

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-509870

(P2005-509870A)

(43) 公表日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	Z N A M 4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00	GO 1 N 33/53	D 4 B O 2 9
C 1 2 N 15/09	C 1 2 M 1/00	A 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-545834 (P2003-545834)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌイー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成14年11月20日(2002.11.20)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月20日(2004.5.20)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/037054	(72) 発明者	フランツ, グレッチェン アメリカ合衆国 カリフォルニア 941 27, サン フランシスコ, サン ベ ニト ウェイ 135
(87) 国際公開番号	W02003/044213		
(87) 国際公開日	平成15年5月30日(2003.5.30)		
(31) 優先権主張番号	60/332, 293		
(32) 優先日	平成13年11月20日(2001.11.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/332, 635		
(32) 優先日	平成13年11月21日(2001.11.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/355, 205		
(32) 優先日	平成14年2月7日(2002.2.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞及び組織アレイ及びマイクロアレイと使用方法

(57) 【要約】

本発明は、生物学的アレイ、生物学的マイクロアレイ、及び生物学的試料中の生物学的分子の量及び/又は存在を検出するためのアッセイ及びマイクロアレイを使用する方法に関する。本発明の生物学的アレイは、複数のウェルがそこに配設された固化され、切片化可能な基質と複数のウェル内に配設された一又は複数の生物学的試料とを含み、生物学的アレイは場合によっては内部標準調製物及び/又は配向マーカーを含む。生物学的アレイの切片又はスライスは平坦な基体表面に取り付けられて本発明の細胞マイクロアレイを形成する。本発明の他の細胞マイクロアレイにおいては、基質材料は、基体表面に細胞生物学的材料を残すマイクロアレイから除去可能な温度感受性材料である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アレシピエントブロックの製造方法において、

複数のピンを有するレイヤーを、埋め込みモールドと流動性温度感受性基質に、基質とピンが埋め込みモールド内に含まれるように係合させ、ここで埋め込みモールドは底面を有し；

埋め込みモールド内の基質を凍結させて基質を固化させ；

基質と埋め込みモールドからレイヤーピンを除去して、固体温度感受性基質内に配設された複数のウェルを形成する、方法。

【請求項 2】

レイヤーが複数のピンが突出する本体を更に有し、該複数のピンの各々が本体に固定された第一端と第一端の反対の自由端を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

係合工程が、ピンの各々の自由端がモールドの底面に接触するように埋め込みモールド内にレイヤーピンを十分に挿入する工程を更に具備する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

複数のピンの各々の自由端が先細になって尖状部を形成している、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

複数のピンの各々の自由端が針部を有している、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

ピンの各々の自由端がモールドの底面に接触しないように埋め込みモールド内にレイヤーピンを不十分に挿入する工程を更に具備する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

温度感受性基質が樹脂-ポリビニルアルコール及びポリエチレングリコールを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

係合工程が、レイヤーピンに潤滑物質を被覆することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

潤滑物質が、グリセロール、脂肪酸、油、グリース、脂肪、又は石鹼からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

凍結工程が、埋め込みモールド、流動性温度感受性基質、及びレイヤーピンを環境に接触させる工程を含み、環境の温度が温度感受性基質の凍結温度より低い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

環境の温度が、温度感受性基質の凍結温度より少なくとも 3℃、少なくとも 5℃ 又は少なくとも 10℃ 低い、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

環境が液状イソペンタンである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

イソペンタンが約 160℃ の温度を有している、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

温度感受性基質の凍結温度が、約 -10℃ から約 -50℃、約 -20℃ から約 -50℃、約 -20℃ から約 -35℃、約 -35℃ から約 -50℃、約 -10℃ から約 -35℃、又は約 -10℃ から約 -20℃ の範囲にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

温度感受性基質が最適切断温度材料 (OCT) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

複数のウェルが配設された温度感受性材料製の凍結基質と、
複数のウェル内に配設され、ウェルを囲む凍結基質によって保持された一又は複数の生物学的試料を具備し、温度感受性材料の凍結温度が生物学的試料の凍結温度よりも低い、生物学的アレイ。

【請求項 17】

温度感受性材料が樹脂-ポリビニルアルコール及びポリエチレングリコールを含む、請求項 16 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 18】

温度感受性基質材料が OCT である、請求項 16 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 19】

5 ウェル / cm^2 より多くを更に含む、請求項 16 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 20】

ウェルの一又は複数の断面直径が、約 0.4 mm から約 1.2 mm、約 0.4 mm から約 0.7 mm、又は約 0.8 mm から約 1.2 mm の範囲にある、請求項 19 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 21】

生物学的試料の一又は複数が細胞を含む、請求項 16 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 22】

細胞が、正常細胞、異常細胞、及び処置細胞からなる群から選択される、請求項 21 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 23】

生物学的試料の一又は複数が細胞懸濁液を含むか又は組織を含む、請求項 21 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 24】

組織が、血液、筋肉、神経、脳、乳房、前立腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、子宮、毛包、皮膚、骨、膀胱、及び脊髄からなる群から選択される、請求項 23 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 25】

組織が、正常組織、異常組織、及び癌細胞を含む組織からなる群から選択される、請求項 23 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 26】

組織が、成体生物及び成体前発達段階の生物からなる群から選択される生物由来のものである、請求項 25 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 27】

複数のウェル内に配設された一又は複数の内部標準調製物を更に含み、ここで内部標準調製物が、埋め込み材料と混合された標準分子を含み、埋め込み材料が少なくとも一の物理的又は化学的性質について基質材料と異なる、請求項 16 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 28】

標準分子が、ポリヌクレオチド、RNA 分子、DNA 分子、及びポリペプチドからなる群から選択される、請求項 27 に記載のアレイ。

【請求項 29】

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なった標準分子を更に含む、請求項 27 に記載のアレイ。

【請求項 30】

標準分子の一つがポリヌクレオチドであり、標準分子の一つがポリペプチドである、請求項 29 に記載のアレイ。

【請求項 31】

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なったポリヌクレオチドを含む、請求項 29 に記載のアレイ。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なったポリペプチドを含む、請求項 29 に記載の
アレイ。

【請求項 33】

埋め込み材料がアガロースを含んでなる、請求項 27 に記載のアレイ。

【請求項 34】

埋め込み材料が、約 1% から約 3% アガロース、約 1.5% から約 2.5% アガロース、
又は約 1.8% から約 2.2% アガロース、又は約 2% アガロースの濃度でアガロース
を含む、請求項 33 に記載のアレイ。

【請求項 35】

埋め込み材料が、約 0.5% から約 10% のウシ血清アルブミン (BSA)、約 1% から
約 7% の BSA、約 1% から約 6% の BSA、又は約 1% から約 5% の BSA を更に含
む、請求項 33 に記載のアレイ。

10

【請求項 36】

内部標準調製物が、約 0.5% から約 20% のウシ血清アルブミン (BSA)、約 1% から
約 15% の BSA、約 1% から約 10% の BSA、又は約 1% から約 5% の BSA を
更に含む、請求項 27 に記載のアレイ。

【請求項 37】

二又はそれ以上の内部標準調製物を更に含み、ここで内部標準調製物の少なくとも二が
埋め込み材料に混合された異なった濃度の標準分子を含む、請求項 27 に記載のアレイ。

【請求項 38】

複数のウェルの一又は複数の中にアレイ配向マーカ―を更に含む、請求項 27 に記載の
アレイ。

20

【請求項 39】

内部標準調製物が既知量の標準分子を含む、請求項 27 に記載のアレイ。

【請求項 40】

複数のウェルの各々に潤滑材料が内張されている、請求項 16 に記載のアレイ。

【請求項 41】

潤滑材料が、グリセロール、脂肪酸、油、グリース、脂肪、及び石鹼からなる群から選
択される、請求項 40 に記載のアレイ。

【請求項 42】

生物学的試料用のアレイを製造する装置において、
本体と該本体から突出する複数のピンを有するアレイヤーであって、各ピンが本体に固
定された第一端と第一端の反対の自由端を有するものと、

30

底面を有する埋め込みモールドと、

埋め込みモールド内に収容された温度感受性基質であって、生物学的試料の凍結温度よ
り低い凍結温度を有する温度感受性基質と、
を具備する、装置。

【請求項 43】

温度感受性基質の凍結温度が、生物学的試料の凍結温度より少なくとも 3、少なくと
も 5、又は少なくとも 10 低い、請求項 42 に記載の装置。

40

【請求項 44】

温度感受性基質が樹脂-ポリビニルアルコール及びポリエチレングリコールを含む、請
求項 42 に記載の装置。

【請求項 45】

温度感受性基質が最適切断温度材料 (OCT) である、請求項 44 に記載の装置。

【請求項 46】

アレイ本体が、プレキシグラス、プラスチック、セラミック、ガラス、金属、及び木か
らなる群から選択される剛性材料から形成されている、請求項 42 に記載の装置。

【請求項 47】

アレイヤーが、5ピン/cm² より多く、7ピン/cm² より多く、又は 13ピン/cm²

50

m² より多く含む、請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 4 8】

複数のピンの一又は複数の自由端が先細にされて尖状部が形成されている、請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 4 9】

複数のピンの一又は複数の自由端がピンの直径より小なる直径を有する、請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 5 0】

複数のピンの一又は複数のガラス平滑端を含んでなる、請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 5 1】

ガラス平滑端の自由端がシーラーで閉塞されている、請求項 5 0 に記載の装置。

【請求項 5 2】

針状部がガラス平滑端の自由端内にシーラーから突出する、請求項 5 1 に記載の装置。

【請求項 5 3】

複数のピンの一又は複数の、中実の管腔を含んでなる、請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 5 4】

複数のピンの一又は複数の、中空の管腔を含み、自由端がシールされている、請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 5 5】

複数のピンの一又は複数の、円形断面形状を有する、請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 5 6】

複数のピンの一又は複数の、約 0.4 mm から約 1.2 mm、約 0.4 mm から約 0.7 mm、又は約 0.8 mm から約 1.2 mm の範囲の断面直径を有する、請求項 5 5 に記載の装置。

【請求項 5 7】

複数のウェルが配設された基質と、

複数のウェルの一又は複数の中に収容された一又は複数の生物学的試料と、

複数のウェルの一又は複数内に収容された一又は複数の内部標準調製物を具備し、内部標準調製物が埋め込み材料混合された標準分子を含み、埋め込み材料が少なくとも一の物理的又は化学的性質において基質とは異なる、生物学的アレイ。

【請求項 5 8】

標準分子がポリヌクレオチド、RNA 分子、DNA 分子、及びポリペプチドからなる群から選択される、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 5 9】

標準分子が、Her2 遺伝子又は VEGF 遺伝子の少なくとも 20 の近接ヌクレオチド又はその相補配列を含んでなるポリヌクレオチドである、請求項 5 8 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 0】

標準分子が、レセプター、可溶性レセプター、レセプター細胞外ドメイン (ECD)、レセプターのリガンド結合断片、レセプターリガンド、抗体、抗体の抗原結合断片、抗原、HER2、VEGF、及び HER2 ポリペプチド又は VEGF ポリペプチドの少なくとも 10 の近接アミノ酸を含む断片 HER2 又は VEGF からなる群から選択されるポリペプチドである、請求項 5 8 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 1】

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なった標準分子を更に含む、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 2】

標準分子の一つがポリヌクレオチドであり、標準分子の一つがポリペプチドである、請求項 6 1 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 3】

10

20

30

40

50

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なったポリヌクレオチドを含む、請求項 6 1 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 4】

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なったポリペプチドを含む、請求項 6 1 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 5】

埋め込み材料がアガロースを含んでなる、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 6】

埋め込み材料が、約 1 % から約 3 % アガロース、約 1 . 5 % から約 2 . 5 % アガロース、又は約 1 . 8 % から約 2 . 2 % アガロース、又は約 2 % アガロースの濃度でアガロースを含む、請求項 6 5 に記載の生物学的アレイ。

10

【請求項 6 7】

埋め込み材料が、約 0 . 5 % から約 1 0 % のウシ血清アルブミン (B S A)、約 1 % から約 7 % の B S A、約 1 % から約 6 % の B S A、又は約 1 % から約 5 % の B S A を更に含む、請求項 6 5 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 8】

内部標準調製物が、約 0 . 5 % から約 2 0 % のウシ血清アルブミン (B S A)、約 1 % から約 1 5 % の B S A、約 1 % から約 1 0 % の B S A、又は約 1 % から約 5 % の B S A を更に含む、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 6 9】

試料が組織である、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

20

【請求項 7 0】

組織が、血液、筋肉、神経、脳、乳房、前立腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、子宮、毛包、皮膚、骨、膀胱、及び脊髄からなる群から選択される、請求項 6 9 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 7 1】

組織が、正常組織、異常組織、成体生物由来の組織、及び成体前発達段階の生物由来の組織からなる群から選択される、請求項 6 9 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 7 2】

試料が細胞懸濁液である、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

30

【請求項 7 3】

基質が、パラフィン、ゼラチン、及び最適切断温度材料 (O C T) からなる群から選択される温度感受性材料を含んでなる、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 7 4】

二又はそれ以上の内部標準調製物を更に含み、ここで内部標準調製物の少なくとも二が埋め込み材料に混合された異なった濃度の標準分子を含む、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

【請求項 7 5】

複数のウェルの一又は複数の中にアレイ配向マーカ―を更に含む、請求項 5 7 に記載の生物学的アレイ。

40

【請求項 7 6】

生物学的アレイの製造方法において、

複数のウェルが配設された基質を調製し、

標準分子を埋め込み材料と混合して内部標準調製物を形成し、ここで埋め込み材料は少なくとも一の物理的又は化学的性質において基質とは異なり、

基質内の複数のウェルの一又は複数中に内部標準調製物を挿入し、

基質内の複数のウェルの一又は複数中に試料を挿入することを含む方法。

【請求項 7 7】

基質が、パラフィン、ゼラチン、樹脂-ポリビニルアルコール及びポリエチレングリコールを含む材料、及び最適切断温度材料 (O C T) からなる群から選択される温度感受性

50

材料を含んでなる、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

調製段階が基質中にウェルを形成することを更に含む、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

調製段階が、

複数のピンを、埋め込みモールドと流動性温度感受性基質に、基質とピンが埋め込みモールド内に含まれるように係合させ；

埋め込みモールド内の基質を凍結させて基質を固化させ；

基質と埋め込みモールドからピンを除去して、固体温度感受性基質内に配設された複数のウェルを形成することを、更に含む、請求項 7 6 に記載の方法。

10

【請求項 8 0】

調製段階が、複数のピンを埋め込みモールドと流動性温度感受性基質に係合させる前に複数のピンを潤滑することを更に含む、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

標準分子が、ポリヌクレオチド、RNA 分子、インビトロ転写 RNA 分子、DNA 分子、Her 2 遺伝子又は VEGF 遺伝子の少なくとも 20 の近接ヌクレオチド又はその相補配列を含むポリヌクレオチド、ポリペプチド、及び HER 2 ポリペプチド又は VEGF ポリペプチドの少なくとも 10 の近接アミノ酸を含むポリペプチドからなる群から選択される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 8 2】

混合工程が、埋め込み材料に複数の標準分子を混合して内部標準調製物を形成することを更に含む、請求項 7 6 に記載の方法。

20

【請求項 8 3】

混合工程が、埋め込み材料と、一又は複数のポリヌクレオチド及び一又は複数のポリペプチドを混合して内部標準調製物を形成することを更に含む、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

混合工程が、埋め込み材料と、二又はそれ以上の異なるポリヌクレオチドを混合して内部標準調製物を形成することを更に含む、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

混合工程が、埋め込み材料と、二又はそれ以上の異なるポリペプチドを混合して内部標準調製物を形成することを更に含む、請求項 8 2 に記載の方法。

30

【請求項 8 6】

混合工程が、アガロースと標準分子を混合して内部標準調製物を形成することを含む、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 8 7】

内部標準調製物中のアガロース濃度が、約 1 % から約 3 % アガロース、約 1 . 5 % から約 2 . 5 % アガロース、又は約 1 . 8 % から約 2 . 2 % アガロース、又は約 2 % アガロースである、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

混合工程が、アガロース及びウシ血清アルブミン (BSA) と標準分子を混合して内部標準調製物を形成することを含む、請求項 7 6 に記載の方法。

40

【請求項 8 9】

内部標準調製物中の BSA 濃度が、約 0 . 5 % から約 20 % のウシ血清アルブミン (BSA)、約 1 % から約 15 % の BSA、約 1 % から約 10 % の BSA、又は約 1 % から約 5 % の BSA である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 9 0】

混合工程が、内部標準調製物をモールド中に注入し、内部標準調製物を固化させ、内部標準ドナーブロックを形成することを更に含む、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 9 1】

内部標準調製物の挿入工程が、内部標準ドナーブロックからコアを穿設し、基質中の複

50

数のウェルの一又は複数中にコアを挿入することを含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

内部標準の挿入工程が、基質中の複数のウェルの一又は複数中に内部標準調製物を注入することを含む、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 9 3】

アレイ中の生物学的分子の検出方法において、該方法が、
既知量の生物学的分子を埋め込み材料と混合して、内部標準調製物を提供し、
アレイレシピエントブロックの複数のウェルの一又は複数中に内部標準調製物を挿入し、
ここで、アレイレシピエントブロックは埋め込み材料とは一又は複数の物理的又は化学的性質が異なる基質を含み、

10

アレイレシピエントブロックの複数のウェルの一又は複数中に一又は複数の試料を挿入して、アレイを形成し、

アレイで分析手順を実施し、
内部標準調製物に対する分析手順の結果を試料に対する分析手順の結果と相関付け、試料中の生物学的分子の検出を決定する、方法。

【請求項 9 4】

生物学的分子が、RNA 分子、DNA 分子、及び Her 2 遺伝子の少なくとも 2 0 の近接ヌクレオチド又は VEGF 遺伝子の少なくとも 2 0 の近接ヌクレオチド又はその相補配列を含むポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドである、請求項 9 3 に記載の方法。

20

【請求項 9 5】

生物学的分子がポリペプチドである、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 6】

生物学的分子が、レセプター、可溶性レセプター、レセプター細胞外ドメイン (ECD)、レセプターのリガンド結合断片、レセプターリガンド、抗体、抗体の抗原結合断片、抗原、HER 2、VEGF、及び HER 2 ポリペプチドの少なくとも 1 0 の近接アミノ酸又は VEGF の少なくとも 1 0 の近接アミノ酸を含むポリペプチドからなる群から選択される、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 7】

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なった生物学的分子を更に含む、請求項 9 3 に記載の方法。

30

【請求項 9 8】

生物学的分子の一つがポリヌクレオチドであり、生物学的分子の一つがポリペプチドである、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なったポリヌクレオチドを含む、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

内部標準調製物が二又はそれ以上の異なったポリペプチドを含む、請求項 9 7 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 1】

埋め込み材料がアガロースを含んでなる、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

内部標準中のアガロース濃度が、約 1 % から約 3 % アガロース、約 1 . 5 % から約 2 . 5 % アガロース、又は約 1 . 8 % から約 2 . 2 % アガロース、又は約 2 % アガロースである、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

内部標準調製物がウシ血清アルブミン (BSA) を更に含み、内部標準調製物中の BSA 濃度が、約 0 . 5 % から約 2 0 % のウシ血清アルブミン (BSA)、約 1 % から約 1 5 % の BSA、約 1 % から約 1 0 % の BSA、又は約 1 % から約 5 % の BSA である、請求

50

項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

試料が組織を含んでなる、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

組織が、血液、筋肉、神経、脳、乳房、前立腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、子宮、毛包、皮膚、骨、膀胱、及び脊髄からなる群から選択される、請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

組織が、正常組織、異常組織、成体生物由来の組織、及び成体前発達段階の生物由来の組織からなる群から選択される、請求項 1 0 4 に記載の方法。

10

【請求項 1 0 7】

試料が細胞懸濁液を含んでなる、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

基質が、パラフィン、ゼラチン、樹脂-ポリビニルアルコール及びポリエチレングリコールを含む材料、及び最適切断温度材料 (OCT) からなる群から選択される温度感受性材料を含んでなる、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

分析手順がインサイツハイブリダイゼーションを含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

分析手順が免疫組織化学を含む、請求項 9 3 に記載の方法。

20

【請求項 1 1 1】

分析手順が免疫蛍光を含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

生物学的分子がレセプターであり、分析手順が、リガンドをレセプターに接触させ、リガンドとレセプターの結合を検出することを含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

リガンドが検出可能に標識される、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

生物学的分子がリガンドであり、分析手順が、リガンド結合ポリペプチドをリガンドに接触させ、リガンドとリガンド結合ポリペプチドの結合を検出することを含む、請求項 9 3 に記載の方法。

30

【請求項 1 1 5】

リガンド結合ポリペプチドが、レセプター、レセプターのリガンド結合断片、レセプター ECD、リガンド特異的抗体、抗体のリガンド特異的結合断片からなる群から選択される、請求項 1 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

抗体が抗 HER 2 又は抗 VEGF である、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

リガンド結合ポリペプチドが検出可能に標識される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

分析手順が、検出可能に標識された化合物を生物学的分子に接触させることを含む、請求項 9 3 に記載の方法。

40

【請求項 1 1 9】

検出可能に標識された化合物が、標識されたポリヌクレオチドプローブ又は標識されたポリペプチドからなる群から選択される、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

標識されたポリペプチドが、抗体、モノクローナル抗体、抗体のリガンド結合断片、レセプター、レセプター ECD、レセプターのリガンド結合断片、抗 HER 2 抗体、抗 VEGF 抗体、抗 HER 2 抗体のリガンド結合抗体断片、抗 VEGF 抗体のリガンド結合断片、HER 2 レセプター、VEGF レセプター、HER 2 レセプターのリガンド結合断片、

50

及び VEGF レセプターのリガンド結合断片からなる群から選択される。請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

相関付け工程が、試料に結合した検出可能に標識された化合物の量に対する、内部標準調製物に結合した検出可能に標識された化合物の量を定量することを含む、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 122】

検出可能に標識された化合物が、放射性同位元素、化学発光標識、発光標識、フルオロフォア、発色団、特異的結合タンパク質、抗体、抗体のリガンド結合断片、抗原、レセプター、レセプター ECD、レセプターのリガンド結合断片、レセプターリガンド、ビオチン、及びストレプトアビジンからなる群から選択される標識を含む、請求項 118 に記載の方法。

10

【請求項 123】

複数のピンを有するアレイヤーを、埋め込みモールドと流動性温度感受性基質に、基質とピンが埋め込みモールド内に含まれるように係合させ、ここで埋め込みモールドは底面を有し；

埋め込みモールド内の基質を凍結させて基質を固化させ；

基質と埋め込みモールドからアレイヤーピンを除去して、固体温度感受性基質内に配設された複数のウェルを形成し；

複数のウェル中に二又はそれ以上の生物学的試料を挿入して生物学的試料のアレイを形成し、

20

アレイをスライシングして一又は複数のアレイスライスを形成し、ここで各アレイスライスは生物学的試料のアレイに対応する生物学的試料の横断切片のアレイを有し；

アレイスライスの一又は複数を平坦な基体表面上に取り付け；

プラットフォームから温度感受性基質材料を除去して、生物学的試料の横断切片のマイクロアレイを形成する、

ことを含む方法によって製造された細胞マイクロアレイ。

【請求項 124】

平坦な基体がガラス板である、請求項 123 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 125】

生物学的試料の横断切片密度が少なくとも 5 横断切片 / cm^2 、少なくとも 7 横断切片 / cm^2 、少なくとも 11 横断切片 / cm^2 、少なくとも 13 横断切片 / cm^2 である、請求項 123 に記載のマイクロアレイ。

30

【請求項 126】

生物学的試料の一又は複数が組織である、請求項 123 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 127】

組織が、正常組織、異常組織、処置組織、成体生物由来の組織、及び成体前発達段階の生物由来の組織からなる群から選択される、請求項 126 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 128】

係合工程が潤滑材料でアレイヤーピンをコーティングすることを更に含む、請求項 123 に記載のマイクロアレイ。

40

【請求項 129】

潤滑材料がグリセロール、脂肪酸、油、グリース、脂肪又は石鹼からなる群から選択される、請求項 128 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 130】

複数のウェルが内部に配設された基質を準備し；

標準分子を埋め込み材料と混合して内部標準調製物を形成し、ここで埋め込み材料は基質とは少なくとも一の物理的又は化学的性質が異なり；

基質の複数のウェルの一又は複数中に内部標準調製物を挿入し；

基質の複数のウェルの一又は複数中に生物学的試料を挿入し；

50

アレイをスライシングして一又は複数のアレイスライスを形成し；
アレイスライスの一又は複数を平坦な基体表面上に取り付け；
基体から基質を除去する、
ことを含む方法によって製造された細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 3 1】

生物学的試料が基質内の管中に収容されていない、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

標準分子が、RNA 分子及び DNA 分子からなる群から選択されるポリヌクレオチドである、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

標準分子がポリペプチドである、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

ポリペプチドが、レセプター、リガンド結合レセプター断片、レセプター E C D、レセプターリガンド、抗体、抗原結合抗体断片、抗体抗原、及び酵素からなる群から選択される、請求項 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

生物学的試料が、細胞懸濁液、細胞ペレット、細胞可溶化物、組織、及び凍結組織からなる群から選択される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

基質が、温度感受性基質、樹脂-ポリビニルアルコール及びポリエチレングリコール、最適切断温度 (OCT) 基質、パラフィン、及びゼラチンからなる群から選択される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

埋め込み材料がアガロースを含む、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

平坦面を有する基体と、
上記面上の一又は複数の細胞性生物学的試料を含む細胞マイクロアレイであって、アレイ基質材料を欠く細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 3 9】

生物学的試料が細胞懸濁液、細胞ペレット、細胞可溶化物、組織、及び凍結組織からなる群から選択される、請求項 1 3 8 に記載の細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 4 0】

アレイが、少なくとも 5 試料 / cm^2 、少なくとも 7 試料 / cm^2 、少なくとも 11 試料 / cm^2 、及び少なくとも 13 試料 / cm^2 の密度で生物学的試料の横断切片積を含む、請求項 1 3 8 に記載の細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 4 1】

平坦面を有する基体と、
上記面上の一又は複数の細胞性生物学的試料と、
上記面上の一又は複数の内部標準調製物であって、埋め込み材料に混合された標準分子を含む内部標準調製物と、
を含む細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 4 2】

生物学的試料が細胞懸濁液、細胞ペレット、細胞可溶化物、組織、及び凍結組織からなる群から選択される、請求項 1 4 1 に記載の細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 4 3】

アレイが、少なくとも 5 試料 / cm^2 、少なくとも 7 試料 / cm^2 、少なくとも 11 試料 / cm^2 、及び少なくとも 13 試料 / cm^2 の密度で生物学的試料の横断切片積を含む、請求項 1 4 1 に記載の細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 4 4】

マイクロアレイがアレイ基質材料を欠く、請求項 1 4 1 に記載の細胞マイクロアレイ。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4 5】

表面上の一又は複数の生物学的試料に関連した少なくとも一の既知の位置に配向マーカー試料を更に含む、請求項 1 4 1 に記載の細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 4 6】

配向マーカー試料が、可視可能な染料、標準分子に非特異的に結合する化合物、セルロース、微粒状セルロース、及びペントナイトからなる群から選択される化合物を含む、請求項 1 4 1 に記載の細胞マイクロアレイ。

【請求項 1 4 7】

患者からの生物学的試料中の p 5 3 の少なくとも 2 倍の過剰発現と h M L H 1 の少なくとも 1 . 5 倍の過小発現を定量することによって、患者の結腸直腸癌を診断することを更に含む、請求項 9 3 に記載の方法。 10

【請求項 1 4 8】

生物学的試料中の V E G F の、正常コントロール組織に対する少なくとも 2 倍の過剰発現を定量することによって、患者の癌を診断することを更に含み、ここで、生物学的試料が、血液、筋肉、神経、脳、乳房、前立腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、子宮、毛包、皮膚、骨、膀胱、及び脊髄からなる群から選択される組織である、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

患者の乳房組織試料中の H e r 2 遺伝子又は H E R 2 ポリペプチドの過剰発現を定量することによって、患者の乳癌を診断することを更に含む、請求項 9 3 に記載の方法。 20

【請求項 1 5 0】

癌の治療のための E r b B アンタゴニストに有利に反応すると思われる患者を同定することを更に含み、患者からの組織試料中の腫瘍細胞中における e r b B 遺伝子増幅を検出することを含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

E r b B が H E R 2 であり、E r b B アンタゴニストが抗 H E R 2 抗体又はその H E R 2 結合断片であり、e r b B が H e r 2 遺伝子である、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

抗 H E R 2 抗体が r h u M A b 4 D 5 (ハーセプチン(登録商標))である、請求項 1 5 1 に記載の方法。 30

【請求項 1 5 3】

検出が、H e r 2 遺伝子の少なくとも 2 0 の隣接ヌクレオチド又はその相補配列を含んでなる検出可能に標識されたポリヌクレオチドを試料に接触させることによる、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

コントロール試料での発現に対して、少なくとも 1 . 5 倍の、生物学的試料中の V E G F 遺伝子又は V E G F ポリペプチドの過剰発現を定量することにより、患者の癌を診断することを更に含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

定量工程が、試料中の核酸を、V E G F 遺伝子の少なくとも 2 0 の隣接ヌクレオチド又はその相補配列を含んでなる検出可能に標識されたポリヌクレオチドに接触させることによって V E G F 遺伝子の過剰発現を検出することを含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。 40

【請求項 1 5 6】

定量工程が、試料中の V E G F ポリペプチドを、検出可能に標識された抗 V E G F 抗体又は該抗体の結合断片に接触させることによって V E G F ポリペプチドの過剰発現を検出することを含む、請求項 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

コントロール組織試料での発現に対して、少なくとも 1 . 5 倍の、患者由来の生物学的試料中の V E G F 遺伝子又は H I F - 1 の過剰発現を定量することにより、患者の癌を診断することを更に含む、請求項 9 3 に記載の方法。 50

