

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-13228
(P2019-13228A)

(43) 公開日 平成31年1月31日(2019.1.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 N	4 B 0 2 9
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 E	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	

審査請求 有 請求項の数 11 O L 外国語出願 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-164202 (P2018-164202)
 (22) 出願日 平成30年9月3日 (2018.9.3)
 (62) 分割の表示 特願2016-501766 (P2016-501766)
 の分割
 原出願日 平成26年3月13日 (2014.3.13)
 (31) 優先権主張番号 61/786,062
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013.3.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)
 1. T W E E N

(71) 出願人 507051972
 アボット・モレキュラー・インコーポレイ
 テッド
 アメリカ合衆国、イリノイ・60018、
 デス・プレーンズ、イースト・トゥイ・ア
 ベニュー・1300
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 イリーナ・ソコロワ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60181、
 ビラ・パーク、サウス・サミット・アベ
 ニュー・835

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞作製物及び細胞支持体、及びテラノースにおけるその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 細胞懸濁液中の少なくとも2つの染色体の領域のコピー数を同時に決定する方法の提供。

【解決手段】 *in situ*ハイブリダイゼーション (ISH) または免疫組織化学 (IHC) の方法；チロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質に対する患者の応答をテラノースする方法；ISHまたはIHCの方法を含むテラノース方法の改良；ISHまたはIHCの方法で検出可能に標識されているプローブと接触させた細胞がその表面上にある細胞支持体；及び (a) ISHまたはIHC用の細胞支持体及び/または少なくとも1つのプローブ及び (b) 細胞支持体上でISHまたはIHCの方法を実施するための使用説明書を含むキット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織または細胞の凝塊を含む患者標本からの細胞の調製方法であって、

(i) 前記患者標本を、還元剤及びキレート剤を含む予加温した平衡塩類溶液中に浸漬し

；

(i i) 前記患者標本を、還元剤、カルシウムイオン源及び極性非プロトン性溶媒を含む新鮮な平衡塩類溶液に移し、混合し；

(i i i) 前記患者標本を前記の新鮮な平衡塩類溶液から取り出し、(a) 前記溶液を遠心して脱凝集させた細胞をペレット化するか、または(b) 前記溶液を濾過して脱凝集させた細胞を収集し；

(i v) (i i i) (a) 後には上清を捨て、前記ペレット化細胞を残留上清中に再懸濁し、再懸濁した細胞を固定液中加入し、または(i i i) (b) 後には前記の濾過した細胞を固定液中加入する；

ことを含み、組織または細胞の凝塊を含む患者標本から細胞を調製する前記方法。

【請求項 2】

前記患者標本が、(a) 新鮮標本、(b) 解凍した新鮮冷凍標本、または(c) 部分的に固定した標本である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

更に、(i) の前に、前記患者標本を平衡塩類溶液を用いて濯ぐことを含み、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

- 前記患者標本を室温でハンス緩衝液を用いて濯ぎ；

- 前記患者標本を 20 m M D T T (ジチオトレイトール) 及び 5 m M E D T A (エチレンジアミンテトラ酢酸) を含有する予加温したハンス緩衝液中に 37 で約 5 分間浸漬し；

- 前記した濯ぎ、浸漬した患者標本を 20 m M D T T 、 5 m M C a C l ₂ 及び 10 % D M S O (ジメチルスルホキシド) を含有する新鮮なハンス緩衝液に移し、約 5 秒間から約 10 秒間混合し；

- 前記患者標本を前記の新鮮なハンス緩衝液から取り出し、(a) 前記溶液を約 1000 × g で約 10 分間遠心して脱凝集させた細胞をペレット化するか、または前記溶液を濾過して脱凝集させた細胞を収集し；

- 遠心後前記上清を捨て、前記ペレット化細胞を残留上清中に再懸濁し、再懸濁した細胞を溶液中加入するか、または濾過した後前記の濾過した細胞を溶液中加入することを含み、前記溶液は約 30 重量% から約 60 重量% のメタノール、約 40 重量% から約 70 重量% の水、緩衝液及び保存剤を含み、前記溶液を室温で一晩保存する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

更に、(v) 前記細胞を細胞支持体に適用することを含み、請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞支持体が細胞診スライドであり、前記方法は更に、

(v i) 前記スライドを水 - アルコール溶液中に浸漬し、

(v i i) 前記スライドを固定液中に浸漬し、

(v i i i) 前記スライドを乾燥させる

ことを含み、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記水 - アルコール溶液は 95 % エタノールであり、前記スライドをエタノール中に室温で約 15 分間浸漬し、前記固定液はカルノア液であり、前記スライドをカルノア液中に室温で約 30 分間浸漬し、前記スライドを室温で乾燥させる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法に従って調製した細胞を、ハイブリダイジング条件下で検出可能に標識されているプローブと接触させ、患者から標本を取り出してから約 14 時間未満で前記検出可能な標識を可視化することを含む *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) または免疫組織化学 (IHC) の実施方法。

【請求項 9】

前記検出可能に標識されているプローブは、蛍光標識されている核酸プローブまたは蛍光標識されている抗体 (または、その抗原的に反応性の断片) プローブである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞が細胞支持体に適用されている請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記細胞支持体は少なくとも 2 つの不連続エリアを含み、前記細胞を不連続エリアに適用し、各エリアを少なくとも 1 つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを 2 つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならばこれらの検出可能に標識されているプローブは区別され得る請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

各不連続エリアを検出可能に標識されているプローブの混合物と別々に接触させ、前記混合物は、

- A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び R O S I に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、
 - A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、R O S 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び c - M E T に対するプローブ、
 - A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、R O S 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、
 - R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び N T R K 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、
 - R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び K I F 5 B に対するプローブ、
 - M E T に対するプローブ、E G F R に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、
 - A U R K A に対するプローブ、9 p 2 1 に対する遺伝子座特異的プローブ、染色体 3 に対する C E P、染色体 6 に対する C E P 及び染色体 7 に対する C E P、
 - M Y C に対するプローブ、E G F R に対するプローブ、D C C に対するプローブ、1 3 q 1 4 に対する遺伝子座特異的プローブ及び染色体 1 8 に対する C E P、
 - M Y C に対するプローブ、T E R C に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、
 - M Y C に対するプローブ、H E R 2 に対するプローブ、Z N F 2 1 7 に対するプローブ及び 9 p 2 1 に対する遺伝子座特異的プローブ、
 - M C L 1 に対するプローブ、F G F R 2 に対するプローブ、M E T に対するプローブ、E G F R に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、
 - F G F R 2 に対するプローブ、P I K 3 C A に対するプローブ、染色体 3 に対する C E P 及び染色体 1 0 に対する C E P、
 - P T E N に対するプローブ、E R G に対するプローブ及び染色体 1 0 に対する C E P、
 - F G F R 1 に対するプローブ、F G F R 2 に対するプローブ、F G F R 2 に対する 2 色ブレイクアウェイプローブ、染色体 8 に対する C E P 及び染色体 1 0 に対する C E P、または
 - M E T に対するプローブ、P I K 3 C A に対するプローブ、E G F R に対するプローブ、染色体 7 に対する C E P 及び染色体 3 に対する C E P
- を含む、請求項 11 に記載の方法。

20

30

40

【請求項 13】

微細針吸引、コア針生検、摘徐生検及び切除からなる群から選択される標本からの脱凝集させた細胞をハイブリダイジング条件下で検出可能に標識されているプローブと接触させ、患者から前記標本を取り出してから約 14 時間未満に前記検出可能な標識を可視化す

50

ることを含む *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) または免疫組織化学 (IHC) の実施方法。

【請求項 14】

前記の検出可能に標識されているプローブが蛍光標識されている核酸プローブであるか、または蛍光標識されている抗体 (または、その抗原的に反応性の断片) プローブである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記細胞が細胞支持体に適用されている、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記細胞支持体は少なくとも 2 つの不連続エリアを含み、前記細胞を不連続エリアに適用し、各エリアを少なくとも 1 つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを 2 つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならばこれらの検出可能に標識されているプローブは区別され得る請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 17】

各不連続エリアを検出可能に標識されているプローブの混合物と別々に接触させ、前記混合物は、

- ALK に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び ROS1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

- ALK に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、ROS1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び c-MET に対するプローブ、

20

- ALK に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、ROS1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び RET に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

- RET に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び NTRK1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

- RET に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び KIF5B に対するプローブ、

- MET に対するプローブ、EGFR に対するプローブ及び染色体 7 に対する CEP、

- AURKA に対するプローブ、9p21 に対する遺伝子座特異的プローブ、染色体 3 に対する CEP、染色体 6 に対する CEP 及び染色体 7 に対する CEP、

- MYC に対するプローブ、EGFR に対するプローブ、DCC に対するプローブ、13q14 に対する遺伝子座特異的プローブ及び染色体 18 に対する CEP、

30

- MYC に対するプローブ、TERC に対するプローブ及び染色体 7 に対する CEP、

- MYC に対するプローブ、HER2 に対するプローブ、ZNF217 に対するプローブ及び 9p21 に対する遺伝子座特異的プローブ、

- MCL1 に対するプローブ、FGFR2 に対するプローブ、MET に対するプローブ、EGFR に対するプローブ及び染色体 7 に対する CEP、

- FGFR2 に対するプローブ、PIK3CA に対するプローブ、染色体 3 に対する CEP 及び染色体 10 に対する CEP、

- PTEN に対するプローブ、ERG に対するプローブ及び染色体 10 に対する CEP、

- FGFR1 に対するプローブ、FGFR2 に対するプローブ、FGFR2 に対する 2 色ブレイクアウェイプローブ、染色体 8 に対する CEP 及び染色体 10 に対する CEP、または

40

- MET に対するプローブ、PIK3CA に対するプローブ、EGFR に対するプローブ、染色体 7 に対する CEP 及び染色体 3 に対する CEP

を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

ISH または IHC を請求項 12 に記載の方法に従って実施することを含む、チロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質を用いる治療に対する患者の応答のテラノーズ (theranose) 方法。

【請求項 19】

前記チロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質が、クリゾチニブ、ボリチニブ、ゲフ

50

イチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ダサチニブ、トラスツズマブ、またはペルツズマブである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ISH を請求項 17 に記載の方法に従って実施することを含む、チロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質を用いる治療に対する患者の応答をテラノースする方法。

【請求項 21】

前記したチロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質が、クリゾチニブ、ポリチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ダサチニブ、トラスツズマブ、またはペルツズマブである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

請求項 10、11 または 12 に記載の方法の使用を含む、テラノース方法における改善。

【請求項 23】

請求項 15、16 または 17 に記載の方法の使用を含む、テラノース方法における改善。

【請求項 24】

請求項 11 または 12 に記載の方法に従って検出可能に標識されているプローブと接触させた細胞がその表面上にある細胞支持体。

【請求項 25】

請求項 16 または 17 に記載の方法に従って検出可能に標識されているプローブと接触させた細胞がその表面上にある細胞支持体。

【請求項 26】

(a) ISH または IHC 用の細胞支持体及び / または少なくとも 1 つのプローブ、及び

(b) 請求項 11 または 12 に記載の方法を実施するための使用説明書を含むキット。

【請求項 27】

(a) ISH または IHC 用の細胞支持体及び / または少なくとも 1 つのプローブ、及び

(b) 請求項 16 または 17 に記載の方法を実施するための使用説明書を含むキット。

【請求項 28】

(a) ISH または IHC 用の細胞支持体及び / または少なくとも 1 つのプローブ、及び

(b) 請求項 18 または 19 に記載の方法を実施するための使用説明書を含むキット。

【請求項 29】

(a) ISH または IHC 用の細胞支持体及び / または少なくとも 1 つのプローブ、及び

(b) 請求項 20 または 21 に記載の方法を実施するための使用説明書を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組織または細胞の凝塊から得た細胞の調製方法、前記細胞を含む細胞支持体、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)、免疫組織化学 (IHC)、染色体異常の検出、テラノース (theranosis) 及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

肺癌のような癌を治療するための標的療法の選択では、生検標本を、当該癌バイオマー

10

20

30

40

50

カーを用いて短時間で検査する必要がある。当該バイオマーカーが複数、例えば3つ以上あることはよくあることである。微細針吸引（FNA）またはコア針生検では、しばしば疾患の進行期及び付随する病気のために患者から1つの標本しか得られない。その標本は細胞、組織、または肺癌の場合の気管吸引のような生体液を少量しか含んでいないので、標本の使用を最大限とすることが重大となる。

【0003】

典型的には、FNAまたはコア針生検は摘除生検または切開生検と同様にプロセッシングされる。固定するために標本をホルムアルデヒド中に24～48時間置く。その後、固定した標本をパラフィン中に包埋する。固定した標本のパラフィンでの包埋には更に24時間かかる可能性がある。標本を固定/包埋した後、標本を約4～6ミクロンの厚さに切断する。次いで、乾燥させるために切片をスライド上に載せる。切片の乾燥には別に24時間かかる可能性がある。蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション（FISH）前に、乾燥させた切片がその表面上にあるスライドを焼成しなければならない。スライドの焼成には約2時間から約18時間かかる可能性がある。よって、FISH用標本を作製するには約5日間かかる。例えば患者が疾患の進行期にあるか、侵襲性の癌に罹っている場合には、時間が患者のアウトカム及び生存における重大な要因となる。

10

【0004】

Liら（Laboratory Investigation, 86:619-627 (2006)）は、原発性肺癌に関連する遺伝子に対する特定のゲノムプローブを開発し、カバーガラス上にプローブの4つの異なる組成物を配置することを含むマルチプルFISHアレイを設計することにより癌診断を向上させることを試みた。各組成物は遺伝子座特異的プローブ及び2つの染色体の各々に対するセントロメアプローブを合計で4つのプローブを含有しており、各プローブは異なる色で標識されていた。スライド上のハイブリダイゼーション緩衝液中に懸濁させた細胞上にカバーガラスを伏せた。Liらの方法は遺伝子特異的ゲノムプローブの作製を必要とするという欠点がある。加えて、細胞の1つの懸濁液上にゾーン状スライドガラスを伏せると、分析のために全くまたは少数の細胞しか含有していないスライドのエリアにスライドガラスの1つ以上のゾーンが伏される恐れがある。更に、Liらはこの方法を気管支洗浄と一緒に使用することのみ開示しており、方法で使用するためにどのように他のタイプの標本を作製するかは教示していない。実際、Liらはこの方法は多分気管支洗浄液のような臨床標本で成功しているが、四分円の一つに偽陰性のリスクがある小さな生検標本または固定組織に対しては適当でないことがある。

20

30

【0005】

Abramovichら（RU2410663; Russian App. No. RU20090134364, 2009年9月14日公開）は、標準的方法により調製した細胞懸濁液（5 μ L）を顕微鏡スライドの表面に対して有孔パラフィルムストリップを密封接着させることにより形成した孔に適用することを開示しているようである。パラフィルムストリップは26 \times 56mm²であり、直径9mmであり、4mm離れており、スライドの端部から2mm離れて8個の孔を含んである。結果は同時FISHのために複数の単離ゾーンとして記載されている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】ロシア特許第2410663号明細書

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Laboratory Investigation, 86:619-627 (2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0008】

FISHを標本収集の数時間以内に開始し、2つ以上、例えば複数のバイオマーカーを同時に分析できることが非常に望ましい。従って、本発明の目的は、*in situ*ハイブリダイゼーション(IISH)、例えば蛍光IISH(すなわち、FISH)、特にマルチプレックスFISH、並びに免疫組織化学(IHC)のための細胞をIISH及びIHC結果が標本収集の約14時間未満で得ることができるように標本収集の1.5時間以内で調製する方法を提供することである。この目的及び他の目的及び作用効果、並びに発明の要件は本明細書中の詳細説明から明らかとなるであろう。

【課題を解決するための手段】

【0009】

組織または細胞の凝塊を含む患者標本からの細胞の調製方法を提供する。この方法は、
 (i) 患者標本を、還元剤及びキレート剤を含む予加温した平衡塩類溶液中に浸漬し；
 (ii) 患者標本を、還元剤、カルシウムイオン源及び極性非プロトン性溶媒を含む新鮮な平衡塩類溶液に移し、混合し；
 (iii) 患者標本を新鮮な平衡塩類溶液から取り出し、(a) 溶液を遠心して脱凝集させた細胞をペレット化するか、または(b) 溶液を濾過して脱凝集させた細胞を収集し；
 (iv) (iii) (a) 後には上清を捨て、ペレット化細胞を残留上清中に再懸濁し、再懸濁した細胞を固定液中に入れ、または(iii) (b) 後には濾過した細胞を固定液の中に入れる；

ことを含む。患者標本は、(a) 新鮮標本、(b) 解凍した新鮮冷凍標本、または(c) 部分的に固定した標本であり得る。方法は更に、(i) の前に、患者標本を、平衡塩類溶液を用いて濯ぐことを含み得る。

【0010】

方法の実施形態は、患者標本を室温でハンクス緩衝液を用いて濯ぎ；患者標本を、20 mM DTT (ジチオトレイトール) 及び5 mM EDTA (エチレンジアミンテトラ酢酸) を含有する予加温したハンクス緩衝液中に37 で約5分間浸漬し；濯ぎ、浸漬した患者標本を20 mM DTT、5 mM $CaCl_2$ 及び10% DMSO (ジメチルスルホキシド) を含有する新鮮なハンクス緩衝液に移し、約5秒間から約10秒間混合し；患者標本を新鮮なハンクス緩衝液から取り出し、(a) 溶液を約1000 × gで約10分間遠心して脱凝集させた細胞をペレット化するか、または(b) 溶液を濾過して脱凝集させた細胞を収集し；遠心後上清を捨て、ペレット化細胞を残留上清中に再懸濁し、再懸濁した細胞を溶液の中に入れるか、または濾過した後濾過した細胞を溶液の中に入れることを含み、前記溶液は約30重量%から約60重量%のメタノール、約40重量%から約70重量%の水、緩衝液及び保存剤を含み、前記溶液を室温で一晩保存する。

【0011】

方法は更に、(v) 細胞を細胞支持体に適用することを含む。細胞支持体が細胞診スライドならば、方法は更に(vi) スライドを水-アルコール溶液中に浸漬し、(vii) スライドを固定液中に浸漬し、(viii) スライドを乾燥させることを含む。水-アルコール溶液は95% エタノールであり得、スライドをエタノール中に室温で約15分間浸漬する。固定液はカルノア液であり得、スライドをカルノア液中に室温で約30分間浸漬し得る。スライドを室温で乾燥させ得る。

【0012】

*in situ*ハイブリダイゼーション(IISH)または免疫組織化学(IHC)を実施する方法も提供する。1つの実施形態では、方法は、上記方法に従って調製した細胞をハイブリダイジング条件下で検出可能に標識されているプローブと接触させ、患者から標本を取り出してから約14時間未満で検出可能な標識を可視化することを含む。他の実施形態では、方法は、微細針吸引、コア針生検、摘徐生検及び切除からなる群から選択される標本由来の脱凝集させた細胞をハイブリダイジング条件下で検出可能に標識されているプローブと接触させ、患者から標本を取り出してから約14時間未満で検出可能な標識を可視化することを含む。検出可能に標識されているプローブは蛍光標識されている核酸プ

