

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-520569

(P2019-520569A)

(43) 公表日 令和1年7月18日 (2019.7.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	
C 1 2 Q 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/00 C	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2018-564832 (P2018-564832)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月7日 (2017.6.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年12月10日 (2018.12.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/063744
 (87) 国際公開番号 W02017/215983
 (87) 国際公開日 平成29年12月21日 (2017.12.21)
 (31) 優先権主張番号 16174158.2
 (32) 優先日 平成28年6月13日 (2016.6.13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 590000248
 コーニンクレッカ フィリップス エヌ
 ヴェ
 KONINKLIJKE PHILIPS
 N. V.
 オランダ国 5656 アーエー アイン
 ドーフェン ハイテック キャンパス 5
 High Tech Campus 5,
 NL-5656 AE Eindhoven
 (74) 代理人 100107766
 弁理士 伊東 忠重
 (74) 代理人 100070150
 弁理士 伊東 忠彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被検体のシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法

(57) 【要約】

本発明は被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法に関連する。本方法は、被検体のサンプルの細胞の中で前記転写因子を検出するための第1染色を実行し(101)、サンプルの細胞の中で転写因子のターゲット遺伝子によりエンコードされるタンパク質を検出するための第2染色を実行するステップ(102)を有する。本方法は、第1染色及び第2染色に基づいて、転写因子の核の存在とターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在との双方を示すサンプルの細胞を定量化し(103)、定量化に基づいて被検体における転写因子のアクティビティを推測するステップ(104)を更に有する。これは提示される方法が被検体における転写因子のアクティビティをより信頼性高く推測することを許容する。

〔選択図〕 図11

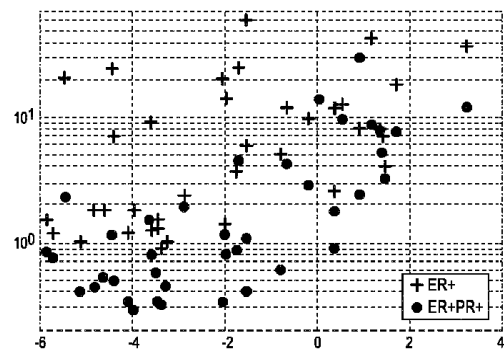


FIG. 11

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法であって

：

前記被検体のサンプルの細胞の中で前記転写因子を検出するための第1染色を実行するステップ；

前記サンプルの細胞の中で前記転写因子のターゲット遺伝子によりエンコードされるタンパク質を検出するための第2染色を実行するステップ；

前記第1染色及び前記第2染色に基づいて、前記転写因子の核の存在と前記ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在との双方を示す前記サンプルの細胞を定量化するステップ；及び

前記定量化に基づいて前記被検体における前記転写因子の前記アクティビティを推測するステップ；

を有する方法。

【請求項 2】

前記第1染色及び前記第2染色は、前記サンプルの同じスライド上で実行される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記第1染色及び前記第2染色は前記サンプルの異なるスライド上で実行され；

前記定量化するステップは、前記第1染色のスライドのデジタル画像と前記第2染色のスライドのデジタル画像とを空間的に位置合わせし、それにより双方のスライドにおいて対応する細胞を検出できるようにするステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記異なるスライドは、前記サンプルの隣接する断面から取得される、或いは前記サンプルのうち、前記サンプルの中で互いに接近して位置する断面から取得される、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記第1染色及び/又は前記第2染色は、

(i)免疫組織化学(IHC)アッセイ、

(ii)免疫蛍光アッセイ、及び

(iii)前記転写因子又は前記ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質に対する高い親和結合に基づく他の染色アッセイ

による群から選択されるアッセイの形式で実行される、請求項1ないし4のうち何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記定量化するステップは：

前記サンプルの細胞の選択された集団の中から、前記転写因子の核の存在と前記ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在との双方を示す細胞の割合を確認するステップ；及び/又は

前記サンプルの細胞の選択された集団の中から、前記転写因子の核の存在を示す細胞を確認し、確認された前記細胞の中から、前記ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在をも示す細胞の割合を確認するステップ；

を有する、請求項1ないし5のうち何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記集団は癌細胞の集団であり、特に乳癌の細胞の集団である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記定量化するステップは、前記第1染色及び前記第2染色の前記同じスライドのデジタル画像、又は前記第1染色のスライド及び前記第2染色のスライドのデジタル画像のうちの少なくとも1つを、コンピュータで実現される画像分析技術を利用して分析するステ

10

20

30

40

50

ップを含む、請求項2ないし7のうち何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である、請求項1ないし8のうちの何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記シグナル伝達経路がER- α シグナル伝達経路であり、前記転写因子がER- α であり、前記ターゲット遺伝子がPgRであり、前記ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質がPRである、請求項1ないし9のうちの何れか一項に記載の方法。

【請求項 11】

被検体に対する治療の適性を評価する方法であって、前記治療はシグナル伝達経路に対して行われるものであり、前記方法は、前記被検体における前記シグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測するために請求項1ないし10のうちの何れか一項に記載の方法を実行し、及び推測された前記アクティビティに基づいて前記治療の適性を評価するステップを有する、方法；又は

10

被検体を分類する方法であって、前記被検体における前記シグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測するために請求項1ないし10のうちの何れか一項に記載の方法を実行し、及び推測された前記アクティビティに基づいて前記被検体を分類するステップを有する、方法。

【請求項 12】

被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する際に使用するシステムであって：

20

前記被検体のサンプルの細胞の中で前記転写因子を検出するための第1染色を実行する第1染色キット；

前記サンプルの細胞の中で前記転写因子のターゲット遺伝子によりエンコードされるタンパク質を検出するための第2染色を実行する第2染色キット；

前記第1染色及び前記第2染色に基づいて、前記転写因子の核の存在と前記ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在との双方を示す前記サンプルの細胞を定量化する定量化ユニット；

を有し、前記定量化に基づいて前記被検体における前記転写因子の前記アクティビティを推測する推測ユニット；

30

を選択的に有するシステム。

【請求項 13】

被検体に対する治療の適性を評価する際に使用するシステムであって、前記治療はシグナル伝達経路に対して行われるものであり、前記システムは、請求項12に記載されるような前記被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測するシステムを有し、推測された前記アクティビティに基づいて前記治療の適性を評価する評価ユニットを選択的に有するシステム；又は

被検体を分類する際に使用するシステムであって、請求項12に記載されるような前記被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する際に使用されるシステムを有し、推測された前記アクティビティに基づいて前記被検体を分類する分類ユニットを選択的に有するシステム。

40

【請求項 14】

被検体における前記シグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する際に使用するためのコンピュータ・プログラムであって、前記コンピュータ・プログラムがコンピュータで実行される場合に、請求項1ないし10のうちの何れか一項に記載されているように前記被検体における転写因子のアクティビティを推測する際に使用方法のうちの前記定量化するステップを実行し、前記推測するステップを選択的に実行するプログラム・コード手段を有するコンピュータ・プログラム；又は

被検体に対する治療の適性を評価する際に使用するためのコンピュータ・プログラムであって、前記治療はシグナル伝達経路に対して行われるものであり、前記コンピュータ・

50

プログラムがコンピュータで実行される場合に、請求項11に記載されているように前記被検体に対する治療の適性を評価する際に使用する方法のうちの前記定量化するステップを実行し、前記推測するステップ及び/又は前記評価するステップを選択的に実行するプログラム・コード手段を有するコンピュータ・プログラム；又は

被検体を分類するために使用するためのコンピュータ・プログラムであって、前記コンピュータ・プログラムがコンピュータで実行される場合に、請求項11に記載されているように前記被検体を分類する際に使用する方法のうちの前記定量化するステップを実行し、前記推測するステップ及び/又は前記分類するステップを選択的に実行するプログラム・コード手段を有するコンピュータ・プログラム。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は被検体のシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティ(activity of a transcription factor of a signal transduction pathway)を推測する方法に関連する。本発明は、被検体を分類する方法、及び被検体に対する治療であってシグナル伝達経路に対して行われる治療の適性(the suitability)を分析する方法にも関連し、その方法は被検体のシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法を含む。

【背景技術】

【0002】

乳癌における日常的な病理染色(pathology staining)は、今日、例えば免疫組織化学(IHC)アッセイを実行することによるER(エストロゲン受容体)、PR(プロゲステロン受容体)、HER-2(ヒト上皮細胞増殖因子受容体)染色を含み、一般に、スライド毎に1つの染色が行われる。臨床診断ガイドラインによれば、使用される病院内プロトコルに依存して、サンプル中の癌細胞のうち1ないし10%以上が核ER及びPRを示す場合、ER及びPRは陽性であると考えられる。陽性に関して必要な核ER及びPRを有する癌細胞の最小パーセンテージは様々な国々/センターの間で異なり；例えば、オランダでは10%という値が使用されているが、USでは1%で既に陽性結果を示していると判断される。染色結果は、個々のシグナル伝達経路(例えば、ERシグナル伝達経路、及びPRシグナル伝達経路)が患者の中でアクティブであるか否かの指標として使用される。

20

【0003】

30

現在のところ、ER陽性患者は典型的にはホルモン療法(例えば、ネオアジュバント療法、アジュバント療法、及び/又は転移療法)で治療され、PR染色の結果は治療の選択肢をガイドする際に使用されていない。しかしながら、現在の実務では、患者のうち約25ないし50%が治療に反応しないことが判明している。この高い割合の被反応性に対する可能性のある理由は、個々の患者の中で、ER陽性染色結果であるにも関わらず、ERシグナル伝達経路が実際にはインアクティブであるかもしれないからであり、これは患者のERシグナル伝達経路のアクティビティを評価する際に、ER染色が不十分にしか特有でないことを示す。

