

【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1部門第1区分

【発行日】令和3年11月4日(2021.11.4)

【公表番号】特表2021-502055(P2021-502055A)

【公表日】令和3年1月28日(2021.1.28)

【年通号数】公開・登録公報2021-004

【出願番号】特願2020-514937(P2020-514937)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/04 (2006.01)

C 12 M 1/34 (2006.01)

C 12 M 3/00 (2006.01)

G 01 N 21/64 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/04

C 12 M 1/34 B

C 12 M 3/00 Z

G 01 N 21/64 E

【手続補正書】

【提出日】令和3年9月24日(2021.9.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

1つ以上の期間中に生物学的活性細胞を同定する方法であって、前記方法は、前記1つ以上の期間の各々について、

a. サンプル容器内に含有されるサンプルの複数の蛍光活性画像を生成することであって、前記サンプルが、生物学的活性細胞を含み、前記複数の蛍光活性画像の各画像が、それぞれの複数のピクセル値を含み、各ピクセル値が、画像フレーム内のそれぞれのピクセル位置に対応する、生成することと、

b. 前記複数の蛍光活性画像から蛍光範囲画像を生成することであって、複数の蛍光活性画像から蛍光範囲画像を生成することが、前記蛍光範囲画像について複数のピクセル値を決定することを含み、前記蛍光範囲画像について所与のピクセル値を決定することが、前記複数の蛍光活性画像の各々から、前記画像フレーム内の前記所与のピクセル値のピクセル位置に対応するピクセル位置を有するピクセル値のセットの範囲を決定することを含む、生成することと、

c. 前記蛍光範囲画像に基づいて、対応する期間中の前記サンプル容器内の1つ以上の活性オブジェクトの、前記画像フレームに対する位置を決定することであって、前記1つ以上の活性オブジェクトの各々が、前記対応する期間中に前記サンプル内に存在する少なくとも1つのそれぞれの生物学的活性細胞の一部分である、決定することと、

d. 前記対応する期間中の前記サンプル容器内の前記1つ以上の活性オブジェクトの各活性オブジェクトについて、前記対応する期間にわたる前記1つ以上の活性オブジェクトの各々のそれぞれの時間変化活性レベルを決定することと、

を含む、方法。

【請求項2】

前記工程d.において、各時間変化活性レベルが、前記複数の蛍光活性画像の各々から

、対応する活性オブジェクトの前記決定された位置に近接したピクセル位置を有するピクセル値のセットに基づいて決定される、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

前記1つ以上の期間の特定の期間中に前記サンプル容器内の1つ以上の活性オブジェクトについて決定された前記時間変化活性レベルに基づいて、活性オブジェクトのサブセットを選択することをさらに含み、

前記特定の期間中の前記サンプル容器内の前記1つ以上の活性オブジェクトから特定の活性オブジェクトを選択することが、前記特定の活性オブジェクトについて決定された前記時間変化活性レベルが少なくとも1つのバーストを示すことを決定することを含む、

請求項1又は2に記載の方法。

#### 【請求項4】

前記活性オブジェクトの選択されたサブセットについて決定された前記時間変化活性レベルに基づいて、前記活性オブジェクトの選択されたサブセット内の活性オブジェクトの各ペア間のパターン又は協調度の少なくとも1つを決定することと、

前記活性オブジェクトの選択されたサブセット内の活性オブジェクトの各ペア間の前記決定されたパターン又は協調度の少なくとも1つを表示することと、

をさらに含む、請求項3に記載の方法。

#### 【請求項5】

1つ以上の期間中に生物学的活性細胞を同定する方法であって、前記方法は、前記1つ以上の期間のそれについて：

a. サンプル容器内に含まれるサンプルの複数の蛍光活性画像を生成することであって、前記サンプルが生物学的活性細胞を含み、前記複数の蛍光活性画像の各画像がそれぞれの複数のピクセル値を含み、各ピクセル値がそれぞれ、画像フレーム内のピクセル位置に対応する、生成することと、

