

(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2017-518516

(P2017-518516A)

(43) 公表日 平成29年7月6日(2017.7.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Y
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574	
	GO 1 N 33/543	5 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2017-514967 (P2017-514967)	(71) 出願人	511286517 ヴェンタナ メディカル システムズ、 インク。 アメリカ合衆国 アリゾナ 85755, ツーソン, イースト イノベーション ン パーク ドライブ 1910
(86) (22) 出願日	平成27年5月29日 (2015. 5. 29)	(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(85) 翻訳文提出日	平成29年1月24日 (2017. 1. 24)	(72) 発明者	ニッタ, ヒロ アメリカ合衆国 アリゾナ 85718, ツーソン, ノース ハシエンダ デル ソル ロード 5250
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/061922		
(87) 国際公開番号	W02015/181343		
(87) 国際公開日	平成27年12月3日 (2015. 12. 3)		
(31) 優先権主張番号	62/005, 701		
(32) 優先日	平成26年5月30日 (2014. 5. 30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-L1 について染色された腫瘍組織の改善されたスコア化のための多重アッセイ

## (57) 【要約】

PD-L1 で染色される腫瘍組織の改善されたスコア化のための多重アッセイが開示され、この方法は、第1の色でのPD-L1染色と、一又は複数の差別化マーカー、例えば腫瘍細胞に特異的なマーカー及び免疫細胞に特異的なマーカーの染色を特徴とする。腫瘍細胞と免疫細胞の差別化により、治療目的での、スコア化の容易度、スコア化の精度及び速さ、並びにPD-L1陽性試料のスコア化の再現性が改善される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腫瘍組織試料中の P D - L 1 の多重標識化方法であって：  
組織試料を抗 P D - L 1 一次抗体と接触させること；及び  
同組織試料を

- ・腫瘍細胞に特異的なマーカーに対する一次抗体；又は
- ・免疫細胞に特異的なマーカーに対する一次抗体；又は
- ・腫瘍細胞に特異的なマーカーに対する一次抗体及び免疫細胞に特異的なマーカーに対する抗体

と接触させること；及び

10

組織試料中の抗体の各々を、一次抗体の各々に対応する検出可能なシグナルを生成する試薬を用いて可視化すること

を含み、ここで抗 P D - L 1 抗体は第 1 の検出可能なシグナルを有し、腫瘍細胞に特異的なマーカーに対する抗体は、第 1 の検出可能なシグナルから区別可能な第 2 の検出可能なシグナルを有し、且つ免疫細胞に特異的なマーカーに対する抗体は、第 1 の検出可能なシグナル及び第 2 の検出可能なシグナルから区別可能な第 3 の検出可能なシグナルを有する、方法。

## 【請求項 2】

腫瘍細胞に特異的なマーカーが、サイトケラチン、クロモグラニン、シナプトフィジン、C D 5 6、甲状腺転写因子 - 1 ( T T F - 1 )、p 5 3、白血球共通抗原 ( L C A )、ビメンチン、及び平滑筋アクチンからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 3】

免疫細胞に特異的なマーカーが、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 9、C D 2 0、C D 1 1 c、C D 1 2 3、C D 5 6、C D 1 4、C D 3 3、又は C D 6 6 b からなる群より選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

免疫細胞に特異的なマーカーが T 細胞マーカー又は B 細胞マーカーである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

組織試料が、腫瘍細胞に特異的なマーカーに対する抗体及び免疫細胞に特異的なマーカーに対する抗体と接触させられ、ここで腫瘍細胞に特異的なマーカーに対する抗体がパンケラチン抗体であり、免疫細胞に特異的なマーカーに対する抗体が抗 C D 4 抗体である、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

抗 P D - L 1 抗体が S P 2 6 3 又は S P 1 4 2 である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

第 1、第 2 及び第 3 の検出可能なシグナルが色素原によって生成される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

40

第 1 の検出可能なシグナルが、

- ・組織試料を、抗 P D - L 1 一次抗体を認識するホースラディッシュペルオキシダーゼ ( H R P ) コンジュゲート二次抗体と接触させること；
- ・H R P を 3 , 3 ' - ジアミノベンジジン ( D A B ) と反応させて褐色を生成すること

により生成され、

第 2 の検出可能なシグナルが、

- ・試料を、腫瘍細胞に特異的なマーカーに対する一次抗体を認識するアルカリホスファターゼ ( A P ) 標識化抗体と接触させること；
- ・A P をファストレッド色素原及びナフトールと反応させて赤色を生成すること

50

により生成され；且つ

第 3 の検出可能なシグナルが、

- ・ 試料を、免疫細胞に特異的なマーカーに対する一次抗体を認識する H R P コンジュゲート二次抗体と接触させること；
- ・ H R P を H R P - グリーン色素原と反応させて緑色を生成すること

により生成される、

請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

第 1、第 2 及び / 又は第 3 の検出可能なシグナルが、増幅されたシグナルである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 10】

増幅されたシグナルがチラミドシグナル増幅により生成される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

試料を一次抗体と接触させることが、同時に実施される、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

試料を一次抗体と接触させることが、連続的に実施される、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

組織試料を対比染色することを更に含み、対比染色が、第 1、第 2、及び第 3 の検出可能なシグナルから区別可能な第 4 の検出可能なシグナルを生成する、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 14】

対比染色がヘマトキシリンを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

第 5 の検出可能なシグナルが、第 1 の検出可能なシグナルと第 2 の検出可能なシグナルの重複により生成される、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

第 6 の検出可能なシグナルが、第 1 の検出可能なシグナルと第 3 の検出可能なシグナルの重複により生成される、請求項 15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

腫瘍試料中における P D - L 1 発現をスコア化する方法であって、腫瘍組織試料を請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の方法に従って標識することと、腫瘍細胞、免疫細胞、若しくは両方における P D - L 1 発現をスコア化することを含み、ここで第 1 及び第 2 の検出可能なシグナルの共局在により、P D - L 1 陽性腫瘍細胞の存在が示され、第 1 及び第 3 の検出可能なシグナルの共局在により P D - L 1 陽性免疫細胞の存在が示される、方法。

【請求項 18】

P D - L 1 陽性腫瘍細胞と P D - L 1 陰性腫瘍細胞の総数が定量化される、請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 19】

約 10 % を上回る腫瘍細胞に P D - L 1 の染色が検出された場合に腫瘍が P D - L 1 陽性とスコア化される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

約 50 % を上回る腫瘍細胞に P D - L 1 の染色が検出された場合に腫瘍が P D - L 1 陽性とスコア化される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

P D - L 1 陽性免疫細胞と P D - L 1 陰性免疫細胞の総数が定量化される、請求項 17 に記載の方法。

50

## 【請求項 2 2】

約 10% を上回る免疫細胞に PD-L1 の染色が検出された場合に腫瘍が PD-L1 陽性とスコア化される、請求項 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

約 50% を上回る免疫細胞に PD-L1 の染色が検出された場合に腫瘍が PD-L1 陽性とスコア化される、請求項 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

PD-L1 陽性免疫細胞、PD-L1 陽性腫瘍細胞、及び PD-L1 陰性腫瘍細胞が定量化されて PD-L1 値が生成され、ここで：

$PD-L1 \text{ 値} = PD-L1 \text{ 陽性腫瘍細胞} / (PD-L1 \text{ 陰性腫瘍細胞} + PD-L1 \text{ 陽性免疫細胞})$  であり、

上式中：

PD-L1 陽性腫瘍細胞は、第 1 及び第 2 の検出可能なシグナルの両方について染色された細胞の数を数えることにより、又は第 1 の検出可能なシグナルが第 2 の検出可能なシグナルに関連付けられる組織試料の面積を計算することにより計算され；

PD-L1 陰性腫瘍細胞は、第 2 の検出可能なシグナルのみについて染色された細胞の数を数えることにより、又は第 2 の検出可能なシグナルが第 1 の検出可能なシグナルに関連付けられない組織試料の面積を計算することにより計算され；且つ

PD-L1 陽性免疫細胞は、第 1 及び第 3 の検出可能なシグナルの両方について染色された細胞の数を数えることにより、又は第 1 の検出可能なシグナルが第 3 の検出可能なシグナルに関連付けられる組織試料の面積を計算することにより計算される、

請求項 1 7 に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

PD-L1 陽性腫瘍細胞中における PD-L1 染色の強度をスコア化すること、及び Hスコアを計算することを更に含み、ここで：

$H \text{ スコア} = 1 * (\text{強度 } 1 + \text{での PD-L1 陽性腫瘍細胞染色のパーセンテージ}) + 2 * (\text{強度 } 2 + \text{での PD-L1 陽性腫瘍細胞染色のパーセンテージ}) + 3 * (\text{強度 } 3 + \text{での PD-L1 陽性腫瘍細胞染色のパーセンテージ})$

である、請求項 1 7 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の交互参照

[0001] 本出願は、2014年5月30日出願の米国特許出願第 62 / 005701 号の利益を主張し、この出願はその全体が参照により本明細書に援用される。

## 【0002】

発明の分野

[0001] 本開示内容は、腫瘍組織における PD-L1 の発現を組織化学的に検出及びスコア化するための材料及び方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

関連技術の説明

[0002] プログラム死 (Programmed death) 1 (PD-1) は、受容体の CD28 ファミリーのメンバーであり、これには CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、及び BTLA が含まれる。PD-1 には、PD-L1 及び PD-L2 という二つの細胞表面糖タンパク質リガンドが同定されており、PD-1 に結合すると T 細胞活性化とサイトカイン分泌を下方制御することが示されている (Freeman et al., J Exp Med 192:1027-34 (2000); Latchman et al., Nat Immunol 2:261-8 (2001); Carter et al., Eur J Immunol 32:634-43 (2002); Ohigashi et al., Clin Cancer Res 11:2947-53 (2005))。PD-L1 (B7-H1) 及び PD-L2 (B7-DC) は共に、PD-

10

20

30

40

50

1 に結合するが、他の CD 28 ファミリーメンバーには結合しない B7 ホモログである。

【 0 0 0 4 】

[0003] PD-L1 - PD1 経路は、いくつかの免疫応答の負の調節に関与しており、末梢トランスの調節に重要な役割を担っていると思われる。PD-L1 と PD1 の相互作用の結果、TCR 媒介性増殖及びサイトカイン生成が阻害される。PD-L1 は、抗原特異的 T 細胞クローンのアポトーシスを増加させることにより、腫瘍免疫に寄与することが示唆されている (Dong et al. Nat Med 8:793-800 (2002))。実際、PD-L1 の発現は、ヒトの肺癌、卵巣癌及び結腸癌並びに様々な骨髄腫を含む、複数のマウス及びヒトのがんに見出された (Iwai et al. PNAS 99:12293-7 (2002); Ohigashi et al. Clin Cancer Res 11:2947-53 (2005))。したがって、生物学的試料中の PD-L1 タンパク質の量を測定することは、がん病変の早期検出を助け、PD-L1 タンパク質の結合を阻害する治療薬の有効性及び耐性の評価を助ける可能性がある。

