



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107250796 A

(43)申请公布日 2017. 10. 13

(21)申请号 201580064039.2

(22)申请日 2015.09.24

(30)优先权数据

62/055,491 2014.09.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/051899 2015.09.24

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/049291 EN 2016.03.31

(71)申请人 艾匹克科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 瑞安·迪塔莫尔

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

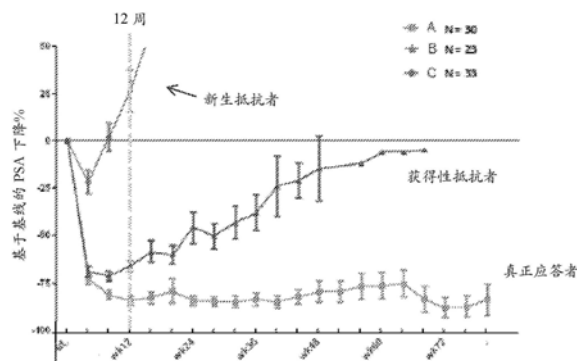
权利要求书2页 说明书16页 附图22页

(54)发明名称

用于鉴别对雄激素受体靶向疗法的抵抗性的循环肿瘤细胞诊断

(57)摘要

本发明公开提供了预测对于前列腺癌患者肿瘤中雄激素受体(AR)靶向疗法的新生抵抗性的方法,包括(a)实施包括获自患者的血液样品中有核细胞的免疫荧光染色和形态学表征的直接分析以产生循环肿瘤细胞(CTC)数据,其中所述分析包括确定一组对于雄激素受体(AR)靶向疗法的新生抵抗性的常规和非常规CTC生物标志物的可测量特征,和(b)评价CTC数据以确定前列腺癌患者肿瘤中AR靶向疗法的新生抵抗性的概率。还公开了用于所述方法的一组常规和非常规CTC生物标志物。



1. 预测对于前列腺癌患者肿瘤中雄激素受体 (AR) 靶向疗法新生抵抗性的方法, 包括
  - (a) 实施包括获自患者的血液样品中有核细胞的免疫荧光染色和形态学表征的直接分析以产生循环肿瘤细胞 (CTC) 数据, 其中所述分析包括确定一组对于雄激素受体 (AR) 靶向疗法的新生抵抗性的常规和非常规CTC生物标志物的可测量特征, 和
  - (c) 评价所述CTC数据以确定对于前列腺癌患者肿瘤中AR靶向疗法的新生抵抗性的概率。
2. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述免疫荧光染色包括有核细胞的免疫荧光染色, 其包括广谱细胞角蛋白、分化簇 (CD) 45、二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 和AR。
3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中, 所述生物标志物包括 (1) CTC异质性, (2) 具有明显核仁形态的细胞角蛋白阳性 (CK+), AR N-末端阳性CTC的频率, 和 (3) AR C-末端截短CTC的频率。
4. 根据权利要求3所述的方法, 其中, 所述CTC异质性还包括选自下列的生物标志物: 常规CTC、CTC簇、CK-CTC、小CTC、核仁<sup>+</sup>CTC、CK斑点型CTC和表1中所列的生物标志物。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法, 包括将所述有核细胞作为单层沉积到载玻片上的初始步骤。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法, 其中, 所述前列腺癌是转移性去势抵抗性前列腺癌 (mCRPC)。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中, 所述CTC数据是通过荧光扫描显微术产生的。
8. 根据权利要求7所述的方法, 其中, 所述显微术提供了包含CTC和至少200个周围白细胞 (WBC) 的视场。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法, 其中, 所述CTC数据是通过评价至少400万个所述有核细胞产生的。
10. 根据权利要求8所述的方法, 其中, 所述CTC包括不同于周围有核细胞的免疫荧光染色。
11. 根据权利要求8所述的方法, 其中, 所述CTC包括与周围有核细胞相比不同的形态特征。
12. 根据权利要求11所述的方法, 其中, 所述形态特征包括以下中的一种或多种: 核大小、核形状、核中孔的存在、细胞大小、细胞形状和核浆比、核细节、核轮廓、存在或不存在核、胞浆的质量以及胞浆的量。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法, 其中, 所述CTC的鉴别还包括将广谱细胞角蛋白荧光染色的强度与周围有核细胞进行比较。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法, 还包括获得血液样品的白细胞 (WBC) 计数的初始步骤。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法, 还包括裂解血液样品中红细胞的初始步骤。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 还包括将来自血液样品的有核细胞作为单层沉积到玻璃载玻片上的初始步骤。
17. 根据权利要求16所述的方法, 还包括将约200万至约300万个细胞沉积到玻璃杯载

玻片上。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中,所述CTC数据的产生包括血液样品中CTC的计数。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中,使用预测模型分析所述可测量特征。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中,所述模型是多变量模型。

## 用于鉴别对雄激素受体靶向疗法的抵抗性的循环肿瘤细胞 诊断

[0001] 本专利申请主张2014年9月25日提交的美国临时专利申请序列号No.62/055,491的优先权,该专利申请的全部内容作为参考并入本文。

[0002] 本发明总体上涉及癌症诊断领域,并且更具体地涉及用于预期鉴别mCRPC患者中对AR靶向疗法的新生抵抗性(*de novo resistance*)的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 在美国,前列腺癌(PC)仍是最常见的非皮肤癌症。仅在2014年,前列腺癌的预计发病率为233,000例,其中死亡29,480人,这使得转移性前列腺癌疗法确实成为尚未满足的医学需求。Siegel et al.,2014.CA Cancer J Clin.2014;64(1):9-29。欧洲流行病学研究显示了相当的数据,其中2012年预计新发病416,700例,占癌症诊断患者的22.8%。总的来说,预期有92,200例PC-特异性死亡,这使得3位癌症患者中有1位最可能死于PC,其死亡率为9.5%。

[0005] 随着仅在过去5年中所测试和批准用于患有转移性去势治疗-抵抗性前列腺癌(mCRPC)的患者治疗的新型药剂的指数增长,出现了有关这些药剂的最佳顺序和组合的问题。存在一些帮助指导临床医师最佳的顺序方法,并且将评价症状的存在或缺乏、表现状况以及疾病负荷,从而帮助对于这些试剂确定最佳顺序的指南。Mohler et al.,2014,J Natl Compr Canc Netw.2013;11(12):1471-1479;Cookson et al.,2013,J Urol.2013;190(2):429-438。目前,批准的治疗包括紫杉烷类细胞毒性药物和雄激素-靶向疗法。对于临床医师而言,挑战在于决定施用这些疗法的最佳顺序从而为患者提供最大的益处。然而,基于患者之间对疗法的异质反应并且根据每种药剂的交叉耐药性,治疗失败仍是巨大的挑战。Mezynski et al. Ann Oncol.2012;23(11):2943-2947;Noonan et al.,Ann Oncol.2013;24(7):1802-1807;Pezaro et al.,Eur Urol.2014,66(3):459-465。另外,患者会失去从已证明提供整体存活期延长的每种药物获得最大益处的治疗窗口。因此,鉴别具有最大可能从靶向疗法获得益处的目标人群的更好方法仍是重要的目的。

[0006] 循环肿瘤细胞(CTC)代表了癌症诊断中的巨大发展,并且由于它们的无创测量而使其更有吸引力。Cristofanilli et al.,N Engl J Med 351:781-91,(2004)。从原发瘤或其转移性位点释放的CTC具有肿瘤生物学相关的重要信息。定量和鉴定CTC作为液体活组织检查帮助临床医师选择治疗时程并监视患者癌症发展。因此,CTC不但可以认为是转移性疾病的替代生物标志物,而且是无创追踪肿瘤变化、治疗反应、癌症复发或患者结局的有希望的重要工具。历史上,血流中极低水平的CTC结合它们未知的表型明显阻碍了它们的检测并且限制了它们的临床应用。目前,为了利用它们的信息,已发展了用于CTC检测、分离和鉴定的多种技术。

[0007] 仍需要开发预期鉴别患有对AR靶向疗法具有新生抵抗性的肿瘤的患者们的准确、无创方法以降低发病率并且能早期探索替代治疗方法。本发明基于能够对CTC进行表型鉴定的稳健CTC检测和鉴定平台,通过提供AR靶向疗法新生抵抗性的多变量生物标志物预测因子来解决该需求。还提供了相关优势。

### [0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了用于预期鉴别mCRPC患者中AR靶向疗法的新生抵抗性的方法。

[0010] 本发明公开内容提供了预测对于前列腺癌患者肿瘤中雄激素受体 (AR) 靶向疗法的新生抵抗性的方法, 包括 (a) 实施包括获自患者的血液样品中有核细胞的免疫荧光染色和形态学表征的直接分析以产生循环肿瘤细胞 (CTC) 数据, 其中所述分析包括确定一组对于雄激素受体 (AR) 靶向疗法的新生抵抗性的常规和非常规CTC生物标志物的可测量特征, 和 (c) 评价该CTC数据以确定前列腺癌患者肿瘤中AR靶向疗法的新生抵抗性的概率。在一些实施方式中, 所述免疫荧光染色包括有核细胞的染色, 其包括广谱细胞角蛋白 (pan cytokeratin)、分化簇 (CD) 45、二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 和AR。在一些实施方式中, 所述生物标志物包括 (1) CTC异质性, (2) 具有明显核仁形态的细胞角蛋白阳性 (CK+)、AR N-末端阳性CTC的频率, 和 (3) AR C-末端截短CTC的频率。根据权利要求3所述的方法, CTC异质性还包括选自下列的生物标志物: 常规CTC、CTC簇、CK-CTC、小CTC、核仁<sup>+</sup>CTC、CK斑点型CTC和表1所列的生物标志物。

[0011] 根据详细说明和权利要求, 本发明的其他特征和优势将是显而易见的。

### 附图说明

[0012] 图1显示AR信号指导疗法 (A, 真实起反应者, N=30; B, 获得性抵抗者, N=23; C, 重新抵抗者, N=33) 之后的PSA变化类型。

[0013] 图2A和图2B显示了方法和图像的示意图。图2A显示了Epic的CTC采集和检测过程的示意图, 其如下所示进行: (1) 血液裂解, 将来自血液样品的有核细胞置于载玻片上; (2) 将载玻片保存在-80°C生物储备库中; (3) 用CK、CD45、DAPI和AR对载玻片染色; (4) 扫描载玻片; (5) 运行多参数数字病理算法, 和 (6) CTC的软件和人读取器确认和生物标志物表达的定量。图2B显示了常规 (细胞角蛋白阳性 (红色)、CD45阴性 (绿色), 含DAPI核 (蓝色), 形态不同于周围白细胞) 和非常规CTC的图像。

[0014] 图3. AR疗法反应/抵抗的CTC特征。图3显示了表示常规CTC和非常规CTC的数目/7.5mL相对于对A或E (左) 或紫杉烷 (右) 的反应的箱形图。箱的周边定义了上和下四分位数, 中值是箱内的标志物。须触线代表观测值的1.5IQR。

[0015] 图4显示了列出在一线、二线或三线A或E之前根据反应筛选的患者相对于特异性CTC特征的相对丰度分组的热图。CTC特征不互相排斥并且可以不代表唯一事件。对每种表型, 以CTC/mL报告所显示的值 (平均AR+/CTC除外), 并且所显示的值是彩色编码的以反应所有患者间的相对丰度 (高=红/深灰色并且为正数, 中等=黄/浅灰, 低=绿/深灰并且为负数)。

[0016] 图5显示了列出在一线、二线或三线紫杉烷之前根据反应筛选的患者相对于特异性CTC特征的相对丰度分组的热图。CTC特征不互相排斥并且可以不代表唯一事件。对每种表型, 以CTC/mL报告所显示的值 (平均AR+/CTC除外), 并且所显示的值是彩色编码的以反应所有患者间的相对丰度 (高=红/深灰色并且为正数, 中等=黄/浅灰, 低=绿/深灰并且为负数)。

[0017] 图6. AR配体结合域改变的测量。图6显示了比较接受AR疗法的两位代表性 (顶部, 1位AR疗法抵抗患者; 底部, 1位AR疗法起反应患者) 患者 (两者均>40AR+CTC/7.5mL) 之间的AR

表达值的柱状图。使用针对AR N-末端蛋白表达和AR C-末端蛋白表达的2-靶标测定,检验CTC的AR配体结合域(LBD)变化。AR C-末端变体表达的丧失与AR疗法抵抗性有关。

[0018] 图7A-图7C. AR疗法新生抵抗性的预测。图7A显示了比较使用分子和形态学变量预测AR疗法反应的单变量和多变量模型的表。图7B和图7C显示了瀑布图,其显示了AR疗法抵抗性预测与AR疗法(图7B)和紫杉烷(图7C)治疗患者的最大PSA降低%之间的关系。

[0019] 图8. 一线、二线或三线治疗决策之间的CTC频率。图8显示了表示使用AR疗法或紫杉烷疗法的一线、二线或三线治疗之前,患者内部CTC/7.5mL值的分布的箱形图。箱的周边定义了上和下四分位数,中值是箱内的标志物。须触线代表观测值的1.5IQR。

[0020] 图9A-图9C显示了列出在一线(图9A)、二线(图9B)或三线(图9C)疗法之前筛选的患者相对于具有特异性特征的CTC的相对丰度(行)的热图。CTC特征不互相排斥并且可以不代表唯一事件。对每种表型,以CTC/7.5mL报告所显示的值(平均AR表达除外),并且所显示的值是彩色编码的以反应所有患者间的相对丰度(高=红/深灰色并且为正数,中等=黄/浅灰,低=绿/深灰并且为负数)。

[0021] 图10. CTC表型的异质性。图10显示了点状图,其描述了在一线、二线和三线治疗决策时,以具有大于1、10或100个CTC/7.5mL的患者表示的最常见的CTC表型的%。右上角表格显示了组间不相同的CTC亚群中所观察到的异质性的概率。

[0022] 图11A和图11B. AR定位的异质性。图11A显示了CTC免疫荧光图像,其显示了核AR染色、核和细胞质AR染色以及细胞质AR染色。图11B是描述在一线、二线、三线疗法时具有>5个AR阳性CTC(其中AR定位至核、细胞浆或两者)的患者的分布的表。

[0023] 图12显示了瀑布图,其描述了如通过最大PSA表达减少%所测量的对一线(浅澄色/箱1)、二线(绿色/箱3)或三线(蓝色/箱2)疗法的反应的异质性。

[0024] 图13. AR疗法抵抗性的CTC特征随连续疗法增加。图13显示了柱状图,其鉴别了预测在一线、二线和三线治疗决策时AR疗法(A或E)失败的患者的百分比。预测模型使用了如本文所述的CTC鉴定。

[0025] 图14. CTC表型频率随连续疗法升高。图14显示了柱状图,其鉴别了面对一线、二线和三线疗法,具有>50CTC事件以及特定相关CTC特征(从左至右,每组柱状图为一、二线和三线治疗决策)的患者的百分比。

