



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108348588 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680062090.4

金周荣

(22)申请日 2016.10.21

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

(30)优先权数据

62/245,853 2015.10.23 US

62/301,035 2016.02.29 US

代理人 林强

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.23

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

G12Q 1/6886(2018.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/058277 2016.10.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/070581 EN 2017.04.27

(71)申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 詹尼弗·波尔德奥克斯

纳温·达卡帕加里 泰·特兰

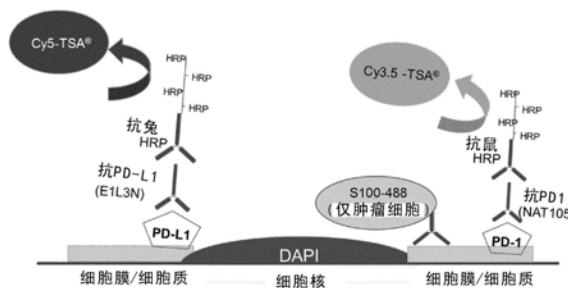
权利要求书7页 说明书40页 附图28页

(54)发明名称

用于导出视野中呈现的选定细胞的生物标志物阳性百分比值的方法

(57)摘要

本发明部分涉及用于导出在来自癌症患者的组织样本的视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比(%) (PBP)值的方法。PBP值可以指示患者对免疫治疗的应答。



1. 一种导出视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比(%) (PBP) 值的方法, 包括:

(i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像, 并将所述第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建所述视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

(ii) 构建表示所述视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

(iii) 可选地, 构建表示所述视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模;

(iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模, 所述第四掩模包括表示所述视野中亦表达所述亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

(v) 可选地, 以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模, 所述第五掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的所述第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的荧光信号;

(vi) 通过将所述第四掩模的总面积除以所述第一掩模的总面积来导出针对表达所述亚组生物标志物的所有细胞的PBP值;

(vii) 可选地, 以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模, 所述第六掩模包括表示所述视野中表达所述亚组生物标志物和所关注的所述第一生物标志物的所有细胞的所述第一亚组的荧光信号;

(viii) 可选地, 通过将所述第六掩模的总面积除以所述第四掩模的所述总面积来导出针对表达所述亚组生物标志物和所关注的所述第一生物标志物的所有细胞的所述第一亚组的PBP值。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 执行所列举的所有可选步骤。

3. 根据权利要求1所述的方法, 还包括:

(ix) 构建表示所述视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

(x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第七掩模, 所述第八掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的所述第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号;

(xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第八掩模, 所述第九掩模包括表示所述视野中表达所述亚组生物标志物和所关注的所述第二生物标志物的的所有细胞的所述第二亚组的荧光信号;

(xii) 通过将所述第九掩模的总面积除以所述第四掩模的所述总面积来导出针对表达所述亚组生物标志物和所关注的所述第二生物标志物的所有细胞的所述第二亚组的PBP值。

4. 根据权利要求1所述的方法, 还包括:

(ix) 构建表示所述视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

(x) 以提供第八掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模, 所述第八掩模包括表示所述视野中不表达所述亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

(xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第七掩模和所述第八掩模, 所述第九掩模包括

表示所述视野中表达所关注的所述第二生物标志物但不表达所述亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;以及

(xii) 通过将所述第九掩模的总面积除以所述第八掩模的总面积来导出针对表达所关注的所述第二生物标志物但不表达所述亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所关注的所述第一生物标志物包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所关注的所述第一生物标志物包括选自PD-L1、半乳凝素9、和MHC的生物标志物。

7. 根据权利要求4所述的方法,其中,所关注的所述第二生物标志物包括选自PD-1、TIM-3、和TCR的生物标志物。

8. 根据权利要求4所述的方法,其中,所关注的所述第二生物标志物不同于所关注的所述第一生物标志物并且包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括肿瘤细胞。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括非肿瘤细胞。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括T细胞。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述T细胞表达CD3。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述T细胞表达CD8。

14. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述T细胞表达CD4。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述亚组生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述亚组生物标志物仅在非肿瘤细胞中表达。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述亚组生物标志物在T细胞中表达。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述亚组生物标志物包括CD3。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述亚组生物标志物包括CD19。

20. 根据权利要求2所述的方法,其中,所关注的所述第一生物标志物包括Ki67,并且所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括CD8阳性细胞。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述总面积是以像素为单位测量的。

22. 一种监测被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者的病情进展的方法,包括:

(i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点从癌症患者采集的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值(PBP)以获得至少第一PBP值和至少第二PBP值;

(ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述变化是所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加,所述增加指示所述免疫治疗的积极效果。

25. 根据权利要求22所述的方法,其中所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。

26. 一种监测被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者的病情进展的方法,包括:

(i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点从癌症患者采集的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值 (PBP) 以获得至少第一PBP值和至少第二PBP值;

(ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述变化是指示所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加。

29. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。

30. 一种导出视野中呈现的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法,包括:

(i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将所述第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建所述视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

(ii) 构建表示所述视野中呈现的表达肿瘤生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

(iii) 以提供第三掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模,所述第三掩模包括表示所述视野中所有肿瘤细胞的荧光信号;

(iv) 构建表示所述视野中呈现的表达所关注的生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第四掩模;

(v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第三掩模和所述第四掩模,所述第五掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的所述生物标志物的所有肿瘤细胞的荧光信号;以及

(vi) 通过将所述第五掩模的总面积除以所述第三掩模的总面积来导出针对表达所关注的所述生物标志物的所有肿瘤细胞的PBP值。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中,所关注的所述生物标志物包括选自由PD-L1、半乳凝素9、和MHC组成的组中的生物标志物。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中,所述视野还包括非肿瘤细胞。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述非肿瘤细胞包括免疫细胞和基质细胞。

34. 根据权利要求30所述的方法,其中,所述总面积是以像素为单位测量的。

35. 一种导出视野中呈现的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法,

包括：

(i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像，并将所述第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建所述视野中呈现的所有细胞的第一掩模；

(ii) 构建表示所述视野中呈现的表达肿瘤生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模；

(iii) 以提供第三掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模，所述第三掩模包括表示所述视野中所有非肿瘤细胞的荧光信号；

(iv) 构建表示所述视野中呈现的表达所关注的生物标志物的所有区域的荧光信号的第四掩模；

(v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第三掩模和所述第四掩模，所述第五掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的所述生物标志物的所有非肿瘤细胞的荧光信号；以及

(vi) 通过将所述第五掩模的总面积除以所述第三掩模的总面积来导出针对表达所关注的所述生物标志物的所有非肿瘤细胞的PBP值。

36. 根据权利要求35所述的方法，其中，所关注的所述生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。

37. 根据权利要求35所述的方法，其中，所关注的所述生物标志物包括选自由CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。

38. 根据权利要求35所述的方法，其中，所述非肿瘤细胞包括免疫细胞和基质细胞。

39. 根据权利要求35所述的方法，其中，所述非肿瘤细胞包括骨髓细胞。

40. 一种导出视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法，包括：

(i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像，并将所述第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建所述视野中呈现的所有细胞的第一掩模；

(ii) 构建表示所述视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模；

(iii) 可选地，构建表示所述视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模；

(iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模，所述第四掩模包括表示所述视野中亦表达所述亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；

(v) 可选地，以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模，所述第五掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的所述第一生物标志物的所有细胞的荧光信号；

(vi) 通过将所述第四掩模的总面积除以所述第一掩模的总面积来导出针对表达所述亚组生物标志物的所有细胞的PBP值；

(vii) 可选地，以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模，所述第六

掩模包括表示所述视野中表达下列各项的所有细胞的荧光信号：

- (a) 所述亚组生物标志物和所关注的所述第一生物标志物；或
 - (b) 其中不存在所关注的所述第一生物标志物的所述亚组生物标志物；
- 以及

(viii) 可选地，通过将所述第六掩模的总面积除以所述第四掩模的总面积来导出针对表达 (a) 所述亚组生物标志物和所关注的所述第一生物标志物或 (b) 其中不存在所关注的所述第一生物标志物的所述亚组生物标志物的所有细胞的第一亚组的PBP的值。

41. 根据权利要求40所述的方法，其中，执行所列举的所有可选步骤。

42. 根据权利要求40所述的方法，还包括：

(ix) 构建表示所述视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模；

(x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第七掩模，所述第八掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的所述第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号；

(xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第八掩模，所述第九掩模包括表示所述视野中表达所述亚组生物标志物和所关注的所述第二生物标志物的所有细胞的所述第二亚组的荧光信号；

(xii) 通过将所述第九掩模的总面积除以所述第四掩模的所述总面积来导出针对表达所述亚组生物标志物和所关注的所述第二生物标志物的所有细胞的所述第二亚组的PBP值。

43. 根据权利要求40所述的方法，还包括：

(ix) 构建表示所述视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模；

(x) 以提供第八掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模，所述第八掩模包括表示所述视野中不表达所述亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；

(xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第七掩模和所述第八掩模，所述第九掩模包括表示所述视野中表达所关注的所述第二生物标志物但不表达所述亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；以及

(xii) 通过将所述第九掩模的总面积除以所述第八掩模的总面积来导出针对表达所关注的所述第二生物标志物但不表达所述亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

44. 根据权利要求40所述的方法，还包括：

(ix) 构建表示所述视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模；

(x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第六掩模和所述第七掩模，所述第八掩模包括表示表达下列各项的所有细胞的荧光信号：

(a) 所述视野中的所述亚组生物标志物、所关注的所述第一生物标志物、以及所关注的所述第二生物标志物；

(b) 所述视野中的其中不存在所关注的所述第二生物标志物的所述亚组生物标志物和所关注的所述第一生物标志物；或

(c) 所述视野中的其中不存在所关注的所述第一生物标志物的所述亚组生物标志物和

所关注的所述第二生物标志物；

以及

(xii) 通过将所述第八掩模的总面积除以所述第四掩模的所述总面积来导出针对表达所关注的所述第一生物标志物或所关注的所述第二生物标志物或它们的组合和所述亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

45. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所关注的所述第一生物标志物包含选自CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。

46. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所关注的所述第一生物标志物包含选自PD-L1、半乳凝素9、和MHC的生物标志物。

47. 根据权利要求43所述的方法, 其中, 所关注的所述第二生物标志物包括选自PD-1、TIM-3、和TCR的生物标志物。

48. 根据权利要求43所述的方法, 其中, 所关注的所述第二生物标志物不同于所关注的所述第一生物标志物并且包括选自CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。

49. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括肿瘤细胞。

50. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括非肿瘤细胞。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中, 所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括T细胞。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中, 所述T细胞表达CD3。

53. 根据权利要求51所述的方法, 其中, 所述T细胞表达CD8。

54. 根据权利要求51所述的方法, 其中, 所述T细胞表达CD4。

55. 根据权利要求50所述的方法, 其中, 所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括骨髓细胞。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中, 所述骨髓细胞是骨髓来源的抑制性细胞。

57. 根据权利要求55所述的方法, 其中, 所述骨髓细胞是肿瘤相关的巨噬细胞。

58. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述亚组生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。

59. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述亚组生物标志物仅在非肿瘤细胞中表达。

60. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述亚组生物标志物在T细胞中表达。

61. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述亚组生物标志物包括CD3。

62. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述亚组生物标志物包括CD19。

63. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述亚组生物标志物在骨髓细胞中表达。

64. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述亚组生物标志物在骨髓来源的抑制细胞中

表达。

65. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述亚组生物标志物在肿瘤相关的巨噬细胞中表达。

66. 根据权利要求41所述的方法, 其中, 所关注的所述第一生物标志物包括Ki67, 并且所述视野中所有细胞的所述第一亚组包括CD8阳性细胞。

67. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 所述总面积是以像素为单位测量的。

用于导出视野中呈现的选定细胞的生物标志物阳性百分比值的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有于2015年10月23日递交的美国临时专利申请No. 62/245,853和于2016年2月29日递交的美国临时专利申请No. 62/301,035的权益,所述两个申请的全部公开通过引用被结合于此。

背景技术

[0003] 本发明总体涉及癌症治疗领域。

发明内容

[0004] 本文在一个方面中公开了导出视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组(subset)的生物标志物阳性百分比(%) (PBP)值的方法,包括:

[0005] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0006] (ii) 构建表示视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0007] (iii) 可选地,构建表示视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模;

[0008] (iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模,所述第四掩模包括表示视野中亦表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0009] (v) 可选地,以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模,所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的第一生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0010] (vi) 通过将第四掩模的总面积除以第一掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值;

[0011] (vii) 可选地,以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模,所述第六掩模包括表示视野中表达下列各项的所有细胞的荧光信号:

[0012] (a) 亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物;或

[0013] (b) 其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物;

[0014] 以及

[0015] (viii) 可选地,通过将第六掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达(a) 亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物或(b) 其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物的所有细胞的第一亚组的PBP的值。

[0016] 在一些实施例中,执行所列举的所有可选步骤。在一些实施例中,该方法还包括:

[0017] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

[0018] (x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第七掩模,所述第八掩模

包括表示视野中亦表达所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号；

[0019] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第八掩模,所述第九掩模包括表示视野中表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号；

[0020] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的PBP值；

[0021] 在一些实施例中,该方法还包括：

[0022] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模；

[0023] (x) 以提供第八掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模,所述第八掩模包括表示视野中不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；

[0024] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第七掩模和所述第八掩模,所述第九掩模包括表示视野中表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；以及

[0025] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第八掩模的总面积来导出针对表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0026] 在一些实施例中,该方法还包括：

[0027] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模；

[0028] (x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第六掩模和所述第七掩模,所述第八掩模包括表示表达下列各项的所有细胞的荧光信号：

[0029] (a) 视野中的亚组生物标志物、所关注的第一生物标志物、以及所关注的第二生物标志物；

[0030] (b) 视野中其中不存在所关注的第二生物标志物的亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物；或

[0031] (c) 视野中其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物；

[0032] 以及

[0033] (xii) 通过将第八掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达所关注的第一生物标志物或所关注的第二生物标志物或它们的组合以及亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0034] 在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括选自CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括选自

PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。在一些实施例中，所关注的第一生物标志物包括选自PD-L1、半乳凝素9、和MHC的生物标志物。在一些实施例中，所关注的第二生物标志物包括选自PD-1、TIM-3、和TCR的生物标志物。在一些实施例中，所关注的第二生物标志物不同于所关注的第一生物标志物并且包括选自CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。在一些实施例中，所关注的第二生物标志物不同于所关注的第一生物标志物并且包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。在一些实施例中，视野中所有细胞的第一亚组包括肿瘤细胞。在一些实施例中，视野中所有细胞的第一亚组包括非肿瘤细胞。在一些实施例中，视野中所有细胞的第一亚组包括T细胞。在一些实施例中，T细胞表达CD3。在一些实施例中，T细胞表达CD8。在一些实施例中，T细胞表达CD4。在一些实施例中，视野中所有细胞的第一亚组包括骨髓细胞。在另一实施例中，骨髓细胞是骨髓来源的抑制性细胞。在又一实施例中，骨髓细胞是肿瘤相关的巨噬细胞。在一些实施例中，亚组生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。在一些实施例中，亚组生物标志物仅在非肿瘤细胞中表达。在一些实施例中，亚组生物标志物在T细胞中表达。在一些实施例中，亚组生物标志物包括CD3。在一些实施例中，亚组生物标志物包括CD19。在一些实施例中，亚组生物标志物在骨髓细胞中表达。在一些实施例中，亚组生物标志物在骨髓来源的抑制性细胞中表达。在一些实施例中，亚组生物标志物在肿瘤相关的巨噬细胞中表达。在一些实施例中，所关注的第一生物标志物包括Ki67，并且视野中所有细胞的第一亚组包括CD8阳性细胞。在一些实施例中，以像素为单位来测量总面积。

[0035] 本文在另一方面公开了导出视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性 (PBP) 百分比值的方法，包括：

[0036] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像，并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模；

[0037] (ii) 构建表示视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模；

[0038] (iii) 可选地，构建表示视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模；

[0039] (iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模，所述第四掩模包括表示视野中亦表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；

[0040] (v) 可选地，以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模，所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的荧光信号；

[0041] (vi) 通过将第四掩模的总面积除以第一掩模的总面积来导出针对表达亚组生物

标志物的所有细胞的PBP值；

[0042] (vii) 可选地, 以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模, 所述第六掩模包括表示视野中表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的荧光信号; 以及

[0043] (viii) 可选地, 通过将第六掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的PBP值。

[0044] 在一些实施例中, 执行所列举的所有可选步骤。在一些实施例中, 该方法还包括:

[0045] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

[0046] (x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第七掩模, 所述第八掩模包括表示视野中亦表达该所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号;

[0047] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第八掩模, 所述第九掩模包括表示视野中表达该亚组生物标志物和该所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号;

[0048] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的PBP值;

[0049] 在一些实施例中, 该方法还包括:

[0050] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

[0051] (x) 以提供第八掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模, 所述第八掩模包括表示视野中不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0052] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第七掩模和所述第八掩模, 所述第九掩模包括表示视野中表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号; 以及 (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0053] 在一些实施例中, 所关注的第一生物标志物包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。在一些实施例中, 所关注的第一生物标志物包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。在一些实施例中, 所关注的第一生物标志物包括选自PD-L1、半乳凝素9、和MHC的生物标志物。在一些实施例中, 所关注的第二生物标志物包括选自PD-1、TIM-3、和TCR的生物标志物。在一些实施例中, 所关注的第二生物标志物不同于所关注的第一生物标志物并且包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。在一些实施例中, 视野中所有细胞的第一亚组包括肿瘤细胞。在一些实施例中, 视野中所有细胞的第一亚组包括非

肿瘤细胞。在一些实施例中,视野中所有细胞的第一亚组包括T细胞。在一些实施例中,T细胞表达CD3。在一些实施例中,T细胞表达CD8。在一些实施例中,T细胞表达CD4。在一些实施例中,亚组生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。在一些实施例中,亚组生物标志物仅在非肿瘤细胞中表达。在一些实施例中,亚组生物标志物在T细胞中表达。在一些实施例中,亚组生物标志物包括CD3。在一些实施例中,亚组生物标志物包括CD19。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括Ki67,并且视野中所有细胞的所述第一亚组包括CD8阳性细胞。在一些实施例中,以像素为单位来测量总面积。

[0054] 本文在另一方面公开了监测被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者的病情进展的方法,包括:

[0055] (i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点取自癌症患者的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值(PBP)以获得至少第一PBP值和至少第二PBP值;

[0056] (ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

[0057] 在一些实施例中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。在一些实施例中,所述变化是指示所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加。在一些实施例中,所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。

[0058] 本文在另一方面公开了监测被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者的病情进展的方法,包括:

[0059] (i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点从癌症患者采集的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值(PBP)以获得至少第一PBP值和至少第二PBP值;

[0060] (ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

[0061] 在一些实施例中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。在一些实施例中,所述变化是指示所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加。在一些实施例中,所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。

[0062] 本文在另一方面公开了导出视野中呈现的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比(PBP)值的方法,包括:

[0063] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0064] (ii) 构建表示视野中呈现的表达肿瘤生物标志物物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0065] (iii) 以提供第三掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模,所述第三掩模包括表示视野中所有肿瘤细胞的荧光信号;

[0066] (iv) 构建表示视野中呈现的表达所关注的生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第四掩模；

[0067] (v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第三掩模和所述第四掩模，所述第五掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的荧光信号；以及

[0068] (vi) 通过将第五掩模的总面积除以第三掩模的总面积导出针对表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的PBP值。

[0069] 在一些实施例中，所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、半乳凝素9、和MHC组成的组的生物标志物。在一些实施例中，视野还包括非肿瘤细胞。在一些实施例中，非肿瘤细胞包括免疫细胞和基质细胞。在一些实施例中，以像素为单位来测量总面积。

[0070] 本文在另一方面公开了导出视野中呈现的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法，包括：

[0071] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像，并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模；

[0072] (ii) 构建表示视野中呈现的表达肿瘤生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模；

[0073] (iii) 以提供第三掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模，所述第三掩模包括表示视野中所有非肿瘤细胞的荧光信号；

[0074] (iv) 构建表示视野中呈现的表达所关注的生物标志物的所有区域的荧光信号的第四掩模；

[0075] (v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第三掩模和所述第四掩模，所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的荧光信号；以及

[0076] (vi) 通过将第五掩模的总面积除以第三掩模的总面积导出针对表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的PBP值。

[0077] 在一些实施例中，所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组的生物标志物。在一些实施例中，所关注的第一生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组的生物标志物。在一些实施例中，所关注的生物标志物包括选自CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组的生物标志物。在一些实施例中，非肿瘤细胞包括免疫细胞和基质细胞。在一些实施例中，非肿瘤细胞包括骨髓细胞。

附图说明

[0078] 图1示出了在制备用于成像和分析的组织样品中使用的抗体和检测试剂的概况的非限制性示例。

- [0079] 图2a示出了图像内的用DAPI检测到的所有细胞核的非限制性示例。
- [0080] 图2b示出了图2a的图像内的所有细胞的扩大二元掩模的非限制性示例。
- [0081] 图3a示出了用488染料检测到的S100的图像的非限制性示例。
- [0082] 图3b示出了图3a的图像内的所有肿瘤区域的二元掩模的非限制性示例。
- [0083] 图3c示出了图3a的图像内的所有肿瘤细胞的掩模的非限制性示例。
- [0084] 图3d示出了图3a的图像内的所有非肿瘤细胞的掩模的非限制性示例。
- [0085] 图4a示出了用Cy[®]5检测到的PD-L1的图像的非限制性示例。
- [0086] 图4b示出了图4a的图像内的所有PD-L1阳性细胞的二元掩模的非限制性示例。
- [0087] 图4c示出了图4a图像内的所有PD-L1阳性肿瘤细胞的掩模的非限制性示例。
- [0088] 图4d示出了图4a图像内的所有PD-L1阳性非肿瘤细胞的掩模的非限制性示例。
- [0089] 图5a示出了用Cy[®]3.5检测到的PD-1的图像的非限制性示例。
- [0090] 图5b示出了图5a的图像内的所有PD-1阳性非肿瘤细胞的二元掩模的非限制性示例。
- [0091] 图6a示出了按照增加的PD-L1表达进行分类的在21名黑素瘤患者的组织样品中表达PD-L1的所有细胞的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的非限制性示例。
- [0092] 图6b示出了按照增加的PD-1表达进行分类的在相同的21名黑素瘤患者的组织样品中表达PD-1的所有非肿瘤细胞的PBP值的非限制性示例。
- [0093] 图7示出了与PD-L1阳性细胞 (红色)、PD-1-阳性细胞 (黄色)、所有肿瘤细胞 (绿色)、和针对免疫治疗为阳性应答者的所有细胞 (蓝色) 相对应的荧光信号的掩模的非限制性示例。
- [0094] 图8示出了与PD-L1阳性细胞 (红色), PD-1阳性细胞 (黄色), 所有肿瘤细胞 (绿色) 和针对免疫治疗为阴性应答者的所有细胞 (蓝色) 相对应的荧光信号的掩模的非限制性示例。
- [0095] 图9示出了38名非小细胞肺癌患者的针对PD-L1和PD-1的生物标志物阳性 (PBP) 百分比值。
- [0096] 图10示出了通过自动细胞计数方法确定的PD-L1阳性百分比与本文所述方法确定的PD-L1阳性百分比的比较。
- [0097] 图11是根据示例性实施例的用于导出生物标志物阳性值的过程的流程图。
- [0098] 图12是根据第二示例性实施例的用于导出生物标志物阳性值的过程的流程图。
- [0099] 图13是根据示例性实施例的被配置为导出生物标志物阳性值的控制器的框图。
- [0100] 图14是根据示例性实施例的用于导出生物标志物阳性值的图像处理步骤的流程图。
- [0101] 图15示出了在制备用于成像和分析的组织样品中使用的抗体和检测试剂的概况的另一非限制性示例。
- [0102] 图16a示出了用DAPI检测到的图像内的所有细胞核的非限制性示例。
- [0103] 图16b示出了图16a的图像内的所有细胞的扩大二元掩模的非限制性示例。
- [0104] 图17a示出了用Cy[®]5检测到的PD-1的图像的非限制性示例。
- [0105] 图17b示出了图17a的图像内的所有PD-1阳性细胞的二元掩模的非限制性示例。