10

【 0 0 0 5 】

[0004] しかしながら、PD-L1 タンパク質の発現のがんの正確な予測因子としての使用及び / 又は抗 PD-1 及び抗 PD-L1 指向性療法の有効性は、課題として残っている。例えば、多くの腫瘍試料が、腫瘍細胞と免疫細胞の両方に PD-L1 染色を示す。これら二つの細胞種の差別化は、特に同じ試料中に両者が存在するとき、病理学者にとって困難である。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 6 】

[0005] 本発明は、PD-L1 で染色された腫瘍組織の改善されたスコア化のための多重アッセイを主題とする。本アッセイは、第 1 の色での PD-L1 染色、腫瘍細胞又は免疫細胞に特異的な差別化マーカーの第 2 の色での染色、及び任意選択的に、腫瘍細胞又は免疫細胞に特異的な第 2 の差別化マーカーの第 3 の色での染色を特徴とする。本発明のアッセイは、PD-L1 陽性腫瘍細胞と PD-L1 陽性免疫細胞の差別化を助ける。これは、PD-L1 のみで染色された試料のスコア化と比較して、試料のスコア化を迅速且つ正確に、再現性を高めて行う能力を向上させうる。

20

【 0 0 0 7 】

[0006] 本明細書に記載される任意の特徴又は特徴の組み合わせは、そのような組み合わせのいずれかに含まれる特徴が、文脈、本明細書、及び当業者の知識から明らかとなるように、相互に矛盾しない限りにおいて、本発明の範囲に含まれる。本発明の更なる利点及び態様は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかとなる。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 8 】

【 図 1 】 [0007] NSCLC 腫瘍試料の染色を示している。PD-L1 染色は (a) によって示されており、カラー画像において褐色で示される。パンケラチン抗体由来のサイトケラチンは (b) によって示されており、カラー画像では赤である。免疫細胞の CD4 は (c) によって示されており、カラー画像では青 / 緑である。対比染色は希釈されたヘマトキシリンである。

【 発明を実施するための形態 】

40

【 0 0 0 9 】

[0008] 本開示内容は、概して、腫瘍細胞、免疫細胞、又は両方における PD-L1 発現のスコア化を容易にするための、腫瘍試料標識化の組織化学的又は細胞化学的方法に関する。簡潔に説明すると、細胞は、PD-L1 に特異的な結合要素と：(1) 少なくとも一つの腫瘍細胞マーカー；(2) 少なくとも一つの免疫細胞マーカー；又は(3) 少なくとも一つの腫瘍細胞マーカー及び少なくとも一つの免疫細胞マーカーとで標識される。この結合要素は次いで、少なくとも三つの異なる検出可能なシグナル：即ち、PD-L1 結合要素の位置と相関する第 1 の検出可能なシグナル；腫瘍細胞に特異的な結合要素の位置と相関する第 2 の検出可能なシグナル；及び免疫細胞マーカーの位置と相関する第 3 の検出可能なシグナルを生成することによって、腫瘍試料中において可視化される。検出可能な

50

各シグナルは、互いに区別可能である。任意選択的に、第4の検出可能なシグナルでの対比染色を行ってもよく、及び/又は第5の検出可能なシグナルを、第1、第2及び第3の検出可能なシグナルのいずれか二つの共局在から生成してもよい。

【0010】

[0009]腫瘍試料

[0010]本方法は、例えば、新鮮凍結、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料、細胞学的スミア(子宮頸部スミア)、循環性腫瘍細胞の単離物などを含む、組織化学的又は細胞化学的分析に適した腫瘍試料と適合する。

【0011】

[0011]腫瘍細胞マーカー及び免疫細胞マーカー

[0012]非腫瘍細胞から腫瘍細胞を区別することのできる任意のマーカーを使用することができる。腫瘍細胞に特異的なバイオマーカーの例には、限定されないが：パンケラチン抗体で検出可能なサイトケラチン(例えば、塩基性サイトケラチン、酸性サイトケラチンの多く)、その他のサイトケラチン、例えばサイトケラチン7(CK7)及びサイトケラチン20(CK20)、クロモグラニン、シナプトフィジン、CD56、甲状腺転写因子-1(TTF-1)、p53、白血球共通抗原(LCA)、ビメンチン、平滑筋アクチンなどが含まれる(例えば、Capelozzi, V., J Bras Pneumol. 2009;35(4):375-382参照)。

10

【0012】

[0013]非免疫細胞から免疫細胞を区別することのできる任意のマーカーを使用することができる。免疫細胞に特異的なバイオマーカーの例には、限定されないが：CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD11c、CD123、CD56、CD14、CD33、又はCD66bが含まれる。一実施例では、リンパ球に特異的なマーカーが使用される。例えば、T細胞に特異的なマーカー、例えばCD3、CD4、若しくはCD8、又はB細胞に特異的なマーカー、例えばCD19若しくはCD20を使用することができる。

20

【0013】

[0014]特定の一実施態様では、免疫細胞マーカーはCD4であり、腫瘍細胞マーカーはパンサイトケラチン抗体によって検出可能なサイトケラチンである。

【0014】

[0015]結合要素

[0016]組織化学及び細胞化学は、顕微鏡で可視化できる方式で、バイオマーカーに特異的に結合する分子を用いて試料を標識化することにより、無傷細胞の状況においてバイオマーカーを同定するためにしばしば使用される技術である。免疫組織化学(IHC)及び免疫細胞化学(ICC)は、バイオマーカーを標識するために抗体を用いる組織化学及び細胞化学の種類である。in situハイブリダイゼーション(ISH)は、組織又は細胞試料中の特定のヌクレオチド配列を標識するために核酸プローブを用いる組織化学又は細胞化学の種類である。組織環境又は細胞環境の状況においてバイオマーカーを同定することにより、バイオマーカーと、細胞又は組織試料の他の形態的又は分子的特徴の空間的相互関係を解明することができ、これにより他の分子的又は細胞的技術からは明らかでない情報が明らかになりうる。

30

40

【0015】

[0017]本明細書において使用される用語「結合要素」は、組織化学的又は細胞化学的分析に適した腫瘍試料中の特定の分子構造に特異的に結合することのできる任意の化合物又は組成物を指す。例には、抗体及びその抗原結合断片、並びに遺伝子操作された特異的結合構造が含まれ、これには、ADNECTIN(10番目のFN3フィブロネクチンベースの足場; Bristol-Myers-Squibb Co.)、AFFIBODY(黄色ブドウ球菌由来のプロテインAのZドメインベースの足場; Affibody AB, Solna, Sweden)、AVIMER(ドメインA/LDL受容体ベースの足場; Amgen, Thousand Oaks, CA)、dAb(VH又はVL抗体ドメイ

50

ンベースの足場；GlaxoSmithKline PLC, Cambridge, UK), DARPIn (アンキリンリピートタンパク質ベースの足場；Molecular Partners AG, Zurich, CH)、ANTICALIN (リポカリンベースの足場；Pieris AG, Freising, DE)、NANOBODY (VHH (ラクダ科のIg)ベースの足場；Ablynx N/V, Ghent, BE)、TRANS-BODY (トランスフェリンベースの足場；Pfizer Inc., New York, NY)、SMIP (Emergent Biosolutions, Inc., Rockville, MD)、及びテトラネクチン (C型レクチンドメインベースの足場 (CTLD)、テトラネクチン；Borean Pharma A/S, Aarhus, DK) が含まれる。このような遺伝子操作された特異的結合構造の説明は、Wurch et al., Development of Novel Protein Scaffolds as Alternatives to Whole Antibodies for Imaging and Therapy: Status on Discovery Research and Clinical Validation, Current Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 9, pp. 502-509 (2008) に概説がある。

10

#### 【0016】

[0018]一実施態様では、結合要素は、抗体又はその抗原結合断片である。本明細書において使用される用語「抗体」は、所望の生物又は結合活性を呈する抗体の任意の形態を指す。したがって、この用語は最も広い意味で使用され、限定しないが、具体的にモノクローナル抗体 (完全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体)、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、キメラ抗体及びラクダ化された単ドメイン抗体を網羅する。

20

#### 【0017】

[0019]本明細書において使用される場合、別途指示がない限り、「抗体断片」又は「抗体結合断片」は、抗体の抗原結合断片、即ち完全長抗体に結合した抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体断片、例えば一又は複数のCDR領域を保持する断片を指す。抗体結合断片の例には、限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片；ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子、例えば、sc-Fv；抗体断片から形成されたナノボディ及び多重特異性抗体が含まれる。

#### 【0018】

[0020]例示的抗PD-L1抗体には、SP263 (米国仮特許出願第62/004572号に十分に明らかにされている、Docket Number 32151 US、2014年5月29日出願、この出願の開示内容全体を参照により本明細書に包含する)、SP142 (Cat. # M4420、Spring Biosciences, Inc., Pleasanton, CA)、及びPD-L1 (E1L3N (登録商標))XP (登録商標) Rabbit mAb (Cat. # #13684；Cell Signaling Technologies, Inc., Danvers, MA) が含まれる。特定の実施態様では、PD-L1結合要素はSP263又はSP142であり、腫瘍細胞に特異的な結合要素はパンケラチン抗体であり、免疫細胞特異的結合要素は抗CD4抗体である。別の特定の実施態様では、PD-L1結合要素はSP142であり、腫瘍細胞に特異的な結合要素はパンケラチン抗体であり、免疫細胞特異的結合要素は抗CD4抗体である。

30

40

#### 【0019】

[0021]特異的結合要素の可視化

[0022]先述のように、本発明のアッセイは、外因性結合要素が試料に結合した位置と関連する検出可能なシグナルを生成するための、PD-L1の染色と、腫瘍及び免疫細胞マーカーのうちの一又は複数の染色を特徴とする。試料中の外因性結合要素に由来する検出可能なシグナルを生成する組織化学的及び細胞化学的方法は、当業者に周知であり、典型的には一又は複数の標識の適用を利用する。例示的標識には、発色性標識、蛍光性標識、発光性標識、放射測定標識などが含まれ、マーカー又は標的 (例えば、PD-L1、腫瘍細胞特異的マーカー、免疫細胞特異的マーカーなど) の認識のために使用される。標識は、当業者には周知であり、本明細書に記載される標識に限定されない。特定の実施態様で

