



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107407626 B

(45) 授权公告日 2020.10.30

(21) 申请号 201580064526.9

(22) 申请日 2015.09.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107407626 A

(43) 申请公布日 2017.11.28

(30) 优先权数据
62/056,321 2014.09.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.05.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/052736 2015.09.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/049658 EN 2016.03.31

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 赛达斯-西奈医学中心

(72) 发明人 曾宪荣 黄娇妮

爱德温·M·波萨达斯 陈洁芙
霍浩 柯尊福 李克昭 陆逸聪
杰克·利希特曼 宋敏
利兰·W·钟

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 刘明海 周瑞

(51) Int.Cl.
G01N 15/14 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102782498 A, 2012.11.14
US 2012315690 A1, 2012.12.13
Yi-Tsung Lu, et al. NanoVelcro Chip for
CTC enumeration in prostate cancer
patients. 《Methods》. 2013, 第144-152页.

审查员 周立新

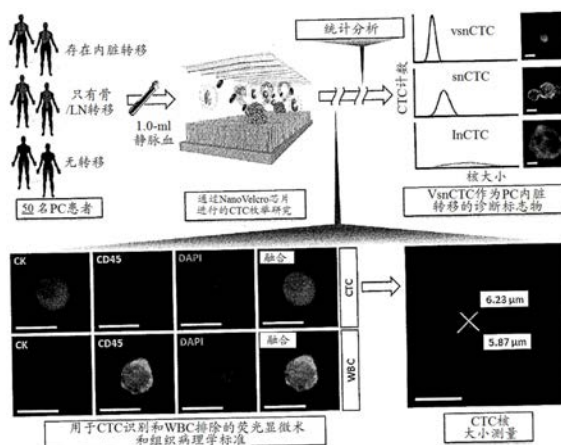
权利要求书3页 说明书31页 附图20页

(54) 发明名称

评估癌症的疾病状况的方法

(57) 摘要

一种用于评估受试者的癌症的疾病状况的方法、系统和计算机可读介质,其包括:接收来自所述受试者的血液样本;从所述血液样本中分离多个循环肿瘤细胞(CTC);测量所述多个CTC中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项;基于所述测量确定所述多个CTC的测量的CTC大小分布;使用计算机将所述测量的CTC大小分布与参考CTC大小分布进行比较;以及基于所述比较来指定所述受试者的所述癌症的疾病状况。



1. 一种用于评估受试者的癌症的疾病状况的系统,其包括:
 - 用于接收来自所述受试者的血液样本的单元;
 - 用于从所述血液样本中分离多个循环肿瘤细胞的单元;
 - 用于测量所述多个循环肿瘤细胞中每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项的单元;
 - 用于基于所述测量确定所述多个循环肿瘤细胞的测量的循环肿瘤细胞大小分布的单元;
 - 用于使用计算机将所述测量的循环肿瘤细胞大小分布与参考循环肿瘤细胞大小分布进行比较的单元;以及
 - 用于基于所述比较来指定所述受试者的所述癌症的所述疾病状况的单元。
2. 根据权利要求1所述的系统,其中所述指定是由所述计算机执行的自动化指定。
3. 根据权利要求1所述的系统,其中所述分离所述多个循环肿瘤细胞使用具有纳米结构表面的装置进行,所述纳米结构表面增强循环肿瘤细胞相对于其它类型的细胞的优先捕获。
4. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述参考循环肿瘤细胞大小分布是被分解成多个大小簇分布的凭借经验获得的大小分布。
5. 根据权利要求4所述的系统,其中所述多个大小簇分布是分别对应于大核循环肿瘤细胞、小核循环肿瘤细胞和极小核循环肿瘤细胞的三种不同的大小簇分布。
6. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述指定所述受试者的所述癌症的所述疾病状况包括指定所述癌症的转移阶段。
7. 根据权利要求6所述的系统,其中所述指定所述癌症的转移阶段包括基于至少极小核循环肿瘤细胞在所述测量的循环肿瘤细胞大小分布中的分量来指定内脏转移阶段。
8. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述接收所述血液样本是接收全血样本。
9. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述测量细胞大小或细胞核大小中的至少一项测量每个所述循环肿瘤细胞的最长尺寸,测量垂直于每个对应的最长轴的尺寸,计算每个最长尺寸和对应的垂直尺寸的乘积并计算每个所述乘积的平方根。
10. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述癌症的所述疾病状况是转移的存在、转移位置或所述癌症的疾病阶段中的至少一项。
11. 根据权利要求1或2所述的系统,其进一步包括在所述从所述血液样本分离所述多个循环肿瘤细胞之前对所述血液样本进行红细胞耗尽处理。
12. 根据权利要求3所述的系统,其中所述装置还具有微流体混沌混合器,其有助于进一步增强循环肿瘤细胞相对于其它类型的细胞的优先捕获。
13. 根据权利要求12所述的系统,其中所述纳米结构表面涂有链霉亲和素。
14. 根据权利要求1或2所述的系统,其进一步包括在所述从所述血液样本分离所述多个循环肿瘤细胞之前将所述血液样本与捕获剂一起孵育。
15. 根据权利要求14所述的系统,其中所述捕获剂是生物素化抗体。
16. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述分离所述多个循环肿瘤细胞进一步包括固定所述多个循环肿瘤细胞并对所述多个循环肿瘤细胞进行免疫组织化学测定。
17. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述癌症为前列腺癌。

18. 根据权利要求3所述的系统,其中所述分离所述多个循环肿瘤细胞包括将所述循环肿瘤细胞捕获在所述纳米结构表面上,使得所述多个循环肿瘤细胞保持为活的有活力的循环肿瘤细胞。

19. 一种用于指定前列腺癌的转移阶段的系统,其包括:

用于接收来自患有前列腺癌的受试者的血液样本的单元;

用于使用具有纳米结构表面并且利用微流体混沌混合器和所述纳米结构表面的组合的装置从所述血液样本中分离多个循环肿瘤细胞的单元,所述纳米结构表面增强循环肿瘤细胞相对于其它类型的细胞的优先捕获;

用于测量所述多个循环肿瘤细胞中每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项的单元;

用于基于所述测量确定所述多个循环肿瘤细胞的测量的循环肿瘤细胞大小分布的单元;

用于使用计算机将所述测量的循环肿瘤细胞大小分布与参考循环肿瘤细胞大小分布进行比较的单元;以及

用于基于所述比较来指定所述受试者的所述前列腺癌的转移阶段的单元。

20. 根据权利要求19所述的系统,其中所述参考循环肿瘤细胞大小分布是被分解成多个大小簇分布的凭借经验获得的大小分布,其中所述多个大小簇分布是分别对应于大核循环肿瘤细胞、小核循环肿瘤细胞和极小核循环肿瘤细胞的三种不同的大小簇分布。

21. 根据权利要求19所述的系统,其中所述指定所述受试者的所述癌症的所述转移阶段包括基于至少极小核循环肿瘤细胞在所述测量的循环肿瘤细胞大小分布中的分量来指定内脏转移阶段。

22. 根据权利要求19所述的系统,其中所述测量细胞大小或细胞核大小中的至少一项测量每个所述循环肿瘤细胞的最长尺寸,测量垂直于每个对应的最长轴的尺寸,计算每个最长尺寸和对应的垂直尺寸的乘积并计算每个所述乘积的平方根。

23. 根据权利要求19所述的系统,其进一步包括使用免疫组织化学来检测所述分离的多个循环肿瘤细胞中的前列腺癌特异性生物标志物的表达。

24. 一种用于评估受试者的癌症的疾病状况的系统,其包括:循环肿瘤细胞分离装置;和

计算机,所述计算机包括计算机可读介质,所述计算机可读介质包含用于评估所述受试者的所述癌症的疾病状况的非瞬时计算机可执行代码,所述非瞬时计算机可执行代码在被所述计算机执行时使所述计算机执行以下步骤,包括:

接收从来自所述受试者的血液样本分离的多个循环肿瘤细胞中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项的测量值;

基于所述接收的测量值确定所述多个循环肿瘤细胞的测量的循环肿瘤细胞大小分布;

将所述测量的循环肿瘤细胞大小分布与参考循环肿瘤细胞大小分布进行比较;以及

基于所述比较来指定所述受试者的所述癌症的所述疾病状况。

25. 根据权利要求24所述的系统,其中所述循环肿瘤细胞分离装置具有纳米结构表面,其增强循环肿瘤细胞相对于其它类型的细胞的优先捕获。

26. 根据权利要求25所述的系统,其中所述装置还具有微流体混沌混合器,其有助于进

一步增强循环肿瘤细胞相对于其它类型的细胞的优先捕获。

27. 根据权利要求25所述的系统,其中所述纳米结构表面涂有链霉亲和素。

28. 根据权利要求24所述的系统,其中所述细胞大小或细胞核大小中的至少一项的测量值测量每个所述循环肿瘤细胞的最长尺寸,测量垂直于每个对应的最长轴的尺寸,计算每个最长尺寸和对应的垂直尺寸的乘积并计算每个所述乘积的平方根。

29. 根据权利要求24所述的系统,其中所述参考循环肿瘤细胞大小分布是被分解成多个大小簇分布的凭借经验获得的大小分布。

30. 根据权利要求29所述的系统,其中所述多个大小簇分布是分别对应于大核循环肿瘤细胞、小核循环肿瘤细胞和极小核循环肿瘤细胞的三种不同的大小簇分布。

评估癌症的疾病状况的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年9月26日提交的美国临时申请第62/056,321号的优先权,该申请的全部内容在此通过引用并入。

[0003] 本发明是在政府支持下根据由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号R21 CA151159、R33 CA157396和CA092131以及由美国陆军医学研究和材料司令部(U.S.Army,Medical Research and Material Command)授予的授权号W81XWH-11-1-0422而完成。政府享有本发明的某些权利。

[0004] 背景

1. 技术领域

[0005] 本发明的目前要求保护的实施方案的领域涉及用于评估受试者的癌症的疾病状况的方法和系统,并且更具体地说,涉及使用来自受试者的分离的循环肿瘤细胞评估受试者的癌症的疾病状况。

[0006] 2. 相关技术论述

[0007] 前列腺癌(PC)是影响美国男性的最常见癌症。估计2014年将有超过20万名美国男子被诊断为患有PC,并且预计有近3万人死于这种疾病[1]。PC患者的5年生存率从被诊断为局部疾病(I期)的患者的近100%下降到转移性疾病(IV期)患者的28%[1]。众所周知,PC是一种成骨性疾病[2]。然而,一小部分患者发展为向内脏器官(例如,肝脏或肺)的转移。内脏转移的出现与死亡率明显升高有关[3]。这种形式的临床进展通常预示即将到来的最终器官衰竭并导致死亡。内脏转移存在于PC的特别具有侵袭性的亚型中[4],所述亚型尚未被明确定义,但包括那些具有神经内分泌特征的癌或前列腺的小细胞癌。在这些情况下,已经针对这些侵袭性变型提出了非雄激素受体靶向治疗策略,包括铂基化疗[5,6],因为它们对常规激素治疗常常具有抗性[7-9]。因此,仍然有鉴定这些将发展为向内脏器官的转移的侵蚀性PC的绝对的和未满足的需求。在较早的时间点鉴定这些患者可以允许在自然病史可能被显著改变的时候施用更合适的治疗。相同的方法可能被用作临床监测的一部分,用于测量特别有益于这些亚型的疗法的功效。

[0008] 目前没有能够特异性预测内脏转移的发作或存在的PC生物标志物。另一方面,在多项试验中[11-18],循环肿瘤细胞(CTC)被认为是具有预后意义的晚期疾病的信息生物标志物[10]。此外,我们与其他团体一起提出可以将其用作“液体活检”[19]。使用FDA批准的常规方法,CTC计数没有在隐匿性内脏扩散的检测中显示出价值[14]。建议可以将其它信息如形态学分析并入CTC测定中以提高临床价值。

[0009] 作为最常分析的形态特征之一,肿瘤切片中的核形状与PC的远处转移和死亡有关[20,21]。研究还揭示了在恶性肿瘤的情况下影响核结构的多种信号传导途径的改变[22]。因此,可以想象到,CTC的核形态可能与其形成转移的能力相关,并且核形状分析结合经由技术进步允许更具灵敏性和特异性的检测和分离的基于CTC的测定[23]可用于检测更具侵袭性的疾病形式,诸如与内脏转移相关的疾病形式。本发明的一些实施方案包括用于通过

分析分离的循环肿瘤细胞的形态特征来评估受试者的癌症的疾病状况的方法、系统和计算机可读介质。

发明概要

[0010] 一种评估受试者的癌症的疾病状况的方法,其包括:

[0011] 接收来自受试者的血液样本;从血液样本中分离多个循环肿瘤细胞(CTC);测量多个CTC中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项;基于该测量确定多个CTC的测量的CTC大小分布;使用计算机将测量的CTC大小分布与参考CTC大小分布进行比较;以及基于该比较来指定受试者的癌症的疾病状况。

[0012] 一种指定前列腺癌的转移阶段的方法,其包括:

[0013] 接收来自患有前列腺癌的受试者的血液样本;使用具有纳米结构表面并且利用微流体混沌混合器和所述纳米结构表面的组合的装置从所述血液样本中分离多个循环肿瘤细胞(CTC),所述纳米结构表面增强CTC相对于其它类型的细胞的优先捕获;测量多个CTC中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项;基于该测量确定多个CTC的测量的CTC大小分布;使用计算机将测量的CTC大小分布与参考CTC大小分布进行比较;以及基于该比较来指定受试者的前列腺癌的转移阶段。

[0014] 一种用于评估受试者的癌症的疾病状况的系统,其包括:

[0015] 循环肿瘤细胞(CTC)分离装置;和计算机,所述计算机包括计算机可读介质,所述计算机可读介质包含用于评估受试者的癌症的疾病状况的非瞬时计算机可执行代码,所述非瞬时计算机可执行代码在被计算机执行时使所述计算机执行以下步骤,包括:接收从受试者的血液样本分离的多个循环肿瘤细胞(CTC)中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项的测量值;基于接收到的测量值确定所述多个CTC的测量的CTC大小分布;比较所测量的CTC大小分布与参考CTC大小分布;以及基于该比较指定受试者的癌症的疾病状况。

[0016] 一种计算机可读介质,其包含用于评估受试者的癌症的疾病状况的非瞬时计算机可执行代码,所述非瞬时计算机可执行代码在被计算机执行时使所述计算机执行以下步骤,包括:接收从受试者的血液样本分离的多个循环肿瘤细胞(CTC)中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项的测量值;基于接收到的测量值确定所述多个CTC的测量的CTC大小分布;比较所测量的CTC大小分布与参考CTC大小分布;以及基于该比较指定受试者的癌症的疾病状况。

[0017] 附图简述

[0018] 通过考虑描述、附图和实施例,其它目标和优点将变得显而易见。

[0019] 图1A示出了研究设计的示意图。

[0020] 图1B示出了用于分离循环肿瘤细胞的具有纳米结构表面的装置的图示

[0021] 图2A-2B示出了描绘循环肿瘤细胞(CTC)核大小分布和CTC亚群的统计分析和建模的结果的图。

[0022] 图3A-3D示出了各种CTC的荧光图像以及显示CTC核大小与转移状态之间的关系的的数据图。

[0023] 图4A-4D示出了展现小核CTC+极小核CTC计数与转移性PC之间的相关性的数据图。

[0024] 图5A-5D示出了展现vsnCTC计数与具有内脏转移的侵袭性PC之间的相关性的图

表。

[0025] 图6A-6B示出了来自临床病例的数据图和计算机断层(CT)扫描图像,其中连续CTC枚举示出了vsncTC计数和内脏转移之间的关系。

[0026] 图7A-7B是示出了vsncTC和转移性肿瘤组织的免疫组织化学染色的图像组。

[0027] 图8示出了用于鉴定极小核CTC(vsncTC)的研究设计的示意图。

[0028] 图9示出了通过NanoVelcro芯片进行CTC富集的一般方案的示意图。

[0029] 图10A-10D示出了显示核大小测量在NanoVelcro芯片上的再现性的数据图。

[0030] 图11A-11B示出了展现CTC核大小分布和CTC亚群的统计分析和建模的结果的数据图。

[0031] 图12A-12D示出了CTC的荧光显微图像以及显示CTC核大小与转移状态之间的关系的数据图。

[0032] 图13A-13C示出了展现snCTC+vsncTC计数与转移性PC之间的相关性的图。

[0033] 图14是用于相关性分析的患者和枚举研究的示意图。

[0034] 图15A-15C示出了展现vsncTC计数与具有内脏转移的侵袭性PC之间的相关性的图。

[0035] 图16示出了汇总15名内脏转移患者的图。

[0036] 图17A-17B示出了个体临床病例的数据图、CT扫描和骨扫描,展示出vsncTC和内脏转移之间的相关性。

[0037] 图18A-18B示出了展现vsncTC和转移性肿瘤组织之间的共有标志物表达的免疫组织化学测定的图像。

[0038] 图19A-19B示出了展现NanoVelcro芯片比CellSearch™系统具有更高的CTC识别灵敏度的图。

具体实施方式

[0039] 下面详细讨论了本发明的一些实施方案。在描述实施方案时,为了清楚起见,使用特定的术语。然而,本发明并不旨在受到所选用的特定术语的限制。相关领域的技术人员将认识到,可以采用其它等效组件,并且在不脱离本发明的广泛概念的情况下可以开发其它方法。在本说明书中的任何地方(包括背景和具体实施方式部分)引用的所有参考文献是通过引用并入,就如同各自己被单独并入一样。

[0040] 本发明的一些实施方案涉及评估受试者的癌症的疾病状况的方法,其包括以下步骤:接收来自受试者的血液样本;从血液样本中分离多个循环肿瘤细胞(CTC);测量多个CTC中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项;基于该测量确定多个CTC的测量的CTC大小分布;使用计算机将测量的CTC大小分布与参考CTC大小分布进行比较;以及基于该比较来指定受试者的癌症的疾病状况。在一些实施方案中,参考分布是被分解成多个大小簇分布的凭借经验获得的大小分布。在一些实施方案中,所述多个大小簇分布是分别对应于大核CTC、小核CTC和极小核CTC的三种不同的大小簇分布。

[0041] 本发明的一些实施方案包括用于评估受试者的癌症的疾病状况的系统。所述系统包括:循环肿瘤细胞(CTC)分离装置;和计算机,所述计算机包括计算机可读介质,所述计算机可读介质包含用于评估受试者的癌症的疾病状况的非瞬时计算机可执行代码,所述非瞬

时计算机可执行代码在被计算机执行时使所述计算机执行以下步骤,包括:接收从来自受试者的血液样本中分离的多个循环肿瘤细胞(CTC)中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项的测量值;基于所述接收到的测量值确定所述多个CTC的测量的CTC大小分布;比较所测量的CTC大小分布与参考CTC大小分布;以及基于该比较指定受试者的癌症的疾病状况。

[0042] 本发明的一些实施方案包括计算机可读介质,其包含用于评估受试者的癌症的疾病状况的非瞬时计算机可执行代码,所述非瞬时计算机可执行代码在被计算机执行时使所述计算机执行以下步骤,包括:接收从来自受试者的血液样本分离的多个循环肿瘤细胞(CTC)中的每一个的细胞大小或细胞核大小中的至少一项的测量值;基于接收到的测量值确定所述多个CTC的测量的CTC大小分布;比较所测量的CTC大小分布与参考CTC大小分布;以及基于该比较指定所述受试者的癌症的疾病状况。

[0043] 本发明的一些实施方案涉及用于指定癌症的转移阶段的方法、系统和计算机可读介质。在涉及用于指定所述癌症的转移阶段的方法、系统和计算机可读介质的一些实施方案中,指定癌症的转移阶段包括基于至少极小核CTC在所述测量的CTC大小分布中的分量来指定内脏转移阶段。

[0044] 本发明的一些实施方案涉及用于评估受试者的癌症的疾病状况的方法、系统和计算机可读介质,方式是部分地通过测量每个分离的CTC的最长尺寸,测量垂直于每个对应的最长轴的尺寸,计算每个最长尺寸和对应的垂直尺寸的乘积并计算每个所述乘积的平方根。

[0045] 在本发明的涉及用于评估受试者的癌症的疾病状况的方法和系统的一些实施方案中,一种装置被用于分离多个CTC并且具有纳米结构表面,该纳米结构表面增强CTC相对于其它类型的细胞的优先捕获。所述装置在图1B中示意性地示出并在美国专利号9,140,697中有所描述,所述专利的全部内容通过引用在此并入。所述装置(100)含有具有纳米结构表面区域(104)的衬底(102)。多种结合剂(106)被附着在所述衬底的所述纳米结构表面区域上。所述纳米结构表面区域包括多个纳米结构(如纳米结构108),每个纳米结构具有纵向尺寸和横向尺寸。当样本被放置在所述装置上时,结合剂和多个纳米结构通过协同作用捕获生物细胞(110)。更多的细胞表面组分附着在纳米结构基底而不是平坦基底上,因为纳米结构基底提供与细胞表面组分的增强的局部互相作用。

[0046] 在涉及用于评估受试者的癌症的疾病状况的方法和系统的一些实施方案中,使用了NanoVelcro细胞亲和力测定,其中利用抗EpCAM(上皮细胞粘附分子)包覆的纳米结构衬底(例如,垂直取向的硅纳米线衬底(SiNWS))以固定的装置设置来捕获CTC,捕获效率为40%至70%。(参见,例如,美国公开专利申请号US 2012/0003711 A1,“Device for Capturing Circulating Tumor Cells”和美国公开专利申请号US 2015-0260710A1,“Selective Capture and Stimulated Release of Circulating Tumor Cells on Nanostructured Devices”,二者均被让与和本申请相同的受让人,其中每个申请的全部内容通过引用并入本文中。)所述NanoVelcro CTC测定的一个独特的特征是使用纳米结构衬底。SiNWS和纳米级细胞表面组分(例如,微绒毛)之间的增强的局部地形相互作用类似于纳米级VELCRO的工作原理,产生相比于在非结构化(即,平坦的)基底中观察到的细胞捕获亲和力大大提高的细胞捕获亲和力。NanoVelcro概念的普遍适用性受以下两点支持:i)最近