【0004】

以上の観点から、一般に、患者のシグナル伝達経路のアクティビティについてのより信頼できる判断を許容する改善された技術を提供できることが望ましい。

40

【発明の概要】

【0005】

本発明の課題は、被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法であって、転写因子のアクティビティをより信頼性高く推測することを許容する方法を提供することである。本発明の別の課題は、被検体を分類する方法、及び被検体に対する治療の適性を評価する方法を提供することであり、その治療はシグナル伝達経路に対して施されるものであり、その方法は、被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法を含む。

【0006】

50

本発明の第1側面では、被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法が提示され、本方法は：

被検体のサンプルの細胞の中で転写因子を検出するための第1染色を実行するステップ；

サンプルの細胞の中で転写因子のターゲット遺伝子によりエンコードされるタンパク質 (a protein encoded by a target gene of the transcription factor) を検出するための第2染色を実行するステップ；

第1染色及び第2染色に基づいて、転写因子の核の存在とターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在との双方を示すサンプルの細胞を定量化するステップ；及び

定量化に基づいて被検体における転写因子のアクティビティを推測するステップ；
を含む方法である。

10

【0007】

本発明は、細胞中のシグナル伝達経路の転写因子の核の存在を示す細胞に関し、細胞の核又は細胞質の何れかにおける、転写因子のターゲット遺伝子によりエンコードされるタンパク質の存在は、その特定の細胞の中で、転写因子が実際にアクティブである(又は「on」である)、即ちアクティブ遺伝子転写モード(the active gene transcribing mode)にあることの追加的なインジケータとして使用することが可能である、というアイディアに基づいている。被検体のサンプルの細胞において転写因子とターゲット遺伝子エンコード・タンパク質とをそれぞれ検出するために第1染色と第2染色とを実行することにより、及び第1染色及び第2染色に基づいて、転写因子の核の存在とターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在との双方を示すサンプルの細胞を定量化することにより、被検体における転写因子のアクティビティ、及びシグナル伝達経路のアクティビティが、より信頼できる方法で推測されることが可能である。

20

【0008】

本発明により使用される(1つ以上の)サンプルは、取り出されたサンプルであるとする事が可能であり、即ち被検体から取り出されたサンプルであるとする事が可能である。サンプルの具体例は、組織、細胞、血液、及び/又は被検体の体液等を含むが、これらに限定されない。サンプルは、例えば、癌病巣から、癌の疑いのある病変部位から、転移性腫瘍から、他の任意の組織から、(癌細胞に汚染されている)液体が存在する体腔(例えば、胸膜又は腹腔又は膀胱腔)から、又はその他の癌細胞を含む体液等から、好ましくは生体検査プロシジャ又はその他のサンプル抽出プロシジャにより取得されたサンプルであるとする事が可能である。サンプルが取り出される細胞は、血液悪性腫瘍(例えば、白血病又はリンパ腫)からの腫瘍細胞であってもよい。場合によっては、細胞サンプルは、循環腫瘍細胞(即ち、血流に入った腫瘍細胞)であってもよく、また、例えばアフエレーシス(apheresis)又は通常の静脈血採取のような適切な分離技術を利用して抽出されてもよい。血液とは別に、サンプルが取り出される体液は、尿、胃腸内容物、又は溢出物であってもよい。ここで使用される「サンプル」という用語は、例えば被検体の組織及び/又は細胞及び/又は体液が被検体から採取されているケースも包含し、例えばそれは顕微鏡のスライド上に置かれており、更にサンプルという用語は本発明を実行するためにサンプルの一部分が、例えば、レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション(LCM)を利用することにより、又はスライドから対象の細胞を剥離することにより、又は蛍光活性化細胞分類法により抽出される。更に、ここで使用される「サンプル」という用語は、例えば被検体の組織及び/又は細胞及び/又は体液が、被検体から採取され、且つ顕微鏡のスライドに置かれており、請求項に係る方法がスライド上で実行されるケースも包含する。

30

40

【0009】

シグナル伝達経路は好ましくは細胞核レセプタ・シグナル伝達経路である。これらのシグナル伝達経路は細胞内リガンド・レセプタにより特徴付けられ、そのレセプタは、リガンドが結合され且つレセプタが細胞核へ転移する場合に、アクティブ転写因子として機能する。アクティブ転写因子は、以後、タンパク質に変換される特定の一群のターゲット遺伝子の転写を誘導する。核レセプタの具体例は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容

50

体 (AR)、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド受容体 (GCR)、レチノイン酸受容体 (RAR)、ビタミンD受容体 (VDR)、及びオーファン核受容体である。

【0010】

一実施形態において、第1染色及び第2染色は、サンプルの同じスライド上で実行される。あるアプローチでは、先ず第1染色が同じスライド上で実行される。その後、第1染色によるステイン (又は染色剤) が同じスライドから除去され、速やかに第2染色が同じスライド上で実行される。言い換えれば、このアプローチでは、第1染色によるステインと第2染色によるステインとが同じスライド上で同時には存在しない。これは、同じスライドのデジタル画像において、第1染色からの色情報と第2染色からの色情報とを分離する必要がないという利点を有する。別のアプローチでは、第1染色によるステインと第2染色によるステインとが同じスライド上で同時に存在するように、第1染色及び第2染色が同じスライド上で実行される。これは、第1染色によるステインを同じスライドから除去する追加的なステップを行わないことを可能にする。

10

【0011】

別の実施形態において、第1染色及び第2染色はサンプルの異なるスライド上で実行され、その場合において、定量化するステップは、第1染色のスライドのデジタル画像と第2染色のスライドのデジタル画像とを空間的に位置合わせし、それにより双方のスライドにおいて対応する細胞を検出できるようにするステップを含む。第1染色及び第2染色はそのサンプルの異なるスライド上で実行されるので、それらは同時に実行されてもよく、染色を実行するための合計時間を短縮し得る。

20

【0012】

好ましくは、異なるスライドは、サンプルの隣接する断面から取得される、或いはサンプルのうち、サンプルの中で互いに接近して位置する断面から取得される。これは、十分な数の対応する細胞 (即ち、双方のスライドに存在する細胞) が異なるスライドに存在することの保証を支援する。

【0013】

第1染色及び/又は第2染色は、(i) 免疫組織化学 (an immunohistochemistry: IHC) アッセイ、(ii) 免疫蛍光アッセイ (an immunofluorescent assay)、及び (iii) 転写因子又はターゲット遺伝子エンコード・タンパク質に対する高い親和結合に基づく他の染色アッセイによる群から選択されるアッセイの形式で実行されることが好ましい。

30

【0014】

定量化するステップは：

サンプルの細胞の選択された集団の中から、転写因子の核の存在とターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在との双方を示す細胞の割合を確認するステップ、及び/又は

サンプルの細胞の選択された集団の中から、転写因子の核の存在を示す細胞を確認し、確認された細胞の中から、ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在をも示す細胞の割合を確認するステップ；

を含むことが更に好ましい。

【0015】

第1変形例において、割合 (又はパーセンテージ) はサンプル中の細胞の選択された集団から「直接的に」決定される。これは、サンプルの細胞の選択された集団のうちから、転写因子が実際にアクティブである (又は「on」である)、即ちアクティブ遺伝子転写モードにある細胞の割合の尺度 (a measurement) を提供し、この場合において、転写因子は、その割合が適切に決定された「アクティブ閾値」を超える場合に、被検体の中でアクティブであると考えられる。第2変形例は、転写因子が実際にアクティブである (又は「on」である)、即ちアクティブ遺伝子転写モードにある転写因子陽性細胞 (即ち、転写因子の核の存在を示すサンプル細胞の選択された集団のうちの細胞) の割合の尺度を提供する。この場合においても、その割合が、適切に決定された「アクティブ閾値」を超える場合、転写因子は被検体においてアクティブであると考えられることが可能である。当然に、双方の割合が確認されること、及び被検体における転写因子のアクティビティの推測が双方の割合

40

50

に基づくことも可能である。

【0016】

母集団は、癌細胞、特に乳癌の細胞の集団であることが特に好ましい。

【0017】

定量化するステップは、第1染色及び第2染色の同じスライドのデジタル画像、又は第1染色のスライド及び第2染色のスライドのデジタル画像のうちの少なくとも1つを、コンピュータで実行される画像分析技術を利用して分析するステップを含むことが好ましい。そのようなコンピュータで実現される画像分析技術を利用することにより、定量化するステップは、実質的に自動化された方法で実行されることが可能であり、特に、染色の結果を解釈する医師の経験を当てにしないより客観的な方法で実行されることが可能である。

10

【0018】

好ましくは、被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0019】

一実施形態において、シグナル伝達経路がER- α シグナル伝達経路であり、転写因子がER- α であり、ターゲット遺伝子がPgRであり、ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質がPRである。

【0020】

本発明の別の側面では、被検体に対する治療の適性を評価する方法が提示され、その治療はシグナル伝達経路に対して行われるものであり、本方法は：

20

被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測するために請求項1ないし10のうち何れか一項に記載の方法を実行するステップ；及び

推測された前記アクティビティに基づいて前記治療の適性を評価するステップ；
を有する方法である。

【0021】

本発明の別の側面では、被検体を分類する方法が提示され、本方法は：

被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測するために請求項1ないし10のうち何れか一項に記載の方法を実行するステップ；及び