【請求項 158】

定量工程が、試料中の核酸を、VEGF 遺伝子の少なくとも 20 の隣接ヌクレオチド又はその相補配列を含んでなる検出可能に標識されたポリヌクレオチドに接触させることによって VEGF 遺伝子の過剰発現を検出し、試料中の核酸を、HIF-1 遺伝子の少なくとも 20 の隣接ヌクレオチド又はその相補配列を含んでなる検出可能に標識されたポリヌクレオチドに接触させることによって HIF-1 遺伝子の過剰発現を定量することを含む、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 159】

生物学的試料が、血液、筋肉、神経、脳、乳房、前立腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、子宮、毛包、皮膚、骨、膀胱、及び脊髄からなる群から選択される組織である、請求項 158 に記載の方法。

10

【請求項 160】

生物学的試料が、腎細胞癌を含んでいると疑われる腎臓組織である、請求項 159 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、切片化して、アレイ中の生物学的試料の生物学的性質を比較するのに有用な複数の組成物を作製するのに好適な基質に入れた細胞試料又は組織試料等の複数の生物学的試料のアレイに関する。本発明は更に内部標準を含むアレイ並びに生物学的試料の生物学的性質の比較のためのその複数の組成物の使用に関する。

20

【0002】

(背景)

ヒトゲノム又は他の生物のゲノムの配列決定が最近完了したために、莫大な量の情報が科学社会にもたらされた。この技術に基づいて、バイオテクノロジー及び製薬産業は潜在的な治療用途のための候補分子を同定するための方策を開発した。次の目的は疾患の予測、診断、及び治療に遺伝子データのこの莫大な富を利用することである。しかし、この情報の意味を理解するためには、高効率の分析技術が必要である。

特定のタイプの細胞又は組織に独特な遺伝子又は遺伝子産物を同定するための既知のアプローチ法は一般に制約があり、一つ又は数種の特定の遺伝子配列のみを標的とし、一度に一つの細胞型又は組織型を分析するものである。より最近では、複数の異なった細胞又は組織試料中の遺伝子又は遺伝子産物を同定するための高スループット法が開発されている。かかる高スループット法の一つは細胞又は組織試料のアレイを作製することからなる。アレイを作製するためには、細胞及び/又は組織試料は、パラフィン又はゼラチンのような基質材料から形成された 3 次元の固形アレイレシピエントブロック内のチューブ中に典型的に挿入される。ついで、パラフィンアレイレシピエントブロックを、各スライスが同じ試料アレイを含む一又は複数の薄いスライスに切断する。アレイスライスを顕微鏡のスライドに取り付け、基質を取り除き、細胞試料又は組織試料のスポット又は横断切片のアレイ中に細胞及び/又は組織試料のアレイを残す。組織マイクロアレイとも呼ばれるアレイスライドは様々な分析手順又は分子解析、例えばインサイトハイブリダイゼーション、及び免疫化学手順に有用である。既知のアレイによって複数の異なった細胞又は組織試料の複数の分子分析を効率的な形で行うことが可能になるが、これらのアレイは、特に製造方法において、多くの不具合を有している。

30

40

【0003】

既知のアレイの一つの欠点は、調製中に、例えば細胞懸濁液のような幾つかの試料を、アレイの固形基質内に、ガラス又はプラスチックチューブのような障壁材料で保持しなければならないことである。チューブの存在はアレイのスライス化の邪魔になる。更に、アレイがスライスされるときに、チューブが壊れ、試料を乱す傾向がある。従って、容易にスライスでき、試料の保持にチューブを必要としないアレイを作製する方法及び装置に対

50

して相当な必要性が存在する。

既知のアレイの他の欠点は、アレイのチューブ中に挿入する前に細胞又は組織試料を固定し保存のためのいろいろな取り扱いが必要となることである。固定液は細胞又は組織試料にダメージを与える可能性があり、これが今度はアレイスライドについて実施される分子分析又は分析手順の結果の完全性に影響を与えうる。試料のいろいろな取り扱いが試料にダメージを生じさせる可能性があり、非常に時間を費やす。従って、アレイ中への挿入前に試料のいろいろな取り扱いや化学的処理を必要としないアレイ製造のための方法及び装置に対してかなりの必要性が残っている。

【0004】

また、アレイから得られるデータの定性的及び定量的分析方法を改善することが好ましい。一般に、これらの結果の分析には、典型的には、顕微鏡でアレイスライド上の各スポットを検査し、単一のスライド上のスポットのそれぞれについて結果を定性的に（例えば -、+、又は+/-）記録する人員が必要となる。この手順は時間がかかり、間違いを起こしやすく、非常に限られた定量的情報をもたらす、例えば人の眼で可視できるシグナル強さのレベルに限られる。更に、組織切片中での発現の定量化が望まれる場合、既存の方法では、標準物質を別個に分析することが必要であり、よってその有用性を制限している（Ermer, L.等, Am. J. Path. 158:407-417 (2001)）。従って、アレイスライド上の試料の分子分析結果を解析する効率的な方法に対してかなりの必要性が残っている。また、アレイスライド上の試料の分子分析の結果を定量化するための精確で効率的な手段を提供するかなりの必要性がある。

【0005】

（発明の概要）

この背景下、本発明は上記及び他の問題を解決するためになされた。本発明は一般にアレイ基質と生物学的試料の間の障壁材料の必要性を排除し、試料をアレイで使用する前にそれを化学的に処理する必要性がない、凍結生物学的アレイ及び凍結アレイを作製するための方法及び装置を含む。また、本発明は、凍結されていようとなかろうと、生物学的アレイを含み、アレイ内に収容される生物学的試料の分析に役に立つ内部標準調製物を含むアレイを作成する方法を含む。

一実施態様では、凍結生物学的アレイは、複数のウェルが配設されてなる温度感受性材料から形成された凍結基質と凍結された切片化可能な基質内の複数のウェル内に配設された一又は複数の生物学的試料を含む。一実施態様では、凍結アレイをつくり出すように一又は複数の凍結された生物学的試料を収容可能な凍結アレイレシピエントブロックが次のようにして作製される。複数のピンを有するアレイヤーを、埋め込みモールドと流動性温度感受性基質に、基質とピンが埋め込みモールド内に含まれるように係合させる。他の実施態様では、基質をモールド中に注ぎ、基質を、アレイヤーピンを基質に係合させる前にモールドに係合させる。例えば、一実施態様では、アレイヤーピンは埋め込みモールド内の流動性基質中に挿入される。別法では、アレイヤーピンは、流動性基質をモールドとアレイヤーピンに係合させる前にモールドに係合される。温度感受性基質はピンとモールドに係合される一方、基質が凍結され、流動性基質をアレイヤーピンの周りに固化させる。ピンが基質と埋め込みモールドから除去されると、複数のウェルが凍結された温度感受性基質内に配される。

【0006】

アレイヤーのピンを潤滑材料で被覆すると凍結温度感受性基質からのピンの除去を可能にすることがここに開示される。その結果、本発明の実施態様は、温度感受性基質と凍結を接触させる前に、潤滑材料、例えば限定されるものではないが、グリセロール、脂肪酸、油、グリース、脂肪、又は石鹼でピンを被覆することによって、凍結生物学的アレイを作製する方法を含む。

他の実施態様では、本発明は潤滑材料を裏打ちした複数のウェルを含む凍結アレイを含む。更に他の実施態様では、本発明は潤滑材料で裏打ちされ、生物学的試料、例えば限定されるものではないが、細胞懸濁液、細胞ペレット、細胞可溶化物、組織を含む複数のウ

10

20

30

40

50

エルを含む凍結生物学的アレイを含み、ここで潤滑材料は凍結温度感受性基質と細胞又は組織試料間にウェルを裏打ちする薄膜を形成する。

他の側面では、本発明は、本体と該本体から突出する複数のピンを有するアレイヤーと、温度感受性基質を収容するための埋め込みモールドと、温度感受性基質を含む、アレイレシピエントブロックを作製する装置を含む。本発明によれば、アレイヤー本体は、 $5 \text{ピン}/\text{cm}^2$ より多く、あるいは $7 \text{ピン}/\text{cm}^2$ より多く、またあるいは $13 \text{ピン}/\text{cm}^2$ より多く含む。また、本発明によれば、本発明の生物学的アレイの断面は $5 \text{ウェル}/\text{cm}^2$ より多く、あるいは $7 \text{ウェル}/\text{cm}^2$ より多く、またあるいは $11 \text{ウェル}/\text{cm}^2$ より多く、またあるいは $13 \text{ウェル}/\text{cm}^2$ より多く含む。一実施態様では、ウェルは基質内に等間隔に離間している。他の実施態様では、ウェルの一又は複数の円形断面を有する。更に他の実施態様では、ウェルの一又は複数の約 0.4mm から約 1.2mm 、約 0.4mm から約 0.7mm 、又は約 0.8mm から約 1.2mm の範囲の内径を有する。

10

【0007】

他の側面では、本発明は、凍結アレイレシピエントブロック内の複数のウェル中に一又は複数の生物学的試料を挿入し、凍結アレイを一又は複数の切片にスライスし、顕微鏡スライドのような平坦な基体表面上に切片を取り付け、プラットフォームから基質材料を除去して細胞マイクロアレイを形成することにより作製された細胞マイクロアレイを含む。一実施態様では、生物学的試料は細胞懸濁液であり、凍結アレイの切片は細胞懸濁液試料の横断切片（又はスポット）を含む。他の実施態様では、マイクロアレイの発明は、生物学的アレイの生物学的試料の横断切片（又はスポット）が平坦な表面上のOCTと生物学的試料横断切片の間の潤滑材料の領域によって囲まれている細胞マイクロアレイを含む。本発明によれば、アレイ又はマイクロアレイのスライスは、 $5 \text{横断切片}/\text{cm}^2$ より多く、あるいは $7 \text{横断切片}/\text{cm}^2$ より多く、またあるいは $11 \text{横断切片}/\text{cm}^2$ より多く、またあるいは $13 \text{横断切片}/\text{cm}^2$ より多く含む。更なる実施態様では、生物学的アレイのウェルは、この実施態様に係るマイクロアレイがウェルの裏打ちのそのような潤滑材料がない場合よりも清浄な端を有する生物学的試料横断切片を有するように、ウェルの生物学的試料のスライス化を容易にするピンの除去の後に潤滑材料で裏打ちされる。

20

【0008】

更に他の側面では、本発明は複数のウェルがそこに配設された基質と、ウェルの幾らかの中に収容される試料と、ウェルの幾らかの中に収容される一又は複数の内部標準調製物を含む生物学的アレイを含む。内部標準調製物は、埋め込み材料と混合されて、生物学的分子のような標準分子を含む。埋め込み材料は、アレイ又はマイクロアレイについてなされる加工及び任意の手順中に内部標準調製物がアレイ中とマイクロアレイ基体上に標準分子を保持するように少なくとも一の物理的又は化学的性質において基質とは異なる。内部標準調製物は、ポジティブ又はネガティブコントロールとして作用し、アレイ又はマイクロアレイ中の生物学的分子を検出し定量するのに役立つことによることを含む、多くの形でアレイ又はマイクロアレイで実施される手順の結果を分析するのに役立つ。

30

一実施態様では、内部標準調製物は、これら内部標準調製物を含むアレイで実施されるインサイツハイブリダイゼーションの結果を分析するのに役立つ内部標準調製物を形成するために、BSAを伴うか伴わないでアガロースと混合されて、ポリヌクレオチド、例えばRNA又はDNA分子を含む。一実施態様では、RNA又はDNA分子は一本鎖である。他の実施態様では、ポリヌクレオチドは標準物質中におけるポリヌクレオチドの存在を検出するために使用されるプローブにハイブリダイズする。他の実施態様では、生物学的分子は、内部標準調製物を含むアレイで実施される免疫組織化学手順を分析するのに役立つ内部標準調製物を形成するために、BSAと共に又はBSAなしにアガロースと混合されてポリペプチドを含む。更に他の実施態様では、内部標準調製物は、二又はそれ以上のポリヌクレオチド、二又はそれ以上のポリペプチド、又はその任意の組み合わせを含む、又はそれ以上の生物学的分子を含みうる。

40

【0009】

他の実施態様では、標準配向分子、例えばプローブの染料又は非特異的バインダーを、

50

アレイ又はマイクロアレイ中で配向マーカ―として作用するように、埋め込み材料に混合することができる。

他の側面では、本発明は、生物学的アレイをつくるために、凍結していようとまいと、アレイレシピエントブロック内に複数のウェル中に一又は複数の内部標準調製物を挿入し、アレイを一又は複数の切片にスライスし、顕微鏡スライドのような平坦な基体表面上に切片を取り付け、アレイが凍結アレイである場合は、表面から基質材料を除いて、細胞マイクロアレイを形成することによって形成されるマイクロアレイを含む。ある実施態様では、生物学的試料は細胞懸濁液であり、アレイの切片は細胞懸濁液試料と内部標準調製物の横断切片（又はスポット）を含む。一実施態様では、生物学的試料は組織試料であり、アレイの切片は組織試料と内部標準調製物の横断切片（又はスポット）を含む。

10

他の側面では、本発明は、複数のウェルが内部に配設された基質を準備し、内部標準調製物を形成し、基質の複数のウェルの一又は複数中に内部標準調製物を挿入し、基質の複数のウェルの一又は複数中に生物学的試料を挿入して、細胞アレイを形成することによって作製される細胞マイクロアレイを含む。ついで、細胞アレイは一又は複数のアレイスライスにスライスされ、平坦な基体表面上に取り付けられ、基質が基体から除去される。細胞マイクロアレイは、平坦な表面を持つ基体；表面上の一又は複数の細胞生物学的試料；及び表面上の一又は複数の内部標準調製物を含み、内部標準調製物は埋め込み材料に混合された標準分子を含む。他の実施態様では、細胞マイクロアレイは平坦な表面を含む基体と表面上の一又は複数の細胞生物学的試料を含み、マイクロアレイはアレイ基質材料を欠く。

20

【0010】

他の側面では、本発明は、次のものを含むアレイ又はマイクロアレイ中の生物学的分子を検出する方法を含む。既知量の生物学的分子が内部標準調製物を提供するように埋め込み材料と混合される。内部標準調製物はアレイレシピエントブロック中の一又は複数のウェル中に挿入される。一又は複数の試料はアレイレシピエントブロックのウェル中に挿入され、よってアレイを形成する。分析的手順がアレイで実施され、内部標準調製物に対する分析手順の結果が試料に対する分析手順の結果と相関付けられ、試料中の生物学的分子の検出が決定される。本発明によれば、検出方法の実施態様は、限定されるものではないが、インサイツハイブリダイゼーション、免疫組織化学、リガンドへのレセプター（又はレセプターのリガンド結合断片、例えばECD）の結合が含まれ、かかる結合は、レセプター、リガンド又は第三の分子（例えば抗体）を標識することによって検出され、その第三の分子はレセプター-リガンド複合体に特異的に結合する。本発明の方法によれば、検出は、別法として、検出可能に標識された分子の、対象の生物学的分子との特異的会合（例えば結合又はハイブリダイゼーションによる）を検出することによって達成される。本発明によれば、検出は、例えば限定されるものではないが、ホスフォロイメジャー、蛍光検出装置、写真フィルム、可視光検出器、化学発光検出器、及びCCDカメラのような機器によって実施される。

30

【0011】

他の側面では、本発明は、コントロールの非疾患状態に対する患者の生物学的試料中の疾患状態を検出することを含む。本発明の実施態様には、限定されるものではないが、アレイ中の生物学的分子の、本発明のマイクロアレイ及びマイクロアレイ法を使用する検出が含まれ、ここで、試料中の生物学的分子の量は正常試料の量とは異なる。一実施態様では、生物学的分子は、コントロール組織又は細胞に対して、試料アレイ細胞又は組織中で少なくとも1.5倍過剰発現される。一実施態様では、本発明は、Her2遺伝子の少なくとも20の隣接ヌクレオチド（又はその相補鎖）を含むポリヌクレオチドを本発明の組織マイクロアレイ又は凍結細胞マイクロアレイ中の試料と接触させ、コントロール試料に対するHer2遺伝子の過剰発現を検出することによる、乳房組織試料における癌の検出を含む。他の実施態様では、本発明は、HER2結合剤、例えば抗体又はそのHER2結合断片を本発明の組織アレイ又は凍結細胞アレイ中の生物学的試料と接触させ、コントロール試料に対するHER2タンパク質の過剰発現を検出することによる、乳房組織試料中

40

50

の癌の検出を含む。更に他の実施態様では、本発明は癌治療のために E r b B アンタゴニストに好ましく応答すると思われる患者を同定することを含み、その方法は、ここで上に開示された本発明の組織マイクロアレイ又は細胞マイクロアレイを使用して遺伝子の増幅又はタンパク質の過剰発現を検出することにより患者からの組織試料中の腫瘍細胞の e r b B 遺伝子増幅を検出することを含む。E r b B アンタゴニストに好ましく応答する患者の素質は、その全体が出典明示によりここに取り込まれる 2001年5月18日出願の係属出願第09/863101号に開示されている。

【0012】

更に他の実施態様では、本発明は、V E G F 遺伝子の少なくとも20の隣接ヌクレオチド(又はその相補鎖)を含むポリヌクレオチドを本発明の組織マイクロアレイ又は凍結細胞マイクロアレイ中の試料と接触させ、コントロール試料に対するV E G F 遺伝子の過剰発現を検出することによる、生物学的試料における、癌の検出を含む、V E G F の過剰発現の検出を含む。他の実施態様では、本発明は、V E G F 結合剤、例えば抗体又はそのV E G F 結合断片を本発明の組織アレイ又は凍結細胞アレイ中の生物学的試料と接触させ、コントロール試料に対するV E G F タンパク質の過剰発現を検出することによる、試料中の癌の検出を含む。

これらの特徴及び様々な他の特徴並びに本発明を特徴付ける利点は、実施例と関連図面の参酌を含め、次の詳細な記載を読むと明らかになるであろう。

【0013】

(実施態様の記載)

定義

ここで使用される場合、「成体生物」という用語は十分な成長及び発達に達した生物を意味する。これに対して、生物に適用される「成体前発達段階」は十分な成長及び発達には未だ到達していない生物を意味する。

ここで使用される場合、「アミノ酸」という用語は、グリシン及びD又はL光学異性体の双方、及びアミノ酸アナログ及びペプチド模倣体(peptidomimetics)を含む、天然及び/又は非天然又は合成のアミノ酸の何れかを意味する。

ここで使用される場合、「抗体」と「免疫グロブリン」という用語は同じ構造的特徴を有する糖タンパク質を意味する。抗体は特定の抗原に対して結合特異性を示すものであるが、免疫グロブリンは、抗体と抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系により低レベルで、骨髄腫により増加したレベルで産生される。

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている(Clotheta等(1985) J. Mol. Biol. 186, 651-663; Novotny及びHaber(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4592-4596)。

【0014】

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダ(8)と呼ばれる2つの明確に区別される型に分けることができる。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに分けられる。免疫グロブリンの5つの大きなクラス：I g A、I g D、I g E、I g G 及びI g Mがあり、そのうちの幾つかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、I g G

10

20

30

40

50

-1、IgG-2、IgG-3、及びIgG-4；IgA-1及びIgA-2に更に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、各々、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び3次元立体配置はよく知られている。

「抗体」という用語は最も広義に使用され、単一のモノクローナル抗体（アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を持つ抗体組成物、並びにそれらが所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片（例えば、Fab、F(ab')₂、及びFv）を特に包含する。

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質上均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち集団を構成する個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じうる可能な突然変異を除いて同一である。「モノクローナル」という形容詞は、実質上均一な抗体集団から得られたという抗体の性質を示し、抗体を何らかの特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature 256:495(1975)によって初めて記載されたハイブリドーマ法によって作製することができ、あるいは組換えDNA法（例えば、米国特許第4816567号（Cabilly等）及びMage及びLamoyi (1987) Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, Inc., New Yorkを参照）によって作製することができる。モノクローナル抗体は、例えばMcCafferty等(1990) Nature 348:552-554に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

10

20

【0015】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型とは、特異的キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、あるいはそれらの断片（例えばFv、Fab、F(ab')₂、F(ab)₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。大部分において、ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト（ドナー抗体）のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはFR配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練し、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒトの免疫グロブリンのものを含む。更なる詳細については、その全体を出典明示によりここに取り込む、Jones等(1986) Nature 321:522-525；Reichmann等(1988) Nature 332:323-329；1987年9月30日発行のEP-B-239400；Presta(1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596；及び1996年1月24日発行のEP-B-451216を参照のこと。ヒト化抗体には、抗体の抗原結合領域が、対象の抗原でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来するプリマタイズ(PRIMATIZEDTM)抗体が含まれる。

30

40

【0016】

ここで使用される場合の「抗原」とは抗体、その断片、又はT細胞抗原レセプターが認識し特異的に結合する物質を意味する。抗原には、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖類、脂質、その一部、及びそれらの組み合わせが含まれうる。抗原は天然に見出されうるか、又は合成でありうる。抗原は細胞の表面上に又は細胞の内部に位置して存在しうる。

「アンチセンス」という用語は、核酸の特定の配列配向を指すために使用される。DNA配列配向を指すために使用される場合は、「アンチセンス鎖」は、メッセンジャーRNA(mRNA)の転写の鋳型となるDNA二本鎖のようなDNA鎖を意味する。DNAの

50

「センス鎖」はDNAのアンチセンス鎖に相補的なDNA鎖を意味し、そのセンス鎖はmRNA合成のための鋳型として機能しない。センスDNA鎖とmRNAは、鋳型アンチセンスDNAから合成され、mRNAのウラシル(U)がDNAのチミジン(T)に置換する点を除いて同じヌクレオチド配列を有している。その結果、天然に生じるmRNAの配列配向は、それが転写されるアンチセンスDNAに相補的であり、その配列がセンスDNA鎖の配列に類似しているため、センス配向にあると言われる。一般に、アンチセンスRNAは天然には希にしか生じないが、インサイツハイブリダイゼーション法において使用される典型的な試薬である。

【0017】

「アレイヤー」という用語は、アレイ基質中に一又は複数のウェルを製造し又はつくり出すように設計されたツール、装置又は機器を意味する。組織アレイ及び組織マイクロアレイの調製に有用なアレイヤーの非限定的な例は、アレイヤー装置とその用途に関してその全体が出典明示によりここに取り込まれるLeighton, S.B.の米国特許第6103518号に記載されている。

ここで使用され、ここで更に記載されるところの「生物学的アレイ」という用語は、典型的には組織、細胞懸濁液、又は細胞ペレットのような25から1000以上の個々の生物学的試料を、生物学的試料のコアのパターン(例えばアレイ(列(横列)とカラム(縦列)))として含むパラフィン又は凍結ブロックのような切片化可能なブロックを意味し、各コアは切片化可能なブロック中の特定の格子座標位置に埋め込まれ、各格子座標は、切片化して平坦な基体上に取り付けたときに、各生物学的試料からの材料が分かれ、あらゆる他の生物学的試料の材料から別個に検出可能であるように、あらゆる他の格子座標とは十分に分かれている。本発明によれば、各ウェルの生物学的試料は、ウェルの壁部を形成する他の非基質材料又はチューブによってではなく、ウェルの壁部を形成する固化基質材料によって、ウェル内に収容される。「生物学的アレイ」という用語は、限定するものではないが、ここで定義される「組織アレイ」、「細胞アレイ」、「凍結細胞アレイ」又は「凍結組織アレイ」を含む。

ここで使用されるところの「生物学的分子」という用語は、限定されるものではないが、ポリヌクレオチド、異なった配向(センス又はアンチセンス)又はポリヌクレオチドのスプライシング変異体、ポリペプチド、及び/又はタンパク質の異なったアイソフォーム(完全長又は部分配列)、並びに非ポリマー分子、例えばホルモン、サイトカイン、代謝物、代謝前駆体、研究している生物学的試料を処理するために使用される薬物又は他の薬品、並びにそのような分子の合成形態を含む、生存している生物中に見いだされる分子の本質的に一部又はそれから誘導される任意の有機分子を意味する。

【0018】

ここで使用されるところの「生物学的試料」又は「細胞性生物学的試料」という用語は、細胞集団からの懸濁液又は細胞ペレット又は細胞可溶化物中の全細胞の集団のような、細胞集団の試料を意味し、更に全及び/又は破壊又は溶解細胞を含む組織試料を意味する。細胞又は組織は、限定するものではないが、細菌、酵母、昆虫、鳥、爬虫類、及びヒトを含む任意の哺乳動物を含む、任意の原核又は真核生物から由来しうる。細胞又は組織が哺乳動物である場合、細胞又は組織は、限定されるものではないが、血液、筋肉、神経、脳、乳房、前立腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、子宮、毛包、皮膚、骨、膀胱、及び脊髄を含む、任意の細胞又は組織である。

ここで使用されるところの「細胞ペレット」という用語は、細胞懸濁液を濃縮し、上清を除去し、及び/又は凍結細胞アレイ又はマイクロアレイのような組織試料を調製するために、例えば遠心分離によって、細胞を塊に充填された試料を意味する。

「細胞懸濁液」は細胞が程度の差はあれ液相に均一に分散した試料である。

「コントロール」は比較目的の分析手順において使用される代わりに被検体又は試料である。コントロールは「ポジティブ(陽性)」又は「ネガティブ(陰性)」でありうる。例えば、分析手順の目的が関心のある疾患に罹った細胞又は組織中で差次的に発現された転写物又はポリペプチドを検出することである場合、例えば所望の発現及び/又は所望の発現

の臨床症候群特性を示す被検体又は被検体からの試料のようなポジティブコントロール、及び所望の発現及び/又は所望の発現の臨床症候群特性を欠く被検体又は被検体からの試料のようなネガティブコントロールを含めることが一般に有用である。コントロールは試料中の標的分子を検出し、及び/又はその量を定量するためのここに定義したような標準分子を含んでいてもいなくてもよい。

【0019】

「検出可能に標識された化合物」は、生物学的分子に付着又は結合可能で、生物学的分子について実施される分析手順によって検出され得る標識を有する化合物を意味する。「標識」という用語は、化合物(例えばヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体又はその抗原結合断片、そのレセプター又はリガンド結合断片、レセプター-EC D、抗原、又はレセプターリガンド、ビオチン、アビジン、又はストレプトアビジン)に付着させられた場合、既知の検出手段を使用してそのような化合物を検出することを可能にする部分を意味する。非限定的で例示的な標識には、フルオロフォア、発色団、放射性同位体、スピン標識、酵素標識、化学発光標識、発光標識等々が含まれ、直接検出したり、あるいは標識抗体又はアビジンのような検出可能な抗リガンドに高親和性をもって特異的に結合可能な、抗原又はビオチンのようなリガンド又は適切な検出器によって標識化合物を検出することが可能になる。標識化合物が標識抗体である場合、標識は、「標識」抗体を産生させるように抗体に直接的又は間接的に結合されうる。標識はそれ自体が検出可能であるか(例えば放射性同位元素又は蛍光標識)、あるいは酵素標識の場合には、検出可能である基体化合物又は組成物の化学的変化を触媒しうる。

10

20

試料中のヌクレオチド配列又はポリペプチド配列に対して適用される「差次的に発現」とは、コントロール中に検出されるその発現と比較した場合の、配列の過剰発現又は過小発現を意味する。過小発現はまたコントロールと比較した場合、試料中の検出可能な発現がないことによって証明される特定の配列の発現の不存在をも包含する。

「差次的発現」又は「差次的提示」とは遺伝子産物の発現パターン又は量の変更を意味する。「発現パターン」の変更は組織分布の変化、又は本発明のアレイで確認できるハイブリダイゼーションパターンの変化によって示されうる。

【0020】

「異常細胞」又は「異常組織」という用語は、細胞又は組織において正常細胞又は組織に対して生物学的にネガティブに損なわれている細胞又は組織の状態を意味する。異常状態の例には、限定されるものではないが、癌、炎症、アポトーシス、及び異常遺伝子発現が含まれる。異常細胞又は異常組織は、限定されるものではないが、細菌、酵母、昆虫、鳥、爬虫類及びヒトを含む任意の哺乳動物を含む任意の原核又は真核生物由来のものでありうる。細胞又は組織が哺乳動物である場合、細胞又は組織は、限定されるものではないが、血液、筋肉、神経、脳、乳房、前立腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、子宮、毛包、皮膚、骨、膀胱、及び脊髄を含む、任意の細胞又は組織である。

30

「ドナーブロック」は、例えばここに記載された内部標準調製物のブロック又は凍結組織又はパラフィン包埋組織のブロックを含む、試料がそこからアレイ中に挿入される任意の固体又は半固体物質を意味する。試料又はコアは、限定されるものではないが、Becherアレイ化機器のような典型的なアレイ化機器を使用することを含む、任意の手段によってドナーブロックから取り出されうる。

40

ここで使用されるところの「発現」は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス及び/又は転写されたmRNA(「転写物」とも呼ばれる)が引き続いてペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳されるプロセスを意味する。

【0021】

ここで使用されるところの「埋め込み材料」という用語は、ここに定義される標準分子が、生物学的アレイのウェル中に挿入される前又は挿入中に固化すると、調製物中の標準分子の分布が均一である固体内部標準調製物を形成する埋め込み材料の液化形態中に均一に懸濁され得る任意の材料を意味する。本発明の一実施態様では、液化埋め込み材料の固

50

化は冷却によって生じる。本発明の他の実施態様では、埋め込み材料の固化は、ゲル化を生じる酵素反応によって触媒されない。内部標準調製物の固化埋め込み材料はその後アレイ又はアレイスライドについてなされる、アレイ基質を除去するための手順を含む、加工及び分析手順の間にわたってアレイ又はマイクロアレイ中に標準分子を保持する。埋め込み材料は、限定されるものではないが、アガロース（例えば1 - 4%アガロース）、ウシ血清アルブミン（BSA、例えば1 - 20%BSA）、アガロースとBSAの混合物等々を含みうる。

