

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 519796

(P2003 - 519796A)

(43)公表日 平成15年6月24日(2003.6.24)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード [*] (参考) |
|--------------------------|------|---------------|--------------------------|
| G 0 1 N 33/48 | | G 0 1 N 33/48 | P 2 G 0 4 5 |
| 21/27 | | 21/27 | A 2 G 0 5 9 |
| | | | F |
| 33/483 | | 33/483 | C |
| 33/53 | | 33/53 | D |

審査請求 有 予備審査請求(全 43数) 最終頁に続く

| | |
|-------------|---------------------------------|
| (21)出願番号 | 特願2001 - 552090(P2001 - 552090) |
| (86)(22)出願日 | 平成13年1月12日(2001.1.12) |
| (85)翻訳文提出日 | 平成14年7月11日(2002.7.11) |
| (86)国際出願番号 | PCT/US01/01438 |
| (87)国際公開番号 | W001/051928 |
| (87)国際公開日 | 平成13年7月19日(2001.7.19) |
| (31)優先権主張番号 | 60/176,514 |
| (32)優先日 | 平成12年1月12日(2000.1.12) |
| (33)優先権主張国 | 米国(US) |
| (31)優先権主張番号 | 60/176,515 |
| (32)優先日 | 平成12年1月12日(2000.1.12) |
| (33)優先権主張国 | 米国(US) |

| | |
|---------|---|
| (71)出願人 | ヴェンタナ メディカル システムズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 アリゾナ州 85737 ツーソン イノヴェーション パーク ドライブ 1910 |
| (72)発明者 | バッカス、サラ エス. アメリカ合衆国 イリノイ州 60521 ヒンスデール インディアン トレール 1222 |
| (74)代理人 | 弁理士 三好 秀和 (外1名) |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 画像分析によるタンパク質の定量法

(57)【要約】

本発明は、標的細胞の免疫組織化学的染色の使用および細胞の光学密度の決定による組織または細胞サンプル中の1つまたは複数の標的タンパク質の発現レベルの決定法を提供する。前記光学密度を、標的タンパク質の発現レベルが既知のコントロール細胞から作成した校正曲線と比較する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 標的タンパク質に指向する検出可能に標識した抗体を使用してサンプルおよび少なくとも第1のコントロール細胞ペレットおよび第2のコントロール細胞ペレット中の細胞を免疫組織学的に染色する工程であって、前記第1および第2のコントロール細胞ペレット中の標的タンパク質の発現レベルは既知であり、前記第1および第2のコントロール細胞ペレット中の標的タンパク質の発現レベルは同一ではなく、

(b) 工程(a)で染色した前記サンプルならびに前記第1および第2のコントロール細胞ペレット中の染色細胞の光学密度を決定する工程と、

(c) 前記細胞ペレットの細胞中の既知の標的タンパク質量を使用して前記染色した第1および第2のコントロール細胞ペレットに関する校正曲線を作成する工程と、

(d) 工程(c)で作成した校正曲線を用いた前記サンプル中の染色細胞の光学密度と前記標的タンパク質量との比較によって前記生体サンプル中の細胞の標的タンパク質の発現量を決定する工程とを包含する、細胞を含む生体サンプル中の標的タンパク質の発現レベルの決定法。

【請求項2】 前記標的タンパク質が動物の悪性細胞中で特異的に発現するタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記標的タンパク質が、HER-2/neu、HER-3、HER-4、エストロゲン受容体、前立腺特異的抗原、EGFR、AKT、p13キナーゼ、およびMAPキナーゼである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記細胞ペレットが培養細胞株から調製される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記培養細胞株が一定量の前記標的タンパク質を発現する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記細胞ペレット中の標的タンパク質量が免疫組織化学的に決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記標的タンパク質量をELISAアッセイによって決定する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記標的タンパク質量を前記細胞ペレット中のタンパク質量に基準化する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記標的タンパク質量を細胞あたりの前記標的タンパク質量に基準化する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 前記校正曲線による標的タンパク質量を細胞あたりの分子数で示す、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 前記生体サンプル細胞染色の光学密度を画像分析を使用して決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記画像分析を、各シグナルが前記生体サンプル中の細胞を染色するために使用した多数の染色物質の1つに特異的なように染色生体サンプルの光学密度を含むシグナルを異なる吸光度および透過性を有する光学フィルターを使用して処理した多数のシグナルへの分配によって行う、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記検出可能な標識がクロマゲン(chromagen)または蛍光発色団である、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記第1および第2の細胞ペレット中の前記標的タンパク質の発現レベルをELISAによって決定する、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本出願は、2000年1月12日に提出された、米国特許仮出願番号60/176,514および60/176,515（各開示が明白に本明細書中で参考として援用される）の継続出願である。

【0002】

（発明の背景）

1．発明の分野

本発明は、組織または細胞サンプル中の標的タンパク質の発現レベルの決定法に関する。特に、本発明は、画像分析を使用した組織または細胞サンプル中の標的タンパク質の発現レベルの決定法に関する。

【0003】**2．発明の背景**

臨床医の癌診断補助において、病理学者は2つの重要な問題に直面する。第1に、病理学者は、患者から採取した組織または細胞サンプルが良性か悪性かを決定しなければならない。第2に、組織または細胞サンプルが悪性であると決定された場合、病理学者は癌の病原性を分類し、その臨床および生物学的拳動を決定しなければならない。

【0004】

患者から採取した組織または細胞サンプルの組織学的試験によって癌診断を確認しなければならない。このような組織学的試験には、組織の形態学的特徴が光学顕微鏡下で容易に試験可能な組織染色が必要である。病理学者は、染色組織または細胞サンプルの試験後、組織またはサンプルを採取した患者の状態および組織が良性または悪性のどちらかであるかを定性的に決定する。しかし、腫瘍の病原性を標準的な組織学的技術を使用して確認することは困難である。臨床医は、癌治療の耐性または応答性と治療法の選択による患者の潜在的悪影響とのバランスを保ちながら、病理学者の組織学的分析結果を使用して適切な治療を選択する（Mussら、194、N Engl J Med.、330、1260～66）。

【0005】

自動化（コンピュータ支援）画像分析システムの使用による組織および細胞サンプルの目視検査が増大している。代表的なシステムには、テレビカメラから組織または細胞サンプルの拡大画像を受信して受信した光学顕微鏡像を処理するコンピュータが含まれる。一般に、画像分析を使用して種々の生物マーカーに対する染色物質の親和性を評価する。適切な親和性染色物質の例には、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、HER-2/neuタンパク質、および上皮増殖因子受容体（EGFR）に指向するクロマゲン（chromagen）標識モノクローナル抗体が含まれる。

【0006】

親和性染色とコンピュータ支援画像分析との組み合わせにより、臨床医は患者に最適な治療（例えば、ERおよびPR陽性の癌のホルモン治療および抗癌遺伝子受容体療法（HER-2/neu（ヘルセプチン（商標））、EGFR、またはC255（商標）のみに指向するモノクローナル抗体または化学療法との組み合わせなどを使用））をより良好に選択することができる。さらに、画像分析技術を使用して、他の受容体（erbB受容体ファミリー（HER-1、HER-2/neu、HER-3、およびHER-4）中の受容体など）、そのリガンド（EGF、NDF、およびTGF）、および下流シグナル（PI3キナーゼ、Akt、MAPキナーゼ、およびJUNキナーゼ）を定量することができる（NISHコンセンサス開発会議：乳癌におけるステロイド受容体、1979、第2巻6号；Krausら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、86、9193～97；Mendelsohn、1990、Semin. Cancer Biol. 1:339～44；Hancockら、1991、Cancer Res. 51:4575～80；Pelešら、1991、EMBO J. 10:2077～86；Pelešら、1992、Cell 69:205～16；Arteagaら、1994、Cancer Res. 54:3758～65；Pietrasら、1994、Oncogene 9:1829～38；Baselgaら、1999、AACR NCI EORTC国際会議議事録、要約書98；Cobleighら、1999、J. Clin. O

ncol.17:2639~48; DiGiovanna、1999、PPO Updates: Princ. Practice Oncol. 13:1~9; Shak、1999、Semin. Oncol. 26:71~77; Sliwkowski、1999、Semin. Oncol. 26:60~70; Vincentら、2000、Cancer Chemother. Pharmacol. 45:231~38)。

【0007】

腫瘍サンプルを免疫組織化学分析のみを使用して試験する場合、腫瘍細胞によって発現される特異的標的タンパク質の正確な定量は、腫瘍サンプルと共に患者から採取された正常な組織の存在によって妨げられる。癌治療の生物学的アプローチ（モノクローナル抗体またはキナーゼインヒビターの使用など）は、腫瘍サンプル中の特異的標的タンパク質の正確な定量に依存する。例えば、HER-2/neu抗体であるヘルセプチン（商標）の有効性は、腫瘍細胞中で発現されるHER-2/neuの量に依存することが示されている（表1）。

【0008】

組織または細胞サンプル中の標的タンパク質の発現レベルのより正確な決定法の開発が当該分野で必要とされている。このような方法の開発は、癌治療に広く適用されるであろう。

【0009】

（発明の要約）

本発明は、組織または細胞サンプル中の標的タンパク質の発現レベルの決定法を提供する。本発明は、特に、画像分析を使用した組織または細胞サンプル中の標的タンパク質の発現レベルの決定法を提供する。本発明の方法では、コンピュータ支援画像分析システムを使用して免疫組織化学的に染色した組織または細胞サンプルの光学顕微鏡像を拡大および処理し、染色組織または細胞サンプルの光学密度を決定する。

【0010】

本発明の1つの方法では、サンプル細胞中の標的タンパク質の発現レベルを、標的タンパク質に指向する検出可能に標識した抗体を使用したサンプル中の細胞

および少なくとも第1のコントロール細胞および第2のコントロール細胞の免疫組織化学的染色（ここで、前記第1および第2のコントロール細胞中の標的タンパク質の発現レベルが既知であり、前記第1および第2のコントロール細胞中の標的タンパク質の発現レベルが同一ではない）、前記染色サンプル細胞ならびに染色された第1および第2のコントロール細胞の光学密度の決定、前記第1および第2のコントロール細胞の光学密度の決定値からの校正曲線の作成、および作成した前記校正曲線を使用した前記サンプル細胞中の標的タンパク質の発現レベルの決定、によって決定する。好ましい実施形態では、検出可能な標識は、クロマゲン（chromagen）または蛍光発色団である。