50

は、検出可能なシグナルは、色素原の使用により生成される。

【0020】

[0023]一実施態様では、標識は、二次抗体の使用により適用される。例えば、結合要素は、PD-L1、免疫細胞マーカー、又は腫瘍細胞マーカーに特異的な一次抗体である。動物の複数の異なる種に由来する抗体が一次抗体として使用される場合、そのような抗体の種に特異的な二次抗体を使用して標識を適用することができる。別の実施例では、特定の結合要素が結合できる別個の部分を含むように一次抗体を修飾することができる。このような一次抗体の一例は、ハプテン化抗体（即ち、特定のハプテンを含有するように修飾された抗体）である。多くの異なるハプテンが既知であり、一次抗体の各々を、異なるハプテンを含有するように修飾することができ、異なる抗ハプテン抗体を使用して異なる一次抗体を特異的に標識することができる。

10

【0021】

[0024]別の実施態様では、検出可能なシグナルは増幅されうる。本明細書において使用されるシグナルは、一次抗体一つあたり、標準的な一次-二次抗体の構成を用いる場合より多くの標識が沈着するとき、「増幅される」。一般に称される一つの増幅方法はチラミドシグナル増幅であり、これはBobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J., and Litt, G. J. (1989) J. Immunol. Methods 125, 279-285に記載されている。一つの例示的实施態様では、国際公開第2013148498号に記載のチラミドシグナル増幅の修飾型が使用される。

【0022】

[0025]ここで図1を参照する。本発明は、PD-L1で染色される腫瘍組織の改善されたスコア化のための多重アッセイを特徴としている。本アッセイは、第1の色でPD-L1を染色するための工程（PD-L1は図1で褐色で示される）と、腫瘍細胞に特異的なマーカー及び/又は免疫細胞に特異的なマーカーを第2の及び/又は第3の差別化色で染色するための工程とを特徴とする。例えば、図1は、褐色に染色されたPD-L1（（a）により示す）、赤/ピンク色に染色された、パンケラチン抗体によって標的化されたサイトケラチン（上皮がん細胞に特異的なサイトケラチン）（（b）により示す）、及び緑/青色に染色された（免疫細胞の）CD4（（c）により示す）を示している。差別化の色（赤/ピンク及び緑/青）により、検出されるPD-L1が腫瘍細胞又は免疫細胞中に存在するかどうかを決定することができる。したがって、本発明のアッセイは、PD-L1陽性腫瘍細胞とPD-L1陽性免疫細胞を区別することを助ける。これは、PD-L1のみで染色された試料のスコア化と比較して、試料のスコア化を迅速且つ正確に、再現性を高めて行う能力（手動/目視、マシン/画像分析）を向上させうる。

20

30

【0023】

[0026]表1は、PD-L1陽性腫瘍細胞とPD-L1陽性免疫細胞とを差別化するための、差別化マーカー/色の使用を示している。PD-L1は、抗PD-L1抗体を用いて検出ことができ、PD-L1は第1の色（例えば、図1に示される例では褐色）として可視である。PD-L1を含む腫瘍細胞は、第1の色（PD-L1）を示し、表1の列4の符号「+」によって示される（PD-L1を含まない腫瘍細胞は第1の色を有さず、表1の列4の符号「-」によって示される）。免疫細胞もPD-L1の発現を呈し、第1の色（PD-L1）として示され、表1の列1の符号「+」によって示される。PD-L1について陽性の二つの細胞種を差別化するために、試料は、腫瘍特異的なマーカー（例えば、パンケラチン抗体によって検出されるサイトケラチン）について染色され、これが第2の色（第1の色とは異なる色）として可視である。試料は免疫細胞特異的なマーカー（例えば、CD4又はその他のマーカー）について染色してもよく、これは第3の色（第1及び第2の色とは異なる色）として可視である。

40

【0024】

[0027]表1（以下のまとめを参照）

	列 1	列 2	列 3	列 4
	PD-L1 を含む 免疫細胞	PD-L1 を含まない 免疫細胞	PD-L1 を含む 腫瘍細胞	PD-L1 を含ま ない腫瘍細胞
PD-L1(第 1 の色)	+	-	+	-
腫瘍細胞に特異的な差 別化マーカー(第 2 の色)	-	-	+	+
免疫細胞に特異的な差 別化マーカー(第 3 の色)	+	+	-	-

10

## 【 0 0 2 5 】

[0028]表 1 のまとめ：第 1 の色（PD-L1）及び第 2 の色（腫瘍細胞に特異的な差別化マーカー）の両方を有するが第 3 の色（免疫細胞に特異的な差別化マーカー）を有さない細胞は、PD-L1 陽性腫瘍細胞（列 3）であり；第 1 の色（PD-L1）及び第 3 の色（免疫細胞に特異的な差別化マーカー）の両方を有するが第 2 の色を有さない細胞は PD-L1 陽性免疫細胞（列 1）であり；第 2 の色（腫瘍細胞に特異的な差別化マーカー）を有するが第 1 の色（PD-L1）も第 3 の色（免疫細胞に特異的な差別化マーカー）も有さない細胞は PD-L1 陰性腫瘍細胞（列 4）である。第 3 の色を有するが第 1 の色及び第 2 の色を有さない細胞は PD-L1 陰性免疫細胞（列 2）である。本発明は、いずれかの特定の順序での染色に限定されない。例えば、実施例 1 には、まず PD-L1 について染色し、次いで腫瘍細胞に特異的なマーカーについて染色し、次いで免疫細胞に特異的なマーカーについて染色し、最後に対比染色を用いることが記載されている。しかしながら、いくつかの実施態様では、染色の順序は異なる。例えば、いくつかの実施態様では、免疫細胞に特異的なマーカーを染色した後で腫瘍細胞に特異的なマーカーを染色するなどする。

20

30

## 【 0 0 2 6 】

[0029]先述のように、本発明のアッセイは、PD-L1 の染色と、一又は複数の差別化マーカーの染色とを特徴とする。染色方法には、免疫組織化学（IHC）、*in situ* ハイブリダイゼーション（ISH）、その変形、又は他のいずれかの適切な染色若しくは標識技術が含まれる。このような方法は当業者には周知である。染色技術は、様々な生物学的試料、例えば組織（例えば、新鮮凍結、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE））及び細胞学的試料に対して実施することができる。発色性標識、蛍光性標識、発光性標識、放射測定標識などの標識は、マーカー又は標的（例えば、PD-L1、腫瘍細胞特異的マーカー、免疫細胞特異的マーカーなど）の認識のために使用される。標識は、当業者には周知であり、本明細書に記載される標識に限定されない。

40

## 【 0 0 2 7 】

[0030]詳細なプロトコールの非限定的実施例は、以下の実施例 1 に記載される。簡潔に説明すると、対象の試料は、PD-L1 について染色される。試料は、まず抗 PD-L1 一次抗体と共にインキュベートされる。抗 PD-L1 一次抗体は、第 1 の色により検出される。実施例 1 では、試料を、一次抗 PD-L1 抗体に対するホースラディッシュペロオキシダーゼ（HRP）コンジュゲート二次抗体と共にインキュベートし、基質（3,3'-ジアミノベンジジン（DAB））を加え、第 1 の色（例えば、褐色）を生じさせる。代替的な酵素及び基質（及び結果として得られる色は後述される）。

50

## 【 0 0 2 8 】

[0031]次いで試料を第1の差別化マーカー、例えば、腫瘍細胞に特異的なマーカーについて染色する。腫瘍細胞に特異的なバイオマーカーの例には、限定されないが：パンケラチン抗体で検出可能なサイトケラチン（例えば、塩基性サイトケラチン、酸性サイトケラチンの多く）、その他のサイトケラチン、例えばサイトケラチン7（CK7）及びサイトケラチン20（CK20）、クロモグラニン、シナプトフィジン、CD56、甲状腺転写因子-1（TTF-1）、p53、白血球共通抗原（LCA）、ビメンチン、平滑筋アクチンなどが含まれる（例えば、Capelozzi, V., J Bras Pneumol. 2009;35(4):375-382参照）。腫瘍細胞に特異的なバイオマーカーは、IHCで検出可能なタンパク質に限定されることはなく；例えば、腫瘍細胞に特異的なバイオマーカーは、ISH技術により検出可能な対象の核酸配列でもよい。したがって、IHC工程を説明する方法（例えば、腫瘍細胞に特異的なマーカーの一次抗体と共に試料をインキュベートすること）は、ISH工程により適切に置換されうる。当業者であれば、腫瘍細胞に特異的な別の適切なバイオマーカーで実施例1に記載されるサイトケラチンを置換することができる。試料をまず、第1の差別化マーカー（腫瘍細胞に特異的なマーカー）に対する一次抗体（例えば、抗パンケラチン抗体）と共にインキュベートする。抗差別化マーカーの一次抗体は、第2の色により検出される。実施例1では、試料を、抗差別化マーカーの一次抗体に対するハプテン化抗体と共にインキュベートし、次いでアルカリホスファターゼ（AP）コンジュゲート抗ハプテン抗体と共にインキュベートする。基質ファストレッド色素原は第2の色（例えば、赤色）を生じさせる。

10

20

## 【 0 0 2 9 】

[0032]試料は次いで免疫細胞に特異的なマーカーについて染色することができる。免疫細胞に特異的なバイオマーカーの非限定的実施例には、CD4又は他のいずれかのCDマーカーが含まれる。免疫細胞に特異的なバイオマーカーは当業者には周知である。免疫細胞に特異的なバイオマーカーは、IHCで検出可能なタンパク質に限定されることはなく；例えば、免疫細胞に特異的なバイオマーカーは、ISH技術により検出可能な対象の核酸配列でもよい。したがって、IHC工程を説明する方法（例えば、免疫細胞に特異的なマーカーの一次抗体と共に試料をインキュベートすること）は、ISH工程により適切に置換されうる。当業者であれば、免疫細胞に特異的な別の適切なバイオマーカーで実施例1に記載されるCD4を置換することができるであろう。試料をまず、第2の差別化マーカー（免疫細胞に特異的なマーカー）に対する一次抗体（例えば、CD4抗体）と共にインキュベートする。抗差別化マーカーの一次抗体は、第3の色により検出される。実施例1では、試料を、一次抗差別化マーカー抗体に対するHRPコンジュゲート二次抗体と共にインキュベートし、基質HRP-グリーン色素原を加え、第3の色（例えば、緑/青色）を生じさせる。

