



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107614698 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201680029396.X

S.马赫斯瓦兰 X.洪

(22)申请日 2016.03.25

D.T.米亚莫托 T.托多罗瓦

S.雅瓦伊德

(30)优先权数据

62/137,891 2015.03.25 US

62/219,339 2015.09.16 US

62/253,619 2015.11.10 US

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张文辉

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.21

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/024367 2016.03.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/154600 EN 2016.09.29

(71)申请人 通用医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D.A.哈伯 R.卡普尔 M.托纳

权利要求书2页 说明书34页 附图34页

(54)发明名称

对血液样品中的循环肿瘤细胞的数字分析

(57)摘要

本公开涉及用于分析血液样品中循环肿瘤细胞(CTC)以检测,例如早期检测和/或监测疾病,例如癌症的新测定方法。该方法提供超高的灵敏度和特异性,并且包括使用CTC的微流体分离和源自CTC的RNA的数字检测。

1. 用于在受试者中以超高灵敏度和特异性检测癌症的方法,所述方法包括从所述受试者的血液样品中分离循环肿瘤细胞 (CTC);
将CTC衍生的RNA转化为cDNA;
将cDNA包囊到单独的液滴中;
在报告基团的存在下扩增每个液滴中的cDNA,所述报告基团配置成特异性结合来自CTC的cDNA而不结合来自血液中其他细胞的cDNA;并且
确定对报告基团呈阳性的液滴总数,以确定指示所述受试者中存在癌症的CTC的存在。
2. 分析血液样品中的循环肿瘤细胞 (CTC) 的方法,所述方法包括:
从血液样品分离包含CTC和血液中存在的其它细胞的产物;
从所述产物分离核糖核酸 (RNA) 分子;
从分离的RNA在溶液中产生cDNA分子;
将cDNA分子包囊在单独的液滴中;
在一个或多个报告基团的存在下扩增每个液滴内的cDNA分子,所述报告基团配置成特异性结合来自CTC的cDNA而不结合来自其他细胞的cDNA;
检测含有报告基团的液滴,所述报告基团作为所述液滴中来自CTC的cDNA分子的存在指标;并且
分析检测的液滴中的CTC。
3. 权利要求2的方法,其还包括在分离RNA之前减少所述产物的体积。
4. 权利要求2或3的方法,其还包括在包囊所述cDNA分子之前从含有cDNA的溶液中除去污染物。
5. 权利要求2-4中任一项的方法,其中从所述分离的RNA产生cDNA分子包括进行分离的RNA分子的逆转录 (RT) 聚合酶链反应 (PCR)。
6. 权利要求1至5中任一项的方法,其中扩增每个液滴内的cDNA或cDNA分子包括在每个液滴中进行PCR。
7. 权利要求2至6中任一项的方法,其中包囊单独的cDNA分子还包括将PCR试剂与所述cDNA分子一起包囊在单独的液滴中并形成至少1000个非水性液体的液滴。
8. 权利要求2至7中任一项的方法,其中所述报告基团包含荧光标记物。
9. 权利要求4至10中任一项的方法,其中从所述含有cDNA的溶液中除去污染物包括使用固相可逆固定化 (SPRI)。
10. 权利要求9的方法,其中所述SPRI包括
用配置为特异性结合cDNA的磁珠固定化溶液中的cDNA;
从所述溶液中除去污染物;并且
洗脱纯化的cDNA。
11. 权利要求7至10中任一项的方法,其中所述非水性液体包含一种或多种氟碳化合物、氢氟烃、矿物油、硅油和烃油。
12. 权利要求6至11中任一项的方法,其中用于扩增每个液滴内的所述cDNA分子的探针和引物对应于与表1中列出的选择的癌症基因相关的一种或多种探针和引物。
13. 权利要求12的方法,其中所述选择的癌症选择性基因包括前列腺癌选择性基因。
14. 权利要求12的方法,其中所述选择的癌症基因包括乳腺癌选择性基因。

15. 权利要求12的方法,其中所述选择的癌症基因包括对肺癌、胰腺癌、肝癌和黑素瘤中的一种或多种选择性的基因。

16. 权利要求12的方法,其中所述选择的癌症基因包括对两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种,或五种或更多种不同类型的癌症选择性的一种或多种基因。

17. 权利要求16的方法,其中所述基因对于下列癌症是选择性的:乳腺癌和肺癌;乳腺癌、肺癌、和肝癌;乳腺癌、肺癌、和胰腺癌;乳腺癌、肺癌、和前列腺癌;乳腺癌、肝癌、和黑素瘤;乳腺癌、肺癌、和黑素瘤;乳腺癌、肺癌、肝癌、和前列腺癌;乳腺癌、肺癌、肝癌、和黑素瘤;乳腺癌、肺癌、肝癌、和胰腺癌;乳腺癌、肺癌、前列腺癌、和胰腺癌;乳腺癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、和胰腺癌;或乳腺癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、胰腺癌、和前列腺癌。

18. 权利要求1至17中任一项的方法,其中所述CTC由转移性或原发性/局部性癌症引起。

19. 权利要求2至18中任一项的方法,其中分析所检测的液滴中的CTC包括监测来自随时间从具有已知癌症的患者取得的血液样品的CTC,并且测试,成像,或同时测试和成像CTC以提供针对所述患者的预后。

20. 权利要求2至18中任一项的方法,其中分析所检测的液滴中的CTC包括测试,成像,或测试和成像来自患者的血液样品的CTC,以提供CTC对治疗干预的响应的指示。

21. 权利要求2至19中任一项的方法,其中分析所检测的液滴中的CTC包括确定来自患者的每单位体积血液样品的CTC的数量或水平,以提供所述患者中肿瘤负荷的测量。

22. 权利要求21的方法,其还包括使用所述患者中肿瘤负荷的测量来选择疗法。

23. 权利要求22的方法,其还包括在第二时间点确定所述患者中肿瘤负荷的测量以随时间监测肿瘤负荷,例如响应于治疗干预。

24. 与表1中列出的一种或多种选择的癌症基因相关的探针和引物的用途,用于扩增和检测从血液样品中的循环肿瘤细胞(CTC)获得的cDNA分子。

25. 权利要求24的用途,其中分析扩增的CTC以检测所述血液样品获自的受试者中的癌症。

26. 权利要求24的用途,其中在随时间从具有已知癌症的患者获得的多个血液样品中分析所扩增的CTC,并且测试,成像,或同时测试和成像CTC以提供针对所述患者的预后。

27. 权利要求24的用途,其中分析所扩增的CTC以提供CTC对治疗干预的响应的指示。

28. 权利要求24的用途,其中分析所扩增的CTC以提供所述血液样品获自的患者中的肿瘤负荷的测量。

对血液样品中的循环肿瘤细胞的数字分析

发明领域

[0001] 本发明涉及血液采样技术,更具体地涉及用于检测和分析血液样品中的细胞的方法和系统。

[0002] 发明背景

[0003] 使用简单血液检查或“液体活检”检测罕见循环肿瘤细胞(CTC)的存在的能力具有大大增强对上皮癌的监测,提供肿瘤细胞数量,遗传组成和药物反应参数的即时取样,而无需侵入性肿瘤活检的潜力。因此,用于早期癌症检测的CTC的检测具有变革癌症治疗的潜力,使得能够在其转移之前的阶段(预期根治疗法)诊断侵入型癌症(invasive cancer)。

[0004] 然而,CTC是非常罕见的,即使在使用已知的微流体装置或类似技术部分纯化之后,与正常血液成分混合的这些肿瘤细胞的鉴定,可视化和评分仍然是重大的挑战。例如,每毫升全血,在超过50亿个红细胞(RBC)和500多万个白细胞(WBC)中只有1-10个CTC(Plaks et al., “Cancer Circulating Tumor Cells,” Science, 341:1186; 2013)。此外,肿瘤细胞的抗体染色是高度可变的,这是由于甚至在个体患者中癌细胞之间的高度异质性,以及在血流中循环的许多肿瘤细胞的差的生理条件,所述肿瘤细胞中的许多已开始经历程序性细胞死亡或失巢凋亡(anoikis)。此外,抗体染色的肿瘤细胞的准确评分需要分辨大量污染的白细胞,其中一些白细胞非特异性结合抗体试剂。因此,尽管具有广泛转移性癌症,但是只有候选肿瘤细胞的子集可以通过抗体染色强力地鉴定,并且多达一半的被测试患者检测不到细胞。

[0005] 因此,目前用于成像CTC的方案正在寻求在分离CTC,特别是从其他有核血细胞诸如白细胞(WBC)中分离CTC的越来越高的纯度水平。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开涉及在避免需要CTC的极高水平纯度的情况下获得与标准血液样品中罕见CTC相关的数据的最高可能性灵敏度的方法,用途和系统。特别地,新方法不需要将CTC与污染的WBC完全分离,而是可以在含有例如高达 10,000WBC或更多的产物中可靠地检测少至一个CTC。新的测定方法和系统组合(1)分离系统,其可以自血液一致地获得作为完整的全细胞(具有高质量的核糖核酸(RNA))的CTC,与(2)基于液滴的数字聚合酶链反应(PCR)测定,其关注在健康患者血液中不存在的每种肿瘤类型的特定癌症谱系的核糖核酸RNA标志物。

[0008] 当如本文所述进行组合时,这两个构思提供了CTC数字液滴PCR测定方法(“CTC ddPCR”)或简称为“数字CTC”测定(“d-CTC”)。在一些实施方案中,分离系统是微流体系统,诸如负消耗微流体系统(例如,所谓的“CTC-芯片”,其使用造血细胞例如红细胞(RBC),WBC和血小板的负消耗以揭示血液样品中的未标记的非造血细胞,诸如CTC)。

[0009] 一般来说,本公开涉及以超高灵敏度和特异性早期检测癌症的方法,其中所述方法包括使用循环肿瘤细胞(CTC)的微流体分离和衍生于CTC的RNA的数字检测。在一些实施方案中,CTC衍生的RNA可以转化成cDNA并包裹到单独的液滴中,用于在cDNA的报告基团(reporter group)的存在下进行扩增,所述报告基团配置成特异性结合来自CTC的cDNA而

不结合来自其他细胞。可以计数报告基团阳性的液滴以评估疾病,例如各种类型的癌症的存在。

[0010] 另一方面,本公开涉及分析血液样品中的循环肿瘤细胞(CTC)的方法。所述方法包括以下或由以下组成:从血液样品分离包含CTC和血液中存在的其它细胞的产物;从所述产物分离核糖核酸(RNA)分子;从所述分离的RNA在溶液中产生cDNA分子;将cDNA分子包裹在单独的液滴中;在报告基团的存在下扩增每个液滴中的cDNA分子,所述报告基团配置成特异性结合来自CTC的cDNA而不结合来自其他细胞的cDNA;检测含有报告基团的液滴,所述报告基团作为所述液滴中来自CTC的cDNA分子存在的指标;和分析检测的液滴中的CTC。

[0011] 本文所述的方法还包括在分离RNA之前减少所述产物的体积和/或在包裹cDNA分子之前从含有cDNA的溶液中除去污染物。

[0012] 在新方法的各种实施方式中,从分离的RNA产生cDNA分子可以包括进行所述分离的RNA分子的逆转录(RT)聚合酶链反应(PCR)和/或扩增每个液滴内的cDNA分子可以包括在每个液滴中进行PCR。在新方法中,将单独的cDNA分子和PCR试剂包裹在单独的液滴中可以包括形成非水性液体的至少1000个液滴,所述非水性液体诸如一种或多种氟碳化合物、氢氟烃,矿物油,硅油和烃油和/或一种或多种表面活性剂。每个液滴平均可以含有从CTC获得的一个靶cDNA分子。在一些实施方案中,报告基团可以是或包括荧光标记物。

[0013] 新方法可以包括通过使用固相可逆固定化(Solid Phase Reversible Immobilization)(SPRI)从所述含有cDNA的溶液中除去污染物,例如固定化溶液中的cDNA,例如用配置为特异性结合cDNA的磁珠;从所述溶液中除去污染物;和洗脱纯化的cDNA。

[0014] 在各种实施方式中,本文描述的方法包括使用探针和引物扩增每个液滴内对应于选自本文表1中列出的一批癌症选择性基因的一个或多个基因的cDNA分子。例如,所选择的基因可以包括前列腺癌选择性基因,例如AGR2, FOLH1, HOXDB13, KLK2, KLK3, SCHLAP1/SET4, SCHLAP1/SET5, AMACR, AR变体, UGT2B15/SET1, UGT2B15/SET5和STEAP2(从表1可以容易地确定)中的任一个或多个。在另一个实例中,ALDH1A3, CDH11, EGFR, FAT1, MET, PKP3, RND3, S100A2和STEAP2中的任何一个或多个对于胰腺癌是选择性的。可以对于表1中列出的其他类型的癌症生成类似的列表。

[0015] 在其它实例中,所选择的基因包括表1中列出的任何一个或多个乳腺癌选择性基因。在其它实例中,所选择的基因包括对肺癌,肝癌,前列腺癌,胰腺癌和黑素瘤中的一个或多个选择性的基因。例如,多路复用的测定可以包括对于特定类型的癌症,例如乳腺癌,肺癌,前列腺癌,胰腺癌,肝癌和黑素瘤选择性的表1中列出的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或甚至所有选择的基因。通常,针对来自表1的5至12个癌症选择性基因的一组引物和探针用于特定类型的癌症。所选择基因(那些基因的标志物)的其他特定组合在下面的实例中描述。

[0016] 所述方法还可以包括使用针对两种或多种,三种或多种,四种或多种或五种或多种不同类型的癌症具有选择性的一个或多个基因。例如,这些基因可以对以下癌症具有选择性的:乳腺癌和肺癌;乳腺癌、肺癌、和肝癌;乳腺癌、肺癌、和胰腺癌;乳腺癌、肺癌、和前列腺癌;乳腺癌、肝癌、和黑素瘤;乳腺癌、肺癌、和黑素瘤;乳腺癌、肺癌、肝癌、和前列腺癌;乳腺癌、肺癌、肝癌、和黑素瘤;乳腺癌、肺癌、肝癌、和胰腺癌;乳腺癌、肺癌、前列腺癌、和胰腺癌;乳腺癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、和胰腺癌;或乳腺癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、胰腺癌、和

前列腺癌。

[0017] 在本文描述的方法中,CTC可以由转移性或原发性/局部性癌症引起。在新方法中,分析所述检测的液滴中的CTC包括监测来自例如随时间从例如具有已知癌症的患者取得的血液样品的CTC,并且测试和/或成像CTC(例如使用标准技术)以提供针对所述患者的预后。在其他实施方案中,分析所述检测的液滴中的CTC可以包括测试和/或成像来自患者的血液样品的CTC(例如使用标准技术),以提供CTC对治疗干预的响应的指示。

[0018] 在其他实施方案中,分析所述检测的液滴中的CTC的步骤包括确定来自患者的每单位体积血液样品的CTC的数量或水平,以提供所述患者中肿瘤负荷的测量。该方法可以然后进一步包括使用所述患者中肿瘤负荷的测量来选择疗法或者进一步包括在第二时间点确定所述患者中肿瘤负荷的测量,以监测随时间的肿瘤负荷,例如响应于治疗干预,例如用于肿瘤负荷的动力学监测。

[0019] 本文所述的方法和测定法可用于扩增和检测多种诊断,预后和诊断治疗方法中的CTC。

[0020] 如本文所用,短语“循环肿瘤细胞”(CTC)是指来自实体瘤(非血源性癌症)的癌细胞,其以非常罕见的数量存在于患者的血液中(例如,在全血中在约10,000,000WBC中约1个CTC)。CTC可以来自转移性以及原发/局部癌症。

[0021] 如本文所用,“产物”是指来自本文所述方法,例如使用本文所述的系统的处理的例如在某种液体中,例如缓冲液,诸如pluronic缓冲液中的一组分离的罕见细胞和其它污染性血细胞,例如红血细胞,白血球(例如白细胞)。典型的产物可以只含有与500至2,500或更多WBC混合的约1至10个CTC,例如在1000至2000WBC的混合物中的1至10个CTC。然而,本方法的检测限可以为约在10,000WBC中约1CTC。因此,虽然本方法可以达到在500个WBC中约1个CTC的纯度水平,但是本方法不需要高度纯化的CTC,其在一些已知的CTC分析方法中是需要的。

[0022] 如本文所用,固相可逆固定化(SPRI)清除是使用包被的磁珠对产物的逆转录(RT)-PCR产生的cDNA进行大小选择的技术。在本文所述的新的测定方法中,这实现了双重目的:(a)仅选择正确大小的cDNA,和(b)去除与液滴稳定性不相容的苛刻裂解去垢剂。

[0023] 聚合酶链反应(PCR)是通过小寡核苷酸引物的连续退火和再退火来扩增已知DNA片段,导致可检测的分子信号的过程。

[0024] 逆转录(RT)-PCR是指使用逆转录从RNA模板产生互补的c-DNA分子,从而使DNA聚合酶链反应能够对RNA进行操作。本文公开的新方法的一个重要方面是来自全细胞CTC的高质量RNA的可用性,所述全细胞CTC不以可以破坏或降解RNA的方式裂解或处理。

[0025] 如本文所用,“阳性液滴”是脂质包囊的分子,其中用加标签的引物进行的PCR反应允许PCR扩增产物的可视化。因此,使用荧光显微镜可以使含有特定靶基因的单个模板cDNA分子的液滴变得可见,而“空”或“阴性”液滴是不含靶cDNA的液滴。

[0026] 新的方法和系统提供了许多优点和益处。例如,当前的方法和系统提供比单独使用的现有的已知系统中的任一种更准确和强健的结果。通过将来自单个CTC的信号分解成数百或数千个明亮荧光的液滴,每个衍生自单个cDNA分子,新的数字CTC测定法能够实现极大的信号放大。鉴于选择和优化本文所述生物标志物基因的严格标准,d-CTC中来自正常血细胞的背景信号可忽略不计。因此,d-CTC能够使来自具有晚期癌症患者(近100%的患者

具有前列腺癌,肺癌,乳腺癌和肝癌)的信号大大放大。不仅具有阳性得分的患者的分数显著增加,而且高水平的信号使得能够动态测量,因为在癌症治疗后的肿瘤负荷下降。此外,信号放大允许检测CTC衍生的特征,甚至在具有非常低的肿瘤负荷的患者(不容易用CTC细胞成像实现的情况)中的特征,因此能够显著更早地检测癌症。

[0027] 总之,这种新型微流体平台提供了富集,检测和分析患者血液样品中的 CTC的流线型的,超高通量,快速(例如每次运行3小时),和极高灵敏度的方法。该平台提供丰富的临床可行信息,并且进一步的优化可能能够实现癌症的早期检测。

[0028] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实践或测试中,但是合适的方法和材料在下面描述。本文提及的所有出版物,专利申请,专利和其它参考文献通过引用整体并入本文。在发生冲突的情况下,将以本说明书,包括定义为准。另外,材料,方法和实施例仅仅是说明性的而不旨在是限制性的。

[0029] 从以下详细描述的说书和权利要求书中,本发明的其它特征和优点将是显而易见的。

[0030] 附图简述

[0031] 图1A的图显示由LNCaP前列腺癌细胞的总RNA制备cDNA稀释物,其与白细胞混合并通过使用两种不同的前列腺引物组的液滴PCR分析。结果表示几种纯度,并且在该范围内显示阳性液滴数量的良好响应。

[0032] 图1B是掺入到健康供体(HD)血液样品中、运行通过CTC-iChip,并经历液滴RT-PCR(KLK3引物组)的手动分离的LNCaP细胞的图。结果显示下至低数量的靶细胞时极好的灵敏度。

[0033] 图1C的图显示来自健康对照,具有局部(可切除)前列腺癌和转移性前列腺癌的患者血液样品的分析,所述样品通过CTC-iChip处理,经历RT-PCR 并且使用三种前列腺特异性和一种上皮特异性生物标志物(KLK3,AMACR, FOLH1,EpCAM)进行液滴分析。显示了所有组合的四种标志物的液滴总数目/ml的结果。

[0034] 图2是显示衍生于LNCAP前列腺癌细胞的KLK3阳性液滴的信号强度图,所述前列腺癌细胞被掺入血液并使用CTC-iChip回收。

[0035] 图3是柱状图,显示了通过CTC-iChip进行样品处理后的实验重复和信号保留之间的最小变化,并且显示使用本文所述的新测定得到的增加的检测灵敏度。

[0036] 图4是信号强度点图,显示使用本文所述的新的CTC数字液滴PCR测定方法(“CTC ddPCR”测定或简单地“d-CTC”测定)在健康供体中不存在四种不同的癌症特异性标志物阳性液滴。

[0037] 图5是信号强度点图,显示针对四种不同谱系特异性转录物多路复用(multiplexed)的d-CTC测定以检测掺入血液中的前列腺癌细胞系。

[0038] 图6A至7B是信号强度点图,显示每个反应针对四种不同前列腺癌特异性转录物多路复用的d-CTC测定。对于两个这样的反应(反应1和2)所示的理论模型(图6A和7A)和癌细胞系数数据(图6B和7B)两者证明了理论模型准确地预测了实验数据。

[0039] 图8A至13B是信号强度点图,显示每个反应针对四种不同的乳腺癌和肺癌特异转录物多路复用的d-CTC测定。对于六个这样的反应,反应1至6(每个具有不同的标志物组合)

所示的理论模型(图8A,9A,10A,11A,12A和13A) 和癌细胞系数数据(图8B,9B,10B,11B,12B和13B) 两者证明理论模型准确地预测了实验数据。

[0040] 图14是条形图,显示针对来自1ng未扩增的细胞系cDNA和来自10,14 和18个循环的特异性靶标扩增(Specific Target Amplification) (STA) 预扩增后的1 μ l预扩增产物的7种不同生物标志物(PIP,PRAME,RND3,PKP3,FAT1, S100A2和AGR2) 的液滴PCR信号,证明了来自STA预扩增的液滴PCR信号的显著增强。

[0041] 图15A至15C的图显示使用用于三种不同组的具有肺癌(图15A),乳腺癌(图15B) 和前列腺癌(图15C) 的患者的新d-CTC测定方法在患者中的CTC检测的结果。在每组中,健康的患者都没有CTC。

[0042] 图16是水平条形图,显示使用本文所述的多路复用d-CTC测定方法的患者前列腺癌数据的结果,测试了图中所述的九种生物标志物(AGR2,Dual, FAT1,FOLH1,HOXB13, KLK2,KLK3,STEAP2,和TMPRSS2)。91%的癌症患者具有可检测的CTC(11例患者中的10例), 28例中的24例样品含有可检测的CTC(86%),并且12例健康供体(HD) 血液样品中的0例(0%)含有 CTC。

[0043] 图17是一系列信号强度图,显示用于来自转移性前列腺癌患者(上排) 的血液样品,局部前列腺癌患者(中间行) 和来自健康供体对照样品(下排) 的血液样品的针对两种不同反应(反应1(TMPRSS2,FAT1,KLK2和STEAP2),左柱,和反应2(KLK3,HOXB13,AGR2和FOLH1),右柱) 多路复用的d-CTC 测定。在每种情况下,在健康供体(HD) 样品中没有CTC,但癌症样品中具有 CTC的明确证据。

[0044] 图18是多条形图,说明随时间测量的CTC中雄激素受体信号传导基因的相对比例,以提供用阿比特龙(Abiraterone®) 治疗的前列腺癌患者中药物反应的读数。

[0045] 图19A和19B是显示非扩增相对于18个循环的SMARTer预扩增的图。图19A是显示针对在三个重复(replicate) (WTA1,WTA2,WTA3) 中一致的不同靶区的扩增子扩增效率水平的条形图。图19B是显示与非预扩增样品相比,使用18个循环的SMARTer预扩增提供大约四个数量级(10^8 对 10^4) 的信号增加的图。

[0046] 图20A至20C是显示在多路复用的肝癌测定中11个标志物的检测结果的图。图20A至20C显示在21例肝细胞癌(HCC) 患者(图20A),13例慢性肝病(CLD) 患者(图20B,无显著可检测的液滴) 和15例健康供体(HD) (图20C,没有显著的可检测的液滴) 的总液滴数。

[0047] 图21A和21B是显示14个标志物的多路复用的肺癌测定结果的图。图21A 显示了8名转移性肺癌患者和8名健康供体(全部为阴性) 的检测结果。图21B 显示,在该测定中,癌症患者(8个中的8个) 中每ml血液的所有液滴计数均高于所有健康供体,给出了100%的检测率。

[0048] 图22是显示针对用于9个转移性乳腺癌患者,5个局部乳腺癌患者和15个健康供体的领域中的多路复用的11种标志物测定法的乳腺癌测定结果的图。该结果显示,该测定法检测到9例转移性乳腺癌患者中的7例,5例局部乳腺癌患者中的2例,并且未检测健康供体样品。

[0049] 图23A和23B是显示转移性乳腺癌患者中ARv7检测结果的图。图23A是显示通过本文所述的CTC-Chip处理的来自10个转移性乳腺癌患者和7个健康供体的样品的结果的条形图。图23B显示,十个癌症患者样品中有五个高于健康供体背景水平,检测率为5/10或50%。

[0050] 图24A是显示34个黑素瘤患者中各个标志物(PMEL,MLANA, MAGEA6,PRAME,TFAP2C和SOX10)和组合的标志物混合物(SUM)的检测率的条形图。

[0051] 图24B是与15个健康供体相比,在34个黑素瘤患者中针对182个绘制点(draw point)检测到的液滴信号的点图分布,证明显示高于81%的健康供体背景信号的总体检测灵敏度(基于绘制点)和100%的特异性(通过绘制点)。

[0052] 发明详述

[0053] 本公开涉及从血液样品中罕见的癌细胞获得信息的方法和系统。这些方法和系统结合了分离技术和分析技术的力量,所述分离技术诸如超高通量微流体技术,例如负消减技术,例如使用造血细胞的负消减来分离血液样品中的未标记的CTC的那些,所述分析技术诸如关注特定癌症谱系的核糖核酸(RNA)标志物的基于液滴的数字聚合酶链反应(PCR)测定。尽管RNA的质量和由此测定的灵敏度将低于微流体技术,但是这种策略也可以应用于提供细胞的部分纯化的其它CTC分离技术(例如过滤,阳性肿瘤细胞选择)。类似地,应用于RNA的其他数字PCR技术能够检测谱系特异性引物,尽管基于液滴的测定法的灵敏度可能是最高的。

[0054] 本文所述的新方法不仅可用于基于血液中CTC的存在而对癌症的早期检测,而且可用于肿瘤负荷定量以及随时间监测来自特定肿瘤的CTC,例如以确定存在于CTC中的特定肿瘤标志物基因中任何的潜在变化以及肿瘤的变化而作为特定疗法的结果,例如在临床试验或特定疗法的情况下。

[0055] 测定方法的一般概念

[0056] 这种分离技术例如使用超高通量微流体,诸如所谓“CTC-iChip”用于从血液样品中富集CTC,所述“CTC-iChip”描述于例如国际PCT申请WO 2015/058206和Ozkumur et al., “Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and-Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells,”*Sci.Transl.Med.*, 5:179ra47 (2013)。CTC-iChip使用独立于CTC抗原的方法,其中血液样品中的WBC用磁珠标记,并且然后通过两个富集阶段处理样品。第一阶段使用确定性侧向位移(deterministic lateral displacement)来移除小的和柔性的细胞/颗粒(RBC,血小板,未结合的磁珠和血浆),同时保留较大的细胞(CTC和WBC)。第二阶段使用惯性聚焦将所有细胞移动到狭窄的流体流中,并且然后使用磁场将珠标记的WBC从聚焦流中拉出,留下高度富集的CTC。来自10ml全血的CTC-iChip产物通常含有<500,000RBC,<5,000WBC和可变数量的CTC。

[0057] 一些分析技术进一步富集和分析分离的CTC,例如从CTC-iChip,例如使用液滴微流体获得的CTC。关于液滴微流体的一些基本信息一般性地描述于Jeremy et al., “Ultrahigh-Throughput Screening in Drop-Based Microfluidics for Directed Evolution,”*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,107:4004 (2010)。

[0058] 如本文所使用的,液滴微流体技术在某些实施方式中可以包括将单细胞,RT-PCR试剂和裂解缓冲液包裹到通常为非水性液体的液滴中(例如氟碳化合物、氢氟烃,矿物油,硅油和烃油;表面活性剂也可以包括在非水性液体中,例如Span80,Monolein/油酸,Tween20/80,SDS,正丁醇,ABIL EM90 和磷脂),其尺寸范围例如为以体积约0.5pL至15nL,例如以直径10至300 μm ,例如20至100 μm ,例如30至50 μm ,例如35 μm 。如在本公开中描述的新方法中所使用的,这些技术还包括在液滴内扩增癌症特异性转录物以产生荧光信号,以及

扩增阳性液滴的分选。这种方法导致分离出可以进行测序和分析的纯CTC,用于诊断和个体化药物治疗的目的。由于CTC的异质性很高,使用多路复用的扩增来检测尽可能多的CTC是有用的。因此,使用肿瘤特异性引物的组合而不是在PCR混合物中使用一对引物可以增加检测和分选CTC的可能性。关于使用PCR分选癌细胞的其他信息,参见例如Eastburn et al., “Identification and genetic analysis of cancer cells with PCR-activated cell sorting,” *Nucleic Acids Research*, 2014, Vol. 42, No. 16e128。

[0059] 在新的测定方法中,将CTC裂解以释放RNA分子,其代表在癌细胞中表达的基因。大多数是“谱系”特异性,而不是癌症特异性的,例如任何前列腺细胞(无论是否是癌性的)表达这些标志物。然而,正常的血细胞不是,并且信号来自在血流中循环的细胞的事实将其定义为异常信号。通过将RNA转化为cDNA,我们现在可以PCR扩增该谱系信号。我们使用非常敏感的液滴数字PCR,允许将来自单个癌细胞的信号(即成像测定中的一个信号)转换成数千个阳性免疫荧光液滴。多个高度策划(curate)的基因转录物的组合确保针对癌症的高灵敏度和特异性,并且还允许功能性见解(如在前列腺和乳腺癌中的激素反应途径中的状态)。

[0060] 如上所述,新的测定方法关注高质量RNA而不是DNA的检测和分析。虽然在血浆和CTC中的DNA突变检测方面已经有大量的工作,但是本方法依赖于RNA标志物,原因如下:

