

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-503167

(P2016-503167A)

(43) 公表日 平成28年2月1日(2016.2.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 A	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48 P	2 G O 5 9
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Y	
<b>GO 1 N 21/27 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
	GO 1 N 21/27 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁)

(21) 出願番号 特願2015-550033 (P2015-550033)  
 (86) (22) 出願日 平成25年12月19日 (2013.12.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年6月24日 (2015.6.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/077295  
 (87) 国際公開番号 W02014/102130  
 (87) 国際公開日 平成26年7月3日 (2014.7.3)  
 (31) 優先権主張番号 61/747, 148  
 (32) 優先日 平成24年12月28日 (2012.12.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 304054507  
 ザ ユニバーシティ オブ メルボルン  
 オーストラリア国 3010 ビクトリア  
 , パークビル, グラタン ストリート

最終頁に続く

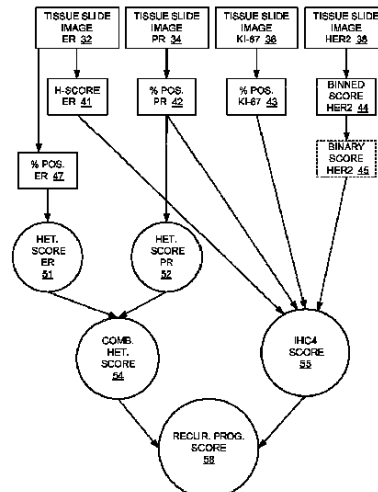
(54) 【発明の名称】 乳癌予知のための画像分析

(57) 【要約】

組織サンプルにおけるバイオマーカーに対する異質性を計算することができる。異質性スコアは、免疫組織化学複合スコアと組み合わせて、乳癌再発予知を提供することができる。異質性は、サンプルにおいてどの位の細胞が陽性に染色されるかにしたがって、複数のバイオマーカーに対する陽性百分率の判定に基づることができる。免疫組織化学複合スコアを計算することができる。撮像ツールは、組織サンプルの画像において視野を指定することができる。視野に基づいて、異質性メトリックを計算し、免疫組織化学複合スコアと組み合わせて、乳癌再発予知スコアを生成することができる。

【選択図】 図2

FIG. 2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

コンピュータ実装方法であって、

バイオマーカ用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する表示画像内における複数のデジタル視野間においてバイオマーカに対して測定したタンパク質異質性と、被験者に対する免疫組織化学複合スコアとに少なくとも部分的に基づいて、乳癌再発予知スコアを生成するステップであって、前記乳癌サンプルが前記被験者から得られる、ステップと、

前記乳癌再発予知スコアに基づいて、前記被験者に対する乳癌再発予知の指示を出力するステップと

10

を含む、コンピュータ実装方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の方法をコンピュータ・システムに実行させるコンピュータ実行可能命令を含む 1 つ以上の非一時的コンピュータ読み取り可能媒体。

## 【請求項 3】

請求項 1 記載の方法において、

前記バイオマーカが、エストロゲン受容体 (ER) およびプロゲステロン受容体 (PR) を含む 1 群の中から選択された 1 つ以上である、方法。

## 【請求項 4】

請求項 1 記載の方法において、

20

前記バイオマーカが、Ki-67、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2)、エストロゲン受容体 (ER)、およびプロゲステロン受容体 (PR) を含む一群の中から選択された 1 つ以上である、方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 記載の方法において、

前記被験者に対する前記免疫組織化学複合スコアが、前記乳癌サンプルから生成される、方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 記載の方法であって、更に、

複数の視野を受け取るステップと、

30

前記複数のデジタル視野間において前記バイオマーカに対するタンパク質異質性を測定するステップと、

前記被験者に対する免疫組織化学複合スコアを受け取るステップとを含む、方法。

## 【請求項 7】

請求項 6 記載の方法において、

前記複数のデジタル視野間において前記バイオマーカに対するタンパク質異質性を測定するステップが、領域レベルで空間タンパク質発現異質性を測定するステップを含む、方法。

## 【請求項 8】

40

請求項 6 記載の方法において、

前記バイオマーカに対するタンパク質異質性を測定するステップが、

前記デジタル視野のそれぞれに対して陽性百分率測定値を決定するステップであって、前記陽性百分率測定値が、前記デジタル視野のそれぞれにおいて、前記バイオマーカに対して陽性に染色された細胞の百分率を示す、ステップと、

前記デジタル視野に対する陽性百分率測定値を比較するステップとを含む、方法。

## 【請求項 9】

請求項 6 記載の方法であって、更に、

前記被験者に対して免疫組織化学複合スコアを生成するステップを含む、方法。

50

## 【請求項 1 0】

請求項 6 記載の方法において、前記バイオマーカが第 1 バイオマーカを含み、当該方法が、更に、

第 2 バイオマーカ用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する表示画像内における第 2 複数のデジタル視野を受け取るステップと、

前記第 2 複数のデジタル視野間において前記第 2 バイオマーカに対するタンパク質異質性を測定するステップと

を含み、前記乳癌再発予知スコアが、前記第 2 バイオマーカに対して測定した前記タンパク質異質性に少なくとも付加的に基づく、方法。

## 【請求項 1 1】

10

請求項 1 0 記載の方法において、

前記第 2 バイオマーカ用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する前記表示画像が、前記第 1 バイオマーカ用の前記画像に描写された区間とは、前記サンプルの異なる区間を描写する、方法。

## 【請求項 1 2】

請求項 1 0 記載の方法であって、更に、

前記第 1 バイオマーカに対する前記測定タンパク質異質性、または前記第 2 バイオマーカに対する前記測定タンパク質異質性の内少なくとも 1 つを正規化するステップを含む、方法。

## 【請求項 1 3】

20

請求項 1 0 記載の方法であって、更に、

前記第 1 バイオマーカに対する前記測定タンパク質異質性、および前記第 2 バイオマーカに対する前記測定タンパク質異質性を、異なる正規化係数によって正規化するステップを含む、方法。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 記載の方法であって、更に、

前記乳癌再発予知スコアに対して格納された 1 つ以上の閾値に基づいて、前記乳癌再発予知の指示を選択するステップを含む、方法。

## 【請求項 1 5】

30

請求項 1 記載の方法において、

前記免疫組織化学複合スコアが、エストロゲン受容体 (E R) 成分、ヒト上皮成長因子受容体 2 (H E R 2) 成分、K i - 6 7 成分、およびプロゲステロン受容体 (P R) 成分を含む、方法。

## 【請求項 1 6】

画像処理システムであって、

被験者からの乳癌サンプルにおけるそれぞれのバイオマーカに対するタンパク質発現を描写する複数のスライド画像を受け取るように動作可能なスライド画像処理ツールであって、

更に、前記スライド画像内における視野を更に受け取るように動作可能であり、

前記スライド画像および前記スライド画像内における視野に基づいて、免疫組織化学複合スコアを計算するように動作可能であり、

40

前記スライド画像および前記スライド画像内における視野の選択に基づいて、1 つ以上の異質性スコアを計算するように動作可能である

スライド画像処理ツールと、

前記免疫組織化学複合スコアおよび前記 1 つ以上の異質性スコアを入力として受け入れ、前記被験者において癌が再発する可能性が高いか否かの指示を出力するように動作可能な予知ツールと

を含む、画像処理システム。

## 【請求項 1 7】

請求項 1 6 記載の画像処理システムであって、更に、

50

1つ以上のプロセッサと、  
メモリと  
を含む、画像処理システム。

【請求項18】

コンピュータ実装方法であって、  
免疫組織化学複合スコアおよび異質性スコアを組み合わせ、乳癌再発予知スコアを求め  
るステップと、  
前記乳癌再発予知スコアに基づいて、乳癌再発予知の指示を表示するステップと  
を含む、コンピュータ実装方法。

【請求項19】

10

請求項18記載の方法であって、更に、  
ユーザ・インターフェースを介して、前記免疫組織化学複合スコア用に視野を要求し、  
前記免疫組織化学複合スコアを判定するために表示された複数のスライド画像内において  
、前記免疫組織化学複合スコア用に1つ以上の視野を受け取るステップと、  
ユーザ・インターフェースを介して、前記異質性スコア用に視野を要求し、前記異質性  
スコアを判定するために表示された複数のスライド画像内において、前記異質性スコア用  
に複数の視野を受け取るステップと、  
前記免疫組織化学複合スコア用の前記視野に対するタンパク質発現値を測定し、それか  
ら前記免疫組織化学複合スコアを計算するステップと、  
前記異質性スコア用の前記視野に対するタンパク質発現値を測定し、それから前記異質  
性スコアを計算するステップと  
を含む、方法。

20

【請求項20】

請求項19記載の方法において、  
タンパク質発現が複数のバイオマーカに対して測定され、  
少なくとも1つのバイオマーカに対してタンパク質発現を測定するステップが、前記バ  
イオマーカに対する陽性百分率を計算するステップを含む、方法。

【請求項21】

請求項19記載の方法において、  
前記免疫組織化学複合スコア用の視野を要求する前記ユーザ・インターフェースが、エ  
ストロゲン受容体（ER）、ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）、Ki-67、およ  
びプロゲステロン受容体（PR）の各々用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを  
描写する複数のスライド画像を含み、  
前記免疫組織化学複合スコア用に前記1つ以上の視野を受け取るステップが、ER、H  
ER2、Ki-67、およびPRの各々用に1つ以上の視野を受け取るステップを含み、  
前記異質性スコア用に視野を要求する前記ユーザ・インターフェースが、ERおよびP  
Rの各々用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する複数のスライド画像を  
含み、  
前記複数の視野に対する前記異質性スコアの指示を受け取るステップが、ERおよびP  
Rの各々用に複数の視野を受け取るステップを含む、方法。

40

【請求項22】

コンピュータ実装方法であって、  
バイオマーカ用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する表示画像内にお  
いて複数のデジタル視野を受け取るステップと、  
前記デジタル視野において前記バイオマーカに対するタンパク質発現を測定するステ  
ップと、  
前記複数のデジタル視野間において、前記バイオマーカに対して測定したタンパク質  
発現の異質性を測定するステップと、  
前記バイオマーカに対して測定したタンパク質異質性を出力するステップと、  
を含む、コンピュータ実装方法。

50

## 【請求項 2 3】

請求項 2 2 記載の方法において、

前記複数のデジタル視野間において、前記バイオマーカに対して測定したタンパク質発現の異質性を測定するステップが、領域レベルで空間タンパク質発現異質性を測定するステップを含む、方法。

## 【請求項 2 4】

被験者に対する免疫組織化学複合スコアを計算するコンピュータ実装方法であって、

複数のバイオマーカ用に、それぞれのバイオマーカ抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写するそれぞれの画像内におけるそれぞれの複数のデジタル視野を受け取るステップと、

前記複数のバイオマーカに対して陽性百分率を測定するステップと、

前記免疫組織化学複合スコアを計算するステップであって、前記免疫組織化学複合スコアの計算が、1つのバイオマーカに対する前記陽性百分率を、第2バイオマーカに対する前記陽性百分率と組み合わせることを含む、ステップと、

前記免疫組織化学複合スコアを出力するステップと、  
を含む、コンピュータ実装方法。

10

## 【請求項 2 5】

請求項 2 4 記載の方法において、

前記バイオマーカがHER2を含み、

前記免疫組織化学複合スコアを計算するステップが、HER2スコアを計算するステップを含む、方法。

20

## 【請求項 2 6】

請求項 2 5 記載の方法において、前記免疫組織化学複合スコアを計算するステップが、HER2に対する二進スコアを計算するステップを含む、方法。

## 【請求項 2 7】

請求項 2 5 記載の方法において、前記免疫組織化学複合スコアを計算するステップが、HER2に対する等級スコアを計算するステップを含む、方法。

## 【請求項 2 8】

請求項 2 7 記載の方法において、HER2用に複数のデジタル視野があり、HER2に対する等級スコアを計算するステップが、

30

HER2用の前記複数のデジタル視野に対する分析を集成的に実行するステップを含む、方法。

## 【請求項 2 9】

請求項 2 7 記載の方法において、HER2に対する等級スコアを計算するステップが、

HER2用の前記デジタル視野に現れる複数の細胞に対して、それぞれの染色完全性指標および染色強度値を判定するステップと、

前記染色完全性指標および前記染色強度値を分析するステップと、  
を含む、方法。

## 【請求項 3 0】

請求項 2 9 記載の方法において、前記分析するステップが、

完全に染色された細胞の百分率が閾値よりも高いか否かを判定するステップを含む、方法

40

## 【請求項 3 1】

請求項 2 9 記載の方法において、前記分析するステップが、  
膜中央強度を強い強度閾値と比較するステップを含む、方法。

## 【請求項 3 2】

請求項 2 7 記載の方法において、HER2に対する等級スコアを計算するステップが、

HER2用の前記デジタル視野内に現れる複数の核に対して、前記核を包囲する細胞膜が完全に染色されたか否かを判定するステップを含む、方法。

## 【請求項 3 3】

50

請求項 27 記載の方法において、HER2 に対する等級スコアを計算するステップが、HER2 用の前記デジタル視野内に現れる複数の核に対して、前記核のそれぞれを包囲する細胞膜の染色の強度を判定するステップを含む、方法。

【請求項 34】

コンピュータ実装方法であって、

ER用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する画像において、ER用に複数のデジタル視野を受け取るステップと、

ER用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する画像において、PR用に複数のデジタル視野を受け取るステップと、

ER用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する画像において、Ki-67用に複数のデジタル視野を受け取るステップと、

ER用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する画像において、HER2用に複数のデジタル視野を受け取るステップと、

ER用の前記デジタル視野に基づいて、ERに対するHスコアを計算するステップと、

PR用の前記デジタル視野に基づいて、PRに対する陽性百分率を計算するステップと、

Ki-67用の前記デジタル視野に基づいて、Ki-67に対する陽性百分率を計算するステップと、

HER2用の前記デジタル視野に基づいて、HER2に対する等級スコアを計算するステップと、

前記ERに対するHスコア、前記PRに対する陽性百分率、前記Ki-67に対する陽性百分率、および前記HER2に対する等級スコアを組み合わせると共に、免疫組織化学複合スコアを求めるステップと

を含む、コンピュータ実装方法。

【請求項 35】

請求項 34 記載の方法において、前記組み合わせるステップが、前記HER2に対する等級スコアをHER2に対する二進スコアに変換するステップを含む、方法。

【請求項 36】

請求項 34 記載の方法において、HER2 に対して等級スコアを計算するステップが、前記HER2用のデジタル視野に対して集合的に分析を行うステップを含む、方法。

【請求項 37】

請求項 34 記載の方法において、HER2 に対して等級スコアを計算するステップが、前記HER2用のデジタル視野内に現れる複数の核に対して、該核を包囲する細胞膜が完全に染色されたか否かを判定するステップを含む、方法。

【請求項 38】

請求項 34 記載の方法において、HER2 に対して等級スコアを計算するステップが、前記HER2用のデジタル視野内に現れる複数の核に対して、当該核を包囲する細胞膜の染色の強度を判定するステップを含む、方法。

【請求項 39】

被験者において乳癌を予知する方法であって、

エストロゲン受容体 (ER)、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2)、Ki-67、およびプロゲステロン受容体 (PR) の各々用に少なくとも 2 つの異なる視野 (FOV) を、前記被験者から得られた乳癌サンプルにおいて選択するステップであって、前記サンプルが、ER、HER2、Ki-67、およびPRの各々用の抗体が検出可能に標識される、ステップと、

前記選択したFOVの各々において、ER、HER2、Ki-67、およびPRタンパク質発現を測定するステップと、

免疫組織化学 (IHC) 複合スコアを判定するステップと、

前記選択したFOVの各々において、ERおよびPRタンパク質異質性を測定するステ

ップと、

ERおよびPRの各々に対してタンパク質異質性スコアを判定するステップと、  
前記タンパク質異質性スコアおよび前記IHC複合スコアを組み合わせることによって、出力予知スコアを生成するステップと、

前記出力予知スコアが閾値と一致する場合に、前記被験者における乳癌が進行性である可能性が高いと判定し、前記出力予知スコアが閾値に一致しない場合に、前記被験者における乳癌は進行性でありそうにないと判定するステップと

を含む、方法。

【請求項40】

請求項39記載の方法において、前記乳癌サンプルが早期乳癌サンプルである、方法。 10

【請求項41】

請求項40記載の方法において、前記早期乳癌サンプルが、HER2陰性、ER陽性、およびリンパ節陰性である、方法。

【請求項42】

請求項39から41までのいずれか一項記載の方法において、乳癌の再発5年危険性を判定する、方法。

【請求項43】

請求項39から42までのいずれか一項記載の方法であって、更に、ER、HER2、Ki-67、およびPRの各々に対して検出可能に標識された前記乳癌サンプルのデジタル画像を得るステップを含む、方法。 20

【請求項44】

請求項39から43までのいずれか一項記載の方法において、ER、HER2、Ki-67、およびPRタンパク質発現を測定するステップが、

ER、Ki-67、およびPRの各々に対する陽性百分率と、

HER2に対する等級スコアと、

ERに対するHスコアと、

を判定するステップを含む、方法。

【請求項45】

請求項39から44までのいずれか一項記載の方法において、IHC複合スコアを判定するステップが、 30

$$IHC4 = 94.7 \times \{-0.100ER_{1.0} - 0.079PR_{1.0} + 0.586HER2 + 0.240 \ln(1 + 10 \times Ki67)\}$$

の式を適用するステップを含み、 $ER_{1.0}$ がERに対するHスコアであり、 $PR_{1.0}$ がPRに対する調節した陽性百分率スコアであり、HER2がHER2に対する等級スコアであり、Ki67がKi-67に対する陽性百分率である、方法。

【請求項46】

請求項39から45までのいずれか一項記載の方法において、ER、HER2、Ki-67、およびPRタンパク質異質性を測定するステップが、ER、HER2、Ki-67、およびPRの各々に対する可変性メトリック (VM) を判定するステップを含み、ここで、 40

$$VM = STD(PP(FS_1), PP(FS_2), \dots, PP(FS_N))$$

であり、 $PP(FS)$ が、各視野FSに対する陽性百分率である、方法。

【請求項47】

請求項39から46までのいずれか一項記載の方法において、ERおよびPRの各々に対してタンパク質異質性スコアを判定するステップが、次の式

【数1】

$$H = \begin{cases} \alpha * \frac{VM}{0.05}, & S < 10\% \\ \alpha * \frac{VM}{S}, & otherwise \end{cases} \text{ wherein } \alpha = [0, 1].$$

を使用するステップを含む、方法。

【請求項 4 8】

請求項 3 9 から 4 7 までのいずれか一項記載の方法において、HER 2 に対するタンパク質異質性スコアを判定するステップが、次の式

$$H = \sum_{\substack{\forall i, j \\ i \neq j}} \|P(FS_i) - P(FS_j)\|$$

を使用するステップを含み、P が視野 FS 毎の等級スコアである、方法。

10

【請求項 4 9】

請求項 3 9 から 4 8 までのいずれか一項記載の方法において、出力予知スコアを生成するステップが、

出力予知スコア = 免疫組織化学複合係数 × IHC 4 + 異質性係数 × 複合異質性スコア

の式を適用するステップを含み、前記複合異質性スコアが、(ER 異質性スコア + PR 異質性スコア) の二乗根に等しい、方法。

【請求項 5 0】

請求項 3 9 から 4 9 までのいずれか一項記載の方法において、

前記免疫組織化学複合係数が 0.03114 に等しく、前記異質性係数が 1.95119 に等しい、方法。

20

【請求項 5 1】

請求項 3 9 から 5 0 までのいずれか一項記載の方法において、前記ステップの 1 つ以上が、相応しくプログラミングされたコンピュータによって実行される、方法。

【請求項 5 2】

請求項 3 9 から 5 1 までのいずれか一項記載の方法において、乳癌サンプルにおいて少なくとも 2 つの異なる FOV を選択する前記ステップが、病理医によって実行される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本願は、早期乳癌のような、乳癌を予知するための画像分析に関する。

研究契約に参加する当事者

Ventana Medical Systems, Inc., (ベンタナ・メディカス・システムズ社)、Cleveland Clinic (クリーブランド・クリニック)、および the University of Melbourne (メルボルン大学) は、本明細書において開示する発明を管理する研究契約に参加する当事者である。

【背景技術】

【0002】

局所的 (早期、切除可能な) 乳癌があり治療のための手術を受けた患者は、局所的な癌再発または離れた部位における癌再発という根本的な危険性があり、再発する人々は、高い死亡率を示す。危険の大きさに依存して、異なる処置の選択肢が存在する。このため、癌再発の危険性が低い患者または高い患者を信頼性高く識別する検定 (assay) が必要とされる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

したがって、危険が高い患者と危険が低い患者との間で信頼性高く判別し、患者の処置選択肢を決定するときに考慮すべき追加情報を医療供給者に提供することができる技術も必要とされる。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

本願は、乳癌予知のためのコンピュータ実装方法を提供する。例えば、この方法は、バイオマーカー用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する表示画像内における複数のデジタル視野間においてバイオマーカーに対して測定したタンパク質異質性と、被験者に対する免疫組織化学複合スコアとに少なくとも部分的に基づいて、乳癌再発予知スコアを生成するステップと、乳癌再発予知スコアに基づいて、被験者に対する乳癌再発予知の指示を出力するステップとを含むことができる。これらの方法に基づいて、開示した方法を計算システムに実行させるコンピュータ実行可能命令を含む1つ以上の非一時的なコンピュータ読み取り可能媒体も提供される。

10

## 【0005】

また、コンピュータ実装方法も提供される。一例では、このような方法は、被験者からの乳癌サンプルにおけるそれぞれのバイオマーカーに対するタンパク質発現を描写する複数のスライド画像を受け取るように動作可能なスライド画像処理ツールを含む。このスライド画像処理ツールは、更に、スライド画像内における視野を更に受け取るように動作可能であり、このスライド画像処理ツールは、スライド画像およびスライド画像内における視野に基づいて、免疫組織化学複合スコアを計算するように動作可能であり、このスライド画像処理ツールは、スライド画像およびスライド画像内における視野の選択に基づいて、1つ以上の異質性スコアを計算するように動作可能であり、免疫組織化学複合スコアおよび1つ以上の異質性スコアを入力として受け入れ、被験者において癌が再発する可能性が

20

## 【0006】

また、本開示は、乳癌再生予知の指示を表示するステップを含むことができる、コンピュータ実装方法も提供する。このような方法は、免疫組織化学複合スコアと異質性スコアとを組み合わせる乳癌再発予知スコアを求めるステップと、乳癌再発予知スコアに基づいて、乳癌再発予知の指示を表示するステップとを含むことができる。

## 【0007】

コンピュータ実装方法が提供され、この方法は、バイオマーカー用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する表示画像内において複数のデジタル視野を受け取るステップと、デジタル視野においてバイオマーカーに対するタンパク質発現を測定するステップと、複数のデジタル視野間において、バイオマーカーに対して測定したタンパク質発現の異質性を測定するステップと、バイオマーカーに対して測定したタンパク質異質性を出力するステップとを含む。

30

## 【0008】

被験者に対する免疫組織化学複合スコアを計算するステップを含むコンピュータ実装方法が提供される。この方法は、複数のバイオマーカー用に、それぞれのバイオマーカー抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写するそれぞれの画像内における複数のデジタル視野を受け取るステップと、複数のバイオマーカーに対して陽性百分率を測定するステップと、免疫組織化学複合スコアを計算するステップであって、免疫組織化学複合スコアの計算が、1つのバイオマーカーに対する陽性百分率を、第2バイオマーカーに対する陽性百分率と組み合わせることを含む、ステップと、免疫組織化学複合スコアを出力するステップを含む。

40

## 【0009】

コンピュータ実装方法が提供され、ER用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する画像において、ER用に複数のデジタル視野を受け取るステップと、ER用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する画像において、PR用に複数のデジタル視野を受け取るステップと、ER用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する画像において、Ki-67用に複数のデジタル視野を受け取るステップと、ER用の抗体で検出可能に標識された乳癌サンプルを描写する画像において、HER2用に複数のデジタル視野を受け取るステップと、ER用のデジタル視野に基づいて、E

50

Rに対するH-スコアを計算するステップと、PR用のデジタル視野に基づいて、PRに対する陽性百分率を計算するステップと、Ki-67用のデジタル視野に基づいて、Ki-67に対する陽性百分率を計算するステップと、HER2用のデジタル視野に基づいて、HER2に対する等級スコアを計算するステップと、ERに対するH-スコア、PRに対する陽性百分率、Ki-67に対する陽性百分率、およびHER2に対する等級スコアを組み合わせて、免疫組織化学複合スコアを求めるステップを含む。

