

(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2019-502384
(P2019-502384A)

(43) 公表日 平成31年1月31日(2019.1.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574	D
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁)

(21) 出願番号 特願2018-535034 (P2018-535034)
 (86) (22) 出願日 平成29年1月5日 (2017.1.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月3日 (2018.9.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/012317
 (87) 国際公開番号 W02017/120324
 (87) 国際公開日 平成29年7月13日 (2017.7.13)
 (31) 優先権主張番号 62/275, 659
 (32) 優先日 平成28年1月6日 (2016.1.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/344, 703
 (32) 優先日 平成28年6月2日 (2016.6.2)
 (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 92
 121 サン ディエゴ スイート 20
 0 ジュディシアル ドライブ 9381
 (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 92
 121 サン ディエゴ スイート 20
 0 ジュディシアル ドライブ 9381

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患の不均一性を特徴づけるための転移性疾患における、循環腫瘍細胞 (CTC) の単一細胞ゲノムプロファイリング

(57) 【要約】

本件開示は、癌患者における疾患の不均一性を検出する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的分析を実施して、循環腫瘍細胞 (CTC) を同定し、かつ計数すること；(b) 該試料から該CTCを単離すること；(c) ゲノムパラメータを個別に特徴づけて、該CTCの各々に対するゲノムプロファイルを作成すること；及び(d) 該プロファイルに基づいて該癌患者における疾患の不均一性を決定すること、を含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、該癌は、前立腺癌である。いくつかの実施態様において、該前立腺癌は、ホルモン不応性である。

【選択図】 図1 A

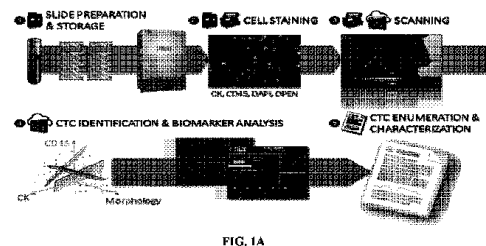


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

癌患者における疾患の不均一性を検出する方法であって、

(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的分析を実施して、循環腫瘍細胞 (CTC) を同定し、かつ計数すること；

(b) 該試料から該CTCを単離すること；

(c) ゲノムパラメータを個別に特徴づけて、該CTCの各々に対するゲノムプロファイルを作成すること；及び

(c) 該プロファイルに基づいて該癌患者における疾患の不均一性を決定すること、を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記癌が、前立腺癌である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記前立腺癌が、ホルモン不応性である、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記有核細胞の免疫蛍光染色が、汎サイトケラチン、表面抗原分類 (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 5】

前記ゲノムパラメータが、コピー数多型 (CNV) シグネチャーを含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項 6】

前記コピー数多型 (CNV) シグネチャーが、遺伝子の増幅又は欠失を含む、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

前記CNVシグネチャーが、アンドロゲン非依存的細胞成長と関連する遺伝子を含む、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

前記欠失が、ホスファターゼ・テンシン・ホモログ遺伝子 (PTEN) の喪失を含む、請求項6記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子の増幅が、AR遺伝子の増幅を含む、請求項6記載の方法。

30

【請求項 10】

前記ゲノムパラメータが、ゲノム不安定性を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

前記ゲノム不安定性が、大規模トランジション (LST) を測定することによって特徴づけられる、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

前記ゲノム不安定性がゲノム変化率 (PGA) を測定することによって特徴づけられる、請求項10記載の方法。

【請求項 13】

不均一性が高いことにより、アンドロゲン受容体標的化療法に抵抗性のある患者が特定される、請求項1記載の方法。

40

【請求項 14】

CTC間の多様性が高いことが、タキサンベースの化学療法への抵抗性と関連しない、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

癌患者において疾患の表現型上の不均一性を検出する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的分析を実施して、循環腫瘍細胞 (CTC) を同定し、かつ計数すること；(b) 各々の前記CTCの複数の形態的特徴及びタンパク質発現特徴の存在を検出して、CTCの亜型を同定すること、並び

50

に(c) 前記CTCの亜型の数に基づいて該癌患者における疾患の表現型上の不均一性を決定すること、を含む前記方法。

【請求項16】

表現型上の不均一性が高いことにより、アンドロゲン受容体標的化療法に抵抗性のある患者が特定される、請求項1記載の方法。

【請求項17】

CTC間の表現型上の不均一性が高いことが、タキサンベースの化学療法への抵抗性と関連しない、請求項1記載の方法。

【請求項18】

大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を特徴とするCTCの亜型を検出することをさらに含む、請求項14記載の方法。

10

【請求項19】

前記CTCの亜型の普及率の検出をさらに含み、ここで前記普及率が、アンドロゲン受容体標的化療法及びタキサンベースの化学療法の両方に対する不良な転帰と関連付けられる、請求項14記載の方法。

【請求項20】

癌患者における循環腫瘍細胞（CTC）の表現型の分析に基づいてLSTスコアを決定する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的分析を実施して、CTCを同定し、かつ計数すること；(b) 各々の前記CTCの複数の形態的特徴及びタンパク質発現特徴の存在を検出して、CTCの亜型を同定すること、並びに(c) 1以上のCTCの亜型の頻度に基づいて該癌患者のLSTスコアを決定すること、を含む前記方法。

20

【請求項21】

前記癌が、前立腺癌である、請求項20記載の方法。

【請求項22】

前記前立腺癌が、ホルモン不応性である、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記有核細胞の免疫蛍光染色が、汎サイトケラチン、表面抗原分類（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20記載の方法。

【請求項24】

前記特徴が、表1に記載されている特徴から選択される、請求項20記載の方法。

30

【請求項25】

前記特徴が、核/細胞質比、核及び細胞質の真円度、核エントロピー、CKの発現、及びARの発現から選択される、請求項20記載の方法。

【請求項26】

前記特徴が、核面積、核凸面面積、核斑、核長軸、細胞質面積、細胞質凸面面積、細胞質短軸、ホルモン受容体発現、及び細胞質長軸から選択される、請求項20記載の方法。

【請求項27】

前記ホルモン受容体がアンドロゲン受容体（AR）である、請求項26記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本件出願は、2016年6月2日に出願された米国仮出願第62/344,703号及び2016年1月6日に出願された米国仮出願第62/275,659の利益を主張するものであり、これらの各々の全内容は、引用により本明細書中に組み込まれている。

【0002】

本発明は一般に、癌診断の分野、及びより具体的には、疾患の不均一性を特徴づけるための循環腫瘍細胞（CTC）の単一細胞ゲノムプロファイリングについての方法に関する。

【背景技術】

【0003】

50

(背景)

連続的な癌治療の後、癌細胞の複数の亜集団が生じ、これらはそれぞれ薬物への抵抗性又は感受性を付与し得る異なる遺伝的異常を備える。組織生検ではこれらの亜集団を検出することができないが、血液の液体生検は、これらの重要な腫瘍細胞を同定し、患者の腫瘍がどのように経時的に発展してきたかを特徴づける一助とすることができる。単一細胞ゲノムプロファイリングは、癌の発展及び多様性を研究し、並びに腫瘍の発達における希少細胞の役割を理解するための、強力な新たなツールである。クローンの多様性は、浸潤、転移、及び治療への抵抗性の発展において重要な役割を果たすように運命づけられる。

【0004】

前立腺癌は、米国(US)において最もよく診断される固形臓器悪性腫瘍であり、依然として米国人男性の間の癌による死亡の2番目の原因となっている。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治療をまさに未だ満たされていない医療的要望としている(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と特定される死亡が予想され、これは男性の最も可能性のある2862の死因となる(maybe 2862st likely to die from)3種の癌の一つであり、死亡率は9.5%である。

【0005】

化学的又は外科的去勢を使用する前立腺癌のホルモン療法の成功は証明されているものの、大部分の患者はやがて転移性の疾患段階へと進行することとなり、さらなるホルモン処置に対する抵抗性を示す。これを、転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)と呼ぶ。しかしながら、この呼称にもかかわらず、去勢レベルのアンドロゲンに直面した場合さえも、アンドロゲン受容体(AR)仲介性シグナル伝達及び遺伝子発現が、mCRPCにおいて持続され得ることの証拠が存在する。このことは部分的に、アンドロゲン合成に關与する酵素の上方調節、ARの過剰発現、又は様々なステロイド性リガンドの無差別的認識を有する変異型ARの出現に起因し得る。アンドロゲン受容体(AR)遺伝子の増幅は、mCRPCの20~30%に認められ、ホルモン除去療法の結果として発達し、治療の失敗の最も重要な原因となることが提唱されている。mCRPCを有する患者の治療は、依然として重大な臨床的課題である。研究によりさらに、PI3K-AKT-mTOR及びアンドロゲン受容体(AR)シグナル伝達軸の間の直接的関係が明らかにされ、その結果ホルモン抵抗性の発達の際のこれらの経路間の動的相互作用が明らかにされた。PTENはヒト前立腺癌において最もよく欠失され/変異が入る腫瘍抑制遺伝子の1つである。脂質ホスファターゼ及びPI3K/AKT/mTOR経路の負の調節因子として、PTENは生存、成長、増殖、代謝、遊走、及び細胞構造を含む、いくつかの細胞プロセスを制御する。PTENの喪失を、前立腺癌の診断的及び予後的バイオマーカーとして使用し、並びに出現するPI3K/AKT/mTOR阻害剤への患者の反応を予測することができる。

【0006】

2004年よりも前、mCRPCを有する男性の生存を向上することが証明された治療は存在しなかった。ミトキサントロンと、プレドニゾン又はヒドロコルチゾンとによる患者の治療は、疼痛を軽減し、かつ生活の質を向上することのみを目的としていたが、全生存期間(OS)の観点からの利点は存在しなかった。2004年に、2つの主要な第3相臨床試験、TAX 327及びSWOG(米国南西部癌臨床試験グループ(Southwest Oncology Group))9916の結果により、mCRPCを有する患者の第1化学療法選択肢として、Taxotere(登録商標)(ドセタキセル)が確立された。アンドロゲン受容体(AR)標的化療法、化学療法、併用療法、及び免疫療法と共に行う追加のホルモン治療がmCRPCについて研究されており、近年の結果により、この難治療性患者群における追加の選択肢が提供された。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飛躍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わせに関する問題が生じてきている。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

10

20

30

40

50

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、パフォーマンスステータス、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一助となる (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、承認されている治療は、Taxotere (登録商標) (ドセタキセル) 及びJevtana (登録商標) (カバジタキセル) などのタキサンクラスの細胞傷害性薬剤、並びにZytiga (登録商標) (アンドロゲン生産を遮断する、アルビテロン (arbiteron)) 又はXtandi (登録商標) (アンドロゲン受容体 (AR) 阻害剤である、エンザルタミド) などの抗アンドロゲンホルモン療法薬からなる。

【0007】

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治療法を施す最良の順番を決定することである。順番に使用する場合、アピラテロン酢酸エステル後のエンザルタミド、又はエンザルタミド後のアピラテロン酢酸エステルへの反応は、比較的低頻度であり、持続期間がより短い。タキサンベースの化学療法が第2の抗アンドロゲンホルモン療法よりも有益であるかどうかは、重要な問いかけである。しかし治療法の失敗は、各薬剤からの交差抵抗性を考慮した、患者間の治療に対する不均一な反応に基づく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、標的化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。

【0008】

ポリADP-リボースポリメラーゼ (PARP) 阻害剤 (PARPi) は、生殖系列BRCAの変異を有するmCRPC、乳癌、卵巣癌、及び他の癌患者において、並びにより最近には、体細胞での相同組換え (HR) DNA修復経路の変異による不活性化を有する患者において、有効であることが実証されている (Mateoらの文献、NEJM, 2015;373(18):1697-708; Robinsonらの文献、Cell, 2015;161(5):1215-28; Balmanaらの文献、Ann Oncol. 2014, 25:1656-63; Del Conteらの文献、Br J Cancer, 2014,111:651-9)。HRの欠陥 (HRD) を検出する最新の方法では、HRDの徴候である不活性化をもたらす変異又はゲノムの傷跡 (LSTs, NtAI、又はLOH) を検出するために、直前に得た、又は保管された腫瘍生検からゲノム分析を行うことが要求される (Abkevichらの文献、Br J Cancer, 2012 Nov 6, 107(10):1776-82)。HRDのゲノムバイオマーカーは、患者集団の10~20%に認められる (Marquardらの文献、Biomark Res. 2015 May 1, 3:9)。

【0009】

また、最近HRD遺伝子型と白金薬への感受性との関係を明らかにする重要な進歩がなされた。あるレトロスペクティブな分析ではPrECOG 0105からの試料がプールされ、シスプラチン-1及びシスプラチン-2の臨床試験により、Myriad HRDスコアがトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) において、ネオアジュバント白金薬への完全な病理的反応と強く関連付けられることが明らかとなった (Telliらの文献、「臨床癌研究：米国癌研究学会公式機関誌、2016年 (Clinical cancer research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. 2016))。アジュバント (Volleberghらの文献、Breast Cancer Res. 2014, 16(3):R47) 及び転移性 (Isakoffらの文献、J. Clinical Oncol., 2015, 33(17):1902-9) 背景にあっては、HRDはTNBC及びホルモン受容体陽性乳癌におけるその他のコホートと比較して、白金薬に対する良好な転帰と強く関連付けられることが明らかにされた。

【0010】

固形腫瘍生検のHRDの測定は、生検材料への到達不可能性/利用不可能性 (すなわち、骨転移) 及び保管された原発性腫瘍試料の直前に採取された生検に対する相関が乏しいことが原因で、扱いが難しい場合がある (Punnooseらの文献、Br J Cancer. 2015 Oct 20;113(8):1225-33)。保管された生検と直前に採取した生検との間の低い一致は、一般に過去

10

20

30

40

50

の治療的介入に反応する時間的クローン進化が空間的不均一性をもたらすことからくる、及び最終的にポリクローン性疾患の試料採取の下での高度の腫瘍内及び細胞間不均一性に帰する。

【0011】

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, 2004, 351:781-91)。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。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の情報を利用するために、それらの検出、単離、及び特徴づけに関する様々な技術が近年出現している。CTCは治療中にリアルタイムで癌の増悪を評価する非侵襲的な手段を提供し、さらに、治療に反応して生じる表現型上の、生理的な、及び遺伝的变化をモニタリングすることによる、直接的治療の一助となる潜在性を有する。大部分の進行した前立腺癌患者において、原発性腫瘍が摘出され、CTCは転移部位から放出される細胞からなると期待され、「液体生検」を提供する。CTCは従来CD45⁺、かつ形態的に識別可能なEpCAM/サイトケラチン陽性(CK⁺)細胞として定義されているが、近年の証拠から、EpCAM/サイトケラチン陰性(CK⁻)の細胞、又は従来型CTCよりもサイズの小さい細胞を含む、CTCの候補となる他の集団が存在することが示唆されている。CTC集団の不均一性に関するこれらの知見より、富化を伴わないCTCのプラットフォームが、重要なCTC亜集団を取りこぼす傾向のある、CTCをサイズ、密度、又はEpCAM陽性に基づいて単離するポジティブ選択技術よりも有利であることが示唆される。

10

20

【0012】

CRPCはこの進行した形態の前立腺癌に罹患した患者及びこれらの患者を管理する臨床医の両方にとって深刻な問題を提示する。臨床医は適切な個別治療を導く努力において総合的診断の提供及び疾患増悪を引き起こす機構の評価に直面することが多い。適切な治療及び予後マーカーを同定することにより、標的化療法の潜在的な臨床上の利益は増し、臨床医がより十分にCRPCを管理することが可能となり、患者の生活の質が向上し、臨床転帰が強化される。細胞表現型と合わせてサブクローン性CNV駆動因子の変化の頻度及び個別のCTCにおけるゲノム不安定性を理解して不均一な疾患のより正確な観察を可能とし、治療への反応を予測し、かつ抵抗性の新規機構を特定することの必要性が存在する。治療法を選択する決断が必要となるたびに、個別の患者において評価することができる、抗アンドロゲンホルモン療法及びタキサンベースの化学療法に対する感受性の予測的バイオマーカーが、必要とされている。本発明は、この必要性に対処し、関係する利点を提供する。

30

【発明の概要】

【0013】

(発明の概要)

本発明では、癌患者において疾患の不均一性を検出する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的分析を実施して、循環腫瘍細胞(CTC)を同定し、かつ計数すること；(b) 該試料から該CTCを単離すること；(c) ゲノムパラメータを個別に特徴づけて、該CTCの各々に対するゲノムプロファイルを作成すること；及び(c) 該プロファイルに基づいて該癌患者における疾患の不均一性を決定すること、を含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、該癌は、前立腺癌である。いくつかの実施態様において、該前立腺癌は、ホルモン不応性である。

40

【0014】

本発明では、癌患者において疾患の表現型上の不均一性を検出する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的分析を実施して、循環腫瘍細胞(CTC)を同定し、かつ計数すること；(b) 各々の前記CTCの複数の形態的特徴及びタンパク質発現特徴の存在を検出して、CTCの亜型を同定すること、並びに(c) 前記CTCの亜型の数に基づいて該癌患者における疾患の表現型上の不

50

均一性を決定すること、を含む前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、表現型上の不均一性が高いことにより、アンドロゲン受容体標的化療法に抵抗性のある患者が特定される。いくつかの実施態様において、表現型上の不均一性が高いことは、タキサンベースの化学療法への抵抗性と関連しない。いくつかの実施態様において、方法は、大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を特徴とするCTCの亜型を検出することをさらに含む。関係する実施態様において、前記CTCの亜型の普及率の検出は大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を特徴とし、ここで前記普及率は、アンドロゲン受容体標的化療法及びタキサンベースの化学療法の両方に対する不良な転帰と関連付けられる。

【0015】

いくつかの実施態様において、有核細胞の該免疫蛍光染色は、汎サイトケラチン、表面抗原分類 (CD) 45、及びジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を含む。

【0016】

いくつかの実施態様において、該ゲノムパラメータは、コピー数多型 (CNV) シグネチャーを含む。いくつかの実施態様において、該CNVシグネチャーは、遺伝子の増幅又は欠失を含む。いくつかの実施態様において、該遺伝子の増幅は、AR遺伝子の増幅を含む。いくつかの実施態様において、該欠失は、ホスファターゼ・テンシン・ホモログ遺伝子 (PTEN) の喪失を含む。いくつかの実施態様において、該CNVシグネチャーは、アンドロゲン非依存的細胞成長と関連する遺伝子を含む。

【0017】

いくつかの実施態様において、該ゲノムパラメータは、ゲノム不安定性を含む。いくつかの実施態様において、該ゲノム不安定性は、大規模トランジション (LST) を測定することによって特徴づけられる。いくつかの実施態様において、該ゲノム不安定性は、ゲノム変化率 (PGA) を測定することによって特徴づけられる。

【0018】

本発明では、癌患者における循環腫瘍細胞 (CTC) の表現型の分析に基づいてLSTスコアを決定する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的分析を実施して、CTCを同定し、かつ計数すること；(b) 各々の前記CTCの複数の形態的特徴及びタンパク質発現特徴の存在を検出して、CTCの亜型を同定すること、並びに(c) 1以上のCTCの亜型の頻度に基づいて該癌患者のLSTスコアを決定すること、を含む前記方法をさらに提供する。いくつかの実施態様において、特徴は、表1に記載した特徴から選択される。いくつかの実施態様において、特徴には、N/C比、核及び細胞質の真円度、核エントロピー、CK発現、並びにホルモン受容体発現、例えば、AR発現がある。いくつかの実施態様において、特徴には、核面積、核凸面面積、核斑、核長軸、細胞質面積、細胞質凸面面積、細胞質短軸、AR発現、細胞質長軸がある。いくつかの実施態様において、癌は、前立腺癌である。いくつかの実施態様において、前立腺癌は、転移性ホルモン抵抗性前立腺癌 (mCRPC) である。

【0019】

いくつかの実施態様において、LSTスコアが高いことにより、ARS治療への抵抗性がさらに予測される。さらなる実施態様において、LSTスコアが高いことにより、PARPi + ARS治療への反応性及び/又は感受性が予測される。追加の実施態様において、LSTスコアが高いことにより、白金ベースの薬剤による治療への反応性が予測される。いくつかの実施態様において、追跡検査試料において検出されたLSTスコアが高いことにより、疾患の増悪、疾患の再発、及び/又は抵抗性の獲得が予測される。ARS治療に最初に反応した患者では、追跡検査試料においてLSTスコアが高いことにより、抵抗性の獲得及び疾患の増悪が予測される。PARPi + ARS治療に最初に反応した患者では、追跡検査試料においてLSTスコアが高いことにより、疾患の再発及び/又は増悪が予測される。

【0020】

本発明の他の特徴及び利点は、詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかとなるだろう。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0021】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1Aは、標準的なEpic CTC分析プロセスの説明を示す。マルチパラメータデジタル病理アルゴリズムを使用して画像を分析し、CTC候補を検出してタンパク質バイオマーカーの発現レベルを定量化する。CTCの分類をウェブベースの報告に表示して、熟練した技術者が確認する。図1Bは、CTC回収の説明及びゲノムプロファイリングのワークフローを示す。個別の細胞を単離し、全ゲノム増幅及びNGSライブラリ調製に付す。配列決定をIllumina NextSeq 500上で実施する。

【0022】

【図2】図2は、実施されたパイオインフォマティクス分析の図を提供する。生のFASTQファイルを品質について評価し、フィルタリングする。リードをhg 38参照ゲノム(UCSC)とアラインし、PCR重複産物を除去し、MAPQスコア30によってフィルタリングする。フィルタリング後の>250Kのリードを有する試料をコピー数変化について分析する。フィルタリングしたアラインメントファイルをEpicコピー数パイプライン(Epic's Copy Number Pipelines)によってさらに分析する。一方のパイプラインは1 Mbp域を使用するゲノム不安定性を評価するためのものとし、もう一方のパイプラインは遺伝子特異的コピー数測定のためのものとした。¹ LST:隣接する少なくとも10 Mbの領域間の染色体切断のn数。² PGA:コピー数変化(増幅又は欠失)を有する患者のゲノムのパーセンテージ。

【0023】

【図3】図3A~3Dは、単一細胞中のコピー数多型(CNV)を示す。各々LNCaP、PC3、及びVCaP(図3A~3C)からの単一細胞を単離し、かつ全ゲノム配列決定法によってコピー数多型について分析した。増幅及び欠失は、レプリケート間で再現的に観察することができる。各細胞株の代表的な画像も示す。細胞をCKカクテル、AR、CD45、及びDAPIで染色する。各細胞株からの5つのレプリケートをここに示し、再現性を実証する。各細胞株からの既知のゲノム変化を図3Dに記載する。プロットをCircos: Krzywinski, M.らの文献、「Circos: 比較ゲノミクスのための美感に関する情報(Circos: an Information Aesthetic for Comparative Genomics.)」、Genome Res (2009) 19:1639-1645により作成した。

【0024】

【図4】図4A~4BはCNVを示し、図4C~4Dはゲノム不安定性測定を示す。図4Aは、3つの代表的な細胞株及び健常ドナーの白血球(WBC)対照におけるARのlog₂ゲノムコピー数の比較を示す。VCaPはARの増幅を有し、一方LNCaP及びPC3は2コピーのARを維持する。図4Bは、3つの代表的な細胞株及び健常ドナーのWBC対照におけるPTENのlog₂ゲノムコピー数の比較を示す。PC3のホモ接合PTENの喪失を確認し、顕著なz-スコアを有するLNCaPヘテロ接合PTENの喪失を多くの細胞中で観察した。図4Cは3つの代表的な細胞株及び健常ドナーWBC対照の間の切断点(LST)の数の比較を示す。LNCaP(wt p53及びヘテロ接合PTENの喪失)及びWBC対照と比較して、より多くの数の切断点がPC3(ゼロPTEN、p53変異体)及びVCaP(p53変異体)中に検出された。図4Dは、3つの代表的な細胞株及び健常ドナーのWBC対照におけるゲノム変化率の比較を示す。PC3は最も高い変化率を示し、おそらくPTEN及びp53の両方の喪失に起因する遺伝的不安定性及び倍数性が明らかとなった。

【0025】

【図5】図5は、CTCを単離し、形態/タンパク質化学によって単一細胞レベルでCTCを分析する(顔認識)ために使用された「細胞選択なし」のプラットフォームの模式図を示す。

【0026】

【図6】図6は、CTCのタンパク質特徴及び形態的特徴の決定の後に、表中に記載した核面積並びに他の特徴を含む一連の個別の細胞特徴を患者試料中で同定された各CTCに対し測定したことを示す。

【0027】

【図7】図7は、右にヒートマップを示し、ここで15の細胞型をy軸上に、個別の特徴をx軸上に色で規定する。赤はダイナミックレンジの下端(すなわち、小さい核面積)の特徴

10

20

30

40

50

を反映し、一方緑はダイナミックレンジの上端（すなわち、大きい核面積）の特徴を反映する。

【0028】

【図8】図8は各決定の点において細胞がどれだけ不均一又は多様性があるかに基づいて患者を順位づけたことを示す。

【0029】

【図9】図9は、mCRPC集団の人口統計を示す。

【0030】

【図10】図10は、15種の異なる表現型上のCTCクラスの頻度が治療法のラインによって異なり、かつ時間とともにより不均一さを増したことを示す。赤は大きな比率を占めるか、又はより多様性のある細胞型の普及率を表す。各カラムは患者であり、多くの縦の赤い区画があるカラムは、表現型上の不均一性が比較的高くなるようになっている。

10

【0031】

【図11】図11は、シャノン指数がより高くなると、治療法のラインによってより大きな多様性（不均一性）を示したことを示し、注目すべきことに第三選択及び第四選択治療において中央値は増加し、比較的低い指標スコアが少なくなる。