- [0106] 图18a示出了用Cy[®]3检测到的CD3的图像的非限制性示例。
- [0107] 图18b示出了图18a的图像内的所有CD3阳性细胞的二元掩模的非限制性示例。
- [0108] 图19示出了PD-1和CD3双阳性的所有细胞的二元掩模的非限制性示例。
- [0109] 图20a示出了对来自DLBCL患者 (n=43) 的组织样品中CD3+T细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0110] 图20b示出了对来自DLBCL患者 (n=43) 的组织样品中CD3+/PD1+T细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0111] 图21a示出了对NSCLC、胃癌、和黑素瘤组织上的CD25的定量评估的非限制性示例。
- [0112] 图21b示出了对NSCLC、胃癌、和黑素瘤组织上的FoxP3的定量评估的非限制性示例。
- [0113] 图22示出了对NSCLC、胃癌、和黑素瘤组织上的CD25+/FoxP3+T细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0114] 图23a示出了对NSCLC、胃癌、和黑素瘤组织上的CD4的定量评估的非限制性示例。
- [0115] 图23b示出了对NSCLC、胃癌、和黑素瘤组织上的CD8的定量评估的非限制性示例。
- [0116] 图24a示出了对黑素瘤组织上的CD11b+/HLA-DR-表型 (phenotype) 的定量评估的非限制性示例。
- [0117] 图24b示出了对黑素瘤组织上的CD11b+/IDO-1+/HLA-DR-表型的定量评估的非限制性示例。
- [0118] 图25a示出了对黑素瘤组织上的IDO-1+/HLA-DR+表型的定量评估的非限制性示例。
- [0119] 图25b示出了对黑素瘤组织上的CD11b+/IDO-1+/HLA-DR+表型的定量评估的非限制性示例。
- [0120] 图26a示出了对NSCLC组织上的CD11b+/CD33+/ARG1+表型的定量评估的非限制性示例。
- [0121] 图26b示出了对NSCLC组织上的CD11b+/HLA-DR+/IDO-1+表型的定量评估的非限制性示例。
- [0122] 图27示出了对NSCLC组织上的CD11b+/HLA-DR-/IDO-1+表型的定量评估的非限制性示例。
- [0123] 图28示出了对转移性黑素瘤组织上的CD8+Ki67+T细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0124] 图29a示出了转移性黑素瘤组织上的CD163+细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0125] 图29b示出了转移性黑素瘤组织上的CD68+细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0126] 图29c示出了对转移性黑素瘤组织上的CD163+CD68+细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0127] 图30a示出了对DLBCL和NET组织上的LAG-3阳性T细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0128] 图30b示出了对DLBCL和NET组织上的TIM-3阳性T细胞的定量评估的非限制性示例。
- [0129] 图31a示出了对黑素瘤组织上的T细胞中CTLA-4的定量评估的非限制性示例。

[0130] 图31b示出了对黑素瘤组织上的CD80的定量评估的非限制性示例。

[0131] 图32示出了基于其免疫情境的代表性肿瘤分类。

具体实施方式

[0132] 下文描述各种实施例。应该注意的是,这些具体实施例并非旨在作为详尽的描述或作为对本文讨论的更广泛方面的限制。结合特定实施例描述的一个方面不一定限于该实施例并且可以用任何其他(一个或多个)实施例来实践。

[0133] 本文所使用的“大约”将被本领域普通技术人员所理解并且将根据使用该术语的上下文而在一定程度上变化。如果存在对于本领域普通技术人员而言并不清楚的术语的使用,考虑到使用该术语的上下文,“大约”将意指达到特定术语的正负10%。

[0134] 在描述元素的上下文中(特别是在所附权利要求的上下文中)中,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则术语“一”、“一个”和“该”以及类似表达的使用将被解释为涵盖单数和复数。除非本文另有说明,否则本文中的值的范围的详述仅旨在用作单独参考落在范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独值被并入到本说明书中,如同在本文中单独列举一样。除非本文另有说明或者与上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序执行。除非另有说明,否则对本文提供的任何和所有示例或示例性语言(例如“诸如”)的使用仅旨在更好地阐明实施例,并且不对权利要求的范围构成限制。说明书中的语言不应被解释为将任何未要求保护的元素表示为必需的。

[0135] 术语“治疗”或“诊治”是指以达到统计学上明显的程度或达到本领域技术人员可检测的程度的量、方式或模式给予治疗来有效改善与疾病相关的状况、症状、或参数或预防疾病恶化。有效的量、方式或模式可以根据患者的不同而有所不同,并且可以根据患者进行量身定制。

[0136] 肿瘤可以基于其免疫情境被分类为“热”(发炎的)或“冷”(未发炎的)(见图32)。尽管能预期到患有热肿瘤的患者可能对某些免疫治疗有应答,并且可能会比患有冷肿瘤的患者活得更长,但本领域技术人员以前并不清楚哪些生物标志物与应答和存活相关。

[0137] 为了解决这个问题,本文描述的方法的一些实施例通过免疫衰竭生物标志物(例如,PD-1和PD-L1)的表达来帮助辨识对一种或多种免疫治疗应答的癌症患者以及通过能够引起免疫抑制的已知细胞类型(例如,CD11b、HLA-DR、IDO-1、ARG1)的出现或缺少MHC I类表达的高增殖性肿瘤细胞(例如,Ki67+、B2M-)的出现来帮助辨识无应答的癌症患者(非应答者)。在一些实施例中,本文所述的方法包括基于特异性免疫抑制或激活签名的多重免疫组织化学测定法(例如,多重FIHC测定法)的使用。下表示出了基于特异性免疫抑制或激活签名的多重FIHC测定的非限制性示例。

[0138]

目标	多重 FIHC 测定
T 细胞抑制	CD3 + PD-1 + PD-L1 肿瘤标志物 (CK 或 S100) + PD-1 + PD-L1 CD3 + LAG3 + TIM3 CD3 + CD25 + FOXP3 CTLA-4 + CD80
骨髓抑制	CD11b + HLA-DR(-) IDO-1(TAM) CD11b + HLA-DR (+) ARG1 (fMDSC)
T 细胞激活	CD3 + CD8 + Ki67 CD3 + CD8 + 颗粒酶 B
免疫细胞枚举	CD3 + CD4 + CD8 肿瘤标志物(CK or S100) + CD16 + CD56 肿瘤标志物(CK or S100) + CD68 + CD163
辨识冷肿瘤	肿瘤标志物(CK or S100) + CD3(-)B2M (-) Ki67 (+)

[0139] 在一个方面中,本文提供的是用于导出在取自癌症患者的组织样品的视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比 (%) (PBP) 值的方法。

[0140] 在一些实施例中,可以使用对特定生物标志物具有亲和性的多个荧光标记对样品染色。经染色的样品的数字图像可被获取,并且可基于荧光标记的位置来进一步对图像进行分析。可基于表达所关注的第一生物标志物的细胞的数目来区分视野的优先次序,而非进行全图像分析。然后可以针对荧光信号来对预定数目的视野进一步分析。在一些实施例中,使用四种不同类型的荧光标记来生成对应于所关注的第一生物标志物的荧光信号的图像和对应于所关注的第二生物标志物的荧光信号的图像以及对应于由所有细胞表达的生物标志物的荧光信号的图像以及对应于亚组生物标志物(例如,由肿瘤细胞表达的生物标志物)的荧光信号的图像。在另外的实施例中,操控荧光信号的图像以生成与图像内的细胞相对应的荧光信号的一个或多个掩模。在一些实施例中,荧光信号的一个或多个掩模包括选自包括以下各项的中的一者或多者:图像内的所有细胞的掩模、图像内的表达亚组生物标志物的所有细胞(例如,所有肿瘤细胞)的掩模、图像内的不表达亚组生物标志物的所有细胞(例如,所有非肿瘤细胞)的掩膜、图像内的表达所关注的第一生物标志物的所有细胞的掩膜、以及图像内的表达所关注的第二生物标志物的所有细胞的掩膜。这些掩模的面积可以用于导出PBP值。在一些实施例中,导出针对表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。在一些实施例中,导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的PBP值。在一些实施例中,导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的PBP值。在一些实施例中,导出针对表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的第二亚组的PBP值。

[0141] 因此,在一些实施例中,本文所提供的是用于导出视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法,包括:

[0142] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0143] (ii) 构建表示视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0144] (iii) 可选地,构建表示视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模;

[0145] (iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模,所述第四掩模包括表示视野中亦表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0146] (v) 可选地,以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模,所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的第一生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0147] (vi) 通过将第四掩模的总面积除以第一掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值;

[0148] (vii) 可选地,以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模,所述第六掩模包括表示视野中的表达下列各项的所有细胞的荧光信号:

[0149] (a) 亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物;或

[0150] (b) 其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物;

[0151] 以及

[0152] (viii) 可选地,通过将第六掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达 (a) 亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物或 (b) 其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物的所有细胞的PBP的值。

[0153] 在一些实施例中,不执行这些可选步骤。在一些实施例中,以像素为单位来测量总面积。在一些实施例中,第四掩模的总面积和第一掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中,第六掩模的总面积和第四掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中,第一掩模的总面积、第四掩模的总面积、和第六掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中,像素宽度为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0154] 在一些实施例中,本文提供了导出视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法,包括:

[0155] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0156] (ii) 构建表示视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0157] (iii) 可选地,构建表示视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模;

[0158] (iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模,所述第四掩模包括表示视野中亦表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0159] (v) 可选地,以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模,所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的第一生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0160] (vi) 通过将第四掩模的总面积除以第一掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值；

[0161] (vii) 可选地, 以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模, 所述第六掩模包括表示视野中表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的荧光信号; 以及

[0162] (viii) 可选地, 通过将第六掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的PBP值。

[0163] 在一些实施例中, 不执行这些可选步骤。在一些实施例中, 以像素为单位来测量总面积。在一些实施例中, 第四掩模的总面积和第一掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中, 第六掩模的总面积和第四掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中, 第一掩模的总面积、第四掩模的总面积、和第六掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中, 像素宽度为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0164] 在一些实施例中, 本文提供了导出视野中呈现的所有细胞或可选地呈现的其中一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法, 包括:

[0165] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像, 并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0166] (ii) 构建表示视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0167] (iii) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模;

[0168] (iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模, 所述第四掩模包括表示视野中亦表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0169] (v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模, 所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的第一生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0170] (vi) 通过将第四掩模的总面积除以第一掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值;

[0171] (vii) 以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模, 所述第六掩模包括表示视野中表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的荧光信号; 以及

[0172] (viii) 通过将第六掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0173] 在一些实施例中, 以像素为单位来测量总面积。在一些实施例中, 第四掩模的总面积和第一掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中, 第六掩模的总面积和第四掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中, 第一掩模的总面积、第四掩模的总面积、和第六掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中, 像素宽度为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0174] 在一些实施例中, 该方法还包括:

[0175] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

[0176] (x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第七掩模,所述第八掩模包括表示视野中亦表达该所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号;

[0177] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第八掩模,所述第九掩模包括表示视野中表达该亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号;

[0178] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的PBP值;

[0179] 在一些实施例中,以像素为单位来测量总面积。在一些实施例中,第九掩模的总面积和第四掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中,像素宽度为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0180] 在一些实施例中,该方法还包括:

[0181] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

[0182] (x) 以提供第八掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模,所述第八掩模包括表示视野中不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0183] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第七掩模和所述第八掩模,所述第九掩模包括视野中表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;以及

[0184] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第八掩模的总面积来导出针对表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0185] 在一些实施例中,该方法还包括:

[0186] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

[0187] (x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第六掩模和所述第七掩模,所述第八掩模包括表示表达下列各项的所有细胞的荧光信号:

[0188] (a) 视野中的亚组生物标志物、所关注的第一生物标志物、以及所关注的第二生物标志物;

[0189] (b) 视野中其中不存在所关注的第二生物标志物的亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物;或

[0190] (c) 视野中其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物;

[0191] 以及

[0192] (xii) 通过将第八掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达所关注的第一生物标志物或所关注的第二生物标志物或它们的组合和亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0193] 在一些实施例中,该方法还包括关于一种或多种额外的所关注生物标志物(例如,所关注的第三生物标志物)的与步骤(ix)、(x)、和(xii)类似的步骤的附加循环。

[0194] 在一些实施例中,以像素为单位来测量总面积。在一些实施例中,第九掩模的总面积和第八掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中,像素宽度为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0195] 在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞和非亚组细胞分别对应于肿

瘤细胞和非肿瘤细胞,反之亦然。在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞和非亚组细胞分别对应于活(viable)细胞和非活细胞,反之亦然。在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞是活细胞亚组,非亚组细胞由不被包含在活细胞亚组中的活细胞组成。在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞和非亚组细胞分别对应于T细胞和非T细胞,反之亦然。在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞和非亚组细胞分别对应于骨髓细胞和非骨髓细胞,反之亦然。

[0196] 在一些实施例中,视野中所有细胞的第一亚组包括肿瘤细胞。在一些实施例中,视野中所有细胞的第一亚组包含非肿瘤细胞。在一些实施例中,视野中所有细胞的第一亚组包括非肿瘤细胞和肿瘤细胞。

[0197] 在一些实施例中,视野中的所有细胞的第一亚组包括T细胞。在一些实施例中,T细胞表达CD3。在一些实施例中,T细胞表达CD8。在一些实施例中,T细胞表达CD4。

[0198] 在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包含选自由CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包含由选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、ICOS、CD28、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包含选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、和GITRL组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包含选自由PD-L1、半乳凝素9、和MHC组成的组中的生物标志物。在一些实施例,所关注的第一生物标志物包括PD-L1。

[0199] 在一些实施例中,所关注的第二生物标志物包括选自PD-1、TIM-3、和TCR的生物标志物。在一些实施例中,所关注的第二生物标志物包括PD-1。

[0200] 在一些实施例中,所关注的第一生物标志物和所关注的第二生物标志物彼此不同并且包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物和所关注的第二生物标志物彼此不同并且包括选自由CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组的生物标志物。

[0201] 在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、ICOS、CD28、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物;且所关注的第二生物标志物包括选自PD-1、TIM-3、和TCR的生物标志物。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括PD-L1,并且所关注的第二生物标志物包括PD-1。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括PD-L1,并且所关注的第二生物标志物包括CD80。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括含CTLA-4,并且所关注的第二生物标志物包括CD80。

在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括PD-L2,并且所关注的第二生物标志物包括PD-1。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括CTLA-4,并且所关注的第二生物标志物包括CD86。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括LAG-3,并且所关注的第二生物标志物包括HLA-DR。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括TIM-3且所关注的第二生物标志物包括半乳凝素9。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括41BB,且所关注的第二生物标志物包括4.1BBL。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括OX40并且所关注的第二生物标志物包括OX40L。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括CD40并且所关注的第二生物标志物包括CD40L。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括ICOS并且所关注的第二生物标志物包括ICOSL。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括GITR,并且所关注的第二生物标志物包括GITRL。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括HLA-DR,并且所关注的第二生物标志物包括TCR。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括CD25,并且所关注的第二生物标志物包括FoxP3。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括CD4,并且所关注的第二生物标志物包括CD8。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括CD3,并且所关注的第二生物标志物包括PD-1。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括CD56,并且所关注的第二生物标志物包括CD16。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括HLA-DR,并且所关注的第二生物标志物包括IDO-1。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括CD33并且所关注的第二生物标志物包括ARG1。

[0202] 在一些实施例中,亚组生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。在一些实施例中,亚组生物标志物仅在非肿瘤细胞中表达。在一些实施例中,亚组生物标志物在T细胞中表达。在一些实施例中,亚组生物标志物包括CD3。在一些实施例中,亚组生物标志物包括CD19。在一些实施例中,亚组生物标志物包括CD45。在一些实施例中,亚组生物标志物在骨髓细胞中表达。在一些实施例中,亚组生物标志物包括CD11b。

[0203] 在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括Ki67,且视野中所有细胞的第一亚组包括CD8阳性细胞。

[0204] 在一些实施例中,荧光信号来自四个荧光标记,每个荧光标记针对不同的生物标志物具有特异性。在另外的实施例中,第一荧光标记与所关注的第一生物标志物相关联,第二荧光标记与所关注的第二生物标志物相关联,第三荧光标记与所关注的第三生物标志物相关联,并且第四荧光标记与所关注的第四生物标志物相关联。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括肿瘤和非肿瘤标志物。在一些实施例中,所关注的第二生物标志物包括非肿瘤标志物。在一些实施例中,所关注的第一生物标志物包括肿瘤和非肿瘤标志物,并且所关注的第二生物标志物包括非肿瘤标志物。在一些实施例中,所关注的第三生物标志物被所有细胞表达。在一些实施例中,所关注的第四生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。在一些实施例中,所关注的第三生物标志物被所有细胞表达,并且所关注的第四生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。在一些实施例中,所关注的第四生物标志物是亚组生物标志物。在一些实施例中,所关注的第三生物标志物被所有细胞表达,并且所关注的第四生物标志物为亚组生物标志物。在一些实施例中,一个或多个荧光标记包括与对特定生物标志物具有结合亲和性的抗体或另一抗体结合的荧光团。在一些实施例中,一个或多个荧光标记是对特定生物标志物具有亲和性的荧光团。

[0205] 荧光团的示例包括但不限于荧光素 (fluorescein)、6-FAM、罗丹明 (rhodamine)、德克萨斯红 (Texas Red)、加利福尼亚红 (California Red)、iFluor594、四甲基罗丹明 (tetramethylrhodamine)、羧基罗丹明 (carboxyrhodamine)、羧基罗丹明 6F (carboxyrhodamine 6F)、羧基罗多明 (carboxyrhodol)、羧基罗丹明 110 (carboxyrhodamine 110)、Cascade Blue、Cascade Yellow、香豆素 (coumarin)、Cy2®、Cy3®、Cy3.5®、Cy5®、Cy5.5®、Cy7®、Cy-Chrome、DyLight® 350、DyLight®405、DyLight® 488、DyLight®549、DyLight®594、DyLight®633、DyLight® 649、DyLight® 680、DyLight® 750、DyLight® 800、藻红蛋白 (phycoerythrin)、PerCP (多甲藻黄素-叶绿素-a蛋白)、PerCP-Cy5.5、JOE (6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素)、NED、ROX (5-(和-6)-羧基-X-罗丹明)、HEX、Lucifer Yellow、Marina Blue、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Alexa Fluor®350、Alexa Fluor® 430、Alexa Fluor®488、Alexa Fluor®532、Alexa Fluor®546、Alexa Fluor®568、Alexa Fluor®594、Alexa Fluor®633、Alexa Fluor®647、Alexa Fluor®660、Alexa Fluor®680、7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸、BODIPY®FL、BODIPY®FL-Br2、BODIPY®530/550、BODIPY®558/568、BODIPY®630/650、BODIPY®650/665、BODIPY®R6G、BODIPY®TMR、BODIPY®TR、OPAL™520、OPAL™540、OPAL™570、OPAL™620、OPAL™650、OPAL™690以及它们的组合。在一些实施例中，荧光团选自 DAPI、Cy®2、Cy®3、Cy®3,5、Cy®5、Cy®7、FITC、TRITC、488染料、555染料、594染料、德克萨斯红和香豆素组成的组。488染料的示例包括但不限于 Alexa Fluor®488、OPAL™520、DyLight®488、和 CF™488A。555染料的示例包括但不限于 Alexa Fluor®555。594染料的示例包括但不限于 Alexa Fluor®594。

[0206] 本文所使用的“视野”是指组织样本的整个切片数字图像的一部分。在一些实施例中，整个切片图像具有2-200个预定视野。在一些实施例中，整个切片图像具有10-200个预定视野。在一些实施例中，整个切片图像具有30-200个预定视野。在一些实施例中，整个切片图像具有10-150个预定视野。在一些实施例中，整个切片图像具有10-100个预定视野。在一些实施例中，整个切片图像具有10-50个预定视野。在一些实施例中，整个切片图像具有10-40个预定视野。在一些实施例中，整个切片图像具有10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、或100 (包括其中的增加数) 个预定视野。

[0207] 在本文公开的方法中，癌症患者是哺乳动物。在一些实施例中，哺乳动物是人类。在一些实施例中，哺乳动物并不是人类。在另外的实施例中，哺乳动物是小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、或马。

[0208] 在本文公开的方法中，肿瘤组织取自癌症患者。癌症的种类包括但不限于：循环系统的癌症，例如，心脏的癌症 (肉瘤 [血管肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤]、粘液瘤、横纹肌瘤、纤维瘤、脂肪瘤和畸胎瘤)、纵隔膜和胸膜的癌症、以及其他胸内器官、血管肿瘤和肿瘤相关的血管组织的癌症；呼吸道 (例如，鼻腔和中耳、副鼻窦、喉、气管、支气管和肺) 的癌症，例如小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、支气管癌 (鳞状细胞、未分化小细胞、未分化的大细胞、腺癌)、肺泡 (细支气管) 癌、支气管腺瘤、肉瘤、淋巴瘤、软骨瘤性错构瘤、间皮瘤；消化系统的癌症，例如，食道的癌症 (例如，鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、淋巴

瘤)、腹部的癌症(癌、淋巴瘤、平滑肌肉瘤)、胃的癌症、胰腺的癌症(导管腺癌、胰岛瘤、胰高血糖素瘤、胃泌素瘤、类癌瘤、舒血管肠肽瘤)、小肠的癌症(腺癌、淋巴瘤、类癌瘤、Kaposi's 肉瘤、平滑肌瘤、血管瘤、脂肪瘤、神经纤维瘤、纤维瘤)、大肠的癌症(腺癌、管状腺瘤、绒毛状腺瘤、错构瘤、平滑肌瘤);泌尿生殖道的癌症,例如,肾脏的癌症(腺癌、Wilm's 瘤[肾胚细胞瘤]、淋巴瘤、白血病)、膀胱和/或尿道的癌症(鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌)、前列腺的癌症(腺癌、肉瘤)、睾丸的癌症(精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎癌、畸胎瘤、绒毛膜癌、肉瘤、间质细胞癌、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样瘤、脂肪瘤);肝脏的癌症,例如,肝细胞癌(肝细胞性肝癌)、胆管细胞型肝癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤、肝细胞腺瘤、血管瘤、胰腺内分泌肿瘤(例如,嗜铬细胞瘤、胰岛瘤、血管活性肠肽肿瘤、胰岛细胞瘤和胰高血糖素瘤);骨骼的癌症(例如,骨原发性肉瘤(骨肉瘤)、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤因氏(Ewing's)肉瘤、恶性淋巴瘤(网状细胞肉瘤)、多发性骨髓瘤、恶性巨细胞瘤脊索瘤、骨软骨瘤(骨软骨外生骨疣)、良性软骨瘤、成软骨细胞瘤、软骨粘液纤维瘤、骨样骨瘤和巨细胞瘤);神经系统的癌症,例如,中枢神经系统(CNS)的肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、头骨癌(骨瘤、血管瘤、肉芽肿瘤、黄瘤、畸形性骨炎)、脑膜的癌症(脑膜瘤、脑膜肉瘤、脑胶质瘤)、脑癌(星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤、生殖细胞瘤[松果体瘤]、多形性成胶质细胞瘤、少突胶质细胞瘤、神经鞘瘤、成视网膜细胞瘤、先天性肿瘤)、脊髓神经纤维瘤、脑膜瘤、神经胶质瘤、肉瘤;生殖系统的癌症,例如,妇科方面的癌症、子宫方面的癌症(子宫内膜癌)、宫颈方面的癌症(宫颈癌、宫颈癌前病变)、卵巢方面的癌症(卵巢癌[浆液性囊腺癌、粘液性囊腺癌、未分类的癌]、颗粒细胞肿瘤、睾丸间质细胞瘤(Sertoli-Leydig cell tumor)、无性细胞瘤、恶性畸胎瘤)、外阴方面的癌症(鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌、纤维肉瘤、黑素瘤)、阴道方面的癌症(透明细胞癌、鳞状细胞癌、葡萄状肉瘤(胚胎性横纹肌肉瘤))、输卵管(癌)以及与女性生殖器官有关的其他部位的癌症;胎盘、阴茎、前列腺、睾丸、和其他与男性生殖器官相关的部位的癌症;血液系统的癌症,例如,血液方面的癌症(骨髓性白血病[急性和慢性]、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞性白血病、骨髓增殖性疾病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征)、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤[恶性淋巴瘤];口腔方面的癌症,例如唇、舌头、牙龈、口底、腭等口腔部位、腮腺以及唾液腺的其他部位、扁桃体、口咽、鼻咽、梨状窝、咽喉、以及唇、口腔和咽部的其他部位的癌症;皮肤的癌症,例如,恶性黑素瘤、皮肤黑素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、Kaposi's 肉瘤、痣异常增生痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、和瘢痕瘤;肾上腺的癌症:成神经细胞瘤;以及包括结缔组织和软组织和其他组织的癌症,腹膜后腔和腹膜的癌症,眼睛、眼内黑素瘤及附件的癌症,乳房、头和/或颈、肛门区的癌症,甲状腺、甲状旁腺、肾上腺和其他内分泌腺及相关结构的癌症,继发性和非特异性恶性淋巴结肿瘤、呼吸系统和消化系统的继发性恶性肿瘤以及其他部位的继发性恶性肿瘤,或它们的一种或多种组合。

[0209] 免疫治疗的示例包括但不限于单克隆抗体(例如,阿仑单抗或曲妥单抗)、缀合单克隆抗体(例如,替伊莫单抗、本妥昔单抗(brentuximab vendotin)、或曲妥珠单抗抗体-药物偶联物)、双特异性单克隆抗体(博纳吐单抗)、免疫检查点抑制剂(例如,易普利姆玛、派姆单抗、尼鲁单抗(nivolumab)、阿特朱单抗(atezolizumab)、或杜瓦单抗(durvalumab))、沙利度胺、来那度胺、泊马度胺、和咪喹莫特、以及它们的组合。在一些实施例中,免疫治疗包括免疫检查点疗法。

[0210] 本文在另一方面提供了导出视野中呈现的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法, 包括:

[0211] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像, 并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0212] (ii) 构建表示视野中呈现的表达肿瘤生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0213] (iii) 以提供第三掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模, 所述第三掩模包括表示视野中所有肿瘤细胞的荧光信号;

[0214] (iv) 构建表示视野中呈现的表达所关注的生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第四掩模;

[0215] (v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第三掩模和所述第四掩模, 所述第五掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的荧光信号; 以及

[0216] (vi) 通过将第五掩模的总面积除以第三掩模的总面积导出针对表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的PBP值。