#### 【0010】

被験者において乳癌を予知する(prognosing)または予告する(prognosticating)方法が提供される。ある例では、このような方法は、エストロゲン受容体(ER)、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)、Ki-67、およびプロゲステロン受容体(PR)の各々用に少なくとも2つの異なる視野(FOV)を、被験者から得られた乳癌サンプルにおいて選択するステップであって、これらのサンプルが、ER、HER2、Ki-67、およびPRの各々の抗体が検出可能に標識される、ステップと、選択したFOVの各々において、ER、HER2、Ki-67、およびPRタンパク質発現を測定するステップと、免疫組織化学(IHC)複合スコアを判定するステップと、選択したFOVの各々において、ERおよびPRタンパク質異質性を測定するステップと、ERおよびPRの各々に対してタンパク質異質性スコアを判定するステップと、タンパク質異質性スコアおよびIHC複合スコアを組み合わせることによって、出力予知スコアを生成するステップと、出力予知スコアが閾値と一致する場合、被験者における乳癌が進行性である可能性が高いと判定し、出力予知スコアが閾値に一致しない場合、被験者における乳癌は進行性でありそうにないと判定するステップを含む。

#### 【0011】

バイオマーカー用の抗体で検出可能に標識された被験者からの乳癌サンプルの画像におけるデジタル視野を受け取り、このバイオマーカーに対するタンパク質異質性を測定するために処理することができる。

#### 【0012】

異質性測定値を免疫組織化学複合スコアと組み合わせて、乳癌再発予知スコアを生成することができる。

このようなスコアは、免疫組織化学複合スコア単独よりも多い情報を提供することができる。

#### 【0013】

画像上における視野の選択を容易にするために、デジタル病理医ワークフローをサポートすることができる。

本開示の以上のならびに他の目的および特徴は、添付図面を参照しながら進める以下の詳細な説明から一層明らかとなる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

【図1】図1は、本明細書において説明する技術を実行するためのシステム例のブロック図である。

【図2】図2は、乳癌再発予知スコアを生成するために使用される異なるタンパク質について、スライドの画像がどのように染色したかを示すブロック図である。

【図3】図3は、特許請求する方法の全体像を示す模式図である。

【図4A】図4Aは、視野におけるアノテーション例を示す画像である。

【図4B】図4Bは、視野におけるアノテーション例を示す画像である。

【図5】図5は、特許請求する方法の全体像を示す模式図である。

【図6】図6は、胸部組織サンプルの免疫組織化学(IHC)画像を得るステップ例を示す模式図である。

【図7】図7は、視野においてタンパク質発現を判定または測定するステップ例を示す模式図である。

【図8】図8は、タンパク質異質性を判定または測定するステップ例を示す模式図である。

。

【図 9】 図 9 は、本明細書において説明する乳癌予知技術を実現するシステム例のブロック図である。

【図 10】 図 10 は、本明細書において説明する乳癌予知技術を実現するコンピュータ実装方法例のフローチャートである。

【図 11】 図 11 は、スライドにおいて核を識別するコンピュータ実装方法例のフローチャートである。

【図 12】 図 12 は、視野採点(field-of-vide scoring)のためのシステム例のブロック図である。

【図 13】 図 13 は、視野採点のための他のシステム例のブロック図である。

10

【図 14】 図 14 は、真の陽性染色核を判定するためのクラシファイア(classifier)の一例のブロック図である。

【図 15】 図 15 は、真の陽性染色核を判定するための多段階クラシファイアの一例のブロック図である。

【図 16】 図 16 は、HER2 等級スコア(binned HER2 score)を判定する方法例のフローチャートである。

【図 17】 図 17 は、本明細書において説明する乳癌予知技術を実現する異質性ツール(heterogeneity tool)を含むシステム例のブロック図である。

【図 18】 図 18 は、それぞれのバイオマーカに対して異質性スコアを判定することによって、本明細書において説明する乳癌予知技術を実現するコンピュータ実装方法例のフローチャートである。

20

【図 19】 図 19 は、バイオマーカに対して異質性スコアを計算するために異なるエンジンを含むシステム例のブロック図である。

【図 20】 図 20 は、本明細書において説明する乳癌予知技術において使用するための、異質性スコアを計算するためのコンピュータ実装方法例のフローチャートである。

【図 21】 図 21 は、画像内部においてデジタル視野を示すユーザ・インターフェースの一例のスクリーンショットである。

【図 22】 図 22 は、デジタル病理学者ワークフロー方法の一例のフローチャートである。

【図 23】 図 23 は、説明する実施形態を実現することができる計算システム例のブロック図である。

30

【図 24】 図 24 は、乳癌サンプルを、進行性が強い(悪化)または弱い(悪化せず)ものとして分類する、開示する方法の能力を示すグラフである。該グラフに示される事例は、アルゴリズムを作成するために使用されたのと同じ事例である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

略語および用語

用語および方法についての以下の説明は、本開示をより良く説明するため、そして本開示の実施において当業者を導くために設けられる。単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上そうでないことが明らかに判断できない限り、1つよりも多いことに言及するものとする。例えば、「抗体を含む」(comprising an antibody)は、1つまたは複数の抗体を含み、「少なくとも1つの抗体を含む」という句と同等であると見なされる。

40

「または」(or)という用語は、文脈上そうでないことが明らかに示されない限り、述べられた代替要素の1つの要素、または2つ以上の要素の組み合わせに言及するものとする。本明細書において使用される場合、「含む」(comprises)は「含む」(includes)を意味するものとする。つまり、「AまたはBを含む」(comprising A or B)は、追加の要素を除外せずに「A、B、またはAおよびBを含む」(including A, B, or A and B)ことを意味する。本明細書において言及されるGenBankアクセッション番号の日付けは、早い方では少なくとも2012年12月28日には入手可能な連番(sequences)である。

【0016】

50

別段説明されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術の当業者に共通して理解されるのと同じ意味を有するものとする。本開示の実施または検査において、本明細書において説明するものと同様または同等の方法および材料を使用することができるが、適した方法および材料については以下で説明する。その材料、方法、および例は、例示に過ぎず、限定することを意図していない。

#### 【0017】

抗体：免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的にアクティブな部分、即ち、特定の抗原（ER、PR、Ki-67またはHER2等）と結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含有する分子。抗体の例は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびヒト化抗体を含む。

10

#### 【0018】

自然に発生する抗体（IgG、IgM、IgD等）は、4つのポリペプチド鎖、2つの重鎖（H）、および軽鎖（L）を含み、ジスルフィド結合によって相互接続される。本明細書において使用する場合、抗体という用語は、細胞内に1つ以上の抗体鎖をエンコードするヌクレオチドの発現によって生成される組換え抗体も含む（例えば、米国特許第4,745,055号、米国特許第4,444,487号、WO88/03565、EP256,654、EP120,694、EP125,023、Faoukner et al, Nature 298:286, 1982、Morrison, J. Immunol. 123:793, 1979、Morrison et al, Ann Rev. Immunol 12:239, 1984を参照）。

#### 【0019】

また、抗体という用語は、自然に発生した抗体または組み替え抗体の抗体結合断片も含む。抗体という用語に含まれる結合断片の具体的な、非限定的例は、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、Fv、および単鎖Fv(scFv)を含む。Fbは、完全な軽鎖および1つの重鎖の一部を形成するためにパパイン酵素による抗体全体の消化によって生成される、または遺伝子工学によって同等に生成される、抗体分子の1価抗原結合断片を含有する断片である。Fab'は、ペプシンによって抗体全体を処理し、続いて還元によって完全な軽鎖および1つの重鎖の一部を形成することによって得られる抗体分子の断片である。抗体分子毎に、2つのFab'断片が得られる。(Fab')<sub>2</sub>は、酵素ペプシンによって抗体全体を処理し、続いて還元を行わないことによって、または遺伝子工学によって同等に得られる抗体の断片である。(FAB')<sub>2</sub>は、ジスルフィド結合によって一緒に保持された2つのFab'断片の二重体である。Fvは、軽鎖の可変領域、および2つの鎖で表現される重鎖の可変領域を含有する、遺伝子工学で作られた断片である。単鎖抗体（「SCA」: single chain antibody）は、軽鎖の可変領域、遺伝子的に溶解された単鎖分子として適したポリペプチド・リンカによってリンクされた、重鎖の可変領域を含有する、遺伝子工学で作られた分子である。これらの断片を作る方法は、当技術分野における型どおりの手順である。

20

30

#### 【0020】

結合親和性：ER、PR、Ki-67、HER2ペプチド用の抗体の親和性というような、抗体の抗原に対する親和性。抗体親和性を判定する方法は、当技術分野では周知であり、Frankel et al., Mol. Immunol., 16: 101-106, 1979に記載されたスキヤッチャード(Scatchard)法の変更による計算、抗原/抗体解離速度による測定、または競合放射免疫検定法による計算を含む。高い結合親和性は、少なくとも約 $1 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約 $1.5 \times 10^{-8}$ 、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-8}$ 、少なくとも約 $2.5 \times 10^{-8}$ 、少なくとも約 $3.0 \times 10^{-8}$ 、少なくとも約 $3.5 \times 10^{-8}$ 、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-8}$ 、少なくとも約 $4.5 \times 10^{-8}$ 、または少なくとも約 $5.0 \times 10^{-8}$  Mとすることができる。

40

#### 【0021】

乳癌：上皮（癌腫）、間質（肉腫）胸部組織、その付近、またはそれを含む腫瘍のような、胸部のあらゆる腫瘍を含む。転移していない腺管癌（DCIS）は、導管の非侵襲的腫瘍性状態である。小葉癌は、侵襲的疾患ではないが、癌が発現するかもしれないという

50

指標である。胸部の湿潤（悪性）癌は、段階（I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV）に分割することができる。例えば、Bonadonna et al, (eds), Textbook of Breast Cancer: A clinical Guide the Therapy（乳癌の教科書：臨床の手引き、療法）、3rd ; London, Tayloy & Francis, 2006を参照のこと。DCISは、侵襲的でないので、段階0の乳癌と呼ばれることもある。侵襲的乳癌の例は、癌NOS（それ以外に指定されない）、小葉癌、管状腺癌／くし状腺癌、粘液性（コロイド）癌腫、骨髄癌、乳頭状癌、および化生性癌を含む。胸部肉腫の例に、仮葉腫瘍(phyllodes tumor)がある。

#### 【0022】

早期乳癌は、段階IまたはIIのものである。胸部組織サンプル、例えば、ER陽性、リンパ節陰性、および、ある例では、HER2陰性も早期乳癌として特徴付けられることもある。 10

#### 【0023】

乳癌に対する治療例は、外科手術（例えば、腫瘍の一部または全部の除去）、ホルモン遮断療法（例えば、タモキシフェン）、放射線、シクロホスホアミドおよびドキシソルビシン（アドリアマイシン）、タキサン（例えば、ドセタケセル）、ならびにトラツズマブ(trastuzumab)（ハーセプチン）またはパーツズマブ(pertuzumab)のようなモノクローナル抗体、あるいはその組み合わせを含む。例の中には、開示する方法が、一層進行性の腫瘍を有すると識別された者のような被験者に対するこれらの療法の1つ以上を管理することを含むものもある。

#### 【0024】

対照(Control)：実験または検査サンプル（胸部サンプル等）との比較に使用されるサンプルまたは標準。実施形態の中には、対照が、正常な胸部サンプルまたは複数のサンプルというような、健康な患者（または複数の患者）から得られた正常なサンプルである場合もある。実施形態の中には、対照が、正常な胸部組織のような、乳癌と診断された患者から得られた非腫瘍組織サンプルである場合もある。実施形態の中には、対照が、ER+, PR+, K-67+, HER2-であると分かっているサンプルのような、既知の早期乳癌サンプル（または複数のサンプル）である場合もある。 20

#### 【0025】

実施形態の中には、対照が、過去の対照あるいは標準的基準値または値の範囲（既知の乳癌、正常な胸部サンプル、良性の胸部サンプル、上皮、または基質等）である場合もある。実施形態の中には、対照が、既知の正常な胸部サンプルまたは既知の早期乳癌サンプルというような、複数の患者サンプルから得られた平均値（または値の平均範囲）を表す標準値である場合もある。 30

#### 【0026】

対照サンプルは、対照を染色するために使用することができる。このような手法は、サンプルの信号対ノイズ比を識別することに関連することができる。

接触：ある薬剤を他の薬剤に近接させることによって、これらの薬剤に相互作用させること。例えば、生物サンプルを収容した顕微鏡スライドまたは他の表面に抗体を載せることによって、サンプルにおいて、抗体によって特定の認識されるタンパク質の検出を可能にすることができる。 40

#### 【0027】

検出：薬剤が存在するかまたは不在か判定することであり、パターンを判定することも含むことができる。例の中には、これが更に定量化も含むことができる場合もある。例えば、個々のタンパク質（例えば、Ki-67, ER, PR, HER2）に対して特定の抗体の使用により、乳癌組織を含有するサンプルのような、サンプルにおけるタンパク質の検出が可能になる。特定の例では、検出可能な標識（標的が存在する場合の信号の増大等）からの放出信号が検出される。

#### 【0028】

検出は一括で行うことができるので、巨視的な数の分子を同時に観察することができる。また、検出は、顕微鏡を使用して、更にこのような技法を、背景ノイズを低減するため 50

の全内部反射として使用して、ひとつひとつの分子からの信号の識別を含むことができる。

#### 【0029】

エストロゲン受容体 (ER) : 細胞間受容体の核ホルモン族のメンバーは、17P-エストラジオール(17P-estradiol)によって活性化される。エストロゲン受容体は、乳癌の事例の約70%において過剰発現され、「ER陽性」(ER+)と呼ばれる。

#### 【0030】

H-スコア: 強く染色された細胞を、弱く染色された細胞よりも大きく重み付けするタンパク質発現の指示。例えば、H-スコアは、弱く染色する細胞の百分率(例えば、1+)、中位に染色する細胞の百分率(例えば、2+)、更に強く染色する細胞の百分率(例えば、3+)を示すことができる(例えば、Cuzick et al., J. Clin. Oncol. 29:4273-8, 2011を参照のこと。この論文をここで引用したことにより、その内容が本願にも含まれるものとする)(また、[www.pathogenesys.com/html/semi-quantitative\\_ihc.html](http://www.pathogenesys.com/html/semi-quantitative_ihc.html)も参照のこと)。H-スコア計算技法の例については、本明細書において説明する。

10

#### 【0031】

異質性スコア: 乳癌サンプルにおいて染色するER, HER2, Ki-67, PRというようなサンプルにおけるバイオマーカのタンパク質発現異質性の量の指示。異質性スコアは、1つのFOVが他のFOVとは、同じマーカに対してどのように異なるかについて尺度を提示する。

#### 【0032】

ヒト上皮成長因子受容体2 (HER2) : ErbBタンパク質族のメンバーであり、人の染色体17の長腕に位置する癌原遺伝子である(17q112-q12)。乳癌の約25~30%は、HER2/ニュー遺伝子の増幅、またはそのタンパク質生成物の過剰発現を有し、「HER2陽性」と呼ばれる(HER2+)。HER2+の患者は、モノクロナール抗体トラスツマブ(ハーセプチン)を、乳癌のための治療として受けることができ、例の中には、モノクロナール抗体ペルツマルと組み合わせて使用されることもある。乳癌におけるHER2の過剰発現は、疾病の再発および悪化予知と関連付けられている。

20

#### 【0033】

免疫組織化学(IHC)複合スコア: IHCマーカの数に基づく予知スコアであり、マーカ数は1よりも多い。IHC4は、乳癌サンプルにおける4つの被測定IHCマーカ、即ち、ER, HER2, Ki-67, PRに基づくそのようなスコアの1つである(例えば、Cuzick et al., J. Clin. Oncol. 29:4273-8, 2011、およびBarton et al, Br. J. Cancer 1-6, April 24, 2012を参照のこと、双方の論文をここで引用したことにより、その内容が本願にも含まれるものとする)。一例では、IHC4スコアは、例えば、次の式を使用して計算される。

30

$$IHC4 = 94.7 \times \{-0.100ER_1 - 0.079PR_1 + 0.586HER2 + 0.240In(1+10 \times Ki67)\}$$

当業者にとって、他のIHC複合スコア(例えば、IHC3, IHC5等)も可能であることが認められる。

#### 【0034】

Ki-67: 細胞増殖およびリボソームRNAに関連する核タンパク質。抗原Ki-67の不活性化は、リボソームRNA合成の抑制に至る。Ki-67は、例えば、増殖のマーカとして使用される。

40

#### 【0035】

標識(Label): 例えば、分光測光、流動細胞分析法、または顕微鏡検査(光学顕微鏡検査等)による検出が可能な薬剤。例えば、1つ以上の標識を抗体に付着することによって、標的タンパク質の検出を可能にすることができる。標識の例は、放射性同位元素、蛍光体、リガンド、化学発光剤、酵素、およびその組み合わせを含む。一例では、標識は量子ドットである。

#### 【0036】

50

正常な細胞または組織：腫瘍のない、悪性でない細胞および組織。

出力予知スコア：被験者に対する IHC 複合（例えば、IHC 4）スコアおよび異質性スコアを組み合わせて重み付けした結果。これから、乳癌予知を判定することができる。

【0037】

プロゲステロン受容体（PRまたはPgR）：プロゲステロンを特定して結合する細胞間ステロイド受容体。プロゲステロン受容体は、「PR陽性」（PR+）と呼ばれる、ある乳癌事例において過剰発現される。

【0038】

予知：追加の療法がないときに疾病（例えば、早期乳癌）を発症する被験者が起こり得る結果を判定するプロセス。一例では、開示する方法は、閾値よりも高い出力予知スコアが検出された場合、早期乳癌の一層進行した形態の予知を可能にする。対照的に、閾値よりも低い出力予知スコアが検出された場合、早期乳癌の進行性の弱い形態が予知される。例えば、予知は、余命（例えば、1年、3年、または5年後の生存の可能性）というような将来の事象を予測すること、乳癌の再発があり得ること（局所的または転移）（例えば、1年、3年、または5年後）を予測することに関係することができる。同様の「予告する」（prognosticate）という用語も本明細書では使用される。

10

【0039】

定量化：実際の量または相対的な量のいずれであれ、数値量として表現すること。

サンプル：例えば、ゲノムDNA、RNA（例えば、mRNA）、タンパク質、またはその組み合わせを含有し、被験者から得られる生体試料。例は、微細針吸引生検、組織生検、外科手術標本、および生検素材を含むが、これらに限定されるのではない。一例では、サンプルは、針生検、乳腺腫瘍摘出、および乳房切除の間に得られるような、胸部組織を含む。

20

【0040】

癌の病期分類：乳癌のような癌は、元の（原発）腫瘍の程度および身体内における拡散の程度に基づいて、癌の程度または重症度を記述するために、病期分類することができる。乳癌は、TNMシステム（AJCC Staging Manualを参照のこと）にしたがって、病期分類することができ、Tは腫瘍のサイズ、および近隣の組織に侵入しているか否か記述し、Nは含まれるあらゆるリンパ節を記述し、Mは転移（ある身体部分から他への癌の拡散）を記述する。

30

【0041】

病期は、次の通りである。病期0－上皮内癌、病期I－腫瘍（T）は腋窩リンパ節（N）を含まない。病期IIA－T 2～5 cm、N陰性、またはT < 2 cm、およびN陽性、病期IIB－T > 5 cm、N陰性、またはT 2～5 cm、およびN陽性（< 4つの腋窩リンパ節）。病期III A－T > 5 cm、N陽性、またはTは2～5 cmで4つ以上の腋窩リンパ節がある。病期III B－Tは胸壁または皮膚に入り込んでおり、10箇所よりも多い腋窩リンパ節Nに拡散している可能性がある。病期III C－Tは10箇所よりも少ない腋窩リンパ節N、1つ以上の鎖骨上または鎖骨下N、または内部乳N（internal mammary N）を有する。病期IV－遠隔転移（M）。

【0042】

被験者：生きている多細胞脊椎有機体、人および、獣医被験者（veterinary subject）のような人以外を含む分類。特定の例では、被験者は、早期乳癌のような、乳癌であった者、または乳癌であったことが疑われる者である。

40

【0043】

標的分子：乳癌マーカのような、検出または測定が望まれる生体分子。標的分子の例は、ER、PR、Ki-67、およびHER2を含む。

次にとって十分な条件下：所望の活動を許す任意の環境を記述するために使用される句。例は、サンプルにおいて1つ以上の標的分子（例えば、ER、PR、HER2、Ki-67）の検出を可能にする程十分に抗体を乳癌サンプルと接触させることを含み、サンプルにおける1つ以上の標的分子の定量化を含むことができる。

50

## 【0044】

## 乳癌予知システム例

図1は、本明細書において説明する技術を実行するためのシステム例のブロック図である。この例では、スライド・スキャナ（例えば、Ventana Medical Systems, Inc.の iScan Coreo等）のような画像取得デバイス10が、本明細書において説明するように用意されたスライド5を受け入れ、本明細書において説明するような分析のためにスライド5の画像を生成するように動作可能である。実際には、本明細書において説明するように、複数のスライドが使用される。

## 【0045】

計算システム20は、1つ以上の入力デバイス23、1つ以上のディスプレイ24、および1つ以上のコンピュータ21を含むことができ、コンピュータ21は、本明細書において説明するように、画像処理アプリケーションまたはプラットフォームを実行することができる。

## 【0046】

走査画像のようなデータは、例えば、リモートにあるサーバ12に、および/またはコンピュータ21内部に格納することができる。画像取得は、画像処理とは別々にすることができる（例えば、異なるシステムにおいて、異なる人物によって等）。

## 【0047】

実施態様の中には、クラウド・ベースまたはサービスとしてのソフトウェアのシナリオを実施できる場合もあり、画像処理アプリケーション22は、部分的にまたは全体的にコンピュータ21の外部に常駐する（例えば、サーバ12または1つ以上の他のサーバにて）。

## 【0048】

## 乳癌予知方法例

本明細書では、乳癌、例えば、早期乳癌を、免疫組織化学（IHC）複合スコア（IHC4等）スコアおよび/または異質性スコアを得ることに基づいて予知できることを示す。これら2つのスコアが組み合わされ重み付けされ、出力予知スコアが得られる。得られた出力予知スコアは、患者の乳癌を予知するために使用することができる。例えば、出力予知スコアが閾値よりも高い場合、これは乳癌の進行性が強いことまたは乳癌が再発する可能性が高いことを示し、一方閾値よりも低い出力予知スコアは、乳癌の進行性が弱く再発する可能性が低いことを示す。これによって、臨床医および患者は、より適切な処置および監視判断を行うことが可能になる。例えば、出力予知は、適切な療法を判断するときには有益であり得る（例えば、監視、乳房切除、乳腺腫瘍摘出術、または乳腺腫瘍摘出術と化学療法の組み合わせの中から選択する）。

## 【0049】

本明細書において提供するのは、被験者における早期乳癌のような乳癌を予知する方法である。例では、乳癌は、エストロゲン受容体陽性（ER+）、プロゲステロン受容体陽性（PR+）、およびヒト上皮成長因子受容体2陰性（HER2-）、またはヒト上皮成長因子受容体2陽性（HER2+）であることが知られている。例えば、本方法は、可能性がある癌の進行性、または癌が再発する可能性、例えば、癌が5年以内に再発する可能性を判定するために使用することができる。

## 【0050】

本明細書における技術は、被験者から採取された、乳癌組織がある1つ以上のスライドの画像上で指示された視野に基づいて、IHC複合スコアおよび異質性スコアを生成することができる。次いで、これらのスコアを組み合わせ、本明細書において説明するような、予知スコアを生成することができる。本明細書において説明するようなIHC複合スコアまたは異質性スコアに到達する前に、種々の中間計算値および/またはスコアを生成することができる。

## 【0051】

一方法例では、乳癌組織サンプルが被験者から採取される。例では、乳癌サンプルは、

HER2 陰性（例えば、本明細書において説明するように、2+未満の IHC 染色）、および/または FISH 増幅、ER 陽性、および/またはリンパ節陰性であるもののような、早期乳癌サンプルである。したがって、HER 陰性サンプルは、(1) 2+未満である染色というような、何らかの IHC 染色、または 1 より大きい H-スコアを示すもの、または (2) FISH 分析によって示されるように増幅されたものであることができるが、臨床医または病理医がいずれにせよ HER2 陰性であったと結論付けたものである。あるいは、サンプルが HER2 陽性であってもよい。

