

(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2018-536163

(P2018-536163A)

(43) 公表日 平成30年12月6日 (2018.12.6)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A Y	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁)

(21) 出願番号	特願2018-526566 (P2018-526566)	(71) 出願人	511286517
(86) (22) 出願日	平成28年11月21日 (2016.11.21)		ヴェンタナ メディカル システムズ、
(85) 翻訳文提出日	平成30年7月13日 (2018.7.13)		インク、
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/078237		アメリカ合衆国 アリゾナ 85755、
(87) 国際公開番号	W02017/085307		ツーソン、 イースト イノベーション
(87) 国際公開日	平成29年5月26日 (2017.5.26)		ン パーク ドライブ 1910
(31) 優先権主張番号	62/258,493	(74) 代理人	110002077
(32) 優先日	平成27年11月22日 (2015.11.22)		園田・小林特許業務法人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	バーチ、 チャンドラー モーガン
			アメリカ合衆国 アリゾナ 85718、
			ツーソン、 イースト カミノ フラン
			シスコ ソーザ 5420
		F ターム (参考)	4C085 AA14 BB11 CC23 EE01

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-L1 陽性腫瘍組織における免疫細胞を同定する方法

(57) 【要約】

本開示は、組織試料内の PD-L1 陽性免疫細胞、PD-L1 陽性腫瘍細胞、及び PD-L1 陰性免疫細胞を同定するための、自動化方法を含む多重アッセイ、キット及び方法に関する。

【選択図】図 1 A



FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) PD-L1 に特異的な第一の一次抗体；
 (b) 少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な第二の一次抗体；
 (c) 第一の検出試薬セットであって、
 (c1) 第一の酵素；
 (c2) 第一の一次抗体が組織試料に結合している間に、第一の一次抗体に近接して組織試料上に第一の酵素を沈着させるように適合された試薬セット；及び
 (c3) 第一の酵素に近接して試料上に第一の色素を沈着させる、第一の酵素と反応性の基質を含む試薬セット；及び

10

(d) 第二の検出試薬セットであって、
 (d1) 第二の酵素；
 (d2) 第二の一次抗体が組織試料に結合している間に、第二の一次抗体に近接して組織試料上に第二の酵素を沈着させるように適合された試薬セット；及び
 (d3) 第一の酵素に近接して試料上に第二の色素を沈着させる、第二の酵素と反応性の基質

を含む試薬セットを含み、第一の色素と第二の色素が異なり、第一の色素と第二の色素がそれぞれ、ジアミノベンジジン (DAB)、4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4' - スルホンアミド (DABSYL)、テトラメチルローダミン (DISCOVERY パープル)、N, N' - ビスカルボキシペンチル - 5, 5' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (Cy5)、及びローダミン 110 (ローダミン) からなる群から選択される、キット。

20

【請求項 2】

(a) 第一の一次抗体が第一のハプテンにコンジュゲートされ、かつ
 (c2) 第一の酵素を沈着させるように適合された試薬セットが、第一のハプテンと反応性の抗体を含み、第一のハプテンと反応性の抗体が第一の酵素にコンジュゲートされ；

かつ / 又は

(b) 第二の一次抗体が第二のハプテンにコンジュゲートされ、かつ
 (c2) 第二の酵素を沈着させるように適合された試薬セットが、第二のハプテンと反応性の抗体を含み、第二のハプテンと反応性の抗体が第二の酵素にコンジュゲートされる、

30

請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

(c2) 第一の酵素を沈着させるように適合された試薬セットが、第一の一次抗体の Ig 種に特異的な抗種抗体を含み、第一の一次抗体の Ig 種に特異的な抗種抗体が第一の酵素にコンジュゲートされ；かつ / 又は

(d2) 第二の酵素を沈着させるように適合された試薬セットが、第二の一次抗体の Ig 種に特異的な抗種抗体を含み、第二の一次抗体の Ig 種に特異的な抗種抗体が第二の酵素にコンジュゲートされる、

40

請求項 1 に記載のキット。

【請求項 4】

(c2) 第一の酵素を沈着させるように適合された試薬セットが、第一の一次抗体に特異的な第一の二次抗体を含み、前記第一の二次抗体が第一の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、更に第一の酵素が第一の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされ；かつ / 又は

(d2) 第二の酵素を沈着させるように適合された試薬セットが、第二の一次抗体に特異的な第二の二次抗体を含み、前記第二の二次抗体が第二の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、更に第二の酵素が第二の特異的結合対の第二のメンバーにコン

50

ジュゲートされる、
請求項 1 に記載のキット。

【請求項 5】

(c 2) 第一の特異的結合対の第一のメンバーがビオチンであり、第一の特異的結合対の第二のメンバーがビオチン結合タンパク質であり；かつ / 又は

(d 2) 第二の特異的結合対の第一のメンバーがビオチンであり、第二の特異的結合対の第二のメンバーがビオチン結合タンパク質である、

請求項 4 に記載のキット。

【請求項 6】

ビオチン結合タンパク質が、アビジン、アビジン誘導体、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 5 に記載のキット。

10

【請求項 7】

(c) 第一の特異的結合対の第一のメンバーがハプテンであり、第一の特異的結合対の第二のメンバーが抗ハプテン抗体であり；かつ / 又は

(d) 第二の特異的結合対の第一のメンバーがハプテンであり、第二の特異的結合対の第二のメンバーが抗ハプテン抗体である、

請求項 4 に記載のキット。

【請求項 8】

(c 1) 第一の酵素が第一の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、かつ

20

(c 2) 第一の酵素を沈着させるように適合された試薬セットが、

(c 2 a) 第一の一次抗体に特異的な第一の二次抗体であって、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素にコンジュゲートされた第一の二次抗体；

(c 2 b) 第一の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされたチラミド；及び

(c 2 c) 過酸化水素溶液
を含み；
かつ / 又は

(d 1) 第二の酵素が第二の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、かつ

30

(d 2) 第二の酵素を沈着させるように適合された試薬セットが、

(d 2 a) 第二の一次抗体に特異的な第二の二次抗体であって、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素にコンジュゲートされた第二の二次抗体；

(d 2 b) 第二の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされたチラミド；及び

(d 2 c) 過酸化水素溶液
を含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 9】

(c 1) 第一の特異的結合対の第一のメンバーがビオチン結合タンパク質であり；かつ

(c 2 b) 第一の特異的結合対の第二のメンバーがビオチンであり；

40

かつ / 又は

(d 1) 第二の特異的結合対の第一のメンバーがビオチン結合タンパク質であり；かつ

(d 2 b) 第二の特異的結合対の第二のメンバーがビオチンである、

請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

ビオチン結合タンパク質が、アビジン、アビジン誘導体（例えば、ニュートラアビジン）、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

(c 1) 第一の特異的結合対の第一のメンバーが抗ハプテン抗体であり、かつ

(c 2 b) 第一の特異的結合対の第二のメンバーがハプテンであり；

50

かつ / 又は

(d 1) 第二の特異的結合対の第一のメンバーが抗ハプテン抗体であり、かつ

(c 2 b) 第二の特異的結合対の第二のメンバーがハプテンである、

請求項 8 に記載のキット。

【請求項 1 2】

第一の色素が D I S C O V E R Y パープルであり、第二の色素が D A B であるか、又は第一の色素が D A B であり、第二の色素が D I S C O V E R Y パープルである、請求項 1 から 1 1 の何れかに記載のキット。

【請求項 1 3】

第一の色素が D I S C O V E R Y パープルであり、第二の色素が D A B S Y L であるか、又は第一の色素が D A B S Y L であり、第二の色素が D I S C O V E R Y パープルである、請求項 1 から 1 1 の何れかに記載のキット。

10

【請求項 1 4】

少なくとも一つの免疫細胞マーカーが、C D 8、C D 4、C D 3、C D 2 5、C D 1 6 3 及び C D 4 5 L C A からなる群から選択される、請求項 1 から 1 3 の何れかに記載のキット。

【請求項 1 5】

免疫細胞マーカーが C D 8 又は C D 4 5 L C A である、請求項 1 4 に記載のキット。

【請求項 1 6】

P D - L 1 に特異的な第一の一次抗体が S P 1 4 2 又は S P 2 6 3 である、請求項 1 から 1 5 の何れかに記載のキット。

20

【請求項 1 7】

第二の一次抗体が抗 C D 4 5 L C A 抗体 (R P 2 / 1 8) 又は抗 C D 8 (S P 2 3 9) である、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

第二の一次抗体が C D 8 に特異的であり、第一の色素が D I S C O V E R Y パープルであり、第二の色素が D A B S Y L である、請求項 1 から 1 1 の何れかに記載のキット。

【請求項 1 9】

P D - L 1 以外の腫瘍マーカーに特異的な少なくとも一つの他の検出プローブと少なくとも一つの他の検出プローブを検出するための検出試薬とを更に含む、請求項 1 から 1 8 の何れかに記載のキット。

30

【請求項 2 0】

E G F R、H E R 2、H P V、A L K、B R A F、O X - 4 0、P D - 1、I D O - 1、F o x P 3、C D 1 6 3、及び C T L A - 4 に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブを更に含む、請求項 1 から 1 9 の何れかに記載のキット。

【請求項 2 1】

第一の酵素及び / 又は第二の酵素を不活性化する成分を更に含む、請求項 1 から 2 0 の何れかに記載のキット。

【請求項 2 2】

第一の一次抗体及び / 又は第二の一次抗体が結合している組織試料から第一の一次抗体及び / 又は第二の一次抗体を溶出させるための成分を更に含む、請求項 1 から 2 1 の何れかに記載のキット。

40

【請求項 2 3】

P D - L 1 陽性腫瘍における腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性免疫細胞を同定する方法であって、

組織試料によって発現された P D - L 1 タンパク質に近接して組織試料への抗体の結合をもたらすように、P D - L 1 タンパク質に特異的な第一の一次抗体に組織試料を接触させる工程；

組織試料に結合した第一の一次抗体に近接して第一の酵素を沈着させる工程；

第一の酵素を第一の基質と反応させて、第一の一次抗体に近接して組織試料上に第一の

50

色素の沈着をもたらす工程であって、第一の色素が、ジアミノベンジジン (DAB)、4 - (ジメチルアミノ)アゾベンゼン - 4' - スルホンアミド (DABSYL)、テトラメチルローダミン (DISCOVERYパープル)、N, N' - ビスカルボキシペンチル - 5, 5' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (Cy5)、及びローダミン 110 (ローダミン) からなる群から選択される工程；

組織試料によって発現された免疫細胞マーカータンパク質に近接して組織試料への抗体の結合をもたらすように、少なくとも一つの免疫細胞マーカータンパク質に特異的な第二の一次抗体に組織試料を接触させる工程；

組織試料に結合した第二の一次抗体に近接して第二の酵素を沈着させる工程；

第二の酵素を第二の基質と反応させて、第二の一次抗体に近接して組織試料上に第二の色素の沈着をもたらす工程であって、第二の色素は第一の色素とは異なり、更に第二の色素は、ジアミノベンジジン (DAB)、4 - (ジメチルアミノ)アゾベンゼン - 4' - スルホンアミド (DABSYL)、テトラメチルローダミン (DISCOVERYパープル)、N, N' - ビスカルボキシペンチル - 5, 5' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (Cy5)、及びローダミン 110 (ローダミン) からなる群から選択される工程を含む、方法。

【請求項 24】

腫瘍浸潤 PD - L1 陽性免疫細胞が、PD - L1 と少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

第一の一次抗体が SP142 又は SP263 である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

免疫細胞マーカーが、CD8、CD4、CD3、CD25、CD163 及び CD45LCA からなる群から選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

免疫細胞マーカーが CD45LCA 又は CD8 である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

第二の一次抗体が抗 CD45LCA 抗体 (RP2 / 18) である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

第一の色素が DISCOVERYパープルであり、第二の色素が DAB であるか、又は第一の色素が DAB であり、第二の色素が DISCOVERYパープルである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

第一の色素が DISCOVERYパープルであり、第二の色素が DABSYL であるか、又は第一の色素が DABSYL であり、第二の染料が DISCOVERYパープルである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 31】

第一の一次抗体が第一のハプテンにコンジュゲートされ、第一の酵素が第一の二次抗体にコンジュゲートされ、第一の二次抗体が第一のハプテンに特異的であり、第一の二次抗体の第一のハプテンへの結合をもたらすのに十分な条件下で組織試料を第一の二次抗体と接触させることにより、第一の酵素が組織試料に沈着され；

かつ / 又は

第二の一次抗体が第二のハプテンにコンジュゲートされ、第二の酵素が第二の二次抗体にコンジュゲートされ、第二の二次抗体が第二のハプテンに特異的であり、第二の二次抗体の第二のハプテンへの結合をもたらすのに十分な条件下で組織試料を第二の二次抗体と接触させることにより、第二の酵素が組織試料に沈着される、

請求項 23 から 30 の何れかに記載の方法。

【請求項 32】

第一の酵素は、第一の一次抗体の Ig 種に特異的な第一の二次抗体にコンジュゲートさ

れ、第一の酵素は、第一の二次抗体の第一の一次抗体への結合をもたらすのに十分な条件下で第一の二次抗体に組織試料を接触させることにより組織試料上に沈着され；

かつ / 又は

第二の酵素は、第二の一次抗体の I g 種に特異的な第二の二次抗体にコンジュゲートされ、第二の酵素は、第二の二次抗体の第一の一次抗体への結合をもたらすのに十分な条件下で第二の二次抗体に組織試料を接触させることにより組織試料上に沈着される、

請求項 23 から 30 の何れかに記載の方法。

【請求項 33】

第一の酵素が、

第一の一次抗体に特異的な第一の二次抗体に組織試料を接触させる工程であって、第一の二次抗体が第一の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされる工程、及び

第一の酵素に組織試料を接触させる工程であって、第一の酵素が第一の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされ、組織試料は第一の結合対の第一のメンバーと第一の結合対の第二のメンバーとの間の結合をもたらすのに十分な条件下で第一の酵素に接触される工程

によって組織試料上に沈着され；

かつ / 又は

第二の酵素が、

第二の一次抗体に特異的な第二の二次抗体に組織試料を接触させる工程であって、第二の二次抗体が第二の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされる工程、及び

第二の酵素に組織試料を接触させる工程であって、第二の酵素が第二の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされ、組織試料は第二の結合対の第一のメンバーと第二の結合対の第二のメンバーとの間の結合をもたらすのに十分な条件下で第二の酵素に接触される工程

によって組織試料上に沈着される、

請求項 23 から 30 の何れかに記載の方法。

【請求項 34】

第一の特異的結合対の第一のメンバーがビオチンであり、第一の特異的結合対の第二のメンバーがビオチン結合タンパク質であり；かつ / 又は

第二の特異的結合対の第一のメンバーがビオチンであり、第二の特異的結合対の第二のメンバーがビオチン結合タンパク質である、

請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

ビオチン結合タンパク質が、アビジン、アビジン誘導体（例えばニュートラアビジン）、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

第一の特異的結合対の第一のメンバーがハプテンであり、第一の特異的結合対の第二のメンバーが抗ハプテン抗体であり；かつ / 又は

第二の特異的結合対の第一のメンバーがハプテンであり、第二の特異的結合対の第二のメンバーが抗ハプテン抗体である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

第一の酵素が第一の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、第一の酵素が、

第一の一次抗体に特異的な第一の二次抗体に組織試料を接触させる工程であって、第一の二次抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素（HRP）にコンジュゲートされる工程；

第一の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートしたチラミドに組織試料を接触させ、第一の一次抗体に近接して組織試料上にチラミドを沈着させるのに十分な条件下でチラミドを第一の二次抗体の HRP と反応させる工程；及び

第一の結合対の第一のメンバーと第一の結合対の第二のメンバーとの間に結合をもた

10

20

30

40

50

らすのに十分な条件下で第一の酵素に組織試料を接触させる工程
によって組織試料上に沈着され；
かつ / 又は

第二の酵素が第二の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、第二の酵素が、

第二の一次抗体に特異的な第二の二次抗体に組織試料を接触させる工程であって、第二の二次抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素（HRP）にコンジュゲートされる工程；

第二の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートしたチラミドに組織試料を接触させ、第一の一次抗体に近接して組織試料上にチラミドを沈着させるのに十分な条件下でチラミドを第二の二次抗体のHRPと反応させる工程；及び

第二の結合対の第一のメンバーと第二の結合対の第二のメンバーとの間に結合をもたらすのに十分な条件下で第二の酵素に組織試料を接触させる工程
によって組織試料上に沈着される、
請求項 23 から 30 の何れかに記載の方法。

【請求項 38】

第一の特異的結合対の第一のメンバーがビオチン結合タンパク質であり、第一の特異的結合対の第二のメンバーがビオチンであり；かつ / 又は

第二の特異的結合対の第一のメンバーがビオチン結合タンパク質であり、第二の特異的結合対の第二のメンバーがビオチンである、
請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

ビオチン結合タンパク質が、アビジン、アビジン誘導体（例えばニュートラアビジン）、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

第一の特異的結合対の第一のメンバーが抗ハプテン抗体であり、第一の特異的結合対の第二のメンバーがハプテンであり；かつ / 又は

第二の特異的結合対の第一のメンバーが抗ハプテン抗体であり、第二の特異的結合対の第二のメンバーがハプテンである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

PD-L1 以外の腫瘍マーカーに特異的な少なくとも一つの他の検出プローブに組織試料を接触させる工程を更に含む、請求項 23 から 30 の何れかに記載の方法。

【請求項 42】

EGFR、HER2、HPV、ALK、BRAF、OX-40、PD-1、IDO-1、FoxP3、CD163、及びCTLA-4 に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブに組織試料を接触させる工程を更に含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

請求項 22 から 41 の何れかに記載の方法に従って、腫瘍浸潤PD-L1 陽性免疫細胞を検出する工程；

腫瘍浸潤PD-L1 陽性免疫細胞の数を定量する工程；及び

腫瘍浸潤PD-L1 陽性免疫細胞の数を、PD-1 軸標的療法に対する腫瘍の応答と関連させる工程
によって、PD-1 軸標的療法に対する応答を予測する方法。

【請求項 44】

PD-L1 陽性腫瘍細胞の数を定量し、PD-L1 陽性腫瘍細胞の数と腫瘍浸潤PD-L1 陽性免疫細胞の数を関連させることを更に含む、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

腫瘍を有する患者を治療する方法であって、

請求項 23 から 42 の何れかに記載の方法に従って、PD-1 軸標的療法に対する腫瘍の応答を予測する工程；及び

10

20

30

40

50

腫瘍が P D - 1 標的療法に応答すると予測される場合、P D - 1 軸標的療法を患者に施す工程を含む、方法。

【請求項 4 6】

P D - 1 軸標的療法が、アテゾリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びピディリズマブ、及びそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 4 3 から 4 5 の何れかに記載の方法。

【請求項 4 7】

P D - L 1 陽性腫瘍における腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性免疫細胞を同定するためのシステムにおいて、

(a) 組織試料によって発現される P D - L 1 タンパク質に近接して組織試料上に第一の色素を沈着させるための手段であって、第一の色素がジアミノベンジジン (D A B) 、 4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4 ' - スルホンアミド (D A B S Y L) 、テトラメチルローダミン (D I S C O V E R Y パープル) 、 N , N ' - ビスカルボキシペンチル - 5 , 5 ' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (C y 5) 、及びローダミン 1 1 0 (ロードミン) からなる群から選択される手段 ; 及び

(b) 組織試料によって発現される免疫細胞マーカータンパク質に近接して組織試料上に第二の色素を沈着させるための手段であって、第二の色素が第一の色素とは異なり、かつ第二の色素がジアミノベンジジン (D A B) 、 4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4 ' - スルホンアミド (D A B S Y L) 、テトラメチルローダミン (D I S C O V E R Y パープル) 、 N , N ' - ビスカルボキシペンチル - 5 , 5 ' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (C y 5) 、及びローダミン 1 1 0 (ロードミン) からなる群から選択される手段

を備える、システム。

【請求項 4 8】

(a) 第一の色素を沈着させるための手段が、

(a 1) P D - L 1 に特異的な第一の一次抗体 ; 及び

(a 2) 第一の検出試薬セットであって、

(a 2 a) 第一の酵素 ;

(a 2 b) 第一の一次抗体が組織試料に結合している間に、第一の一次抗体に近接して組織試料上に第一の酵素を沈着させるように適合された試薬セット ; 及び

(a 2 c) 第一の酵素に近接して組織試料上に第一の色素を沈着させる第一の酵素と反応性の基質

を含む検出試薬セット

を含み ; 及び

(b) 第二の色素を沈着させるための手段が、

(b 1) 免疫細胞マーカータンパク質に特異的な第二の一次抗体 ; 及び

(b 2) 第二の検出試薬セットであって、

(b 2 a) 第二の酵素 ;

(b 2 b) 第一の一次抗体が組織試料に結合している間に、第二の一次抗体に近接して組織試料上に第二の酵素を沈着させるように適合された試薬セット ; 及び

(b 2 c) 第二の酵素に近接して組織試料上に第二の色素を沈着させる第二の酵素と反応性の基質

を含む検出試薬セット

を含む、請求項 4 7 に記載のシステム。

【請求項 4 9】

(a 1) 第一の一次抗体が第一のハプテンにコンジュゲートされ、かつ

(a 2 b) 第一の酵素を沈着させるように適合した試薬セットが、第一のハプテンと反応性の抗体を含み、第一のハプテンと反応性の抗体が第一の酵素にコンジュゲートされ ;

かつ / 又は

10

20

30

40

50

(b 1) 第二の一次抗体が第二のハプテンにコンジュゲートされ、かつ

(b 2 b) 第二の酵素を沈着させるように適合した試薬セットが、第二のハプテンと反応性の抗体を含み、第二のハプテンと反応性の抗体が第二の酵素にコンジュゲートされる、請求項 48 に記載のシステム。

【請求項 50】

(a 2 b) 第一の酵素を沈着させるように適合した試薬セットが、第一の一次抗体の Ig 種に特異的な抗種抗体を含み、第一の一次抗体の Ig 種に特異的な抗種抗体は第一の酵素にコンジュゲートされ；かつ / 又は

(b 2 b) 第二の酵素を沈着させるように適合した試薬セットが、第二の一次抗体の Ig 種に特異的な抗種抗体を含み、第二の一次抗体の Ig 種に特異的な抗種抗体は第二の酵素にコンジュゲートされる、請求項 48 に記載のシステム。

10

【請求項 51】

(a 2 b) 第一の酵素を沈着させるように適合した試薬セットが、第一の一次抗体に特異的な第一の二次抗体を含み、前記第一の二次抗体は第一の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、更に第一の酵素は第一の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされ；かつ / 又は

(b 2 b) 第二の酵素を沈着させるように適合した試薬セットが、第二の一次抗体に特異的な第二の二次抗体を含み、前記第二の二次抗体は第二の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、更に第二の酵素は第二の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされる、請求項 48 に記載のシステム。

20

【請求項 52】

(a 2 b) 第一の特異的結合対の第一のメンバーがビオチンであり、第一の特異的結合対の第二のメンバーがビオチン結合タンパク質であり；かつ / 又は

(b 2 b) 第二の特異的結合対の第一のメンバーがビオチンであり、第二の特異的結合対の第二のメンバーがビオチン結合タンパク質である、請求項 51 に記載のシステム。

【請求項 53】

ビオチン結合タンパク質が、アビジン、アビジン誘導体（例えばニュートラアビジン）、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 52 に記載のシステム。

【請求項 54】

(a 2 b) 第一の特異的結合対の第一のメンバーがハプテンであり、第一の特異的結合対の第二のメンバーが抗ハプテン抗体であり；かつ / 又は

(b 2 b) 第二の特異的結合対の第一のメンバーがハプテンであり、第二の特異的結合対の第二のメンバーが抗ハプテン抗体である、請求項 51 に記載のシステム。

30

【請求項 55】

(a 2 a) 第一の酵素が第一の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、かつ

(a 2 b) 第一の酵素を沈着させるように適合した試薬セットが、

(a 2 b 1) 第一の一次抗体に特異的な第一の二次抗体であって、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素にコンジュゲートした第一の二次抗体；

40

(a 2 b 2) 第一の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートしたチラミド；及び

(a 2 b 3) 過酸化水素溶液を含み；
かつ / 又は

(b 2 a) 第二の酵素が第二の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、かつ

(b 2 b) 第二の酵素を沈着させるように適合した試薬セットが、

(b 2 b 1) 第二の一次抗体に特異的な第二の二次抗体であって、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素にコンジュゲートした第二の二次抗体；

50

(b 2 b 2) 第二の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートしたチラミド ;
及び

(b 2 b 3) 過酸化水素溶液
を含む、請求項 4 8 に記載のシステム。

【請求項 5 6】

(a 2 a) 第一の特異的結合対の第一のメンバーがビオチン結合タンパク質であり、
(a 2 b 2) 第一の特異的結合対の第二のメンバーがビオチンであり ;
かつ / 又は

(b 2 a) 第二の特異的結合対の第一のメンバーがビオチン結合タンパク質であり、
(b 2 b 2) 第二の特異的結合対の第二のメンバーがビオチンである、
請求項 5 5 に記載のシステム。

10

【請求項 5 7】

ビオチン結合タンパク質が、アビジン、アビジン誘導体 (例えばニュートラアビジン)
、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 5 6 に記載のシステム。

【請求項 5 8】

(a 2 a) 第一の特異的結合対の第一のメンバーが抗ハプテン抗体であり、
(a 2 b 2) 第一の特異的結合対の第二のメンバーがハプテンであり ;
かつ / 又は

(b 2 a) 第二の特異的結合対の第一のメンバーが抗ハプテン抗体であり、
(b 2 b 2) 第二の特異的結合対の第二のメンバーがハプテンである、
請求項 5 6 に記載のシステム。

20

【請求項 5 9】

第一の色素及び第二の色素を沈着させるための手段が、自動スライド染色装置を含む、
請求項 4 7 に記載のシステム。

【請求項 6 0】

自動スライド染色装置が、
組織試料によって発現された P D - L 1 タンパク質に近接して組織試料への抗体の結合
をもたらすように、P D - L 1 タンパク質に特異的な第一の一次抗体に組織試料を接触さ
せ ;

30

組織試料に結合した第一の一次抗体に近接して第一の酵素を沈着させ ;

第一の酵素を第一の基質と反応させて、第一の一次抗体に近接して組織試料上に第一の
色素の沈着をもたらすのに十分な条件下で、組織試料上に第一の基質を沈着させ ;

組織試料によって発現された免疫細胞マーカータンパク質に近接して組織試料への抗体
の結合をもたらすように、免疫細胞マーカータンパク質に特異的な第二の一次抗体に組織
試料を接触させ ;

組織試料に結合した第二の一次抗体に近接して第二の酵素を沈着させ ;