10

20

30

40

50

ローブ、例えば蛍光ISH (FISH) 用プローブ、または蛍光標識されている抗体プローブ、例えば免疫組織化学 (IHC) 用プローブであり得る。好ましくは、細胞を細胞支持体に適用し得る。好ましい実施形態では、細胞支持体は少なくとも2つの不連続エリアを含み、細胞を不連続エリアに適用し、各エリアを少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならばこれらの検出可能に標識されているプローブは区別され得る。実施形態では、各不連続エリアを別々に検出可能に標識されているプローブの混合物と接触させ、その混合物は、

- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ及びROSIに対する2色ブレイクアパートプローブ、
 - ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ、ROS1に対する2色ブレイクアパートプローブ及びc-METに対するプローブ、
 - ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ、ROS1に対する2色ブレイクアパートプローブ及びRETに対する2色ブレイクアパートプローブ、
 - RETに対する2色ブレイクアパートプローブ及びNTRK1に対する2色ブレイクアパートプローブ、
 - RETに対する2色ブレイクアパートプローブ及びKIF5Bに対するプローブ、
 - METに対するプローブ、EGFRに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、
 - AURKAに対するプローブ、9p21に対する遺伝子座特異的プローブ、染色体3に対するCEP、染色体6に対するCEP及び染色体7に対するCEP、
 - MYCに対するプローブ、EGFRに対するプローブ、DCCに対するプローブ、13q14に対する遺伝子座特異的プローブ及び染色体18に対するCEP、
 - MYCに対するプローブ、TERCに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、
 - MYCに対するプローブ、HER2に対するプローブ、ZNF217に対するプローブ及び9p21に対する遺伝子座特異的プローブ、
 - MCL1に対するプローブ、FGFR2に対するプローブ、METに対するプローブ、EGFRに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、
 - FGFR2に対するプローブ、PIK3CAに対するプローブ、染色体3に対するCEP及び染色体10に対するCEP、
 - PTENに対するプローブ、ERGに対するプローブ及び染色体10に対するCEP、
 - FGFR1に対するプローブ、FGFR2に対するプローブ、FGFR2に対する2色ブレイクアウェイプローブ、染色体8に対するCEP及び染色体10に対するCEP、または
 - METに対するプローブ、PIK3CAに対するプローブ、EGFRに対するプローブ、染色体7に対するCEP及び染色体3に対するCEP
- からなる。

【0013】

更に、チロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質に対する患者の応答をテラノースする方法を提供する。この方法は、細胞が適用されており、少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブを別々に接触させる少なくとも2つの不連続エリアを含む細胞支持体を用いて上記方法に従ってISHまたはIHCを実施することを含む。エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならば検出可能に標識されているプローブは区別され得る。チロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質はクリゾチニブ、ボリチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ダサチニブ、トラスツズマブ、またはベルツズマブであり得る。

【0014】

もっと更に、テラノース方法の改良を提供する。この改良は、例えば細胞が適用されており、少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブと接触させる少なくとも2つの不連続エリアを含む細胞支持体上で上記したISHまたはIHCを実施する方法を使用することを含み、エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させる

10

20

30

40

50

ならば検出可能に標識されているプローブは区別され得る。

【0015】

もっと更に、上記したISHまたはIHCを実施する方法に従って上記したような検出可能に標識されているプローブと接触している細胞がその表面上にある細胞支持体を提供する。この細胞支持体は少なくとも2つの不連続エリアを含み、各エリアを少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならばこれらの検出可能に標識されているプローブは区別され得る。各不連続エリアを上記した混合物のような検出可能に標識されているプローブの混合物と別々に接触させてもよい。

【0016】

よって、キットも提供する。そのキットは、(a)ISHまたはIHC用の細胞支持体及び/または少なくとも1つのプローブ、及び(b)上記したISHまたはIHCの実施方法を例えば細胞が適用されており、少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブと接触している少なくとも2つの不連続エリアを含む細胞支持体上で実施するための使用説明書を含み、エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならばこれらの検出可能に標識されているプローブは区別され得る。加えてまたは替えて、使用説明書は上記したテラノシス方法を実施するための使用説明書を含み得る。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、組織サンプルから得た細胞の調製方法、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、特にマルチプレックスFISH、免疫組織化学(IHC)の方法、テラノシスの方法、細胞支持体及びキットを提供する。細胞の調製方法により、組織標本を患者から微細針吸引(FNA)、コア針生検、摘徐生検、切除等により得た後できるだけすぐに、例えば約14時間(例えば、約13.5時間)未滿で核酸ハイブリダイゼーション(例えば、マルチプレックスFISHのようなFISH)を実施することができる。組織標本は、(a)新鮮であり、(b)解凍した新鮮冷凍であり、または(c)部分的に固定され得る。固定/包埋標本の使用を避けることにより、ハイブリダイゼーション結果はより明瞭に見ることができ、包埋標本の切片作製に関連する打ち切りアーチファクトを避けることができる。本方法により、ISH、例えばFISH用に使用しなければならないプローブを含めた試薬の容量を固定/包埋標本に対するISH、例えばFISHと比較して低減または実質的に低減させることができる。更に、本方法によりISH、例えばFISHを比較的小さな限定エリアで実施することができ、全体を迅速に画像処理することができる。よって、本方法によりマルチプレックスISH、例えばマルチプレックスFISHが可能である。

【0018】

本方法は、例えば別の治療オプションよりも成功する可能性が高い治療オプション、予後判定、考えられる治療応答、予防または治療処置のモニタリング、治療効果の評価等を選択する目的で一般的にコンパニオン診断と称されているテラノシスにおいて有用である。

【0019】

より具体的な例は癌の標的療法に対するコンパニオン診断である。すべての迅速に分裂する細胞で干渉される化学療法とは明瞭に対照的に、標的療法(分子標的療法とも称される)は発癌や腫瘍増殖に必要な特別の標的分子で干渉することにより癌細胞の増殖を阻止する。標的治療はより有効であり、正常細胞に対して余り有害でないと予想される。標的治療の主なカテゴリーは小分子、小分子薬物コンジュゲート及びモノクローナル抗体である。現在、乳癌、多発性骨髄腫、リンパ腫、前立腺癌、メラノーマ及び他の癌に対する標的治療がある。

【0020】

患者が癌を有していると診断されるか、癌を有していると疑われる場合には、マルチプレックスISH(例えば、マルチプレックスFISH)用の細胞のサンプルを複数の(す

10

20

30

40

50

なわち、2つ以上、例えば2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の)プローブを用いて作製することが好ましく、望ましくさえあり、この場合各プローブまたはプローブの組合せ(例えば、2つ、3つまたはそれ以上のプローブ)により癌バイオマーカーを検出することができる。この点で、マルチプレックスFISHにより、複数の(すなわち、2つ以上、例えば2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の)癌バイオマーカーを検出することができることが好ましく、望ましくさえある。本発明は多くは癌の関連で、特に癌の診断、癌の予後判定、(併用治療を含めた)癌治療の選択、治療効果の評価、治療のモニタリング、再発のモニタリング等に向けられているが、本発明はマルチプレックスFISH(例えば、マルチプレックスFISH)による評価を受けることができる他の疾患の関連で有用であると理解されたい。

10

【0021】

本方法は、大量生産される予防及び治療薬のテーラード製造及びテーラード投与、並びに前記物質を単独または他の活性物質と一緒にテーラード製造及びテーラード投与において、例えば個別化した用量レベルの2つ以上の活性物質を含有しているピル剤及びポリピル剤の製造及び処方においても有用である。従って、本方法により、医薬コンパウンディング、すなわち特定患者のために有効成分含量及び/または処方に対する患者の具体的な要望に応じて医薬品を製造する従来のプラクティスが容易になる。2つ以上の活性物質を含有しているポリピル剤の製造は大量生産される一定容量の配合医薬品の使用に対する代替を提供する。

20

【0022】

用語

以下の用語が本発明に関連する：

「約」は、示されている値からほぼ $\pm 10\%$ の変動を指す。特に言及されていなくても、本明細書中に記載されている所与の値には前記変動が常に含まれると理解されたい。

【0023】

「腺腫」は、腺起源の良性腫瘍である。本明細書中、「腺腫」、「結腸腺腫」、「結腸の腺腫」及び「結腸腺腫」は、腺腫様ポリープとも称されている結腸中の腺腫を指すために使用され得る。腺腫様ポリープは通常結腸内視鏡検査により発見され、悪性になる傾向があるので切除される。

30

【0024】

本明細書中、「腺癌」、「結腸腺癌」、「結腸の癌」及び「結腸腺癌」は、結腸での悪性増殖(すなわち、癌)を指すために使用され得る。

【0025】

本明細書中、「ALK」は、染色体2上に位置する未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)遺伝子を指すために使用され得る。Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは2p23であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは2p23.1である。別名は未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ、CD246、CD246抗原、EC2.7.10.1、NBLST3、Ki-1、ALKチロシンキナーゼ受容体及び変異未分化リンパ腫キナーゼを含む。本明細書中、「ALK」は、ALKを伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。insituハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりALKを伴うパラメーターを検出するためのプローブを、ALK遺伝子を含む染色体2のp23領域(2p23)にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC_000002.11及びNT_022184.15が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0026】

本明細書中、「AURKA」は、ヒト染色体20上のq13に位置するオーロラキナーゼA遺伝子を指すために使用され得る。Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは20q13であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは20q13.2である。AURKAの別名はARK1、BTAK、STK15、STK6、ALK、PPP1

50

R47、STK7、セリン/スレオニンキナーゼ6、オーロラ2、オーロラ関連キナーゼ1、オーロラ/IPL1関連キナーゼ1、乳房腫瘍増殖キナーゼ、セリン/スレオニン-タンパク質キナーゼ15、セリン/スレオニン-タンパク質キナーゼ6、セリン/スレオニン-タンパク質キナーゼオーロラ-A、ARK-1、AURA、hARK1、AURORA2、AURA、セリン/スレオニンキナーゼ15、オーロラ/IPL1様キナーゼ、乳房腫瘍増幅キナーゼ、IPL1関連キナーゼ、タンパク質ホスファターゼ1調節サブユニット47、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼ15、AIRK1、AYK1、EC2.7.11.1及びIAK1を含む。本明細書中、「AURKA」は、AURKAを伴う染色体異常、例えばコピー数の増加を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりAURKAを伴うパラメーター、例えばAURKAのコピー数、AURKAを伴うコピー数比、またはAURKAの増加%を検出するためのプローブを、AURKA遺伝子を含む染色体20のq13領域(20q13)にハイブリダイズさせることが好ましい。DNA参照配列には、NC_000020.10及びNT_011362.10が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0027】

国立衛生研究所が規定している「バイオマーカー」は、正常な生物学的プロセス、病原プロセス、または治療介入に対する医薬応答のインジケーターとして客観的に測定され、評価される特性である。

20

【0028】

本明細書中、「ブレイクアパートプローブ」は、転座を検出できる2つの別個に検出可能に標識されているプローブの組合せを指すために使用され得る。例えば、1つのプローブは所与の遺伝子の5'末端またはその近くにハイブリダイズし、1つの波長で蛍光を発し得、他方のプローブは所与の遺伝子の3'末端またはその近くにハイブリダイズし、異なる波長で蛍光を発し得る。染色体が天然状態にあるとき、色は単色、例えば黄色として合わされる。染色体が転移を受けたならば、色は例えば赤色と緑色に分かれる。

【0029】

「ブラシ細胞診標本」は、上皮表面、例えば胃腸管、肺または頸部をブラッシングすることにより得られる細胞のサンプルである。

30

【0030】

「癌診断」は、通常癌のタイプの同定を指す。

【0031】

「癌予後判定」は、通常癌の起こり得る経過(例えば、疾患の進行)またはアウトカム(例えば、転移または死)の予想または予測を指す。

【0032】

本明細書中、「CDKN2」は、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤2Aを指すために使用され得る。Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは9p21であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは9p21.3である。別名はサイクリン依存性キナーゼ4阻害剤A、CDK4I、MLM、MTS1、MTS-1、CMM2、P16、ARF、INK4、INK4A、P14、P14ARF、P16-INK4A、P16INK4、P16INK4A、P19、P19ARF、TP16、CDK4阻害剤P16-INK4、細胞周期ネガティブ調節因子、p14ARF、p16-INK4、P16-INK4a、p16INK4A及びp19ARFを含む。明細書中、「CDKN2」は、CDKN2を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりCDKN2を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、CDKN2遺伝子を含む染色体9のp21領域(9p21)にハイブリダイズさせることが好ましい。「CDKN2」及び「P16」は本明細書中で互換可能に使用され得る。DNA参照配列には、NC_000009.11、NT_008413.18及びNC_018920.2が含まれる。

40

50

【0033】

「染色体列挙プローブ (CEP)」または「セントロメアプローブ」は、細胞中の1つ以上の特定の染色体を列挙することができるプローブである。染色体列挙プローブは、典型的には特定の染色体のセントロメアまたはその近くの領域(「ペリセントロメア」とも称される)、典型的にはその反復DNA配列(例えば、アルファサテライトDNA)を認識し、結合する。セントロメアは細胞分裂中の忠実な分離のために必要なもので、染色体のセントロメアは典型的にはその染色体を表すと見なされている。特定遺伝子座に相当するシグナルの数(コピー数)をセントロメアに相当するシグナルの数と比較することにより、特定の染色体領域の欠失または増幅は通常残留している全染色体(異数染色体)の消失または増加と区別され得る。この比較を行うための1つの方法は、遺伝子座を表すシグナルの数を、セントロメアを表すシグナルの数で割ることである。1未満の比は遺伝子座の相対的消失または欠失を示し、1を超える比は遺伝子座の相対的増加または増幅を示す。また、染色体内のアンバランスな増加または消失を示すために同一の染色体上、例えば染色体の2つの異なるアーム上の2つの異なる遺伝子座間で比較を行うことができる。染色体に対するセントロメアプローブの代わりに、当業者は全染色体消失または増加を概算するために染色体アームプローブを替わりに使用し得ることを認識している。しかしながら、そのようなプローブのシグナルの消失が必ずしも全染色体の消失を示すとは限らないので、前記プローブは染色体を列挙するのに正確ではない。染色体列挙プローブの例には、Abbott Molecular, Inc. (イリノイ州デス・プレーンズ)(旧Vysis, Inc., イリノイ州ダウナーズ・グローブ)から市販されているCEP(R)プローブが含まれる。染色体列挙プローブまたはセントロメアプローブの具体例には、染色体1、染色体2、染色体3、染色体4、染色体5、染色体6、染色体7、染色体8、染色体9、染色体10、染色体11、染色体12、染色体13、染色体14、染色体15、染色体16、染色体17、染色体18、染色体19、染色体20、染色体21、染色体X及び染色体Yに対するプローブが含まれる。CEP(R)プローブの具体例には、CEP1、CEP2、CEP3、CEP4、CEP5、CEP6、CEP7、CEP8、CEP9、CEP10、CEP11、CEP12、CEP13、CEP14、CEP15、CEP16、CEP17、CEP18、CEP19、CEP20、CEP21、CEPX及びCEPYが含まれる。

10

20

【0034】

「コピー数」は単一遺伝子座、1つ以上の遺伝子座または全ゲノムのDNAの測定値である。2の「コピー数」はヒトにおける「野生型」である(6つの染色体を除いて二倍体であるので)。(6つの染色体を除いて)ヒトにおける2以外の「コピー数」は野生型から逸脱している。そのような逸脱には、増幅、すなわちコピー数の増加、及び欠失、すなわちコピー数の低下、及びコピー数の不在が含まれる。

30

【0035】

本明細書中、「コア針生検」「コア生検」または「摘除生検」は、組織の組織学的構築を保存しながら組織のサンプルを取り出すための針または切開の使用を指すために使用されている。

【0036】

本明細書中、「DCC」は、ヒト染色体18上の領域q21中に位置する結腸直腸癌欠失遺伝子を指すために使用され得る。Entrez Gene細胞遺伝学的バンドは18q21.3であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは18q21.2であり、HGNC細胞遺伝学的バンドは18q21.1である。別名はIGDCC1、結腸直腸癌抑制因子、免疫グロブリンスーパーファミリーDCCサブクラスメンバー1、腫瘍抑制因子タンパク質DCC、CRC18、CRCR1、結腸直腸腫瘍抑制因子、結腸直腸癌欠失タンパク質及びネトリン受容体DCCを含む。本明細書中、「DCC」は、DCCを伴う染色体異常、例えばDCCコピー数低下を調べるために使用され得るプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用され得る。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりDCCを伴うパラメーター、例えばDCCのコピー数、DCCを伴うコ

40

50

ピー数比、またはDCCの増加%を検出するためプローブを、DCC遺伝子を含む染色体18のq21領域(18q21)にハイブリダイズさせることが好ましい。DNA参照配列には、NC__000018.9及びNT__010966.14が含まれるが、これらに限定されない。

【0037】

本明細書中、「EGFR」は、ヒト染色体7上の領域p12中に位置する上皮成長因子受容体遺伝子を指すために使用され得る。Entrez Gene細胞遺伝学的バンド及びHGNC細胞遺伝学的バンドは7p12であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは7p11.2である。別名は鳥類赤芽球性白血病ウイルス(v-erb-b)発癌遺伝子ホモログ、ERBB、ERBB1、癌原遺伝子c-ErbB-1、受容体チロシン-タンパク質キナーゼerbB-1、HER1、EC 2.7.10.1、PLG61、細胞増殖抑制タンパク質40、細胞増殖誘導タンパク質61、mENA及びEC 2.7.10を含む。本明細書中、「EGFR」は、EGFRを伴う染色体異常、例えばEGFRコピー数増加を調べるために使用され得るプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用され得る。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりEGFRを伴うパラメーター、例えばEGFRのコピー数、EGFRを伴うコピー数比、またはEGFRの増加%を検出するためのプローブを、EGFR遺伝子を含む染色体7のp12領域(7p12)にハイブリダイズさせることが好ましい。DNA参照配列には、NC__000007.13、NT__033968.6及びNT__079592.2が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0038】

本明細書中、「ERG」は、V-Ets鳥類赤芽球症ウイルスE26発癌遺伝子ホモログを指すために使用され得る。Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは21q22.3であり、Ensembl遺伝子バンドは21q22.2である。別名はV-Ets鳥類赤芽球症ウイルスE26発癌遺伝子関連転写調節因子ERG(形質転換タンパク質ERG)、V-Ets赤芽球症ウイルスE26発癌遺伝子様、TMPRSS2-ER前立腺癌特異的erg-3, ets-関連p55、TMPRSS2/ERG融合、転写調節因子ERG、V-Ets赤芽球症ウイルスE26発癌遺伝子ホモログ及び形質転換タンパク質ERGを含む。本明細書中、「ERG」は、ERGを伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりERGを伴うパラメーターを検出するためのプローブを、ERG遺伝子を含む染色体21のq22領域(21q22)にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC__000021.8、NC__018932.2及びNT__011512.11が含まれる。