[0217] 在一些实施例中, 总面积是以像素为单位来测量的。在一些实施例中, 第五掩模的总面积和第三掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中, 像素宽度为0.5 μm 。在一些实施例中, 所关注的生物标志物包含选自由PD-L1、半乳凝素9和MHC组成的组的生物标志物。在一些实施例中, 所关注的生物标志物包含PD-L1。在一些实施例中, 所关注的生物标志物包含半乳凝素9。在一些实施例中, 所关注的生物标志物包含MHC。在一些实施例中, 视野还包括非肿瘤细胞。在一些实施例中, 非肿瘤细胞包含免疫细胞和基质细胞。

[0218] 本文在另一方面公开了导出视野中呈现的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法, 包括:

[0219] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像, 并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0220] (ii) 构建表示视野中呈现的表达肿瘤生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0221] (iii) 以提供第三掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模, 所述第三掩模包括表示视野中所有非肿瘤细胞的荧光信号;

[0222] (iv) 构建表示视野中呈现的表达所关注的生物标志物的所有区域的荧光信号的第四掩模;

[0223] (v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第三掩模和所述第四掩模, 所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的荧光信号; 以及

[0224] (vi) 通过将第五掩模的总面积除以第三掩模的总面积导出针对表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的PBP值。

[0225] 在一些实施例中, 以像素为单位来测量总面积。在一些实施例中, 第五掩模的总面积和第三掩模的总面积分别以像素为单位进行测量。在一些实施例中, 像素宽度为0.5 μm 。在一些实施例中, 所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、

和CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、和CD28组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括PD-L1。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括PD-1。在一些实施例中,非肿瘤细胞包括免疫细胞和基质细胞。

[0226] 本文在另一方面公开了监测被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者的病情进展的方法,包括:

[0227] (i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点从癌症患者采集的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值(PBP)以获得至少第一PBP值和至少第二PBP值;

[0228] (ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

[0229] 在一些实施例中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。在一些实施例中,所述变化是指示所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加。在一些实施例中,所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自由CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、ICOS、CD28、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86、PD-1、TIM-3、和TCR组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、ICOS、CD28、PD-1、TIM-3、和TCR组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括PD-L1。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括PD-1。

[0230] 本文在另一方面公开了监测被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者的病情进展的方法,包括:

[0231] (i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点从癌症患者采集的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值(PBP)以获得至少第一PBP值和至少第

二PBP值；

[0232] (ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

[0233] 在一些实施例中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。在一些实施例中,所述变化是指示所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加。在一些实施例中,所关注的生物标志物包含选自由PD-L1、半乳凝素9、和MHC组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括PD-L1。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括含半乳凝素9。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括MHC。在一些实施例中,所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。

[0234] 本文在另一方面公开了监测对被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者进行的免疫细胞调节的方法,包括:

[0235] (i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点从癌症患者采集的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值(PBP)以获得至少第一PBP值和至少第二PBP值;

[0236] (ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

[0237] 在一些实施例中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。在一些实施例中,所述变化是指示所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加。在一些实施例中,所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自由CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、ICOS、CD28、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、CD86、PD-1、TIM-3、和TCR组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、ICOS、CD28、PD-1、TIM-3、和TCR组成的组中的生物标志物。在一些实施例中,所关注的生物标志物包括PD-1。

[0238] 本文在另一方面公开了需要其来治疗患者的癌症的方法,该方法包括(i)根据本文所述的方法导出视野中呈现的所有肿瘤细胞或所有非肿瘤细胞的第一生物标志物阳性百分比(PBP)值;(ii)记录该第一PBP值;(iii)对患者施用至少第一剂量的免疫治疗;(iv)

在施用该至少第一剂量之后,根据本文所述的方法导出视野中呈现的所有肿瘤细胞或所有非肿瘤细胞的第二生物标志物阳性百分比(PBP)值;(v)记录该第二PBP值;(vi)计算该第一PBP值和第二PBP值之间的变化;以及(vii)调整施用于患者的后续免疫治疗的剂量。在一些实施例中,调整后续剂量包括选自由以下各项组成的组中的一个或多个动作:增加免疫治疗的剂量、减少免疫治疗的剂量;延长免疫治疗的用药之间的时间周期;缩短免疫治疗的用药之间的时间周期;用另一种免疫治疗来代替该免疫治疗;用非免疫治疗来代替免疫治疗;以及终止免疫治疗。

[0239] 本文在另一方面公开了需要其来治疗患者的癌症的方法,该方法包括(i)根据本文所述的方法导出视野中呈现的所有肿瘤细胞或所有非肿瘤细胞的第一生物标志物阳性百分比(PBP)值;(ii)记录该第一PBP值;(iii)作为用药方案的一部分而向患者施用至少第一剂量的免疫治疗;(iv)在施用该至少第一剂量之后,根据本文所述的方法导出视野中呈现的所有肿瘤细胞或所有非肿瘤细胞的第二生物标志物阳性百分比(PBP)值;(v)记录该第二PBP值;(vi)计算该第一PBP值和第二PBP值之间的变化;以及(vii)在不改变用药方案的情况下施用后续免疫治疗的剂量。

[0240] 图11是描绘用于导出生物标志物阳性百分比(PBP)值的方法的一个实施例的步骤的流程图。在步骤1101中,图像数据被获取,并且在步骤1102中,图像数据被解混,使得特定于各种类型的荧光信号的数据被分离到不同的信道中。在步骤1103中,使用来自第一信道的数据来生成所有细胞的掩模。在步骤1104中,使用来自第二信道的数据来生成视野中表达亚组生物标志物的区域的掩模,例如,该亚组掩模可以是视野中呈现的肿瘤区域的掩模。在步骤1105中,将全部细胞掩模和亚组掩模(例如,肿瘤区域掩模)结合以生成所有亚组细胞的掩模。

[0241] 在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞和非亚组细胞分别对应于肿瘤细胞和非肿瘤细胞,反之亦然。在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞和非亚组细胞分别对应于活细胞和非活细胞,反之亦然。在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞是亚组活细胞,非亚组细胞由未被包含在亚组活细胞中的活细胞组成。在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞和非亚组细胞分别对应于T细胞和非T细胞,反之亦然。在一些实施例中,由亚组生物标志物标识的亚组细胞和非亚组细胞分别对应于分别对应于骨髓细胞和非骨髓细胞,反之亦然。

[0242] 在某些实施例中,所有细胞掩模和亚组掩模的结合可以标识全部肿瘤细胞和/或全部非肿瘤细胞。可仅对所关注的选定类型的细胞来执行该过程,例如仅对肿瘤细胞或仅对非肿瘤细胞执行。该过程也可以针对对这两者的分析。在步骤1106中,使用来自第三信道的数据来生成对生物标志物呈阳性(基于表示具有与所关注的特定生物标志物结合的亲和性的荧光标记的存在的荧光信号)的所有细胞的掩模。在步骤1107和步骤1108中,将在步骤1106中生成的生物标志物掩模与在步骤1105中生成的亚组细胞掩模结合。步骤1107以第一方式将生物标志物掩模与亚组细胞掩模结合,以生成对生物标志物呈阳性的所有亚组细胞的掩模。步骤1108以第二方式将生物标志物掩模与亚组细胞掩模结合,以生成对生物标志物不呈阳性的亚组细胞的掩模。可以根据该方法的各种实施例来执行步骤1107和1108中的一者或两者。在步骤1109/步骤1110中,通过将所关注的亚组细胞(例如,在步骤1107中掩模所标识的对生物标志物呈阳性的亚组细胞或在步骤1108中掩模所标识的对生物标志物不呈

阳性的亚组细胞)的面积除以所有亚组细胞的总面积。可以根据该方法的各种实施例来执行步骤1109和步骤1110中的一者或两者。

[0243] 图12是描绘用于导出生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法的第二实施例的步骤的流程图。在步骤1201中,图像数据被获取,并且在步骤1202中,图像数据被解混,使得特定于各种类型的荧光信号的数据被分离到不同的信道中。在步骤1203中,使用来自第一信道的数据来生成所有细胞的掩模。在步骤1204中,使用来自第二信道的数据来生成对生物标志物呈阳性(基于表示具有与所关注的特定生物标志物结合的亲和性的荧光标记的存在的所有细胞的掩模。在步骤1205中,通过对生物标志物呈阳性(这由在步骤1204中创建的掩模标识)的细胞的面积除以所关注的所有细胞的总面积(来自步骤1203)来计算PBP分值。图12的过程可以单独执行或与图11所示的方法同时执行。换句话说,可以结合图11和图12的方法来针对所有细胞、所有肿瘤细胞、和所有非肿瘤细胞或它们的任何组合计算PBP分值。

[0244] 在本文公开的方法中,根据示例性实施例,对数字图像的操纵可以通过包括诸如图13的框图中所示的控制器的计算系统来执行。控制器200被示出为包括通信接口202和处理电路204。通信接口202可以包括用于与各种系统、设备或网络进行数据通信的有线或无线接口(例如,插孔、天线、发射器、接收器、收发器、接线端子等)。例如,通信接口202可以包括用于经由基于以太网的通信网络来发送和接收数据的以太网卡和端口和/或用于经由无线通信网络进行通信的WiFi收发器。通信接口202可以被配置为经由局域网或广域网(例如,互联网、建筑物WAN等)进行通信并且可以使用各种通信协议(例如,BACnet、IP、LON等)。

[0245] 通信接口202可以是配置为促进控制器200与各种外部系统或设备(例如,成像设备102)之间的电子数据通信的网络接口。例如,控制器200可以从成像设备102接收针对选定视野的成像数据,以便进行数据的分析和空间接近度分值 (SPS) 的计算。

[0246] 仍然参考图13,处理电路204被示出为包括处理器206和存储器208。处理器206可以是通用或专用处理器、专用集成电路 (ASIC)、一个或多个现场可编程门阵列 (FPGA)、一组处理组件、或其他合适的处理组件。处理器506可以被配置为执行存储在存储器508中或从其他计算机可读介质(例如,CDROM、网络存储装置、远程服务器等)接收的计算机代码或指令。

[0247] 存储器208可以包括用于存储用于完成和/或促进本公开中描述的各种过程的数据和/或计算机代码的一个或多个设备(例如,存储器单元、存储器设备、存储设备等)。存储器208可以包括随机存取存储器 (RAM)、只读存储器 (ROM)、硬盘驱动器存储装置、临时存储装置、非易失性存储器、闪存、光存储器、或用于存储软件对象和/或计算机指令的任何其他合适的存储器。存储器208可以包括数据库组件、目标代码组件、脚本组件、或用于支持本公开中描述的各种活动和信息结构的任何其他类型的信息结构。存储器508可经由处理电路204可通信地连接到处理器206,并且可以包括用于运行(例如,通过处理器206来运行)本文描述的一个或多个过程的计算机代码。

[0248] 仍然参考图13,控制器200被示出为接收来自成像设备102的输入。成像设备获取所有成像数据并将对其及描述其的所有元数据进行记录。成像设备然后将数据串行化成可由控制器200读取的流。数据流可容纳任何二进制数据流类型,例如,文件系统、RDBM、或直接TCP/IP通信。为了数据流的使用,控制器200被示出为包括光谱解混器210。光谱解混器

210可以从成像设备102接收图像数据,光谱解混器对图像数据执行光谱解混以将呈现各种波长的图像解混到针对每个波段的单独的离散信道。例如,对于用于识别的,图像数据可被“解混”到针对被用来标识组织样本中所关注的细胞或蛋白质的各种荧光团中的每一者的单独的信道中。仅通过举例的方式,荧光团可以是由DAPI、Cy®2、Cy®3、Cy®3,5、Cy®5、FITC、TRITC、Alexa Fluor®488、Alexa Fluor®555、Alexa Fluor®594、和德克萨斯红组成的组中的一者或多者。在一个示例中,信道之一可以包括落在围绕461nm的波长(针对DAPI的最大发射波长)的预定频带内的图像数据,以识别图像中的细胞核。其他信道可以包括不同波长的图像数据,以使用不同的荧光团来标识组织样本的不同部分。

[0249] 控制器200还被示出为包括各种掩模器,例如细胞掩模器212、亚组区域掩模器216、以及生物标志物掩模器222。在其他实施例中,这些掩模器或被包括在控制器200中的其他掩模器被用于从光谱解混器210接收经解混的信号并且根据用于标识组织样本中的某些所关注特征的荧光团来创建用于所关注的特定细胞或区域的掩模。为了创建掩模,掩模器(例如,细胞掩模器212、亚组区域掩模器216和生物标志物掩模器222)接收与视野中的每个像素的强度有关的图像数据。像素强度直接与样品发射的荧光量成比例,荧光量又与样品中蛋白质生物标志物的量成比例(当使用荧光团来标识特定生物标志物时)。可以基于存在于图像像素中的值来设置绝对阈值。大于或等于阈值的所有像素将被映射为1.0或“有(on)”,并且所有其他像素将被映射为0.0或“无(off)”。通过这种方式,创建二元掩模来识别视野中所关注的细胞或组织部分。在其他实施例中,使用下限来创建掩模,其中,具有处于或高于下限的强度的所有像素被接受并用作掩模的像素值。如果强度低于下限,则将像素值设置为0.0或“无”。

[0250] 在图14中所示的用于掩模的示例性流程图中,示出了DAPI和488染料信道(或分别用于标识细胞核和肿瘤区域的其他荧光团)使用下限方案(步骤1410、步骤1412、步骤1420、步骤1422)来用于提供掩模输出,而Cy5信道(或用于标识所关注的生物标志物的其他荧光团)使用的是阈值方案(步骤1430)。与下限方案相关联的是还需要直方图步骤来确定下限。特别地,直方图阈值(步骤1412、步骤1422)生成输入图像的阈值,但使用浮动比例(sliding scale)来确定阈值出现的点。输入是当前图像和用户定义的阈值百分比。后者用于确定阈值级别应被设置在总强度的哪个百分比上。首先,每个像素的强度被相加至总强度。阈值百分比乘以该总强度以获得截断总和(cut-off sum)。最后,所有像素按照强度(直方图)分组,并将它们的强度从最低到最高(逐柱式地)相加,直到达到截断总和。该过程中访问的最后一个最高像素强度是当前图像的阈值。所有强度大于该值的像素其强度都被设置为最大,而其他所有像素都被设置为最小。

[0251] 在图14中被标识为步骤1414、步骤1416、步骤1424、步骤1426、步骤1428、步骤1432、步骤1434、步骤1436的步骤表示在最初的掩模器(例如,细胞掩模器212(步骤1414、步骤1416)、亚组区域掩模器216(步骤1424、步骤1426、步骤1428)、和生物标志物掩模器222(步骤1432、步骤1434、步骤1436))中出现的中间步骤,这些步骤定义如下:

[0252] 扩大增加了图像中最亮的区域的面积。针对扩大需要两个输入。第一个是隐式的当前图像,第二个是要扩大的迭代的数目。假定只有二元图像用于第一输入。若该过程对连续图像进行操作,则输出不会是有效的扩大。扩大过程首先要找到图像中的最大像素强度。随后,图像中的每个像素都被检查一次。如果进行检查的像素的强度等于最大强度,则该像

素将在输出图像中被绘制为具有迭代半径并以原始像素为中心的圆。该圆中的所有像素的强度都等于最大强度。所有的其他像素都将无需修改直接被复制到输出图像中。

[0253] 填孔过程可用最大强度的像素填充图像的“空白”区域。这些空白区域是那些具有最小强度并且其像素面积(大小)是由用户指定的区域。当前图像和大小是所需的两个输入。如同扩大,该过程应仅被应用于二元图像。

[0254] 腐蚀以与扩大相同的方式来处理图像。第一步中确定图像中的最小强度,只有与最低强度匹配的像素被更改,并且用最低强度值来填充用于放大所找到的最小强度像素的圆,除此之外,其余功能均与扩大相同。如同扩大,该过程应仅被应用于二元图像。

[0255] 移除对象。预计有两个输入:当前图像和对象大小。移除对象与填孔过程相反。只包含最大强度的填充面积小于输入对象大小的像素的任何区域将会被设置为最小强度并因此被“移除”。该过程应仅被应用于二元图像;应用于连续图像可能会产生不期望的结果。

[0256] 步骤1418、步骤1429、和步骤1438处的输出分别是所得到的细胞掩模、亚组掩模(或者,在该特定示例中是肿瘤区域掩模)和生物标志物细胞掩模。图14进一步描绘了这些所得到的掩模的结合以获得关于PBP分值的相关区域信息。下面参考图13中描绘的控制器200的结合掩模器来描述这些结合。

[0257] 控制器200被示出为包括结合掩模器,例如亚组细胞掩模器218、非亚组细胞掩模器220和结合掩模器230。在一些实施例中,由掩模器218标识的亚组细胞和由掩模器220标识的非亚组细胞分别为肿瘤细胞和非肿瘤细胞。亚组细胞掩模器执行与(And)操作(如图14中的步骤1452所示)以将细胞掩模器212的输出(表示图像中的所有细胞)与亚组区域掩模器216的输出结合。因此,亚组细胞掩模器生成图像中所有亚组细胞的掩模。使用了由非亚组细胞掩模器220执行的输出(out)操作(如图14中的步骤1454所示)的相同结合生成样本图像中所有非亚组细胞的掩模。

[0258] 结合掩模器230被配置为结合两个输入掩模。如图14所示,结合掩模器230将生物标志物掩模与亚组细胞掩模(来自亚组细胞掩模器218)或非亚组细胞掩模(来自非亚组细胞掩模器220)中的一者结合或者与兼有生物标志物掩模+亚组掩模和生物标志物掩模+非亚组掩模这二者。虚线表示细胞掩模中的一者或两者可以在结合掩模器230处与生物标志物掩模结合。结合掩模器230的结果是表示对生物标志物呈阳性的所有亚组细胞和/或对生物标志物呈阳性的所有非亚组细胞的掩模。结合掩模器230可以以替代方式来结合掩模,使得结合掩模器230的结果是表示对生物标志物不呈阳性(生物标志物阴性)的亚组细胞的掩模。如果所关注的细胞与该亚组细胞(例如,肿瘤或非肿瘤细胞,而非全部细胞)不是特别相关,则生物标志物阳性的掩模不与任何额外的掩膜结合,并无需修改便可通过结合掩膜器230。

[0259] 为了计算生物标志物阳性百分比分值(PBP),所选亚组细胞(例如,所有细胞、肿瘤或非肿瘤细胞)生物标志物阳性掩模或生物标志物阴性掩模(在这种情况下,该分值表示的是生物标志物阴性)的面积在面积评估器232处以像素为单位被确定。所有所选细胞(对生物标志物呈阳性和阴性)的总面积在面积评估器232处以像素为单位被确定。终止于面积评估器232的虚线指示总面积输入可以是要被单独计算的全部细胞掩模、亚组细胞掩模、和非亚组细胞掩模中的一者或多者。在阳性计算器236处确定生物标志物阳性百分比分值。在一个实施例中,通过将来自面积评估器232的所选的细胞生物标志物阳性掩模的面积除以来

自面积评估器232的所有所选细胞掩模的面积,并乘以100来计算BPB分值。在一个实施例中,由交互计算器236运行的等式是:

$$[0260] \quad BPB = \frac{A_P}{A_A} \times 100$$

[0261] 其中, A_P 是所选亚组细胞的类型(例如,所有细胞、肿瘤或非肿瘤细胞)的生物标志物阳性面积, A_A 是所选细胞类型(所有细胞、肿瘤或非肿瘤细胞)的所有细胞的总面积。类似地, A_N 可以取代上述等式中的 A_P ,其中, A_N 是所选细胞类型(例如,所有细胞、肿瘤或非肿瘤细胞)的生物标志物阴性面积,以确定表示该亚组细胞类型的生物标志物阴性百分比分值。

[0262] And过程在二元与(AND)运算之后被建模,但在重要方面有所不同。And接受当前图像和用户所选择的结果。输出是通过执行来自两个输入图像的匹配像素的标准化强度之间的乘法而创建的图像。在某些情况下,图像强度数据已被标准化。因此,And过程只是两个图像之间的逐像素式的乘法。Out所需的两个输入是当前图像和用户所选择的结果。根据公式 $A * (1 - B / B_{max})$ 从第一图像中将第二图像去除,其中,A是当前图像,B是用户所选择要以去除的图像, B_{max} 是B的最大强度。注意,B除以 B_{max} 将B标准化。

[0263] 示例

[0264] 示例1。对来自人类患者的黑素瘤组织样品进行的样品制备、成像、以及成像分析

[0265] 样品制备。对福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织样品脱蜡。然后,切片在蒸馏水中温育之前通过一系列二甲苯再水合,再进行酒精洗涤。然后在升高的压力和温度条件下进行热诱导的抗原修复,随后使其冷却并将其转移至Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲盐水中。接着进行染色,其中进行以下步骤。首先,在与蛋白封闭剂一起温育之前,阻断内源性过氧化物酶以减少非特异性抗体染色。接下来,用鼠抗PD1一抗(primary antibody)来对切片染色。然后,切片在用抗鼠HRP二抗(secondary antibody)进行温育之前先要被洗涤。在切片被洗涤之后使用TSA+Cy®3.5(珀金埃尔默)来检测PD-1染色。然后通过含有50mM过氧化氢的新鲜的100mM苯甲酰肼进行两次洗涤来淬灭任何残留的HRP。在用兔抗PD-L1一抗进行染色之前再次洗涤切片。切片被洗涤之后,利用抗兔HRP二抗与用488染料和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)直接标记的鼠抗S100的混合物进行温育。再次洗涤切片之后使用TSA-Cy®5(珀金埃尔默)来检测PD-L1染色。最后一次对切片进行洗涤,随后将具有封固剂的盖玻片盖在切片上并在室温下干燥过夜。图1中示出了抗体和检测试剂的示意性概览。

[0266] 样品成像与分析。然后,使用Vectra 2智能切片分析系统(使用Vectra软件版本2.0.8(珀金埃尔默))来获取荧光图像。首先,使用DAPI以4倍(4x)放大率对切片进行单色成像。使用(利用inForm开发的)自动算法来辨识切片中含有组织的区域。

[0267] 针对与DAPI(蓝色)、FITC(绿色)、和Cy®5(红色)相关联的信道,所辨识的含有组织的切片区域以4x放大率成像以创建RGB图像。这些4x放大率的图像使用视野选择器104中的(利用inForm开发的)自动富集算法来处理,以根据最高的Cy®5表达来辨识和排列可能的20x放大率的视野。

[0268] 在DAPI、FITC、德克萨斯红、和Cy®5波长的20x放大率下对最大的40个视野进行成像。对原始图像的可接受性进行检查,并且在分析之前排除未聚焦、不存在任何肿瘤细胞、高度坏死、或包含与预期抗体定位(即,背景染色)高度不相关的荧光信号的图像。使用

AQUAduct (珀金埃尔默) 来处理所接受的图像,其中,每个荧光团通过光谱解混器210在光谱上被解混到单个信道并被保存为单独的文件。

[0269] 使用AQUAnalysis™或通过AQUAserve™的全自动过程来进一步分析所处理的文件。详情如下。

[0270] 由细胞掩模器212处理每个DAPI图像以标识该图像(图2a)内的所有细胞核,然后将该图像扩大3个像素以表示整个细胞的大致尺寸。所得到的掩模表示该图像内的所有细胞(图2b)。

[0271] 通过肿瘤掩模器216来处理用488染料检测到的S100(黑素瘤的肿瘤细胞标志物)(图3a)以创建该图像(图3a)内所有肿瘤区域的二元掩膜(图3b)。该掩膜与所有细胞的掩膜之间的重叠创建了针对肿瘤细胞的新的掩膜(图3c)。

[0272] 类似地,肿瘤细胞标志物的缺失与所有细胞核的掩膜的结合创建了针对所有非肿瘤细胞的新的掩膜(图3d),该过程是由非肿瘤细胞掩膜器220执行的。

[0273] 生物标志物掩模器222处理每个Cy®5图像(图4a)以创建为PD-L1阳性的所有细胞的二元掩膜(图4b)。使用结合掩模器230来在所有肿瘤细胞的掩膜与所有PD-L1阳性细胞的掩膜之间进行的重叠创建了所有PD-L1阳性肿瘤细胞的新的掩膜(图4c)。类似地,使用结合掩模器240在所有非肿瘤细胞的掩膜与所有PD-L1阳性细胞的掩膜之间进行的重叠创建了所有PD-L1阳性非肿瘤细胞的新的掩膜(图4d)。

[0274] 将每个Cy®3.5图像(图5a)与所有非肿瘤细胞的掩膜重叠以创建PD-1阳性的所有细胞的二元掩膜(图5b)。

[0275] 使用阳性计算器236,通过将以像素为单位测得的且由面积评估器232确定的所有PD-L1阳性肿瘤细胞的掩膜(图4c)的总面积除以以像素为单位测得的且由面积评估器232确定的所有肿瘤细胞的掩膜(图3c)的总面积来导出针对表达PD-L1的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比(PBP)。表达PD-L1的所有细胞的PBP的代表值在图6a中示出(按照表达的增加对数据进行分类)。

[0276] 通过将以像素为单位测得的所有PD-1阳性非肿瘤细胞的掩膜(图5b)的总面积除以以像素为单位测得的所有非肿瘤细胞的掩膜(图3d)的总面积来导出针对表达PD-1的所有非肿瘤细胞的PBP。表达PD-1的所有非肿瘤细胞的PBP的代表值在图6b中示出(按照表达的增加对数据进行分类)。

[0277] 图7和图8示出了指示PD-L1阳性细胞(红色)、PD-L-阳性细胞(黄色)、肿瘤细胞(S100,绿色)、和所有细胞(DAPI,蓝色)的重叠掩膜的代表性示例。对于免疫治疗的阳性应答者,图7中的掩膜很容易地指示出PD-L1阳性细胞(红色)、PD-1阳性细胞(黄色)、和所有肿瘤细胞(绿色)的存在。相反,对于免疫治疗的阴性应答者,图8中的掩膜指示肿瘤细胞(S100,绿色)和所有细胞(DAPI,蓝色)的存在,但几乎不指示PD-L1阳性细胞(红色)或PD-1阳性细胞(黄色)的存在。

