

(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2018-517895
(P2018-517895A)

(43) 公表日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)			
GO 1 N	1/30	(2006.01)	GO 1 N	1/30	2 G O 4 5	
GO 1 N	33/48	(2006.01)	GO 1 N	33/48	P	2 G O 5 2
GO 1 N	33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	Y	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁)

(21) 出願番号 特願2017-554833 (P2017-554833)
 (86) (22) 出願日 平成28年4月20日 (2016.4.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月27日 (2017.11.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/058801
 (87) 国際公開番号 W02016/170008
 (87) 国際公開日 平成28年10月27日 (2016.10.27)
 (31) 優先権主張番号 62/150,122
 (32) 優先日 平成27年4月20日 (2015.4.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507179346
 ベンタナ メディカル システムズ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国アリゾナ州85755, トゥーソン, イースト・イノベーション・パーク・ドライブ 1910
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74) 代理人 100120112
 弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織学的試料のための試薬のインクジェット沈着

(57) 【要約】

試薬小滴を細胞または組織試料上に沈着させるためのデバイスおよび方法を開示する。試料は保護液体層を有してもよく、小滴は約1 pL ~ 約50 pLの間の体積を有し、pH修飾剤が試料に分配され、小滴は約5 m/s ~ 約15 m/sの間の速度を有し、小滴は9.52 x 10⁻¹⁰ - 10⁻¹⁰ジュールより大きい動力学エネルギーを有し、そして試料上に沈着される試薬の空間密度は約50 dpi ~ 約1200 dpiの範囲である。やはり開示するのは、小滴オンデマンドシステムを通じて分配するために適した試薬組成物であり、これにより、試薬組成物は、一次染色試薬組成物、抗体試薬組成物および巨大分子染色組成物からなる群より選択される。また、インクジェット沈着システム、および試料を含有するスライドを画像化する手段も開示する。

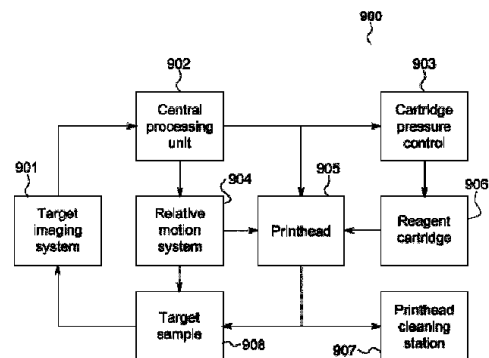


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的試料の上に試薬を分配する方法であって：

保護液体層を生物学的試料上に重層する、該生物学的試料は支持媒体上に沈着されている；

約 1 p L ~ 約 5 0 p L の間の試薬小滴を分配し、該試薬小滴が該保護液体層に浸透し、そして該生物学的試料と接触するようにする；

ここで、該試薬小滴は、一次染色試薬組成物および抗体試薬組成物からなる群より選択される試薬組成物を含むことを含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記試薬小滴を、約 5 m / s ~ 約 1 5 m / s の間の速度で分配する、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

前記保護液体層が水性パドルである、請求項 1 または 2 の方法。

【請求項 4】

前記保護液体層が非混和性油である、請求項 1 または 2 の方法。

【請求項 5】

前記試薬小滴の密度が、前記非混和性油の密度より大きい、請求項 4 の方法。

【請求項 6】

前記試薬小滴の動力学エネルギーが、前記保護液体層の表面張力より大きい、請求項 1 ~ 5 のいずれかの方法。

20

【請求項 7】

前記動力学エネルギーが 9.52×10^{-10} ジュールより大きい、請求項 6 の方法。

【請求項 8】

前記一次染色試薬組成物が、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約 1 c p ~ 約 4 0 c p の範囲の粘性および約 2 5 ダイン / c m ~ 約 4 5 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれかの方法。

【請求項 9】

前記色素が、ヘマトキシリン、エオジン、アクリジンオレンジ、ビスマルクブラウン、カーミン、クーマシブルー、クレシルバイオレット、クリスタルバイオレット、D A P I (「2 - (4 - アミジノフェニル) - 1 H - インドール - 6 - カルボキサミジン」)、エチジウムプロミド、酸性フクシン、ヘキスト染色剤、ヨウ素、マラカイトグリーン、メチルグリーン、メチレンブルー、ニュートラルレッド、ナイルブルー、ナイルレッド、四酸化オスミウム、ローダミン、およびサフラニンからなる群より選択される、請求項 8 の方法。

30

【請求項 10】

前記一次染色試薬組成物の粘性が、約 6 c p ~ 約 1 0 c p の範囲である、請求項 8 または 9 の方法。

【請求項 11】

前記一次染色試薬溶液が、約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配される、請求項 8 ~ 10 のいずれかの方法。

40

【請求項 12】

前記抗体試薬組成物が、一次抗体、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約 4 c p ~ 約 7 c p の範囲の粘性、および約 2 0 ダイン / c m ~ 約 4 0 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれかの方法。

【請求項 13】

前記抗体組成物が、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される、請求項 12 の方法。

【請求項 14】

生物学的試料の上に試薬を分配する方法であって：

50

保護液体層を生物学的試料上に重層する、該生物学的試料は支持媒体上に沈着されている；

pH修飾剤を、該生物学的試料に分配し；そして試薬小滴を、約5 m/s ~ 約15 m/s の間の速度で分配する；

ここで、該試薬小滴は、一次染色試薬組成物および抗体試薬組成物からなる群より選択される試薬組成物を含むことを含む、前記方法。

【請求項15】

分配される試薬小滴の量が、約10 $\mu\text{L} / \text{in}^2$ ~ 約30 $\mu\text{L} / \text{in}^2$ の範囲である、請求項14の方法。

10

【請求項16】

前記pH修飾剤が、約3 ~ 約5の範囲のpHを有する、請求項14または15の方法。

【請求項17】

前記保護液体層が非混和性油であり、そして前記試薬小滴の動力学エネルギーが該非混和性油の表面張力より大きい、請求項14 ~ 16のいずれかの方法。

【請求項18】

前記一次染色試薬組成物が、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約1 cp ~ 約40 cpの範囲の粘性および約25 dIN / cm ~ 約45 dIN / cm の範囲の表面張力を有する、請求項14 ~ 17のいずれかの方法。

20

【請求項19】

前記一次染色試薬組成物が、約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配される、請求項18の方法。

【請求項20】

前記抗体試薬組成物が、一次抗体、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約4 cp ~ 約7 cpの範囲の粘性、および約20 dIN / cm ~ 約40 dIN / cm の範囲の表面張力を有する、請求項14 ~ 17のいずれかの方法。

【請求項21】

前記抗体組成物が、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される、請求項20の方法。

【請求項22】

生物学的試料の上に試薬を分配する方法であって：

保護液体層を生物学的試料上に重層する、該生物学的試料は支持媒体上に沈着されている；

試薬小滴を、約 9.52×10^{-10} ジュールより大きい動力学エネルギーで分配し、そして該生物学的試料上に沈着する試薬小滴の空間密度が約50 dpi ~ 約1200 dpiであるように分配する、

ここで、該試薬小滴は、一次染色試薬組成物および巨大分子染色組成物からなる群より選択される試薬組成物を含むことを含む、前記方法。

30

【請求項23】

前記保護液体層が非混和性油であり、そして前記試薬小滴の密度が該非混和性油の密度より大きい、請求項22の方法。

40

【請求項24】

前記巨大分子染色組成物が、抗体、抗体コンジュゲート、マルチマー、および酵素からなる群より選択される巨大分子；界面活性剤；ならびに粘性修飾剤を含み、約4 cp ~ 約7 cpの範囲の粘性、および約20 dIN / cm ~ 約40 dIN / cm の範囲の表面張力を有する、請求項22または23の方法。

【請求項25】

前記巨大分子染色組成物が、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される、請求項24の方法。

50

【請求項 26】

前記一次染色試薬組成物が、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約 1 c p ~ 約 40 c p の範囲の粘性および約 25 ダイン / c m ~ 約 45 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する、請求項 22 または 23 の方法。

【請求項 27】

前記一次染色試薬組成物が、 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配される、請求項 26 の方法。

【請求項 28】

色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含む、一次染色組成物であって、約 1 c p ~ 約 40 c p の範囲の粘性および約 25 ダイン / c m ~ 約 45 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する、前記組成物。

10

【請求項 29】

約 6 c p ~ 約 10 c p の範囲の粘性を有する、請求項 28 の一次染色組成物。

【請求項 30】

前記色素が、ヘマトキシリン、エオジン、アクリジンオレンジ、ビスマルクブラウン、カーミン、クーマシブルー、クレシルバイオレット、クリスタルバイオレット、D A P I (「2 - (4 - アミジノフェニル) - 1 H - インドール - 6 - カルボキサミジン」)、エチジウムブロミド、酸性フクシン、ヘキスト染色剤、ヨウ素、マラカイトグリーン、メチルグリーン、メチレンブルー、ニュートラルレッド、ナイルブルー、ナイルレッド、四酸化オスミウム、ローダミン、およびサフラニンからなる群より選択される、請求項 28 または 29 の一次染色組成物。

20

【請求項 31】

前記色素がヘマトキシリンおよびエオジンからなる群より選択される、請求項 30 の一次染色組成物。

【請求項 32】

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項 28 ~ 31 のいずれかの一次染色組成物。

【請求項 33】

前記粘性修飾剤がグリコールである、請求項 28 ~ 32 のいずれかの一次染色組成物。

【請求項 34】

前記粘性修飾剤がプロピレングリコールである、請求項 28 ~ 32 のいずれかの一次染色組成物。

30

【請求項 35】

前記界面活性剤が、前記一次染色組成物の総重量の約 0.01% ~ 約 0.5% の間の範囲の量で存在する、請求項 28 ~ 34 のいずれかの一次染色組成物。

【請求項 36】

前記粘性修飾剤が、前記一次染色組成物の総重量の約 25% ~ 約 75% の間の範囲の量で存在する、請求項 28 ~ 35 のいずれかの一次染色組成物。

【請求項 37】

前記粘性修飾剤が、前記一次染色組成物の総重量の約 35% ~ 約 60% の間の範囲の量で存在する、請求項 28 ~ 35 のいずれかの一次染色組成物。

40

【請求項 38】

緩衝剤をさらに含む、請求項 28 ~ 37 のいずれかの一次染色組成物。

【請求項 39】

約 2 ~ 約 5 の範囲の pH を有する、請求項 28 ~ 38 のいずれかの一次染色組成物。

【請求項 40】

約 2.2 の pH を有する、請求項 28 ~ 38 のいずれかの一次染色組成物。

【請求項 41】

塩化アルミニウムをさらに含む、請求項 28 ~ 40 のいずれかの一次染色組成物。

【請求項 42】

50

前記色素がヘマトキシリンであり、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であり、前記粘性修飾剤がプロピレングリコールであり；そしてプロピレングリコールの量が前記一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲である、請求項28の一次染色組成物。

【請求項43】

前記色素がエオジンであり、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であり、前記粘性修飾剤がプロピレングリコールであり；そしてプロピレングリコールの量が前記一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲である、請求項28の一次染色組成物。

【請求項44】

請求項42の一次染色組成物を含む第一の構成要素、および請求項43の一次染色組成物を含む第二の構成要素を含む、キット。

10

【請求項45】

抗体、抗体コンジュゲート、マルチマー、および酵素からなる群より選択される巨大分子；界面活性剤；ならびに粘性修飾剤を含み、約4cp～約7cpの範囲の粘性、および約20ダイン/cm～約40ダイン/cmの範囲の表面張力を有する、巨大分子染色組成物。

【請求項46】

少なくとも1つのキャリアタンパク質をさらに含む、請求項45の巨大分子染色組成物。

【請求項47】

前記少なくとも1つのキャリアタンパク質が、ウシ血清アルブミンおよび正常ヤギ血清からなる群より選択される、請求項46の巨大分子染色組成物。

20

【請求項48】

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項45～47のいずれかの巨大分子染色組成物。

【請求項49】

前記界面活性剤が、前記抗体染色組成物の総重量の約0.01%～約0.5%の範囲の量で存在する、請求項45～48のいずれかの巨大分子組成物。

【請求項50】

前記粘性修飾剤がグリセロールである、請求項45～49のいずれかの巨大分子染色組成物。

30

【請求項51】

前記粘性修飾剤が、前記抗体染色組成物の総重量の約2%～約50%の範囲の量で存在する、請求項45～50のいずれかの巨大分子染色組成物。

【請求項52】

緩衝剤をさらに含む、請求項45～51のいずれかの巨大分子染色組成物。

【請求項53】

塩化アルミニウムをさらに含む、請求項45～52のいずれかの巨大分子染色組成物。

【請求項54】

前記巨大分子が抗体であり、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であり、前記粘性修飾剤がグリセロールであり、そして前記組成物がさらにウシ血清アルブミンを含み；そしてグリセロールの量が、前記抗体染色組成物の総重量の約2%～約50%の範囲である、請求項45の巨大分子染色組成物。

40

【請求項55】

請求項54の巨大分子染色組成物を含む第一の組成物、および請求項42または43のいずれかの一次染色組成物の少なくとも1つを含む第二の構成要素を含む、キット。

【請求項56】

請求項42または43のいずれかの一次染色組成物の別の1つを含む第三の構成要素をさらに含む、請求項55のキット。

【請求項57】

50

自動化スライド染色装置であって

- a. 約 1 p L ~ 約 5 0 p L の範囲の体積を有する試薬小滴を分配するためのディスペンサー；
- b. 顕微鏡スライドを保持するように適応したスライド支持体；
- c. インクジェットプリンティングヘッドと液体連絡がある、請求項 2 8 ~ 4 3 および 4 5 ~ 5 4 のいずれか記載の組成物を含む、少なくとも 1 つの試薬リザーバー；および
- d. プロセッサおよびメモリを含有する制御モジュールであって、該スライド支持体によって保持された顕微鏡スライド上に組成物を分配するよう分配装置に命令するようにプログラミングされている、前記制御モジュールを含む、前記装置。

10

【請求項 5 8】

前記制御モジュールが、請求項 1 ~ 2 7 のいずれかの方法を実行するようプログラミングされている、請求項 5 7 記載の自動化スライド染色装置。

【請求項 5 9】

組織化学的または細胞化学的分析のために、細胞または組織試料を染色するための、請求項 5 7 または請求項 5 8 記載の自動化スライド染色装置の使用。

【請求項 6 0】

組織化学的または細胞化学的分析のために、細胞または組織試料を染色するための、請求項 2 8 ~ 4 3 および 4 5 ~ 5 4 のいずれか記載の組成物の使用。

【請求項 6 1】

組織化学的または細胞化学的分析のために、細胞または組織試料を染色するための、請求項 4 4、5 5、および 5 6 のいずれか記載のキットの使用。

20

【請求項 6 2】

組織試料を染色する方法であって

(a) 小滴オンデマンドプリントヘッドを、染色試薬を受け取る組織試料の部分の近傍に配置し、該プリントヘッドは染色試薬供給源と液体連絡があり；

(b) あらかじめ決定した量の該染色試薬を、該プリントヘッドから、そして該組織試料の部分上に、あらかじめ決定した速度で分配する

ことを含む、前記方法。

【請求項 6 3】

工程 (b) を 1 回またはそれより多く反復する工程をさらに含む、請求項 6 2 の方法。

30

【請求項 6 4】

染色強度を測定する工程をさらに含む、請求項 6 2 の方法。

【請求項 6 5】

測定染色強度が、あらかじめ決定した閾値を満たさない場合、工程 (b) を反復する、請求項 6 4 の方法。

【請求項 6 6】

あらかじめ決定した閾値が、約 3 0 A U ~ 約 1 6 0 A U の間の吸光度である、請求項 6 5 の方法。

【請求項 6 7】

前記染色試薬の累積量が、約 1 0 μ L / i n ² ~ 約 3 0 μ L / i n ² の範囲になるまで、工程 (b) を反復する、請求項 6 2 の方法。

40

【請求項 6 8】

前記あらかじめ決定した速度が、約 5 m / s ~ 約 1 5 m / s の範囲である、請求項 6 2 ~ 6 7 のいずれかの方法。

【請求項 6 9】

2 つの染色試薬を前記組織試料に連続的に適用する、請求項 6 2 ~ 6 8 のいずれかの方法。

【請求項 7 0】

前記染色試薬が一次染色剤である、請求項 6 2 ~ 6 9 のいずれかの方法。

50

【請求項 7 1】

前記染色試薬が、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含む組成物であり；該組成物が約 1 c p ~ 約 4 0 c p の範囲の粘性および約 2 5 ダイン / c m ~ 約 4 5 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する、請求項 6 2 ~ 6 9 のいずれかの方法。

【請求項 7 2】

前記組成物が、約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配される、請求項 7 1 の方法。

【請求項 7 3】

前記染色試薬が巨大分子染色組成物である、請求項 6 2 ~ 6 9 のいずれかの方法。

【請求項 7 4】

前記巨大分子染色組成物が、抗体、抗体コンジュゲート、マルチマー、および酵素からなる群より選択される巨大分子；界面活性剤；ならびに粘性修飾剤を含み、約 4 c p ~ 約 7 c p の範囲の粘性、および約 2 0 ダイン / c m ~ 約 4 0 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する、請求項 7 3 の方法。

【請求項 7 5】

前記巨大分子染色組成物が、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される、請求項 7 4 の方法。

【請求項 7 6】

前記組織試料の部分と連絡がある染色剤枯渇層に補充する、請求項 6 2 ~ 7 5 のいずれかの方法。

【請求項 7 7】

各分配工程の前または後に、1 またはそれより多いさらなる試薬を沈着させてもよい工程をさらに含む、ここで、該 1 またはそれより多いさらなる試薬が、脱パラフィン化剤、洗浄剤、リンス剤、希釈剤、緩衝剤、または検出試薬からなる群より選択される、請求項 6 2 ~ 7 6 のいずれかの方法。

【請求項 7 8】

前記 1 またはそれより多い試薬を沈着させてもよい工程を、インクジェットプリントヘッドから該 1 またはそれより多い試薬を分配することによって行う、請求項 7 7 の方法。

【請求項 7 9】

生物学的試料上に試薬を分配する方法であって、該生物学的試料は支持媒体上に沈着している；試薬小滴を約 $5 \text{ m} / \text{s}$ ~ 約 $15 \text{ m} / \text{s}$ の範囲の速度で分配することを含む、ここで、該小滴が約 1 p L ~ 約 5 0 p L の範囲の体積を有し、そして該試薬が一次染色試薬溶液および巨大分子試薬染色溶液からなる群より選択され、そして該一次染色試薬溶液が約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配され、そして該巨大分子試薬組成物が約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される、前記方法。

【請求項 8 0】

前記分配を分配手段で実行する、請求項 7 9 の方法。

【請求項 8 1】

前記分配手段がプリントヘッドである、請求項 8 0 の方法。

【請求項 8 2】

前記プリントヘッドがインクジェットプリントヘッドである、請求項 8 1 の方法。

【請求項 8 3】

前記一次染色試薬溶液が、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、前記組成物が約 1 c p ~ 約 4 0 c p の範囲の粘性および約 2 5 ダイン / c m ~ 約 4 5 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する、請求項 7 9 ~ 8 2 のいずれかの方法。

【請求項 8 4】

前記色素がヘマトキシリンであり、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であり、前記粘性修飾剤がプロピレングリコールであり；そしてプロピレングリコールの量が前記一次染色組成物の総重量の約 3 5 % ~ 約 6 0 % の範囲である、請求項 8 3 の方法。

【請求項 8 5】

10

20

30

40

50

前記色素がエオジンであり、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であり、前記粘性修飾剤がプロピレングリコールであり；そしてプロピレングリコールの量が前記一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲である、請求項83の方法。

【請求項86】

巨大分子試薬染色溶液が、一次抗体、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約4cp～約7cpの範囲の粘性、および約20ダイン/cm～約40ダイン/cmの範囲の表面張力を有する、請求項79～82のいずれかの方法。

【請求項87】

(i) スライドの第一の部分を画像化する、該スライドは組織試料を含有する；

(ii) 染色試薬の適用のため、該スライドの第二の部分を選択する、ここで該第二の部分は該第一の部分のサブセットである；

(iii) 複数回のパスに渡って、インクジェット沈着システムを通じて、該第二の部分に染色試薬を沈着させる

工程を含む、コンピュータ実装法。

【請求項88】

染色試薬の約360nL/in²～約14.4μL/in²の間が、前記沈着システムのパスを通じて、前記第二の部分に沈着される、請求項87のコンピュータ実装法。

【請求項89】

インクジェットプリンティングヘッドに、請求項1～27のいずれかの方法を実行させるプログラムを記憶している、永続性(non-transitory)コンピュータ読み取り可能媒体。

【請求項90】

1またはそれより多いプロセッサおよび少なくとも1つのメモリを含む、組織試料を染色するためのコンピュータシステムであって、該少なくとも1つのメモリが永続性コンピュータ読み取り可能命令を記憶する、該永続性コンピュータ読み取り可能命令は、小滴オンデマンド分配機構を有し、該コンピュータシステムと連絡がある染色装置に、あらかじめ決定した量の一次染色試薬組成物または巨大分子試薬組成物を、生物学的試料の少なくとも部分に分配するようにさせる、該1またはそれより多いプロセッサによる実行のためのものである、前記システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対するクロスリファレンス

[0001]本出願は、2015年4月20日出願の米国仮特許出願第62/150,122号の出願日の利益を主張し、その開示は本明細書に援用される。

【0002】

産業上の利用可能性の言及

[0002]本開示は、診断の分野において産業上の利用可能性を有する。

【背景技術】

【0003】

[0003]分子病理学は、疾患を引き起こすかまたは疾患に関連する、DNA、mRNA、およびタンパク質の分子レベルでの検査である。この検査から、患者診断、予後、および治療オプションに関する重要な情報を解明することが可能である。疾患、例えば癌は、多くの異なる方法によって診断可能である。1つの方法は、特定の癌タイプに相関するか、または相関すると考えられているバイオマーカー、例えば癌バイオマーカーの、組織または細胞中の存在を同定することである。

【0004】

[0004]ヘマトキシリンおよびエオジン(H&E)は、少なくとも1世紀に渡って使用されてきた主な染色剤であり、そして現代の癌診断の基礎を形成する、多様な組織タイプおよび形態学的変化を認識するために必須である。該染色剤は、多様な固定法でよく働き、