【0011】

本発明の方法は、先行技術で開示された技術を超えるいくつかの利点を提供する。例えば、本発明の方法では、標的タンパク質の発現レベルを組織サンプルの腫瘍細胞中（患者から腫瘍サンプルと共に採取した正常な組織以外）でアッセイすることができるので、組織サンプル中の特異的標的タンパク質がより有意義に定量される。さらに、本発明の方法は、染色条件のばらつきによる細胞染色の変化に関連する問題を克服する（例えば、標的タンパク質の発現レベルがELS Aアッセイで決定される場合、図1A～1Dを参照のこと）。

【0012】

本発明特に好ましい実施形態は、以下の一定の好ましい実施形態および特許請求の範囲のより詳細な説明によって明らかとなる。

【0013】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

本発明の方法は、画像分析を用いた組織または細胞サンプル中の標的タンパク質の発現レベルの正確な決定に有用である。具体的には、本発明は、免疫組織化学的に染色した組織または細胞サンプルの光学顕微鏡像を拡大および処理し、染色した組織または細胞サンプルの光学密度を決定するためのコンピュータ支援画像分析システムを使用した組織または細胞サンプル中の標的タンパク質の発現レベルの決定法を提供する。より詳細には、本発明は、患者から採取した組織または細胞サンプルの腫瘍細胞中の標的タンパク質の発現レベルの決定法を提供する

。

【0014】

本発明の方法の1つの実施形態では、サンプル細胞中の標的タンパク質の発現レベルを、標的タンパク質に指向する検出可能に標識した抗体を使用したサンプル中の細胞および少なくとも第1のコントロール細胞ペレットおよび第2のコントロール細胞ペレットの免疫組織化学的染色（ここで、前記第1および第2のコントロール細胞ペレット中の標的タンパク質の発現レベルが既知であり（例えば、特にELISAなどの当該分野で公知の方法による決定後）、前記第1および第2のコントロール細胞ペレット中の標的タンパク質の発現レベルが同一ではない）；前記染色サンプル細胞ならびに染色された第1および第2のコントロール細胞ペレットの光学密度の決定、前記第1および第2のコントロール細胞ペレットの光学密度の決定値からの校正曲線の作成、および作成した前記校正曲線を使用した前記サンプル細胞中の標的タンパク質の発現レベルの決定によって決定する。好ましい実施形態では、検出可能な標識は、クロマゲン（chromagen）または蛍光発色団である。

【0015】

本発明の方法の実施では、生体サンプル中の標的タンパク質量を、標的タンパク質特異的染色の量および程度とサンプル中の標的タンパク質量とを比較する校正曲線を使用して定量する（すなわち、量を決定する）。これを、細胞、最も好ましくは高い精度および正確さで決定することができる一定量の標的タンパク質を産生する培養細胞株の使用によって行うことが最も一般的である。好ましい実施形態では、異なる量の標的タンパク質を発現する多数の細胞集団をアッセイする。このような細胞集団を使用して、異なる細胞集団中の標的タンパク質量の変化に関連する標的タンパク質特異的染色量を決定する。ELISAおよび本明細書中に記載の画像分析によってHER-2/neu量を比較するこのような較正実験の結果の例を表7に示す。一定の好ましい実施形態では、標的タンパク質特異的染色を、総細胞タンパク質量に関して基準化するか、または示して、生体組織、好ましくは腫瘍細胞、最も好ましくは悪性腫瘍細胞を測定することが都合がよい（細胞数の決定は実用的ではないか信頼できない）。本発明の実施では、標

的タンパク質特異的染色と細胞中で発現した標的タンパク質量との相関関係を、標的タンパク質特異的染色に関連する物理的パラメータ、最も好ましくは光学密度に対して標的タンパク質量を比較した校正曲線として示す。本発明の方法を使用して作成した校正曲線を、アルゴリズム、最も好ましくは一次関数式または対数式の形態で示すことも有利である。

【0016】

標的タンパク質を、それ自体が標識された特定の試薬（最も好ましくは抗体）を使用するか、非標識の評定タンパク質特異的抗体および検出可能に標識され、且つ標的タンパク質特異的抗体を認識する第2の抗体を使用して検出することができる。あるいは、検出可能に標識され、且つ標的タンパク質に特異的に結合する任意の分子を本発明で使用することができる。本発明の方法の好ましい実施形態では、2成分免疫組織化学的染色系を使用して、染色タンパク質を対比染色組織または細胞サンプルとより容易に区別することが出来るように標的タンパク質および組織または細胞サンプルを個別に染色する。例えば、標的タンパク質を、ジアミノベンジン（DAB）を使用して染色し、組織または細胞サンプルをエチルグリーンまたはメチレンブルーを使用して対比染色することができる。免疫組織化学的染色後、コンピュータ支援画像分析システムによって作成した組織または細胞サンプルの光学顕微鏡像を光学顕微鏡で拡大し、1組の画像に分割する。分割した画像を1組の光学フィルター（一方は、染色に対応する最大吸収を有し、他方は対比染色に対応する最大吸収を有する）を使用して増強する。本発明の方法の他の実施形態では、複数の画像分析フィルターを使用して、種々の成分（例えば、膜、細胞質、および核）中の異なる細胞タンパク質の染色レベルを検出、識別、および定量する。

【0017】

本発明の方法の好ましい実施形態では、染色物質および対比染色物質のロットのばらつきを、サンプル細胞ならびに第1および第2のコントロール細胞ペレットの染色に同一の試薬を使用することによって制御することができる。本発明の方法の別の好ましい実施形態では、染色工程における環境の相違およびばらつきを、サンプルならびに第1および第2のコントロール細胞ペレットの同時染色に

よって制御する。

【0018】

好ましい実施形態では、標的タンパク質特異的染色を、本明細書中で定義の光学顕微鏡または蛍光顕微鏡、画像転送カメラおよびビュースクリーンを含み、最も好ましくはデバイスの操作を指揮し、最も好ましくは染色組織調製物の一定の領域の光学密度の形態で収集した情報を保存および操作をするために使用することができます。コンピュータも含む画像分析装置を使用して検出、測定、および定量する。本発明の実施に有用な画像分析デバイスには、C A S 2 0 0 システム (B e c t o n D i c k e n s o n , M o u n t a i n V i e w , C A) が含まれるが、これに限定されない。

【0019】

本発明の方法を、以下に記載のように、このような画像分析システムを使用して実施する。免疫組織化学的染色後、染色サンプルの顕微鏡画像のデジタル化およびデジタル化画像の各画素（ピクセル）中の光強度の染色細胞核の割合に対応する光学密度値への変換によって発現%を定量することができる。

【0020】

より詳細には、コンピュータ処理画像分析を使用して、デジタルグレースケール画像から特定の染色を有する細胞の量を決定することができる。グレースケール画像は、検討中の特定の標的に結合する光強度増強因子クロマゲン (c h r o m a g e n) などの量を示すので、標的の光增幅および視覚化が可能である。

【0021】

コンピュータ処理画像分析用装置には、顕微鏡スライドの視野からの検体の細胞群の画像の拡大および表示手段が含まれる。検体細胞集団を、免疫組織化学的染色法または当該分野で公知の酵素染色法を使用した特異的染色および対比染色技術を使用して調製する。適切な染色物質および対比染色物質を、コンピュータ処理画像分析システムを使用したカメラによる特定の酵素およびマーカーの抗体サンドイッチ複合体を含む細胞とこのような複合体を含まない細胞とを区別する能力によって選択する。染色後、画像領域をこのような装置によってデジタル化し、このようなシステムのメモリに保存する。デジタル化画像から、1つの光の

波長（赤の波長など）または緑色光学フィルターでの画像の形成によって核または細胞質画像マスクを形成する。組織マスクを保存し、第2のフィルターを使用して、光強度増強因子を有する領域の別のフィルター処理画像を形成する。第1の画像と第2の画像を比較して細胞の特徴を区別し、光強度増強因子で染色した物質を定量することができる（したがって、研究中の特定の標的の量のアッセイ）。

【0022】

第1の工程では、細胞中で発現した標的タンパク質を、標的タンパク質に特異的な検出可能に標識した一次抗体または一次抗体に特異的な検出可能に標識した二次抗体の添加によって決定する。これらの抗原が存在するならば、抗体をサンプルと一定時間インキュベートすると複合体を形成する。

【0023】

次いで、複合体を適切な条件下での切片の染色物質（ジアミノベンジン（DAB）など）での処理により視覚化する。第2の工程では、組織を、別の光強度増強因子、例えばエチルグリーン、で対比染色する。ペルオキシダーゼおよびエチルグリーンを使用した染色技術を例示しているが、特定のクロマゲン（chromagens）、ファーストレッド、ファーストグリーンなど、を基本とした他の染色物質および光強度増強因子（アルカリホスファターゼなど）も適切である。スペクトル研究により、エチルグリーン染色により画像の特徴の相違を2つの異なる波長での画像のフィルター処理によって容易に分離することが出来るよう、酵素免疫化学法のDAB沈殿物から良好にスペクトルが分離されることが示された。これにより、画像を2つの異なる画像（一方は全細胞核が光学的に増強されたものであり（エチルグリーンまたはファーストグリーン）、他方は受容体染色（DAB）を用いた組織領域のみが光学的に増強されているもの）にデジタル化可能である。好ましい実施形態では、画像を600nm（赤色）フィルターで分離して全対比染色領域の画像を得ることができ、500nm（緑色）フィルターで分離してDAB沈殿が染色した組織領域のみの画像を得ることができる。

【0024】

これらの領域をさらに区別するために、画像を視覚化するオペレータが対象領

域の境界を設定することができる会話型閾値設定技術を使用することができる。境界を設定すると、光学密度の閾値未満の画像の全ての部分を消去して画像を形成することができる。第1の画像について閾値を設定し、第2の画像について第2の閾値を設定する。

