

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6971218号
(P6971218)

(45) 発行日 令和3年11月24日(2021.11.24)

(24) 登録日 令和3年11月4日(2021.11.4)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/6823 (2018.01)
 C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)
 C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)
 C 1 2 Q 1/686 (2018.01)
 C 1 2 Q 1/6874 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6823 Z
 C 1 2 Q 1/6837 Z
 C 1 2 Q 1/6851 Z
 C 1 2 Q 1/686 Z
 C 1 2 Q 1/6874 Z

請求項の数 44 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-502114 (P2018-502114)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月15日(2016.7.15)
 (65) 公表番号 特表2018-529314 (P2018-529314A)
 (43) 公表日 平成30年10月11日(2018.10.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/042460
 (87) 国際公開番号 W02017/015099
 (87) 国際公開日 平成29年1月26日(2017.1.26)
 審査請求日 令和1年7月16日(2019.7.16)
 (31) 優先権主張番号 62/193,809
 (32) 優先日 平成27年7月17日(2015.7.17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/261,657
 (32) 優先日 平成27年12月1日(2015.12.1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 513322707
 ナノストリング テクノロジーズ, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, ワシントン 98109
 , シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 530, スイート 2000
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100141977
 弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 横断組織切片のユーザー定義領域における遺伝子発現の同時定量

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 組織サンプル中の少なくとも1つの核酸標的を、標的結合ドメイン、シグナルオリゴヌクレオチド、および標的結合ドメインとシグナルオリゴヌクレオチドとの間に位置する光切断可能モチーフを含む少なくとも1つのプローブと接触させ；

(2) 前記組織サンプルの特定の位置を、前記プローブから前記シグナルオリゴヌクレオチドを切り離すのに十分な光で照射し；

(3) 切り離されたシグナルオリゴヌクレオチドを含む溶液を、照射された位置で溶出させ；

(4) 毛細管を用いて、当該溶液を吸引することによって、前記切り離されたシグナルオリゴヌクレオチドを回収し；および

(5) 前記切り離されたシグナルオリゴヌクレオチドを同定し、それによって、照射された組織サンプルの特定の位置の少なくとも1つの核酸標的を検出すること、を含む方法。

【請求項 2】

前記検出が、少なくとも1つの核酸標的の同一性および量を決定することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも1つの核酸標的が、少なくとも2つの異なった核酸標的または同じ核酸標的の少なくとも2つのコピーを含む

10

20

、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記検出が、異なった核酸標的のそれぞれの量を比較することを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記組織サンプルの少なくとも第二の特定の位置に対して少なくともステップ (2) ~ (5) を反復することを更に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記検出が、特定の位置内の少なくとも 1 つの核酸標的の量を、少なくとも第二の特定の位置のものと比較することを含む、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記特定の位置および少なくとも第二の特定の位置が、同じ細胞型を含む、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記特定の位置および少なくとも第二の特定の位置が、異なった細胞型を含む、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出が特定の位置の少なくとも 1 つの核酸標的の量と、第二の特定の位置の少なくとも 1 つの核酸標的の量を比較することを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

20

前記細胞型が、正常細胞および異常細胞から独立に選択される、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記組織サンプルが、表面に直接固定されるか、または表面に間接的に固定される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記組織サンプルが、2 ~ 1000 μ m 厚の組織切片である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記組織切片が、ホルマリンで固定されたパラフィン包埋 (F F P E) サンプルから得られる、請求項 12 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記組織サンプルが、培養細胞、初代細胞、または外植片からの解離細胞を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記組織サンプルが、固定されるかまたは固定されていない、請求項 12 または 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記組織サンプルが、ステップ (2) の前に染色または標識され、それによって、当該染色または標識された組織サンプルの細胞下構造、細胞構造、または組織関連構造の視覚化を可能にする、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 17】

前記シグナルオリゴヌクレオチドが、一本鎖核酸または部分的に二本鎖核酸である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

逆精製が、放出されたシグナルオリゴヌクレオチドから完全なプローブ分子を取り出すために使用される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記逆精製が、完全なプローブを、完全なプローブの一部に相補的な固定されたオリゴヌクレオチドまたは完全なプローブの一部を認識し、結合する固定化抗体もしくはタンパ

50

ク質結合モチーフと接触させることを含む親和性精製を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記完全なプローブの標的結合ドメインが、普遍的な精製タグ、あるいは、固定されたオリゴヌクレオチドに部分的に相補的であるか、または固定化抗体もしくはタンパク質結合モチーフによって認識されるか、または結合されることができる配列を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記照射が、アーク燈、レーザー、集束 UV 光源、および発光ダイオード (LED) から成る群から選択される光源によって行われる、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 22】

前記照射が、組織サンプルの特定の位置の少なくとも 1 つの細胞下構造に行われる、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記検出が、組織サンプルの少なくとも 1 つの細胞下構造内の少なくとも 1 つの核酸標的の量を決定することを含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記照射が、アーク燈、レーザー、集束 UV 光源、および発光ダイオード (LED) から成る群から選択される光源によって行われ、かつ、該光源が、組織サンプルの特定の位置の少なくとも 1 つの細胞下構造に照射され、そして、組織サンプルの少なくとも第二の特定の位置の少なくとも 1 つの細胞下構造に照射される、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 25】

前記検出が、組織サンプルの特定の位置の少なくとも 1 つの細胞下構造内の少なくとも 1 つの核酸標的の量と、組織サンプルの少なくとも第二の特定の位置の少なくとも 1 つの細胞下構造内のものとを比較することを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記標的結合ドメインが、一本鎖核酸または部分的二本鎖核酸を含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記検出が、ポリメラーゼ反応、逆転写酵素反応、オリゴヌクレオチドマイクロアレイへのハイブリダイゼーション、質量分析法、蛍光分子ビーコンへのハイブリダイゼーション、シーケンシング反応、または分子バーコードを含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 28】

前記核酸標的が、DNA または RNA である、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 RNA が、cRNA、mRNA または miRNA である、請求項 28 に記載の方法。

40

【請求項 30】

前記 DNA が cDNA である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記毛細管が、光を組織サンプルの特定の位置まで透過させることができる光学デバイスを備えている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

前記光が、UV 光である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記溶液が、陰イオン性重合体および / またはサケ精子 DNA を含む、請求項 1 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 3 4】

前記陰イオン性重合体が、硫酸デキストランである、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記回収したシグナルオリゴヌクレオチドが、陰イオン性重合体、および/またはサケ精子 DNA を含む溶液に加えられる、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記方法が、レーザー走査デバイスを使用して関心領域に照射をおこなうことを更に含む、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記方法が、デジタルミラーデバイス (DMD) を使用して関心領域に照射をおこなうことを更に含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

前記方法が、サンプル中の核酸量の空間分解プロファイルを提供する、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記検出が、> 5 ログの線形ダイナミックレンジを有するデジタル読み出し値を提供することを、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記組織サンプルが、スライドに接着され、最初に、蛍光を使用して画像化され、次に、核酸発現が、前記組織サンプルからデジタル的にカウントされる、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 4 1】

前記プローブが、0.01 nM ~ 5 nM の濃度にて用意される、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記プローブが、0.01 nM ~ 1 nM の濃度にて用意される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記プローブが、0.01 nM ~ 0.4 nM の濃度にて用意される、請求項 4 2 に記載の方法。

30

【請求項 4 4】

前記プローブが、0.01 nM ~ 0.2 nM の濃度にて用意される、請求項 4 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願に関する相互参照

本出願は、2015年7月17日に提出された米国特許仮出願第62/193,809号、2015年12月1日に提出された米国特許仮出願第62/261,657号、2016年1月11日に提出された米国特許仮出願第62/277,289号、および2016年4月15日に提出された米国特許仮出願第62/323,023号に対する優先権および利益を主張する。前述の出願それぞれは、参照によりその全体を本明細書に援用する。

40

【0002】

背景技術

標準的な免疫組織化学法および *in situ* ハイブリダイゼーション法は、3 ~ 4 個の標的が典型的ではあるが、多くても 6 ~ 10 個のタンパク質または核酸標的の同時検出を可能にする。組織のユーザー定義領域、ユーザー定義細胞、および/または細胞内のユーザー定義細胞下構造内のタンパク質および/または核酸発現の同時の、多重検出および定量のためのプローブ、組成物、方法、およびキットの必要性が存在している。

50

【発明の概要】

【0003】

発明の概要

本発明は、組織のユーザー定義領域、ユーザー定義細胞、および/または細胞内のユーザー定義細胞下構造内のタンパク質および/または核酸発現の同時の、多重検出および定量的ためのプローブ、組成物、方法、およびキットに関する。

【0004】

本発明の態様は、(1)組織サンプル中の少なくとも1つの細胞内のまたはそこからの少なくとも1つの標的を、標的結合ドメインおよびシグナルオリゴヌクレオチドを含む少なくとも1つのプローブと接触させ；(2)該シグナルオリゴヌクレオチドを放出するの10
に十分な力を該組織サンプルのある位置に加え；および(3)放出されたシグナルオリゴヌクレオチドを回収および同定し、それによって、該力を加えた組織サンプル中の特定の位置のまたはそこからの少なくとも1つの標的を検出すること、から成るステップを含む方法に関する。特定の位置とは、組織のユーザー定義領域、ユーザー定義細胞、および/または細胞内のユーザー定義細胞下構造である。前記標的は、核酸(例えば、mRNAやmiRNA)であっても、および/またはタンパク質であってもよい。標的-結合ドメインは、一本鎖核酸、部分的二本鎖核酸、またはタンパク質結合分子、例えば、抗体、ペプチド、アプタマー、およびペプチドであってもよい。複数の実施形態では、2以上の標的(タンパク質、核酸およびその組み合わせ)が検出される。複数の実施形態では、3、4
、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19
、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400
、500、600、700、800、900、1000個またはそれ以上、およびそれらの間の任意の数の標的が検出される；例えば、800個以上の異なった標的が検出される。複数の実施形態では、検出することは、それぞれの標的の量を定量することを含む。

【0005】

複数の実施形態では、前記方法は、前記組織サンプルの少なくとも第二の特定の位置に対して少なくともステップ(2)および(3)を反復することを更に含み、前記第二の特定の位置は、少なくとも第二の細胞を含む。複数の実施形態では、検出することは、第一の特定の位置内のまたはそこからの少なくとも1つの標的の量を、少なくとも第二の特定の位置のまたはそこからのものと比較することを含む。前記少なくとも1つの細胞と少なくとも第二の細胞とは、同じ細胞型であっても、または異なった細胞型であってもよい。いくつかの複数の実施形態では、検出することは、第一の細胞型内のまたはそこからの少なくとも1つの標的、および少なくとも第二の細胞型内のまたはそこからのものの量を定量することを含む。複数の実施形態では、第一および第二の細胞型は、正常細胞および異常細胞、例えば、病的および癌性細胞、から独立に選択される。

【0006】

複数の実施形態では、前記少なくとも1つの細胞は、表面に直接固定されるか、または少なくとも1つの他の細胞を介して表面に間接的に固定される。組織サンプルは、例えば、ホルマリンで固定されたパラフィン包埋(FFPE)のサンプルまたは固定されていないサンプルから得られた、2~1000μm厚の組織切片であり得る。少なくとも1つの細胞は、固定されていても、または未固定であってもよい。少なくとも1つの細胞は、染色または標識された細胞の細胞下または細胞構造の視覚化を可能にする、ステップ(2)前に染色または標識されてもよい。或いは、組織切片について、プローブと接触させた切片に隣接した切片は、ステップ(2)の前に染色または標識されてもよく、それによって、プローブと接触させた切片内の対応する細胞または近くの細胞内の細胞下、または細胞、または組織関連構造について判断することを可能にする。斯かる染色または標識技術は、当該技術分野で周知である。

【0007】

上記の態様において、少なくとも1つのプローブは、標的結合ドメインとシグナルオリゴヌクレオチドとの間に位置するリンカー(例えば、切断可能リンカー)を更に含む。切

10

20

30

40

50

断可能リンカーは、光切断可能であってもよく、そしてそれは、好適なコヒーレント光源（例えば、レーザーおよびUV光源）または好適なインコヒーレント光源（例えば、アーク燈および発光ダイオード（LED））によって供給される光によって切断される。光源は、少なくとも1つの細胞の少なくとも1つの細胞下構造に照射されることができ、そして、少なくとも1つの細胞の少なくとも1つの細胞下構造内のまたはそこからの少なくとも1つの核酸標的の量は、検出され得る。また、光源は、最初に、少なくとも1つの細胞の少なくとも1つの細胞下構造に照射され、その後、少なくとも第二の細胞の少なくとも1つの細胞下構造に照射されることができ、少なくとも1つの細胞の少なくとも1つの細胞下構造内のまたはそこからの少なくとも1つの標的の量と、少なくとも第二の細胞の少なくとも1つの細胞下構造内またはそこからのものとの比較を可能にする。

10

【0008】

複数の実施形態では、前記シグナルオリゴヌクレオチドは、一本鎖核酸または部分的に二本鎖核酸である。

【0009】

複数の実施形態では、前記サンプルは、スライドに固定された、培養細胞であっても、または解離細胞（固定または未固定）であってもよい。前記サンプルは、細胞（初代細胞および培養細胞株の両方を含む）および/または組織（培養されたものまたは外植されたものを含む）を含んでもよい。前記サンプルは、培養細胞、初代細胞、または外植片からの解離細胞を含んでもよい。

【0010】

20

複数の実施形態では、その視野より小さい関心領域（例えば、単独細胞または細胞内の細胞下構造）の照射では、レーザー走査デバイス（例えば、共焦）または光を誘導するためのデジタルミラーデバイス（DMD）の使用を含む。

【0011】

複数の実施形態では、プローブは、好ましくは抗体のヒンジ領域の重鎖に対して、安定して、部位選択的であるシステイン生体共役反応法によって調製される。複数の実施形態では、プローブは、抗体毎に複数（すなわち、2以上、例えば、2、3、4、5またはそれ以上）の標識オリゴヌクレオチドを含み得る。

【0012】

検出することとは、ポリメラーゼ反応、逆転写酵素反応、オリゴヌクレオチドマイクロアレイへのハイブリダイゼーション、質量分析法、蛍光分子ビーコンへのハイブリダイゼーション、シーケンシング反応、またはnCounter（登録商標）分子バーコードを含む。好ましい実施形態では、nCounter（登録商標）システムおよびNanoString Technologies（登録商標）による方法が使用される。

30

【0013】

複数の実施形態では、前記シグナルオリゴヌクレオチドは、液層、乱流、または遷移流を経由して組織から回収される。流れは、例えば、組織と、流体デバイスまたは組織上に配置された不透水層との間の25～500 μmの深さを有する、チャンネルを経由したものであってもよい。

【0014】

40

複数の実施形態では、前記シグナルオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの細胞の、例えば、少なくともすぐに上の、近位溶液から回収される。前記近位溶液は、例えば、ピペット、毛細管、マイクロアレイピン、穴を備えたフローセル、もしくは当該技術分野で知られている別の好適な吸引システム、またはそれらの任意の組み合わせによって吸引することによって回収されてもよい。前記毛細管は、光の力、例えば、UV光、を少なくとも1つの細胞まで透過させることができる光学デバイスを備えていてもよい。前記ピペットまたはマイクロアレイピンは、複数のピペットまたはマイクロアレイピンを備えたアレイに取り付けられていてもよい。前記近位溶液は、陰イオン性重合体、例えば、硫酸デキストラン、および/またはサケ精子DNAを含んでもよい、そして/あるいは、回収したシグナルオリゴヌクレオチドは、陰イオン性重合体、例えば、硫酸デキストラン、および

50

／またはサケ精子DNAを含む溶液に添加されてもよい。サケ精子DNAに加えて、またはその代わりに、当該技術分野で知られている他の非特異的ブロッキング剤が使用されてもよい。

【0015】

複数の実施形態では、前記方法は、組織サンプルに関する同時の空間分解DNA、RNA、および／またはタンパク質検出を提供する。

【0016】

複数の実施形態では、デジタル読み出し値は、5ログ以上の線形ダイナミックレンジを有する。

【0017】

複数の実施形態では、プローブは、典型的に、免疫組織化学(IHC)またはin situ ハイブリダイゼーション(ISH)に使用されるより低い濃度にてサンプルに提供される。あるいは、前記濃度は、IHCまたはISHに使用されるより著しく低くてもよい。例えば、前記プローブ濃度は、1/2、1/5、1/10、1/20、1/25、1/30、1/50、1/60、1/70、1/80、1/90、1/100、1/200、1/300、1/400、1/500、1/600、1/700、1/800、1/900、1/1000、1/2000、またはそれ未満、およびその間の任意の値であり得る。複数の実施形態では、プローブは、100 nM、70 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM、0.01 nM、およびそれ未満、ならびにその間の任意の値の濃度にて提供される。

【0018】

複数の実施形態では、組織サンプルは、スライドに接着され、そして、最初に、蛍光(例えば、蛍光標識抗体および蛍光染色(例えば、DAPI))を使用して画像化し、次に、タンパク質および／または核酸発現がサンプルからデジタル的にカウントされる。

【0019】

複数の実施形態では、例えば、完全なプローブ分子を、完全なプローブの一部に相補的な固定されたオリゴヌクレオチドまたは完全なプローブの一部を認識し、結合する固定化抗体もしくはタンパク質結合モチーフと接触させることを含む親和性精製法を含めた逆精製が、放出されたシグナルオリゴヌクレオチドから完全なプローブ分子を取り出すために使用される。複数の実施形態では、完全なプローブの標的結合ドメインは、普遍的な精製タグ、あるいは、固定されたオリゴヌクレオチドに部分的に相補的であるか、または固定化抗体もしくはタンパク質結合モチーフによって認識されるか、または結合されることができる配列を含む。当該技術分野で周知の任意の斯かるタグまたは配列が、これらの実施形態に使用されてもよい。

【0020】

本明細書中に記載したいずれの態様または実施形態も、本明細書中に開示されるいずれの他の態様または実施形態とも組み合わせることができる。開示はその詳細な説明と関連づけて記載された一方で、上記の説明は例示することを意図したものであって、添付の請求項の範囲によって規定される開示の範囲を制限することを意図していない。他の態様、利点、および修飾も以下の請求項の範囲内にある。