第二の酵素を第二の基質と反応させて、第二の一次抗体に近接して組織試料上に第二の
色素の沈着をもたらすのに十分な条件下で、組織試料上に第二の基質を沈着させる
ようにプログラムされた、請求項 5 9 に記載のシステム。

40

【請求項 6 1】

第一の一次抗体が第一のハプテンにコンジュゲートされ、第一の酵素が第一の二次抗体
にコンジュゲートされ、第一の二次抗体は第一のハプテンに特異的であり、自動スライド
染色装置が、第一のハプテンへの第一の二次抗体の結合をもたらすのに十分な条件下で組
織試料を第一の二次抗体に接触させることによって組織試料上に第一の酵素を沈着させる
ようにプログラムされ ;

かつ / 又は

第二の一次抗体が第二のハプテンにコンジュゲートされ、第二の酵素が第二の二次抗体
にコンジュゲートされ、第二の二次抗体は第二のハプテンに特異的であり、自動スライド
染色装置が、第二のハプテンへの第二の二次抗体の結合をもたらすのに十分な条件下で組
織試料を第二の二次抗体に接触させることによって組織試料上に第二の酵素を沈着させる

50

ようにプログラムされた、請求項 60 に記載のシステム。

【請求項 62】

第一の酵素が第一の一次抗体の Ig 種に特異的な第一の二次抗体にコンジュゲートされ、自動スライド染色装置が、第一の二次抗体の第一の一次抗体への結合をもたらすのに十分な条件下で組織試料を第一の二次抗体と接触させることによって、組織試料上に第一の酵素を沈着させるようにプログラムされ；

かつ / 又は

第二の酵素が第二の一次抗体の Ig 種に特異的な第二の二次抗体にコンジュゲートされ、自動スライド染色装置が、第二の二次抗体の第一の一次抗体への結合をもたらすのに十分な条件下で組織試料を第二の二次抗体と接触させることによって、組織試料上に第二の酵素を沈着させるようにプログラムされた、請求項 60 に記載のシステム。

10

【請求項 63】

自動スライド染色装置が、

第一の一次抗体に特異的な第一の二次抗体に組織試料を接触させる工程であって、前記第一の二次抗体が第一の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされる工程、及び

第一の酵素に組織試料を接触させる工程であって、第一の酵素が第一の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされ、第一の結合対の第一のメンバーと第一の結合対の第二のメンバーとの間の結合をもたらすのに十分な条件下で組織試料が第一の酵素と接触される工程

20

によって、第一の酵素を組織試料上に沈着させるようにプログラムされ、

かつ / 又は

自動スライド染色装置が、

第二の一次抗体に特異的な第二の二次抗体に組織試料を接触させる工程であって、前記第二の二次抗体が第二の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされる工程、及び

第二の酵素に組織試料を接触させる工程であって、第二の酵素が第二の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートされ、第二の結合対の第一のメンバーと第二の結合対の第二のメンバーとの間の結合をもたらすのに十分な条件下で組織試料が第二の酵素と接触される工程

30

によって、第一の酵素を組織試料上に沈着させるようにプログラムされた、請求項 60 に記載のシステム。

【請求項 64】

第一の特異的結合対の第一のメンバーがビオチンであり、第一の特異的結合対の第二のメンバーがビオチン結合タンパク質であり；かつ / 又は

第二の特異的結合対の第一のメンバーがビオチンであり、第二の特異的結合対の第二のメンバーがビオチン結合タンパク質である、

請求項 63 に記載のシステム。

【請求項 65】

ビオチン結合タンパク質が、アビジン、アビジン誘導体（例えばニュートラアビジン）、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 64 に記載のシステム。

40

【請求項 66】

第一の特異的結合対の第一のメンバーがハプテンであり、第一の特異的結合対の第二のメンバーが抗ハプテン抗体であり；かつ / 又は

第二の特異的結合対の第一のメンバーがハプテンであり、第二の特異的結合対の第二のメンバーが抗ハプテン抗体である、請求項 63 に記載のシステム。

【請求項 67】

第一の酵素が第一の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、自動スライド染色装置が、

第一の一次抗体に特異的な第一の二次抗体に組織試料を接触させる工程であって、第

50

一の二次抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素（HRP）にコンジュゲートされる工程；

第一の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートしたチラミドに組織試料を接触させ、第一の一次抗体に近接して組織試料上にチラミドを沈着させるのに十分な条件下でチラミドを第一の二次抗体のHRPと反応させる工程；及び

第一の結合対の第一のメンバーと第一の結合対の第二のメンバーとの間に結合をもたらすのに十分な条件下で第一の酵素に組織試料を接触させる工程
によって第一の酵素を組織試料上に沈着させるようにプログラムされ；
かつ／又は

第二の酵素が第二の特異的結合対の第一のメンバーにコンジュゲートされ、自動スライド染色装置が、

第二の一次抗体に特異的な第二の二次抗体に組織試料を接触させる工程であって、第二の二次抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素（HRP）にコンジュゲートされる工程；

第二の特異的結合対の第二のメンバーにコンジュゲートしたチラミドに組織試料を接触させ、第一の一次抗体に近接して組織試料上にチラミドを沈着させるのに十分な条件下でチラミドを第二の二次抗体のHRPと反応させる工程；及び

第二の結合対の第一のメンバーと第二の結合対の第二のメンバーとの間に結合をもたらすのに十分な条件下で第二の酵素に組織試料を接触させる工程
によって第二の酵素を組織試料上に沈着させるようにプログラムされた、請求項60に記載のシステム。

【請求項68】

第一の特異的結合対の第一のメンバーがビオチン結合タンパク質であり、第一の特異的結合対の第二のメンバーがビオチンであり；

かつ／又は

第二の特異的結合対の第一のメンバーがビオチン結合タンパク質であり、第二の特異的結合対の第二のメンバーがビオチンである、
請求項67に記載のシステム。

【請求項69】

ビオチン結合タンパク質が、アビジン、アビジン誘導体（例えばニュートラアビジン）、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項68に記載のシステム。

【請求項70】

第一の特異的結合対の第一のメンバーが抗ハプテン抗体であり、第一の特異的結合対の第二のメンバーがハプテンであり；

かつ／又は

第二の特異的結合対の第一のメンバーが抗ハプテン抗体であり、第二の特異的結合対の第二のメンバーがハプテンである、請求項67に記載のシステム。

【請求項71】

組織試料を画像化するための手段を更に備える、請求項47から70の何れかに記載のシステム。

【請求項72】

組織試料を画像化するための手段が撮像装置を含む、請求項71に記載のシステム。

【請求項73】

撮像装置が、明視野イメージスライドスキャナである、請求項72に記載のシステム。

【請求項74】

プロセッサとコンピュータ可読媒体と出力手段とを備えるコンピュータを更に備え、
撮像装置が、プロセッサに作動可能に接続され、第一の検出試薬からの第一のシグナルを検出し、第二の検出剤からの第二のシグナルを検出し、第一のシグナルを第一のシグナルデータに変換し、第二のシグナルを第二のシグナルデータに変換し、第一のシグナルデ

10

20

30

40

50

ータ及び第二のシグナルデータをプロセッサに送信するように構成され、

コンピュータ可読媒体が、第一のシグナルデータ及び第二のシグナルデータに基づいて組織試料内の第一のシグナル及び第二のシグナルを定量し位置特定するためのプロセッサ実行可能命令を含む、請求項 7 3 に記載のシステム。

【請求項 7 5】

プロセッサ実行可能命令が、第一及び第二のシグナルの数と位置を出力手段に出力するための命令を更に含む、請求項 7 4 に記載のシステム。

【請求項 7 6】

第一及び第二のシグナルの数及び位置に基づいて、PD-L1 陽性腫瘍における腫瘍浸潤 PD-L1 陽性免疫細胞の (i) 存在もしくは非存在又は (i i) 数を決定するスコア化手段を更に備える、請求項 7 4 に記載のシステム。

10

【請求項 7 7】

PD-L1 陽性腫瘍における腫瘍浸潤 PD-L1 陽性免疫細胞の存在又は非存在を同定する、出力手段へのレポートを作成することを更に含む、請求項 7 5 に記載のシステム。

【請求項 7 8】

PD-L1 陽性腫瘍における腫瘍浸潤 PD-L1 陽性免疫細胞の数を同定する、出力手段へのレポートを作成することを更に含む、請求項 7 5 に記載のシステム。

【請求項 7 9】

第一の色素が DISCOVERY パープルであり、第二の色素が DAB であるか、又は第一の色素が DAB であり、第二の色素が DISCOVERY パープルである、請求項 4 7 から 7 8 の何れかに記載のシステム。

20

【請求項 8 0】

第一の色素が DISCOVERY パープルであり、第二の色素が DABSYL であるか、又は第一の色素が DABSYL であり、第二の色素が DISCOVERY パープルである、請求項 4 7 から 7 8 の何れかに記載のシステム。

【請求項 8 1】

少なくとも一つの免疫細胞マーカーが、CD8、CD4、CD3、CD25、CD163 及び CD45 LCA からなる群から選択される、請求項 4 7 から 8 0 の何れかに記載のシステム。

【請求項 8 2】

腫瘍浸潤 PD-L1 陽性免疫細胞の存在又は非存在について PD-L1 陽性腫瘍組織試料を分析することによって PD-L1 標的療法に対する応答を予測するためのシステムであって、

30

PD-L1 と少なくとも一つの CD マーカーとを共発現する免疫細胞を同定するための手段を備えるシステム。

【請求項 8 3】

PD-L1 と少なくとも一つの CD マーカーとを共発現する免疫細胞を同定するための手段が、PD-L1 に特異的な第一の一次抗体に腫瘍組織試料を接触させ；少なくとも一つの CD マーカーに特異的な第二の一次抗体に腫瘍組織試料を接触させるように構成された自動 IHC / ISH スライド染色装置を備える、請求項 8 2 に記載のシステム。

40

【請求項 8 4】

第一の一次抗体及び第二の一次抗体の腫瘍組織試料への結合を検出するための手段を更に備える、請求項 8 3 に記載のシステム。

【請求項 8 5】

第一の一次抗体及び第二の一次抗体の腫瘍組織試料への結合を検出するための手段が、第一の一次抗体に結合することができる第一の検出プローブと第二の一次抗体に結合することができる第二の検出プローブとを含み、

第一の検出プローブが第一の基質を含み、第二の検出プローブが第二の基質を含む、請求項 8 4 に記載のシステム。

【請求項 8 6】

50

腫瘍組織試料を画像化するための手段を更に備える、請求項 8 5 に記載のシステム。

【請求項 8 7】

腫瘍組織試料を画像化するための手段が撮像装置を備える、請求項 8 5 に記載のシステム。

【請求項 8 8】

撮像装置が明視野イメージスライドスキャナである、請求項 8 6 に記載のシステム。

【請求項 8 9】

第一の検出プローブ及び第二の検出プローブの存在又は数及び位置を決定するために、撮像装置からのデータをスコア化するための手段を更に備える、請求項 8 6 に記載のシステム。

【請求項 9 0】

P D - L 1 陽性腫瘍における腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性免疫細胞の存在又は非存在を同定するために、データをスコア化するための手段からレポートを受け取るように構成された出力手段を更に備える、請求項 8 9 に記載のシステム。

【請求項 9 1】

P D - L 1 陽性腫瘍における腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性免疫細胞の存在又は非存在から P D - L 1 標的療法に対する応答を予測するレポートを作成することを更に含み、存在が正の応答の可能性を示し、非存在が負の応答を示す、請求項 9 0 に記載のシステム。

【請求項 9 2】

P D - L 1 陽性免疫細胞から P D - L 1 陽性腫瘍細胞を区別するためのシステムであって、

- (a) P D - L 1 に特異的な第一の検出プローブに生物学的試料を接触させ；
 - (b) 第一の検出プローブに特異的に結合する第一の標識用コンジュゲートであって、第一の酵素を含む第一の標識用コンジュゲートに生物学的試料を接触させ；
 - (c) 第一の潜在的反応性部分と第一の検出可能部分とを含む第一のシグナル伝達コンジュゲートに生物学的試料を接触させ；
 - (d) 第一の酵素を不活性化し；
 - (e) 第二の検出プローブであって少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的である第二の検出プローブに生物学的試料を接触させ；
 - (f) 第二の検出プローブに特異的に結合する第二の標識用コンジュゲートであって第二の酵素を含む第二の標識用コンジュゲートに生物学的試料を接触させ；かつ
 - (g) 第二の潜在的反応性部分と第二の検出可能部分とを含む第二のシグナル伝達コンジュゲートに生物学的試料を接触させる
- ための手段と；

第一及び第二の検出可能部分からのシグナルを検出するための手段であって、第一及び第二の検出可能部分が異なり、P D - L 1 陽性免疫細胞が P D - L 1 と少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する手段とを備えるシステム。

【請求項 9 3】

シグナルを検出するための手段が、生物学的試料を画像化して出力画像を作成するためのイメージャを備える、請求項 9 2 に記載のシステム。

【請求項 9 4】

出力画像に基づいて P D - L 1 陽性腫瘍細胞及び P D - L 1 陽性免疫細胞をスコア化してスコア化データを作成するための手段を更に備える、請求項 9 3 に記載のシステム。

【請求項 9 5】

P D - L 1 陽性腫瘍細胞、P D - L 1 陰性腫瘍細胞、P D - L 1 陽性免疫細胞、及び / 又は P D - L 1 陰性免疫細胞を同定するためのシステムであって、

- (a) 第一の検出プローブであって、P D - L 1 又は免疫細胞マーカーの一つに特異的な第一の一次抗体を含む第一の検出プローブに生物学的試料を接触させ；
- (b) 第一の酵素と第一の基質とを含む第一の検出試薬に、酵素を基質と反応させて

10

20

30

40

50

ジアミノベンジジン (DAB)、4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4' - スルホンアミド (DABSYL)、テトラメチルローダミン (DISCOVERYパープル)、N, N' - ビスカルボキシペンチル - 5, 5' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (Cy5)、及びローダミン 110 (ローダミン) からなる群から選択される第一の色素を試料上に沈着させるのに十分な条件下で、生物学的試料を接触させ;

(c) 第一の酵素を不活性化し、場合によっては第一の検出プローブを組織試料から除去し;

(d) 第二の検出プローブであって、PD - L1 又は免疫細胞マーカーの別のものに特異的な抗体の別のものから選択される第二の一次抗体を含む第二の検出プローブに生物学的試料を接触させ; かつ

(e) 第二の酵素と第二の基質とを含む第二の検出試薬に生物学的試料を接触させ、ここで、前記接触は、酵素を基質と反応させてジアミノベンジジン (DAB)、4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4' - スルホンアミド (DABSYL)、テトラメチルローダミン (DISCOVERYパープル)、N, N' - ビスカルボキシペンチル - 5, 5' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (Cy5)、及びローダミン 110 (ローダミン) からなる群から選択される第二の色素であって、第一の色素とは異なる第二の色素を試料上に沈着させるのに十分な条件下で実施する

ための手段と、

第一及び第二の色素からのシグナルを検出するための手段であって、前記シグナルが第一の色素によって生成される第一のシグナルと、第二の色素によって生成される第二のシグナルと、第一の色素と第二の色素の共存によって生成される第三のシグナルとを含み、第三のシグナルの存在が、PD - L1 陽性免疫細胞を示す、手段を備えるシステム。

【請求項 96】

第一及び第二の検出試薬からのシグナルを検出するための手段が、生物学的試料を画像化して出力画像を生成してスコア化データを生成するイメージャを備える、請求項 95 に記載のシステム。

【請求項 97】

出力画像に基づいて、PD - L1 陽性腫瘍細胞、PD - L1 陰性腫瘍細胞、PD - L1 陽性免疫細胞、及び PD - L1 陰性免疫細胞の少なくとも一つにスコアをつけるための手段を更に備える、請求項 96 に記載のシステム。

【請求項 98】

PD - L1 陽性腫瘍細胞、PD - L1 陰性腫瘍細胞、PD - L1 陽性免疫細胞、又は PD - L1 陰性免疫細胞の少なくとも一つを同定するためのシステムであって、

(a) 第一の検出プローブであって PD - L1 又は免疫細胞マーカーの一つに特異的な第一の一次抗体を含む第一の検出プローブに生物学的試料を接触させ;

(b) 第一の酵素を含む第一の検出試薬に生物学的試料を接触させ;

(c) 第一の酵素を不活性化し;

(d) 第二の検出プローブであって PD - L1 又は免疫細胞マーカーの別のものに特異的な抗体の別のものから選択される第二の一次抗体を含む第二の検出プローブに生物学的試料を接触させ; かつ

(e) 第二の酵素を含む第二の検出試薬に生物学的試料を接触させるための手段と;

第一及び第二の検出試薬からのシグナルを検出するための手段であって、第一及び第二の検出試薬が異なる検出可能部分を含み、PD - L1 陽性免疫細胞が PD - L1 と免疫細胞マーカーとを共発現する、手段を備えるシステム。

【請求項 99】

第一及び第二の検出試薬からのシグナルを検出する手段が、生物学的試料を画像化して出力画像を生成するイメージャを備える、請求項 98 に記載のシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 100】

出力画像に基づいて P D - L 1 陽性腫瘍細胞及び P D - L 1 陽性免疫細胞をスコア化してスコア化データを生成するための手段を更に備える、請求項 99 に記載のシステム。

【請求項 101】

プロセッサを備えるコンピュータを更に具備し、

第一及び第二の検出試薬からのシグナルを検出する手段が、プロセッサに作動可能に連結され、第一の検出試薬からの第一のシグナルを検出し、第二の検出試薬からの第二のシグナルを検出し、第一のシグナルを第一のシグナルデータに変換し、第二のシグナルを第二のシグナルデータに変換し、第一のシグナルデータと第二のシグナルデータをプロセッサに送信するように構成された、請求項 98 に記載のシステム。

10

【請求項 102】

第一のシグナルデータ及び第二のシグナルデータに基づいて P D - L 1 陽性腫瘍細胞、P D - L 1 陰性腫瘍細胞、P D - L 1 陽性免疫細胞、又は P D - L 1 陰性免疫細胞の少なくとも一つをスコア化してスコア化データを作成するための手段を更に備える、請求項 101 に記載のシステム。

【請求項 103】

コンピュータが、プロセッサに動作可能に接続され、第一のシグナルデータに基づいて生物学的試料内の第一のシグナルの位置を特定し、定量し；第二のシグナルデータに基づいて生物学的試料内の第二のシグナルの位置を特定し、定量する、命令を含むプロセッサ実行可能命令を保存するコンピュータ可読媒体を更に備える、請求項 101 に記載のシステム。

20

【請求項 104】

コンピュータが、プロセッサに動作可能に接続された出力手段を更に備え、プロセッサ実行可能命令が、生物学的試料内の第一のシグナルの位置と量、並びに生物学的試料内の第二のシグナルの位置と量を出力手段に出力する命令を更に含む、請求項 103 に記載のシステム。

【請求項 105】

プロセッサ実行可能命令が、第一のシグナルデータ及び第二のシグナルデータに基づいて P D - L 1 陽性腫瘍細胞、P D - L 1 陰性腫瘍細胞、P D - L 1 陽性免疫細胞、又は P D - L 1 陽性免疫細胞の少なくとも一つをスコア化してスコア化データを作成するための命令を更に含む、請求項 103 に記載のシステム。

30

【請求項 106】

コンピュータが、プロセッサに動作可能に接続された出力手段を更に備え、プロセッサ実行可能命令がスコア化データを出力手段に出力する命令を更に含む、請求項 105 に記載のシステム。

【請求項 107】

プロセッサ、入力、及びコンピュータ可読媒体を備えるコンピュータシステムであって、

入力は、プロセッサと、第一の色素によって生成された第一のシグナル、第二の色素によって生成された第二のシグナル、及び第一の色素及び第二の色素の共存によって生成された第三のシグナルを含むシグナルセットを検出するための手段とに動作可能に接続され、第一の色素及び第二の色素がジアミノベンジジン (D A B)、4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4 ' - スルホンアミド (D A B S Y L)、テトラメチルローダミン (D I S C O V E R Y パープル)、N , N ' - ビスカルボキシペンチル - 5 , 5 ' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (C y 5)、及びローダミン 110 (ローダミン) からなる群から選択され、第二の色素は第一の色素とは異なり、入力はシグナルセットを検出するための手段からのシグナルセットをプロセッサに送信するように構成され、

40

コンピュータ可読媒体は、シグナルをシグナルデータに変換する命令を含むプロセッサ実行可能命令を含み、

プロセッサは、コンピュータ可読媒体に作動可能に連結され、第一のシグナルを第一の

50

シグナルデータに変換し、第二のシグナルを第二のシグナルデータに変換し、第三のシグナルを第三のシグナルデータに変換するようにプロセッサ実行可能命令によって構成可能である、コンピュータシステム。

【請求項 108】

プロセッサ実行可能命令が、第一のシグナルデータを PD-L1 単一発現量に、第二のシグナルデータを免疫細胞マーカー単一発現量に、第三のシグナルデータを PD-L1 / 免疫細胞マーカー共発現量に変換して試験結果を生成するための命令を更に含む、請求項 107 に記載のシステム。

【請求項 109】

コンピュータが、プロセッサに動作可能に接続された出力装置を更に備え、プロセッサ実行可能命令が、試験結果を出力装置に出力する命令を更に含む、請求項 108 に記載のシステム。

【請求項 110】

プロセッサ実行可能命令が、試験結果に基づく患者の治療のための命令を更に含む、請求項 109 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔関連出願との相互参照〕

2015 年 11 月 22 日に出願した米国仮特許出願第 62 / 258493 号の利益をここに主張し、その内容の全体を出典明示により援用する。

【背景技術】

【0002】

PD-1 は、活性化 T 細胞、B 細胞及び単球上に発現される CD28 / CTLA4 受容体ファミリーに属する免疫抑制性受容体である。PD-1 は制御性 T 細胞上でもまた発現され、そこで、樹状細胞及び NK T 細胞と相互作用し、アネルギー及び腫瘍免疫回避と関連することが示されている。T 細胞活性の負の制御因子としての PD-1 の役割は、免疫細胞及び腫瘍細胞上に発現されるそのリガンド PD-L1 及び PD-L2 とのその相互作用を介して媒介される。

【0003】

PD-L1 及び PD-L2 は、メラノーマ、神経膠芽腫、非小細胞肺癌及び尿路上皮癌、卵巣癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、膵臓癌及び胃癌を含む多くのヒト腫瘍に発現される。PD-L1 は、宿主免疫系からの腫瘍免疫回避及び腫瘍抗アポトーシス活性の媒介に関与している。更に、抗原提示細胞上に発現される PD-1 リガンド 1 及び 2 (PD-L) は、T 細胞上の PD-1 を介して間接的に T 細胞アネルギー又は枯渇を誘導することが示される一方、末梢組織上に発現される PD-L1 は自己反応性リンパ球を直接的に抑制する。腫瘍上に発現される PD-L は、CD8+ T 細胞のエフェクター機能の抑制を含む、腫瘍誘導免疫抑制をもたらす適応調節性 T 細胞の生成を調節すると考えられる。腫瘍上の PD-L1 のより高い発現レベルは、メラノーマ、食道、腎臓、肺、及び脳、膵臓、卵巣及び頭頸部を含む幾つかの悪性腫瘍における予後不良と相関することが示されていると

【0004】

PD-L1 発現は、最も一般的には免疫組織化学的検査 (IHC) によって測定される。腫瘍性 PD-L1 発現状態は、メラノーマ、腎細胞癌、及び非小細胞肺癌を含む複数の腫瘍型における予後因子であると考えられる。予測バイオマーカーとしての PD-L1 免疫組織化学的検査の使用は、不定の検出抗体、異なる IHC カットオフ、組織調製、プロセッシングの多様性、原発性対転移性生検、発がん性対 PD-L1 発現の誘導、及び腫瘍対免疫細胞の染色を含む、複数の未解決の問題によって混乱させられる。

【0005】

国際公開第 2014 / 194293 号 (「293 刊行物」) は、PD-L1 及び B7

10

20

30

40

50

- H 4 経路標的療法に受け入れられるであろう患者を選択する方法を開示する。' 2 9 3 刊行物は、C D 6 8 + / B 7 - H 1 + マクロファージが検出されうるように、二重 C D 6 8 / B 7 0 - H 1 染色で組織試料を共染色することを開示する。' 2 9 3 刊行物はまた B 7 - H 1、P D - 1、又は C D 8 の一つで個々の組織試料を染色することを開示しており、多重アッセイにおける単一組織試料の染色は開示していない。また、' 2 9 3 刊行物は、P D - L 1 に特異的な第一の検出試薬と免疫細胞マーカーに特異的な少なくとも第二の検出試薬とに組織試料を接触させることも開示していない。

【0006】

国際公開第 2 0 1 5 / 0 8 8 9 3 0 号（「' 9 3 0 刊行物」）は、組織切片を P D - 1 に特異的な抗体（抗 P D - 1 A b）と所望の P D リガンドに特異的な抗体（抗 P D リガンド A b）とに接触させることを含む多重 I H C アッセイを開示している。また、' 9 3 0 刊行物は、P D - 1 を発現する細胞が、P D - 1 と広範囲に共存する分子の発現について I H C 染色によって検出され得、同様に、関心のある P D リガンドを発現する細胞が、P D リガンドと広範囲に共存する分子の発現について I H C 染色によって検出されうることを開示している。そのような実施態様では、共存する分子に特異的に結合する抗体が、抗 P D - 1 又は抗 P D リガンド抗体の代わりに一次抗体として使用される。' 9 3 0 刊行物は、P D - L 1 に特異的な第一の検出試薬と免疫細胞マーカーに特異的な少なくとも第二の検出試薬とに組織試料を接触させることは開示していない。

【0007】

Fent 等 “Multispectral imaging of formalin-fixed tissue predicts ability to generate tumor infiltrating lymphocytes from melanoma” J. ImmunoTherapy of Cancer, (2015)3:47（「F e n g」）は、メラノーマの患者由来の腫瘍の免疫環境を分析する 7 色の定量的マルチスペクトル I H C アッセイを記載している。特に、開示されたアッセイは、C D 3、C D 8、F o x P 3、C D 1 6 3、P D - L 1 を含む定量的マルチスペクトル蛍光免疫組織化学パネルである。研究は、自己腫瘍反応性腫瘍浸潤リンパ球の発生を妨げる可能性のある腫瘍微小環境における潜在的な抑制機構を研究することに向けられた。F e n g は、P D - L 1 標的療法に対する応答を予測する目的のために P D - L 1 に特異的な第一の検出試薬と、P D - L 1 と少なくとも一つの他の免疫細胞マーカーとを共発現する免疫細胞を同定する目的のための免疫細胞マーカーに特異的な少なくとも第二の検出試薬とに組織試料を接触させることは開示していない。F e n g は、検出試薬を使用する多重アッセイも何ら開示していない。更に、F e n g は C D 4 5 に特異的な抗体を利用するアッセイを開示していない。