「流動性」という用語は例えば液体又はソフトゲルのような、自由に流れ又は移動することができる物質の状態を意味するが気体ではない。

ここで使用され、更にここで記載されるところの「凍結細胞アレイ」及び「凍結組織アレイ」という用語は、ウェルが凍結組織又は濃縮細胞懸濁液で満たされ、ウェルがあるパターン、例えば列とカラムの形状に形成されて切片化可能なブロックのアレイを形成する凍結基質材料の切片化可能なブロックを意味する。

「遺伝子」は転写及び翻訳後に特定のタンパク質をコードしうる少なくとも一のオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを意味する。

【0022】

ポリヌクレオチドに適用されるところの「ハイブリダイズ」という用語は、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化される複合体を形成するポリヌクレオチドの能力を意味する。水素結合はWatson-Crick塩基対形成、Hoogsteen結合によって、又は任意の他の配列特異的な形で生じうる。複合体は二本鎖構造を形成する二本鎖、複数本鎖複合体を形成する3本以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズ鎖、又はこれらの任意の組み合わせを含みうる。ハイブリダイゼーション反応は、PCR反応の開始、又はリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断のような、より広範なプロセス中のある段階を構成しうる。ハイブリダイゼーションが2つの一本鎖ポリヌクレオチド間で逆平行配置で生じる場合、反応は「アニーリング」と呼ばれ、そのポリヌクレオチドは「相補的」とであると言われる。二本鎖ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが第1のポリヌクレオチドのストランドの一つと第2のものとの間で生じうるならば、他のポリヌクレオチドに対して「相補的」又は「相同的」でありうる。「相補性」又は「相同性」（一つのポリヌクレオチドが他のものと相補的である度合い）は、一般的に受け入れられている塩基対形成則に従って、互いに水素結合を形成すると期待される対向するストランドにおける塩基の割合によって定量化できる。

「インサイツハイブリダイゼーション」という用語は例えば埋め込み材料に導入される組織又は標準材料の薄い切片におけるような、クローン化細菌又は培養真核細胞中における相補的DNA又はRNA配列の存在を検出するためのプローブの使用を意味する。「インサイツハイブリダイゼーション」は、形態学的に保存された染色体、細胞、組織切片、又は全組織断片中の特異的ポリヌクレオチド配列を検出することを可能にする十分に確立された技術である。免疫組織化学法を組み合わせると、インサイツハイブリダイゼーションは顕微鏡でのトポロジー情報をDNA、mRNA及びタンパク質レベルでの遺伝子活動に関係づけることができる。

【0023】

「内部標準調製物」という用語は、アレイにおいてアレイの分析を補助するために使用される、ここに定義される埋め込み材料と、ここに定義される標準分子の混合物を意味する。例えば、内部標準調製物は生物学的アレイ中の試料中の生物学的分子、例えば生物学的アレイ中のポジティブ又はネガティブコントロール（ここで定義）を検出するため、又はアレイ中の生物学的又は標的分子の定量のために使用することができる。定量が意図される場合は、内部標準物質は既知量又は検出可能な量で調製物中に存在する。

「インビトロ」研究は生存生物の外部で実施されるものである。「インビボ」研究は生存生物内において実施されるものである。

「リガンド」はレセプターのリガンド結合ドメインが結合し得る分子を意味する。その分子は化学的に合成されるか又は天然に生じうる。

10

20

30

40

50

「発光」はその温度の上昇以外の何らかの理由による物質からの光の放出を意味する。一般に、原子又は分子は、「励起状態」から低エネルギー状態（通常、基底状態）まで移動するとき、電磁気エネルギーの光子（例えば、光）を放つ；このプロセスはしばしば「放射減衰」と称される。多くの励起原因が存在する。励起原因が光子である場合、ルミネッセンスプロセスは「光ルミネッセンス」と呼ばれる。励起原因が電子である場合、発光プロセスは「電界発光」と呼ばれる。より詳細には、電界発光は電子-ホール対を形成する電子の直接の注入と除去と、光子を発する電子-ホール対の続く再組み合わせから生じる。化学反応から生じる発光は、通常「化学発光」と呼ばれる。生存生物によって作り出される発光は通常「生物発光」と称される。光ルミネッセンスがスピン許容遷移（例えばシングル-重項遷移、三重項-三重項遷移）の結果である場合、光ルミネッセンスプロセスは通常「蛍光」と呼ばれる。典型的には、そのようなスピン許容遷移を通じて急速に緩和される、短時間で消滅する励起状態の結果、励起源が除かれた後には蛍光発光は持続しない。光ルミネッセンスがスピン禁止遷移（例えば三重項-一重項遷移）の結果である場合、光ルミネッセンスは通常「リン光」と称される。典型的には、そのようなスピン禁止遷移を通じてのみ緩和されうる、長期間続く励起状態の結果、励起源が除かれた後にもリン光発光は持続する。「発光標識」は上述の性質の何れか一つを有しうる。

10

【0024】

「基質」という用語は、生物学的アレイに使用されるブロックを形成するために使用される材料を意味する。「基質材料」はそこに配設されるウェルを備えた固体状態を形成可能な任意の材料であり得るが、しかし「基質材料」は少なくとも一の物理的又は化学的性質において（ここに定義された）埋め込み材料とは異なっていなければならない。アレイをスライスし、アレイスライスを平坦な表面、例えばプラットフォーム又はスライド上に配した後、基質材料は除去されてマイクロアレイが形成される。

20

「マイクロアレイ」、「アレイスライド」、「生物学的マイクロアレイ」及び「細胞マイクロアレイ」という用語は互いに交換可能に使用され、限定されるものではないが、ガラス、プラスチック、金属、シリコンウエハー等々を含むガラス顕微鏡スライド又は他の平坦な剛性表面で、選択されたスクリーニング法と適合性があるもののような、平坦なプラットフォーム又は基部上に取り付けられる生物学的アレイ（ここで定義）の薄い切片を意味する。薄い切片（0.5 - 30 μm 、あるいは5 - 15 μm 、あるいは6 - 12 μm ）は、別個で分離した生物学的試料がプラットフォーム上に分離した試料のパターン（例えば格子又はアレイのような列とカラムのパターン）を形成するように平坦な基部上に取り付けられている。本発明によれば、試料は生物学的アレイのウェル中に細胞又は組織試料を収容するために使用される管又は他の剛性器具又は障壁材料のセクションによって分離されない。マイクロアレイにより、技術者の時間、試薬及び貴重な組織資源の有効利用を最大にしながらかの標本群の検査が可能になる。マイクロアレイは、潜在的な治療的標的の組織発現パターンの迅速で大規模のスクリーニング及び予後及び治療への応答に関連した分子マーカーの研究に使用することができる。

30

ここで使用される「天然に生じる」という用語は物に適用され、物を天然に見出すことができることを意味する。例えば、天然の供給源から単離することができ、研究室の研究者によって意図的には修飾されていない（ウイルスを含む）生物中に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は天然に生じるものである。

40

【0025】

「正常」試料とはここで定義された異常がない組織又は細胞を意味する。ここで使用される「正常細胞」又は「正常組織」という用語は、悪い生物学的状態を持つ異常細胞と比較した場合に悪い生物学的状態を明らかに持たない細胞又は組織の状態を意味する。正常細胞又は正常組織は、限定されるものではないが、細菌、酵母、昆虫、鳥、爬虫類、及びヒトを含む任意の哺乳動物を含む任意の原核又は真核生物からのものでありうる。細胞又は組織が哺乳動物である場合、細胞又は組織は、限定されるものではないが、血液、筋肉、神経、脳、乳房、前立腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、子宮、毛包、皮膚、骨、膀胱、及び脊髄を含む任意の細胞又は組織である。

50

「核酸配列」及び「ポリヌクレオチド」という用語は交換可能に使用される。それらはデオキシリボヌクレオチドでありリボヌクレオチドであり、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態又はその類似体を意味する。ポリヌクレオチドは任意の三次元構造を持ち得、又は知られていようと未知であろうと任意の機能を生じうる。次のものはポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子又は遺伝子断片のコード又は非コード領域、連鎖解析から定まった遺伝子座（遺伝子座群）、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体のような修飾ヌクレオチドを含みうる。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾はポリマーの構築の前又は後に付与されうる。ヌクレオチドの配列には非ヌクレオチド成分が介在しうる。ポリヌクレオチドは重合の後に、例えば標識成分との結合のように、更に修飾されうる。

10

【0026】

「最適切断温度媒体」、「OCT媒体」及び「OCT」という用語はここでは互いに交換可能に使用され、固体の場合（例えば凍結による）、約6ミクロン又はマイクロメートルから約12ミクロン又はマイクロメートルの薄い切片に切断され、その状態で扱われうる化学製剤を意味し、その切片は続いて平坦な平面に取り付けられて、凍結組織マイクロアレイ、又はここで開示したような凍結細胞マイクロアレイを産生する。OCTは一般に樹脂-ポリビニルアルコール、抗真菌剤として作用する塩化ベンザルコニウム及び凍結温度を低下させるポリエチレングリコールを含有する。Lab-Tek Instruments Co., Westmont ILにより製造されたもののようなOCT媒体は3通りの温度範囲、-10 から -20、-20 から -35 及び -35 から -50 の3タイプがある。

20

ここで用いられるところの「オリゴヌクレオチド」という用語は、典型的には合成手段によって調製される、一本鎖DNA又はRNA分子を意味する。本発明において用いられるオリゴヌクレオチドは通常50から200ヌクレオチド長、好ましくは80から120ヌクレオチドであるが、任意の長さのオリゴヌクレオチドがある状況下では適切であろう。好適なオリゴヌクレオチドは、Beaucage及びCarruthers, Tet. Lett. 22:1859-1862 (1981)に記載されたホスホラミダイト法、又はMatteucci等, J. Am. Chem. Soc. 103:3185(1981)によるトリエステル法、あるいは市販の自動オリゴヌクレオチド合成機を使用するよう

30

な他の方法によって調製することができる。「プラスミド」という用語は、正常な細菌ゲノムとは区別され、非選択的条件下での細胞生存には非必須の自己複製する染色体外環状DNA分子を意味する。ある種のプラスミドは宿主ゲノム中に組み込まれ得る。多くの人工的に構築されたプラスミドがクローニングベクターとして使用される。

「複数」という用語は二以上を意味する。

【0027】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために交換可能に使用される。ポリマーは直鎖状又は分岐状であり、修飾されたアミノ酸を含み得、また非アミノ酸が介在しうる。その用語はまた修飾されたアミノ酸ポリマー、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、あるいは標識成分との結合のような任意の他の操作を包含する。

40

ここで使用されるところの「プローブ」という用語は、天然に生じるものであり、合成法によって製造されるものであり、例えば凍結細胞試料、組織試料又は標準物質に検出される核酸配列の全て又は一部に相同か又は相補的であるオリゴヌクレオチドを意味する。プローブは好ましくは適切な条件下でそれが試料又は標準物質中の核酸配列に特異的にハイブリダイズ可能なように選択される。

「プロモーター」という用語は、それが作用可能に結合された遺伝子又は配列の転写を制御するポリヌクレオチド配列を意味する。プロモーターは、RNAポリメラーゼ結合部位及び転写開始部位を含む。一般に、遺伝子又は配列の発現が考えられている環境におい

50

て機能的であることが知られているプロモーターが選択される。例えば、発現環境が細胞、例えば細菌又は哺乳動物細胞である場合、細菌又は哺乳動物プロモーターが通常使用される。あるいは、発現環境がインビトロである場合、プロモーターは選択されたインビトロポリメラーゼ活性に対して機能するものである。

「レシピエントブロック」は、限定するものではないが、細胞懸濁液、細胞ペレット、組織コア、及びここに記載の内部標準調製物を含む、アレイの試料を収容するためのそこに形成されたウェルのアレイを有するか又はそれを有し得る、アレイで使用される固体基質を意味する。

【0028】

「固体」相又は状態は、液体又は流体と気体と共に、物質の3つの基本的な状態の一つを意味する。これらの3つの状態のうち、固体状態はその形状を変化させる力に抵抗する最も大なる傾向を持っており、よって、その形状と体積は固定され、それが利用できる空間によって影響を受けない。

「 SQH_2O 」という用語はヌクレアーゼを含まない分子生物学グレードの水を意味する。

「標準分子」という用語は、その既知の組成又は濃度が、組織又は凍結細胞マイクロアレイのようなアレイ中の他の生物学的分子の存在、組成、構造及び/又は濃度を分析するのに使用される、ここで定義された任意の生物学的分子及び任意の他の分子を意味する。ここで使用される場所の標準分子は、限定するものではないが、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、非ポリペプチドホルモン、サイトカイン、代謝物、代謝前駆体、薬物、並びにプローブの非特異的バインダー、例えば外科用染料、ベントナイト、及びセルロースを含む。標準分子がHER2コードポリヌクレオチドである場合、そのポリヌクレオチドはHer2遺伝子の少なくとも20、50、100、又は200あるいは更に多くの隣接ヌクレオチド又はその相補配列を含む。標準分子がVEGFコードポリヌクレオチドである場合、そのポリヌクレオチドはVEGF遺伝子の少なくとも20、50、100、又は200あるいは更に多くの隣接ヌクレオチド又はその相補配列を含む。標準分子がHER2ポリペプチドである場合、そのポリペプチドはHER2ポリペプチドの少なくとも10、20、50、又は100あるいは更に多くの隣接アミノ酸を含む。標準分子がVEGFポリペプチドである場合、そのポリペプチドはVEGFポリペプチドの少なくとも10、20、50、又は100あるいは更に多くの隣接アミノ酸を含む。

【0029】

「温度感受性基質」はその温度が凍結温度より低くなると流体又は液体状態から固体状態に変化する材料を意味する。凍結温度は変わり得、各特定の温度感受性基質材料の成分に依存する。凍結細胞又は組織アレイに使用される温度感受性基質の凍結温度は、アレイに含まれる細胞及び/又は組織の凍結温度より、例えば3、5、10低く、又は細胞又は組織の凍結温度より更に低い。更に、温度感受性基質材料はその凍結状態での切断を容易にする。

ここで用いられ、更にここで記載される「組織アレイ」という用語は、生物学的組織のコアのアレイとして百から千を越える個々の組織試料を典型的には含み、各コアが個々のドナー組織試料から穿孔され、切片化可能なブロック中の特定の格子座標位置に埋め込まれている、パラフィンブロック又は凍結アレイブロックのような、切片化可能なブロックを意味する。

「組織マイクロアレイ」及び「TMA」という用語はここでは互換可能に使用され、組織又は細胞の列とカラムがプラットフォーム上に試料の格子(アレイ)を形成するように、平坦なプラットフォーム又は基体上に取り付けられた組織アレイ又は凍結組織アレイの薄い切片を意味する。組織マイクロアレイは、技術者の時間、試薬及び貴重な組織資源の効率的な利用を最大化しながら多くの標本列の検査を可能にする。組織アレイは、潜在的な治療標的の組織発現パターンの迅速で大きなスケールのスクリーニング及び予後と治療への応答に関連する分子マーカーの研究に使用することができる。

「転写」という用語はDNA鋳型を用いてRNAポリメラーゼによってRNAを合成す

ることを意味する。

「翻訳」という用語は mRNA が有する遺伝暗号をアミノ酸からのタンパク質の合成に向ける方法を意味する。

試料に関する「処置された」という用語は、動物、組織、及び/又は細胞に治療物、例えば製薬薬物又は薬剤、あるいはアレイのための生物学的試料を調製するために使用される細胞又は組織内での標準又は生物学的分子の発現に影響を及ぼしうる興味のある他の任意の試薬を投与することによって、試料を調製するために続いて使用される（例えば動物、動物の組織、細胞株、又は細胞懸濁液中の）細胞の処置を意味する。

【0030】

凍結アレイを作製するための方法と装置

図1-4に示すように、本発明の一実施態様に係るアレイ化装置は温度感受性基質160を含むモールド140にウェルのアレイを生成するために使用されるアレイヤー100を含む。図1に最もよく示されているように、アレイヤー100は、プレキシグラス、プラスチック、セラミック、ガラス、金属又は木材のような剛性材料製の基部102と基部102から突出する複数のピン120を具備する。ピン120の各々は基部102に固定された又はその内部の第一端122と第二自由端124を有する。ピン120は例えばヒートシール等のシールが施され、基部102に又は基部102中にエポキシでの接着等のように固定されているガラス又は金属（鈍角(プラント)ガラス）製の一又は複数の鈍角端部を持つ中空のチューブを含む、任意のタイプの材料製でありうる。ピン120の各々の自由端124はシーラー、例えば金属、プラスチック、糊剤、接着剤、エポキシ又は他の等価なポリマーで塞がれている。ピン120は金属、セラミック、及びプラスチックなど、0より低い温度にも耐えることができる任意の強固な材料製でありうる。更に、ピン120は中空又は中実の管体とできる。ピン120は円形断面形状、又は限定するものではないが矩形、楕円等々を含む生物学的試料を保持するためのウェルをつくり出すのに適した任意の断面形状をもちうる。

【0031】

モールド140は、正方形、長方形、楕円形等々を含む任意の形状及びサイズであり得、顕微鏡スライド又はトレイのような適切な分析具に適合するようなスライスを提供するようなサイズ及び形状でありうる。一実施態様では、モールド140は矩形形状であり、図2に示すように4の側面142と底部144を有している。

基質160は基質材料の凍結温度より温度が低くなると流体又は液体状態から固体状態に変化する温度感受性材料を含んでなる。更に、温度感受性基質材料はその凍結又は固体状態において切断を容易にする。一つの有用な温度感受性基質材料は樹脂-ポリビニルアルコール及びポリエチレングリコールを含む。他の有用な温度感受性基質は最適切断温度媒質（「OCT媒質」）であり、樹脂-ポリビニルアルコール、抗真菌剤、例えば塩化ベンザルコニウム、及び凍結温度を低下させるためのポリエチレングリコールを含有する。OCT媒質は市販されており、例えばLab-Tek Instruments Co., Westmont ILが-10から-20、-20から-35、及び-35から-50の3通りの凍結温度範囲のOCTを製造している。

【0032】

凍結アレイを作製するには、アレイヤー100のピン120を、先ず、例えばグリセロール、油、脂肪酸、グリース、ゲル、脂肪、石鹸等々のような潤滑材料に浸漬し、ついでその流動性状態の温度感受性基質160中に部分的に浸漬し、ピン120の自由端124がモールド140の底部144に接触しないようにモールド140に配設されうる。アレイヤーピン120は温度感受性基質160とモールド140に係合させられる一方、基質160はその温度を温度感受性基質の凍結温度より低く、例えば少なくとも3、5、10又はそれ以上低下させることによって凍結される。モールド140は、例えばイソペンタンの極低温浴中にモールド140を沈めることにより、瞬時に凍結されうる。別法としては、モールド140はフリーザーに配して、液体窒素で凍結させ、又はドライアイス上に配してもよい。この方法を使用すると、温度感受性基質160はモールド140中

10

20

30

40

50

のピン120の周りで固化する。温度感受性基質160が凍結した後、モールド140からアレイヤーピン120を除去して、図3に示すようなアレイレシピエントブロック180中に形成されたウェル170のアレイを生じる。凍結レシピエントブロック180中のウェル170はピン120の数と形状に対応しており、図2に示されるように基質を部分的にだけ通って延びる。このようにして製造されると、凍結アレイレシピエントブロック180は試料を保持するためのガラス又はプラスチック管のような障壁材料を必要としない。代わりに、凍結レシピエントブロック180に形成されたウェル170中に試料を直接充填することができ、よってアレイを製造しスライスすることが容易になる。アレイレシピエントブロック180はスライス化の前にモールド140から除去される。モールド140の除去後、ウェル170の各々はピン120の一つが通過し基質160を抜き出た第一の開口端172と基質160内の第二の閉止端174を有している。レシピエントブロック180は、一又は複数の試料がウェル170中に充填されるまで凍結固体状態に温度感受性基質160を維持するのに十分な温度に保存される。別の実施態様では、凍結レシピエントブロックは、温度感受性基質の凍結温度より少なくとも3℃低い、あるいは少なくとも5℃低い、あるいは温度感受性基質の凍結温度より少なくとも10℃低い温度に保存される。

10

【0033】

細胞懸濁液、細胞ペレット、組織コアのような一又は複数の試料は試料の凍結アレイを形成するために、凍結レシピエントブロック180のウェル170中に直接挿入される。細胞懸濁液のような生物学的試料を凍結レシピエントブロック180のウェル170中に直接挿入すると、細胞はウェル180内で瞬時に凍結する。このようにして、細胞は固定液、保存料又は他のタイプの化学処理を必要とすることなく保存される。組織試料に関して、ピーチャー・インストルメントのようなアレイ化機器を用いて組織試料、例えば液体窒素を使用して瞬間凍結された組織からコアを穿設する。別法として、組織コアはドナーブロックから手作業で穿設することができる。これらの凍結組織は同様なアレイ化機器を使用してウェル170中に挿入される。凍結レシピエントブロック180は同様にして組織コアの凍結温度を維持し、それによって、固定液又は他のタイプの化学処理なしにアレイレシピエントブロック180中に組織を挿入することができるようになる。

20

【0034】

試料を含むレシピエントブロック180は、ウェル170の長軸に直交して水平にスライスして一又は複数の凍結アレイスライス182を形成することができ、これがついで図4に示されるように顕微鏡スライド184又は他の分析台に適用され、凍結細胞又は組織マイクロアレイが形成される。各アレイスライスはスライスがなされる前にアレイのウェル170の各々内に収容されていた試料に対応する試料のスポット(又は横断切片)190を有している。一又は複数のアレイスライス182はスライド184の各々の上に配されうる。スライド184は同様に使用されるまで凍結温度で保存されうる。分析のためには、スライドを処理して基質材料を除去し、顕微鏡スライド上にスポットのマイクロアレイを形成することができる。基質は、例えば水性バッファー、キシレン、アセトンなどの様々な種類の薬品を使用して除去することができる。スライド184を単に室温に放置することによって、温度感受性基質、例えばOCTを溶融させて、スライド184からそれを簡単に除去することができる。限定するものではないが、インサイトハイブリダイゼーション、免疫化学法、PCR、及びリガンド/レセプター結合手順を含む、顕微鏡スライドで実施することができる実質的に任意の種類の実験手順又は分子分析法を凍結アレイから作製されたマイクロアレイで実施することができる。

30

40

【0035】

図5に示されるように、本発明の他の実施態様は基部102に固定されて又は基部102内に複数のピン220を有するアレイヤー200を含む。ピン220はそれぞれ基部102に又はその内部に第一端222を、また第二の自由端224を有する。ピン120と同様に、図1に示されるように、ピン220はヒートシールが施され、基部102にエポキシで接着された鈍角(プラント)ガラス製でありうる。ピン220の各々の自由端224

50

はシーラー、例えば金属片及びエポキシで塞がれている。ピン 120 とは異なり、ピン 220 は、シーラー内に沈み自由端 224 を越えて延びる針体 226 のような小さい長い付属器を有している。上述したように、ピン 220 を用いて、アレイレシピエントブロック 280 中に複数のウェル 270 を作り出す。しかしここでは、ピン 220 は、ピン 220 の自由端 224 がモールド 140 の底部 144 に接触するようにモールド 140 にその流動性状態で温度感受性基質 160 中に完全に挿入される。この手順を用いて、ピン 220 は、アレイレシピエントブロック 280 がモールド 140 から除去されると、レシピエントブロック 280 全体にわたって延び、二つの開口端 272 及び 274 を有するウェル 270 のアレイをつくり出す。このようにして、組織コアのような固形飼料をウェル 270 の開口端 272 を通して挿入することができ、反対の開口端 274 が例えばウェル内の空気を逃がし、それによって圧力を幾らか軽減し、固形試料をウェル 270 中に挿入するのを容易にする経路を提供する。更に、ウェル 270 は、それぞれがピン 220 と針体 226 の直径にそれぞれ対応する直径を有する二つの部分 276 及び 278 を有している。第二部分 278 の小さなサイズは固形コアがウェル 270 内に挿入される場合、固形コアに対して停止機構を提供する。

10

【0036】

図 6 は本発明の更なる実施態様を示している。アレイヤー 300 は基部 102 に固定され又はその内部にある複数のピン 320 を有している。ピン 320 はそれぞれ基部 102 に又はその内部に第一端 322 と第二の自由端 324 を有している。ピン 320 は任意の固体材料、例えば金属又はガラス製でありうる。ピン 320 の各々の自由端 324 は先細になって先端部 326 を形成している。上述のように、ピン 320 はアレイレシピエントブロック 380 中に複数のウェル 370 を作り出している。ピン 320 は、ピン 320 の自由端 324 がモールド 140 の底部 144 に接触するようにモールド 140 のその流動性状態で温度感受性基質 160 中に十分に挿入される。この手順を使用して、レシピエントブロック 380 がモールド 140 から除去されると、レシピエントブロック 380 全体を延び二つの開口端 372 及び 374 を有するウェル 370 のアレイをつくり出す。ウェル 370 の開口端 374 は蔭 320 の点状部 326 のサイズに対応する小開口部 376 を有している。開口部 376 は凍結組織コアのような固形試料がウェル 370 中に挿入された場合にウェル 370 内の空気を逃がすための経路を提供する。

20

【0037】

アレイの内部標準

本発明の一実施態様では、一又は複数の内部標準調製物は、ここで検討されるような、アレイ、例えば組織マイクロアレイ、細胞アレイ、又は凍結組織又は細胞アレイにおいて、細胞又は組織中のような生物学的分子、例えば核酸、ポリペプチド、タンパク質、及び抗体又は他の分子を含む、選択された分子を検出又は定量するために使用することができる。内部標準調製物はアレイのウェル中に挿入することができる内部標準調製物を形成するために、埋め込み材料中に導入された既知量の生物学的分子のような標準分子を含む。内部標準調製物はインビトロ翻訳タンパク質、インビトロ転写 RNA、プラスミド又は PCR 増幅 DNA、細胞ホモジネートを、担体タンパク質、例えばウシ血清アルブミン (BSA)、ポリカチオン、例えばプロタミン、スペルミン又はスペルミジン、あるいはアレイ中の生物学的又は標準分子を定量するのに役立つ任意の他の物質と共に含む。

30

40

内部標準調製物を利用するアレイ及びマイクロアレイは次のようにして作製される。一又は複数の内部標準調製物を、アレイレシピエントブロック内に配設された複数のウェルの一又は複数中に挿入される。組織、細胞懸濁液、又は細胞ペレットのような試料をアレイレシピエントブロックの他のウェル中に挿入してアレイを形成する。そのアレイをスライスし、一又は複数のアレイスライスを、例えば分析用の顕微鏡スライド上に配する。水性バッファー、キシレン、シトルリン、アルコール又は他の有機溶媒、液体 CO₂ (臨界点乾燥) 又は蒸発を含む、様々な技術及び / 又は化学薬品を使用してマイクロアレイ又はアレイから基質材料を取り除くことができる。内部標準調製物は、加工、例えば基質材料の除去、及びアレイスライドで実施される分析手順を通してアレイスライド上に標準分子

50

を保持することを可能にする。基質材料はアレイスライドの加工の全体を通じて除去されるので、埋め込み材料は、例えば、溶解度、温度感受性（例えば凍結温度、融解温度等）、pH、又はマイクロアレイを調製するために使用される平坦な基体に対する親和性を含み、少なくとも一の物理的又は化学的性質が基質材料と異ならなければならない。

【0038】

図7は内部標準調製物を使用するマイクロアレイ500を示す。マイクロアレイ500は顕微鏡スライド502に取り付けられ、1-5と標示される5つの列と、A-Fと標示される5つのカラムに組織化された内部標準調製物又は試料のスポット（又は横断切片）のアレイを有している。内部標準調製物504の5つのスポットはマイクロアレイ500の位置A1-A5を占める。組織試料506の20のスポットは残りの位置を占める。

10

例えば、インサイツハイブリダイゼーション、免疫組織化学法等々を含む、様々な分析手順又は分子分析法を、例えば標準分子の存在を検出又は検査するために、アレイスライドについて実施することができる。これらの分析手順に関連して、検出可能に標識された化合物、例えば発光標識、蛍光標識、放射標識等々のような検出可能なシグナル又は標識を有するプローブ又はポリペプチドが使用される。検出可能に標識された化合物の例には、標識プローブ、標識ポリペプチド、例えばモノクローナル抗体、抗体結合断片、レセプター、レセプターECD、又はレセプターのリガンド結合断片、及び結合タンパク質、例えば抗体抗原、レセプターリガンド、ビオチン、又はストレプトアビジンが含まれる。ついで、様々な装置と方法を用いて標識を検出することができ、例えばホスフォイメージャー又はCCDカメラ又は他の画像処理装置を使用して全アレイスライドの上の標識を記録することができる。内部標準調製物中の標準分子の量は既知であるので、内部標準調製物の分析で得られた定量的シグナル又は結果を、試料の分析で得られたシグナル又は結果と関連させ、試料中に存在する標準分子の量を決定することができる。

20

【0039】

また、内部標準調製物はポジティブコントロールとして作用しうる。例えば、試料がポジティブな結果を示さなかった場合には、分析手順の完全性を、内部標準調製物に対して得られたポジティブな結果に対して分析することができる。ネガティブコントロール、例えば、標準分子を含まない内部標準物質又はネガティブな結果を示すことが予想等される分子を含む内部標準物質をアレイレシピエントブロックの他のウェル中に導入することもできる。

30

一実施態様では、合成RNAのような生物学的分子が内部標準調製物に使用されうる。クローン化DNA配列を、合成RNA内部標準調製物を産生するために使用することができる。例えば、ヒトVEGF (Leung, D.W.等 Science 246, 1306-1309 (1989))、Her2/erbB2 (Coussens, L.等 Science 230, 1132-1139 (1985))、細胞質アクチン、及びイセルアルデヒドデヒドロゲナーゼ等々を含む、例えば30000を越えるヒト遺伝子があると考えられる。これらの遺伝子のRNA転写物又はその断片、並びに将来記載されるその他のものを合成し、埋め込み部材に導入し、これら遺伝子の一又は複数の発現を分析するために設計されたアレイ中で内部標準調製物として使用され得る。