【0021】

本明細書で参照された特許および科学文献は、当業者が利用可能である知識を確立した。本明細書で引用されたすべての米国特許および公開されたまたは未公開の米国特許出願は本明細書によって援用される。本明細書で引用されたすべての公開された外国特許および特許出願は本明細書によって援用される。本明細書で引用されたすべての他の公表された参考文献、文書、原稿および科学論文は、本明細書によって援用される。

【0022】

特許または出願ファイルは、カラーで仕上げられた少なくとも 1 枚の図面を含んでいる。カラー図面を伴った本願の特許または特許出願公開のコピーは、請求と必要な料金の支払いにより特許庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図 1】2 つの代表的なプローブを示す。核酸骨格（一本鎖 DNA または一本鎖 RNA のいずれか）を、まっすぐな黒色の線として示す。プローブはそれぞれ、赤色で示した標的結合ドメインを含む。上のプローブは、核酸骨格にハイブリダイズした標識 RNA セグメントを含み、それに対して、下のプローブは、核酸骨格にハイブリダイズした標識 DNA オリゴヌクレオチドを含む。切断可能モチーフ（例えば、切断可能リンカー、未掲載）は、骨格と標的結合ドメインとの間、または骨格の中に配置され得る。切断可能モチーフは、結合された標的核酸またはタンパク質からのシグナルオリゴヌクレオチドの放出を可能にし；その後、シグナルオリゴヌクレオチドは、回収され、検出される。

10

【図 2】標的核酸に直接結合し得る第一タイプのプローブを示す（上部）。以下の画像で、プローブは、青色の曲線として示した標的核酸に結合した。この図面およびそれ以降の図面では、レポータープローブを、（色付けした円によって示される）標識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる 6 つの場所を含む。プローブを標識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる位置を含むので、プローブはまた、レポータープローブと呼ぶこともできる。

【図 3】本発明の第一タイプの二重プローブ組成物を示す。ここで、第一タイプのプローブは、標的核酸に直接結合し、そして、第一タイプの捕捉プローブは、標的核酸に直接結合する。前記捕捉プローブは、少なくとも 1 つの親和性試薬を含んでもよく、それを星印として示す。サンプル中の標的核酸を、青色の曲線として示す。

20

【図 4】サンプル中の標的核酸に間接的に結合できる第二タイプのプローブ（またはレポータープローブ）を示す（上部）。ここで、プローブの標的は、緑色で示した媒介オリゴヌクレオチドであり、そしてそれは、下部画像において青色の曲線として示したサンプル中の標的核酸に順番に結合する。媒介オリゴヌクレオチドが、本明細書中に規定したプローブであると言われる場合がある。なぜなら、それが、核酸骨格を含んでいるので、標的核酸に結合できるからである。

【図 5】本発明の第二タイプの二重プローブ組成物を示す。ここで、第二タイプのプローブは、（緑色で示した媒介オリゴヌクレオチドを介して）サンプル中の標的核酸に間接的に結合し、そして、第二タイプの捕捉プローブは、（オレンジ色で示した別の媒介オリゴヌクレオチドを介して）サンプル中の標的核酸に間接的に結合する。前記捕捉プローブは、少なくとも 1 つの親和性試薬を含んでもよく、それを星印として示す。

30

【図 6】サンプル中の標的核酸に間接的に結合した（図 4 で例示した）第二タイプのプローブからのシグナルオリゴヌクレオチドの放出を示す。プローブ（またはレポータープローブ）内の切断可能モチーフの位置は、どの材料が放出シグナルオリゴヌクレオチドに含まれるかに影響する。

【図 7】タンパク質を検出するために使用する 3 つのタイプのプローブを示す。最上部の形態では、プローブは、タンパク質結合ドメインに取り付けられた核酸を備え；この形態では、切断可能モチーフ（例えば、切断可能リンカー、未掲載）は、核酸とタンパク質結合ドメインとの間、または核酸自体の中に含まれ得る。真ん中の形態では、タンパク質結合ドメインは、核酸に取り付けられ、そして、プローブは、その核酸にハイブリダイズしている。（標的結合ドメインおよび（緑色で示した）タンパク質結合ドメインに取り付けられた核酸を備えた）プローブは、その標的結合ドメインがタンパク質標的に結合する前後に、プローブによって結合され得る（図 8 に示したとおり）。切断可能モチーフは、骨格またはタンパク質結合ドメインに取り付けられた核酸のいずれかまたはその両方に含まれ得る。図 2 および 4 に示した第一または第二タイプのプローブは、タンパク質を検出するためにこの形態で使用されてもよい。下部の形態では、タンパク質結合ドメインは、核酸に取り付けられ、そして、媒介オリゴヌクレオチド（赤色で示した）は、プローブとタ

40

50

ンパク質結合ドメインに取り付けられた核酸との両方にハイブリダイズする。図2および4に示した第一または第二タイプのプローブは、タンパク質を検出するためにこの形態で使用されてもよい。

【図8】図7の真ん中と下部のプローブを示す。上部の2つの画像は、それがタンパク質に結合した前後のプローブを示す。次の画像は、その切断可能モチーフが切断された後のプローブを示す；この画像では、切断可能モチーフは、核酸と標的結合ドメインの間にある。核酸が放出されると、それは、シグナルオリゴヌクレオチドであると見なされ得る。下部画像では、前記シグナルオリゴヌクレオチド（プローブの放出された核酸）には、（例えば、図2および4に示したように）レポータープローブが結合する。

【図9】図7に示した真ん中の形態のプローブおよび図8のプローブからのシグナルオリゴヌクレオチドの放出を示す。プローブ（またはレポータープローブ）内の切断可能モチーフの位置は、放出されたシグナルオリゴヌクレオチドにどの材料が含まれるかに影響する。

【図10】ある関心領域（ROI）からのシグナルオリゴヌクレオチドを検出する本発明の方法のステップを示す。

【図11】関心領域が組織サンプルの第一連続切片に位置していて、そして、プローブが組織サンプルの第二連続切片に適用される本発明の方法のステップを示す。シグナルオリゴヌクレオチドは、第二連続切片の第一関心領域において標的に結合したプローブから放出され、回収される。次に、前記シグナルオリゴヌクレオチドは、第二連続切片の第二（n番目までの）関心領域において標的に結合したプローブから放出され、回収される。

【図12】第一関心領域からの複数の標的核酸および/またはタンパク質の多重検出と、それに続く、第二関心領域からの複数の標的核酸および/またはタンパク質の多重検出をおこなう。

【図13】本発明の方法のステップを例示する。示した方法は、本明細書中で「nCounter（登録商標）デジタル多重免疫組織化学（IHC）」とも呼ばれ得る。

【図14】標準的なTSAベースの多重IHC（下部）と比較して、nCounter（登録商標）デジタル多重IHC（上部）で可能となる、簡略化されたワークフローおよびより高度な多重化を実証するフローチャートである。

【図15】Ti-E顕微鏡に取り付けられたデジタルミラーデバイス（DMD）（上部）およびFFPE組織切片（下部）の明視野画像を示す写真である。FFPE組織（明視野像）上の光照射（白点）は、サイズが約 $10 - 20 \mu m$ 、すなわち、単独細胞サイズの複数のROIを示す。

【図16】前記方法がデジタルミラーデバイス（DMD）の使用を伴うときの、本発明に関連する構成要素と光路を例示する。DMDを用いた広視野照射が、サンプルに焦点を合わせた。LEDは、一度に視野全体を励起させるのに十分な照射であって、そして、 $80 - 600 \text{ DMDピクセル}$ が $10 \mu m$ の直径の細胞に照射されるような単独細胞照射を提供する。通常グレードのDMDは、十分な単独細胞分解能を提供するであろう。DS：ダイクロイックミラー、FW：フィルターホイール、およびDMD：デジタルミラーデバイス。

【図17】前記方法がレーザー走査デバイス（例えば、共焦走査デバイス）の使用を伴うときの、本発明に関連する構成要素と光路を例示する。共焦走査構成では、亜鉛メッキ鏡が光を誘導する。この方法は、安価な 405 nm レーザーを必要とする。DS：ダイクロイックミラー、FW：フィルターホイール、およびMM：電動式の鏡。

【図18】Ki-67（緑色の細胞増殖マーカー）およびCD3（赤色の免疫細胞マーカー）の二色の蛍光を使用して最初に画像化した扁桃腺サンプルの全体的な組織形態を確立する顕微写真を示す。12カ所の領域（図19で拡大した4つの領域を含む）が、白枠で識別される。

【図19】図18に示した4つの領域に関するKi-67およびCD3のnCounter（登録商標）データカウントを示すグラフである。（調査すべき様々な追加対照を許容するように）画像を連続切片から得た。一般に、サンプルは、蛍光抗体を用いて画像化され、次に

10

20

30

40

50

、同じスライドを使用して、(UV曝露によって)デジタル的にカウントされ得る。(ここに示した4つの領域を含めて)12の領域にわたって分析される多重標的は、Ki-67およびCD3の局在性の異なったプロファイルを示す。以下のグラフは、4つの領域の倍率である。

【図20】図18に示した扁桃腺サンプルから12の関心領域(ROI)に対する30plexのオリゴ抗体カクテルによる代表的なカウントを示す。(調査すべき様々な追加対照を許容するように)データを連続切片から得た。

【図21】CD3(赤色)、CD8(緑色)、およびDAPI(青色)の三色の蛍光を使用して最初に画像化したリンパ節からの黒色腫サンプル中のT細胞の全体的な組織形態を確立する顕微写真を示す。白丸は、直径25μmであり、3つの細胞を囲んでいる。

【図22】UV照射領域(直径100μm~1mm)の作用としてFFPEリンパ節組織切片(5μm厚)から放出されたCD3複合体に関するnCounter(登録商標)データを示す。視野の絞りサイズを、図の下に示す。

【図23】UV照射領域(直径100μm~1mm)の作用としてFFPEリンパ節組織切片(5μm厚)から、および図21および22に示したのと同じ実験から放出されたCD45複合体に関するnCounter(登録商標)データを示す。

【図24】UV照射領域(直径100μm~1mm)の作用としてFFPEリンパ節組織切片(5μm厚)から、および図21~23に示したのと同じ実験から放出されたPD1複合体に関するnCounter(登録商標)データを示す。

【図25】IHC染色によってHer2蛍光を同定する顕微写真(中央のパネル)に示した可変レベルのHer2タンパク質を含めた、乳房腫瘍組織の組織マイクロアレイ(TMA;左のパネル)を示す。右のパネルは、中央のパネルの単一領域の拡大図を示す。

【図26】48の代表的な領域対Her2状況(ASCO-CAPガイドライン)に関するnCounter(登録商標)カウントデータを示す。

【図27】図26について言及した48の領域に関するnCounter(登録商標)カウント対合計ピクセル強度($\times 10^3$)のプロット。

【図28】CD3(赤色)とDAPI(青色)の二色の蛍光を使用して最初に画像化した黒色腫サンプルの全体的な組織形態を確立する顕微写真である。10の代表的な領域が、白枠で識別される。

【図29】図28に示したサンプルからの10の関心領域(ROI)に対する30plexのオリゴ抗体カクテルによる代表的なカウントを示す。

【図30A】扁桃腺組織サンプル(緑色)中の単独細胞(青色)のデジタルミラーデバイス(DMD)を使用したUV照射を示す顕微写真である。

【図30B】扁桃腺組織サンプル(緑色)中の単独細胞(青色)のデジタルミラーデバイス(DMD)を使用したUV照射を示す顕微写真である。

【図31A】扁桃腺組織サンプル中の単独細胞(明るい白色)のデジタルミラーデバイス(DMD)を使用したUV照射を示す顕微写真である。

【図31B】扁桃腺組織サンプル中の単独細胞(明るい白色)のデジタルミラーデバイス(DMD)を使用したUV照射を示す顕微写真である。図31Bは、図31Aで触れた単独細胞を強調する。

【図31C】扁桃腺組織サンプル中の単独細胞(明るい白色)のデジタルミラーデバイス(DMD)を使用したUV照射を示す顕微写真である。

【図31D】扁桃腺組織サンプル中の単独細胞(明るい白色)のデジタルミラーデバイス(DMD)を使用したUV照射を示す顕微写真である。図31Dは、図31Cで触れた単独細胞を強調する。

【図32】空間分解FFPE組織タンパク質アッセイのステップを示す。該ステップは、核酸検出アッセイにおいて、サンプルが、抗体よりむしろ核酸標的結合ドメインを含むプローブに結合されることを除いて、核酸検出アッセイのものと同様である。

【図33】空間分解FFPE組織タンパク質アッセイのステップを示す。

【図34】組織全体またはサンプル全体が、例えば、標準的なUVゲルボックスを用いて

10

20

30

40

50

、照射されて、プローブに取り付けられる前にシグナルオリゴヌクレオチドが放出される実施形態からのデータを示す。

【図 3 5】組織またはサンプルの一部に、例えば、顕微鏡を用いて、照射される実施形態、すなわち、顕微鏡下での UV 切断を示す（時間滴定実験）。

【図 3 6】組織またはサンプルの一部に、例えば、顕微鏡を用いて、照射される実施形態、すなわち、顕微鏡下での UV 切断を示す（照射領域滴定実験）。

【図 3 7】組織またはサンプルの一部に、例えば、顕微鏡を用いて、照射される実施形態、すなわち、顕微鏡下での UV 切断を示す（照射領域滴定実験 - 多重標的）。

【図 3 8】組織（例えば、乳癌サンプル）内の関心領域が最初に、マーカの発現に関して同定され、次に、この関心領域は（例えば、UV を）照射されて、プローブからシグナルオリゴヌクレオチドが放出されるにある実施形態を示す。

10

【図 3 9】フローセルに組織が包埋された実施形態を示す。複数の画分に関するデータが示される。図 3 8 のデータと同様に、ここで、関心領域は、蛍光標識マーカの発現に関してあらかじめ同定される。また、装置の形態を示す写真および図解も示され得る。

【図 4 0】小さい穴を備えたフローセル内に組織が包埋されている実施形態を示す。また、装置の形態を示す写真および図解も示される。

【図 4 1 A】小さい穴を備えたフローセルを使用する実施形態が、組織の全表面からの溶出液の回収よりむしろ有意なシグナル対ノイズの改善を有することを示す。また、装置の形態を示す写真および図解も示される。

【図 4 1 B】小さい穴を備えたフローセルを使用する実施形態が、組織の全表面からの溶出液の回収よりむしろ有意なシグナル対ノイズの改善を有することを示す。また、装置の形態を示す写真および図解も示される。

20

【図 4 1 C】小さい穴を備えたフローセルを使用する実施形態が、組織の全表面からの溶出液の回収よりむしろ有意なシグナル対ノイズの改善を有することを示す。また、装置の形態を示す写真および図解も示される。

【図 4 2 A】小さい穴（12 または 96 穴形式）を備えたフローセルを使用した実施形態におけるデータを示す。

【図 4 2 B】小さい穴（12 または 96 穴形式）を備えたフローセルを使用した実施形態におけるデータを示す。

【図 4 2 C】小さい穴（12 または 96 穴形式）を備えたフローセルを使用した実施形態におけるデータを示す。

30

【図 4 3 A】全組織溶出を実施したフローセルからのバックグラウンドシグナル（図 4 3 A）を、溶出が関心領域の上で直接起こったフローセルからのバックグラウンドシグナル（図 4 3 B）と比較した際のデータを示す。

【図 4 3 B】全組織溶出を実施したフローセルからのバックグラウンドシグナル（図 4 3 A）を、溶出が関心領域の上で直接起こったフローセルからのバックグラウンドシグナル（図 4 3 B）と比較した際のデータを示す。

【図 4 4】複数の関心領域の吸引の実施形態のための開放表面での溶出液回収を示す図解である。ここでは、回転弁の切り替えを用いた溶出液の吸引 / 分配のためのマルチチューブアレイを示す。

40

【図 4 5】溶出液回収が毛細管（マイクロアスピレーター）を通してである実施形態を示す写真および図解を含む。

【図 4 6 A】溶出液回収が毛細管（マイクロアスピレーター）を通してである図 4 5 の実施形態からのデータを示す。

【図 4 6 B】溶出液回収が毛細管（マイクロアスピレーター）を通してである図 4 5 の実施形態からのデータを示す。

【図 4 7】複数の関心領域の吸引の実施形態または単独の関心領域のための開放表面での溶出液回収を示す図解である。ここでは、吸引 / 分配のためのピペティング対毛管作用を使用したマルチチューブアレイ、または固定された位置の単一の管 / ピペットを示す。

【図 4 8】組み合わせた毛細管とレンズによる照射および流体回収を示す図解である。

50

【図 49】96 ウェル格子を備えた空間分解 F F P E 組織アッセイに関する実施形態のステップを示す図解である。

【図 50】本明細書中に記載した方法および装置を使用して単独細胞または 2 つの細胞から得られたタンパク質発現データを示す。

【図 51】単一の腫瘍サンプルから連続切片上に位置する関心領域を同定する。

【図 52】実施例 16 のアッセイに含まれる 9 つの RNA プローブのうち 6 つについて得られたカウントを示す。

【図 53】図 52 に示したカウントの平均および標準偏差を示す。

【図 54】nCounter (登録商標) 分子バーコードに同時にハイブリダイズさせ、そして、NanoString Technologies (登録商標) 製の nCounter (登録商標) システムによってデジタル的にカウントされたプローブに関する RNA 発現データとタンパク質データを示す。

【図 55】一本鎖 DNA プローブおよび部分的二本鎖 DNA プローブから得られた RNA 発現データを示す。

【図 56】サケ精子 DNA の存在下でハイブリダイズさせたプローブから得られた RNA 発現データを示す。

【図 57】PSA (前立腺特異抗原) に特異的なプローブによる RNA 発現データを示す。

【図 58】プローブの特異性が、非標準的な、nM 未満 (sub-nM) の濃度にて増強されることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

発明の詳細な説明

本発明は、組織のユーザー定義領域、ユーザー定義細胞、および/または細胞内のユーザー定義細胞下構造内のタンパク質および/または核酸発現の同時の、多重検出および定量的ためのプローブ、組成物、方法、およびキットに一部基づいている。