的研究,其中证明了其它类型的纳米结构基底(例如电化学沉积型共轭聚合物纳米特征和水平填充的超长TiO₂纳米纤维)也表现出与捕获剂的协同效应,从而实现增强的CTC捕获性能;以及ii)其中利用包覆免疫细胞特异性捕获剂的SiNWS来对免疫细胞的亚群进行分类的研究。(另请参见2013年5月29日提交的转让给与本申请相同的受让人的“Systems,Methods and Components for Isolating Cells from a Fluid Sample”,PCT/US13/43171,其全部内容通过引用并入本文中。

[0047] 1. 定义

[0048] 为了有利于理解本发明,下文定义了许多术语和短语。

[0049] 如本文中所使用,除非上下文另外明确说明,否则单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数形式。因此,例如,提及“一种结合剂”包括提及一种以上的结合剂。

[0050] 术语“纳米结构”是指具有横向尺寸和纵向尺寸的结构,其中横向尺寸、纵向尺寸或横向和纵向尺寸两者都小于1mm。纳米结构的形状并不重要。它可以例如是任何三维表面,诸如珠粒、颗粒、链、管、球体等。

[0051] 术语“诊断性”和“诊断”是指鉴定病理状况的存在或性质并且包括鉴定处于发展特定疾病或病症的风险的患者。诊断方法的灵敏度和特异性不同。诊断测定的“灵敏度”是患病个体测试呈阳性的百分比(“真阳性”的百分比)。未通过测定检测出的患病个体为“假阴性”。没有患病并且在测定中测试呈阴性的受试者被称为“真阴性”。诊断测定的“特异性”为1减去假阳性率,其中“假阳性”率被定义为那些测试呈阳性,但没有患病的受试者的比例。虽然特定的诊断方法可能提供不了明确的病状诊断,但只要该方法提供了有助于诊断的阳性指示就足够了。

[0052] 术语“检测(detection,detecting等)”可以在检测生物标志物或检测疾病或病症(例如,当获得阳性分析结果时)的情况下使用。在后一种情况下,“检测”和“诊断”被视为是同义的。

[0053] 术语“受试者”、“患者”或“个体”通常指的是人,但是本发明的方法并不局限于人,并且应该可用于其它哺乳动物(例如,猫、狗等)。

[0054] “样本”以其最广泛的含义用于本文中。样本可以包括体液,包括血液、血清、血浆、泪液、房水和玻璃体液、脊髓液、尿液和唾液;细胞或组织制备物的可溶性部分,或其中细胞生长的培养基。获得合适的生物样本的方法是本领域技术人员已知的。

[0055] 如本文中所用的术语“结合剂”是指与纳米结构表面区域缔合(例如,固定在该表面区域上或共价或非共价连接至该表面区域)或是该表面的一部分(例如,塑料表面的衍生部分),并且可以经历与靶细胞的特异性相互作用或缔合的任何实体或物质,例如分子。“多个结合剂”可以指多个一种特定结合剂或多个一种以上的结合剂。

[0056] “抗体”是免疫球蛋白分子,其经由免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合靶标,例如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质等。如本文所用,该术语以其最广泛的含义使用,并且涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体(例如从至少两个完整抗体产生的双特异性抗体)、杂合抗体、包含抗体部分的融合蛋白以及包含抗原识别位点的任何其他经修饰的免疫球蛋白分子,只要抗体表现出所需的生物活性。抗体可以是免疫球蛋白的以下五个主要类别中的任一个:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同种

型) (例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2), 所述类别是基于分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链恒定结构域的特性来划分。不同类别的免疫球蛋白具有不同的和众所周知的亚基结构和三维构型。抗体可以是裸露的或缀合至其它分子如毒素、放射性同位素等。

[0057] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于: 线性抗体; 单链抗体分子; Fc或Fc'肽; Fab和Fab片段; 以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0058] “杂合抗体”是免疫球蛋白分子, 其中来自具有不同抗原决定簇区的抗体的重链和轻链对被组装在一起而使得所得的四聚体可以识别和结合两个不同的表位或两种不同的抗原。

[0059] 关于细胞的“分离”是指细胞从其天然环境(例如在实体瘤中)中去除并且被单离或分离, 并且与其共同天然存在但缺少分离所依据的标志物的其它细胞至少约30%、50%、75%和90%分离。

[0060] “特异性结合”或显示“特异性结合”或“捕获”或“选择性捕获”靶细胞的分子(例如, 结合剂)是指该分子与靶细胞的反应或缔合比与其它物质更频繁、更迅速、持续时间更长和/或更具亲和力。因此, 在指定的实验条件下, 特定分子对靶细胞的结合是对背景的至少两倍, 并且大体上不显著地与样本中存在的其它细胞和蛋白质结合。

[0061] 如本文中所使用的“转移”是指癌症从原始部位扩散或转移到身体的其他区域并在新位置发展出类似癌性病变的过程。“转移性”或“转移”细胞是丧失与邻近细胞的粘着接触并经由血流或淋巴从疾病的原发部位迁移而侵入邻近身体结构的细胞。

[0062] 实施例

[0063] 以下实施例帮助解释本发明的一些概念。然而, 本发明的总体概念并不限于具体实施例。

[0064] 实施例1: 极小核循环肿瘤细胞(vsnCTC)作为晚期前列腺癌的内脏转移的诊断生物标志物

[0065] 在这个实施例中, 我们招募了涵盖疾病的广泛临床表现(包括没有转移、仅有骨/淋巴结转移以及存在内脏转移)的PC患者, 旨在发现CTC中的内脏转移的特征。图1A示出了研究设计的示意图(比例尺为10微米)。使用高灵敏度NanoVelcro芯片[24, 25]结合荧光显微术对这些患者进行CTC枚举研究, 以通过常规标准(DAPI+/CK+/CD45-)鉴定CTC。测量所鉴定的CTC的核大小并进行统计建模, 由此我们确定了CTC的三个亚群, 它们被称为大核CTC(1nCTC)、小核CTC(snCTC)和极小核CTC(vsnCTC)。发现了CTC亚群与转移状态之间存在明显的相关性, 因为snCTCs和vsncTC在一起(snCTC+vsncTC)和单独的vsncTC计数预测分别存在转移性PC和累及内脏的侵袭性转移性PC。此外, 索引患者的连续枚举表明vsncTC用于预测内脏转移的发生和监测治疗反应的潜在作用。细胞标志物的分析示出了vsncTC和神经内分泌PC之间的生化相似性。这些发现表明vsncTC的存在是具有内脏转移的PC的一个特征, 并且可以作为这种最具侵袭性形式的PC的诊断标志物。

[0066] 患者与方法

[0067] 患者与样本

[0068] 所有患者都患有组织学上确认的PC, 并在西达塞奈医学中心(Cedars-Sinai Medical Center, CSMC)接受评估和/或治疗。样本采集和分析由CSMC机构审查委员会批准。对于那些处在患有转移性疾病风险下的患者, 入选需要在样本采集后的3个月内进行成像。

允许从个别患者多次抽血。对于该研究,将静脉血采集在含酸-柠檬酸盐-葡萄糖的真空采血管(BD Bioscience)中并在采集后4小时内进行处理。

[0069] 使用NanoVelcro芯片进行CTC富集

[0070] 通过NanoVelcro芯片进行CTC富集的一般方案简要概括如下:使用标准RBC裂解缓冲液(含有NH₄Cl和Tris,pH 7.2)对1.0mL静脉血进行红细胞(RBC)耗尽处理;将剩余的细胞与捕获剂(生物素化山羊抗人EpCAM抗体,R&D Systems)一起培育;仔细洗涤后,将样本装载到NanoVelcro芯片中,该芯片由链霉亲和素涂覆的NanoVelcro基底和覆盖的PDMS混沌混合器组成。结合使用自动化流体处理器,将细胞悬浮液以一致的流速(0.5mL/h)引入芯片中。在通过2%多聚甲醛(PFA,Electron Microscopy Science)固定后,使用DAPI、FITC缀合的抗CK和TRITC缀合的抗CD45对固定在NanoVelcro基底上的细胞进行免疫细胞化学染色(ICC),随后进行显微成像以鉴定CTC。

[0071] CTC成像以及核大小测量

[0072] 成像系统由具有NIS-Element成像软件(Nikon)的直立式荧光显微镜(Eclipse 90i,Nikon)组成。该成像系统在40X放大倍数下以分别对应于核、CK和CD45染色的DAPI、FITC和TRITC通道在NanoVelcro芯片上方进行自动扫描。DAPI+/CK+/CD45事件(图1A)被定义为候选CTC并在100X或400X放大倍数下对其进行后续的自动扫描。由经验丰富的技术人员和资深病理学家审核高分辨率图像以排除任何错误鉴定。对于通过最终审核的所有CTC,沿最长轴和垂直于该轴的宽度测量核大小(图1A)。^[26,27]用于统计分析的核大小的定义如下:

[0073]
$$\text{核大小} = \sqrt{(\text{最长轴}) \times (\text{垂直宽度})}$$

[0074] 为了确保在NanoVelcro芯片上的核大小测量的一致性和准确性,我们使用PC细胞系和其加标血样(spiked blood sample)进行了一系列校准研究。

[0075] 统计分析

[0076] 为了鉴定CTC的亚群,我们使用由具有不同方差的K个高斯分量形成的高斯混合模型(GMM)对CTC核大小进行聚类分析。K个高斯分量的平均值和方差由期望最大化(EM)算法估计,且最优数K由Akaike信息准则和贝叶斯信息准则确定。然后,我们可以根据CTC的核大小将其分类为K个簇,其中CTC将被分配给具有所有K个高斯分量的最大似然量的簇。

[0077] 使用Wilcoxon检验来评估不同转移类别之间CTC计数的统计学差异:1)转移对无转移和2)非内脏转移对存在内脏转移。采用箱线图呈现CTC计数的分布。使用接受者操作特征(ROC)曲线比较对应于不同簇的CTC计数的诊断性能。以95%置信区间(CI)计算ROC曲线下面积。所有的检验都是双侧的且P值小于0.05被认为具有统计显著性。使用R软件进行所有的统计检验。

[0078] 结果

[0079] CTC枚举研究中的PC患者招募、特征和样本采集

[0080] 从2013年1月至2014年6月期间在CSMC接受治疗的PC患者收集用于CTC枚举的新鲜静脉血样本。根据我们的各种血液采集方案,共有50名来自PC的广泛临床过程的患者被鉴定为具有可从该分析使用的样本。简而言之,这项研究包括接受原始局部治疗(即根治性前列腺切除术或原始性放射治疗)的患者、接受辅助治疗(化疗或救助放射治疗)的患者、在主

动监测下的患者、接受雄激素剥夺治疗 (ADT) 的去势敏感性患者以及接受全身治疗的转移性去势难治性患者 (mCRPC)。根据转移部位将患者样本分类: 1) 无转移; 2) 仅有骨/淋巴结转移; 和 3) 存在内脏转移。

[0081] CTC核大小分布以及CTC亚群的统计分析和建模

[0082] 在92个枚举研究中鉴定的总共254个CTC (来自50名患者) 被用于CTC核大小分布的统计分析和建模。图2示出了描绘CTC核大小分布和CTC亚群的统计分析和建模的结果的图。图2的A图中的直方图描绘了254个CTC根据其核大小的分布。黑色实线表示最匹配直方图的最优高斯混合模型 (GMM) 的密度。线21、22和23分别表示三个簇特异性高斯密度曲线 (组1、2和3)。虚线指示我们的分类规则的截止值: 将样本分配到具有最大高斯似然的簇中。在图2的B图中, 线24显示Akaike信息标准 (AIC) 值, 并且线25显示贝叶斯信息准则 (BIC) 值从1至5的K (聚类数)。最佳聚类数为3, 因为当K=3时, AIC和BIC都达到最小值。

[0083] 根据信息准则AIC和BIC, 最优模型是具有聚类均值 (6.94、10.49、21.04 μm)、标准偏差 (1.30、2.49、5.91 μm) 和先验概率 (0.34、0.38、0.28) 的3聚类GMM (图2A)。还示出了不同聚类数的AIC和BIC值 (图2B)。然后, 我们将CTC分配到具有最大高斯似然的簇中, 并产生三个CTC亚群, 我们将其标记为极小核CTC (vsnCTC, 核大小 $<8.70\mu\text{m}$)、小核CTC (snCTC, 核大小介于8.70 μm 与14.71 μm 之间) 和大核CTC (lnCTC, 核大小 $>14.71\mu\text{m}$)。

[0084] CTC核大小与转移状态之间的关系

[0085] 为进一步分析三个CTC亚群与转移状态之间的关系, 我们首先进行筛选以选出可能受治疗影响的CTC和枚举结果。提供样本的几名患者接受了具有各种反应的许多治疗操作 (其实例提供于下文中)。其中一些患者从治疗中获得了临床益处。为了消除由治疗效果产生的潜在偏差 [25, 28], 从下面详述的分析中排除在治疗开始后的1个月内获得的样本。此外, 如果有明显的益处, 排除与疾病状态有关的样本, 直到该疾病在治疗时明显正在进展 (即, 使任何治疗效果的风险最小化)。最后, 如果缺乏表明抽血时的疾病状态的同期成像信息, 则将样本排除在样本组 (分析组) 的再分析之外。在此分析组中, 最初92个枚举中总共有36个 (38%) 由于潜在治疗效果而被排除。使用来自56个枚举测试的总计152个CTC来分析CTC核大小和转移状态之间的关系。使用CTC计数与核大小绘制直方图并根据转移状态进行分类 (图3A-3D)。图3A-3D示出了各种CTC的荧光图像以及显示CTC核大小与转移状态之间的关系的数据图。图3A示出了通过荧光显微术获取的lnCTC、snCTC和vsnCTC的代表性图像。用DAPI、FITC-缀合的抗CK和TRITC缀合的抗CD45缀合物使细胞染色。使用CTC计数与核大小绘制直方图和簇特异性高斯密度曲线并分为三种转移状态: 图3B表示无转移的类别, 其中lnCTC在所有CTC中占最大比例 (62%); 图3C表示仅有骨/LN转移的类别, 其中snCTC构成主要亚群 (66%); 且图3D表示存在内脏转移的类别, 其中vsnCTC占最大比例 (62%), 其次是snCTC (27%)。如通过双侧 χ^2 检验 ($p=2.85 \times 10^{-13}$) 所表明, 三个CTC亚群的比例在不同转移状态之间显著不同。在图3B、3C和3D中, 线31、32和33分别表示vsnCTC、snCTC或lnCTC。

[0086] 三种亚型 (图3A中的实例) 的比例在不同状态之间显著不同。在无转移的类别 (图3B) 中, 大部分细胞被归类为lnCTC (62%)。在仅有骨/LN转移的类别 (图3C) 中, 大部分细胞被归类为snCTC (66%)。在存在内脏转移的类别 (图3D) 中, vsnCTC构成主要CTC亚群 (62%), 其次是snCTC (27%)。该结果表明, 我们的CTC无监督聚类与转移类别具有显著的相关性 (双侧 χ^2 检验, $p=2.85 \times 10^{-13}$)。

[0087] snCTC+vsCTC计数与转移相关

[0088] 根据观察到的CTC亚群和转移状态的关系,我们然后评价不同CTC亚群对于转移性PC的诊断潜力。我们对通过上述样本集合细化的56个枚举试验进行了统计分析,结果显示26个枚举来自无转移类别,30例来自转移性PC(仅存在骨/LN转移+存在内脏转移)。图4A-4D示出了展现snCTC+vsCTC计数与转移性PC之间的相关性的数据图。箱线图示出了1.0mL血液中的总CTC计数(图4A)、lnCTC计数(图4B)和snCTC+vsCTC计数(图4C)。箱形表示四分位范围,并且穿过每个箱形的水平线表示中值。y轴代表每mL血液的CTC计数。在分析中,有26个枚举来自无转移的类别,并且有30个枚举来自转移性PC。使用双侧Wilcoxon检验进行统计分析。图中指出了所有p值。图4D示出了使用用于鉴定转移性PC的CTC亚群的计数产生的接受者操作特征(ROC)曲线。总CTC计数(lnCTC+snCTC+vsCTC,黑线)在鉴定转移性PC中得到0.856的曲线下面积(AUC)值(95%置信区间[CI]=0.757至0.955)。lnCTC计数(黑色虚线)得到0.580的AUC值(95%置信区间[CI]=0.460至0.700)。snCTC+vsCTC计数(黑色箭头指示的线)得到0.884的AUC值(95%置信区间[CI]=0.799至0.968)。

[0089] 总CTC计数(lnCTC+snCTC+vsCTC)在转移性和非转移性疾病之间显示统计学上的显著差异(0.94 ± 1.84 对 3.81 ± 3.77 个细胞/mL血液, $p < 0.001$,图4A)。然而,如我们在统计分析中分离CTC亚群,lnCTC亚群未能区分转移性和非转移性疾病(0.54 ± 1.79 对 0.53 ± 0.87 个细胞/mL血液, $p = 0.200$,图4B)。相反地,snCTC+vsCTC计数仍然具有显著的差异(0.41 ± 0.75 对 3.28 ± 3.87 个细胞/mL血液, $p < 0.001$,图4C)。产生ROC曲线以评估CTC计数作为转移性PC的诊断生物标志物的潜在可用性。snCTC+vsCTC计数相比于总CTC计数显示较大的曲线下面积(AUC)(0.884对0.856,图4D)。当利用>0个细胞/mL血液的snCTC+vsCTC计数的截止值时,对于诊断转移性PC的灵敏度和特异性分别达到69%和93%。这些结果与snCTC和vsCTC在关于仅有骨/LN转移和存在内脏转移的类别的直方图(分别参见图3C和3D)中的聚类一致。这表明snCTC+vsCTC计数相比于总CTC计数可以是转移的较好生物标志物。

[0090] vsCTC计数与内脏转移的存在相关

[0091] 接下来,我们检查了所鉴定的CTC亚群在检测具有内脏转移的侵袭性PC变种中的诊断潜力。图5A-5D示出了展现vsCTC计数与具有内脏转移的侵袭性PC之间的相关性的图。箱线图示出了1.0mL血液中的snCTC+vsCTC计数(图5A)、snCTC计数(图5B)和vsCTC计数(图5C)。箱形表示四分位范围,并且穿过每个箱形的水平线表示中值。y轴代表每mL血液的CTC计数。来自具有已知骨转移的患者的样本子集被用于该分析。这些在分析中包括来自非内脏转移(仅骨/LN转移)的类别的14个枚举,以及来自内脏和骨转移的类别的13个枚举。使用双侧Wilcoxon检验进行统计分析。图中指出了所有p值。图5D示出了使用CTC亚群的计数产生ROC曲线,用于鉴定转移性PC中内脏转移的存在。snCTC+vsCTC计数(黑线)在鉴定转移性PC中内脏转移的存在中得到0.654的AUC值(95%置信区间[CI]=0.367至0.803)。snCTC的计数得到0.379的AUC值(95%置信区间[CI]=0.167至0.570)。vsCTC的计数得到0.819的AUC值(95%置信区间[CI]=0.606至0.921)。

[0092] 尽管成功区分了转移性PC与无转移,但snCTC+vsCTC计数未能在具有骨/LN转移的患者中确定内脏转移(2.54 ± 2.75 对 4.54 ± 4.90 个细胞/mL血液, $p = 0.178$,图5A)。认识到图3D中的snCTC和vsCTC的偏向分配,我们继续进行个别CTC亚群的进一步统计分析。结

果显示,snCTC单独无法鉴定具有骨/LN转移的患者中的内脏转移(2.26 ± 2.91 对 1.23 ± 1.42 个细胞/mL血液, $p=0.286$,图5B)。然而,vsnCTC计数成功地区分内脏转移性与非内脏转移性PC(0.29 ± 0.47 对 3.31 ± 5.02 个细胞/mL血液, $p=0.0028$,图5C)。ROC曲线显示vsncTC(0.819)相比于单独的snCTC(0.379)和两个亚群的组合(0.654)具有更大的AUC(图5D)。当对于vsncTC计数应用的截止值为 >0 个细胞/mL时,对于诊断内脏转移的灵敏度和特异性分别达到77%和71%。当vsncTC计数的截止值设定为 >1 /ml血液时,出现灵敏度和特异性的最高总和。灵敏度和特异性分别为54%和100%。该结果展现了vsncTC计数作为具有内脏受累的侵袭性PC的诊断标志物的潜力。

[0093] 个体临床病例:vsncTC和内脏转移之间的相关性

[0094] 为了呈现连续样本分析的价值,我们提供了两个临床病例,其自然史中发生重大变化,在其随访期间vsncTC计数发生变化:

[0095] 患者A:新肺转移的预测。该患者呈现局部晚期高分级PC,其复发和进展为转移性去势难治性PC(mCRPC)。他接受了一系列全身治疗,包括醋酸阿比特龙、多西他赛、镭-223和实验性PI3K抑制剂。他从治疗中获得了有限的生化和临床益处,并最终发展为肺转移,接着是快速的临床恶化和死亡。

