

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-535432
(P2018-535432A)

(43) 公表日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A 4 B 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
GO 1 N 15/00 (2006.01)	GO 1 N 15/00	B
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/6841 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6841	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2018-536062 (P2018-536062)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年5月17日 (2018. 5. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/053387
 (87) 国際公開番号 W02017/053763
 (87) 国際公開日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)
 (31) 優先権主張番号 62/233, 206
 (32) 優先日 平成27年9月25日 (2015. 9. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 518100340
 エピック サイエンス、 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ スイート 2 0 0 ジュディシアル ドライブ 9 3 8 1
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ライアン ディッタモア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ スイート 2 0 0 ジュディシアル ドライブ 9 3 8 1
 Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR55 QS34 QX02

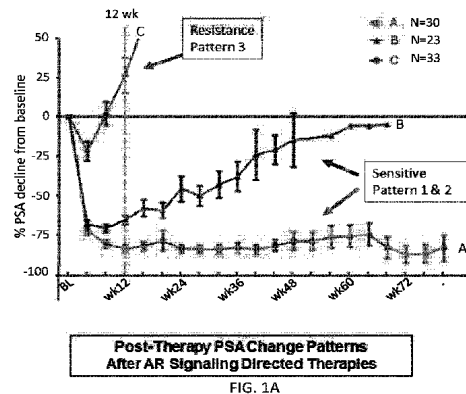
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 転移性去勢抵抗性前立腺癌 (mCRPC) 患者における治療選択のためのバイオマーカーとしてのアンドロゲン受容体バリエーション7

(57) 【要約】

本発明は、アンドロゲン受容体(AR)標的療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴う転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)患者を特定する方法であって、(a)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行し、循環腫瘍細胞(CTC)データを作製する工程であって、この分析が、該細胞中のアンドロゲン受容体バリエーション7(AR-V7)の存在を検出することを含む、前記工程、並びに、(c)このCTCデータを評価し、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する工程を含む方法を提供する。

【選択図】 図1A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アンドロゲン受容体(AR)標的療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴う転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)患者を特定する方法であって：

(a)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行し、循環腫瘍細胞(CTC)データを作製する工程であって、この分析が、該細胞中のアンドロゲン受容体バリエーション7(AR-V7)の存在を検出することを含む、前記工程；並びに

(c)このCTCデータを評価し、アンドロゲン受容体シグナル伝達-指向型(ARS-指向型)療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する工程を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記ARS-指向型療法と比べタキサン療法に対し改善された反応を伴うmCRPC患者が、CTC中のAR-V7の核局在化を基に特定される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記AR-V7の核局在化が、ARS-指向型療法に対する抵抗性に対応している、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記AR-V7の核局在化が、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する有益な反応に対応している、請求項2記載の方法。

20

【請求項 5】

前記核局在化が、隣接白血球(WBC)からのバックグラウンド染色よりも3倍以上高いシグナル強度を伴う、染色パターンを含む、請求項2記載の方法。

【請求項 6】

ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を有すると特定された場合に、患者はタキサン療法により治療される追加工程(d)を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

スライド上に単層として有核細胞を沈着する初期工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

前記直接分析が、走査型蛍光顕微鏡検査を含む、請求項1記載の方法。

30

【請求項 9】

前記顕微鏡検査が、CTC及び少なくとも200個の周囲の白血球(WBC)を含む視野を提供する、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

前記CTCが、周囲の有核細胞と比べ識別できる形態学的特徴を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

前記形態学的特徴が、核サイズ、核形状、核内の細孔の存在、細胞サイズ、細胞形状、及び核対細胞質の比、核の詳細、核輪郭、核小体の存在又は非存在、細胞質の質及び細胞質の量からなる群の1以上を含む、請求項10記載の方法。

40

【請求項 12】

前記CTCの検出が、周囲の有核細胞に対して、汎サイトケラチン(CK)蛍光染色の強度を比較することをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

前記血液試料に関する白血球(WBC)数を得る初期工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

前記血液試料中の赤血球を溶解する初期工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

50

前記CTCを検出するための有核細胞の免疫蛍光染色が、汎サイトケラチン(CK)、分化抗原群(CD)45、及びジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を含む、請求項1記載の方法。

【請求項16】

転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行し、循環腫瘍細胞(CTC)データを作製する方法であって、この分析が、該細胞中のアンドロゲン受容体バリエーション7(AR-V7)の存在を検出することを含む、前記方法。

【請求項17】

前記AR-V7が、CTCの核内に局在化されている、請求項16記載の方法。

【請求項18】

前記AR-V7の核局在化が、mCRPC患者に関するARS-指向型療法に対する抵抗性に対応している、請求項17記載の方法。

【請求項19】

前記AR-V7の核局在化が、mCRPC患者に関するARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する陽性反応に対応している、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記核局在化が、隣接白血球(WBC)からのバックグラウンド染色よりも3倍以上高いシグナル強度を伴う、染色パターンを含む、請求項17記載の方法。

【請求項21】

周囲の有核細胞と比べ、CTCにおける識別できる形態学的特徴を検出することをさらに含む、請求項16記載の方法。

【請求項22】

前記形態学的特徴が、核サイズ、核形状、核内の細孔の存在、細胞サイズ、細胞形状、及び核対細胞質の比、核の詳細、核輪郭、核小体の存在又は非存在、細胞質の質及び細胞質の量からなる群の1以上を含む、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記CTCの検出が、周囲の有核細胞に対する、汎サイトケラチン(CK)蛍光染色の強度を比較することをさらに含む、請求項16記載の方法。

【請求項24】

前記CTCを検出するための有核細胞の免疫蛍光染色が、汎サイトケラチン(CK)、分化抗原群(CD)45、及びジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を含む、請求項16記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年9月25日に出願された米国特許仮出願第62/233,206号の恩典を主張するものであり、この仮出願の全内容は、引用により本明細書中に組み込まれている。

【0002】

本開示は概して、循環腫瘍細胞(CTC)中のアンドロゲン受容体バリエーション7(AR-V7)を検出することを含む、転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)患者に関する療法を選択する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

前立腺癌(PC)は、依然米国における最も一般的な非皮膚癌である。2014年だけでも、前立腺癌の予測される発生数は233,000症例であり、男性29,480名が死亡に至るとされ、このことは転移性前立腺癌療法をまさに満たされない医学的必要性のあるものとしている。Siegelらの文献、2014. CA Cancer J Clin. 2014;64(1):9-29。欧州の疫学的研究は、2012年の、新規症例416700例の推定発生数に匹敵するデータを示し、これは男性における癌診断の22.8%を占めている。合計で92200例のPCに特定される死亡が予想され、これは男

10

20

30

40

50

性の最も可能性のある死因となる3種の癌の一つであり、死亡率は9.5%である。

【0004】

過去5年間のみでも、転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)患者の治療のために試験されかつ承認された新規薬剤が指数的に増加したことにより、これらの薬剤の最適な順番又は組合せに関する問題点が生じてきている。最良の順番を決定するアプローチについて、臨床医を直接補助するいくつかの指針が存在し、かつそれらのほとんどは、症状の有無、一般状態、並びに疾患の負担を評価し、これらの薬剤に関する最良の順番を決定することを補助する。Mohlerらの文献、2014, J Natl Compr Canc Netw. 2013;11(12):1471-1479; Cooksonらの文献、2013, J Urol. 2013;190(2):429-438。現在、承認された治療は、細胞毒性薬のタキサンクラス及びアンドロゲン標的療法からなる。臨床医にとっての課題は、患者に最大の恩恵を提供するためのこれらの療法を投与する最良の順番を決定することである。しかし療法の失敗は、患者にわたる療法に対する不均一な反応を基にし、かつ各薬剤からの交差抵抗性を考慮し、重大な課題であり続けている。Mezynskiらの文献、Ann Oncol. 2012;23(11):2943-2947; Noonanらの文献、Ann Oncol. 2013;24(7):1802-1807; Pezaroらの文献、Eur Urol. 2014, 66(3): 459-465。加えて患者は、全生存期間の向上を提供することが証明されている各薬物から実質的恩恵を得るための治療域を外れることがある。従って、標的療法から恩恵を受ける可能性が最大である標的集団を特定するより良い方法は、重要な目標であり続けている。