【0032】

【図12】図12AはCTCの表現型上の不均一性が高いことによりAR治療に関する増悪及び生存期間が短くなることが予測されるが、タキサン治療に関してはそうでないことを示している。図12Bは、不均一性に基づくAR Txの転帰を示す。

20

【0033】

【図13】図13は、CTCの表現型上の不均一性が高いことにより、多変量モデルにおけるタキサンによる転帰がAR Txによる転帰より良好となることが予測されることを示している。生存への予後を示すことが先に示された様々な因子を、一変量及び多変量分析において調べた多変量分析についてのみ示す。不均一性が高いことにより、タキサン治療に対する感受性がAR治療に対する感受性を上回ることが予測された。

【0034】

【図14】図14は、CTCの垂型（K型）の普及により、ARの状態とは無関係にARTx及びタキサンの両方について転帰が不良であることが予測されることを示している。1つの特定の数学的に規定された細胞型、K型は、大きな核、多岐にわたる核サイズ、及び目立った核を有しており、両方の薬物クラスへの抵抗性と関連付けられた。

30

【0035】

【図15】図15はCTCを増幅し、配列決定のために調製し、続いてクローン性及び増幅/欠失を評価するための配列決定情報工学処理を行うためのプロセスの概略図を示している。

【0036】

【図16】図16は、単一細胞CTC配列決定法により、クローンの多様性及び系統発生的疾患系譜についての情報が得られることを示している。

【0037】

【図17】図17は、単一CTC CNVのプロファイルにより、クローンの多様性及び系統発生的疾患系譜についての情報が得られることを示している。

40

【0038】

【図18】図18はまた、単一CTCの配列決定法により、ARTxについて検討できない第2ラインのタキサン後の患者における、クローンの多様性の欠落についての情報を得ることができると示している。この患者はエンザルタミドに反応した。

【0039】

【図19】図19は、CTCの表現型上の不均一性がゲノム不均一性と相互に関連付けられることを示している。

【0040】

【図20】図20Aは高頻度のCNV、多数の切断点、並びにそれらに付随する大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を特徴とする表現型を特徴とする細胞型Kのゲノミ

50

クスの例を示している。図20Bは、他の全てのCTCの表現型と比較した細胞型Kのゲノム不安定性を示している。

【0041】

【図21】図21は、表現型上の不均一性が高いことが、AR-V7陰性患者における有益なバイオマーカーであることを示している。

【0042】

【図22】図22は、均一なゲノムプロファイルを示す第1選択治療の前の患者からの6つのCTCにおいてCTCの表現型上の不均一性が低いことを示している。

【0043】

【図23】図23は、CTCタンパク質及び形態的特徴に基づく教師なし分析を使用して、15個のCTCの数学的表現型垂型のヒートマップが特定されたことを示している。

10

【0044】

【図24】図24A~24Dは、15個の細胞型A~Dについて選択された特徴を、それぞれ示している。特定のCTCの表現型垂型から、患者の生存が予測される。

【0045】

【図25】図25は、CTCの計数及び15個のCTCの表現型垂型により、ARSを採用すると180日までに死亡することが予測されることを示している（n=150試料）。優れた予測指標には、細胞型E（クラスター5）、K（クラスター11）、及びO（クラスター15）がある。

【0046】

【図26】図26は、いくつかのCTCの表現型垂型（細胞型E、K、及びN）によりAR標的化療法に対するmCRPC患者の反応が予測されることを示している。

20

【0047】

【図27】図27は、タキサン治療への反応を予測するCTCの表現型垂型（細胞型G、K、及びN）を示している。

【0048】

【図28】図28は、クラスター11（細胞型K）が大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を有することを示している。

【0049】

【図29】図29は、複数の細胞型（細胞型G、K、及びM）が、ゲノム不安定性（LST）の予測に利用できることを示している。これらの特定の垂型は、ゲノム不安定性が増加していることを考慮すると、DNA傷害薬物、例えば白金ベースの化学療法剤（すなわち、カルボプラチン、シスプラチン）、又はポリADP-リボースポリメラーゼ（PARP）阻害剤、DNA-PK阻害剤、及びATM経路を標的化する治療薬を含む、相同組換えの欠陥を標的化する標的化療法薬に感受性であり得る。

30

【0050】

【図30】図30は、CTCのゲノム不安定性の予測に利用できることが見出された5つの形態的特徴及びタンパク質発現特徴を示している。初めの4つの特徴はゲノム不安定性と正の相関を示し、最後の1つは負の相関を示す。

【0051】

【図31】図31は、CK(-) CTCが比較的高いゲノム不安定性の出現率を有し、かつゲノム不安定性の予測に利用できることを示している。

40

【0052】

【図32】図32は、タンパク質特徴及び形態的特徴を用いると、CTCのゲノム不安定性を高い精度で予測することができることを示している。Y軸は実測のLST（切断点のn数）を示し、X軸は予測された不安定性（安定対不安定）を示している。ゲノム不安定性が高いと予測されたCTCは、DNA傷害薬物、例えば白金ベースの化学療法剤（すなわち、カルボプラチン、シスプラチン）、又はPARP阻害剤、DNA-PK阻害剤、及びATM経路を標的化する治療薬を含む、相同組換えの欠陥を標的化する標的化療法薬に感受性であり得る。

【0053】

【図33】図33は、表現型上の不均一性を、全生存期間及びAR標的化療法への反応性の予

50

測に利用できることを示している。

【0054】

【図34】図34は、CTCの表現型上の不均一性を遺伝子型上の不均一性の予測に利用できることを示している。高い表現型上の不均一性は、低い表現型上の不均一性と比較して複数のゲノムクローンを表す可能性が40倍高い。

【0055】

【図35】図35は、CTCのゲノム不安定性を、mCRPC患者の全生存期間の予測に利用できることを示している。

【0056】

【図36】図36は、CTCのゲノム不安定性を、mCRPC患者のタキサン治療への反応性の予測に利用できることを示している。

10

【0057】

【図37】図37A~37Cは、ゲノム不安定性の代理として測定された大規模状態トランジション(LST)及びゲノム変化率(PGA)を示している。LST:隣接する少なくとも10 Mbの領域間の染色体切断のn数(Popovらの文献、Cancer Res. 72(21):5454-62 (2012))。PGA:コピー数変化(増幅又は欠失)を有する患者のゲノムの割合(Zafaranaらの文献、Cancer 2012 Aug; 118(16): 4053 (2012))。例:高いLST(27)及び高いPGA(23%)。

【0058】

【図38】図38は、aLSTを予測するための各々の画像化特徴(y軸に沿って)の相関係数値を示すグラフを示している。0に近い相関係数は、特徴がaLSTと正にも負にも傾かないことを示す。値が0より十分に大きい、又は0より十分に小さいことは、特徴がaLSTと正又は負に強く傾いていることを示し、従ってより一層aLSTの予測に利用できる。

20

【0059】

【図39】図39は、生殖系列BRCA2の変異又は他のHRD(相同組換えの欠陥)経路遺伝子の有害変異を有するmCRPC患者由来のCTCが、一般にずっと高いLSTスコアを有し、本発明者らの試験において観察されたスコアの中央値は40を上回っていることを示している。以下のプロットは、3つのBRCA2又はHRD変異体(Mt)試料(CR.1、H_PR.1、及びH_PR.2)がその他の試料と比較して最も高いLSTを有することを示している。高いLSTスコア(LSTの中央値>30)を有するmCRPC患者は、PARPi+ARS(ARシグナル伝達阻害剤、アピラテロン及びエンザルタミドを含む)治療に対し完全奏効又は>90%の奏効をもってよく反応する。

30

【0060】

【図40】図40は、高いLSTスコア(LSTの中央値>30)を有するmCRPC患者がARS治療単独に対し抵抗性であることを示している。

【0061】

【図41】図41A~41Bは、PARPi+ARS治療に抵抗性であるARの獲得及びPTENの喪失の共出現を有する2名の患者についてのヒートマップを示している。30名のmCRPC患者のコホートのうち、2名の患者はARの獲得及びPTENの喪失の共出現を有していた。両方の患者はPARPi+ARS治療に抵抗性であった。

【0062】

【図42】図42A~42Eは、PARPi+ARSで治療されたmCRPC患者について、患者が治療に反応した時点で、追跡検査で採血されたCTCが、LSTの高いCTCを有さなかったことを示している。このことから、LSTの高いCTCがこの治療に感受性であり、反応マーカーとして利用できることが示唆された。図42A~42Eは、5名の患者の例に相当する。

40

【0063】

【図43】図43A~43Bは、PARPi+ARSで治療されたmCRPC患者について、患者の疾患が増悪した時点で、追跡検査で採血されたCTCが、まさにLSTの高いCTCを有していたことを示している。このことから、LSTの高いCTCが、疾患増悪又は再発の指標となることが示唆された。以下の2名の患者の例を参照されたい。図43Aでは、患者120109-084は、PARPi+ARSに対し短期間の反応を有し、追跡検査で試料を採取した時には疾患の再発を有していた(

50

「疾患増悪」)。図43Bでは、患者210109-168はPARPi + ARS治療に反応せず、2つの採血試料を12週及び16週に採取した。

【0064】

【図44】図44は、ARS単独で治療されたmCRPC患者について、患者が治療に反応した時点で、追跡検査で採血されたCTCが、なおLSTの高いCTCを有することを示している。このことから、LSTの高いCTCは、ARS治療に感受性でないことが示唆された。他の治療法（例えば、PARPi）又はPARPiとの併用療法が必要となる可能性がある。

【0065】

【図45】図45A～45Bは、高いゲノムの傷跡、例えばLST及びLOHを有する細胞株が、PARPi感受性である可能性がより高いことを示している。2つのBRCA変異を有し、PARPi感受性のTNBC細胞株（HCC1395及びMB436）は、野生型BRCA、PTEN及びTP53の変異体を有するTNBC細胞株（MB231）よりもずっと高いLSTスコア（図45A）及びLOHスコア（図45B）を有する。

10

【0066】

【図46】図46は、表現型上の細胞型と関連付けられるLSTを示している。細胞型B、D、E、G、K、L、M、及びOはその他の細胞型よりも高いLSTを有する。

【0067】

【図47】図47A～47Cは、LSTをN/C比、核及び細胞質の真円度、核エントロピー、CK発現、及びAR発現を含むCTCの表現型特徴を使用した回帰アルゴリズムによって予測することができることを実証する。ARの発現データは予測モデルにおいて好ましいが、これは任意選択である。LST予測モデルを独立した前立腺癌及び乳癌のコホートで試験し、精度は78%であった。患者のレベルに関し、患者のLSTの類別化（高い又は低い）の決定におけるaLST及びpLSTの間の一貫率は95%（38の試料のうち、36）である。LSTの高い患者を、pLST > 0.37又はaLST > 8である少なくとも4つのCTCを有する患者と規定した。図47Aはアルゴリズムを介した予測LST（pLST）スコア（y）に対する配列決定法を介した実測のLSTスコア（x）を示している。図47Bは、多岐にわたるLSTを有する細胞画像の例を示している。これらのプロットにおけるaLST及びpLSTの両方を、log10変換し、Zスケールで正規化した（図47C）。

20

【0068】

【図48】図48A～48Bは、高いpLSTを有する患者は、AR標的化療法に抵抗性であることを示している。第1ラインの高いLSTを有するmCRPC患者において、43%（6/14）の患者がAR標的化療法に反応した。ベースライン試料及び追跡検査試料（< 18週）の両方を伴う7名の患者において、高いpLSTの数は、ベースラインでの35細胞から追跡検査試料での122（320%）へと上昇した。2つの独立したmCRPCコホートからの例示的データを参照されたい。

30

【0069】

【図49】図49は、初めにAR標的化療法に反応した低いpLSTを有する患者が、追跡検査試料において検出された高いpLSTのCTCを有し得ることを示しており、このことから疾患の増悪及び抵抗性の獲得が示唆された。

【0070】

【図50】図50A～50Bは、高いpLSTを有する患者がPARPi + ARS治療によく反応することを示している。図50Aは、高いLSTを有する第1ラインのmCRPC患者において、88%（15/17）の患者がPARPi + ARS標的化療法に反応したことを示している。図50Bは、ベースライン試料及び追跡検査試料（< 18週）の両方を伴う20名の患者において、高いpLSTの数は、ベースラインでの635細胞から追跡検査試料での33（95%低下）へと低下したことを示している。

40

【0071】

【図51】図51は、高いpLSTを有する患者がPARPi + ARS治療に反応し、時間の経過とともに高いpLSTのCTC集団が追跡検査試料において減少することを示している。このことから、pLSTを薬物反応をモニタリングするためのバイオマーカーとして使用できることが示唆される。

50

【 0 0 7 2 】

【図 5 2】図52A～52Bは、高いpLSTを有するmCRPC患者が、白金ベースの薬剤治療に反応することを示している。図52Aは、96%のベースラインCTCを高いpLSTとして有する1名の第10ラインのmCRPC患者からの細胞画像を示し、この患者はカルボプラチン治療に反応した（12週間のPSA変化：-50.1%）。図52Bは、4.3%のベースラインCTCを高いpLSTとして有する1名の第8ラインのmCRPC患者からの細胞画像を示し、この患者はカルボプラチン治療に反応しなかった（12週間のPSA変化：+2.1%）。

【 0 0 7 3 】

【図 5 3】図53は、高いpLSTを有する患者が全生存期間分析においてタキサン治療に抵抗性であることを示している。快方に向かっている群には、<6の高いpLSTのCTCを有する患者が含まれ、快方に向かっていない群には 6 の高いpLSTのCTCを有する患者が含まれた。

10

【 0 0 7 4 】

【図 5 4】図54Aは、細胞の形態的特徴及び表現型上の細胞型を有するpResistの間の相関関係を示している。図54Bは、高いpResist細胞対低いpResist細胞についての細胞画像の例を示している。分類基準において使用される最も重要な特徴には、核面積、核凸面面積、核斑、核長軸、細胞質面積、細胞質凸面面積、細胞質短軸、AR発現、細胞質長軸がある。細胞型K、C、及びMは、その他の細胞型よりも高いpResistを有する。

【 0 0 7 5 】

【図 5 5】図55は、pResist細胞の多くがCK- CTCであることを示しており、このことから、それらがEMTを起源とすることが示唆される。

20

【 0 0 7 6 】

【図 5 6】図56A～56Bは、ARSのみにおける全ての患者又はPARPi + ARSを受ける患者についてpResist細胞が上昇傾向にあることを示す長期試験を示している。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 7 7 】

（詳細な説明）

本件開示は、統合単一細胞全ゲノムCNV分析が、複数のレプリケート間で再現的なコピー数プロファイルを提供し、ARの増幅及びPTENの喪失を含む既知の局所CNV事象の存在を確認するという発見に部分的に基づいている。本件開示はさらに、全ゲノムコピー数分析を使用して、LST及びPGAを測定することによりゲノム不安定性を再現的に特徴づけることができるという発見に部分的に基づいている。本明細書に開示されるような、野生型（LN CaP）と比較してp53変異体細胞株（PC3及びVCaP）において検出されるのは最も高いゲノム不安定性である。サブクローン性CNV駆動因子の変化の頻度及び個別のCTCにおけるゲノム不安定性を細胞表現型と合わせて理解することにより、不均一な疾患のより正確な観察、潜在的な治療反応が可能となり、かつ新規抵抗性の機構を特定することができる。

30

【 0 0 7 8 】

本発明はさらに、たとえ全CTC集団のほんの少数派の部分しか構成しない場合であっても、全生存期間が短いこと及び薬物への抵抗性があることを予測する、CTCの希少な亜型の同定に基づいている。さらに以下に記載するように、本発明の方法はさらに、20の別個の形態的特徴及びタンパク質発現特徴に基づいてCTCを分類する、人工知能アルゴリズムを介して希少なCTC亜型を驚くべきことに同定したことに部分的に基づき、該亜型は患者の部分集団において認められた。この型のCTCを含む血液を有する患者は、該患者の医療記録に記載された全ての治療法に例外なく失敗し、はるかに短い全生存期間を経験した。本明細書で例証されるように、引き続き行ったこのCTC亜型のゲノム配列決定法により、該細胞が他のCTCとは全く異なるゲノムシグネチャーを共有することが見出され、CTCのゲノム特徴を視覚的分析により導き出せることが確認された。

40

【 0 0 7 9 】

腫瘍内不均一性の増加は、治療に対する内因の抵抗性及び不良な転帰と相互に関連付けられている。CTCは不均一な疾患及び転移患者における活動的転移性腫瘍集団を反映することが示されている。本明細書では、個々の細胞ベースでのCTCにおける不均一性の分析

50

、及び不均一性が、利用可能な治療法のより良い順序立てを可能にする治療法管理における決断時点での感受性の予測的バイオマーカーとなるという、驚くべき発見を例証する。本明細書に記載の富化を伴わないCTC分析プラットフォームは、単一細胞解像度及び不均一なCTC集団の正確なゲノムプロファイリングを可能にすることによって本発明の方法を可能にする。腫瘍内の不均一性を特徴づけるために、循環腫瘍細胞（CTC）の単一細胞全ゲノムコピー数分析を、富化を伴わないCTC分析プラットフォームを使用して実施した。

【0080】

PI3K阻害剤又はAR標的化療法についての治療感受性のマーカー、例えばPTENの欠失又はアンドロゲン受容体（AR）の増幅はそれぞれ、患者試料を模倣するために血液中に添加される個別の前立腺癌細胞において検出された（実施例1）。局所性の利用可能な変化の検出に加え、ゲノム不安定性を大規模トランジション（LST）及びゲノム変化率（PGA）を測定することによって特徴づけた。

10

【0081】

本明細書で示すように、単一細胞レベルでの分析により、不均一性を様々な方法で探索することが可能となる。単一クローンから発生した腫瘍細胞における形態の変動及び個々の細胞レベルでの遺伝子発現の変動の測定基準となる（measures）表現型又は細胞の不均一性、例えばアンドロゲン受容体（AR）発現の喪失及びTMPRSS2:ERG遺伝子融合体の検出を用いると、系譜スイッチ（可塑性）を検出することができる。遺伝子型上の不均一性は、単一の開始根幹傷害（initiating trunk lesion）から発展する識別可能な変異プロファイルを有する腫瘍における単一の領域を検出する。単一細胞レベルでのCTCの分析の重要な応用は、標的化療法を導くことである。本明細書で例証するように、複数の単一細胞を配列決定し、比較することにより、腫瘍クローンの下位構造を明らかにする系統発生的ツリー及びヒートマップを構築することが可能である。これらの遺伝学的ツリーにより、ツリーの「幹」のファウンダー変異を同定することが可能となり、該ファウンダー変異は、腫瘍の発展の早期に発生し、腫瘍の全ての細胞に受け継がれるために、理想的な治療標的である。あるいは、これらのツリーは複数の腫瘍の亜集団を独立に標的化するための併用療法を考案するのに使用することができる。

20

【0082】

遺伝学的可塑性は、癌の可能性を付与する特性の1つであり、ここで複数の癌の特質を獲得するかどうかは新生物細胞のゲノム中の変化の継承に応じて決まる。この可塑性は追加の体細胞変異の継続的な蓄積によって生じ、該体細胞変異は続いて正の選択を受ける。この高度の遺伝学的多様性は、発展的最適化プロセスに対し、資源をめぐって競合し、癌治療などの外圧に適応するサブクローンとしてのいつでも変化を受け入れられる基盤を提供する。従って、癌の増悪とは根本的に変異による多様化及びクローン選択のプロセスであり、腫瘍は不均一な亜集団から構成される。本発明の方法は単一細胞レベルでの分析を可能にし、サブクローン集団の同定を可能にする。

30

【0083】

本明細書に記載する方法により、転移性癌の患者の血液中のCTCを、形態的特徴及びタンパク質特徴によって特徴づけることが可能となる。本明細書で例証するように、蛍光顕微鏡を通じて測定され、細胞の区分分け及び特徴抽出アルゴリズムを利用するこれらの特徴により、識別された細胞ごとに複数のバイオマーカーを開発することができる。提供する例では、221名の転移性患者からの>9000のCTCを特徴づけて、特徴のセットの教師なしクラスタリングを実施するためにこれらの特徴を利用することを示す。特徴を主成分を通じて分類し、続いて特有の多次元亜型へとクラスター化した。本発明ではさらに、一般的に使用される治療薬（アピラテロン酢酸エステル、エンザルタミド、ドセタキセル、及びカビザタキセル（Cabizataxel））に対する抵抗性及び生存の悪化を予測するためのバイオマーカーとなるCTC亜型を提供する。この細胞型の単一細胞ゲノム配列決定により、CTCのゲノム内部の大規模トランジション（LST）の測定を通じて、他のCTC亜型と比較して増加したゲノム不安定性を有する細胞が同定された。ゲノム不安定性の増加を考慮すると、この特定の亜型はDNA傷害薬物、例えば白金ベースの化学療法薬（すなわち、カルボプラ

40

50

チン、シスプラチン)、又はPARP阻害剤、DNA-PK阻害剤、及びATM経路を標的化する治療薬を含む相同組換えの欠陥を標的化する標的化治療薬に感受性である。感受性のバイオマーカーを見つけようとする過去のアプローチでは、患者からの組織についてゲノム上で配列決定して、HRDゲノミクスを見出すことに焦点を当てていたが、本法はデジタル病理アルゴリズムを利用し、配列決定を回避する能力を付与するものである。

【0084】

本明細書に記載の方法及び付随する実施例では、単一CTCの表現型及びゲノムの特徴づけが実現可能であり、該特徴づけを使用して患者における腫瘍不均一性を評価することができることを実証する。表現型上の不均一性が高いことから、アビラテロン及びエンザルタミドに関し死亡リスクが増加しているが、タキサン化学療法に関しては増加しておらず、かつゲノム不均一性(複数のクローン)を有する可能性が40倍高いコホート中の患者が特定される。本明細書で例証するように、CTCのクラスタリングによりARS及びタキサン治療の両方に対する抵抗性を有し、かつゲノム不安定性が増加している(LST切断点が高い)CTC亜型が同定される。本発明は転移性癌を有する患者からの個々の細胞の特徴づけを可能にし、かつ治療選択を導くのに使用することができる非侵襲的液体生検を提供する。

10

【0085】

本件開示はさらに、LSTを表現型によるCTC亜型と関連付けられるという発見に部分的に基づく。本明細書に記載するように、LSTはN/C比、核及び細胞質の真円度、核エントロピー、CK発現、及びホルモン受容体発現を含むCTCの表現型特徴を使用する回帰アルゴリズムによって予測することができる。特に、分類基準において使用される最も重要な表現型特徴には、核面積、核凸面面積、核斑、核長軸、細胞質面積、細胞質凸面面積、細胞質短軸、AR発現、細胞質長軸がある。いくつかの実施態様において、CTCの表現型特徴を使用して、高いLSTスコアを低いLSTに対して決定する。本明細書では形態的特徴及びタンパク質発現特徴をまとめて「表現型特徴」と呼ぶ。

20

【0086】

本明細書に記載するように、mCRPC患者における高いLSTスコアを用いると、ARS(アビラテロン及びエンザルタミドを含むARシグナル伝達阻害剤)治療に対する先天的抵抗性並びに初めは低いLSTスコアがARS治療への反応に対応していた獲得型抵抗性を含むARS治療への抵抗性が予測される。本明細書で例証するように、LSTの高いCTCはARS治療に感受性ではない。特に、本明細書に記載するように、ARS治療で治療されたmCRPC患者は、該患者が治療に反応した時点で追跡検査採血時に依然としてLSTの高いCTCを有する。

30

【0087】

本明細書にさらに記載するように、mCRPC患者におけるLSTスコアが高いことにより、PARPi + ARS治療への反応性が予測される。また本明細書に記載するように、mCRPC患者におけるLSTスコアが高いことにより、白金ベースの薬剤治療、例えばカルボプラチン治療への反応性が予測される。

【0088】

本明細書で開示するように、LSTスコアが高いことにより、PARPi + ARS治療への感受性が予測され、LSTが高いCTCを本発明の方法における反応マーカーとして利用することができる。本明細書で例証するように、治療に反応したPARPi + ARSで治療されたmCRPC患者は、追跡検査での採血に際しLSTが高いCTCを有さなかった。本明細書にさらに記載するように、LSTが高いCTCは、疾患の増悪又は再発の指標である。本明細書で例証するように、PARPi + ARSで治療されたmCRPC患者は、疾患増悪の時点で、追跡検査での採血のCTCは実にLSTが高いCTCを有する。

40

【0089】

本発明は、癌患者における循環腫瘍細胞(CTC)の表現型の分析に基づいてLSTスコアを決定する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的分析を実施して、CTCを同定し、かつ計数すること；(b) 各々の前記CTCの複数の形態的特徴及びタンパク質発現特徴の存在を検出して、CTCの亜型を同定すること、並びに(c) 1以上のCTCの亜型の頻度に基づいて該癌患者のLSTスコア

50

を決定すること、を含む前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、特徴は、表1に記載の特徴から選択される。いくつかの実施態様において、特徴には、N/C比、核及び細胞質の真円度、核エントロピー、CK発現、及びAR発現がある。いくつかの実施態様において、特徴には、核面積、核凸面面積、核斑、核長軸、細胞質面積、細胞質凸面面積、細胞質短軸、AR発現、細胞質長軸がある。

【0090】

いくつかの実施態様において、LSTスコアが高いことにより、ARS治療への抵抗性がさらに予測される。さらなる実施態様において、LSTスコアが高いことにより、PARPi + ARS治療への反応性及び/又は感受性が予測される。さらなる実施態様において、LSTスコアが高いことにより、白金ベースの薬剤治療への反応性が予測される。いくつかの実施態様において、追跡検査試料において検出されたLSTスコアが高いことにより、疾患の増悪、疾患の再発、及び/又は抵抗性の獲得が予測される。初期にARS治療に反応した患者において、追跡検査試料中のLSTスコアが高いことにより、抵抗性の獲得又は疾患の増悪が予測される。初期にPARPi + ARS治療に反応した患者において、追跡検査試料中のLSTスコアが高いことにより、疾患の再発及び/又は増悪が予測される。