[0061] 1. DNA突变不是肿瘤特异性的,并且健康的个体在血液有一些未鉴定的癌细胞的发现是非常困难的临床情况。相比之下,通过选择肿瘤特异性 RNA(例如前列腺对肺),新方法可以鉴定血液中癌细胞的来源。

[0062] 2. DNA突变是非常异质性的,并且除了许多癌症共有的几个复发突变之外,大多数基于血液的突变检测策略需要存在于原发性肿瘤中的突变的现有知识(即不适合于筛选未知的癌症)。与之相比,衍生自特定器官的所有肿瘤细胞在RNA水平上表达共同谱系标志物。因此,在新方法中针对每种单个的癌症类型使用标志物的单一混合物。

[0063] 3. 在转移建立之前,通过侵入型癌症脱落(shed) CTC的低水平(即基于血液检测尚不太迟),而血液中肿瘤细胞的存在意味着血管侵入(即侵入性而非无痛性癌症(indolent cancer))。血浆DNA或血浆蛋白质并不是这种情况,其从原发性肿瘤中的死亡细胞漏出,并不必然指示血管侵入。例如,血液中的血清PSA蛋白通过良性前列腺细胞以及原发性前列腺癌两者释放。另一方面,表达PSA的CTC仅通过侵入性前列腺癌脱落。

[0064] 4. 使用本文所述的新颖的数字评分技术对RNA的分析是非常灵敏的。然而,游离RNA在血流中降解,并且使用如本文所述的分离系统,诸如微流体负消减系统(例如,CTC-Chip系统)的独特之处在于未加标签的肿瘤细胞具有可提取的高质量RNA。

[0065] 相对于DNA选择cDNA作为靶分子不仅增强了源自每个肿瘤细胞的信号,而且仅特异性靶向肿瘤细胞转录物以排除白细胞(WBC)转录物。信号的增强是显著的优势,因为它避免了将CTC分离至非常高的纯度水平的需要。也就是说,它用含有仍被在相同的产物中的数百或数千个污染WBC,例如,白细胞包围的一个或多个“分离”CTC的产物能够产生强健且可重复的结果。然而,与以前的方法相比,在新方法中使用的靶向由RNA制备的cDNA的策略允许新的测定方法以最小的CTC纯度水平精巧修改(tailor)以实现最大特异性。

[0066] CTC-iChip技术通过抗体加标签的白细胞的微流体消减来分离非造血细胞是非常有效的。CTC-iChip的这个特征提供了完整的肿瘤衍生的RNA(其水平远远高于使用其他技术获得的那些),并且它独立于肿瘤细胞表面表位(其在癌症之间和在个体癌症中的上皮相

对间充质细胞亚型之间是高度异质的)。此外,即使其抗体染色和选择对于成像分析来说是次最佳的,预凋亡的癌细胞可提供使用本文所述方法评分的肿瘤特异性RNA来源。由于所有这些原因,从完整的CTC提供高质量的RNA,伴有在样品中与罕见CTC一起发现的WBC的至少一些减少的分离技术或系统,诸如诸如微流体负消减系统,例如CTC-iChip是在将肿瘤特异性数字读数应用于产物之前重要的第一步分离。

[0067] 最初开发了在异质混合物中非常罕见的分子的基于液滴的数字检测,用于PCR扩增单独的DNA分子,其低于在存在于异质混合物中时的检测水平,但是在经历PCR之前当隔离在脂质液滴中时容易被鉴定。基于液滴的数字 PCR (“Droplet Digital PCR (ddPCR)”) 的基本技术已经由RainDance和Bio-Rad 商业化,其提供用于靶分子的脂质包裹,然后进行PCR分析的设备。重要的科学进步包括在哈佛的David Weitz和约翰·霍普金斯(Johns Hopkins)的Bert Vogelstein的实验室的工作使这一切成为可能。例如,参见美国专利号6,767,512;7,074,367;8,535,889;8,841,071;9,074,242;和美国公开申请号2014/0303005。另见美国专利号9,068,181。

[0068] 然而,液滴数字PCR本身不是生物学上重大的,除非与生物材料源相连,这是本文描述的新方法的关键。例如,检测谱系特异性RNA (我们的检测策略的关注的中心) 并不区分正常的前列腺上皮细胞和癌性前列腺细胞。因此,血液中前列腺衍生的转录物的检测是没有意义的:它们存在于来自正常前列腺细胞或外来体的碎片内。只有当与整个CTC (即血液中完整的CTC) 分离相偶联时,才能使ddPCR测定实现非凡的灵敏度和特异性两者。因此,这两种技术理想地适用于彼此,因为分离系统提供高质量的RNA,并且基于液滴的数字PCR测定关注新方法中的RNA标志物。

[0069] 一个另外的方面对于新的测定方法的整体成功是重要的。如上提到的,本文所述的新的测定方法使用由总RNA制成的cDNA,但是这个用途的关键在于鉴定合适的生物标志物,其对于每种类型的癌症是肿瘤谱系特异性的,但是是如此独特的,以致在正常血液细胞中完全不存在(甚至具有ddPCR灵敏性)。选择,测试和验证针对本文描述的每种类型的癌症的多种靶RNA生物标志物使得新的测定方法成功。

[0070] 测定方法步骤

[0071] 新的测定方法开始于使用分离系统,诸如微流体负消减系统分离部分纯的CTC,直到并包括分析来自液滴数字PCR仪的数据。有八个主要的测定步骤,其中一些是可选的,但通常提供更好的结果:

[0072] 1. 从血液样品中分离含有CTC和血液中的其他细胞的产物;例如来自患者或受试者;

[0073] 2. 减少含有罕见细胞的产物的体积(可选);

[0074] 3. 例如通过细胞裂解,从产物中分离核糖核酸(RNA)分子,并从分离的RNA中产生溶液中的cDNA分子;这例如通过从包含在产物中的细胞释放的RNA的RT-PCR来进行;

[0075] 4. 清除RT-PCR步骤期间合成的cDNA(可选);

[0076] 5. 使用基因特异性靶向预扩增探针,例如使用Fluidigm BioMark™嵌套 PCR方法(Fluidigm BioMark™ Nested PCR approach)或非特异性全转录物组扩增(non-specific whole-transcriptome amplification),例如使用Clontech SMARTer™方法预扩增cDNA(可选);

- [0077] 6. 将cDNA分子,例如与PCR试剂一起包囊在单独的液滴中;
- [0078] 7. 在报告基团的存在下例如使用PCR扩增每个液滴中的cDNA分子,所述报告基团配置成特异性结合来自CTC的cDNA而不结合来自血液中其他细胞的cDNA;
- [0079] 8. 检测含有报告基团的液滴(例如,“阳性”液滴)作为液滴中来自CTC的cDNA分子存在的指标;和
- [0080] 9. 分析所述检测的液滴中的CTC,例如,以确定患者或受试者中特定疾病的存在。
- [0081] 如下面进一步描述的,新的d-CTC测定方法的重要特征之一是仔细选择在保持几乎完美的特异性的情况下递送优异灵敏度的许多靶基因生物标志物(和相应的引物)。使用公开可获得的数据集和专有RNAseq CTC数据的生物信息学分析来确定本文描述的靶基因生物标志物的独特列表(下表1)。非常谨慎地选择在白细胞的任何亚群中未表达,但是在CTC中以足够高的频率和强度表达的标志物,以在不同和相区别的患者的相当广泛的阵列中提供可靠的信号。针对每种癌症类型(例如前列腺癌,乳腺癌,黑素瘤,肺癌,胰腺癌等)选择标志物的特定组。
- [0082] 现在将更详细地描述测定方法的单独步骤。
- [0083] 1. CTC分离
- [0084] 患者血液运行通过CTC-iChip,例如1.3M或1.4.5T版本,并将样品收集在冰上的15mL锥形管中。CTC-iChips如前所述设计和制造(Ozkumur et al., “Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and-Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells,” *Science Translational Medicine*, 5 (179):179ra47 (DOI:10.1126/scitranslmed.3005616) (2013))。
- [0085] 使用批准的方案将血样(每个癌症患者约20ml)收集在EDTA管中。然后将这些样品与针对CD45 (R&D Systems) 和CD66b (AbD Serotec, nebula生物化) 的生物素化抗体一起温育,然后与Dynabeads® MyOne® 链霉亲和素T1 (Invitrogen) 一起温育以实现白血细胞的磁性标记(Ozkumur et al., 2013)。
- [0086] 然后将样品通过CTC-iChip处理,所述CTC-iChip将血液成分(红血球和白血球和血小板)以及未缀合的珠与CTC分离。将CTC收集在溶液中,同时将红血球,血小板,未缀合的珠和加标签的白细胞收集在废物室中。该过程是自动化的,在1小时内处理10ml血液。
- [0087] 2. 含有罕见细胞的产物的体积减少和储存
- [0088] 为了完全裂解产物中分离的所有细胞,优选将产物体积从几毫升的通常起始点降低至约100 μ l的最终体积。这可以通过例如离心产物,并重悬浮在 pluronic缓冲液中以准备用于细胞裂解和产生cDNA来实现。此时,可以通过以下将样品加工用于长期储存:加入RNAlater™ (ThermoFisher),之后在液氮中快速冷冻并在-80°C储存。
- [0089] 3. 从产物中的细胞分离RNA和产生cDNA
- [0090] 在准备用于RT-PCR中, RNA分离步骤对于从细胞中完全释放所有RNA分子的过程是重要的。可以使用一步式管内反应来最小化在标准转移步骤期间有可能引起的细胞和RNA丢失的风险。例如,对于qRT-PCR试剂盒,可以使用Invitrogen SuperScriptIII® First-Strand Synthesis Supermix®, 通过将 RT-PCR主混合物直接加入到沉淀的产物中,通过移液以完全裂解,并根据试剂盒方案,靶向1:1的RNA:cDNA比例进行反应。一旦合成了cDNA,

就将RNA酶H用于反应以除去任何剩余的RNA。或者,如果想在后续步骤中进行样品的全转录物组预扩增,则可以使用SMARTer™ Ultra Low Input RNA Kit方案(其使用专有寡核苷酸和逆转录酶)来合成cDNA。

[0091] 4. RT-PCR过程中合成的cDNA的清除

[0092] 该方法中另一个有用但可选的步骤涉及从含有cDNA的溶液中除去裂解试剂。一旦将含有cDNA的溶液转移到ddPCR仪器中,苛刻去垢剂的存在可以导致ddPCR方法中使用的液滴的不稳定。可以例如通过使用固相可逆固定化(SPRI)来完成去垢剂的去除。该技术首先使用包被的磁珠结合特定大小范围的cDNA,然后允许去除含有去垢剂的上清液,并且最终洗脱纯的cDNA以输入到ddPCR仪器中。除了RT-PCR的清除之外,SPRI方法还完成了cDNA的大小选择,这减少了进入该过程的ddPCR阶段的非靶标cDNA分子的数量,进而降低了背景和噪声。

[0093] 5. 预扩增

[0094] cDNA的预扩增是任选步骤,其增加在液滴PCR步骤中可以检测到的模板分子的数量,因此提高信噪比并提高阳性读数的置信度。对于检测在CTC中以低水平表达的标志物,以及诸如在早期检测转移性疾病的背景下,对于分析含有非常少量可能的凋亡性CTC的样品,它可以是非常强大的方法。这两种方法已经被修改为适用于d-CTC测定的工作流程。基于Fluidigm BioMark™嵌套PCR方案的特异性靶向扩增(STA)依赖于使用特别设计的引物以扩增在液滴PCR步骤中使用的探针靶向的区域(参见表2)。仔细设计这些引物并与其各自的荧光探针结合测试,以确保有效和特异性的扩增,而不会增加健康对照中的噪音。或者,基于SMARTer™超低输入RNA试剂盒方案(SMARTer™ Ultra Low Input RNA Kit protocol)的全转录物组扩增依赖于使用随机引物扩增产物中每个转录物,包括在WBC中发现的那些和在CTC中发现的那些。

[0095] 6. cDNA加PCR试剂在液滴中的包裹

[0096] 一旦已经合成了cDNA并纯化掉污染的去垢剂,例如通过液滴制备工具,例如液滴发生器(droplet generator),诸如Biorad自动液滴发生器(Biorad Automated Droplet Generator)(每个样品产生20,000个液滴),将溶液中cDNA分子加上qPCR试剂的整个聚集体分成许多微小的分区反应。每个反应都由非常小的非水性液体,例如油(PCR稳定的,例如来自供应商的专有配方)的液滴组成,所述液滴含有Taqman型PCR试剂与基因特异性引物和寡核苷酸探针以及少量的样品。一旦液滴产生完成,样品由含有大量单独的PCR即用反应的乳液组成。

[0097] 对于该步骤,可以使用PCR探针和相关引物对下表1中列出的任何一种或两种或多种不同靶基因进行肿瘤装载的总体测定,例如在单次或多重反应中确定肿瘤进展或对治疗的响应。因此,尽管在一些情况下,每个液滴中可以包含用于来自表1的特定基因的单套PCR引物和探针,但是考虑到CTC中基因表达的异质性,也可能使用每个引物/探针组的不同荧光探针,多路复用每个液滴中用于两个或更多个不同基因的PCR引物和探针,以最大化肿瘤细胞的检测。也可能多路复用每个液滴中用于靶向不同癌症类型的多个基因的多重PCR引物和探针,从而能够在单次测定中广泛而特异性地检测多种肿瘤类型。

[0098] 7. 液滴包裹的cDNA分子的PCR

[0099] 使用qPCR循环条件对整个乳液样品进行标准PCR循环。将反应进行45个循环,以

确保绝大多数单独的液滴-PCR体积达到终点。这是重要的,因为虽然反应是用Taqman型qPCR试剂进行的,并且在qPCR条件下循环,但是在PCR循环期间不会测量样品的荧光强度,而是在下一步骤中测量。

[0100] 8. 检测阳性液滴

[0101] 由于在进行任何荧光测量之前,将每个单独的分隔的(partitioned)PCR全面达到终点,所以每个单独的液滴将是完全具有荧光的液滴,或将实际上不含有荧光。这使得能够简单地计数所有的阳性(荧光)和阴性(非荧光)液滴。

[0102] 9. 分析

[0103] 由于上游RT-PCR靶向1:1的RNA:cDNA比例,每个阳性液滴应该代表单个起始RNA转录物。这种解释取决于远远超过靶cDNA分子数量的单独液滴的数量。在新的方法中,在一个极端,我们考虑以下的可能性:分离和裂解单个CTC,释放一些数量的RNA转录物,然后将其以1:1逆转录成cDNA,分隔,PCR扩增和计数。

[0104] 我们估计在中等表达基因,诸如前列腺癌细胞中的KLK3基因的情况下,每个细胞含有KLK3mRNA的大约80-120个拷贝。Biorad QX200ddPCR系统产生20,000个液滴,这确保了对于小数目分离的CTC和中等表达的靶基因,每个液滴将不会有多于一个靶cDNA分子。另一方面,如果CTC的数量达到数十个或数百个,则对于中等表达的基因,每个液滴有可能会有多个拷贝的靶cDNA。在这种情况下,可以使用泊松统计(Poisson statistics)来估计原始转录物的近似数量。

[0105] 新型基因板(gene panel)使得能够谱系特异性地鉴定CTC

[0106] 如上所述,在周围正常血细胞的背景下对癌细胞高度特异性的基因转录物的鉴定是新方法的核心。虽然已知许多基因在癌细胞中更高度表达,但这些基因中绝大多数也通常在包括血液在内的正常组织中具有至少有限的表达。鉴于该测定所需的超高灵敏度,正常血细胞中完全不存在信号对于血流中肿瘤细胞的高置信度鉴定是必不可少的。

[0107] 用于检测血液中CTCs的候选肿瘤特异性转录物首先通过分析以下来选择:来自乳腺癌,前列腺癌,肺癌,胰腺癌,肝癌和黑素瘤的公众可获得的基因表达数据集,以及我们实验室产生的来自从乳腺癌,前列腺癌和胰腺癌患者和这些癌症的小鼠模型分离的CTC的单细胞RNASeq数据。选择表达限于肿瘤并且在血液成分中不存在或检测不到的转录物用于进一步的下游分析。证明和验证在正常血细胞中完全不存在表达(具有最高灵敏度水平,即数字PCR测定)是重要的。一般来说,我们发现,基于计算模型或RNA Seq数据预测的候选基因只有~10%在人体血液样品中呈真正阴性。

[0108] 具体来说,用于检测CTC的候选肿瘤特异性mRNA转录物最初通过分析以前来自人乳腺癌,前列腺癌,肺癌,胰腺癌,肝细胞癌和黑素瘤癌症的基因表达数据集(微阵列和RNA-Seq)来鉴定。用于此分析的具体公开数据集包括癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas)(TCGA)(癌症基因组图谱,可在tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp在线获得)和癌细胞系百科全书(Cancer Cell Line Encyclopedia)(CCLE)(可在broadinstitute.org/ccle/home在线获取;另见Barretina et al.,The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity,Nature 483:603-607(2012))。此外,分析了从具有乳腺癌,前列腺癌和胰腺癌的人患者分离的CTC的单细胞RNA-seq基因表达数据(GEO登录号GSE51827,GSE60407和

GSE67980) (Aceto et al., Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis, *Cell*, 158:1110-1122 (2014); Ting et al., Single-Cell RNA Sequencing Identifies Extracellular Matrix Gene Expression by Pancreatic Circulating Tumor Cells, *Cell Rep*, 8:1905-1918 (2014); 和 Miyamoto et al., RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance, *Science* 349:1351-1356 (2015)。然后将通过这些数据库鉴定的肿瘤特异性转录物与人白细胞RNA-Seq基因表达数据 (GEO登录号GSE30811, GSE24759, GSE51808, GSE48060, GSE54514和 GSE67980) 进行比较。然后选择显示显著差异表达,即在肿瘤中高表达和白细胞中低或检测不到的表达的转录物进行进一步的下游分析。此外,进行文献检索以选择另外的候选肿瘤特异性转录物。针对每种类型的人癌症选择50至100个候选基因。

[0109] 对于每个特定癌症类型中的每个候选基因,设计了两组至四组PCR引物来跨越靶转录物间的区域。引物通过IDT (Integrated DNA Technologies) 合成,探针用FAM或HEX, ZEN和IABkFQ标记,以产生靶向扩增子中间的探针。在人类CTC中基于数字PCR的mRNA转录物检测的成功应用所必需的我们的PCR引物设计方法的独特特征包括以下:1) 每个mRNA转录物的3'末端的特异性靶向,鉴于细胞mRNA转录物倾向 (proclivity) 于靶向从5'末端降解,特别是在未固定的易碎细胞如CTC中;2) 设计引物以产生跨越内含子的扩增子,以便排除例如自富集CTC混合物中过量污染的白细胞无意扩增污染性基因组DNA;和3) 鉴于在某些情况下在特定剪接变体的临床相关性方面的不确定性,设计引物纳入性扩增给定基因的多个剪接变体。

[0110] 首先通过qRT-PCR使用来自癌细胞系 (代表乳腺癌,前列腺癌,肺癌,胰腺癌,肝癌和黑素瘤) 的cDNA测试引物的特异性。对于每种类型的人类癌症,培养2至5个建立的癌细胞系并用于初始测试以评估PCR引物性能和评估特定癌症中靶转录物的表达。为了提供特异性的初步测试,使用相同的引物来评估来自不具有癌症诊断的健康个体的白细胞中靶转录物的表达。在这个测试阶段 (男性和女性个体的混合物-这取决于癌症的类型,即候选前列腺癌和乳腺癌基因仅需要分别使用男性或女性健康供体) 测试来自最少五种不同健康个体的白细胞。

[0111] 根据产品插入说明书,使用具有肝素钠 (CPT) 的细胞制备管 (Becton, Dickinson, and Co., NJ) 从全血中分离来自健康个体的白细胞。使用标准方法对癌细胞系和分离的白细胞进行RNA提取和第一链cDNA合成。使用qRT-PCR测试每个基因 (每个基因使用2至4个不同组的引物) 的表达的特异性 (细胞系cDNA作为阳性对照,来自健康供体的白细胞cDNA作为阴性对照,并且水作为另外的阴性对照)。然后选择基于qRT-PCR测试存在于癌细胞系中但在白细胞中不存在的转录物,用于通过液滴数字PCR进一步验证。通过这个测试阶段的选择标准是非常严格的,并且需要qRT-PCR信号存在于至少一种癌细胞系中,并且在测试的所有健康供体白细胞样品中都不存在。

[0112] 使用液滴数字PCR进一步验证了通过qRT-PCR测试阶段的靶转录物和特异性引物对。对于这个测试阶段,将CTC-iChip (参见例如Ozkumur et al., "Inertial focusing for tumor antigen-dependent and-independent sorting of rare circulating tumor cells," *Sci Transl Med*, 5, 179ra147 (2013) 用于处理由健康个体捐献的全血样品,CTC-

iChip进行从全血中消减红细胞,血小板和白细胞,并产生富集血液中不表达白细胞标志物的细胞,包括CTC(其不应存在于健康个体中)的样品产物。对于每个血液样品,来自CTC-iChip的产物补充有RNA 稳定溶液(RNAlater®,Life Technologies),并且加工用于使用标准方法的RNA 提取和cDNA合成。然后使用液滴数字PCR(Biorad,CA)基于所测试的特异性引物对定量每个样品中存在的转录物数目。在此测试阶段通过液滴数字PCR 评估的样品包括来自癌细胞系的cDNA,通过CTC-iChip处理的来自健康供体的白细胞cDNA(每个引物对测试了至少四个健康个体),并且将水作为阴性对照。

[0113] 通过液滴数字PCR检测的标准是严格的,并且包括:1)在癌细胞系中存在转录物信号(至少一个细胞系具有>10个阳性液滴);2)由阳性和阴性(空)液滴之间的信号分离所表示的优异的信噪比;3)健康供体中的极小或不存在的液滴信号(每个健康供体<3滴);和4)在水中不存在液滴信号(0个阳性液滴)。

[0114] 然后对在上述液滴数字PCR测试中在细胞系而不是在白细胞中特异性扩增转录物的引物进行信号灵敏度的详细测试。使用单细胞显微操作,将精确数量的癌细胞(1,5,10,25和50细胞)掺入由健康个体捐献的全血中,并且然后通过CTC-iChip进行处理。然后如上文对液滴数字PCR测试那样加工每个样品,并评估灵敏度以确保信号足以满足所需的临床应用。

[0115] 使用qRT-PCR和液滴数字PCR评估候选基因和引物的上述严格程序导致了最终引物列表,其由针对每种类型的癌症的50-100个候选基因的初始列表的约10%组成(总共约400个初始候选基因)。然后使用在IRB批准的临床方案下收集的在MGH癌症中心进行癌症治疗的癌症患者捐献的血液样品,进一步评估这些引物在患者CTC中的信号。评估的这一部分的关键是与从未诊断出癌症的健康个体收集的血液进行比较。以下表1列出了迄今已经使用这些方法开发的引物和探针,用于使用液滴数字PCR特异性检测来自具有前列腺癌,乳腺癌,肝细胞癌,胰腺癌,肺癌和黑素瘤癌症患者的CTC。

[0116] 虽然可以使用针对每个癌症类型的单个基因,但是每个组中的多个基因的存在对于灵敏度(CTC甚至在个体患者中在其表达模式上是异质性的)和特异性(检测多个基因信号赋予增加的置信度,这代表真正的癌细胞特征)都是有用的。

[0117] 以下表1中提供的基因列表包括特定类型的癌症特有的转录物(例如,前列腺或乳腺癌或肝癌的高度特异性标志物),以及几种癌症类型,例如所有上皮癌类型共享的基因(并因此可用作泛癌标志物),以及在某些条件下(例如前列腺癌中活性雄激素信号传导或乳腺癌中活性雌激素信号传导)诱导的基因。因此,对每种类型的癌症分配特定组的基因,其被设计为针对给定癌症类型的最佳灵敏度,特异性和临床可操作的信息。

[0118] 此外,设计表2中描述的引物以预先扩增表1中列出的一些基因,同时保持其高特异性。如果STA是选择的方法,这些巢式引物成为每个癌症组的另外的组分。

[0119] 针对不同类型癌症的基因列表

[0120] 下表1提供了基因名称(具有(Genbank ID)和序列识别号(SEQ ID NO))以及其选择性的癌症类型(Br:乳腺,Lu:肺,Li:肝,Pr:前列腺,Panc:胰腺,Mel:黑素瘤)。此外,针对每个基因列出了优化的引物组(引物1和2),以及荧光引物探针的组成(例如,用于加标签的探针的6-FAM™(蓝色荧光标记物)或HEX™(绿色荧光标记物))和ZEN-31ABkFQ猝灭剂),用于数字PCR 产物的最佳可视化。

[0121] 表1

基因	核苷酸	seq no	引物2	seq no	引物1	seq no	探针
AG62 (30593)	Se, Lu, L, P	1	CTG ACA GTT AAA GCC GAT ATC AC	2	CAG TTC AGT CTT CAG CAA CTT GAG	3	/5'-FAM/ATG CTT AG G /3EN/AGC CTG CAG ATA CAG CTC /3ABBP/Q/
AG101A1 (328)	Se, Lu, P, M	4	GAT GGC TTT AAA ATG TCA GGA A	5	TGT GGC CAA GTT TGA TGG T	6	/5'-FAM/TTT TCA CTT /3EN/CTG TGT ATT CGT CCA AAG C/3ABBP/Q/
CA0092 (30664)	Se, L1, Lu, S, M	7	TTC TGC ATT TTT GGA CAT AGG AG	8	GCC TTG CAC TTC CAC TAT GAC	9	/5'-FAM/TTC CAC GTC /3EN/CTA CTG TCA TTC ACC /3ABBP/Q/
CDN13 (3009)	Se, Lu, P, M	10	GAG GCC TAC ATT CTG AAC GC	11	GTC GTT CTT TCT TTC GCC TTC TC	12	/5'-FAM/AT TCT CTC /3EN/CTG CAG CAT CAT TCT /3ABBP/Q/
CD93 (3003)	Se, L1, S, M	13	GTT TCA TCC TCC CTG TGC TG	14	GCT CTT TGA TCT TCC GCT TC	15	/5'-FAM/CTG CTG GTC /3EN/CTG CTT TTG TCG GTC /3ABBP/Q/
CD18A1 (3295)	Se, Lu	16	GAT GCC TCA CTT GCA GTA	17	CTT GAT AAA CTG GCT AAT GGT	18	/5'-FAM/AT TAT CAC /3EN/ACC TAC CTC AAT ATA TGA AGG AAA /3ABBP/Q/
EGFR (3094)	Se, Lu, L1, P, M	19	CTG CTG CCA CAA CCA GT	20	TTC ACA TCC ATC TGA TAT GCG	21	/5'-FAM/CTG CTT GGT /3EN/CTG CCG CAA ATT C/3ABBP/Q/
FA71 (3289)	Se, Lu, L1, S, M, P, P, M	22	GAT CCT TAT GCC ATC ACC GT	23	ATC AGC AGA GTC AAT CAG TGA G	24	/5'-FAM/TCT TGT CAG /3EN/CAG CCG TCC CGG /3ABBP/Q/
FA72 (3290)	Se, Lu	25	CTT GGA TGC TGA CAT TTX TGA	26	TTC TCC ACT CAG CTC CAG CT	27	/5'-FAM/ACC TGC TAC /3EN/ATC ACN GAG GCA GAC C/3ABBP/Q/
F2H1 (3340)	P	28	CAG TGT GAT AGG TAC TCT CAG AGG	29	TGT TCC AAA GCT CCT CAC AA	30	/5'-FAM/ATG AAC AAC /3EN/AGC TGC TTC ACT CTG A/3ABBP/Q/
HO10013 (36372)	Se, Lu, P	31	CAG CCA GAT GTC TTC CCA	32	CTG TAC GGA ATG CCT TTC TGG	33	/5'-FAM/CAG CAT TTT /3EN/CAG ACT CCA GCG G/3ABBP/Q/
IKK1 (3817)	P	34	GCT GTC TAC AGT CAT GGA TGG	35	GTC TTC AGG CTC AAA CAG GT	36	/5'-FAM/TGG CTA TTC /3EN/TTC TTT AGG CAA TGG GCA /3ABBP/Q/
IKK1 (3818)	P	37	GAG TGC TGG ACC CTG GA	38	GTC ATA CTT TGA AGC ACA CCA TCA C	39	/5'-FAM/AAA GCA CTT /3EN/ACT CCG GTG ATT C/3ABBP/Q/
ISABBP (4045)	S, M	40	CAC ATT TGA GTC AAG CTT GTC G	41	GCC GAT GTC AAA CAA GTT AAG	42	/5'-FAM/TCC AAG ACC /3EN/AA T GAA GCC ACC ACA /3ABBP/Q/
MS01A1-0801 (4305)	S, M	43	GAA GGA GAA GAT CTG CCA GTC	44	GCT GAC TTC TCT GCT CAA G	45	/5'-FAM/TTC CCG TGA /3EN/CCA GAG TCA TCA TGC /3ABBP/Q/

[0122]

[0123]