推測されたアクティビティに基づいて前記被検体を分類するステップ；
を有する方法である。

30

【0022】

本発明の別の側面では、被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する際に使用するシステムが提示され、本システムは：

被検体のサンプルの細胞の中で転写因子を検出するための第1染色を実行する第1染色キット；

サンプルの細胞の中で転写因子のターゲット遺伝子によりエンコードされるタンパク質を検出するための第2染色を実行する第2染色キット；

第1染色及び第2染色に基づいて、転写因子の核の存在とターゲット遺伝子エンコード・タンパク質の存在との双方を示すサンプルの細胞を定量化する定量化ユニット；

40

を有し、定量化に基づいて被検体における転写因子のアクティビティを推測する推測ユニットを選択的に有するシステムである。

【0023】

システムが推測ユニットを有する場合、そのシステムは、被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測するシステムであると考えられることが可能である。

【0024】

本発明の別の側面では、被検体に対する治療の適性を評価する際に使用するシステムが提示され、治療はシグナル伝達経路に対して行われるものであり、本システムは：

請求項12に記載されるような被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビ

50

ティを推測するシステムを有し、及び

推測された前記アクティビティに基づいて治療の適性を評価する評価ユニットを選択的に有するシステムである。

【0025】

システムが評価ユニットを有する場合、そのシステムは、被検体に対する治療の適性を評価するシステムであると考えられることが可能であり、その治療はシグナル伝達経路に対して行われる。

【0026】

本発明の別の側面では、被検体を分類する際に使用するシステムが提示され、本システムは：

請求項12に記載されるような被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する際に使用されるシステムを有し、及び

推測されたアクティビティに基づいて被検体を分類する分類ユニットを選択的に有するシステムである。

【0027】

システムが分類ユニットを有する場合、そのシステムは被検体を分類するシステムであると考えられることが可能である。

【0028】

本発明の別の側面では、被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する際に使用するためのコンピュータ・プログラムが提示され、コンピュータ・プログラムは、コンピュータ・プログラムがコンピュータで実行される場合に、請求項1ないし10のうち何れか一項に記載されているように被検体における転写因子のアクティビティを推測する際に使用する方法のうちの定量化するステップを実行し、推測するステップを選択的に実行するプログラム・コード手段を有する。

【0029】

本発明の別の側面では、被検体に対する治療の適性を評価する際に使用するためのコンピュータ・プログラムが提供され、治療はシグナル伝達経路に対して行われるものであり、コンピュータ・プログラムは、コンピュータ・プログラムがコンピュータで実行される場合に、請求項11に記載されているように被検体に対する治療の適性を評価する際に使用する方法のうちの定量化するステップを実行し、推測するステップ及び/又は評価するステップを選択的に実行するプログラム・コード手段を有する。

【0030】

本発明の別の側面では、被検体を分類する際に使用するためのコンピュータ・プログラムが提示され、コンピュータ・プログラムは、コンピュータ・プログラムがコンピュータで実行される場合に、請求項11に記載されているように被検体を分類する際に使用する方法のうちの定量化するステップを実行し、推測するステップ及び/又は分類するステップを選択的に実行するプログラム・コード手段を有する。

【0031】

請求項1の被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法、被検体に対する治療(シグナル伝達経路に対して行われる治療)の適性を評価する方法、請求項11の被検体を分類する方法、及び請求項12ないし14の対応するシステム及びコンピュータ・プログラムは、類似する及び/又は同様な好ましい実施形態(特に、従属請求項に規定されているようなもの)を有することが、理解されるべきである。

【0032】

本発明のこれら及びその他の側面は、以下に説明される実施形態から明らかになり、それらに関連して説明される。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は被検体のシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法の第1実施形態を示すフローチャート例を示す。

10

20

30

40

50

【図2】図2は被検体のシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法の第2実施形態を示すフローチャート例を示す。

【図3】図3は被検体のシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法の第3実施形態を示すフローチャート例を示す。

【図4】図4は被検体に対する治療であってシグナル伝達経路に対して行われる治療の適性を評価する方法の実施形態を示すフローチャート例を示す。

【図5】図5は被検体を分類する方法の実施形態を示すフローチャート例を示す。

【図6】図6は被検体のシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測するのに使用するためのシステムの実施形態を図式的及び例示的に示す。

【図7】図7は被検体に対する治療であってシグナル伝達経路に対して行われる治療の適性を評価する際に使用されるシステムの実施形態を図式的及び例示的に示す。

【図8】図8は患者を分類するのに使用するシステムの実施形態を図式的及び例示的に示す。

【図9】図9はサンプルのスライドのデジタル画像における細胞及び細胞核の輪郭の検出を図式的及び例示的に示す。

【図10】図10は、48時間のエストロゲン欠乏及び以後の16時間に及ぶエストラジオール刺激の下でMCF7乳癌細胞株サンプルで測定されたER- α シグナル及びPRシグナルの進行の比較を示す。

【図11】図11は、39個の乳癌サンプルで実行されたER及びPR定量実験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

図中、同様な又は対応する参照番号は同様な又は対応するパーツ及び/又はエレメントを指す。

【0035】

以下、被検体内のシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測する方法の第1実施形態が、図1に示されるフローチャートに関連して例示的に説明される。ここで、被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0036】

ステップ101において、サンプルの細胞(この例では、乳癌の患者の組織)における転写因子(ここでは、ER- α)を検出するための第1染色が、実行される。ステップ102において、サンプルの細胞における転写因子(ここでは、ER- α)のターゲット遺伝子によりエンコードされるタンパク質(ここでは、PR)を検出するための第2染色が、実行される。第1染色及び第2染色はサンプルの同じスライド上で実行される。ここで、第1染色及び第2染色は双方ともに免疫組織化学(IHC)アッセイの形式で実行される。

【0037】

この実施形態では、先ず第1染色が同スライド上で実行される(ステップ101)。その後、第1染色によるステイン(the stain from the first staining)が同スライドから除去されるとすぐに、第2染色が同スライド上で実行される(ステップ102)。言い換えれば：この実施形態では、第1染色からのステインと第2染色からのステインとは同スライド上で同時に存在しない。

【0038】

ステップ103において、ER- α の核の存在及びPgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)の双方を示すサンプルの細胞は、第1染色及び第2染色に基づいて定量化される。この実施形態では、これは、コンピュータで実現される画像分析技術を利用して、第1染色からのステイン及び第2染色からのステインとともに同スライドのデジタル画像を分析することにより実行される。デジタル画像は、例えば、適切なスキャニング装置又はデバイスを利用して、染色された同スライドをスキャニングすることにより、取得されることが可能である。

【0039】

10

20

30

40

50

より詳細に言えば、上述したようなコンピュータで実現される検出技術を利用して、第1染色からの色情報、及び/又は第1染色(おそらくは、別のH&E(ヘマトキシリン及びエオシン)染色との組み合わせによるもの)からの色情報に基づいて、細胞及び細胞核の輪郭が同スライドのデジタル画像の中で検出され、この点については例えば次の文献に記載されている：

J.P. Vink et al., "Efficient nucleus detector in histopathology images", in Journal of Microscopy, Vol. 249, No. 2, 2013, pages 124 to 135.

【0040】

細胞及び細胞核の検出された輪郭に基づいて、次に定量化は、本実施形態では、細胞の核における第1染色からの色情報の強度を確認し、細胞の核及び細胞質における第2染色からの色情報の強度を確認することを含む。このプロセスは、例えばフィルタリング・オペレーションの利用、形態に関するオペレーション(morphological operations)の利用等のような様々な処理ステップを含むことが可能である。次に、(転写因子である)ER- α の核の存在とPgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)との双方を示す細胞が、強度を閾値処理することにより適切に検出される。この検出は、例えば、細胞の核において第1染色からの色情報の強度と、同じ細胞の核又は細胞質において第2染色からの色情報の強度との双方が、所定の閾値を超えている細胞を検出することにより、実行される。代替的に、そのような閾値を予め決定する代わりに、閾値は、同スライドの癌でない部分の背景染色(a background staining)により設定されることが可能であり、その部分の細胞はER- α の核の存在及び/又はPgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)を示さず、或いは第1染色及び/又は第2染色はそのような背景染色に対して正規化されることが可能である。第1染色及び第2染色からのステインの波長、デジタル画像を取得するために使用されるスキャニング装置又はデバイス等のようなプロセスの詳細に依存して、所定の閾値は、第1染色からの色情報及び第2染色からの色情報の双方に対して同じであってもよいし、或いは異なる閾値が予め設定又は事後的に設定されてよいことに留意を要する。ここで、定量化は、ER- α の核の存在及びPgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)の双方を示す細胞の割合を確認することを含む。第1変形例では、その割合は、サンプル中の選択された細胞集団(a selected population of the cells in the sample)から「直接的に」決定され、その場合においてその集団は例えば乳癌細胞の集団である。第2変形例では、その割合は、(例えば、乳癌細胞の集団のような)サンプルの細胞のうち選択された集団から、ER- α の核の存在を示す細胞を確認し、確認された細胞群から、PgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)をも示す細胞の割合を確認することにより、決定されることが可能である。

【0041】

複数のデジタル画像(即ち、第1染色からのステインを伴う同スライドのデジタル画像、及び第2染色からのステインを伴う同スライドのデジタル画像)は、同じスライドから別々に取得されるので、定量化は、デジタル画像を互いに空間的に位置合わせする(spatially registering)ことを含む必要があり、それにより、第1染色及び第2染色からの色情報は、双方の染色が同じ細胞の中に共存する細胞の識別を可能にするように、重ね合わせられることが可能になる。そのような空間的な位置合わせは、コンピュータで実現される画像処理技術を利用して達成されることが可能であり、この点については例えば次の文献に記載されている：

D. Mueller et al., "Real-time deformable registration of multi-modal whole slides for digital pathology", in Computerized Medical Imaging and Graphics, No. 35, 2011, pages 542 to 556.