30

## 【 0 0 3 0 】

[0033]いくつかの実施態様では、試料を次いで対比染色し、第4の色（第4の色は第1、第2及び第3の色とは異なる）を生じさせる。いくつかの実施態様では、対比染色はヘマトキシリンを含む；しかしながら、対比染色はヘマトキシリンに限定されない。代替的な対比染色は当業者には周知である。例えば、いくつかの実施態様では、対比染色は、メチレンブルー、ニュークリアレッド、トルイジンブルー、エオシン、メチルグリーンなどを含む。特定の対比染色は通常、可視性を増強するためにコントラストを生むように選択される。

40

## 【 0 0 3 1 】

[0034]染色手順に従い、試料を次いで解釈し、スコア化する（スコア化については後述する）。いくつかの実施態様では、染色の結果は表1に記載されるように解釈される。PD-L1、腫瘍細胞に特異的なマーカー（例えば、サイトケラチン）、及び免疫細胞に特異的なマーカーについて染色するアッセイの場合、第1の色及び第3の色についてスコアを得るが第2の色についてはスコアを得ない細胞はPD-L1陽性免疫細胞であり、第1の色及び第2の色の両方についてスコアを得る（が第3の色については得ない）細胞はP

50

D - L 1 陽性がん細胞であり、第 2 の色についてスコアを得るが第 1 の色についても第 3 の色についても得ない細胞は PD - L 1 陰性がん細胞である。いくつかの実施態様では、第 1 の色及び第 2 の色は重複し（又は他が重複し）、第 5 の（異なる）色を生じさせる。このような重複色はスコア化の助けとなりうる。

【 0 0 3 2 】

[0035]いくつかの実施態様では、染色（例えば、PD - L 1 及び差別化マーカー）は連続的に起こる。いくつかの実施態様では、染色は同時に起こる。

【 0 0 3 3 】

[0036]本発明は、いずれかの特定の順序での染色に限定されない。例えば、実施例 1 には、まず PD - L 1 について染色し、次いで腫瘍細胞に特異的なマーカーについて染色し、次いで免疫細胞に特異的なマーカーについて染色し、最後に対比染色を用いることが記載されている。しかしながら、いくつかの実施態様では、腫瘍細胞に特異的なマーカー（又は免疫細胞に特異的なマーカー）が最初に染色され、続いて PD - L 1 が染色されるなどする。

10

【 0 0 3 4 】

シグナル伝達コンジュゲート（IHC / ISH 発色性基質）

[0037]本発明は、実施例 1 に用いられるシグナル伝達コンジュゲート（例えば、酵素及び発色基質）にも、本明細書に記載される他のシグナル伝達コンジュゲートにも限定されることはない。検出方法のための代替的な酵素 - 発色基質の対（例えば、免疫組織化学、様々な *in situ* ハイブリダイゼーション法、例えば、シルバー *in situ* ハイブリダイゼーション法（SISH）、クロモジェニック *in situ* ハイブリダイゼーション法（CISH）、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法（FISH）、mRNA *in situ* ハイブリダイゼーション法など）が、当業者には周知である。

20

【 0 0 3 5 】

[0038]伝統的に、適切な酵素により活性化されると、発色基質が沈殿する。即ち、伝統的な発色基質は、酵素と接触すると、可溶性試薬から非可溶性の有色沈殿物へと変換する。本発明のために用いられる発色基質は、自動スライド染色機器及び方法及び / 又は自動検出及び分析機器及びソフトウェアと適合性に行うことができる。これにより、高い検出感度と多重化能が可能になる。

【 0 0 3 6 】

[0039]いくつかの実施態様では、二次抗体の酵素は、HRP、アルカリホスファターゼ（AP）、グルコースオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼなど、及び / 又は国際公開第 20131484498 号に記載される他のものを含む。いくつかの実施態様では、基質は、DAB、ファストレッド及びファストブルー、ファストレッド及びブラック（シルバー）、ニトロブルーテトラゾリウムクロライド（NBT）、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート（BCIP）、エックスギャル、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール（AEC）、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドイル - ベータ - D - ガラクトピラノシド（BCIG）、p - ニトロフェニルホスフェート（PNPP）、2, 2' - アジノビス [ 3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸 ]（ABTS）、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン（TMB）、HRP - グリーン色素原など、及び / 又は国際公開第 20131484498 号に記載される他のものを含む。実施例 2（後述）は、更に別のシグナル伝達コンジュゲートを記載する。

30

40

【 0 0 3 7 】

[0040]本発明は、いずれかの特定の色又は色の組み合わせに限定されることもない。例えば、いくつかの実施態様では第 1 の色（PD - L 1）は褐色であるが、いくつかの実施態様では第 1 の色（PD - L 1）は、酵素 - 基質の組み合わせに応じて、他の任意の適切な色、例えば、赤、青、黄色、緑などでもよい。いくつかの実施態様では、第 2 の色（例えば、サイトケラチン、その他マーカー）は、赤 / ピンクとすることができるが、いくつかの実施態様では、第 2 の色（例えば、サイトケラチン、その他マーカー）は、酵素 - 基質の組み合わせに応じて、他の任意の適切な色、例えば、褐色、青、黄色、緑などでもよ

50

い。いくつかの実施態様では、第3の色（例えば、CD4、その他マーカー）は、緑/青であるが、いくつかの実施態様では、第3の色（例えば、CD4、その他マーカー）は、酵素-基質の組み合わせに応じて、他の任意の適切な色、例えば、褐色、赤/ピンク、黄色などでもよい。いくつかの実施態様では、第4の色（対比染色）は青でよいが、第4の色（対比染色）は、他の任意の適切な色、例えば、赤、緑などでもよい。いくつかの実施態様では、第5の色（二色の重複）は、二色の組み合わせに応じて、パープル（例えば、二色が赤と青である場合）、緑（例えば、二色が黄色と青である場合）、オレンジ色（例えば、二色が赤と黄色である場合）などでもよい。

【0038】

スコア化

10

[0041]試料は次いでスコア化される。第2の色（及び第3の色）は、腫瘍細胞又は免疫細胞におけるPD-L1のスコア化を志向する。第3の色の使用はスコア化を改善させる。例えば、第3の色の使用は、いずれの細胞種（腫瘍対免疫）がPD-L1陽性であるかを明らかにすることを助けることができる。これは、PD-L1陽性免疫細胞、PD-L1陰性腫瘍細胞、及びPD-L1陽性腫瘍細胞の数の計算の精密化を助けうる。

【0039】

[0042]陽性の結果（例えば、PD-L1陽性の結果）は、様々な方法で計算することができ、本明細書に記載される実施例に限定されない。

【0040】

[0043]いくつかの実施態様では、PD-L1陽性腫瘍細胞の数又は腫瘍細胞に関連付けられるPD-L1の面積（例えば、腫瘍細胞に起因してPD-L1で覆われたスライドの面積）又はPD-L1陽性腫瘍細胞のパーセンテージを計算し、次いで等式に因数分解してHスコアを計算することができる。いくつかの実施態様では、HスコアがPD-L1陽性の閾値を上回った場合、試料はPD-L1陽性であり、HスコアがPD-L1陽性の閾値を下回った場合、試料はPD-L1陰性である。

20

【0041】

[0044]スコア化の計算の非限定的な実施例を実施例3に示す。いくつかの実施例が、以下に簡単に記載される。

【0042】

[0045]いくつかの実施態様では、陽性の結果は、PD-L1陽性腫瘍細胞のパーセンテージを計算すること、及びそのパーセンテージが陽性の閾値又は所定のカットオフを上回っているかどうかを決定することにより決定される。例えば、いくつかの実施態様では、PD-L1陽性を付与するPD-L1細胞の最低パーセンテージ、例えば、5%以上のPD-L1陽性腫瘍細胞はPD-L1陽性を付与する、10%以上のPD-L1陽性腫瘍細胞はPD-L1陽性を付与する、25%以上のPD-L1陽性腫瘍細胞はPD-L1陽性を付与する、50%以上のPD-L1陽性腫瘍細胞はPD-L1陽性を付与するなどである。

30

【0043】

[0046]いくつかの実施態様では、陽性の結果は、PD-L1陽性腫瘍細胞の数を細胞の総数（例えば、腫瘍+免疫細胞の数）で除した商を計算し、その値が陽性の閾値（例えば、0.15を上回る値、0.25を上回る値、0.5を上回る値など）を上回るかどうかを決定することにより決定される。

40

【0044】

[0047]いくつかの実施態様では、陽性の結果は、PD-L1陽性腫瘍細胞とPD-L1陽性免疫細胞のパーセンテージの和を計算し、その値が陽性の閾値（例えば、40を上回る値、50を上回る値、60を上回る値など）を上回るかどうかを決定することにより決定される。

【0045】

[0048]いくつかの実施態様では、陽性の結果は、PD-L1陽性腫瘍細胞の数をPD-L1陰性腫瘍細胞の数で除した商を計算し、その値が陽性の閾値（例えば、1.5を上回

50

る値、1.8を上回る値、2を上回る値など)を上回るかどうかを決定することにより決定される。

【0046】

[0049]いくつかの実施態様では、陽性の結果は、PD-L1陽性腫瘍細胞の数をPD-L1陰性腫瘍細胞の数とPD-L1陰性免疫細胞の数の和で除した商を計算し、その値が陽性の閾値(例えば、1.1を上回る、1.3を上回る値など)を上回るかどうかを決定することにより決定される。

【0047】

[0050]いくつかの実施態様では、陽性の結果は、PD-L1陽性腫瘍細胞の数をPD-L1陰性腫瘍細胞の数とPD-L1陽性免疫細胞の数の和で除した商を計算し、その値が陽性の閾値(例えば、1.1を上回る、1.3を上回る値など)を上回るかどうかを決定することにより決定される。

10

【0048】

[0051]いくつかの実施態様では、陽性の結果は、PD-L1陽性腫瘍細胞の数をPD-L1陽性免疫細胞の数で除した商を計算し、その値が陽性の閾値を上回るかどうかを決定することにより決定される。いくつかの実施態様では、陽性の結果は、PD-L1陽性腫瘍細胞の数をPD-L1陰性免疫細胞の数で除した商を計算し、その値が陽性の閾値を上回るかどうかを決定することにより決定される。

【0049】

[0052]上述のように、PD-L1陽性は、PD-L1陽性腫瘍細胞のパーセンテージを計算することにより決定されうる。いくつかの実施態様では、約1%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約5%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約10%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約15%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約20%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約25%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約30%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約35%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約40%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約45%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約50%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約55%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約60%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約65%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約70%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約75%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約80%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。いくつかの実施態様では、約90%を上回る細胞(例えば、腫瘍細胞)の染色がPD-L1陽性とスコア化される。