【0025】

画像処理法は、レッドフィルターを用いた第1の対象組織のマスク画像の形成からなる。このマスク画像を保存し、発現タンパク質定量用の別の画像を同一画像のグリーンフィルター処理バージョンの使用によって獲得する。フィルターの組み合わせ効果は、組織成分をDABで染色した組織マスク領域を光学的に増強し（暗くする）、緑色対比染色のみを使用した組織成分をより明るくすることである。次いで、染色され、且つマスク内のこれらの画像領域のみを使用して画像分析を行うことができる。

【0026】

2つの画像の相違および比較の統計分析（ヒストグラムなど）を使用して、定量する。また、全染色組織領域の比率または割合を、第2の画像の抗体閾値レベルを超えて染色した領域として容易に測定することができる。

【0027】

レッドおよびグリーンフィルターは、本発明の実施ならびにDABおよび緑色対比染色に適切である。これにより、対比染色した2つの領域の便利で有利な識別法が示される。1つの特定の領域または特徴が他方の細胞の特徴を超えるように光学的に増強するために使用することができる、ファーストグリーン、エオシンのような、種々の他の染色または光強度増強法およびフィルター処理法が存在することが認識される。

【0028】

本発明の方法は、受容体タンパク質（エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、HER-2/neuタンパク質、および上皮増殖因子受容体（EGFR）など）（これらのタンパク質は特定の生物学的治療アプローチ（例えば、モノクローナル抗体またはキナーゼ阻害）の決定に主要な役割を果たす）の発現レベルの決定に特に有用である（Bacusら、1997、Anal

. Quant. Cytol. Histol., 19, 316~28; Bacusら、1999、Brest J.). このような決定の例を、本発明の画像分析の結果を fmol / µg および細胞あたりの HER-2/neu 受容体数で報告した表 8A および 8B に示す。本発明の方法はまた、他の受容体（受容体の HER ファミリー、そのリガンド、および他の核抗原、ならびにシグナル伝達受容体（例えば、PI3K/Akt、MAPk、および JUN キナーゼ）を含む）の発現レベルの決定に適切である。HER-4 を使用した決定結果の例を、表 9 に示す。

【0029】

本発明の方法の好ましい実施形態および組織または細胞サンプルにおけるタンパク質発現レベルの以前に研究された決定法を超える利点は、図 1 ~ 6 および実施例 1 ~ 2 を参照すれば最良に理解される。以下の実施例は、本発明の特定の実施形態およびその使用例である。実施例は、例示目的のみのために記載されており、本発明を制限するために記載されていない。

【0030】

（実施例 1）

酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）による標的タンパク質の定量

マウスモノクローナル捕獲抗体およびウサギポリクローナル検出血清を使用したサンドイッチ酵素免疫アッセイを使用して、コントロール組織および細胞中の HER-2/neu、EGFR、ER、PR の発現レベルを決定した。市販のキット（Abbott Laboratories, North Chicago、IL；Calbiochem、La Jolla、CA）を使用して、ELISA アッセイを行った。各組織または細胞サンプルについて得られた比色反応強度がアッセイの作業領域を超えないように ELISA アッセイを行った。

【0031】

ELISA アッセイ中、組織および細胞サンプルを 0 ~ 4 に維持した。細胞ペレットを秤量し、10 体積の冷受容体緩衝液（10 mM Tris-HCl（pH 7.4）、1.5 mM EDTA、10% グリセロール、0.1% アジ化ナトリウム、0.5 µg · ml ペプスタチン、0.2 mM pA-PMSF）に懸濁

し、Tekmar Tissueemizerを使用して5秒間ホモジナイズした。氷上で15~20秒間のインキュベーション後、サンプルを再び5行間ホモジナイズした。組織サンプルを細かく碎き、受容体緩衝液に懸濁した。ホモジナイズ後、抗原抽出薬(AEA)をホモジネートに添加し(各50μlのホモジネートに対して10μlのAEA)、サンプルを混合し、その後ELISAアッセイを行うまでサンプルを-70°で保存した。

【0032】

ELISA分析前に、ホモジネートを4°、15,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を新鮮なチューブに移した。各上清のタンパク質レベルをLowryらの方法(1951、J.Biol.Chem.、193、265~275)で決定し、サンプルを5μg/ml総タンパク質に希釈した。次いで、サンプルをELISAキットに付属の64ウェルマイクロタイタープレートのウェルにロードした。全サンプルを2連でアッセイした。HER-2/neuの発現レベル(fm/μg全タンパク質)を、ELISAアッセイで計算したHER-2/neu量を上記のように計算した総タンパク質量で割ることにより決定した。

【0033】

EGFR、ER、およびPRの発現レベルを、HER-2/neu発現の決定のように決定した。

【0034】

校正曲線作成用のコントロール細胞の選択では、HER-2/neuまたはEGFR発現構築物でトランスフェクトした生物学的に操作した細胞(MCF7/HER-2細胞(Pelēsら、1991、EMBO J.、10、2077~86)またはチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)など)は、HER-2/neuまたはEGFRをより一定に発現するので好ましい。

【0035】

(実施例2)

画像分析による標的タンパク質の定量

本発明の方法を評価するために、多数の腫瘍組織におけるHER-2/neu、ER、またはPRの発現レベルを画像分析によって定量した。HER-2/neu

e u、ER、およびPR陰性であるか、種々のHER-2/neu、ER、およびPR陽性腫瘍量を発現することが他の方法によって以前に示された組織サンプルおよび正常な細胞（0 fmol/mgから500 fmol/mgの標的タンパク質の反応範囲を対象とする）を分析で使用した。

【0036】

組織または細胞サンプルにおける標的タンパク質の発現を、コントロール（キャリブレータ）細胞のELISAアッセイおよび画像分析から作成した校正曲線から得た式を使用して定量した。コントロール細胞を染色および定量し、それに並行して組織または細胞サンプルを分析した。ELISAアッセイおよび画像分析によるコントロール細胞における標的タンパク質定量の再現性を以下のように評価した。コントロール細胞ペレットを最初に4つの画分に分け、2つの画分中のER濃度をELISAアッセイによって決定し、2つの画分中のER染色の光学密度を画像分析によって決定した。表2は、ELISAおよび画像分析によってER濃度および光学密度測定の再現性が得られたことを示す。

【0037】

腫瘍組織サンプルにおけるER発現を定量するために、ELISAアッセイ（実施例に記載のように実施）によって決定した3つのコントロール細胞ペレット中の標的タンパク質濃度（細胞あたりのfmol/等価物またはレセプター）の画像分析で決定したこれらのペレットの平均光学密度を使用したグラフ作成によって校正曲線を作成した。組織サンプルの膜または核領域を含む全ピクセル数に対応するピクセルあたりの平均合計光学密度を、染色標的タンパク質の総光学密度をエチルグリーンまたはメチレンブルー染色サンプルの総ピクセル数で割ることによって計算した。腫瘍組織サンプルのELISAアッセイおよび画像分析の結果を表3に示す。標的タンパク質発現がELISAアッセイによる検出の範囲を超える組織から「>」fmol/mgで示したELISA値を得た。ELISAアッセイおよび画像分析によって決定したER発現レベルは、他の方法を使用して決定したER発現レベルに相關していた。

【0038】

別の実験では、ERまたはHER-2/neuのいずれかを発現することが公

知の3つの凍結コントロール細胞ペレットを切断し、7つの凍結組織切断サンプルとともに染色した。コントロール細胞ペレットにおけるERまたはHER-2/neuの発現レベル(fmol/mg 総タンパク質)を、ELISAアッセイによって決定した。次いで、コントロール細胞および組織切片を染色し、スライドを画像分析を使用して定量してHER-2/neuまたはER染色の平均光学密度および割合を決定した。ELISAアッセイで得た標的タンパク質濃度(fmol/mg 総タンパク質)に対する画像分析で決定した染色コントロール細胞の平均光学密度のプロッティングによって校正曲線を作成した。図2および3は、HER-2/neuおよびER発現コントロール細胞から作成した校正曲線を示す。これらのグラフ由来の式を使用して、組織サンプルにおけるERまたはHER-2/neu発現を定量した。腫瘍組織サンプルのELISAアッセイおよび画像分析の結果を、表4に示す。

【0039】

上記の結果は、本発明の方法を使用して腫瘍細胞に発現した受容体タンパク質の発現レベルを正確に定量することができるることを示す。しかし、いくつかの腫瘍サンプルについてのELISAアッセイによって決定した標的タンパク質濃度は、画像分析によって決定された標的タンパク質濃度に直接相關しなかった。腫瘍サンプル中に存在する正常細胞の結果として、ELISAによる標的タンパク質の定量により、画像分析で得られた濃度よりも低いか高い濃度が得られる。例えば、標的タンパク質(例えば、HER-2/neu、ER、またはPR)を発現しない正常細胞の割合により、ELISA値が減少し得る。この現象を、組織サンプル98~594(表4)(ELISAアッセイで決定した標的タンパク質濃度が画像分析で決定した濃度より有意に低い)で示す。あるいは、標的タンパク質を発現する正常細胞(例えば、HER-2/neu、ER、またはPRを発現する正常な乳管)の存在により、ELISAアッセイで定量したHER-2/neu、ER、またはPRレベルが有意に増加し得る。抽出腫瘍サンプルが腫瘍細胞および周囲の正常な管組織を含む場合、ELISAアッセイにより標的タンパク質発現レベルがより高くなる可能性があり、その場合、実際には腫瘍細胞はより低いレベルの標的タンパク質を発現する(表3)。

【0040】

本発明の方法の他の受容体(HER-3、HER-4、そのリガンド、および他の因子など)の定量能力を評価するために、ドキソルビシンベースの化学療法を受けた患者から採取したサンプルに対して画像分析を行った(Estevala、2001、Pathology Oncology Researchに提出)。表5は、HER-3、HER-4、ヘレグリン、および他の因子p38で認められた光学密度単位の範囲を示す(DiGiovanna、1999、PP Updates:Princ.Practice Oncol.、13、1~9)。