30

【0039】

本明細書中、「摘徐生検」は、全凝塊または疑わしいエリアの切除を指すために使用されている。

【0040】

本明細書中、「FGFR1」は、線維芽細胞増殖因子受容体1を指すために使用され得る。Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは8p12であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは8p11.22である。別名はFLT2、KAL2、Fms関連チロシンキナーゼ2、塩基性線維芽細胞増殖因子受容体1、Fms様チロシンキナーゼ2、癌原遺伝子C-Fgr、BFGFR、CEK、FGFBR、FGFR-1、FLG、FLT-2、HBGFR、bFGF-R-1、EC 2.7.10、EC 2.7.10.1、OGD、プファイファー症候群、CD331、CD331抗原、HH2、N-SAM、FGFR1/PLAG1融合、ヘパリン結合増殖因子受容体、ヒドロキシアリール-タンパク質キナーゼ、N-SAM、N-sam、FGFR1/PLAG1縮合、ヘパリン結合増殖因子受容体及びヒドロキシアリール-タンパク質キナーゼを含む。本明細書中、「FGFR1」は、FGFR1を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼ

40

50

ーション（例えば、FISH）によりFGFR1を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、FGFR1遺伝子を含む染色体8のp11-12領域（8p11-12）にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC_000008.10、NT_167187.1及びNC_018919.2が含まれる。

【0041】

本明細書中、「FGFR2」は、線維芽細胞増殖因子受容体2を指すために使用され得る。Entrez Gene細胞遺伝学的バンドは10q26であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは10q26.13であり、HGNC細胞遺伝学的バンドは10q25.3-q26である。別名はFGFR-2、BEK、ケラチノサイト増殖因子受容体、KGF、CFD1、JWS、細菌発現キナーゼ、EC2.7.10.1、頭蓋顔面骨形成不全1、クルゾン症候群、ジャクソン・ワイス症候群、プファイファー症候群、BBD5、BFR-1、CD332、CD332抗原、CEK3、ECT1、TK14、TK25、BEK線維芽細胞増殖因子受容体、FGF受容体、ヒドロキシアリアル-タンパク質キナーゼ、タンパク質チロシンキナーゼ受容体様14、可溶性FGFR4バリエーション4、K-SAM、K-sam、KSAM及びEC2.7.10を含む。本明細書中、「FGFR2」は、FGFR2を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション（例えば、FISH）によりFGFR2を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、FGFR2遺伝子を含む染色体10のq14領域（10q14）にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC_000010.10、NC_018921.2及びNT_030059.13が含まれる。

10

20

【0042】

本明細書中、「微細針吸引」または「針吸引生検」は、細胞を取り出す組織の組織学的構築を保存することなく組織から細胞のサンプルを取り出すための針の使用を指すために使用されている。微細針吸引は例えば嚢胞から流体サンプルを取り出すためにも使用され得る。

【0043】

「固定液」には、アルコール溶液、酸アセトン溶液、アルデヒド（例えば、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒド）、メタノール/酢酸、及びホルマリンが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0044】

本明細書中、「HER2」は、V-Erb-B2鳥類赤芽球性白血病ウイルス発癌遺伝子ホモログ2を指すために使用され得る。Entrez Gene及びEnsembl細胞遺伝学的バンドは17q12であり、HGNC細胞遺伝学的バンドは17q11.2-q12である。別名はHER-2、HER-2/neu、TKR1、NGL、NEU、神経/膠芽腫由来発癌遺伝子ホモログ、転移性リンパ節遺伝子19タンパク質、癌原遺伝子C-ErbB-2、癌原遺伝子Neu、チロシンキナーゼ-タイプ細胞表面受容体HER2、MLN19、p185erbB2、EC2.7.10.1、V-Erb-B2鳥類赤芽球性白血病ウイルス発癌遺伝子ホモログ2、CD340、C-ErbB2/Neuタンパク質、ハースタチン、神経芽細胞腫/膠芽腫由来発癌遺伝子ホモログ、受容体チロシン-タンパク質キナーゼErbB-2、V-Erb-B2赤芽球性白血病ウイルス発癌遺伝子ホモログ2、MLN19、CD340抗原及びEC2.7.10を含む。本明細書中、「HER2」は、HER2を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション（例えば、FISH）によりHER2を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、HER2遺伝子を含む染色体17のq11-12領域（17q11-12）にハイブリダイズさせるのが好ましい。参照DNA配列には、NC_000017.10、NT_010783.15及びNC_018928.2が含まれる。

40

【0045】

本明細書中、「標識されている」、「検出可能な標識で標識されている」及び「検出可

50

能に標識されている」は、実在物（例えば、プローブ）が検出できることを示すために本明細書中で互換可能に使用されている。「標識」及び「検出可能な標識」は、実在物を検出可能にするように該実在物に結合している部分、例えば標的配列に結合したときにプローブを検出可能にするように該プローブに結合している部分を意味する。部分それ自体は検出可能でなくてもよいが、別の部分と反応すると検出可能になり得る。用語「検出可能に標識されている」はこのような標識を包含すると意図される。検出可能な標識は、該標識がシグナルを発生するように選択され、そのシグナルは測定され得、結合した実在物の量に比例する強度を有し得る。分子、例えばプローブのような核酸を標識及び/または検出するための多種多様なシステムが公知である。標識されている核酸は分光的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的または他の手段により直接または間接的に検出され得る標識を取り込むか、コンジュゲートすることにより作成され得る。適当な検出可能な標識には、放射性同位体、発蛍光団、発色団、化学発光剤、マイクロ粒子、酵素、磁気粒子、電子密度粒子、質量標識、スピン標識、ハプテン等が含まれる。本発明では、発蛍光団及び化学発光剤が好ましい。

10

【0046】

本明細書中、「洗浄」は、流体を体腔、例えば肺に導入し、試験のためにその流体を収集することを指すために使用されている。

【0047】

本明細書中、「遺伝子座特異的プローブ」及び「遺伝子座特異的識別子(LSI)」は、染色体上の領域中の特定の遺伝子座、例えば転移の増加/消失を受けたことが判明している遺伝子座に対して選択的に結合するプローブを指すために本明細書中で互換可能に使用され得る。プローブは、エクソン、イントロン、及び/またはプロモーター配列のような調節配列等を含むコーディングまたは非コーディング配列を標的とし得る。

20

【0048】

本明細書中、「MET」は、met癌原遺伝子を指すために使用され得る。Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは7q31であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは7q31.2である。別名は肝細胞増殖因子受容体、癌原遺伝子C-Met、分散因子受容体、チロシン-タンパク質キナーゼMet、HGF受容体、HGF/SF受容体、SF受容体、EC2.7.10.1、AUTS9、HGFR、RCCP2、c-Met、Met癌原遺伝子チロシンキナーゼ及びEC2.7.10を含む。本明細書中、「MET」は、METを伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりMETを伴うパラメーターを検出するためのプローブを、MET遺伝子を含む染色体7のq31領域(7q31)にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC_000007.13、NT_007933.15、NC_018918.2、及びNT_079596.2が含まれる。

30

【0049】

本明細書中、「MCL1」は骨髄細胞白血病配列1(BCL2関連)を指すために使用され得る。Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは1q21であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは1q21.3である。別名はBcl-2様タンパク質3、Bcl-2関連タンパク質EAT/Mcl1、BCL2L3、mcl1/EAT、EAT、MCL1-ES、MCL1L、MCL1S、Mcl-1、TM、bcl2-L-3、誘導骨髄性白血病細胞分化タンパク質Mcl-1、骨髄細胞白血病ES及びBcl2-L-3を含む。本明細書中、「MCL1」は、MCL1を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりMCL1を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、MCL1遺伝子を含む染色体1のq21領域(1q21)にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC_000001.10、NC_018912.2及びNT_004487.19が含まれる。

40

【0050】

50

本明細書中、「MYC」は、染色体8上のq24の領域中に位置するc-myc発癌遺伝子を指すために使用され得る。Entrez Gene及びEnsembl細胞遺伝学的バンドは8q24.21であり、HGNC細胞遺伝学的バンドは8q24である。別名はvHLH39、c-Myc、v-myc鳥類骨髄細胞腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ、クラスE塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質39、癌原遺伝子c-Myc、転写因子p64、MRTL、鳥類骨髄細胞腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ、myc癌原遺伝子タンパク質、myc関連翻訳/局在化調節因子及びBHLHE39を含む。本明細書中、MYCは、MYCを伴う染色体異常、例えばMYCコピー数増加を調べるために使用され得るプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用され得る。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりMYCを伴うパラメーター、例えばMYCのコピー数、MYCを伴うコピー数比、またはMYCの増加%を検出するためのプローブを、MYC遺伝子を含む染色体8のq24領域(8q24)にハイブリダイズさせることが好ましい。DNA参照配列には、NC_000008.10及びNT_008046.16が含まれるが、これらに限定されない。

【0051】

本明細書中、「NTRK1」は、神経栄養性チロシンキナーゼ受容体タイプ1を指すために使用され得る。Ensemble細胞遺伝学的バンドは1q23.1であり、Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは1q21-q22である。別名はMTC、TRKA、高アフィニティー神経成長因子受容体、トロポミオシン関連キナーゼA、チロシンキナーゼ受容体A、TRK、Trk-A、gp140trk、p140-TrkA、TRK1-形質転換チロシンキナーゼタンパク質、EC 2.7.10.1、TRK1、発癌遺伝子TRK、神経栄養性チロシンキナーゼ受容体タイプ1、チロシンキナーゼ受容体及びEC 2.7.10を含む。本明細書中、「NTRK1」は、NTRK1を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりNTRK1を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、NTRK1遺伝子を含む染色体1のq21-23領域(1q21-23)にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC_000001.10、NT_004487.19及びNC_018912.2が含まれる。

【0052】

「核酸サンプル」は、プローブとのハイブリダイゼーションに適した形態の核酸を含むサンプル、例えば核またはその核から単離または精製した核酸を含むサンプルを指す。核酸サンプルは全または部分的(例えば、特定の染色体)ゲノムDNA、全または部分的mRNA(例えば、特定染色体または遺伝子)、または選択した配列を含み得る。(間期または中期に存在するような)凝縮した染色体はin situハイブリダイゼーション(例えば、FISH及びマルチプレックスFISH)において標的として使用するのに適している。

【0053】

本明細書中、「PIK3CA」は、ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスホスフェート3-キナーゼ触媒サブユニットを指すために使用され得る。Entrez Gene細胞遺伝学的バンドは3q26.3であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは3q26.32であり、HGNC細胞遺伝学的バンドは3q26.3である。別名はホスホイノシチド-3-キナーゼ触媒ポリペプチド、ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート3-キナーゼ触媒サブユニットイソ型、ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスホスフェート3-キナーゼ110kDa触媒サブユニット、ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスホスフェート3-キナーゼ触媒サブユニットイソ型、PI3-キナーゼP110サブユニット、PI3-キナーゼサブユニット、PtdIns-3-キナーゼサブユニットP110、PtdIns-3-キナーゼサブユニット、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼPIK3CA、PI3K、PI3K-、CLOVE、EC 2.7.1.153、EC 2.7.11.1、CWS5、PI3Kア

10

20

30

40

50

ルファ、M C A P、p 1 1 0、p 1 1 0 -、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ触媒 1 1 0 - K D、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ触媒 ポリペプチド、M C M、M C M T C、ホスファチジルイノシトール 4, 5 - ビスホスフェート 3 - キナーゼ 1 1 0 k D a 触媒サブユニット、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ触媒 ポリペプチド及び E C 2 . 7 . 1 を含む。本明細書中、「P I K 3 C A」は、P I K 3 C A を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すために使用されている。i n s i t u ハイブリダイゼーション（例えば、F I S H）により P I K 3 C A を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、P I K 3 C A 遺伝子を含む染色体 3 の q 2 6 領域（3 q 2 6）にハイブリダイズさせることが好ましい。参照 DNA 配列には、N C _ 0 0 0 0 0 3 . 1 1、N C _ 0 1 8 9 1 4 . 2 及び N T _ 0 0 5 6 1 2 . 1 6 が含まれる。

10

【0054】

「所定カットオフ」及び「所定レベル」は、通常アッセイ結果を所定カットオフ/レベルに対して比較することにより診断/予後/治療有効性結果を評価するために使用されるカットオフ値を指し、前記した所定カットオフ/レベルは既に各種臨床パラメーター（例えば、疾患の重篤度、進行/非進行/改善等）にリンクまたは関連している。

【0055】

本発明との関連で、「プローブ」は、選択的ハイブリダイゼーションを可能にするかまたは促進させる条件下で標的配列の少なくとも一部に選択的にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドである。通常、プローブは DNA のコーディングまたはセンス（+）鎖に相補的であり、または DNA の非コーディングまたはアンチセンス（-）鎖に相補的（時に、「逆相補的」と称される）であり得る。プローブの長さは大きく異なり得る。幾つかの用途では約 1 0 から約 1 0 0 ヌクレオチド、例えば約 1 5 から約 5 0 ヌクレオチドのような約 1 5 から約 7 5 ヌクレオチドの長さが好ましいことがあり、染色体プローブの場合約 5 0 ~ 1 × 1 0⁵ ヌクレオチドの長さが好ましいことがあり、遺伝子座特異的プローブの場合約 2 5 , 0 0 0 から約 8 0 0 , 0 0 0 ヌクレオチドの長さが好ましいことがある。本明細書中、プローブは、例えば I H C 及び細胞の上皮細胞としての確認の関連で検出可能に標識されている抗体またはその抗原結合断片を指すためにも使用され得る。

20

【0056】

「予後判定」は、疾患の起こりそうなプロセス及び/またはアウトカム、例えば回復の可能性の予想である。よって、予後判定は病態の改善、病態の悪化、及び病態に変化なしを含む。

30

【0057】

本明細書中、「P T E N」は、ホスファターゼ及びテンシンホモログを指すために使用され得る。E n t r e z Gene 細胞遺伝学的バンドは 1 0 q 2 3 . 3 であり、E n s e m b l 細胞遺伝学的バンドは 1 0 q 2 3 . 3 1 であり、H G N C 細胞遺伝学的バンドは 1 0 q 2 3 である。別名はホスファターゼ及びテンシン様タンパク質、ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5 - トリスホスフェート 3 - ホスファターゼ及び二重特異性タンパク質ホスファターゼ、P T E N 1、多重進行癌 1 における変異、M M A C 1、染色体 1 0 で欠失している M M A C ホスファターゼ及びテンシンホモログ、B Z S、M H A M、T E P 1、G L M 2、1 0 q 2 3 d e l、C W S 1、D E C、E C 3 . 1 . 3 . 1 6、E C 3 . 1 . 3 . 4 8 及び E C 3 . 1 . 3 . 6 7 を含む。本明細書中、「P T E N」は、P T E N を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。i n s i t u ハイブリダイゼーション（例えば、F I S H）により P T E N を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、P T E N 遺伝子を含む染色体 1 0 の q 2 3 領域（1 0 q 2 3）にハイブリダイズさせることが好ましい。参照 DNA 配列には、N C _ 0 0 0 0 1 0 . 1 0、N C _ 0 1 8 9 2 1 . 2 及び N T _ 0 3 0 0 5 9 . 1 3 が含まれる。

40

【0058】

50

本明細書中、「RB1」は、ヒト染色体13上のq14の領域中に位置する網膜芽細胞腫遺伝子を指すために使用され得る。Entrez、Ensembl及びHGNC細胞遺伝学的バンドは13q14.2である。別名はOSRC、RB、p105-Rb、pRb、pp110、骨肉腫、網膜芽細胞腫感受性タンパク質、網膜芽細胞腫関連タンパク質及びRbを含む。「RB1」は「13q14」と本明細書中で互換可能に使用され得る。本明細書中、「RB1」または「13q14」は、RB1または13q14を伴う染色体異常、例えばRB1または13q14コピー数増加を調べるために使用され得るプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用され得る。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりRB1または13q14を伴うパラメーター、例えばRB1または13q14のコピー数、RB1または13q14を伴うコピー数比、またはRB1または13q14の増加%を検出するためのプローブを、RB1遺伝子を含む染色体13のq14領域(13q14)にハイブリダイズさせることが好ましい。DNA参照配列にはNC_000013.10及びNT_024524.14が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0059】

本明細書中、「RET」は、染色体10上に位置するret癌原遺伝子を指すために使用され得る。Entrez Gene及びHGNC細胞遺伝学的バンドは10q11.2であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは10q11.21である。別名はCDHF12、CDHR16、PTC、RET51、HSCR1、MEN2A、MEN2B、MTC1、EC2.7.10.1、EC2.7.10、カドヘリンファミリーメンバー12、癌原遺伝子c-Ret、ヒルシュスブルグ病1、多発性内分泌腺腫症及び甲状腺髄様癌1、RET-ELE1、カドヘリン関連ファミリーメンバー16、ヒドロキシアリール-タンパク質キナーゼ、癌原遺伝子チロシン-タンパク質キナーゼ受容体Ret、受容体チロシンキナーゼ及RET形質転換配列を含む。本明細書中、「RET」は、RETを伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりRETを伴うパラメーターを検出するためのプローブを、RET遺伝子を含む染色体10のq11領域(10q11)にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列にはNC_000010.10及びNT_033985.7が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0060】

本明細書中、「進行のリスク」は病態の悪化を指すために使用されている。

【0061】

本明細書中、「ROS」は、C-Ros発癌遺伝子1受容体チロシンキナーゼを指すために使用されている。Entrez Gene細胞遺伝学的バンドは6q22であり、Ensembl細胞遺伝学的バンドは6q22.1であり、HGNC細胞遺伝学的バンドは6q21-q22である。別名はMCF3、V-Ros UR2肉腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ1、V-Ros鳥類UR2肉腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ1、V-Ros UR2肉腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ1(鳥類)、c-ros-1、癌原遺伝子チロシン-タンパク質キナーゼ、膜貫通チロシン特異的タンパク質キナーゼ、癌原遺伝子C-Ros、癌原遺伝子C-Ros-1、受容体チロシンキナーゼC-Ros発癌遺伝子、C-Ros受容体チロシンキナーゼ及びEC2.7.10.1を含む。本明細書中、「ROS」はROSを伴う染色体異常を調べるためのプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりROSを伴うパラメーターを検出するためのプローブを、ROS遺伝子を含む染色体6のq22領域(6q22)にハイブリダイズさせることが好ましい。参照配列には、NC_000006.11、NC_018917.2及びNT_025741.15が含まれる。

40

【0062】

組織サンプルの「切片」は組織サンプルの1つのパーツまたはピース、例えば組織サン

50

ブルから切った組織または細胞の薄片である。組織サンプルの2つ以上の切片を取り、分析してもよい。所望ならば、1つの切片を各種レベルで、例えば形態学的及び分子（例えば、核酸及びタンパク質）レベルで分析し得る。

