(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118891525 A
(43)申请公布日 2024.11.01

(21)申请号 202380027572.6
(22)申请日 2023.03.14
(30)优先权数据
63/320629 2022.03.16 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2023/052428 2023.03.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/175483 EN 2023.09.21
(71)申请人 阿斯利康(英国)有限公司
地址 英国剑桥
申请人 第一三共株式会社
(72)发明人 A·斯皮茨穆勒 G·施密特 N·特里奇 A·卡皮尔
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 罗文锋 王伦伟
(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)

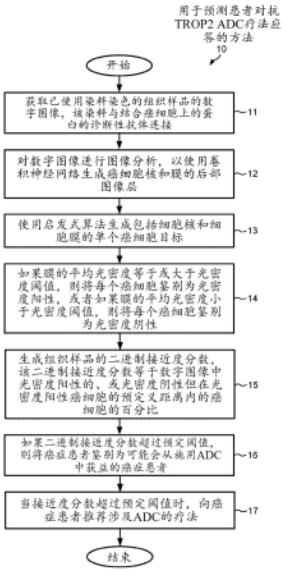
权利要求书13页 说明书25页
序列表（电子公布） 附图28页

(54)发明名称

用于抗TROP2抗体-药物缀合物疗法的评分方法

(57)摘要

用于预测癌症患者对抗体药物缀合物(ADC)疗法的应答情况的方法涉及通过对组织样品中每个癌细胞的染色进行统计运算来计算预测应答分数。该ADC包括ADC有效载荷和靶向这些癌细胞中的滋养层抗原2(TROP2)蛋白的ADC抗体。将该组织样品使用与诊断性抗体连接的染料染色，该诊断性抗体与该蛋白结合。检测组织的数字图像中的癌细胞。基于每个癌细胞的膜和/或细胞质中和/或在相邻癌细胞的膜中该染料的染色强度,对每个癌细胞进行统计运算。基于这些统计运算的结果是否超过各种临床上得出的阈值来预测癌症患者对该ADC疗法的应答。



CN 118891525 A

1.一种鉴别用抗体药物缀合物(ADC)治疗的癌症患者的方法,该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

使用与诊断性抗体连接的染料对来自该癌症患者的组织样品进行免疫组织化学染色,其中该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合;

获取该组织样品的数字图像;

检测该数字图像中的癌细胞;

针对每个癌细胞确定该癌细胞的膜中该染料染色的平均光密度;

如果每个癌细胞的该平均光密度等于或大于光密度阈值,则将该癌细胞鉴别为光密度阳性,或者如果每个癌细胞的该平均光密度小于该光密度阈值,则将该癌细胞鉴别为光密度阴性;

如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将该组织样品鉴别为接近度阳性;以及

如果该组织样品是接近度阳性的,则将该癌症患者鉴别为可能从施用该ADC中获益的癌症患者。

2.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

使用与诊断性抗体连接的染料对来自该癌症患者的组织样品进行免疫组织化学染色,其中该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合;

获取该组织样品的数字图像;

检测该数字图像中的癌细胞;

针对每个癌细胞确定该癌细胞的膜中该染料染色的平均光密度;

如果每个癌细胞的该平均光密度等于或大于光密度阈值,则将该癌细胞鉴别为光密度阳性,或者如果每个癌细胞的该平均光密度小于该光密度阈值,则将该癌细胞鉴别为光密度阴性;

如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将该组织样品鉴别为接近度阳性;以及

如果该组织样品是接近度阳性的,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

3.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞中的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果将来自该癌症患者的组织样品确定为接近度阳性,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法,其中将该组织样品使用与诊断性抗体连接的染料染色,该诊断性抗体与该组织样品中癌细胞膜中的该蛋白质结合,其中针对该组织样品的数字图像中的每个癌细胞确定了该膜中该染料染色的平均光密度,其中如果该膜染色的平均光密度等于或大于光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阳性,或者如果该膜染色的平均光密度小于该光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阴性,并且其中如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将该组织

样品鉴别为接近度阳性。

4.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中癌细胞的该检测涉及(或曾涉及)检测每个癌细胞的属于该膜的像素。

5.如权利要求1所述的方法,该方法进一步包括:

当该组织样品是接近度阳性的时,向该癌症患者推荐涉及该ADC的疗法。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中在最大光密度为255的标度上,该光密度阈值在(或曾在)23至27的范围内。

7.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中在最大光密度为255的标度上,该光密度阈值为(或曾为)25。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中该百分比阈值在(或曾在)99%至99.99%的范围内。

9.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中该百分比阈值为(或曾为)99.97%。

10.如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中该光密度阈值和预定百分比阈值与(或曾与)用该ADC治疗的训练患者队列的应答相关。

11.如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中每个膜的染色强度(或曾经)基于该膜的像素中棕色二氨基联苯胺(DAB)信号的平均光密度计算。

12.如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中该染料是3,3'-二氨基联苯胺(DAB)。

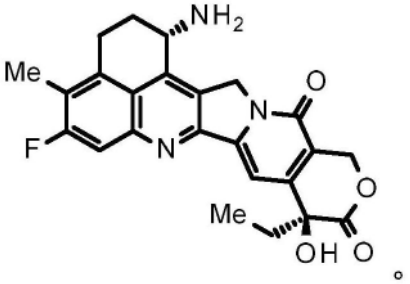
13.如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中该ADC是德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)。

14.如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中该ADC抗体是hTINA1-H1L1。

15.如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中该ADC抗体是人源化IgG1单克隆抗体。

16.如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中该ADC有效载荷是拓扑异构酶I抑制剂。

17.如权利要求16所述的方法,其中该拓扑异构酶I抑制剂由下式表示:



。

18.如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中该诊断性抗体是Abcam EPR 20043。

19.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、膀胱癌、前列腺癌、尿路上皮癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性成胶质细胞瘤、肉瘤、骨肉瘤和黑色素瘤。

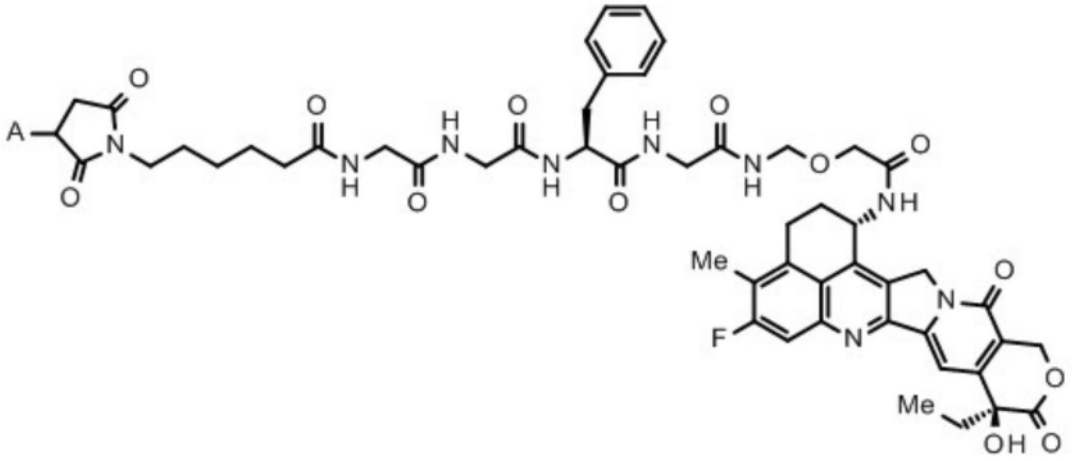
20.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和肾癌。

21.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有乳腺癌。

22.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有肺癌。

23.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有非小细胞肺癌。

24.如权利要求1-12和16-23中任一项所述的方法,其中该ADC是经由硫醚键与药物接头缀合的抗TROP2抗体,其中该药物接头由下式表示:



并且

,

其中A表示与该抗TROP2抗体的连接位置。

25.如权利要求1-12和16-24中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

重链,该重链包含由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列组成的CDRH3;以及

轻链,该轻链包含由SEQ ID NO:6表示的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:7表示的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:8表示的氨基酸序列组成的CDRL3。

26.如权利要求1-12和16-24中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列组成的重链可变区;以及

由SEQ ID NO:10表示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

27.如权利要求1-12和16-24中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列组成的重链;以及

由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链。

28.如权利要求1-12和16-24中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成的重链;以及

由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链。

29.一种鉴别用抗体药物缀合物(ADC)治疗的癌症患者的方法,该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

使用与诊断性抗体连接的染料对来自该癌症患者的组织样品进行免疫组织化学染色,其中该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合;

获取该组织样品的数字图像;

检测该数字图像中的癌细胞;

针对每个癌细胞确定该癌细胞的膜中该染料染色的平均光密度;

针对每个癌细胞确定该癌细胞的细胞质中该染料染色的平均光密度;

计算该数字图像中每个癌细胞的归一化膜光密度(nmOD);

如果每个癌细胞的nmOD等于或小于nmOD阈值,则将该癌细胞鉴别为nmOD阳性;

如果nmOD阳性的癌细胞的百分比等于或大于nmOD百分比阈值,则将该组织样品鉴别为nmOD阳性;以及

如果该组织样品是nmOD阳性的,则将该癌症患者鉴别为可能从施用该ADC中获益的癌症患者。

30.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

使用与诊断性抗体连接的染料对来自该癌症患者的组织样品进行免疫组织化学染色,其中该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合;

获取该组织样品的数字图像;

检测该数字图像中的癌细胞;

针对每个癌细胞确定该癌细胞的膜中该染料染色的平均光密度;

针对每个癌细胞确定该癌细胞的细胞质中该染料染色的平均光密度;

计算该数字图像中每个癌细胞的归一化膜光密度(nmOD);

如果每个癌细胞的nmOD等于或小于nmOD阈值,则将该癌细胞鉴别为nmOD阳性;

如果nmOD阳性的癌细胞的百分比等于或大于nmOD百分比阈值,则将该组织样品鉴别为nmOD阳性;以及

如果该组织样品是nmOD阳性的,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

31.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞中的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品被确定为归一化膜光密度(nmOD)阳性,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法,其中将该组织样品使用诊断性抗体染色,该诊断性抗体与该组织样品中癌细胞的膜和细胞质中的该蛋白质结合,其中针对该组织样品的数字图像中的每个癌细胞确定膜染色的平均光密度和细胞质染色的平均光密度,其中计算该数字图像中的每个癌细胞的归一化膜光密度(nmOD),其中如果该癌细胞的归一化膜光密度等于或小于nmOD阈值,则将该数字图像中的每个癌细胞鉴别为nmOD阳性,并且其中如果nmOD阳性的癌细胞的百分比等于或大于nmOD百分比阈值,则将该组织样品鉴别为nmOD阳性。

32.如权利要求29-31中任一项所述的方法,其中癌细胞的该检测涉及(或曾涉及)检测每个癌细胞的属于该膜的像素和属于该细胞质的像素。

33.如权利要求29所述的方法,该方法进一步包括:

当该组织样品是nmOD阳性的时,向该癌症患者推荐涉及该ADC的疗法。

34.如权利要求29-33中任一项所述的方法,其中该归一化膜阈值在(或曾在)0.45至0.50的范围内。

35.如权利要求29-33中任一项所述的方法,其中该归一化膜阈值为(或曾为)0.486。

36.如权利要求29-35中任一项所述的方法,其中该百分比阈值在(或曾在)3%至7%的范围内。

37.如权利要求29-35中任一项所述的方法,其中该百分比阈值为(或曾为)5%。

38.如权利要求29-37中任一项所述的方法,其中癌细胞的该检测涉及(或曾涉及)使用针对每个癌细胞确定的细胞中心检测每个癌细胞的这些属于膜的像素。

39.如权利要求29-38中任一项所述的方法,其中每个膜的染色强度(或曾经)基于该膜的像素中棕色二氨基联苯胺(DAB)信号的平均光密度计算,并且其中每个细胞质的染色强度基于该细胞质的像素中棕色DAB信号的平均光密度计算。

40.如权利要求29-39中任一项所述的方法,其中该染料是3,3'-二氨基联苯胺(DAB)。

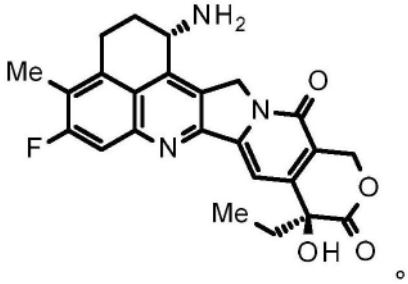
41.如权利要求29-40中任一项所述的方法,其中该ADC是德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)。

42.如权利要求29-40中任一项所述的方法,其中该ADC抗体是hTINA1-H1L1。

43.如权利要求29-40中任一项所述的方法,其中该ADC抗体是人源化IgG1单克隆抗体。

44.如权利要求29-40中任一项所述的方法,其中该ADC有效载荷是拓扑异构酶I抑制剂。

45.如权利要求44所述的方法,其中该拓扑异构酶I抑制剂由下式表示:



。

46.如权利要求29-45中任一项所述的方法,其中该诊断性抗体是Abcam EPR 20043。

47.如权利要求29-46中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、膀胱癌、前列腺癌、尿路上皮癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性成胶质细胞瘤、肉瘤、骨肉瘤和黑色素瘤。

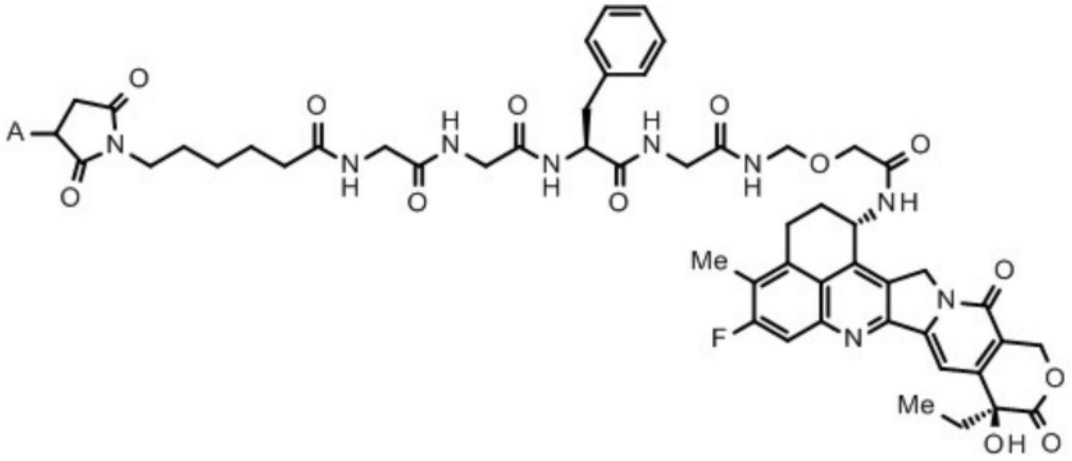
48.如权利要求29-46中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和肾癌。

49.如权利要求29-46中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有乳腺癌。

50.如权利要求29-46中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有肺癌。

51.如权利要求29-46中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有非小细胞肺癌。

52.如权利要求29-40和46-51中任一项所述的方法,其中该ADC是经由硫醚键与药物接头缀合的抗TROP2抗体,其中该药物接头由下式表示:



并且

，

其中A表示与该抗TROP2抗体的连接位置。

53.如权利要求29-40和44-52中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

重链,该重链包含由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列组成的CDRH3;以及

轻链,该轻链包含由SEQ ID NO:6表示的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:7表示的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:8表示的氨基酸序列组成的CDRL3。

54.如权利要求29-40和44-52中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列组成的重链可变区;以及

由SEQ ID NO:10表示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

55.如权利要求29-40和44-52中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列组成的重链;以及

由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链。

56.如权利要求41所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成的重链;以及

由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链。

57.一种鉴别用抗体药物缀合物(ADC)治疗的癌症患者的方法,该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

使用与诊断性抗体连接的染料对来自该癌症患者的组织样品进行免疫组织化学染色,其中该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合;

获取该组织样品的数字图像;

检测该数字图像中的癌细胞;

针对每个癌细胞确定膜染色的平均光密度和细胞质染色的平均光密度;

计算该数字图像中每个癌细胞的归一化膜光密度(nmOD);

如果每个癌细胞的nmOD等于或小于nmOD阈值,则将该癌细胞鉴别为nmOD阳性;

如果nmOD阳性的癌细胞的百分比等于或大于nmOD百分比阈值,则将该组织样品鉴别为nmOD阳性;

如果该膜染色的平均光密度等于或大于光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阳性,或者如果该膜染色的平均光密度小于该光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阴性;

如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将该组织样品鉴别为接近度阳性;以及

如果该组织样品是nmOD阳性且接近度阳性的,则将该癌症患者鉴别为可能从施用该ADC中获益的癌症患者。

58.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

使用与诊断性抗体连接的染料对来自该癌症患者的组织样品进行免疫组织化学染色,其中该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合;

获取该组织样品的数字图像;

检测该数字图像中的癌细胞;

针对每个癌细胞确定膜染色的平均光密度和细胞质染色的平均光密度;

计算该数字图像中每个癌细胞的归一化膜光密度(nmOD);

如果每个癌细胞的nmOD等于或小于nmOD阈值,则将该癌细胞鉴别为nmOD阳性;

如果nmOD阳性的癌细胞的百分比等于或大于nmOD百分比阈值,则将该组织样品鉴别为nmOD阳性;

如果该膜染色的平均光密度等于或大于光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阳性,或者如果该膜染色的平均光密度小于该光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阴性;

如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将该组织样品鉴别为接近度阳性;以及

如果该组织样品是nmOD阳性且接近度阳性的,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

59.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞中的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品被确定为归一化膜光密度(nmOD)阳性并且该组织样品被确定为接近度阳性,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法,其中将该组织样品使用诊断性抗体染色,该诊断性抗体与该组织样品中癌细胞的膜和细胞质中的该蛋白质结合,其中针对该组织样品的数字图像中的每个癌细胞确定膜染色的平均光密度和细胞质染色的平均光密度,其中针对该数字图像中的每个癌细胞计算归一化膜光密度(nmOD),其中如果该数字图像中的每个癌细胞的归一化膜光密度等于或小于nmOD阈值,则将该癌细胞鉴别为nmOD阳性,其中如果nmOD阳性的癌细胞的百分比等于或大于nmOD百分比阈值,则将该组织样品鉴别为nmOD阳性,其中如果该膜染色的平均光密度等于或大于光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阳性,或者如果该膜染色的平均光密度小于光密度阈值,则将每个癌

细胞鉴别为光密度阴性,并且其中如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将该组织样品鉴别为接近度阳性。

60.如权利要求57所述的方法,该方法进一步包括:

当该组织样品是归一化膜阳性且接近度阳性的时,向该癌症患者推荐涉及该ADC的疗法。

61.如权利要求57-60中任一项所述的方法,其中该归一化膜阈值在(或曾在)0.45至0.50的范围内,该归一化百分比阈值在(或曾在)3%至7%的范围内,在最大光密度为255的标度上,该光密度阈值在(或曾在)23至27的范围内,并且该接近度百分比阈值在(或曾在)90%至94%的范围内。

62.如权利要求57-60中任一项所述的方法,其中该接近度百分比阈值在(或曾在)90%至99.99%的范围内。

63.如权利要求57-60中任一项所述的方法,其中该归一化膜阈值是(或曾是)0.486,该归一化百分比阈值是(或曾是)5%,在最大光密度为255的标度上,该光密度阈值是(或曾是)25,并且该接近度百分比阈值是(或曾是)92%。

64.如权利要求57-63中任一项所述的方法,其中癌细胞的该检测涉及(或曾涉及)使用针对每个癌细胞确定的细胞中心检测每个癌细胞的属于细胞膜的像素。

65.如权利要求57-64中任一项所述的方法,其中该膜染色的平均光密度是(或曾经)基于该膜的像素中棕色二氨基联苯胺(DAB)信号的平均光密度计算,并且其中该细胞质染色的平均光密度(或曾经)基于该细胞质的像素中该棕色DAB信号的平均光密度计算。

66.如权利要求57-65中任一项所述的方法,其中该染料是3,3'-二氨基联苯胺(DAB)。

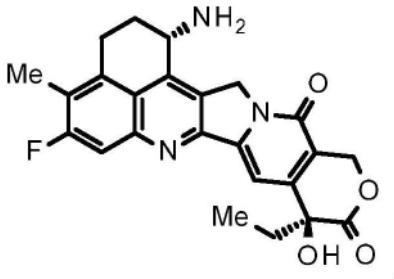
67.如权利要求57-66中任一项所述的方法,其中该ADC是德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)。

68.如权利要求57-66中任一项所述的方法,其中该ADC抗体是hTINA1-H1L1。

69.如权利要求57-66中任一项所述的方法,其中该ADC抗体是人源化IgG1单克隆抗体。

70.如权利要求57-66中任一项所述的方法,其中该ADC有效载荷是拓扑异构酶I抑制剂。

71.如权利要求70所述的方法,其中该拓扑异构酶I抑制剂由下式表示:



。

72.如权利要求57-71中任一项所述的方法,其中该诊断性抗体是Abcam EPR 20043。

73.如权利要求57-72中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、膀胱癌、前列腺癌、尿路上皮癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、

恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性成胶质细胞瘤、肉瘤、骨肉瘤和黑色素瘤。

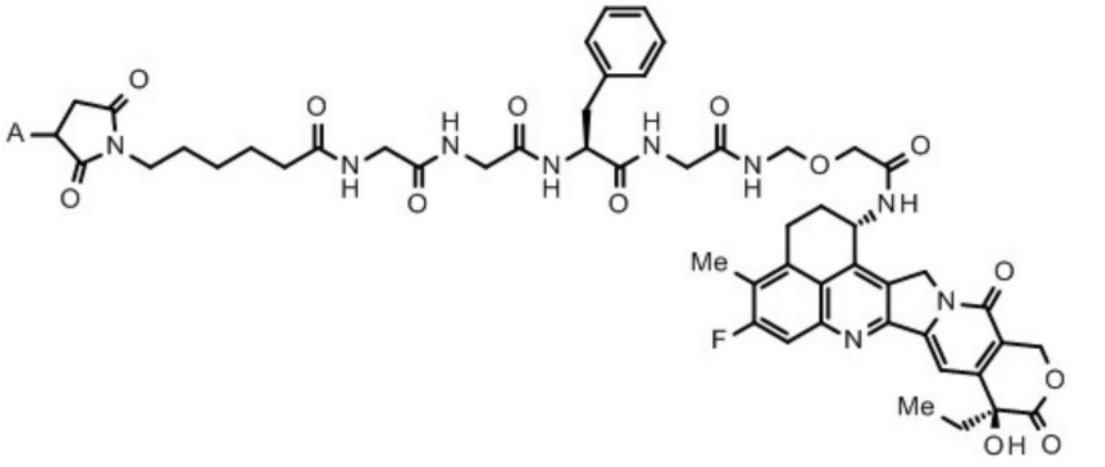
74.如权利要求57-72中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和肾癌。

75.如权利要求57-72中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有乳腺癌。

76.如权利要求57-72中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有肺癌。

77.如权利要求57-72中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有非小细胞肺癌。

78.如权利要求57-66和72-77中任一项所述的方法,其中该ADC是经由硫醚键与药物接头缀合的抗TROP2抗体,其中该药物接头由下式表示:



并且

,

其中A表示与该抗TROP2抗体的连接位置。

79.如权利要求57-66和70-77中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

重链,该重链包含由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列组成的CDRH3;以及

轻链,该轻链包含由SEQ ID NO:6表示的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:7表示的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:8表示的氨基酸序列组成的CDRL3。

80.如权利要求57-66和70-77中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列组成的重链可变区;以及

由SEQ ID NO:10表示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

81.如权利要求57-66和70-77中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列组成的重链;以及

由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链。

82.如权利要求57-66和70-77中任一项所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成的重链;以及

由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链。

83.一种生成应答分数以预测癌症患者对抗体药物缀合物(ADC)的应答的方法,该抗体

药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

使用与诊断性抗体连接的染料对来自组织样品进行免疫组织化学染色,其中该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合;

获取该组织样品的数字图像;

检测该数字图像中的癌细胞;

基于每个癌细胞的膜和细胞质中该染料的染色强度,以及基于与该癌细胞相距比预定义距离更近的其他癌细胞的膜和细胞质中该染料的染色强度,计算该癌细胞的连续空间接近度分数;以及

通过使用统计运算聚合该组织样品的所有连续空间接近度分数来生成该应答分数。

84.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

使用与诊断性抗体连接的染料对来自组织样品进行免疫组织化学染色,其中该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合;

获取该组织样品的数字图像;

检测该数字图像中的癌细胞;

基于每个癌细胞的膜和细胞质中该染料的染色强度,以及基于与该癌细胞相距比预定义距离更近的其他癌细胞的膜和细胞质中该染料的染色强度,计算该癌细胞的连续空间接近度分数;

基于使用统计运算聚合该组织样品的所有连续空间接近度分数来鉴定该组织样品是否是接近度阳性的;以及

如果该组织样品是接近度阳性的,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

85.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品被鉴别为接近度阳性,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法,其中将该组织样品使用与诊断性抗体连接的染料免疫组织化学染色,该诊断性抗体与该组织样品中该癌细胞上的蛋白质结合,其中获取该组织样品的数字图像,并且在该数字图像中检测这些癌细胞,其中针对该数字图像中的每个癌细胞,基于该癌细胞的膜和细胞质中该染料的染色强度,以及基于与该癌细胞相距比预定义距离更近的其他癌细胞的膜和细胞质中该染料的染色强度计算连续空间接近度分数,并且其中基于使用统计运算聚合该组织样品的所有连续空间接近度分数,将该组织样品鉴别为接近度阳性。

86.如权利要求83-85中任一项所述的方法,其中癌细胞的该检测涉及(或曾涉及)检测每个癌细胞的属于该膜的像素和属于该细胞质的像素。

87.如权利要求83-85中任一项所述的方法,其中每个膜的染色强度(或曾经)基于该膜的像素中棕色二氨基联苯胺(DAB)信号的平均光密度计算,并且其中每个细胞质的染色强度基于该细胞质的像素中棕色DAB信号的平均光密度计算。

88.如权利要求83-87中任一项所述的方法,其中细胞i的该连续空间接近度分数计算

为(或曾计算为):

所有细胞j的和,其中$|r_j-r_i|<d\{a_{20}(|r_j-r_i|)\times ODM_j^2+a_{11}(|r_j-r_i|)\times ODM_j \times ODC_j+a_{02}(|r_j-r_i|)\times ODC_j^2+a_{00}(|r_j-r_i|)\}$,

其中该函数a_{kl}取决于每个细胞j与每个细胞i的距离$|r_j-r_i|$,其中ODM_j是细胞j的膜中该棕色DAB信号的光密度,并且其中ODC_j是细胞j的细胞质中该棕色DAB信号的光密度。

89.如权利要求88所述的方法,其中该函数a_{kl}取决于该细胞j与细胞i的距离$|r_j-r_i|$,关系如下:$a_{kl}(|r_j-r_i|)=A_{kl}\times \exp(-|r_j-r_i|/r_{norm})$,其中预定义常数系数为$A_{oo}$、$A_{1o}$、$A_{o1}$、$A_{11}$、$A_{20}$、$A_{o2}$。

90.如权利要求89所述的方法,其中这些系数A_{oo}、A_{1o}、A_{o1}、A_{11}、A_{20}、A_{o2}、d和r_{norm}通过优化该应答分数与训练患者队列的疗法应答的相关性来确定。

91.如权利要求83-87中任一项所述的方法,其中所有连续空间接近度分数的该聚合取自(或曾取自)由以下组成的组:确定平均值、确定中位数、以及确定具有预定百分比的分位数。