【0041】

本発明の方法を使用して、35人の患者から採取したパラフィン包埋乳癌組織におけるHER-4、ヘレグリン、およびリン酸化p38(P-p38)に対して指向する抗体の予後の役割を分析した(Santa Cruz、Santa Cruz、CA)。腫瘍が高レベルのHER-4およびヘレグリンを発現する患者は、腫瘍が低レベルのこれらのタンパク質を発現する患者と比較して5年無病生存率(DFS)が低かった。それに対してリン酸化p38は高タンパク質発現レベルがDFSの改善に関連することが認められた。患者のこの小さな部分集団における他のマーカーと生存率との相関関係は認められなかった。HER-4、ヘレグリン、およびP-p38とDFSとの間に示された関連性を、他の公知の予後要因で説明されなかった。結論として、画像分析によって得られた結果により、HER-4、ヘレグリン、およびP-p38が初期乳癌患者の予後値を有することが示唆される(Estevala、1999、Clinical Cancer Res.)。このような標的タンパク質発現の正確な定量の重要性を表1に示す(HER-2/neu発現レベル3の腫瘍はヘルセプチンよりも良好に反応する)。

【0042】

本発明の方法を使用して、種々の細胞株(表6Aに示す結果)および腫瘍サンプル(表6Bに示す結果)中のEGFRも定量した。EGFRを使用して、画像分析法により細胞あたりの受容体数を決定した。

【0043】

最後に、画像分析を使用して、シグナル伝達経路に関連する標的タンパク質の発現を試験し、これらの標的タンパク質発現レベルと癌遺伝子（A k t - 2 およびH E R - 2 / n e uなど）の発現または薬物反応（ヘルセプチン処理後のp A K T またはM A P k の下方制御など）とを相関させた。図5および図6は、画像分析に使用により、シグナル伝達に関連する標的タンパク質の上方制御または下方制御が癌遺伝子タンパク質（H E R - 2 / n e u およびA k t - 2など）の発現に相関し得ることを例示する。画像分析を使用して、腫瘍におけるH E R - 2 / n e u の過剰発現がA k t - 2 の過剰発現に関連し、これはおそらくこれらの癌の攻撃性に寄与することを示すことができる。

【0044】

上記の開示が本発明のある特定の実施形態を強調したが、その全ての修正形態または変更形態が添付の特許請求の範囲に記載の本発明の精神および範囲内であることが理解されるべきである。

【0045】

【表1】

表1 H e r - 2 発現レベルに対する治療効果

| シングルーアーム試験 | | 無作為化試験における治療亜群 | | | |
|-------------|-----------------|-----------------------------|----------------|---------------------|----------------|
| | ヘルセプチン (商標) | ヘルセプチン (商標) + パクリタキセル | パクリタキセル | ヘルセプチン(商 標) + AC | AC |
| 全反応率 | | | | | |
| 2+ | 4% (2/50) | 21% (5/24) | 16% (3/19) | 49% (14/35) | 43% (18/42) |
| 3+ | 17% (29/172) | 44% (30/68) | 14% (11/77) | 53% (57/108) | 36% (35/96) |

【0046】

【表2】

表2

| ペレット | Fmo 1 / mg ELISA | Fmo 1 / mg 画像分析 |
|------------|------------------|-----------------|
| MCF7212167 | 220.0 | 262.0 |
| MCF7112167 | 236.0 | 307.0 |
| MCF7201148 | 188.0 | 183.0 |
| MCF7301148 | 179.0 | 207.0 |
| ERC101148 | 348.0 | 315.0 |
| ERC301158 | 358.0 | 338.0 |

【0047】

【表3】

表3 患者の組織におけるエストロゲン受容体のELISA値と
画像分析値との間の相関関係

| 組織 | Fmol/mg <u>ELISA</u> | Fmol/mg <u>画像分析</u> | %陽性範囲 <u>画像分析</u> |
|---------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| 95-1014 | 62 | 70 | 25 |
| 95-1052 | 23 | 36 | 43 |
| 95-1071 | 186 | 105 | 45 |
| 96-1130 | 34 | 34 | 0.6 |
| 96-1142 | 35 | 122 | 51 |
| 96-1268 | 170 | 150 | 34 |
| 96-328 | >250 | 238 | 45 |
| 96-361 | 109 | 85 | 40 |
| 97-029 | 256 | 91 | 36 |
| 97-1161 | >167 | 240 | 65 |
| 97-1234 | >294 | 262 | 51 |
| 97-1275 | 21 | 93 | 41 |
| 97-1350 | 226 | 217 | 55 |
| 97-1469 | 38 | 56 | 26 |
| 97-1497 | 0.5 | 0 | 0 |
| 97-234 | 2.5 | 0 | 0 |
| 97-242 | 27 | 40 | 6 |
| 97-573 | 11.5 | 33 | 2 |
| 98-011 | 135 | 77 | 27 |
| 98-025 | >454 | 556 | 78 |
| 98-035 | 143 | 150 | 46 |
| 98-043 | 25 | 114 | 47 |
| 98-077 | >227 | 318 | 65 |
| 98-078 | 305 | 23 | 2 |
| 98-087 | 56 | 55 | 23 |
| 98-098 | 77 | 73 | 26 |
| 98-103 | 178 | 160 | 15 |
| 98-134 | 304 | 10 | 0.2 |
| 98-159 | 10 | 18 | 0.2 |
| 97-341 | >161 | 191 | 70 |
| 97-417 | 90 | 125 | 19 |
| 97-446 | 250 | 201 | 55 |
| 97-647 | 0.94 | 0 | 0 |
| 97-1053 | 76 | 71 | 14 |
| 97-1111 | 273 | 217 | 56 |

【0048】

【表4】

表4 5つの乳癌組織に対するHER-2/neuのELISA
およびHER-2/neuの定量画像分析(IA)の結果

| 組織番号 | ELISA fm/ μ g | IA fm/ μ g |
|--------|-------------------|----------------|
| 98-510 | 0.23 | 0.30 |
| 98-511 | 1.74 | 1.12 |
| 98-551 | 0.05 | 0.08 |
| 98-594 | 0.16 | 0.76 |
| 98-664 | 0.17 | 0.20 |

【0049】

【表5】

表5 腫瘍マーカー分布のまとめ

| 腫瘍マーカー | 閾値 | 範囲 |
|---------|-------|-----------|
| HER-3 | 0.79 | 0.01~2.80 |
| HER-4 | 0.08 | 0.01~0.89 |
| ヘレグリン | 0.22 | 0.01~1.08 |
| P-P38-1 | 22.00 | 0~0.05 |

【0050】

【表6】

表6A DU145の較正(細胞あたり250,000個の受容体)

| 細胞株 | 細胞あたりの受容体数 |
|-----------|------------|
| SKBR3 | 60,000 |
| A549 | 85,000 |
| PACA | 150,000 |
| PC3 | 205,000 |
| AU565 | 1,000,000 |
| MDA-MB468 | 2,000,000 |

表6B 画像分析によるEGFRの定量:組織

| 組織 | 供給源 | 受容体数 |
|---------|-----|------|
| 98-421 | 膀胱癌 | 47K |
| 98-348 | 乳癌 | 31K |
| 99-1746 | 乳癌 | 43K |

【0051】

【表7】

表7 4つの細胞ペレットのHER-2/neuの定量ELISAデータ
およびHER-2/neuの定量画像分析(IA)データ。

| ペレット | ELISA fm/ug | IA fm/ug |
|------------|-------------|----------|
| MCF-7 | 0.28 | 0.24 |
| MCF&/HER-2 | 0.53 | 0.55 |
| MDA-MB543 | 1.31 | 1.37 |
| SKBR3 | >3.07 | 3.04 |

【0052】

【表8】

表8 A キャリブレータ細胞

| 細胞株 | 受容体/細胞 | fm/ μ g |
|------------|-----------|-------------|
| MDA-MB-361 | 92,000 | 0.19 |
| SKBR3 | 2,400,000 | 3.90 |
| MCF7 | 60,552 | 0.14 |
| AU537 | 2,585,637 | 4.20 |

表8 B 細胞

| 検体 | 受容体/細胞 | fm/ μ g |
|---------|-----------|-------------|
| 99-1908 | 611,066 | 1.02 |
| 99-1973 | 1,202,527 | 1.98 |
| 99-1976 | 2,567,438 | 4.20 |

【0053】

【表9】

表9 ドキソルビシンベース補助薬の化学療法で治療したI期乳癌患者における
HER-4、ヘレグリン、およびJNK-p38の予後の役割

| 腫瘍マーカー | 合計 | #有効レコード数 | 5年無病生存率 (%) | P |
|--------|----|----------|-------------|-------|
| | 35 | 20 | 57 | |
| HER-4 | | | | |
| <0.08 | 15 | 4 | 80 | <0.01 |
| >0.08 | 20 | 16 | 39 | |
| ヘレグリン | | | | |
| <0.245 | 18 | 6 | 78 | <0.01 |
| >0.245 | 17 | 14 | 35 | |
| P-p38 | | | | |
| 0 | 24 | 16 | 46 | 0.06 |
| >0 | 11 | 4 | 81 | |

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 A ~ 図1 D は HER - 2 / neu を発現するトランスフェクト MCF - 7 細胞の異なる HER - 2 / neu 発現の免疫組織化学分析条件下で染色した細胞の写真である。 QDL キャリブレータ細胞 (1 A および 1 B) およびトランスフ

エクトMCF-7細胞(1Cおよび1D)を、アルカリホスファターゼ法を使用して室温で3分間(1Aおよび1C)または37℃で5分間(1Bおよび1D)染色し、染色強度において異なる結果を得た。しかし、図2に記載の校正曲線を使用すると、同一の細胞の異なる染色条件下で受容体が正確に定量される(0.19pg/細胞)。

【図2】

図2は細胞ペレット中のHER-2/neuの量(ELISAで決定したフェムトモル/μgのタンパク質として示す)と画像分析によって決定した既知の量のHER-2/neuを示すHER-2/neu染色の光学密度のピクセル平均との間の関係を示すグラフである。

【図3】

図3は細胞ペレット中のエストロゲン受容体(ER)の量(ELISAで決定したフェムトモル/μgのタンパク質として示す)と画像分析によって決定した既知の量のHER-2/neuを示すER染色の光学密度のピクセル平均との間の関係を示すグラフである。