【発明の概要】

【0008】

本発明の一態様は、組織試料中の P D - L 1 陽性腫瘍細胞、P D - L 1 陽性免疫細胞、P D - L 1 陰性腫瘍細胞、及び / 又は P D - L 1 陰性免疫細胞の同定及び / 又は区別を容易にするシステム又はキットである。幾つかの実施態様では、キットは、P D - L 1 に特異的な第一の一次抗体；少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な第二の一次抗体；第一の一次抗体を検出するための第一の検出試薬；及び第二の一次抗体を検出するための第二の検出試薬を含む。幾つかの実施態様では、少なくとも一つの免疫細胞マーカーは、C D 8、C D 4、C D 3、C D 2 5、C D 1 6 3 及び C D 4 5 L C A からなる群から選択される。幾つかの実施態様では、免疫細胞マーカーは C D 4 5 L C である。幾つかの実施態様では、第一の一次抗体は、抗 P D - L 1 抗体（S P 1 4 2）又は抗 P D - L 1 抗体（S P 2 6 3）である。幾つかの実施態様では、第二の一次抗体は抗 C D 4 5 L C A 抗体（R P 2 / 1 8）である。

【0009】

幾つかの実施態様では、第一及び第二の検出試薬のそれぞれが、（i）酵素；（2）一次抗体が組織試料に結合したときに一次抗体に近接して酵素を沈着させるための試薬、及び（i i i）試料上に沈着した酵素に近接して色素を沈着させる酵素と反応性の酵素基質を含み、第一及び第二の検出試薬は異なる色素を沈着させる基質を含む。幾つかの実施態

様では、異なる色素は、ジアミノベンジジン (DAB)、4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド (DABSYL)、テトラメチルローダミン (DISCOVERYパープル)、N,N'-ビスカルボキシペンチル-5,5'-ジスルホナト-インド-ジカルボシアニン (Cy5)、及びローダミン110 (ローダミン) からなる群から選択される。幾つかの実施態様では、第一の基質は、DISCOVERYパープル又はDABの一方を沈着させ、第二の基質は、DISCOVERYパープル又はDABの他方を沈着させる。幾つかの実施態様では、第一の基質は、DISCOVERYパープル又はDABSYLの一方を沈着させ、第二の基質は、DISCOVERYパープル又はDABSYLの他方を沈着させる。

【0010】

幾つかの実施態様では、キットは、PD-L1以外の腫瘍マーカーに特異的な少なくとも一つの他の検出プローブと、少なくとも一つの他の検出プローブを検出するための検出試薬とを更に含む。幾つかの実施態様では、キットは、EGFR、HER2、HPV、ALK、BRAF、OX-40、PD-1、IDO-1、FoxP3、CD163、及びCTLA-4に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブを更に含む。幾つかの実施態様では、キットは、少なくとも二つの免疫細胞マーカーに特異的な二つの一次抗体を更に含む。幾つかの実施態様では、キットは、酵素を不活性化する成分を更に含む。

【0011】

本開示の別の態様は、組織試料中の免疫細胞を共染色する方法であって、PD-L1に特異的な第一の検出プローブに組織試料を接触させる工程；少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な第二の検出プローブに組織試料を接触させる工程；及び第一及び第二の検出試薬に組織試料を接触させる工程を含み、第一及び第二の検出試薬が、異なる色素の沈着をもたらす基質を含む、方法である。幾つかの実施態様では、第二の検出プローブはCD45LCAに特異的である。

【0012】

本開示の別の態様は、PD-L1陽性腫瘍細胞、PD-L1陰性腫瘍細胞、PD-L1陽性免疫細胞、及びPD-L1陰性免疫細胞を同定する方法であって、PD-L1に特異的な第一の検出プローブに組織試料を接触させる工程；少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な第二の検出プローブに組織試料を接触させる工程；及び第一及び第二の検出試薬に組織試料を接触させる工程を含み、第一及び第二の検出試薬が、異なる色素の沈着をもたらす異なる基質を含む、方法である。幾つかの実施態様では、第一及び第二の検出試薬は検出試薬である。幾つかの実施態様では、第二の検出プローブはCD45LCAに特異的である。

【0013】

本開示の別の態様は、PD-L1陽性免疫細胞からPD-L1陽性腫瘍細胞を区別する方法であって、PD-L1に特異的な第一の検出プローブに組織試料を接触させる工程；少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な第二の検出プローブに組織試料を接触させる工程；及び第一及び第二の検出試薬に組織試料を接触させる工程を含み、第一及び第二の検出試薬が、異なる色素の沈着をもたらす異なる基質を含む、方法である。幾つかの実施態様では、第一及び第二の検出試薬は検出試薬である。幾つかの実施態様では、第二の検出プローブはCD45LCAに特異的である。

【0014】

本開示の別の態様は、PD-L1陽性腫瘍における腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞を同定する方法であって、PD-L1に特異的な第一の一次抗体に組織試料を接触させる工程；少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な第二の一次抗体に組織試料を接触させる工程；及び第一及び第二の検出試薬に組織試料を接触させる工程を含み、第一及び第二の検出試薬が、異なる色素の沈着をもたらす異なる基質を含む、方法である。幾つかの実施態様では、腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞は、PD-L1と少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する。幾つかの実施態様では、第一の一次抗体は抗PD-L1抗体SP142である。幾つかの実施態様では、免疫細胞マーカーは、CD8、CD4、CD

10

20

30

40

50

3、CD25、CD163及びCD45LCAからなる群から選択される。幾つかの実施態様では、免疫細胞マーカーはCD45LCAである。幾つかの実施態様では、第二の抗体は抗CD45LCA抗体RP2/18である。

【0015】

幾つかの実施態様では、第一及び第二の検出試薬のそれぞれは、(i)酵素、(ii)一次抗体が組織試料に結合したときに一次抗体に近接して酵素を沈着させるための試薬、及び(iii)試料上に色素を沈着させる酵素と反応性の酵素を含み、第一及び第二の検出試薬は異なる基質を含む。幾つかの実施態様では、異なる基質は、DAB、DABSYL、DISCOVERYパープル、Cy5、及びローダミンからなる群から選択される色素を付着させるように選択される。幾つかの実施態様では、第一の基質は、DISCOVERYパープル又はDABの一方を沈着させ、第二の基質は、DISCOVERYパープル又はDABの他方を沈着させる。幾つかの実施態様では、第一の基質は、DISCOVERYパープル又はDABSYLの一方を沈着させ、第二の基質は、DISCOVERYパープル又はDABSYLの他方を沈着させる。幾つかの実施態様では、本方法は、PD-L1以外の腫瘍マーカーに特異的な少なくとも一つの他の検出プローブに組織試料を接触させる工程を更に含む。幾つかの実施態様では、本方法は、EGFR、HER2、HPV、ALK、BRAF、OX-40、PD-1、IDO-1、FoxP3、CD163、及びCTLA-4の一つに特異的な少なくとも一つの他の検出プローブに組織試料を接触させる工程を更に含む。

10

【0016】

本開示の別の態様は、腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞の存在又は非存在についてPD-L1陽性腫瘍組織試料を分析することによって、PD-L1標的療法に対する応答を予測する方法であって、PD-L1と少なくとも一つのCDマーカーとを共発現する免疫細胞を同定する工程を含み、PD-L1と少なくとも一つのCDマーカーとを共発現する免疫細胞を同定する工程が、PD-L1に特異的な第一の一次抗体に腫瘍組織試料を接触させることと、少なくとも一つのCDマーカーに特異的な第二の一次抗体に腫瘍組織試料を接触させることを含む、方法である。幾つかの実施態様では、本方法は、PD-L1陽性腫瘍細胞の数を定量し、及び腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞の数を定量し、及び場合によっては定量値又はそれから誘導される任意の値を、ここに記載された対照値又は予め決められたカットオフ値と比較することを更に含む。幾つかの実施態様では、CDマーカーは、CD8、CD4、CD3、及びCD45LCAからなる群から選択される。幾つかの実施態様では、CDマーカーはCD45LCAである。

20

30

【0017】

幾つかの実施態様では、本方法は、第一及び第二の検出試薬に組織試料を接触させることを更に含み、第一及び第二の検出試薬は異なる色素の沈着をもたらす異なる基質を含む。幾つかの実施態様では、第一及び第二の検出試薬のそれぞれは、(i)酵素、(ii)一次抗体が組織試料に結合したときに一次抗体に近接して酵素を沈着させるための試薬、及び(iii)色素を沈着させる酵素と反応性の基質を含み、第一及び第二の検出試薬は、異なる色素を沈着させる基質を含む。幾つかの実施態様では、異なる基質は、DAB、DABSYL、DISCOVERYパープル、Cy5、及びローダミンからなる群から選択される色素を沈着させるように選択される。幾つかの実施態様では、第一の基質は、DISCOVERYパープル又はDABの一方を沈着させ、第二の基質は、DISCOVERYパープル又はDABの他方を沈着させる。幾つかの実施態様では、第一の基質は、DISCOVERYパープル又はDABSYLの一方を沈着させ、第二の基質は、DISCOVERYパープル又はDABSYLの他方を沈着させる。

40

【0018】

幾つかの実施態様では、本方法は、PD-L1以外の腫瘍マーカーに特異的な少なくとも一つの他の検出プローブと少なくとも一つの他の検出プローブを検出するための検出試薬とに組織試料を接触させることを更に含む。他の実施態様では、本方法は、EGFR、HER2、HPV、ALK、BRAF、OX-40、PD-1、IDO-1、FoxP3

50

、CD163、及びCTLA-4に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブを導入することを含む。

【0019】

本開示の別の態様では、患者のがんを治療する方法であって、患者のPD-L1陽性腫瘍組織試料が腫瘍浸潤PD-L1陽性リンパ球を含むかどうかを決定する分析の結果を提供する試験を要求し、患者の腫瘍組織試料がPD-L1陽性腫瘍細胞及び腫瘍浸潤PD-L1陽性リンパ球を発現する場合に患者にPD-L1標的療法を施すことを含み、前記試験が、PD-L1に特異的な第一の一次抗体と少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な第二の一次抗体とに腫瘍組織試料が接触させられる多重アッセイを含み、腫瘍浸潤PD-L1陽性リンパ球がPD-L1と少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する、方法を含む。幾つかの実施態様では、本方法は、PD-L1陽性腫瘍細胞の数と腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞の数を定量し、場合によっては定量値又はそれに由来する任意の値を対照値と比較することを更に含む。幾つかの実施態様では、免疫細胞マーカーは、CD8、CD4、CD3、及びCD45LCAからなる群から選択される。幾つかの実施態様では、免疫細胞マーカーはCD45LCAである。

10

【0020】

幾つかの実施態様では、本方法は、第一及び第二の検出試薬に組織試料を接触させることを更に含み、第一及び第二の検出試薬は異なる色素の沈着をもたらす異なる基質を含む。幾つかの実施態様では、第一及び第二の検出試薬のそれぞれは、(i)酵素、(ii)一次抗体が組織試料に結合したときに一次抗体に近接して酵素を沈着させるための試薬、及び(iii)試料上に色素を沈着させる酵素と反応性の基質を含み、第一及び第二の検出試薬は、異なる色素の沈着を生じる基質/酵素の組み合わせを含む。幾つかの実施態様では、異なる基質は、DAB、DABSYL、DISCOVERYパープル、Cy5、及びローダミンからなる群から選択される色素を沈着させるように選択される。幾つかの実施態様では、第一の基質は、DISCOVERYパープル又はDABの一方を沈着させ、第二の基質は、DISCOVERYパープル又はDABの他方を沈着させる。幾つかの実施態様では、第一の基質は、DISCOVERYパープル又はDABSYLの一方を沈着させ、第二の基質は、DISCOVERYパープル又はDABSYLの他方を沈着させる。

20

【0021】

幾つかの実施態様では、本方法は、PD-L1以外の腫瘍マーカーに特異的な少なくとも一つの他の検出プローブと少なくとも一つの他の検出プローブを検出するための検出試薬とに組織試料を接触させることを更に含む。他の実施態様では、本方法は、EGFR、HER2、HPV、ALK、BRAF、OX-40、PD-1、IDO-1、FoxP3、CD163、及びCTLA-4に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブを導入することを含む。幾つかの実施態様では、PD-L1標的療法はアテゾリズマブである。

30

【0022】

本開示の別の態様は、PD-L1陽性免疫細胞からPD-L1陽性腫瘍細胞を区別する方法であって、(a)PD-L1に特異的な第一の検出プローブに生物学的試料を接触させる工程；(b)第一の検出用プローブに特異的に結合する第一の標識用コンジュゲートに生物学的試料を接触させる工程であって、第一の標識用コンジュゲートが第一の酵素を含む工程；(c)第一の潜在的反応性部分と第一の検出可能部分とを含む第一のシグナル伝達コンジュゲートに生物学的試料を接触させる工程；(d)第一の酵素を不活性化し、二つの一次抗体が同じ二次抗体と反応性である場合には、一次抗体を変性及び/又は溶出させる工程；(e)第二の検出プローブに生物学的試料を接触させる工程であって、第二の検出プローブが少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的である工程；(f)第二の検出用プローブに特異的に結合する第二の標識用コンジュゲートに生物学的試料を接触させる工程であって、第二の標識用コンジュゲートが第二の酵素を含む工程；(g)第二の潜在的反応性部分と第二の検出可能部分とを含む第二のシグナル伝達コンジュゲートに生物学的試料を接触させる工程；(h)第一及び第二の検出可能部分からのシグナルを検出

40

50

する工程であって、第一及び第二の検出可能部分の各々がそれぞれ異なる工程を含み、PD-L1陽性免疫細胞がPD-L1と少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する、方法である。幾つかの実施態様では、第一の検出プローブは抗PD-L1抗体であり；第二の検出プローブは抗CD45LCA抗体である。幾つかの実施態様では、第一の検出可能部分は、ジアミノベンジジン又はDISCOVERYパープルの一方であり；第二の検出可能部分は、ジアミノベンジジン又はDISCOVERYパープルの他方である。幾つかの実施態様では、本方法は、第二の酵素を不活性化する工程、PD-L1以外の腫瘍マーカーに特異的な第三の検出プローブに生物学的試料を接触させる工程、第三の検出プローブに特異的に結合する第三の標識用コンジュゲートに試料を接触させる工程であって、第三の標識用コンジュゲートが第三の酵素を含む工程；及び第三の潜在的反応性部分と第三の検出可能部分とを含む第三のシグナル伝達コンジュゲートに生物学的試料を接触させる工程であって、第三の検出可能部分が第一又は第二の検出可能部分の何れかとは異なる工程を更に含む。

【0023】

本開示の別の態様は、PD-L1陽性腫瘍細胞、PD-L1陰性腫瘍細胞、PD-L1陽性免疫細胞、及び/又はPD-L1陰性免疫細胞を同定する方法であって、(a)第一の検出プローブに生物学的試料を接触させる工程であって、第一の検出プローブが、PD-L1又は免疫細胞マーカーの一方に特異的な第一の一次抗体を含む工程；(b)第一の酵素を含む第一の検出試薬に生物学的試料を接触させる工程；(c)第一の酵素を不活性化する工程；(d)第二の検出プローブに生物学的試料を接触させる工程であって、第二の検出プローブがPD-L1又は免疫細胞マーカーの別のものに特異的な抗体の別のものから選択される第二の一次抗体を含む工程；(e)第二の酵素を含む第二の検出試薬に生物学的試料を接触させる工程；(f)第一及び第二の検出試薬からのシグナルを検出する工程であって、第一及び第二の検出試薬の各々が異なる検出可能部分を含む工程を含み、PD-L1陽性免疫細胞がPD-L1と免疫細胞マーカーとを共発現する、方法である。幾つかの実施態様では、第二の検出プローブはリンパ球に特異的である。幾つかの実施態様では、第一の検出プローブは抗PD-L1抗体であり；第二の検出プローブは抗CD45LCA抗体である。幾つかの実施態様では、第一の検出可能部分は、ジアミノベンジジン又はDISCOVERYパープルの一方であり；第二の検出可能部分は、ジアミノベンジジン又はDISCOVERYパープルの他方である。幾つかの実施態様では、本方法は、第二の酵素を不活性化し、PD-L1以外の腫瘍マーカーに特異的な第三の検出プローブに生物学的試料を接触させ、第三の検出試薬に試料を接触させることを更に含む。

【0024】

本出願人は、PD-L1に特異的な第一の検出プローブと免疫細胞マーカーに特異的な少なくとも第二の検出プローブとで組織試料を共染色するための多重アッセイ及び方法を開発した。従来技術の方法と比較して、本出願人が開発した多重アッセイ及び方法は、浸潤PD-L1陽性腫瘍組織のようなPD-L1陽性免疫細胞の改善された同定と、PD-L1陽性腫瘍細胞からのPD-L1陽性免疫細胞の区別とを可能にする。また、従来技術の方法と比較して、本出願人は、ここで開示された方法が優れており、より高いスループットでPD-L1陽性免疫細胞の同定を精確に可能にすることを立証した。更に、ここに開示された方法は、従来技術の方法と比較して、より迅速で、より精確であり、PD-L1陽性細胞免疫細胞とPD-L1陽性腫瘍細胞との間の微妙な形態学的相違の認識に依存しない。実際、ここに開示された方法は、異なったPD-L1陽性細胞型の読み取り及び識別に関連した主観性の幾らかを除去し、改善されたスコア化及び臨床診断を可能にすると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

次の図面を参照して、非限定的で非網羅的な実施態様を説明する。

【図1A】図1A、1B及び1Cは、組織検体の例を提供し、PD-L1陽性腫瘍細胞がDABSYL（図1A及び1Bでは黄色、図1Cでは「a」で示す）で染色され、腫瘍浸

潤リンパ球がDISCOVERYパープル（図1A及び1Bではフクシア色（鮮やかな赤紫色）、図1Cでは「b」で示す）で染色され、PD-L1を共発現するリンパ球が、図1A及び1Bではオレンジ色／赤色に見え、図1Cでは「c」で示される。

【図1B】上記

【図1C】上記

【図2A】図2A、2B及び2Cは、組織検体の例を提供し、PD-L1陽性腫瘍細胞がCy5（図2A及び2Bではシアン／ブルー；図2Cでは「a」で示す）で染色され、腫瘍浸潤リンパ球がDISCOVERYパープル（図2A及び2Bではフクシア色、図2Cでは「b」で示す）で染色され、PD-L1を共発現するリンパ球が、図2A及び2Bでは暗紫色／ネービー色に見え、図2Cでは「c」で示される。

10

【図2B】上記

【図2C】上記

【図3A】図3A、3B及び3Cは、組織検体の例を提供し、PD-L1陽性腫瘍細胞がローダミン（図3A及び3Bではピンク；図3Cでは「a」で示す）で染色され、腫瘍浸潤リンパ球がDISCOVERYパープル（図3A及び3Bではフクシア色、図3Cでは「b」で示す）で染色され、PD-L1を共発現するリンパ球が、図3A及び3Bでは赤色／ネービー色に見え、図3Cでは「c」で示される。

【図3B】上記

【図3C】上記

【図4A】図4A、4B及び4Cは、組織検体の例を提供し、PD-L1陽性腫瘍細胞がDAB（図4A及び4Bでは褐色、図4Cでは「a」で示す）で染色され、腫瘍浸潤リンパ球がDISCOVERYパープル（図4A及び4Bではフクシア色、図4Cでは「b」で示す）で染色され、PD-L1を共発現するリンパ球が、図4A及び4Bでは紫色及び褐色の斑点状であり、図4Cでは「c」で示される。

20

【図4B】上記

【図4C】上記

【図5A】図5A及び5Bは、幾つかの色素原の吸収スペクトルを示すグラフを提供する。

【図5B】上記

【図6】本開示の非限定的な実施態様に係る多重アッセイを実施するための方法を例証するフローチャートである。

30

【図7】本開示の非限定的な実施態様に係る多重アッセイを実施するための方法を例証するフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0026】

一般に、本開示は、組織試料中のPD-L1陽性免疫細胞及びPD-L1陽性腫瘍細胞を同定するための、自動化方法を含む多重アッセイ、キット及び方法に関する。幾つかの実施態様では、ここに記載の多重アッセイ、キット、及び方法は、医療従事者がPD-L1陽性腫瘍細胞、PD-L1陽性免疫細胞、及びPD-L1陰性免疫細胞を区別することを可能にする。幾つかの実施態様では、ここに記載の多重アッセイ、キット及び方法は、例えばPD-L1陽性腫瘍組織試料内での腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞の存在及び／又は量を検出することによって、患者がPD-L1を標的とする治療法での治療から恩恵を受けうるかどうかを医療従事者が評価することを可能にする。幾つかの実施態様では、多重アッセイ、キット、及び方法は、当業者が（i）リンパ球免疫応答、及び（ii）腫瘍及び浸潤免疫細胞のPD-L1発現状態を明確に同定することを可能にする。これら実施態様及び他の実施態様がここに更に十分に記載される。

40

【0027】

ここで使用される場合、「a」、「an」及び「the」という単数形の用語は、文脈が明らかに他の定義を示すものでない限り、複数の指示対象を含む。同様に、「or」という単語は、文脈が明らかに他の定義を示すものでない限り、「and」を含むことが意図される。

50

【 0 0 2 8 】

「含む (comprising)」、「含む (including)」、「有する (having)」等の用語は交換可能に使用され、同じ意味を有する。同様に、「含む (comprises)」、「含む (includes)」、「有する (has)」等は交換可能に使用され、同じ意味を有する。詳細には、前記用語の各々は、「含む (comprising)」の共通の米国特許法の定義と一致するように定義され、従って、「少なくとも次のもの」を意味するオープンな用語であると解釈され、また更なる特徴、限定、態様等々を排除するものではないと解釈される。従って、例えば、「コンポーネント a、b、及び c を有する装置」は、装置が少なくともコンポーネント a、b 及び c を含むことを意味する。同様に、「工程 a、b、及び c を含む方法」という語句は、方法が少なくとも工程 a、b、及び c を含むことを意味する。更に、工程及びプロセスは、ここでは特定の順序で概説されうるが、当業者は、順序付け工程及びプロセスが変わりうることを認識するであろう。

10

【 0 0 2 9 】

ここで使用される場合、「抗体」という用語は、例を挙げると、限定しないが、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G 及び Ig M、それらの組み合わせ、及び任意の脊椎動物（例えば、ヒト、ヤギ、ウサギ及びマウスなどの哺乳類）において免疫応答中に産生される同様の分子、並びに抗体断片（例えば、当該分野で知られている F (a b ') 2 断片、F a b ' 断片、F a b ' - S H 断片及び F a b 断片）、他の分子への結合を実質的に排除するまで対象の分子（又は対象の非常に類似した分子の群）に特異的に結合する組換え抗体断片（例えば s F v 断片、d s F v 断片、二重特異性 s F v 断片、二重特異性 d s F v 断片、F (a b) ' 2 断片、一本鎖 F v タンパク質（「s c F v」）、ジスルフィド安定化 F v タンパク質（「d s F v」）、ダイアボディ、及びトリアボディ（当該技術分野で知られている）、及びラクダ科抗体）を含む、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様分子を意味する。抗体は抗原のエピトープを特異的に認識して結合する少なくとも軽鎖又は重鎖の免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンドを更に意味する。抗体は、可変重鎖（V H）領域及び可変軽鎖（V L）領域と呼ばれる可変領域をそれぞれが有する、重鎖と軽鎖から構成されうる。併せて、V H 領域と V L 領域は、抗体によって認識される抗原の結合に関与する。抗体という用語はまたインタクトな免疫グロブリンと、当該技術分野でよく知られているそれらの変異体及び部分を含む。

20

【 0 0 3 0 】

「抗原」とは、抗体分子又は T 細胞受容体のような特異的な体液性又は細胞性免疫の産物が特異的に結合しうる化合物、組成物、又は物質を意味する。抗原は、例えば、ハプテン、単純な中間代謝物、糖（例えばオリゴ糖）、脂質、及びホルモン、並びに高分子、例えば複雑な炭水化物（例えば、多糖類）、リン脂質、核酸及びタンパク質を含む任意のタイプの分子でありうる。

30

【 0 0 3 1 】

「ハプテン」は、抗体と特異的に結合することができるが、典型的には、担体分子との組み合わせ以外では免疫原性を実質的に有さない小分子である。幾つかの実施態様では、ハプテンには、限定されないが、ピラゾール（例えば、ニトロピラゾール）；ニトロフェニル化合物；ベンゾフラザン；トリテルペン；尿素（例えば、フェニル尿素）；チオ尿素（例えば、フェニルチオ尿素）；ロテノンとロテノン誘導体；オキサゾール（例えば、オキサゾールスルホンアミド）；チアゾール（例えば、チアゾールスルホンアミド）；クマリンとクマリン誘導体；及びシクロリグナンが含まれる。ハプテンの更なる非限定的な例には、チアゾール；ニトロアリール；ベンゾフラン；トリテルペン；及びシクロリグナンが含まれる。ハプテンの特定の例には、ジ - ニトロフェニル、ビオチン、ジゴキシゲニン、及びフルオレセイン、並びにそれらの任意の誘導体又はアナログが含まれる。他のハプテンは、その開示の全体が出典明示によりここに援用される米国特許第 8 8 4 6 3 2 0 号；第 8 6 1 8 2 6 5 号；第 7 6 9 5 9 2 9 号；第 8 4 8 1 2 7 0 号；及び第 9 0 1 7 9 5 4 号に記載されている。ハプテン自体は、直接的な検出に適している場合があり、すなわち、ハプテンは検出のための適切なシグナルを発しうる。

40

50

【 0 0 3 2 】

ここで使用される場合、「試料」及び「生物学的試料」という用語は、バイオマーカーを含んでいるか、又は含むと推定される任意の組成物を意味するものである。本用語は、細胞、組織、又は血液の精製され又は分離された成分、例えばDNA、RNA、タンパク質、無細胞部分、又は細胞可溶化物を含む。試料は、例えば腫瘍又は転移性病变由来の、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）細胞試料でありうる。試料はまた凍結又は新鮮組織、又は液体試料、例えば血液又は血液成分（血漿又は血清）、尿、精液、唾液、痰、粘液、精液、涙液、リンパ液、脳脊髄液、スワブ洗浄材料等々由来でありうる。試料はまた細胞株を含む個体から得られた細胞のインビトロ培養物の構成物及び成分を含みうる。試料は、例えば細胞可溶化物又は赤血球が枯渇した血液など、個体から直接得られた試料から部分的に処理することもできる。

10

【 0 0 3 3 】

ここで使用される場合、「細胞試料」という用語は、病理学的、組織学的、又は細胞学的解釈のために採取された細胞培養物、体液試料又は外科検体のような、インタクトな細胞を含む任意の試料を意味する。

