



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2014102672/08, 27.07.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

28.07.2011 SE 1150724-1;

28.07.2011 US 61/512,617

(43) Дата публикации заявки: 10.09.2015 Бюл. № 25

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 28.02.2014

(86) Заявка РСТ:

SE 2012/050851 (27.07.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2013/015740 (31.01.2013)

Адрес для переписки:

191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(71) Заявитель(и):

МЕДЕТЕКТ АБ (SE)

(72) Автор(ы):

ЭРЙЕФЕЛЬТ Йонас (SE)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЙ СРЕЗА ТКАНИ**(57) Формула изобретения**

1. Способ различения зон в серии из N первичных цифровых изображений, где N является целым числом >1 , тем самым создавая новое изображение, причем указанный способ включает этапы:

а) получения серии из N первичных цифровых изображений (221), содержащих неопределенные маркерные зоны, причем изображение I_{n+1} содержит, по меньшей мере, такое же количество неопределенных маркерных зон, как и первичное цифровое изображение I_n при $2 \leq n \leq N$, где n - целое число;

б) оценивания (211, 222, 310) каждого первичного цифрового изображения I_n для $1 \leq n \leq N$ согласно заданным критериям выбора и определения маркерных зон изображения как неопределенных маркерных зон, удовлетворяющих заданным критериям выбора, и сохранения информации (311) о любой такой маркерной зоне изображения в полученном в результате соответствующем вторичном цифровом изображении или в связи с/в соответствии с ним, тем самым получая серию из N вторичных цифровых изображений;

с) получения (223) нового изображения I_{new} ;

д) для каждого n при $2 \leq n \leq N$ серии вторичных цифровых изображений, полученных при выполнении этапа б), введения маркерных зон нового изображения в новое изображение I_{new} , причем указанные маркерные зоны нового изображения имеют такую

A
2
2
6
9
2
0
1
4
1
0
1
0
2
R
U

R
U
2
0
1
4
1
0
2
6
7
2
A

же форму и местоположение, как и маркерные зоны изображения, присутствующие в изображении I_n , но не в изображении I_{n-1} , и указанные маркерные зоны нового изображения могут быть идентифицированы в I_{new} по характерному признаку;

е) введения (212, 224) маркерных зон нового изображения в новое изображение I_{new} , причем указанные маркерные зоны нового изображения имеют такую же форму и местоположение, как и маркерные зоны изображения, присутствующие в изображении I_1 , и указанные маркерные зоны изображения могут быть идентифицированы в I_{new} по характерному признаку.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что этап получения нового изображения I_{new} включает получение изображения образца ткани.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что новое изображение I_{new} является копией одного из изображений в указанной серии изображений.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный характерный признак на этапах д) и е) представляет собой признак, который имеет характерное значение для каждого n при $1 < n < N$.

5. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный характерный признак представляет собой преобладающий цвет, и указанное характерное значение представляет собой конкретный цвет, ассоциированный с определенным клеточным маркером.

6. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что заданные критерии выбора включают порог для визуального свойства неопределенной маркерной области.

7. Способ визуализации популяций клеток в гистологическом срезе ткани, причем указанный способ включает этапы:

а) получения (811) среза ткани, который подготовлен для молекулярного окрашивания ранее известным способом;

б) получения (812) серии из K определенных молекулярных средств обнаружения для обеспечения специфического связывания с элементами заданных серий из K клеточных маркеров, которые могут присутствовать в срезе ткани по этапу а), и их обнаружения, причем указанные определенные молекулярные средства обнаружения способны вызывать формирование иницируемой и выявляемой ответной реакции, причем K - целое число > 2 ;

с) для каждого определенного молекулярного средства обнаружения $k=1, 2, \dots, K$ по этапу б) выполнения следующей последовательности операций:

1) приведение указанного среза ткани по этапу а) в соприкосновение (813) с указанным определенным молекулярным средством обнаружения с обеспечением в результате специфического связывания с определенным элементом указанной заданной серии клеточных маркеров;

2) промывание (814) указанного среза ткани для того, чтобы удалить молекулярные средства обнаружения, которые не связаны ни с каким клеточным маркером;

3) иницирование ответной реакции (815) от молекулярных средств обнаружения, которые могут быть связаны с клеточными маркерами среза ткани, тем самым позволяя выявить указанные молекулярные средства обнаружения; и

4) когда могут быть выявлены указанные молекулярные средства обнаружения, осуществление сканирования/визуализации (817) среза ткани для того, чтобы создать первичное цифровое изображение I_k , которое может содержать одну или несколько неопределенных маркерных зон, ассоциированных с образованием выявляемого полимера;

при этом получение серии из K первичных цифровых изображений I_k при $k=1, \dots, K$,

содержащих возрастающее количество неопределенных маркерных зон;

d) осуществления способа по п.1 на серии из K первичных цифровых изображений I_k при $k=1, \dots, K$, полученных при выполнении этапа с), тем самым создавая изображение I_{new} , визуализирующее указанные клеточные структуры.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанные молекулярные средства обнаружения представляют собой группу антител, предпочтительно моноклональных антител или фрагментов антител, при этом каждое антитело связывается с конкретным клеточным маркером, и при этом с каждым антителом конъюгирован фермент, причем указанный фермент обладает способностью вызывать образование выявляемого полимера в присутствии одного или нескольких подходящих субстратов,

