

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成29年6月29日(2017.6.29)

【公表番号】特表2015-514212(P2015-514212A)

【公表日】平成27年5月18日(2015.5.18)

【年通号数】公開・登録公報2015-033

【出願番号】特願2015-503378(P2015-503378)

【国際特許分類】

G 0 1 N	33/48	(2006.01)
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	16/18	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)
C 1 2 M	1/34	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/543	(2006.01)
G 0 1 N	33/483	(2006.01)
G 0 1 N	21/64	(2006.01)

【F I】

G 0 1 N	33/48	M
C 1 2 Q	1/04	
C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	15/00	A
C 0 7 K	16/18	
C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 M	1/34	B
C 1 2 M	1/34	F
G 0 1 N	33/48	P
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53	Y
G 0 1 N	33/543	5 0 1 A
G 0 1 N	33/483	C
G 0 1 N	21/64	F

【誤訳訂正書】

【提出日】平成29年4月14日(2017.4.14)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 0 7

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 0 7】

G a i s e r et al. は、同じ組織試料での遺伝子増幅についてのタンパク質発現より位置決めされる組織構造を分析するための方法を記載した。著者らは、モノクローナル抗体及びF I T C 標識化二次抗体を使用して、結腸ガンの組織試料におけるC D 1 3 3 の発現を、まず検出した。4 0 ×拡大を使用して、関心領域が手動で選択され、記録された。イメージング後、F I S H 分析は、増幅されたc M y c 発ガン遺伝子及びZ N F 2 1 7 について同時に行われた。試料は、同じ領域において、4 0 ×拡大で再度イメージ

ングされた。タイル系のFISH分析についての自動顕微鏡及び特注の選別機が、画像を分析するのに使用された。Anal Cell Pathol (Aust). 2010; 33(2):105-112 doi: [10.3233/ACP-CLO-2010-0532](https://doi.org/10.3233/ACP-CLO-2010-0532)).

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0008

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0008】

同じ生物学的試料で複数の標的を検出し、細胞単位での発現を比較するための合成画像を形成するための改良法であって、タンパク質発現、アポトーシス等に基づいて細胞を包含又は除外することのできる方法に対するニーズが依然として存在する。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0034

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0034】

ある実施形態では、工程(1)(d)は、(i)検出した蛍光信号から、試料の少なくとも一部の最初の画像を生成する工程、及び(ii)最初の画像から関心領域を選択し、少なくとも第1のバインダー及び蛍光マーカーからの信号を蛍光により検出して、最初の画像より高い解像度で第1の画像を生成する工程を含む。ある実施形態では、合成画像は、より高い解像度の画像及び第2の画像からの信号情報を組み合わせることにより生成される。他の実施形態では、合成画像は、第2の画像における蛍光マーカーからの信号の位置と共に、より高い解像度の画像における蛍光マーカーからの信号の位置を登録する工程を含む方法により生成される。さらに他の実施形態では、合成画像の生成は、工程(2)で取得された蛍光マーカーからの信号の位置と共に、工程(1)で取得された蛍光マーカーからの信号の位置を登録する工程を含む。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0036

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0036】

特定の実施形態では、本方法は、1つ以上のマーカー及び蛍光マーカー（例えば、DAPI）染色についての免疫蛍光により染色されている、ホルマリン固定された、パラフィン包埋組織試料の第1の低拡大画像を生成する工程、低拡大画像からバーチャルH&E又はバーチャルDABの画像を生成し、それらを使用して、染色強度又は形態に基づいて関心領域を選択する工程、FISH及び蛍光マーカー染色により染色されている試料の第2の画像を生成する工程、合成画像を生成するために、座標としての蛍光マーカー染色を使用して得られた共通画像に基づいて、画像の重ね合わせ又は登録をする工程を含む。このため、ある実施形態では、合成画像は、明視野型画像、例えば、バーチャルH&E又はバーチャルDABの画像である。ある実施形態では、本方法は、画像を分析して、個々の細胞におけるタンパク質発現及び標的核酸配列の量を測定する工程をさらに含む。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0084

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0084】**生物学的試料の第1の画像を生成する工程**