10

20

30

40

50

そして広い範囲の細胞質、核、および細胞外マトリックス特徴を提示する。ヘマトキシリンは、深い青紫色を呈し、そして複雑な反応によって核酸を染色する。エオジンはピンクであり、そして非特異的にタンパク質を染色する。典型的な組織において、核は青に染色され、一方、細胞質および細胞外マトリックスは、多様な度合いのピンクの染色を有する。よく固定された細胞は、かなりの核内詳細を示す。核は、ヘテロクロマチン凝集の多様な細胞タイプおよび癌タイプ特異的パターン（ヘマトキシリン染色）を示し、これは診断的に非常に重要である。核小体はエオジンで染色される。豊富なポリリボソームが存在する場合、細胞質は特徴的な青い外観を有するであろう。ゴルジ帯は、核に近い領域における染色の欠如によって、暫定的に同定可能である。したがって、該染色剤は、特定の機能的暗示とともに、豊富な構造情報を開示する。

10

【0005】

[0005]組織化学および細胞化学は、顕微鏡上で視覚化可能な方式で、バイオマーカーに特異的に結合する分子で試料を標識することによって、インタクトな細胞の関連で、バイオマーカーを同定するためにしばしば用いられる技術である。免疫組織化学（IHC）および免疫細胞化学（ICC）は、バイオマーカーを標識するために抗体を用いるタイプの組織化学および細胞化学である。組織環境または細胞環境の関連で、バイオマーカーを同定することによって、バイオマーカー、および細胞または組織試料の他の形態学的または分子特徴の間の空間的關係が解明可能であり、これは、他の分子技術または細胞技術からは明らかではない情報を明らかにしうる。

20

【0006】

[0006]これらの技術は、典型的には、顕微鏡スライド、例えばガラス、プラスチック、または水晶顕微鏡スライド上にマウントされた組織切片（例えば腫瘍生検）または細胞試料（例えば血液または骨髄）に対して行われる、一連の処理工程を必要とする。しばしば用いられる工程には、マウントし、そして染色するために組織試料を調製する前処理（例えば脱パラフィン化、再水和、および/または抗原回復）、バイオマーカー特異的抗体またはプローブでの組織試料標識、酵素標識二次処理およびインキュベーション、バイオマーカーに関して標識された試料のフルオロフォアまたは発色団強調領域を生じるための酵素との基質反応、対比染色等が含まれる。これらの工程の大部分は、先の工程由来の未反応残渣試薬を除去する、多数のリンス工程によって分離される。インキュベーションはしばしば、上昇した温度、通常およそ37℃で行われ、そして組織は脱水から連続して保護されなければならない。

30

【0007】

[0007]IHCに必要な多数の反復処理工程を考慮して、自動化システムが導入されて、人の労働およびコスト、ならびにそれらに関連するエラー率が減少し、そして均一性が導入されてきた。成功裡に使用されてきた自動化システムの例には、Ventana Medical Systems（アリゾナ州ツーソン）から入手可能な、ES（登録商標）、NexES（登録商標）、DISCOVERYTM、BENCHMARKTMおよびGen II（登録商標）染色システムが含まれる。これらのシステムは、放射状に配置されたスライドを支持する回転カールセルを含むマイクロプロセッサ制御システムを使用する。ステップモーターはカールセルを回転させて、各スライドを、スライド上に配置された一連の試薬ディスペンサーの1つの下に配置する。スライドおよび試薬ディスペンサー上のバーコードが、コンピュータの適切なプログラミングによって、多様な組織試料各々に関して、異なる試薬処理が実行可能であるように、ディスペンサーおよびスライドのコンピュータ制御配置を可能にする。

40

【0008】

[0008]プロセッシング中に試薬および他の液体を導入するため、試薬送達システムおよび送達法をしばしば用いる。典型的には、試薬送達システムは、試薬リザーバーまたはバイアル内に、針またはプラスチックチューブを挿入し、モーター駆動シリンジで、チューブ内に試薬を吸い上げ、針をスライド（または他の容器）に移動させ、そしてシリンジを逆転させて、試薬を分配することによって、試薬を自動的にピペッティングする。前述のよ

50

うなプロセスにおいて、多くの試薬を、正確に測定された少量（マイクロリットル規模程度の少なさ）で、スライド上に沈着させなければならない。

【0009】

[0009] Ventana Medical Systems ES（登録商標）、NextES（登録商標）、BENCHMARK（登録商標）およびDISCOVERY（登録商標）システムなどの装置は、基本的に、制御された環境条件下で、1 x 3 インチのガラス顕微鏡スライド上にマウントされた組織切片に、試薬を連続して適用するよう設計されている。装置は、いくつかの基本的な機能、例えば試薬適用、洗浄（以前に適用された試薬を除去するため）、ジェット排出（洗浄に続いて、スライド上の残渣緩衝剤体積を減少させるための技術）、Liquid CoverslipTM適用（試薬を封じ込め、そして蒸発を防止するために用いる軽油適用）、および他の装置機能を行わなければならない。

10

【0010】

[0010]スライド上の組織を染色するプロセスは、上述の基本的な装置機能の連続的な反復からなる。本質的に、試薬を組織に適用し、次いで、特定の温度で、特定された時間に渡ってインキュベーションする。インキュベーション時間が完了したら、すべての試薬が適用され、そして染色プロセスが完了するまで、試薬をスライドから洗い流し、そして次の試薬を適用し、インキュベーションし、そして洗い流す等を行う。

【発明の概要】

【0011】

[0011]本開示の1つの側面において、色素（例えばヘマトキシリンまたはエオジン）、界面活性剤、および粘性修飾剤を含む、一次染色組成物を開示する。いくつかの態様において、一次染色組成物は、本明細書にさらに記載するように、小滴オンデマンド試薬分配システムから分配するために適している。いくつかの態様において、小滴オンデマンド試薬分配システムは、インクジェット分配システムである。いくつかの態様において、一次染色組成物は、塩化アルミニウムをさらに含む。

20

【0012】

[0012]本開示の別の側面において、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含む、一次染色組成物を開示し、ここで、組成物は、約1 cp ~ 約40 cpの範囲の粘性、および約25 ダイン/cm ~ 約45 ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、組成物は、約6 cp ~ 約10 cpの範囲の粘性を有する。いくつかの態様において、色素は、ヘマトキシリン、エオジン、アクリジンオレンジ、ピスマルクブラウン、カーミン、クーマシブルー、クレシルバイオレット、クリスタルバイオレット、DAPI（「2 - (4 - アミジノフェニル) - 1H - インドール - 6 - カルボキサミジン」）、エチジウムプロミド、酸性フクシン、ヘキスト染色剤、ヨウ素、マラカイトグリーン、メチルグリーン、メチレンブルー、ニュートラルレッド、ナイルブルー、ナイルレッド、四酸化オスミウム、ローダミン、およびサフラニンからなる群より選択される。いくつかの態様において、界面活性剤は非イオン性界面活性剤である。いくつかの態様において、粘性修飾剤はグリコールである。いくつかの態様において、粘性修飾剤はプロピレングリコールである。いくつかの態様において、界面活性剤は、一次染色組成物の総重量の約0.01% ~ 約0.5%の間の範囲の量で存在する。いくつかの態様において、粘性修飾剤は、一次染色組成物の総重量の約35% ~ 約60%の間の範囲の量で存在する。いくつかの態様において、一次染色組成物は、緩衝剤をさらに含む。いくつかの態様において、一次染色組成物は、緩衝剤をさらに含む。いくつかの態様において、一次染色組成物は、約2 ~ 約5の範囲のpHを有する。いくつかの態様において、一次染色組成物は、約2.2のpHを有する。いくつかの態様において、一次染色組成物は、塩化アルミニウムをさらに含む。

30

40

【0013】

[0013]いくつかの態様において、色素はヘマトキシリンであり、界面活性剤は非イオン性界面活性剤であり、粘性修飾剤はプロピレングリコールであり；そしてプロピレングリ

50

コールの量は一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲である。いくつかの態様において、色素はエオジンであり、界面活性剤は非イオン性界面活性剤であり、粘性修飾剤はプロピレングリコールであり；そしてプロピレングリコールの量は一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲である。

【0014】

[0014]本開示の別の側面において、第一の一次染色組成物および第二の一次染色組成物を含む、キットを開示し、ここで第一の一次染色組成物は、ヘマトキシリン、非イオン性界面活性剤、およびプロピレングリコールを含み、プロピレングリコールは、第一の一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲の量で存在し；そして第二の一次染色組成物は、エオジン、非イオン性界面活性剤、およびプロピレングリコールを含み、プロピレングリコールは、第二の一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲の量で存在する。

10

【0015】

[0015]本開示の別の側面において、抗体、抗体コンジュゲート、酵素、およびマルチマーからなる群より選択される生物学的分子；界面活性剤；ならびに粘性修飾剤を含む、巨大分子試薬組成物を開示し；ここで、抗体組成物は、本明細書にさらに記載するような小滴オンデマンド試薬分配システムから分配するために適している。いくつかの態様において、小滴オンデマンド試薬分配システムは、インクジェット分配システムである。いくつかの態様において、巨大分子試薬組成物は、塩化アルミニウムをさらに含む。

【0016】

[0016]本開示の別の側面において、抗体または抗体コンジュゲート、界面活性剤、および粘性修飾剤を含む抗体染色組成物を開示し、ここで、抗体組成物は、約4cp～約11cpの範囲の粘性、および約20ダイン/cm～約40ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、抗体染色組成物は、少なくとも1つのキャリアタンパク質をさらに含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのキャリアタンパク質は、ウシ血清アルブミンおよび正常ヤギ血清からなる群より選択される。いくつかの態様において、界面活性剤は非イオン性界面活性剤である。いくつかの態様において、界面活性剤は、抗体染色組成物の総重量の約0.01%～約0.5%の範囲の量で存在する。いくつかの態様において、粘性修飾剤はグリセロールである。いくつかの態様において、粘性修飾剤は、抗体染色組成物の総重量の約2%～約50%の範囲の量で存在する。いくつかの態様において、界面活性剤は非イオン性界面活性剤であり、粘性修飾剤はグリセロールまたは高分子量デキストランであり、そして組成物は、ウシ血清アルブミンをさらに含み；そしてグリセロールまたは高分子量デキストランの量は、抗体染色組成物の総重量の約2%～約50%の範囲である。いくつかの態様において、巨大分子試薬組成物は、塩化アルミニウムをさらに含む。

20

30

【0017】

[0017]本開示の別の側面において、抗体染色組成物を含む第一の組成物および少なくとも1つの一次染色組成物を含む第二の構成要素を含む、キットを開示する。いくつかの態様において、一次染色組成物は、ヘマトキシリンまたはエオジンの一方、非イオン性界面活性剤、およびプロピレングリコールを含み、プロピレングリコールは、一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲の量で存在する。いくつかの態様において、抗体組成物は、一次抗体、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、ここで抗体組成物は、約4cp～約11cpの範囲の粘性、および約20ダイン/cm～約40ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。

40

【0018】

[0018]本開示の別の側面において、組織試料を染色する方法であって、(a)小滴オンデマンドプリントヘッド(例えばインクジェットプリントヘッドまたは他の小滴分配手段)を、染色試薬を受け取る組織試料の部分の近傍(例えば、x、y、z空間において近く、その上、またはその周囲)に配置し、プリントヘッドは染色試薬供給源と液体連絡があり；(b)あらかじめ決定した量の染色試薬を、インクジェットプリントヘッドから、そ

50

して組織試料の部分上に、あらかじめ決定した速度で分配する工程を含む、前記方法を開示する。いくつかの態様において、方法は、工程（b）を1回またはそれより多く反復する工程を含む。いくつかの態様において、方法は、工程（b）を少なくとも3回反復する工程を含む。いくつかの態様において、方法を組織試料の異なる部分に関して反復する。

【0019】

[0019]いくつかの態様において、方法は、分配された染色試薬の染色強度を測定する工程をさらに含む。いくつかの態様において、測定した染色強度が、あらかじめ決定した閾値を満たさない場合、工程（b）を反復する。いくつかの態様において、あらかじめ決定した閾値は、約30 AU（任意的単位）～約160 AUの間の吸光度値である。いくつかの態様において、あらかじめ決定した閾値は、約25 AU～約60 AUの間の吸光度値である。いくつかの態様において、あらかじめ決定した閾値は、約30 AU～約70 AUの間の吸光度値である。いくつかの態様において、あらかじめ決定した閾値は、約44 AU～約145 AUの間の吸光度値である。

10

【0020】

[0020]いくつかの態様において、染色試薬の累積量が、約 $10 \mu\text{L} / \text{in}^2$ ～約 $30 \mu\text{L} / \text{in}^2$ の範囲になるまで、工程（b）を反復する。いくつかの態様において、染色試薬の累積量が、約 $12 \mu\text{L} / \text{in}^2$ ～約 $28 \mu\text{L} / \text{in}^2$ の範囲になるまで、工程（b）を反復する。いくつかの態様において、染色試薬の累積量が、約 $14 \mu\text{L} / \text{in}^2$ ～約 $28 \mu\text{L} / \text{in}^2$ の範囲になるまで、工程（b）を反復する。

【0021】

[0021]いくつかの態様において、分配法は、組織試料の部分と連絡がある染色剤枯渇層に補充する。いくつかの態様において、あらかじめ決定した速度は、染色試薬が、組織試料と連絡があるパドルに浸透し、そして染色剤枯渇層に補充することを可能にするものである。いくつかの態様において、あらかじめ決定した速度は、組織試料の界面層での混合を可能にするものである。いくつかの態様において、あらかじめ決定した速度は、約 $5 \text{ m} / \text{s}$ ～約 $15 \text{ m} / \text{s}$ の範囲である。

20

【0022】

[0022]いくつかの態様において、2つの染色試薬を組織試料に連続して適用する。いくつかの態様において、染色試薬は一次染色剤である。いくつかの態様において、染色試薬は、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含む組成物であり、該組成物は、約 1 cp ～約 40 cp の範囲の粘性および約 $25 \text{ ダイン} / \text{cm}$ ～約 $45 \text{ ダイン} / \text{cm}$ の範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、組成物は、約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配される。いくつかの態様において、ヘマトキシリンまたはエオジンの一方を、まず組織試料の少なくとも部分に適用し、そして続いて、ヘマトキシリンまたはエオジンのもう一方を、組織試料の少なくとも同じ部分に二番目に適用する。

30

【0023】

[0023]いくつかの態様において、染色試薬は巨大分子染色組成物である。いくつかの態様において、巨大分子染色組成物は、抗体、抗体コンジュゲート、マルチマー、および酵素からなる群より選択される巨大分子；界面活性剤；ならびに粘性修飾剤を含み、約 4 cp ～約 11 cp の範囲の粘性、および約 $20 \text{ ダイン} / \text{cm}$ ～約 $40 \text{ ダイン} / \text{cm}$ の範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、巨大分子染色組成物は、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される。

40

【0024】

[0024]いくつかの態様において、方法は、各分配工程の前または後に、1またはそれより多いさらなる試薬を場合によって沈着させる工程をさらに含み、1またはそれより多いさらなる試薬が、脱パラフィン化剤、洗浄剤、リンス剤、希釈剤、緩衝剤、または検出試薬からなる群より選択される。いくつかの態様において、1またはそれより多い試薬を場合によって沈着させる工程を、インクジェットプリントヘッドから1またはそれより多い試薬を分配することによって行う。いくつかの態様において、1またはそれより多い試薬を場合によって沈着させる工程を、別の沈着手段によって行う。

50

【 0 0 2 5 】

[0025]本開示の別の側面において、生物学的試料の上に試薬を分配する方法であって：保護液体層を生物学的試料上に重層する、該生物学的試料は支持媒体上に沈着されている；約1 pL～約50 pLの間の試薬小滴を分配し、試薬小滴が保護液体層に浸透し、そして生物学的試料と接触するようにする；ここで、試薬小滴は、一次染色試薬組成物および抗体試薬組成物からなる群より選択される試薬組成物を含む工程を含む、前記方法を開示する。いくつかの態様において、試薬小滴を、約5 m/s～約15 m/sの間の速度で分配する。いくつかの態様において、保護液体層は水性パドルである。いくつかの態様において、保護液体層は非混和性油である。いくつかの態様において、試薬小滴の密度は、非混和性油の密度より大きい。いくつかの態様において、試薬小滴の動力学エネルギーは、非混和性油の表面張力より大きい。いくつかの態様において、試薬小滴の動力学エネルギーは、保護液体層の表面張力より大きい。いくつかの態様において、動力学エネルギーは 9.52×10^{-10} ジュールより大きい。

10

【 0 0 2 6 】

[0026]いくつかの態様において、一次染色試薬組成物は、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約1 cp～約40 cpの範囲の粘性および約25 ダイン/cm～約45 ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、一次染色試薬組成物は、約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配される。いくつかの態様において、抗体試薬組成物は、一次抗体、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約4 cp～約7 cpの範囲の粘性、および約20 ダイン/cm～約40 ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、抗体組成物は、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される。

20

【 0 0 2 7 】

[0027]本開示の別の側面において、生物学的試料の上に試薬を分配する方法であって：保護液体層を生物学的試料上に重層する、該生物学的試料は支持媒体上に沈着されている；pH修飾剤を、生物学的試料に分配し；そして試薬小滴を、約5 m/s～約15 m/sの間の速度で分配する；ここで、試薬小滴は、一次染色試薬組成物および抗体試薬組成物からなる群より選択される試薬組成物を含む工程を含む、前記方法を開示する。いくつかの態様において、分配される試薬小滴の量は、約 $10 \mu\text{L}/\text{in}^2$ ～約 $30 \mu\text{L}/\text{in}^2$ の範囲である。いくつかの態様において、pH修飾剤は、約3～約5の範囲のpHを有する。いくつかの態様において、保護液体層は非混和性油であり、そして試薬小滴の動力学エネルギーは非混和性油の表面張力より大きい。いくつかの態様において、一次染色試薬組成物が、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約1 cp～約40 cpの範囲の粘性および約25 ダイン/cm～約45 ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、一次染色試薬組成物は、約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の剪断速度で分配される。いくつかの態様において、抗体試薬組成物は、一次抗体、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約4 cp～約7 cpの範囲の粘性、および約20 ダイン/cm～約40 ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、抗体組成物は、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される。

30

【 0 0 2 8 】

[0028]本開示の別の側面において、生物学的試料の上に試薬を分配する方法であって：保護液体層を生物学的試料上に重層する、該生物学的試料は支持媒体上に沈着されている；試薬小滴が保護液体層に浸透して生物学的試料に到達するために十分な動力学エネルギーで、試薬小滴を分配し、そして生物学的試料上に沈着される試薬小滴の空間密度が約50 dpi～約1200 dpiであるように分配する、ここで、試薬小滴は、一次染色試薬組成物および巨大分子染色組成物からなる群より選択される試薬組成物を含む工程を含む、前記方法を開示する。いくつかの態様において、保護液体層は非混和性油であり、そして試薬小滴の密度は非混和性油の密度より大きい。いくつかの態様において、巨大分子染色組成物は、抗体、抗体コンジュゲート、マルチマー、および酵素からなる群より選択される巨大分子；界面活性剤；ならびに粘性修飾剤を含み、約4 cp～約7 cpの範囲の粘

40

50

性、および約20ダイン/cm～約40ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、巨大分子染色組成物が、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される。いくつかの態様において、一次染色試薬組成物は、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約1cp～約40cpの範囲の粘性および約25ダイン/cm～約45ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、一次染色試薬組成物は、 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配される。

【0029】

[0029]本開示の別の側面において、生物学的試料の上に1またはそれより多い試薬を分配する方法であって、保護液体層を生物学的試料上に重層する、該生物学的試料は支持媒体（例えば顕微鏡スライド）上に沈着されている；試薬小滴が保護液体層に浸透し、そして生物学的試料に接触するように、小滴オンデマンドシステムを通じて、試薬小滴を分配する；ここで、試薬は、一次染色試薬組成物または巨大分子試薬組成物からなる群より選択される工程を含む、前記方法を開示する。いくつかの態様において、一次染色組成物は、色素、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約1cp～約40cpの範囲の粘性および約25ダイン/cm～約45ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、色素はヘマトキシリンであり、界面活性剤は非イオン性界面活性剤であり、粘性修飾剤はプロピレングリコールであり；そしてプロピレングリコールの量は一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲である。いくつかの態様において、色素はエオジンであり、界面活性剤は非イオン性界面活性剤であり、粘性修飾剤はプロピレングリコールであり；そしてプロピレングリコールの量は一次染色組成物の総重量の約35%～約60%の範囲である。いくつかの態様において、巨大分子染色組成物は、一次抗体、界面活性剤、および粘性修飾剤を含み、約4cp～約7cpの範囲の粘性、および約20ダイン/cm～約40ダイン/cmの範囲の表面張力を有する。いくつかの態様において、保護液体層は水性パドルである。いくつかの態様において、試薬小滴を、生物学的試料周囲の枯渇層に浸透させ、そして補充するために十分な速度で提供する。いくつかの態様において、試薬小滴を、約5m/s～約15m/sの間の速度で分配する。いくつかの態様において、保護液体層は非混和性液体、例えば油である。いくつかの態様において、試薬小滴の密度は、非混和性油の密度より大きい。いくつかの態様において、試薬小滴の動力学エネルギーは、非混和性油の表面張力より大きい。いくつかの態様において、試薬小滴のウェーバー数は約1.8未満である。いくつかの態様において、一次染色試薬溶液は、約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の剪断速度で分配され、そして抗体試薬溶液は、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配される。

【0030】

[0030]本開示の別の側面において、一次染色試薬組成物または巨大分子試薬染色組成物を、組織試料に分配するための手段を開示し、ここで、分配される一次染色試薬組成物または巨大分子試薬染色組成物の体積は、約 $10 \mu\text{L} / \text{in}^2$ ～約 $30 \mu\text{L} / \text{in}^2$ の範囲である。いくつかの態様において、分配手段はインクジェットプリントヘッドである。いくつかの態様において、分配手段は、ターゲット画像化システム、相対運動システム、プリントヘッド、液体リザーバー、および圧制御手段を含む、小滴オンデマンドシステムである。いくつかの態様において、分配手段は、プリントヘッドクリーニングシステムをさらに含む。いくつかの態様において、分配手段は、図1Aに例示するとおりである。いくつかの態様において、一次染色試薬組成物および巨大分子試薬染色組成物は、分配手段での分配に適した粘性を有するように配合される。

【0031】

[0031]本開示の別の側面において、自動化スライド染色装置であって、(a)約1pL～約50pLの範囲の体積を有する試薬小滴を分配するためのディスペンサー；(b)顕微鏡スライドを保持するように適応したスライド支持体；(c)インクジェットプリンティングヘッドと液体連絡がある、一次染色試薬組成物または巨大分子染色組成物を含む、少なくとも1つの試薬リザーバー；および(d)プロセッサおよびメモリを含有する制御モジュールであって、スライド支持体によって保持された顕微鏡スライド上に組成物を分