【0025】

本発明は、第一関心領域 (例えば、組織型、(正常および異常細胞を含めた) 細胞、および細胞内の細胞下構造) に存在する標的タンパク質および/または標的核酸の同一性および量と、第二関心領域に存在する標的タンパク質および/または標的核酸の同一性および量との比較を提供する。関心領域および実施できる比較の数に対してあらかじめ定義された上限はなく; 上限は、サンプルサイズに対する関心領域のサイズに関連する。例として、単独細胞が関心領域の標本となると、その場合には、切片は数百~数千もの関心領域を有する可能性があるが; しかしながら、組織切片が 2 つの細胞型しか含んでいないのであれば、その場合には、その切片は、(それぞれ 1 つの細胞型のみを含む) 2 つの関心領域しか有していない可能性がある。

【0026】

本発明は、標準的な免疫組織化学的または in situ ハイブリダイゼーションで可能であるより高度な多重度を提供する。標準的な免疫組織化学法は、最大 6 ~ 10 個のタンパク質標的の同時検出を可能にするが、3 ~ 4 個のタンパク質標的がより典型的である。同様に、in situ ハイブリダイゼーションは、10 個未満の核酸標的の同時検出に制限される。本発明は、サンプルの規定領域から多数の組み合わせの核酸標的および/またはタンパク質標的の検出を実現する。本発明は、デジタル定量による客観的測定を増大、ならびに増強された信頼性および整合性を実現し、それによって、複数のセンター間での結果の比較を可能にする。

【0027】

本発明のプローブは、少なくとも 1 つの標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ (非共有結合) することができる規定の位置を有する核酸骨格 (一本鎖 DNA または RNA) を有してもよい。図 1 を参照。(少なくとも 1 つの標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができる規定の位置を有する) 斯かるプローブもまた、本明細書中でレポータープローブと呼ばれる。レポータープローブ骨格上の位置の数は、1 ~ 100 またはそ

10

20

30

40

50

れ以上に及ぶ。複数の実施形態では、位置の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10～15、20、30、40、もしくは50、またはその間の任意の範囲に及ぶ。実際には、斯かる骨格の設計が十分に当業者の能力の範囲内にあるので、(標的核酸を検出するため、および/または標的タンパク質を検出するための)骨格上の位置の数には制限がない。1セットのプロープによって検出可能な標的核酸および/またはタンパク質の数は、プロープ骨格に含まれる位置の数に依存する。

【0028】

本明細書中で使用される場合、標識オリゴヌクレオチドとは、検出可能な標識を含むRNAセグメントまたは検出可能な標識を含むDNAオリゴヌクレオチドに関する。

【0029】

核酸骨格のある位置が、少なくとも1つの標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ(非共有結合)され得る。あるいは、ある位置が、検出可能な標識を欠く少なくとも1つのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされ得る。各位置は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21～100またはそれ以上の標識(または非標識)オリゴヌクレオチドとハイブリダイズできる。各位置にハイブリダイズする標識オリゴヌクレオチドの数は、その位置の長さおよびオリゴヌクレオチドのサイズに依存する。位置は、長さが約300～約1500ヌクレオチドであり得る。標識(または非標識)オリゴヌクレオチドの長さは、約20～約1500ヌクレオチドの長さで変化する。複数の実施形態では、標識(または非標識)オリゴヌクレオチドの長さは、約800～約1300リボヌクレオチドの間で変化する。他の複数の実施形態では、標識(または非標識)オリゴヌクレオチドの長さは、約20～約55デオキシリボヌクレオチドで変化する;斯かるオリゴヌクレオチドは、約65～約85、例えば、約80、の融解/ハイブリダイゼーション温度を有するように設計される。例えば、長さが約1100ヌクレオチドの位置は、長さが約45～25デオキシリボヌクレオチドの各オリゴヌクレオチドを含めた約25～45オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得る。複数の実施形態では、各位置を、長さで約33デオキシリボヌクレオチドの約34の標識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる。標識オリゴヌクレオチドは、一本鎖DNAであることが好ましい。

【0030】

各標識オリゴヌクレオチドは、1もしくは複数の検出可能な標識モノマーで標識されてもよい。該標識は、オリゴヌクレオチドの末端であっても、オリゴヌクレオチドの中の点であっても、またはその組み合わせであってもよい。オリゴヌクレオチドは、アミン修飾を伴ったヌクレオチドを含んでもよく、そしてそれが、ヌクレオチドへの検出可能な標識のカップリングを可能にする。

【0031】

本発明の標識オリゴヌクレオチドは、例えば、蛍光色素、量子ドット、色素、酵素、ナノ粒子、化学発光マーカー、ビオチン、あるいは直接(例えば、発光で)または間接的(例えば、蛍光標識している抗体の結合で)に検出できる当該技術分野で知られているその他のモノマーなどのさまざまな標識モノマーのいずれかで標識できる。本発明で利用できる標識の好ましい例は、蛍光色素分子である。これだけに限定されるものではないが、GFP関連タンパク質、シアニン色素、フルオレセイン、ローダミン、Alexa Flour(商標)、Texas Red、ファム、JOE、TAMRA、およびROXを含めた、ヌクレオチドを標識するための標識モノマーとして、いくつかの蛍光色素分子が使用できる。全スペクトルに及ぶいくつかの異なった蛍光色素分子が知られており、より長く産生され続ける。

【0032】

(標識オリゴヌクレオチドと位置のハイブリダイゼーションによる)各位置に関連する標識は、その前の位置またはその後の位置の該標識と、空間的に分離可能であり、かつ、スペクトル的に分解可能である。空間的に分離可能、かつ、スペクトル的に分解可能であるプロープの標識の順序集合は、本明細書中ではバーコードまたは標識コードとも呼ばれるバーコードまたは標識コードは、特定のプロープによって結合された標的核酸または標

10

20

30

40

50

的タンパク質の識別を可能にする。

【0033】

標識オリゴヌクレオチドは、標準的なハイブリダイゼーション反応下、例えば、65、5×SSPE、でそれらの位置にハイブリダイズする；これは、レポータープローブまたはプローブの自己組み立てを可能にする。（例えば、US2003/0013091に記載のように）標識オリゴヌクレオチドとして、より長いRNA分子を使用するプローブは、エンドユーザーによるというよりむしろ製造場所にて、そして、より長いRNA分子を介した複数の骨格の架橋を避けるためにより高い温度にて、予備組み立てされなければならない；該予備組み立てステップの後には、RNA分子のバックグラウンドを増大させる（デオキシリボヌクレオチドを含めた）余分な非ハイブリダイズRNA分子を取り除くための精製が続く。（例えば、デオキシリボヌクレオチドを含めた）短い一本鎖標識オリゴヌクレオチドの使用は、プローブの製造を大いに簡素化し、さらに、その製造方法に関連するコストを削減する。

10

【0034】

複数の実施形態では、プローブは、典型的に、免疫組織化学（IHC）またはin situ ハイブリダイゼーション（ISH）に使用されるより低い濃度にてサンプルに提供される。あるいは、前記濃度は、IHCまたはISHに使用されるより著しく低くてもよい。例えば、前記プローブ濃度は、1/2、1/5、1/10、1/20、1/25、1/30、1/50、1/60、1/70、1/80、1/90、1/100、1/200、1/300、1/400、1/500、1/600、1/700、1/800、1/900、1/1000、1/2000、またはそれ未満、およびその間の任意の値であり得る。複数の実施形態では、プローブは、100nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.09nM、0.08nM、0.07nM、0.06nM、0.05nM、0.04nM、0.03nM、0.02nM、0.01nM、およびそれ未満、ならびにその間の任意の値の濃度にて提供される。

20

【0035】

プローブは、商業的に入手可能なカートリッジ、ソフトウェア、システム、例えば、nCounter（登録商標）カートリッジを使用したnCounter（登録商標）システムを使用して検出および定量できる。

30

【0036】

タンパク質検出中の、バックグラウンドノイズは、完全なプローブ分子の逆精製をおこなうことによって低減され得る。これは、関心領域からの溶出液の回収後に抗体または光切断可能リンカーの親和性精製を実施することによってできる。通常、放出されたシグナルオリゴヌクレオチドは、溶液から取り出されない。ピペットチップ、チューブ、またはプレートにおけるプロテインGまたはO機構がこのステップに使用できる。斯かるデバイスおよび試薬が市販されている。

【0037】

核酸検出中の、バックグラウンドノイズは、完全なプローブ分子の逆精製をおこなうことによって低減され得る。これは、関心領域からの溶出液の回収後に標的結合ドメインまたは光切断可能リンカーの親和性精製を実施することによってできる。通常、放出されたシグナルオリゴヌクレオチドは、溶液から取り出されない。逆精製における支援のために、普遍的な精製配列がプローブ、例えば、標的結合ドメイン、の中に含まれていてもよい。

40

【0038】

図1は、一本鎖核酸骨格および赤色で示した標的結合ドメインを含む2つの代表的なプローブを示す。上のプローブは、骨格内の位置にハイブリダイズした標識RNAセグメントを含み、それに対して、下のプローブは、核酸骨格内の位置にハイブリダイズした標識DNAオリゴヌクレオチドを含む。図1に示した色およびこの開示の他の部分所は、限定

50

されない；当該技術分野で知られている他の色の標識および他の検出可能な標識が、本発明のプロープに使用できる。

【0039】

本発明のプロープは、標的核酸を検出するために使用できる。図2および4は、この態様を例示する。斯かるプロープは、少なくとも骨格および標的核酸結合性領域を含む。該標的核酸結合性領域は、長さが少なくとも15ヌクレオチドであることが好ましく、そして、長さが少なくとも20ヌクレオチドであることがより好ましい。特定の実施形態では、該標的核酸結合性領域は、長さが約10～500、20～400、25、30～300、35、40～200、または50～100ヌクレオチドである。標的核酸に結合および同定するためのプロープおよび方法は、例えば、US2003/0013091、US2007/0166708、US2010/0015607、US2010/0261026、US2010/0262374、US2010/0112710、US2010/0047924、およびUS2014/0371088に記載されており、そのそれぞれは、その全体を参照により本明細書中に援用する。

標的核酸は、DNAであっても、またはRNAであってもよく、好ましくは、cRNA、メッセンジャーRNA(mRNA)またはmiRNAであり；該DNAは、cDNAであることが好ましい。

【0040】

本発明のプロープは、標的核酸に直接ハイブリダイズするために使用されてもよい。図2は、この実施形態のプロープ(または組成物)を例示する。該プロープは、赤色で示した標的核酸結合ドメインを含む。該標的核酸は、青色の曲線として示される。図3は、図2のプロープおよび捕捉プロープを含む二重プロープ組成物を例示する。該捕捉プロープは、星印で示した少なくとも1つの親和性試薬を含む。該少なくとも1つの親和性部分は、共有結合または非共有結合によって捕捉プロープに取り付けられ得る。精製および/または固定に適当な様々な親和性部分が、当該技術分野で知られている。好ましくは、該親和性部分は、ビオチン、アビジン、またはストレプトアビジンである。他の親和性タグは、特異的結合パートナーによって認識され、それによって、(固体支持体除に固定され得る)結合パートナーへの親和性結合による分離および固定を容易にする。これらの図面では、各プロープは、標識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする6つの位置を含んでおり、各位置は色付きの円によって識別される。

【0041】

本発明のいずれのプロープも親和性部分を備え得る。

【0042】

本発明のプロープは、(媒介オリゴヌクレオチドを介して)サンプル中に存在する標的核酸に間接的にハイブリダイズするために使用され得る。図4は、この実施形態のプロープ(または組成物)を例示する。該プロープは、生体サンプル中の標的核酸に順番に結合する合成オリゴヌクレオチド(媒介オリゴヌクレオチド；緑色で示した)に結合する、赤色で示した標的核酸結合ドメインを含む。該媒介オリゴヌクレオチドは、本明細書中に規定されるプロープであると言われる場合がある。なぜなら、それが、核酸骨格を含んでいて、標的核酸に結合できるからである。生体サンプル中に存在する標的核酸を、青色の曲線として示す。図5は、図4のプロープおよび捕捉プロープを含む二重プロープ組成物を例示する。これらの実施形態では、プロープの標的核酸結合性領域は、サンプル中に存在する標的核酸と異なった媒介オリゴヌクレオチド(すなわち、合成オリゴヌクレオチド)の領域にハイブリダイズする。よって、プロープの標的結合領域は、サンプル中の最終的な標的核酸とは無関係である。これは、標的(サンプル中に存在)特異的成分のアッセイが、より高価なプロープよりむしろ安価で幅広く入手可能な合成DNAオリゴヌクレオチドに含まれるので、アッセイデザインにおける経済的および迅速な柔軟性を可能にする。斯かる合成オリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在する標的核酸にハイブリダイズする領域およびプロープにハイブリダイズする領域を含むように単純に設計される。そのため、1セットの間接的に結合するプロープは、アッセイの標的特異的な(合成の)オリゴヌ

クレオチド部分を置き換えることによって、単純に異なった実験の無限に多様な標的核酸（サンプル中に存在）を検出するために使用できる。

【0043】

本発明のプロープまたはプローブは、好適な力の適用後にシグナルオリゴヌクレオチドの放出を可能にする領域を含む。限定されることのない一例では、該領域は、切断可能モチーフ（例えば、制限酵素部位または切断可能リンカー）である。該切断可能モチーフは、結合した標的核酸またはタンパク質からのシグナルオリゴヌクレオチドの放出を可能にし、その後、そのシグナルオリゴヌクレオチドは回収され、検出される。本明細書中で使用される場合、シグナルオリゴヌクレオチドとは、現在、少なくとも1つの標識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる位置を有するか、またはプローブの標的結合ドメインから放出され得るプローブ（例えば、核酸分子）の領域であるプローブの領域である。シグナルオリゴヌクレオチドは、それがプローブの残りと切り離される（すなわち、切断され、放出される）とき、放出可能であると言われる。切断可能モチーフの例としては、これだけに限定されるものではないが、光切断可能リンカーが挙げられる。

【0044】

（本明細書中に記載した）本発明のプロープでは、切断可能モチーフは、核酸と標的結合ドメインとの間、骨格と標的結合ドメインとの間、または骨格の中に配置され得る。図6では、切断可能モチーフの位置に関する限定されない選択肢が、プローブ内のギャップまたは媒介オリゴヌクレオチド内のギャップから推測され得る。

【0045】

本発明のプロープは、標的タンパク質を検出するために使用できる。図7は、この実施形態のプロープ（または組成物）を例示する。斯かるプローブは、少なくとも骨格および標的タンパク質結合領域を含む。本発明のタンパク質標的化プローブでは、シグナルオリゴヌクレオチドは、タンパク質結合ドメインに取り付けられた核酸であってもよい。これらのプローブでは、シグナルオリゴヌクレオチドは、標識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするための位置を含むプローブによって標的化され、結合される。斯かるプローブを、図7の中央の画像に示す。そこでは、シグナルオリゴヌクレオチドを、緑色の線として見られる。該プローブは、そのプローブが（タンパク質結合ドメインを介して）タンパク質に結合する前かまたはそれがタンパク質に結合した後に、プローブによって結合され得る。シグナルオリゴヌクレオチドは、それが標的結合ドメイン（この実施形態では未掲載）から既に放出されるまで、該プローブによって結合される必要はない。

【0046】

標的タンパク質に結合することができるプローブの領域としては、少なくとも1つの標的タンパク質、少なくとも1つの標的タンパク質代替物、またはその両方と結合し、そして、適当な条件下で、タンパク質プローブおよび標的タンパク質を含む分子複合体を形成できるように設計された分子または組み立て物が挙げられる。標的タンパク質に結合することができる領域としては、抗体、ペプチド、アプタマー、またはペプチドが挙げられる。該抗体は、これだけに限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナルな抗体、単一特異性抗体、遺伝子組み換えにより発現された抗体、ヒト化抗体、植物抗体（plantibodies）などを含めた、さまざまな起源から得られる。タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、およびアミノ酸配列といった用語は、任意の長さのアミノ酸の重合体を指すために、本明細書において互換的に使用される。該重合体は、直鎖であってもまたは分岐であってもよく、それは修飾アミノ酸を含んでもよく、そして、それは、非アミノ酸または合成アミノ酸によって分断されてもよい。該用語はまた、例えば、ジスルフィド結合生成、グリコシル化反応、脂質化、アセチル化、リン酸化、または、例えば、標識成分との結合などその他の操作によって、修飾されたアミノ酸重合体も包含する。本明細書中で使用される場合、アミノ酸という用語は、天然および/または非天然、あるいは、これだけに限定されるものではないが、グリシンとDまたはL光学異性体の両方、アミノ酸アナログおよびペプチド模倣体を含めた、合成アミノ酸のいずれかを指す。標的タンパク質に結合し、同定するためのプローブおよび方法は、例えば、US 2011/00867

74に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書中に援用される。

【0047】

複数の実施形態では、プローブは、好ましくは、抗体のヒンジ領域重鎖、に対して安定な、部位選択的であるシステイン生体共役反応法によって調製される。この製造法は、比較的制御可能な標識オリゴヌクレオチド対抗体の化学量論比をもたらす。プローブは、1抗体あたり複数（すなわち、2以上、例えば、2、3、4、5またはそれ以上）の標識オリゴヌクレオチドを含む。一般的に、（1抗体あたり3または4つの標識オリゴヌクレオチドを含む）「より重い」プローブは、標識オリゴヌクレオチドを欠く抗体または（1抗体あたり1または2つの標識オリゴヌクレオチドを含む）「より軽い」プローブより著しく感度を欠く。

10

【0048】

タンパク質標的化プローブと核酸標的化プローブは、条件がタンパク質標的および核酸標的の両方の結合を可能にする限り、同時に適用され得る。あるいは、タンパク質標的化プローブと核酸標的化プローブは、タンパク質標的と核酸標的の両方の結合を可能にする条件が可能でないとき、連続して適用され得る。

【0049】

1セットのプローブは、プローブの組成物と同義である。1セットのプローブは、少なくとも1つのプローブの種、すなわち、1つの標的を対象とものを含む。1セットのプローブは、少なくとも2、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000またはそれ以上のプローブの種を含むことが好ましい。1つのプローブセットは、プローブのそれぞれの種の1または複数のコピーを含んでもよい。