92.如权利要求83所述的方法,其中推荐应答分数高于预定阈值的患者接受涉及该ADC的疗法。

93.如权利要求83-92中任一项所述的方法,其中该ADC是德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)。

94.如权利要求83-92中任一项所述的方法,其中该ADC抗体是hTINA1-H1L1。

95.如权利要求83-92中任一项所述的方法,其中该ADC有效载荷是拓扑异构酶I抑制剂。

96.如权利要求83-95中任一项所述的方法,其中该诊断性抗体是Abcam EPR 20043。

97.如权利要求83-96中任一项所述的方法,其中该染料是3,3'-二氨基联苯胺(DAB)。

98.如权利要求83-97中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、膀胱癌、前列腺癌、尿路上皮癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性成胶质细胞瘤、肉瘤、骨肉瘤和黑色素瘤。

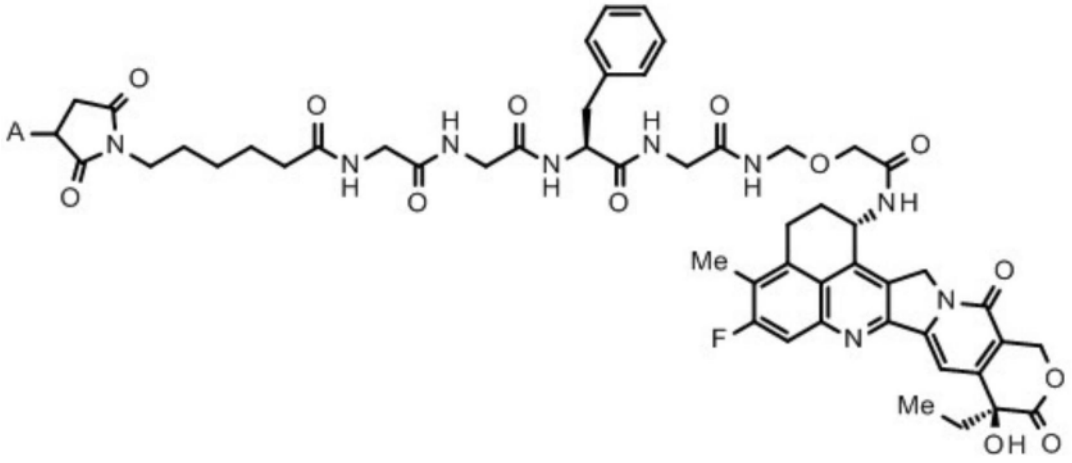
99.如权利要求83-97中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和肾癌。

100.如权利要求83-97中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有乳腺癌。

101.如权利要求83-97中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有肺癌。

102.如权利要求83-97中任一项所述的方法,其中该癌症患者患有非小细胞肺癌。

103.如权利要求83-92和96-102中任一项所述的方法,其中该ADC是经由硫醚键与药物接头缀合的抗TROP2抗体,其中该药物接头由下式表示:



并且

，

其中A表示与该抗TROP2抗体的连接位置。

104.如权利要求103所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

重链,该重链包含由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列组成的CDRH3;以及

轻链,该轻链包含由SEQ ID NO:6表示的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:7表示的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:8表示的氨基酸序列组成的CDRL3。

105.如权利要求103所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列组成的重链可变区;以及

由SEQ ID NO:10表示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

106.如权利要求103所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列组成的重链;以及

由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链。

107.如权利要求103所述的方法,其中该ADC包括抗TROP2抗体,该抗TROP2抗体包含:

由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成的重链;以及

由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链。

108.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品是接近度阳性的,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

109.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞中的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品被确定为接近度阳性,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

110.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品为归一化膜光密度(nmOD)阳性的,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

111.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞中的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品被确定为归一化膜光密度(nmOD)阳性,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

112.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品是nmOD阳性且接近度阳性的,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

113.一种治疗癌症的方法,该方法涉及向癌症患者施用抗体药物缀合物(ADC),该抗体药物缀合物包括ADC有效载荷和靶向癌细胞中的蛋白质的ADC抗体,其中该蛋白质是钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2),该方法包括:

如果来自该癌症患者的组织样品被确定为nmOD阳性且接近度阳性,则向该癌症患者施用涉及该ADC的疗法。

114.如权利要求108、109、112和113中任一项所述的方法,其中该组织样品是否是接近度阳性基于使用统计运算聚合该组织样品的所有连续空间接近度分数(cSPS)或二进制空间接近度分数(bSPS)来确定。

用于抗TROP2抗体-药物缀合物疗法的评分方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年3月16日提交的美国临时申请号63/320,629的优先权,该临时申请通过引用以其全文并入本文。

对以电子方式提交的序列表的引用

[0002] 以电子方式提交的序列表(名称:TROP2_402_Seqlisting.xml;大小:19,496字节;创建日期:2023年3月5日)的内容通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种用于计算分数的方法,该分数指示癌症患者将对使用抗体-药物缀合物的疗法的应答情况,该抗体-药物缀合物具有经由接头结构缀合至抗TROP2抗体的药物。

背景技术

[0004] 评估癌症患者对给定治疗的应答概率是确定癌症患者治疗方案的必需步骤。这样的评估常常基于对癌症患者组织样品的组织学分析,并涉及使用标准分级方案对癌症进行鉴别和分类。免疫组织化学(IHC)染色可用于区分表达特定蛋白质的标志物阳性细胞与不表达该蛋白质的标志物阴性细胞。IHC染色通常涉及多种染料,这些染料包括与蛋白质特异性抗体相连的一种或多种染料和作为复染剂的另一种染料。常见的复染剂是苏木精,其标记DNA,从而对细胞核进行染色。

[0005] 蛋白质特异性染剂或生物标志物可用于鉴别癌症患者组织中可能对预定疗法表现出应答的区域。例如,对上皮细胞进行染色的生物标志物可以帮助鉴别疑似肿瘤区域。然后用其他蛋白质特异性生物标志物来表征癌组织内的细胞。可以鉴别和量化特定生物标志物染色的细胞,并且随后病理学家可以视觉估计指示阳性染色细胞和阴性染色细胞数量的分数。然后可以将此分数与已经以同样方式计算的其他癌症患者的分数进行比较。如果这些其他患者对给定癌症治疗的应答是已知的,则病理学家可以基于为该癌症患者计算的分数与其他患者的分数的比较来预测该癌症患者对给定治疗的应答可能性。然而,病理学家的视觉评估有可变性和主观性倾向。

[0006] 一种有前景的癌症治疗涉及抗体-药物缀合物(ADC),该抗体-药物缀合物具有与抗体缀合的具有细胞毒性的药物,该抗体的抗原在癌细胞的表面上表达。ADC与抗原结合并经历细胞内化,以将药物选择性地递送至癌细胞并且使药物在那些癌细胞内积聚并杀伤癌细胞。寻求一种基于计算机的方法,该方法用于生成指示癌症患者对涉及治疗性TROP2抗体-药物缀合物的治疗的应答的可重复的客观分数。

发明内容

[0007] 用于预测癌症患者对涉及抗体药物缀合物(ADC)的疗法的应答情况的方法涉及基于每个癌细胞的单细胞ADC分数来计算应答分数。ADC包括ADC有效载荷和靶向每个癌细胞

上的蛋白质的ADC抗体。将组织样品使用与诊断性抗体连接的染料免疫组织化学染色,该诊断性抗体与组织样品中癌细胞上的蛋白质结合。获取组织样品的数字图像。对数字图像进行图像分析,以使用卷积神经网络检测癌细胞。针对每个癌细胞,基于癌细胞的膜和/或细胞质中染料的染色强度,和/或与该癌细胞相距比预定义距离更近的其他癌细胞的膜和细胞质中的染色强度,计算单细胞ADC分数。通过使用统计运算聚合组织样品的所有单细胞ADC分数,生成预测癌症患者对ADC疗法的应答的应答分数。推荐应答分数高于预定阈值的患者接受涉及ADC的疗法。

[0008] 在一个实施例中,预测癌症患者对ADC的应答的方法涉及计算单细胞ADC分数。将癌症患者的组织样品使用与诊断性抗体连接的染料免疫组织化学染色。ADC包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的滋养层细胞表面抗原2(TROP2)蛋白的ADC抗体。诊断性抗体与组织样品中癌细胞上的TROP2蛋白结合。获取组织样品的数字图像,并使用图像分析检测数字图像中的癌细胞。针对每个癌细胞,基于膜中染料的染色强度计算单细胞ADC分数。单细胞ADC分数也可以任选地基于癌细胞的细胞质中染料的染色强度,以及基于与该癌细胞相距比预定义距离更近的其他癌细胞的膜和细胞质中染料的染色强度。每个膜的染色强度基于膜的像素中棕色二氨基联苯胺(DAB)信号的平均光密度计算,并且每个细胞质的染色强度基于细胞质的像素中棕色DAB信号的平均光密度计算。通过使用统计运算聚合组织样品的所有单细胞ADC分数,生成指示癌症患者对ADC的应答的所得定量连续分数(QCS)。所有单细胞ADC分数的聚合通过确定平均值、确定中位数或确定具有预定义百分比的分位数进行。在另一个方面,所有单细胞ADC分数的聚合涉及使用预定阈值的阈值运算。所有单细胞ADC分数大于预定阈值的细胞都被标记为单细胞ADC阳性。聚合通过确定单细胞ADC阳性细胞的数量除以所有癌细胞的数量进行。在一个实例中,QCS分数是连续空间接近度分数。

[0009] 在另一个实施例中,鉴别用ADC治疗的癌症患者的方法涉及确定癌症患者的组织样品的二进制空间接近度分数(binary spatial proximity score)。ADC包括ADC有效载荷和靶向癌细胞上的TROP2蛋白的ADC抗体。将来自癌症患者的组织样品使用与诊断性抗体连接的染料免疫组织化学染色,该诊断性抗体与组织样品中癌细胞上的TROP2蛋白结合。获取组织样品的数字图像,并使用卷积神经网络检测数字图像中的癌细胞。在数字图像中检测癌细胞。针对每个癌细胞确定细胞膜中染料染色的平均光密度。如果每个癌细胞的平均光密度等于或大于光密度阈值,则将该癌细胞鉴别为光密度阳性,或者如果每个癌细胞的平均光密度小于光密度阈值,则将该癌细胞鉴别为光密度阴性。如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将组织样品鉴别为接近度阳性。如果组织样品是接近度阳性的,则将癌症患者鉴别为可能从施用ADC中获益的癌症患者。当组织样品是接近度阳性的时,向癌症患者推荐涉及ADC的疗法。在另一方面,治疗癌症的方法涉及如果组织样品是接近度阳性的,则向癌症患者施用ADC。

[0010] 在另一个实施例中,鉴别用ADC治疗的癌症患者的方法涉及确定染色的癌细胞的细胞膜的归一化染色。ADC包括ADC有效载荷和ADC抗体。将癌症患者的组织样品使用与诊断性抗体连接的染料免疫组织化学染色。诊断性抗体和ADC抗体两者都靶向癌细胞上的TROP2蛋白。获取组织样品的数字图像。对数字图像进行图像分析,以使用卷积神经网络检测癌细胞。针对每个癌细胞确定癌细胞膜中染料染色的平均光密度,并且确定癌细胞的细胞质中

染料染色的平均光密度。计算数字图像中每个癌细胞的归一化膜光密度(nmOD),其等于膜染色的平均光密度除以膜染色的平均光密度加上细胞质染色的平均光密度之和。如果每个癌细胞的nmOD等于或小于nmOD阈值,则将该癌细胞鉴别为nmOD阳性。如果nmOD阳性的癌细胞的百分比等于或大于nmOD百分比阈值,则将组织样品鉴别为nmOD阳性。如果组织样品是nmOD阳性的,则将癌症患者鉴别为可能从施用ADC中获益的癌症患者。当组织样品是nmOD阳性的时,向癌症患者推荐涉及ADC的疗法。在另一方面,治疗癌症的方法涉及如果组织样品是nmOD阳性的,则向癌症患者施用ADC。

[0011] 在另一个实施例中,鉴别用ADC治疗的癌症患者的方法基于不同染色的癌细胞的空间接近度和染色的癌细胞的细胞膜的归一化染色两者。ADC包括ADC有效载荷和ADC抗体。将癌症患者的组织样品使用与诊断性抗体连接的染料免疫组织化学染色。诊断性抗体和ADC抗体两者都靶向癌细胞上的TROP2蛋白。获取组织样品的数字图像。对数字图像进行图像分析,以使用卷积神经网络检测癌细胞。针对每个癌细胞确定膜染色的平均光密度和细胞质染色的平均光密度。

[0012] 计算数字图像中每个癌细胞的归一化膜光密度(nmOD),其等于膜染色的平均光密度除以膜染色的平均光密度加上细胞质染色的平均光密度之和。如果每个癌细胞的nmOD等于或小于nmOD阈值,则将该癌细胞鉴别为nmOD阳性。如果nmOD阳性的癌细胞的百分比等于或大于nmOD百分比阈值,则将组织样品鉴别为nmOD阳性。如果膜染色的平均光密度等于或大于光密度阈值,则将每个癌细胞都鉴别为光密度阳性,或者如果膜染色的平均光密度小于光密度阈值,则将每个癌细胞都鉴别为光密度阴性。如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将组织样品鉴别为接近度阳性。如果组织样品是nmOD阳性且接近度阳性的,则将癌症患者鉴别为可能从施用ADC中获益的癌症患者。当组织样品是nmOD阳性且接近度阳性的时,向癌症患者推荐涉及ADC的疗法。在另一方面,治疗癌症的方法涉及如果组织样品是nmOD阳性且接近度阳性的,则向癌症患者施用ADC。

[0013] 其他实施例和优点将在下面的具体实施方式中进行描述。该发明内容并不旨在限定本发明。本发明由权利要求书限定。

附图说明

[0014] 附图说明了本发明的实施例,附图中相同的数字指示相同的组成部分。

[0015] 图1示出了抗TROP2抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID No:1)。

[0016] 图2示出了抗TROP2抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID No:2)。

[0017] 图3示出了抗TROP2抗体的CDRH1的氨基酸序列(SEQ ID No:3)。

[0018] 图4示出了抗TROP2抗体的CDRH2的氨基酸序列(SEQ ID No:4)。

[0019] 图5示出了抗TROP2抗体的CDRH3的氨基酸序列(SEQ ID No:5)。

[0020] 图6示出了抗TROP2抗体的CDRL1的氨基酸序列(SEQ ID No:6)。

[0021] 图7示出了抗TROP2抗体的CDRL2的氨基酸序列(SEQ ID No:7)。

[0022] 图8示出了抗TROP2抗体的CDRL3的氨基酸序列(SEQ ID No:8)。

[0023] 图9示出了抗TROP2抗体的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID No:9)。

[0024] 图10示出了抗TROP2抗体的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID No:10)。

[0025] 图11示出了抗TROP2抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID No:11)。

[0026] 图12说明了具有四个药物接头单元的抗TROP2抗体-药物缀合物德达博妥单抗-德鲁替康。

[0027] 图13是步骤流程图,通过这些步骤分析系统分析来自癌症患者的组织的数字图像,并预测癌症患者将可能对涉及抗TROP2抗体-药物缀合物的疗法的应答情况。

[0028] 图14示出了说明图13的步骤12的图像分析过程的数字图像。

[0029] 图15说明了图像分析步骤,其中检测癌细胞的细胞核目标。

[0030] 图16说明了图像分析步骤,其中使用细胞核目标检测膜。

[0031] 图17是图像分析软件环境中的图像分析步骤结果的截图。

[0032] 图18示出了基于细胞分离的十个示例性细胞的二进制空间接近度分数的样品计算,以反映ADC有效载荷向相邻细胞中的摄取。

[0033] 图19说明了抗TROP2 ADC疗法杀伤癌细胞的机制。

[0034] 图20示出了使用膜和细胞质像素的灰度值进行图像分析的染色强度的样品定量结果。

[0035] 图21列出了图20的图像的膜上和细胞质中的示例性定量染色量。

[0036] 图22说明了基于细胞分离的,图21所示三个细胞的每个细胞的连续空间接近度分数的计算,以反映ADC有效载荷向相邻细胞中的摄取。

[0037] 图23示出了计算每个癌细胞的连续空间接近度分数的公式。

[0038] 图24是示出与图13的方法的应答分数(bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25)相比,在肿瘤生长/缩小方面临床试验的115名患者施用ADC的应答的图。在该图中,患者表示为具有疾病进展(PD)、稳定疾病(SD)、部分缓解(PR)或不可评估(NE)。

[0039] 图25是两组115名患者的无进展生存期的Kaplan-Meier曲线图,将这些患者使用图13的方法的二进制空间接近度分数分层为QCS阳性患者和QCS阴性患者。该图示出了QCS阳性患者和QCS阴性患者的客观缓解率(ORR)。

[0040] 图26示出了图25的Kaplan-Meier曲线的88名bSPS阳性患者和27名bSPS阴性患者肿瘤随时间缩小的蜘蛛图。

[0041] 图27是示出了从最大肿瘤生长到最大肿瘤缩小排序的图25的115名患者中的105名患者的临床应答的瀑布条形图。

[0042] 图28是用于基于每个癌细胞的归一化膜光密度预测癌症患者对ADC的应答的新型方法的步骤流程图。

[0043] 图29是示出与图28的方法的应答分数(memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5)相比,在肿瘤生长/缩小方面115名患者施用ADC的应答的图。该图将患者鉴别为具有疾病进展(PD)、稳定疾病(SD)、部分缓解(PR)或不可评估(NE)。

[0044] 图30是两组115名患者的无进展生存期的Kaplan-Meier曲线图,将这些患者使用图28的方法的应答分数分层为QCS阳性和QCS阴性患者。该图示出了QCS阳性患者和QCS阴性患者的客观缓解率(ORR)。

[0045] 图31示出了图30的Kaplan-Meier曲线的84名QCS阳性患者和31名QCS阴性患者肿瘤随时间缩小的蜘蛛图。

[0046] 图32是示出了从最大肿瘤生长到最大肿瘤缩小排序的图30的115名患者中的105

名患者的临床应答的瀑布条形图。

[0047] 图33是用于基于二进制空间接近度分数和归一化膜光密度分数的组合预测癌症患者对ADC的应答的新型方法的步骤流程图。

[0048] 图34是两组115名患者的无进展生存期的Kaplan-Meier曲线图,将这些患者使用图33的方法的应答分数分层为QCS阳性和QCS阴性患者。该图示出了QCS阳性患者和QCS阴性患者的客观缓解率(ORR)。

[0049] 图35示出了图34的Kaplan-Meier曲线的80名QCS阳性患者和35名QCS阴性患者肿瘤随时间缩小的蜘蛛图。

[0050] 图36是示出了从最大肿瘤生长到最大肿瘤缩小排序的图34的115名患者中的105名患者的临床应答的瀑布条形图。

具体实施方式

[0051] 本发明涉及用于预测癌症患者对抗体药物缀合物(ADC)的应答的新型方法,该抗体药物缀合物包括靶向癌细胞上的钙信号转导因子滋养层抗原2(TROP2)蛋白的ADC抗体,其中该应答使用与诊断性抗体(也靶向TROP2蛋白)连接的染料染色的测量光密度基于统计运算预测。本发明的另一个方面涉及一种基于QCS分数鉴别用ADC治疗的癌症患者的方法。本发明的另一个方面涉及鉴别将会对ADC表现出预定应答的癌症患者。本发明的又另一个方面涉及一种基于使用统计运算中的一种计算的定量连续分数(QCS),通过施用涉及ADC的疗法来治疗癌症患者的方法。

[0052] 第一实施例涉及基于二进制空间接近度分数鉴别可能从施用ADC中获益的癌症患者,该二进制空间接近度分数等于患者组织样品中具有高于光密度阈值的平均染色光密度、或具有低于光密度阈值的平均染色光密度但位于平均染色光密度高于光密度阈值的细胞的预定义距离内的癌细胞百分比。

[0053] 第二实施例涉及基于每个癌细胞的归一化膜光密度来鉴别可能从施用ADC中获益的癌症患者,该归一化膜光密度等于膜染色的平均光密度除以膜染色的平均光密度加上细胞质染色的平均光密度之和。

[0054] 第三实施例涉及基于二进制空间接近度分数和归一化膜光密度鉴别可能从施用ADC中获益的癌症患者。如果二进制空间接近度分数超过接近度百分比阈值并且归一化膜阳性的癌细胞的百分比等于或大于归一化百分比阈值,则将癌症患者鉴别为可能从ADC中获益。

[0055] I.定义。

[0056] 为了便于理解本发明,下文定义了一些术语和短语。术语“癌症”与术语“肿瘤”的含义相同。在本披露中,“TROP2”与钙信号转导因子滋养层抗原2跨膜蛋白同义。在本披露中,术语“TROP2蛋白”以与TROP2相同的含义使用。TROP2蛋白的表达可以使用本领域技术人员熟知的方法检测,如免疫组织化学(IHC)或免疫荧光(IF)。

[0057] 在本发明中,“抗TROP2抗体”意指与TROP2特异性结合的抗体。抗TROP2抗体具有与TROP2结合的活性并且由此内化到表达TROP2的细胞中,使得在表现出与TROP2结合的活性之后,抗体移动到表达TROP2的细胞中。抗TROP2抗体靶向肿瘤细胞,与肿瘤细胞结合,内化到肿瘤细胞中,对肿瘤细胞表现出杀细胞活性,并且可经由接头与具有抗肿瘤活性的药物

缀合以形成抗体-药物缀合物。

[0058] 图1示出了示例性抗TROP2抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID No.1)。重链具有信号序列(1-19)、可变区(20-140)和恒定区(141-470)。

[0059] 图2示出了示例性抗TROP2抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID No.2)。轻链具有信号序列(1-20)、可变区(21-129)和恒定区(130-234)。

[0060] 图3示出了示例性抗TROP2抗体的CDRH1的氨基酸序列(SEQ ID No:3),图4示出了示例性抗TROP2抗体的CDRH2的氨基酸序列(SEQ ID No:4),并且图5示出了示例性抗TROP2抗体的CDRH3的氨基酸序列(SEQ ID No:5)。

[0061] 图6示出了示例性抗TROP2抗体的CDRL1的氨基酸序列(SEQ ID No:6),图7示出了示例性抗TROP2抗体的CDRL2(SAS)的氨基酸序列(SEQ ID No:7),并且图8示出了示例性抗TROP2抗体的CDRL3的氨基酸序列(SEQ ID No:8)。

[0062] 图9示出了示例性抗TROP2抗体的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID No:9),并且图10示出了示例性抗TROP2抗体的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID No:10)。图11示出了示例性抗TROP2抗体的另一重链的氨基酸序列(SEQ ID No:11)。

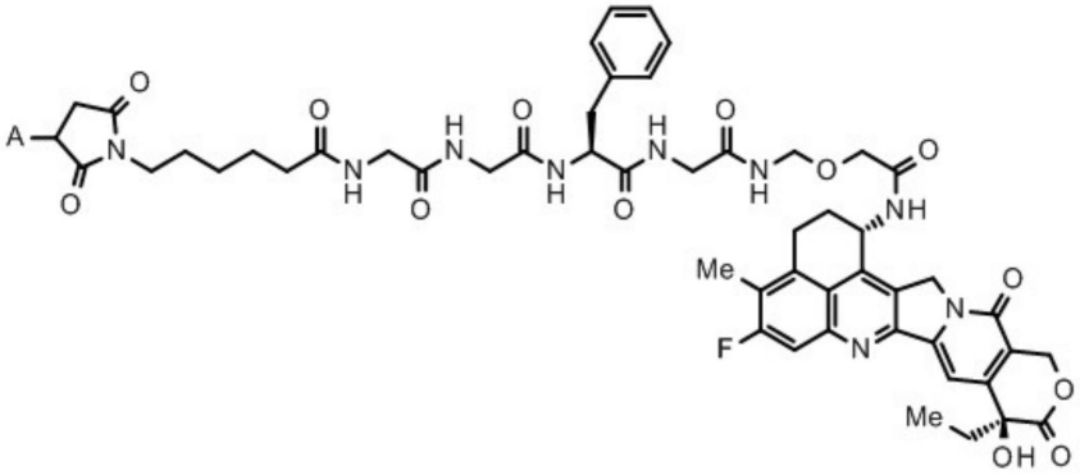
[0063] 本发明中使用的抗TROP2抗体-药物缀合物的抗TROP2抗体优选地是包含以下重链和轻链的抗体,该重链包含:由SEQ ID No.3表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.1的氨基酸残基50至54组成的氨基酸序列)组成的CDRH1、由SEQ ID No.4表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.1的氨基酸残基69至85组成的氨基酸序列)组成的CDRH2和由SEQ ID No.5表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.1的氨基酸残基118至129组成的氨基酸序列)组成的CDRH3,该轻链包含:由SEQ ID No.6表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.2的氨基酸残基44至54组成的氨基酸序列)组成的CDRL1、由SEQ ID No.7表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.2的氨基酸残基70至76组成的氨基酸序列)组成的CDRL2和由SEQ ID No.8表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.2的氨基酸残基109至117组成的氨基酸序列)组成的CDRL3;并且更优选地是包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体,该重链可变区由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.1的氨基酸残基20至140组成的氨基酸序列)组成,该轻链可变区由SEQ ID No.10表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.2的氨基酸残基21至129组成的氨基酸序列)组成。在其他优选的实施例中,抗体包含以下重链和轻链,该重链由SEQ ID No.11表示的氨基酸序列(由SEQ ID No.1的氨基酸残基20至469组成的氨基酸序列)组成,该轻链由SEQ ID No.2的氨基酸残基21-234表示的氨基酸序列组成。在其他实施例中,抗体包含以下重链和轻链,该重链由SEQ ID No.1的氨基酸残基20-470表示的氨基酸序列组成和该轻链由SEQ ID No.2的氨基酸残基21-234表示的氨基酸序列组成。

[0064] 在本发明中,术语“QCS阳性”(QCS+)是指可能对抗TROP2 ADC疗法显示应答的癌症。术语“QCS阴性”(QCS-)是指不太可能对抗TROP2 ADC疗法显示应答的癌症。首字母QCS缩写代表定量连续分数。本发明的新型预测方法的结果通常称为定量连续分数并且可以是应答分数、治疗分数或预测生存时间的指示。QCS分数是通过对患者获得的所有单细胞ADC分数进行统计运算获得的。将预定阈值应用于QCS分数区分“QCS阳性”患者和“QCS阴性”患者。将癌症患者分层为QCS阳性组和QCS阴性组使得可以鉴别那些可能从涉及ADC的疗法中受益的QCS+患者。

[0065] II.抗TROP2抗体-药物缀合物。

[0066] 本披露中使用的示例性抗体-药物缀合物是其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗TROP2抗体缀合的抗体-药物缀合物,

[0067] [式1]

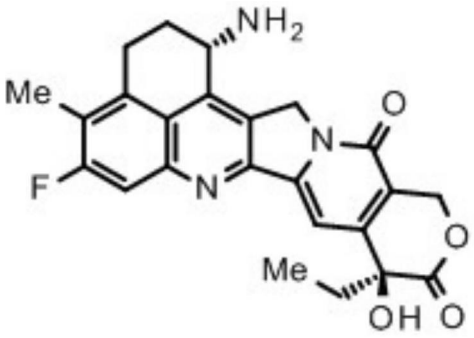


[0068] 其中A表示与抗体的连接位置。

[0069] 在本披露中,抗体-药物缀合物中由接头和药物组成的部分结构被称为“药物-接头”。药物-接头与抗体中链间二硫键位点(重链之间的两个位点,以及重链和轻链之间的两个位点)形成的巯基(换句话说,半胱氨酸残基的硫原子)相连。

