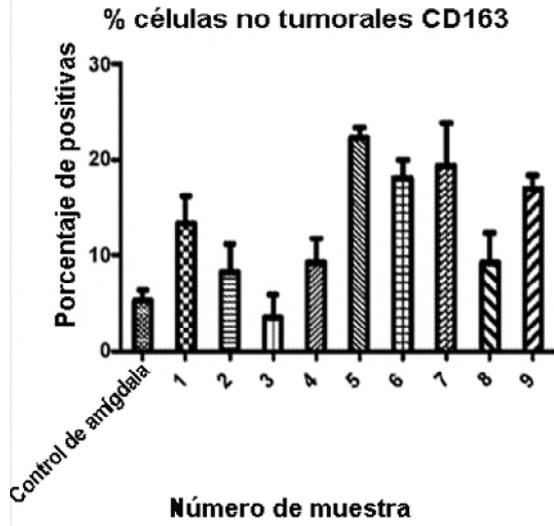


FIG. 29b

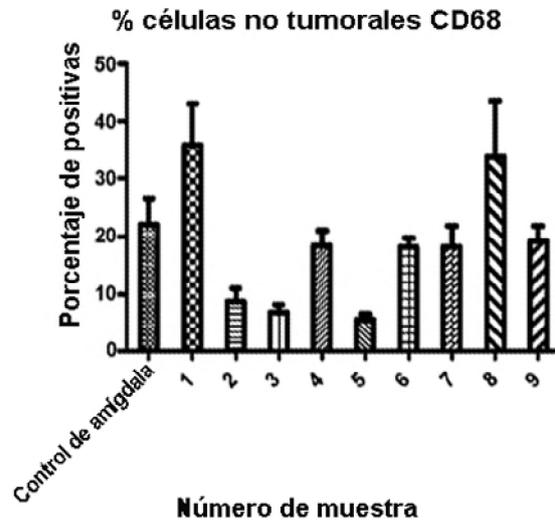


FIG. 29c

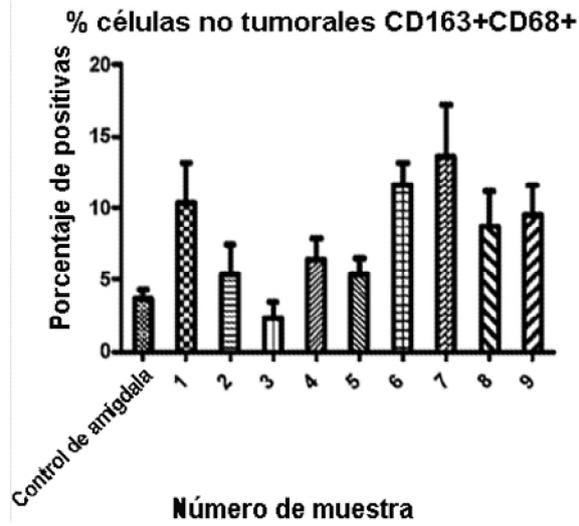


FIG. 30a

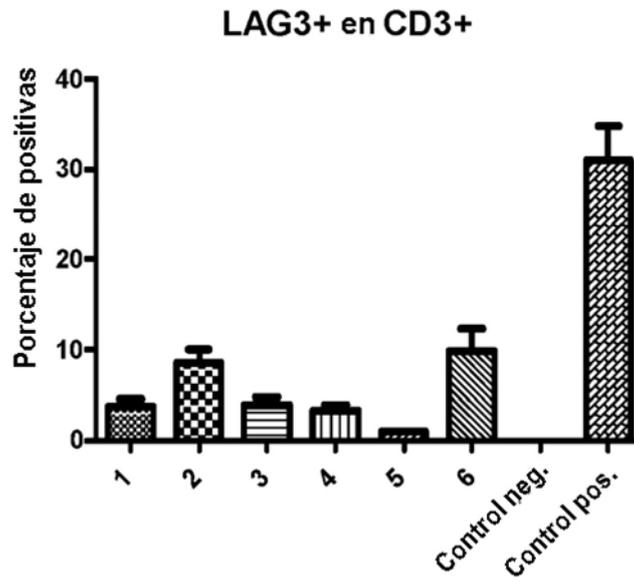


FIG. 30b

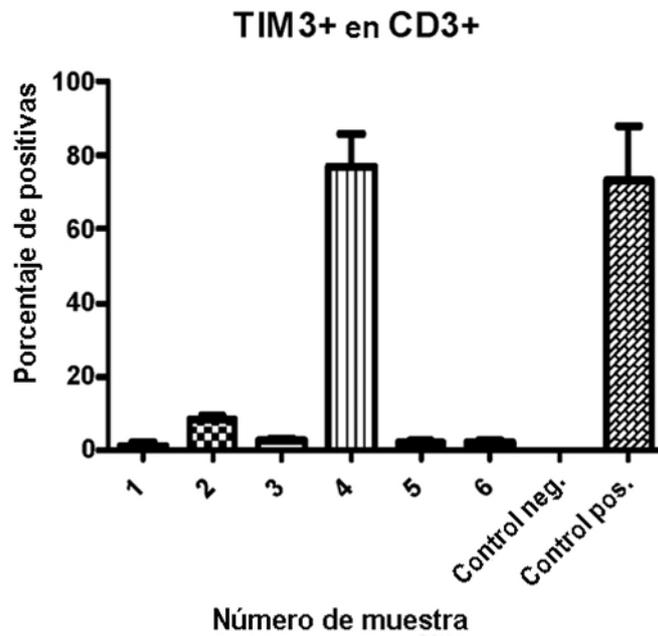


FIG. 31a

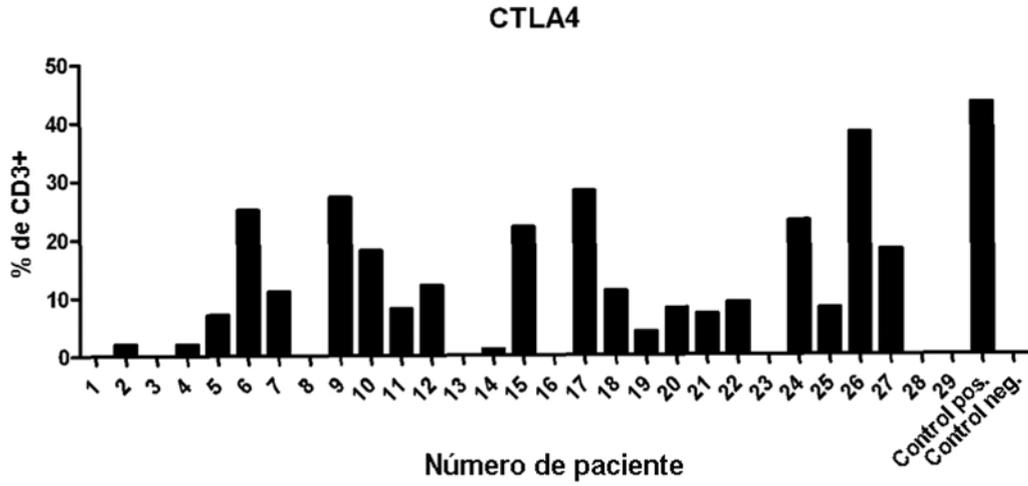


FIG. 31b