ここに記載されたアレイ及び内部標準調製物は、細胞生体分子の分析のための既知の方法及び手順において、例えば新規cDNA配列によって表される遺伝子の組織特異的発現を特徴付ける（つまり組織mRNA量を測定する）ために使用することができる。標準的技術を用いて、合成センス配向RNA鎖を産生するためにcDNAを使用することができる。このRNA鎖は固体埋め込み材料、例えばアガロース、ポリアクリルアミド、ゼラチン、又はBSAのような凝集（変性）タンパク質に導入することができ、アレイにおいて、様々な対象組織のような、試料と平行に「標的」又は内部標準物質として使用することができる。つまり、アレイは少なくとも一つのウェルにRNA内部標準調製物を含み、一又は複数の試料がアレイの他のウェルを占める。アレイ全体がスライスされ、スライスは例えば顕微鏡スライド上に配され、RNA標準物質と均一であり後での検出が可能になるように標識されているアンチセンスRNA又はDNAのような、分子プローブを用いて好適なハイブリダイゼーション条件下で探索される。例えば、RNA又はDNAプロー

40

50

ブはフィルム又はホスフォイメージャーにより検出することを可能にする発光標識又は放射性同位体を含むかもしれない。あるいは、RNA又はDNAプローブは、標準的な技術を用いてプローブの位置を明らかにしうる酵素又は他のマーカーに結合させられた適切な抗体又はタンパク質（例えばストレプトアビジン）を用いて間接的に検出されうるジゴキシゲニン、ビオチン、又はFITC（フルオレセインイソチオシアネート）のような抗原を含むかもしれない。あるいは、RNA又はDNAプローブは標識プローブに続いてハイブリダイズする配列を含む。

【0040】

組織の試料への適切なプローブの結合は、組織中に存在するセンスmRNAの量に比例している。アンチセンスプローブはまた内部標準調製物に含まれるセンスRNAに結合する。内部標準調製物中のRNAの量が既知であるので、使用中のmRNAの量は、内部標準調製物のシグナル強度を試料のシグナル強度に相関させることによって決定することができる。発現の数値（検出可能な標識の量）は、発光標識、例えば化学発光、蛍光又は放射性シグナルを堅守するための、例えばホスフォイメージャー、CCDカメラ、又は他の電子的画像システムを含む、多くの方法で得ることができる。典型的には、これらのシステムは、例えばAdobe Photoshop、Scion IMAGE、NIH IMAGE、及びPhoretix Array²を含む様々なソフトウェアツールを使用して分析し定量することができる電子イメージファイルをつくり出す。確かに、この方法を使用すると、試料中のmRNAの特定の数値量、例えば組織試料中のmRNAの単位体積当りの分子を決定することが可能になる。

良好に制御された手順では、組織に結合したプローブの量はその組織中の対応する遺伝子の発現レベルの一つの目安である。しかし、組織へのプローブ結合が検出可能ではない分析方法は適切なポジティブコントロール試料なしには解釈が難しい。しかし、上述の内部標準調製物を試料組織と平行して分析し、アンチセンスRNAプローブに適切に結合すれば、分析手順の技術的完全性が確認できる。換言すれば、組織試料中のネガティブな結果は、コントロール内部標準調製物がポジティブな結果を示している場合は、技術的な手順の失敗というよりも、真のネガティブであると解釈することができる。もちろん、この解釈は、組織試料が良好に保存され、RNAプローブへハイブリダイズ可能なmRNAを含んでいることをまた知っている研究者に依存する。試料の完全性は、同じアレイからのスライスを含む2組のスライドで平行の分析手順を実施し、細胞質 -アクチン及びグリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼ等々のような、よく知られた豊富で広く発現される遺伝子に相同なプローブを使用することによって決定することができる。よく知られたアンチセンスプローブが組織試料に結合し、対応するセンスプローブが結合しない場合、組織試料の完全性が確認できる。

【0041】

アレイに使用される内部標準物質はRNA又は他のポリヌクレオチドに限定されず、限定されるものではないがDNA及びポリペプチド又はタンパク質を含む任意の生物学的又は標準分子を用いて調製することができる。例えば、研究者は、コントロールとしてインビトロ合成タンパク質試料又は天然タンパク質試料を、アガロースのような埋め込み材料に導入して、タンパク質内部標準調製物をつくることによって、組織試料中の特定のタンパク質の発現を評価することができる。標準タンパク質は、検出可能に標識されたモノクローナル又はポリクローナル抗体、レセプター又はレセプターリガンドのような特定の試薬を用いて検出できる。タンパク質内部標準調製物は、抗体が反応させられる標的として様々な組織試料と並列に使用することができる。つまり、アレイ内に配設された複数のウェルの一又は複数又はタンパク質内部標準調製物を含み、アレイ内に配設された複数のウェルの一又は複数又は組織試料を含む。このようにして、内部標準調製物は試料中のタンパク質の発現の定量化を可能にし、また手順の完全性に対するポジティブコントロールとして作用する。組織試料中のタンパク質の発現は、内部標準調製物中の抗体反応の結果を、試料中の抗体反応の結果と相関させることによって定量することができる。更に、抗体がタンパク質内部標準調製物の標準タンパク質と反応する場合、何れの組織試料も抗体と反応しなくとも、抗体染色反応の手順完全性が確認される。

上述の内部標準調製物は任意の試料中の任意の選択分子の量を決定するために用いることができる。アレイに使用される試料は、例えば正常組織、異常組織、炎症組織、腫瘍、様々な発達段階の組織を含む、任意の対象試料からなり得、ここで細胞は選択分子、細胞懸濁液及び細胞ペレットの発現に影響を及ぼしうる様々な試薬で処理されている。標準分子には、限定されるものではないが、ポリヌクレオチドの異なった配向（センス又はアンチセンス）又はスプライシング変異体、例えばRNA又はDNA、及び/又はタンパク質の異なったアイソフォーム（完全長又は部分配列）が含まれうる。内部標準調製物は、限定されるものではないが、複数種のポリヌクレオチド及び/又は複数種のポリペプチドを含む、一を越える標準分子を含み得る。

【0042】

内部標準物質の生物学的又は標準分子は、(1)アレイのウェル中に標準分子を挿入することを可能にし；(2)アレイ又はアレイスライドについて実施される加工及び分析手順の全体にわたってアレイ又はアレイスライド中に標準分子を保持する、任意の埋め込み材料に埋め込むことができる。埋め込み材料は、例えばアガロースを、単独に、又はBSEと組み合わせて、及び/又は内部標準調製物から標準分子が拡散して逃げるのを防止する担体タンパク質を含み得る。また、標準分子に対するエンベロープを提供する材料が、標準分子のアレイ基質中への核酸を防止するために内部標準調製物中に含まれうる。例えば、赤血球ゴースト又はリポソームは、RNA分子がアレイ基質中に拡散するのを防止するためのRNAのエンベロープとして作用しうる。適切な固定液の選択は調製中の標準試料からのRNAの核酸を最小にする。埋め込み材料の濃度と材料は、内部標準調製物が固体又はゲル状状態を形成することを可能にするように選択されなければならない。しかしながら、注意をして材料と濃度を選択しなければならず、例えば、内部標準調製物が剛性になりすぎるのを防止し、ドナーブロックから内部標準調製物を除去し、アレイのウェル中に内部標準調製物を挿入する能力を阻害しうるアガロースを選ばなければならない。また、剛性すぎる内部標準調製物はアレイをスライスするのを困難にする。固体又はゲル様状態を形成する埋め込み材料の例には、例えば、約1-3%のアガロースと約1-20%の範囲のBSAが含まれる。別法として、埋め込み材料は約2%アガロースと約1-5%BSAを含み得る。BSAを伴わない約2%のアガロースの濃度は良好に作動し、過度に剛性にならないで固体又はゲル様状態を形成する。

【0043】

一実施態様では、内部標準調製物は一般に一又は複数の生物学的分子を単離し、その生物学的分子を埋め込み材料と混合し、その混合物をアレイ中に挿入するように準備することによって作製される。内部標準調製物は多くの方法でアレイ中に挿入することができる。例えば、内部標準調製物はモールド中に注ぎ込み、ゲルドナーブロックに固化させ又はこれを形成することができる。内部標準ドナーブロックはモールドから除去され、内部標準ドナーブロックからコアが、Beecher機器又はパンチのような、典型的なアレイ化機器を用いて取り出される。内部標準調製物ドナーブロックのコアはついで標準的なアレイ化機器を使用して任意のアレイレシピエントブロックのウェル中に挿入されうる。別法として、内部標準調製物は、例えばゲルになる前に、任意のタイプの針、シリンジ又は漏斗を用いて、流動状態のアレイレシピエントブロックのウェル中に挿入することができる。この場合、内部標準調製物はレシピエントアレイブロックのウェルに固体又はゲルを形成する。凍結アレイの場合では、流動性内部標準調製物は凍結アレイレシピエントブロックのウェル中に直接挿入され、ウェル内で凍結する。

本発明の他の実施態様では、複数の異なる内部標準調製物がアレイに収容されうる。例えば、複数の異なる内部標準調製物のそれぞれは濃度の標準曲線をつくり出すために異なった濃度の同じ生物学的分子を含みうる。すなわち、アレイは、組織又は細胞株の試料のアレイ中の生物学的分子の検出のレベルを定性的又は定量的に評価するために生物学的分子の濃度範囲の標準曲線範囲を有する内部標準調製の複数のコアを含みうる。この実施態様では、内部標準物質は、それぞれが異なった濃度の生物学的分子を有する複数の混合物及び/又はドナーブロックが作製される場合を除き、上述のように調製される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

本発明の他の実施態様では、限定するものではないが、複数タイプのポリヌクレオチドと複数タイプのポリペプチドを含む、同じ内部標準調製物中に複数の異なった生物学的分子を使用して、汎用性のある内部標準調製物が作製される。この汎用性のある内部標準調製物はアレイ中の複数のタイプの生物学的分子を検出し、及び/又は定量することを探求する多くのタイプの分析手順で使用することができる。

他の実施態様では、内部標準調製物はアレイ中に配向マーカースとして使用することができる。光学顕微鏡を用いた配向では、有色の外科用染料が埋め込み材料に混合され、上述のようにアレイ中に挿入される。ホスフォイメージャーでの配向に対しては、例えば生物学的分子の非特異的バインダーのような標準分子が埋め込み材料と混合され、上述のようにアレイ中に挿入される。非特異的バインダーにはベントナイト及びセルロースが含まれる。非特異的バインダーはアレイ上で実施される分析手順において使用されるあらゆるプローブに結合し、よって配向マーカースを含むスポットに対してポジティブな結果を生じる。内部標準調製物配向マーカースは、アレイの一侧の非対称パターンにおけるように、アレイ全体の戦略的位置に位置する一又は複数のウェルに配することができる、アレイスライド上で実施される分析手順の結果を調べるときにアレイの配向を示す案内又はマップを提供する。

【 実施例 】

【 0 0 4 5 】

次の実施例は本発明を例証するためのもので限定するためのものではない。これらは典型的に使用されうるものであるが、他の手順も当業者には知られており、また使用することができる。

【 0 0 4 6 】

実施例 1

R N A / アガロース内部標準調製物

本実施例は、アレイの作製に使用される基質材料とは異なる固形埋め込み材料中に既知量の生物学的分子を有する内部標準調製物を使用して細胞又は組織中の R N A のような生物学的分子を分析するための本発明の有用性を証明する。特に、本実施例は、アレイについて実施される加工及び分析手法の間にわたって R N A 分子が保持されるようにアレイで使用する内部標準調製物を形成するためにアガロース及び B S A 中に特異的 R N A 分子を埋め込むためのアプローチ法を証明する。埋め込まれた R N A は単に手順の成功のための陽性コントロールとして、手順の方法を改良する基本的アッセイの成分として、又は結局は組織又は細胞中の遺伝子発現の比較レベルを評価するための定量的標準として使用することができる。

【 0 0 4 7 】

生物学的分子の調製

R N A、例えばヒト H e r 2 / c - E r b B 2 を次の手順を使用してインビトロで転写させた。その手順は Lu L H, Gillett NA. Cell Vision 1:169-176(1994)に記載されており、P C R 産生^{3 3} P 標識プローブを使用したインサイツハイブリダイゼーションの最適化プロトコールである。別法としては、Ambion Maxiscript又はAmbion Megascriptキットを使用してこの手順を実施することができる (Ambion, Austin, Texas)。まず、次のものをシリコン処理した 1 . 5 m l のマイクロチューブ (Eppendorf) に添加した: R N A ポリメラーゼプロモーター配列 (例えばバクテリオファージ T 3 又は T 7 プロモーター) が隣接した P C R 増幅 c D N A 断片を有するヒト H e r 2 / c - E r b B 2 遺伝子をコードする 1 μ g の線形二本鎖 D N A 鋳型 (Coussens, L.等, Science 230: 1132-1139 (1985)) (Genentech, South San Francisco, CA); 2 μ l の 1 0 X 反応バッファー; 8 μ l の高濃度 r N T P s ; どのプロモーターを使用したかに依存した 2 μ l の T 3 又は T 7 ポリメラーゼ酵素混合物; 及び 2 0 μ l の最終容積までのヌクレアーゼ非含有水。混合物を合成 R N A を合成するために 3 7 °C で 4 時間インキュベートした。別法として、D N A 鋳型は R N A ポリメラーゼ (例えばバクテリオファージ T 3 及び/又は T 7) プロモーターが

10

20

30

40

50

隣接した所望の配列をコードする線形化プラスミドDNAを含みうる。ついで、 $1\ \mu\text{l}$ のDNアーゼ (Ambion) を、合成したRNAを含むエッペンドルフ管に添加し、混合物を 37°C で15分インキュベートした。この工程は反応中のDNA鋳型を変性させ、その後これは除去される。変性反応を停止させるために、 $80\ \mu\text{l}$ のTEをエッペンドルフ管に添加した。RNeasyミニキット (Qiagen, Germantown, MD) を用いてRNA溶液中のRNA転写物を精製した。分光光度計を用いてRNA溶液中のRNA転写物の濃度を定量した。次に、このRNA溶液を $1\ \mu\text{g}$ 、6%ポリアクリルアミドTBE/尿素ゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA) で分析して、転写物が適切な強度のものであることを確認した。Her2/Erbb2 RNA溶液を使用準備ができるまで、 -20°C で保存した。

【0048】

内部標準物質の調製

上述のようにして調製されたHer2/Erbb2 RNA溶液を使用して次の方法に従って、内部標準調製物を調製した。 $100\ \text{ng}/\mu\text{l}$ の作動濃度のRNA溶液を作製した。新しいエッペンドルフ管中の $200\ \mu\text{l}$ のTEに $50\ \mu\text{l}$ アリコート of RNA溶液 ($5\ \mu\text{g}$) を加えた。エッペンドルフ管を 95°C のヒートブロックで3分間加熱してRNA転写物を変性させ、ついで氷で即座に冷却した。 50°C のヒートブロックで温めた $500\ \mu\text{l}$ のSQH₂Oと $250\ \mu\text{l}$ の8%Nusieve 3:1 (99°C で溶融した高ゲル強度のアガロース) (FMC Bioproducts, Rockland, ME) をRNA溶液に添加した。得られたRNA/アガロース混合物を簡単にボルテックスした後、 $15\ \text{mm} \times 15\ \text{mm}$ のDISPベースモールド (Baxter Scientific, McGaw Park, IL) 中に注いだ。RNAの最終濃度は $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。ついで、そのRNA/アガロース内部標準調製物を少なくとも1時間 4°C でゲル化させた。RNA又はアガロースの濃度を変化させるために、何れかの体積を、SQH₂Oの量を相反させて低減することによって増加させることができる。

望むのであれば、ウシ血清アルブミン (BSA) などのキャリアタンパク質、又はプロタミン、ポリイノシン、スペルミジン、又はインビトロトランスレートされたタンパク質などの他の構成要素は、例えば、 $1\ \text{ml}$ の最終体積を得るためにSQH₂Oの所望の量を添加し体積を調整することによって、アガロースブロック中に取り込ませることができる。例えば、BSA (Roche, Indianapolis, IN) は、水で10%のストック溶液とし、RNA/アガロースと混ぜて所望の濃度にする前に、溶解させるために 50°C で熱した。5%BSAを含む内部標準ブロックを調製するために、前にも言及したように $500\ \mu\text{l}$ のSQH₂Oは、2%アガロースと5%BSAを含む内部標準調製物を作製するために、10%のBSA $500\ \mu\text{l}$ で置換される。

ゲルの形成後、RNA/アガロースブロックを清浄な剃刀の刃を使用してプラスチックモールドから除去し、無傷のブロックを10%の中性緩衝ホルマリン (Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI) に固定した。中性緩衝ホルマリンに固定されたRNAの幾らかは固定段階において標準基質から拡散して放出される。この拡散を防止するためには、別の固定化法を使用することができる。例えば、RNA/アガロースの無傷のブロックを、 $0.5\ \text{M}$ の酢酸ナトリウム、 $\text{pH}\ 5$ 、70%のエタノール及び20% (v/v) の原液37%ホルムアルデヒド (ホルムアルデヒドの最終濃度は7.4%) を含む沈殿固定液で室温にて一晩固定した。ついで、アガロースブロックを70%エタノール (水中) に移し、パラフィン包埋のために (標準的方法に従って) 加工した。試料を70%FLEXアルコール (Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI) 中で30分間インキュベートした後、95%FLEXアルコール (Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI) 中でそれぞれ1時間で2回、ついで100%FLEXアルコール (Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI) 中でそれぞれ30分間で3回、ついでClearing Agent (Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI) で45分を3回インキュベートし、最後に60-30分間、100%の溶融パラフィン中でそれぞれ30分インキュベートした。ついで試料をライカヒストエンベッダー (histoembedder) (Leica, Deerfield, IL) を使用してパラフィン中に包埋した。

これらの方法は、例えば前述の固定工程を省くことによって、ここに記載した凍結アレ

10

20

30

40

50

イの実施例を用いて、凍結アレイレシピエントブロックに使用されるRNA内部標準調製物の凍結試料をつくり出すこともできる。

【0049】

実施例 2

タンパク質 / アガロース内部標準調製物

本実施例はアレイを作製するために使用される基質材料とは異なる固体埋め込み材料中に既知量の生物学的分子を有する内部標準調製物を使用して細胞又は組織アレイ中のタンパク質のような生物学的分子を分析するための本発明の有用性を証明する。特に、本実施例は、アレイで実施される加工及び分析手順を通じてタンパク質が保持されるようにアレイで使用される内部標準調製物を形成するためにアガロース中に特定のタンパク質分子を埋め込むためのアプローチ法を証明する。埋め込まれたタンパク質は、単に手順の成功のポジティブコントロールとして、手順方法を改善するための基礎的アッセイにおける成分として、又は最終的に組織又は細胞中のタンパク質の発現の比較レベルを評価するための定性的標準として、使用することができる。

Her2 / ErbB2 ECDタンパク質 (Molecular Oncology, Genentech, South San Francisco, CA) の 0.45 mg / mL の最終濃度は、エッペンドルフ管に 500 μ l の 1.09 mg / mL の合成 Her2 / ErbB2 細胞外ドメインタンパク質と 250 μ l の SQH₂O を添加することによって得た。タンパク質 / 水混合物を簡単にボルテックスした。ついで、およそ 60 まで簡単に冷却した 250 μ l の 8% NuSieve 3:1 (99 で溶融した高ゲル強度のアガロース) をタンパク質 / 水混合物に添加した後、簡単にボルテックスした。タンパク質がアガロースの何れかの濃度を変えるために、SQH₂O の量を相反させて低減することで何れかの体積を増加させることができる。所望される場合は、担体タンパク質、例えば BSA 又は他の成分、例えば天然に生じるかもしくはは合成のペプチド配列又は天然に生じるかインビトロ翻訳されたタンパク質を、所望量の担体タンパク質を加え、SQH₂O の体積を調して、例えば 1 ml の最終容積を得ることによって、アガロースブロック中に導入することができる。

ついで、タンパク質 / アガロース内部標準調製物を 15 mm x 15 mm の DispO ベースモールド (Baxter Scientific) 中に注ぎ、少なくとも 1 時間 4 でゲル化させた。そのタンパク質 / アガロースブロックを清浄な剃刀の刃を使用してプラスチックモールドから除去した後、無傷のブロックを室温で一晩 10% の中性緩衝ホルマリンに固定した。ついで固定されたタンパク質 / アガロースブロックを水中 70% のエタノールに移し、実施例 1 に記載されたようにしてアレイ中にパラフィン包埋するための標準的方法に従って加工した。

この方法は固定段階を省くことによって凍結内部標準調製物を調製するのに使用されるタンパク質の凍結試料をつくり出すためにここに記載された凍結アレイ系において使用することもできる。

【0050】

実施例 3

組織マイクロアレイ中の内部標準調製物に対するインサイトハイブリダイゼーション

本実施例は、インサイトハイブリダイゼーション法のための組織マイクロアレイ (TMA) 組織学的セクションにおいて内部標準物質及びコントロールとなる本発明の有用性を証明する。特に、本実施例は、インサイトハイブリダイゼーション法で大腸腫瘍中の VEGF mRNA の発現を定量するための本発明の有用性を証明する。更に、本実施例は発現シグナルの標準曲線を設定するために、異なった量の生物学的分子をそれぞれが有する複数の異なった内部標準物質を使用して、アレイ中の RNA のような生物学的に有用な分子を定量する本発明の有用性を証明している。

20 カラム 15 列に配列した 282 のコアを含む大腸腫瘍組織マイクロアレイを次のようにして構築した。直径 0.6 mm の寸法の 177 の試料コアが、44 標本の大腸腺癌 (National Cancer Institute Cooperative Human Tissue Network (CHTN), Western Division, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN; <http://www-chn.ims.nci>).

nih.gov/)、腫瘍 (C H T N) に隣接する 6 標本の正常大腸、肝臓に転移性の大腸腺癌の 6 標本 (C H T N (1 事例); University of Glasgow (1 例)、Glasgow, Scotland; University of Michigan (4 例); Ann Arbor, MI)、及び 6 例の良性大腸腺 (C H T N) (通常二通り又は三通り) を含む様々なドナーパラフィンブロックから得られた。ついで、試料コアを、例えばここに記載する B e e c h e r 組織アレイ化機器 (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) を使用して、レシピエントパラフィンブロック中に埋め込んだ。

【 0 0 5 1 】

内部標準物質の 1 2 のコアは、直径が 0 . 6 m m の寸法であり、上の実施例 1 に記載されたようにして調製された、3 通りの異なった濃度の R N A / アガロース内部標準調製物を含む 6 つのドナーブロックから得た。R N A / アガロース標準物質の半分は 0 . 5、1 . 0 及び 5 . 0 μ g / m l (全て二通り) でヒト V E G F A (Leung, D.W.等, Science 246: 1306-1309 (1989)) のアンチセンス R N A を含み、その標準物質の半分は 0 . 5、1 . 0 及び 5 . 0 μ g / m l (全て二通り) でヒト V E G F A のセンス R N A を含んでいた。R N A s は以下に記載される P C R 増幅配列からインビトロ転写によって合成した。内部標準調製物コアは、上述の試料コアと同じようにしてパラフィンレシピエントブロック中に埋め込んだ。

2 つの異なったヒト異種移植腫瘍細胞株 (A T C C カタログ番号 C C L - 2 2 2) 及び H C T 1 1 6 (A T C C カタログ番号 C C L - 2 4 7) からの直径 0 . 6 m m の寸法の 4 つのコアを、同様の方法を使用してレシピエントパラフィンブロック中に埋め込んだ。切片の評価中の配向に有用である、実施例 1 5 に記載されたようにして調製された、8 % の N u S i e v e 3 : 1 アガロース及び 5 0 % の青、黄色又は黒の外科マーカース染料 (Triangle Biomedical S, Durham, NC) の直径 0 . 6 m m の寸法の 1 1 のコアをレシピエントパラフィンブロック中に埋め込んだ。

【 0 0 5 2 】

コアの全てを 3 7 のオープンでブロックを一晩インキュベートすることにより、アレイレシピエントブロックアレイ中でアニールした。パラフィンアレイを 2 又はそれ以上の 3 - 5 μ m 厚の組織学的 T M A 切片にスライスした。各 T M A 切片はレシピエントパラフィンブロック中のコアのアレイに対応するスポットのアレイを有している。ついで、各 T M A を 4 2 の水浴に移した後、ガラススライド上に個々に収集し、十分に乾燥させた。

インサイツハイブリダイゼーション分析を大腸腫瘍 T M A スライドの幾つかについて実施した。T M A スライドは次の方法を使用してヒト V E G F A センス及びアンチセンス R N A プローブにハイブリダイズさせた。センス及びアンチセンスプローブを転写するために使用した P C R 増幅 D N A 鋳型の配列は次のものであった：

```
GGGCCTCCGAAACCATGAACCTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCCTCGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCATGCCAAG
TGGTCCCAGGCTGCACCCATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCACGAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTCTATCAGCG
CAGCTACTGCCATCCAATCGAGACCCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCAT
CCTGTGTGCCCCCTGATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAAGGCCTGGAGTGTGTGCCCACTGAGGAGTCCAACATC
ACCATGCAGATTATGCGGATCAAACCTCACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGATGAGCTTCTACAGCACAACAAATGTGA
ATGCAGACCAAAGAAAGATAGAGCAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGCCCTTGCTCAGAGCGGAGAAAGCATTGTGTTGTAC
AAGATCCGCAGACGTGTAATGTTCTGCAAAAACACAGACTCGCGTTGCAAGGCGAGGCAGCTTGAGTTAAACGAACGT
ACTTGCGATGTGACAAGCCGAGGCGGTGAGCCGGGCAGGAGGA [配列番号： 1]
```

【 0 0 5 3 】

T M A スライドを 3 7 で一晩、ついで 6 5 で 3 0 分オープンでベークして組織をガラスに付着させた。切片を、それぞれキシレン (Richard Allen, Kalamazoo, MI) 中で 5 分間 3 回インキュベートし、ついで段階的にエタノール列から蒸留水まで通して再水和させることにより、ライカオートステイナー X L (Leica, Deerfield, IL) で脱パラフィン処理を行った。ついで、スライドを各 5 分間で 2 回 2 X S S C (0 . 3 M の N a C l、0 . 0 3 0 M のクエン酸ナトリウム、p H 7 . 0) で洗浄した。スライドを、3 7 で 1 5 分間、1 0 m M T r i s p H 8 . 0 / 0 . 5 M N a C l 溶液中、2 0 μ g / m l のプロテイナーゼ K (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) で処理し、0 . 5 X の S S C

(0.075 MのNaCl、0.007 Mのクエン酸ナトリウム、pH 7.0)で10分洗淨した。そのスライドをエタノール勾配(70% - 95% - 100%)で脱水し、空気乾燥させた。そのスライドを100 μ lのハイブリダイゼーションバッファー(50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、及び2XのSSC)で覆い、42 $^{\circ}$ Cで1-4時間プレハイブリダイズした。2 \times 10⁶ cpmの濃度の上述した [³³P]標識一本鎖VEGF A RNAプローブ(アンチセンス配向)を、1 mg/mlのtRNAを含む100 μ lのハイブリダイゼーションバッファーに溶解させ、スライドの一つの上のプレハイブリダイゼーションバッファーに添加し、よく混合し、カバーガラスで覆い、密封された加湿容器中で55 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイズさせた。

上記のハイブリダイゼーション手順は、上述の同じPCR増幅鋳型から、しかしセンス配向に転写された [³³P]標識一本鎖VEGF A RNAプローブを用いて、TMAの他のスライドについて実施した。

【0054】

ハイブリダイゼーション後、室温で1 mMのEDTAを含む2XのSSC中で10分間、2回洗淨し、ついで10 mMのTris、pH 8.0、0.5 MのNaCl中20 μ g/mlのRNアーゼA中で37 $^{\circ}$ Cにて30分間、インキュベートした。そのスライドを室温で1 mMのEDTAを含む2XのSSC中で10分間、洗淨した後、55 $^{\circ}$ Cで1 mMのEDTAを含む0.1XのSSC中でそれぞれ30分間、4回洗淨し、その後、室温で10分間、0.5XのSSC中で洗淨した。スライドを、0.3 Mの酢酸アンモニウムを含む50%、70%、及び90%エタノールでそれぞれ2分間脱水し、空気乾燥させた。

ハイブリダイゼーションの結果を見るために、スライドをストレージリン光体スクリーン(コダック)に18時間暴露し、ついでリン光体スクリーンをTyphoon 8600可変モードイメージャー(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)を用いてスキャンした。画像はPhoretix Array²(Nonlinear USA Inc, Durham, NC)ソフトウェアを用いて定量し、データはマイクロソフトのエクセルを使用して解析した。

内部標準調製物及び試料中に存在するVEGF A RNAの量を次のようにして計算した。まず、RNA/アガロース標準物質中のVEGF A RNAの量を計算した。RNA/アガロース標準物質中のVEGF A RNAの量は約604塩基長であった。各塩基は340ダルトンの重さであると仮定され、よってVEGF A RNAの各分子は約604 \times 340ダルトン又は約2.05 \times 10⁵ダルトンの重さであった。RNA/アガロース標準物質は0.5 μ g/mlのVEGF A RNAを含んでおり、よって約2.43 \times 10⁻¹²モル/ml、又は約1.5 \times 10¹²分子/ml、又は約1.5分子/ μ m³のVEGF A RNAを含んでいた。従って、RNA/アガロース標準物質の5 μ m厚の組織切片は平方ミクロン当たり約7.5分子のVEGF A RNAを含んでいた。

試料中のVEGF A RNAの量を決定するために、試料のオートラジオグラフィフィルム又はホスフォイメージャー分析からのシグナルの強度を、RNA/アガロース標準物質からのシグナルの強度と相関づけ、組織の単位体積当たりの分子中に発現される試料中のVEGF A RNAの量が得られた。表1はアンチセンスプローブを使用する上述のインサイトハイブリダイゼーションから得たデータとまとめたものである。