10

【0005】

循環腫瘍細胞(CTC)は、癌診断において著しい利点を示し、それらの非侵襲的測定によりさらにより魅力的なものとなっている。Cristofanilliらの文献、N Engl J Med, 351:781-91, (2004)。原発性腫瘍部位又はその転移部位のいずれかから放出されたCTCは、その腫瘍の生物学に関する重要な情報を保持している。液体生検としてのCTCの定量及び特徴決定は、臨床医が、療法の過程を選択し、かつ患者の癌がどのように発達するかのモニタリングを監視することを補助する。従ってCTCは、転移性疾患に関する代理バイオマーカーであるのみではなく、腫瘍の変化、治療奏効、癌再発又は患者の転帰を非侵襲的に追跡するための有望な重要なツールでもあるとみなされ得る。歴史的に、血流中のCTCの極めて低いレベルは、それらの未知の表現型と一緒に、それらの検出を著しく妨げ、かつそれらの臨床的有用性を制限している。CTCの情報を利用する目的で、CTCの検出、単離及び特徴決定のための様々な技術が現在開発されている。

20

30

【0006】

アンドロゲン受容体シグナル伝達指向型療法(AR療法)は、酢酸アピラテロン+プレドニゾン(A)及びエンザルタミド(E)を含むが、これらはmCRPCの患者の生存を延長し、かつFDA承認されている。EpCAM選択されたCTCにおけるスプライスパリアントAR-V7 mRNAの存在は、A及びEに対する抵抗性と予測的に関連づけられているが(Antonarakisらの文献、New England Journal of Medicine, 371.11 (2014): 1028-1038)、タキサン化学療法(T)に対しては関連づけられていない(Antonarakisらの文献、J Clin Oncol, 33, 2015 (suppl 7; abstract 138)。AR-V7は、A及びE又はTの間の療法の選択において臨床的有用性を提供し得る。

40

【0007】

CTCにおけるAR-V7 mRNAアッセイの予測値に対する重大な制限は、CTC中の低頻度で不安定なmRNA測定の堅牢性の分析的検証であり、これは地域での実践(community practice)に適している診断のワークフローに合致しないことがある。加えてEpCAM-CTC評価ができないことは、AR-V7バイオマーカーの試料採取の不足に繋がりが得る。選択肢についての情報を与えるか又はA及びE又はTの選択を導く、臨床的有用性を伴う診断試験の必要性が存在する。本発明は、この必要性に対処し、かつ関連する利点を提供している。

【発明の概要】

【0008】

(概要)

本開示は、療法の変更が必要とされる進行性mCRPC患者由来の試料を利用する、全てのC

50

TC垂型を含む、固定された単独CTCにおいて使用するためのAR-V7免疫蛍光試験を説明している。

【0009】

本発明は、(a)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行し、循環腫瘍細胞(CTC)データを作製する工程であって、この分析が、該細胞中のアンドロゲン受容体バリエーション7(AR-V7)の存在を検出することを含む、前記工程、並びに、(c)このCTCデータを評価し、アンドロゲン受容体シグナル伝達-指向型(ARS-指向型)療法と比べ、タキサン療法に対する改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する工程を含む、アンドロゲン受容体(AR)標的療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する方法を対象とする。

10

【0010】

本発明は、(a)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行し、循環腫瘍細胞(CTC)データを作製する工程であって、この分析が、該細胞中のアンドロゲン受容体バリエーション7(AR-V7)の存在を検出することを含む、前記工程、並びに、(c)このCTCデータを評価し、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する工程、及びCTC中のAR-V7の核局在化を基に、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する改善された反応を伴う該mCRPC患者を特定する工程を含む、アンドロゲン受容体(AR)標的療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する方法を対象とする。

20

【0011】

本発明は、(a)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行し、CTCデータを作製する工程であって、この分析が、該細胞中のAR-V7の存在を検出することを含む、前記工程、並びに、(c)このCTCデータを評価し、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する工程、及びCTC中のAR-V7の核局在化を基に、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する改善された反応を伴う該mCRPC患者を特定する工程であって、AR-V7の核局在化は、ARS-指向型療法に対する抵抗性に対応している、前記工程を含む、アンドロゲン受容体(AR)標的療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する方法を対象とする。

30

【0012】

本発明は、(a)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行し、CTCデータを作製する工程であって、この分析が、該細胞中のAR-V7の存在を検出することを含む、前記工程、並びに、(c)このCTCデータを評価し、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する工程、及びCTC中のAR-V7の核局在化を基に、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する改善された反応を伴う該mCRPC患者を特定する工程であって、AR-V7の核局在化は、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する陽性反応に対応している、前記工程を含む、アンドロゲン受容体(AR)標的療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する方法を対象とする。

40

【0013】

一部の実施態様において、この核局在化は、隣接白血球(WBC)からのバックグラウンド染色よりも3倍以上高いシグナル強度を伴う、染色パターンを含む。

【0014】

一部の実施態様において、本方法は、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を有するものであると特定された場合、患者がタキサン療法により治療される、追加工程(d)を含む。

【0015】

本発明はまた、循環腫瘍細胞(CTC)データを作製するための、転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行する方法であって、この分析が、該細胞中のアンドロゲン受容体バ

50

リアント7(AR-V7)の存在を検出することを含む方法も提供する。

【0016】

本発明はまた、CTCデータを作製するための、mCRPC患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行する方法であって、この分析が、CTCの核中に局在化したAR-V7の存在を検出することを含む、前記方法も提供する。

【0017】

本発明はまた、CTCデータを作製するための、mCRPC患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行する方法であって、この分析が、CTCの核中に局在化したAR-V7の存在を検出することを含み、ここでAR-V7の核局在化が、mCRPC患者に関するARS-指向型療法に対する抵抗性に対応している、前記方法も提供する。

10

【0018】

本発明はまた、CTCデータを作製するための、mCRPC患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行する方法であって、この分析が、CTCの核中に局在化したAR-V7の存在を検出することを含み、ここでAR-V7の核局在化が、mCRPC患者に関するARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する有益な反応に対応している、前記方法も提供する。

【0019】

一部の実施態様において、この核局在化は、隣接白血球(WBC)からのバックグラウンド染色よりも3倍以上高いシグナル強度を伴う、染色パターンを含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0020】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1Aは、ARシグナル伝達指向型療法後の治療後PSA変化パターンを示す。193名のmCRPC患者の血液試料を、アピラテロン(44)；エンザルタミド(81)、ドセタキセル(46)、カバジタキセル(13)、及びパクリタキセル(2)の開始前に採取した。PSA転帰は、感受性(S)：パターン1及び2、又は抵抗性(R)：パターン3(A)として記録した。Scherらの文献、Cancer J. 2013 Jan-Feb;19(1):43-9。患者は、rPFS転帰及びOS転帰を評価するための最長2.3年間のモニタリングを受けた。試料は、CTC計数のためのEpic Sciencesプラットフォーム、形態学、バイオマーカー、及びFISH分析を利用して処理した。ワークフローを図1Bに概略的に示す：1)血液試料からの有核細胞を、スライド上に配置し、-80のバイオレポジトリー内に保存する；2)スライドを、サイトケラチン(CK)、CD45、DAPI、AR-V7で染色する；3)スライドを走査する；4)CTC候補を、多重パラメータのデジタル病理アルゴリズムにより検出する、並びに5)測定者が、CTC及びバイオマーカー発現の定量を確認する。

30

【0021】

【図2】図2A及び2Bは、AR-V7 IFアッセイ呈色を示す。AR-V7スプライスバリエーションに特異的なウサギモノクローナル抗体を、Epic CTCプラットフォームにより特徴決定された細胞株対照及び患者CTCのIF染色に使用した。陽性(22RV1)、図2A上側、及び陰性(DU145)、図2A下側の、細胞株対照を使用し、初期AR-V7 IFタンパク質アッセイを評価した。AR-V7陽性細胞は、隣接WBCからのバックグラウンド染色よりもシグナル強度が3倍を超えて高い、特異的核局在化した染色パターンを有する細胞として規定した。図2Bは、個別に特徴付けられた22RV1細胞の55%(2660/4813)が、特異的AR-V7染色を示した一方で、DU145陰性対照のわずか0.001%(5/3360)において核染色が認められたことを示すグラフを描いている。