デジタル画像は同じスライドから取得されるので、空間的な位置合わせはほぼ完璧になり得る。

【0042】

ステップ104において、乳癌患者における転写因子(ここでは、ER- α)のアクティビティが、定量化に基づいて、ここではコンピュータで実現されるアルゴリズムを利用して推測される。従来臨床的に使用されるER染色に基づいて(その場合、サンプル中の癌細胞の1又は10%以上が(使用される院内プロトコルに依存する閾値を超えて)陽性に染色されるならば、ERは陽性であると考えられる)、1又は10%という同じ値が「アクティビティ閾値」として使用されてもよいが、全ての細胞を考察するのではなく、ER- α の核の存在を示す(例えば、乳癌細胞の集団のような)サンプルの細胞の選択された集団の中から、PgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)をも示す細胞のみが、考察される(上記参照)。これは、(乳癌細胞の集団のような)サンプルの細胞の選択された集団からの、細胞の割合についての尺度を提供し、その細胞では転写因子(ここでは、ER- α)が実際にアクティブであり(即ち、「on」であり)、即ちアクティブ遺伝子転写モードにあり、この場合において、パーセンテージが1又は10%というアクティビティ閾値を超える場合、転写因子(ER- α)は乳癌患者の中でアクティブであると考えられる。代替的に、そのパーセンテージが、(例えば、乳癌細胞の集団のような)サンプルの細胞の選択された集団の中から、ER- α の各存在を示す細胞を確認し、確認された細胞の中から、PgRエンコード・タンパク質PRの(核及び/又は細胞膜の)存在をも示す細胞のパーセンテージを確認することにより決定される場合(上記参照)、これは、((例えば、乳癌細胞の集団のような)ER- α の核の存在を示すサンプルの細胞の選択された集団からの細胞のような)ER- α 陽性細胞のパーセンテージの尺度を提供し、その細胞では転写因子(ここでは、ER- α)が実際にアクティブであり(即ち、「on」であり)、即ちアクティブ遺伝子転写モードにある。また、このケースにおいて、パーセンテージが1又は10%というアクティビティ閾値を超える場合、転写因子(ER- α)は、乳癌患者の中でアクティブであると考えられることが可能である。当然に、転写因子(ここでは、ER- α)が乳癌患者の中でアクティブであると考えられるか否かを決定するために、他のアクティビティ閾値が使用されてもよい。更に、双方のパーセンテージが確認されること、及び乳癌患者における転写因子(ここでは、ER- α)のアクティビティの推測が双方のパーセンテージに基づくことも可能である。

【0043】

以下、被検体のシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測する方法の第2実施形態が、図2に示されるフローチャートに関連して例示的に説明される。ここでも被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0044】

第2実施形態は、図1に示されるフローチャートに関連して説明された第1実施形態とかなり類似している。特に、本実施形態においても、サンプルの細胞(この例では、乳癌患者の組織)における転写因子(ここでは、ER- α)を検出するための第1染色と、サンプルの細胞における転写因子(即ち、ER- α)のターゲット遺伝子(ここでは、PgR)によりエンコードされるタンパク質(ここでは、PR)を検出するための第2染色とが、実行される。但し、このケースでも第1染色及び第2染色がサンプルの同一スライドで実行されるが、それらはステップ1012において実行され、それにより、第1染色からのステイン及び第2染色からのステインが同じスライド上に同時存在するようになる。従って、第1染色及び第2染色は、双方共に、免疫組織化学(IHC)アッセイの形式で実行される。

【0045】

この実施形態においても、ER- α の核の存在、及びPgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞膜の存在)の双方を示すサンプルの細胞が、第1染色及び第2染色に基づいて定量化される(ステップ103)。この場合において、定量化は、コンピュータで実現される画像分析技術を利用して、第1染色からのステイン、及び第2染色からのステインとともに、同じスライドのデジタル画像を分析することにより実行される。デジタル画像は、例えば、適切なスキャニング装置又はデバイスを利用して、染色された同じスライドをスキャニングすることにより取得されることが可能である。

【0046】

第1染色からのステインと第2染色からのステインとが同じスライドに同時に存在するので、それらの波長が実質的にオーバーラップしないように、且つ第1染色からの色情報と第2染色からの色情報とが上述のコンピュータで実現されるカラー・デコンボリューション技術を用いてデジタル画像の中で分離されるように、各波長は適切に選択され、これらの技術については以下の文献に記載されている：

A.C. Ruifrok and D.A. Johnston, "Quantification of histochemical staining by color deconvolution", in Analytical and Quantitative Cytology and Histology, Vol. 23, No. 4, 2001, pages 291 to 299,

M. Macenko et al., "A method for normalizing histology slides for quantitative analysis", in Proceedings of IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Boston, MA, USA, 2009, pages 1107 to 1110,

M. Niethammer et al., "Appearance normalization in histology slides", in Proceedings of First International Workshop on Machine Learning in Medical Imaging, Beijing, China, 2010, pages 58 to 66, or in J.P. Vink et al. (ibid).

【0047】

第1染色から分離された色情報、及び第2染色から分離された色情報(おそらくは、更なるH&E(ヘマトキシリン及びエオシン)染色との組み合わせによるもの)に基づいて、定量化(ステップ103)、及び定量化に基づく乳癌患者の転写因子(ここでは、ER- α)のアクティビティの推測(ステップ104)が、第1実施形態に関して上述したように実質的に実行される。

【0048】

以下、被検体内のシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測する方法の第3実施形態が、図3に示されるフローチャートに関連して例示的に説明される。ここでも被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0049】

第3実施形態は、図1及び図2に示されるフローチャートに関連して説明された第1及び第2実施形態とかなり類似している。特に、本実施形態においても、サンプルの細胞(この例では、乳癌患者の組織)における転写因子(ここでは、ER- α)を検出するための第1染色が実行され、また、サンプルの細胞における転写因子(即ち、ER- α)のターゲット遺伝子(ここでは、PgR)によりエンコードされるタンパク質(ここでは、PR)を検出するための第2染色が実行される。但し、このケースでは、第1染色及び第2染色が、サンプルの異なるスライド上でステップ201及び202において実行される。ここでは、サンプルの隣接する断面から、異なるスライドが取得され、第1染色及び第2染色は双方ともに免疫組織化学(IHC)アッセイの形式で実行される。サンプルの隣接する断面から異なるスライドを取得する代わりに、サンプルの中で互いに密接して存在するサンプルの複数の断面から異なるスライドが取得されることも可能である。このケースでは、複数の断面の間の距離は、例えば、それぞれ4ミクロンの5断面より大きくすべきではない。

【0050】

この実施形態においても、ER- α の核の存在、及びPgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞膜の存在)の双方を示すサンプルの細胞が、第1染色及び第2染色に基づいて定量化される(ステップ203)。この場合において、定量化は、コンピュータで実現される画像分析技術を利用して、第1染色からのステインを伴うスライド、及び第2染色からのステインを伴うスライドのデジタル画像を分析することにより実行される。デジタル画像は、例えば、適切なスキャニング装置又はデバイスを利用して、染色された各スライドをスキャニングすることにより取得されることが可能である。

【0051】

複数のデジタル画像(即ち、第1染色からのステインを有するスライドのデジタル画

10

20

30

40

50

像、及び第2染色からのステインを有するスライドのデジタル画像)は、サンプルの隣接する断面から取得される異なるスライドから取得されるので、一般に、定量化は、デジタル画像を互いに空間的に位置合わせすることを含む必要がある。そのような空間的な位置合わせは、上記の「D.Muller et al.」に説明されているもののようなコンピュータで実現される画像処理技術を利用して達成されることが可能である。使用される方法が何であれ、2つのスライドのデジタル画像のアライメントを可能にすべきであり、それにより、双方のスライドで対応する細胞が検出されることが可能になり、第1染色及び第2染色が同じ細胞に存在する細胞を確認及び定量化することを可能にする。複数のデジタル画像はサンプルの隣接する断面から取得される異なるスライドから取得されるので、空間的な位置合わせは完全なものにはならず、なぜなら第1染色のスライド及び第2染色のスライドは、少なくとも部分的に異なる細胞を含むことになるからである。この問題に対処するため、双方のスライドに存在することが不明である細胞は、定量化(ステップ203)において、及び定量化に基づく乳癌患者における転写因子(ここでは、ER- α)のアクティビティの推測(ステップ204)において使用されなくてもよく、それ以外についてこれらのステップは第1及び第2実施形態に関して説明されたように実質的に実行される。

10

20

30

40

50

【0052】

以下、被検体に対する治療の適性を評価する方法の実施形態が図4に示されるフローチャートに関連して例示的に説明され、その治療は、ここではER- α シグナル伝達経路であるシグナル伝達経路に対して行われる。ここでも被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0053】

ステップ301において、図1ないし図3に示されるフローチャートに関連して説明されたような方法が、乳癌の患者における転写因子(ここでは、ER- α)のアクティビティを推測するために実行される。