[0096] 图6A-6B示出了来自临床病例的数据图和CT扫描图像,其中连续CTC枚举示出了vsncTC计数和内脏转移之间的关系。图6A示出了具有转移性去势难治性前列腺癌(mCRPC)的患者A的病程。患者在骨转移的疾病状态(由骨扫描确认)下开始接受NanoVelcro CTC枚举测试。调查未发现内脏转移。在连续CTC枚举期间,在第102天,也就是在第206天通过CT扫描检测到肺中的新转移病变的约三个月之前,检测到了vsncTC。图6B示出了具有mCRPC和通过活检确认的肝转移的患者B的病程。血清PSA浓度低于 1.0ng/mL ,并且CellSearch分析在整个临床过程中测得 $<5\text{CTC}/7.5\text{mL}$ 。他的初始vsncTC计数相当于每 7.5mL 血液中30个vsncTC。所述vsncTC在开始实验性激酶抑制剂后在连续CTC枚举中变得不可检测,且CT扫描显示其肝转移在第81天的消退。通过骨扫描还发现骨病消退。

[0097] 在连续CTC分析开始时,通过CT和骨扫描成像证实,他的宏观疾病负担仅限于骨扩散(图6A)。我们确定了vsncTC的出现,其比肺转移的发展早大约100天。这些vsncTC在其余的疾病过程中持续存在。该事件并没有伴随着肺部症状。这个例子表明vsncTC可能是内脏转移发展的预测标志物。

[0098] 患者B:监测临床/放射影像反应。这是一名mCRPC患者,他具有在其自然病史的早期发展的已知肝转移。尽管接受了ADT和多西他赛治疗,放射照相显示他的疾病仍有进展(血清PSA浓度未升高)。他在参加研究性多靶向激酶抑制剂的临床试验期间开始CTC采集。患者在开始治疗后的2周内经历临床改善,并在3个月时发现软组织和骨反应(图6B)。

[0099] 在第一次抽血时,通过NanoVelcro芯片鉴定,发现该患者具有30个CTC/ 7.5mL (而通过CellSearch鉴定5个CTC/ 7.5mL),所有CTC都是vsncTC。在开始治疗后的2周内,他的CTC计数为 $7.5\text{snCTC}/7.5\text{mL}$ 和 $0\text{vsncTC}/7.5\text{mL}$ 。CTC的计数进一步下降,并且他在本发明公开时继续受益于治疗。vsncTC的消失与其肝转移的消退具有良好的相关性,这表明了vsncTC在动态监测已存在内脏转移的患者(包括那些无法通过常规血液诊断进行监测的患者)的疾病反应中的潜在作用。

[0100] vsncTC和转移性肿瘤组织之间的标志物表达的相关性

[0101] 为了进一步评价vsncTC和内脏器官中的转移性肿瘤之间的关联,我们比较了几种细胞标志物在CTC和来自患者C的同期转移性肿瘤活检物中的表达。患者C在病理上被诊断患有前列腺小细胞(神经内分泌)癌并且具有6.8ng/mL的血清PSA。他在利用前列腺切除术、辅助放疗和铂基化疗进行了积极的局部治疗后1年出现复发。在复发时,他被发现具有无生化进展的新的肺和骨转移。对该患者进行了胸膜转移的活检,并采集血液用于CTC分析。图7A-7B是示出了vsncTC和转移性肿瘤组织的免疫组织化学染色的图像组。图7A-7B示出了通过共有的细胞标志物证明了vsncTC与同期转移性肿瘤组织之间的正关联。图7A示出了转移性PC肿瘤在胸膜腔处的代表性横切面。左图:胸膜肿瘤活检的标准H&E染色;右图:对胸膜肿瘤中的突触素表达的免疫组织化学(IHC)分析。图7B示出了同期获得的vsncTC的突触素染色。图中的比例尺表示10 μ m。

[0102] 转移性病变的组织形态学示于图7A中。对活检物的免疫组织化学(IHC)染色显示大量的突触素和细胞角蛋白表达。相同的突触素和细胞角蛋白的抗体被用于CTC,其中也鉴定了突触素和细胞角蛋白表达(图7B)。这一发现不仅表明CTC来源于肿瘤组织,而且还提供证据表明,通过掺入额外的标志物,CTC可以提供辅助肿瘤组织的病理学分析的有效信息和/或帮助区分PC的病理学子集,例如此处所描述的小细胞癌患者。

[0103] 讨论

[0104] 组织病理学仍然是癌症诊断的金标准。良性和恶性组织之间的区别主要依赖于病理学家的解释。因此,在20世纪后期引入了“定量病理学”的概念,旨在利用软件中的标准化算法测量和定量形态特征[29-31]。然而,尽管在过去的20年间取得了研究进展,但这种方法在现代医学中还没有被广泛地采用。在此,我们将这种未受重视的基本概念应用于基于NanoVelcro芯片的高度灵敏的和特异性的CTC枚举方法,从而鉴定可以被视为伴随内脏受累的转移性PC和侵袭性PC的诊断性生物标志物的snCTC和vsncTC亚群。

[0105] 如在本研究和先前的出版物中所展现,NanoVelcro芯片在检测来自外周血的CTC方面展现高灵敏度[24,25]。使用荧光显微术,我们产生满足定量病理学标准的细胞图像。这允许高度特异性地鉴定来自周围WBC的CTC,并且同时使得能够对单个CTC进行核大小测量。在常用的细胞特征(例如,细胞和核的形状/大小、核/胞质含量)中,我们发现核大小是被NanoVelcro基底固定的CTC的最稳定的特征,原因是:1) DAPI染色的高再现性和2) DAPI荧光在成像过程中的最小衰减。此外,我们根据自身的经验和其它团体的报告确认CTC的细胞膜非常脆弱,并且容易产生假象和遭受机械力的破坏[32]。相反地,核形态在整个CTC枚举过程中保存地相当完好。我们的观察结果与核形态的重要性的历史发现以及癌症阶段和结果[参考文献]是一致的。因此,我们专注于测量核大小。

[0106] 在技术进步的帮助下,我们通过核大小确定了三个不同的CTC亚群,即1nCTC、snCTC和vsncTC。转移性PC中的snCTC+vsncTC计数显著高于无转移类别。ROC曲线显示出优于总CTC计数或1nCTC的诊断能力。当利用>0个细胞/mL血液的snCTC+vsncTC计数的截止值时,对于诊断转移性PC的灵敏度和特异性分别达到69%和93%。此外,vsncTC在累及内脏的侵袭性PC中比在其它转移性PC中显著更高。ROC曲线显示vsncTC(0.819)相比于单独的snCTC(0.379)和两个亚群的组合(0.654)具有更大的AUC。当vsncTC计数的截止值设定为>1个细胞/mL血液时,出现灵敏度和特异性的最高总和。灵敏度和特异性分别为54%和100%。

[0107] 除了现有的CTC富集技术外,重要的研究工作已致力于针对CTC中的各种基因组学

[33]、转录组学[34,35]和蛋白质组学特征[36,37]的分子表征。在癌细胞生物学的经典文献中,核形态和核大小与同细胞行为密切相关的上游分子信号的变化相关[22,38,39]。只有少数团体已经描述了CTC的形态特征[40]并且主要专注于在基于滤波器的技术[41]中可能影响CTC检测率的细胞大小。我们在本研究中证明了CTC的核大小允许鉴定对具有内脏转移的侵袭性PC具有诊断意义的vsnCTC。

[0108] 除了CTC核大小,我们还进行了CK和突触素的免疫染色,并在vsnCTC以及来自我们的索引患者的同期胸膜转移中发现了这些标志物的存在。由于突触素是已识别的神经内分泌前列腺癌(NEPC)的标志物[4],并且之前未曾报道在PC CTC中存在该标志物,因此这一点尤其重要。这表明我们鉴定的vsnCTC可能源于转移性肿瘤或与其具有共同起源。这也意味着CTC中的额外的细胞标志物可用于提供对区别PC的某些病理亚型有用的信息。

[0109] 有几个独特之处为我们的发现做好了准备。首先,我们没有使用根据临床阶段、格里森评分(Gleason Score)或去势敏感性对PC进行分类的常用方法,而是根据转移能力对疾病进行分类,重点关注致死性内脏转移。第二,我们招募了一个群组,其不仅包含来自PC的广泛临床过程的患者,还包括罕见的内脏转移患者。最后,进行严格的统计分析和建模,以确定CTC亚群。

[0110] 以前的努力主要致力于CTC的预后意义。已经证明,通过CellSearch™获得的提高的CTC计数可以预测PC患者的总生存期[11-18]及其对某些疗法的反应[42]。然而,只有少数研究显示了CTC对于转移性PC的潜在诊断价值的[18,43,44]。基于我们的发现和目前的临床指南,我们将建议由NanoVelcro芯片检测的snCTC和vsnCTC的潜在效用。vsnCTC的检测与内脏转移之间的显著关系指出了用于监测晚期mCRPC患者的潜在的新临床工具。鉴于ECOG3805(CHARTED)的近期研究结果[45][参考文献],已考虑到早期阶段的更积极的PC治疗,因为该研究表明,早期的细胞毒物治疗显著提高患者的生存率。此时,内脏转移通常在疾病过程的晚期被检测到,并且经常很快发生患者死亡。早期检测具有内脏转移或处于相应风险的患者将允许早期干预,这可以显著改变原本会致命的疾病进程。这种工具还可以通过确定用于实施可能增强这些新治疗的临床益处的新型治疗方法的最佳受试者库来影响临床研究的状态。

[0111] 总之,我们对广泛的PC患者进行了NanoVelcro CTC枚举测定,并提供了令人信服的证据表明由核大小的定义CTC亚群表现出的临床相关性。NanoVelcro测定在CTC鉴定方面具有高灵敏度和特异性,从而使核大小评估成为可能并具有意义。未来将进行大规模前瞻性试验以验证(i)组合的snCTC和vsnCTC亚群作为用于检测转移性PC的现有诊断工具(即,骨扫描和MRI)的辅助性诊断标志物的效用;以及(ii)vsnCTC对具有内脏转移的侵袭性PC的独特诊断潜力。鉴于形态分析在病理学中的根本性质,我们预期了未来将snCTC和vsnCTC纳入临床实践指南和指导治疗或测量疗法的疗效的效用。

[0112] 实施例1的参考文献:

[0113] 1.Siegel R, Ma J, Zou Z. et al. Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin 2014; 64(1):9-29.

[0114] 2.Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med 2004; 350(16):1655-64.

[0115] 3.Halabi S, Kelly WK, Zhou H, et al. The site of visceral metastases

(mets) to predict overall survival (OS) in castration-resistant prostate cancer (CRPC) patients (pts): A meta-analysis of five phase III trials. *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr 5002).

[0116] 4. Beltran H, Tomlins S, Aparicio A, et al. Aggressive Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2014;10.1158/1078-0432.CCR-13-3309.

[0117] 5. Aparicio AM, Harzstark AL, Corn PG, et al. Platinum-based chemotherapy for variant castrate-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(13):3621-30.

[0118] 6. Papandreou CN, Daliani DD, Thall PF, et al. Results of a phase II study with doxorubicin, etoposide, and cisplatin in patients with fully characterized small-cell carcinoma of the prostate. *J Clin Oncol* 2002;20(14):3072-80.

[0119] 7. Beltran H, Tagawa ST, Park K, et al. Challenges in recognizing treatment-related neuroendocrine prostate cancer. *J Clin Oncol* 2012;30(36):e386-9.

[0120] 8. Yuan X, Cai C, Chen S, et al. Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. *Oncogene* 2014;33(22):2815-25.

[0121] 9. Lipianskaya J, Cohen A, Chen CJ, et al. Androgen-deprivation therapy-induced aggressive prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *Asian J Androl* 2014;10.4103/1008-682X.123669.

[0122] 10. Danila DC, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(12):3903-12.

[0123] 11. Goldkom A, Ely B, Quinn DI, et al. Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(11):1136-42.

[0124] 12. Resel Folkersma L, San Jose Manso L, Galante Romo I, et al. Prognostic significance of circulating tumor cell count in patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Urology* 2012;80(6):1328-32.

[0125] 13. Wang FB, Yang XQ, Yang S, et al. A higher number of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood indicates poor prognosis in prostate cancer patients—a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12(10):2629-35.

[0126] 14. Scher HI, Jia X, de Bono JS, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol* 2009;10(3):233-9.

[0127] 15. Olmos D, Arkenau HT, Ang JE, et al. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann Oncol* 2009;20(1):27-33.

- [0128] 16.de Bono JS,Scher HI,Montgomery RB,et al.Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer.Clin Cancer Res 2008;14(19):6302-9
- [0129] 17.Moreno JG,Miller MC,GrossS,et al.Circulating tumor cells predictsurvival in patients with metastatic prostate cancer.Urology 2005;65(4):713-8.
- [0130] 18.Thalgott M,Rack B,Maurer T,et al. Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer.J Cancer Res Clin Oncol2013;139(5):755-63.
- [0131] 19.Pantel K,Alix-Panabieres C.The potential of circulating tumor cells as a liquid biopsy to guide therapy in prostate cancer.Cancer Discov 2012;2(11):974-5.
- [0132] 20.Khan MA,Walsh PC,Miller MC,et al.Quantitative alterations in nuclear structure predict prostate carcinoma distant metastasis and death in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy.Cancer 2003;98(12):2583-91.
- [0133] 21.Mohler JL,Figlesthaller WM,Zhang XZ,et al.Nuclear shape analysis for the assessment of local invasion and metastases in clinically localized Prostate carcinoma.Cancer 1994;74(11):2996-3001.
- [0134] 22.Zink D,Fischer AH,Nickerson JA.Nuclear structure in cancer cells.Nat Rev Cancer 2004;4(9):677-87.
- [0135] 23.Haber DA,Velculescu VE.Blood-based analyses of cancer:circulating tumor cells and circulating tumor DNA.Cancer Discov 2014;4(6):650-61.
- [0136] 24.Wang S,Liu K,Liu J,et al.Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers.Angew Chem Int Ed Engl 2011;50(13):3084-8.
- [0137] 25.LuYT,Zhao L,Shen Q et al.NanoVelcro Chip for CTC enumeration in prostate cancer patients.Methods2013;64(2):144-52.
- [0138] 26.Klingauf M,Stanck D,Neugebauer KM.Enhancement of U4/U6small nuclear ribonucleoprotein particle association in Cajal bodies predicted by mathematical modeling.Mol Biol Cell2006;17(12):4972-81.
- [0139] 27.Vesalainen S,Lipponen P,Talja M,et al.Nuclear morphometry is of independent prognostic value only in T1 prostatic adenocarcinomas.Prostate 1995;27(2):110-7.
- [0140] 28.Kalykaki A,Agelaki S,Kallergi G,etal. Elimination of EGFR-expressing circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer treated with gefitinib.Cancer Chemother Pharmacol2014;73(4):685-93.
- [0141] 29.Baak JP.The principles and advances of quantitative pathology.Anal Quant Cytol Histol1987;9(2):89-95.

- [0142] 30. Kayser G, Kayser K. Quantitative pathology in visual microscopy: history, applications, perspectives. *Acta Histochem* 2013;115(6):527-32.
- [0143] 31. Kothari S, Phan JH, Stokes TH, et al. Pathology imaging informatics for quantitative analysis of whole-slide images. *J Am Med Inform Assoc* 2013;20(6):1099-108.
- [0144] 32. Lin M, Chen JF, Lu YT, et al. Nanostructure Embedded Microchips for Detection, Isolation, and Characterization of Circulating Tumor Cells. *Acc Chem Res* 2014;10.1021/ar5001617.
- [0145] 33. Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, et al. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat Biotechnol* 2014;32(5):479-84.
- [0146] 34. Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 2014;345(6193):216-20.
- [0147] 35. Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013;339(6119):580-4.
- [0148] 36. Chan CM, Au TC, Chan AT, et al. Advanced technologies for studying circulating tumor cells at the protein level. *Expert Rev Proteomics* 2013;10(6):579-89.
- [0149] 37. Scatena R, Bottoni P, Giardina B. Circulating tumour cells and cancer stem cells: a role for proteomics in defining the interrelationships between function, phenotype and differentiation with potential clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 2013;1835(2):129-43.
- [0150] 38. Leman ES, Gctzenberg RH. Nuclear structure as a source of cancer specific biomarkers. *J Cell Biochem* 2008;104(6):1988-93.
- [0151] 39. Veltri RW, Christudass CS, Isharwal S. Nuclear morphometry, nucleomics and prostate cancer progression. *Asian J Androl* 2012;14(3):375-84.
- [0152] 40. Coumans FA, Doggen CJ, Attard G, et al. All circulating EpCAM+CK+CD45-objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 2010;21(9):1851-7.
- [0153] 41. Coumans FA, van Dalum G, Beck M, et al. Filter characteristics influencing circulating tumor cell enrichment from whole blood. *PLoS One* 2013;8(4):e61770.
- [0154] 42. Goodman OB, Jr., Symanowski JT, Loudyi A, et al. Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with hormone-sensitive prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2011;9(1):31-8
- [0155] 43. Resel Folkersma L, Olivier Gomez C, San Jose Manso L, et al. Immunomagnetic quantification of circulating tumoral cells in patients

with prostate cancer:clinical and pathological correlation.Arch Esp Urol2010; 63(1):23-31.

[0156] 44.Amato RJ,Melnikova V,Zhang Y,et al.Epithelial cell adhesion molecule-positive circulating tumor cells as predictive biomarker in patients with prostate cancer.Urology2013;81(6):1303-7.

[0157] 45.Sweenev C,Chen YH,Carducci MA,et al.Impact on overall survival(OS) with chemohormonal therapy versus hormonal therapy for hormone-sensitive newly metastatic prostate cancer(mPrCa):An ECOG-led phase III randomized trial.J Clin Oncol32:5s,2014(suppl;abstr LBA2).

[0158] 实施例2:前列腺癌循环肿瘤细胞(CTC)通过核大小的亚分类显示内脏转移患者中的极小核CTC

[0159] 虽然循环肿瘤细胞(CTC)的枚举显示出一些临床价值,但是CTC集合含有包含可以提取的额外信息的细胞混合物。我们的团队通过以核大小为重点的形状特征对CTC进行亚分类,并将其与临床信息关联起来。

[0160] 从具有以下转移状态的57例胰腺癌(PC)患者获得总共148份血液样本:无转移、非内脏转移和内脏转移。对在NanoVelcro芯片上捕获和枚举的CTC进行病理学检查,包括核大小。使用高斯混合模型分析核大小的分布。建立了CTC亚群和转移状态之间的相关性。

[0161] 核大小分布的统计建模揭示了3个不同的亚群:大核(lnCTC)、小核(snCTC)和极小核CTC(vsnCTC)。snCTC+vsnCTC鉴定出患有转移性疾病的患者。然而,单独的vsnCTC计数在具有内脏转移的患者中相比于那些没有内脏转移的患者有所提高(0.36 ± 0.69 对 1.95 ± 3.77 个细胞/mL血液, $p < 0.001$)。连续枚举表明在检测到内脏转移之前出现了vsnCTC。

[0162] 有能够通过基本病理学方法(如核大小测量)鉴定的CTC的形态学子集。该观察性研究强烈表明,它们包含与疾病状况有关的信息。具体地说,vsnCTC的检测与内脏转移的存在相关,并且应该作为推定的血源性生物标志物来正式研究以鉴定处于发展PC的该临床演变的风险的患者。

[0163] 引言

[0164] 前列腺癌(PC)仍然是一个重要的公共健康问题,因为预计2014年有30,000人会死于这种疾病。¹在处于死于这种疾病的风险的男性群体中,存在一系列临床行为,包括进展至内脏转移,其扩散到非骨非淋巴结部位,包括肝脏和/或肺。²⁻⁴已认识到与没有以这种方式进展的男性相比,具有内脏转移的男性的生存期明显缩短⁵。这些进展事件往往导致器官衰竭和随后不久的死亡。在典型的实践中,通过血清PSA浓度监测患者,而不进行频繁的放射影像评估。然而,应当认识到,血清PSA的变化检测不到⁶⁻⁸某些疾病变化,如产生神经内分泌PC(NEPC)或小细胞PC的非PSA的出现。此外,PSA监测对具有预后重要性的其它临床改变(例如,内脏转移的发展)几乎没有预示作用。当这些病变在放射影像学上或临床上被检测到(通过改变的器官功能)时,转移病变已存在了一段时间。仍然需要其它高度灵敏的、微创性、可连续监测疾病状态的手段,特别是对于内脏进展事件。

[0165] 循环肿瘤细胞(CTC)已经成为PC的同期的预后和预测生物标志物。⁹他们的价值主要体现在枚举中。¹⁰⁻¹⁷常规的FDA批准的CTC测定在测量临床行为的某些变化(例如检测显著或隐匿的内脏扩散)方面尚不可用。¹³CTC是一个异质群体。^{18,19}我们和其他人提出这些细胞

的亚分类可以增大其临床效用。²⁰⁻²²为此,形态学分类一直是病理学中的基本实践。虽然格里森评分已有很高的信息量,但肿瘤切片中的核大小和形状也已被证明与PC中的远处转移和死亡相关。²³⁻²⁵这些形态改变已经与通过结构-功能关系驱动各种促肿瘤发生和促转移过程的信号传导途径的变化相关联。²⁶因为影响疾病自然史的生物学改变导致细胞(包括CTC集合)的结构改变,所以我们假设CTC形态和核大小的变化可用于检测疾病表型的变化,如内脏转移的检测和可能的预测。