10

20

30

40

50

配するようインクジェットプリンティングヘッドに命令するようにプログラミングされている、前記制御モジュールを含む、前記染色装置を開示する。

【0032】

[0032]本開示の別の側面において、(i)組織試料を含有するスライドの第一の部分画像化し；(ii)染色試薬の適用のため、スライドの第二の部分を選択し、ここで第二の部分は第一の部分のサブセットである；(iii)複数回のパスに渡って、インクジェット沈着システムを通じて、第二の部分に染色試薬を沈着させる工程を含む、コンピュータ実装法を開示する。いくつかの態様において、染色試薬は、約 360 nL/in^2 ～約 $14.4\text{ }\mu\text{L/in}^2$ の間で、沈着システムのパスを通じて、第二の部分に沈着される。

【0033】

[0033]本開示の別の側面において、1またはそれより多いプロセッサおよび少なくとも1つのメモリを含む、組織試料を染色するためのコンピュータシステムであって、少なくとも1つのメモリが、1またはそれより多いプロセッサに、小滴オンデマンド分配機構を有し、コンピュータシステムと連絡がある染色装置が、あらかじめ決定した量の一次染色試薬組成物または巨大分子試薬組成物を、生物学的試料の少なくとも部分に分配するように実行させるための永続性コンピュータ読み取り可能命令を記憶する、前記システムを開示する。

【0034】

[0034]慣用的な染色法に比較した際、より正確に（例えば投薬正確性、時間的正確性、*in situ*混合）試薬を適用するかまたは分配することが有利であろう。慣用的な染色法に比較した際、より少ない試薬体積（そしてしたがってより少ない無駄）で試薬を分配し、そして/またはより速い速度で、染色動力学を駆動することもまた有利であろう。本出願人は、小滴オンデマンド技術（例えばインクジェット技術または圧電技術）を通じた試薬溶液の分配が、一貫した結果を可能にし、そして自動化染色プロセス内に取り込むために適していることを見出した。本出願人はまた、小滴オンデマンドシステムを通じて、より多くのまたはより少ない試薬量を組織に分配することによって、染色強度を最適化する（例えば「ダイヤル合わせする(*dial ed-in*)」）ことが可能であることも見出した。実際、本出願人は、いくつかの方法の1つによって、試薬量を変動させることが可能であることを見出しており、これらには、本明細書に開示するような、(i)分配機構の多数回のパスによる試薬の適用；(ii)試薬分配のインチあたりのドット(*dpi*)の変化；(iii)小滴体積の変化；および/または(iv)試薬濃度の変化が含まれる。本出願人は、予期せぬことに、本明細書にさらに論じるように、染色反応動力学が、先行技術のパドル技術を用いるよりも、より迅速であるようであることを発見した。本出願人はまた、小滴オンデマンド沈着プロセスを通じた試薬溶液の分配が、慣用的な染色法と比較した際に、同じ染色強度を提供しながら、試薬使用の有意な減少を可能にすることもまた見出した。これらのおよび他の比較上優れた結果を本明細書にさらに記載する。

【図面の簡単な説明】

【0035】

[0035]本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図を含有する。カラー図を含む本特許または特許出願公開のコピーは、リクエストと必要な料金の支払いがあれば、特許庁に提供されるであろう。

【図1-1】[0036]図1Aは、本開示の態様にしたがった小滴オンデマンドシステムを示す。

【図1-2】[0037]図1Bは、本開示の態様にしたがった小滴オンデマンドシステムを含むかまたはこれに結びつけられていてもよいシステムを示す。

【図2】[0038]図2は、本開示の態様の1つにしたがった試薬分配プロセスを示す。

【図3】[0039]図3は、本開示の別の態様にしたがった試薬分配プロセスを示す。

【図4-1】[0040]図4A～4Eは、組織が本開示の1つの態様にしたがった試薬分配プロセスで染色されるヘマトキシリンでの組織試料の染色を例示し、そしてさらに、慣用的

10

20

30

40

50

な染色技術と小滴オンデマンド染色を比較する。

【図 4 - 2】[0040]図 4 A ~ 4 E は、組織が本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスで染色されるヘマトキシリンでの組織試料の染色を例示し、そしてさらに、慣用的な染色技術と小滴オンデマンド染色を比較する。

【図 4 - 3】[0040]図 4 A ~ 4 E は、組織が本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスで染色されるヘマトキシリンでの組織試料の染色を例示し、そしてさらに、慣用的な染色技術と小滴オンデマンド染色を比較する。

【図 5 - 1】[0041]図 5 A ~ 5 C は、組織が本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスで染色されるエオジンでの組織試料の染色を例示し、そしてさらに、慣用的な染色技術と小滴オンデマンド染色を比較する。

【図 5 - 2】[0041]図 5 A ~ 5 C は、組織が本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスで染色されるエオジンでの組織試料の染色を例示し、そしてさらに、慣用的な染色技術と小滴オンデマンド染色を比較する。

【図 6】[0042]図 6 A および 6 B は、本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスを用いた、ヘマトキシリンおよびエオジン両方での組織試料の染色を例示する。

【図 7】[0043]図 7 は、IHC プロセスにおける一次染色剤または抗体での組織試料の染色のための 1 つのプロセスを例示するフローチャートを示す。

【図 8 - 1】[0044]図 8 A は、本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスを示す。

【図 8 - 2】[0045]図 8 B は、本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスを用いた組織試料染色を例示する。

【図 9 - 1】[0046]図 9 A、9 B、および 9 C は、本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスを用いた一次抗体の沈着を通じて達成される染色を例示する。

【図 9 - 2】[0046]図 9 A、9 B、および 9 C は、本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスを用いた一次抗体の沈着を通じて達成される染色を例示する。

【図 10】[0047]図 10 A ~ 10 C は、本開示の 1 つの態様にしたがった試薬分配プロセスを用いた一次抗体の沈着のさらなる例を例示する。

【図 11】[0048]図 11 は、異なる試薬での異なる組織領域の染色を例示する。

【図 12】[0049]図 12 A は、組織の細胞質および細胞外領域の染色強度に対する、細胞核における染色強度の比を比較する。[0050]図 12 B は、異なる pH での染色の効果

【発明を実施するための形態】

【0036】

[0051]一般的に、本開示は、小滴オンデマンド技術を利用した、生物学的試料への 1 またはそれより多い試薬の送達または分配に関する。分配されたら、試薬は、生物学的試料内の細胞、細胞膜、核および/または組織または構造に分布する。ここに開示する方法は、(i) 試料内およびスライド上両方の空間的選択性；(ii) 染色パドル中に存在する任意の拡散枯渇層の厚みより小さい組織切片（高さおよそ 4 μm ）のサイズ規模まで試薬フィルムの厚さを低下させて、フィルムを試料上にプリントする能力；および (iii) 利用する特定の小滴生成技術によって定義されるような、単一の小滴のサイズ規模まで低下させて、試料上の関心対象の領域を染色する能力を持つ、染色反応のための試薬を沈着させる能力によってユニークに特徴付けられる。例えば、いくつかの態様において、最少染色領域は、直径およそ 25 ~ 60 μm の組織領域である。本明細書にさらに詳細に記載するように、分配される試薬には、生物学的試料内のターゲットが、染色、検出および分析可能であるような、組織化学において有用な一次染色または抗体が含まれる。

【0037】

[0052]本明細書において、単数形の用語「a」、「an」、および「the」には、文脈が別の意味を明らかに示さない限り、複数形の参照対象が含まれる。同様に、単語「または (or)」は、文脈が別の意味を明らかに示さない限り、「および (and)」を含むよう意図される。

10

20

30

40

50

【0038】

[0053]用語「含むこと (comprising)」、「含まれること (including)」、「有すること (having)」等は、交換可能に用いられ、そして同じ意味を有する。同様に、「含む (comprises)」、「含まれる (includes)」、「有する (has)」等は、交換可能に用いられ、そして同じ意味を有する。具体的には、用語各々は、「含むこと」の一般的な米国特許法の定義と一致して定義され、そしてしたがって、「少なくとも以下」を意味するオープンタームであると解釈され、そしてまたさらなる特徴、限定、側面等を排除しないと解釈される。したがって、例えば、「構成要素 a、b、および c を有するデバイス」は、デバイスが、少なくとも構成要素 a、b および c を含むことを意味する。同様に、句：「工程 a、b、および c を含む方法」は、方法が少なくとも工程 a、b、および c を含むことを意味する。さらに、工程およびプロセスは、本明細書において特定の順序で概略されうるが、当業者は、工程およびプロセスの順序は多様でありうることを認識するであろう。

10

【0039】

[0054]本明細書において、用語「抗体」は、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子を指し、例えば、そして限定なしに、関心対象の分子（または関心対象の非常に類似の分子群）に特異的に結合して、他の分子への結合を実質的に排除する、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G および Ig M、その組み合わせ、および任意の脊椎動物において（例えばヒト、ヤギ、ウサギおよびマウスなどの哺乳動物において）免疫反応中に産生される類似の分子、ならびに抗体断片（例えば、当該技術分野に知られるような F (ab')₂断片、Fab'断片、Fab'-SH断片および Fab断片）、組換え抗体断片（例えば sFv断片、dsFv断片、二重特異性 sFv断片、二重特異性 dsFv断片、F(ab)'₂断片、一本鎖 Fvタンパク質（「scFv」）、ジスルフィド安定化 Fvタンパク質（「dsFv」）、ディアボディ、およびトリアボディ（当該技術分野に知られるようなもの）およびラクダ科 (Camelid) 抗体）が含まれる。抗体は、さらに、抗原のエピトープを特異的に認識して、そしてこれに結合する、少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含む、ポリペプチドリガンドを指す。抗体は、各々、可変領域を有する、可変重鎖 (VH) 領域および可変軽鎖 (VL) 領域と称される重鎖および軽鎖で構成されてもよい。VH 領域および VL 領域は、一緒に、抗体によって認識される抗原への結合に関与する。用語、抗体にはまた、インタクトな免疫グロブリン、ならびに当該技術分野に周知のその変異体および部分も含まれる。

20

30

【0040】

[0055]本明細書において、用語「抗原」は、抗体分子または T 細胞受容体などの、特異的体液性または細胞性免疫の産物によって特異的に結合可能である化合物、組成物、または物質を指す。抗原は、例えば、ハプテン、単純中間代謝産物、糖（例えばオリゴ糖）、脂質、およびホルモン、ならびに巨大分子、例えば複合糖質（例えば多糖）、リン脂質、核酸およびタンパク質を含む任意のタイプの分子であってもよい。

【0041】

[0056]「生物学的試料」または「組織試料」は、組織化学または細胞化学分析に適している、限定されるわけではないが、単細胞生物、例えばとりわけ細菌、酵母、原生動物、およびアメーバ、多細胞生物（例えば、健康なまたは見かけ上健康なヒト被験体、あるいは診断または研究しようとする状態または疾患、例えば癌に罹患しているヒト患者を含む、植物または動物）を含む、任意の生存生物から得られるか、これらによって排出されるか、またはこれらによって分泌される、任意の固形または液体試料、例えば分析しようとする細胞および/または組織の形態学的特性を保持する試料であってもよい。例えば、生物学的試料は、例えば、血液、血漿、血清、尿、胆汁、腹水、唾液、脳脊髄液、眼房水または硝子体液、あるいは任意の体性分泌物、漏出液、滲出液（例えば、膿瘍あるいは感染または炎症の任意の他の部位から得られる液体）、あるいは関節（例えば正常関節または疾患に罹患した関節）から得られる液体であってもよい。生物学的試料はまた、任意の臓器または組織（生検または検屍標本、例えば腫瘍生検を含む）から得られる試料であって

40

50

もよく、あるいは細胞（初代細胞または培養細胞いずれであってもよい）、または任意の細胞、組織もしくは臓器によって馴化された培地を含んでもよい。いくつかの例において、生物学的試料は、核抽出物である。特定の例において、試料は品質管理試料である。他の例において、試料は試験試料である。例えば、試験試料は、被験体から得られた生物学的試料から調製された、細胞、組織または細胞ペレット切片である。1つの例において、被験体は、リスクがあるかまたは獲得しているものである。試料は、一般の当業者によって知られる任意の方法を用いて調製可能である。試料は、ルーチンのスクリーニングのため、被験体から得られてもよいし、または障害、例えば遺伝子異常、感染、または新生物を有すると推測される被験体から得られてもよい。また、開示する方法の記載する態様を、「正常」試料と称される、遺伝子異常、疾患、障害等を持たない試料に適用してもよい。試料には、1またはそれより多い検出プローブによって特異的に結合可能である多数のターゲットが含まれてもよい。

10

【0042】

[0057]本明細書において、句「ディップアンドダーク(dip and dunk)」は、試料および顕微鏡スライドを、各アッセイ工程に関する染色試薬のバスに浸すことによる染色技術を指す。

【0043】

[0058]本明細書において、用語「滴オンデマンド」、「小滴オンデマンド」、または「小滴に基づく」（および他の同様の用語または句）は、試薬でスライドまたはその上の試料を「水浸しにする(flooding)」のとは対照的に、ターゲット試料上に試薬の別個の小滴を沈着させる染色技術を指す。いくつかの態様において、小滴オンデマンド技術は、インクジェット技術または圧電技術を利用する。本明細書に開示するいくつかの態様において、小滴分配技術は、インクジェットプリントヘッドまたは類似の技術を用いて容易になる。

20

【0044】

[0059]本明細書において、用語「保水剤」は、物質、例えば組織試料を湿らせておくために用いられる吸湿性物質を指し；乾燥剤とは反対である。これはしばしば、いくつかの親水性基、最も頻繁にはヒドロキシル基を含む分子であるが；アミンおよびカルボキシル基、時にはエステル化されたものもまた、遭遇可能である（水分子と水素結合を形成するアフィニティが必須の特質である）。保水剤は、吸収によって近くの空気中の水分を誘引し、そして保持し、水蒸気を生物/対象の表面内におよび/またはその下に引き入れると考えられる。対照的に、乾燥剤もまた、周囲の水分を誘引するが、水蒸気をフィルム層としての表面上に凝集させることによって、吸収するのではなく吸着させる。インクジェット沈着または類似の技術の関連において、保水剤は、存続可能なノズルを維持するために重要でありうる。いくつかの態様において、組織試料または生物学的試料を、薄フィルムプロセッシング中に水和させておくことが重要である。

30

【0045】

[0060]用語「インクジェット」は、本開示において、分配マニホールドから小滴を作動させるために圧電（または熱）素子を用いる、滴オンデマンド技術のファミリーを指す。これには、商業的プリンティング産業に一般的である直接および非接触法、または商業的プリンティング産業の外で用いられるものが含まれてもよい。

40

【0046】

[0061]本明細書において、用語「免疫組織化学」は、特異的結合剤、例えば抗体と抗原の相互作用を検出することによって、試料における抗原の存在または分布を決定する方法を指す。試料を、抗体-抗原結合を可能にする条件下で、抗体と接触させる。抗体-抗原結合は、抗体にコンジュゲートされた検出可能標識によって（直接検出）、または一次抗体に特異的に結合する二次抗体にコンジュゲートされた検出標識によって（間接的検出）、検出可能である。

【0047】

[0062]本明細書において、用語「微量流体」は、ガラス顕微鏡スライドの向かい側に設

50

置可能な表面、ならびにギャップ内への染色試薬の流動に基づく導入および排除のための手段を必要とする染色技術を指す。さらに、望ましいギャップの高さは、スライド表面を渡る試薬流動が、層状であり、そしてギャップ内部の総体積が最小限であるように生成すべきである。

【0048】

[0063]本明細書において、用語「一次抗体」は、組織試料中のターゲットタンパク質抗原に特異的に結合する抗体を指す。一次抗体は、一般的に、免疫組織化学法において用いられる第一の抗体である。一次抗体にはまた、別の分子（例えば標識、ハプテン等）にコンジュゲートされた抗体も含まれる。一次抗体は、組織試料内のターゲットを検出するための「検出プローブ」として働くことも可能である。

10

【0049】

[0064]本明細書において、用語「一次染色剤」は、組織試料において、コントラストを増進する色素または類似の分子である。いくつかの態様において、一次染色剤は、細胞内または細胞上の生物学的構造を、特定の結合剤、例えば抗体の使用を伴わずに直接「標識する」ものである。一次染色剤のいくつかの例には、ヘマトキシリンおよびエオジンが含まれる。一次染色剤の他の例には、アクリジンオレンジ、ピスマルクブラウン、カーミン、クーマシーブルー、クレシルバイオレット、クリスタルバイオレット、DAPI（「2-（4-アミジノフェニル）-1H-インドール-6-カルボキサミジン」）、エチジウムブロミド、酸性フクシン、ヘキスト染色剤（ビス-ベンズイミダゾール誘導体であるヘキスト33342およびヘキスト33258）、ヨウ素、マラカイトグリーン、メチルグリーン、メチレンブルー、ニュートラルレッド、ニールブルー、ニールレッド、四酸化オスミウム、ローダミン、およびサフラニンが含まれる。一次染色剤の他の例には、細菌を染色するために用いられる染色剤（グラム陽性またはグラム陰性染色剤）、内性胞子を同定するために用いられる染色剤（内性胞子染色剤）、結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）の種の同定を補助するために用いられる染色剤（チール・ネールゼン染色剤）、パバニコロー染色キット（ヘマトキシリン、オレンジG、エオジンY、ライトグリーンSFイエローイッシュ、および時によってピスマルクブラウンYの組み合わせを用いる）、過ヨウ素酸シッフ染色剤（「PAS染色剤」）、銀染色剤等が含まれる。さらに他の限定されない一次染色剤には、(i)マイコバクテリウム属（*Mycobacterium*）および他の抗酸生物または構成要素を選択的に示すための組織学的染色剤（例えばVentana Medical Systems、アリゾナ州ツーソンより入手可能な、AFB III染色キット）；(ii)酸性ムチンを中性多糖と区別するための組織学的染色（例えば、やはりVentanaより入手可能なPAS用のアルシアンブルー）；(iii)弱酸性ムコ多糖を示すための組織学的染色剤（例えば、やはりVentanaより入手可能なアルシアンブルー染色キット）；(iv)ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）に関する組織学的染色剤（例えば、やはりVentanaより入手可能なアルシアンイエロー染色キット）；(v)アミロイドを選択的に示すための組織学的染色剤（例えば、やはりVentanaより入手可能な、コングロレッド染色キット）；(vi)中性多糖から酸性ムチンを区別するための組織学的染色剤（例えば、やはりVentanaより入手可能な、ジアスターゼキット）；(vii)組織切片における弾性線維を示すための組織学的染色剤（例えば、やはりVentanaより入手可能な、弾性染色キット）；(viii)骨髄および他の造血組織（リンパ節）中の白血球を区別するための組織学的染色（例えば、やはりVentanaより入手可能なギムザ染色キット）；(ix)限定されるわけではないが、アスペルギルス属（*Aspergillus*）およびブラストミセス属（*Blastomyces*）などの病原性真菌、ならびにニューモシスチス・カリニ（*Pneumocystis carinii*）などの他の日和見感染生物を区別可能な染色剤を含む、真菌および他の日和見感染生物の細胞壁中の多糖を示すための組織学的染色剤（例えば、やはりVentanaより入手可能なGMS II染色キット）；(x)グラム陰性およびグラム陽性細菌を示すための組織学的染色剤（例えば、やはりVentanaより入手可能なグラム染色キ

20

30

40

50

ット) ; (x i) 結合組織、筋肉およびコラーゲン線維を研究するために用いる組織学的染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能なトリクローム用グリーン) ; (x i i) 骨髄、ヘモクロマトーシス組織、およびヘモジデリン沈着症における鉄色素を検出するための組織学的染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能な鉄染色キット) ; (x i i i) 毛細血管基底膜を示すための組織学的染色剤 (例えば、どちらもやはり V e n t a n a より入手可能な J o n e s H & E 染色キットまたは J o n e s ライトグリーン染色キット) ; (x i v) 真菌検出用の組織学的染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能な P A S 用ライトグリーン) ; (x v) 酸性ムコ多糖 (ムチン) を検出するための組織学的染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能なムチアルミン (M u c i a r m i n e) 染色キット) ; (x v i) 陽性細網線維、基底膜、真菌、および中性ムコ多糖の同定を補助可能な染色剤、または未分化 P A S 陰性扁平上皮癌から、P A S 陽性分泌性腺癌を区別する際に補助可能な染色剤を含む、グリコーゲンの存在を示すために用いられる組織学的染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能な P A S 染色キット) ; (x v i i) 細網線維を示すための組織学的染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能な細網 I I 染色キット) ; (x v i i i) 特定の好銀性微生物を研究するために用いられる組織学的染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能な S t e i n e r I I 染色キット) ; (x i x) ある種の胃潰瘍 (H . ピロリ (H . p y l o r i))、ライム病、レジオネラ病、ネコひっかき熱等の疾患の原因生物の同定を補助するための組織学的銀染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能な S t e i n e r 染色キット) ; (x x) 結合組織、筋肉およびコラーゲン線維を研究するための組織学的染色剤 (例えば、やはり V e n t a n a より入手可能なトリクローム I I ブルー染色キット) ; (x x i) 結合組織、筋肉およびコラーゲン線維を研究するための組織学的染色剤 (例えば、各々、やはり V e n t a n a より入手可能なトリクローム染色キット、トリクローム I I I ブルー染色キット、またはトリクローム I I I グリーン染色キット) が含まれる。当業者はまた、本開示のキット、方法、および組成物 (例えば一次染色組成物、試薬組成物) と組み合わせて使用可能な他の一次染色剤、またはそれに関しては色素が存在することを認識するであろう。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

[0065] 本明細書において、用語「パドル」は、それによって、顕微鏡スライドの試料表面全体が各アッセイ工程に関してある体積の試薬で覆われる、単一スライド染色技術を指す。

【 0 0 5 1 】

[0066] 本明細書において、用語「試薬」は、形態学的 (例えばヘマトキシリンおよびエオジン)、免疫組織化学的、または特殊染色の関連で用いられる、組織切片または細胞学試料上に沈着される任意の液体を指すことも可能である。これには、限定されるわけではないが、ワックスを除去する (すなわち脱パラフィン化) ための油、有機物、および架橋試薬 ; 洗浄剤、リンス剤、希釈剤、または反応条件を設定するために用いられる緩衝剤、適切な濃度にするか、反応を停止するか、または過剰な反応物質を洗い流すための希釈試薬 ; 形態学的染色および特殊染色に用いられる小分子色素 ; I H C または I C C 染色に用いられる、抗体、抗体コンジュゲート、酵素、マルチマー、増幅剤、発色原基質、蛍光検出化学物質、化学発光基質、および酵素反応補因子が含まれる。