基因	核苷酸	seq ID	引物2	seq ID	引物1	seq ID	注释
SR1 (2233)	Re, L1, L2 Panc	48	CCA GTA GCC TGA TTG TGC AT	47	TCT CAG TGA TTC TGT TCA AGG A	48	/5'-FAM/AGT CAT AGC /ZEN/AGC AGG GCA TTT TGG TGG T/3'-BARB/FQ/
SR1A (2235)	Mut	49	ACT CTT ACA CCA GGG CTG A	50	CCA TCA AGG CTC TGT ATC CAT	51	/5'-FAM/AGG ACT CCA /ZEN/AGG ATC ACT GTC AGG A/3'-BARB/FQ/
SR1B (2236)	Re, L1	52	GGA TTT GAG CAG GAG AAA TCC C	53	GAA TTC TTC ATY CCX TFG AAC TGA	54	/5'-FAM/AGC AGC AGC /ZEN/GAA AAA GAC AAA TTC CAA AC/3'-BARB/FQ/
OC1B (10056648)	Re, L1, L2	55	AAG ATG GAC AGG TAT GAC AAG TC	56	ACT CTT TCC ACA TAG TCA GAT GG	57	/5'-FAM/TCG AGA CAC /ZEN/ATY TTY AAC CCA CTC CTC G/3'-BARB/FQ/
SR2A (2237)	Mut	58	TGT CCT GGC TGT TCA TTC TG	59	TGG ATC CCT ATC TCT TGC CA	60	/5'-FAM/AGC TCC TCC /ZEN/CTG TCC ATC TCC T/3'-BARB/FQ/
PG8 (2241)	Re	61	GGC AAT TGG TTY GAG GCA A	62	GGA CTG GAT AAA TGT ATT CAA GCA	63	/5'-FAM/ACA AGA TCA /ZEN/TCG AAG TTA TCA AGA AGT TTY GTA AGT T/3'-BARB/FQ/
PR1 (11187)	Re, L1, L2 Panc	64	CTG GTG GAG GAG AAC GG	65	GGT CGC TGG ATG AAA GGT T	66	/5'-FAM/AGT GTC CGC /ZEN/AGC AGC TCG AA/3'-BARB/FQ/
SR1 (2238)	Mut	67	CAG GCA TCG TCA GTT TCC T	68	ACA CAA TGG ATC TGG TGC TAA	69	/5'-FAM/TTT GGC TGT /ZEN/GAT AGG TGC TTC GCT G/3'-BARB/FQ/
SR (2239)	Re, L1, L2	70	GAG GAG AGA ATC AAC AAA CTC C	71	AGG TTC AGG TAC TCC TTC CAG	72	/5'-FAM/AGG AAC TCC /ZEN/ATY GAG GAG CAC AT/3'-BARB/FQ/
SR10 (2240)	Mut	73	ATA CTT CTG CTT GGT GTA GGC	74	AGC CAT TGT ACT CTT TAA CCA A	75	/5'-FAM/CTC TGA GGT /ZEN/GGA GAC TCT GCG AGA /3'-BARB/FQ/
SR11 (2241)	Re, L1, L2 Mut, Panc	76	CCG AGA ATY AGC TTC CTA CAG TG	77	GCG GAC ATY CTC ATA GTA AGG A	78	/5'-FAM/AGC ACC AGT /ZEN/TTT GAA ATC GAC ACA C/3'-BARB/FQ/
SR12 (2242)	Re, L1, L2 Panc	79	CTG CTT TGG TCT CTT TCC	80	CTT ACT CAG CTT GAA CTT GTC G	81	/5'-FAM/ACC TGG TCT /ZEN/TGT ACA GAT CCA TG/3'-BARB/FQ/
SR13 (2243)	Re	82	ACT TCC TCG ATC CTT GCC A	83	GTC TTT TCA ACC ATG TCC TCC A	84	/5'-FAM/CCA TGA AGC /ZEN/TCG TGA TGG TCC TCA /3'-BARB/FQ/
SR14 (2244)	Mut	85	CAG TGC CAC CGA AGC CT	86	CTY TTA TTY TCA TCC TCA GTC CAA AC	87	/5'-FAM/TGT GAC AAC /ZEN/GAG TTS AAA TCT GAG GCC /3'-BARB/FQ/
SR15 (2245)	Mut	88	CTT GTC ACT TTC CTT CAG CAG	89	CTY CAT GGT GTC GGC TCA	90	/5'-FAM/TTG TGC AGG /ZEN/TGC GGG TAC TGG /3'-BARB/FQ/

基因	核苷酸	seq ID	引物2	seq ID	引物1	seq ID	注释
SR16 (2246)	Re	91	TCC TCG GAT GAC TCT CCA TAC	92	AGA TAC CAC CTC CCT GAA GAA	93	/5'-FAM/CCA ATG ATG /ZEN/AGG AGC GCG ATG GAG /3'-BARB/FQ/
SR17 (2247)	Re	94	AGA GGT TTA ATG GGC TCA CAG	95	CTC TGG TCT GTC GTC ATG TAA G	96	/5'-FAM/ACA TGC CTT /ZEN/TCA CCT TCT CCA TCA /3'-BARB/FQ/
SR18 (2248)	Re	97	CAC ACC ACC ATA CCT GGA TGA T	97	TCA CTT GAG GCC AAG AGT TC	98	/5'-FAM/AGA AAC GGA /ZEN/GAT CCA GCC AAG TCC /3'-BARB/FQ/
SR Variant 1 (2249)	Re	100	CTT TCT TCA GGG TCT GGT CAT T	101	CTT GTC GTC TTC GGA AAT GTT ATG	102	/5'-FAM/AGC CAG GGA /ZEN/TGA CTC TGG GAG AAA /3'-BARB/FQ/
SR Variant 2 (2250)	Re	103	GAG GCA AGT CAG CCT TCC T	104	TGT CCA TCT TGT CTT CTT CG	105	/5'-FAM/TGA AGC AGG /ZEN/GAT GAC TCT GGG AGA /3'-BARB/FQ/
SR Variant 12 (2251)	Re	106	GCT CAC CAT GTC TGA CTT GA	107	TGG GAG AGA GAC AGC TTG TA	108	/5'-FAM/TGA TFG CGA /ZEN/GAG AGC TGC ATC AGT /3'-BARB/FQ/
SR Variant 12 (2252)	Re	109	GAG AGT CCA CGC TCA CCA T	110	GCA GGC TFG CTC TCT AGC	111	/5'-FAM/TGA TFG CGA /ZEN/GAG AGC TGC ATC AGT /3'-BARB/FQ/
SR19 (2253)	Re	112	CTC TGC ACA AAC TCT TCC ATY TC	113	TTT CTT CGC CCA TTE TTA CC	114	/5'-FAM/TTG GCT GGT /ZEN/TTA CAG TGA AGT CCA /3'-BARB/FQ/
SR20 (2254)	Re	115	GGA AGG AGG GAA CAG AAA TCT	116	GTC AGC TAC TGG CTC AAC TAT T	117	/5'-FAM/TGG CTA CAC /ZEN/ATY TGA GAA GAA TGG TGG A/3'-BARB/FQ/
SR SET 1 (2255)	Re	118	AGG AGA TGT GCT GGA TFG TC	119	TCT GCA TGA ATY ATA CAT TGA CCA C	120	/5'-FAM/ATY GCT GCA /ZEN/AAC TGA TCA CAC TTT/3'-BARB/FQ/
SR SET 2 (2256)	Re	121	ACT GCA GAG ATA AGT TTA GCT GAC	122	TCA CCA TTT TGC TTA CTT CCT TG	123	/5'-FAM/TTG CCA AGT /ZEN/TTG TTC AAG AAG CCA C/3'-BARB/FQ/

序 号	序 号	序 号	序 号	序 号	序 号	序 号	
1041720 1	Se, 1a	124	CAT GGT GGC TAC AGC CTT T	125	TCT CCA AAC TTC TTC CTC ATT CC	126	TGG TAA/TACA TGG CTT TGG/TATC AGC AGC TTC ATG CA/TAAATTC
1041720 2	Se, 1a, 1b	127	GAA GAT CAT CCT GTC AGG TGA G	128	CTT CCG AGC TAG AAC CTC TAT G	129	TGG TAA/TAGC GTG CAA TGG/TCA ACT CAT TTC GGC TAAATTC
1041720 3	Se, 1a, 1b	130	GAT CAG ACA GTT ATT CAG AAA G	131	TAC AAT CTT CCA GGG ACT GAG	132	TGG TAA/TACA GAG GAG TGG/TCT CAG AGC GCT CTT TAAATTC
1041720 4	Se	133	CCC AAC CCA GGC ATG ATG	134	TCA ATG AGA AGC ACC TTG GC	135	TGG TAA/TACC CCG AAG TGG/TCA AGC AGA GCT TAAATTC
1041720 5	Se	136	TGC TGG AAT GGA CAA GAA CTC	137	GCT CAT GGA GAT TGA ACT GAT	138	TGG TAA/TCC TGG CCG TGG/TCT TTT GAC TGT ATC TAAATTC
1041720 6	Se	139	CTT ACT GGC GTT TTC TGA TGC	140	CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AG	141	TGG TAA/TACA TTT GCT TGG/TCC CAC TTT TCC TAG GT/TAAATTC
1041720 7	Se	142	GGA CCA GGG AAA CAT AAA GCT	143	TGA AGG TGG ATT GGT GAC AGA	144	TGG TAA/TACA GCT CAG TGG/TAA CCA AAC CAC AAA TAAATTC
1041720 8	Se	145	CAT CTT GTC GTC GGG ATT CTG G	146	GAT ACT GTC GAT GTC GCT GAT	147	TGG TAA/TCC TCA CCA TGG/TCC TAC CTT GCT GCT CA/TAAATTC
1041720 9	Se	148	GCC TGG CAC TTC CAT TAT GAC	149	CTT TGC ATY TTT GGA CXT AGG AG	150	TGG TAA/TCA GCG TTG TGG/TGG GTC CCG AGG CT/TAAATTC
1041720 10	Se	151	ATG TGG AGT TTA CAG TGT CTG G	152	AGC TTT TCA CTG AGT GAT GC	153	TGG TAA/TCA CAG AGG TGG/TAG CCA AGT GTC ACC TAAATTC
1041720 11	Se	154	ACG GCT CXC ATC CTC CT	155	CCA CTA TGT CAC CAT GTA CCT G	156	TGG TAA/TTC GCT AGC TGG/TAG ACC AGC AGC TAAATTC
1041720 12	Se	157	TGC TCT GAC AAC CCT TAT GC	158	GGC TGA GGA TCA CTT TGT AGA	159	TGG TAA/TAG CCA GGA TGG/TGC TTT GCT GAC ATT TAAATTC

[0124]

序 号	序 号	序 号	序 号	序 号	序 号	序 号	
1041720 13	Se	160	CAT CAG CAG GAC CAG TAA C	161	TGT CTG TAC TCC CCG ATC T	162	TGG TAA/TCT CCC AAG TGG/TAG ACC AGC ACT GCT TAAATTC
1041720 14	Se	163	TCA TTT GGA CXT ACT GAC TTT G	164	CTT GCT CCA GCT CXT GTT C	165	TGG TAA/TCT GCT CTT TGG/TGT TCT CCG CCT AT/TAAATTC
1041720 15	Se	166	GAT GTT TGG TCT AGG ATG GAG	167	ACT GGG TTT GAC TTC GGA GC	168	TGG TAA/TGT GGG CAG TGG/TAT CTA TAT TTT GCA CT/TAAATTC
1041720 16	Se, 1a	169	GTC ACT CTC CTG ACA TCC TTA G	170	CCA TCT CAT TTC GTC CTC CAG	171	TGG TAA/TTC GGC TTC TGG/TACA GAC ATA GGC AAA GT/TAAATTC
1041720 17	Se	172	ACT CTA AAA GAC TTT GGA CTA ATG	173	TCT AGC AAT CAA CAG ATG AGT TCT	174	TGG TAA/TAG CCC TCT TGG/TAG CCA AAC TCC TAAATTC
1041720 18	Se, 1a, 1b	175	AGC TCC TTT CAG TCC GAA T	176	GTC TAC TTA TCA ATC ACC TCA	177	TGG TAA/TTC CCA GTG TGG/TATA CCC ATT GTC ATC GC/TAAATTC
1041720 19	Se, 1a, 1b	178	GGA CAG AGG GAA CAA GGA TGA AC	179	GTT GGG AGA ATA TGG GTC SAY TG	180	TGG TAA/TGG AGG TGA TGG/TCT TGC TGG ACA ATG TAAATTC
1041720 20	Se, 1a	181	GCT TTG ACA TCA GTA GAC CAG AG	182	CTG TCC GCA GAT CAG ACT TG	183	TGG TAA/TACA GTG TCC TGG/TCA AAA AGT GCA AAG GTC AT/TAAATTC
1041720 21	Se	184	CCT GGA AAA TGG CCT CCT T	185	CAT TGC CTA CAG GAA GTC TGG	186	TGG TAA/TCA ATG ACC TGG/TAT GCT AAG AGT GTC AG/TAAATTC
1041720 22	Se	187	CCA GAG GTA AAG GTC CCA AC	188	TCC CAG ATA ACT GTC ATG AAG C	189	TGG TAA/TAG GCA GTA TGG/TCA GAG TAA CTA CAG AAG CT/TAAATTC
1041720 23	Se, 1a	190	CCT CAA ATX CAY CAA GCA CAG C	191	GGA AGC CTT CAC CAG CAA GCA	192	TGG TAA/TAG CAG TCT TGG/TCC AAG TGG TCC AT/TAAATTC
1041720 24	Se, 1a	193	TTG CAG GCT TCA CAT ACC TT	194	GCC CCA CAT GCT TGA AT	195	TGG TAA/TTT TCC CCA TGG/TGG CAA CGA CCT TT/TAAATTC
1041720 25	Se, 1a	196	CCT TTA CAG CCA TTC CTC TT	197	CCC TTA CCA CAG TCA TTT CT	198	TGG TAA/TTT CTT TGA TGG/TAT CTT CTT TCC TCC CTT TAAATTC
1041720 26	Se	199	TGG ACA GAA GAC ATA CTE ATA AAG G	200	GCT GCC AGC ATG AAT CCC TCA G	201	TGG TAA/TCC ATC CTT TGG/TGG ACC TCC AGT TAT CA/TAAATTC
1041720 27	Se, 1a	202	ATC TTC CTT CCA TTC TGC TTC	203	CAG TTC CCA CTC ACT TTC TCA G	204	TGG TAA/TTC ACT CCA TGG/TCC ACC CCA CTC TAAATTC
1041720 28	Se	205	TTT TGC ACC AGT CTC GCT T	206	GCC GCS CTG ACA GTA TGA G	207	TGG TAA/TCT ACA CAG TGG/TGG GAG CCC TG/TAAATTC

[0125]

名称	核苷酸	位置	序列	位置	序列	位置	序列
PRAME (2204)	5a	208	CGA CTG CAA GTC ATA CCG	209	CCT TCC ACA CAC TCA CT	210	TGA TAA GTT TG CAG TAG TTA GAC ACC CAC AAC GG TAAATG?
PRAME (2205)	5a	213	TGC CAG TCA TGT TCA TGC	213	CAG GAC ACC ATG AGG AAC AG	213	TGA TAA TCC ACC ACC TAA TCC CAG TTC A TAAATG?
PRAME (2206)	5a	218	AAG ATG TCA GAC ACT GAG AAC G	218	CAG AGC CCG ATG TGA TC	218	TGA TAA TTT TCG ATG TAA TGT CCA AAC CAC ACC A TAAATG?
PRAME (2207)	5a	223	AGG AAT CCG TGG AAT GTC	223	TC TCA TGA AAT TAA TTA TGA CAC	223	TGA TAA TAT GGT GAA TAA TAA TGA CCA CAC TAA TAAATG?
PRAME (2208)	5a	228	AGG ATC TGC TTG AAT GTC	228	CAG CAG AGC TTT TTC ACA GCA T	228	TGA TAA TGA TAT ACT TAA TGC CAG GGT CAG CCG TAAATG?
PRAME (2209)	5a	233	CAT GAT AAG TGA ACC TGC TAT G	233	GAT GAT AAG TGA ACC TGC TAT G	233	TGA TAA TCT TAT TGC TAA TGC AAG TCA ACC TGC TAAATG?
PRAME (2210)	5a	238	GCA CAG TCT GAG AAT TAT ACT C	238	GCT ATG CCA AAG TGT TGA ATG	238	TGA TAA TCC TCT TGT TAA TGA AAG GCT TCA GAA TAAATG?
PRAME (2211)	5a	243	TGA TGA ATA TTC TCT GGA TGG C	243	CCT GAA TCT TTA CTC TCT CTT CTT G	243	TGA TAA TCA GGT TCC TAA TCA TTT GGT GCA TTC TAT TTC TTC C TAAATG?
PRAME (2212)	5a	248	GCA CTT CAA GTT CAG CTT CAC	248	ACC AGT TTA TTG TCA CTT TCA A	248	TGA TAA TAC CAC TGT TAA TCT GAC TTT CTC CCG TAAATG?
PRAME (2213)	5a	253	ACA TCT AAT ATT GGT ACT ATT GAG AAT T	253	TGG GAG CTT CTT CTC TCT TC ATG	253	TGA TAA TCC CTC CTC TAA TAT GTC ATT GAC ACC TAAATG?
PRAME (2214)	5a	258	TTC ATT TGA TAA GCA CAC AGT CTG	258	ACC TTA AAC ATG GCA TAG TCT G	258	TGA TAA TGC CAT TCC TAA TAT CTT CCA GGT CCA C TAAATG?
PRAME (2215)	5a	263	AAT TAA TCA TCA TCA TCA TAA G	263	TAA TAA TCA TCA TCA TCA TAA G	263	TGA TAA TTT CAG GCG TAA TCA TAT CCA CAA C TAAATG?
PRAME (2216)	5a	268	TAG AAG TCA AGA AGA TTA TAA G	268	TCT TTC TGA TCT GTC ATC GC TAA G	268	TGA TAA TGG CAG AAT TAA TCA CAG AAC GGT T TAAATG?
PRAME (2217)	5a	273	AGA AAG GAG TCC GAC TAT	273	CAC TAC ACA CCA TCT CAG A	273	TGA TAA TCA GAC ACA TAA TCC CCA GGA CCG TAAATG?

[0126] 注意,PRAME也称为MAPE (优先在肿瘤中表达的黑素瘤抗原), OIP4 (Opa相互作用蛋白OIP4) 和CT130 (癌/睾丸抗原130)。

[0127] 下表2列出了设计用于特异性预扩增通过表1所列引物靶向的区域的巢式引物。

[0128] 表2

[0129]

序列名称	Seq ID	序列序列	Seq ID	序列序列
FAT1	253	CAG ATG GAG GAG GAA GAT TCT G	254	GTA TAC TGC CTG GAG TTC TCT G
FAT2	255	CTG GTT LAG GTC TCC ATT ACA G	256	GCT GTG ACT CTG AGC AAG TA
AGR2	257	TGT CCT CCT CAA TCT GGT TTA TG	258	GAC AGA AGG GCT TGG AGA TTT
PKP3	259	CGG TGG CGT TGT AGA AGA T	260	AGA AGA TCT CTG CCT CCG A
RND3	261	CAA GAT AGT TGT GGT GGG AGA C	262	AGG GTC TCT GGT CTA CTG ATG
TFAP2C	263	TTTGGATTACCGCTTGGG	264	GACTCCAGTGTGGGAGAG
SI00A2	265	GGG CCC ACA TAT AAA TCC TCA C	266	CTG CTG GTC ACT GTT CTC ATC
PRAME	267	CTTCGCGGTGTGGTGAA	268	GC TGTGTCTCCCGTCAAA
PPP	269	CTG GGA CAC ATT GCC TTC T	270	CCA CCA TGC ATT CTT TCA ATT CT
PGR	271	AAA CCC AGT TTG AGG AGA TGA G	272	CCC TGC CAA TAT CTT GGG TAA T
SCGB2A1	273	ACA GCA ACT TCC TIG ATC CC	274	GCG GCA TCA CTG TCT ATG AA
MUCL1	275	CCT TGC CTT CTC TTA GGC TTT	276	AGC AGT GGT TTC AGC ATC A
PGR	277	CAG ATA ACT CTC ATT CAG TAT TCT TGG	278	CTC TAA TGT AGC TTG ACC TCA TCT
TFAP2C	279	GAG AAG TTG GAC AAG ATT GGG	280	GCT GAG AAG TTC TGT GAA TTC TTY A
SCGB2A1	281	GTT TCC TCA ACC AGT CAC ATA GA	282	AGT TGT CTA GCA GTT TCC ACA TA

[0130]

基因名称	Seq ID	第 1 序列	Seq ID	第 2 序列
FAT1	283	GGG AAA GCC TGT CTG AAG TG	284	TCG TAG CCT CCA GGG TAA TAG
FAT2	285	GTT ACA GGT CTC CTA TCT ACA GC	286	GCT CAG CCT CTC TGG AAG
RND3	287	CTC TCT TAC CCT GAT TEG GAT G	288	GGC GTC TGC CTG TGA TT
SFTPB	289	CCT GAG TTC TGG TGC CAA AG	290	GGG CAT GAG CAG CTT CAA
SCGB3A2	291	CCA CTG GCT TGG TGG ATT T	292	TCA ACA GAA ATG CCC AGA GTT
SERPINA3	293	CTT CTC CAG CTG GGC ATT	294	TGC TGT GGC AGE AGA TG
SFRP2	295	GGG TCA TGT CCG CCF TC	296	GGG TTT CCA TTA TGT CGT TGT C
CRABP2	297	CCC TCC TTC TAG GAT AGC G	298	AAC CCG GAA TGG GTG AT
AQP4	299	AAACGGACTGATGTCACITGG	300	TGGACAGAGACATACTCATAAAGG
TM6PR54	301	CCCCTGCTTLAGGAACATA	302	GTEAGACATCTTCCCTCCATTC
GREM1	303	GCCGCACTGACAGTATGA	304	CAGAGGAGCAGGACTGAAA
FDX1	305	AGC GGC GCC TCT TAT ATC	306	GCG TTG AAA GAG AAG ACA AAC T
NRX2-1	307	CTA CTG CAA CGG CAA CCT	308	GGG CCA TGT TCT TGC TCA
NRX2-1	309	CAG ACT CGC TCG CTC ATT T	310	CCT CCA TGC CCA CTT TCT T
PPP	311	CCCAGTCAGTACGTCCAAAT	312	GCCTAATCCCGAATAACATCAAC
AGR2	313	GCT TTA AAG AAA GFG TTT GCT G	314	CTG TAT CTG CAG GTT CGT AAG

基因名称	Seq ID	第 1 序列	Seq ID	第 2 序列
SORL1	315	AAG TTC CCC GTG TGC ATC	316	CTC AGC CTC CTC GAT GAA
MAGEA6	317	GTGAGGAGGCAAGGTCTG	318	GGCTCCAGAGAGGGTAGTT
TFAP2C	319	TTTGGATTACCGCTTGGG	320	GACTCCAGTGTGGGAGAG
PRAME	321	CTTCGCGGTGTGGTGAA	322	GCTGTGTCCTCCGTEAAA
GPR143	323	ATC CTG CTG TAT CAC ATC ATG	324	CTG ACA GGT TTC AAA GAA CCT
PMEL	325	CCAGTGCCTTGGTGGCT	326	CAAGAGCCAGATGGGCAAG
MLANA	327	TGCCAAGAGAGATGCTCAC	328	CATTGAGTGCACACATGAAGAC
PTPRZ1	329	AAG AAG CTG CCA ATA GGG AT	330	TGT CCA GAG AGG TGG ATG

[0131] 来自CTC-Chip产物的基因转录物的多重数字分析

[0132] 为了改进最小量的来自CTC的RNA的肿瘤特异性mRNA的检测,我们建立了能够测试来自微量CTC-Chip产物的许多不同基因转录物的多重测定。这结合了使用多个独立基因的更高的灵敏度/特异性,以及输入模板的量受限 (并且因此不应该被稀释成多个反应)的

实情。我们的测定包括每个反应4个基因,每个基因通过选择不同比例的荧光缀合引物在二维空间中唯一地解析 (resolve)。因此,在单个反应中,我们可以独立地测量4个基因转录物,而不必稀释模板。对于不同的癌症,我们已经进行多达4个不同的反应(即多达20 种不同的基因转录物),并且通过应用巢式RT-PCR数字测定法,对可以进行的反应数量没有限制。

[0133] 这种多重策略在分析多个转录物(并因此确保了癌细胞表达模式中的异质变化),而非通过进行多个独立的PCR反应来稀释输入物质之间实现了理想的平衡。取决于肿瘤类型和最佳信号所需的基因数量,我们开发了范围在2-4 种多重反应的测定(每个多重反应检测4种基因)。因此,我们可以对单个CTC 的产物询问8到16个不同基因的表达而不需要输入模板的过度稀释。重要的是该测定能够从所有这些基因中添加信号(即累积信号),同时还具有单独的基因结果(以优化在单个基因水平上的信号/噪声,并且还从每个基因询问的特定信号途径-例如前列腺CTC中的雄激素信号传导收集信息)。

[0134] 为了在单个视图中显示多重反应的结果(并且因此区别分离的每个基因的扩增),我们改变了两种荧光探针(FAM(蓝色)和HEX(绿色))的浓度。通过这样做,每个单独的基因扩增反应具有反映基因特异性引物组成的FAM/HEX信号的独特组合,并因此鉴定基因特异性PCR产物。在二维空间中,我们可以说明从单一多重反应产生的4种不同基因扩增产物的信号位置。如应用于使用液滴以包裹每个PCR反应的数字PCR,该方法通过修改定量显示的阳性液滴的二进制信号振幅将靶标分离成单个簇。如所预测的,该方法允许多个基因的总信号的累积评分(例如,在总共4个反应中的16个标志物),同时还保留量化来自每一单独基因靶标的信号的能力。

[0135] 具体的测试结果在下面的实例中有详细说明。

[0136] d-CTC测定方法的应用

[0137] 上皮癌在其可被手术切除或照射时的早期检测提供了最佳的治愈机会,并且在设置最小的癌症传播方面施用辅助化疗在实现治愈方面比治疗已建立的转移性疾病更有效。然而,目前在早期癌症检测方面的努力缺乏特异性。例如,对于男性前列腺癌普遍筛查,使用血清PSA测量对于揭示早期癌症是有效的,但也鉴定更多数量的非恶性前列腺状况(例如,例如,腺体的良性肥大)或者甚至是无痛并且从未注定成为侵入性的癌症。由此,公共卫生机构不推荐广泛的PSA筛查,因为过度诊断的并发症(包括死亡)的数量匹配甚至超过早期癌症检测中的计算益处。

[0138] 对于其他癌症,诸如乳腺癌,乳房X线照相术(mammography)被认为是有效的,但是即使那样要进行大量的乳腺活组织检查来诊断每个真正的恶性肿瘤。对于肺癌,最近推荐的具有严重吸烟史的个体的低剂量CT扫描也可能针对每个真实恶性肿瘤检测到数百个良性放射照相异常。

[0139] 正是在这种情况下,为存在的癌细胞衍生的标签添加基于血液的超灵敏读数将提供所需的特异性。本文所述的d-CTC测定可用于初始筛选和用作较后时间时的较早筛选的确认两者。例如,在一些情况下,测定法可用作二线测试以验证高灵敏性但非特异性筛选测试(例如前列腺癌中的PSA)。在癌症高度致死,但目前不存在筛选方法(例如胰腺癌)的其他设定中,使用本文所述的测定法进行的常规周期性血液筛选可能成为随时间监测患者的状态或状况的惯例。

[0140] 新的d-CTC读数也与患者(例如,具有家族史和/或特定类型的癌症的遗传标志物的看似健康的患者或具有晚期或转移性癌症的患者)的连续监测高度相关。CTC的成像是昂贵的并且相对不灵敏的,原因在于针对所有需要的标志物进行了适当染色的完整细胞产生单个信号。使用本文所述的新的 d-CTC测定法,其中每个CTC(无论多么完整或预凋亡的)可产生数百个分子信号,极大地提高了在具有已知癌症的患者中检测和监测CTC的能力,以及定量地监测和分析他们对治疗干预反应的能力。除了通过分子标志物对细胞数进行评分,可以以相当的灵敏度实现突变或癌症相关重排(例如肺癌中的 EML4-ALK)的特异性询问。

[0141] 除了提供血液样品中存在的CTC的数字(定量)测量之外,新的d-CTC测定还允许分析血液中对于肿瘤细胞独特的特异性信号传导途径。例如,前列腺谱系特异性基因的子集由雄激素信号传导(诸如PSA)驱动,而另一个子集被雄激素信号传导(诸如PSMA)抑制。通过同时分析这些基因,我们可以确定CTC中雄激素信号传导的状态。类似地,在乳腺癌中,雌激素反应性基因(例如孕激素受体)的表达提供了CTC内雌激素反应途径状态的测量。这些测量特别重要,原因在于将前列腺癌和乳腺癌两者中的治疗干预衍生为分别靶向雄激素和雌激素受体。因此,定义血液中CTC信号的总数,同时具有关于治疗剂在靶向和关闭关键途径中的有效性的信息对于治疗监测是重要的。

[0142] 如以下实施例所述,本文描述的新方法在前列腺癌中进行了说明,其中抗雄激素剂abiratorone(例如ZYTIGA®)有效抑制癌症进展,特别是在依赖于雄激素途径的肿瘤中。

实施例

[0143] 在以下实施例中进一步描述本发明,所述实施例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0144] 实施例1-数字CTC测定的初步测试和验证

[0145] 为了测试CTC-Chip-液滴测定法的可行性,我们首先选择了在前列腺肿瘤细胞中特异性表达,但在污染性白细胞中不存在的几种转录物。这些是前列腺谱系特异性标志物KLK3(激肽释放酶相关肽酶;又称为前列腺特异性抗原或PSA),FOLH1(叶酸水解酶,又称为前列腺特异性膜抗原或PSMA)和AMACR(α -甲酰基-CoA消旋酶),以及EpCAM(上皮细胞粘附分子)。使用内含子跨越引物和来自Integrated DNA Technologies(Coralville,Iowa)的ZEN双重淬灭的经FAM标记的探针,按照标准qPCR方案优化PCR条件。首先通过来自癌细胞和白细胞混合物的包囊cDNA测试这些条件,以便探索系统的动态范围。接下来,使用手动分离技术单独选择细胞,将0,3,6,12,25和125个前列腺癌LNCaP细胞逐渐掺入单独的5ml等分的HD血液中,然后进行CTC-iChip处理,RT-PCR并且使用RainDrop系统进行液滴包囊。我们选择KLK3作为本实验的靶转录物,因为预期它是适度丰富的。使用5,000的强度阈值,我们发现大约250个液滴下容易检测到少至3个相当于KLK3转录物的细胞。

[0146] 基于这些初步数据,我们测试了在具有转移性和局限性前列腺癌的患者与健康对照组中的CTC-Chip液滴测定。每个样品运行通过iChip,然后使用上述四种前列腺标志物:KLK3,AMACR,FOLH1和EpCAM,使含有CTC的产物运行通过液滴RT-PCR。与HD对照相比,具有局部或转移性前列腺癌的患者产生显著更高的阳性液滴计数。

[0147] 图1A显示由LNCaP前列腺癌细胞的总RNA制备的cDNA稀释物,与白细胞混合并通过

使用两种不同的前列腺引物组进行的液滴PCR分析。结果显示几种纯度,并且在该范围内显示阳性液滴数量的良好响应。

[0148] 图1B显示手动分离的LNCaP细胞掺入HD血液样品中,运行通过iChip,并进行液滴RT-PCR(KLK3引物组)。结果显示下至极低的靶细胞数量的极好的灵敏度。