b. 対応する期間中の前記サンプル容器内の1つ以上の活性オブジェクトの前記画像フレームに対する位置を決定することであって、前記1つ以上の活性オブジェクトのそれらが、前記対応する期間中の前記サンプル内に存在する少なくとも1つのそれぞれの生物学的活性細胞の部分である、決定することと、

c. 前記対応する期間中の前記サンプル容器内の前記1つ以上の活性オブジェクトのそれについて、前記対応する期間にわたるそれぞれの時間変化活性レベルを決定することと、

d. 前記1つ以上の活性オブジェクトについて決定された前記時間変化活性レベルに基づいて、前記1つ以上の活性オブジェクトから活性オブジェクトのサブセットを選択することであって、前記1つ以上の活性オブジェクトから特定の活性オブジェクトを選択することが、特定の活性オブジェクトについて決定された前記時間変化活性レベルが、少なくとも1つのバーストを示すことを決定する、選択することと、

を含む、方法。

#### 【請求項6】

前記工程c.において、前記1つ以上の活性オブジェクトの前記それぞれの決定された位置に近接したピクセル位置を有する、前記複数の蛍光活性画像の各々からのピクセル値のそれぞれのセットに基づいて、前記対応する期間にわたるそれぞれの時間変化活性レベルを決定する、請求項5に記載の方法。

#### 【請求項7】

前記サンプル容器がインキュベータ内に配置されている、請求項1から6のいずれかに記載の方法。

#### 【請求項8】

特定の期間中の特定の活性オブジェクトの時間変化活性レベルを決定することが、

前記特定の期間中に生成された前記複数の蛍光活性画像の各々から、前記特定の活性オブジェクトの前記決定された位置に近接したピクセル位置を有するピクセル値のセットに基づいて未修正の時間変化活性レベルを決定すること、

前記未修正の時間変化活性レベルに基づいて、前記特定の期間にわたる前記特定の活性オブジェクトの光退色の時間変化レベルを決定することと、

前記特定の期間中の前記特定の活性オブジェクトの前記時間変化活性レベルを、前記未修正の時間変化活性レベルから前記時間変化活性レベルの光退色を除去することによって決定することと、

を含む、請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

(a) 前記1つ以上の期間の第1の期間及び前記1つ以上の期間の最終期間が、24時間よりも長い時間、3日よりも長い時間、30日よりも長い時間で離隔されるか、又は

(b) 前記1つ以上の期間が、指定された割合で経時的に規則的に離間しているか、又は

(c) 前記1つ以上の期間のうちの少なくとも2つ又は3つが、24時間以内に生じる

、  
請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

前記(b)において、前記指定された割合が、1日1回よりも大きい、又は、1日2回よりも大きい、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

(a) 前記1つ以上の期間の第1の期間中に位置する前記活性オブジェクト及び前記1つ以上の期間の異なる期間中に位置する活性オブジェクトは、前記サンプル内の前記同じ生物学的活性細胞の部分である、及び/又は

(b) 前記1つ以上の期間の特定の期間中に前記サンプル容器内の前記1つ以上の活性オブジェクトについて決定された前記時間変化活性レベルに基づいて、前記特定の期間中の前記サンプル容器内の活性オブジェクトの各ペア間のパターン又は協調度の少なくとも1つを決定することと、前記特定の期間中に、前記サンプル容器内の活性オブジェクトの各ペア間のパターン又は協調度のうちの前記決定された少なくとも1つを表示することと、をさらに含む、及び/又は

前記生物学的活性細胞が、ニューロン、平滑筋細胞、横紋筋細胞、心筋細胞、又は分泌細胞の少なくとも1つを含む、

請求項1から10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

前記サンプル容器内の前記1つ以上の活性オブジェクトの前記画像フレームに対する位置を決定することが、前記ピクセル位置の1つ以上のセットを決定することを含み、各セットが、前記1つ以上の活性オブジェクトのそれぞれの活性オブジェクトの前記画像フレーム内の範囲に対応する、請求項1から11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記1つ以上の期間の特定の期間中に特定の活性オブジェクトの時間変化活性レベルを決定することが、前記特定の活性オブジェクトに対応する前記決定されたピクセル位置のセットに対応する、前記特定の期間にわたるピクセル値の総活性レベルを決定することを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記1つ以上の期間の特定の期間についての複数の蛍光画像を生成することが、顕微鏡を操作して前記複数の蛍光活性画像を生成することを含み、