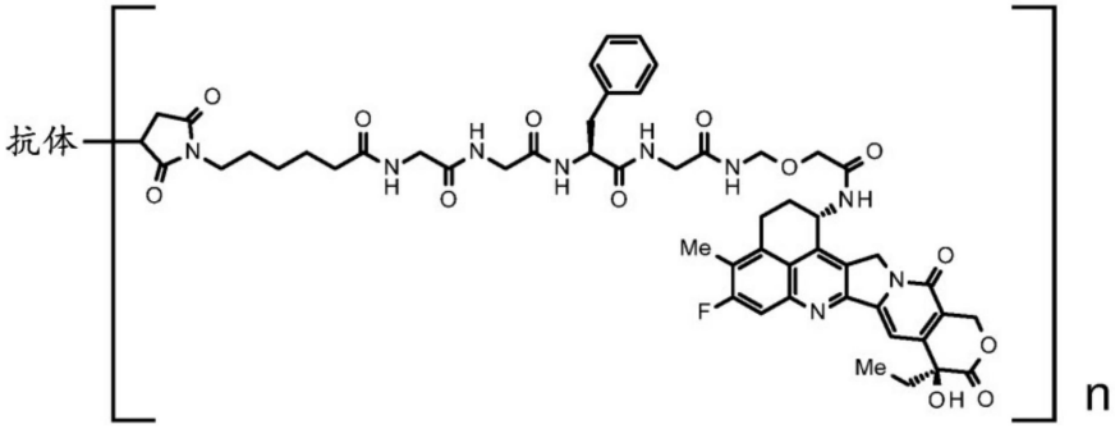
[0070] 本披露的药物-接头可包括依喜替康(IUPAC名称:(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氢-9-羟基-4-甲基-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮,(也表示为化学名:(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)),其为拓扑异构酶I抑制剂,作为成分。依喜替康是具有抗肿瘤作用的喜树碱衍生物,由下式表示:

[0071] [式2]



[0072] 本披露中使用的示例性抗TROP2抗体-药物缀合物也可以由下式表示:

[0073] [式3]

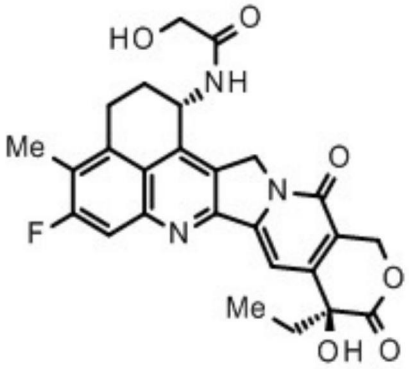


[0074] 在此,药物-接头经由硫醚键与抗TROP2抗体(“抗体-”)缀合。n的含义与所谓的缀合药物分子的平均数(DAR;药物与抗体比率)的含义相同,并指示每个抗体分子所缀合的药物-接头的平均单元数。

[0075] 图12说明了具有四个指定为“DL”的药物接头单元的优选的抗TROP2抗体-药物缀合物德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)。图12中所示的德达博妥单抗-德鲁替康的德达博妥单抗部分是人源化抗TROP2 IgG1 mAb,其中IgG1指示抗TROP2抗体的同种型。

[0076] 在迁移到癌细胞中后,本披露中使用的优选的抗TROP2抗体-药物缀合物在接头部分被切割,以释放由下式表示的化合物:

[0077] [式4]



[0078] 以上所示化合物是本发明中使用的优选的抗TROP2抗体-药物缀合物的抗肿瘤活性的主要来源,并且具有拓扑异构酶I抑制作用。

[0079] 本发明中使用的优选的抗TROP2抗体-药物缀合物还具有旁观者效应,其中该抗TROP2抗体-药物缀合物被内化到表达靶蛋白TROP2的癌细胞,然后以上所示化合物还对不表达靶蛋白TROP2的相邻癌细胞发挥抗肿瘤作用。

[0080] III.抗体-药物缀合物中的抗TROP2抗体。

[0081] 本发明中使用的抗体-药物缀合物中的抗TROP2抗体可以来源于任何物种,并且优选为来源于人、大鼠、小鼠或兔的抗体。在抗体为来自除人类物种以外的物种的情况下,优选使用熟知的技术将其嵌合化或人源化。本发明的抗体可以为多克隆抗体或单克隆抗体,并且优选为单克隆抗体。

[0082] 本发明中使用的抗体-药物缀合物中的抗体是优选具有能够靶向癌细胞的特性的抗体,并且优选是具有例如,能够识别癌细胞的特性、能够与癌细胞结合的特性、在癌细胞中内化的特性和/或针对癌细胞的杀细胞活性的抗体。

[0083] 抗体对癌细胞的结合活性可以使用流式细胞术来证实。抗体到肿瘤细胞中的内化可以使用以下来证实:(1)使用与治疗性抗体结合的二级抗体(荧光标记的)在荧光显微镜下观察掺入细胞中的抗体的测定(Cell Death and Differentiation[细胞死亡与差异](2008)15,751-761),(2)使用与治疗性抗体结合的二级抗体(荧光标记的)测量掺入细胞中的荧光强度的测定(Molecular Biology of the Cell[细胞分子生物学],第15卷,5268-5282,2004年12月),或(3)使用与治疗性抗体结合的免疫毒素的Mab-ZAP测定,其中该毒素在掺入细胞后释放以抑制细胞生长(Bio Techniques[生物技术]28:162-165,2000年1月)。作为免疫毒素,可以使用白喉毒素催化结构域和蛋白G的重组复合蛋白。

[0084] 通过测定对抗细胞生长的抑制活性,可以在体外证实抗体的抗肿瘤活性。例如,培养过表达抗体的靶蛋白的癌细胞系,并将抗体以不同浓度添加到培养系统中,以测定对抗病灶形成、集落形成和球状体生长的抑制活性。可以在体内证实抗肿瘤活性,例如,通过将抗体施用于具有移植的高表达靶蛋白的癌细胞系的裸鼠,并测定癌细胞的变化。

[0085] 由于在抗体-药物缀合物中缀合的化合物发挥抗肿瘤作用,优选但非必须的是抗体本身应该具有抗肿瘤作用。为了特异性和选择性地发挥抗肿瘤化合物对癌细胞的细胞毒活性,重要且也是优选的是,该抗体应该具有被内化以迁移到癌细胞中的特性。

[0086] 本发明中使用的抗体-药物缀合物中的抗体可以通过本领域已知的方法获得。例如,可以使用本领域通常实施的方法获得本发明的抗体,该方法涉及用抗原多肽对动物进行免疫,并收集和纯化体内产生的抗体。抗原的来源不限于人类,并且动物可以用来源于非人类动物如小鼠、大鼠等的抗原进行免疫。在这种情况下,可以测试与获得的异源抗原结合的抗体与人类抗原的交叉反应性,以筛选适用于人类疾病的抗体。

[0087] 可替代地,根据本领域已知的方法,可以将产生针对该抗原的抗体的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合(例如,Kohler和Milstein,Nature[自然](1975)256,第495-497页;Kennet,R.编辑,Monoclonal Antibodies[单克隆抗体],第365-367页,Plenum Press[普莱纽姆出版社],纽约(1980))以建立杂交瘤,从杂交瘤中可以继而获得单克隆抗体。

[0088] 可以通过基因工程改造宿主细胞以产生编码抗原蛋白的基因来获得抗原。特别地,制备允许抗原基因表达的载体,并将其转移至宿主细胞以便该基因被表达。如此表达的抗原可以被纯化。也可以通过用上述基因工程化的抗原表达细胞或表达抗原的细胞系对动物进行免疫的方法来获得抗体。

[0089] 本发明中使用的抗体-药物缀合物中的抗体优选为通过人工修饰以降低对人的异源抗原性而获得的重组抗体,如嵌合抗体或人源化抗体,或者优选为仅具有来源于人的抗体的基因序列的抗体,即人抗体。这些抗体可以用已知的方法生产。

[0090] 作为嵌合抗体,可以例举其中抗体可变区和恒定区来自不同物种的抗体,例如其中小鼠或大鼠来源的抗体可变区与人源性抗体恒定区连接的嵌合抗体(Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],81,6851-6855,(1984))。

[0091] 作为人源化抗体,可以例举通过仅将异源抗体的互补决定区(CDR)整合到人源性抗体中获得的抗体(Nature[自然](1986)321,第522-525页)、通过CDR移植方法将异源抗体框架的一部分氨基酸残基以及异源抗体的CDR序列移植到人抗体中获得的抗体(WO 90/07861),和使用基因转化诱变策略进行人源化的抗体(美国专利号5821337)。

[0092] 作为人抗体,可以例举通过使用产生人抗体的小鼠产生的抗体,该小鼠具有包括

人抗体的重链和轻链的基因的人染色体片段(参见Tomizuka,K.等人,Nature Genetics[自然遗传学](1997)16,第133-143页;Kuroiwa,Y.等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究](1998)26,第3447-3448页;Yoshida,H.等人,Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects[动物细胞技术:基础和应用方面]第10卷,第69-73页(Kitagawa,Y.,Matsuda,T.和Iijima,S.编辑),Kluwer Academic Publishers[克吕韦尔学术出版社],1999;Tomizuka,K.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊](2000)97,第722-727页,等)。作为替代,可以例举通过噬菌体展示获得的抗体,该抗体选自人抗体库(参见Wormstone,I.M.等人,Investigative Ophthalmology&Visual Science[调查性眼科与视觉科学](2002)43(7),第2301-2308页;Carmen,S.等人,Briefings in Functional Genomics and Proteomics[功能基因组学和蛋白质组学简介](2002),1(2),第189-203页;Siriwardena,D.等人,Ophthalmology[眼科学](2002)109(3),第427-431页等)。

[0093] 在本发明使用的抗体-药物缀合物中的抗体中,还包括该抗体的修饰变体。修饰变体是指通过对根据本发明的抗体进行化学或生物修饰而获得的变体。化学修饰的变体的实例包括:包含化学部分与氨基酸骨架的连接的变体,包含化学部分与N-连接的或O-连接的碳水化合物链的连接的变体等。生物修饰的变体的实例包括通过翻译后修饰(如N-连接的或O-连接的糖基化、N-或C-末端加工、脱酰胺、天冬氨酸异构化或甲硫氨酸氧化)获得的变体,以及其中甲硫氨酸残基通过在原核宿主细胞中表达而被添加到N末端的变体。此外,经标记以便使得能够检测或分离根据本发明的抗体或抗原的抗体(例如,酶标记抗体、荧光标记抗体和亲和标记抗体)也包括在修饰变体的含义中。根据本发明的抗体的这样的修饰变体可用于提高抗体的稳定性和血液滞留性、降低其抗原性、检测或分离抗体或抗原等。

[0094] 此外,通过调节与根据本发明的抗体连接的聚糖的修饰(糖基化、去糖基化等),有可能增强抗体依赖性细胞毒活性。作为调节抗体聚糖的修饰的技术,国际公开号WO 99/54342、国际公开号WO 00/61739、国际公开号WO 02/31140、国际公开号WO 2007/133855、国际公开号WO 2013/120066等是已知的。然而,该技术不限于此。在根据本发明的抗体中,还包括其中聚糖的修饰受到调节的抗体。

[0095] 已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体的重链的羧基末端处的赖氨酸残基缺失(Journal of Chromatography A[色谱法杂志A辑],705:129-134(1995)),并且还已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体的重链的羧基末端的处两个氨基酸残基(甘氨酸和赖氨酸)缺失,并且新位于羧基末端处的脯氨酸残基被酰胺化(Analytical Biochemistry[分析生物化学],360:75-83(2007))。然而,重链序列的这样的缺失和修饰不影响抗体的抗原结合亲和力和效应子功能(补体活化、抗体依赖性细胞毒性等)。因此,在根据本发明的抗体中,也包括经过这样的修饰的抗体和抗体的功能片段,并且还包括其中在重链的羧基末端处缺失了一个或两个氨基酸的缺失变体、通过缺失变体的酰胺化获得的变体(例如,其中羧基末端脯氨酸残基已经酰胺化的重链)等。在根据本发明的抗体的重链的羧基末端处具有缺失的缺失变体的类型不限于上述变体,只要抗原结合亲和力和效应子功能得以保留。构成根据本发明的抗体的两条重链可以是选自由全长重链和上述缺失变体组成的组中的一种类型,或者可以是从中选择的两种类型的组合。每种缺失变体的量的比率可以受产生根据本发明的抗体的培养的哺乳动物细胞的类型和培养条件影响;然而,可以优选地例举其中在根据本发明的抗体的两条重链中,羧基末端处的一个氨基酸残基已经缺失的抗体。

[0096] 作为根据本发明的抗体的同种型,例如,可以例举IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。优选地,可以例举IgG1或IgG2。

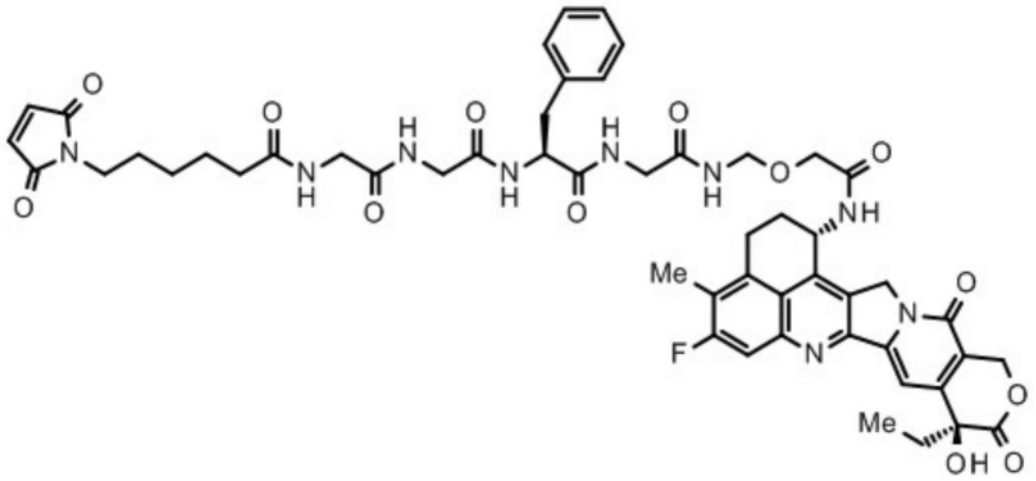
[0097] 在本发明中,术语“抗TROP2抗体”是指特异性结合TROP2(TACSTD2:肿瘤相关钙信号转导因子2;EGP-1)的抗体,并且优选通过与TROP2结合而在表达TROP2的细胞中具有内化活性。

[0098] 抗TROP2抗体的实例包括hTINA1-H1L1(WO 2015/098099)。

[0099] IV.生产抗TROP2抗体-药物缀合物。

[0100] 用于生产根据本发明的抗体-药物缀合物的药物-接头中间体由下式表示。

[0101] [式5]



[0102] 药物-接头中间体可以表示为化学名称为N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰-甘氨酰-L-苯基丙氨酰基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-2-氧代乙氧基)甲基]甘氨酰胺,并且可以参照WO 2014/057687、WO 2015/098099、WO 2015/115091、WO 2015/155998、WO 2019/044947等中的描述来生产。

[0103] 本发明中使用的抗体-药物缀合物可以通过使上述药物-接头中间体和具有硫醇基(可替代地,也称为巯基)的抗TROP2抗体反应来生产。

[0104] 具有巯基的抗TROP2抗体可以通过本领域熟知的方法获得(Hermanson,G.T,Bioconjugate Techniques[生物缀合技术],第56-136页,第456-493页,Academic Press[学术出版社](1996))。例如,通过对抗体中的每个链间二硫化物使用0.3至3摩尔当量的还原剂如三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP),并在含有螯合剂如乙二胺四乙酸(EDTA)的缓冲溶液中与抗体反应,可以获得抗体中链间二硫化物部分或完全还原的具有巯基的抗体。

[0105] 此外,通过对每个具有巯基的抗体使用2至20摩尔当量的药物-接头中间体,可以生产其中每个抗体分子缀合2至8个药物分子的抗体-药物缀合物。

[0106] 生产的抗体-药物缀合物的每个抗体分子的缀合药物分子平均数可例如通过以下测定:基于抗体-药物缀合物及其缀合前体在280nm和370nm两个波长下的UV吸光度测量的计算方法(UV方法)或基于通过用还原剂处理抗体-药物缀合物获得的片段的HPLC测量的定量的计算方法(HPLC方法)。

[0107] 可以参考例如WO 2015/098099和WO 2017/002776中的描述来进行抗体和药物-接

头中间体之间的缀合以及抗体-药物缀合物的每个抗体分子的缀合药物分子平均数的计算。

[0108] 在本发明中,术语“抗TROP2抗体-药物缀合物”是指以下抗体-药物缀合物,其使得根据本发明的抗体-药物缀合物中的抗体是抗TROP2抗体。

[0109] 抗TROP2抗体优选地是包含以下重链和轻链的抗体,该重链包含由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:1的氨基酸残基50至54组成的氨基酸序列]组成的CDRH1、由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:1的氨基酸残基69至85组成的氨基酸序列]组成的CDRH2和由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:1的氨基酸残基118至129组成的氨基酸序列]组成的CDRH3,该轻链包含由SEQ ID NO:6表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:2的氨基酸残基44至54组成的氨基酸序列]组成的CDRL1、由SEQ ID NO:7表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:2的氨基酸残基70至76组成的氨基酸序列]组成的CDRL2和由SEQ ID NO:8表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:2的氨基酸残基109至117组成的氨基酸序列]组成的CDRL3;更优选地为包含以下重链和轻链的抗体,该重链包含由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至140组成的氨基酸序列]组成的重链可变区,该轻链包含由SEQ ID NO:10表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:2的氨基酸残基21至129组成的氨基酸序列]组成的轻链可变区;并且甚至更优选地为包含以下重链和轻链的抗体,该重链由SEQ ID NO:12表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至470组成的氨基酸序列]组成,该轻链由SEQ ID NO:13表示的氨基酸序列[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基21至234]组成;或包含以下重链和轻链的抗体,该重链由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列[=由SEQ ID NO:1的氨基酸残基20至469组成的氨基酸序列]组成,该轻链由SEQ ID NO:13表示的氨基酸序列[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基21至234]组成。

[0110] 抗TROP2抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头单元的平均数优选地为2至8、更优选地为3至5,甚至更优选地为3.5至4.5、并且甚至更优选地为约4。

[0111] 抗TROP2抗体-药物缀合物可以参考WO 2015/098099和WO 2017/002776中的描述来生产。

[0112] 在优选的实施例中,抗TROP2抗体-药物缀合物为德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)。

[0113] V.抗TROP2 ADC的治疗用途。

[0114] 本披露的抗体-药物缀合物可以用于治疗癌症,并且可以优选地用于治疗选自由以下组成的组的至少一种癌症:乳腺癌(包括三阴性乳腺癌和激素受体(HR)阳性,HER2阴性乳腺癌)、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、结直肠癌(也称为结肠和直肠癌,并且包括结肠癌和直肠癌)、胃癌(也称为胃腺癌)、食管癌、头颈癌(包括唾液腺癌和咽喉癌)、食管胃连接部腺癌、胆道癌(包括胆管癌)、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫体癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤、肉瘤和黑色素瘤,并且可以更优选地用于治疗选自由以下组成的组的至少一种癌症:乳腺癌(优选地三阴性乳腺癌和激素受体(HR)阳性,HER2阴性乳腺癌)、肺癌(优选地非小细胞肺癌,包括具有可操作的基因组改变的非小细胞肺癌和不具有可操作的基因组改变的非小细胞肺癌,其中可操作的基因组改变包括EGFR、ALK、ROS1、NTRK、BRAF、RET和

MET外显子14跳过)、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和肾癌。此外,本披露的抗体-药物缀合物可以优选地用于治疗缺乏同源重组(HR)依赖性DNA DSB修复活性的癌症,或不缺乏同源重组(HR)依赖性DNA DSB修复活性的癌症。

[0115] 本披露的抗体-药物缀合物可优选用于哺乳动物,并且可更优选用于人类。

[0116] 本披露的抗体-药物缀合物的抗肿瘤效果可以例如通过以下来证实:生成其中将癌细胞移植到测试动物的模型,并且测量由于应用本披露的抗体-药物缀合物而导致的肿瘤体积的减小、生命延长效果。

[0117] 此外,本披露的抗体-药物缀合物的抗肿瘤效果在临床研究中可以用实体瘤应答评价标准(RECIST)评价方法、WHO评价方法、麦克唐纳评价方法、体重测量和其他方法来证实;并且可以通过指标如完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病进展(PD)、客观缓解率(ORR)、缓解持续时间(DoR)、无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)来确定。

[0118] 本披露的抗体-药物缀合物可以延缓癌细胞的生长、抑制其增殖,并且进一步可以杀伤癌细胞。这些作用可以使癌症患者摆脱由癌症引起的症状,或者可以实现改善癌症患者的QOL并通过维持癌症患者的生命而达到治疗效果。即使该抗体-药物缀合物不能完成杀伤癌细胞,它也可以通过抑制或控制癌细胞的生长来实现癌症患者的更高生活质量(QOL),同时实现更长期的生存。

[0119] 可以预期本发明的抗体-药物缀合物通过作为全身疗法应用于患者以及另外通过局部应用于癌组织来发挥治疗作用。

[0120] 在另一个方面,本披露的抗体-药物缀合物提供了在用电离辐射或其他化学治疗剂的癌症疗法中作为辅助剂的用途。例如,在癌症的治疗中,该治疗可以包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量的抗体-药物缀合物,其同时或顺序地与电离辐射或其他化学治疗剂一起施用。

[0121] 本披露的抗体-药物缀合物可用作与外科手术结合的辅助化疗。本披露的抗体-药物缀合物可以在外科手术之前为了减小肿瘤大小的目的而施用(称为术前辅助化疗或新辅助治疗),或者可以在外科手术之后为了防止肿瘤复发的目的而施用(称为术后辅助化疗或辅助治疗)。

[0122] 在另外的方面,本披露的抗体-药物缀合物可以用于治疗缺乏同源重组(HR)依赖性DNA DSB修复活性的癌症。HR依赖性DNA DSB修复途径经由同源机制修复DNA中的双链断裂(DSB),以重建连续的DNA螺旋(K.K.Khanna和S.P.Jackson,Nat.Genet.[自然遗传学]27(3):247-254(2001))。HR依赖性DNA DSB修复途径的组分包括但不限于ATM(NM 000051)、RAD51(NM 002875)、RAD51L1(NM_002877)、RAD51C(NM_002876)、RAD51L3(NM_002878)、DMC1(NM_007068)、XRCC2(NM_005431)、XRCC3(NM_005432)、RAD52(NM_002879)、RAD54L(NM_003579)、RAD54B(NM_012415)、BRCA1(NM_007295)、BRCA2(NM_000059)、RAD50(NM_005732)、MRE11A(NM_005590)和NBS1(NM_002485)。HR依赖性DNA DSB修复途径中涉及的其他蛋白质包括调节因子如EMSY(Hughes-Davies等人,Cell[细胞],115,第523-535页)。HR组分也描述于Wood等人,Science[科学],291,1284-1289(2001)中。缺乏HR依赖性DNA DSB修复的癌症可以包含一种或多种癌细胞、或由其组成,这些癌细胞相对于正常细胞具有降低的或消除的通过该途径修复DNA DSB的能力,即HR依赖性DNA DSB修复途径的活性可在一种或多种癌细胞中降低或消除。HR依赖性DNA DSB修复途径的一种或多种组分的活性可以在患有缺乏

HR依赖性DNA DSB修复的癌症的个体的一种或多种癌细胞中消除。HR依赖性DNA DSB修复途径的组分在本领域中是充分表征的(参见例如,Wood等人,Science[科学],291,1284-1289(2001))并且包括以上列出的组分。

[0123] 在一些实施例中,癌细胞可具有BRCA1和/或BRCA2缺陷表型,即在癌细胞中BRCA1和/或BRCA2活性被降低或消除。具有这种表型的癌细胞的BRCA1和/或BRCA2可能有缺陷,即BRCA1和/或BRCA2的表达和/或活性可以在癌细胞中降低或消除,例如通过编码核酸中的突变或多态性的方式,或通过编码调节因子的基因(例如编码BRCA2调节因子的EMSY基因)中的扩增、突变或多态性的方式(Hughes-Davies等人,Cell[细胞],115,523-535)。BRCA1和BRCA2是已知的肿瘤抑制因子,其野生型等位基因在杂合子携带者的肿瘤中经常丢失(Jasin M.,Oncogene[癌基因],21(58),8981-93(2002);Tutt等人,Trends Mol Med.[分子医学趋势],8(12),571-6,(2002))。BRCA1和/或BRCA2突变与乳腺癌的关联在本领域中是充分表征的(Radice,P.J.,Exp Clin Cancer Res.[实验与临床癌症研究],21(3增刊),9-12(2002))。还已知编码BRCA2结合因子的EMSY基因的扩增与乳腺癌和卵巢癌有关。BRCA1和/或BRCA2中突变的携带者罹患某些癌症(包括乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、血液癌、胃肠癌和肺癌)的风险也较高。在一些实施例中,个体对于BRCA1和/或BRCA2或其调节剂中的一个或多个变异(例如突变和多态性)是杂合的。对BRCA1和BRCA2的变异的检测是本领域熟知的,并且描述于例如以下中:EP 699 754、EP 705903、Neuhausen,S.L.和Ostrander,E.A.,Genet.Test[基因检测],1,75-83(1992);Chappnis,P.O.和Foulkes,W.O.,Cancer Treat Res[癌症治疗研究],107,29-59(2002);Janatova M.等人,Neoplasma[赘生物],50(4),246-505(2003);Jancarkova,N.,Ceska Gynekol.[捷克妇科],68(1),11-6(2003)中。BRCA2结合因子EMSY的扩增的确定描述于Hughes-Davies等人,Cell[细胞],115,523-535中。

[0124] 与癌症相关的突变和多态性可以通过检测变体核酸序列的存在而在核酸水平上检测,或者通过检测变体(即突变体或等位基因变体)多肽的存在而在蛋白质水平上检测。

[0125] 本披露的抗体-药物缀合物可以作为含有至少一种药学上合适的成分的药物组合物施用。根据本披露中使用的抗体-药物缀合物的剂量、施用浓度等,可以从本领域通常使用的配制剂添加剂等中适当选择和应用药学上合适的成分。例如,本披露中使用的抗体-药物缀合物可以作为含有缓冲剂(如组氨酸缓冲剂)、赋形剂(如蔗糖或海藻糖)以及表面活性剂(如聚山梨醇酯80或20)的药物组合物进行施用。本披露中使用的含有抗体-药物缀合物的药物产品可以优选用作注射剂,可以更优选用作含水注射剂或冻干注射剂,并且可以甚至更优选用作冻干注射剂。

[0126] 在本披露中使用的含有抗TROP2抗体-药物缀合物的药物产品是含水注射剂的情况下,其可以优选用合适的稀释剂稀释,然后作为静脉输注液给予。对于稀释剂,可以例举右旋糖溶液、生理盐水等,并且可以优选地例举右旋糖溶液,并且可以更优选地例举5%右旋糖溶液。在本披露的药物产品是冻干注射剂的情况下,可以优选地将其溶解在注射用水中,随后可以用合适的稀释剂稀释所需量,并且然后作为静脉输注液给予。对于稀释剂,可以例举右旋糖溶液、生理盐水等,并且可以优选地例举右旋糖溶液,并且可以更优选地例举5%右旋糖溶液。