#### 【0052】

FISHに加えて、色素生成原位置ハイブリッド形成法 (CISH: chromogenic in situ hybridization)、二重色素生成原位置ハイブリッド形成法 (DISH: dual color chromogenic in situ hybridization) 等のような、他のタイプの原位置ハイブリッド形成法 (ISH: in situ hybridization) を使用することもできる。

#### 【0053】

図2は、異なるタンパク質に対して染色されたスライドの画像32, 34, 36, 38が、乳癌再発予知スコア58を生成するためにどのように使用されるかを示すブロック図である。異なるスライドが示されるが、本明細書において説明する組織マイクロアレイ手法を採用すると、その結果スライド数を減らすことができる。例えば、1つのスライドが複数の異なる組織区間を含むことができ、その各々を異なるタンパク質について分析することができる。他の例では、1つの組織区間を複数のタンパク質について分析することができる。サンプル、例えば、組織ブロックが、区間、例えば4つの区間に分割される。これらの区間はサンプルからの隣接する区間、または連続区間であってもなくてもよい。対象のバイオマークに特定の薬剤、例えば、プローブまたはステイン(stain)が各区間に塗布される。一例では、エストロゲン受容体ERに特定の薬剤が1つの区間に塗布され、PRに特定の薬剤が他の区間に塗布される等である。薬剤の例は、抗体およびアプタマーを含む。このように、サンプルには、ER, HER2, Ki-67, PRの各々を特定の抗体で検出可能に標識することができる。次いで、本明細書において説明するように、サンプル区間の画像32, 34, 36, 38が取得される。画像32, 34, 36, 38から、ERに対するH-スコア41、PRに対する陽性百分率(percent positivity)42、Ki-67に対する陽性百分率43、およびHER2に対する等級スコア(binned score)44が計算される。等級スコア44は、二進スコア(例えば、0または1)45に変換することができる。次いで、本明細書において説明するように、これらのスコアが組み合わされてIHC4スコア55を生成する。

#### 【0054】

ERに対する異質性スコア51は、ERに対する陽性百分率判定47を拠り所とし、PRに対する異質性スコア52は、PRに対する陽性百分率判定42を拠り所とする。異質性スコア51, 52は、本明細書において説明するように、組み合わせて、複合異質性スコア54を生成することができる。

#### 【0055】

次に、IHC4スコア55および複合異質性スコア54を組み合わせて、乳癌再発予知スコア58を生成することができる。

図3は、方法例の全体像を示す。この方法は、例えば、PRおよびKi-67の各々に対する陽性百分率、HER2に対する等級スコア(例えば、強度を表す典型的な0から3までの目盛り上。0は陰性染色に指定され、3は非常に強く染色されたサンプルに指定される)、そしてERに対するH-スコアを判定または測定することによって、ER, Ki-67, PR, HER112の各々に対して測定した発現(expression)によって、IHC4スコアを判定するステップを含む。また、この方法は、少なくともERおよびPRに対して、そしてある例ではKi-67およびHER2 114に対しても異質性スコアを判定するステップも含む。得られたIHC4スコア112および異質性スコア114を組み合わせて(116)、出力予知スコア118を生成する。この出力予知スコアに基づいて、乳癌を予知する(120)。

## 【0056】

一例では、各スライドが走査され、本明細書において説明するシステムのいずれかを使用して、各スライドのデジタル画像が生成される。IHC複合スコアは、これらのスライドに基づいて、コンピュータ実装方法によって生成され、異質性スコアは、スライド毎（または、ER分析のための組織区間を含む領域というような、分析されるスライドの区間毎）に生成される。例示の一実施形態では、情報を取り込むために4つのバイオマーカーが利用されるので、IHC複合スコアを「IHC4スコア」と呼ぶ。IHC4スコアは、本明細書において説明するように、異質性スコアと組み合わせて、乳癌再発予知スコアを生成することができる。

## 【0057】

10

一例では、IHC4スコアを計算するために、本方法は、薬剤（抗体等）で標識された乳癌サンプルからの1つ以上のスライド上の組織区間の各々の画像において、ER組織区間スライド画像、HER2組織区間スライド画像、Ki-67組織区間スライド画像、およびPR組織区間スライド画像の各々に少なくとも2つの異なる視野（FOV）を選択する。本発明の例示の実施形態では、IHC4スコアを計算するために、スライドまたは区間毎に、3つのFOVが選択される。腫瘍領域が視野として選択される。

## 【0058】

図4Aは、IHC複合スコアを計算するためのスライド画像のそれぞれにおいて（例えば、病理医によって）視野（FOV）181A、181B、181Cが選択される基になる1組のスライド画像180およびアノテーション(annotations)の例を示す。図示のよう  
20  
に、アノテーションは、バイオマーカー毎に、視野間に関係がなく、独立であることが可能である。これらの例では、視野は矩形である。しかしながら、本明細書において説明するように、他の技法を使用することができる（例えば、視野は他の既知の形状または不規則な形状にすることができる）。ある例では、視野は、対象の解剖学的領域（例えば、内分泌腺）のような、対象エリアである。一例では、視野はスライド全体または組織区間全体である。

## 【0059】

視野に基づいて、IHC複合スコアが計算される。IHC複合スコアに対するコンポーネントを計算するとき、特定のバイオマーカーに対して視野を一緒に取り込むことができる（例えば、組み合わせるおよび／または集合的に考慮する）。例えば、Hスコア、陽性  
30  
百分率、およびHER2等級スコアは、一緒に取り込まれたそれぞれの組の視野に基づくことができる（例えば、ERに対するHスコアは、視野において観察された細胞に基づく）。他の技法も可能である（例えば、スコアを平均する、あるスコアに投票する等）。

## 【0060】

例えば、IHC複合スコアは、ドーセット(Dowsett)のIHC4式またはその変形を使用して計算することができる。

$$IHC4 = 94.7 \times \{ -0.100ER_{1.0} - 0.079PR_{1.0} + 0.586HER2 + 0.240 \ln(1 + 10 \times Ki67) \}$$

ここで、 $ER_{1.0}$  はERに対するHスコア/30であり、 $PR_{1.0}$  は陽性に染色した細胞の百分率（細胞の百分率に対して10%の上限を課する）を10で除算して、0から1  
40  
0の範囲の変数を生成することによって得られる。HER2は、二進HER2スコア（例えば、2+未満の場合0、その他の場合1）であり、Ki67はKi-67に対する陽性百分率である。実際には、 $ER_{1.0}$  は、式に示されるように、Hスコアを30で除算することによって、0から10の範囲に調整される。

## 【0061】

視野の一部では、陽性に染色された核は、各視野において陰性に染色された（例えば、染色されない）核から区別される。次いで、PRおよびKi-67のスライドについて、陽性百分率が1つのスライドにおいて以下のように計算される（例えば、スライドのディ  
50  
ジタル画像における各視野内で陽性に染色された細胞（例えば、悪性細胞）の核の総数が合計され、デジタル画像の視野の各々からの陽性および陰性に染色された核の総数で除

算される)。

【0062】

陽性百分率=陽性に染色された細胞の数/(陽性に染色された細胞の数+陰性に染色された細胞の数)

例示の実施形態では、陽性百分率は、手作業で(例えば、デジタル画像を使用せずに、画像分析を使用して、または種々の他の画像分析方法で)判定される。

【0063】

例示の実施形態では、核が検出され、本明細書において説明する核識別技法によって、陽性染色核または陰性染色核に分類される。例えば、陰性に染色された細胞は、例えば、リンパ球および間質組織から区別することができる。このような技法は、汎用の色閾値を使用するよりも優れている可能性がある。 10

【0064】

加えて、例えば、ERスライド(または組織区間)に対するH-スコア(個々のスライドに対する染色細胞の強度および染色細胞の数を反映する)が計算される。このようなスコアは、集合的に一緒に取り込まれたFOVに基づくことができる。実施形態例では、数値目盛り(例えば、0-300)がH-スコアに使用される。陽性に染色された細胞(例えば、視野内において)に対して、強度が判定される。このような強度は、アルゴリズムによって判定され、閾値と比較され、ピン番号を指定することができる。このようなピン番号は、例えば、0, 1, 2, 3とすることができる。その結果、各ピンには核(即ち、細胞)の個数が得られる。ピンにおける個数(bin count)は、H-スコアを計算するために使用することができる。 20

【0065】

核をビンニングする中間ステップは、後に異質性スコアを計算するときに再使用することができる。必要に応じて(例えば、ERに対する異質性スコアのために)、陽性の(例えば、茶色)強度(例えば、1, 2, 3)を集計して、陽性に染色された核の総数を判定することができる。

【0066】

HER2に対する二進スコアの計算は、HER2のスライドに対する等級スコア(細胞膜染色の完全性、および染色された細胞膜の強度に関係する)を判定すること(例えば、視野に基づいて)を含むことができる。組み合わせたFOVに対する等級スコアは、本明細書において説明するように、0, 1, 2, 3である。0または1は陰性に見なされ(二進スコアでは0)、2または3は陽性に見なされる(二進スコアでは1)。このように、HER2に対して二進スコアが計算される。あるいは、FOVに対するスコアを組み合わせ(例えば、平均する、平均して丸める等)、HER2に対する総合スコアを判定することもできる。 30

【0067】

次に、前述した陽性百分率、H-スコア、および二進スコアを利用することによって、IHC4スコアを判定することができる。選択されたFOVの各々において、これらの判定を行うときに補助するために、ER, HER2, Ki-67, PRタンパク質発現を検出または測定することができる。例えば、タンパク質の発現は、Ki-67およびPRの各々に対する陽性百分率、HER2に対する染色強度等級スコア、およびERに対するH-スコアを判定または測定するために、試験または測定することができる。この情報に基づいて、先の式にしたがって、免疫組織化学(IHC)複合スコアを判定または計算することができる。 40

【0068】

サンプルに対する集合的IHC(例えば、IHC4)複合スコアを別にして、異質性、例えば、タンパク質発現異質性も、それぞれのバイオマーカ(例えば、ER, PER, HER2, Ki67)に対して計算することができる。異質性の判定では、IHC複合(例えば、IHC4)スコアの既に存在する値に、予知値を加算する。例示の実施形態では、異質性、例えば、領域異質性がバイオマーカ(例えば、ER, PER, HER2, Ki6 50

7) 毎に判定される。図4 Bは、視野186 A, 186 B, 186 Cが、異質性スコアを計算するためにスライド画像のそれぞれにおいて選択される (例えば、病理医によって) 基になるアノテーションを示す、1組のスライド画像例185である。図示のように、アノテーションは、バイオマーカー毎に視野間に関係がなく、独立であることができる。IHC複合スコアに使用したものと異なる1組のアノテーションを、異質性に使用することができる。場合によっては、IHC複合スコアに使用されたFOVと異質性スコアに使用されたFOVとの間に部分的な重複がある可能性がある (例えば、1つのバイオマーカーに対するこれらのスコアの間で、1つの視野を共有することができる)。

【0069】

例示の実施形態では、異質性は、種々の腫瘍が、例えば、互いに基準からどのように異なるか測定するために、スライド (または組織区間) に対して判定される。例示の実施形態では、病理医が1つのスライド (または組織区間) にある数の視野を選択する。一実施形態では、病理医が、例えば、異なる陽性百分率を有する腫瘍領域を各々が含む、3つの視野を選択する。

【0070】

ERおよびPRタンパク質異質性は、示されたFOVを使用して測定または検出される。例えば、タンパク質異質性を測定するには、ER、およびPRの各々について可変性メトリック (VM: variability metric) を判定することを含むことができ、 $VM = STD(P(FS_1), P(FS_2), \dots, P(FS_N))$ である。PP(FS)は、各FOV, FS (例えば、ERプローブに特定の薬剤、PRに特定の薬剤等と接触した組織サンプルのデジタル画像の視野) に対する陽性百分率である。可変性メトリックに基づいて、ERおよびPRの各々に対する異質性スコアが判定または計算される。例えば、ERおよびPRの各々に対する異質性スコアは、本明細書において説明するように、以下の式を使用して計算することができる。ここで、 $\alpha = [0, 1]$  (例えば、0から1の範囲の値をトル数値) は正規化係数であり、Sは平均陽性百分率スライド・スコアである。

【0071】

【数1】

$$H = \begin{cases} \alpha * \frac{VM}{0.05}, S < 10\% \\ \alpha * \frac{VM}{S}, otherwise \end{cases}$$

【0072】

Ki-67に対する異質性を計算する実施形態は、ERおよびPRに使用した式と同じまたは同様の式を使用することができる。HER2に対するタンパク質異質性スコアは、実施形態の中には有用である場合もあり、以下の式を使用して計算することができる。

【0073】

【数2】

$$H = \sum_{\substack{vi,j \\ i \neq j}} \|P(FS_i) - P(FS_j)\|$$

【0074】

ここで、P(FS)は、視野FS毎のHER2等級スコア (例えば、本明細書において説明するように判定される)。視野毎の等級スコアが等しい場合 (例えば、 $P(FS_1) = P(FS_2) = P(FS_N)$ ) は、 $H = 0$ となる。つまり、Hはどのように異なるタンパク質発現が、バイオマーカーに対する異なる視野内にあるかを示す。

【0075】

例示の実施形態では、これらの異質性スコアの内少なくとも1つが、出力予知スコアを判定するために利用される。一実施形態では、スライドのそれぞれに対して得られた異質性スコア、およびIHC複合スコアが組み合わせられ、重み付けされることによって、出

力予知スコアを生成する。例示の実施形態では、出力予知スコアは、係数または百分率（P1）にIHC複合スコアを乗算し、複合異質性スコアの係数または百分率（P2）を乗算した値であり、P1およびP2は0よりも大きい。例えば、出力予知スコア（PS）は、以下の式を使用することによって計算することができる。

$$PS = 0.03114 \times IHC4 + 1.95119 \times \text{複合異質性スコア}$$

ここで、複合異質性スコアは、二乗根（ER異質性スコア+PR異質性スコア）である。得られた出力予知スコアは、乳癌を有する患者の予知を判定するために使用される。例えば、本方法は、出力予知スコアがある閾値よりも高い場合、被験者における乳癌が進行性であるまたは再発する（例えば、5年以内に）可能性が高いことを予知することができ、また出力予知スコアが閾値よりも低い場合、被験者における乳癌は進行性であるまたは再発する可能性が低いことを予知することができる。

10

#### 【0076】

ある例の中には、本方法が、ER、HER2、Ki-67、PRの各々に対して検出可能に標識された乳癌サンプル（例えば、1つ以上の顕微鏡スライド上にあるもの）のデジタル化画像を得るステップを含むことができるものもある。例えば、ER、HER2、Ki-67、PRの各々に対して、1つ以上のデジタル化画像を得ることができる。ある例の中は、本方法は、更に、再発の可能性が更に高いと予知された被験者を選択するステップ、例えば、より攻撃的な療法のために患者を選択するステップも含むものもある。

#### 【0077】

図5は、本技術による方法の一特定実施形態の更なる詳細を示す。また、この方法は、ER、HER2、Ki-67、PRを検出するために染色された乳癌サンプルの画像（デジタル画像等）を取得または入手するステップ108も含むことができる。ER、HER2、Ki-67、PRの各々に対して少なくとも2つのFOVを選択し（110）、例えばデジタル画像上で選択して印を付ける。しかしながら、選択されるFOVの数は異なってもよい（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10通りのFOVがあってもよい）。FOVを選択した（110）後、本方法は、各FOVにおいてER、HER2、Ki-67、PR発現を検出または測定するステップ111を含む。この情報に基づいて、例えば、PRおよびKi-67の各々に対する陽性百分率、HER2に対する等級スコア（例えば、強度を表すために典型的な0~3の目盛り上。ここで0は陰性染色に指定され、3は非常に強く染色したサンプルに指定される）に基づく二進スコア、およびERに対するHスコアを判定または測定することによって、ER、Ki-67、PR、HER2の各々に対する発現によって、IHC（例えば、IHC4）スコアを判定する（112）。また、本方法は、ERおよびPRの各々に対して、そしてある例ではKi-67およびHER2に対しても、タンパク質異質性を検出または測定するステップ113も含む。この情報に基づいて、少なくともERおよびPRに対する異質性スコア、そしてある例ではKi-67およびHER2に対する異質性スコアも判定する（114）。結果的に得られたIHC4スコア112および異質性スコア114を組み合わせて、出力予知スコアを生成する（118）。出力予知スコアに基づいて、乳癌を予知する（120）。

20

30

#### 【0078】

図6は、本明細書において提供する方法を使用して分析される胸部組織サンプルのIHC画像を入手または取得する方法例の詳細を示す。サンプルを入手し染色する方法は、当技術分野における型どおりの手順である。例えば、本方法は、患者210から、例えば、乳房生検から胸部組織を入手するステップを含むことができる。次いで、得られた組織は、例えば、ホルマリンおよびパラフィンを使用して、固定し埋め込む（212）。次に、固定され埋め込まれた組織は、薄切りにするまたは区分し、基板214上に載せる、例えば、1つ以上のガラス製の顕微鏡スライド上に載せることができる。ある例では、1つのスライドが、少なくとも2つまたは少なくとも4つの区間というように、複数の組織区間を含む。これらの組織区間は、次に、適切な抗体（または他の特定の結合剤）によって培養し、ER、HER2、Ki-67、PRタンパク質を標識することができる。例えば、少なくとも1つの胸部組織区間をER特定抗体で標識することができ、他の胸部組織区

40

50

間をHER2特定抗体で標識することができ、他の胸部組織区間をPR特定抗体で標識することができ、他の胸部組織区間をKi-67特定抗体で標識することができる(216)。しかしながら、このように標識されたタンパク質が、例えば、別々に標識された副抗体を使用することによって区別可能である限り、1つの組織区間を1つよりも多い抗体(または他の特定結合剤)で標識することができることが当業者にとって認められる。組織区間を標識した後、画像を入手することができる。例えば、ER特定抗体で標識された胸部組織区間の1つ以上の画像を入手することができ、HER2特定抗体で標識された胸部組織区間の1つ以上の画像を入手することができ、PR特定抗体で標識された胸部組織区間の1つ以上の画像を入手することができ、Ki-67特定抗体で標識された胸部組織区間の1つ以上の画像を入手することができる(218)。

10

【0079】

図7は、各FOVにおいてタンパク質発現を検出するときに測定または判定することができるパラメータについての詳細を示す。このような値は、IHC(例えば、IHC4)スコアを計算するために使用することができる。図5において注記したように、FOVを選択した(110)後、本方法は、各FOVにおいてER、HER2、Ki-67、PR発現を検出または測定するステップ111を含む。図7に示すように、各FOVにおいてタンパク質発現を検出するには、PRおよびKi-67の各々に対して陽性百分率を判定または測定するステップ410、本明細書において説明したようにHER2に対する等級スコアを判定または測定するステップ412、そしてER414に対してHスコアを判定または測定するステップ414を含むことができる。これらのスコアは、本明細書において説明したように、組み合わせて免疫組織化学スコアを求めることができる。組み合わせは、HER2に対する等級スコアをHER2に対する二進スコアに変換することを含むことができる。

20

【0080】

図8は、各FOVにおいてタンパク質異質性を測定するときに測定または判定することができるパラメータについての詳細を示す。このような値は、異質性スコアを計算するために使用することができる。図5において注記したように、本方法は、ER、HER2、Ki-67、PRの各々に対してタンパク質異質性を検出または測定するステップ113を含むことができる。図8に示すように、タンパク質異質性を検出するには、各FOVにおいて陽性百分率の可変性(variability)を判定または測定し、少なくともERおよびPRに対して(そして、ある例ではKi-67に対しても)値を正規化するステップ510を含むことができる。例えば、ERおよびPR(そして、ある例ではKi-67)の各々に対する可変性メトリック(VM)が計算される。ここで、 $VM = STD(PP(FS_1), PP(FS_2), \dots, PP(FS_N))$ であり、 $PP(FS)$ は、視野FS毎の陽性百分率である。図8に示すように、HER2に対するタンパク質異質性を測定するには、HER2に対するFOV毎の等級スコア、および等級スコア間のばらつきを判定または測定するステップ512を含むことができる(例えば、先の412において判定された等級スコアを使用するが、少なくとも1つの他のFOVを組み込む)。

30

【0081】

本技術を実現するシステム例

40

図9は、本明細書において説明した乳癌予知技術を実現するシステム例900のブロック図である。この例では、スライド画像処理ツール920が複数のスライド画像912および複数の視野914を入力として受け入れることができる。ツール902は、癌が被験者において再発する可能性があるか否かの指示990を出力する。本明細書において説明したように、このような指示990は出力予知スコアに基づくことができる。

【0082】

スライドは、被験者からの乳癌サンプルにおけるそれぞれのバイオマーカに対するタンパク質発現を描写することができる(例えば、本明細書において説明したように、バイオマーカ用の抗体で検出可能に標識する)。

【0083】

50

ツール920は、視野（FOV）914の選択を受けるためのユーザ・インターフェースを提供することができ、またはこのような機能は他のツールまたはコンポーネントによって提供することもできる。

【0084】

IHC複合スコアは、スライド画像およびスライド画像内の視野に基づいて計算することができる（例えば、ツール920あるいは他のツールまたはコンポーネントによって）。

【0085】

ツール920は、本明細書において説明したように、スライド画像およびスライド画像内の視野に基づいて、1つ以上の異質性スコア927を計算するように動作可能である。 10

スライド画像処理ツール920は、予知ツール930を含むことができる。予知ツール930は、計算されたIHC複合スコアおよび1つ以上の異質性スコア927を入力として受け入れ、癌がより進行性であり、それ故被験者において再発する可能性が更に高いか否かについての指示990を出力する。

【0086】

実際のところ、システム900のような、本明細書において示すシステムは、追加の機能、更に複雑な入力等を有し、更に複雑であることも可能である。例えば、追加の機能は、IHC複合スコア、異質性スコア（1つまたは複数）、または双方を計算することができ、あるいはこのようなスコアは、他のソフトウェアによって提供することもできる。

【0087】

システム900、および本明細書において説明する他のシステムは、以下で説明する計算システム（例えば、処理ユニット、メモリ等）のように、本明細書において説明するハードウェア・コンポーネントの内任意のものと合わせて実現することができる。本明細書における例では、いずれも、入力、出力、およびツールを1つ以上のコンピュータ読み取り可能記憶媒体またはコンピュータ読み取り可能記憶デバイスに格納することができる。本明細書において説明した技術は、オペレーティング・システムまたはハードウェアの仕様(specifics)に対しては一般的(generic)とすることができ、説明した特徴を利用するために、種々の環境のいずれにおいても適用することができる。 20

【0088】

本技術を実現するコンピュータ実装方法の例 30

図10は、本明細書において説明した乳癌予知技術を実現するコンピュータ実装方法例1000のフローチャートであり、例えば、図9に示したシステムにおいて実現することができる。

【0089】

この方法は、処理のために受け取られた1つ以上のスライド入力画像に対して実行することができる。例えば、本明細書において説明したような、バイオマーカー用の抗体で検出可能に標識された被験者からの乳癌サンプルを描写するスライド画像を使用することができる。

【0090】

1010において、画像内における複数のデジタル視野を受け取る。本明細書において説明したように、視野の指示は、表示された画像の選択によって（例えば、画像上で視野の輪郭を辿ることによって）、または画像内における境界の指示によって受け取ることができる。 40

【0091】

1012において、本明細書において説明したように、デジタル視野間でタンパク質異質性を測定する（例えば、所与のスライド画像の視野に対して領域間異質性を判定する）。たとえば、バイオマーカーに対するタンパク質発現をそれぞれの視野に対して測定することができ、本明細書において説明したように、測定値を比較して可変性を求めることができる。実際には、複数のバイオマーカーに対して異質性を測定することができる（例えば、異質性スコアとして）。ER、PR等（例えば、Ki-67、HER2等）の内1つ以 50

上を使用することができる。

【0092】

第2バイオマーカに対してタンパク質異質性を測定するとき、被験者からの乳癌サンプルを描写する表示画像内部において、第2バイオマーカ用の抗体で検出可能に標識された複数の視野を受け取ることができる。第2バイオマーカに対するタンパク質異質性を測定することができる（例えば、第1とは別の異質性スコアとして）。

【0093】

1016において、被験者に対するIHC複合スコアを受け取る。本明細書において説明したIHC複合スコアであればいずれでもサポートすることができる。IHC複合スコアは、異質性分析に使用された同じサンプルに対して得ることができ、または同じ被験者からの異なるサンプルを使用することもできる。