10

【0091】

本発明は、癌患者において疾患の表現型上の不均一性を検出する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的な分析を実施して、循環腫瘍細胞 (CTC) を同定し、かつ計数すること；(b) 各々の前記CTCの複数の形態的特徴及びタンパク質発現特徴の存在を検出して、CTCの亜型を同定すること、並びに(c) 前記CTCの亜型の数に基づいて該癌患者における疾患の表現型上の不均一性を決定すること、を含む前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、特徴は、表1に記載の特徴から選択される。いくつかの実施態様において、表現型上の不均一性が高いことにより、アンドロゲン受容体標的化療法に抵抗性の患者が特定される。いくつかの実施態様において、表現型上の不均一性が高いことは、タキサンベースの化学療法への抵抗性とは関連付けられない。いくつかの実施態様において、方法は、大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を特徴とするCTCの亜型の検出をさらに含む。関連する実施態様において、大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を特徴とするCTCの亜型の普及率の検出、ここで、前記普及率はアンドロゲン受容体標的化療法及びタキサンベースの化学療法の両方に対する不良な転帰と関連付けられる。

20

30

【0092】

本発明は、癌患者において疾患の不均一性を検出する方法であって、(a) 該患者から取得した血液試料中の有核細胞の、免疫蛍光染色及び形態的特徴づけを含む直接的な分析を実施して、循環腫瘍細胞 (CTC) を同定し、かつ計数すること；(b) 該試料から該CTCを単離すること；(c) ゲノムパラメータを個別に特徴づけて、該CTCの各々に対するゲノムプロファイルを作成すること；及び(c) 該プロファイルに基づいて該癌患者における疾患の不均一性を決定すること、を含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、該癌は、前立腺癌である。いくつかの実施態様において、該前立腺癌は、ホルモン不応性である。

【0093】

いくつか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、表面抗原分類 (CD) 45、ジァミジノ-2-フェニルインドール (DAPI)、及びホルモン受容体、例えば非限定的に、アンドロゲン受容体 (AR)、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、又はヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2) を含む。当業者であれば、前立腺癌、卵巣癌、子宮内膜癌、及び乳癌を含む様々な癌が、特定のホルモン受容体の発現と関連付けられる亜型を有し、かつ特定の癌に基づいてホルモン受容体を選択することができることを理解している。

40

【0094】

いくつかの実施態様において、有核細胞の該免疫蛍光染色は、汎サイトケラチン、表面抗原分類 (CD) 45、ジァミジノ-2-フェニルインドール (DAPI)、及びアンドロゲン受容

50

体 (AR) を含む。

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施態様において、該ゲノムパラメータは、コピー数多型 (CNV) シグネチャーを含む。いくつかの実施態様において、該CNVシグネチャーは、遺伝子の増幅又は欠失を含む。いくつかの実施態様において、該遺伝子の増幅は、AR遺伝子の増幅を含む。いくつかの実施態様において、該欠失は、ホスファターゼ・テンシン・ホモログ遺伝子 (PTEN) の喪失を含む。いくつかの実施態様において、該CNVシグネチャーは、アンドロゲン非依存的細胞成長と関連する遺伝子を含む。

【 0 0 9 6 】

いくつかの実施態様において、該ゲノムパラメータは、ゲノム不安定性を含む。いくつかの実施態様において、該ゲノム不安定性は、大規模トランジション (LST) を測定することによって特徴づけられる。いくつかの実施態様において、該ゲノム不安定性は、ゲノム変化率 (PGA) を測定することによって特徴づけられる。

10

【 0 0 9 7 】

いくつかの実施態様において、該プロファイルに基づいて癌患者における疾患の不均一性を決定することは、疾患の新規機構を特定する。

【 0 0 9 8 】

いくつかの実施態様において、該プロファイルに基づいて癌患者における疾患の不均一性を決定することは、治療に対する肯定的な反応を予測する。

【 0 0 9 9 】

いくつかの実施態様において、該プロファイルに基づいて癌患者における疾患の不均一性を決定することは、治療に対する抵抗性を予測する。

20

【 0 1 0 0 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」、及び「該 (the)」は、そうでないことが文脈によって明らかに指示されない限り、複数の指示物を含むことに留意しなくてはならない。従って、例えば、「バイオマーカー (a biomarker)」に対する言及は、2以上のバイオマーカーの混合物などを含む。

【 0 1 0 1 】

用語「約」は、特に所与の量を参照して、プラスマイナス5%の偏差を包含することを意味する。

30

【 0 1 0 2 】

添付の特許請求の範囲を含む本件出願において使用される、単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」、及び「該 (the)」は、そうでないことが文脈によって明らかに指示されない限り、複数の指示物を含み、「少なくとも1つの (at least one)」及び「1以上の (one or more)」と互換的に使用される。

【 0 1 0 3 】

本明細書で使用される用語「含む (comprises)」、「含んでいる (comprising)」、「含む (includes)」、「含んでいる (including)」、「含む (contains)」、「含んでいる (containing)」、及びこれらの任意の変形は、非排他的な包含を含むことを意図するものであり、その結果要素又は要素のリストを含み (comprises)、含み (includes)、又は含む (contains) プロセス、方法、プロダクトパイプロセス、又は物質の組成が、これらの要素を含むだけでなく、明示的に列記されていないか、又はそのようなプロセス、方法、プロダクトパイプロセス、又は物質の組成に固有の他の要素も含み得る。

40

【 0 1 0 4 】

本明細書で使用される、液体生検試料の文脈で使用される用語「提供する (providing)」は、試料を取得することの任意の、かつ全ての手段を包含することを意味している。この用語は、請求される方法の実践の文脈において、試料の存在をもたらす全ての直接的及び間接的手段を包含する。

【 0 1 0 5 】

本明細書で使用される用語「患者」は、好ましくはヒトを指すが、他の哺乳動物も包含

50

する。本明細書で使用される用語「生物」、「個体」、「対象」、又は「患者」は、同義語として互換的に使用されることに留意されたい。

【0106】

本明細書に記載の組成物及び方法において使用される用語「癌」は、典型的に未制御の細胞成長を特徴とする哺乳動物における生理状態を指すか、又は記載する。一実施態様において、癌は、上皮癌である。一実施態様において、癌は、前立腺癌である。本明細書に記載の方法及び組成物の様々な実施態様において、癌は、非限定的に、乳癌、肺癌、前立腺癌、結腸直腸癌、脳癌、食道癌、胃癌、膀胱癌、膵癌、子宮頸癌、頭頸部癌、卵巣癌、黒色腫、及び多剤抵抗性癌、又はそれらの亜型及び病期を含み得る。さらに代替の実施態様において、癌は、「初期」癌である。さらに別の実施態様において、癌は、「後期」癌である。本明細書で使用される用語「腫瘍」は、悪性であれ良性であれ、全ての腫瘍性細胞成長及び細胞増殖、並びに全ての前癌性及び癌性の細胞及び組織を指す。癌は、リンパ増殖性癌、例えば、前駆Bリンパ芽球性白血病/リンパ芽球性リンパ腫、濾胞起源のB細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫前駆T細胞リンパ芽球性白血病/リンパ芽球性リンパ腫、未成熟T細胞の新生物、末梢性成熟T細胞の新生物、T細胞前リンパ球性白血病、末梢性T細胞リンパ腫、不特定未分化大細胞リンパ腫、成人性T細胞白血病/リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、前駆Tリンパ芽球性白血病/リンパ芽球性リンパ腫、T細胞前リンパ球性白血病、血管免疫芽細胞性リンパ腫、又は結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫であり得る。

10

20

【0107】

本明細書で使用される用語「循環腫瘍細胞」又は「CTC」は、生体試料中に存在し、かつ癌と関係する任意の希少細胞を包含することを意味している。CTCは単一細胞として、又はCTCのクラスター中に存在し得るものであり、患者の循環中に非常に低濃度に認められる固形腫瘍から放出される上皮細胞である場合が多い。

【0108】

本明細書で使用される「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、かつ形態的に周囲の白血球から識別可能な単一CTCを指す。

【0109】

本明細書で使用される「従来型でないCTC」は、少なくとも1つの特性において、従来型CTCと異なるCTCを指す。

30

【0110】

その最も広い意味で、生体試料は、CTCを含む任意の試料とすることができる。試料は、血液などの体液；細胞調製品の可溶性画分、又は細胞がそこで成長した培地のアリコート；細胞から単離若しくは抽出された染色体、細胞小器官、又は膜；溶液中の若しくは基板に結合された、ゲノムDNA、RNA、又はcDNA；1個の細胞；1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体試料は、細胞を含む任意の試料とすることができ、かつCTCがその中で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、唾液又は細胞を含む他の体液若しくは組織とすることができる。

40

【0111】

特定の実施態様において、生体試料は、血液試料である。本明細書に記載のように、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とすることができる。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などの微小胞を含むことができる。本件開示の文脈において、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。

【0112】

本件開示の試料は、当技術分野において周知の方法(例えば、FACS、免疫組織化学)に

50

より識別可能な複数の細胞集団及び細胞亜集団を、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/ μl ）又は血小板（150,000～400,000細胞/ μl ）のような無核細胞の集団、及びWBC（例えば、4,500～10,000細胞/ μl ）、CEC又はCTC（循環腫瘍細胞；例えば、2～800細胞/ μl ）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細胞/ μl ）、リンパ球（1,000～4,000細胞/ μl ）、単球（100～700細胞/ μl ）、好酸球（50～500細胞/ μl ）、好塩基球（25～100細胞/ μl ）などの細胞亜集団を含んでよい。本件開示の試料は、富化を伴わない試料であり、すなわちこれらは、有核細胞の特定の集団又は亜集団のいずれかについて富化されていない。例えば、富化を伴わない血液試料は、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。

10

【0113】

いくつかの実施態様において、該試料は健常対象又は例えば年齢、人種、家族及び病歴を含む当技術分野で公知の臨床上確立された基準に基づいて癌又は既存の癌の転移のリスクが高いと考えられる対象から取得した血液試料である。いくつかの実施態様において、該血液試料は、組織又は液体生検及び/又は外科手術又は治療的背景に基づいて癌と診断された対象からのものである。いくつかの実施態様において、該血液試料は癌の臨床徴候を示し、かつ/又は当技術分野で周知されており、又は特定の癌についての既知のリスク因子のいずれかを示す対象から取得される。いくつかの実施態様において、該癌は、膀胱癌、例えば、尿路上皮膀胱癌である。

20

【0114】

CTCデータ作成の文脈において本明細書において使用される用語「直接的分析」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文脈において検出されることを意味する。いくつか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。

【0115】

本件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文脈における希少事象の同定を包含している集団の、直接的分析、すなわち富化を伴わ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較正を可能にする。直接的分析を基にせず、代わりに、本質的に歪められた構成上での希少事象の比較で富化された集団を比較する方法では達成できない結果が、本件開示の方法の堅牢性である。本明細書に開示された直接的分析方法の堅牢性は、本明細書に記載のCTC亜型を含むCTCの特徴づけを可能にし、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、かつ請求項記載の方法の構成においてバイオマーカーの分析が可能である。

30

【0116】

いくつかの実施態様において、本明細書に開示する方法は、さらに個別の患者のリスク因子及び画像化データを包含し、該画像化データは、例えば非限定的に、X線コンピュータ断層撮影（CT）、超音波、陽電子放射断層撮影（PET）、電気インピーダンス断層撮影、及び磁気共鳴（MRI）による、任意の形態の公知かつ当技術分野で使用される画像化モダリティを含む。当業者であれば、様々な技術分野で知られた基準に基づいて、画像化モダリティを選択することができることを理解する。本明細書に記載の本発明の方法は、1枚以上の画像化データを包含することができる。本明細書で開示する方法において、1以上の個別のリスク因子を年齢、人種、家族歴からなる群から選択することができる。当業者であれば、様々な技術分野で知られた基準に基づいて、追加の個別のリスク因子を選択することができることを理解する。本明細書に記載の本発明の方法は、1以上の個別のリスク因子を包含することができる。従って、バイオマーカーは画像化データ、個別のリ

40

50

スク因子、及びCTCデータを含むことができる。本明細書に記載のバイオマーカーはまた、これらに限定はされないが、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、生体高分子の代理物としての機能を果たす関心対象の領域、及びそれらの組み合わせ（例えば、糖タンパク質、リボヌクレオタンパク質、リボタンパク質）、並びに生体分子の一部又は断片を含む生体分子を含み得る。

【0117】

CTCデータは、形態的、遺伝的、後成的特徴、及び免疫蛍光特徴を含み得る。当業者に理解されるように、バイオマーカーは、生体分子、又は生体分子の断片を含むことができ、それらの変化及び/又は検出は、個別に又は他の測定可能な特徴と組合わせて、癌と相互に関連付けられ得る。CTCは、単一細胞又は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放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。いくつかの実施態様において、CTCは、該細胞集団中に1:50,000~1:100,000の存在量を有する。

10

【0118】

本件開示の試料は、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取得されてもよい（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、7.5 mL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0.5 mLの相当量を収容する専用の顕微鏡スライド上への残存する有核細胞の堆積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、全血を採取しかつ処理する手順）を用いて、処理されてよい。いくつかの実施態様において、血液試料は、EDTA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、さらなる処理の前に、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。

20

30

【0119】

いくつかの実施態様において、本件開示の方法は、血液試料の白血球(WBC)数を取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。いくつか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相当するCTCを逆算するために、使用される。

【0120】

いくつかの実施態様において、本件開示の方法は、血液試料中の赤血球を溶解する初期工程を含む。いくつか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。ある実施態様において、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溶液中に再懸濁される。

40

【0121】

いくつかの実施態様において、試料、例えば血液試料由来の有核細胞は、平面支持体上に単層として堆積される。この平面支持体は、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<100 μmを有する任意の物質など任意の材料であってよい。いくつかの実施態様において、この材料は、フィルムである。いくつかの実施態様において、この材料は、スライドガラスである。ある実施態様において、本方法は、スライドガラス上の単層として血液試料由来の有核細胞を堆積する初期工程を包含している。スライドガラスは、生存細胞の最大保持が可能で

50

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）。いくつか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、スライドグラス上に堆積される。いくつかの実施態様において、この開示の方法は、スライドグラス上に約300万個の細胞を堆積することを含む。追加の実施態様において、この開示の方法は、スライドグラス上に約200万～約300万個の細胞を堆積することを含む。いくつかの実施態様において、スライドグラス及び固定された細胞試料は、本件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。

【0122】

いくつかの実施態様において、本件開示の方法は、富化を伴わない血液試料中の有核細胞を同定する初期工程を含む。いくつか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。ある実施態様において、蛍光染色は、核酸特異的染色を含む。ある実施態様において、蛍光染色は、ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）である。いくつか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）、表面抗原分類（CD）45、及びDAPIを含む。本明細書にさらに記載されたいくつかの実施態様において、CTCは、周囲の有核細胞からの識別可能な免疫蛍光染色を含む。いくつかの実施態様において、CTCの識別可能な免疫蛍光染色は、DAPI（+）、CK（+）及びCD45（-）を含む。いくつか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。いくつか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成される（Marrinucci D.らの文献、2012, Phys. Biol. 9 016003）。

【0123】

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、白血球に共通の抗原CD45を標的化する汎白血球特異的な抗体、及び核染色DAPIを用いて、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成することができる。周囲のWBCは、CD45を標的化する汎白血球特異的な抗体を用いて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、該CTCは、周囲の有核細胞から識別可能な免疫蛍光染色を含む。

【0124】

さらなる実施態様において、該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及び破壊された外見を伴わない無傷な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類別化され得る。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富化を伴わない直接的分析は、高い感度及び高い特異度を生じると同時に、高解像度細胞形態学的情報を加えて不均一であることがわかっているCTC集団の詳細な形態的特徴づけを可能にする。

【0125】

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データを作成し並びに/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、その変化及び/又は検出を、CTCと相互に関連付けることができる形態的特徴、生体分子、又は生体分子の断片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、生体高分子の代理物としての機能を果たす関心対象の領域及びそれらの組み合わせ（例えば、糖タンパク質、リボヌ

10

20

30

40

50

クレオタンパク質、リポタンパク質)を含む生体分子を含むが、これらに限定されるものではない。この用語はまた、生体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。

【0126】

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、Marrinucci D.らの文献、2012, Phys. Biol. 9 016003参照)、配列決定アプローチ、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、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、放射免疫アッセイ、ドットブロッティング、及びFACSなどの免疫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データを作成することができることを認識するであろう。免疫アッセイ技術及びプロトコルは一般に、当業者に公知である(Price及びNewmanの文献、「免疫アッセイの原理と実践(Principles and Practice of Immunoassay)」、第2版、Grove's Dictionaries、1997;及び、Goslingの文献、「免疫アッセイ:実践法(Immunoassays: A Practical Approach)」、Oxford University Press、2000)。競合及び非競合免疫アッセイを含む様々な免疫アッセイ技術を、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「放射免疫アッセイ及び関連技術への入門(An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques)」、Elsevier Science、1995、ISBN 0444821198も参照されたい)。

【0127】

当技術分野で公知であり、かつ各論的には(specifically)記載されていない標準的分子生物学技術は、一般にSambrookらの文献、「分子クローニング:実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)、及びAusubelらの文献、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)、及びPerbal, Aの文献、「分子クローニングの実践的ガイド(A Practical Guide to Molecular Cloning)」、John Wiley & Sons, New York (1988)、及びWatsonらの文献、「組換えDNA(Recombinant DNA)」、Scientific American Books, New York、及びBirrenら(編)「ゲノム分析:実験室マニュアルシリーズ(Genome Analysis: A Laboratory Manual Series)」、Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)にあるように従う。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は一般的に、「PCRプロトコル:方法及び応用のガイド(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications)」、Academic Press, San Diego, Calif. (1990)にある通りに実施することができる。特定の試料のDNAコピー数プロファイルを決定することができる任意の方法を、本発明のバイオマーカーを同定するのに十分な解像度を提供する、本発明による分子プロファイリングに使用することができる。当業者は、本発明の1以上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の全ゲノムコピー数変化を評価するために、いくつかの異なるプラットフォームを使用することを認識し、かつ使用することができる。

【0128】

インサイチュハイブリダイゼーションアッセイは周知されており、一般にAngererらの文献、Methods Enzymol. 152:649-660 (1987)に記載されている。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を固体支持体、典型的にはスライドガラスに固定する。DNAをプロービングする場合、細胞を熱またはアルカリで変性させる。続いて細胞を中程度の温度でハイブリダイゼーション溶液と接触させて、標識された特異的プローブをアニーリングさせる。好ましくはプローブを、放射性同位体又は蛍光レポーターで標識する。FISH(蛍光インサイチュハイブリダイゼーション)では蛍光プローブが高度の配列類似性を示す配列部分にのみ結合する蛍光プローブを使用する。

【0129】

10

20

30

40

50

FISHは細胞中の特定のポリヌクレオチド配列を検出し、かつ局在を明らかに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、組織試料内の特定のRNA、例えばmRNAを検出し、かつその局在を明らかにするために使用することができる。FISHでは、蛍光プローブが高度の配列類似性を示す特定のヌクレオチド配列と結合する蛍光プローブを使用する。蛍光顕微鏡検査を使用して、蛍光プローブが結合しているかどうか、及びどこに結合しているかを突き止めることができる。特定のヌクレオチド配列、例えば転座、融合、切断、重複、及び他の染色体異常の検出に加え、FISHは細胞及び組織内の特定の遺伝子のコピー数及び/又は遺伝子発現の空間的-時間的パターンを規定する一助となり得る。

【0130】

核酸配列決定技術は遺伝子発現の分析に好適な方法である。これらの方法の基礎となる原理は、試料中でcDNA配列が検出される回数が、その配列に対応するRNAの相対発現と直接関係することである。これらの方法は時に用語デジタル遺伝子発現(DGE)によって参照され、得られるデータの離散的数的特性を反映する。この原理が適用される初期の方法は、遺伝子発現連鎖解析(SAGE)及び大規模並列シグネチャー配列決定法(MPSS)であった。例えば、S. Brennerらの文献、Nature Biotechnology 18(6):630-634 (2000)を参照されたい。より最近、「次世代」配列決定技術の出現により、DGEはより簡単に、よりハイスループットに、かつより手ごろなものとなった。結果として、より多くの実験室でDGEを利用し、以前に可能であったよりも多くの個別の患者試料におけるより多くの遺伝子の発現をスクリーニングすることができる。例えば、J. Marioniの文献、Genome Research 18(9):1509-1517 (2008); R. Morinの文献、Genome Research 18(4):610-621 (2008); A. Mortazaviの文献、Nature Methods 5(7):621-628 (2008); N. Cloonanの文献、Nature Methods 5(7):613-619 (2008)を参照されたい。

【0131】

当業者であれば、例えば抗体、アプタマー、融合タンパク質、例えばタンパク質受容体若しくはタンパク質リガンド成分を含む融合タンパク質、又はバイオマーカー特異的低分子結合剤を含む当技術分野で公知の任意のクラスのマーカー特異的結合試薬を使用して、バイオマーカーの存在又は不存在を検出することができることをさらに認識するであろう。いくつかの実施態様において、CK又はCD45の存在又は不存在を、抗体により決定する。当業者であれば、バイオマーカーの存在又は不存在を、バイオマーカーの染色体座位での染色体コピー数変化を評価することによって測定することができることをさらに認識するであろう。ゲノムバイオマーカーは、例えば、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGHS)などの任意の技術、又は癌細胞などの細胞株の一塩基多型アレイ(遺伝子型判定マイクロアレイ)によって同定することができる。バイオインフォマティクスアプローチは、qPCR又はインサイチュハイブリダイゼーションのような技術を使用するさらなる分析に加え、増幅及び欠失の適切なコピー数閾値を使用して、細胞株群を識別し、バイオマーカーを示す染色体異常の領域を同定することができる。染色体DNAのコピー数変化の検出のための核酸アッセイ方法には:(i)無傷な組織又は細胞試料に対するインサイチュハイブリダイゼーションアッセイ、(ii)組織試料から抽出した染色体DNAに対するマイクロアレイハイブリダイゼーションアッセイ、及び(iii)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、又は組織試料から抽出された染色体DNAに対する他の増幅アッセイがある。これらのいずれかのフォーマットにおける核酸の合成アナログ、例えばペプチド核酸を使用するアッセイも使用することができる。

【0132】

バイオマーカーは検出可能に標識された核酸ベースのプローブ、例えばデオキシリボ核酸(DNA)プローブ又はタンパク質核酸(PNA)プローブ、又は特異的に設計された染色体標的にハイブリダイズするように設計され/選択された非標識プライマーを使用したハイブリダイゼーションアッセイにより検出することができる。非標識プライマーは増幅アッセイにおいて、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって使用され、ここではプライマー結合後、ポリメラーゼはその後の検出のための標的核酸配列を増幅する。PCRにおい

10

20

30

40

50

て使用される検出プローブ又は他の増幅アッセイは、好ましくは蛍光であり、さらにより好ましくは、検出プローブは「リアルタイムPCR」において有用である。蛍光標識はまた、インサイチュハイブリダイゼーションにおける使用に好ましいが、ハイブリダイゼーション技術に一般的に使用される他の検出可能な標識、例えば酵素的、発色性、及び同位体標識も使用することができる。有用なプローブ標識技術は、参照により本明細書に組み込まれている「分子細胞遺伝学：プロトコル及び応用 (Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications)」、Y.-S. Fan, Ed., Chap. 2、「ゲノム標的のための標識蛍光インサイチュハイブリダイゼーションプローブ (Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets)」、L. Morrisonらの文献、p. 21-40, Humana Press, .COPYRGT. 2002に記載されている。マイクロアレイ分析によるゲノムバイオマーカの検出において、これらのプローブ標識技術を適用して、患者試料からの染色体DNA抽出物を標識し、これをその後マイクロアレイにハイブリダイズさせる。

10

【0133】

他の実施態様において、バイオマーカータンパク質は免疫学的手段又は他のタンパク質アッセイにより検出することができる。本発明において有用なバイオマーカールレベルを測定するためのタンパク質アッセイ法は、(i) 発現するバイオマーカートの標識抗体又はタンパク質の結合を伴う免疫アッセイ法、(ii) 発現するバイオマーカートを決定するための質量分析法、及び(iii) 発現するバイオマーカートに対する「プロテインチップ」アッセイに基づくプロテオミクスを含み得る。有用な免疫アッセイ法には、当技術分野で公知の任意のフォーマット、例えば、これらに限定はされないが、ELISAフォーマット、サンドイッチフォーマット、競合阻害フォーマット(フォワード又はリバース競合阻害アッセイの両方を含む)、又は蛍光分極フォーマットを使用して実施する溶液相アッセイ、及び免疫組織化学(「IHC」と呼ぶ)などの固相アッセイの両方がある。

20

【0134】

本件開示の抗体は、バイオマーカートと特異的に結合する。この抗体は、当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ル (Current Protocols in Immunology)」(1991); Harlow及びLaneの文献、「抗体：実験室マニュアル (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、天然に生産されるか、全体的若しくは部分的に合成により生産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とすることができる。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、又は部分的若しくは全体的に合成により生産することができる。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とすることができる。いくつか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認識するであろう。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とすることができる。この抗体は、任意の手段により生産することができる。例えば、この抗体は、無傷な抗体の断片化により、酵素的に若しくは化学的に生産することができるか、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生産することができる。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。完全分子の機能性構成要素である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、無傷な抗体に勝る利点をもたらしすることができる。

30

40

【0135】

50

検出可能な標識は、本発明の方法においてCTCデータを作成する場合に、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（tetra-rhodimine 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、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、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。

10

【0136】

質量分析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、本件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。

20

【0137】

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、及びリサミンを含む。間接的標識は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（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、当技術分野において周知である様々な酵素を含む。セイヨウワサビペルオキシダーゼ、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、当技術分野において周知である。