[0127] 可以用于施用本披露的药物产品的施用途径的实例包括静脉内、皮内、皮下、肌内

和腹膜内途径,并且优选地包括静脉内途径。

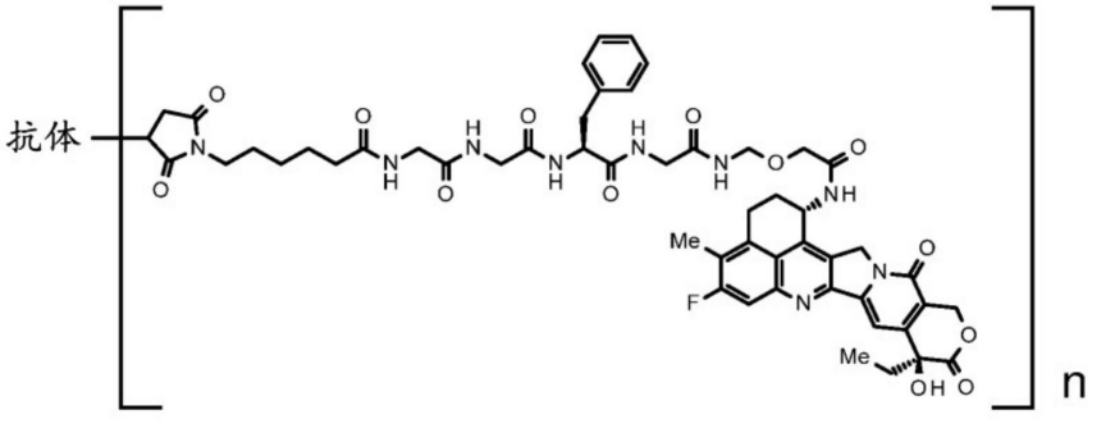
[0128] 本披露中使用的抗TROP2抗体-药物缀合物可以以1至180天的间隔向人施用一次,并且可以优选地一周施用一次、每2周施用一次、每3周施用一次或每4周施用一次,并且可以甚至更优选地每3周施用一次。另外,本发明中使用的抗体-药物缀合物可以以约0.001至100mg/kg的剂量施用,并且可以优选地以0.8至12.4mg/kg的剂量施用。例如,抗TROP2抗体-药物缀合物可以以0.27mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、6.0mg/kg或8.0mg/kg的剂量每3周施用一次,并且可以优选以6.0mg/kg的剂量每3周施用一次。

[0129] VI.预测患者对抗TROP2抗体-药物缀合物的应答的方法。

[0130] 图13是方法10的步骤11-17的流程图,通过这些步骤分析系统分析来自癌症患者的组织的数字图像,并预测癌症患者将可能对涉及抗TROP2抗体-药物缀合物(ADC)的疗法的应答情况。在一个实施例中,ADC是德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)。在一个实施例中,该方法预测患有选自由以下组成的组的癌症的患者对ADC的应答:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、膀胱癌、前列腺癌、尿路上皮癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性成胶质细胞瘤、肉瘤、骨肉瘤和黑色素瘤。在一个实施例中,该方法预测患有选自由以下组成的组的癌症的患者对ADC的应答:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃交界腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、膀胱癌和前列腺癌。在一个实施例中,该方法预测乳腺癌患者对ADC的应答。在另一个实施例中,该方法预测胃癌患者的ADC应答。在又一个实施例中,该方法预测肺癌患者的ADC应答。

[0131] 在第一步骤11中,获取来自癌症患者的组织切片的高分辨率数字图像,该组织切片已使用一种或多种生物标志物或染剂进行染色。为了预测ADC疗法的功效,使用附接有染料的诊断性抗体(例如诊断性生物标志物),其靶向与ADC疗法所靶向的相同的蛋白质。在一个实施例中,评分所针对的抗TROP2 ADC疗法是经由硫醚键缀合至药物-接头的抗TROP2抗体,其中该药物-接头由下式表示:

[0132] [式3]



,

[0133] 其中“抗体-”表示抗TROP2抗体所连接的位置。在一个实施例中,评分所针对的抗TROP2 ADC是德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)。因此,在各个实施例中,诊断性生物标志物也靶向TROP2蛋白。

[0134] 在步骤12中,预训练卷积神经网络处理癌症患者的组织的数字图像,该组织已用与染料如3,3'-二氨基联苯胺(DAB)连接的诊断性抗体染色。染料在癌细胞膜中的染色强度是基于与相应的分割膜目标相关的所有像素的染料的平均染色强度来确定的。此外,单个像素中染料的染色强度是基于该像素的红、绿、蓝颜色组分计算的。图像分析处理的结果是两个后部图像层,表示对于数字图像中每个像素,该像素属于细胞核的概率和该像素属于细胞膜的概率。

[0135] 在步骤13中,基于对细胞核和膜的后部层的启发式图像分析,检测单个癌细胞。生成包括细胞膜目标的癌细胞目标。

[0136] 在步骤14中,基于细胞膜中DAB的量,每个癌细胞被鉴别为光密度阳性或光密度阴性。基于膜的所有像素中棕色二氨基联苯胺(DAB)信号的平均(mean/average)光密度,通过每个膜的染色强度来确定DAB的量。(i)如果每个癌细胞的平均光密度等于或大于光密度阈值,则将该癌细胞鉴别为光密度阳性,或者(ii)如果每个癌细胞的平均光密度小于光密度阈值,则将该癌细胞鉴别为光密度阴性。在一个实施例中,在最大光密度为255的标度(scale)上,光密度阈值在23到27的范围内。例如,光密度阈值是25。可由8位RGB数据表示的最大光密度是255。在膜的DAB染色中观察到的最大光密度为约220。

[0137] 在步骤15中,生成组织样品的数字图像的二进制接近度分数,该二进制接近度分数等于数字图像中光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的百分比。在一个实施例中,预定义距离是五十微米。在另一个实施例中,预定义距离是二十五微米。

[0138] 在步骤16中,如果接近度分数超过预定百分比阈值,则将癌症患者鉴别为可能从施用抗TROP2 ADC中获益的癌症患者。在一个实施例中,预定百分比阈值在95%至100%的范围内。例如,预定百分比阈值是99.975%。在一些实施例中,如果数字图像中至少95%的癌细胞是光密度阳性的、或光密度阴性但位于光密度阳性癌细胞的预定义距离内,即如果接近度分数是至少95%,则将患者指定为QCS阳性。在一些实施例中,如果接近度分数是至少98%,则患者为QCS阳性的。在一些实施例中,如果接近度分数是至少99%,则患者为QCS阳性的。在一些实施例中,如果接近度分数是至少99.9%,则患者为QCS阳性的。

[0139] 使用已知对ADC疗法具有应答的患者的训练队列来优化步骤14中使用的光密度阈值、步骤15中使用的预定义距离、以及步骤16中使用的预定百分比阈值。通过使用Kaplan-Meier分析找到最低对数秩p值来进行优化,以将患者分层为具有肿瘤缩小和肿瘤生长的组。尽管PFS与患者的生存时间无关,而是与没有肿瘤生长的时间相关,仍将无进展生存期(PFS)映射到Kaplan-Meier曲线上。因此,二进制接近度分数指示癌症患者将在肿瘤生长方面对涉及抗TROP ADC的疗法的应答情况。

[0140] 在步骤17中,如果分数超过预定百分比阈值,则向评分阳性的患者推荐涉及抗TROP2 ADC的疗法。

[0141] VII.预测和评分方法的实例

[0142] A.染色组织的图像分析

[0143] 现在结合染色的癌症组织的特定图像来描述图13的方法。

[0144] 在步骤11中,将组织样品使用与诊断性抗体连接的染料免疫组织化学染色,该诊断性抗体与组织样品中癌细胞上的相关蛋白质结合。图14(左上方图像)是在步骤11中获取

的一部分染色组织的数字图像18。图像18示出了癌症患者的组织,该组织已用与染料连接的抗TROP2诊断性抗体免疫组织化学染色。在此实例中,诊断性抗体是抗TROP2生成的克隆,重新格式化为兔抗人TROP2 IgG1克隆。IgG1指示抗TROP2抗体的同种型。抗TROP2抗体与跨膜蛋白TROP2结合,使得3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色指示组织样品中TROP2蛋白的位置。

[0145] 在步骤12中,对数字图像18进行图像分析,以使用卷积神经网络生成癌细胞核和膜的后部图像层。使用图像分析检测癌细胞及其组分,如细胞核、膜和细胞质。图14说明了步骤12的图像分析过程。卷积神经网络生成后部层(灰度图像),对于数字图像18的每个像素,该后部层指示每个像素属于细胞核(图14的右上方图像)或细胞膜(图14的左下方图像)的概率。高概率示为黑色,低概率示为白色。右上方图像还示出了首先鉴别的细胞核中心,以通过从细胞核中心向外生长直到遇到从另一个细胞核中心的生长来生成细胞膜目标。

[0146] 在一个实施例中,卷积神经网络包括来自输入图像18朝向具有非常低的空间尺寸(1至16个像素)的瓶颈层的一系列卷积层,以及朝向具有与输入图像18相同尺寸的后部层的一系列去卷积层。这种网络结构被称为U-Net。卷积神经网络权重的训练是通过以下方式进行的:在多个训练图像中生成细胞核和膜的人工注释层,然后通过优化算法调整网络权重,使得生成的后部层与人工生成的注释层最为相似。

[0147] 在另一个实施例中,细胞核和膜的注释层是自动生成的,并在多个训练图像中进行人工校正。上皮细胞区域和细胞核中心分别被人工注释为区域和点。对于每张训练图像,膜的分割是通过应用类似于区域增长的算法(例如,分水岭分割)自动生成的,该算法由带注释的细胞核中心作为种子并受到带注释的上皮区域的范围限制。考虑到训练图像,通过应用斑点(blob)检测算法(例如,通过最大稳定极值区域MSER算法)和通过仅选择检测到的含有带注释的细胞核中心的斑点作为细胞核,自动生成细胞核的分割。对自动生成的细胞膜和细胞核的分割进行视觉审查并在必要时进行人工校正。校正步骤涉及以下方法之一:拒绝不正确分割的细胞膜或细胞核,明确接受正确注释的细胞膜或细胞核,或细化细胞膜或细胞核的形状。对于每张具有带注释的细胞膜或细胞核的图像,创建注释层。在一个实施例中,如果注释层的每个像素属于注释目标(细胞膜或细胞核),则对其分配"1",否则对其分配"0"。在另一个实施例中,注释层的像素表示与最近的注释目标的距离。通过优化算法来调整网络权重,使得生成的后部层与自动生成的细胞膜和细胞核注释层最为相似。

[0148] 图15说明了步骤13,其中检测到各自包括细胞膜和细胞质的单个癌细胞目标。启发式图像分析过程使用分水岭分割法,以使用由卷积神经网络生成的细胞核后部层来分割细胞核。分割生成细胞核目标。对每个细胞核目标分配唯一标识符(UID)。在图15(右下方图像)中,单独鉴别的细胞核示为深色目标。检测到的细胞核也在输入图像18(左上方图像)以及细胞核(右上方图像)和细胞膜(左下方图像)的后部层中作为覆盖图展示。

[0149] 在一个实施例中,分水岭分割涉及用预定义的第一尺寸阈值对核后部层进行阈值化。所有高于第一尺寸阈值的单一连接像素都被认为属于细胞核目标。弃去面积小于16um^2的细胞核目标。对每个细胞核目标分配UID。在后续步骤中,细胞核目标朝向更小的细胞核后部增长,其中增加的细胞核后部像素必须大于第二预定阈值。

[0150] 图16说明了膜目标的检测和分割,这些膜目标是通过使检测到的细胞的边界像素区域向外增长到膜概率层和预定义膜层后部阈值来分割的。较厚的边界区域成为膜目标。对每个膜目标分配与相关细胞核目标相同的UID。

[0151] 使用细胞核的UID将膜与细胞核之间的空间分配给细胞质。对于每个膜(图16见左上方图像)和细胞质(图16见左上方图像),将DAB染色的平均光密度与UID一起输出到硬盘驱动器上的文件中。对于每个细胞(定义为包括细胞核、细胞质和细胞膜),还输出了载玻片内细胞的重心位置(x,y)。该文件可以留在硬盘、固态盘或计算机系统中的一部分专用RAM上。

[0152] 图17说明了图像分析软件环境中图像分析的结果。图17(左上方图像)作为染色组织的数字图像的叠加图示出了细胞核目标和细胞膜目标的分割。图17(左下方图像)作为数字图像的光密度表示的叠加图示出了细胞核目标的分割。暗光密度像素与DAB量大相关,而亮光密度像素与DAB量小相关。每个图像像素的DAB光密度是由图像像素的红-绿-蓝表示通过以下方式计算的:对红-绿-蓝色彩空间进行转换,使得棕色DAB分量变成独立色彩,并对该棕色色彩分量取对数。图17(右上方图像)示出了用于生成分割图像的图像分析脚本。图17(右下方图像)示出了图像18中所有细胞膜目标和细胞质目标的输出测量值。

[0153] B.预测性功效分数的计算

[0154] 基于膜目标和任选细胞质目标内DAB染色的光密度,为数字图像18中示出的组织样品确定空间接近度分数。空间接近度分数还考虑了相邻癌细胞的膜目标和任选细胞质目标中DAB染料的染色强度,这些相邻癌细胞与正在计算单细胞ADC分数的癌细胞相距比预定义距离更近。存在两种类型的空间接近度分数:二进制空间接近度分数(bSPS)和连续空间接近度分数(cSPS)。空间接近度分数估计ADC药物的旁观者活性的影响。旁观者活性的特征在于从内化ADC药物的细胞释放的ADC有效载荷的局部毒性。局部毒性的有效范围表示为二进制空间接近度分数和连续空间接近度分数中的预定义距离参数。

[0155] 图18示出了如何确定二进制空间接近度分数(bSPS)的实例。二进制空间接近度分数是百分比分数,其等于(i)数字图像18中染色强度等于或超过光密度阈值的癌细胞的数量加上(ii)数字图像中染色强度小于光密度阈值但位于染色强度等于或超过光密度阈值的至少一个癌细胞的预定义距离内的癌细胞的数量之和,再除以数字图像18中癌细胞的总数。

[0156] 图18说明了来自步骤12-13的图像分析的具有不同染色光密度的十个示例性癌细胞(也称为肿瘤细胞)。图14-16中说明的启发式图像分析步骤用于获得向图像目标的分割,这些图像目标包括癌细胞目标、细胞膜目标和细胞质目标。圆周上有实线的圆圈表示其棕色DAB染色的光密度(对应于靶蛋白TROP2的量)大于或等于预定光密度阈值的肿瘤细胞。在此实例中,光密度阈值为十二,其中光密度的最大标度为255。图18中的三个癌细胞19-21被分类为光密度阳性。具有虚线圆周的圆圈表示棕色DAB染色的光密度小于预定光密度阈值的肿瘤细胞。七个癌细胞22-28被分类为光密度阴性。具有虚线圆周的较深灰色圆圈表示位于至少一个光密度阳性癌细胞的预定义距离内的光密度阴性癌细胞。两个癌细胞22-23是光密度阴性的,但也位于光密度阳性癌细胞的预定义距离内。在此实例中,预定义距离是25微米。

[0157] 在此实例中,二进制空间接近度分数等于50%的百分比分数,其如图18所示计算为三个光密度阳性细胞和在光密度阳性细胞的预定义距离内的两个光密度阴性细胞之和,再除以总共十个癌细胞([3+2]/10=0.5)。

[0158] 在图18的示意图中,该三个癌细胞19-21表达大量靶蛋白TROP2并且非常有可能被

进入细胞的与ADC抗体连接的ADC有效载荷(例如细胞毒素)杀伤(图19中的作用1)。两个癌细胞22-23不表达足够量的靶蛋白TROP2,无法被抗TROP2ADC直接杀伤。然而,由于距光密度阳性细胞19-21中至少一个的接近度,从细胞19-21释放的毒性有效载荷也将杀伤癌细胞22-23(图19中的作用3)。剩余的光密度阴性癌细胞24-28将保持活性并且可以成为耐药机制的起源,最终可导致患者死亡。

[0159] 图19说明了抗TROP2 ADC疗法杀伤癌细胞的机制。在第一步骤中,ADC抗体与靶蛋白TROP2结合并抑制靶蛋白的自然功能,这可导致细胞死亡。在第二步骤中,有效载荷(例如,I型拓扑异构酶抑制剂)内化到细胞中并通过有效载荷的毒性杀伤细胞。有效载荷的这种摄取取决于膜上靶蛋白的量,并且还取决于膜上和细胞质中靶蛋白量的差异。摄取后,有效载荷可以从细胞中释放到周围组织中。在第三步骤中,有效载荷可以进入附近的细胞并且也可能杀伤它们。有效载荷在组织中的空间分布是通过被动扩散传播的。

[0160] 传统的IHC评分既反映了ADC结合引起的靶蛋白的抑制效果,也反映了细胞毒性有效载荷与ADC抗体一起进入癌细胞的效果。因此,传统的ADC疗法评分并不反映靶蛋白在细胞质中存在的重要性以及细胞毒性有效载荷的从杀伤的第一癌细胞释放后扩散到组织中的作用。相比之下,新型预测空间接近度分数测量细胞毒性有效载荷释放对相邻癌细胞的影响。

[0161] 图20-22说明了如何确定连续空间接近度分数的实例。尽管连续空间接近度分数应用了预定义距离,但光密度阴性癌细胞仍然被赋予一些权重,尽管位于比距光密度阳性癌细胞的预定义距离更远。位于预定义距离外的光密度阴性癌细胞的权重可以是高斯的或线性的。图23中所示的用于连续空间接近度分数的公式应用了高斯加权。此外,连续空间接近度分数的这个实施例还考虑了细胞质中的染色。基于膜目标和任选细胞质目标内DAB染色的光密度,计算数字图像18中所示的组织样品的连续空间接近度分数。

[0162] 图20在示意图中使用膜和细胞质像素的灰度值说明了步骤12-13的图像分析的染色光密度的示例性定量结果。图14-16中说明的启发式图像分析步骤用于获得图20的向细胞核、细胞膜和细胞质的示例分割。图20中的亮灰度值与高DAB光密度相关,因此与大量诊断性抗体靶向的蛋白质相关。暗灰度值与低DAB光密度相关。较亮的像素对应于较高的DAB光密度。

[0163] 图21列出了图20的图像的膜上和细胞质中的示例性定量染色量,其在图21中部分重现。来自第一细胞、第二细胞和第三细胞的膜的棕色DAB信号的光密度分别为0.949、0.369和0.498。在此实例中,光密度表示为最大染色255的百分比。来自第一细胞、第二细胞和第三细胞的细胞质的棕色DAB信号的光密度分别为0.796、0.533和0.369。在图21的示意图中,第一癌细胞29表达大量靶蛋白TROP2并且非常有可能被进入细胞的与ADC抗体连接的ADC有效载荷(例如细胞毒素)杀伤(图19中的作用1)。第二癌细胞30和第三癌细胞31不表达足够量的靶蛋白TROP,无法被抗TROP2 ADC直接杀伤。然而,由于第二癌细胞30与第一癌细胞29相邻,从第一癌细胞释放的毒性有效载荷也会杀伤第二癌细胞30(图19中的作用3)。第三癌细胞31将保持活性并且可以成为耐药机制的起源,最终可导致患者死亡。

[0164] 在图13的方法的步骤14中,确定每个癌细胞的平均光密度。然后在用于连续分数的方法10的修改中,确定单细胞空间接近度分数。图22说明了图21所示三个细胞中的每个的单细胞空间接近度分数的计算,且并入了用于细胞分离的指数加权因子以反映ADC有效

载荷(例如细胞毒素)向相邻细胞中的摄取。单细胞分数可以基于图22中所示的公式计算。公式中使用的预定义距离是50微米。将图21中列出的细胞膜(0.949、0.369和0.498)和细胞质(0.796、0.533和0.369)的DAB信号的光密度输入到图22中说明的计算中。第一细胞、第二细胞和第三细胞29、30、31的单细胞空间接近度分数分别为0.145、0.012和0.064。

[0165] 因此,连续空间接近度分数并入了使用DAB光密度对细胞膜上靶蛋白的量的测量,以及任选对ADC有效载荷(例如细胞毒素)摄取量的估计。如图21所示,第一细胞的ADC有效载荷(例如细胞毒素)的摄取取决于其膜和其细胞质中染料的量,以及第一细胞附近的第二细胞的膜和细胞质中染料的量。更特别地,附近可以是围绕第一癌细胞具有预定义半径的圆盘。在一个实施例中,第一癌细胞的连续空间接近度分数通过膜和细胞质目标的DAB光密度的几次幂的距离加权总和来确定,这些膜和细胞质目标的相关癌细胞中心比预定义距离更靠近第一癌细胞中心。在一个实施例中,预定义距离是50μm,如图22的计算中使用的。在另一个实施例中,距离是20μm。在又另一个实施例中,距离加权涉及计算总和中从第一癌细胞中心到其他癌细胞中心按比例的负欧氏距离的指数。在另一个实施例中,总和中的幂限制为0、1和2(常数、线性项、平方)。

[0166] 图23示出了用于以连续空间接近度分数的形式计算单细胞ADC分数的公式的一个实施例。公式中的函数a_{kl}取决于细胞j到细胞i的距离$|r_j-r_i|$。ODM_j是细胞j的膜的DAB光密度,并且ODC_j是细胞j的细胞质的DAB光密度。常数A_ij、r_norm和d对于所有类型的癌症而言是相同的。然而,确定患者是否有资格接受ADC疗法的分数阈值对于不同类型的癌症而言是不同的。

[0167] 图23中用于连续空间接近度分数的公式将高斯加权应用于光密度阴性癌细胞,该光密度阴性癌细胞位于距正在计算单细胞分数的细胞的预定义距离外。在另一个实施例中,对位于预定义距离外的光密度阴性癌细胞给予线性加权。对于细胞$_i$,应用线性加权的单细胞连续空间接近度分数的公式是:

[0168] Sum_j,其中$|r_j-r_i|<d\{膜OD_j x(1-|r_j-r_i|/d)\}$

[0169] C.二进制空间接近度分数的验证。

[0170] 基于患者试验(J101 NCT03401385)验证了各种QCS预测应答分数,该患者试验是德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)的I期临床试验。J101患者试验的数据集包括染色组织图像(使用Abcam抗体克隆EPR 20043)和患有多种癌症类型的患者的治疗应答率。预测应答分数的第一次验证基于115名患有非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的数据。使用病理学家的注释训练每个应答分数,并在不可见的数据上验证评分方法的性能,以确保其广义性和稳健性。将应答分数盲应用于J101数据。计算所检测的膜上的光密度OD(棕色DAB染色强度水平)以得出与无进展生存期(PFS)预测有联系的应答分数特征。选择应答分数特征以最大化无肿瘤生长(或肿瘤缩小)的时间。

[0171] 图13的方法涉及新型QCS方法的第一应答分数特征,其是二进制空间接近度分数。将无肿瘤生长的时间(无进展生存期时间)最大化,膜光密度截止参数为25,预定义距离为50微米。因此,使用115名NSCLC患者的队列来验证表示为bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25的二进制空间接近度分数。

[0172] 在方法13的步骤15中,基于数字图像中光密度(OD)阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的百分比生成组织样品的二进制空间接近度分

数。在QCS方法的这个实施例中,预定义距离是25微米。如果平均光密度大于或等于光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阳性,并且如果平均光密度小于光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阴性。在这个实施例中,在最大光密度为255的标度上,光密度阈值为25。

[0173] 在方法13的步骤15中,如果二进制空间接近度分数超过预定阈值,则将癌症患者鉴别为可能从施用ADC中获益的癌症患者(bSPS阳性)。在这个实施例中,预定阈值是99.97%。预定义距离、光密度阈值和预定阈值与训练队列中115名患者的应答相关。

[0174] 图24说明了预定义距离、光密度阈值和预定阈值如何与用抗TROP2ADC治疗的癌症患者的组织样品的应答相关。图24是示出J101试验中115名NSCLC患者的实际结果之间相关性的散点图。患者的实际应答表示为疾病进展PD(圆形)、疾病稳定SD(三角形)、部分缓解PR(正方形)和不可评估的NE(菱形)。115名患者在应答组中的分布为PD=21,SD=60,PR=20和NE=14。肿瘤缩小少于30%且生长少于30%的患者被认为具有稳定的疾病。部分缓解PR被定义为肿瘤缩小在30%-100%之间,完全缓解CR为肿瘤缩小100%和肿瘤消除。在图24的散点图中,完全缓解被分类为部分缓解。尽管将各种剂量的ADC施用于115名患者(4mg/kg、6mg/kg和8mg/kg),但是没有观察到各种剂量与不同应答的相关性。图24示出了以百分比计的肿瘤生长速率与预测应答分数之间的关系:bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25((i)OD阳性的、或(ii)OD阴性且在OD阳性细胞的50微米内的癌细胞百分比)。Y轴值大于0表示观察期间肿瘤大小增大,值小于0表示观察期间肿瘤大小缩小。

[0175] 图24的最佳拟合线显示,预测应答分数bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25与治疗后肿瘤大小的变化之间存在负相关。最佳拟合线的斯皮尔曼相关性rho是R=-0.28。因此,肿瘤大小较大的减小与较高的预测应答分数相关。

[0176] 图25是使用二进制空间接近度分数分层的J101试验中两组115名NSCLC患者的无进展生存期的Kaplan-Meier曲线图。使用图13的方法将115名患者分成QCS阳性患者和QCS阴性患者。使用QCS特征bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25实现的两个Kaplan-Meier曲线之间的分层质量由0.00047的对数秩p值表示。有88名bSPS阳性(QCS阳性)患者和27名bSPS阴性(QCS阴性)患者。88名bSPS阳性患者组表现出14.8%的客观缓解率(ORR)和5.15个月的平均无进展生存期(mPFS)。27名bSPS阴性患者组表现出18.1%的客观缓解率和1.44个月的平均无进展生存期。上方Kaplan-Meier曲线示出了具有更好生存结局的88名患者组,该患者组对应于至少99.97%的细胞(i)表现出至少25的TROP2染色光密度,或(ii)位于表现出25的最小染色的细胞50微米内的患者。因此,图13的评分方法将151名J101肺癌患者中的88名鉴别为可能从抗TROP2 ADC疗法中获益。

[0177] 图26示出了图25的Kaplan-Meier曲线的88名bSPS阳性患者和27名bSPS阴性患者的蜘蛛图。蜘蛛图的每个点都指示在指定时间段后患者肿瘤缩小或生长的百分比。图26的蜘蛛图指示以天计的时间,而图25的Kaplan-Meier曲线中的无进展生存时间以月计示出。例如,在图25的上方Kaplan-Meier曲线上近25个月的最后一点对应于bSPS阳性患者的下方蜘蛛图中约750天的右下点。bSPS阳性患者的下方蜘蛛图中点分布的权重低于0%线,这表示肿瘤已缩小的患者的加权。另一方面,bSPS阴性患者的上方蜘蛛图中点分布的权重高于0%线,这指示肿瘤已生长的患者的加权。

[0178] 在图25-26中,肿瘤缩小30%或更多的患者被分类为对抗TROP2 ADC具有阳性应答

(包括部分缓解PR患者和完全缓解CR患者)。bSPS阴性患者的上方蜘蛛图示出了27名bSPS阴性患者中只有四名表现出对ADC的阳性应答。(在50天后具有单次观察的在-30％线以下的点被认为是不可评估的NE,因此不是阳性应答。)在bSPS阳性患者的下方蜘蛛图中,在-30％线以下有16个点(除了NE点),对应于对ADC表现出阳性应答的患者。