20

【0050】

第一セットのプローブのみがサンプルに適用されてもよい。あるいは、第二セット（またはより大きい数）のプローブが、その後にサンプルに適用されてもよい。第一セットおよび第二（またはより大きい数）セットは、核酸のみ、タンパク質のみ、またはその組み合わせを標的としてもよい。

【0051】

本発明では、2以上の標的（すなわち、タンパク質、核酸、またはその組み合わせ）が検出される；3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000またはそれ以上、およびその間の任意の数の標的が検出される。

30

【0052】

1セットのプローブは、標的とされる細胞型または組織型に基づいて事前に規定されてもよい。例えば、組織が乳癌であれば、その場合には、プローブのセットは、乳癌細胞（例えば、Her2、EGFR、およびPR）に関連するタンパク質を対象としたプローブ、および/または正常乳房組織に関連するタンパク質を対象としたプローブを含む。さらに、該プローブのセットは、標的とされる細胞または組織の分化状態に基づいて事前に規定されてもよい。あるいは、該プローブのセットは、例えば、着目の細胞下局在性、例えば、核、細胞質、および膜、に基づいて事前に規定されてもよい。例えば、Foxp3、ヒストンH3、またはP-S6を対象とした抗体は、核を標識し、CD3、CD4、PD-1、またはCD45ROを対象とした抗体は、細胞質を標識し、およびPD-L1を対象とした抗体は、膜を標識する。

40

【0053】

プローブは、化学的に合成されても、またはそのプローブをコードする核酸がクローン化されたベクターを使用して生物学的に作製されてもよい。

【0054】

本明細書中に記載した任意のプローブまたはプローブセットが、本発明の方法およびキ

50

ットで使用されてもよい。

【 0 0 5 5 】

本明細書中に記載したプローブに関しては、標的核酸または標的タンパク質に対する標識コードの関連づけが決定されていない。

【 0 0 5 6 】

本発明のプローブは、任意のサンプル、例えば、生体サンプル、中に存在する標的核酸またはタンパク質を検出するために使用できる。当業者によって理解されるように、該サンプルは、これだけに限定されるものではないが：細胞（初代細胞および培養細胞株の両方を含む）および組織（培養されたものまたは外植されたものを含む）、を含めたいろいろなものを含んでいてもよい。複数の実施形態では、（固定または未固定）組織サンプルは、包埋され、連続的に切片にされ、そして、顕微鏡用スライド上に固定される。周知のとおり、一組の連続切片は、両方の連続切片中に存在する少なくとも1つの細胞を含む。第一連続切片に位置する構造および細胞型は、隣接する連続切片と同様の位置を有する。該サンプルは、スライド上に固定された培養細胞であっても、または解離細胞（固定または未固定）であってもよい。

10

【 0 0 5 7 】

複数の実施形態では、組織サンプルは、生検腫瘍またはその一部、すなわち、臨床的に関連する組織サンプルである。例えば、腫瘍は、乳癌由来であってもよい。該サンプルは、切除されたリンパ節であってもよい。

【 0 0 5 8 】

20

前記サンプルは、例えば、植物、真菌、および動物界の、多細胞生物を含めた事実上あらゆる生物体から入手できる；好ましくは、該サンプルは、動物、例えば、哺乳動物、から入手される。ヒトサンプルが特に好まれる。

【 0 0 5 9 】

いくつかの複数の実施形態では、本明細書中に記載したプローブ、組成物、方法、およびキットは、病気の診断に使用される。本明細書中で使用される場合、診断または病気の診断という用語は、病気の予測または診断、病気に対する素因の決定、病気に対する処置の観察、疾患の治療反応の診断、および病気の予後診断、病気の進行、ならびに病気の特定の処置に対する応答を含む。例えば、組織サンプルは、（非病的状態に対して）サンプル中の疾患または悪性細胞型のマーカーの存在および／または数量を測定し、それによって、疾患または癌を診断するかまたは病期診断するために、本明細書中に記載した任意のプローブ、方法、またはキットに従ってアッセイできる。

30

【 0 0 6 0 】

一般に、スライドに接着されたサンプルは、形態学、関心領域、着目の細胞型、および単独細胞を同定するために、最初に、蛍光（例えば、蛍光抗体または蛍光染色（例えば、DAPI））を使用して画像化され、そして次に、タンパク質および／または核酸の発現が同じスライド上のサンプルからデジタル的にカウントされ得る。

【 0 0 6 1 】

本発明の組成物およびキットは、プローブおよび他の試薬、例えば、サンプル中のタンパク質および／または核酸の結合を容易にすることが当該技術分野で知られている、すなわち、ハイブリダイゼーション反応を実施するための、バッファーおよび他の試薬を含み得る。

40

【 0 0 6 2 】

キットはまた、これだけに限定されるものではないが、標識オリゴヌクレオチドをプローブにハイブリダイズするため、プローブを標的特異性オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするため、標的特異性ヌクレオチドを標的核酸にハイブリダイズするためおよび／またはプローブを標的タンパク質にハイブリダイズするために必要な情報を含めた、キットの要素を使用するための取扱説明書も含む。

【 0 0 6 3 】

標的核酸および／または標的タンパク質を検出するための代表的なプロトコールは、次

50

のように、および図 10 ~ 14 (上部) に示されるように説明される。

【0064】

多重免疫組織化学法および / または核酸 *in situ* ハイブリダイゼーション法に従って調製される細胞 (生細胞または固定) または組織切片 (例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE)) は、調製され、そして、ガラススライドまたは好適な固体支持体上に固定される。細胞または組織切片の表面への接近は維持され、流体交換を可能にする; これは、流体チャンバー試薬交換システム (例えば、Grace (商標) Bio-Labs, Bend OR) を使用することによって達成できる。関心領域 (ROI) は、プローブが提供される連続切片上、または隣接する連続切片上で同定される。第一に、着目の細胞 / 組織の全体的な巨視的特徴を測定するために、着目の細胞 / 組織に対する完全な「巨視的特徴」の画像化方法論、例えば、DAPI 染色、膜染色、ミトコンドリア染色、特異的なエピトープ染色、および特異的な転写産物染色、が実施される。あるいは、関心領域 (ROI) は、プローブを提供する連続切片に隣接した連続切片上で同定される; ここで、完全な「巨視的特徴」の画像化 (先に記載したように) が、第一連続切片に対して実施される (図 11 および 12 の切片番号 1)。一般的に、この画像化は、好適かつ指示された力の適用により、シグナルオリゴヌクレオチドがプローブから放出される、隣接する連続切片 (図 10 のパネル B の赤線、ならびに図 11 および 12 の切片番号 2 の緑色の楕円形および緑色の三角形) の領域を同定する。連続切片は、互いに約 5 μm ~ 15 μm 離れている。

【0065】

図 13 および図 14 (上部) は、本発明のステップを更に例示する。図 13 に示したステップは、次のものを含む。(1) プロセス: FFPE スライド封入組織は、限定数の可視波長画像化試薬と一緒に、光切断可能リンカーを介して DNA オリゴに結合された一次抗体カクテルとインキュベートされる。(2) 概観: 関心領域 (ROI) は、腫瘍切片の全体的な「構造」を確立するための低 $p \times$ での可視光ベースの画像化試薬を用いて同定される (例えば、核の画像および / または 1 もしくは 2 つの主要な腫瘍バイオマーカーを使用した画像)。(3) プロファイル: 抜粋 ROI が、高解像度の多重プロファイリングのために選択されて、そして、UV 光への曝露後に、選択された領域からオリゴが放出される。(4) プレーティング: 次に、遊離の光切断されたオリゴが、例えば、微小毛細管ベースの「シッパー (sipper)」を介して回収され、その後の定量的のためにマイクロプレートウェル内で保存される。(5) デジタル的カウント: デジタルカウントステップ中、マイクロプレート内の空間分解 ROI からの光切断オリゴを 4 色、6 スポットの光学バーコードにハイブリダイズさせて、標準的な NanoString nCounter (登録商標) 読み出し器具 (例えば、SPRINT、Flex、および MAX) を使用して、単独の ROI において (最大 800 $p \times$ マーカーの中に分配された) タンパク質標的の最大 ~ 100 万デジタルカウントを可能にする。

【0066】

関心領域は、サンプル中に存在する組織型、細胞型、細胞、または細胞内の細胞下構造であってもよい。

【0067】

1 セットのプローブ (各プローブが放出可能なシグナルオリゴヌクレオチドを含む) を含む組成物が、連続切片に適用される。該プローブのセットは、タンパク質を標的とするプローブ、核酸を標的とするプローブ、またはその両方のプローブを含んでもよい。該組成物は、捕捉プローブを含んでもよい。プローブが間接的に標的 (タンパク質および / または核酸) に結合するとき、適用される組成物は、媒介オリゴヌクレオチドを含む。該組成物には、サンプル中のタンパク質および / または核酸の結合を容易にすることが当該技術分野で知られている他の試薬が含まれるであろう。

【0068】

ブロックステップは、組成物が適用される前後に実施される。

【0069】

光切断可能リンカーを含むプローブに関して、前記固体支持体 (例えば、顕微鏡用スラ

10

20

30

40

50

イド)は、光切断可能リンカーを切断することができる波長にて励起光を供給できる顕微鏡内に置かれる。第一関心領域(図10のパネルBの赤線、ならびに図11および12のROI_i)は光で励起され、それによって、光切断可能リンカーが切断され、そして、シグナルオリゴヌクレオチドが放出される。図6および9で例示するように、シグナルオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの標識オリゴヌクレオチドと結合する位置を現在有するプローブの少なくとも1つの領域、あるいは、レポータープローブによって結合されるまたは結合され得るプローブからの核酸を包含する。励起光をROI_iのみに向けることによって、シグナルオリゴヌクレオチドは、ROI_i内のプローブから放出されるのみであり、ROI_i外に位置したプローブからは放出されず、それらのシグナルオリゴヌクレオチドはそのままである。よって、シグナルオリゴヌクレオチドは、ROI_i内の標的に結合されたプローブに関してのみ回収され、それによって、ROI_i内に位置する標的(タンパク質および/または核酸)の同一性および数量の検出を可能にする。

10

【0070】

切片の表面は、少量のバッファーで洗浄され、そして(〜5 - 30 μl)溶出液(放出されたシグナルオリゴヌクレオチドを含む)は、第一サンプルコンテナ内に回収される(図12でサンプル「i」と示した)。切片の表面は、溶出液に入らなかったすべての放出シグナルオリゴヌクレオチドを取り除くために、更にすすがれる。

【0071】

第二関心領域(図11および12のROI_j)は光で励起され、それによって、光切断可能リンカーが切断され、そして、第二関心領域からシグナルオリゴヌクレオチドが放出される。同様に、励起光をROI_jのみに向けることによって、シグナルオリゴヌクレオチドは、ROI_j内のプローブから放出されるのみであり、ROI_j外に位置したプローブからは放出されず、それらのシグナルオリゴヌクレオチドはそのままである。よって、シグナルオリゴヌクレオチドは、ROI_j内の標的に結合されたプローブに関してのみ回収され、それによって、ROI_j内に位置する標的(タンパク質および/または核酸)の同一性および数量の検出を可能にする。

20

【0072】

切片の表面は、少量のバッファーで洗浄され、そして(〜5 - 30 μl)溶出液(放出されたシグナルオリゴヌクレオチドを含む)は、第一サンプルチューブ内に回収される(図12でサンプル「j」と示した)。切片の表面は、溶出液に入らなかったすべての放出シグナルオリゴヌクレオチドを取り除くために、更にすすがれる。

30

【0073】

励起ステップ、洗浄ステップ、およびすすぎステップは、すべての関心領域(最大ROI_n)からシグナルオリゴヌクレオチドが回収されるまで反復される。

【0074】

本発明の更なる利点、特徴、および実施形態は、共に出願された付記に例示される。例として、シグナルオリゴヌクレオチドを回収するための様々な方法およびデバイス、ならびに力を供給する様々な方法が示される。そのうえ、意外なことに、付記は、他の実施形態を超える本発明の特定の実施形態から得られた改善された結果をもたらした。約7倍〜約200倍のシグナル対ノイズの改善を実証するデータを示す。

40

【0075】

検出は、当該技術分野で知られているあらゆる顕微鏡タイプデバイスまたはシステムを使用できる。デバイスまたはシステムは、デジタルミラーデバイス(DMD; 図15および16を参照)と共に広視野照射を含み得る。この利点としては、DMDおよびコントローラは(プローブを光切断する)LEDも駆動できるので、実質的に別途費用を追加することなく、10〜40 μmの細胞を含むであろう〜1 mmの小さな特徴サイズを可能にし、さらに(プロジェクターのような)入手可能な家庭用電化製品を利用する、実施の容易さをもたらすので、削減されたコストが挙げられる。デバイスまたはシステムには、例えば、共焦の、レーザー走査デバイスが含まれ得る、図16を参照。この利点は、より小さい形態学的特徴が、照射され、そして、画像化されることである; しかしながら、別途費

50

用はこれらのデバイスに関係する。

【 0 0 7 6 】

サンプルの各関心領域中に存在する複数の標的タンパク質および／または標的核酸は、ポリメラーゼ反応、逆転写酵素反応、オリゴヌクレオチドマイクロアレイへのハイブリダイゼーション、質量分析、蛍光分子ビーコンへのハイブリダイゼーション、シーケンシング反応、またはnCounter（登録商標）分子バーコードを使用してそれぞれの溶出液サンプルで同定される。US 2 0 0 3 / 0 0 1 3 0 9 1、US 2 0 0 7 / 0 1 6 6 7 0 8、US 2 0 1 0 / 0 0 1 5 6 0 7、US 2 0 1 0 / 0 2 6 1 0 2 6、US 2 0 1 0 / 0 2 6 2 3 7 4、US 2 0 1 0 / 0 1 1 2 7 1 0、US 2 0 1 0 / 0 0 4 7 9 2 4、US 2 0 1 4 / 0 3 7 1 0 8 8、およびUS 2 0 1 1 / 0 0 8 6 7 7 4に記載のNanoString Technologies（登録商標）製のnCounter（登録商標）システムおよび方法は、標的タンパク質および／または標的核酸を同定するための好ましい手段である。NanoString Technologies（登録商標）製のnCounter（登録商標）システムおよび方法は、複数（800以上）の異なる標的タンパク質および／または標的核酸の同時多重識別を可能にする。

10

【 0 0 7 7 】

同時に、第一関心領域中に存在する標的タンパク質および／または標的核酸の同一性および量（例えば、組織型、細胞型（正常および異常細胞を含む））と、第二関心領域中に存在する標的タンパク質および／または標的核酸の同一性および量、或いはさらに多くの関心領域の比較ができる。

【 0 0 7 8 】

20

本発明は、腫瘍（例えば）とその隣接する正常組織内の不連続領域からの最大800種類の着目のタンパク質の多重検出および比較を実現し、それによって、腫瘍とその微小環境の系統的な調査を可能にする。

【 0 0 7 9 】

本発明は、免疫療法および他の標的療法に対する新規な応答を解明するための臨床試験を進めるのに使用できる。

【 0 0 8 0 】

本発明はまた、（例えば）コンパニオン診断の開発に使用され得る、腫瘍の免疫バイオマーカーの発見も可能にする。

【 0 0 8 1 】

30

免疫組織化学は、FFPE組織切片におけるタンパク質の発現および局在を分析するための効果的な技術である。しかしながら、それは、ダイナミックレンジの不足、難しい定量、および非常に限定された多重化のため労働集約型のワークフローを含めた多くの課題に苦しんでいる。高度に多重化（最大800plex）されたアッセイ、すなわち、nCounter（登録商標）デジタル多重免疫組織化学（IHC）アッセイにおいてタンパク質の空間分解された、デジタル的な特徴づけを可能にするnCounter（登録商標）バーコーディング技術に基づく新規プラットフォームを、ここで開示する。該アッセイは、集束させた対象透過UV（例えば、 $\sim 365\text{ nm}$ ）曝露を使用して組織の不連続領域から放出される光切断可能オリゴヌクレオチドタグに連結された抗体に依存している。切断タグが、nCounter（登録商標）アッセイで定量され、カウントが組織分布に戻ってマッピングされ、そして、タンパク質量の空間分解デジタルプロファイルをもたらす。タンパク質検出は、光切断可能オリゴヌクレオチドタグを含む核酸プローブを使用する核酸検出アッセイと共に、またはそれとは別個に実施され得る。よって、本発明は、タンパク質量の空間分解デジタルプロファイル、タンパク質および核酸量の空間分解デジタルプロファイル、または核酸量の空間分解デジタルプロファイルを提供し得る。

40

【 0 0 8 2 】

前記アッセイの利点としては、これだけに限定されるものではないが：高感度（例えば、 $\sim 1 - 4$ 細胞）であり、全てデジタル的にカウントされ、広いダイナミックレンジを有し（ $> 10^5$ ）、高度に多重化され（30個の標的、そして、例えば、800個の標的まで器具を変えることのない拡張性）、簡単なワークフロー、FFPEとの適合性、（タン

50

パク質検出のために) 二次抗体または増幅試薬を必要としない、ならびに臨床アッセイの可能性、が挙げられる。

【0083】

この明細書および添付の請求項で使用される場合、単数形の「a」、「an」、および「the」は、別段の明確な文脈指示のない限り、複数の指示物も含む。

【0084】

具体的に記載されるかまたは文脈から明白でない限り、本明細書中に使用される場合、「または」という語句は、包括的であると理解されるので、「または」と「および」の両方を網羅する。

【0085】

具体的に記載されるかまたは文脈から明白でない限り、本明細書中に使用される場合、「約」という語句は、例えば、当該技術分野における標準的な許容性の範囲内、例えば、平均の2標準偏差の範囲内にあると理解される。約は、記載された値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%の範囲内と理解され得る。別段文脈から明確でない限り、本明細書中に提供されたすべての数値が、「約」という語句によって修飾される。

