(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0066094
(43) 공개일자 2023년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 16/32 (2006.01) *G06V 10/44* (2022.01)
G06V 20/69 (2022.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57492 (2013.01)
A61K 47/6803 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2023-7012303
(22) 출원일자(국제) 2021년09월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월11일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2021/058273
(87) 국제공개번호 WO 2022/054009
국제공개일자 2022년03월17일
(30) 우선권주장
63/077,604 2020년09월12일 미국(US)

(71) 출원인
아스트라제네카 유케이 리미티드
영국 씨비2 0에이에이 캠브릿지 캠브릿지 바이오메디칼 캠퍼스 프랜시스 크릭 애비뉴 1
다이이찌 산쿄 가부시키가이샤
일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 3-5-1
(72) 발명자
슈미트, 귄터
독일 80999 뮌헨 베링스트라쎄 93
브리우, 니콜라스
독일 81543 뮌헨 운테레 바이덴스트라쎄 13
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 류현경

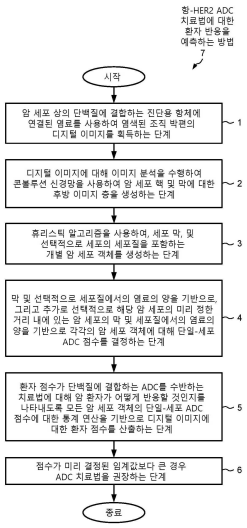
전체 청구항 수 : 총 123 항

(54) 발명의 명칭 **항-HER2 항체-약물 접합체 치료법을 위한 채점 방법**

(57) 요 약

항체 약물 접합체(ADC) 치료법에 대해 암 환자가 어떻게 반응할 것인지를 예측하는 방법은 각각의 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수를 기반으로 예측 반응 점수를 산출하는 단계를 수반한다. ADC는 ADC 페이로드, 및 각각의 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함하며, 여기서 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)이다. 조직 샘플은 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하는 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색된다. 조직의 디지털 이미지에서 암 세포가 검출된다. 각각의 암 세포에 대해, 단일-세포 ADC 점수는 암 세포의 막 및/또는 세포질 및/또는 인근 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출된다. 통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 ADC 치료법에 대한 암 환자의 반응이 예측된다.

대 표 도 - 도14



(52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
G06V 10/454 (2023.01)
G06V 20/69 (2022.01)
G01N 2800/52 (2021.08)
G06V 2201/03 (2022.01)
(72) 발명자
스피츠뮐러, 안드레아스
독일 83052 브루크뮈엘 탄넨베크 12
카필, 안쉬
독일 80339 뮌헨 아스탈러스트라쎄 10

명 세 서

청구범위

청구항 1

항체 약물 접합체(ADC) 페이로드, 및 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함하는 ADC에 대한 암 환자의 반응을 예측하기 위해 반응 점수를 생성하는 방법으로서, 상기 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)이고,

조직 샘플을 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색하되, 진단용 항체는 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하는, 단계;

조직 샘플의 디지털 이미지를 획득하는 단계;

디지털 이미지에서 암 세포를 검출하는 단계;

각각의 암 세포에 대해, 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로, 및 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 단일-세포 ADC 점수를 산출하는 단계; 및

통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 반응 점수를 생성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 암 세포를 검출하는 단계는 각각의 암 세포에 대해 막에 속하는 픽셀 및 세포질에 속하는 픽셀을 검출하는 것을 수반하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 각각의 막의 염색 강도는 막의 픽셀 단위의 갈색 디아미노벤지딘(DAB) 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되며, 각각의 세포질의 염색 강도는 세포질의 픽셀 단위의 갈색 DAB 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포(i)에 대한 단일 세포 ADC 점수는 다음과 같이 계산되는, 방법:

$|r_j - r_i|<d \{a_{20}(|r_j - r_i|) \times ODM_j^2 + a_{11}(|r_j - r_i|) \times ODM_j \times ODC_j + a_{02}(|r_j - r_i|) \times ODC_j^2 + a_{00}(|r_j - r_i|)\}$

인 모든 세포(j)의 합,

(여기서 함수 a_{kl}은 각각의 세포(j)에서 각각의 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되고, ODM_j는 세포(j)의 막의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도이고, ODC_j는 세포(j)의 세포질의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도임).

청구항 5

제4항에 있어서, 함수 a_{kl}은 관계식 $a_{kl}(|r_j - r_i|) = A_{kl} \times \exp(- |r_j - r_i| / r_{norm})$($A_{oo}$, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}는 미리 정한 상수 계수임)에서 세포(j)에서 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 계수 A_{oo}, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}, d 및 r_{norm}은 훈련 환자 코호트의 치료법 반응과 반응 점수의 상관관계를 최적화함으로써 결정되는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계는 평균의 결정, 중앙값의 결정, 및 백분율을 미리 정한 분위수의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 미리 결정된 임계값보다 높은 반응 점수를 가지는 환자는 ADC를 수반하는 치료법에 대해 권장되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 항체는 트라스투주맙인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 페이로드는 국소이성질화효소 I 억제제인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 진단용 항체는 Ventana 항-HER2/neu 4B5인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 염료는 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)인, 방법.

청구항 14

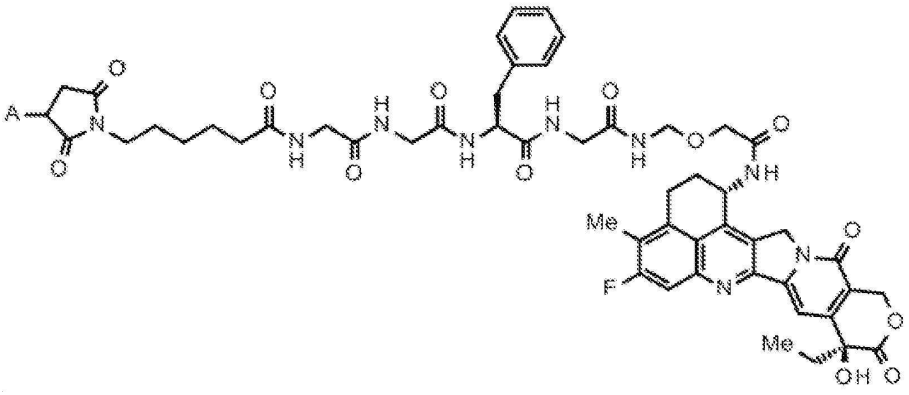
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암, 폐암, 식도암, 두경부암, 식도위 접합부 암, 담도암, 파제트병, 췌장암, 난소암, 자궁암 육종, 방광암, 전립선암, 요로상피암, 위장관 기질종양, 자궁경부암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 자궁내막암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 교모세포종 다형체, 육종, 골육종, 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 티오에테르 결합을 통해 약물-링커에 접합된 항-HER2 항체이고, 약물-링커는 다음 화학식으로 표시되는, 방법:



(여기서 A는 항-HER2 항체에 대한 연결 위치를 나타냄).

청구항 17

제16항에 있어서, ADC는

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH3을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 1 내지 3으로 이루어진 아미노산 서열로 이루어진 CDRL2 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL3을 포함하는 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, ADC는

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, ADC는

서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, ADC는

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 21

항체 약물 접합체(ADC)로 치료된 암 환자의 생존 확률을 나타내는 점수를 생성하는 방법으로서,

암 환자의 조직 샘플을 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역화학적으로 염색하되, ADC는 ADC 페이로드, 및 암 세포 상의 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2) 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함하고, 진단용 항체는 조직 샘플의 암 세포 상의 HER2 단백질에 결합하는, 단계;

조직 샘플의 디지털 이미지를 획득하는 단계;

디지털 이미지에서 암 세포를 검출하는 단계;

각각의 암 세포에 대해, 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로, 및 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 단일-세포 ADC 점수를 산출하는 단계; 및

통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 암 환자의 생존 확률을 나타내는 점수를 생성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 암 세포를 검출하는 단계는 각각의 암 세포에 대해 막에 속하는 픽셀 및 세포질에 속하는 픽

셀을 검출하는 것을 수반하는, 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 각각의 막의 염색 강도는 막의 픽셀 단위의 갈색 디아미노벤지딘(DAB) 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되며, 각각의 세포질의 염색 강도는 세포질의 픽셀 단위의 갈색 DAB 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 세포(i)에 대한 단일 세포 ADC 점수는 다음과 같이 계산되는, 방법:

$|r_j - r_i|<d \{a_{20}(|r_j - r_i|) \times ODM_j^2 + a_{11}(|r_j - r_i|) \times ODM_j \times ODC_j + a_{02}(|r_j - r_i|) \times ODC_j^2 + a_{00}(|r_j - r_i|)\}$

인 모든 세포(j)의 합,

(여기서 함수 a_{kl}은 각각의 세포(j)에서 각각의 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되고, ODM_j는 세포(j)의 막의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도이고, ODC_j는 세포(j)의 세포질의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도임).

청구항 25

제24항에 있어서, 함수 a_{kl}은 관계식 $a_{kl}(|r_j - r_i|) = A_{kl} \times \exp(- |r_j - r_i| / r_{norm})$($A_{oo}$, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}는 미리 정한 상수 계수임)에서 세포(j)에서 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 계수 A_{oo}, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}, d 및 r_{norm}은 훈련 환자 코호트의 치료법 반응과 반응 점수의 상관관계를 최적화함으로써 결정되는, 방법.

청구항 27

제21항에 있어서, 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계는 평균의 결정, 중앙값의 결정, 및 백분율을 미리 정한 분위수의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 28

제21항에 있어서, ADC를 수반하는 치료법은 점수가 암 환자의 생존 확률이 미리 결정된 임계값을 초과함을 나타내는 경우 암 환자에 대해 권장되는, 방법.

청구항 29

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)인, 방법.

청구항 30

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 항체는 트라스투주맙인, 방법.

청구항 31

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 페이로드는 국소이성질화효소 I 억제제인, 방법.

청구항 32

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 진단용 항체는 Ventana 항-HER2/neu 4B5인, 방법.

청구항 33

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 염료는 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)인, 방법.

청구항 34

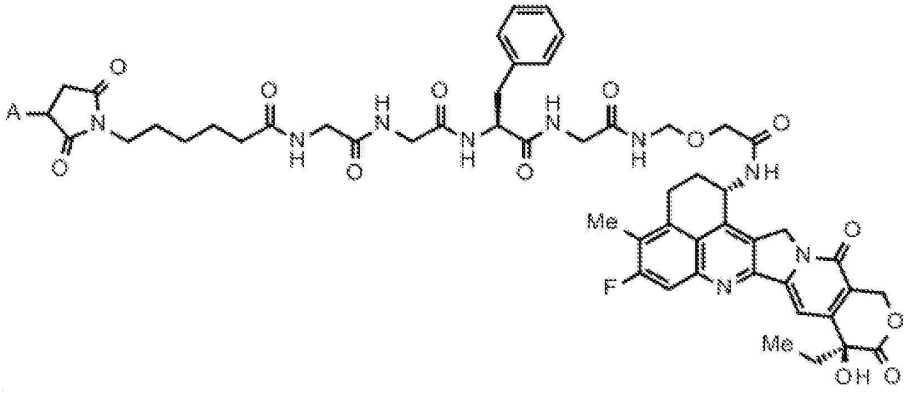
제21항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암, 폐암, 식도암, 두경부암, 식도위 접합부 암, 담도암, 파제트병, 췌장암, 난소암, 자궁암 육종, 방광암, 전립선암, 요로상피암, 위장관 기질 종양, 자궁경부암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 자궁내막암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 교모세포종 다형체, 육종, 골육종, 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 35

제21항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 36

제21항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 티오에테르 결합을 통해 약물-링커에 접합된 항-HER2 항체이고, 약물-링커는 다음 화학식으로 표시되는, 방법:



(여기서 A는 항-HER2 항체에 대한 연결 위치를 나타냄).

청구항 37

제36항에 있어서, ADC는

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH3을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 1 내지 3으로 이루어진 아미노산 서열로 이루어진 CDRL2 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL3을 포함하는 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, ADC는

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, ADC는

서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 40

제36항에 있어서, ADC는

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 41

항체 약물 접합체(ADC) 항체 및 ADC 페이로드를 포함하는 ADC에 대한 암 환자의 반응을 예측하는 방법으로서, ADC 항체는 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하고,

조직 샘플을 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색하되, 진단용 항체는 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하고, 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)인, 단계;

조직 샘플의 디지털 이미지를 획득하는 단계;

디지털 이미지에서 암 세포를 검출하는 단계;

각각의 암 세포에 대해, 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 단일-세포 ADC 점수를 산출하는 단계; 및

통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계를 기반으로 ADC에 대한 암 환자의 반응을 예측하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 각각의 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수는 또한 세포질에서 염료의 염색 강도 및/또는 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및/또는 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 암 세포를 검출하는 단계는 각각의 암 세포에 대해 막에 속하는 픽셀 및/또는 세포질에 속하는 픽셀을 검출하는 것을 수반하는, 방법.

청구항 44

제41항에 있어서, 각각의 막의 염색 강도는 막의 픽셀 단위의 갈색 디아미노벤지딘(DAB) 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되고/되거나, 각각의 세포질의 염색 강도는 세포질의 픽셀 단위의 갈색 DAB 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 세포(i)에 대한 단일 세포 ADC 점수는 다음과 같이 계산되는, 방법:

$|r_j - r_i| < d$ $\{a_{20}(|r_j - r_i|) \times ODM_j^2 + a_{11}(|r_j - r_i|) \times ODM_j \times ODC_j + a_{02}(|r_j - r_i|) \times ODC_j^2 + a_{00}(|r_j - r_i|)\}$

인 모든 세포(j)의 합,

(여기서 함수 a_{kl}은 각각의 세포(j)에서 각각의 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되고, ODM_j는 세포(j)의 막의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도이고, ODC_j는 세포(j)의 세포질의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도임).

청구항 46

제45항에 있어서, 함수 a_{kl}은 관계식 $a_{kl}(|r_j - r_i|) = A_{kl} \times \exp(-|r_j - r_i| / r_{norm})$($A_{oo}$, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}는 미리 정한 상수 계수임)에서 세포(j)에서 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 계수 A_{oo}, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}, d 및 r_{norm}은 훈련 환자 코호트의 치료법 반응과 반응 점수의 상관관계를 최적화함으로써 결정되는, 방법.

청구항 48

제41항에 있어서, 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계는 평균의 결정, 중앙값의 결정, 및 백분율을 미리 정한 분위수의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 연산에 의해 수행되는, 방법.

청구항 49

제41항에 있어서, ADC를 수반하는 치료법은 점수가 암 환자의 생존 확률이 미리 결정된 임계값을 초과함을 나타내는 경우 암 환자에 대해 권장되는, 방법.

청구항 50

제41항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)인, 방법.

청구항 51

제41항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 항체는 트라스투주맙인, 방법.

청구항 52

제41항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 페이로드는 국소이성질화효소 I 억제제인, 방법.

청구항 53

제41항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 진단용 항체는 Ventana 항-HER2/neu 4B5인, 방법.

청구항 54

제41항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 염료는 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)인, 방법.

청구항 55

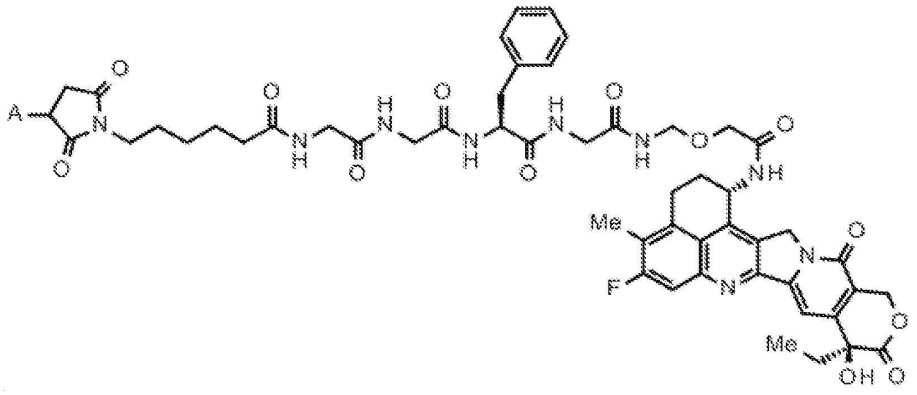
제41항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암, 폐암, 식도암, 두경부암, 식도위 접합부 암, 담도암, 파제트병, 췌장암, 난소암, 자궁암 육종, 방광암, 전립선암, 요로상피암, 위장관 기질 종양, 자궁경부암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 자궁내막암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 교모세포종 다형체, 육종, 골육종, 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 56

제41항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 57

제41항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 티오에테르 결합을 통해 약물-링커에 접합된 항-HER2 항체이고, 약물-링커는 다음 화학식으로 표시되는, 방법:



(여기서 A는 항-HER2 항체에 대한 연결 위치를 나타냄).

청구항 58

제57항에 있어서, ADC는

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH3을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 1 내지 3으로 이루어진 아미노산 서열로 이루어진 CDRL2 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL3을 포함하는 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 59

제57항에 있어서, ADC는

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 60

제57항에 있어서, ADC는

서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 61

제57항에 있어서, ADC는

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 62

항체 약물 접합체(ADC) 페이로드, 및 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함하는 항-HER2 ADC로 치료하기 위한 암 환자를 식별하는 방법으로서,

암 환자의 조직 샘플을 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색하되, 진단용 항체는 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하고, 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)인, 단계;

조직 샘플의 디지털 이미지를 획득하는 단계;

디지털 이미지에서 암 세포를 검출하는 단계;

각각의 암 세포에 대해, 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 단일-세포 ADC 점수를 산출하는 단계;

통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 반응 점수를 생성하는 단계; 및

반응 점수가 임계값을 초과하는 경우 ADC의 투여로부터 이익을 얻을 가능성이 있는 사람으로 암 환자를 식별하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 가능한 이익은 평균 종양 크기의 감소인, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 각각의 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수는 또한 세포질에서 염료의 염색 강도 및/또는 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및/또는 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 암 세포를 검출하는 단계는 각각의 암 세포에 대해 막에 속하는 픽셀 및/또는 세포질에 속하는 픽셀을 검출하는 것을 수반하는, 방법.

청구항 66

제62항에 있어서, 각각의 막의 염색 강도는 막의 픽셀 단위의 갈색 디아미노벤지딘(DAB) 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되고/되거나, 각각의 세포질의 염색 강도는 세포질의 픽셀 단위의 갈색 DAB 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 세포(i)에 대한 단일 세포 ADC 점수는 다음과 같이 계산되는, 방법:

$|r_j - r_i| < d$ $\{a_{20}(|r_j - r_i|) \times ODM_j^2 + a_{11}(|r_j - r_i|) \times ODM_j \times ODC_j + a_{02}(|r_j - r_i|) \times ODC_j^2 + a_{00}(|r_j - r_i|)\}$ 인 모든 세포(j)의 합,

(여기서 함수 a_{kl}은 각각의 세포(j)에서 각각의 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되고, ODM_j는 세포(j)의 막의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도이고, ODC_j는 세포(j)의 세포질의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도임).

청구항 68

제67항에 있어서, 함수 a_{kl}은 관계식 $a_{kl}(|r_j - r_i|) = A_{kl} \times \exp(-|r_j - r_i| / r_{norm})$($A_{oo}$, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}는 미리 정한 상수 계수임)에서 세포(j)에서 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되는, 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 계수 A_{oo}, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}, d 및 r_{norm}은 훈련 환자 코호트의 치료법 반응과 반응 점수의 상관관계를 최적화함으로써 결정되는, 방법.

청구항 70

제62항에 있어서, 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계는 평균의 결정, 중앙값의 결정, 및 백분율을 미리 정한 분위수의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 71

제62항에 있어서, 미리 결정된 임계값보다 높은 반응 점수를 가지는 환자는 ADC를 수반하는 치료법에 대해 권장되는, 방법.

청구항 72

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)인, 방법.

청구항 73

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 항체는 트라스투주맙인, 방법.

청구항 74

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 페이로드는 국소이성질화효소 I 억제제인, 방법.

청구항 75

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 진단용 항체는 Ventana 항-HER2/neu 4B5인, 방법.

청구항 76

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 염료는 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)인, 방법.

청구항 77

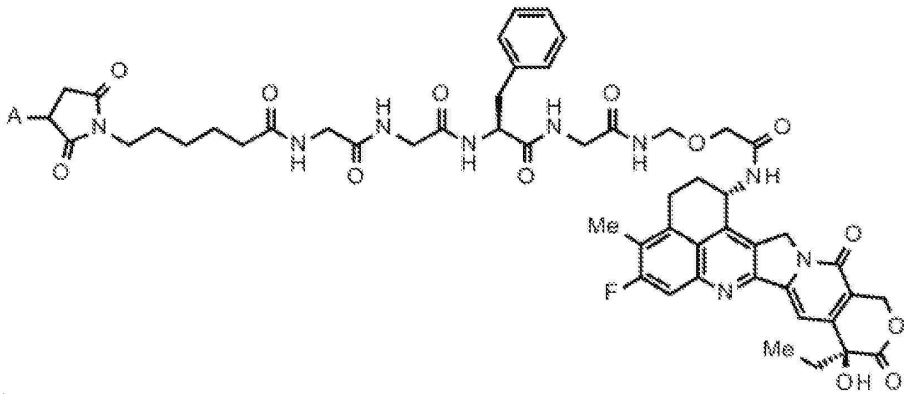
제62항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암, 폐암, 식도암, 두경부암, 식도위 접합부 암, 담도암, 파제트병, 췌장암, 난소암, 자궁암 육종, 방광암, 전립선암, 요로상피암, 위장관 기질 종양, 자궁경부암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 자궁내막암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 교모세포종 다형체, 육종, 골육종, 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 78

제62항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 79

제62항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 티오에테르 결합을 통해 약물-링커에 접합된 항-HER2 항체이고, 약물-링커는 다음 화학식으로 표시되는, 방법:



(여기서 A는 항-HER2 항체에 대한 연결 위치를 나타냄).

청구항 80

제79항에 있어서, ADC는

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진

CDRH2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH3을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 1 내지 3으로 이루어진 아미노산 서열로 이루어진 CDRL2 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL3을 포함하는 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 81

제79항에 있어서, ADC는

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 82

제79항에 있어서, ADC는

서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

다음을 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법:

청구항 83

제79항에 있어서, ADC는

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 84

항체 약물 접합체(ADC) 페이로드, 및 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함하는 ADC를 암 환자에게 투여하는 것을 수반하는 암을 치료하는 방법으로서, 상기 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)이고,

암 환자의 조직 샘플을 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색하되, 진단용 항체는 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하는, 단계;

조직 샘플의 디지털 이미지를 획득하는 단계;

디지털 이미지에서 암 세포를 검출하는 단계;

각각의 암 세포에 대해, 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 단일-세포 ADC 점수를 산출하는 단계;

통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 치료 점수를 생성하는 단계; 및

치료 점수가 미리 결정된 임계값을 초과하는 경우 ADC를 수반하는 치료법을 암 환자에게 투여하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 각각의 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수는 또한 세포질에서 염료의 염색 강도 및/또는 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및/또는 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 암 세포를 검출하는 단계는 각각의 암 세포에 대해 막에 속하는 픽셀 및/또는 세포질에 속하는 픽셀을 검출하는 것을 수반하는, 방법.

청구항 87

제84항에 있어서, 각각의 막의 염색 강도는 막의 픽셀 단위의 갈색 디아미노벤지딘(DAB) 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되고/되거나, 각각의 세포질의 염색 강도는 세포질의 픽셀 단위의 갈색 DAB 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 세포(i)에 대한 단일 세포 ADC 점수는 다음과 같이 계산되는, 방법:

$|r_j - r_i| < d$ $\{a_{20}(|r_j - r_i|) \times ODM_j^2 + a_{11}(|r_j - r_i|) \times ODM_j \times ODC_j + a_{02}(|r_j - r_i|) \times ODC_j^2 + a_{00}(|r_j - r_i|)\}$ 인 모든 세포(j)의 합,

(여기서 함수 a_{kl}은 각각의 세포(j)에서 각각의 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되고, ODM_j는 세포(j)의 막의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도이고, ODC_j는 세포(j)의 세포질의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도임).

청구항 89

제88항에 있어서, 함수 a_{kl}은 관계식 $a_{kl}(|r_j - r_i|) = A_{kl} \times \exp(-|r_j - r_i| / r_{norm})$($A_{oo}$, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}는 미리 정한 상수 계수임)에서 세포(j)에서 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되는, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 계수 A_{oo}, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}, d 및 r_{norm}은 훈련 환자 코호트의 치료법 반응과 반응 점수의 상관관계를 최적화함으로써 결정되는, 방법.

청구항 91

제84항에 있어서, 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계는 평균의 결정, 중앙값의 결정, 및 백분율을 미리 정한 분위수의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 92

제84항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)인, 방법.

청구항 93

제84항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 항체는 트라스투주맙인, 방법.

청구항 94

제84항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 페이로드는 국소이성질화효소 I 억제제인, 방법.

청구항 95

제84항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 진단용 항체는 Ventana 항-HER2/neu 4B5인, 방법.

청구항 96

제84항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 염료는 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)인, 방법.

청구항 97

제84항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암, 폐암, 식도암, 두경부암, 식도위 접합부 암, 담도암, 파제트병, 췌장암, 난소암, 자궁암 육종, 방광암, 전립선암, 요로상피암, 위장관 기질 종양, 자궁경부암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 자궁내막암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음

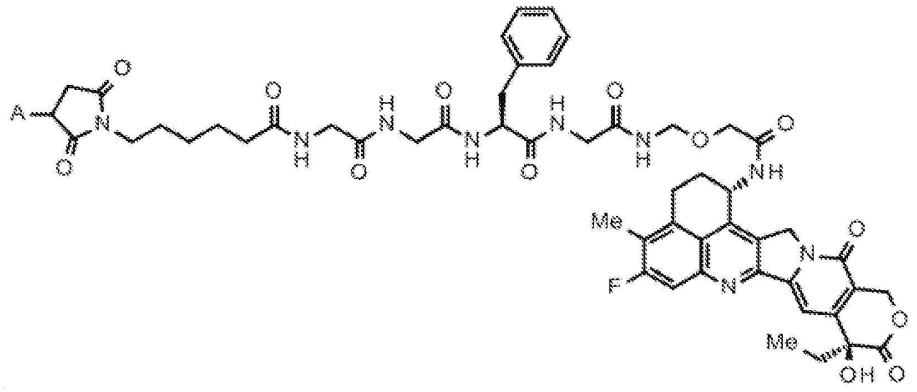
경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 교모세포종 다형체, 육종, 골육종, 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 98

제84항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 99

제84항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 티오에테르 결합을 통해 약물-링커에 접합된 항-HER2 항체이고, 약물-링커는 다음 화학식으로 표시되는, 방법:



(여기서 A는 항-HER2 항체에 대한 연결 위치를 나타냄).

청구항 100

제99항에 있어서, ADC는

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH3을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어진 CDRL2 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL3을 포함하는 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 101

제99항에 있어서, ADC는

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 102

제99항에 있어서, ADC는

서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 103

제99항에 있어서, ADC는

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 104

항체 약물 접합체(ADC) 페이로드, 및 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함하는 ADC를 암 환자에게 투여하는 것을 수반하는 암을 치료하는 방법으로서, 상기 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)이고,

반응 점수가 미리 결정된 임계값을 초과하는 경우 ADC를 수반하는 치료법을 암 환자에게 투여하는 단계로서, 반응 점수는 통계 연산을 사용하여 암 환자의 조직 샘플의 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 생성되었고, 각각의 단일-세포 ADC 점수는 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 각각의 암 세포에 대해 산출되었고, 암 세포는 암 환자의 조직 샘플의 디지털 이미지에서 검출되었고, 조직 샘플은 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색되었고, 진단용 항체는 조직 샘플에서 암 세포 상의 단백질에 결합하는, 단계

를 포함하는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 각각의 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수는 또한 세포질에서 염료의 염색 강도 및/또는 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출된, 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 암 세포를 검출하는 것은 각각의 암 세포에 대해 막에 속하는 픽셀 및/또는 세포질에 속하는 픽셀을 검출하는 것을 수반하는, 방법.

청구항 107

제105항에 있어서, 각각의 막의 염색 강도는 막의 픽셀 단위의 갈색 디아미노벤지딘(DAB) 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되고/되거나, 각각의 세포질의 염색 강도는 세포질의 픽셀 단위의 갈색 DAB 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되는, 방법.

청구항 108

제104항에 있어서, 세포(i)에 대한 단일 세포 ADC 점수는 다음과 같이 계산되는, 방법:

$|r_j - r_i| < d$ $\{a_{20}(|r_j - r_i|) \times ODM_j^2 + a_{11}(|r_j - r_i|) \times ODM_j \times ODC_j + a_{02}(|r_j - r_i|) \times ODC_j^2 + a_{00}(|r_j - r_i|)\}$

인 모든 세포(j)의 합,

(여기서 함수 a_{kl}은 각각의 세포(j)에서 각각의 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되고, ODM_j는 세포(j)의 막의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도이고, ODC_j는 세포(j)의 세포질의 갈색 DAB 신호의 광학 밀도임).