【図4】

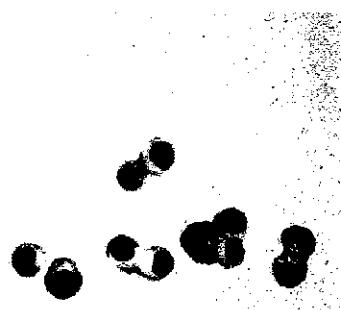
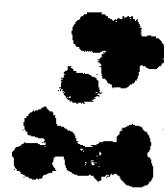
図4A～図4Bは乳癌および膀胱腫瘍における上皮増殖因子受容体(EGFR)発現の免疫組織化学分析の顕微鏡写真である。組織サンプルを、アルカリホスファターゼ法を使用して染色した。

【図5】

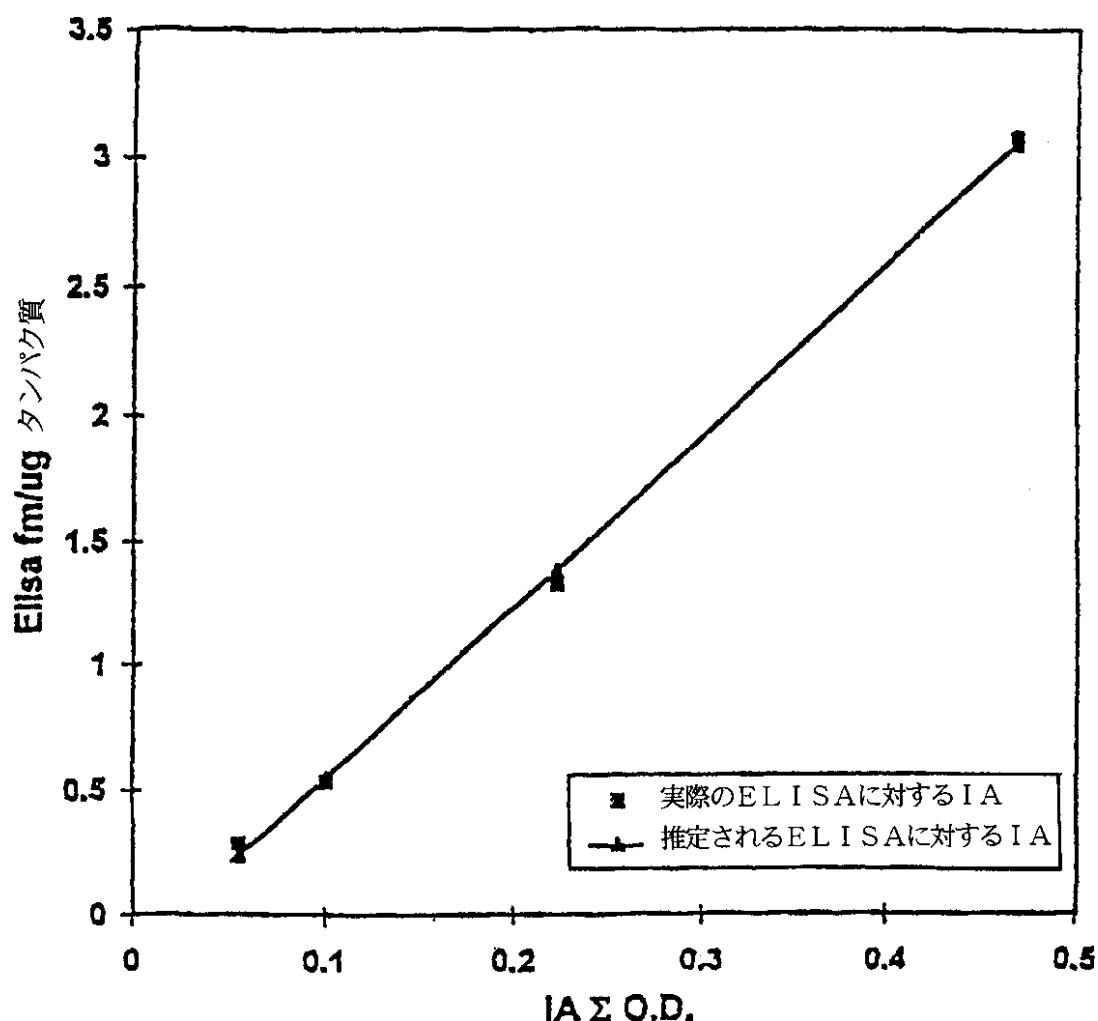
図5A～図5CはHER-2/neu(FER-2)またはコントロール(Neo)ベクターでトランスフェクトしたMDA-MB453細胞におけるHER-2/neu(FER-2)およびAkt-2(AKT-2)発現のウェスタンプロット分析のオートラジオグラム(5A)；患者の組織サンプルにおけるHER-2/neu(2114HER-2IHC)もしくはAkt-2(2114AKT2IHC)の免疫組織化学分析または蛍光インシチューハイブリッド形成(FISH)分析(2114HER-2FISH)(5B)；および画像分析による腫瘍サンプルにおけるHER-2/neuとAkt-2発現との相関関係(5C)の写真である。

【図6】

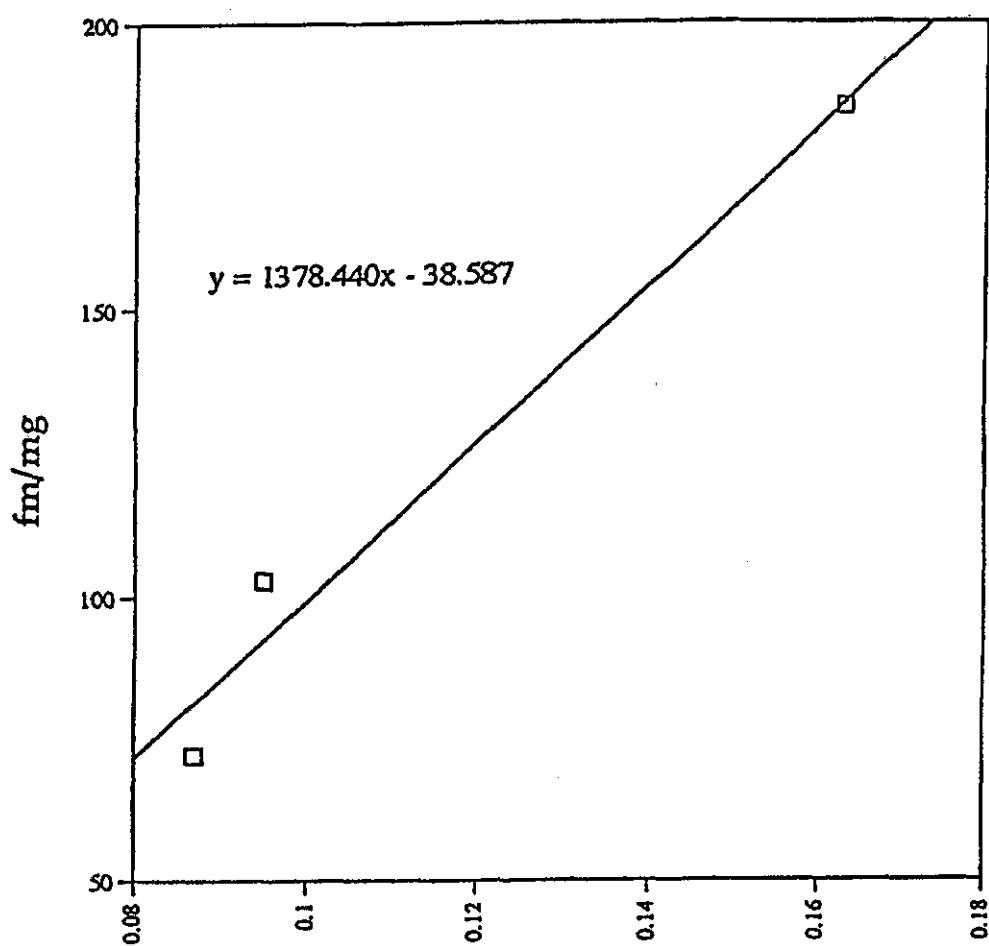
図6はヘルセプチン、タキソール、またはP D 1 5 3 0 3 5で処理した細胞における活性化Akt(ホスホAkt)、HER-2/neu(HER-2)、または活性化MAPキナーゼ(ホスホMAPキナーゼ)の画像分析から得た結果の棒グラフである。