【0054】

ステップ302において、推測されたアクティビティに基づいて治療の適性が判断される。治療は、この実施形態ではホルモン療法(「内分泌療法」とも呼ばれる)であり、この療法は、ER- α シグナル伝達経路を経由するエストラジオール・シグナリング(estradiol signaling)を様々な方法で減らすことが可能であり、この療法は、タモキシフェン(Tamoxifen)のように転写因子(即ち、ER- α)に対して「直接的に」施される投薬、あるいはアロマターゼ阻害薬(aromatase inhibitors)のようなエストラジオール・リガンド生成物(estradiol ligand production)を妨げる投薬、あるいはER- α の分解(degradation)を促す投薬から構成されてもよい。より詳細に言えば：アロマターゼ阻害薬(例えば、エキセメスタン)はエストラジオール生成物を妨げ、ER- α シグナル伝達経路を活性化するリガンドのレベルを減少させる結果をもたらす。これに対して、エストロゲン受容体(ER)阻害薬(例えば、タモキシフェン)は、一般に、エストロゲン受容体における結合場所を求めてエストラジオールと競い、活性化を妨げる。最後に、むしろ新薬であるフルベストラント(Fulvestrant)はER- α の分解を増やす。

【0055】

治療(ここでは、ホルモン療法)の適性判断の基礎を、乳癌患者内の転写因子(ここでは、ER- α)の推測されたアクティビティにおくことによって、仮に転写因子(ER- α)がアクティブであると推測されると、治療に対する反応の可能性は、臨床におけるER(及びPR)染色の従来の判断による現在のケースの場合よりも高くなることが期待され、これは、治療反応予測が、感度を維持しつつ特異度(specificity)を増やすことを意味する。これは臨床的に非常に関連性があり、なぜなら、乳癌の患者が転写因子(ここでは、ER- α)の推測されたアクティビティに基づいて非反応者であると予測されるケースにおいても、別のより相応しい効果的な治療が時宜にかなって選択されることが可能になり、ひいては有効でない治療の下での癌の進行を防止し、不要な副作用(及び不要な費用)を防止するからである。例えば、1又は10%という上記のアクティビティ閾値に基づいて、サンプルの細胞の選択された集団(乳癌の細胞の集団)のうち、転写因子(ここでは、ER- α)がアクティブ遺

伝子転写モードで実際にアクティブ(又は「on」)である細胞のパーセンテージが、アクティブ閾値を超える場合、乳癌患者のホルモン療法に対する反応の可能性は(アクティブ閾値が1%である場合)60%より大きく、(アクティブ閾値が10%である場合)80%より大きい。1又は10%という同じアクティビティ閾値が使用される場合であって、サンプルの細胞の選択された集団(例えば、乳癌細胞の集団)の中から、ER- α の核の存在を示す細胞を確認し、確認された細胞の中から、PgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)をも示す細胞のパーセンテージを確認することにより、定量化においてパーセンテージが決定される場合に、同じ可能性又はより高い可能性さえ期待される(上記参照)。この点に関し、適切なホルモン療法反応に必要な実際の転写因子(ここでは、ER- α)を有する細胞のパーセンテージの臨床キャリブレーション(clinical calibration)は、適切な乳癌患者達の評価に完全に基づくことになる点に留意を要する。

10

【0056】

従って、本質的には、転写因子(ここでは、ER- α)が乳癌患者の中でアクティブであると推測される場合、ER- α の活性化突然変異のケースを除いて、タモキシフェンやアロマトラーゼ阻害薬のような投薬が腫瘍の成長の抑制に有効である傾向があり、活性化突然変異の場合にはフルベストラントが治療の選択肢となる。最終的な治療の選択は、例えばDNA又はRNAシーケンスにより、活性化ER- α 変異の追加的な評価によって行われることが可能である。

【0057】

一方、転写因子(ここでは、ER- α)がインアクティブである(即ち、「off」)と推測される場合、即ち乳癌患者においてアクティブ遺伝子転写モードにおけるものでない場合、その乳癌患者は(タモキシフェンやアロマトラーゼ阻害薬のような)ホルモン療法に反応しないことになる傾向がある。この場合、代替的な治療は、例えば、化学療法、代替的なターゲット治療、又は免疫療法、又は組み合わせ療法から構成されることが可能である。

20

【0058】

以下、被検体を分類する方法の実施形態が、図5に示されるフローチャートに関連して例示的に説明される。ここでも被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0059】

ステップ401において、図1ないし図3に示されるフローチャートに関連して説明されたような方法が、乳癌の患者におけるシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測するために実行される。

30

【0060】

ステップ402において、乳癌患者は、推測されたアクティビティに基づいて分類される。例えば、乳癌患者において、転写因子(ここでは、ER- α)がアクティブである(即ち、「on」である)、即ちアクティブ遺伝子転写モードにあると推測される場合、その乳癌患者はホルモン療法に関して分類されることが可能であり、転写因子(ここでは、ER- α)がインアクティブである(即ち、「off」である)、即ちアクティブ遺伝子転写モードにないと推測される場合、その乳癌患者は代替的な治療に関して分類され、例えば、化学療法、代替的な標的治療、免疫治療、又は併用治療に関して分類される。個々の分類判断は、図4に示されるフローチャートに関連して説明されたもの(即ち、被検体に対する治療の適性を評価する方法で行われる判断)と同じであることが可能である。

40

【0061】

以下、被検体のシグナル伝達経路(ここでは、ER- α 視患案ル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測するのに使用するためのシステムの実施形態が、図6に示されるように図式的及び例示的に示される。ここでも被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0062】

システム30は、この例では乳癌患者の組織であるサンプルの細胞の中で転写因子(ここでは、ER- α)を検出するための第1染色を実行する第1染色キット31と、そのサンプルの細

50

胞の中で転写因子(即ち、ER- α)についてのターゲット遺伝子(ここでは、PgR)によりエンコードされたタンパク質(ここでは、PR)を検出するための第2染色を実行する第2染色キット32とを有する。システム32は、第1染色及び第2染色に基づいて、ER- α の核の存在及びPgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)の双方を示すサンプルの細胞を定量化する定量化ユニット33と、選択的に、定量化に基づいて乳癌患者における転写因子(ここでは、ER- α)のアクティビティを推測する推測ユニット34とを更に有する。

【0063】

システム30は、好ましくは、図1ないし図3に示されるフローチャートに関連して説明された方法を実行するように適合されている。

【0064】

以下、被検体に対する治療の適性を評価する際に使用するためのシステムの実施形態が、図7において図式的及び例示的に示され、その治療は、ここではER- α シグナル伝達経路であるシグナル伝達経路に対して行われる。ここでも被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0065】

システム40は、図6に関連して説明されたようなシステム30を含み、選択的に、推測されたアクティビティに基づいて治療の適性を評価する評価ユニット41を含む。

【0066】

システム40は、好ましくは、図4に示されるフローチャートに関連して説明されたような方法を実行するように構成される。

【0067】

以下、被検体を分類するのに使用するためのシステムの実施形態が図8に図式的及び例示的に示される。ここでも被検体は医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である。

【0068】

システム50は、図6に関連して説明されたようなシステム30を含み、選択的に、推測されたアクティビティに基づいて被検体を分類する分類ユニット51を含む。

【0069】

システム50は、好ましくは、図5に示されるフローチャートに関連して説明されたような方法を実行するように構成される。

【0070】

図1ないし図3に関連して説明された被検体におけるシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測する方法の第1ないし第3実施形態において、本方法は適切なサンプル処理(ステップ100; ステップ200)の後に行われてよい。例えば、サンプルは、新鮮な又はパラフィン内蔵の組織/細胞材料から取得されることが可能であり、そのサンプルは、顕微鏡のスライド上に固定され配置され、且つ標準的なIHC又は免疫蛍光染色プロトコルに従って染色されるように処理される。

【0071】

図1ないし図3に関して説明される被検体におけるシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測する方法についての第1ないし第3実施形態において、第1染色及び第2染色が免疫組織化学(IHC)アッセイの形式で双方共に実行されるが、他の実施形態では、第1染色及び第2染色のうちの一方のみがIHCアッセイの形式で実行される一方、第1染色及び第2染色のうちの他方が免疫蛍光アッセイとして実行されることが可能である。代替的に、第1染色及び第2染色の双方が免疫蛍光アッセイとして実行されることが可能であり、あるいは、第1染色及び/又は第2染色が、例えば、転写因子(ここでは、ER- α)又はターゲット遺伝子エンコード・タンパク質PR(ターゲット遺伝子、PgR)に対する高い親和結合に基づく他の染色アッセイ、(金のビーズ又は金コロイドのような)コロイドに対する抗体(antibodies with colloids)に基づく染色アッセイ、写真現像に関するアイソトープによる染色アッセイ、或いはエンハンスド・ケミルミネセンス(enhanced chemiluminescence: ECL)に基づく染色アッセイとして実行されることが

10

20

30

40

50

可能である。

【0072】

図1ないし図3に関して説明される被検体におけるシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測する方法についての第1ないし第3実施形態において、定量化の一部として実行されるコンピュータ画像分析を容易にするために、追加的なDAPI(diamidino phenylindole)染色が実行され、細胞の核を明らかにすることが可能である。この点に関し、図9はサンプルのスライドのデジタル画像における細胞及び細胞核の輪郭の検出を図式的及び例示的に示す。この例において、コンピュータで実行されるアルゴリズムは、デジタル画像のDAPI(青(blue))チャンネルに存在する核に基づいて細胞を検出するために使用される。DAPI染色に基づいて識別される輪郭を有する核の一例は、図9において参照番号21により示されている。膜染色(a membrane staining)を行わない場合、核21はカーネル(a kernel)として役立ち、そのカーネルから仮想的な膜22が外方に、所与の表面エリアに到達するまで、あるいは膜22が他の膜(例えば、膜23)に当たるまで成長させられる。規定された核21(the defined nucleus)とともに膜22は、他の蛍光チャンネルにおける染色を定量化するのに使用される細胞核(a nuclear)と細胞質画分(a cytoplasmic compartment)とをもたらず。例えば、図9に示される染色において、転写因子(ここでは、ER- α)の核の存在を示すサンプルの細胞を定量化するために、グリーン蛍光チャンネルで平均的な核染色が細胞毎に定量化されることが可能である。