청구항 109

제108항에 있어서, 함수 a_{kl}은 관계식 $a_{kl}(|r_j - r_i|) = A_{kl} \times \exp(-|r_j - r_i| / r_{norm})$($A_{oo}$, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}는 미리 정한 상수 계수임)에서 세포(j)에서 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우되는, 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 계수 A_{oo}, A_{1o}, A_{o1}, A_{11}, A_{20}, A_{o2}, d 및 r_{norm}은 훈련 환자 코호트의 치료법 반응과 반응 점수의 상관관계를 최적화함으로써 결정되는, 방법.

청구항 111

제104항에 있어서, 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계는 평균의 결정, 중앙값의 결정, 및 백분율을 미리 정한 분위수의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 112

제104항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)인, 방법.

청구항 113

제104항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 항체는 트라스투주맙인, 방법.

청구항 114

제104항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, ADC 페이로드는 국소이성질화효소 I 억제제인, 방법.

청구항 115

제104항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 진단용 항체는 Ventana 항-HER2/neu 4B5인, 방법.

청구항 116

제104항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 염료는 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)인, 방법.

청구항 117

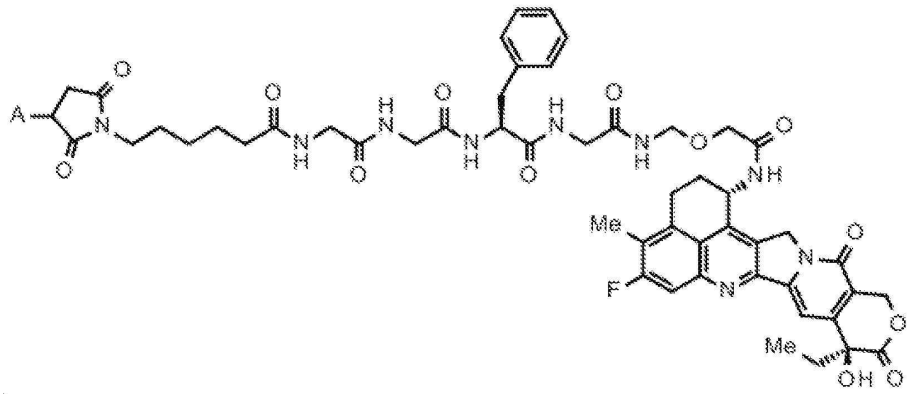
제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암, 폐암, 식도암, 두경부암, 식도위 접합부 암, 담도암, 파제트병, 췌장암, 난소암, 자궁암 육종, 방광암, 전립선암, 요로상피암, 위장관 기질 종양, 자궁경부암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 자궁내막암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 교모세포종 다형체, 육종, 골육종, 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 118

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 암 환자는 유방암, 위암, 결장직장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는, 방법.

청구항 119

제104항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, ADC는 티오에테르 결합을 통해 약물-링커에 접합된 항-HER2 항체이고, 약물-링커는 다음 화학식으로 표시되는, 방법:



(여기서 A는 항-HER2 항체에 대한 연결 위치를 나타냄).

청구항 120

제119항에 있어서, ADC는

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진

CDRH2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH3을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 1 내지 3으로 이루어진 아미노산 서열로 이루어진 CDRL2 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL3을 포함하는 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 121

제119항에 있어서, ADC는

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 122

제119항에 있어서, ADC는

서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

청구항 123

제119항에 있어서, ADC는

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄

를 포함하는 항-HER2 항체를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호-참조**

[0002] 본 출원은 2020년 9월 12일에 출원된 미국 가출원 63/077,604에 대한 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 전문이 참조로 포함된다.

[0003] **전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조**

[0004] 전자적으로 제출된 서열 목록의 내용(파일명: DSADC_400_Seqlisting.txt: 크기: 24,662 바이트; 및 생성일: 2021년 9월 9일)은 본 명세서에 전문이 참조로 포함된다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 발명은 링커 구조를 통해 항-HER2 항체에 접합된 약물을 가지는 항체-약물 접합체를 사용하는 치료법에 대해 암 환자가 어떻게 반응할 것인지를 나타내는 점수를 산출하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 주어진 치료에 대한 암 환자의 반응 확률을 평가하는 것은 암 환자의 치료 요법을 결정하는 데 필수적인 단계이다. 이러한 평가는 종종 암 환자 유래의 조직 샘플에 대한 조직학적 분석을 기반으로 하며 표준 등급 체계를 사용하여 암을 식별하고 분류하는 것을 수반한다. 면역조직화학(IHC) 염색은 특정 단백질을 발현하는 마커-양성 세포와 단백질을 발현하지 않는 마커-음성 세포를 구별하는 데 사용될 수 있다. IHC 염색은 통상적으로 단백질-특이적 항체에 연결된 하나 이상의 염료와 대비염료인 다른 염료를 포함하는 여러 염료를 수반한다. 일반적인 대비염료는 헤마톡실린으로, 이는 DNA를 표지하여 핵을 염색한다.

[0008] 단백질 특이적 염색 또는 바이오마커는 미리 결정된 치료법에 대한 반응을 나타낼 가능성이 있는 암 환자의 조직 영역을 식별하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상피 세포를 염색하는 바이오마커는 의심되는 종양 영역을 식별하는 데 도움이 될 수 있다. 그 다음 다른 단백질 특이적 바이오마커가 암성 조직 내의 세포를 특성화하는 데 사용된다. 특정 바이오마커에 의해 염색된 세포를 식별하고 정량화할 수 있으며, 이어서 병리학자가 양성으로 염색된 세포와 음성으로 염색된 세포의 수를 나타내는 점수를 시각적으로 추정할 수 있다. 그 다음 이 점수는 같은 방식으로 계산된 다른 암 환자의 점수와 비교될 수 있다. 주어진 암 치료에 대한 이러한 다른 환자들의 반응이 알려진 경우, 병리학자는 암 환자에 대해 계산된 점수와 다른 환자의 점수의 비교를 기반으로 암 환자가 주어진 치료에 반응할 가능성이 얼마나 되는지 예측할 수 있다. 그러나 병리학자의 육안 평가는 가변성과 주관성이 있는 경향이 있다.

[0009] 유망한 암 치료 중 하나는 항원이 암 세포의 표면에 발현되는 항체에 접합된 세포독성이 있는 약물을 가지는 항체-약물 접합체(ADC)를 수반한다. ADC는 항원에 결합하고 세포 내재화(cellular internalization)되어 암 세포에 선택적으로 약물을 전달하고 암 세포 내에 약물을 축적하여 암 세포를 사멸시킨다. 치료용 HER2 항체-약물 접합체를 수반하는 치료에 대한 암 환자의 반응을 나타내는 반복 가능하고 객관적인 점수를 생성하기 위한 컴퓨터-기반 방법이 모색된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0010] 암 환자가 항체 약물 접합체(ADC)를 수반하는 치료법에 어떻게 반응할지 예측하는 방법은 각각의 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수를 기반으로 반응 점수를 산출하는 것을 수반한다. ADC는 ADC 페이로드, 및 각각의 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함한다. 조직 샘플은 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하는 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색된다. 조직 샘플의 디지털 이미지가 획득된다. 디지털 이미지에 대해 이미지 분석이 수행되어 콘볼루션 신경망을 사용하여 암 세포를 검출한다. 각각의 암 세포에 대해, 단일-세포 ADC 점수는 암 세포의 막 및/또는 세포질에서 및/또는 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출된다. 통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 ADC 치료법에 대한 암 환자의 반응을 예측하는 반응 점수가 생성된다. 미리 결정된 임계값보다 높은 반응 점수를 가지는 환자는 ADC를 수반하는 치료법에 대해 권장된다.

[0011] 일 구현예에서, 항체 약물 접합체(ADC)로 치료된 암 환자의 생존 확률을 나타내는 점수를 생성하는 방법은 단일-세포 ADC 점수를 산출하는 단계를 수반한다. 암 환자의 조직 샘플은 진단용 항체와 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색된다. ADC는 ADC 페이로드와 암 세포 상의 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2) 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함한다. 진단용 항체는 조직 샘플에서 암 세포 상의 HER2 단백질에 결합한다. 조직 샘플의 디지털 이미지가 획득되고, 이미지 분석을 사용하여 디지털 이미지에서 암 세포가 검출된다. 각각의 암 세포에 대해, 단일-세포 ADC 점수는 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출된다. 단일-세포 ADC 점수는 또한 선택적으로 암 세포의 세포질에서 염료의 염색 강도뿐만 아니라, 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 할 수 있다. 통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 결과로 암 환자의 생존 확률을 나타내는 정량적 연속 점수(Quantitative Continuous Score; QCS)가 생성된다. 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계는 평균을 결정하거나, 중앙값을 결정하거나, 미리 정한 백분율을 이용하여 분위수를 결정함으로써 수행된다. 또 다른 양태에서, 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계는 미리 정한 임계값을 사용하는 임계값 연산을 수반한다. 미리 정한 임계값보다 큰 단일-세포 ADC 점수를 가지는 모든 세포는 단일-세포 ADC 양성으로 표지된다. 집계는 단일-세포 ADC 양성 세포의 수를 모든 암 세포의 수로 나눈 값을 결정함으로써 수행된다.

[0012] 일 구현예에서, 항체 약물 접합체(ADC)에 대한 암 환자의 반응을 예측하는 방법은 암 세포를 검출하는 단계 및 각각의 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수를 산출하는 단계를 수반한다. ADC는 ADC 페이로드, 및 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함한다. 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)이다. 조직 샘플은 진단용 항체와 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색된다. 진단용 항체는 조직 샘플에서 암 세포 상

의 단백질에 결합한다. 조직 샘플의 디지털 이미지가 획득되고, 디지털 이미지에서 암 세포가 검출된다. 각각의 암 세포에 대해, 단일-세포 ADC 점수는 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출된다. 단일-세포 ADC 점수는 또한 선택적으로 암 세포의 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 하고, 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 할 수 있다. 각각의 막의 염색 강도는 막의 픽셀 단위의 갈색 디아미노벤지딘(DAB) 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출되며, 각각의 세포질의 염색 강도는 세포질의 픽셀 단위의 갈색 DAB 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출된다. ADC에 대한 암 환자의 반응은 통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수의 집계를 기반으로 예측된다.

[0013] 또 다른 구현예에서, 항체 약물 접합체(ADC)에 대해 미리 결정된 반응을 나타낼 암 환자를 식별하는 방법은 반응 점수를 생성하는 단계를 수반한다. ADC는 ADC 페이로드, 및 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함한다. 암 환자의 조직 샘플은 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하는 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색된다. 조직 샘플의 디지털 이미지가 획득되고, 콘볼루션 신경망을 사용하여 디지털 이미지에서 암 세포가 검출된다. 각각의 암 세포에 대해, 단일-세포 ADC 점수는 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 산출된다. 단일-세포 ADC 점수는 또한 선택적으로 암 세포의 세포질에서 염료의 염색 강도, 및 단일-세포 점수가 산출된 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 할 수 있다. QCS 점수는 통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 생성된 반응 점수이다. 암 환자는 QCS 점수가 임계값을 초과하는지 여부를 기반으로 ADC에 대해 미리 결정된 반응을 나타낼 환자로 식별된다. 임계값보다 큰 QCS 점수를 나타내는 환자는 QCS 양성(QCS+)으로 간주되고, 다른 모든 환자는 QCS 음성(QCS-)으로 간주된다. 미리 결정된 반응은 평균 종양 크기의 감소이다. 또 다른 양태에서, 임계값에 대한 QCS 점수의 차이는 암 환자가 ADC에 대해 미리 결정된 반응을 나타낼 환자로 정확하게 식별될 확률을 나타낸다. 차이가 작으면 확률이 낮음을 나타내는 반면, 차이가 크면 암 환자를 정확하게 식별할 확률이 높음을 나타낸다. 또 다른 구현예에서, 미리 결정된 반응은 미리 정한 시간 범위 내의 환자 사망이 무반응으로 간주되도록 환자 생존에 의해 표시된다. 일 양태에서, 미리 정한 시간 범위는 표준 치료에 따라 치료된 환자의 평균 생존 시간의 2배이다.

[0014] 일 구현예에서, 항체 약물 접합체(ADC)로 암 환자를 치료하는 방법은 QCS 점수를 치료 점수의 형태로 생성하는 단계를 수반한다. ADC는 ADC 페이로드, 및 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함한다. 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)이다. 암 환자의 조직 샘플은 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하는 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색된다. 조직 샘플의 디지털 이미지가 획득되고, 디지털 이미지에서 암 세포가 검출된다. 각각의 암 세포에 대해, 단일-세포 ADC 점수는 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 계산된다. 단일-세포 ADC 점수는 또한 선택적으로 암 세포의 세포질에서 염료의 염색 강도뿐만 아니라, 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 할 수 있다. 치료 점수는 통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 생성된다. 치료 점수가 미리 결정된 임계값을 초과하는 경우 ADC를 수반하는 치료법이 암 환자에게 투여된다. 또 다른 양태에서, 환자의 치료전 HER2 염색 조직 샘플이 QCS 양성(QCS+)으로 채점된 경우 ADC를 수반하는 치료법이 암 환자에게 투여된다.

[0015] 또 다른 구현예에서, 항체 약물 접합체(ADC)로 암 환자를 치료하는 방법은 치료법을 투여하는 임상의에 의해 수행된다. ADC는 ADC 페이로드, 및 암 세포 상의 단백질을 표적으로 하는 ADC 항체를 포함한다. 단백질은 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)이다. 반응 점수가 미리 결정된 임계값을 초과하는 경우 ADC를 수반하는 치료법이 암 환자에게 투여된다. QCS 반응 점수는 통계 연산을 사용하여 암 환자의 조직 샘플의 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 생성되었다. 각각의 단일-세포 ADC 점수는 막에서 염료의 염색 강도를 기반으로 각각의 암 세포에 대해 산출되었다. 단일-세포 ADC 점수는 또한 선택적으로 각각의 암 세포의 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 하고, 또한 단일-세포 ADC 점수가 산출된 각각의 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 다른 암 세포의 막 및 세포질에서 염료의 염색 강도를 기반으로 할 수 있다. 암 환자의 조직 샘플의 디지털 이미지에서 암 세포가 검출되었다. 조직 샘플은 조직 샘플의 암 세포 상의 단백질에 결합하는 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색되었다.

[0016] 다른 구현예 및 이점은 하기 상세한 설명에 기재되어 있다. 본 개요는 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 본 발명은 청구범위에 의해 한정된다.

도면의 간단한 설명

[0017] 동일한 번호가 동일한 구성요소를 나타내는 첨부 도면은 본 발명의 구현예를 예시한다.

도 1은 HER2 단백질의 아미노산 서열(서열번호 1)을 나타낸다.

도 2는 항-HER2 항체 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 2)을 나타낸다.

도 3은 항-HER2 항체 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 3)을 나타낸다.

도 4는 항-HER2 항체 CDRH1의 아미노산 서열(서열번호 4)을 나타낸다.

도 5는 항-HER2 항체 CDRH2의 아미노산 서열(서열번호 5)을 나타낸다.

도 6은 항-HER2 항체 CDRH3의 아미노산 서열(서열번호 6)을 나타낸다.

도 7은 항-HER2 항체 CDRL1의 아미노산 서열(서열번호 7)을 나타낸다.

도 8은 항-HER2 항체 CDRL2(SAS)의 아미노산 서열(서열번호 8)을 나타낸다.

도 9는 항-HER2 항체 CDRL3의 아미노산 서열(서열번호 9)을 나타낸다.

도 10는 항-HER2 항체 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 10)을 나타낸다.

도 11은 항-HER2 항체 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 11)을 나타낸다.

도 12는 항-HER2 항체 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 12)을 나타낸다.

도 13은 8개의 약물-링커 단위가 있는 항-HER2 항체-약물 접합체인 트라스투주맙 데룩스테칸을 예시한다.

도 14는 분석 시스템이 암 환자 유래 조직의 디지털 이미지를 분석하고 암 환자가 항-HER2 항체-약물 접합체를 수반하는 치료법에 반응할 가능성이 얼마인지를 예측하는 단계의 흐름도이다.

도 15는 도 14의 단계 2의 이미지 분석 과정을 예시하는 디지털 이미지를 나타낸다.

도 16은 도 14의 단계 2의 이미지 분석 과정의 또 다른 구현예의 디지털 이미지를 나타낸다.

도 17은 암 세포의 핵 객체가 검출되는 이미지 분석 단계를 예시한다.

도 18은 핵 객체가 막을 검출하는 데 사용되는 이미지 분석 단계를 예시한다.

도 19는 암 세포의 막 객체가 검출되는 이미지 분석 단계를 예시한다.

도 20은 이미지 분석 소프트웨어 환경에서 이미지 분석 단계 결과의 스크린샷이다.

도 21은 이미지 분석 분할에 사용된 스크립트 및 스크립트를 사용하여 얻은 세포 객체 측정을 나타낸다.

도 22는 막 및 세포질 픽셀의 회색 값을 사용한 이미지 분석으로부터의 염색 강도의 샘플 정량 결과를 나타낸다.

도 23은 도 22의 이미지의 막 및 세포질에서의 염색의 예시적인 정량적 양을 열거한다.

도 24는 항-HER2 ADC 치료법이 암 세포를 사멸시키는 메커니즘을 예시한다.

도 25는 인근 세포로의 ADC 페이로드 흡수를 설명하기 위해 세포 분리를 기반으로 도 23에 나타낸 3개의 세포 각각에 대한 단일-세포 ADC 점수의 계산을 예시한다.

도 26은 단일-세포 점수를 계산하는 공식을 나타낸다.

도 27은 서로 비교하여 얼마나 일관되게 병리학자가 막에 주석을 다는지 비교하는 다이어그램이다.

도 28은 도 14의 방법의 이미지 분석을 사용하여 검출된 막이 병리학자가 식별한 막과 어떠한 상관관계가 있는지를 비교하는 다이어그램이다.

도 29는 HER2 IHC 1+ 및 HER2 IHC 2+/ISH- 점수를 가지는 50명의 환자 각각이 진행성 질환, 안정 질환을 가졌는지 또는 항-HER2 ADC 치료법에 대한 반응을 보이는지를 나타내는 다이어그램이다.

도 30은 신규 채점 방법으로부터 점수가 "HER2 양성"으로 분류된 환자의 종양 수축에 대한 반응을 나타낸다.

도 31은 IHC 채점의 "HER2 음성" 범주로부터 환자의 하위 그룹이 여전히 항-HER2 ADC 치료법에 대해 유리한 객관적인 반응률을 보임을 나타낸다.

도 32는 도 14의 신규 채점 방법을 사용하여 종래의 "HER2 음성" 범주로부터 "QCS 양성" 및 "QCS 음성"으로의

환자의 계층화를 나타낸다.

도 33은 도 14의 신규 채점 방법을 사용하여 151명의 환자를 "QCS 양성" 및 "QCS 음성"으로 계층화한 것을 예시한다.

도 34a는 종래의 HER2 IHC 점수가 막대의 음영으로 표시되는 유방암 환자에 대한 신규 반응 점수를 나타내는 막대 그래프이다.

도 34b는 도 34a에서 계층화된 QCS 양성 및 QCS 음성 환자의 객관적 반응률(ORR) 및 무진행 생존 기간 중앙값(mPFS)을 나타내는 표이다.

도 35는 신규 방법의 구현예를 사용하여 식별된 HER2-음성 환자의 2개 그룹에 대한 무진행 생존율의 카플란-마이어(Kaplan-Meyer) 곡선의 그래프이며, 여기서 단일-세포-ADC-점수 양성 암 세포의 인근에 있는 단일-세포-ADC-점수 음성 암 세포도 또한 고려된다.

도 36은 신규 QCS 채점 방법을 사용하여 식별된 전체 J101 시험의 2개 환자 그룹에 대한 무진행 생존율의 카플란-마이어 곡선의 그래프이다.

도 37은 도 36의 카플란-마이어 곡선에 나타낸 환자의 2개 그룹을 계층화하기 위한 신규 QCS 채점 방법에서 사용되는 특징 표이다.

도 38은 151명의 유방암 환자를 항-HER2 ADC 치료법에 반응하여 더 길고 더 짧은 무진행 생존(PFS)을 나타내는 환자로 계층화하는 데 사용된 모델의 종양 침윤 림프구(TIL)-기반 및 HER2 염색-기반 특징의 표이다.

도 39a는 도 38에 열거된 TIL 밀도 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 39b는 도 38에 열거된 HER2+ 세포 밀도 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 39c는 도 38에 열거된 HER2+ 인근 점수 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 40a는 J101 시험의 151명의 환자 중 HER2 양성으로 지정된 단지 72명의 환자에 대한 도 38에 열거된 TIL 밀도 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 40b는 J101 시험의 총 151명의 환자 중 단지 72명의 HER2 양성 환자에 대한 HER2+ 세포 밀도 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 40c는 J101 시험의 총 151명의 환자 중 단지 72명의 HER2 양성 환자에 대한 HER2+ 인근 점수 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 41a는 J101 시험의 총 151명의 환자 중 단지 65명의 HER2 음성 환자에 대한 TIL 밀도 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 41b는 J101 시험의 총 151명의 환자 중 단지 65명의 HER2 음성 환자에 대한 HER2+ 세포 밀도 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 41c는 J101 시험의 총 151명의 환자 중 단지 65명의 HER2 음성 환자에 대한 HER2+ 인근 점수 특징에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 42는 종래의 HER2 IHC 점수가 막대의 음영으로 표시되는 위암 환자에 대한 신규 반응 점수를 나타내는 막대 그래프이다.

도 43은 위암 환자를 항-HER2 ADC 치료법에 반응하여 더 길고 더 짧은 무진행 생존(PFS)을 나타내는 환자로 계층화하는 데 사용된 모델의 HER2 염색-기반 특징의 표이다.

도 44는 위암 환자를 항-HER2 ADC 치료법에 반응하여 더 길고 더 짧은 전체 생존기간(OS)을 나타내는 환자로 계층화하는 데 사용된 모델의 HER2 염색-기반 특징의 표이다.

도 45는 J101 시험의 32명의 위암 환자에 대한 PFS를 기반으로 도 43에 열거된 특징 membOD_density_10에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

도 46은 J101 시험의 32명의 위암 환자에 대한 OS를 기반으로 도 44에 열거된 특징 membOD_density_10에 대한 카플란-마이어 곡선이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 항-HER2 항체-약물 접합체를 사용하는 치료법에 대해 암 환자가 어떻게 반응할 것인지를 나타내는 점수를 산출하는 신규 방법을 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 ADC로 치료된 암 환자의 생존 확률을 나타내는 암 환자에 대한 점수를 산출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 양태는 ADC에 대한 암 환자의 반응을 예측하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 양태는 ADC에 대해 미리 결정된 반응을 나타낼 암 환자를 식별하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 양태는 치료 점수가 미리 결정된 임계값을 초과하는 경우 ADC를 수반하는 치료법을 투여함으로써 암 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0019] **I. 정의.**

[0020] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어 및 어구가 하기에 정의되어 있다. 용어 "암"은 용어 "종양"과 동일한 의미를 가지는 것으로 사용된다.

[0021] 본 발명에서, "HER2"는 인간 표피 성장 인자 수용체 2(또한 neu 또는 ErbB-2로도 지칭될 수 있음)와 동의어이며 HER1(EGFR 또는 ErbB-1), HER3(ErbB-3) 및 HER4(ErbB-4)와 함께 수용체 단백질 티로신 키나제의 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 서브패밀리에 속하는 막관통 수용체이다. HER2는 HER1, HER3, 또는 HER4와의 이종이량체 형성으로 인한 세포간 티로신 잔기의 자가인산화에 의해 활성화됨으로써 정상 세포와 종양 세포에서 세포 증식, 분화, 및 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서, 용어 "HER2 단백질"은 HER2와 동일한 의미로 사용된다. HER2 단백질의 발현은 면역조직화학법(IHC) 또는 면역형광법(IF)과 같은 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 검출될 수 있다.

[0022] 도 1은 HER2 단백질의 아미노산 서열(서열번호 1)을 나타낸다. 서열번호 1에서, 아미노산 잔기 1 내지 652로 이루어진 아미노산 서열은 "HER2 단백질의 세포외 도메인"으로 지칭되고, 아미노산 잔기 653 내지 675로 이루어진 아미노산 서열은 "HER2 단백질의 막관통 도메인"으로 지칭되며, 아미노산 잔기 676 내지 1255로 이루어진 아미노산 서열은 "HER2 단백질의 세포간 도메인"으로 지칭된다.

[0023] 본 발명에서, "항-HER2 항체"는 HER2에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 항-HER2 항체는 HER2에 결합하는 활성을 가지며, 이에 의해 HER2-발현 세포로 내재화되어 HER2에 대한 결합 활성을 나타낸 후 항체는 HER2 발현 세포로 이동한다. 항-HER2 항체는 종양 세포를 표적으로 하고, 종양 세포에 결합하고, 종양 세포로 내재화하고, 종양 세포에 대해 세포파괴 활성을 나타내며, 링커를 통해 항종양 활성을 가지는 약물과 접합되어 항체-약물 접합체를 형성할 수 있다.

[0024] 도 2는 항-HER2 항체 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 2)을 나타내고, 도 3은 항-HER2 항체 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 3)을 나타낸다.

[0025] 도 4는 항-HER2 항체 CDRH1의 아미노산 서열(서열번호 4)을 나타내고, 도 5는 항-HER2 항체 CDRH2의 아미노산 서열(서열번호 5)을 나타내고, 도 6은 항-HER2 항체 CDRH3의 아미노산 서열(서열번호 6)을 나타낸다.

[0026] 도 7은 항-HER2 항체 CDRL1의 아미노산 서열(서열번호 7)을 나타내고, 도 8은 항-HER2 항체 CDRL2(SAS)의 아미노산 서열(서열번호 8)을 나타내고, 도 9는 항-HER2 항체 CDRL3의 아미노산 서열(서열번호 9)을 나타낸다.

[0027] 도 10은 항-HER2 항체 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 10)을 나타내고, 도 11은 항-HER2 항체 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 11)을 나타낸다. 도 12는 항-HER2 항체의 또 다른 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 12)을 나타낸다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체의 항-HER2 항체는 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열(서열번호 2의 아미노산 잔기 26 내지 33으로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진 CDRH1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열(서열번호 2의 아미노산 잔기 51 내지 58로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진 CDRH2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열(서열번호 2의 아미노산 잔기 97 내지 109로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진 CDRH3을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열(서열번호 3의 아미노산 잔기 27 내지 32로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진 CDRL1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 1 내지 3으로 이루어진 아미노산 서열(서열번호 3의 아미노산 잔기 50 내지 52로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진 CDRL2 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열(서열번호 3의 아미노산 잔기 89 내지 97로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진 CDRL3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체이고, 더 바람직하게는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열(서열번호 2의 아미노산 잔기 1 내지 120으로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열(서열번호 3의 아미노산 잔기 1 내지 107로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진

경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고, 훨씬 더 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 항체; 또는 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열(서열번호 2의 아미노산 잔기 1 내지 449로 이루어진 아미노산 서열)로 이루어진 중쇄 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 항체이다.

[0029] 본 발명에서, 용어 "HER2-양성" 및 "HER2-과발현"은 면역조직화학 방법에서 HER2의 발현에 대해 3+의 점수를 부여받은 암 조직뿐만 아니라, 면역조직화학 방법에서 HER2의 발현에 대해 2+의 점수를 부여받고 동시에 제자리 혼성화 방법에서 HER2의 발현에 대해 양성인 것으로 결정된 암을 지칭한다. 본 발명의 제자리 혼성화 방법은 형광 제자리 혼성화 방법(fluorescence in situ hybridization method; FISH) 및 이중색 제자리 혼성화 방법(dual color in situ hybridization method; DISH)을 포함한다.

[0030] 본 발명에서, 용어 "HER2-음성"은 면역조직화학 방법에서 HER2의 발현에 대해 0의 점수를 부여받은 암 조직, 면역조직화학 방법에서 HER2의 발현에 대해 1+의 점수를 부여받은 암, 및 면역조직화학 방법에서 HER2의 발현에 대해 2+의 점수를 부여받고 동시에 제자리 혼성화 방법에서 HER2의 발현에 대해 음성인 것으로 결정된 암을 지칭한다.