【 0 0 3 4 】

ここで使用される場合、「組織試料」という用語は、試料が得られた被験体内に存在する細胞間の断面の空間的關係を保存する細胞試料を意味するものとする。「組織試料」は、一次組織試料（すなわち、被験体によって産生された細胞及び組織）及び異種移植片（すなわち、被験体に移植される外来細胞試料）の双方を包含するものとする。

20

【 0 0 3 5 】

ここで使用される場合、「細胞学的試料」という用語は、細胞試料が得られた被験体において存在していた細胞の空間的關係を試料がもはや反映しないように、試料の細胞が部分的に又は完全に脱凝集させられている細胞試料を意味する。細胞学的試料の例には、組織擦過物（例えば、頸部擦過物）、細針吸引物、被験体の洗浄によって得られる試料等々が含まれる。

【 0 0 3 6 】

ここで使用される場合、「組織化学的検出」とは、組織試料の構造間の断面關係の観点でバイオマーカー又は他の構造の顕微鏡検出を可能にするように検出試薬を用いて組織試料中のバイオマーカー又は他の構造を標識することを含むプロセスを意味する。例には、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の免疫組織化学的検査（IHC）、発色インサイツハイブリダイゼーション（CISH）、蛍光インサイツハイブリダイゼーション（FISH）、銀インサイツハイブリダイゼーション（SISH）、及びヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色が含まれる。

30

【 0 0 3 7 】

ここで使用される場合、「細胞化学的検出」とは、細胞学的試料の細胞の観点でバイオマーカー又は他の構造の顕微鏡検出を可能にするように検出試薬を用いて細胞学的試料中のバイオマーカー又は他の構造を標識することを含むプロセスを意味する。

【 0 0 3 8 】

ここで使用される場合、「切片」という用語は、典型的にはミクロトームを使用して切断された、顕微鏡分析に適した組織試料の薄片を意味するものとする。

40

【 0 0 3 9 】

ここで使用される場合、「連続切片」という用語は、組織試料から連続的に切断された一連の切片の何れか一つを意味するものとする。二つの切片が互いに「連続切片」と考えられるためには、必ずしも組織からの連続した切片を必要とするわけではないが、組織学的染色後に構造が互いに一致しうるように、同じ断面關係で同じ組織構造を一般に含むべきである。

【 0 0 4 0 】

ここで使用される場合、「特異的結合」、「特異的に結合する」又は「に特異的な」という語句は、標的とバイオマーカー特異的薬剤との間の結合などの測定可能で再現性のあ

50

る相互作用を意味し、生物学的分子を含む分子の異種集団の存在下での標的の存在を決定するものである。例えば、標的に特異的に結合する結合体は、より高い親和性、結合活性で、より容易に、及び／又はそれが他の標的に結合するよりも長い持続時間でこの標的に結合する抗体である。一実施態様では、結合体の非関連標的への結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ (RIA) によって測定して、抗体の標的への結合の約 10 % 未満である。所定の実施態様では、標的に特異的に結合する結合体は、 $1 \mu\text{M}$ 、 100 nM 、 10 nM 、 1 nM 、又は 0.1 nM の解離定数 (K_d) を有する。別の実施態様では、特異的結合は排他的結合を含みうるが、それを必要とはしない。

【0041】

ここで使用される場合、「検出プローブ」は、試料中の構造の検出を可能にする形で、試料内の特定の構造に結合する任意の化合物又は組成物を意味するものとする。例としては、

- ・特定のヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ；
- ・適切な増幅試薬と対になったときに特定のヌクレオチド配列又は配列セットを増幅することができる核酸プライマーセット；
- ・抗体及びその抗原結合断片；及び

・ADNECTIN (第10のFN3フィブロネクチンに基づくスカフォールド；Bristol-Myers-Squibb Co.)、AFFIBODY (スタフィロコッカス・アウレウス由来のプロテインAのZドメインに基づくスカフォールド；Affibody AB, Solna, Sweden)、AVIMER (ドメインA/LDL受容体に基づくスカフォールド；Amgen, Thousand Oaks, CA)、dAb (VH又はVL抗体ドメインに基づくスカフォールド；GlaxoSmithKline PLC, Cambridge, UK)、DARPin (Ankyrinリピートタンパク質に基づくスカフォールド；Molecular Partners AG, Zurich, CH)、ANTICALIN (リボカリンに基づくスカフォールド；Pieris AG, Freising, DE)、NANOBODY (VHH (ラクダ科Ig) に基づくスカフォールド；Abllynx N/V, Ghent, BE)、TRANS-BODY (トランスフェリンに基づくスカフォールド；Pfizer Inc., New York, NY)、SMIP (Emergent Biosolutions, Inc., Rockville, MD)、及びTETRANECTIN (C型レクチンドメイン (CTL D) に基づくスカフォールド、テトラネクチン；Boreas Pharma A/S, Aarhus, DK) を含む、操作された特異的結合構造 (このような操作された特異的結合構造の説明は、その内容が出典明示により援用されるWurch等, Development of Novel Protein Scaffolds as Alternatives to Whole Antibodies for Imaging and Therapy: Status on Discovery Research and Clinical Validation, Current Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 9, pp. 502-509 (2008) に概説されている) が含まれる。

【0042】

検出プローブは、放射性同位元素、酵素、酵素基質、補因子、リガンド、化学発光又は蛍光剤、ハプテン (限定されないがDNPを含む)、及び酵素などの直接検出用の標識を含みうる。あるいは、検出プローブは、標識又はタグを含んでいなくてもよく、間接的に (例えば、検出プローブを標識又はタグと特異的に関連付ける二次抗体又は他の分子を用いて) 検出されてもよい。

【0043】

「多重 (マルチプレックス)」、「多重化 (マルチプレクスト)」又は「多重化 (マルチプレキシング)」は、試料中の複数の標的を同時発生的に、実質的に同時に、又は順次検出することを意味する。多重化は、個々に、また任意かつ全ての組み合わせで、複数の異なる核酸 (例えば、DNA、RNA、mRNA、miRNA) 及びポリペプチド (例えば、タンパク質) を同定及び／又は定量することを含みうる。

【0044】

「一次検出プローブ」又は「一次抗体」という用語は、組織試料中の標的タンパク質抗原に特異的に結合する検出プローブ又は抗体を意味する。一次検出プローブは、一般に、組織化学的手順で使用される第一の検出である。

【0045】

ここでの「二次検出プローブ」又は「二次抗体」という用語は、検出プローブ又はその一部（例えば、ハプテン又は一次抗体）に特異的に結合し、それにより検出プローブと、もしあればその後の試薬（例えば標識、酵素等々）との間に架橋を形成する抗体を意味する。二次抗体は検出プローブを間接的に検出するために使用することができる。

【0046】

「PD-L1腫瘍細胞」は、PD-L1を発現又は過剰発現する、転移性細胞を含む腫瘍細胞を意味する。

10

【0047】

「標的」とは、存在、位置及び/又は濃度が決定されるか又は決定されうる任意の分子を意味する。標的の例には、ここに開示されるような核酸配列及びタンパク質が含まれ、特にPD-L1及び免疫細胞マーカー（表面抗原分類（「CD」）マーカー）が含まれる。

【0048】

腫瘍浸潤リンパ球（「TIL」）は、腫瘍に見出される一種の免疫細胞であり、腫瘍細胞の「死滅」に關与する。

【0049】

20

[一次検出プローブ]

本開示の多重アッセイ、キット及び方法は、少なくとも二つの検出プローブ、すなわち少なくとも(i)PD-L1陽性腫瘍細胞及び(ii)免疫細胞の検出を可能にする検出プローブを含む。もちろん、当業者であれば、更なる検出プローブを、他の腫瘍マーカーを含む他の標的の検出を達成するために最後の二つの検出プローブと組み合わせることができることを認識するであろう。ここでの所定の実施態様は、IHCにおける使用のための検出プローブとしての一次抗体を指すが、組織化学アッセイでの使用のための他のタンパク質特異的検出プローブ及びインサイトハイブリダイゼーションアッセイでの使用のための核酸プローブもまた等しく利用されうる。

【0050】

30

幾つかの実施態様では、利用される検出プローブは一次抗体、すなわちPD-L1陽性腫瘍細胞及び免疫細胞の検出を可能にする一次抗体である。幾つかの実施態様では、検出プローブは、PD-L1に特異的な一次抗体（例えば、抗PD-L1抗体）を含む。一実施態様では、PD-L1抗体は、配列番号：1を含むポリペプチドに対して免疫特異的である。他の実施態様では、検出プローブは、少なくともPD-L1を発現する腫瘍細胞に特異的な一次抗体である。更に他の実施態様では、検出プローブは、PD-L1に特異的な一次抗体である。抗PD-L1抗体は、例えば、Ventana Medical Systems, AZ, Tucsonから入手可能であり、SP142（ウサギモノクローナルIHC抗体）及びSP263（ウサギモノクローナルIHC抗体）を含む。他の抗PD-L1抗体は、Dako North America (Carpinteria, CA)から入手可能であり、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx及びPD-L1 IHC 28-8 pharmDxを含む。SP142は米国特許出願公開第20160009805A1号に詳細に記載されており、SP263は米国特許出願公開第20150346208A1号に詳細に記載されており、その各々の内容はその全体が出典明示により援用される。SP142及びSP263は、次の重鎖及び軽鎖配列を含む：

40

表1

	重鎖免疫グロブリン 可変ドメイン配列	LC 免疫グロブリン 可変ドメイン配列 (カッパ)
SP142	QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS SNGLTWVRQAPGEGLEWIGTINKDASA YYASWAKGRLTISKPSSTKVLDKITSPT TEDTATYFCGRIAFKTGTISIWGPGLTV VSS (配列番号: 2)	AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINCQAS ESVYSNNYLSWFQQKPGQPPKLLIYL ASTLASGVPSRFKGSSTGTQFTLTISG VQCDDAATYYCIGGKSSSTDGNAFG GGTEVVVR (配列番号: 3)
SP263	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSL SNHAISWVRQAPGKGLEWIGTINS DTH TYYATWPKGRFTISKTSSTTVDLKMTS PTTEDTATYFCARRIFSSSNIWGPGLTV TVSS (配列番号: 4)	AIVMTQTSSPVSAVVGGTVAINCQAS QSIYNNNWLSWFQQKPGQPPKLLIYL ASTLASGVPSRFKGSSTGTQFTLTISD VVCDDAATYYCIGGESSNNDGIAFGG GTEVVVK (配列番号: 5)

10

【 0 0 5 1 】

幾つかの実施態様では、利用される検出プローブは、免疫細胞マーカーに特異的である。幾つかの実施態様では、検出プローブは、Tリンパ球及びBリンパ球を含むリンパ球のマーカーに特異的な一次抗体から選択される。他の実施態様では、検出プローブは、白血球、ヘルパーT細胞、制御性T細胞、及び/又は細胞傷害性T細胞のマーカーに特異的な一次抗体から選択される。更に他の実施態様では、検出プローブは、広域スペクトルリンパ球二次バイオマーカーに特異的な一次抗体から選択される。

20

【 0 0 5 2 】

幾つかの実施態様では、検出プローブは、限定されないが、CD45、CD45LCA（ここで「LCA」は白血球共通抗原を指す）、CD3、CD4、CD8、CD20、CD25、CD19及びCD163（例えば、抗CD抗体）を含む、所定の受容体及び/又はリガンドに特異的な一次抗体から選択される。他の実施態様では、検出プローブは、CD45LCAに特異的な一次抗体である。幾つかの実施態様では、検出プローブは、例えばVentana Medical Systems, Tucson, AZから入手可能であり、CONFIRM抗CD45, LCA(RP2/18)とのブランド名で入手可能な抗CD45LCA一次抗体（白血球の膜上に位置する抗原に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体（IgG1））である。

30

【 0 0 5 3 】

[検出試薬]

検出試薬は、組織試料に結合したときに検出試薬に近接して検出可能部分の沈着をもたらすように選択される。「検出可能部分」は、試料中の標的の存在（すなわち、定性分析）及び/又は濃度（すなわち、定量分析）を示す検出可能（例えば、視覚的、電子的又はその他）なシグナルをつくり出すことができる分子又は材料である。検出可能シグナルは、（ラジオ周波数、マイクロ波周波数、赤外線周波数、可視周波数及び紫外周波数光子を含む）光子の吸収、放出及び/又は散乱を含む、何らかの既知又は未発見のメカニズムによって生成されうる。幾つかの実施態様では、検出可能部分は、発色性、蛍光性、燐光性及び発光性分子及び物質、（例えば、無色物質を着色物質に変換するか、又は沈殿を生成するかもしれない試料の濁度を増加させることによって）ある物質を別の物質に変換して検出可能な差異をもたらす触媒（酵素など）を含む。幾つかの例では、検出可能部分は、クマリン、フルオレセイン（又はフルオレセイン誘導体及びアナログ）、ローダミン、レゾルフィン、発光団及びシアニンを含む幾つかの一般的な化学クラスに属するフルオロフォアである。蛍光分子の更なる例は、Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR, ThermoFisher Scientific, 11版に見出すことができる。他の実施態様では、検出可能部分は、明視野顕

40

50

微鏡によって検出可能である。特定の実施態様では、検出可能部分は、ジアミノベンジジン(DAB)、4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド(DABSYL)、テトラメチルローダミン(DISCOVERYパープル)、N,N'-ビスカルボキシペンチル-5,5'-ジスルホナト-インド-ジカルボシアニン(Cy5)、及びローダミン110(ローダミン)からなる群から選択される色素を含む。

【0054】

幾つかの実施態様では、検出可能部分は、検出プローブに直接コンジュゲートされ、よって、その標的への検出プローブの結合の際に試料上に沈着する。他の場合では、検出可能部分の沈着は、酵素反応によってなされる。幾つかの実施態様では、適切な酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ又は β -ラクタマーゼが挙げられるが、これらに限定されない。他の実施態様では、酵素は、オキシドレダクターゼ、ヒドロラーゼ、又はペルオキシダーゼ(例えば、HRP又はAP)を含む。酵素は、検出プローブに直接コンジュゲートされてもよく、又は標識用コンジュゲートによって検出プローブと間接的に関連付けられてもよい。ここで使用される場合、「標識用コンジュゲート」は、(a)一次特異的結合体又は一次抗体に結合又は関連した別の実体(例えば、一次抗体に結合した二次抗体又は一次抗体に結合したハプテン等)に特異的な特異的結合体；及び(b)特異的結合体に関連した酵素で、その場での色素の生成及び/又は組織試料上への色素の沈着をもたらす適切な反応条件下で発色基質、シグナル伝達コンジュゲート、又は酵素反応性色素と反応性である酵素を含む。

10

20

【0055】

場合によっては、酵素は発色性化合物/基質と反応する。発色性化合物/基質の特定の非限定的な例には、4-ニトロフェニルホスフェート(pNPP)、ファストレッド、リン酸プロモクロロインドリル(BCIP)、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)、BCIP/NBT、ファストレッド、APオレンジ、APブルー、テトラメチルベンジジン(TMB)、2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート](ABTS)、o-ジアニシジン、4-クロロナフトール(4-CN)、ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド(ONPG)、o-フェニレンジアミン(OPD)、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド(X-Gal)、メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド(MU-Gal)、p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド(PNP)、5-ブromo-4-クロロ-インドリル- β -D-グルクロニド(X-Glu)、3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム(INT)、テトラゾリウムブルー、又はテトラゾリウムバイオレットが含まれる。

30

【0056】

幾つかの実施態様では、酵素は、金属学的検出スキームで使用されうる。金属組織学的検出法には、酵素の水溶性金属イオン及び酸化還元不活性基質と組み合わせたアルカリホスファターゼなどの酵素の使用が含まれる。幾つかの実施態様では、基質は酵素によって酸化還元活性剤に変換され、酸化還元活性剤は金属イオンを還元して、検出可能な沈殿物を形成させる。(例えば、2004年12月20日に出願された米国特許出願第11/015646号、PCT公開第2005/003777号及び米国特許出願公開第2004/0265922号を参照のこと；これらの各々は、出典明示によりその全体がここに援用される)。金属組織学的検出法には、水溶性金属イオン、酸化剤及び還元剤と共にオキシド-レダクターゼ酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼなど)を使用して検出可能な沈殿物を形成することが含まれる。(例えば、出典明示によりその全体がここに援用される米国特許第6670113号を参照のこと)。

40

【0057】

幾つかの実施態様では、酵素作用は酵素と色素自体との間で起こり、反応は色素を非結合種から試料上に沈着した種に変換する。例えば、DABとペルオキシダーゼ(西洋ワサビペルオキシダーゼなど)との反応は、DABを酸化させて沈殿させる。

50

【 0 0 5 8 】

更に他の実施態様では、色素は、酵素と反応して試料又は他の検出成分に結合することができる反応種を形成するように構成された潜在反応性部分を含むシグナル伝達コンジュゲートを介して沈着される。これらの反応種は、それらの生成の近くで、すなわち酵素の近くで試料と反応することができるが、酵素が沈着する部位から遠位の部位にシグナル伝達コンジュゲートが沈着しないように、非反応性種に速やかに転換する。潜在的反応性部分の例には、その各々の全体が出典明示によりここに援用される、国際公開第 2 0 1 5 1 2 4 7 0 3 A 1 号に記載されているもののようなキノンメチド (Q M) アナログ、及び国際公開第 2 0 1 2 0 0 3 4 7 6 A 2 号に記載されているもののようなチラミドコンジュゲートが含まれる。幾つかの例では、シグナル伝達コンジュゲートは、N , N ' - ビスカルボキシペンチル - 5 , 5 ' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (C y 5)、4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4 ' - スルホンアミド (D A B S Y L)、テトラメチルローダミン (D I S C O パープル)、及びローダミン 1 1 0 (ローダミン) のような色素に直接コンジュゲートした潜在的反応性部分を含む。他の例では、潜在的反応性部分は、特異的結合対の一方のメンバーに結合し、色素は特異的結合対の他方のメンバーに結合する。他の例では、潜在的反応性部分は特異的結合対の一方のメンバーに結合し、酵素は特異的結合対の他のメンバーに結合し、ここで、酵素は (a) 発色基質と反応して色素の生成をなすか、又は (b) 色素と反応して色素 (D A B など) の沈着をもたらす。特異的結合対の例には、

10

20

(1) 潜在的反応性部分に結合したビオチン又はビオチン誘導体 (例えばデスチオビオチン) と、色素又は発色基質と反応性であるかもしくは色素と反応性である酵素 (例えば、色素が D A B である場合、ビオチン結合タンパク質に結合したペルオキシダーゼ) に結合したビオチン結合体 (例えば、アビジン、ストレプトアビジン、脱グリコシル化されたアビジン (例えば、ニュートラアビジン)、そのビオチン結合部位にニトロ化チロシンを有するビオチン結合性タンパク質 (例えば、C A P T A V I D I N)) ; 及び

(2) 潜在的反応性部分に結合したハプテンと、色素又は発色基質と反応性であるかもしくは色素と反応性である酵素 (例えば、色素が D A B である場合、ビオチン結合タンパク質に結合したペルオキシダーゼ) に結合した抗ハプテン抗体が含まれる。

30

【 0 0 5 9 】

幾つかの実施態様では、多重アッセイ、キット、及び方法において利用される検出試薬は、色素と組織試料上への色素の沈着に有用な試薬とを含む。而して、幾つかの実施態様では、検出試薬は標識用コンジュゲートを含み、発色基質、シグナル伝達コンジュゲート、又は酵素反応性色素の一つを更に含む。他の実施態様では、検出試薬は標識用コンジュゲートを含み、発色基質、シグナル伝達コンジュゲート、又は酵素反応性色素の一つを更に含む。

【 0 0 6 0 】

一次検出プローブと検出試薬の特定の構成には、表 2 に示すものが含まれる。当業者には理解されるように、一次抗体の各々の検出は同じであってもよく、又は異なってもよい。

40

表2

A. 検出可能部分に直接結合した一次検出プローブ	
1° 検出プローブ-色素	
B. 検出可能部分と反応する酵素に結合した一次検出プローブ	
1° 検出プローブ-酵素 + DAB	
1° 検出プローブ-酵素 + 色素原	
C. シグナル伝達部分と反応する酵素に結合した一次検出プローブ	
C1. シグナル伝達部分が検出可能部分を含む	1° 検出プローブ-酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-色素
C2. シグナル伝達部分が、検出可能部分と直接反応する酵素を含む	1° 検出プローブ-酵素 + QM-酵素 + DAB 1° 検出プローブ-酵素 + QM-酵素 + 色素原 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-酵素 + DAB 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-酵素 + 色素原
C3. シグナル伝達部分が、検出可能部分を含む第二シグナル伝達部分と反応する酵素を含む	1° 検出プローブ-酵素 + QM-酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ-酵素 + QM-酵素 + チラミド-色素 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-酵素 + チラミド-色素
C4. シグナル伝達部分が特異的結合対のメンバーを含み、結合対の他のメンバーが検出可能部分に結合する	1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) 1° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ)
C5. シグナル伝達部分が特異的結合対のメンバーを含み、結合対の他のメンバーが検出可能部分と反応性の酵素に結合する	1° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原

10

20

30

40

C6. シグナル伝達部分が特異的結合対のメンバーを含み、結合対の他のメンバーが、検出可能部分に結合した第二シグナル伝達部分と反応性の酵素に結合する	1° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素 1° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素 1° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素	10
D. 特異的結合対のメンバーに結合した一次		
D1. 特異的結合対の他のメンバーに結合した色素	1° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ)	20
D2. 特異的結合対の他のメンバーに結合した酵素で、検出可能部分と反応性の酵素	1° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原 1° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素 1° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素	30
E. 検出可能部分に直接結合した二次検出プローブ 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-色素		
F. 検出可能部分と反応する酵素と結合した二次検出プローブ 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + 色素原		
G. シグナル伝達部分と反応する酵素に結合した二次検出プローブ		
G1. シグナル伝達部分が検出可能部分を含む	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-色素	40

G2. シグナル伝達部分が、検出可能部分と直接反応する酵素を含む	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-酵素 + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-酵素 + 色素原 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-酵素 + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-酵素 + 色素原
G3. シグナル伝達部分が、検出可能部分を含む第二シグナル伝達部分と反応する酵素を含む	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-酵素 + チラミド-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-酵素 + チラミド-色素
G4. シグナル伝達部分が特異的結合対のメンバーを含み、結合対の他のメンバーが検出可能部分に結合する	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ)
G5. シグナル伝達部分が特異的結合対のメンバーを含み、結合対の他のメンバーが、検出可能部分と反応性の酵素と結合する	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原

10

20

30

40

G6. シグナル伝達部分が特異的結合対のメンバーを含み、結合対の他のメンバーが、検出可能部分に結合した第二シグナル伝達部分と反応性の酵素に結合する	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素	10
H. 特異的結合対のメンバーに結合した二次検出プローブ		
H1. 特異的結合対の他のメンバーに結合した色素	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ)	20
H2. 特異的結合対の他のメンバーに結合した酵素であって、検出可能部分と反応性の酵素	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素	30
I. 検出可能部分に直接結合した三次検出プローブ 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-色素		
J. 検出可能部分と反応する酵素に結合した三次検出プローブ 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + 色素原		
K. シグナル伝達部分と反応する酵素に結合した三次検出プローブ		

K1. シグナル伝達部分が 検出可能部分を含む	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + チラミド-色素
K2. シグナル伝達部分 が、検出可能部分と直接反 応する酵素を含む	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + QM-酵素 + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + QM-酵素 + 色素原 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + チラミド-酵素 + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + チラミド-酵素 + 色素原
K3. シグナル伝達部分 が、検出可能部分を含む第 二シグナル伝達部分と反応 する酵素を含む	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + QM-酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + QM-酵素 + チラミド-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + チラミド-酵素 + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + チラミド-酵素 + チラミド-色素
K4. シグナル伝達部分が 特異的結合対のメンバーを 含み、結合対の他のメンバー が検出可能部分に結合する	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビ ジン/抗ハプテン 検出プローブ) 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- 酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビジン/ 抗ハプテン 検出プローブ)

10

20

30

K5. シグナル伝達部分が特異的結合対のメンバーを含み、結合対の他のメンバーが、検出可能部分と反応性の酵素に結合する	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原	10
K6. シグナル伝達部分が特異的結合対のメンバーを含み、結合対の他のメンバーが、検出可能部分に結合した第二シグナル伝達部分と反応性の酵素に結合する	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + QM-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-酵素 + チラミド-(ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素	20 30
L. 特異的結合対のメンバーに結合した三次検出プローブ		
L1. 特異的結合対の他のメンバーに結合した色素	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ-(ビオチン/ハプテン) + 色素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ)	

L2. 特異的結合対の他のメンバーに結合した酵素であって、検出可能部分と反応性の酵素	1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- (ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + DAB 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- (ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + 色素原 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- (ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + QM-色素 1° 検出プローブ + 2° 検出プローブ + 3° 検出プローブ- (ビオチン/ハプテン) + 酵素-(アビジン/抗ハプテン 検出プローブ) + チラミド-色素
---	---

10

特定の実施態様では、表 2 に示す検出プローブは抗体である。

【0061】

本方法での使用に適した検出試薬を含む市販の検出試薬又はキットの非限定的な例には、VENTANA ultraView 検出システム (HRP 及び AP を含む酵素にコンジュゲートした二次抗体) ; VENTANA iVIEW 検出システム (ビオチン化抗種二次抗体及びストレプトアビジンコンジュゲート酵素) ; VENTANA OptiView 検出システム (OptiView) (ハプテンにコンジュゲートした抗種二次抗体及び酵素多量体にコンジュゲートした抗ハプテン三次抗体) ; VENTANA 増幅キット (一次抗体の結合部位に沈着した酵素の数を増大させるために上記 VENTANA 検出システムの何れかと共に使用できる非コンジュゲート二次抗体) ; VENTANA OptiView 増幅システム (ハプテンにコンジュゲートした抗種二次抗体、酵素多量体にコンジュゲートした抗ハプテン三次抗体、及び同じハプテンにコンジュゲートしたチラミド。使用時に、二次抗体を試料と接触させて一次抗体へ結合させる。ついで、試料を抗ハプテン抗体と共にインキュベートして、酵素の二次抗体への会合を生じさせる。ついで、試料をチラミドと共にインキュベートして、更なるハプテン分子の沈着を生じさせる。ついで、試料を再び抗ハプテン抗体と共にインキュベートして更なる酵素分子の沈着をもたらす。ついで、試料を検出可能部分と共にインキュベートして色素沈着を生じさせる) ; それぞれが Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, Arizona) から入手可能な、VENTANA DISCOVERY、DISCOVERY OmniMap、DISCOVERY UltraMap 抗ハプテン抗体、二次抗体、色素原、フルオロフォア、及び色素キット ; PowerVision 及び PowerVision + IHC 検出システム (抗体に対して高い比率の酵素を有するコンパクトポリマーに HRP 又は AP と共に直接重合された二次抗体) ; 及び DAKO EnVision T^M + システム (二次抗体にコンジュゲートされた酵素標識ポリマー) が含まれる。