40

【0022】

【図3】図3A及び3Bは、患者の人口統計学的属性を示している。図3Aは、患者の特徴を示す一方で、図3Bは、試料が得られた時点での患者治療の次数を示している。

【0023】

【図4】図4A-4Cは、ベースラインAR-V7+ CTCは、AR療法に対し抵抗性があるが、タキサ

50

ン化学療法に対しては抵抗性がないPSAを予測することを示している。図4Aは、AR-V7及びCTC不均一性を明らかにしている、単独の3+次患者からの代表的CTC画像を示す。図4Bは、AR療法抵抗性及び感受性患者における1ml当たりのAR-V7陽性CTCの数(左側)、並びにタキサン療法抵抗性及び感受性患者における1ml当たりのAR-V7陽性CTCの数(右側)を描いているグラフを示す。図4Cは、AR-V7陽性は、AR-指向型療法に対するPSA抵抗性を予測することを明らかにしている表を示す。簡潔に説明すると、AR-V7タンパク質発現は、66名のAR療法に対し抵抗性の患者のうち、15名からのCTCにおいて認められた。CTCは、57名のAR療法感受性患者中、37名において特定された(範囲：0~345 CTC/mL、中央値：2 CTC/mL)のに対し、57名のAR療法感受性患者中、AR-V7+ CTCを保有するものはいなかった。AR-V7+細胞を欠いているAR療法コホート中の全患者の53%は、AR療法に対し感受性であった。AR-V7保有率は、タキサン化学療法に対する抵抗性を予測せず：AR-V7+ CTCは、タキサン感受性患者30名中、7名において、及びタキサン抵抗性患者26名中7名において、各々認められた。

10

【0024】

【図5】図5A-5Cは、ベースラインAR-V7+ CTCは、AR療法に対する好ましくない転帰を予測すること、及びAR-指向型療法中の患者において、AR-V7陽性状態は、療法のより短い時間(図5A)、より短い放射線学的無増悪生存期間(rPFS)(図5B)、及びより短い全生存期間(OS)(図5C)に関連していることを明らかにしている。

【0025】

【図6】図6A-6Dは、AR-V7+ CTCの不均一性及び保有率を示し、具体的にはAR-V7陽性の頻度及び不均一性は、治療の回数が増加した患者において増加することを示している。CTCは、191名中144名(75%)の患者において確定された。AR-V7+ CTCは、一次の67名中2名(3%)において(図6A)、二次の50名中9名(18%)において(図6B)、及び三次又はそれ以上の回数の74名中23名(31%)において(図6C)、認められた。図6Dは、AR-V7陽性の頻度及び不均一性は、治療の回数が増加した患者において増大したことを示す表を描いている。

20

【発明を実施するための形態】

【0026】

(詳細な説明)

本開示は、全般的診断的ワークフローに関して設計されたプラットフォーム上の療法の変更が必要とされる進行性mCRPC患者からの試料を利用する、全てのCTC亜型を含む、固定された単独CTCにおける使用のためのAR-V7免疫蛍光試験を説明している。

30

【0027】

本発明は、アンドロゲン受容体(AR)標的療法と比べ、タキサン療法に対し改善された反応を伴う転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)患者を特定する方法であって、(a)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行し、循環腫瘍細胞(CTC)データを作製する工程であって、この分析が、該細胞中のアンドロゲン受容体パリアント7(AR-V7)の存在を検出することを含む、前記工程、並びに、(c)このCTCデータを評価し、ARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する改善された反応を伴うmCRPC患者を特定する工程を含む、前記方法を提供する。

【0028】

40

本明細書において使用される用語「循環腫瘍細胞」又は「CTC」は、従来型及び非従来型のCTCを含む、生物学的試料中に存在しかつ前立腺癌に関連したいずれかの希少細胞を包含することを意味する。単一細胞として又はCTCクラスター内に存在することができるCTCは、患者の循環中に非常に低い濃度で認められる固形腫瘍から流出された上皮細胞であることが多い。従来型CTCは、サイトケラチン陽性、CD45陰性であり、DAPI核を含み、かつ周囲の白血球とは形態学的に識別できる、単独のCTCを指す。非従来型CTCは、従来型CTCとは、少なくとも1つの特徴が異なるCTCを指す。非従来型CTCは、図2、パネルBに示された5種のCTC亜型を含み、これは、CTCクラスター、CTCとして分類することが可能である少なくとも1種の追加バイオマーカーが陽性であるCK陰性CTC、小型CTC、核小体+CTC、及びCK陽性(speckled)CTCを含む。本明細書において使用される用語「CTCクラスター」は、細

50

胞膜が接触している (touching)、2種以上のCTCを意味する。

【0029】

その最も広い意味で、生物学的試料は、CTCを含む任意の試料であることができる。試料は、血液などの体液；細胞調製品の可溶性画分、又はそこで細胞が成長される培地のアリコート；細胞から単離もしくは抽出された染色体、細胞小器官、又は膜；溶液中のもしくは基板に結合された、ゲノムDNA、RNA、又はcDNA；1個の細胞；ひとつの組織；組織プリント；フィンガープリント；複数の細胞；皮膚などを含むことができる。対象から得られた生物学的試料は、細胞を含む任意の試料であることができ、かつその中でCTCが検出され得る任意の物質を包含している。試料は、例えば、全血、血漿、唾液又は他の体液若しくは細胞を含む組織であることができる。

10

【0030】

特定の実施態様において、生物学的試料は、血液試料である。本明細書記載のように、試料は、全血、より好ましくは末梢血又は末梢血の細胞画分であることができる。当業者に理解されるように、血液試料は、血液の任意の画分又は成分を、非限定的に、T細胞、単球、好中球、赤血球、血小板、並びにエキソソーム及びエキソソーム様小胞のような微小胞を含むことができる。本開示のこの文脈において、血液試料中に含まれる血液細胞は、任意の有核細胞を包含し、かつ全血の成分に限定されない。従って血液細胞は、例えば、白血球(WBC)、並びにCTCを含む希少細胞の両方を含む。

【0031】

本開示の試料は、当該技術分野において周知の方法(例えば、FACS、免疫組織化学)により識別可能な複数の細胞集団及び細胞垂集団を、各々含むことができる。例えば、血液試料は、赤血球(例えば、4~5百万個/ μ l)又は血小板(150,000~400,000個細胞/ μ l)のような無核細胞の集団、及びWBC(例えば、4,500~10,000個細胞/ μ l)、CEC又はCTC(循環腫瘍細胞；例えば、2~800個細胞/)のような有核細胞の集団を含むことができる。WBCは、例えば好中球(2,500~8,000個細胞/ μ l)、リンパ球(1,000~4,000個細胞/ μ l)、単球(100~700個細胞/ μ l)、好酸球(50~500個細胞/ μ l)、好塩基球(25~100個細胞/ μ l)などのような細胞垂集団を含んでよい。本開示の試料は、富化されない試料であり、すなわちこれらは、有核細胞の特定の集団又は垂集団について富化されていない。例えば、富化されない血液試料は、CTC、WBC、B細胞、T細胞、NK細胞、単球などについて富化されていない。

20

【0032】

本方法は、例えば、Marrinucciらの文献、Hum Pathol, 38(3): 514-519 (2007)；Marrinucciらの文献、Arch Pathol Lab Med, 133(9): 1468-1471 (2009)；Mikolajczykらの文献、J Oncol, 2011: 252361. (2011)；Marrinucciらの文献、Phys Biol, 9(1): 016003 (2012)；Wernerらの文献、J Circ Biomark, 4: 3 (2015)により説明されたような、当業者に公知の方法により実行することができる。

30

【0033】

CTCデータ作製の文脈において本明細書において使用される用語「直接分析」とは、CTCが、検出前にCTCについて試料を富化した後とは対照的に、試料中に全ての周囲の有核細胞が存在する状況において検出されることを意味する。一部の実施態様において、本方法は、CTC及び少なくとも200個の周囲の白血球(WBC)の両方を含んだ視野を提供する顕微鏡検査を含む。

40

【0034】

本発明はまた、循環腫瘍細胞(CTC)データを作製するために、転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行する方法であって、この分析が、該細胞中のアンドロゲン受容体バリアント7(AR-V7)の存在を検出することを含む、前記方法を提供する。

【0035】

本発明はまた、CTCデータを作製するために、mCRPC患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行する方法であって、この分析が、CTCの核内に局在化されたAR-V7の存在を検出することを含む、前記方法を提供す

50

る。

【0036】

本発明はまた、CTCデータを作製するために、mCRPC患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行する方法であって、この分析が、CTCの核内に局在化されたAR-V7の存在を検出することを含み、ここでAR-V7の核局在化が、mCRPC患者に関するARS-指向型療法に対する抵抗性に対応している、前記方法を提供する。

【0037】

本発明はまた、CTCデータを作製するための、mCRPC患者から得られた血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色及び形態学的特徴決定を含む直接分析を実行する方法であって、この分析が、CTCの核内に局在化されたAR-V7の存在を検出することを含み、ここでAR-V7の核局在化が、mCRPC患者に関するARS-指向型療法と比べ、タキサン療法に対する有益な反応に対応している、前記方法も提供する。