【0055】

【表 1】

表 1

コア/TMAスポットの内容物	ホスフォイメジャー シグナル *	VEGF A RNA の量 (分子/ μm^3)
VEGF A RNA 内部標準調製物 - 5 $\mu\text{g/ml}$ (センス鎖)	1145	15 (既知)
VEGF A RNA 内部標準調製物 - 1 $\mu\text{g/ml}$ (センス鎖)	773	3.0 (既知)
VEGF A RNA 内部標準調製物- 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (センス鎖)	489	1.5 (既知)
VEGF A RNA 内部標準調製物- 5 $\mu\text{g/ml}$ (アンチセンス鎖)	50	15 (既知)
VEGF A RNA 内部標準調製物- 1 $\mu\text{g/ml}$ (アンチセンス鎖)	15	3.0 (既知)
VEGF A RNA 内部標準調製物- 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (アンチセンス鎖)	16	1.5 (既知)
試料 1: 正常な大腸	2	<0.01 (相関 ¹)
試料 2: 転移性大腸腺癌	222	0.7 (相関 ¹)
試料 3: 転移性大腸腺癌	449	1.4 相関 ¹)

* データはバックグラウンドシグナル(23 ユニット/ピクセル)に相関させたホスフォイメジャーのピクセル当りのカウント(直径 50 ミクロン)で表示。

¹ センス RNA 内部標準調製物データに基づく相関値。

表 1 のデータは、VEGF センス RNA 標準物質は、アンチセンス RNA プロブとハイブリダイズした場合、センス RNA の量が増加するに従って増加するホスフォイメジャーシグナルを生じることを示している。予想されるように、VEGF アンチセンス RNA 標準物質は、アンチセンス RNA プロブとハイブリダイズした場合、バックグラウンドに近いホスフォイメジャーシグナルを生じる。

【 0 0 5 6 】

実施例 4

組織マイクロアレイ中の内部標準調製物を使用する定量免疫蛍光検出

本実施例は免疫蛍光 (IF) 法のための組織マイクロアレイ (TMA) 組織切片において内部標準物質及びコントロールを提供する本発明の有用性を証明する。この実施例では、本発明のアレイを使用して、乳房腫瘍中の Her 2 / Erb B 2 の発現を、IHC により評価した。更に、本実施例は、それぞれが発現シグナルの標準曲線を作製するための異なる量の生物学的分子を有している複数の異なる内部標準物質を使用するアレイ中の、タンパク質のような生物学的に有用な分子を定量するための本発明の有用性を実証する。

次のようにして、24 カラムと 15 列の配列の 360 コアを含む臨床乳ガン試料よ内部標準調製物を含む典型的な組織アレイを構築した。直径 0.6 mm の寸法の 326 の試料組織コアを様々なドナーパラフィンブロックから得た。ドナーブロックは、通常は 2 組又は 3 組が採取される 99 標本の乳管腺癌組織と、2 標本の正常な乳房組織 (Leeds General Infirmary, Yorkshire, England) を含んでいた。試料コアは、例えば実施例 3 に記載のように、組織アレイ化機器を使用して、レシピエントパラフィンブロック中に埋め込ん

10

20

30

40

50

だ。

直径0.6mmの寸法の内部標準調製物の8のコアを、それぞれ上の実施例2に記載されたようにして調製されたタンパク質/アガロースを含むドナーブロックから得た。タンパク質/アガロース内部標準調製物は、0.0046、0.046、0.46及び0.93mg/mlの濃度でHer2/Erbb2細胞外ドメイン(ECD)タンパク質を含み、それぞれ2組が配列されて、それぞれ1%BSAを含んでいた。内部標準調製物は試料組織コアと同じようにしてパラフィンレシピエントブロック中に埋め込まれた。

【0057】

直径0.6mmの寸法の16コアの細胞ペレットコントロール(A673(ATCCカタログ番号CRL-1598); Calu-6(ATCCカタログ番号HTB-56); NC1-H460(ATCCカタログ番号HTB-177); MDA-MB-453(ATCCカタログ番号HTB-131); MCF7(ATCCカタログ番号HTB-22); MDA-MB-175VII(ATCCカタログ番号HTB-25); MDA-MB-231(ATCCカタログ番号HTB-26); NC1-H322(ATCCカタログ番号CRL-5806); SK-BR-3(ATCCカタログ番号HTB-30); A549(ATCCカタログ番号CCL-185); 及びSK-MES-1(ATCCカタログ番号HTB-58)で、これら細胞株は様々なレベルのHer2/Erbb2を発現する)を、上述の一般的方法を使用してレシピエントパラフィンブロック中に埋め込んだ。細胞ペレットのための細胞は標準的な組織培養条件で培養し、60-80%のコンフルエンスまで成長させた。約 10^7 から 10^8 の細胞を、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)中7mMのEDTAを使用して組織培養皿から集め、細胞が離脱するまで37でインキュベートした。ついで、細胞を10%NBFでの一晩の固定の前に50mlの円錐ポリプロピレン遠心管中に4で5分間、約300gでペレット化した。固定の後、固定液を70%エタノールで置き換え、試料を実施例3に記載のようにパラフィン包埋のために直ぐに加工した。直径0.6mmの寸法の25%の青、黄、又は黒の外科用マーカー染料(切片の評価中の配向に有用)を含む8%Nusieve3:1アガロースの4コアをレシピエントパラフィンブロック中に埋め込んだ。

コアの全てを37で一晩ブロックをインキュベートすることによりレシピエントパラフィンブロックアレイ中でアニールした。分析のために、パラフィンアレイを、一又は複数の3-5µm厚の組織TMA切片にスライスした。ついで、各TMA切片を42の水浴に移し、個々に集めてSuperfrostガラススライド上に置き、十分に乾燥させた。

【0058】

免疫蛍光法(IF)を次の2つの抗体を使用して乳癌アレイからのTMAスライドの幾つかで実施した: 1)天然に生じるHer2/Erbb2レセプター及び合成ECD配列のHer2/Erbb2細胞外ドメイン(ECD)に特異的なヤギポリクローナル抗体; 及び2)タンパク質の天然に生じる形態で存在するが合成ECD配列には存在していないタンパク質の細胞内ドメインを認識するDAKOUSAGIポリクローナル抗体。TMAスライドをキシレン(Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI)中でそれぞれ5分で3回洗浄することによって脱パラフィン化し、段階的にエタノールから蒸留水で水和させた後、それぞれ5分蒸留水で2回すすいだ。TMAスライドを、電子レンジで99で20分間、蒸留水で、10x原液から1:10希釈された、予め加熱したBiogenex Citra液(Biogenex, San Ramon, CA)に配した後、室温で20分冷却し、ついで、それぞれ5分で2回蒸留水ですすいだ。内在性組織ビオチンを、製造者の推奨に従ってアビジン-ビオチンブロック試薬キット(カタログ番号SP-2001)(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用いてブロックした。簡単に述べると、スライドを、アビジン試薬で10分間、ビオチン試薬で10分間、ついで、PBSで5分間、すすいだ。そのTMAスライドを3%BSA/PBS中10%の正常なウシ血清を用いて30分ブロックし; ブロック血清をスライドから除去した。ついで、TMAスライドを、5µg/mlのポリクローナルヤギ抗体(ヒトHer2/Erbb2 ECD)室温で60分間インキュベートした。パラレルなスライド

には、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギアイソタイプコントロール抗体 (Neomarkers, Fremont, CA) をネガティブコントロールとして用いた。インキュベーション後、TMAスライドを、それぞれ5分で2回、PBSですすいだ。ついで、TMAスライドを、PBS中1%BSAと、10%の正常なウサギ血清で1:200に希釈したビオチン化ウサギ抗ヤギ抗体(最終濃度は $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)と共に室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、TMAスライドを、それぞれ5分で2回、PBSですすいだ。ついで、TMAスライドを、AlexaFluor 633に結合した $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトアビジン (Molecular Probes, Eugene, OR)と共に室温で30分間、インキュベートした。インキュベーション後、TMAスライドを、それぞれ5分で2回、PBSですすいだ。

【0059】

10

DAKOウサギ抗(ヒトHer2/Erbb2)抗体を検出するために、一次抗体をPBS中1%BSA、10%ウサギ血清中に希釈したビオチン化ヤギ抗ウサギ二次抗体で検出したことを除いて、同じ手順を用いた。

IHC手順の結果を見るために、TMAスライドを、PBSに漬けた $0.45 \mu\text{m}$ の孔径のニトロセルロースフィルター紙で覆い、Typhoon 8600可変モードイメージャー (Molecular Dynamics) を用いてスキャンした。Alexa633蛍光染料を、633nmレーザーを使用して励起し、670バンドパスの30nmエミッションフィルターを用いて $50 \mu\text{m}$ の解像度で検出した。画像はPhoretix Array²ソフトウェア(Nonlinear USA Inc, Durham, NC)を用いて定量し、データはマイクロソフトのエクセルを使用して解析した。

20

内部標準調製物及び試料中のHer2/Erbb2 ECDタンパク質の量を計算した。タンパク質/アガロース内部標準調製物中のHer2/Erbb2 ECDタンパク質はタンパク質のN末端から約650のアミノ酸を含んでいた。このECD断片は約71400ダルトンの重さであった。タンパク質/アガロース内部標準調製物は $0.46 \text{mg}/\text{ml}$ のHer2/Erbb2 ECDを含んでおり、よって約 6.44×10^{-9} モル/ml、又は約 3.88×10^{15} 分子/ml、又は約 3.88×10^3 分子/ μm^3 のHer2/Erbb2 ECDを含んでいた。 $5 \mu\text{m}$ 厚の組織切片では、この標準物質は約 1.94×10^4 分子のHer2/Erbb2 ECDを平方ミクロン当りに含んでいた。

ついで、Her2/Erbb2 ECD内部標準調製物及び組織試料から生じる免疫蛍光シグナルの強度を、試料中のHer2/Erbb2タンパク質の量が組織の単位体積当たりのタンパク質分子で決定できるように、相関させた。次表に上述の免疫蛍光法から得られたデータをまとめる。

30

【0060】

【表 2】

表 2

コア/TMA スポット の内容物	ホスフォイメジャー シグナル (ヤギ抗 ECD Ab)*	Her2/ErbB2 タンパク質量 ¹ (分子/ μm^3)
Her2/ErbB2 タンパク質内 部標準調製物 - 0.46 mg/ml	64	3.9×10^3 (既知)
Her2/ErbB2 タンパク質内 部標準調製物- 0.093 mg/ml	10	7.8×10^2 (既知)
Her2/ErbB2 タンパク質内 部標準調製物- 0.046 mg/ml	0.8	3.9×10^2 (既知)
Her2/ErbB2 タンパク質内 部標準調製物- 4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.4	39 (既知)
試料 1: SkBr3 細胞株 細胞ペレット	290	1.7×10^4 (相関 ²)
試料 2: 乳房, 管 腺癌	376	2.2×10^4 (相関 ²)
試料 3: 乳房, 正常	0.26	1.8×10^2 (相関 ²)

* データは、同一 TMA 中での 1%BSA コアのバックグラウンドシグナル(0.66 カウント/ピクセル)に相関させたホスフォイメジャーのピクセル当りのカウント(直径 50 ミクロン)で表示。各値は 2 組のコア試料の平均値。

¹ Her2/ErbB2 ECD タンパク質標準物質を用いて、実験的に測定した 50 μm 径ピクセル当りのホスフォイメジャー値(カラム 2)を、既知の立方ミクロン当りの Her2 タンパク質コピー数(カラム 3)に関連させる 4 点標準曲線を得た。その関係は式 $H=(P+2.811)/0.0171$ によって表され、ここで H は立方当りの HER2 コピー数、P は 50 μm 径ピクセル当りのホスフォイメジャー値 (BSA のみのバックグラウンドに対して補正)に等しい。

² Her2/ErbB2 タンパク質内部標準調製物データに基づく相関値。カラム 2 の測定データで、脚注 1 に記載の関係を用いてカラム 3 の値を算定。

【 0 0 6 1 】

上に示されたように、試料内に含まれていた HER2 / ErbB2 レセプタータンパク質の量を、内部標準調製物中のレセプタータンパク質の既知量に基づいて定量した。上の表 2 のデータは、適切な免疫蛍光染色後に、合成 HER2 / ErbB2 ECD 標準物質を使用して、ホスフォイメジャーシグナル強度に単位体積当りの HER2 / ErbB2 タンパク質分子数を相関付ける標準曲線を作成できることを示している。データは更に、標準曲線を用いて、臨床組織試料の測定ホスフォイメジャーシグナル強度を組織の単位体積当りの HER2 分子と相関させることができることを示している。

【 0 0 6 2 】

細胞又は組織中における HER2 発現又は HER2 産生を測定する他の方法との定量免疫蛍光法の比較： HER2 / neu (c-erb-B2) 癌遺伝子は増幅され、HER2 レセプタータンパク質は乳癌の 20 - 30 % で過剰発現される。HER2 レセプターが陽

10

20

30

40

50

性の転移性乳癌の女性はより攻撃的な疾患で、再発の可能性が高く、予後も乏しく、HER2陰性乳癌の女性のおよそ半分の平均余命である。現在の常套的な臨床実務では、HER2陽性腫瘍は、二つの手段：HER2遺伝子増幅を定量する蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)又は免疫ペルオキシダーゼ検出法がHER2レセプタータンパク質過剰発現に対する腫瘍の半定量的診断スコア付けを可能にする免疫組織化学法を含むHercepTestTMの一つによって同定される。簡単に述べると、スコア付けは、病理学者が、ある基準の大まかな推定値に基づいて免疫組織化学的に染色されたスライドに整数のスコアをあてがう方法である。3+ = 細胞の > 10% で強い強度の完全な膜染色。2+ = 細胞の > 10% で弱いし中程度の強度の完全な膜染色。1+ = 細胞の > 10% で不完全な膜染色。0 = 細胞の < 10% で染色又は膜染色の欠如。

10

本発明の定量免疫蛍光法は、一般的に使用されている方法と比較して、高スループットの迅速な定量検出、特異性、及び改善された擬陽性及び擬陰性の検出速度の利点を有している。これらの利点は、パラフィン埋め込み組織マイクロアレイの細胞中での細胞HER2発現が、本発明の定量免疫蛍光及び定量免疫組織化学法を使用して決定された次の実験によって例証されている。結果はインサイツハイブリダイゼーション(FISH)、Taqman(登録商標)RT-PCR、HercepTestTM免疫組織化学、ELISA分析法と比較される。

【0063】

細胞株：HER2発現は、9つの新鮮に調製された細胞株において、RT-PCR(リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法)、ウェスタンブロット法、FACS(蛍光標示式細胞分取法)、及びELISA(酵素結合免疫吸着検定法)によって測定された。細胞株には、SK-BR-3、MDA-MB0453、NCI-H322、MDA-MB-175、MCF7、A673、A549、MDA-MB-231、SK-MES-1(上述したもの)が含まれる。各細胞株をHER2発現のレベルに従ってランク付けた。各細胞株からの細胞ペレットを室温で一晩10%中性緩衝ホルマリン(Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI)で固定した。ついで、細胞ペレットを70%エタノール(水中)に移し、パラフィン包埋のために加工した(標準的技術による)。

20

【0064】

アガロースHER2 ECD標準物質：組換えHER2レセプター細胞外ドメイン(ECD)タンパク質を、0.46 mg/ml、0.093 mg/ml、0.046 mg/ml及び0.0046 mg/mlの希釈度で2%溶融アガロースに加えた。各アガロースブロックを固化させた後、10%中性緩衝ホルマリン(NBF)に固定し、パラフィン包埋のために加工し、上述のようにしてパラフィンブロック中にアレイ化した。

30

【0065】

組織マイクロアレイ：99のパラフィン包埋した段階3の乳管癌からの3組の代表的組織コアを、例えばKonenen等、Nature Medicine 4(7):767-768 (1998)により記載されているようにして、組織アレイヤー。(Beecher Instruments, Silver Springs, MD)を使用して、単一の組織マイクロアレイにアレイ化した。各組織マイクロアレイにアレイ化したのは3組のコアのHER2 ECDアガロース標準物質及び9つのHER2発現細胞株であった。便宜上、細胞株とアガロース標準物質を、標準物質中のHER2レセプターECDタンパク質の既知量と細胞株中で発現されたHER2レセプターの予想量に従ってアレイ中に収容した。

40

【0066】

HER2 ECD標準物質を使用する定量免疫蛍光法：アガロースに埋め込んだHER2 ECD標準物質を次のようにして調製した。溶融アガロースを2%の最終濃度まで添加し、溶液を15 mm X 15 mmのdiSPo(登録商標)組織学埋め込みモールド(Baxter Healthcare Corporation, McGaw Park, IL)中に注いだ。組換えHER2レセプター細胞外ドメイン(HER2 ECD)をアガロースに加えて固化させた。HER2 ECDを0.46、0.046、及び0.0046 mg/mlの濃度まで希釈した。ついで、アガロースブロックを10%中性緩衝ホルマリン(NBF)に固定し、パラフィン包埋のために加工し

50

、パラフィンブロック中にアレイ化した。

4つの抗体を用いて、この実施例4に記載された手順によって調製された組織マイクロアレイの組織、細胞及び標準物質中のHER2タンパク質レベルのレベルを検出した。標的特異的抗体を含む任意の標準的な免疫染色法を使用することができる。この実施例の目的のために、HER2レセプタータンパク質に対して産生した4つの異なった抗体を使用して免疫染色を実施した。二つのものは細胞質内ドメインを認識する；(1)ウサギ抗ヒトc-erbB2(HER2/neu)ポリクローナル抗体(HerceptTestTM, キット, DAKO, Carpinteria, CA)；(2)CB11(マウス抗ヒトHER2 ICDモノクローナル抗体(NeoMarkers, Fremont, CA)。2つのものはHER2細胞外ドメインに対して産生し；(3)4D5マウス抗ヒトHER2 ECDモノクローナル抗体(Genentech, Inc. South San Francisco, CA; 1990年5月24日寄託のATCC CRL 10463; ここでrhUMAb 4D5はHerceptin(登録商標))；(4)ヤギ抗ヒトHER2 ECDポリクローナル抗体(Genentech, Inc. South San Francisco, CA)。ウサギ抗ヒトc-erbB2(HER2/neu)ポリクローナル抗体(上掲のHerceptTestTM, DAKO)及びCB11抗体(上掲のNeoMarkers)を使用する免疫染色をそれぞれの製造者の指示書に従って実施した。4D5抗体と共にインキュベートした組織を37℃で5分間、0.1NのHCl中0.4%ペプシンで処理した後、4℃で4D5と共に一晩インキュベートした。ヤギ抗HER2 ECD抗体と共にインキュベートした組織を、99℃で20'間 DAKO標的回収液(DAKO, Carpinteria, CA)で前処理した後、室温で1時間抗体をインキュベーションした。全組織を7.5 µg/mlの種特異的ビオチン化二次抗体(Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA)で処理した。ビオチン二次抗体の結合に続いて、組織を室温で30分間、5 µg/mlのストレプトアビジンAlexaFluor 633 (Molecular Probes, Eugene, OR) と共にインキュベートした。

マイクロアレイ上の標準物質と試料によって発せられる蛍光を検出するには、任意の標準的な蛍光検出法を使用することができる。この実施例の目的のために組織試料を、DAPI(4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)を含むVectashield取り付け媒質(Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA)を使用して取り付けた。定量免疫蛍光検出は、Typhoon 8600 ホスフォイメージャー(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を使用して実施した。試料を、350ボルトの633 nmレーザーを使用して励起し、670バンドパスの30エミッションフィルターを用いて50 µmの解像度で検出した。データはPhoretixソフトウェア(Nonlinear USA Inc, Durham, NC)を用いて解析した。

【0067】

蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)： FISHは標準的な方法によって実施することができる。これらの実験の目的のために、Vysis PathVysion HER2 DNAプローブキット(Vysis, Downers Grove, IL)を用いてアレイ組織又は細胞株中のHER2遺伝子増幅のレベルを検出した。HER2過剰発現の決定(スコア付け)とアッセイは製造者の指示書(上掲のVysis)に従って実施した。しかしながら、組織マイクロアレイ上の組織コア切片(スポット又はエレメント)の小さいサイズのため、組織エレメント当たり10の核だけについて、遺伝子座に対応する各蛍光ドットの数調べた。Vysisプロトコルを使用して、染色体17のコピー数に対する、染色体17のセントロメア(17p11.1-q11.1)に位置するアルファ付随体DNAに存在する遺伝子CEP17の検出により、HER-2遺伝子のコピー数を決定することができた。区別されるHER2及びCEP17シグナルの数は、それぞれDAPI/9-オレンジ及びDAPI/グリーン(ニコン)デュアルバンドパスフィルターを使用して独立に決定した。落射照明はオリンパスAH2-RFL-T水銀ランプによって与えられ、シグナルは100x油浸レンズで数え上げた。エレメント当たり10の調べた核のそれぞれに対して、HER2及びCEP17シグナルをカウントし、増幅のレベルをHER2：CEP17シグナルの比として表した。

【0068】

遺伝子発現のTaqman^a RT-PCR分析： HER2を発現する9つの細胞株からのDNAをQiagen RNeasy midi キット(Qiagen, Inc., Valencia, CA)を用いて単離した。各試

料を 50 pg から 0.05 pg の全 RNA の範囲で 11 ポイントの標準曲線で希釈した。正方向 5'-TGGTCTTTGGGATCCTCATCA-3' (配列番号: 2) 及び逆方向 5'-AGCAGTCTCCGCATCGTGTA-3' (配列番号: 3) 配列に相当する HER2 特異的プライマーが産生された。蛍光発生プローブ配列は 5'-FAM-TCCGGATCTGCTGCCGTC-TAMRA-3' (配列番号: 4) であった。5-FAMTM は 6-カルボキシフルオレセインを意味し、TAMRATM は 6-カルボキシテトラメチルローダミンを意味する。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (Taqman (登録商標) RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) 分析を製造者の指示書に従って実施した。遺伝子発現の定量は SYBER (登録商標) グリーン RT-PCR 試薬キット (上掲の Applied Biosystems) を使用して行った。

【0069】

HercepTestTM: HercepTestTM 免疫組織化学法を製造者のガイドライン (DAKO, Carpinteria, CA) に従って実施した。

ヤギ抗 HER2 ECD 免疫組織化学法: HercepTest IHC に対する可能な代替法として、ヤギ抗 HER2 ECD 抗体を検出に用いた IHC 法を評価した。ヤギ抗 HER2 ECD 抗体の検出は、Vectastain エリート ABC-HRP キット (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を使い、ついで製造者の指示書 (ImmunoPure (登録商標) DAB、製品番号 34001, Pierce Chemical Company, Rockford, IL) に従って 10 - 15 分間、金属増強 DAB (3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) での処理を行って実施した。IHC に対する蛍光画像法を、例えば、DAPI 及びローダミンフィルターセット (Chroma, Brattleboro, VT) を備えたニコン Microphot - FX スコープ (ニコン, Tokyo, Japan) を使用して実施した。画像を RT スライダー SPO T カメラ (Diagnostic instruments, Inc., Sterling Heights, Michigan) を使用して取得した。HER2 過剰発現に対して陽性又は陰性かの乳癌試料のスコア付けを、DAKO HercepTestTM キット (上掲の DAKO) によって確立されたガイドラインによって行った。

【0070】

ELISA 分析法: ヤギ抗 HER2 ECD アフィニティ精製抗体をコーティングバッファー (0.05 M 炭酸塩 / 炭酸水素塩、pH 9.6) で 1:2000 に希釈した。抗体溶液の 100 µl のアリコート を 96 ウェルのプレートに添加し、4 で一晩インキュベートした。抗体溶液を捨てて、150 µl のブロックバッファー (PBS + 0.5% BSA + 10 ppm の Proclin) を室温で 1 時間穏やかに攪拌しながら添加し、PBS + 0.05% トウイン (Tween) 20 で 3 回洗浄した。中間物をマジックバッファー (PBS + 0.5% BSA + 10 ppm Proclin + 0.05% トウイン 20) + 0.2% BgG + 0.25% CHAPS + 0.35 M の NaCl、pH 7.4) で 2 倍に希釈し、4 から 0.06 ng/ml の範囲の 7 ポイントの標準曲線を作成した。標準物質、試料及びコントロールの 100 µl のアリコートを、3 組、プレートに添加し、穏やかに攪拌しながら室温で 2 時間インキュベートし、3 X 洗浄した。ストレプトアビジン-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) をマジックバッファーで 1:10000 に希釈し、穏やかに攪拌しながら室温で 30 分間インキュベートし、3 X 洗浄した。TMB ペルオキシダーゼ基質 (TMB Peroxidase Substrate) をペルオキシダーゼ溶液 B (H₂O₂) と混合し、100 µl を各ウェルに添加し、10 - 15 分の間、発色させた。反応を 100 µl の 1 M リン酸を用いて停止させ、吸光度を 450 - 630 nm で読みとった、

マイクロアレイ上の HER2-発現細胞における HER2 遺伝子の増幅とタンパク質の発現の相対量を図 8 A - 8 F の棒グラフによって示す。その棒グラフは、マイクロアレイ上の細胞株中の HER2 の検出が Taqman (図 8 A)、ELISA (図 8 B) 及び本発明の方法を使用する定量免疫蛍光法 (図 8 C - 8 D) と同様であることを示している。これは更に IF と ELISA の間の高相関係数 (R^2) によって実証された。定量免疫蛍光法は定量免疫組織化学法に対して、平均して、改善された検出範囲の強いシグナルを与えた。また、抗細胞内ドメイン (抗 ICD) 抗体の特異性は、図 9 B において、HER2 細胞外ドメイン (ECD) タンパク質標準物質に対する検出シグナルがないことによって証明されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 1 】

統計的分析： この分析の目的は、98の臨床乳房組織試料に適用された、アガロースに埋め込まれ上述の4つの抗体（ウサギ抗ヒトc-erbB2（HER2/neu）ポリクローナル抗体；CB11（マウス抗ヒトHER2 ECDモノクローナル抗体）；4D5マウス抗ヒトHER2 ECDモノクローナル抗体；及びヤギ抗ヒトHER2 ECDポリクローナル抗体）で検出されるHER2 ECDタンパク質を含むマイクロアレイでの、FISH法と6種の別のアッセイ：HercepTestTM IHC、ヤギ抗HER2 ECD IHC、及び定量免疫蛍光のそれぞれの結果の間の診断の一致性を比較することである。HercepTestTMはハーセプチン（登録商標）抗HER2抗体での治療の適格性を決定する（2+又は3+のスコアが適格性を示している）現在承認されている方法であるが、多くの臨床医が、FISH分析法の方がHER2発現状態を決定するためにHercepTestTMよりもより信頼性があると考えている。また、IHC法は臨床医による蛍光画像の可視化を必要とし、よって、誤診の可能性、低処理量、高コストを持ち込む。従って、FISH法の診断能力に勝るとも劣らないが、より高処理量で低コストの他の検査法を見出すことが有用である。

10

FISH分析結果は標準として使用し、ここで2.0以上のFISHスコアは陽性のHER2過剰発現スコアであると定義される。98名の患者からの98の乳癌試料のうち、マイクロアレイ上のエレメント（スポット）の喪失のために10の組織試料に対しては最大のFISHスコアは得られなかった。88の残りの試料のうち、38を陽性又はHER2過剰発現に分類し、50を陰性に分類した。ついで、標準としてこれらのFISH結果を使用して、他の方法のそれぞれの成績を、他の方法に対して選択されたスコア閾値に対する診断スコアの一致性を調べることによって特徴付けた。各方法に対して、感度（その選択された閾スコア値において与えられた方法により陽性と正しく同定されたFISHスコア陽性試料の割合）及び特異性（その選択された閾スコア値において与えられた方法により陰性と正しく同定されたFISHスコア陰性試料の割合）を決定した。定量免疫蛍光値は各組織マイクロアレイ上に存在するコントロールMB-MDA-453細胞株の結果に対して正規化させた。1の全ての正規化蛍光値をHER2過剰発現に対して陽性と考え、3+スコアに等しいとした。正規化免疫蛍光結果を、臨床的に関連するHER2過剰発現に対して試料を正しくスコア付けする各方法の相対能力を評価するためにHercepTestTM IHCアッセイのものと比較した。

20

30

【 0 0 7 2 】

現在、HercepTestTMによる陽性のHER2過剰発現に対するスコア付けの基準は2+の閾値であり、これは、それぞれ76.3%及び92%の感度及び特異性推定値のデータを生じる。他のアッセイの結果を調べて、HercepTestTMの基準によって与えられる同様の感度及び特異性レベルをつくり出すスコア閾値を決定した。例えば、少なくとも76.3%の感度を生じる最も高い4D5 ECD閾値は4IFであり、これは正確には76.3%の感度であるがわずかに86%の特異性に相当し、HercepTestTMアッセイのものより低い。少なくとも92%の特異性を生じる最も低い4D5 ECD閾値は5IFであり、これは94%の特異性と73.7%の感度を生じた。4D5 ECDアッセイの如何なる単一の閾値も感度と特異性の双方の等価物又はよりよい推定値を与えない。他の3つのアッセイ（ヤギIHC、ウサギ抗HER2 ICD免疫蛍光、及び4D5 ECD免疫蛍光）の何れかをを用いると、感度が特異性の何れかの減少を生じた。他方、表3に挙げられているように、ヤギ抗ヒトHER2 ECD免疫蛍光法（61-85IF）及びCB11抗ヒトHER2 ICD免疫蛍光アッセイ（56-59IF）には有用な閾値は存在していない。よって、これらの試験の何れから見ても、常套的に使用されているHercepTestTMアッセイよりもFISHアッセイの結果は勝るとも劣らない。

40

【表 3】

表 3
HercepTest 結果に対するアッセイ感度と特異性の比較
(76.3% 感度, 92% 特異性).

