

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992876** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.05.20

(22) Дата подачи заявки
2018.06.01

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01)
C12N 5/095 (2010.01)
C12N 5/22 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕРАПИИ НА ОСНОВАНИИ ХАРАКТЕРИСТИК ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (ЦОК) ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ ЗАБОЛЕВАНИИ**

(31) **62/514,642; 62/531,725**

(32) **2017.06.02; 2017.07.12**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/035581**

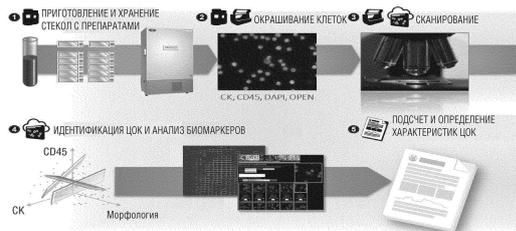
(87) **WO 2018/222979 2018.12.06**

(71) Заявитель:
ЭПИК САЙЕНСИЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Диттамор Райан (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу идентификации клеточного типа, либо присутствия или отсутствия клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон или энзалутамид у пациента с раком, включающему (а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, а также (d) идентификацию биомаркерных ЦОК, при этом присутствие или отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента к лечению абиратероном или энзалутамидом.



A1

201992876

201992876

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–560365EA/072

СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕРАПИИ НА ОСНОВАНИИ ХАРАКТЕРИСТИК ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (ЦОК) ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ ЗАБОЛЕВАНИИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 62/514642, поданной 2 июня 2017 г., и предварительной патентной заявки США № 62/531725, поданной 12 июля 2017 г., полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Изобретение относится, в целом, к области диагностики рака и, более конкретно, к способам фенотипического и морфологического анализа отдельных клеток из циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) для анализа гетерогенности заболевания.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

После последовательно используемых видов терапии рака возникает множество субпопуляций раковых клеток, каждая из которых имеет различные генетические aberrации, способные придавать устойчивость или восприимчивость к лекарственным средствам. Биопсия ткани может не выявить эти субпопуляции, однако жидкая биопсия крови может помочь идентифицировать эти важные опухолевые клетки и определить, как опухоли пациента развивались с течением времени. Геномное профилирование отдельных клеток является мощным новым инструментом для исследования эволюции и разнообразия при раке и понимания роли редких клеток в прогрессировании опухоли. Клональное разнообразие призвано играть важную роль в инвазии, метастазировании и развитии устойчивости к терапии.

Рак предстательной железы (РС) является наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием органов в Соединенных Штатах (США) и остается второй по значимости причиной смерти от рака среди американских мужчин. Только в 2014 году прогнозируемая заболеваемость раком предстательной железы составляет 233000 случаев, со смертельным исходом у 29480 мужчин, что делает терапию метастатического рака предстательной железы действительно неудовлетворенной медицинской потребностью. Siegel *et al.*, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9–29. Эпидемиологические исследования в Европе демонстрируют сопоставимые результаты, с оценкой заболеваемости, составляющей 416700 новых случаев в 2012 году, что соответствует 22,8% диагнозов рака у мужчин. В целом, ожидается 92200 случаев смерти от РС, что делает его одним из трех видов рака, от которых, скорее всего, умрут мужчины, с коэффициентом смертности 9,5%.

Несмотря на доказанный успех гормональной терапии рака предстательной железы с использованием химической или хирургической кастрации, у большинства пациентов рак в конечном итоге переходит в фазу заболевания, когда он становится метастатическим и демонстрирует устойчивость к дальнейшим гормональным манипуляциям. Такой рак получил название «метастатический кастрационно–резистентный рак предстательной

железы (mCRPC)». Однако, несмотря на это обозначение, существуют доказательства того, что опосредованная андрогеновым рецептором (AR) передача сигнала и генная экспрессия может сохраняться при mCRPC, даже в случае кастрационных уровней андрогенов. Это может быть отчасти связано с повышающей регуляцией ферментов, вовлеченных в синтез андрогенов, избыточной экспрессией AR или появлением мутантных AR с беспорядочным узнаванием различных стероидных лигандов. Амплификация гена андрогенового рецептора (AR), наблюдаемая в 20–30% случаев mCRPC, предположительно развивается как следствие гормон–депривационной терапии и является основной причиной неудачного лечения. Лечение пациентов с mCRPC остается серьезной клинической проблемой. Исследования также позволили обнаружить прямую связь между осями передачи сигналов PI3K–АКТ–mTOR и андрогенового рецептора (AR), выявив динамическое взаимодействие между этими путями в процессе развития гормональной устойчивости. PTEN является одним из наиболее часто делетируемых/мутирующих генов опухолевых супрессоров при раке предстательной железы человека. Подобно фосфатазе липидов и отрицательному регулятору пути PI3K/АКТ/mTOR, PTEN контролирует ряд клеточных процессов, включая выживание, рост, пролиферацию, метаболизм, миграцию и клеточную архитектуру. Утрата PTEN может быть использована в качестве диагностического и прогностического биомаркера для рака предстательной железы, а также для прогнозирования реакции пациента на создаваемые ингибиторы РВК/АКТ/mTOR.

До 2004 г. отсутствовало лечение, которое достоверно улучшало показатели выживаемости мужчин с mCRPC. Лечение пациентов митоксантроном с преднизолоном или гидрокортизоном было направлено лишь на облегчение боли и улучшение качества жизни, но никак не способствовало увеличению общей выживаемости (OS). В 2004 г. результаты двух крупных клинических испытаний фазы 3, TAX 327 и SWOG (Southwest Oncology Group) 9916, привели к тому, что таксотер® (доцетаксел) был признан основным химиотерапевтическим средством для лечения пациентов с mCRPC. Дополнительное гормональное лечение терапевтическими средствами, направленными на андрогеновый рецептор (AR), химиотерапия, комбинированная терапия и иммунотерапия были изучены в случае mCRPC, и недавние результаты позволили обнаруживать дополнительные варианты лечения этой трудно поддающейся лечению группы пациентов. С началом экспоненциального роста количества новых средств, протестированных и одобренных для лечения пациентов с метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC), только за последние 5 лет возникли вопросы относительно оптимальной последовательности использования или комбинации этих средств. Существуют несколько руководств, помогающих врачам определять наилучший подход к последовательности использования средств, и в большинстве из них оценивают наличие или отсутствие симптомов, общее состояние пациента, а также болезненную нагрузку, с целью определения наилучшей последовательности использования данных средств. Mohler *et al.*, 2014, *J Natl Compr Canc Netw.* 2013;11(12):1471–1479; Cookson *et al.*, 2013, *J Urol.* 2013;190(2):429–438. В настоящее время одобренные методы лечения включают

использование цитотоксических средств класса таксанов, таких как таксотер® (доцетаксел) и джевтана® (кабазитаксел), и антиандрогеновых гормональных терапевтических средств, таких как зитига® (абиратерон, блокирует продуцирование андрогенов) или кстанди® (энзалутамид, ингибитор андрогеновых рецепторов (AR)).

Задача клиницистов состоит в том, чтобы выбрать наилучшую последовательность введения таких терапевтических средств для обеспечения наибольшей пользы для пациентов. При последовательном использовании ответ на энзалутамид после абиратерон ацетата, или на абиратерон ацетат после энзалутамида является менее частым и менее продолжительным. Будет ли химиотерапия на основе таксанов более полезной, чем вторая антиандрогеновая гормональная терапия, является ключевым вопросом. Однако неудача в лечении остается серьезной проблемой, учитывая разнородные ответы на терапию у пациентов и в свете наличия перекрестной устойчивости к каждому средству. Mezynski *et al.*, *Ann Oncol.* 2012;23(11):2943–2947; Noonan *et al.*, *Ann Oncol.* 2013;24(7):1802–1807; Pezaro *et al.*, *Eur Urol.* 2014, 66(3): 459–465. Кроме того, пациенты могут потерять терапевтическое окно для получения существенной пользы от каждого лекарственного средства, которое, как было доказано, обеспечивает улучшение показателей общей выживаемости. Вследствие этого, разработка усовершенствованных способов идентификации целевых популяций с наибольшим потенциалом для получения пользы от таргетированной терапии остается важной задачей.

Ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) (PARPi) продемонстрировали эффективность для пациентов с mCRPC, раком молочной железы, раком яичника и другими видами рака с мутациями BRCA зародышевой линии и, в последнее время, для пациентов с соматическими мутациями, инактивирующими путь репарации ДНК за счет гомологичной рекомбинации (HR) (Mateo *et al.*, *NEJM*, 2015;373(18):1697–708; Robinson *et al.*, *Cell*, 2015;161(5):1215–28; Balmana *et al.*, *Ann Oncol.* 2014, 25:1656–63; Del Conte *et al.*, *Br J Cancer*, 2014,111:651–9). Для современных способов обнаружения недостатков HR (HRD) необходим геномный анализ свежего или архивного биопсийного образца опухоли для обнаружения инактивирующих мутаций или геномных шрамов (LST, NtAI или LOH), указывающих на HRD (Abkevich *et al.*, *Br J Cancer*, 2012 Nov 6, 107(10):1776–82). Геномные биомаркеры HRD встречаются у 10–20% пациентов (Marquard *et al.*, *Biomark Res.* 2015 May 1, 3:9).

В последнее время также были достигнуты значительные успехи в выяснении взаимосвязи между генотипами HRD и восприимчивостью к средствам на основе платины. Один ретроспективный анализ объединенных образцов из испытаний PrECOG 0105, цисплатина–1 и цисплатина–2 показал, что балльный показатель HRD Myriad был тесно связан с полным патологическим ответом на неоадьювантные средства на основе платины при трижды негативном раке молочной железы (TNBC) (Telli *et al.* *Clinical cancer research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research.* 2016). В условиях с адьювантом (Vollebergh *et al.* *Breast Cancer Res.* 2014, 16(3):R47) и метастатическим раком (Isakoff *et al.* *J. Clinical Oncol.*, 2015, 33(17):1902–9) было показано, что HRD тесно связаны

с благоприятным исходом при лечении средствами на основе платины, в сравнении с остальной группой пациентов с TNBC и положительным по гормональным рецепторам раком молочной железы.

Определение HRD в биопсийных образцах солидных опухолей может быть проблематичным вследствие недоступности/недостижимости биопсийного материала (то есть, костных метастазов) и плохой корреляции архивных образцов первичной опухоли со свежими биопсийными образцами (Punnoose *et al.*, Br J Cancer. 2015 Oct 20;113(8):1225–33). Слабая согласованность между архивными и свежими биопсийными образцами в значительной степени объясняется высокой степенью внутриопухолевой и межклеточной гетерогенности в результате временной клональной эволюции в ответ на предшествующие терапевтические вмешательства, приводящие к пространственной гетерогенности и, в конечном итоге, отбору образцов поликлонального заболевания.

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) обеспечивают значительные преимущества при диагностике рака, которая становится еще более удобной за счет возможности их неинвазивного изучения. Cristofanilli *et al.*, N Engl J Med 2004, 351:781–91. ЦОК, высвобожденные либо из первичной опухоли, либо из метастазов, несут важную информацию о биологии опухоли. Исторически, чрезвычайно низкие уровни ЦОК в кровотоке, в сочетании с их неизвестным фенотипом, значительно затрудняли их обнаружение и ограничивали их клиническую применимость. В последнее время появилось множество технологий для обнаружения, выделения и изучения ЦОК с целью использования заключенной в них информации. ЦОК обладают потенциалом для обеспечения неинвазивного способа оценки прогрессирующих раковых опухолей в реальном времени во время терапии и, кроме того, для способствования прямой терапии за счет мониторинга фенотипических, физиологических и генетических изменений, возникающих в ответ на терапию. У пациентов с наиболее запущенным раком предстательной железы первичная опухоль была удалена, и ожидается, что ЦОК состоят из клеток, высвобождающихся из метастазов, представляя собой «жидкую биопсию». Хотя ЦОК традиционно определяют как ЕрСАМ/цитокератин–положительные (СК+) клетки, CD45–, и с особой морфологией, последние данные свидетельствуют о том, что существуют и другие группы ЦОК–кандидатов, включая клетки, которые являются ЕрСАМ/цитокератин–отрицательными (СК–), или клетки меньшего размера, чем обычные ЦОК. Эти факты, относящиеся к гетерогенности популяции ЦОК, указывают на то, что аналитические платформы без обогащения по ЦОК имеют преимущества в сравнении с методами положительной селекции, в которых ЦОК выделяют на основании размера, плотности или наличия ЕрСАМ, и в которых могут быть упущены важные субпопуляции ЦОК.

CRPC представляет серьезную проблему как для пациентов, страдающих этой прогрессирующей формой рака предстательной железы, так и для клиницистов, лечащих этих пациентов. Клиницисты часто сталкиваются с необходимостью составления комплексных диагнозов и оценки механизмов, вызывающих прогрессирование

заболевания, в попытке назначения соответствующего и индивидуального лечения. При определении соответствующих терапевтических и прогностических маркеров потенциальная клиническая польза от таргетированной терапии повышается, и врачи получают возможность лучше контролировать СРРС, повышать качество жизни пациентов и улучшать клинические результаты. Необходимо понимать изменения факторов, определяющих частоту субклональных ВЧК и геномную нестабильность в отдельных ЦОК, в сочетании с клеточным фенотипом, для более четкого представления о гетерогенном заболевании, прогнозирования ответа на терапию и выявления новых механизмов устойчивости. Необходимы прогностические биомаркеры восприимчивости к антиандрогеновой гормональной терапии и химиотерапии на основе таксанов, которые можно оценивать у отдельных пациентов каждый раз, когда необходимо принимать решение о выборе терапии. Настоящее изобретение решает эту проблему и предоставляет соответствующие преимущества.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу идентификации клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет определять клеточный тип, связанный с ответом пациента на абиратерон. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Изобретение относится к способу определения присутствия или отсутствия клеточного типа, при этом отсутствие клеточного типа связано с ответом на энзалутамид у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего

иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК указывает на отсутствие клеточного типа, связанное с ответом пациента на энзалутамид. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Изобретение относится к способу идентификации пациента с раком для лечения лекарственным средством, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом присутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения абиратерона пациенту с раком, или при этом отсутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения энзалутамида пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак

предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения абиратерона пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения энзалутамида пациенту с раком.

Изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению абиратероном, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению абиратероном. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению энзалутидом, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных

ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению энзалутамидом. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу идентификации клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет определять клеточный тип, связанный с ответом пациента на абиратерон. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Изобретение относится к способу определения присутствия или отсутствия клеточного типа, при этом отсутствие клеточного типа связано с ответом на энзалутамид у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик

ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать отсутствие клеточного типа, связанное с ответом пациента на энзалутамид. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Изобретение относится к способу идентификации пациента с раком для лечения лекарственным средством, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом присутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения абиратерона пациенту с раком, или при этом отсутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения энзалутамида пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак

предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения абиратерона пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения энзалутамида пациенту с раком.

Изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению абиратероном, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению абиратероном. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению энзалутидом, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных

ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению энзалутамидом. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидными из подробного описания, а также из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1А представлено описание процесса стандартного анализа Еris ЦОК. Изображения анализируют с использованием многофакторного алгоритма цифровой патологии для обнаружения ЦОК–кандидатов и количественного определения уровней экспрессии белковых биомаркеров. Классификации ЦОК отображаются в веб–отчете и подтверждаются обученными специалистами. На Фигуре 1В представлено описание последовательности действий для извлечения и геномного профилирования ЦОК. Отдельные клетки выделяют, проводят амплификацию всего генома и получают библиотеку СНП. Секвенирование проводят на Illumina NextSeq 500.

На Фигуре 2 представлена диаграмма проведенного биоинформационного анализа. Первичные файлы FASTQ оценивают и фильтруют в отношении качества. Прочтенные последовательности выравнивают с эталонным геномом hg38 (UCSC), дубликаты ПЦР удаляют, и проводят фильтрацию на основании показателя 30 MAPQ. Образцы с прочтенными последовательностями >250К после фильтрации анализируют на предмет изменения числа копий. Фильтрованные файлы выравниваний дополнительно анализируют при помощи Еris конвейеров обработки данных по числу копий. Один конвейер применяли для оценки нестабильности генома с использованием 1М п.н. окна, а другой применяли для определения конкретного числа копий гена.

¹LST: n хромосомных разрывов между смежными областями размером по меньшей мере 10 Мб. ²PGA: процентная доля генома пациента с изменениями числа копий (амплификации или делеции).

На Фигурах 3А–3D показаны вариации числа копий (ВЧК) в отдельных клетках. Отдельные клетки, в каждом случае из LNCaP, PC3 и VCaP (Фигуры 3А–3С), выделяли и анализировали на вариации числа копий путем секвенирования всего генома. Амплификации и делеции можно наблюдать воспроизводимо в разных репликах.

Репрезентативные изображения каждой линии клеток также показаны. Клетки окрашивали коктейлем для СК, AR, CD45 и DAPI. На фигуре показаны 5 реплик из каждой линии клеток для демонстрации воспроизводимости. Известные геномные изменения от каждой линии клеток описаны на Фигуре 3D. Графики получены с использованием Circos: Krzywinski, M. *et al.* Circos: an Information Aesthetic for Comparative Genomics. *Genome Res* (2009) 19:1639–1645.

На Фигурах 4A–4B показаны ВЧК, и на Фигурах 4C–4D показаны результаты определения нестабильности генома. На Фигуре 4A представлено сравнение \log_2 геномного числа копий AR в 3 репрезентативных линиях клеток и контрольных белых клетках крови (БКК) здорового донора. VCaP имеет амплификацию AR, в то время как LNCaP и PC3 сохраняют 2 копии AR. На Фигуре 4B представлено сравнение \log_2 геномного числа копий PTEN в 3 репрезентативных линиях клеток и контрольных БКК здорового донора. Была подтверждена гомозиготная потеря PTEN в PC3, в LNCaP гетерозиготную потерю PTEN наблюдали во многих клетках со значительными z-показателями. На Фигуре 4C представлено сравнение количества точечных разрывов (LST) в 3 репрезентативных линиях клеток и контрольных БКК здорового донора. Больше количество точечных разрывов было обнаружено в PC3 (PTEN нуль, p53 мутант) и VCaP (p53 мутант) в сравнении с LNCaP (дт p53 и гетерозиготная потеря PTEN) и контрольными БКК. На Фигуре 4D представлено сравнение % измененного генома в 3 репрезентативных линиях клеток и контрольных БКК здорового донора. В PC3 наблюдали наивысший процент изменений, что указывало на генетическую нестабильность и полиплоидию, вероятно, вследствие потери как PTEN, так и p53.

На Фигуре 5 представлено схематическое изображение платформы «без селекции клеток», используемой для выделения и анализа ЦОК на уровне отдельных клеток на основании морфологии/белковой химии (опознание).

На Фигуре 6 показано, что следующее определение белковых и морфологических признаков ЦОК, серии индивидуальных клеточных признаков, было проведено для каждой ЦОК, идентифицированной в образце от пациента, включая площадь ядра, а также другие признаки, приведенные в таблице.

На Фигуре 7, справа, представлена тепловая карта, на которой 15 клеточных типов указаны цветами по оси y, и отдельные признаки – по оси x. Красный цвет отражает признаки в нижней части динамического диапазона (то есть, малая площадь ядра), в то время как зеленый цвет отражает признаки в верхней части динамического диапазона (то есть, большая площадь ядра).

На Фигуре 8 показано ранжирование пациентов на основании того, насколько гетерогенными, или разнообразными, были клетки на каждом этапе принятия решения.

На Фигуре 9 приведены демографические данные для популяции пациентов с mCRPC.

На Фигуре 10 показана частота встречаемости 15 разных фенотипических классов ЦОК, отличающихся для линий терапии и более гетерогенных с течением времени.

Красным цветом показана распространенность клеточных типов, которые избыточно представлены или более разнообразны. Каждая колонка соответствует пациенту, так что колонки со многими вертикальными красными секциями соответствуют большей фенотипической гетерогенности.

На Фигуре 11 показано, что более высокие индексы Шеннона соответствуют большему разнообразию (гетерогенности) в зависимости от линии терапии, особенно с увеличением медианы и несколькими более низкими показателями индекса для 3-й и 4-й линии терапии.

На Фигуре 12А показано, что высокая фенотипическая гетерогенность ЦОК позволяет прогнозировать более короткие периоды прогрессирования и сроки выживания при AR-терапии, но не терапии таксанами. На Фигуре 12В показаны результаты для AR Tx на основании гетерогенности.

На Фигуре 13 показано, что высокая фенотипическая гетерогенность ЦОК позволяет прогнозировать лучший результат при лечении таксанами, чем AR Tx, в многофакторной модели. Диапазон факторов, которые, как показано ранее, позволяют прогнозировать выживание, изучали в однофакторном и многофакторном анализе – показаны результаты только многофакторного анализа. Высокая гетерогенность позволяет прогнозировать восприимчивость к терапии таксанами, но не AR-направленной терапии.

На Фигуре 14 показано, что преобладание подтипа ЦОК (типа К) позволяет прогнозировать неудовлетворительный результат при использовании как AR Tx, так и таксанов, независимо от статуса AR. Клетки одного конкретного математически определенного типа, типа К, имеющие большое ядро, широкий диапазон размеров ядра и заметные ядрышки – были связаны с устойчивостью к лекарственным средствам обоих классов.

На Фигуре 15 представлено схематическое изображение процесса, в котором ЦОК амплифицируют, готовят для секвенирования, с последующей электронной обработкой данных секвенирования для оценки клональности и амплификаций/делеций.

На Фигуре 16 показано, что секвенирование отдельных клеток ЦОК предоставляет информацию о клональном разнообразии и филогенетической линии заболевания.

На Фигуре 17 показано, что профили ВЧК отдельных ЦОК предоставляют информацию о клональном разнообразии и филогенетической линии заболевания.

На Фигуре 18 показано, что секвенирование отдельных ЦОК также может предоставлять информацию об отсутствии клонального разнообразия у пациента после 2-й линии терапии таксанами, который не мог быть рассмотрен для использования AR Tx. Этот пациент ответил на лечение энзалутамидом.

На Фигуре 19 показано, что фенотипическая гетерогенность ЦОК коррелирует с геномной гетерогенностью.

На Фигуре 20А приведен пример геномики клеточного типа К, характеризующегося частыми ВЧК, большим количеством точечных разрывов и сопутствующим фенотипом, характеризующимся большим ядром, высокой ядерной энтропией и частыми ядрышками.

На Фигуре 20В показана геномная нестабильность для клеточного типа К в сравнении со всеми другими фенотипами ЦОК.

На Фигуре 21 показано, что высокая фенотипическая гетерогенность является информативным биомаркером у AR-V7-отрицательных пациентов.

На Фигуре 22 показана низкая фенотипическая гетерогенность ЦОК в 6 ЦОК от пациента до первой линии терапии, демонстрирующих однородный геномный профиль.

На Фигуре 23 представлена тепловая карта 15 математических фенотипических подтипов ЦОК, которые были идентифицированы с использованием независимого анализа, основанного на белковых и морфологических признаках ЦОК.

На Фигурах 24А–24О представлены выбранные признаки 15 клеточных типов А–О, соответственно. Некоторые фенотипические подтипы ЦОК позволяют прогнозировать выживание пациента.

На Фигуре 25 представлен прогноз смерти через 180 дней при использовании ARS-направленной терапии (n=150 образцов) на основании количественного определения ЦОК и 15 фенотипических подтипов ЦОК. Хорошие прогностические факторы включают клетки типа Е (кластер 5), К (кластер 11) и О (кластер 15).

На Фигуре 26 показано, что некоторые фенотипические подтипы ЦОК (клеточные типы Е, К и N) позволяют прогнозировать ответ пациентов с mCRPC на AR-направленную терапию.

На Фигуре 27 показаны фенотипические подтипы ЦОК (клеточные типы G, К и N), которые позволяют прогнозировать ответ на терапию таксанами.

На Фигуре 28 показано, что клетки кластера 11 (клеточный тип К) имеют большое ядро, высокую ядерную энтропию и частые ядрышки.

На Фигуре 29 показано, что некоторые клеточные типы (клеточные типы G, К и M) позволяют прогнозировать геномную нестабильность (LST). Клетки этих конкретных подтипов, учитывая повышенную геномную нестабильность, могут быть чувствительными к повреждающим ДНК лекарственным средствам, таким как химиотерапевтические средства на основе платины (то есть, карбоплатин, цисплатин), или таргетированным терапевтическим средствам, которые направлены на недостатки гомологичной рекомбинации, включая ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), ингибиторы ДНК-РК и терапевтические средства, направленные на путь ATM.

На Фигуре 30 показаны пять морфологических признаков и признаков белковой экспрессии, которые, как было показано, позволяют прогнозировать геномную нестабильность ЦОК. Первые четыре признака коррелируют положительно с геномной нестабильностью, и последний признак коррелирует отрицательно.

На Фигуре 31 показано, что СК(-) ЦОК имеют более высокую частоту встречаемости, и являются прогностическим фактором, геномной нестабильности.

На Фигуре 32 показано, что белковые и морфологические признаки позволяют прогнозировать геномную нестабильность ЦОК с высокой точностью. Ось Y показывает реальные LST (n точечных разрывов) и ось X показывает прогнозируемую

нестабильность (стабильные против нестабильных). ЦОК с прогнозированной высокой геномной нестабильностью могут быть чувствительны к повреждающим ДНК лекарственным средствам, таким как химиотерапевтические средства на основе платины (то есть, карбоплатин, цисплатин), или таргетированным терапевтическим средствам, которые направлены на недостатки гомологичной рекомбинации, включая ингибиторы PARP, ингибиторы ДНК–РК и терапевтические средства, направленные на путь ATM.

На Фигуре 33 показано, что фенотипическая гетерогенность позволяет прогнозировать общую выживаемость и ответ на AR–направленную терапию.

На Фигуре 34 показано, что фенотипическая гетерогенность ЦОК позволяет прогнозировать генотипическую гетерогенность. Высокая фенотипическая гетерогенность с большей в 40 раз вероятностью представляет множество геномных клонов, чем низкая фенотипическая гетерогенность.

На Фигуре 35 показано, что геномная нестабильность ЦОК позволяет прогнозировать общую выживаемость пациентов с mCRPC.

На Фигуре 36 показано, что геномная нестабильность ЦОК позволяет прогнозировать ответ пациентов с mCRPC на терапию таксанами.

На Фигурах 37A–37C показаны масштабные переходы между состояниями (LST) и процентная доля измененного генома (PGA), измеренные в качестве суррогатного показателя геномной нестабильности. LST: n хромосомных разрывов между смежными областями размером по меньшей мере 10 Мб. Popova *et al.*, *Cancer Res.* 72(21):5454–62 (2012). PGA: процентная доля генома пациента с изменениями числа копий (амплификации или делеции). Zafarana *et. al*, *Cancer* 2012 Aug; 118(16): 4053 (2012). Примеры: высокий показатель LST (27) и высокий показатель PGA (23%).

На Фигуре 38 представлен график, показывающий величину коэффициента корреляции каждого отображенного признака (вдоль оси y) для прогнозирования aLST. Коэффициенты корреляции ближе к 0 указывают на признаки, которые не коррелируют отрицательно/положительно с aLST. Значения $\gg 0$ или $\ll 0$ указывают на признаки, которые сильно коррелируют положительно или отрицательно с aLST и, таким образом, могут быть в большей степени прогностическими факторами для aLST.