10

【0038】

本明細書記載の方法の一部の実施態様において、AR-V7の核局在化は、隣接白血球(WBC)からのバックグラウンド染色よりも、シグナル強度が約 2倍、 3倍、 4倍、 5倍、 6倍、 7倍、 8倍、 9倍、 10倍、 11倍、 12倍、 13倍、 14倍、 15倍、 20倍、 25倍、 30倍、又は 35倍高い、染色パターンを含む。

【0039】

本開示の基本的態様は、CTCの検出に関する開示された方法の無類の堅牢性である。CTCに関する本明細書に開示された希少事象の検出は、周囲の非希少事象の状況における希少事象の同定を包含している集団の、直接分析、すなわち富化されない分析を基にしている。開示された方法に従う希少事象の同定は、周囲の事象を非希少事象として本質的に同定する。周囲の非希少事象を考慮し、かつ非希少事象に関する平均、例えば非希少事象の平均細胞サイズを決定することは、ノイズを除去することによるその検出方法のキャリブレーションを可能にする。その結果、直接分析を基にしていけない方法によっては達成されることができないが、代わりに希少事象の本質的に歪められた前後関係上の比較により富化された集団を比較する開示された方法の堅牢性が生じる。本明細書に開示された直接分析方法の堅牢性は、本明細書記載のCTC亜型を含むCTCの特徴決定を可能にし、他のCTC検出方法により達成することができない表現型及び不均一性を同定することが可能であり、かつ請求された方法の状況においてバイオマーカーの分析が可能である。

20

30

【0040】

CTCデータは、形態学的性質及び免疫蛍光性質の両方を含むことができる。当業者に理解されるように、バイオマーカーは、生物学的分子、又は生物学的分子の断片、前立腺癌及び/もしくはmCRPCと、個別に又は他の測定可能な性質と組合せて相互に関連付けられ得る変化及び/もしくは検出を含むことができる。CTCは、単独細胞又はCTCクラスター内に存在することができるが、これらは固形腫瘍から流出されかつ対象の循環中に非常に低い濃度で存在する上皮細胞であることが多い。従って血液試料中のCTCの検出は、希少事象検出と称され得る。CTCは、血液細胞集団中に1:1,000未満の存在量を、例えば、1:5,000、1:10,000、1:30,000、1:50,000、1:100,000、1:300,000、1:500,000、又は1:1,000,000未満の存在量を有する。一部の実施態様において、CTCは、細胞集団中に1:50,000~1:100,000の存在量を有する。

40

【0041】

本開示の試料は、例えば固形組織生検又は液体生検を含む任意の手段により入手されてもよい(例えば、Marrinucci D.らの文献、2012, Phys. Biol. 9 016003参照)。簡潔に説明すると、特定の実施態様において、このプロセスは、7.5mL血液試料中の赤血球の溶解及び除去、その各々が全血のおよそ0.5mLの等価物を収容する専用の顕微鏡スライド上の残存する有核細胞の沈着を包含することができる。血液試料は、血液細胞又はそれらの成分を含むことが分かっている任意の給源、例えば静脈、動脈、末梢、組織、臍帯などから抽出されてよい。これらの試料は、周知かつ慣習的な臨床方法(例えば、全血を採取しか

50

つ処理する手順)を用いて、処理されてよい。一部の実施態様において、血液試料は、EDT A又は Streck Cell-Free DNA (商標) を含み得る含抗凝固剤採血管(BCT)へ採取される。他の実施態様において、血液試料は、CellSave(登録商標)チューブ(Veridex社)へ採取される。血液試料は、さらなる処理前に、最大12時間、24時間、36時間、48時間、又は60時間さらに貯蔵されてよい。

【0042】

一部の実施態様において、本開示の方法は、血液試料に関する白血球(WBC)数を獲得する初期工程を含む。いくつかの実施態様において、WBC数は、HemoCue(登録商標)WBC装置(Hemocue社、エンゲルホルム、スウェーデン)を使用することにより得てよい。一部の実施態様において、WBC数は、スライド1枚当たり有核細胞の一貫した負荷量を播くのに必要とされる血液の量を決定し、かつ血液容量当たりの同等のCTCを逆算するために、使用される。

10

【0043】

一部の実施態様において、本開示の方法は、血液試料中の赤血球を溶解する初期工程を含む。一部の実施態様において、赤血球は、例えば、塩化アンモニウム溶液を血液試料へ添加することにより、溶解される。いくつかの実施態様において、血液試料は、赤血球溶解後、遠心分離に供され、かつ有核細胞は、例えばPBS溶液中に再浮遊される。

【0044】

一部の実施態様において、血液試料のような試料由来の有核細胞は、平面基板上に単層として沈着される。この平面基板は、例えば、任意の蛍光的に透明な物質、細胞付着を促す任意の物質、細胞デブリの容易な除去を促す任意の物質、厚さ<100µmを有する任意の物質など任意の材料であってよい。一部の実施態様において、この材料は、フィルムである。一部の実施態様において、この材料は、ガラススライドである。いくつかの実施態様において、本方法は、ガラススライド上の単層として血液試料由来の有核細胞を沈着する初期工程を包含している。ガラススライドは、生存細胞の最大保持が可能であるように、コーティングされ得る(例えば、Marrinucci D.らの文献、2012, Phys. Biol. 9 016003参照)。一部の実施態様において、約50万、100万、150万、200万、250万、300万、350万、400万、450万、又は500万個の有核細胞が、ガラススライド上に沈着される。一部の実施態様において、この開示の方法は、ガラススライド上に約300万個の細胞を沈着することを含む。追加の実施形態において、この開示の方法は、ガラススライド上に約200万~約300万個の細胞を沈着することを含む。一部の実施態様において、ガラススライド及び固定された細胞試料は、本開示の方法が完了された後のさらなる処理又は実験に利用され得る。

20

30

【0045】

一部の実施態様において、本開示の方法は、富化されない血液試料中の有核細胞を同定する初期工程を含む。一部の実施態様において、有核細胞は、蛍光染色により同定される。いくつかの実施態様において、蛍光染色は、核酸特異的染色を含む。いくつかの実施態様において、蛍光染色は、ジァミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)である。一部の実施態様において、有核細胞の免疫蛍光染色は、汎サイトケラチン(CK)、分化抗原群(CD)45、及びDAPIを含む。本明細書にさらに記載された一部の実施態様において、CTCは、周囲の有核細胞からの識別できる免疫蛍光染色を含む。一部の実施態様において、CTCの識別できる免疫蛍光染色は、DAPI(+)、CK(+)及びCD45(-)を含む。一部の実施態様において、CTCの同定は、汎サイトケラチン蛍光染色の強度を、周囲の有核細胞と比較することをさらに含む。一部の実施態様において、CTCデータは、血液試料中の有核細胞の免疫蛍光染色を検出するために、走査型蛍光顕微鏡検査により作製される。Marrinucci D.らの文献、2012, Phys. Biol. 9 016003)。

40

【0046】

特定の実施態様において、全ての有核細胞は、保持され、かつ専ら上皮細胞中に認められる中間径フィラメントであるサイトケラチン(CK)を標的化するモノクローナル抗体、白血球共通抗原CD45を標的化する汎白血球に特異的な抗体、及び核染色DAPIにより、免疫蛍光的に染色される。有核血液細胞は、複数の蛍光チャンネルにおいて画像化され、核輪郭

50

及び細胞質分布の細かい細胞学的詳細を保持する高品質かつ高解像度のデジタル画像を作製することができる。周囲のWBCは、CD45を標的化する汎白血球特異的抗体により同定することができるが、CTCは、DAPI(+)、CK(+)及びCD45(-)として同定することができる。本明細書記載の方法において、CTCは、周囲の有核細胞から識別できる免疫蛍光染色を含む。

【0047】

さらなる実施態様において、CTCデータは、高解像度CTC(HD-CTC)としても公知である従来型CTCを含む。従来型CTCは、CK陽性、CD45陰性であり、これは識別可能であるアポトーシス変化又は破壊された外見を伴わない無傷のDAPI陽性の核を含み、かつ周囲の白血球(WBC)から形態学的に識別される。DAPI(+)、CK(+)及びCD45(-)強度は、先に説明されたような、HD-CTC計数時に、測定可能な特徴として分類され得る。Nievaらの文献、Phys Biol, 9:016004 (2012)。本明細書に開示された方法により利用される無富化直接分析は、高い感度及び高い特異性を生じると同時に、不均一であることがわかっているCTC集団の詳細な形態学的特徴決定を可能にするために高解像度細胞形態学を加える。