30

【0138】

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な、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、本件開示の方法を実践するために使用されるアッセイを、自動化するか、又はロボット制御により実行することができ、かつ複数の試料からのシグナルを、同時に検出することができる。

40

【0139】

いくつか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。いくつか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。いくつか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。いくつかの実施態様において、1以上の免疫蛍光マーカーは、CD45及びCKを含む。

50

【0140】

いくつか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不存在は、識別可能な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。いくつかの実施態様において、1以上の免疫蛍光マーカーの存在又は不存在の決定は、例えば、WBCを識別可能に同定する、CD45の免疫蛍光染色を使用し、CTCの識別可能な免疫蛍光染色を、WBCの識別可能な免疫蛍光染色と比較することを含む。W

50

BC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わせが存在する。これらは、CD45の免疫蛍光染色との組合わせにおいて、又はこれの代わりとして含む、様々な組合わせで使用してもよい。

【0141】

いくつかの実施態様において、CTCは、周囲の有核細胞と比べて、識別可能な形態的特徴を含む。いくつかの実施態様において、この形態的特徴は、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。いくつかの実施態様において、この方法は、核の詳細、核輪郭、核小体の存在又は不存在、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、本件開示の形態的特徴は、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特徴、特性、特質、又は態様を含み得ることを理解している。

10

【0142】

CTCデータは、当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成することができる。いくつか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。ある実施態様において、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 016003を参照されたい)。いくつかの実施態様において、富化を伴わ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不存在の決定、並びに有核細胞の形態の評価が可能である。いくつか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。

20

【0143】

いくつかの実施態様において、CTCデータは、1以上のバイオマーカー、例えばCK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、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。いくつか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、「不存在」と考えられる。

30

【0144】

いくつか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不存在は、視野内のWBC上の全ての免疫蛍光マーカーが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)。

40

【0145】

典型的には、各顕微鏡視野は、CTC及びWBCの両方を含む。ある実施態様において、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。ある実施態様において

50

、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。ある実施態様において、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。

【0146】

本明細書記載の方法のいくつかの実施態様において、CTCデータの作成は、血液試料中に存在するCTCの計数を含む。いくつかの実施態様において、本明細書に記載の方法は、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。

10

【0147】

本明細書記載の方法のいくつかの実施態様において、CTCデータの作成は、非従来型CTCを含む、CTCの識別可能な亜型を検出することを含む。いくつか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、本明細書に記載の方法は、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。

20

【0148】

いくつかの実施態様において、その開示された方法は、予測的モデルの使用を包含する。さらなる実施態様において、その開示された方法は、測定可能な特徴を参照特徴と比較することを包含する。当業者であれば認識できるように、そのような比較は参照特徴との直接的比較、又は参照特徴を予測的モデルに組み込んだ間接的比較とすることができる。さらなる実施態様において、測定可能対象 (a measurable) の分析は、線形判別分析モデル、サポートベクター機械分類アルゴリズム、再帰的特徴量削減モデル、マイクロアレイモデルの予測解析、ロジスティック回帰モデル、CARTアルゴリズム、フレックスツリーアルゴリズム、LARTアルゴリズム、ランダムフォレストアルゴリズム、MARTアルゴリズム、機械学習アルゴリズム、ペナルティー回帰法、又はそれらの組み合わせの1以上を包含する。特定の実施態様において、該解析は、ロジスティック回帰を含む。追加の実施態様において、決定は、リスクスコアとして表される。

30

【0149】

解析的分類プロセスでは、様々な統計解析法のいずれか1つを使用して、定量的データを操作し、かつ試料の分類を提供することができる。有用な方法の例には、線形判別分析、再帰的特徴量削減、マイクロアレイの予測解析、ロジスティック回帰、CARTアルゴリズム、フレックスツリーアルゴリズム、LARTアルゴリズム、ランダムフォレストアルゴリズム、MARTアルゴリズム、機械学習アルゴリズム、及び当業者に公知の他の方法がある。

40

【0150】

試料が所与のクラスに属する確率を決定するための閾値を設定する予測的モデリング法によって、分類を行うことができる。確率は好ましくは少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%、又はそれより高い。また、取得したデータセット及び参照データセットの間の比較によって統計的有意差がもたらされるかどうか決定することにより、分類を行うことができる。もしそうであるならば、データセットを取得した試料は、参照データセットクラスに属しないと分類する。反対に、そのような比較によって参照データセットとの統計的有意差がない場合、デー

50

タセットを取得した試料を参照データセットクラスに属するものとして分類する。

【0151】

モデルの予測能力は、特定の値、又は値の範囲の質測定基準、例えばAUROC (ROC曲線下面積) 又は精度を提供するその能力に従って評価することができる。曲線下面積基準は、完全なデータ範囲にわたって分類基準 (classifier) の精度を比較するのに有用である。AUCのより大きい分類基準は、未知試料 (unknowns) を関心対象の2つの群間で正確に分類する能力がより高い。ROC解析を使用して、様々な臨床状況下で最適な閾値を選択し、特異度と感度の間に存在する固有のバランスをとることができる。いくつかの実施態様において、所望の質閾値は、少なくとも約0.7、少なくとも約0.75、少なくとも約0.8、少なくとも約0.85、少なくとも約0.9、少なくとも約0.95、又はそれより高い精度で試料を分類する予測的モデルである。代替の基準として、所望の質閾値は、少なくとも約0.7、少なくとも約0.75、少なくとも約0.8、少なくとも約0.85、少なくとも約0.9、又はそれより高いAUCで試料を分類する予測的モデルを指すことができる。

10

【0152】

当技術分野で公知であるように、予測的モデルの相対感度及び特異度を調節して、特異度測定基準又は感度測定基準のいずれかを優位にすることができ、ここでこの2つの測定基準は逆相関関係を有する。上記モデルにおける限界値は、実施される検査の特定の要求に応じて、選択した感度又は特異度のレベルを提供するように調節することができる。感度及び特異度の一方又は両方は、少なくとも約0.7、少なくとも約0.75、少なくとも約0.8、少なくとも約0.85、少なくとも約0.9、又はそれよりも高くすることができる。

20

【0153】

生データは、通常3連又は複数の3連で、最初に各測定可能な特徴又はバイオマーカの値を測定することにより、解析することができる。該データは操作することができ、例えば、生データを標準曲線を使用して変換することができ、3連の測定値の平均を、各患者に対する平均及び標準偏差の計算に使用する。これらの値は、モデルにおいて使用する前に変換、例えば対数変換、Box-Cox変換 (Box及びCoxの文献、Royal Stat. Soc., Series B, 26:211-246(1964)) することができる。そして該データを、状態に従って試料を分類する予測的モデルに入力する。結果として得られる情報を、患者又は医療提供者に伝達することができる。いくつかの実施態様において、該方法は、>60%、>70%、>80%、>90%、又はそれより高い特異度を有する。

30

【0154】

当業者であれば理解するように、解析的分類プロセスは、様々な統計解析法のうちのいずれか1つを使用して、定量的データを操作し、試料の分類を提供することができる。有用な方法の例には、非限定的に、線形判別分析、再帰的特徴量削減、マイクロアレイの予測解析、ロジスティック回帰、CARTアルゴリズム、フレックスツリアルゴリズム、LARTアルゴリズム、ランダムフォレストアルゴリズム、MARTアルゴリズム、及び機械学習アルゴリズムがある。

【0155】

別の実施態様において、本件開示は、少なくとも1つの試料中に発現するバイオマーカとの結合に特異的な少なくとも1つの標識プローブ、タンパク質、又は抗体を含む容器を含む、バイオマーカレベルの測定用キットを提供する。また、これらのキットはアッセイ用の他の関連する試薬を含む容器を含んでいてもよい。いくつかの実施態様において、キットは、バイオマーカと結合させるための標識モノクローナル抗体又は核酸プローブを含む容器、及び少なくとも1つの校正組成物を含む。キットは、検出可能な標識を検出するために必要な構成要素 (例えば、酵素又は基質) をさらに含むことができる。また、キットはアッセイし、検査試料と比較することができる対照試料又は一連の対照試料を含むことができる。キットの各構成要素は個別の容器内に封入することができ、様々な容器の全てを、キットを使用して実施されるアッセイの結果を解釈するための説明書とともに、一つの包装中に入れることができる。

40

【0156】

50

先の記載から、本明細書に記載の発明に変更及び修正を加えて、様々な使用及び条件に採用することができることが明らかであろう。また、そのような実施態様は以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【0157】

本明細書中のあらゆる変数の定義における要素の表の列挙には、列記された要素のあらゆる単一の要素又は組合わせ（又はサブコンビネーション）としてのその変数の定義を含む。本明細書における実施態様の列挙には、あらゆる単一の実施態様又は、あらゆる他の実施態様との組合わせ、又はそれらの一部としての実施態様を含む。

【0158】

本明細書中に言及された全ての特許及び刊行物は、各々の独立した特許及び刊行物が具体的かつ個別的に参照により組み込まれていることが示されているかのように、同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれている。

10

【0159】

以下の実施例を、限定としてではなく、例示として提供する。

【実施例】

【0160】

(実施例)

(実施例1)

【0161】

CTCの試料の評価を、Epic Sciencesプラットフォームを使用して過去に報告した通りに実施した(Marrinucciらの文献、Phys Biol 9:016003, 2012)。Epic CTC収集及び検出プロセスは、以下の流れである：(1) 血液を溶解させ、血液試料由来の有核細胞をスライド上に載せる；(2) スライドを-80 の生物貯蔵容器中で保存する；(3) スライドをCK、CD45、DAPI、及びARで染色する；(4) スライドをスキャンする；(5) マルチパラメータデジタル病理アルゴリズムを実行する、及び(6) ソフトウェア及びヒト分析者によるCTCの確認並びにバイオマーカーの発現の定量化である。続くCTCの回収及びゲノムプロファイリングワークフローの間、個別の細胞を単離し、全ゲノム増幅、及びNGSライブラリ調製に付した。配列決定をIllumina NextSeq 500により実施した。

20

【0162】

血液試料は、溶血、遠心分離、再懸濁及びスライド上への播種を経た後、-80 で保存した。分析の前に、スライドを解凍し、免疫蛍光により標識（汎サイトケラチン、CD45、DAPI）し、かつ自動蛍光透視法により画像化し、その後人力で病理学者として熟練した技術者（MSL）によって確認した(Marrinucciらの文献、Phys Biol 9:016003, 2012)。DAPI (+)、CK (+)、及びCD45 (-) の強度を先に記載した通りCTC計数の間に、特徴として類別した。

30

【0163】

より具体的には、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。受け取ったらすぐに、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枚当たり播いた血液のミリリットル相当量を、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)。その後のCTC回収及びゲノムプロファイリングワークフローの間に、個別の細胞を単離し、全ゲノム増幅、及びNGSライブラリ調製に付した。配列決定をIllumina NextSeq 500により実施した。

40

50

【0164】

図1~4及び対応する図面の簡単な説明には、さらなる実験の詳細を記載する。

【0165】

(実施例2. mCRPC患者における単一CTCの特徴づけにより、アンドロゲン受容体シグナル伝達標的化療法 (AR Tx) への抵抗性の機構としての表現型及びゲノム不均一性が同定される)

【0166】

腫瘍不均一性 (多様性) は、感受性のバイオマーカーであると提案されている。本実施例では、より良い順番が利用可能な治療法を目指した、管理における決断時の感受性の予測的バイオマーカーとしての、CTCにおける細胞レベルベースの不均一性の分析を実証する。

10

【0167】

初期の焦点は、単一クローンから出現する細胞の形態的变化及びタンパク質発現の変化 (系譜のスイッチ又は可塑性)、例えばTMPRSS2-ERG融合体によるAR+ AR-の神経内分泌を含め、表現型 (顔認識) 又は細胞レベルでCTCを特徴づけることであった。

【0168】

CTCを「非細胞選択」プラットフォームを使用して単離し、形態/タンパク質化学により単一細胞レベルで分析した (顔認識) (図5)。非細胞選択とすることにより: CK-、小型、アポトーシス、CTCクラスターを含めたあらゆる希少細胞型の特徴づけが可能となる。

【0169】

CTCの以下のタンパク質特徴及び形態的特徴、表1に記載した核面積並びに他の特徴を含む、患者試料において同定された一連の個別の細胞特徴を、各CTCについて測定した (図6)。

20

【0170】

表1. タンパク質バイオマーカー及びデジタル病理特徴

【表1】

タンパク質バイオマーカー特徴	
CK c比 (タンパク質発現)	
AR c比 (タンパク質発現)	
デジタル病理特徴	
核面積 (um ²)	
細胞質面積 (um ²)	
核凸面面積 (um ²)	
細胞質凸面面積 (um ²)	
核長軸 (um)	
細胞質長軸 (um)	
核短軸 (um)	
細胞質短軸 (um)	
核真円度	
細胞質真円度	
核中実度	
細胞質中実度	
核エントロピー	
核の細胞質に対する凸面面積比	
核小体	
CK斑	
核斑	
追加の類別化変数	
CK状態 (CK陽性度)	
M1状態 (AR陽性度)	
クラスター状態	

30

40

50

【0171】

遺伝子発現について行ったことと同様に、20のタンパク質特徴及び形態的特徴を個別に記録し、主成分、すなわち重要な特徴が決定され、続いてクラスター化された場合に > 9000個のCTCの教師なし分析を実施した(図7)。これにより、15の異なるCTCの表現型を規定する数学的群分けが導かれた。図7では右側にヒートマップが示され、ここではy軸上に15の細胞型が色で規定され、x軸上に個別の特徴が規定されている。赤はダイナミックレンジの最低端に関する特徴(すなわち、小さい核面積)を反映し、一方緑はダイナミックレンジの最高端に関する特徴(すなわち、大きな核面積)を反映する(図7)。図23はまた、15のCTCの数学的表現型亜型がCTCのタンパク質特徴及び形態的特徴に基づく教師なし分析を使用して同定されたことを示すヒートマップを示す。図24のパネルA~Oは、15の細胞型の選択された特徴を示す。特定のCTCの表現型亜型から、患者の生存が予測される。図25は、CTCの計数及び15のCTCの表現型亜型により、ARSを採用すると180日までに死亡することが予測されることを示している(n=150試料)。優れた予測因子には、細胞型E(クラスター5)、K(クラスター11)、及びO(クラスター15)がある。図26に示されるように、一部のCTCの表現型亜型(細胞型E、K、及びN)により、AR標的化療法に反応するmCRPC患者が予測される。図27は、タキサン治療への反応を予測するCTCの表現型亜型(細胞型G、K、及びN)を示す。遺伝子発現について行ったことと同様に、20のタンパク質特徴及び形態的特徴を個別に記録し、主成分、すなわち重要な特徴が決定され、続いてクラスター化された場合に > 9000個のCTCの教師なし分析を実施した(図7)。これにより、15の異なるCTCの表現型を規定する数学的群分けが導かれた。図7では右側にヒートマップが示され、ここではy軸上に15の細胞型が色で規定され、x軸上に個別の特徴が規定されている。赤はダイナミックレンジの最低端に関する特徴(すなわち、小さい核面積)を反映し、一方緑はダイナミックレンジの最高端に関する特徴(すなわち、大きな核面積)を反映する(図7)。図23はまた、15のCTCの数学的表現型亜型がCTCのタンパク質特徴及び形態的特徴に基づく教師なし分析を使用して同定されたことを示すヒートマップを示す。図24のパネルA~Oは、15の細胞型の選択された特徴を示す。特定のCTCの表現型亜型から、患者の生存が予測される。図25は、CTCの計数及び15のCTCの表現型亜型により、ARSを採用すると180日までに死亡することが予測されることを示している(n=150試料)。優れた予測因子には、細胞型E(クラスター5)、K(クラスター11)、及びO(クラスター15)がある。図26に示されるように、一部のCTCの表現型亜型(細胞型E、K、及びN)により、AR標的化療法に反応するmCRPC患者が予測される。図27は、タキサン治療への反応を予測するCTCの表現型亜型(細胞型G、K、及びN)を示す。各細胞型は特有の形態的パターンを有する。例えば、図28に示すように、クラスター11(細胞型K)は大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を有する。複数の細胞型(細胞型G、K、及びM)が、ゲノム不安定性(LST)の予測に役立つ(図29)。これらの特定の亜型は、高いゲノム不安定性を考慮すると、DNA傷害薬物、例えば白金ベースの化学療法剤(すなわち、カルボプラチン、シスプラチン)、又はPARP阻害剤、DNA-PK阻害剤、及びATM経路を標的化する治療薬を含む、相同組換えの欠陥を標的化する標的化療法薬に感受性であり得る。

【0172】

静脈切開試料を管理における決断時に取得した：治療を担当する医師が治療法を選択した。決断時の221名のmCRPC患者からの管理下の収集の基準。A、E、又はTに先立つベースライン採血。続くPSA、服薬する時間、放射線無増悪生存期間(rPFS)及び全生存期間(OS)。9225個のCTCを表現型により同定し、特徴づける。31名の患者からの741個のCTCを、全ゲノムCNVによりクローン性及び遺伝子増幅/欠失について調べた。各決断時での細胞の不均一性又は多様性の程度に基づいて患者を順位分けした(図8)。図9は、mCRPC集団の人口統計を示している。15の異なる表現型上のCTCクラスの頻度は治療のラインによって異なり、時間とともにより不均一となった(図10)。図10において赤は大きな比率を占めるか、又はより多様性のある細胞型の普及率を表す。各カラムは患者であり、多くの縦の赤い区画があるカラムは、表現型上の不均一性が比較的高くなるようになっている。

【0173】

静脈切開試料を管理における決断時に取得した：治療を担当する医師が治療法を選択した。決断時の221名のmCRPC患者からの管理下の収集の基準。A、E、又はTに先立つベースライン採血。続くPSA、服薬する時間、放射線無増悪生存期間(rPFS)及び全生存期間(OS)。9225個のCTCを表現型により同定し、特徴づける。31名の患者からの741個のCTCを、全ゲノムCNVによりクローン性及び遺伝子増幅/欠失について調べた。各決断時での細胞の不均一性又は多様性の程度に基づいて患者を順位分けした(図8)。図9は、mCRPC集団の人口統計を示している。15の異なる表現型上のCTCクラスの頻度は治療のラインによって異なり、時間とともにより不均一となった(図10)。図10において赤は大きな比率を占めるか、又はより多様性のある細胞型の普及率を表す。各カラムは患者であり、多くの縦の赤い区画があるカラムは、表現型上の不均一性が比較的高くなるようになっている。

各患者試料について、観察された異なる細胞型の数を数え、CTCの不均一性をシャノン指数を計算することによって定量化する。シャノン指数は生態系の多様性を定量化するために生態学において広く使用され、生態系中に存在する異なる種の数に基づいている。シャノン指数の値は、生態系中に存在する異なる種の数が増加するか、又は一様性が増加する場合（すなわち、各々の種が同程度の数の生態系中に存在する実体を有する場合）に増加する。シャノン指数は全ての種が存在し、かつ全ての種が等しい数存在する場合に最大化され、1つの種のみが存在する場合に最小化される。従って、低いシャノン指数値は、試料中に認められるCTCの均一性のために不均一性が低い患者を示し、高いシャノン指数値は、存在する全ての型のCTCを有するために不均一性が高い患者を示す。図11に示すように、高いシャノン指数は治療のライン分だけ大きな多様性（不均一性）を示し、特に中央値の増加を伴い、第3及び第4ラインの治療法においてはより低い指数スコアはほとんどない。CTCの表現型上の不均一性が高いことにより、AR治療に対する増悪及び生存期間が短くなるが、タキサン治療に対してはそうでないことが予測される（図12A）。図12Bは、不均一性に基づくAR Txの転帰を示す。

10

20

30

40

50

【0174】

CTCの表現型上の不均一性が高いことにより、多変量モデルにおいてAR Txについてよりもタキサンについて転帰がより良好であることが予測される。過去生存の予後を示すことが示されている様々な因子を一変量及び多変量解析において調べた多変量のみを示す（図13）。不均一性が高いことにより、AR治療に対するよりもタキサン治療に対して感受性が高いことが予測された（図13）。図14は、CTCの垂型（K型）の普及により、ARの状態とは無関係にARTx及びタキサンの両方について転帰が不良であることが予測されることを示している。1つの特定の数学的に規定された細胞型、K型は、大きな核、多岐にわたる核サイズ、及び目立った核を有しており、両方の薬物クラスへの抵抗性と関連付けられた。

【0175】

利用可能な治療法が腫瘍内の「全ての細胞」を排除するものではないことを認識しているため、患者試料中のCTCの遺伝子型上の不均一性（単一の開始根幹傷害から発展する識別可能な変異プロファイルを有する腫瘍における単一の領域）を調べた。CTCを表現型により測定した後、カバーグラスを取り外し、個別のCTCを吸引して個別のチューブに入れる。CTCを増幅し、配列決定法のために調製する（図15）。続く配列決定情報工学処理を実施して、クローン性及び増幅/欠失を評価した（図15）。

【0176】

単一細胞CTC配列決定法により、クローンの多様性及び系統発生的疾患系譜の情報を得る。各患者試料を別々に分析した。患者試料中の他のCTCに対する単一のCTCのゲノムCNVプロットを個別にキュレートした。クローン性を少なくとも2つのCTCにおける、例えば、5番染色体長腕の喪失を有する、若しくは有さない同じ患者からの2つの細胞、又はARの増幅を有する、及び有さない患者からの2つのクローンにおける、大規模ゲノム変化及び既知の駆動因子の変化の局所の増幅又は欠失に基づいて特徴づけた（図16）。

【0177】

単一のCTCのCNVプロファイルにより、クローンの多様性及び系統発生的疾患系譜についての情報が得られる。一人の患者から取得した23細胞のうち、8個は比較的变化がなく、7個は複数の変化を有し、続いて変化は多様であった：5つはさらに2つ目の変化を有する一方の経路にあり、2つはさらにもう一方の経路にあり、そして1つである（図17）。この分析は3つの主要な値を提供する：1つには、組織/cfDNA分析はサブクローンを区別するのに多大な困難を有する。2つには、クローンの発達は異なる細胞がより早期の損傷から派生する場合に起こり、そのためにどのサブクローンの変化が特定の薬物への感受性/抵抗性を有するかを理解するために経時的に患者をモニタリングし、かつ最終的に新たな薬物治療又は組み合わせへの反応の重みつき平均を予測することが可能となる。3つには、単一の細胞内での異なる変化の共発生を理解することは、潜在的に経路の利用についての情報（すなわち、ARの増幅及びPTENの欠失を有するのが同一細胞におけるものか、異なる細胞におけるものかということ、重要となり得る）を得る一助となり得る。

【 0 1 7 8 】

また、単一のCTCの配列決定法により、ARTxについて検討され得なかった第2ラインのタキサン後の患者におけるクローン多様性の欠如についての情報を得ることができる。この患者はエンザルタミドに反応した(図18)。図19に示すように、CTCの表現型上の不均一性は、ゲノムの不均一性と相互に関連付けられる。図20Aは、高頻度のCNV、多くの数の切断点を特徴とする細胞型Kのゲノミクス、並びに付随する大きな核、高い核エントロピー、及び高頻度の核小体を特徴とする表現型の例を示す。図20Bは、全ての他のCTCの表現型と比較した細胞型Kのゲノム不安定性を示している。図21は、表現型上の不均一性が高いことが、AR-V7陰性患者における有益なバイオマーカーであることを示している。図22は、第1選択治療の前の患者からの均一なゲノムプロファイルを示す6つのCTCの、CTCの表現型上の不均一性が低いことを示している。

10

【 0 1 7 9 】

図23は、15のCTCの数学的表現型垂型のヒートマップが、CTCのタンパク質特徴及び形態的特徴に基づく教師なし分析を使用して特定されたことを示している。

【 0 1 8 0 】

教師ありクラスター解析を使用して、5つの形態的特徴及びタンパク質発現特徴が、CTCのゲノム不安定性の予測に役立つことを見出す。初めの4つの特徴はゲノム不安定性と正の相関を示し、最後の1つは負の相関を示す(図30)。

【 0 1 8 1 】

図31に示すように、CK(-)のCTCは、ゲノム不安定性の出現率がより高く、ゲノム不安定性の予測に役立つ。

20

【 0 1 8 2 】

以下の遺伝子：ACADSB、AR、BRAF、CCDC69、ETV1、EZH2、KRAS、NDRG1、PTK2、SRCIN1、YWHAZの増幅は、ゲノム不安定性の予測に役立つ。以下の遺伝子：ABR、ACADSB、BCL2、CCDC6、CDKN2B-AS1、CXCR4、KLF5、KRAS、LOC284294、MAP3K7、MTMR3、PTEN、PTK2B、RB1、RBPMS、RND3、SMAD4、SNX14、WVVOX、ZDHHC20の欠失は、ゲノム不安定性の予測に役立つ。

【 0 1 8 3 】

高精度のCTCのゲノム不安定性の予測のための分類基準を、タンパク質特徴及び形態的特徴に基づいて開発した。図32において、Y軸は真のLST(切断点のn数)を示し、X軸は予測された不安定性(安定対不安定)を示す。ゲノム不安定性が高いと予測されたCTCは、DNA傷害薬物、例えば白金ベースの化学療法剤(すなわち、カルボプラチン、シスプラチン)、又はPARP阻害剤、DNA-PK阻害剤、及びATM経路を標的化する治療薬を含む、相同組換えの欠陥を標的化する標的化療法薬に感受性であり得る。

30

【 0 1 8 4 】

図33は、表現型上の不均一性が全生存期間及びAR標的化療法への反応の予測に役立つことを示している。図34は、CTCの表現型上の不均一性が、遺伝子型上の不均一性の予測に役立つことを示している。表現型上の不均一性が高いことは、表現型上の不均一性が低いことよりも複数のゲノムクローンとなる可能性が40倍高い。図35は、CTCのゲノム不安定性が、mCRPC患者の全生存率の予測に役立つことを示している。図36は、CTCのゲノム不安定性が、mCRPC患者のタキサン治療への反応の予測に役立つことを示している。