На Фигуре 39 показано, что ЦОК от пациентов, страдающих от mCRPC с мутациями BRCA2 зародышевой линии или другими вредными мутациями генов пути HRD (недостатки гомологичной рекомбинации), обычно имеют более высокие показатели LST, со средними показателями выше 40, как имело место в исследовании авторов изобретения. График ниже показывает, что три образца с мутациями (Mt) BRCA2 или HRD (CR.1, H_PR.1 и H_PR.2) имеют наивысшие показатели LST, в сравнении с остальными образцами. Пациенты, страдающие от mCRPC с высокими показателями LST (средний показатель LST >30), хорошо отвечают на PARPi+ARS терапию (ингибиторами сигнализации AR, включая абиратерон и энзалутамид), либо с полным ответом, либо с или $>90\%$ ответом. CR: полный ответ; H_PR: $>90\%$ ответ; PR: $>50\%$ ответ; SD: стабильное заболевание; xPD: прогрессирующее.

На Фигуре 40 показано, что пациенты, страдающие от mCRPC с высокими показателями LST (средний показатель LST >30), не отвечают на терапию только ARS.

На Фигурах 41А–41В представлены тепловые карты для двух пациентов, имеющих одновременно приобретение AR и потерю PTEN, и не отвечающих на PARPi+ARS терапию. Из группы 30 пациентов с mCRPC два пациента имели одновременно приобретение AR и потерю PTEN. Оба пациента не отвечают на PARPi+ARS терапию.

На Фигурах 42А–42Е показано, что у пациентов с mCRPC, получавших PARPi+ARS терапию, в момент времени, когда пациент отвечал на терапию, полученные при последующем заборе крови ЦОК не имели ЦОК с высокими уровнями LST. Это свидетельствовало о том, что ЦОК с высокими уровнями LST были восприимчивы к терапии, и могут быть использованы в качестве маркера ответа. Фигуры 42А–42Е соответствуют пяти иллюстративным пациентам.

На Фигурах 43А–43В показано, что у пациентов с mCRPC, получавших PARPi+ARS терапию, в момент времени, когда у пациента заболевание прогрессировало, полученные при последующем заборе крови ЦОК имели ЦОК с высокими уровнями LST. Это свидетельствовало о том, что ЦОК с высокими уровнями LST являются показателями прогрессирования или рецидива заболевания. Смотри ниже результаты для двух иллюстративных пациентов. На Фигуре 43А пациент 120109–084 имел краткосрочный ответ на PARPi+ARS терапию и имел рецидив заболевания, во время которого был получен образец («прогрессирующее заболевание»). На Фигуре 43В пациент 210109–168 не отвечал на PARPi+ARS терапию, и два образца крови были собраны в неделю 12 и 16.

На Фигуре 44 показано, что для пациентов с mCRPC, получавших только ARS-терапию, в момент времени, когда пациент отвечал на терапию, полученные при последующем заборе крови ЦОК все еще имели ЦОК с высокими уровнями LST. Это свидетельствовало о том, что ЦОК с высокими уровнями LST не чувствительны к ARS-терапии. Возможно, необходима иная терапия (например, PARPi) или комбинированная терапия с PARPi.

На Фигурах 45А–45В показано, что линии клеток, имеющих высокий уровень геномных шрамов, например, LST и LOH, с большей вероятностью являются чувствительными к PARPi. 2 мутантные по BRCA, PARPi-чувствительные линии клеток TNBC (HCC1395 и MB436) имеют более высокие показатели LST (Фигура 45А) и показатели LOH (Фигура 45В), чем линия клеток TNBC с BRCA дикого типа, мутантная по PTEN и TP53 (MB231).

На Фигуре 46 показано, что показатели LST связаны с фенотипическим типом клеток. Клетки типов В, D, E, G, K, L, M и O имеют более высокие показатели LST, чем клетки остальных типов.

На Фигурах 47А–47С показано, что показатели LST могут быть предсказаны на основании алгоритма регрессии с использованием фенотипических признаков ЦОК, включая отношение Я/Ц, округлость ядра и цитоплазмы, ядерную энтропию, экспрессию СК и экспрессию AR. Данные по экспрессии AR являются предпочтительными, но

необязательными, в прогностической модели. Прогностическую модель на основе LST тестировали в независимой группе пациентов с раком предстательной железы и раком молочной железы, с точностью 78%. На уровне пациентов, уровень согласованности между aLST и pLST составляет 95% (36 из 38 образцов) при определении LST-категории пациентов (высокий или низкий показатель). Пациентом с высоким показателем LST считали пациента, имеющего по меньшей мере четыре ЦОК с pLST >0,37 или aLST >8. На Фигуре 47А представлены фактические показатели LST, полученные при секвенировании (x), в сравнении с предсказанными с помощью алгоритма показателями LST (pLST) (y). На Фигуре 47В представлены иллюстративные изображения клеток с широким диапазоном показателей LST. Как aLST, так и pLST, показатели на данных графиках были log₁₀ трансформированы и нормированы по Z-шкале (Фигура 47С).

На Фигурах 48А–48В показано, что пациенты с высокими показателями pLST не отвечают на AR-направленную терапию. При терапии первой линии пациентов с mCRPC, имеющих высокие показатели LST, 43% (6/14) пациентов отвечали на AR-направленную терапию. У семи пациентов, для которых были получены как исходные, так и последующие (<18 недель), образцы крови, количество клеток с высоким показателем pLST возросло с 35 клеток в исходных образцах до 122 (320%) в последующих образцах. Смотри пример данных из двух независимых групп пациентов с mCRPC.

На Фигуре 49 показано, что у пациентов с низкими показателями pLST, которые исходно отвечали на AR-направленную терапию, могли быть обнаружены ЦОК с высоким уровнем pLST в последующих образцах, что указывало на прогрессирование заболевания и приобретенную устойчивость.

На Фигурах 50А–50В показано, что пациенты с высокими показателями pLST хорошо отвечают на терапию PARPi+AR. На Фигуре 50А показано, что при терапии первой линии пациентов с mCRPC, имеющих высокие показатели LST, 88% (15/17) пациентов отвечали на PARPi+AR-направленную терапию. На Фигуре 50В показано, что у 20 пациентов, для которых были получены как исходные, так и последующие (<18 недель), образцы крови, количество клеток с высоким показателем pLST сократилось от 635 клеток в исходных образцах до 33 (снижение 95%) в последующих образцах.

На Фигуре 51 показано, что пациенты с высокими показателями pLST отвечают на терапию PARPi+AR, и, с течением времени, популяции ЦОК с высокими показателями pLST уменьшаются в последующих образцах. Это указывает на то, что pLST можно использовать в качестве биомаркера для мониторинга ответа на лекарственное средство.

На Фигурах 52А–52В показано, что пациенты с mCRPC, имеющие высокий показатель pLST, отвечают на лечение средствами на основе платины. На Фигуре 52А представлены изображения клеток от одного пациента с mCRPC во время 10-й линии терапии, с 96% исходных ЦОК, имеющих высокий уровень pLST, и пациент отвечал на терапию карбоплатином (к 12 неделе изменение ПСА: -50,1%). На Фигуре 52В представлены изображения клеток от одного пациента с mCRPC во время 8-й линии терапии, с 4,3% исходных ЦОК, имеющих высокий уровень pLST, и пациент не отвечал на

терапию карбоплатином (к 12 неделе изменение ПСА: +2,1%).

На Фигуре 53 показано, что пациенты с высокими показателями pLST не отвечают на терапию таксанами, в анализе общей выживаемости. Группа с благоприятными результатами включала пациентов, имеющих <6 ЦОК с высоким показателем pLST, и группа с неблагоприятными результатами включала пациентов, имеющих ≥6 ЦОК с высоким показателем pLST.

На Фигуре 54А показана корреляция между pResist с клеточными морфологическими признаками и фенотипическими клеточными типами. На Фигуре 54В представлены иллюстративные клеточные изображения для клеток с высокими показателями, в сравнении с низкими показателями, pResist. Наиболее важные признаки, используемые в классификации, включают площадь ядра, площадь выпуклости ядра, ядерный спекл, большую ось ядра, площадь цитоплазмы, площадь выпуклости цитоплазмы, малую ось цитоплазмы, экспрессию AR, большую ось цитоплазмы. Клеточные типы К, С и М имеют более высокий показатель pResist, чем клетки остальных типов.

На Фигуре 55 показано, что многие из pResist клеток представляют собой СК– ЦОК, что указывает на их EMT происхождение.

На Фигурах 56А–56В представлены результаты лонгитюдного исследования, показывающие, что pResist клетки имеют тенденцию к увеличению количества у всех пациентов, получающих только ARS, или у пациентов, получающих PARPi+ARS.

На Фигурах 57А–57С показана продолжительность терапии (время на Tx) (Фигура 57А), выживаемость без определяемого радиографическими методами прогрессирования (rPFS) (Фигура 57В) и общая выживаемость (OS) (Фигура 57С) у пациентов, получавших лечение абиратероном (Abi) или энзалутамидом (Enza).

На Фигуры 58А–58С показана продолжительность терапии (время на Tx) (Фигура 58А), выживаемость без определяемого радиографическими методами прогрессирования (rPFS) (Фигура 58В) и общая выживаемость (OS) (Фигура 58С) у пациентов, получавших лечение абиратероном, при наличии или отсутствии клеточного типа К.

На Фигурах 59А–59С показана продолжительность терапии (время на Tx) (Фигура 59А), выживаемость без определяемого радиографическими методами прогрессирования (rPFS) (Фигура 59В) и общая выживаемость (OS) (Фигура 59С) у пациентов, получавших лечение энзалутамидом (Enza), при наличии или отсутствии клеточного типа К.

На Фигурах 60А–60С показана продолжительность терапии (время на Tx) (Фигура 60А), выживаемость без определяемого радиографическими методами прогрессирования (rPFS) (Фигура 60В) и общая выживаемость (OS) (Фигура 60С) у пациентов, имеющих клеточный тип К и получающих лечение абиратероном (Abi) или энзалутамидом (Enza).

На Фигурах 61А–61С показана продолжительность терапии (время на Tx) (Фигура 61 А), выживаемость без определяемого радиографическими методами прогрессирования (rPFS) (Фигура 61В) и общая выживаемость (OS) (Фигура 61С) у пациентов, не имеющих клеточный тип К и получающих лечение абиратероном (Abi) или энзалутамидом (Enza).

На Фигуре 62 показаны связанные с лечением риски смерти (общая выживаемость)

при лечении абиратероном (Abi) или энзалутамидом (Enza).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, частично, на том открытии, что комплексный анализ целого генома отдельных клеток на ВЧК обеспечивает получение воспроизводимых профилей числа копий для множества реплик и подтверждает наличие известных очаговых событий ВЧК, включая амплификацию AR и потерю PTEN. Настоящее изобретение также основано, частично, на том открытии, что анализ числа копий в целом геноме может быть использован для воспроизводимой характеристики геномной нестабильности путем измерения LST и PGA. Как раскрыто в настоящем документе, наибольшая геномная нестабильность обнаружена в мутантных по p53 линиях клеток (PC3 и VCaP), в сравнении с клетками дикого типа (LNCaP). Понимание изменения факторов, определяющих частоту субклональных ВЧК и геномную нестабильность в отдельных ЦОК, в сочетании с клеточным фенотипом, может дать более четкое представление о гетерогенном заболевании, потенциальном ответе на терапию, а также выявить новые механизмы устойчивости.

Настоящее изобретение также основано на идентификации редких подтипов ЦОК, которые, даже в том случае, когда они составляют лишь незначительную часть общей популяции ЦОК, позволяют прогнозировать менее продолжительную общую выживаемость и устойчивость к лекарственному средству. Как дополнительно описано ниже, способы по изобретению также основаны, частично, на неожиданной идентификации редкого подтипа ЦОК при помощи алгоритма искусственного интеллекта, который классифицирует ЦОК на основании 20 дискретных морфологических признаков и признаков белковой экспрессии, и данные клетки данного подтипа были обнаружены у подмножества пациентов. Пациенты, кровь которых содержала ЦОК такого типа, были постоянно невосприимчивы ко всем видам терапии, отмеченным в их медицинских картах, и имели менее продолжительную общую выживаемость. Как описано в настоящем документе, последующее секвенирование генома ЦОК этого подтипа показало, что клетки имели геномную сигнатуру, отличающуюся от сигнатуры других ЦОК, подтверждая, что геномные признаки ЦОК могут быть выведены путем визуального анализа.

Настоящее изобретение также основано на идентификации конкретных типов ЦОК и на корреляции присутствия или отсутствия конкретных типов ЦОК с терапевтической эффективностью применения определенных лекарственных средств. Как раскрыто в настоящем документе, клеточный тип ЦОК, называемый в настоящем документе клеточным типом К, был идентифицирован в качестве прогностического биомаркера, коррелирующего с эффективностью лечения абиратероном или энзалутамидом. Как раскрыто в настоящем документе, было установлено, что присутствие клеточного типа К у пациента коррелирует с более благоприятным ответом на абиратерон, в то же время отсутствие клеточного типа К у пациента коррелирует с более благоприятным ответом на энзалутамид. Присутствие или отсутствие клеточного типа К в образце ЦОК позволяет прогнозировать ответ пациента на лечение, и результат лечения, абиратероном или

энзалутамидом. Таким образом, способы по изобретению можно использовать для определения того, подходит ли для пациента в большей степени лечение абиратероном или энзалутамидом.

Возрастание внутриопухолевой гетерогенности коррелирует с характерной устойчивостью к терапии и неудовлетворительным результатом лечения. Показано, что ЦОК отражают гетерогенность заболевания и активную популяцию клеток метастатической опухоли у пациентов с метастазами. В настоящем документе приведен пример основанного на отдельных клетках анализа гетерогенности в ЦОК, и описано удивительное открытие, заключающееся в том, что гетерогенность является прогностическим биомаркером восприимчивости к лечению в моменты принятия решения в процессе терапии, позволяющим лучше планировать использование доступных методов лечения. Платформа анализа небогатых ЦОК, описанная в настоящем документе, является основой способов по изобретению за счет возможности исследования отдельных клеток и точного геномного профилирования гетерогенных популяций ЦОК. Для характеристики внутриопухолевой гетерогенности был проведен анализ числа копий на целом геноме отдельных клеток из циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с использованием платформы для анализа небогатых ЦОК.