【 0 0 5 2 】

[0067] 本明細書において、「界面活性剤」は、化学作用の様式に応じて、陰イオン性、陽イオン性、または非イオン性と分類される。一般的に、界面活性剤は、2つの液体の間の界面張力を減少させる。界面活性剤分子は、典型的には、極性またはイオン性「ヘッド」および非極性炭化水素「テール」を有する。水への溶解に際して、界面活性剤分子は凝集し、そしてミセルを形成し、その中で、非極性テールは内側に向き、そして極性またはイオン性ヘッドは水性環境に向かい外側に向く。非極性テールは、ミセル内に非極性「ポケット」を生成する。溶液中の非極性化合物は、界面活性剤分子によって形成されたポケット中に隔離され、したがって、非極性化合物が水溶液内で混合されたままであることを

可能にする。いくつかの態様において、界面活性剤を用いて、組織切片に渡る試薬の均一な拡散を生じるとともに、バックグラウンド染色を減少させることも可能である。

【0053】

[0068]本明細書において、「ターゲット」は、生物学的試料における特定の組織、あるいは生物学的試料における特定の分子またはマーカーであることも可能である。ターゲットの例には、抗原（ハプテンを含む）、抗体、および酵素が含まれる。ターゲットのさらなる例には、一般的に、タンパク質、ペプチド、核酸、糖、および脂質が含まれる。本開示で使用するための試薬は、生物学的試料中に存在するターゲット物質を、ターゲットの局在が検出可能であるように（例えば視覚的に）、検出可能な型に変換することが可能なものであることも可能である。

10

【0054】

[0069]小滴オンデマンド分配システムおよび試薬を分配する方法

[0070]本開示の1つの側面において、小滴オンデマンド技術を利用する試薬沈着システム、例えばインクジェット分配システムを含む、生物学的試料上に1またはそれより多い試薬を沈着させるためのデバイスまたはシステムを開示する。本開示にしたがって、試薬、または試薬を含む組成物を、生物学的試料、あるいはその領域または部分上に、小滴の形で送達して、試薬溶液での試料のスポットティングまたは染色を達成する。圧電またはインクジェット分配技術を含む小滴オンデマンド技術は、例えば、米国特許第4,877,745号およびPCT公報第WO98/47006号にさらに記載され、これらの開示は、その全体が本明細書に援用される。

20

【0055】

[0071]本開示のいくつかの態様にしたがった小滴オンデマンド染色システム900の要素を図1Aに示す。図1Aは、プリントヘッド905およびターゲット試料908との関係を例示する（ターゲット試料は、標準的顕微鏡スライド上にマウントされた生物学的試料または組織試料であってもよい）。「染色ジョブ」を生じるため、ターゲット試料908を、いくつかの態様において、ターゲット画像化システム901によって分析して、ターゲット試料の空間的位置を決定してもよい。この情報を次いで、続いて、中央処理装置902にフィードし、該装置は画像化情報およびアッセイを解釈し、そして次いで、続いて、例えば、タイミングおよび協調情報を含む命令をプリントヘッド905、圧制御システム903、および相對運動システム904に送る。相對運動システム904は、プリントヘッド905および/またはターゲット試料908を、整列させて、試料上に染色小滴（例えば試薬染色小滴）の分配を開始するように設計される。いくつかの態様において、液体または試薬を、試薬カートリッジ906から、プリントヘッド905に、そしてターゲット試料908上にフィードする。相對運動システム904は、中央処理装置902を通じて、プリントヘッド905からの分配タイミングと協調し、901において提供され、そして902によって解釈された画像によって定義されるように、望ましい染色画像を生じる。定期的に、プリントヘッドクリーニングステーション907を通じて、プリントヘッドのクリーニングが必要である。要素907は、プリントヘッドと直接相互作用して、能動的にクリーニングし、そしてプリントノズルを通じて液体を押し出し、ノズルを染色のためにブライミングする。いくつかの態様において、ノズルから液体を能動的に一掃するために、小さい陽圧、例えば約10psiまたはそれ未満をカートリッジに適用してもよい。

30

40

【0056】

[0072]当業者は、小滴オンデマンド染色システム900が、さらなる構成要素、例えば分析装置、スキャナ、コンピュータシステム等に連絡可能にカップリングされていてもよいことを認識するであろう（図1Bを参照されたい）。一般的に、小滴オンデマンド染色システム900には、限定なしに、1またはそれより多い画像捕捉デバイスを有するターゲット画像化システム901が含まれてもよい。画像捕捉デバイスには、限定なしに、カメラ（例えばアナログカメラ、デジタルカメラ等）、オブティクス（例えば1またはそれより多いレンズ、センサー焦点レンズグループ、顕微鏡対物レンズ等）、画像化センサ -

50

(例えば電荷結合素子(CCD)、相補型金属酸化膜半導体(CMOS)画像センサー等)、写真フィルム等が含まれてもよい。デジタル態様において、画像捕捉デバイスには、協調して作動中焦点合わせを立証する、複数のレンズが含まれてもよい。CCDセンサーは、標本のデジタル画像を捕捉可能である。デジタル画像を産生する1つの方法には、標本の少なくとも部分を含む顕微鏡スライド領域を含むスキャン領域を決定する工程が含まれる。スキャン領域を複数の「スナップショット」に分割してもよい。個々の「スナップショット」を組み合わせることによって、画像を生じてもよい。いくつかの態様において、ターゲット画像化システム901は、標本全体の高解像度画像を生じ、こうした装置の1つの例は、Ventana Medical Systems, Inc. (アリゾナ州ツーソン)のVENTANA iScan HTスライドスキャナであり、そしてこれはシステム900と連絡可能にカップリングしていてもよい。

10

【0057】

[0073]図1Bを参照すると、コンピュータデバイス14には、中央処理装置(CPU902であってもよいし、または別個のCPUであってもよい)が含まれてもよく、そしてコンピュータデバイス14には、デスクトップコンピュータ、ラップトップコンピュータ、タブレット等が含まれてもよく、そしてデジタル電子回路、ファームウェア、ハードウェア、メモリ、コンピュータ記憶媒体、コンピュータプログラム、プロセッサ(プログラムされたプロセッサを含む)等が含まれてもよい。図1Bの例示される計算システム14は、スクリーン16およびタワー18を有するデスクトップコンピュータである。タワー18は、ターゲット画像化システム901由来のデジタル画像をバイナリ型で記憶可能である。いくつかの態様において、ネットワーク20または直接連結は、小滴オンデマンド染色システム900およびコンピュータシステム14を相互連結する。コンピュータシステムには、一連のコンピュータ実行可能命令でプログラミングされる1またはそれより多いプロセッサが含まれ、命令はメモリに記憶される。

20

【0058】

[0074]当業者は、小滴オンデマンド構成要素が、生物学的試料を調製し、プロセッシングし、そして/または分析する際に有用なさらなる構成要素を含む、より大きなシステムの部分であってもよいことを認識するであろう。例えば、本開示の小滴オンデマンドシステム900を、組織標本の1またはそれより多い調製プロセスを実行可能な標本プロセッシング装置に(システム900の上流または下流のいずれかで)結びつけてもよい。調製プロセスには、限定なしに、標本の脱パラフィン化、標本の馴化(例えば細胞馴化)、標本の染色、抗原回復の実行等が含まれてもよい。当業者はまた、本開示の小滴オンデマンド分配システムが、試料の染色(例えば一次染色またはIHC染色)の手段を提供するものの、該システムを、他の染色システム、例えば免疫組織化学染色(標識を含む)を実行し、そして/またはin situハイブリダイゼーション(例えばSISH、FISH等)染色(標識を含む)を実行するためのもの、ならびに顕微鏡分析、微量分析、質量分析法、または他の分析法のために標本を調製するための他のプロセスとカップリングしていてもよいことを認識するであろう。

30

【0059】

[0075]図2は、自動化染色システムの一部として小滴オンデマンド技術を利用するプロセスを示す。図2は、インクジェット分配技術の関連で、プロセスマップを例示するが、当業者は、システムが、一般的な当業者に知られるような、他の小滴オンデマンド技術を利用してよいことを認識するであろう。図2を参照して、生物学的試料をまず802に導入する。いくつかの態様において、生物学的試料には、脱パラフィン化組織切片、凍結組織切片、または細胞試料が含まれてもよい。いくつかの態様において、小滴オンデマンド分配システムには、組織切片の脱パラフィン化のための分配試薬が含まれてもよい(または脱パラフィン化を、上流プロセスにおいて、別に行ってもよい)。受け入れ試料に関する必要なアッセイ情報801を、プロセス工程および/またはパラメータに変換し、そして次いで、ハードウェア立体配置によってユニークに定義されるか、または異なるプロセスブロックを定義するハードウェアに関して、ソフトウェア命令によって定義される「

40

50

インクジェット染色ブロック」803に分割する。プロセスブロック803は、システム内で空間的に分離されていてもよいし、またはこれらのブロック各々に関して再形成可能な一体化構造として存在してもよい。完全なアッセイは、さらなる下流プロセッシング804の用意ができた変換試料の結果を伴う、803プロセスブロックの連続的実行と定義される。

【0060】

[0076]図2はまた、インクジェット染色プロセスブロック803の1つの態様の拡大された図も提供する。いくつかの態様において、受け入れ試料は、802と定義されるが、インクジェット染色プロセスブロックに導入する前に、試料上で行う、場合によるさらなるインクジェットまたは小滴に基づくプロセッシング操作を伴う。ブロック806は、インクジェットアッセイ情報801および試料805のインプットを合成し、そしてプロセスブロックにおいて実行しようとするインクジェット染色作業を定義する、パラメータ設定に分割する、フロントエンドプロセッシング工程を定義する。いくつかの態様において、プロセスのこの工程でセットされるパラメータ807には(i)分配しようとする特定の染色試薬；(ii)試料に対して行うプリントパスの数；(iii)(a)顕微鏡スライド全体、(b)スライド上の組織試料を有する領域のみ、または(c)試料領域およびガラス領域、多数の組織試料、または単一の試料内の多数の領域の何らかの組み合わせをプリントしうる、プリント画像ファイルの関連における染色領域；(iv)ターゲット上に分配される小滴の密度を定義する、プリントDPI；(v)プロセスブロックの温度条件；および(vi)プロセスブロックに必要なインキュベーション時間およびルーチンが含まれる。プロセスブロックを定義したら、808、809、および810に定義するように、インクジェット染色プロセスの実行のため、試料をブロック内に導入する。これらの3つの工程は、一般的に、試料と試薬の分配および/または反応の活性部分に相当する(図7および8Aもまた参照されたい)。最後に、811で、残りの未反応プリント試薬も洗い流し、そしてスライド上の過剰な液体を除去し、804でさらに下流プロセッシングする準備ができた変換試料を生じる。

【0061】

[0077]図3は、インクジェット染色システムの別の態様を示し、DMC-11610プリントヘッドを利用するカスタムインクジェット染色装置上で開発された、小滴オンデマンド技術を利用する染色プロセスを示す。本明細書にさらに例示するように、図4Aは、本明細書に概略する方法にしたがって、そして図3に例示するように調製された、染色組織試料を提供する。再び図3を参照すると、工程1401で、試料を小滴オンデマンド染色システム(900)に導入し、そしてこれには、脱パラフィン化組織切片、凍結組織切片、または細胞試料が含まれることも可能である。1401で、プリントヘッドに対する試料の位置に関する情報を含めて、試料画像を捕捉する(例えばターゲット画像化システム901を用いる)。この画像を、いくつかの態様において、ピクセルマップのスタックに変換し、各ピクセルは、試料上のそれぞれの位置に、プリントヘッドから噴出されるべき1またはそれより多い小滴に相当する。ピクセルマップのスタックは、アッセイにおいて用いようとするプリントヘッド各々に関する命令に相当し、スタックの1またはそれより多い層は、プリントヘッド各々に分割される。工程1411で、プリントするサーベル角度(saber angle)を調節することによって、インチあたりのプリントドット(dpi)をプリントヘッドが調節可能である(1412)ように、命令を生成し、そして/または提供する(サーベル角度に関するさらなる情報に関しては、その開示が本明細書に援用される、米国特許公報第2009/0314170号を参照されたい)。いくつかの態様において、サーベル角度は、DMC-11610プリントヘッド上のノズル間のスペーシングを設定する。同時に、ピクセルマップもまた、試料輸送システムに送られる、一連の運動に変換される。小滴沈着のタイミングおよびプリント作業1404中のプリントヘッドに対する試料の相対運動は、図1Aおよび1Bに例示されるように、コンピュータシステムによって協調される。

【0062】

10

20

30

40

50

[0078]いくつかの態様において、過剰な液体を受け入れ試料から除去する(1402)。これは、小滴沈着技術での染色剤沈着につながる統合工程であると考えられ、これは、過剰な液体が1404で沈着される小体積の染色剤を希釈するか、または不均一な染色剤沈着を導く可能性があるためである。染色用の試料を調製する1403ため、非染色液の沈着を用いて、組織試料内のpHおよび緩衝条件を調節する。この特定の態様において、バルク分配を用いてこれを行うことも可能であり；プリントヘッドに染色調製液を装填するか；または続く染色工程(単数または複数)にマッチしたpH条件を「ダイヤル合わせ」するため、組織上に比率計測的に分配される、異なる緩衝剤を装填された2つのプリントヘッドを組み合わせてもよい。比率計測緩衝系の例として、表2は、ヘマトキシリンでの最適染色のために組織を調製するために適した範囲に渡って滴定可能なギ酸および酢酸緩衝系を記載する。工程1404、1405、1406、および1407は、図1および2に示すような、染色剤の強度および特異性を「ダイヤル合わせ」するように、同じ染色剤の多数のプリント層を沈着させるための、プリント、インキュベーション、フィードバックループを含む、プリント染色を実行するためのプロセスを示す。プリント染色工程が完了した後、試料をリンスして1407、いかなる未反応プリント試薬も除去し、そしてプロセス1408を通じてループを戻り、次の染色工程(例えばプリントヘマトキシリン工程に続いてプリントエオジン工程)をプリントするか、またはエアナイフ(例)工程1402を通じて、下流プロセッシングのために放出して、過剰な液体を除去したのち、変換された試料を生じる1409。

10

20

30

40

50

【0063】

[0079]当業者は、分配する試薬のタイプ、生物学的試料のタイプ、または生物学的試料の調製法に応じて、異なるプロセッシングパラメータを提供するように、小滴オンデマンド分配システムを「チューニング」可能であると認識するであろう。本明細書に先に示すように、チューニング可能ないくつかのパラメータには、限定されるわけではないが、小滴体積、および小滴速度が含まれる。いくつかの態様において、小滴オンデマンド分配システムは、沈着システムの小滴あたり、約1pL~約10nLの間の試薬を分配することが可能である。他の態様において、小滴オンデマンド分配システムは、沈着システムの小滴あたり、約1pL~約1nLの間の試薬を分配することが可能である。さらに他の態様において、小滴オンデマンド分配システムは、沈着システムの小滴あたり、約1pL~約500pLの間の試薬を分配することが可能である。さらなる態様において、小滴オンデマンド分配システムは、沈着システムの小滴あたり、約1pL~約250pLの間の試薬を分配することが可能である。さらにさらなる態様において、小滴オンデマンド分配システムは、沈着システムの小滴あたり、約1pL~約100pLの間の試薬を分配することが可能である。さらにさらなる態様において、小滴オンデマンド分配システムは、小滴オンデマンド分配システムの小滴あたり、約1pL~約50pLの間の試薬を分配することが可能である。

【0064】

[0080]いくつかの態様において、試薬を約0.5m/s~約20m/sの間の速度で小滴オンデマンド分配システムから分配し、そして/または沈着させる。他の態様において、試薬を約4m/s~約10m/sの間の速度でデバイスから分配し、そして/または沈着させる。

【0065】

[0081]本明細書にさらに記載するように、異なる試薬または試薬を含む組成物を、小滴オンデマンド分配システムから分配することも可能である。当業者は、異なる試薬組成物または配合物が、異なる特性を含むことも可能であり、そしていくつかの態様において、異なる剪断速度で分配されることも可能であることを認識するであろう。例えば、一次染色試薬組成物(またはそれに関しては、任意の小分子色素)は、約 $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ~約 $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ の間の剪断速度で分配可能である。別の例として、巨大分子試薬組成物は、約 $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配可能である。さらなる例として、抗体試薬溶液は、約 $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 未満の剪断速度で分配可能である。適切な剪断速度は、一般

の当業者によって、各組成物に関して決定可能であり、そして分配デバイスは適宜チューニング可能である。

【0066】

[0082]本出願人は、本開示の小滴オンデマンド分配システムが、生物学的試料上への試薬の正確な分配を可能にすることを示す。実際、そして先行技術に比較した際、開示する分配デバイスを用いて、生物学的試料上に沈着される試薬の量または質量は、試薬の量を「ダイヤル合わせ」することによって、変化させることが可能である。したがって、当業者は、染色強度を特定の試料および/またはアッセイに基づいて、変化させることも可能であることを認識するであろう。実際、本出願人は、驚くべきことに、(i)分配機構の多数回のパスにより、試料を適用して(例えば約1~約25回のパスまたはそれより多く)、試薬材料の累積沈着を提供するようにすること；(ii)分配する試薬のインチあたりのドット(dpi)(例えば約50dpi~約1200dpi)を変化させること；(iii)小滴体積(例えば約1pL~約1nL)を変化させること；および/または(iv)任意の試薬組成物または配合物における試薬濃度を変化させることを含むいくつかの方法の1つによって、試薬量を変化させることが可能であることを発見した。

10

【0067】

[0083]本発明の試薬分配デバイスは、先行技術に比較した際に、利用されるおよび/または無駄になる試薬の量をより少なくすることを可能にすると考えられる。表1は、多様な染色プロセスを示し、そして異なる装置間のアッセイ工程あたりのスライド被覆体積および空間的染色能力を比較して例示する。表1は、自動化染色組織染色プラットフォームの関連において、インクジェットまたは別の小滴生成技術を用いて、顕微鏡スライドの特定の領域を染色するための試薬体積節約および能力を示す。アッセイ工程、例えば本明細書記載の小滴オンデマンドシステムに関して、全試料を覆うために必要な総体積は、約10マイクロリットルから約1マイクロリットル未満まで多様である。同時に、約10ピコリットルの単一小滴体積で、約10の細胞またはそれ未満の特定の領域を染色することが可能であると考えられる。例えば、そして表1に列挙するように、アッセイ工程あたり、スライドあたり、約10mL~100mLの試薬を必要とする、先行技術の「ディップアンドダンク」技術に比較した際、本デバイスは、いくつかの態様において、アッセイ工程あたり、スライドあたり、約0.001mLの試薬の利用が必要とされるのみであり、利用する試薬体積の有意な減少を生じる(すなわち数桁の相違)。さらに、本出願人は、本開示記載のデバイスが、本明細書にさらに記載するように、先行技術の方法と比較した際、反応動力学の増加を可能にすることを発見した。

20

30

【0068】

表1：染色プロセスの相違の比較

【0069】

【表1】

染色プロセス	装置例	アッセイ工程あたりのスライド被覆体積	空間的染色能
ディップアンドダンク	Dako 自動染色装置 LINK 48	容器あたりおよそ> 10 mL	なし
パドル	VENTANA HE 600 システム	およそ~1 mL	なし
微量流体	Leica BOND-III	およそ~100 μ L	なし
小滴に基づく	インクジェット染色装置(本明細書開示)	<1 ~10 μ L	あり、およそ10細胞領域

40

50

【0070】

[0084]一次染色剤、ヘマトキシリンおよびエオジンの関連において、分配する試薬の量が増加するにつれて（パス回数が増加するにつれて）、染色強度が増加する（例えば図4 A～4 Eおよび5 A～5 Cを参照されたい）。図4 A～4 Eは、標本スライド上に固定された扁桃腺組織上に分配されたヘマトキシリン試薬を例示する（染色法に関しては、本明細書の実施例6を参照されたい）。図4 Aは、インクジェットプロセスに関して、パス回数が増加し、そして分配試薬体積が増加する（ $4 \mu\text{L}/\text{in}^2$ 、 $8 \mu\text{L}/\text{in}^2$ 、 $14 \mu\text{L}/\text{in}^2$ ）とともに、染色強度が増加することを定性的に示す。図4 Bは、総染色沈着に基づいて、ヘマトキシリン一次染色の吸光度を例示する（ 600 dpi 、 3 pL 滴サイズ、プリントヘッドパスあたり、約 $1 \mu\text{L}/\text{in}^2$ ）。慣用的な染色装置と比較するため、対照スライドからの吸光度値を図4 Bの示すバンド中に示す。試薬分配デバイスからの約 $14 \mu\text{L}/\text{in}^2$ の染色剤沈着は、2分間のインキュベーション時間で、慣用的な染色装置で提供されるものとほぼ同等の染色を生じる。開示する方法にしたがった染色例として、図4 Cは、本開示に記載するインクジェット染色プロセスによって生じるような、高品質組織染色の重大な巨視的特徴である、胚中心を取り巻くリンパ濾胞の鮮明な染色を示す。図4 Cにおいて、矢印は、リンパ濾胞の縁における強い染色を有する胚中心を示す。図4 Dは、インクジェット染色扁桃腺組織の巨視的外観を提供し、そしていくつかの核における凝集クロマチンおよび核膜を見る能力を含めて、明白な核染色を示す。図4 Dにおいて、矢印は、周囲の核よりも、凝集核物質が、明らかに暗く染色される、核の例を示す。図4 Eは、開示する技術が特異的染色を提供することを示す、染色された扁桃腺切片の視野を提供し；該視野において、染色された核および染色されない赤血球（矢印によって示す）の両方が存在する。

10

20

【0071】

[0085]修飾された商業的に入手可能なヘマトキシリンを充填した非OEMリフィル可能インクカートリッジを備えたカスタム改良EPSON C88+プリンターを用いて、図4 A～4 Eに例示する実験結果を得た。プリント特性は上記の通りであった。簡潔には、実験は：1) FFPEブロックから $4 \mu\text{m}$ 扁桃腺切片を調製し、2) 染色用の切片を調製し、3) プリントしようとする試薬の上にプリンターを導くプリント画像ファイル、染色用のx-y座標、およびプリントしようとするパターンを生成して、4) 組織切片およびガラススライドを、プリントフィード機構上に装填して、5) プリンティングプロセスを反復して、望ましい染色強度を達成し、そして6) 過剰な染色剤を手動で洗い落として、そしてスライドにカバースリップを掛ける工程からなった。VENTANA iScan HTスライドスキャナを用いてスライドを画像化し、そしてImageJおよびMATLABを用いて、強度値を抽出した。