【0063】

本発明に関連して、「に対して選択的にハイブリダイズする」（及び「選択的ハイブリダイゼーション」、「に対して特異的にハイブリダイズする」及び「特異的ハイブリダイゼーション」）は、核酸分子をストリンジェントな条件下で特定のヌクレオチド配列に対して優先的に結合、二重鎖形成、またはハイブリダイズさせることを指す。用語「ストリンジェントな条件」は、プローブがその標的配列に対して優先的にハイブリダイズし、他の非標識配列に対してはより少ない程度しかまたは全くハイブリダイズしない条件を指す。（例えば、アレイ、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーションまたはFISHの場合のように）核酸ハイブリダイゼーションの関連での「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」及び「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」は配列依存性であり、各種条件下で異なる。核酸のハイブリダイゼーションに対する詳細なガイドは、例えばTijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Ch. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, NY (1993) 中に見つけられる。通常、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、規定のイオン強度及びpHで特定の配列についての熱融点(T_m)より約5 低いように選択される。 T_m は（規定のイオン強度及びpHで）標的配列の50%が完全に整合するプローブに対してハイブリダイズする温度である。特定プローブに対する非常にストリンジェントな条件は T_m に等しいように選択される。サザンまたはノーザンプロットにおいてアレイまたはフィルター上で100個以上の相補性残基を有する相補的核酸をハイブリダイズするためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は標準のハイブリダイゼーション溶液を用いて42 である（例えば、Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY (2001)を参照されたい）。

【0064】

本明細書中、「STAT1」は、ヒト染色体2上のq32に位置する転写1遺伝子のシグナルトランスドューサー及びアクティベーターを指すために使用され得る。Entrez Gene及びEnsembl細胞遺伝学的バンドは2q32.3であり、HGNC細胞遺伝学的バンドは2q32.2-q32.3である。STAT1の別名はSTAT-1、ISGF-3、STAT91、転写因子ISGF-3コンポーネントp91/p84、CANDF7、及び転写1 / のシグナルトランスドューサー及びアクティベーターを含む。本明細書中、「STAT1」は、STAT1を伴う染色体異常、例えばコピー数の増加を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すためにも使用されている。in situハイブリダイゼーション（例えば、FISH）によりSTAT1を伴うパラメーター、例えばSTAT1のコピー数、STAT1を伴うコピー数比、またはSTAT1の増加%を検出するためのプローブを、STAT1遺伝子を含む染色体2のq32領域（2q32）にハイブリダイズさせることが好ましい。DNA参照配列には、NC_000002.11及びNT_005403.17が含まれるが、これらに限定されない。

【0065】

「標的配列」、「標的領域」及び「核酸標的」は、例えばその消失及び/または増加を調べようとする特定の染色体位置にあるヌクレオチド配列を指す。

【0066】

本明細書中、「TERC」は、テロメラーゼRNAコンポーネントを指すために使用され得る。Ensembl及びHGNC細胞遺伝学的バンドは3q26.2であり、Entrez Geneバンドは3q26である。別名はTR、TRC3、小カール体特異的RNA19、DKCA1、PFBMFT2、SCARNA19及びhTRを含む。本明細書中、「TERC」は、TERCを伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すために使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりTERCを伴うパラメーターを検出するためのプローブを、TERC遺伝子を含む染色体3のq26領域(3q26)に対してハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC_000003.11、NC_018914.2及びNT_005612.16が含まれる。

10

【0067】

本明細書中、「テラノーシス」は、患者に対して治療を適合させるために使用されるプロセス、例えば診断テスト、特にISH(例えば、FISH)を用いる診断テストを指すために使用されている。テラノーシスにより、具体的患者の治療に対する薬物の適合性を評価し得る。加えて、薬物を用いる患者の治療の有効性を評価し得る。

【0068】

本明細書中、「ZNF217」は、ジンクフィンガータンパク質217を指すために使用され得る。Entrez Gene、Ensembl及びHGNC細胞遺伝学的バンドは20q13.2である。別名はZABC1である。本明細書中、「ZNF217」はZNF217を伴う染色体異常を調べるために使用されるプローブまたはプローブのセットを指すために使用されている。in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)によりZNF217を伴うパラメーターを検出するためのプローブを、ZNF217遺伝子を含む染色体20のq13領域(20q13)にハイブリダイズさせることが好ましい。参照DNA配列には、NC_000020.10、NT_011362.10及びNC_018931.2が含まれる。

20

【0069】

本明細書中で使用されている用語は具体的実施形態を記載する目的のためだけであり、別な方法で限定すると意図されない。

【0070】

細胞の調製方法

細胞のサンプルの調製方法を提供する。細胞のサンプルは組織または細胞の凝塊を含む適当な患者標本から調製され得る。典型的には、患者標本を微細針吸引(FNA)、コア針生検、摘徐生検、切除、洗浄(例えば、気管支洗浄)、ブラッシング等のような方法により得る。また、典型的には、患者標本は固定/包埋されていても、固定されているが包埋されていなくても、(例えば、Hologic Inc.(マサチューセッツ州マルボロ)が製造しているメタノール-水緩衝保存液であるPreservCyt(R)のような保存剤中に)部分的に固定されていても、冷凍(例えば、新鮮冷凍)されていても、または新鮮でもよい。好ましくは、患者標本をFNA、コア針生検、摘徐生検または切除により得る。幾つかの場合には、組織標本、または細胞の凝塊(すなわち、凝集物または凝集)を含む標本を洗浄及びブラッシングにより得ることができる。本発明の目的は標本を患者から得た後できるだけすぐに、例えば約14時間未満にISH(例えば、FISH)、特にマルチプレックスISH(例えば、マルチプレックスFISH)、または抗体との結合(IHCの場合のように)のようにプローブとのハイブリダイゼーションの結果を得ることなので、患者標本を包埋せず、(a)新鮮であり、(b)解凍した新鮮冷凍され、または(c)部分的に固定されていることが好ましい。上記にてらして、標本を患者から得た後できるだけ迅速に(例えば、直後に)患者標本から細胞のサンプルを調製することが好ましく、望ましくさえある。上述したように、包埋標本の使用を避けることにより、包埋標本の切片作製に伴う打ち切りアーチファクトを避けることができる。

30

40

【0071】

50

方法は組織または細胞の凝塊を含む患者標本を脱凝集させることを含む。組織または細胞の凝塊を適当な方法により脱凝集させ得る。好ましくは、方法は遠心または細胞ストレーナーの使用を含む。

【0072】

実施形態では、方法は、新鮮標本、解凍した新鮮冷凍標本、または部分的に固定した標本であり得る患者標本を濯ぐことを含む。好ましくは、標本を周囲温度（例えば、室温）で平衡塩類溶液を用いて濯ぐ。前記溶液の組成はpH及び浸透圧平衡を維持し、周囲温度で水及び必須無機イオン（例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム及び塩素）を与える。平衡塩類溶液の例には、ハンクス平衡塩類溶液（Life Technologies (TM) (カリフォルニア州カールスバッド) から入手可能)、アルセバール液、アール平衡塩類溶液、ゲイ平衡塩類溶液、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液、バック平衡塩類溶液、リンガー平衡塩類溶液、シムス平衡塩類溶液、トリス緩衝生理食塩液及びタイロード平衡塩類溶液が含まれるが、これらに限定されない。好ましい平衡塩類溶液はハンクス平衡塩類溶液である。濯いだ後、標本をジチオトレイトール（DTT）のような還元剤及びエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）のようなキレート剤を含む平衡塩類溶液、例えばハンクス平衡塩類溶液中に浸漬する。好ましくは、還元剤及びキレート剤を含み、その中に標本を浸漬する平衡塩類溶液を予加温する。濯ぎ、浸漬した後、標本をDTTのような還元剤、塩化カルシウムのようなカルシウムイオン源、及びジメチルスルホキシド（DMSO）のような極性非プロトン性溶媒を含む新鮮な平衡塩類溶液、例えばハンクス平衡塩類溶液に移し、短時間、例えば約5秒間から約10秒間混合する。

10

20

【0073】

この時点で、標本を脱凝集させる、例えば遠心または濾過する。遠心する場合、標本を低速（例えば、 $1000 \times g$ ）で回転して、脱凝集させた細胞をペレット化する。脱凝集させた細胞は数分程度で、例えば約15分未満、例えば約10分でペレット化する。遠心後、上清を捨て、ペレット化した細胞を残留上清中に再懸濁する。再懸濁した細胞を固定液、例えば緩衝液、保存剤及びアルコール（例えば、メタノールまたはエタノール）、PreservCyt (R) 等を含む水溶液中に入れる。濾過する場合、標本を細胞ストレーナー、例えばBecton Dickinson (ニュージャージー州フランクリン・レイクス) から入手可能な細胞ストレーナーを介して濾過し、濾過した細胞を固定液、例えば緩衝液、保存剤及びアルコール（例えば、メタノールまたはエタノール）、PreservCyt (R) 等を含む水溶液中に入れる。再懸濁した細胞を固定液中に数分程度（例えば、約15分間、約30分間、または約45分間）から最長約1時間放置する。

30

40

【0074】

この時点で、再懸濁した細胞を細胞支持体の表面に適用する。適当な細胞支持体を使用され得る。適当な細胞支持体の例には、細胞診スライド、サイトスピン、テティススライド及びマイクロ流体カメラが含まれるが、これらに限定されない。細胞支持体は、核酸ハイブリダイゼーション及び可視化を受けることができる2つ以上、例えば複数の（例えば、3つ4つ、5つ、6つまたはそれ以上の）不連続エリアを含み得る。不連続エリアの例には、凹部、例えば窪み、ウェル、チャンバ等が含まれる。再懸濁した細胞を2つ以上、例えば複数の不連続エリアに分配すると、プローブとのマルチプレックスハイブリダイゼーション、例えばISH（例えば、マルチプレックスFISH）及び/または抗体との結合（IHCの場合のように）を細胞支持体上で実施することができる。ハイブリダイゼーション結果は手動で（標識の際に使用した発蛍光団がヒトの眼に見えない遠赤外発蛍光団でないならば）、または適当なイメージングシステムを用いて可視化され得る。市販されているイメージングシステムには、Bioview, Inc. (マサチューセッツ州ビレリカ) 及びASIから入手可能なものが含まれるが、これらに限定されない。

【0075】

よって、上記にてらして、組織または細胞の凝塊を含む患者標本からの細胞の調製方法を提供する。この方法は、

(i) 患者標本を、還元剤及びキレート剤を含む予加温した平衡塩類溶液中に浸漬し；

50

(i i) 患者標本を還元剤、カルシウムイオン源及び極性非プロトン性溶媒を含む新鮮な平衡塩類溶液に移し、混合し；

(i i i) 患者標本を新鮮な平衡塩類溶液から取り出し、(a) 溶液を遠心して脱凝集させた細胞をペレット化するか、または(b) 溶液を濾過して脱凝集させた細胞を収集し；

(i v) (i i i) (a) 後、上清を捨て、ペレット化した細胞を残留上清中に再懸濁し、再懸濁した細胞を固定液中に入れるか、または(i i i) (b) 後、濾過した細胞を固定液中に入れることを含む。患者標本は(a) 新鮮標本、(b) 解凍した新鮮冷凍標本、または(c) 部分的に固定した標本であり得る。方法は更に、(i) の前に、患者標本を、平衡塩類溶液を用いて濯ぐことを含み得る。

【 0 0 7 6 】

好ましい実施形態では、方法は、患者標本、例えば腺腫のサンプルを室温でハクス緩衝液を用いて濯ぎ、患者標本を 2 0 m M D T T 及び 5 m M E D T A を含有する予加温したハクス緩衝液中に 3 7 で約 5 分間浸漬し、濯ぎ、浸漬した患者標本を 2 0 m M D T T、5 m M C a C l ₂ 及び 1 0 % D M S O を含有する新鮮なハクス緩衝液に移し、約 5 秒間から約 1 0 秒間混合し、患者標本を新鮮なハクス緩衝液から取り出し、(a) 溶液を約 1 0 0 0 x g で約 1 0 分間遠心して脱凝集させた細胞をペレット化するか、または(b) 溶液を濾過して脱凝集させた細胞を収集し、遠心後は上清を捨て、ペレット化した細胞を残留上清中に再懸濁し、再懸濁した細胞を溶液の中に入れるか、または濾過後は濾過した細胞を溶液の中に入れる。前記溶液は約 3 0 重量% から約 6 0 重量% のメタノール、約 4 0 重量% から約 7 0 重量% の水、緩衝液及び保存剤を含み、前記溶液は室温で一晩保持されている。

【 0 0 7 7 】

方法は更に、(v) 細胞を細胞支持体に適用することを含み得る。細胞支持体が細胞診スライドの場合、方法は更に(v i) スライドを水 - アルコール溶液中に浸漬し、(v i i) スライドを固定液中に浸漬し、(v i i i) スライドを乾燥させることを含む。水 - アルコール溶液は 9 5 % エタノールであり得、スライドをエタノール中に室温で約 1 5 分間浸漬する。固定液はカルノア液であり得、スライドをカルノア液中に室温で約 3 0 分間浸漬する。スライドを室温で乾燥させ得る。

【 0 0 7 8 】

細胞支持体

上記方法に従って患者標本から調製した細胞、例えば腺腫のサンプルから単離した細胞を含む細胞支持体、例えば細胞診スライド、サイトスピン、テティススライド (T e t h i s s l i d e) 及びマイクロ流体カメラも提供する。細胞を細胞支持体に手で、或いは器具、例えば ThinPrep T - 2 0 0 0 プロセッサ (H o l o g i c , I n c . , マサチューセッツ州マルボロ) または別の市販されている器具を用いて適用し得る。細胞支持体は、上記した方法に従って患者標本から調製した細胞を適用するために I S H (または、I H C) 及び可視化を受けることができる 2 つ以上、例えば複数の (例えば、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、またはそれ以上の) 不連続エリアを含み得る。不連続エリアの例には、凹部、例えば窪み、ウェル、チャンバ等が含まれる。好ましい実施形態では、細胞支持体は少なくとも 6 つの不連続エリアを含む。各不連続エリア中の細胞を少なくとも 1 つの検出可能に標識されているプローブと接触させることが好ましく、望ましくさえあり、エリアを 2 つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならば検出可能に標識されているプローブは異なるプローブとして区別され得る。好ましくは、不連続エリアは、各不連続エリアが全体としてイメージングシステムで見ることのできるような大きさである。また、好ましくは、不連続エリア間に距離があり、その距離は 1 つの不連続エリアにおいて検出可能な標識、例えば蛍光標識により生ずるシグナルが 1 つ以上の隣接する不連続エリアにおいて検出可能な標識、例えば蛍光標識により生ずるシグナルの可視化を妨害しないような距離である。この点で、検出可能な標識は、隣接エリア中の検出可能な標識が異なる波長で、その可視化が相互に妨害しないシグナルまたは蛍光を発するように選択され得る。不連続エリア間の距離は、細胞支持体を使用しにくくする及び/また

10

20

30

40

50

はイメージングシステムを使用するならばそのイメージングシステムと適合しなくなるほど大きくてはならない。

【0079】

細胞を細胞支持体、例えば細胞診スライドの表面に適用し得、細胞支持体を周囲温度（すなわち、室温）でアルコール - 水溶液、例えば95% エタノール中に数分間、例えば約15分間浸漬し得る、その後、細胞支持体を周囲温度（すなわち、室温）で上記した固定液、例えば3:1 メタノール:酢酸であるカルノア液中に約30分間浸漬し、例えば室温で乾燥させ得る。

【0080】

所望により、細胞支持体、例えばスライドを使用するまで - 20 で保存し得る。しかしながら、本発明の目的は標本を患者から得た後できるだけ迅速に、例えば約14時間未満でISH（例えば、FISH）、特にマルチプレックスISH（例えば、マルチプレックスFISH）の結果を得ることなので、細胞支持体を直ちに使用することが好ましく、望ましくさえある。

【0081】

よって、上記にてらして、本明細書中に記載されている方法に従って検出可能に標識されているプローブと接触させた細胞がその表面上にある細胞支持体を提供する。細胞支持体は少なくとも2つの不連続エリアを含み、その不連続エリアに細胞を適用する。各エリアを少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならば検出可能に標識されているプロ

ーブは区別され得る。例えば、各不連続エリアを検出可能に標識されているプローブの混合物と別々に接触させ得、前記混合物は、

- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ及びROSIに対する2色ブレイクアパートプローブ、

- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ、ROSIに対する2色ブレイクアパートプローブ及びc-METに対するプローブ、

- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ、ROSIに対する2色ブレイクアパートプローブ及びRETに対する2色ブレイクアパートプローブ、

- RETに対する2色ブレイクアパートプローブ及びNTRK1に対する2色ブレイクアパートプローブ、

- RETに対する2色ブレイクアパートプローブ及びKIF5Bに対するプローブ、

- METに対するプローブ、EGFRに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、

- AURKAに対するプローブ、9p21に対する遺伝子座特異的プローブ、染色体3に対するCEP、染色体6に対するCEP及び染色体7に対するCEP、

- MYCに対するプローブ、EGFRに対するプローブ、DCCに対するプローブ、13q14に対する遺伝子座特異的プローブ及び染色体18に対するCEP、

- MYCに対するプローブ、TERCに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、

- MYCに対するプローブ、HER2に対するプローブ、ZNF217に対するプローブ及び9p21に対する遺伝子座特異的プローブ、

- MCL1に対するプローブ、FGFR2に対するプローブ、METに対するプローブ、EGFRに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、

- FGFR2に対するプローブ、PIK3CAに対するプローブ、染色体3に対するCEP及び染色体10に対するCEP、

- PTENに対するプローブ、ERGに対するプローブ及び染色体10に対するCEP、

- FGFR1に対するプローブ、FGFR2に対するプローブ、FGFR2に対する2色ブレイクアウェイプローブ、染色体8に対するCEP及び染色体10に対するCEP、または

- METに対するプローブ、PIK3CAに対するプローブ、EGFRに対するプローブ、染色体7に対するCEP及び染色体3に対するCEP

をからなる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

In situハイブリダイゼーション及び免疫組織化学

in situハイブリダイゼーション (ISH) または免疫組織化学 (IHC) の実施方法を提供する。この方法は、上記方法に従って調製した細胞をハイブリダイジング条件下で検出可能に標識されているプローブと接触させ、患者から標本を取り出してから約14時間未満、例えば13.5時間で検出可能な標識を可視化することを含む。実施形態では、方法は、微細針吸引、コア針生検、摘徐生検及び切除からなる群から選択される標本から脱凝集させた細胞をハイブリダイジング条件下で検出可能に標識されているプローブと接触させ、患者から標本を取り出してから約14時間未満、例えば13.5時間で検出可能な標識を可視化することを含む。検出可能に標識されているプローブは検出可能に標識されている核酸プローブ、例えば蛍光標識されている核酸プローブ、または検出可能に標識されている抗体、例えば蛍光標識されている抗体 (または、その抗原的に反応性の断片) プローブである。上記方法に関して、例えばオリゴベースのプローブを使用するときには、ハイブリダイゼーション及び可視化は実質的に約14時間未満、例えば約6.5時間で起こり得る。

10

【 0 0 8 3 】

好ましくは、細胞は細胞支持体に適用されている。好ましくは、細胞支持体は少なくとも2つの不連続エリアを含み、細胞は不連続エリアに適用されており、各エリアを少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならば検出可能に標識されているプローブは区別され得る。不連続エリアを適当な検出可能に標識されているプローブと別々に接触させ得る。各不連続エリアを検出可能に標識されているプローブの混合物と別々に接触させ得る。前記混合物は、