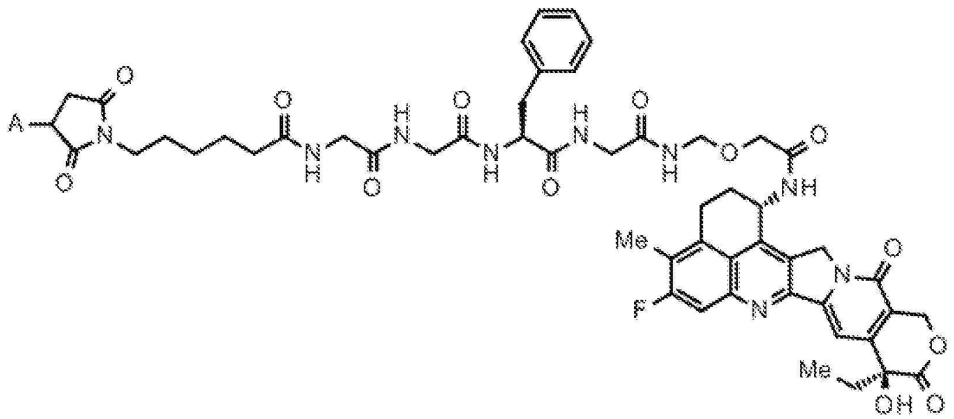
[0031] 본 발명에서, 용어 "HER2-낮음"은 면역조직화학 방법에서 HER2의 발현에 대해 0+(0 초과 1+ 미만을 의미함)의 점수를 부여받은 암 조직, 면역조직화학 방법에서 HER2의 발현에 대해 1+의 점수를 부여받은 암, 및 면역조직화학 방법에서 HER2의 발현에 대해 2+의 점수를 부여받고 동시에 제자리 혼성화 방법에서 HER2의 발현에 대해 음성인 것으로 결정된 암을 지칭한다. 0+로 분류된 조직은 매우 약하지만 노이즈가 없는 HER2 발현을 나타낸다.

[0032] 본 발명에서, 용어 "QCS 양성"(QCS+)은 항-HER2 ADC 치료법에 대해 반응을 나타낼 가능성이 있는 암을 지칭한다. 용어 "QCS 음성"(QCS-)은 항-HER2 ADC 치료법에 대해 반응을 나타내지 않을 것 같은 암을 지칭한다. 두문자어 QCS는 정량적 연속 점수를 의미한다. 본 발명의 신규한 예측 방법의 결과는 일반적으로 정량적 연속 점수로 지칭되며, 반응 점수, 치료 점수 또는 예상 생존 시간의 지표일 수 있다. QCS 점수는 환자에 대해 얻은 모든 단일-세포 ADC 점수에 대해 통계 연산을 수행함으로써 얻어진다. QCS 점수에 미리 결정된 임계값을 적용하면 "QCS 양성" 환자와 "QCS 음성" 환자가 구별된다. 암 환자를 QCS 양성 및 QCS 음성 그룹으로 계층화하면 ADC를 수반하는 치료법으로 이익을 얻을 가능성이 있는 QCS+ 환자를 식별할 수 있다.

[0033] **II. 항-HER2 항체-약물 접합체.**

[0034] 본 발명에서, 항-HER2 항체-약물 접합체의 링커와 약물로 이루어진 부분 구조는 "약물-링커"로 지칭된다. 약물-링커는 티오에테르 결합을 통해 항-HER2 항체에 접합될 수 있다. 따라서, 약물-링커는 항체의 사슬간 이황화 결합 부위(중쇄 사이의 2개 부위 및 중쇄와 경쇄 사이의 2개 부위)에 형성된 티올 기(시스테인 잔기의 황 원자)에 연결될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 바람직하게는 약물-링커가 다음 화학식으로 표시되는 항-HER2 항체-약물 접합체이다:

[0035] [화학식 1]



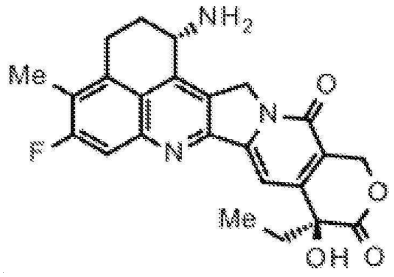
[0036]

[0037] 여기서 A는 항-HER2 항체에 대한 연결 위치를 나타낸다.

[0038] 본 발명의 약물-링커는 국소이성질화효소 I 억제제인 엑사테칸(IUPAC 명칭: (1S,9S)-1-아미노-9-에틸-5-플루오로-1,2,3,9,12,15-헥사하이드로-9-하이드록시-4-메틸-10H,13H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온(또한 화학명 (1S,9S)-1-아미노-9-에틸-5-플루오로-2,3-디하이드로-9-하이드록시-4-메틸-

1H,12H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13(9H,15H)-디온으로 표현됨))을 포함한다. 엑사테칸은 항체 약물 접합체의 세포독성 페이로드이며 항종양 효과를 가진다. 엑사테칸은 다음 화학식으로 표시되는 캄프토테신 유도체이다:

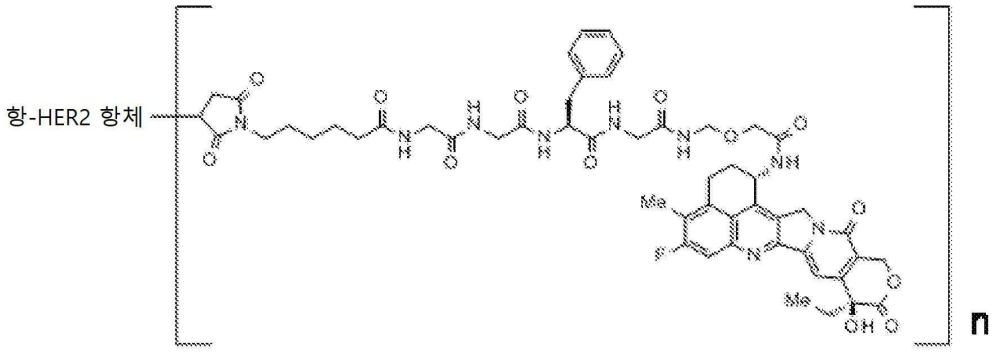
[0039] [화학식 2]



[0040]

[0041] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 바람직하게는 DS-8201로도 알려진 트라스투주맙 데룩스테칸이다. 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 또한 다음 화학식으로 표시될 수 있다:

[0042] [화학식 3]



[0043]

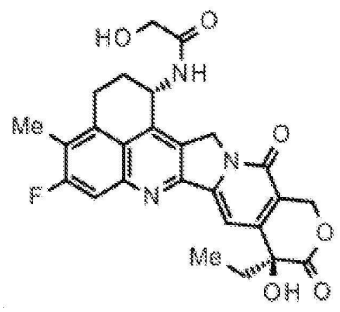
[0044] 대괄호 안에 나타낸 약물-링커는 티오에테르 결합을 통해 항-HER2 항체에 접합된다. n의 의미는 접합된 약물 분자의 평균 수(약물-대-항체 비율, DAR)라고 불리는 것과 동일하며, 항체 분자당 접합된 약물-링커의 평균 단위 수를 나타낸다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체에서 항체 분자당 접합되는 약물-링커의 평균 단위 수는 바람직하게는 2 내지 8, 더 바람직하게는 3 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 7 내지 8, 훨씬 더 바람직하게는 약 8이다.

[0046] 도 13은 "DL"로 지정된 8개의 약물-링커 단위가 있는 항-HER2 항체-약물 접합체인 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)을 예시한다. 도 13에 나타낸 트라스투주맙 데룩스테칸의 트라스투주맙 부분은 인간화 항-HER2 IgG1 mAb이며, 여기서 IgG1은 항-HER2 항체의 이소형을 나타낸다.

[0047] 암세포로의 세포 내재화를 거친 후, 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 링커 모이어티에서 절단되어 다음 화학식으로 표시되는 화합물을 방출한다:

[0048] [화학식 4]



[0049]

[0050] 상기 나타낸 화합물은 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체의 항종양 활성의 주요 공급원이며, 국소

이성질화효소 I 억제 효과를 가진다.

[0051] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 또한 항-HER2 항체-약물 접합체가 표적 단백질 HER2를 발현하는 암 세포로 내재화되고, 그 다음 상기 나타낸 화합물이 또한 표적 단백질 HER2를 발현하지 않는 인근 암 세포에 대해 항종양 효과를 발휘하는 방관자 효과를 가진다.

[0052] **III. 항-HER2 항체의 생산.**

[0053] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 국제 공개 WO 2015/115091에 개시된 바와 같이 생산될 수 있다.

[0054] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체는 항원의 역할을 하는 HER2 또는 HER2의 아미노산 서열로부터 선택되는 임의의 폴리펩타이드로 동물을 면역화하고, 생체내에서 생산된 항체를 수집한 다음, 항체를 정제함으로써 수득될 수 있다. 항원의 기원은 인간에 제한되지 않으며, 동물은 비-인간 동물, 예컨대 마우스, 래트 등으로부터 유래된 항원으로 면역화될 수 있다. 이 경우, 수득된 이종 항원에 결합하는 항체와 사람 항원의 교차 반응성을 테스트하여 사람 질환에 적용가능한 항-HER2 항체를 스크리닝할 수 있다.

[0055] 대안적으로, 항원에 대한 항체를 생산하는 항체-생산 세포는 골수종 세포와 융합되어 하이브리도마를 확립하고, 이로부터 결국 모노클로날 항체가 수득된다.

[0056] 항원은 숙주 세포를 유전자 조작하여 항원성 단백질을 인코딩하는 유전자를 생산함으로써 수득될 수 있다. 구체적으로, 항원 유전자의 발현을 허용하는 벡터를 준비하고 숙주 세포로 옮겨 유전자가 발현되도록 한다. 이렇게 발현된 항원은 정제될 수 있다. 항체는 또한 상기 기재된 유전자 조작된 항원-발현 세포 또는 항원을 발현하는 세포주로 동물을 면역화하는 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0057] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체는 키메라 항체 또는 인간화 항체와 같이 인간에 대한 이종 항원성을 감소시킬 목적으로 인위적 변형에 의해 수득된 재조합 항체이거나, 인간 유래 항체, 즉 인간 항체의 유전자 서열만을 가지는 항체이다. 키메라 항체로서, 항체 가변 영역과 불변 영역이 상이한 종으로부터 유래된 항체, 예를 들어 마우스-유래 또는 래트-유래 항체 가변 영역이 인간-유래 항체 불변 영역에 연결된 키메라 항체가 예시될 수 있다.

[0058] 인간화 항체의 경우, 항체는 이종 항체의 상보성 결정 영역(CDR)만을 인간-유래 항체에 통합함으로써 수득되거나, 항체는 이종 항체의 프레임워크의 아미노산 잔기의 일부뿐만 아니라 이종 항체의 CDR 서열을 CDR-그래프팅 방법에 의해 인간 항체에 그래프팅함으로써 수득되거나(WO 90/07861), 항체는 유전자 전환 돌연변이유발 전략을 사용하여 인간화된다(미국 특허 5821337).

[0059] 인간 항체의 경우, 항체는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄의 유전자를 포함하여 인간 염색체 단편을 가지는 인간 항체-생산 마우스를 사용함으로써 생성된다. 대안으로서, 항체는 파지 디스플레이에 의해 수득되며, 항체는 인간 항체 라이브러리로부터 선택된다.

[0060] 본 발명에서, 항-HER2 항체의 변형된 변이체가 또한 사용될 수 있다. 변형된 변이체란 본 발명에 따른 항체를 화학적 또는 생물학적으로 변형시킴으로써 수득한 변이체를 지칭한다. 화학적으로 변형된 변이체의 예는 아미노산 골격에 대한 화학적 모이어티의 연결을 포함하는 변이체, N-연결 또는 O-연결된 탄수화물 사슬에 대한 화학적 모이어티의 연결을 포함하는 변이체를 포함한다. 생물학적으로 변형된 변이체의 예는 번역 후 변형(예컨대, N-연결 또는 O-연결된 글리코실화, N-말단 또는 C-말단 가공, 탈아미드화, 아스파르트산의 이성질체화, 또는 메티오닌의 산화)에 의해 수득된 변이체, 및 원핵 숙주 세포에서 발현됨으로써 메티오닌 잔기가 N 말단에 첨가된 변이체를 포함한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체 또는 항원을 검출 또는 단리할 수 있도록 표지된 항체, 예를 들면 효소-표지 항체, 형광-표지 항체, 및 친화성-표지 항체도 또한 변형된 변이체의 의미에 포함된다. 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체의 이러한 변형된 변이체는 항체의 안정성 및 혈중 체류를 개선시키고, 이의 항원성을 감소시키며, 항체 또는 항원을 검출하거나 단리하는 데 유용하다.

[0061] 추가적으로, 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체에 연결된 글리칸의 변형(글리코실화, 탈푸코실화 등)을 조절함으로써, 항체-의존성 세포 독성 활성을 향상시킬 수 있다. 항체의 글리칸 변형을 조절하는 기법은 WO99/54342, WO00/61739 및 WO02/31140에 개시되어 있다. 그러나, 기법은 이에 제한되지 않는다. 글리칸의 변형이 조절되는 항체도 또한 본 발명의 항-HER2 항체로 사용될 수 있다.

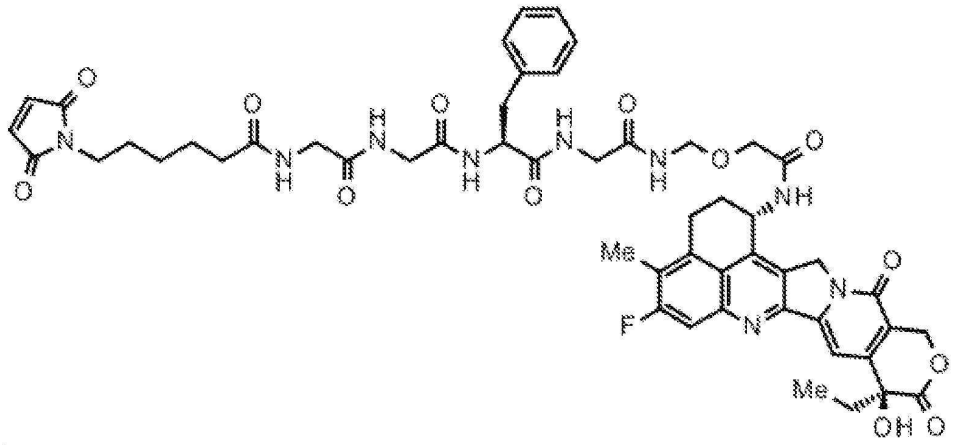
[0062] 배양된 포유동물 세포에서 생산된 항체의 중쇄 카르복실 말단의 라이신 잔기가 결실된 것으로 알려져 있으며, 또한 배양된 포유동물 세포에서 생산된 항체의 중쇄 카르복실 말단에 2개의 아미노산 잔기(글리신 및 라이신)가

결실되고 카르복실 말단에 새로 위치한 프롤린 잔기가 아미드화되는 것이 알려져 있다. 그러나, 이러한 중쇄 서열의 결실 및 변형은 항체의 항원-결합 친화성 및 이펙터 기능(보체의 활성화, 항체-의존적 세포 독성 등)에 영향을 미치지 않는다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체에는, 이러한 변형을 거친 항체 및 항체의 기능적 단편도 또한 포함되며, 중쇄의 카르복실 말단에서 1개 또는 2개의 아미노산이 결실된 결실 변이체, 결실 변이체의 아미드화에 의해 수득된 변이체(예를 들어, 카르복실 말단 프롤린 잔기가 아미드화된 중쇄) 등도 또한 포함된다. 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체의 중쇄 카르복실 말단에 결실을 가지는 결실 변이체의 유형은 항원-결합 친화성 및 이펙터 기능이 보존되는 한 상기 변이체에 제한되지 않는다. 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체를 구성하는 2개의 중쇄는 전장 중쇄 및 상기 기재한 결실 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종일 수 있거나, 또는 이들로부터 선택되는 2종을 조합한 것일 수 있다. 각각의 결실 변이체의 양의 비율은 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체를 생산하는 배양된 포유동물 세포의 유형 및 배양 조건에 의해 영향을 받을 수 있다. 그러나, 항-HER2 항체에서 2개의 중쇄 둘 다에서 카르복실 말단의 하나의 아미노산 잔기가 결실된 항체도 또한 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0063] **IV. 항-HER2 항체-약물 접합체의 생산.**

[0064] 본 발명의 항-HER2 항체-약물 접합체의 생산에 사용될 수 있는 약물-링커 중간체는 다음 화학식으로 표시된다:

[0065] [화학식 5]



[0066]

[0067] 약물-링커 중간체는 화학명 N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]글리실글리실-L-페닐알라닐-N-[(2-{[(1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]인돌리지노 [1,2-b]퀴놀린-1-일]아미노}-2-옥소에톡시)메틸]글리신 아미드로 표현될 수 있으며 국제 공개 WO2015/115091의 개시내용을 기반으로 생산될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 상기 기재된 약물-링커 중간체를 티올 기(대안적으로 설프하이드릴 기로 지칭됨)를 가지는 항-HER2 항체와 반응시킴으로써 생산될 수 있다.

[0068] 설프하이드릴 기를 가지는 항-HER2 항체는 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 항체 내 사슬간 이황화물당 0.3 내지 3 몰당량의 환원제, 예컨대 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드(TCEP)를 사용하고 킬레이트제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 포함하는 완충 용액에서 항-HER2 항체와 반응시킴으로써, 항체 내에 부분적 또는 완전히 환원된 사슬간 이황화물이 있는 설프하이드릴 기를 가지는 항-HER2 항체가 수득될 수 있다.

[0069] 추가적으로, 설프하이드릴 기를 가지는 항-HER2 항체당 2 내지 20 몰당량의 약물-링커 중간체를 사용함으로써, 항체 분자당 2 내지 8개의 약물 분자가 접합된 항-HER2 항체-약물 접합체가 생산될 수 있다.

[0070] 생산된 항-HER2 항체-약물 접합체의 항체 분자당 접합된 약물 분자의 평균 수는, 예를 들어 280 nm 및 370 nm의 2개 파장에서 항-HER2 항체-약물 접합체 및 이의 접합 전구체에 대한 UV 흡광도의 측정을 기반으로 한 계산 방법(UV 방법), 또는 항체-약물 접합체를 환원제로 처리함으로써 수득된 단편에 대한 HPLC 측정을 통한 정량화를 기반으로 한 계산 방법(HPLC 방법)에 의해 결정될 수 있다.

[0071] 항-HER2 항체와 약물-링커 중간체 사이의 접합, 및 항-HER2 항체-약물 접합체의 항체 분자당 접합된 약물 분자의 평균 수의 계산은 국제 공개 WO2015/115091의 개시내용에 따라 수행될 수 있다.

[0072] **V. 항-HER2 항체-약물 접합체의 용도.**

[0073] 본 발명의 항체-약물 접합체는 암 세포 성장을 지연시키고, 이의 증식을 억제하며, 추가로 암 세포를 파괴할 수 있다. 이러한 작용은 암에 의해 유발된 증상의 완화, 암 환자의 삶의 질(QOL)의 개선을 달성하고, 암 환자의 생명을 보존하여, 치료 효과를 달성할 수 있다. 심지어 암 세포의 파괴로 이어지지 않더라도, 암 세포 증식의 억제 또는 제어는 암 환자의 장기 생존의 달성뿐만 아니라, 더 높은 QOL의 달성을 초래할 수 있다.

[0074] 본 발명의 항체-약물 접합체는 환자에게 전신 치료법으로 적용되고, 추가적으로 암 조직에 국소 적용됨으로써 치료 효과를 발휘할 것으로 예상될 수 있다.

[0075] 항체-약물 접합체는 하나 이상의 약제학적으로 양립가능한 구성요소가 포함된 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다. 약제학적으로 양립가능한 구성요소는 항-HER2 항체-약물 접합체의 투약량, 투여 농도 등을 고려하여 당업계에서 일반적으로 사용되는 제형 첨가제 등으로부터 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 히스티딘 완충제와 같은 완충제, 수크로스와 같은 부형제, 및 폴리소르베이트 80과 같은 계면활성제를 포함하는 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체를 포함하는 약제학적 조성물은 주사제로서, 수성 주사제 또는 동결건조된 주사제로서, 또는 심지어 동결건조 주사제로서 사용될 수 있다.

[0076] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체를 포함하는 약제학적 조성물이 수성 주사제인 경우, 적합한 희석제로 희석된 다음 정맥내 주입으로 제공될 수 있다. 희석제의 예는 덱스트로스 용액 및 생리 식염수를 포함할 수 있다.

[0077] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체를 포함하는 약제학적 조성물이 동결건조된 주사제인 경우, 주사 등급 수로 용해시킨 다음, 적합한 희석제로 필요한 양으로 희석한 후 정맥내 주입으로 제공될 수 있다. 희석제의 예는 덱스트로스 용액 및 생리 식염수를 포함한다.

[0078] 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하는 데 사용되는 가능한 투여 경로의 예는 정맥내, 피내, 피하, 근육내, 및 복강내 경로를 포함할 수 있다.

[0079] 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 인간에게 1 내지 180일의 간격으로 투여될 수 있고, 수주의 간격으로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 3주의 간격으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항-HER2 항체-약물 접합체는 투여당 약 0.001 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있고, 바람직하게는 투여당 0.8 내지 12.4 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 항-HER2 항체-약물 접합체는 바람직하게는 3주에 1회 0.8 mg/kg 내지 8 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있고, 더 바람직하게는 3주에 1회 투약당 5.4 mg/kg 내지 6.4 mg/kg로 투여될 수 있다.

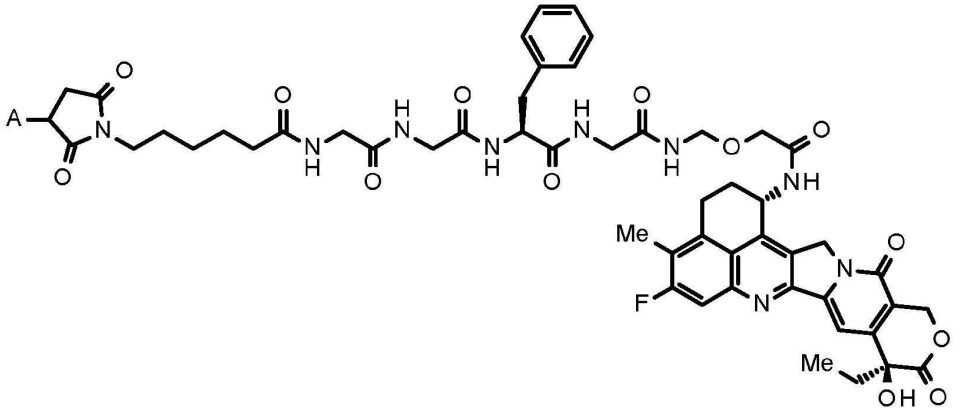
[0080] **VI. 항-HER2 항체-약물 접합체에 대한 환자 반응을 예측하는 방법.**

[0081] 도 14는 분석 시스템이 암 환자 유래 조직의 디지털 이미지를 분석하고 암 환자가 항-HER2 항체-약물 접합체(ADC)를 수반하는 치료법에 반응할 가능성이 얼마일지를 예측하는 방법(7)의 단계(1 내지 6)의 흐름도이다. 일 구현예에서, 방법은 유방암, 위암, 결장직장암, 폐암, 식도암, 두경부암, 식도위 접합부 암, 담도암, 파제트병, 췌장암, 난소암, 자궁암 육종, 방광암, 전립선암, 요로상피암, 위장관 기질 종양, 자궁경부암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 자궁내막암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 교모세포종 다형체, 육종, 골육종, 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는 환자의 ADC에 대한 반응을 예측한다. 일 구현예에서, 방법은 유방암, 위암, 결장직장암, 비소세포 폐암, 식도암, 두경부암, 식도위 접합부 선암종, 담도암, 파제트병, 췌장암, 난소암, 자궁 암육종, 방광암, 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 가지는 환자의 ADC에 대한 반응을 예측한다. 일 구현예에서, 방법은 유방암 환자의 ADC에 대한 반응을 예측한다. 또 다른 구현예에서, 방법은 위암 환자의 ADC 반응을 예측한다. 또 다른 구현예에서, 방법은 폐암 환자의 ADC 반응을 예측한다.

[0082] 첫 번째 단계 1에서, 하나 이상의 바이오마커 또는 염색을 사용하여 염색된 암 환자 유래의 조직 박편의 고해상도 디지털 이미지가 획득된다.

[0083] ADC 치료법의 효능을 예측하기 위해, ADC 치료법에 의해 표적으로 되는 것과 동일한 단백질을 표적으로 하는 부착된 염료를 가지는 진단 바이오마커가 사용된다. 일 구현예에서, 항-HER2 ADC는 티오에테르 결합을 통해 약물-링커에 접합된 항-HER2 항체를 포함하며, 여기서 약물-링커는 다음 화학식으로 표시된다:

[0084] [화학식 1]



[0085] ,

[0086] 여기서 A는 항-HER2 항체에 대한 연결 위치를 나타낸다. 일부 구현예에서, 항-HER2 항체는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRH3을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL1, 서열번호 8의 아미노산 잔기 1 내지 3으로 이루어진 CDRL2 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDRL3을 포함하는 경쇄가 있는 항체이다.

[0087] 일부 추가 구현예에서, 항-HER2 항체는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 일부 추가 구현예에서, 항-HER2 항체는 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 항체이다. 특정 구현예에서, 항-HER2 항체는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 항체이다. 일 구현예에서, 채점이 지시되는 항-HER2 ADC는 상기 화학식 3으로 표시되는 바와 같은 트라스투주맙 데룩스테칸이다. 따라서, 구현예에서, 진단 바이오마커는 또한 HER2 단백질을 표적으로 한다.

[0088] 단계 2에서, 사전 훈련된 콘볼루션 신경망은 염료, 예컨대 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)에 연결된 진단용 항체로 염색된 암 환자 조직의 디지털 이미지를 처리한다. 암 세포의 막에서 염료의 염색 강도는 해당하는 분할된 막 객체와 연관된 모든 픽셀의 염료의 평균 염색 강도를 기반으로 결정된다. 더욱이, 단일 픽셀에서 염료의 염색 강도는 픽셀의 빨강, 녹색 및 파랑 색상 구성요소를 기반으로 산출된다. 이미지 분석 처리의 결과는 디지털 이미지의 각각의 픽셀에 대해 픽셀이 세포 핵에 속할 확률과 픽셀이 세포 막에 속할 확률을 나타내는 2개의 후방 이미지 층이다.

[0089] 단계 2의 또 다른 구현예에서, 2개의 사전 훈련된 콘볼루션 네트워크는 조직의 디지털 이미지를 처리한다. 제1 네트워크에 의한 처리의 결과는 디지털 이미지의 각각의 픽셀에 대해 픽셀이 세포 핵에 속할 가능성을 나타내는 후방 이미지 층이다. 제2 네트워크에 의한 처리의 결과는 디지털 이미지의 각각의 픽셀에 대해 픽셀이 세포 막에 속할 가능성을 나타내는 사후 이미지 층이다.

[0090] 단계 3에서, 핵 및 막에 대한 후방 층의 휴리스틱 이미지 분석을 기반으로 개별 암 세포가 검출된다. 세포 막 객체 및 선택적으로 또한 세포의 세포질 객체를 포함하는 암 세포 객체가 생성된다.

[0091] 단계 4에서, 단일-세포 ADC 점수가 각각의 암 세포에 대해 결정된다. 단일-세포 ADC 점수는 (1) 세포 막에서 DAB의 양, 및 (2) ADC 페이로드 흡수 양에 대한 대용 측정을 기반으로 한다. DAB의 양은 막의 픽셀 단위의 갈색 디아미노벤지딘(DAB) 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 각각의 막의 염색 강도에 의해 결정된다. ADC 페이로드 흡수의 양은 세포 막에서, 및 선택적으로 또한 세포의 세포질에서 DAB의 양, 및 추가로 선택적으로 또한 점수가 결정된 세포에 대해 인근 세포의 막 및 세포질에서 DAB의 양을 기반으로 추정된다. 세포의 세포질에서 DAB의 양은 각각의 세포질의 염색 강도에 의해 결정되며, 이는 세포질의 픽셀 단위의 갈색 DAB 신호의 평균 광학 밀도를 기반으로 산출된다. 인근 세포에서 DAB의 양은 점수가 결정된 세포의 미리 정한 거리 내에 있는 이들 암 세포에 대해 결정된다.

[0092] 단계 5에서, 환자 점수 QCS는 디지털 이미지에서 모든 암 세포의 단일-세포 ADC 점수에 대한 통계 연산을 기반으로 조직의 디지털 이미지에 대해 산출된다. 환자 점수는 항-HER2 ADC를 수반하는 치료법에 대해 암 환자가 어떻게 반응할 것인지를 나타낸다. 단계 4에서 단일-세포 ADC 점수의 매개변수 및 단계 5에서 통계 연산의 유형은

ADC 치료법에 대해 반응이 알려진 환자의 훈련 코호트를 사용하여 최적화된다. 최적화 목표는 훈련 코호트에서 점수-양성 환자 대 점수-음성 환자 그룹의 카플란 마이어 분석에서 낮은 p-값이다.

[0093] 단계 6에서, 항-HER2 ADC를 수반하는 치료법은 점수가 미리 결정된 임계값보다 더 큰 경우 점수-양성 환자에게 권장된다.