[0026] 图15A和图15B. 图15A显示了实施例1的研究群体,图15B显示了该群体的前一个患者疗法。

[0027] 图16A和图16B. 图16A显示了实施例2的研究群体,图16B显示了mCRPC中的临床治疗决策点。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明公开部分基于一组生物标志物的鉴定,所述生物标志物可以预期预测患有mCRPC的患者中AR靶向疗法的新生抵抗性。如本文所公开的,与对AR靶向疗法起反应的患者相比,对AR靶向疗法不起反应的患者显示出CTC亚群更大的异质性。如本文进一步公开的,可以使用测量CTC亚群异质性的单个CTC鉴定来预测对AR靶向疗法的抵抗性。本文还公开了可以使用CTC的上皮细胞表达、雄激素N-末端染色和形态学评价来预测对AR靶向疗法的反应。另外,如本文所公开的,可以使用AR C-末端缺失检测来预测对AR靶向疗法的抵抗性。

[0030] 本文所公开的方法提供了对AR靶向疗法的新生抵抗性的预测指示因素。预测生物

标志物的鉴定使得能够在整个mCRPC临床进展期间对治疗性干预和调整提供早期和发展的机会。实施生物标志物的可区分多变量模型来鉴别一组生物标志物,所述生物标志物使得所公开的方法能够鉴别患有对AR靶向疗法具有新生抵抗性的肿瘤的前列腺癌患者。因此,本发明公开涵盖了多变量模型以鉴别患有对AR靶向疗法具有新生抵抗性的肿瘤的前列腺癌患者。因此,本发明公开已鉴别了用于鉴别患有对AR靶向疗法具有新生抵抗性的肿瘤的前列腺癌患者的预测生物标志物。

[0031] 在一个实施方式中,本发明公开提供了预测对于前列腺癌患者肿瘤中雄激素受体(AR)靶向疗法的新生抵抗性的方法,包括(a)实施包括得自患者的血液样品中有核细胞的免疫荧光染色和形态学表征的直接分析以产生循环肿瘤细胞(CTC)数据,其中所述分析包括确定一组对于雄激素受体(AR)靶向疗法的新生抵抗性的常规和非常规CTC生物标志物的可测量特征,和(c)评价CTC数据以确定前列腺癌患者肿瘤中AR靶向疗法的新生抵抗性的概率。在具体的实施方式中,所述前列腺癌是转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC)。在一些实施方式中,所述有核细胞的免疫荧光染色包括广谱细胞角蛋白、分化簇(CD)45、二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)和AR。

[0032] 在一些实施方式中,在本文所公开的方法中使用的生物标志物包括(1) CTC异质性、(2) 具有明显核仁形态的细胞角蛋白阳性(CK+)、AR N-末端阳性CTC的频率和(3) AR C-末端截短CTC的频率。在其他实施方式中,CTC异质性包括选自下列的CTC生物标志物:常规CTC、CTC簇、CK-CTC、小CTC、核仁<sup>+</sup>CTC和CK斑点型CTC以及表1所列的其他生物标志物。

[0033] 由于2004年美国食品和药物管理局(FDA)的关键性批准,通过使用多西他赛,前列腺癌中药物疗法的快速进展得到了极大改善并且导致产生了新纪元,其中通过加入新型激素试剂、免疫疗法、二线化疗以及放射性药物(参见表1),进展已超越了雄激素阻断疗法(ADT)。目前,顺序的选择依赖于患者情况,是否存在转移性疾病症状。7,8位无症状或最低限度症状患者可能受益于Sipuleucel-T的早期使用,而使用多西他赛的治疗通常保留给具有疼痛的患者。镭主要用于骨转移患者,特别是在非侵袭性化疗候选的那些患者,对于疼痛缓解作用,可以施用乙酸阿比特龙。在进行多西他赛施用后,可以提供试剂,如卡巴他赛、乙酸阿比特龙、恩杂鲁胺或镭。尽管通过使用这些疗法,无疑改善了存活结局,但是对于每种方案,疾病最终将发展。

[0034] 处于睾酮或更有效的二氢睾酮(DHT)形式的雄激素已是前列腺癌发展和前列腺分化的明确定义的驱动因素。照此,当手术睾丸切除术形式的去势治疗实现显著前列腺肿瘤消退时,在几十年前已建立了晚期前列腺癌的治疗主体。9从那时起,主要由于患者的优先选择,使用化学去势的取代。10因此,ADT已成为局部晚期或转移性前列腺癌的标准全身治疗。11尽管ADT在大多数患者中几乎始终有效,但是不可避免地发生了疾病向去势治疗抵抗性的发展。12目前,逐渐认识到尽管表面上睾酮达到去势水平,但雄激素受体(AR)仍过表达,这是因为替代受体可以激活AR或者其他靶标基因可以帮助保持去势-抵抗性表型,13,14因此,在文献中已广泛采用术语“去势治疗-抵抗性”。对这些雄激素在刺激前列腺癌生长中的作用的进一步理解导致开发和批准了阿比特龙和恩杂鲁胺。

[0035] 一些因素与前列腺癌高风险有关。遗传学、年龄增长以及环境和地理因素起主要作用。但是,在一些个体中,饮食因素,如红肉中存在的脂肪-脂肪酸、 $\alpha$ 亚麻酸的大量消费、微量元素,如硒的缺乏以及低水平的维生素D和E也涉及到前列腺癌发展的高风险。

[0036] 应注意除非内容中明确规定,否则如本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式的“一个”和“所述”包括复数对象。因此,例如,对“生物标志物”的提及包括两种或更多种生物标志物的混合物等。

[0037] 具体地,与给定量有关的术语“约”表示包括正或负5%的偏差。

[0038] 除非内容中明确规定,否则如包括所附权利要求在内的本发明申请中所使用的,单数形式的“一个”和“所述”包括复数参考并且与“至少一个”和“一个或多个”是可互换使用的。

[0039] 如本文所使用的,术语“包含”、“包括”、“含有”及其任何变化形式旨在覆盖非排他包含物,从而包含、包括或含有元素或元素表的工艺、方法、方法限定的产品或物质组合物不仅仅包括那些元素,而且可以包括未明确列出的或非这些工艺、方法、方法限定的产品或物质组合物固有的其他元素。

[0040] “生物标志物”是可以测量并且与前列腺癌,具体地,mCRPC的概率有关的任何分子、性质、特性或方面。所述术语还涵盖了可以测量并且与预测对前列腺癌疗法,例如,AR靶向疗法的反应有关的任何性质、特性、特征或方面。对于CTC生物标志物,这些可测量特征可以包括(例如)生物样品中生物标志物或其型的存在、不存在或浓度,改变的免疫荧光和/或形态学表型,如(例如)核的详细信息、核轮廓、存在或不存在核仁、细胞浆的质量、细胞浆的量、与适当对照受试者相比免疫荧光染色谱图的强度和/或对CTC生物标志物观察到的表型的存在或异质性程度。除CTC生物标志物之外,生物标志物还可以包括风险指征,包括(例如)年龄、家族史、种族和饮食。

[0041] 如本文所使用的,术语“组”是指包含一个或多个生物标志物的组合物,如阵列或集合。该术语还可以表示本文所述的一种或多种生物标志物的表达类型的谱图或指数。用于生物标志物组的生物标志物的数目基于生物标志物值的特定组合的灵敏度和特异性值。

[0042] 如本文所使用的术语“患者”优选地指人,但是还涵盖其他哺乳动物。注意到如本文所使用的术语“生物”、“个体”、“受试者”或“患者”作为同义词并且可互换使用。

[0043] 如本文所使用的,术语“循环肿瘤细胞”或“CTC”旨在涵盖生物样品中存在的并且与前列腺癌有关的任何稀有细胞。可以作为单个细胞或CTC簇提供的CTC通常是在患者循环中以极低浓度存在的从实体瘤上脱落的上皮细胞。

[0044] 如本文所使用的,“常规CTC”是指单个CTC,它是细胞角蛋白阳性、CD45阴性的,含有DAPI核,并且形态上不同于周围白细胞。

[0045] 如本文所使用的,“非常规CTC”是指至少一种特性不同于常规CTC的CTC。非常规CTC包括图2部分B中所示的5种CTC子类型,其包括CTC簇、至少一种其他生物标志物为阳性从而使其分类为CTC的CK阴性CTC、小CTC、核仁<sup>+</sup>CTC和CK斑点型CTC。如本文所使用的,术语“CTC簇”表示具有接触细胞膜的两个或更多个CTC。

[0046] 如本文所使用的,术语“CTC异质性”是指样品中所观察到的CTC子类型的数量和/或频率。CTC子类型包括本文所述的非常规CTC以及其特征为与常规CTC不相关的形态学和/或免疫荧光表型的任何CTC。如本文所公开的,与对AR靶向疗法起反应的患者相比,在对AR靶向疗法不起反应的患者异质性更强。因此,可以分配对应于样品CTC子类型数目的得分。例如,涵盖每一个可观察的CTC子类型的样品将分配最高异质性得分,这可以预测患者将不会对AR靶向疗法起反应。相反,异质性缺乏对应于低异质性得分,其可以预测患者有可能对

AR靶向疗法起反应。可以将患者异质性得分计算为每7.5mL血液样品的生物标志物数目(异质性得分(每位患者)=#生物标志物,其中[生物标志物]/7.5mL>0)。CTC异质性是用于实践本发明所述的方法的生物标志物,其涵盖了总体而言还用作生物标志物的多个可测量特征。表1列出了用于实践本发明所述的方法的异质性生物标志物的列表。

表 1. 异质性生物标志物	
[CK+簇]/7.5mL	
[CK-簇]/7.5mL	
[簇]/7.5mL	
[AR+ CTC]/7.5mL	
[AR- CTC]/7.5mL	
[CK+ CTC]/7.5mL	
[CK- CTC]/7.5mL	
小细胞区域/7.5mL	
平均细胞区域/7.5mL	
大细胞区域/7.5mL	
巨细胞区域/7.5mL	
小核区域/7.5mL	
平均核区域/7.5mL	
大核区域/7.5mL	
巨大核区域/7.5mL	
核仁-/7.5mL	
核仁+/7.5mL	
核仁++/7.5mL	
Dot CK-/7.5mL	
Dot CK+/7.5mL	
[CK++ AR+ 核仁++]/7.5mL	
[CK++ AR- 核仁-]/7.5mL	
[CK++ AR+ 核仁-]/7.5mL	
[CK++ AR- 核仁++]/7.5mL	
[CK++ AR+ 核仁+]/7.5mL	
[CK++ AR- 核仁+]/7.5mL	
[CK+ AR- 核仁++]/7.5mL	
[CK+ AR- 核仁-]/7.5mL	
[CK++ AR++ 核仁++]/7.5mL	
[CK+ AR+ 核仁++]/7.5mL	
[CK- AR- 核仁++]/7.5mL	
[CK- AR- 核仁-]/7.5mL	
[CK- AR+ 核仁+]/7.5mL	
[CK- AR+ 核仁-]/7.5mL	
[CK+ AR+ 核仁+]/7.5mL	
[CK- AR+ 核仁++]/7.5mL	

[0047]

表 1. 异质性生物标志物	
[0048]	[CK+ AR+ 核仁-]/7.5mL
	[CK- AR- 核仁+]/7.5mL
	[CK- AR++ 核仁-]/7.5mL
	[CK- AR++ 核仁++]/7.5mL
	[CK- AR++ 核仁+]/7.5mL
	[CK+ AR++ 核仁++]/7.5mL
	[CK+ AR++ 核仁+]/7.5mL
	[CK++ AR++ 核仁+]/7.5mL
	[CK++ AR++ 核仁-]/7.5mL

[0049] 在一些实施方式中,AR C-末端截短CTC的频率是用于实践本发明所述的方法的生物标志物。如本文所公开的,与N-末端AR核染色相比核C-末端AR染色的减少可以预测患者将不会对AR靶向疗法起反应。

[0050] 以其最广泛的含义,生物样品可以是含有CTC的任何样品。样品可以包括体液,如血液;细胞制剂的可溶性部分或其中生长细胞的培养基的一部分;分离或提取自细胞的染色体、细胞器或膜;在溶液中或与基底结合的基因组DNA、RNA或cDNA;细胞;组织;组织印迹;指纹;细胞;皮肤等。得自受试者的生物样品可以是含有细胞的任何样品,并且涵盖了其中可以检测CTC的任何材料。样品可以是(例如)全血、血浆、唾液或者含有细胞的其他体液或组织。

[0051] 在具体的实施方式中,所述生物样品是血液样品。如本文所述,样品可以是全血,更优选地周围血液或者周围血液细胞部分。如本领域技术人员将理解的,血液样品可以包括血液的任何部分或组分,无限制地,T细胞、单核细胞、嗜中性白细胞、红细胞、血小板和微囊,如外来体和外来体样微囊。在本发明公开的背景中,包含在血液样品中的血细胞涵盖了任何有核细胞并且不局限于全血组分。照此,血细胞包括(例如)白细胞(WBC)和稀有细胞,包括CTC。

[0052] 本发明公开的样品可以分别包含通过本领域中熟知的方法(例如,FACS、免疫组织化学)可分辨的多个细胞群体和细胞亚群。例如,血液样品可以含有无核细胞群体,如红细胞(例如,4-5百万/ $\mu$ l)或血小板(150,000-400,000个细胞/ $\mu$ l),和有核细胞群体,如WBC(例如,4,500-10,000个细胞/ $\mu$ l)、CEC或CTC(循环肿瘤细胞;例如,2-800个细胞/ $\mu$ l)。WBC可以含有细胞亚群,例如,嗜中性白细胞(2,500-8,000个细胞/ $\mu$ l)、淋巴细胞(1,000-4,000个细胞/ $\mu$ l)、单核细胞(100-700个细胞/ $\mu$ l)、嗜曙红细胞(50-500个细胞/ $\mu$ l)、嗜碱细胞(25-100个细胞/ $\mu$ l)等的细胞亚群。本发明公开的样品是未富集的样品,即它们未对有核细胞的任何具体群体或亚群富集。例如,未富集的血液样品未对CTC、WBC、B细胞、T细胞、NK-细胞、单核细胞等富集。

[0053] 在一些实施方式中,所述样品是得自健康受试者或基于领域已知的临床确立的标准(包括,例如,年龄、种族、家庭snd史)而视为前列腺癌或已有前列腺癌的转移的高风险受试者的血液样品。在一些实施方式中,所述血液样品来自自己基于组织或液体活组织检查和/或手术或临床基础诊断为前列腺癌和/或mCRPC的受试者。在一些实施方式中,所述血液样品得自显示出本领域熟知的前列腺癌和/或mCRPC临床表现的受试者或者表现出任何已知

的前列腺癌和/或mCRPC风险因素的受试者。

[0054] 如本文在产生CTC数据的背景中所使用的,术语“直接分析”是指与检测前对样品富集CTC相反,在存在于样品中的所有周围有核细胞的背景中检测CTC。在一些实施方式中,所述方法包括提供包含CTC和至少200个周围白细胞(WBC)的视场的显微术。

[0055] 本发明公开的基本方面在于就CTC检测而言,所公开方法前所未有的稳健性。就CTC而言,本文所公开的稀有事件检测基于群体的直接分析(即未富集),其涵盖了在周围非稀有事件的背景中鉴别稀有事件。根据所公开的方法,稀有事件的鉴别固有地将周围事件鉴别为非稀有事件。考虑周围非稀有事件并确定非稀有事件的平均值,例如,非稀有事件的平均细胞大小,使得能够通过除去噪音来标定检测方法。结果是所公开的方法的稳健性,这是使用未基于直接分析的方法所不可能实现的,并且相反将富集群体与稀有事件固有失真的背景比较相比较。本文所公开的直接分析方法的稳健性使得能够鉴定CTC,包括本文所述的CTC子类型,其使得能够鉴别使用其他CTC检测方法不能实现的表型和异质性并且使得能够在所主张的方法的背景中分析生物标志物。