当該方法は、

前記特定の期間についての前記複数の蛍光画像を生成する前に、前記顕微鏡が前記特定の期間についての前記サンプルの前記複数の蛍光活性画像を生成できるように、作動したガントリを操作して前記サンプル容器に対して前記顕微鏡を配置することをさらに含む、

請求項1から13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

前記1つ以上の期間の特定の期間に対応する特定の複数の蛍光活性画像の各蛍光活性画

像において表されるサンプルのそれぞれの光退色度を決定することと、

前記特定の期間の前記蛍光範囲画像を生成する前に、前記特定の複数の蛍光活性画像のそれぞれの前記蛍光活性画像を、前記それぞれの決定された光退色度に従って補正することと、

をさらに含む、

請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

前記生物学的活性細胞が、前記生物学的活性細胞の活性レベルに関連する蛍光特性を有するフルオロフォアを含み、前記サンプルの所定の蛍光活性画像を生成することが、前記フルオロフォアの励起波長で前記サンプルを照明することと、前記フルオロフォアの発光波長で前記サンプルから応答的に発出される光を画像化することと、をさらに含む、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】

前記フルオロフォアが、カルシウム感受性フルオロフォアを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

それぞれの決定された時間変化活性レベルに基づいて、前記1つ以上の期間の少なくとも1つの間の前記オブジェクトの1つ以上のそれぞれの平均強度レベルを決定することをさらに含み、及び／又は

それぞれの決定された時間変化活性レベルに基づいて、前記1つ以上の期間の少なくとも1つの間の前記オブジェクトの1つ以上のそれぞれの平均バースト割合を決定することをさらに含む、

請求項 1 から 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 9】

細胞培養容器の動画をキャプチャすることと、

前記動画から静的な範囲画像を生成することと、

を含み、

前記範囲画像が、完全なスキャン期間にわたって、各ピクセル位置において、最大蛍光強度から減算された最小蛍光強度を表すピクセルで構成される、

方法。

【請求項 2 0】

(a) 前記範囲画像をセグメント化することによって、オブジェクトを定義することをさらに含み、及び／又は

(b) 前記オブジェクトから、前記完全なスキャン期間からすべてのオブジェクトの各バーストの強度を導出することをさらに含む、

請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 (a) において、

前記オブジェクトから、前記完全なスキャン期間からの平均オブジェクト平均強度を導出することと、

前記オブジェクトから、前記完全なスキャン期間にわたるすべてのオブジェクトトレースのペアワイズ相関分析を導出することと、

前記オブジェクトから、前記完全なスキャン期間からすべてのオブジェクトの平均バースト持続時間の平均を導出することと、

の一又は複数をさらに含む、

請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 (b) において、前記完全なスキャン期間からのすべてのオブジェクトの平均バースト強度の平均として、全般的なバースト強度メトリックを導出することをさらに含む、

請求項 2 0 に記載の方法。

**【請求項 2 3】**

非一時的コンピュータ可読媒体であって、コンピューティングデバイスの1つ以上のプロセッサによって実行される場合、前記コンピューティングデバイスに、請求項1から2のいずれかに記載の方法を実行するコンピュータ操作を実行させる、少なくともコンピュータ可読命令を格納するように構成されている、非一時的コンピュータ可読媒体。

**【請求項 2 4】**

システムであって、

1つ以上のプロセッサと、

非一時的コンピュータ可読媒体であって、前記1つ以上のプロセッサによって実行される場合、前記システムに、請求項1から22のいずれかに記載の方法を実行させる、少なくともコンピュータ可読命令を格納するように構成されている非一時的コンピュータ可読媒体と、を備える、システム。