10

【0094】

1018において、複数のデジタル視野の中からのバイオマークに対して測定されたタンパク質異質性、および被験者に対する免疫組織化学複合スコアに少なくとも基づいて、出力予知スコアを生成する。本明細書において説明したように、IHC複合スコアおよびそれぞれのバイオマーカに対する1つ以上の異質性スコアを生成し、出力予知スコアを計算するために使用することができる。

【0095】

1020において、出力予知スコアに基づいて、予知の指示（例えば、被験者において癌がより進行性か否か、したがって再発する可能性が高いか否かの指示990）を出力する。例えば、本明細書において説明したような閾値を使用して、予知指示のカテゴリ間で選択することができ、肯定または結果なしを指示することができる等である。

20

【0096】

方法100および本明細書において説明する他のコンピュータ実装方法は、1つ以上のコンピュータ読み取り可能媒体（例えば、ストレージまたは他の有形媒体）に格納されたコンピュータ実行可能命令、または1つ以上のコンピュータ読み取り可能記憶デバイスに格納されたコンピュータ実行可能命令（例えば、計算システムに本方法を実行させる）によって実行することができる。

【0097】

視野の受け取りの例

本明細書における例のいずれにおいても、視野は、画像内部におけるあるエリア（例えば、1組の画素、境界等）の格納された指示として、または画像（例えば、後の使用のためにその後格納される）を参照して（例えば、画像上で）病理医によって操作されるコンピュータ・システムによるアノテーション（例えば、図、トレース等）として受け取ることができる。

30

【0098】

例えば、アノテーションは、異質性分析を実行するツールまたはソフトウェアに組み込まれた別のツールまたはソフトウェアによって実行することができる。

免疫組織化学複合スコアの例

本明細書における例のいずれにおいても、免疫組織複合スコアを異質性スコアと組み合わせ、乳癌再発予知スコアを求めることができる。例えば、本明細書において説明したIHC（例えば、IHC4）スコア、または2つ以上のバイオマーカ、例えば、HER2、ER、PR、Ki-67等を組み合わせた他の免疫組織化学複合スコアを使用することができる。このようなスコアは、本明細書において説明したように、病理医によって示される視野によって判定することができる。

40

【0099】

異質性は、本明細書において説明したように、IHC複合スコアを生成するために使用されるバイオマーカに対して分析し、IHC複合スコアと組み合わせ、出力予知スコアを得ることができる。

【0100】

50

## 画像例

本明細書における例のいずれにおいても、画像は、特定のバイオマーカー用の抗体で検出可能に標識された被験者からの乳癌サンプルを描写するデジタル画像とすることができる。実際には、このような画像は、このようなサンプルの1区間を描写する。異なる区間を異なるバイオマーカーに使用することができる。

### 【0101】

本技術は、バイオマーカーのそれぞれに対して複数の画像をサポートすることができる。実施態様は、1つの画像における多数のバイオマーカーをサポートすることができる（例えば、多重化のシナリオにおいて）。

### 【0102】

格納される時、画像は画像データ、画素、または、例えば、色値、強度値、または双方を有するボクセルとして表すことができる。画像画素またはボクセルは、本明細書において説明したように処理することができる。例えば、画像内の視野を分析して、その視野内部における、所与のバイオマーカーに対するタンパク質発現を定量化することができる。

10

### 【0103】

#### 視野の例

本明細書における例のいずれにおいても、デジタル視野は、画像内のエリア、またはそのようなエリアの指示とすることができる、ときとしてここでは単に「視野」と呼ばれることもある。このような視野は、病理医によって示される対象領域を含むことができる。ある実施態様では、視野がスライド全体となることができるように、スライドを他のスライドと比較することができる。しかしながら、視野は通例デジタル画像全体よりは小さいので、視野は、通例、撮像された区間全体よりも小さいエリアに対応する。実際には、このようなデジタル視野は、基準画像（例えば、視野が得られた画像）を参照して、別個の画像として格納すること、または境界によって示すことができる（例えば、本来病理医によって描写され電子的に格納される）。境界内側の画像の部分は、視野内と見なされ、境界外側の画像の部分は視野外と見なされる。境界上の部分は、所望に応じて、内側または外側と見なすことができる。

20

### 【0104】

通例、デジタル視野は、しかるべきプロトコルにしたがって病理医によって選択された画像内部の画素またはボクセルの連続領域である。あらゆる任意の形状（例えば、矩形、矩形以外、正方形、楕円形、円形、トレースされた形状等）または対象エリアをサポートすることができる、特定の形状を選択するためにツールを設けることができる（例えば、トレース・ツール、楕円ツール、円ツール、正方形ツール、矩形ツール等）。視野は、対象の解剖学的構造（グランド等）を含むことができる。

30

### 【0105】

免疫組織化学複合スコアおよび異質性スコアには、通例、異なる視野が選択される。しかしながら、これら2つの間で重複することも可能である。言い換えると、化学組織免疫複合スコアの視野を、異質性スコアに再使用することができ、その逆も可能である。

### 【0106】

視野を格納する、受け取る、または出力するとき、実際の視野データ自体の代わりに、デジタル視野に対する参照を使用することができる。

40

#### 視野選択の例

本明細書における例のいずれにおいても、視野は、目的に適したプロトコルにしたがって選択することができる。例えば、IHC（例えば、IHC4）スコアにおいて使用される視野では、プロトコルは、選択されたフィールド（例えば、2, 3, 4, 5, 6, 7等）が腫瘍領域であり、腫瘍組織内部におけるバイオマーカーのタンパク質発現を表す（例えば、同様の外観）ことを指定する。異質性スコアに使用される視野では、プロトコルは、腫瘍組織内部においてバイオマーカーのタンパク質発現の異なる（例えば、異質な）レベルを表すフィールド（例えば、2, 3, 4, 5, 6, 7等）が選択されることを指定する。場合によっては、1つのフィールドを双方の目的に使用することができる（例えば、異質

50

フィールドの内1つがIHC複合スコアにおいて使用される)。

【0107】

選択するユーザ(例えば、病理医)に提示されるユーザ・インターフェースは、何の目的のために視野が選択されているのか示すことができ、更にプロトコルに関する指針を適宜与えることもできる。

【0108】

タンパク質異質性の例

本明細書における例のいずれにおいても、タンパク質異質性は、乳癌サンプルにおける乳癌バイオマーカーER, HER2, Ki-67, PRに対する染色パターンのような、組織化学的および分子的染色パターンに言及し、ときとしてここでは単に「異質性」と呼ばれることもある。例えば、異質性は、1つのサンプル内にある異なる位置におけるバイオマーカーの可変性レベルと共に増大する。異質性は、総合(aggregated)臨床表現型(例えば、再発する可能性が高い腫瘍)と相関付けることができる腫瘍進行性および/または成長パターンの空間的ばらつきの指標となることができる。

10

【0109】

ここでは、ERおよびPRタンパク質発現の生物学的異質性が、少数の早期乳癌患者の予測できない再発と相関付けられることを示す。

異質性は、複数の視野間において同じバイオマーカーに対するタンパク質発現レベルがどのように異なるかを測定する可変性メトリックによって測定することができる(例えば、1つのバイオマーカーに対する複数の視野内におけるタンパク質発現測定値の可変性)。つまり、領域間(例えば、FOV間)異質性を使用することができる。

20

【0110】

領域間異質性(例えば、複数の視野間における異質性)の定量的尺度は、所与のバイオマーカー(例えば、ER, PR, Ki-67等)に対する異なる視野におけるタンパク質発現測定値の偏差(例えば、標準偏差または分散の他のモーメント)、PE(陽性百分率)に基づいて計算することができる。このような測定値は、どれ位速くタンパク質発現測定値が別れるか(例えば、分散の拡散(spread of distribution))定量化することができる。例えば、視野FSにおける所与のバイオマーカーに対するそれぞれのタンパク質発現測定値 $PE(FS_1)$ ,  $PE(FS_2)$ , ...,  $PE(FS_N)$ を有する1組の視野に対する異質性の計算例は、次のように計算することができる。

30

異質性の例(H) =  $\sigma(PE(FS_1), PE(FS_2), \dots, PE(FS_N))$   
この値は、平均スライド・スコア(S)にしたがって正規化することができる。平均スライド・スコア(S)は、特定のスライドに対するタンパク質発現測定値の平均(例えば、 $PE(FS_1)$ ,  $PE(FS_2)$ , ...,  $PE(FS_N)$ )の平均)とすることができる。平均スライド・スコア(S)が閾値(例えば、10%等)よりも低い場合、代替値(例えば、5%)を平均スライド・スコアとして使用することができる。観察された偏差を平均スライド・スコアで除算することによって、正規化を行うことができる。

【0111】

等級分け計算を伴うバイオマーカー(例えば、HER2)では、視野の入れ替え(permutations)間におけるビンの相違の和を、異質性の測定値として使用することができる。つまり、当該マーカーについて、異なる視野に対する等級スコアの差を集計することによって、異質性を計算することができる。例えば、所与の等級分けされたバイオマーカーに対してそれぞれのタンパク質発現等級スコア(例えば、0, 1, 2, 3)  $P(FS_1)$ ,  $P(FS_2)$ , ...,  $P(FS_N)$ を有する1組の視野(iおよびj)は、次のように計算することができる。

40

【0112】

$$H = \sum_{\substack{v_i, j \\ i \neq j}} \|P(FS_i) - P(FS_j)\|$$

## 【0113】

この例では、1つの視野が1つの等級スコアを有する。全ての等級スコアが等しい場合、このスコアは0になる。

本明細書において説明したように、関与するバイオマーカにしたがって、正規化を行うことができる。

10

## 【0114】

空間タンパク質異質性の例

本明細書における例のいずれにおいても、空間タンパク質異質性を測定することができる。このような異質性は、地理的、領域的、腺間、腺内等に分類することができる。

## 【0115】

例えば、地理的異質性は、地理的レベル、即ち、ある閾値距離（例えば、2インチ）よりも多く離れた2つの別個の組織ブロックにおけるタンパク質発現のばらつきを測定することによって測定することができる。

## 【0116】

領域的異質性は、領域的レベルで、即ち、同じ組織区間内において、例えば、0.25インチないし2インチ離れたところ、そして異なる視野、例えば、少なくとも4倍の対物レンズ(4x objective)の距離だけ離れたところのタンパク質発現のばらつきを測定することによって、測定することができる。本明細書において説明した視野は、このような領域的異質性を測定するために使用することができる。

20

## 【0117】

腺間異質性は、腺間レベル、例えば、0.25インチ未満だけ離れそして4倍の対物レンズ以内におけるタンパク質発現のばらつきを測定することによって、測定することができる。

## 【0118】

腺内異質性は、腺内レベルで、例えば、領域的および腺間カテゴリを20倍の対物レンズで形成して、タンパク質発現のばらつきを測定することによって、測定することができる。

30

## 【0119】

代用異質性スコアの例

本明細書における例のいずれにおいても、標準偏差 $\sigma$ 以外の可変性メトリック (VM) は、領域間タンパク質異質性を測定するために使用することができる。例えば、タンパク質発現測定値またはその最大値における領域間相違（例えば、2つよりも多い視野の場合）を使用することができる。例えば、所与のバイオマーカ用の視野 $FS_1$ ,  $FS_2$ ,  $FS_3$  に対するそれぞれのタンパク質発現 (PE) 測定値を有する1組の視野に対する異質性計算の例は、次のように、絶対値 (ABS) 関数を使用して計算することができる。

40

$$VM = \text{MAX} (\text{ABS} (\text{PE} (FS_1) - \text{PE} (FS_2)), \text{ABS} (\text{PE} (FS_1) - \text{PE} (FS_3)), \text{ABS} (\text{PE} (FS_2) - \text{PE} (FS_3)))$$

このような計算は、可変性の範囲も考慮することができる。例えば、最少領域間相違を考慮に入れることができる。したがって、計算の一例は次のようにすることができる。

$$VM_{\text{adj}} = \text{VM} - \text{MIN} (\text{ABS} (\text{PE} (FS_1) - \text{PE} (FS_2)), \text{ABS} (\text{PE} (FS_1) - \text{PE} (FS_3)), \text{ABS} (\text{PE} (FS_2) - \text{PE} (FS_3)))$$

更に他の変形も可能である。

## 【0120】

異質性スコアの正規化の例

本明細書における例のいずれにおいても、正規化を異質性スコアに適用することができ

50

る（例えば、バイオマーカに対する異質性スコア）。例えば、正規化は、先に説明したように、観察された偏差を平均スライド・スコア（例えば、測定されたバイオマーカに対する）で除算することによって行うことができる。

【0121】

関与する所与のバイオマーカに基づいて、他の正規化を行うこともできる。例えば、所与のバイオマーカに対するタンパク質発現の異質性の過去の観察に基づいて、係数または他の正規化技法を使用することができる。

【0122】

したがって、可変性メトリックVM（例えば、標準偏差等）およびS（例えば、平均陽性百分率スライド・スコア）に対する正規化係数 $\alpha$ （例えば、0から1の範囲）を用いた異質性計算の一例は、次のようにすることができる。

【0123】

【数4】

$$H = \begin{cases} \alpha * \frac{VM}{0.05}, S < 10\% \\ \alpha * \frac{VM}{S}, otherwise \end{cases}$$

【0124】

バイオマーカ毎の正規化係数 $\alpha$ は、特定のバイオマーカの異質性が予知スコアに対して及ぼす影響の差を考慮に入れることができる。異質性分析に対するデータが見られるので、このようなバイオマーカ毎の正規化係数を適応させることができる。

【0125】

一例では、 $\alpha$ はERおよびPRに対して1.0であり、Ki-67に対して0.75である。このような係数は、関与するバイオマーカ（1つまたは複数）に対して適した重みを決定する統計的方法（例えば、得られる予知スコアに基づいて患者を予知カテゴリに別けるため）によって決定することができる。

【0126】

タンパク質発現の測定例

本明細書における例のいずれにおいても、所与のバイオマーカに対するタンパク質発現は、そのタンパク質が発現された程度（例えば、1つの視野において、または複数の視野において集合的に）測定することによって、定量化することができる。1つの視野における染色細胞を参照すると、タンパク質発現は、視野において陽性に染色された細胞の百分率として表すことができる。例えば、視野FSにおけるタンパク質発現の定量化PP(FS)は、陽性百分率を判定するために、次のように計算することができる。

$$PP(FS) = (FS \text{ における陽性染色細胞の個数}) / (FS \text{ における細胞の総個数})$$

このような場合、細胞の総個数は、陽性染色細胞の個数と陰性染色細胞の個数の和とすることができる。実際には、陽性染色細胞の個数を判定することができ、陰性染色細胞の個数を判定することができ、これら2つに基づいて、タンパク質発現を計算することができる。定量化は、陽性に染色された細胞の百分率を示すので、このような測定値は時として「視野」に対する「陽性百分率」（例えば、所与のバイオマーカに対する）とも呼ばれる。

【0127】

タンパク質発現を測定するためには、他の技法も使用することができる。

本明細書において説明したような等級スコアを、タンパク質発現（例えば、HER2に対する）を測定するために使用することができる。

【0128】

陽性百分率の判定例

本明細書における例のいずれにおいても、所与の視野に対する陽性百分率は、任意の数の技法によって判定することができる。本明細書において説明した技術は、陽性百分率を

判定するための現在の技法および今後開発される技法を利用することができる。

#### 【0129】

このような技法の中には、陽性染色細胞の細胞核を数え、陰性染色細胞の細胞核を数えるものがある。このような技術は、視野の間質およびリンパ球領域を除外することができる。望ましければ、核を数えるときに、スライド全体からの情報を使用することができる。

#### 【0130】

つまり、タンパク質異質性は、バイオマーカに関連付けられた画像のそれぞれの視野に対して陽性百分率測定値を判定することによって、判定することができる。ここでは、陽性百分率測定値は、それぞれの視野において、バイオマーカに対して陽性に染色された細胞の百分率を示す。次いで、本明細書において説明したように、陽性百分率測定値を比較することができる（例えば、可変性メトリックを生成するため）。

10

#### 【0131】

また、陽性百分率の判定は、染色の強度を判定し、複数のビン（例えば、0, 1, 2, 3）に対する核の個数を判定することも含むことができる。ビン0における核は陰性と見なすことができ、他のものは、陽性染色細胞として集計することができる。このようなビン情報を有することは、H-スコアを計算する等のような、他の目的に有用であることができる。

#### 【0132】

陽性百分率判定の実施態様例：核識別

20

図11は、スライドにおいて核を識別するコンピュータ実装方法例1100のフローチャートである。この例では、方法1100は、分析のために、視野の外側にあるスライドについての情報を使用することができる。

#### 【0133】

1110において、本明細書において説明したように、染色された胸部組織区間のスライド・スキャンを受け取る。このようなスキャンは、第1倍率（たとえば、20倍、40倍等）および／または分解能で実行することができる。

#### 【0134】

1120において、スライドの組織領域を識別する。スライド・スキャンは、ガラス背景および組織領域に分けることができる。このような分析は、第2倍率（例えば、1倍、2倍等）および／または分解能で実行することができる。

30

#### 【0135】

1130において、組織領域に対して、優性色成分分析を実行することができる。例えば、優性色は、スライド内の組織領域から抽出することができる。このような分析は、第3倍率（例えば、5倍等）および／または分解能で実行することができる。

#### 【0136】

1140において、多数の倍率からの色および模様の特徴を使用して、組織領域を異なる標識領域(labeled regions)にセグメント化するために、セグメント化を実行することができる。

#### 【0137】

1150において、スライドおよび／または視野における核を検出し数える（例えば、これらが陽性に染色されているかまたは陰性に染色されているかにしたがって）。このようにして、採点を行うことができる。

40

#### 【0138】

核を識別するための他の技法を使用することもできる。例えば、候補核の色区別（例えば、陽性の茶色と陰性の青との間）および形状（例えば、形態分析）を使用する任意の技法を使用して、核を識別することができる。このような技法では、形態後処理によって、間質細胞および浮遊小塊(stray blobs)を除外することができる。

#### 【0139】

陽性百分率判定の実施態様例：F O V採点

50

図12は、視野採点のシステム例1200のブロック図である。この例では、入力視野1210が示される。しかしながら、このような分析は、多数の視野、スライドの1つ以上のタイル、スライド全体、または任意の他の入力画像に対して実行することができる。

【0140】

FOVにおいて核を識別するために、核セグメント化（例えば、画像における核の識別）1220を実行することができる。核を識別するためには、任意の数の技法を使用することができる。

【0141】

次いで、識別した核を分類するために、核分類1230を実行することができる。この場合も、核を陽性染色または陰性染色に分類するためには、任意の数の技法を使用することができる。 10

【0142】

1240において、分類された核に対して採点を実行し、バイオマーカに対する陽性百分率を得ることができる。核を識別することによって、対応する細胞が識別される。分析が視野の外側のエリアに対して実行されても、採点は特定の視野に対して実行することができる。

【0143】

陽性百分率判定の実施態様例：FOV採点

図13は、視野採点の他のシステム例1300のブロック図である。この例では、入力視野1310が示される。しかしながら、このような分析は、多数の視野、スライドの1つ以上のタイル、スライド全体、または任意の他の入力画像に対して実行することができる。 20

【0144】

核セグメント化（例えば、画像における核の識別）1320を実行することができる。1322において、本システムによって処理されたシードを突き止めるために、入力画像に対してシード検出を実行する。シードとは、候補核内にあり、細胞核の位置を検出するための開始点として役割を果たす点である。シード検出は、カーネルに基づく投票手順を使用して勾配画像(gradient image)上で動作するというような技法を使用することができる。1324において前景セグメント化を実行する。核領域に関連付けられた前景マスクを計算することができる。1326において、小塊セグメント化を実行する。前景セグメント化および小塊セグメント化は、画像間における全域的強度変動を利用することができる。核毎に小塊状表現を抽出することができる。 30

【0145】

核分類1330を実行することができる。1332において、特徴構築を実行する。1336において、訓練からのモデル1334を参照して、分類を実行する。このようなモデルは、関与するバイオマーカに特定のことにすることができる。

【0146】

1340において、採点を実行し、バイオマーカに対する陽性百分率を得る。核を識別することによって、対応する細胞を識別する。分析が視野の外側の領域に対して実行されても、採点は特定の視野に対して実行することができる。 40

【0147】

陽性百分率判定の実施態様例：分類

図14は、真に陽性染色された核を判定するクラシファイアの一例1400のブロック図である。この例では、候補の核（例えば、入来する候補）がクラシファイア1410によって処理される。クラシファイア1410は、2つのクラス、陽性1451および陰性1452に分ける。入来する候補がいずれにも分類されないこと、前もって除外されること等があり得る。クラシファイアは、染色されていない細胞であると判定された細胞（例えば、核に関連付けられた）を陰性1452と判定することができる。一部の候補（例えば、間質組織、リンパ球等）は、陰性1452分類にも陽性1451分類にも含まれない非細胞である可能性がある。 50

## 【0148】

クラシファイアは、色特徴（例えば、平均、分散等）、組織背景色および状況(context)、形状（例えば、サイズ、離心率、延長）、形態、細胞密度等のような、特徴を使用することができる。

## 【0149】

陽性百分率判定の実施態様例：分類

図15は、真に陽性染色された核を判定する多段階線形二進クラシファイアの一例1500のブロック図である。この例では、候補核（例えば、入来する小塊）は、クラシファイア1510によって処理される。クラシファイア1510は2つの暫定クラスに別ける。

10

## 【0150】

- 1) 茶色（真の陽性）で僅かにくずれた小塊、および
- 2) 陰性（例えば、染色されない核）、リンパ球、および間質。

クラシファイア1520は、入来する候補を、間質1554ならびに陰性およびリンパ球に別ける。

## 【0151】

他のクラシファイア1530は、入来する候補を、陰性1552およびリンパ球1553に別ける。

更に他のクラシファイア1540は、入来する候補を茶色（真の陽性）1551および僅かに茶色のくずれた小塊1555に別ける。

20

## 【0152】

真の陽性1551および陰性1552の個数は、視野に対する陽性百分率を判定するために使用することができる。

これらのクラシファイアは、色特徴（例えば、平均、分散等）、組織背景色および状況、形状（例えば、サイズ、離心率、延長）、形態、細胞密度等のような、特徴を使用することができる。

## 【0153】

HER2等級スコアの判定例

本明細書における例のいずれにおいても、等級スコアをHER2バイオマーカに対して生成することができる。IHC複合スコアについては、HER2に対する視野は集合的に考えることができる（例えば、複数のデジタル視野上で集合的に分析を実行することができる）。異質性スコアについては、HER2バイオマーカに対する組織スライドの画像内にあるそれぞれの視野に対して等級スコアを生成することができる。実際には、このようなスコアは、核を包囲する細胞膜に対する染色の完全さを判定する。

30

## 【0154】

等級スコアは、本明細書において説明したように、HER2に対して（例えば、集合的に複数のFOVに対してまたはそれぞれのFOVに対して）1つの数値（例えば、0、1、2、または3）を含むことができる。

## 【0155】

HER2等級採点方法例

図16は、HER2等級スコアを判定する方法例1600のフローチャートであり、本明細書においてHER2等級スコアが使用される例のいずれにでも使用することができる。このようなスコアは、本明細書において説明したように、複数の視野に対して集合的に、または別々の視野毎に生成することができる。

40

## 【0156】

方法1600は、HER2について本明細書において説明したように、用意されアノテーションが付けられたスライドの所与の画像に対して実行することができる。1610において、画像内の組織をセグメント化する。例えば、間質エリアおよび非間質エリアを判定することができる。

## 【0157】

50

1620において、例えば、非間質（例えば、腺）領域において、本明細書で説明したように核を検出することができる。

1630において、核を染色または対比染色に分類する。

【0158】

1640において、画像（例えば、画像全体、FOV等）における染色細胞膜を検出する。

1650において、それぞれの核を、それらの回りにある染色膜と関連付けることによって、細胞を採点する。核の周囲における染色膜の存在に基づいて、細胞を次のタイプの内1つに分類する。非染色（例えば、核の回りに染色膜が発見されない）、部分的染色（例えば、細胞の核が部分的に染色膜によって包囲される）、完全染色（例えば、核が染色膜によって完全に包囲される）。部分的または完全な染色を判定するための閾値として、パラメータを使用することができる。望ましくは、このようなパラメータは、ユーザによって調節することができる（例えば、部分的と評価するために必要な百分率範囲（percentage surrounding）、完全と評価するために必要な百分率範囲）。例えば、包囲する染色膜が閾値量よりも多い（例えば、90%）細胞は、「完全に」染色されたものと判定することができる。