при этом операции 1) и 2) этапа с) выполняют таким образом, что:

i) срез ткани по этапу а) вводят в соприкосновение с антителом, которое специфически связывается с определенным элементом указанной заданной серии клеточных маркеров; причем указанное антитело конъюгировано с ферментом, указанный фермент обладает способностью вызывать образование выявляемого полимера в присутствии одного или нескольких подходящих субстратов;

ii) после выполнения этапа i), описанного выше, промывают срез ткани для того, чтобы удалить несвязанные антитела; и

при этом операцию 3) этапа с) выполняют таким образом, что:

iii) после выполнения операции 2) воздействуют на срез ткани одним или несколькими подходящими для указанного фермента субстратами с образованием в результате выявляемых полимеров в случае присутствия в указанном срезе ткани указанного определенного элемента указанной заданной серии клеточных маркеров.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанные молекулярные средства обнаружения представляют собой группу молекулярных комплексов, в которой каждый комплекс содержит первое антитело, предпочтительно моноклональное антитело, связывающееся с конкретным клеточным маркером, второе антитело или фрагмент антитела, предпочтительно моноклональное антитело, специфически связанное с указанным первым антителом, и фермент, конъюгированный с указанным вторым антителом, причем указанный фермент обладает способностью вызывать образование выявляемого полимера в присутствии одного или нескольких подходящих субстратов,

при этом операции 1) и 2) этапа с) выполняют таким образом, что:

i) срез ткани по этапу а) вводят в соприкосновение с первым антителом, специфически связывающимся с определенным элементом указанной определенной серии клеточных маркеров;

ii) после выполнения этапа i), описанного выше, промывают срез ткани для того, чтобы удалить несвязанные антитела;

iii) после выполнения этапа ii), описанного выше, вводят срез ткани в соприкосновение со вторым антителом, специфически связывающимся с указанным первым антителом, причем указанное второе антитело конъюгировано с ферментом, указанный фермент обладает способностью вызывать образование выявляемого полимера в присутствии одного или нескольких подходящих субстратов; и

iv) после выполнения этапа iii), описанного выше, промывают срез ткани для того, чтобы удалить несвязанные антитела; и

при этом операцию 3) этапа с) выполняют таким образом, что:

v) после выполнения операции 2) воздействуют на срез ткани одним или несколькими подходящими для указанного фермента субстратами с образованием в результате выявляемых полимеров в случае присутствия в указанном срезе ткани указанного определенного элемента указанной заданной серии клеточных маркеров.

10. Способ по п.8 или 9, отличающийся тем, что указанный фермент выбирают из

группы, состоящей из щелочной фосфатазы и пероксидазы, такой как пероксидаза хрена.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что указанный субстрат выбирают из группы, состоящей из 3,3'-диаминобензидина, Ferangi Blue, Vulcan Fast Red, аминоэтилкарбазола (АЕС) и Vina green.

12. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанные молекулярные средства обнаружения представляют собой группу молекулярных конъюгатов, содержащих распознающую часть, связанную с индикаторной частью, причем указанная распознающая часть обладает способностью специфически связываться с определенным элементом указанной заданной серии клеточных маркеров, указанную распознающую часть выбирают из группы, состоящей из антитела, такого как поликлональное антитело, моноклональное антитело и их фрагменты, и молекулы нуклеиновой кислоты, такой как молекула РНК и молекула ДНК, при этом указанная индикаторная часть представляет собой флуорохром, указанный флуорохром обладает способностью испускать излучение с определенной длиной волны после воздействия на него иницирующим излучением, отличающимся от указанного испускаемого излучения,

при этом операцию 3) этапа с) выполняют таким образом, что срез ткани и любое молекулярное средство обнаружения, которое с ним связано, подвергают действию иницирующего излучения, что вызывает испускание излучения с определенной длиной волны при наличии в указанном срезе ткани указанного определенного элемента указанной заданной серии клеточных маркеров; и

при этом выполняют операцию 4) этапа с) тогда, когда испускается указанное излучение с определенной длиной волны.

13. Способ по любому из пп.8, 9 или 12, отличающийся тем, что субстрат, из которого образуются по меньшей мере частично растворимые полимеры, такие как Vina green или аминоэтилкарбазол (АЕС), применяют в качестве субстрата для получения выявляемого полимера, причем способ дополнительно включает этапы:

е) промывания указанного среза ткани для того, чтобы удалить указанный выявляемый полимер; и

ф) повторения этапов b-d с новой серией молекулярных средств обнаружения.

14. Способ визуализации трехмерного распределения нескольких популяций клеток и клеточных структур в пределах одного и того же трехмерного пространства в образце для гистологического исследования, включающий этапы:

iv) получения образца ткани и разрезание указанного образца на ряд первоначально наложенных друг на друга срезов ткани ранее известным способом;

v) осуществления способа по любому из пп.7-13 для всех срезов ткани, полученных при выполнении этапа i); и

vi) наложения друг на друга изображений, полученных при выполнении этапа ii), согласно известным принципам, тем самым получая трехмерное визуальное отображение трехмерного распределения нескольких клеточных популяций и клеточных структур в пределах одного и того же трехмерного пространства в образце для гистологического исследования.

А
2
2
6
7
2
2
0
1
4
1
0
1
4
1
0
2
6
7
2
А
R
U

RU
2014102672
А