30

【0072】

[0086]いかなる特定の理論に束縛されることも望ましくないが、上述の結果の意味は2つあると考えられる。第一に、染色強度（量で制限される染色）の「ダイヤル合わせ」は、小滴オンデマンドプリンティングプロセス（例えばインクジェット沈着または別の小滴沈着技術）によって可能になることを示す。以前には、すべての他の技術は、染色強度を「ダイヤル合わせ」するために、インキュベーション時間、温度、または多様な試薬濃度の組み合わせを必要としたため、いかなる他の組織染色技術もこの能力は持たなかった。第二に、この結果は、図4 C、4 D、および4 Eにおいて可視である巨視的および顕微鏡的特徴によって立証されるように、この低体積染色形式で、組織乾燥が非特異的染色を生じないことを示す。

40

【0073】

[0087]別の例として、図5 A～5 Cは、標本スライド上に固定された結腸組織に対するエオジン試薬分配を例示する。図5 Aは、ここに開示する分配デバイスおよびプロセスを利用して、染色剤沈着（ $5 \mu\text{L}/\text{in}^2$ 、 $15 \mu\text{L}/\text{in}^2$ 、 $25 \mu\text{L}/\text{in}^2$ ）を増加させると、エオジン染色強度が増加することを例示する。図5 Bは、総染色沈着に基づく、エオジン一次染色剤の吸光度を例示する。慣用的な染色装置との比較のため、対照スラ

50

イド由来の吸光度値を影のバンドで示す。試薬分配デバイスからの染色剤沈着約 $25 \mu\text{L} / \text{in}^2$ は、慣用的染色装置を用いた2分間のインキュベーション時間と同等の染色を生じる。図5Cは、インクジェットプロセスを用いた結腸組織染色を比較し、ここで、エオジンの3つの別個の影が明らかに観察可能であり、そしてこれによって、当業者が組織領域（平滑筋、結合組織、および赤血球）を区別することが可能になる。図5Cにおいて、逆方向斜線矢印は、結合組織の明るく染色された領域を示し、順方向斜線矢印は、赤血球の強く染色された領域を示し、そして白い矢印は、血管を取り巻く、中程度に染色された平滑筋を示す。ヘマトキシリンが修飾エオジン配合物で置換されたこと以外は、本明細書記載の方法を用いて、この実験結果を得た。図4A～4Eにおけるように、図5A～5Cは、染色強度の「ダイヤル合わせ」が、小滴オンデマンド試薬分配プロセスによって可能になり、そしてさらに低体積染色環境が、図5Cにおいて明らかであるように、染色の必要な特異性を阻害しないことを立証する。

【0074】

[0088]もちろん、当業者は、例えば2つの一次染色剤（または任意の2つの試薬）を生物学的試料上に沈着させる多工程プロセスにおいて、染色剤を沈着させることも可能であることを認識するであろう。図6Aおよび6Bは、本開示にしたがって、小滴オンデマンド分配デバイスを用いて、ヘマトキシリンおよびエオジン一次染色剤の両方を用いた染色の例示を提供し、ここで、沈着される総染色剤体積は、約 $8 \mu\text{L} / \text{in}^2$ および約 $12 \mu\text{L} / \text{in}^2$ であった。本出願人は、多数回の染色剤分配作業が干渉せず、そしてインクジェット技術のために配合されるカスタム試薬が、許容される染色結果を提供することを発見した。図6Aは、その特徴の微細的構造に基づいて、適宜、異なる比のヘマトキシリンおよびエオジンで染色された組織の多数の形態学的領域を伴う、巨視的染色結果を示す。図6Bは拡大視野を示し、胚中心のリンパ濾胞に対する高い度合いの核染色、およびこの扁桃腺標本の活性領域間の結合組織における高い度合いのエオジン染色を示す。図6Bにおいて、左の矢印は、胚中心（より明るいヘマトキシリン染色）を取り巻くリンパ濾胞（より暗いヘマトキシリン染色）の領域を示し、そして上部右の矢印は、エオジンで強く染色された扁平上皮領域を示す。

【0075】

[0089] Dimatrix DMP-2831 Materials プリンターと、Dimatrix DMC-11610 プリントカートリッジを用いて、図6Aおよび6Bの実験結果を得た。これらの16ノズルプリントヘッドからの滴サイズは、約 10pL に固定されることが知られ、そしてプリントジョブの小滴スペーシングは、ヘマトキシリンおよびエオジン両方のプリンティングに関して、約 1270dpi に設定された。この染色に関して、本明細書に記載するように、ヘマトキシリンおよびエオジンに関するカスタムインクジェット配合物を開発した。本明細書にさらに示すように、これらの配合物は、いくつかの目的を達成するように設計され、これには：1) 流体の物理的特性の設計（すなわち、ジェット形成および小滴離脱（break off）のための、適切な粘性および表面張力の設定）を通じた、分配信頼性および一貫性の改善、2) カートリッジ中の試薬の安定性改善（例えばヘマトキシリン配合物への塩化アルミニウムの導入）、および3) 必要なプリンティングパス回数を最小限にするための、配合物の染色強度の増加（例えば、図5A～5Cにおいて、最も暗い染色のために25回のパスが必要であるのに対して、「インクジェットエオジン」の5回のパスで、より暗いエオジン染色が生じる）が含まれる。この実験におけるプリンティングプロセスは、以下の工程：1) ガラススライド上にマウントされた組織切片の位置、形状、およびサイズに関するプリント画像ファイルの生成、2) 組織上にプリントしようとする特定の試薬のためのカートリッジおよびプリントヘッドの装填、3) 染色プロセスのため、正しいDPIをダイヤル合わせするための、プリントヘッドサーベル角度の設定、4) 運動ステージ上への顕微鏡スライドおよび試料の装填、および5) 適切な染色強度を発展させるための、望ましい回数 of 相互作用でのプリントジョブの実行からなつた。ヘマトキシリンのためのブルーイング溶液、またはエオジンを区別するための溶液の適用を、手動でオフラインで行った。

10

20

30

40

50

【0076】

[0090]いくつかの態様において、液体の薄い境界層に浸透し、そして試料と連絡して染色試薬を補充するよう、任意の試薬を分配可能であるように、試薬沈着デバイスを設定する。いかなる特定の理論に束縛されることも望ましくないが、現在の染色技術は、受動的に拡散して組織試料へ下降する濃度勾配を作る染色試薬のパドルに依存すると考えられる。パドル-組織界面での試薬の能動的な混合を欠くと考えられるこれらの染色システムにおいて、組織内への染色剤拡散は、界面での染色剤濃度枯渇層の構築によって仲介され、染色動力学を制限する。本開示は、(i) 枯渇層のものに近い厚みの染色フィルムを生成し；そして(ii) 枯渇層に染色剤分子を補充し、それによって受動染色剤拡散の限界を克服することによって、先行技術の染色技術を改善すると考えられる。

10

【0077】

[0091]いくつかの態様において、試薬、または試薬を含む組成物を、組織保存液体媒体の薄フィルムを通じて試薬小滴を駆動するために十分な速度で、非混和性液体を通じて分配する。薄フィルム液体の例には、限定されるわけではないが、draksol、linpar、ミネラルオイル、またはシリコン油が含まれる。一般的に、好ましい特質には、室温(例えば20~30)での液体状態、低い表面張力、および低い蒸気圧が含まれる。非混和性バリア層の液体状態によって、バリアを通じた水性液体の再供給が可能である。低い表面張力によって、バリアが、比較的薄いフィルム(高さ100 μ mまたはそれ未満)として試料上にコーティングされることが可能になる。低い蒸気圧によって、バリア層が試料から蒸発する速度が緩慢であることが確実になる。これによって、試薬が非混和性液体の下で連絡する層内に駆動されると考えられる。本態様に関して、小滴の動力学エネルギー(小滴の量および小滴がフィルムにヒットする際の衝撃速度の積)は、保護層の表面張力/エネルギーより大きくなければならず(それに加えて、置換された液体に相当する十分なさらなるエネルギーを提供しなければならず)、例えば約 9.52×10^{-10} Jより大きくなければならない。いくつかの態様において、動力学エネルギーは、約 6.23×10^{-10} Jである。さらに、小滴破壊が衝撃に際して起こらないことを確実にするため、小滴のウェーバー数は、約18未満でなければならない。いくつかの態様において、表面が破壊されたら、小滴が保護層を通じて続いて組織に直接接触することを確実にするため、小滴は保護フィルムより高い密度を持たなければならない。

20

【0078】

[0092]他の態様において、局所的にパドルを通じて染色剤を液体-組織染色剤枯渇層に運ぶであろう薄フィルム内に、試薬小滴を駆動するために十分な速度で、あらかじめ存在する水性液体「パドル」内に、試薬を分配する。これは、試料と連絡する界面接触ポイントで、試薬の補充を促進するであろうと考えられる。続いて、これは、染色剤枯渇境界層を排除し、そしていくつかの場合、枯渇層を渡る染色試薬の拡散によって仲介される、染色反応動力学を改善すると考えられる。実際、巨大生体分子、例えば抗体に関して、ターゲットへの分子の結合は、時間および濃度によって駆動される。本明細書に開示するデバイス(および固有の混合)での分配を通じて、さらなる試薬材料で薄フィルムを連続的に破壊することによって、組織表面での有効濃度が増進し、そしてより迅速な取り込みを提供すると考えられる。この態様のため、速度は一般的に、約5m/s~約15m/sの範囲である。

30

40

【0079】

[0093]図7を参照すると、組織試料を含有する受け入れスライドは、まず、デバイス110によって受け取られる。いくつかの態様において、組織試料は、試料と連絡する保護液体層を含有して、試料が乾燥するのを防止する。次いで、試薬を組織切片120上に分配する。工程120を、染色強度を構築するために必要なだけ多く反復してもよい。いくつかの態様において、試薬を場合によってインキュベーションする130。例えば、巨大生体分子に関しては、時間および濃度によって、結合を駆動することも可能である。インキュベーションを伴うまたは伴わない分配を、必要に応じて反復してもよい135。いかなる特定の理論によって束縛されることも望ましくないが、分配試薬の添加で薄フィルム

50

を連続して破壊することによって、組織表面での有効濃度が増進し、より迅速な取り込みを生じる。分配後、残った試薬および/または保護フィルムを工程140で除去する。いくつかの態様において、試薬および/または保護フィルムの除去は、洗浄溶液を分配して、希釈し、表面張力を増加させ、そして/または粘性を減少させることによって、促進される。次いで、さらなる下流プロセッシングまたは分析のため、組織切片を工程150で提供する。

【0080】

[0094] 図8Aは、インクジェットまたは他の小滴オンデマンド技術を用いた、自動化方式での、免疫組織化学染色のためのプロセスを例示するさらなるプロセスマップを示す。工程701で、受け入れ試料には、脱パラフィン化組織切片、凍結組織切片、または細胞試料が含まれることも可能である。工程702は、一般的な試料調製工程（単数または複数）を提供して、任意の以前のプロセス工程から橋渡しする。一般的に、この工程（単数または複数）は、試料内に、一貫した低体積の残渣液体が存在し、そして反応条件（例えば緩衝剤強度、pH）が、続くインクジェットまたは小滴に基づく染色工程のために適切に設定されていることを確実にするよう設計される。工程702での分配作業は、1マイクロリットルから最大1ミリリットルの体積での、試料上への小滴に基づくプロセスまたはバルク液体分配であってもよい。試料上に残る液体の残渣体積を、約100nL~約100μLの範囲の最終体積まで正確に減少させるため、液体除去部分を設計してもよい。工程703は、インクジェットまたは小滴分配技術を通じた、ターゲティングされたタンパク質結合剤の組織への導入を示し、これは、約1pL~約100nLの個々の小滴サイズ、単一の小滴程度の小ささから標準的な顕微鏡スライドサイズまでのプリントパターン、および約100dpi~約1300dpiまでのプリント密度を含む。

10

20

【0081】

[0095] 工程704は、特定のアッセイ工程に関して、関心対象の試薬と、別の試薬を同時に分配する、場合による実施を示す。小さい小滴に関しては、これは、ほぼ即時の、スライド上での試薬混合を促進し、そして試薬を*in situ*で混合して、反応を誘発するか；比率計測的に生体分子、色素、または基質の濃度を希釈するか；あるいは試料を渡る染色フィールドをホモジナイズする、ユニークな能力を与えると考えられる。工程705は、特異的結合相互作用が、分配された試薬およびターゲット試料の間で起こる期間を示す。工程706は、組織との反応を通じて、少量の活性結合剤が消費される一方、過剰な液体が能動的にまたは受動的に試料から除去される、組織上に沈着されたプリント小滴に生じる効果を示す。これらの小体積は、パドル染色技術において観察される、予期される拡散枯渇層よりも薄いと考えられるため、これらの反応は、迅速に進行すると考えられ、そしてその結果、さらなる活性結合剤が補充され、望ましい終点または平衡に向かって、反応を迅速に駆動し続けることが可能であると考えられる。

30

【0082】

[0096] 工程707は、効率的な反応を駆動し続けるため、さらなる活性結合剤（生体分子または色素）が試料に再供給される手段を示す。この場合、再供給に必要なプリント密度は、元来のプリント適用よりもはるかにより小さい可能性もある。いくつかの態様において、約50~約100dpiの間の小滴密度は、反応を駆動するために十分である可能性もあり、一方、他の態様においては、元来のプリント密度の完全な再プリントが必要でありうる。最後に、工程708において、試料はこのアッセイブロックを完了し、そして次のアッセイブロックに移動する準備ができており、次のブロックは、このプロセスの回復であるが、異なる試薬および反応条件を用いてもよいし、あるいは統合デジタル病理ワークフローの一部としての、異なるプロセス、例えば自動化カバースリップ付与または画像化であってもよい。

40

【0083】

[0097] 図8Bは、図8Aのプロセスにしたがった染色由来の結果例を提供する。この例は、4μmで切片作製された、扁桃腺のFFPE切片上への、抗CD20一次抗体の沈着結果を例示する。この特定の例で用いるインクジェット試薬を、本明細書にさらに記載す

50

る。一般的に、プロセスは、一次抗体、二次抗体、酵素仲介検出用のリンカー、検出反応を駆動するための酵素、または特異的に連結された酵素に対する基質に適用可能である。本明細書記載のプロセスは、Liら (Small, 2016, 12, No. 8, 1035-1043) に記載されるような、「周期的排出 - 補充」技術の背後にある理論の非自明な延長である。実際、本明細書に記載するプロセスは、試薬の再供給が、インクジェットプリントヘッドを通じて、組織内へ、ゼロではない速度 (この例では、およそ 8 m/s) で導かれるという意味で、Liによって記載されるプロセスのいくつかの限界を克服すると考えられる。さらに、Liによる研究において、焦点は、周期的混合プロセスにある一方、本開示においては、能動的 (例えばエアフロー) または受動的 (例えば蒸発) プロセスのいずれかを用いて、過剰な液体を排出しつつ、色素または生物学的物質を、インクジェットヘッドでのさらなるプリントパスを通じて再供給する (図8Aの工程707を参照されたい)。これは、続いて、拡散仲介プロセス (緩慢であり、パドルに基づく染色技術に特徴的) から、結合動力学仲介プロセス (迅速であり、枯渇層が生体分子または色素を能動的に再供給可能である、小滴沈着およびフィルムに基づく染色技術に特有) へ、反応速度を駆動すると考えられる。

【0084】

[0098] 図9A、9B、および9Cは、本明細書に開示する小滴オンデマンドシステムおよび方法を用いて、一次抗体沈着を通じて達成される染色をさらに例示する。一般的に、図9A、9B、および9Cは、扁桃腺組織に対して、抗CD-20抗体を用い、小滴オンデマンドプロセスを用いて、沈着した一次抗体の例を示す。図9Aは、混合薄フィルムパドルに対する静置薄フィルムパドルに関する染色強度を比較する。この場合、フィルム内への液体のジェットングを通じて混合される薄フィルムは、より低い総抗体曝露 ($\mu\text{L} \times \text{時間}$) にもかかわらず、より高い染色強度を生じた。これらの示差的結果を駆動する機構の詳細を図8Aに例示する。図9Bおよび9Cは、本明細書の染色プロセスにしたがって染色された扁桃腺組織の領域を示し、ここで、図9Bに関しては、パラメータは以下のとおりである: $14.4 \mu\text{L}/\text{in}^2$ (1200 dpi 、 10 pL 滴、単回プリントヘッドパス)、静置フィルム、16分間インキュベーション時間。図9Cに関しては、パラメータは以下の通りである: $3.6 \mu\text{L}/\text{in}^2$ (600 dpi 、 10 pL 滴サイズ、単回プリントヘッドパス)、4分間インキュベーション時間、抗体の $400 \text{ nL}/\text{in}^2$ (200 dpi 、 10 pL 滴サイズ、単回プリントヘッドパス) の薄フィルムへの添加を通じた混合、その後、さらに4分間のインキュベーション、その後2回のさらなる混合工程。

【0085】

[0099] 図10A~10Cは、本開示にしたがって小滴オンデマンド沈着プロセスを用いて沈着された一次抗体の沈着のさらなる例を提供する (抗CD20、扁桃腺組織)。図10A~10Cは、インクジェットまたは小滴沈着技術が、結合動力学がターゲット上に沈着される試薬量によって駆動されるように、十分に小さい液体体積を提供することをさらに確認する。図10Aは、2つの異なる体積の薄フィルムパドルに関する染色強度を比較して、インクジェット薄フィルムプロセスに関する抗体結合が、沈着される抗体の量によって、仲介されることを立証する (すなわち、CD20シグナル強度は、組織に沈着される一次抗体の量の関数として増加する)。図10Bおよび10Cは、図10Aからそれぞれのプロセスで染色される扁桃腺の領域である。簡潔には、図10Bに関して、試薬 $14.4 \mu\text{L}/\text{in}^2$ (1200 dpi 、 10 pL 滴、単回プリントヘッドパス) を組織切片上への静置フィルムとしてパターン形成し、そして16分間室温でインキュベーションした。図10Cに関しては、試薬 $28.8 \mu\text{L}/\text{in}^2$ (1200 dpi 、 10 pL 滴、2回のプリントヘッドパス) を組織切片上への静置フィルムとしてパターン形成し、そして16分間室温でインキュベーションした。図10A~10Cを調製するために用いた抗体配合物を、本明細書にさらに記載する。

【0086】

[00100] 本開示の別の側面において、本出願人は、本開示の分配デバイスが、関心対象の組織領域を同定し、そして染色剤を生物学的試料の領域に選択的に適用可能であるよ

10

20

30

40

50

うに、試薬沈着の x - y 空間制御を可能にすることを見出した。いくつかの態様において、試料内の特定の領域または細胞を試薬で処理可能であるように、本明細書記載の分配デバイスを画像化システムと組み合わせる。本開示の別の側面において、(a) 組織試料を画像化し；(b) 試薬の適用のため、組織の特定の領域を選択し；そして(c) 圧電沈着システムで、組織の特定の領域に、試薬を沈着させる工程を含む、組織標本の特定の領域に、少なくとも1つの試薬を適用する方法を開示する。いくつかの態様において、約 $360 \text{ nL} / \text{in}^2$ (600 dpi 、 $1 \text{ pL} / \text{滴}$) から約 $14.4 \text{ } \mu\text{L} / \text{in}^2$ (1200 dpi 、 $10 \text{ pL} / \text{滴}$) の間の試薬を、沈着システムのパスを通じて、組織の特定の領域に適用する。

【0087】

[00101]例えば、図11は、開示するインクジェット染色プロセスを用いて可能になる、空間沈着/多重化によって、特に可能になる、「スライド上の組織パネル」態様を例示する。図11を参照して、IHC染色用の抗体(標識されたIHC1およびIHC4)を、同時に、隣接する組織切片上でインキュベーションする。同時に、一次染色(標識されたH&E)をスライド上の別の領域で調製する。一次抗体とインキュベーションした後、同じまたは異なる検出化学反応を、IHC組織切片上で用いてもよく、これは、一次抗体が、スライド上の異なる組織切片上で空間的に分離されているためである。これは、より迅速なアッセイターンアラウンド時間ならびに単一スライド上での完全診断パネルの利便性を促進すると考えられる。いくつかの態様において、やはり図11を参照して、3つのIHCマーカー乳房パネルを単一スライド上で実行し、乳癌を表現型決定するための3つの診断IHCマーカー(例えばHER2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体)各々を通じた、一次染色剤での形態学的染色からの病理学者ワークフローを容易にすることも可能である。

【0088】

[00102] 試薬組成

[00103] 概説

[00104]当業者は、本明細書記載の試薬沈着デバイスおよびプロセスを用いて、任意のタイプの試薬または試薬組成物を、分配してもよいことを認識するであろう。例えば、いくつかの態様において、分配デバイスから分配される試薬は、一次染色剤、例えばヘマトキシリンまたはエオジンである。他の態様において、デバイスから分配される試薬は、組織化学において有用な抗体(例えば一次および二次抗体)、抗体または抗体コンジュゲート(例えば酵素コンジュゲート化抗体、あるいはフルオロフォア、ハプテン、または他の標識にコンジュゲートされた抗体)を含む組成物、および/または抗体または抗体-ターゲット複合体を検出するための検出試薬(例えば、発色原基質、一次抗体にコンジュゲートされた標識に特異的な二次抗体等を含む組成物)である。

【0089】

[00105]いくつかの態様において、試薬または試薬を含む組成物を修飾し、市販の試薬またはこうした試薬を含む組成物と比較して、インクジェット沈着装置または圧電沈着装置を通じた送達および分配をよりよく促進させる。例えば、試薬または試薬を含む組成物を、特定の密度、pH、粘性、またはレオロジーを有するように改変してもよい。いくつかの態様において、任意の試薬組成物は、緩衝剤、レオロジー修飾剤、界面活性剤、キャリアタンパク質、安定化剤、粘性修飾剤、保水剤、保存剤、および他の添加物の1またはそれより多くを含んでもよい。当業者は、適切な量で適切な構成要素を選択して、インクジェット技術を用いた分配を実現するために望ましい特性を有する試薬組成物を提供することが可能であろう。

【0090】

[00106]いくつかの態様において、本開示の試薬組成物は、ようなレオロジー、すなわち溶液の「流動」を有し、圧膜(piezomembrane)の1単位の励起の下に、試薬の単一小滴を促進する。実際、本開示の試薬溶液は、(i) 適切な染色を可能にし、(i i) 安定な薄フィルムを形成可能であり；そして(i i i) 圧電沈着を通じて分散