20

30

40

【0062】

また更なる実施態様では、検出試薬は、組織検体に導入されたときに検出可能部分が異なる色 (例えば、黄色、青色、フクシア色) を提供するように選択される。幾つかの実施態様では、検出可能部分は、互いの間の良好なコントラスト、すなわち光学的に認識可能であり及び / 又は異なって染色された (例えば褐色と紫色) 標的の検出を (手作業で又は自動化された方法によって) 容易にする助けとなる色の分離をもたらすように選択される。例えば、図 5 は、幾つかの色素原の吸光度スペクトルを示すグラフを提供する。図示されているように、DISCOVERY パープルは、他の色素原の吸光度ピークと比較して、DISCOVERY パープルの狭い吸光度ピークのために、多重アッセイにおいて DA

50

Bと組み合わせて使用される場合、図5に列挙された他の色素原よりも優れていると考えられる。図4Aから4Cに示されるように、そのような色の組み合わせは、良好なコントラストとPD-L1陽性免疫細胞の明確な同定をもたらし、PD-L1陽性免疫細胞をPD-L1陽性腫瘍細胞から区別することを可能にする。

【0063】

他の実施態様では、基質又はシグナル伝達コンジュゲートは、任意の検出可能部分のピークの検出可能な波長が互いに重なり合わず、病理学者又は光検出器（例えば、スキャナ）によって容易に検出可能となるように選択される。幾つかの実施態様では、検出可能部分は、異なる検出可能部分のピーク波長が少なくとも約50nm離れているように選択される。他の実施態様では、検出可能部分は、異なる検出可能部分のピーク波長が少なくとも約70nm離れているように選択される。更に他の実施態様では、検出可能部分は、異なる検出可能部分のピーク波長が少なくとも約100nm離れているように選択される。

10

【0064】

幾つかの実施態様では、任意の多重アッセイにおける基質の適用の順序付けが重要である。例えば、特定の基質は、ある特定の標的を他の特定の標的と比較して検出するために使用される場合、それほど高感度ではない可能性がある。更に、適切な順序付けは、互いに近接したシグナルのマスキングを防止しうると考えられる。幾つかの実施態様では、適用される第一の検出試薬はPD-L1に特異的であり、適用される第二の検出試薬は少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的である。

20

【0065】

[多重検出方法]

幾つかの実施態様では、本開示は、組織試料内の標的（例えば、PD-L1陽性腫瘍細胞及び免疫細胞）の多重検出のための方法を提供する。ここに記載される所定の非限定的な実施態様及び実施例は、明視野顕微鏡法を利用する一次抗体の間接的検出を提供しうが、当業者には、ここで使用される検出プローブが一次抗体に限定されるものではなく、利用される任意の検出プローブが直接的又は間接的に検出され得、検出は、当業者に知られているように、色素原、フルオロフォア、量子ドット等々を用いて容易にすることができることが分かるであろう。

【0066】

従来技術の方法と比較して、本開示の多重アッセイ及び方法は、PD-L1陽性免疫細胞の検出精度の改善とより効率的なワークフローを可能にする。実際、本開示の多重アッセイ及び方法は、組織試料の単一のスライド上で、かつ一次染色（例えば、ヘマトキシリン・エオシン染色（「H&E」））で染色されたスライドとPD-L1バイオマーカーのIHCアッセイで染色されたスライド間で交換する必要なく、PD-L1陽性免疫細胞の同定を可能にする。ここに開示される方法とは対照的に、従来技術の方法は、PD-L1陽性腫瘍細胞及びPD-L1陽性免疫細胞の双方を染色するために単一の検出プローブを利用し、染色された組織試料の分析及びスコア化は、病理学者が一次染色で染色されたスライドとIHCによって染色されたものを交互にすることが必要であった。例えば、従来技術の方法によれば、病理学者は先ずH&E染色スライド中の腫瘍組織を同定し、ついでIHC染色スライドに切り替えてPD-L1陽性腫瘍細胞を同定する。その後、病理学者はH&E染色スライドに戻って、陽性領域内の免疫細胞を同定した後、再びIHC染色スライドに戻って免疫細胞PD-L1陽性を評価する。他方、開示された方法は、2工程のみ、すなわち、一次H&E染色を伴う腫瘍の同定と、続く単一スライド上のPD-L1と少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する陽性染色腫瘍細胞及び免疫細胞の同定を必要とする。本出願人が優れた結果を達成したのは二次バイオマーカーの取り込みによるものである。

30

40

【0067】

幾つかの実施態様では、多重検出の方法は、(i)PD-L1陽性腫瘍細胞、及び(ii)免疫細胞が検出されうるように（例えば、PD-L1陽性である免疫細胞とPD-L1陰性である免疫細胞）、組織試料を少なくとも二つの異なる検出プローブ（例えば、一

50

次抗体)と接触させることを含む。幾つかの実施態様では、組織試料への検出プローブの適用は、PD-L1陽性腫瘍細胞をPD-L1陽性免疫細胞(特に、浸潤PD-L1陽性腫瘍組織であるPD-L1陽性免疫細胞)から区別することを可能にする。他の実施態様では、検出プローブの組織試料への導入は、PD-L1陽性腫瘍細胞、PD-L1陽性免疫細胞、PD-L1陰性腫瘍細胞、及び/又はPD-L1陰性免疫細胞を同定及び/又は定量することを可能にする。他の実施態様では、組織試料への検出プローブ及び検出試薬の適用は、PD-L1陽性腫瘍細胞を第一の色(第一の色素原)で識別し、免疫細胞を第二の色(第二の色素原)で識別し、及びPD-L1陽性免疫細胞を、第一及び第二の色(第一及び第二の色素原)を共発現するとして識別することを可能にする。例えば、図4に示されるように、PD-L1腫瘍細胞は褐色(DAB)で同定され、免疫細胞はフクシア色(DISCOVERYパープル)で同定され、PD-L1陽性である免疫細胞、つまりPD-L1と免疫細胞マーカーとを共発現する免疫細胞は、褐色及びフクシア色の両方を含むか又は共発現する。

10

【0068】

幾つかの実施態様では、本開示の多重アッセイ及び方法は、PD-L1に特異的な検出プローブと少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な少なくとも一つの検出プローブとを導入することを含む。幾つかの実施態様では、少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な少なくとも一つの検出プローブは一次抗体である。少なくとも一つの免疫細胞マーカーを検出するための一次抗体に関して、当業者は、各一次抗体が異なる免疫細胞マーカーに特異的である複数の一次抗体を利用できることを認識するであろう。例えば、抗CD4抗体は、抗CD8抗体と一緒に(同時に又は逐次的に)導入することができ、ここで、抗CD4抗体及び抗CD8抗体の各々は、同じ又は異なる色素原(又は他の検出試薬)を用いて間接的に検出することができる。他の実施態様では、抗CD3抗体、抗CD4抗体、及び抗CD8抗体からなる群から選択される一次抗体と共に、抗CD45LCA抗体を(同時に又は逐次的に)導入することができ、再び、免疫細胞マーカーに特異的な抗体の各々は、同じ又は異なる色素原(又は他の検出試薬)を用いて検出することができる。他の実施態様では、少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な単一の検出プローブのみ(例えば、抗CD45LCA一次抗体)が利用される。

20

【0069】

図6及び7は、本開示の方法の所定の実施態様の工程を描写するフローチャートを提供する。特に、本方法は、工程1において、試料が検出プローブ(例えば、PD-L1に特異的な一次抗体)と接触させられる多重検出スキームを記載する。検出プローブが試料中に導入されると、それが検出プローブ-標的複合体(例えば、一次抗体-標的複合体)を形成する。次の工程2は、試料を検出試薬と接触させることを含む。検出試薬は、図7の工程3a及び3bに示されるように、(i)標識用コンジュゲートと、(ii)発色基質又はシグナル伝達コンジュゲートとを含みうる。更に続く工程4は、試料を酵素阻害組成物と接触させること(又は、検出試薬を含む酵素及び/又は抗体スタックが阻害又は変性される工程)を含む。ダッシュ線は、工程1から4のプロセスが一又は複数回反復されて、組織試料内の複数の異なる標的(例えば、免疫細胞マーカー;他の腫瘍マーカー)の逐次的な多重検出を提供しうることを示している。本方法はまた試料を光で照らす工程5と、工程6で標的を検出することを含む。検出は、手作業でも自動化されてもよく、場合によってはコンピュータシステム及び/又は撮像システムに結びつけることができる。

30

40

【0070】

図6及び7に提供された実施態様の代替態様として、異なる検出プローブのそれぞれを同時に又は逐次的に、また何らかの検出試薬が添加される前に、加えることができる。例えば、第一の検出プローブを加えた後、第二の検出プローブ(そして、アッセイによって必要とされる場合には「n」個の更なる検出プローブ)を導入してもよい。続いて、第一の検出試薬を加えることができ、続いて、第一の検出試薬と共に含まれる任意の酵素及び/又は関連する抗体の変性、阻害、及び/又は溶出が続く。その工程に続いて、提供された「n」個の検出プローブに基づいて、第二の検出試薬と任意の更なる「n」個の指示試

50

薬を添加することができる。その時点で、第一及び第二の検出試薬を同時に検出することができる。

【0071】

本開示による多重アッセイの更なる例として、（例えば、PD-L1又は免疫細胞マーカーの一つに特異的な）第一の標的に特異的な第一の一次抗体を組織試料に導入する。幾つかの実施態様では、第一の一次抗体は、検出可能な第一の標的-抗体コンジュゲート複合体を形成する。同時に又はその後、第二の標識を含む第二の標的（例えば、他のPD-L1又は免疫細胞マーカー）に特異的な第二の一次抗体を試料に導入して、第二の標的-抗体コンジュゲートを形成する。他の標的に特異的な第三、第四及び第nの更なる検出プローブ（「n」個の標的検出プローブ複合体を形成する）を、再び第一及び/又は第二の一次抗体と逐次的に又は同時に、更に導入してもよい。検出プローブは沈着後、もちろんそれらの構成に応じて、直接的又は間接的に検出されうる。幾つかの実施態様では、標的の検出を可能にするために更なる検出試薬が導入され、その更なる検出試薬はここに記載のものを含む。幾つかの実施態様では、第一、第二及び第nの検出試薬の各々が、（i）検出プローブの各々に特異的な二次抗体であって、酵素にコンジュゲートされている二次抗体と；（ii）発色基質であって；第一、第二及び第nの発色基質の各々が異なるものを含む、第一、第二及び第nの検出試薬が導入される。

10

【0072】

幾つかの実施態様では、多重検出法は、（i）生物学的試料を第一の検出プローブ（例えば、PD-L1又はCD45LCAに特異的な一次抗体の一つ）と接触させて第一の抗体-標的複合体を形成する工程；（ii）生物学的試料を、第一の標識用コンジュゲートであって第一の酵素を含む第一の標識用コンジュゲート（ここで第一の標識用コンジュゲートは第一の検出プローブに特異的に結合し、標的を酵素で標識するように構成された抗種抗体である）と接触させる工程；（iii）生物学的試料を、第一の潜在的反応性部分及び第一の検出可能部分を含む第一のシグナル伝達コンジュゲートと接触させる工程；（iv）試料を第一の酵素不活性化組成物と接触させて、生物学的試料に含まれる第一の酵素を実質的に不活性化又は完全に不活性化させることなどにより、第一の酵素を不活性化する工程を含む。幾つかの実施態様では、加えられた第一の検出プローブは、PD-L1に特異的な一次抗体、例えば抗PD-L1抗体である。幾つかの実施態様では、第一のシグナル伝達コンジュゲートは、適切な酵素と反応したとき、適切な条件下で、DISCOVERYパープル、Cy5、ローダミン及びDABSYLからなる群から選択される色素を沈着させる化学部分に結合した色素を含む。他の実施態様では、第一のシグナル伝達コンジュゲートはDABを基質として含む。

20

30

【0073】

第一の酵素の不活性化後（任意工程）、多重方法は、（v）生物学的試料を第二の検出プローブ（例えば、PD-L1又はCD45LCAに特異的な一次抗体の他方）と接触させて、第二抗体-標的複合体を形成する工程；（vi）生物学的試料を、第二の標識用コンジュゲートであって第二の酵素を含む第二の標識用コンジュゲート（ここで第二の標識用コンジュゲートは第二の検出プローブに特異的に結合し、標的を酵素で標識するように構成された抗種抗体である）と接触させる工程；（vii）生物学的試料を、第二の潜在的反応性部分及び第二の検出可能部分を含む第二のシグナル伝達コンジュゲートと接触させる工程；（viii）試料を第一の酵素不活性化組成物と接触させて、生物学的試料に含まれる第一の酵素を実質的に不活性化又は完全に不活性化させることなどにより、第二の第二酵素を不活性化する工程を更に含む。幾つかの実施態様では、加えられる第二の検出プローブは、腫瘍細胞マーカーに特異的な一次抗体、例えば抗CD45LCA抗体である。幾つかの実施態様では、第二のシグナル伝達コンジュゲートは、第二の検出可能部分が第一の検出可能部分とは異なる、DAB、DISCOVERYパープル、Cy5、ローダミン及びDABSYLからなる群から選択される検出可能部分を含む。他の実施態様では、第二のシグナル伝達コンジュゲートは、基質としてQM-DISCOVERYパープルを含む。

40

50

【0074】

第二の酵素の不活性化後、前記方法を、他の標的（例えば、他の免疫細胞受容体、EGFR、HER2、HER2/neu、HPV、ALK等々）の検出を達成するために、更なる検出プローブ（例えば、一次抗体又は核酸プローブ）が更なる検出試薬と共に導入されうるように繰り返すことができる。幾つかの実施態様では、PD-L1以外の腫瘍マーカーを検出するために第三の検出プローブを導入する。一次抗体（及び他の検出プローブ）及びそれぞれの検出試薬又はキットの全ての導入後、前記方法は、第一、第二、及び第nの検出可能部分から（手作業又は自動化方法を介して）シグナルを検出する工程を更に含み、第一、第二及び第nの検出可能部分の各々がそれぞれ異なる。あるいは、ここに記載されるように、検出プローブの各々は、同時又は逐次的に加えることができるが、任意の標識用コンジュゲートが添加される前である。別の例として、任意の検出試薬の導入前に、工程1において三つの検出プローブが逐次的に適用されうる。

10

【0075】

複数の試薬が逐次的に検出される多重アッセイの場合、連続する検出工程間で任意の試薬又は内因性酵素を実質的に不活性化（例えば、90%を超える不活性化）させることが望ましい。結果として、何れか一つの検出工程に存在する酵素は、後の検出工程における酵素と干渉しないと考えられる。これはひいては多重アッセイで使用される異なる色素原の視覚化及び検出を改善すると考えられる。当該技術分野で知られている任意の酵素不活性化組成物をこの目的のために使用することができる。幾つかの実施態様では、酵素不活性化組成物を適用して、各検出工程後に試薬又は内因性酵素を不活性化する。例示的な酵素不活性化組成物及び方法は、同時係属中の米国特許出願第62/159297号に開示されており、その開示は、その全体が出典明示によりここに援用される。

20

【0076】

幾つかの実施態様では、変性工程が、第一の検出試薬セットにおいて使用される酵素が第二の基質に作用するのを防止する。幾つかの実施態様では、変性剤は、第一の検出試薬セット中の酵素を変性させる物質である。幾つかの実施態様では、変性剤は、例えばホルムアミド、アルキル置換アミド、尿素又は尿素系変性剤、チオ尿素、塩酸グアニジン、又はその誘導体である。アルキル置換アミドの例には、N-プロピルホルムアミド、N-ブチルホルムアミド、N-イソブチルホルムアミド、及びN,N-ジプロピルホルムアミドが含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施態様では、変性剤はバッファー中に提供される。幾つかの実施態様では、第一の標的プローブ検出酵素、例えばアルカリホスファターゼを変性させるのに十分な時間及び条件下で、試料を変性剤で処理する。幾つかの実施態様では、試料は約37で約15から約30分間、好ましくは約20から24分間変性剤で処理される。幾つかの実施態様では、試料は、第二の核酸プローブの標的へのハイブリダイゼーションを保存しながら標的酵素を変性させるのに十分な時間及び条件下で変性剤で処理される。

30

【0077】

シグナル伝達コンジュゲート又は基質を生物学的試料と共に導入するのに適した条件が使用され、典型的には、過氧化物（例えば、過酸化水素）を含み、酵素がその所望の機能を実施するのを可能にするか又は容易にするのに適した塩濃度及びpHを有する反応バッファー又は溶液を提供することを含む。一般に、前記方法のこの工程は、約35から約40の範囲の温度で実施されるが、当業者は、選択された酵素及びシグナル伝達コンジュゲートに適した適当な温度範囲を選択することができるであろう。例えば、これらの条件は、酵素と過氧化物が反応して、シグナル伝達コンジュゲートの潜在的反応性部分上でのラジカル形成を促進することを可能にすると考えられる。潜在的な反応性部分、従ってシグナル伝達コンジュゲート全体は、生物学的試料上、特に固定化酵素コンジュゲートに近接する一又は複数のチロシン残基、酵素コンジュゲートの酵素部分のチロシン残基、及び/又は酵素コンジュゲートの抗体部分のチロシン残基に共有結合的に沈着するであろう。ついで、生物学的試料を光で照らし、標的は、シグナル伝達コンジュゲートの検出可能部分によって生成される光の吸光度によって検出されうる。

40

50

【0078】

多重アッセイ、方法及びシステムは、完全に手作業であってもよく、又は自動化された工程を含んでいてもよい。幾つかの実施態様では、自動化された方法は、自動化されたIHC/ISSHスライド染色装置で実施されうる。自動化されたIHC/ISSHスライド染色装置は、典型的には、染色プロトコルをスライド上に実施するために試薬を分注するための少なくとも染色ユニットを含む。市販の染色ユニットは、典型的には次の原理の一つで動作する：(1)スライドを水平に配置し、組織試料を含むスライドの表面上に液たまりとして試薬を分配する開放された個々のスライド染色(例えば、DAKO AUTOSTAINER Link 48 (Agilent Technologies)及びintelliPATH (Biocare Medical)染色装置で実施)；(2)試薬を、試料上に沈着した不活性の流体層で覆うか、又は該層を通して分配する液体オーバーレイ技術(例えば、VENTANA BenchMark及びDISCOVERY染色装置で実施)；(3)スライド表面を別の表面(別のスライドであるか又はカバープレートでもよい)に平行に近接して配置して狭い間隙をつくり、その間隙を通して毛細管力が液体試薬を吸い上げ試料と接触させるキャピラリー間隙染色(例えば、DAKO TECHMATE、Leica BOND、及びDAKO OMNIS染色装置によって使用される染色原理)。(例えばDAKO TECHMATE及びLeica BONDでは)キャピラリー間隙染色の幾らかの繰り返しは、間隙内の液体を混合しない。キャピラリー間隙染色の他の変形態様では、間隙がスライドと湾曲表面との間につくり出され、表面同士の互いの移動が混合をなす(米国特許第7820381号参照)平行移動間隙技術；及びキャピラリー間隙染色と同様の毛細管力を使用してスライドに試料を適用し、ついで平行表面を互いに平行移動させてインキュベーション中に試薬を攪拌して試薬混合を行う動的間隙染色におけるように、試薬が間隙内で混合される(例えば、DAKO OMNISスライド染色装置(Agilent)で実施される染色原理)。最近、インクジェット技術を使用して試薬をスライド上に沈着させることが提案されている。国際公開第2016-170008A1号を参照のこと。この染色原理のリストは網羅的なものではなく、本方法及びシステムは、適切な試薬を試料に適用するために使用することができる任意の染色技術(未知のもの及び将来開発されるもの)を含むものとする。

10

20

【0079】

検体がパラフィンに包埋された試料である場合、試料は適切な脱パラフィン流体を使用して手作業で又は自動IHC/ISSHスライド染色装置で脱パラフィンされうる。廃棄物除去剤が脱パラフィン流体を除去した後、任意の数の物質が検体に連続して適用されうる。物質は、前処理(例えば、タンパク質架橋、核酸曝露など)、変性、ハイブリダイゼーション、洗浄(例えば、ストリンジェンシー洗浄)、検出(例えば、視覚又はマーカー分子をプローブに関連付ける)、増幅(例えば、タンパク質、遺伝子などの増幅)、対比染色、カバースリッピング等々のためでありうる。

30

【0080】

自動IHC/ISSHスライド染色装置は、検体に広範囲の物質を適用することができる。前記物質には、限定されないが、染色剤、プローブ、試薬、リンス、及び/又はコンディショナーが含まれる。物質は、流体(例えば、気体、液体、又は気/液混合物)などでありうる。流体は、溶媒(例えば、極性溶媒、非極性溶媒など)、溶液(例えば、水溶液又は他のタイプの溶液)などでありうる。試薬は、限定されないが、染色剤、湿潤剤、抗体(例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体など)、抗原回収流体(例えば、水性又は非水性系の抗原回収溶液、抗原回収バッファーなど)等々を含みうる。プローブは、検出可能な標識又はレポーター分子に結合した、単離された核酸又は単離された合成オリゴヌクレオチドでありうる。標識は、放射性同位体、酵素基質、補因子、リガンド、化学発光又は蛍光剤、ハプテン、及び酵素を含みうる。

40

【0081】

intelliPATH (Bioscare Medical)、WAVE (Celerus Diagnostics)、DAKO OMNIS及びDAKO AUTOSTAI

50

NER LINK 48 (Agilent Technologies)、BENCHMARK (Ventana Medical Systems, Inc.)、Leica BOND、及びLab Vision Autostainer (Thermo Scientific) 自動スライド染色装置を含む自動IHC / ISHスライド染色装置の特定の例は、その全体が出典明示によりここに援用されるPrichard, Overview of Automated Immunohistochemistry, Arch Pathol Lab Med., Vol. 138, pp. 1578-1582 (2014)に記載されている。加えて、Ventana Medical Systems, Inc. は、その各々の全体が出典明示によりここに援用される米国特許第5650327号、第5654200号、第6296809号、第6352861号、第6827901号及び第6943029号、並びに米国特許出願公開第20030211630号及び第20040052685号を含む、自動分析を実施するためのシステム及び方法を開示する多くの米国特許の譲受人である。あるいは、検体は手作業で処理されうる。

10

【0082】

検体が染色された後（手作業か又は自動スライド染色装置で）、染色されたスライドは、明視野イメージスライドスキャナで画像化されうる。基本レベルでは、スライドスキャナは、染色された試料の代表的なデジタル画像を作成する。典型的な明視野スライドスキャナは、少なくとも、（１）対物レンズを有する顕微鏡、（２）光源（ハロゲン、発光ダイオード、白色光及び／又はマルチスペクトル光源など）、（３）ガラススライドを回りに移動させる（又はスライドの回りに光学素子を移動させる）ロボット、（４）画像キャプチャ用の一又は複数のデジタルカメラ、（５）ロボットを制御し、デジタルスライドを操作し、管理し、及び見るためのコンピュータ及び関連ソフトウェアを含む。スライド上の多くの異なるXY位置（場合によっては複数のZ面）のデジタルデータが、カメラの電荷結合素子（CCD）によってキャプチャーされ、画像が互いに結合されてスキャン面全体の合成画像が形成される。達成する一般的方法は次を含む：

20

（１）スライドステージ又は光学素子を非常に小さな増分で移動させて、隣接する正方形と僅かに重なる正方形の画像フレームをキャプチャーする。ついで、キャプチャーされた正方形を自動的に互いにマッチさせて合成画像を構築する、タイルベーススキャンニング；及び

（２）取得中にスライドステージが単一の軸で動いて多数の合成画像「ストリップ」をキャプチャーするラインベーススキャンニング。次に、画像ストリップを互いにマッチさせて、より大きな合成画像を形成することができる。ある場合には、

30

【0083】

様々な明視野スキャナの詳細な概説は、その内容の全体が出典明示によりここに援用されるFarahani等, Whole slide imaging in pathology: advantages, limitations, and emerging perspectives, Pathology and Laboratory Medicine Int'l, Vol. 7, p. 23-33 (June 2015)に見出すことができる。スライドスキャナの例には、3DHISTECH PANNORAMIC SCAN II; Digipath PATHSCOPE; Hamamatsu NANOZOOMER RS、HT、及びXR; Huron TISSUE SCOPE 4000、4000XT、及びHS; Leica SCANSCOPE AT、AT2、CS、FL、及びSCN400; Mikroskan D2; Olympus VS120-SL; Omnyx VL4、及びVL120; PerkinElmer LAMINA; Philips ULTRA-FAST SCANNER; Sakura Finetek VISIONTEK; Unic PRECICE 500、及びPRECICE 600x; VENTANA ISCAN COREO及びISCAN HT; 及びZeiss AXIO SCAN.Z1が含まれる。他の例示的なシステム及び特徴は、例えば、IMAGING SYSTEM AND TECHNIQUESと題された国際特許出願第PCT/US2010/002772号（特許公開番号：国際公開第2011/049608号）に見出すことができ、又はIMAGING SYSTEMS, CASSETTES, AND METHODS OF USING THE SAMEと題された2011年9月9日出願の米国特許出願第61/533114号に開示されている。国際特許出願第P

40

50

CT/US2010/002772号及び米国特許出願第61/533114号は、それらの実体が出典明示により援用される。

【0084】

スライドスキャナによって作成されたデジタル画像は、様々なデジタル病理ソフトウェアパッケージを使用して更に解析されうる。これらのコンピュータプログラムは、典型的には、デジタル画像の各ピクセルにおけるシグナルチャネルのシグナル強度を測定することによって動作する。ついで、例えばオブジェクトを識別し、平均シグナル強度、画像全体又は関心のある特定の領域における染色の面積等々を含む、様々な色素に相関するシグナルについての様々な統計を計算するために、様々なアルゴリズムをそれから生成されたシグナルデータに適用することができる。加えて、これらのソフトウェアパッケージは、
10 多くの場合、ズームイン及びズームアウト、様々な関心領域を識別する、オブジェクト及び/又は領域に注釈を付ける等々を含む、ユーザが画像を操作することを可能にする機能を有する。これらのソフトウェアパッケージの例には、VENTANA VIRTUOS O (Roche); Definiens TISSUE STUDIO、DEVELOPER XD、及びIMAGE MINER; 並びにVisopharm BIOTOPIX、ONCOTOPIX、及びSTEREOTOPIXソフトウェアパッケージが含まれる。

【0085】

[検出キット]