20

30

40

【0050】

[0053]PD-L1陽性免疫細胞の数又はパーセンテージは、PD-L1陽性の決定に関連しうる。いくつかの実施態様では、約5%を上回る免疫細胞の染色が、PD-L1陽性であるとするスコア化に関連付けられる。いくつかの実施態様では、約10%を上回る免疫細胞の染色が、PD-L1陽性であるとするスコア化に関連付けられる。いくつかの実施態様では、約15%を上回る免疫細胞の染色が、PD-L1陽性であるとするスコア化

50

に関連付けられる。いくつかの実施態様では、約25%を上回る免疫細胞の染色が、PD-L1陽性であるとするスコア化に関連付けられる。いくつかの実施態様では、約50%を上回る免疫細胞の染色が、PD-L1陽性であるとするスコア化に関連付けられる。

#### 【0051】

[0054] 試料が陽性であることは、染色の度合い又は強度によっても決定されうる（例えば、濃い染色は陽性で、薄い染色は陰性）。いくつかの実施態様では、スコア化方法は、例えば、PD-L1発現について0から3の、強度スケールで試料をスコア化すること（例えば、米国仮特許出願第61/875334号（「Scoring Method For Mesothelin Protein Expression」、この出願の開示内容の全体が、参照により本明細書に包含される）参照）を特徴とする。いくつかの実施態様では、試料は、細胞染色の強度及びパーセンテージに基づいてスコア化される。例えば、米国仮特許出願第61/875334号に記載されるように、Hスコアが次のように計算される： $1 * (\text{強度}1 + \text{での腫瘍細胞染色のパーセンテージ}) + 2 * (\text{強度}2 + \text{での腫瘍細胞染色のパーセンテージ}) + 3 * (\text{強度}3 + \text{での腫瘍細胞染色のパーセンテージ}) = \text{Hスコア}$ （0から300の値）。他のスコア化方法が開示されており、当業者には周知である。

10

#### 【0052】

スコア化のためのコンピューターベースの免疫検出

[0055] 画像化及び検出及び/又はスコア化は、手動で/目視により又はコンピューターシステムを介して実施することができる。スコア化のためのコンピューターベースの免疫検出の例は、当業者には既知である。例えば、その全内容が本明細書に参照により援用される、参照文献の米国仮特許出願第62/005222号、Docket Number 32154 US（「Automatic Field of View Selection Systems and Methods」）には、自動細胞検出アルゴリズムを用いた病理組織画像における特定の細胞の検出が開示されている。例えば、希薄色アンミックスアルゴリズムが、生物学的に有意義な複数の異なるカラーチャンネルにRGB画像を混合しないために使用される。自動免疫細胞検出アルゴリズムは、一般のニューラルネットワークを用いて免疫細胞マーカーの画像チャンネル中の免疫細胞を同定するように訓練される細胞検出器を利用する。更に、自動免疫細胞検出アルゴリズムは、非最大値抑制（non-maximum suppression algorithm）アルゴリズム

20

30

#### 【0053】

患者の処置方法

[0056] PD-L1に関する患者のスコア化は、治療的処置を決定するために使用される。本発明の一態様は、本明細書に記載されるスコア化が治療手法を予測するものである。一実施態様では、陽性のスコア化は、PD-L1阻害剤を用いる治療法の改善された結果を予測する。一実施態様によれば、方法は、腫瘍試料をPD-L1陽性についてスコア化し、PD-L1について陽性とスコア化された腫瘍を有する患者に対して治療剤を投与する。

40

#### 【0054】

[0057] 開示の実施態様は更に、例えば対象から得られた腫瘍試料が本明細書に提供される方法を用いてスコア化される場合に、PD-L1標的化療法剤（又はPD-L1標的化療法剤の組み合わせ）により治療される対象を同定及び/又は選択することを含む。加えて、開示の方法は更に、対象から得られた試料がPD-L1陽性であるとスコア化された場合に一又は複数のPD-L1標的化療法剤を対象に投与することを含む。これとは異なり、開示の実施態様は更に、例えば対象から得られた腫瘍試料が本明細書に提供される方法を用いてPD-L1陰性とスコア化された場合にPD-L1標的化療法剤による治療の恩恵を受ける可能性が低い対象を同定することを含む。

#### 【0055】

50

[0058] P D - L 1 標的化療法剤は、治療的有効量で投与されると所望の応答（例えば、例えば腫瘍の大きさ又は体積を減少させること、又は転移の大きさ、体積、若しくは数を減少させることによる、P D - L 1 発現腫瘍の治療）を誘導する治療剤を含む。

【 0 0 5 6 】

[0059] 一実施例では、P D - L 1 標的化療法剤は、P D - L 1 発現腫瘍細胞の死滅を増加させる（又はそれらの生存率を低下させる）。このような死滅は、P D - L 1 発現腫瘍細胞の 1 0 0 % の減少をもたらす必要はない；例えば生存 P D - L 1 発現腫瘍細胞の数を少なくとも 1 0 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 %（例えば P D - L 1 標的化療法剤による治療がない場合と比較して）低減させる P D - L 1 標的化療法剤を、本明細書に提供される方法に使用することができる。例えば、P D - L 1 標的化療法剤は、P D - L 1 発現腫瘍細胞の増殖を、少なくとも 1 0 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 %（例えば P D - L 1 標的化療法剤による治療がない場合と比較して）減少させることができる。

10

【 0 0 5 7 】

[0060] 一実施例では、P D - L 1 標的化療法剤は、P D - L 1 の発現又は活性を低減する。このような阻害は、P D - L 1 の発現又は活性の 1 0 0 % の低減をもたらす必要はない；例えば生存 P D - L 1 の発現又は活性を少なくとも 1 0 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 %（例えば P D - L 1 標的化療法剤による治療がない場合と比較して）低減させる P D - L 1 標的化療法剤を、本明細書に提供される方法に使用することができる。例えば、P D - L 1 標的化療法剤は、例えば、P D - L 1 の m R N A に干渉し、遺伝子産物の翻訳をブロックすることにより、又は遺伝子産物の翻訳後修飾により、又は細胞内局在に変化を生じさせることにより、遺伝子発現に干渉（転写、プロセッシング、翻訳、翻訳後修飾）することができる。

20

【 0 0 5 8 】

[0061] P D - L 1 標的化療法剤の他の例には、阻害性核酸分子、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、マイクロRNA ( m i R N A )、s h R N A 又はリボザイムが含まれる。このような分子を使用して、P D - L 1 遺伝子の発現を低減又は除去することができる。P D - L 1 核酸の発現を特異的に標的化及び調節する任意の種類のアナチセンス化合物の使用が考慮される。アンチセンス化合物は、標的の核酸分子（例えば P D - L 1 ）に特異的にハイブリダイズしてその発現を調節するものである。このような化合物は、一本鎖、二本鎖、円形、分枝又はヘアピン化合物として導入することができる。二本鎖アンチセンス化合物は、ハイブリダイズして二本鎖化合物を形成する二つの鎖、又はハイブリダイズして完全な若しくは部分的な二本鎖化合物を形成することを可能にするのに十分な自己相補性を有する単一の鎖とすることができる。いくつかの実施例では、アンチセンス P D - L 1 オリゴヌクレオチドは一本鎖アンチセンス化合物であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドが P D - L 1 m R N A にハイブリダイズするとき、二本鎖が R N A s e H によって認識される結果、m R N A が切断される。他の実施例では、m i R N A は、R N A i 経路を介して遺伝子発現を調節する m R N A 分子に少なくとも部分的に相補的な、約 2 1 ~ 2 3 のヌクレオチドの一本鎖 R N A 分子である。更なる実施例では、s h R N A は、s i R N A に切断されるタイトなヘアピンを形成する R N A オリゴヌクレオチドである。s i R N A 分子は通常、約 2 0 ~ 2 5 ヌクレオチドの長さであり、3' 末端上に重複する二つのヌクレオチドを有することができるか、又は平滑末端でありうる。通常、s i R N A の一つの鎖は、少なくとも部分的に標的核酸に相補的である。P D - L 1 遺伝子の特異的に標的化するアンチセンス化合物は、P D - L 1 ヌクレオチド配列、例えば m R N A 配列に相補的な化合物を設計することにより調製することができる。P D - L 1 アンチセンス化合物は、P D - L 1 にハイブリダイズしてその発現を調節するために、P D - L 1 核酸分子に 1

30

40

50

00%相補性である必要はない。例えば、二本鎖化合物の場合、アンチセンス化合物、又は化合物のアンチセンス鎖は、PD-L1核酸配列に、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%又は100%相補的でありうる。特異性についてアンチセンス化合物をスクリーニングする方法は周知である（例えば、米国特許出願公開第2003/0228689号参照）。加えて、阻害性核酸分子の設計、調製及び使用方法は、当業者の能力の範囲内である。更に、PD-L1の配列は公的に入手可能である。

【0059】

[0062]いくつかの実施例では、開示の方法は、一又は複数のPD-L1標的化療法剤の治療的有効量を、PD-L1陽性の結果を有する対象に提供することを含む。このような薬剤及び処置の方法及び治療的投薬量は当業者に既知であり、例えば、熟練の臨床医によって決定されうる。いくつかの実施例では、開示の方法は更に、外科的手術、放射線療法、及び/又は化学療法を、PD-L1標的化療法剤と組み合わせて（例えば、逐次的に、ほぼ同時に、又は同時に）対象に提供することを含む。投与は、単回又は複数回の用量により実施することができる。このような薬剤及び処置の方法及び治療的投薬量は当業者に既知であり、熟練の臨床医によって決定されうる。必要な用量は、対象の人種、年齢、体重及び全身状態、使用される特定の治療剤並びにその投与様式に応じて、対象間で異なるであろう。

10

【0060】

[0063]PD-L1標的化療法剤を含む治療剤は、治療を必要とする対象に、当技術分野において既知の任意の適切な手段を用いて投与することができる。投与の方法には、限定されないが、皮内、経皮、筋肉内、腹腔内、非経口、静脈内、皮下、腔内、直腸内、鼻腔内、吸入、経口、又は遺伝子ガンによるものが含まれる。鼻腔内投与は、鼻腔の一方又は両方を通して組成物を鼻腔及び鼻腔路の中へ送達することを指し、噴霧機構若しくは液滴機構による送達、又は治療剤のエアロゾル化による送達を含むことができる。