[0166] 在这个实施例中,我们从涵盖广泛的转移状态的PC患者获得血液标本:无转移、非内脏(骨和/或淋巴结)转移和内脏(肝和/或肺)转移。我们使用NanoVelcro芯片来分离并枚举CTC^{27,28},所述NanoVelcro芯片是一种新兴的CTC分离系统,其利用微流体混沌混合器和纳米结构捕获基底的组合高灵敏度地运行。通过将高分辨率的荧光显微术并入NanoVelcro系统中,我们能够使捕获的CTC(DAPI+/CK+/CD45-)的细胞特征可视化,并进行关于细胞形态和核大小的病理学检查。这导致确定了由核大小定义的CTC子集。我们的研究表明,这些子集对应于转移状态。

[0167] 图8示出了用于鉴定极小核CTC(vsnCTC)的研究设计的示意图。招募PC患者来进行CTC枚举研究,并根据患者在募集时的转移状况将每个样本归入三个群组之一,所述转移状况包括:内脏转移、非内脏(骨/淋巴结)转移和非内脏转移性疾病。使用高灵敏度NanoVelcro芯片并结合荧光显微术进行CTC枚举研究。然后对所鉴定的CTC(DAPI+/CK+/CD45-)进行核大小测量。通过生物统计分析和建模,我们确定了CTC的三个亚群:大核CTC(lnCTC)、小核CTC(snCTC)和极小核CTC(vsnCTC)。vsnCTC的出现与内脏转移的发生或存在相关,并且可以作为针对最具侵袭性的PC形式的新诊断测定的基础。(图中的比例尺表示10 μm)。

[0168] 患者与方法

[0169] 患者和样本

[0170] 用于本研究的血液样本是从由西达塞奈医学中心(CSMC)机构审查委员会(IRB)批准的现有的生物库方案提取出来的。整个患者库由患有组织学确认的PC并同意提供血液作为CSMC生物库方案的一部分的男性构成,他们于2013年1月至2014年12月期间在CSMC接受评估和/或治疗。使用来自库研究的所有生物样本也在IRB的监督下进行。因此,本研究是作为一项观察性研究进行,以确定男性PC患者的单机构群组中的CTC核大小的范围和分布。在样本采集后的3个月内进行放射影像学评估是纳入该分析所需要的。允许从个别患者多次抽血。根据同期放射影像学证据,患者及其枚举研究按转移部位被分为三个类别:无转移、非内脏转移或内脏转移。分类为“非内脏转移”的样本和患者表明受试者在最近的大多数放射影像学研究中具有骨病变和/或淋巴结扩散。分类为“内脏转移”的样本和患者表明受试者在最近成像时通过放射影像学检测到软组织器官(如肝或肺)中的病变并伴有或不伴有骨或淋巴结受累。我们进行了CTC核大小分布的统计分析和建模,划分CTC的子类。在CTC亚群和转移状态之间建立了相关性(参见下文的统计分析)。

[0171] 使用NanoVelcro芯片进行CTC富集

[0172] 通过NanoVelcro芯片进行CTC富集的一般方案汇总在如图9所示的工作流中。图9示出了通过NanoVelcro芯片进行CTC富集的一般方案的示意图。将红细胞从收集的静脉血中耗尽,并将剩余的细胞与生物素化山羊抗人EpCAM一起孵育。仔细洗涤后,将样本装入

NanoVelcro芯片中。通过自动化流体处理器将细胞悬浮液以一致的流速引入芯片。当样本在该30分钟的步骤期间流经微流体通道时,CTC被捕获在在NanoVelcro基底上。在用多聚甲醛固定后,使用DAPI、兔抗泛细胞角蛋白、小鼠抗CD45、Alexa Fluor 488缀合的兔抗和Alexa Fluor 555缀合的抗鼠对固定在纳米基底上的细胞进行免疫细胞化学染色。CTC被鉴定为通过标准病理学审查以确保其形态与上皮细胞而非血液细胞一致的DAPI+/CK+/CD45-对象。记录每个芯片的CTC计数并沿最长轴和垂直于该轴的宽度测定CTC的核大小。

[0173] 将静脉血采集在含酸-柠檬酸盐-葡萄糖的真空采血管(BDBioscience, San Jose, CA, USA)中并在采集后4小时内进行处理。如前所述,使用NanoVelcro芯片分离CTC。^{27,28}简而言之,使用标准RBC裂解缓冲液(含有NH₄Cl和Tris, pH 7.2)对1.0mL静脉血进行红细胞(RBC)耗尽处理。将剩余的细胞与捕获剂(生物素化山羊抗人EpCAM抗体, R&D Systems)一起孵育。仔细洗涤后,将样本装载到NanoVelcro芯片中,该芯片由链霉亲和素涂覆的NanoVelcro基底和覆盖的聚二甲基硅氧烷(PDMS)混沌混合器组成。配合使用自动化流体处理器,将细胞悬浮液以一致的流速(0.5mL/h)引入芯片中。在使用2%多聚甲醛(PFA, Electron Microscopy Science)固定后,用DAPI(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)、兔抗泛细胞角蛋白(Life technologies, Grand Island, NY, USA和Abcam, Cambridge, MA, USA)、小鼠抗CD45(BD Biosciences, San Jose, CA, USA和Abcam, Cambridge, MA, USA)、Alexa Fluor 488缀合的抗兔和Alexa Fluor 555缀合的抗鼠对固定在NanoVelcro基底上的细胞进行免疫细胞化学(ICC)染色。随后进行显微成像以鉴定CTC。对于选定的病例,使用鸡抗突触素(Abcam, Cambridge, MA, USA)和Alexa Fluor 647缀合的抗鸡(Life technologies, Grand Island, NY, USA)。

[0174] CTC成像以及核大小测量

[0175] 使用具有NIS-Element成像软件(Nikon)的直立式荧光显微镜(Eclipse 90i, Nikon)使NanoVelcro芯片成像。该成像系统在40X放大倍数下以分别对应于核、CK和CD45染色的DAPI、FITC和TRITC通道在NanoVelcro芯片上方进行自动扫描。DAPI+/CK+/CD45-事件(图8)被选为候选CTC并在100X或400X放大倍数下进一步接受另一次扫描。所有高分辨率图像由病理学家审查,以确保CTC细胞在形态上与上皮细胞而不是血液细胞一致。

[0176] 所有识别出的CTC的核大小沿最长轴和垂直于该轴的宽度进行测量(图8)。^{29,30}用于统计分析的核大小的定义如下:

[0177]
$$\text{核大小} = \sqrt{(\text{最长轴}) \times (\text{垂直宽度})}$$

[0178] 为了确保在NanoVelcro芯片上的核大小测量的一致性和准确性,我们使用PC细胞系和取自PC患者的血样进行了一系列校准研究。

[0179] 图10A-10D示出的数据图显示核大小测量在NanoVelcro芯片上的再现性。使用对患者样本的细胞系研究和随机选择的枚举测试来验证核大小测量在NanoVelcro芯片上的再现性。图10A显示了针对NanoVelcro基底上的PC3细胞的核大小测量结果,显示在PC3细胞研究中的三个或任何两个重复之间没有显著差异。如图10B所示,LNCaP细胞研究显示类似的结果。我们还从针对PC患者进行的148个枚举测试中随机抽取了3个枚举测试作为样本。我们基于组织病理学和免疫细胞化学的标准(CD45+/CK-/DAPI+)从每个所选的NanoVelcro芯片识别出40个小淋巴细胞,并测量了它们核大小。如图10C中所示,在三个随机抽取的枚

举测试当中或其中任何两个之间未发现显著差异。此外,我们还从全部148个枚举测试中随机选取了54个小淋巴细胞并测量了它们的核大小。如图10D所示,这些交叉试验取样的54个小淋巴细胞的平均值与测量小淋巴细胞的上述三个试验的任一个之间没有显著差异。图中指出了所有p值。

[0180] 统计分析

[0181] 为了鉴定CTC的亚群,我们使用由具有不同方差的K个高斯分量形成的高斯混合模型(GMM)对CTC核大小进行聚类分析。K个高斯分量的平均值和方差由期望最大化(EM)算法³¹估算,且最优数K由Akaike信息准则(AIC)³²和贝叶斯信息准则(BIC)³³决定。根据核大小,将每个CTC分配到具有所有K个高斯分量的最大似然的簇。进行 χ^2 检验以测试我们的CTC无监督聚类对转移类别的独立性。

[0182] 由于转移状态受整个病程期间的变化的影响,该研究中的相关性分析是基于枚举研究,而不是患者,并且允许来自连续时间点的多个枚举研究。使用Wilcoxon秩和检验来评估不同转移类别之间的枚举研究的CTC计数的统计学差异:1)转移对无转移和2)非内脏转移对内脏转移。考虑到来自相同患者的多个血液样本和枚举研究的潜在独立的性质,我们进一步采用泊松广义线性混合模型(GLMM)来检验转移状态与CTC计数(针对由重复测量引起的潜在影响加以调整)的相关性。

[0183] 使用3.1.1版本的R统计软件进行该研究中的统计检验(<http://www.r-project.org/>)。使用软件包glmmML版本1.0进行GLMM分析。³⁴所有检验都是双侧的,并且小于0.05的p值被认为具有统计显著性。

[0184] 结果

[0185] CTC枚举研究中的患者特征和样本采集

[0186] 来自总共57例PC患者的血液样本构成在该分析中使用的满额受试者。患者的详细临床特征汇总在表1中。还列出了患者的分类以及对他们的基于其转移部位的枚举研究。对每个患者进行1至11个枚举研究,总共产生148个枚举研究(表2列出了来自每个患者的枚举研究)。

[0187] 表1:患者特征

[0188]

患者分类	患者 (n=57) ^a	枚举样本 (n=148) ^a	转移状态
接受局部治疗的患者	14	15	无转移
局部治疗后的受监测患者	4	5	无转移
在局部疾病后复发的患者			
去势敏感性			
无转移性疾病(仅PSA)	3	3	无转移
已知转移性疾病			
只有骨/LN转移	4	6	非内脏(骨/LN)转移
骨/LN和内脏转移	0	0	内脏转移
去势难治性			
无转移性疾病(仅PSA)	3	8	无转移
已知转移性疾病			
只有骨/LN转移	17 ^a	38 ^a	非内脏(骨/LN)转移



骨/LN 和内脏转移	13 ^a	61 ^a	内脏转移
仅有内脏转移 ^b	2 ^b	12 ^b	内脏转移

[0189] 缩写: LN, 淋巴结; PSA, 前列腺特异性抗原
^a 在随访期间具有转移状态变化的患者被归在其所属或曾经属于的所有类别中。然而, 在枚举研究的分类中反映了状态的变化
^b 由于缺少共存的非内脏转移, 患者和枚举研究被纳入针对转移的相关性分析中, 而不是针对内脏转移的分析中。

[0190] 表2: 枚举研究、参加枚举研究的患者和排除的枚举研究。

无转移					
患者	枚举研究	患者	枚举研究	患者	枚举研究
392	<input type="checkbox"/>	463	<input type="checkbox"/>	3501	<input type="checkbox"/>
450	<input type="checkbox"/>	464	<input type="checkbox"/>	3502	<input type="checkbox"/>
453	<input type="checkbox"/>	465	<input type="checkbox"/>	3702	<input type="checkbox"/>
454	<input type="checkbox"/>	467	<input type="checkbox"/>	3801	<input type="checkbox"/>
457	<input type="checkbox"/>	1159	<input type="checkbox"/>	3803	<input type="checkbox"/>
459	<input type="checkbox"/>	1347	<input type="checkbox"/>	3810	<input type="checkbox"/>
461	<input type="checkbox"/>	3301	<input type="checkbox"/>	3903	<input type="checkbox"/>
462	<input type="checkbox"/>	3401	<input type="checkbox"/>	31001	<input type="checkbox"/>
非内脏 (骨和/或淋巴结) 转移					
患者	枚举研究	患者	枚举研究	患者	枚举研究
1117 *	<input type="checkbox"/>	1308	<input type="checkbox"/>	3712	<input type="checkbox"/>
1161 *	<input type="checkbox"/>	1336	<input type="checkbox"/>	3714	<input type="checkbox"/>
3701 *	<input type="checkbox"/>	1314	<input type="checkbox"/>	3715	<input type="checkbox"/>
446	<input type="checkbox"/>	1365	<input type="checkbox"/>	3802	<input type="checkbox"/>
1165	<input type="checkbox"/>	3703	<input type="checkbox"/>	3805	<input type="checkbox"/>
1185	<input type="checkbox"/>	3707	<input type="checkbox"/>	3808	<input type="checkbox"/>
1268	<input type="checkbox"/>	3708	<input type="checkbox"/>	3901	<input type="checkbox"/>
内脏 (肝和/或肺) 转移					
患者	枚举研究	患者	枚举研究	患者	枚举研究
1117*	<input type="checkbox"/>	3704/ 002	<input type="checkbox"/>	012	<input type="checkbox"/>
1161 *	<input type="checkbox"/>	1350/ 004	<input type="checkbox"/>	014	<input type="checkbox"/>

[0191]

3701 *	□ □	1367/ 006	□□□□□□ □□	3804	□□
1366	□ □	010	□□□□□□	390 †	
1354	□ □	011	□□□□□□□□	3701/0 09 †	

[0192]

□ 纳入相关性分析中的枚举研究(图 13A-13C 和图 15A-15C)
 ■ 由于缺少共存的非内脏转移,枚举研究被纳入针对转移的相关性分析中(图 13A-13C),而不是针对内脏转移的分析中(15A-15C)。
 * 在随访期间发生转移状态变化的患者被归在其所属或曾经属于的所有类别中。然而,在枚举研究的分类中反映了诊断的变化。
 † 由于缺少共存的非内脏转移,患者被纳入针对转移的相关性分析中(图 13A-13C),而不是针对内脏转移的分析中(图 15A-15C)。

[0193] CTC核大小分布以及CTC亚群的统计分析和建模

[0194] 通过进行148个枚举研究(如使用连续采集)产生CTC数据集合,这些枚举研究总共提供304个CTC用于分析核大小分布。图11A-11B示出了展现CTC核大小分布和CTC亚群的统计分析和建模的结果的数据图。图11A示出了描绘根据304个CTC的核大小的分布的直方图。黑色实线表示最匹配直方图的最优高斯混合模型(GMM)的密度。线111、112和113表示三个簇特异性高斯密度曲线(分别为组1、2和3)。虚线指示我们的分类规则的截止值:将样本分配到具有最大高斯似然的簇中。在图11B中,线115显示对于1至4的K(聚类数)的AIC值,并且线114显示对于1至4的K的BIC值。最佳聚类数为3,因为当K=3时,AIC和BIC都达到最小值。

[0195] 根据AIC和BIC,最优模型被测定为具有6.82、10.63、21.63 μm 的聚类均值和1.14、2.51、5.67 μm 的标准偏差的3聚类GMM(图11A)。还示出了不同聚类数的AIC和BIC值(图11B)。然后,我们将CTC分配到具有最大高斯似然的簇中,并产生三个CTC亚群,我们将其标记为极小核CTC(vsnCTC,核大小<8.54 μm)、小核CTC(snCTC,核大小在8.54 μm 与14.99 μm 之间)和大核CTC(lnCTC,核大小>14.99 μm)。

[0196] CTC核大小与转移状态之间的关系

[0197] 为了进一步分析三个CTC亚群和转移状态之间的关系,使用CTC计数的密度与核大小为每个转移状态类别绘制直方图(图12A-12D)。图12A-12D示出了CTC的荧光显微图像以及显示CTC核大小与转移状态之间的关系的的数据图。图12A示出了通过荧光显微术获取的lnCTC、snCTC和vsncTC的代表性图像。用DAPI、AlexaFluor 488缀合的抗CK和Alexa Fluor 555缀合的抗CD45使细胞染色。使用CTC计数与核大小绘制直方图和簇特异性高斯密度曲线并分为三种转移状态:图12B示出了无转移,其中lnCTC在所有CTC中占最大比例(62%);图12C示出了非内脏转移,其中snCTC构成主要亚群(51%),其次是vsncTC(27%);并且图12D示出了内脏转移,其中vsncTC占细胞的最大比例(65%),其次是snCTC(20%)。如通过双侧 χ^2 检验($p=2.29 \times 10^{-13}$)所表明,三个CTC亚群的比例在不同转移状态之间显著不同。

[0198] 三种CTC核亚型(图12A中的实例)的比例在不同的转移类别之间显著不同。在非转移性患者的群组(图12B)中,大部分细胞被归类为lnCTC(62%)。在非内脏转移的类别(图12C)中,snCTC构成主要的CTC亚群(51%),其次是vsncTC(27%)。在内脏转移的类别(图12D)中,vsncTC构成主要CTC亚群(65%),其次是snCTC(20%)。该结果表明,我们的CTC无监督聚类与转移类别具有显著的相关性(双侧 χ^2 检验, $p=2.29 \times 10^{-13}$,表3)。

[0199] 表3:在不同转移状态中的CTC亚群的比例

		CTC 亚群的计数		
		vsncTC	snCTC	lnCTC
[0200]	转移状态			
	无转移	4	7	18
	非内脏(骨/LN)转移	16	30	13
	内脏转移	140	43	33

[0201] snCTC+vsncTC计数与转移相关

[0202] 然后,我们对148个枚举研究进行了统计分析,以测量CTC亚群和转移状态之间的相关性。集合包括无转移类别中的31个枚举研究以及转移性PC类别(非内脏转移和内脏转移类别的组合)中的117个枚举研究。图13A-13C示出了展现snCTC+vsncTC计数与转移性PC之间的相关性的图。箱线图示出了1.0mL血液中的总CTC计数(图13A)、lnCTC计数(图13B)和snCTC+vsncTC计数图13C)。箱形表示四分位范围,并且穿过每个箱形的水平线表示中值。y轴代表每1.0mL血液的CTC计数。有31个枚举来自无转移的类别,并且有117个枚举来自转移性PC患者(图14)。图14是用于相关性分析的患者和枚举研究的示意图。在我们招募的患者中,存在一系列临床行为(见表1)。对于我们在图13A-13C中的相关性分析,我们包括了来自患有转移性PC(虚线框142,非内脏和内脏转移)的所有枚举研究以形成转移类别的样本集合。这在CTC子集与PC转移之间的分析中提供了总共117个枚举研究。对于图15A-15C中的分析,我们检查了CTC子集与PC的内脏转移之间的相关性。我们只包括了来自具有非内脏转移的患者以及那些具有共同存在的内脏转移和非内脏转移的患者的枚举研究(虚线框141)。

[0203] 数据表明,通过使用这些基于核大小的CTC定义获得的snCTC+vsncTC计数比总CTC计数提供更多关于PC转移状态的信息。采用遵循广义线性混合模型(GLMM)的双侧Wilcoxon检验和Wald检验来进行统计分析。图中指出了所有p值。

[0204] 当检查总CTC计数(lnCTC+snCTC+vsncTC)时,在转移性和非转移性疾病之间存在统计学上的显著差异(0.94 ± 1.91 对 2.42 ± 3.60 个细胞/mL血液, $p=0.002$,图13A)。在另一个审查中,lnCTC亚群独自未能区分转移性和非转移性疾病(0.58 ± 1.88 对 0.40 ± 1.28 个细胞/mL血液, $p=0.893$,图13B)。相反地,snCTC+vsncTC计数仍然具有显著的差异(0.35 ± 0.66 对 2.02 ± 3.36 个细胞/mL血液, $p<0.0001$,图13C)。为了评估由来自相同患者的重复测量引起的潜在影响,使用GLMM进行分析,以检验转移状态和CTC计数之间的相关性。使用GLMM得到的p值与来自Wilcoxon检验的p值一致(指示于图中)。这些数据与图12C和图12D中snCTC和vsncTC的偏向分布一致,并且证实了通过核大小($<14.99 \mu\text{m}$)对CTC进行分类的好

处。总体而言,通过使用这些CTC定义获得的snCTC+vsncTC计数比总CTC计数提供更多关于PC转移状态的信息。

[0205] vsncTC计数与内脏转移的存在相关

[0206] 我们进一步研究了CTC子集与内脏转移之间的关系。使用来自具有放射影像学上可检测的骨和/或淋巴结病变且伴有或不伴有内脏器官受累的患者105个枚举研究进行这些分析。在这些枚举研究中,44个来自非内脏转移类别,61个来自内脏转移类别中(图14)。

[0207] 图15A-15C示出了展现vsncTC计数与具有内脏转移的侵袭性PC之间的相关性的图。箱线图示出了1.0mL血液中的snCTC+vsncTC计数图(15A)、snCTC计数图(15B)和vsncTC计数图(15C)。箱形表示四分位范围,并且穿过每个箱形的水平线表示中值。y轴代表每1.0mL血液的CTC计数。有44个枚举来自非内脏转移类别,并且有61个枚举来自内脏转移类别。结果表明,vsncTC而非snCTC与内脏转移的存在相关。采用遵循广义线性混合模型(GLMM)的双侧Wilcoxon检验和Wald检验来进行统计分析。图中指出了所有p值。

[0208] 我们发现,非内脏转移和内脏转移类别之间的snCTC+vsncTC计数有显著差异(1.05 ± 1.26 对 2.69 ± 4.27 个细胞/mL血液, $p=0.030$,图15A)。认识到图12C和图12D中的snCTC和vsncTC的偏向分配,我们继续进行个别CTC亚群的进一步统计分析。snCTC计数独自无法区分转移性亚群(0.68 ± 1.12 对 0.74 ± 1.38 个细胞/mL血液, $p=0.721$,图15B)。相反地,vsncTC计数成功地区分内脏转移性与非内脏转移性PC患者(0.36 ± 0.69 对 1.95 ± 3.77 个细胞/mL血液, $p=0.002$,图15C)。使用GLMM得到的p值与来自Wilcoxon检验的p值一致(指示于图中)。这些数据结合图12D中示出的vsncTC分布表明,vsncTC而非snCTC与具有内脏受累的侵袭性PC的存在相关。