[0179] 图27是瀑布条形图,其示出了从最大肿瘤生长到最大肿瘤缩小排序的,J101试验中115名NSCLC患者中的105名的临床应答。10名不可评估(NE)患者未示出肿瘤生长/缩小的结果。实心条表示bSPS阳性患者,其二进制空间接近度分数等于或超过99.975％。具有斜线阴影的条表示bSPS阴性患者,其二进制空间接近度分数小于99.975％。条形图示出了QCS预测应答分数bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25将更大部分的在ADC治疗后肿瘤缩小的患者鉴别为bSPS阳性,并且将更大部分的在ADC治疗后肿瘤生长的患者鉴别为bSPS阴性。

[0180] D.归一化膜OD分数的验证

[0181] 图13的新型方法的变体也基于使用抗TROP2 ADC德达博妥单抗-德鲁替康(DS-1062)的115名NSCLC患者的患者试验(J101 NCT03401385)进行验证。图28是预测癌症患者对抗TROP2 ADC的应答的方法32的步骤33-40的流程图。方法32是图13的方法10的另一个实施例,并且基于每个癌细胞的归一化膜光密度预测涉及抗TROP2 ADC的疗法的功效。归一化膜光密度等于膜染色的平均光密度除以膜染色的平均光密度加上细胞质染色的平均光密度之和。

[0182] 在步骤33中,获取来自癌症患者的组织切片的数字图像18,该组织切片已使用与诊断性抗体连接的染料染色,该诊断性抗体靶向与ADC疗法靶向的蛋白相同的蛋白,在这种情况下是TROP2蛋白。在步骤34中,对数字图像进行图像分析,以生成癌细胞、细胞膜和细胞质目标的图像目标。在步骤35中,确定每个癌细胞的细胞膜中染料染色的平均光密度(OD)。在步骤36中,确定每个癌细胞的细胞质中染料染色的平均光密度(OD)。

[0183] 在步骤37中,计算数字图像中每个癌细胞的归一化膜光密度。归一化膜光密度等于膜染色的平均光密度除以膜染色的平均光密度加上细胞质染色的平均光密度之和。在步骤38中,(i)如果每个癌细胞的归一化膜光密度等于或小于归一化膜阈值,则将该癌细胞鉴别为归一化膜阳性,或(ii)如果每个癌细胞的归一化膜光密度大于归一化膜阈值,则将该癌细胞鉴别为归一化膜阴性。在步骤39中,基于数字图像中被鉴别为归一化膜阳性的癌细胞的百分比,生成组织样品的预测应答分数。如果归一化膜阳性的癌细胞的百分比等于或大于百分比阈值,则预测应答分数为阳性,并且如果归一化膜阳性的癌细胞的百分比小于百分比阈值,则预测应答分数为阴性。在步骤40中,如果预测应答分数是阳性的,则将癌症患者鉴别为可能从施用抗TROP2ADC中获益的癌症患者。

[0184] 将归一化膜阈值和百分比阈值与已用TROP2 ADC治疗的115名训练患者队列的应答关联。通过对临床试验数据进行无进展生存期(PFS)分析来确定这些参数。将无肿瘤生长的时间(无进展生存期时间)最大化,其中归一化膜阈值(OD/OD)的参数为0.486,百分比阈值为5％。因此,将115名NSCLC患者队列用于验证表示为memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5的预测应答分数。

[0185] 图29说明了归一化膜阈值和百分比阈值如何与用抗TROP2 ADC治疗的癌症患者的组织样品的应答相关。图29是示出J101试验中115名NSCLC患者的实际结果之间相关性的散

点图。患者的实际应答表示为疾病进展PD(圆形)、SD疾病稳定SD(三角形)、部分缓解PR(正方形)和不可评估的NE(菱形)。115名患者在应答组中的分布为PD＝21,SD＝60,PR＝20和NE＝14。肿瘤缩小少于30％且生长少于30％的患者被分类为疾病稳定SD,而肿瘤缩小在30％与100％之间的患者被认为表现出部分缓解PR。在图29的散点图中,由于肿瘤消除(缩小100％)而具有完全缓解CR的患者也被分类为具有部分缓解PR。

[0186] 图29示出了以百分比计的肿瘤生长速率与预测应答分数之间的关系:memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5(归一化膜OD)。Y轴值大于0表示观察期间肿瘤大小增大,而值小于0表明观察期间肿瘤大小缩小。图29的最佳拟合线显示,预测应答分数memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5与治疗后肿瘤大小的变化之间存在正相关。最佳拟合线的斯皮尔曼相关性rho是R＝0.14。因此,肿瘤大小较大的减小与较低的预测应答分数相关。

[0187] 图30是使用图28的方法32将J101试验的115名NSCLC患者分为84名QCS阳性患者和31名QCS阴性患者的无进展生存期的Kaplan-Meier图。使用QCS特征memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5实现的两个Kaplan-Meier曲线之间的分层质量由0.00054的对数秩p值表示。84名QCS阳性患者组表现出22.6％的客观缓解率(ORR)和5.45个月的平均无进展生存期(mPFS)。31名QCS阴性患者组表现出3.2％的客观缓解率和2.85个月的平均无进展生存期。上方Kaplan-Meier曲线示出具有更好生存结局的84名患者组,该患者组对应于至少5％的癌细胞表现出等于或小于0.486的归一化膜光密度的患者。因此,图28的评分方法32将151名J101肺癌患者中的84名鉴别为可能从抗TROP2 ADC疗法中获益。

[0188] 图31示出了图30的Kaplan-Meier曲线的84名QCS阳性患者和31名QCS阴性患者的蜘蛛图。蜘蛛图的每个点都指示在指定时间段后患者肿瘤缩小或生长的百分比。图31的蜘蛛图指示以天计的时间,而图30的Kaplan-Meier曲线中的无进展生存期时间以月计示出。例如,在图30的上方Kaplan-Meier曲线上近25个月的最后一点对应于QCS阳性患者的下方蜘蛛图中约750天的右下点。QCS阳性患者的下方蜘蛛图中点分布的权重低于0％肿瘤生长线,这指示方法32已主要鉴别了肿瘤已缩小的患者。另一方面,QCS阴性患者的上方蜘蛛图中点分布的权重高于0％线,这指示方法32已主要鉴别了肿瘤已经生长的患者。

[0189] 图32是瀑布条形图,其示出了从最大肿瘤生长到最大肿瘤缩小排序的,J101试验中115名NSCLC患者中的105名的临床应答。10名不可评估(NE)患者未示出肿瘤生长/缩小的结果。实心条表示QCS阳性患者,其归一化膜OD特征的应答分数为0.486或更低。具有斜线阴影的条表示QCS阴性患者,其归一化膜OD特征的应答分数高于0.486。条形图示出了QCS特征的应答分数memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5将更大部分的在ADC治疗后肿瘤缩小的患者鉴别为QCS阳性,并且将更大部分的在ADC治疗后肿瘤生长的患者鉴别为QCS阴性。

[0190] E.组合bSPS和归一化膜OD分数的验证

[0191] 图33是预测癌症患者对抗TROP2 ADC的应答的额外方法41的步骤42-50的流程图。方法41基于二进制空间接近度分数和归一化膜光密度的组合预测涉及抗TROP2 ADC的疗法的功效。

[0192] 在步骤42中,获取来自癌症患者的组织切片的数字图像18,该组织切片已使用与诊断性抗体连接的染料染色,该诊断性抗体靶向与ADC疗法靶向的蛋白相同的蛋白,在这种

情况下是TROP2蛋白。在步骤43中,对数字图像进行图像分析,以生成癌细胞、细胞膜和细胞质目标的图像目标。在步骤44中,确定每个癌细胞的膜染色的平均光密度(OD)和细胞质染色的平均OD。在步骤45中,计算数字图像18中每个癌细胞的归一化膜光密度,其等于膜染色的平均OD除以膜染色的平均OD加上细胞质染色的平均OD之和。在步骤46中,(i)如果每个癌细胞的归一化膜光密度等于或小于归一化膜阈值,则将该癌细胞鉴别为归一化膜阳性,或(ii)如果每个癌细胞的归一化膜光密度大于归一化膜阈值,则将该癌细胞鉴别为归一化膜阴性。在步骤47中,如果归一化阳性的癌细胞的百分比等于或大于归一化百分比阈值,则将组织样品鉴别为归一化膜阳性,并且如果归一化阳性的癌细胞的百分比小于归一化百分比阈值,则将组织样品鉴别为归一化膜阴性。

[0193] 在步骤48中,如果膜染色的平均OD大于或等于光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阳性,或者如果膜染色的平均OD小于光密度阈值,则将每个癌细胞鉴别为光密度阴性。在步骤49中,如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值,则将组织样品鉴别为接近度阳性。在步骤50中,如果该组织样品是归一化膜阳性且接近度阳性的,则将癌症患者鉴别为可能从施用抗TROP2 ADC中获益的癌症患者。

[0194] 通过对临床试验数据进行无进展生存期(PFS)分析来确定QCS分数的最佳参数。将归一化膜阈值、归一化百分比阈值、光密度阈值和接近度百分比阈值与已用TROP2 ADC治疗的115名训练患者队列的临床应答相关。因此,使用115名NSCLC患者队列来验证组合QCS特征memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5和bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25的预测应答分数。

[0195] 图34是使用图33的方法41将临床试验的115名NSCLC患者分为80名QCS阳性和35名QCS阴性患者的无进展生存期的Kaplan-Meier图。使用bSPS和归一化膜OD的组合实现的两个Kaplan-Meier曲线之间的分层质量由0.00011的对数秩p值表示。80名QCS阳性患者组表现出23.7%的客观缓解率(ORR)和5.45个月的平均无进展生存期(mPFS)。35名QCS阴性患者组表现出0.03%的客观缓解率和2.85个月的平均无进展生存期。上方Kaplan-Meier曲线示出了具有更好生存结局的80名患者组,该患者组对应于(i)至少5%的癌细胞表现出等于或小于0.4864的归一化膜光密度,并且(ii)至少92%的细胞表现出至少25的膜染色光密度,或位于表现出25的最小膜染色的细胞的50微米之内的患者。因此,图33的评分方法41将151名J101肺癌患者中的80名鉴别为可能从抗TROP2 ADC疗法中获益。

[0196] 图33的评分方法41仅鉴别了80名进行ADC疗法的患者,而图13的bSPS评分方法10将151名J101患者中的88名鉴别为可能从ADC疗法中获益。这显示组合的bSPS和归一化膜OD QCS特征比单独特征更具选择性,并且鉴别了从ADC疗法中获益的概率更高的患者。注意,组合QCS特征中使用的至少92%的接近度百分比阈值比单独归一化膜OD特征中使用的至少99.97%的预定阈值更具包容性尽管如此,与通过单独的二进制空间接近度特征仅将27名QCS阴性患者排除在ADC疗法之外相比,通过组合QCS特征将35名QCS阴性患者排除在ADC疗法之外。因此,相比于基于bSPS和归一化膜OD的组合特征,基于每个单独QCS特征,更高比例的患者被鉴别为可能从ADC中获益。

[0197] 图35示出了图34的Kaplan-Meier曲线的80名QCS阳性患者和35名QCS阴性患者的蜘蛛图。蜘蛛图的每个点都指示在指示的天数后患者肿瘤生长或缩小的百分比。蜘蛛图显

示,QCS阳性患者的下方图中明显更多的点低于0%肿瘤生长线,而QCS阴性患者的上方图中点分布的权重高于0%线。

[0198] 图36是瀑布条形图,其示出了从最大肿瘤生长到最大肿瘤缩小排序的,J101试验中115名NSCLC患者中的105名的临床应答。10名不可评估(NE)患者未示出肿瘤生长/缩小的结果。实心条表示QCS阳性患者,其染色组织样品是使用归一化膜OD分数的归一化膜阳性以及使用二进制空间接近度分数的接近度阳性。具有斜线阴影的条表示QCS阴性患者,其染色组织样品不是归一化膜阳性且接近度阳性的。0%肿瘤生长线上方的大部分条具有表示QCS阴性患者的斜线阴影,而0%肿瘤生长线下方的大部分条是表示QCS阳性患者的实心条。因此,条形图显示组合的bSPS和归一化膜OD QCS特征将更大部分的在ADC治疗后肿瘤缩小的患者鉴别为QCS阳性以及将更大部分的在ADC治疗后肿瘤生长的患者鉴别为QCS阴性。

[0199] 尽管为了说明的目的,本发明已经结合某些特定的实施例进行了描述,但本发明并不限于此。在不脱离权利要求书中规定的本发明范围的情况下,可以对所描述的实施例的各种特征进行各种修改、改编和组合。

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWINTHSGV
PKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYY
CARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

（SEQ ID No. 1: 抗TROP2抗体的重链的氨基酸序列）

图1

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYT
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYIT
PLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

（SEQ ID No. 2: 抗TROP2抗体的轻链的氨基酸序列）

图2

TAGMQ

（SEQ ID No. 3: 抗TROP2抗体的CDRH1的氨基酸序列）

图3

WINTHSGVPKYAEDFKG

（SEQ ID No. 4: 抗TROP2抗体的CDRH2的氨基酸序列）

图4

SGFGSSYWYFDV

（SEQ ID No. 5: 抗TROP2抗体的CDRH3的氨基酸序列）

图5

KASQDVSTAVA

（SEQ ID No. 6: 抗TROP2抗体的CDRL1的氨基酸序列）

图6

SASYRYT

（SEQ ID No. 7: 抗TROP2抗体的CDRL2的氨基酸序列）

图7

QQHYITPLT

（SEQ ID No. 8: 抗TROP2抗体的CDRL3的氨基酸序列）

图8

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVR
QAPGQGLEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTST
STAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWYFDVWGQG
TLVTVSS

（SEQ ID No. 9: 抗TROP2抗体的重链可变区的氨基酸序列）

图9

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRT

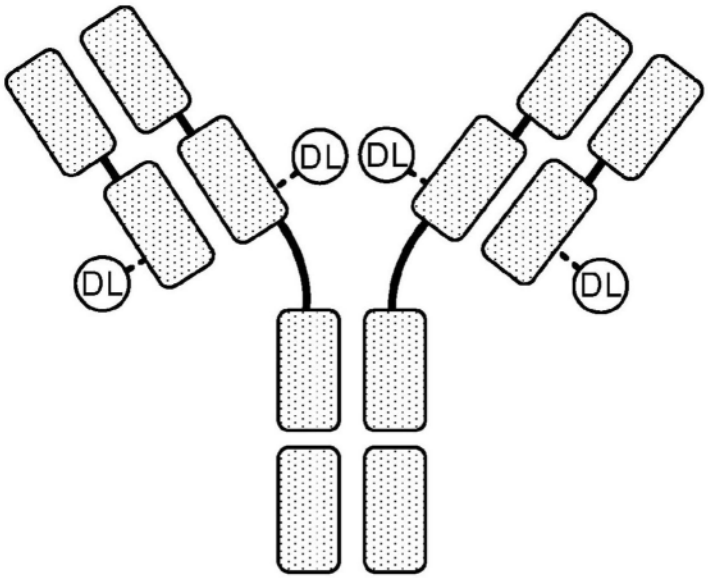
（SEQ ID No. 10: 抗TROP2抗体的轻链可变区的氨基酸序列）

图10

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVR
QAPGQGLEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTST
STAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWYFDVWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

（SEQ ID No. 11: 抗TROP2抗体的重链的氨基酸序列）

图11



（人源化抗 TROP2 IgG1 mAb^3）

图12

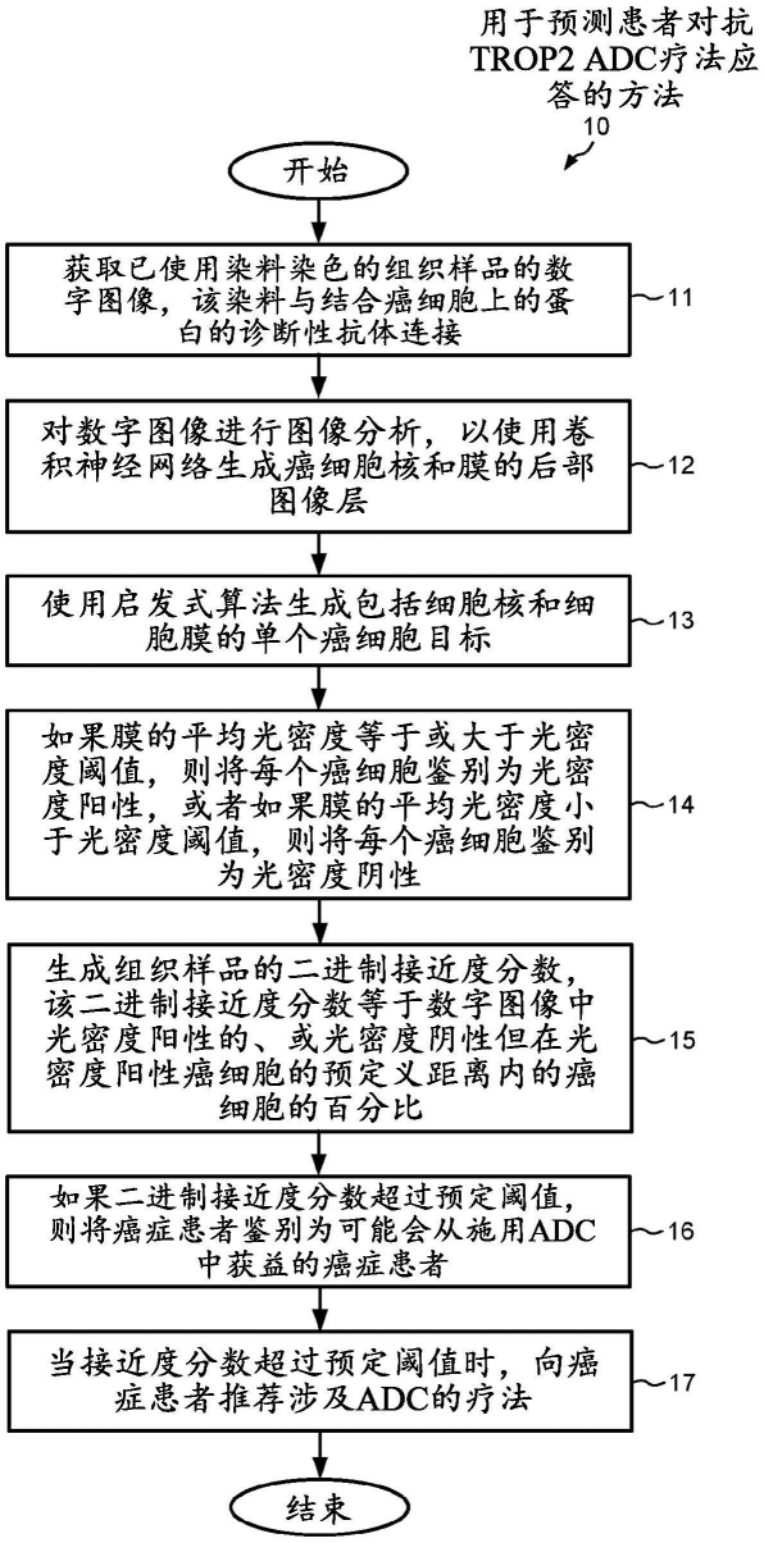

用于预测患者对抗TROP2 ADC疗法应答的方法
10
开始
获取已使用染料染色的组织样品的数字图像，该染料与结合癌细胞上的蛋白的诊断性抗体连接
11
对数字图像进行图像分析，以使用卷积神经网络生成癌细胞核和膜的后部图像层
12
使用启发式算法生成包括细胞核和细胞膜的单个癌细胞目标
13
如果膜的平均光密度等于或大于光密度阈值，则将每个癌细胞鉴别为光密度阳性，或者如果膜的平均光密度小于光密度阈值，则将每个癌细胞鉴别为光密度阴性
14
生成组织样品的二进制接近度分数，该二进制接近度分数等于数字图像中光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的百分比
15
如果二进制接近度分数超过预定阈值，则将癌症患者鉴别为可能会从施用ADC中获益的癌症患者
16
当接近度分数超过预定阈值时，向癌症患者推荐涉及ADC的疗法
17
结束

图13

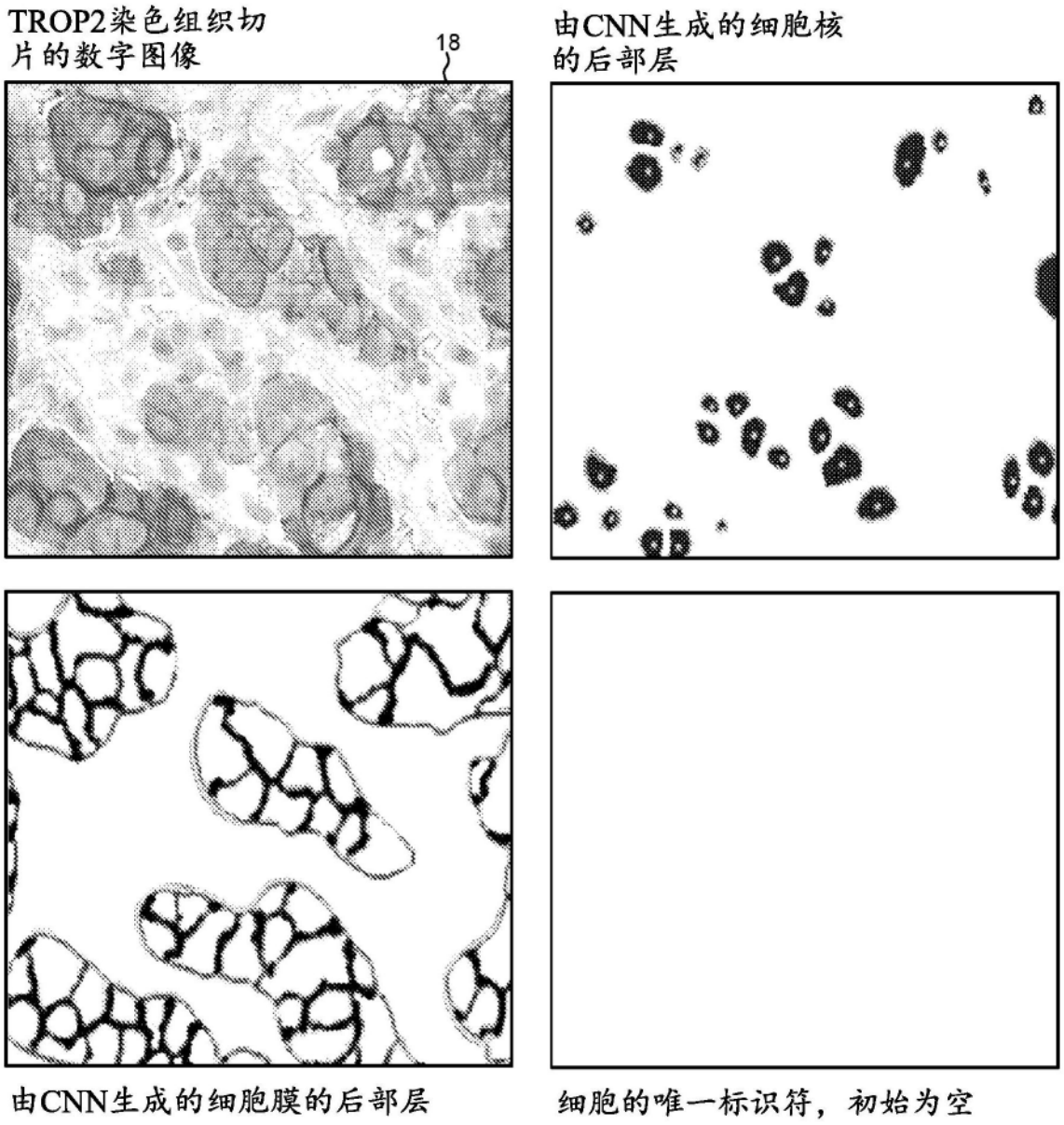

TROP2染色组织切片的数字图像
18
由CNN生成的细胞核的后部层
由CNN生成的细胞膜的后部层
细胞的唯一标识符，初始为空
在图像中，深色对应于高概率，白色对应于低概率

图14

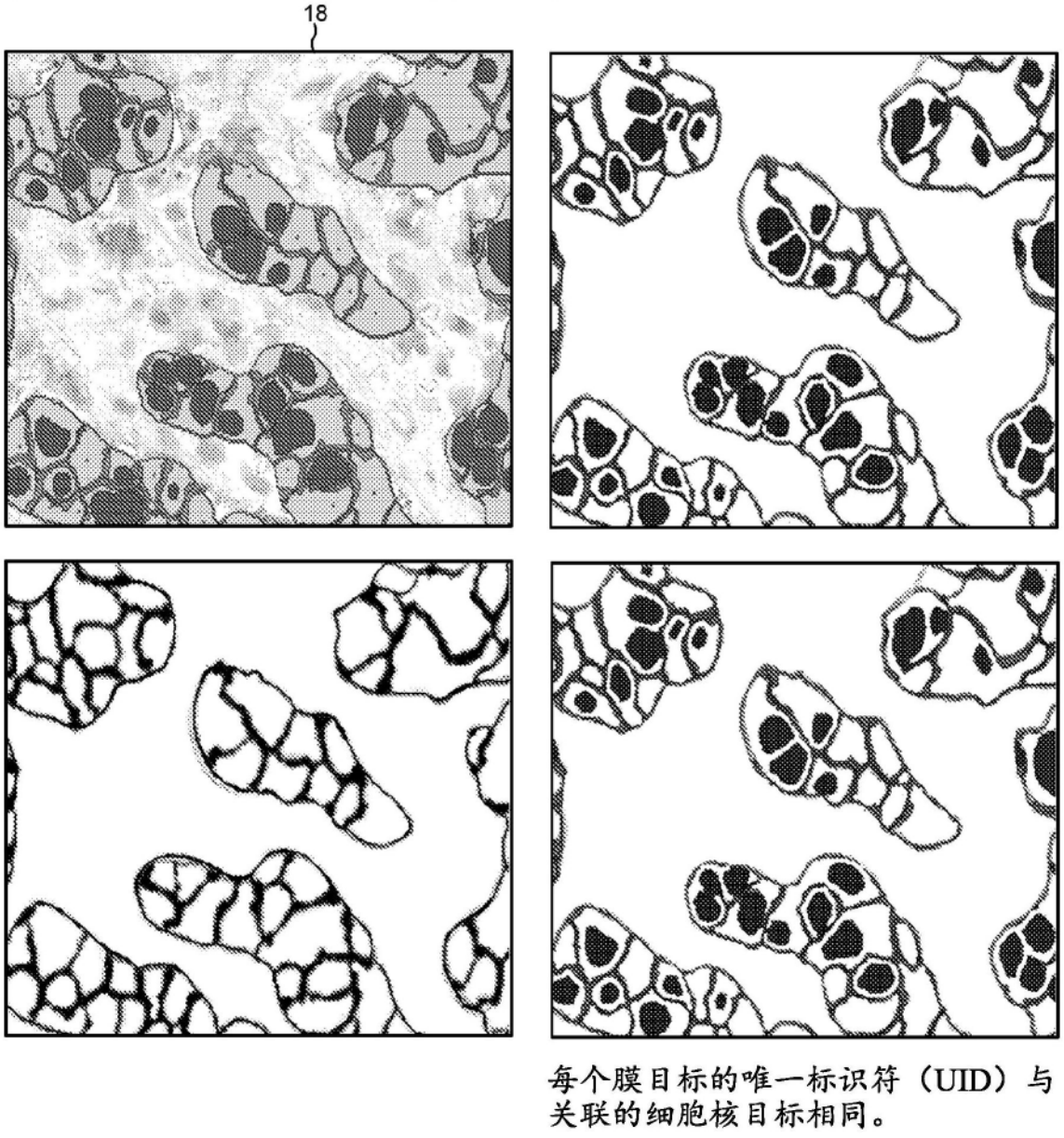

通过每个细胞核的区域生长的细胞分割结果，但有限制：
(1) 在膜后部不向下生长，
(2) 并对细胞边界使用最小目标密度约束
18
每个膜目标的唯一标识符（UID）与关联的细胞核目标相同。