10

【0048】

CTCは、DAPI(+)、CK(+)及びCD45(-)細胞を含むものとして同定することができるが、本発明の方法は、当業者がCTCデータを作製し並びに/又はCTC及びCTCクラスターを同定するために選択するいずれか他のバイオマーカーにより実践することができる。当業者は、形態学的特徴、生物学的分子、又は生物学的分子の断片、CTCと相互に関連付けられ得る変化及び/もしくは検出を選択する方式を知っている。分子バイオマーカーは、ヌクレオチド、核酸、ヌクレオシド、アミノ酸、糖、脂肪酸、ステロイド、代謝産物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、ホルモン、抗体を含む生物学的分子、生物学的高分子の代理として役立つ関心対象の領域及びそれらの組合せ(例えば、糖タンパク質、リボヌクレオタンパク質、リボタンパク)を含むが、これらに限定されるものではない。この用語はまた、生物学的分子の一部又は断片、例えばタンパク質のペプチド断片又はポリペプチドも包含している。

20

【0049】

当業者は、走査型蛍光顕微鏡検査を含む顕微鏡検査ベースのアプローチ(例えば、Marriucci D.らの文献、2012, Phys. Biol. 9 016003参照)、MS/MS、LC-MS/MS、多重反応モニタリング(MRM)又はSRM及びプロダクト-イオンモニタリング(PIM)のような質量分析アプローチを含み、並びにまた、免疫蛍光測定、免疫組織化学、ウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ、ドットプロット、及びFACSなどのイムノアッセイのような抗体ベースの方法を含む、数多くの方法を使用し、CTCデータを作製することができることを理解するであろう。イムノアッセイ技術及びプロトコールは一般に、当業者に公知である(Price及びNewmanの文献、「イムノアッセイ原理と実践(Principles and Practice of Immunoassay)」、第2版、Grove's Dictionaries、1997;及び、Goslingの文献、「イムノアッセイ:実践法(Immunoassays: A Practical Approach)」、Oxford University Press、2000)。競合及び非競合イムノアッセイを含む様々なイムノアッセイ技術を、使用することができる(Selfらの文献、Curr. Opin. Biotechnol., 7:60-65 (1996)、同じくJohn R. Crowtherの文献、「ELISA指針(The ELISA Guidebook)」、第1版、Humana Press、2000、ISBN 0896037282、及びChard T編集の「ラジオイムノアッセイ及び関連技術の入門(An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques)」、Elsevier Science、1995、ISBN 0444821198も参照されたい)。

30

40

【0050】

当業者は、バイオマーカーの存在又は非存在は、例えば抗体、アプタマー、タンパク質受容体もしくはタンパク質リガンド成分を含む融合タンパク質のような融合タンパク質、又はバイオマーカー特異的小型分子結合剤を含む当該技術分野において公知の任意のクラスのマーカー特異的結合試薬を用いて検出されてもよいことをさらに理解するであろう。一部の実施態様において、CK、AR-V7又はCD45の存在又は非存在は、抗体により決定される。

50

【0051】

本開示の抗体は、バイオマーカーへ特異的に結合する。この抗体は、当該技術分野において公知のいずれか好適な方法を用いて調製することができる。例えば、Coliganの文献、「免疫学最新プロトコール(Current Protocols in Immunology)」(1991); Harlow及びLaneの文献、「抗体：実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)」(1988); Godingの文献、「モノクローナル抗体：原理と実践(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)」(第2版 1986)を参照されたい。この抗体は、天然に又は全体的もしくは部分的に合成により生成されるかにかかわらず、任意の免疫グロブリン又はそれらの誘導体であることができる。特異的結合能を維持しているそれらの誘導体もまた全て、この用語に含まれる。この抗体は、免疫グロブリン結合ドメインと相同であるか又は大部分相同である結合ドメインを有し、かつ天然の給源から誘導されるか、又は部分的もしくは全体的に合成により作製することができる。この抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であることができる。一部の実施態様において、抗体は、単鎖抗体である。当業者は、抗体は、例えば、ヒト化、部分的ヒト化、キメラ、キメラヒト化などを含む様々な形態のいずれかで提供され得ることを理解するであろう。この抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFv、ダイアボディ、及びFd断片を含むが、これらに限定されるものではない抗体断片であることができる。この抗体は、任意の手段により作製することができる。例えば、この抗体は、無傷の抗体の断片化により、酵素的にもしくは化学的に作製されることができるか、及び/又はこれは、部分的抗体配列をコードしている遺伝子から組み換えにより作製されるることができる。この抗体は、単鎖抗体断片を含むことができる。あるいは又は加えて、この抗体は、例えば、ジスルフィド結合により一緒に連結されている複数の鎖、並びにそのような分子から得られた任意の機能性断片を含むことができ、ここでそのような断片は、親抗体分子の特異的結合特性を保持している。全分子の機能性成分としてのそれらのより小さいサイズのために、抗体断片は、ある種の免疫化学技術における使用及び実験適用について、無傷の抗体に勝る利点をもたらすことができる。

10

20

【0052】

検出可能な標識は、本発明の方法においてCTCデータを作製する場合に、バイオマーカーの直接又は間接検出のために、本明細書記載の方法において使用することができる。多種多様な検出可能な標識を使用することができ、標識の選択は、必要な感度、抗体とのコンジュゲーションの容易さ、安定性の必要要件、並びに利用可能な計測手段及び廃棄設備に応じて決まる。当業者は、本発明の方法におけるバイオマーカーのアッセイ検出を基に、好適な検出可能な標識の選択について、熟知している。好適な検出可能な標識は、蛍光色素(例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、Oregon Green(商標)、ローダミン、テキサスレッド、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(tetrarhodamine isothiocyanate)(TRITC)、Cy3、Cy5、Alexa Fluor(登録商標)647、Alexa Fluor(登録商標)555、Alexa Fluor(登録商標)488)、蛍光マーカー(例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、フィコエリトリンなど)、酵素(例えば、ルシフェラーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)、ナノ粒子、ビオチン、ジゴキシゲニン、金属などを含むが、これらに限定されるものではない。

30

【0053】

質量スペクトルベースの分析について、同位体試薬による示差的タグ付け、例えば同位体-コードされた親和性タグ(ICAT)又はアイソパリック(isobaric)タグ付け試薬を使用するより最近の変法iTRAQ(Applied Biosystems社、フォスターシティ、カリフォルニア)、それに続く多方向液体クロマトグラフィー(LC)及びタンデム質量分析(MS/MS)の分析は、本開示の方法を実践する上でのさらなる方法論を提供することができる。

40

【0054】

化学発光性抗体を使用する化学発光アッセイは、タンパク質の感度のよい非放射性検出のために使用することができる。蛍光色素で標識された抗体もまた、好適であることができる。蛍光色素の例は、非限定的に、DAPI、フルオレセイン、Hoechst 33258、R-フィコシアニン、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、及

50

びリサミンを含む。間接的標識は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼなどのような、当該技術分野において周知である様々な酵素を含む。ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼのための好適な基質を使用する検出システムは、当該技術分野において周知である。

【0055】

直接又は間接標識からのシグナルは、例えば、蛍光顕微鏡又は走査型蛍光顕微鏡のような顕微鏡を用いて、分析することができる。あるいは、発色基質からの色を検出するための分光光度計；¹²⁵Iの検出のためのガンマカウンターのよう、放射線を検出するための放射線カウンター；又は、特定の波長の光の存在下で蛍光を検出するための蛍光光度計を、使用することができる。望ましいならば、本開示の方法を実践するために使用されるアッセイは、自動化されるか、又はロボット制御により実行されることができ、かつ複数の試料からのシグナルが、同時に検出されることができ、

10

【0056】

一部の実施態様において、これらのバイオマーカーは、免疫蛍光マーカーである。一部の実施態様において、免疫蛍光マーカーは、上皮細胞に特異的なマーカーを含む。一部の実施態様において、免疫蛍光マーカーは、白血球(WBC)に特異的なマーカーを含む。一部の実施態様において、1種以上の免疫蛍光マーカーは、CD45及びCKを含む。

【0057】

一部の実施態様において、CTC又はWBCのような有核細胞における免疫蛍光マーカーの存在又は非存在は、識別できる免疫蛍光染色パターンを生じる。CTC及びWBCに関する免疫蛍光染色パターンは、上皮マーカー又はWBCマーカーが各細胞において検出されることを基に異なってよい。一部の実施態様において、1種以上の免疫蛍光マーカーの存在又は非存在の決定は、例えば、WBCを識別できるように同定する、CD45の免疫蛍光染色を使用し、CTCの識別できる免疫蛍光染色を、WBCの識別できる免疫蛍光染色と比較することを含む。WBCの様々な亜集団に結合する他の検出可能なマーカー又は検出可能なマーカーの組合せが存在する。これらは、CD45の免疫蛍光染色との組合せにおいて、又はこれの代わりとして含む、様々な組合せで使用してもよい。