【0086】

別段の規定がない限り、本明細書中に使用されるすべての学術用語および科学用語は、本発明が関係する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載したものと類似したまたは同等の他のプローブ、組成物、方法、およびキットが本発明の実施において使用可能であるが、好ましい材料および方法を本明細書中に記載している。本明細書中に使用される専門用語は、特定の実施形態だけを記載する目的のためのものであって、制限することを意図するものではないことは、理解されるべきである。

【実施例】

【0087】

実施例1：本発明は、FFPE組織切片内の多重標的を定量するための「バーコーディングの可能性」をもたらす。

【0088】

腫瘍内の不均一性が、標的とした治療薬の実施に対する重要な課題として現れる。歴史的に、免疫組織化学(IHC)は、タンパク質の空間的不均一性を評価するために使用された；しかしながら、高度な多重化および広いダイナミックレンジにてタンパク質量を定量することは難しい。

【0089】

この実施例では、ホルマリンで固定したパラフィン包埋(FFPE)組織切片内のタンパク質を、光切断可能リンカーおよび蛍光バーコードを含んだ抗体含有プローブで標識した。FFPE組織切片のユーザー規定ROIにおけるプローブを、続いて集束UV光に当て、それによって、ROIから(蛍光バーコードを含む)シグナルオリゴヌクレオチドを放出させる。放出されたシグナルオリゴヌクレオチドを、FFPEサンプルから洗い流し、回収した。次に、該放出されたシグナルオリゴヌクレオチドからの蛍光バーコードを、NanoString Technologies(登録商標)製のnCounter(登録商標)システムによって認識し、デジタル的にカウントし、それによって、組織切片のユーザー規定の空間的領域内のそれぞれの標的タンパク質の量を定量した。第一ROIからのシグナルオリゴヌクレオチドを放出させ、回収した後に、集束UV光を、FFPE組織切片の第二ユーザー規定ROIに当て、それによって、第二ROIからシグナルオリゴヌクレオチドを放出させた。この制限されることのない例では、観察されたカウント数対UV照射面積の高度な直線性($0.97 < R^2 < 0.99$)が観察され、そして、約 $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ 、または約100細胞の検出空間分解能を有した。意外なことに、本発明は、単独のFFPE組織切片において、対数5.5(基数10)のダイナミックレンジにて、最大800個の標的を定量するための「バーコーディングの可能性」をもたらした。

【0090】

実施例 2：本発明は、シグナル増幅なしにタンパク質発現を定量するため、および F F P E 組織切片における高次な標的抗原の多重化を達成するための実用的かつ実現可能なアプローチを提供する。

【 0 0 9 1 】

定量的な、多重免疫組織化学が、腫瘍学の中の非常に興味深い分野として現れた。なぜなら、それが、チェックポイントの遮断が腫瘍の微小環境にどのように影響を与えるかをさらに規定する、空間時間的組織および相互依存性を識別する独特な能力を有するからである。この実施例は、F F P E 組織切片内で標的抗原と相互作用する光切断可能なオリゴタグを付与した一次抗体を使用する、ワンステップの、増幅不要の染色法を説明する。該抗体からオリゴを放出する紫外 (U V) 光の照射が適用され、そして、溶出液回収、定量、および抗原量に相当するデジタルカウントがその後に続く。

10

【 0 0 9 2 】

最初に、さまざまな結合方法を調査した；これが、安定な、主にヒンジ領域重鎖に対して部位選択的であり、そのうえ、オリゴヌクレオチド対抗体の化学量論比に関して比較的制御可能であるシステイン生体共役反応法を確立した。

【 0 0 9 3 】

次に、U V 誘発性切断面積と、計測されたデジタルタンパク質カウントとの間の相関を判定するために、線形回帰分析を実施した；これから、高度な直線性 ($0.97 < R^2 < 0.99$) が観察され、F F P E 組織に対するこの多重タンパク質カウント法に関連する基本機構 / 前提を確認した。

20

【 0 0 9 4 】

抗体 - 抗原相互作用に対する結合オリゴヌクレオチドの存在の影響を判定するために、F F P E 組織切片において同一条件下での無修飾抗体に対する標識オリゴヌクレオチド結合抗体の性能を、感度、特異性、およびシグナル強度に関して比較した。抗体性能と標的抗原の細胞下配置との相関を判定するために、核、細胞質、または膜に局在する抗原を標的とした抗体を選択した。選択した抗体は、F o x p 3、ヒストン H 3、P - S 6 (核抗原)、C D 3、C D 4、P D - 1、C D 4 5 R O (細胞質抗原)、および P D - L 1 (膜抗原) を標的とした。感度に関して、一般的に、「より重い」オリゴヌクレオチド結合抗体 (1 抗体あたり 3 または 4 つの標識オリゴヌクレオチドを有する) は、非結合抗体または「より軽い」オリゴヌクレオチド結合抗体 (1 抗体あたり 1 または 2 つの標識オリゴヌクレオチドを有する) と比較したときに、著しく感度を欠くことがわかった。核、細胞質、および膜の標的抗原を通じて、感度、特異性、または強度に関して、非結合抗体と、「より軽い」オリゴヌクレオチド結合抗体との間で顕著な違いは観察されなかった。

30

【 0 0 9 5 】

本発明は、免疫治療介入前およびその最中における腫瘍の免疫状況を包括的に規定するための実用的かつ実現可能な方法を使用して、絶対タンパク質発現レベルを計測する高度に多重化したタンパク質プロファイリングを提供する。

【 0 0 9 6 】

実施例 3：本発明は、F F P E 組織から空間分解した、多重タンパク質検出を提供する。

40

【 0 0 9 7 】

方法

【 0 0 9 8 】

抗体 - この実施例および実施例 4 ~ 6 に使用した抗体としては：「標的 (クローン I D、供給業者)」：H 3 (D 1 H 2、CST)、C D 8 (O T I 3 H 6、Origene)、C D 4 (S P 3 5、Spring Bio)、F O X P 3 (D 2 W 8 E、CST)、B 7 - H 3 (D 9 M 2 L、CST)、S 6 (5 4 D 2、CST)、B 7 - H 4 (D 1 M 8 I、CST)、G r a n z y m e B (O T I 4 E 4、Origene)、K i 6 7 (8 D 5、CST)、P D - 1 (N a t 1 0 5、Cell Marque)、C D 3 (M R Q - 3 9、Cell Marque)、V i s t a (D 1 L 2 G、CST)、H e r 2 (2 9 D 8、CST)、P R (D 8 Q 2 J、CST)、E R (S P 1、Spring Bio)、

50

E G F R (D 3 8 B 1、CST)、C D 5 6 (M R Q - 4 2、Cell Marque)、P D - L 1 (E 1 L 3 N、CST)、C D 4 5 (2 B 1 1 & P D 7 / 2 6、Cell Marque)、T I M - 3 (D 5 D 5 R、CST)、および P a n K e r a t i n (C 1 1、CST)、C D 4 5 R O (U C H L 1、Cell Marque) が挙げられる。

【 0 0 9 9 】

扁桃腺の顕微鏡法 - 扁桃腺 F F P E ブロック (Amsbio) の 5 μ m 切片を、スライド上に封入した。I H C を、標準プロトコールを使用して実施した。抗原回復を、圧力鍋を用いて実施した。扁桃腺切片の染色を、C D 3 一次抗体 M R Q - 3 9 (ウサギ m A b、Cell Marque) および K i - 6 7 一次抗体 8 D 5 (マウス m A b、CST) を用いて実施した。二次インキュベーションを、A l e x a 5 9 4 標識ヤギ ウサギ (Life Tech) および A l e x a 4 8 8 標識ヤギ マウス (Life Tech) と共に実施した。

10

【 0 1 0 0 】

ここで、スライドに接着したサンプルを、最初に、蛍光抗体を使用して画像化し、次に、タンパク質発現を、サンプルからデジタル的にカウントした。

【 0 1 0 1 】

図 1 0 ~ 図 1 4 (上部) に例示したものと同様のステップを使用した。選択した R O I の U V 切断は、3 0 p l e x すべてのデジタルプロファイリングを可能にした (nCounter (登録商標) カウント)。

【 0 1 0 2 】

結果

20

【 0 1 0 3 】

図 1 8 は、K i - 6 7 (緑色の細胞増殖マーカー) および C D 3 (赤色の免疫細胞マーカー) の二色の蛍光を使用して最初に画像化した扁桃腺サンプルの全体的な組織形態を確立する顕微写真を示す。1 2 カ所の領域 (図 1 9 で拡大した 4 つの領域を含む) にわたる多重標的分析は、K i - 6 7 および C D 3 の局在性に関する 3 つの異なったプロファイルを示す。図 1 9 は、図 1 8 に示した 4 つの領域に関する K i - 6 7 および C D 3 の nCounter (登録商標) カウントを示す。図 2 0 は、図 1 8 に示した扁桃腺サンプルから 1 2 の関心領域 (R O I) に対する 3 0 p l e x のオリゴ抗体カクテルによる代表的なカウントを示す。(調査すべき様々な追加対照を許容するように) データを連続切片から得た。示したように、組織サンプルの領域を、発現されたマーカーの強度および同一性に基いて分類した。示した代表的な分類: 「C D 3 豊富」「K i 6 7 豊富」、「混合」、および「結合組織」。

30

【 0 1 0 4 】

これらのデータは、本発明が複数 (ここでは、少なくとも 3 0) のタンパク質標識の空間分解検出を提供することを示す。使用するタンパク質プローブ (抗体) 数の規模を拡大することによって、最大 8 0 0 の異なったタンパク質標識を、同様の分解能で検出できる。

【 0 1 0 5 】

実施例 4 : 本発明は、F F P E 組織からの多重タンパク質検出、および単独細胞分解能アプローチを提供する。

40

【 0 1 0 6 】

方法

【 0 1 0 7 】

黒色腫の顕微鏡法 - メラノーマ (リンパ節由来) F F P E ブロック (Asterand) の 5 μ m 切片を、スライド上に封入した。I H C を、標準プロトコールを使用して実施した。抗原回復を、圧力鍋を用いて実施した。

【 0 1 0 8 】

ここで、サンプルを、最初に、蛍光を使用して画像化し、次に、タンパク質発現を、サンプルからデジタル的にカウントした。

【 0 1 0 9 】

50

図10～図14（上部）に例示したものと同様のステップを使用した。

【0110】

結果

【0111】

図21は、CD3（赤色）、CD8（緑色）、およびDAPI（青色）の三色の蛍光を使用して最初に画像化したリンパ節の黒色腫サンプル中のT細胞の全体的な組織形態を確立する顕微写真を示す。白丸は、直径25 μmであり、3つの細胞を囲んでいる。

【0112】

図22は、UV照射領域（直径100 μm～1 mm）の作用としてFFPEリンパ節組織切片（5 μm厚）から放出されたCD3複合体に関するnCounter（登録商標）データを示す。検出カウントの制限（LOD = バックグラウンドカウント + 2 × 標準偏差）は、直径で26 μmの空間分解能に相当する。視野の絞りサイズを、図面の下部に示す。図23および図24は、（それぞれ、同じ実験からの）CD45およびPD1に関するデータを示す。

10

【0113】

前記データは、本発明の空間的検出能力が約1～4細胞に相当することを示す。

【0114】

実施例5：本発明は、臨床関連アッセイにおける定量性能を提供する。

【0115】

方法

20

【0116】

図10～図14（上部）に例示したものと同様のステップを使用した。

【0117】

乳癌組織マイクロアレイ（TMA）：TMA BR1504aを、US Biomax, Inc.から入手し、H & E 染色画像を、US Biomaxウェブサイト（World Wide Web (www) biomax.us/tissue-arrays/Breast/BR1504a）から入手した。図25の左側のパネルに示した切片と同じブロックからの切片を、Her2一次抗体29D8（ウサギmAb、CST）およびAlexa594標識ヤギウサギ（Life Tech）を用いて染色した。カウントもまた、ヒストンH3、リボソームタンパク質S6、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、マウスIgGアイソタイプ対照、およびウサギIgGアイソタイプ対照に関して得た（データ未掲載）。TMA BR1504aのHer2病理学者スコアは、US Biomax, Inc.によって提供された（World Wide Web (www) biomax.us/tissue-arrays/Breast/BR1504a）。Her2一次抗体29D8（ウサギmAb、CST）およびAlexa594標識ヤギウサギ（Life Tech）を用いて、染色を実施した。他のウサギ一次抗体を一次カクテル中に使用したが、それらの抗体からの蛍光は、Her2蛍光と比較して、ごくわずかであった。合計ピクセル強度（= 594における）を、ImageJソフトウェアを使用して得た。これに関して、バックグラウンド値を強度 = 0に設定し、そして、最も高い強度を強度 = 255に設定した。ROIあたりの全ピクセル強度の合計を示す。

30

【0118】

ここで、サンプルを、最初に、蛍光を使用して画像化し、次に、タンパク質発現を、サンプルからデジタル的にカウントした。

40

【0119】

結果

【0120】

図25（左のパネル）は、IHC染色によってHer2蛍光を同定する顕微写真（中央のパネル）に示した可変レベルのHer2タンパク質を含めた、乳房腫瘍組織の組織マイクロアレイ（TMA）を示す。右のパネルは、中央のパネルの単一領域の拡大図を示す：斯かる領域を、多重抗体カクテルで染色した。

【0121】

図26は、48の代表的な領域対Her2状況（ASCO-CAPガイドライン）に関

50

するnCounter（登録商標）カウントデータを示す。図27では、図26について言及した48の領域に関するnCounter（登録商標）カウント対合計ピクセル強度（ $\times 10^3$ ）をプロットする。

【0122】

これらのデジタルカウントデータは、ASCO-CAPガイドラインによる目視によるHer2状況のスコアリング（ $R^2 = 0.51$ 、図26）と比較して、蛍光強度（ $R^2 = 0.92$ 、図27）との高い相関関係を示す。

【0123】

実施例6：本発明は、組織サンプル内の特定の細胞型の量を明らかにする。

【0124】

図10～図14（上部）に例示したものと同様のステップを使用した；スライドに接着した黒色腫のサンプルを、最初に、蛍光を使用して画像化し、次に、タンパク質発現を、サンプルからデジタル的にカウントした。

【0125】

図28は、CD3（免疫細胞マーカー、赤色）とDAPI（細胞核、青色）の二色の蛍光を使用した黒色腫サンプルの全体的な組織形態を確立する顕微写真を示す。30個の抗体のカクテルを使用した発現データを、白枠で識別される10の領域から得た。図29は、図28に示した黒色腫サンプルからの10の関心領域（ROI）に対する30plexのオリゴ抗体カクテルによる代表的なnCounter（登録商標）カウントを示す。それぞれがバックグラウンドを超える発現カウントを有する、13のマーカーに関するカウントを示す。「免疫浸潤が豊富」であると確認された領域5、6、7は、T細胞性マーカーおよびT細胞調節マーカーの最も高い発現を有した。

【0126】

これらのデータは、本発明が複数（ここでは、少なくとも30）のタンパク質マーカーの空間分解検出を実現することを示す。使用するタンパク質プローブ（抗体）の数の規模を拡大することによって、最大800の異なったタンパク質標識を、同様の分解能で検出できる。

【0127】

実施例7：デジタルミラーデバイス（DMD）は、単独細胞の照射を可能にする。

【0128】

図30Aおよび30Bは、扁桃腺組織サンプル中の単独細胞に照射する場合、デジタルミラーデバイス（DMD）を使用したUV照射が可能であることを示す顕微写真である。

【0129】

これらのデータは、DMDを使用したときに、本発明が単独細胞分解可能であることを示す。

【0130】

実施例8：ゲルボックスは、サンプル全体に照射をおこない、そして、サンプル全体に結合したプローブからシグナルオリゴヌクレオチドを放出させることができる。

【0131】

図34：組織またはサンプル全体が、例えば、標準的な実験室用UVゲルボックスを用いて、照射された実施形態からのデータを示す。ここで、FFPE組織スライドを、ライトパネル上に置き、ワックスペンを使用して、バッファー溶液（TBS）を保持し、FFPE組織を被覆し、そして、UV光曝露（276～362nm、例えば、302nm；～5mW/cm²）を、ガラススライド（1mm厚）を通して組織に適用した。データは、約1分以内のUV曝露で、シグナルオリゴヌクレオチドの大部分が、FFPE結合抗体から放出されたことを示す。カウントを、陽性対照に対して標準化する。

【0132】

実施例9：顕微鏡からの照射は、サンプルの関心領域を照射し、そして、関心領域に結合されたプローブからシグナルオリゴヌクレオチドを放出させることを可能にする。

【0133】

10

20

30

40

50

図35は、組織またはサンプルの一部に、例えば、顕微鏡を用いて、照射される実施形態、すなわち、顕微鏡下でのUV切断を示す（時間滴定実験）。これは、サンプル全体が照射される実施例8の実験と対照的である。ここで、UV LED（365nmにて）は、20×対物レンズを用いて $\sim 150\text{mW}/\text{cm}^2$ にて適用される。UV照射は、以前の蛍光（ $\sim 590\text{nm}$ の励起）明視野画像化によって同定した全組織領域を走査した。視野（FOV）あたり約1秒以内のUV曝露で、ほとんどのシグナルオリゴヌクレオチドがFFPE結合プローブから放出される。実施例8のゲルボックス実験を、非空間分解100%放出対照として利用した。カウントを、陽性対照に対して標準化する。青色：可変の露出時間を用いた顕微鏡データ；赤色：ゲルボックス2.5分曝露のデータ。顕微鏡装置の形態を示す写真および図解も示す。

10

【0134】

図36は、シグナルオリゴヌクレオチドが肺組織サンプルに結合した均一に分布した抗ヒストン（H3）抗体から放出されることを示す。組織を、約 $450\mu\text{m} \times 330\mu\text{m} = 0.15\text{mm}^2$ の視野（FOV）あたり1秒のUV（365nm、20×対物レンズを用いて $\sim 150\text{mW}/\text{cm}^2$ ）に当てた。流出液を回収するために使用される「マクロ体積」は、約 $70\mu\text{l}$ であった。これは、約 $5\mu\text{l}$ の回収流出液を用いた（FOV/5） $\sim 99\mu\text{m} \times 99\mu\text{m}$ までの検出限界を低下させた。したがって、この実施例では、検出限界は約10細胞 \times 10細胞ニッシュである。これらのデータは、抗体シグナルが、空間分解照射領域FOVに比例し、「マクロ流体」検出限界（LOD）を評価することを示す。