图15

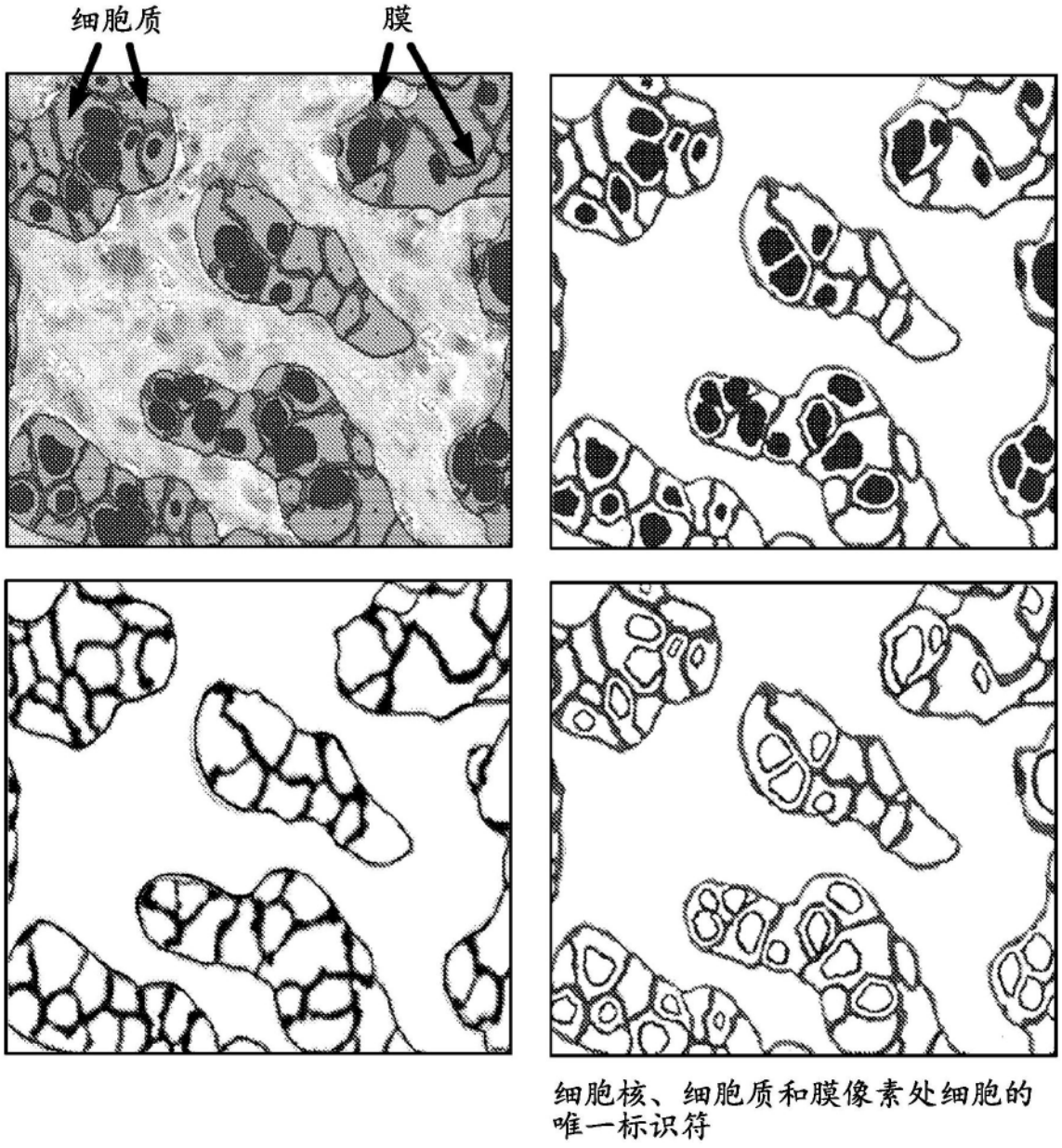

通过将细胞边界像素鉴别为膜，然后将膜区域生长成膜后部>20%的像素的细胞质和膜分割结果。
细胞质
膜
细胞核、细胞质和膜像素处细胞的唯一标识符

图16

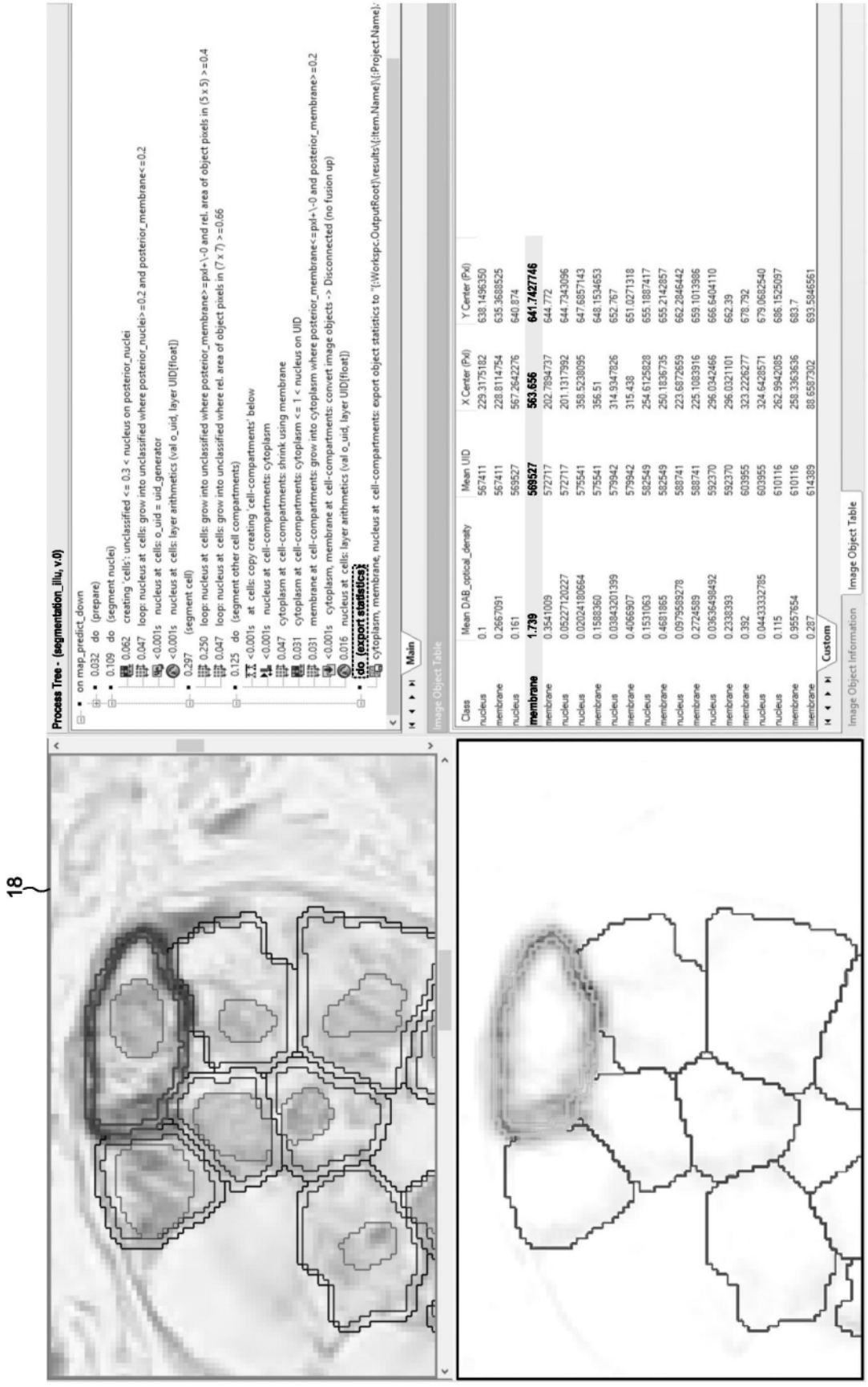
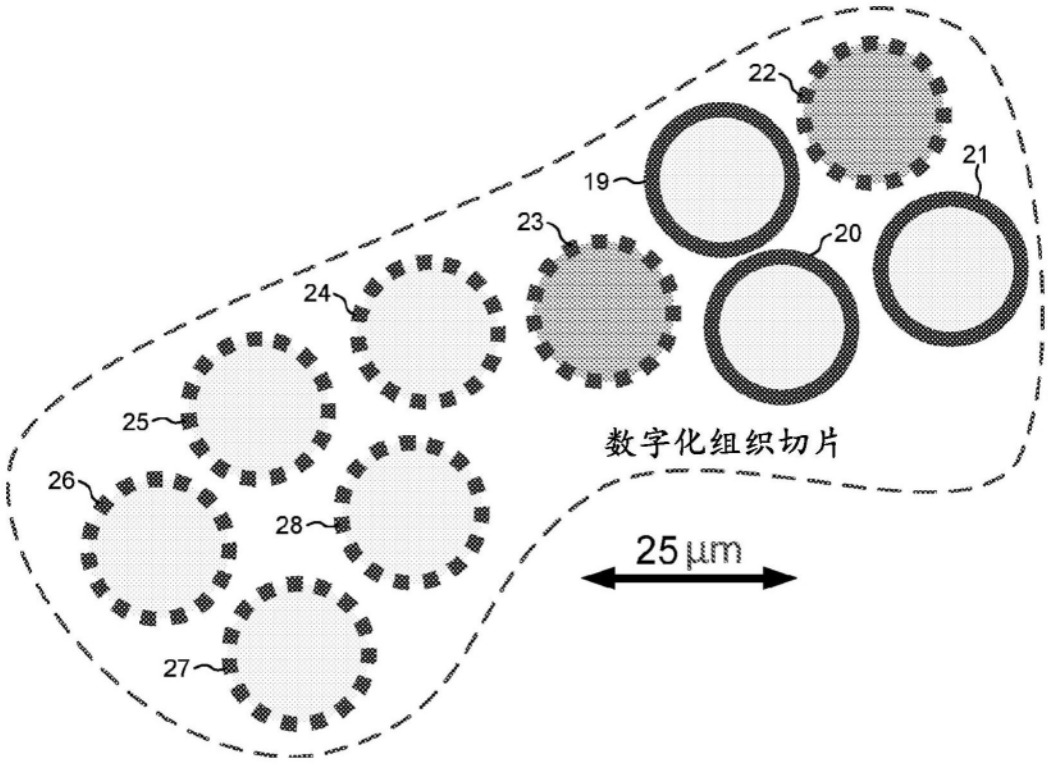

18
Process Tree - (segmentation_illu_v.0)
on map_predict_down
0.032 do (prepare)
0.109 do (segment nuclei)
0.062 creating 'cells': unclassified <= 0.3 < nucleus on posterior_nuclei
0.047 loop: nucleus at cells: grow into unclassified where posterior_nuclei> =0.2 and posterior_membrane<=0.2
<0.001s nucleus at cells: o_uid = uid_generator
<0.001s nucleus at cells: layer arithmetics (val o_uid, layer UID(float))
0.297 (segment cell)
0.250 loop: nucleus at cells: grow into unclassified where posterior_membrane>=pxl+\-0 and rel. area of object pixels in (5 x 5) >=0.4
0.047 loop: nucleus at cells: grow into unclassified where rel. area of object pixels in (7 x 7) >=0.66
0.125 do (segment other cell compartments)
<0.001s at cells: copy creating 'cell-compartments' below
<0.001s nucleus at cell-compartments: cytoplasm
0.047 cytoplasm at cell-compartments: shrink using membrane
0.031 cytoplasm at cell-compartments: cytoplasm <= 1 < nucleus on UID
0.031 membrane at cell-compartments: grow into cytoplasm where posterior_membrane<=pxl+\-0 and posterior_membrane>=0.2
<0.001s cytoplasm, membrane at cell-compartments: convert image objects -> Disconnected (no fusion up)
0.016 nucleus at cells: layer arithmetics (val o_uid, layer UID(float))
do (export statistics)
cytoplasm, membrane, nucleus at cell-compartments: export object statistics to 'f:\Workspc.OutputRoot\results\{:Item.Name}\{:Project.Name}
Main
Image Object Table
Class Mean DAB_optical_density Mean UID X Center (Pxl) Y Center (Pxl)
nucleus 0.1 567411 229.3175182 638.1496350
membrane 0.2667091 567411 228.8114754 635.3688525
nucleus 0.161 569527 567.2642276 640.874
membrane 1.739 569527 563.656 641.7427746
membrane 0.3541009 572717 202.7894737 644.772
nucleus 0.05227120227 572717 201.1317992 644.7343096
nucleus 0.02024180664 575541 358.5238095 647.6857143
membrane 0.1588360 575541 356.51 648.1534653
nucleus 0.03843201399 579942 314.9347826 652.767
membrane 0.4066907 579942 315.438 651.0271318
nucleus 0.1531063 582549 254.6125828 655.1887417
membrane 0.4681865 582549 250.1836735 655.2142857
nucleus 0.09795892278 588741 223.6872659 662.2846442
membrane 0.2724589 588741 225.1083916 659.1013986
nucleus 0.03636498492 592370 296.0342466 666.6404110
membrane 0.2338393 592370 296.0321101 662.39
membrane 0.392 603955 323.2226277 678.792
nucleus 0.04433332785 603955 324.6428571 679.0682540
nucleus 0.115 610116 262.9942085 686.1525097
membrane 0.9557654 610116 258.3363636 683.7
membrane 0.287 614389 88.6587302 693.5846561
Custom
Image Object Information
Image Object Table
在下方图像中，暗对应于高光密度，亮对应于低光密度

图17



肿瘤细胞，其膜像素的平均光密度≥12，最大标度为220。

肿瘤细胞，其膜像素的平均光密度<12，且该细胞位于膜像素的平均光密度≥12的肿瘤细胞的25 μm内。

肿瘤细胞，其膜像素的平均光密度<12

bSPS (r,阈值)=((单细胞光密度分数≥阈值的肿瘤细胞数)+(单细胞光密度分数<阈值且位于单细胞光密度分数≥阈值的肿瘤细胞的半径r之内的肿瘤细胞数))/(所有肿瘤细胞数)

例如上图所示：

bSPS(r=25μm，膜 OD_{CUT}=12) = (3+2)/10 = 0.5 = 50%

二进制空间接近度分数（bSPS）用于估计ADC旁观者活性

图18

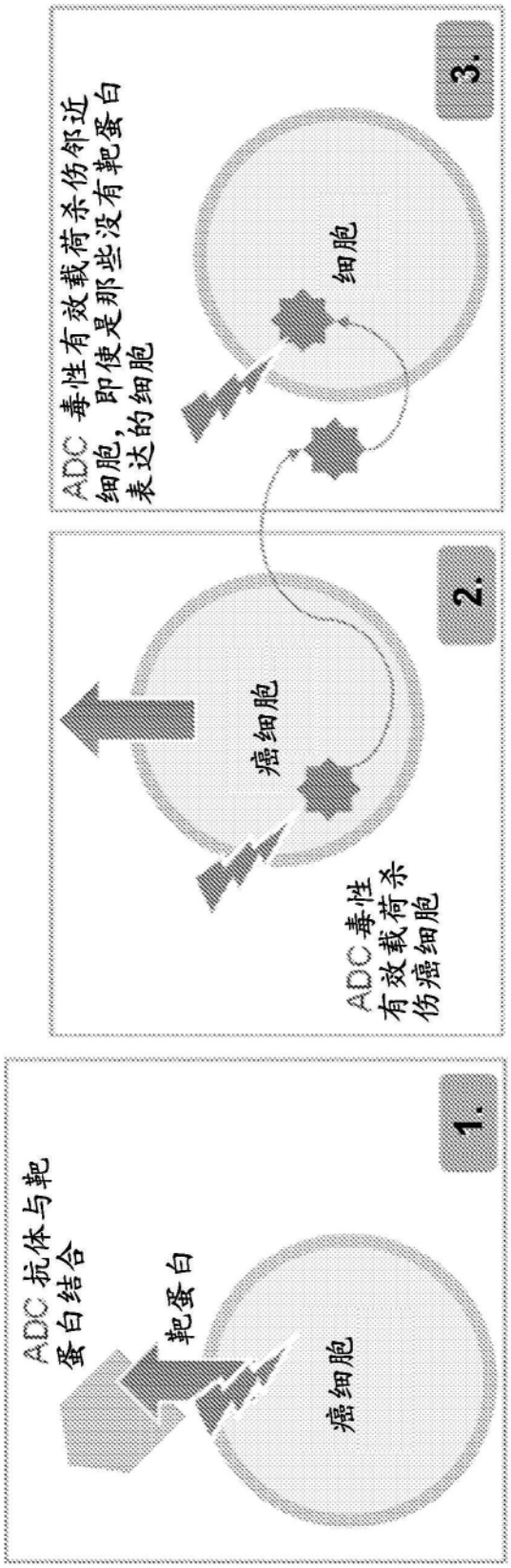
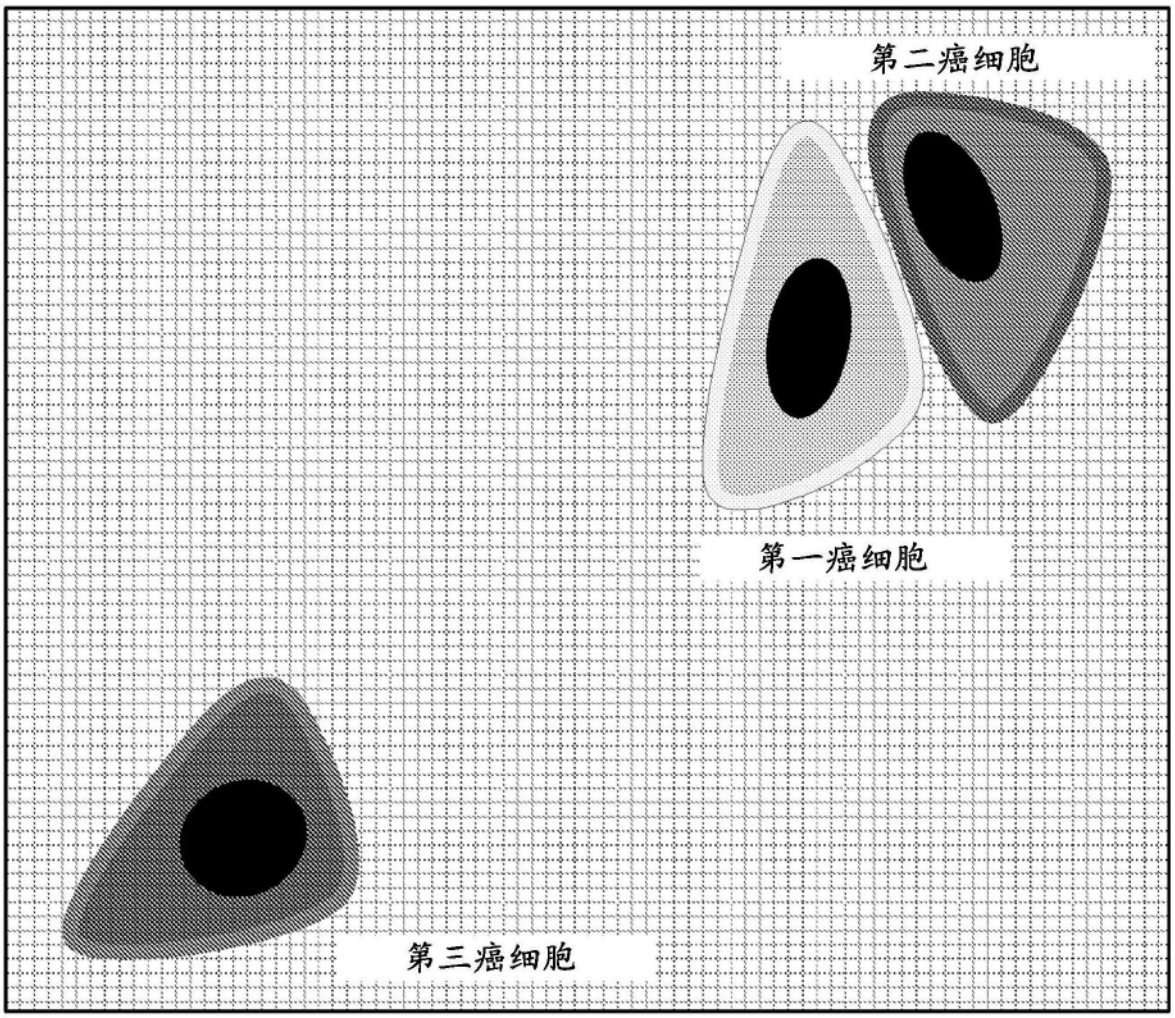
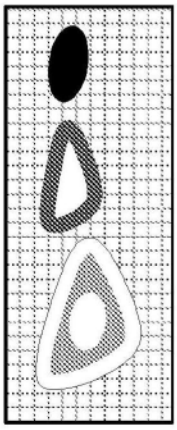

1.
ADC 抗体与靶蛋白结合
靶蛋白
癌细胞
2.
ADC 毒性有效载荷杀伤癌细胞
癌细胞
3.
ADC 毒性有效载荷杀伤邻近细胞，即使是那些没有靶蛋白表达的细胞
细胞

图19



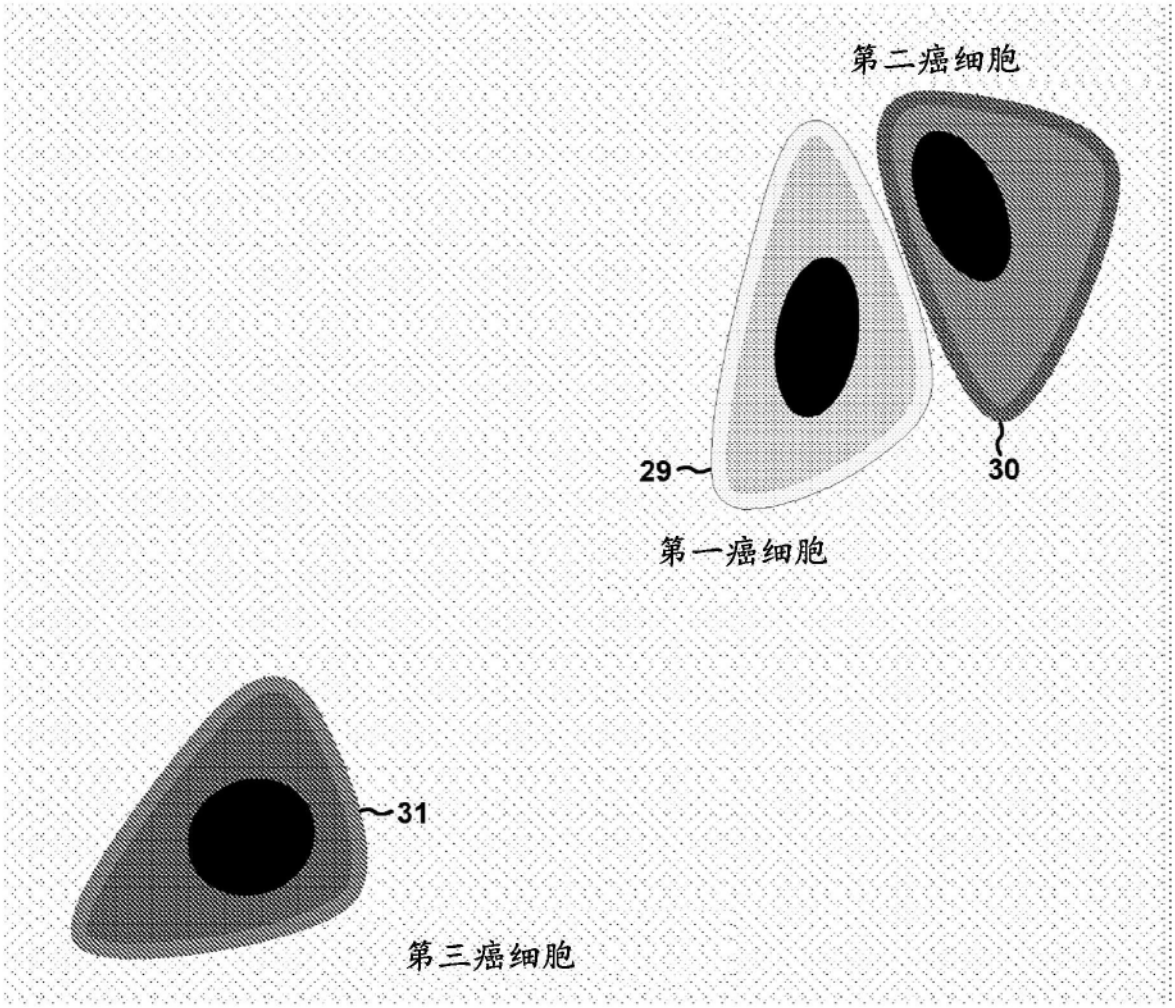


细胞核

细胞膜：灰度值表示所有膜像素的平均DAB光密度（越亮对应于越多量的诊断性抗体）

细胞质：灰度值表示所有细胞质像素的平均DAB光密度。

图20



UID	X [像素]	Y [像素]	膜光密度 (ODM)	细胞质光密度(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

图21

使用单细胞空间接近度评分的细胞统计

r_1 – r_i：从UID 1的细胞的重心至UID i细胞的欧氏距离。

w_ij = exp (- |r_i – r_j | / r_norm)：指数加权因子，包括来自邻近细胞的ADC有效载荷摄取

细胞i的单细胞ADC分数 = **min (K1 , Sum_j 与 w_ij < 15% { w_ij x max (0, ODM_j x (K2 + ODM_j – ODC_j)) })**

UID	X [像素]	Y [像素]	膜光密度 (ODM)	细胞质光密度 (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)	单细胞连续 SPS
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

图22

生成每个细胞的反映癌细胞功能受损或被杀伤的可能性的分数

单细胞ADC分数＝该细胞和邻近细胞的细胞膜和细胞质上靶蛋白量的双线性组合的加权之和，权重取决于邻近细胞与该细胞的距离。

载玻片上位置为r_i且膜（细胞质）平均光密度值为ODM_i (ODC_i)的细胞i的数学计算

$$单_细胞_分数_i = Sum_j, 其中\ |r_j - r_i| < d\ \{ a_{20}(|r_j - r_i|) \times ODM_j^2 + a_{11}(|r_j - r_i|) \times ODM_j \times ODC_j + a_{02}(|r_j - r_i|) \times ODC_j^2 + a_{00}(|r_j - r_i|) \}$$

其中函数a_{kl}取决于细胞j到细胞i的距离$|r_j - r_i|$，例如$a_{kl}(|r_j - r_i|) = A_{kl} \times \exp(- |r_j - r_i|/r_{norm})$，其中$A_{kl}$和$r_0$常数由优化疗法成功预测确定。