[0094] 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 5 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 6 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 7 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 9 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 10 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 15 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 20 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 25 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다.

[0095] 일부 구현예에서, 적어도 50%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 5 이상, 8 이상, 또는 25 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 50%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 60%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 5 이상, 8 이상, 또는 25 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 60%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 70%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 5 이상, 8 이상, 또는 25 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 70%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 80%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 5 이상, 8 이상, 또는 25 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 80%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 5 이상, 8 이상, 또는 25 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 95%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 5 이상, 8 이상, 또는 25 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 적어도 95%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다.

[0096] 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 500개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 1000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 1250개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 1500개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 1600개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 1670개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 1700개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 1800개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 1900개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 2000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 8인 종양 세포의 밀도가 3000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다.

[0097] 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 500개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 1000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 1500개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀

도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 2000개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 2500개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 2750개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 3000개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 3250개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 3500개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 4000개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 5000개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다.

[0098] 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 90 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 91 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 92 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 93 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 94 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 95 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 96 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 97 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 98 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 99 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 99.5 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수가 99.8 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 상기 구현예에서, 이원 공간 근접성 점수는 다음과 같이 계산된다: 공간 근접성 점수 = ([OD>8인 종양 세포의 수] + [OD>8인 적어도 하나의 종양 세포의 50 ㎛ 인근 내에 있는 OD<=8인 종양 세포의 수])/[모든 종양 세포의 수].

[0099] 일부 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수가 20 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수가 30 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수가 40 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수가 50 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수가 60 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수가 70 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수가 80 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수가 90 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 상기 구현예에서, 연속 공간 근접성 점수는 각각의 종양 세포 및 25 ㎛ 이내의 임의의 인근 종양 세포의 누적 광학 밀도의 10% 분위수이며, 이는 인근 세포의 거리에 의해 가중된다.

[0100] 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 50개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 100개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 125개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 150개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 160개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 165개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 168개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 170개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 175개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 180개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 190개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 200개 세포/㎟ 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다.

[0101] 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 300개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 400개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 500개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 600개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 700개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 735개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 750개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다.

[0102] 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 800개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 900개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 1000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 2000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 3000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 4000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 5000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다.

[0103] 일부 구현예에서, a) 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상이고 b) 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 3000개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, a) 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상이고 b) 이원 공간 근접성 점수가 99.8 이상인 경우 환자는 점수가 양성이다. 일부 구현예에서, a) 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상이고 b) 연속 공간 근접성 점수가 50 이상인 경우 환자는 점수가 양성이다. 일부 구현예에서, a) 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상이고 b) 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 735개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 점수가 양성이다.

[0104] 일부 구현예에서, a) 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상이고; b) 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 3000개 세포/mm^2 이상이고; c) 이원 공간 근접성 점수가 99.8 이상이거나 연속 공간 근접성 점수가 50 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, a) 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상이고; b) 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 3000개 세포/mm^2 이상이고; c) 이원 공간 근접성 점수가 99.8 이상이고; d) 연속 공간 근접성 점수가 50 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, a) 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상이고; b) 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 3000개 세포/mm^2 이상이고; c) 이원 공간 근접성 점수가 99.8 이상이거나 연속 공간 근접성 점수가 50 이상이고; d) 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 735개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다. 일부 구현예에서, a) 적어도 90%의 종양 세포가 막 광학 밀도가 8.4 이상이고; b) 종양 영역 내 막 광학 밀도가 적어도 20인 종양 세포의 밀도가 3000개 세포/mm^2 이상이고; c) 이원 공간 근접성 점수가 99.8 이상이고; d) 연속 공간 근접성 점수가 50 이상이고; e) 기질 내 종양 침윤 림프구의 밀도가 735개 세포/mm^2 이상인 경우 환자는 QCS 양성이다.

[0105] **VII. 예측 및 채점 방법의 예.**

[0106] **A. 염색된 조직의 이미지 분석.**

[0107] 도 14의 방법은 이제 염색된 암 조직의 특정 이미지와 관련하여 설명된다.

[0108] 단계 1에서, 조직 샘플은 조직 샘플의 암 세포 상의 연관 단백질에 결합하는 진단용 항체에 연결된 염료를 사용하여 면역조직화학적으로 염색된다. 도 15(상단 좌측 이미지)는 단계 1에서 획득된 염색된 조직 부분의 디지털 이미지(17)이다. 이미지(17)는 염료에 연결된 항-Her2 진단용 항체로 면역조직화학적으로 염색된 암 환자 유래의 조직을 나타낸다. 이 예에서, 진단용 항체는 Ventana PATHWAY 항-HER-2/neu(4B5) 토끼 모노클로날 1차 항체

이며, 이는 단백질 HER2를 표적으로 한다. 다른 예에서, 진단용 항체는 Dako HercepTest 1차 항체일 수 있으며, 이는 또한 단백질 HER2를 표적으로 하는 토끼 항-인간 항체이다. 항-Her2/neu 항체는 막 단백질 Her2/neu에 결합하여 3,3'-디아미노벤지딘(DAB) 염색이 조직 샘플에서 단백질 Her2/neu의 위치를 나타낸다.

[0109] 단계 2에서, 이미지 분석은 디지털 이미지(17)에 대해 수행되어 콘볼루션 신경망을 사용하여 암 세포 핵 및 막의 후방 이미지 층을 생성한다. 이미지 분석은 암 세포 및 이의 구성요소, 예컨대 핵, 막 및 세포질을 검출하는 데 사용된다. 도 15는 단계 2의 이미지 분석 과정을 예시한다. 콘볼루션 신경망은 디지털 이미지(17)의 각각의 픽셀에 대해 각각의 픽셀이 세포의 핵(도 15의 상단 우측 이미지) 또는 막(도 15의 하단 좌측 이미지)에 속할 확률을 나타내는 후방 층(회색 값 이미지)을 생성한다. 높은 확률은 검정색으로, 낮은 확률은 흰색으로 나타나 있다.

[0110] 도 16은 단계 2의 이미지 분석을 수행하는 방법의 또 다른 구현예를 예시한다. 콘볼루션 신경망은 각각의 픽셀에 대해 핵까지의 거리(도 16의 상단 우측 이미지) 또는 막까지의 거리(도 16의 하단 좌측 이미지)를 나타내는 회귀 층(회색 값 이미지)을 생성한다. 긴 거리는 흰색으로 나타나 있는 한편, 짧은 거리는 검정색으로 나타나 있다. 도 15와 16의 비교는 도 16의 구현예의 이미지 분석이 더 두꺼운 막 객체를 생성하지만 도 15의 구현예보다 더 작은 핵 객체를 생성함을 나타낸다.

[0111] 일 구현예에서, 콘볼루션 신경망은 입력 이미지(17)로부터 매우 작은 공간 크기(1 내지 16 픽셀)를 가지는 병목 층을 향하는 일련의 콘볼루션 층, 및 입력 이미지(17)와 동일한 크기를 가지는 후방 층을 향하는 일련의 디콘볼루션 층을 포함한다. 이러한 네트워크 아키텍처는 U-Net이라고 한다. 콘볼루션 신경망의 가중치 훈련은 여러 훈련 이미지에서 핵과 막에 대한 수동 주석 층을 생성한 다음, 생성된 후방 층이 수동으로 생성된 주석 층과 가장 유사하도록 최적화 알고리즘에 의해 네트워크 가중치를 조정하여 수행된다.

[0112] 또 다른 구현예에서, 핵 및 막에 대한 주석 층은 자동으로 생성되고 여러 훈련 이미지에서 수동으로 수정된다. 상피 영역과 핵 중심은 각각 영역과 점으로 수동으로 주석 처리된다. 각각의 훈련 이미지에 대해, 막 분할은 주석이 달린 핵 중심에 의해 시딩되고 주석이 달린 상피 영역의 범위에 의해 제한되는 영역 성장-유사 알고리즘(예를 들어, 분수계 분할)을 적용함으로써 자동으로 생성된다. 훈련 이미지가 주어지면, 블랍(blob) 검출 알고리즘을 적용함으로써(예를 들어, 최대 안정 극단 영역(maximally-stable-extremal-regions; MSER) 알고리즘에 의해) 그리고 주석이 달린 핵 중심을 포함하는 검출된 블랍만 핵으로 선택함으로써 핵 분할이 자동으로 생성된다. 자동으로 생성된 막 및 핵 분할은 시각적으로 검토되고 필요한 경우 수동으로 수정된다. 수정 단계는 부정확하게 분할된 막 또는 핵의 거부, 정확하게 주석이 달린 막 또는 핵의 명시적 수락, 또는 막 또는 핵 형상의 개선 중 하나의 방법을 수반한다. 주석이 달린 막 또는 핵이 있는 각각의 이미지에 대해, 주석 층이 형성된다. 일 구현예에서, 주석 층의 각각의 픽셀은 주석이 달린 객체(막 또는 핵)에 속하는 경우 "1"이 할당되고; 그렇지 않으면 "0"이 할당된다. 또 다른 구현예에서, 주석 층의 픽셀은 가장 가까운 주석이 달린 객체까지의 거리를 나타낸다. 네트워크 가중치는 생성된 후방 층이 자동으로 생성된 막 및 핵 주석 층과 가장 유사하도록 최적화 알고리즘에 의해 조정된다.

[0113] 도 17은 각각 세포 막 및 세포의 세포질을 포함하는 개별 암 세포 객체가 검출되는 단계 3을 예시한다. 휴리스틱 이미지 분석 과정은 분수계 분할을 사용하여 콘볼루션 신경망에 의해 생성된 핵 후방 층을 사용하여 세포 핵을 분할한다. 분할은 핵 객체를 생성한다. 각각의 핵 객체에는 고유 식별자(UID)가 할당된다. 개별적으로 식별된 핵은 도 17(하단 우측 이미지)에 어두운 객체로 나타나 있다. 검출된 핵은 또한 입력 이미지(17)(상단 좌측 이미지)와 핵(상단 우측 이미지) 및 막(하단 좌측 이미지)에 대한 후방 층에서 오버레이로 표시된다.

[0114] 일 구현예에서, 분수계 분할은 미리 정한 제1 크기 임계값을 가지는 핵 후방 층의 임계화를 수반한다. 제1 크기 임계값을 초과하는 모든 단일 연결 픽셀은 핵 객체에 속하는 것으로 간주된다. 16 um^2보다 작은 면적을 가지는 핵 객체는 폐기된다. UID는 각각의 핵 객체에 할당된다. 후속 단계에서, 핵 객체는 추가된 핵 후방 픽셀이 제2의 미리 정한 임계값보다 더 커야 하는 더 작은 핵 후방을 향해 성장한다.

[0115] 도 18은 핵 객체가 막의 분할을 검출하고 개선시키는 데 사용되는 추가 분할 단계를 예시한다. 영역 성장 알고리즘은 검출된 핵 객체를 시드로 사용하여 막 후방 층에서 막의 능선(대략적인 세포 경계)까지 성장한다. 검출된 막(하단 우측 이미지)은 입력 이미지(17)(상단 좌측 이미지)에서, 및 핵(상단 우측 이미지)과 막(하단 좌측 이미지)에 대한 후방 층에서 오버레이로 표시된다.

[0116] 도 19는 검출된 세포의 경계 픽셀의 영역을 막 확률 층 바깥쪽 및 미리 정한 막 층 후방 임계값까지 성장시킴으로써 분할되는 막 객체의 검출 및 분할을 예시한다. 더 두꺼운 경계 영역은 막 객체가 된다. 각각의 막 객체에

는 연관된 핵 객체와 동일한 UID가 할당된다.

[0117] 막과 핵 사이의 공간은 핵의 UID를 사용하여 세포질로 할당된다. 각각의 막(도 19의 상단 좌측 이미지 참조) 및 세포질(도 19의 상단 좌측 이미지 참조)에 대해, DAB 염색의 평균 광학 밀도를 UID와 함께 하드 드라이브의 파일로 내보낸다. 각각의 세포(핵, 세포질 및 막을 포함하는 것으로 정의됨)에 대해, 슬라이드 내 세포의 무게 중심의 위치(x,y)도 또한 내보낸다. 파일은 하드 디스크, 반도체 디스크(solid state disk) 또는 컴퓨터 시스템의 전용 RAM 부분에 존재할 수 있다.

[0118] 도 20은 이미지 분석 소프트웨어 환경에서 이미지 분석의 결과를 예시한다. 도 20(상단 좌측 이미지)은 디지털 이미지(17) 상의 오버레이로서 핵 객체 및 막 객체의 분할을 나타낸다. 도 20(하단 좌측 이미지)은 이미지(17)의 광학 밀도 표현 상의 오버레이로서 핵 객체의 분할을 나타낸다. 어두운 광학 밀도 픽셀은 많은 양의 DAB와 연관되고, 밝은 광학 밀도 픽셀은 적은 양의 DAB와 연관된다. 각각의 이미지 픽셀의 DAB 광학 밀도는 갈색 DAB 구성요소가 독립적인 색상이 되도록 적녹청 색상 공간을 변환하고 갈색 색상 구성요소의 로그를 취함으로써 이미지 픽셀의 적녹청 표현으로부터 산출된다. 면역형광(IF) 이미징을 사용하여 염색을 결정하는 경우, HER2 채널은 적녹청 색상 공간을 사용하는 것과 반대로 12 비트, 16 비트 또는 32 비트 그레이 스케일 이미지로서 획득될 것이다. IF에서, 핵은 제1 염료로서 DAPI(2-[4-(아미노이미노메틸)페닐]-1H-인돌-6-카르복스이미드아미드 하이드로클로라이드)를 사용하여 표시된다. 핵의 후방 층은 콘볼루션 신경망에 대한 입력으로서 제1 염료의 이미지를 사용하여 생성된다. 제2 염료는 진단용 항-HER2 항체에 연결된다. 제2 염료로부터의 형광 신호 강도는 DAB의 광학 밀도(OD)에 해당한다. 도 20(상단 우측 이미지) 및 도 21(상단)은 Definiens Developer XD 플랫폼 내에서 분할된 이미지를 생성하는 데 사용되는 이미지 분석 스크립트를 나타낸다. 도 20(하단 우측 이미지) 및 도 21(하단)은 이미지(17)에서 모든 세포 막 객체 및 세포질 객체에 대하여 내보낸 측정치를 나타낸다. 또 다른 구현예에서, 이미지 분석 스크립트는 또 다른 프로그래밍 언어, 예컨대 C++, C#, Java, Python 또는 R을 사용하여 인코딩된다.

[0119] **B. 예측 ADC 점수의 계산.**

[0120] 막 객체 및 세포질 객체 내의 DAB 염색의 광학 밀도를 기반으로, 단일-세포 ADC 점수를 디지털 이미지(17)에서 각각의 암 세포에 대해 산출한다. 단일-세포 ADC 점수는 또한 단일-세포 ADC 점수가 산출된 암 세포까지의 미리 정한 거리보다 더 가까운 인근 암 세포의 막 객체 및 세포질 객체에서 DAB 염료의 염색 강도를 기반으로 한다. 점수는 항-HER2 ADC 치료법에 대한 암 환자의 반응을 예측한다.

[0121] 도 22는 막 및 세포질 픽셀의 회색 값을 사용하는 개략도에서 단계 2 내지 3의 이미지 분석으로부터 염색의 광학 밀도의 예시적인 정량적 결과를 예시한다. 도 15 내지 20에 예시된 휴리스틱 이미지 분석 단계는 세포 핵, 세포막 및 세포의 세포질로 도 22의 예시적인 분할을 얻는 데 사용된다. 도 22의 밝은 회색 값은 높은 DAB 광학 밀도와 연관되므로, 진단용 항체에 의해 표적화되는 많은 양의 단백질과 연관이 있다. 어두운 회색 값은 낮은 DAB 광학 밀도와 연관이 있다. 더 밝은 픽셀은 더 높은 DAB 광학 밀도에 해당한다.

[0122] 도 23은 도 22의 이미지의 막 및 세포질에서의 염색의 예시적인 정량적 양을 열거하며, 이는 도 23에 부분적으로 재현되어 있다. 제1, 제2 및 제3 세포의 막으로부터 갈색 DAB 신호의 광학 밀도는 각각 0.949, 0.369 및 0.498이다. 제1, 제2 및 제3 세포의 세포질로부터 갈색 DAB 신호의 광학 밀도는 각각 0.796, 0.533 및 0.369이다. 도 23의 개략적인 이미지에서, 제1 암 세포(18)는 많은 양의 표적 단백질 HER2를 발현하고 ADC 항체에 연결된 세포에 들어가는 ADC 페이로드에 의해 사멸될 가능성이 매우 높다(도 24의 효과 1). 제2 암 세포(19) 및 제3 암 세포(20)는 항-HER2 ADC에 의해 직접 사멸되기에 충분한 양의 표적 단백질 HER2를 발현하지 않는다. 그러나, 제1 암 세포(18)에 대한 제2 암 세포(19)의 근접으로 인해, 제1 암 세포로부터 방출된 독성 페이로드는 또한 제2 암 세포(19)를 사멸시킬 것이다(도 24의 효과 3). 제3 암 세포(20)는 활성 상태를 유지할 것이고, 약물 내성 메커니즘의 기원이 될 수 있으며, 이는 결국 환자의 사망을 유발할 수 있다.

[0123] 도 24는 항-HER2 ADC 치료법이 암 세포를 사멸시키는 메커니즘을 예시한다. 예를 들어, 트라스투주맙 데룩스테칸도 또한 이 메커니즘을 사용한다. 제1 단계에서, ADC 항체(예를 들어, 트라스투주맙)는 표적 단백질 HER2에 결합하고 표적 단백질의 천연 기능을 억제하여, 세포 사멸을 야기할 수 있다. 제2 단계에서, 페이로드(예를 들어, 유형 I 국소이성질화효소 억제제)는 세포 내로 내재화되고 페이로드의 독성에 의해 세포를 사멸시킨다. 이러한 페이로드의 흡수는 막에 있는 표적 단백질의 양, 및 막 및 세포질에 있는 표적 단백질의 양의 차이에 따라 다르다. 흡수 후, 페이로드는 세포로부터 주위 조직으로 방출될 수 있다. 제3 단계에서, 페이로드는 근처 세포에 들어갈 수 있으며 또한 세포를 사멸시킬 수 있다. 조직에서 페이로드의 공간 분포는 수동 확산에 의해 퍼진다.

[0124] 전통적인 HER2 채점은 ADC 결합으로 인한 표적 단백질 HER2의 억제 효과뿐만 아니라, ADC 항체와 함께 암 세포에 들어가는 세포독성 페이로드의 효과를 둘 다 반영한다. 따라서, 트라스투주맙 치료법에 대한 전통적인 채점은 세포질 내 HER2 단백질의 존재의 중요성과 제1 사멸된 암 세포로부터 방출된 후 조직으로 확산되는 세포독성 페이로드의 효과를 반영하지 않는다. 이에 비해, 신규 예측 ADC 점수는 인근 암 세포에 대한 세포독성 페이로드의 방출 효과를 측정한다.

[0125] 도 14 방법의 단계 4에서, 단일-세포 ADC 점수가 각각의 암 세포에 대해 결정된다. 도 25는 인근 세포로의 ADC 페이로드 흡수를 설명하기 위해 세포 분리를 기반으로 도 23에 나타낸 3개의 세포 각각에 대한 단일-세포 ADC 점수의 계산을 예시하고 지수 가중 인자를 포함한다. 단일-세포 점수는 도 26에 나타낸 식 또는 청구항 4에 인용된 식을 기반으로 계산될 수 있다. 세포막으로부터의 DAB 신호(0.949, 0.369 및 0.498) 및 세포질(0.796, 0.533 및 0.369)로부터의 DAB 신호에 대해 도 23에 열거된 광학 밀도는 도 25에 예시된 계산에 대한 입력값이다. 제1, 제2 및 제3 세포(18 내지 20)는 각각 0.145, 0.012 및 0.064의 단일-세포 점수를 가진다.

[0126] 따라서, 단일 세포 ADC 점수는 DAB 광학 밀도를 사용하여 세포막 상의 표적 단백질 양의 측정 및 ADC 페이로드 섭취량의 추정치를 포함한다. 도 24에 나타낸 바와 같이, 제1 세포에 대한 ADC 페이로드의 흡수는 제1 세포의 세포막과 세포질에 있는 염료의 양 둘 다뿐만 아니라, 제1 세포에 근접한 제2 세포의 막과 세포질에 있는 염료의 양에 따라 달라진다. 더 구체적으로, 근접부는 제1 암 세포 주위에 미리 정한 반경을 가지는 원형 디스크일 수 있다. 일 구현예에서, 제1 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수는 연관 암 세포 중심이 미리 정한 거리보다 제1 암 세포 중심에 더 가까운 막 및 세포질 객체의 DAB 광학 밀도의 여러 거듭제곱의 거리-가중 합에 의해 결정된다. 일 구현예에서, 미리 정한 거리는 도 25의 계산에서 사용된 바와 같이 50 um이다. 또 다른 구현예에서, 거리 가중은 합에서 제1 암 세포 중심으로부터 다른 암 세포 중심까지 스케일링된 음의 유클리드 거리의 지수를 산출하는 것을 수반한다. 다른 구현예에서, 합계의 거듭제곱은 0, 1 및 2(상수, 선형 항, 제곱)로 제한된다.

[0127] 도 26은 단일-세포 ADC 점수를 계산하기 위한 공식의 일 구현예를 나타낸다. 식의 함수 a_{kl}은 세포(j)에서 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 따라 다르다. ODM_j는 세포(j)의 막의 DAB 광학 밀도이고, ODC_j는 세포(j)의 세포질의 DAB 광학 밀도이다. 상수 A_ij, r_norm 및 d는 모든 유형의 암에 대해 동일하다. 그러나, 환자가 ADC 치료법에 적격인지 여부를 결정하기 위한 점수의 임계값은 상이한 유형의 암에 대해 동일하지 않다.

[0128] 특정 암 환자가 ADC 치료법에 어떻게 반응할 것인지를 나타내는 방법의 단계 5에서, 표적 단백질 HER2의 염색를 기반으로 암 환자 유래 조직의 디지털 이미지(17)에 대한 반응 점수가 산출되어 점수는 암 환자가 항-HER2 ADC 치료법에 어떻게 반응할 것인지를 나타낸다. 반응 점수는 통계 연산을 사용하여 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 생성된다. 따라서, 점수는 디지털 이미지에서 검출된 모든 암 세포에 대한 단일-세포 ADC 점수의 통계를 기반으로 산출된다. 일 구현예에서, 통계는 이미지(17)의 모든 암 세포의 ADC 페이로드 흡수 추정치의 미리 정한 분위수이다.

[0129] 방법의 단계 6에서, 항-HER2 ADC 치료법은 반응 점수가 미리 결정된 임계값보다 더 큰 경우 암 환자에게 권장된다. 단계 6에서 미리 결정된 임계값과 단계 5에서 분위수는 알려진 단일-세포 ADC 점수와 치료법 반응 매개변수를 가진 환자 코호트를 사용하여 양성 예측값, 음성 예측값 및 양성 권장 유병률을 최적화함으로써 결정된다.

[0130] 단계 5에서 반응 점수 산출의 또 다른 예에서, 암 환자의 조직 샘플의 디지털 이미지(S)가 획득되고 진단용 항체(dAB)로 염색된다. 디지털 이미지(s)에 대해 이미지 분석이 수행되어 N개의 암 세포를 검출한다($(c_i)_{0 \le i < N}$. 진단용 항체(dAB)는 Ventana PATHWAY 항-HER-2/neu(4B5)이다. 세포(c_i)의 분할된 막의 광학 밀도는 OD^i_M로 표시되고, 분할된 세포질의 광학 밀도는 OD^i_C로 표시된다. 디지털 이미지(S)와 연관된 반응 점수(S^s)는 암 환자가 항-HER2 ADC 치료법에 반응할 가능성을 나타낸다. ADC는 진단용 항체와 동일한 HER2 단백질에 특이적으로 결합한다. 반응 점수(S^s)는 다음과 같이 표현될 수 있다:

[0131] [식 6]

[0132] $$S^s = \bigwedge_{0 \le i < N} [p(c_i)]$$

[0133] 여기서 $\bigwedge$는 디지털 이미지(s)에서 검출된 세포 집합에 대한 집계 연산자이다. 집계 연산은 검출된 세포와 연관된 양성 값($p(c_i)$)을 나타내는 단일 숫자이다. 일 예에서, 집계 연산은 산술 평균이다. 다른 예에서, 집계 연산은 조화 평균 또는 기하 평균과 같은 여러 종류의 평균 중 하나이다. 다른 예에서, 집계 연산은 검출된 세포의 하위 그룹의 빈도이다. 다른 예에서, 집계 연산은 합계이다. 일 구현예에서, 집계 연산은 세포 하위집합의 여러 종류의 평균 중 하나이다. 또 다른 예에서, 집계 연산은 분위수이다.

[0134] 용어 $p(\square)$는 각각의 세포에 대해 항-HER2 ADC 치료법에 반응할 확률을 나타내는 양성 함수를 나타낸다. 세포에 대한 양성 함수는 세포의 인근 세포와 연관된 dAB 양성 값의 집계에 대해 양성이다. 세포(c_i)와 연관된 양성 값($p(c_i)$)은 다음과 같이 표현된다:

[0135] [식 7]

$$p(c_i) = \bigvee_{(c_j)_{j \in \pi_i}} \left[p^{dAB}(c_j) \right]$$

[0136]

[0137] 여기서 π_i는 세포(c_i)까지의 거리가 미리 정한 상수보다 더 작은 암 세포로 정의되는 세포(c_i)를 포함하는 세포(c_i) 부근의 인근 암 세포의 집합이다. 일 예에서, c_i와 c_j 사이의 거리는 2개 세포 중심 사이의 유클리드 거리이다. 또 다른 예에서, 거리는 c_i와 c_j의 막 사이의 최소 거리이다. 식 7에서, $p^{dAB}(c_j)$는 막에서의 광학 밀도와 세포질에서의 광학 밀도를 기반으로 세포(c_j)와 연관되는 양성 값이다. 일 예에서, $p^{dAB}(c_j)$는 다음과 같은 경우에 세포에 대해 1을 연결시키고:

[0138] [식 8]

$$\alpha_1 \left(OD_M^j \right)^{\gamma_1} + \alpha_2 \left(OD_C^j \right)^{\gamma_2} + \alpha_3 \left(h\left(OD_M^j, OD_C^j \right) \right)^{\gamma_3} > T_p$$

[0139]

[0140] 그렇지 않으면 0을 연결시키는 함수로 정의된다. 식 8에서, α_1, α_2, α_3, γ_1, γ_2, γ_3 및 T_p는 미리 정한 상수이고, $h(\square)$는 OD_M^j와 OD_C^j 사이의 차이를 측정하는 함수이다. 미리 정한 상수는 항-HER2 ADC 치료법에 대해 치료 반응이 알려진 암 환자 코호트의 통계 분석에 의해 결정된다. 또 다른 예에서, $p^{dAB}(c_j)$는 다음과 같이 표현된다:

[0141] [식 9]

$$p^{dAB}(c_j) = \alpha_1 \left(OD_M^j \right)^{\gamma_1} + \alpha_2 \left(OD_C^j \right)^{\gamma_2} + \alpha_3 \left(h\left(OD_M^j, OD_C^j \right) \right)^{\gamma_3}$$

[0142]

[0143] 일 예에서, 함수 $h(\square)$는 OD_M^j와 OD_C^j사이의 차이와 동일하며, $h\left(OD_M^j, OD_C^j \right) = OD_M^j \times \left(OD_M^j - OD_C^j \right)$로 표현된다. 또 다른 예에서, 함수 $h(\square)$는 OD_M^j와 OD_C^j 사이의 양의 차이만 고려하며, $h\left(OD_M^j, OD_C^j \right) = OD_M^j \times \max\left(0, OD_M^j - OD_C^j \right)$로 표현된다. 또 다른 예에서, 함수 $h(\square)$는 OD_C^j와 OD_M^j 사이의 차이와 동일하며, $h\left(OD_M^j, OD_C^j \right) = OD_M^j \times \max\left(0, \frac{OD_M^j - OD_C^j}{OD_M^j + OD_C^j} \right)$로 표현된다.