【図1】**FIG. 1A****FIG. 1B****FIG. 1C****FIG. 1D**

【図2】



【図3】



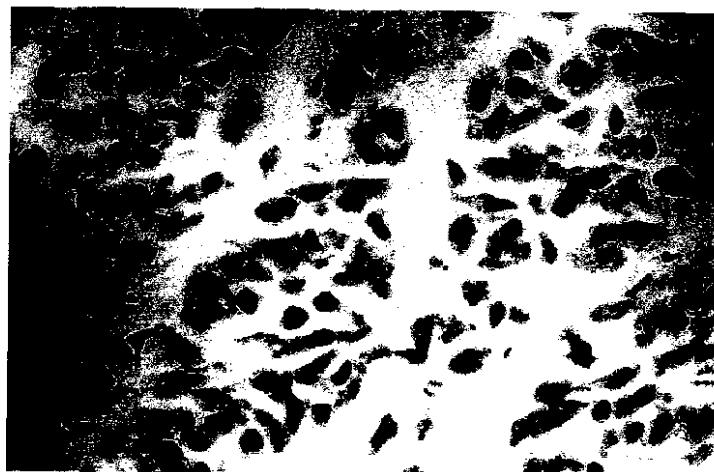
ピクセルあたりのΣOD

【図4】

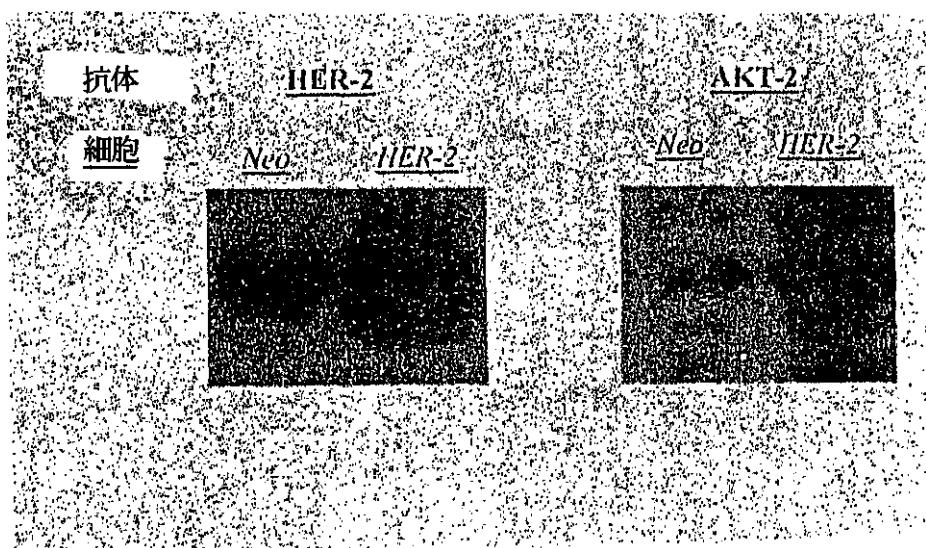
FIG. 4A



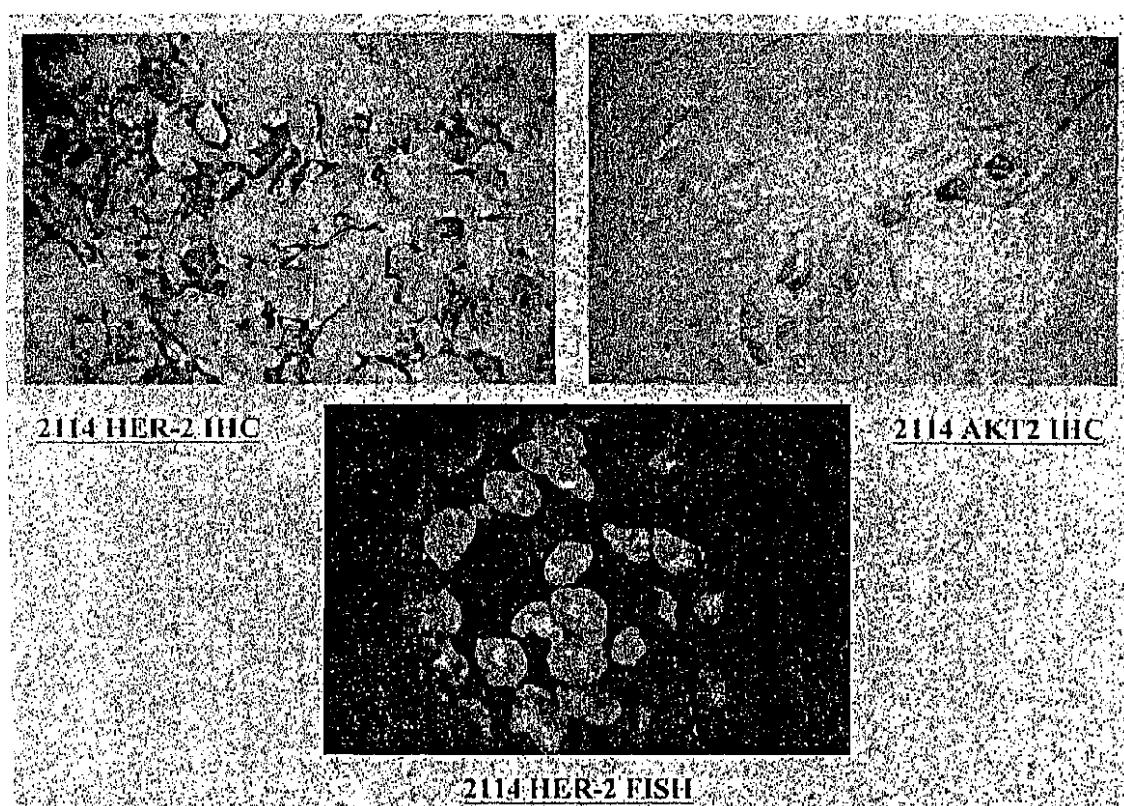
FIG. 4B



【図5A】

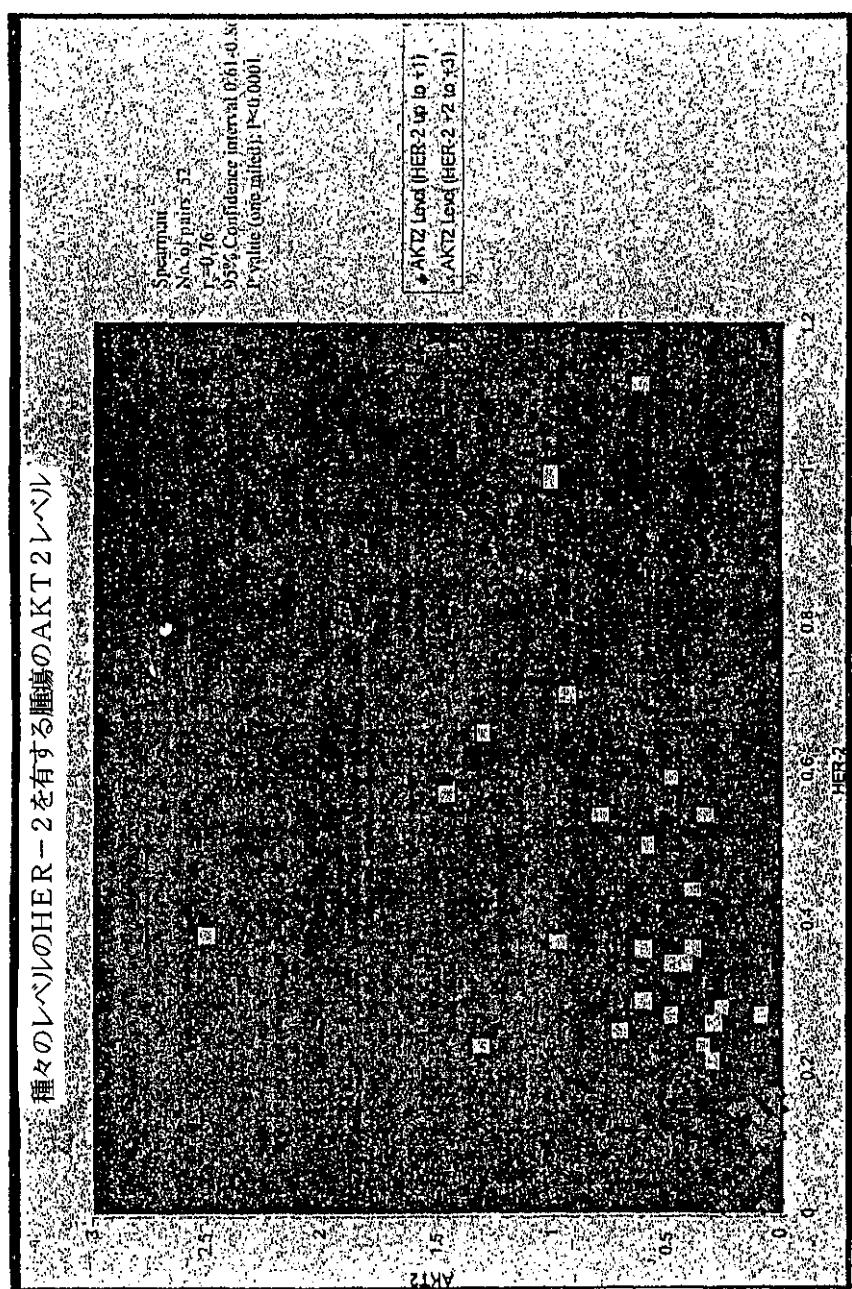


【図5B】

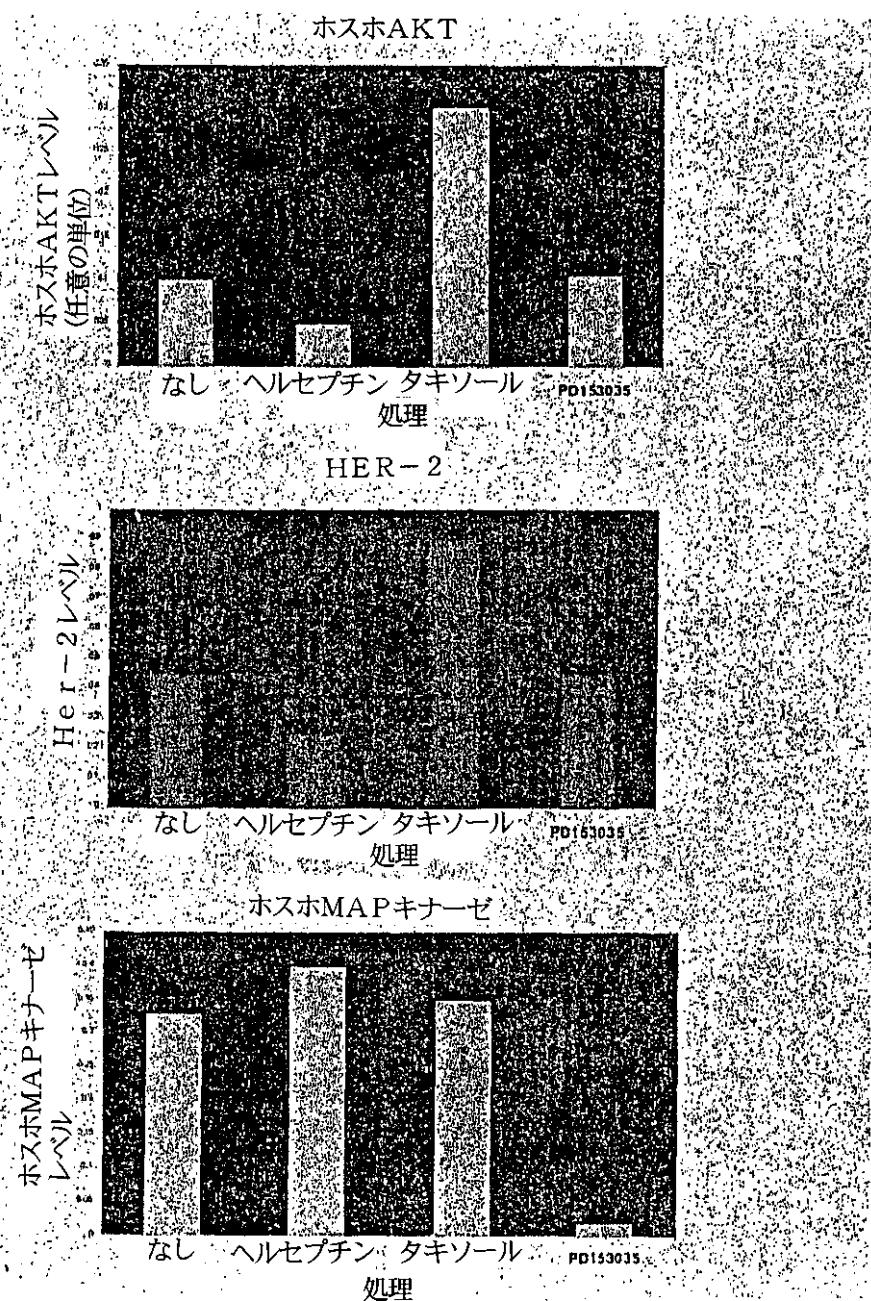


【図5C】

図5C



【図6】



【手続補正書】**【提出日】**平成14年10月3日(2002.10.3)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 細胞を含む生体サンプル中の標的タンパク質量の決定法であって、前記方法は、

(a) 少なくとも第1のコントロール細胞ペレットの第1の部分中および第2のコントロール細胞ペレットの第1の部分中の標的タンパク質量を決定する工程であって、前記第1のコントロール細胞ペレットおよび第2のコントロール細胞ペレット中の標的タンパク質量が同一ではなく、

(b) 前記標的タンパク質に指向する検出可能に標識された抗体を使用してすくなくとも前記第1のコントロール細胞ペレットの第2の部分および前記第2のコントロール細胞ペレットの第2の部分由来の標的タンパク質を免疫組織化学的に染色する工程と、

(c) 少なくとも前記第1のコントロール細胞ペレットの第2の部分および前記第2のコントロール細胞ペレットの第2の部分中の染色標的タンパク質の光学密度を決定する工程と、

(d) 少なくとも前記第1のコントロール細胞ペレットおよび第2のコントロール細胞ペレットについて、工程(c)で決定した前記染色標的タンパク質の光学密度を使用して、工程(a)で決定した前記標的タンパク質量に関する校正曲線を作成する工程と、

(e) 前記標的タンパク質に指向する前記検出可能に標識した抗体を使用して前記生体サンプル由来の細胞の一部由来の前記標的タンパク質を免疫組織化学的に染色する工程と、

(f) 前記生体サンプル由来の細胞の一部中の染色標的タンパク質の光学密度

を決定する工程と、

(g) 工程 (d) で作成した校正曲線の使用により前記生体サンプル中の標的タンパク質量を決定して前記標的タンパク質量を導き、工程 (f) で決定した前記生体サンプル由来の細胞の一部中の染色標的タンパク質の光学密度と比較する工程を包含する、方法。

【請求項2】 前記標的タンパク質が動物中の悪性細胞で発現するタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記標的タンパク質がHer-2/neu、Her-3、Her-4、エストロゲン受容体、前立腺特異的抗原、上皮増殖因子受容体 (EGFR)、Akt、p13キナーゼ、およびマイトジエン活性化プロテインキナーゼ (MAPキナーゼ) である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 少なくとも前記第1のコントロール細胞ペレットおよび第2のコントロール細胞ペレットを培養細胞株から調製する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記培養細胞株が再生可能な量の前記標的タンパク質を発現する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 少なくとも前記第1のコントロール細胞ペレットの第1の部分中および前記第2のコントロール細胞ペレットの第1の部分中の標的タンパク質量を免疫試薬を使用して決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 少なくとも前記第1のコントロール細胞ペレットの第1の部分中および前記第2のコントロール細胞ペレットの第1の部分中の標的タンパク質量を酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって決定する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 少なくとも前記第1のコントロール細胞ペレットの第1の部分中および前記第2のコントロール細胞ペレットの第1の部分中の標的タンパク質量を、細胞ペレット中の総タンパク質量に基準化する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 少なくとも前記第1のコントロール細胞ペレットの第1の部分中および前記第2のコントロール細胞ペレットの第1の部分中の標的タンパク

質量を細胞あたりの総タンパク質量に基準化する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記校正曲線中の標的タンパク質量を細胞あたりの標的タンパク質分子数として示す、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 前記生体サンプルの染色標的タンパク質の光学密度を、画像分析を使用して決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記生体サンプルを複数の染色物質で染色し、前記画像分析を、各シグナルが前記生体サンプル中の細胞を染色するために使用した多数の染色物質の1つに特異的なように前記生体サンプル中の染色標的タンパク質の光学密度を含むシグナルを異なる吸光度および透過性を有する光学フィルターを使用して処理した多数のシグナルへの分配によって行う、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記検出可能な標識は、色素原または蛍光発色団である、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記生体サンプルが被験体から採取された細胞サンプルの組織である、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記少なくとも第1のコントロール細胞ペレットの第1の部分および前記第2のコントロール細胞ペレットの第1の部分がパラフィンに包埋されていない、請求項1に記載の方法。