10

【0073】

図1ないし図3に関して説明される被検体におけるシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)の転写因子のアクティビティを推測する方法についての第1ないし第3実施形態において、第1染色が先に(即ち、第2染色の前に)実行されるように説明されているが、他の実施形態では、第2染色が先に(即ち、第1染色の前に)実行されることが可能である。例えば、図1に関連して説明される第1実施形態において、第2染色が先に同一スライドで実行されることが可能であり、第1スライドは、第2染色からのステインが同一スライドから除去された後に限って実行されることが可能である。言い換えれば：「第1染色」及び「第2染色」という表現における「第1」及び「第2」という用語は、2つの染色を互いに区別するだけのために使用されているに過ぎず；それらは2つの染色が実行される相対的な順序を必ずしも意味していない。

20

【0074】

上述したように、従来の臨床で使用されるER染色では、細胞中の核ER染色は、その細胞におけるアクティブなERシグナル伝達経路を示すように考えられる。しかしながら、この仮定は、MCF-7乳癌細胞株からのサンプルに関して以下に示されるように、必ずしも真ではない。ここで、乳癌の患者のサンプルの組織ブロックから、3つのスライスが切り出され、この場合において、最初のスライド及び最後のスライドはコントロール(controls)として機能する。中間のスライドに関し、サンプルの細胞中の転写因子(ここでは、ER- α)を検出するために第1染色が実行され、サンプルの細胞中の転写因子(即ち、ER- α)のターゲット遺伝子(ここでは、PgR)によりエンコードされたタンパク質(ここでは、PR)を検出するために第2染色が実行された。より詳細に言えば：第1染色及び第2染色の双方がサンプルの同一スライド上で免疫蛍光アッセイの形式で実行され、それにより、第1染色からのステイン及び第2染色からのステインが、同一スライド上に同時に存在している。第1染色からのステイン及び第2染色からのステインが同一スライドに同時に存在するので、それらの波長は、それらが実質的に非オーバーラップであるように適切に選択される。

30

40

【0075】

図10は、48時間のエストロゲン欠乏及び以後の16時間に及ぶエストラジオール刺激の下でMCF7乳癌細胞株サンプルで測定されたER- α シグナル(上のグラフ)及びPRシグナル(下のグラフ)の進行の比較例を示す。これらのグラフにおいて、水平軸は「1時間」を単位とする時間を示し、縦軸はこれらのタンパク質に対する特定の抗体を利用して測定されるMCF7の核における個々のタンパク質発現シグナルの強度を示す。上のグラフから分かるように、エストロゲン欠乏の48時間の経過後、MCF7細胞は、(黒い四角■で示される)通常の培養

50

条件に対して、(×印で示される)増加したER- α シグナルを示す。エストラジオールの刺激の下で、ERシグナルはコントロールに対して減少する(刺激のない場合は、黒いドット●で示される)。一方、下のグラフは、(黒いドットで示される、刺激を受けない)コントロールと比較して、エストラジオールとともにER- α シグナル伝達経路の活性化に応じて、(バツ印で示される)PRシグナルは核シグナルを増加させることを示す。PRシグナルは、エストラジオールの存在の下で16時間後に、(四角で示される)通常の培養条件におけるものを上回るレベルまで増加する。これは、実際、ER経路の特定の刺激がPRタンパク質の生成の増加をもたらすことを示す。ER自体は下方に規制されるという事実は予想されており、この点については過去に説明されている(Borra's M. et al., "Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression", J Steroid Biochem Mol Biol, Vol. 48, No. 4, 1994, pages 325 to 336)。

【0076】

被検体におけるシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)のアクティビティ及び転写因子(ここでは、ER- α)の信頼可能な推測を可能にする本発明による方法の力量を確認するために、シグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)のアクティビティは、ある文献で説明されている方法を利用して推測され、その文献は、Verhaegh W. et al., "Selection of personalized patient therapy through the use of knowledge-based computational models that identify tumor-driving signal transduction pathways", Cancer Research, Vol. 74, No. 11, 2014, pages 2936 to 2945であり、この場合において、本方法は、シグナル伝達経路アクティビティの解釈に対して発現マイクロアレイ・データの代わりにqPCRデータを利用するように若干適合させられる。以下の表1は、ER- α シグナル伝達経路が実際にアクティブである(即ち、「on」)である、即ちアクティブ遺伝子転写モードにある推測された確率(第3列)及び確率のlog2(第4列)を示す。表から分かるように、転写因子(ここでは、ER- α)の核の存在とPgRエンコード・タンパク質PRの存在(核及び/又は細胞質の存在)との双方を示す(省略して「ER+PR+」のように示す)、乳癌サンプルでER- α シグナル経路がアクティブである確率のlog2は3.2であると推測され、これはこのサンプルにおけるER- α シグナル伝達経路のアクティビティを示す。これに対して、「ER+PR-」として略記される)ER- α 染色のみが陽性である乳癌サンプルの場合、確率のlog2は-0.676であると推測され、これはその部分におけるER- α シグナル伝達経路についてのインアクティビティを示す。この結果は、転写因子(ここでは、ER- α)の核の存在と転写因子(即ち、ER- α)のターゲット遺伝子(ここでは、PgR)によりエンコードされるタンパク質(ここでは、PR)の存在(核及び/又は細胞質の存在)との双方を示す被検体のサンプルの細胞を考察する場合に、転写因子(ここでは、ER- α)のアクティビティと、被検体のシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)のアクティビティとについてのより信頼できる推測が達成されうることを保証する。

【0077】

【表1】

サンプル	ER- α "on"確率	ER- α "on"確率のLog2
ER+PR-	0.38498161	-0.675840018
ER+PR+	0.901885007	3.200397975

表1 - ER- α シグナル伝達経路がアクティブである可能性

【0078】

図11は、39個の乳癌サンプルとともに実行された実験結果を示し、単独のER染色に基づくERのみのスコア(「ER+」として略記される)は、上述したように第1染色及び第2染色に基づく転写因子(ここでは、ER- α)の核の存在とターゲット遺伝子エンコード・タンパク

質(ここでは、PR)の存在との双方を示すサンプルの細胞のみを考察したスコアと比較される(後者は、「ER+PR+」として略記される)。個々のサンプルにおいてシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)がアクティブである確率のlog2がx軸で示され、その確率は上述の「Verhaegh W. et al.」による文献に示される方法を利用して推測される。確率のlog2のより大きな正の値(グラフの右側)は、サンプルの中でER- α シグナル伝達経路がアクティブであるより大きな可能性を示す一方、確率のlog2のより大きな負の値(グラフの左側)は、サンプルの中でER- α シグナル伝達経路がインアクティブである傾向が強いことを示す。y軸は、「ER+」に関する従来技術により発見された細胞のパーセンテージ、及び「ER+PR+」に関する本発明による方法を利用して発見された細胞のパーセンテージを示す。

10

【0079】

結果は、従来技術で使用されているような従来のER染色及び病院プロトコルに関し、多くのサンプルが、ER- α シグナル伝達経路のアクティビティを不正確に発見されていることを示す(グラフの左上の象限)。これらの「偽陽性(false positives)」はER陽性細胞のうち高いパーセンテージを示すが；その確率のlog2は、ER- α シグナル伝達経路は個々のサンプルにおいて実際にはインアクティブである傾向が強いことを示す。そのようなER陽性結果を有する患者が、例えばネオアジュバント療法、アジュバント療法、及び/又は転移療法のようなホルモン療法で治療された場合、彼/彼女は治療に対して所望の反応を示さない傾向が強い。これに対して、「ER+PR+」の場合、ER- α の核の存在(即ち、転写因子)及びPRの存在(即ち、ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質)の双方を示す細胞についての確認されるパーセンテージは、転写因子がアクティブである確率のlog2の増加と共に定量的に増えていることが分かる。これは、従来技術と比較して「偽陽性」の個数を減らし、ER- α シグナル伝達経路のアクティビティ評価においてより高い特異性を提供することを許容する。陽性に対する閾値は、非常に類似する成果をもたらす2つの異なる方法で決定された。第1変形例では、(例えば、一次抗体がアッセイから除かれ、二次抗体のみが組織スライスに付加される)ネガティブ・コントロール(negative controls)が染色される。これらのネガティブ・コントロールのうち平均的な核強度が確認され、細胞の99%が下回る強度が、ノーマルに染色されたサンプルのうちの細胞を陽性と呼ぶためのカットオフ・ポイントとして選択される。第2の代替的な変形例では、細胞質染色がローカルにバックグラウンドを決定するために使用される。これは、個々のサンプルにわたって非常に変化し得るバックグラウンド染色を補償するために実行される。細胞を陽性としてラベル付けるために、ネガティブ・コントロールよりも顕著に高い総合的な細胞核細胞質染色比率(significantly higher nuclear total cytoplasmic staining ratio)を有するべきである。