[0149] 图1C显示了来自健康对照,具有局部(可切除)前列腺癌和转移性前列腺癌患者的血液样品的分析,所述样品通过CTC-iChip处理,进行RT-PCR并使用三种前列腺特异性和一种上皮特异性生物标志物(KLK3,AMACR, FOLH1,EpCAM)进行液滴分析。结果显示了所有组合的四个标志物的滴数总数目/ml的结果。

[0150] 这些结果表明,将基于液滴的PCR读数应用于CTC-iChip大大提高了其在检测生物试样中存在的几乎所有CTC中的灵敏度。总而言之,CTC-iChip 和Droplet-PCR代表两个强大的微流体技术,它们彼此高度兼容,可以整合在一起,以创建一种新的,高度灵敏和准确的生物测定法。

[0151] 实施例2-数字CTC测定方案

[0152] 该实施例提供了可用于本文所述方法的通用数字CTC测定方案。该通用方案的不同方面用于本文所述的一些实施例中。例如,使用下面描述的方案(涉及RNA纯化到cDNA合成)的步骤3中的方法1来生成图15A至15C的数据。步骤3中的方法2用于生成图19A至24B中的数据。

[0153] 1. 患者血液运行通过I-Chip,版本1.3M或1.4.5T。将样品收集在冰上的15mL锥形管中。

[0154] 2. 在4°C下将样品向下旋转。倾析上清液,并将SUPERase™ In(不依赖于DTT的RNA酶抑制剂)+RNALater®稳定溶液(通过抑制RNA酶预防RNA降解)加入到沉淀中。将样品快速冷冻并置于-80°C直至进一步处理。样品在-80°C是稳定的。

[0155] 3. 在以下描述的实施例中使用了用于RNA纯化至cDNA合成的两种不同的处理方案。

[0156] 方法1

[0157] a. 样品在冰上解冻。

[0158] B. 使用去垢剂(NP40, Tween20)直接裂解样品。

[0159] c. 将裂解的样品直接用于cDNA合成(Superscript III)。

[0160] d. cDNA合成后,通过SPRI(AgencourtXPure®XP珠)清除纯化样品,以清除去垢剂和<100bp的任何核苷酸。

[0161] 方法2

[0162] a. 样品在冰上解冻。

[0163] b. 用RNeasy Qiagen Micro试剂盒处理样品。与传统的Qiagen推荐方案相比,方案有一些微小的变化。使用更大体积的缓冲液RLT(裂解缓冲液)以及更高的ETOH浓度。进行这些修改原因在于添加到样品中的RNALater®。

[0164] c. cDNA合成后-通过SPRI(AgencourtXPure®XP珠)清除纯化样品,以清除去垢剂和<100bp的任何核苷酸。

[0165] 4. 可以以两种不同的方式处理cDNA(由方法1或2合成):

- [0166] a. 将cDNA直接用于ddPCR;或者
- [0167] b. 使用Fluidigm BioMark™巢式PCR方法(已经预先验证了用于巢式PCR 的来自基因的引物)扩增cDNA。稀释扩增的cDNA。
- [0168] 5. 加入cDNA(来自步骤4a或4b),用于探针的Biorad Supermix™,一种引物或多种引物(用于感兴趣的基因;可以多路复用多达4种不同引物(FAM 和HEX)),总体积为22μl。
- [0169] 6. 产生液滴(每孔~15,000-18,000滴)。
- [0170] 7. 将液滴样品放入PCR仪器中。PCR条件与Biorad推荐条件不同。我们使用步式降低而非缓慢坡道以确保所有液滴达到相同的温度。这与 RainDance和Biorad两者使用的不同。通过步式降低而不是梯度可以获得更好的结果(即,更多的信号以及更多的阳性和阴性液滴滴之间的分离)。
- [0171] 8. PCR后,在ddPCR仪器中计数阳性液滴。
- [0172] 9. 使用TIBCO®Spotfire®分析软件收集和分析数据。
- [0173] 试剂,试剂浓度和反应体积如下:
- [0174] 试剂:
- [0175] • 用于探针的Biorad ddPCR™Supermix (无dUTP)
 - [0176] • IDT引物/探针(20x或40x)
 - [0177] • cDNA(对于细胞系1ng/ul)
 - [0178] • 无核酸酶的水
 - [0179] • Eppendorf semi-skirted 96孔板(只有这些板能与机器配合使用)
- [0180] 测试相关细胞系
- [0181] 每单一反应:
- | | |
|---------------------|---------------|
| ddPCR Supermix | 11.0μl |
| 引物(20x) | 1.10μl |
| [0182] cDNA(1ng/μl) | 1.10μl |
| 水 | <u>8.80μl</u> |
| 总共 | 每孔22.0μl |
- [0183] 将含有ddPCR supermix,cDNA和水的主混合物等分到孔中,并将1.1μl 的每个引物加入每个孔中并充分混合。
- [0184] 患者样品
- [0185] 用于单独基因的每单一反应
- | | |
|-----------------|---------------------------|
| ddPCR Supermix | 11.0μl |
| 引物(20x) | 1.1μl |
| [0186] cDNA(患者) | <u>多达9.9μl(如果量少,用水平衡)</u> |
| 总共 | 每孔22.0μl |
- [0187] 用于多个基因的每个单一多路复用反应
- [0188] ddPCR Supermix 11.0μl

	引物1(40x).	.55μl
	引物2(40x).	.55μl
[0189]	引物3(40x).	.55μl
	引物4(40x).	.55μl
	<u>cDNA(患者)</u>	<u>8.8μl</u>

[0190] 总共 每孔22.0 μl

[0191] 当针对基因特异性引物或针对多个基因的多重引物测试多个患者时,将包含 ddPCR supermix和引物的主混合物等分到孔中,然后向每个孔中加入患者cDNA并充分混合。

[0192] 实施例3-基因验证方案

[0193] 以下方案用于选择表1中列出的特异性标志物基因。

[0194] 1.对于CTC独特的并且在白血球(WBC),白细胞等中不表达的转录物通过生物信息学开发(mine)-将原发性肿瘤和CTC基因表达数据与WBC基因表达数据集进行比较,以分离仅存在于原发性肿瘤和/或CTC中的转录物。

[0195] 2.通过qPCR验证通过阈值截留的转录物。

[0196] 3.引物由IDT合成。用FAM/ZEN/IBFQ标记探针。

[0197] 4.qPCR验证要求每个转录物通过两个不同细胞系上的至少两个独立引物组,5个健康供体WBC(通过CPT柱分离)和水作为阴性对照来验证。使用qPCR的50个循环来确认转录物的表达仅存在于细胞系中,而不存在于健康供体中。

[0198] 5.通过qPCR验证的转录物在ddPCR上用通过CTC-iChip的细胞系和健康供体(有和没有细胞掺入)进行验证。

[0199] 6.取决于感兴趣的疾病,多路复用转录物的组(每次反应多达4个不同的基因)。

[0200] 该策略的有效性在下文显示在掺入(spiked)细胞实验中,其中将仔细测量了数量的肿瘤细胞(来自LNCAP前列腺癌细胞系)单独显微操作,加入以控制血液样本,通过CTC-iChip,并且然后如上所述通过d-CTC分析进行分析。如图2所示掺入细胞的数量增加显示数字信号的数量增加,这说明了该方案的能力。图2显示使用单个基因转录物(KLK3,也称为PSA,用于前列腺癌)作为探针(在测定中,我们使用8-24个基因转录物,从而进一步提高灵敏度)。在这里,我们掺入了计算出的数量的癌细胞(将每个细胞显微操作,挑选并引入到10ml的对照血液标本中)。然后通过CTC-芯片处理血液并进行数字读出,如上所述。没有掺入单一癌细胞的血液中没有观察到信号。引入2个细胞/10ml的血液产生清晰的信号(65个阳性液滴)。在这种情况下,将10个CTC产物分为4份,并且一式四份运行,因此64个液滴实际上代表了来自1/4的肿瘤细胞的数字信号。

[0201] 该测定法既高度灵敏又是可重复的。如图3所示,这些掺入细胞实验中的数字信号显示高的重复性(这里显示了2次独立的重复),并且当将细胞掺入缓冲液(而不是血液)并直接分析(没有CTC-Chip处理)时,可以看到相同量的信号。因此,当肿瘤细胞被稀释到数十亿个正常血细胞中,并且然后使用CTC-Chip“再分离”,之后进行数字读出时,几乎没有信号损失。

[0202] 实施例4-来自CTC芯片产物的基因转录物的多重数字分析

[0203] 我们建立了能够测试来自微量CTC-Chip产物的许多不同基因转录物的多重测定。这结合了使用多个独立基因的更高的灵敏度和特异性,以及输入模板的量受限(并且因此不应该被稀释成多个反应)的实情。新的测定法包括多个基因,例如每个反应2,3,4,6,8,10或更多个基因,每个基因通过选择不同比例的荧光缀合引物在二维空间中唯一地解析(resolve)。因此,在单个反应中,可以独立地测量2,3,4或更多个基因转录物,而不必稀释模板。对于不同的癌症,可以运行和分析多个不同的反应(例如在4个运行中多达20种不同的基因转录物),并且通过应用巢式RT-PCR数字测定法,对可以进行的反应数量没有限制。

[0204] 为了在单个视图中显示多重反应的结果(并且因此区别分离的每个基因的扩增),我们改变了两种荧光探针(FAM和HEX)的浓度。通过这样做,每个单独的基因扩增反应具有反映基因特异性引物组成的FAM/HEX信号的独特组合,并因此鉴定基因特异性PCR产物。在二维空间中,我们可以说明从单个多重反应产生的4种不同基因扩增产物的信号位置。如应用于使用液滴以包裹每个PCR反应的数字PCR,该方法通过修改定量显示的阳性液滴的二进制信号振幅将靶标分离成单独的簇。如所预测的,该方法允许多个基因的总信号的累积评分(例如,在总共4个反应中的16个标志物),同时还保留量化来自每一单独基因靶标的信号的能力。

[0205] 探针1:100%FAM

[0206] 探针2:100%HEX

[0207] 探针3:FAM和HEX的混合物-总和高达100%

[0208] 探针4:FAM和HEX的混合物-总和高达100%

[0209] 如表3至7所示,在多重反应中使用以下探针混合物:

[0210] 表3

[0211] 每个反应针对4个基因的多重引物(黑素瘤)

[0212] 反应1

[0213]

FAM	HEX	引物	FAM Int	HEX Int
100%	0	Sox10	6000	0
70%	30%	SFRP1	4000	2500
30%	70%	RND3	4500	5500
0%	100%	TFAP2C	0	6000

[0214] 反应2

[0215]

FAM	HEX	引物	FAM Int	HEX Int
100%	0	PRAME	11000	0
70%	30%	MLANA	8000	4000
30%	70%	MAGEA6	5000	6000
0%	100%	PMEL	0	5500

[0216] 反应3

[0217]

FAM	HEX	引物	FAM Int	HEX Int
100%	0	PMEL	7000	0
70%	30%	MLANA	6000	3000
30%	70%	MAGEA6	4000	5000
0%	100%	MET	0	4500

[0218] 表4

[0219] 每个反应针对4个基因的多重引物

[0220] (泛癌/谱系)

[0221]

FAM	HEX	引物	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	TFAP2C	9000	0
60	40	PGR	5100	1800
35	65	SCGB2A1	2205	7800
0	100	CADPS2	0	5000

[0222] 表5

[0223] 多路复用每个反应针对多个基因的引物(前列腺中的AR状态)

[0224] 多路复用每个反应针对4个基因的引物(前列腺)

[0225] 反应1

[0226]

FAM	HEX	引物	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	TMPR2	5500	0
65	35	FAT1	5525	1837.5
40	60	KLK2	2440	2580
0	100	STEAP2	0	4300

[0227] 反应2

[0228]

FAM	HEX	引物	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	KLK3	6600	0
70	30	HOXB13	4340	1320
50	50	AGR2	4050	3050
0	100	FOLH1	0	5200

[0229] 图6

[0230] 每个反应针对4个基因的多重引物,上皮-间质转化(EMT)

[0231] 反应1

[0232]

FAM	HEX	引物	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	PKP3	8000	0
75	25	OCLN	6000	1625
40	60	CDH11	4000	3600
0	100	S100A2	0	5000

[0233] 反应2

[0234]

FAM	HEX	引物	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	FAT1	8000	0
65	35	FAT2	5200	1750
40	60	COL8A1	3200	3900
0	100	CDH3	0	6000

[0235] 图7

[0236] 每个反应针对多个基因的多重引物

[0237]

反应	基因 引物组	Avg强度 (FAM)	Avg强度 (HEX)	AR状态
1	TMPRSS2	5500		ON
1	FAT1	8500	5250	?
1	KLK2	6100	4300	ON
1	STEAP2	3350	4300	ON
2	KLK3	6600		ON
2	FOLH1	6200	5200	OFF
2	AGR2	8100	6100	OFF
2	HOXB13	6500	4400	OFF

[0238] 验证和测试

[0239] 为了验证和证明这种多重策略的有效性,我们阐述了(使用掺入细胞实验)概念和患者衍生样品两者。图4显示通过CTC-Chip处理来自健康供体(HD)的正常对照血液样品,并针对4种不同的基因转录物进行d-CTC测定的结果,所有这些结果都是阴性的(即空白液滴)。

[0240] 另一方面,图5代表了来自掺入细胞实验的数据,将前列腺癌细胞系引入血液并通过CTC-Chip处理,然后进行数字测定,显示针对4个谱系转录物中的每一个的阳性信号(荧光液滴)。基于两个探针的差异荧光(图中标注的颜色),这些出现在二维图中的不同位置。由于样品用肿瘤细胞过载,一些液滴含有来自多于一个基因转录物的信号(每个液滴多个基因以灰色显示)。

[0241] 在每个反应中代表四种不同基因的策略适用于多种不同的癌症,伴随着替换每种肿瘤类型的特定谱系标志物。例如,在前列腺癌中,对于2个反应中的每个,我们预测(理论模型)具有四个象限的多重反应(每个象限一个基因)(总共8个基因标志物)。掺入细胞实

验(前列腺癌细胞引入对照血液并通过 CTC-iChip处理)精确地重演了预测结果。

[0242] 此外,图6A-6B和图7A-7B显示,正如从建模预测的那样,当组装在一起时,我们的分析程序整合象限中所有的阳性信号,并允许我们开发评分特定基因信号的方法。信号的多维空间分析允许以高水平准确性自动分析和评分。图6A和6B分别显示了针对反应1的前列腺癌细胞系的理论模型和实际结果,并且图7A和7B分别显示了针对反应2的相同前列腺癌细胞系的理论模型和实际结果。

[0243] 图8A-8B(乳腺癌和肺癌的理论和实际结果,反应1),图9A-9B(乳腺和肺癌的理论和实际结果,反应2),图10A-10B(相同,反应3),图11A-11B(相同的反应4),图12A-12B(相同的反应5)和图13A-13B(相同,反应6)说明当对乳腺癌和肺癌使用相同的方法时的结果。我们可以以6个反应(每个反应中4个基因标志物,共有24个标志物)建立有效地鉴定大多数腺癌(即分组为乳腺癌和肺癌)共享的标志物的多癌症小组,如下所示(使用乳腺癌和肺癌细胞两者的掺入细胞实验的理论与验证)。

[0244] 这些图显示了当将以多重方式(每个反应4个基因)测试多个基因转录物的相同方法应用于乳腺癌时的结果。对相同的CTC芯片产物进行了六个不同的反应(使得能够独立地测试总共24个基因转录物),每个具有指定的信号位置(在上图中预测)并在掺入细胞验证实验中观察到(在下图中观察)。

[0245] 实施例5-靶特异性预扩增以改善肿瘤特异性mRNA的检测

[0246] 为了改善肿瘤特异性RNA的检测,针对每个基因特异性扩增优化了巢式 PCR策略。为了实现这一点,首先用基因特异性引物扩增来源于CTC的 cDNA,其位于用于d-CTC测定的基因特异性引物外部的几个碱基对。对于每个基因,测试了两到三个引物组,并选择与基因特异性d-CTC测定引物相容和在HD血液测试中阴性的引物组,用于分析患者样品。

[0247] 如上所述,首先在来自不同癌症的细胞系中测试靶特异性扩增方案。然后用混合到血液中并通过CTC-iChip富集的癌细胞系的混合物测试对肿瘤细胞特异性(并且在白细胞中不存在)的引物组合。将通过CTC-iChip处理的HD 血液用作为对照。该策略的关键在于巢式PCR条件的设计以增强来自微量 CTC衍生的cDNA的信号,而不增加来自正常血细胞的最小基线信号。通过仔细优化PCR引物序列和测定条件以及平衡外部和内部PCR的循环数目来实现该选择性。所有条件通过以下进行验证:首先用纯化的核酸,然后用掺入到对照血液样品中并通过CTC-iChip处理的各个肿瘤细胞,然后用不同健康供血者的大组(>10),并且最终用来自患者的患者衍生的血液样品,所述患者患有前列腺癌,乳腺癌,黑素瘤,肝癌,肺癌或胰腺癌的转移性或局部癌症。

[0248] 试剂

[0249] • DNA悬浮液缓冲液(Suspension Buffer)(10mM Tris,pH 8.0,0.1mM EDTA)(TEKnova,PN T0221)

[0250] • 0.5EDTA,pH 8.0(Invitrogen,PN Am9260G)

[0251] • TaqMan PreAmp主混合物(Master Mix)(Applied Biosystems,PN 4391128)

[0252] • 无核酸酶水(TEKnova,PN W330)

[0253] 准备10X特异性靶物扩增(STA)引物混合物

[0254] 1) 在无DNA通风柜中,将0.5 μ L的每一200 μ L引物对(0.5 μ L正向引物和 0.5 μ L反向引物)混合。

[0255] 2) 将每个引物在1X DNA悬浮液缓冲液中稀释至终浓度为500nM。(例如:如果合并的引物体积等于8mL,加入192mL DNA悬浮液缓冲液)

[0256] 3) 将混合物涡旋20秒,并向下旋转30秒。

[0257] 4) 10X STA引物混合物 (Primer Mix) 可以在4℃储存,重复使用长达六个月,或在-20℃下冷冻保存,长期使用。

[0258] 制备STA反应混合物 (Reaction Mix)

[0259] 1) 对于96孔PCR板的每个孔,制备以下混合物。

组分	每9μL样品(μL)	96个样品超量(μL)
TaqMan® PreAmp 主混合物	7.5	780.0
10X STA引物混合物 (500 nM)	1.5	156.0
0.5M EDTA, pH 8.0	0.075	7.8
总体积	9.0	943.8

[0261] 2) 将6μL cDNA加入到9μL STA反应混合物中

[0262] 3) 以下列出的热循环条件使用18个循环而不是20个循环的变性和退火/延伸步骤。(注:使用18个循环以比较TSA预扩增方案与全转录组扩增(Whole Transcriptome Amplification))。

[0263]

条件	酶活化	10至18次循环		保持
		变性	退火/延伸	
温度	95℃	96℃	60℃	4℃
时间	10分钟	5秒	4分钟	持续

[0264] 在每个液滴PCR反应中装载1μl预扩增产物。

[0265] 图14显示来自1ng未扩增的细胞系cDNA和来自在10, 14和18个循环的预扩增后1μl预扩增产物,针对7种标志物(PIP, PRAME, RND3, PKP3, FAT1, S100A2和AGR2)的液滴PCR信号。预扩增的额外循环导致信号增加。值得注意的是,PRAME(在该细胞系中以非常低的水平表达的标志物)仅在预扩增18个循环后才被检测,证明了该技术的效用。

[0266] 实施例6-临床数据和测定法验证

[0267] 本文所述的测定法已经使用来自临床研究的实际患者样品进行了验证。这些包括具有转移性癌症(肺癌,乳腺癌,前列腺癌和黑素瘤)的患者以及具有局部癌症(前列腺癌)的患者。如实施例2至5所述进行测定法。

[0268] 图15A, B和C显示了来自具有以下转移性癌症的患者的临床测定的概述:肺癌(6名

患者;图15A),乳腺癌(6名患者;图15B)和前列腺癌(10名患者;图15C),显示实际上所有患者均具有阳性信号,而健康对照无信号。在该测定中,添加了所有阳性得分(累积得分)。然而,如下所述,如图16所示,得分也可以通过单个基因分解。

[0269] 图16显示了来自多个探针的数据的累积分析,并且在10/11转移性前列腺癌患者(基于每个患者为91%)相对于0/12(0%)的健康对照中显示阳性信号。基于每个样品,28个样品中的24个具有阳性信号,指示86%的检出率。此外,一些单个标志物也是相当有效的,例如AGR2(转移性癌症,检测9/10,并且局部癌症,检测0/3),TMPRSS2(5/10和1/3),KLK2(6/10和0/3),STEAP2(1/10和1/3),FAT1(2/10和1/3)和FOLH1(3/10和1/3)。

[0270] 如上所述,也可以使用上述多重荧光色彩方案来分解单个基因标志物,用于独立验证和定量。在下面的这个实例中,具有转移性前列腺癌的患者具有多个阳性标志物,具有局部前列腺癌的患者在较少的标志物内具有较少数量的阳性评分,而健康对照对于所有标志物均为阴性。

[0271] 图17显示来自三个代表性患者样品的临床数据。在每个具有四个基因转录物(总共8个探针)的两个单独的反应中,来自具有转移性前列腺癌的患者血液样品显示多个信号(所有探针在不同程度上是阳性的)。相比之下,来自具有局部(可治愈的)前列腺癌的患者血液样品显示较弱(但可清楚地检测到的)信号。而在转移性癌症患者中,探针1(TMPRSS2),5(KLK3),6(HOXB13),7(AGR2)具有最强的信号,在局部癌症患者中探针2(FAT1)和4(STEAP2)阳性最强。该结果清楚地说明了血液中癌细胞之间的信号异质性以及测定中解析差异信号的重要性。来自HD对照的血液(与癌症患者样品的处理相同)完全没有信号。

[0272] 实施例7-CTC内信号传导途径的测量

[0273] 除了提供血液样品中存在的CTC的数字(定量)测量之外,我们的d-CTC测定法还允许分析血液中对肿瘤细胞独特的特定信号传导途径。例如,前列腺系特异性基因的一个子集由雄激素信号传导(诸如PSA)驱动,而另一个子集通过雄激素信号传导(诸如PSMA)抑制。通过一起分析这些基因,我们可以确定CTC中雄激素信号传递的状态。定义血液中CTC信号的总数,同时伴随着关于治疗剂在靶向和关闭关键途径中的有效性的信息,对于治疗监测是重要的。

[0274] 我们已经在前列腺癌中说明了这一概念,其中抗雄激素剂阿司匹酮(abiratorone)有效抑制癌症进展,特别是在仍依赖于雄激素途径的肿瘤中。下面,我们显示了具有“去势抗性前列腺癌(Castrate Resistant Prostate Cancer)(CRPC)”患者的结果,该患者不再对一线亮丙瑞林(leuprolide)作出反应并且用abiratorone治疗。雄激素响应标志物(绿色)最初通过该疗法抑制,因为其显示初始功效,但随着肿瘤变得抗性并且患者在该药物上经历疾病进展而恢复。

[0275] 图18提供了具有转移性前列腺癌患者的临床研究结果。来自“雄激素受体诱导的基因(AR-On)”的信号子集在该条形图中在条的顶部显示为绿色,而来自“雄激素受抑制的基因(AR-Off)”的信号子集显示在每一条的底部显示为红色。当用雄激素途径抑制剂abiratorone(例如ZYTIGA®醋酸阿比特龙(abiraterone acetate))处理患者时,AR-On信号大大降低,表明有效抑制血液中癌细胞内的雄激素途径。然而,通过药物治疗的周期4,雄激素途径看起来在癌细胞中被再活化(增加绿色信号),表明抗药性。在这些时间点进行

的血清PSA测量与药物治疗失败一致。

[0276] 实施例8-非特异性预扩增以改善肿瘤特异性mRNA的检测

[0277] 与实施例5类似,非特异性全转录物组扩增(WTA)可用于增加CTC特异性转录物的检测率。该方法依赖于随机引物的使用,所述随机引物不仅扩增感兴趣的靶标而且扩增在产物中发现的所有信息。在本实施例中,如下所述使用SMARTer™超低RNA试剂盒方案(SMARTer™ Ultra Low RNA kit protocol) (Clontech):

[0278] 将RNA转移到PCR管或板

[0279] 1) 向每个样品添加1uL的1:50,000稀释的ERCC Spike-In Mix 1

[0280] 2) 使每个样品的体积达到10uL

[0281] 3) 向每个样品添加1uL的3' SMART CDS Primer IIA

[0282] 4) 运行“72C”热循环仪程序:

[0283] 72°C 3分钟

[0284] 持续4°C

[0285] 第一链cDNA主混合物(FSM):

[0286] 1x 4uL 5x第一链缓冲液

[0287] 0.5uL DTT

[0288] 1uL dNTP混合物

[0289] 1uL SMARTer IIA寡核苷酸

[0290] 0.5uLRNA酶抑制剂

[0291] 2uL SMARTScribe RT

[0292] 9uL每一样品

[0293] 5) 为样品号准备10%的额外(excess)FSM,然后加入9uL的FSM至每个样品,并且用移液管混合

[0294] 6) 运行“cDNA”热循环仪程序:

[0295] 42°C 90分钟

[0296] 70°C 10分钟

[0297] 持续4°C

[0298] 第二链合成和扩增(SSM):

[0299] 1x 25uL 2x SeqAmp PCR缓冲液

[0300] 1uL Primer IIA-v3

[0301] 1uL SeqAmp DNA聚合酶

[0302] 3uL无核酸酶水 30uL每个样品

[0303] 7) 为样品号准备10%的额外SSM,然后加入30uL的SSM至每个样品,并且用移液管混合

[0304] 8) 运行“PCR”热循环仪程序:

[0305] 95°C 1分钟

[0306] X循环

[0307] 98°C 10秒

[0308] 65°C 30秒

- [0309] 68°C 3分钟
- [0310] 72°C 10分钟
- [0311] 持续4°C
- [0312] 可以根据RNA输入调整循环数目(例如,对于单个细胞为18个循环或对于10ng RNA输入为9个循环)。此外,4度停止点是过夜。
- [0313] 固相可逆固定化(SPRI)净化:
- [0314] 转移PCR产物以装载1.5mL Eppendorf并用样品ID标记第二组管;在室温下运行SPRI方案,直到最终洗脱
- [0315] 9) 在室温下温育AMPure™XP珠[4度]至少30分钟
- [0316] 10) 确保足够量的洗脱缓冲液解冻并且处在室温下
- [0317] 11) 制备80%乙醇(每个样品至少400uL)
- [0318] 12) 很好地涡旋珠,之后在每个样品中加入50uL珠,上下移液5-10次以良好地混合。注意:当移液珠时,建议使用RPT尖端,以更好地控制添加的体积,并减少残留的珠粒在尖端中的结合
- [0319] 13) 在室温下将样品温育5分钟
- [0320] 14) 将样品放在磁体上,并放置5分钟
- [0321] 15) 在不干扰珠的情况下吸出上清液(~95uL)(检查移液管尖端中是否有棕色,并且如果有显著量的珠损失,则放回管中)
- [0322] 16) 用200uL的80%乙醇洗涤两次-不要混合或干扰珠沉淀。将珠沉淀简单地放在乙醇中30秒,并且然后除去乙醇。尽量不要让珠沉淀在乙醇洗涤之间干燥。
- [0323] 17) 在磁性架上将样品空气干燥,直到珠沉淀不再发光,但在它们破裂前。吸出在干燥时底部合并的任何残留乙醇(注意:干燥时间取决于扩增后的DNA浓度而有很大变化)。单细胞水平的RNA输入通常需要3-5分钟来干燥,而其他IFD产物样品已经花费了一个小时。
- [0324] 18) 当它们开始破裂时,在17uL的洗脱缓冲液中洗脱沉淀。从磁体中取出样品,并将缓冲液反复吸取沉淀物,直到所有的珠粒都溶解;然后移液管混合以完全重悬珠(对于每个样品,这将对不同程度起作用)。尽量不要太剧烈地混合,因为这会产生许多气泡,这往往会降低可达到的洗脱体积。
- [0325] 19) 将再悬浮的样品在室温下温育至少2分钟,然后快速旋转所有样品。
- [0326] 20) 将样品放回磁架5分钟。
- [0327] 21) 吸取~15uL的洗脱的扩增cDNA,并检查移液管尖端中的珠。如果存在珠,那么将溶液移取回珠沉淀上,并放置~1分钟,然后尝试再次洗脱。否则,储存在新装载的1.5-mL Eppendorf,PCR管或96孔PCR板中。注意:如果在洗脱产物中反复获得珠,唯一的解决方案可以是吸入体积降至14uL 或更低。
- [0328] 首先在来自不同癌症的细胞系中测试这种全转录组扩增(WTA)方法。图 19A和19B显示了来自肝癌细胞系(HEPG2)的,用来自肝癌组的12个探针分析的三个不同的SMARTer预扩增cDNA(18个循环)的重复。如图19A所示,每个靶区域的扩增效率不同,在三个重复(WTA1,WTA2,WTA3)之间是一致的,证明了该方法的重现性。如图19B所示,使用18个循环的SMARTer预扩增的这些方法提供了大约四个数量级(10^8 对比 10^4)的信号增加,提供了大大增强的检测。

[0329] 实施例9-用于肝癌的多路复用的对单独的标志物测定

[0330] 对于每个样品,从每个患者收集10-20mL的血液。血液在到达后3小时内在以负消减模式运行的CTC-iCHIP上处理。使用Qiagen RNeasy™ plus Micro 试剂盒从产物中提取RNA,并且使用ClonTech v3 SMARTer™全转录组扩增 (WTA) 策略扩增可用的17uL中的5uL。然后将1%的WTA产物装载到数字PCR 板的每个孔中,并使用500nM Taqman™引物/探针组合来确定每个感兴趣的基因的转录物浓度。将转录物针对血液体积标准化,并比较HCC,HD和CLD 患者。将HCC患者定义为活组织检查证实的非切除肝细胞癌,CLD患者是具有不同病因(酒精介导的,HBV,HCV)的肝脏疾病的患者,其具有阴性超声 /MRI。HD是实验室外部捐赠10-20mL血液的健康供体。