【請求項16】 前記少なくとも第1のコントロール細胞ペレットの第1の部分および前記第2のコントロール細胞ペレットの第1の部分が親水性基質中に固定されていない、請求項1に記載の方法。

【請求項17】 前記校正曲線が前記染色標的タンパク質の光学密度の自然対数を使用していない、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 工程(e)の免疫組織化学的染色を、工程(b)の免疫組織化学的染色で使用したものと同一の試薬を用いて行う、請求項1に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更**【補正の内容】****【0005】**

自動化（コンピュータ支援）画像分析システムの使用による組織および細胞サンプルの目視検査が増大している。代表的なシステムには、テレビカメラから組織または細胞サンプルの拡大画像を受信して受信した光学顕微鏡像を処理するコンピュータが含まれる。一般に、画像分析を使用して種々の生物マーカーに対する染色物質の親和性を評価する。適切な親和性染色物質の例には、エストロゲン受容体（E R）、プログステロン受容体（P R）、H E R - 2 / n e u タンパク質、および上皮増殖因子受容体（E G F R）に指向する色素原標識モノクローナル抗体が含まれる。

【手続補正3】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0010****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0010】**

本発明の1つの方法では、サンプル細胞中の標的タンパク質の発現レベルを、標的タンパク質に指向する検出可能に標識した抗体を使用したサンプル中の細胞および少なくとも第1のコントロール細胞および第2のコントロール細胞の免疫組織化学的染色（ここで、前記第1および第2のコントロール細胞中の標的タンパク質の発現レベルが既知であり、前記第1および第2のコントロール細胞中の標的タンパク質の発現レベルが同一ではない）、前記染色サンプル細胞ならびに染色された第1および第2のコントロール細胞の光学密度の決定、前記第1および第2のコントロール細胞の光学密度の決定値からの校正曲線の作成、および作成した前記校正曲線を使用した前記サンプル細胞中の標的タンパク質の発現レベルの決定、によって決定する。好ましい実施形態では、検出可能な標識は、色素原または蛍光発色団である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

本発明の方法の1つの実施形態では、サンプル細胞中の標的タンパク質の発現レベルを、標的タンパク質に指向する検出可能に標識した抗体を使用したサンプル中の細胞および少なくとも第1のコントロール細胞ペレットおよび第2のコントロール細胞ペレットの免疫組織化学的染色（ここで、前記第1および第2のコントロール細胞ペレット中の標的タンパク質の発現レベルが既知であり（例えば、特にELISAなどの当該分野で公知の方法による決定後）、前記第1および第2のコントロール細胞ペレット中の標的タンパク質の発現レベルが同一ではない）；前記染色サンプル細胞ならびに染色された第1および第2のコントロール細胞ペレットの光学密度の決定、前記第1および第2のコントロール細胞ペレットの光学密度の決定値からの校正曲線の作成、および作成した前記校正曲線を使用した前記サンプル細胞中の標的タンパク質の発現レベルの決定によって決定する。好ましい実施形態では、検出可能な標識は、色素原または蛍光発色団である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

より詳細には、コンピュータ処理画像分析を使用して、デジタルグレースケール画像から特定の染色を有する細胞の量を決定することができる。グレースケール画像は、検討中の特定の標的に結合する光強度増強因子色素原などの量を示すので、標的の光增幅および視覚化が可能である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

次いで、複合体を適切な条件下での切片の染色物質（ジアミノベンジン（DAB）など）での処理により視覚化する。第2の工程では、組織を、別の光強度増強因子、例えばエチルグリーン、で対比染色する。ペルオキシダーゼおよびエチルグリーンを使用した染色技術を例示しているが、特定の色素原、ファーストレッド、ファーストグリーンなど、を基本とした他の染色物質および光強度増強因子（アルカリホスファターゼなど）も適切である。スペクトル研究により、エチルグリーン染色により画像の特徴の相違を2つの異なる波長での画像のフィルター処理によって容易に分離することが出来るように酵素免疫化学法のDAB沈殿物から良好にスペクトルが分離されることが示された。これにより、画像を2つの異なる画像（一方は全細胞核が光学的に増強されたものであり（エチルグリーンまたはファーストグリーン）、他方は受容体染色（DAB）を用いた組織領域のみが光学的に増強されているもの）にデジタル化可能である。好ましい実施形態では、画像を600nm（赤色）フィルターで分離して全対比染色領域の画像を得ることができ、500nm（緑色）フィルターで分離してDAB沈殿が染色した組織領域のみの画像を得ることができる。