[0144] 식 7에서, $\bigvee$는 인근 암 세포의 세트에 대한 집계 연산자이다. 집계 연산은 인근 세포와 연관된 dAB 양성 값을 나타내는 단일 숫자이다. 일 예에서, 집계 연산은 dAB 양성의 가중 산술 평균이며, 다음과 같이 표현된다:

[0145] [식 10]

$$\underset{(c_j)_{j\in\pi_i}}{\mathrm{V}}\left[p^{dAB}(c_j)\right]=\frac{\Sigma_{(c_j)_{j\in\pi_i}} w_{c_i}(c_j)\left[p^{dAB}(c_j)\right]}{\Sigma_{(c_j)_{j\in\pi_i}} w_{c_i}(c_j)}$$

[0146]

[0147] 여기서 $w_{c_i}(c_j)$는 세포(c_i)가 인근 세포(c_j)에 의해 영향을 받을 세포의 가능성을 산출하는 가중 함수를 나타낸다. 다른 예에서, 집계 연산은 인근 세포의 dAB 양성 값의 합이 임의의 실제 상수(T_n)를 초과하는 경우 세포(c_i)에 대해 1을 연결시키고, 그렇지 않으면 0을 연결시킨다. 또 다른 예에서, 집계 연산은 분위수, 빈도 측정, 또는 조화 평균 또는 기하 평균과 같은 여러 종류의 평균 중 하나이다. 일 예에서, 가중 함수 $w_{c_i}(c_j)$는 세포(c_i)와 세포(c_j) 사이의 공간 거리($d(c_i, c_j)$)의 가우스(Gaussian) 함수이며, 다음과 같이 표현된다:

[0148] [식 11]

$$w_{c_i}(c_j)=exp\left[-\frac{d(c_i,c_j)^{\alpha}}{\sigma^{\alpha}}\right]$$

[0149]

[0150] 여기서 σ 및 α는 미리 정한 상수이다. 또 다른 예에서, 가중 함수는 공간 거리의 시그모이드이다:

[0151] [식 12]

$$w_{c_i}(c_j)=1-\frac{1}{1+exp\left[-\frac{(d(c_i,c_j)-\beta)^{\alpha}}{\sigma^{\alpha}}\right]}$$

[0152]

[0153] 여기서 σ, α 및 β는 미리 정한 상수이다. 또 다른 예에서, 가중 함수는 세포(c_i)와 세포(c_j) 사이의 유클리드 거리의 감소 함수이다. 또 다른 예에서, 가중 함수는 거리가 미리 정한 상수(T_d)보다 작은 경우 1을 연결시키고, 그렇지 않으면 0을 연결시키는 세포(c_i)와 세포(c_j) 사이의 거리의 헤비사이드(Heaviside) 함수이다.

[0154] 양성 함수($p(c_i)$)의 일 특정 예는 다음과 같은 경우에 세포(c_i)에 대해 1을 연결시키고

[0155] [식 13]

$$\left(\sum_{(c_j)_{j\in\pi_i}}\left[OD_M^j > T_p\right]\right) > T_n$$

[0156]

[0157] 그렇지 않으면 0을 연결시킨다.

[0158] **C. 유방암 환자를 기반으로 한 예측 방법의 검증.**

[0159] 도 14의 방법에 따라 생성된 신규 예측 ADC 점수의 정확도를 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)을 이용한 I상 임상 시험인 환자 시험(J101 NCT02564900)을 기반으로 검증하였다. J101 환자 시험의 데이터 세트는 유방암과 위암을 포함한 여러 암 유형을 가지는 환자에 대한 염색된 조직 이미지와 치료법 반응률을 포함한다. 예측 ADC 점수의 첫 번째 검증은 다양한 HER2 발현 수준(1+, 2+, 3+)을 가지는 151명의 유방암 환자의 데이터를 기반으로 하였다. 병리학자의 주석을 사용하여 반응 점수를 훈련하였으며, 일반화 및 견고성을 보장하기 위해 채점 방법의 성능을 보이지 않는 데이터에서 검증하였다. J101 데이터에 반응 점수를 맹목적으로 적용하였다. 생존 예측과 연결된 특징을 도출하기 위해 광학 밀도 OD(갈색 DAB 염색 강도 수준)를 검출된 막에서 산출하였다. 양성 환자군에서 객관적 반응률(ORR)을 최대화하고 음성 환자군에서 (ORR)을 최소화하도록 반응 점수 특징을 선택하였다. 객관적 반응률은 치료법에 대해 부분 반응 또는 완전 반응을 나타내는 그룹 내 환자의 비율이다. 부분 반응은 30%에서 100% 사이의 종양 수축으로 정의된다. 완전 반응은 종양이 100% 수축되고 종양이 제거되는 것이다.

[0160] 하기 설명된 분석 검증은 병리학자가 주석을 단 통합된 막에서 측정한 광학 밀도(R=0.995)에 대해 도 14의 방법에 따라 이미지 분석을 사용하여 검출된 막에서 측정된 광학 밀도 값(R=0.993)의 높은 상관관계를 입증한다. 도 27은 서로 비교하여 얼마나 일관되게 병리학자가 막에 주석을 다는지 비교하는 다이어그램이다. 다이어그램은 첫 번째 병리학자가 식별한 막 염색의 광학 밀도 내지 두 번째 병리학자가 식별한 광학 밀도를 나타낸다. 다이어그램에서 광학 밀도의 척도는 0에서 300까지 열거되어 있지만, 실제 광학 밀도는 0 내지 220의 범위에서 측정된다. 광학 밀도는 때때로 대안적으로 본 출원에서 측정된 광학 밀도를 220으로 나누어 0 내지 1의 범위로 표시된다. 도 28은 이미지 분석을 사용하여 검출된 막이 병리학자가 식별한 막과 어떠한 상관관계가 있는지를 비교하는 다이어그램이다. 2개의 다이어그램의 산점도를 비교하면 도 14의 방법의 이미지 분석이 병리학자들이 하는 것처럼 거의 일관되게 막을 검출함이 입증된다. 더욱이, 이미지 분석에서 파생된 반응 점수는 병리학자의 HER2 IHC 테스트 점수와 대체로 일치했지만, 또한 IHC 및 ISH 염색 범주 사이에 광범위한 정량적 오버레이를 나타내었다. 도 14의 방법을 사용한 채점은 전체 분석 범위에 걸쳐 객관적 반응률(ORR)과 증가된 HER2 발현 사이의 직접적인 선형 관계를 나타내었다.

[0161] HER2-표적화 치료법은 암이 (i) 면역조직화학(IHC) 염색으로부터 HER2의 발현에 대해 >0 및 <1+, (ii) 면역조직화학 염색으로부터 HER2의 발현에 대해 1+ 및 (iii) 면역조직화학(ISH) 염색으로부터 HER2의 발현에 대해 2+이고 동시에 제자리 혼성화 염색으로부터 HER2의 발현에 대해 음성(-)인 점수를 할당받은 "HER2 낮음" 환자에 대해 현재 승인되어 있지 않다.

[0162] 도 29는 HER2 IHC 1+ 점수를 가지는 것과 대조적으로 반응의 질과 HER2 IHC 2+ 점수를 가지는 것 사이의 낮은 상관관계를 예시한다. IHC 2+ 점수를 가지는 HER2-음성 코호트의 J101 시험으로부터의 유방암 환자 모두가 IHC 1+ 점수를 가지는 코호트의 환자보다 일관되게 더 나은 반응을 갖지는 않았다. 다이어그램에서 오른쪽에 긴 막대로 표시된 환자는 왼쪽에 있는 환자보다 종양 크기가 더 크게 감소한 것으로 나타났다. 오른쪽의 종양 크기가 30% 초과로 축소된 환자는 항-HER2 ADC 치료법에 대한 반응을 나타낸 것으로 간주된다. 종양이 30% 미만으로 축소되고 30% 미만으로 성장한 환자는 안정 질환을 가지는 것으로 간주된다. 그리고 종양 크기가 30% 초과로 증가한 환자는 진행성 질환을 가지는 것으로 간주된다. 치료법에 반응을 보인 것으로 도 29의 다이어그램에 나타낸 22명의 환자 중, 9명은 IHC 점수가 1+이고, 13명은 IHC 점수가 2+이다. 따라서 HER2 IHC 점수는 환자가 치료법에 대한 반응을 나타내는지 여부에 대한 양호한 예측 인자가 아니다.

[0163] 도 30은 HER2-양성 반응 점수를 가지는 DESTINY-Breast01 연구로부터의 168명의 환자에 대한 반응(종양 크기의 변화)을 예시한다. 도 30은 HER2-양성으로 채점된 환자의 약 85%가 치료법에 대한 반응(30% 초과의 종양 감소)을 나타내었고, 15%는 안정 질환을 가졌으며, 오직 1명의 환자만이 진행성 질환을 가졌다는 것을 예시한다. 따라서, HER2 IHC 점수 3+ 및 2+와 ISH+는 2+의 점수보다 항-HER2 ADC 치료법에 대한 반응의 더 나은 예측 인자였으며, 1+ 점수는 항-HER2 ADC 치료법에 대한 반응 없음의 예측 인자였다.

[0164] 도 31은 IHC 채점의 HER2-음성 범주에 속하는 151명의 J101 유방암 환자 중 65명의 코호트가 여전히 항-HER2 ADC 치료법에 대해 42%의 유리한 객관적 반응률(ORR)을 나타냄을 예시한다. HER2-표적화 치료법이 현재 승인되지 않은 J101 환자의 이러한 HER2-음성 코호트(n=65)에서, 환자의 42%는 여전히 11개월의 무진행 생존 기간 중앙값(mPFS)으로 항-HER2 ADC 치료법에 반응하였다. 따라서, 도 14의 방법을 사용한 채점은 항-HER2 ADC 치료법에 유리한 반응을 나타낼 HER2-음성 범주 환자 내에서 식별하는 데 사용될 수 있다. 도 31은 또한 객관적 반응률이 IHC 채점을 사용하여 HER-양성으로 분류된 72명의 환자 코호트에 대해 56%이었고, 이들 환자가 14.1개월의 mPFS로 치료법에 반응하였음을 나타낸다.

[0165] 도 32는 도 14의 방법을 사용한 채점을 사용하여 종래의 HER2-음성 범주에서 65명의 유방암 환자를 추가로 계층화한 것을 예시한다. 신규 예측 ADC 점수의 컷오프를 조정함으로써, 65명의 HER2-음성 그룹 중 40명의 환자를 "QCS 양성"으로 분류하였다. 이 40명의 환자 코호트는 ORR이 52%이었고, 환자들은 14.5개월의 mPFS로 항-HER2 ADC 치료법에 반응하였다. 따라서, 도 14의 방법을 사용하는 채점은 신규 반응 점수가 (미리 결정된 컷오프 초과의 염색 강도를 기준으로) 미리 결정된 임계값을 초과하는 HER2-음성 환자의 하위 그룹을 식별할 수 있었으며, 이는 항-HER2 ADC 치료법에 대한 유리한 반응을 나타낸다.

[0166] 도 33은 도 14의 방법을 사용하여 151명의 J101 유방암 환자 모두를 채점한 결과를 나타낸다. 상단 좌측 도면은 각각의 상피 세포의 세포 중심(작은 점), 핵의 경계, 및 각각의 세포의 경계(막)를 검출한 QCS 이미지 분석의 예시적인 결과를 나타낸다. 핵의 경계와 세포의 경계 사이의 공간은 세포질로 지정된다.

[0167] 도 33의 상단 우측 그래프는 151명의 J101 환자의 막 염색 분포를 나타낸다. 각각의 막대의 높이는 각각의 환자의 HER2-염색 조직 이미지의 종양 세포 막 광학 밀도의 중앙값을 나타낸다. 막대의 음영은 병리학자가 각각의

환자에 대하여 시각적 HER2 채점을 한 것을 나타낸다. 8.04 초과의 막 광학 밀도에서 표시된 "컷오프"는 환자의 전체 J101 코호트의 생존 분석을 기초로 결정되었다. 도 33의 하단 그래프는 단일 환자에 대한 세포 OD 점수 및 이의 분포를 나타내는 히스토그램이다.

[0168] 도 34a는, 151명의 J101 환자를 120명의 "QCS 양성"(QCS+) 환자 및 31명의 "QCS 음성"(QCS-) 환자로 계층화한 것을 나타내는 도 33의 상단 우측 그래프의 더 상세한 형태이다. 120명의 환자 그룹은 조직 샘플에 있는 세포의 적어도 90%가 미리 결정된 임계값인 0.0365(8.04/220)를 초과하는 HER2 막 염색의 광학 밀도를 나타내었기 때문에 "QCS 양성"(QCS+)으로 채점되었다. 120명의 "QCS 양성"(QCS+) 환자 그룹은 도 34b의 표에 나타낸 바와 같이 56%의 객관적 반응률(ORR) 및 14.1개월의 평균 무진행 생존 기간(mPFS)을 나타내었다.

[0169] 신규 반응 점수는 또한 26%의 객관적 반응율(ORR) 및 9개월의 평균 무진행 생존 기간(mPFS)을 가지는 31명 환자의 "QCS 음성" 그룹을 식별하였다. 따라서, 도 14의 채점 방법은 151명의 J101 유방암 환자 중 더 큰 비율이 병리학자가 종래의 HER2 IHC 채점을 한 것보다 항-HER2 ADC 치료법으로 이익을 얻을 수 있음을 확인하였다. 그럼에도 불구하고 항-HER2 ADC 치료법으로부터 이익을 얻을 수 있는 종래의 HER2-음성 IHC 채점 그룹에서 환자를 식별하는 능력은 이 HER2-음성 그룹의 환자에 의한 효과적인 치료법에 대한 충족되지 않은 높은 요구가 있기 때문에 중요하다.

[0170] 반응 점수를 생성하는 데 사용되는 단일-세포 점수의 염색 강도 컷오프를 J101 환자를 높은 ORR을 가지는 첫 번째 그룹과 낮은 ORR을 가지는 두 번째 그룹으로 나누기 위해 조정한다. 가장 높은 ORR을 가진 첫 번째 그룹과 가장 낮은 ORR을 가진 두 번째 그룹으로의 J101 환자의 최상의 계층화는 적어도 최소량의 HER2를 발현하는 더 큰 비율의 종양 세포를 포함하도록 단일-세포 점수의 염색 강도 임계값을 0.0365(8.04/220)로 낮춤으로써 달성되었다. 이러한 8.04/220의 염색 강도 임계값은 더 높은 수준의 HER2를 발현하는 단지 소수의 세포만 포함하도록 더 높은 염색 컷오프를 설정하는 현재 임상 지침과 대조된다.

[0171] 도 34a의 막대 그래프는 151명의 J101 유방암 환자 각각에 대한 종래의 HER2 IHC 점수를 나타내며, 이는 막대의 음영으로 표시된다. 예를 들어, 점수가 IHC 3+인 환자에 대한 막대는 두 번째로 가장 어두운 회색이고 점수가 IHC 1+인 환자에 대한 막대는 흰색이다. 가장 높은 막 광학 밀도에 해당하는 HER2 IHC 3+ 점수를 가지는 환자를 제외하고 동일한 HER2 IHC 점수를 가지는 모든 환자가 함께 그룹화되지 않는다는 것은 분명하다. 그러나 막 광학 밀도가 훨씬 낮은 환자도 또한 항-HER2 ADC 치료법에 잘 반응할 가능성이 있었다. ORR이 56%인 환자 그룹(n=120)은 "HER 양성"으로 정의된다. 이 그룹의 환자는 조직 슬라이드에 있는 세포의 적어도 90%가 미리 결정된 강도 임계값인 0.0365(8.04/220)(이는 2+인 종래 HER IHC 점수에 사용된 강도 임계값보다 작음)보다 큰 HER2 염색의 광학 밀도를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0172] 또 다른 구현예에서, 적어도 염색 강도의 미리 결정된 임계값을 가지는 것으로 계수된 세포는 또한 임계값 초과의 염색을 가지는 세포에 근접하여 있지만 자체적으로 임계값 미만의 염색을 가지는 세포를 포함한다. 따라서 반응 점수는 또한 세포를 미리 결정된 광학 밀도 임계값(양성 세포) 초과로 막 염색을 나타내거나 양성 세포로부터 미리 결정된 거리 내에 있는 것으로 특성화함으로써 염색된 세포의 공간적 이질성을 고려한다.

[0173] 도 35는 염색된 세포의 인근에 있는 세포를 또한 고려하는 구현예에 대해 도 14의 방법을 사용하여 식별된 HER2-음성 코호트에서 J101 유방암 환자의 두 그룹에 대한 무진행 생존율의 카플란-마이어 곡선 그래프이다. 이 방법은 HER2-음성 코호트에서 65명의 유방암 환자에 대한 생존 확률을 나타내는 점수를 생성한다. 상단 곡선은 더 나은 생존 결과를 가지는 환자 그룹을 나타내며, 이는 세포의 95%가 (i) 적어도 최소 임계값의 HER2 염색 광학 밀도를 나타내거나 (ii) 최소 염색을 나타내는 세포로부터 최소 거리 내에 위치하는 환자에 해당한다.

[0174] 방법에서, 각각의 조직 샘플의 모든 상피 세포는 0.04077(8.97/220)보다 큰 막에서의 평균 광학 밀도를 나타내는 것으로 확인되며; 이들 세포를 "p1"로 지정한다. 그 다음 0.04077 미만의 막에서의 평균 광학 밀도를 나타내지만, p1 세포로부터 20 um(미크론) 거리 내에 있는 조직 샘플의 모든 상피 세포가 식별되며; 이들 세포를 "p2"로 지정한다. 그 다음 "p12" 세포의 백분율은 (p1의 수 + p2의 수)/(조직 샘플의 모든 상피 세포의 수)로 산출된다. 환자는 더 높은 생존 확률을 가지며 p12 세포의 백분율이 95%보다 크면 상단 카플란-마이어 곡선에 있다.

[0175] 상단 곡선의 환자는 평균 무진행 생존 기간이 16개월이었고, 하단 곡선의 환자는 평균 무진행 생존 기간이 9개월이었다. 더 긴 생존성과 항-HER2 ADC 치료법에 대한 더 나은 반응을 가지는 상단 곡선의 환자는 HER2-음성 세포 중에서 HER2-양성 세포의 보다 균일한 분포를 가진다. 대부분의 HER2 양성 세포가 함께 뭉쳐서 HER2-음성 세포로부터 임계 최소 거리(이 예에서는 20 um) 내에서 종양 조직에 분포하지 않으면, HER2-양성 세포를 표적으로

하는 항-HER2 ADC는 HER2-음성 세포에 충분히 가까이 접근하지 못하여 임의의 상당한 방관자 효과를 갖는다. 신규 예측 QCS 점수는 세포 독성 페이로드를 HER2-양성 세포로 방출하는 ADC의 인근 암 세포에 대한 효과로부터 개선된 반응을 나타낼 동종 HER2 발현이 있는 환자를 식별한다. 상단 카플란-마이어 곡선에 나타낸 것과 유사한 항-HER2 ADC 치료법에 대한 반응을 달성하기 위해, 임상의는 항-HER2 ADC 치료법을 새로운 반응 점수가 조직 샘플에서 95% 초과의 p12 세포인 각각의 환자에게 투여할 것이다.

[0176] 도 36은 p1 세포의 최소 거리 내에 있는 p2 세포를 또한 고려하는 구현예에 대해 도 14의 방법을 사용하여 전체 151명의 J101 환자로부터 두 그룹의 환자에 대한 무진행 생존율의 카플란-마이어 곡선 그래프이다. 이 방법은 J101 시험의 151명의 유방암 환자에 대한 생존 확률을 나타내는 점수를 생성한다. 상단 곡선은 더 나은 생존 결과를 가지는 환자 그룹을 나타내며, 이는 세포의 95%가 (i) 적어도 최소 임계값인 0.0481(10.59244/220)의 HER2 염색 광학 밀도를 나타내거나 (ii) 최소 염색을 나타내는 세포로부터 최소 거리 20 um 내에 위치하는 환자에 해당한다. 상단 곡선의 환자는 평균 무진행 생존 기간이 19개월이었고, 하단 곡선의 환자는 평균 무진행 생존 기간이 11개월이었다.

[0177] 도 37은 도 14의 방법에서 사용되어 조직 샘플의 모든 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 각각의 암 환자의 생존 확률을 나타내는 점수를 생성하는 다른 매개변수 및 특징을 나타낸다. 도 37의 하위 10개 특징은 표지된 특징의 특정 매개변수를 사용하여 얻은 2개의 곡선 사이의 최상의 계층화(로그 순위 p-값으로 측정됨)에 따라 순위가 매겨진다.

[0178] 도 37의 상위 9개 특징은 표지된 특징의 특정 매개변수를 사용하여 얻은 상단 곡선의 환자의 평균 객관적 반응률에 따라 순위가 매겨진다. 특징 #1은 양성 종양 세포의 백분율을 기반으로 환자를 분류하며, 여기서 양성은 막 광학 밀도가 5 초과인 것으로 정의된다. 특징 #2는 양성 종양 세포의 백분율을 기반으로 환자의 순위를 매기며, 여기서 양성은 세포 광학 밀도가 5 초과(세포질 및 막 둘 다의 평균 광학 밀도)인 것으로 정의된다. 특징 #3은 양성/음성 세포 분류를 사용하여 환자를 계층화하는 방관자 점수이며, 여기서 양성 세포는 막 광학 밀도가 25 초과이고 점수는 100 um 반경 내의 모든 세포를 고려한다. 특징 #4는 양성/음성 세포 분류를 사용하여 환자를 분류하는 방관자 점수이며, 여기서 양성 세포는 막 광학 밀도가 10 초과이고 점수는 50 um 반경 내의 모든 세포를 고려한다. 특징 #5는 양성/음성 세포 분류를 사용하여 환자를 분류하는 방관자 점수이며, 여기서 양성 세포는 막 광학 밀도가 25 초과이고 점수는 50 um 반경 내의 모든 세포를 고려한다. 특징 #6은 각각의 종양 세포에 대한 막 광학 밀도와 세포질 광학 밀도의 차이를 산출한 다음, 생성된 히스토그램의 15% 분위수 값을 취하여 환자의 순위를 매긴다. 특징 #7은 양성/음성 세포 분류를 사용하여 환자를 분류하는 방관자 점수이며, 여기서 양성 세포는 막 광학 밀도가 10 초과이고 점수는 10 um 반경 내의 모든 세포를 고려한다. 특징 #8은 각각의 종양 세포에 대해 막 광학 밀도 * (막 광학 밀도 - 세포질 광학 밀도)를 계산한 다음, 생성된 히스토그램의 10% 분위수 값을 취하여 환자를 계층화한다. 특징 #9는 각각의 종양 세포에 대해 막 광학 밀도 * (최대(0, 막 OD - 세포질 OD))를 계산한 다음, 생성된 히스토그램의 10% 분위수 값을 취하여 환자의 순위를 매긴다.

[0179] 항-HER2 ADC 치료법에 대한 환자의 반응을 예측하기 위한 도 14의 방법은 선택적으로 암 세포 객체의 염색 특성에 추가적으로 기질 종양 침윤 림프구(TIL)의 존재를 기반으로 할 수 있다. 하기에 설명된 검증은 또한 TIL을 기반으로 한 도 14의 변형된 채점 방법이 객관적 반응률(ORR)과 증가된 HER2 발현 및 TIL 유병률 사이에서 훨씬 더 우수한 일치성을 나타낸 것을 입증한다. 종양 침윤 림프구(TIL)는 주로 세포독성(CD8+) T 세포와 헬퍼(CD4+) T 세포로 구성된다. CD8+ T 림프구는 유리한 임상 결과와 상관관계가 있으며, 유방 병변에 기질 TIL 수가 더 많은 환자는 트라스투주맙으로 치료할 때 더 나은 생존을 나타낸다. HER2 염색으로부터 추출된 이미지 분석-기반 특징과 TIL 유병률을 결합하면, 특히 HER2 발현 수준이 낮은 종양을 가지는 유방암 환자의 경우 항-HER2 ADC 치료법에 대해 암 환자가 어떻게 반응할 것인지를 예측하기 위한 도 14의 방법에 의해 생성된 환자 점수의 정확도가 개선된다.

[0180] 도 14의 방법의 추가적인 단계에서, 염료에 연결된 항-Her2 진단용 항체로 면역조직화학적으로 염색된 조직의 디지털 이미지에 대해 딥 러닝-기반 이미지 분석을 수행한다. 콘볼루션 신경망을 훈련시켜 HER2 염색 IHC 이미지에서 TIL을 검출한다. TIL 자체가 염색된 HER2는 아니지만, HER2가 염색된 IHC 이미지로부터 직접 TILS를 검출하기 위해 딥 러닝-기반 모델을 개발하였다. TIL 검출 모델의 경우, 관심이 있는 영역의 별도 하위 집합에 TIL에 대하여 주석을 달았다. TIL을 표시하는 데 포인트 주석을 사용하였으며, 이는 기능적 염색의 부재시 세포질이 거의 없고 핵이 있는 균질한 질감을 가지는, 원형 내지 다각형의 비교적 작은 세포로 특징지어진다. 종양-연관 기질에 위치한 TIL 및 상피내 TIL만이 주석을 달고 검출되었다. TIL 검출 모델은 주석이 달린 종양 코어 영역 내의 비-상피 영역에 적용되었다. TIL 중심은 획득된 후방 맵을 임계값으로 설정한 후 비최대값 억제에 의

해 검출되었다.

[0181] 도 14의 방법의 또 다른 추가적인 단계에서, 각각의 HER2 염색된 IHC 이미지에 대해 TIL 점수가 산출된다. 따라서 HER2 염색-기반 점수에 추가적으로, 방법은 염색된 조직에서 검출된 TIL의 밀도를 바이오마커로 사용한다. 이 모델은 (i) 주석이 달린 전체 종양 영역 내 모든 TIL의 밀도, (ii) 분할된 종양-연관 기질의 TIL 밀도, 및 (iii) 상피 내 TIL 밀도의 3가지 밀도를 산출한다.

[0182] 예측 ADC 점수의 정확도를 개선시키기 위해, TIL-기반 특징을 HER2 염색 기반 특징과 조합하여 사용하였다. 특징의 최적 조합은 코호트의 모든 환자의 카플란-마이어 곡선에 대한 로그 순위 테스트 p-값으로 표시된 바와 같이 환자 코호트를 무진행 생존율(PFS)이 더 긴 그룹과 PFS가 더 짧은 그룹으로 가장 잘 나누는 것이다. 도 37의 하단 표는 로그-순위 p-값에 의해 표시된 바와 같이 각각의 특징이 카플란-마이어 그래프의 2개의 곡선 사이에서 개별적으로 달성하는 계층화에 의해 순위가 매겨지는 3개의 TIL-기반 특징 및 7개의 HER2-염색 특징을 포함한다.

[0183] 도 38은 3개의 추가적인 특징의 표이고 더 오래 생존하는 환자와 더 짧게 생존하는 환자에 대한 로그 순위 테스트 p-값과 예측되는 객관적 반응률(ORR)을 비교한다. 도 38의 표는 TIL-기반 특징, HER2+ 종양 세포의 밀도 기반 특징, 및 151명의 유방암 환자 코호트의 J101 데이터세트에서 계산된 정의된 인근 내 HER2+ 세포 기반 특징을 포함한다. 표의 p-값은 모델 컷오프가 훈련 세트에서 훈련된 다음 검증 세트에 적용되는 교차 검증에 의해 결정되었다. 생성된 교차 검증된 모델은 CM으로 약칭한다. 예를 들어, TIL 밀도 특징의 경우, 환자를 높은(QCS+) 및 낮은(QCS-) CM 그룹으로 계층화하기 위한 컷오프는 168이다. 이는 기질의 TIL의 수를 종양 코어 면적(단위: mm^2)으로 나누어 측정한 종양 침윤 림프구의 밀도가 168/mm^2를 초과하면, 환자는 CM-높음 그룹에 속함을 의미한다. HER2+ 세포 밀도 특징의 경우, 컷오프는 1672이다. 이 특징의 경우, 막 광학 밀도가 15를 초과하는 종양 세포의 수를 종양 코어 면적(단위: mm^2)으로 나누어 측정한 양성 종양 세포의 밀도가 1672/mm^2를 초과하면, 환자는 CM-높음 그룹에 속한다. HER2+ 인근 점수의 경우, 컷오프는 37이다. 컷오프는 히스토그램을 생성하기 위해 25 um의 반경을 사용하여 모든 종양 세포에 대해 연속 방관자 점수를 먼저 계산하여 적용된다. 그런 다음 모든 세포의 히스토그램의 5% 분위수가 37보다 크면, 환자는 CM-높음 그룹에 속한다. TIL 밀도 특징은 151명의 환자에 대해 최상의 계층화를 달성하였으며, 그 결과 로그 순위 테스트 p-값은 0.007이었다. HER2+ 세포 밀도에 대한 특징은 카플란-마이어, 로그 순위 p-값 0.011을 가져왔고, HER2+ 인근 점수에 대한 특징은 p-값 0.014를 가져왔다.

