



(12)

Veröffentlichung der Patentansprüche

der europäischen Patentanmeldung mit der
(97) Veröffentlichungsnummer: **EP 2 861 986**
in deutscher Übersetzung (Art. II § 2 Abs. 1 IntPatÜG)
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP2013/062405**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **13 73 1071.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2013/186374**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.12.2013**
(97) Veröffentlichungstag
der europäischen Anmeldung: **22.04.2015**
(46) Veröffentlichungstag der Patentansprüche
in deutscher Übersetzung: **18.08.2016**

(51) Int Cl.: **G01N 33/50 (2006.01)**
G01N 33/574 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
PCT/IB2012/001446 14.06.2012 WO

(74) Vertreter:
**Graf von Stosch Patentanwaltsgeellschaft mbH,
80538 München, DE**

(71) Anmelder:
**Assistance Publique Hôpitaux De Paris,
Paris, FR; Institut National de la Santé et de
la Recherche Médicale (INSERM), Paris, FR;
Université Paris Descartes, Paris, FR**

(72) Erfinder:
**GALON, Jérôme, F-75006 Paris, FR; MLECNIK,
Bernhard, F-75006 Paris, FR; PAGÈS, Franck, F-
75006 Paris, FR**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Quantifizierung von Immunzellen in Tumorgewebe und dessen Anwendungen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Bestimmung einer Anzahl oder Dichte von Immunzellen in tumorösen Geweben, umfassend die Schritte bestehend aus dem:
a. Bereitstellen eines oder mehrerer immungefärbter Gewebschnitte, die durch ein automatisiertes Objektträger-Färbesystem unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch an Antigene (Marker) binden, die von Immunzellen exprimiert werden, erhalten wurden,
b. Digitalisieren der Objektträger von Schritt a. durch hochauflösende Scanerfassung, wobei ein hochauflösendes (4,6 µm/Pixel oder besser) digitales Bild des zu analysierenden Objektträgers erhalten wird,
c. Detektieren des Gewebeschnitts auf dem digitalen Bild,
d. Analysieren des Gewebeschnitts zum Definieren (i) eines Tumors (CT) und (ii) eines invasiven Grenzbereichs („invasive margin“) des Tumors (IM),
e. Bereitstellen eines Größenreferenz-Gitternetzes mit gleichmäßig verteilten Einheiten, welche die gleiche Oberfläche aufweisen, wobei das Gitternetz an die Größe des zu analysierenden Tumors angepasst ist,
e1. Überprüfen der Qualität der Immunfärbung,
f. Detektieren und Quantifizieren gefärbter Zellen jeder Einheit, wobei die Anzahl oder die Dichte der gefärbten Immunzellen jeder Einheit bestimmt wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung einer Anzahl oder Dichte von Immunzellen in tumorösen Geweben, umfassend die Schritte bestehend aus dem:

a. Bereitstellen eines oder mehrerer immungefärbter Gewebebeschnitte, die durch ein automatisiertes Objekträger-Färbesystem unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch an Antigene (Marker) binden, die von Immunzellen exprimiert werden, erhalten wurden,

b. Digitalisieren der Objekträger von Schritt a. durch hochauflösende Scalerfassung, wobei ein hochaufgelöstes (4,6 µm/Pixel oder besser) digitales Bild des zu analysierenden Objekträgers erhalten wird,

c. Detektieren des Gewebebeschnitts auf dem digitalen Bild,

d. Analysieren des Gewebebeschnitts zum Definieren (i) eines Tumors (CT) und (ii) eines invasiven Grenzbereichs („invasive margin“) des Tumors (IM),

e. Bereitstellen eines Größenreferenz-Gitternetzes mit gleichmäßig verteilten Einheiten, welche die gleiche Oberfläche aufweisen, wobei das Gitternetz an die Größe des zu analysierenden Tumors angepasst ist,

e1. Überprüfen der Qualität der Immunfärbung,

f. Detektieren und Quantifizieren gefärbter Zellen jeder Einheit, wobei die Anzahl oder die Dichte der gefärbten Immunzellen jeder Einheit bestimmt wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Detektieren und das Quantifizieren gefärbter Zellen jeder Einheit separat in dem Tumor (CT) und dem invasiven Grenzbereich des Tumors (IM) durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei kein Größenreferenz-Gitternetz bereitgestellt wird.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Antikörper ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, die spezifisch für CD3-, CD4-, CD8-, CD20-, CD45RO- oder GZMB-Marker sind.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei zwei oder drei Antikörper, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den folgenden Kombinationen: CD3 + CD8, CD3 + CD45RO, CD3 + CD20, CD3 + GZMB, CD8 + CD20, CD8 + GZMB, CD8 + CD45 RO, CD20 + GZMB, CD20 + CD45RO, GZMB + CD 45RO, CD4 + CD8, CD4 + CD45RO, CD4 + GZMB, CD4 + CD20 und allen Kombinationen von drei Markern von CD3-, CD8-, CD20-, CD45RO-, CD4- und GZMB-Markern, verwendet werden.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei ein IHC-Automat zur Durchführung von Schritt a) eingesetzt wird.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Analyse des Gewebebeschnitts zum Definieren der Grenzen (i) des Tumors (CT) und (ii) des invasiven Grenzbereichs des Tumors (IM) durch geeignete Software durchgeführt wird.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1, 2 und 4 bis 7, wobei hexagonale, quadratische oder rechteckige Einheiten mit einer Oberfläche von $10\ 10^{-9}\ m^2$ bis $1000\ 10^{-9}\ m^2$ verwendet werden.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die bestimmte Anzahl oder Dichte gefärbter Immunzellen jeder Einheit aus Werten der Gruppe A ausgewählt ist:

- maximale Anzahl gefärbter Zellen
- maximale Dichte gefärbter Zellen
- Summe der Anzahl gefärbter Zellen
- Summe der Oberfläche gefärbter Zellen
- Summe der Dichten gefärbter Zellen
- durchschnittliche Anzahl gefärbter Zellen
- durchschnittliche Dichte gefärbter Zellen
- maximale Anzahl gefärbter Zellen
- Medianwert der Anzahl gefärbter Zellen.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1, 2 und 4 bis 9, weiterhin umfassend das Detektieren von Zellen oder Einheiten gemäß einem Kriterium der Gruppe B, bestehend aus:

- einzelne gefärbte Zellen
- gefärbte Zellen in Clustern, welche wenigstens drei gefärbte Zellen enthalten
- einzelne gefärbte Zellen oder Cluster, welche wenigstens drei gefärbte Zellen enthalten
- sämtliche gefärbte Zellen
- am meisten gefärbte Einheiten
- willkürliche Einheiten.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, weiterhin umfassend einen Schritt des Einteilens von Patienten in Gruppen gemäß ihrem erwarteten Überleben oder ihrem Ansprechen auf eine Krebsbehandlung.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei der Wert der Anzahl oder der Dichte von Immunzellen für einen bestimmten Marker mit einem vorbestimmten Referenzwert für diesen Marker verglichen wird, wobei der vorbestimmte Referenzwert mit einer spezifischen Prognose des Verlaufs der Krebserkrankung und/oder des Überlebens des Patienten und/oder des Ansprechens auf eine Krebsbehandlung korreliert ist.

Es folgen keine Zeichnungen