[0056] 在一些实施方式中,用于预测对于前列腺癌患者肿瘤中雄激素受体(AR)靶向疗法的新生抵抗性的方法还可以涵盖个体患者风险因素和成像数据,其包括本领域已知和使用的任何形式的成像方式,例如并且无限制地,通过X光计算机断层成像(CT)、超声、正电子发射断层成像术(PET)、电阻抗断层成像和磁共振(MRI)。应理解本领域技术人员可以基于多个本领域已知的标准选择成像方式。如本文所述,本发明所述的方法可以涵盖一幅或多幅成像数据。在本文所公开的方法中,一个或多个个体风险因素可以选自年龄、种族、家族史。应理解本领域技术人员可以基于多个本领域已知的标准选择其他个体风险因素。如本文所述,本发明所述的方法可以涵盖一个或多个个体风险因素。因此,生物标志物可以包括成像数据、个体风险因素和CTC数据。如本文所述,生物标志物还可以包括(但不限于)生物分子,其包括核苷酸、核酸、核苷、氨基酸、糖、脂肪酸、类固醇、代谢产物、肽、多肽、蛋白质、碳水化合物、脂肪、激素、抗体、用作生物大分子的替代物的感兴趣区及其组合(例如,糖蛋白、核糖核蛋白、脂蛋白)以及生物分子的部分或片段。

[0057] CTC数据可以包括形态特征和免疫荧光特征两者。如本领域技术人员将理解的,生物标志物可以包括生物分子或生物分子的片段,其变化和/或检测可以单独或与其他可测量特征结合与前列腺癌和/或mCRPC相关联。可以作为单个细胞或CTC簇存在的CTC通常是从实体瘤脱落的上皮细胞并且在受试者循环中以极低浓度存在。因此,血液样品中CTC的检测可以被称为稀有事件检测。血细胞群体中CTC的丰度小于1:1000,例如,丰度小于1:5000、1:10000、1:30000、1:50000、1:100000、1:300000、1:500000或1:1000000。在一些实施方式中,细胞群体中CTC的丰度为1:50000至1:100000。

[0058] 本发明公开的样品可以通过任何方式获得,其包括(例如)通过实体组织活组织检查或液体活组织检查的方式(参见,例如,Marrinucci D.et al.,2012,Phys.Biol.9 016003)。简要地,在具体的实施方式中,所述方法可以涵盖7.5mL血液样品中的溶胞和红细胞的去、残余有核细胞在专用显微镜用载玻片上的沉积,每个载玻片容纳大致0.5mL全血的等价物。可以从已知包含血细胞或其组分的任何来源提取血液样品,如静脉血、动脉血、外周血、组织血、脐带血等。可以使用熟知和常规的临床方法处理样品(例如,用于吸取和处理全血的程序)。在一些实施方式中,将血液样品吸入抗凝血液收集管(BCT),其可以含有

EDTA或Streck无细胞DNA™。在其他实施方式中,将血液样品吸入CellSave®管(Veridex)。在进一步处理前,可以将血液样品再储存多至12小时、24小时、36小时、48小时或60小时。

[0059] 在一些实施方式中,本发明公开的方法包括获得血液样品白细胞(WBC)计数的初始步骤。在某些实施方式中,可以通过使用HemoCue®WBC装置(Hemocue, Angelholm, Sweden)获得WBC计数。在一些实施方式中,将WBC计数用于确定每个载玻片铺板统一加载量的有核细胞所需的血液量并用于计算回每个血容量的CTC等价量。

[0060] 在一些实施方式中,本发明公开的方法包括裂解血液样品中红细胞的初始步骤。在一些实施方式中,例如,通过将氯化铵溶液加入到血液样品中来裂解红细胞。在某些实施方式中,在红细胞裂解后对血液样品进行离心,并将有核细胞在(例如)PBS溶液中再悬浮。

[0061] 在一些实施方式中,将来自样品(如血液样品)的有核细胞作为单层沉积在平面载体上。平面支持物可以是任何材料,例如,任何无荧光材料(fluorescently clear material)、任何有助于细胞附着的材料、任何有助于容易除去细胞碎片的材料、任何厚度<100μm的材料。在一些实施方式中,所述材料为薄膜。在一些实施方式中,所述材料是玻璃载玻片。在某些实施方式中,所述方法包括将来自血液样品的有核细胞作为单层沉积在玻璃载玻片上的初始步骤。可以涂覆玻璃载玻片以允许活细胞的最大保留(参见,例如, Marrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9 016003)。在一些实施方式中,将约50万、100万、150万、200万、250万、300万、350万、400万、450万或500万的有核细胞沉积在玻璃载玻片上。在一些实施方式中,本发明公开的方法包括将约300万的细胞沉积在玻璃载玻片上。在其他实施方式中,本发明公开的方法包括将约200万至约300万之间的细胞沉积在玻璃载玻片上。在一些实施方式中,在已完成本发明公开的方法之后,玻璃载玻片和固定化细胞样品对于进一步处理或实验是可用的。

[0062] 在一些实施方式中,本发明公开的方法包括在未富集血液样品中鉴别有核细胞的初始步骤。在一些实施方式中,用荧光染色鉴别有核细胞。在某些实施方式中,荧光染色包括核酸特异性染色。在某些实施方式中,荧光染色剂为二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)。在一些实施方式中,有核细胞的免疫荧光染色包括广谱细胞角蛋白(pan cytokeratin)、分化簇(CD)45和DAPI。在本文进一步描述的一些实施方式中,CTC包括来自周围有核细胞的不同免疫荧光染色。在一些实施方式中,CTC不同的免疫荧光染色包括DAPI(+)、CK(+)和CD 45(-)。在一些实施方式中,CTC的鉴别还包括将广谱细胞角蛋白荧光染色的强度与周围有核细胞进行比较。在一些实施方式中,通过荧光扫描显微术产生CTC数据以检测血液样品中有核细胞的免疫荧光染色。Marrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9 016003。

[0063] 在具体的实施方式中,保留了所有有核细胞并且用靶向细胞角蛋白(CK)的单克隆抗体免疫荧光染色,细胞角蛋白是仅存在于上皮细胞中的中间丝,pan白细胞特异性抗体靶向常见的白细胞抗原CD45和核染料DAPI。可以在多个荧光通道中对有核血细胞成像以产生保留了核轮廓和细胞浆分布的精细细胞学详细信息的高质量和高分辨率数字图像。尽管可以用靶向CD45的pan白细胞特异性抗体鉴别周围WBC,但是可以将CTC鉴别为DAPI(+)、CK(+)和CD 45(-)。在本文所述的方法中,CTC包括与周围有核细胞不同的免疫荧光染色。

[0064] 在其他实施方式中,所述CTC数据包括也称为高分辨率CTC(HD-CTC)的常规CTC。常规CTC是CK阳性、CD45阴性的,其包含完整的DAPI阳性核而无可鉴别的凋亡变化或破裂外形,并且在形态上不同于周围白细胞(WBC)。如前所述,在HD-CTC计数期间,可以将DAPI(+)

CK(+)和CD45(-)强度分类为可测量特征(图1)。Nieva et al., *Phys Biol* 9:016004 (2012)。本文所公开的方法所使用的未富集直接分析导致了高灵敏度和高特异性,尽管已知增加高分辨率细胞形态使得能够对CTC群体进行详细的形态学表征是非均一的。

[0065] 尽管可以将CTC鉴别为包含DAPI(+)、CK(+)和CD 45(-)细胞,但是可以通过本领域技术人员选择用于产生CTC数据和/或鉴别CTC和CTC簇的任何其他生物标志物实践本发明所述的方法。本领域技术人员知道如何选择形态特征、生物分子或生物分子片段,其变化和/或检测可以与CTC有关。分子生物标志物包括(但不限于)生物分子,其包括核苷酸、核酸、核苷、氨基酸、糖、脂肪酸、类固醇、代谢产物、肽、多肽、蛋白质、碳水化合物、脂肪、激素、抗体、用作生物大分子的替代物的感兴趣区及其组合(例如,糖蛋白、核糖核蛋白、脂蛋白)。该术语还包括生物分子的部分或片段,例如,蛋白质的肽片段或多肽。

[0066] 本领域技术人员将理解一些方法可以用于产生CTC数据,其包括基于显微术的方法,包括荧光扫描显微术(参见,例如,Marrinucci D.等人,2012,*Phys. Biol.* 9:016003)、质谱分析法,如MS/MS、LC-MS/MS、多次反应监控(MRM)或SRM以及产物离子监控(PIM)并且还包包括基于抗体的方法,如免疫荧光法、免疫组织化学、免疫测定,如免疫印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀、放射免疫测定、斑点印迹和FACS。免疫测定技术和规程通常是本领域技术人员所知的(Price和Newman,Principles and Practice of Immunoassay,第2版,Grove's Dictionaries,1997;和Gosling,Immunoassays:A Practical Approach,Oxford University Press,2000)。可以使用多种免疫测定技术,包含竞争和非竞争免疫测定(Self et al.,Curr. Opin. Biotechnol., 7:60-65(1996),还参见John R. Crowther,The ELISA Guidebook,第1版,Humana Press 2000,ISBN 0896037282和An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques,Chard T(主编),Elsevier Science 1995,ISBN 0444821198)。

[0067] 本领域技术人员将进一步理解可以使用本领域中已知的任何种类的标志物-特异性结合剂来检测生物标志物的存在与否,其包括(例如)抗体、适配体、融合蛋白,如包含蛋白质受体或蛋白质配体成分的融合蛋白,或生物标志物特异性小分子结合剂。在一些实施方式中,通过抗体确定CK或CD45的存在与否。

[0068] 本发明公开的抗体特异性结合生物标志物。可以使用本领域中已知的任何适合的方法制备抗体。参见,例如,Coligan,Current Protocols in Immunology(1991);Harlow& Lane,Antibodies:A Laboratory Manual(1988);Goding,Monoclonal Antibodies: Principles and Practice(第2版,1986)。所述抗体可以是任何免疫球蛋白或其衍生物,无论是天然的或者完全或部分合成产生的。维持特异结合能力的它的所有的衍生物也包含在该术语中。所述抗体具有与免疫球蛋白结合域同源或基本同源的并且可以来源于天然来源或者部分或完全合成产生的结合域。所述抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。在一些实施方式中,抗体是单链抗体。本领域那些技术人员将理解抗体可以以任何多种形式提供,其包括(例如)人源化、部分人源化、嵌合、嵌合人源化等。所述抗体可以是抗体片段,其包括(但不限于)Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、Fv、dsFv双链抗体和Fd片段。可以通过任何方式产生抗体。例如,所述抗体可以通过完整抗体的碎片化来酶促或化学产生和/或它可以从编码所述部分抗体序列的基因重组产生。所述抗体可以包括单链抗体片段。作为另外一种选择或者另外,所述抗体可以包括(例如)通过二硫键连接在一起的多条链,和得自这些分子的任

何功能性片段,其中这些片段保留了亲本抗体分子的特异结合性质。由于它们作为完整分子的功能性组分的较小尺寸,对于在某些免疫化学技术和实验应用中的使用,抗体片段可以提供优于完整抗体的优势。

[0069] 当在本发明所述的方法中产生CTC数据时,可以在本文所述的方法中使用可检测的标记物以用于生物标志物的直接或间接检测。可以使用多种可检测的标记物,并基于所需的灵敏度、与抗体缀合的容易性、稳定性要求和可用的仪器以及处理规定选择标记物。本领域技术人员熟悉基于本发明所述的方法中生物标志物的测定检测的适合的可检测标记物的选择。适合的可检测标记物包括(但不限于)荧光染料(例如,荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、Oregon Green™、罗丹明、得克萨斯红、四若丹明异硫氰酸酯(tetrarhodimine isothiocyanate, TRITC)、Cy3、Cy5、AlexaFluor®647、AlexaFluor®555、AlexaFluor®488)、荧光标志物(例如,绿色荧光蛋白(GFP)、藻红蛋白等)、酶(例如,荧光素酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、纳米颗粒、生物素、洋地黄毒苷(digoxigenin)、金属等。

[0070] 对于质谱基分析,使用同位素试剂的差异标记,例如,同位素编码的亲合标签(ICAT)或使用同量异序标记试剂的近期变化,iTRAQ(Applied Biosystems,Foster City, Calif.)然后进行多维液相色谱(LC)和串联质谱(MS/MS)分析可以在本发明公开所述的方法的实践中提供其他方法。

[0071] 使用化学发光抗体的化学发光测定可以用于蛋白质的灵敏、非放射性检测。用荧光物标记的抗体也可以是适合的。荧光物的实例无限制地包括DAPI、荧光素、Hoechst 33258、R-藻青蛋白、B-藻红蛋白、R-藻红蛋白、罗丹明、得克萨斯红和丽丝胺(lissamine)。间接标记物包括在本领域中熟知的多种酶,如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、β-半乳糖苷酶、尿酶等。使用适合于辣根-过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶的底物的检测系统在本领域中是熟知的。

[0072] 可以(例如)使用显微镜,如荧光显微镜或荧光扫描显微镜分析来自直接或间接标记物的信号。作为另外一种选择,可以使用分光光度计检测来自发色底物的颜色;使用辐射计数器来检测辐射,如γ粒子计数器检测<sup>125</sup>I;或者在存在特定波长的光的情况下使用荧光计检测荧光。如果需要,用于实践本发明公开的方法的测定可以自动或机械化进行,并且可以同时检测来自多个样品的信号。

[0073] 在一些实施方式中,生物标志物是免疫荧光标志物。在一些实施方式中,免疫荧光标志物包括对上皮细胞特异的标志物。在一些实施方式中,免疫荧光标志物包括对白细胞(WBC)特异的标志物。在一些实施方式中,一个或多个免疫荧光标志物包括CD 45和CK。

[0074] 在一些实施方式中,有核细胞,如CTC或WBC中免疫荧光标志物的存在与否导致了不同的免疫荧光染色图案。基于在各自细胞中检测何种上皮细胞或WBC标志物,CTC和WBC的免疫荧光染色图案可以是不同的。在一些实施方式中,确定一个或多个免疫荧光标志物的存在与否包括使用(例如)明确鉴别WBC的CD45的免疫荧光染色,将CTC不同的免疫荧光染色与WBC不同的免疫荧光染色相比较。存在与WBC多个亚群结合的其他可检测标志物或可检测标志物的组合。这些可以在多种组合中使用,包括与CD45的免疫荧光染色组合或作为它的替代。

[0075] 在一些实施方式中,CTC包括不同于周围有核细胞的形态特征。在一些实施方式中,所述形态特征包括核尺寸、核形状、细胞尺寸、细胞形状和/或核质比。在一些实施方式

中,所述方法还包括通过核详细情况、核轮廓、核的存在与否、细胞浆质量、细胞浆数量、免疫荧光染色图案的强度来分析有核细胞。本领域的技术人员将理解本发明公开的形态特征可以包括可以确定并且与CTC检测有关的细胞的任何特征、性质、特性或方面。