Маркеры восприимчивости к терапии, такие как делеция PTEN или амплификация андрогенового рецептора (AR), для терапии ингибиторами PI3K или AR-направленной терапии, соответственно, были обнаружены в отдельных клетках рака предстательной железы, добавленных в кровь для имитации образцов от пациентов (пример 1). Помимо обнаружения требующих принятия мер очаговых изменений, была охарактеризована геномная нестабильность путем измерения масштабных переходов между состояниями (LST) и % измененного генома (PGA).

Как описано в настоящем документе, анализ на уровне отдельных клеток позволяет изучать различные формы гетерогенности. Фенотипическую или клеточную гетерогенность, когда определяют вариации в морфологии и генной экспрессии в отдельных опухолевых клетках, возникающих из одного клона, и может быть обнаружено переключение линии дифференцировки (пластичность), например, потеря экспрессии андрогенового рецептора (AR), и обнаружено слияние генов TMPRSS2:ERG. Для изучения генотипической гетерогенности обнаруживают отдельные области в опухоли с отличающимися профилями мутаций, возникающие из отдельной исходной стволовой лезии. Важным применением анализа ЦОК на уровне отдельных клеток является управление таргетированной терапией. Как описано в настоящем документе, путем секвенирования и сравнения множества отдельных клеток становится возможным создание филогенетического дерева и тепловой карты для выявления клональной субструктуры опухоли. Такие генетические деревья позволяют идентифицировать основополагающие мутации в «стволе» дерева, которые являются идеальными терапевтическими мишенями, поскольку они возникли на ранних этапах эволюции опухоли и были унаследованы всеми клетками в опухоли. Альтернативно, эти деревья можно использовать для разработки

комбинированной терапии, независимо направленной на несколько субпопуляций опухолевых клеток.

Генетическая пластичность является одной из адаптационных характеристик рака, при этом приобретение множественных признаков рака зависит от последовательности изменений в геномах неопластических клеток. Эта пластичность является результатом постоянного накопления дополнительных соматических мутаций, которые затем подвергаются положительной селекции. Эта высокая степень генетической изменчивости обеспечивает готовую основу для эволюционного процесса оптимизации, поскольку субклоны конкурируют за ресурсы и адаптируются к внешнему давлению, такому как противораковая терапия. Таким образом, прогрессирование рака является, в принципе, процессом диверсификации мутаций и клональной селекции, и опухоли состоят из гетерогенных субпопуляций клеток. Способы по изобретению позволяют проводить анализ на уровне отдельных клеток и создают возможность для идентификации субклональных популяций.

Способы, описанные в настоящем документе, позволяют характеризовать ЦОК в крови пациентов с метастатическим раком на основании морфологических и белковых признаков. Как описано в настоящем документе, эти признаки, определяемые методом флуоресцентной микроскопии с использованием сегментации клеток и алгоритмов извлечения признаков, могут становиться множеством биомаркеров, идентифицируемых в каждой клетке. Приведенные примеры показывают применение таких признаков для изучения >9000 ЦОК от 221 пациента с метастазами с целью проведения неконтролируемой кластеризации наборов признаков. Признаки были редуцированы на основании главных компонентов, а затем сгруппированы в уникальные многомерные подтипы. Кроме того, настоящее изобретение относится к подтипу ЦОК, который является биомаркером для прогнозируемой устойчивости к терапии и худших показателей выживаемости при использовании общепринятых терапевтических средств (абиратерон ацетата, энзалутамида, доцетаксела и кабазитаксела). Секвенирование генома отдельных клеток данного клеточного типа позволило идентифицировать клетки, имеющие повышенную геномную нестабильность, в сравнении с другими подтипами ЦОК, за счет измерения масштабных переходов между состояниями (LST) в геномах ЦОК. Клетки данного конкретного подтипа, учитывая повышенную геномную нестабильность, являются чувствительными к повреждающим ДНК лекарственным средствам, таким как химиотерапевтические средства на основе платины (то есть, карбоплатин, цисплатин), или таргетированные терапевтические средства, которые направлены на недостатки гомологичной рекомбинации, включая ингибиторы PARP, ингибиторы ДНК-ПК и терапевтические средства, направленные на путь ATM. Предыдущие подходы к поиску биомаркеров восприимчивости к лечению были сосредоточены на геномном секвенировании тканей от пациентов для обнаружения HRD, в то время как настоящие способы позволяют использовать алгоритмы цифровой патологии и избегать секвенирования.

Способы, описанные в настоящем документе, и сопроводительные примеры, показывают, что получение фенотипических и геномных характеристик отдельных ЦОК возможно, и может быть использовано для оценки гетерогенности опухоли у пациента. Высокая фенотипическая гетерогенность является основанием для отнесения пациентов к группе с повышенным риском смерти при использовании абиратерона и энзалутамида, но не химиотерапии таксанами, и указывает на большую в 40 раз вероятность геномной гетерогенности (множества клонов) у пациентов. Как описано в настоящем документе, кластеризация ЦОК выявила подтип ЦОК с устойчивостью как к ARS-направленной терапии, так и терапии таксанами, и повышенной геномной нестабильностью (большим количеством точечных разрывов LST). Настоящее изобретение относится к неинвазивной жидкой биопсии, которая позволяет изучать отдельные клетки от пациента с метастатическим раком и может быть использована для информированного выбора метода лечения.

Настоящее изобретение также основано, частично, на том открытии, что LST связаны с фенотипическими типами ЦОК. Как описано в настоящем документе, LST могут быть прогнозированы при помощи алгоритма регрессии с использованием фенотипических признаков ЦОК, включая отношение Я/Ц, округлость ядра и цитоплазмы, ядерную энтропию, экспрессию СК и экспрессию гормонального рецептора. В частности, наиболее важные признаки, используемые в классификации, включают площадь ядра, площадь выпуклости ядра, ядерный спекл, большую ось ядра, площадь цитоплазмы, площадь выпуклости цитоплазмы, малую ось цитоплазмы, экспрессию AR, большую ось цитоплазмы. В некоторых вариантах осуществления фенотипические признаки ЦОК используют для определения высокого, в сравнении с низким, показателя LST. Морфологические признаки и признаки белковой экспрессии в настоящем документе обобщенно называют «фенотипическими признаками».

Как описано в настоящем документе, высокие показатели LST у пациентов с mCRPC позволяют прогнозировать устойчивость к ARS-терапии (ингибиторами сигнализации AR, включая абиратерон и энзалутамид), в том числе, *de novo* устойчивость к ARS-терапии, а также приобретенную устойчивость в случае, когда изначально низкий показатель LST соответствовал ответу на ARS-терапию. Как описано в настоящем документе, ЦОК с высоким показателем LST не чувствительны к ARS-терапии. В частности, как описано в настоящем документе, пациенты с mCRPC, получавшие лечение ARS, все еще имеют ЦОК с высоким показателем LST при последующих анализах крови, полученных в момент времени, когда пациент отвечал на терапию.

Как дополнительно описано в настоящем документе, высокие показатели LST у пациентов с mCRPC позволяют прогнозировать ответ на PARPi+ARS терапию. В настоящем документе также описано, что высокие показатели LST у пациентов с mCRPC позволяют прогнозировать ответ на терапию средствами на основе платины, например, терапию карбоплатином.

Как раскрыто в настоящем документе, высокие показатели LST позволяют

прогнозировать восприимчивость к PARPi+ARS терапии, и ЦОК с высоким показателем LST могут быть использованы в качестве маркера ответа в способах по изобретению. Как описано в настоящем документе, пациенты с mCRPC, получавшие PARPi+ARS терапию, которые отвечали на лечение, не имели ЦОК с высоким показателем LST при последующих анализах крови. Как дополнительно описано в настоящем документе, ЦОК с высоким показателем LST являются показателями прогрессирования или рецидива заболевания. Как описано в настоящем документе, у пациентов с mCRPC, получавших PARPi+ARS терапию, в период прогрессирования заболевания анализируемые образцы крови содержали ЦОК с высоким показателем LST.

Настоящее изобретение относится к способу идентификации клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет определять клеточный тип, связанный с ответом пациента на абиратерон. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Изобретение относится к способу определения присутствия или отсутствия клеточного типа, при этом отсутствие клеточного типа связано с ответом на энзалутамид у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и

(iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК указывает на отсутствие клеточного типа, связанное с ответом пациента на энзалутамид. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Изобретение относится к способу идентификации пациента с раком для лечения лекарственным средством, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом присутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения абиратерона пациенту с раком, или при этом отсутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения энзалутамида пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения абиратерона пациенту с раком. В некоторых

вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения энзалутамида пациенту с раком.

Изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению абиратероном, включающему (а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению абиратероном. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению энзалутамидом, включающему (а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) количество ядрышек; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению энзалутамидом. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки. В некоторых

вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу идентификации клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) количества ядрышек и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; а также (d) идентификацию биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и частых ядрышек, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет определять клеточный тип, связанный с ответом пациента на абиратерон. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу определения присутствия или отсутствия клеточного типа, при этом отсутствие клеточного типа связано с ответом на энзалутамид у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из указанного образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) количества ядрышек; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров),

приведенных в Таблице 1; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и частых ядрышек, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК указывает на отсутствие клеточного типа, связанное с ответом пациента на энзалутамид. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента с раком для лечения лекарственным средством, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из указанного образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) количества ядрышек; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и частых ядрышек, при этом присутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения абиратерона пациенту с раком, или при этом отсутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения энзалутамида пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения абиратерона пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения энзалутамида пациенту с раком.

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению абиратероном, включающему: (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для

идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из указанного образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания геномного профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) количества ядрышек; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; а также (d) идентификацию биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и частых ядрышек, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению абиратероном. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению энзалутамидом, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из указанного образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) количества ядрышек; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и частых ядрышек, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению энзалутамидом. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу идентификации клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон у пациента с раком, включающему (a) проведение

прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет определять клеточный тип, связанный с ответом пациента на абиратерон. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Изобретение относится к способу определения присутствия или отсутствия клеточного типа, при этом отсутствие клеточного типа связано с ответом на энзалутамид у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК указывает на отсутствие клеточного типа, связанного с ответом пациента на энзалутамид. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой

гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Изобретение относится к способу идентификации пациента с раком для лечения лекарственным средством, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом присутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения абиратерона пациенту с раком, или при этом отсутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения энзалутамида пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения абиратерона пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения энзалутамида пациенту с раком.

Изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению абиратероном, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c)

классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению абиратероном. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению энзалутамидом, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают (i) размер ядра; (ii) ядерную энтропию; (iii) размер цитоплазмы; и (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1; (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению энзалутамидом. В некоторых вариантах осуществления клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации. В некоторых вариантах осуществления биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап выделения ЦОК из указанного образца. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу идентификации клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон у пациента с раком, включающему (a) проведение

прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) количества ядрышек; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; а также (d) идентификацию биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и большой цитоплазмы, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет определять клеточный тип, связанный с ответом пациента на абиратерон. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу определения присутствия или отсутствия клеточного типа, при этом отсутствие клеточного типа связано с ответом на энзалутамид у пациента с раком, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из указанного образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) размера цитоплазмы; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и частых ядрышек, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК указывает на отсутствие клеточного типа, связанное с ответом пациента на энзалутамид. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно-резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно-резистентным

раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента с раком для лечения лекарственным средством, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из указанного образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) размера цитоплазмы; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и большой цитоплазмы, при этом присутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения абиратерона пациенту с раком, или при этом отсутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения энзалутамида пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения абиратерона пациенту с раком. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап введения энзалутамида пациенту с раком.

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению абиратероном, включающему: (a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из указанного образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания геномного профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) размера цитоплазмы; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; а также (d) идентификацию биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и большой цитоплазмы, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к

лечению абиратероном. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению энзалутамидом, включающему (a) проведение прямого анализа, включающего иммуофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из указанного образца; (c) индивидуальное определение параметров с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают один или более параметров, выбранных из группы, состоящей из (i) сигнатур вариаций числа копий (ВЧК); (ii) количества точечных разрывов; (iii) размера ядра; (iv) ядерной энтропии; (v) размера цитоплазмы; и (vi) необязательно, одного или более других признаков (параметров), приведенных в Таблице 1; и (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК, имеющих характеристики частых ВЧК, большого количества точечных разрывов, большого ядра, высокой ядерной энтропии и большой цитоплазмы, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению энзалутамидом. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой гормонорезистентный, также называемый кастрационно–резистентным, рак предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы, также называемый метастатическим кастрационно–резистентным раком предстательной железы (mCRPC).

Как раскрыто в настоящем документе, обнаружено, что ЦОК клеточного типа К представляют собой прогностический биомаркер для эффективности лечения абиратероном или энзалутамидом. Как раскрыто в настоящем документе, 15 фенотипических клеточных типов могут быть определены путем измерения фенотипических параметров, с последующим использованием классификатора, который предсказывает 15 клеточных типов. Вероятность 15 клеточных типов определяется для каждой клетки, и конкретный клеточный тип (например, К), вероятность которого максимальна, присваивается клетке. Фенотипические параметры включают белковые биомаркеры и признаки цифровой патологии, приведенные в Таблице 1. Как раскрыто в настоящем документе, клеточный тип К может быть идентифицирован путем измерения фенотипических параметров и использования классификатора, разработанного на основе неконтролируемой классификации, который предсказывает клеточный тип К (смотри

Фигуру 10). Такие параметры включают общие признаки цифровой патологии, смотри Таблицу 1. В частности, клеточный тип К имеет характеристики частых ВЧК (смотри Фигуру 20А), большого количества точечных разрывов (смотри Фигуру 20В), большого ядра, высокой ядерной энтропии, большой цитоплазмы (смотри Фигуру 28) и/или частых ядрышек.