【0159】

実際には、検出された細胞（例えば、検出された核に対応する）に対して、染料（例えば、茶色）色成分に対する画素強度（例えば、0から100, 255等のような最大値までの範囲を取る）に基づいて、染色完全性インディケータ（例えば、染色が完全か否か、完全さの度合い等を示す）および染色強度値を、細胞に指定することができる。次いで、このような情報を分析して、本明細書において説明したように、HER2を判定することができる。

【0160】

このように、HER2用のデジタル視野内に現れる複数の細胞について、それぞれの染色完全性インディケータおよび染色強度値を、判定することができる。次いで、本明細書において説明したように、染色完全性インディケータおよび染色強度値を、条件によって分析することができる。

【0161】

HER2用のデジタル視野内に現れる複数の核について、核のそれぞれを包囲する細胞膜の染色の強度を判定することができる。

1660において、視野における細胞のスコアに基づいて、視野を採点する（例えば、集合的にまたはそれぞれに）。例えば、以下の条件を使用することができる（例えば、視野がもっと高いスコアに該当する（qualify for）場合、それより低いスコアに対して処理を実行する必要はない）。

【0162】

【表 1】

条件	指定するスコア
閾値（例えば、30%）よりも高い完全染色細胞の百分率判定に応答する場合	3+
（完全染色細胞百分率>閾値（例えば、10%）） OR （完全染色細胞百分率）>0% AND 膜中央強度が強い強度閾値未満）の判定に応答する場合	2+
（部分的染色細胞百分率>0%） OR （部分的染色細胞百分率>0% AND 完全染色細胞百分率>閾値（例えば、10%） AND 膜中央強度>=強い強度閾値 AND 膜中央強度<弱い強度閾値）の判定に応答する場合	1+
以上の条件を満たさない（例えば、それ以外）という判定に応答する場合	0

10

20

## 【0163】

説明したように、膜中央強度を強い強度閾値と比較することができる。また、HER2用のデジタル視野に現れる複数の核に対して、核を包囲する細胞膜が完全に染色されたか否かも判定することができる。

## 【0164】

このように、HER2に対する視野等級採点を行うことができる。二進スコアが望まれる場合、等級スコアを判定する中間ステップを省略するか、またはプロセスに組み込むことができる。

## 【0165】

## 染色強度の例

本明細書における例のいずれにおいても、陽性染色（例えば、細胞膜の）を平均的な茶色っぽさ（average brownness）によって定量化することができる。例えば、膜上における平均的な茶色っぽさは、輝度スカラー値（例えば、0-255）によって判定することができる。輝度スカラー値は、膜領域のRGB画素値から計算することができる。RGB値は、RGB-L\*a\*b\*変換技法によって、輝度値（L）に変換することができる。L値は、0-100の目盛りから0-255の目盛りに変換することができる。

30

## 【0166】

細胞に対する平均的な茶色っぽさは、膜の画素にわたってLの平均を取ることによって計算することができる。平均的な茶色っぽさは、本明細書において説明したように、中央強度（例えば、細胞膜の）として使用することができる。

40

## 【0167】

## 核分類の例

本明細書における例のいずれにおいても、HER2等級スコアを計算する目的のために、核を分類することができる。例えば、画像からの核細胞における彩度、強度、ならびに赤および青色情報に基づいて、細胞を染色および対比染色に分類することができる。彩度および強度情報は、暗い灰色の細胞が、非染色の代わりに、染色に分類できるように、暗い灰色の細胞を区別するために使用することができる。

## 【0168】

例えば、以下の規則を使用することができる。

$$A. \text{ 染色百分率} = 100 * (R - G) / (R + 1)$$

50

B. 染色百分率  $2 = 100 * (R - B) / (R + 1)$

C. 染色百分率  $1 >$  画素レベル染色%、および染色百分率  $2 >$  画素レベル染色%である場合、画素=染色となる。

【0169】

D. 彩度  $< 45$ 、および強度  $< 128$  の場合、画素=染色となる。

E. 彩度  $< 128$ 、および強度  $< 55$  の場合、画素=染色となる。

F. 彩度  $< 255$ 、および強度  $< 30$  の場合、画素=染色となる。

【0170】

G. 強度  $\leq 20$  の場合、画素=染色となる。

この画素分類情報を使用すると、各核内における染色画素の百分率に基づいて、各核を染色または非染色に分類することができる。例えば、以下の規則を使用することができる。

【0171】

A. 細胞レベル閾値  $>$  各核内における染色画素の百分率 (%) の場合、細胞を染色に分類する。

B. それ以外の場合、非染色に分類する。

【0172】

次いで、サイズに基づいて、核物体(nuclei object)を除外することができる。

HER2 等級スコア対照の例

HER2 等級スコアが本明細書において説明したように判定されているか否か判定するために、4つの細胞株対照を使用することができる。本明細書において説明したように処理し染色したとき、細胞株は、以下の表に記載されるように染色するはずである。細胞株は、Ventana Medical Systems, Inc. からカタログ番号 781-2991 として入手可能である。

【0173】

【表2】

HER2 IHCスコア	細胞株	HER2 遺伝子コピー#
0	MCF-7	1.7
1+	T47D	2.9
2+	MDA-MB-453	5.2
3+	BT-474	18.9

【0174】

HER2 遺伝子コピー# は、PathVysion (R) HER2 プローブを使用して決定された PATHWAY HER-2 フォー・イン・ワン対照スライド(4 in 1 control slides) の3つのロットの平均として決定されたものである。

【0175】

HER2 採点に関する追加情報は、Ventana Medical Systems, Inc., から入手可能な "PATHWAY (R) anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody" (反HER-2/ニュー (4B5) うさぎモノクローナル一次抗体) Catalog Number 790-2991 (カタログ番号 790-2991) についての文書において見出すことができる。

【0176】

H-スコア計算の例

本明細書における例のいずれにおいても、H-スコアは、自動化技法によって1つまたは複数の視野から集合的に計算することができる。例えば、核を識別することができ、次

いで細胞（例えば、これらの核に対応する）を4つのビン、0, 1（弱い染色）, 2（適度な染色）, 3（強い染色）に分類する（例えば、等級分けする）ことができる。このような技法は、細胞または細胞のかたまり（例えば、小塊）の平均的な茶色っぽさを判定することによって遂行することができる。

【0177】

色成分（例えば、RGB等）を検査することによって、平均的な茶色っぽさを閾値と比較して、細胞が非染色（0）、弱い染色（1+）、適度な染色（2+）、または強い染色（3+）か判定することができる。ビンにおける細胞の個数を維持することができ、計数の終了時に、本明細書において説明したように、各ビンにおける細胞の百分率に基づいて、Hスコアを計算することができる。

10

【0178】

例えば、それぞれの染色強度（例えば、ゼロ強度に対するビンを含む）に関連付けられた複数のビンにおける細胞の個数を仮定して、これらのビン毎に、ビンにおける細胞の百分率（例えば、ビンにおける細胞の数を細胞の総数で除算するというような、細胞個数の百分率）とそのビンに関連付けられたそれぞれの強度レベルとの積を加算することによって、Hスコアを計算することができる。4つのビン0-3を有する構成では、Hスコアは0から300までの範囲になる。このような構成における最大スコアは、細胞の全て（100%）が強度3になる場合（例えば、 $0 \times 0 + 0 \times 1 + 0 \times 2 + 100 \times 3 = 300$ ）に達せられる。つまり、百分率は、端数ではなく、整数として扱うことができる（例えば、 $50\% = 50$ ）。ビンに関連付けられた強度レベルは、強度指定の数値部分（例えば、2+は2として扱われる）とすることができる。

20

【0179】

乳癌再発予知スコアの例

本明細書における例のいずれにおいても、乳癌再発予知スコアは、1つ以上のバイオマーカーに対するIHC複合スコアおよび異質性スコアに基づいて生成することができる。このような予知スコアは時として単に「出力予知スコア」とも呼ばれる。

【0180】

このスコアは、IHC複合スコアおよび異質性スコアを組み合わせることによって生成することができる。例えば、異質性スコアを加算、乗算、またはそれ以外で組み合わせることができ、次いで異質性成分をスコアに形成する演算（例えば、二乗根、指数、係数等）を適用することができる。

30

【0181】

免疫組織化学複合スコアも同様に、免疫組織化学複合成分をスコアに形成するために調節する（例えば、二乗根、指数、係数等）ことができる。

次いで、これら2つの成分を組み合わせる（例えば、加算、乗算等）ことができる。

【0182】

出力予知スコアを計算するための1つの特定の技法は次の通りである。

【0183】

【数5】

$$F_{IHC} * IHC4 + F_{Het} * \sqrt{Het_{ER} + Het_{PR}}$$

40

【0184】

ここで、 $F_{IHC}$  は免疫組織化学複合係数であり、 $F_{H.t}$  は異質性係数であり、 $Het_{ER}$  はERに対する異質性スコアであり、 $Het_{PR}$  はPRに対する異質性スコアである。一実施態様では、 $F_{IHC} = 0.03114$ ,  $F_{H.t} = 1.95119$ である。しかしながら、本技術は、所望に応じて、係数の調節をサポートすることができる。例えば、蓄積されたデータに照らし合わせて変更することができる（例えば、本明細書において説明したように患者をカテゴリに分割するため）適した係数を、統計的分析が示すことができる。

【0185】

50

### 予知の指示の例

本明細書における例のいずれにおいても、予知の指示は、出力予知スコア自体、閾値に基づくカテゴリ（例えば、赤、黄色、緑）等を含むことができる。この指示は、入力に基づいて、癌が再発すると予測されるか否か（またはどの位の可能性か）示す形式にすることができる。

#### 【0186】

乳癌再発の指示は、乳癌再発予知スコアに対して格納された1つ以上の閾値に基づいて選択することができる（例えば、複数のカテゴリから）。例えば、スコアが閾値と一致した場合、第1指示（例えば、再発の予知）を選択することができる。スコアが閾値と一致しない場合、第2指示（例えば、非再発の予知）を選択することができる。

10

#### 【0187】

このようなカテゴリは、時間成分等も含むことができる（例えば、5年以内に再発することが予期される）。

多数の指示をサポートすることができる（例えば、癌が1年以内に再発することが予期されるか否かについて1つのカテゴリ、癌が5年以内に再発することが予期されるか否かについての他のカテゴリ等）。

#### 【0188】

##### 撮像プラットフォームにおける実施態様例

本技術は単体でも実現することができるが、本明細書において説明した技術は、スライド画像データの分析においてユーザを補助する多機能デジタル病理プラットフォームにおいても実現することができる。例えば、本技術は、Ventana Medical Systems, Inc., の Virtuoso画像管理ソフトウェアまたは相当する解決手段に統合することができる。

20

#### 【0189】

このようなプラットフォームは、本技術のフロント・エンドとして役割を果たすことができる。デジタル病理プラットフォームを介してこれらについて収集されたスライド画像および情報（例えば、視野）は、本明細書において説明した技術への入力として使用することができる。

#### 【0190】

このようなプラットフォームは、病理医に、事例、見本、および画像に対して任意の所望の順序で作業する柔軟性を許容することができる。スライド画像にはアノテーションを付けることができ、種々の他の機能も利用可能にすることができる。

30

#### 【0191】

プラットフォームは、所望に応じて、薄いクライアント（例えば、サービスとしてのソフトウェア、クラウド・コンピューティング等）において実現することができる。

##### 本技術を実現する異質性ツールを含むシステム例

図17は、本明細書において説明した乳癌予知技術を実現する異質性ツール1720を含むシステム例1700のブロック図である。この例では、異質性ツール1720は、それぞれのバイオマーカー用の複数のデジタル視野1711A-N、1714A-Nを入力として受け入れ、任意のノーマライザ(normalizer)1725の補助により、バイオマーカーのそれぞれに対して異質性スコア1731、1734を出力する。

40

#### 【0192】

図9の特徴について、所望に応じて、混在させるまたは組み込むことができる。

予知ツール1740は、異質性スコア1731、1734、およびIHC複合スコア1750を入力として受け入れ、予知閾値1745を参照して、被験者において癌が再発する可能性が高いか否かの指示1790を出力する。

#### 【0193】

それぞれのバイオマーカーに対する異質性スコアによって本技術を実現するコンピュータ実装方法の例

図18は、それぞれのバイオマーカーに対する異質性スコアを判定することによって、本明細書において説明した乳癌予知技術を実現するコンピュータ実装方法例1800のプロ

50

ーチャートであり、例えば、図 17 に示したシステムにおいて実現することができる。

【0194】

1810において、それぞれのバイオマーカ用に複数のデジタル視野を受け取る。

1812において、デジタル視野に基づいて、バイオマーカのそれぞれに対する異質性スコアを判定する。

【0195】

1816において、IHC複合スコアおよび異質性スコアを組み合わせ、予知スコアを得る。

1818において、予知スコアに基づいて、予知の指示（例えば、被験者において癌が再発する可能性が高いか否かの指示1790）を出力する。

10

【0196】

IHC複合スコアの計算例

コンピュータ実装方法は、それぞれのバイオマーカ抗体で検出可能に標識された（例えば、本明細書において説明したように、複数のバイオマーカに対して）乳癌サンプルを描写するそれぞれの画像内におけるそれぞれの複数のデジタル視野を受け取ることによって、被験者に対する免疫組織化学複合スコアを計算することができる。

【0197】

次いで、本明細書において説明したように、複数のバイオマーカに対する陽性百分率を判定することができる。

次いで、免疫組織化学複合スコアを計算することができる。このような計算は、1つのバイオマーカに対する陽性百分率を第2バイオマーカに対する陽性百分率と組み合わせることを含むことができる。

20

【0198】

次いで、免疫組織化学複合スコアを出力することができる。

本明細書において説明したように、バイオマーカは、HER2を含むことができ、IHC複合スコアの計算は、HER2スコア（例えば、等級分け、二進等）を含むことができる。

【0199】

バイオマーカの例

図17の例では、領域的異質性を判定するために、バイオマーカERおよびPRが使用される。実際には、バイオマーカの異なる組み合わせの異質性を計算し、IHC複合スコアと組み合わせ、予知スコアを生成することができる。

30

【0200】

使用することができるバイオマーカは、IHC複合スコアの一部として使用されるバイオマーカ（例えば、ER, PR, Ki-67, HER2）の内1つ以上の組み合わせを含むことができる。本明細書における他の例のいずれも、適宜変更することができる（例えば、視野を得る、異質性スコアを計算するため等）。

【0201】

多重化の例

本明細書における例のいずれにおいても、多重化のシナリオにおいてバイオマーカを測定することができる。例えば、本明細書において説明したように、例えば、異なる標識がなされた副抗体を使用することによって、このように標識されたタンパク質が区別可能である限り、1つの組織区間を1つよりも多い抗体（2つの異なるバイオマーカに特定の2つの抗体等）で標識することができる。

40

【0202】

組織マイクロアレイ技法の例

本明細書における例のいずれにおいても、組織染色を実施するために組織マイクロアレイ技法を適用することができる。例えば、複数の組織サンプルを1つの基板に付着させることができ、複数の染色剤（例えば、標識された抗体）をこれらのサンプルに適用することができる（例えば、組織サンプル毎に異なる薬剤）。次いで、本明細書において説明し

50

た技法は、本明細書において説明したように、1つ以上のスコアを判定するために使用することができる（例えば、検出可能に標識された組織サンプルの画像に基づいて）。

#### 【0203】

##### 閾値の例

本明細書における例のいずれにおいても、統計的評価によって閾値を導くことができる。例えば、訓練および検査を使用して切断点を決定し、危険性が高い患者および低い患者を最良に定める最適な切断点の妥当性を判断することができる。

#### 【0204】

##### 本技術を実装する示差エンジンを有するシステム例

図19は、バイオマーカに対する異質性スコアを計算するための示差エンジン(difference engine)1940を含むシステム例1900のブロック図である。所望に応じて、図9および/または図17の特徴を組み込むまたは混在させることができる。

#### 【0205】

この例では、視野アナライザ1920が視野1711A-N（例えば、1つのバイオマーカに対する）を入力として受け入れ、視野のそれぞれに対する陽性百分率測定値1931A~Nを出力する。

#### 【0206】

示差エンジン1940は、陽性百分率測定値1931A-Nを入力として受け入れ、任意のノーマライザ1945の補助により、バイオマーカに対する異質性スコア1731を出力する。

#### 【0207】

##### 異質性スコアを計算するためのコンピュータ実装方法例

図20は、本明細書において説明した乳癌予知技術において使用する異質性スコアを計算するためのコンピュータ実装方法例2000のフローチャートであり、例えば、図19に示したシステムにおいて実装することができる。

#### 【0208】

2010において、所与のバイオマーカ用に複数のデジタル視野を受け取る。このような画像は、本明細書において説明したように、バイオマーカ用の抗体で検出可能に標識された被験者からの乳癌サンプルを描写することができる。

#### 【0209】

2012において、デジタル視野におけるこのバイオマーカに対するタンパク質発現を測定する。例えば、バイオマーカのそれぞれに対する陽性百分率測定値を受け取るか、または判定する。

#### 【0210】

2016において、これら複数のデジタル視野間において、バイオマーカに対して測定したタンパク質発現の異質性を測定する。例えば、異なる視野（例えば、1つのバイオマーカに対する）に現れる陽性百分率測定値間の可変性として、異質性スコアを計算する。

#### 【0211】

本明細書において説明したように、異質性スコアを調節するために、異質性スコア（例えば、暫定的異質性スコアまたは可変性メトリック）を正規化することができる。

2020において、バイオマーカに対する異質性スコアを出力する（例えば、本明細書において説明した技術において使用するため）。

#### 【0212】

##### ユーザ・インターフェース例

図21は、画像内においてデジタル視野を示すユーザ・インターフェース例2100のスクリーンショットである。ユーザ・インターフェースは、入力を受け入れるためにユーザに提示されるウィンドウ、画面、ペイン等の形態を成すことができる（例えば、表示されたスライド画像上における視野の指示）。

#### 【0213】

10

20

30

40

50

この例では、病理医が、異質性を目的とする特定のバイオマーカ（例えば、ER）用に、表示されたスライド上において3つの視野2120A, 2120B, 2120Cを選択した。異なるバイオマーカには、独立した視野を選択することができる。異質性を目的として、そして免疫組織化学複合スコアを目的として、他の独立した視野も選択することができる。

#### 【0214】

病理医のワークフロー例

図22は、デジタル病理医ワークフロー・コンピュータ実装方法例2200のフローチャートである。画像上（例えば、内部）における視野の選択を容易にするために、デジタル病理医ワークフローをサポートすることができる。

10

#### 【0215】

2210において、ユーザ・インターフェースを介してIHC複合スコア用の視野を要求し、IHC複合スコアを判定するために表示された複数のスライド（または組織）画像内において、IHC複合スコア用に複数の視野を受け取る。このようなユーザ・インターフェースは、ER, HER2, Ki-67, PRの各々用の抗体で検出可能に標識された被験者からの乳癌サンプルを描写する複数のスライド（または組織）画像を含むことができる。IHC複合スコア用に複数の視野を受け取るステップは、ER, HER2, Ki-67, PRの各々に複数の視野を受け取ることを含むことができる。例えば、一連のスライド（または組織区間）を提示することができ、病理医はそれぞれのスライド上で複数のフィールドを指示することができる（例えば、第1スライドに対するFOV、第2スライドに対するFOV等）（または組織区間毎に複数のフィールド）。このような指示は、表示された画面上でアノテーション（例えば、描写されたエリア）を受け取ることによって実施することができる。

20

#### 【0216】

2212において、ユーザ・インターフェースを介して異質性スコアに対する視野を要求して、異質性スコアを判定するために表示された複数のスライド（または組織）画像内において、異質性スコア用に複数の視野を受け取る。このようなユーザ・インターフェースは、ERおよびPRの各々用の抗体で検出可能に標識された被験者からの乳癌サンプルを描写する複数のスライド（または組織）画像を含むことができる。IHC複合スコア用に複数の視野を受け取るステップは、ERおよびPRの各々にというように、複数の視野バイオマーカを受け取ることを含むことができる。このように受け取ることは、表示された画面上でアノテーション（例えば、描写または識別されたエリア）を受け取ることによって実施することができる。

30

#### 【0217】

2216において、IHC複合スコア用の視野に対するタンパク質発現値を測定し、これからIHC複合スコアを計算する。

2218において、異質性スコア用の視野に対するタンパク質発現値を測定し、これから異質性スコアを計算する。それぞれの他のバイオマークに対する1つ以上の他の異質性スコアも同様に得ることができる。

#### 【0218】

2220において、IHC複合スコアおよび1つ以上の異質性スコアを組み合わせ、乳癌再発予知スコアを求める。

2222において、乳癌再発予知スコアに基づく乳癌再発予知の指示を表示する（例えば、見ている病理医による検討のため）。

40

#### 【0219】

視野選択の例

本明細書における例のいずれにおいても、スライド全体を表すように、IHC複合スコア用に視野を選択することができる。病理医に提示されるユーザ・インターフェースは、そのように指示することができる。

#### 【0220】

50

本明細書における例のいずれにおいても、異質性スコア用の視野は、スライド上のある領域を表すように選択することができる（例えば、領域間の差を強調するためにそのように選択する）。病理医に提示されるユーザ・インターフェースは、そのように指示することができる。

#### 【0221】

更なる説明の例

##### A. 生物学的サンプル

被験者から生物学的サンプルを得る方法は、当技術分野では周知である。例えば、胸部組織または胸部細胞を得る方法は型どおりの手順である。例えば、細胞物質を含有する腫瘍からのサンプルは、その腫瘍の全部または一部の外科的切除によって、腫瘍から微細針吸引液を収集することによって、そして当技術分野において周知である他の方法によって得ることができる。

#### 【0222】

サンプルは、新鮮なまたは処理された事後収集物(post-collection)であってもよい。ある例では、処理済みサンプルが固定され（例えば、ホルマリン固定）および/またはワックス（例えば、パラフィン）で埋め込まれてもよい。実装細胞および組織調合物用の定着薬は、当技術分野では周知であり、限定ではなく、95%アルコール・ブアンの定着薬、95%アルコール定着薬、B5定着薬、ブアンの定着薬、ホルマリン定着薬、カルノフスキーの定着薬（グルタルアルデヒド）、ハートマンの定着薬、ホルランドの定着薬、オースの溶液（重クロム酸塩定着薬）、ゼンカーの定着薬（例えば、Carson, Histotechnology : A Self-Instructional Text（組織技術：自己指導教本）、Chicago:ASCP Press, 1997を参照）。このように、サンプルは、固定されたワックス埋め込み早期乳癌組織サンプルのような、固定されたワックス埋め込み乳癌組織サンプルとすることができる。ある例では、サンプルは、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色された胸部組織区間である。ある例では、サンプルは、ER, HER2, Ki-67, PRに特定の腫瘍抗体で標識された胸部組織区間であり、直接または間接に標識することができ（例えば、標識された副抗体によって）、ある例では、更にH&Eで染色される。

#### 【0223】

ある例では、サンプル（またはその断片）は固体の支持部上にある。固体の支持部は、生物学的サンプルを支え、サンプルにおける成分（例えば、タンパク質）の便利な検出を可能にする。支持部または基板の例には、顕微鏡スライド（例えば、ガラス製の顕微鏡スライドまたはプラスチック製の顕微鏡スライド）、カバーガラス（例えば、ガラス製のカバーガラスまたはプラスチック製のカバーガラス）、組織培養皿、マルチウェル・プレート、膜（例えば、ニトロセルロースまたはフッ化ポリビニリデン（PVDF））またはBIACORE (R) チップを含む。

#### 【0224】

##### B. 乳癌バイオマーク

##### 1. エストロゲン受容体（ER）（OMIM:133430）

人エストロゲン受容体（ERまたはESR）は、 $\alpha$ （ESR1）および $\beta$ （ESR2）と呼ばれる、2つの異なる形態を有する。ER $\alpha$ は、乳癌細胞において見られる形態である。ER $\alpha$ は、例えば、GenBank (R) から公に入手可能なシーケンスである（例えば、アクセッション番号 NP\_001116214.1, NP\_001116213.1, P03372.2（タンパク質）, NM\_000125.3, NM\_001122741.1, NM\_178850.2（ヌクレオチド））。

#### 【0225】

エストロゲン受容体は、ホルモン結合、DNA結合、および転写の活性化に重要な様々なドメインで構成された、リガンド活性化転写因子である。交互のスプライシングによって、様々なESR1 mRNA転写体が得られ、これらは主にその5'非翻訳領域において異なる。