[0076] 可以通过本领域中已知的任何显微方法产生CTC数据。在一些实施方式中,通过荧光扫描显微术实施所述方法。在某些实施方式中,显微方法提供了CTC及其周围WBC的高分辨率图像(参见,例如,Marrinucci D.et al.,2012,Phys.Biol.9 016003)。在一些实施方式中,通过荧光扫描显微镜扫描用来自样品,如未富集的血样品的有核细胞单层涂覆的载玻片,并且记录来自免疫荧光标志物和核染色剂的荧光强度以允许确定每个免疫荧光标志物的存在与否并评价有核细胞的形态。在一些实施方式中,以自动化方式进行显微数据的采集和分析。

[0077] 在一些实施方式中,CTC数据包括检测一个或多个生物标志物,例如,CK和CD 45。如果在高于所使用的各个检测方法的背景噪声之上是可检测的(例如,比背景高2-倍、3-倍、5-倍或10-倍;例如,在背景之上 $2\sigma$ 或 $3\sigma$ ),则认为细胞中“存在”生物标志物。如果在高于所使用的检测方法的背景噪声之上是不可检测的(例如,比背景信号高 $<1.5$ 倍或 $<2.0$ 倍;例如,在背景之上 $<1.5\sigma$ 或 $<2.0\sigma$ ),则认为“不存在”生物标志物。

[0078] 在一些实施方式中,通过在荧光扫描过程期间选择暴露时间来确定有核细胞中免疫荧光标志物的存在与否,从而在视场中所有免疫荧光标志物对WBC实现了预设的荧光水平。在这些条件下,即使在WBC上不存在,CTC-特异性免疫荧光标志物在WBC中作为具有固定高度的背景信号是可见的。此外,在CTC上不存在的WBC-特异性免疫荧光标志物在CTC中作为具有固定高度的背景信号是可见的。如果其对于各个标志物的荧光信号显著高于固定背景信号(例如,比背景高2-倍、3-倍、5-倍或10-倍;例如,在背景之上 $2\sigma$ 或 $3\sigma$ ),则认为细胞对于免疫荧光标志物是阳性的(即认为存在标志物)。例如,如果对于CD 45,其荧光信号显著高于背景信号,则认为有核细胞是CD 45阳性的(CD 45+)。如果细胞对于各个标志物的荧光信号不显著高于背景信号(例如,比背景信号高 $<1.5$ 倍或 $<2.0$ 倍;例如,在背景之上 $<1.5\sigma$ 或 $<2.0\sigma$ ),则认为细胞对于免疫荧光标志物是阴性的(即认为不存在标志物)。

[0079] 通常,每个显微镜视野含有CTC和WBC两者。在某些实施方式中,显微镜视野显示至少1、5、10、20、50或100个CTC。在某些实施方式中,显微镜视野显示比CTC多至少10、25、50、100、250、500或1000倍的WBC。在某些实施方式中,显微镜视野包含被至少10、50、100、150、200、250、500、1000或更多个WBC围绕的一个或多个CTC或CTC簇。

[0080] 在本文所述方法的一些实施方式中,CTC数据的产生包括存在于血液样品中的CTC的计数。在一些实施方式中,本文所述的方法包括至少1.0个CTC/mL血液、1.5个CTC/mL血液、2.0个CTC/mL血液、2.5个CTC/mL血液、3.0个CTC/mL血液、3.5个CTC/mL血液、4.0个CTC/mL血液、4.5个CTC/mL血液、5.0个CTC/mL血液、5.5个CTC/mL血液、6.0个CTC/mL血液、6.5个CTC/mL血液、7.0个CTC/mL血液、7.5个CTC/mL血液、8.0个CTC/mL血液、8.5个CTC/mL血液、9.0个CTC/mL血液、9.5个CTC/mL血液、10个CTC/mL血液或以上的检测。

[0081] 在本文所述方法的一些实施方式中,CTC数据的产生包括检测不同的CTC子类型,包括非常规CTC。在一些实施方式中,本文所述的方法涵盖了至少0.1个CTC簇/mL血液、0.2个CTC簇/mL血液、0.3个CTC簇/mL血液、0.4个CTC簇/mL血液、0.5个CTC簇/mL血液、0.6个CTC簇/mL血液、0.7个CTC簇/mL血液、0.8个CTC簇/mL血液、0.9个CTC簇/mL血液、1个CTC簇/mL血

液、2个CTC簇/mL血液、3个CTC簇/mL血液、4个CTC簇/mL血液、5个CTC簇/mL血液、6个CTC簇/mL血液、7个CTC簇/mL血液、8个CTC簇/mL血液、9个CTC簇/mL血液、10个CTC簇/mL血液或以上的检测。在具体的实施方式中，本文所述的方法涵盖了至少1个CTC簇/mL血液的检测。

[0082] 在一些实施方式中，所公开的用于预期鉴别mCRPC患者中AR靶向疗法的新生抵抗性的方法涵盖了预测模型的使用。在其他实施方式中，所公开的用于预期鉴别mCRPC患者中AR靶向疗法的新生抵抗性的方法涵盖将可测量特征与参考特征相比较。如本领域技术人员可以理解的，这种比较可以是与参考特征的直接比较或者是其中已将参考特征引入预测模型的间接比较。在其他实施方式中，分析可测量特征来预期鉴别mCRPC患者中AR靶向疗法的新生抵抗性包括以下中的一种或多种：线性差别分析模型、支持向量机分类算法、回归特征消去模型、微阵列预测分析模型、逻辑回归模型、CART算法、flex tree算法、LART算法、随机森林算法、MART算法、机器学习算法、惩罚回归方法及其组合。在具体的实施方式中，所述分析包括逻辑回归。在其他实施方式中，mCRPC患者中AR靶向疗法的新生抵抗性的鉴别表示为风险得分。

[0083] 分析分类法可以使用多种统计分析方法中的任一种以调控定量数据并为样品分类做准备。有用的方法的实例包括线性差别分析、回归特征消去、微阵列预测分析、逻辑回归、CART算法、FlexTree算法、LART算法、随机森林算法、MART算法、机器学习算法以及本领域技术人员所知的其他方法。

[0084] 可以根据设置确定样品属于给定分类的概率的阈值的预测模型方法来进行分类。所述概率优选地为至少50%，或至少60%，或至少70%，或至少80%，或至少90%或更高。还可以通过确定所获得的数据集和参考数据集之间的比较是否产生统计学显著差异来进行分类。如果产生，则将获得该数据集的样品分为不属于参考数据集类。相反地，如果该比较不统计学显著地不同于参考数据集，则将获得该数据集的样品分为属于参考数据集类。

[0085] 可以根据提供具体值或数值范围的质量度量，例如，AUROC (ROC曲线下面积) 或准确度来评价模型的预测能力。曲线下面积量度对于比较整个数据范围内分类器的精确性是有用的。具有较大AUC的分类器将具有较大的将未知在两关心组之间正确分类的能力。在多种临床情况下，ROC分析可以用于选择最佳阈值，从而平衡了特异性和灵敏度之间存在的固有折衷方案。在一些实施方式中，所期望的质量阈值为将样品以至少约0.7、至少约0.75、至少约0.8、至少约0.85、至少约0.9、至少约0.95或更高的准确度分类的预测模型。作为替代量度，所需质量阈值可以表示至少约0.7、至少约0.75、至少约0.8、至少约0.85、至少约0.9或更高的AUC将样品分类的预测模型。

[0086] 如本领域中已知的，可以调整预测模型的相对灵敏度和特异性以有利于特异性度量或灵敏度度量，其中两种度量具有反比关系。根据所进行的测试的具体要求，可以调整上述模型中的限度以提供选择的灵敏度或特异性水平。灵敏度和特异性中的一者或二者可以为至少约0.7、至少约0.75、至少约0.8、至少约0.85、至少约0.9或更高。

[0087] 开始，可以通过测量每个可测量特征或生物标志物的值来分析原始数据，通常重复三次或多次重复三次。可以调控数据，例如，可以使用标准曲线转化原始数据，并使用三次测量的平均值来计算每位患者的平均值和标准偏差。可以在模型中使用前转化这些值，例如，log-转化，Box-Cox转化 (Box和Cox, *Royal Stat. Soc., Series B*, 26:211-246 (1964))。然后，将数据输入到预测模型中，所述模型将根据状况对样品分类。可以将所得信

息传达给患者或保健供应商。

[0088] 在一些实施方式中,本文所公开的用于预期鉴别mCRPC患者中对AR靶向疗法的新生抵抗性的方法具有>60%、>70%、>80%、>90%或更高的特异性。在其他实施方式中,用于预期鉴别mCRPC患者中对AR靶向疗法的新生抵抗性的方法在分类阈值为7.5个CTC/mL血液时具有>90%的特异性。

[0089] 如本领域技术人员将理解的,分析分类法可以使用多种统计分析方法中的任一种以调控定量数据并为样品分类做准备。有用的方法的实例无限制地包括线性差别分析、回归特征消除、微阵列预测分析、逻辑回归、CART算法、FlexTree算法、LART算法、随机森林算法、MART算法和机器学习算法。

[0090] 根据上述说明,显而易见的是可以对本文所述的本发明做出改变和变化以使其适合于多种用途和条件。这些实施方式也在以下权利要求的范围内。

[0091] 在本文中,对变量的任何定义中的元素列表的列举包括该变量作为任何单个元素或所列元素组合(或子组合)的定义。在本文中,对实施方式的列举包括作为任何单个实施方式或者与任何其他实施方式或其部分组合的实施方式。

[0092] 在本说明书中提及的所有专利和专利公开以每个单独的专利和专利公开具体并且单独表明作为参考并入本文的相同程度作为参考并入本文。

[0093] 通过非限制性说明提供了以下实施例。

## 实施例

[0094] 实施例1. 转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC)患者中通过循环肿瘤细胞(CTC)分析的雄激素靶向治疗(AR Tx)的新生抵抗性的特征

[0095] 本实施例显示与对AR靶向疗法起反应的患者相比,对AR靶向疗法不起反应的患者显示出CTC亚群更大的异质性。

[0096] 如先前所报告的,使用Epic Sciences平台对CTC进行样本评价。Marrinucci et al. *Phys Biol* 9:016003, 2012。图2显示了Epic的CTC采集和检测过程的示意图,其如下所示进行:(1)血液裂解,将来自血液样品的有核细胞置于载玻片上;(2)将载玻片保存在-80℃生物储备库中;(3)用CK、CD45、DAPI和AR对载玻片染色;(4)扫描载玻片;(5)运行多参数数字病理算法,和(6)CTC的软件和人读取器确认和生物标志物表达的定量。在用乙酸阿比特龙+泼尼松(A)、恩杂鲁胺(E)或紫杉烷(T)治疗前,立即从mCRPC患者采集85份血液样品,并检验总CTC、特异性CTC亚群和CTC AR蛋白表达。结果与通过PSA变化测量的对AR信号指导的疗法的反应模式有关(图1)。根据图1,将使用A、E或T的患者分为:起反应者(n=39),其包括:真正应答(n=15)、获得性抵抗(n=24)。无应答者(n=46):新生抵抗性。

[0097] 图1-图7和图15描述了其他实验细节。

[0098] 血液样品经历溶血、离心、再悬浮和铺板到载玻片上,然后在-80℃储存。在分析之前,将载玻片融化,通过免疫荧光标记(广谱细胞角蛋白、CD45、DAPI和AR)并通过自动荧光检查法成像,然后通过经病理学训练的技术人员(MSL)进行手动验证。Marrinucci et al. *Phys Biol* 9:016003, 2012。如前所述,在HD-CTC计数期间,根据特征将DAPI(+)、CK(+)和CD45(-)强度分类。

[0099] 本实施例中描述的研究显示,AR疗法或紫杉烷结果之间患者血液的CTC数目/

7.5mL或者非常规CTC数目/7.5mL无显著性差异。因此,CTC/7.5mL或非常规CTC/7.5mL频率不能预测阿比特龙、恩杂鲁胺或紫杉烷抵抗性。

[0100] 本研究还显示通过下列的单细胞CTC测量,根据基线血液,对阿比特龙或恩杂鲁胺的敏感性是可获得的:

[0101] 1. CTC异质性

[0102] 2. 具有明显核仁形态的细胞角蛋白阳性、AR N-末端阳性CTC的频率

[0103] 3. AR C-末端缺失

[0104] 本实施例中所述的研究表明对阿比特龙和恩杂鲁胺抵抗疾病的敏感性CTC谱不能预测对紫杉烷疗法的敏感性,从而确认所公开的方法使得能够基于本文所述的预测特征进行治疗选择。

[0105] 本研究还显示与对AR靶向疗法起反应的患者相比,对AR靶向疗法不起反应的患者显示出CTC亚群更大的异质性。

[0106] 本研究还显示可以使用测量CTC亚群异质性的单个CTC鉴定来预测对AR靶向疗法的抵抗性。

[0107] 本研究还证明可以使用CTC的上皮细胞表达、雄激素N-末端染色和形态学评价来预测对AR靶向疗法的反应。

[0108] 本研究还显示尽管对AR疗法抵抗性的特征与对紫杉烷的抵抗性不相关,但是可以实现对AR疗法抵抗性和紫杉烷反应的特征的优化。

[0109] 实施例2. 一线、二线和三线全身疗法中转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC)患者中循环肿瘤细胞(CTC)的鉴定

[0110] 新批准的雄激素信号指导疗法(AR疗法),包括乙酸阿比特龙+泼尼松(A)和恩杂鲁胺(E)延长mCRPC患者(pts)的存活。本实施例显示顺序使用时,对在A之后施用的E的反应历时较短且不太频繁。更可能受益于新型特异性疗法的靶向患者对开发更有效的治疗是必需的。本实施例还显示了接受用于mCRPC的一线、二线和三线全身疗法的pts中CTC表型的发展以及AR表达和AR定位。

[0111] 如先前所报告的,使用Epic Sciences平台对CTC进行样本评价。Marrinucci et al. Phys Biol 9:016003, 2012. 图2显示了Epic的CTC采集和检测过程的示意图,其如下所示进行:(1) 血液裂解,将来自血液样品的有核细胞置于载玻片上;(2) 将载玻片保存在-80℃生物储备库中;(3) 用CK、CD45、DAPI和AR对载玻片染色;(4) 扫描载玻片;(5) 运行多参数数字病理算法,和(6) CTC的软件和人工读取器确认和生物标志物表达的定量分析。使用Epic Sciences平台,从112位独特患者(58位患者先前无治疗,33位患者先前1次治疗失败,27位患者先前2+次治疗失败)中采集117份血液样品用于CTC分析。Epic分析包括如下所述的CTC子类型鉴别:另外,评价CTC AR表达、AR亚细胞定位和所观察的细胞形态(尺寸、核、CK斑点)。在代表具体临床编组的处理组(未经治疗、一线治疗失败或一线和二线治疗均失败)和亚组之间比较来自所有患者样品的CTC和患者数据。