На Фигуре 28 представлены иллюстративные фенотипические параметры клеточного типа К (кластер 11). Например, клеточный тип К отличается большим ядром, которое, как показано на Фигуре 28, имеет площадь в диапазоне от 107 до 169 мкм² с пиком при 128 мкм², в сравнении с другими клеточными типами (диапазон 35–143 мкм², пик при 63 мкм²). Клеточный тип К также отличается высокой ядерной энтропией, которая, как показано на Фигуре 28, находится в диапазоне от 4,4 до 5,6, с пиком при 5, в сравнении с другими клеточными типами (диапазон 3,6–5,1, пик при 4,4). Клеточный тип К также отличается большей площадью цитоплазмы, которая, как показано на Фигуре 28, находится в диапазоне от 115 до 178 мкм², с пиком при 137 мкм², в сравнении с другими клеточными типами (диапазон 43–226 мкм², пик при 70 мкм²). Как раскрыто в настоящем документе и описано выше, клеточный тип К может быть идентифицирован путем измерения фенотипических параметров, таких как те, которые приведены в Таблице 1 (например, белковые биомаркерные признаки, такие как СК пропорция (белковая экспрессия) и AR пропорция (белковая экспрессия); признаки цифровой патологии, такие как площадь ядра (мкм²), площадь цитоплазмы (мкм²), площадь выпуклости ядра (мкм²), площадь выпуклости цитоплазмы (мкм²), большая ось ядра (мкм), большая ось цитоплазмы (мкм), малая ось ядра (мкм), малая ось цитоплазмы (мкм), округлость ядра, округлость цитоплазмы, плотность ядра, плотность цитоплазмы, ядерная энтропия, отношение площадей выпуклости ядра и цитоплазмы, ядрышки, СК спекл и ядерный спекл). Измеренные фенотипические параметры анализируют при помощи классификатора, который использует модели и/или алгоритмы, описанные в настоящем документе, для предсказания 15 клеточных типов. На основании классификации клеточных типов определяют, содержит или не содержит образец клеточный тип К.

В одном иллюстративном варианте осуществления способа анализа образца от пациента на присутствие или отсутствие клеточного типа К используют сценарий, согласно которому у одного пациента обнаружено 20 ЦОК. Сначала для этих 20 клеток измеряют фенотипические параметры, с последующим использованием классификатора для оценки вероятности отнесения каждой из этих 20 клеток к одному из 15 клеточных типов. После расчетов, каждая клетка будет иметь 15 вероятностей быть отнесенной к одному из 15 клеточных типов. Затем каждую клетку ранжируют в отношении 15 вероятностей для нее, и клетку относят к одному из клеточных типов, вероятность которого максимальна. Например, 10 клеток могут относиться к клеточному типу D, 5 клеток могут относиться к клеточному типу F, 3 клетки могут относиться к клеточному типу К и 2 клетки могут относиться к клеточному типу L (10+5+3+2=20). В данном случае пациент имеет 3 клетки клеточного типа К. Понятно, что такой сценарий является исключительно иллюстративным

и примером того, как вариант осуществления изобретения может быть использован для определения того, присутствует или отсутствует клеточный тип К в образце.

Как раскрыто в настоящем документе, присутствие клеточного типа К коррелирует с более благоприятным ответом пациента на абиратерон. Отсутствие клеточного типа К коррелирует с более благоприятным ответом пациента на энзалутамид. Таким образом, определение того, содержит ли образец от пациента с раком ЦОК клеточного типа К позволяет прогнозировать ответ на абиратерон или энзалутамид.

В настоящем документе описан способ определения показателя LST на основании фенотипического анализа циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) у пациента с раком, включающий (а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета ЦОК; (b) обнаружение наличия нескольких морфологических признаков и признаков белковой экспрессии для каждой из указанных ЦОК с целью идентификации подтипов ЦОК и (с) определение показателя LST для пациента с раком на основании частоты встречаемости одного или более подтипов ЦОК. В некоторых вариантах осуществления признаки выбирают из признаков, приведенных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления признаки включают ядерно–цитоплазматическое (Я/Ц) отношение, округлость ядра и цитоплазмы, ядерную энтропию, экспрессию СК и экспрессию гормонального рецептора, например, экспрессию AR. В некоторых вариантах осуществления признаки включают площадь ядра, площадь выпуклости ядра, ядерный спекл, большую ось ядра, площадь цитоплазмы, площадь выпуклости цитоплазмы, малую ось цитоплазмы, экспрессию AR, большую ось цитоплазмы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический гормонорезистентный рак предстательной железы (mCRPC), также называемый гормонорезистентным. В некоторых вариантах осуществления иммунофлуоресцентное окрашивание ядросодержащих клеток включает окрашивание на пан–цитокератин, кластер дифференцировки (CD) 45, а также диамино–2–фенилиндолом (DAPI).

В некоторых вариантах осуществления высокий показатель LST также позволяет прогнозировать устойчивость к ARS–терапии. В следующих вариантах осуществления высокий показатель LST позволяет прогнозировать ответ и/или восприимчивость к PARPi+ARS терапии. В дополнительных вариантах осуществления высокий показатель LST позволяет прогнозировать ответ на лечение средствами на основе платины. В некоторых вариантах осуществления высокий показатель LST, обнаруженный в последующем образце, позволяет прогнозировать прогрессирование заболевания, рецидив заболевания и/или приобретенную устойчивость. У пациентов, которые изначально отвечали на ARS–терапию, высокий показатель LST в последующем образце позволяет прогнозировать приобретенную устойчивость и прогрессирование заболевания. У пациентов, которые изначально отвечали на PARPi+ARS терапию, высокий показатель LST

в последующем образце позволяет прогнозировать рецидив и/или прогрессирование заболевания.

В настоящем документе описан способ определения фенотипической гетерогенности заболевания у пациента с раком, включающий (а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) обнаружение наличия нескольких морфологических признаков и признаков белковой экспрессии для каждой из указанных ЦОК с целью идентификации подтипов ЦОК и (с) определение фенотипической гетерогенности заболевания у пациента с раком на основании количества указанных подтипов ЦОК. В некоторых вариантах осуществления признаки выбраны из признаков, приведенных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления высокая фенотипическая гетерогенность указывает на то, что пациент невосприимчив к терапии, направленной на андрогеновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления высокая фенотипическая гетерогенность, среди ЦОК, не связана с устойчивостью к химиотерапии таксанами. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает обнаружение подтипа ЦОК, характеризующегося большим ядром, высокой ядерной энтропией и частыми ядрышками. В связанном варианте осуществления способ включает обнаружение преобладания подтипа ЦОК, характеризующегося большим ядром, высокой ядерной энтропией и частыми ядрышками, при этом указанное преобладание связано с неудовлетворительным результатом как терапии, направленной на андрогеновый рецептор, так химиотерапии таксанами.

В настоящем документе описан способ определения гетерогенности заболевания у пациента с раком, включающий (а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); (b) выделение ЦОК из образца; (с) индивидуальное определение геномных параметров с целью создания геномного профиля для каждой из ЦОК, и (с) определение гетерогенности заболевания у пациента с раком на основании данного профиля. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы является гормонорезистентным.

В некоторых вариантах осуществления иммунофлуоресцентное окрашивание ядросодержащих клеток включает окрашивание на пан-цитокератин, кластер дифференцировки (CD) 45, окрашивание диамино-2-фенилиндолом (DAPI) и окрашивание на гормональный рецептор, например, и без ограничения, андрогеновый рецептор (AR), эстрогеновый рецептор (ER), прогестероновый рецептор (PR) или рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2). Специалист в данной области понимает, что различные виды рака, включая рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия и рак молочной железы, имеет подтипы, связанные с экспрессией конкретного

гормонального рецептора, и можно выбирать гормональный рецептор, исходя из конкретного вида рака.

В некоторых вариантах осуществления иммунофлуоресцентное окрашивание ядросодержащих клеток включает окрашивание на пан-цитокератин, кластер дифференцировки (CD) 45, окрашивание диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) и окрашивание на андрогеновый рецептор (AR).

В некоторых вариантах осуществления геномные параметры включают сигнатуру вариаций числа копий (ВЧК). В некоторых вариантах осуществления сигнатуры ВЧК включают амплификации или делеции генов. В некоторых вариантах осуществления амплификации генов включают амплификацию гена AR. В некоторых вариантах осуществления делеции включают потерю гена гомолога фосфатазы и тензина (PTEN). В некоторых вариантах осуществления сигнатуры ВЧК включают гены, связанные с независимым от андрогенов ростом клеток.

В некоторых вариантах осуществления геномные параметры включают геномную нестабильность. В некоторых вариантах осуществления геномную нестабильность характеризуют путем измерения масштабных переходов между состояниями (LST). В некоторых вариантах осуществления геномную нестабильность характеризуют путем измерения процентной доли измененного генома (PGA).

В некоторых вариантах осуществления определение гетерогенности заболевания у пациента с раком на основании данного профиля позволяет идентифицировать новые механизмы заболевания.

В некоторых вариантах осуществления определение гетерогенности заболевания у пациента с раком на основании данного профиля позволяет прогнозировать положительный ответ на лечение.

В некоторых вариантах осуществления определение гетерогенности заболевания у пациента с раком на основании данного профиля позволяет прогнозировать устойчивость к лечению.

В некоторых вариантах осуществления высокая гетерогенность позволяет идентифицировать пациента, невосприимчивого к терапии, направленной на андрогеновый рецептор.

В некоторых вариантах осуществления высокая степень разнообразия ЦОК не связана с устойчивостью к химиотерапии таксанами.

Следует отметить, что, при использовании в настоящей спецификации и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа терминов включает и соответствующую форму множественного числа, если из контекста явно не следует иначе. Таким образом, например, ссылка на «биомаркер» включает смесь из двух или более биомаркеров, и тому подобное.

Термин «примерно», в частности, при упоминании конкретного количества, должен охватывать отклонения плюс или минус пять процентов от величины.

При использовании в настоящей заявке, включая прилагаемую формулу

изобретения, форма единственного числа терминов включает и соответствующую форму множественного числа, если из контекста явно не следует иначе, и используется взаимозаменяемо с выражениями «по меньшей мере один» и «один или более».

Используемые в настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «заклучает в себе», «заклучающий в себе», и любые их вариации, предназначены для описания неисключительного включения, например, процесс, способ, изделие, характеризуемое способом его получения, или композиция, который(ое, ая) содержит, включает или заклучает в себе элемент или перечень элементов, включает не только эти элементы, но может включать и другие элементы, специально не указанные или неотъемлемые для такого процесса, способа, изделия, характеризуемого способом его получения, или композиции.

В настоящем документе термин «получение», используемый в контексте жидкого биопсийного образца, должен охватывать любой, и все, из способов получения образца. Термин охватывает все прямые и непрямые способы, приводящие к наличию образца, в контексте осуществления на практике заявляемых способов.

Используемый в настоящем документе термин «пациент» предпочтительно относится к человеку, но также охватывает и других млекопитающих. Следует отметить, что в настоящем документе термины «организм», «индивидуум», «субъект» или «пациент» используют в качестве синонимов и взаимозаменяемо.

Используемый в контексте композиций и способов, описанных в настоящем документе, термин «рак» означает или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. В одном варианте осуществления рак представляет собой эпителиальный рак. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В различных вариантах осуществления способов и композиций, описанных в настоящем документе, рак может включать, без ограничения, рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак головного мозга, рак пищевода, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак яичника, меланому и рак с множественной лекарственной устойчивостью, или их подтипы и стадии. В альтернативном варианте осуществления рак представляет собой «раннюю стадию» рака. В другом варианте осуществления рак представляет собой «позднюю стадию» рака. Используемый в настоящем документе термин «опухоль» относится к росту и пролиферации всех неопластических клеток, как злокачественных, так и доброкачественных, а также ко всем предраковым и злокачественным клеткам и тканям. Рак может представлять собой лимфопролиферативный рак, например, лимфобластный лейкоз/лимфобластную лимфому из предшественников В-клеток, В-клеточные неходжкинские лимфомы фолликулярного происхождения, лимфому Ходжкина, лимфобластный лейкоз/лимфобластную лимфому из предшественников Т-клеток, новообразование из незрелых Т-клеток, новообразование из периферических, пост-тимусных Т-клеток, Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, периферическую Т-

клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому неустановленной этиологии, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому из клеток мантийной зоны, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, волосатоклеточный лейкоз, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфоплазматическую лимфому, лимфобластный лейкоз/лимфобластную лимфому из предшественников Т-клеток, Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, ангиоиммунобластную лимфому или нодулярную лимфому Ходжкина с лимфоидным преобладанием.

Используемый в настоящем документе термин «циркулирующая опухолевая клетка», или «ЦОК», должен охватывать любую редкую клетку, которая присутствует в биологическом образце, и которая связана с раком. ЦОК, которые могут присутствовать в виде отдельных клеток или в виде кластеров ЦОК, часто представляют собой эпителиальные клетки, отделившиеся от солидных опухолей, которые присутствуют в очень низких концентрациях в системе кровообращения пациентов.

Используемый в настоящем документе термин «классическая ЦОК» означает отдельную ЦОК, которая является цитокератин-положительной, CD45-отрицательной, содержит окрашиваемое DAPI ядро и морфологически отличается от окружающих белых клеток крови.

Используемый в настоящем документе термин «неклассическая ЦОК» означает ЦОК, которая отличается от классической ЦОК по меньшей мере одной характеристикой.

В самом широком смысле, биологический образец может представлять собой любой образец, который содержит ЦОК. Образец может представлять собой жидкость организма, такую как кровь; растворимую фракцию клеточного препарата или аликвоту среду, в которой росли клетки; хромосому, органеллу или мембрану, выделенную или экстрагированную из клетки; геномную ДНК, РНК или кДНК в растворе или связанную с субстратом; клетку; ткань; созданную путем печати ткань; отпечаток пальца; клетки; кожу и тому подобное. Биологический образец, полученный от субъекта, может представлять собой любой образец, который содержит клетки, и включает любой материал, в котором могут быть обнаружены ЦОК. Образец может представлять собой, например, цельную кровь, плазму, слюну или другую жидкость или ткань организма, содержащую клетки.