20

- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ及びROSIに対する2色ブレイクアパートプローブ、

- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ、ROS1に対する2色ブレイクアパートプローブ及びc-METに対するプローブ、

- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ、ROS1に対する2色ブレイクアパートプローブ及びRETに対する2色ブレイクアパートプローブ、

- RETに対する2色ブレイクアパートプローブ及びNTRK1に対する2色ブレイクアパートプローブ、

30

- RETに対する2色ブレイクアパートプローブ及びKIF5Bに対するプローブ、

- METに対するプローブ、EGFRに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、

- AURKAに対するプローブ、9p21に対する遺伝子座特異的プローブ、染色体3に対するCEP、染色体6に対するCEP及び染色体7に対するCEP、

- MYCに対するプローブ、EGFRに対するプローブ、DCCに対するプローブ、13q14に対する遺伝子座特異的プローブ及び染色体18に対するCEP、

- MYCに対するプローブ、TERCに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、

- MYCに対するプローブ、HER2に対するプローブ、ZNF217に対するプローブ及び9p21に対する遺伝子座特異的プローブ、

40

- MCL1に対するプローブ、FGFR2に対するプローブ、METに対するプローブ、EGFRに対するプローブ及び染色体7に対するCEP、

- FGFR2に対するプローブ、PIK3CAに対するプローブ、染色体3に対するCEP及び染色体10に対するCEP、

- PTENに対するプローブ、ERGに対するプローブ及び染色体10に対するCEP、

- FGFR1に対するプローブ、FGFR2に対するプローブ、FGFR2に対する2色ブレイクアウェイプローブ、染色体8に対するCEP及び染色体10に対するCEP、または

- METに対するプローブ、PIK3CAに対するプローブ、EGFRに対するプローブ、染色体7に対するCEP及び染色体3に対するCEP

50

からなる。

【0084】

上記方法は当業界で公知の適当な検出方法を用いて実施され得る。同一サンプルに対して2つ以上のプローブを同時にまたは逐次使用する場合、各プローブを別個の標識、例えば別個の発蛍光団で検出可能に標識することが好ましい。

【0085】

各プローブが、例えばFISHにより検出可能に標識されており（同一サンプルに対して2つ以上のプローブを同時にまたは逐次使用する場合には、別個に標識されている）、各プローブが発蛍光団で標識されている（同一サンプルに対して2つ以上のプローブを同時にまたは逐次使用する場合には、別個に標識されている）in situハイブリダイゼーションにより上記方法を実施する場合、方法は患者標本（例えば、腺腫）から本明細書中に記載されている方法に従って調製した細胞（例えば、上皮細胞）を用いて実施し得る。患者標本は、（a）新鮮であり得（新鮮な細胞は1～3日間培養し、染色体が高度に凝縮されている中期中細胞をブロックするためにコルセミドのようなブロッカーを培養物に添加し得、可視化し得る）、（b）解凍・新鮮冷凍され得、または（c）（例えば、メタノール、エタノールまたはPreservCyt（R）中に）部分的に固定され得、（例えば、RNアーゼ及びペプシンで）処理して、標的核酸（例えば、DNA）の接触性を高め、非特異的結合を低下させた後に、1つ以上のプローブとハイブリダイズし、洗浄して未結合プローブを除去し、ハイブリダイズしたプローブを検出し得る。

10

【0086】

細胞診スライドのような細胞支持体は、ThinPrep T-2000プロセッサ（Hologic, Inc., マサチューセッツ州ベッドフォード）を製造業者の使用説明書に従って用いて作製され得る。スライドを2×SSC中に73で2分間置き、ペプシン（0.5mg/mL）と37で10分間インキュベートし、1×PBS（リン酸緩衝食塩液）中に室温で5分間、1% NBF（中性緩衝ホルマリン）中に室温で5分間、1×PBS中に室温で5分間置く。70% エタノール、85% エタノール及び100% エタノール中にそれぞれ1分間置くことによりスライドを脱水した後、風乾する。プローブ及びカバーガラスを適用し、カバーガラスを密封し、スライドをサーモブライトにおいて72で2分間共変性し、37で最長8時間ハイブリダイズし得る。ハイブリダイゼーションが完了したら、スライドを0.4×SSC/0.3% NP-40を用いて73で2分間、2×SSC/0.1% NP-40を用いて室温で1分間処理した後、風乾し、4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩水和物（DAPI）I褪色防止剤（Abbott Molecular, Inc., イリノイ州デス・プレーンズ）を載せ、カバーガラスを被せ得る。

20

30

【0087】

上記した細胞支持体を用いる上記した1つ以上のプローブとのハイブリダイゼーションは、自動化共変性機器（HYBriteまたはThermoBrite変性/ハイブリダイゼーションシステム, Abbott Molecular, Inc., イリノイ州デス・プレーンズ）を製造業者の使用説明書に従って用いて37で最長8時間実施し得る（この方法は典型的にはプローブ及び標的核酸の変性を含む）。ハイブリダイゼーション後、細胞支持体、例えば細胞診スライドを洗浄緩衝液（2×クエン酸緩衝液/0.3% NP40; Abbott Molecular, Inc. から入手可能）中に室温で2～10分間置いてカバーガラスを外した後、73の洗浄緩衝液中に2分間浸漬し、乾燥し、DAPI I褪色防止剤（Abbott Molecular, Inc.）を載せ得る。好ましくは、細胞支持体、例えば細胞診スライドをシングルバンドパスフィルター（Abbott Molecular, Inc.）を備えている落射蛍光顕微鏡を用いて分析する。

40

【0088】

検出前に、細胞サンプルを場合により見かけ上の細胞学的異常に基づいて前選択してもよい。前選択は疑わしい細胞を同定し、これによりこれらの細胞にスクリーニングを集中

50

させることができる。前選択によりより速くスクリーニングすることができ、陽性結果を見落とさない可能性が高くなる。生物学的サンプルからの細胞を顕微鏡スライド上に載せ、通常異形成胞及び新生細胞に関連する細胞学的異常を目視でスキャンすることができる。異常には、通常プローブをその標的DNAに対してハイブリダイズした後核を核酸ステインまたは染料、例えばヨウ化プロピジウムまたはDAPIを用いて対比染色することにより評価される核のサイズ、核の形状及び核染色の異常が含まれる。典型的には、新生細胞は広がったり、形状が不規則であったり、及び/またはまだらな染色パターンを示す核を有している。典型的には約0.4 µg/mlから約5 µg/mlの濃度で使用されるヨウ化プロピジウムは、614 nmの発光ピーク波長で観察され得る赤色蛍光DNA特異的染料である。典型的には約125 ng/mlから約1,000 ng/mlの濃度で使用されるDAPIは、452 nmの発光ピーク波長でDAPIフィルターを用いて低倍率で観察され得る青色蛍光DNA特異的ステインである。この場合、検出のために前選択した細胞のみを染色体消失及び/または増加についてカウントする。DAPIフィルターを用いて異常な核を有する多くの細胞があると見られるときには、少なくとも100、好ましくはより多くのオーダーの前選択細胞を染色体消失及び/または増加を評価するために選択することが好ましい。

10

【0089】

或いは、あるレベルの異形成または疑わしい病巣を示す組織中のエリアを、DAPIフィルターを用いて低倍率で局在化し、プローブの異常なコピー数を有している核の存在について十分に検査し得る。正常細胞では、所与のプローブの2コピーが検出される。異常細胞では、所与のプローブのより多いまたはより少ないコピーが検出される。好ましくは、列挙のために最も有意なコピー数変化を有するエリアを選択する。可能な限り、多数の異常エリアを選択し、少なくとも約100個の核が分析されるように各異常エリア内で少なくとも約10個のランダム核を高倍率(64倍または100倍の対物レンズ)で選択する。好ましくは、核は重複しておらず、十分に明るいシグナルを有している。

20

【0090】

或いは、検出のための細胞は細胞学的または組織学的特徴と無関係に選択され得る。例えば、顕微鏡スライド上の所与の1つ以上のエリア中の非重複細胞のすべてを染色体消失及び/または増加について評価し得る。更なる例として、顕微鏡スライド上に番号順に現れる少なくとも約50、より好ましくは少なくとも約100のオーダーのスライド上の細胞、例えば変化した形態を示す細胞が染色体消失及び/または増加を評価するために選択され得る。

30

【0091】

遺伝子/遺伝子座/染色体のコピーをカウントする。所望ならば、コピー数をコピーの予想されるまたは「正常な」数(すなわち、2コピー)と比較し得、2を超えるコピー数(すなわち、増加)及び2未満のコピー数(すなわち、低下)、及び/または必要に応じてLSIプローブのコピー数及びセントロメアプローブ(本明細書中では染色体列挙プローブ(CEP)とも称される)のコピー数の比較に基づいて比較した相対的低下は、細胞がFISHにより異常であることを示す。2つ以上の遺伝子座の3以上のコピーの存在は多染色体性を示す。単一遺伝子座のコピー数の増加、例えば単一遺伝子座の3以上のコピーは単一遺伝子座増加を示す。脱パラフィン、前処理、染色及びルーチンのスライド洗浄も当業界で公知の方法に従って実施し得るが、VP 2000プロセッサ(Abbott Molecular, Inc., イリノイ州デス・プレーンズ)のような自動化システムを使用すると評価用スライドを作成するのに必要な時間が短くなる。スライドは、ハイブリダイゼーション後洗浄のために標準のコプリンジャーを使用するときの小バッチ(例えば、4スライド)と対照的に、大バッチ(例えば、50スライド)で作成し得る。加えて、スライドの採点法は自動化イメージングを用いて完全自動化され得、これにより標本分析のために必要な実地時間が短くなる。完全自動化により、より多くの異常細胞をより頻繁に、常に捕捉するイメージングアルゴリズムを使用することができる。また、当業界で公知のスライド作成の適当な方法を使用し得るが、スライドを細胞のより均一且つ一

40

50

定の単層を生成するThinPrep 2000 (Hologic, Inc., マサチューセッツ州ベッドフォード) を用いて作成することが好ましい。

【0092】

in situハイブリダイゼーション及び類似方法による分析のための核酸標的の変性は典型的には細胞形態を保存するように行われる。例えば、染色体DNAは高pH、高熱(例えば、約70~95の温度)、有機溶媒(例えば、ホルムアミド)及びその組合せにより変性され得る。一方、プローブは数分程度加熱することにより変性され得る。

【0093】

変性後、ハイブリダイゼーションを実施する。プローブをその核酸標的に対して特異的にハイブリダイズするための条件は通常特定のハイブリッドを作製するための所与のハイブリダイゼーション手順で使用され得る条件の組合せを含み、その条件は当業者により容易に決定され得る。その条件は典型的には管理された温度、液相、及びプローブと標的の接触を含む。ハイブリダイゼーション条件は、プローブ濃度、標的長さ、標的及びプローブG-C含量、溶媒組成、温度及びインキュベーション期間を含めた多くの要因に応じて異なる。少なくとも1つの変性ステップをプローブの標的との接触に先行させてもよい。或いは、プローブ及び標的を相互に接触させながら、またはその後プローブを生物学的サンプルと接触させて一緒に変性条件にかけてもよい。ハイブリダイゼーションの後、プローブ/サンプルを例えば約2~4×SSC及び約10~50%ホルムアミドを含有している液相中、約25から約55の温度で、例えば約0.5から約96時間の範囲の時間インキュベートし得る。特異性を高めるために、米国特許No. 5,756,696(その内容は全体として、特にブロッキング核酸の使用の記載について、参照により本明細書に組み入れる)に記載されている非標識ブロッキング核酸のようなブロッキング剤を使用し得る。当業者には自明のように、サンプル中に存在する核酸に対してプローブを特異的にハイブリダイズするために他の条件を容易に使用し得る。ハイブリダイゼーションプロトコルは、例えばPinkelら, PNAS USA, 85:9138-9142(1988); In situ Hybridization Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 33, Choo編, Humana Press, Totowa, NJ(1994);及びKallioniemiら, PNAS USA, 89:5321-5325(1992)に記載されている。

【0094】

適当なインキュベーション期間が終了したら、サンプルDNAに対する染色体プローブの非特異的結合を一連の洗浄により除去し得る。所望のストリンジェンシーのために温度及び塩濃度を適当に選択する。必要なストリンジェンシーのレベルはゲノム配列に対する特定のプローブ配列の複雑さに依存し、公知の遺伝組成を有するサンプルに対してプローブを系統的にハイブリダイズすることにより決定され得る。通常、高ストリンジェンシー洗浄は約65から約80の範囲の温度で、約0.2×から約2×SSC及び約0.1%から約1%の非イオン性洗浄剤、例えばノニデットP-40(NP40)を用いて実施され得る。より低いストリンジェンシー洗浄が必要ならば、洗浄はより低温で、高濃度の塩を用いて実施され得る。

【0095】

発蛍光団標識されているプローブまたはプローブ組成物を使用する場合、検出方法は蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー、またはプローブハイブリダイゼーションを調べるための他の手段を含み得る。複数の発蛍光団を観察するために適当な顕微鏡イメージング方法を本明細書中に記載されている方法と一緒に使用し得る。蛍光顕微鏡法を使用する場合、ハイブリダイズしたサンプルを各発蛍光団の励起に適した光の下で適当な1つ以上のフィルターを使用して観察することができる。自動化デジタルイメージングシステム、例えばMetaSystems、BioViewまたはAppliedイメージングシステムをシグナル列挙及びデータ獲得アルゴリズムと一緒に使用し得る。

【0096】

使用する方法に応じて、結果の表示を容易にし、蛍光強度の小さな違いを検出する感度

10

20

30

40

50

を改善するためにデジタル画像分析システムを使用し得る。例示的システムは、自動化ステージ、焦点コントロール及びフィルターホイールを備えた標準蛍光顕微鏡をベースとする自動化画像分析システムであるQUIPS（定量的画像処理システムの頭辞語）（Ludl Electronic Products, Ltd., ニューヨーク州ハウソン）である。励起波長を選択するために、フィルターホイールを顕微鏡の蛍光励起路中に載置する。二色ブロック中の特殊フィルター（Chroma Technology, パーモント州ブラトルボロ）により、画像表示をシフトすることなく複数の染料を励起させることができる。顕微鏡は2つのカメラポートを有しており、その1つはスライド上の興味深いエリアを見つけ、焦点を合わせるために使用される高感度高速ビデオ画像表示のための増感CCDカメラ（Quantex Corp., カリフォルニア州サニーベール）である。他のカメラポートは、高解像度及び感度で実際の画像を獲得するために使用される冷却CCDカメラ（Photometrics Ltd. のモデル200, アリゾナ州ツェッソン）を有している。冷却CCDカメラを、VMEバスを介してSUN 4/330ワークステーション（SUN Microsystems, Inc., カリフォルニア州マウンテンビュー）にインターフェースで接続する。多色画像の全獲得は画像処理ソフトウェアパッケージSCIL-Image（Delft Centre for Image Processing, オランダ国デルフト）を用いてコントロールされる。

10

【0097】

テラノーシス

テラノーシスのための方法も提供する。この方法は、患者に対して治療を適合させるために使用される上記した細胞支持体を用いる診断テスト、特にFISH、例えばマルチプレックスFISHを用いる診断テストのようなプロセスを含む。テラノーシスにより、特定患者の治療のための薬物の適合性を評価し得る。加えて、特に、患者の薬物を用いる治療の有効性を評価し得る。例えば、患者標本から調製した細胞中の調べた遺伝子座が異常（例えば、コピー数の増加または低下、または転座等）ならば、腫瘍は多分活性物質、例えば小分子、標的化モノクローナル抗体（mAb）、標的化ポリクローナル抗体（pAb）または他の活性物質に対して感受性であり、この場合この活性物質を患者に投与し得、おそらく投与すべきである。活性物質に対する感受性を示す染色体異常が検出されないならば、患者はその活性物質での治療に应答しないか、うまく应答しない恐れがある。患者を活性物質で治療した後に染色体異常の消失が検出されたならば、その活性物質を用いる患者の治療が有効であると見なされ得る。患者を活性物質で治療した後に染色体異常の増加が検出されたならば、その活性物質を用いる患者の治療が無効であると見なされ得る。患者を活性物質で治療した後に染色体異常の変化が検出されないならば、その活性物質を用いる患者の治療は有効であると見なされるか、あるいは見なされないことがある。

20

30

【0098】

1つの実施形態では、少なくとも2つの不連続エリアを含む細胞支持体を使用し得る。上記方法に従って調製した細胞を連続エリアに適用した後、各エリアを少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならば検出可能に標識されているプローブは区別され得る。例えば、各不連続エリアを検出可能に標識されているプローブの混合物と別々に接触させ得、前記混合物は、

40

- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ及びROSIに対する2色ブレイクアパートプローブ、
- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ、ROSIに対する2色ブレイクアパートプローブ及びc-METに対するプローブ、
- ALKに対する2色ブレイクアパートプローブ、ROSIに対する2色ブレイクアパートプローブ及びRETに対する2色ブレイクアパートプローブ、
- RETに対する2色ブレイクアパートプローブ及びNTRK1に対する2色ブレイクアパートプローブ、
- RETに対する2色ブレイクアパートプローブ及びKIF5Bに対するプローブ、

50

- M E T に対するプローブ、 E G F R に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、
 - A U R K A に対するプローブ、 9 p 2 1 に対する遺伝子座特異的プローブ、染色体 3 に対する C E P、染色体 6 に対する C E P 及び染色体 7 に対する C E P、
 - M Y C に対するプローブ、 E G F R に対するプローブ、 D C C に対するプローブ、 1 3 q 1 4 に対する遺伝子座特異的プローブ及び染色体 1 8 に対する C E P、
 - M Y C に対するプローブ、 T E R C に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、
 - M Y C に対するプローブ、 H E R 2 に対するプローブ、 Z N F 2 1 7 に対するプローブ及び 9 p 2 1 に対する遺伝子座特異的プローブ、
 - M C L 1 に対するプローブ、 F G F R 2 に対するプローブ、 M E T に対するプローブ、 E G F R に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、
 - F G F R 2 に対するプローブ、 P I K 3 C A に対するプローブ、染色体 3 に対する C E P 及び染色体 1 0 に対する C E P、
 - P T E N に対するプローブ、 E R G に対するプローブ及び染色体 1 0 に対する C E P、
 - F G F R 1 に対するプローブ、 F G F R 2 に対するプローブ、 F G F R 2 に対する 2 色ブレイクアウェイプローブ、染色体 8 に対する C E P 及び染色体 1 0 に対する C E P、または
 - M E T に対するプローブ、 P I K 3 C A に対するプローブ、 E G F R に対するプローブ、染色体 7 に対する C E P 及び染色体 3 に対する C E P
- からなる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】