アッセイ法	特異性 $\geq 92\%$ の閾値 (感度%, 特異性%)	感度 $\geq 76.3\%$ の閾値 (感度%, 特異性%)
ヤギ抗 HER2 ECD 免疫組織化学法	3+ (73.7%, 98%)	2+ (92.1%, 74%)
ウサギ抗 HER2 ICD 免疫蛍光法	64 IF (71.1%, 92%)	59 IF (76.3%, 90%)
ヤギ抗 HER2 ECD 免疫蛍光法	61 IF (78.9%, 94%)	85 IF (76.3%, 100%)
4D5 抗 HER2 ECD 免疫蛍光法	5 IF (73.7%, 94%)	4 IF (76.3%, 92%)
CB11 抗 HER2 ICD 免疫蛍光法	56 IF (76.3%, 92%)	59 IF (76.3%, 92%)

第一列は少なくとも 92% の特異性を示した閾値を揚げ、第二列は少なくとも 76.3% の感度を生じた閾値を付与する。

アガロースに埋め込んだ標的タンパク質標準物質を使用する組織マイクロアレイの免疫蛍光分析は高スループットの組織分析及び診断に有用な迅速な定量法である。定量免疫蛍光法の結果は、標的遺伝子の増幅又は標的タンパク質の発現に対して常套的に使用される他の方法に勝るとも劣らず、定量免疫蛍光法をそれだけで有用なものにし又は既存の方法に付加されるものになる。

【0073】

p 5 3、K i 6 7、C D 3 1、h M L H 1 及び h M S H 2 を測定する他の方法との本発明の定量免疫蛍光法の比較 結腸直腸組織中での発現

定量免疫蛍光法の比較性を次の実験によって更に証明した。

インサイツ実験の精確さと信頼性は定性的解釈によって譲歩される。定量化はより大なる客観性と再現性を課す。これらの実験は内部標準物質を有する組織マイクロアレイを調製することの有用性を証明する。レーザーイメージャーシステムを、組織マイクロアレイ中での遺伝子発現のインサイツ定量分析に使用した。免疫蛍光法を用いて、結腸直腸組織のアレイ列 (n = 110) 中での p 5 3、K i 6 7、C D 3 1、h M L H 1 及び h M S H 2 の発現を定量した。このパネルの抗原に対する定量データを、免疫組織化学色素原付着の定性的スコア付けと客観的に比較した。また、血管内皮成長因子 (V E G F) - A、胎盤成長因子、肝細胞成長因子及び c - M e t m R N A の発現を、インサイツハイブリダイゼーションのリン画像解析によって定量した。p 5 3、K i 6 7 及び C D 3 1 の発現に対する定量データは免疫組織化学スコアと有意に関連していた (p = 0.001)。

マイクロアレイ技術は、全ての標本が同一条件下で加工され、分析前及び分析標準化が最適化されるという事実から有利である。アガロースが合成ブロック中に既知量の m R N A 及びタンパク質を導入する媒体として用いられ、それが、組織検査され、内部コントロールとして組織マイクロアレイ中に組み込まれうる。よって、研究の目的は免疫標識と I S H の特異性と感度をコントロールする際のアガロース基質の有用性を決定することにある。

【0074】

ヒト組織の選択

10

20

30

40

50

FFPE 結腸直腸組織カセットと対応するヘマトキシリン及びエオシン (H & E) 染色切片を、マイクロアレイの構築のための非腫瘍性、良性及び悪性上皮細胞を含むブロックについて調べた。

合成標準ブロックの調製

-アクチン、HGF、P1GF、c-Met及びVEGF-Aの断片を増幅するためにPCRプライマーを設計した。センス及びアンチセンスHGF、P1GF、c-Met及びVEGF-A RNA断片を、製造者のプロトコールに従って、適切なMegascriptキット (Ambion, Austin, TX) を用いて転写した。製造者の指示書に従って、RNeasyミニキット (Qiagen Inc., Valencia, CA) を使用してRNAを精製した。260及び280nmでの吸光を分光光度法によって測定して、RNA収量及び濃度を決定した。

10

NuSieve3 : 1 アガロース (FMC Bioproducts, Rockland, ME) を、8%の水溶液の250 μ lのアリコートに構成し、95 $^{\circ}$ Cの水浴でインキュベートした。mRNAの段階希釈物を調製し、ピペット採取によってアガロースと混合し、1ml (2%アガロース) の全容積中、5 μ g/ml、1 μ g/ml及び0.5 μ g/mlの最終濃度にした。ついで、混合物を95 $^{\circ}$ Cで更に10分間インキュベートしmRNAを変性させた。ボルテックスによって十分に混合した後、各コントロールをピペットによって15 x 15 mmのdiSP0ベースモールド (Baxter, Deerfield, IL) に入れ、4 $^{\circ}$ Cで1 - 2時間放置した。固化したブロックをモールドから取り除き、パラフィン包埋前に4%ホルマリンで一晩固定した。また、HER2タンパク質細胞外ドメイン (ECD) に対応するペプチドを使用して同様の方法で標準物質を構築した。タンパク質の段階希釈物を調製し、2%アガロース1ml中、0.46 mg/ml、0.093 mg/ml及び0.046 mg/mlの最終濃度にした。タンパク質の変性を防止するために、混合及びモールド中へのピペットによる注入の前にアガロースを冷却させた。ブランクのFFPE 2%アガロースコントロールをまたアレイ中に導入した。

20

【0075】

組織マイクロアレイの構築

Beecher Instrumentsマイクロアレイヤー (Silver Spring, MD) を使用して事例群を代表する2つのTMAsを構築した。全体で、83の原発性結腸直腸腺癌 (CRCs)、12の転移 (CRMs; 9の肝臓、2のリンパ節、1の小腸漿膜)、15の腺腫 (CRAs) 及び9の隣接する正常な粘膜組織を採取した。標準物質を各マイクロアレイ中に導入して次のように本発明に係る内部標準物質とした。円筒状コア (直径600 μ m) をドナーブロックの代表的領域から穿孔採取し、レシピエントパラフィンブロック (35 x 35 mm) 中に入れた。組織採取は3組実施して、親ブロックに代表的データを提供し、合成標準物質を3組採取してレシピエントブロックに挿入した。3 μ mの厚みの切片をレシピエントブロックから切り出しガラススライドに取り付けた。

30

【0076】

免疫組織化学法

CD31、Ki67、ヒトMutLホモログ1 (hMLH1)、ヒトMutSホモログ2 (hMSH2) 及びp53の免疫局在化を免疫組織化学法 (IHC) によって評価した。マイクロアレイ切片を脱パラフィン化し、熱媒介抗原回復を、表1に引用された条件下でスライドをマイクロウェーブ処理することにより実施した。内在性ペルオキシダーゼを、脱イオン水で1 : 10に希釈したKirkegaard及びPerry Laboratoriesブロック液 (Gaithersburg, MD) を用いて、室温で4分にわたって急冷した。リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2) を全体にわたって洗浄液として使用した。続いて、スライドを加湿チャンバー中に平らにして配し、内在性ビオチンを、製造者の指示書に従って、アビジン-ビオチンブロックキット (Vector Labs., Burlingame, CA) を用いてブロックした。非特異的免疫グロブリン結合を、室温で30分間、10%の正常ウマ血清 (NHS) (Gibco, Rockville, MD) を用いてブロックした。ついで、表1において引用した条件下で、NHSに希釈した適切な一次抗体と共にTMA切片をインキュベートした。一晩のインキュベーション (CD31) を4 $^{\circ}$ CにてShandon Sequenzaユニット (Runcorn, UK) で実施した。その後、スラ

40

50

イドを、NHSに1:200で希釈した適切なビオチン化二次抗体(Vector Labs.)と共にインキュベートした。ビオチン化抗体からのシグナルを増幅し、ストレプトアビジン-ビオチン複合体(ABC)(Vectastain Elite; Vector Labs.)を用い、提供されたプロトコールに従って西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)で標識した。CD31免疫染色に対しては、HRP複合体のチラミドシグナル増幅を、製造者のプロトコールに従っての、ビオチン化チラミド(NEN TSAキット, Perkin Elmer, Boston, MA)と、続く第二のABC層とのインキュベーションによって実施した。免疫複合体を、室温で5分間の金属増強3,3'-ジアミノベンジジン(Pierce Technology, New York, NY)とのインキュベーションによって可視化した。組織をMayerのヘマトキシリンで対比染色し、ブルーイング液で発色させ、脱水し、合成培地に取り付けた。

10

【0077】

【表4】

表4

免疫染色に用いた一次抗体及び抗原回復条件							
抗原	一次抗体					抗原回復	
	製造元	クローン	種アイソタイプ	濃度(μg/ml)	時間と温度	バッファー	時間と温度
CD31	DAKO Corp.	JC/70A	マウス IgG ₁	13.2	16 h 4°C	標的	20' 99°C
ERA	DAKO Corp.	MOC-31	マウス IgG ₁	1.3	60' 20°C	標的	40' 99°C
HER2	Genentech, Inc. ^a	ポリクローナル	ヤギ	5.0	60' 20°C	標的	20' 99°C
Ki67	DAKO Corp.	ポリクローナル	ウサギ	2.5	30' 20°C	標的	40' 99°C
hMLH1	BD PharMingen	G168-15	マウス IgG ₁	10.0	120' 20°C	トリロジー	30' 99°C
hMSH2	BD PharMingen	G219-1129	マウス IgG ₁	10.0	120' 20°C	トリロジー	30' 99°C
p53	DAKO Corp.	DO-7	マウス IgG _{2b}	2.5	60' 20°C	標的	20' 99°C

^a HER2 タンパク質細胞外ドメインのC末端ペプチドに対して産生。
略号: AS, 供給状態; ERA, 上皮関連抗原; hMLH1/hMSH2, ヒト *Mut L/S* ホモログ 1/2;
BD Pharmingen, San Diego, CA; DAKO Corp., Carpinteria, CA.

20

30

3 μm厚のFFPEヒト胎児ブロックの切片を実験のコントロールとした。陰性のコントロールスライドは、一次抗体の代わりに同じ種、アイソタイプ及び濃度の免疫グロブリン培養上清(DAKO Corp., Carpinteria, CA)とインキュベートした。

40

全てのIHCを一人の組織病理学者がスコア付けした。コアは、陽性の染色核が上皮細胞集団の25%より多く占める場合にp53を過剰発現しているとした。hMLH1及びhMSH2の発現の喪失に対する閾値はコアの上皮細胞集団中の核染色の完全な欠如として定義した。Ki67の核発現を証明する上皮細胞の割合を使用して、1-3のスコアの増殖指数とした(各コア中、それぞれ<10%、10-50%及び>50%の陽性染色腸細胞に相当)。CD31に対して産生されたIHCを用いて、0-3のスコアの相対コア血管増生を決定した。各コアに対する最終スコアはそれぞれの3つのコアからの最大値を取った。免疫蛍光データの統計的比較を補助するために、Ki67及びCD31 IHC

50

スコアを、低(スコア1)又は高(2又は3のスコア)増殖指数及び低(0又は1のスコア)又は高(2又は3のスコア)血管密度に再分類した。

【0078】

免疫蛍光

IHCによって評価された抗原に加えて、上皮関連抗原(ERA)及びHER2の発現もまたIFによって評価された。一次及び二次抗体(CD31に対するビオチン化チラミドまで)を用いての所望の抗原の免疫標識をIHCのように実施した。ついで、ビオチン化タグを、室温にて30分かけてストレプトアビジン、ALexa Fluor 633 コンジュゲート(正常血清で1:200に希釈; Molecular Probes, Eugene, OR)で標識した。組織を取り付け、DAPI(4',6ジアミジノ-2-フェニルインドール)(Vector Labs.)を用いたVectashield媒体で対比染色した。脱色とシグナルの消失を防止するために、全ての蛍光スライド及び試薬は、使用しないときはアルミフォイルでラッピングし、4℃で保存した。

10

蛍光標識したスライドを、励起のために635nmレーザーを用いるFLA-8000イメージャー(Fujifilm Medical Systems USA Inc., Stamford, CT)を使用して先ず評価した。900Vの電位差を蛍光発光の検出と定量のために光電子増倍管に印加した。スキニングを最大感度で実施し、5µmの画像分解能を達成した。続いて、免疫染色の検定のために蛍光顕微鏡(AMJ)によってマイクロアレイを検査した。

バックグラウンド除去、スキャンイメージのグリッド化と解析をPhoretix Arrayソフトウェア(バージョン2; Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK)を用いて行った。各例に対する定量シグナルをバックグラウンドを越える最大コア面積(CD31、ERA)又は体積(他の全ての定量抗原)として取った。ついで、定量IFシグナル(CD31、hMLH1、Ki67及びp53)を、それぞれのバイナリーIHCスコア及び比較した四分位範囲(IQRs)によって分類した。定量IFの評価のための閾値を、最低のメジアン面積/体積を持つグループの第三の四分位数と最高のメジアン面積/体積を持つグループの第一の四分位数の間に設定した。ついで、各事例に選択された閾値に対してバイナリースコアをあてがった。

20

【0079】

インサイツハイブリダイゼーション

[³³P]UTP標識(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)アンチセンスリボプローブを、増幅-アクチン、VEGF-A、HGF、c-Met及びP1GF cDNA鋳型からインビトロにて転写した。TMA切片を脱パラフィン化し、4µg/mlのプロテイナーゼKで37℃で30分間、除タンパクし、更に標準的な方法を使用してISHのために加工した(例えばLu L.H.及びGillett N.A., Cell Vision 1:169-176 (1994); 及びWeisinger G等, Biochim Biophys Acta 1446:225-232 (1999)を参照)。アンチセンスリボプローブを55℃で一晩ハイブリダイズさせた後、0.1xSSC中で55℃にて2時間、高ストリンジェント条件の洗浄を行った。定量分析のために、乾燥させ同位体的にハイブリダイズさせたスライドを、室温で18時間、リン光イメージングプレート(IP)(露出カセットを備えた85x127mm, 富士フィルム)に並べた。インキュベーション直後に、励起のための532nmレーザーと写真刺激発光を検出するためのB390フィルターを使用して、ホスフォイメージャー(FLA-8000)を用いて10µmの解像度でIPをスキャンした。バックグラウンド除去、IPのグリッド化と解析をPhoretix Arrayソフトウェアを用いて行った。各例に対する定量シグナルをバックグラウンドを越える最大コア体積として取った。コアのmRNA量の変動を制御するために、VEGF-A、c-Met、HGF及びP1GFにハイブリダイズさせたプローブからのシグナルを、-アクチンにハイブリダイズさせたプローブからのシグナルに対して正規化させた(Frantz G.D.等, J Pathol 195:87-96 (2001)を参照)。

30

40

IP露出後に、スライドをNBT2核トラックエマルジョン(Eastman Kodak, Rochester, NY)に浸け、乾燥剤を含む密封プラスチックスライドボックス中で4℃にて2-4週間露出させ、現像し、H&Eで対比染色した。続いて、ハイブリダイゼーションの証明のた

50

めに明視野 / 暗視野顕微鏡によってマイクロアレイを調べた。

【0080】

統計的解析

統計的解析を、ウィンドウズ用 S P S S (バージョン10.1; Chicago, IL) を使用して実施した。イエーツ補正ピアソンの²検定を用いてカテゴリーデータ間の関係の優位性を評価した; ここで、期待カウントは5未満であり、フィッシャーの正確な検定を用いた。連続データの平均及びメジアン値を、ステューデント t 検定とマン・ホイットニー U 検定によってそれぞれ比較した。両側性 p 値が < 0.05 の場合に統計的に有意であるとされる。

【0081】

10

結果

免疫組織化学

採取した119の例のうち85から103(71 - 86%)が抗原の発現の解釈に十分であった(表5)。エレメントは、それが不十分な上皮細胞、組織壊死又は出血を含んでいる場合は不十分であると見なした。全ての陰性コントロール切片は色素原付着の欠如を証明した。抗 p 5 3 免疫グロブリンクローン D O - 7 は p 5 3 タンパク質の野生型及び変異体型の両方に感受性である。色素原付着は上皮細胞集団の核のみに観察された。p 5 3 の発現は、隣接した正常な粘膜の 0 / 9 (p = 0 . 0 0 1) 及び 1 / 1 2 のみの C R A s (p = 0 . 0 0 5) と比較して 4 0 / 7 0 の C R C s において明らかであった。これに対して、K i 6 7、h M L H 1 及び h M S H 2 の発現は上皮細胞と介在する間質の双方の核において観察された。正常な腸細胞では、3種全ての抗原の発現の徐々の喪失が、腺窩を通じての細胞の進行と共に観察された。一つのミスマッチ修復タンパク質の喪失(h M L H 1)が7 / 7 3 の腫瘍(9.6%)で検出される一方、h M S H 2 はスコア付けされた全ての腫瘍によって発現された(n = 7 6)。全ての隣接する非腫瘍粘膜コアは h M L H 1 及び h M S H 2 を発現した。K i 6 7 の増殖指数は、隣接する正常な粘膜(0 / 9 が 2 - 3 のスコア; p = 0 . 0 0 1) と C R A s (6 / 1 5 が 2 - 3 のスコア; p < 0 . 0 0 1) と比較して原発性 C R C s において有意に高かった(6 0 / 6 7 が 2 - 3 のスコア)。C D 3 1 の発現は内皮細胞の細胞質膜及び血小板において有意に観察された。周囲の組織中への血小板の全血管外遊走が信頼性のあるスコアを不可能にするため、出血を示すコア(n = 9)を除外した。採取した C R A s は隣接した正常粘膜(6 / 9 が 2 - 3 のスコア; p = 0 . 0 1 2) 又は C R C s (3 9 / 6 8 が 2 - 3 のスコア; p = 0 . 0 3 2) の何れかよりも血管が有意に少なかった(2 / 1 2 が 2 - 3 のスコア)。C R M s の発現特性は C R C s のものとは有意には異なっていなかった(表5にまとめ)。

20

30

【0082】

【表 5】

表 5

		正常	CRA	CRC	CRM	合計
p53 (n=103)	0	9 (100%)	11 (92%)	30 (43%)	8 (67%)	58 (56%)
	1	0 ^a	1 ^b (8%)	40 (57%)	4 (33%)	45 (44%)
	合計	9	12	70	12	103
hMLH1 (n=89)	0	0	1 (8%)	5 (9%)	1 (11%)	7 (9%)
	1	9 (100%)	11 (92%)	54 (91%)	8 (89%)	82 (91%)
	合計	9	12	58	9	89
hMSH2 (n=85)	1	9 (100%)	10 (100%)	57 (100%)	9 (100%)	85 (100%)
	合計	9	10	57	9	85
Ki67 (n=102)	1	9 (100%)	9 (60%)	7 (10%)	2 (18%)	27 (26%)
	2	0	5 (33%)	22 (33%)	6 (55%)	33 (32%)
	3	0 ^c	1 ^d (7%)	38 (57%)	3 (27%)	42 (42%)
	合計	9	15	67	11	102
CD31 (n=100)	0,1	3 (33%)	10 (83%)	29 (43%)	5 (45%)	47 (47%)
	2,3	6 (67%)	2 ^{e,f} (17%)	39 (57%)	6 (55%)	53 (53%)
	合計	9	12	68	11	100
両側統計的優位性: ^a p=0.001 (正常 対 CRCs), ^b p=0.005 (CRA 対 CRCs), ^c p=0.001 (正常 対 CRCs), ^d p<0.001 (CRA 対 CRCs), ^e p=0.012 (CRA 対 正常), ^f p=0.032 (CRA 対 CRCs).						

10

20

30

p53の発現は、hMLH1を保持していた腫瘍の53%と比較してhMLH1を喪失した腫瘍では観察されなかった(0/7対39/74; p=0.012)。他の抗原は統計的に有意な結合を示さなかった(データは示さず)。

【0083】

定量的免疫蛍光法

採取した119事例のうち81から100(68-84%)が各切片の分析に十分であった(表6)。不十分な上皮細胞量のコアの排除は蛍光顕微鏡のスライドのレビューとERA I Fの双方によって導かれた。これは評価に対して有効であったIHC染色例の数と有意には異なっていなかった。蛍光顕微鏡と定量的イメージングによって見られる蛍光シグナルの免疫局在化は各々それぞれの抗体に対する色素原付着のパターンと同一であった。

40

ERAの発現が正常な腸細胞と腫瘍腸細胞の双方の膜に観察された。しかし、蛍光強度は上皮細胞集団にわたって一様ではなかった。hMLH1を例外として、IHC分類IQRsが別個のオーバーラップしていないグループを形成した。p53、Ki67及びCD31の発現の定量的IFスコアはIHCにより評価された定量スコアと有意に関連していた(表6; p=0.001)。

【表 6】

表 6

オブザーバースコア付け免疫組織化学法との定量免疫蛍光法の比較										
IHC スコア	p53			Ki67			CD31			
	0	1	合計	1	2,3	合計	0,1	2,3	合計	
IF スコア	0	43	4	47	12	13	25	37	13	50
	1	1	33	34	10	56	66	10	40	50
合計		44	37	81	22	69	91	47	53	100

10

20

【 0 0 8 4 】

しかしながら、定量 I F の分布は、より高い定量 I H C スコア (1 . 6 から 8 . 1 倍大きい範囲) の場合に広い I Q R s を実証した。I H C と定量 I F スコア間の絶対的的一致性は p 5 3 に対しては 1 に近い ($\kappa = 0.88$) が、K i 6 7 ($\kappa = 0.34$) 及び C D 3 1 ($\kappa = 0.54$) に対しては比較的低い (表 7) 。同様に、定量アッセイの予想値は特定の細胞集団 (p 5 3 、C D 3 1) 中で発現された抗原に対して最も大きく、よって隣接する細胞型からの交絡シグナルを被らなかつた (表 7) 。これに対して、K i 6 7 は、間質及び上皮細胞集団の何れか又は双方において発現され得、比較的低い陰性の予想値を示した (表 7) 。

【表 7】

表 7

オブザーバースコア付け免疫組織化学法と比較した定量免疫蛍光法の予測値			
抗原	p53	Ki67	CD31
イエーツ補正ピアソンの χ^2 検定	p<0.001	p=0.001	p<0.001
カッパ比例一致統計	0.88	0.34	0.54
ポジティブ的中率	0.89	0.84	0.78
ネガティブ的中率	0.98	0.48	0.75

40

合成内部標準物質コアは H E R 2 E C D の濃度に応じて勾配のある陽性シグナルを示した。H E R 2 コントロールコアのシグナルは全ての他の I H C 、 I F 及び I S H 実験の

50

バックグラウンドレベルを超えておらず、ブランクのアガロースコントロールコアは陰性であった。HER2は検査した結腸直腸上皮組織の大部分で低レベルで発現された。しかしながら、HER2の半発現は正常な隣接粘膜と比較して腫瘍集団において1.8から2.9倍に増加した($p = 0.008$)。しかし、高レベルの発現は単一の漿膜転移に観察され、これはアレイの他の悪性腫瘍の平均シグナルより4.9倍大きいシグナル体積を示した(70536対14408相対ユニット; $p < 0.001$)。

【0085】

定量ISH

合成センスmRNA内部標準物質は適切なアンチセンスリボプローブと特異的にハイブリダイズし、mRNA濃度の増加に伴ってリン発光のポジティブな勾配を示した。これに対して、アンチセンス及びブランクアガロースコントロールからのシグナルはバックグラウンド発光を越えなかった。明視野/暗視野顕微鏡は全ての結腸直腸細胞集団中でのβ-アクチンの発現を実証した。第一の四分位数以下のβ-アクチンシグナル体積を示す例は分析には不十分なmRNAを含むものであると思われ、解釈から除外した。β-アクチンは採取された119の例の内88において(74%)十分に高いレベルで発現された。

スキャン画像、定量データ及び明視野/暗視野顕微鏡を調べたところ、結腸直腸組織はHGF及びP1GF mRNAに対して産生された放射標識リボプローブのハイブリダイゼーションを示さなかった。これに対して、c-Met及びVEGF-AはCRAs、CRCs及びCRMsの下位群においてアップレギュレートされた。ある割合のCRAs及びCRCsは、それぞれ正常粘膜での発現の1.9及び2.7倍までのc-Met mRNAの発現のアップレギュレーションが示された。有意なVEGF-Aの発現が明視野/暗視野顕微鏡によって観察された。VEGF-A mRNAの半レベルが隣接の正常な粘膜と比較してCRCsにおいて4倍増加した(0.20対0.05; $p = 0.003$)が、VEGF-Aの発現は、CRAsとCRCsの間(メジアン、0.14対0.20; $p = 0.387$)又はCRCsとCRMsの間(メジアン、0.20対0.29; $p = 0.718$)において有意に異なっていなかった。

全体で、結腸直腸腫瘍の74/88(84%)がVEGF-Aの増加した発現を示した。VEGF-Aの発現は、p53の発現の場合に免疫組織化学検出の閾値より2.7倍であり(メジアン、0.225対0.084; $p = 0.025$)、2又は3のスコアの増殖指数の場合に2.2倍(メジアン、0.169対0.077; $p = 0.014$)であった。

【0086】

この実験は、IF及びISHの迅速な定量のための新規な高解像度のレーザー画像処理システムの有用性を示した。また、データは、癌進行及び腫瘍関連血管新生の原因をなしていると思われる分子変化に関する重要な情報を生じた。

組織マイクロアレイ中に内部標準物質を使用し、p53及びCD31に対する定量IFはIHCスコアと高レベルの一致を見た(上掲の表7)。定量データは、高IHCスコアを示したオブザーバー定義カテゴリー内に広い範囲にわたって分布していた。これは、免疫標識が密である場合、IHC観察者が色素原分布及び/又は強度の差を精確に識別できず、よって臨床病理学的に重要なデータを見逃すかも知れないことを示している。同様に、観察者は発現の僅かな際を精確には区別することができない。例えば、定量画像処理は、蛍光顕微鏡によっては明らかではなかった、HER2発現の全体的増加を腫瘍化と識別することができた。この研究はまた結腸直腸腫瘍形成において遅いp53の発現を示し、それがhMLH1の喪失と逆に関連していることを見出した。

IHC、ISH及びRT-PCRの定性的評価は、連続変数である、VEGFの発現を十分には評価しない。これに対して、ここに記載された組織マイクロアレイに対して内部標準物質を使用する定量アプローチ法は遺伝子発現のより精確な手段を提供する。精確な定量に加えて、FFPEの優れた形態学により、標識抗原及びmRNA転写物の明解な局在化が可能になった。

【0087】

10

20

30

40

50

コントロールに対する腎細胞癌での V E G F の発現の増加は H I F - 1 の核の発現の増加に相関する。

酸素利用性が、低酸素条件下でのホメオスタシスの維持に必要な、エリスロポイエチン、一酸化窒素合成酵素 (N O S)、ヘモオキシゲナーゼ 1 (H O - 1)、グルコース輸送体及び血管成長因子 (例えば V E G F) を含む多くの異なった遺伝子の発現の調節において重要な役割を担っている。低酸素誘導因子 1 アルファ (H I F - 1) はこれらの遺伝子の酸素依存性調節に役立つ b H L H - P A S ファミリーメンバーとして同定された。H I F - 1 は低酸素状態において核に急速に蓄積し、H I F - 1 ベータとも称されるアリアル炭化水素核レセプター A R N T とヘテロ二量体化する。様々な癌における V E G F 及び H I F - 1 の相対発現を、ここに記載した方法に従う定量インサイツハイブリダイゼーションにより評価した。

10

標準物質はここに記載したようにして調製した。V E G F 及び H I F - 1 をコードする m R N A を転写し、ここに記載されたようにして B S A を含むアガロース中に埋め込んだ。正常なコントロール組織並びに乳房、肺、大腸、卵巣、甲状腺、腎臓、及び肉腫を含む様々な組織からの試料を含む組織マイクロアレイを、V E G F 及び H I F - 1 の相対的定量発現について調べた。

【 0 0 8 8 】

V E G F 及び / 又は H I F - 1 の発現を複数の腫瘍型において検出した。V E G F の発現は腎細胞癌において最も高かったが、肺、卵巣及び甲状腺癌においても正常なコントロールを越えて発現された。V H L 遺伝子に変異を有する腎細胞癌では、V E G F の発現は H I F - 1 の発現と相関していた。V E G F m R N A のレベルと検査した他の腫瘍型における H I F - 1 m R N A の存在との間に殆ど相関はなかった。よって、定量インサイツハイブリダイゼーションにより、正常コントロール組織を越える V E G F 及び H I F - 1 の発現の増加を検出することは、患者の腎細胞癌を検出する有用な方法である。

20

これらを併せると、ここで提示された結果は、内部標準物質を含む組織マイクロアレイのレーザー画像化がアレイ化腫瘍集団のインサイツでの検査のための有用な方法であることを実証している。このアプローチは、F F P E 組織に適用でき、広いダイナミックレンジにわたる定量データを提供する高処理で再現性がある標準化方法に対する要求に合致している。I F 標識及びリン光画像プレートは長期保存には受け入れられないが、デジタル画像処理により、パーチャルアーカイブに高解像度の電子データを保存することが可能になる。これは、実験データの遡及的分析を容易にし、構造化された T M A データベースの一体部分を形成しうる。

30

【 0 0 8 9 】

実施例 5

複数 R N A 分子 / アガロース内部標準調製物

本発明は、アガロースのような固体埋め込み材料中に入れた、異なったタイプの R N A のような、既知量の異なった生物学的分子を有する内部標準調製物を使用するための本発明の有用性を証明する。特に、本実施例は、アレイで実施される加工及び分析手順を通じて R N A s が保持されるようにアレイで使用される内部標準調製物を形成するためにアガロースと B S A 中に複数の異なった R N A 分子を埋め込むためのアプローチ法を証明する。埋め込まれた R N A s は、特に二つの異なった R N A 分子が異なった標識を使用して検出されるかも知れない手順に対して、単に手順の成功のポジティブコントロールとして、例えば二本鎖インサイツハイブリダイゼーションに対する手順方法を改善するための基礎的アッセイにおける成分として、又は最終的に組織又は細胞中の遺伝子発現の比較レベルを評価するための定性的標準として、使用することができる。

40

l i v - 1 R N A のセンス転写物を、次の配列 (センス配向) を持つ P C R 増幅 D N A 鋳型を使用してインピットで転写させた :

```
TGCCATTCACATTTCCACGATACACTCGGCCAGTCAGACGATCTCATTACCACCATCATGACTACCATCATATTCTCCA
TCATCACCACCACCAAAACCACCATCCTCACAGTCACAGCCAGCGCTACTCTCGGGAGGAGCTGAAAGATGCCGGCGTCG
CCACTTTGGCCTGGATGGTGATAATGGGTGATGGCCTGCACAATTTTCAGCGATGGCCTAGCAATTGGTGCTGCTTTTACT
```