[0209] 具有内脏转移的临床病例的汇总

[0210] 在此研究中,总共有15名患者具有内脏转移,其中9名具有肝脏病变,7名具有实质性肺结节,并且2名具有胸膜肿块。只有2名患者呈现仅内脏性疾病,而其他患者具有共存的骨受累。图16示出了每名患者的时间轴,从本研究中首次CTC枚举的时间开始到随访结束。图16示出了汇总15名内脏转移患者的图表。每个时间轴的起点(第0天)指示通过NanoVelcro芯片进行首次CTC枚举的时间。每个时间轴的终点是随访结束的时间。有3名患者(1117、1161、3701)最初出现骨/淋巴结转移,且后期发展为内脏病变。在放射检测到内脏转移之前,在这些患者中发现了vsncTC,提前的时间为104至196天(典型实例参见图17A中的患者A)。另外两个示例病例(患者B和C)的详细临床病史以及对其vsncTC的观察结果呈现在图17B和图18中。

[0211] 图17A-17B示出了个体临床病例的数据图、CT扫描和骨扫描,显示了vsncTC和内脏转移之间的相关性。(图17A)示出了患者A的详细临床病史,作为vsncTC预测新的内脏转移的实例。患者A呈现局部晚期高分级PC,其复发和进展为转移性去势难治性PC(mCRPC)。他接受了一系列全身治疗,包括醋酸阿比特龙、多西他赛、镭-223和实验性PI3K抑制剂。他从治疗中获得了有限的生化和临床益处,并最终发展为肺转移,接着是快速的临床恶化和死亡。在连续CTC分析开始时,通过CT和骨扫描成像证实,他的宏观疾病负担仅限于骨扩散。我们鉴定了vsncTC的出现,其比肺转移的发展早大约100天。这些vsncTC在其余的疾病过程中持续存在。(图17B)患者B是一名mCRPC患者,他具有在其自然病史的早期发展的已知肝转移。

尽管接受了ADT和多西他赛治疗,放射照相显示他的疾病仍有进展(血清PSA浓度未升高)。他在参加使用研究性多靶向激酶抑制剂的临床试验期间开始CTC采集。患者在开始治疗后的2周内经历临床改善,并在3个月时发现软组织和骨反应。在第一次抽血时,通过NanoVelcro芯片鉴定,发现该患者具有30个CTC/7.5mL(而通过CellSearch™系统识别5个CTC/7.5mL),所有CTC都是vsncTC。在开始治疗后的2周内,他的CTC计数为7.5snCTC/7.5mL和0vsncTC/7.5mL。CTC计数进一步下降,并且他在本发明公开时继续受益于治疗。在患者B的临床病史中发生的CTC计数变化表明vsncTC可用于监测临床/放射影像反应。

[0212] 我们在所有12例呈现内脏转移的患者中使用NanoVelcro芯片成功检测到vsncTC。其他3例患者最初具有骨/淋巴结转移,但后期在内脏器官中发展为转移性病变。在放射检测到内脏病变之前,在这些患者中发现了vsncTC,提前的时间为104至196天(典型实例参见图17A中的患者A)。这些患者接受了针对其内脏疾病的各种治疗干预,包括基于铂和紫杉烷的化疗、镭-223、比卡鲁胺(bicalutamide)、阿比特龙、恩杂鲁胺(enzalutamide)和研究性多激酶抑制剂。在我们的系列中,发展或呈现内脏转移的患者都具有可检测的vsncTC。当该研究结束时,47%(7/15)的患者死于他们的疾病。

[0213] 图18A-18B示出了展现vsncTC和转移性肿瘤组织之间的共有标志物表达的免疫组织化学测定的图像。患者C在病理上被诊断为患有前列腺小细胞癌。他接受了前列腺切除术,随后接受了辅助放疗和铂基化疗。通过放射成像证实他在1年后复发而无PSA升高,并且被发现具有新的肺和骨转移。对该患者进行了胸膜转移的活检,并采集血液用于CTC分析。(图18A)来自胸膜腔处的转移性PC肿瘤的4 μ m厚石蜡包埋组织切片的代表性图像。将组织样本固定在10%福尔马林中。左图:苏木精和伊红(H&E)染色切片,原始放大倍数400X;右图:对胸膜肿瘤切片中的突触素表达的免疫组织化学(IHC)分析。(图18B)同期获得的vsncTC和WBC的突触素染色。图中的比例尺表示10 μ m。

[0214] 讨论

[0215] CTC生物学在包括PC的几个肿瘤模型中已成为迅速发展的领域。其价值已在枚举中得到明确的体现。¹⁰⁻¹⁷较新的技术进一步提高了我们分析CTC集合的能力,从而有机会从这种容易获得的癌细胞来源提取更多有用的临床信息。我们的团队率先使用了NanoVelcro芯片,该芯片利用精确设计的纳米基底和微流体学,使我们能够利用细胞表面标志物表达(如EpCAM)从全血中捕获CTC。如本研究和早先的出版物中所示^{26,27},NanoVelcro芯片在检测来自外周血的活CTC方面比目前临床上使用的方法表现出更高的灵敏度(还参见图19A-19B)。此外,通过结合荧光显微术和NanoVelcro芯片,我们生成了适合正式组织病理学检查的细胞图像。

[0216] 图19A-19B示出了证明NanoVelcro芯片比CellSearch™系统具有更高的CTC识别灵敏度的图。在这项研究中,我们从124个在同一时间或两周间隔内进行CellSearch™测定的枚举研究中确定了40个枚举研究。这40个枚举研究对的CTC计数的并排比较绘制在(图19A)中。进行了Wilcoxon配对检验,如(图19B)所示,该检验显示使用NanoVelcro CTC芯片获得的CTC计数(平均值:21.38个细胞/7.5mL血液;95%置信区间:11.67至31.08)显著高于($p=0.0071$)使用CellSearch™系统获得的值(平均值:12.35个细胞/7.5mL血液;95%置信区间3.99至20.71)。

[0217] 组织病理学仍然是癌症诊断和分类的黄金标准。在包括前列腺癌的各种疾病中,

已经将形态特征与临床行为关联起来(例如,格里森评分)。然而,通常还未将这种类型的组织病理学检查应用于CTC分离策略。在此,我们将这种未受重视的基本概念应用于基于NanoVelcro芯片技术的高度灵敏的和特异性的CTC枚举方法。这种改进的过程确定了来自白细胞和其它非上皮细胞的假阳性事件的潜在来源。同样的方法也使我们能够对个别CTC进行核大小测量。在常用的形态特征中,我们发现核大小是被NanoVelcro基底固定的CTC的最稳定特征,原因是:1) DAPI染色的高再现性和2) DAPI荧光在成像过程中的最小衰减。此外,我们根据自身的经验和其它团体的报告确认CTC的细胞膜非常脆弱,并且容易产生假象和遭受机械力的破坏。³⁵相反地,核形态在整个CTC枚举过程中保存地相当完好。因此,我们在该观察性研究中专注于测量核大小,并且使用核大小揭示了三个不同的CTC亚群,即lnCTC、snCTC和vsnCTC。

[0218] 我们的研究指向将简单的形态学分类(即核大小)添加到CTC枚举中的潜在益处。最重要的是,这一观察为探索vsnCTC作为PC患者中出现的内脏转移的推定生物标志物奠定了基础。已经有报道指出,在报告的病例系列中,在不到20%的患者中发现了临床上和/或放射影像学上可检测的内脏转移。³虽然这只是少数患者,但也认识到发展为内脏转移的患者比那些仅患有骨和/或淋巴结疾病的患者的结果差。²⁻⁵有人认为这种临床行为确定了一种尚未得到很好研究的侵袭性PC亚型。具有内脏转移的患者(或有内脏转移风险的患者)是PC患者的一个重要子类。我们的观察结果可以作为临床试验的基础,这可以有助于鉴定具有内脏转移以及因此死于由PC引起的器官衰竭的高风险的男性。因此,这种方法可以为可能影响与内脏转移相关的负面结果的早期干预(如E3805中所示的早期细胞毒性治疗³⁶)创造一个机会。

[0219] 我们对内脏转移患者的关注必然限制了在单一机构中可实现的样本大小,并且限制了这项探索性研究。另外重要的是,要认识到转移状态可以随着时间的推移而变化-患者的子集将会发展为内脏疾病,而另一些则仅具有渐进性骨病变。因此,我们和其他人已经假设循环中的主要CTC子集可能会随着这个过程而发生变化。³⁷可以想象的是,可以在对应于不同的疾病状态的不同时间点检测到不同的CTC子集,并且使用针对每个患者的连续样本收集和枚举研究仍可能建立CTC子集与转移扩散的放射照相图案之间的相关性。因此,我们在相关分析中包括了来自患者的连续样本,将每个枚举研究视为反映患者疾病的当前状态的独立事件。虽然这引起了对由于从某些患者重复取样而产生偏倚的担忧,但所进行的GLMM检验显示Wilcoxon检验的结果仍然有效。我们的研究表明,与无转移类别相比,转移性PC中的snCTC+vsnCTC计数显著较高。此外,与仅具有骨和淋巴结转移的PC相比,具有内脏受累的侵袭性PC中的vsnCTC计数显著较高。使用两项独立的统计检验显示我们报告的观察结果是真实的。

[0220] 在我们的患者群组中,我们观察到在经历连续CTC枚举的患者中,vsnCTC的鉴定是在利用放射照相检测到内脏转移性病变之前(图17A中的患者A)。这提高了vsnCTC相对于进展至内脏转移可能具有预测价值的可行性。我们指出,vsnCTC不是仅在现有/可检测)的内脏转移的情况下才检测到的。然而,有可能其中检测到vsnCTC的患者发展内脏疾病的风险可能会增加。

[0221] 与通过CellSearch³⁸⁻⁴⁰测得的CTC计数的动态变化一样,vsnCTC计数的变化也可以反映抗癌治疗的积极影响^{27,37-39}。每个CTC子集也可以表现出回应于治疗的变化。虽然本报

告受样本大小和治疗干预的异质性的限制,但我们已经观察到,作为治疗应答者的内脏转移患者已经表现出面对治疗时vsncTC减少的趋势(典型实例见图17B中的患者B)。⁴¹正在进行一项更大的前瞻性研究,以通过更多的纵向病例和较少的治疗选项异质性进一步验证这些观察结果。

[0222] 进展至内脏转移表明推动PC中的转移过程的潜在分子机制的变化⁴²。这种改变的一个例子是分化为更具神经内分泌性的PC表型(NEPC)。⁷我们在这样的患者中报告了令人感兴趣的观察结果(图18A-18B中的患者C)。该患者经历了胸膜病变的活检,发现其表达CK和突触素。对其vsncTC的分析也反映了这种免疫表型。由于突触素是已识别的NEPC⁷的标志物,并且之前未曾报道在PC CTC中存在该标志物,因此这一点尤其令人感兴趣。虽然这一发现仅限于单独的病例报告,但它不仅证明了在该患者中的vsncTC-肿瘤关系,而且还支持在CTC枚举中包括额外的细胞标志物以获得更多临床信息的想法。

[0223] 除了CTC计数的预后效用外,重要的研究工作已致力于使用基因组学⁴³⁻⁴⁵、转录组学⁴⁶和蛋白质组学方法^{47,48}来表征CTC的分子性质,以及基于离体扩增⁴⁹和异种移植测定⁵⁰探索CTC的功能特性。有趣的是,最近的研究也再次强调了形态分析的重要性,方式是指出具有增加的间质表型的CTC簇具有增加的转移潜能⁵¹并且与不良预后相关⁵²,这点与组织病理学中的早期观察结果一致⁵³。我们的发现印证了这些研究,方式是通过显示CTC核大小的重要性及其与癌症阶段和临床行为的相关性。考虑到有可能是所有可能的组水平的变化的组合共同导致表型的范例⁵⁴,我们的观察结果为未来在不同组水平下全面表征这种侵袭性PC表型的研究提供了一个极好的机会。

[0224] 总之,我们报告了初步的观察结果,即:由核大小定义的CTC子集可以具有临床相关性。我们所利用的NanoVelcro分析对于CTC识别具有高灵敏度和特异性,同时使核大小评估成为可能。虽然我们认识到这一创新发现是在一个小型患者群组中达到的,但是CTC子集的出现及其与临床转移状态的关系出乎意料地稳定。应当进行较大规模的前瞻性试验以验证这一初步观察结果,并调查其在检测和可能预测内脏转移方面的潜在应用。这一观察结果也指出了理解vsncTC的生化性质以进一步描述其在转移性PC中的相关性的重要性。鉴于病理学中的形态分析的基本性质,我们建议将形态学表征并入CTC枚举中,并进一步研究vsncTC以探讨其与内脏转移的关系。

[0225] 实施例2的参考文献:

[0226] 1.Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64:9-29.

[0227] 2. Pezaro CJ, Omlin A, Lorente D, et al. Visceral disease in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2014;65:270-273.

[0228] 3. Gandaglia G, Karakiewicz PI, Briganti A, et al. Impact of the Site of Metastases on Survival in Patients with Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2014.

[0229] 4. Pond GR, Sonpavde G, de Wit R, Eisenberger MA, Tannock IF, Armstrong AJ. The prognostic importance of metastatic site in men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2014;65:3-6.

[0230] 5. Halabi S, Kelly WK, Zhou H, et al. The site of visceral metastases

(mets) to predict overall survival (OS) in castration-resistant prostate cancer (CRPC) patients (pts): A meta-analysis of five phase III trials. *J Clin Oncol*. 2014; 5s, 2014 (suppl; abstr 5002).

[0231] 6. Vinjamoori AH, Jagannathan JP, Shinagare AB, et al. Atypical metastases from prostate cancer: 10-year experience at a single institution. *AJR Am J Roentgenol*. 2012; 199: 367-372.

[0232] 7. Beltran H, Tomlins S, Aparicio A, et al. Aggressive Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2014.

[0233] 8. Beltran H, Tagawa ST, Park K, et al. Challenges in recognizing treatment-related neuroendocrine prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2012; 30: e386-389.

[0234] 9. Danila DC, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 3903-3912.

[0235] 10. Goldkorn A, Ely B, Quinn DI, et al. Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2014; 32: 1136-1142.

[0236] 11. Resel Folkersma L, San Jose Manso L, Galante Romo I, Moreno Sierra J, Olivier Gomez C. Prognostic significance of circulating tumor cell count in patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Urology*. 2012; 80: 1328-1332.

[0237] 12. Wang FB, Yang XQ, Yang S, Wang BC, Feng MH, Tu JC. A higher number of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood indicates poor prognosis in prostate cancer patients—a meta-analysis. *Asfan Pac J Cancer Prev*. 2011; 12: 2629-2635.

[0238] 13. Scher HI, Jia X, de Boao JS, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol*. 2009; 10: 233-239.

[0239] 14. Olmos D, Arkenau HT, Ang JE, et al. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann Oncol*. 2009; 20: 27-33.

[0240] 15. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 6302-6309.

[0241] 16. Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG, Terstappen LW. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology*. 2005; 65: 713-718.

[0242] 17. Thalgott M, Rack B, Maurer T, et al. Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;

139:755-763.

[0243] 18.Wicha MS,Hayes DF.Circulating tumor cells:not all detected cells are bad and not all bad cells are detected.J Clin Oncol.2011;29:1508-1511.

[0244] 19.Alix-Panabieres C,Pantel K.Challenges in circulating tumour cell research.Nat Rev Cancer.2014;14:623-631.

[0245] 20.Ligthart ST,Coumans FA,Bidard FC,et al.Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast,Colorectal and Prostate Cancer.PLoS One.2013;8:e67148.

[0246] 21.Marrinucci D,Bethel K,Bruce RH,et al.Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells.Hum Pathol.2007;38:514-519.

[0247] 22.Bobek V,Hoffman RM,Kolostova K.Site-specific cytomorphology of disseminated PC-3prostate cancer cells visualized in vivo with fluorescent proteins.Diagn Cytopathol.2013;41:413-417.

[0248] 23.Partin AW,Steinberg GD,Pitcock RV,et al.Use of nuclear morphometry,gleason histologic scoring,clinical stage,and age to predict disease-free survival among patients with prostate cancer.Cancer.1992;70:161-168.

[0249] 24.Mohler JL,Figlesthler WM,Zhang XZ,Partin AW,Maygarden SJ.Nuclear shapeanalysis for the assessment of local invasion and metastases in clinically localized prostate carcinoma.Cancer.1994;74:2996-3001.

[0250] 25.Khan MA,Walsh PC,Miller MC,et al.Quantitative alterations in nuclear structure predict prostate carcinoma distant metastasis and death in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy.Cancer.2003;98:2583-2591.

[0251] 26.Zink D,Fischer AH,Nickerson JA.Nuclear structure in cancer cells.Nat Rev Cancer.2004;4:677-687.

[0252] 27.Wang S,Liu K,Liu J,et al.Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers.Angew Chem Int Ed Engl.2011;50:3084-3088.

[0253] 28.Lu YT,Zhao L,Shen Q,et al.NanoVelcro Chie for CTC enumeration in prostate cancer patients.Methods.2013;64:144-152.

[0254] 29.Vesalainen S,Lipponen P,Talja M,Kasurinen J,Syrjanen K.Nuclear morphometry is of independent prognostic value only in T1 prostatic adenocarcinomas.Prostate.1995;27:110-117.

[0255] 30.Klingauf M,Stanek D,Neugebauer KM.Enhancement of U4/U6small nuclear ribonucleoprotein particle association in Cajal bodies predicted by mathematical modeling.Mol Biol Cell.2006;17:4972-4981.

[0256] 31.Dempster AP,Laird NM,Rubin DB.Maximun Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm.Journal of the Royal Statistical Society,Series

B.1977;39:1-38.

[0257] 32. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions Automatic Control*. 1974;19:716-723.

[0258] 33. Schwarz GE. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*. 1978;6:461-464.

[0259] 34. **Broström** G. Generalized linear models with clustering 2009. Available from URL: <http://cran.r-project.org/web/packages/glmmML/glmmML.pdf>.

[0260] 35. Lin M, Chen JF, Lu YT, et al. Nanostructure embedded microchips for detection, isolation, and characterization of circulating tumor cells. *Acc Chem Res*. 2014;47:2941-2950.

[0261] 36. Sweeney C, Chen Y-H, Carducci MA, et al. Impact on overall survival (OS) with chemohormonal therapy versus hormonal therapy for hormone-sensitive newly metastatic prostate cancer (mPrCa): An ECOG-led phase III randomized trial. *J Clin Oncol*. 2014;5s, 2014 (suppl; abstr LBA2012).

[0262] 37. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11:129-144.

[0263] 38. Attard G, Reid AH, A'Hern R, et al. Selective inhibition of CYP17 with abiraterone acetate is highly active in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, 2009;27:3742-3748.

[0264] 39. Reid AH, Attard G, Danila DC, et al. Significant and sustained antitumor activity in post-docetaxel, castration-resistant prostate cancer with the CYP17 inhibitor abiraterone acetate. *J Clin Oncol*. 2010;28:1489-1495.

[0265] 40. Danila DC, Morris MJ, de Bone JS, et al. Phase II multicenter study of abiraterone acetate plus prednisone therapy in patients with docetaxel-treated castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:1496-1501.

[0266] 41. Posadas EM, Tighiouart M, Chen J-F, et al. A translational phase 2 study of cabozantinib in men with metastatic castration resistant prostate cancer with visceral metastases with characterization of circulating tumor cells and large oncosomes. *Annals of Oncology*. 2014;25 (suppl_4):iv546-iv563..

[0267] 42. Akfirat C, Zhang X, Ventura A, et al. Tumour cell survival mechanisms in lethal metastatic prostate cancer differ between bone and soft tissue metastases. *J Pathol*. 2013;230:291-297.

[0268] 43. Zhao L, Lu YT, Li F, et al. High-Purity Prostate Circulating Tumor Cell Isolation by a Polymer Nanofiber-Embedded Microchip for Whole Exome Sequencing. *Adv Mater*. 2013.

[0269] 44. Hou S, Zhao L, Shen Q, et al. Polymer nanofiber-embedded microchips for detection, isolation, and molecular analysis of single circulating melanoma cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52:3379-3383.

[0270] 45.Lohr JG,Adalsteinsson VA,Cibulskis K,et al.Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer.Nat Biotechnol.2014;32:479-484.

[0271] 46.Yu M,Bardia A,Wittner BS,et al.Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition.Science.2013;339:580-584.

[0272] 47.Chan CM,Au TC,Chan AT,et al.Advanced technologies for studying circulating tumor cells at the protein level.Expert Rev Proteomics.2013;10:579-589.

[0273] 48.Scatena R,Bottoni P,Giardina B.Circulating tumour cells and cancer stem cells:a role for proteomics in defining the interrelationships between function,phenotype and differentiation with potential clinical applications.Biochim Biophys Acta.2013;1835:129-143.

[0274] 49.Yu M,Bardia A,Aceto N,et al.Cancer therapy.Ex vivoculture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility.Science.2014;345:216-220.

[0275] 50.Baccelli I,Schneeweiss A,Riethdorf S,et al.Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay.Nat Biotechnol.2013;31:539-544.

[0276] 51.Aceto N,Bardia A,Miyamoto DT,et al.Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasisCell.2014;158:1110-1122.

[0277] 52.Hou JM,Krebs MG,Lancashire L,et al.Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer.J Clin Oncol.2012;30:525-532.

[0278] 53.Liotta LA,Saidel MG,Kleinerman J.The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process.Cancer Res.1976;36:889-894.

[0279] 54.Ritchie MD,Holzinger ER,Li R,Pendergrass SA,Kim D.Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions.Nat Rev Genet.2015;16:85-97.