[0184] 도 39a 내지 39c는 도 38의 표에 열거된 3가지 특징에 대한 카플란-마이어 곡선을 나타낸다. 도 39a는 TIL 밀도에 대한 카플란-마이어 곡선이고; 도 39b는 HER2+ 세포 밀도에 대한 카플란-마이어 곡선이며; 도 39c는 HER2+ 인근 점수에 대한 카플란-마이어 곡선이다. p-값과 카플란-마이어 곡선으로 표시된 바와 같이, TIL 밀도 특징은 전체 151명의 유방암 환자에게 적용할 때 더 긴 무진행 생존(PFS) 시간과 더 짧은 무진행 생존(PFS) 시간을 가지는 환자 사이에서 최상의 계층화를 제공한다. HER2+ 인근 점수 특징에 대한 도 39c의 카플란-마이어 곡선은 특징 bystander_pot_cut1_20에 대한 도 36의 카플란-마이어 곡선과 유사하며, 이는 각각의 HER2-염색 종양 세포의 20 um 반경 내에서 염색되지 않은 방관자 세포를 고려한다. HER2+ 인근 점수 특징은 25 um의 인근 반경을 사용한다. 이에 비해, 연속 방관자 특징인 도 36의 "bystander_pot_cut1_20"은 시그마=20 um 및 알파=2의 반경을 사용하고 주어진 세포 자체를 포함하여 주어진 세포 주변의 모든 종양 세포의 막 광학 밀도의 가중 합을 결정한다. 거리에 따른 가중치는 "exp(-0.5*(거리/시그마)^2)"로 계산된다.

[0185] 도 40a, 40b 및 40c는 151명의 유방암 환자 중 HER2 양성으로 지정된 72명의 환자에 대해서만 적용했을 때 도 38의 표에 열거된 3가지 특징에 대한 카플란-마이어 곡선을 나타낸다. 다시 TIL 밀도 특징은 p-값이 0.00095인 최상의 계층화를 달성하였다. HER2+ 세포 밀도 특징은 p-값이 0.092이었고, HER2+ 인근 점수 특징은 p-값이 0.046이었다.

[0186] 도 41a, 41b 및 41c는 151명의 유방암 환자 중 HER2 음성으로 지정된 65명의 환자에 대해서만 적용했을 때 도 38의 표에 열거된 3가지 특징에 대한 카플란-마이어 곡선을 나타낸다. 그러나 HER2-음성 코호트의 경우, TIL 밀도 특징은 더 긴 무진행 생존율(PFS)과 더 짧은 무진행 생존율(PFS) 사이에서 최악의 계층화를 제공하였다. TIL 밀도 카플란-마이어 곡선에 대한 p-값은 0.31이다. HER2+ 인근 점수는 p-값이 0.0061인 최상의 계층화를 달성하였다. HER2+ 세포 밀도 특징에 의해 달성된 계층화는 p-값이 0.0064로 거의 양호하였다. HER2+ 인근 점수 특징에 대한 도 41c의 카플란-마이어 곡선은 도 35의 카플란-마이어 곡선과 유사하다.

[0187] 도 39 내지 41의 카플란-마이어 곡선의 결과는 HER2 염색에 기반한 특징과 함께 TIL-기반 특징을 사용하는 것이 항-HER2 ADC 치료법에 유리하게 반응할 환자를 식별하는 도 14의 방법의 정확도를 개선시킨다는 것을 나타낸다.

그러나, TIL-기반 특징의 사용이 항-HER2 ADC 치료법에 유리한 반응을 나타낼 가능성이 있는 HER2-음성 환자의 하위 그룹 중에서 환자를 식별하는 정확도를 개선시키지는 않는다. 이는 종양 침윤 림프구(TIL)가 항-HER2 ADC 치료법에 대한 환자의 즉각적인 유리한 반응을 달성하는 데 필수적인 것은 아니지만, TIL의 존재가 암의 전반적인 진행을 지연시킨다는 것을 시사한다.

[0188] **D. 위암 환자를 기반으로 한 예측 방법의 검증.**

[0189] 트라스투주맙 데룩스테칸(DS-8201)을 이용한 J101 시험은 또한 위암 환자를 포함하였다. J101 시험의 데이터 세트 분석은 항-HER2 ADC 치료법에 대한 반응의 질과 종래 HER2 IHC 채점 사이의 낮은 상관관계가 있음을 나타내었다. 도 14의 방법의 QCS 채점을 사용하여 예측된 반응은 종래 HER2 IHC 채점의 결과로부터 상당히 벗어났다.

[0190] 도 42는 도 14의 방법을 사용하여 32명의 J101 위암 환자 코호트에 대한 채점 결과를 나타낸다. 이 구현예에서 QCS 점수는 샘플 내 모든 종양 세포의 평균 막 광학 밀도의 중앙값을 기반으로 한다. 단일-세포 ADC 점수를 집계하기 위한 통계 연산은 "중앙값"이다. 각각의 단일-세포 ADC 점수는 세포 막의 DAB 광학 밀도의 평균에 의해 생성된다. 환자는 증가하는 QCS 점수에 따라 정렬된다. 도 42는 0, 1+, 2+ 및 3+의 HER2 IHC 점수가 QCS 점수와 잘 일치하지 않음을 나타낸다. 도 42의 막대 도표는 또한 32명의 위암 환자의 임상 결과를 나타내며, 각각의 막대 위에 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), 안정 질환(SD) 및 진행성 질환(PD)으로 열거되어 있다. 도 42는 도 34a의 유방암 환자에 대한 결과와 유사한 위암 환자에 대한 결과를 나타낸다.

[0191] 도 43은 도 14의 방법에서 사용되어 조직 샘플의 단일-세포 ADC 점수를 집계함으로써 항-HER2 ADC 치료법을 받은 각각의 위암 환자의 생존 확률을 나타내는 점수를 생성하는 6개 특징의 표이다. 도 43의 표는 무진행 생존율(PFS)을 기반으로 환자를 계층화함에 있어서 특징에 의해 달성된 로그 순위 테스트 p-값을 비교한다. 표는 또한 더 오래 생존하는 환자의 코호트(카플란-마이어 곡선의 상단 가지에 있는 환자)에 대한 예측된 객관적 반응률(ORR)을 나타낸다. ORR은 ORR에 대한 양의 예측값(PPV)으로 표현된다. 양의 예측값(PPV)은 (관찰된 ORR에 의해) 반응자로 올바르게 예측된 환자의 수를 모든 반응자로 나눈 값이다. ORR은 반응 범주 CR, ORR=참인 경우 PR 및 ORR=거짓인 경우 SD, PD를 사용하여 RECIST에 의해 측정된다. 도 43은 유방암 환자를 계층화하는 데 사용된 도 37 내지 38의 특징과 유사한 위암 환자를 계층화하는 데 사용된 특징을 나타낸다. 더 긴 생존 환자와 더 짧은 생존 환자의 최상의 계층화를 제공하는 특징은 membOD_density_10(종양 면적의 제곱 mm당 10보다 큰 막 광학 밀도(membOD)를 가지는 종양 세포의 밀도)이었으며, 이는 상피 세포의 막 염색의 광학 밀도를 기반으로 하였다. membOD_density_10 특징은 p-값이 0.00594인 계층화를 달성하였다.

[0192] 도 44는 무진행 생존율(PFS)과 대조적으로 전체 생존기간(OS)을 기반으로 하여 항-HER2 ADC 요법을 받은 환자를 계층화하는 데 사용된 모델의 7가지 HER2-염색-기반 특징의 표이다. 따라서, 특징 목록은 PFS가 아닌 OS 기반의 p-값에 최적화되어 있다. 첨도(Kurtosis) 및 왜도(Skewness) 특징은 전체 생존기간을 기반으로 환자의 최상의 계층화를 제공하고 0.0002의 p-값을 달성하였다.

[0193] 도 45는 도 43의 표에 열거된 특징 membOD_density_10에 대한 카플란-마이어 곡선이다. 이 특징에 근거하여, 환자는 QCS-양성이고, 상피에서 막 광학 밀도가 10보다 큰 종양 세포의 밀도가 810/mm^2보다 큰 경우 HER2 ADC 치료법으로부터 이익을 얻을 가능성이 더 클 것이다. 특징 membOD_density_10으로, PFS를 기반으로 32명의 위암 환자를 23명의 환자로 구성된 더 오래 생존하는 코호트와 9명의 환자로 구성된 더 짧은 생존 코호트로 나누었으며, 이 때 p-값은 0.00594이었다.

[0194] 도 46은 도 44의 표에 열거된 특징 membOD_density_10에 대한 카플란-마이어 곡선이다. 특징 membOD_density_10으로, OS를 기반으로 32명의 위암 환자를 23명의 환자로 구성된 더 오래 생존하는 코호트와 9명의 환자로 구성된 더 짧은 생존 코호트로 나누었으며, 이 때 p-값은 0.00731이었다.

[0195] 본 발명은 교육 목적을 위해 구체적인 특정 구현예와 관련하여 설명되었지만, 본 발명은 이에 제한되지 않는다. 기재된 구현예의 다양한 특징의 다양한 변형, 적용, 및 조합이 청구범위에 제시된 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 실시될 수 있다.

도면

도면1

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPAS
PETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQD
IQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYAL
AVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGG
VLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSR
ACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCK
GPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICEL
HCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYL
STDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVC
YGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPES
FDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDS
LPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLR
SLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALL
HTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCS
QFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQ
NGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDL
SYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQ
RASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRK
YTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRK
VKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTS
PKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVT
QLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDLLNWCMQIAKGMSYL
EDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDE
TEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTV
WELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTID
VYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVV
IQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVP
QQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLE
PSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLP
THDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYV
NQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKN
GVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPA
FDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVP
V

(서열번호 1: HER2 단백질의 아미노산 서열)

도면2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(서열번호 2: 항-HER2 항체 중쇄의 아미노산 서열)

도면3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC .

(서열번호 3: 항-HER2 항체 경쇄의 아미노산 서열)

도면4

GFNIKDTY

(서열번호 4: 항-HER2 항체 CDRH1의 아미노산 서열)

도면5

IYPTNGYT

(서열번호 5: 항-HER2 항체 CDRH2의 아미노산 서열)

도면6

SRWGGDGFYAMDY

(서열번호 6: 항-HER2 항체 CDRH3의 아미노산 서열)

도면7

QDVNTA

(서열번호 7: 항-HER2 항체 CDRL1의 아미노산 서열)

도면8

SASFLYS

(서열번호 8: 항-HER2 항체 CDRL2(SAS)의 아미노산 서열)

도면9

QQHYTTPPT

(서열번호 9: 항-HER2 항체 CDRL3의 아미노산 서열)

도면10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSS .

(서열번호 10: 항-HER2 항체 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열)

도면11

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

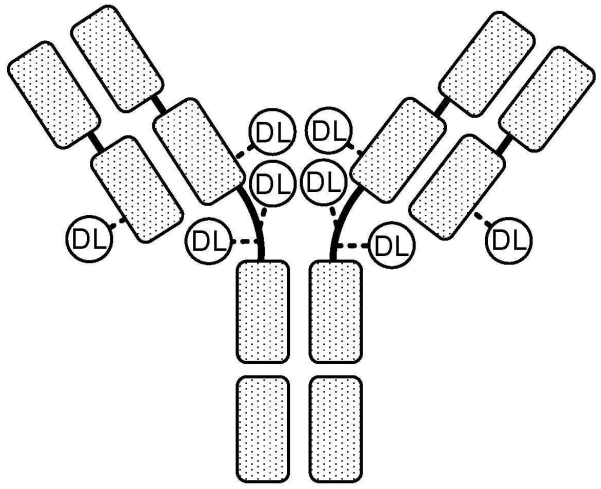
(서열번호 11: 항-HER2 항체 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열)

도면12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

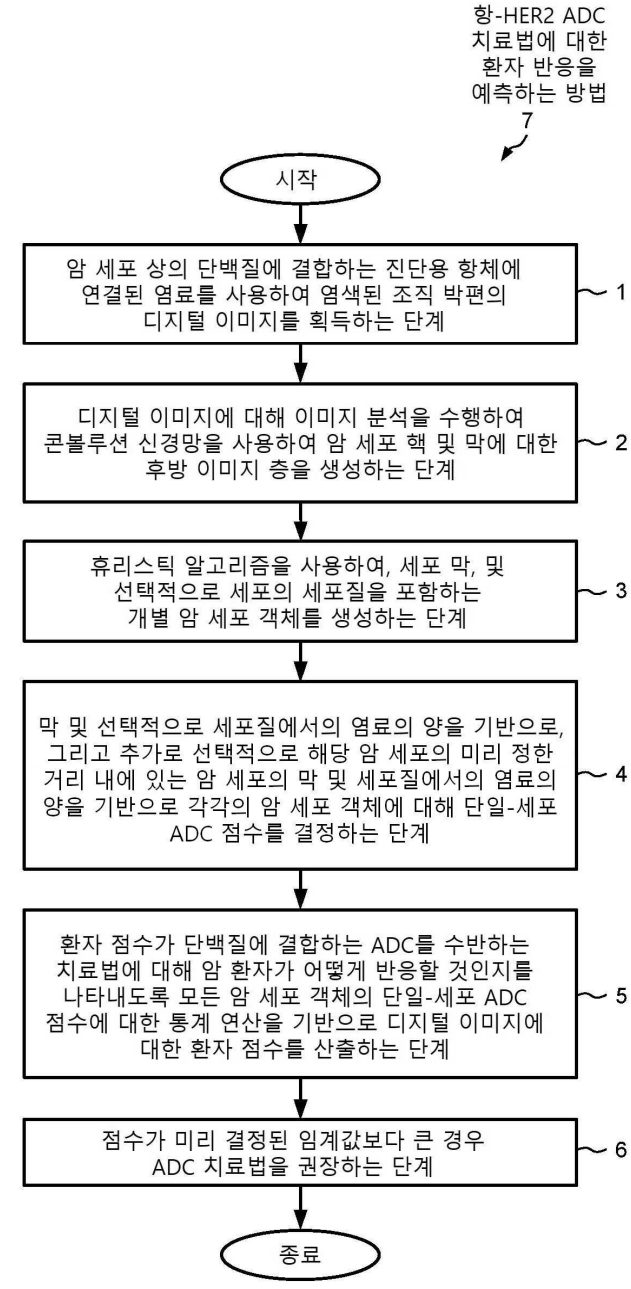
(서열번호 12: 항-HER2 항체 중쇄의 아미노산 서열)

도면13

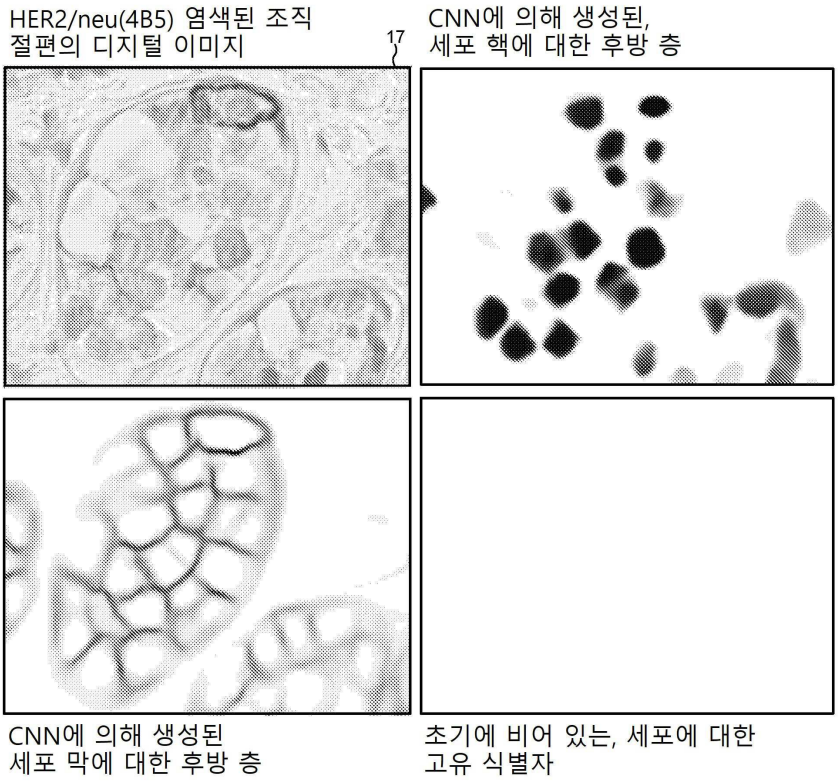


(인간화 항 -HER2 IgG1 mAb[1-3])

도면14

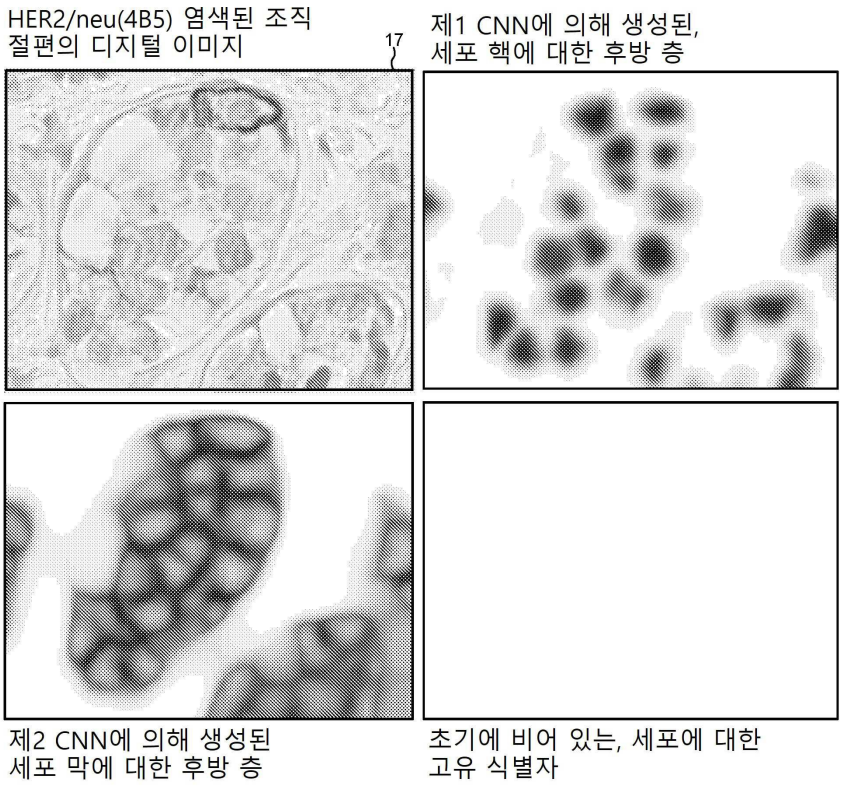

항-HER2 ADC
치료법에 대한
환자 반응을
예측하는 방법
7
시작
암 세포 상의 단백질에 결합하는 진단용 항체에
연결된 염료를 사용하여 염색된 조직 박편의
디지털 이미지를 획득하는 단계
1
디지털 이미지에 대해 이미지 분석을 수행하여
콘볼루션 신경망을 사용하여 암 세포 핵 및 막에 대한
후방 이미지 층을 생성하는 단계
2
휴리스틱 알고리즘을 사용하여, 세포 막, 및
선택적으로 세포의 세포질을 포함하는
개별 암 세포 객체를 생성하는 단계
3
막 및 선택적으로 세포질에서의 염료의 양을 기반으로,
그리고 추가로 선택적으로 해당 암 세포의 미리 정한
거리 내에 있는 암 세포의 막 및 세포질에서의 염료의
양을 기반으로 각각의 암 세포 객체에 대해 단일-세포
ADC 점수를 결정하는 단계
4
환자 점수가 단백질에 결합하는 ADC를 수반하는
치료법에 대해 암 환자가 어떻게 반응할 것인지를
나타내도록 모든 암 세포 객체의 단일-세포 ADC
점수에 대한 통계 연산을 기반으로 디지털 이미지에
대한 환자 점수를 산출하는 단계
5
점수가 미리 결정된 임계값보다 큰 경우
ADC 치료법을 권장하는 단계
6
종료

도면15



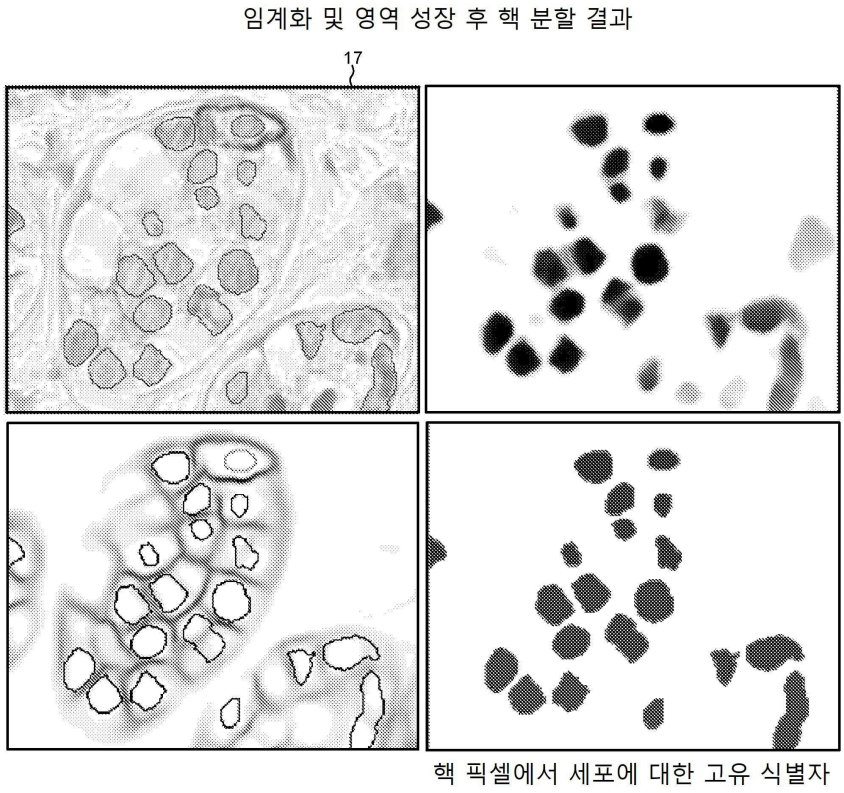
이미지에서, 어두운 부분은 확률이 높은 것에 해당하고, 흰색은 확률이 낮은 것에 해당한다

도면16



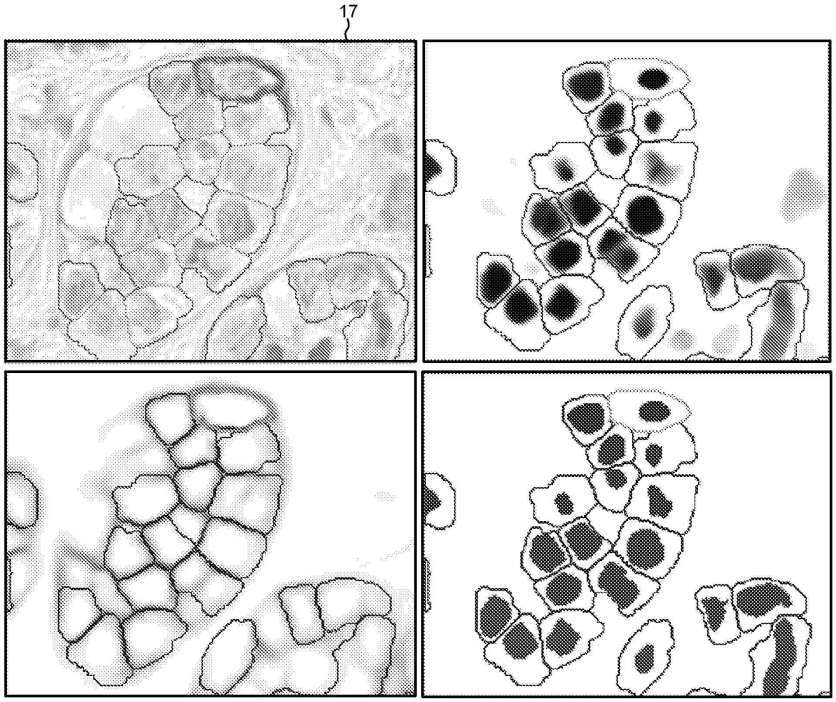
이미지에서, 어두운 부분은 확률이 높은 것에
해당하고, 흰색은 확률이 낮은 것에 해당한다

도면17



도면18

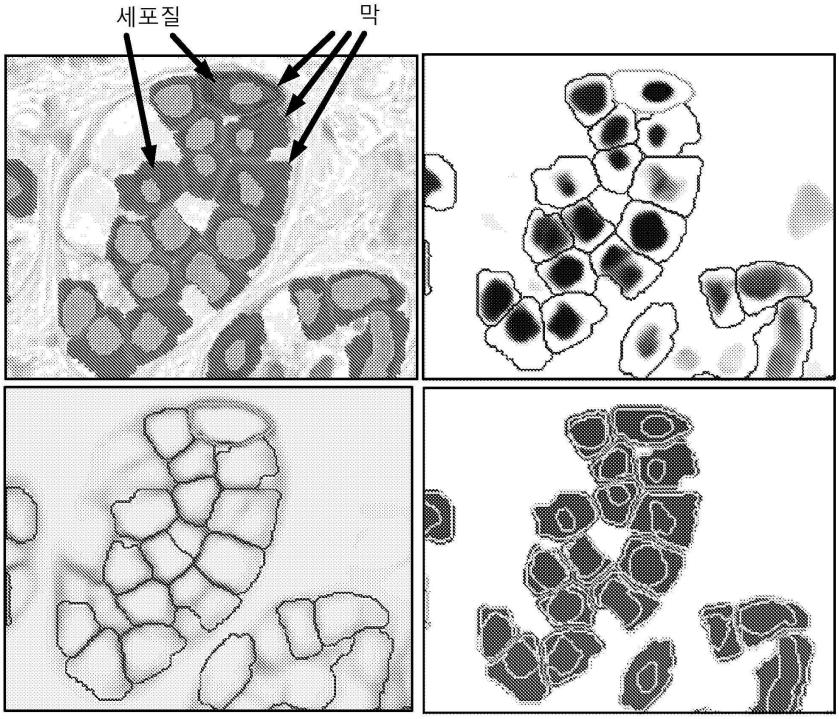
제한이 있는 각각의 핵의 영역 성장에 의한 세포 분할 결과:
(1) 막 후방에서 아래쪽으로 자라지 않음
(2) 세포 경계에 대해 최소한의 객체 밀도 제한 사용



각각의 막 객체에 대한 고유 식별자(UID)는 연관된 핵 객체의 것과 동일함.

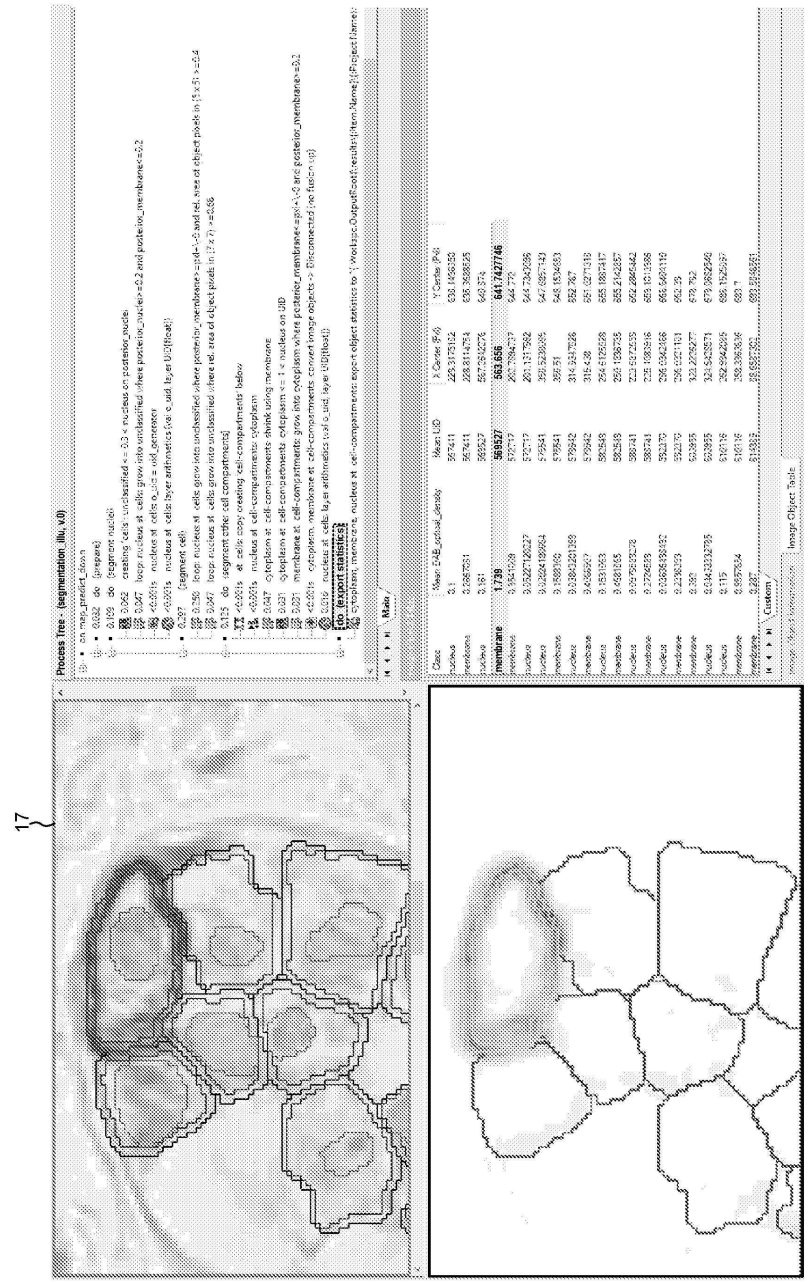
도면19

막으로서 세포 경계 픽셀의 식별, 및 그 후 막 후방이 20%를 초과하는 픽셀로의 막의 영역 성장에 의한 세포질 및 막 분할 결과.