[0278] 示例2对来自人类患者的非小细胞肺癌(NSCLC)组织样品进行的样品制备、成像、以及成像分析

[0279] 执行与示例1类似的过程,其中,用488染料直接标记的鼠抗泛细胞角蛋白来取代之用488染料直接标记的用于上皮肿瘤样品的鼠抗-S100。针对PD-1和PD-L1的BPP值在图9中示出。这些患者中的一部分表现出高度的受体-配体相互作用,使人能够联想到免疫抑制。

[0280] 示例3.分析技术的比较

[0281] 为了生成对照样本,根据制造商说明书来培养具有先前建立的PD-L1的表达(Karpas 299)或缺乏表达(Ramos RA#1)的淋巴瘤细胞系。然后对细胞进行计数并将这两种细胞系以不同的百分比混合以生成一系列PD-L1表达范围在0-100%的FFPE细胞系小球块。然后使用来自这些细胞系混合物以及来自正常扁桃体组织切除的核心(600 μ m)来创建组织微阵列(TMA)。然后使用AQUAnalysis™(所有步骤如示例1中所述)对该TMA的一部分进行染色、成像,然后针对每个核心进行PD-L1阳性百分比值的评分,评分结果在图10的Y轴上示出,其中,每个点表示单个核心(单个视野)。

[0282] 可选地,相同的图像被用于使用基于细胞计数的软件针对百分比PD-L1表达进行定量,以便进行如下比较。DAPI用于首先辨识每个细胞核,然后在所辨识的细胞核周围创建形态学细胞质。设置强度阈值以辨识在细胞的细胞质中具有PD-L1表达的细胞。然后将超出该阈值的所辨识的细胞总数除以图像中的细胞总数,以确定每个核心中的PD-L1阳性细胞百分比,并且结果在图10的X轴上示出。总体而言,两种细胞计数方法之间呈现出高度一致性($R^2=0.86$,斜率1.1);然而,在图10中有三个被标记为A、B、C的显而易见的离群值,其中,由AQUA®评分确定的PD-L1阳性百分比明显高于细胞计数方法所确定的。点A和B是其中100%的细胞是Karpas299的细胞系核心,因此通过AQUA®评分确定的值更接近预期,并且细胞计数方法未能将细胞的细胞质鉴定为PD-L1阳性。类似地,在点C处,细胞混合物包含理论上40%的Karpas299细胞,其中,相比细胞计数方法,通过AQUA®评分确定的值又一次更接近预期。这些结果证明了本文公开的方法优于基于细胞计数的软件。

[0283] 示例4.对具有表达PD-L1的细胞和表达CD80的细胞的组织样品进行的样品制备、成像、以及成像分析

[0284] 执行与示例1类似的过程,用CD80的染色和分析来取代PD-1的染色和分析。

[0285] 示例5.对具有表达CTLA-4的细胞和表达CD80的细胞的组织样品进行的样品制备、成像、以及成像分析。

[0286] 样品制备。对福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织样品脱蜡、再水合并升高的温度条件下进行抗原修复。然后进行染色,随后执行以下步骤。首先,使用RNAScope®(高级细胞诊断),利用20对跨越约1kb的CTLA-4mRNA的杂交探针对组织进行CTLA-4表达检测。用TSA-Cy®3观察原位杂交。洗涤切片,然后通过含有50mM过氧化氢的新鲜的100mM苯甲酰肼进行两次洗涤来淬灭任何残留的HRP。在用鼠抗CD80一级抗体进行染色之前再次洗涤切片。切片被洗涤之后用抗鼠HRP二抗进行温育。洗涤切片,然后使用TSA-Cy®5(珀金埃尔默)来检测CD80染色。然后通过含有50mM过氧化氢的新鲜的100mM苯甲酰肼对切片进行两次洗涤来淬灭任何残留的HRP。再次洗涤切片之后使用兔抗CD3一抗来染色。洗涤切片,然后用与抗兔HRP二抗与4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)的混合物一起进行温育。洗涤切片,然后使用TSA-AlexaFluor488®(Life Technologies)来检测CD3染色。最后一次对切片进行洗涤,随后将具有封固剂的盖玻片盖在切片上并在室温下干燥过夜。

[0287] 执行与示例1类似的成像和分析过程,成像是针对DAPI、FITC、Cy®3和Cy®5波长进行的。使用CTLA-4和CD80的表达来开发用于获取20x图像的富集算法。执行分析以调查取自患有转移性黑素瘤患者的肿瘤样品中CD3阳性T细胞中CTLA-4的患病率(prevalence)和

CD80表达。结果在图31a和图31b中示出。

[0288] 示例6。对具有表达PD-L2的细胞和表达PD-1的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0289] 执行与示例1类似的过程，用PD-L2的染色和分析来取代PD-L1的染色和分析。

[0290] 示例7。对具有表达CTLA-4的细胞和表达CD86的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0291] 执行与示例1类似的过程，用CTLA-4和CD86的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染色和分析。

[0292] 示例8。对具有表达LAG-3的细胞和表达HLA-DR的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0293] 执行与示例1类似的过程，用LAG-3和HLA-DR的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染色和分析。

[0294] 示例9。对具有表达TIM-3的细胞和表达半乳凝素9的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0295] 执行与示例1类似的过程，用TIM-3和半乳凝素9的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染色和分析。

[0296] 示例10。对具有表达41BB的细胞和表达4.1BBL的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0297] 执行与示例1类似的过程，用41BB和4.1BBL的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染色和分析。

[0298] 示例11。对具有表达OX40的细胞和表达OX40L的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0299] 执行与示例1类似的过程，用OX40和OX40L的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染色和分析。

[0300] 示例12。对具有表达CD40的细胞和表达CD40L的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0301] 执行与示例1类似的过程，用CD40和CD40L的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染色和分析。

[0302] 示例13。对具有表达ICOS的细胞和表达ICOSL的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0303] 执行与示例1类似的过程，用ICOS和ICOSL的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染色和分析。

[0304] 示例14。对具有表达GITR的细胞和表达GITRL的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0305] 执行与示例1类似的过程，用GITR和GITRL的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染色和分析。

[0306] 示例15。对具有表达HLA-DR的细胞和表达TCR的细胞的组织样品进行的样品制备、成像和成像分析。

[0307] 执行与示例1类似的过程，用HLA-DR和TCR的染色和分析来取代PD-L1和PD-1的染

色和分析。

[0308] 示例16.对来自弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 患者的组织样品上的CD3和PD-1进行的样品制备、成像、以及成像分析

[0309] 样品制备。对来自DLBCL患者 (n=43) 的福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织样品进行脱蜡。然后,切片在蒸馏水中温育之前通过一系列二甲苯再水合,再进行酒精洗涤。然后在升高的压力和温度条件下进行热诱导的抗原修复,随后使其冷却并被转移至Tris缓冲盐水中。接着进行染色,其中进行以下步骤。首先,在与蛋白封闭剂一起温育之前,阻断内源性过氧化物酶以减少非特异性抗体染色。接下来,用鼠抗PD1一抗来对切片染色。然后,切片在用抗鼠HRP二抗进行温育之前先要被洗涤。在切片被洗涤之后使用TSA+Cy®3 (珀金埃尔默) 来检测PD-1染色。然后通过微波去除一抗试剂和二抗试剂。在用兔抗CD3一抗进行染色之前再次洗涤切片。洗涤切片,然后利用抗兔HRP二抗和4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 的混合物进行温育。洗涤切片,然后使用TSA-Cy®5 (珀金埃尔默) 来检测CD3染色。最后一次对切片进行洗涤,随后将具有封固剂的盖玻片盖在切片上并在室温下干燥过夜。图15中示出了抗体和检测试剂的示意图。

[0310] 样品成像与分析。然后,使用Vectra 2智能切片分析系统(使用Vectra软件版本2.0.8 (珀金埃尔默)) 来获取荧光图像。首先,使用DAPI以4倍 (4x) 放大率对切片进行单色成像。使用(利用inForm开发的) 自动算法来辨识切片中含有组织的区域。

[0311] 针对与DAPI (蓝色)、Cy®3 (绿色)、和Cy®5 (红色) 相关联的信道,所辨识的含有组织的切片区域以4x放大率成像以创建RGB图像。使用视野选择器104中的(利用inForm开发的) 自动富集算法来处理这些4x放大率的图像,以根据最高的Cy®3表达来辨识和排列可能的20x放大率的视野。

[0312] 在DAPI、Cy®3、和Cy®5波长的20x放大率下对最大的40个视野进行成像。对原始图像的可接受性进行检查,并且在分析之前排除未聚焦、不存在任何肿瘤细胞、高度坏死、或包含与预期抗体定位(即,背景染色) 高度不相关的荧光信号的图像。使用AQUAduct (珀金埃尔默) 来处理所接受的图像,其中,每个荧光团通过光谱解混器210在光谱上被解混到单个信道并被保存为单独的文件。

[0313] 使用AQUAnalysis™或通过AQUAserve™的全自动过程来进一步分析所处理的文件。详情如下。

[0314] 每个DAPI图像由细胞掩模器212处理以辨识该图像(图16a) 内的所有细胞核,然后将该图像扩大2个像素以表示整个细胞的大致尺寸。所得到的掩模表示该图像内的所有细胞(图16b)。

[0315] 通过生物标志物掩模器222来处理每个Cy®5图像(图17a) 以创建为PD-1阳性的所有细胞的二元掩模(图17b)。

[0316] 通过生物标志物掩模器222处理每个Cy®3图像(图18a) 以创建为CD3-阳性的所有细胞的二元掩模(图18b)。

[0317] PD-1阳性的所有细胞的二元掩模和CD3阳性的所有细胞的二元掩模被结合以创建针对PD-1和CD3双阳性的所有细胞的二元掩模(图19)。

[0318] 使用阳性计算器236,通过将以像素为单位测得的且由面积评估器232确定的所有

PD-1阳性细胞的掩模(图17b)的总面积除以以像素为单位测得的且由面积评估器232确定的所有CD3阳性细胞的掩模(图18b)的总面积来导出针对表达PD-1的所有CD3细胞的生物标志物阳性百分比(PBP)。在初级(低级)位点对比次级位点(高级)时,观察到被耗尽的T细胞(CD3+/PD1+)的差异分布。结果在图20a和图20b中示出。

[0319] 示例17.平台比较

[0320] 通过与流式细胞术比较证实了与示例1和示例16类似的过程的准确性。在用CD3包被的载物片上用IL-2、TGFβ、和CD28进行5天刺激的全血中(基于FoxP3和CD25表达)确定调节性T细胞的频率。

[0321]

平台	FoxP3	CD25
流式细胞术	22%	66%
PBP方法	24%	66%

[0322] 示例18.对多种肿瘤指示中的CD25/FoxP3 T细胞的评估

[0323] 执行与示例16类似的过程,使用用AlexaFluor488第二抗体检测到的具有抗S100或抗细胞角蛋白抗体对肿瘤细胞进行进一步辨识并在DAPI、FITC、Cy®3、和Cy®5波长下成像,以定量评估NSCLC、胃癌和黑素瘤组织中的CD25和FoxP3。用辨识CD25和FoxP3的抗体对组织进行染色,并将它们在非肿瘤区域中的表达计算为表达百分比。记录在案的肺、胃和黑素瘤组织样本中CD25/FoxP3+ T细胞的患病率为1%至10%。结果在图21和图22中示出。

[0324] 示例19.对多种肿瘤指示中的CD4/CD8 T细胞的评估

[0325] 执行与示例16类似的过程,使用用AlexaFluor488第二抗体检测到的抗S100或抗细胞角蛋白抗体对肿瘤细胞进行进一步辨识并在DAPI、FITC、Cy®3、和Cy®5波长下成像,以定量评估NSCLC、胃癌和黑素瘤组织中的CD4和CD8。用辨识CD4和CD8的抗体对组织进行染色,并将它们在非肿瘤区域中的表达计算为表达百分比。在肿瘤样本的连续切片中观察到CD4+和CD8+ T细胞的广泛表达(10%-50%)。结果在图23a和图23b中示出。

[0326] 示例20.对来自被诊断患有转移性黑素瘤或非小细胞肺癌的患者的肿瘤样品中骨髓来源的抑制细胞(MDSC)样细胞的评估。

[0327] 为了辨识表达骨髓细胞的表型标志物特征(例如,CD11b、CD33、和HLA-DR)和对这些细胞施加抑制功能的生化标志物(例如,ARG1和IDO-1)的MDSC样细胞,样品用CD11b、HLA-DR和IDO或CD11b、CD33和ARG1进行染色。

[0328] 利用CD11b、HLA-DR、和IDO-1的差异表达来调查在来自转移性黑素瘤患者的肿瘤活组织中被称为TAM(肿瘤相关巨噬细胞)的抑制性骨髓细胞的亚组的存在。可能与预测对癌症免疫治疗的应答有关的代表性亚表型在图24a、图24b、图25a、和图25b中示出。

[0329] 利用CD11b、CD33和ARG-1或CD11b、HLA-DR和IDO-1的差异表达来调查来自晚期肺癌(NSCLC)患者的肿瘤样本中MDSC样细胞和TAM的存在。可能与预测对癌症免疫治疗的应答有关的代表性亚表型在图26a、图26b和图27中示出。

[0330] 样品制备。对福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织样品脱蜡。然后,切片在蒸馏水中温育之前通过一系列二甲苯再水合,再进行酒精洗涤。然后在升高的压力和温度条件下进行热诱导的抗原修复,随后使其冷却并将其转移至Tris缓冲盐水中。接着进行染色,其中进行以下步骤。首先,在与蛋白封闭剂一起温育之前,阻断内源性过氧化物酶以减少非特异性

抗体染色。接下来,用兔抗IDO-1或鼠抗CD33一抗来对切片染色。然后,切片在用抗鼠或抗兔HRP二抗进行温育之前先要被洗涤。在切片被洗涤之后使用TSA+Cy®5(珀金埃尔默)来检测抗IDO-1或抗CD33染色。然后通过含有50mM过氧化氢的新鲜的100mM苯甲酰肼进行两次洗涤来淬灭任何残留的HRP。在用鼠抗HLA-DR或兔抗ARG1一抗进行染色之前再次洗涤切片。切片被洗涤之后,利用抗鼠或抗兔HRP二抗进行温育。再次洗涤切片之后使用TSA-Cy®3(珀金埃尔默)来检测抗HLA-DR或抗ARG1染色。然后通过微波去除一抗试剂和二抗试剂。在用鼠抗CD11b抗体进行染色之前再次洗涤切片。切片被洗涤之后,利用抗兔HRP二抗加4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)的混合物进行温育。洗涤切片,然后使用TSA-AlexaFluor488(Life Technologies)来检测抗CD11b染色。最后一次对切片进行洗涤,随后将具有封固剂的盖玻片盖在切片上并在室温下干燥过夜。

[0331] 与示例16类似的过程被用来针对DAPI、FITC、Cy®3和Cy®5波长进行样品成像和分析。使用视野选择器104中的(利用inForm开发的)自动富集算法来处理4x放大率的图像,以根据最高的Cy®3和Cy®5表达来辨识和排列可能的20x放大率的视野。

[0332] 细胞掩模器212处理每个DAPI图像以辨识该图像内的所有细胞核,然后将该图像扩大以表示整个细胞的大致尺寸。所得到的掩模表示该图像内的所有细胞。

[0333] 通过生物标志物掩模器222来处理每个AlexaFluor®488图像以创建为CD11b阳性的所有细胞的二元掩模。

[0334] 通过生物标志物掩模器222来处理每个Cy®3图像以创建为HLA-DR或CD33阳性的所有细胞的二元掩模。

[0335] 通过生物标志物掩模器222处理每个Cy®5图像以创建为IDO-1或ARG1阳性的所有细胞的二元掩模。

[0336] CD11b阳性的所有细胞的二元掩模和HLA-DR阳性的所有细胞的二元掩模被结合以创建对CD11b和HLA-DR双阳性的所有细胞或对CD11b阳性和对HLA-DR阴性的所有细胞的二元掩模。

[0337] 使用阳性计算器236,通过将以像素为单位测得的且由面积评估器232确定的所有CD11b阳性的、HLA-DR阴性的细胞的掩模的总面积除以以像素为单位测得的且由面积评估器232确定的所有CD11b阳性细胞的掩模的总面积来导出缺乏HLA-DR表达的所有CD11b细胞的生物标志物阳性百分比(PBP)。针对从被诊断患有转移性黑素瘤的患者采集的肿瘤样品的结果在图24a中示出。

[0338] 将CD11b阳性的所有细胞、IDO阳性的所有细胞与HLA-DR阳性的所有细胞的二元掩模结合以创建CD11b阳性的、HLA-DR阴性的且IDO-1阳性的所有细胞的二元掩模。

[0339] 通过将以像素为单位测得的所有CD11b阳性的、HLA-DR阴性的且IDO-1阳性的细胞的掩模的总面积除以以像素为单位测得的所有CD11b阳性细胞的掩模的总面积来导出针对表达IDO但缺乏HLA-DR表达的所有CD11b细胞的PBP。针对从被诊断患有转移性黑素瘤的患者采集的肿瘤样品的结果在图24b中示出。针对从被诊断患有非小细胞肺癌的患者的结果在图27中示出。

[0340] 将HLA-DR阳性的所有细胞的二元掩模和IDO-1阳性的所有细胞的二元掩模结合以创建对HLA-DR和IDO-1双阳性的所有细胞的二元掩模。

[0341] 使用阳性计算器236,通过将以像素为单位测得的且由面积评估器232确定的所有IDO-1阳性的、HLA-DR阳性的细胞的掩膜的总面积除以以像素为单位测得的且由面积评估器232确定的所有HLA-DR阳性细胞的掩膜的总面积来导出针对表达IDO-1的所有HLA-DR细胞的生物标志物阳性百分比(PBP)。针对从被诊断患有转移性黑素瘤的患者采集的肿瘤样品的结果在图25a中示出。

[0342] 将CD11b阳性的所有细胞、IDO阳性的所有细胞、和HLA-DR阳性的所有细胞的二元掩模结合以创建为CD11b阳性的、IDO阳性的且HLA-DR阳性的所有细胞的二元掩模。

[0343] 通过将以像素为单位测得的所有CD11b阳性的、HLA-DR阳性的且IDO-1阳性的细胞的掩膜的总面积除以以像素为单位测得的所有CD11b阳性细胞的掩膜的总面积来导出针对表达IDO-1和HLA-DR的所有CD11b细胞的PBP。针对从被诊断患有转移性黑素瘤的患者采集的肿瘤样品的结果在图25b中示出。针对从被诊断患有非小细胞肺癌的患者的结果在图27中示出。

[0344] 将CD11b阳性的所有细胞、CD33阳性的所有细胞、和ARG1阳性的所有细胞的二元掩模结合以创建为CD11b阳性的、CD33阳性的且ARG1阳性的所有细胞的二元掩模。

[0345] 通过将以像素为单位测得的所有CD11b阳性的、CD33阳性的和ARG1阳性的细胞的掩膜的总面积除以以像素为单位测得的所有CD11b阳性细胞的掩膜的总面积来导出针对表达CD33和ARG1的所有CD11b细胞的PBP。针对从被诊断患有非小细胞肺癌的患者的结果在图26a中示出。

[0346] 示例21。对从被诊断患有转移性黑素瘤的患者采集的肿瘤样品中的活化T细胞的评估。

[0347] 执行与示例20类似的过程以用DAPI、CD3、CD8、和Ki67的结合对每个样品进行染色以辨识活化T细胞的亚群。在从被诊断患有转移性黑素瘤的患者采集的肿瘤活检组织中调查CD8+Ki67+的患病率(图28)。

[0348] 示例22。对从被诊断患有转移性黑素瘤的患者采集的肿瘤样品中的巨噬细胞患病率的评估。

[0349] 执行与示例16类似的过程,使用用AlexaFluor488第二抗体检测到的抗S100对肿瘤细胞进行进一步辨识并在DAPI、FITC、Cy®3、和Cy®5波长下成像,以定量评估黑素瘤组织上的CD163和CD68。用辨识CD163和CD68的抗体对组织进行染色,并将它们在非肿瘤区域中的表达计算为单个PBP表达或双PBP表达。结果在图29a、图29b和图29c中示出。

[0350] 示例23。对来自被诊断患有弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和神经内分泌肿瘤(NET)的患者的肿瘤样品中的T细胞抑制患病率的评估。

[0351] 执行与示例1类似的过程,以用鼠抗-LAG-3一抗、抗鼠HRP二抗来将DLBCL和NET肿瘤样品染色、用TSA+Cy®3.5检测对其进行检测、以及用含有50mM过氧化氢和100mM苯甲酰肼来淬灭残留的HRP。在此之后,用兔抗TIM-3一抗、抗兔HRP二抗来将切片染色,并通过TSA+Cy®5进行检测。然后通过微波去除一抗和二抗。然后将组织用兔抗CD3一抗、抗兔HRP二抗加4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)进行染色,并通过Opal™520进行检测。针对DAPI、FITC、Texas Red、和Cy®5波长执行与示例1类似的成像。执行与示例1类似的分析以确定分别为LAG-3和TIM-3阳性的T细胞的PBP患病率。结果在图30a和图30b中示出。

[0352] 段落A。一种导出视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比(%) (PBP) 值的方法,包括:

[0353] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0354] (ii) 构建表示视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0355] (iii) 可选地,构建表示视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模;

[0356] (iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模,所述第四掩模包括表示视野中亦表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0357] (v) 可选地,以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模,所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的荧光信号;

[0358] (vi) 通过将第四掩模的总面积除以第一掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值;

[0359] (vii) 可选地,以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模,所述第六掩模包括表示视野中表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的荧光信号;

[0360] (viii) 可选地,通过将第六掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物的所有细胞的第一亚组的PBP值。

[0361] 段落B。根据段落A所述的方法,其中,执行所列举的所有可选步骤。

[0362] 段落C。根据段落A或段落B所述的方法,还包括:

[0363] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

[0364] (x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第七掩模,所述第八掩模包括表示视野中亦表达所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号;

[0365] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第八掩模,所述第九掩模包括表示视野中表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号;

[0366] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的PBP值;

[0367] 段落D。根据段落A或段落B所述的方法,还包括:

[0368] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模;

[0369] (x) 以提供第八掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模,所述第八掩模包括表示视野中不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;

[0370] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第七掩模和所述第八掩模,所述第九掩模包括表示视野中表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号;以及

[0371] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第八掩模的总面积来导出针对视野中表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0372] 段落E。根据段落A-段落D中任一段所述的方法,其中,所关注的第一生物标志物包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。

[0373] 段落F。根据段落A-段落D中任一段所述的方法,其中,所关注的第一生物标志物包括选自PD-L1、半乳凝素9、和MHC的生物标志物。

[0374] 段落G。根据段落D所述的方法,其中,所关注的第二生物标志物包括选自PD-1、TIM-3、和TCR的生物标志物。

[0375] 段落H。根据段落D所述的方法,其中,所关注的第二生物标志物不同于所关注的第一生物标志物并且包括选自PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。

[0376] 段落I。根据段落A-段落E中任一段所述的方法,其中,视野中所有细胞的第一亚组包括肿瘤细胞。

[0377] 段落J。根据段落A-段落E中任一段所述的方法,其中,视野中所有细胞的第一亚组包括非肿瘤细胞。

[0378] 段落K。根据段落J所述的方法,其中,视野中所有细胞的第一亚组包括T细胞。

[0379] 段落L。根据段落K所述的方法,其中,T细胞表达CD3。

[0380] 段落M。根据段落K所述的方法,其中,T细胞表达CD8。

[0381] 段落N。根据段落K所述的方法,其中,T细胞表达CD4。

[0382] 段落O。根据段落A-段落D中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。

[0383] 段落P。根据段落A-段落D中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物仅在非肿瘤细胞中表达。

[0384] 段落Q。根据段落A-段落D中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物在T细胞中表达。

[0385] 段落R。根据段落A-段落D中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物包括CD3。

[0386] 段落S。根据段落A-段落D中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物包括CD19。

[0387] 段落T。根据段落B所述的方法,其中,所关注的第一生物标志物包括Ki67,并且视野中所有细胞的第一亚组包括CD8阳性细胞。

[0388] 段落U。根据段落A-段落T中任一段所述的方法,其中,以像素为单位来测量总面积。

[0389] 段落V。一种监测被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者的病情进展的方法,包括:

[0390] (i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点从癌症患者采集的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物

标志物的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值 (PBP) 以获得至少第一PBP值和至少第二PBP值;

[0391] (ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

[0392] 段落W。根据段落V所述的方法,其中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。

[0393] 段落X。根据段落V所述的方法,其中,所述变化是指示所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加。

[0394] 段落Y。根据段落V-段落X中任一段所述的方法,其中,所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。

[0395] 段落Z。一种监测被诊断患有癌症并正在进行免疫治疗的患者的病情进展的方法,包括:

[0396] (i) 使用包含至少在免疫治疗开始之前和之后的两个时间点从癌症患者采集的肿瘤组织的至少两个样品来针对所述至少两个样品中的每一者导出针对表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比值 (PBP) 以获得至少第一PBP值和至少第二PBP值;

[0397] (ii) 记录所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值,所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的变化指示所述免疫治疗的效果。