[0280] 在本说明书中说明和讨论的实施方案仅旨在教导本领域技术人员如何创作和使用本发明。在描述本发明的实施方案时,为了清楚起见,使用特定的术语。然而,本发明并不旨在受到所选用的特定术语的限制。本领域技术人员根据上述教导应了解,在不脱离本发明的情况下,可以修改或改变本发明的上述实施方案。因此,应该理解的是,在权利要求和其等同物的范围内,本发明可以以不同于具体描述的其他方式来实施。

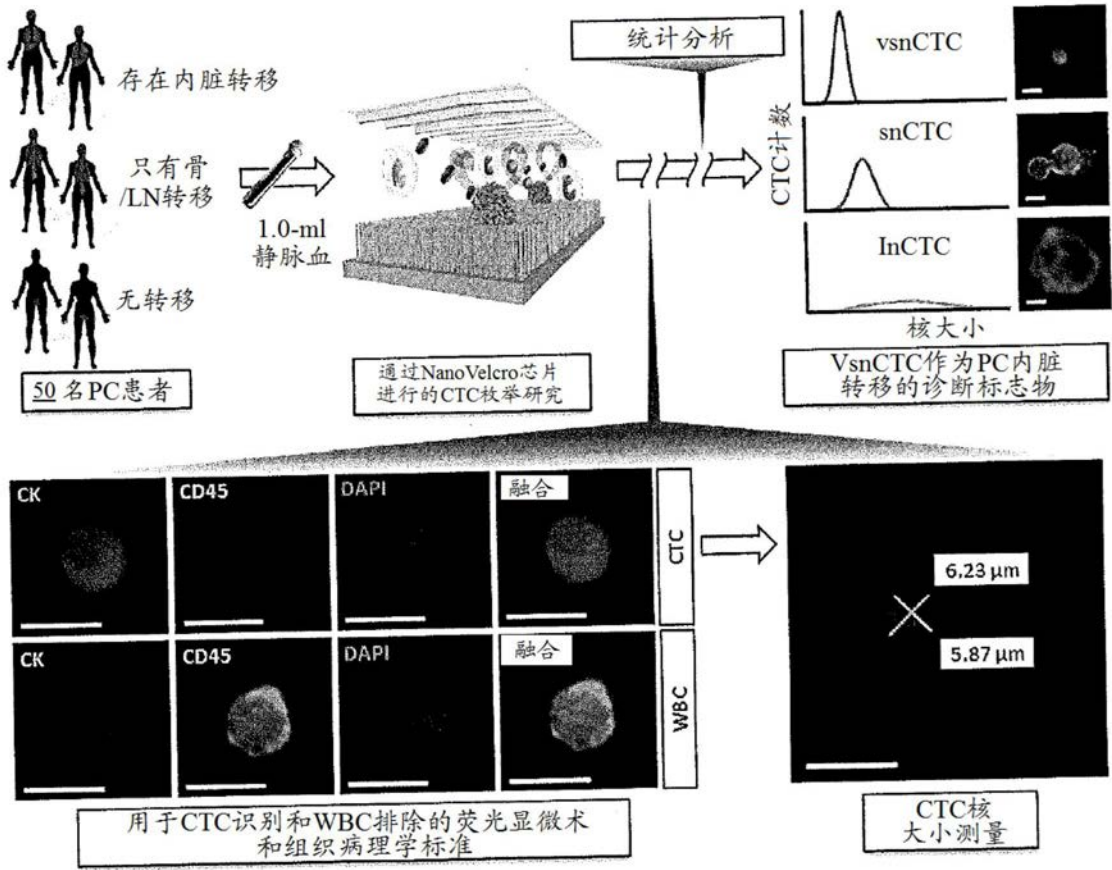


图1A

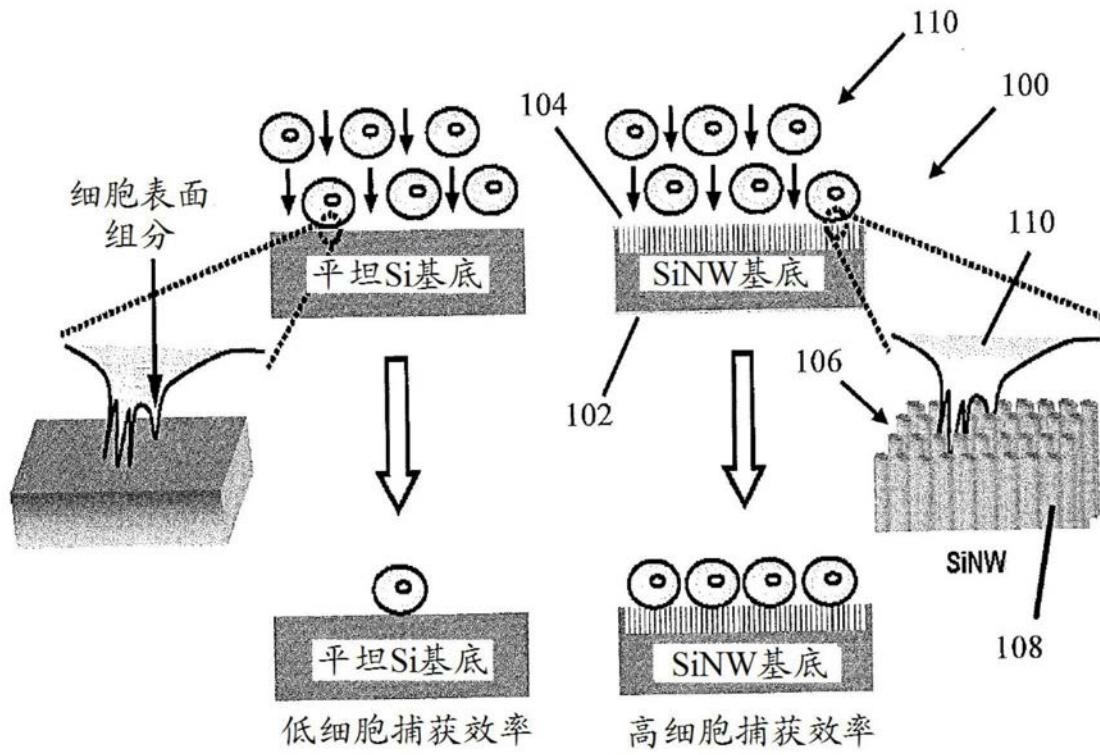


图1B

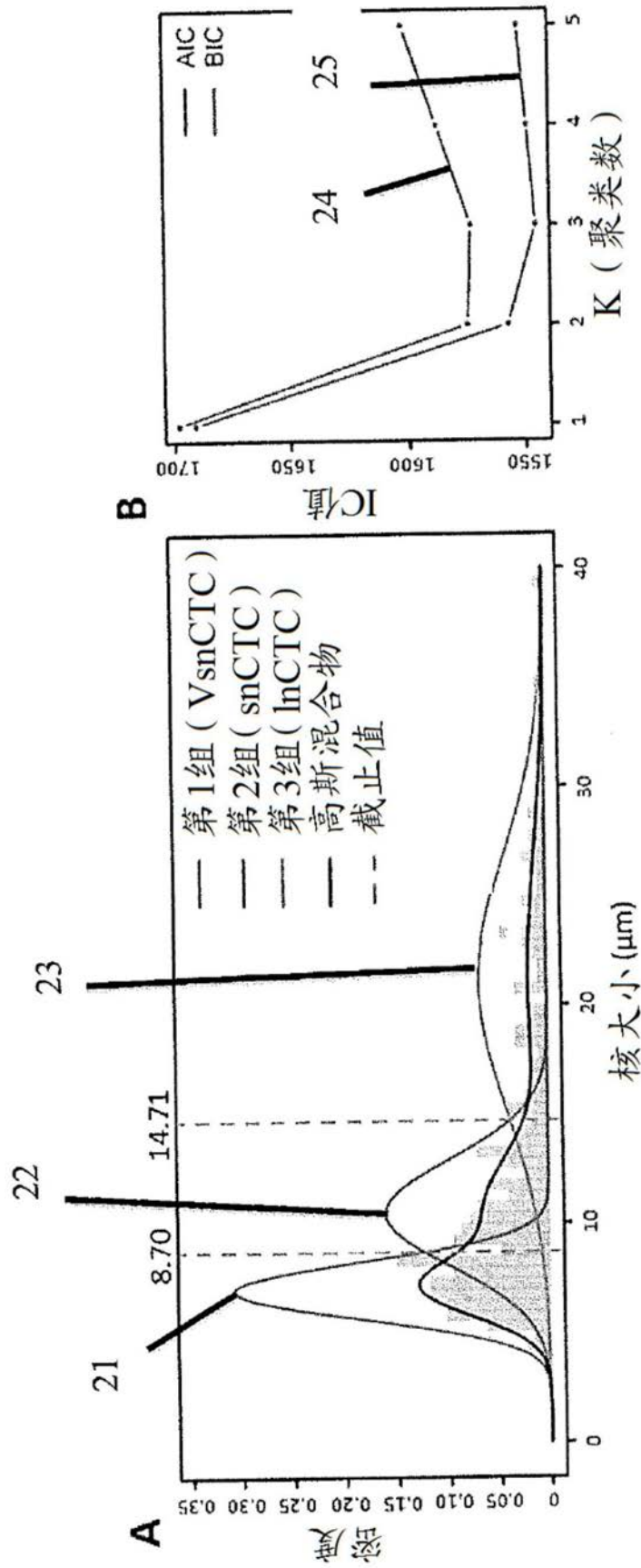


图2A-2B

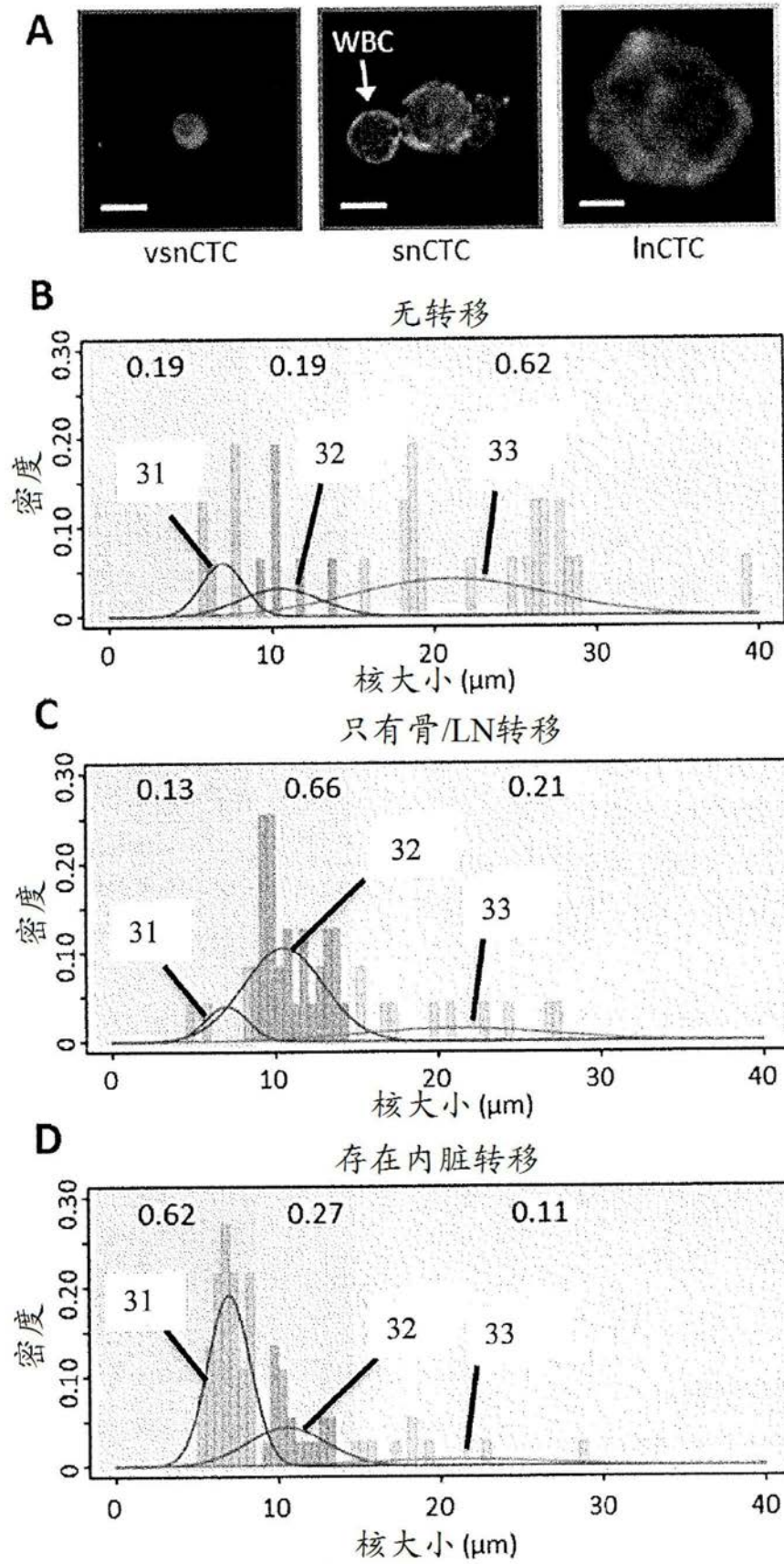


图3A-3D