[0112] 图8-图14和图16描述了其他实验细节。

[0113] 本实施例中所述的研究显示随着所施用的全身疗法数目的增加,常规和非常规CTC的整体数目增加。(未经治疗、一线疗法失败或一线和二线疗法失败)。

[0114] 结果还显示在所研究的每个治疗决策点,CTC、CTC子类型型和CTC表型的数目剧烈

变化。(未经治疗、一线疗法失败或一线和二线疗法失败)。

[0115] 结果还显示非常规CTC亚群的异质性随着一线、二线或三线全身疗法而升高。(未经治疗、一线疗法失败或一线和二线疗法失败)。

[0116] 结果还显示随着连续疗法的提供,观察到更独特的CTC表型:(a)增加的CTC表型包括:核CTC、CTC簇、CK-CTC、CK斑点型CTC、小CTC、AR核仁CTC、AR细胞质CTC。表型的增加与更异质的肿瘤一致。结果还表明追踪表型发展和指导表型鉴定使得本文所公开的方法能够更有效地进行治疗管理。

[0117] 结果还显示随着所施用的全身疗法的数目的增加,具有与新生抵抗性有关的CTC表型的患者的百分比增加。

[0118] 结果还显示在A或E之后,AR核CTC发生率的提高可以鉴别具有组成活性的雄激素信号的患者。

[0119] 在本文中,对变量的任何定义中的元素列表的列举包括该变量作为任何单个元素或所列元素组合(或子组合)的定义。在本文中,对实施方式的列举包括作为任意单个实施方式或者与任意其他实施方式或其部分组合的实施方式。

[0120] 在本说明书中提及的所有专利和专利公开以每个单独的专利和专利公开具体并且以单独表明作为参考并入本文的相同程度作为参考并入本文。

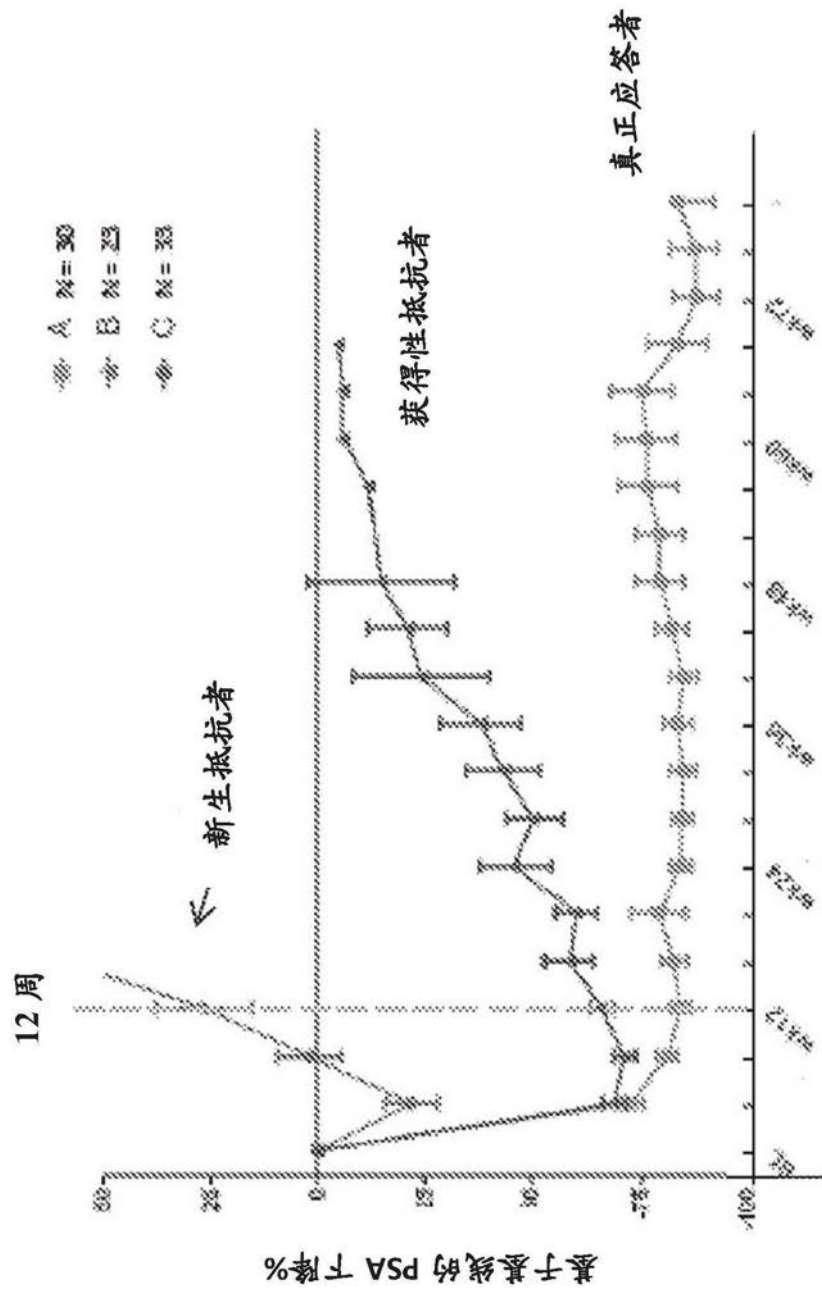


图1



图2A

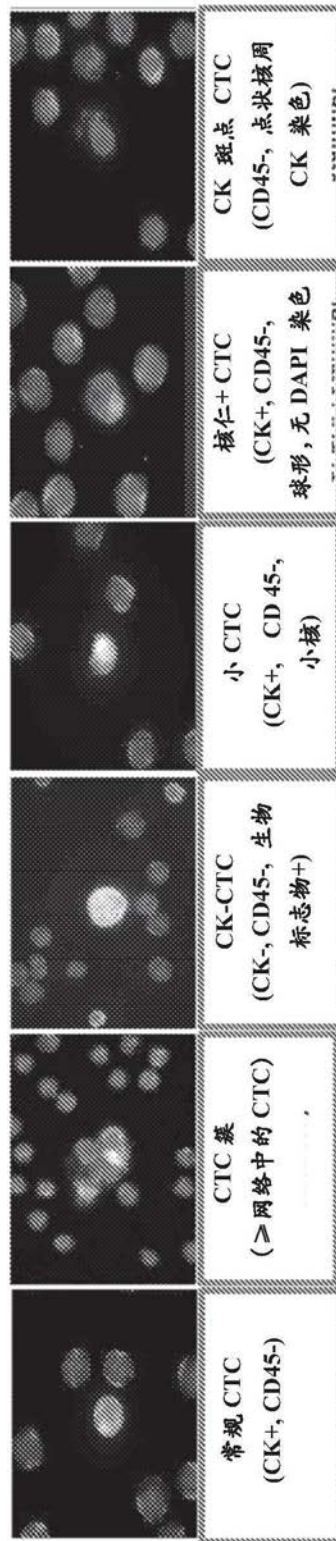


图2B



患者 ID	CTC 类型			CTC 特征			AR TX 预测性因素											
	结果	PSA 相对变化 (%)	总 CTC	CTC 子类型	AR 活力	细胞大小	形态假象	CTC 异质性	AR-C-检测亮 (1-路, 0 = 正常)	CK+/AR+ [CK+/AR+] / 7.5ml								
患者 ID																		
CTC-12-0024	100%	29	28	0	0	29	10	18	0	0	14	0	0					
CTC-14-0272	100%	55	46	0	0	4,307	27	48	0	0	37	56	0	17				
CTC-14-0326	100%	44	35	0	0	5,535	15	8	0	0	26	26	0	13				
CTC-13-0198	100%	148	64	0	82	5,728	119	73	0	0	48	18	72	137	0			
CTC-14-0224	100%	378	318	76	34	11,280	102	273	17	2,058	54	68	68	119	247	0		
CTC-12-0293	100%	126	63	0	63	4,432	100	28	11	63	0	32	5	26	58	5		
CTC-13-0109	100%	87	48	3	35	6,728	47	41	6	81	0	0	15	12	61	87	0	
CTC-14-0039	100%	65	44	0	22	4,584	55	11	11	55	0	0	11	3	55	66	0	
CTC-12-0120	100%	153	99	8	48	10,880	77	107	48	0	0	52	23	38	153	0	31	
CTC-14-0330	100%	58	26	5	24	4,034	5	19	34	0	0	29	14	10	63	0	21	
CTC-13-0134	94%	72	60	0	12	7,965	48	24	0	73	0	0	12	0	60	73	0	
CTC-14-0397	84%	488	276	83	150	4,374	83	426	25	312	50	0	113	125	150	378	13	27
CTC-08-0326	77%	162	91	12	69	5,697	99	67	57	89	2	2	52	30	69	151	0	34
CTC-12-0011	67%	37	21	0	16	8,656	11	27	11	16	5	5	16	0	21	38	0	20
CTC-10-0108	66%	279	247	0	32	5,675	16	283	120	160	5	0	231	40	8	279	0	22
CTC-10-0363	60%	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-09-0048	57%	164	135	5	14	7,727	34	120	29	101	5	0	43	34	63	125	14	30
CTC-12-0135	42%	62	45	6	11	3,171	6	67	34	0	0	6	45	0	17	57	6	24
CTC-12-0047	41%	32	12	0	0	0	12	8	0	0	0	0	12	0	0	12	0	11
CTC-12-0078	39%	22	11	0	11	4,111	11	11	11	0	0	0	11	0	11	22	0	16
CTC-13-0308	28%	962	883	6	73	11,633	798	183	103	266	30	6	218	91	623	907	24	36
CTC-12-0259	2%	10	5	0	5	8,165	11	5	0	0	0	0	0	0	11	1	0	13
CTC-09-0161	-4%	345	268	0	47	6,338	266	80	66	278	4	0	61	47	208	343	4	37
CTC-12-0038	-10%	65	54	0	11	17,571	22	43	16	43	0	5	38	0	27	60	5	23
CTC-12-0174	-14%	22	11	0	11	8,897	17	8	0	0	0	0	0	0	8	0	8	11
CTC-14-0059	-24%	81	38	0	13	3,971	19	38	19	32	0	0	22	0	14	36	0	18
CTC-09-0054	-28%	62	45	0	17	4,238	17	45	23	24	0	0	40	0	17	57	0	19
CTC-12-0041	-30%	66	45	15	5	0	0	66	5	61	0	0	61	5	0	61	5	17
CTC-10-0274	-34%	52	34	0	9	0	0	51	8	34	0	9	34	0	17	43	8	21
CTC-13-0254	-37%	9	0	0	9	0	0	9	0	9	0	0	9	0	0	9	0	9
CTC-08-0093	-37%	14	14	0	0	14	0	14	7	7	0	0	14	0	0	14	0	13
CTC-12-0290	-46%	11	11	0	0	23,068	11	0	0	11	0	0	11	0	0	11	0	8
CTC-10-0100	-46%	168	148	18	0	0	0	168	12	141	12	0	95	18	49	160	8	19
CTC-12-0263	-59%	250	184	59	37	3,985	18	238	20	140	37	37	160	7	96	221	22	23
CTC-12-0118	-73%	262	237	0	26	8,736	227	35	35	207	10	0	35	15	202	252	0	28
CTC-12-0074	-89%	27	27	0	0	15,697	8	22	0	22	0	0	16	5	0	22	0	13
CTC-08-0186	-90%	37	22	0	14	8,417	14	23	14	0	0	0	18	0	18	37	0	18
CTC-08-0084	-90%	70	32	6	32	5,438	32	32	0	38	13	0	38	13	6	61	6	21
CTC-07-0169	-91%	70	23	0	47	3,084	23	47	23	47	0	0	47	0	23	70	0	17
CTC-14-0018	-91%	18	8	5	5	0	0	14	0	14	0	0	9	0	5	14	0	13
CTC-10-0265	-92%	18	18	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
CTC-12-0154	-99%	32	8	0	26	4,348	32	0	12	19	0	0	19	6	8	32	0	16
CTC-13-0113	-97%	263	265	48	52	5,827	17	348	25	264	17	0	196	40	69	300	25	28
CTC-12-0063	-100%	20	4	0	16	4,895	16	4	0	16	0	0	16	0	4	16	0	15
CTC-13-0147	-100%	13	13	0	0	8	13	10	3	0	0	0	13	0	0	13	0	10

图4

紫杉烷 应答 类型	患者 ID	结果 PSA相对基线变化 (%)	CTC 类型			CTC 特征										预后性因素					
			总 CTC	CTC 子类型		AR 活力			细胞大小				形态组群			CTC 异质评分	AR C 指数失 (1=缺 失, 0=正常)	[CK+; AR+; 核仁+]/ 75mL			
				[CKCTC]/7.5mL	[CTC 核仁]/7.5mL	[CTC 核仁+]/7.5mL	平均 (AR n 表达)	[AR + CTC] / 75mL	[AR · CTC] / 75mL	小细胞面积 / 75mL	平均细胞面积 / 75mL	大细胞面积 / 75mL	巨细胞面积 / 75mL	核仁- / 75mL	核仁+ / 75mL				核仁 H+ / 75mL	斑点的 CK- / 75mL	斑点的 CK+ / 75mL
应答	CTC-18-0966	100%	52	49	0	3	5.640	7	45	13	39	0	0	39	3	10	53	0	21	0	0
	CTC-12-0150	100%	2150	1853	15	282	8.818	1141	1058	1058	1082	0	0	830	298	1003	2194	0	37	1	341
	CTC-10-0183	100%	1069	1005	0	63	4.382	150	318	544	484	13	0	728	108	156	1050	0	23	2	31
	CTC-09-0964	100%	16	16	0	0	6.075	10	6	0	12	0	0	0	0	10	10	0	0	0	10
	CTC-12-0070	100%	568	484	38	48	5.483	48	520	157	302	12	0	276	24	160	472	0	29	0	0
	CTC-12-0233	88%	18	18	0	0	7.668	16	0	0	18	0	0	0	0	16	0	16	0	0	0
	CTC-10-0794	48%	120	100	5	15	10.444	95	25	20	95	6	0	20	10	85	110	5	30	1	35
	CTC-08-0958	48%	89	69	0	0	7.59	9	61	6	54	8	0	8	54	8	61	8	20	0	0
	CTC-09-0168	45%	31	13	0	0	0	0	11	6	6	0	0	0	6	11	6	11	0	0	0
	CTC-12-0103	41%	71	47	8	16	7.51	8	63	23	39	0	0	47	16	3	66	5	16	0	0
CTC-12-0272	6%	7	7	0	0	5.9	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0	7	0	0	0	
CTC-10-0916	5%	732	537	6	119	13.88	599	120	112	171	28	0	73	108	532	700	11	35	0	96	
CTC-10-0371	5%	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-10-0371	5%	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-10-0371	5%	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-10-0100	-13%	19	14	5	0	7.715	54	18	18	18	0	0	0	0	9	15	36	0	13	0	9
CTC-09-0124	-17%	135	108	0	27	4.319	43	93	0	131	0	0	0	19	31	81	128	4	18	1	4
CTC-12-0233	-20%	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-13-0005	-23%	44	32	0	12	6.311	32	12	8	305	0	0	0	8	12	8	305	0	18	0	4
CTC-01-0189	-24%	99	20	20	59	6	69	20	59	20	0	0	0	49	0	29	69	0	23	0	0
CTC-08-0953	-25%	14	0	14	0	3.82	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-08-0953	-25%	14	0	14	0	3.82	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-08-0953	-25%	14	0	14	0	3.82	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-10-0300	-24%	14	8	0	6	5.1	8	0	0	14	0	0	0	8	6	8	14	0	13	0	0
CTC-07-0003	-38%	445	376	6	64	6.666	328	117	164	270	6	0	117	69	264	439	0	22	0	152	
CTC-09-0910	-44%	56	0	11	45	6.255	45	11	11	45	0	0	0	23	11	23	57	0	20	0	0
CTC-12-0206	-47%	484	432	35	16	4.651	170	366	240	284	10	0	200	65	156	474	10	36	1	63	
CTC-10-0333	-49%	93	98	0	5	8.08	3	38	51	37	0	0	0	66	9	14	38	0	21	0	0
CTC-08-0185	-61%	222	141	27	54	8.873	70	201	13	174	20	0	114	33	60	174	33	27	0	0	0
CTC-09-0351	-64%	808	871	179	168	6.31	8	900	178	577	46	17	877	150	92	762	68	28	5	0	0
CTC-09-0305	-61%	81	57	0	24	15.16	65	16	0	82	0	0	49	0	33	52	0	19	1	0	0
CTC-10-0410	-67%	2092	2375	19	298	3.733	1548	846	431	225	87	10	431	268	1932	2819	86	48	1	211	
CTC-12-0112	-69%	130	107	8	15	3.16	8	122	23	89	31	8	23	15	36	107	23	25	0	0	
CTC-09-0213	-73%	52	29	0	23	5.64	12	41	6	47	0	0	12	12	29	53	0	21	0	0	
CTC-12-0739	-81%	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-12-0143	-82%	2163	4332	693	420	14.84	6338	1038	1167	4388	170	61	1370	665	4388	6722	11	66	0	1023	
CTC-09-0223	-81%	284	235	0	28	5.457	22	243	110	147	7	0	176	59	29	205	0	24	0	0	
CTC-09-0303	-80%	281	216	4	61	14.43	185	84	51	216	4	0	94	24	163	281	0	35	0	8	
CTC-13-0145	-95%	23	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-09-0303	-83%	56	51	0	5	5.333	28	38	23	32	0	0	14	0	14	0	14	0	22	1	8