#### 【0226】

ER発現を検出するための抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、The

rmo Scientific Pierce Antibodies (Rockford, IL)、GeneTex (Irvine, CA)、ARP American Research Products、Ventana Medical Systems, Inc (Tucson, AZ)、またはAbcam(Cambridge, MA) からというように、公に入手可能であり、例えば、Santa Cruz BiotechnologyからのCat. Nos. sc-71064, sc-73562およびsc-7207、Pierce AntibodiesからのMA1-310、Ventanaからの790-4325 (clone SP1、あるいはAbcamからのab2746、ab27614、またはab37438がある。

【0227】

2. 人上皮成長因子受容体2 (HER2) (OMIM164870)

人HER2遺伝子は、染色体17(17q21-q22)上に位置する。HER2シーケンスは、例えば、GenBank (R) から公に入手可能である(例えば、アクセッション番号 NP\_001005862.1, P04626.1, NP\_004439.2 (タンパク質), NM\_001005862.1, NM\_001982.3 (ヌクレオチド))。

【0228】

HER2の増幅または過剰発現は、ある種の進行性乳癌の病因および進展においてある役割を果たし、この疾病に対する療法の重要なバイオマーカーおよび標的となる。

HER2発現を測定するための抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、Thermo Scientific Pierce Antibodies (Rockford, IL)、GeneTex (Irvine, CA)、ARP American Research Products、Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ)、またはAbcam(Cambridge, MA)からというように、公に入手可能であり、例えば、VentanaからのCat. Nos. 790-2991 (クローン4B5)、Santa Cruz Biotechnologyからのsc-08、sc-81528、およびsc-136294、ならびにAbcamからのab2428、ab16901、またはab36728がある。

【0229】

3. Ki-67 (OMIM:176741)

人のKi-67遺伝子は、染色体10上に位置する。Ki-67シーケンスは、例えば、GenBank (登録商標) から公に入手可能である。(例えば、アクセッション番号 NP\_001139438.1, P46013.2, NP\_002408.3 (タンパク質), NM\_001040058.1, NM\_001145966.1 (ヌクレオチド))。

【0230】

Ki-67は、所与の細胞集団の増殖分画を判定するために使用することができる。Ki-67-陽性腫瘍細胞(Ki-67標識インデックス)の分画は、多くの場合、乳癌のような癌の臨床経過と相関付けられる。したがって、Ki-67は患者の生存および腫瘍の再発を予知するために使用することができる。

【0231】

Ki-67発現を測定するための抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、Thermo Scientific Pierce Antibodies (Rockford, IL)、GeneTex (Irvine, CA)、ARP American Research Products、Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ)、またはAbcam (Cambridge, MA)からというように、公に入手可能であり、例えば、VentanaからのCat. Nos. 790-4286 (クローン30-9)、Santa Cruz Biotechnologyからのsc-101861 (クローンMIB-1)、sc-15402、sc-23900、Abcamからのab15580、ab16667、ab8191がある。

【0232】

4. プロゲステロン (PR) (OMIM:607311)

人のPR遺伝子(核受容体サブファミリー3、グループC、メンバー3、NR3C3としても知られる)は、染色体11q22に位置する。PRシーケンスは、例えば、GenBank (登録商標) (例えば、アクセッション番号NP\_000917.3, AAA60081.1, AAS00096.1 (タンパク質), NM\_001202474.1, NM\_000926.4 (ヌクレオチド)) から公に入手可能である。

【0233】

PRの増幅または過剰発現は、ある乳癌において示されている。

PR発現を測定するための抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、The rmo Scientific Pierce Antibodies (Rockford, IL)、GeneTex (Irvine, CA)、ARP American Research Products、Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ)、またはAbcam (Cambridge, MA)からというように、公に入手可能であり、例えば、VentanaからのCat. No s. 790-2223 (クローン I E 2)、Santa Cruz Biotechnologyからのsc-810, sc-811, sc-539、およびAbcamからのab2765, ab2764, ab68195がある。

【0234】

#### 5. 配列変異体

本明細書において示し、公に入手可能な特定のER, HER2, Ki-67, PRに加えて、当業者は、このような配列の変異体が特定の被験者には存在し得ることを認めよう。例えば、特定の遺伝子またはタンパク質の多相性が存在する場合がある。加えて、配列は異なる有機体間でも変化する場合がある。特定の例では、配列変異体は、その対応する天然配列の生物学的活動を保持する。例えば、特定の被験者内に存在するER, HER2, Ki-67, PR配列が、1から5または1から10の保存アミノ酸置換のような、保存アミノ酸変化（非常に高く保存された置換、高く保存された置換、または保存された置換）を有する可能性がある。保存アミノ酸置換の例をテーブル1に示す。

【0235】

【表3】

テーブル1：保存アミノ酸置換の例

元の 残留物	非常に良く 保存された置換	良く保存された置換 (Blosum90行列から)	保存された置換 (Blosum65行列から)
Ala	Ser	Gly, Ser, Thr	Cys, Gly, Ser, Thr, Val
Arg	Lys	Gln, His, Lys	Asn, Gln, Glu, His, Lys
Asn	Gln; His	Asp, Gln, His, Lys, Ser, Thr	Arg, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr
Asp	Glu	Asn, Glu	Asn, Gln, Glu, Ser
Cys	Ser	None	Ala
Gln	Asn	Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met	Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser
Glu	Asp	Asp, Gln, Lys	Arg, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Ser
Gly	Pro	Ala	Ala, Ser
His	Asn; Gln	Arg, Asn, Gln, Tyr	Arg, Asn, Gln, Glu, Tyr
Ile	Leu; Val	Leu, Met, Val	Leu, Met, Phe, Val
Leu	Ile; Val	Ile, Met, Phe, Val	Ile, Met, Phe, Val
Lys	Arg; Gln; Glu	Arg, Asn, Gln, Glu	Arg, Asn, Gln, Glu, Ser,
Met	Leu; Ile	Gln, Ile, Leu, Val	Gln, Ile, Leu, Phe, Val
Phe	Met; Leu; Tyr	Leu, Trp, Tyr	Ile, Leu, Met, Trp, Tyr
Ser	Thr	Ala, Asn, Thr	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Lys, Thr
Thr	Ser	Ala, Asn, Ser	Ala, Asn, Ser, Val
Trp	Tyr	Phe, Tyr	Phe, Tyr
Tyr	Trp; Phe	His, Phe, Trp	His, Phe, Trp
Val	Ile; Leu	Ile, Leu, Met	Ala, Ile, Leu, Met, Thr

【0236】

実施形態の中には、ER, HER2, Ki-67, PR配列が、それぞれ、本明細書において言及されたGenBank (R) アクセッション番号に明記される配列に対して、少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも95%、少なくとも92%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、または少なくとも60%の配列同一性を有するヌクレオチドまたはタンパク

質配列というような、天然ER, HER2, Ki-67, PR配列の配列変異体である場合もあり、得られた変異体は、ER, HER2, Ki-67, PR生物学的活動を保持する。「配列同一性」とは、2つのアミノ酸配列間（または2つのヌクレオチド配列間）の類似性を記述するために一般に使用される句である。配列同一性は、通例、同一性百分率に関して表現され、百分率が高い程、2つの配列は類似する。

#### 【0237】

比較のためそして配列同一性を判定するための配列整合方法は、当技術分野では周知である。種々のプログラムおよび整合アルゴリズムが、以下の論文に記載されている。Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981、Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970、Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444, 1988、Higgins and Sharp, *Gene*, 73:237-244, 1988、Higgins and Sharp, *CABIOS*, 5: 151-153, 1989、Corpet et al., *Nucleic Acids Research*, 16: 10881-10890, 1988、Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences*, 8: 155-165, 1992、Pearson et al., *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331, 1994、Tatiana et al, *FEMS Microbiol. Lett.*, 174:247-250, 1999。Altschul et al.は、配列整合方法および相同関係(homology)計算の詳細な検討を紹介する(*J. Mol. Biol*, 215:403-410, 1990)。

#### 【0238】

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST<sup>TM</sup>, Altschul et al, *J. Mol. Biol*, 215:403-410, 1990)は、National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD)を含む様々なソースから、そしてインターネット上で、配列分析プログラム blastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxと関連付けて使用するために入手可能である。このプログラムを使用してどのようにして配列同一性を判定するかについての説明は、BLAST (R) のヘルプ・セクションにおいてインターネット上で入手可能である。

#### 【0239】

約15個よりも多いアミノ酸のアミノ酸配列の比較のために、デフォルト・パラメータに設定されたデフォルトのBLAST 2行列を使用して、BLAST (商標) (Blastp)プログラムの「BLAST 2配列」機能を採用する(ギャップを開くコスト [デフォルト=5]、ギャップを広げるコスト [デフォルト=2]、不一致に対する減点 [デフォルト=3]、一致に対する加点 [デフォルト=1]、期待値 (E) [デフォルト=10.0]、ワード・サイズ [デフォルト=3]、および概要の数 (V) [デフォルト=100])。短いペプチド(約15個未満のアミノ酸)を整合するとき、この整合は、組成に基づく統計(composition-based statistics)を使用して、デフォルト・パラメータに設定されたPAM30行列を採用するBlast 2配列機能「短いほぼ正確な一致の検索」を使用して実行されるとよい(期待閾値=20000、ワード・サイズ=2、ギャップ・コスト:存在=9および拡大=1)。

#### 【0240】

##### C. タンパク質の検出

特定の例では、被験者から得られたサンプルが、乳癌サンプルのように、ER, HER2, Ki-67, PRタンパク質を含有するか否か判定するために、このサンプルが分析される。つまり、サンプルにおけるER, HER2, Ki-67, PRタンパク質の存在、例えば、定性的または定量的測定値を検出または測定するために、サンプルを分析することができる。また、タンパク質発現の異質性を判定するために、ER, HER2, Ki-67, PRタンパク質の発現パターンも使用することができる。

#### 【0241】

タンパク質検出方法は、型どおりの手順である。ある例では、サンプルにおけるER, HER2, Ki-67, PRタンパク質の存在を検出するために、免疫測定法が使用される。一般に、免疫測定法は、ER, HER2, Ki-67, PRのような、実質的に標的ペプチドだけに結合することができる1つ以上の特定の結合剤(抗体等)の使用を含む。このような結合剤は、タンパク質への結合の検出を可能にする、検出可能な標識(放射線

同位元素識別、蛍光体、酵素等)を含むことができる。使用することができる免疫測定法の例は、ウェスタン・ブロット法、E L I S A、蛍光体顕微鏡測定法、および流量血球計算を含むが、これらに限定されるのではない。特定の免疫測定法は、免疫組織化学法である。

#### 【0242】

一例では、具体的な結合剤は、ポリクロナールまたはモノクロナール抗体、あるいはその断片である。ある例では、抗体はヒト化抗体である。ある例では、抗体はキメラ抗体である。望ましければ、抗体は、標的タンパク質/抗体複合体の検出、そして場合によっては定量化を可能にする、検出可能な標識を含むことができる。他の例では、抗体は、標識された適切な副抗体によって検出される。

10

#### 【0243】

ある例では、E R, P R, H E R 2, K i - 6 7用の抗体は、Ventana Medical Systems, Inc. (Tuscon, AZ)から得られる。しかしながら、本明細書において提供する方法およびキットにおいて使用することができる他の抗体も、Novus Biologicals (Littleton, CO)、Santa Cruz biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)、Abcam(Cambridge, MA)、およびInvitrogen (Carlsbad, CA)というような、他のソースから市販されていることが当業者にとって認められる。

#### 【0244】

背景または対照標識上に検出可能な信号が存在するときは、サンプル内における標的ペプチド(例えば、E R, H E R 2, K i - 6 7, およびP Rタンパク質)の存在を示す。検査用乳癌サンプルのために得られた値は、ある値を表す基準値のような基準値、または予期される値の範囲と比較することができる。ある例では、基準は、E R, H E R 2, K i - 6 7, P Rタンパク質の既知量または期待量を有するサンプルである。

20

#### 【0245】

ある例では、乳癌サンプルが得られ、処理されてI H Cを求める。例えば、サンプルは、固定され、例えば、ホルマリンおよびパラフィンで埋め込むことができる。次いで、ガラス製顕微鏡スライドのような、支持部上にサンプルを載せることができる。例えば、サンプルを薄切りにして一連の薄い区間とし、これらの区間を1つ以上の顕微鏡スライド上に載せることができる。ある例では、1つのスライドが多数の組織区間を含む。次いで、E R, H E R 2, K i - 6 7, P Rタンパク質に特定の抗体で、乳癌サンプルの異なる区間を個々に標識することができる。即ち、1つの区間にはE R - 特定抗体で標識し、他の区間にはH E R 2 - 特定抗体で標識する等とすることができる。ある例では、乳癌サンプルの1つの区間を、E R, H E R 2, K i - 6 7, またはP Rタンパク質の内2つ以上に特定の抗体で標識することができる。即ち、1つの区間をE R - 特定抗体およびH E R 2 - 特定抗体で標識することができ、異なる標識を使用することによって、抗体を区別することができる(各標識はE R, H E R 2, K i - 6 7, P Rに特定の抗体である)。例えば、スライドを染色し処理するために、Ventana Medical Systems, Inc.からのBenchMark ULTRAを使用することができる。

30

#### 【0246】

ある例では、標識されたサンプルを含むスライドが、例えば、iScan Coreo (Ventana)を使用して、走査およびデジタル化される。このように、E R, H E R 2, K i - 6 7, およびP Rタンパク質の各々に対して(サンプルにおいて検出可能に標識されている)、少なくとも1つのデジタル画像を得ることができる。続いて、タンパク質(E R, H E R 2, K i - 6 7, およびP Rタンパク質)毎に2つ以上の視野(F O V)が、例えば、病理医によって選択され、アノテーションが付けられる。

40

#### 【0247】

##### D. I H C複合スコアの計算

I H C複合(例えば、I H C 4)スコアを計算するために、検出可能に標識されたE R, H E R 2, K i - 6 7, P R(例えば、1, 2, 3, 4枚のスライドというような、1枚以上のスライド)を含む乳癌サンプルが使用される。一例では、乳癌サンプルには、E

50

R, HER2, Ki-67, PRの各々に特定の主抗体で、更にしかるべく標識された副抗体（蛍光体、またはDIGのような酵素で標識されたもの等）で標識することができる。一例では、ultraView Red ISH DIG検出キットが、製造業者の指示通りに（Ventana Medical Systems, Inc., Catalog # 760-505）使用される。

【0248】

標識された乳癌サンプルを含有する1枚以上のスライドの1つ以上のデジタル画像を、例えば、顕微鏡画像走査ソフトウェアを使用して得ることができる。1つ以上の標識された乳癌サンプル（またはそのデジタル画像）を含有する1枚以上のスライドは、例えば、病理医によって、その全体的な染色について評価される。例えば、染色における異質性の領域を、ER, HER2, Ki-67, PRの各々について検出することができる。領域的異質性が観察された場合、領域異質性を有する少なくとも1つのFOV（2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個のFOVのような、スライド上における領域的異質性の少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの異なるFOVエリア等）が、互いに類似する少なくとも2つの他のFOV（2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個のFOVのような、互いに類似するスライド上における少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの異なるFOVエリア等）と共に、選択される。領域的異質性が観察されない場合、スライド上の2, 3, 4, 5つのFOVというような、スライド上の少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの異なるFOVというような、もっと少ないFOVを選択することができる。

10

【0249】

PRおよびKi-67タンパク質に対して選択されたFOV毎に、陽性百分率が判定される。つまり、4つのFOVがPRに対して選択された場合、陽性%は、4つのFOVの各々について判定される。陽性%を計算するために、FOV内における腫瘍細胞の総数、およびFOVにおいて染色された腫瘍細胞の総数（例えば、PR+）が判定される。陽性%は、FOVにおいて染色された腫瘍細胞の総数を、FOVにおける腫瘍細胞の総数で除算した値である。特定のマーカ（例えば、PR）に対するFOV毎の陽性%の平均を取り、PRおよびKi-67に対する陽性%が得られる。

20

【0250】

HER2に対するFOV毎に、等級スコア（0～3の目盛り上）が判定される。例えば、FOV毎に、当該FOVの評価に基づいて、0および3の間の等級スコアを染色に指定することができる。以下のように、HER2に対する核を包囲する膜の免疫染色を記述するために、例えば、テーブル2に示すように、四点目盛りを使用することができる。0は陰性、1は弱陽性、2は中陽性、3+は強陽性。細胞質染色が未だ存在するかもしれないが、このような染色は判定に含まれる必要はない。

30

【0251】

【表4】

テーブル2：HER2等級スコア

染色パターン	スコア	HER2 染色評価
膜染色が観察されない	0	陰性
膜の微かな部分的染色	1+	陰性
癌細胞の10%よりも多くにおいて、膜の弱い完全な染色	2+	陽性
癌細胞の10%よりも多くにおいて、膜の強い完全な染色	3+	陽性

40

【0252】

代わりに、HER2に対して二進スコア（0または1）を判定することができる（例えば

50

、個々のFOVまたは集合的に複数のFOVに基づいて)。この場合、陽性結果(1)は、2または3の染色スコアに対応し、陰性結果(0)は0または1の染色スコアに対応する。これよりも高いまたは低い分解能も使用することができる。例えば、0, 1, 2, 3を使用するシステムを使用することができる。内部では、HER2に対するスコアは、等級スコア(例えば、0, 1, 2, 3)としてまたは二進値(例えば、0または1)として表すことができる(例えば、等級スコアに基づいて二進値が判定される)。

#### 【0253】

ERに対して選択されたFOVについて、H-スコアが判定される(例えば、個々のFOVまたは集合的に複数のFOVについて)。ERに対するH-スコアは、弱い染色を示す細胞の百分率を、中程度に染色した細胞の百分率の2倍に加算し、強く染色した細胞の百分率の3倍に加算し、30で除算して、0-10の間の変数( $ER_1$ )に到達する。1よりも大きなH-スコアが陽性となる。PRに対して陽性に染色した細胞の百分率(例えば、10%を上限にする)を10で除算して、0-10の間の変数を得た( $PR_1$ )。

10

#### 【0254】

このように、4つのマーカの各々に対して病理医によってFOVが識別された後、撮像アルゴリズムがスライド(ER, HER2, Ki-67, PRタンパク質を検出するために標識された乳癌サンプル等)からデジタル情報を抽出することができ、このデジタル画像をスコア構成要素(例えば、陽性%、等級(または二進)スコア、およびH-スコアの測定値)に変換する。以上で説明したマーカ毎のこれらのスコアは、IHC複合スコアを生成するために使用される。IHC複合スコアは、以下の式を使用して計算される。

20

$$IHC4 = 94.7 \times \{-0.100ER_1 - 0.079PR_1 + 0.586HER2 + 0.240In(1 + 10 \times Ki67)\}$$

#### E. 異質性スコアの計算

異質性とは、乳癌サンプルにおける乳癌バイオマーカER, HER-2, Ki-67, PRに対する染色パターンのような、組織化学的および分子染色パターンの空間的ばらつきを指す。異質性は、腫瘍の進行性および/または成長パターンの空間的ばらつきの指標となることができ、統合臨床表現型(例えば、再発する可能性が高い腫瘍)と相関付けることができる。ここでは、ER, PR, HER2, Ki-67タンパク質発現の生物学的異質性が、早期乳癌患者の一部(fraction)の予測不可能な再発と相関付けられることを示す。

30

#### 【0255】

本方法は、4つのマーカの各々について、サンプルにおける領域的異質性を定量化することを含む。これは、選択されたFOVからのスコアから計算される。このために、マーカ毎に、領域的異質性の定量的尺度が判定される。マーカが均質であるかまたは検出できない場合(例えば、HER2-)、その値は異質性スコアの計算から外される。タンパク質毎(ER, HER2, Ki-67, PRタンパク質)に2つ以上の視野(FOV)が、例えば、病理医によって、選択されアノテーションが付けられる。選択されたFOVは、IHC4スコアを計算するために選択されたFOVと同じでも、または異なっても可能である。

40

#### 【0256】

ある例では、複数のFOV(例えば、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つ等)が選択され、例えば、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個のFOVが選択される。先に説明したように、領域的異質性を観察したことに応答して、領域的異質性を有する少なくとも1つのFOV(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個のFOVのような、スライド上で領域的異質性の少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの異なるFOVエリアというような)のような、もっと多くのFOVが、互いに類似する少なくとも2つの他のFOV(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個のFOVのような、互いに類似するスライド上における少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの異なるFOVエリア等)と共に選択されてもよい。

50

領域的異質性を観察しなかったことに応答して、スライド上における2, 3, 4, 5つのFOVというような、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの異なるFOVのように、もっと少ないFOVが選択されてもよい。

【0257】

場合によっては、領域的異質性が存在しないことを結論的に確定する（例えば、確認または証明する）ために、追加のFOVを選択することが望ましい場合もある。しかしながら、領域的異質性がないことが結論的に明白である場合、追加のFOVを選択すると、不必要にリソースが広がる虞があり、したがって、もっと少ないFOVが選択されればよい。

【0258】

10

一例では、異なる陽性%を有するFOVが選択される。何故なら、これらのエリアは、異質性、例えば、領域的異質性を示すからである。

ER, Ki-67, HER2, PRタンパク質の各々について、異質性スコアが判定される。ある例では、例えば、サンプルがHER2陰性である場合、HER2は判定されない（またはHER2に対する異質性がないので、値は外れる）。ある例では、例えば、Ki-67は判定されない（またはKi-67に対する異質性がないので、値は外れる）。

【0259】

ERおよびPRマーカに対して（そして、ある例ではHER2およびKi-67に対しても）異質性スコアは次のように計算される。選択されたFOVにおける異質性領域から、陽性百分率スコアの可変性が計算される。例えば、マーカ毎に可変性メトリック（VM）を判定することができる。ここで、VMは1つの選択されたFOVが他のFOVとは同じタンパク質に対してどのように異なるかの指示である。標準偏差を判定する等、これを計算できる方法は数多くある。一例では、ER, PR, Ki-67（そして、ある例では、HER2も）に対するVMは、次のように計算される。

20

$$VM = STD(PPFS_1), PP(FS_2), \dots, PP(FS_N))$$

ここで、PP(FS)は、視野FS毎の陽性百分率である。陽性百分率は、本明細書において説明したように計算することができる。次いで、マーカ（例えば、ERおよびPR）に対する異質性スコアは、次の式を使用して計算される。

【0260】

【数6】

30

$$H = \begin{cases} \alpha * \frac{VM}{0.05}, S < 10\% \\ \alpha * \frac{VM}{S}, otherwise \end{cases}$$

【0261】

HER2に対して、各FOV, FS毎に等級スコアP(FS)が計算される（0から3までの目盛り。上記を参照のこと）。次いで、異質性スコアは、以下の式を使用して計算することができる。

【0262】

【数7】

40

$$H = \sum_{\substack{\forall i,j \\ i \neq j}} \|P(FS_i) - P(FS_j)\|$$

【0263】

FOV毎に等級スコアが同じである場合、HER2に対する異質性スコアは0になる。

以下のテーブルは、本明細書において説明したように、領域的異質性を含む、異なるタイプの異質性を示す。

【0264】

【表5】

テーブル3：異質性のタイプ

	族	ER タンパク質	PR タンパク質	Ki67 タンパク質	HER2 タンパク質	HER2 遺伝子
地理的 2つの別個のブロック >2インチ離れる	拡散一焦点	該当せず	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
領域的 4×FOV1つ分だけ離れる 同じ区間/ブロック、 0.25~2インチ	拡散一焦点	有り	有り	有り	有り	有り
腺間 4×FOV以内、 <0.25インチ 双方の領域的カテゴリ	50%超または 未満 同様の形成	無し	無し	無し	有り	有り
腺内=細胞-細胞 20×FOV1つにおける全ての形成 全ての領域的および腺 間カテゴリ	50%超または未満 同様の細胞	有り	有り	有り	有り	有り
	多層化の場合、 全てのまたは 特定の層	無し	無し	無し	無し	無し
	拡散一分極	無し	無し	無し	無し	無し
細胞レベル未満	核 細胞質または膜 全ての領域的、腺 間、腺内カテゴリ	核	核	核	膜	核
強度	陰性、3つの陽性 カテゴリ	有り	有り	有り	有り	有り

10

20

30

## 【0265】

## F. 出力予知スコアの計算

出力予知スコアは、以上で説明したIHC複合スコアおよび異質性スコアから計算される。複合異質性スコアは、以下のように生成され、更に他のバイオマーカを含むように調節することができる。