40

【 0 1 8 5 】

ゲノム不安定性。LST及びPGAを、ゲノム不安定性の代理として測定した。LST：隣接する少なくとも10 Mbの領域間の染色体切断のn数(Popovaらの文献、Cancer Res. 72(21):5454-62 (2012))。PGA：コピー数変化を有する患者のゲノムのパーセンテージ(増幅又は欠失)(Zafaranaらの文献、Cancer 2012 Aug; 118(16): 4053 (2012))。例：高いLST(27)及び高いPGA(23%)、図37A~C。

【 0 1 8 6 】

(実施例3：液体生検のHRD+シグネチャーの開発)

【 0 1 8 7 】

50

本実施例は、治療前の決定的な臨床決断時点での、簡単な末梢血を採取したのから単離した循環腫瘍細胞（CTC）におけるHRDを検出するためのCTCベースの方法の開発を実証する。配列決定された > 600 の個別のCTCによって検出されたHRDゲノム変化（LST）に教示を受けながら、マルチパラメータ大容量画像分析アルゴリズムを使用して、これらの変化と関連付けられる細胞及び核の形態的特徴に基づいて個別のCTCのHRD状態を決定した。不均一及び均一疾患状態の両方の内のHRD+表現型を有するCTCのサブクローン普及率に基づいて、この検査により細胞レベルで78%の精度及び86%の特異性でHRDのゲノミクスを予測することができる。患者のスコア化指標を利用することにより、患者レベルでのHRD+表現型の精度が95%まで向上する。

【0188】

Epic SciencesによるHRD+シグネチャーの普及率及び臨床有効性：168名及び86名のmCRPC患者の確認コホートにおいて、発達したHRDシグネチャーはそれぞれ32%及び37%の患者で検出された。マーカーの普及率は同様のコホート内で最近報告されたHRD関連ゲノム変化の10~20%の普及率と比較して、より後のラインの全身療法（第1ライン：25%、第4ライン：41%）にある患者において増加する。HRD+であると特定された患者は、HRD-である患者と比較して、AR Tx（HR=9.83、 $p < 0.0001$ ）及びタキサン（HR=3.31、 $p=0.001$ ）に対する悪化したOSを有する。

【0189】

Epic SciencesのHRD+シグネチャーにより、mCRPCにおけるPARPi及び白金治療への反応が予測される：プロスペクティブな無作為化したAR Tx対AR Tx + PARPiの第II相臨床試験において、HRD+患者はAR Tx + PARPiのアームにおいて統計的に有意に全奏効率（ORR、PSAの > 50%の低下）が向上した（88%対42%）。さらに、AR Txアームの患者は、治療中の採血に対するベースラインからHRD+ CTCの320%の増加を示した。AR Tx + PARPiアームの患者は、治療中の採血に対するベースラインからHRD+ CTCの95%の低下を示した。また、早期のデータから、HRD+シグネチャーにより白金化学療法薬への感受性のORR並びに白金化学療法薬による治療中の採血に対するベースラインからの同様のHRD+ CTCの低下が予測されることが裏付けられる。

【0190】

Epic SciencesのPARPi抵抗性シグネチャー：HRD+ CTCバイオマーカーシグネチャーに加え、Epic SciencesではPARPiへの主抵抗性を予測するためのシグネチャーも開発してきた。PARPi抵抗性シグネチャーにより、上皮の可塑性に関連する特定のCTC表現型並びにAR/P13K相互フィードバックが併用療法AR Tx + PARPiに抵抗性を示すことが特定された。Epic SciencesのCTC HRD感受性及びPARPi抵抗性のシグネチャーは、顕著に関連の小さいCOGSにより5日かけずに実施することができる頑健で臨床適合したプラットフォームに関する非侵襲的な代替検査である。mCRPC患者におけるEpic SciencesのHRD+ CTCマーカーのより高い普及率、並びにPARPiへの反応性及び抵抗性マーカーの両方に基づき患者を階層化する能力により、これは実践において、かつ臨床試験の全体を通じて臨床決断を導くための貴重なツールとなる。

【0191】

簡潔に説明すると、血液試料を収集し、赤血球を溶解させ、かつ白血球及びCTCを含む残りの有核細胞をスライドグラス上に堆積させた。試料体積及びWBCの数に応じて、各試料につき最大12枚のレプリケートスライドを作製した。2枚のレプリケートスライドを複数のサイトケラチン（CK）、CD45、及びN-末端ARの発現を標的化する抗体のカクテルを使用して、IFによって染色した。DAPI染色を使用して核面積及び背景を規定した。CTCである可能性が高い蛍光特徴及び形態的特徴の特定された外れ値細胞を用いて、CTCを同定するためのアルゴリズムを利用した。熟練した分析者が、マーカーの発現及び形態に基づいてCTCを分類した。報告すべき値には、CTC/mL、AR+/- CTC/mL、CK+/- CTC/mL、アポトーシス性CTC/mL、及びCTCクラスター/mLを含めた。

【0192】

CTCの分類後、確認されたCTCに、単一細胞デジタル病理区分分けを行った。該区分分け

10

20

30

40

50

では、核 (DAPI)、細胞質 (CK)、及びARの明確な区分を作成し、報告した。自動化された細胞の区分分けとそれに続く熟練した分析者による区分の確認を患者血液試料において特定された全てのCTCに対し実施した。単一細胞特徴抽出では、20の定量的特徴及び2つの類別化特徴を抽出する。これらは以下のものを含む：

【 0 1 9 3 】

定量的特徴：(1) タンパク質特徴：ARタンパク質発現、CKタンパク質発現；(2) 形態的特徴：核面積 (μm^2)、細胞質面積 (μm^2)、核凸面面積 (μm^2)、細胞質凸面面積 (μm^2)、核長軸 (μm)、細胞質長軸 (μm)、核短軸 (μm)、細胞質短軸 (μm)、核真円度、細胞質真円度、核中実度、細胞質中実度、核エントロピー、核の細胞質に対する凸面面積比、核小体、CK斑、及び核斑。

10

【 0 1 9 4 】

質特徴：CK⁺又はCK⁻、AR⁺又はAR⁻。

【 0 1 9 5 】

単一細胞特徴抽出の後、個別のCTCをNGSで配列決定した。

【 0 1 9 6 】

全ゲノムCNV分析：非アポトーシス性個別CTCを細胞捕捉に使用されるNikon TE2000倒立型免疫蛍光顕微鏡と適合する新たな組のx、y基準へとスキャン手順の間に計算された元のCTC位置 (x及びy座標) を変換する数学的アルゴリズムに基づいてスライド上に再配置した。単一細胞をEppendorf TransferMan NK4顕微操作器を用いて捕捉した。細胞を1 μL のTE緩衝液を使用して個別の0.2 mL PCRチューブに入れ、過去に記載の通り高pH溶解緩衝液1.5 μL の追加によって直ちに溶解した。個別の細胞を含むチューブをスピンドウンし、さらなる処理までドライアイスで凍結した。単一細胞全ゲノム増幅 (WGA) を製造業者の説明書に従い、これにわずかな変更を加えて、SeqPlex Enhanced (Sigma) を使用して実施した。WGAの後、DNA濃度をUV/Visによって決定した。製造業者の推奨法に従い、これにわずかな変更を加えて、100 ngのWGA DNAからIllumina用NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (NEB) を使用してNGSライブラリを構築した。NGSライブラリ調製の後、ライブラリ濃度及びサイズ分布をPicoGreen (ThermoFisher Scientific) 及びFragment Analyzer (Advanced Analytical) によって決定した。各ライブラリから等ナノモルの濃縮物をプールし、Rapid Run Paired-End 2x150フォーマット (PE 2x150) を使用してIllumina NextSeq 500上で配列決定した。

20

30

【 0 1 9 7 】

生の配列決定データ (FASTQ) をBurrows-Wheeler Aligner (BWA, <http://bio-bwa.sourceforge.net>) を使用してUCSC (<http://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg38/bigZips/>) からのhg38ヒト参照ゲノムとアラインさせた。参照配列に対する1つ又はほんの少数の「良い」ヒットを有するリードのみを保つため、アラインメントファイル (BAM) を質 (MAPQ 30) についてフィルタリングした。フィルタリングしたアラインメントファイルを2つの分離したパイプラインを使用してさらに処理した (図1)。単一細胞WGA DNAからCNV分析対照ゲノムを作成するため、15個のWBCを血液疾患を有さない異なる成人男性個体から収集し、普遍的参照として使用した。各試料について、ピン当たりのリード数 (ピン当たりの値域サイズは2つのパイプライン間で異なる、以下を参照されたい) をリード総数が100万となるように比例的に正規化した。続いてこれらの対照の正規化リード数の中央値、平均、及び標準偏差 (sd) を、さらなる使用のため、各ピンに対し計算した。

40

【 0 1 9 8 】

分析パイプライン1をゲノム不安定性の評価に利用した。hg38ヒトゲノムを100万塩基対の約3000ピンへと分割し、各試料について各ピン内でリードを数えた。各試料について、ピン当たりのリード数を比例的に正規化して総リード数を100万とし、続いて各ピンについてGC含量を調節した [34]。WBC対照の各ピンのリード数の中央値を使用して低カバレッジピン (<100リード) を下流の分析から除外した。検査試料及びWBC対照の間の比を計算し、Log2変換の後報告した。染色体セグメントをR BioconductorのパッケージDNAcopyを使用して予測し、これによりDNAコピー数が変化している切断点を見出した。LSTを少なく

50

とも10 Mbの隣接した領域間での染色体の切断部の数として計算し、PGAをコピー数変化（増幅のカットオフ：>0.4、欠失のカットオフ：<-0.7）を有する患者のゲノムのパーセンテージとして計算した。

【0199】

（LSTの表現型の予測（pLST）：）

【0200】

トレーニング用の608の患者CTCのセットを定量的及び定性的デジタル病理特徴について分析した。CTCを順次画像分析及び配列決定法を介して処理した。多変量分類基準を以下の技法を利用して開発した。

【0201】

画像分析から、CTC当たりp個のタンパク質/形態的特徴（X1、X2、...、Xp）を得る。配列決定法から、CTC当たりのLSTの「実測の」数を得る（aLST）。次に、多変量線形回帰アルゴリズムを、画像法からの一連のタンパク質/形態的特徴を考慮してaLSTを予測するために、トレーニングする（ $aLST \sim X1 + X2 + \dots + Xp$ ）。トレーニング後（及び新たな検査データについての予測を行う際に）、このアルゴリズムはCTCごとに画像化からの一連のタンパク質/形態的特徴（X1、X2、...、Xp）を考慮して、予測されたLSTの数（「pLST」と命名する）を出力する。トレーニング又は検査の前に、共通に使用されるデータ変換及び正規化技法を使用して、aLSTにより画像化特徴（X1、X2、...、Xp）を線形化する。トレーニングセットに適用された任意の正規化を、検査セットに施す。特徴の重要性を評価するため、使用された1つの技法は各画像化特徴（X1、X2、...、Xp）がどれだけ強く一変量ベースのaLSTと相関しているか評価されるべきである。まず、各画像化特徴について、aLSTとのピアソン相関係数を計算する。相関係数が0より十分に大きいことは、特徴がaLSTと強く正の傾向をとる（例えば、Xに対する値がより大きいと、aLSTに対する値がより大きくなる）ことを示唆する。相関係数が0より十分に小さいことは、特徴がaLSTと強く負の傾向をとる（例えば、Xに対する値がより小さいと、aLSTに対する値がより大きくなる）ことを示唆する。相関係数が0付近であることは、特徴がaLSTといずれの方向にも傾かない（従ってaLSTの予測に役立ち得ない）ことを示唆する。各特徴についての相関係数の絶対値を考慮し、aLSTとのより弱い予測的関連を有する特徴に対し、aLSTとの強い予測的関連（正に、又は負に）を有する特徴を区別する。これは、図38に表されている。AR標的化療法（cyp17阻害剤、アピラテロン、又はAR阻害剤、エンザルタミド）又はタキサン化学療法（ドセタキセル又はカバジタキセル）の開始直前の採血による独立したmCRPCの患者コホートのpLST分析。アルゴリズムがpLST+細胞の様々なレベルを包含することは、このマーカーに陰性である患者よりも悪化した転帰を有する患者をもたらした。

【0202】

本明細書中のあらゆる変数の定義における要素の表の列挙には、列記された要素のあらゆる単一の要素又は組み合わせ（又はサブコンビネーション）としてのその変数の定義を含む。本明細書における実施態様の列挙には、あらゆる単一の実施態様又は、あらゆる他の実施態様との組み合わせ、又はそれらの一部としての実施態様を含む。

【0203】

本明細書中で言及された全ての特許及び刊行物は、各々の独立した特許及び刊行物が具体的かつ個別的に参照により組み込まれていることが示されているかのように、同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれている。

10

20

30

40

【 図 3 C 】

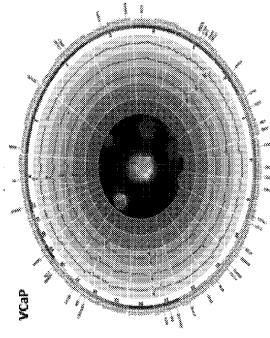


FIG. 3C

【 図 3 D 】

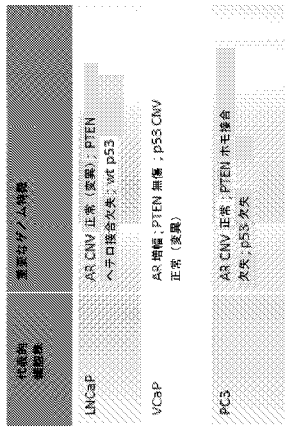


図 3D

【 図 4 A 】

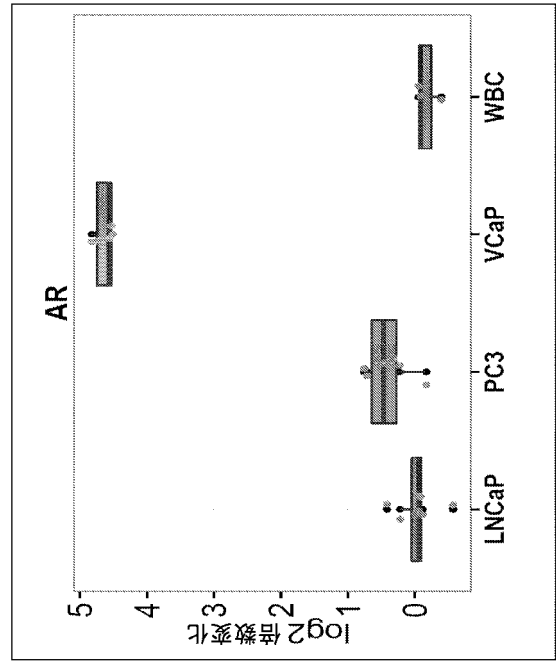


図 4A

【 図 4 B 】

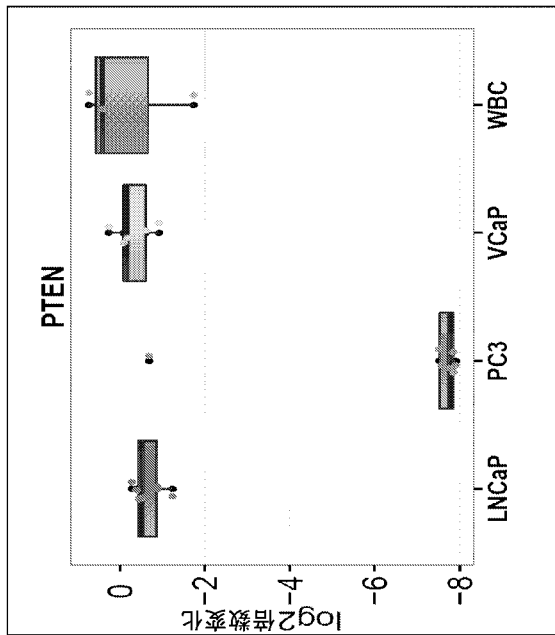


図 4B

【 図 4 C 】

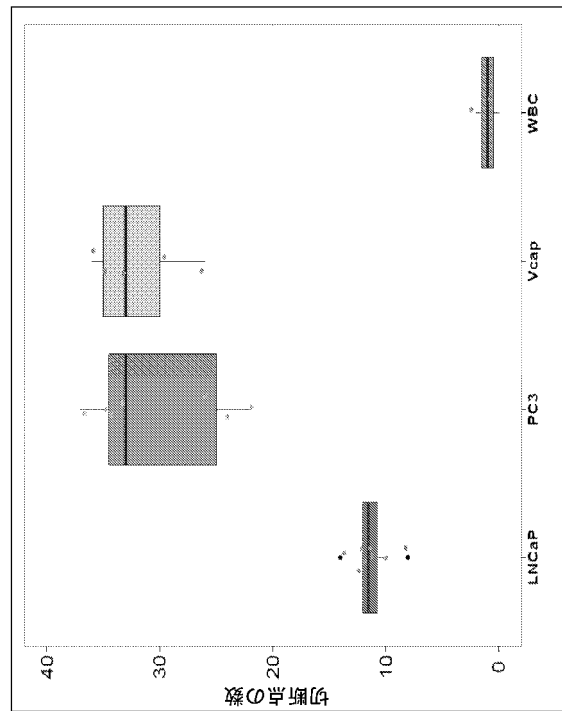


図 4C

【 図 8 】

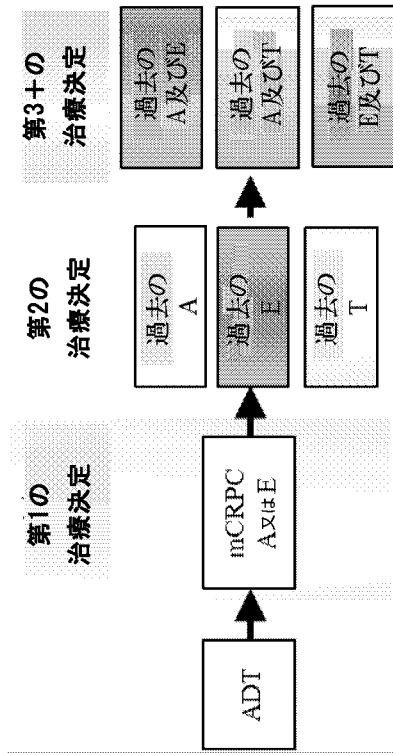


図 8

【 図 9 】

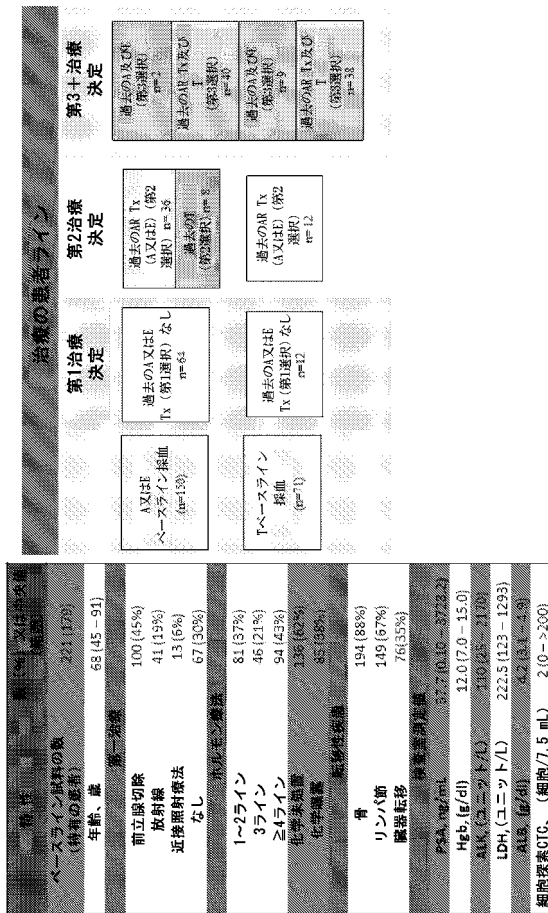


図 9

【 図 10 】

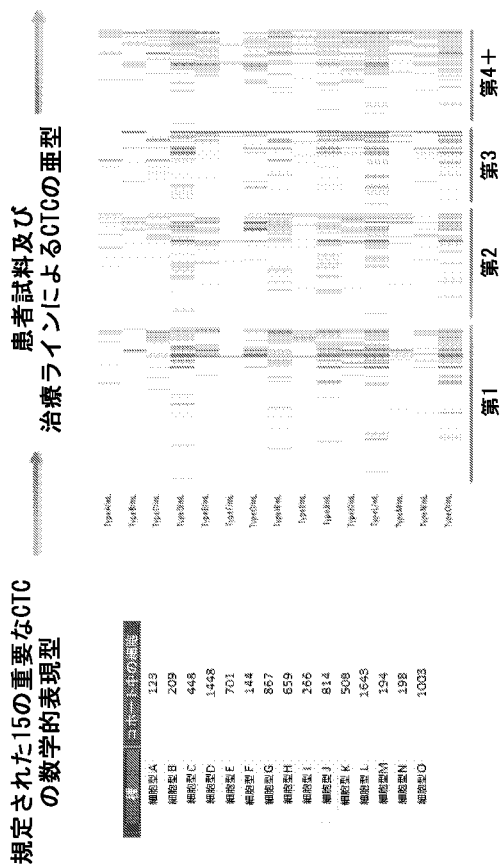


図 10

【 図 11 】

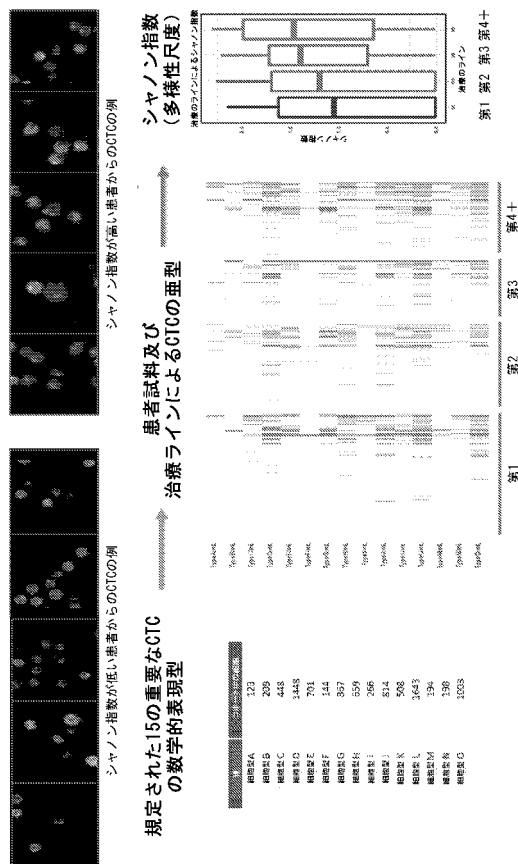


図 11

【 図 1 2 A 】

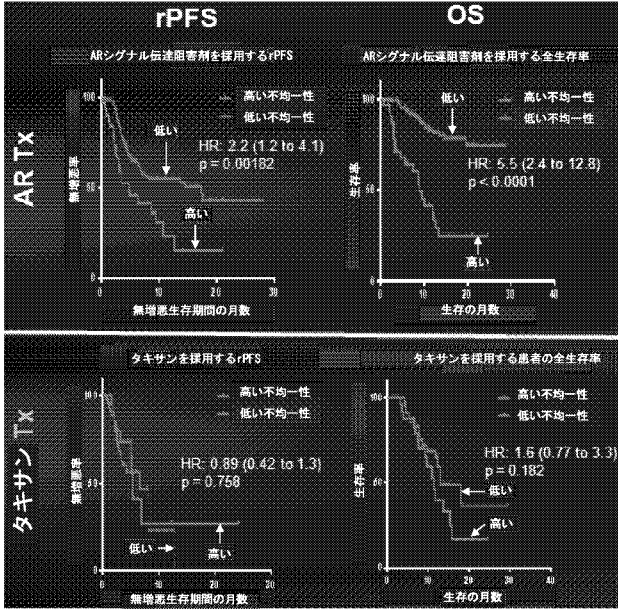


図 12A

【 図 1 2 B 】

不均一性に基づく AR Tx の転帰

AR Tx (n=150)	高い不均一性	低い不均一性
生存期間中央値	9カ月	到達せず
ハザード比: OS	5.51	
ログランク p-値 OS	<0.0001	
rPFSの中央値	5カ月	17カ月
ハザード比: rPFS	2.2	
ログランク: rPFS	0.00182	