10

20

30

40

50

可能であるように、開発されている。いくつかの態様において、試薬組成物は、約 1 g / mL より大きい密度を有する。他の態様において、試薬組成物は、約 0.75 g / mL ~ 約 1.5 g / mL の間の密度を有する。

【0091】

[00107]いくつかの態様において、試薬組成物の粘性は、約 1 c p ~ 約 40 c p の範囲である。他の態様において、試薬組成物の粘性は、約 4 c p ~ 約 15 c p の範囲である。さらに他の態様において、試薬組成物の粘性は、約 6 c p ~ 約 10 c p の範囲である。いくつかの態様において、試薬組成物の表面張力は、約 20 ダイ / cm ~ 約 70 ダイ / cm の範囲である。他の態様において、試薬組成物の表面張力は、約 20 ダイ / cm ~ 約 45 ダイ / cm の範囲である。さらに他の態様において、試薬組成物の表面張力は、約 20 ダイ / cm ~ 約 35 ダイ / cm の範囲である。

10

【0092】

[00108]一般的に、任意の試薬組成物において使用するための粘性修飾剤は、グリコール、例えばエチレングリコール、ジエチレングリコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、グリコールエーテル、酢酸グリコールエーテル；糖および多糖、例えばグアーガム、キサンタンガム；セルロースおよび修飾セルロース、例えばヒドロキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、プロピルメチルセルロース、メトキシセルロース、メトキシメチルセルロース、メトキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエチルエーテル、およびキトサンより選択される。

20

【0093】

[00109]いくつかの態様において、本開示の組成物はまた、1またはそれより多い低揮発性水溶性保水剤も含んでもよい。保水剤の代表的な例には：(1) トリオール、例えば；グリセロール、1, 2, 6 - ヘキサントリオール、2 - エチル - 2 - ヒドロキシメチル - プロパンジオール、トリメチロールプロパン、アルコキシル化トリオール、アルコキシル化ペンタエリスリトール、糖類、および糖アルコール；ならびに(2) ジオール、例えばエチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、プロピレングリコール、4またはそれより多い酸化アルキレン基を有するポリアルキレングリコール、1, 3 - プロパンジオール (dial)、1, 2 - ブタンジオール、1, 3 - ブタンジオール、1, 4 - ブタンジオール、1, 2 - ペンタンジオール、1, 5 - ペンタンジオール、1, 2 - ヘキサジオール、1, 6 - ヘキサジオール、2 - メチル - 2, 4 - ペンタンジオール、1, 2 - ヘプタンジオール、1, 7 - ヘキサジオール、2 - エチル - 1, 3 - ヘキサジオール、1, 2 - オクタンジオール、2, 2, 4 - トリメチル - 1, 3 - ペンタンジオール、1, 8 - オクタンジオール；ならびにチオグリコールまたはその混合物が含まれる。望ましい保水剤は、多価アルコールである。

30

【0094】

[00110]いくつかの態様において、試薬組成物は、1またはそれより多い安定化剤を含む。一般的に、安定化剤は、ヨウ素酸ナトリウム、塩化アルミニウム六水和物、硫酸アルミニウム十六水和物、およびタンパク質安定化剤（例えばトレハロース、グリセロール、グロブリン、BSA等）より選択されてもよい。1またはそれより多い安定化剤を包含すると、試薬分子の沈殿が防止可能であると考えられる。例えば、溶液から沈殿することが当該技術分野から知られるヘマトキシリンを1またはそれより多い安定化剤と配合して、溶液からの沈殿を軽減させるかまたは防止し、そしてしたがって、試薬ラインまたはプリント/インクジェット分配ヘッドの目詰まりを回避することも可能である。

40

【0095】

[00111]いくつかの態様において、表面張力修飾剤は、界面活性剤である。界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、またはその混合物の1つであってもよい。いくつかの態様において、適切な界面活性剤は、(i) 他の試薬構成要素と組み合わせた際、望ましい表面張力が達成されることを可能にし；(i

50

i) タンパク質または他の試薬構成要素を変性させず；そして/または(iii)低い泡高を提供するように、選択される。

【0096】

[00112]陰イオン性界面活性剤は、一般的に、硫酸塩、スルホン酸塩、リン酸塩、またはカルボン酸塩に基づき、そして水溶性陽イオンを含有する。スルホン酸塩の代表的な式は、 $R-SO_3M$ であり、式中、Rは、スルホン酸官能性にアルコキシまたはオキシアルコキシを通じて連結されていてもよい約5~22炭素原子の炭化水素基であり、そしてMはアルカリ金属などの水溶性陽イオンである。陰イオン性界面活性剤には、硫酸アルキルエーテル、硫酸およびスルホン酸アルキル、カルボン酸アルキル、硫酸アルキルフェニルエーテル、スルホン酸アルキルポリ(オキシエチレン)のナトリウム塩、スルホン酸アルキルベンジルのナトリウム塩、例えばスルホン酸ドデシルベンジルのナトリウム塩およびラウリルエーテル硫酸ナトリウムである。陰イオン性界面活性剤にはまた、陰イオン性リン酸エステルも含まれる。

10

【0097】

[00113]いくつかの態様において、界面活性剤には、限定されるわけではないが、ポリオキシエチレンアルキルエーテルが含まれ、ここでアルキルは $(CH_2)_M$ であり、そしてオキシエチレンは $(C_2H_4O)_N$ であり、式中、Mは5~16、8~14、または10~12の整数であり、そしてNは10~40、15~30、または20~28の整数である。1つの態様において、界面活性剤は、式 $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$ を有するポリオキシエチレンラウリルエーテルである。別の態様において、界面活性剤は、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノアルキレートであり、モノアルキレートは8~14の間の炭素を含む。別の態様において、界面活性剤は、式 $C_{12-14}H_{25-29}O(CH_2CH_2O)_x$ を有する直鎖二級アルコールポリオキシエチレンであり、式中、xは2~12の間の整数に等しい。さらに別の態様において、界面活性剤は、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルである。例示的な界面活性剤は、名称：Brij(登録商標)35、TWEEN(登録商標)、TergitolTM、TritonTM、EcosurfTM、DowfaxTM、ポリソルベート80TM、BigCHAP、デオキシBigCHAP、IGEPAL(登録商標)、サポニン、Thesit(登録商標)、Nonidet(登録商標)、プルロニックF-68、ジギトニン、デオキシコール酸塩等である。特定の開示する作業態様は、Brij(登録商標)35、TWEEN(登録商標)、TergitolTM、TritonTMの名の下に販売されている。

20

30

【0098】

[00114]本開示の組成物において有用な陽イオン性界面活性剤は、アミノまたは四級アンモニウム部分含有する。本明細書で有用なものの陽イオン性界面活性剤は、以下の文書に開示される：M. C. Publishing Co., McCutcheon's, Detergents & Emulsifiers, (North American edition 1979); Schwartz; Surface Active Agents, Their Chemistry and Technology, New York: Interscience Publishers, 1949; 米国特許第3,155,591号、Hilfer、1964年11月3日発行；米国特許第3,929,678号、Laughlin、1975年12月30日発行；米国特許第3,959,461号、Bailey、1976年5月25日発行；および米国特許第4,387,090号、Bolich, Jr., 1983年6月7日発行。

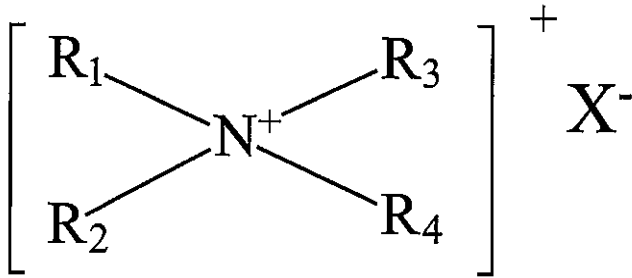
40

【0099】

[00115]本明細書で有用な四級アンモニウム含有陽イオン性界面活性剤物質には以下の一般式のものがある：

【0100】

【化1】



【0101】

10

[00116]式中、R₁～R₄は、独立に、約1～約22炭素原子の脂肪族基、あるいは約1～約22炭素原子を有する芳香族、アルコキシ、ポリオキシアルキレン、アルキルアミド、ヒドロキシアルキル、アリールまたはアルキルアリール基であり；そしてXは、ハロゲン（例えば塩素、臭素）、酢酸、クエン酸、乳酸、グリコール酸、リン酸硝酸、硫酸、およびアルキル硫酸ラジカルより選択されるものなどの塩形成性陰イオンである。脂肪族基は、炭素および水素原子に加えて、エーテル結合、および他の基、例えばアミノ基を含有してもよい。より長鎖の脂肪族基、例えば約12炭素またはそれより多いものは、飽和されていてもまたは不飽和であってもよい。特に好ましいのは、モノ長鎖（例えばモノC₁₂～C₂₂、好ましくはC₁₂～C₁₈、より好ましくはC₁₆、脂肪族、好ましくはアルキル）、ジ短鎖（例えばC₁～C₃アルキル、好ましくはC₁～C₂アルキル）四級アンモニウム塩である。

20

【0102】

[00117]一級、二級および三級脂肪アミンの塩もまた、適切な陽イオン性界面活性物質である。こうしたアミンのアルキル基は、好ましくは約12～約22炭素原子を有し、そして置換されていてもまたは未置換であってもよい。本明細書で有用なこうしたアミンには、ステアルアミドプロピルジメチルアミン、ジエチルアミノエチルステアルアミド、ジメチルステアルアミン、ジメチルソイアミン、ソイアミン、ミリスチルアミン、トリデシルアミン、エチルステアリルアミン、N-タロウプロパンジアミン、エトキシ化（酸化エチレン5モルを伴う）ステアリルアミン、ジヒドロキシエチルステアリルアミン、およびアラキジルベヘニルアミンが含まれる。適切なアミン塩には、ハロゲン、酢酸、リン酸、硝酸、クエン酸、乳酸、およびアルキル硫酸塩が含まれる。こうした塩には、ステアリルアミン塩酸、塩化ソイアミン、ギ酸ステアリルアミン、二塩化N-タロウプロパンジアミン、クエン酸ステアルアミドプロピルジメチルアミン、塩化セチルトリメチルアンモニウム、および塩化ジセチルジアンモニウムが含まれる。本明細書の組成物において使用するために好ましいのは、塩化セチルトリメチルアンモニウム、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化テトラデシルトリメチルアンモニウム、塩化ジセチルジメチルアンモニウム、塩化ジココジメチルアンモニウムおよびその混合物である。より好ましいのは、塩化セチルトリメチルアンモニウムである。

30

【0103】

[00118]本開示の組成物にはまた、多様な非イオン性界面活性剤も含まれてもよい。適切な非イオン性界面活性剤の中には、糖またはデンプンポリマーと、C₈～C₃₀アルコールの縮合産物がある。これらの化合物は、式(S)_n-O-Rによって示され、式中、Sは糖部分、例えばグルコース、フルクトース、マンノース、およびガラクトースであり；nは約1～約1000の整数であり、そしてRはC₈～C₃₀アルキルである。R基が由来していてもよい適切なC₈～C₃₀アルコールの例には、デシルアルコール、セチルアルコール、ステアリルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、オレイルアルコール等が含まれる。これらの界面活性剤の特定の例には、デシルポリグルコシドおよびラウリルポリグルコシドが含まれる。

40

【0104】

[00119]他の適切な非イオン性界面活性剤には、酸化アルキレンと脂肪酸の縮合産物が

50

含まれる（すなわち脂肪酸の酸化アルキレンエステル）。これらの物質は、一般式 $\text{RCO}(\text{X})_n\text{OH}$ を有し、式中、Rは、 $\text{C}_{10} - \text{C}_{30}$ アルキルであり、Xは $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ （酸化エチレン由来）または $-\text{OCH}_2\text{CHCH}_3-$ （酸化プロピレン由来）であり、そしてnは、約1～約200の整数である。

【0105】

[00120]さらに他の適切な非イオン性界面活性剤は、式 $\text{RCO}(\text{X})_n\text{OOCR}$ を有する酸化アルキレンと脂肪酸の縮合産物であり（すなわち脂肪酸の酸化アルキレンジエステル）、式中、Rは $\text{C}_{10} - \text{C}_{30}$ アルキルであり、Xは $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ （酸化エチレン由来）または $-\text{OCH}_2\text{CHCH}_3-$ （酸化プロピレン由来）であり、そしてnは、約1～約200の整数である。さらに他の非イオン性界面活性剤は、一般式 $\text{R}(\text{X})_n\text{OR}'$ を有する酸化アルキレンと脂肪アルコールの縮合産物であり（すなわち脂肪アルコールの酸化アルキレンエーテル）、式中、Rは $\text{C}_{10} - \text{C}_{30}$ アルキルであり、nは、約1～約200の整数であり、そしてR'は、Hまたは $\text{C}_{10} - \text{C}_{30}$ アルキルである。

10

【0106】

[00121]さらに他の非イオン性界面活性剤は、式、 $\text{RCO}(\text{X})_n\text{OR}'$ を有する化合物であり、式中、RおよびR'は、 $\text{C}_{10} - \text{C}_{30}$ アルキルであり、Xは $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ （酸化エチレン由来）または $-\text{OCH}_2\text{CHCH}_3-$ （酸化プロピレン由来）であり、そしてnは、約1～約200の整数である。酸化アルキレン由来非イオン性界面活性剤の例には、セテス-1、セテス-2、セテス-6、セテス-10、セテス-12、セテアレ-2、セテアレ6、セテアレ-10、セテアレ-12、ステアレ-1、ステアレ-2、ステアレ-6、ステアレ-10、ステアレ-12、ステアリン酸PEG-2、ステアリン酸PEG4、ステアリン酸PEG6、ステアリン酸PEG-10、ステアリン酸PEG-12、グリセリルステアリン酸PEG-20、グリセリルタロウ酸PEG-80、グリセリルステアリン酸PPG-10、グリセリルココ酸PEG-30、グリセリルココ酸PEG-80、グリセリルタロウ酸PEG-200、ジラウリル酸PEG-8、ジステアリン酸PEG-10、およびその混合物が含まれる。さらに他の有用な非イオン性界面活性剤には、例えば本明細書に援用される米国特許第2,965,576号、第2,703,798号、および第1,985,424号に開示されるポリヒドロキシ脂肪酸アミドが含まれる。

20

【0107】

[00122]例示的な界面活性剤には、Tomadol 1200 (Air Products)、Tomadol 900 (Air Products)、Tomadol 91-8 (Air Products)、Tomadol 1-9 (Air Products)、Tergitol 15-S-9 (Sigma)、Tergitol 15-S-12 (Sigma)、Masurf NRW-N (Pilot Chemical)、Bio-Soft N91-6 (Stepan)、およびBrij-35 (ポリエチレングリコールドデシルエーテル) (Sigma) が含まれる。

30

【0108】

[00123]染色液のプリンティング前に、組織に固有の反応条件が、開示する染色法に関して、染色品質に影響を及ぼすことを示すため、顕微鏡スライド上にマウントされた4 μm 肝臓切片において、ヘマトキシリンのプリンティング前の異なる組織pHの体系的な研究を行った。組織に300 μL の緩衝溶液を適用し、そして次いで、第一の「洗浄（場合によるpH洗浄）適用」工程中、表8に記載するアッセイを用いて、試料上にヘマトキシリンおよびエオジンをプリンティングすることによって、組織切片のpHを設定した。図12Aは、組織の細胞質および細胞外領域の染色強度に対する、核における染色強度の比を比較する。これらの値の最適な比は、最適な染色条件に相当し、そしてpH増加に関して、全体の染色強度が増加すると仮定された（核に特異的なものおよび非特異的なヘマトキシリン染色の両方が増加するはずである）。pHがある点まで増加するにつれて、染色強度が全体的に増加するのは事実であるが、スケールの最高点、5のpHを持つ染色前緩衝液に関しては、全体の染色強度は許容しえないレベルまで減少した（図12B）。したが

40

50

って、次に最適な条件、3.5のpHの染色前緩衝液を選択した。この方法は、ユニークな組織タイプまたは異なる染色化学反応および生化学反応に関して、染色前組織緩衝条件をユニークに調節するよう拡張可能であった。

【0109】

[00124]表2は、2プリントヘッドシステムが、組織に緩衝pH溶液を送達する能力を詳述する。1つの態様において、分配しようとする溶液は、弱酸溶液および希水酸化ナトリウムである。この場合、各液体のプリントパターンのDPIを調節することによって、分配フィルムのpHを調節可能であった。これは、ヘマトキシリンプリンティング前の組織のpHが、染色強度および染色特異性の両方に影響を有することが見て取れる図12Bと関連する。インクジェット染色のこの適用は、プリント沈着中の2つの溶液のin situ混合のこの必要性を満たすために適している。

10

【0110】

表2：組織pHを設定する緩衝系の比率計測配合

【0111】

【表2】

バイナリプリント緩衝剤構成要素1	バイナリプリント緩衝剤構成要素2	体積比の例 (vol1:vol2)	プリント比の例 (dpi1:dpi2)	ターゲット pH	実際の pH
ギ酸, 189 mM	NaOH, 31 mM	1:1	500dpi : 500dpi	3	3.002
ギ酸, 189 mM	NaOH, 31 mM	1:2	460dpi : 650dpi	3.5	3.496
ギ酸, 189 mM	NaOH, 31 mM	1:3	370dpi : 640dpi	4	4.086
酢酸, 34.8 mM	NaOH, 38.8 mM	1:i	500dpi : 500dpi	4	4.094
酢酸, 34.8 mM	NaOH, 38.8 mM	10:17	460dpi : 600dpi	4.5	4.500
酢酸, 34.8 mM	NaOH, 38.8 mM	10:23	400dpi : 607dpi	5	5.083

20

【0112】

[00125]一次染色試薬組成物

30

[00126]一次染色試薬組成物の関連において、組成物は、色素、染色剤、または「一次染色剤」（この用語が本明細書に定義される通り）、粘性修飾剤、および表面張力修飾剤を含む。本明細書の特定の態様または例は、ヘマトキシリンまたはエオジンを含む一次染色組成物を指すことも可能であるが、当業者は、一次染色試薬組成物が、これらの特定の色素に限定されず、そして他の色素、染色剤、「一次染色剤」、または別の方式で、組織試料中の生物学的構造の視覚的コントラストを増進する剤が、限定なしに、同様の方式で配合可能であることを認識するであろう。

【0113】

[00127]いくつかの態様において、粘性修飾剤の量は、一次染色試薬組成物の総重量の約35%～約60%の範囲である。他の態様において、粘性修飾剤の量は、一次染色試薬組成物の総重量の約25%～約75%の範囲である。溶解された固体が含まれる（例えばPEG）、いくつかの態様において、粘性修飾剤の量は、一次染色試薬組成物の総重量の約2%～約60%の範囲であってもよい。溶解された固体が含まれる、他の態様において、粘性修飾剤の量は、一次染色試薬組成物の総重量の約0.1%～約2%の範囲であってもよい。

40

【0114】

[00128]いくつかの態様において、表面張力修飾剤の量は、一次染色試薬組成物の総重量の約0.01%～約0.5%の範囲である。他の態様において、表面張力修飾剤の量は、一次染色試薬組成物の総重量の約0.001%～約1%の範囲である。

【0115】

50

[00129]いくつかの態様において、一次染色試薬組成物は、1 c p ~ 約 4 0 c p の粘性を有する。他の態様において、一次染色試薬組成物は、6 c p ~ 約 1 0 c p の粘性を有する。いくつかの態様において、一次染色試薬組成物は、最大約 7 0 ダイン / c m の表面張力を有する。他の態様において、一次染色試薬組成物は、約 2 5 ダイン / c m ~ 約 4 5 ダイン / c m の表面張力を有する。

【 0 1 1 6 】

[00130]いくつかの態様において、一次染色試薬溶液は、1 またはそれより多い安定化剤および / または緩衝剤をさらに含む。いくつかの態様において、安定化剤には、塩化アルミニウム、硫酸アルミニウムが含まれる。いくつかの態様において、緩衝剤には、酢酸、炭酸、リン酸、T r i s - H C l、酢酸、t r i s 緩衝剤、およびリン酸緩衝剤が含まれる。一般的に、任意の一次染色試薬組成物内に含まれる安定化剤の量は、一次試薬染色組成物の総重量の約 1 % ~ 約 2 0 % の範囲である。同様に、任意の一次染色試薬組成物内に含まれる緩衝剤の量は、一次試薬染色組成物の総重量の約 0 . 5 % ~ 約 5 % の範囲である。

10

【 0 1 1 7 】

[00131] 巨大分子試薬組成物

[00132]いくつかの態様において、巨大分子試薬組成物は、生物学的分子（例えば抗体、抗体コンジュゲート、酵素、マルチマー等）、粘性修飾剤、および表面張力修飾剤を含む。いくつかの態様において、巨大分子試薬組成物は、1 またはそれより多いキャリアータンパク質（例えばウシ血清アルブミン、正常ヤギ血清）をさらに含む。いくつかの態様において、巨大分子試薬組成物は、緩衝剤および / または保存組成物をさらに含む。いくつかの態様において、巨大分子試薬組成物は、最大約 1 5 c p までの範囲の粘性を有する。他の態様において、巨大分子試薬組成物は、約 4 c p ~ 約 1 1 c p の範囲の粘性を有する。さらなる態様において、巨大分子試薬組成物は、約 4 c p ~ 約 7 c p の範囲の粘性を有する。いくつかの態様において、巨大分子試薬組成物は、約 2 0 ダイン / c m ~ 約 4 0 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する。他の態様において、巨大分子試薬組成物は、約 2 5 ダイン / c m ~ 約 3 5 ダイン / c m の範囲の表面張力を有する。

20

【 0 1 1 8 】

[00133]いくつかの態様において、粘性修飾剤の量は、巨大分子試薬組成物の総重量の約 1 % ~ 約 5 0 % の範囲である。他の態様において、粘性修飾剤の量は、巨大分子試薬組成物の総重量の約 2 5 % ~ 約 7 5 % の範囲である。いくつかの態様において、表面張力修飾剤の量は、巨大分子試薬組成物の総重量の約 0 . 0 1 % ~ 約 0 . 5 % の範囲である。他の態様において、表面張力修飾剤の量は、巨大分子試薬組成物の総重量の最大約 1 % の範囲である。当業者は、任意に含まれるキャリアータンパク質および / または一次抗体自体が、表面張力に影響を有する可能性があり、そしていくつかの態様において、表面張力の減少に寄与しうることを認識するであろう。当業者は、抗体試薬組成物内に含める、任意の表面張力修飾剤の量を決定する際に、この要素を考慮に入れることが可能であろう。