В конкретных вариантах осуществления биологический образец представляет собой образец крови. Как описано в настоящем документе, образец может представлять собой цельную кровь, более предпочтительно, периферическую кровь или клеточную фракцию периферической крови. Как понимают специалисты в данной области, образец крови может включать любую фракцию или компонент крови, без ограничения, Т-клетки, моноциты, нейтрофилы, эритроциты, тромбоциты и микровезикулы, такие как экзосомы и экзосома-подобные везикулы. В контексте настоящего изобретения клетки крови, заключенные в образце крови, включают любые ядросодержащие клетки и не ограничены компонентами цельной крови. Вследствие этого, клетки крови включают, например, как белые клетки крови (БКК), так и редкие клетки, включая ЦОК.

Каждый из образцов по настоящему изобретению может содержать множество клеточных популяций и клеточных субпопуляций, которые можно отличать способами, хорошо известными в данной области (например, FACS, иммуногистохимическими методами). Например, образец крови может содержать популяции безъядерных клеток, таких как эритроциты (например, 4–5 миллионов/мкл) или тромбоциты (150000–400000 клеток/мкл), и популяции ядросодержащих клеток, таких как БКК (например, 4500–10000 клеток/мкл), РЭК или ЦОК (циркулирующие опухолевые клетки; например, 2–800 клеток/мкл). БКК могут включать клеточные субпопуляции, такие как, например, нейтрофилы (2500–8000 клеток/мкл), лимфоциты (1000–4000 клеток/мкл), моноциты (100–700 клеток/мкл), эозинофилы (50–500 клеток/мкл), базофилы (25–100 клеток/мкл), и тому подобное. Образцы по настоящему изобретению представляют собой необогащенные образцы, то есть, они не обогащены по какой-либо конкретной популяции или субпопуляции ядросодержащих клеток. Например, необогащенные образцы крови не обогащены по ЦОК, БКК, В-клеткам, Т-клеткам, НК-клеткам, моноцитам, или тому подобному.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови, полученный от здорового субъекта или субъекта, предположительно имеющего высокий риск развития рака, метастазирования имеющегося рака, на основании известных в данной области клинических критериев, включая, например, возраст, расовую принадлежность и семейный анамнез. В некоторых вариантах осуществления образец крови получен от субъекта, у которого диагностирован рак на основании тканевой или жидкой биопсии, и/или на основании хирургических или клинических показателей. В некоторых вариантах осуществления образец крови получен от субъекта, имеющего клинические проявления рака, хорошо известные в данной области, или имеющего любой из известных факторов риска для конкретного вида рака. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, например, уротелиальный рак мочевого пузыря.

При использовании в настоящем документе в контексте получения данных по ЦОК, термин «прямой анализ» означает, что ЦОК обнаруживают в контексте всех окружающих ядросодержащих клеток, присутствующих в образце, а не после обогащения образца по ЦОК перед обнаружением. В некоторых вариантах осуществления способы включают микроскопию, обеспечивающую поле зрения, которое включает как ЦОК, так и по меньшей мере 200 окружающих белых клеток крови (БКК).

Фундаментальным аспектом настоящего изобретения является беспрецедентная надежность раскрытых способов в отношении обнаружения ЦОК. Обнаружение редких событий, раскрытое в настоящем документе применительно к ЦОК, основано на прямом анализе, то есть анализе необогащенной популяции, который включает идентификацию редких событий в контексте окружающих нередких событий. Идентификация редких событий в соответствии с раскрытыми способами по своей сути означает идентификацию окружающих событий как нередких событий. С учетом окружающих нередких событий, и путем определения средних значений для нередких событий, например, среднего

клеточного размера нередких событий, становится возможной калибровка способа обнаружения за счет удаления «шума». Результатом является надежность раскрытых способов, которая не может быть достигнута способами, не основанными на прямом анализе, но, вместо этого, основанными на сравнении обогащенных популяций с изначально искаженными контекстуальными сравнениями редких событий. Надежность способов прямого анализа, раскрытых в настоящем документе, позволяет характеризовать ЦОК, включая подтипы ЦОК, описанные в настоящем документе, что делает возможной идентификацию фенотипов и гетерогенности, которую невозможно осуществлять при использовании других способов обнаружения ЦОК, и что делает возможным анализ биомаркеров в контексте заявленных способов.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, могут дополнительно включать оценку для пациентов индивидуальных факторов риска и данных визуализации, которая включает любую форму визуализации, известную и используемую в данной области, например, и без ограничения, рентгеновскую компьютерную томографию (КТ), ультразвуковое обследование, позитронную эмиссионную томографию (ПЭТ), электроимпедансную томографию и магнитно-резонансную томографию (МРТ). Понятно, что специалист в данной области может выбирать любой способ визуализации на основании различных известных в данной области критериев. Как описано в настоящем документе, способы по изобретению могут включать оценку одного или более фрагментов данных визуализации. В способах, раскрытых в настоящем документе, один или более индивидуальных факторов риска могут быть выбраны из группы, состоящей из возраста, расовой принадлежности, семейного анамнеза. Понятно, что специалист в данной области может выбирать дополнительные индивидуальные факторы риска на основании различных известных в данной области критериев. Как описано в настоящем документе, способы по изобретению могут включать оценку одного или более индивидуальных факторов риска. Соответственно, биомаркеры могут включать данные визуализации, индивидуальные факторы риска и данные по ЦОК. Как описано в настоящем документе, биомаркеры также могут включать, но без ограничения, биологические молекулы, включающие нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, нуклеозиды, аминокислоты, сахара, жирные кислоты, стероиды, метаболиты, пептиды, полипептиды, белки, углеводы, липиды, гормоны, антитела, интересующие области, служащие в качестве суррогатов для биологических макромолекул, и их сочетания (например, гликопротеины, рибонуклеопротеины, липопротеины), а также части или фрагменты биологических молекул.

Данные по ЦОК могут включать морфологические, генетические, эпигенетические признаки и иммунофлуоресцентные признаки. Как понимают специалисты в данной области, биомаркеры могут включать биологические молекулы, или фрагменты биологических молекул, изменение и/или обнаружение которых может коррелировать, отдельно или в сочетании с другими поддающимися измерению признаками, с раком. ЦОК, которые могут присутствовать в виде отдельных клеток или в виде кластеров ЦОК, часто

представляют собой эпителиальные клетки, отделившиеся от солидных опухолей и присутствующие в очень низких концентрациях в системе кровообращения субъектов. Соответственно, обнаружение ЦОК в образце крови можно считать обнаружением редкого события. ЦОК имеют численность менее 1:1000 в популяции клеток крови, например, численность менее 1:5000, 1:10000, 1:30000, 1:50000, 1:100000, 1:300000, 1:500000 или 1:1000000. В некоторых вариантах осуществления ЦОК имеют численность от 1:50000 до 1:100000 в популяции клеток.

Образцы по настоящему изобретению могут быть получены любыми способами, в том числе, например, путем биопсии твердой ткани или путем жидкой биопсии (смотри, например, *Marrinucci D. et al.*, 2012, *Phys. Biol.* 9 016003). Вкратце, в конкретных вариантах осуществления способ может включать лизис и удаление эритроцитов в 7,5-мл образце крови, нанесение оставшихся ядродержащих клеток на специализированные предметные стекла микроскопа, каждое из которых вмещает примерно 0,5 мл цельной крови. Образец крови может быть извлечен из источника, который, как известно, содержит клетки крови или их компоненты, такого как венозная, артериальная, периферическая кровь, ткань, пуповинная кровь и тому подобное. Образцы могут быть обработаны с использованием хорошо известных и рутинных клинических методов (например, методов забора и обработки цельной крови). В некоторых вариантах осуществления образец крови отбирают в покрытые антикоагулянтом пробирки для сбора крови (ВСТ), которые могут содержать ЭДТА или Streck Cell-Free DNA™. В других вариантах осуществления образец крови отбирают в пробирки CellSave® (Veridex). Образец крови затем можно хранить в течение вплоть до 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов или 60 часов до дальнейшей обработки.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают начальный этап определения количества белых клеток крови (БКК) в образце крови. В конкретных вариантах осуществления количество БКК можно определять с использованием устройства NemoCue® для определения БКК (Nemocue, Angelholm, Sweden). В некоторых вариантах осуществления количество БКК используют для определения количества крови, необходимого для нанесения соответствующего нагрузочного объема ядродержащих клеток на каждое предметное стекло, а также для обратного расчета эквивалента ЦОК на объем крови.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают начальный этап лизиса эритроцитов в образце крови. В некоторых вариантах осуществления эритроциты лизируют, например, путем добавления раствора хлорида аммония к образцу крови. В конкретных вариантах осуществления образец крови подвергают центрифугированию после лизиса эритроцитов, и ядродержащие клетки ресуспендируют, например, в растворе PBS.

В некоторых вариантах осуществления ядродержащие клетки из образца, такого как образец крови, наносят в виде монослоя на плоскую подложку. Плоская подложка может быть изготовлена из любого материала, например, любого прозрачного для флуоресцентного излучения материала, любого материала, способствующего

прикреплению клеток, любого материала, способствующего легкому удалению клеточного детрита, любого материала, имеющего толщину <100 мкм. В некоторых вариантах осуществления материал представляет собой пленку. В некоторых вариантах осуществления материал представляет собой предметное стекло. В конкретных вариантах осуществления способ включает начальный этап нанесения ядродержащих клеток из образца крови в виде монослоя на предметное стекло. Предметное стекло может иметь покрытие для максимального удержания живых клеток (смотри, например, *Marrinucci D. et al.*, 2012, *Phys. Biol.* 9 016003). В некоторых вариантах осуществления примерно 0,5 миллиона, 1 миллион, 1,5 миллиона, 2 миллиона, 2,5 миллиона, 3 миллиона, 3,5 миллиона, 4 миллиона, 4,5 миллиона или 5 миллионов ядродержащих клеток наносят на предметное стекло. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают нанесение примерно 3 миллионов клеток на предметное стекло. В дополнительных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают нанесение от примерно 2 миллионов до примерно 3 миллионов клеток на предметное стекло. В некоторых вариантах осуществления предметное стекло и иммобилизованные клеточные образцы могут быть дополнительно обработаны или использованы в дальнейших экспериментах после завершения применения способов по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают начальный этап идентификации ядродержащих клеток в необогащенном образце крови. В некоторых вариантах осуществления ядродержащие клетки идентифицируют путем окрашивания флуоресцентным красителем. В конкретных вариантах осуществления флуоресцентный краситель включает специфический краситель для нуклеиновых кислот. В конкретных вариантах осуществления флуоресцентный краситель представляет собой диамидино-2-фенилиндол (DAPI). В некоторых вариантах осуществления иммунофлуоресцентное окрашивание ядродержащих клеток включает окрашивание на пан-цитокератин (СК), кластер дифференцировки (CD) 45, а также окрашивание DAPI. В некоторых вариантах осуществления, также описанных в настоящем документе, ЦОК имеют флуоресцентное окрашивание, отличающееся от окружающих ядродержащих клеток. В некоторых вариантах осуществления отличающееся иммунофлуоресцентное окрашивание ЦОК представляет собой DAPI (+), СК (+) и CD45 (-) окрашивание. В некоторых вариантах осуществления идентификация ЦОК дополнительно включает сравнение интенсивности флуоресцентного окрашивания на пан-цитокератин с окрашиванием окружающих ядродержащих клеток. В некоторых вариантах осуществления данные для ЦОК получают методом флуоресцентной сканирующей микроскопии для обнаружения иммунофлуоресцентного окрашивания ядродержащих клеток в образце крови. *Marrinucci D. et al.*, 2012, *Phys. Biol.* 9 016003).

В конкретных вариантах осуществления все ядродержащие клетки сохраняют и иммунофлуоресцентно окрашивают моноклональными антителами, направленными на цитокератин (СК), промежуточный филамент, обнаруживаемый исключительно в

эпителиальных клетках; антителом, специфическим для всех лейкоцитов, которое направлено на общий лейкоцитарный антиген CD45; и ядерным красителем, DAPI. Ядродержащие клетки крови можно визуализировать в нескольких флуоресцентных каналах, получая высококачественные и с высоким разрешением цифровые изображения, которые сохраняют мелкие цитологические детали ядерного контура и распределения цитоплазмы. При том, что окружающие БКК можно идентифицировать при помощи специфического для всех лейкоцитов антитела, направленного на CD45, ЦОК можно идентифицировать как DAPI (+), СК (+) и CD45 (-) клетки. В способах, описанных в настоящем документе, ЦОК имеют иммунофлуоресцентное окрашивание, отличающееся от окрашивания окружающих ядродержащих клеток.

В следующих вариантах осуществления данные по ЦОК включают классические ЦОК, также известные как ЦОК высокой четкости (ВЧ-ЦОК). Классические ЦОК являются СК-положительными, CD45-отрицательными, содержат интактное DAPI-положительное ядро без опознаваемых апоптических изменений или нарушенного внешнего вида и морфологически отличаются от окружающих белых клеток крови (БКК). Интенсивности окрашивания DAPI (+), СК (+) и CD45 (-) могут быть классифицированы как измеримые признаки при количественном определении ВЧ-ЦОК, описанных ранее. Nieva *et al.*, *Phys Biol* 9:016004 (2012). Прямой анализ без обогащения, используемый в способах, раскрытых в настоящем документе, имеет высокую чувствительность и высокую специфичность, обеспечивая высокое разрешение цитоморфологии, что позволяет проводить подробную морфологическую характеристику популяции ЦОК, которая, как известно, является гетерогенной.