20

30

【0080】

図1ないし図3に関連して説明される被検体におけるシグナル伝達経路(ここでは、ER- α シグナル伝達経路)又は転写因子のアクティビティを推測する方法の第1ないし第3実施形態において、第1染色及び第2染色からのステインの波長を適切にコントラストを付ける波長での対比染色(counterstain)が、追加的に実行され、関心のある染色される構造(ここでは、細胞及び細胞核)をよりいっそう容易に検出できるようにすることが可能である。この場合において、細胞及び細胞核の輪郭は、対比染色からの色情報に基づいて検出されることも可能である。そのような対比染色を実行するために特に相応しい物質の1つは、例えば、(通常のブライトフィールド染色の場合)ヘマトキシリン及びエオシンであることが可能である。蛍光染色の場合、DAPI又はヘキスト(Hoechst)は適切な選択肢である。

40

【0081】

本発明は、シグナル伝達経路がER- α シグナル伝達経路であり、転写因子がER- α であり、ターゲット遺伝子がPgRであり、ターゲット遺伝子エンコード・タンパク質がPRであることに加えて、被検体が医療対象であり、特に癌患者であり、より具体的には乳癌の患者である場合について上述されてきたが、本発明は他の場合にも非常に関連している。例え

50

ば、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド受容体、レチノイン酸受容体(RAP)、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAP)、ビタミン受容体(VDR)、及びオーファン核受容体に加えて、本発明は、Wnt転写因子(the Wnt transcription factor)、ヘッジホッグ(HH)転写因子、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β) 転写因子、ノッチ転写因子、NF- κ B転写因子、ホスホイノシチド3キナーゼ(PI3K)転写因子、活性化プロテイン-1(AP1)転写因子、ヤヌス・キナーズ/シグナル伝達及び転写活性化(Jak-STAT)転写因子、及び全ての転写因子とともに使用されることが可能であり、それらの転写因子は、少なくとも1つの転写固有のターゲット遺伝子エンコード・タンパク質との組み合わせにおいて、インアクティブからアクティブな遺伝子転写モードに切り替わることが可能である。これらの経路は全てのタイプの癌において或る役割を演じるので、本発明は、全ての臓器に加えて、生体検査される場合に、非悪性腫瘍及びその他の異常な組織病理を伴う他の疾患の全ての癌のタイプに適用されることが可能であり、例えば、肝臓(例えば、原発性肝癌、転移性肝癌、肝硬変)、肺(例えば、原発性及び転移性癌、肺線維症)、腎臓(例えば、ウィルムス腫瘍、急性糸玉腎炎)、膀胱(例えば、膀胱癌、上皮肥厚)、胃腸(例えば、胃腸癌、結腸腺腫、炎症性腸疾患)、心臓(例えば、心筋症、心臓腫瘍)、子宮(例えば、子宮内膜癌、子宮内膜症、繊維腫)、卵巣(例えば、卵巣癌、過形成性卵巣症候群)、前立腺(例えば、前立腺肥大、前立腺癌、前立腺炎)、精巣(例えば、精巣癌)、筋肉(例えば、肉腫)、皮膚(例えば、メラノーマ、扁平上皮癌、湿疹)、骨(例えば、転移性腫瘍、白血病、骨肉腫)、経口(例えば、粘膜症、頭頸部癌)、脳(例えば、神経膠腫、クロイツフェルト-ヤコブ)、血管(例えば、アテローム性動脈硬化症)、及び繊維性組織(例えば、線維腫及び繊維肉腫、肺及び膀胱線維症、瘢痕組織)等の疾患に適用可能である。

10

20

【0082】

開示される実施形態に対する他の変形例は、図面、本開示、及び添付の特許請求の範囲を学ぶことにより、請求項に係る発明を実施する当業者により理解及び把握されることが可能である。

【0083】

特許請求の範囲において、「有する(comprising)」という言葉は他のエレメント又はステップを排除しておらず、「ある("a" or "an")」という不定冠詞的な語は複数を排除していない。

30

【0084】

1つのユニット又はデバイスが特許請求の範囲に記載されている複数の事項についての機能を発揮してもよい。例えば、図6に関連して説明される被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する際に使用するシステムの実施形態において、定量化ユニット33及び(選択的な)推測ユニット34は2つの別個のユニットとして記載/図示されているが、それらは単独のユニットとして実現されてもよい。

【0085】

コンピュータ・プログラムは、他のハードウェアと一緒に提供される又は他のハードウェアの一部として提供される適切な媒体(例えば、光ストレージ媒体、又はソリッド・ステート媒体)に保存/分散されてもよいが、インターネット又はその他の有線又は無線の通信システムを介するような他の形式で分散されていてもよい。

40

【0086】

特許請求の範囲における如何なる参照符号も範囲を限定するように解釈されるべきでない。

【0087】

本発明は、被検体におけるシグナル伝達経路の転写因子のアクティビティを推測する方法に関連する。本方法は、被検体のサンプルの細胞の中で転写因子を検出するための第1染色を実行するステップと、サンプルの細胞の中で転写因子のターゲット遺伝子によりエンコードされるタンパク質を検出するための第2染色を実行するステップとを有する。本方法は、第1染色及び第2染色に基づいて、転写因子の核の存在とターゲット遺伝子エンコ

50

ード・タンパク質の存在との双方を示すサンプルの細胞を定量化するステップと、定量化に基づいて被検体における転写因子のアクティビティを推測するステップを更に有する。これは、提示される方法が、被検体における転写因子のアクティビティをより信頼性高く推測することを許容する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0088】

【非特許文献1】J.P. Vink et al., "Efficient nucleus detector in histopathology images", in Journal of Microscopy, Vol. 249, No. 2, 2013, pages 124 to 135.

10

【非特許文献2】D. Mueller et al., "Real-time deformable registration of multi-modal whole slides for digital pathology", in Computerized Medical Imaging and Graphics, No. 35, 2011, pages 542 to 556

【非特許文献3】A.C. Ruifrok and D.A. Johnston, "Quantification of histochemical staining by color deconvolution", in Analytical and Quantitative Cytology and Histology, Vol. 23, No. 4, 2001, pages 291 to 299,

【非特許文献4】M. Macenko et al., "A method for normalizing histology slides for quantitative analysis", in Proceedings of IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Boston, MA, USA, 2009, pages 1107 to 1110,

20

【非特許文献5】M. Niethammer et al., "Appearance normalization in histology slides", in Proceedings of First International Workshop on Machine Learning in Medical Imaging, Beijing, China, 2010, pages 58 to 66, or in J.P. Vink et al. (ibid).

【非特許文献6】Borra's M. et al., "Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression", J Steroid Biochem Mol Biol, Vol. 48, No. 4, 1994, pages 325 to 336)

【非特許文献7】Verhaegh W. et al., "Selection of personalized patient therapy through the use of knowledge-based computational models that identify tumor-driving signal transduction pathways", Cancer Research, Vol. 74, No. 11, 2014, pages 2936 to 2945

30

【 図 1 】

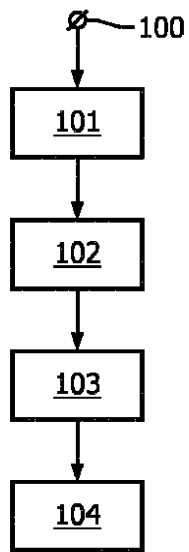


FIG. 1

【 図 2 】

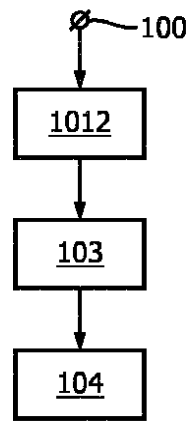


FIG. 2

【 図 3 】

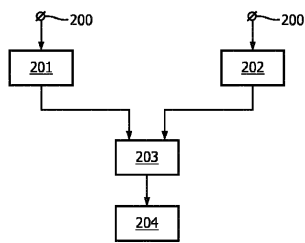


FIG. 3

【 図 5 】

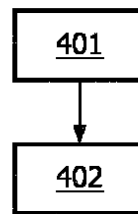


FIG. 5

【 図 4 】

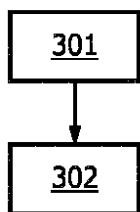


FIG. 4

【図 6】

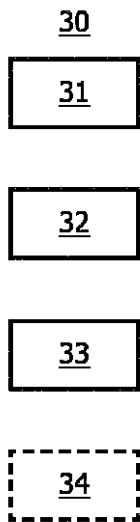


FIG. 6

【図 7】

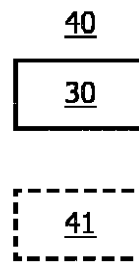


FIG. 7

【図 8】

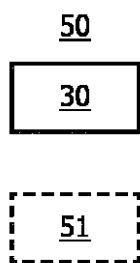


FIG. 8

【図 9】

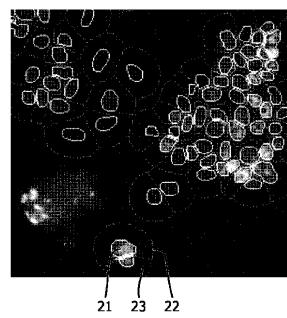


FIG. 9

【図 10A】

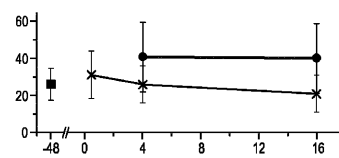


FIG. 10A

【図 10 B】

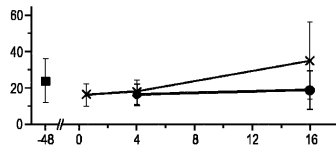


FIG. 10B

【図 11】

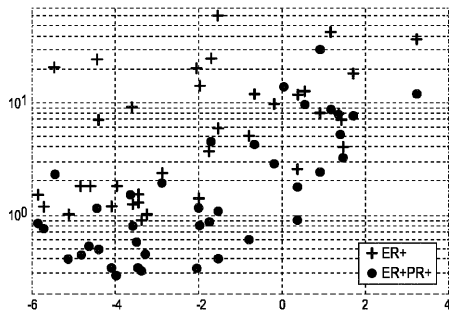


FIG. 11

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/063744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/574 G06F19/20 G06F19/10
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N G06F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/110440 A1 (KONINKL PHILIPS NV [NL]) 30 July 2015 (2015-07-30) the whole document page 2, line 6 - page 16, line 24; claims 1-13; figures 1-6 -----	1-14
Y	WO 2014/174003 A1 (KONINKL PHILIPS NV [NL]) 30 October 2014 (2014-10-30) the whole document page 2, line 12 - page 11, line 15 page 13, lines 10-26 page 41, line 23 - page 42, line 14; figure 6 ----- -/--	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 2017