[0398] 段落AA。根据段落Z所述的方法,其中,所述变化是表明所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的减少。

[0399] 段落AB。根据段落Z所述的方法,其中,所述变化是指示所述免疫治疗的积极效果的所述至少第一PBP值和所述至少第二PBP值之间的增加。

[0400] 段落AC。根据段落Z-段落AB中任一段所述的方法,其中,所述免疫治疗包括免疫检查点疗法。

[0401] 段落AD。一种导出视野中呈现的所有肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法,包括:

[0402] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0403] (ii) 构建表示视野中呈现的表达肿瘤生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0404] (iii) 以提供第三掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模,所述第三掩模包括表示视野中所有肿瘤细胞的荧光信号;

[0405] (iv) 构建表示视野中呈现的表达所关注的生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第四掩模;

[0406] (v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第三掩模和所述第四掩模,所述第五掩模包括表示所述视野中亦表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的荧光信号;以及

[0407] (vi) 通过将第五掩模的总面积除以第三掩模的总面积导出针对表达所关注的生物标志物的所有肿瘤细胞的PBP值。

[0408] 段落AE。根据段落AD所述的方法,其中,所关注的生物标志物包括选自PD-L1、半乳

凝素9、和MHC组成的组中的生物标志物。

[0409] 段落AF。根据段落AD所述的方法,其中,视野还包括非肿瘤细胞。

[0410] 段落AG。根据段落AF所述的方法,其中,非肿瘤细胞包括免疫细胞和基质细胞。

[0411] 段落AH。根据段落AD-段落AG中任一段所述的方法,其中,总面积是以像素为单位进行测量的。

[0412] 段落AI。一种导出视野中呈现的所有非肿瘤细胞的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法,包括:

[0413] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0414] (ii) 构建表示视野中呈现的表达肿瘤生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0415] (iii) 以提供第三掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模,所述第三掩模包括表示视野中所有非肿瘤细胞的荧光信号;

[0416] (iv) 构建表示视野中呈现的表达所关注的生物标志物的所有区域的荧光信号的第四掩模;

[0417] (v) 以提供第五掩模的方式来结合所述第三掩模和所述第四掩模,所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的荧光信号;以及

[0418] (vi) 通过将第五掩模的总面积除以第三掩模的总面积导出针对表达所关注的生物标志物的所有非肿瘤细胞的PBP值。

[0419] 段落AJ。根据段落AI所述的方法,其中,所关注的生物标志物包括选自由PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。

[0420] 段落AK。根据段落AI所述的方法,其中,所关注的生物标志物包括选自由CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86组成的组中的生物标志物。

[0421] 段落AL。根据段落AI所述的方法,其中,非肿瘤细胞包括免疫细胞和基质细胞。

[0422] 段落AM。根据段落AI所述的方法,其中,非肿瘤细胞包括骨髓细胞。

[0423] 段落AN。一种导出视野中呈现的所有细胞或其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比 (PBP) 值的方法,包括:

[0424] (i) 生成表示视野中呈现的所有细胞的细胞核的第一荧光信号的图像,并将第一荧光信号扩大至整个细胞的直径以构建该视野中呈现的所有细胞的第一掩模;

[0425] (ii) 构建表示视野中呈现的表达亚组生物标志物的所有区域的第二荧光信号的第二掩模;

[0426] (iii) 可选地,构建表示视野中呈现的表达所关注的第一生物标志物的所有区域的第三荧光信号的第三掩模;

[0427] (iv) 以提供第四掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第二掩模,所述第四掩模

包括表示视野中亦表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；

[0428] (v) 可选地, 以提供第五掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第三掩模, 所述第五掩模包括表示视野中亦表达所关注的第一生物标志物的所有细胞的荧光信号；

[0429] (vi) 通过将第四掩模的总面积除以第一掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值；

[0430] (vii) 可选地, 以提供第六掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第五掩模, 所述第六掩模包括表示视野中表达下列各项的所有细胞的荧光信号：

[0431] (a) 亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物；或

[0432] (b) 其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物；

[0433] 以及

[0434] (viii) 可选地, 通过将第六掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达 (a) 亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物或 (b) 其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物的所有细胞的第一亚组的PBP的值。

[0435] 段落A0。根据段落AN所述的方法, 其中, 执行所列举的所有可选步骤。

[0436] 段落AP。根据段落AN或段落A0所述的方法, 还包括：

[0437] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模；

[0438] (x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第一掩模和所述第七掩模, 所述第八掩模包括表示视野中亦表达所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号；

[0439] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第四掩模和所述第八掩模, 所述第九掩模包括表示视野中表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的荧光信号；

[0440] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物的所有细胞的第二亚组的PBP值；

[0441] 段落AQ。根据段落AN或段落A0所述的方法, 还包括：

[0442] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模；

[0443] (x) 以提供第八掩模的方式从所述第一掩模中减去所述第二掩模, 所述第八掩模包括表示视野中不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；

[0444] (xi) 以提供第九掩模的方式来结合所述第七掩模和所述第八掩模, 所述第九掩模包括表示视野中表达的所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的荧光信号；以及

[0445] (xii) 通过将第九掩模的总面积除以第八掩模的总面积来导出针对视野中表达所关注的第二生物标志物但不表达亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0446] 段落AR。根据段落AN所述的方法, 还包括：

[0447] (ix) 构建表示视野中呈现的表达所关注的第二生物标志物的所有区域的第四荧光信号的第七掩模；

[0448] (x) 以提供第八掩模的方式来结合所述第六掩模和所述第七掩模, 所述第八掩模包括表示视野中表达下列各项的所有细胞的荧光信号：

[0449] (a) 视野中的亚组生物标志物、所关注的第一生物标志物、以及所关注的第二生物标志物;

[0450] (b) 视野中其中不存在所关注的第二生物标志物的亚组生物标志物和所关注的第一生物标志物;或

[0451] (c) 视野中其中不存在所关注的第一生物标志物的亚组生物标志物和所关注的第二生物标志物;

[0452] 以及

[0453] (xii) 通过将第八掩模的总面积除以第四掩模的总面积来导出针对表达所关注的第一生物标志物或所关注的第二生物标志物或它们的组合和亚组生物标志物的所有细胞的PBP值。

[0454] 段落AS。据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,所关注的第一生物标志物包含选自CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。

[0455] 段落AT。根据段落AN-段落AQ中任一段所述的方法,其中,所关注的第一生物标志物包含选自PD-L1、半乳凝素9、和MHC的生物标志物。

[0456] 段落AU。根据段落AQ所述的方法,其中,所关注的第二生物标志物包括选自PD-1、TIM-3、和TCR的生物标志物。

[0457] 段落AV。根据段落AQ所述的方法,其中,所关注的第二生物标志物不同于所关注的第一生物标志物并且包括选自CD11b、CD33、HLA-DR、IDO-1、ARG1、颗粒酶B、B2M、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、HLA-DR、半乳凝素9、CD80、CD86、4.1BBL、ICOSL、CD40、OX40L、IDO-1、GITRL、PD-1、TIM3、LAG3、41BB、OX40、CTLA-4、CD40L、CD28、GITR、ICOS、CD28、CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD25、CD16、CD56、CD68、CD163、CD80、和CD86的生物标志物。

[0458] 段落AW。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,视野中所有细胞的第一亚组包括肿瘤细胞。

[0459] 段落AX。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,视野中所有细胞的第一亚组包括非肿瘤细胞。

[0460] 段落AY。根据段落AX所述的方法,其中,视野中所有细胞的第一亚组包括T细胞。

[0461] 段落AZ。根据段落AY所述的方法,其中,T细胞表达CD3。

[0462] 段落BA。根据段落AY所述的方法,其中,T细胞表达CD8。

[0463] 段落BB。根据段落AY所述的方法,其中,T细胞表达CD4。

[0464] 段落BC。根据段落AX所述的方法,其中,视野中所有细胞的第一亚组包括骨髓细胞。

[0465] 段落BD。根据段落BC所述的方法,其中,骨髓细胞是骨髓来源的抑制性细胞。

[0466] 段落BE。根据段落BC所述的方法,其中,骨髓细胞是肿瘤相关的巨噬细胞。

[0467] 段落BF。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物仅在肿瘤细胞中表达。

[0468] 段落BG。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物仅在非

肿瘤细胞中表达。

[0469] 段落BH。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物在T细胞中表达。

[0470] 段落BI。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物包括CD3。

[0471] 段落BJ。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物包括CD19。

[0472] 段落BK。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物在骨髓细胞中表达。

[0473] 段落BL。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物在骨髓来源的抑制性细胞中表达。

[0474] 段落BM。根据段落AN-段落AR中任一段所述的方法,其中,亚组生物标志物在肿瘤相关的巨噬细胞中表达。

[0475] 段落BN。根据段落A0所述的方法,其中,所关注的第一生物标志物包括Ki67,并且视野中所有细胞的第一亚组包括CD8阳性细胞。

[0476] 段落B0。根据段落AN-段落BN中任一段所述的方法,其中,以像素为单位来测量总面积。

[0477] 虽然已经示例并描述了特定实施例,应当明白的是可以根据本领域普通技术在其中进行修改和变更,而不脱离如在所附权利要求中定义的其较宽方面中的技术。

[0478] 本文的示例性描述的实施例可以适宜地在不存在本文未详细公开的任意一个或多个要素,一个或多个限制的情况下实施。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应当可扩展并且非限制性地理解。另外,本文采用的术语和表达作为说明并且非限制性的术语使用,并且在这种术语和表达的使用中不意图排除所显示和描述的特征或其一部分的任意等价物,但应知道在所要求保护的技术的范围内多种修改是可能的。另外,短语“基本上由……组成”将被解释为包括具体叙述的那些要素以及不实质影响本发明所要求保护的技術的基本和新特性的另外的要素。短语“由……组成”排除未具体叙述的任意要素。

[0479] 本公开不限制于本申请中描述的特定实施例的方面。对本领域技术人员将显而易见的是,可以进行多种修改和变化而不脱离其精神和范围。除本文列举的那些之外,本公开的范围内功能上等价的方法和组合物根据以上说明对于本领域技术人员是显而易见的。这种修改和变化意图落入所附权利要求的范围内。本公开仅由所附权利要求的方面,连同这些权利要求给出的全部等价范围来限定。应该明白的是该公开不限于特定的方法、试剂、化合物组合物或生物学系统,其当然可以变化。还应该明白的是本文所使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,并且不旨在是限定性的。

[0480] 此外,在公开的特征或方面以马库什 (Markush) 组的方式描述的情况下,本领域技术人员将明白该公开从而也以马库什组的任何单独的成员或成员的子组的方式描述。

[0481] 本领域技术人员明白的是,用于任何和所有目的,尤其是在提供书写描述的方面,本文公开的所有范围也包括任何和所有可能的子范围和其子范围的组合。任意列出的范围可以容易地被认为是足以描述并实现被分成至少两等份、三等份、四等份、五等份、十等份等的相同范围。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可以容易地被分成下面的三分之

一、中间的三分之一和上面的三分之一。如本领域技术人员也将明白的是，所有语言如“高达”、“至少”、“大于”、“小于”等包括所叙述的数目并且是指可以随后如上所述被分成子范围的范围。最终，如本领域技术人员将明白的是，范围包括每个单独的成员。

[0482] 本说明书中所引用的所有出版物、专利申请和授权专利和其他文件通过引用并入本文，如同明确单独地指示每个单独出版物、专利申请、授权专利或其他文件通过引用整体并入本文。在本公开内容的定义与通过引用并入的文本所包含的定义矛盾的情况下，以本公开内容为准。