また開示されるのは、(i)PD-L1に特異的な検出プローブと、(ii)少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な少なくとも一つの検出プローブとを含むシステム及び
20 キットである。幾つかの実施態様では、キットは、PD-L1と免疫細胞マーカーとを発現する免疫細胞を共染色するために使用される。幾つかの実施態様では、キットは、PD-L1陽性腫瘍細胞、PD-L1免疫細胞、PD-L1陰性腫瘍細胞、及びPD-L1陰性免疫細胞が同定され及び/又は互いに区別されるように、組織試料を染色するために使用される。幾つかの実施態様では、キットは、腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞を検出
及び/又は定量することを可能にし、腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞の検出及び/又は定
30 量の結果は、PD-L1標的療法に対する応答を予測するために単独で又は他のデータ(例えば、組織試料スコア化の結果)と組み合わせて使用されうる。幾つかの実施態様では、開示されたキットを用いた組織染色の結果は、がんがPD-L1を発現又は過剰発現する腫瘍細胞を含むがんの治療のような、治療の過程(例えば、抗PD-L1療法又は抗
PD-L1剤を用いた併用療法)を決定するために医療従事者によって使用されうる。

【0086】

幾つかの実施態様では、キットに使用される検出プローブは一次抗体である。他の実施態様では、キットに使用される検出プローブは、核酸プローブである。他の実施態様では、
40 キットに使用される検出プローブは、一次抗体と核酸プローブとの組み合わせを含む。幾つかの実施態様では、PD-L1に特異的な検出プローブは一次抗体、例えば、抗PD-L1抗体である。幾つかの実施態様では、少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な検出プローブは、CD3、CD4、CD8、CD45、及びCD45LCAの少なくとも一つに特異的な一次抗体である。幾つかの実施態様では、第一の一次抗体は抗PD-L1抗体(SP142)である。幾つかの実施態様では、第二の一次抗体は抗CD45LCA抗体(RP2/18)である。

【0087】

幾つかの実施態様では、キットは、一又は複数の検出試薬又は検出キットを更に含む。幾つかの実施態様では、キットは、第一の一次抗体に特異的な第一の標識用コンジュゲートと、第二の一次抗体に特異的な第二の標識用コンジュゲートを更に含む。幾つかの実施態様では、キットは、第一及び第二の基質又は第一及び第二のシグナル伝達コンジュゲートを更に含み、第一及び第二の基質又はシグナル伝達コンジュゲートは異なる。標識用コンジュゲート、シグナル伝達コンジュゲート、発色基質、及び/又は色素原は、ここに列挙されたもの又は当業者に知られている他のものの何れかを含みうる。幾つかの実施態様では、キットは、標識用コンジュゲートの酵素に特異的な一又は複数の酵素不活性化組成
50

物を更に含む。

【0088】

幾つかの実施態様では、キットは、マーカーの多重検出のための指示書又はPD-L1陽性腫瘍浸潤リンパ球の存在に基づいて治療の結果を予測するための指示書を含む。他の実施態様では、キットは、腫瘍浸潤PD-L1陽性リンパ球がPD-L1陽性腫瘍組織を含む組織試料の領域において検出されるかどうかに基づいて、適切な活性医薬成分の投与のための説明書を含む。幾つかの実施態様では、キットは一又は複数の治療剤を含む。キットは、PD-L1陽性腫瘍細胞、PD-L1陽性免疫細胞（浸潤PD-L1陽性腫瘍組織であるPD-L1陽性リンパ球を含む）の存在及び/又は量に基づいて、特定のがんのステージング又はグレードをスコア化するための指示又はプロトコル及び/又はこれを決定するための指示又はプロトコルを更に含む。

10

【0089】

キットは、他の試薬、例えば、バッファー、一次染色剤、ブロッキング剤、顕微鏡カバースリップ等々を含む。

【0090】

幾つかの実施態様では、キットは、EGFR、HER2、HPV、ALK、BRAF、OX-40、PD-1、IDO-1、FoxP3、CD163、及びCTLA-4に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブを含む。

【0091】

[組織試料のスコア化]

本開示の別の態様は、PD-L1発現に対して腫瘍試料をスコア化する方法であって、組織試料中の腫瘍細胞及び免疫細胞を同定する工程（例えば、ここに記載の多重方法及びキットを利用することによって）；PD-L1を発現する腫瘍細胞の数及びPD-L1を発現する免疫細胞の数及び/又は細胞中のPD-L1発現の相対強度を決定する工程；及びPD-L1発現に従って腫瘍を分類する工程を含む方法である。幾つかの実施態様では、腫瘍細胞をスコア化するために、PD-L1陽性腫瘍細胞の割合を腫瘍細胞（すなわち、PD-L1陽性及びPD-L1陰性腫瘍細胞）の総数で割る。幾つかの実施態様では、免疫細胞をスコア化するために、これらの細胞を含む画像内の面積を測定し、PD-L1陽性リンパ球（免疫細胞）を含む腫瘍面積の割合をスコア化する。幾つかの実施態様では、PD-L1の発現は、腫瘍中のPD-L1タンパク質及び/又はPD-L1 mRNAを特異的に検出することによって決定される。幾つかの実施態様では、細胞がIHCによって検出されるPD-L1タンパク質の少なくとも部分的な膜染色を有する場合、細胞はPD-L1を発現すると考えられる。幾つかの実施態様では、腫瘍は、手順が当業者に知られているように、改変Hスコア（MHS）又は改変比率スコア（MPS）の一方又は両方に従って分類される。

20

30

【0092】

本開示の更に別の態様は、抗PD-L1抗体で染色され、少なくとも一つの免疫細胞マーカーの存在について染色された腫瘍組織切片におけるPD-L1発現をスコア化する方法である。幾つかの実施態様では、スコア化プロセスの結果は、抗PD-L1療法に対する被験体の応答を予測するために、またがんの患者を治療する方法において、例えば治験における登録基準として、抗PD-L1療法による治療のための患者を選択するために使用されう。

40

【0093】

他の実施態様では、試料は、次に従ってスコア化される：

腫瘍浸潤免疫細胞は、全腫瘍領域における任意の強度の任意の識別可能なPD-L1（SP142）染色を示すPD-L1陽性免疫細胞のパーセンテージとしてスコア化することができる（表3参照）。腫瘍領域は、腫瘍細胞と、リンパ球、マクロファージ、及び樹状又は網様形態を有する細胞を含む、関連した腫瘍内及び近接腫瘍周囲間質によって占められる領域として定義される。

表3 NSCLC 組織での VENTANA PD-L1 (SP142) アッセイのスコア化アルゴリズム (IC 5% カットオフ)	
顕微鏡観察	PD-L1 (SP142) 状態
如何なる識別可能な PD-L1 染色もなし 又は 腫瘍細胞、関連した腫瘍内、及び近接腫瘍周囲間質によって占められる腫瘍領域の $\leq 5\%$ をカバーする腫瘍浸潤免疫細胞に任意の強度の識別可能な PD-L1 染色が存在する	陰性
腫瘍細胞、関連した腫瘍内、及び近接腫瘍周囲間質によって占められる腫瘍領域の $\geq 5\%$ をカバーする腫瘍浸潤免疫細胞に任意の強度の識別可能な PD-L1 染色が存在する	陽性

10

20

【 0 0 9 4 】

免疫細胞（IC）の染色強度：腫瘍浸潤免疫細胞のPD-L1（SP142）染色の強度を、表4に記載の基準を使用して（通常は情報提供目的で）スコアシートに記録する。

表4 腫瘍浸潤免疫細胞の強度評価: NSCLC 組織における VENTANA PD-L1 (SP142) アッセイ	
染色強度 スコア*	免疫細胞に対する染色強度の記述
0	腫瘍細胞、関連した腫瘍内、及び近接腫瘍周囲の線維形成性間質によって占められる腫瘍領域をカバーする腫瘍浸潤免疫細胞の陰性染色
1+	腫瘍細胞、関連した腫瘍内、及び近接腫瘍周囲の線維形成性間質によって占められる腫瘍領域をカバーする腫瘍浸潤免疫細胞の弱い膜染色
2+	腫瘍細胞、関連した腫瘍内、及び近接腫瘍周囲の間質によって占められる腫瘍領域をカバーする腫瘍浸潤免疫細胞の中程度の膜染色
3+	腫瘍細胞、関連した腫瘍内、及び近接腫瘍周囲の間質によって占められる腫瘍領域をカバーする腫瘍浸潤免疫細胞の強い膜染色
評価不能 (N/E)	解釈不能、例えば組織／腫瘍が存在しない、アーティファクト、又はエッジアーティファクト

30

40

【 0 0 9 5 】

腫瘍細胞（TC）の染色強度：腫瘍細胞（TC）のPD-L1（SP142）染色の強度を、表5に記載の基準を使用して（情報提供目的で）スコアシートに記録する。

50

表5 腫瘍細胞の強度評価: NSCLC 組織における VENTANA PD-L1 (SP142) アッセイ	
染色強度スコア	染色強度の記述
0	腫瘍細胞の陰性染色
1+	腫瘍細胞の弱い膜染色
2+	腫瘍細胞の中程度の膜染色
3+	腫瘍細胞の強い膜染色
評価不能 (N/E)	解釈不能、例えば組織／腫瘍が存在しない、アーティファクト、又はエッジアーティファクト

10

【 0 0 9 6 】

腫瘍細胞を、何らかの識別可能な PD - L 1 (S P 1 4 2) 膜染色を示す生存腫瘍細胞のパーセンテージとしてスコア化する (表 6) 。

20

表6 NSCLC 組織における VENTANA PD-L1 (SP142) アッセイのスコア化アルゴリズム (TC 5% カットオフ)	
顕微鏡観察	PD-L1 (SP142) 状態
如何なる識別可能な PD-L1 染色もなし 又は 腫瘍細胞の <5% に任意の強度の識別可能な PD-L1 膜染色が存在する	陰性
腫瘍細胞の $\geq 5\%$ に任意の強度の識別可能な PD-L1 膜染色が存在する	陽性

30

【 0 0 9 7 】

非特異的な背景染色は、典型的な染色パターンから逸脱する予期しない染色である。非特異的染色は、表 7 の基準に従って PD - L 1 (S P 1 4 2) 抗体染色 NSCLC 試験検体スライド上で評価し、許容可能又は許容不可能と記録する。

表7 背景評価: NSCLC及び扁桃組織におけるVENTANA PD-L1 (SP142) アッセイ		
	顕微鏡観察	スコア
許容可能	背景染色なし	0
	特異的染色の解釈に障りがない識別可能な非特異的染色が僅かにあり	0.25
	特異的染色の解釈に障りがない識別可能な非特異的染色が幾らかあり	0.5
許容不可能	特異的染色の解釈に僅かに障りがある識別可能な非特異的染色が幾らかあり	0.75
	非特異的染色が特異的染色の解釈に障りがある	1
	非特異的染色が特異的染色の解釈に非常に障りがある	1.5
	非特異的染色が極めて障りがあるが特異的染色ほど強くはない	2
	非特異的染色強度が特異的染色の強度とほぼ同等である	2.5
	非特異的染色を特異的染色と区別できない	3

10

20

30

【 0 0 9 8 】

[治療法に対する応答を予測する方法及び治療方法]

幾つかの実施態様では、ここに開示される多重アッセイ、キット及び方法は、治療法（例えば、抗PD-L1療法又は抗PD-L1剤を用いた併用療法）に対する応答を予測するか、予測を補助するために利用でき、あるいはここに開示される任意のアッセイ又は方法の結果を使用して、抗PD-L1療法又は抗PD-L1剤を用いた併用療法での治療を容易にすることができる。何か特定の理論に拘束されることを望むものではないが、PD-L1陽性腫瘍組織内の腫瘍浸潤PD-L1陽性免疫細胞、例えば腫瘍浸潤リンパ球の存在が、患者が抗PD-L1療法又は抗PD-L1剤を含む組み合わせ療法／併用療法での治療によく応答しうることの指標であると考えられる。また、腫瘍浸潤リンパ球が、腫瘍増殖を制御しようとして腫瘍内に補充されると考えられる。従って、一部の患者は、PD-L1陽性腫瘍組織におけるTILの発現に応じて抗PD-L1療法から恩恵を得ることができると考えられる。

40

【 0 0 9 9 】

50

従って、幾つかの実施態様は、腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性免疫細胞の存在又は非存在について P D - L 1 陽性腫瘍組織試料を分析することにより、P D - L 1 標的療法に対する応答を予測する方法であって、P D - L 1 と少なくとも一つの C D マーカーとを共発現する免疫細胞を同定することを含む方法である。幾つかの実施態様では、腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性免疫細胞の同定は、腫瘍組織試料を P D - L 1 に特異的な第一の検出プローブと接触させ（て第一の検出プローブ - 標的複合体を形成し）、腫瘍組織試料を少なくとも一つの C D マーカーに特異的な少なくとも第二の検出プローブと接触させ（て第二の検出プローブ - 標的複合体を形成す）ることを含む。幾つかの実施態様では、P D - L 1 に特異的な検出プローブは一次抗体、例えば、抗 P D - L 1 抗体である。幾つかの実施態様では、少なくとも一つの C D マーカーに特異的な検出プローブは、抗 C D 3 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 8 抗体、及び C D 4 5 L C A 抗体から選択される群から選択される抗体である。幾つかの実施態様では、P D - L 1 マーカーと少なくとも一つの C D マーカーとを共発現する免疫細胞の同定を可能にする検出試薬が導入される。幾つかの実施態様では、P D - L 1 マーカーと少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する免疫細胞は、D I S C O V E R Y パープル及び D A B で共染色される。幾つかの実施態様では、P D - L 1 標的療法は、アテゾリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びピディリズマブ並びにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。幾つかの実施態様では、本方法は、E G F R、H E R 2、H P V、A L K、B R A F、O X - 4 0、P D - 1、I D O - 1、F o x P 3、C D 1 6 3、及び C T L A - 4 に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブを導入することを更に含む。

10

20

【0100】

更に、幾つかの実施態様は、患者からの P D - L 1 陽性腫瘍組織試料が腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性リンパ球を含むかどうかを決定するための分析結果を提供する試験を要求し、患者の腫瘍組織試料が P D - L 1 陽性腫瘍細胞及び腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性リンパ球を発現する場合、患者に P D - L 1 標的療法を施すことを含む、患者におけるがんの治療方法である。幾つかの実施態様では、試験は、腫瘍組織試料を P D - L 1 に特異的な第一の一次抗体（例えば S P 1 4 2）と少なくとも一つの免疫細胞マーカーに特異的な第二の一次抗体（例えば R P 2 / 1 8）とに接触させ、ここで、腫瘍浸潤 P D - L 1 陽性リンパ球が P D - L 1 と少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する、多重アッセイを含む。幾つかの実施態様では、P D - L 1 マーカーと少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する免疫細胞の同定を可能にする検出試薬が導入される。幾つかの実施態様では、P D - L 1 マーカーと少なくとも一つの免疫細胞マーカーとを共発現する免疫細胞は、D I S C O V E R Y パープル及び D A B で共染色される。幾つかの実施態様では、P D - L 1 標的療法は、アテゾリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びピディリズマブ、並びにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。他の実施態様では、P D - L 1 標的療法は、T 細胞刺激療法又は活性医薬成分（生物学的薬剤を含む）と組み合わせられる。幾つかの実施態様では、本方法は、E G F R、H E R 2、H P V、A L K、B R A F、O X - 4 0、P D - 1、I D O - 1、F o x P 3、C D 1 6 3、及び C T L A - 4 に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブを導入することを更に含む。

30

40

【0101】

幾つかの実施態様では、個体 / 患者由来の腫瘍組織試料中の P D - L 1 発現レベルが予め決められたカットオフ値（例えば対照値）と比較され、この検出及び比較プロセスは自動化されうる（もちろん、検体分析装置及びコンピュータシステムを含みうる）。幾つかの実施態様では、カットオフを超える値は、P D - L 1 の過剰発現を表すと考えられ、カットオフ又はそれ以下の値は、P D - L 1 の発現低下と考えられる。幾つかの実施態様では、P D - L 1 の発現レベルが、対照群に確立された 5 0 パーセントイルと 7 5 パーセントイルの間のカットオフ値を上回る場合、P D - L 1 の過剰発現が認められる。他の実施態様では、P D - L 1 の発現レベルが対照群の 5 0 パーセントイルと 7 0 パーセントイルとの間のカットオフ値を上回る場合、P D - L 1 に対する過剰発現が認められる。更に他の実施態様では、P D - L 1 が過剰発現する（すなわち、定量された P D - L 1 発現レベ

50

ルがPD-L1カットオフ値を上回る)場合、個体/患者はPD-L1療法又は抗PD-L1剤を含む併用療法を必要としていると判定される。幾つかの実施態様では、ある量のPD-L1陽性免疫細胞がある予め決められたカットオフ値を超える場合、患者はPD-L1標的療法での治療の恩恵を受けうる。

【0102】

幾つかの実施態様では、本方法は、EGFR、HER2、HPV、ALK、BRAF、OX-40、PD-1、IDO-1、FoxP3、CD163、及びCTLA-4に特異的な少なくとも一つの他の検出プローブを導入することを含む。幾つかの実施態様では、本方法は、表8に提供される検出プローブを導入し、導入された検出プローブに対応する表8の活性剤を投与することを含む。

表8: マーカーと対応する活性薬剤を提供する表

マーカー	染色	活性薬剤
EGFR	膜 / 細胞質	エルロチニブ, アファチニブ, ゲフィチニブ
ALK	細胞質	クリゾチニブ, セリチニブ
HER2	膜	ハーセプチン, パージェタ, カドサイラ, ラパチニブ)
HPV	核	
OX40	膜	開発中のアゴニスト
CTLA-4	膜 / 細胞質	トレメリムマブ

【0103】

[プロトコル]

表9及び表10は、多重検出のための二つのプロトコルの概要を示す。当業者には、表9及び10に概説されたプロトコルは非限定的であり、異なる検出プローブ及び検出試薬が置換されうるように適合化されうることが分かるであろう。

【0104】

10

20

30

表9

手順: U 5-Plx DAB_Gray_Blu_Pur_Gree.37 (v1.00.0270)		
プロトコル番号	プロトコル名	作成日
1735	PD-L1 CC1.56@100.12.ampCD8-32T Str@42-32	07/06/2015
1	ベーキング[選択]	
2	スライドを[60℃]に加温し、[4 分]間インキュベートする(ベーキング)	
3	パラフィン[選択]	
4	脱パラフィンに替える[選択]	
5	細胞コンディショニング[選択]	10
6	細胞コンディショニング オプション[選択]	
7	CC1[選択]	
8	スライドを[100℃]に加温し、[4 分]間インキュベートする(細胞コンディショナー#1)	
9	CC1 8 分[選択]	
10	CC1 16 分[選択]	
11	CC1 24 分[選択]	
12	CC1 32 分[選択]	
13	CC1 40 分[選択]	
14	CC1 48 分[選択]	20
15	CC1 56 分[選択]	
16	DAB[選択]	
17	阻害剤[選択]	
18	抗体[選択]	
19	一滴の[PREP キット 42](抗体)を適用し、[0 時間 12 分]間インキュベートする, PDL1(SP142)	
20	OptiView増幅[選択]	
21	一滴の OV AMP H202 と一滴の OV AMPLIFIER を適用し、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	
22	一滴の OV AMP MUTIMER を適用し、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	30
23	ストリンジェンシー洗浄#2[選択]	
24	オプションボトルで銀洗浄、スライドを[42℃]に加温(ストリンジェンシー洗浄#2)	
25	[32 分]間インキュベートする(ストリンジェンシー洗浄#2)	
26	DISCOVERY パープル[選択]	
27	第三抗体[選択]	
28	一滴の[PREP キット 8](第二抗体)を適用し、[0 時間 32 分]間インキュベートする, 219 中 CD8-spring Conc.1:50	
29	研究分岐点#11[選択]対比染色 5 Disco パープル	
30	一滴の COUNTERSTAIN 6 を適用し、[0 時間 32 分]間インキュベートする, Disco パープル H2O2	
31	対比染色[選択]	40
32	対比染色に EZPrep を使用[選択]	
33	一滴の[ヘマトキシリン II](対比染色)を適用し、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	
34	対比染色後[選択]	
35	一滴の[BLUING REAGENT]を適用し(対比染色後)、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	

表9

1	ミキサーをオンにする	
2	[抗体ブロック#が選択される場合、この手順は PSS 希釈剤に対して OPTION #4 ディスペンサーを使用する]	
3	[オプションが選択される場合、この手順は BLOXALL に対して OPTION #6 ディスペンサーを使用する]	
4	スライドを[60°C]に加温し、[4 分]間インキュベートする(ベーキング)	
5	[LCS Depar]	
6	ミキサーをオンにする	10
7	スライドを 58°Cに加温し、4 分間インキュベートする	
8	CC カバースリップロングを適用する	
9	CC カバースリップロングを適用する	
10	Depar 適用, 容量調整	
11	スライドを 68°Cに加温し、8 分間インキュベートする	
12	スライドを 36°Cに加温する	
13	[細胞コンディショニング オプションは TM CC である。選択されない場合、通常のCCを実施]	
14	スライドをEZ Prep でリンスする	
15	ロング細胞コンディショナー#1 を適用する	20
16	CC カバースリップロングを適用する	
17	スライドを[100°C]に加温し、[4 分]間インキュベートする(細胞コンディショナー#1)	
18	[ノミナル温度選択:93°C]	
19	細胞コンディショナー#1 を適用する	
20	CC 培地カバースリップNo BB を適用する	
21	4 分間インキュベートする	
22	8 分間インキュベートする	
23	細胞コンディショナー#1 を適用する	
24	CC 培地カバースリップNo BB を適用する	
25	8 分間インキュベートする	30
26	8 分間インキュベートする	
27	細胞コンディショナー#1 を適用する	
28	CC 培地カバースリップNo BB を適用する	
29	8 分間インキュベートする	
30	8 分間インキュベートする	
31	細胞コンディショナー#1 を適用する	
32	CC 培地カバースリップNo BB を適用する	
33	8 分間インキュベートする	
34	細胞コンディショナー#1 を適用する	40
35	CC 培地カバースリップNo BB を適用する	
36	スライドを 37°Cに加温する	
37	細胞コンディショナー#1 を適用する	
38	CC 培地カバースリップNo BB を適用する	
39	スライドを 36°Cに加温する	
40	スライドを 36°Cに加温する	

表9

41	[第一検出はoView DABである]	
42	[8 分間反応バッファー中に阻害剤]	
43	スライドを反応バッファーでリンスする	
44	スライド容量を反応バッファーで調整する	
45	一滴の OV PEROX IHBTR を適用し、カバースリッスを適用し、8 分間インキュベートする	
46	スライドを反応バッファーでリンスする	
47	スライド容量を反応バッファーで調整する	
48	カバースリッスを適用する	10
49	スライドを 36℃に加温する	
50	スライドを反応バッファーでリンスする	
51	スライド容量を反応バッファーで調整する	
52	カバースリッスを適用する	
53	スライドを反応バッファーでリンスする	
54	スライド容量を反応バッファーで調整する	
55	カバースリッスを適用する	
56	[滴定は選択された場合しか起こらない]	
57	一滴の[PREP キット 42](抗体)を適用し、[0 時間 12 分]間インキュベートする	20
58	スライドを反応バッファーでリンスする	
59	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
60	カバースリッスを適用する	
61	スライドを反応バッファーでリンスする	
62	スライド容量を反応バッファーで調整する	
63	一滴の OV HQ UNIV LINKR を適用し、カバースリッスを適用し、12 分間インキュベートする	
64	スライドを反応バッファーでリンスする	
65	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
66	カバースリッスを適用する	
67	スライドを反応バッファーでリンスする	30
68	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
69	カバースリッスを適用する	
70	スライドを反応バッファーでリンスする	
71	スライド容量を反応バッファーで調整する	
72	一滴の OV HRP MULTIMER を適用し、カバースリッスを適用し、12 分間インキュベートする	
73	スライドを反応バッファーでリンスする	
74	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
75	カバースリッスを適用する	
76	スライドを反応バッファーでリンスする	40
77	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
78	カバースリッスを適用する	

表9

79	スライドを反応バッファでリンスする	
80	スライド容量を反応バッファで調整する	
81	[OptiView Amplifier 及び OptiView Amplification H2O2 インキュベーション時間]	
82	一滴の OV AMP H2O2 と一滴の OV AMPLIFIER を適用し、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	
83	スライドを反応バッファでリンスする	
84	230ul+VA 反応バッファを適用する	
85	カバースリップを適用する	10
86	スライドを反応バッファでリンスする	
87	230ul+VA 反応バッファを適用する	
88	カバースリップを適用する	
89	スライドを反応バッファでリンスする	
90	スライド容量を反応バッファで調整する	
91	[OptiView Amplification Multimer インキュベーション時間]	
92	一滴の OV AMP MULTIMER を適用し、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	
93	スライドを反応バッファでリンスする	
94	230ul+VA 反応バッファを適用する	
95	カバースリップを適用する	20
96	スライドを反応バッファでリンスする	
97	230ul+VA 反応バッファを適用する	
98	カバースリップを適用する	
99	スライドを反応バッファでリンスする	
100	スライド容量を反応バッファで調整する	
101	一滴の OV H2O2 と一滴の OV DAB を適用し、カバースリップを適用し、8 分間インキュベートする	
102	スライドを反応バッファでリンスする	
103	スライド容量を反応バッファで調整する	
104	一滴の OV COPPER を適用し、カバースリップを適用し、4 分間インキュベートする	30
105	スライドを反応バッファでリンスする	
106	スライド容量を反応バッファで調整する	
107	カバースリップを適用する	
108	[36°C4 分間の SWII バッファ]	
109	[工程が「低 pH 酵素不活性化及び抗体溶出」と読まれる場合]	
110	スライドを[42°C)に加温する(ストリンジェンシー洗浄 #2)	
111	スライドをオプションでリンスする	
112	300ulのオプションを適用する	
113	カバースリップを適用する	
114	一滴の OPTION 6 を適用し、4 分間インキュベートする	40
115	[32 分]間インキュベートする(ストリンジェンシー洗浄 #2)	