細胞支持体の上記した実施形態のすべてがチロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質に対する患者の応答を本明細書中に記載されている方法に従ってテラノースするため使用され得る。例えば、患者標本から調製した細胞中の調べた遺伝子座が異常（例えば、コピー数の増加または低下、または転座等）ならば、腫瘍は多分チロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質、例えば小分子チロシンキナーゼ阻害剤（ T K I ）、標的化 m A b、標的化 p A b または他の活性物質に対して感受性であり、この場合その活性物質を患者に投与し得、おそらく投与すべきである。活性物質に対する感受性を示す染色体異常が検出されないならば、患者はその活性物質での治療に応答しないか、うまく応答しない恐れがある。患者を活性物質で治療した後に染色体異常の減少が検出されたならば、その活性物質を用いる患者の治療が有効であると見なされ得る。患者を活性物質で治療した後に染色体異常の増加が検出されたならば、その活性物質を用いる患者の治療が無効であると見なされ得る。患者を活性物質で治療した後に染色体異常の変化が検出されないならば、その活性物質を用いる患者の治療が有効であると見なされるか、あるいは見なされないことがある。上記方法に従って患者の応答を評価し得る活性物質の例にはクリゾチニブ、ボリチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ダサチニブ、トラスツズマブ、またはペルツズマブが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 0 】

患者が結腸直腸腺腫を有しているならば、少なくとも 5 つの不連続エリアを含む細胞支持体を使用し得る。上記方法に従って調製した細胞を不連続エリアに適用した後、各エリアを少なくとも 1 つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを 2 つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならば検出可能に標識されているプローブは区別され得る。例えば、第 1 エリアを E G F R に対する遺伝子座特異的プローブと接触させ、第 2 エリアを D C C に対する遺伝子座特異的プローブと接触させ、第 3 エリアを染色体 1 8 に対する C E P と接触させ、第 4 エリアを 1 3 q 1 4（染色体 1 3 の q アーム上のバンド 1 4）に対する遺伝子座特異的プローブと接触させ、第 5 エリアを M Y C に対する遺伝子座特異的プローブと接触させる。所望ならば、第 6 不連続エリアを S T A T 1 に対する遺伝子座特異的プローブまたは A U R K A に対する遺伝子座特異的プローブと接触させてもよい。或いは、第 6 不連続エリアを S T A T 1 に対する遺伝子座特異的プローブと接触させ、第 7 不連続エリアを A U R K A に対する遺伝子座特異的プローブと接触させてもよい。上記した細胞支持体は結腸直腸腺腫の再発のリスク及び結腸直腸腺腫の結

腸直腸腺癌への進行のリスクを予知するために使用され得る。染色体異常がないことは結腸直腸腺腫の再発のリスクが低いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが低いことを示し、一方EGFRのコピー数の増加は結腸直腸腺腫の再発のリスクが高いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクの高いことを示し、CEP18に対するDCCのコピー数の低下は結腸直腸腺腫の再発のリスクが高いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが高いことを示し、EGFRのコピー数の増加に加えてCEP18に対するDCCのコピー数の低下、13q14のコピー数の増加及びMYCのコピー数の増加は結腸直腸腺腫の再発のリスクが高いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが高いことを示す。STAT1のコピー数の増加及び/またはAURKAのコピー数の増加は結腸直腸腺腫の再発のリスクが高いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが高いことを示す。

10

【0101】

その表面上の不連続エリアに上記方法に従って調製した細胞が適用されている細胞支持体は以下の状況でも使用され得る：

- 患者が非小細胞肺癌（NSCLC）を有しており、患者がALKに対して陽性の結果を示すならば、クリゾチニブ（ザコリ（R））を患者に対して投与し得る。患者がNSCLCを有しており、患者がROS1に対して陽性の結果を示すならば、患者はクリゾチニブを用いる治療に対して耐性であるか、耐性を有するようになり得る。

20

- ASCL1及びRETの高い発現は喫煙関係肺癌を同定するための好結果の予後判定バイオマーカーであり得る。

- 多分AURKAコピー数及び/または染色体20異数染色体の増加に起因するAURKAの過剰発現が後期上皮性卵巣癌の大部分で見られ、タキサン及び非タキサンをベースとする補助治療応答に差別的に影響を与え得る（Lassmannら, Clin. Cancer Res., 13(14): 4083-4091 (July 15, 2007)）。AURKA過剰発現はタキソール/カルボプラチン治療を受けた患者の向上した全生存期間に関連しており、非タキサンベースの治療を受けた患者では全生存期間を悪化させる（上掲のLassmannら）。尿路上皮細胞中のAURKAのコピー数の増加は膀胱癌を検出するための将来有望なバイオマーカーであると示唆されている（Parkら, J. Nat'l Cancer Inst., 100(19): 1401-1411 (Oct. 1, 2008)）。

30

- 患者が慢性骨髄性白血病（CML）を有しているならば、患者が染色体9と染色体22間の相互転座から生ずるBCR-ABL遺伝子融合に対して陽性の結果（症例の>95%）を示すであろう。タンパク質シグナル化において過度に活発なABLタンパク質を阻害するためにチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブメシレート（グリベックとして販売されている；STI-571としても公知）を患者に対して投与する。CMLを有しており、他の治療薬で治療できないかまたは体調が良くならなかった患者に対してはボスチニブ（ボシュリフとして販売されている）を投与する。BCR-ABL遺伝子融合物（フィラデルフィア染色体）に対して陽性である慢性CMLを有しており、前治療に耐性/寛容であったり、なかつたりする患者に対してはダサチニブ（スプリセル（R）として販売されている）を投与する。フィラデルフィア染色体に対して陽性である急性リンパ芽球性白血病（ALL）を有しており、前治療に耐性/寛容である患者に対してもダサチニブを投与する。フィラデルフィア染色体に対して陽性であり、慢性CMLと新たに診断されたか、または以前慢性CMLに対する治療を受けた患者に対してはニロチニブ（タシグナ（TM）として販売されている）を投与する。

40

- 患者がNSCLCを有しており、癌がFGFR2のFGFR1を過剰発現しているならば、AZD4547として公知であり、FGFR1、FGFR2及びFGFR3を標的とする新規の選択的FGFRインヒビターを投与する（Cancer Lett., 307(1): 47-52 (August 2011)を参照されたい）。

- 患者が乳癌を有しており、癌がHER2/neu受容体を過剰発現しているならば、ト

50

ラスツズマブ（商標にはハークロン及びハーセプチンが含まれる）と名付けられている H E R 2 / n e u 受容体を妨害するモノクローナル抗体薬物を投与する。癌が H E R 2 / n e u 受容体を過剰発現していないならば、トラスツズマブを投与しない。患者が H E R 2 陽性の転移性乳癌を有しており、以前トラスツズマブ及びタキサンを別々にまたは一緒に投与されており、補助治療中または補助治療が完了してから 6 ヶ月以内の転移または疾患再発のために以前治療を受けているならば、アド - トラスツズマブエムタンシン（カドサイラ； G e n e n t e c h）を投与する。

- N T R K 1 の通常遠隔の遺伝子（例えば、M P R I P または C D 7 4）への融合は肺腺癌を有している非喫煙者において見られた（V a i s h n a v i r a , N a t u r e M e d i c i n e , 1 9 : 1 4 6 9 - 1 4 7 2 (2 0 1 3) を参照されたい）。

- 患者が癌を有しており、R E T を過剰発現しているならば、クリゾチニブ（ザーコリ（R））またはバンダタニブ（Z D 6 4 7 4）を投与する。カボザンチニブ（X L 1 8 4）は現在臨床試験中である（C a n c e r S c i . , 1 0 4 (1 1) : 1 3 9 6 - 1 4 0 0 (N o v e m b e r 2 0 1 3)）。

- 患者が癌を有しており、R O S を過剰発現しているならば、クリゾチニブ（ザーコリ（R））を投与する。

【0102】

上皮細胞の存在は、不連続エリア中の細胞を標識されている抗 C A M 5 . 2 抗体と接触させることにより確認され得る（すなわち、I H C）。

【0103】

よって、他のテラノース方法の中で、チロシンキナーゼ経路を標的とする活性物質に対する患者の応答をテラノースする方法を提供する。この方法は、本明細書中に記載されているように調製した細胞が適用されている少なくとも 2 つの不連続エリアを含む細胞支持体上で I S H を実施することを含む。各エリアを少なくとも 1 つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを 2 つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならば検出可能に標識されているプローブは区別され得る。各不連続エリアを検出可能に標識されているプローブの混合物と別々に接触させ得、前記混合物は、

- A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び R O S I に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

- A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、R O S 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び c - M E T に対するプローブ、

- A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、R O S 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

- R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び N T R K 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

- R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ及び K I F 5 B に対するプローブ、

- M E T に対するプローブ、E G F R に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、

- A U R K A に対するプローブ、9 p 2 1 に対する遺伝子座特異的プローブ、染色体 3 に対する C E P、染色体 6 に対する C E P 及び染色体 7 に対する C E P、

- M Y C に対するプローブ、E G F R に対するプローブ、D C C に対するプローブ、1 3 q 1 4 に対する遺伝子座特異的プローブ及び染色体 1 8 に対する C E P、

- M Y C に対するプローブ、T E R C に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、

- M Y C に対するプローブ、H E R 2 に対するプローブ、Z N F 2 1 7 に対するプローブ及び 9 p 2 1 に対する遺伝子座特異的プローブ、

- M C L 1 に対するプローブ、F G F R 2 に対するプローブ、M E T に対するプローブ、E G F R に対するプローブ及び染色体 7 に対する C E P、

- F G F R 2 に対するプローブ、P I K 3 C A に対するプローブ、染色体 3 に対する C E P 及び染色体 1 0 に対する C E P、

- P T E N に対するプローブ、E R G に対するプローブ及び染色体 1 0 に対する C E P、

- F G F R 1 に対するプローブ、F G F R 2 に対するプローブ、F G F R 2 に対する 2 色

10

20

30

40

50

ブレイクアウェイプローブ、染色体 8 に対する C E P 及び染色体 10 に対する C E P、または

- M E T に対するプローブ、P I K 3 C A に対するプローブ、E G F R に対するプローブ、染色体 7 に対する C E P 及び染色体 3 に対する C E P からなる。

【0104】

この点で、本明細書中に記載されている I S H 及び I H C の実施方法はテラノーシスの方法との関連で使用され得る。本明細書中に記載されている方法に伴う作用効果を考慮すると、テラノーシスの関連でのその使用は現在利用されている方法に勝る改善を与える。

【0105】

上記方法は、治療薬を用いる治療に対する可能性ある応答の評価、再発のモニタリング、及び予防または治療処置の有効性の評価のために使用され得る。よって、方法は治療決断、例えば治療または予防用治療薬の選択、手術に勝る積極的サーベイランスまたは治療の選択、その選択を含めた補助治療を使用する決断を助け得る。所望ならば、本明細書中に記載されている方法は他の検査、例えばルーチンの細胞学、組織学、抗原アッセイ、ノモグラム、メチル化、変異等と一緒に使用され得る。方法は他の予後判定方法で前もってまたは同時に得た結果を確認するためにも使用され得る。

【0106】

例えば、患者において上記した結腸直腸腺腫の予後判定方法を実施する過程で E G F R の増加したコピー数が存在すると判明したならば、抗 E G F R 剤を用いて患者を治療する決定がなされ得る。例えば、ヒト E G F R に結合し、表皮増殖因子 (E G F) の E G F R への結合を阻止して受容体シグナル化を阻止し、細胞活性化及び増殖を阻害することを示すと報告されている (例えば、国際公開 N o . W O 9 8 / 5 0 4 3 3 及び米国特許 N o . 6 , 2 3 5 , 8 8 3 を参照されたい) ヒト I g G 2 モノクローナル抗体 (m A b) であるパニツムマブ (V e c t i b i x)、または K R A S 変異ネガティブの E G F R 発現転移性大腸癌の治療のために認可されているキメラ m A b であるセツキシマブ (E r b i t u x) を、腺腫の腺癌への進行を抑制する及び / または腺腫の再発を抑制するために患者に対して投与し得る。加えてまたは替えて、患者に対してフォローアップ結腸内視鏡検査を約 1 年たったら実施する決定がなされ得る。

【0107】

また、患者において上記した結腸直腸腺腫の予後判定方法を実施する過程で D C C の低下したコピー数が存在すると判明したならば、患者を代替治療、例えば抗 E G F R 剤を含まない抗癌治療を用いて治療する決定がなされ得る。そのような代替治療の例にはフルオロウラシル、シスプラチン、ドキシソルピシン及びシクロホスファミドが含まれるが、これらに限定されない。加えてまたは替えて、患者に対してフォローアップ結腸内視鏡検査を約 1 年たったら実施する決定がなされ得る。

【0108】

また、患者に対して結腸内視鏡検査を実施する過程で腺腫が発見され、腺腫様ポリープを切除したならば、上記方法は腺腫の再発について患者をモニターするために使用され得る。同様に、患者において上記した結腸直腸腺腫の予後判定方法を実施する過程で染色体異常がないと判明したときのように患者において腺腫の再発のリスクが低いと判断されるならば、患者に対してフォローアップ結腸内視鏡検査を約 5 年たったら実施する決定がなされ得る。

【0109】

患者における上記した結腸直腸腺腫の予後判定方法を実施する過程で E G F R、M Y C 及び 1 3 q 1 4 の増加したコピー数及び C E P 1 8 に対して D C C の低下したコピー数が存在することが判明したならば、患者をパニツムマブ及び / またはセツキシマブのような抗 E G F R 剤を単独で、またはフルオロウラシル、シスプラチン、ドキシソルピシン及び / またはシクメホスファミドのような代替または補助治療剤と一緒に用いて患者を治療する決定がなされ得る。加えて、患者に対してフォローアップ結腸内視鏡検査を約 6 ヶ月たっ

10

20

30

40

50

たら実施する決定がなされ得る。加えてまたは替えて、上記方法は、方法を経時的に、例えばちょうどよい1時点からその後のちょうどよい時点まで定期的実施し、結果を経時的に比較することにより治療の有効性を評価するために使用され得る。

【0110】

上記方法を、検査サンプルを得た患者の治療の有効性を評価するために使用するならば、方法は場合により更に、有効性を改善するために必要に応じて患者の治療/予防処置を修飾することを含む。自動システムまたは半自動システムにおいて使用するために方法を改変してもよい。

【0111】

概して、疾患の進行及び/または治療をモニターするとき、染色体異常（存在またはレベル）は「変化なし」、「有利（または、「有利に変化している」）」、または「不利」（または、「不利に変化している」）であり得る。「高い」または「増加した」は、患者標本（例えば、腺腫）から得た細胞（例えば、上皮細胞）のサンプル中の染色体異常のレベルが正常または典型的なレベルまたは範囲よりも高いこと、または別の参照レベルまたは範囲（例えば、早期または基準サンプル）よりも高いことを指す。用語「低い」または「低下した」は、患者標本（例えば、腺腫）から得た細胞（例えば、上皮細胞）のサンプル中の染色体異常のレベルが正常または典型的なレベルまたは範囲よりも低い、または別の参照レベルまたは範囲（例えば、早期または基準サンプル）よりも低いことを指す。用語「変化した」は、患者標本（例えば、腺腫）からの細胞（例えば、上皮細胞）のサンプル中の染色体異常のレベルが正常または典型的なレベルまたは範囲、または別の参照レベルまたは範囲（例えば、早期または基準サンプル）に比して変化（増加または低下）していることを指す。

10

20

【0112】

所与の染色体異常についての正常または典型的なレベルまたは範囲は標準プラクティスに従って規定される。幾つかの場合染色体異常のレベルは非常に低いので、典型的なまたは正常レベルまたは範囲、または参照レベルまたは範囲と比較して実験誤差またはサンプルの違いにより説明できない正味の変化があるときに所謂変化したレベルまたは変化が起こったと見なされ得る。よって、特定サンプル中で測定されたレベルを所謂正常被験者からの類似サンプル中で測定されたレベルまたはレベルの範囲と比較する。これに関連して、「正常被験者」は検出可能な疾患を持たない個人であり、「正常」または「対照」患者または集団は例えばそれぞれ検出可能な疾患を示さないものである。更に、ヒト集団の大部分で染色体異常が高レベルで日常的に見つからないならば、「正常被験者」は所与の染色体異常の高いレベルが実質的に検出され得ない個人と見なされ得、「正常」（場合により、「対照」と称する）患者または集団は所与の染色体異常の高いレベルの実質的不検出を示すものである。「見かけ正常な被験者」は染色体異常を評価したことがないかまたは評価のものである。所与の染色体異常のレベルは、染色体異常が通常検出不能であるが検査サンプル中で検出されるとき、またアナライトが試験サンプル中に正常レベルよりも高いレベルで存在しているとき「高い」と言われる。

30

【0113】

方法は他のマーカー等の検出をも含み得る。

40

【0114】

よって、患者における癌（例えば、腺癌）のような状態の治療の有効性をモニターする場合、方法は、

(a) 治療薬を用いて治療する前の被験者由来の患者標本（例えば、腺癌）からの細胞（例えば、上皮細胞）のサンプル中の染色体異常を測定するステップ；

(b) 治療薬を用いて治療した後の被験者由来の患者標本（例えば、腺癌）からの細胞（例えば、上皮細胞）のより後のサンプル中の染色体異常のレベルを測定するステップ；

(c) ステップ(b)で測定された染色体異常のレベルをステップ(a)で測定された染色体異常のレベルと比較するステップ；

を含み得、ステップ(b)におけるレベルがステップ(a)で測定されたレベルと比較し

50

て変化なしかまたは不利ならば、被験者における癌（例えば、腺癌）のような状態は継続、進行または悪化していると判断される。対照的に、ステップ（b）で測定されたレベルがステップ（a）で測定されたレベルと比較して有利ならば、被験者における癌（例えば、腺癌）のような状態は休止、退行または改善していそうである。場合により、方法は更に、比較により例えばステップ（b）で測定されたレベルがステップ（a）で測定されたレベルに対して不利に変化していると判断されたならば、被験者を例えば1つ以上の他の治療薬、放射線及び/またはホルモン療法を用いて一定期間治療することを含む。被験者が治療を受ける期間は当業者により決められ得る（例えば、期間は約7日間から約2年間、好ましくは約14日間から約1年間であり得る）。

【0115】

治療中、腺癌細胞の第2及びその後のサンプルを被験者から得る。サンプルの数及びサンプルを被験者から得る時期は重要でない。例えば、第2サンプルは被験者が最初に治療を受けてから7日後に得られ得、第3サンプルは被験者が最初に治療を受けてから2週間後に得られ得、第4サンプルは被験者が最初の治療を受けてから3週間後に得られ得、第5サンプルは被験者が最初の治療を受けてから4週間後に得られ得る、等々。

【0116】

第2またはその後のサンプルの各々を被験者から得た後、第2またはその後のサンプル中の染色体異常のレベルを（例えば、本明細書中に記載されている方法または当業界で公知の方法を用いて）測定する。次いで、第2またはその後のサンプルの各々において測定されたレベルを第1サンプル（例えば、元々場合により所定レベルと比較したサンプル）において測定されたレベルと比較する。ステップ（c）で測定されたレベルがステップ（a）で測定されたレベルと比較して有利ならば、癌（例えば、腺癌）のような状態は休止、退行または改善していそうであり、被験者は治療され続けなければならない。しかしながら、ステップ（c）で測定されたレベルがステップ（a）で測定されたレベルと比較して変化なしかまたは不利ならば、癌（例えば、腺癌）のような状態は継続、進行または悪化していると判断され、被験者はより高用量の医薬組成物、放射線またはホルモンで治療されなければならない、または被験者は別の方法で治療されなければならない。