Date of mailing of the international search report

10/07/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Boiangiu, Clara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/063744

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARÍA C DÍAZ FLAQUÉ ET AL: "Progesterone receptor assembly of a transcriptional complex along with activator protein 1, signal transducer and activator of transcription 3 and ErbB-2 governs breast cancer growth and predicts response to endocrine therapy", BREAST CANCER RESEARCH, CURRENT MEDICINE GROUP LTD, GB, vol. 15, no. 6, 17 December 2013 (2013-12-17), page R118, XP021176433, ISSN: 1465-5411, DOI: 10.1186/BCR3587 the whole document abstract; figures 1-10; table 1	1-14
Y	WO 01/96605 A2 (UNIV ARKANSAS [US]; MANOLAGAS STAVROS C [US]; KOUSTENI STAVROULA [US]) 20 December 2001 (2001-12-20) the whole document page 25, line 28 - page 26, line 8 page 12, line 17 - page 16, line 19; claims 1, 3, 18-36	1-14
X	Josefine Bostner: "The Akt/mTOR Pathway and Estrogen Receptor Phosphorylations - a crosstalk with potential to predict tamoxifen resistance in breast cancer", 12 November 2013 (2013-11-12), XP055124680, Retrieved from the Internet: URL:http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:664277/FULLTEXT01.pdf [retrieved on 2014-06-23] the whole document	1-14
Y	W. VERHAEGH ET AL: "Selection of Personalized Patient Therapy through the Use of Knowledge-Based Computational Models That Identify Tumor-Driving Signal Transduction Pathways", CANCER RESEARCH, vol. 74, no. 11, 1 June 2014 (2014-06-01), pages 2936-2945, XP055212377, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2515 the whole document	1-14
Y	WO 2016/062891 A1 (KONINKL PHILIPS NV [NL]) 28 April 2016 (2016-04-28) the whole document	1-14
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/063744

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 1 736 780 A1 (EPPENDORF ARRAY TECH SA [BE]) 27 December 2006 (2006-12-27) the whole document	1-14
Y	----- WO 2015/101635 A1 (KONINKL PHILIPS NV [NL]) 9 July 2015 (2015-07-09) the whole document claims 1-15	1-14
Y	----- WO 2016/062892 A1 (KONINKL PHILIPS NV [NL]) 28 April 2016 (2016-04-28) pages 1-17; claim 7	1-14
Y	----- WO 2009/058884 A1 (LE CT NATIONALE DE LA RECH SCI [FR]; NEUTEKBIO LTD [IE]; GERAGHTY ERIN) 7 May 2009 (2009-05-07) the whole document -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/063744

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015110440 A1	30-07-2015	CN 105917231 A EP 3097421 A1 JP 2017508137 A US 2016334405 A1 WO 2015110440 A1	31-08-2016 30-11-2016 23-03-2017 17-11-2016 30-07-2015
WO 2014174003 A1	30-10-2014	AU 2014259459 A1 CA 2909991 A1 CN 105121665 A EP 2989211 A1 JP 2016519926 A KR 20160003124 A RU 2015150464 A US 2016110494 A1 WO 2014174003 A1	17-12-2015 30-10-2014 02-12-2015 02-03-2016 11-07-2016 08-01-2016 02-06-2017 21-04-2016 30-10-2014
WO 0196605 A2	20-12-2001	AU 6980101 A BR 0111688 A CA 2412998 A1 EP 1363946 A2 JP 2004507232 A KR 20030021172 A MX PA02012436 A US 2002137209 A1 WO 0196605 A2	24-12-2001 17-02-2004 20-12-2001 26-11-2003 11-03-2004 12-03-2003 10-09-2004 26-09-2002 20-12-2001
WO 2016062891 A1	28-04-2016	AU 2015334840 A1 CA 2965442 A1 US 2016113572 A1 WO 2016062891 A1	15-06-2017 28-04-2016 28-04-2016 28-04-2016
EP 1736780 A1	27-12-2006	CN 101213455 A EP 1736780 A1 EP 1894015 A1 US 2010137144 A1 WO 2006135992 A1	02-07-2008 27-12-2006 05-03-2008 03-06-2010 28-12-2006
WO 2015101635 A1	09-07-2015	AU 2014375206 A1 CA 2923092 A1 CN 105492630 A DK 3013986 T3 EP 3013986 A1 ES 2613521 T3 JP 6077178 B2 JP 2016536976 A US 2016298196 A1 WO 2015101635 A1	03-03-2016 09-07-2015 13-04-2016 27-02-2017 04-05-2016 24-05-2017 08-02-2017 01-12-2016 13-10-2016 09-07-2015
WO 2016062892 A1	28-04-2016	AU 2015334841 A1 CA 2965217 A1 US 2016117443 A1 WO 2016062892 A1	15-06-2017 28-04-2016 28-04-2016 28-04-2016
WO 2009058884 A1	07-05-2009	CA 2704220 A1 DK 2220488 T3 EP 2220488 A1 ES 2409356 T3 US 2009136947 A1	07-05-2009 22-04-2013 25-08-2010 26-06-2013 28-05-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

Information on patent family members

PCT/EP2017/063744

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

(74)代理人 100091214

弁理士 大貫 進介

(72)発明者 ファン デ ストルペ , アニャ

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイテック キャンパス 5

(72)発明者 ファン ヘメルト , フレーク

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイテック キャンパス 5

(72)発明者 フェルハーフ , ウィルヘルミウス フランシスキュス ヨーハネス

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイテック キャンパス 5

(72)発明者 ヴィムベルガー - フリードル , ラインホルト

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイテック キャンパス 5

(72)発明者 ファン デル フェン , ヨン コルネリユス ペトリユス

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイテック キャンパス 5

F ターム(参考) 2G045 AA24 BB24 CB02 DA36 FA19 FB03

4B063 QA01 QA08 QA19 QQ08 QQ42 QQ79 QR48 QS33 QX02

专利名称(译)	在受试者的信号转导途径中推断转录因子活性的方法		
公开(公告)号	JP2019520569A	公开(公告)日	2019-07-18
申请号	JP2018564832	申请日	2017-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦NV哥德堡		
[标]发明人	ファンデストルベアニャ ファンヘルムトフレーク フェルハーフウィルヘルムスフランシスキュスヨーハネス ヴィムベルガーフリードルラインホルト ファンデルフェンヨンコルネリユスペトリユス		
发明人	ファン デストルベ,アニャ ファン ヘルムト,フレーク フェルハーフ,ウィルヘルムス フランシスキュス ヨーハネス ヴィムベルガー-フリードル,ラインホルト ファン デル フェン,ヨン コルネリユス ペトリユス		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/00 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/6875 G01N33/574 G01N33/57415 G01N33/6872 G01N2333/723 G01N2800/52 G16B5/20 G16B25/10		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/48.P G01N33/53.Y C12Q1/00.C C12Q1/68		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA19 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	2016174158 2016-06-13 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在受试者中推断信号转导途径的转录因子的活性的方法。该方法执行第一染色以检测受试者的样品的细胞中的转录因子 (101) , 并检测样品的细胞中由转录因子的靶基因编码的蛋白质。 (102) 用于进行第二次染色。该方法基于第一和第二次染色 (103) 对显示转录因子核的存在和目标基因编码蛋白的存在进行定量的样品细胞, 并基于定量检测样品细胞。该方法还包括估计样品中转录因子活性的步骤 (104) 。这使得提出的方法能够更可靠地推断受试者中转录因子的活性。[选择图]图11

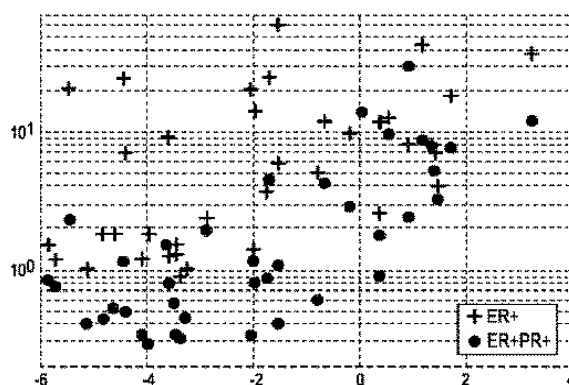


FIG. 11