表9

116	スライドを反応バッファーでリンスする	
117	スライド容量を反応バッファーで調整する	
118	カバースリップを適用する	
119	スライドを 36℃まで加温する	
120	スライドを 36℃まで加温する	
121	[ディスカバリーパープルは TAMRA である]	
122	[第三検出は ultraView レッドである]	
123	スライドを反応バッファーでリンスする	10
124	スライド容量を反応バッファーで調整する	
125	カバースリップを適用する	
126	一滴の[PREP キット 8] (第二抗体)を適用し、[0 時間 32 分]間インキュベートする	
127	スライドを反応バッファーでリンスする	
128	スライドを反応バッファーでリンスする	
129	スライド容量を反応バッファーで調整する	
130	カバースリップを適用する	
131	スライドを反応バッファーでリンスする	
132	スライド容量を反応バッファーで調整する	
133	スライドを反応バッファーでリンスする	20
134	スライド容量を反応バッファーで調整する	
135	一滴の OV HQ UNIV LINKR を適用し、カバースリップを適用し、12 分間インキュベートする	
136	スライドを反応バッファーでリンスする	
137	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
138	カバースリップを適用する	
139	スライドを反応バッファーでリンスする	
140	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
141	カバースリップを適用する	
142	スライドを反応バッファーでリンスする	30
143	スライド容量を反応バッファーで調整する	
144	一滴の OV HRP MULTIMER を適用し、カバースリップを適用し、12 分間インキュベートする	
145	スライドを反応バッファーでリンスする	
146	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
147	カバースリップを適用する	
148	スライドを反応バッファーでリンスする	
149	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
150	カバースリップを適用する	
151	スライドを反応バッファーでリンスする	40

表9

152	スライド容量を反応バッファーで調整する	
153	カバースリップを適用する	
154	[ディスカバリーパープルは COUNTERSTAIN#5 にあり、H2O2 は COUNTERSTAIN#6 にある]	
155	[RF11: ディスカバリーパープル色素原は二滴の色素原を適用し、4 分間インキュベートする]	
156	[続いて一滴の H2O2 と選択可能なインキュベーション]	
157	二滴の COUNTERSTAIN 5 を適用し、カバースリップを適用し、4 分間インキュベートする	
158	一滴の COUNTERSTAIN 6 を適用し、[0 時間 32 分]間インキュベートする	
159	スライドを反応バッファーでリンスする	10
160	スライド容量を反応バッファーで調整する	
161	カバースリップを適用する	
162	スライドを EZ Prep でリンスする	
163	スライド容量を EZ Prep で調整する	
164	一滴の[ヘマトキシリン II] (対比染色)を適用し、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	
165	スライドを EZ Prep でリンスする	
166	スライド容量を EZ Prep で調整する	
167	カバースリップを適用する	
168	スライドを反応バッファーでリンスする	20
169	スライド容量を反応バッファーで調整する	
170	一滴の[BLUING REAGENT]を適用し(対比染色後)、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	
171	スライドを反応バッファーでリンスする	
172	カバースリップを適用する	
173	スライドヒーターをオフにする	

【 0 1 0 5 】

表10

手順: U 4-Plx TAM_Rho_CY5_Dabsyl46 (v1.00.0280)		
プロトコル番号	プロトコル名	作成日
1587	CC32PDL32T40LCA32Cy512St32@42+PSS	07/06/2015
1	ベーキング[選択]	
2	スライドを[60℃]に加温し、[4 分]間インキュベートする(ベーキング)	
3	研究分岐点 #1[選択]	
4	脱パラフィン[選択]	
5	細胞コンディショニング[選択]	
6	ウルトラ CC1[選択]	10
7	スライドを[93℃]に加温し、4 分間インキュベートする(細胞コンディショナー #1)	
8	CC1 8 分[選択]	
9	CC1 16 分[選択]	
10	CC1 24 分[選択]	
11	CC1 32 分[選択]	
12	スライドを[36℃]に加温する(ストリンジェンシー洗浄 #1)、オプションボトルw/銀洗浄	
13	[32 分]間インキュベートする(ストリンジェンシー洗浄 #1)	
14	DISCOVERY パープル[選択]	
15	阻害剤[選択]Disco 760-4840	
16	抗体[選択]	20
17	一滴の[PREP キット 63](抗体)を適用し、[0 時間 32 分]間インキュベートする, PDL1(SP263)	
18	ウサギ抗体[選択]	
19	研究分岐点 #11[選択]	
20	一滴の COUNTERSTAIN 6 を適用し、[0 時間 40 分]間インキュベートする	
21	ストリンジェンシー洗浄 #3[選択]	
22	スライドを[42℃]に加温する(ストリンジェンシー洗浄 #3)	
23	[32 分]間インキュベートする(ストリンジェンシー洗浄 #3)	
24	ブルー[選択]	
25	第三抗体[選択]	
26	抗体ブロック 3[選択]PPS w/カゼイン(219)	30
27	一滴の[OPTION2](オプション)を適用し、カバースリップを適用し、4 分間インキュベートする, 抗体 Dil 219	
28	一滴の[ANTI-CLA](DS 一次抗体)を適用し、[0 時間 32 分]間インキュベートする	
29	研究分岐点 #21[選択]	
30	一滴の抗マウス NP を適用し、カバースリップを適用し、[8 分]間インキュベートする, Disco 760-4816	
31	一滴の抗 NP AP を適用し、カバースリップを適用し、[8 分]間インキュベートする, Disco 760-4827	
32	一滴の COUNTERSTAIN 9 を適用し、[0 時間 12 分]間インキュベートする, C4-5(Qmp) + 対比染色 2-pH 調整	40
33	対比染色[選択]	
34	対比染色に EZPrep を使用[選択]	
35	一滴の[ヘマトキシリン II](対比染色)を適用し、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	
36	対比染色後[選択]	
37	一滴の[BLUING REAGENT]を適用し(対比染色後)、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	

表10

工程番号	手順工程	
1	ミキサーをオンにする	
2	[この手順は第一及び第二に対してチラミド媒介明視野フルオロフォアを使用する]	
3	[この手順は第三及び第四マーカに対してキノンメチド媒介明視野フルオロフォアを使用する]	
4	[抗体ブロック#が選択される場合、この手順は PSS 希釈剤に対して OPTION #4 ディスペンサーを使用する]	
5	[オプションが選択される場合、この手順は BLOXALL に対して OPTION #8 ディスペンサーを使用する]	10
6	スライドを[60°C]に加温し、[4 分]間インキュベートする(ベーキング)	
7	[研究分岐点#1 は通常の TM LCS Depar、前処理及び細胞コンディショニングである]	
8	スライドを 58°Cに加温し、4 分間インキュベートする	
9	CC カバースリップロングを適用する	
10	CC カバースリップロングを適用する	
11	EZ Prep 適用, 容量調整	
12	スライドを 68°Cに加温し、4 分間インキュベートする	
13	スライドを EZ Prep でリンスする	
14	EZ Prep 適用, 容量調整	20
15	カバースリップを適用する	
16	スライドを EZ Prep でリンスする	
17	EZ Prep 適用, 容量調整	
18	カバースリップを適用する	
19	スライドを EZ Prep でリンスする	
20	Depar 適用, 容量調整	
21	カバースリップを適用する	
22	スライドを EZ Prep でリンスする	
23	ロング細胞コンディショナー#1 を適用する	
24	CC カバースリップロングを適用する	30
25	[93-95°Cは標準温度である]	
26	スライドを[93°C]に加温し、4 分間インキュベートする(細胞コンディショナー#1)	
27	4 分間インキュベートする	
28	細胞コンディショナー#1 を適用する	
29	CC 培地カバースリップNo BB を適用する	
30	8 分間インキュベートする	
31	8 分間インキュベートする	
32	細胞コンディショナー#1 を適用する	
33	CC 培地カバースリップNo BB を適用する	40
34	8 分間インキュベートする	
35	細胞コンディショナー#1 を適用する	

表10

36	CC 培地カバースリップNo. BB を適用する	
37	スライドヒーターをオフにする	
38	細胞コンディショナー #1 を適用する	
39	CC 培地カバースリップNo. BB を適用する	
40	[CC2 のために保存する]	
41	スライドを 36°C に加温する	
42	スライドを反応バッファーでリンスする	
43	スライド容量を反応バッファーで調整する	10
44	カバースリップを適用する	
45	[36°C 4 分間の SWII バッファー]	
46	[工程が「低 pH 酵素不活性化及び抗体溶出」と読まれる場合]	
47	スライドを [36°C] に加温する (ストリンジェンシー洗浄 #1)	
48	スライドをオプションでリンスする	
49	300ul のオプションを適用する	
50	カバースリップを適用する	
51	一滴の OPTION 8 を適用し、4 分間インキュベートする, Bloyall (ベクター) Sp6000	
52	[32 分] 間インキュベートする (ストリンジェンシー洗浄 #1)	20
53	スライドを反応バッファーでリンスする	
54	スライド容量を反応バッファーで調整する	
55	カバースリップを適用する	
56	[ディスカバリーパープルは TAMRA である]	
57	[8 分間反応バッファー中に阻害剤]	
58	スライドを反応バッファーでリンスする	
59	スライド容量を反応バッファーで調整する	
60	一滴の DISC 阻害剤を適用し、カバースリップを適用し、8 分間インキュベートする, 4840	
61	スライドを反応バッファーでリンスする	
62	スライド容量を反応バッファーで調整する	30
63	カバースリップを適用する	
64	スライドを反応バッファーでリンスする	
65	スライド容量を反応バッファーで調整する	
66	[一次 Ab に対して 1 滴の OPTION ディスペンサーの抗体ブロック及び共インキュベート]	
67	カバースリップを適用する	
68	一滴の [PREP キット 63] (抗体) を適用し、[0 時間 32 分] 間インキュベートする	
69	スライドを反応バッファーでリンスする	
70	230ul + VA 反応バッファーを適用する	
71	カバースリップを適用する	
72	スライドを反応バッファーでリンスする	40
73	スライド容量を反応バッファーで調整する	

表10

74	一滴の抗ウサギ HQ を適用し、カバースリップを適用し、0 時間 16 分間インキュベートする	
75	スライドを反応バッファーでリンスする	
76	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
77	カバースリップを適用する	
78	スライドを反応バッファーでリンスする	
79	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
80	一滴の抗 HQ HRP を適用し、カバースリップを適用し、12 分間インキュベートする	
81	スライドを反応バッファーでリンスする	10
82	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
83	スライドを反応バッファーでリンスする	
84	カバースリップを適用する	
85	スライドを反応バッファーでリンスする	
86	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
87	カバースリップを適用する	
88	スライドを反応バッファーでリンスする	
89	スライド容量を反応バッファーで調整する	
90	カバースリップを適用する	
91	[ディスカバリーパープルは COUNTERSTAIN#5 にあり、H2O2 は COUNTERSTAIN#6 にある]	20
92	[RF11: ディスカバリーパープル色素原は二滴の色素原を適用し 4 分間インキュベートする]	
93	[続く1滴の H2O2 及び選択可能なインキュベーション]	
94	二滴の COUNTERSTAIN 5 を適用し、カバースリップを適用し、4 分間インキュベートする	
95	一滴の COUNTERSTAIN 6 を適用し、[0 時間 40 分]間インキュベートする	
96	スライドを反応バッファーでリンスする	
97	スライド容量を反応バッファーで調整する	
98	カバースリップを適用する	
99	[36°C4 分間の SWII バッファー]	
100	[工程が「低 pH 酵素不活性化及び抗体溶出」と読まれる場合]	30
101	スライドを[42°C]に加温する(ストリンジェンシー洗浄#3)	
102	スライドをオプションでリンスする	
103	300ulのオプションを適用する	
104	カバースリップを適用する	
105	一滴の OPTION 8 を適用し、4 分間インキュベートする	
106	[32 分]間インキュベートする(ストリンジェンシー洗浄#3)	
107	スライドを反応バッファーでリンスする	
108	スライド容量を反応バッファーで調整する	
109	カバースリップを適用する	40

表10

110	(ブルーは CY5 キノンメチドである)	
111	スライドを反応バッファーでリンスする	
112	スライド容量を反応バッファーで調整する	
113	カバースリップを適用する	
114	スライドを反応バッファーでリンスする	
115	スライド容量を反応バッファーで調整する	
116	[一次 Ab に対して1滴の OPTION ディスペンサーの抗体ブロック及び共インキュベート]	
117	一滴の[OPTION 2] (オプション)を適用し、カバースリップを適用し、4 分間インキュベートする	10
118	[一次 Ab に対して1滴の OPTION ディスペンサーの抗体ブロック及び共インキュベート]	
119	カバースリップを適用する	
120	一滴の[ANTI-LCA] (DS一次抗体)を適用し、[0 時間 32 分]間インキュベートする	
121	スライドを反応バッファーでリンスする	
122	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
123	カバースリップを適用する	
124	スライドを反応バッファーでリンスする	
125	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
126	カバースリップを適用する	
127	スライドを反応バッファーでリンスする	20
128	スライド容量を反応バッファーで調整する	
129	[抗マウスリンカー-NP]	
130	一滴の抗マウス NP を適用し、カバースリップを適用し、[8 分]間インキュベートする	
131	スライドを反応バッファーでリンスする	
132	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
133	カバースリップを適用する	
134	スライドを反応バッファーでリンスする	
135	スライド容量を反応バッファーで調整する	
136	一滴の抗 NP AP を適用し、カバースリップを適用し、[8 分]間インキュベートする	30
137	スライドを反応バッファーでリンスする	
138	230ul+VA 反応バッファーを適用する	
139	カバースリップを適用する	
140	スライドを SSC でリンスする	
141	スライド容量を SSC で調整する	
142	カバースリップを適用する	
143	スライドを SSC でリンスする	

表10

144	スライド容量を SSC で調整する	
145	[COUNTERSTAIN#2 において pH 調整、COUNTERSTAIN#9 に CY5 キノンメチド]	
146	二滴の COUNTERSTAIN 2 を適用し、カバースリップを適用し、4 分間インキュベートする	
147	一滴の COUNTERSTAIN 9 を適用し、[0 時間 12 分]間インキュベートする	
148	スライドを反応バッファでリンスする	
149	スライド容量を反応バッファで調整する	
150	カバースリップを適用する	
151	スライドを EZ Prep でリンスする	10
152	スライド容量を EZ Prep で調整する	
153	一滴の[ヘマトキシリン II](対比染色)を適用し、カバースリップを適用し、(4 分)間インキュベートする	
154	スライドを EZ Prep でリンスする	
155	スライド容量を EZ Prep で調整する	
156	カバースリップを適用する	
157	スライドを反応バッファでリンスする	
158	スライド容量を反応バッファで調整する	
159	一滴の[BLUING REAGENT](対比染色後)を適用し、カバースリップを適用し、[4 分]間インキュベートする	20
160	スライドを反応バッファでリンスする	
161	カバースリップを適用する	
162	スライドヒーターをオフにする	

【 0 1 0 6 】

[更なる標的及び検出プローブ]

幾つかの実施態様では、ここに開示される多重アッセイ、キット、及び方法は、PD-L1 及び免疫細胞マーカーに加えて他の標的を検出することを含む。従って、幾つかの実施態様では、ここでのアッセイ、キット、及び方法は、以下に記載された更なる標的のような、更なる標的を検出するための更なる検出プローブ（例えば、核酸プローブ又は一次抗体又はそれらの任意の組み合わせ）を含む。幾つかの実施態様では、他の標的は、PD-L1 以外の腫瘍マーカーである。幾つかの実施態様では、アッセイ、キット、及び方法は、EGFR、HER2、HPV、ALK、BRAF、OX-40、PD-1、IDO-1、FoxP3、CD163、及びCTLA-4 の一又は複数に特異的な検出プローブを含みうる。当業者であれば、任意の数の更なる検出プローブを任意の多重アッセイ、キット又は方法に含めることができることが分かるであろう。当業者ならば、良好なコントラスト（ここで定義）をもたらすか又は色素原、フルオロフォアなどの任意の組み合わせを利用する検出試薬のような、更なる検出プローブを最もよく検出するための適切な検出試薬を選択することもできる。

【 0 1 0 7 】

本開示全体を通して、標的タンパク質が参照される場合、そのタンパク質に関連する核酸配列もまた標的として使用できることが理解される。幾つかの例では、標的は、例えばウイルスゲノム由来のような、ウイルス、細菌、又は細胞内寄生体などの病原体に由来するタンパク質又は核酸分子である。例えば、標的タンパク質は、疾患に関連する（例えば、相関する、因果関係に関与する等々）標的核酸配列から産生されうる。

【 0 1 0 8 】

幾つかの実施態様では、標的タンパク質は、新生物（例えば、がん）に関連する標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）によって産生される。新生物細胞、特にがん細胞、例えばB細胞及びT細胞白血病、リンパ腫、乳がん、結腸がん、神経学的がん等々において、多数の染色体異常（転座及び他の再構成、増幅又は欠失を含む）が同定されている

。従って、幾つかの実施態様では、標的分子の少なくとも一部が、試料中の細胞の少なくともサブセットにおいて増幅又は欠失された核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）によって産生される。

【0109】

がん遺伝子は幾つかのヒト悪性腫瘍の原因であることが知られている。例えば、染色体18q11.2の切断点領域に位置するS Y T遺伝子を含む染色体再構成は、滑膜肉腫軟部組織腫瘍の間で共通である。t(18q11.2)転座は、例えば、異なる標識を有するプローブを使用して同定することができる：第一のプローブは、S Y T遺伝子から遠位に伸びる標的核酸配列から生成されたF P C核酸分子を含み、第二のプローブは3'又はS Y T遺伝子の近位に伸びる標的核酸配列から生成されたF P C核酸を含む。これらの標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）に対応する検出プローブがインサイツハイブリダイゼーション手順において使用される場合、S Y T遺伝子領域にt(18q11.2)を欠く正常細胞が、S Y Tの二つのインタクトなコピーを反映する、（近接した二つのラベルによって作製される）二つの融合を示す。t(18q11.2)を有する異常細胞は単一の融合シグナルを示す。

10

【0110】

他の実施態様では、悪性細胞において欠損（喪失）している腫瘍抑制遺伝子である核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）から産生された標的タンパク質が選択される。例えば、染色体9p21上に位置するp16領域（D9S1749、D9S1747、p16（INK4A）、p14（ARF）、D9S1748、p15（INK4B）、及びD9S1752を含む）がある種の膀胱がんにおいて欠失される。1番染色体の短腕の遠位領域（例えば、SHGC57243、TP73、EGFL3、ABL2、ANGPTL1、及びSHGC-1322を包含する）及び19番染色体の動原体周囲領域（例えば、19p13-19q13）（例えば、MAN2B1、ZNF443、ZNF44、CRX、GLTSCR2、及びGLTSCR1を包含する）を含む染色体欠失は、中枢神経系のある種の固形腫瘍の特徴的な分子的特徴である。

20

【0111】

上述の例は、例証の目的のためにのみ提供されており、限定を意図するものではない。腫瘍性形質転換及び/又は増殖と相関する多数の他の細胞遺伝学的異常が当業者に知られている。腫瘍性形質転換と相関があり、開示された方法において有用である、核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）によって産生される標的タンパク質には、また、EGFR遺伝子（7p12；GENBANKTM受託番号NC-000007、ヌクレオチド55054219-55242525）、C-MYC遺伝子（8q24.21；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000008、ヌクレオチド128817498-128822856）、D5S271（5p15.2）、リボタンパク質リパーゼ（LPL）遺伝子（8p22；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000008、ヌクレオチド19841058-19869049）、RBI（13q14；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000013、ヌクレオチド47775912-47954023）、p53（17p13.1；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000017、補体、ヌクレオチド7512464-7531642）、N-MYC（2p24；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000002、補体、ヌクレオチド151835231-151854620）、CHOP（12q13；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000012、補体、ヌクレオチド56196638-56200567）、FUS（16p11.2；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000016、ヌクレオチド31098954-31110601）、FKHR（13p14；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000013、補体、ヌクレオチド40027817-40138734）、並びに、例えば：ALK（2p23；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000002、補体、ヌクレオチド29269144-29997936）、Ig重鎖、CCND1（11q13；例えば、GENBANKTM受託番号NC-000011、ヌクレオチド69165054-69178423）、BCL2（18

30

40

50

q 2 1 . 3 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 1 8、補 体、ヌ ク レ オ
 チ ド 5 8 9 4 1 5 5 9 - 5 9 1 3 7 5 9 3)、B C L 6 (3 q 2 7 ; 例 えば、G E N B A
 N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 0 3、補 体、ヌ ク レ オ チ ド 1 8 8 9 2 1 8 5 9 - 1 8 8
 9 4 6 1 6 9)、M A L F 1、A P 1 (1 p 3 2 - p 3 1 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M}
 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 0 1、補 体、ヌ ク レ オ チ ド 5 9 0 1 9 0 5 1 - 5 9 0 2 2 3 7 3
)、T O P 2 A (1 7 q 2 1 - q 2 2 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0
 0 0 1 7、補 体、ヌ ク レ オ チ ド 3 5 7 9 8 3 2 1 - 3 5 8 2 7 6 9 5)、T M P R S S (2 1 q 2 2 . 3 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 2 1、補 体、ヌ ク
 レ オ チ ド 4 1 7 5 8 3 5 1 - 4 1 8 0 1 9 4 8)、E R G (2 1 q 2 2 . 3 ; 例 えば、G
 E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 2 1、補 体、ヌ ク レ オ チ ド 3 8 6 7 5 6 7 1 -
 3 8 9 5 5 4 8 8) ; E T V 1 (7 p 2 1 . 3 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N
 C - 0 0 0 0 0 7、補 体、ヌ ク レ オ チ ド 1 3 8 9 7 3 7 9 - 1 3 9 9 5 2 8 9)、E W S
 (2 2 q 1 2 . 2 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 2 2、ヌ ク レ オ
 チ ド 2 7 9 9 4 2 7 1 - 2 8 0 2 6 5 0 5) ; F L I 1 (1 1 q 2 4 . 1 - q 2 4 . 3 ;
 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 1 1、ヌ ク レ オ チ ド 1 2 8 0 6 9 1
 9 9 - 1 2 8 1 8 7 5 2 1)、P A X 3 (2 q 3 5 - q 3 7 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M}
 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 0 2、補 体、ヌ ク レ オ チ ド 2 2 2 7 7 2 8 5 1 - 2 2 2 8 7 1
 9 4 4)、P A X 7 (1 p 3 6 . 2 - p 3 6 . 1 2 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番
 号 N C - 0 0 0 0 0 1、ヌ ク レ オ チ ド 1 8 8 3 0 0 8 7 - 1 8 9 3 5 2 1 9)、P T E N
 (1 0 q 2 3 . 3 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 1 0、ヌ ク レ オ
 チ ド 8 9 6 1 3 1 7 5 - 8 9 7 1 6 3 8 2)、A K T 2 (1 9 q 1 3 . 1 - q 1 3 . 2 ;
 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 1 9、補 体、ヌ ク レ オ チ ド 4 5 4 3
 1 5 5 6 - 4 5 4 8 3 0 3 6)、M Y C L 1 (1 p 3 4 . 2 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M}
 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 0 1、補 体、ヌ ク レ オ チ ド 4 0 1 3 3 6 8 5 - 4 0 1 4 0 2 7
 4)、R E L (2 p 1 3 - p 1 2 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0
 0 2、ヌ ク レ オ チ ド 6 0 9 6 2 2 5 6 - 6 1 0 0 3 6 8 2) 及 び C S F 1 R (5 q 3 3 -
 q 3 5 ; 例 えば、G E N B A N K ^{T M} 受 託 番 号 N C - 0 0 0 0 0 5、補 体、ヌ ク レ オ チ ド
 1 4 9 4 1 3 0 5 1 - 1 4 9 4 7 3 1 2 8) が 含 ま れ る。

【 0 1 1 2 】

他 の 例 で は、標 的 タ ン パ ク 質 は、疾 患 又 は 状 態 に 関 連 す る ウ イ ル ス 又 は 他 の 微 生 物 か ら
 選 択 さ れ る。細 胞 又 は 組 織 試 料 中 の ウ イ ル ス 又 は 微 生 物 由 来 標 的 核 酸 配 列 (例 えば、ゲ ノ
 ム 標 的 核 酸 配 列) の 検 出 は、生 物 の 存 在 を 示 す。例 えば、標 的 ペ プ チ ド、ポ リ ペ プ チ ド 又
 は タ ン パ ク 質 は、発 がん 性 又 は 病 原 性 ウ イ ル ス、細 菌 又 は 細 胞 内 寄 生 体 (例 えば、熱 帯 熱
 マ ラ リ ア 原 虫 (*Plasmodium falciparum*) 及 び 他 の プ ラ ス モ ジ ウ ム
 種、リ ー シ ュ マ ニ ア (種)、ク リ プ ト ス ポ リ ジ ウ ム ・ パ ル バ ム、エ ン ト ア メ ー バ ・ ヒ ス ト
 リ チ カ、及 び 鞭 毛 虫 (*Giardia lamblia*)、並 び に ト キ ソ プ ラ ズ マ、エ イ
 メ リ ア、タ イ レ リ ア、及 び バ ベ シ ア 種) の ゲ ノ ム か ら 選 択 さ れ う る。

【 0 1 1 3 】

幾 つか の 例 で は、標 的 タ ン パ ク 質 は、ウ イ ル ス ゲ ノ ム 由 来 の 核 酸 配 列 (例 えば、ゲ ノ ム
 標 的 核 酸 配 列) か ら 産 生 さ れ る。例 示 的 な ウ イ ル ス と 対 応 す る ゲ ノ ム 配 列 (カ ッ コ 内 に G
 E N B A N K ^{T M} - R e f S e q 受 託 番 号) は、ヒ ト ア デ ノ ウ イ ル ス A (N C - 0 0 1 4
 6 0)、ヒ ト ア デ ノ ウ イ ル ス B (N C - 0 0 4 0 0 1)、ヒ ト ア デ ノ ウ イ ル ス C (N C -
 0 0 1 4 0 5)、ヒ ト ア デ ノ ウ イ ル ス D (N C - 0 0 2 0 6 7)、ヒ ト ア デ ノ ウ イ ル ス E
 (N C - 0 0 3 2 6 6)、ヒ ト ア デ ノ ウ イ ル ス F (N C - 0 0 1 4 5 4)、ヒ ト ア ス ト ロ
 ウ イ ル ス (N C - 0 0 1 9 4 3)、ヒ ト B K ポ リ オ ー マ ウ イ ル ス (V 0 1 1 0 9 ; G I :
 6 0 8 5 1) ヒ ト ボ カ ウ イ ル ス (N C - 0 0 7 4 5 5)、ヒ ト コ ロ ナ ウ イ ル ス 2 2 9 E (N C -
 0 0 2 6 4 5)、ヒ ト コ ロ ナ ウ イ ル ス H K U 1 (N C - 0 0 6 5 7 7)、ヒ ト コ ロ
 ナ ウ イ ル ス N L 6 3 (N C - 0 0 5 8 3 1)、ヒ ト コ ロ ナ ウ イ ル ス O C 4 3 (N C - 0 0
 5 1 4 7)、ヒ ト エ ン テ ロ ウ イ ル ス A (N C - 0 0 1 6 1 2)、ヒ ト エ ン テ ロ ウ イ ル ス B
 (N C - 0 0 1 4 7 2)、ヒ ト エ ン テ ロ ウ イ ル ス C (N C - 0 0 1 4 2 8)、ヒ ト エ ン テ