핵, 세포질 및 막 픽셀에서 세포에 대한 고유 식별자

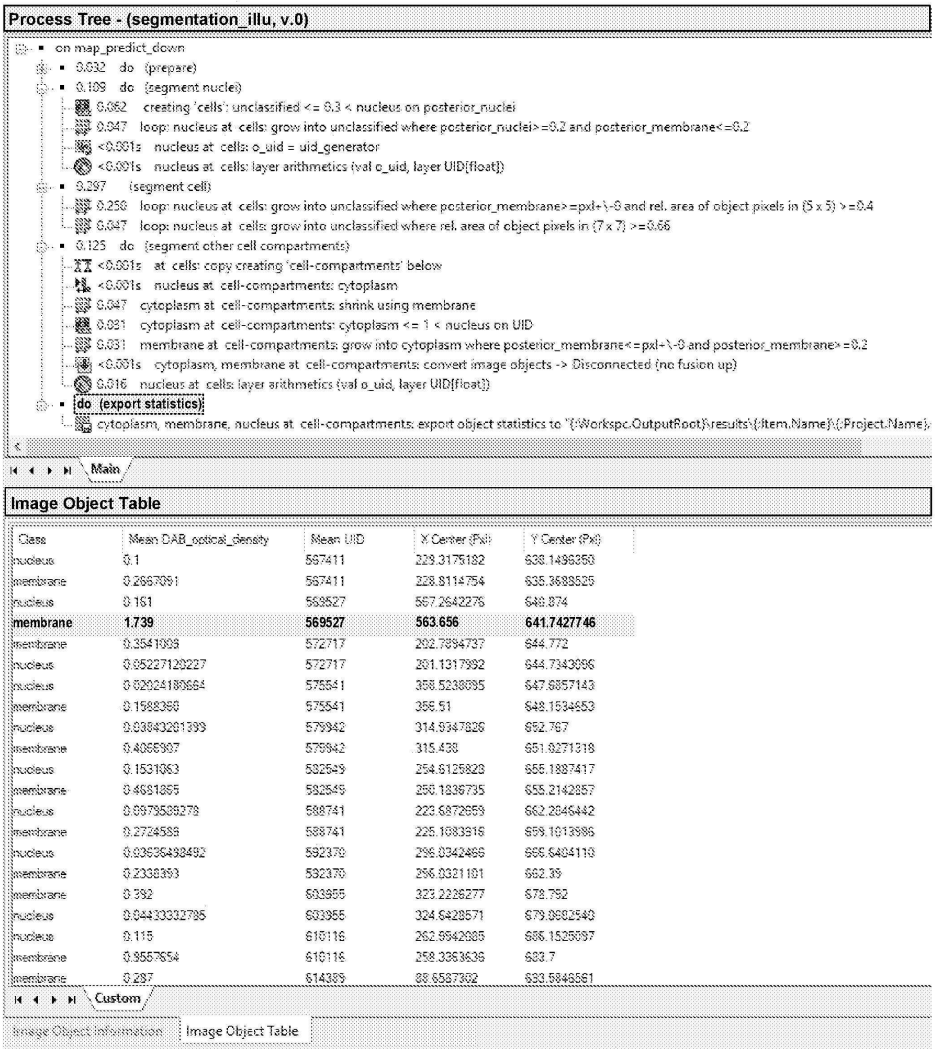
도면20



하단 이미지에서, 어두운 부분은 광학 밀도가 높은 것에 해당하고, 밝은 부분은 광학 밀도가 낮은 것에 해당한다

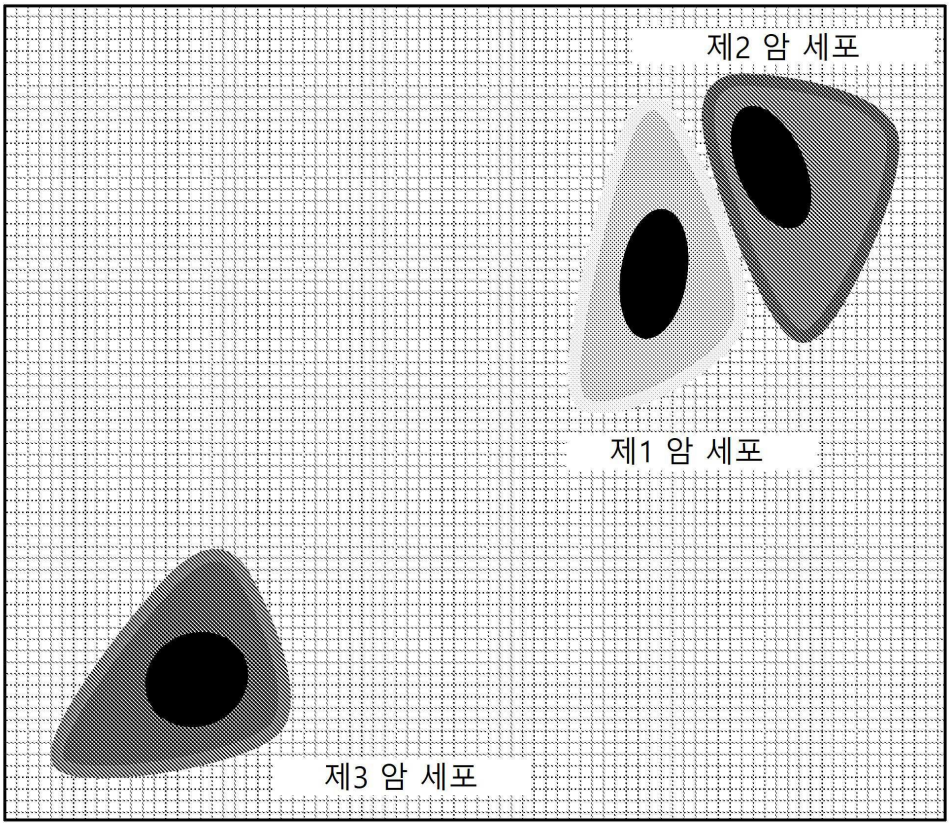
도면21

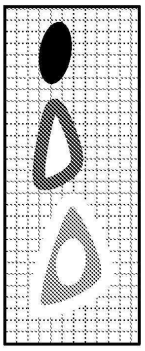
인지 네트워크 언어 스크립트가 세포를 별도의 핵, 세포질 및 막으로 분할하는 데 사용된다.



통계는 이미지의 모든 막과 세포질에 대한 DAB 광학 밀도의 표로 작성된다.

도면22



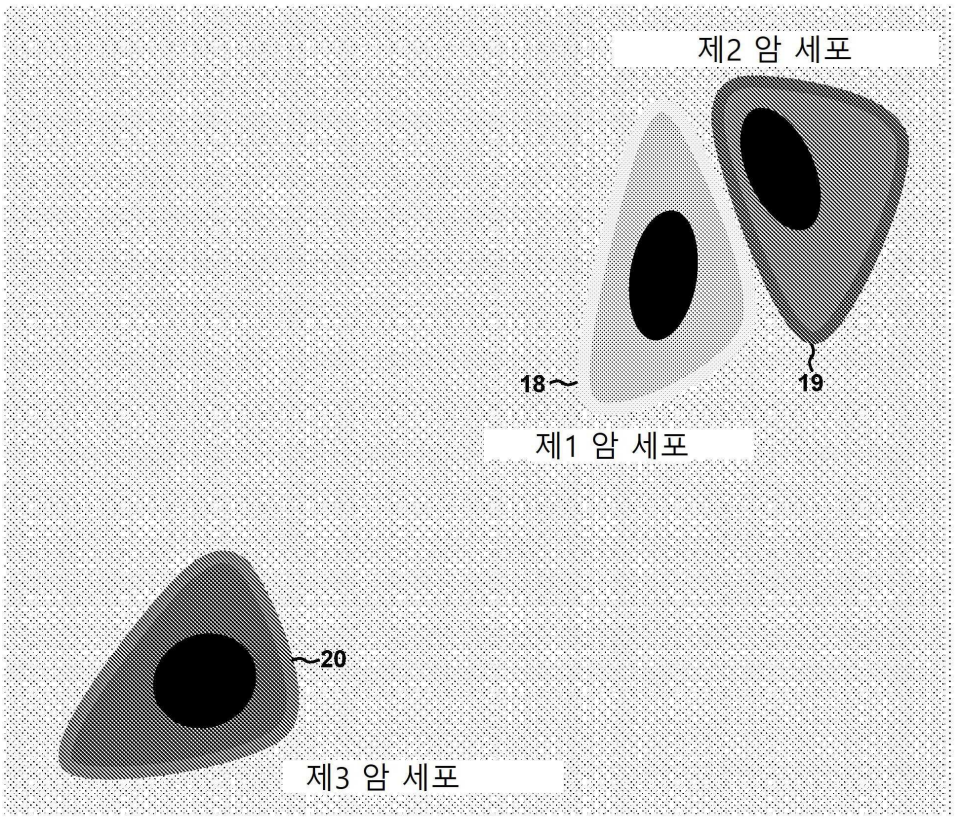


세포 핵

세포 막: 회색 값은 모든 막 픽셀의 평균 DAB 광학 밀도를 나타낸다(더 밝은 부분은 더 많은 양의 진단용 항체에 해당함)

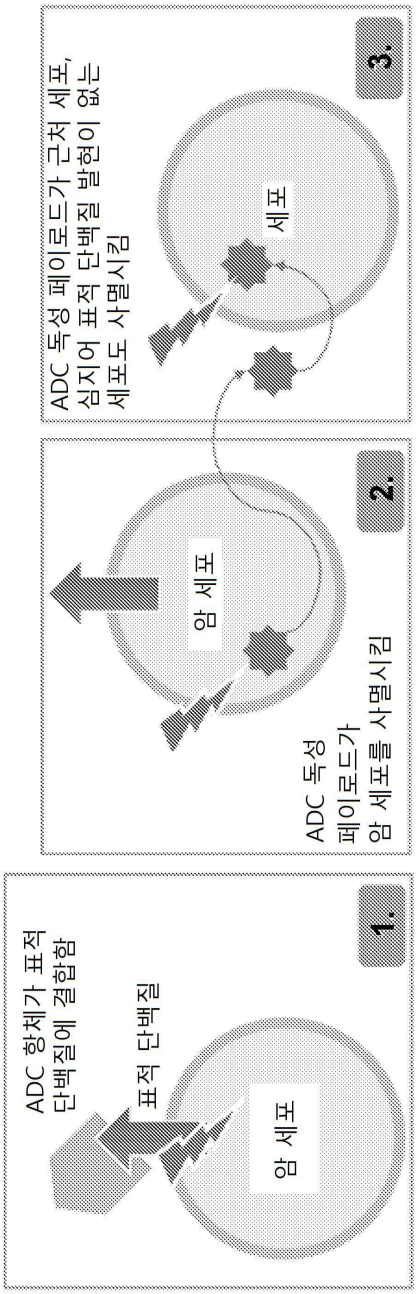
세포의 세포질: 회색 값은 모든 세포질 픽셀의 평균 DAB 광학 밀도를 나타낸다.

도면23



UID	X [픽셀]	Y [픽셀]	광학 밀도 막 (ODM)	광학 밀도 세포질 (ODC)
1	480	190	242/255 = .949	203/255 = .796
2	590	130	94/255 = .369	136/255 = .533
3	140	500	127/255 = .498	94/255 = .369

도면24


1.
ADC 항체가 표적
단백질에 결합함
표적 단백질
암 세포
2.
ADC 독성
페이로드가
암 세포를 사멸시킴
암 세포
3.
ADC 독성 페이로드가 근처 세포,
심지어 표적 단백질 발현이 없는
세포도 사멸시킴
세포

단일 세포 ADC 채점을 이용한 세포 통계

r_1 ~ r_i : UID 1인 세포의 무게 중심에서 UID i인 세포까지의 유클리드 거리.

w_ij = exp (- |r_i ~ r_j | / r_norm) : 인근 세포로부터의 ADC 페이로드 흡수를 포함하는 지수 가중 인자

세포 i에 대한 단일 세포 ADC 점수 = min (K1 , w_ij < 15%인 Sum_j { w_ij x max (0, ODM_j x (K2 + ODM_j – ODC_j)) })

UID	X [픽셀]	Y [픽셀]	광학 밀도 막 (ODM)	광학 밀도 세포질 (ODC)	max(0, ODM x(ODM-ODC))	r_1-r_i	r_2-r_i	r_3-r_i	exp(-(r_1-r_i)/50)	exp(-(r_2-r_i)/50)	exp(-(r_3-r_i)/50)	단일-세포 ADC 흡수
1	480	190	0.949019608	0.796078431	0.145144175	0	125.2996	460.1087	1	0.08159455	0.00010082	0.145144175
2	590	130	0.368627451	0.533333333	0	125.2996	0	582.5805	0.08159455	1	8.705E-06	0.011842974
3	140	500	0.498039216	0.368627451	0.064452134	460.1087	582.5805	0	0.00010082	8.705E-06	1	0.064452134

r_norm=50

공개특허 10-2023-0066094

도면26

암세포가 기능상 손상되거나 사멸될 가능성을 반영하는
각각의 세포에 대한 점수의 생성

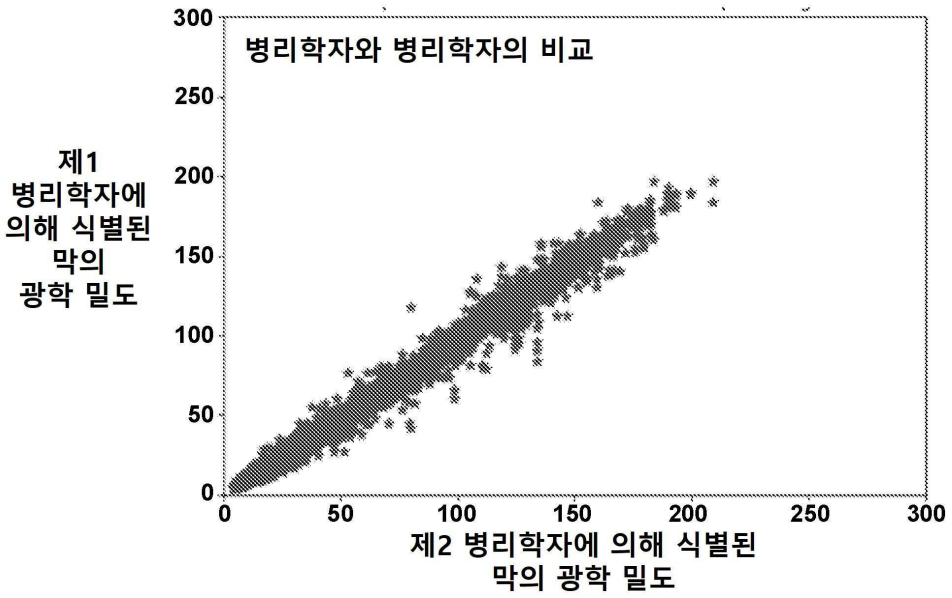
단일 세포 ADC 점수 = 세포막과 세포질에 있는 표적 단백질 양의 이중선형 조합의 이 세포와 인근 세포의 가중 합, 가중치는 이 세포에 대한 인근 세포의 거리에 따라 달라짐.

슬라이드에서 위치가 r_i이고 평균 막(세포질) 광학 밀도 값이 ODM_i (ODC_i)인 세포(i)에 대한 수학

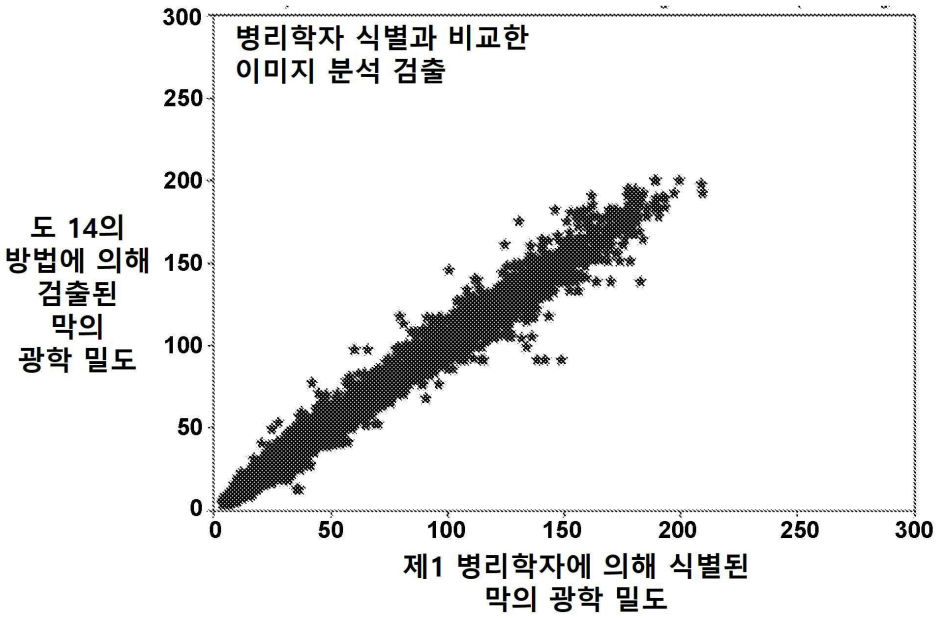
$$\text{단일\_세포\_점수}_i = |r_j - r_i|<d \{ a_{20}(|r_j - r_i|) \times ODM_j^2 + a_{11}(|r_j - r_i|) \times ODM_j \times ODC_j + a_{02}(|r_j - r_i|) \times ODC_j^2 + a_{00}(|r_j - r_i|) \}\text{인 합}_j$$

(여기서, 함수 a_{kl}은 세포(j)에서 세포(i)까지의 거리 $|r_j - r_i|$에 좌우됨, 예를 들어 $a_{kl}(|r_j - r_i|) = A_{kl} \times \exp(- |r_j - r_i|/r_{norm})$(여기서, A_{kl} 및 r_0 상수는 최적화된 치료법 성공 예측에 의해 결정됨)).

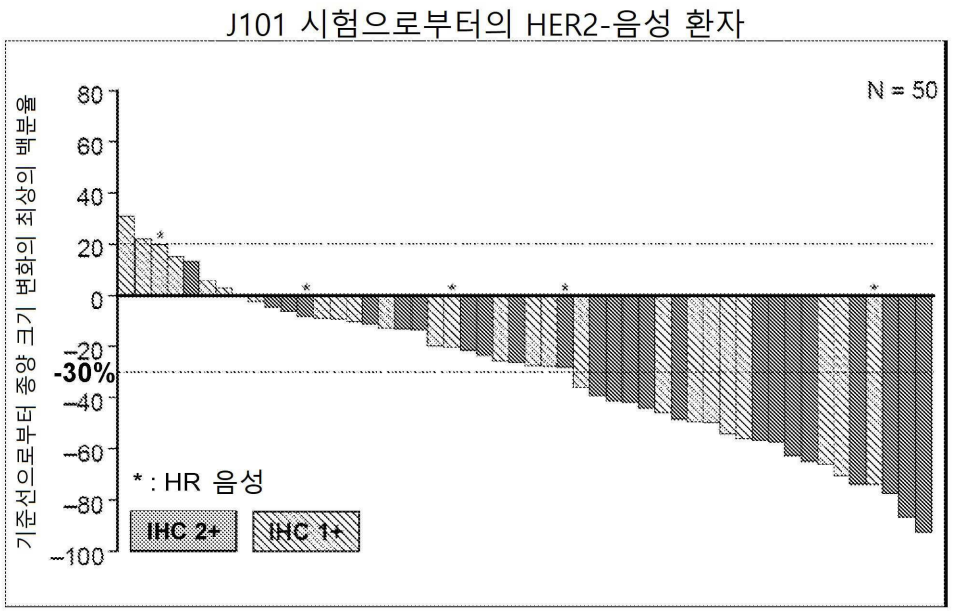
도면27



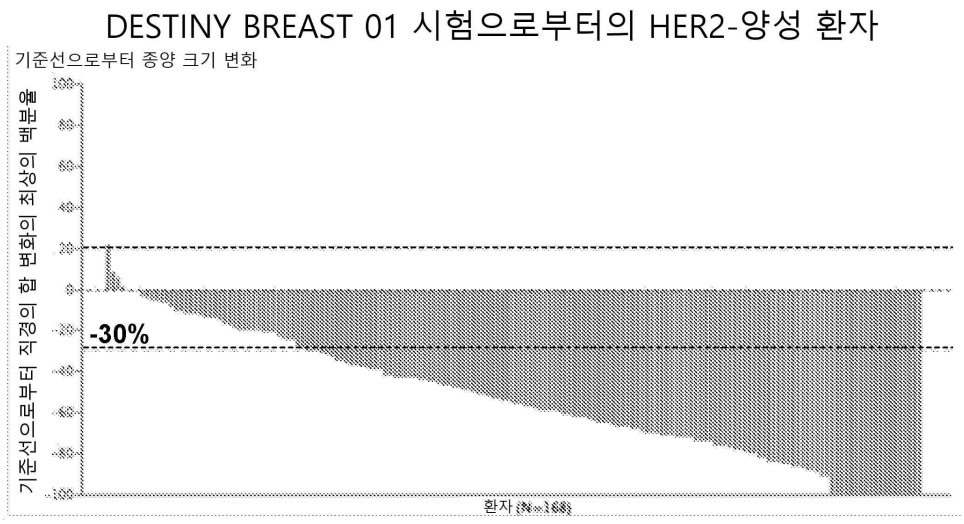
도면28


병리학자 식별과 비교한
이미지 분석 검출
도 14의 방법에 의해 검출된 막의 광학 밀도
제1 병리학자에 의해 식별된 막의 광학 밀도
0
50
100
150
200
250
300

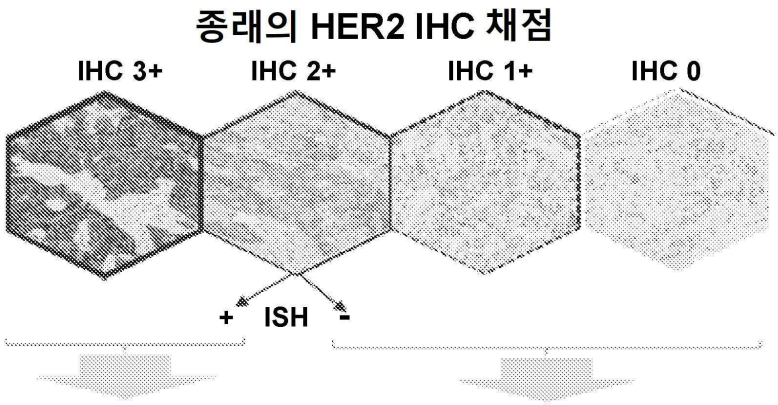
도면29


J101 시험으로부터의 HER2-음성 환자
N = 50
기준선으로부터 종양 크기 변화의 최상의 백분율
80
60
40
20
0
-20
-30%
-40
-60
-80
-100
* : HR 음성
IHC 2+
IHC 1+

도면30



도면31



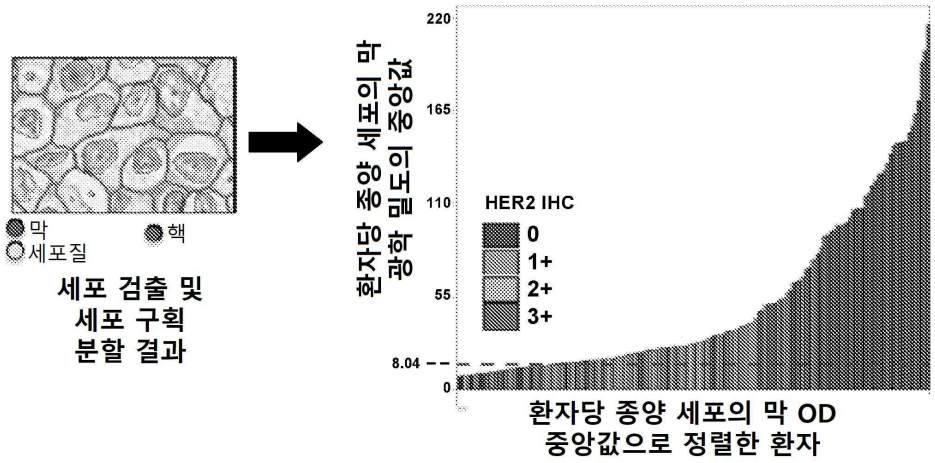
	HER2 양성 (IHC 3+ & 2+ ISH+)	HER2 음성 (IHC 2+/ISH-, 1+, 0)
ORR	56%	42%
mPFS	14.1 mos	11.0 mos
n	72	65

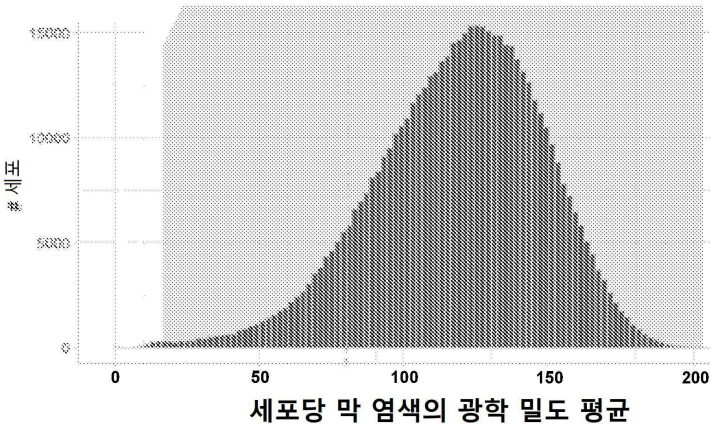
(N=137)

도면32

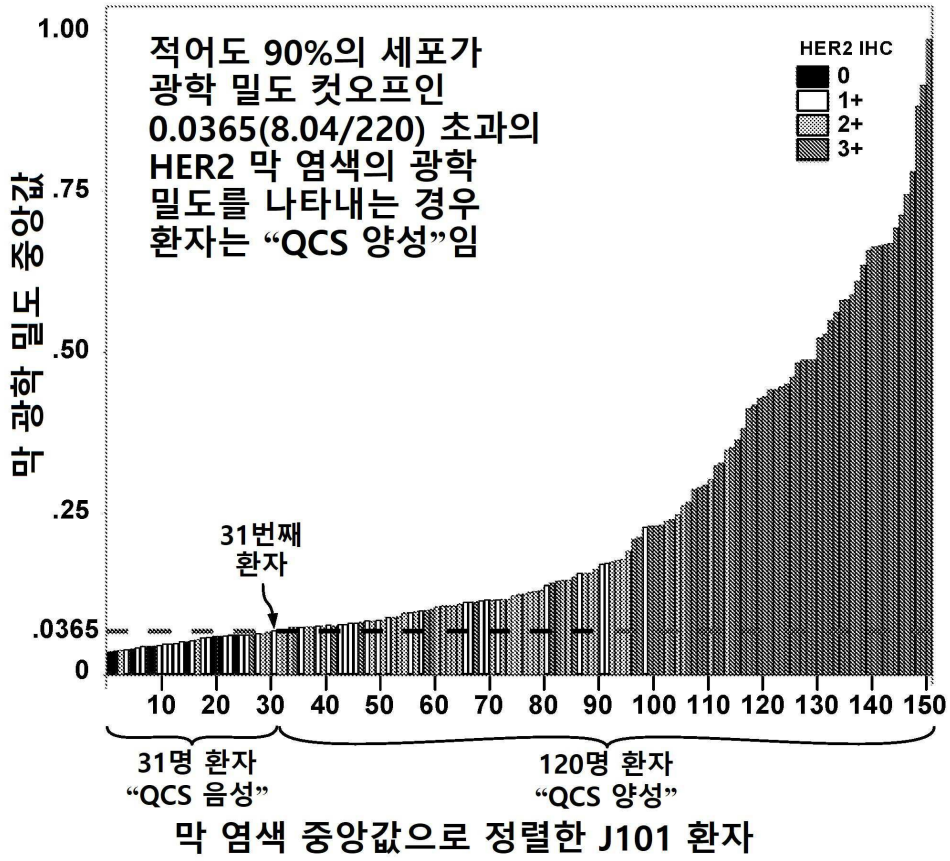
	QCS 양성 (OD>컷오프)	QCS 음성 (OD<컷오프)
ORR	52%	24%
mPFS	14.5 mos	8.6 mos
n	40	25