[0331] 图20A至20C显示21个肝细胞癌(HCC)患者(图20A),13个慢性肝病(CLD)患者(图20B)和15个健康供体(HD)(图20C)中的总液滴数。与CLD和HD两者相比,HCC患者显示较多数量的液滴,提示该小组在高风险CLD组中非常干净(clean),可用于筛选肝癌发展的那些患者。鉴于临床上目前可获得的针对肝癌的筛选方法的低的特异性,这是一个重要的结果。在CLD患者中,美国肝病协会(American Association of Liver Disease)推荐每6个月用取决于检测到的肝损伤(liver lesion)大小的详细算法进行超声(US)。中国的前瞻性组合AFP 基因标志物超声筛选(prospective combined AFP gene marker-ultrasound screening)证实,与没有进行筛选的人群相比,经筛选的群体具有37%的死亡率的益处,即使筛选群体仅维持60%的遵从率。

[0332] 每种测定法的灵敏度和特异性取决于所选择的定义“患病”与“非患病”的阈值,但是使用20ug/L,AFP基因标志物具有50-80%之间的灵敏度和 80%-90%之间的特异性。在使用20ng/ml作为截断点的研究中,灵敏度上升到78.9%,尽管特异性降低到78.1%(Taketa,Alpha-fetoprotein,J.Med.Technol., 1989;33:1380)。另一方面,当考虑患者的临床病史并针对接受根治性切除(curative resection)或肝移植的患者具有100%特异性进行校正时,本测定法的总检测率为76%。

[0333] 此外,虽然本文使用的所有11种肝癌测定标志物都具有76%的灵敏度,但是前5个标志物(AHSG,ALB,APOH,FGB和FGG)本身具有70%的灵敏度,而单独的前3个标志物ALB,FGB,FGG)导致67%的灵敏度。仅ALB检测到56%的病例。

[0334] 实施例10-用于肺癌的多路复用的对单独的标志物测定

[0335] 如前所述,通过CTC芯片处理来自8名转移性肺部患者和8名健康供体的血液样品。将样品离心,用RNAlater™处理并储存在-80℃。如所述纯化RNA 并合成cDNA。使用6uL cDNA和对应于图中所示探针的巢式引物对每个样品进行STA。每个液滴PCR反应装载1uL STA产物。

[0336] 将滴液数量针对血液体积标准化。如图21A和21B所示,多路复用的肺基因标志物组能够在8名健康供体的背景之上检测出100%(8/8)转移性肺癌患者样品。也确定了肺组的每一标志物的灵敏度,结果显示SFRP具有8/8的检测率,FAT1探针2具有7/8的检测率,TMPRSS4具有6/8的检测率,FOXF1 ARG2,探针2具有5/8的检测率,FAT1具有4/8的检测率,FAT2和AGR2具有 3/8的检测率,和FAT2,探针2具有2/8的检测率。

[0337] 针对SERPINA3和SFRP2的测定结果表明,SFRP2对肺癌和乳腺癌两者的检测均有效,而前者看起来对乳腺癌检测更具特异性,但也检测到一些肺癌样品。

[0338] 实施例11-用于乳腺癌的多路复用的对单独的标标志物测定

[0339] 通过CTC-Chip处理来自9名转移性乳腺癌患者,5名局部乳腺癌患者和15名健康供体的血液样品。将产物沉淀,用RNAlater™处理并储存在-80℃。如前所述制备来自每个样品的RNA和cDNA。使用对应于图22所列出的探针(FAT2, SCGB2A1, PGR, PRAME, TFAP2C, S100A2, FAT1, AGR2, PKP3, RND3和PIP)的巢式引物,对来自每个样品的6μl cDNA进行STA扩增。将滴液数量针对血液体积标准化,并从患者样品值中减去每个标志物的最高健康供体值。

[0340] 图22显示了每个患者的高于背景的信号。这些方法检测到7/9(78%)的转移性样品和2/5(40%)的局部样品。每个单独标志物的灵敏度从1/14变化到6/14,而两个最相关的标志物是AGR2(6/14)和FAT1(5/14),并且接下来的四个最相关的标志物是RND3, PKP3, PRAME, 和SCGB2A1(每个3/14)。

[0341] 实施例12-转移性乳腺癌中的ARv7检测

[0342] 通过CTC-Chip处理来自10个转移性乳腺癌患者和7个健康供体的血液样品。将产物沉淀,用RNAlater™处理并储存在-80℃。如前所述制备来自每个样品的RNA和cDNA。将6μl未扩增的cDNA加载到每个液滴PCR反应中。用针对雄激素受体的v7同种型(ARv7,表1中的序列)的探针分析样品。将滴液数量针对血液体积标准化。

[0343] 如图23A所示,在5/10个患者(50%)中以背景(HD)以上的水平检测了ARv7,表明该测定法在检测来自液体活组织检查中的ARv7中是成功的。其中一名患者具有三阴性乳腺癌,表明即使在三阴性乳腺癌(TNBC)的背景下,ARv7也可用作标志物(例如,患者不表达以下三种最常见乳腺癌标志物中任何一种的基因:雌激素受体(ER),HER2/neu和孕酮受体(PR)标志物)。

[0344] 实施例13-用于黑素瘤的多路复用的对单独的标标志物测定

[0345] 通过CTC-Chip处理来自34个转移性或不可切除的黑素瘤患者(每个具有多个绘制点(总绘制点:182))和15个健康供体的血液样品。将产物沉淀,用RNAlater™处理并在-80℃下冷冻。如前所述制备来自每个样品的RNA和cDNA。使用对应于图24A中的图的底部列出的探针(单个标志物PMEL, MLANA, MAGEA6, PRAME, TFAP2C和SOX10)的巢式引物,通过特异性靶扩增(10个循环)扩增来自每个样品的12μl cDNA。将滴液数量对血液体积标准化。图24B显示与健康供体相比,在黑素瘤患者中检测的液滴信号的点图分布。针对所有患者绘制点,检测灵敏度为81%(如果6个标志物中的任何1个显示高于针对该特定标志物的HD中的最高背景信号的液滴信号,则患者画图平均得分为正)。在单个标志物中,PMEL和MLANA显示最高的检测率。

[0346] 其他实施方案

[0347] 应当理解,虽然已经结合其详细的说明书描述了本发明,但是前面的说明书旨在说明而不是限制本发明的范围,所述范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