ロウイルスD (NC - 001430)、ヒトエリスロウイルスV9 (NC - 004295)、ヒト泡沫状ウイルス (NC - 001736)、ヒトヘルペスウイルス1 (単純ヘルペスウイルス1型) (NC - 001806)、ヒトヘルペスウイルス2 (単純ヘルペスウイルス2型) (NC - 001798)、ヒトヘルペスウイルス3 (水痘帯状疱疹ウイルス) (NC - 001348)、ヒトヘルペスウイルス4 1型 (エプスタイン - バーウイルス1型) (NC - 007605)、ヒトヘルペスウイルス4 2型 (エプスタイン - バーウイルス2型) (NC - 009334)、ヒトヘルペスウイルス5株AD169 (NC - 001347)、ヒトヘルペスウイルス5株Merlin Strain (NC - 006273)、ヒトヘルペスウイルス6A (NC - 001664)、ヒトヘルペスウイルス6B (NC - 000898)、ヒトヘルペスウイルス7 (NC - 001716)、ヒトヘルペスウイルス8 M型 (NC - 003409)、ヒトヘルペスウイルス8 P型 (NC - 009333)、ヒト免疫不全ウイルス1 (NC - 001802)、ヒト免疫不全ウイルス2 (NC - 001722)、ヒトメタニューモウイルス (NC - 004148)、ヒトパピローマウイルス - 1 (NC - 001356)、ヒトパピローマウイルス - 18 (NC - 001357)、ヒトパピローマウイルス - 2 (NC - 001352)、ヒトパピローマウイルス - 54 (NC - 001676)、ヒトパピローマウイルス - 61 (NC - 001694)、ヒトパピローマウイルス - cand90 (NC - 004104)、ヒトパピローマウイルスRTRX7 (NC - 004761)、ヒトパピローマウイルス10型 (NC - 001576)、ヒトパピローマウイルス101型 (NC - 008189)、ヒトパピローマウイルス103型 (NC - 008188)、ヒトパピローマウイルス107型 (NC - 009239)、ヒトパピローマウイルス16型 (NC - 001526)、ヒトパピローマウイルス24型 (NC - 001683)、ヒトパピローマウイルス26型 (NC - 001583)、ヒトパピローマウイルス32型 (NC - 001586)、ヒトパピローマウイルス34型 (NC - 001587)、ヒトパピローマウイルス4型 (NC - 001457)、ヒトパピローマウイルス41型 (NC - 001354)、ヒトパピローマウイルス48型 (NC - 001690)、ヒトパピローマウイルス49型 (NC - 001591)、ヒトパピローマウイルス5型 (NC - 001531)、ヒトパピローマウイルス50型 (NC - 001691)、ヒトパピローマウイルス53型 (NC - 001593)、ヒトパピローマウイルス60型 (NC - 001693)、ヒトパピローマウイルス63型 (NC - 001458)、ヒトパピローマウイルス6b型 (NC - 001355)、ヒトパピローマウイルス7型 (NC - 001595)、ヒトパピローマウイルス71型 (NC - 002644)、ヒトパピローマウイルス9型 (NC - 001596)、ヒトパピローマウイルス92型 (NC - 004500)、ヒトパピローマウイルス96型 (NC - 005134)、ヒトパラインフルエンザウイルス1 (NC - 003461)、ヒトパラインフルエンザウイルス2 (NC - 003443)、ヒトパラインフルエンザウイルス3 (NC - 001796)、ヒトパレコウイルス (NC - 001897)、ヒトパルボウイルス4 (NC - 007018)、ヒトパルボウイルスB19 (NC - 000883)、ヒト呼吸器多核体ウイルス (NC - 001781)、ヒトライノウイルスA (NC - 001617)、ヒトライノウイルスB (NC - 001490)、ヒトスプーマレトロウイルス (NC - 001795)、ヒトTリンパ球向性ウイルス1 (NC - 001436)、ヒトTリンパ球向性ウイルス2 (NC - 001488)を含む。

【0114】

所定の例では、標的タンパク質は、エプスタイン - バーウイルス (EBV) 又はヒトパピローマウイルス (HPV、例えば、HPV16、HPV18) などの発がんウイルス由来の核酸配列 (例えば、ゲノム標的核酸配列) から産生される。他の例では、核酸配列 (例えば、ゲノム標的核酸配列) から産生される標的タンパク質は、病原性ウイルス、例えば呼吸器多核体ウイルス、肝炎ウイルス (例えば、C型肝炎ウイルス)、コロナウイルス (例えば、SARSウイルス)、アデノウイルス、ポリオーマウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、又は単純ヘルペスウイルス (HSV) 由来である。

【0115】

10

20

30

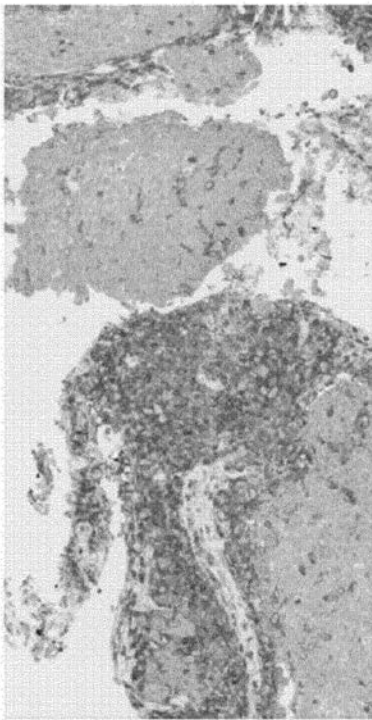
40

50

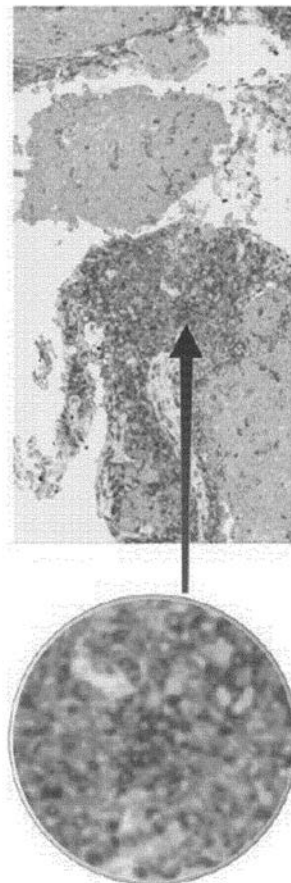
[更なる特定の実施態様]

本発明を、特定の実施態様を参照して説明したが、これらの実施態様は、本発明の原理及び用途の単なる例示であることを理解されたい。従って、例示的な実施態様に多くの変更を加えることができ、添付の特許請求の範囲によって定まる本発明の精神及び範囲から逸脱することなく他の構成を案出しうるということが理解される。

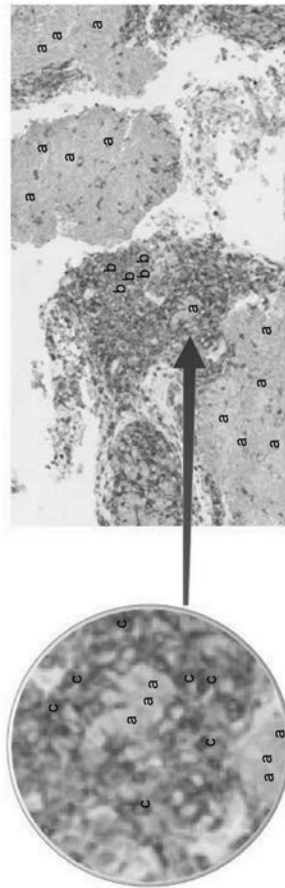
【 図 1 A 】



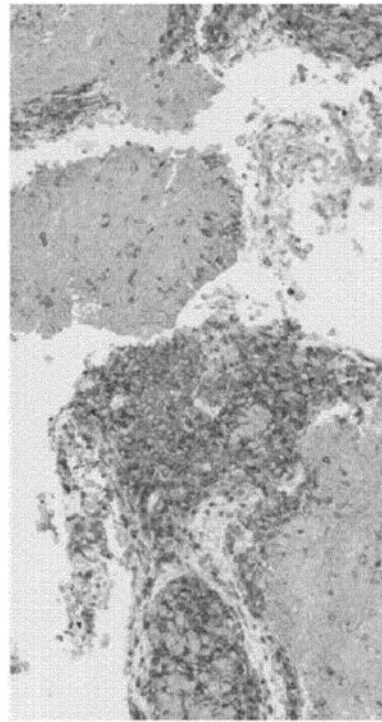
【 図 1 B 】



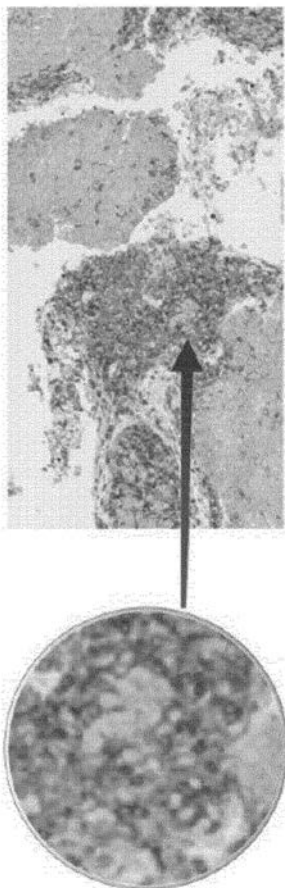
【図 1 C】



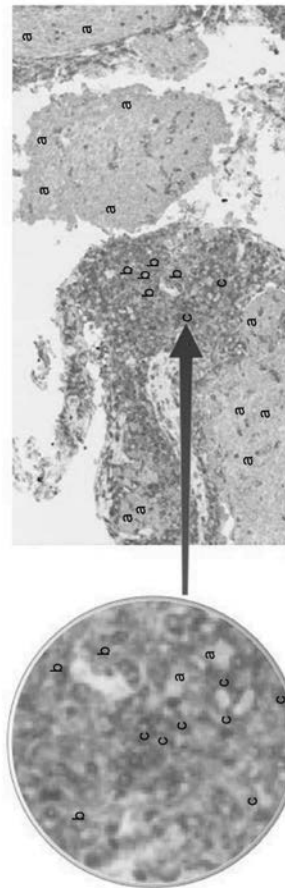
【図 2 A】



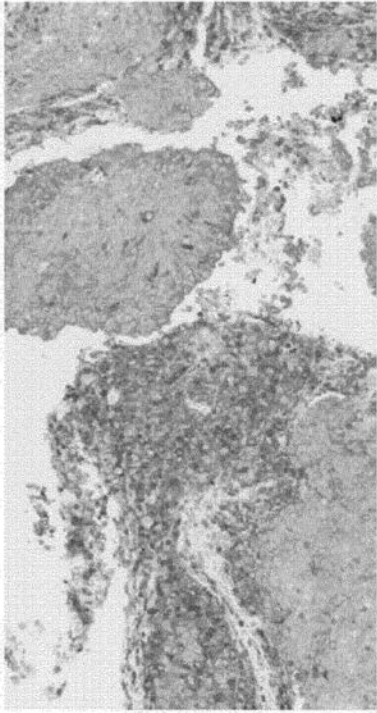
【図 2 B】



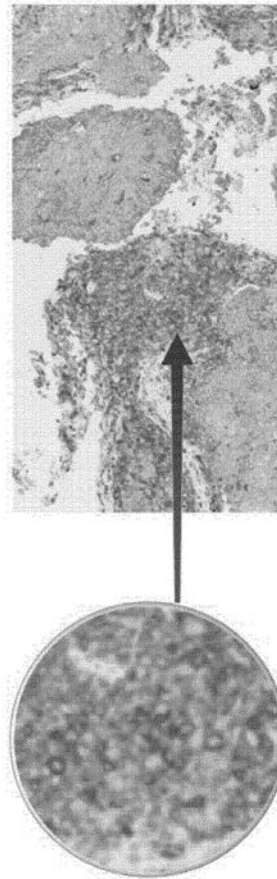
【図 2 C】



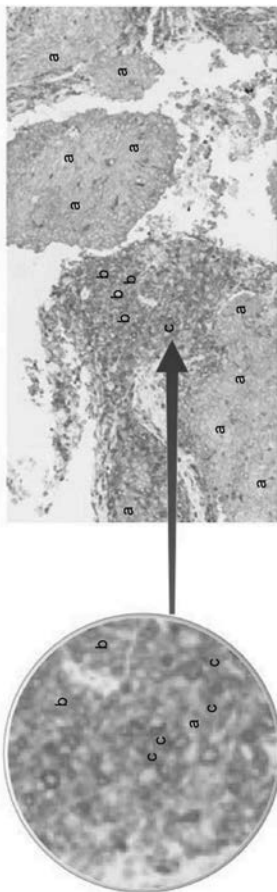
【図 3 A】



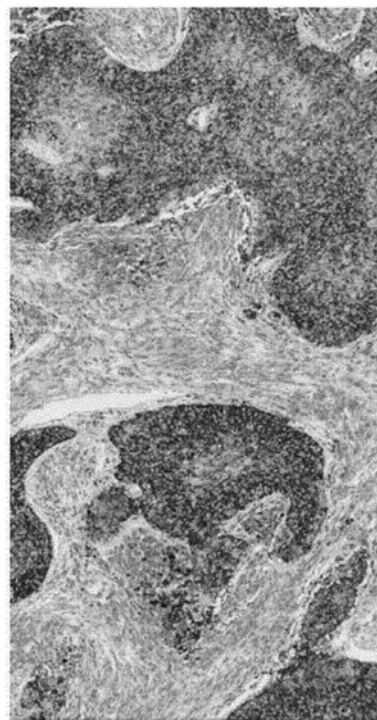
【図 3 B】



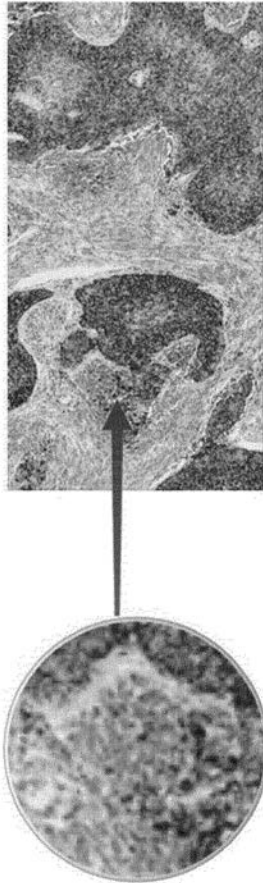
【図 3 C】



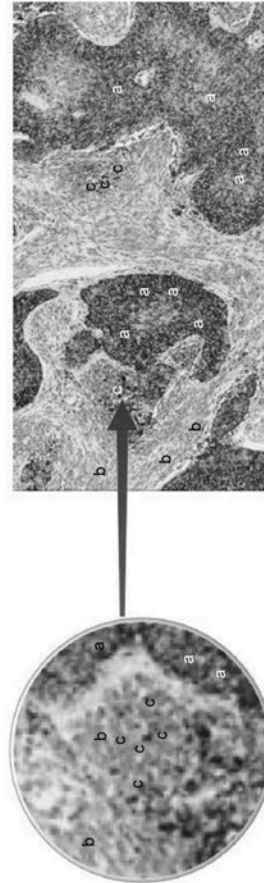
【図 4 A】



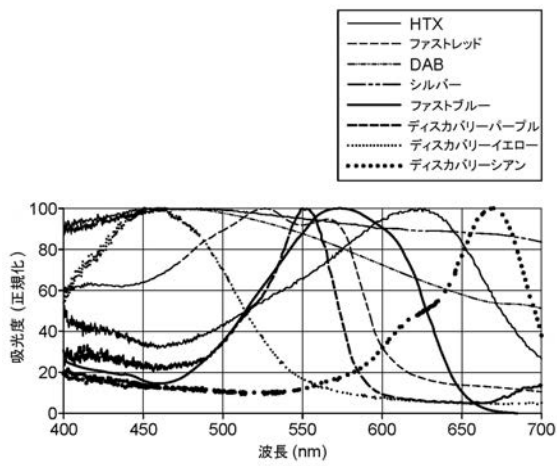
【図 4 B】



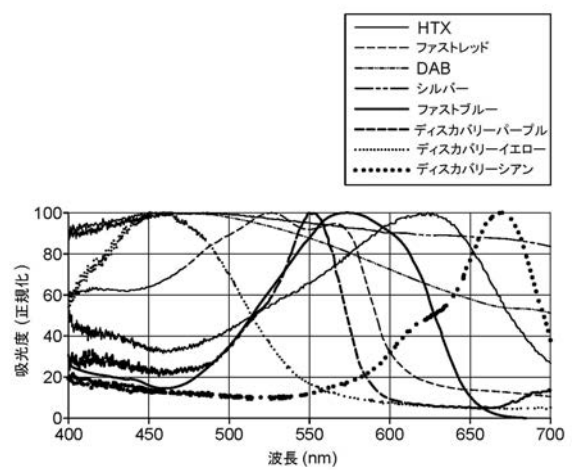
【図 4 C】



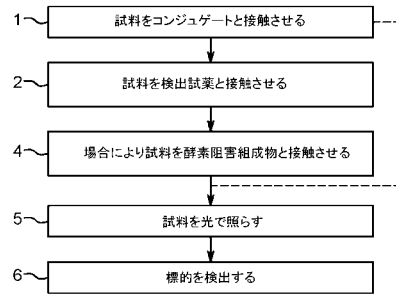
【図 5 A】



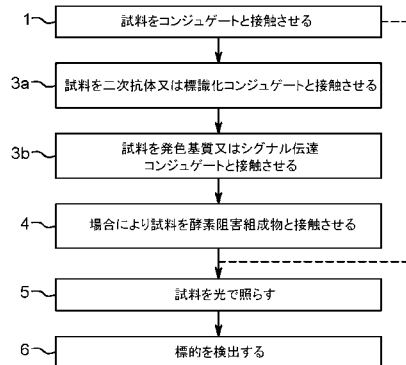
【図 5 B】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

2018536163000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/078237

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/30 G01N33/50 G01N33/569 G01N33/574
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C07K

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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	B. J. CHEN ET AL: "PD-L1 Expression Is Characteristic of a Subset of Aggressive B-cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 13, 14 May 2013 (2013-05-14), pages 3462-3473, XP055338763, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0855 pages 4-5; figures 2,4 ----- -/--	1-42

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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 combined 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

22 March 2017

Date of mailing of the international search report

31/03/2017

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

Lunter, Pim

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/078237

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PAUL C. TUMEH ET AL: "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance", NATURE, vol. 515, no. 7528, 27 November 2014 (2014-11-27), pages 568-571, XP055247294, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature13954 page 570; figure S5a -----	1-46
Y	GHEBEH H ET AL: "The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-stimulatory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors", NEOPLASIA, NEOPLASIA PRESS, ANN ARBOR, MI, US, vol. 8, no. 3, 3 April 2006 (2006-04-03), pages 190-198, XP008091677, ISSN: 1522-8002, DOI: 10.1593/NEO.05733 page 3; figure 2 -----	1-42
Y	GHEBEH HAZEM ET AL: "FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 8, no. 1, 23 February 2008 (2008-02-23), page 57, XP021034690, ISSN: 1471-2407 page 3; figure 4 -----	1-42
Y	T. K. CHOUEIRI ET AL: "Correlation of PD-L1 Tumor Expression and Treatment Outcomes in Patients with Renal Cell Carcinoma Receiving Sunitinib or Pazopanib: Results from COMPARZ, a Randomized Controlled Trial", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 21, no. 5, 23 December 2014 (2014-12-23), pages 1071-1077, XP055338684, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1993 page 1073; figure 1 page 1074 - page 1075 ----- -/--	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/078237

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C. SHEN ET AL: "Impaired ICOSL in human myeloid dendritic cells promotes Th2 responses in patients with allergic rhinitis and asthma", CLINICAL & EXPERIMENTAL ALLERGY : JOURNAL OF THE BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 44, no. 6, 24 May 2014 (2014-05-24), pages 831-841, XP055339182, UK ISSN: 0954-7894, DOI: 10.1111/cea.12308 page 833 figure 2	1-22
Y	----- Anonymous: "Dual IHC on Discovery Ultra Research Instrument", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055337858, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ventana.com/researchprotoco ls [retrieved on 2017-01-23] the whole document	1-22
Y	----- Anonymous: "Dual IHC on Discovery Ultra Research Instrument", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055337860, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ventana.com/researchprotoco ls [retrieved on 2017-01-23] the whole document	1-22
Y	----- WO 2015/124703 A1 (VENTANA MED SYST INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 27 August 2015 (2015-08-27) page 10, line 19 - line 28 page 11, lines 1-2 page 11, line 28	1,8,13, 18
Y	----- WO 2012/003476 A2 (VENTANA MED SYST INC [US]; MURILLO ADRIAN E [US]; KOSMEDER JEROME W [U]) 5 January 2012 (2012-01-05) page 11, line 1 - line 3 ----- -/--	1,8,13, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/078237

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHUAN-YONG MU ET AL: "High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation", MEDICAL ONCOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NEW YORK, vol. 28, no. 3, 6 April 2010 (2010-04-06), pages 682-688, XP019937695, ISSN: 1559-131X, DOI: 10.1007/S12032-010-9515-2 page 686; figure 4 abstract	23-42
Y	----- YUNMEI LIAO ET AL: "VSIG4 expression on macrophages facilitates lung cancer development", LABORATORY INVESTIGATION, vol. 94, no. 7, 26 May 2014 (2014-05-26), pages 706-715, XP055357214, The United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. ISSN: 0023-6837, DOI: 10.1038/labinvest.2014.73 abstract page 709 - page 710; figure 4	23-42
Y	----- WO 2015/088930 A1 (MERCK SHARP & DOHME [US]; PIERCE ROBERT H [US]; YEARLEY JENNIFER H [US]) 18 June 2015 (2015-06-18) paragraph [0044]; example 2	23-46
Y	----- WO 2015/013388 A2 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 29 January 2015 (2015-01-29) page 8, line 4 - line 9; figure 6a page 70, line 16 - line 27	23-42
Y	----- WO 2014/194293 A1 (AMPLIMUNE INC [US]) 4 December 2014 (2014-12-04) page 29, line 4 - line 13; example 2 page 53, line 16 - line 19 page 66, line 3 - line 5 page 44, line 1 - line 2	23-46
Y	----- WO 2013/173223 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]) 21 November 2013 (2013-11-21) pages 3-5 page 9, line 10 page 15, lines 18-28 page 35, line 3 - line 5 page 76, line 7 - line 18 page 77, line 22 - line 25 page 81, line 25 - line 32 page 83, line 32 - page 84, line 3	23-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/078237**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.:

1-46

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 Application No. PCT/ EP2016/ 078237

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-22

Kit

2. claims: 23-46

Method of identifying tumor infiltrating PD-L1 positive immune cells in PD-L1 positive tumors; Method of predicting a response to a PD-1 axis targeted therapy; Method of treating a patient having a tumour

3. claims: 47-81

System for identifying tumor infiltrating PD-L1 positive immune cells in PD-L1 positive tumours

4. claims: 82-91

System for predicting a response to a PD-1 targeted therapy

5. claims: 92-94

System for differentiating PD-L1 positive tumor cells from PD-L1 positive immune cells

6. claims: 95-97

System for identifying PD-L1 positive tumor cells, PD-L1 negative tumor cells, PD-L1 positive immune cells, and/or PD-L1 negative immune cells

7. claims: 98-106

System for identifying at least one of PD-L1 positive tumor cells, PD-L1 negative tumor cells

8. claims: 107-110

Computer system

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/078237

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015124703 A1	27-08-2015	AU 2015220750 A1 CA 2940439 A1 EP 3111224 A1 WO 2015124703 A1	21-07-2016 27-08-2015 04-01-2017 27-08-2015
WO 2012003476 A2	05-01-2012	AU 2011274369 A1 CA 2800936 A1 EP 2588443 A2 JP 2013531801 A US 2013109019 A1 WO 2012003476 A2	06-12-2012 05-01-2012 08-05-2013 08-08-2013 02-05-2013 05-01-2012
WO 2015088930 A1	18-06-2015	EP 3079772 A1 US 2016305947 A1 WO 2015088930 A1	19-10-2016 20-10-2016 18-06-2015
WO 2015013388 A2	29-01-2015	AU 2014293154 A1 AU 2014293155 A1 CA 2918780 A1 CA 2919473 A1 CN 105611947 A CN 105916878 A EP 3024496 A2 EP 3024850 A2 JP 2016531904 A JP 2016534093 A US 2016168236 A1 US 2016215052 A1 WO 2015013388 A2 WO 2015013389 A2	18-02-2016 18-02-2016 29-01-2015 29-01-2015 25-05-2016 31-08-2016 01-06-2016 01-06-2016 13-10-2016 04-11-2016 16-06-2016 28-07-2016 29-01-2015 29-01-2015
WO 2014194293 A1	04-12-2014	NONE	
WO 2013173223 A1	21-11-2013	AU 2013263076 A1 CA 2873402 A1 CN 104470949 A EA 201492105 A1 EP 2850102 A1 HK 1203971 A1 JP 2015518826 A KR 20150020189 A SG 10201700698W A SG 11201407190T A US 2013309250 A1 US 2015125463 A1 US 2016090417 A1 WO 2013173223 A1	22-01-2015 21-11-2013 25-03-2015 30-06-2015 25-03-2015 06-11-2015 06-07-2015 25-02-2015 27-02-2017 30-12-2014 21-11-2013 07-05-2015 31-03-2016 21-11-2013

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, ST, 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, DJ, 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, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

专利名称(译)	用于鉴定PD-L1阳性肿瘤组织中的免疫细胞的方法		
公开(公告)号	JP2018536163A	公开(公告)日	2018-12-06
申请号	JP2018526566	申请日	2016-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统，墨水。		
[标]发明人	バーチチャンドラーモーガン		
发明人	バーチ, チャンドラー モーガン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	G01N33/574 C07K16/2812 C07K16/2815 C07K16/2818 C07K16/2827 C07K16/2863 C07K16/289 C07K16/2896 C07K16/32 G01N1/30 G01N1/312 G01N21/6428 G01N33/5091 G01N33/56966 G01N33/582 G01N2035/00138 G01N2333/70532 G01N2333/70578 G01N2333/70589 G01N2333/70596 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y A61K39/395.N A61P35/00		
F-TERM分类号	4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/EE01		
优先权	62/258493 2015-11-22 US		
其他公开文献	JP2018536163A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及多重测定，试剂盒和方法，包括用于鉴定组织样品中PD-L1阳性免疫细胞，PD-L1阳性肿瘤细胞和PD-L1阴性免疫细胞的自动化方法。[选型图]图1A



FIG. 1A