[0483] 其他实施例在所附权利要求中给出。

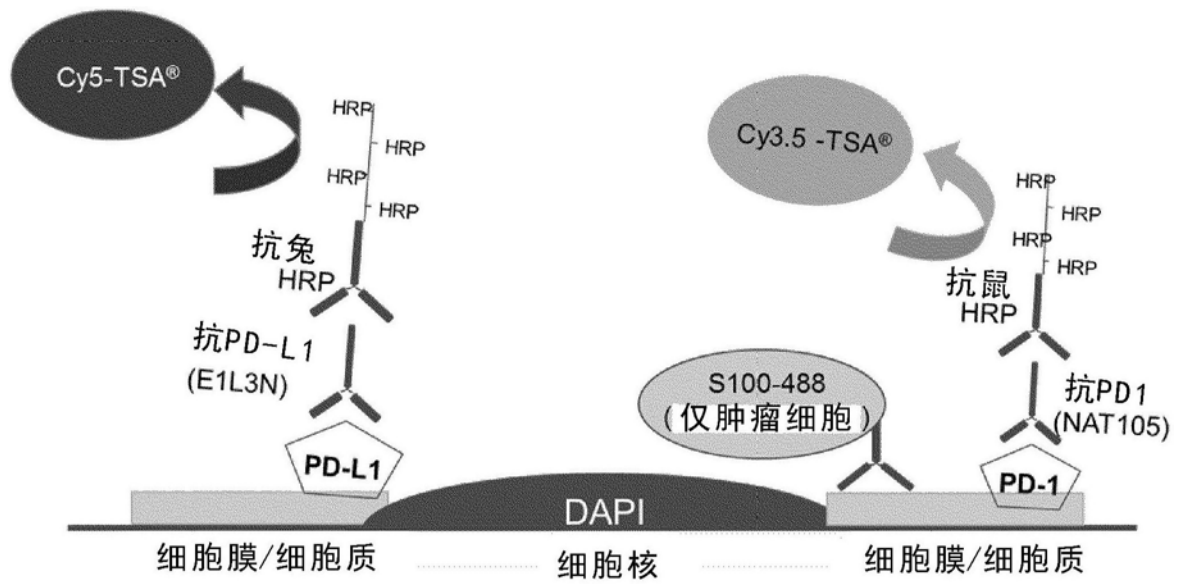


图1

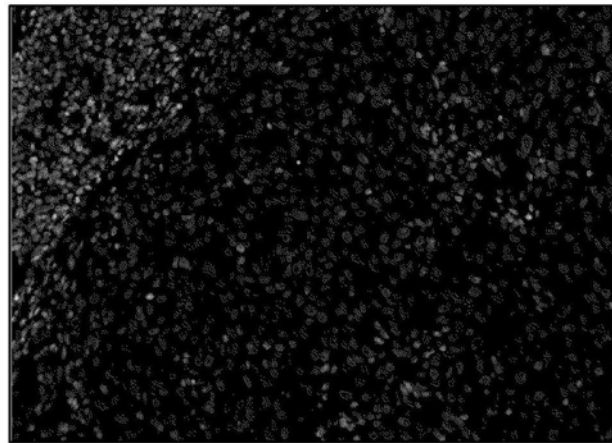


图2a

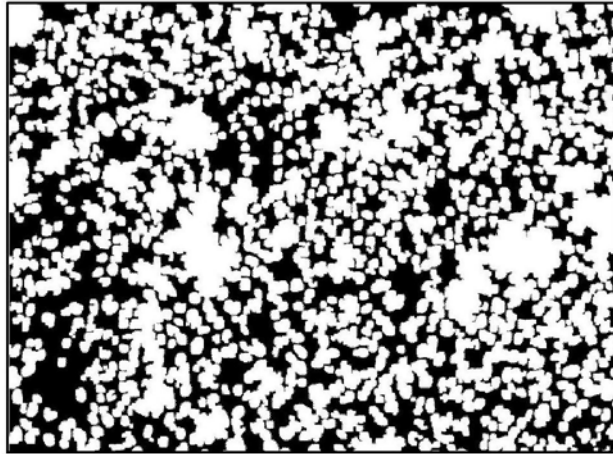


图2b

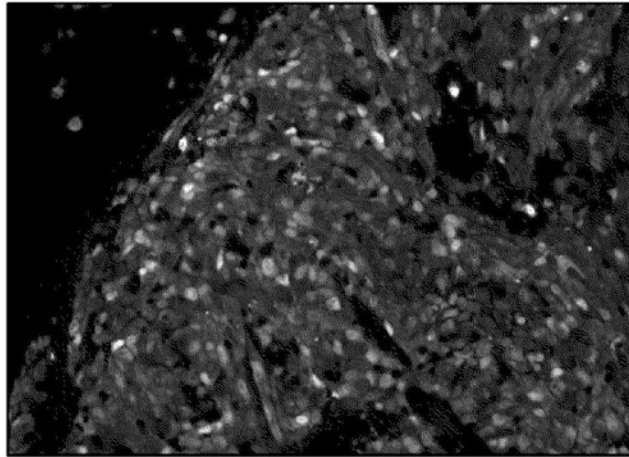


图3a

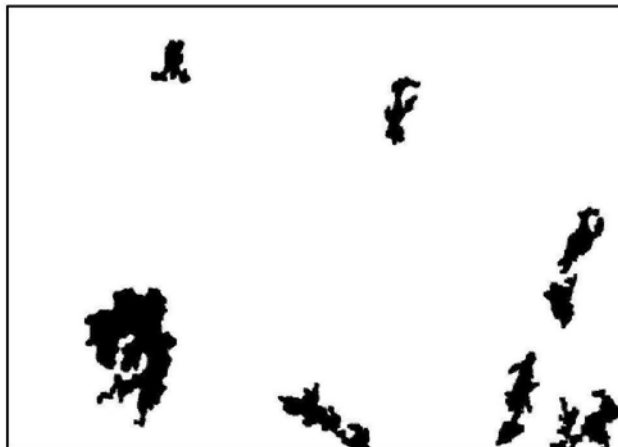


图3b

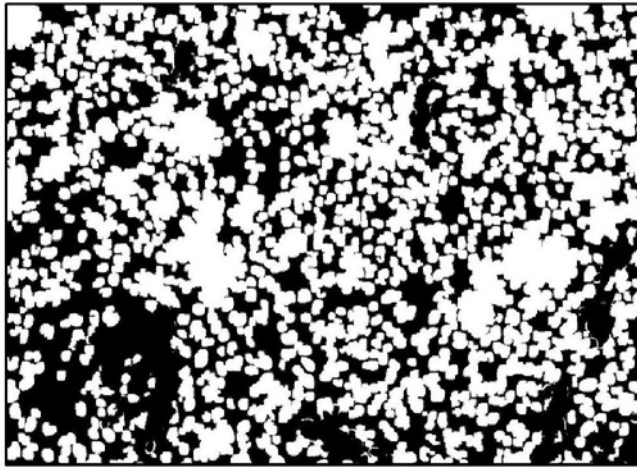


图3c

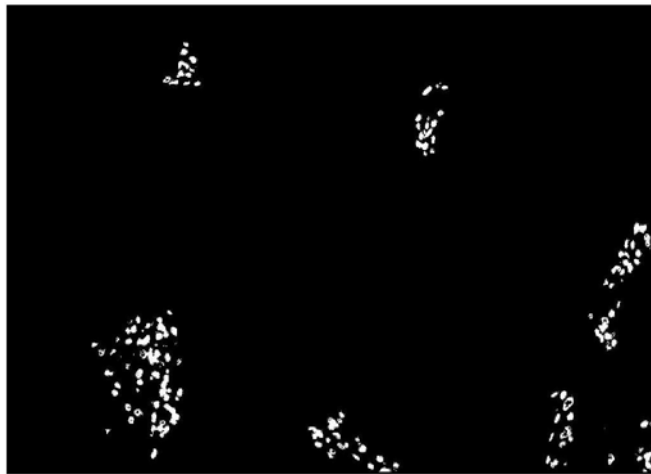


图3d

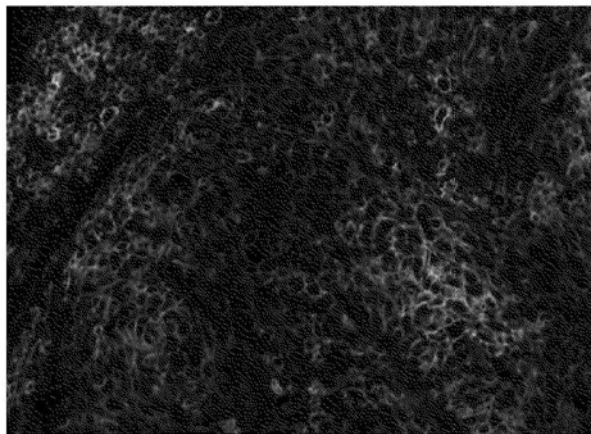


图4a

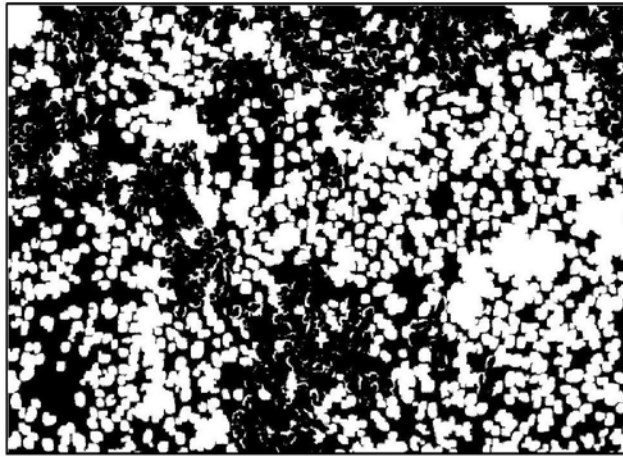


图4b

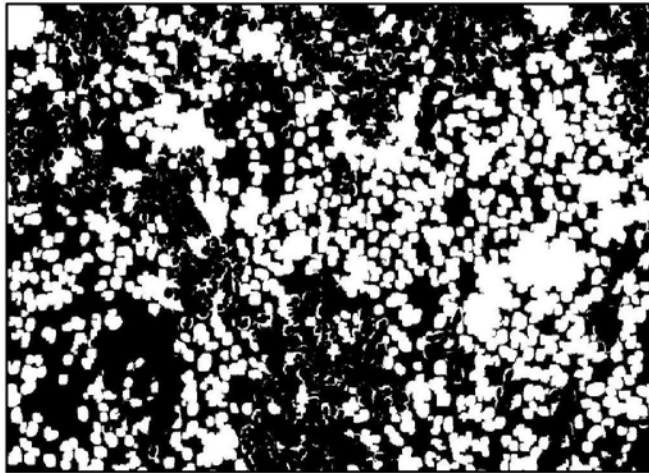


图4c

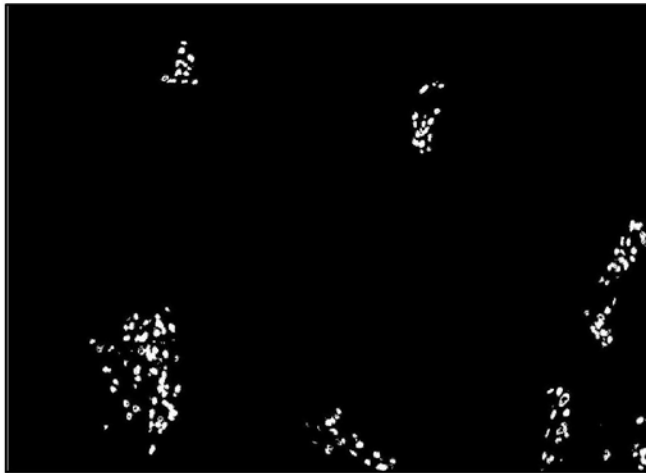


图4d

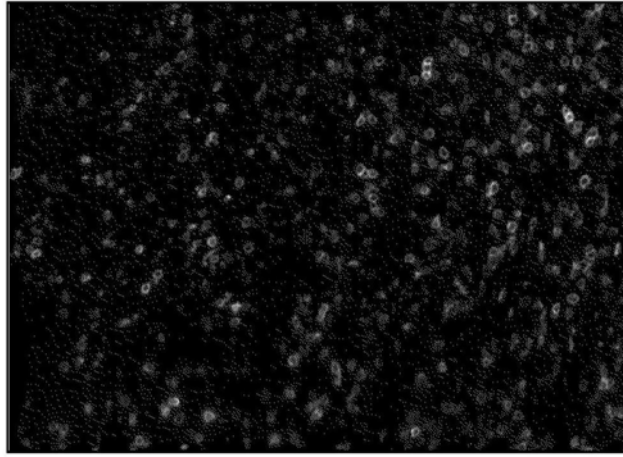


图5a

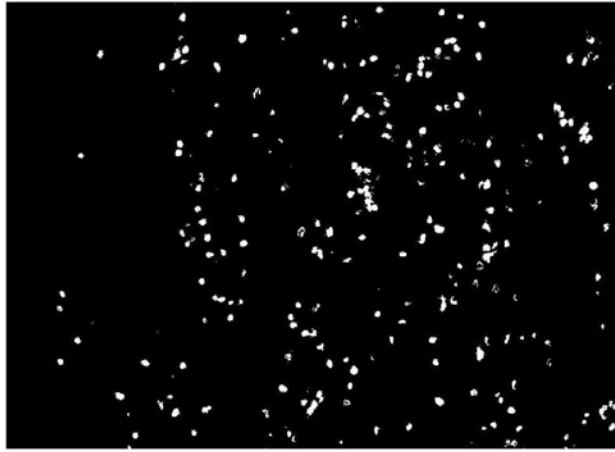


图5b

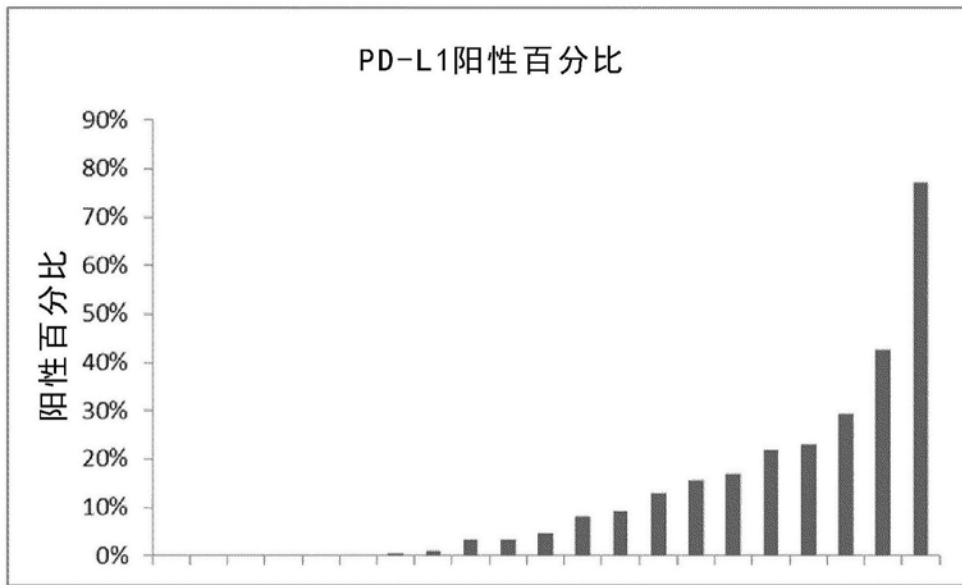


图6a

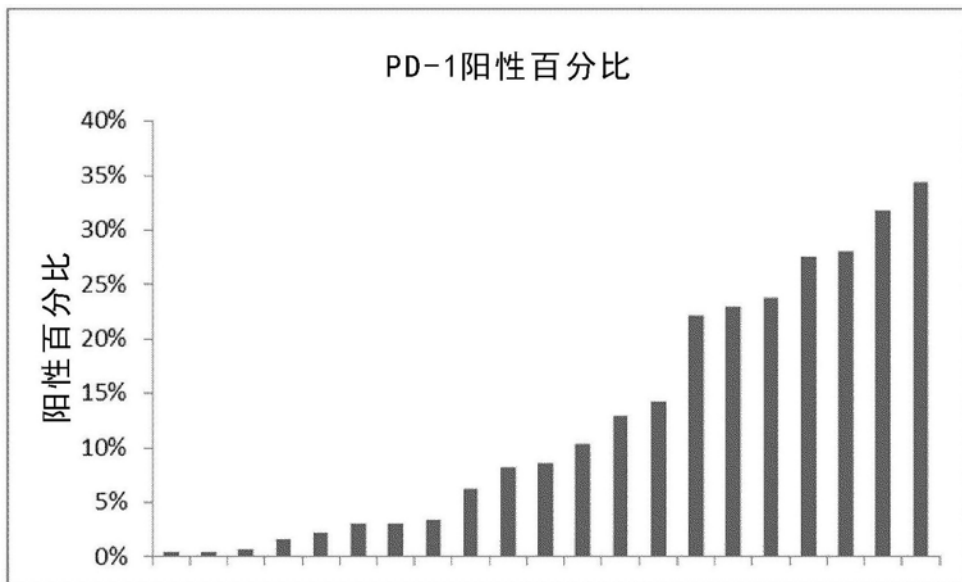


图6b

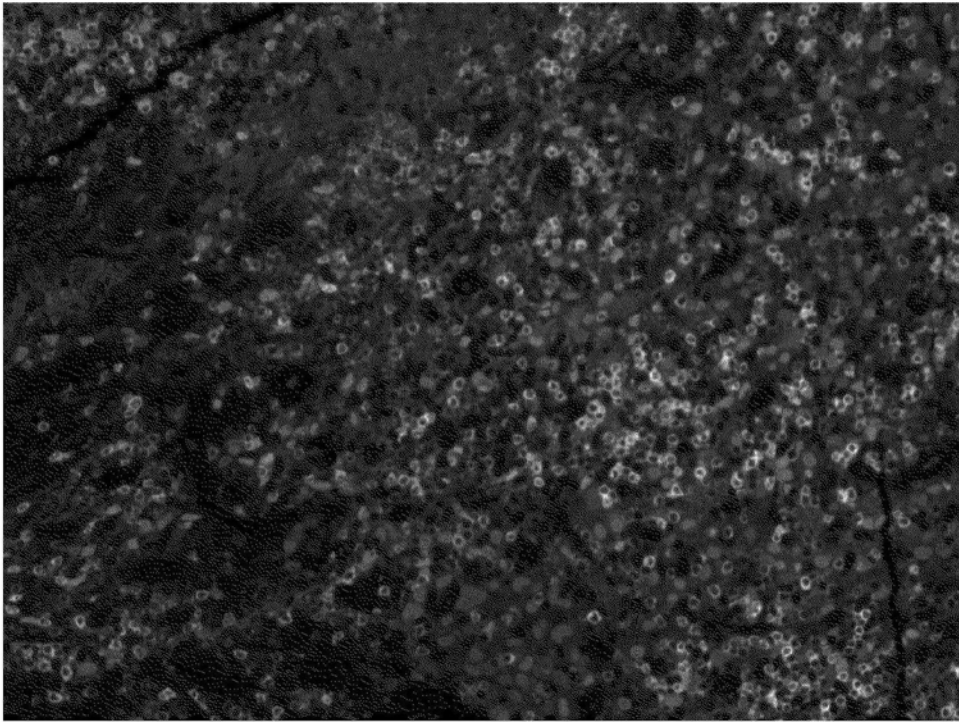


图7

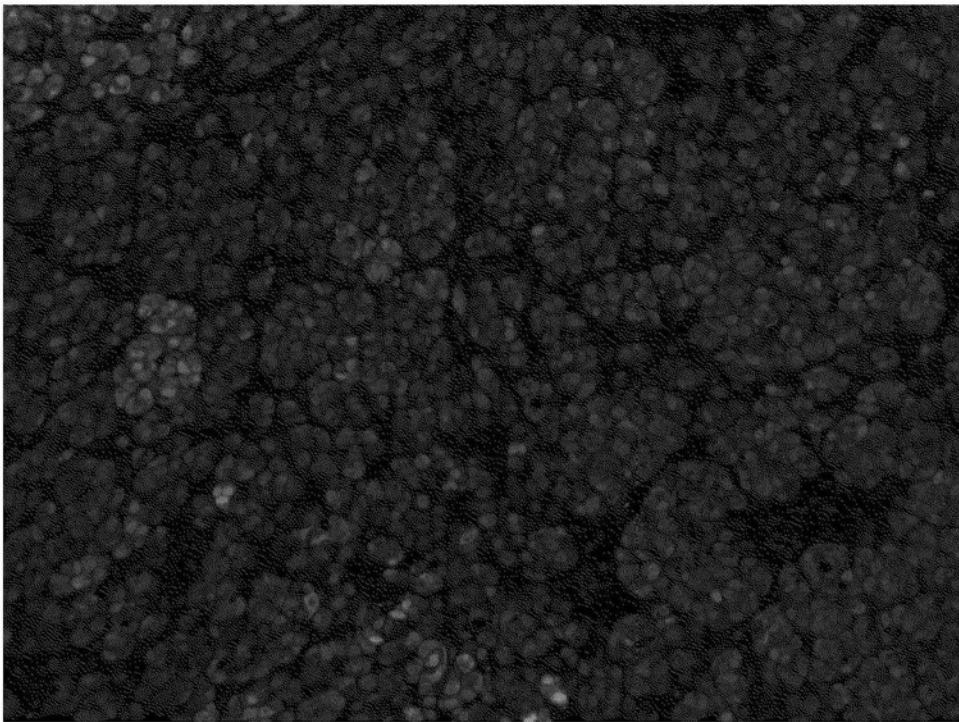


图8

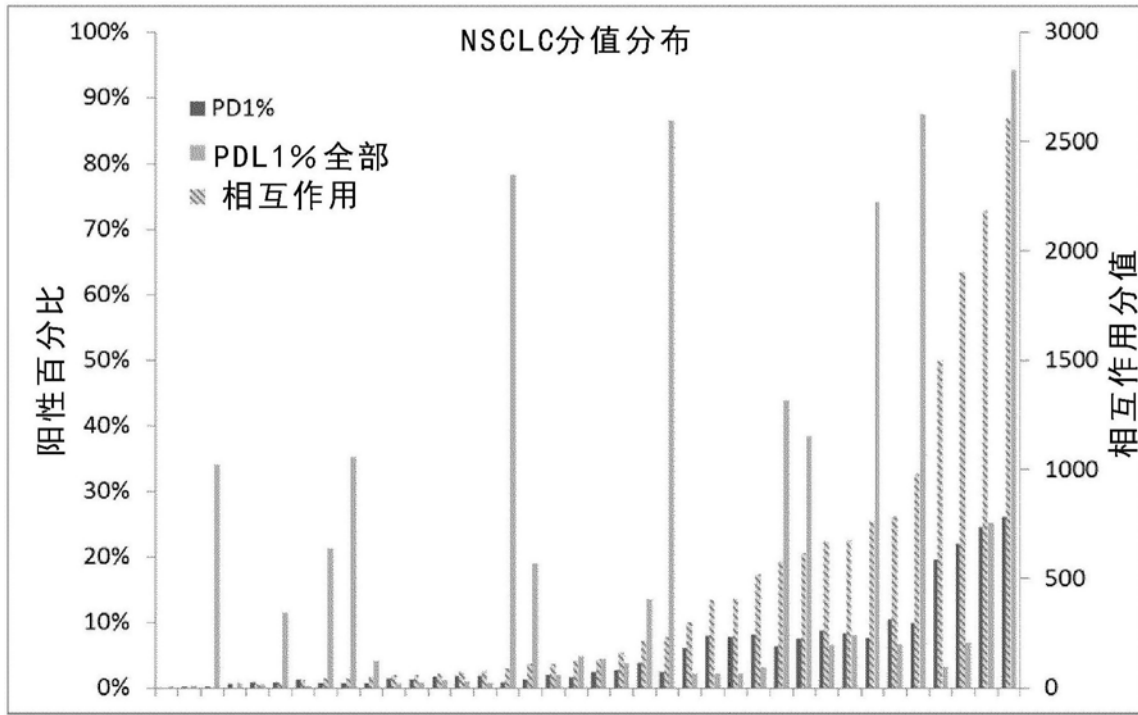


图9

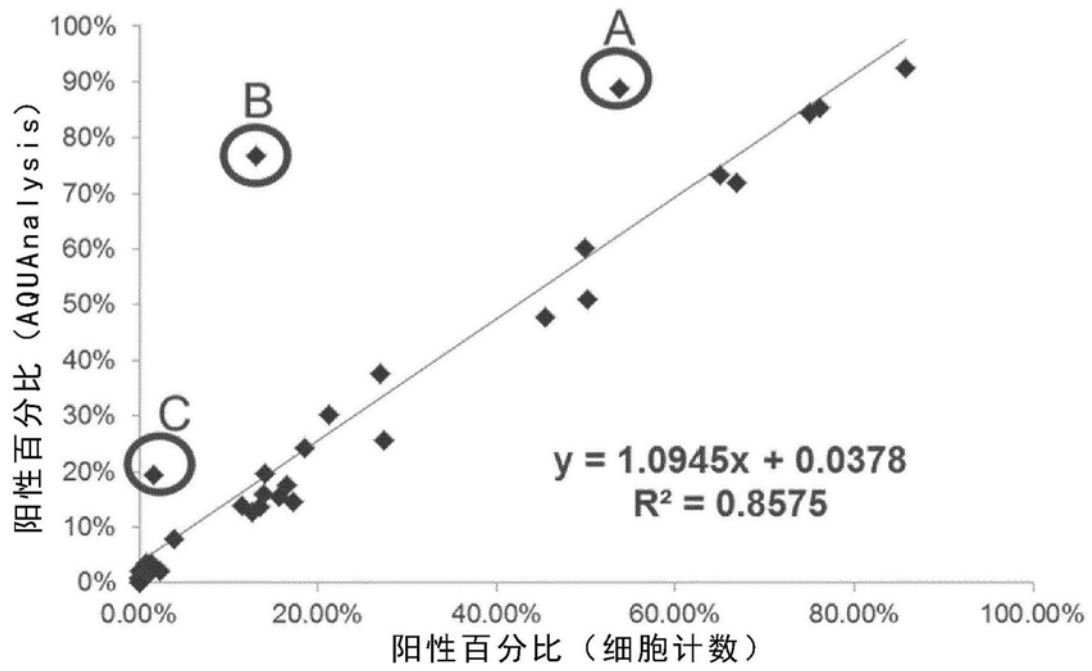


图10

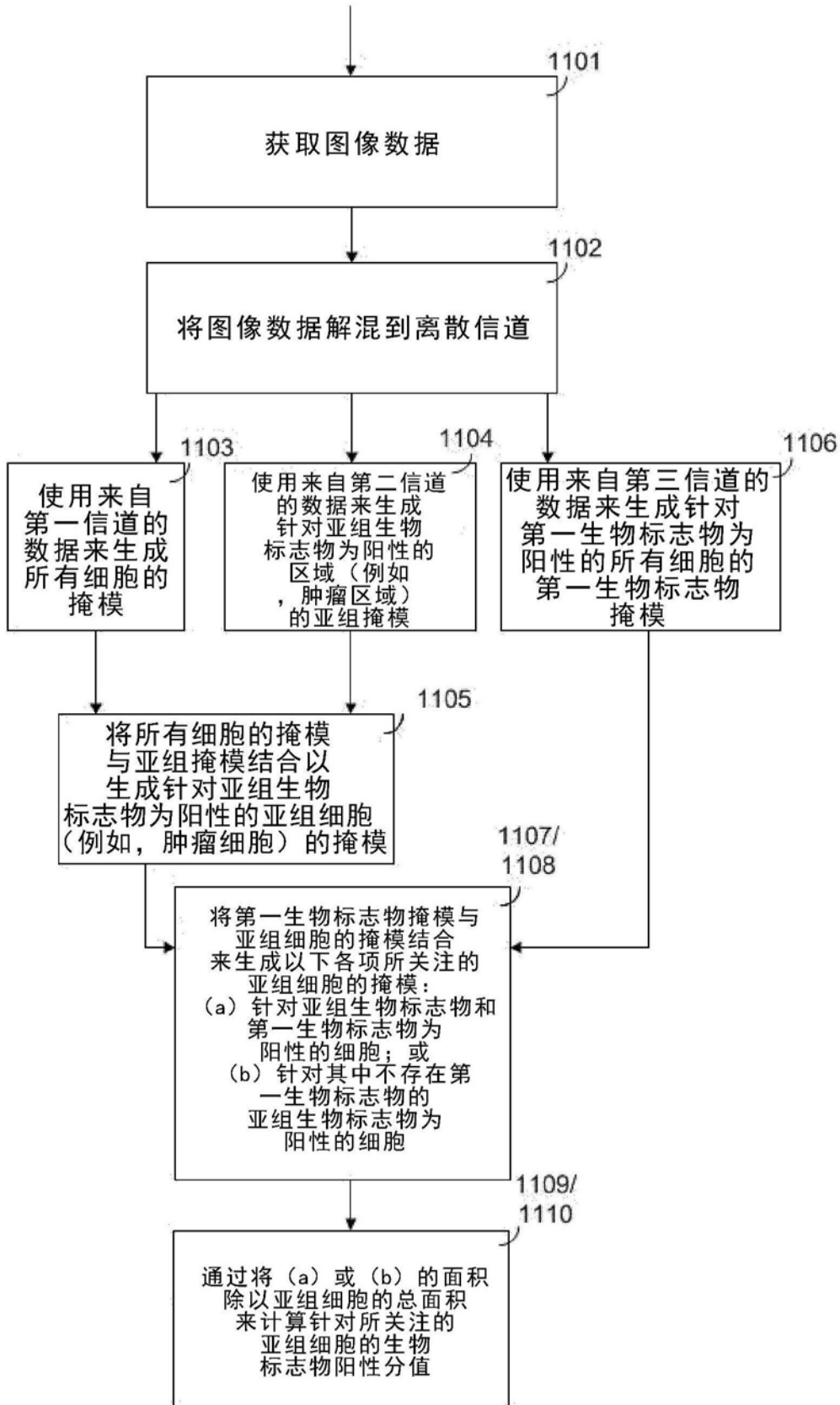


图11

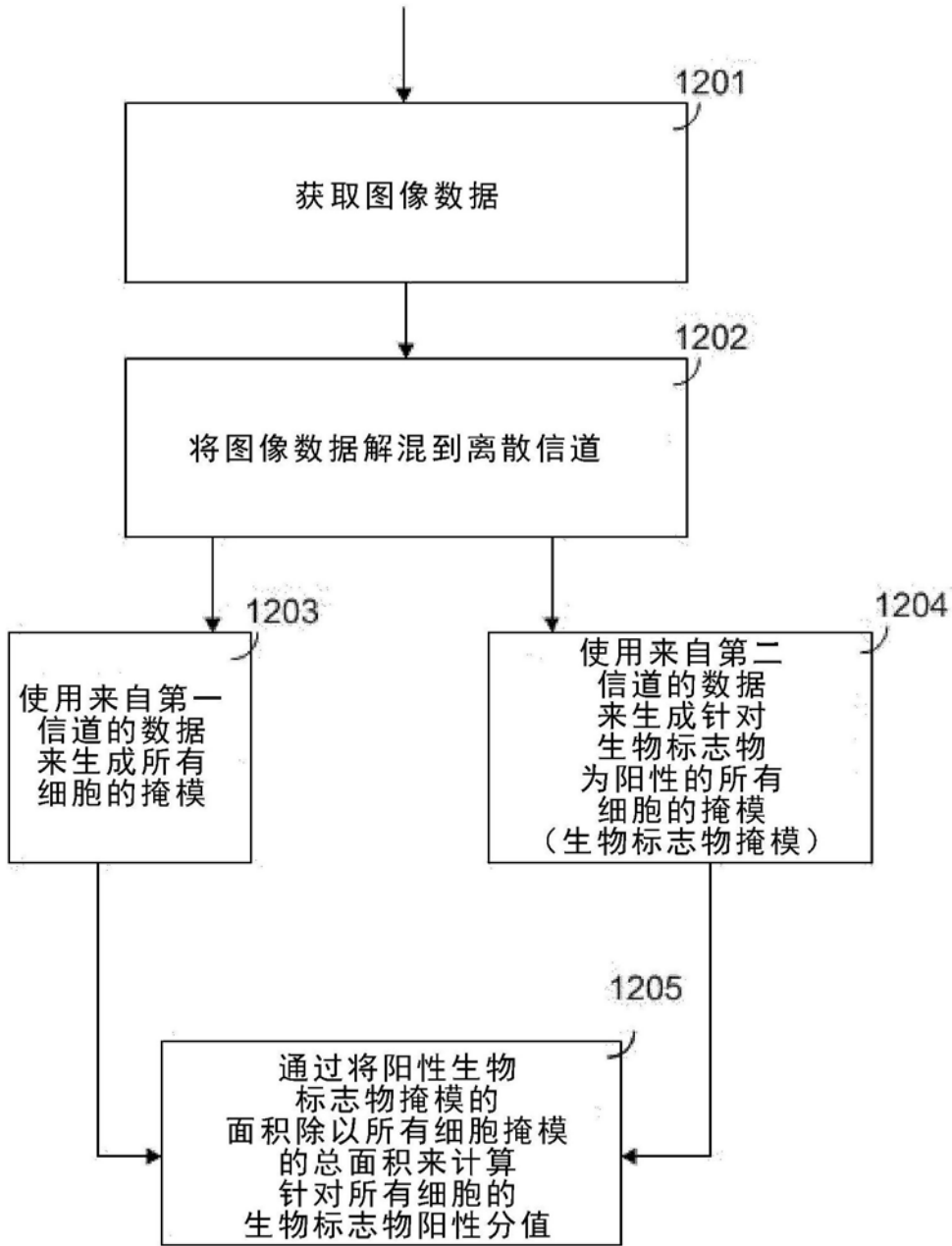


图12

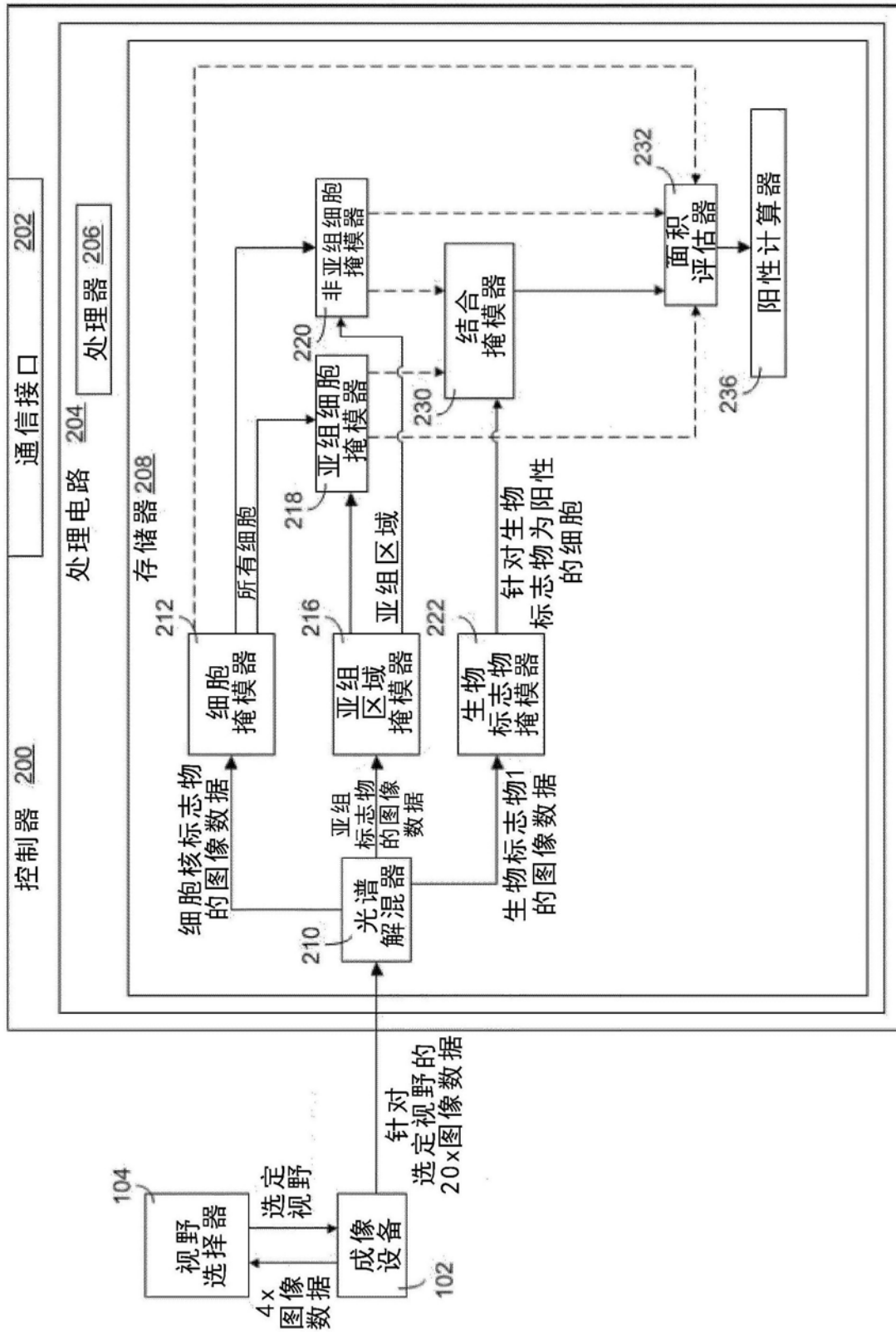


图13

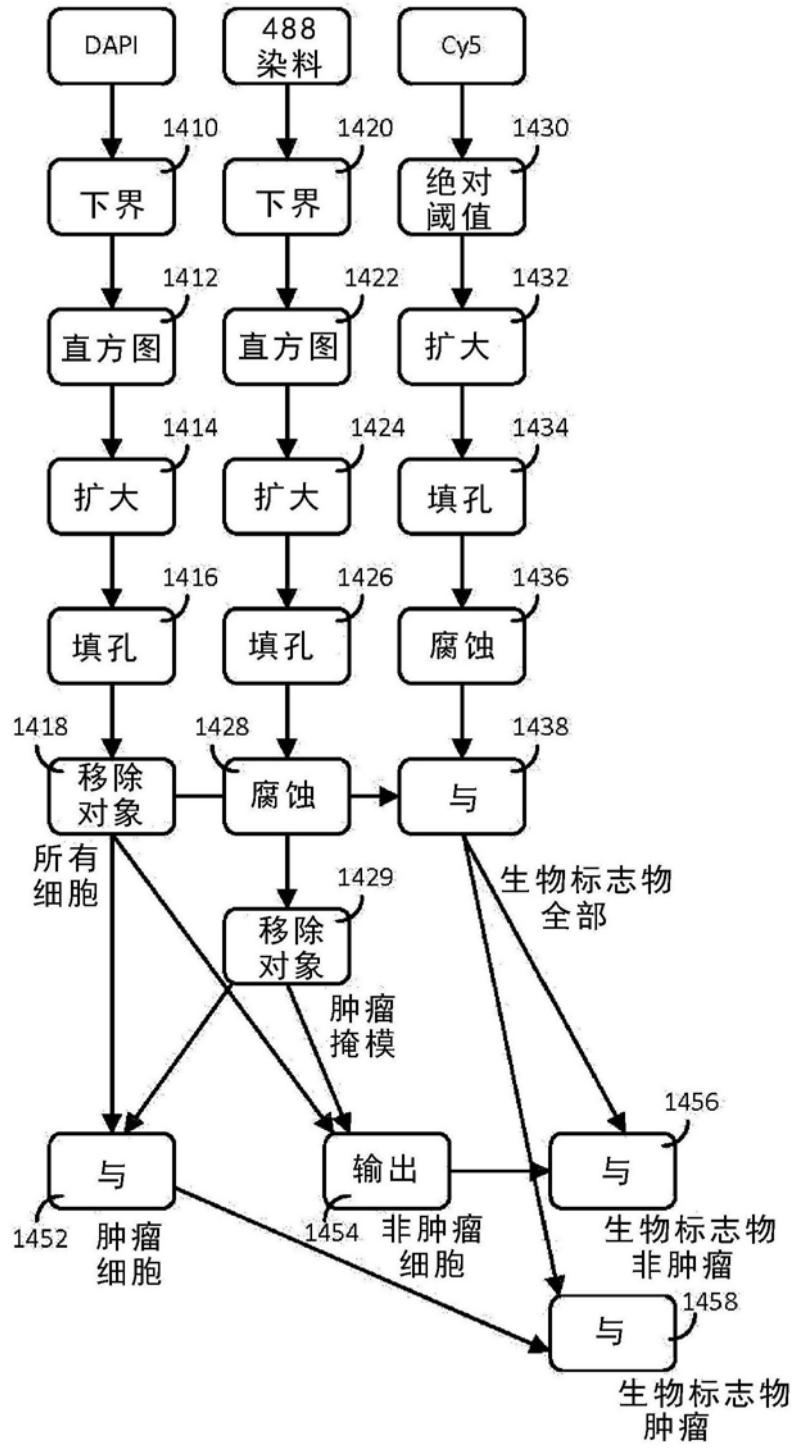