50

GAAGGCTTATCAAGTGGTTTAAAGTACTTCTGTTGCTGTGTTCTGTGCATGAGTTGCCTCATGAATTAGGTGACTTTGCTGT
TCTACTAAAGGCTGACATGACCGTTAAGCAGGCTGTCCCTTTATAATGCATTGTCAGCCATGCTGGCGTATCTTGAATGG
CAACAGGAATTTTCATTGGTCATTATGCTGAAAATGTTTCTATGTGGATATTTGCACTTACTGCTGGCTTATTTCATGTAT
GTTGCTCTGGTTGATATGGTACCTGAAATGCTGCACAATGATGCTAGTGACCATGGATGTAGCCGCTGGGG [配列番
号：5]

D r C 3 R N A のセンス転写物を、次の配列（センス配向）を持つ P C R 増幅 D N A 鋳
型を使用してインビトロで転写させた：

CAGCCAGAACACGCAGTGCCAGCCGTGCCCCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCCC
ACCGCAACTGCACGGCCCTGGGCCTGGCCCTCAATGTGCCAGGCTCTTCTCCCATGACACCCTGTGCACCAGCTGCACT
GGCTTCCCCCTCAGCACCAGGGTACCAGGAGCTGAGGAGTGTGAGCGTGCCGTCATCGACTTTGTGGCTTTCCAGGACAT 10
CTCCATCAAGAGGCTGCAGCGGCTGCTGCAGGCCCTCGAGGCCCGGAGGGCTGGGGTCCGACACCAAGGGCGGGCCGCG
CGGCCTTGCAGCTGAAGCTGCGTCGGCGGCTCACGGAGCTCCTGGGGGCGCAGGACGGGGCGCTGCTGGTGGGCTGCTG
CAGGCGCTGCGCGTGGCCAGGATGCCCCGGGCTGGAGCGGAGCGTCCGTGAGCGCTTCTCCCTGTGCACTGATCCTGGCC
CCCTCTTATTTATTCTACATCCTTGGCACCCC

[配列番号：6]

V E G F A 転写物は実施例 1 に記載されたようにして転写された。

【0090】

実施例 1 に記載された方法を使用して 3 つの異なった内部標準調製物をつくった：一つ
は V E G F A センス R N A のみを含むもの；第二は l i v - 1 センス R N A 及び D c R 3
センス R N A を含むもの；第三は l i v - 1 センス R N A 、 D c R 3 センス R N A 及び V 20
E G F A センス R N A を含むものである。V E G F A センス R N A を含む第一内部標準
調製物は実施例 1 に記載された手順に正確に従って作製した。第二の内部標準調製物は、
各 R N A の最終濃度が 1 0 0 n g / m L になるように l i v - 1 及び D c R 3 R N A を添
加することによって作製した。（例えば、1 μ l の 1 0 0 n g / μ l l i v - 1 R N A
+ 1 μ l の 1 0 0 n g / μ l の D c R 3 R N A + 2 5 0 μ l の 8 % アガロース + 7 4 8
 μ l の S Q H 2 O ）。第三の内部標準調製物は、各 R N A の最終濃度が 1 0 0 n g / m L
になるように V E G F A 、 l i v - 1 及び D c R 3 R N A を添加することによって作製し
た。（例えば、1 μ l の 1 0 0 n g / μ l l i v - 1 R N A + 1 μ l の 1 0 0 n g / μ 30
l の D c R 3 R N A + 1 - μ l の 1 0 0 n g / μ l の V E G F A R N A + 2 5 0 μ l の
8 % アガロース + 7 4 7 μ l の S Q H 2 O ）。

別個のエピンドルフ管に収容した 3 つの内部標準調製物の各々を、9 5 のヒートブ
ロックで 3 分間加熱した後、氷で直ぐに冷却して R N A 転写物を変性させた。R N A 溶液
のそれぞれに、2 5 0 μ l の 8 % N u S i e v e 3 : 1 （高ゲル強度のアガロース）及び
5 0 のヒートブロックで温めた 5 0 0 m l の S Q H ₂ O を、実施例 1 に記載されている
ようにして添加した。R N A / アガロース内部標準調製物の各々を簡単にボルテックスし
た後、1 5 m m X 1 5 m m の D i s P O ベースモールド（Baxter Scientific）中に注い
だ。その R N A / アガロース内部標準調製物を少なくとも 1 時間 4 でゲル化させてドナ
ーブロックを形成した。R N A / アガロースドナーブロックの各々を実施例 1 に記載され
たようにして固定した。

3 通りのコアが 3 つの内部標準調製物（V E G F A 転写物単独、D c R 3 及び l i v - 40
1 転写物、及び D c R 3 、 l i v - 1 及び V E G F A 転写物）を持つ T M A を実施例 3 に
記載のようにつくった。T M A を実施例 3 において使用された同じ V E G F A アン
チセンスプローブを用いてハイブリダイズした。V E G F A センス転写物を含む内部標
準調製物コアだけが、単独で又は組み合わせで、ポジティブなシグナルを生じた。

【表 8】

表 8

コア/TMA スポットの内容物	ホスフォイメージャー シグナル *	VEGF A RNA の ポジティブ検出
第 1 内部標準調製物 (VEGF A セン ス RNA 単独)	2011	有り
第 2 内部標準調製物 (DcR3 及び liv-1 RNA)	1	なし
第 3 内部標準調製物 (DcR3, liv-1, 及び VEGF A センス RNA)	135	有り

* データは各スポット端のバックグラウンドシグナルに対して補正したホスフォイメージャーのピクセル当りのカウント(直径 50 ミクロン)で表示。各値は3通りのコア試料の平均を表す。

上の表 8 に示したように、複数の異なった種類の RNA 分子を含む内部標準調製物は、ここで VEGF A に対して例証されたように、RNA 分子の混合物中において個々の RNA のプローブと共にハイブリダイズした場合にポジティブな結果を付与する。

【 0 0 9 1 】

実施例 6

RNA / タンパク質 / アガロース内部標準調製物

本発明は、アガロースのような固体埋め込み材料中に入れた、既知量の異なった生物学的分子、例えば RNA 分子及びタンパク質を有する内部標準調製物を使用するための本発明の有用性を証明する。特に、タンパク質と RNA 分子の両方を含む実施例 1 及び 2 に記載されたようにして調製された内部標準調製物は、RNA 及びタンパク質の発現が免疫組織化学及びインサイツハイブリダイゼーション法によって同じ切片において評価される方法に対して特に成功裡の手順のポジティブコントロールとして、例えば RNA 及びタンパク質を同じ切片において検出するための、基礎的アッセイにおいて手順方法を改善する成分として、又は最終的に組織又は細胞中の RNA 及びタンパク質の発現の比較レベルを評価するための定性的標準として、使用することができる。

Her 2 / Erb B 2 センス RNA 転写物を、実施例 1 に詳細に記載したような RNA 溶液を作製するためにインビトロで転写する。100 ng / μ l の作動濃度の Her 2 / Erb B 2 RNA 溶液を実施例 1 に記載されているようにして作製する。新しいエッペンドルフ管中の 200 μ l の SQH₂O に 50 μ l アリコートの RNA 溶液 (5 μ g) を加える。RNA 溶液を含むエッペンドルフ管を 95 ° のヒートブロックで 3 分間加熱して RNA 転写物を変性させ、ついで氷で即座に冷却する。RNA 溶液とは別個に、最終濃度 0.45 mg / mL の Her 2 / Erb B 2 タンパク質を、実施例 2 に記載されたような 0.93 mg / mL の合成 Her 2 / Erb B 2 ECD タンパク質 500 μ l を添加することによって作製する。タンパク質 / 水混合物を簡単にボルテックスした後、250 μ l の RNA 溶液に添加する。ついで、約 60 °C まで簡単に冷却した、250 μ l の 8% NuSieve 3 : 1 (99% で溶融した高ゲル強度のアガロース) を RNA / タンパク質混合物に添加する。RNA / タンパク質 / アガロース混合物を簡単にボルテックスした後、15 mm X 15 mm の DisPO ベースモールド (Baxter Scientific) 中に注ぐ。その RNA / タンパク質 / アガロース混合物を少なくとも 1 時間 4 °C でゲル化させた。RNA、タンパク質、又はアガロースの濃度を変化させるために、その成分の体積を、SQH₂O の量を相反させて低減することによって増加させることができる。ゲル形成後、RNA / タンパク質 / アガロースブロックを実施例 1 - 4 に記載のようにしてプロセッシングすることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

実施例 7

凍結細胞アレイの構築

本実施例は凍結細胞アレイを構築するための本発明の有用性を証明する。

40 mm 長 x 1.2 mm 外径の寸法の中空ガラスピン、つまりガラス平滑端を含んでなる、25本のピンを有するアレイヤーを作製し、ヒートシールし、12 mm x 12 mm (144 mm²)の寸法のプレキシグラス製の基部にエポキシで接着した。各ピンは1.4 mmの等間隔に離間し、金属小片とエポキシを含むシーラーで塞がれている。流動性 OCT 媒体を、22 mm x 30 mm x 20 mm (深)の寸法の使い捨て埋め込みモールド (VWR, San Francisco, CA) 中に注いだ。アレイヤーピンを先ずグリセロールに浸漬した後、埋め込みモールド内に含まれる流動性 OCT 媒体中に部分的に浸漬した。流動性 OCT を、-160 イソペンタンの極低温中に3から5分間、流動性 OCT、モールド及び係合ピンを沈めることによって凍結させた。ついで、ピンを OCT モールドから取り出し、アレイレシピエントブロック中に少なくとも20 mm 深さの25 ウェルのアレイを残した。アレイレシピエントブロックを、ウェルに様々な細胞株懸濁液を充填するまで -70 で保存した。

10

次のチャートに列挙した付着及び懸濁細胞の双方を用いて、凍結アレイに添加した。付着細胞は室温で15 - 20分間0.5 mMの EDTA の存在下で組織培養フラスコから取り外した後、1000 rpm で5分間遠心分離し、4 にて PBS で洗浄した。懸濁細胞 (COLO205、ジャーカット、及び B j a b) は PBS で4 にて直接洗浄した。細胞数を、粒子計数アナライザー (Coulter Z2, Beckman Coulter) を用いて決定し、細胞を、高度に濃縮した細胞懸濁液を得るために70から150 µl の冷 PBS 中に再懸濁させた。細胞懸濁液を充填まで4 に維持した。アレイ中に充填した細胞懸濁液の最終密度を表9に示す。

20

【 0 0 9 3 】

【表 9】

表 9

細胞型	濃度	由来	供給源
BKGE	92.9 x 10 ⁶ 細胞/ml	ウシ腎糸球体内皮細胞	VEC Technologies, Inc
COLO205	259.3 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト結腸直腸癌細胞株	ATCC Cat # CCL-222
U87MG	86.6 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト神経膠腫細胞株	ATCC Cat # HTB-138
DU145	52.9 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト前立腺癌細胞株	ATCC Cat # HTB-81
HIAEC	60.4 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト腸骨動脈内皮細胞	BioWhittaker/Clonetics Cat # CC-2545
HMVEC	124 x 10 ⁶ 細胞/ml	肺由来ヒト微小血管内皮細胞	BioWhittaker/Clonetics Cat # CC-2543
CASMC	45.1 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト冠状動脈平滑筋細胞	BioWhittaker/Clonetics Cat # CC-2583
A375	79.4 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト悪性メラノーマ細胞株	ATCC Cat # CRL-1619
MCF7	26 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト乳癌細胞株	ATCC Cat # HTB-22
A673	172.7 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト横紋筋肉腫細胞株	ATCC Cat # CRL-1598
Hep3b	57.4 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト肝癌細胞株	ATCC Cat # HB-8064
Bjab	335.5 x 10 ⁶ 細胞/ml	B細胞白血病細胞株	ATCC Cat # HB-136
HCT116	82.5 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト結腸直腸癌細胞株	ATCC Cat # CCL-247
SW620	95 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト結腸直腸癌細胞株	ATCC Cat # CCL-227
PC3	56.4 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト前立腺癌細胞株	ATCC Cat # CRL-1435
NRP154	74.1 x 10 ⁶ 細胞/ml	腫瘍化成体ラット前立腺細胞株	Marker P.C. <i>et al.</i> , Developmental Biology (2001), 233, 95-108
HUVEC	65 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト臍静脈内皮細胞	BioWhittaker/Clonetics Cat # CC-2517
NHDF	36.1 x 10 ⁶ 細胞/ml	正常ヒト真皮線維芽細胞	BioWhittaker/Clonetics Cat # CC-2509
NHEK	42.3 x 10 ⁶ 細胞/ml	新生児正常ヒト表皮角化細胞	BioWhittaker/Clonetics Cat # CC-2507
SkBr3	53.3 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト乳癌細胞株	ATCC Cat # HTB-30
BT474	72.4 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト乳癌細胞株	ATCC Cat # HTB-20
HepG2	66.6 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト肝癌細胞株	ATCC Cat # HB-8065
Jurkat	614.4 x 10 ⁶ 細胞/ml	T細胞白血病細胞株	ATCC Cat # TIB-152
SKMES	73.9 x 10 ⁶ 細胞/ml	ヒト肺癌細胞株	ATCC Cat # HTB-58

10

20

30

40

【0094】

細胞を充填するために、OCTアレイを冷保存所から取り出し、室温でドライアイスを満たしたボックス上に配する。アレイ位置には、全体で25の位置に対して、段にA-Eを、列に1-5の番号を付した。アレイの位置A1にトリパンブルー染色0.4% (BivcoBRL) を配向マーカーとして充填した。100 μl未満の上述の24の再冒險濁液をそれ

50

ぞれ、22ゲージの1.5インチ長(0.7mm×40mm)針を備えた1mlシリンジ(Becton Dickinson & Co., Bedford, MA)を用いてアレイの残りのウェル中に充填した。アレイはアレイスライドのためにスライスされるまで-70℃で保存される。

6μmから12μmの厚みの一又は複数の切片を-20℃のクリオスタット上で上記のアレイから切り取り、予め洗浄した顕微鏡スライド(75mm×25mm、0.96から1.09mm厚)(Baxter Diagnostic Inc.)上に配した。各スライドは細胞アレイの2つの切片(1.44cm²)を含み、各スポットはおよそ1.1mmの直径であった。細胞アレイスライドは分析に使用するまで-70℃で保存した。

【0095】

実施例8

凍結細胞アレイでの免疫組織化学

本実施例は凍結細胞アレイの切片に対して免疫化学的手法を実施するための本発明の有用性を証明する。

複数の細胞試料を含む実施例7の凍結細胞アレイスライドを、少なくとも3時間室温で空気乾燥させた後、アセトン中に5分間固定し、一晚空気乾燥させた。内在性免疫グロブリン結合部位をPBS1%BSAで30分ブロックした後、その上に、0.5μg/mlの Maus抗ヒトEp-CAM蛍光結合モノクローナル抗体(Biomedica Corp., Foster City, CA)を含むPBS1%BSAを室温で1時間覆った。PBSで数回すすいだ後、切片を2分間、核対比染色(100μg/ml)(Hoechst 33342, Molecular Probes, Eugene, OR)処理し、再びすすいだ後、Vectashield取り付け媒体(Vecta Laboratories, Burlingame, CA)と観察のためのカバーガラス(22mm²、N°1, Corning)と共に取り付けした。免疫組織化学検査を実施するまで、スライドを光と塵から保護して保存した。

アレイスポットの組織化学的染色は、アレイを横断してスポットからスポットに至る不均一なシグナルを生じた。アレイ上に存在する異なった細胞型が同じ細胞密度で充填されなかった場合、ヘキストシグナル強度は各スポットで異なって見えた。例えば、最も高い密度(614.4×10⁶細胞/ml)で充填されたジャーカット細胞に対応するスポットは最も明るく見え、50×10⁶細胞/mlより低い密度でNHDF、CASMC、NHEK及びMCF7の細胞懸濁液を充填したスポットは最も薄く見えた。

【0096】

スライドの幾つかについて、Maus抗ヒトEp-CAM蛍光結合モノクローナル抗体(上掲のBiomedica Corp.)を用いて細胞表面Ep-CAMの有無を分析した。蛍光シグナルは蛍光顕微鏡とTyphoon 8600スキャナーを用いて捕捉した。最も強い蛍光シグナル(Ep-CAM)は細胞株COLO205、HCT116、SW620、HepG3及びSkBr3に対して観察された。検出可能な蛍光シグナルがまた細胞株DU145、NRP154、MCF7、BT474及びHepG2に対して観察された。非常に弱いシグナルが細胞株CASMC、HUVEC及びU87MGに対して見られた。BKGE、PC3、HIAEC、HMVEC、NHDF、NHEK、A375、A673、ジャーカット細胞、Bjabb及びSKMES1を含む細胞アレイの他の細胞株ではシグナルは観察されなかった。

このデータは、ここに記載した凍結細胞アレイが広範なタンパク質発現スクリーニングの信頼できるタンパク質発現データを提供することを例証している。

【0097】

実施例9

凍結細胞アレイでのインサイツハイブリダイゼーション

本実施例は凍結細胞アレイの切片でインサイツハイブリダイゼーションを実施するための本発明の有用性を証明する。

凍結細胞アレイ中の凍結試料のRNAの保存の完全性を、次のプロトコールに従って細胞質アクチンに対するRNAプローブを用いたハイブリダイゼーションによって評価した。以下で使用したヒトB-アクチンRNAプローブを転写するために使用したPCR増幅

10

20

30

40

50

D N A 鋳型の配列（センス配向）は次のものである：

GCTGCCTGACGGCCAGGTCATCACCATTTGGCAATGAGCGGTTCCGCTGCCCTGAGGCACTCTTCCAGCCTTCCTTCCTGG
GCATGGAGTCTGTGGCATCCACGAACTACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGACTGTGACATCCGCAAAGACCTGTAC
GCCAACACAGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCCTGGCATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGGC
ACCCAGCACAATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCTGAGCGCAAGTACTC [配列番号：7]

凍結スライドを室温で解凍した後、そのスライドボックスに入れたままで42℃で5分間温めた。ついで、スライドをそのボックスから取り出し、42℃で更に10分ベークした。スライドを氷上4%パラホルムアルデヒド/1%グルタルアルデヒド中に15分、後固定した後、0.5XのSSCで5分すすいだ。切片を、37℃で30分間、4μg/mLのプロテイナーゼK中で除タンパクした後、0.5XのSSCで10分洗浄した。そのスライドをエタノール勾配（70% - 95% - 100%）で脱水し、空気乾燥させた。そのスライドを100μLのハイブリダイゼーションバッファー（50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、及び2XのSSC）で覆い、42℃で1-4時間プレハイブリダイズした。

【0098】

2X10⁶ cpmの濃度で、1mg/mLのtRNAを含む100μLのハイブリダイゼーションバッファーに溶解させた上述した[³³P]標識一本鎖アクチンRNAプローブを、スライド上のプレハイブリダイゼーションバッファーに添加し、よく混合し、カバーガラスで覆い、密封された加湿容器中で55℃で一晩ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイゼーション後、室温で1mMのEDTAを含む2XのSSC中で10分間、2回洗浄し、ついで10mMのTris、pH8、0.5MのNaCl中20μg/mLのRNアーゼA中で37℃にて30分間、インキュベートした。そのスライドを室温で1mMのEDTAを含む2XのSSC中で10分間、4回洗浄した後、55℃で1mMのEDTAを含む0.1XのSSC中でそれぞれ30分間、4回洗浄し、その後、室温で10分間、0.5XのSSC中で洗浄した。スライドを、0.3Mの酢酸アンモニウムを含む50%、70%、及び90%エタノールでそれぞれ2分間脱水し、空気乾燥した。

ハイブリダイゼーションの結果を見るために、スライドをストレージリン光体スクリーン（コダック）に18時間暴露した。リン光体スクリーンをTyphoon 8600パリアブルモードイメージャー（Molecular Dynamics）を用いてスキャンした。アクチンハイブリダイゼーションシグナルは実施例8に記載された凍結細胞アレイ上の全ての異なるスポットで検出された。観察されたシグナルの強度はアレイ上に充填した細胞数に相関していた。SKBr3乳癌細胞に対応するスポットのみ、おそらくは凍結細胞アレイスライドのエLEMENTの喪失のために、シグナルを欠いていた。これらの結果は、本発明の凍結細胞アレイが良好なmRNA保存性をもたらし、同時に多くの異なった細胞株に対して信頼性のあるインサイトハイブリダイゼーション法を実施するのに十分であることを例証している。

【0099】

実施例10

凍結細胞アレイ上のリガンド/レセプター結合

本実施例は凍結細胞アレイの切片上でリガンド/レセプター結合実験を実施するための本発明の有用性を証明する。

実施例8の凍結細胞アレイからのマイクロアレイスライドを、Desnoyer L.等, The journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 48, pp1-9によって記載されている方法に従ってIGF-1レセプターを発現する細胞を同定するために使用した。特に、10μm厚の一又は複数の凍結細胞アレイ切片を、30秒の間室温に置いたSuperfrost Plus Gold顕微鏡スライド（Ery Scientific, Portsmouth, NH）に適用し、ついで最小3日間-20℃で保存した後、-70℃の温度での保存に移した。リガンド/レセプター結合手順の日に、凍結細胞アレイスライドを室温に戻した後直ぐに、3mMのCaCl₂、3mMのMgSO₄、5mMのKCl及び1MのNaClを含む35mMの酢酸（pH3.5）中で4分インキュベートした。ついで、スライドを、32mMのスクロースを含むHBS

-C (25 mMのHepes、pH 7.2、150 mMのNaCl、3 mMのCaCl₂、3 mMのMgSO₄、5 mMのKCl、完全プロテアーゼインヒビターカクテル)で洗浄し、非特異的結合部位を3% BSA及び32 mMスクロースを含むHBS-Cで20分間、ブロックした。アビジンとビオチンの結合部位を、Vector (Burlingame, CA)のアビジン/ビオチンブロックキットを使用してブロックした。内在性ヒスチジンリッチ部位を、1 mMのNiCl₂中で10分間スライドをインキュベートすることによってブロックした。

【0100】

凍結細胞アレイスライドを、3% BSAを含むHBS-Cバッファー中で5 nMのHisタグIGF-1の存在又は非存在下で1時間インキュベートした後、1% BSAを含む冷HBS-Cバッファーでそれぞれ1分間の3回洗浄した。そのスライドを4%ホルムアルデヒドを含むPBS中で10分間固定させ、1% BSAを含むHBS-Cで洗浄した。内在性抗体結合部位を、HBS-C中1.5%の清浄なウマ血清で20分間ブロックした。ついで、スライドを、HBS-C/3% BSA中で1時間1 mg/mlの抗H6抗体 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)と共にインキュベートした。ついで、スライドをHBS-C/1% BSAで洗浄し、3% BSAを含むHBS-Cで1/200に希釈したビオチン化ウマ抗マウスIgG (Vector, Burlingame, CA)と共に30分間インキュベートした。スライドを4分間3回洗浄し、10分間PBS/4%ホルムアルデヒドで固定した。そのスライドをHBS-C/1% BSAで洗浄し、西洋わさびペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジンと共にインキュベートした。スライドを、HBS-C/1% BSAで1分間3回洗浄し、NEN希釈バッファー (NEN Life Science Products, Boston, MA)中ビオチン結合チラミド (TSA)と共に10分間インキュベートした。別法として、スライドはTSA-Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR)と共に10分間インキュベートすることができる。反応はTBS/0.1% BSA 4分3回洗浄することによって停止させた。ビオチン結合TSAと共に前にインキュベートしたスライドを、TBS/0.1% BSA中ストレプトアビジン結合FITCと共に30分インキュベートした。

【0101】

最後に、凍結細胞アレイスライドをTBS/0.05 Tween-20中にそれぞれ1分間で3回洗浄し、Vectashield取り付け媒体 (Vector, Burlingame, CA)を用いて取り付けた後、蛍光顕微鏡を使用して分析した。蛍光シグナルは、ビオチン結合チラミド/ストレプトアビジン結合FITC又はTSA-Alexa 488シグナル系の何れかを使用してIGF-1の存在又は非存在下でアレイスライド中のHMVEC (ヒト微小血管内皮細胞)及びHUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞)細胞試料に対して検出された。ビオチン結合チラミド/ストレプトアビジン結合FITC又はTSA-Alexa 488シグナル系の例えばHMVEC及びHUVEC細胞のような、幾つかの細胞型の凍結細胞IGF-1の結合がアレイ中で検出されが、IGF-1を欠くコントロール細胞では観察されなかった。

このデータは、ここに記載した凍結細胞アレイにより、同時に多くの異なった細胞株に対してのリガンド/レセプター結合手順に適合する細胞表面の天然タンパク質の良好な保存が達成できることを例証している。

【0102】

実施例 11

凍結組織アレイの構築

本実施例は凍結組織アレイを構築するための本発明の有用性を証明する。

25本の40 mm x 1.2 mmピンを有するアレイヤーを実施例7に記載のようにして構築する。OCTアレイレシピエントブロックを実施例7に記載のようにして構築する。試料組織を液体窒素でフラッシュ凍結し、-70℃で保存する。組織試料のタイプは変わり得、ヒト、マウス又は他の供給源の正常又は異常組織が含まれる。OCTアレイレシピエントブロックを冷保存所から取り出し、室温でドライアイスを満たしたボックス上に配

10

20

30

40

50

する。アレイ位置には、全体で25の位置に対して、段にA - Eを、列に1 - 5の番号を付した。アレイの位置A1にトリパンプルー染色0.4% (BivcoBRL)を配向マーカとして充填した。アレイの位置A1にトリパンプルー染色0.4% (BivcoBRL)を配向マーカとして充填した。手作業で、あるいは別法として、直径1mmの特注サイズのパンチを備えたBeecher Instrumentのような組織アレイヤーを使用して、凍結組織の選択した領域から凍結した組織試料を取り出した。組織コアの外径は、組織コアがOCTウェル中にしっかりと嵌まるようにOCTアレイレシピエントブロックのウェルの直径と同じ寸法でなければならない。別法として、組織コアを、OCT中に挿入する前に、適切な溶媒のような接着媒体、例えばエタノール、エタノールで希釈したOCT、プロピレングリコールで希釈したOCT、又はプロピレングリコール中に沈め(接着媒体がOCTより約5 - 10 低い凍結温度を有するように)、アレイへの凍結組織コアの接着を促進させることができる。しかし、接着媒体は凍結組織の解凍を生じる温度を越えてはならない。

10

6 μm から12 μm の厚みの一又は複数の切片をクリオスタット上で凍結アレイから切り取り、予め洗浄した顕微鏡スライド(75mm X 25mm、0.96から1.09mm厚)(Baxter Diagnostic Inc.)上に配する。各スライドは凍結アレイの2つの切片(12mm²)を含み、各スポットはおよそ1mmの直径である。凍結組織アレイスライドは分析に使用するまで-70 で保存した。

【0103】

実施例12

20

凍結組織アレイのRNA / アガロース内部標準調製物

本実施例は、アガロースのような固体埋め込み材料中の既知量の生物学的分子を有する内部標準調製物を使用して、凍結組織アレイ中のRNAのような生物学的に有用な分子を定量するための本発明の有用性を証明する。

凍結OCTアレイレシピエントブロックは実施例7に記載された方法を使用して作製される；該凍結レシピエントブロックは充填されるまで-70 に保存する。Her2 / ErbB2 RNAを実施例1に記載した方法を使用してインピットロにて転写させる。

100ng / μl の作動濃度のHer2 / ErbB2 RNA溶液を、新しいエッペンドルフ管に50 μl のRNA溶液と200 μl のTEを加えることによって作製する。エッペンドルフ管を95 のヒートブロックで3分間加熱してRNA転写物を変性させ、ついで氷で即座に冷却する。RNA溶液に、250 μl の8% NuSieve 3:1 (99 で溶融した高ゲル強度のアガロース)と50 のヒートブロックで温めた500 μl のSQH₂Oを添加した。RNA / アガロース混合物を簡単にボルテックスした後、15mm X 15mmのDisPOベースモールド(Baxter Scientific)中に注いだ。内部標準調製物中のRNAの最終濃度は5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ である。ついで、そのRNA / アガロース混合物を少なくとも1時間4 でゲル化させた。ゲルの形成後、RNA / アガロースブロックを清浄な剃刀の刃を使用してプラスチックモールドから除去した。パンチ又は組織アレイヤーのようなアレイ化機器を用いて、ここに記載されたようにしてRNA / アガロースブロックからコアを取り出した。また同様のアレイ化機器を用いて、実施例11に記載されているようなアレイの他のウェル中に組織試験試料のコアを挿入することもできる。別法として、RNA / アガロース混合物は、それがOCTアレイレシピエントブロック中にゲルを形成する前にピペットで取り出しうる。コアはまた固化冷却されたRNA / アガロースブロックから作製することもできる。内部標準調製物を有するアレイレシピエントブロックは試料の充填まで-70 で保存される。

30

40

【0104】

実施例13

凍結細胞アレイのタンパク質 / アガロース内部標準調製物

本実施例は、アガロースのような固体埋め込み材料中の既知量の生物学的分子を有する内部標準調製物を使用して、凍結細胞アレイ中のタンパク質のような生物学的に有用な分子を定量するための本発明の有用性を証明する。

50

凍結OCTアレイレシピエントブロックは実施例7に記載された方法を使用して作製される；該凍結レシピエントブロックは充填されるまで-70℃に保存する。Her2/ErbB2タンパク質/アガロース内部標準調製物を、タンパク質とアガロースを混合した後、混合物を部分的に冷却して、注ぐのには十分に温かいが凍結OCTを溶融させない程度には冷えているようにする点を除いて、実施例2に記載した方法を使用して作製する。