图23

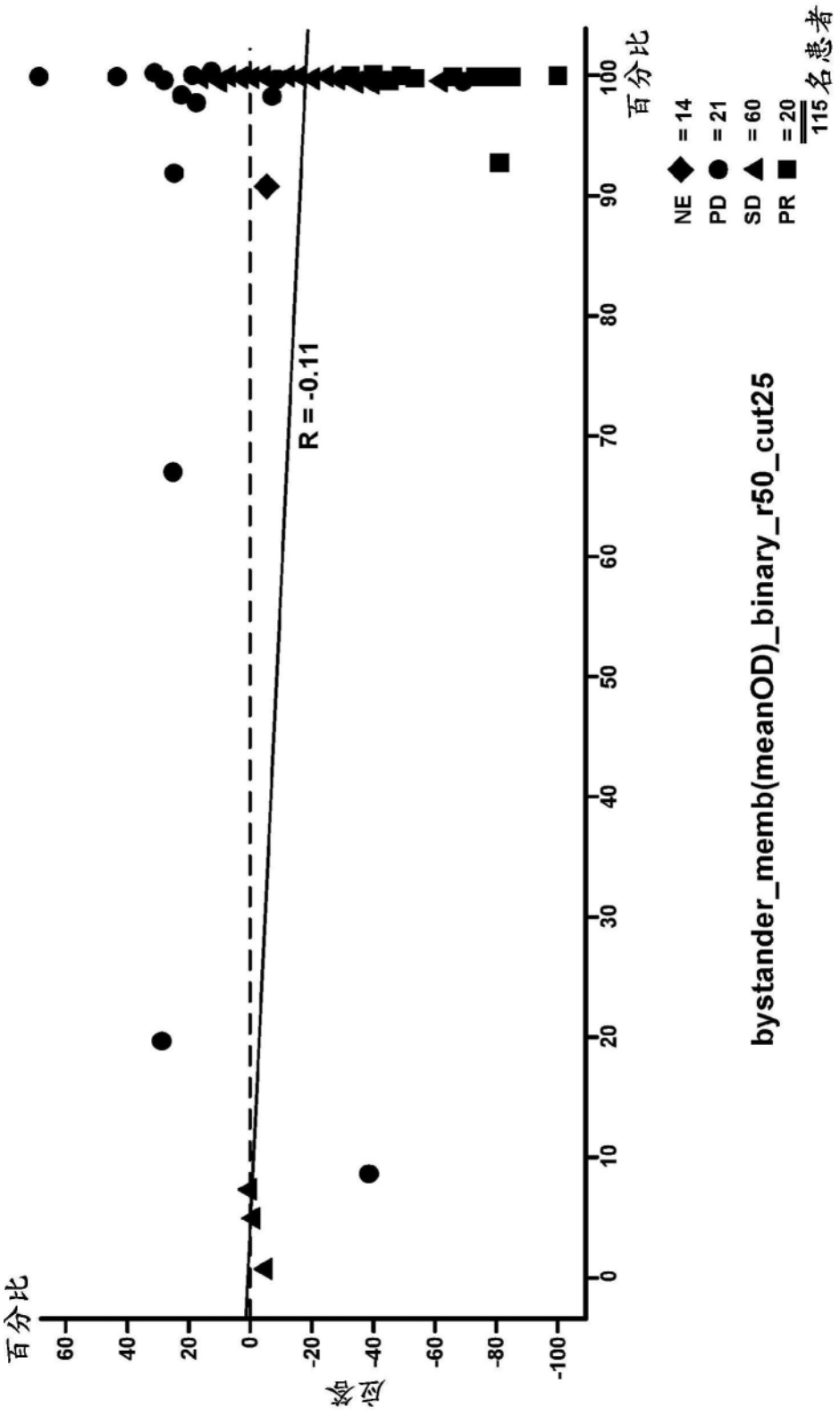

百分比
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
应答
R = -0.11
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
百分比
NE = 14
PD = 21
SD = 60
PR = 20
115名患者
bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25

图24

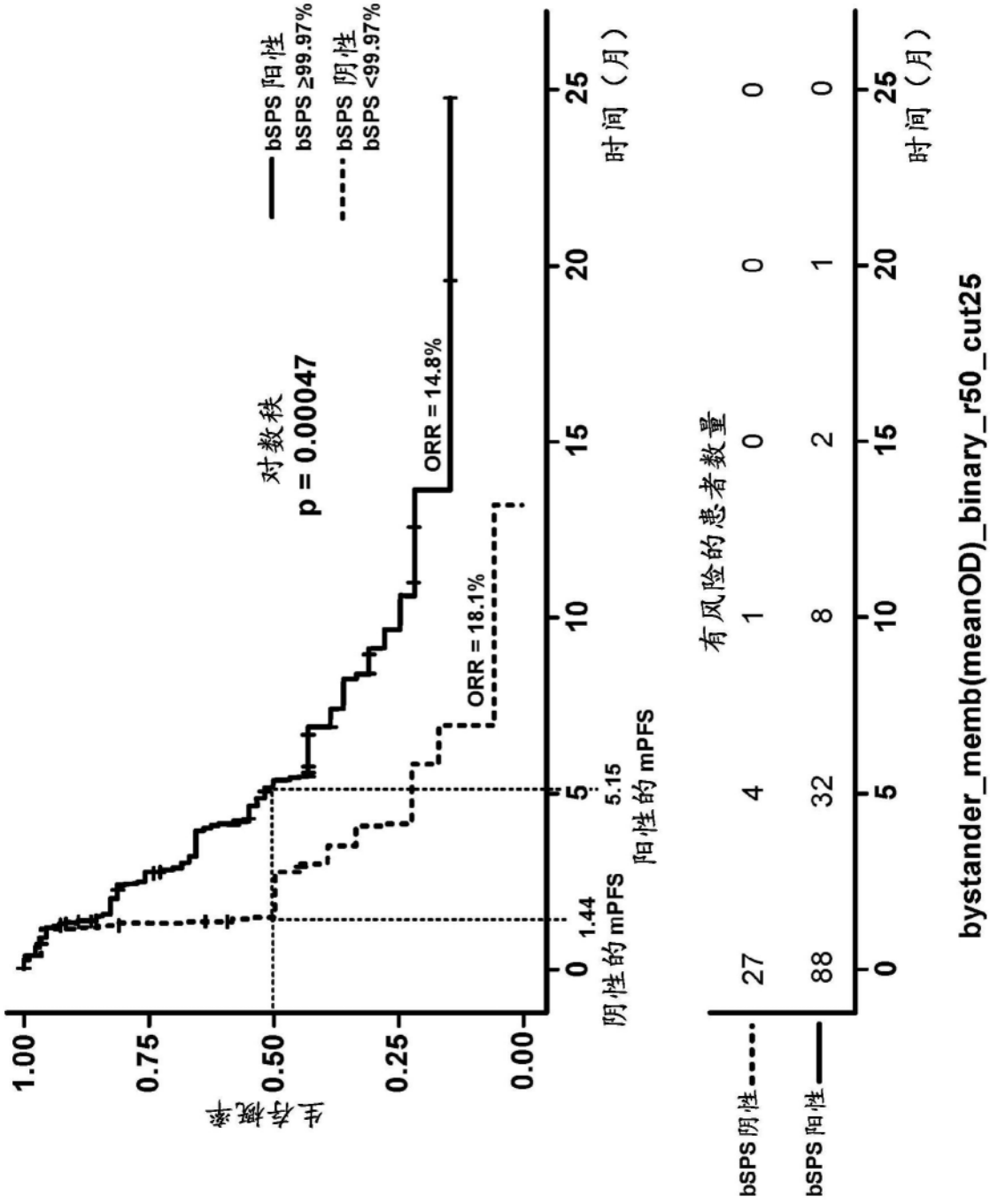

bSPS 阳性
bSPS ≥99.97%
bSPS 阴性
bSPS <99.97%
对数秩
p = 0.00047
ORR = 14.8%
ORR = 18.1%
生存概率
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
5
10
15
20
25
时间（月）
1.44
阴性的 mPFS
5.15
阳性的 mPFS
有风险的患者数量
bSPS 阴性 27 4 1 0 0
bSPS 阳性 88 32 8 2 1 0
bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25

图25

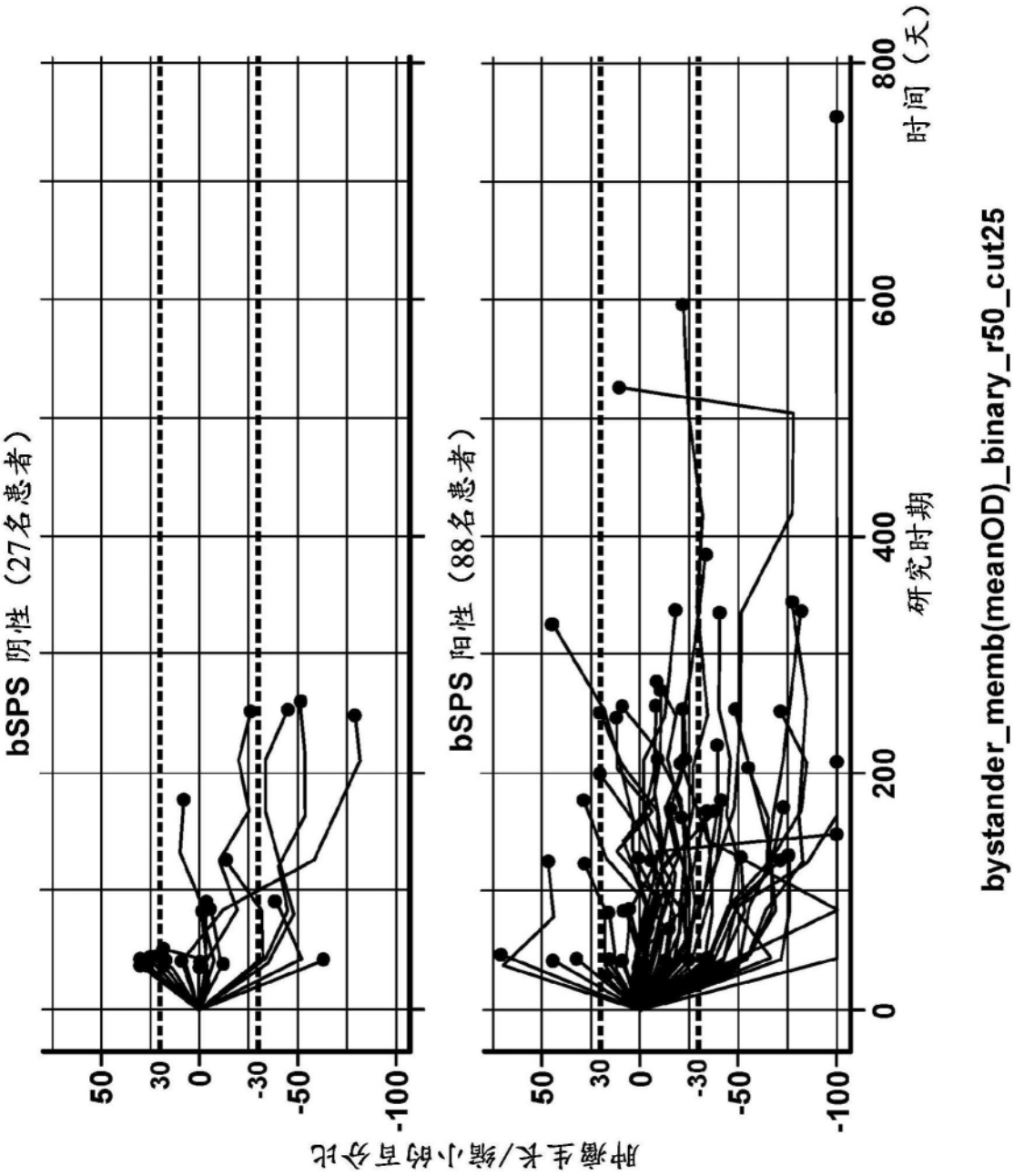

bSPS 阴性（27名患者）
bSPS 阳性（88名患者）
肿瘤生长/缩小的百分比
50
30
0
-30
-50
-100
0
200
400
600
800
研究时期
时间（天）
bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25

图26

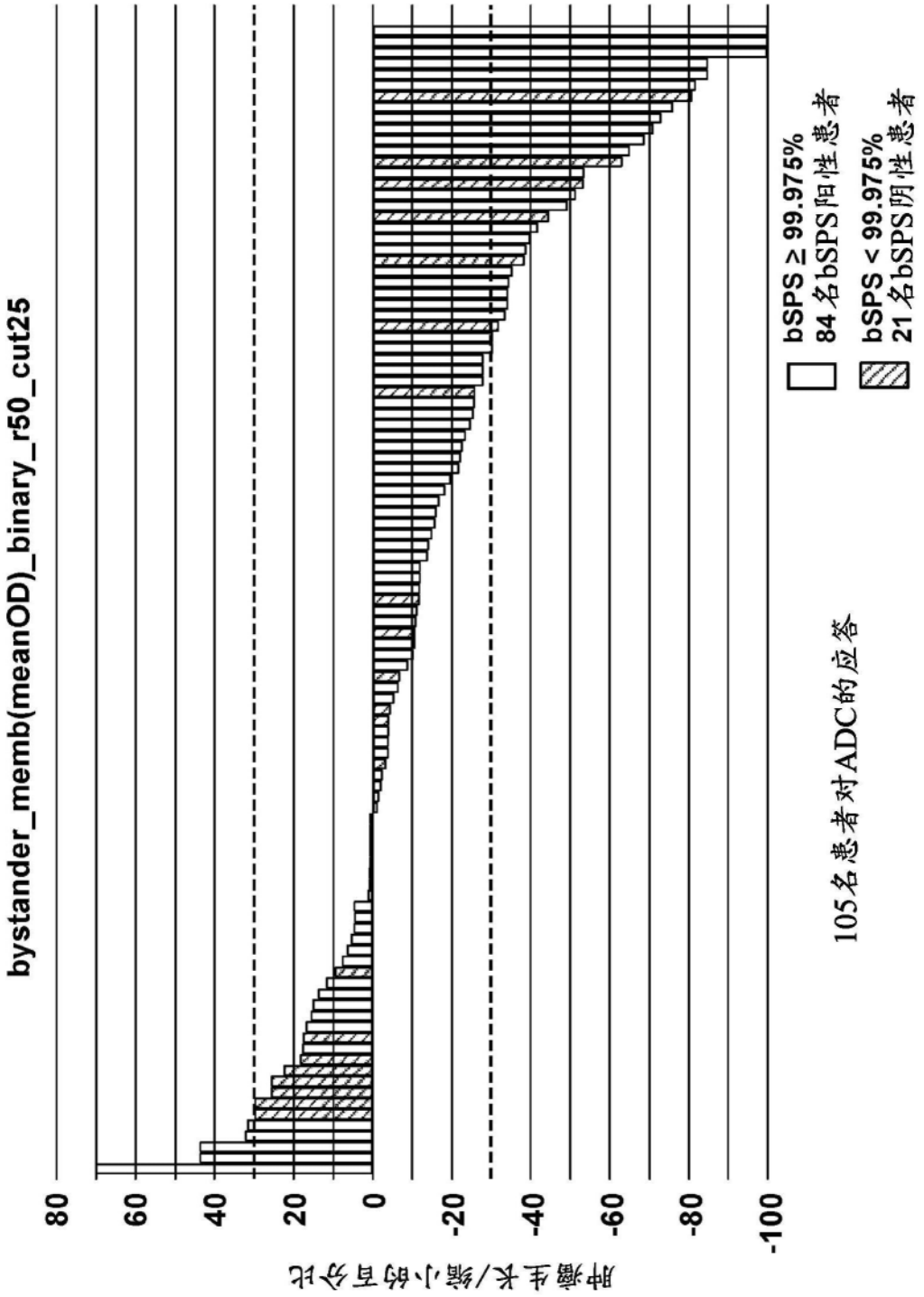

bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
肿瘤生长/缩小的百分比
105名患者对ADC的应答
bSPS ≥ 99.975%
84名bSPS阳性患者
bSPS < 99.975%
21名bSPS阴性患者

图27

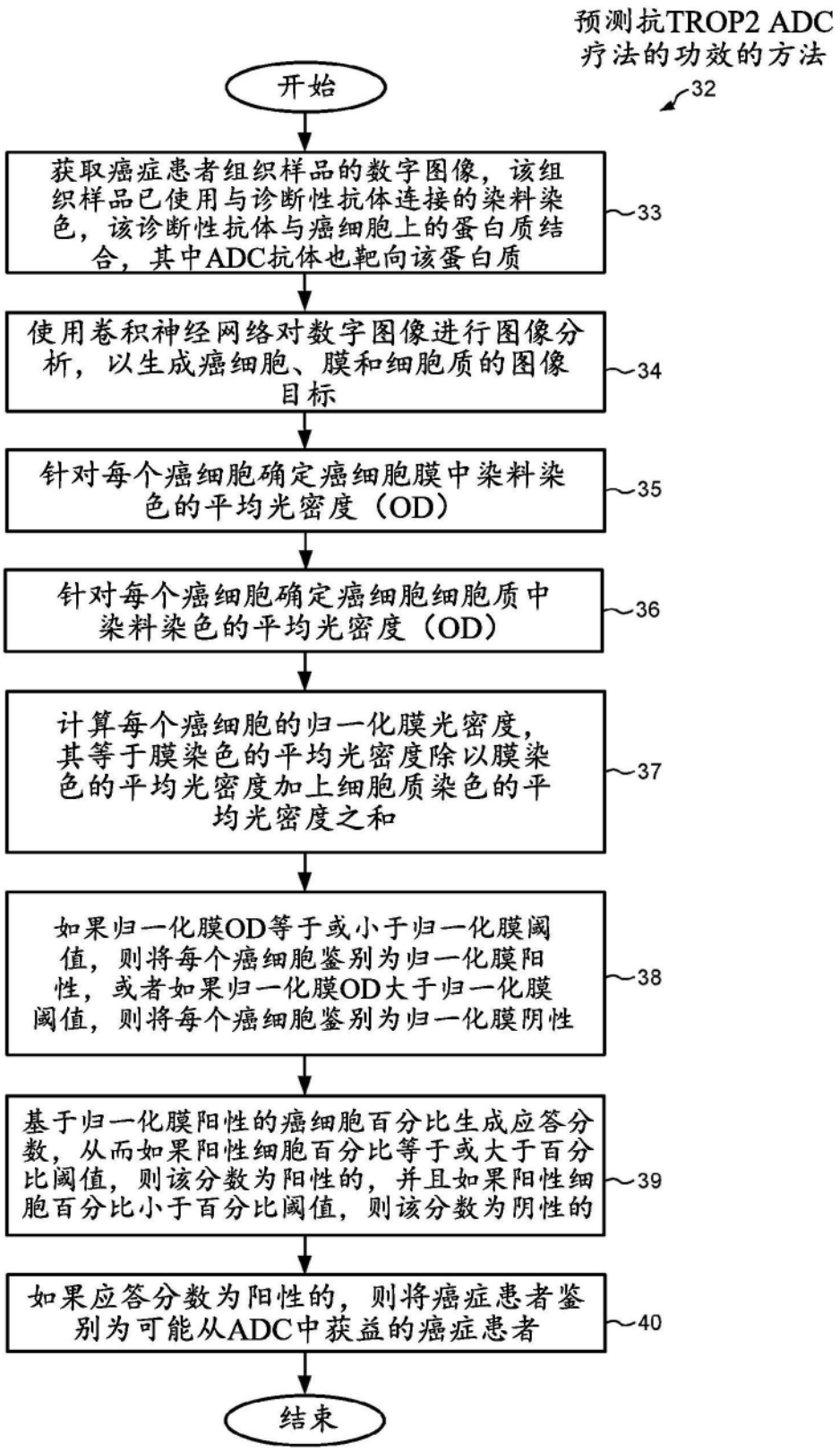

预测抗TROP2 ADC疗法的功效的方法
32
开始
获取癌症患者组织样品的数字图像，该组织样品已使用与诊断性抗体连接的染料染色，该诊断性抗体与癌细胞上的蛋白质结合，其中ADC抗体也靶向该蛋白质
33
使用卷积神经网络对数字图像进行图像分析，以生成癌细胞、膜和细胞质的图像目标
34
针对每个癌细胞确定癌细胞膜中染料染色的平均光密度（OD）
35
针对每个癌细胞确定癌细胞细胞质中染料染色的平均光密度（OD）
36
计算每个癌细胞的归一化膜光密度，其等于膜染色的平均光密度除以膜染色的平均光密度加上细胞质染色的平均光密度之和
37
如果归一化膜OD等于或小于归一化膜阈值，则将每个癌细胞鉴别为归一化膜阳性，或者如果归一化膜OD大于归一化膜阈值，则将每个癌细胞鉴别为归一化膜阴性
38
基于归一化膜阳性的癌细胞百分比生成应答分数，从而如果阳性细胞百分比等于或大于百分比阈值，则该分数为阳性的，并且如果阳性细胞百分比小于百分比阈值，则该分数为阴性的
39
如果应答分数为阳性的，则将癌症患者鉴别为可能从ADC中获益的癌症患者
40
结束

图28

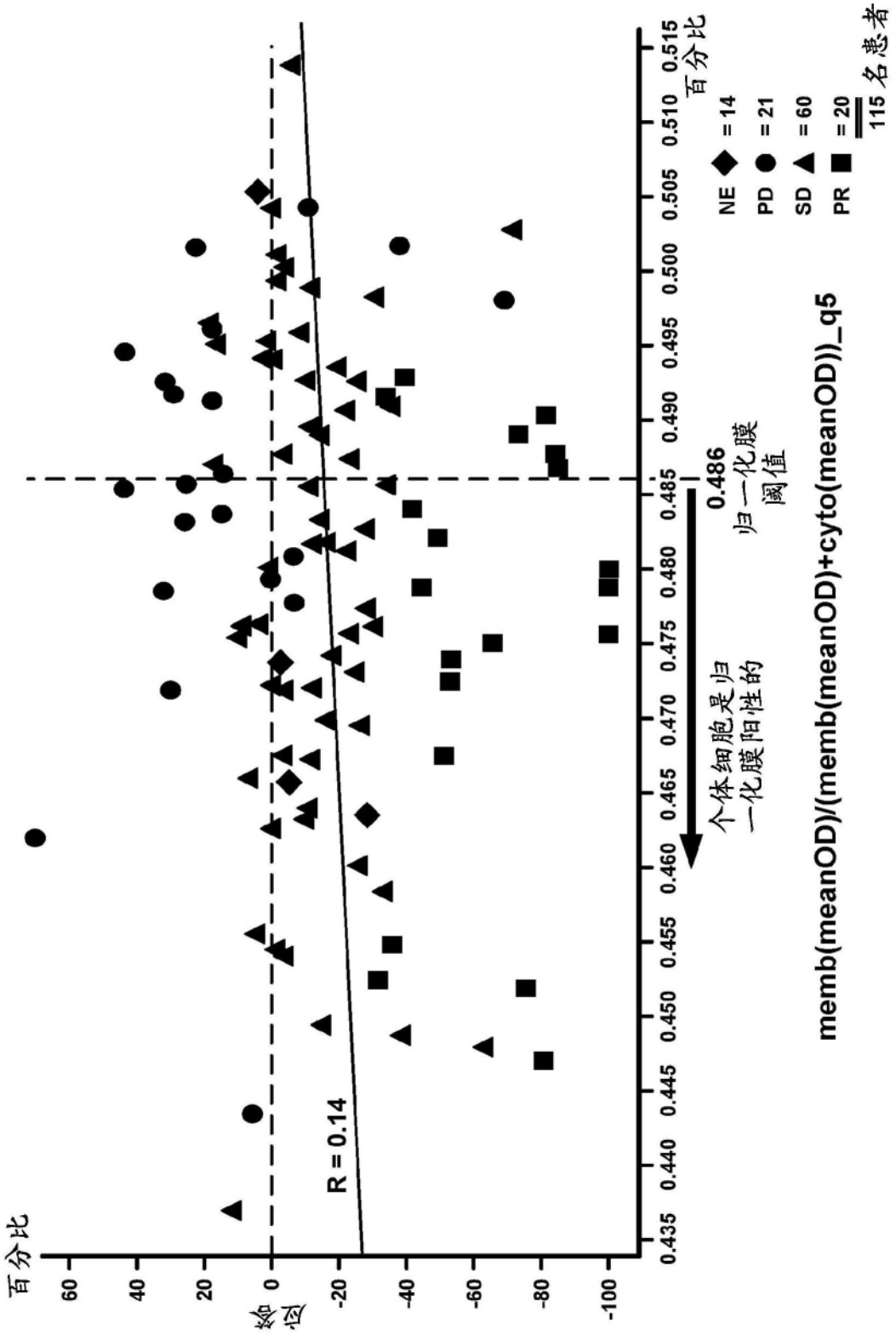

百分比
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
响应
R = 0.14
0.435
0.440
0.445
0.450
0.455
0.460
0.465
0.470
0.475
0.480
0.485
0.490
0.495
0.500
0.505
0.510
0.515
百分比
0.486
归一化膜
阈值
个体细胞是归
一化膜阳性的
NE = 14
PD = 21
SD = 60
PR = 20
115 名患者
memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5

图29

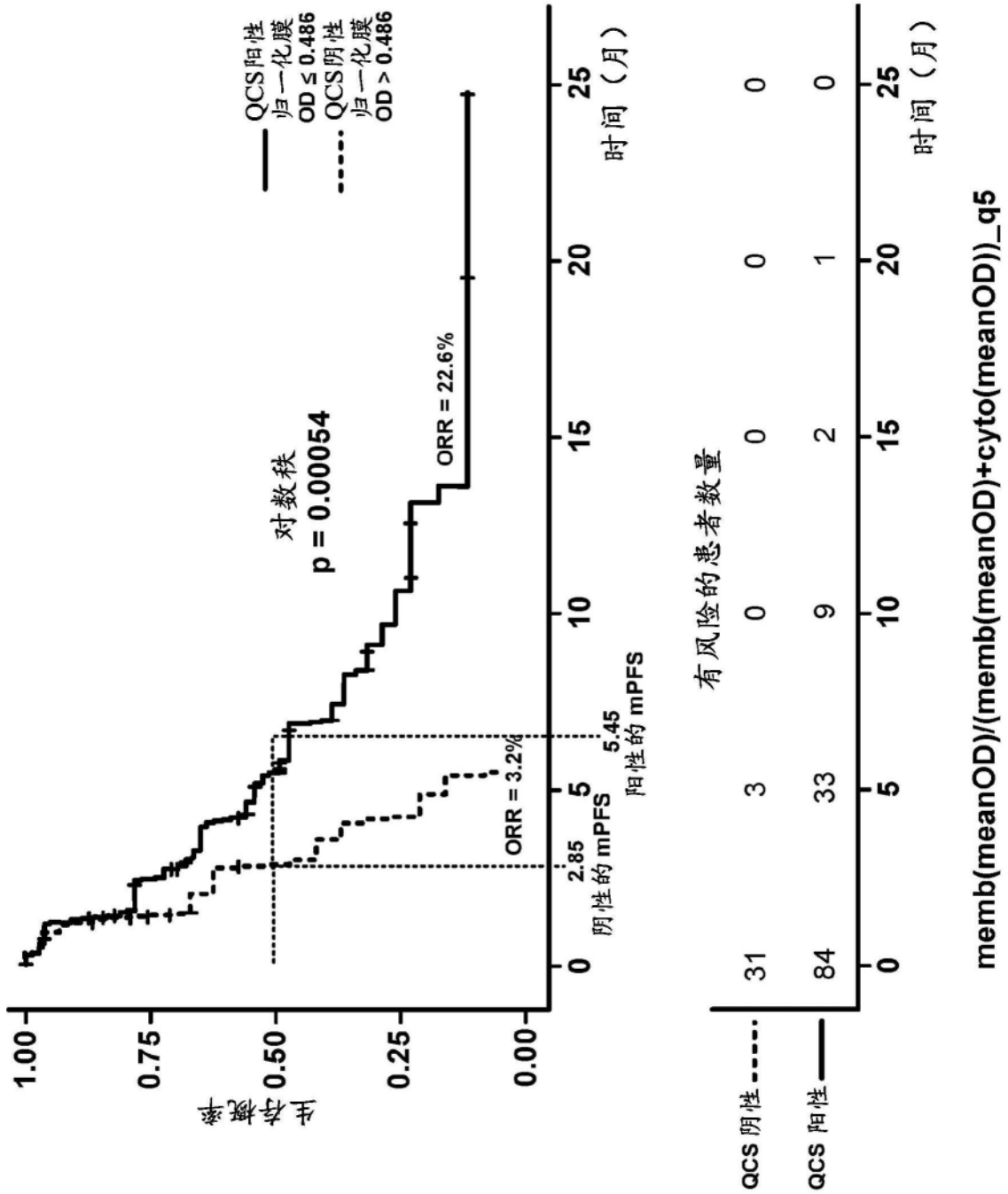

QCS阳性
归一化膜
OD ≤ 0.486
QCS阴性
归一化膜
OD > 0.486
对数秩
p = 0.00054
ORR = 22.6%
ORR = 3.2%
2.85
阴性的 mPFS
5.45
阳性的 mPFS
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
5
10
15
20
25
时间（月）
有风险的患者数量
QCS 阴性
QCS 阳性
31 3 0 0 0 0
84 33 9 2 1 0
memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5