本発明のある実施形態では、本方法は、生物学的試料の第1の画像を生成する工程を含む。第1の画像は、(a)固体支持体上の試料を、標的タンパク質用の第1のバインダーと接触させる工程、(b)形態学的情報を提供する蛍光マーカーで、試料を染色する工程、(c)第1のバインダー及び蛍光マーカーからの信号を、蛍光により検出する工程、並びに(d)検出した蛍光信号から、試料の少なくとも一部の第1の画像を生成する工程により生成される。ある実施形態では、本方法は、第1の工程において、試料を、更なる形態学的情報を提供する少なくとも1つの更なるバインダーと接触させる工程、並びに蛍光による少なくとも1つの更なるバインダーからの信号を検出する工程も含む。ある実施形態では、工程(c)は、このような構造体、例えば、赤血球、fibrose及びリボフスシン顆粒由来の内因性蛍光信号(自己蛍光としても公知)を、蛍光により検出する工程も含む。ある実施形態では、第1の画像を生成する工程(工程(d))は、検出した蛍光信号から、試料の少なくとも一部のより低い拡大での最初の画像を生成する工程、最初の画像から関心領域を選択し、少なくとも第1のバインダー及び蛍光マーカーからの信号を蛍光により検出して、最初の画像より高い解像度で第1の画像を生成する工程を含む。「関心領域を選択する工程」は、(1)最初の画像に基づいて、ユーザが関心領域を選択する;(2)コンピュータ(すなわち、本方法を実行するイメージングシステム)が最初の画像、アルゴリズム及びそれが受け取った命令に基づいて、関心領域を選択する;又は(3)コンピュータが最初の画像及びアルゴリズムに基づいて、関心領域を選択することを意味すると理解される。第1の画像が、生成された最初の画像を、必ずしも意味することは限らないことを理解されたい。同様に、第2の画像が、本方法の実施形態により生成されたちょうどその第2の画像を文字通りには意味しない。

【誤訳訂正6】**【訂正対象書類名】**明細書**【訂正対象項目名】**0086**【訂正方法】**変更**【訂正の内容】****【0086】**

ある実施形態では、最初の画像は、明視野染色プロトコルに類似する、1つ以上の明視野型画像であり得る。このため、最初の蛍光画像データは、アルゴリズムによる、疑似(バーチャル/分子)ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)画像を生成するのに使用されてもよい。又は疑似(バーチャル/分子)3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)画像が、類似のアルゴリズムにより生成されてもよい。蛍光画像データを明視野型画像に変換するための詳細な方法は、表題「画像取得及び分析」において、以下に記載される。次いで、明視野型画像は、関心領域の選択に使用される。

【誤訳訂正7】**【訂正対象書類名】**明細書**【訂正対象項目名】**0125**【訂正方法】**変更**【訂正の内容】****【0125】**

さらに他の実施形態では、生物学的試料全体のより高い解像度の画像が必要でない場合がある。むしろ、より高い解像度の画像は、試料の選択された関心領域(ROI)にのみ必要とされる。このため、第1の画像を生成しながら、まず、生物学的試料は、ROI選択の可能な、(例えば、10×、より高い解像度と比較して)より低い解像度でイメージングされる。場合により、より低い解像度でイメージングすることは、接触工程及び染色工程に使用される蛍光体のそれぞれについてのスキャンを含む。1つ以上のROIが、所定の基準(例えば、試料の完全性、表現型、例えば、腫瘍又は正常、筋肉又は管組織等)に基づいて選択されてもよい。ある実施形態では、ROIは、第1のバインダーから検出

された標的タンパク質のタンパク質発現レベルに少なくとも部分的に基づいて選択される。このため、特定の R O I は、第 1 の閾値と比較してより低い標的タンパク質の発現レベルに選択されてもよい。一方、他の R O I は、第 2 の閾値と比較してより高いタンパク質の発現レベルのために選択されてもよい（第 2 の閾値は、第 1 の閾値とは異なる場合がある。）。R O I の座標は、R O I のみにスキャンする、より高い解像度を指示するのに使用される。ある実施形態では、第 2 の画像は、同じより高い解像度で、第 1 の画像用の R O I のために取得される画像として、R O I 単独で取得される。