图5

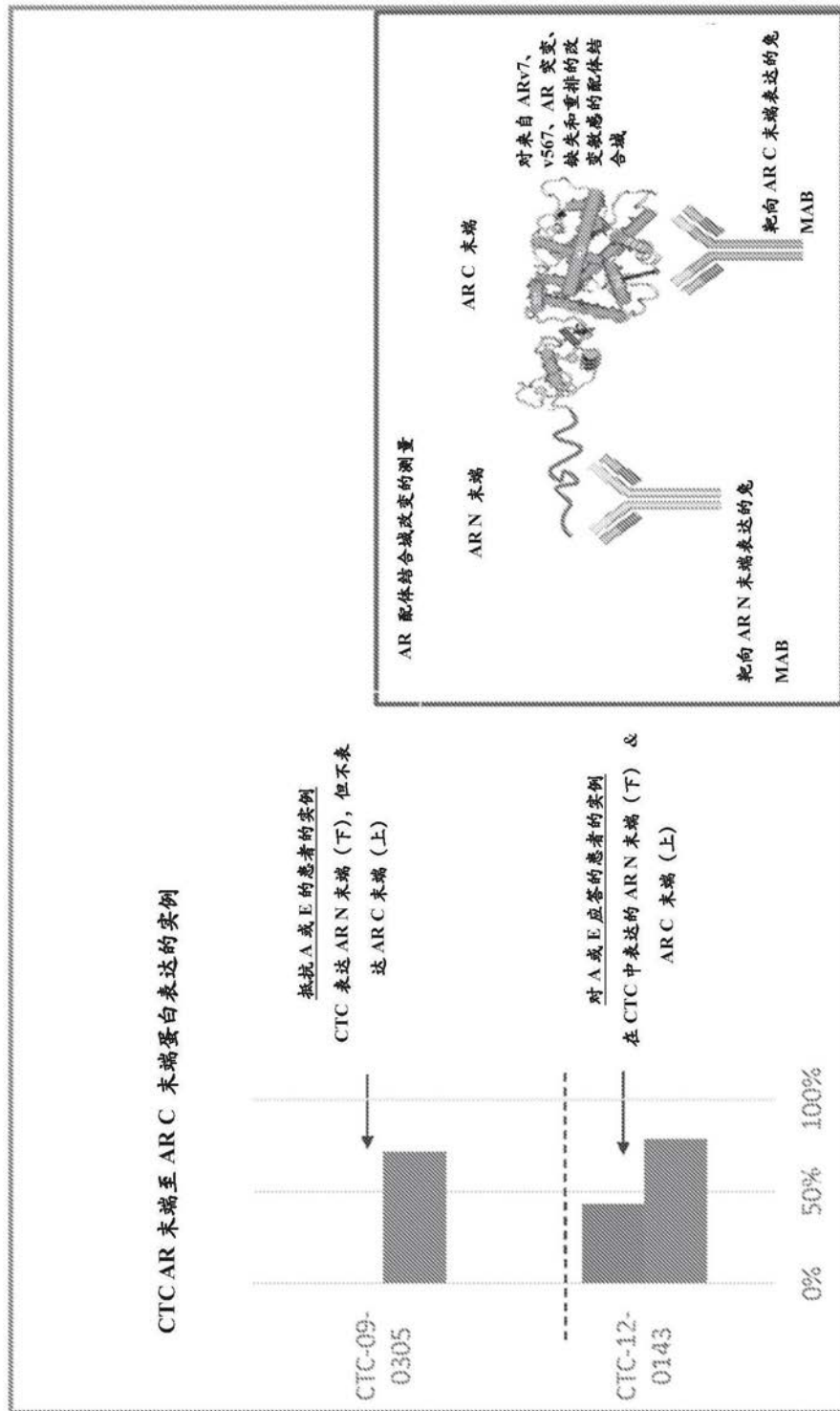


图6

根据基线血液样品, CTC 生物标志物预测 A 或 E 抵抗疾病		
生物标志物	比值比	P-值
CTC 异质性	4.2	0.05
CK /AR+/核仁+CTC 的频率	8.531	0.002
ARN- 端 + 具有 ARC- 端缺失 多变量生物标志物	Inf. 11.9	0.002 0.001

图7A

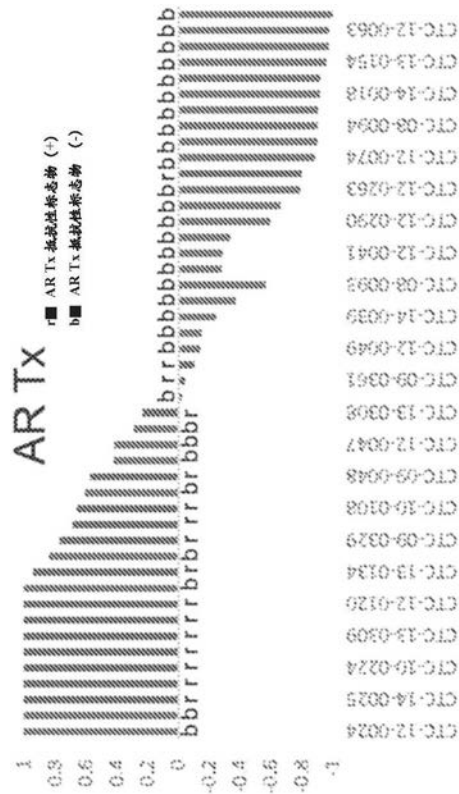


图7B

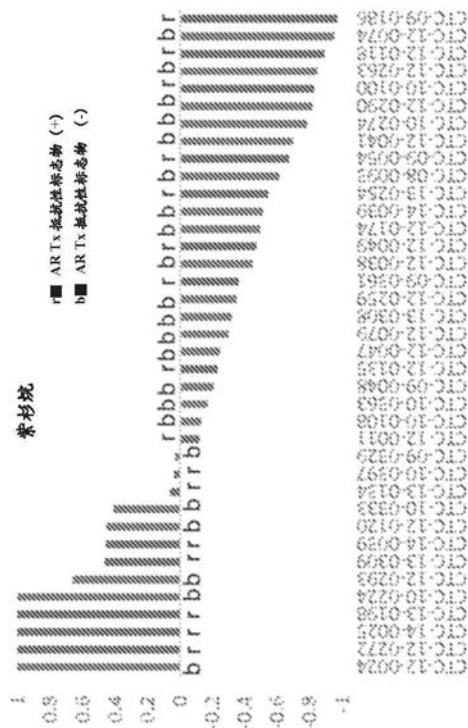


图7C

非常规 CTC

常规 CTC

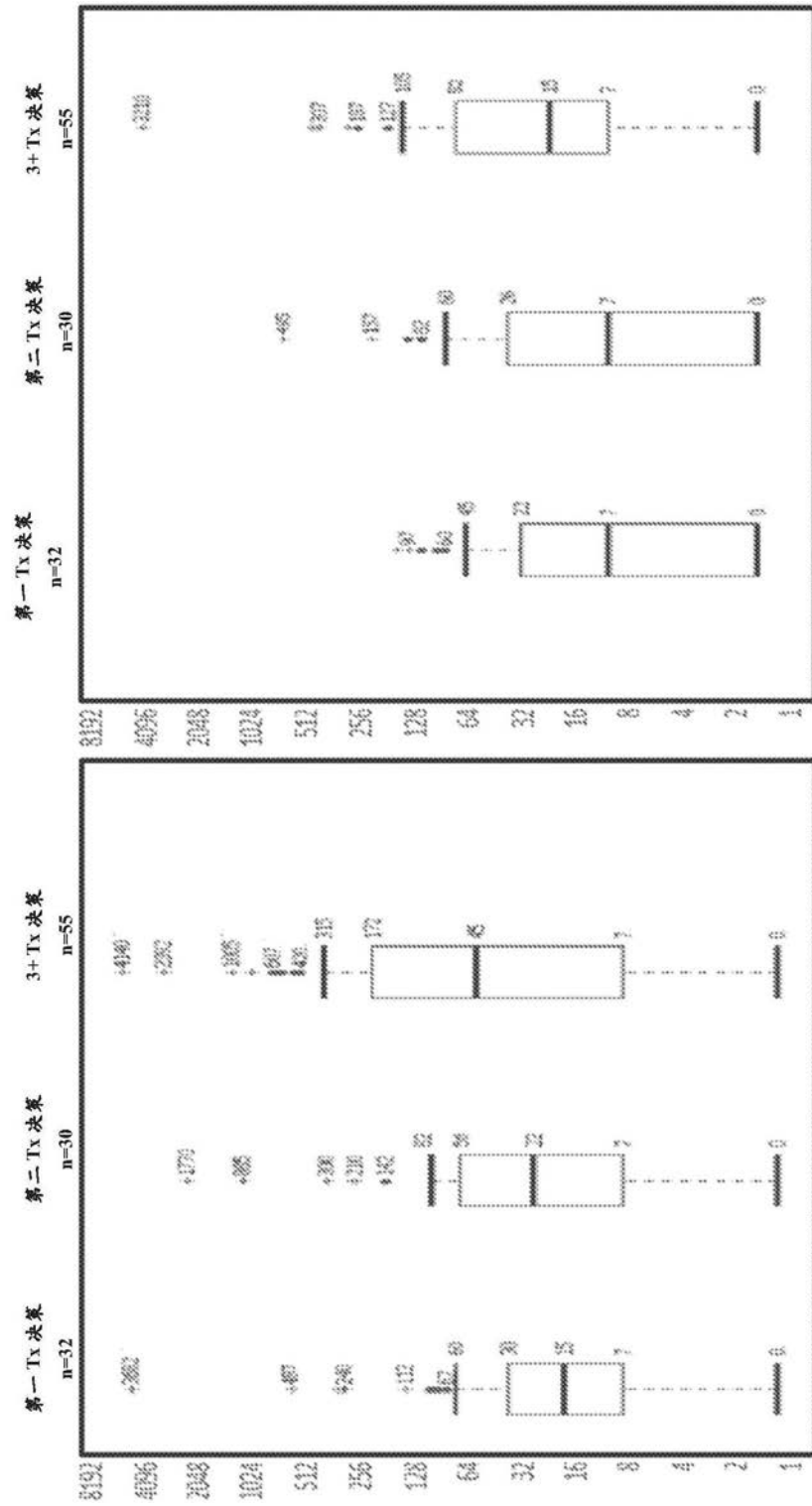


图8



第二Tx 决策	ID 患者	结果 PSA 最大减少 (%)	CTC 类型				CTC 特征										预测性因素 CTC 异质性评分 [CK++   AR+   核仁 +]/7.5ml
			总 CTC #CTCs/7.5ml	CTC 子类型			AR 活力		细胞大小					形态假象			
				[CK-CTC]/7.5ml	[核仁]/7.5ml	[常规 CTCs]/7.5ml	[AR + CTC]/7.5ml	[AR - CTC]/7.5ml	小细胞面积/7.5ml	平均细胞面积/7.5ml	大细胞面积/7.5ml	巨细胞面积/7.5ml	核仁-/7.5ml	核仁+/7.5ml	核仁+/7.5ml	Dot CK-/7.5ml	
CTC-12-0150	2145	1853	15	275	6.61E-1141	3828	103%	0	0	3300	296	1065	3858	5	28	358	
CTC-12-0224	23	29	6	2	0	25	19	0	0	19	5	3	23	0	12	0	
CTC-13-0009	87	49	3	35	8.23E-67	41	81	0	0	15	12	81	53	0	21	12	
CTC-14-0039	86	44	2	22	4.58E-55	11	56	0	0	11	6	55	43	0	12	6	
CTC-13-0134	73	60	6	12	7.56E-48	54	72	0	0	13	6	60	63	0	13	24	
CTC-12-0011	39	21	2	16	8.05E-11	27	11	0	0	16	0	21	21	0	15	5	
CTC-10-0363	6	6	0	0	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	6	0	
CTC-09-0166	11	11	0	0	0	11	8	0	0	8	0	8	0	0	0	0	
CTC-12-0135	62	45	6	11	3.1E-8	57	23	0	0	45	5	17	45	6	18	0	
CTC-12-0079	23	11	0	11	4.1E-11	11	11	0	0	11	0	11	11	0	11	0	
CTC-13-0308	952	843	6	72	1.53E-798	153	192	30	8	213	91	623	547	34	32	276	
CTC-12-0259	11	0	0	0	8.16E-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	
CTC-13-0146	70	17	0	52	4.54E-53	17	35	0	0	17	17	35	17	0	15	0	
CTC-09-0361	348	299	0	47	1.93E-256	96	83	4	0	91	47	258	216	4	31	43	
CTC-12-0174	38	39	0	7	0	36	14	0	0	22	0	14	23	0	12	0	
CTC-12-0238	8	9	0	0	0	8	8	0	0	8	0	8	0	0	8	0	
CTC-07-0163	99	20	20	58	0	98	20	20	0	59	0	98	93	0	10	0	
CTC-12-0128	34	14	0	0	0	14	0	0	0	14	0	14	14	0	6	0	
CTC-10-0274	51	34	8	8	0	51	9	34	0	30	0	17	34	9	15	0	
CTC-09-0010	57	0	0	45	8.28E-45	51	11	45	0	23	11	23	51	0	15	0	
CTC-10-0333	93	89	0	4	9.0E-8	98	51	37	0	56	9	14	81	0	18	0	
CTC-09-0155	221	131	27	54	8.87E-70	201	13	174	20	114	23	60	131	33	21	0	
CTC-08-0033	14	14	0	0	0	14	7	0	0	14	0	14	0	0	11	0	
CTC-12-0230	11	11	0	0	2.23E-11	0	11	0	0	11	0	11	0	0	6	0	
CTC-14-0052	35	30	0	12	8.08E-12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	
CTC-10-0347	91	78	0	29	8.97E-39	52	52	39	0	28	26	39	73	0	18	13	
CTC-09-0225	295	236	0	29	5.45E-221	249	110	147	7	176	59	29	236	0	19	0	
CTC-07-0139	7	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	7	0	0	6	0	
CTC-09-0033	25	25	0	0	0	25	10	15	0	25	0	25	0	0	0	0	