【0117】

一般的に、繰り返し検査を実施するアッセイ（例えば、疾患の進行及び/または治療に対する応答をモニターする）の場合、第1検査サンプルを被験者から得た後ちょうどよい時に第2またはその後の検査サンプルを得る。具体的には、第1検査サンプルを被験者から得てから数分後、数時間後、数日後、数週間後または数年後に被験者からの第2検査サンプルを得ることができる。例えば、被験者から第1試験サンプルを得てから約1分、約5分、約10分、約15分、約30分、約45分、約60分、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約2日間、約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、約9週間、約10週間、約11週間、約12週間、約13週間、約14週間、約15週間、約16週間、約17週間、約18週間、約19週間、約20週間、約21週間、約22週間、約23週間、約24週間、約25週間、約26週間、約27週間、約28週間、約29週間、約30週間、約31週間、約32週間、約33週間、約34週間、約35週間、約36週間、約37週間、約38週間、約39週間、約40週間、約41週間、約42週間、約43週間、約44週間、約45週間、約46週間、約47週間、約48週間、約49週間、約50週間、約51週間、約52週間、約1.5年、約2年、約2.5年、約3.0年、約3.5年、約4.0年、約4.5年、約5.0年、約5.5年、約6.0年、約6.5年、約7.0年、約7.5年、約8.0年、約8.5年、約9.0年、約9.5年または約10.0年後に第2検査サンプルを被験者から得ることができる。

【0118】

10

20

30

40

50

更に、本発明は、癌（例えば、腺癌）または腺腫のような状態に罹りやすいかまたは罹っている被験者が治療の恩恵を受けるかどうかを調べる方法にも関する。特に、本発明はコンパニオン診断方法及び製品に関する。よって、本明細書中に記載されている「被験者における疾患の治療をモニターする」方法は、更に最適には治療のための候補者を選択または同定することを包含し得る。一般的に、被験者は疾患の幾つかの症状を経験している、実際疾患のリスクを有しているかそのリスクがあると診断されるかまたはそのリスクを有している、及び/または本明細書中に記載されている染色体異常の不利なレベルを示しているものである。

【0119】

方法は、場合により被験者の治療の前後に染色体異常のレベルを評価する本明細書中に記載したアッセイを含む。治療後染色体異常の不利なレベルが観察されると被験者が更なる治療または継続治療を受ける恩恵を受けないであろうと確認され、治療後染色体異常の有利なレベルが観察されると被験者は更なる治療または継続治療を受ける恩恵を受けると確認される。この確認は臨床研究の管理及び改善された患者ケアの提供を助ける。

10

【0120】

プローブ

ALKに対するプローブの例はAbbott Molecular, Inc. (イリノイ州デス・プレーズ) から入手可能なVysis LSI ALK 2色ブレイクアパート再構成プローブである。ALK遺伝子に対して3'でハイブリダイズするプローブの1

20

【0121】

CDKN2に対するプローブの例はVysis LSI CDKN2 Aスペクトルオレンジ/CEP 9スペクトルグリーンプローブセットである。CDKN2 aスペクトルオレンジプローブは~222 kbである。

【0122】

ERGに対するブレイクアパートプローブはEmpire Genomics (ニューヨーク州バッファロー) から入手可能である。このプローブのオレンジ部分は~181 kbであり、プローブのグリーン部分は~189 kbである。テキサスレッド及びFITC

30

【0123】

オレンジであるFGFR1 FISHプローブはEmpire Genomicsから入手可能である。このプローブは~193 kbである。

【0124】

オレンジであるFGFR2 FISHプローブはEmpire Genomicsから入手可能である。このプローブは~174 kbである。

【0125】

HER2プローブの例はAbbott Molecular, Inc. から入手可能なLSI HER-2である。このプローブはオレンジであり、~190 kbである。

40

【0126】

METプローブの例はAbbott Molecular, Inc. から入手可能なLSI Metスペクトルレッドである。このプローブはレッドであり、~456 kbである。

【0127】

MCL1 FISHプローブはEmpire Genomicsから5つの異なる色で入手可能である。

【0128】

NTRK1スプリットプローブはAbnovaから入手可能である。1つのプローブは

50

テキサスレッドで標識されており、~420 kbであり、他のプローブはFITCで標識されており、~780 kbである。

【0129】

PIK3CAプローブの例はAbbott Molecular, Inc. から入手可能なLSI PIK3CAスペクトルグリーンプローブである。このプローブは~760 kbである。

【0130】

PTENプローブの例はAbbott Molecular, Inc. から入手可能なLSI PTENスペクトルオレンジプローブである。このプローブは~368 kbである。

10

【0131】

RETブレイクアパートプローブはAbbott Molecular, Inc. から入手可能である。1つのプローブはレッドであり、~469 kbである。他のプローブはグリーンであり、~545 kbである。

【0132】

ROSプローブの例はAbbott Molecular, Inc. から入手可能なLSI ROS1 (Tel) スペクトルオレンジプローブである。このプローブは~317 kbである。

【0133】

TERCプローブの例はAbbott Molecular, Inc. から入手可能なLSI TERCスペクトルゴールドプローブである。このプローブは~495 kbである。

20

【0134】

ZNF217プローブの例はAbbott Molecular, Inc. から入手可能なLSI ZNF217スペクトルオレンジプローブである。このプローブは~433 kbである。

【0135】

EGFRに対するプローブの例はAbbott Molecular, Inc. (イリノイ州デス・プレーンズ) から入手可能であるVysis LSI EGFRである。EGFR遺伝子は~188 kbである。このプローブは遺伝子を超えて5'方向に~1 kb、3'方向に~106 kb延びている。全プローブは約300 kbである。

30

【0136】

DCCに対するプローブの例はAbnova DCCである。Abnova DCCはAbnova Corporation (台湾) より製造されており、Thermo Fisher Scientific Inc. (ペンシルベニア州ピッツバーグ) よりカタログ番号89-028-963で流通している。

【0137】

13q14またはRB1に対するプローブの例はAbbott Molecular, Inc. (イリノイ州デス・プレーンズ) から入手可能なVysis LSI 13 (13q14) である。LSI 13 (13q14) はRB1遺伝子及びフランキング領域を含む重複クロンのセットから構成されている。RB1遺伝子は180 kbである。このプローブは遺伝子を超えて5'方向に110~170 kb、3'方向に約120 kb延びている。全プローブは約440 kbのサイズを有し、7p11領域にハイブリダイズする。

40

【0138】

MYCに対するプローブの例はAbbott Molecular, Inc. (イリノイ州デス・プレーンズ) から入手可能なVysis LSI MYC (8q24) である。MYC遺伝子は4.4 kbである。このプローブは遺伝子を超えて5'方向に~382 kb、3'方向に~434 kb延びている。全プローブは約821 kbであり、8q24領域にハイブリダイズする。

50

【0139】

S T A T 1 に対するプローブは当業界で入手可能な配列情報を用いて当業者に公知の方法に従って調製され得る。例えば、GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) から入手可能である受託番号 NG_008294.1 の参照配列、及び本明細書中に引用されている Haddadら, Cytogenet. Cell Genet., 83(1-2):58-59(1998) を参照されたい。追加の配列情報は、GenBank から受託番号 AC067945.4 として入手可能である BAC クローン RP11-629B4 として入手可能である。

【0140】

AURKA に対するプローブの例は Abbott Molecular, Inc. (イリノイ州デス・プレーンズ) から入手可能な Vysis AURKA FISH プローブである。

10

【0141】

染色体プローブとして使用するのに適しているプローブは染色体のセントロメアに関連する反復DNAとハイブリダイズする。霊長類染色体のセントロメアは、 α -サテライトDNAと称される約171塩基対(bp)のモノマー反復長から構成されているDNAのロングタンデムリピートの複合ファミリーを含んでいる。染色体プローブは、典型的には約50~1×10⁵ヌクレオチドの長さを有する。より長いプローブは、典型的には約100~500ヌクレオチドの長さを有するより小さな断片を含む。

【0142】

染色体領域または小領域を標的とする染色体列挙プローブ(CEP)及び遺伝子座特異的プローブは商業的に入手可能であり、または当業者により容易に作製され得る。このプローブは Abbott Molecular, Inc. (イリノイ州デス・プレーンズ)、Molecular Probes, Inc. (オレゴン州ユージーン)、または Cytocell (英国オックスフォードシャー) から商業的に入手可能である。染色体プローブは、例えばタンパク質核酸(PNA)、クローン化ヒトDNA、例えばプラスミド、細菌人工染色体(BAC)、及びヒトDNA配列のインサートを含むしているP1人工染色体(PAC)から作製され得る。当該領域はPCR増幅またはクローニングにより得られ得る。別の実施形態では、染色体プローブはオリゴプローブであり得る。或いは、染色体プローブは当業界で公知の方法に従って合成され得る。

20

30

【0143】

特定の遺伝子座の標的化を所望する場合、標的化遺伝子の全長に沿ってハイブリダイズするプローブが好ましいが、必須ではない。遺伝子座特異的プローブは、その遺伝子異常が転移に関連する発癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子、例えばMYCにハイブリダイズするように設計され得る。

【0144】

プローブは当業界で公知の方法により作製され得る。プローブは合成され得、または組換え的に産生され得る。このプローブの長さは約25,000塩基対から約800,000塩基対の範囲であり得る。

【0145】

プローブが検出可能に標識されていることが好ましく、2つ以上のプローブを同一サンプルに対して同時または逐次使用する場合には各プローブが別個に標識されていることが好ましい。好ましくは、プローブは発蛍光団で検出可能に標識されている。好ましい発蛍光団の例には、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸(AMCA)、5-カルボキシ-X-ローダミン、6-カルボキシ-X-ローダミン、リサミンローダミンB、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン-5-イソチアシアネート(FITC)、7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボン酸、テトラメチルローダミン-5-イソチアシアネート、テトラメチルローダミン-6-イソチアシアネート、5-カルボキシテトラメチルローダミン、6-カルボキシテトラメチルローダミン、7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸、N-4,4-ジフルオロ-5,7-ジメ

40

50

チル - 4 - ボラ - 3 a , 4 a - ジアザ - 3 - インダセンプロピオン酸、エオシン - 5 - イソチアシアネート、エリスロシン - 5 - イソチアシアネート、スペクトルレッド (TM) (Abbott Molecular, Inc.)、スペクトルゴールド (TM) (Abbott Molecular, Inc.)、スペクトルグリーン (TM) (Abbott Molecular, Inc.)、スペクトルアクア (TM) (Abbott Molecular, Inc.)、スペクトルオレンジ (TM) (Abbott Molecular, Inc., イリノイ州デス・プレーンズ)、テキサスレッド (Molecular Probes, Inc.)、ルシファーイエロー及びカスケードブルーアセチルアジド (Molecular Probes, Inc.) が含まれるが、これらに限定されない。使用する特定標識は重要でない。しかしながら、特定標識がプローブの *in situ* ハイブリダイゼーション及び他のプローブ上の標識の検出を妨害しないことが望ましい。標識はアッセイの感度を最大限とし、バックグラウンドシグナル以上で検出され得るようにできるだけ低いコピー数で検出されることが望ましい。また、標識が非常に局在化したシグナルを与え、よって高度の空間分解能を与えることが望ましい。

10

【0146】

発蛍光団の核酸プローブへの結合は当業界で公知であり、利用可能な手段によりなし得る。発蛍光団は例えば特定ヌクレオチドに共有結合され得。標識されているヌクレオチドはニックトランスレーション、ランダムプライミング (Rigbyら, *J. Mol. Biol.*, 113:237 (1997))、PCR標識、末端標識、シトシン残基のような特定残基の化学修飾による直線標識 (米国特許 No. 5,491,224) 等のような標準技術を用いてプローブに取り込まれ得る。或いは、発蛍光団は、プローブに取り込まれた活性化リンカーアームを用いて、例えばアミノ基転移されているプローブのデオキシシチジンヌクレオチドに対してリンカーを介して、ヌクレオチドに共有結合され得る。プローブの標識方法は、いずれもプローブの標識の記載について参照により本明細書に組み入れられる米国特許 No. 5,491,224 及び Morrisonら, *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*, Chapter 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets", p. 21-40, Fan 編, Humana Press (2002) に記載されている。

20

30

【0147】

当業者は、標識含有部分として発蛍光団の代わりに他の物質または染料を使用し得ることを認識している。発光剤には、例えば放射蛍光、化学発光、生物発光及び燐光性標識含有部分が含まれる。可視光で検出可能な物質にはシアニン染料が含まれる。或いは、間接手段により可視化される検出部分を使用してもよい。例えば、プローブを当業界で公知のルーチンを用いてピオチンまたはジゴキシゲニンで標識した後、検出のために更にプロセッシングしてもよい。ピオチン含有プローブはその後検出可能なマーカースにコンジュゲートしたアビジンの結合により可視化され得る。検出可能なマーカースは発蛍光団であり得、この場合プローブの可視化及び区別は下記するようになされ得る。

【0148】

或いは、標的領域にハイブリダイズした染色体プローブは、不溶性の発色生成物を生じさせるために標識部分を適当な基質と酵素反応させることにより可視化され得る。各プローブは別個の標識部分を選択することによりセット内の他のプローブから区別され得る。セット内のピオチン含有プローブは、その後アルカリホスファターゼ (AP) またはホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) にコンジュゲートしたアビジン及び適当な基質とインキュベートすることにより検出され得る。5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート及びニトロブルーテトラゾリウム (NBT) がアルカリホスファターゼに対する基質として働き、ジアミノベンゾエートが HRP に対する基質として働く。

40

【0149】

キット

50

キットも提供する。このキットは、(a) I S HまたはI H C用の細胞支持体及び/または少なくとも1つのプローブ、及び(b)本明細書中に記載されているように作製した細胞が適用される少なくとも2つの不連続エリアを含む細胞支持体上で上記方法を実施するための使用説明書を含み、前記した各エリアを少なくとも1つの検出可能に標識されているプローブと接触させ、エリアを2つ以上の検出可能に標識されているプローブと接触させるならばこれらの検出可能に標識されているプローブは区別され得る。

【0150】

実施形態では、キットは、(a)患者における結腸直腸腺腫の予後判定を可能にするプローブのセット、及び(b)患者において結腸直腸腺腫を予後判定するための使用説明書を含む。よって、キットは、(a) E G F Rに対する遺伝子座特異的プローブ、D C Cに対する遺伝子座特異的プローブ、染色体18に対する染色体列挙プローブ(C E P 1 8)、1 3 q 1 4に対する遺伝子座特異的プローブ及びM Y Cに対する遺伝子座特異的プローブを含むまたはこれらから構成される患者における結腸直腸腺腫の予後判定を可能にするプローブのセット、及び(b)患者から得た結腸直腸腺腫のサンプル(例えば、上皮細胞のような細胞のサンプル)中の染色体異常の存在または不在を調べることを含む患者における結腸直腸腺腫の予後判定するための使用説明書を含み得る。プローブのセットは更に、1つ以上の他の遺伝子座特異的プローブ及び/またはセントロメアプローブ(C E P)、例えばS T A T 1に対する遺伝子座特異的プローブ及び/またはA U R K Aに対する遺伝子座特異的プローブを含み得る。染色体異常がないことは、結腸直腸腺腫の再発リスクが低いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが低いことを示す。一方、E G F Rのコピー数の増加は結腸直腸腺腫の再発リスクが高いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが高いことを示し、C E P 1 8に対するD C Cのコピー数の低下は結腸直腸腺腫の再発のリスクが高いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが高いことを示し、E G F Rのコピー数の増加に加えてC E P 1 8に対するD C Cのコピー数の低下、1 3 q 1 4のコピー数の増加及びM Y Cのコピー数の増加は結腸直腸腺腫の再発のリスクが高いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが高いことを示す。S T A T 1のコピー数の増加及び/またはA U R K Aのコピー数の増加は結腸直腸腺腫の再発のリスクが高いこと及び/または結腸直腸腺腫の結腸直腸腺癌への進行のリスクが高いことを示す。

【0151】

キットは、更にブロッキング剤または他のプローブ、プローブの検出を容易にする各種標識または標識剤、ハイブリダイゼーションのための試薬(例えば、緩衝液)、中期スプレッド等を含み得る。

【実施例】

【0152】

下記実施例は本発明を説明するのに役立つ。これらの実施例は特許請求されている発明の範囲を限定すると決して意図されない。

【0153】

[実施例1]

本実施例は、新鮮冷凍結腸組織サンプルからの上皮細胞の単離及びこれらの細胞の起源の確認を記載する。

【0154】

冷凍した結腸組織サンプルを室温で解凍した。組織を室温でハンクス緩衝液を用いて濯いだ。次いで、組織を20 mM D T T及び5 mM E D T Aを含有する予加温したハンクス緩衝液中に37 で5分間浸漬した。組織を2 mLの振とう溶液(4 の20 mM D T T、5 mM C a C l ₂、5 mM M g C l ₂及び10% D M S Oを含有するハンクス緩衝液)を収容している10 mLのファルコンチューブに移し、チューブを5~10秒間渦状混合した。組織をファルコンチューブから取り出した。上清を(i)細胞ストレーナー(例えば、B e c t o n D i c k i n s o nから入手可能な100 μ M ナイロン細胞ストレーナー)を介して濾過するか、または(ii)細胞を沈降させるために1,

10

20

30

40

50

000 × g で 10 分間遠心し、その後上清を捨て、残留上清を用いて細胞を再懸濁した。細胞懸濁液を 20 mL の PreservCyt (R) 溶液を収容している ThinPrep パイアルに移した。細胞を PreservCyt (R) 溶液中、室温で一晩固定した。スライド作成までパイアルを周囲温度で保存した。パイアルを長期間保存しなければならないならば、パイアルを 2 ~ 8 °C で保存した。

【0155】

スライドを ThinPrep T-2000 プロセッサを製造業者の使用説明書に従って用いて作成した。スライドを 95% エタノール中に室温で 15 分間浸漬した直後に、カルノア液 (3 : 1 メタノール : 酢酸固定液) に室温で 30 分間移した。その後、スライドを縦向きで、室温で乾燥した。スライドを長期間保存しなければならないならば、使用するまでスライドを -20 °C で保存した。

10

【0156】

組織、例えば新鮮な組織、新鮮冷凍した組織、またはホルマリン固定 / パラフィン包埋 (FFPE) した組織からの上皮細胞の単離を、免疫蛍光抗 CAM5.2 抗体を以下の手順に従って用いて確認した：

1. スライドを 1 × PBS (リン酸緩衝食塩水) で濯ぐ；
2. スライドに PBS 中で調製した 1% 新鮮なブロッキング試薬 (Invitrogen, Inc., カリフォルニア州カールスバッド) (100 μL) を添加し、パラフィルムを被せる；
3. スライドを加湿ボックスにおいて 37 °C で 25 分間インキュベートする；
4. パラフィルムを外し、軽くたたいてスライドから試薬を捨てる；
5. スライドに CAM5.2 - FITC 抗体 (100 μL) を適用し、パラフィルムを被せる；
6. スライドを加湿ボックスにおいて 37 °C で 1 時間インキュベートする；
7. スライドを 1 × PBST (0.05% Tween-20 を含有する 1 × PBS) を用いて 37 °C で 5 分間洗浄する。2 回繰り返す；
8. DAPI を適用し、カバーガラスを被せる；
9. スライドを適切なフィルターを有するレギュラー蛍光顕微鏡の下で観察する。