図 12B

【 図 1 3 】

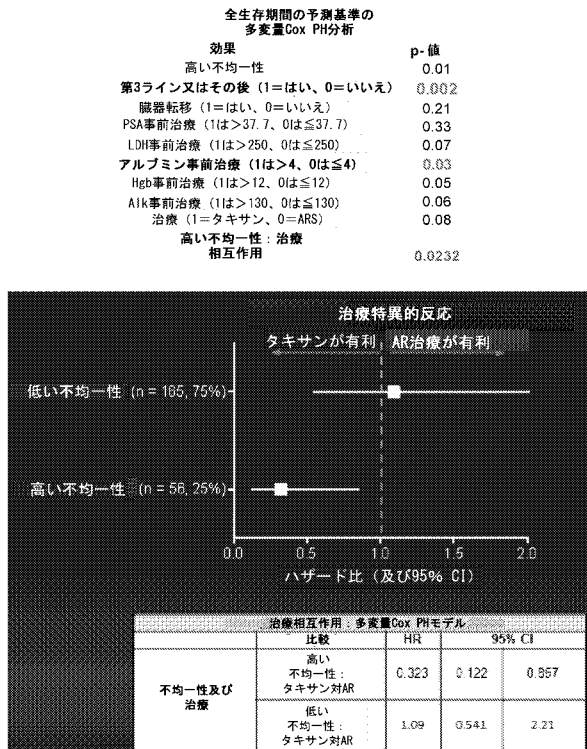


図 13

【 図 1 4 】

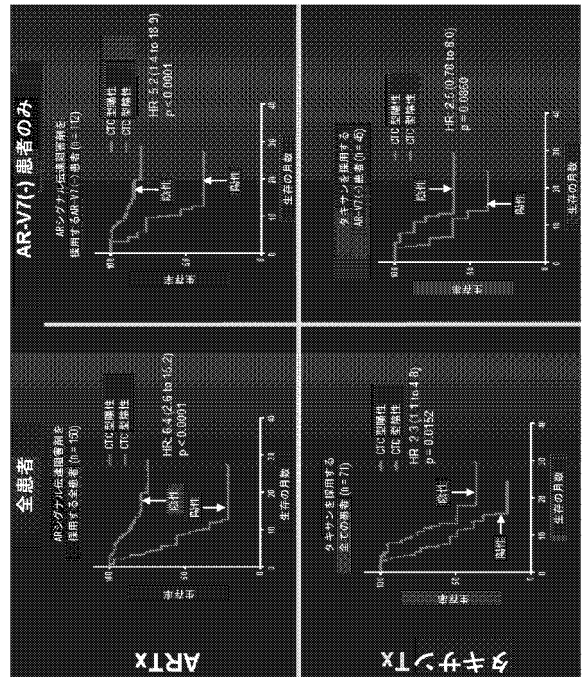


図 14

【 図 1 5 】

遺伝子型判定のための
単一細胞の再配置及び捕捉

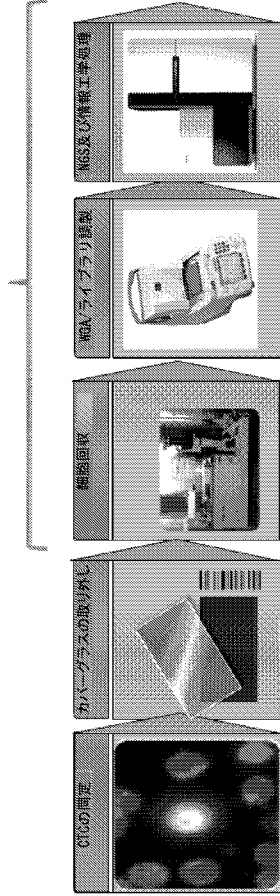
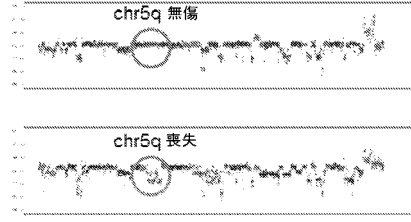


図 15

【 図 1 6 】

同じ患者からの、chr5qの喪失を有する、及び有さない2つのクローンの例



同じ患者からの、ARの増幅を有する、及び有さない2つのクローンの例

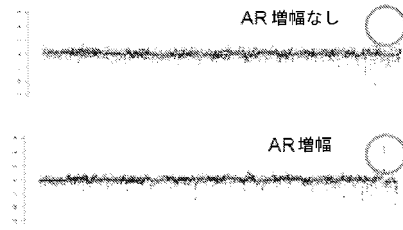


図 16

【 図 1 7 】

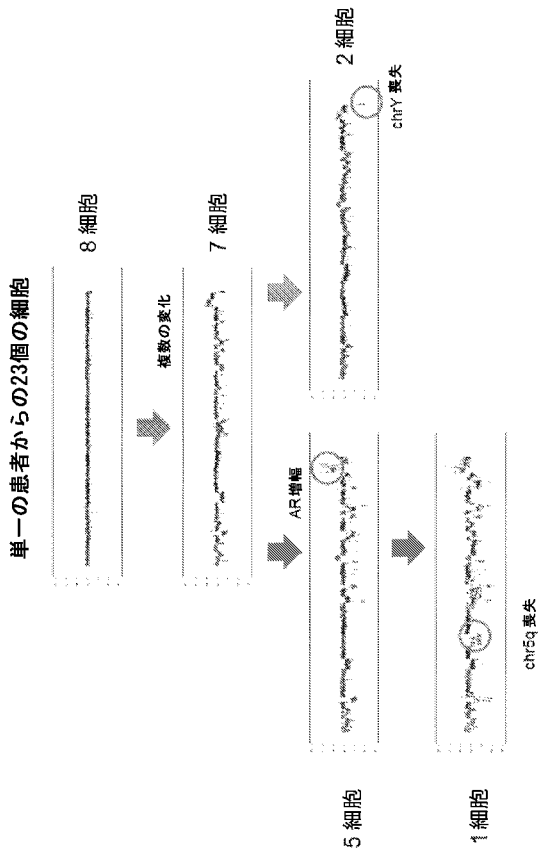
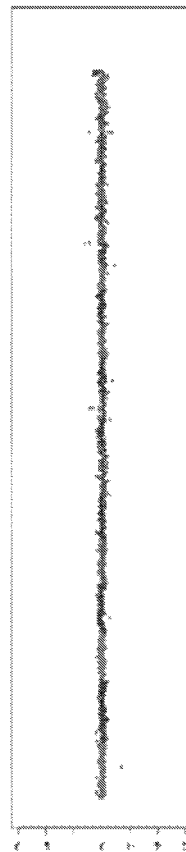


図 17

【 図 1 8 】



同じゲノムプロファイルを有する12個のCTC

図 18

【 図 19 】

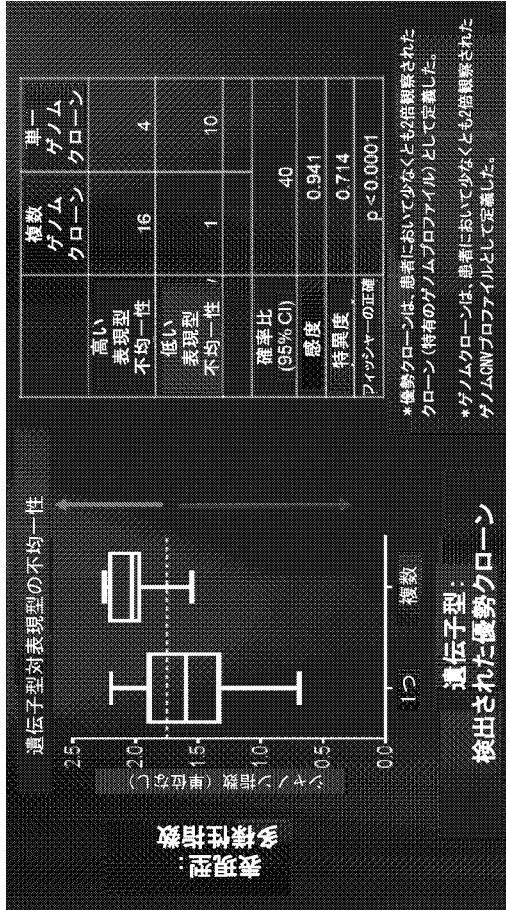


図 19

【 図 20 A 】

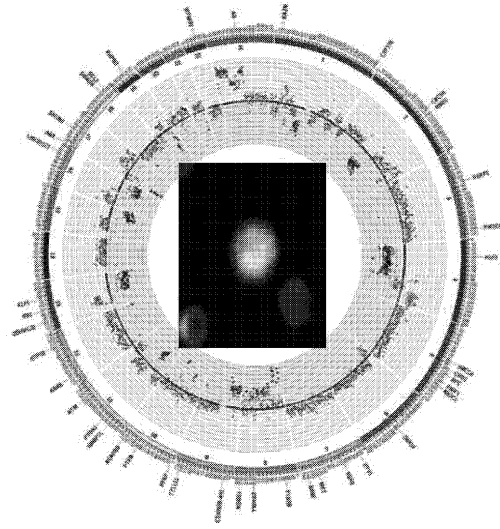


FIG. 20A

【 図 20 B 】

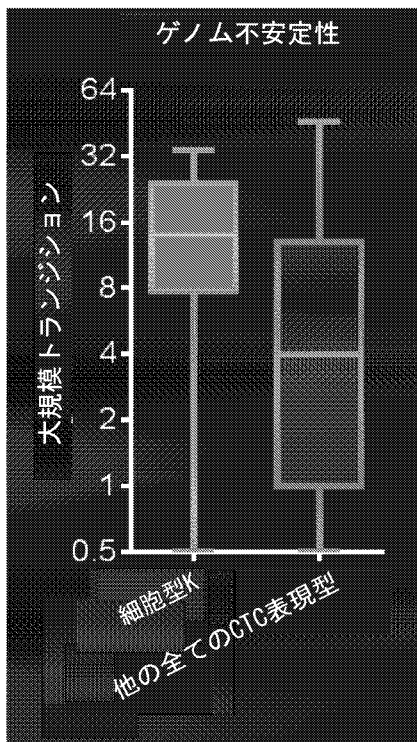


図 20B

【 図 21 】

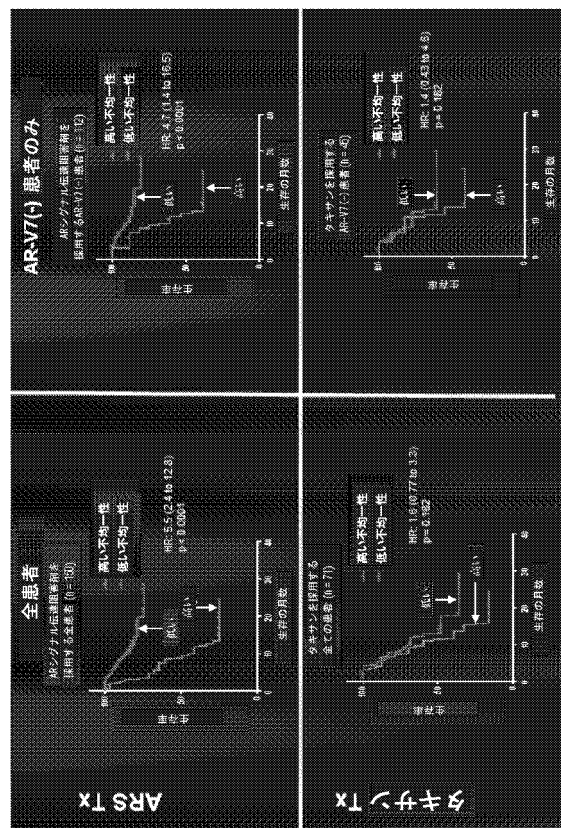


図 21

【 図 2 2 】

低いCTCの表現型不均一性：第1選択治療前の患者からの6つのCTCは均一なゲノムプロファイルを示す

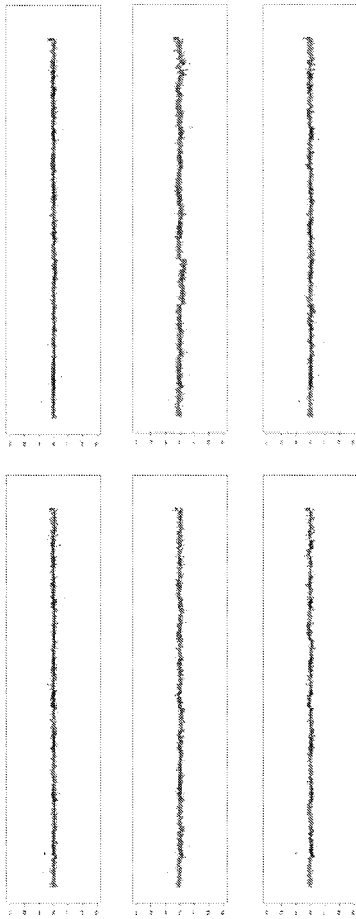


図 22

【 図 2 3 】

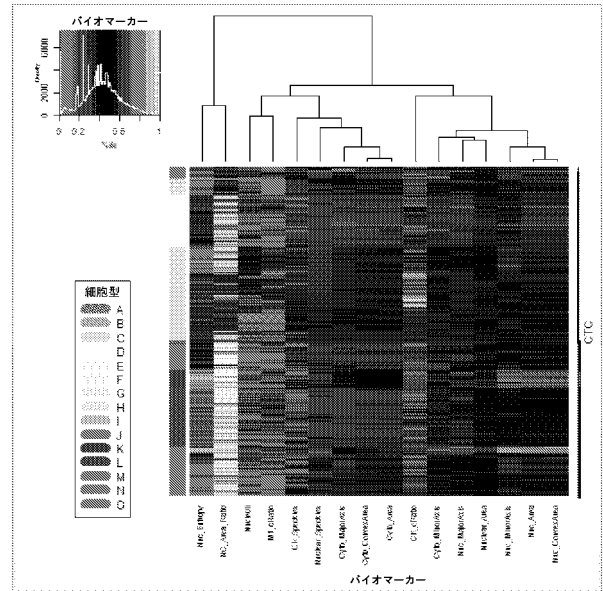


図 23

【 図 2 4 A - B 】

細胞型 A

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 123 / 9225
- 以下は2名の異なる患者からの細胞

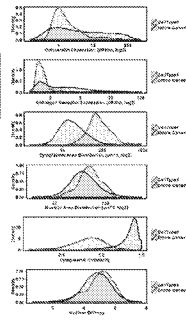
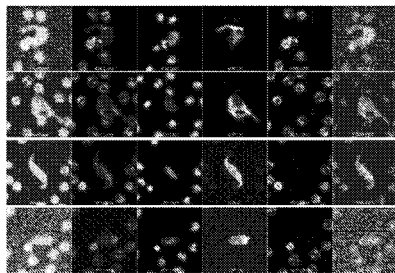


図 24A

細胞型 B

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 209 / 9225
- 以下は2名の異なる患者からの細胞

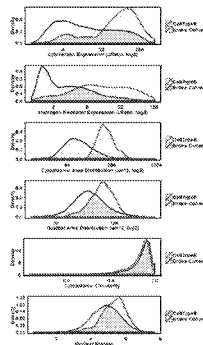
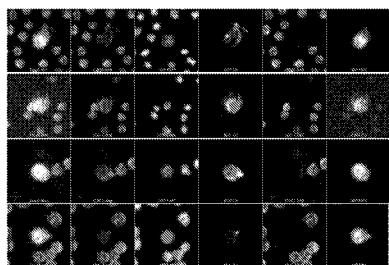


図 24B

【 図 2 4 C - D 】

細胞型 C

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 448 / 9225
- 以下は2名の異なる患者からの細胞
- わずかにタキサンによるTxによる時間の増強が予測される

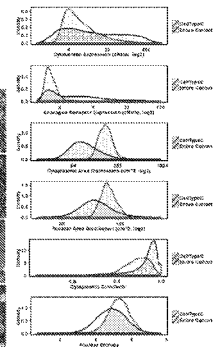
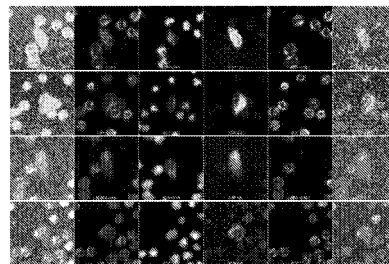


図 24C

細胞型 D

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 1448 / 9225
- 以下は2名の異なる患者からの細胞

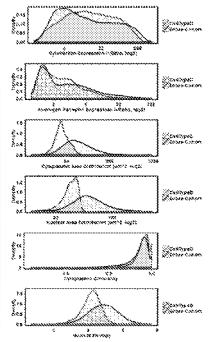
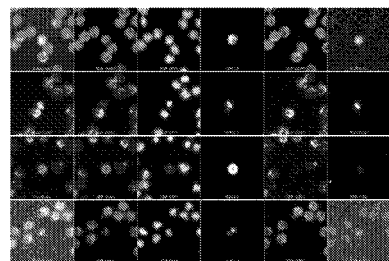


図 24D

【図 24 E - F】

細胞型 E

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 701 / 9225
- Abi/Enzによる12か月までの死が予測される、Txによる短時間、急速な増悪
- 上段2列のCTC画像: チューブID: 004854、第一選択Ab1、5日目までの増悪、49日のTx休業、112日に低下
- 下段2列のCTC画像: チューブID: 012282、第2選択のEnzs、141日目までの増悪、生存、Txを採用

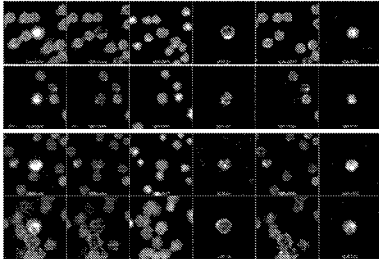


図 24E

細胞型 F

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 144 / 9225
- ほとんど全てがCTCクラスター
- 細胞形態はクラスターとなった1つのCTCに焦点を当てている。興味深いことに、それにもかかわらず重みづけサイズ測定値を考慮するとk-meansによりこのように多くのクラスターに群別された。ごく少数の患者がF型を有する。

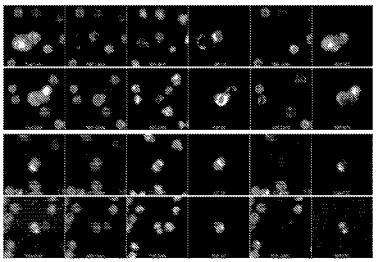


図 24F

【図 24 G - H】

細胞型 G

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 867 / 9225
- タキサン抵抗性と最も関連が深い細胞型
- 両方ともタキサンに先天的抵抗性であるチューブID001689及び011288からの細胞
- 001767から得た約1/3の細胞、8 ptは>90%。
- このことは、この型のみによるタキサン抵抗性の確率予測値を制限し得る。

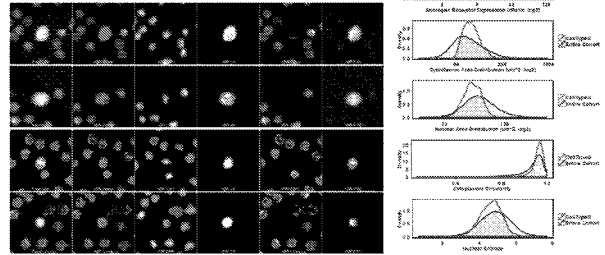


図 24G

細胞型 H

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 659 / 9225
- チューブID 002033及び002111からの画像

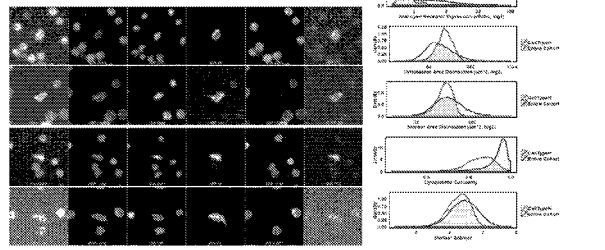


図 24H

【図 24 I - J】

細胞型 I

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 266 / 9225
- ほとんど全てがCTCクラスターである
- 細胞形態はクラスターとなった1つのCTCに焦点を当てている。興味深いことに、それにもかかわらず重みづけサイズ測定値を考慮するとk-meansによりこのように多くのクラスターに群別された。
- チューブID 0010159及び013040からの画像

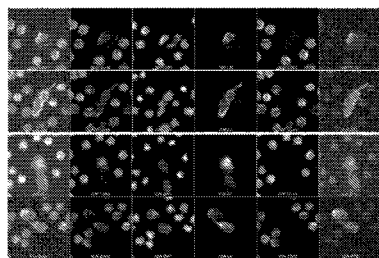


図 24I

細胞型 J

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 814 / 9225
- チューブID 001335及び01288からの画像

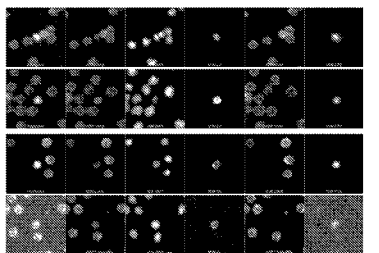


図 24J

【図 24 K - L】

細胞型 K

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 508 / 9225
- Abi/Enzを採用すると12か月までに死亡することが予測される
- チューブID 010159及び012362からの画像

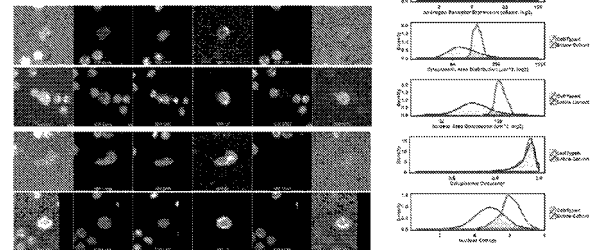


図 24K

細胞型 L

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 1643 / 9225
- Abi/Enzを採用すると12か月までに死亡することが予測される
- チューブID 005747 (先天的抵抗細胞) 及び007839 (獲得型抵抗性細胞) からの細胞

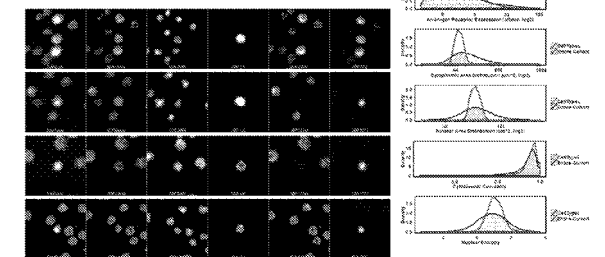


図 24L

【図 24 M - N】

細胞型 M

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 194 / 9225
- チューブID 007931及び010445からの細胞

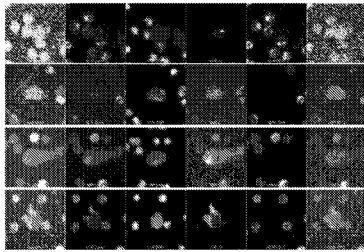
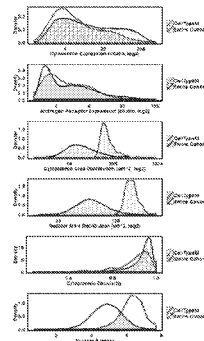


図 24M



【図 24 O】

細胞型 O

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 1003 / 9225
- チューブID 009346及び013040からの画像

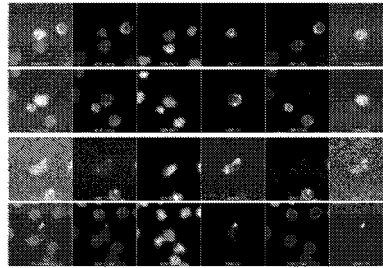
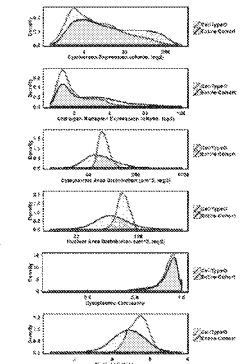


図 24O



細胞型 N

- 21個のうちの6個の特徴を示す
- コホート上の細胞: 195 / 9225
- 高い核面積、低い核エントロピー、異常な特徴関係
- チューブID 45180、010159からの細胞画像
- タキサンに対する良好な反応と関連付けられた。
- コホート中のn数が低いことによる統計的結果であり得る。
- 「外れ値細胞」、又は「他の」群に分けられる細胞型を代表し得る。

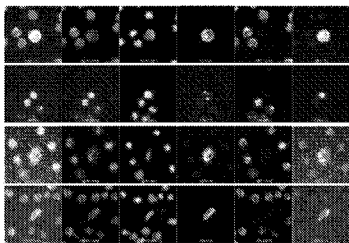
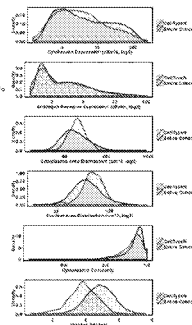