20

【0058】

一部の実施態様において、CTCは、周囲の有核細胞と比べて、識別できる形態学的特徴を含む。一部の実施態様において、この形態学的特徴は、核サイズ、核形状、細胞サイズ、細胞形状、及び/又は核対細胞質の比を含む。一部の実施態様において、この方法は、核の詳細、核輪郭、核小体の存在又は非存在、細胞質の質、細胞質の量、免疫蛍光染色パターンの強度により、有核細胞を分析することをさらに含む。当業者は、本開示の形態学的特徴は、決定されかつCTCの検出と相互に関連付けられ得る細胞の任意の性質、特性、特徴、又は態様を含み得ることを理解している。

30

【0059】

CTCデータは、当該技術分野において公知の顕微鏡的方法のいずれかにより作製することができる。一部の実施態様において、この方法は、走査型蛍光顕微鏡検査により実施される。いくつかの実施態様において、この顕微鏡的方法は、CTC及びそれらの周囲のWBCの高解像度の画像を提供する(例えば、Marrinucci D.らの文献、2012, Phys. Biol. 9 0160 03参照)。一部の実施態様において、富化されない血液試料のような試料由来の有核細胞の単層でコーティングされたスライドを、走査型蛍光顕微鏡により走査し、かつ免疫蛍光マーカー及び核染色からの蛍光強度を記録し、各免疫蛍光マーカーの存在又は非存在の決定、並びに有核細胞の形態の評価が可能である。一部の実施態様において、顕微鏡的データの収集及び分析は、自動化された方式で実施される。

40

【0060】

一部の実施態様において、CTCデータは、1種以上のバイオマーカー、例えばCK、AR-V7及びCD45を検出することを含む。バイオマーカーは、使用される各検出法のバックグラウンドノイズを上回り検出可能である(例えば、バックグラウンドよりも、2倍、3倍、5倍、

50

又は10倍高い；例えば、バックグラウンドを2 又は3 超える)場合に、細胞内に「存在する」と考えられる。一部の実施態様において、バイオマーカーは、使用される検出法のバックグラウンドノイズを上回っても検出可能でない(例えば、バックグラウンドシグナルよりも、<1.5倍又は<2.0倍高い；例えば、バックグラウンドを<1.5 又は<2.0 超える)場合に、「非存在」と考えられる。

【0061】

一部の実施態様において、有核細胞内の免疫蛍光マーカーの存在又は非存在は、全ての免疫蛍光マーカーが視野内のWBC上の予め設定された蛍光レベルに達するように、蛍光走査プロセス時の暴露時間を選択することにより決定される。これらの条件下で、CTC特異的免疫蛍光マーカーは、例えWBC上に存在しないとしても、固定された高さを持つバックグラウンドシグナルとしてWBCにおいて視認される。さらに、CTC上に存在しないWBC特異的免疫蛍光マーカーは、固定された高さを持つバックグラウンドシグナルとしてCTCにおいて視認される。各マーカーに関するその蛍光シグナルが、固定されたバックグラウンドシグナルよりも、有意に高い(例えば、バックグラウンドよりも、2倍、3倍、5倍、又は10倍高い；例えば、バックグラウンドを2 又は3 超える)場合に、細胞は、免疫蛍光マーカーについて陽性であると考えられる(すなわち、このマーカーは存在すると考えられる)。例えば、有核細胞は、CD45に関するその蛍光シグナルがバックグラウンドシグナルよりも有意に高い場合に、CD45陽性(CD45⁺)と考えられる。各マーカーに関する細胞の蛍光シグナルが、バックグラウンドシグナルを有意に上回らない(例えば、バックグラウンドシグナルよりも、<1.5倍又は<2.0倍高い；例えば、バックグラウンドを<1.5 又は<2.0 超える)場合に、細胞は、免疫蛍光マーカーについて陰性であると考えられる(すなわち、このマーカーは存在しないと考えられる)。

10

20

【0062】

典型的には、各顕微鏡視野は、CTC及びWBCの両方を含む。いくつかの実施態様において、顕微鏡視野は、少なくとも1、5、10、20、50、又は100個のCTCを示す。いくつかの実施態様において、顕微鏡視野は、CTCよりも少なくとも10、25、50、100、250、500、又は1,000倍多いWBCを示す。いくつかの実施態様において、顕微鏡視野は、少なくとも10、50、100、150、200、250、500、1,000又はそれよりも多いWBCにより取り囲まれた1以上のCTC又はCTCクラスターを含む。

30

【0063】

本明細書記載の方法の一部の実施態様において、CTCデータの作製は、血液試料中に存在するCTCの計数を含む。一部の実施態様において、本明細書記載の方法は、少なくとも1.0 CTC/mL血液、1.5 CTC/mL血液、2.0 CTC/mL血液、2.5 CTC/mL血液、3.0 CTC/mL血液、3.5 CTC/mL血液、4.0 CTC/mL血液、4.5 CTC/mL血液、5.0 CTC/mL血液、5.5 CTC/mL血液、6.0 CTC/mL血液、6.5 CTC/mL血液、7.0 CTC/mL血液、7.5 CTC/mL血液、8.0 CTC/mL血液、8.5 CTC/mL血液、9.0 CTC/mL血液、9.5 CTC/mL血液、10 CTC/mL血液、又はそれよりも多いものの検出を包含している。

【0064】

本明細書記載の方法の一部の実施態様において、CTCデータの作製は、非従来型CTCを含む、CTCの識別できる亜型を検出することを含む。一部の実施態様において、本明細書記載の方法は、少なくとも0.1 CTCクラスター/mL血液、0.2 CTCクラスター/mL血液、0.3 CTCクラスター/mL血液、0.4 CTCクラスター/mL血液、0.5 CTCクラスター/mL血液、0.6 CTCクラスター/mL血液、0.7 CTCクラスター/mL血液、0.8 CTCクラスター/mL血液、0.9 CTCクラスター/mL血液、1 CTCクラスター/mL血液、2 CTCクラスター/mL血液、3 CTCクラスター/mL血液、4 CTCクラスター/mL血液、5 CTCクラスター/mL血液、6 CTCクラスター/mL血液、7 CTCクラスター/mL血液、8 CTCクラスター/mL血液、9 CTCクラスター/mL血液、10クラスター/mL又はそれよりも多いものの検出を包含している。特定の実施態様において、本明細書記載の方法は、少なくとも1 CTCクラスター/mL血液の検出を包含している。

40

【0065】

一部の実施態様において、本方法は、例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーショ

50

ン(FISH)による、CTCのゲノム分析を含む。

【0066】

当該技術分野において公知であり具体的に説明されていない標準分子生物学技術は、一般的に、Sambrookらの文献、「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク(1989)、及びAusubelらの文献、「分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」、John Wiley and Sons、ボルチモア、Md.(1989)、及びPerbalの文献、「分子クローニングの実践指針(A Practical Guide to Molecular Cloning)」、John Wiley & Sons、ニューヨーク(1988)、及びWatsonらの文献、「組換えDNA(Recombinant DNA)」、Scientific American Books、ニューヨーク、及びBirrenら(編集)の「ゲノム解析：実験マニュアルシリーズ(Genome Analysis: A Laboratory Manual Series)」、第1-4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク(1998)に従う。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、概して「PCRプロトコル：方法及び応用の指針(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications)」、Academic Press、サンディエゴ、Ca.(1990)として実行することができる。特定の試料のDNAコピー数プロファイルの決定が可能である任意の方法は、その解像度が本発明のバイオマーカーの同定に十分であることを条件として、本発明に従う分子プロファイリングのために使用することができる。当業者は、1種以上の本発明のバイオマーカーのコピー数を特定するのに十分な解像度で、全ゲノムコピー数の変化を評価するために数多くの異なるプラットフォームを認めかつこれらを使用することが可能である。

10

20

【0067】

インサイチュハイブリダイゼーションアッセイは、周知であり、かつ一般的にAngererらの文献、Methods Enzymol. 152:649-660 (1987)に説明されている。インサイチュハイブリダイゼーションアッセイにおいて、細胞、例えば生検由来の細胞は、固形基板、典型的にはガラススライド上に固定される。DNAがプロービングされる場合には、細胞は、熱又はアルカリにより変性される。次に細胞は、ハイブリダイゼーション溶液と、適度な温度で接触され、標識されている特異的プローブのアニールングが可能になる。これらのプローブは、放射性同位元素又は蛍光レポーターにより標識されることが好ましい。FISH(蛍光インサイチュハイブリダイゼーション)は、それらと高度の配列類似性を示す配列の一部にのみ結合する蛍光プローブを使用する。