【0135】

20

図37は、組織またはサンプルの一部に、例えば、顕微鏡を用いて、照射される実施形態、すなわち、顕微鏡下での、および多重標的に関するUV切断を示す（照射領域滴定実験）。組織における多重標的：2つの陽性標的（ヒストンH3およびリボソームS6）および8つの陰性標的、のUV切断を示す。1つの陰性標的（Ox40）のみが、高いバックグラウンドを示した。ゼロ、1、4、9、および16視野からのデータを示す。

【0136】

実施例10：関心領域は、標識技術によってあらかじめ同定されてもよく、次に、関心領域は照射され、シグナルオリゴヌクレオチドが、あらかじめ同定した関心領域に結合したプローブから放出される。

【0137】

30

図38は、組織（例えば、乳癌サンプル）内の関心領域が最初に、マーカー（ここでは、Her2）の発現に関して同定され、次に、この関心領域は（例えば、UVを）照射されて、結合プローブからシグナルオリゴヌクレオチドが放出されるにある実施形態を示す。示したデータは、2つの位置：Her2+とあらかじめ識別した1つの関心領域およびHer2-とあらかじめ識別した1つの関心領域、から放出された2つの標的（ここで、Her2およびヒストンH3）に関して、シグナルオリゴヌクレオチドの量を比較する。

【0138】

実施例11：フローセルに包埋された包埋されたサンプルは、照射された関心領域からだけでなく、シグナルオリゴヌクレオチドが放出されるところからも、サンプル全体から溶出の回収を実現する。

40

【0139】

図39は、フローセルに組織が包埋された実施形態を示す。ここで、微小流体フローセルに包埋されたFFPE組織は（約 $25\mu\text{l}$ の体積を有する $100\mu\text{m}$ の高さがある 9mm の円形チャンバー（フローセルが $300\mu\text{m}$ の高さであるとき、大体の体積は $75\mu\text{l}$ である））、シリンジポンプによって制御される。UVはフローセルの内側を切断し、そして、ある領域（9FOVs）の照射、そして溶出、次に、別の領域（9FOVs）の照射、そして溶出の溶出プロファイルを示した。複数の画分に関するデータが示される。実施例10のデータと同様に、ここで、関心領域は、蛍光標識マーカーの発現に関してあらかじめ同定された。

50

【0140】

実施例12：関心領域の一面に小さい穴を含むフローセルに包埋されたサンプルは、照射された関心領域、およびシグナルオリゴヌクレオチドが放出された場所からの効果的な溶出の回収をもたらしたが、それはサンプル全体からではなかった。

【0141】

図40は、小さい穴を備えたフローセル内に組織が埋め込まれている実施形態を示す。ここで、溶出は、関心領域上で直接起こる。流体チャンバー上の直径0.4~1mmの穴は、溶出液（例えば、5 μ lの回収体積）の回収を可能にする。9穴、96穴形式、および12穴形式（組織マイクロアレイ（TMA）のため）を試験した。蛍光画像を、複数の視野を組み合わせることによって作成した。装置の形態を示す写真および図解も示す。

10

【0142】

図41A~41Cは、小さい穴を備えたフローセルを使用する実施形態が、組織の全面からの溶出液の回収よりむしろ有意なシグナル対ノイズの改善を有することを示す。データは、関心領域上の穴を通して溶出液を回収するとシグナル対ノイズが約7倍増強されることを示す。この実施形態では、流体フローセル上の直径1mmの穴（25 μ lのチャンバー）を、溶出液を回収するために使用した（5 μ lの画分）。複数の画分に関するデータを示す。

【0143】

図42A~42Cは、小さい穴（12または96穴形式）を備えたフローセルを使用したデータを示す。データは、関心領域上の穴を通して溶出液を回収するとシグナル対ノイズが約7倍増強されることを示す。この実施形態では、視野照射を穴の中心に集中した；1穴あたり5 μ lの体積の溶出。

20

【0144】

図43AおよびBは、全組織溶出を実施したフローセルからのバックグラウンドシグナル（図43A；実施例11に示すように）を、溶出が関心領域の上で直接起こったフローセルからのバックグラウンドシグナル（図43B）と比較した際のデータを示す。図43Aに見られるように、全組織溶出に関しては、図43Bに見られるバックグラウンドに対して、より高いバックグラウンドである。さらに、図43Bは、フローセル内インキュベーションと、非フローセル内インキュベーションとの相違を示さない。

【0145】

30

実施例13：放出されたシグナルオリゴヌクレオチドは、単一チューブ/ピペット、複数のチューブ/ピペット、またはマルチチューブ/ピペットアレイによって選択され得る。

【0146】

図44は、複数の関心領域の吸引の実施形態のための開放表面での溶出液回収を示す図解である。ここでは、回転弁の切り替えを用いた溶出液の吸引/分配のためのマルチチューブアレイを示す。図47も参照。

【0147】

図45は、溶出液回収が毛細管（マイクロアスピレーター）を通してである実施形態を示す写真および図解を含む。図47も参照。図46AおよびBは、溶出液回収が毛細管（マイクロアスピレーター）を通してである図45の実施形態からのデータを示す。この実施形態は、シグナル対ノイズにおいて劇的な改善があった：シグナル対ノイズ比は、穴溶出によるフローセルと比較して、約10倍増強され、そして、シグナル対ノイズ比は、全組織溶出と比較して、約200倍増強される。ここで、LOD面積は、約60 μ m \times 60 μ mである。

40

【0148】

実施例14：照射能力と溶出能力の両方を備えたデバイスは、規定した関心領域からの核酸および/またはタンパク質発現データを効率的かつ正確に得ることができる。

【0149】

図48は、組み合わせた毛細管とレンズによる照射および流体回収を示す図解である。

50

【0150】

実施例15：タンパク質発現は、単独細胞から検出および定量され得る。

【0151】

図50は、本明細書中に記載した方法および装置を使用して単独細胞または2つの細胞から得られたタンパク質発現データを示す。上部パネルでは、S6タンパク質が、少なくとも1つの細胞から検出および定量され、下部パネルでは、CD45タンパク質が、少なくとも1つの細胞から検出および定量される。

【0152】

実施例16：本明細書中に記載した方法およびデバイスは、空間分解、多重RNA標的および/またはタンパク質標的発現の正確、かつ、効果的な検出および定量を実現する。

10

【0153】

in situハイブリダイゼーション (ISH) を実施して、それぞれ標的結合ドメイン、シグナルオリゴヌクレオチド、および光切断可能リンカーを備えるDNAベースのオリゴプローブ (「RNAプローブ」) を内因性RNAにハイブリダイズさせる。5 μ mのFFPE HER2⁺乳房組織切片を、キシレン中で脱パラフィン処理し、段階的なエタノール中で部分的に再水和し、そして、70%のエタノール中、室温にて1時間インキュベートした。次に、切片を、40 μ g/mlのプロテイナーゼK中で37℃にて25分間インキュベートした。次に、組織を、50%のホルムアミド/2×SSC中、室温にて15分間インキュベートし、そして、1nMプローブ、40%のホルムアミド、1mg/mlの酵母tRNA、10%の硫酸デキストラン、および2×SSC中の0.2%のBSAの溶液中、37℃にて一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後に、50%のホルムアミド/2×SSC中での2回のストリンジェント洗浄を、それぞれ37℃にて25分間実施した。切片を、TO-PRO (登録商標) - 3 (Thermo Fisher Scientific) 蛍光核酸染色を用いて染色して、組織形態を可視化した。次に、半導体型反射デバイスによって誘導した集束UV光を使用して、プローブからユーザー規定の関心領域 (ROI) のDNAシグナルオリゴヌクレオチドを切断した。各組織切片に関して、2つのROIが腫瘍組織を含み、2つのROIが正常組織を含み、および2つのROIが組織を含まなかった (組織スライド自体)。切断後に、シグナルオリゴヌクレオチドを回収し、nCounter (登録商標) 分子バーコードにハイブリダイズし、そして、NanoString Technologies (登録商標) 製のnCounter (登録商標) システムによってデジタル的にカウントした。H & Eを組織切片に対して実施して、腫瘍および通常組織のROIについて確認した。

20

30

【0154】

連続切片に対して、標準的な免疫組織化学 (IHC) を、それぞれ標的結合ドメインとしての抗体、DNAシグナルオリゴヌクレオチド、および光切断可能リンカーを備えた「タンパク質プローブ」を使用して実施した。次に、切片を、抗ウサギAlexa594二次抗体およびTO-PRO (登録商標) - 3 (Thermo Fisher Scientific) 蛍光核酸染色を用いて染色して、組織形態を可視化した。次に、半導体型反射デバイス (DMD) によって誘導した集束UV光を使用して、プローブからユーザー規定の関心領域 (ROI) のDNAシグナルオリゴヌクレオチドを切断した。各組織切片に関して、2つのROIが腫瘍組織を含み、1つのROIが正常組織を含み、および2つのROIが組織を含まなかった (組織スライド自体)。ROIを、ISHプローブ切断のために選択したROIに組み合わせた。切断後に、タンパク質標的からのシグナルオリゴヌクレオチドを、RNA標的からのシグナルオリゴヌクレオチドと混合し、そして、すべてを先に記載したように定量した。H & Eを組織切片に対して実施して、腫瘍および通常組織のROIについて確認し、さらに、ROIが、ISHとIHC組織との間で正しく組み合わせられたことを確認した。

40

【0155】

図51は、同じ腫瘍サンプルの連続切片からサンプル抽出したROIを示す。領域1~4は、この画像に未掲載であるが、代わりに、組織を含まなかった組織の一部から取った (陰性対照 - 「組織なし」)。領域5~8は、わずかな数の腫瘍細胞を含んでいた (「正

50

常組織」)。領域 9 ~ 12 は、多数の腫瘍細胞を含んでいた(「腫瘍」)。

【0156】

図52は、このアッセイに含まれる9つのRNAプローブのうち6つについて得られたカウントを示す。各ROIに関して、サンプルを、UV照射を適用する前(「-UV」データセット)および同じ領域からプラスUVサンプルを回収する前(「+UV」データセット)に回収した。カウントのバックグラウンドレベルを、UVがサンプルに適用されなかったときに得た;それによって、得られたシグナルのUV依存性を示す。+UVであるが、組織に向けられていなかったROIが、バックグラウンドカウントをもたらした(すなわち、ROI 1 ~ 4 - 「組織なし」)。本来正常組織であった領域(すなわち、ROI 5 ~ 8 - 「正常組織」)は、HER2プローブに関して低いカウントを示した(グラフのオレンジ色の棒)。本来腫瘍組織であった領域(すなわち、ROI 9 ~ 12 - 「腫瘍」)は、HER2に関してより高いカウントを示した。同様の、しかしそれほど劇的でない、増大が、リボソームS6プローブに関して見られた(グラフの緑色の棒)。この組織型で高度に発現されないと予想されるRNAを対象とした追加の対照プローブは、正常組織と腫瘍組織との間で異なったレベルを示さず一貫したカウントを示した。これらの対照プローブを、CD45、PSA(前立腺特異抗原)、および2つの独特なERCC配列を標的とするように設計した。明確にするために、図53は、図52に示したデータの平均および標準偏差を示す。

10

【0157】

これらのRNAプローブのサンプルもまた、腫瘍サンプルのサンプル領域を分析したタンパク質プローブと同時に実施した。これに関しては、RNAおよびタンパク質プローブを、同時に、NanoString Technologies(登録商標)製のnCounter(登録商標)分子バーコードにハイブリダイズし、そして、nCounter(登録商標)システムによってデジタル的にカウントした。このアッセイに関するカウントを図54に示す。HER2 RNAプローブカウント(上部グラフの赤色の棒)およびタンパク質プローブカウント(下部グラフの赤色およびオレンジ色の棒)の増大は、正常領域と比較して、腫瘍領域において見られる。+UVサンプルのみを示す。先に記載したとおり、-UV対照サンプルはこのグラフに未掲載である。なぜなら、それらにバックグラウンドカウント(「組織なし」カウントと同様)がないからである。合致するタンパク質プローブサンプルを入手できなかったため、ROI 6およびROI 8をこの分析から除外した。よって、タンパク質プローブからのシグナルオリゴヌクレオチドとRNAプローブからのシグナルオリゴヌクレオチドを、一緒に検出し、定量することができる。

20

30

【0158】

実施例17:部分的二本鎖プローブは、一本鎖プローブと比較したときに、より高いシグナル対ノイズ比を有する。

【0159】

DNAプローブ(mRNAを認識し、結合する)を、実施例16に記載のとおり、5 μmのFFPE組織においてRNAにin situハイブリダイズさせた。UV切断を、別々のスライド上に封入した組織切片全体に対して、2 x SSC + 0.1%のTween 20中でUVライトボックス(ゲルボックス)を使用して3分間実施した。切断およびシグナルオリゴヌクレオチドの放出後に、そのシグナルオリゴヌクレオチドを、実施例16のようにピペットによって回収し、検出した。一本鎖DNAプローブ、部分的二本鎖DNAプローブ、および無プローブ対照カウントを、図55(上部のグラフ)においてHER2 3 + 乳房組織および扁桃腺組織に関して示す。シグナル対ノイズ比は、カウントを平均バックグラウンドカウントで割ることによって決定した(平均ERCCカウント)。図55、下部のグラフを参照。

40

【0160】

実施例18:サケ精子DNAの追加がプローブハイブリダイゼーションを改善する。

【0161】

DNAプローブ(mRNAを認識し、結合する)を、先に記載されるように、5 μmの

50

FFPE組織においてRNAにin situにおいてハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション中に、1 mg/mlの超音波処理した変性サケ精子DNAを、酵母tRNAの代わりに使用した。スライドを、1 nMプローブ、40%のホルムアミド、1 mg/mlの超音波処理した変性サケ精子DNA、10%の硫酸デキストラン、および2×SSC中の0.2%のBSAの溶液を用いてハイブリダイズさせた。UV切断、シグナルオリゴヌクレオチド回収、および検出を、実施例17に記載のとおり実施した。一本鎖DNAプローブを、HER2³+乳房および扁桃腺に示す(図56)。シグナル対ノイズ比は、カウントを平均バックグラウンドカウントで割ることによって決定した(平均ERCCカウント)。

【0162】

10

実施例19：PSA(前立腺特異抗原)RNAプローブは、高度に特異的である。

【0163】

DNAプローブ(mRNAを認識し、結合する)を、先に記載されるように、FFPE前立腺の5 μm切片においてRNAにin situにおいてハイブリダイズさせた。MES中、97℃にて10分間のインキュベーションを、1時間のエタノールインキュベーションの代わりに使用した。UV切断、シグナルオリゴヌクレオチドの回収および検出、ならびにシグナル対ノイズ比の算出を、実施例17に記載のとおり実施した。カウントおよび比を図57に示す。

【0164】

実施例20：プローブの特異性は、非標準的な、nM未満の濃度にて増強される。

20

【0165】

典型的には、RNAを認識するために使用されるin situハイブリダイゼーション(ISH)プローブは、5~200 nMにてハイブリダイズさせる。驚いたことに、本発明の核酸認識プローブは、0.2 nMまたはそれ未満で最もうまく働き、それは、標準的なISHプローブ濃度に比べて1/25~1/1000の低さであった。

【0166】

DNAプローブを、先に記載されているように、FFPE HER2³+乳房サンプルの5 μm切片においてRNAにin situにおいてハイブリダイズさせた。プローブを、5、1、0.2、および0.4 nMで使用した。UV切断、シグナルオリゴヌクレオチドの回収および検出、ならびに倍率変化の計算を、実施例17に記載のとおり実施した。

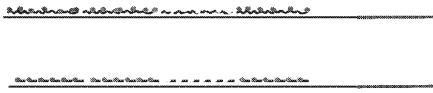
30

【0167】

図58は、プローブ濃度が低いほどカウントが低下することを示す(上部のグラフ)。しかしながら、意外なことに、プローブをnM未満の濃度にてハイブリダイズさせるとき、陽性プローブカウントを陰性対照プローブと比較して、シグナル対ノイズにおいて顕著な増大があった。