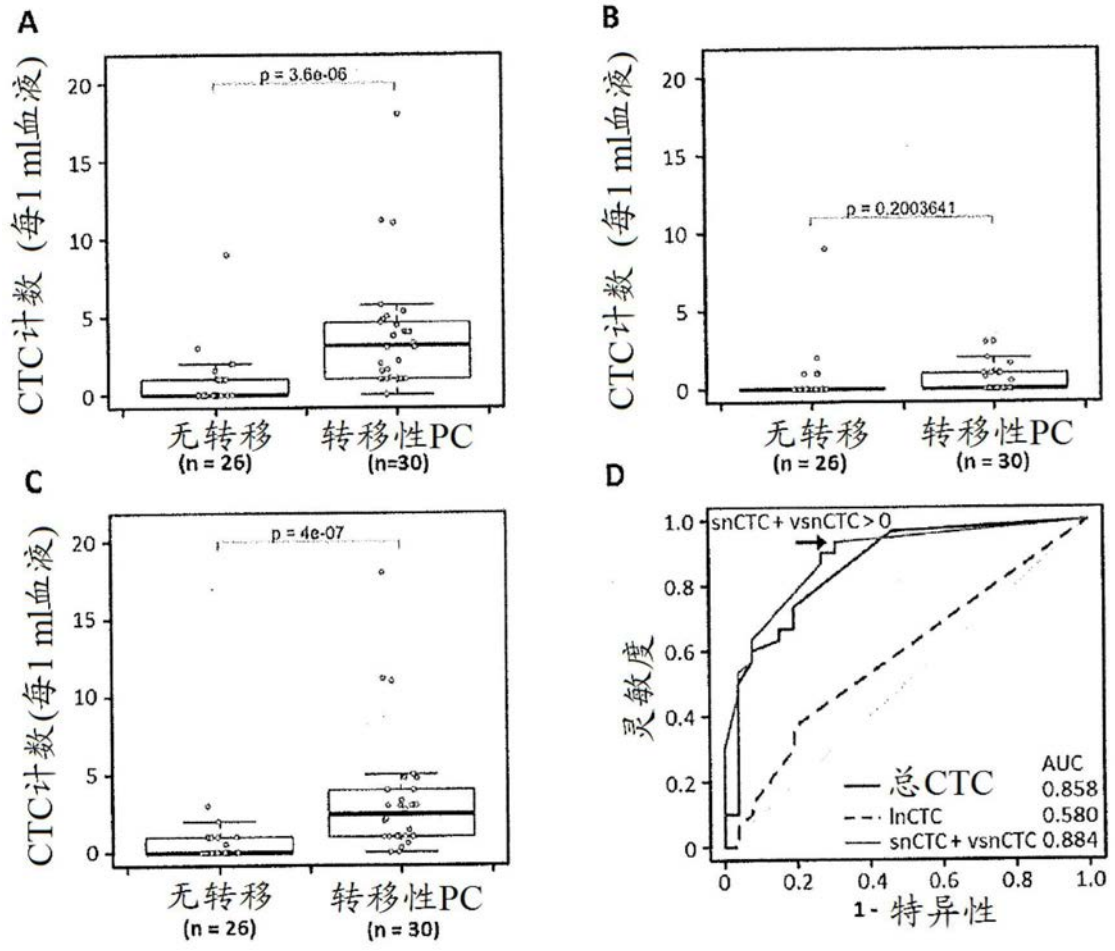


图4A-4D

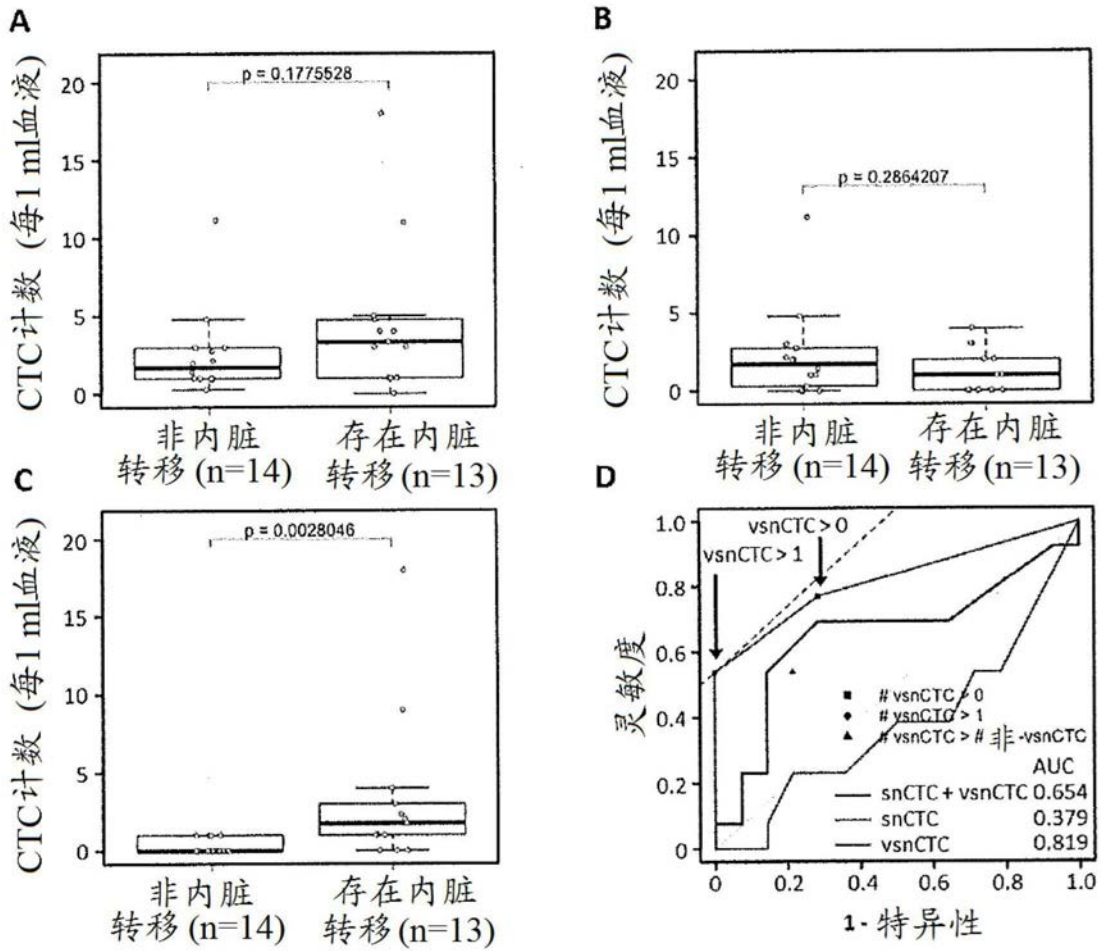


图5A-5D

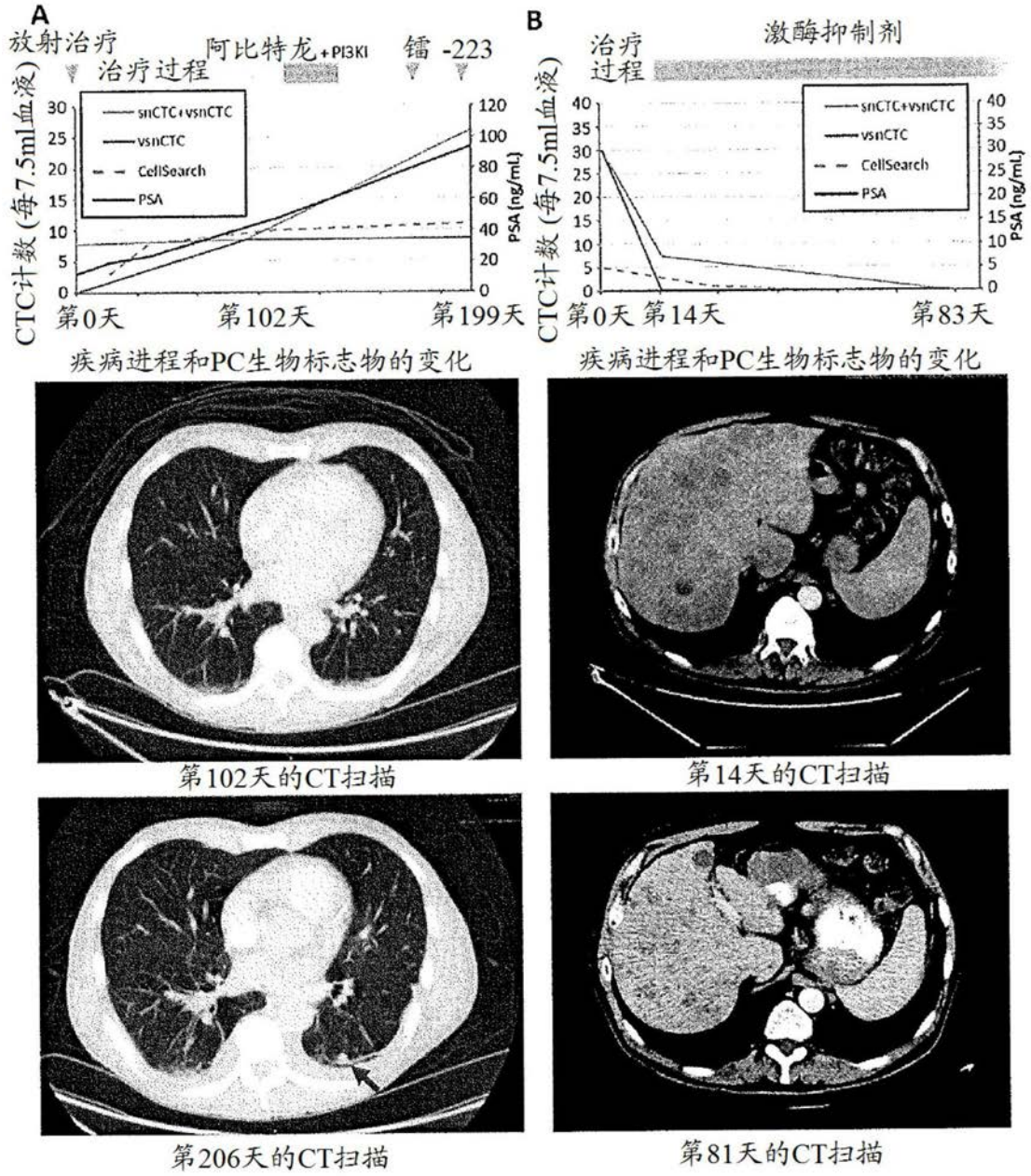


图6A-6B

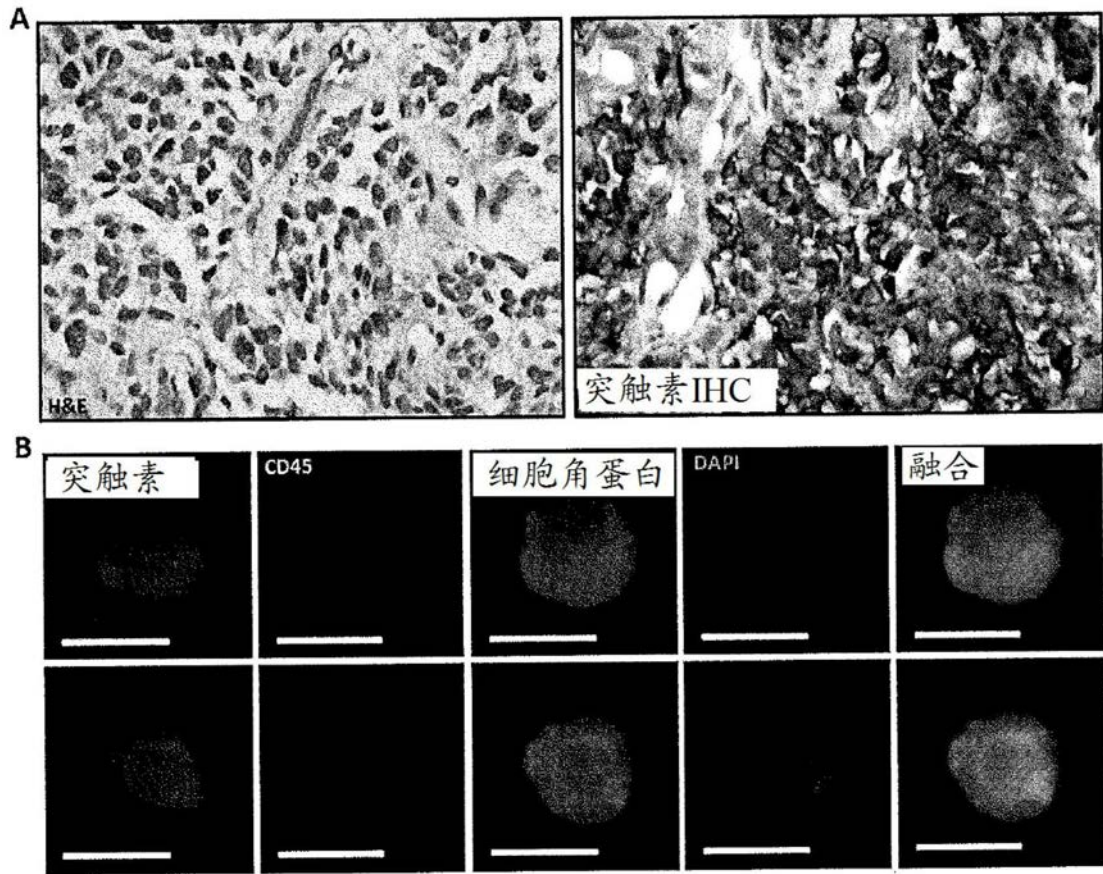


图7A-7B

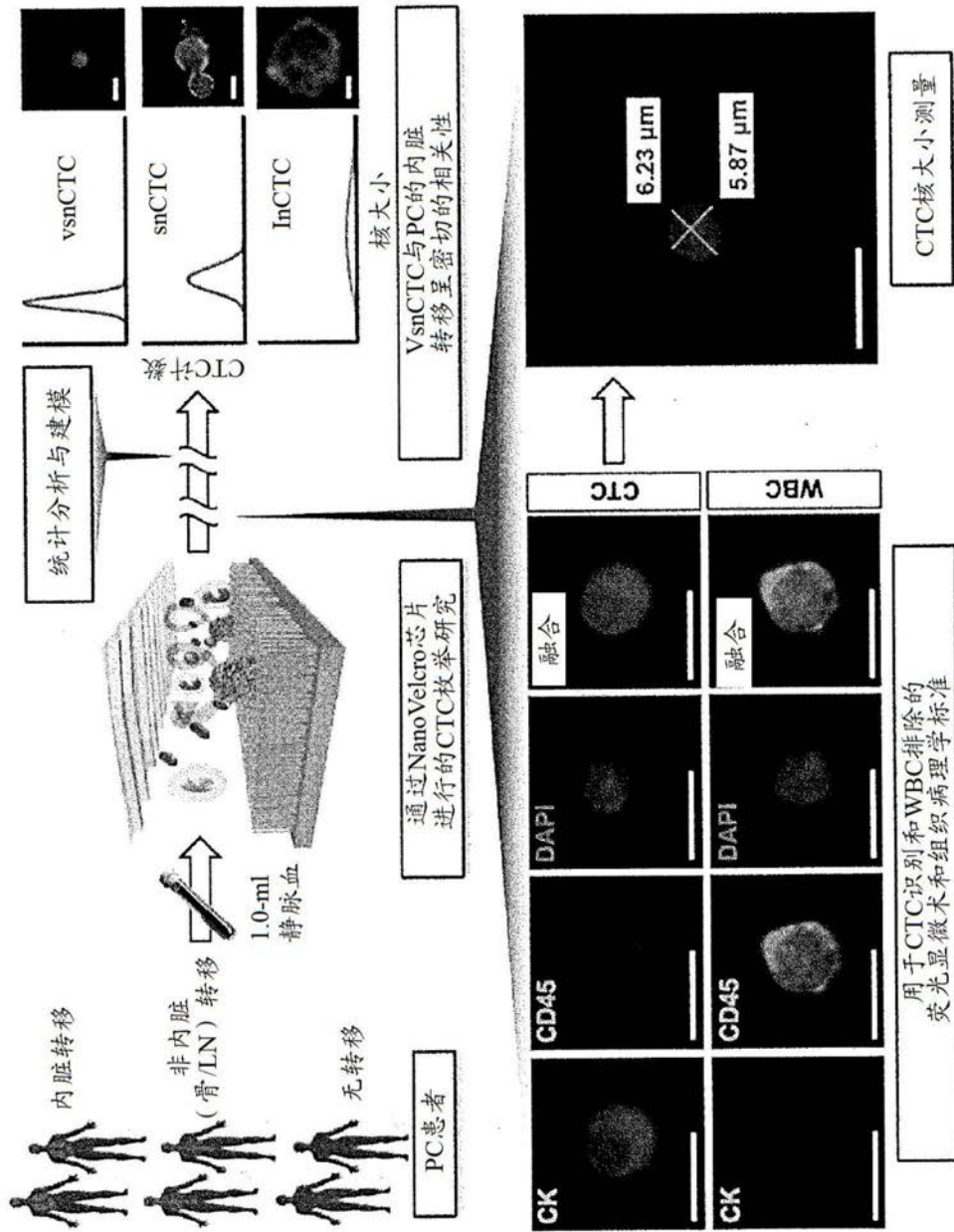


图8

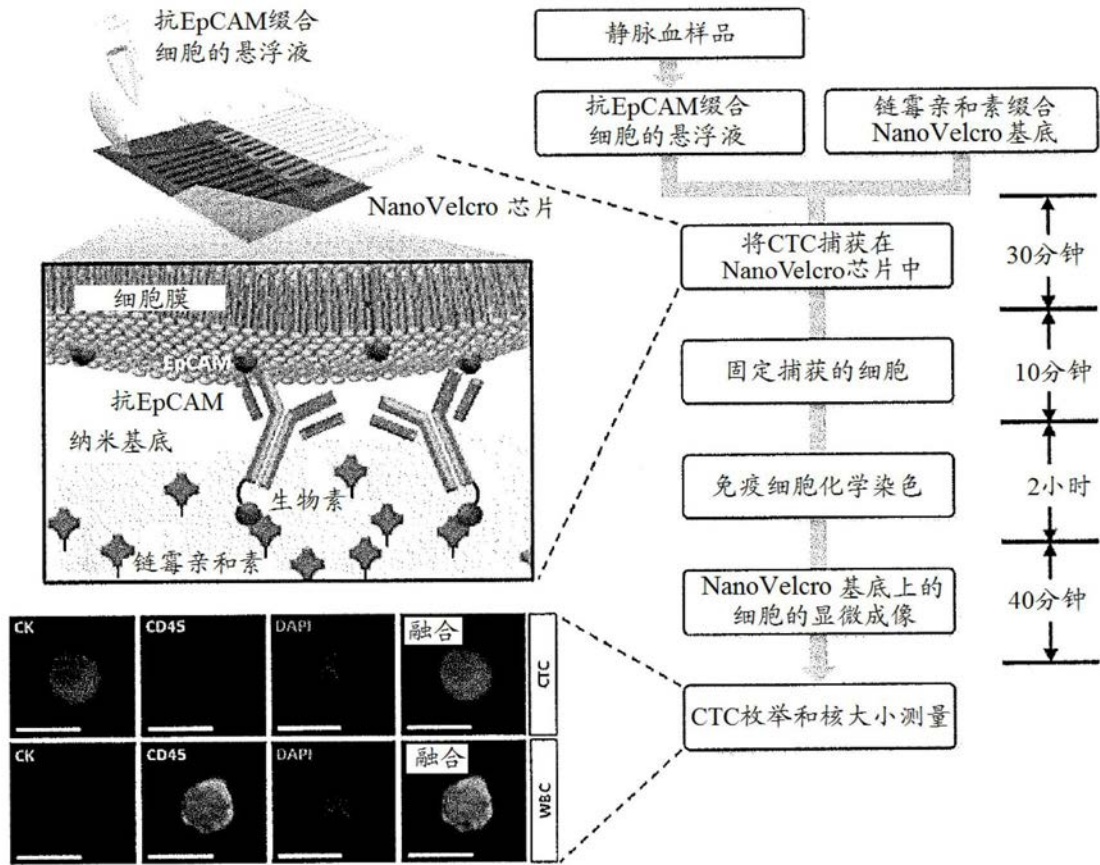


图9

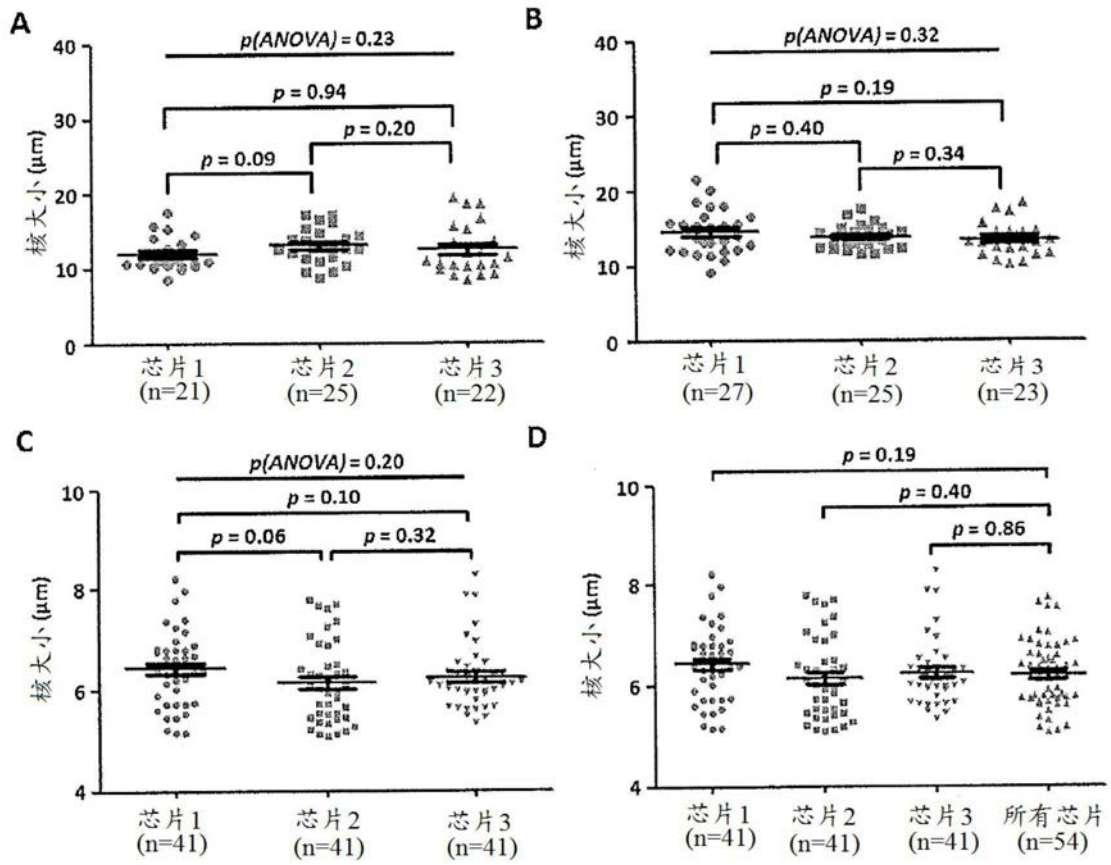


图10A-10D

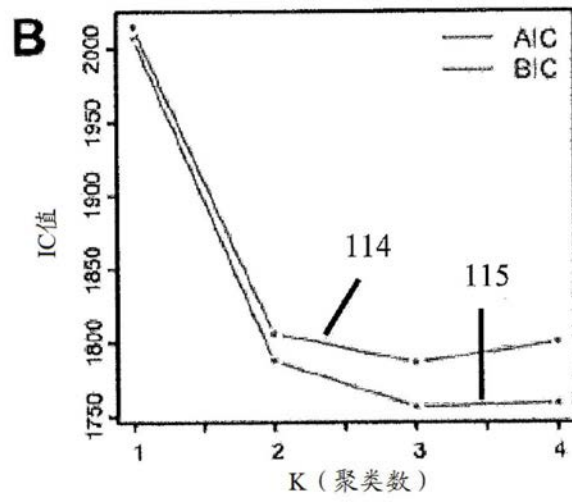
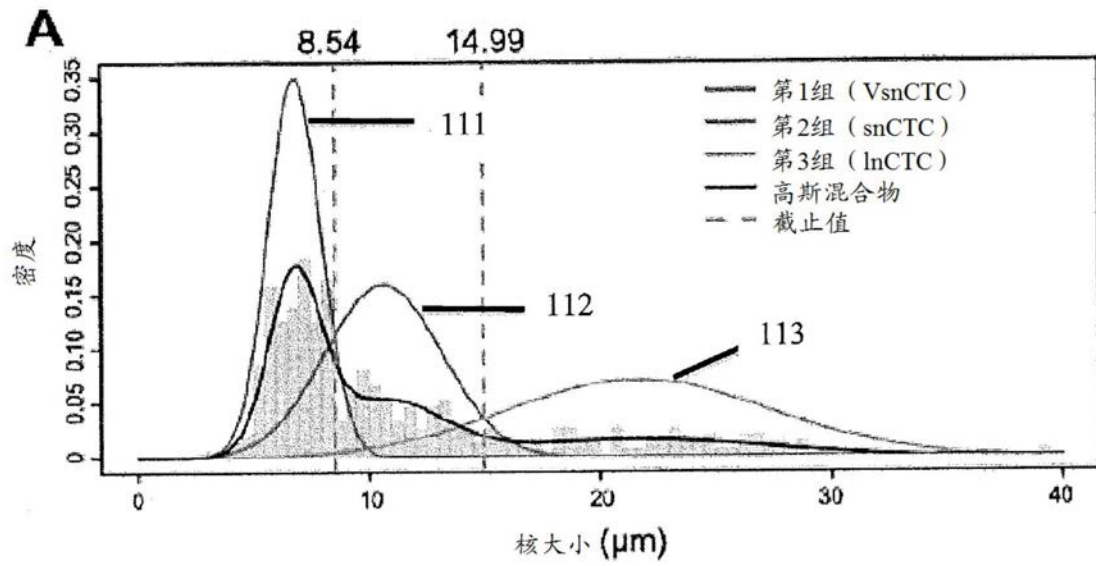