【誤訳訂正 8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 2 6

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 2 6】

上記のように、ある実施形態では、まず、最初の画像（すなわち、より低い解像度の画像）が、明視野染色プロトコルに類似する、1つ以上の明視野型画像に変換される。このため、最初の蛍光画像データは、アルゴリズムにより、疑似（バーチャル／分子）ヘマトキシリソル及びエオシン（H & E）画像を生成するのに使用されてもよい。又は疑似（バーチャル／分子）3，3'-ジアミノベンジジン（DAB）画像が、類似のアルゴリズムにより生成されてもよい。蛍光画像データを明視野型画像に変換するための詳細な方法は、以下に記載される。次いで、明視野型画像は、形態学的情報に少なくとも部分的に基づく関心領域の選択に使用される。

【誤訳訂正 9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 2 8

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 2 8】

好ましい実施形態では、第 1 の画像を像を生成し、固体支持体上の試料を位置決めする工程、（2）試料の中程度の解像度の画生成する工程は、（1）任意に、固体支持体全体のより低い解像度の画像を生成する工程、（3）所定の基準に基づいて、関心領域（R O I）を特定する工程、及び R O I それぞれについてのより高い解像度の画像を生成する工程を含む。生成された第 2 の画像は、第 1 の画像の生成中に選択された各 R O I のより高い解像度の画像である。これらの実施形態では、より低い、中程度及びより高い、という用語は、特定の拡大率に限定されない。むしろそれらは、互いに相対的である。最も好ましい実施形態では、低い解像度の画像は、2 × の画像であり、中程度の解像度の画像は、10 × の画像であり、高い解像度の画像は、40 × の画像である。

【誤訳訂正 10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 3 0

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 3 0】

ある実施形態では、第 1 及び第 2 の画像が、好ましくは、蛍光マーカーから検出された信号から得られたいいくつかの画像に少なくとも部分的に基づいて配列される。好ましくは、第 1 及び第 2 の画像が重ね合わせられ、合成画像がさらに形成される。合成画像によつて、細胞毎に、第 1 の画像から得られた結果を第 2 の画像から得られた結果と直接比較できるようになる。

【誤訳訂正 11】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 3 5

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0135】

標的核酸配列は、その有無、発現又は増幅レベルにより分析され得る。所望のDNA配列の分析に関して、分析は、細胞核内の信号にフォーカスされてもよい。このため、所望のDNA配列がFISHにより検出される場合、好ましくは、まず、数多くの核が、蛍光マーカー（例えば、DAPI染色）から得られた画像に少なくとも部分的に基づいて、個々にセグメント化される。各核内には、標的核酸配列についてのFISHスポット、及び場合により、（染色体特異的プローブからの）対応する染色体についてのFISHスポットが位置決めされる。FISHスポットがさらに分析される。例えば、スポットの比が標的遺伝子の増幅又は再配列状態を評価するのに算出される。

【誤訳訂正12】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0152

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0152】

このため、明視野型画像を生成するための方法は、生物学的試料上の固定された領域の2つ以上の蛍光画像の画像データを取得する工程、特徴系情報又はピクセル強度データ情報を少なくとも部分的に使用して、画像データを分析し、マッピングデータを生成する工程であって、マッピングパラメータが、非線形推定モデルを含む工程、マッピングパラメータを、蛍光画像に適用する工程、2つ以上の蛍光画像を、明視野色空間に変換する工程、並びに明視野型画像を生成する工程を含む。本方法は、明視野型画像に対する鮮明化変換補正を適用する工程を、さらに含んでもよい。

【誤訳訂正13】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0159

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0159】

次いで、組織切片領域の10×画像を、DAPI、Cy3及びCy5のフィルタセットを使用して収集して、核、サイトケラチン及びHerr2タンパク質染色にそれぞれ特異的な画像を取得した。これらの個々のマーカー画像をステッチして、1つの画像を形成し、次いで、重ね合わせて、蛍光疑似カラー画像並びにバーチャルH&E及びバーチャルDA Bの画像を形成した。ステッチされ、組み合わせられた画像により、病理学者は、浸潤ガンを特異的に含む組織切片から、関心領域を選択が可能となった。これらの浸潤ガン領域についての座標を記録し、40×拡大及び全ての蛍光体、例えば、前述のDAPIについてのフィルタセットを使用して画像を収集するのに使用した。