В то время как ЦОК могут быть идентифицированы как DAPI (+), СК (+) и CD45 (-) клетки, способы по изобретению могут быть использованы с любыми другими биомаркерами, которые специалист в данной области выбирает для получения данных по ЦОК и/или для идентификации ЦОК и кластеров ЦОК. Специалистам в данной области известно, как выбирать морфологический признак, биологическую молекулу или фрагмент биологической молекулы, изменение и/или обнаружение которых может коррелировать с ЦОК. Молекулярные биомаркеры включают, но без ограничения, биологические молекулы, включающие нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, нуклеозиды, аминокислоты, сахара, жирные кислоты, стероиды, метаболиты, пептиды, полипептиды, белки, углеводы, липиды, гормоны, антитела, интересующие области, служащие в качестве суррогатов для биологических макромолекул, а также их сочетания (например, гликопротеины, рибонуклеопротеины, липопротеины). Термин также охватывает части или фрагменты биологических молекул, например, пептидный фрагмент белка или полипептида.

Специалист в данной области понимает, что целый ряд способов можно использовать для получения данных по ЦОК, включая подходы на основе микроскопии, в том числе, флуоресцентную сканирующую микроскопию (смотри, например, Maggincsi D. *et al.*, 2012, *Phys. Biol.* 9 016003), подходы на основе секвенирования, подходы на основе масс-спектрометрии, например, МС/МС, ЖХ-МС/МС, мониторинг множественных

реакций (ММР) или МОР и мониторинг дочерних ионов (МДИ), и также включая методы на основе антител, например, иммунофлуоресцентные методы, иммуногистохимические методы, иммуноанализы, такие как вестерн-блоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация, радиоиммунный анализ, дот-блоттинг и FACS. Методики и протоколы иммуноанализов, как правило, известны специалистам в данной области (Price and Newman, *Principles and Practice of Immunoassay*, 2-е издание, Grove's Dictionaries, 1997; и Gosling, *Immunoassays: A Practical Approach*, Oxford University Press, 2000). Можно использовать различные методы иммуноанализа, включая конкурентные и неконкурентные иммуноанализы (Self *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7:60–65 (1996), смотри также John R. Crowther, *The ELISA Guidebook*, 1-е издание., Humana Press 2000, ISBN 0896037282, а также An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, автора Chard T, ed., Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198).

Стандартные методы молекулярной биологии, известные в данной области и не описанные конкретно, как правило, используют в соответствии с публикацией Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), и в соответствии с публикацией Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), а также Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, New York (1988) и Watson *et al.*, *Recombinant DNA*, Scientific American Books, New York, и Birren *et al.* (eds) *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*, Vols. 1–4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) можно выполнять, в целом, как описано в *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Любой метод, позволяющий определять профиль числа копий ДНК в конкретном образце, можно использовать для молекулярного профилирования в соответствии с изобретением, при условии, что разрешение является достаточным для идентификации биомаркеров по изобретению. Квалифицированный специалист знает и может использовать целый ряд разных платформ для оценки изменений числа копий в целом геноме с разрешением, достаточным для определения числа копий одного или более биомаркеров по изобретению.

In situ анализы гибридизации хорошо известны и, в целом, описаны в Angerer *et al.*, *Methods Enzymol.* 152:649–660 (1987). В *in situ* анализе гибридизации клетки, например, из биопсийного образца, фиксируют на твердой подложке, как правило, предметном стекле. Если предстоит исследование ДНК, клетки денатурируют путем нагревания или обработки щелочью. Затем клетки приводят в контакт с раствором для гибридизации при умеренной температуре, допускающей отжиг специфических меченых зондов. Зонды, предпочтительно, мечены радиоизотопами или флуоресцентными репортерами. В методе FISH (флуоресцентной *in situ* гибридизации) используют флуоресцентные зонды, которые связывают только те части последовательности, с которыми они имеют высокую степень сходства последовательностей.

FISH представляет собой цитогенетический метод, используемый для обнаружения и локализации конкретных полинуклеотидных последовательностей в клетках. Например,

FISH можно использовать для обнаружения последовательностей ДНК на хромосомах. FISH также можно использовать для обнаружения и локализации конкретных РНК, например, мРНК, в образцах ткани. В методе FISH используют флуоресцентные зонды, которые связываются с конкретными нуклеотидными последовательностями, с которыми они имеют высокую степень сходства последовательностей. Флуоресцентную микроскопию можно использовать для определения того, связались ли, и где связались, флуоресцентные зонды. Помимо обнаружения конкретных нуклеотидных последовательностей, например, транслокаций, слияний, разрывов, дупликаций и других хромосомных аномалий, FISH можно использовать для определения пространственно-временных паттернов числа копий конкретных генов и/или экспрессии генов в клетках и тканях.

Технологии секвенирования нуклеиновых кислот являются подходящими методами для анализа генной экспрессии. Лежащий в основе данных методов принцип заключается в том, что число раз, когда последовательность кДНК обнаруживают в образце, напрямую связано с относительной экспрессией РНК, соответствующей этой последовательности. Эти методы иногда называют термином «цифровая генная экспрессия (DGE)», чтобы подчеркнуть дискретный цифровой характер полученных данных. Ранее используемыми методами, в которых применялся данный принцип, были серийный анализ генной экспрессии (SAGE) и массивно-параллельное опознавательное секвенирование (MPSS). Смотри, например, S. Brenner, *et al.*, *Nature Biotechnology* 18(6):630–634 (2000). Совсем недавно появление технологий секвенирования «следующего поколения» сделало метод DGE более простым, более высокопроизводительным и более доступным. В результате, в большем количестве лабораторий может быть использован метод DGE для скрининга экспрессии большего количества генов в большем количестве индивидуальных образцов пациентов, чем было возможно раньше. Смотри, например, J. Marioni, *Genome Research* 18(9):1509–1517 (2008); R. Morin, *Genome Research* 18(4):610–621 (2008); A. Mortazavi, *Nature Methods* 5(7):621–628 (2008); N. Cloonan, *Nature Methods* 5(7):613–619 (2008).

Специалист в данной области также понимает, что присутствие или отсутствие биомаркеров можно определять с использованием любого класса специфических для маркера связывающих реагентов, известных в данной области, включая, например, антитела, аптамеры, слитые белки, например, слитые белки, включающие компоненты белкового рецептора или белкового лиганда, или специфические для биомаркера низкомолекулярные связывающие вещества. В некоторых вариантах осуществления присутствие или отсутствие СК или CD45 определяют при помощи антитела. Квалифицированный специалист также понимает, что присутствие или отсутствие биомаркеров можно определять путем оценки изменений хромосомного числа копий в хромосомном локусе биомаркера. Геномные биомаркеры могут быть идентифицированы любым методом, таким как, например, сравнительная геномная гибридизация (CGH), или при помощи матриц для определения однонуклеотидных полиморфизмов (микрочипов для генотипирования) в линейных клетках, таких как раковые клетки. Биоинформационный

подход позволяет идентифицировать области хромосомных aberrаций, которые отличаются у групп линий клеток и которые являются биомаркерным показателем, с использованием соответствующих порогов числа копий для амплификаций и делеций, помимо дополнительного анализа с использованием таких методов, как кПЦР или *in situ* гибридизация. Методы анализа нуклеиновых кислот для обнаружения изменений числа копий хромосомной ДНК включают: (i) *in situ* анализы гибридизации с интактными тканевыми или клеточными образцами, (ii) анализы гибридизации на микрочипах с хромосомной ДНК, экстрагированной из образца ткани, и (iii) полимеразную цепную реакцию (ПЦР) или другие анализы амплификации с хромосомной ДНК, экстрагированной из образца ткани. Также можно использовать анализы с синтетическими аналогами нуклеиновых кислот, например, пептидо–нуклеиновыми кислотами, в любом из этих форматов.

Биомаркер можно обнаруживать при помощи анализов гибридизации с использованием меченых детектируемой меткой нуклеотидных зондов, таких как зонды на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или зонды на основе белково–нуклеиновой кислоты (БНК), или немеченых праймеров, которые проектируют/выбирают для гибридизации с конкретной запланированной хромосомной мишенью. Немеченые праймеры используют в анализах амплификации, например для полимеразной цепной реакции (ПЦР), в которой после связывания праймера полимеразы амплифицирует целевую последовательность нуклеиновой кислоты для последующего обнаружения. Детектируемые зонды, используемые в ПЦР или других анализах амплификации, предпочтительно, являются флуоресцентными, и еще более предпочтительно, детектируемыми зондами, которые могут быть использованы для «ПЦР в реальном времени». Флуоресцентные метки также являются предпочтительными для использования в *in situ* гибридизации, однако можно использовать и другие детектируемые метки, обычно используемые в методах гибридизации, например, ферментные, хромогенные и изотопные метки. Полезные методики мечения зондов описаны в сборнике *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*, Y.–S. Fan, Ed., Chap. 2, «Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets», L. Morrison *et al.*, p. 21–40, Humana Press, COPYRIGHT. 2002, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. При обнаружении геномных биомаркеров в анализе на микрочипах эти методики мечения зондов используют для мечения экстрагированной хромосомной ДНК из образца пациента, которую затем гибридизуют с микрочипом.

В других вариантах осуществления биомаркерный белок можно обнаруживать иммунологическими методами или в других анализах белков. Методы анализа белков, которые могут быть использованы по изобретению для измерения уровней биомаркеров, могут включать (i) методы иммуноанализа, включающие связывание меченого антитела или белка с экспрессированным биомаркером, (ii) методы масс–спектрометрии для определения экспрессированного биомаркера и (iii) протеомные анализы или анализы с использованием «белковых чипов» для экспрессированного биомаркера. Полезные методы

иммуноанализа включают как анализы в растворе, проводимые с использованием любого формата, известного в данной области, такого как, но без ограничения, формат ELISA, «сэндвич»-формат, формат конкурентного ингибирования (включая как прямой, так и обратный, анализы конкурентного ингибирования) или формат поляризации флуоресценции, так и анализы в твердой фазе, такие как иммуногистохимический анализ (называемый «ИГХ»).

Антитела по настоящему изобретению специфически связывают биомаркер. Антитело может быть получено любыми подходящими методами, известными в данной области. Смотри, например, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2-е издание, 1986). Антитело может представлять собой любой иммуноглобулин, или его производное, либо природное, либо полностью или частично полученное путем синтеза. Все производные антител, сохраняющие способность к специфическому связыванию, также охвачены данным термином. Антитело имеет связывающий домен, который гомологичен, или в значительной степени гомологичен, связывающему домену иммуноглобулина и может быть получен из природных источников, либо полностью или частично получен путем синтеза. Антитело может представлять собой моноклональное или поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечное антитело. Специалисты в данной области понимают, что антитело может быть предоставлено в любой из множества форм, например, представлять собой гуманизированное, частично гуманизированное, химерное, химерное гуманизированное, и так далее, антитело. Антитело может представлять собой фрагмент антитела, включая, но без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, диатело и Fd-фрагменты. Антитело может быть получено любым способом. Например, антитело может быть получено ферментативным или химическим путем за счет фрагментации интактного антитела, и/или может быть рекомбинантно продуцировано с гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Антитело может представлять собой одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно или дополнительно, антитело может представлять собой несколько цепей, связанных между собой, например, дисульфидными связями, а также любые функциональные фрагменты, полученные из таких молекул, при этом такие фрагменты сохраняют свойства специфического связывания родительской молекулы антитела. Вследствие небольшого размера функциональных компонентов целой молекулы, фрагменты антитела могут иметь преимущества перед интактными антителами при использовании в определенных иммунохимических методах и экспериментальных вариантах применения.

Детектируемую метку можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, для прямого или непрямого обнаружения биомаркеров при получении данных по ЦОК в способах по изобретению. Можно использовать самые разные детектируемые метки, при этом выбор метки зависит от необходимой чувствительности, легкости конъюгации с антителом, требований стабильности, а также имеющихся инструментов и

условий утилизации. Специалисты в данной области могут выбирать подходящую детектируемую метку в зависимости от анализа обнаружения биомаркеров в способах по изобретению. Подходящие детектируемые метки включают, но без ограничения, флуоресцентные красители (например, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат (FITC), орегонский зеленый™, родамин, тexasский красный, тетрародамин изотиоцианат (TRITC), Cy3, Cy5, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 488), флуоресцентные маркеры (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), фикоэритрин и так далее), ферменты (например, люциферазу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и так далее), наночастицы, биотин, дигоксигенин, металлы и тому подобное.

Для анализов на основе масс-спектрометрии, дифференциальное мечение изотопными реагентами, например, изотоп-кодированные аффинные метки (ICAT) или более современный вариант, в котором используют изобарическое мечение реагентов, iTRAQ (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), с последующей многомерной жидкостной хроматографией (ЖХ) и tandemным масс-спектрометрическим (МС/МС) анализом, могут представлять собой дополнительную методологию при осуществлении на практике способов по настоящему изобретению.

Хемилюминесцентный анализ с хемилюминесцентным антителом можно использовать для чувствительного не радиоактивного обнаружения белков. Антитело, меченое флуорохромом, также может быть подходящим. Примеры флуорохромов включают, без ограничения, DAPI, флуоресцеин, Hoechst 33258, R-фикоцианин, B-фикоэритрин, R-фикоэритрин, родамин, тexasский красный и лиссамин. Непрямые метки включают различные ферменты, хорошо известные в данной области, такие как пероксидаза хрена (HRP), щелочная фосфатаза (AP), бета-галактозидаза, уриназа и тому подобное. Системы обнаружения с использованием соответствующих субстратов для пероксидазы хрена, щелочной фосфатазы, бета-галактозидазы хорошо известны в данной области.

Сигнал от прямой или непрямой метки может быть проанализирован, например, с использованием микроскопа, такого как флуоресцентный микроскоп или флуоресцентный сканирующий микроскоп. Альтернативно, можно использовать спектрофотометр для определения цвета хромогенного субстрата; счетчик радиоактивности для обнаружения радиоактивного излучения, такой как гамма-счетчик для обнаружения ^{125}I ; или флуориметр для обнаружения флуоресценции в присутствии света с определенной длиной волны. При необходимости, анализы, используемые при осуществлении на практике способов по настоящему изобретению, могут быть автоматизированы или роботизированы, и сигналы от множества образцов могут быть обнаружены одновременно.