图9B

第三Tx 决策	结果 PSA最大减少 (%)	CIC 类型				CIC 特征										预测性因素		
		总CIC 总#CICs/7.5mL	CIC 子类型			AR 活力		细胞大小					形态观察			CIC 异质性得分	[CK++   AR+   操作 +/+]/7.5mL	
			[CK-CTC]/7.5mL	[AR]/7.5mL	[正常CICs]/7.5mL	[AR+CTC]/7.5mL	[AR-CTC]/7.5mL	平均(AR)表达	小细胞面积/7.5mL	平均细胞面积/7.5mL	大细胞面积/7.5mL	巨细胞面积/7.5mL	核仁/7.5mL	核仁+/7.5mL	核仁++/7.5mL			Dot CK-/7.5mL
CTC-13-0056	100%	53	49	0	3	5.545	7	46	13	39	0	0	29	3	10	49	0	16
CTC-10-0163	100%	1969	1008	0	63	4.292	150	819	544	494	13	0	785	106	156	894	0	23
CTC-09-0054	100%	10	10	0	0	8.675	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-12-0272	100%	55	46	0	9	2.307	27	27	9	48	0	0	18	0	37	45	0	13
CTC-14-0265	100%	44	35	9	0	6.35	26	9	0	28	0	0	0	0	23	28	0	8
CTC-10-0274	100%	375	315	26	34	11.26	152	273	17	205	34	0	69	69	119	230	9	22
CTC-13-0198	100%	148	64	0	82	5.228	119	27	64	73	0	0	46	19	73	84	0	17
CTC-12-0170	100%	153	99	8	46	10.89	77	77	167	45	0	0	82	23	38	99	0	23
CTC-09-0150	100%	44	19	5	24	4.132	24	19	0	39	5	0	52	4	6	19	0	15
CTC-10-0333	100%	58	29	5	24	4.02	8	53	19	34	0	0	29	14	10	29	0	15
CTC-10-0397	84%	488	275	83	150	4.374	63	425	25	313	80	0	113	152	150	250	13	21
CTC-08-0329	77%	153	91	12	59	6.697	96	67	67	89	0	0	52	30	68	96	0	26
CTC-12-0228	69%	32	32	0	0	7.895	32	0	0	32	0	0	0	0	32	0	0	6
CTC-09-0048	67%	154	135	6	14	7.727	34	150	29	101	5	0	43	34	63	115	14	22
CTC-07-0163	60%	244	184	0	60	8.664	131	113	63	181	0	0	108	41	95	190	5	26
CTC-10-0284	46%	120	100	5	15	10.44	95	25	20	95	0	0	20	10	85	100	5	22
CTC-05-0058	46%	69	69	0	0	7.59	8	61	0	54	8	0	8	54	8	61	8	16
CTC-12-0347	41%	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
CTC-12-0163	41%	70	47	8	16	7.31	8	83	23	39	0	0	47	16	0	39	8	13
CTC-09-0190	38%	385	245	65	75	6.9	7	0	0	7	0	0	200	80	85	215	90	22
CTC-12-0272	5%	7	7	0	0	13.88	589	123	112	571	28	0	73	106	332	521	11	29
CTC-10-0210	4%	722	537	6	178	0	0	8	0	5	0	0	0	0	0	0	0	8
CTC-10-0371	3%	5	5	0	0	0	0	8	0	5	0	0	8	0	5	0	0	6
CTC-12-0163	2%	113	105	0	9	0	0	113	9	105	0	0	79	17	17	105	0	13
CTC-12-0038	-10%	65	54	0	11	17.51	22	43	16	43	0	0	39	0	27	49	5	17
CTC-10-0371	-12%	71	45	0	27	7.715	54	19	18	18	0	0	9	9	18	27	0	15
CTC-10-0100	-13%	18	14	5	0	0	0	18	5	14	0	0	8	9	0	18	0	10
CTC-09-0124	-17%	135	108	0	27	4.318	43	93	0	131	3	0	19	31	81	101	4	21
CTC-14-0067	-17%	320	240	30	60	0	0	330	15	285	45	0	182	80	75	195	80	19
CTC-13-0095	-23%	56	32	0	24	6.714	56	0	16	40	0	0	16	24	16	32	0	16
CTC-12-0180	-23%	44	0	0	44	0	0	44	44	0	0	0	44	0	0	0	0	0
CTC-09-0054	-28%	82	45	0	17	4.28	17	45	23	34	0	0	40	0	17	40	0	16
CTC-08-0049	-30%	28	14	0	14	3.62	8	19	5	5	0	0	5	5	0	0	0	10
CTC-05-0022	-32%	21	0	0	21	4.21	21	0	0	21	0	0	21	0	0	0	0	0
CTC-10-0390	-34%	14	8	0	6	5.1	9	8	0	14	0	0	9	0	8	9	0	10
CTC-12-0077	-36%	445	375	6	64	5.855	328	117	164	270	6	0	117	58	264	375	0	25
CTC-12-0276	-47%	484	432	26	16	4.661	150	395	240	234	10	0	292	88	156	458	10	24
CTC-10-0334	-48%	53	41	8	8	8.34	25	33	25	21	8	4	25	4	29	37	12	21
CTC-09-0383	-54%	908	571	179	158	6.31	6	803	179	577	46	17	577	150	92	594	56	22
CTC-08-0010	-56%	48	16	16	16	0	0	48	18	32	0	0	0	16	32	18	18	11
CTC-12-0272	-58%	28	20	0	0	0	0	20	20	0	0	0	20	0	0	20	0	0
CTC-08-0026	-61%	82	57	0	24	15.15	85	18	0	82	0	0	88	0	33	57	0	13
CTC-10-0190	-66%	166	148	18	0	8.733	1845	845	481	2126	67	10	481	266	833	2317	67	31
CTC-10-0410	-67%	2082	2375	19	298	3.16	8	122	23	69	31	8	23	15	92	84	23	19
CTC-12-0112	-69%	130	107	6	15	5.94	12	41	6	47	0	0	12	12	29	29	0	16
CTC-08-0213	-73%	53	29	0	23	3.695	15	235	29	140	37	37	140	7	95	184	22	17
CTC-12-0276	-81%	250	154	59	37	0	0	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-12-0163	-83%	718	433	65	219	14.94	8825	1318	2152	6498	130	51	1910	995	4926	4825	11	37
CTC-13-0266	-83%	12	6	0	6	0	0	12	6	6	0	0	6	0	6	0	0	11
CTC-08-0183	-89%	281	216	4	61	14.43	188	94	61	216	4	0	84	24	183	220	0	28
CTC-07-0189	-91%	20	23	0	47	3.08	23	47	23	47	0	0	47	0	23	23	0	12
CTC-08-0382	-92%	56	51	0	6	5.333	26	26	23	32	0	0	14	0	42	51	0	17

图9C

CTC表型的#		1 vs 2	2 vs 3	1 vs 3
>1 CTC/mL	0.07	0.80	0.03	
>10 CTC/mL	0.33	0.42	0.06	
>100 CTC/mL	0.37	0.12	0.01	

1st		2nd		3rd	
% CTC 表型 > 1 CTC/7.5 mL		% CTC 表型 > 10 CTC/7.5 mL		% CTC 表型 > 100 CTC/7.5 mL	
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30
31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32
33	33	33	33	33	33
34	34	34	34	34	34
35	35	35	35	35	35
36	36	36	36	36	36
37	37	37	37	37	37
38	38	38	38	38	38
39	39	39	39	39	39
40	40	40	40	40	40
41	41	41	41	41	41
42	42	42	42	42	42
43	43	43	43	43	43
44	44	44	44	44	44
45	45	45	45	45	45
46	46	46	46	46	46
47	47	47	47	47	47
48	48	48	48	48	48
49	49	49	49	49	49
50	50	50	50	50	50
51	51	51	51	51	51
52	52	52	52	52	52
53	53	53	53	53	53
54	54	54	54	54	54
55	55	55	55	55	55
56	56	56	56	56	56

图10

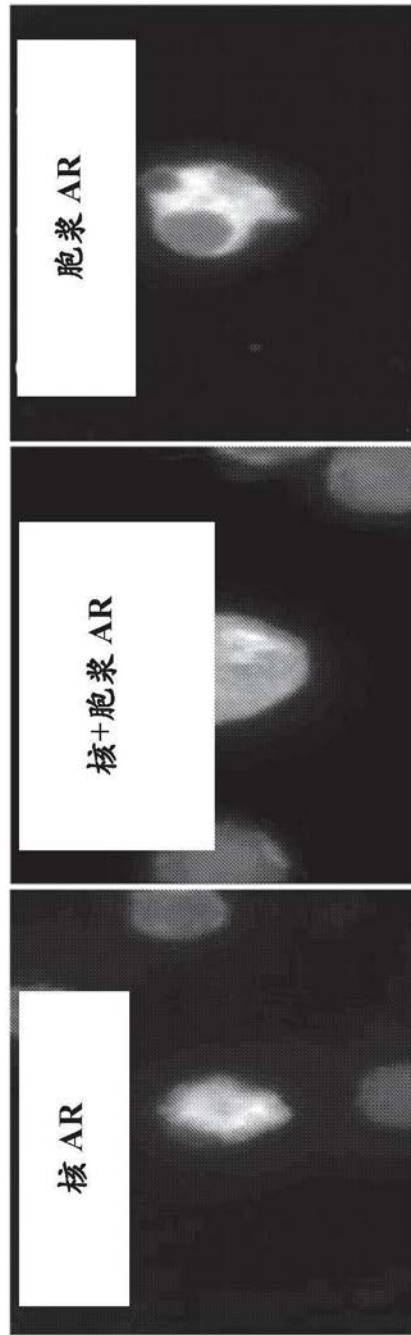


图11A

#Pts, 具有:	1st	2nd	3rd
> 5 CTC 核 AR / 7.5 mL	33%	42%	70%
> 5 CTC 胞浆 AR / 7.5 mL	56%	67%	30%
> 5 CTC 核&胞浆 AR / 7.5 mL	22%	58%	41%

图11B

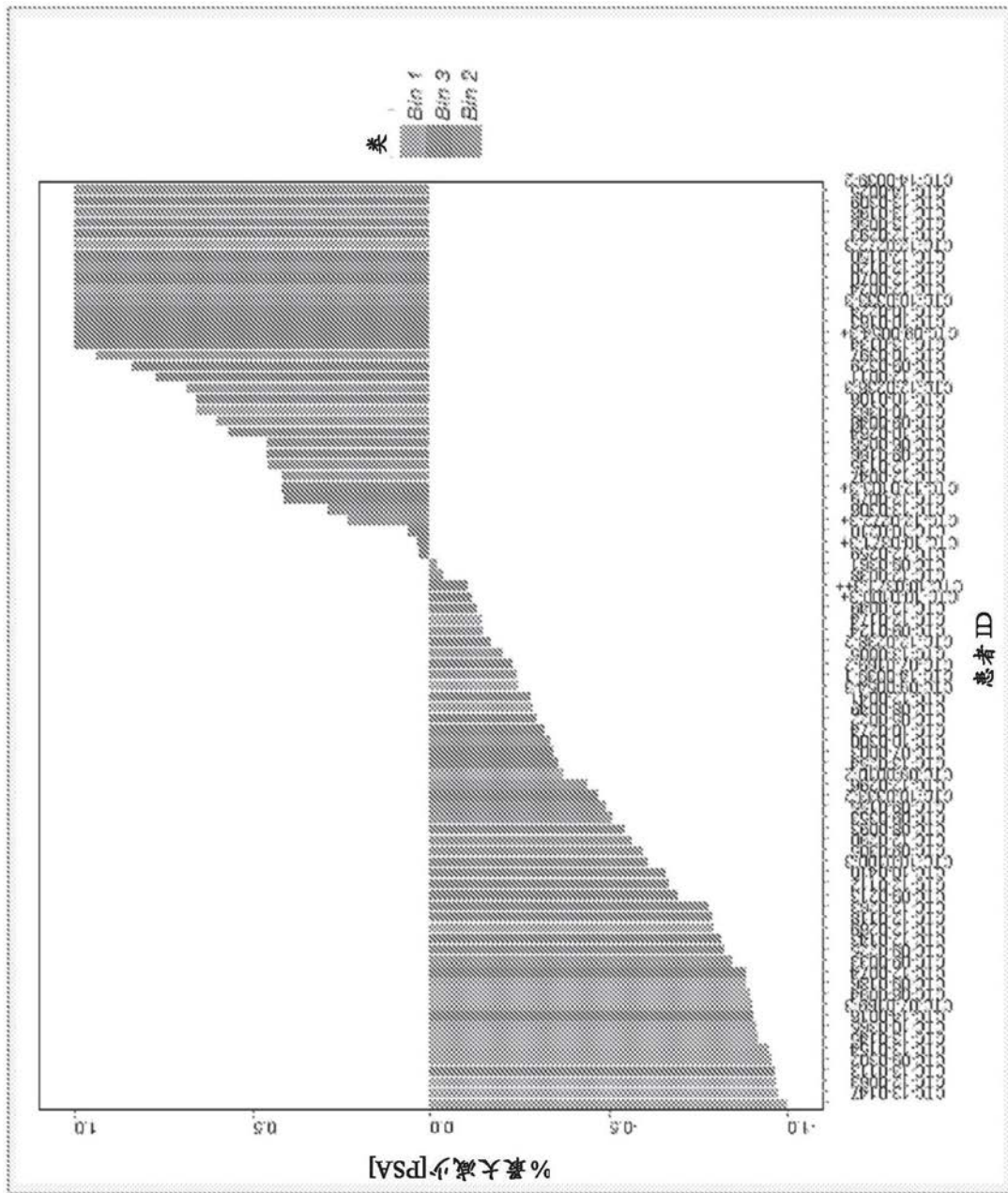


图12

具有预测 AR Tx 新生抵抗性的 CTC 特征的患者%  
(预测模型, 参见海报 237P)