30

【0068】

FISHは、細胞内の特異的ポリヌクレオチド配列を検出しかつ局在化するために使用される細胞遺伝学的技術である。例えば、FISHは、染色体上のDNA配列を検出するために使用することができる。FISHはまた、組織試料内の特異的RNA、例えばmRNAを検出しかつ局在を知るために使用することもできる。FISHは、それらと高度の配列類似性を示す特異的ヌクレオチド配列に結合する蛍光プローブを使用する。蛍光顕微鏡を使用し、蛍光プローブが結合されるかどうか及びどこで結合されるかを見つけることができる。特異的ヌクレオチド配列、例えば転座、融合、破壊、複製及び他の染色体異常の検出に加え、FISHは、特異的遺伝子コピー数並びにノ又は細胞及び組織内の遺伝子発現の空間的-時間的パターン

40

【0069】

本明細書において言及された全ての特許及び刊行物は、各独立した特許及び刊行物が、具体的かつ個別に引用により組み込まれていることが指摘されるのと同じ程度に、引用により本明細書中に組み込まれている。

【0070】

下記実施例は、限定ではなく、例証として提供される。

【実施例】

【0071】

(実施例)

(実施例1) mCRPC患者のCTC中のAR-V7スプライスバリエーションの存在は、アンドロゲン受

50

容体シグナル伝達指向型療法(ARS Tx)に勝る、タキサン療法による改善されたPSA反応を伴う患者を特定する。

【0072】

この実施例は、mCRPC患者のCTC中のAR-V7スプライスパリアントの存在は、アンドロゲン受容体シグナル伝達指向型療法(ARS Tx)に勝る、タキサン療法による改善されたPSA反応を伴う患者を特定することを、明らかにしている。

【0073】

簡潔に説明すると、末梢血液試料を、無細胞DNA BCT(Streck社、オマハ、NE、USA)中に収集し、直ちにEpic Sciences社(サンディエゴ、CA、USA)へ外界温度で輸送した。受理時に、赤血球を溶解し、かつ有核細胞を先に説明されたようにガラス製顕微鏡スライド上に分配し(Marrinucciらの文献、Hum Pathol, 38(3): 514-519 (2007); Marrinucciらの文献、Arch Pathol Lab Med, 133(9): 1468-1471 (2009); Mikolajczykらの文献、J Oncol, 2011: 252361. (2011); Marrinucciらの文献、Phys Biol, 9(1): 016003 (2012); Wernerらの文献、J Circ Biomark, 4: 3 (2015))、かつ染色まで、-80 で保存した。スライド1枚当たりに播いた血液のミリリットル等量を、試料の白血球数、及び使用したRBC溶解後の細胞懸濁液の容量を基に計算した。循環腫瘍細胞を、説明されたように免疫蛍光測定法により同定した(Marrinucciらの文献、2007, 前掲; Marrinucciらの文献、2009, 前掲; Mikolajczykらの文献、2011, 前掲; Marrinucciらの文献、2012, 前掲; Wernerらの文献、2015, 前掲)。

10

【0074】

Epic Sciencesプラットフォームを通じて評価したmCRPC患者のCTC中のAR-V7 IF発現は、診断のワークフロー(血液採取から処理までの中央値24時間)と適合性がある。193名のmCRPC患者の血液試料を、アピラテロン(44); エンザルタミド(81)、ドセタキセル(46)、カバジタキセル(13)、及びパクリタキセル(2)を開始する前に、収集した。PSA転帰を、感受性(S): パターン1及び2、又は抵抗性(R): パターン3(A)として記録した(図1)。Scherらの文献、Cancer J. 2013 Jan-Feb;19(1):43-9。患者は、rPFS転帰及びOS転帰を評価するために、最大2.3年間モニタリングした。試料は、CTC計数のためのEpic Sciencesプラットフォーム、形態学、バイオマーカー、及びFISHの分析ワークフローを利用し、処理した: 1)血液試料からの有核細胞を、スライド上に配置し、-80 のバイオレポジトリー内に保存する; 2)スライドを、サイトケラチン(CK)、CD45、DAPI、AR-V7で染色する; 3)スライドを走査する; 4)CTC候補を、多重パラメータデジタル病理アルゴリズムにより検出する、並びに5)測定者が、CTC及びバイオマーカー発現の定量を確認する(図1)。

20

30

【0075】

Epic CTCにおけるAR-V7発現は、新規PSA抵抗性に対し100%特異性(100%PPV)であり、AR療法を受けている患者の服薬のより短い時間(HR = 4.61、 $p < 0.0001$)、より短いrPFS(HR = 2.92、 $p = 0.0002$)、及びより短いOS(HR = 11.44、 $p < 0.0001$)である。簡潔に説明すると、AR-V7タンパク質発現は、66名のAR療法に対し抵抗性の患者のうち、15名からのCTCにおいて認められた。CTCは、57名中37名のAR療法感受性患者において特定されたが(範囲: 0 ~ 345 CTC/mL、中央値: 2 CTC/mL)、57名のAR療法感受性患者中、AR-V7+ CTCを保有する者はいなかった。AR-V7+細胞を欠いているAR療法コホートにおける全患者の53%は、AR療法に対し感受性があった。AR-V7保有率は、タキサン化学療法に対する抵抗性を予測せず: AR-V7+ CTCは、タキサン感受性患者30名中9名において、及びタキサン抵抗性の患者26名中7名において各々認められた。図4及び図5。

40

【0076】

AR-V7発現は、タキサンで治療した患者におけるPSA抵抗性とは相関していない。図4。

【0077】

AR-V7保有率は、全身療法AR-V7への増加した曝露に伴い、増加し($p < 0.0001$)、かつ総CTCの小さい集団を表し、これは疾患不均一性を示唆する。図6。