30

【 0 1 1 9 】

[00134]任意の巨大分子試薬組成物の部分でありうる抗体の限定されない例には、分化マーカーのクラスター（例えば C D 2 0、C D 3、C D 4、C D 8、C D 4 5、C D 2 5、C D 1 6 3 等）、K i - 6 7、E G F R、H E R 2、H P V、A L K、B R A F、O X - 4 0、P D - 1、I D L - 1、F o x P 3、および C T L A - 4 に特異的な抗体が含まれる。

40

【 0 1 2 0 】

[00135]任意の巨大分子試薬組成物の一部でありうる酵素の限定されない例には、西洋ワサビ（h o r s e r a d i s h）ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、または β -ラクタマーゼが含まれる。

【実施例】

【 0 1 2 1 】

50

[00136]

[00137] 続く限定されない例は、本開示の特定の態様をさらに例示することを意図する。

[00138] 実施例 1 - ヘマトキシリン配合物

表 3 : ヘマトキシリン配合物の 1 つの態様

【 0 1 2 2 】

【表 3】

成分	量 (g)	量 (wt%)	構成要素の説明
DI 水	152.3	57.07	
プロピレングリコール (~40% w/w)	101.6	38.07	粘性修飾剤
ヘマトキシリン色素	2.27	0.85	一次染色剤
ヨウ素酸ナトリウム	0.24	0.09	酸化剤
塩化アルミニウム六水和物	2.56	0.96	安定化剤
硫酸アルミニウム十六水和物	6.67	2.50	安定化剤
Tomadol 900 (5uL/mL, 0.98g/mL)	1.225	0.46	非イオン性界面活性剤
	266.865	100.00	

【 0 1 2 3 】

[00139] 実施例 1 の組成は、開示する圧電沈着法による分散に十分であることが見出された。組成物の最終 pH は約 2 . 2 2 であり；表面張力は約 3 0 ダイン / c m であり；そして粘性は約 5 c p であった。

【 0 1 2 4 】

[00140] インクジェット分配のためのヘマトキシリンの場合、いくつかの軽減が、この特定の染色剤の分配のための小滴形成プロセスの信頼性およびロバストネスを改善することが発見された。まず、配合物中の塩化アルミニウムの包含は、長鎖金属イオン複合体の不溶性による、自発的凝集および沈殿に対して、配合物の全体の安定性を改善した。

【 0 1 2 5 】

[00141] 第二に、より高い水分画を含む配合物に比較した際、混合物の蒸気圧を低下させることによって、空気に曝露した際、プロピレングリコールのかなりの分画が、ヘマトキシリン配合物の乾燥を減少させた。これらの改善はどちらも、インクジェット型要因にユニークに適したヘマトキシリン配合物を生成する際にターゲティングされる、非標準（または非伝統的）配合物特性を代表した。

【 0 1 2 6 】

[00142] インクジェット技術を含む機能的プリンティングの分野に共通するのは、別の液体で使用した後、プリントヘッドを通じてインクのかんりの体積をフラッシュして、システムをプライミングする必要があることである。これは、多数のインクリザーバーを通じてフィードされるプリントヘッドシステムの設計、およびその結果の大きなデッドボリュームから生じる。いくつかの設計において、これは、インクの 2 0 % を超えるロスに相当しうる。同様に、VENTANA HE 6 0 0 システムは、共有試薬マニホールドを有し、そしてページ/プライムサイクル中、総アッセイ体積の 3 0 % を超える量が消費される。インクジェット分配装置に関する開示される概念において、出願人は、これらの限界を克服する、カートリッジに基づくインクジェットシステムを利用した。プリンティングシステムにユニークな、そしてこれに合わせてカスタマイズされた試薬の補完的な配合物を調製することによって、ノズル汚染（すなわち小滴分配の失敗）の多くの供給源が軽減された。しかし、インクジェット試薬カートリッジの毎日の使用全体で、そして試薬インクジェットカートリッジの全寿命に渡って、信頼性がある分配完全性を維持するためには、1 日あたり 5 μ L またはそれ未満のプライムサイクルが適切であることもまた立証

された。

【 0 1 2 7 】

[00143]実施例 2 - 抗体配合物

表 4 : 抗体配合物の 1 つの態様

【 0 1 2 8 】

【表 4】

成分 (g)	量 (g)	量 (%wt)	構成要素の説明
水	117.77	46.99%	
グリセロール	125	49.87%	粘性修飾剤
Tris HCl	1.97	0.79%	緩衝剤
ProClin 300 (1.03g/ml)	0.26	0.10%	保存剤
ウシ血清アルブミン、第 V 分画	2.5	1.00%	キャリアータンパク質
正常ヤギ血清	2.5	1.00%	キャリアータンパク質
Bio-Soft N91-8 (1.020 g/ml)	0.64	0.26%	非イオン性界面活性剤
水酸化ナトリウム	必要に応じて	多様	pH 調節剤
一次抗体	多様	多様	活性染色構成要素
総計	250.64	100.00%	

10

20

【 0 1 2 9 】

[00144]実施例 2 の組成物は、開示する圧電沈着法による分散に十分であることが見いだされた。表面張力は、約 28 ダイン / cm であり ; そして粘性は約 7 c p であった。

[00145]実施例 3 - エオジン配合物

表 5 : エオジン配合物の 1 つの態様

【 0 1 3 0 】

【表 5】

成分 (g)	量 (g)	量 (%wt)	構成要素の説明
DI 水	204.8	39.17%	
プロピレングリコール (~60% w/w)	307.5	58.81%	粘性修飾剤
エオジン Y	3.8143	0.73%	色素
氷酢酸	5.5	1.05%	pH 調節剤
Tomadol 900 (2.5uL/mL, 0.98g/mL)	1.274	0.24%	非イオン性界面活性剤
	522.8883	100.00%	

30

【 0 1 3 1 】

[00146]実施例 3 の組成物は、開示する圧電沈着法による分散に十分であることが見いだされた。組成物の最終 pH は約 4.299 であり ; 表面張力は約 41 ダイン / cm であり ; 密度は 1.042 g / mL であり ; そして粘性は約 8.1 c p であった。

40

【 0 1 3 2 】

[00147]実施例 4 - 酵素 / マルチマー検出配合物

[00148]表 5 は、酵素 / またはマルチマー検出配合物の態様を示す。この特定の限定されない態様において、活性染色構成要素は、マウス抗ヒドロキノン西洋ワサビペルオキシダーゼ (抗 H Q H R P) であった。

【 0 1 3 3 】

表 6 : 酵素 / マルチマー検出配合物の 1 つの態様

【 0 1 3 4 】

50

【表 6】

成分	量 (g)	量 (%wt)	構成要素の説明
脱イオン水	50	49.25%	
プロピレングリコール (1.04 g/ml)	50	49.25%	粘性修飾剤
リン酸カリウム二塩基性	0.8785	0.87%	緩衝剤
リン酸ナトリウム一塩基性	0.138	0.14%	緩衝剤
塩化ナトリウム	0.16	0.16%	緩衝剤
液体 Brij, 30%	0.086	0.08%	界面活性剤
ヤギグロブリン	0.15	0.15%	キャリアタンパク質
B5 ブロッカー	0.068206	0.07%	ブロッカー、非特異的結合
ProClin 300 (1.03 g/ml)	0.02575	0.03%	保存剤
6N HCl / 6N NaOH	必要に応じて	必要に応じて	pH 調節剤
マウス抗 HQ HRP	0.025	0.025%	活性染色構成要素 (酵素仲介検出)
総計	101.531456	100.00%	

10

20

【 0 1 3 5 】

[00149] 実施例 5 - 巨大分子量粘性修飾剤を含む、代替抗体配合物

[00150] 本開示にしたがった代替抗体配合物を表 7 に示す。

表 7 : 代替抗体配合物

【 0 1 3 6 】

【表 7】

成分	量 (g)	量 (%wt)	構成要素の説明
脱イオン水	54.274	54.27%	
グリセロール	40	40.00%	粘性修飾剤
デキストラン (平均 MW 450 kD)	2	2.00%	粘性修飾剤
Tris HCl	0.95	0.95%	緩衝剤
ウシ血清アルブミン、第 V 分画	1.2	1.20%	キャリアタンパク質
正常ヤギ血清	1.2	1.20%	キャリアタンパク質
Bio-Soft N91-8 (1.020 g/ml)	0.256	0.26%	界面活性剤
ProClin 300 (1.03 g/ml)	0.12	0.12%	保存剤
6N NaOH	必要に応じて	必要に応じて	pH 調節剤
一次抗体	多様	多様	活性染色構成要素
総計	100	100.00%	

30

40

【 0 1 3 7 】

50

[00151] 実施例 6 - インクジェット沈着染色法への伝統的な染色法の比較

[00152] 本明細書に示すのは、慣用的な単一スライド染色（表 9）システムおよび本開示に記載する小滴オンデマンド分配手段（表 8）からのアッセイ例の比較である。どちらのアッセイ表も、オフライン脱パラフィン化プロセスならびにアッセイ完了後にカバースリップを掛ける手動ワークアップを仮定する。H & E 染色用の VENTANA HE 600 アッセイ（慣用的な単一スライド染色装置に相当する）は、インキュベーション時間のみを用いて、染色を調節する「ダイヤル合わせ」が可能である一方、インクジェット染色プロセスは、小滴沈着（すなわちインクジェット）染色プロセスにユニークないくつかの調節ポイントを提供する。第一に、図 4 A および 5 B に示すように、染色は、基本的に量で制限される一方、慣用的な染色システム上での染色強度の主な駆動因子は、インキュベーション時間である。実際、これは、慣用的染色装置の例において、アッセイ強度および特異性を「ダイヤル合わせ」する、カスタマーが対面する唯一の特徴である。

10

【 0 1 3 8 】

表 8：インクジェット染色アッセイスク립ト

【 0 1 3 9 】

【表 8 - 1】

アッセイ工程	体積 (μl)	液体プロセス	プロセス時間 (min)	活性時間 (min)	注
スライド温度を 40C に設定	-		-	-	アッセイ温度を用いて、染色強度を調節可能である
HW 初期化	-		0.6	0	スライド「パーク」から pH 洗浄まで（第一の位置、プリントヘッドのための高さ Z 調節が含まれる）
pH 洗浄を適用	300	バルク、組織上	0	0	ヘマトキシリンプリンティング前に、組織 pH を「設定」することによって、バックグラウンド/非特異的染色が軽減される。
液体を除去	-		0.180	0.100	液体を ~5uL まで除去する
ヘマトキシリンをプリント	2.5	1000 x 1000 プ リント、 10pL/滴	1.580	1.580	
インキュベーション	-		1.000	1.000	染色強度を駆動するためのインキュベーション工程は場合による
ヘマトキシリンをプリント	2.5	1000 x 1000 プ リント、 10pL/滴	1.580	1.580	
インキュベーション	-		1.000	1.000	
ヘマトキシリンをプリント	2.5	1000 x 1000 プ リント、 10pL/滴	1.580	1.580	組織上に複数回プリントすることによって、染色強度を調節することも可能である

10

20

30

40

【 0 1 4 0 】

【表 8 - 2】

アッセイ工程	体積 (μl)	液体プロセス	プロセス時間 (min)	活性時間 (min)	注
インキュベーション	-		1.000	1.000	
洗浄を適用 (場合によって pH 洗浄)	300	バルク、組織上	0.033	0.033	ブルーイング前に、未結合ヘマトキシリンを除去する。バックグラウンド染色を「クリーンアップ」することも可能である
インキュベーション	-		1.000	1.000	組織に渡る染色を均質化するための、場合による「浸漬」工程
液体を除去			0.180	0.100	
洗浄を適用	300	バルク、組織上	0.033	0.033	
インキュベーション	-		1.000	1.000	
液体を除去			0.180	0.100	
ブルーイングを適用	300	バルク、組織上	0.050	0.050	塩基性条件への pH 調節、ヘマトキシリンの特異的染色を組織上にロック
インキュベーション	-		0.500	0.500	
洗浄を適用	300	バルク、組織上	0.130	0.033	過剰なブルーイングを除去。pH を調節して、エオジン強度を調節するオプション
液体を除去			0.180	0.100	
洗浄を適用 (場合によって pH 洗浄)	300	バルク、組織上	0.033	0.033	
液体を除去			0.180	0.100	

10

20

30

40

【 0 1 4 1 】

【表 8 - 3】

アッセイ工程	体積 (μl)	液体プロセス	プロセス時間 (min)	活性時間 (min)	注
エオジンをプリント	2.5	1000 x 1000 プ リント, 10pL/滴	1.580	1.580	適用前に pH を管理すること によって、非常に明るくする ことも可能である。インキュ ベーション不要
洗浄を適用	300	バルク、 組織上	0.033	0.033	エオジンの 3 つの影への差別 化 (RBC、
液体を除去			0.180	0.100	
洗浄を適用	300	バルク、 組織上	0.033	0.033	過剰なエオジンの除去
液体を除去			0.180	0.100	
洗浄を適用	300	バルク、 組織上	0.033	0.033	
液体を除去			0.180	0.100	

10

20

【0142】

[00153]しかし、インクジェット染色システム上で、染色強度をダイヤル合わせするための一次駆動因子は、プリントパスの回数および DPI (インチあたりの滴) またはプリント領域の密度であり、これらはどちらも、沈着される染色材料の総量を調節する。図 4 A において、組織上のプリントパスの回数を増加させることによって、ヘマトキシリン強度を駆動し、そして同様に図 5 A において、組織上のさらなるプリント層の沈着によって、エオジン強度を同様に駆動する。表 8 に示すように、開示する染色プロセスの 1 つの態様に関して、アッセイ時間は固定される (沈着量での染色強度の「ダイヤル合わせ可能性」のため)、これは、多様である慣用的なプロセス (染色強度の「ダイヤル合わせ可能性」が、インキュベーション時間によって駆動されるため) とは対照的である。さらに、生じる液体浪費の量の有意な減少があり、慣用的なプロセスの約 14.24 mL から、インクジェット染色プロセスの態様に関する約 2.71 mL に低下した。この結果は、表 10 に示唆するように、インクジェット沈着システムでは、アッセイ体積の最小化が達成可能であることを強調する。

30

【0143】

表 9 : 慣用的な染色装置アッセイスク립ト

40

【0144】

【表 9 - 1】

アッセイ工程	体積 (uL)	液体プ ロセス	プロセ ス時間 (min)	注
染色装置空気温度を 45C に設定する	-		-	慣用的なシステムでは、固 定温度調節
洗浄、インキュベーシ ョン、液体を除去	1000.0 0	バルク	0.333	
洗浄、インキュベーシ ョン、液体を除去	1000.0 0	バルク	0.333	
ヘマトキシリン、イン キュベーション、液体 を除去	1350.0 0	バルク	多様, 1-10	1～10分間の間でありう るインキュベーション時間 を用いて、染色強度を駆動 する
洗浄、インキュベーシ ョン、液体を除去	1000.0 0	バルク	0.667	
酸性洗浄、インキュベ ーション、液体を除去	1200.0 0	バルク	多様, 0-3	多様であり、そしてまた染 色強度を減少させる、酸性 洗浄インキュベーション時 間を用いた、特異的染色が 駆動される
洗浄、インキュベーシ ョン、液体を除去	900.00	バルク	0.333	
ブルーイング、インキ ュベーション、液体を 除去	1050.0 0	バルク	0.500	
洗浄、インキュベーシ ョン、液体を除去	900.00	バルク	0.333	
エオジン、インキュベ ーション、液体を除去	1350.0 0	バルク	多様, 0.5-7	
洗浄、インキュベーシ ョン、液体を除去	1000.0 0	バルク	0.333	
洗浄	1000.0 0	バルク	0.333	
洗浄	1000.0 0	バルク	1.333	

10

20

30

40

【表 9 - 2】

アッセイ工程	体積 (μL)	液体プ ロセス	プロセ ス時間 (min)	注
液体間のパージ/プ ライミング工程総計 (ヘマトキシリン)	1870.6 1	-	-	慣用的なシステムでは、異 なる液体に交換する必要が ある
液体間のパージ/プ ライミング工程総計 (洗浄)	2100.9 9	-	-	慣用的なシステムでは、異 なる液体に交換する必要が ある
液体間のパージ/プ ライミング工程総計 (酸性洗浄)	650.14	-	-	慣用的なシステムでは、異 なる液体に交換する必要が ある
液体間のパージ/プ ライミング工程総計 (ブルーイング)	579.99	-	-	慣用的なシステムでは、異 なる液体に交換する必要が ある
液体間のパージ/プ ライミング工程総計 (エオジン)	610.78	-	-	慣用的なシステムでは、異 なる液体に交換する必要が ある

10

20

【0146】

[00154] 続く表 10 は、本開示の態様にしたがった、インクジェット沈着プロセスを例示する。VENTANA HE 600 プロセスと比較した際、インクジェット染色システムに関しては、染色強度をダイヤル合わせするための一次駆動因子は、プリントパスの回数および DPI (インチあたりの滴) またはプリント領域の密度であり、これらはどちら

30

【0147】

表 10 : インクジェットおよび慣用的アッセイの比較要約

【0148】

【表 10】

	慣用的 H&E	インクジェ ット H&E
総染色アッセイ時間(min)	6.00 to 24.50	14.24
総アッセイ体積 (mL)	19.11	2.71

40

【0149】

[00155] 短いインキュベーション期間は、なお、開示するインクジェット沈着プロセスを通じて染色するためのいくつかのプロセッシング工程の構成要素であるが、強いエオジン染色 (細胞質染色のため) の適用は、プリンティング後のいかなるさらなるインキュベーションも必要としない。任意の特定の理論によって束縛されることは望ましくないが、これは、染色が、非常に低体積の試薬を用いた際、量に制限されることを例示し、ならびに伝統的な染色技術と比較して、試薬が 100 倍減少してもなお、反応動力学が改善可能で

50

ある（染色時間の7分間から1分間への減少）という事実を例示すると考えられる。

【0150】

[00156] 実施例7：パージおよびクリーニング

[00157] インクジェットプリンティングの分野の2つの一般的なプラクティスは、プリントヘッドをパージし、そしてプロットして、液体をキャピラリー空間に流すよう誘導し、そして分配用のノズルをプライミングすることである。パージは、圧電または熱小滴生成要素を作動させずに、液体ジェットをノズルの外に出すための、インク容器内での陽圧適用を指す。パージはまた、閉塞（例えば固体結晶、タンパク質凝集物）を除去し、そしてノズルからの小滴の発動を可能にするためにも使用可能である。プロットは、プリントヘッドのノズル領域の外に、ウィッキングパッドを適用することを指す。これは、ノズルを通じて流動を誘導し、プリンティングのためにプライミングするか、またはプリントヘッド上のいかなる残渣液体もクリーンアップする。これらの方法の両方が、「よく振る舞う」液体（すなわち結晶化し、そしてノズルを閉塞させる傾向を持たない液体）を管理するため、現在のインクジェット染色システム上でも使用されている。

10

【0151】

[00158] インクジェット染色研究において、プリントヘッドのクリーニングおよび維持のいくつかの方法が、物理的または化学的処理を用いて開発された。一般的に、物理的処理は、より破壊的でなく、そして比較的容易に自動化可能であるため、好ましい方法であった。プリントヘッドの維持のため、湿った、局所的に高い湿度の環境は、ノズルでの結晶化または沈殿物形成を防止する際の重要な因子である。水およびグリコールの混合物を充填したプロットングパッドを、インクジェット染色システム上での長期保存中、ノズルプレートの上に乗せることによって、乾燥は軽減された。

20

【0152】

[00159] プrintヘッドからの結晶化物質のクリーニングに用いた、2つの有効な溶媒系は、3%過ヨウ素酸および過酸化水素/炭酸ナトリウムの混合物であった。どちらも、プリントノズルからの閉塞を除去する際に有効であった。

【0153】

[00160] 本明細書に言及され、そして/または出願データシートに列挙された、米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許刊行物は、その全体が本明細書に援用される。態様の側面は、必要であれば、多様な特許、出願および刊行物の概念を使用して、修飾し、さらなる態様を提供することも可能である。

30

【0154】

[00161] 本明細書の開示は、特定の態様に言及して記載されてきているが、これらの態様は本開示の原理および適用を単に例示することを理解しなければならない。したがって、付随する請求項によって定義されるような、本開示の精神および範囲から逸脱することなく、例示する態様に多数の修飾を行うことが可能であり、そして他のアレンジが考案可能であることが理解される。