20

【0061】

[0064]吸入によるPD-L1標的化療法剤を含む治療剤の投与は、噴霧又は液滴機構による送達を介して鼻腔又は口腔を通して行うことができる。送達は、挿管により呼吸系のいずれかの領域へ直接行うことができる。非経口投与は、通常注射により実施される。注射剤は、溶液又は懸濁液のような従来形態に、注前の液体中の懸濁溶液に適した固体の形態に、又は乳濁液として調製することができる。注射溶液及び懸濁液は、滅菌の粉末、顆粒、及び錠剤から調製することができる。投与は全身又は局所とすることができる。

30

【0062】

[0065]PD-L1標的化療法剤を含む治療剤は、任意の適切な方式で、例えば薬学的に許容される担体を用いて投与することができる。薬学的に許容される担体は、部分的には、投与される特定の組成物により、並びに組成物を投与するために使用される特定の方式により決定される。したがって、本開示の薬学的組成物には多岐にわたる適切な製剤が存在する。本開示に有用な薬学的に許容される担体（ビヒクル）は従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)は、一又は複数の治療剤の薬学的送達に適した組成物及び製剤について記載している。

40

【0063】

[0066]非経口投与のための調製物には、滅菌の水性又は非水性溶液、懸濁液、及び乳濁液が含まれる。非水性の溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルなどの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性の担体には、生理食塩水及び緩衝媒体を含む、水、アルコール性/水性溶液、乳濁液又は懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガー、又は揮発性油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流体及び栄養補液、電解質補液（例えばリンガーデキストロースベースのもの）などが含まれる。防腐剤及びその他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸

50

化剤、キレート剤、及び不活性ガスなども存在してよい。

【0064】

[0067]局所投与のための製剤は、軟膏、ローション、クリーム、ジェル、点滴、坐薬、スプレー、液体及び粉末を含むことができる。従来の薬学的担体、水性、粉末状又は油性基剤、濃厚剤などが必要又は望ましい場合がある。

【0065】

[0068]経口投与のための、PD-L1標的化療法剤を含む治療剤は、水若しくは非水性媒体中の粉末若しくは顆粒、カプセル剤、サシェ剤、又は錠剤を含む。濃厚剤、香料、希釈剤、乳化剤、分散補助剤、又は結合剤が望ましいこともある。

【0066】

[0069]PD-L1標的化療法剤を含む治療剤は、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、及びリン酸といった無機酸と、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、及びフマル酸といった有機酸との反応によって形成されるか、又は水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムといった無機基材と、モノ-、ジ-、トリアルキル及びアリアルアミン及び置換されたエタノールアミンといった有機基剤との反応によって形成される、薬学的に許容される酸又は塩基付加塩として投与することができる。

【0067】

[0070]PD-L1標的化療法剤は、別のがん治療法（例えば外科手術、放射線療法、及び/又は化学療法）と組み合わせて使用することができる。一実施例では、追加的治療法は、一又は複数の抗腫瘍性医薬治療を含み、これには、放射線治療、抗腫瘍性化学療法剤、抗生物質、アルキル化剤及び抗酸化剤、キナーゼ阻害剤、及びその他薬剤が含まれる。使用可能な追加的な治療剤の特定の例には、アルキル化剤、例えばナイトロジェンマスタード（例えば、クロラムブシル、クロルメチン、シクロホスファミド、イホスファミド、及びメルファラン）、ニトロソウレア類（例えば、カルムスチン、ホテムスチン、ロムスチン、及びストレプトゾシン）、白金化合物（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、及びBBR3464）、プスルファン、ダカルバジン、メクロレタミン、プロカルバジン、テモゾロミド、チオテパ、及びウラシルマスタード；葉酸（例えば、メトトレキサート、ペメトレキセド、及びラルチトレキセド）、プリン（例えば、クラドリピン、クロファラピン、フルダラピン、メルカプトプリン、及びチオグアニン）、ピリミジン（例えば、カペシタビン）、シタラビン、フルオロウラシル、及びゲムシタビン；植物アルカロイド、例えばポドフィルム（例えば、エトポシド、及びテニポシド）；マイクロチューブル結合剤（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンブラスチン、ビンデシン、ピノレルピン（ナベルピン）ピンクリスチン、エポチロン、コルヒチン、ドラスタチン15、ノコダゾール、ポドフィロトキシン、リゾキシシン、並びにそれらの誘導体及びアナログ）、DNAインターカレーター若しくはクロスリンカー（例えばシスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンC、ブレオマイシン、クロラムブシル、シクロホスファミド、並びにそれらの誘導体及びアナログ）、DNA合成阻害剤（例えばメトトレキサート、5-フルオロ-5'-デオキシウリジン、5-フルオロウラシル及びそのアナログ）；アントラサイクリンファミリーメンパー（例えば、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、及びバルルビシン）；アンチメタボライト、例えば、細胞傷害性/抗腫瘍抗生物質、ブレオマイシン、リファンピシン、ヒドロキシウレア、及びマイトマイシン；トポイソメラーゼ阻害剤、例えばトポテカン及びイリノテカン；モノクローナル抗体、例えばアレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、及びトラスツズマブ；光増感剤、例えばアミノレプリリン剤、アミノレプリリン酸メチル、ポリフィマーナトリウム、及びベルテポルフィン、酵素、酵素阻害剤（例えばカンプトテシン、エトポシド、ホルメスタン、トリコスタチン並びにそれらの誘導体及びアナログ）、キナーゼ阻害剤（例えばイマチニブ、ゲフィチニブ、及びエルロチニブ）、遺伝子制御因子（例えばラロキシフェン、5-アザシチジン、5-アザ-2'

10

20

30

40

50

- デオキシシチジン、タモキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、ミフェプリストン並びにそれらの誘導体及びアナログ) ; 並びに他の薬剤、例えばアレトレチノイン、アルトレタミン、アムサクリン、アナグレリド、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、アキシチニブ、ベキサロテン、ベパシズマブ、ボルテゾミブ、セレコキシブ、デニロイキンジフチトクス、エストラムスチン、ヒドロキシカルバミド、ラパチニブ、パゾパニブ、ペントスタチン、マソプロコール、ミトタン、ペグアスパルガーゼ、タモキシフェン、ソラフェニブ、スニチニブ、ベムラフェニブ、バンデタニブ、及びトレチノインが含まれる。このような薬剤の方法及び治療的投薬量は当業者に既知であり、熟練の臨床医によって決定される。他の治療剤、上記分類のうちの一又は複数に含まれる又は含まれない例えば抗腫瘍薬剤も、記載される特定の結合剤との組み合わせ投与に適している。このような薬剤の選択及び治療的投与量は当業者に既知であり、熟練の臨床医によって決定される。

#### 【0068】

[0071]アッセイの結果、所見、予後、予測及び/又は治療勧告は、記録し、例えば専門家、医師、及び/又は患者に伝達することができる。特定の実施態様では、このような情報を、興味を持った当事者、例えば患者及び/又は主治医に伝達するためにコンピューターが使用される。PD - L1腫瘍の予後(例えば腫瘍がPD - L1標的化療法剤に応答する可能性があるかどうか)に基づき、試料が得られた対象を、PD - L1標的化療法剤を用いた又は用いない治療計画に割り付けることができる。

#### 【0069】

一実施態様では、出力された値に基づく予後、予測及び/又は治療勧告が、興味を持った当事者に対し、アッセイが終了して予後が生成された後可能な限り早く伝達される。結果及び/又は関連情報は、対象を治療する医師により対象に伝達されてもよい。或いは、結果は、興味を持った当事者に対し、報告書の提出によるなどの書面、eメールのような電子的伝達形態、又は電話を含むいずれかの通信手段により伝達されてもよい。伝達は、eメール通信の場合ように、適切にプログラミングされたコンピューターの使用により容易になりうる。特定の実施態様では、予後検査の結果及び/又は検査から導かれた結論及び/又は検査に基づく治療勧告を含む通信が生成され、電子通信の当業者に周知であろうコンピューターハードウェア及びソフトウェアを用いて、興味を持った対象に自動的に伝達される。医療志向の通信システムの一実施例は、米国特許第6283761号に記載されている; しかしながら、本発明は、このような特定の通信システムを用いる方法に限定されない。

#### 【0070】

[0072]本発明の方法の特定の実施態様では、試料の分析、PD - L1タンパク質発現のスコア化、腫瘍の予後、及びアッセイ結果又は予後の伝達を含む方法の工程の全部又は一部は、様々な(例えば、外国の)区域で実施することができる。

#### 【0071】

PD - L1スコア化のためのキット

[0073]本発明はPD - L1をスコア化するためのキットも特徴とする。いくつかの実施態様では、キットは、抗PD - L1抗体及び一又は二(以上)の差別化抗体、例えば、腫瘍細胞に特異的なマーカーに対する抗体、免疫細胞に特異的なマーカーに対する抗体、又は腫瘍細胞に特異的なマーカーに対する抗体と免疫細胞に特異的なマーカーに対する抗体の両方を含む。いくつかの実施態様では、キットは更に、含まれる一次抗体の検出のための二次抗体又は他の試薬を含む。例えば、キットは、検出に使用される二次抗体と基質(例えば、DAB、AEC、ファストレッドなど)を含みうる。いくつかの実施態様では、キットは更に対比染色を含む。いくつかの実施態様では、キットは更に、含まれる抗体及び/又は他の試薬との使用に適切なバッファーを含む。

#### 【0072】

[0074]いくつかの実施態様では、キットは更に、酵素 - 基質反応の色(又は他の)シグナルを増幅するための増幅試薬を含む。

#### 【0073】

10

20

30

40

50

[0075]いくつかの実施態様では、キットの試薬は、自動スライド染色プラットフォーム上での使用のために構成された容器内に包装される。例えば、容器は、BENCHMARKシリーズの自動スライド染色器上での使用のために構成されたディスペンサーである。

【0074】

[0076]例示的实施態様では、キットは、特定のアッセイを実施するためにまとめて作用する、異なる容器に収容された一連の試薬を含む。一実施態様では、キットは第1の容器内の緩衝液中に標識コンジュゲートを含む。緩衝液は、試薬が冷凍環境において貯蔵される間、及び機器上に配置されるとき、安定性を維持し、標識コンジュゲートの特定の結合能を維持するように構成される。別の実施態様では、キットは第2の容器内の水溶液中にシグナル伝達コンジュゲートを含む。別の実施態様では、キットは、第3の容器内に、試料に対してシグナル伝達コンジュゲートと併用される過酸化水素溶液を含む。第2又は第3の容器内において、様々なエンハンサー（例えばピリミジン）が、酵素によって潜在的反応性種を反応性腫に活性化される効率を上昇させることが見出されうる。更なる実施態様では、キットは増幅コンジュゲートを含む。