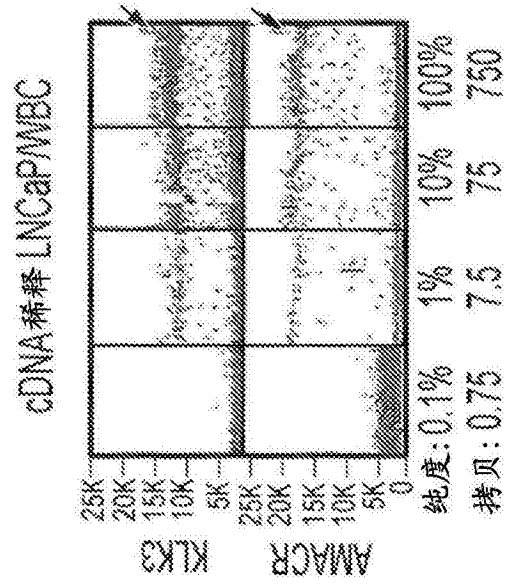


图1A

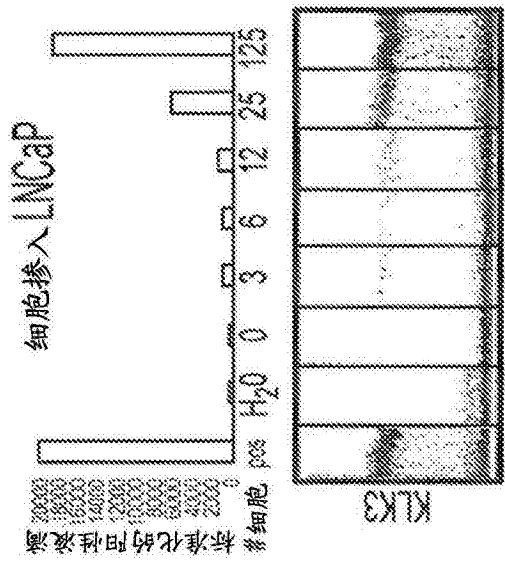


图1B

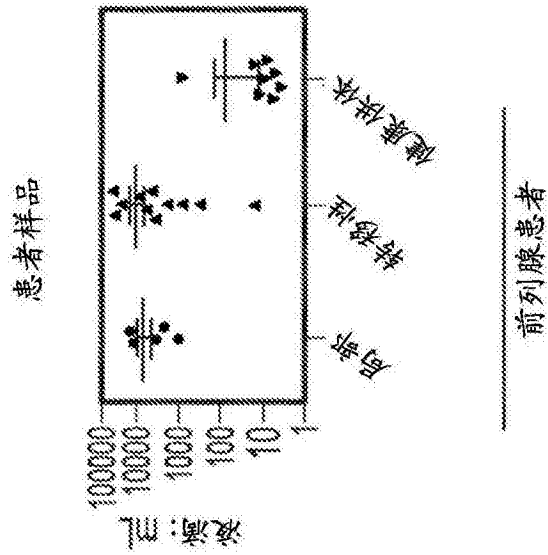


图1C

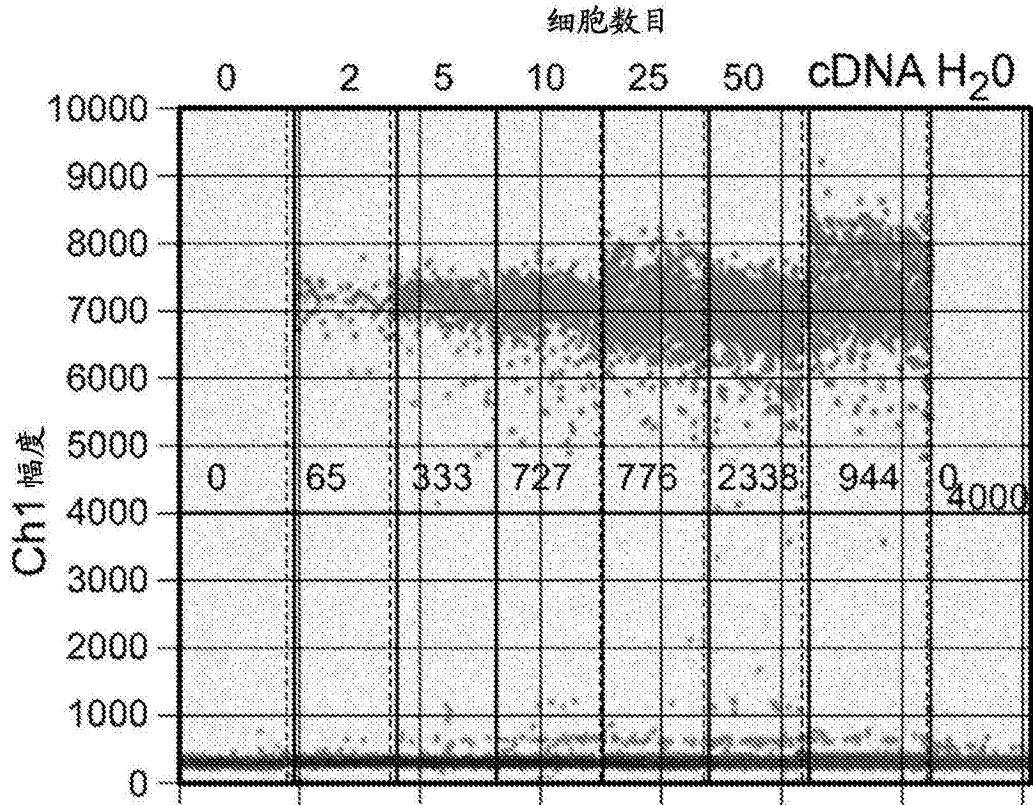


图2

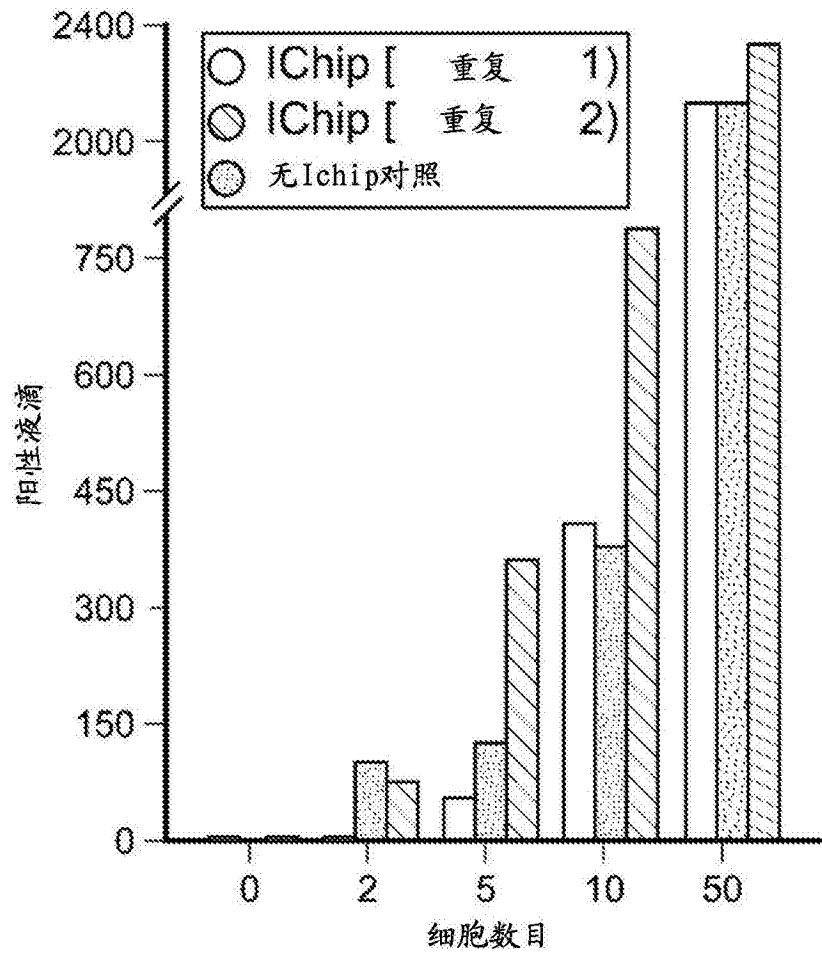


图3

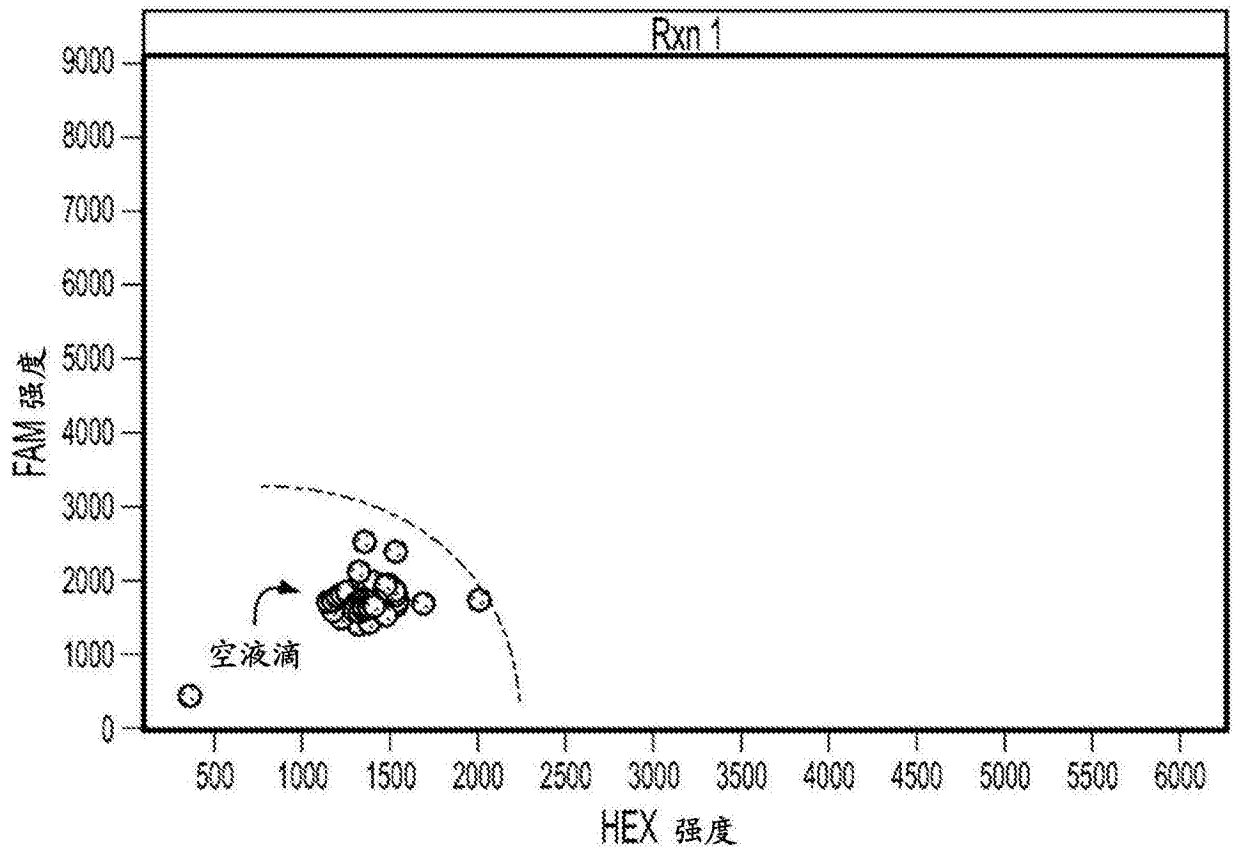


图4

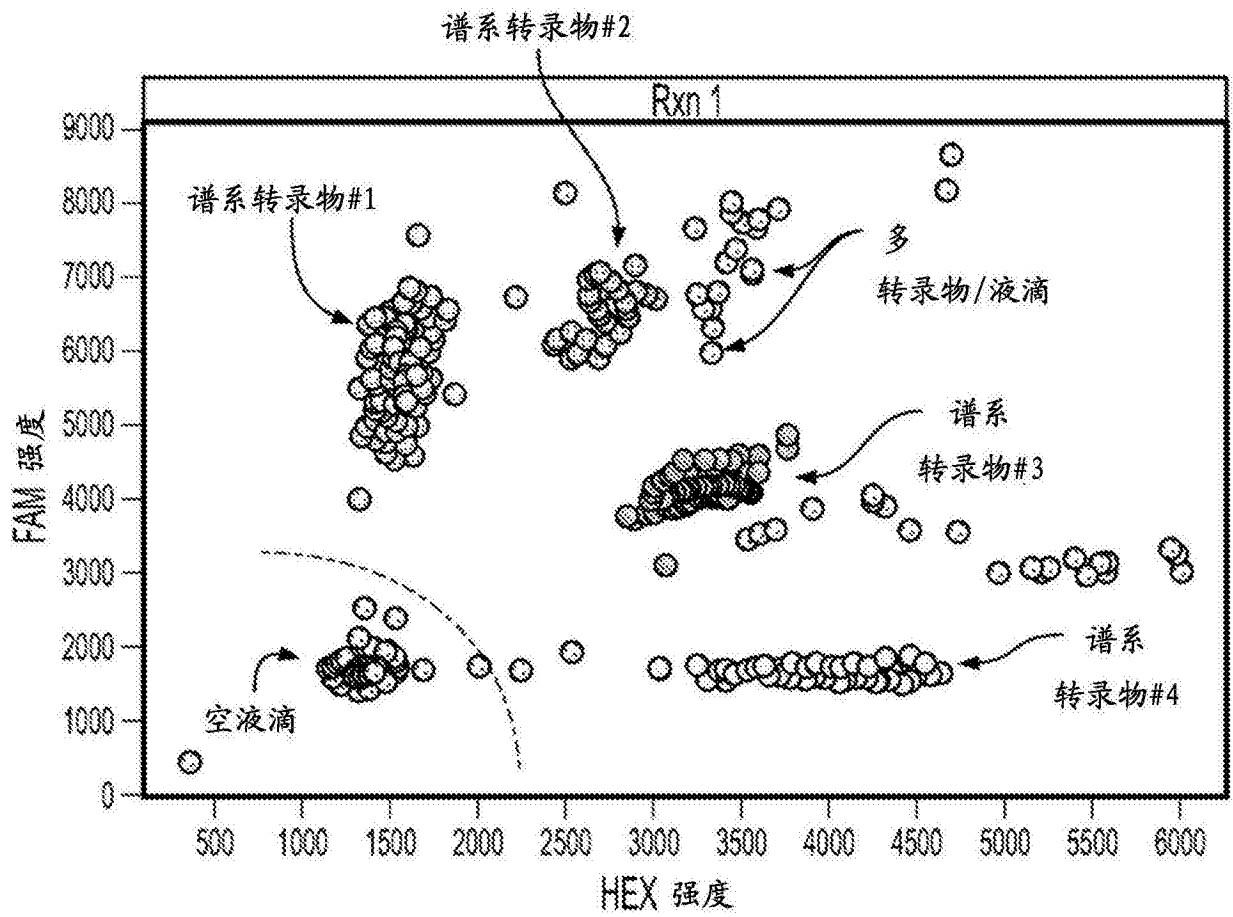


图5

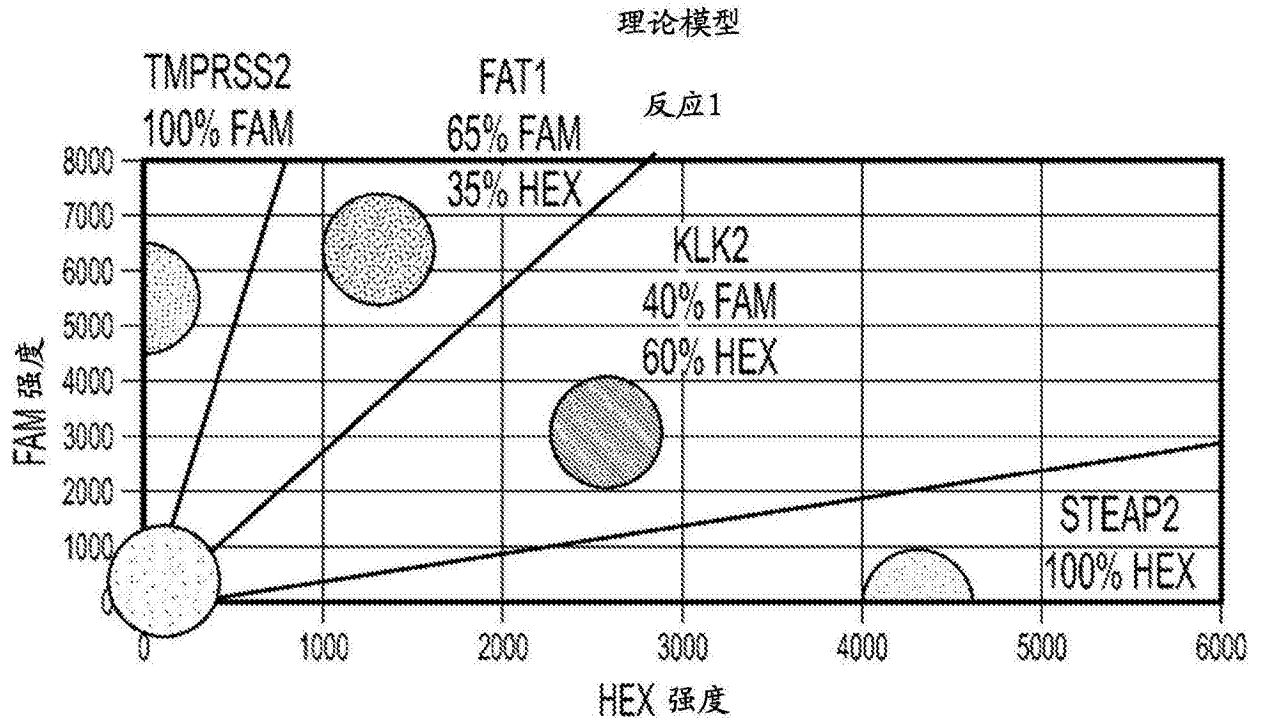


图6A

前列腺癌细胞系数据

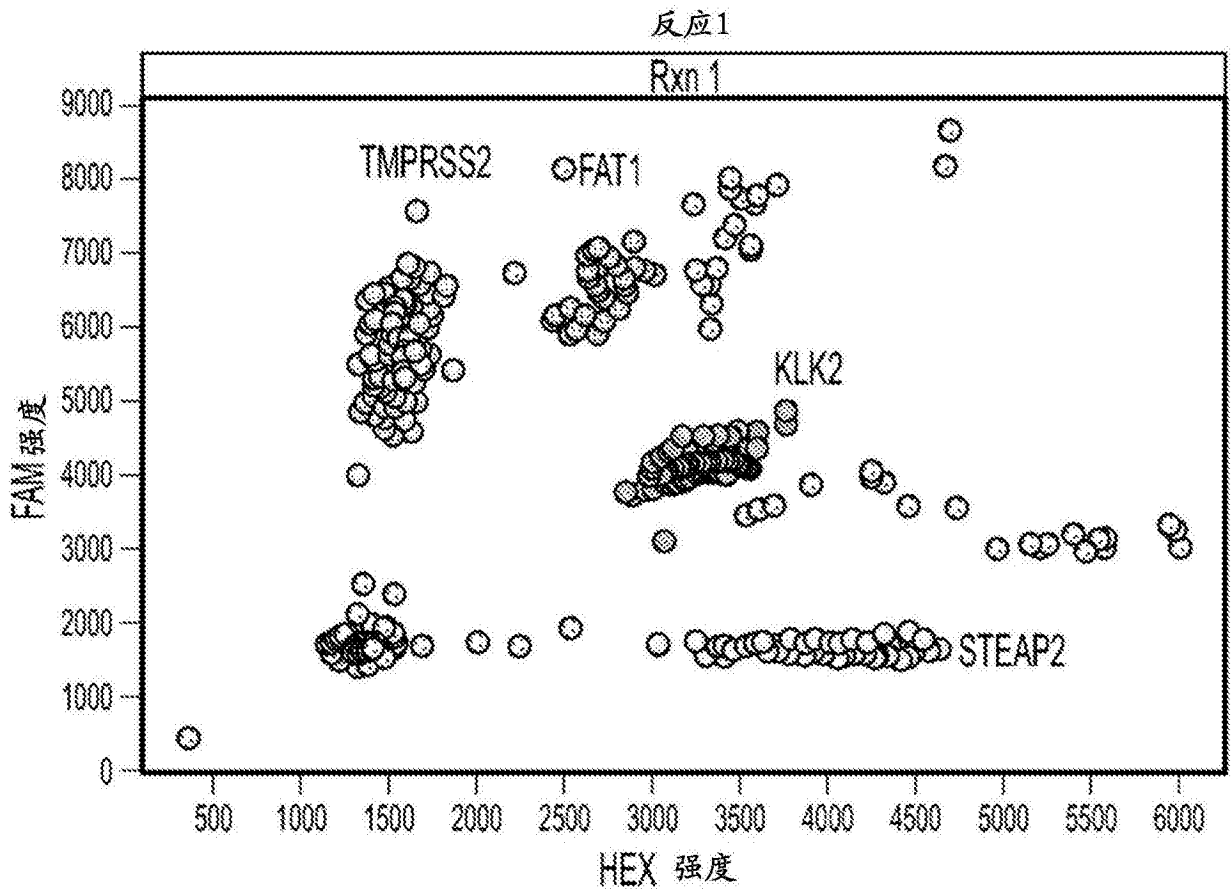


图6B

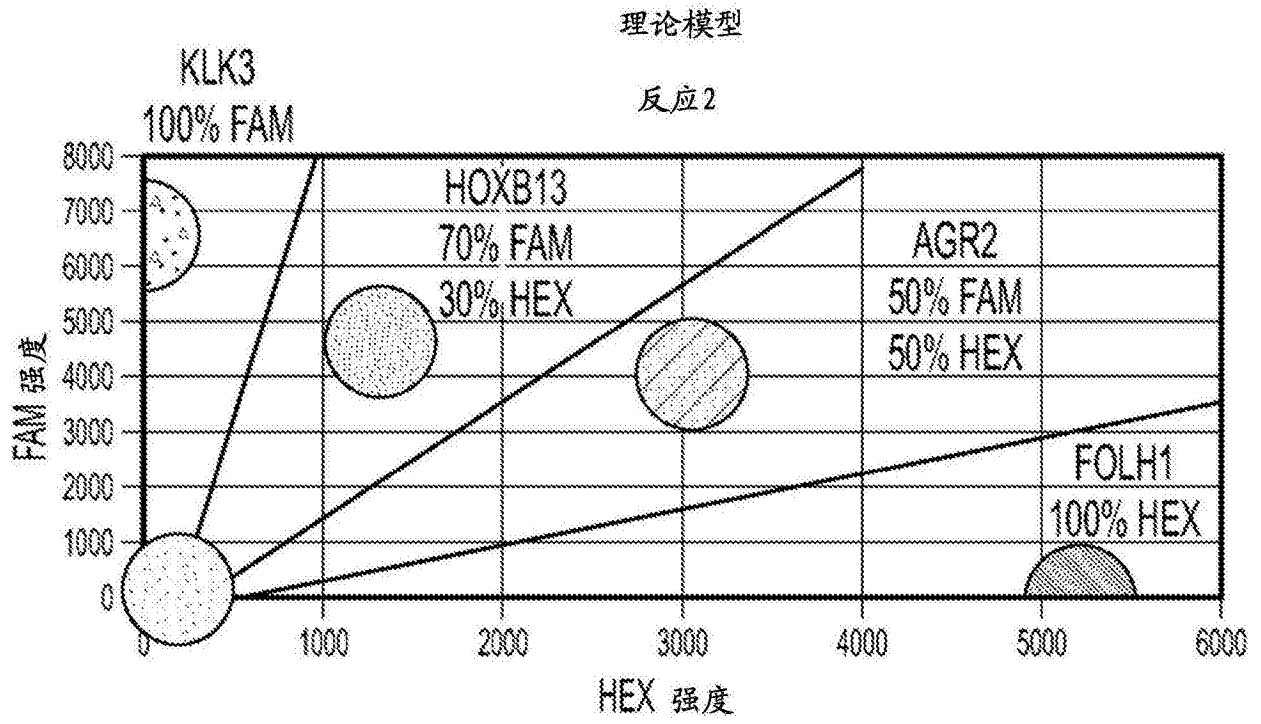


图7A

前列腺癌细胞系数据

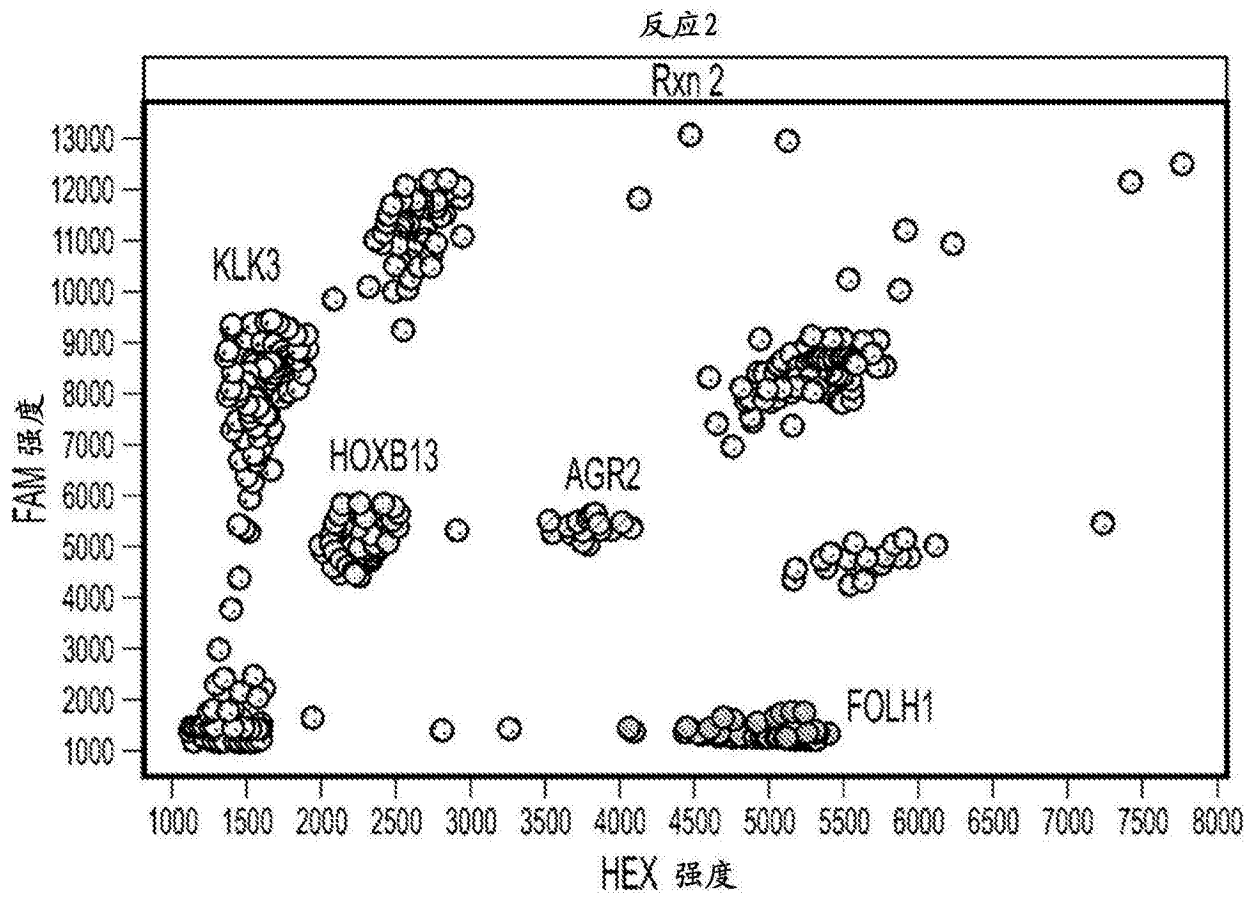


图7B

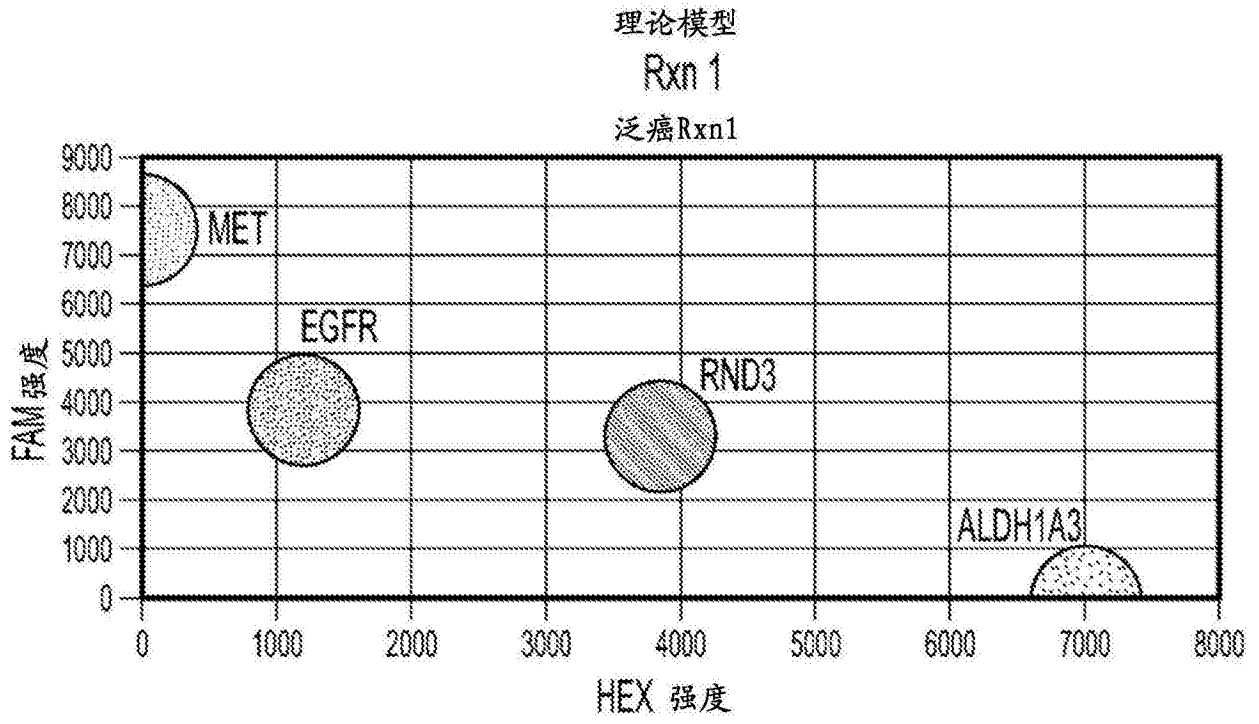


图8A

乳腺癌/肺癌细胞系实验(组合)

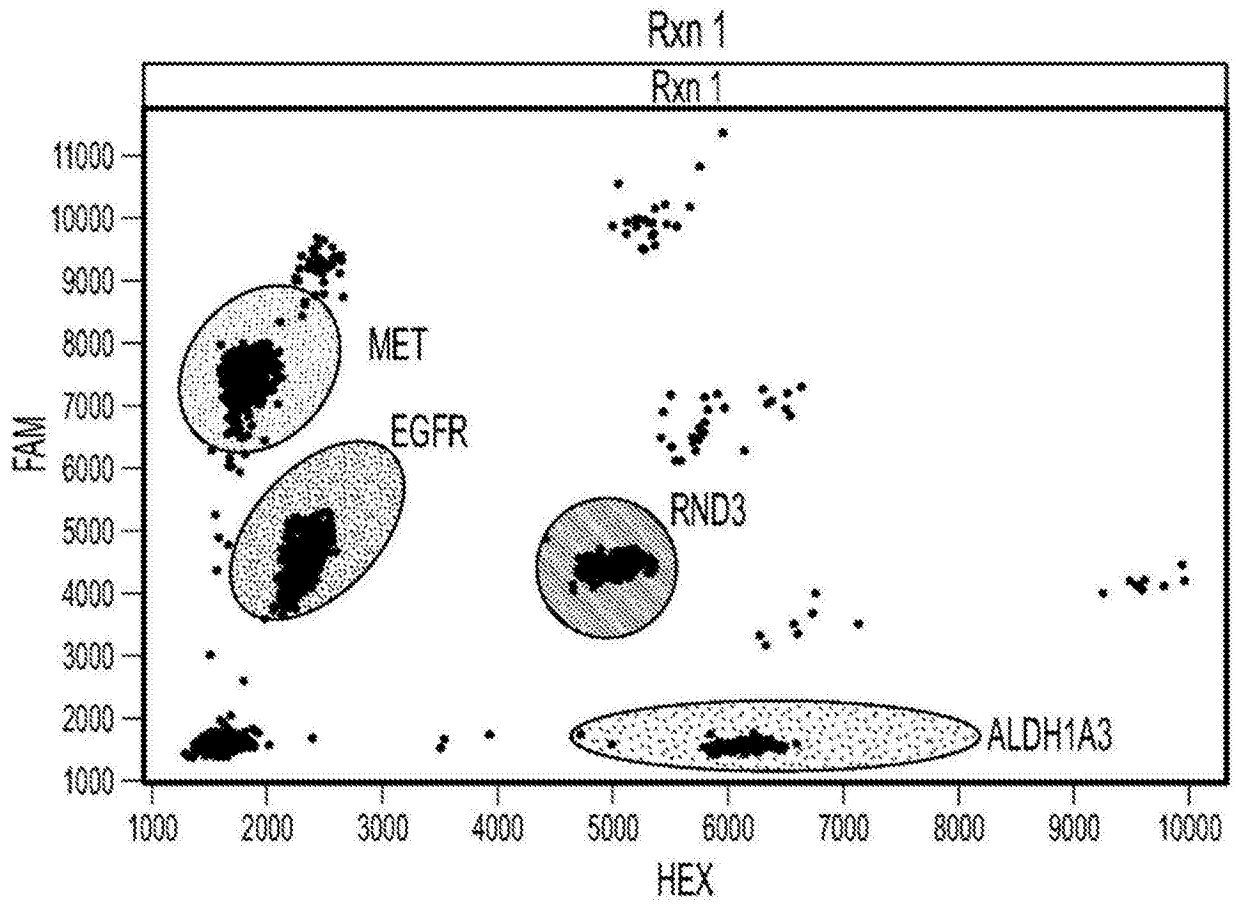


图8B

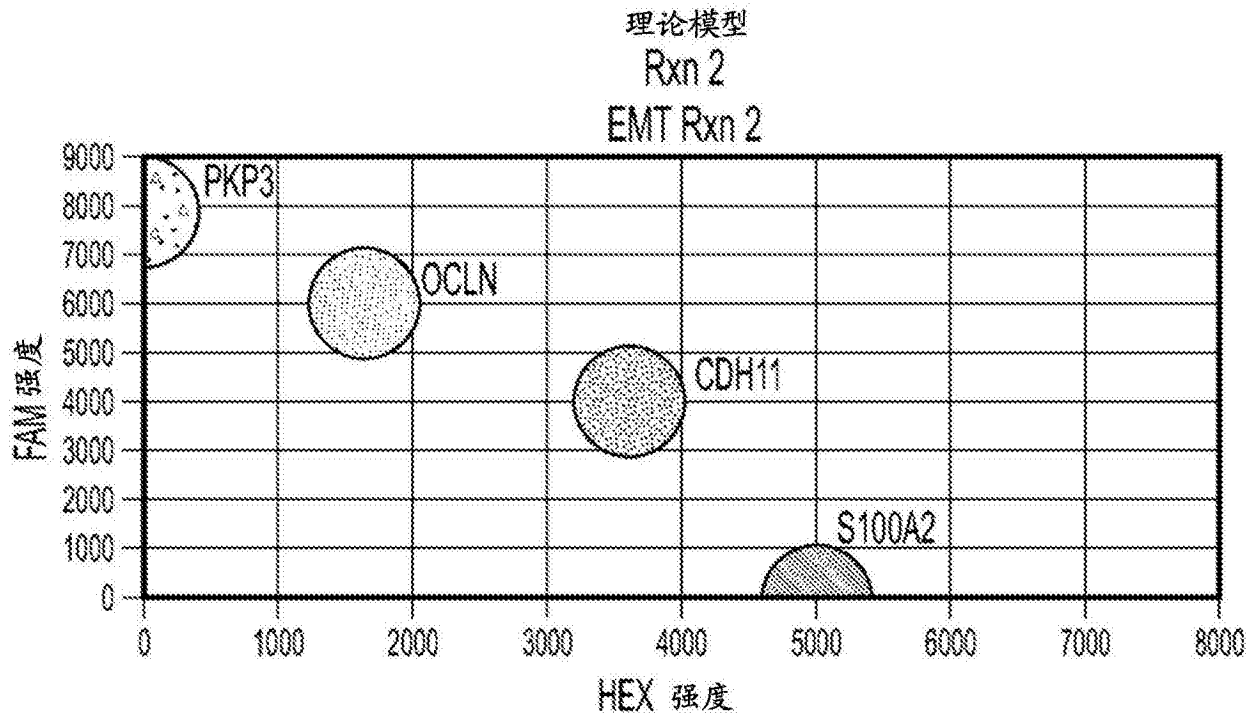


图9A

乳腺癌/肺癌细胞系实验(组合)

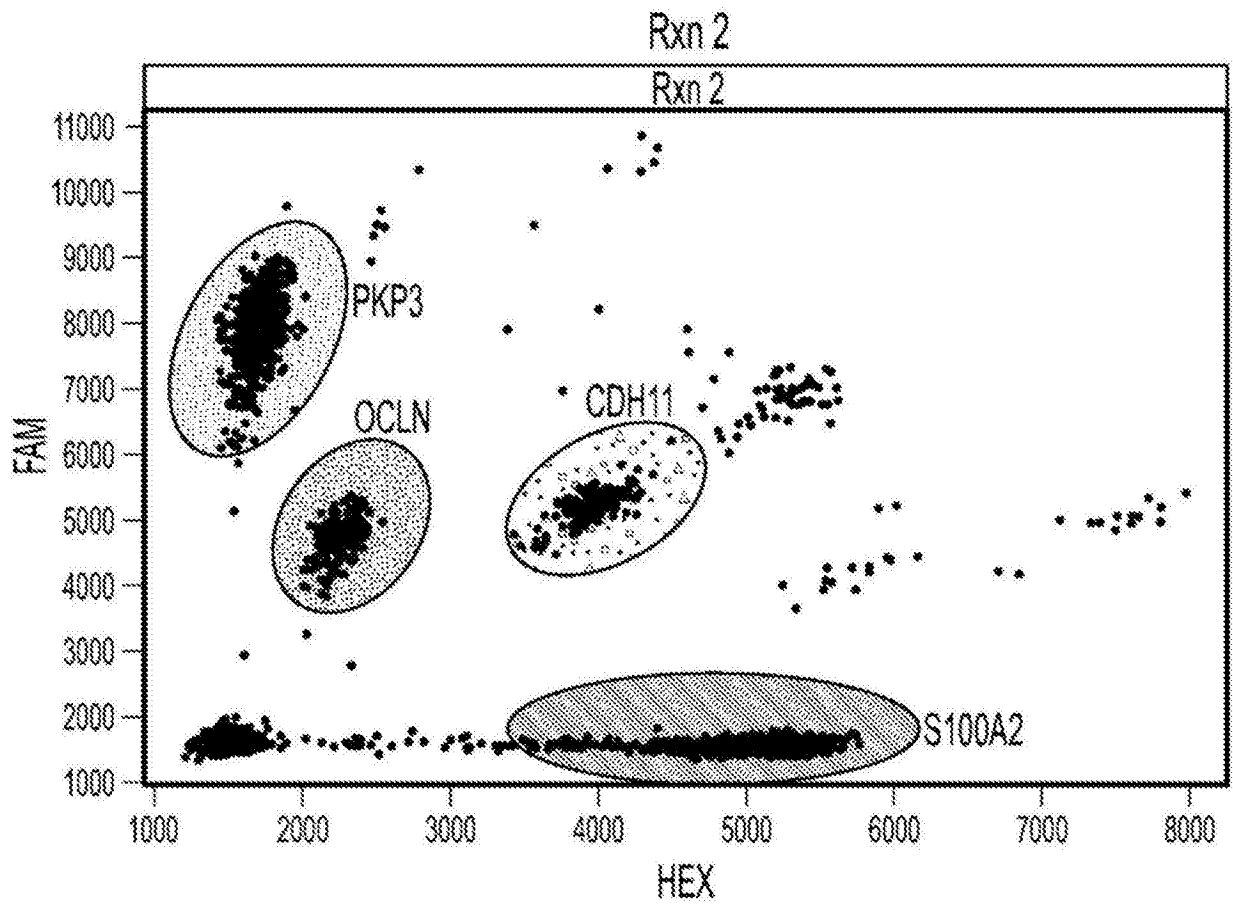


图9B

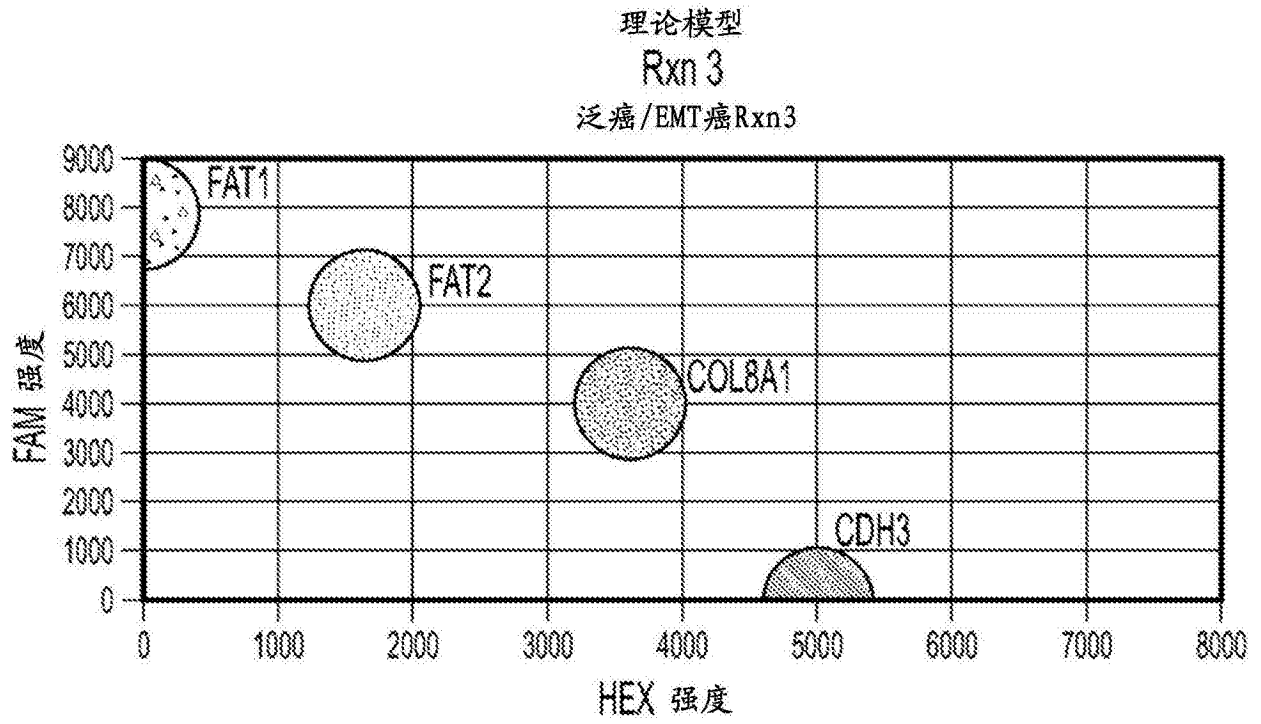


图10A

乳腺癌/肺癌细胞系实验 (组合)

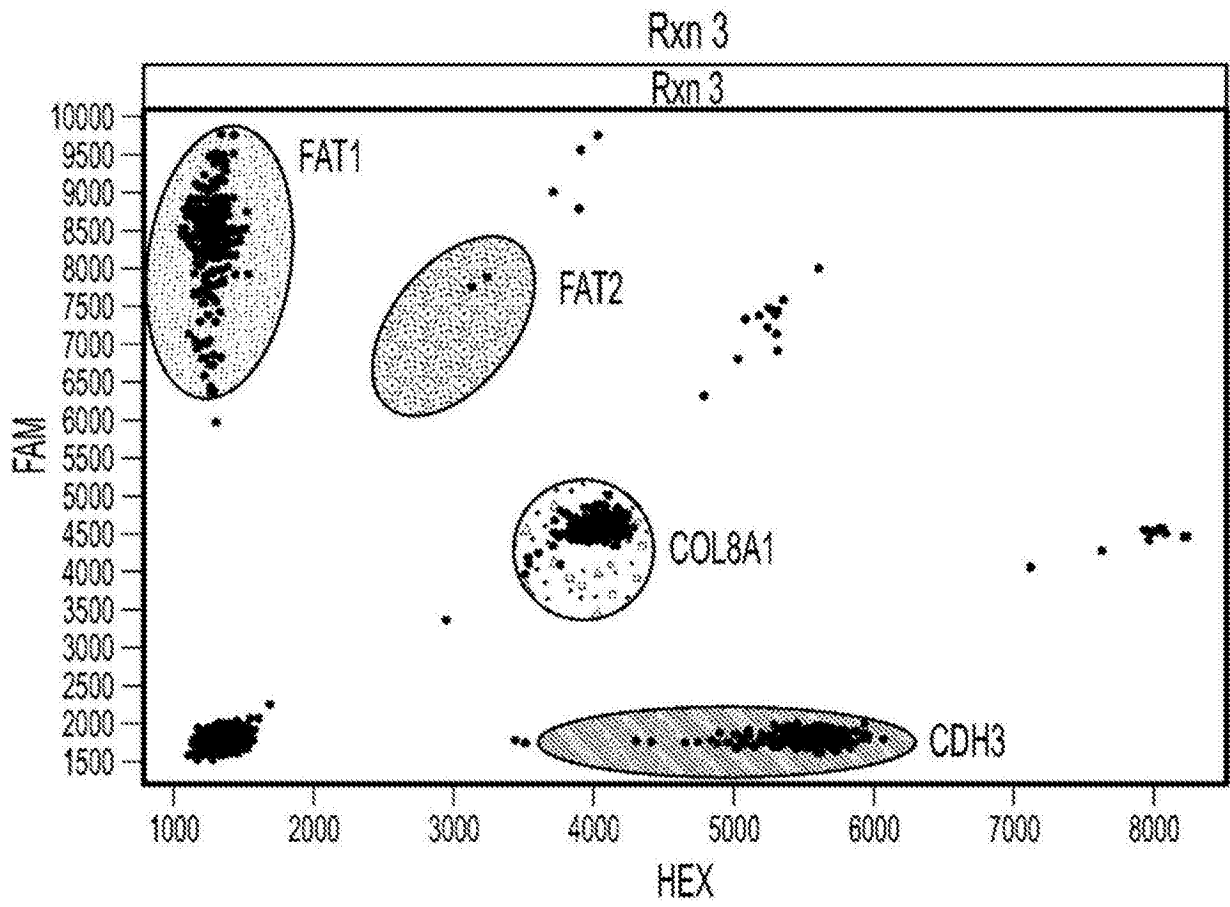


图10B

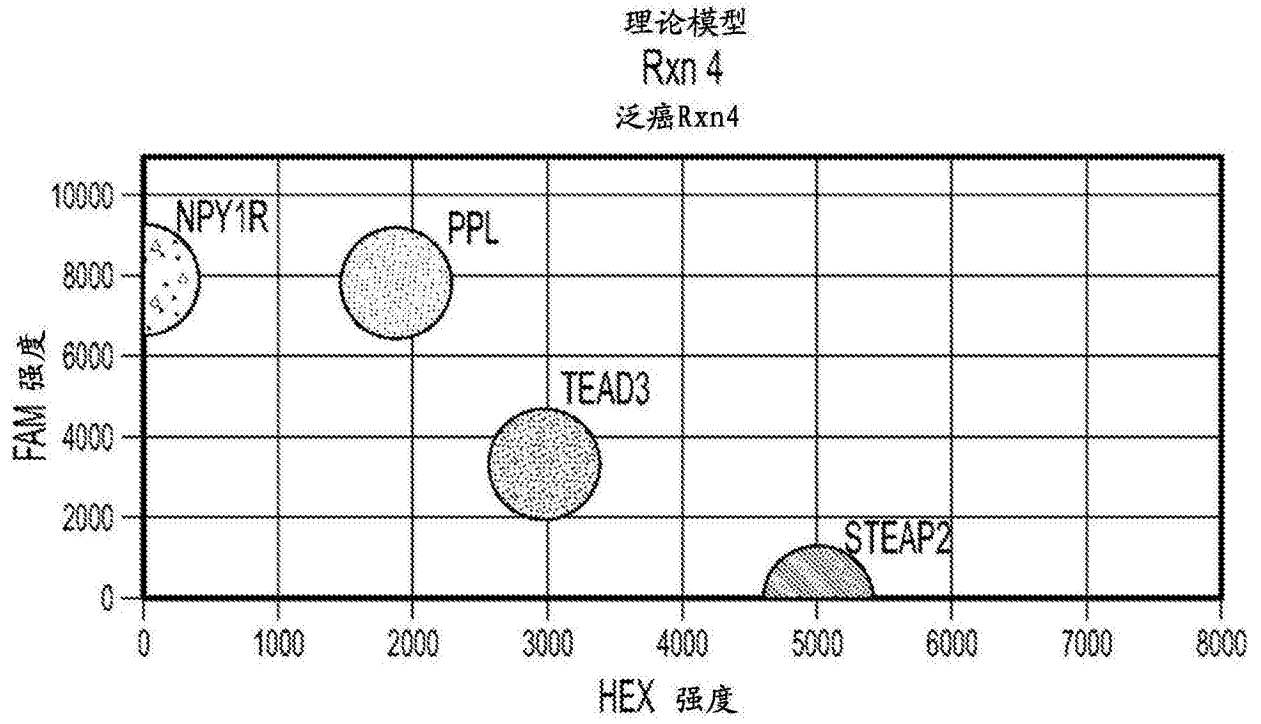


图11A

乳腺癌/肺癌细胞系实验(组合)

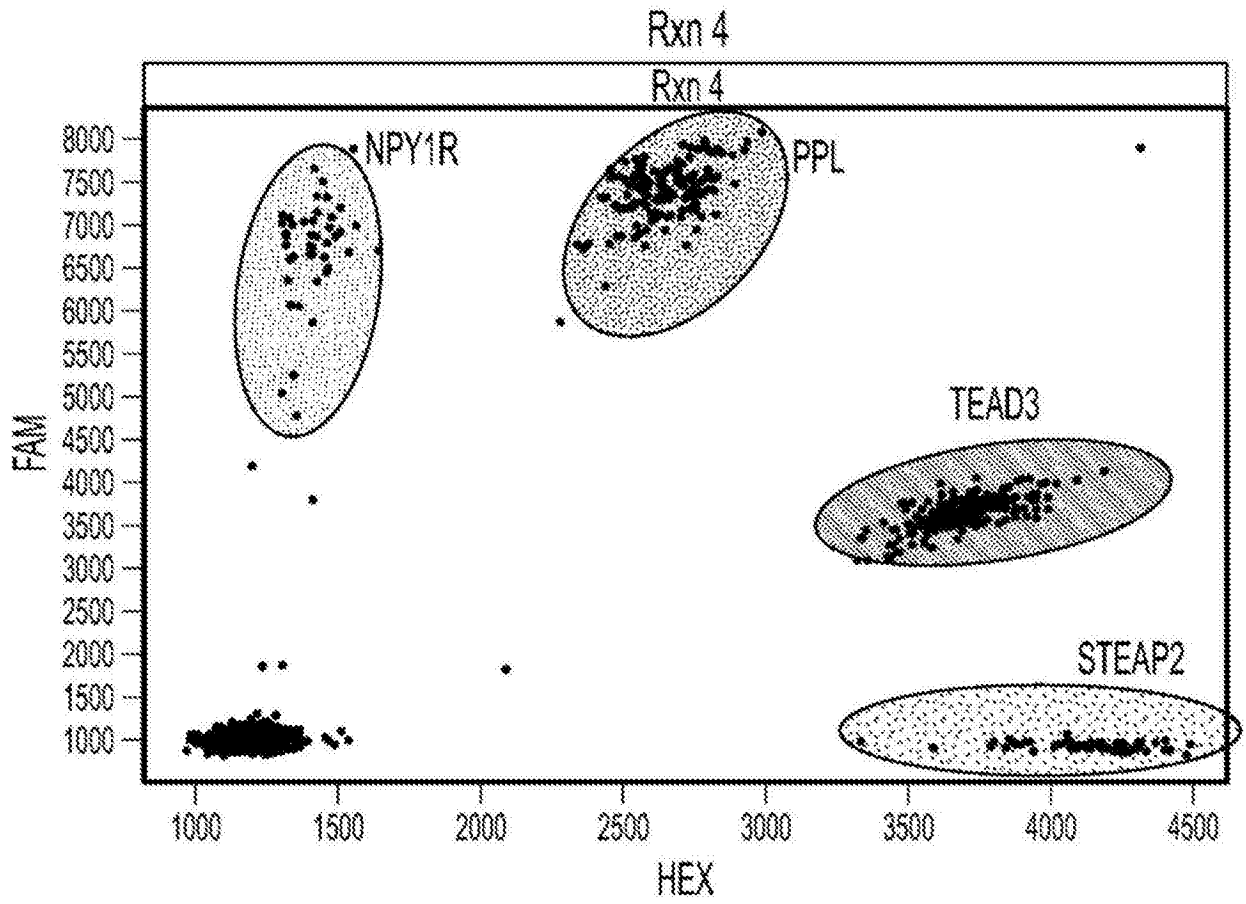


图11B

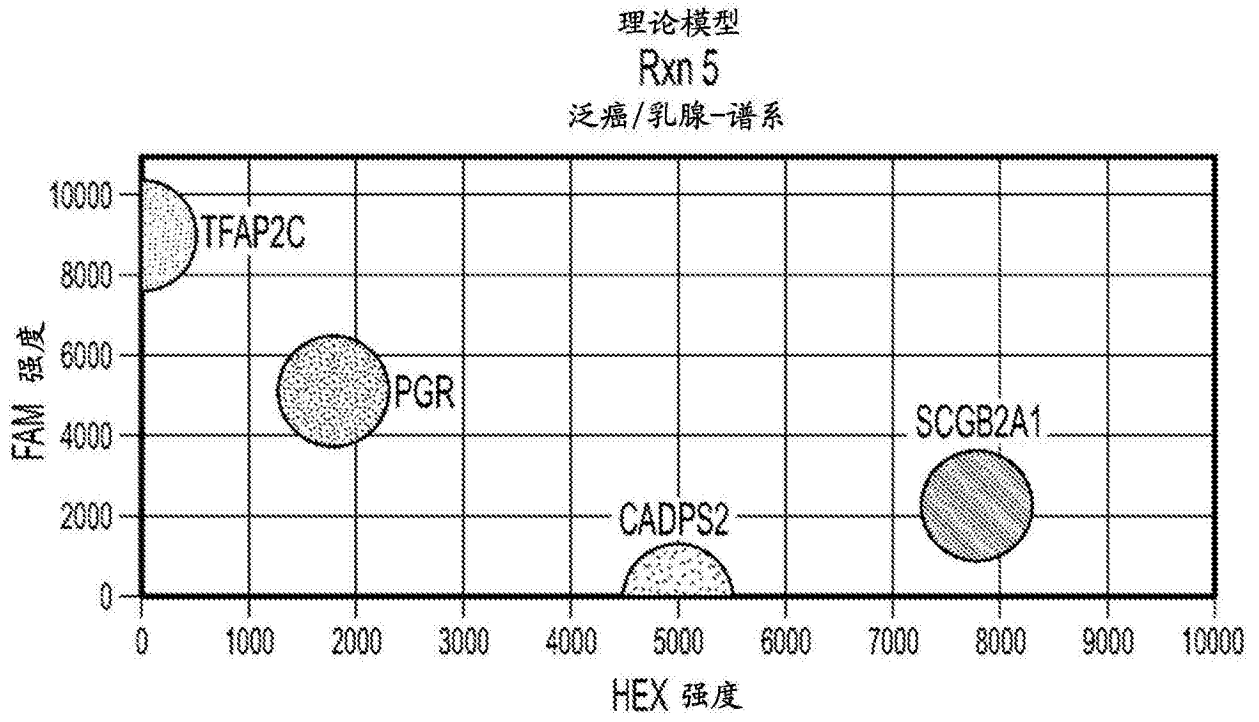


图12A

乳腺癌/肺癌细胞系实验(组合)