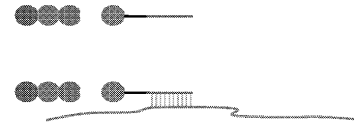
【図 1】

Figure 1



【図 2】

Figure 2



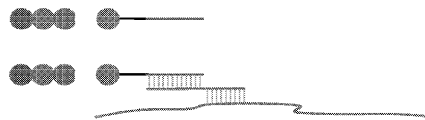
【図 3】

Figure 3



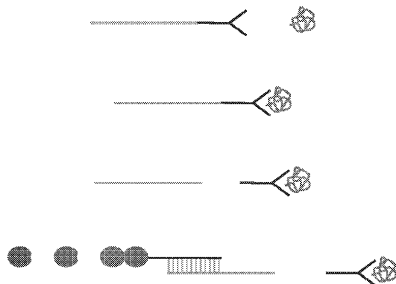
【図 4】

Figure 4



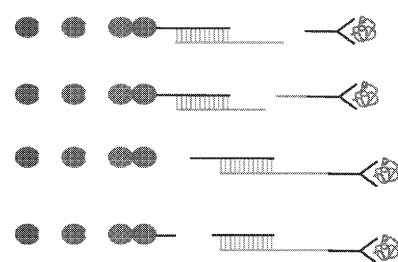
【図 8】

Figure 8



【図 9】

Figure 9



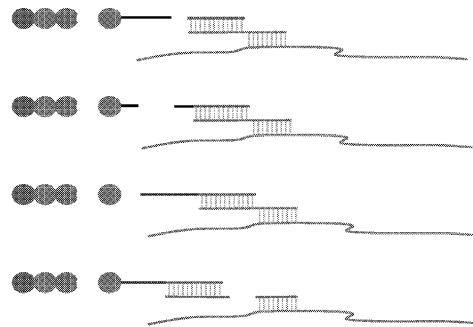
【図 5】

Figure 5



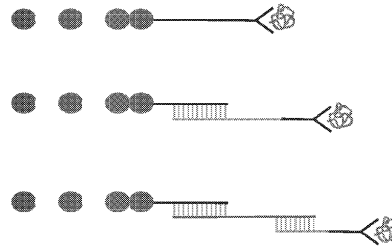
【図 6】

Figure 6



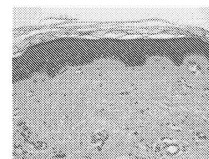
【図 7】

Figure 7

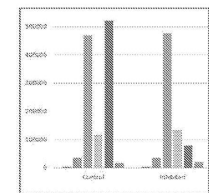


【図 10】

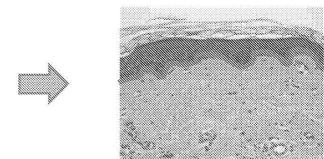
Figure 10



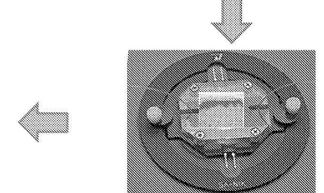
細胞を放出可能な
シグナルオリゴヌクレオチド
を有するプローブと接触させる



シグナルオリゴヌクレオチド
をデジタル的に多重カウント
する



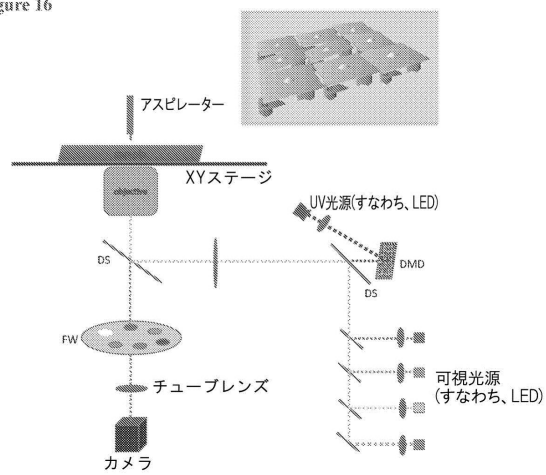
選んだ空間的関心領域(赤線)
を選択し、シグナルオリゴヌクレオチド
を放出する力を適用する



放出された
シグナルオリゴヌクレオチド
を含む溶出液を回収する

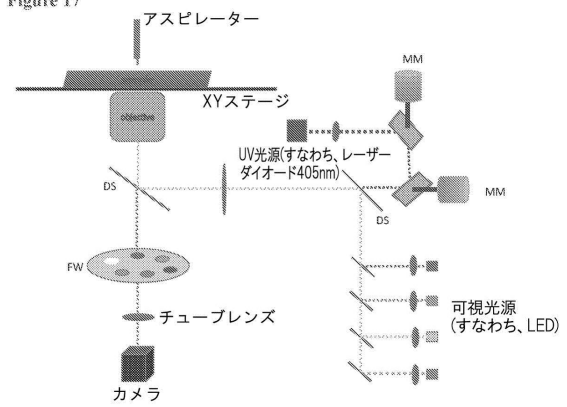
【図 16】

Figure 16



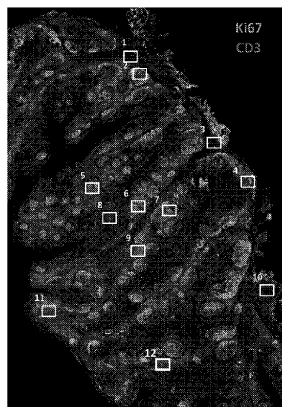
【図 17】

Figure 17



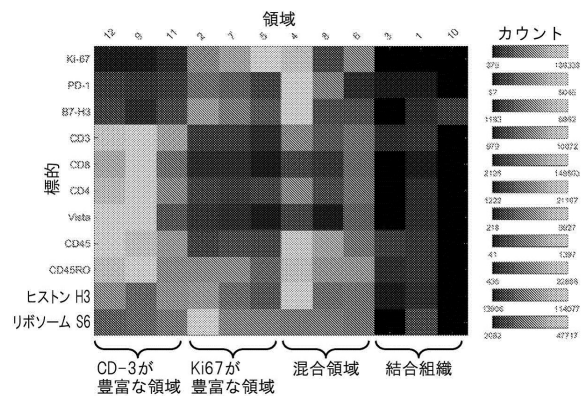
【図 18】

Figure 18



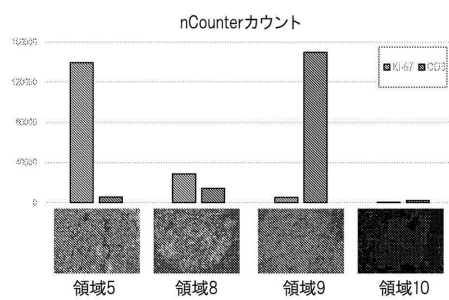
【図 20】

Figure 20



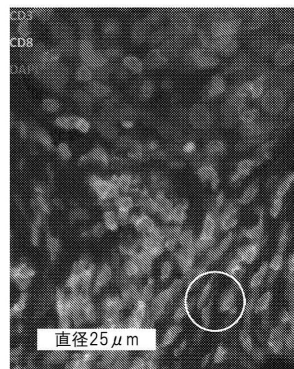
【図 19】

Figure 19



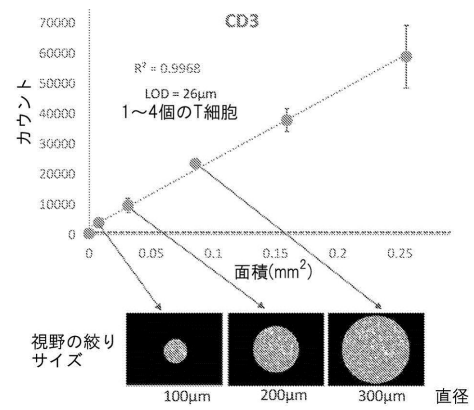
【図 2 1】

Figure 21



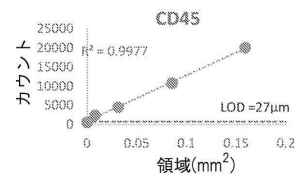
【図 2 2】

Figure 22



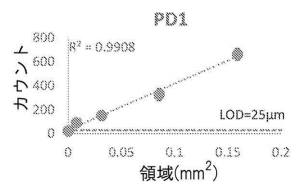
【図 2 3】

Figure 23



【図 2 4】

Figure 24



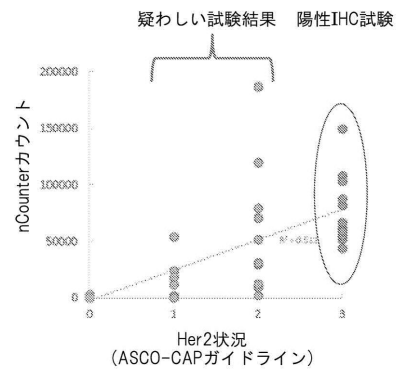
【図 2 5】

Figure 25



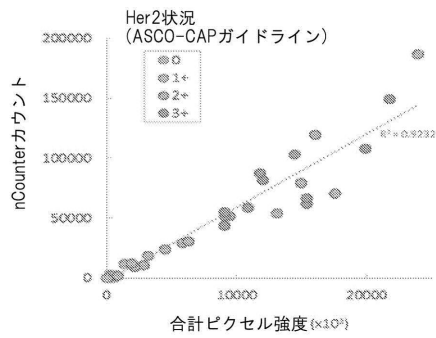
【図 2 6】

Figure 26



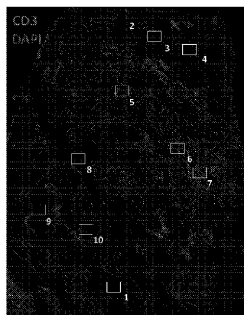
【図 27】

Figure 27



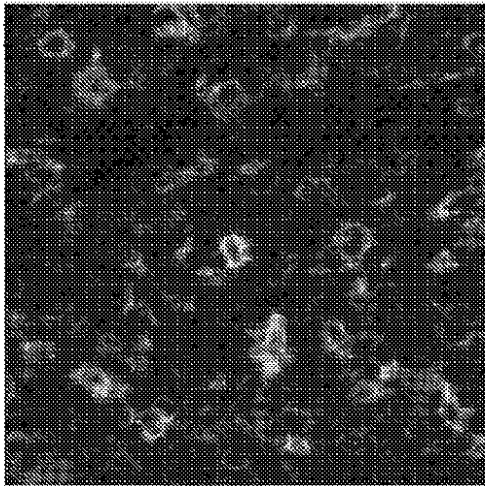
【図 28】

Figure 28



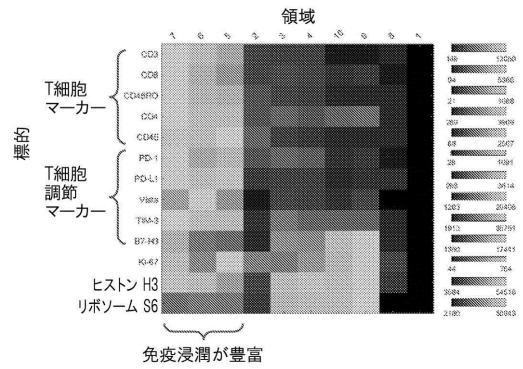
【図 30 A】

Figure 30A



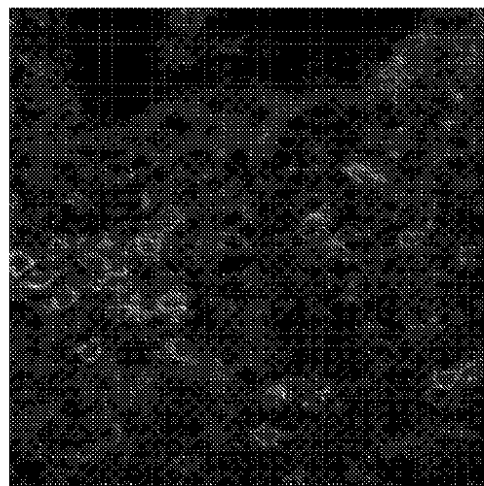
【図 29】

Figure 29

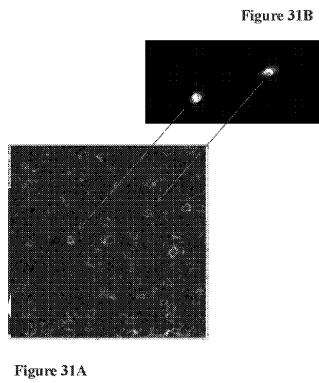


【図 30 B】

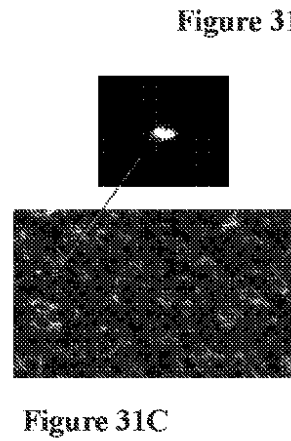
Figure 30B



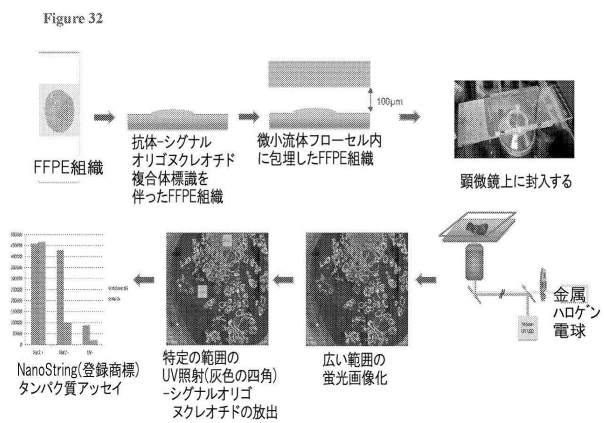
【図 3 1 A - 3 1 B】



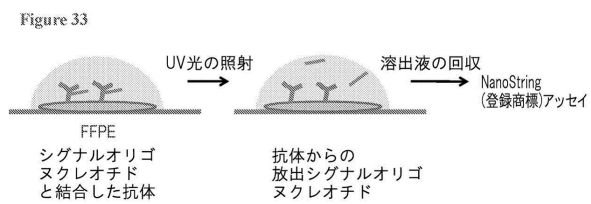
【図 3 1 C - 3 1 D】



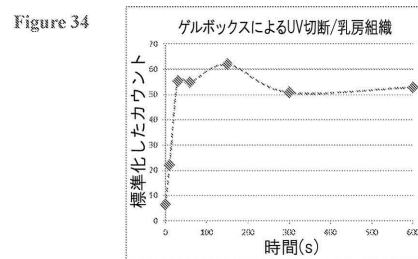
【図 3 2】



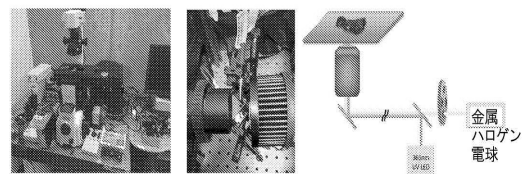
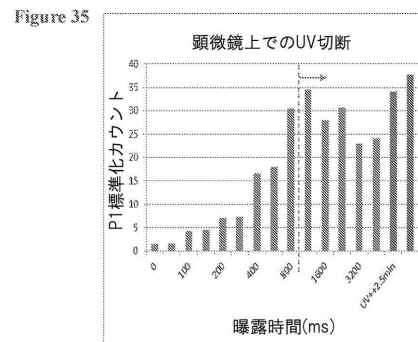
【図 3 3】