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/US 01/01438 |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 | | |
| 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) IPC 7 G01N | | |
| 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 practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P,X | US 6 165 734 A (BUCKWALD ROBERT A ET AL) 26 December 2000 (2000-12-26) column 39, line 18 - line 41 | 1-14 |
| P,X | WO 00 23799 A (SMITH STEVEN JAY) 27 April 2000 (2000-04-27) claims 1-6,15-18 page 9, line 5 - line 16 page 10, line 18 - line 31 page 12, line 30 -page 13, line 16 page 26, line 30 -page 27, line 9 | 1-14 |
| X | US 5 998 151 A (FISHER EDWIN R ET AL) 7 December 1999 (1999-12-07) claims column 2, line 11 - line 22 column 6, line 5 - line 19 | 1-14 |
| | -/- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of box C. | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 | Date of mailing of the international search report | |
| 21 May 2001 | 30/05/2001 | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Routledge, B | |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | Internal Application No PCT/US 01/01438 |
|---|--|--|
| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 5 514 554 A (BACUS SARAH S) 7 May 1996 (1996-05-07) claims column 9, line 26 -column 10, line 31 --- | 1-14 |
| X | US 5 202 931 A (BACUS JAMES W) 13 April 1993 (1993-04-13) claims 24,25 column 6, line 4 - line 23 figure 4 --- | 1-14 |
| X | EP 0 378 383 A (UNIV ARIZONA) 18 July 1990 (1990-07-18) claims 1-4 column 2, line 19 - line 27 column 5, line 20 - line 34 --- | 1-14 |
| X | WO 93 03741 A (YEDA RES & DEV ;BECTON DICKINSON CO (US)) 4 March 1993 (1993-03-04) claims 1-18 page 17, paragraph 2 -page 18, paragraph 2 --- | 1-14 |
| X | BACUS S S ET AL: "Potential use of image analysis for the evaluation of cellular predicting factors for therapeutic response in breast cancers" ANALYTICAL AND QUANTITATIVE CYTOLOGY AND HISTOLOGY, vol. 19, no. 4, August 1997 (1997-08), pages 316-318, XP000998426 page 319, right-hand column, paragraph 2 -page 310, left-hand column, paragraph 4 page 320, right-hand column, paragraph 2 -page 321, right-hand column, paragraph 1 --- | 1-14 |
| X | BACUS SARAH S ET AL: "HER-2/neu oncogene expression, DNA ploidy and proliferation index in breast cancer." ANALYTICAL AND QUANTITATIVE CYTOLOGY AND HISTOLOGY, vol. 14, no. 6, 1992, pages 433-445, XP000998428 ISSN: 0884-6812 page 434, right-hand column, paragraph 2 -page 435, left-hand column, paragraph 1 page 435, left-hand column, paragraph 4 -page 436, left-hand column, paragraph 2 figures 1,7 --- | 1-14 |
| | | -/- |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No PCT/US 01/01438 |
|---|--|---|
| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | VAN DIEST P J ET AL: "QUANTITATION OF HER-2-NEU ONCOPROTEIN OVEREXPRESSION IN INVASIVE BREAST CANCER BY IMAGE ANALYSIS A STUDY COMPARING FRESH AND PARAFFIN-EMBEDDED MATERIAL" ANALYTICAL CELLULAR PATHOLOGY, vol. 3, no. 4, 1991, pages 195-202, XP000998429 ISSN: 0921-8912 the whole document | 1-14 |
| X | BACUS S S ET AL: "HER-2-NEU ONCOGENE EXPRESSION AND DNA PLOIDY ANALYSIS IN BREAST CANCER" ARCHIVES OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDICINE, vol. 144, no. 2, 1990, pages 164-169, XP000998430 ISSN: 0363-0153 Section headed "HER-2/Neu expression" page 165 section headed "Quantification of HER-2/Neu Antibody staining" page 167 -page 168 page 169, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 1 | 1-14 |
| X | BACUS S ET AL: "HER-2/Neu oncogene expression and proliferation in breast cancers" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 137, no. 1, - July 1990 (1990-07) pages 103-111, XP000998483 page 104, left-hand column, last paragraph -page 105, right-hand column, paragraph 2 Section "Discussion" page 106 -page 110 | 1-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International application No
 PCT/us 01/01438

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|---|------------------|--|--|--|
| US 6165734 | A | 26-12-2000 | US 6007996 A US 5784162 A AU 2024700 A WO 0031534 A AU 5123899 A WO 0006774 A EP 0830564 A IL 121426 A JP 11500832 T US 6075599 A WO 9721979 A US 6066459 A US 5936731 A US 5817462 A US 5719024 A US 5856871 A US 5991028 A US 5835214 A US 5798262 A US 6018587 A US 6198532 B US 6055325 A US 5912165 A US 5906919 A | | 28-12-1999 21-07-1998 13-06-2000 02-06-2000 21-02-2000 10-02-2000 25-03-1998 29-02-2000 19-01-1999 13-06-2000 19-06-1997 23-05-2000 10-08-1999 06-10-1998 17-02-1998 05-01-1999 23-11-1999 10-11-1998 25-08-1998 25-01-2000 06-03-2001 25-04-2000 15-06-1999 25-05-1999 |
| WO 0023799 | A | 27-04-2000 | AU 4987699 A | | 08-05-2000 |
| US 5998151 | A | 07-12-1999 | NONE | | |
| US 5514554 | A | 07-05-1996 | AT 176328 T AU 1147595 A AU 663727 B AU 2518292 A CA 2096417 A CA 2145382 A DE 69228300 D DE 69228300 T EP 0554441 A EP 0656367 A ES 2129454 T WO 9303741 A IL 103250 A US 5288477 A | | 15-02-1999 15-06-1995 19-10-1995 16-03-1993 23-02-1993 04-03-1993 11-03-1999 23-09-1999 11-08-1993 07-06-1995 16-06-1999 04-03-1993 12-03-1999 22-02-1994 |
| US 5202931 | A | 13-04-1993 | US 5008185 A DE 3855472 D DE 3855472 T EP 0311368 A JP 1123153 A | | 16-04-1991 19-09-1996 09-01-1997 12-04-1989 16-05-1989 |
| EP 0378383 | A | 18-07-1990 | NONE | | |
| WO 9303741 | A | 04-03-1993 | AT 176328 T AU 1147595 A AU 663727 B AU 2518292 A CA 2096417 A CA 2145382 A | | 15-02-1999 15-06-1995 19-10-1995 16-03-1993 23-02-1993 04-03-1993 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In relation on patent family members

| |
|------------------------------|
| International application No |
| PCT/US 01/01438 |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9303741 A | | DE 69228300 D | 11-03-1999 |
| | | DE 69228300 T | 23-09-1999 |
| | | EP 0554441 A | 11-08-1993 |
| | | EP 0656367 A | 07-06-1995 |
| | | ES 2129454 T | 16-06-1999 |
| | | US 5514554 A | 07-05-1996 |
| | | IL 103250 A | 12-03-1999 |
| | | US 5288477 A | 22-02-1994 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコ-ト [®] (参考) |
|--|------|---------------|--------------------------|
| G 0 1 N 33/53 | | G 0 1 N 33/53 | Y |
| // G 0 1 N 33/574 | | 33/574 | D |
| (81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , | | | |
| D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I | | | |
| T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F | | | |
| , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , | | | |
| M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G | | | |
| M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z | | | |
| , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , | | | |
| M D , R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , | | | |
| A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C | | | |
| H , C N , C U , C Z , D E , D K , E E , E S , F I | | | |
| , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , | | | |
| I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K | | | |
| Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M D | | | |
| , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , | | | |
| P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S | | | |
| L , T J , T M , T R , T T , U A , U G , U S , U Z | | | |
| , V N , Y U , Z A , Z W | | | |
| F タ-ム(参考) 2G045 BA14 BB24 CB01 CB02 DA36 | | | |
| FA11 FA16 FB03 FB09 | | | |
| 2G059 AA02 AA06 BB12 CC16 DD03 | | | |
| DD13 EE07 FF01 FF03 FF12 | | | |
| HH02 HH06 JJ02 KK04 MM02 | | | |
| MM03 MM05 MM09 MM12 PP04 | | | |

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 通过图像分析定量测定蛋白质的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003519796A | 公开(公告)日 | 2003-06-24 |
| 申请号 | JP2001552090 | 申请日 | 2001-01-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 文塔纳医疗系统公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 本塔纳医疗系统公司 | | |
| [标]发明人 | バッカスサラエス | | |
| 发明人 | バッカス、サラエス. | | |
| IPC分类号 | G01N33/48 G01N21/27 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574 | | |
| CPC分类号 | G01N33/574 G01N33/5011 G01N33/57484 G01N2333/495 G01N2333/82 G01N2800/52 Y10T436/101666 Y10T436/105831 Y10T436/13 | | |
| FI分类号 | G01N33/48.P G01N21/27.A G01N21/27.F G01N33/483.C G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/574.D | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB09 2G059/AA02 2G059/AA06 2G059/BB12 2G059/CC16 2G059/DD03 2G059/DD13 2G059/EE07 2G059/FF01 2G059/FF03 2G059/FF12 2G059/HH02 2G059/HH06 2G059/JJ02 2G059/KK04 2G059/MM02 2G059/MM03 2G059/MM05 2G059/MM09 2G059/MM12 2G059/PP04 | | |
| 优先权 | 60/176514 2000-01-12 US 60/176515 2000-01-12 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了一种通过使用靶细胞的免疫组织化学染色并确定细胞的光密度来确定组织或细胞样品中一种或多种靶蛋白的表达水平的方法。将光密度与由具有已知靶蛋白表达水平的对照细胞制成的校准曲线进行比较。

表1 Her-2発現レベルに対する治療効果

| | シングル-アーム試験 | 無作為化試験における治療群 | | | |
|------|------------|---------------|----------------------------|----------|--------------------|
| | | ヘルセチン (商標) | ヘルセチン (商標) + パクリタキセル | パクリタキセル | ヘルセチン(商 標) + AC |
| 全反応率 | | | | | |
| 2+ | 4% | 21% | 16% | 4% | 4% |
| 過剰発現 | (2/50) | (5/24) | (3/19) | (14/35) | (18/42) |
| 3+ | 17% | 44% | 14% | 53% | 36% |
| 過剰発現 | (29/172) | (30/68) | (11/71) | (57/108) | (35/96) |