图14

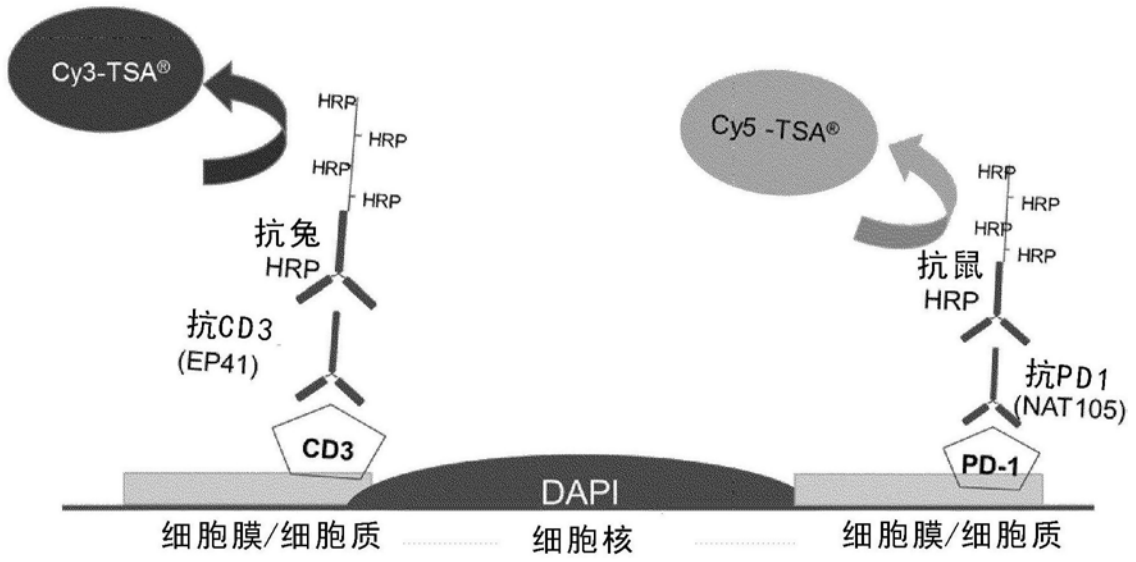


图15

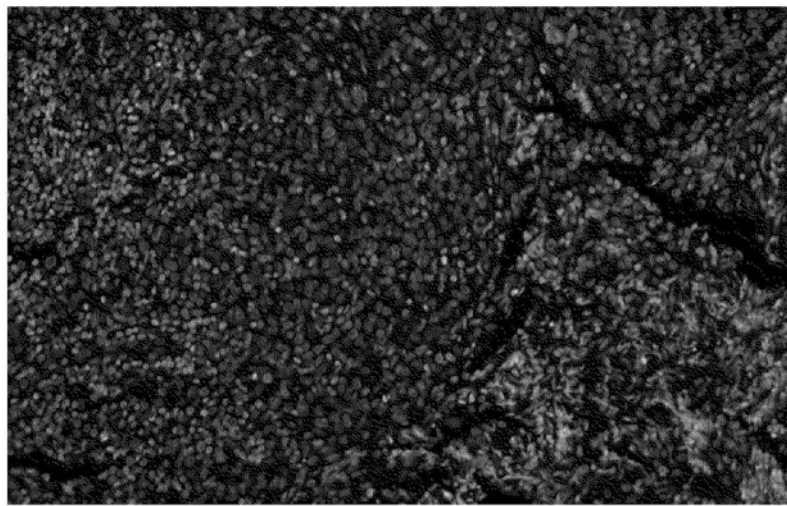


图16a

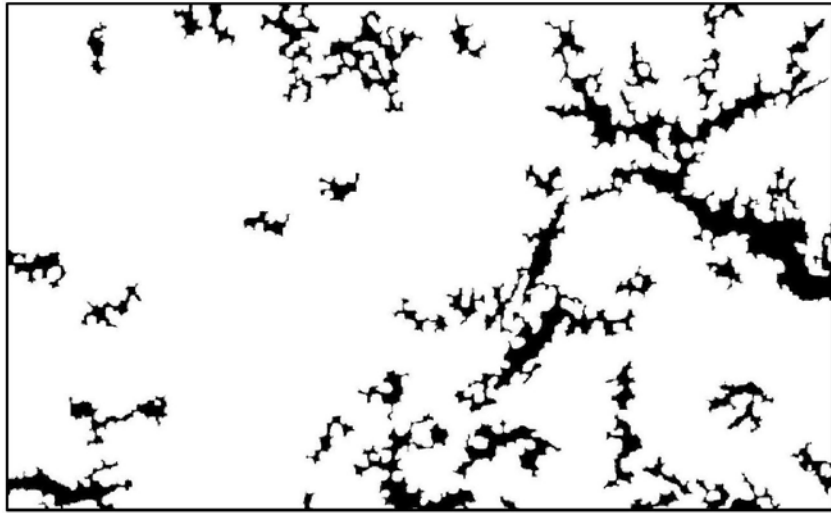


图16b

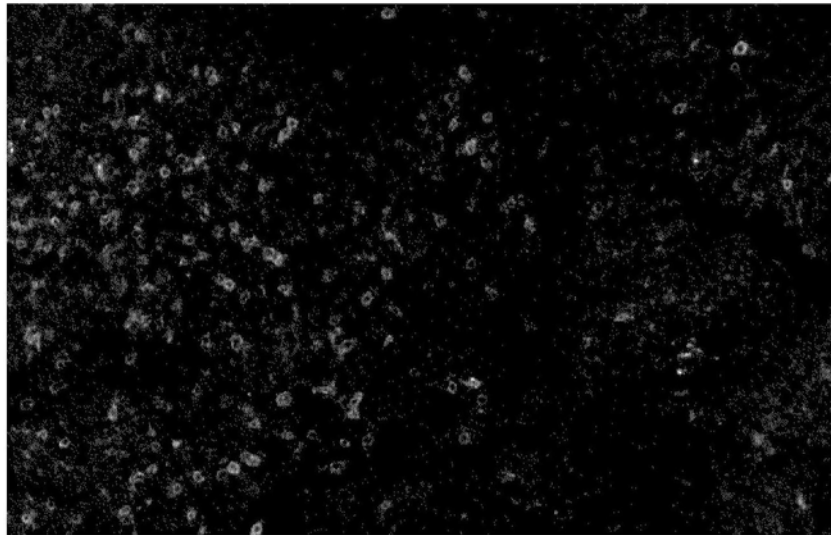


图17a

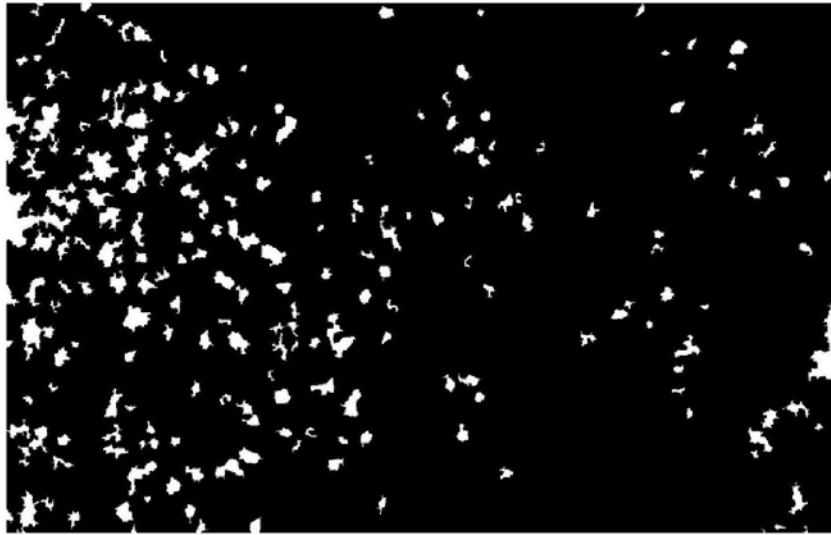


图17b

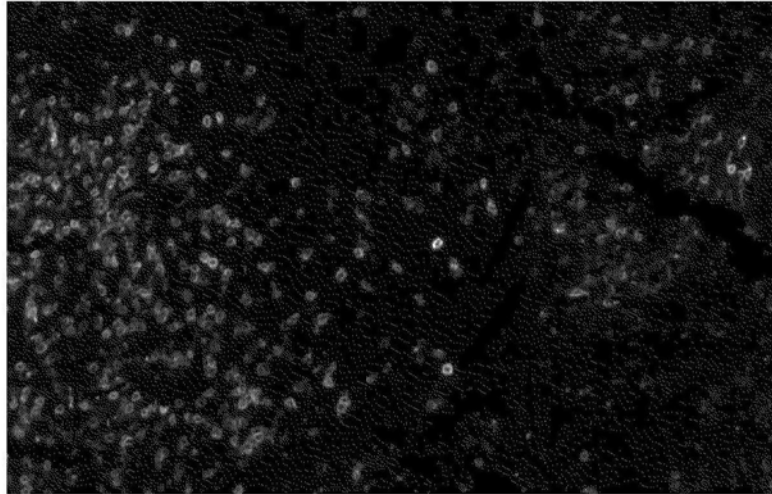


图18a

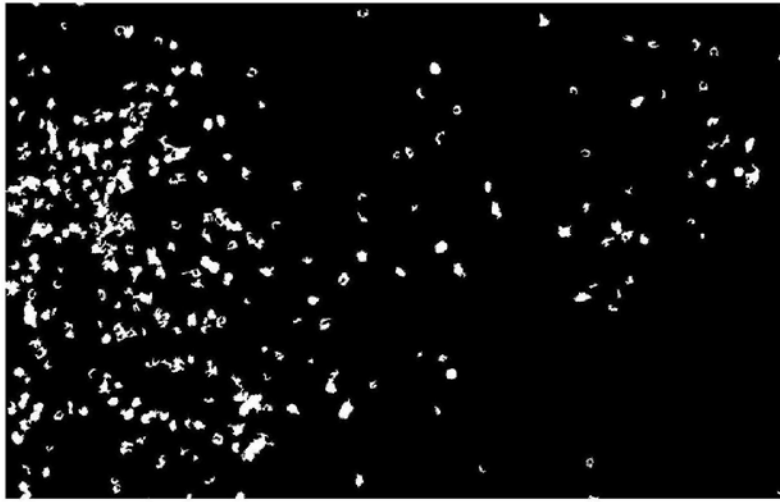


图18b

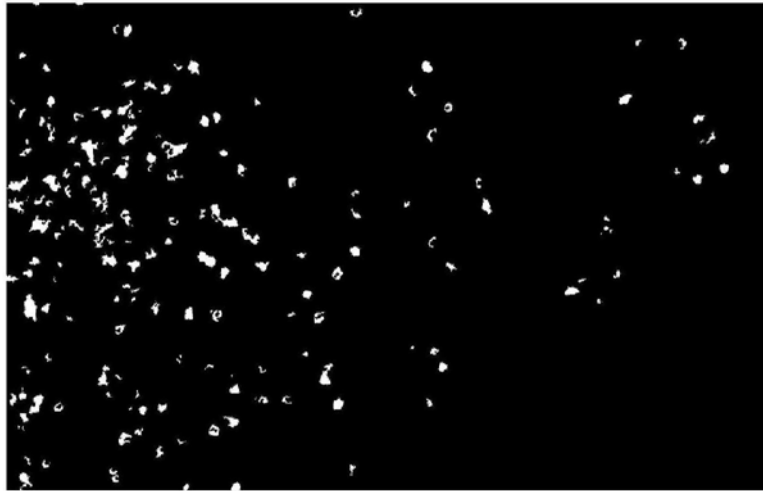


图19

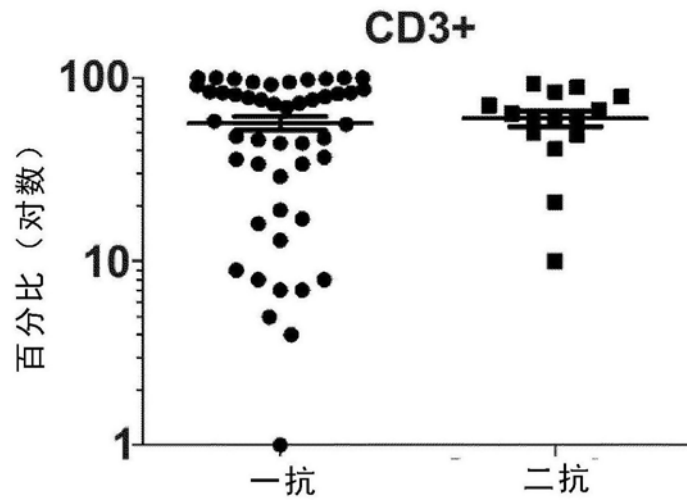


图20a

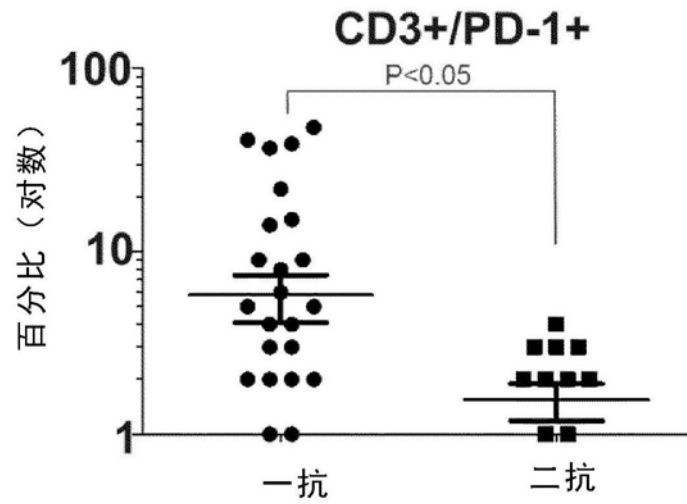


图20b

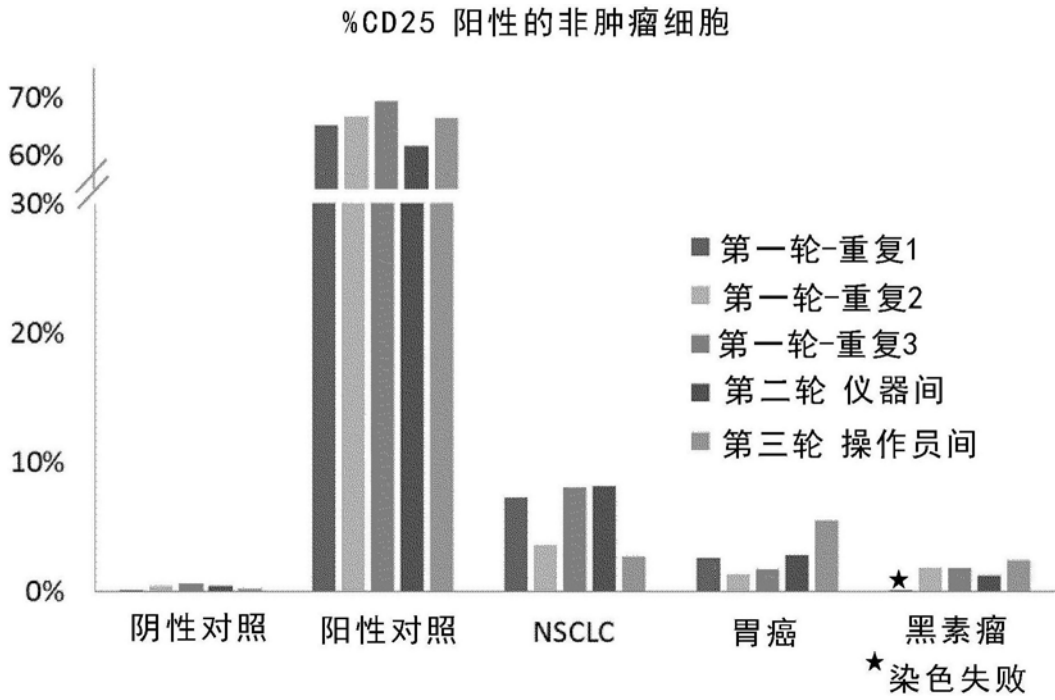


图21a

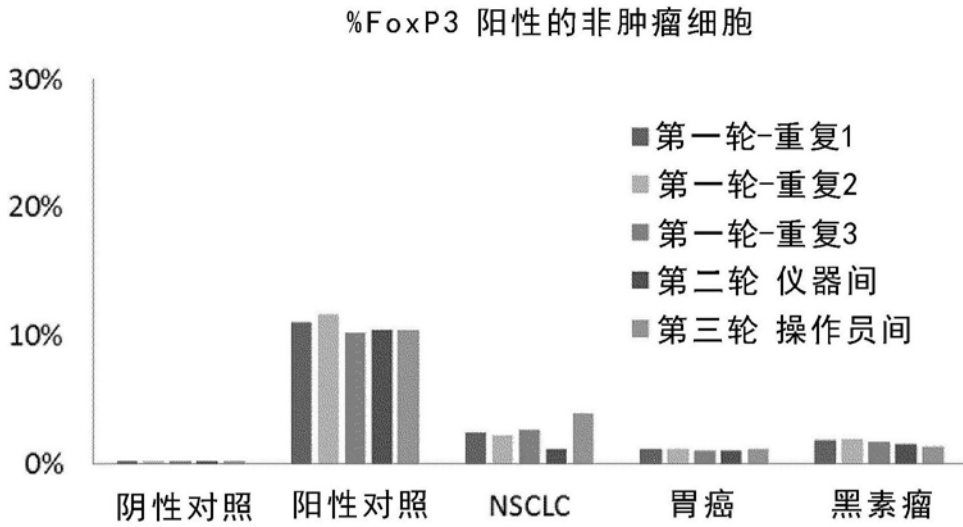


图21b

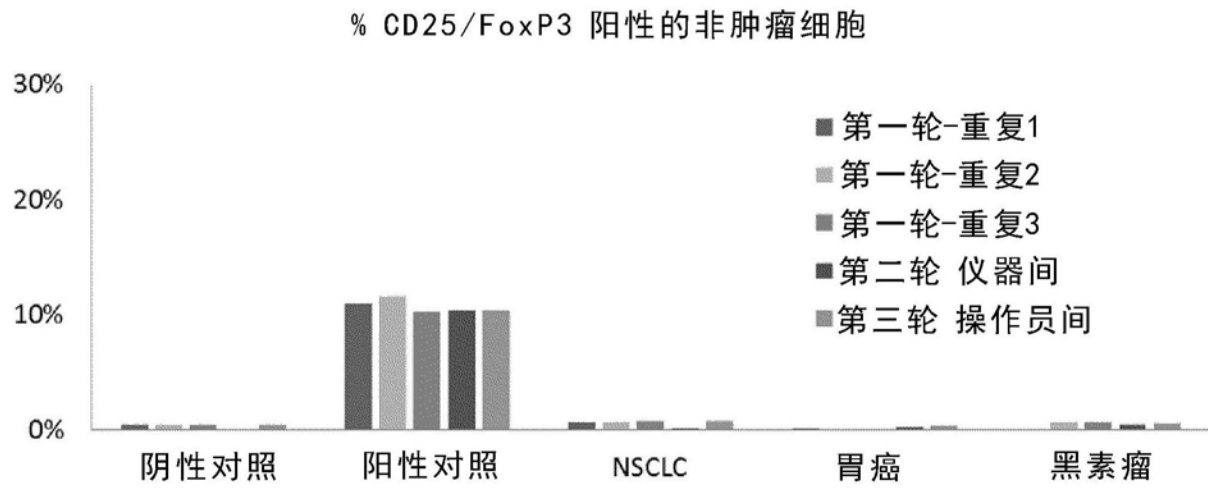


图22

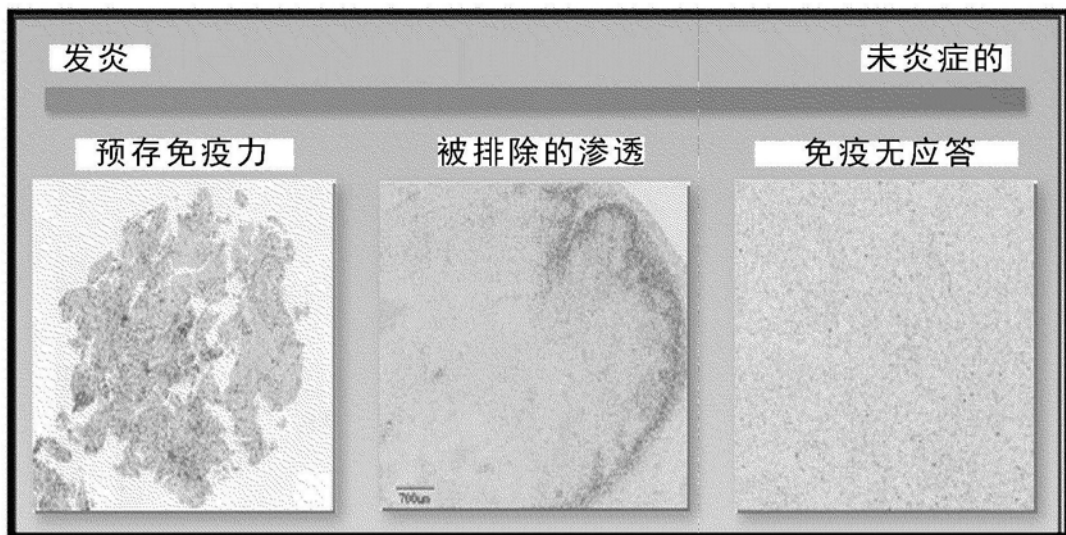


图32

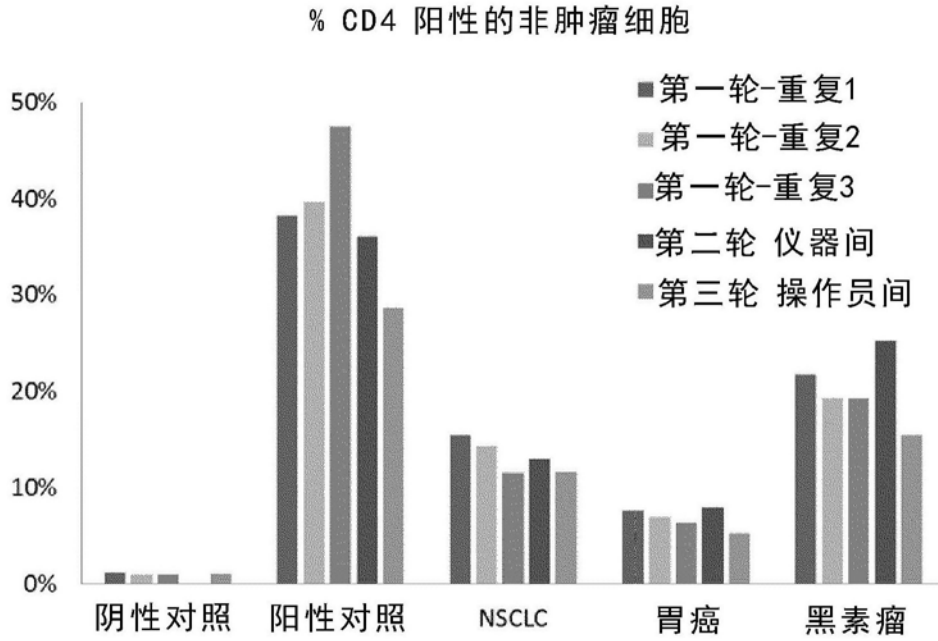


图23a

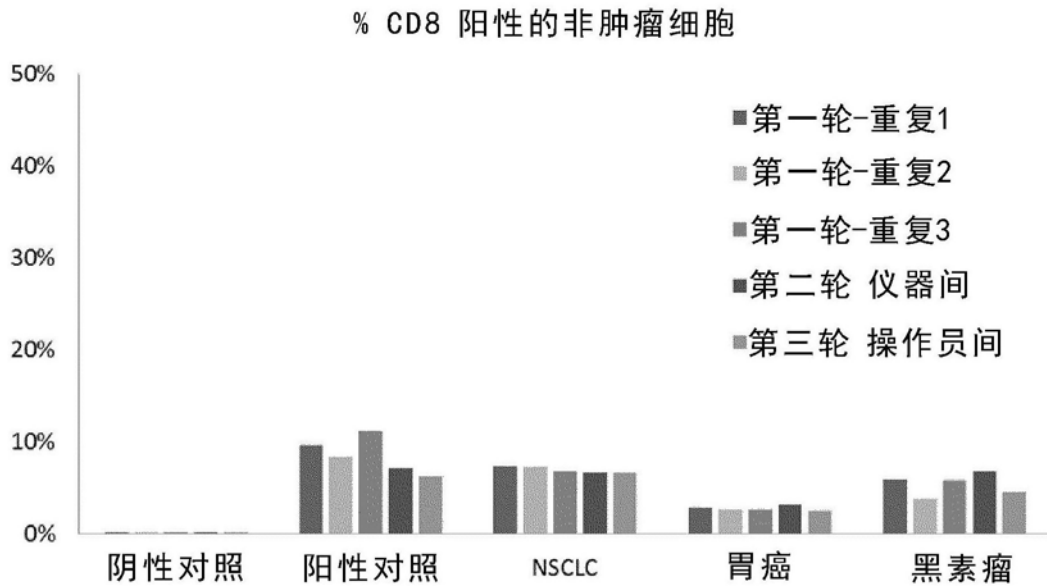


图23b

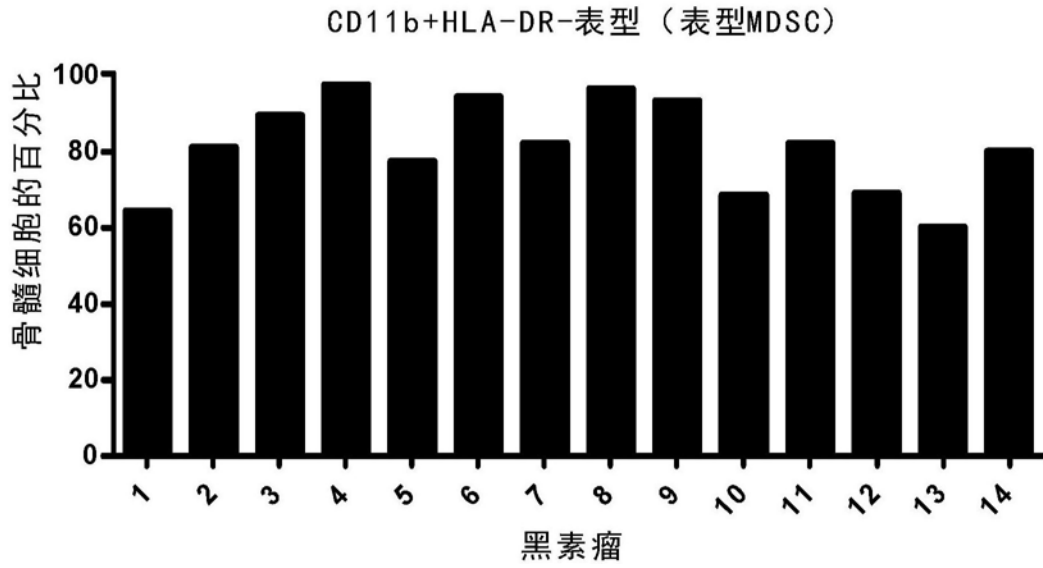


图24a

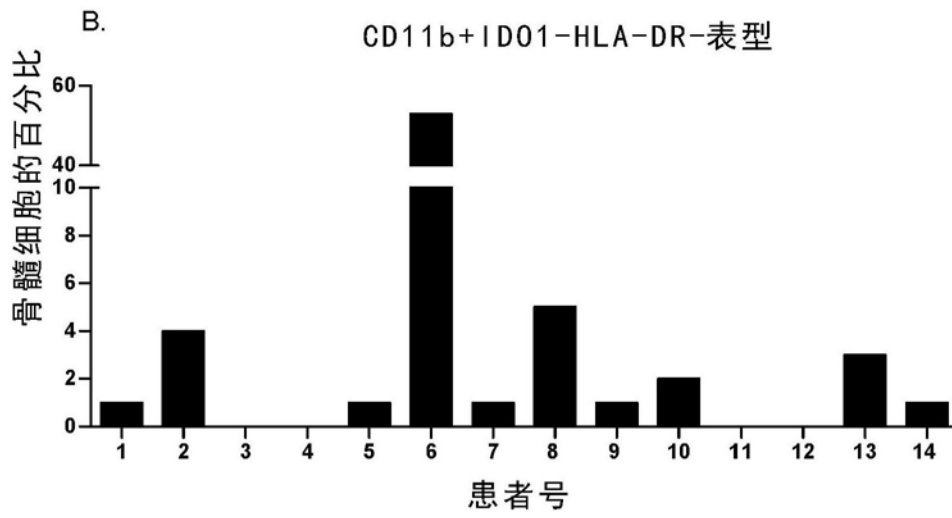


图24b

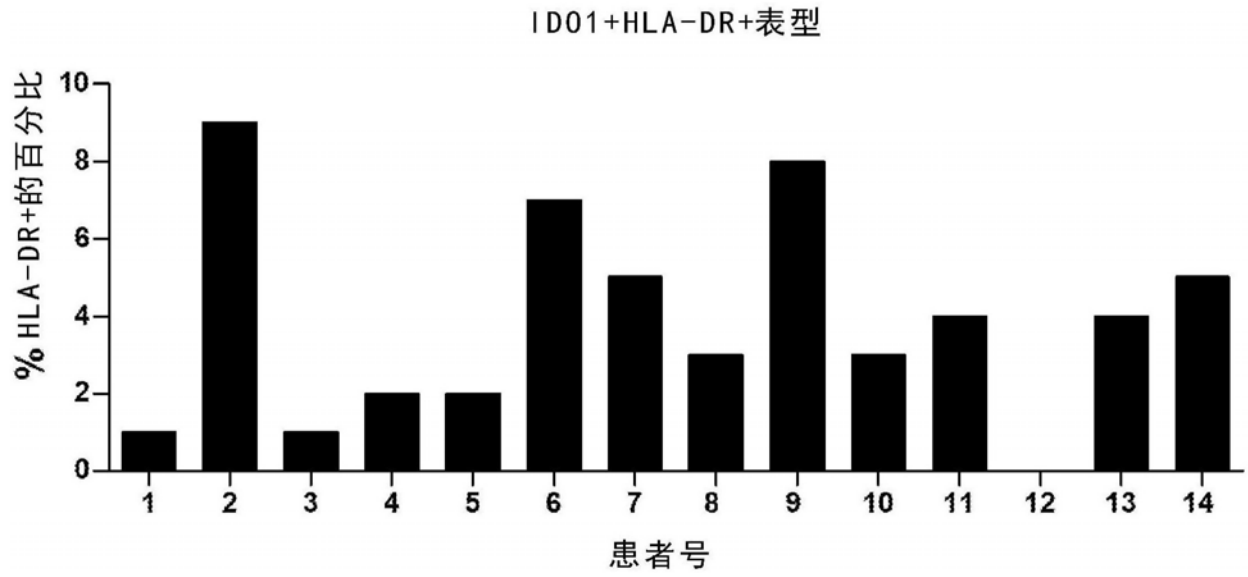


图25a

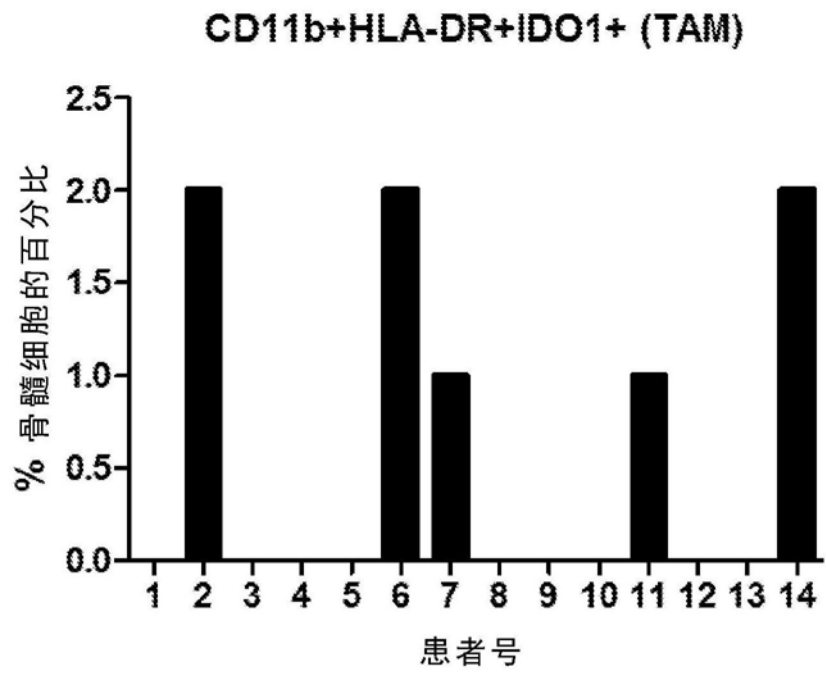


图25b

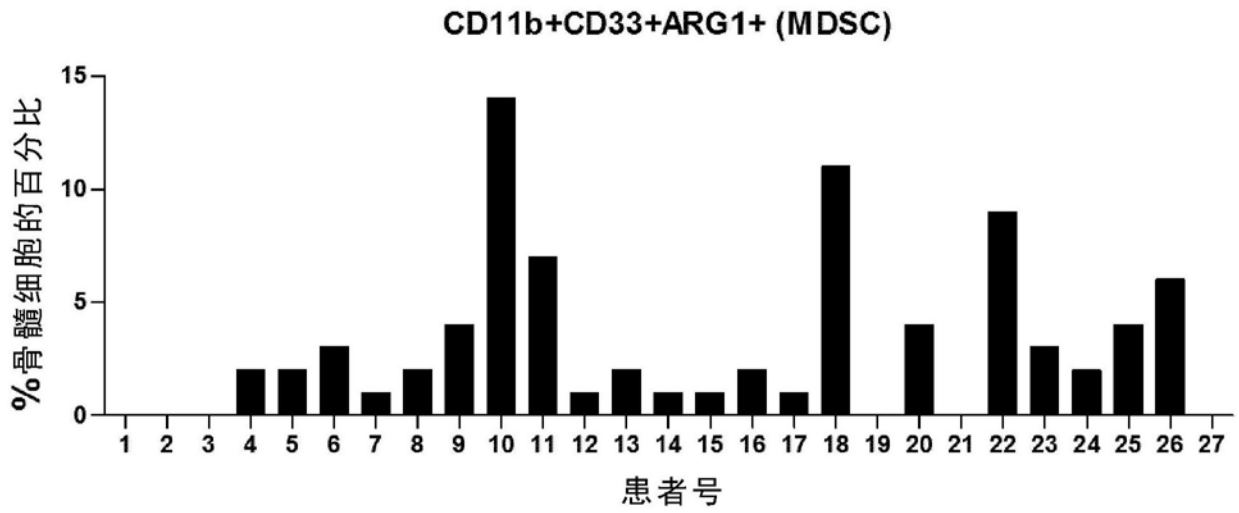


图26a

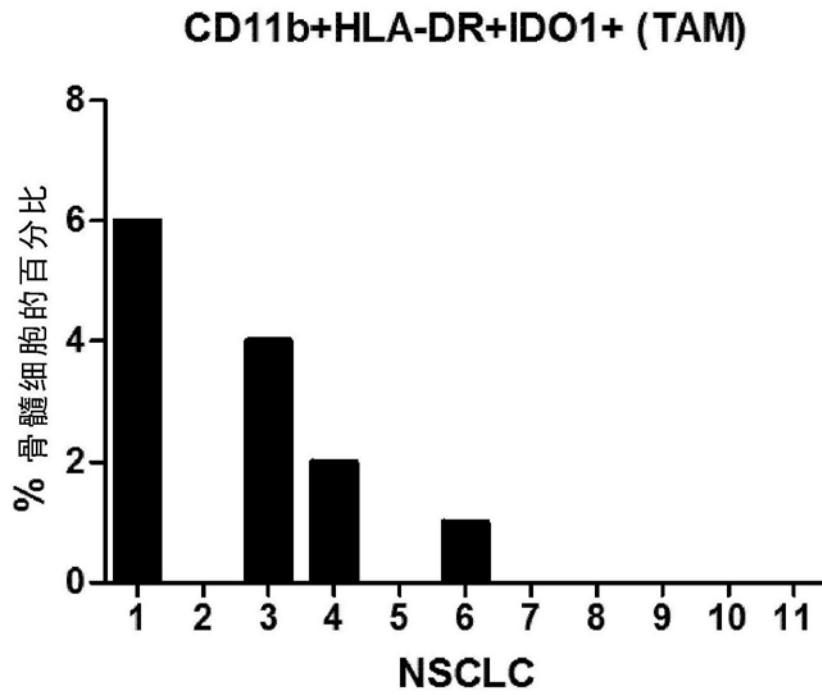


图26b

CD11b+HLA-DR-ID01+表型