複合異質性スコア = 二乗根 (ER異質性スコア + PR異質性スコア)

IHC複合スコアおよび複合異質性スコアは、双方の尺度の複合予測能力が最大になるように、統計分析方法 (例えば、Coxの比例ハザード・モデル) に入力される。例えば、このモデルは、1, 3, 5年のPFSのような成果として進行のない生存 (PFS: progression-free survival) を判定するため、またはそれ以外で患者をカテゴリに分けるために使用することができる。

40

50

## 【0266】

この結果は、5年PFSの危険度を予測するスコアを生成する数学的な式となる。  
出力予知スコア =  $0.03114 \times \text{IHC4} + 1.95119 \times \text{複合異質性スコア}$

このように、出力予知スコアは、高危険性スコア（例えば、5年以内に、局所再発または遠隔転移のように、早期乳癌が再発する可能性が高いことを示す）、または低危険性スコア（早期乳癌が再発しそうなことを示す）のいずれかとなる。

## 【0267】

## G. 出力値および予知の出力

IHC複合スコアの判定に続いて、異質性スコア、ならびに出力予知スコア、分析評価結果（出力予知スコア等）、発見、予知、予測、および/または処置の推奨が、通例、記録され、例えば、技師、外科医、および/または患者に伝えられる。ある種の実施形態では、このような情報を、患者および/または担当する外科医のような、当事者に伝えるためにコンピュータが使用される。乳癌の予知に基づいて、被験者に施される療法を変更することができる。

## 【0268】

一実施形態では、分析表が完了し予知が生成された後できるだけ早く、予知、予測、および/または出力値に基づく処置の推奨が、当事者に伝えられる。この結果および/または関連情報は、被験者を担当する外科医によって、被験者に伝えられてもよい。あるいは、筆記した報告を提出することによってというような筆記、電子メールのような電子形態の通信、または電話を含む任意の通信手段によって、当事者に直接伝えられてもよい。電子メール通信の場合のように、相応しくプログラミングされたコンピュータの使用によって、通信をやりやすくすることができる。ある種の実施形態では、予知検査の結果、および/または検査から引き出された結果および/または検査に基づく処置の推奨を含む通信は、電気通信分野に精通する当業者には馴染みがあるコンピュータ・ハードウェアおよびソフトウェアの組み合わせを使用して、自動的に生成し当事者に配信することもできる。健康管理指向の通信システムの一例が、米国特許第6,283,761号に記載されている。しかしながら、本開示は、この特定の通信システムを利用する方法に限定されるのではない。

## 【0269】

本開示の方法のある種の実施形態では、サンプルの分析評価、乳癌の予知、および分析評価結果または予知の伝達は、様々な（例えば、外国の）管轄区域において実行されてもよい。

## 【0270】

## H. フォローアップ療法

開示する方法は、更に、例えば、サンプルに早期乳癌が起こる可能性が高いと予知された場合、乳癌の処置のために被験者を選択するステップも含むことができる。あるいは、開示する方法は、更に、サンプルに早期乳癌が再発しそうなことを診断された場合、処置しない（例えば、単なる監視）被験者を選択するステップも含むことができる。

## 【0271】

ある実施形態では、開示する方法は、患者の予知に依存して以下のステップを含む。a) 被験者に判定された予知が、早期乳癌が再発する可能性が高いということである場合、この被験者のために治療計画を処方するステップ（1つ以上の放射線療法および/または化学療法薬による処置、追加の外科手術、より頻繁な監視、あるいはその組み合わせ等）と、b) 被験者に判定され予知が、早期乳癌が再発しそうなことを示すということである場合、この患者に治療計画を処方しないステップと、c) 被験者に判定された予知が、早期乳癌が再発する可能性が高いということである場合、被験者に治療（1つ以上の放射線療法および/または化学療法薬による処置、追加の外科手術、あるいはその組み合わせ等）を施すステップと、d) 被験者に判定された予知が、早期乳癌が再発しそうなことを示すということである場合、被験者に治療計画を施さないステップ。代替実施形態では、この方法は、（

a) - (d) の1つ以上を推奨するステップを含むことができる。つまり、開示する方法は、更に、被験者に乳癌のための治療を行うステップも含むことができる。

#### 【0272】

##### スコア構成要素例

本明細書における例のいずれにおいても、スコア構成要素は、1つ以上のバイオマーカーに対する遺伝子の発現（例えば、陽性百分率等）、H-スコア、等級スコア、二進スコア等の測定値を指すことができる。

#### 【0273】

構成要素は組み合わせられるので、結果的に得られる成分は、複数のバイオマーカーを表すことができる。

10

##### 更なる説明例

IHC計算および異質性測定では、手作業の顕微鏡測定法による採点の代わりに、スライドをデジタル化することができ、自動化された画像分析アルゴリズムが、病理医によって選択された視野（FOV）に対して、陽性百分率、等級スコア（例えば、更に二進スコアに変換する）、およびH-スコアを計算することができる。

#### 【0274】

以上で述べた4つのマーカーに関連付けられた各デジタル化スライドにおいて、病理医は、領域間強度および領域的異質性を定量化するために、特定の領域にアノテーションを付ける。領域毎に自動画像分析を使用して、陽性および陰性に染色された細胞の個数、陽性百分率、ならびに等級スコア（0, 1+, 2+, 3+）が計算される。

20

#### 【0275】

領域間異質性を定量化するために、これらの領域スコアに基づく異質性メトリックを使用することができる。異質性スコアは、病理医によって選択されたFOVにおける陰性および陽性（1+, 2+, および3+）細胞個数に基づく。異質性スコアは、選択されたFOV内におけるスコアのばらつきを捕らえる。病理医によってアノテーションが付けられたFOVを使用し、スコアは、異なるFOVからのスコアの標準偏差の正規化関数となる。選択される正規化パラメータは、マーカーに依存し、一般に、領域間陽性百分率スコアは、全体的なスライドの陽性スコアが高い程、高い可変性を有するという事実を反映する。

##### 計算システム例

図23は、説明した様々な革新(innovation)を実現することができるのに適した計算システム2300の一般化した例を示す。計算システム2300は、使用範囲や機能に関して何ら限定を示唆することは意図していない。何故なら、本革新は様々な汎用または特殊目的計算システムにおいて実現できるからである。本明細書において説明する計算システムは、自動機能を実現するために使用することができる（例えば、プロセス、アクション等が、ここで説明する計算システムによって実行される）。

30

#### 【0276】

図23を参照すると、計算システム2300は、1つ以上の処理ユニット2310、2315、およびメモリ2320、2325を含む。図23において、この基本的な構成2330は破線内に含まれる。処理ユニット2310、2315は、コンピュータ実行命令を実行する。処理ユニットは、汎用中央演算装置（CPU）、特定用途集積回路（ASIC）におけるプロセッサ、または任意の他のタイプのプロセッサとすることができる。マルチ処理システムでは、多数の処理ユニットが、処理パワーを増大するために、コンピュータ実行可能命令を実行する。例えば、図23は、中央処理ユニット2310、更にグラフィックス処理ユニットまたは共処理ユニット2315を示す。有形メモリ2320、2325は、揮発性メモリ（例えば、レジスタ、キャッシュ、RAM）、不揮発性メモリ（例えば、ROM、EEPROM、フラッシュ・メモリ等）、または処理ユニット（1つまたは複数）によってアクセス可能な、これら2つの何らかの組み合わせであってもよい。メモリ2320、2325は、処理ユニット（1つまたは複数）による実行に適しており、本明細書において説明した1つ以上の革新を実現するコンピュータ実行可能命令の形態としたソフトウェア2380を格納する。

40

50

## 【0277】

計算システムは、追加の機構を有してもよい。例えば、計算システム2300は、ストレージ2340、1つ以上の入力デバイス2350、1つ以上の出力デバイス2360、および1つ以上の通信接続2370を含む。バス、コントローラ、またはネットワークのような相互接続メカニズム（図示せず）は、計算システム2300のコンポーネントを相互接続する。通例、オペレーティング・システム・ソフトウェア（図示せず）は、計算システム2300において実行する他のソフトウェアのために動作環境を提供し、計算システム2300のコンポーネントのアクティビティを調整する。

## 【0278】

有形ストレージ2340は、リムーバブルまたは非リムーバブルでもよく、磁気ディスク、磁気テープまたはカセット、CD-ROM、DVD、あるいは情報を一時的でない方法で格納するために使用することができ、更に計算システム2300内でアクセスすることができる任意の他の媒体を含む。ストレージ2340は、本明細書において説明した1つ以上の革新を実現するソフトウェア2380の命令を格納する。

## 【0279】

入力デバイス（1つまたは複数）2350は、キーボード、マウス、ペン、またはトラックボールのようなタッチ入力デバイス、音声入力デバイス、走査デバイス、あるいは入力計算システム2300に供給する他のデバイスであってもよい。ビデオ・エンコーディング用には、入力デバイス（1つまたは複数）2350は、カメラ、ビデオ・カード、TVチューナ・カード、あるいはアナログまたはデジタル形態でビデオ入力を受け入れる同様のデバイス、あるいはビデオ・サンプルを計算システム2300に読み込むCD-ROMまたはCD-RWであってもよい。出力デバイス（1つまたは複数）2360は、ディスプレイ、プリンタ、スピーカ、CD-ライター、または計算システム2300からの出力を供給する他のデバイスであってもよい。

## 【0280】

通信接続（1つまたは複数）2370は、通信媒体または他の計算エンティティを通じた通信を可能にする。通信媒体は、コンピュータ実行可能命令、オーディオまたはビデオ入力または出力、あるいは変調データ信号における他のデータというような情報を伝える。変調データ信号とは、当該信号において情報をエンコードするように、その特性の内1つ以上が設定されたまたは変化させられた信号である。一例として、そして限定ではなく、通信媒体は、電気、光、RF、または他の搬送波を使用することができる。

## 【0281】

本革新は、コンピュータ読み取り可能媒体という一般的なコンテキストで説明することができる。コンピュータ読み取り可能媒体は、計算環境内部でアクセスすることができる任意の入手可能な有形媒体である。一例として、そして限定ではなく、計算システム2300では、コンピュータ読み取り可能媒体は、メモリ2320、2325、ストレージ2340、および以上の内任意のものの組み合わせを含む。

## 【0282】

本革新は、計算システムにおけるターゲットの実プロセッサまたは仮想プロセッサ上で実行されるプログラム・モジュールに含まれるような、コンピュータ実行可能命令という一般的なコンテキストで説明することができる。一般に、プログラム・モジュールは、ルーチン、プログラム、ライブラリ、オブジェクト、クラス、コンポーネント、データ構造等を含み、特定のタスクを実行するか、または特定の抽象データ型を実装する。プログラム・モジュールの機能は、種々の実施形態において所望通りに、プログラム・モジュール間で組み合わせてもまたは分割してもよい。プログラム・モジュールのコンピュータ実行可能命令は、ローカルまたは分散型計算システム内部で実行することもできる。

## 【0283】

本明細書では、「システム」および「デバイス」という用語は相互交換可能に使用される。そうでないことを文脈が明らかに示すのであれば、いずれの用語も、計算システムまたは計算デバイスのタイプに対して何の限定も強制しない。一般に、計算システムま

たは計算デバイスは、ローカルまたは分散型であることができ、特殊目的ハードウェアおよび/または汎用ハードウェアと、本明細書において説明した機能を実現するソフトウェアとの任意の組み合わせを含むことができる。

【0284】

紹介のために、詳細な説明では、計算システムにおけるコンピュータ動作を記述するために「判定する」および「使用する」というような用語を使用した。これらの用語は、コンピュータによって実行される動作の上位抽象化であり、人間によって行われる行為と混同すべきでない。これらの用語に対応する実際のコンピュータ動作は、実施態様に応じて異なる。

【0285】

コンピュータ読み取り可能媒体

本明細書におけるコンピュータ読み取り可能媒体はいずれも、非一時的（例えば、メモリ、磁気ストレージ、光ストレージ等）とすることができる。

【0286】

本明細書において説明した格納動作(storing action)はいずれも、1つ以上のコンピュータ読み取り可能媒体（例えば、コンピュータ読み取り可能記憶媒体または他の有形媒体）に格納することによって実現することができる。

【0287】

格納されると説明したものはいずれも、1つ以上のコンピュータ読み取り可能媒体（例えば、コンピュータ読み取り可能記憶媒体または他の有形媒体）に格納することができる。

【0288】

本明細書において説明した方法はいずれも、1つ以上のコンピュータ読み取り可能媒体（例えば、コンピュータ読み取り可能記憶媒体または他の有形媒体）における（例えば、エンコードされた）コンピュータ実行可能命令によって実現することができる。このような命令は、コンピュータに本方法を実行させることができる。本明細書において説明した技術は、種々のプログラミング言語で実現することができる。

【0289】

コンピュータ読み取り可能記憶デバイスにおける方法

本明細書において説明した方法はいずれも、1つ以上のコンピュータ読み取り可能記憶デバイス（例えば、メモリ、磁気ストレージ、光ストレージ等）に格納されたコンピュータ実行可能命令によって実現することができる。このような命令は、コンピュータに本方法を実行させることができる。

【0290】

早期乳癌再発危険性の実施態様および結果の例

この例は、早期乳癌再発の危険性を予測するために使用される方法について説明する。

約20人の患者からの乳癌サンプルを、ER, PR, HER2, Ki-67で特定の抗体で標識した。

【0291】

これら結果的に作られた標識されたサンプルを、顕微鏡スライド上において、デジタル病理学によって撮像した。ER, PR, HER2, Ki-67の各々に対して3つのFOVを選択した。細胞染色百分率（例えば、陽性百分率）およびFOV毎の強度を定量化するためにソフトウェアを使用した。こうして、陽性百分率を判定した。加えて、3つのFOVに対する強度および細胞染色百分率の可変性に基づいて、異質性の3つの異なる尺度を判定した。

【0292】

ER, PR, HER2, Ki-67の各々に対してFOV毎に得られた細胞染色百分率および強度を平均した（例えば、ERのFOVを平均した）。この結果、ER, PR, HER2, Ki-67の各々に対して、細胞染色百分率値および強度値が得られた。これらの値を使用して、以下の式を用いて、IHC4スコアを計算した。

10

20

30

40

50

$$IHC4 = 94.7 \times \{-0.100ER_{10} - 0.79PR_{10} + 0.586HER2 + 0.240 \ln(1 + 10 \times Ki67)\}$$

IHC4スコアおよび12個の異質性値（ER, PR, HER2, Ki-67の各々のための3つのFOVの各々に1つずつ）を使用して、遠隔再発までの時間をモデル化するコックスの比例ハザード・モデルを用いて、異質性尺度およびIHC4スコアの各々をモデル化した。3つの異質性尺度は非常に類似しており、したがって、4回の分析評価の各々に、最初の異質性尺度を使用した。

#### 【0293】

5つの変数、IHCスコア、および分析評価（ER, PR, Ki-67, HER2）毎に1つの異質性スコアを使用して、異質性スコアの各々によって別個にIHC4スコアをモデル化した（コックス・モデルを使用した）。 10

#### 【0294】

その結果に基づいて、遠隔再発までの時間を判定するためには、PR異質性スコア尺度が最も有用であり、ERは多少の予測力を追加すると判断した。

異質性スコアの単位(unit)が変わる毎に、遠隔再発の危険性において同じ増加が生ずるという仮定があるので、異質性スコアと危険性との関係が線形か否か判定する。データを変換し（二乗根、自然対数等を求める）、変換した変数をコックス・モデルに入力した。二乗根を選択したのは、これが予測能力を最も高めたからである。

#### 【0295】

異質性測定のための最後の修正は、ERおよびPRに対する異質性スコア（HET）を求め、これらを加算して二乗根を求めることを必要とした。異質性スコア = 二乗根（ $HET^{PR} + HET^{ER}$ ）。結果的に得られたHETスコアおよびIHC4スコアをコックス比例ハザード・モデルに入力した。このモデルは2つの線形変数を取り込み、これら2つの最良の線形組み合わせを求めて、遠隔再発までの時間を予測する。 20

#### 【0296】

結果的に得られた式は、次の通りである。

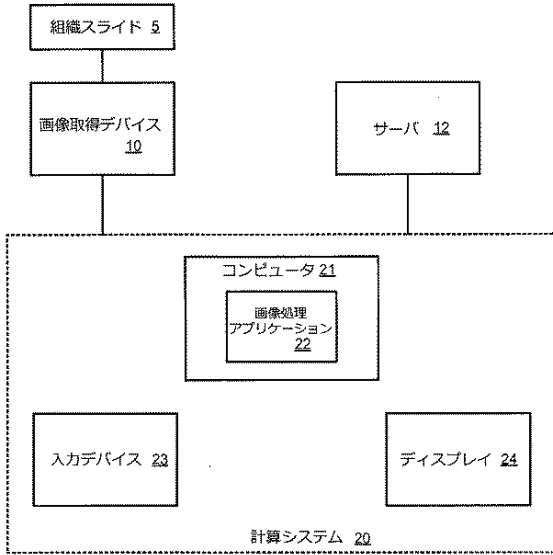
$$\text{出力危険性スコア} = 1.95119 \times (\text{二乗根}(HET^{PR} + HET^{ER})) + 0.03114 \times IHC4$$

図24に示すように、この方法は、乳癌サンプルを高い進行性（悪化）または低い進行性（悪化せず）に正確に分類した。図24に示す事例は、このアルゴリズムを作成するために使用した同じ事例である。 30

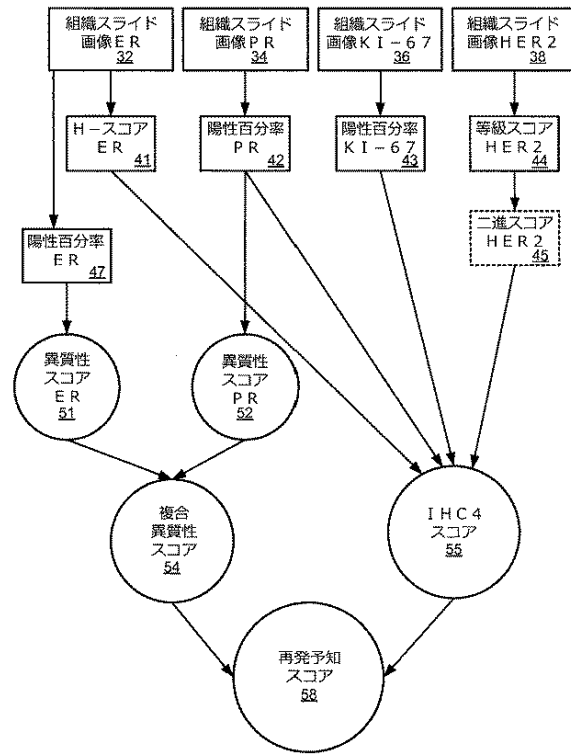
代替態様

いずれの例からの技術でも、他の例のいずれの1つ以上において説明した技術とでも組み合わせることができる。本開示の原理を応用することができる多くの可能な実施形態を考慮して、例示した実施形態は本開示の例に過ぎず、本開示の範囲を限定するように捕らえてはならないことは、認められてしかるべきである。逆に、本開示の範囲は、以下の請求項によって定められる。したがって、これらの請求項の範囲および主旨に該当する全てを、本発明として特許請求する。

【図 1】

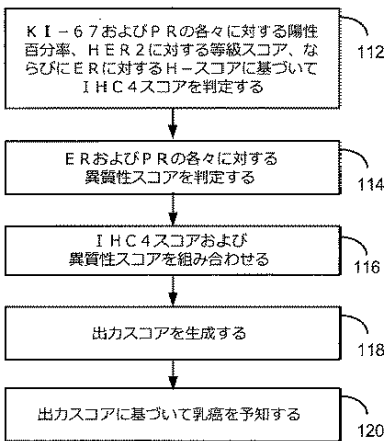


【図 2】

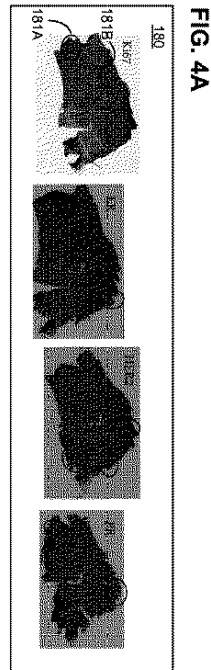


【図 3】

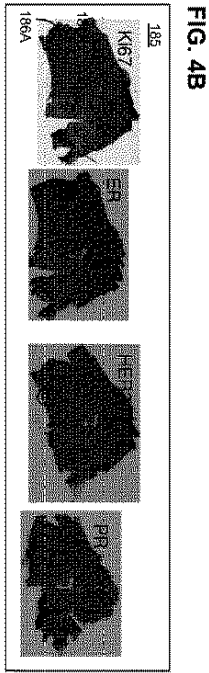
方法の全体像



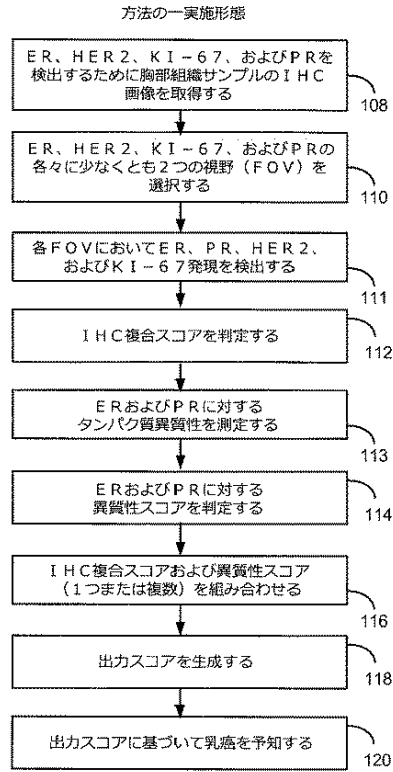
【図 4 A】



【図 4 B】

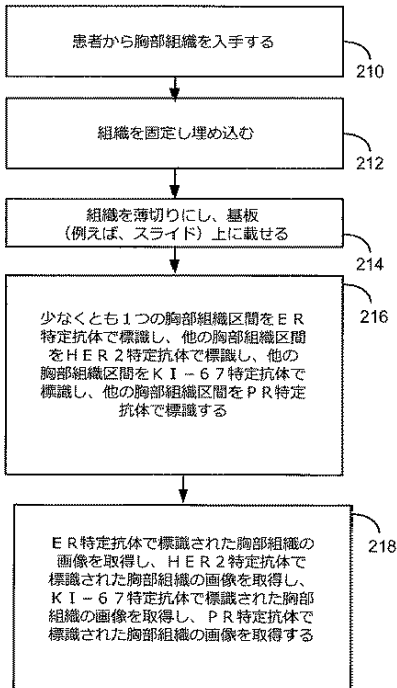


【図 5】



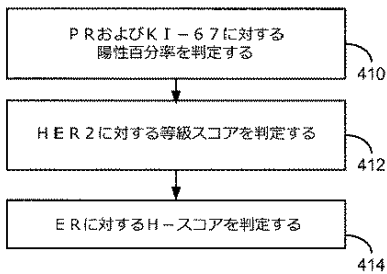
【図 6】

胸部組織サンプルのIHC画像取得



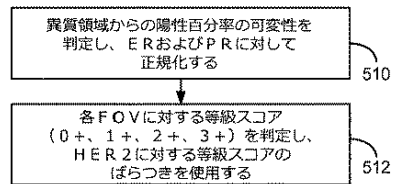
【図 7】

各FOVにおけるタンパク質発現の検出(IHC複合スコアを求めるため)