図 24N



【図 25】

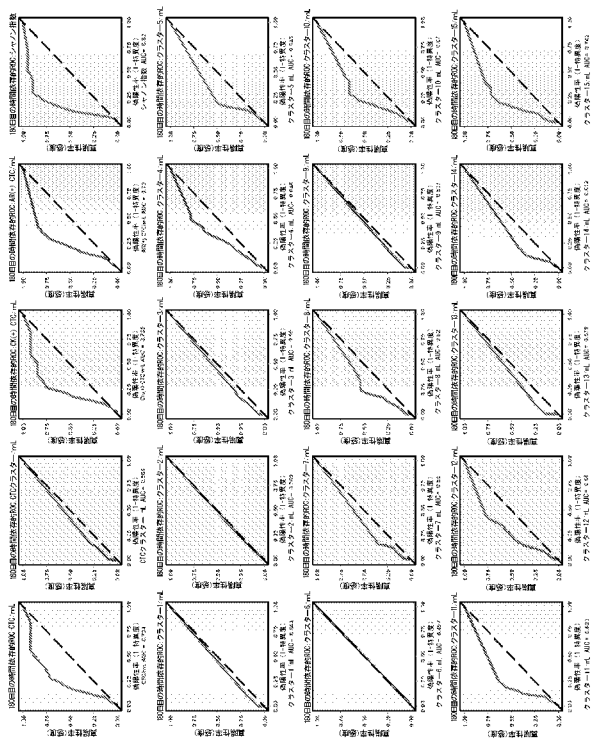


図 25

【図 26】

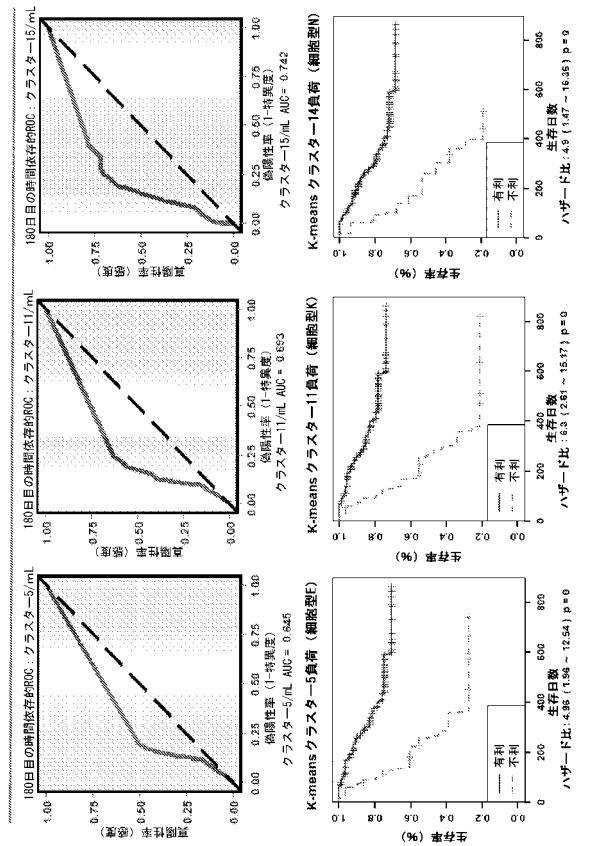


図 26

【 図 27 】

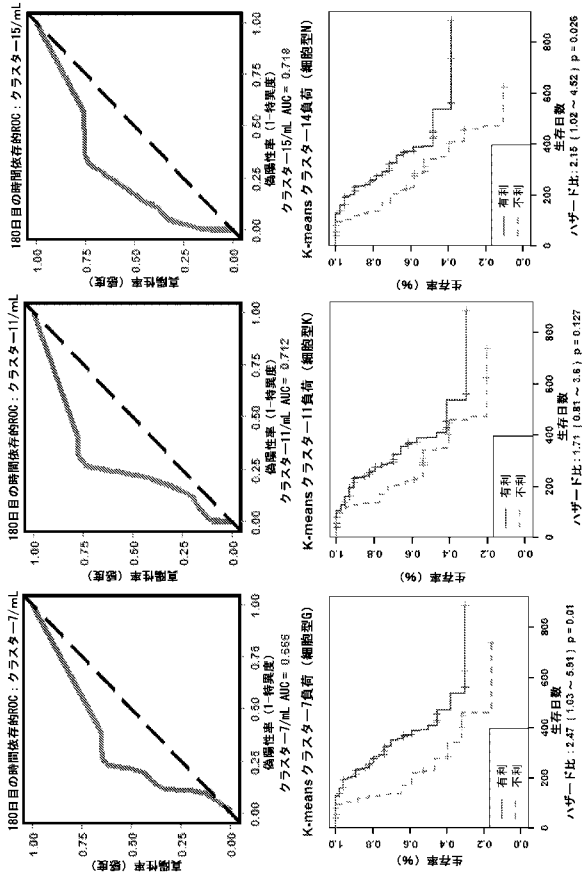


図 27

【 図 28 】

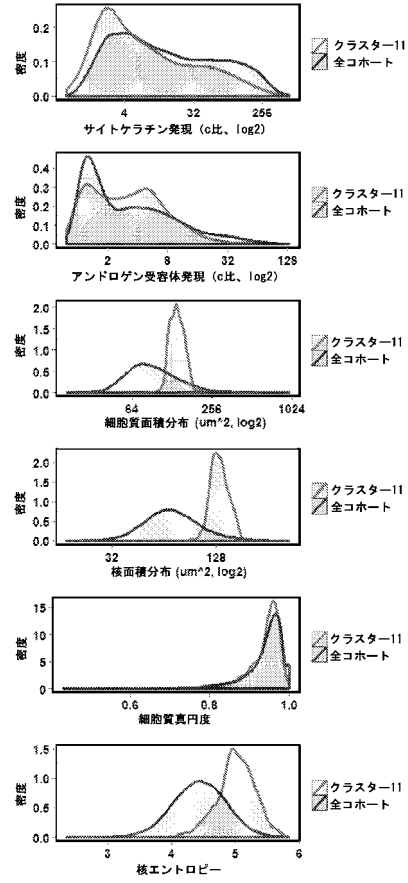


図 28

【 図 29 】

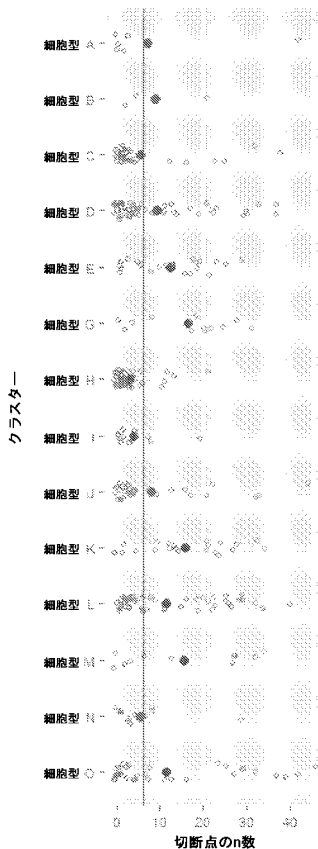


図 29

【 図 30 】

特徴	係数
M1_c 比 (AR c 比)	3.14
核_短軸 (核短軸)	0.97
CK_c 比 (CK c 比)	0.62
核_細胞質_凸面積_比 (核細胞質凸面積比)	0.42
細胞質_長軸 (細胞質長軸)	-0.416

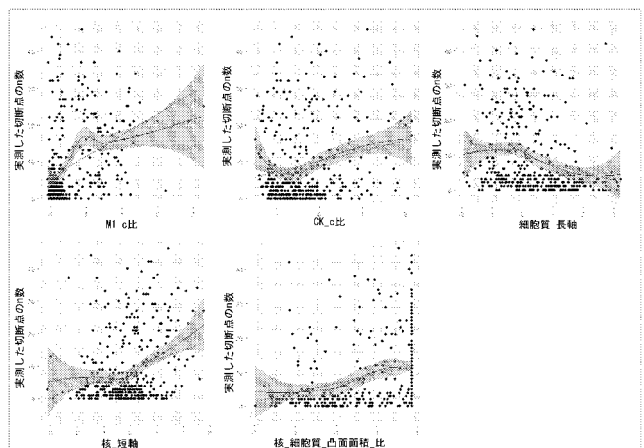


図 30

【 図 3 1 】

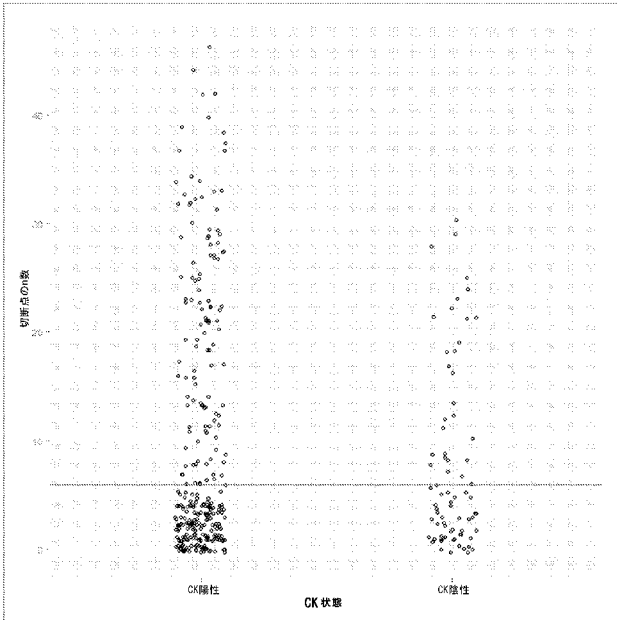


図 31

【 図 3 2 】

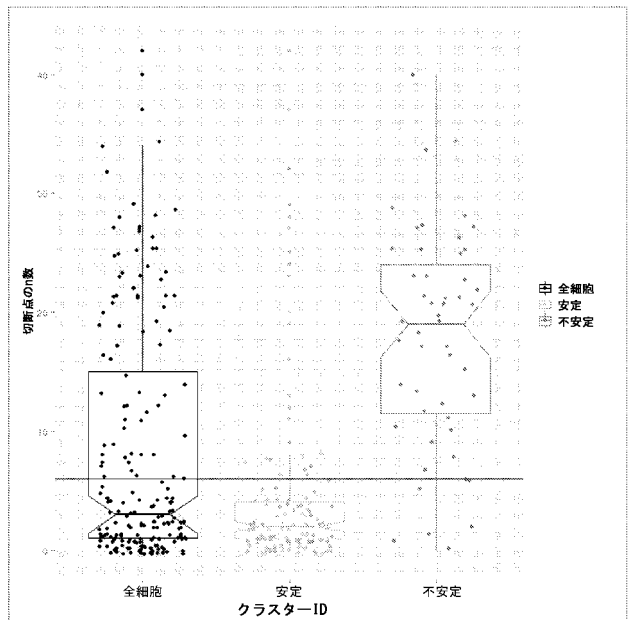
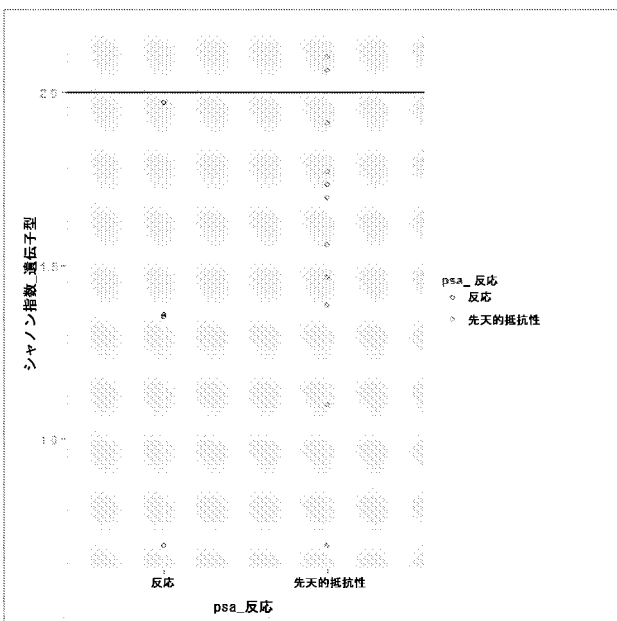


図 32

【 図 3 3 】



		(実際の転帰)	
		PSA 反応	
		先天的抵抗性	反応
ゲノムシャノン指数 (予測された転帰)	高い	2	0
	低い	9	4
		感度 18.2%	
		特異度 100.0%	

図 33

【 図 3 4 】

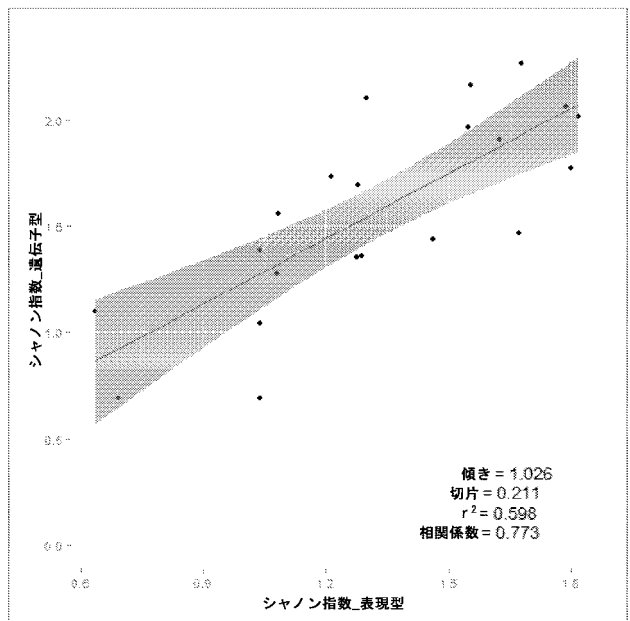


図 34

【 図 3 5 】

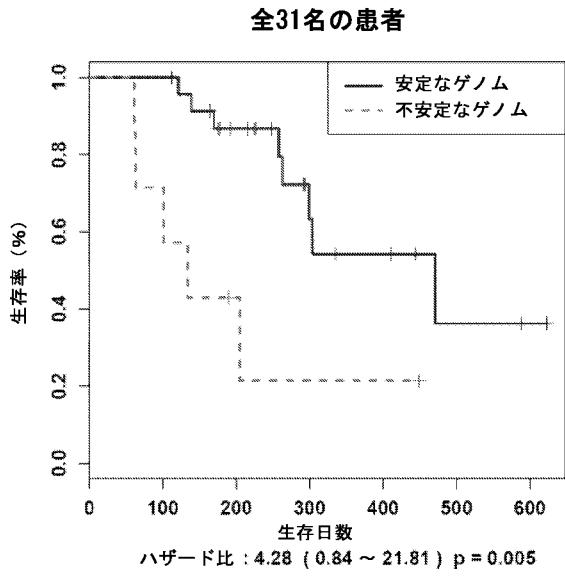


図 35

【 図 3 6 】

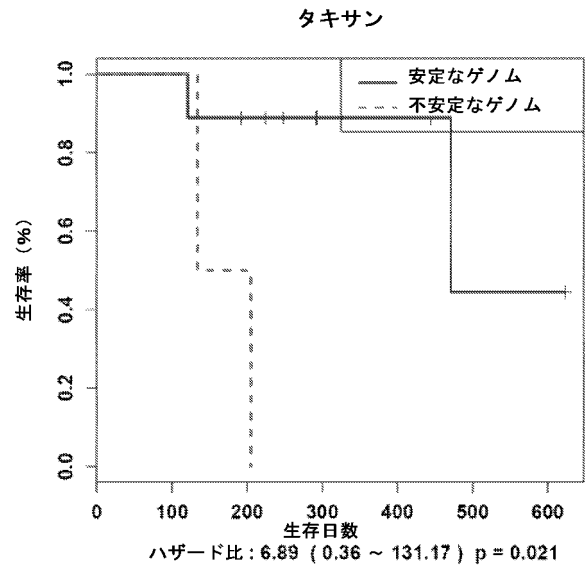
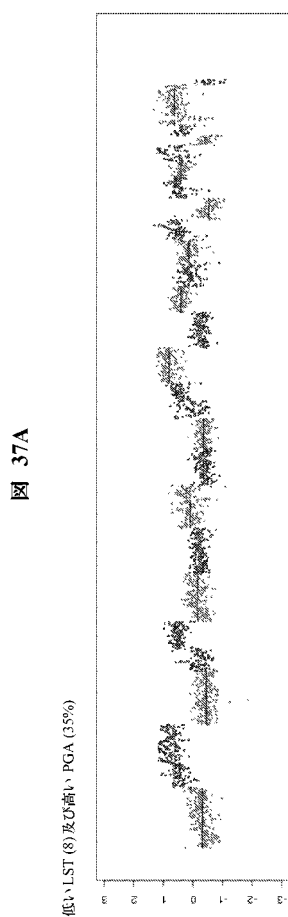
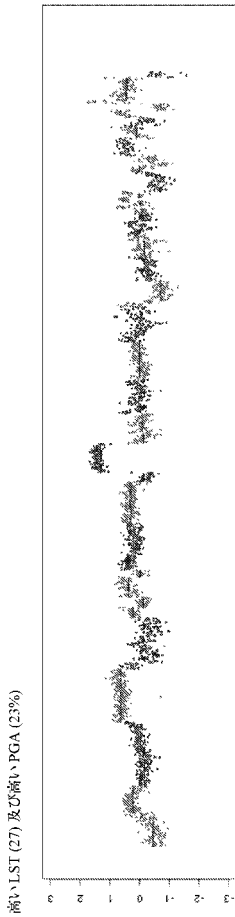
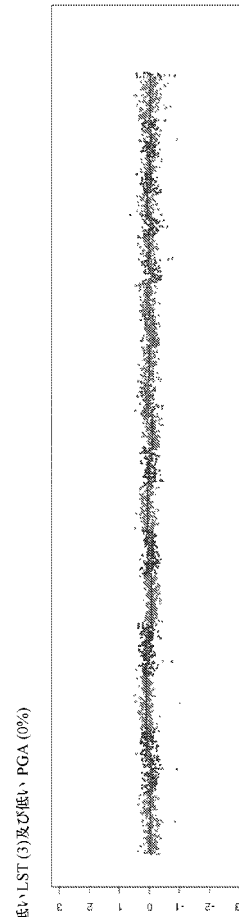


図 36

【 図 3 7 A - B 】



【 図 3 7 C 】



【 図 3 8 】

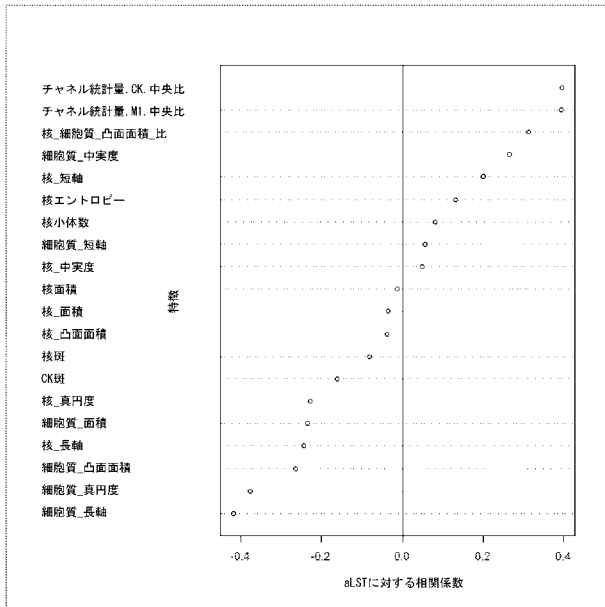
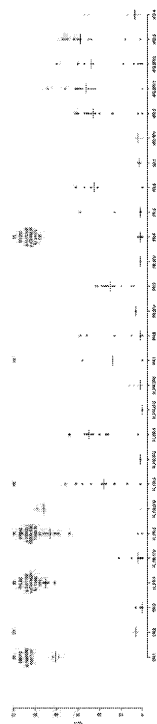
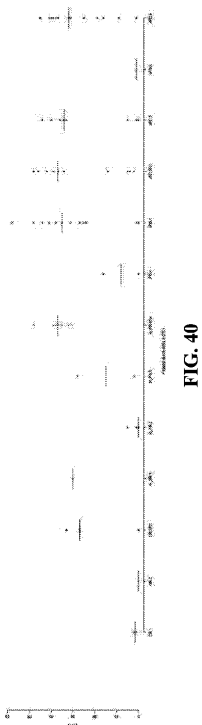