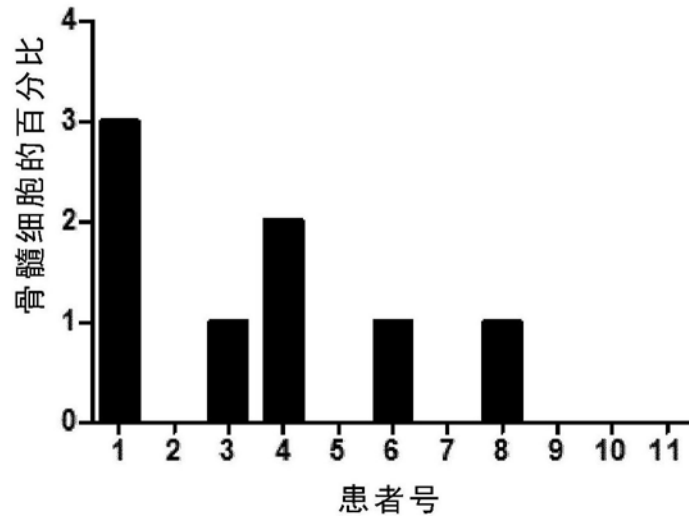


图27

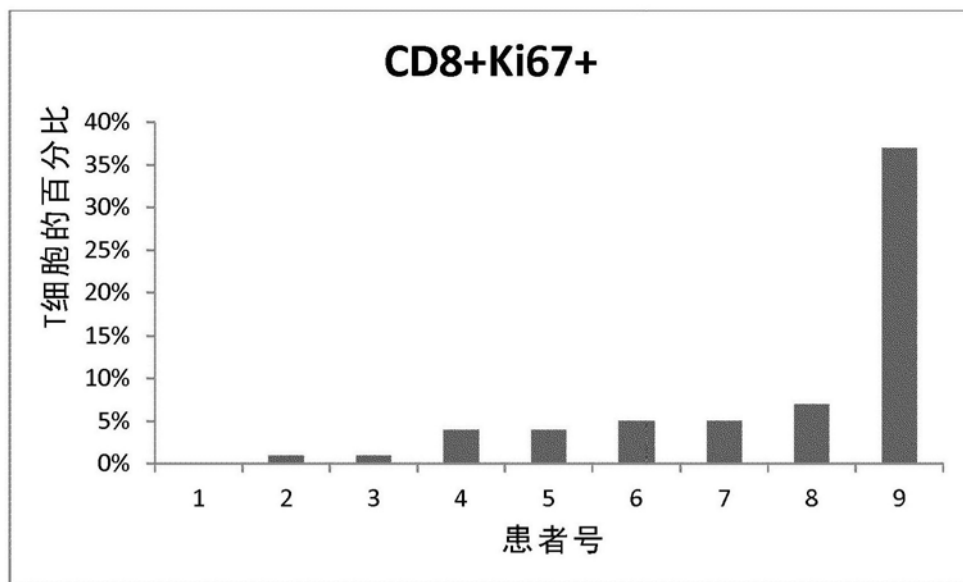


图28

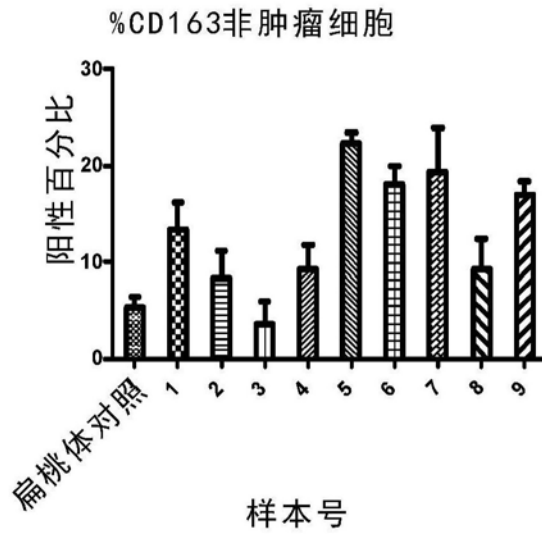


图29a

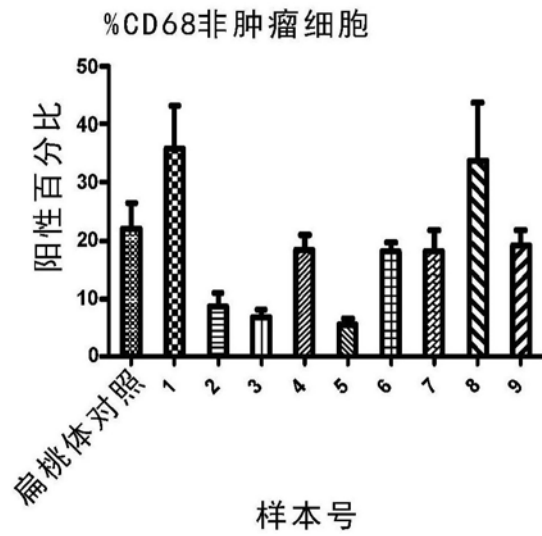


图29b

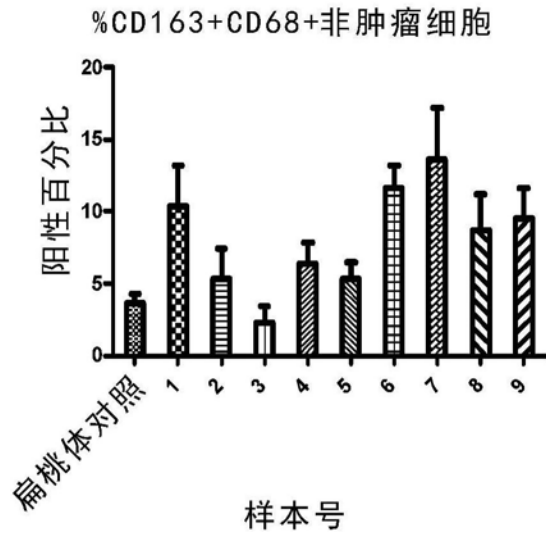


图29c

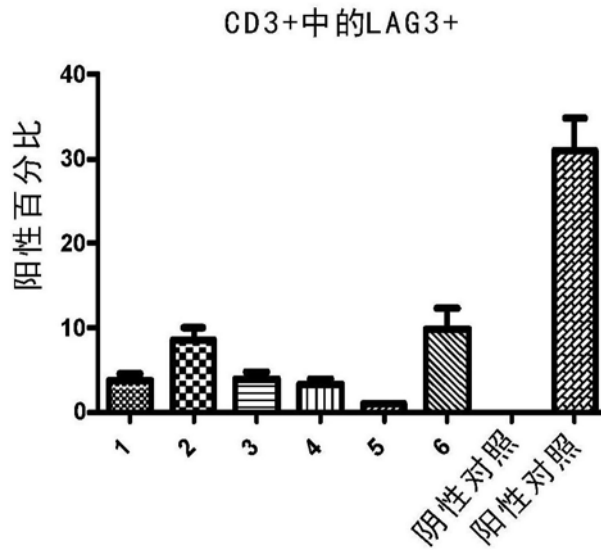


图30a

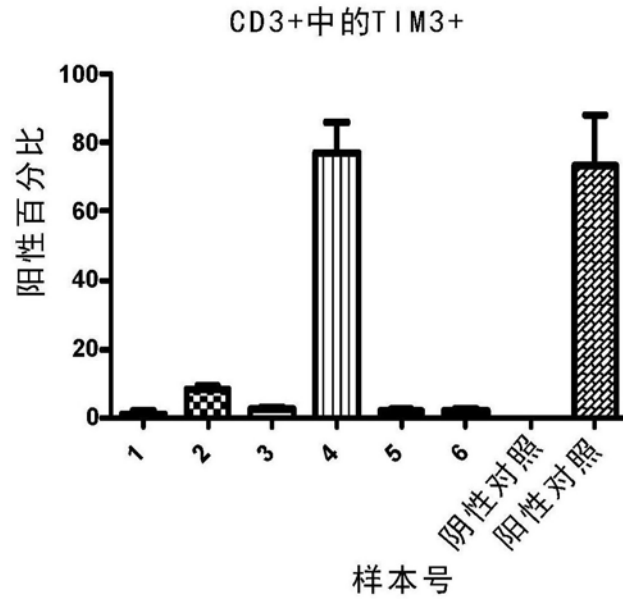


图30b

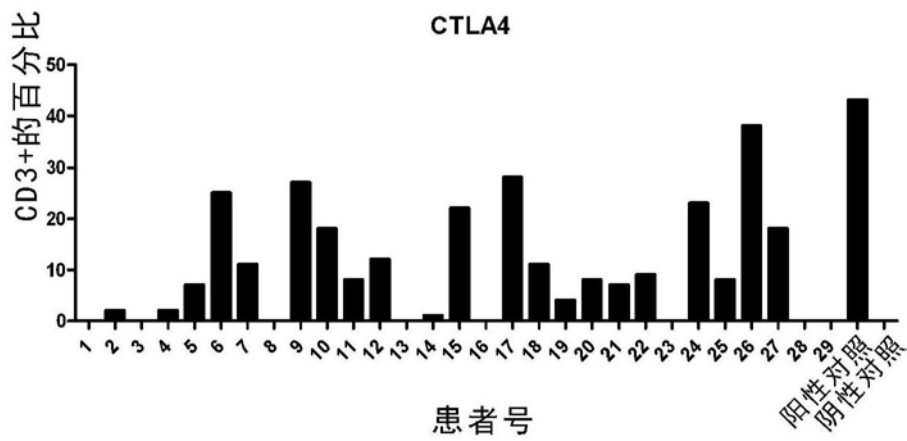


图31a

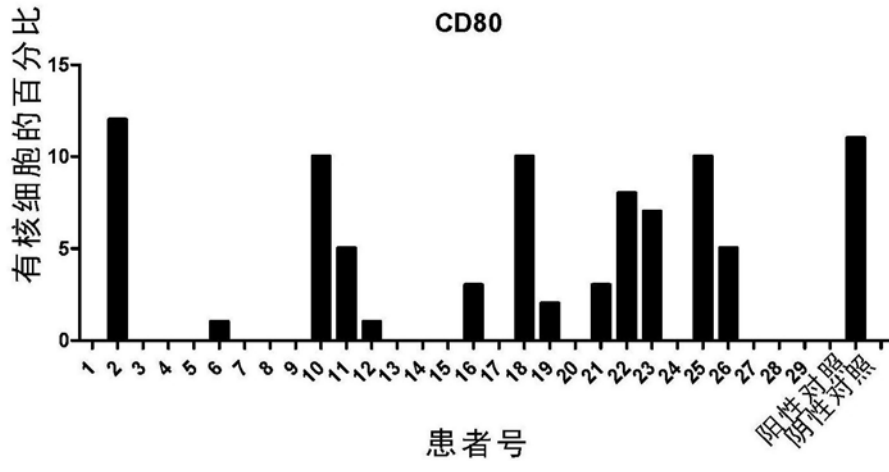


图31b

专利名称(译)	用于导出视野中呈现的选定细胞的生物标志物阳性百分比值的方法		
公开(公告)号	CN108348588A	公开(公告)日	2018-07-31
申请号	CN201680062090.4	申请日	2016-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华股份有限公司		
[标]发明人	詹尼弗·波尔·德·奥克斯 纳温·达卡帕加里 泰·特兰 金周荣		
发明人	詹尼弗·波尔·德·奥克斯 纳温·达卡帕加里 泰·特兰 金周荣		
IPC分类号	A61K39/00 C12Q1/6886 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C12Q1/6841 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/56966 G01N33/574 G01N2800/52 C12Q2537/143 C12Q2563/107 C12Q2563/131 G01N21/6428 G01N33/56972		
代理人(译)	林强		
优先权	62/245853 2015-10-23 US 62/301035 2016-02-29 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明部分涉及用于导出在来自癌症患者的组织样本的视野中呈现的所有细胞或可选地其一个或多个亚组的生物标志物阳性百分比(%) (PBP)值的方法。PBP值可以指示患者对免疫治疗的应答。