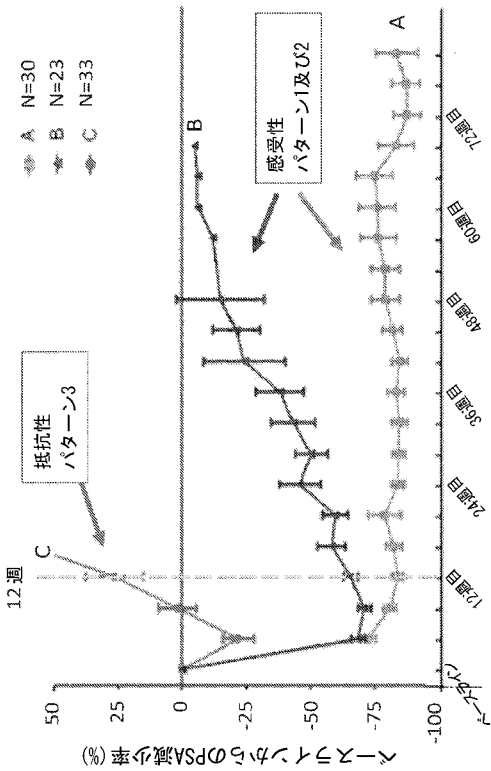
【0078】

この実施例は、AR-V7陽性CTCの存在と、タキサン抵抗性ではなくAR療法抵抗性の間の関

50

係を明らかにし、このことは、mCRPC患者における治療選択の情報をもたらすために、AR-V7バイオマーカーを利用することを確認している。

【 図 1 A 】



ARシグナル伝達指向型療法後の治療後PSA変化パターン

図 1A

【 図 1 B 】

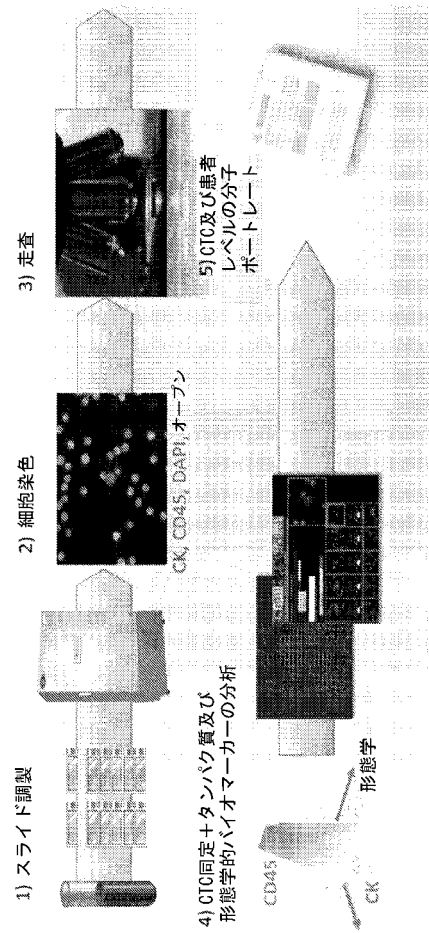


図 1B

【 図 2 A 】

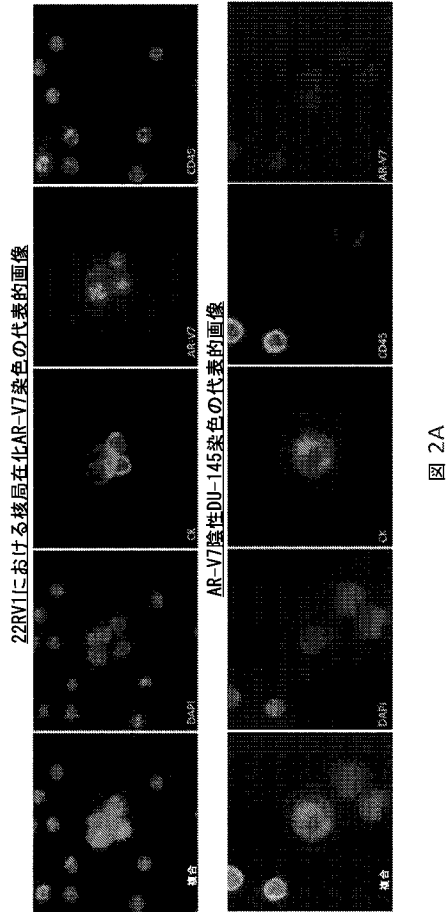


図 2A

【 図 2 B 】

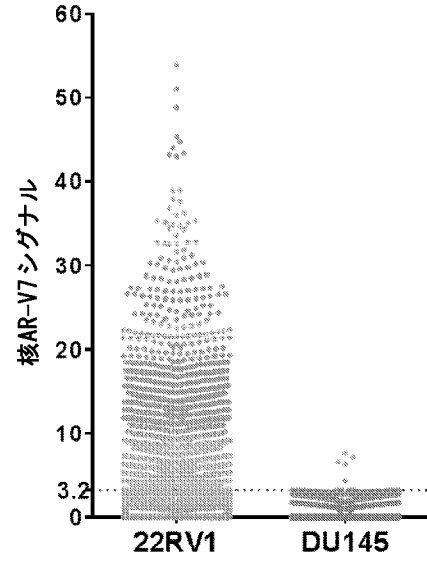


図 2B

【 図 3 A 】

特徴	数(%)又は中央値(範囲)
ベースライン試料の数 (固有の患者)	193 (161)
年齢(歳)	68 (45 - 91)
血液検査に要した時間(時間)	24 (1 - 78)
一次治療	
前立腺切除術	89 (46%)
放射線照射	34 (18%)
小線源療法	11(6%)
なし	59 (31%)
ホルモン療法	
1-2次	69 (36%)
3次	36 (19%)
≥4次	86 (45%)
化学療法を受けていない	120 (62%)
化学療法-曝露	73 (38%)
転移性疾患	
骨	170 (88%)
リンパ節	128 (66%)
肝臓	17 (9%)
肺	21 (11%)
他の軟組織	23 (12%)
臨床検査値	
PSA, ng/mL	37.7 (0.10 - 3728.2)
Hgb, (g/dl)	12.1 (7.0 - 15.0)
ALK, (単位/L)	111 (25 - 2170)
LDH, (単位/L)	220(123 - 1293)
ALB, (g/dl)	4.2 (3.1 - 4.9)
CTC, (細胞/7.5mL)	2 (0 - >200)

図 3A

【 図 3 B 】

患者療法次数	3次及びそれ以上	
	先行するAR Tx及び E (3次) n=2	先行するAR Tx及び E (3次) n=32
	先行するAR Tx (A又はE) (2次) n=32	先行するAR Tx (A又はE) (2次) n=10
	先行するT (2次) n=8	先行するAR Tx (A又はE) (2次) n=10
1次	先行するA又は E Txなし(1次) n=56	先行するA又は E Txなし(1次) n=11
A又はEベースライン時血液採取 (n=130)	Tベースライン時血液採取 (n=63)	

図 3B

【 図 6 C 】

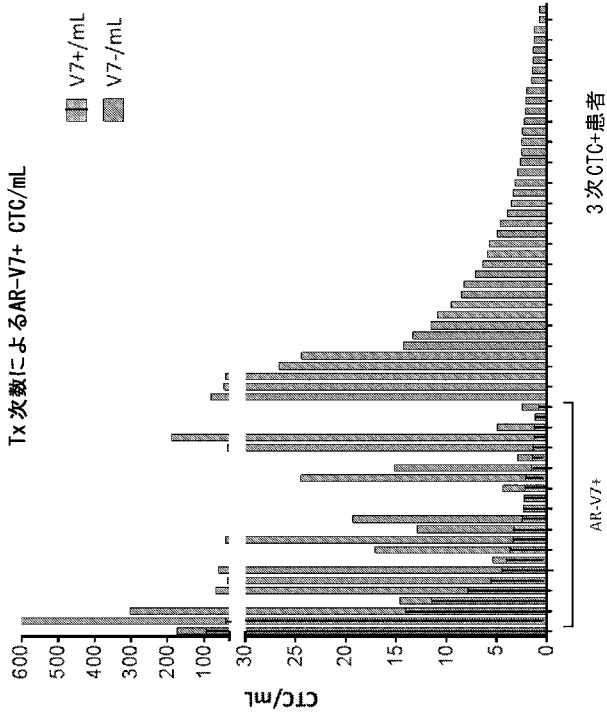


図 6C

【 図 6 D 】

(% AR-V7+ CTCs: 範囲 (中央値))				
Txの回数	1	2	3	全ての回数
総集団	0-11.1 (0)	0-100 (0)	0-100 (0)	0-100 (0)
AR-V7+ 患者のみ (N=34)	0.3-11.1 (5.7)	14.3-100 (38)	0.5-100 (21)	0.3-100 (22)

AR-V7+ 患者: 数 (%)				
Txの回数	1	2	3	P値*
AR-V7+ CTCs	2 (3%)	9 (18%)	23 (31%)	<0001

* AR-V7陽性と治療の回数間の相関に関するフィッシャーの正確検定

図 6D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/53387

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - G01N 33/574, C12Q 1/68 (2016.01) CPC - G01N 33/57434, C12Q 1/6886 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B): G01N 33/574, C12Q 1/68 (2016.01) CPC: G01N 33/57434, C12Q 1/6886 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/6.11, 435/7.23 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubWest, Google Patents, Google Scholar: Nuclear localization, circulating tumor cells, immunofluores*, or fluores*, androgen receptor, metastatic resistant prostate cancer, prostate cancer, variant 7, variant, androgen receptor variant, taxane therapy		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015/0233927 A1 (CORNELL UNIVERSITY et al.) 20 August 2015 (20.08.2015); para [0006], [0007], [0008], [0010], [0019], [0020], [0028], [0066], [0072], [0127], [0151], [0180], [0209]	1-24
Y	US 2015/0212089 A1 (EPIC SCIENCES, INC) 30 July 2015 (30.07.2015); Abstract, para [0010], [0015], [0059], [0064], [0065], [0066], [0080]; Claim 14, 22	1-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* 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		Date of mailing of the international search report
3 November 2016		17 NOV 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpline: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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, DJ, 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, KW, 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

专利名称(译)	雄激素受体变异体作为转移性去势难治性前列腺癌 (mCRPC) 患者治疗选择的生物标志物7		
公开(公告)号	JP2018535432A	公开(公告)日	2018-11-29
申请号	JP2018536062	申请日	2016-09-23
发明人	ライアン デイッタモア		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N15/00 C12Q1/02 C12Q1/6841		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.Y G01N15/00.B C12Q1/02 C12Q1/6841.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	石川彻		
优先权	62/233206 2015-09-25 US		
其他公开文献	JP2018535432A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种与雄激素受体 (AR) 靶向疗法相比, 对紫杉烷疗法具有改善的反应的转移性去势抵抗性前列腺癌 (mCRPC) 患者的鉴定方法, 包括: 进行直接分析, 包括免疫荧光染色和给定血样中有核细胞的形态表征, 以生成循环肿瘤细胞 (CTC) 数据, 该分析包括: 上述步骤, 包括检测雄激素受体变异体7 (AR-V7) 的存在, 以及 (c) 评估了该 CTC数据, 以显示与ARS指导的治疗相比, 紫杉烷治疗的反应有所改善。提供了一种方法, 该方法包括识别mCRPC患者的步骤。[选型图]图 1A