図 38

【 図 3 9 】



【 図 4 0 】



【 図 4 1 A 】

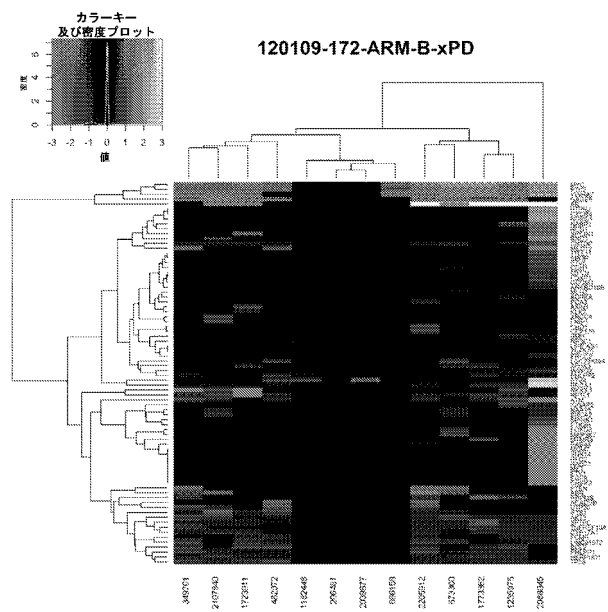


図 41A

【 図 4 1 B 】

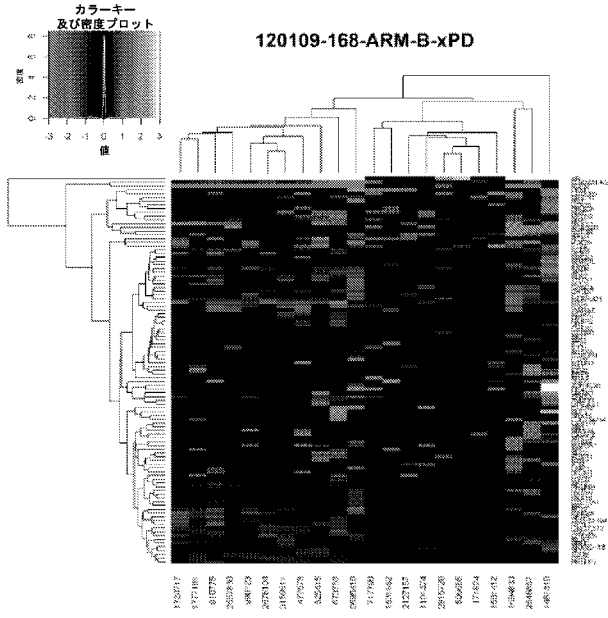


図 41B

【 図 4 2 A - B 】

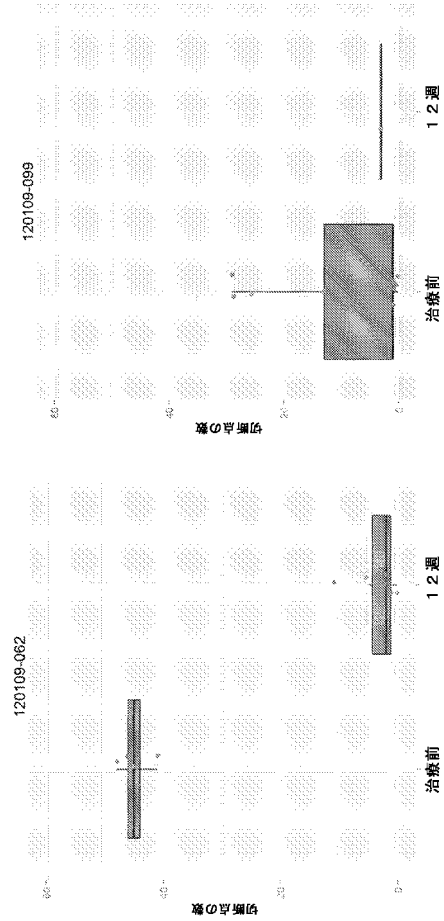


図 42A

図 42B

【 図 4 2 C - D 】

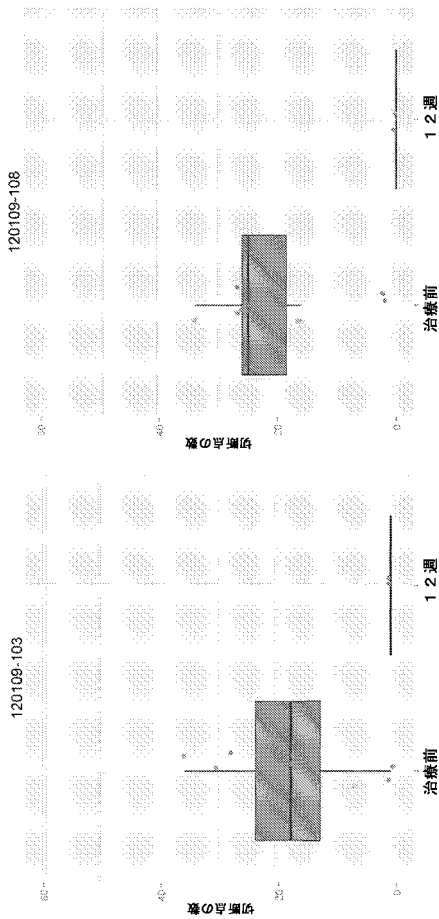


図 42C

図 42D

【 図 4 2 E 】

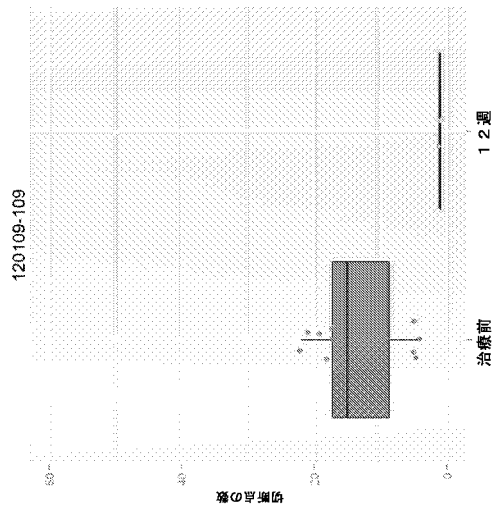


図 42E

【 図 4 3 A 】

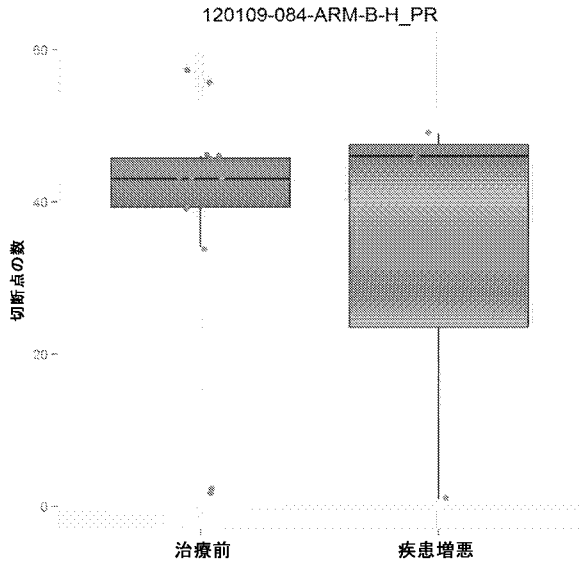


図 43A

【 図 4 3 B 】

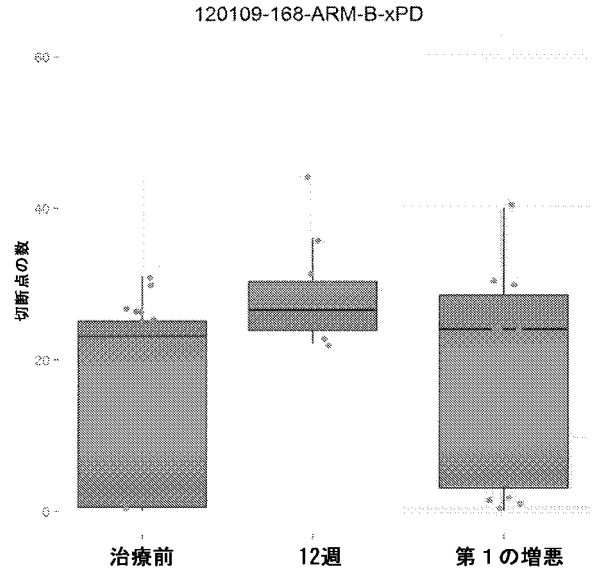


図 43B

【 図 4 4 】

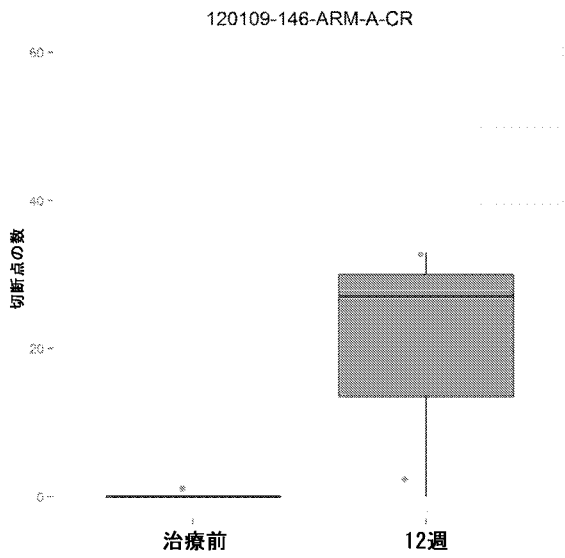


図 44

【 図 4 5 A 】

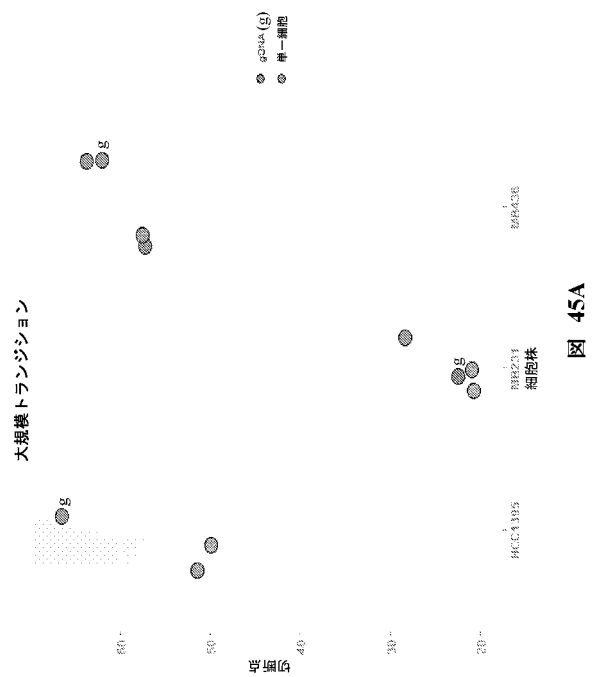


図 45A

【 図 4 5 B 】

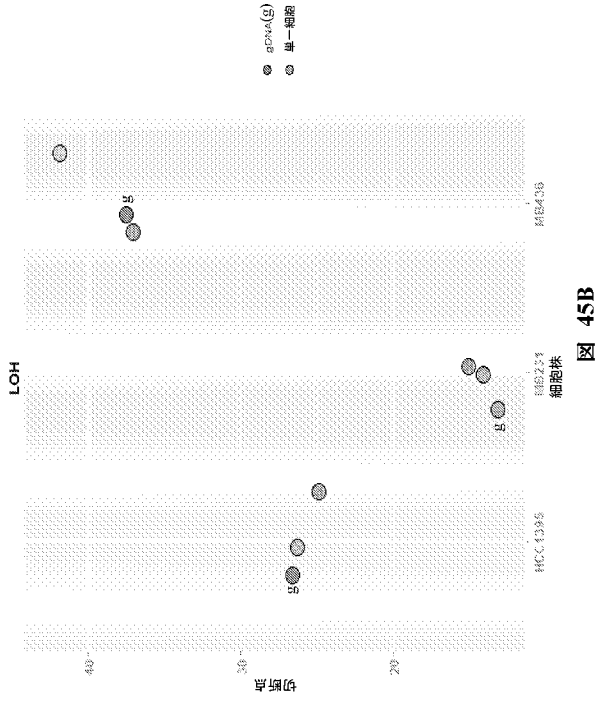
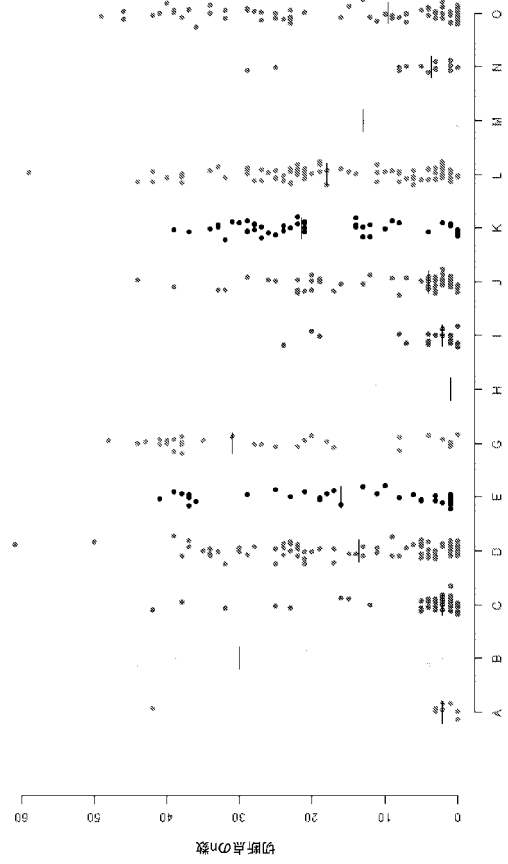


図 45B

【 図 4 6 】



CTC形態的クラスターID (各点はCTCである)

図 46

【 図 4 7 A 】

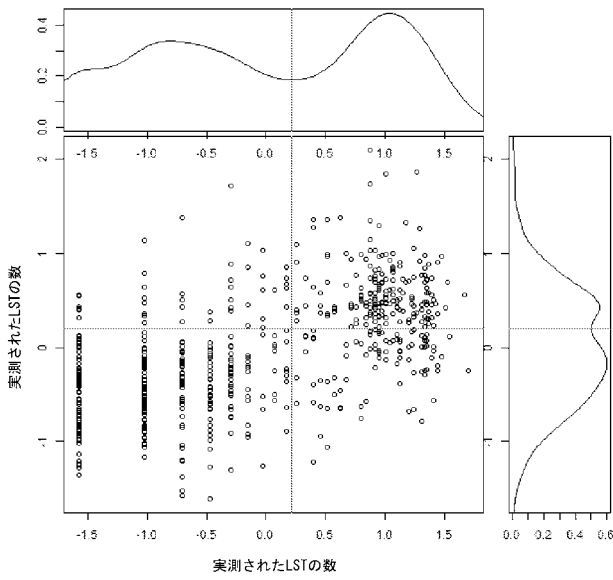


図 47A

【 図 4 7 B - C 】

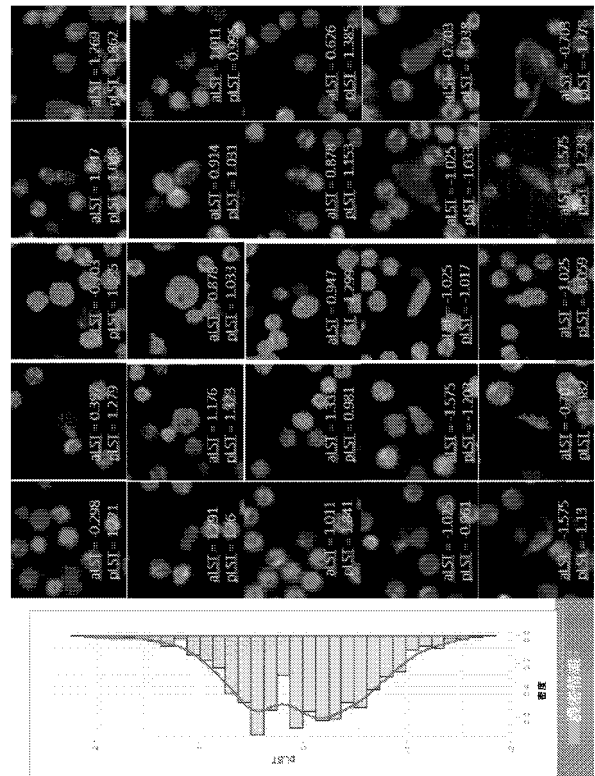


図 47B

図 47C

【 図 4 8 A 】

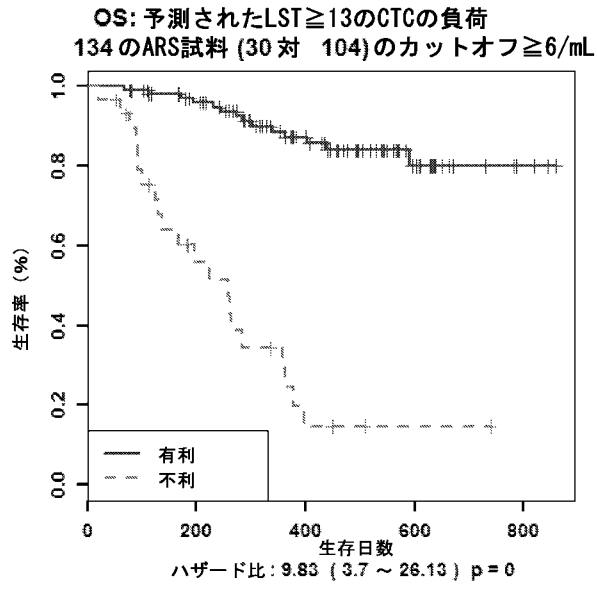
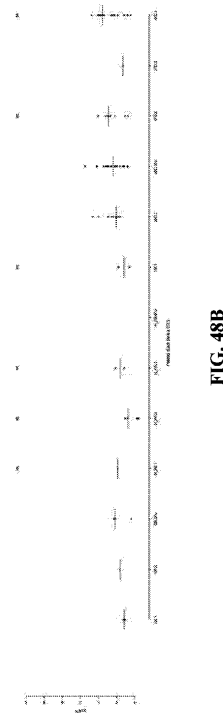


図 48A

【 図 4 8 B 】



【 図 4 9 】

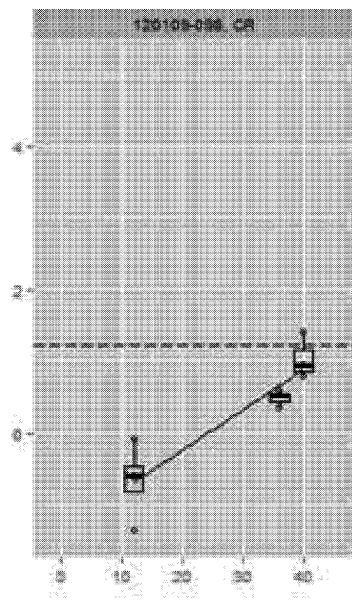


FIG. 49

【 図 5 0 A 】

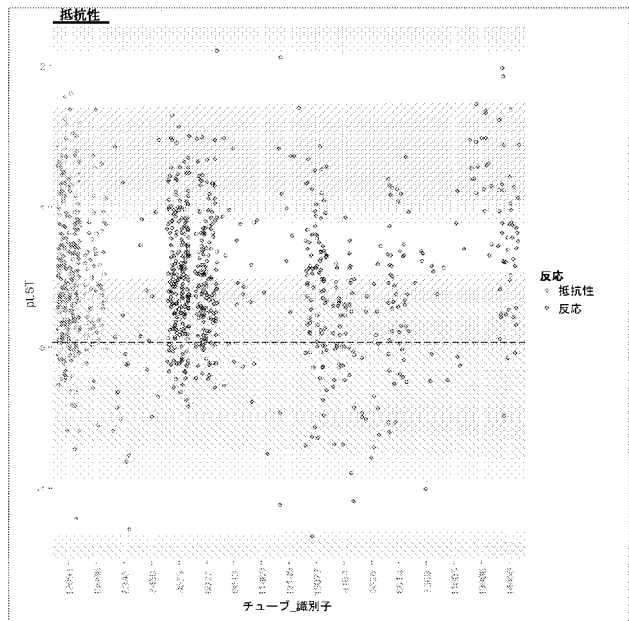


図 50A

【 図 5 0 B 】

患者	PSA 反応	ベースライン (pLST+CTCの数)	追跡検査 (pLST+CTCの数)	変化率 (%)
1	xPD	227	27	-88%
2	H_PR	195	0	-100%
3	H_PR	134	4	-97%
4	PR	36	0	-100%
5	H_PR	11	2	-82%
6	H_PR	8	0	-100%
7	PR	7	0	-100%
8	H_PR	5	0	-100%
9	CR	4	1	-75%
10	CR	3	0	-100%
11	PR	2	1	-50%
12	yNE	1	1	0%
13	CR	1	1	0%
14	SD	1	1	0%
15	CR	0	0	
16	CR	0	1	
17	PR	0	1	
18	PR	0	1	
19	xPD	0	6	
20	xPD	0	0	

図 50B

【 図 5 1 】

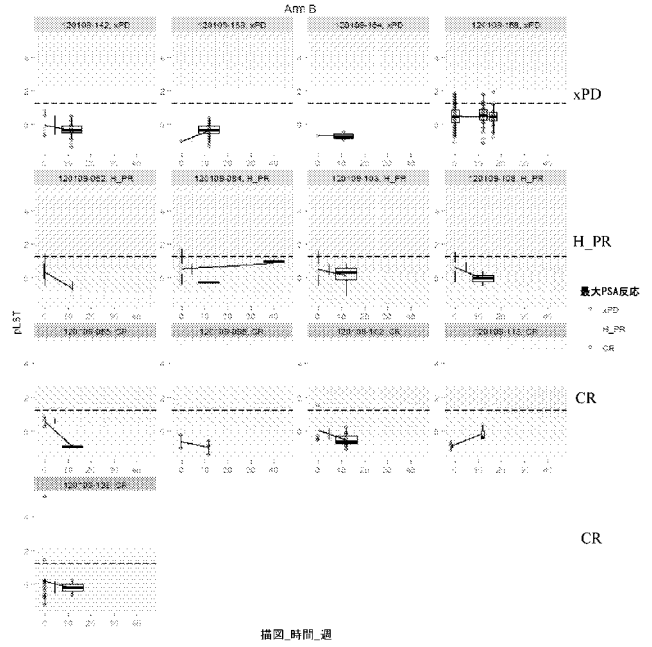


図 51

【 図 5 2 A 】

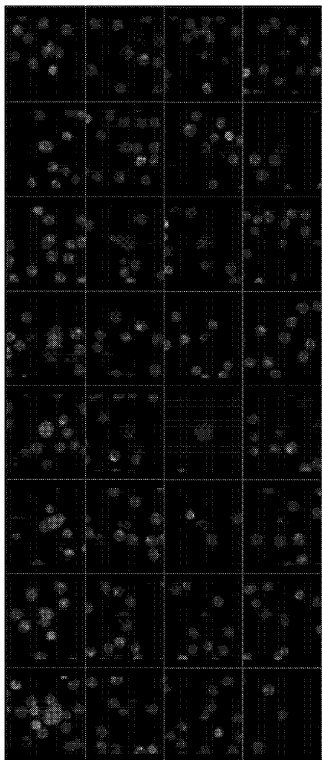


FIG. 52A

【 図 5 2 B 】

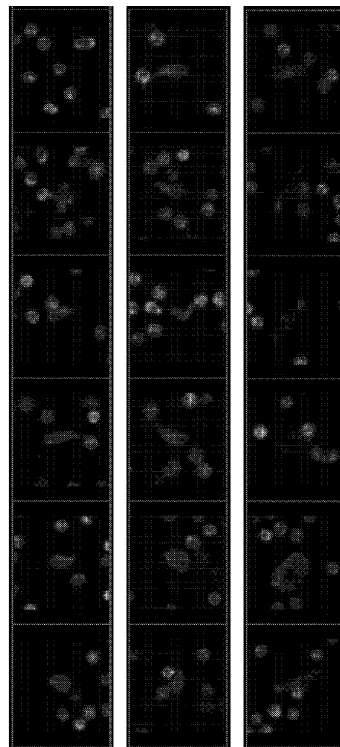


FIG. 52B

【 図 5 3 】

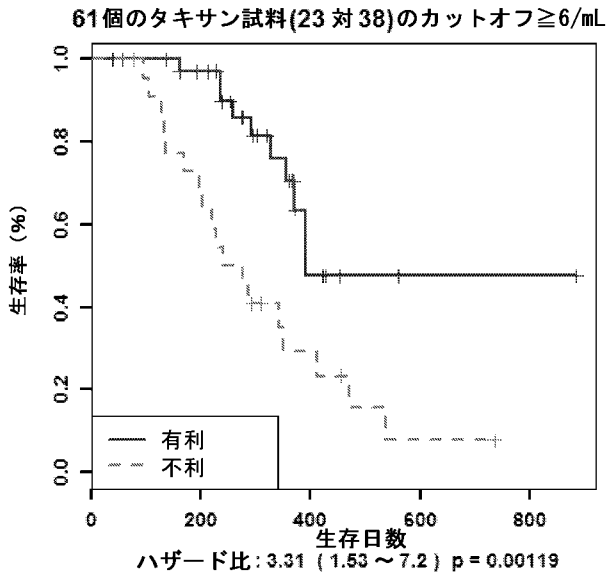
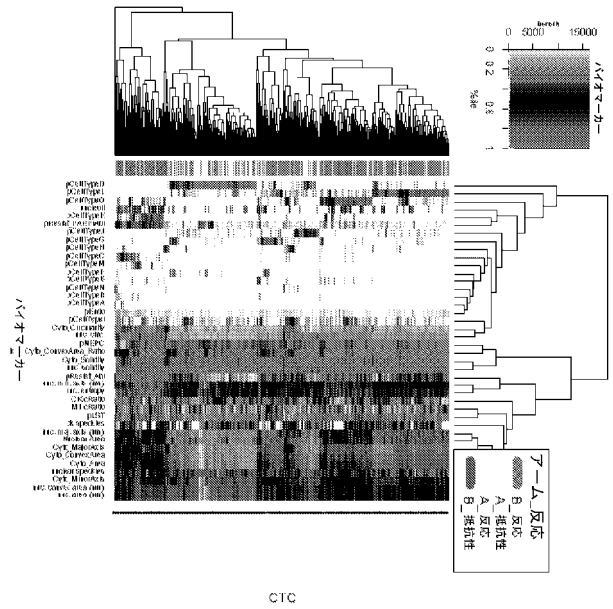


図 53

【 図 5 4 A 】



【 図 5 4 B 】

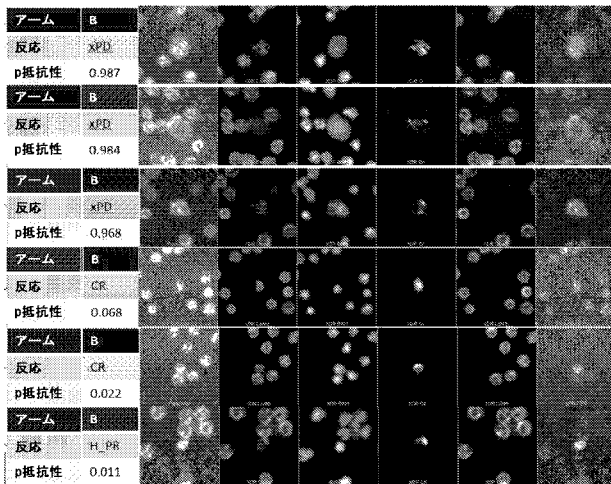
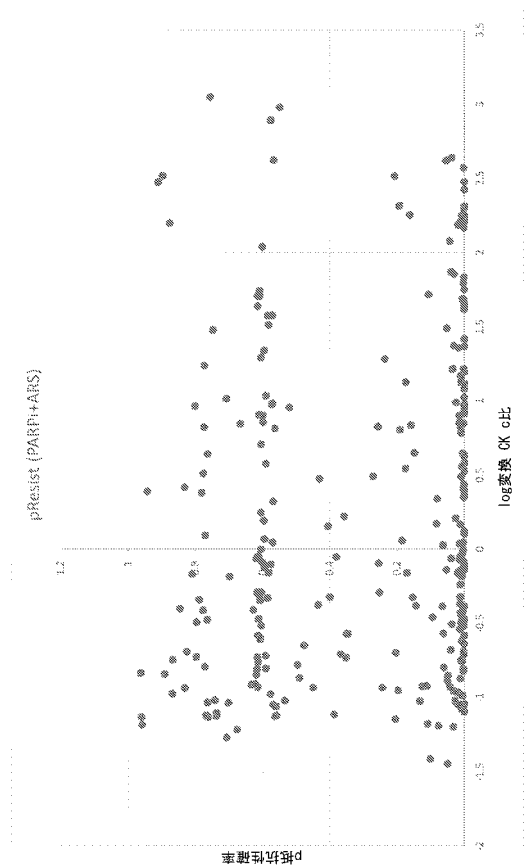


図 54B

【 図 5 5 】



【 図 5 6 A 】

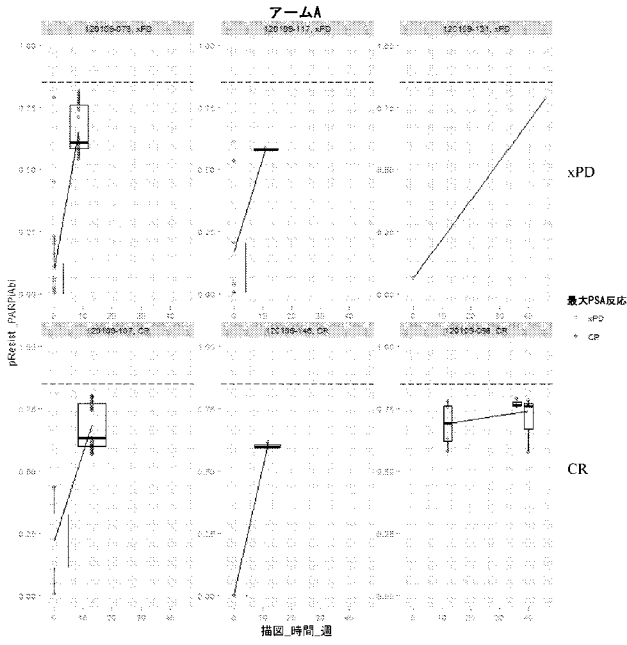


図 56A

【 図 5 6 B 】

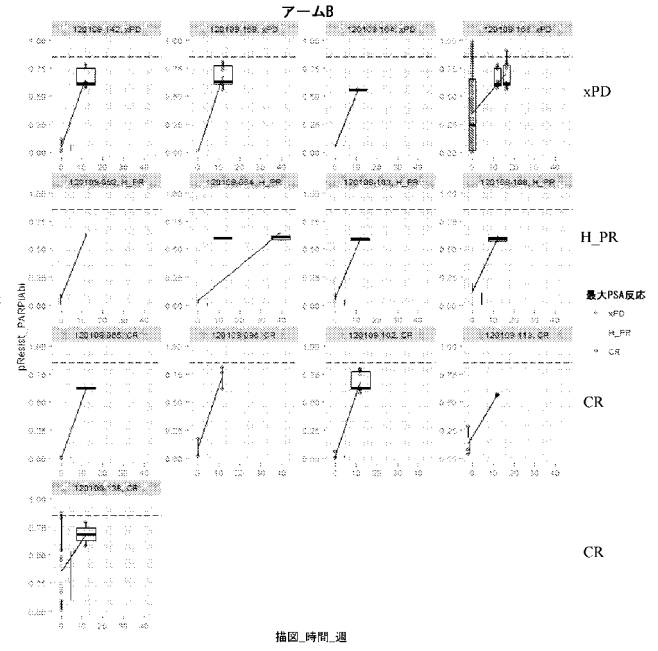


図 56B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 17/12317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12Q 1/68, G01N 21/00, G01N 33/574 (2017.01)
CPC - G01N 33/57434, C12Q 1/6886, G01N 2333/723
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(8) - C12Q 1/68, G01N 21/00, G01N 33/574 (2017.01)
CPC - G01N 33/57434, C12Q 1/6886, G01N 2333/723

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - G01N 2800/52, C12Q 2600/106
(keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar
Search terms: circulating tumor cell, CTC, heterogeneity, androgen receptor, large scale transitions, LST, copy number variation, CNV, immunofluorescent, morphological, percent genome altered, prostate cancer, genomic instability

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0212089 A1 (EPIC SCIENCES, INC.) 30 July 2015 (30.07.2015) para [0006], [0008], [0009], [0012], [0034], [0040], [0046], [0067], [0086], [0087], [0088]	1-9, 13-19
Y		10-12, 20-27
Y	WATKINS et al., Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. Breast Cancer Res. 2014, Vol 16, No 3, page 211 (pp 1-11). Especially p 2, col 1, para 2; p 7, col 1, para 2	10-12, 20-27

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
02 March 2017

Date of mailing of the international search report
23 MAR 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 Helpdesk: 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, KH, 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

(72)発明者 デナ マルリヌッチ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121 サン ディエゴ スイート 200 ジュディ
シアル ドライブ 9381

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR32 QR35
QR55 QR62 QS25 QS34 QX02