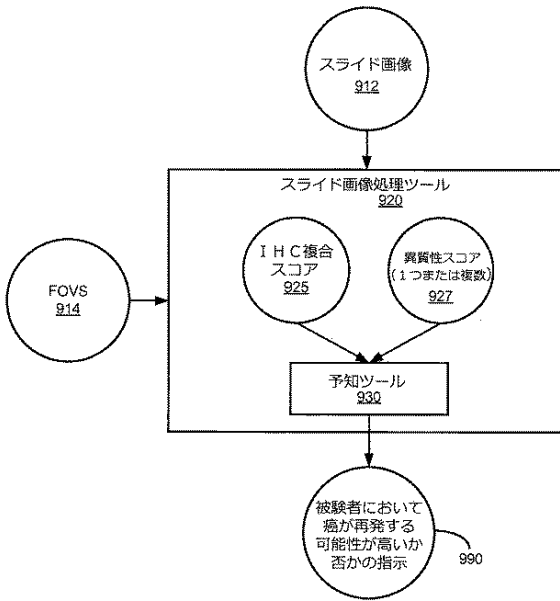


【図 8】

各FOVに対するタンパク質異質性の測定

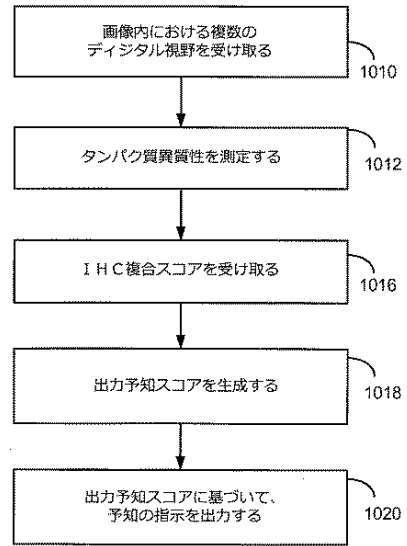


【図 9】



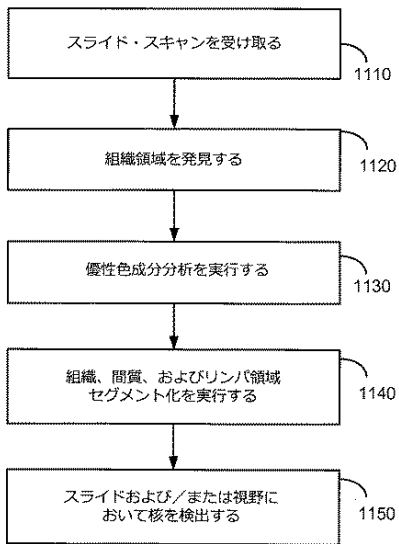
900 ↗

【図 10】



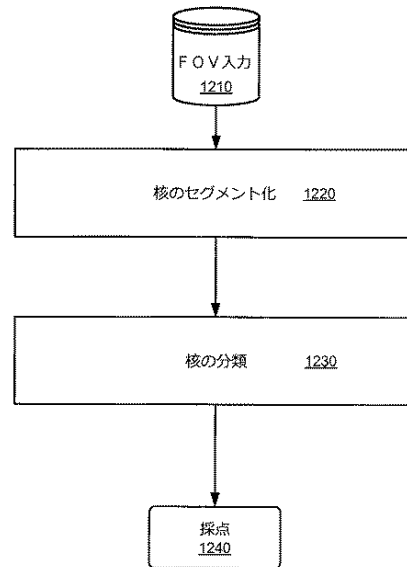
1000 ↗

【図 11】



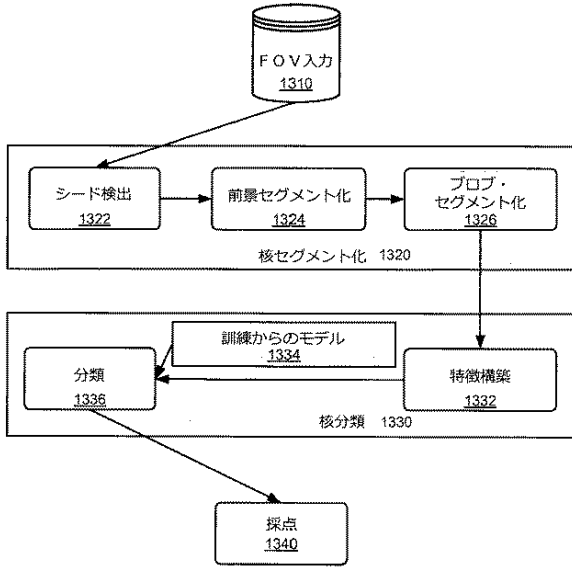
1100 ↗

【図 12】



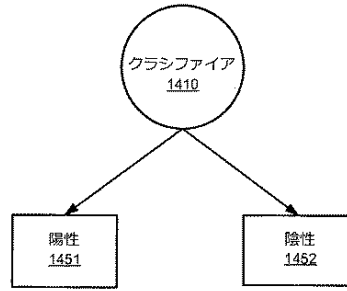
1200 ↗

【図13】



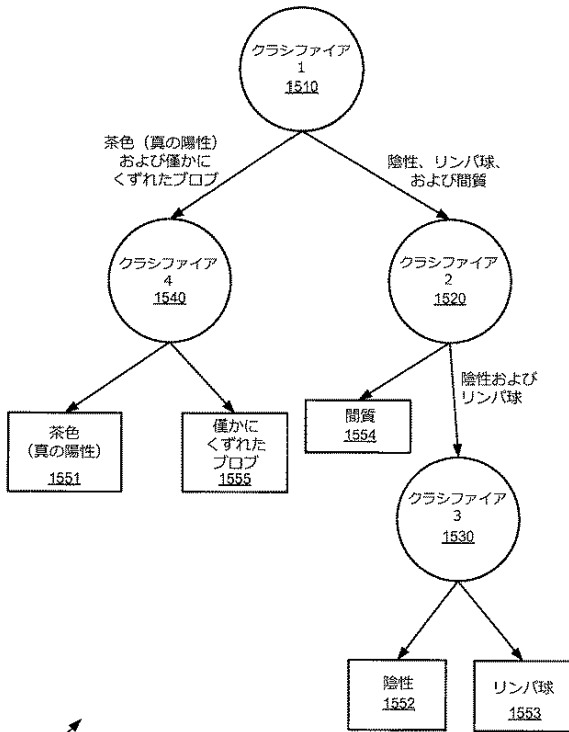
1300

【図14】



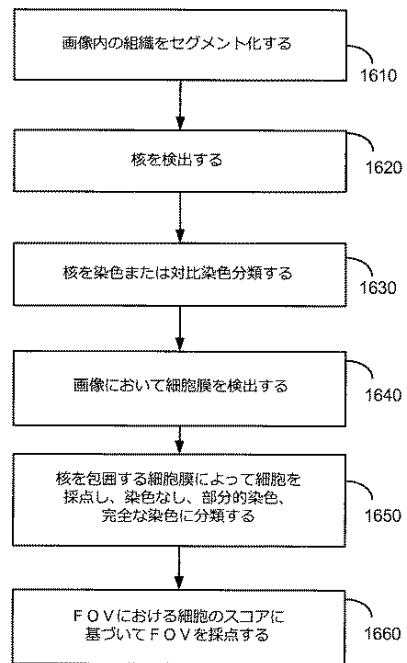
1400

【図15】



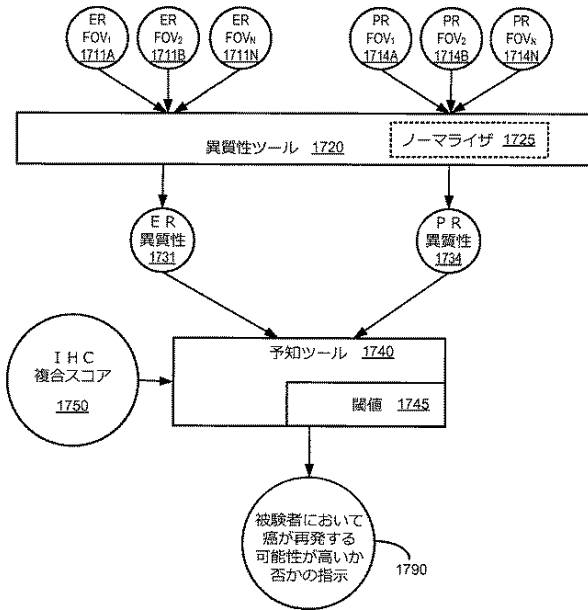
1500

【図16】



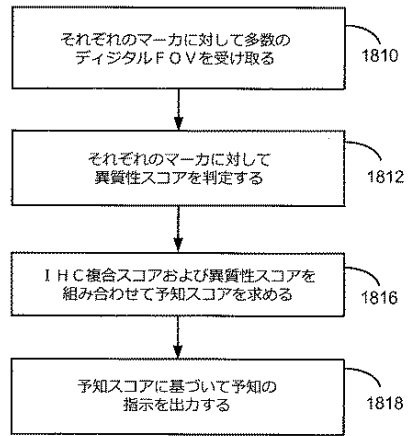
1600

【図 17】



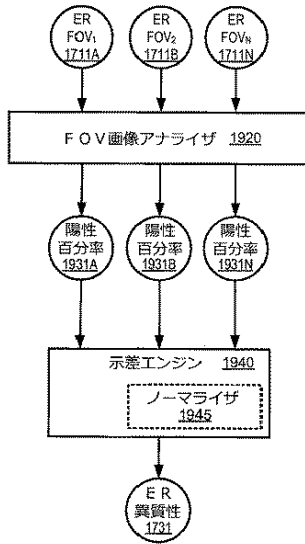
1700

【図 18】



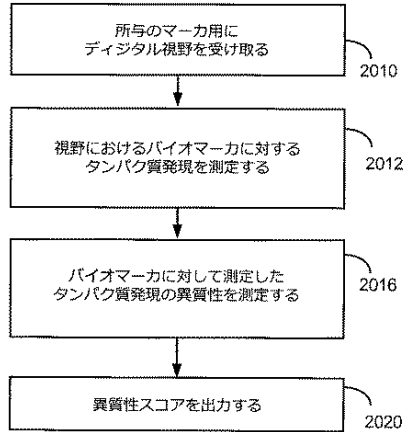
1800

【図 19】



1900

【図 20】



2000

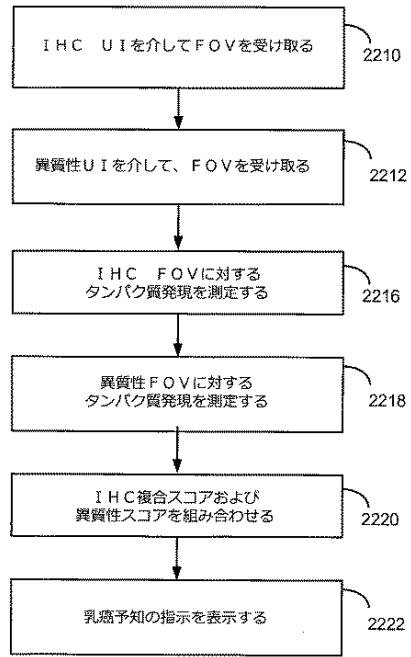
【図 2 1】

FIG. 21



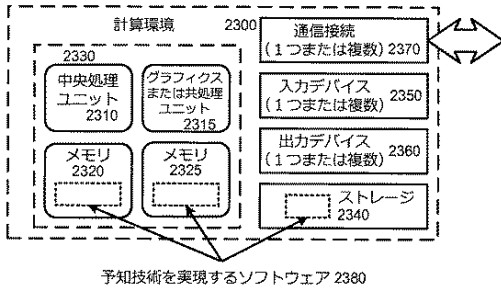
2100

【図 2 2】

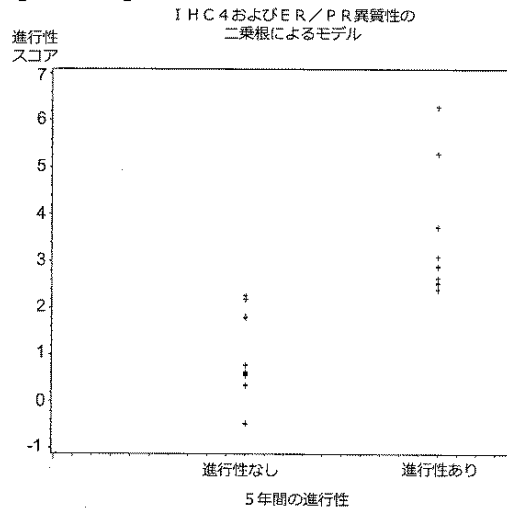


2200

【図 2 3】



【図 2 4】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2013/077295**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-21, 34-52
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/077295

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574 G06F19/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N G06F		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JASON CHRISTIANSEN ET AL: "Validation of IHC4 algorithms for prediction of risk of recurrence in early breast cancer using both conventional and quantitative IHC approaches", 2012 ASCO ANNUAL MEETING PROCEEDINGS, vol. 30, 30 May 2012 (2012-05-30), XP055081113,	1-21
A	the whole document ----- -/--	34-52
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 May 2014		Date of mailing of the international search report 28/05/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jenkins, Gareth

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/077295

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CUZICK J ET AL: "Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, USA, vol. 29, no. 32, 10 November 2011 (2011-11-10), pages 4273-4278, XP002713678, ISSN: 1527-7755, DOI: 10.1200/JCO.2010.31.2835 [retrieved on 2011-10-11] cited in the application	34-38
A	the whole document figure 1 table 2 page 4274	1-21, 39-52
Y	AJAY BASAVANHALLY ET AL: "Multi-field-of-view strategy for image-based outcome prediction of multi-parametric estrogen receptor-positive breast cancer histopathology: Comparison to Oncotype DX", JOURNAL OF PATHOLOGY INFORMATICS, vol. 2, no. 2, 19 January 2012 (2012-01-19), pages 1-9, XP055105277, ISSN: 2153-3539, DOI: 10.4103/2153-3539.92027	34-38
A	the whole document abstract page 2 page 6, column 1	1-21, 39-52
Y	STEVEN J POTTS ET AL: "Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue", LABORATORY INVESTIGATION, vol. 92, no. 9, 16 July 2012 (2012-07-16), pages 1342-1357, XP055105279, ISSN: 0023-6837, DOI: 10.1038/labinvest.2012.91	1-21
A	the whole document abstract page 1343, paragraph 2 page 1348, column 2 page 1349, column 1 figure 2	34-52
	----- -/--	

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/077295
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ENRIQUE DAVILA ET AL: "The Clinical Importance of the Heterogeneity of HER2 neu", CASE REPORTS IN ONCOLOGY, vol. 3, no. 2, 1 January 2010 (2010-01-01) , pages 268-271, XP055105288, ISSN: 1662-6575, DOI: 10.1159/000319020 the whole document abstract -----	1-21, 34-52
A	BISHOP JOHN W ET AL: "MACHINE SCORING OF HER2/NEU IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINS", ANALYTICAL AND QUANTITATIVE CYTOLOGY AND HISTOLOGY, ST. LOUIS, MO, US, vol. 24, no. 5, 1 October 2002 (2002-10-01), pages 257-262, XP008074950, ISSN: 0884-6812 the whole document abstract -----	1-21, 34-52
A	US 2005/136549 A1 (GHOLAP ABHIJEET S [US] ET AL) 23 June 2005 (2005-06-23) the whole document claims 16,22,25 -----	1-21, 34-52
A	M. DOWSETT ET AL: "Relationship Between Quantitative Estrogen and Progesterone Receptor Expression and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2) Status With Recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination Trial", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 26, no. 7, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 1059-1065, XP055118072, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2007.12.9437 the whole document -----	1-21, 34-52

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/077295

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005136549 A1	23-06-2005	US 2005136549 A1	23-06-2005
		WO 2005045734 A1	19-05-2005
-----			

International Application No. PCT/ EP2013/ 077295

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-21, 39-52

A score which combines protein heterogeneity for a biomarker and an IHC combination score.

---

2. claims: 22, 23

Method of claim 22

---

3. claims: 24-33

Method of claim 24

---

4. claims: 34-38

Method of claim 34

---

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 595033056  
ザ クリーブランド クリニック ファウンデーション  
The Cleveland Clinic Foundation  
アメリカ合衆国 44195 オハイオ州, クリーブランド, オウクリッド アベニュー 9500  
9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio, United States of America

(71)出願人 507179346  
ベンタナ メディカル システムズ, インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国アリゾナ州85755, トゥーソン, イースト・イノベーション・パーク・ドライブ 1910

(74)代理人 100140109  
弁理士 小野 新次郎

(74)代理人 100075270  
弁理士 小林 泰

(74)代理人 100101373  
弁理士 竹内 茂雄

(74)代理人 100118902  
弁理士 山本 修

(74)代理人 100173565  
弁理士 末松 亮太

(72)発明者 チュッカ, シュリニヴァス  
アメリカ合衆国カリフォルニア州95129, サンノゼ, オーク・ツリー・ドライブ 1045

(72)発明者 サルカル, アンディヤ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州94086, サニーヴェール, サウス・フェア・オークス・アベニュー 655, アpartment ナンバー1209

(72)発明者 シェンプ, クリスタル  
アメリカ合衆国アリゾナ州85704, トゥーソン, ウェスト・グリーミング・ムーン・レーン 1683

(72)発明者 セルテル, オルケイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州94085, サニーヴェール, エスカロン・アベニュー 1000, アpartment 1-2071

(72)発明者 スィン, シャリニ  
アメリカ合衆国アリゾナ州85750, トゥーソン, ノース・モカシン・トレイル 5741

(72)発明者 タブス, レイモンド  
アメリカ合衆国オハイオ州44023, チャグリン・フォールズ, トール・ツリー・トレイル 17321

(72)発明者 ワリング, ボール・マイケル  
オーストラリア国ヴィクトリア 3126, カンタベリー, ヴィクトリア・アベニュー 22

(72)発明者 ヴィック, ニコラウス

オーストリア国 1160 ウィーン, シュブレンガーシュタイク 8

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA36 FB03

2G059 AA06 BB14 EE07 EE13 FF01 JJ11 KK04 MM01 MM02 MM03

MM05 MM09 PP04

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第6部門第1区分  
 【発行日】平成28年12月28日(2016.12.28)

【公表番号】特表2016-503167(P2016-503167A)  
 【公表日】平成28年2月1日(2016.2.1)  
 【年通号数】公開・登録公報2016-007  
 【出願番号】特願2015-550033(P2015-550033)  
 【国際特許分類】

G 0 1 N 33/574 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/48 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)  
 G 0 1 N 21/27 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/574 A  
 G 0 1 N 33/48 P  
 G 0 1 N 33/53 Y  
 G 0 1 N 33/53 D  
 G 0 1 N 21/27 A

【手続補正書】

【提出日】平成28年11月8日(2016.11.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者において乳癌を予知する方法であって、

エストロゲン受容体(ER)、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)、Ki-67、およびプロゲステロン受容体(PR)の各々用に少なくとも2つの異なる視野(FOV)を、前記被験者から得られた乳癌サンプルにおいて選択するステップであって、前記サンプルが、ER、HER2、Ki-67、およびPRの各々用の抗体が検出可能に標識される、ステップと、

前記選択したFOVの各々において、ER、HER2、Ki-67、およびPRタンパク質発現を測定するステップと、

免疫組織化学(IHC)複合スコアを判定するステップであって、前記免疫組織化学複合スコアは、2つ以上の免疫組織適合性マーカーに基づく予知スコアである、ステップと、

前記選択したFOVの各々において、ERおよびPRタンパク質異質性を測定するステップと、

ERおよびPRの各々に対してタンパク質異質性スコアを判定するステップであって、前記タンパク質異質性スコアは、異なるFOVにおける特定のバイオマーカーのタンパク質発現異質性の量の指示である、ステップと、

前記タンパク質異質性スコアおよび前記IHC複合スコアを組み合わせることによって、出力予知スコアを生成するステップと、

前記出力予知スコアが閾値を満たす場合に、前記被験者における乳癌が進行性である可能性が高いと判定し、前記出力予知スコアが閾値を満たさない場合に、前記被験者における乳癌は進行性でありそうにないと判定するステップと

を含む、方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の方法において、前記乳癌サンプルが早期乳癌サンプルである、方法。

## 【請求項 3】

請求項 2 記載の方法において、前記早期乳癌サンプルが、HER 2 陰性、ER 陽性、およびリンパ節陰性である、方法。

## 【請求項 4】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項記載の方法において、乳癌の 5 年再発リスクを判定する、方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 から 4 までのいずれか一項記載の方法であって、更に、ER、HER 2、Ki-67、および PR の各々に対して検出可能に標識された前記乳癌サンプルのデジタル化画像を得るステップを含む、方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 から 5 までのいずれか一項記載の方法において、ER、HER 2、Ki-67、および PR タンパク質発現を測定するステップが、  
ER、Ki-67、および PR の各々に対する陽性百分率と、  
HER 2 に対する等級スコアと、  
ER に対する H-スコアと、  
を判定するステップを含む、方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 6 までのいずれか一項記載の方法において、IHC 複合スコアを判定するステップが、  

$$IHC4 = 94.7 \times \{-0.100ER_1 - 0.079PR_1 + 0.586HER2 + 0.240 \ln(1 + 10 \times Ki67)\}$$
の式を適用するステップを含み、 $ER_1$  が ER に対する H-スコアであり、 $PR_1$  が PR に対する調節した陽性百分率スコアであり、HER 2 が HER 2 に対する等級スコアであり、Ki 67 が Ki-67 に対する陽性百分率である、方法。

## 【請求項 8】

請求項 1 から 7 までのいずれか一項記載の方法において、ER、HER 2、Ki-67、および PR タンパク質異質性を測定するステップが、ER、HER 2、Ki-67、および PR の各々に対する可変性メトリック (VM) を判定するステップを含み、ここで、  

$$VM = STD(PP(FS_1), PP(FS_2), \dots, PP(FS_N))$$
であり、PP(FS) が、各視野 FS に対する陽性百分率である、方法。

## 【請求項 9】

請求項 1 から 8 までのいずれか一項記載の方法において、ER および PR の各々に対してタンパク質異質性スコアを判定するステップが、次の式

## 【数 1】

$$\begin{cases} \alpha * \frac{VM}{0.05}, S < 10\% \\ \alpha * \frac{VM}{5}, otherwise \end{cases} \text{ wherein}$$

を使用するステップを含む、方法。

## 【請求項 10】

請求項 1 から 9 までのいずれか一項記載の方法において、HER 2 に対するタンパク質異質性スコアを判定するステップが、次の式

## 【数 2】

$$H = \sum_{i,j} \|P(FS_i) - P(FS_j)\|$$

を使用するステップを含み、P が各視野の等級スコアである、方法。

**【請求項 1 1】**

請求項 1 から 1 0 までのいずれか一項記載の方法において、出力予知スコアを生成するステップが、

出力予知スコア = 免疫組織化学複合係数 × IHC4 + 異質性係数 × 複合異質性スコア

の式を使用するステップを含み、前記複合異質性スコアが、(ER異質性スコア + PR異質性スコア) の二乗根に等しい、方法。

**【請求項 1 2】**

請求項 1 から 1 1 までのいずれか一項記載の方法において、

前記免疫組織化学複合係数が 0.03114 に等しく、前記異質性係数が 1.95119 に等しい、方法。

**【請求項 1 3】**

請求項 1 から 1 2 までのいずれか一項記載の方法において、前記ステップの 1 つ以上が、適切にプログラミングされたコンピュータによって実行される、方法。

**【請求項 1 4】**

請求項 1 から 1 3 までのいずれか一項記載の方法において、乳癌サンプルにおいて少なくとも 2 つの異なる FOV を選択する前記ステップが、病理医によって実行される、方法

。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016503167A5</a>	公开(公告)日	2016-12-28
申请号	JP2015550033	申请日	2013-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	墨尔本大学 克里夫兰诊所基金会 文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	墨尔本大学 克利夫兰诊所基金会 本塔纳医疗系统公司		
[标]发明人	チュッカシュリニヴァス サルカルアニンディヤ シェンプクリスタル セルテルオルケイ スインシャリニ タブスレイモンド ワリングポールマイケル ヴィックニコラウス		
发明人	チュッカ,シュリニヴァス サルカル,アニンディヤ シェンプ,クリスタル セルテル,オルケイ スイン,シャリニ タブス,レイモンド ワリング,ポール・マイケル ヴィック,ニコラウス		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 G01N21/27		
CPC分类号	G16B30/00 G01N33/57415 G01N2800/52 G01N2800/54 G06F19/321 G16H50/30		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N21/27.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FB03 2G059/AA06 2G059/BB14 2G059/EE07 2G059/EE13 2G059/FF01 2G059/JJ11 2G059/KK04 2G059/MM01 2G059/MM02 2G059/MM03 2G059/MM05 2G059/MM09 2G059/PP04		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	61/747148 2012-12-28 US		
其他公开文献	JP2016503167A JP6405319B2		

摘要(译)

可以计算出组织样本中生物标志物的异质性。 异质性评分可以与免疫组织化学综合评分相结合，以提供乳腺癌复发预后。 异质性可以基于根据样品中有多少细胞染色阳性的多个生物标志物确定阳性百分比。 可以计算免疫组化综合评分。 成像工具可以支持数字病理学家工作流程，该工作流程包括指定组织样本图像中的视野。 可以基于视野计算异质性度量，并将其与免疫组织化学综合评分相结合以生成乳腺癌复发预测评分。 [选择图]图2