10

【実施例】

【0075】

実施例1 - 多重アッセイのプロトコール

[0077]実施例1は、本発明の多重IHCアッセイの非限定的実施例を記載する。NSCLC試料のスライドが、標準プロトコールに従って調製される。

【0076】

[0078]1. 1滴のPD-L1 SP142抗体（Ventana Medical System, Tucson, Arizona）をスライドに塗布し、16分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

20

【0077】

[0079]2. 1滴のOptiView HQ Universal Linker（カタログ番号760-700、Ventana Medical System, Tucson, Arizona）を塗布し、8分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0078】

[0080]3. 1滴のOptiView HRP Multimer（カタログ番号760-700、Ventana Medical System, Tucson, Arizona）を塗布し、8分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

30

【0079】

[0081]4. 各1滴のOptiView Amplifier H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及びOptiView Amplifier（カタログ番号760-700、Ventana Medical System, Tucson, Arizona）を塗布し、8分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0080】

[0082]5. 1滴のOptiView Amplifier Multimer（カタログ番号760-700、Ventana Medical System, Tucson, Arizona）を塗布し、8分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

40

【0081】

[0083]6. 1滴のOptiView H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及び1滴のOptiView DAB（カタログ番号760-700、Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona）を塗布し、8分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0082】

[0084]7. 1滴のOptiView Copper（カタログ番号760-700、Ventana Medical System, Tucson, Arizona）を塗布

50

し、4分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0083】

[0085] 8 . 1滴のパンケラチン抗体 ( A E 1 / A E 3 / P C K 2 6 ) 一次抗体 ( カタログ番号 7 6 0 - 2 5 9 5、Ventana Medical Systems、Tucson、Arizona ) を塗布する。8分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0084】

[0086] 9 . 1滴のハプテン化抗マウス抗体を塗布し、8分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0085】

[0087] 1 0 . 1滴のAPコンジュゲート抗ハプテン抗体を塗布し、8分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0086】

[0088] 1 1 . ファストレッド色元素を塗布し、8分間インキュベートする。反応バッファーですすぐ。

【0087】

[0089] 1 2 . 1滴の抗CD4 ( S P 3 5 ) ウサギモノクローナル一次抗体 ( カタログ番号 7 9 0 - 4 4 2 3、Ventana Medical Systems、Tucson、Arizona ) を塗布し、16分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0088】

[0090] 1 3 . 1滴のHRPコンジュゲート抗ウサギ抗体を塗布し、16分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0089】

[0091] 1 4 . 2滴のHRP - Green Chromogen Detection 1 を塗布し、4分間インキュベートする。

【0090】

[0092] 1 5 . 2滴のHRP - Green Chromogen Detection 2 を塗布し、12分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0091】

[0093] 1 6 . 1滴のマイアーのヘマトキシリン ( 1 : 5 ) を塗布し、4分間インキュベートする。反応バッファーでスライドをすすぐ。

【0092】

実施例 2 - シグナル伝達コンジュゲート

[0094] 以下の実施例は、国際公開第 2 0 1 3 1 4 8 4 9 8 号に記載される別のシグナル伝達コンジュゲートを記載しており、この特許文献の全内容が本明細書に参照により援用される。

【0093】

[0095] いくつかの実施態様では、生物学的試料中の標的を検出する方法は、生物学的試料を検出プローブと接触させること、生物学的試料を標識コンジュゲートと接触させること、及び生物学的試料をシグナル伝達コンジュゲートと接触させることを含む。標識コンジュゲートは酵素を含む。シグナル伝達コンジュゲートは潜在的反応性部分及び発色性部分を含む。酵素は、潜在的反応性部分の反応性部分への変換を触媒し、反応性部分は、生物学的試料に対し、標的に近接して、又は標的に直接、共有結合する。方法は更に、生物学的試料に光を照射すること、及びシグナル伝達コンジュゲートの発色性部分による光の吸光度を通して標的を検出することを含む。一実施態様では、反応性部分は、生物学的試料のチロシン残基、酵素コンジュゲート、検出プローブ、又はこれらの組み合わせと反応する。

【0094】

[0096] いくつかの実施態様では、検出プローブは抗体プローブである。いくつかの実施

10

20

30

40

50

態様では、標識コンジュゲートは、酵素に結合した抗体を含む。酵素は酸化還元酵素、ペルオキシダーゼ、又は加水分解酵素を含みうる。標識コンジュゲートのための抗体は、抗種又は抗ハプテン抗体でありうる。検出プローブは、オキサゾールハプテン、ピラゾールハプテン、チアゾールハプテン、ニトロアリアルハプテン、ベンゾフランハプテン、トリテルハプテン、尿素ハプテン、チオウレアハプテン、ロテノイドハプテン、クマリンハプテン、シクロリグナンハプテン、ジ-ニトロフェニルハプテン、ピオチンハプテン、ジゴキシゲニンハプテン、フルオレセインハプテン、及びローダミンハプテンからなる群より選択されたハプテンを含みうる。他の実施例では、検出プローブは、ヤギ、ウサギ、マウスなどといった第2の種から誘導されるモノクローナル抗体である。標識コンジュゲートは、検出プローブに選択的に結合する抗種又は抗ハプテン抗体をそれを含むことによって構成される。

10

**【0095】**

[0097]本発明に使用される色素原コンジュゲートは、伝統的に利用可能な色素原よりも選択的に光を吸収するように構成することができる。検出は、シグナル伝達コンジュゲートによる光の吸光により実現される；例えば、入射光の少なくとも約5%の吸光が標的の検出を容易にする。他のもっと暗い染色では、入射光の少なくとも約20%が吸収されうる。可視スペクトル内での光の不均一な吸光により、発色団部分が有色に見える。本明細書に開示されるシグナル伝達コンジュゲートは、その吸光に起因して有色に見える；シグナル伝達コンジュゲートは、アッセイに使用されるといづれかの色を提供するように見え、その特定の色には、発色団部分に関連付けられるスペクトル吸光度に応じて、赤、オレンジ色、黄色、緑、インディゴ、又はバイオレットが含まれる。別の態様によれば、発色団部分のスペクトル吸光度は伝統的に使用される色素源（例えばDAB、ファストレッド、ファストブルー）の吸光度より狭い。例示的实施態様では、第1のシグナル伝達コンジュゲートの第1の発色団部分に関連付けられるスペクトル吸光度は、約30nmから約250nm、約30nmから約150nm、約30nmから約100nm、又は約20nmから約60nmの半値全幅（FWHM）を有する。

20

**【0096】**

[0098]狭いスペクトル吸光度は、シグナル伝達コンジュゲート発色団部分を、伝統的な色素原とは差別化して分析することを可能にする。伝統的な色素原と比較して強化された特徴を有するが、シグナル伝達コンジュゲートの検出は依然として単純である。例示的实施態様では、検出は、明視野顕微鏡又は同等のデジタルスキャナーを用いることを含む。狭いスペクトル吸光度は、伝統的な色素原の能力を超えたレベルでの発色多重化を可能にする。例えば、伝統的な色素原は、いくらか日常的に二重化されている（例えばファストレッドとファストブルー、ファストレッドとブラック（シルバー）、ファストレッドとDAB）。しかしながら、発色団を互いに見分けることが困難となるため、三重化又は三色の使用、若しくはそれ以上の使用は典型的でない。本開示技術の例示的实施態様では、方法は、異なるシグナル伝達コンジュゲート又はその組み合わせを用いた二つから少なくとも約六の異なる標的からの検出を含む。一実施態様では、生物学的試料を光で照射することは、生物学的試料をスペクトルの狭い光源で照射することを含み、スペクトルの狭い光源は、約30nmから約250nm、約30nmから約150nm、約30nmから約100nm、又は約20nmから約60nmの第2の半値全幅（FWHM）でのスペクトル放射を有する。別の実施態様では、生物学的試料を光で照射することは、生物学的試料をLED光源で照射することを含む。別の実施態様では、生物学的試料を光で照射することは、生物学的試料をフィルタリングされた光源で照射することを含む。

30

40

**【0097】**

[0099]例示的实施態様では、試料内の標的を検出することは、生物学的試料を、第1の標識コンジュゲートに近位側で共有結合的に沈着するか、又は第1の標識コンジュゲートに直接共有結合する第1の増幅コンジュゲートと接触させることを含む。第1の増幅コンジュゲートに続いて、生物学的試料を二次的標識コンジュゲートと接触させる。事例として、増幅コンジュゲートを用いたシグナルの増幅は、シグナル伝達コンジュゲートの沈着

50

を増強する。シグナル伝達コンジュゲートの増強された沈着は、発色性シグナルの目視による同定を容易にすることができる、即ち、増幅により色が暗くなり、見易くなる。低発現の標的の場合、この増幅により、シグナルは目視するために十分に暗くなり、反対に増幅しない場合は標的は見えない。一実施態様では、シグナル伝達コンジュゲートは、生物学的試料の  $1 \text{ cm}^2 * \mu\text{m}$  当たり約  $1 \times 10^{11}$  個から約  $1 \times 10^{16}$  個の分子を上回る濃度において、標的に近位側で共有結合的に沈着する。一実施態様では、第1の標的及び第2の標的は遺伝的核酸である。第1の標的を第1のシグナル伝達コンジュゲートによる光の吸光度により検出することは、赤、オレンジ色、黄色、緑、インディゴ、又はバイオレットから選択された第1の有色シグナルを検出することを含み、第1の有色シグナルは、第1のシグナル伝達コンジュゲートの第1の発色性部分に関連付けられたスペクトル吸光度に関連付けられる。第2の標的を第2のシグナル伝達コンジュゲートによる光の吸光度により検出することは、赤、オレンジ色、黄色、緑、インディゴ、又はバイオレットから選択された第2の有色シグナルを検出することを含み、第2の有色シグナルは、第2のシグナル伝達コンジュゲートの第2の発色性部分に関連付けられたスペクトル吸光度に関連付けられる。第2のシグナル伝達コンジュゲートと近距離で重複する第1のシグナル伝達コンジュゲートによる光の吸収により近距離での重複を検出し、第3の有色シグナルは、第1のスペクトル吸光度と第2のスペクトル吸光度の重複するスペクトル吸光度に関連付けられる。一実施例によれば、この第3の色は、正常な遺伝子配置をシグナル伝達し、第1及び第2の色は、遺伝的再構成又は転座をシグナル伝達する。