图11A-11B

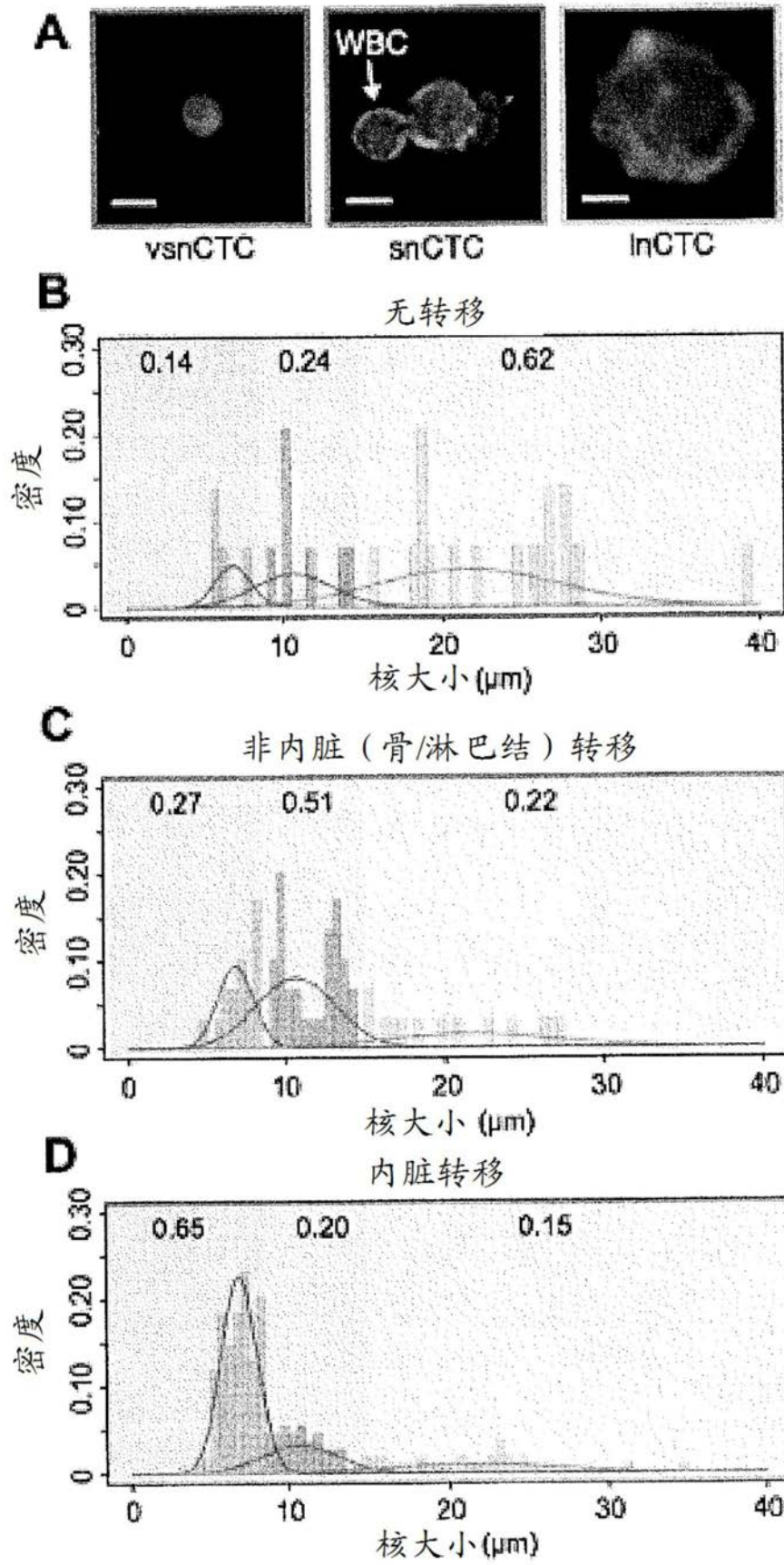


图12A-12D

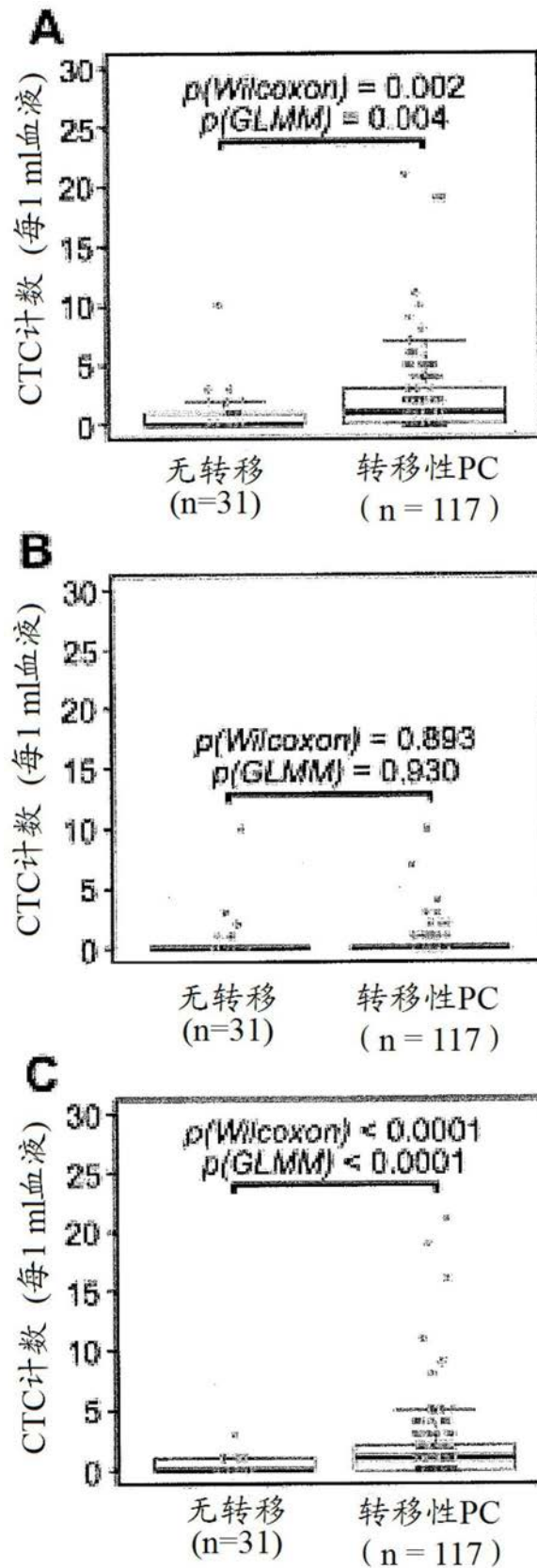


图13A-13C

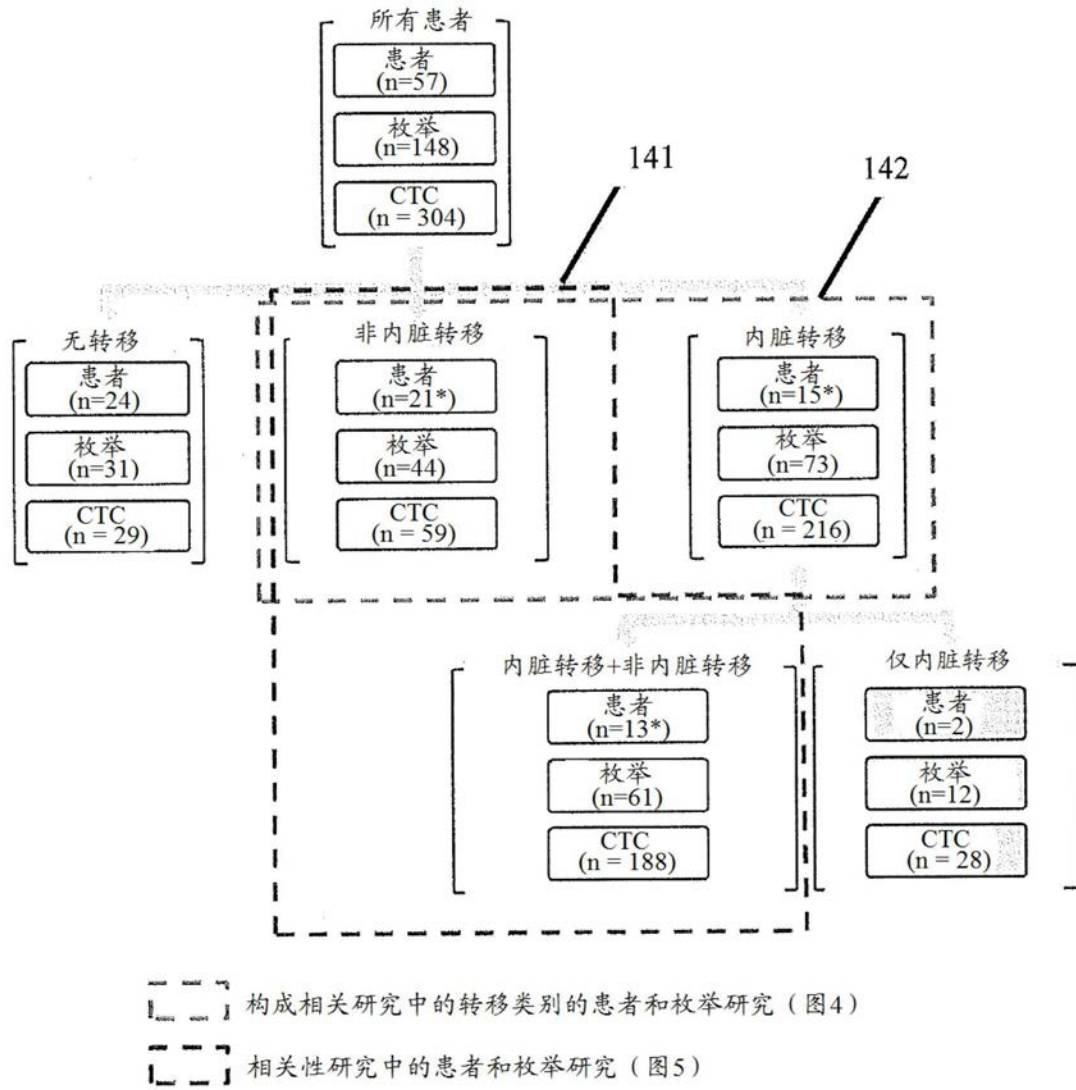


图14

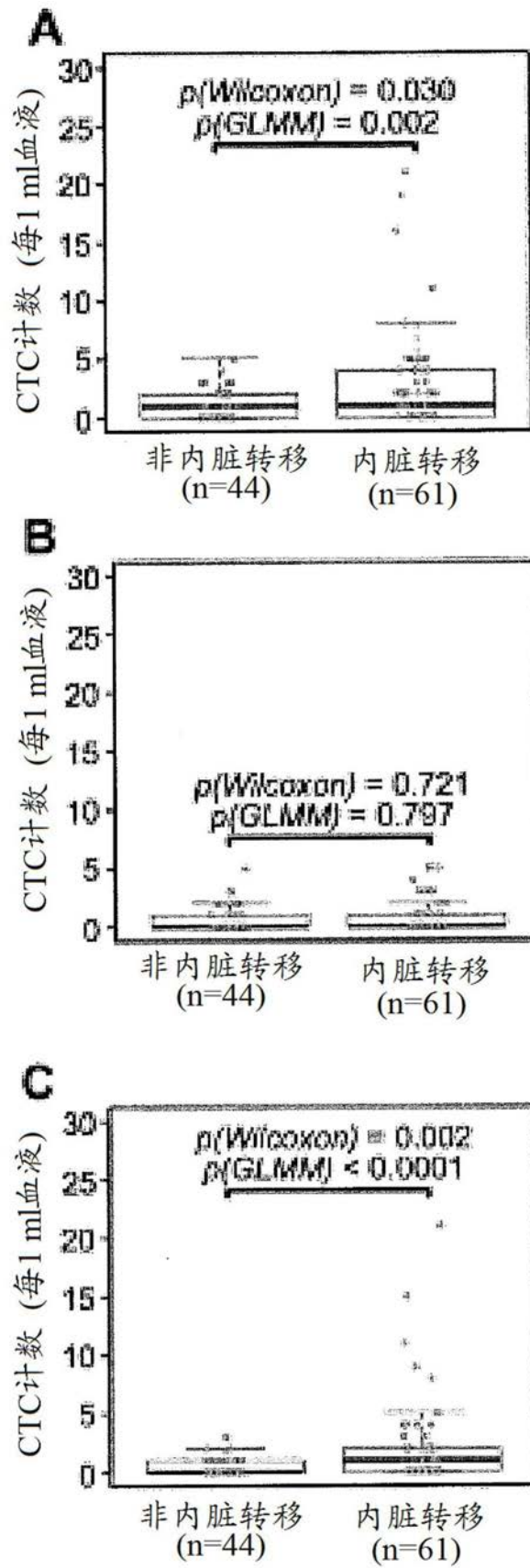


图15A-15C

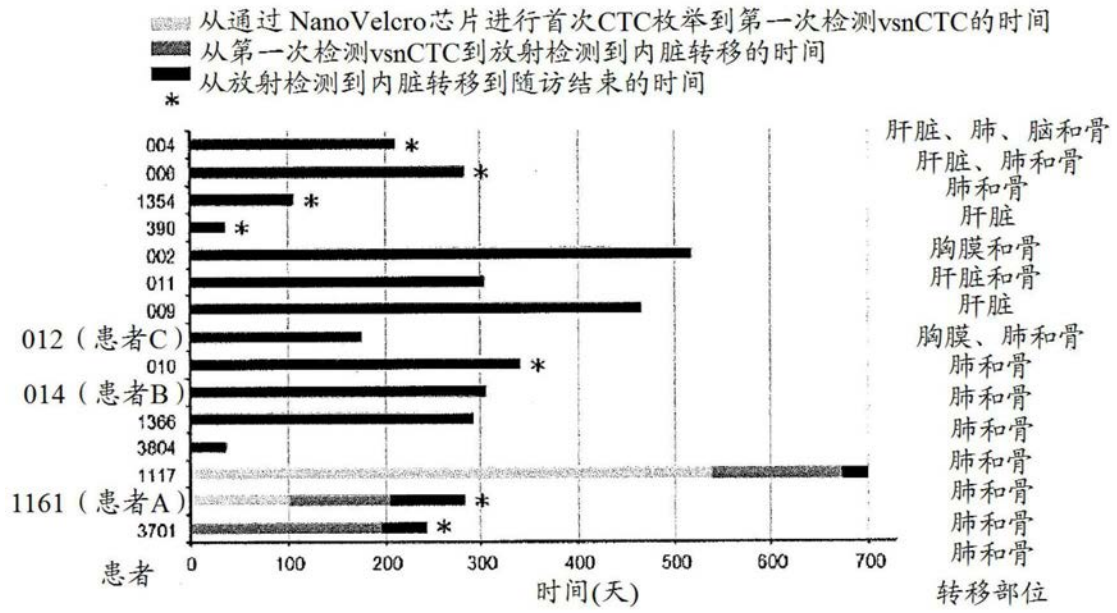


图16

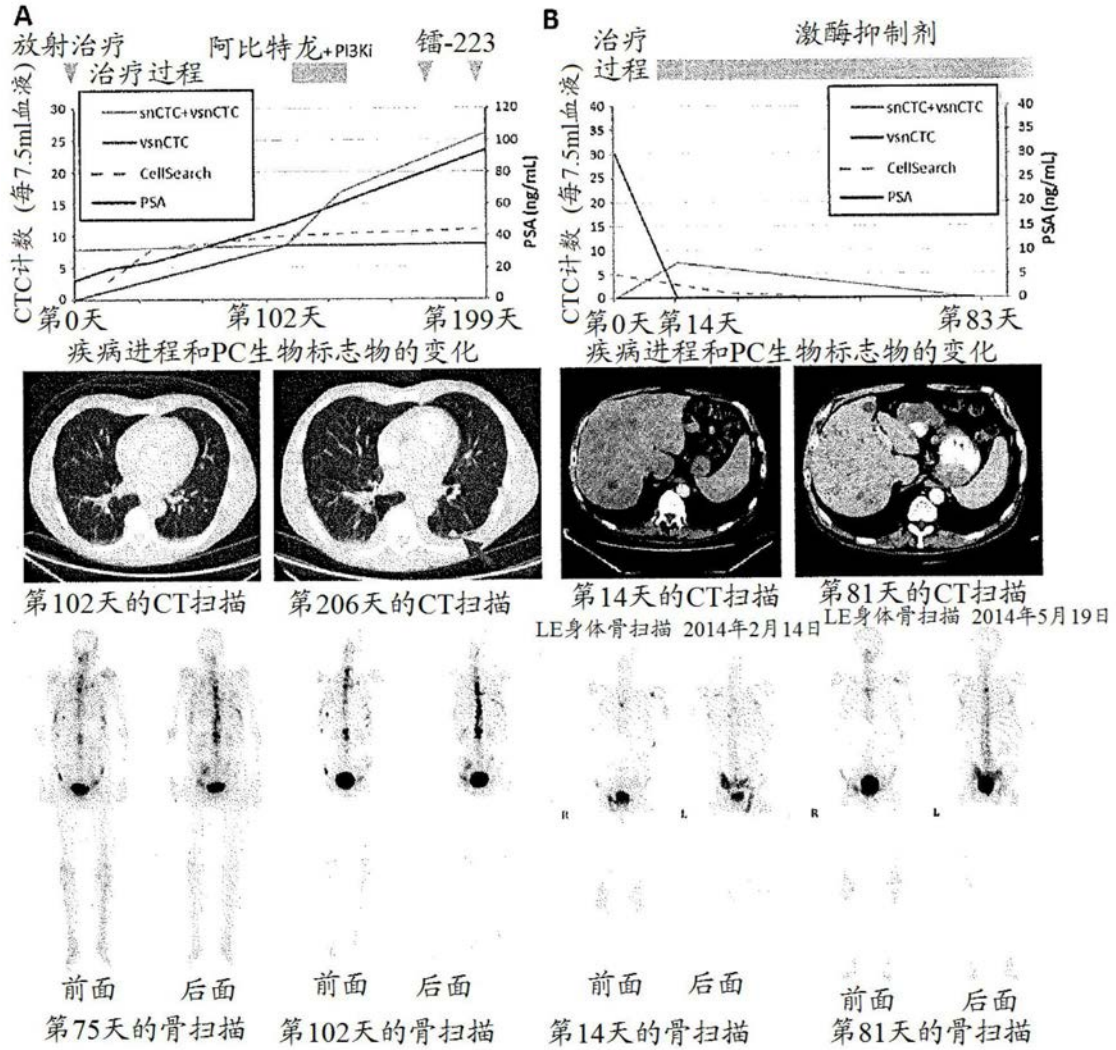


图17A-17B

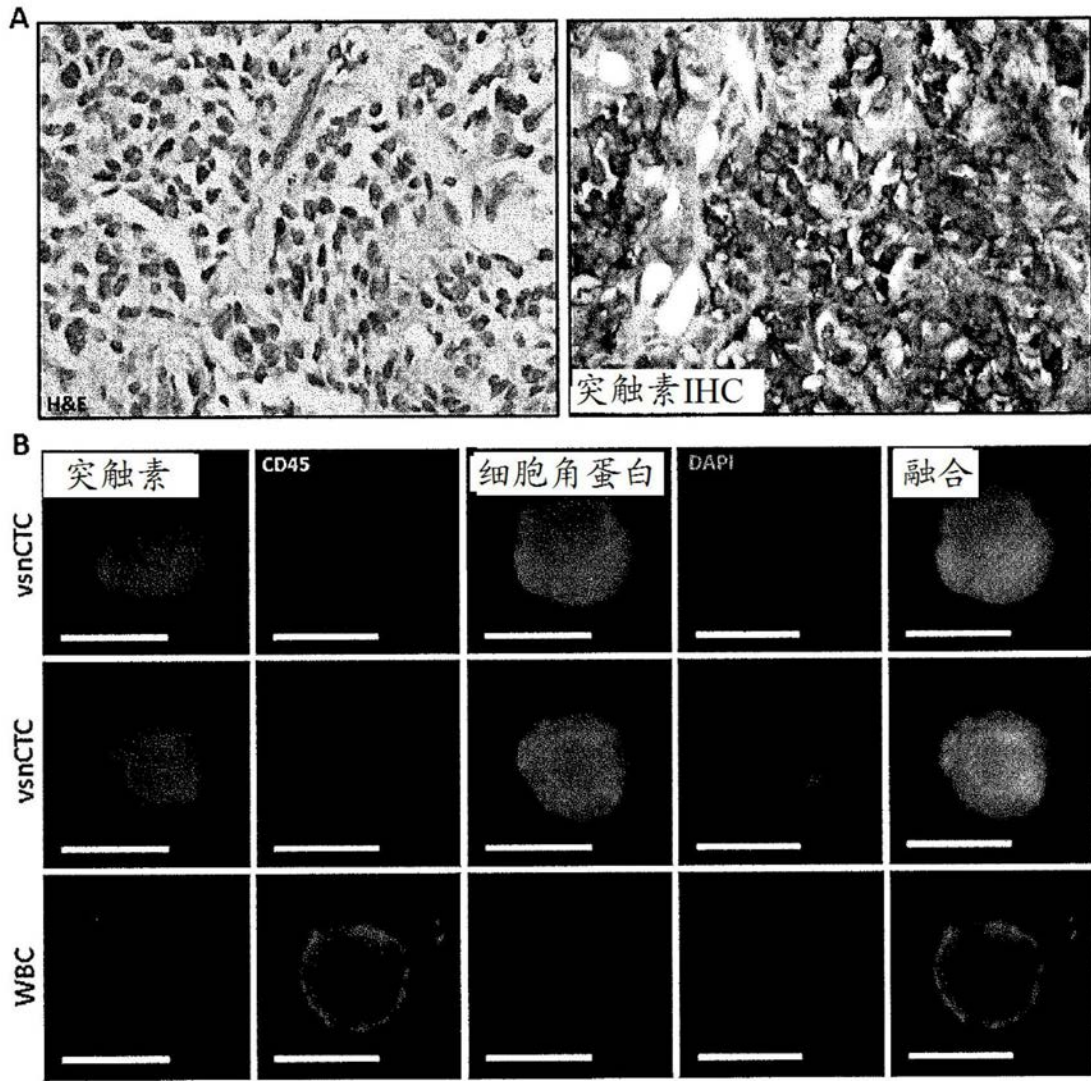


图18A-18B

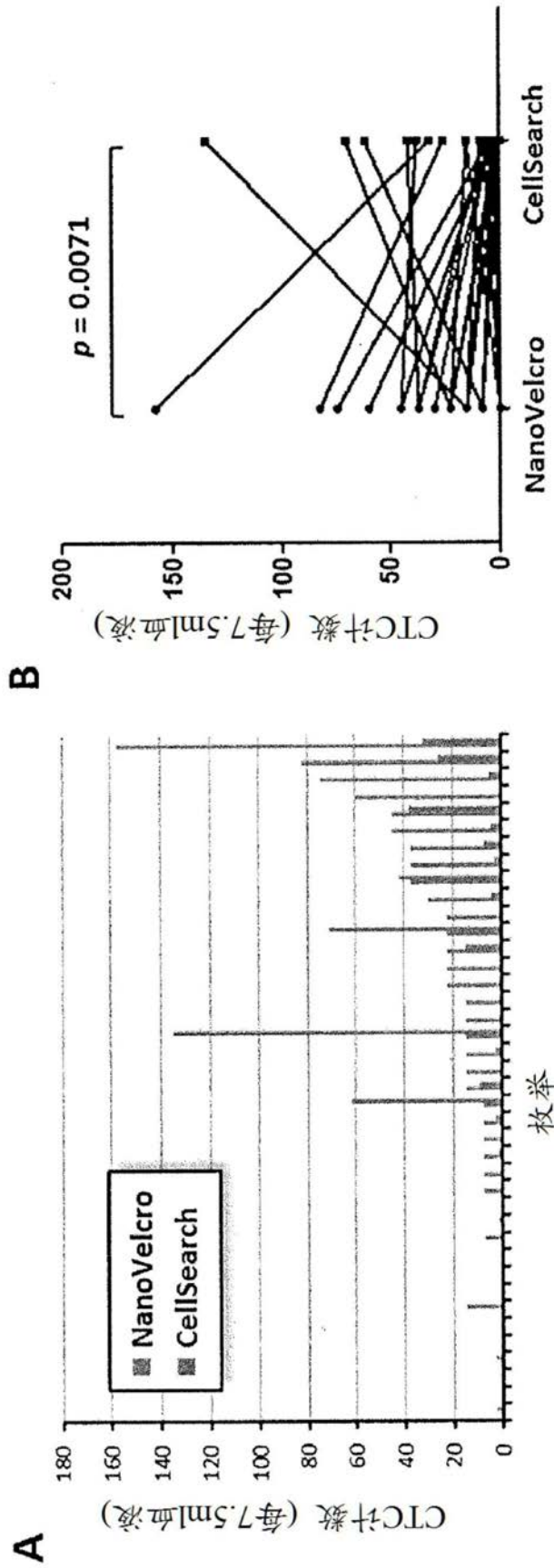


图19A-19B