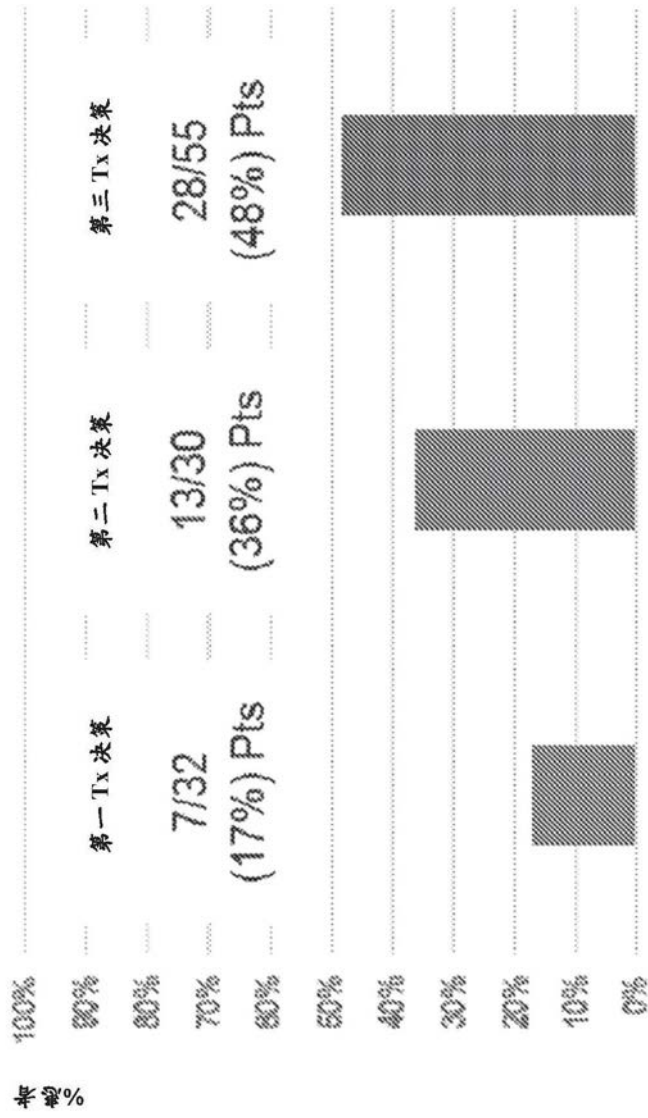


图13

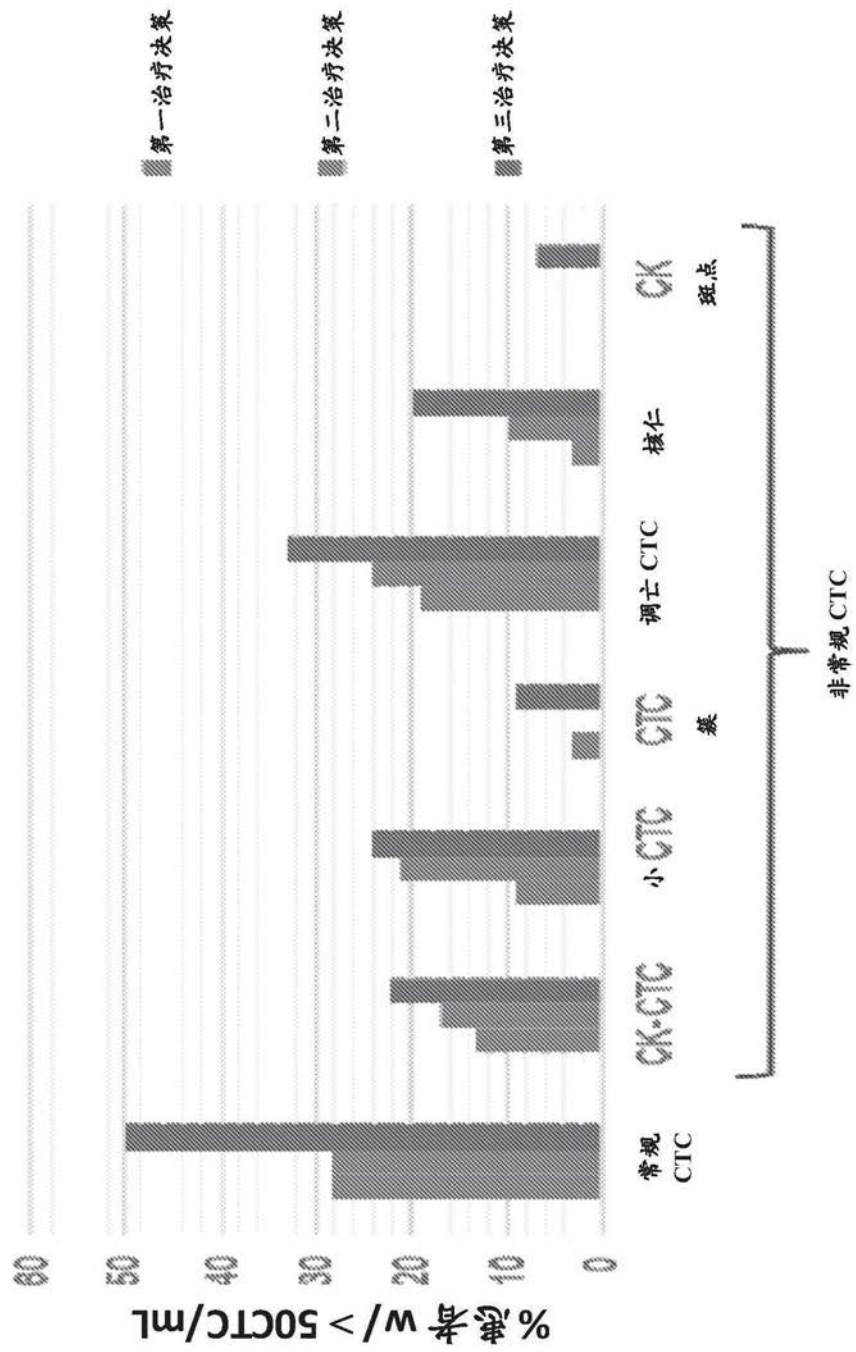


图14

特征	No. (%) 或中值 (范围)			
	所有患者	真正应答者	应答者	抵抗者
患者数量	85	15	24	46
年龄, 岁	70 (48-91)	67 (48-82)	73 (52-91)	69 (48-86)
初次治疗				
前列腺切除术	35 (46%)	9 (82%)	11 (52%)	15 (34%)
放疗	21 (28%)	1 (9%)	4 (19%)	16 (36%)
无	20 (26%)	1 (9%)	6 (29%)	13 (30%)
转移性疾病				
骨	70 (92%)	9 (82%)	21 (100%)	39 (89%)
淋巴结	48 (63%)	6 (55%)	11 (52%)	31 (70%)
肝	5 (7%)	1 (9%)	0 (0%)	4 (9%)
肺	6 (8%)	1 (9%)	3 (14%)	2 (5%)
其他软组织	3 (4%)	1 (9%)	0 (0%)	2 (5%)
实验室测量				
PSA, ng/mL	53.32 (0.71-2589.9)	22.82 (10.77-1322.85)	28.59 (0.71-1774.49)	85.14 (7.94-2589.9)
Hgb, (g/dl)	11.6 (7.2-15.0)	12.0 (10.6-13.4)	12.0 (8.4-15.0)	11.0 (7.2-14.4)
ALK, (单位/L)	108 (42-952)	82 (42-190)	109 (51-857)	142 (49-852)
LDH, (单位/L)	237 (142-976)	215 (156-398)	236 (142-479)	242 (163-976)
ALB, (g/dl)	4.2 (3.3-4.9)	4.3 (4.1-4.9)	4.2 (3.6-4.9)	4.1 (3.3-4.7)
CTC, (细胞/5MD)	6 (0 - >200)	4 (0-160)	1 (0 - >200)	14 (0 - >200)

图15A

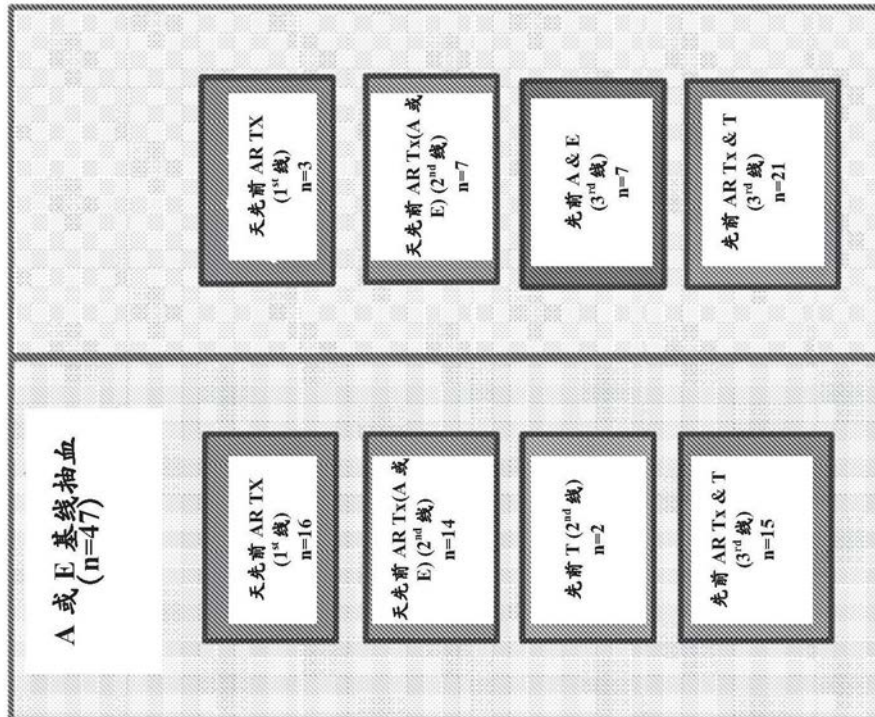


图15B

特征	数量(%) 或中值 (范围)		
	所有患者	第一治疗决策	第二治疗决策
患者数量	117	32	30
年龄, 岁	70 (48-91)	70 (48-86)	73 (53-86)
初次治疗			
前列腺切除术	53 (45%)	14 (44%)	15 (50%)
放疗	31 (26%)	9 (28%)	7 (23%)
无	33 (28%)	9 (28%)	8 (27%)
转移性疾病			
骨	106 (91%)	28 (88%)	25 (83%)
淋巴结	74 (63%)	20 (63%)	17 (57%)
肝	11 (9%)	3 (9%)	0 (0%)
肺	11 (9%)	1 (3%)	2 (7%)
其他软组织	4 (3%)	2 (6%)	1 (3%)
实验室测量			
PSA, ng/mL	45.80 (0.51-2589.9)	17.47 (0.51-1479.88)	26.40 (2.89-1516.11)
Hgb, (g/dl)	11.8 (7.0-15.0)	13 (10.2-14.4)	12.4 (7.2-15.0)
ALK, (单位/L)	108 (42-1816)	86 (42-456)	107 (54-1096)
LDH, (单位/L)	238 (139-976)	214 (139-398)	238 (142-976)
ALB, (g/dl)	4.2 (3.1-4.9)	4.3 (3.8-4.6)	4.2 (3.3-4.9)
CTC (细胞/5MD)	3 (0 - >200)	2 (0 - >200)	3 (0 - >200)
			154.77 (1.91-2589.9)
			11.1 (7.0-14.5)
			119 (49-1816)
			264 (168-964)
			4.2 (3.1-4.9)
			8 (0 - >200)

图16A

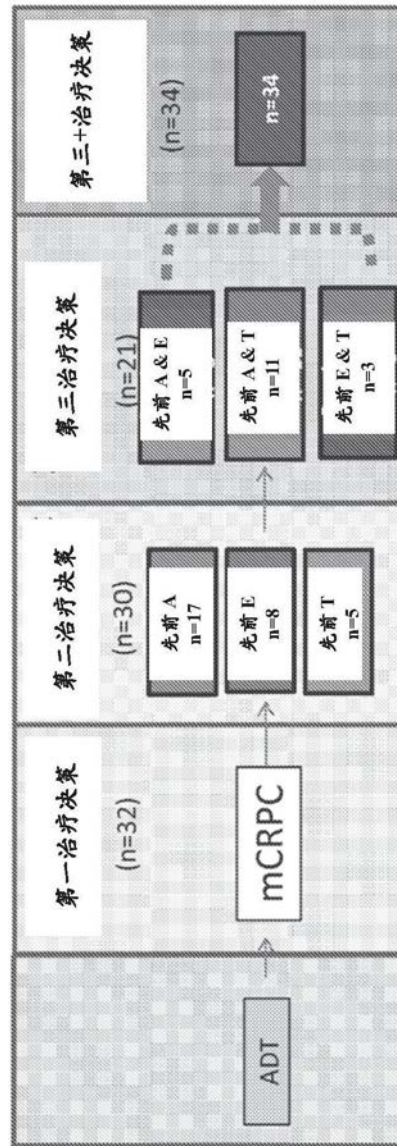


图16B

专利名称(译)	用于鉴别对雄激素受体靶向疗法的抵抗性的循环肿瘤细胞诊断		
公开(公告)号	<a href="#">CN107250796A</a>	公开(公告)日	2017-10-13
申请号	CN201580064039.2	申请日	2015-09-24
申请(专利权)人(译)	艾匹克科学公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾匹克科学公司		
[标]发明人	瑞安迪塔莫尔		
发明人	瑞安·迪塔莫尔		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/57434 G01N2333/4742 G01N2333/723 G01N2800/52 G16B40/00		
代理人(译)	郑霞		
优先权	62/055491 2014-09-25 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开提供了预测对于前列腺癌患者肿瘤中雄激素受体(AR)靶向疗法的新生抵抗性的方法，包括(a)实施包括获自患者的血液样品中有核细胞的免疫荧光染色和形态学表征的直接分析以产生循环肿瘤细胞(CTC)数据，其中所述分析包括确定一组对于雄激素受体(AR)靶向疗法的新生抵抗性的常规和非常规CTC生物标志物的可测量特征，和(b)评价CTC数据以确定前列腺癌患者肿瘤中AR靶向疗法的新生抵抗性的概率。还公开了用于所述方法的一组常规和非常规CTC生物标志物。

表 1. 异质性生物标志物
[CK+核]/7.5mL
[CK-核]/7.5mL
[核]/7.5mL
[AR+CTC]/7.5mL
[AR-CTC]/7.5mL
[CK+CTC]/7.5mL
[CK-CTC]/7.5mL
小细胞区域/7.5mL
平均细胞区域/7.5mL
大细胞区域/7.5mL
巨细胞区域/7.5mL
小核区域/7.5mL
平均核区域/7.5mL
大核区域/7.5mL
巨大核区域/7.5mL
核仁-/7.5mL
核仁+/7.5mL
核仁++/7.5mL
Dot CK-/7.5mL
Dot CK+/7.5mL
[CK++ AR+ 核仁+]/7.5mL
[CK++ AR- 核仁-]/7.5mL
[CK++ AR+ 核仁-]/7.5mL
[CK++ AR- 核仁+]/7.5mL
[CK++ AR+ 核仁+]/7.5mL
[CK++ AR- 核仁+]/7.5mL
[CK++ AR+ 核仁-]/7.5mL
[CK++ AR+ 核仁+]/7.5mL
[CK- AR- 核仁+]/7.5mL
[CK- AR- 核仁-]/7.5mL
[CK- AR+ 核仁+]/7.5mL
[CK- AR+ 核仁-]/7.5mL
[CK- AR+ 核仁+]/7.5mL
[CK- AR+ 核仁-]/7.5mL