10

20

30

40

50

【0098】

## 実施例3 - スコア化

[00100]以下の実施例は、PD-L1陽性を決定するための様々な計算を記載する(3A-3E)。

【0099】

## 実施例3A

[00101]等式: PD-L1の値 = PD-L1陽性腫瘍細胞のパーセンテージ

[00102]陽性の閾値: > 40%のPD-L1値がPD-L1陽性である。

[00103]病理学者は、試料3Aを調べ、PD-L1陽性腫瘍細胞のパーセンテージを48%と計算する。陽性の閾値に基づき、試料3AはPD-L1陽性と標識される。

【0100】

## 実施例3B

[00104]等式: PD-L1の値 = PD-L1陽性腫瘍細胞の数 / 細胞の総数

[00105]陽性の閾値: > 0.25のPD-L1値がPD-L1陽性である。

[00106]病理学者は試料3Bを調べる。PD-L1陽性腫瘍細胞の数は68であり、細胞の総数は460である。上記計算に基づくPD-L1値は  $68 / 460 = 0.147$  である。陽性の閾値に基づき、試料3BはPD-L1陰性と標識される。

【0101】

## 実施例3C

[00107]等式: PD-L1の値 = PD-L1陽性腫瘍細胞の% + PD-L1陽性免疫細胞の%

[00108]陽性の閾値: > 60のPD-L1値がPD-L1陽性である。

[00109]病理学者は試料3Cを調べる。PD-L1陽性腫瘍細胞のパーセントは50であり、PD-L1陽性免疫細胞のパーセントは20である。上記計算に基づくPD-L1値は  $50 + 20 = 70$  である。陽性の閾値に基づき、試料3CはPD-L1陽性と標識される。

【0102】

## 実施例3D

[00110]等式: PD-L1の値 = PD-L1陽性腫瘍細胞の数 / (PD-L1陰性腫瘍細胞の数 + PD-L1陽性免疫細胞の数)

[00111]陽性の閾値: > 0.8のPD-L1値がPD-L1陽性である。

[00112]病理学者は試料3Dを調べる。PD-L1陽性腫瘍細胞の数は68であり、PD-L1陰性腫瘍細胞の数は45であり、PD-L1陽性免疫細胞の数は210である。上記計算に基づくPD-L1値は $68 / (45 + 210) = 0.266$ である。陽性の閾値に基づき、試料3DはPD-L1陰性と標識される。

【0103】

実施例3E

[00113]等式： $Hスコア = 1 * (強度1+での腫瘍細胞染色のパーセンテージ) + 2 * (強度2+での腫瘍細胞染色のパーセンテージ) + 3 * (強度3+での細胞染色のパーセンテージ)$

[00114]陽性の閾値： $> 125$ のHスコアがPD-L1陽性である。

10

[00115]病理学者は試料3Eを調べる。強度1+でのPD-L1陽性腫瘍細胞染色のパーセンテージは5%であり、強度2+でのPD-L1陽性腫瘍細胞染色のパーセンテージは35%であり、強度3+でのPD-L1陽性腫瘍細胞染色のパーセンテージは20%である。Hスコアは $5(1) + 2(35) + 3(20) = 135$ である。陽性の閾値に基づき、試料3EはPD-L1陽性と標識される。

【0104】

参考文献

[00116]以下の非特許文献及び特許文献の開示内容の全体が参照により本明細書に援用される：(1)Capelozzi, V., Role of Immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer, J Bras Pneumol. 2009; 35(4): 375-382; (2)国際公開第20131484498号/米国特許出願公開第2013/0260379号(Signaling Conjugates and Methods of Use); (3)米国仮特許出願第62/005222号 Docket Number 32154 US (Automated Field of View Selection Systems and Methods); (4)米国仮特許出願第61/875334号 Docket Number 31872 US (Scoring Method for Methothelin Protein Expression); 仮特許出願第62/004572号、Docket Number 32151 US、2014年5月29日出願。

20

【0105】

[00117]本明細書において使用される用語「約」は、参照数の $\pm 10\%$ を指す。本明細書に引用される各参照文献は、内容の全体が参照により本明細書に援用される。

30

【0106】

[00118]本明細書に記載されるもの以外に、上記説明から当業者には本発明の種々の修正例が明らかである。このような修正例も、特許請求の範囲に含まれることが意図される。例えば、本発明により使用される「抗体」は、所望の標的部位への結合に有効な全抗体又は抗体の断片でありうる。また、適切である場合、本発明の「抗体」は、標的化部分(例えば、リガンドペプチド、小分子など)で置換されうる。例えば、腫瘍細胞又は免疫細胞が特異的で差別化される固有の細胞表面受容体を有する場合、対応する標的化部分は、本発明により、免疫細胞から腫瘍細胞を差別化するために使用されうる。

40

【 図 1 】

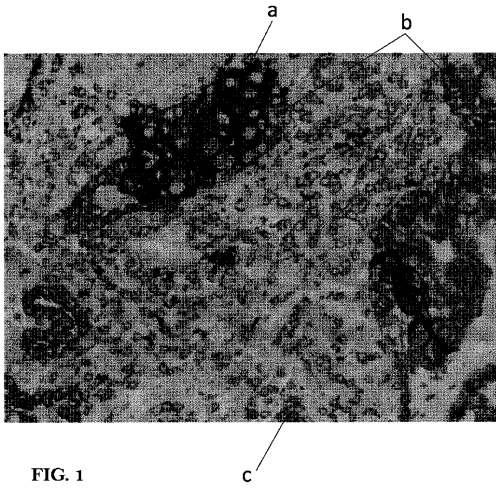


FIG. 1

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/061922

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GHEBEH H ET AL: "The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-stimulatory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors", NEOPLASIA, NEOPLASIA PRESS, ANN ARBOR, MI, US, vol. 8, no. 3, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 190-198, XP008091677, ISSN: 1522-8002, DOI: 10.1593/NEO.05733 the whole document In particular: Title; Abstract; Materials and methods section, histochemistry. ----- -/--	1-25
<input checked="" 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 "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 13 August 2015		Date of mailing of the international search report 22/12/2015
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 C.F. Angioni

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/061922

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GHEBEH HAZEM ET AL: "FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 8, no. 1, 23 February 2008 (2008-02-23), page 57, XP021034690, ISSN: 1471-2407 the whole document In particular: Title; Abstract; Methods section, immunohistochemistry, part (b). -----</p>	1-25
A	<p>O. K. AFANASIEV ET AL: "Merkel Polyomavirus-Specific T Cells Fluctuate with Merkel Cell Carcinoma Burden and Express Therapeutically Targetable PD-1 and Tim-3 Exhaustion Markers", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 19, 1 October 2013 (2013-10-01), pages 5351-5360, XP055207749, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0035 the whole document In particular: Title; Abstract; p. 5352, immunohistochemistry; Fig. 6. -----</p>	1-25
A	<p>J Powderly ET AL: "Biomarkers and Associations With the Clinical Activity of PD-L1 Blockade in a MPDL3280A Study", 1 January 2013 (2013-01-01), XP055207634, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://carolinabiooncology.org/wp-content/uploads/ASCO-2013-Presentation-Anti-PD-L1-Biomarkers.pdf">http://carolinabiooncology.org/wp-content/uploads/ASCO-2013-Presentation-Anti-PD-L1-Biomarkers.pdf</a> [retrieved on 2015-08-13] the whole document In particular: slides 9-14 -----</p>	1-25
A	<p>YOSHIKO IWAI ET AL: "PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells.", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 17, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 133-44, XP055142463, ISSN: 0953-8178, DOI: dxh194 the whole document In particular: p. 135, histology; Fig. 2D -----</p>	1-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2015/061922**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.:  
1-25(partially)

**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/ EP2015/ 061922

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 1-25(partially)

Multiplex methods for labelling PD-L1 and for scoring PD-L1 expression wherein the first primary antibody is PD-L1 specific and the further primary antibody is cytokeratin specific.

---

2-9. claims: 1-25(partially)

Multiplex methods for labelling PD-L1 and for scoring PD-L1 expression wherein the first primary antibody is PD-L1 specific and the further primary antibody is specific for either chromogranin, synaptophysin, CD56, thyroid transcription factor-1 (TTF-1), p53, leukocyte common antigen (LCA), vimentin or smooth muscle actin.

---

10-20. claims: 1-25(partially)

Multiplex methods for labelling PD-L1 and for scoring PD-L1 expression wherein the first primary antibody is PD-L1 specific and the further primary antibody is specific for either CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD11c, CD123, CD56, CD14, CD33, or CD66b.

---

---

 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

(72)発明者 ヴェンナプサ, バラシイ  
 アメリカ合衆国 アリゾナ 85737, ツーソン, ノース グァバ ドライブ 10871  
 (72)発明者 デニス, エスリー  
 アメリカ合衆国 アリゾナ 85704, ツーソン, ノース コルテ カラバザ 6748

專利名称(译)	用于改善PD-L1染色的肿瘤组织评分的多重测定法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017518516A</a>	公开(公告)日	2017-07-06
申请号	JP2017514967	申请日	2015-05-29
[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，墨水。		
[标]发明人	ニッタヒロ ヴェンナプサバラシイ デニスエスリー		
发明人	ニッタ, ヒロ ヴェンナプサ, バラシイ デニス, エスリー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/57423 G01N33/57484 G01N2333/70596 G01N1/30 G01N33/58		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/574 G01N33/543.545		
优先权	62/005701 2014-05-30 US		
其他公开文献	JP6652557B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了一种用于改善PD-L1染色的肿瘤组织的评分的多重测定法，该方法包括第一颜色的PD-L1染色和一种或多种区分标记物，例如肿瘤。其特征在于细胞特异性标记物和免疫细胞特异性标记物的染色。肿瘤细胞和免疫细胞之间的分化提高了评分的便利性，评分的准确性和速度，以及为治疗目的评分PD-L1阳性样品的可重复性。[选择图]无

(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2017-518516 (P2017-518516A) 平成29年7月6日 (2017.7.6)
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	
G01N 33/574 (2006.01)	G01N 33/53 Y	
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/574	
	G01N 33/543 545	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)		
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2017-514967 (P2017-514967) 平成27年5月29日 (2015.5.29) 平成29年1月24日 (2017.1.24) PCT/EP2015/061922 W02015/181343 平成27年12月3日 (2015.12.3) 62/005,701 平成26年5月30日 (2014.5.30) 米国 (US)	(71) 出願人 511286517 ヴェンタナ メディカル システムズ, インク, アメリカ合衆国 アリゾナ 85755, ツーソン, イースト イノヴェーショ ン パーク ドライヴ 1910 (74) 代理人 110002077 園田・小林特許業務法人 (72) 発明者 ニッタ, ヒロ アメリカ合衆国 アリゾナ 85718, ツーソン, ノース ハンセンダ デル ソル ロード 5250
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 PD-L1 について染色された腫瘍組織の改善されたスコア化のための多重アッセイ		