OCTアレイレシピエントブロックを冷保存所から取り出し、室温でドライアイスを満たしたボックス上に配する。細胞を充填するために、OCTアレイを冷保存所から取り出し、室温でドライアイスを満たしたボックス上に配する。アレイ位置には、全体で25の位置に対して、段にA-Eを、列に1-5の番号を付した。アレイの位置A1にトリパンブルー染色0.4% (BivcoBRL)を配向マーカースとして充填した。OCTアレイレシピエントブロックの段Aの一又は複数のウェルに、22g、1.5インチ長(0.7mm X 40mm)針の1mlシリンジ(Becton Dickinson & Co.)を用いてタンパク質/アガロース内部標準調製物を充填する。OCTアレイの他のウェルには、実施例7に記載したような細胞懸濁液を充填する。凍結アレイは切片化まで-70℃で保存される。

別法として、タンパク質/アガロース混合物をついで少なくとも1時間4℃でゲル化させる。ゲル形成後、タンパク質/アガロースブロックを清浄な剃刀の刃を用いてプラスチックモールドから除去する。パンチ又は組織アレイヤーのようなアレイ化機器を用いてタンパク質/アガロースブロックからコアを抽出する。同様のアレイ化機器を用いてアレイの他のウェル中に組織試験試料のコアを挿入することもできる。

【0105】

実施例14

セルロース/アガロース内部標準調製物配向マーカース

本実施例は、アガロースのような埋め込み材料中に、アレイ中のセルロースのような放射性及び/又は蛍光プローブの非特異的バインダーからなる配向マーカースを収容するための本発明に有用性を証明する。特に、ホスフォイメージャーイメージで見た場合、同位体的に標識されたハイブリダイゼーションプローブの非特異的バインダーによりアレイ中での他のシグナルの明瞭な配向が可能になる。第一の内部標準調製物はここに記載した標準分子の非特異的バインダーとして微粒状セルロースを使用して作製した。約20重量/体積%のセルロースを含む非特異的バインダーを合成するために、約1gの微粒状セルロース(Sigma Chem. Co. カタログ番号C-6413)を3mlのH₂Oに添加し、混合して懸濁液を生成した。セルロース懸濁液の750µlアリコート(250µlの8% NuSieve 3:1アガロース(99℃で溶融した高ゲル強度のアガロース)に添加し、ボルテックスし、15mm X 15mmのDISPOベースモールド(Baxter Scientific)中に注いだ。第一の内部標準調製物を少なくとも1時間4℃でゲル化させた。配向マーカースを含む図10に示される組織マイクロアレイは、マーカース中の非特異的結合材料、微粒状セルロースへの標識ポリヌクレオチドプローブの非特異的結合を証明している。TMA配向マーカースは図10のホスフォイメージャーキャンに矢印で示している。セルロースコアは一貫してプローブに非特異的に結合し、配向マーカースに対してポジティブなエレメントの明瞭な整列が可能になった。

第二の内部標準調製物はここに記載した標準分子の非特異的バインダーとして繊維状セルロースを使用して作製した。約20重量/体積%のセルロースを含む非特異的バインダーを合成するために、約1gの繊維状セルロース(Sigma Chem. Co. カタログ番号C-6288)を3mlのH₂Oに添加し、混合して懸濁液を生成した。セルロース懸濁液の750µlアリコート(250µlの8% NuSieve 3:1アガロース(99℃で溶融した高ゲル強度のアガロース)に添加し、ボルテックスし、15mm X 15mmのDISPOベースモールド(Baxter Scientific)中に注いだ。第二の内部標準調製物を少なくとも1時間4℃でゲル化させた。

【0106】

ゲルの生成後に、第一及び第二の内部標準調製物/配向マーカースの各々を清浄な剃刀の刃を使用してプラスチックモールドから除去し、無傷のブロックを室温で一晩10%の中

10

20

30

40

50

性緩衝ホルマリンに固定した。ついで、アガロースブロックを70%エタノールに移し、実施例1に記載したようなパラフィン包埋の標準的技術を使用してプロセッシングした。

9つのウェルが1列のパラフィンブロック製の生物学的アレイを、アレイの第一の3つのウェル中に第一の内部標準調製物の3つのコアを、アレイの中央の3つのウェル中にアガロースの3つのコアを、アレイの最後の3つのウェル中に第二の内部標準調製物の3つのコアを挿入することにより、ここに記載したようにして作製した。前述の9つのコアに直交して等しい厚みの4つのスライスをアレイから切り取り、4つのスライスの各々を実施例3及び4に記載の如くガラススライドに取り付けて4つのマイクロアレイを形成した。

Her2/ErbB2 RNAのアンチセンス及びセンスプローブを実施例3に記載の如く $[^3\text{P}]$ 標識を付して調製した。RNAを転写するために使用したPCR増幅DNA鋳型の配列(センス配向)は次のものである：

```
TGGTCGTGGTCTTGGGGGTGGTCTTTGGGATCCTCATCAAGCGACGGCAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGA
CTGCTGCAGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGCGGAGCGATGCCCAACCAGGCGCAGATGCGGATCCTGAA
AGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCTGGCGCTTTTGGCACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATG
GGGAGAAATGTGAAAATTCCAGTGGCCATCAAAGTGTGAGGGAAAACACATCCCCCAAAGCCAACAAAGAAATCTTAGAC
GAAGCATACGTGATGGCTGGTGTGGGCTCCCATATGTCTCCCGCTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCACGGTGCAGCT
GGTGACACAGCTTATGCCCTATGGCTGCCTCTTAGACCATGTCCGGGAAAACCGCGGACGCCTGGGCTCCCAGGACCTGC
TGAAGTGGTGTATGCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGATGTGCGGCTCGTACACAGGGACTTGGCCGCTCGG
AACGTGCTGGTCAAGAGTCCCAACCATGTCAAATTACAGACTTCGGGCTGGCTCGGCTG [配列番号：8]
```

【0107】

2つのマイクロアレイをアンチセンスプローブにハイブリダイズさせ、2つのマイクロアレイをセンスプローブにハイブリダイズさせた。図11A-11Dから分かるように、センス及びアンチセンスHer2/ErbB2プローブ双方がセルロース含有内部標準調製物に検出可能に結合した。図11A及び11Bはアンチセンスプローブにハイブリダイズした一つのマイクロアレイとセンスプローブにハイブリダイズした一つのマイクロアレイそれぞれに対する自己蛍光(励起周波数=532nm、設定発光フィルター=610nm/バンドパス30nm)を示している。ホスフォイメージャーを用いて、実施例3に記載の如く残りの2つのマイクロアレイのハイブリダイゼーション結果を確認し、その結果はアンチセンス及びセンスプローブに対してそれぞれ図11C及び11Dに示す。セルロース含有内部標準調製物をその自己蛍光と標識プローブの非特異的結合の双方によって可視化できるという事実は、ほんの僅かな臨床試料コアがISHホスフォイメージャーシグナルで可視できるだけの場合でも、これらの内部標準調製物を、ISHホスフォイメージャーシグナルをコア位置に登録するための位置マーカーとして使用することを可能にする。

【0108】

実施例15

染料/アガロース内部標準調製物配向マーカー

本実施例は、アガロースのような埋め込み材料中に、アレイ中の染料からなる内部標準調製物/配向マーカーを収容するための本発明に有用性を証明する。

250 μ lの黒、青、及び黄の外科マーキング染料の4容量(Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC)をそれぞれエッペンドルフ管に添加した。染料の各々に、750 μ lの2%NuSieve3:1アガロース(99で溶解した高ゲル強度のアガロース)を添加し、混合物をボルテックスし、15mmX15mmのDisPOベースモールド(Baxter Scientific)中に注いだ。ついで、4つの内部標準調製物/配向マーカーの各々を少なくとも1時間4でゲル化させた。

臨床前立腺癌試料及び内部着色マーカー線量標準調製物を含む典型的な組織アレイは、次のようにして20段、12列に配列された240のコアを含むように構築された。直径0.6mmの寸法の232の試料組織コアが様々なドナーパラフィンブロックから得られた。ドナーブロックは57標本(試料)の前立腺癌組織を含んでおり、その22の標本は採

取した隣接する正常前立腺組織を含んでいた；各ドナーブロック領域（腫瘍及び正常）は2通り又は3通り採取した（University of Sheffield, England）。試料コアを、例えば実施例3に記載したようにBeecher組織アレイ化機器を使用して、レシピエントパラフィンブロック中に埋め込んだ。

【0109】

内部着色染料標準調製物の8のコアは、直径が0.6mmの寸法であり、それぞれ上述のようにして調製される、染料/アガロースを含むドナーブロックから得た。黒の染料/アガロースブロックからの3のコア、黄色染料/アガロースブロックからの3のコア、青色染料/アガロースブロックからの1のコア、及び淡い青色染料/アガロースブロックからの1のコアを、図12に示されるように、非対称パターンでアレイレシピエントブロックアレイ中に挿入した。染料/アガロース内部標準調製物は非常に明瞭であり、アレイ中にはっきりと目につき、よってアレイを見たとき、明瞭な配向が可能になる。

コアの全てを37のオープンでブロックを一晚インキュベートすることにより、アレイレシピエントブロックアレイ中でアニールした。分析のために、パラフィンアレイを3-5µm厚の組織学的TMA切片にスライスした。ついで、各TMAを42の水浴に移し、Superfrostガラススライド上に個々に収集し、十分に乾燥させた。TMA切片を脱パラフィン処理し、ここで記載したものと同様の手順を使用してヘマトキシリン及びエオシンで染色した。この手順の後に、染料/アガロース配向マーカースは引き続いて明瞭に観察可能で、アレイ中の組織試料と比較してはっきりと目についた。

【0110】

実施例16

赤血球影及びRNA/アガロース内部標準調製物

本実施例は、組織又は細胞アレイで使用される、アガロースのような埋め込み材料に混合されたRNA及び/又はタンパク質内部標準物質を捕捉するために赤血球影を利用するための本発明の有用性を証明する。そのようなビヒクル中にRNA及びタンパク質標準物質を導入することは組織内の条件をより正確に模倣し、それがハイブリダイゼーション速度及び抗体接近又は認識に影響を及ぼしうる。

赤血球溶解

赤血球影をBoogaard及びDixonの方法、Procedural Cell Research 143:175-190 (1983)に従って調製する。簡単に述べると、10ミリリットルのヘパリン処理血液を4で2300xgにて10分間遠心分離する。遠心分離後に、血清及び白血球を吸引する。赤血球を、10mlの冷ハンスバランス塩液(HBSS)中に懸濁させて3回洗浄する。赤血球を再び遠心分離し、あらゆる残留白血球を上清と共に除去する。3度目の洗浄後に白血球を除去した後、20mlの55%HBSSを赤血球に加えてそれらを膨潤させる。膨潤された赤血球を遠心分離し、上清を除去して膨潤赤血球ペレットを残す。次のものをチューブに添加して溶解を開始させる：2mlの膨潤赤血球ペレット；10mlの20%HBSS；及び2mlの10mMのTris-HCl、pH7.6。チューブを数回逆さにして4で2分溶解を進行させ、細胞内容物（例えば内在性タンパク質及び残留RNA）が赤血球からリークさせる。2分後に、1.5mlの10XのHBSSをチューブ中の懸濁液に添加して溶解によって生じる赤血球の膜の孔を閉止させる。チューブ中の懸濁液を37の水浴中で1時間インキュベートして膜を再シールし、ついで4で遠心分離して上清を除く。

次の溶解手順を所望に応じて2又は3回繰り返すことができる。最終の再シール形成工程後に、膨潤細胞ペレットの容積を0.2mlまで注意深く吸引することによって低減させ、細胞の充填準備が整う。

【0111】

赤血球の充填

充填バッファーを作製するには、RNAを約1mg/mlの濃度で10mMのTris-HCl、pH7.0、5mmのDTT中に懸濁させる。4の200µlアリコート

の充填バッファーを、200µlの膨潤赤血球を持つチューブに加え、チューブを、透過

性赤血球によるRNA取り込みを最大にするために2分ボルテックスする。10XのHBSSの30 μ lのアリコートチューブに添加する。チューブをボルテックスし、37の水浴中で30-45分間インキュベートさせて、RNA充填細胞をシールする。インキュベーション後、赤血球を4まで戻し、150mMのNaCl、10mMのTris、pH7.0及び5mMのDTTを加えて洗浄し、10mlの容積の細胞懸濁液をつくる。細胞懸濁液を25分間上述のようにして遠心分離して細胞ペレットをつくり出す、細胞ペレットを150mMのNaCl、10mMのTris、pH7.0及び5mMのDTTで更に2回洗浄する。

ついで、細胞ペレットをチューブから穏やかに除去し、15mmX15mmDisPOベースモールド(Baxter Scientific)中の2%NuSieve3:1アガロース(高ゲル強度アガロースを99で溶融した後、約60まで冷却)に添加する。ついで、混合物を少なくとも1時間4にてゲル化させる。タンパク質溶液が所望の濃度で10mMのTris-HCl、pH7.0、5mMのDTT中に再懸濁させられる以外は同じようにして赤血球影中にタンパク質を充填し、200 μ lアリコートチューブを200 μ lの膨潤赤血球を有するチューブに添加する。

ゲルが形成された後、タンパク質及び/又はRNA充填赤血球影/アガロースブロックを、清浄な剃刀の刃を使用してプラスチックモールドから除去し、無傷のブロックを、実施例1に記載されているように室温で一晩10%中性バッファホルマリンに固定する。ついでアガロースブロックを70%エタノールに移して、実施例1に記載されているようにパラフィン包埋のための標準的な方法を使用してプロセッシングし、実施例3及び4に記載されているようにして使用する。

【0112】

実施例17

凍結細胞アレイの構築

本実施例は凍結組織又は細胞アレイを構築するための本発明の有用性を証明する。

56の金属ピンを有し、40mm長x1.2mm直径の寸法のアレイヤーが作製され、これはヒードシールされ25mmx25mmの寸法のプレキシグラス製の基部にエポキシで接着される。ピンは7列、8段に配置され、各ピンはおよそ1mm等しく離間される。ピンの全面積は20mmx22mmであり、ピンの密度を約13ピン/cm²にする。流動性OCT媒質を、22mmx30mmx20mm(深さ)の寸法の使い捨て埋め込みモールド(VWR)中に注ぐ。アレイヤーピンを先ずグリセロールに浸漬した後、埋め込みモールド内に収容される流動性OCT媒質中に部分的に浸漬する。-160の極低温浴中に3から5分、流動性OCT、モールド及び係合ピンを沈めることにより流動性OCTを凍結させる。ついで、ピンをOCTモールドから抽出し、約13ウェル/cm²のアレイレシピエントブロック中に20mm深さ以下の56ウェルのアレイを残す。アレイレシピエントブロックは、ウェルに様々な細胞株を充填するまで-70で保存される。

アレイレシピエントブロックの56ウェルに一又は複数の生物学的試料を充填して、実施例7又は9-11に記載されたような凍結生物学的アレイをつくる。凍結生物学的アレイはクリオスタット又は他のスライス化機器を使用して6 μ mから12 μ mの範囲の切片にスライドのために切断する。凍結アレイからの二つの切片を75mmx25mm、0.96から1.09mm厚の寸法の予め洗浄した顕微鏡スライド(Baxter Diagnostic Inc.)上に配する。各スライドはアレイ中の56ウェルに対応する試料の112スポットを含み、各スポットはおよそ1.1mmの直径である。細胞アレイスライドは分析に使用するまで-70で保存した。

【0113】

材料の寄託

次のハイブリドーマ細胞株をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801ユニバーシティ・ブルバード、マナッサス、ヴァージニア州20110-2209米国(ATCC)に寄託した：

抗体名	ATCC番号	寄託日
-----	--------	-----

10

20

30

40

50

4 D 5

ATCC CRL 10463

1 9 9 0 年 5 月 2 4 日

【0114】

寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号8860 G 6 3 8の37 CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

10

【0115】

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

20

【図面の簡単な説明】

【0116】

【図1】本発明の一実施態様に係る、アレイヤーをモールド中に挿入する前のアレイ装置の展開斜視図である。

【図2】モールド中の基質内にアレイヤーが挿入され、基質が凍結され、アレイレシピエントブロックの形成のためにアレイヤーが除去された後の状態の、図1の2-2線に沿った断面図である。

30

【図3】本発明の一実施態様に係る、図2のアレイレシピエントブロックの斜視図である。

【図4】本発明の一実施態様に係る、二つのアレイスライスを含むスライドを含んでなる細胞又は組織マイクロアレイの上面図である。

【図5】本発明の他の実施態様に係る、モールド中の基質内にアレイヤーが挿入され、基質が凍結され、アレイヤーが除去された後の状態の、アレイ装置の展開断面図である。

【図6】本発明の他の別の実施態様に係る、モールド中の基質内にアレイヤーが挿入され、基質が凍結され、アレイヤーが除去された後の状態の、アレイ装置の展開断面図である。

40

【図7】本発明の一実施態様に係る、内部標準調製物の3つのスポット504(又は横断切片)と生物学的試料の12のスポット506(又は横断切片)を含む細胞又は組織マイクロアレイの上面図である。

【図8A】HER2遺伝子増幅の相対量の棒グラフである。

【図8B】図8Aと同様の図で、HER2タンパク質レベル(図8B(ELISA)及びマイクロアレイ上のHER2発現細胞株中)に対するものである。

【図8C】図8Aと同様の図で、本発明の定量的免疫蛍光を示すものである。

【図8D】図8Cと同様の図である。

【図8E】図8Cと同様の図である。

50

【図8F】図8Cと同様の図である。

【図9】図9A - 9Dは、HER2発現細胞がコントロールとして使用されアガロースに埋め込まれたHER2ECDタンパク質が標準物質として使用された組織マイクロアレイの写真である。HER2はパラフィン包埋グレード3の管の乳癌、HER2発現細胞株、及びHER2ECD標準の99の例で免疫染色した。図9Aはアレキサ・フルオール(Alexa Fluor)633を使用しての、HER2に結合するヤギ抗ヒトHER2ECDポリクローナル抗体の免疫蛍光検出を示す。図9Bはアレキサ(Alexa)633を使用しての、HER2に結合するウサギウサギ抗ヒトc-erbB2(HER2/neu)ポリクローナル抗体の免疫蛍光検出を示す。図9Cは免疫ペルオキシダーゼを使用しての、HER2に結合するヤギ抗ヒトHER2ECDポリクローナル抗体の免疫組織化学的検出を示す。図9Dは免疫ペルオキシダーゼを使用しての、HER2に結合するウサギウサギ抗ヒトc-erbB2(HER2/neu)ポリクローナル抗体の免疫組織化学的検出を示す。

10

【図10】アレイと共に位置させられた配向マーカを含む組織マイクロアレイを示す。マーカに対する標識ポリヌクレオチドプローブの非特異的結合(矢印)がアレイのホスフォイメージとして示されている。配向マーカは実施例14に記載された微粒子状セルロースとアガロースを含む。

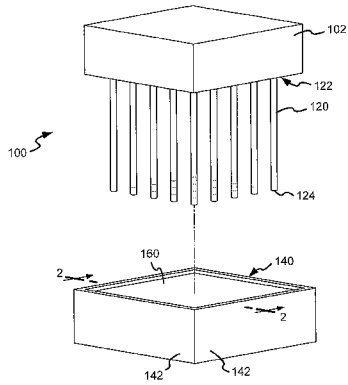
【図11】図11A - 11Dはセルロース/アガロース内部標準調製物を含む組織マイクロアレイの画像である。図11Aは実施例14に記載されたセルロース/アガロース内部標準調製物を含むアレイ上のアンチセンスHer2/Erbb2プローブでのハイブリダイゼーションの自己蛍光ホスフォイメージャーシグナル結果を示す。図11Bは実施例14に記載されたセルロース/アガロース内部標準調製物を含むアレイ上のセンスHer2/Erbb2プローブでのハイブリダイゼーションの自己蛍光ホスフォイメージャーシグナル結果を示す。図11Cは実施例14に記載されたセルロース/アガロース内部標準調製物を含むアレイ上のアンチセンスHer2/Erbb2プローブでのハイブリダイゼーションのISHホスフォイメージャーシグナル結果を示す。図11Dは実施例14に記載されたセルロース/アガロース内部標準調製物を含むアレイ上のセンスHer2/Erbb2プローブでのハイブリダイゼーションのISHホスフォイメージャーシグナル結果を示す。

20

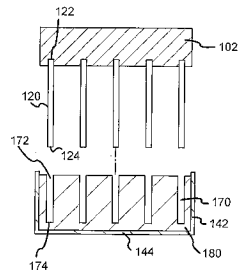
【図12】実施例15に記載された染料/アガロース内部標準調製物の非対称パターンを含むアレイの上面写真である。

30

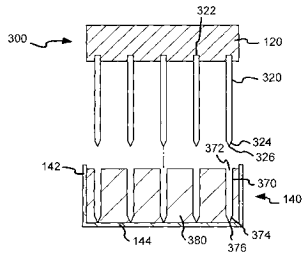
【 図 1 】



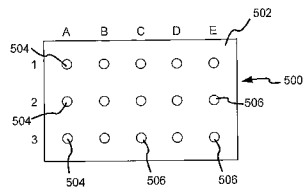
【 図 2 】



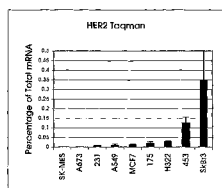
【 図 6 】



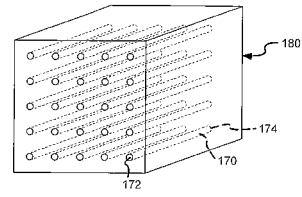
【 図 7 】



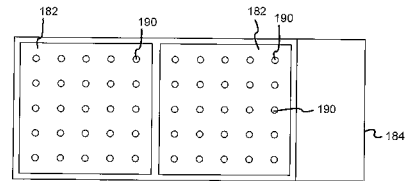
【 図 8 A 】



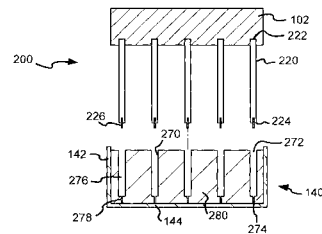
【 図 3 】



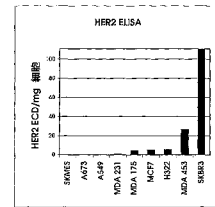
【 図 4 】



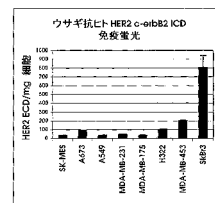
【 図 5 】



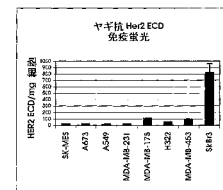
【 図 8 B 】



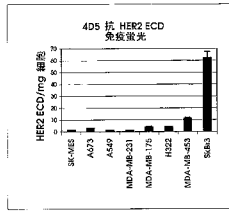
【 図 8 C 】



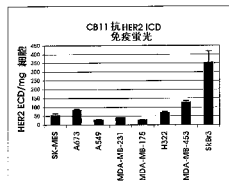
【 図 8 D 】



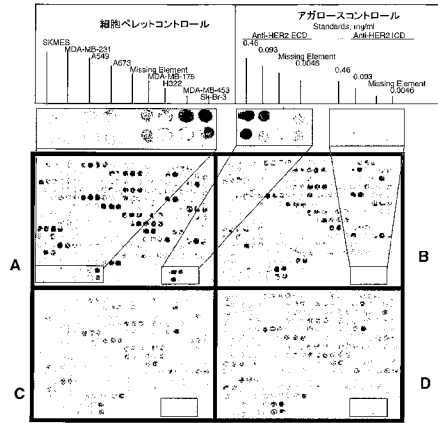
【 図 8 E 】



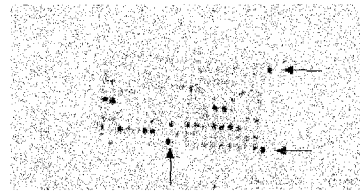
【 図 8 F 】



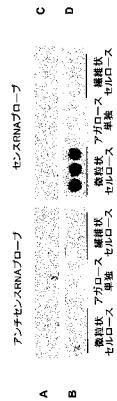
【 図 9 】



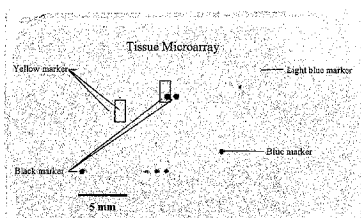
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/37054
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12Q 1/68; C12M 1/00, 1/36; G01N 33/543; B01L 3/00 US CL : 435/6, 283.1, 286.2; 436/518; 422/99 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 283.1, 286.2; 436/518; 422/99		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,269,846 B1(OVERBECK et al) 07 August 2001 (07.08.2001), whole document.	1-160
A	US 6,101,946 A (MARTINSKY et al) 15 August 2000 (15.08.2000), whole document.	1-160
A	US 6,103,518 A (LEIGHTON et al) 15 August 2000 (15.08.2000), whole document.	1-160
A	US 6,110,426 A (SHALON et al) 29 August 2000 (29.08.2000), whole document.	1-160
A	WO 99/44062 (UNITED STATES OF AMERICA) 02 September 1999 (02.09.1999), whole document.	1-160
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 24 February 2003 (24.02.2003)		Date of mailing of the international search report 04 JUN 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Gary Counts Telephone No. (703) 305-1444

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 15/00	F

- (31)優先権主張番号 60/359,563
(32)優先日 平成14年2月22日(2002.2.22)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/389,610
(32)優先日 平成14年6月17日(2002.6.17)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/393,551
(32)優先日 平成14年7月2日(2002.7.2)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)
ウィンドウズ

- (72)発明者 ランドン, トレント
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 2, サン フランシスコ, ポスウォース ストリ
ート 4 2 4, アpartment ビー.
(72)発明者 パール, フランクリン, ジュニア, ヴィー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, パール アベニュー 4 1
6
(72)発明者 パム, シン, クワン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 6, サン ブルーノ, クリスタル スプリングス
ロード 2 0 0 0, 1 - 2 2 番
(72)発明者 ステファン, ジーン-フィリップ, エフ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 3 0, ミルブレイ, シー ランズデール アベニュー
3 2 0
(72)発明者 ダンラップ, デブラ, ワイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 6, サニーヴェイル, ポンデロサ アベニュー 9
9 0 ビー
(72)発明者 ヒラン, ケニス, ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 4, サン フランシスコ, シーワード ストリ
ート 6 4

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 CA20 HA14
4B029 AA07 BB11 BB20 CC03 FA15
4B063 QA01 QQ52 QQ53 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR51 QR56 QR62
QR66 QR77 QR82 QS33 QS34 QS36

专利名称(译)	细胞和组织阵列和微阵列以及使用方法		
公开(公告)号	JP2005509870A	公开(公告)日	2005-04-14
申请号	JP2003545834	申请日	2002-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	フランツグレッチェン ランドントレント パールフランクリンジュニアヴィー パムシンクウアン ステファンジーンフィリップエフ ダンラップデブラワイ ヒランケニスジェイ		
发明人	フランツ, グレッチェン ランドン, トレント パール, フランクリン, ジュニア, ヴィー パム, シン, クウアン ステファン, ジーン-フィリップ, エフ. ダンラップ, デブラ, ワイ. ヒラン, ケニス, ジェイ.		
IPC分类号	G01N33/53 B01L3/00 B28B1/48 B29D19/08 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 G01N1/36 G01N33/554 G01N33/566 G01N33/567 G01N33/574 G01N37/00		
CPC分类号	G01N1/36 B01J2219/00283 B01J2219/00286 B01J2219/00313 B01J2219/00317 B01J2219/00495 B01J2219/00659 B01J2219/00673 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01J2219/00743 B01L3/5085 C12Q1/6837 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/554 G01N33/57438 G01N2001/368		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.M G01N33/53.D C12M1/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/566 G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029 /BB11 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063 /QR77 4B063/QR82 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36		
优先权	60/332293 2001-11-20 US 60/332635 2001-11-21 US 60/355205 2002-02-07 US 60/359563 2002-02-22 US 60/389610 2002-06-17 US 60/393551 2002-07-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及生物阵列，生物微阵列，以及使用所述阵列和微阵列来检测生物样品中生物分子的量和/或存在的方法。本发明的生物阵列包括固化的可切片基质，其包括设置在其中的多个孔和设置在多个孔内的一个或多个生物样品，该生物阵列任选地包含内标制剂和/或取向标记。将生物阵列的切片或切片安装在平面基底表面上以形成本发明的细胞微阵列。在本发明的另一种细胞微阵列中，基质材料是从微阵列上移除的温度敏感材料，在基质表面上留下细胞生物材料。

(5) Int. Cl. 7		F I		テーマコード (参考)	
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/53	ZNAM	4 B 0 2 4
C 1 2 M	1/00	G 0 1 N	33/53	D	4 B 0 2 9
C 1 2 N	15/09	C 1 2 M	1/00	A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q	1/02		
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	1/68	A	
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全 70 頁) 最終頁に
(21) 出願番号	特願2003-545834 (P2003-545834)	(71) 出願人	596168317		
(86) (22) 出願日	平成14年11月20日 (2002.11.20)		ジェネンテック・インコーポレーテッド		
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月20日 (2004.5.20)		GENENTECH, INC.		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/037054		アメリカ合衆国カリフォルニア・940		
(87) 国際公開番号	W02003/044213		0-4990・サウス・サン・フランシ		
(87) 国際公開日	平成15年5月30日 (2003.5.30)		スコ・ディーエヌエー・ウェイ・1		
(31) 優先権主張番号	60/332,293	(74) 代理人	100109726		
(32) 優先日	平成13年11月20日 (2001.11.20)		弁理士 園田 吉隆		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101199		
(31) 優先権主張番号	60/332,635		弁理士 小林 義教		
(32) 優先日	平成13年11月21日 (2001.11.21)	(72) 発明者	フランツ, グレッツェン		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94		
(31) 優先権主張番号	60/355,205		27, サン フランシスコ, サン		
(32) 優先日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		ニト ウェイ 135		
(33) 優先権主張国	米国 (US)				

最終頁に続く