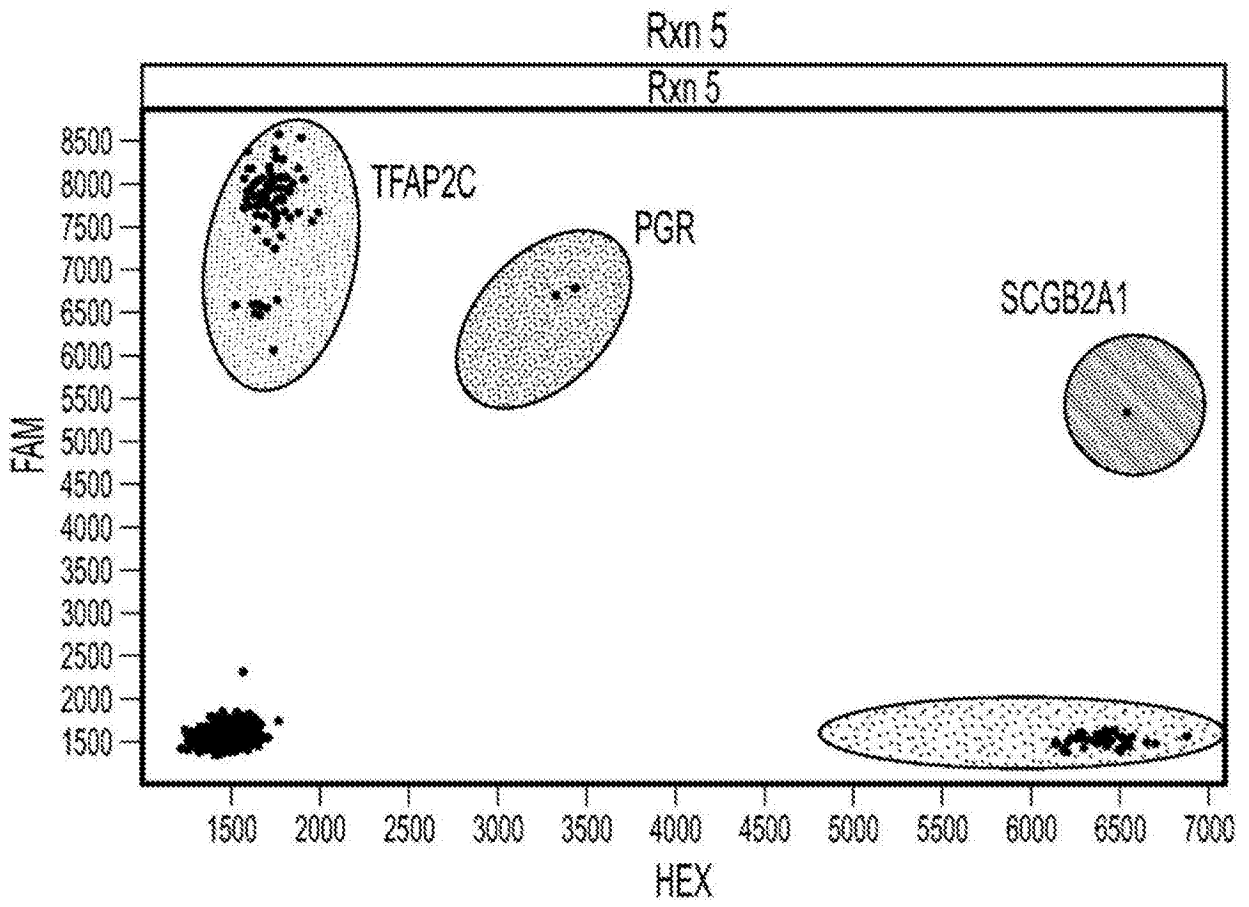


图12B

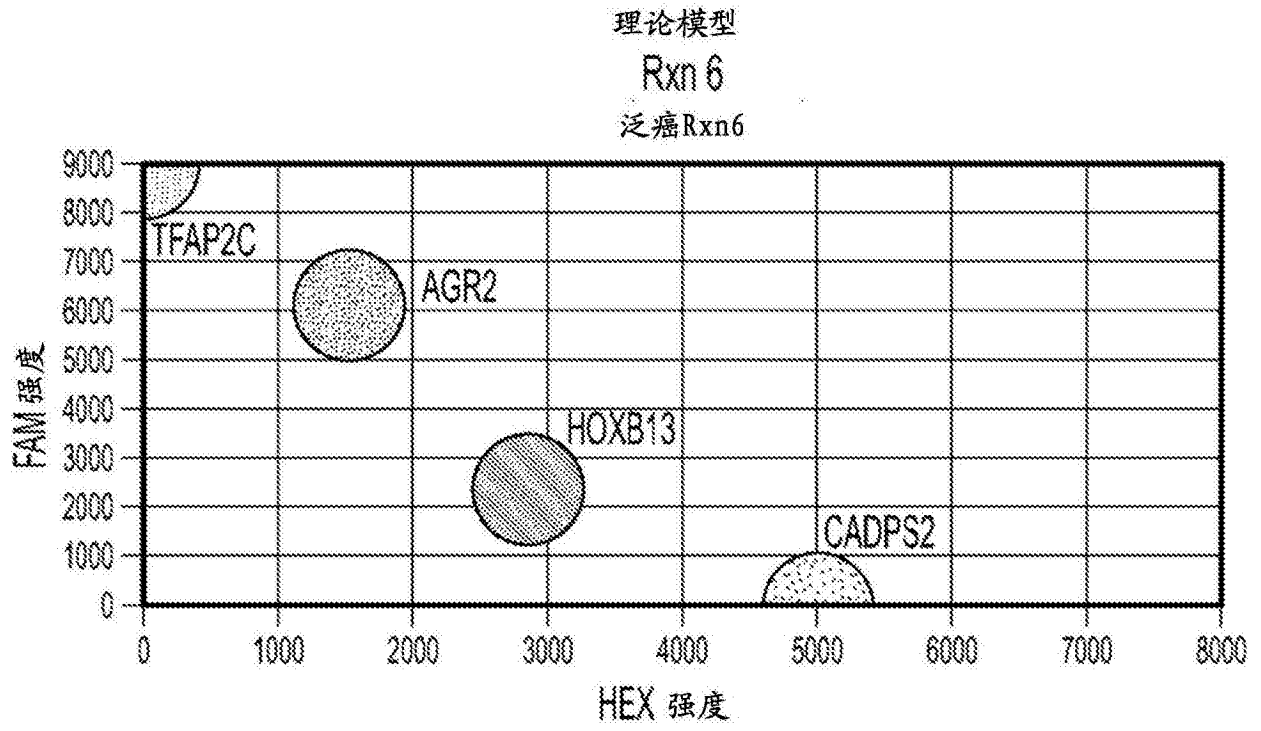


图13A

乳腺癌/肺癌细胞系实验(组合)

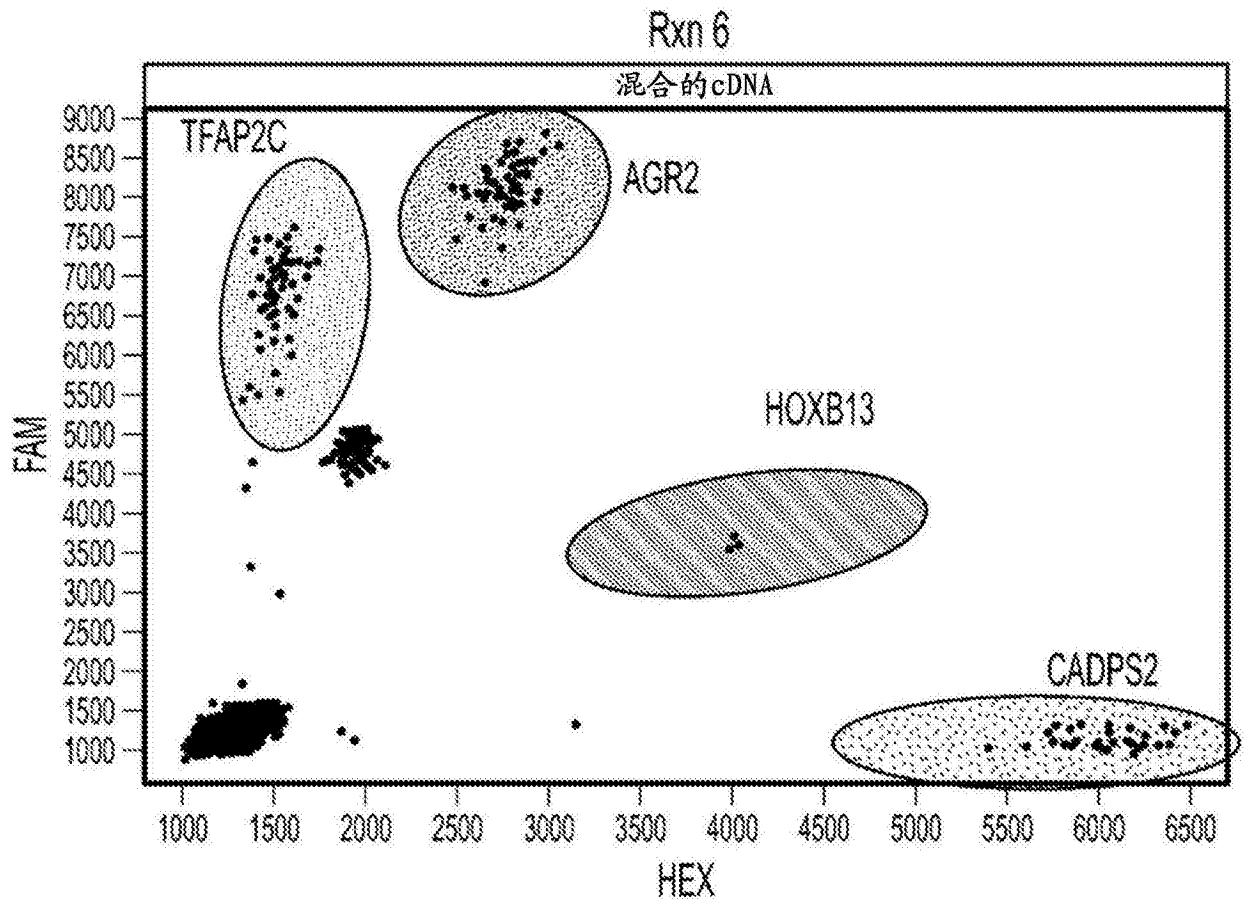


图13B

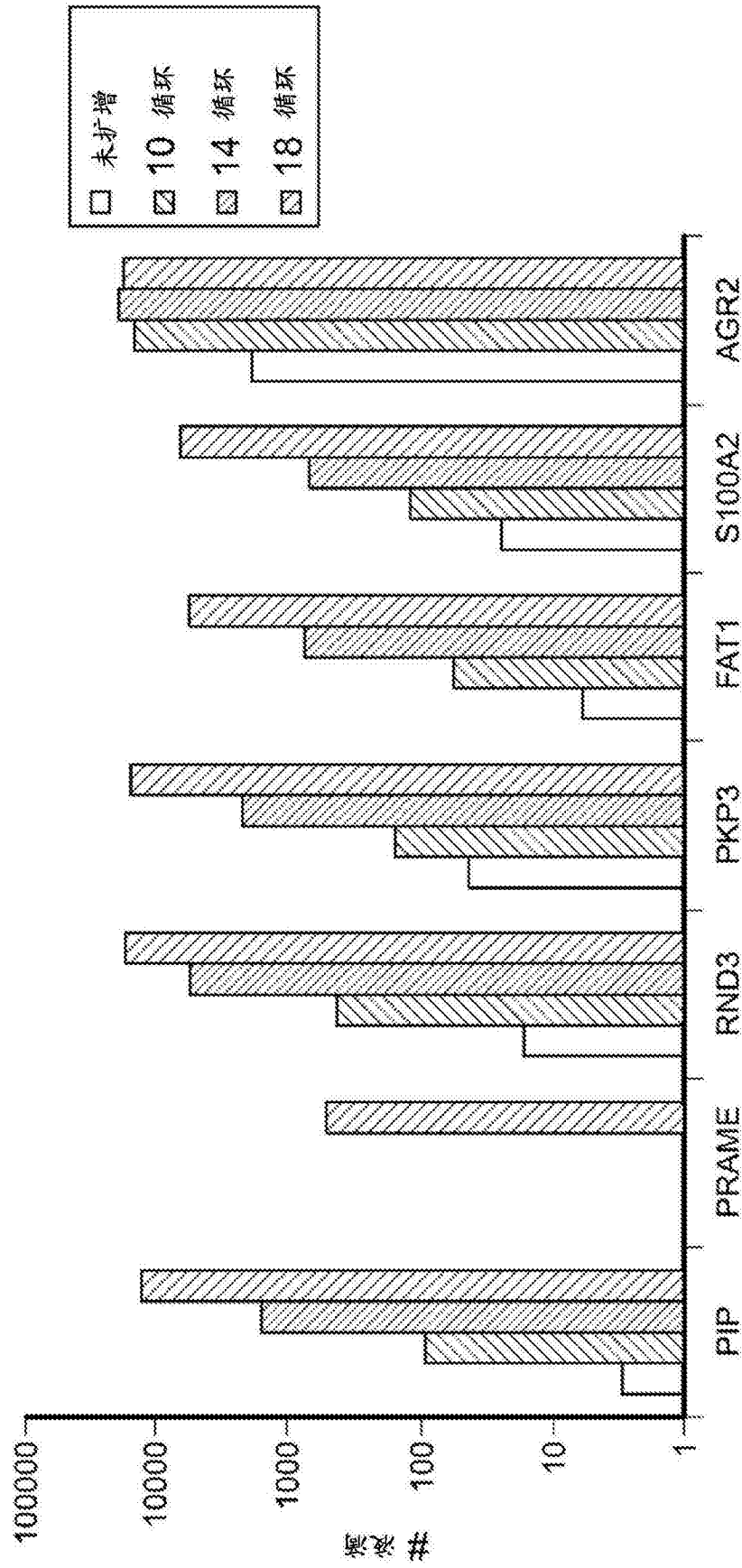


图14

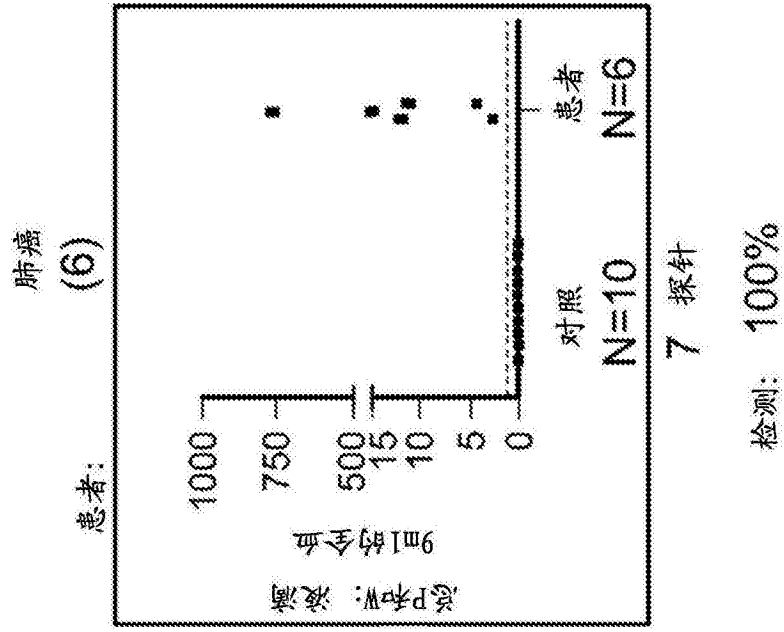


图15A

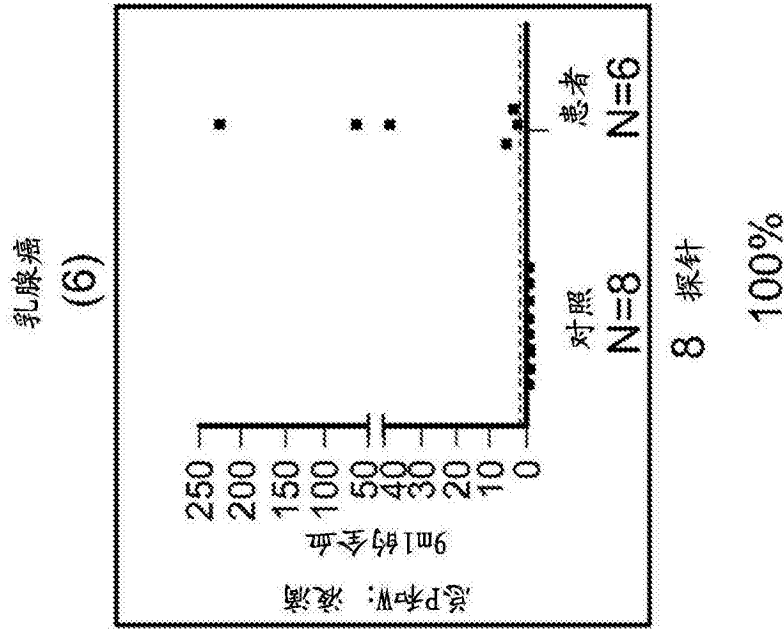


图15B

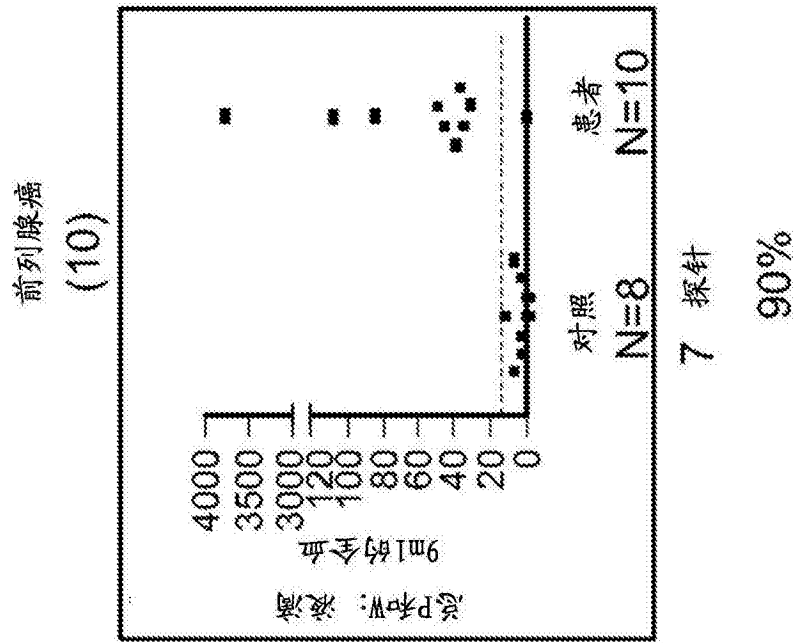


图15C

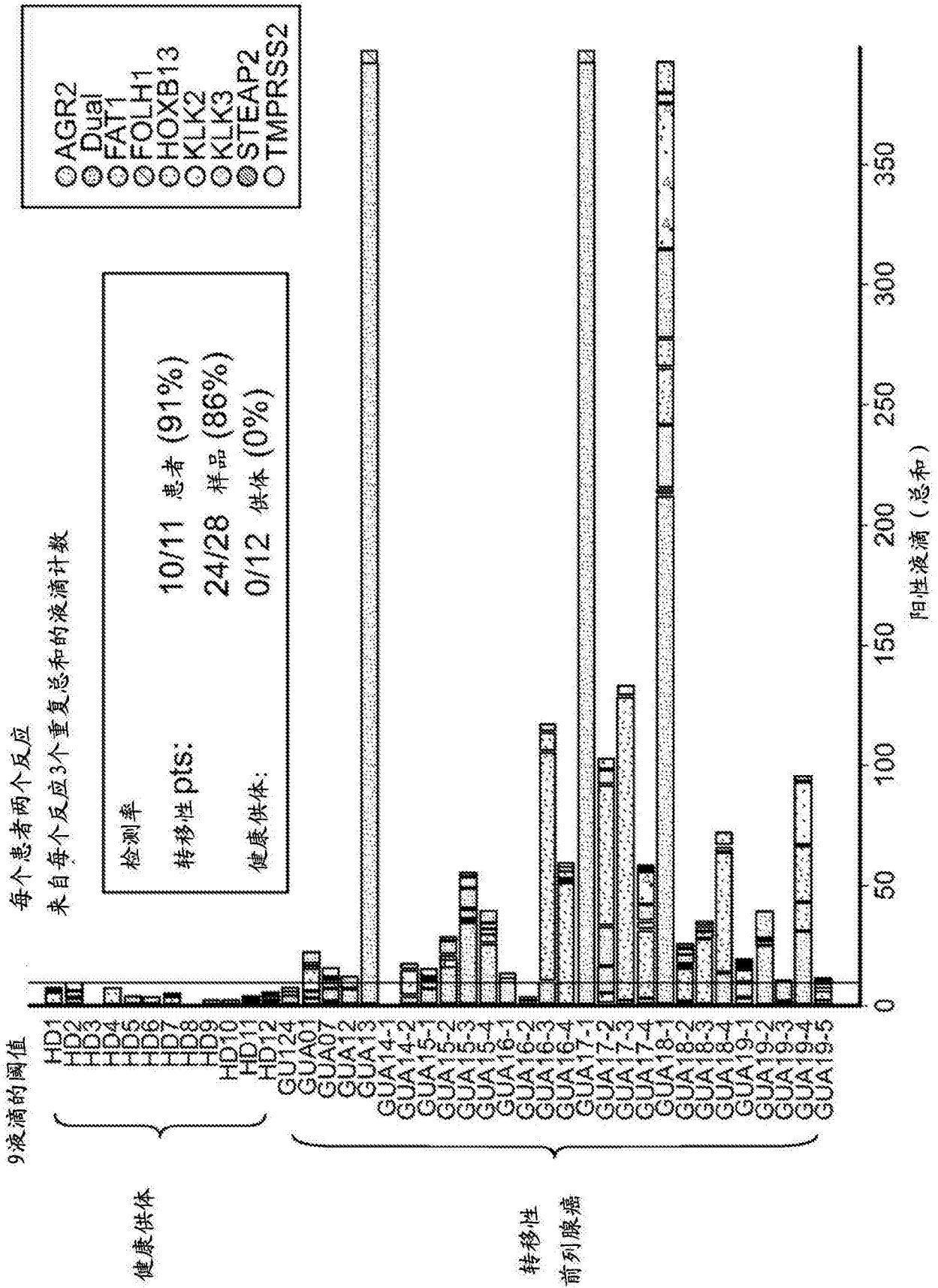
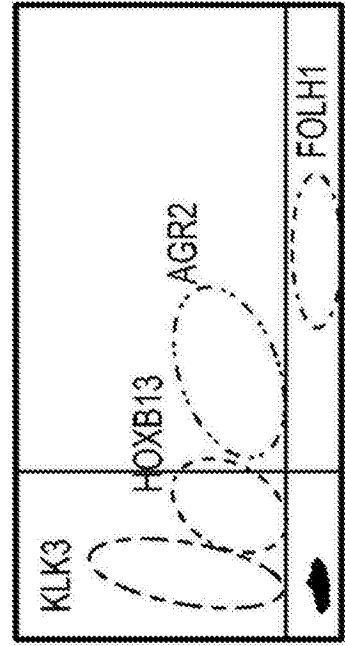
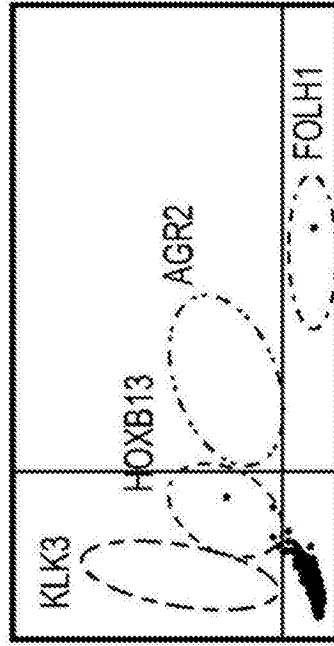
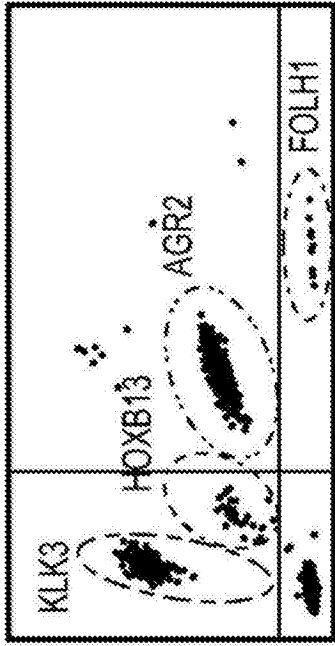
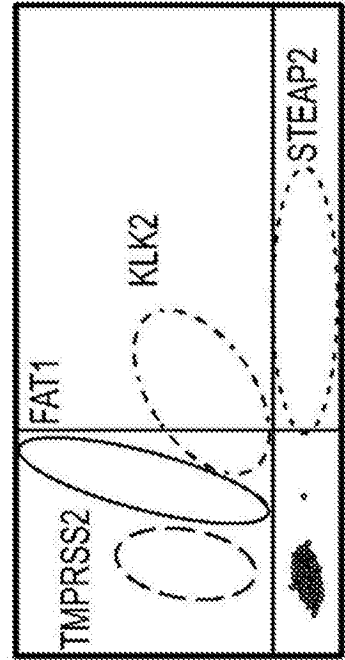
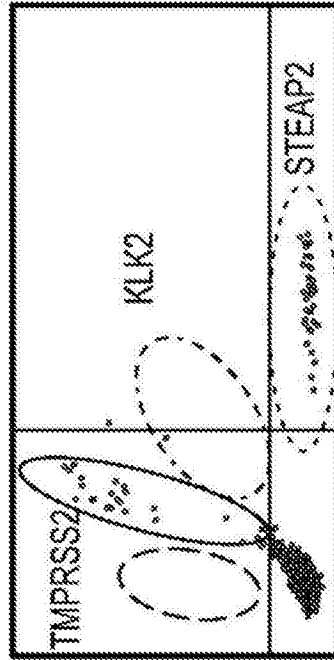
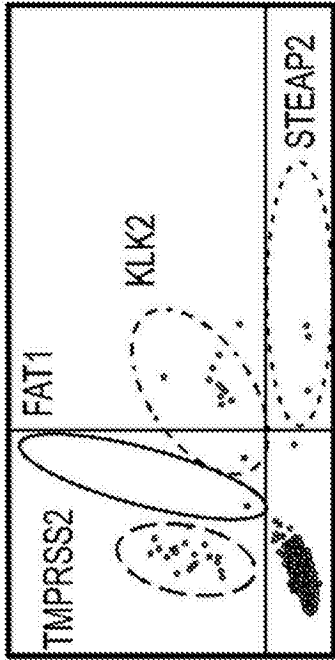