【図 3 4】

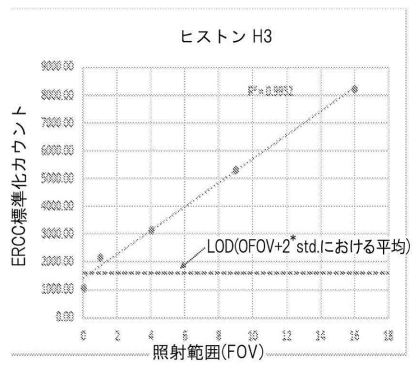


【図 3 5】



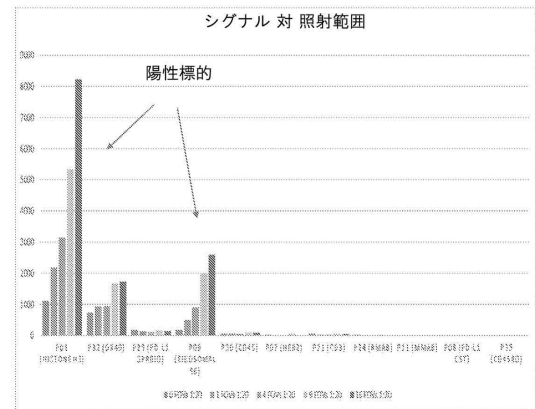
【図 36】

Figure 36



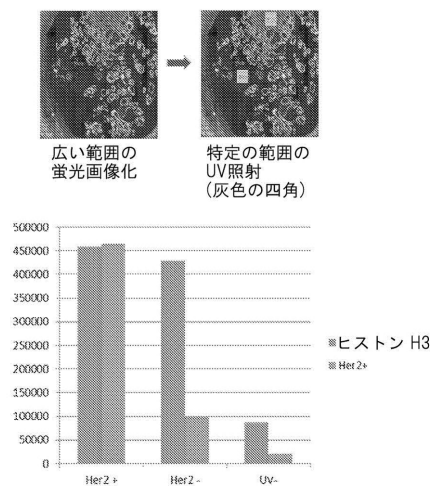
【図 37】

Figure 37



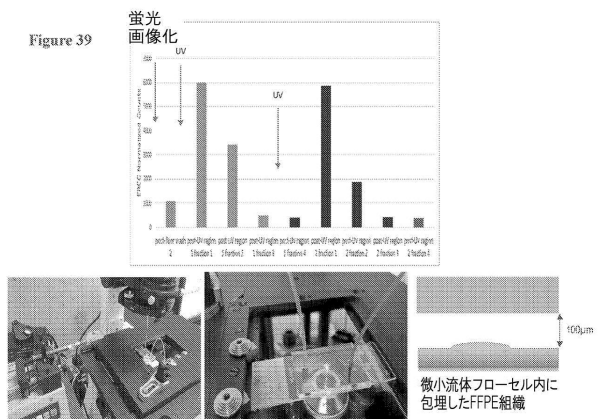
【図 38】

Figure 38



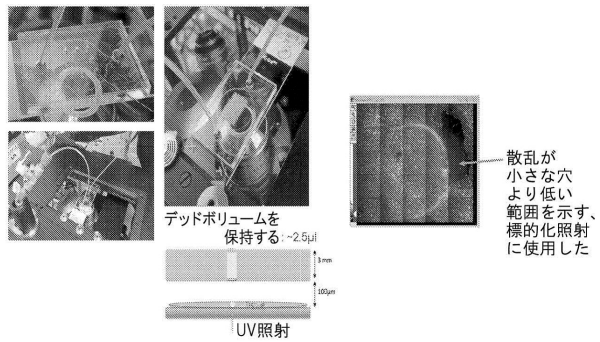
【図 39】

Figure 39



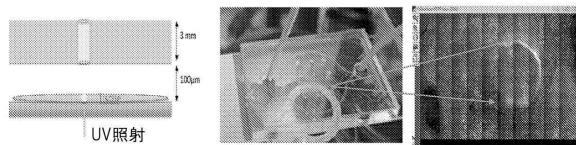
【 図 4 0 】

Figure 40



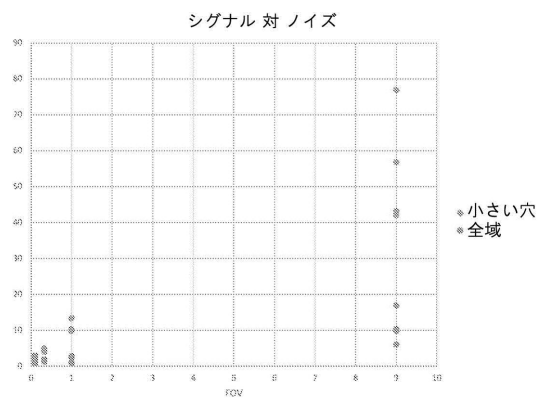
【 図 4 1 A 】

Figure 41A



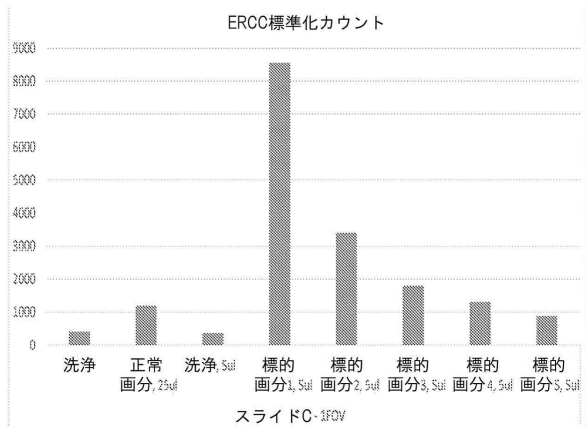
【 図 4 1 C 】

Figure 41C



【 図 4 1 B 】

Figure 41B



【 図 4 2 A 】

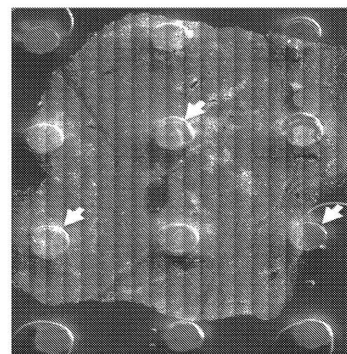
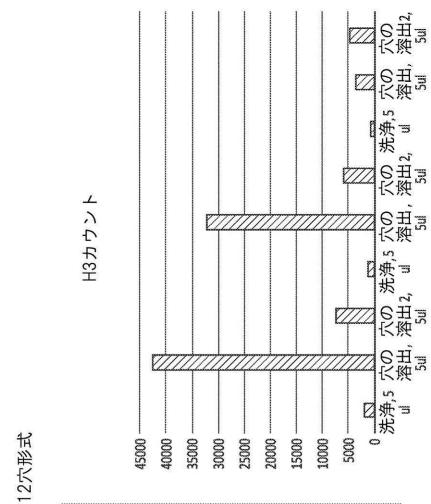
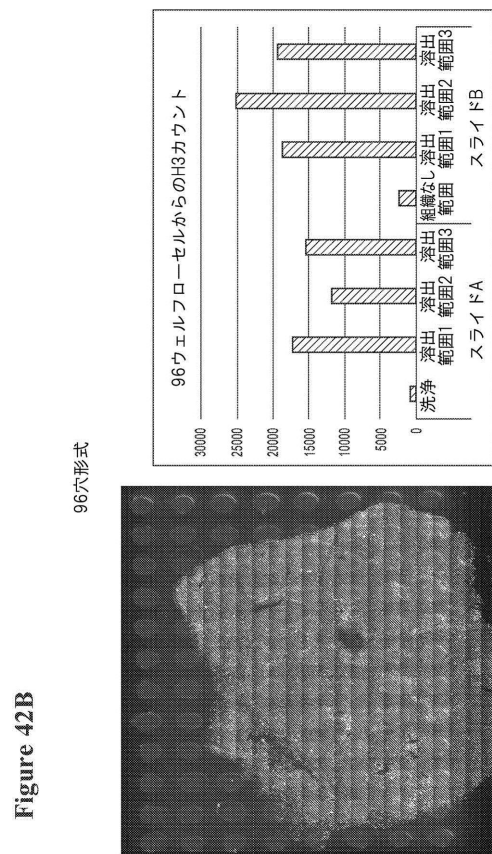


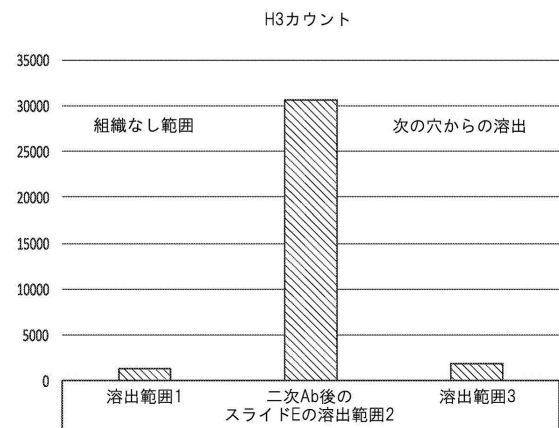
Figure 42A

【図 4 2 B】



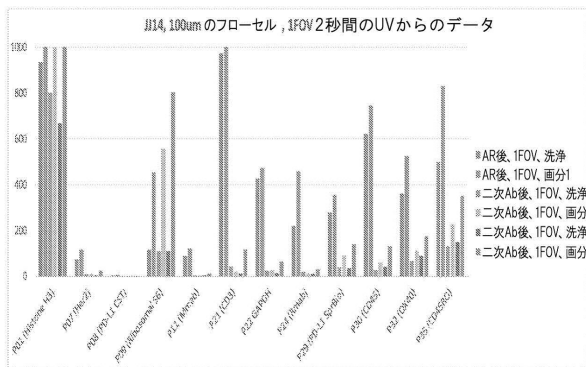
【図 4 2 C】

Figure 42C



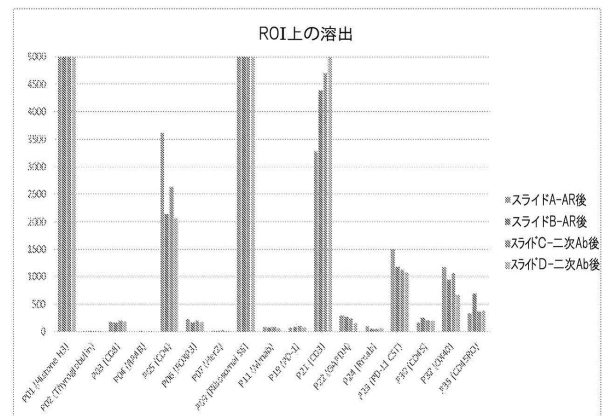
【図 4 3 A】

Figure 43A



【図 4 3 B】

Figure 43B



【 図 4 9 】

Figure 48

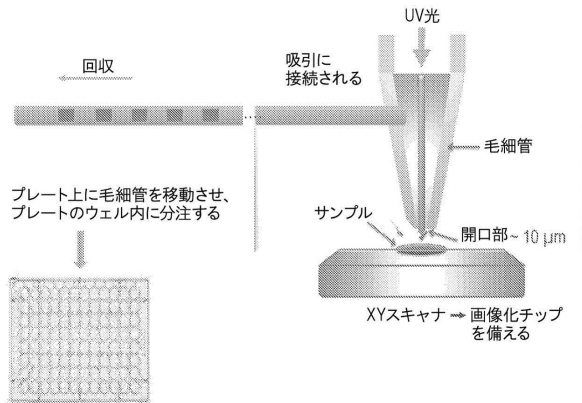
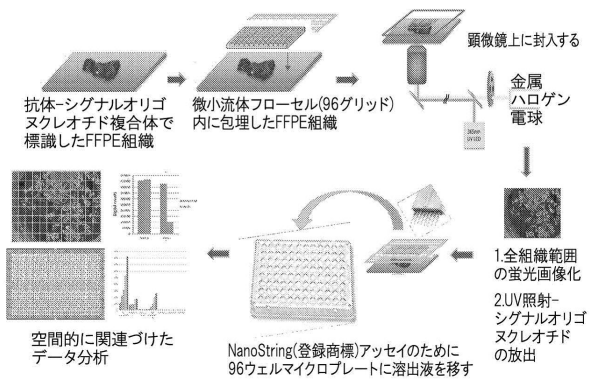
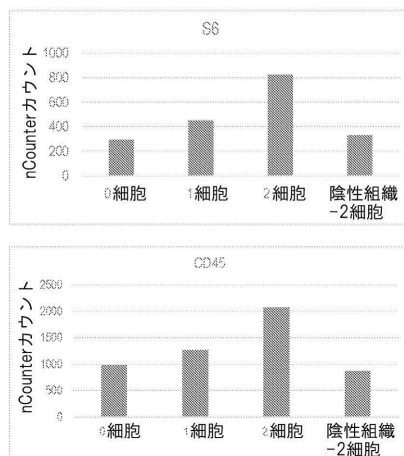


Figure 49



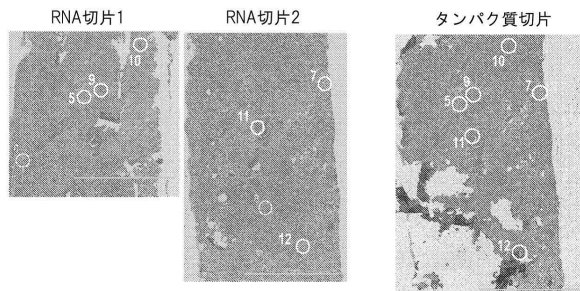
【 図 5 0 】

Figure 50

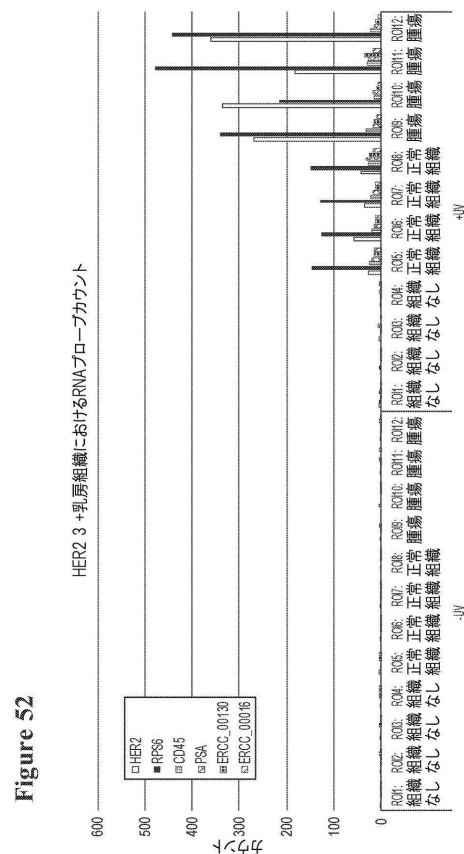


【 図 5 1 】

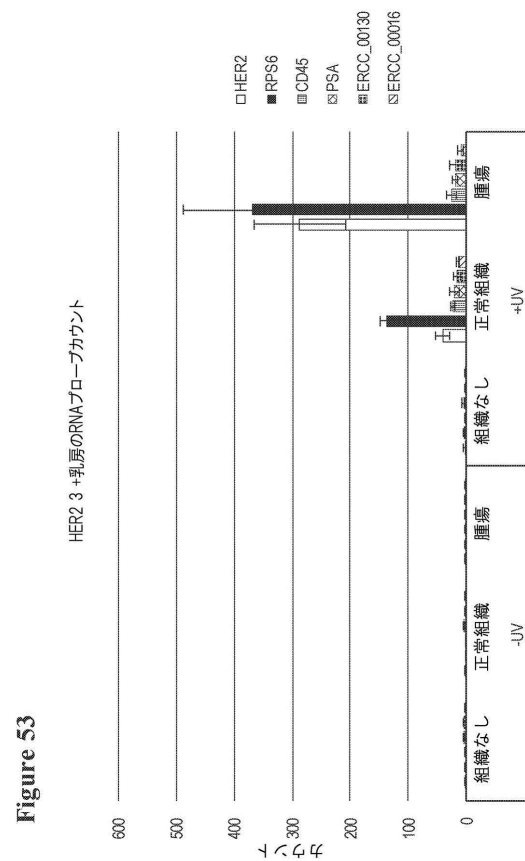
Figure 51



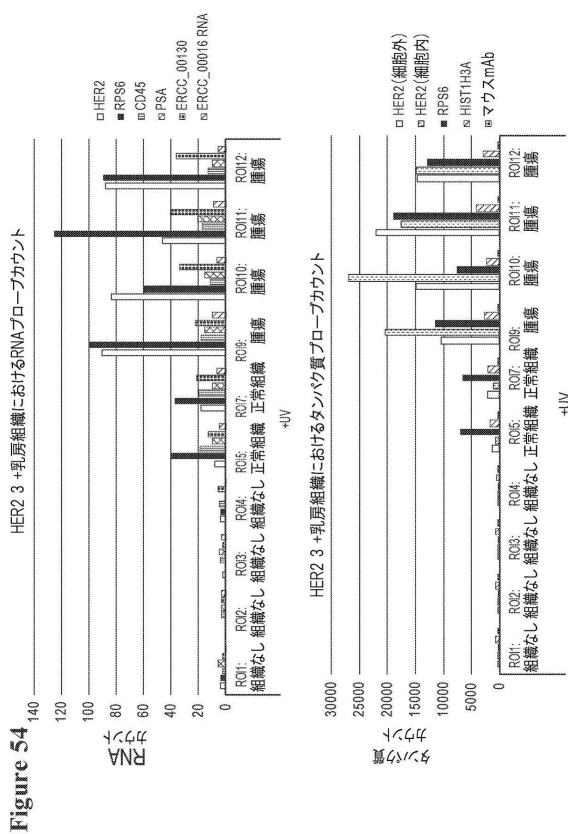
【図 5 2】



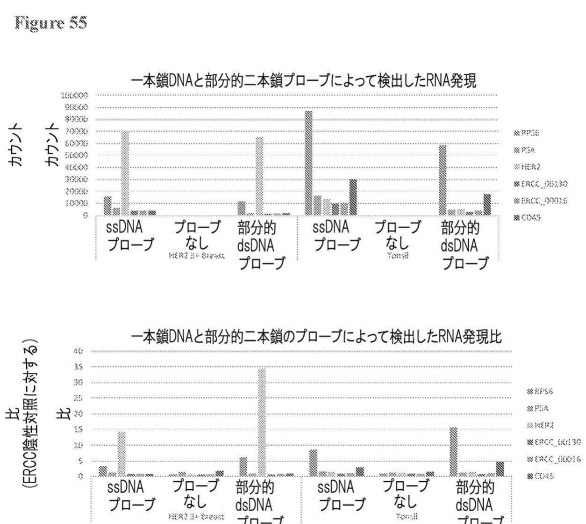
【図 5 3】



【図 5 4】

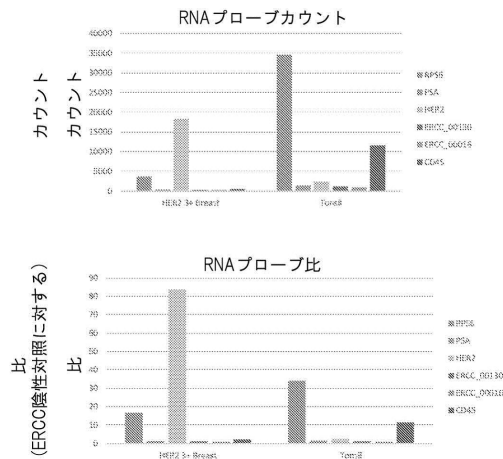


【図 5 5】



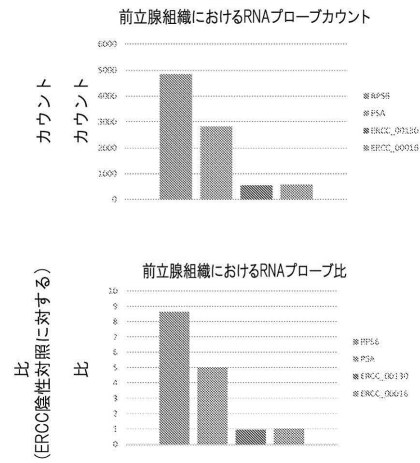
【図 56】

Figure 56



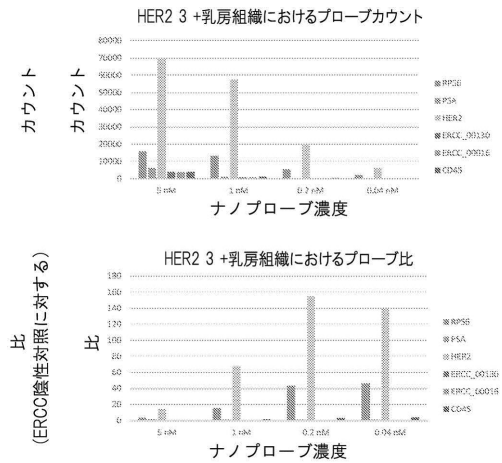
【図 57】

Figure 57



【図 58】

Figure 58



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/6876	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876 Z
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N	33/48 M
G 0 1 N	33/483	(2006.01)	G 0 1 N	33/48 P
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/483 C
G 0 1 N	37/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 M
C 1 2 Q	1/6841	(2018.01)	G 0 1 N	37/00 1 0 2
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 Q	1/6841 Z
			C 1 2 N	15/11 Z

(31)優先権主張番号 62/277,289

(32)優先日 平成28年1月11日(2016.1.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/323,023

(32)優先日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ジョーセフ エム・ピーチェム

アメリカ合衆国, オレゴン 9 7 4 0 5, ユージーン, リッジライン ドライブ 4 6

(72)発明者 チャールズ ウォーレン

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 3 1 0, プレマートン, エネタイ ビーチ ドライブ 2 2 8
0

(72)発明者 クリス メリット

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 2 5, シアトル, ノース イースト ワンハンドレッド ア
ンド トゥエンティフィフス ストリート 1 0 2 1, ユニット エー

(72)発明者 チェミョン チョン

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 0 6, ベルビュー, サウス イースト フィフティファース
ト プレイス 1 4 0 1 0

(72)発明者 ドウェイン エル・ダナウェイ

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, ノース イースト ナインティフォース
ストリート 2 7 5 1

(72)発明者 スコット クラウダー

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 5 3 0
, スイート 2 0 0 0, シーノオー ナノストリング テクノロジーズ, インコーポレイティド

(72)発明者 クリスティナ ソル

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 0 3, シアトル, ノース フォーティセカンド ストリート
3 0 0, アpartment 1

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 特表2008-542783(JP, A)

国際公開第2015/128272(WO, A2)

Science Translational Medicine , 2014年 , Vol.6, Issue 219, 219ra9

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/00 - 3/00

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)