도면33


막
핵
세포질
세포 검출 및
세포 구획
분할 결과
220
165
110
55
8.04
0
환자당 종양 세포의 막 이미지 픽셀 중앙값 밀도
HER2 IHC
0
1+
2+
3+
환자당 종양 세포의 막 OD
중앙값으로 정렬한 환자


15000
10000
5000
0
세포 #
0
50
100
150
200
세포당 막 염색의 광학 밀도 평균

도면34a

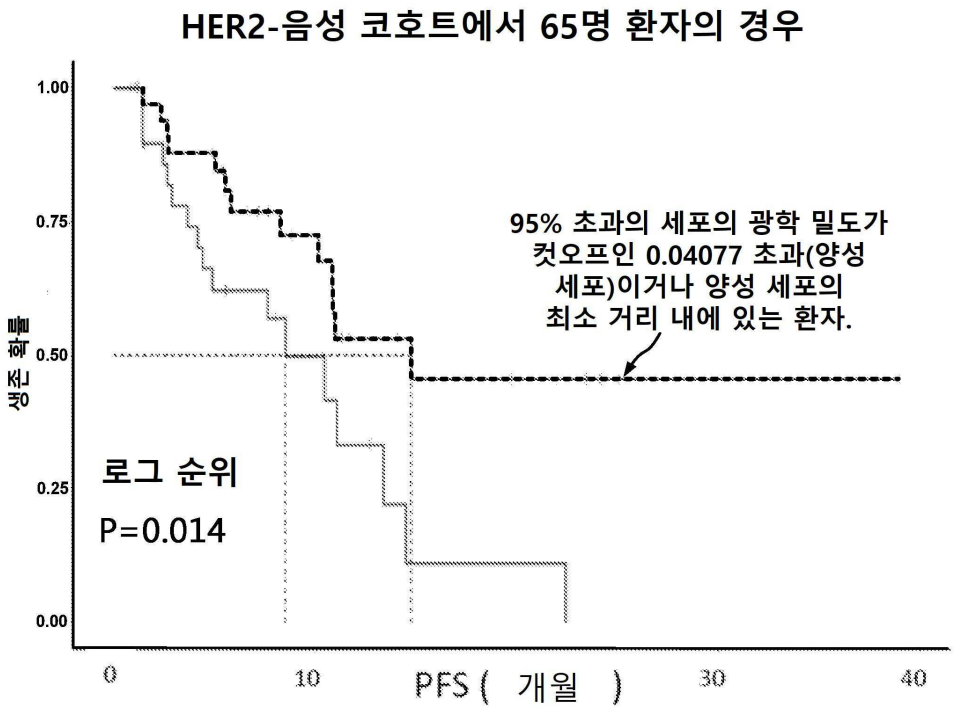


도면34b

	QCS 양성 컷오프 미만의 광학 밀도	QCS 음성 컷오프 초과의 광학 밀도
ORR	56%	26%
mPFS	14.1 mos	9 mos
n	120	31

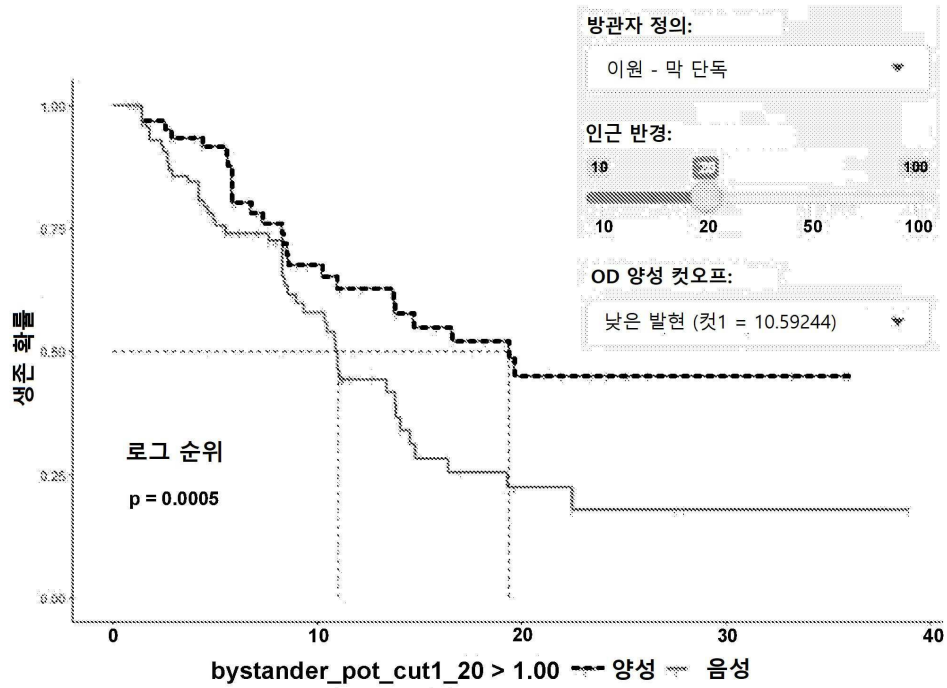
(N=151)

도면35



상단 곡선에 해당하는 환자의 경우, 95%의 세포가 (1) 최소 임계값 초과의 HER2 염색의 광학 밀도를 나타내거나, (2) 최소 염색을 나타내는 세포의 최소 거리 내에 있음.

도면36



도면37

HER2+: IHC 3+ 또는 IHC 2+/ISH+

HER2-: IHC 0 또는 IHC 1+ 또는 ICH2+/ISH-

엔트리 10 개를 나타냄 검색:

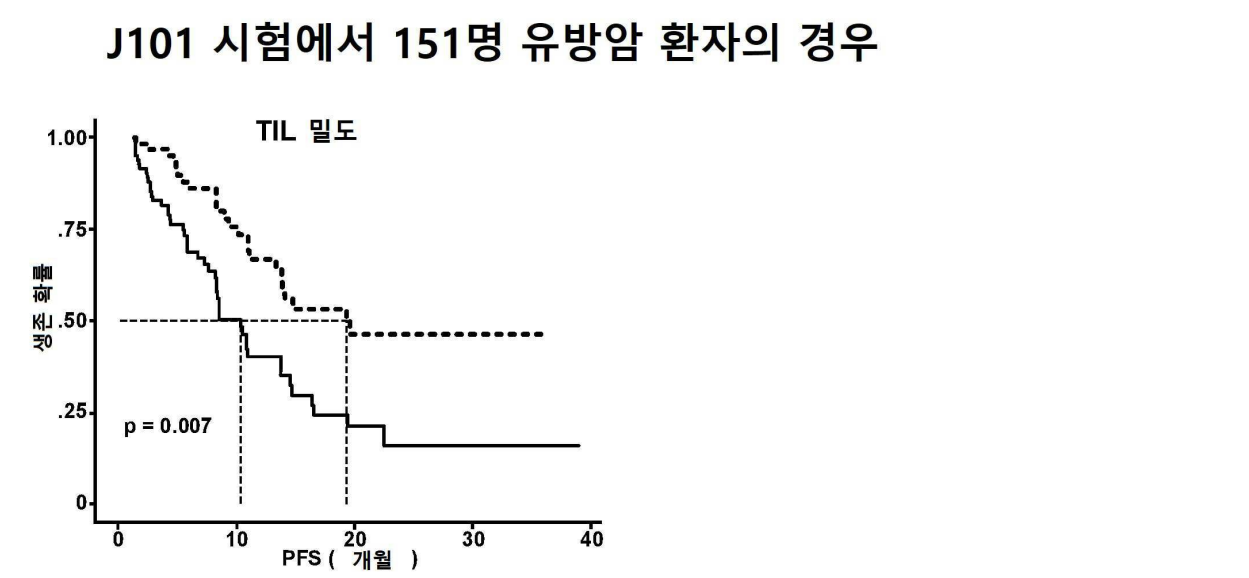
순위	특징	컷오프	N 양성	N 음성	ORR 양성	ORR 음성	HR	HR p-값	로그 순위 p-값	mPFS 양성	mPFS 음성
1	membrane.perc.pos_cut_5	0.9987	78 (51.7%)	73 (48.3%)	0.63	0.95	0.53	0.0063	0.0073	14.8	10.5
2	cell.perc.pos_cut_5	0.9984	67 (44.4%)	84 (55.6%)	0.63	0.09	0.54	0.0122	0.0109	13.4	10.9
3	bystander_pot_cut2_100	0.9998	62 (41.1%)	89 (58.9%)	0.61	0.42	0.60	0.0412	0.0302	13.4	11.0
4	bystander_pot_cut1_50	0.9998	72 (47.7%)	79 (52.3%)	0.61	0.39	0.59	0.0268	0.0245	16.5	10.9
5	bystander_pot_cut2_50	0.9990	61 (40.4%)	90 (59.6%)	0.61	0.42	0.57	0.0216	0.0236	13.4	11.0
6	mem_cyto.OD_diff_1_q15	2.2731	76 (50.3%)	75 (49.7%)	0.59	0.40	0.62	0.0433	0.0409	14.1	11.0
7	bystander_pot_cut1_10	0.9896	71 (47.0%)	80 (53.0%)	0.59	0.41	0.62	0.0451	0.0436	14.7	11.0
8	mem_cyto.OD_diff_3_q10	13.6300	70 (46.3%)	81 (53.7%)	0.59	0.41	0.62	0.0447	0.0421	14.7	11.0
9	mem_cyto.OD_diff_4_q10	13.6300	73 (48.3%)	78 (51.7%)	0.59	0.41	0.62	0.0447	0.0421	14.7	11.0

순위	특징	컷오프	N 양성	N 음성	ORR 양성	ORR 음성	HR	HR p-값	로그 순위 p-값	mPFS 양성	mPFS 음성
1	TIL_HER2_CONTINEOUS	271.8987	71 (29.0%)	78 (51.0%)	0.61	0.49	0.33	0.0000	0.0000	NA	9.6
2	density_TILs_TC	388.7609	70 (46.0%)	75 (51.7%)	0.60	0.49	0.38	0.0002	0.0001	19.6	9.3
3	density_sTILs_rel_to_TC	273.0258	85 (57.2%)	62 (42.8%)	0.48	0.62	0.09	0.0002	0.0001	19.3	8.6
4	membrane.OD_q5	6.9696	119 (78.8%)	32 (21.2%)	0.65	0.28	0.08	0.0008	0.0002	14.7	8.6
5	bystander_1_20_q5	9.0662	113 (75.5%)	37 (24.5%)	0.65	0.32	0.42	0.0007	0.0005	14.1	9.0
6	bystander_2_20_q5	6.5920	113 (75.5%)	37 (24.5%)	0.65	0.32	0.42	0.0007	0.0005	14.1	9.0
7	bystander_pot_cut1_20	0.9860	92 (60.9%)	59 (39.1%)	0.60	0.41	0.44	0.0007	0.0005	16.5	9.0
8	cell.OD_q35	10.1557	118 (78.1%)	33 (21.9%)	0.65	0.36	0.40	0.0008	0.0005	14.5	9.0
9	cell.OD_q10	6.8046	120 (79.5%)	31 (20.5%)	0.66	0.29	0.40	0.0009	0.0006	14.1	9.0
10	cell.OD_q15	7.4176	120 (79.5%)	31 (20.5%)	0.66	0.29	0.40	0.0009	0.0006	14.1	9.0

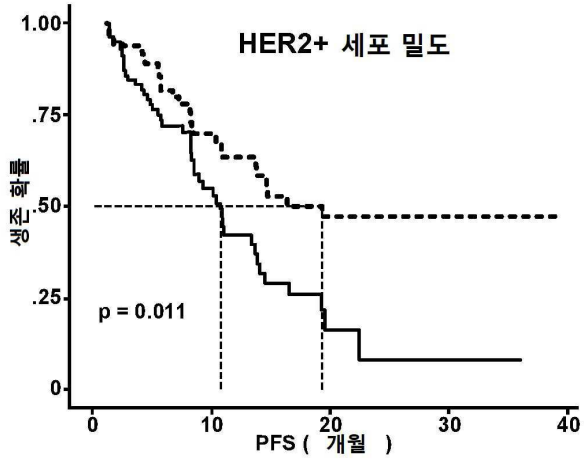
도면38

	특징	특징 매개변수	모델에서의 컷오프	로그 순위 p-값	CM 그룹	객관적 반응률
A	TIL 밀도	종양 중심에서의 기질 TIL	168	0.007	높음	49.2
					낮음	50.2
B	HER2+ 세포 밀도	광학 밀도 컷오프: 종양 중심에서 15 밀도	1672	0.011	높음	60.7
					낮음	40.7
C	HER2+ 인근 점수	반경 25 μm에서의 광학 밀도	37	0.014	높음	57.3
					낮음	38.9

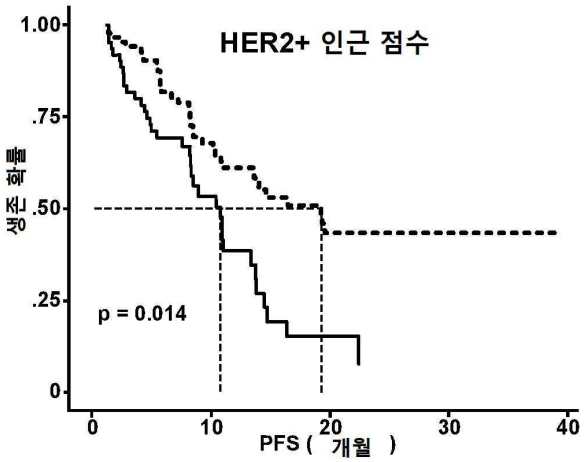
도면39a



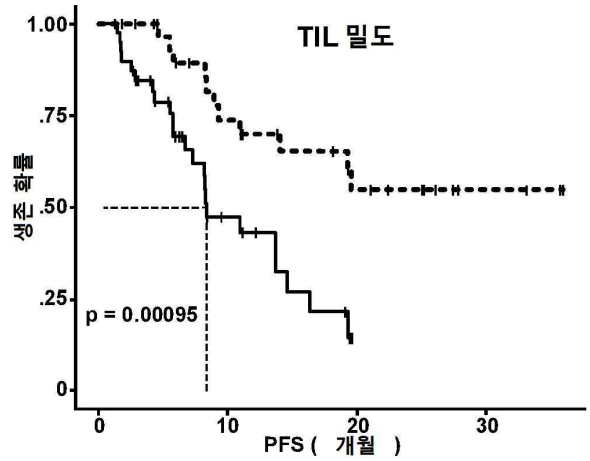
도면39b



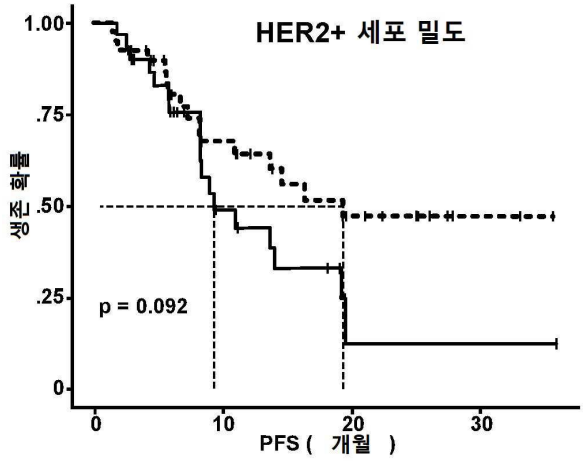
도면39c



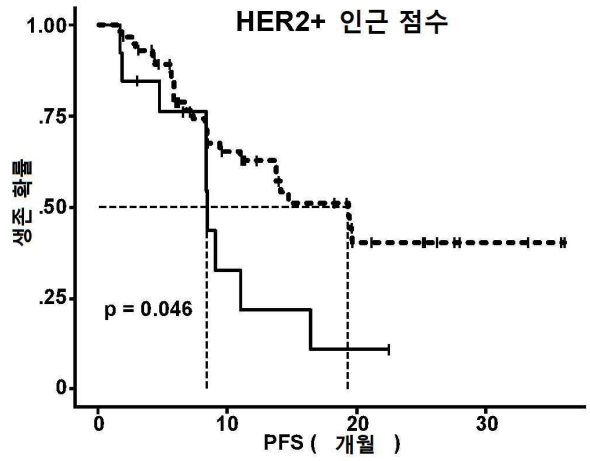
도면40a



도면40b

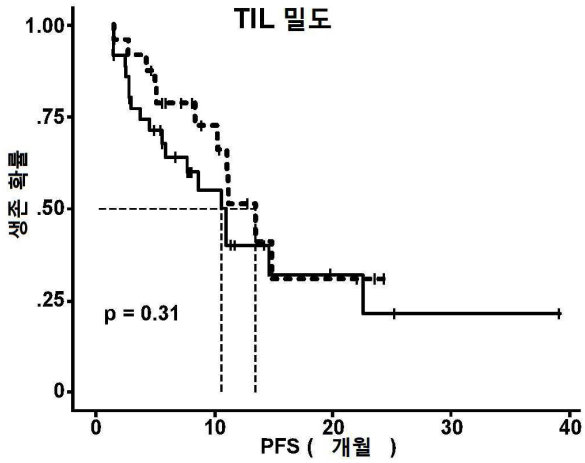


도면40c

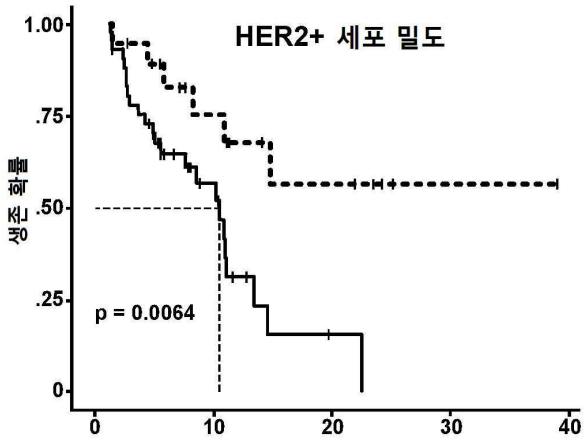


도면41a

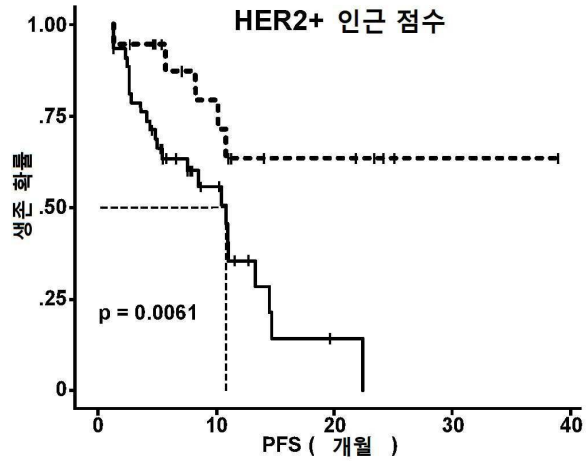
HER2-음성 코호트에서 65명 환자의 경우



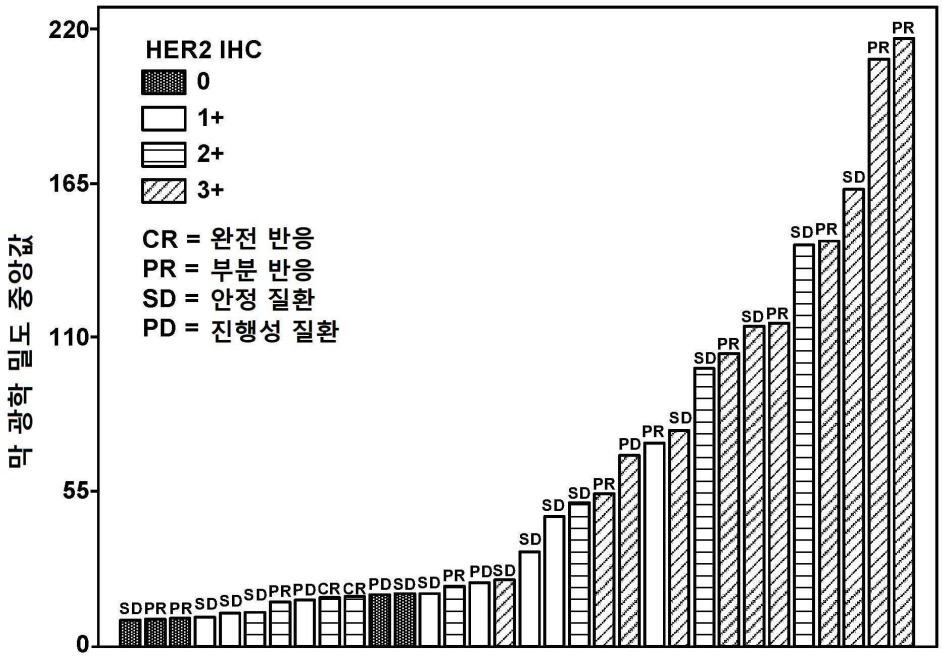
도면41b



도면41c



도면42



막 염색 중앙값 증가로 정렬된 J101 시험의 32명 위암 환자

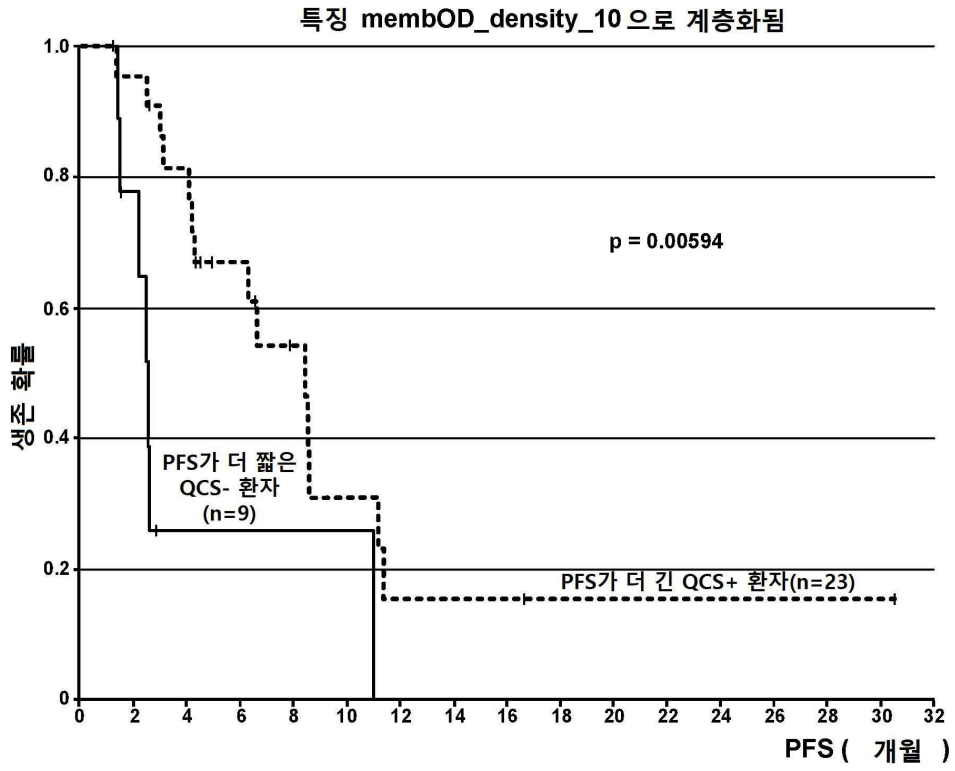
도면43

	특징	특징 매개변수	모델에서의 컷오프	로그 순위 p-값	PPV/ORR
1	membOD_q75	광학 밀도 분위수	>=12.21	0.04	0.45
2	membOD_Perc_pos_12	양성 세포 백분율	>=26.17	0.048	0.45
3	membOD_density_10	상피 세포 밀도	>=810	0.006	0.47
4	R25_cut15	방관자 이원	>=35	0.04	0.45
5	R75_mean	방관자 연속	>=254	0.02	0.44
6	첨도	히스토그램	<=41.45	0.03	0.45

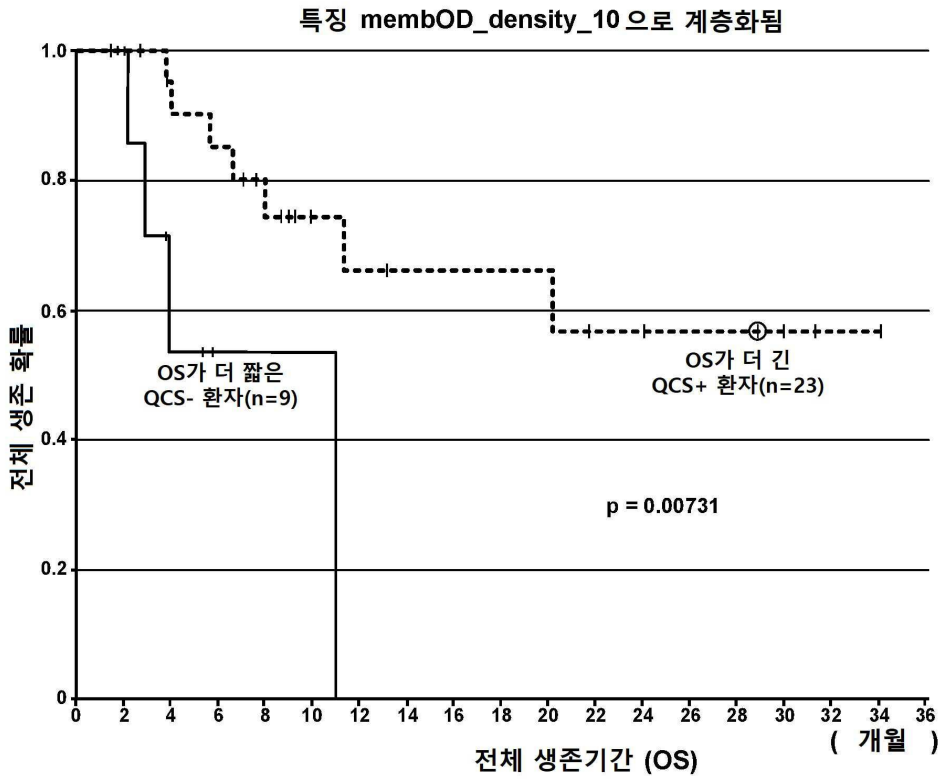
도면44

	특징	특징 매개변수	모델에서의 컷오프	로그 순위 p-값	PPV/ORR
1	membOD_q75	광학 밀도 분위수	>=12.21	0.02	0.45
2	membOD_Perc_pos_12	양성 세포 백분율	>=26.17	0.02	0.45
3	membOD_density_10	상피 세포 밀도	>=810	0.007	0.47
4	R25_cut8	방관자 이원	>=80	0.004	0.44
5	R25_q90	방관자 연속	>=70.8	0.02	0.40
6	첨도	히스토그램	<=37.88	0.0002	0.47
7	왜도	히스토그램	<=6.03	0.0002	0.47

도면45



도면46



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> AstraZeneca UK Limited

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> A SCORING METHOD FOR AN ANTI-HER2 ANTIBODY DRUG CONJUGATE THERAPY

<130> DSADC-400-WO-PCT

<150> US 63/077,604

<151> 2020-09-12

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys

20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His

35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr

50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val

65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu

85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr

100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro

115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser

130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln

145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn

165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys

180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser

195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys

210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys

225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu

245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val

260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg

275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu

290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln

305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys

325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu

340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys

355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp

370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe

385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro

405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg

420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu

435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly

450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val

465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr

485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His

500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
515 520 525
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys

530 535 540
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
545 550 555 560
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
565 570 575
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
580 585 590
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu

595 600 605
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
610 615 620
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
645 650 655
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly

660 665 670
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys

725 730 735
Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750
Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu

```
        755                 760                 765
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
    770                 775                 780
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu

785                 790                 795                 800
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
                805                 810                 815
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
            820                 825                 830
Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
        835                 840                 845
Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe

    850                 855                 860
Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865                 870                 875                 880
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
                885                 890                 895
Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
            900                 905                 910
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala

        915                 920                 925
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
    930                 935                 940
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945                 950                 955                 960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
                965                 970                 975
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu

            980                 985                 990
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu  Asp Ser Thr Phe Tyr  Arg Ser Leu
        995                 1000                1005
```

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
1010 1015 1020
Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
1025 1030 1035
Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg

1040 1045 1050
Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
1055 1060 1065
Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
1070 1075 1080
Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
1085 1090 1095
Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser

1100 1105 1110
Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
1115 1120 1125
Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
1130 1135 1140
Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
1145 1150 1155
Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu

1160 1165 1170
Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
1175 1180 1185
Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
1190 1195 1200
Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
1205 1210 1215
Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro

1220 1225 1230
Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr

1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val

1250 1255

<210> 2

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH1 of heavy chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 4

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH2 of heavy chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 5

Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
1 5

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3 of heavy chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 6

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL1 of light chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 7

Gln Asp Val Asn Thr Ala

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence comprising CDRL2 of light chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 8

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL3 of light chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 9

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable region of heavy chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable region of light chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 12

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of humanized anti-HER2 antibody

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445
Gly