图16

反应 2



反应 1



转移性
患者

局部
患者

健康供体
对照

图17

使用雄激素受体信号标志物来读出药物反应

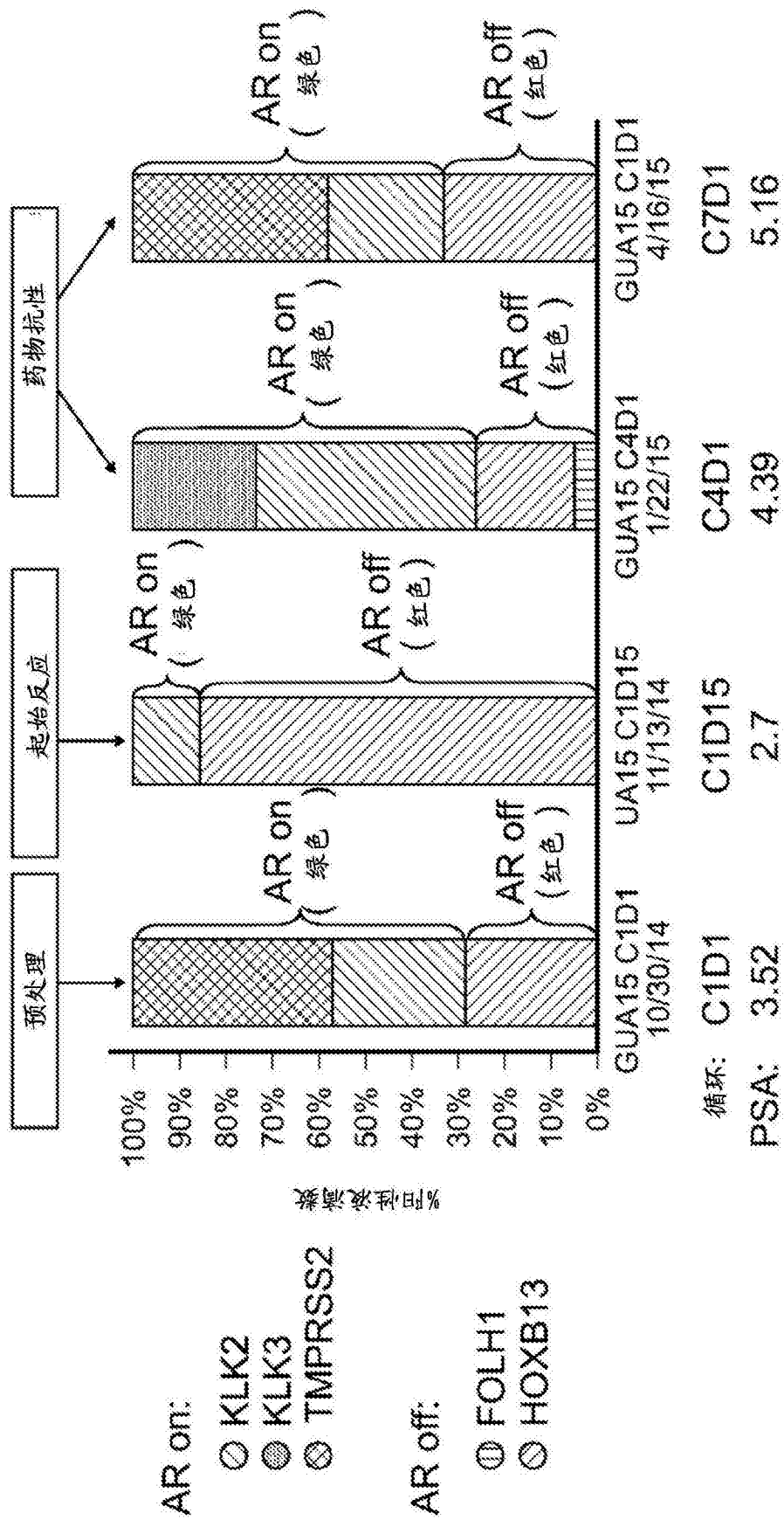


图18

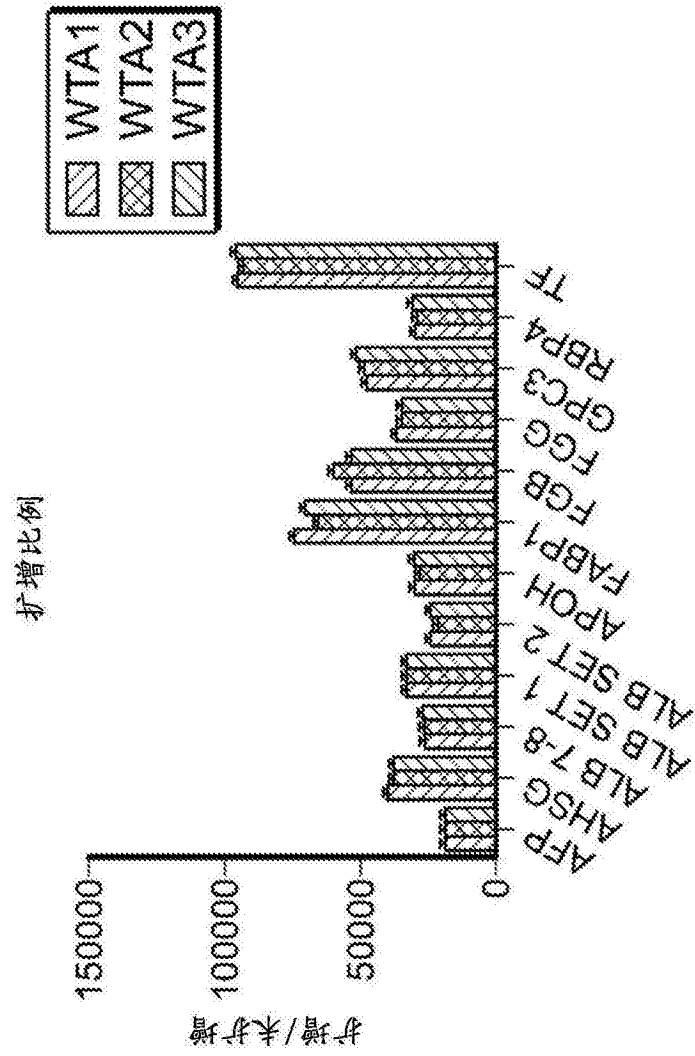


图19A

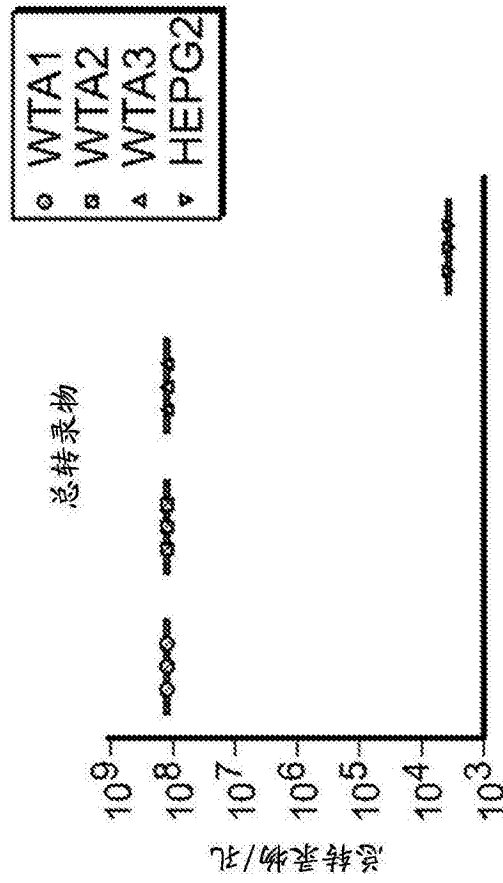


图19B

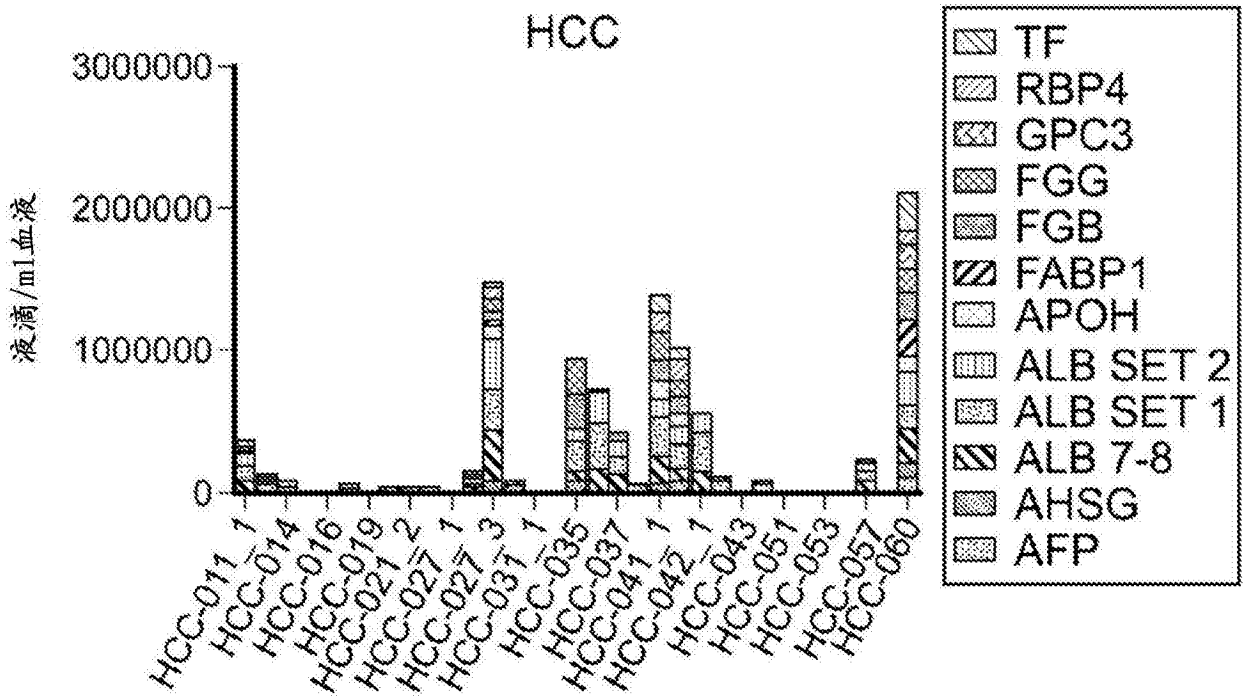


图20A

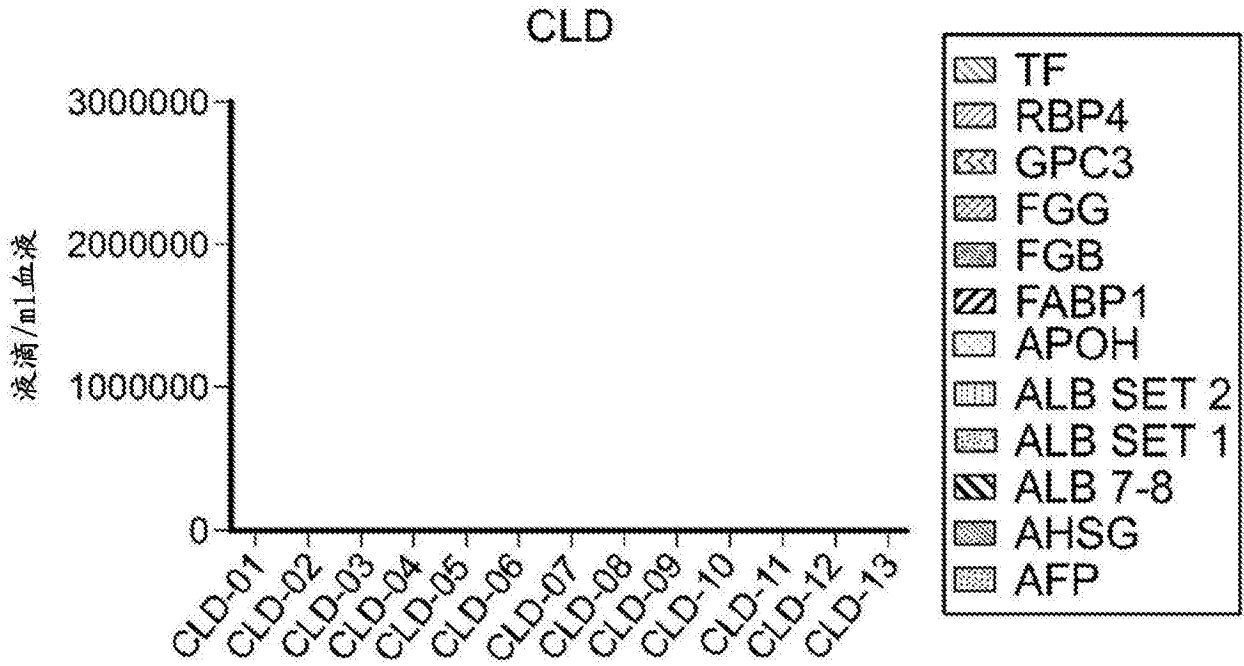


图20B

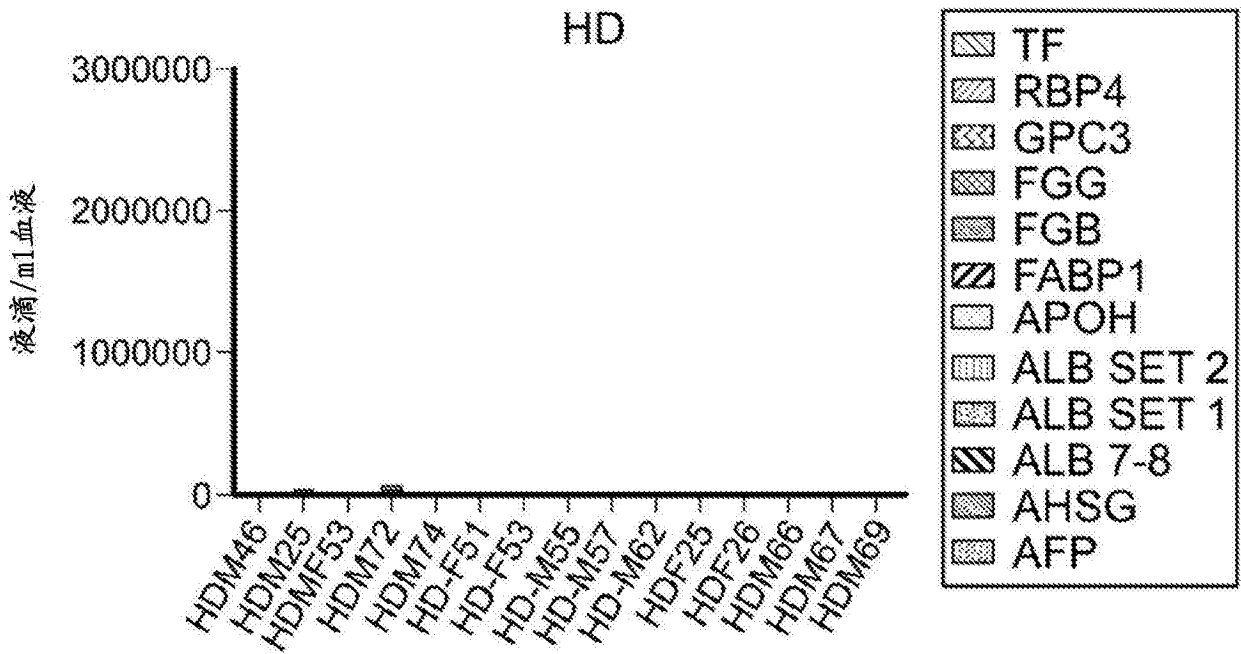


图20C

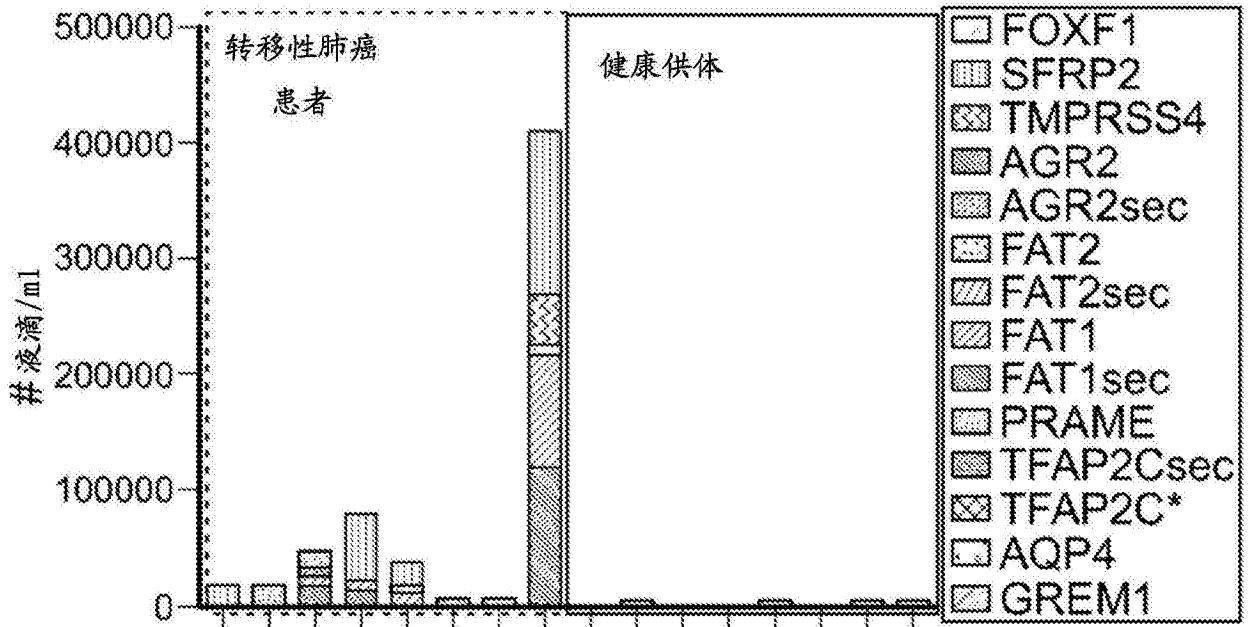


图21A

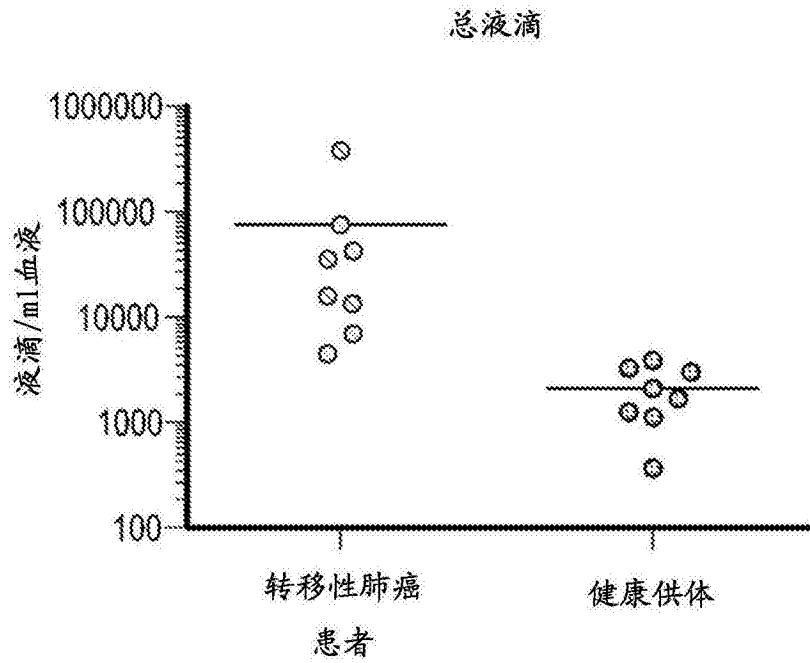


图21B

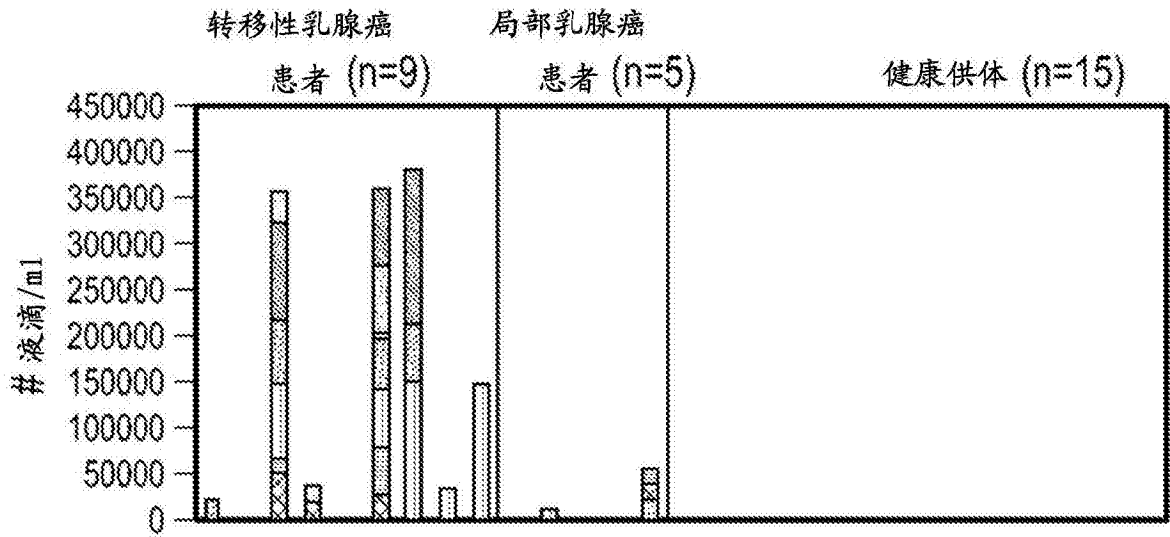


图22

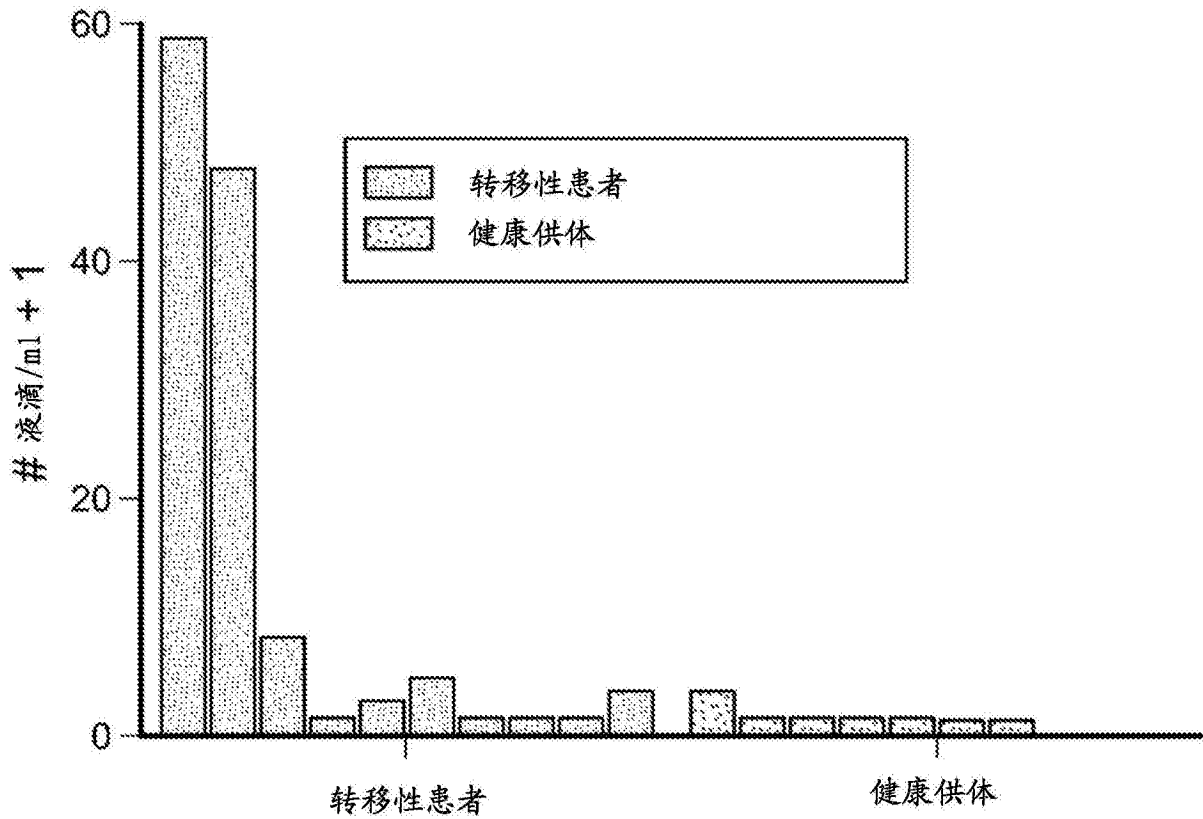


图23A

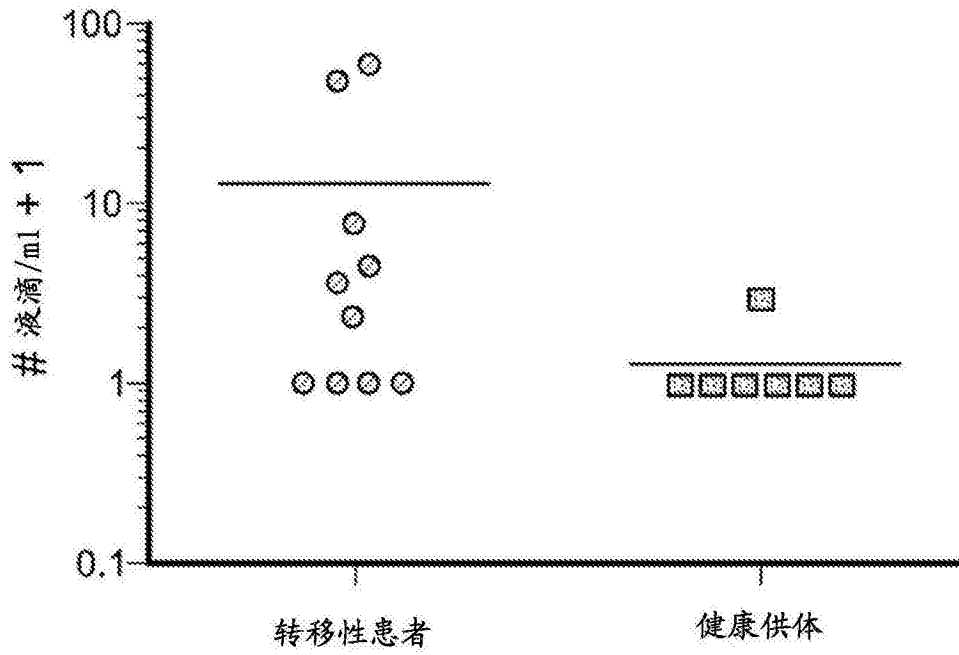


图23B

在背景以上的%样品
在HD中的信号 (1x最高)

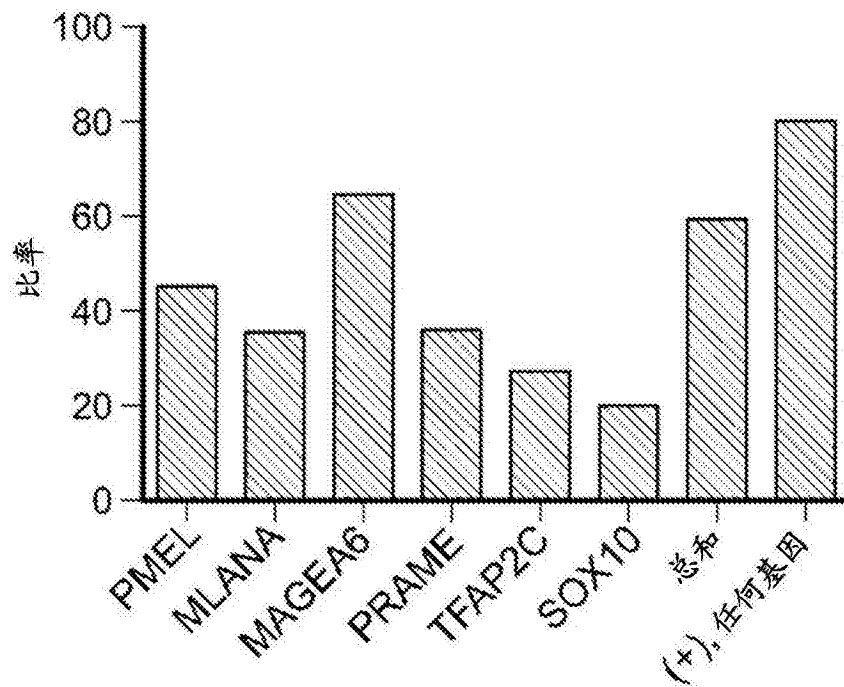


图24A

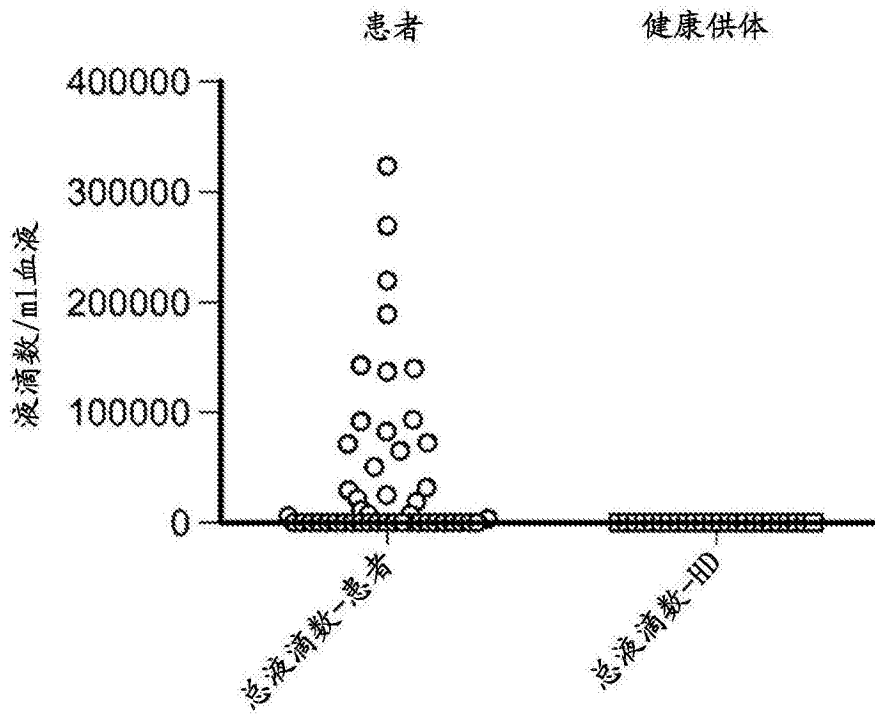


图24B