20

【0157】

顕微鏡評価から、単離した細胞の 95% が上皮起源を有していたことが判明した。上皮細胞は標的内に均一に分布しており、主に良好な細胞及び核形態を有する個別の細胞として存在していた。

30

【0158】

[実施例 2]

本実施例は、実施例 1 からのスライド上で使用した蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 手順を記載する。

【0159】

スライドを 2 × SSC 中に 73 °C で 2 分間入れ、その後スライドをペプシン (0.5 mg/mL) と 37 °C で 10 分間インキュベートした。その後、スライドを 1 × PBS 中に室温で 5 分間、1% NBF 中に室温で 5 分間、1 × PBS 中に室温で 5 分間入れた。スライドを 70% エタノール、85% エタノール及び 100% エタノール中にそれぞれ 1 分間入れることにより脱水した後、風乾した。スライドにプローブ (10 μl)、次いでカバーガラスを適用した。カバーガラスをゴム糊で密封した。スライドをサーモブライトにおいて 72 °C で 2 分間、37 °C で 12 ~ 18 時間 (一晩) 共変性させた。翌日、スライドを 0.4 × SSC / 0.3% NP-40 を用いて 73 °C で 2 分間、2 × SSC / 0.1% NP-40 を用いて室温で 1 分間処理した。次いで、スライドを風乾し、DAPI 褪色防止剤 (Abbot Molecular, Inc., イリノイ州デスプレーンズ) を載せ、カバーガラスを被せた。

40

【0160】

ハイブリダイゼーション後、スライドをスペクトルゴールド (TM)、スペクトルオレ

50

ンジ (T M)、スペクトルレッド (T M)、スペクトルグリーン (T M)、スペクトルアクア (T M) 及び D A P I フィルターを有する蛍光顕微鏡を用いて評価した。下記パラメーターを有していたならば、細胞は染色体異常であると見なされた：

- i) 1 細胞あたり 3 以上で表される遺伝子コピー数増加、及び / または
- i i) 1 または 0 シグナルで表される遺伝子コピー数低下、及び / または
- i i i) 1 . 0 未満の、C E P に対する L S I プローブの比で表される相対低下。

【 0 1 6 1 】

各スライド上の指定標的エリア中の 5 0 個の細胞を列挙し、各プローブのコピー数を記録した。

【 0 1 6 2 】

最高頻度の染色体異常を有していた F I S H プローブを選択するために、結腸直腸癌 (C R C) に関連する 1 3 個のゲノム領域を 6 個の C R C 標本及びその正常な隣接組織 (N A T) で評価した。この評価に基づいて、結腸直腸腺腫と診断された 2 7 個の冷凍組織標本及び 3 個の正常隣接組織のセットに対して追加の試験をするために 5 つの候補プローブ (E G F R 7 p 1 2、M Y C 8 q 2 4、1 3 q 1 4、D C C 1 8 q 2 1 及び C E P 1 8) を選択した。検討した 2 7 人の症例のうち、1 1 人の患者は結腸癌を合併していると診断されたが、腺腫を有している 1 6 人の患者は結腸癌を合併していなかった。標本毎に 5 0 個の細胞 / 核についての F I S H パターンを 1 人の観察者が記録し、染色体異常細胞の数を調べた。少なくとも 1 0 個の F I S H 異常細胞のカットオフポイントを用いて、F I S H 正值性を分類した。E G F R、M Y C 及び 1 3 q 1 4 プローブの場合コピー数増加を有していたとき、C E P 1 8 に対する D C C の場合コピー数低下を有していたとき、細胞は異常と見なされた。結果から、結腸直腸腺腫症例で同定された 4 つの異なる F I S H パターンがあること、すなわち 4 つ全てのプローブは異常なし (二染色体) ; D C C 遺伝子低下のみ ; E G F R 遺伝子増加のみ ; 及び 4 つ全てのプローブが異常、すなわち M Y C、1 3 q 1 4 及び E G F R 増幅及び D C C 欠失 (表 1 を参照されたい) を示した。

【 0 1 6 3 】

【 表 1 】

表 1

全腺種 (27)	FISH陰性	FISH陽性		
	すべての FISH プローブ 正常	DCC 消失のみ	EGFR 増加のみ	すべての FISH プローブ 異常
癌の合併あり (11)	9. 1% (1/11)	36. 4% (4/11)	18. 2% (2/11)	36. 4% (4/11)
癌の合併なし (16)	62. 5% (10/16)	0. 0% (0/16)	18. 8% (3/16)	18. 8% (3/16)

この限定されたセットのサンプルにおいて、結腸直腸癌を合併している患者から得た腺腫標本の 9 1 % が F I S H 陽性であると判明したのに対して、大腸癌を合併していなかった患者から得た標本の 3 8 % のみが F I S H 陽性であった。

【 0 1 6 4 】

所見から、腺腫標本の異なる遺伝子プロフィールが個別化された医療のために臨床価値を有し得ることが示唆される。F I S H 異常を有していない (F I S H パターン 1) 患者はポリープ再発及び / または進行の最低リスクを有し、最良の予後判定を有し得、従って治療を必要としない。これらの患者に対しては、例えば 5 年後のフォローアップ結腸内視鏡検査が推奨され得る。対照的に、全てのプローブについて結腸直腸腺腫ポリープ異常 (

F I S Hパターン4)を有している患者はポリープ再発及び/または進行の最高リスクにある恐れがあり、従って治療(例えば、抗EGFR剤)を必要とする。これらの患者に対しては、例えば6ヶ月後のフォローアップ結腸内視鏡検査が推奨され得る。EGFR増幅(F I S Hパターン2)はポリープ再発及び/または進行の高いリスクを有しているおそれがあり、従って標的薬物治療(例えば、抗EGFR剤)の恩恵を受けることができる。これらの患者に対しては、例えば1年後のフォローアップ結腸内視鏡検査が推奨され得る。DCC遺伝子消失の異常のみを有している(F I S Hパターン3)患者の独自グループはポリープ再発及び/または進行の高いリスクを有しているおそれがあり、従って別の治療の恩恵を受けることができ、予後不良を有することがあり得る。これらの患者に対して、例えば1年後のフォローアップ結腸内視鏡検査が推奨され得る。

10

【0165】

本明細書中に挙げられている全ての特許明細書、特許出願公開明細書、学術論文、教科書及び他の刊行物は本発明が関わる当業者の技術レベルを示している。これらの刊行物はすべて、各刊行物が具体的且つ個別に参照により組み入れると記載されているのと同程度に参照により本明細書に組み入れる。

【0166】

本明細書に例示的に記載されている本発明は、本明細書中に具体的に開示されていないエレメントまたは限定の非存在下で適当に実施され得る。よって、例えば用語「含む(c o m p r i s i n g)」、「本質的に構成される(c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f)」及び「構成される(c o n s i s t i n g o f)」の各々は他の2つの用語のいずれかで置換され得る。また、単数形“a”、“an”及び“the”は文脈上明白に別の意味と分かる以外は、複数形を含む。よって、例えば、「方法」の言及は、本明細書中に記載されている及び/または本明細書を読めば当業者に自明となるであろう、1つ以上のタイプの方法及び/またはステップを含む。

20

【0167】

使用されている用語及び表現は記述として、非限定的に使用されている。これに関して、ある用語が「用語」の欄に記載されており、「発明を実施するための形態」の他のところで別の方法で規定、記載、説明または検討されている場合、これらの規定、記載、説明及び検討はすべてこの用語に帰すると意図される。その部分に示されており、記載されている要件の均等を除外する用語及び表現の使用も意図しない。更に、小見出し、例えば「用語」が「発明を実施するための形態」中に使用されているが、その使用は単に容易に言及するためであり、1つのセクションでなされている開示内容をそのセクションのみに限定すると意図されない。むしろ、1つの小見出しでなされている開示内容は他の小見出しの各々の開示内容を構成すると意図される。

30

【0168】

各種修飾が特許請求されている発明の範囲内で可能であると認められる。よって、本発明は好ましい実施形態及び任意の要件に関連して具体的に開示されているが、当業者は本明細書中に開示されている概念の修飾及び変更をなし得ると理解すべきである。これらの修飾及び変更は特許請求されている発明の範囲内であると見なされる。

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月27日(2018.9.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞懸濁液中の少なくとも2つの染色体の領域のコピー数を同時に決定するための方法であって、

- (a) 患者標本由来の細胞を脱凝集して、細胞懸濁液を作製するステップと、
 (b) 前記細胞懸濁液を、細胞支持体の2又はそれ以上の不連続エリアに適用するステップと、
 (c) 前記細胞支持体に適用された前記細胞懸濁液を含む前記細胞支持体の前記2又はそれ以上の不連続エリアのそれぞれを、ハイブリダイゼーションする条件下で、検出可能に標識されたプローブの混合物に接触させるステップと、ここで、各混合物は、検出可能に標識されたプローブの異なるセットを含む、
 (d) ステップ(c)の後に、前記細胞支持体の前記2又はそれ以上の不連続エリアに適用された細胞懸濁液上で、in situハイブリダイゼーション(ISH)を行い、前記患者標本を得てから14時間未満に、各混合物からの前記検出可能に標識されたプローブのそれぞれからのシグナルを可視化するステップと、
 (e) 細胞懸濁液中の前記少なくとも2つの染色体の領域のコピー数を計測し、細胞懸濁液中の前記少なくとも2つの染色体の領域のコピー数を同時決定するステップとを含む、方法。

【請求項2】

- 患者標本由来の細胞を脱凝集し、細胞懸濁液を作製するステップが、
 (i) 患者標本を、還元剤及びキレート剤を含む予加温した平衡塩類溶液中に浸漬すること、
 (i i) 前記患者標本を、還元剤、カルシウムイオン源、及び極性非プロトン性溶媒を含む新鮮な平衡塩類溶液に移して混合すること、
 (i i i) 前記患者標本を前記平衡塩類溶液から取り出し、(a)前記溶液を濾過して脱凝集させた細胞を収集し、溶液を遠心して脱凝集させた細胞をペレット化する、又は、(b)溶液を遠心のみ行って脱凝集させた細胞をペレット化すること
 (i v) 上清を捨て、前記ペレット化した細胞を残留上清中に再懸濁し、再懸濁した細胞を固定液中に入れること
を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

- 患者標本を予加温した平衡塩類溶液中に浸漬する前に、前記患者標本を平衡塩類溶液により濯ぐことをさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

平衡塩類溶液が、ハンス緩衝液である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

- (i) 患者標本を室温でハンス緩衝液により濯ぎ、前記患者標本を20 mMのDTT (ジチオトレイトール)及び5 mMのEDTA (エチレンジアミンテトラ酢酸)を含有する予加温したハンス緩衝液中に37 °Cで5分間浸漬すること、
 (i i) 濯いで浸漬した前記患者標本を20 mMのDTT、5 mMのCaCl₂及び10%のDMSO (ジメチルスルホキシド)を含有する4 °Cの新鮮なハンス緩衝液に移し、約5秒間から約10秒間混合すること
 (i i i) 前記患者標本を前記ハンス緩衝液から取り出し、(a)前記溶液を濾過して脱凝集させた細胞を収集し、溶液を約1000 × gで約10分間遠心して脱凝集させた細胞をペレット化するか、又は、(b)約1000 × gで約10分間溶液を遠心のみ行って脱凝集させた細胞をペレット化すること、
 (i v) 遠心後前記上清を捨て、前記ペレット化細胞を残留上清中に再懸濁し、再懸濁した細胞を溶液中に入れること、ここで、前記溶液は約30重量%～約60重量%のメタノール、約40重量%～約70重量%の水、及び緩衝液を含み、前記溶液は、室温で一晩保たれる、
ことを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

- 細胞支持体を水-アルコール溶液中に浸漬し、細胞支持体を固定液中に浸漬し、及び/又は、細胞支持体を乾燥させることをさらに含む、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

患者標本が、(a)新鮮な標本、(b)解凍した新鮮冷凍標本、又は(c)部分的に固定した標本である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

患者標本が、腺腫又は腺癌である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

細胞支持体が、細胞診スライド、サイトスピン、又はマイクロ流体カメラである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

細胞支持体の 2 つ又はそれ以上の不連続エリアは、窪み、ウェル、又はチャンバを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

2 つ又はそれ以上の検出可能に標識されたプローブの各混合物は、

(a) A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、及び R O S 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

(b) A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、R O S 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、及び c - M E T に対するプローブ、

(c) A L K に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、R O S 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、及び R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

(d) R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、及び N T R K 1 に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、

(e) R E T に対する 2 色ブレイクアパートプローブ、及び K I F 5 B に対するプローブ、

(f) M E T に対するプローブ、E G F R に対するプローブ、及び染色体 7 に対する C E P、

(g) A U R K A に対するプローブ、9 p 2 1 に対する遺伝子座特異的プローブ、染色体 3 に対する C E P、染色体 6 に対する C E P、及び染色体 7 に対する C E P、

(h) M Y C に対するプローブ、E G F R に対するプローブ、D C C に対するプローブ、1 3 q 1 4 に対する遺伝子座特異的プローブ、及び染色体 1 8 に対する C E P、

(i) M Y C に対するプローブ、T E R C に対するプローブ、及び染色体 7 に対する C E P、

(j) M Y C に対するプローブ、H E R 2 に対するプローブ、Z N F 2 1 7 に対するプローブ、及び 9 p 2 1 に対する遺伝子座特異的プローブ、

(k) M C L 1 に対するプローブ、F G F R 2 に対するプローブ、M E T に対するプローブ、E G F R に対するプローブ、及び染色体 7 に対する C E P、

(l) F G F R 2 に対するプローブ、P I K 3 C A に対するプローブ、染色体 3 に対する C E P、及び染色体 1 0 に対する C E P、

(m) P T E N に対するプローブ、E R G に対するプローブ、及び染色体 1 0 に対する C E P、

(n) F G F R 1 に対するプローブ、F G F R 2 に対するプローブ、F G F R 2 に対する 2 色ブレイクアウェイプローブ、染色体 8 に対する C E P、及び染色体 1 0 に対する C E P、又は

(o) M E T に対するプローブ、P I K 3 C A に対するプローブ、E G F R に対するプローブ、染色体 7 に対する C E P、及び染色体 3 に対する C E P

を含む、請求項 10 に記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/53	D

(72)発明者 ジョン・シュルツ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60004、アーリントン・ハイツ、イースト・ウェイブリー・ドライブ・1106

(72)発明者 オルガ・コーンフェルド
 アメリカ合衆国、イリノイ・60025、グレンビュー、メリズ・ドライブ・1749

(72)発明者 ジェフリー・パネラ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60453、オークローン、ウェスト・フェアファックス・ストリート・4300

(72)発明者 ミンハオ・ソン
 アメリカ合衆国、イリノイ・60532、ライル、パーノン・パーク・プレイス・5008

(72)発明者 スベトラナ・シタイロ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60513、ブルックフィールド、アーサー・アベニュー・4333

(72)発明者 フランク・ポリヒト
 アメリカ合衆国、イリノイ・60714、ナイルズ、ノース・ウェスタン・アベニュー・8303

(72)発明者 ゲーリー・ブラウン
 アメリカ合衆国、イリノイ・60540、ネイパービル、サンドパイパー・レイン・1241

(72)発明者 エカテリーナ・ペストバ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60026、グレンビュー、ラゲン・ロード・2112・エイ

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA27 BB11 CC02 FA15 GA08
 4B063 QA01 QA19 QA20 QQ02 QQ27 QQ42 QR56 QS10 QS32 QS33
 QS34 QS36 QX02
 4B065 AA93X BD09 BD10 BD12 BD50 CA46

【外国語明細書】

2019013228000001.pdf

专利名称(译)	细胞构建和细胞支持，以及它在牙龈炎中的应用		
公开(公告)号	JP2019013228A	公开(公告)日	2019-01-31
申请号	JP2018164202	申请日	2018-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	安博在每次股份有限公司莱特苞片泄漏Kiyura		
申请(专利权)人(译)	Abotsuto-Morekiyura， Incorporated的莱特每次		
[标]发明人	イリーナソコロワ ジョンシュルツ オルガコーンフェルド ジェフリーパネラ ミンハオソン スペトラーナシタイロ フランクポリヒト ゲーリーブラウン エカテリーナベストバ		
发明人	イリーナ・ソコロワ ジョン・シュルツ オルガ・コーンフェルド ジェフリー・パネラ ミンハオ・ソン スペトラーナ・シタイロ フランク・ポリヒト ゲーリー・ブラウン エカテリーナ・ベストバ		
IPC分类号	C12N1/00 C12N5/071 C12Q1/48 C12M1/34 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/6806 C12Q1/6841 C12Q2537/16 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N1/30 G01N33/5091 G01N33/57419 G01N2001/305 C12Q2527/125 C12Q2543/10		
FI分类号	C12N1/00.N C12N5/071 C12Q1/48.Z C12M1/34.E C12M1/34 G01N33/53.M G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA27 4B029/BB11 4B029/CC02 4B029/FA15 4B029/GA08 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ27 4B063/QQ42 4B063/QR56 4B063/QS10 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/BD09 4B065/BD10 4B065/BD12 4B065/BD50 4B065/CA46		
优先权	61/786062 2013-03-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种同时测定细胞悬液中至少两个染色体区域的拷贝数的方法。原位杂交 (ISH) 或免疫组织化学 (IHC) 的方法;一种辐射患者对靶向酪氨酸激酶途径的活性物质的反应的方法;改进包括ISH或IHC方法的亚麻病的方法;存在通过ISH或IHC方法可检测地标记的细胞与细胞接触的细胞支持物;和 (a) ISH或IHC的细胞支持物和/或至少一种探针和 (b) 包含在细胞支持物上进行ISH或IHC方法的说明书的试剂盒。【选择图】无

(5) Int. Cl.	F I				テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00	N		4 B O 2 9
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N	5/071			4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z		4 B O 6 5
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	E		
G O 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 M	1/34			

審査請求 有 請求項の数 11 O L 外国語出願 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-164202 (P2018-164202)	(71) 出願人	507051972
(22) 出願日	平成30年9月3日 (2018. 9. 3)		アボット・モレキュラー・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2016-501766 (P2016-501766) の分割		アメリカ合衆国、イリノイ・60018、デス・ブレンズ、イースト・トワイ・アベニュー・1300
原出願日	平成26年3月13日 (2014. 3. 13)	(74) 代理人	110001173
(31) 優先権主張番号	61/786, 062		特許業務法人川口国際特許事務所
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)	(72) 発明者	イリーナ・ソコロワ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、イリノイ・60181、ピラ・パーク、サウス・サミット・アベニュー・835
(特許庁注：以下のものは登録商標)			
1. T W E E N			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞作製物及び細胞支持体、及びテラノースにおけるその使用