图30

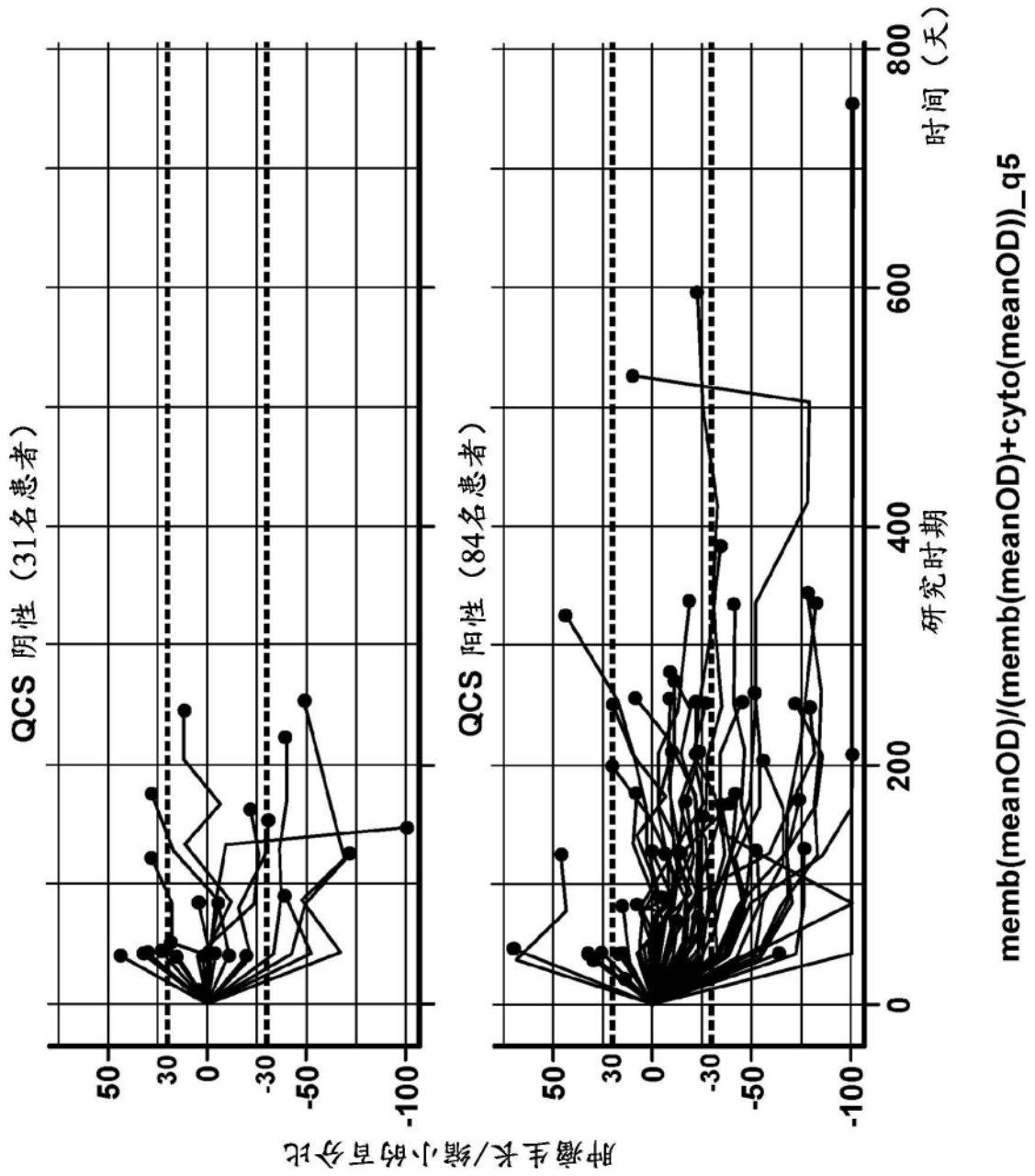

QCS 阴性（31名患者）
QCS 阳性（84名患者）
肿瘤生长/缩小的百分比
50
30
0
-30
-50
-100
0
200
400
600
800
研究时期
时间（天）
memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5

图31

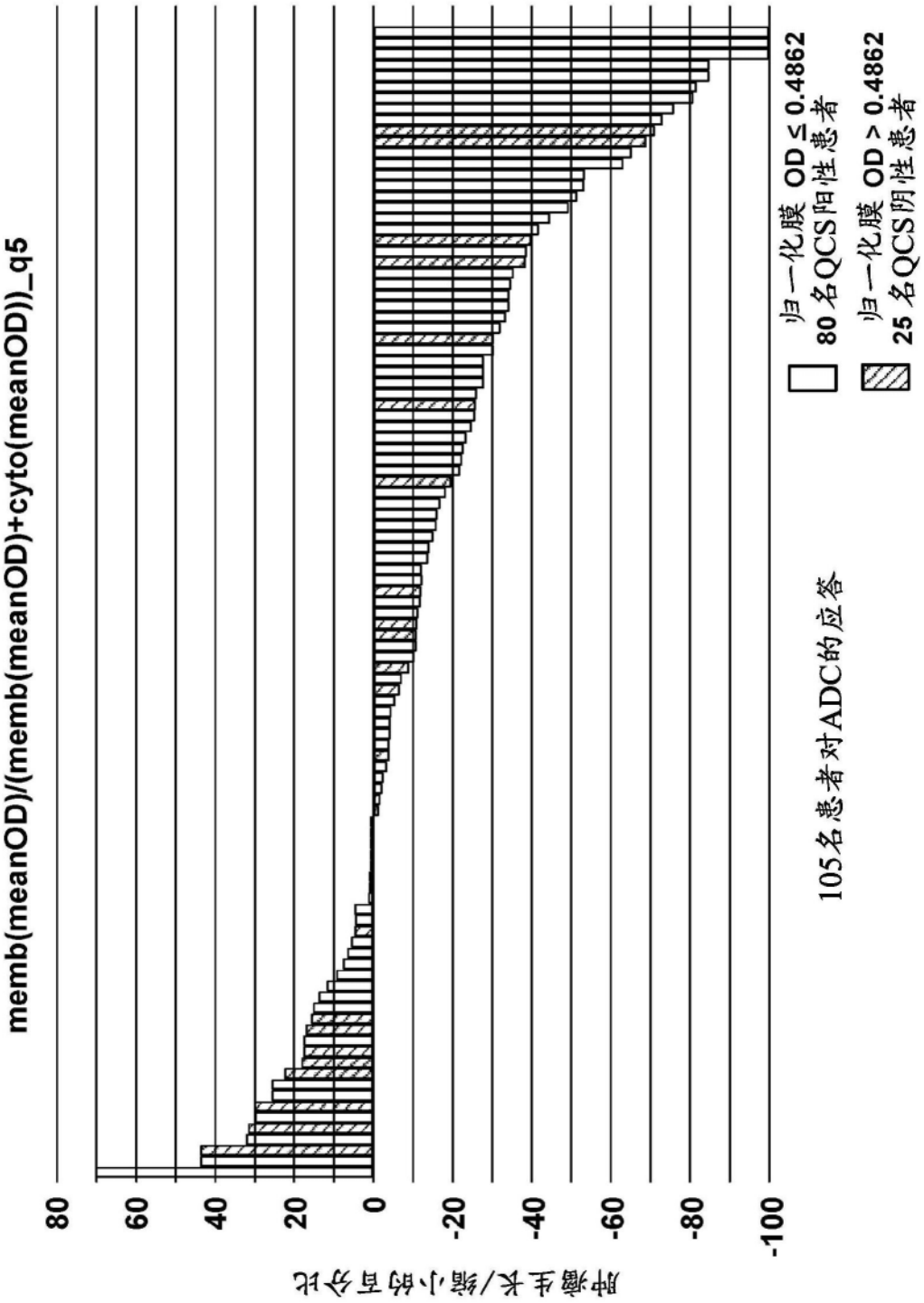

memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
肿瘤生长/缩小的百分比
105名患者对ADC的应答
归一化膜 OD ≤ 0.4862
80名QCS阳性患者
归一化膜 OD > 0.4862
25名QCS阴性患者

图32

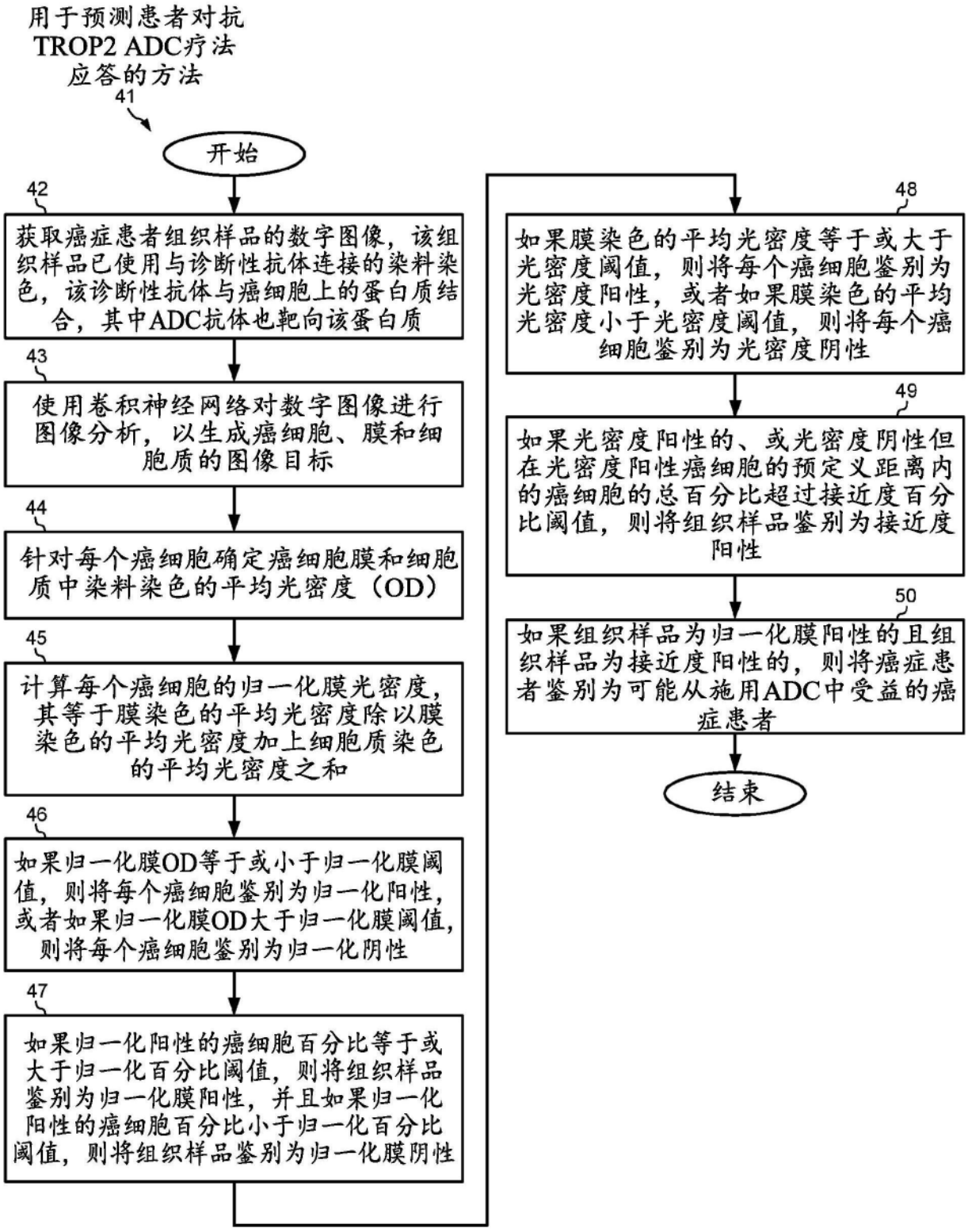

用于预测患者对抗TROP2 ADC疗法应答的方法
41
开始
42
获取癌症患者组织样品的数字图像，该组织样品已使用与诊断性抗体连接的染料染色，该诊断性抗体与癌细胞上的蛋白质结合，其中ADC抗体也靶向该蛋白质
43
使用卷积神经网络对数字图像进行图像分析，以生成癌细胞、膜和细胞质的图像目标
44
针对每个癌细胞确定癌细胞膜和细胞质中染料染色的平均光密度（OD）
45
计算每个癌细胞的归一化膜光密度，其等于膜染色的平均光密度除以膜染色的平均光密度加上细胞质染色的平均光密度之和
46
如果归一化膜OD等于或小于归一化膜阈值，则将每个癌细胞鉴别为归一化阳性，或者如果归一化膜OD大于归一化膜阈值，则将每个癌细胞鉴别为归一化阴性
47
如果归一化阳性的癌细胞百分比等于或大于归一化百分比阈值，则将组织样品鉴别为归一化膜阳性，并且如果归一化阳性的癌细胞百分比小于归一化百分比阈值，则将组织样品鉴别为归一化膜阴性
48
如果膜染色的平均光密度等于或大于光密度阈值，则将每个癌细胞鉴别为光密度阳性，或者如果膜染色的平均光密度小于光密度阈值，则将每个癌细胞鉴别为光密度阴性
49
如果光密度阳性的、或光密度阴性但在光密度阳性癌细胞的预定义距离内的癌细胞的总百分比超过接近度百分比阈值，则将组织样品鉴别为接近度阳性
50
如果组织样品为归一化膜阳性的且组织样品为接近度阳性的，则将癌症患者鉴别为可能从施用ADC中受益的癌症患者
结束

图33

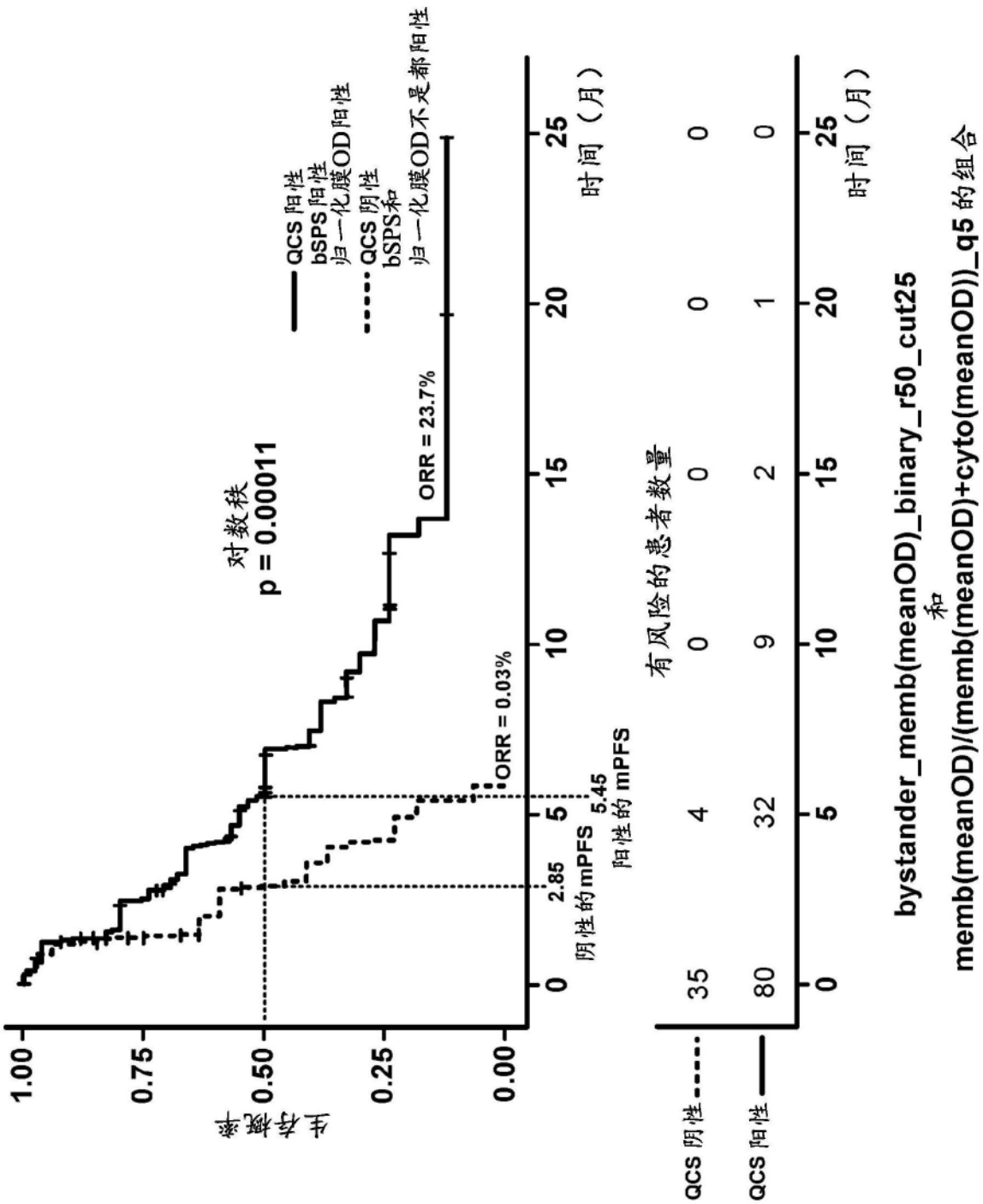

对数秩
p = 0.00011
QCS 阳性
bSPS 阳性
归一化膜OD阳性
QCS 阴性
bSPS和
归一化膜OD不是都阳性
ORR = 23.7%
ORR = 0.03%
2.85
阴性的mPFS
5.45
阳性的 mPFS
生存概率
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
5
10
15
20
25
时间（月）
有风险的患者数量
QCS 阴性
35
4
0
0
0
0
QCS 阳性
80
32
9
2
1
0
bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25
和
memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5 的组合

图34

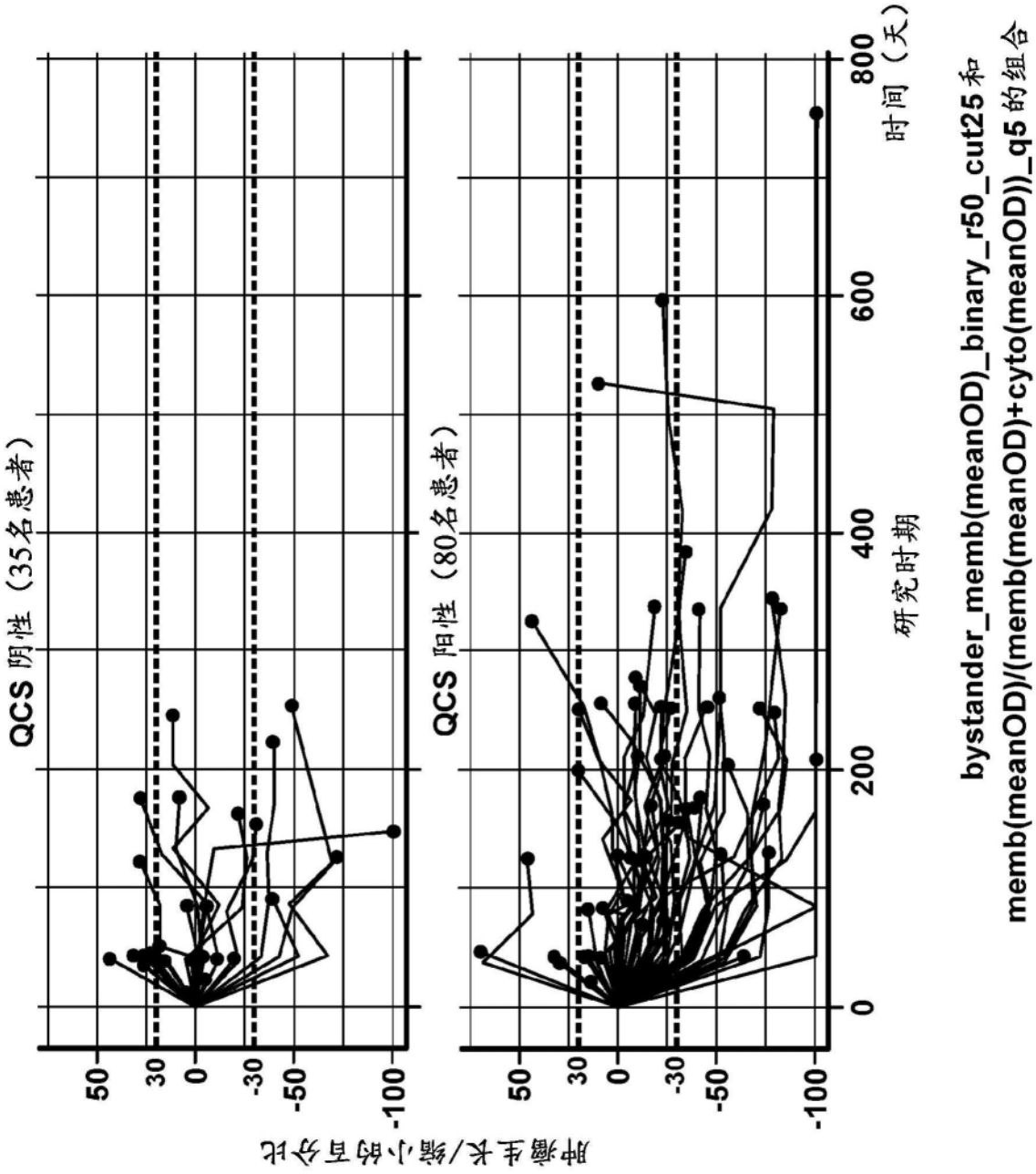

QCS 阴性（35名患者）
QCS 阳性（80名患者）
肿瘤生长/缩小的百分比
50
30
0
-30
-50
-100
0
200
400
600
800
研究时期
时间（天）
bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25 和
memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5 的组合

图35

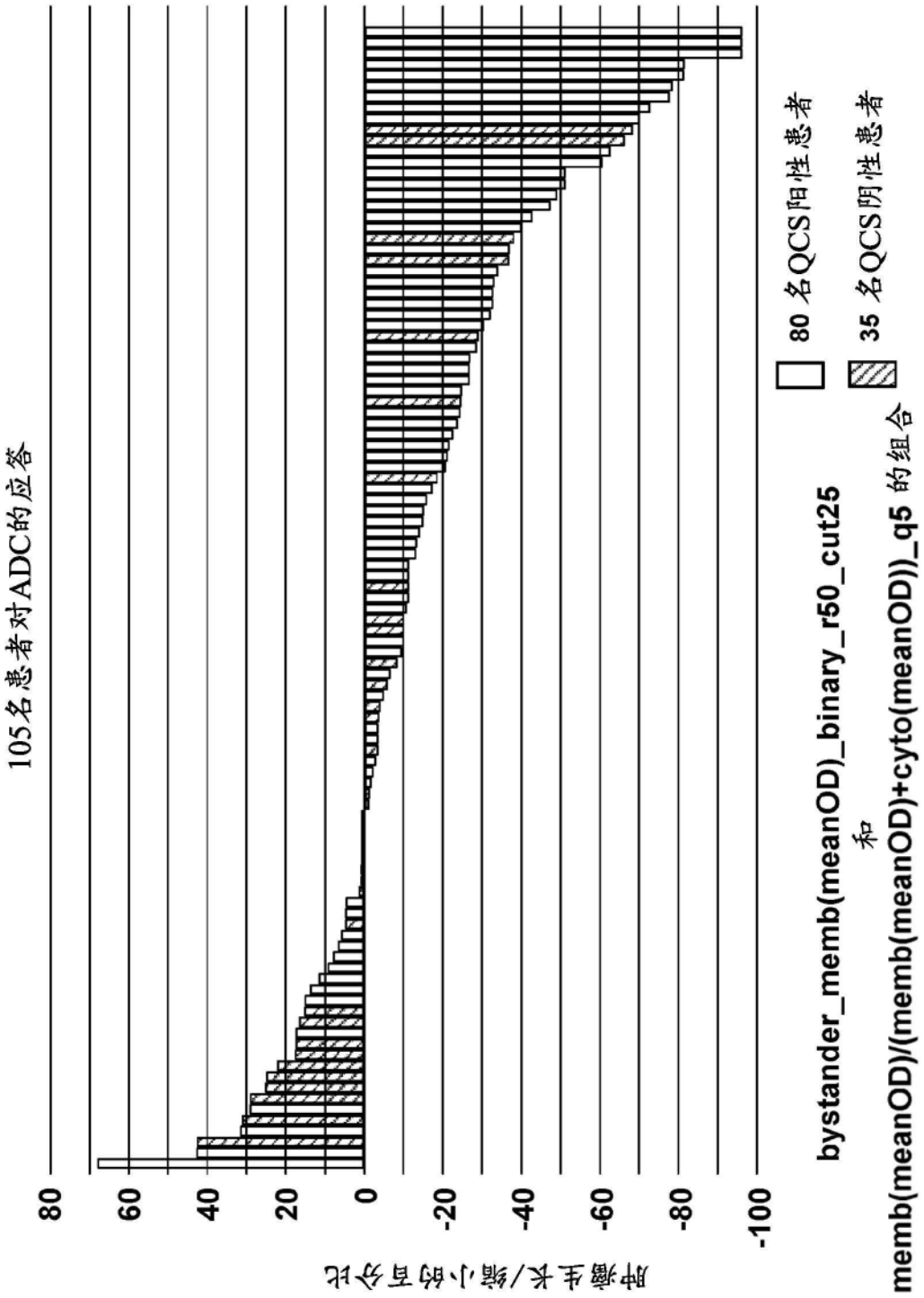

105名患者对ADC的应答
肿瘤生长/缩小的百分比
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
80 名QCS阳性患者
35 名QCS阴性患者
bystander_memb(meanOD)_binary_r50_cut25
和
memb(meanOD)/(memb(meanOD)+cyto(meanOD))_q5 的组合

图36