【 図 1 - 1 】

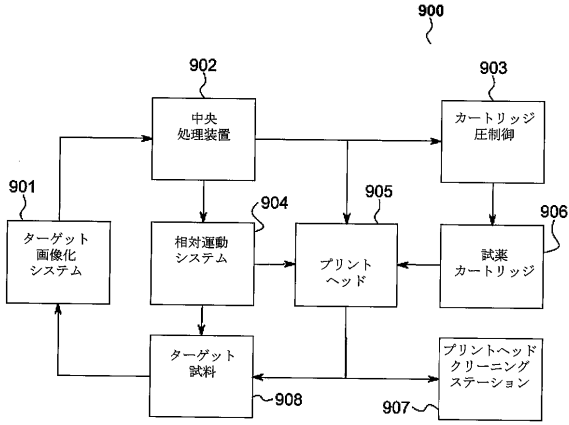


図 1 A

【 図 1 - 2 】

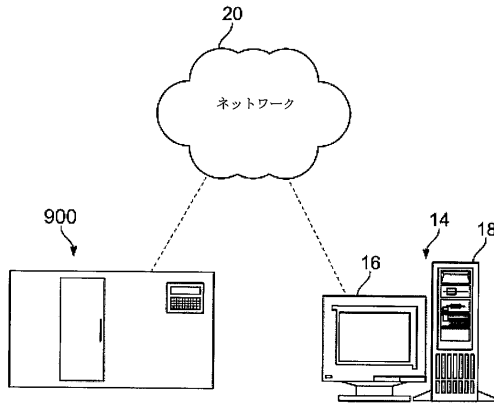


図 1 B

【 図 2 】

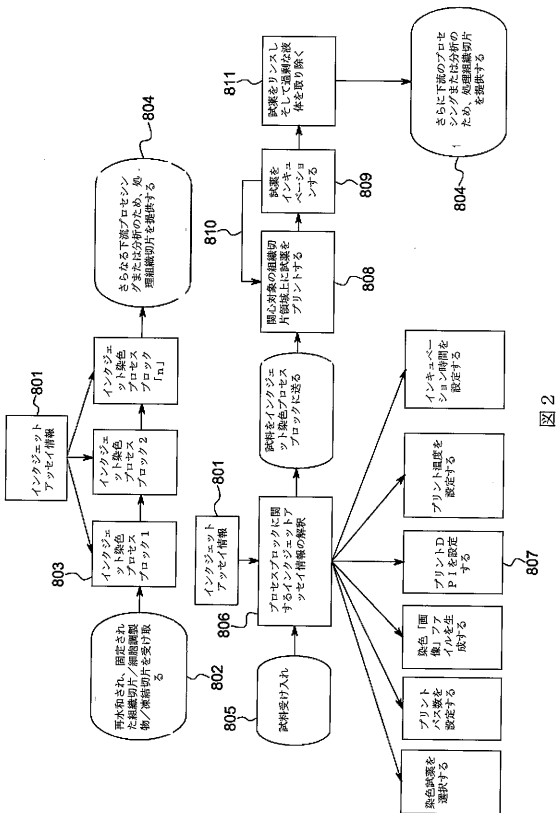


図 2

【 図 3 】

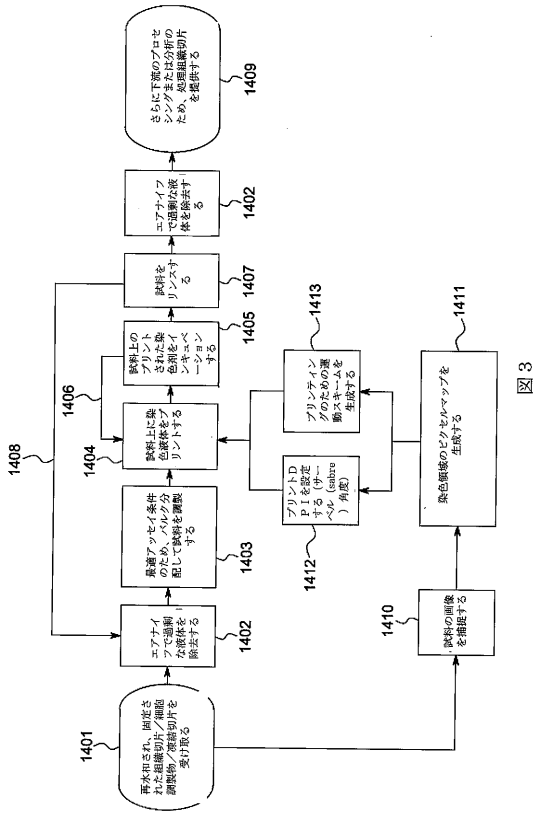


図 3

【 図 4 - 1 】

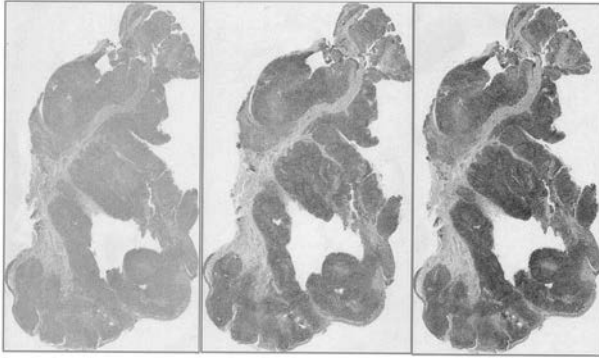


図 4 A

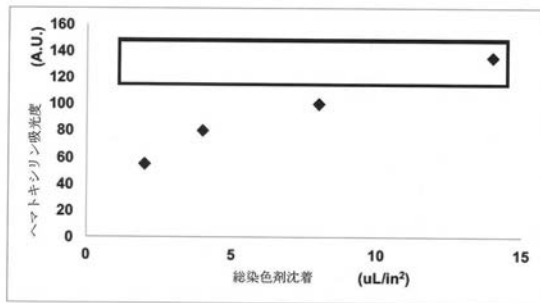


図 4 B

【 図 4 - 2 】

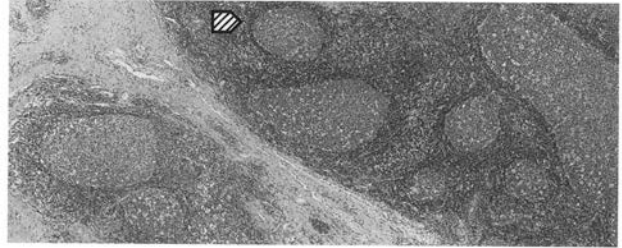


図 4 C

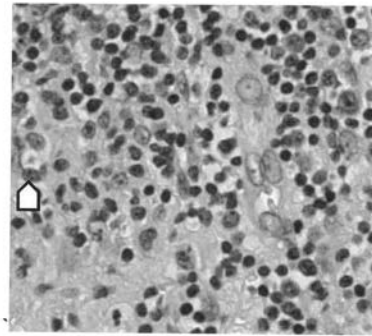


図 4 D

【 図 4 - 3 】

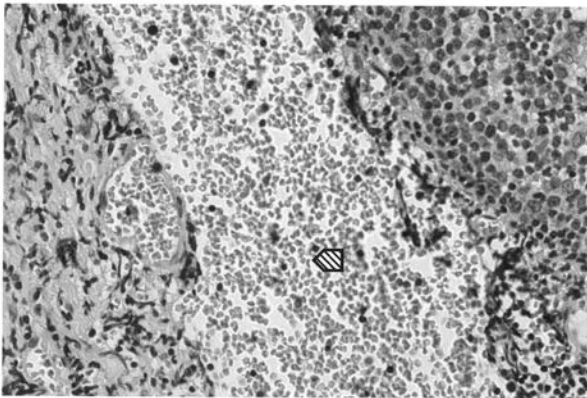


図 4 E

【 図 5 - 1 】



図 5 A

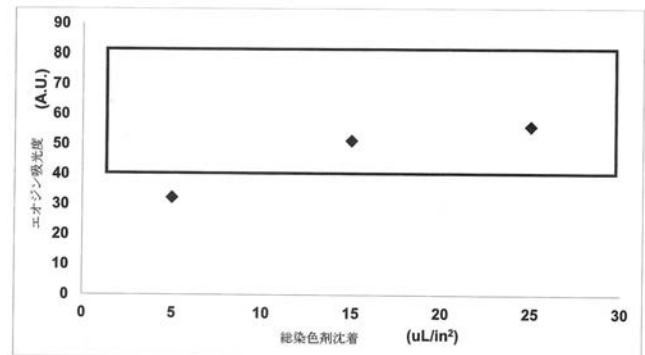


図 5 B

【 図 5 - 2 】

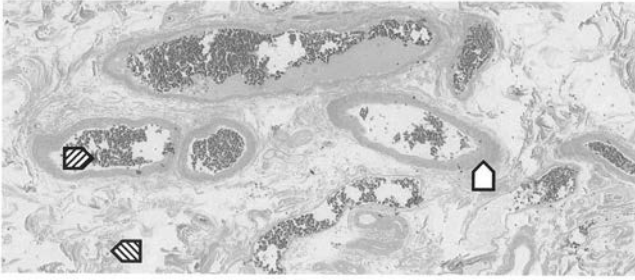


図 5 C

【 図 6 】

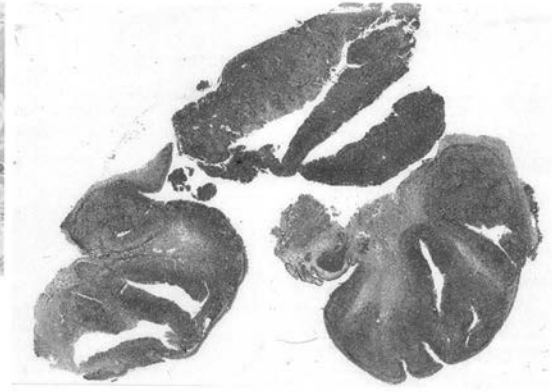


図 6 A

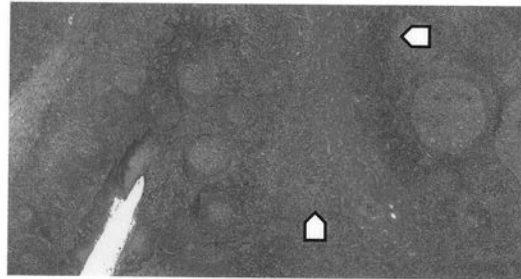


図 6 B

【 図 7 】

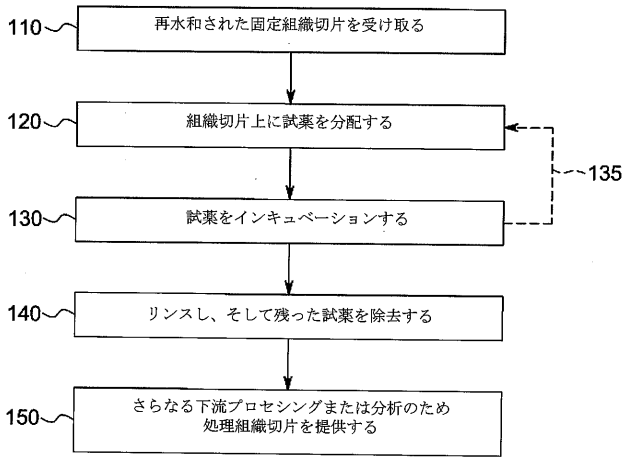


図 7

【 図 8 - 1 】

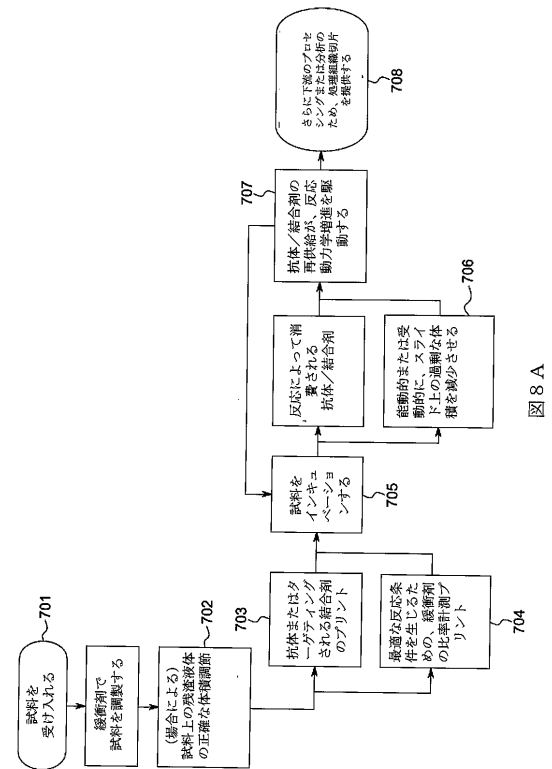


図 8 A

【 図 8 - 2 】

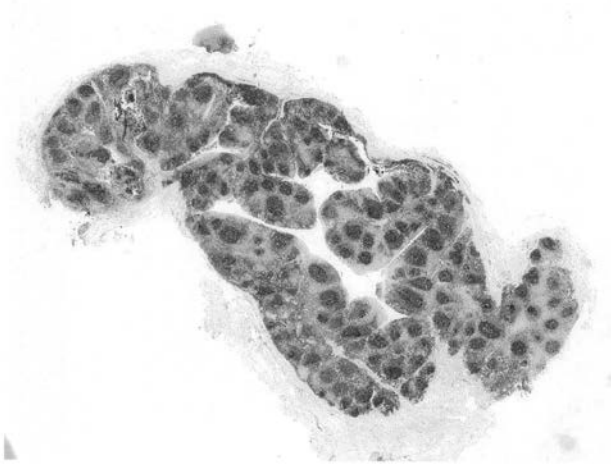


図 8 B

【 図 9 - 2 】

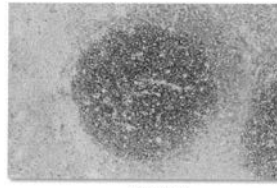


図 9 B

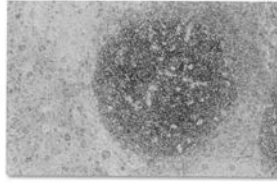


図 9 C

【 図 9 - 1 】

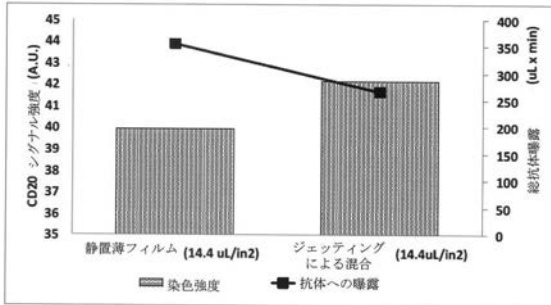


図 9 A

【 図 1 0 】

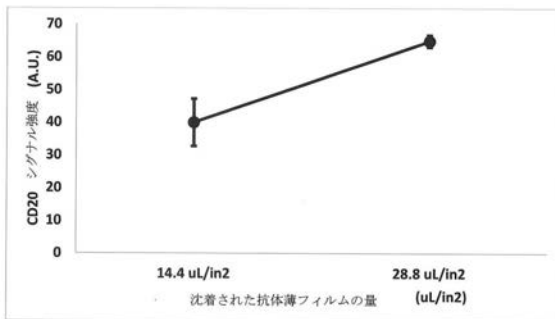


図 1 0 A

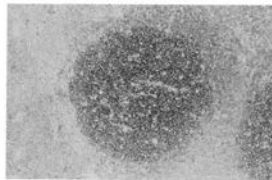


図 1 0 B

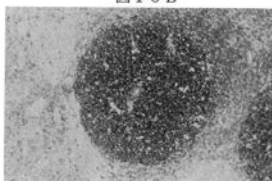


図 1 0 C

【 図 1 1 】

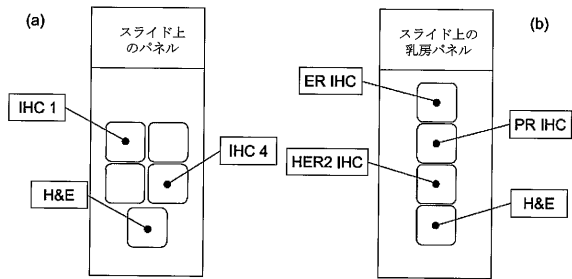


図 1 1

【 図 1 2 】

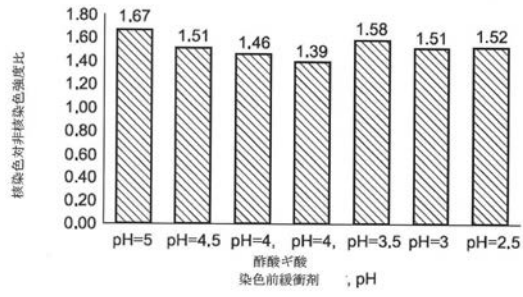


図 1 2 A

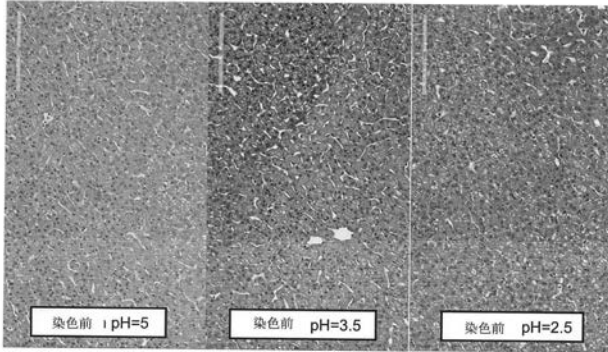


図 1 2 B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/058801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N1/31 G01N1/30 G01N35/10 ADD.		
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) G01N B01L B01J		
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) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/111610 A2 (ACCUPATH DIAGNOSTIC LAB INC [US]; BIODOT INC [US]; MOORE MATHEW [US];) 23 December 2004 (2004-12-23) paragraph [0002] paragraph [0013] paragraph [0018] paragraph [0032] - paragraph [0036] paragraph [0070] - paragraph [0071] paragraph [0091] - paragraph [0093] figures 1, 2	1-27, 57-59, 79-86, 89
Y	----- US 2003/143756 A1 (FISHER WILLIAM D [US] ET AL) 31 July 2003 (2003-07-31) paragraph [0040] ----- -/--	1-27, 57-59, 79-86, 89
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 June 2016		Date of mailing of the international search report 01/09/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Liefbrink, Feike

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/058801

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/046747 A1 (RICOH KK [JP]; BANNAI AKIKO [JP]; HORI EISUKE [JP]; GOTOH AKIHIKO [JP]) 4 May 2006 (2006-05-04) page 6, line 21 - page 7, line 5 -----	1-27, 57-59, 79-86,89
X	US 2003/081209 A1 (TAKAHASHI SATOSHI [JP] ET AL) 1 May 2003 (2003-05-01) paragraph [0013] - paragraph [0018] -----	57-59
X	WO 01/57254 A2 (CARTESIAN TECHNOLOGIES INC [US]) 9 August 2001 (2001-08-09) page 15, line 20 - line 24 page 12, line 26 - line 34 -----	57-59
A	US 5 658 802 A (HAYES DONALD J [US] ET AL) 19 August 1997 (1997-08-19) column 2, line 48 - line 59 -----	1-27, 57-59, 79-86,89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/058801**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-27, 57-59, 79-86, 89

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2016/ 058801

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-27, 57-59, 79-86, 89

A method of dispensing reagent droplets onto a biological sample.

2. claims: 28-44(completely); 60, 61(partially)

A primary stain composition.

3. claims: 45-56(completely); 60, 61(partially)

A large molecule staining composition.

4. claims: 62-78, 90

Staining a tissue sample by dispensing a staining reagent and using a droplet-on-demand dispensing mechanism.

5. claims: 87, 88

A computer implemented method for imaging a slide and depositing a staining reagent.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/058801

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004111610 A2	23-12-2004	CA 2529016 A1	23-12-2004
		EP 1654346 A2	10-05-2006
		US 2005003458 A1	06-01-2005
		US 2010273680 A1	28-10-2010
		US 2014005060 A1	02-01-2014
		US 2015119283 A1	30-04-2015
		WO 2004111610 A2	23-12-2004
US 2003143756 A1	31-07-2003	EP 1334768 A2	13-08-2003
		US 2003143756 A1	31-07-2003
WO 2006046747 A1	04-05-2006	CN 101048287 A	03-10-2007
		EP 1805027 A1	11-07-2007
		KR 20070085423 A	27-08-2007
		US 2008094458 A1	24-04-2008
		WO 2006046747 A1	04-05-2006
US 2003081209 A1	01-05-2003	JP 3902939 B2	11-04-2007
		JP 2003130866 A	08-05-2003
		US 2003081209 A1	01-05-2003
WO 0157254 A2	09-08-2001	AU 3473901 A	14-08-2001
		US 2002064482 A1	30-05-2002
		WO 0157254 A2	09-08-2001
US 5658802 A	19-08-1997	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . M A T L A B

(74)代理人 100157923

弁理士 鶴喰 寿孝

(72)発明者 グロール, ヘニング

アメリカ合衆国アリゾナ州85737, トゥーソン, ノース・ソーンブッシュ・ドライブ 11895

(72)発明者 ボラスク, メリンダ・ジェイ

アメリカ合衆国アリゾナ州85623, オラクル, イースト・マラソン・ウェイ 2136

(72)発明者 コジコウスキ, レイモンド・ティー, ザ・サード

アメリカ合衆国アリゾナ州85718, ツーソン, イースト・キャンベル・テラス 1936

(72)発明者 クレイン, エリック・エル

アメリカ合衆国アリゾナ州85742, ツーソン, ウェスト・サファロ・ディヴァイド 3051

(72)発明者 パルシュツィク, チャナ・アール

アメリカ合衆国アリゾナ州85705, ツーソン, ノース・クロリー・レーン 5257

(72)発明者 ハザー, メリス

アメリカ合衆国アリゾナ州85719, ツーソン, ノース・リリート・クリーク・プレース 4239

(72)発明者 タークル, ラヴィラジ

アメリカ合衆国インディアナ州47906, ウェスト・ラファイエット, シカモア・レーン 2450

Fターム(参考) 2G045 BB24 CB01 FB16

2G052 DA07 FA09 FA10 HC26 HC27 HC29

专利名称(译)	用于组织学样品的喷墨沉积试剂		
公开(公告)号	JP2018517895A	公开(公告)日	2018-07-05
申请号	JP2017554833	申请日	2016-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统公司		
[标]发明人	グロールヘニング ポラスクメリンダジェイ コジコウスキレイモンドティーザサード クレインエリックエル パルシュツイクチャナアール ハザーメリス タークルラヴィラジ		
发明人	グロール,ヘニング ポラスク,メリンダ・ジェイ コジコウスキ,レイモンド・ティー,ザ・サード クレイン,エリック・エル パルシュツイク,チャナ・アール ハザー,メリス タークル,ラヴィラジ		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N1/30 G01N1/312 G01N35/1002 G01N35/1016 G01N2001/317 G01N2035/1041 G01N33/53 G01N35/1011 G01N2001/302		
FI分类号	G01N1/30 G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/FB16 2G052/DA07 2G052/FA09 2G052/FA10 2G052/HC26 2G052/HC27 2G052/HC29		
代理人(译)	山本修 宮前徹 中西 基晴 鶴喰 寿孝		
优先权	62/150122 2015-04-20 US		
其他公开文献	JP2018517895A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于将试剂液滴沉积在细胞或组织样品上的装置和方法。样品可以具有保护性液体层，液滴的体积在约1pL至约50pL之间，pH调节剂分布在样品上，并且液滴在约5m/s至约15m/s之间。液滴具有大于 9.52×10^{-10} 焦耳的动能，并且沉积在样品上的试剂的空间密度在约50dpi至约1200dpi的范围内。还公开了适合通过按需液滴系统分配的试剂组合物，其中所述试剂组合物包含初级染色试剂组合物，抗体试剂组合物和大分子染色组合物。从组中选择。还公开了喷墨沉积系统和用于使载有样品的载玻片成像的装置。

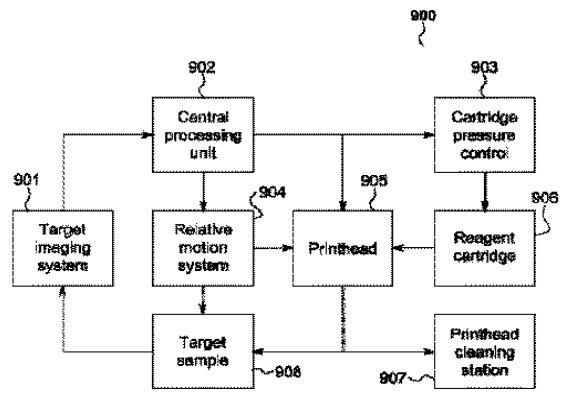


FIG. 1A