В некоторых вариантах осуществления биомаркеры представляют собой иммунофлуоресцентные маркеры. В некоторых вариантах осуществления иммунофлуоресцентные маркеры включают маркер, специфический для эпителиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммунофлуоресцентные маркеры включают маркер, специфический для белых клеток крови (БКК). В некоторых вариантах

осуществления один или более из иммунофлуоресцентных маркеров включают CD45 и СК.

В некоторых вариантах осуществления присутствие или отсутствие иммунофлуоресцентных маркеров в яросодержащих клетках, таких как ЦОК или БКК, приводит к четким паттернам иммунофлуоресцентного окрашивания. Паттерны иммунофлуоресцентного окрашивания для ЦОК и БКК могут отличаться в зависимости от того, эпителиальные или БКК маркеры определяют в соответствующих клетках. В некоторых вариантах осуществления определение присутствия или отсутствия одного или более иммунофлуоресцентных маркеров включает сравнение определенного иммунофлуоресцентного окрашивания ЦОК с определенным иммунофлуоресцентным окрашиванием БКК с использованием, например, иммунофлуоресцентного окрашивания CD45, который четко идентифицирует БКК. Существуют и другие детектируемые маркеры, или сочетания детектируемых маркеров, которые связываются с различными субпопуляциями БКК. Их можно использовать в разных сочетаниях, в том числе, в сочетании с, или в качестве альтернативы, иммунофлуоресцентным окрашиванием CD45.

В некоторых вариантах осуществления ЦОК имеют четко отличающиеся морфологические характеристики в сравнении с окружающими яросодержащими клетками. В некоторых вариантах осуществления морфологические характеристики включают размер ядра, форму ядра, размер клетки, форму клетки и/или ядерно-цитоплазматическое (Я/Ц) отношение. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает анализ яросодержащих клеток на основании деталей ядра, контура ядра, присутствия или отсутствия ядрышек, качества цитоплазмы, количества цитоплазмы, интенсивности паттернов иммунофлуоресцентного окрашивания. Специалист в данной области понимает, что морфологические характеристики по настоящему изобретению могут включать любой признак, свойство, характеристику или аспект клетки, который может быть определен и коррелирует с обнаружением ЦОК.

Данные по ЦОК можно получать любым методом с использованием микроскопа, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления используют флуоресцентную сканирующую микроскопию. В конкретных вариантах осуществления метод микроскопии позволяет получать с высоким разрешением изображения ЦОК и окружающих их БКК (смотри, например, *Marrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9 016003*). В некоторых вариантах осуществления предметное стекло, покрытое монослоем яросодержащих клеток из образца, такого как необогащенный образец крови, сканируют при помощи флуоресцентного сканирующего микроскопа и регистрируют интенсивности флуоресценции от иммунофлуоресцентных маркеров и окрашенных ядер, что позволяет определять присутствие или отсутствие каждого иммунофлуоресцентного маркера и оценивать морфологию яросодержащих клеток. В некоторых вариантах осуществления сбор и анализ данных микроскопии проводят в автоматическом режиме.

В некоторых вариантах осуществления данные по ЦОК включают обнаружение одного или более биомаркеров, например, СК и CD45. Считают, что биомаркер «присутствует» в клетке, если он может быть определен на уровне выше уровня фонового

шума соответствующего используемого метода обнаружения (например, выше уровня шума в 2 раза, 3 раза, 5 раз или 10 раз; например, 2σ или 3σ выше фонового уровня). В некоторых вариантах осуществления считают, что биомаркер «отсутствует», если он не может быть определен на уровне выше уровня фонового шума соответствующего используемого метода обнаружения (например, выше фонового сигнала в $<1,5$ раза или $<2,0$ раза; например, $<1,5\sigma$ или $<2,0\sigma$ выше фонового уровня).

В некоторых вариантах осуществления присутствие или отсутствие иммунофлуоресцентных маркеров в ядродержащих клетках определяют путем выбора времени экспозиции во время процесса флуоресцентного сканирования, так что все иммунофлуоресцентные маркеры достигают заданного уровня флуоресценции на БКК, находящихся в поле зрения. В этих условиях ЦОК–специфические иммунофлуоресцентные маркеры, хотя и отсутствуют на БКК, видны на БКК в виде фоновых сигналов с фиксированной высотой. Кроме того, БКК–специфические иммунофлуоресцентные маркеры, которые отсутствуют на ЦОК, видны на ЦОК в виде фоновых сигналов с фиксированной высотой. Клетку считают положительной по иммунофлуоресцентному маркеру (то есть, считают, что маркер присутствует), если ее флуоресцентный сигнал для соответствующего маркера значительно выше, чем фиксированный фоновый сигнал (например, в 2 раза, 3 раза, 5 раз или 10 раз выше фонового уровня; например, 2σ или 3σ выше фонового уровня). Например, ядродержащую клетку считают CD45–положительной (CD45⁺), если ее флуоресцентный для CD45 значительно превышает фоновый сигнал. Клетку считают отрицательной по иммунофлуоресцентному маркеру (то есть, считают, что маркер отсутствует), если флуоресцентный сигнал клетки для соответствующего маркера незначительно превышает фоновый сигнал (например, в $<1,5$ раза или $<2,0$ раза превышает фоновый сигнал; например, $<1,5\sigma$ или $<2,0\sigma$ превышает фоновый сигнал).

Как правило, каждое поле зрения микроскопа содержит как ЦОК, так и БКК. В конкретных вариантах осуществления в поле зрения микроскопа видны по меньшей мере 1, 5, 10, 20, 50 или 100 ЦОК. В конкретных вариантах осуществления в поле зрения микроскопа видны по меньшей мере в 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 раз больше БКК, чем ЦОК. В конкретных вариантах осуществления в поле зрения микроскопа видны одна или более ЦОК, или кластеров ЦОК, окруженные по меньшей мере 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 или более БКК.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, получение данных по ЦОК включает количественное определение ЦОК, присутствующих в образце крови. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают обнаружение по меньшей мере 1,0 ЦОК/мл крови, 1,5 ЦОК/мл крови, 2,0 ЦОК/мл крови, 2,5 ЦОК/мл крови, 3,0 ЦОК/мл крови, 3,5 ЦОК/мл крови, 4,0 ЦОК/мл крови, 4,5 ЦОК/мл крови, 5,0 ЦОК/мл крови, 5,5 ЦОК/мл крови, 6,0 ЦОК/мл крови, 6,5 ЦОК/мл крови, 7,0 ЦОК/мл крови, 7,5 ЦОК/мл крови, 8,0 ЦОК/мл крови, 8,5 ЦОК/мл крови, 9,0 ЦОК/мл крови, 9,5 ЦОК/мл крови, 10 ЦОК/мл крови, или

более.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, получение данных по ЦОК включает обнаружение конкретных подтипов ЦОК, включая неклассические ЦОК. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают обнаружение по меньшей мере 0,1 кластера ЦОК/мл крови, 0,2 кластера ЦОК/мл крови, 0,3 кластера ЦОК/мл крови, 0,4 кластера ЦОК/мл крови, 0,5 кластера ЦОК/мл крови, 0,6 кластера ЦОК/мл крови, 0,7 кластера ЦОК/мл крови, 0,8 кластера ЦОК/мл крови, 0,9 кластера ЦОК/мл крови, 1 кластер ЦОК/мл крови, 2 кластера ЦОК/мл крови, 3 кластера ЦОК/мл крови, 4 кластера ЦОК/мл крови, 5 кластеров ЦОК/мл крови, 6 кластеров ЦОК/мл крови, 7 кластеров ЦОК/мл крови, 8 кластеров ЦОК/мл крови, 9 кластеров ЦОК/мл крови, 10 кластеров ЦОК/мл крови, или более. В конкретном варианте осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают обнаружение по меньшей мере 1 кластера ЦОК/мл крови.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе способы включают использование прогностической модели. В следующих вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе способы включают сравнение поддающегося измерению признака с эталонным признаком. Как понимают специалисты в данной области, такое сравнение может быть прямым сравнением с эталонным признаком или непрямым сравнением, когда эталонный признак включен в прогностическую модель. В следующих вариантах осуществления анализ поддающегося измерению признака включает одно или более из: модели линейного дискриминантного анализа, алгоритма классификации машин опорных векторов, модели рекурсивного исключения признаков, прогностического анализа модели микроматриц, логистической регрессионной модели, алгоритма CART, алгоритма FlexTree, алгоритма LART, алгоритма «случайный лес», алгоритма MART, алгоритма машинного обучения, метода регрессии со штрафом, или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления анализ включает логистическую регрессию. В дополнительных вариантах осуществления результат определения выражают в виде показателя риска в баллах.

В способе аналитической классификации можно использовать любой из множества методов статистического анализа для обработки количественных данных и классификации образца. Примеры полезных методов включают линейный дискриминантный анализ, рекурсивное исключение признаков, прогностический анализ микроматриц, логистическую регрессию, алгоритм CART, алгоритм FlexTree, алгоритм LART, алгоритм «случайный лес», алгоритм MART, алгоритмы машинного обучения и другие методы, известные специалистам в данной области.

Классификацию можно осуществлять в соответствии с методами прогностического моделирования, которые устанавливают пороговое значение, определяющее вероятность того, что образец относится к конкретному классу. Вероятность, предпочтительно, составляет по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% или выше. Классификацию также

можно осуществлять путем определения того, достигает ли сравнение между полученным набором данных и эталонным набором данных статистически значимого различия. Если это так, тогда образец, для которого был получен набор данных, классифицируют, как не принадлежащий к классу эталонного набора данных. И наоборот, если при таком сравнении отсутствует статистически значимое отличие от эталонного набора данных, тогда образец, для которого был получен набор данных, классифицируют, как принадлежащий к классу эталонного набора данных.

Прогностическую способность модели можно оценивать на основании ее способности обеспечивать показатель качества, например, AUROC (площадь под кривой ROC) или точность, конкретного значения, или диапазона значений. Показатели площади под кривой полезны для сравнения точности классификатора по всему диапазону данных. Классификаторы с большим значением AUC обладают большей способностью правильно классифицировать неизвестные между двумя интересующими группами. Анализ ROC может быть использован для выбора оптимального порога при различных клинических обстоятельствах, уравнивая характерные компромиссы, которые существуют между специфичностью и чувствительностью. В некоторых вариантах осуществления желательному порогу качества соответствует прогностическая модель, которая будет классифицировать образец с точностью по меньшей мере примерно 0,7, по меньшей мере примерно 0,75, по меньшей мере примерно 0,8, по меньшей мере примерно 0,85, по меньшей мере примерно 0,9, по меньшей мере примерно 0,95, или выше. В качестве альтернативной меры, желательному порогу качества может соответствовать прогностическая модель, которая будет классифицировать образец с AUC по меньшей мере примерно 0,7, по меньшей мере примерно 0,75, по меньшей мере примерно 0,8, по меньшей мере примерно 0,85, по меньшей мере примерно 0,9, или выше.

Как известно в данной области, относительная чувствительность и специфичность прогностической модели может быть скорректирована в пользу критерия специфичности или критерия чувствительности, при этом два критерия имеют обратную зависимость. Пределы в модели, описанной выше, могут быть скорректированы для обеспечения выбранного уровня чувствительности или специфичности, в зависимости от конкретных требований выполняемого теста. Одна, или обе, из чувствительности и специфичности могут составлять по меньшей мере примерно 0,7, по меньшей мере примерно 0,75, по меньшей мере примерно 0,8, по меньшей мере примерно 0,85, по меньшей мере примерно 0,9, или выше.

Первичные данные сначала могут быть проанализированы путем измерения значений для каждого измеримого признака или биомаркера, как правило, в тройных повторах или нескольких тройных повторах. Данные можно обрабатывать, например, первичные данные могут быть преобразованы при помощи стандартных кривых, и среднее из трижды повторенных измерений использовано для расчета среднего значения и стандартного отклонения для каждого пациента. Эти значения могут быть преобразованы до их использования в моделях, например, \log -преобразованы, Вох-Сох преобразованы

(Box and Cox, Royal Stat. Soc. Series B, 26:211–246(1964). Затем данные вводят в прогностическую модель, которая будет классифицировать образец в соответствии с состоянием. Полученная информация может быть передана пациенту или поставщику медицинских услуг. В некоторых вариантах осуществления способ имеет специфичность >60%, >70%, >80%, >90% или выше.

Как понимают специалисты в данной области, в способе аналитической классификации можно использовать любой из множества методов статистического анализа для обработки количественных данных и классификации образца. Примеры полезных методов включают, без ограничения, линейный дискриминантный анализ, рекурсивное исключение признаков, прогностический анализ микроматриц, логистическую регрессию, алгоритм CART, алгоритм FlexTree, алгоритм LART, алгоритм «случайный лес», алгоритм MART и алгоритмы машинного обучения.

В другом варианте осуществления изобретение относится к наборам для определения уровней биомаркеров, включающим контейнеры, содержащие по меньшей мере один меченый зонд, белок, или антитело для специфического связывания по меньшей мере одного из экспрессируемых биомаркеров в образце. Эти наборы также могут включать контейнеры с другими необходимыми для анализа реагентами. В некоторых вариантах осуществления набор включает контейнеры, содержащие меченое моноклональное антитело, или нуклеотидный зонд, для связывания с биомаркером и по меньшей мере одну композицию калибратора. Набор может дополнительно включать компоненты, необходимые для обнаружения детектируемой метки (например, фермент или субстрат). Набор также может содержать контрольный образец или серию контрольных образцов, которые могут быть проанализированы и сравнены с тестируемым образцом. Каждый компонент набора может быть заключен в отдельный контейнер, и все контейнеры могут находиться в одной упаковке, наряду с инструкциями для интерпретации результатов анализа, выполненного с использованием набора.

Перечисление списка элементов в любом определении переменной в настоящем документе включает определения этой переменной как любого отдельного элемента или комбинации (или подкомбинации) перечисленных элементов. Перечисление вариантов осуществления в настоящем документе включает данный вариант осуществления как любой отдельный вариант осуществления или в комбинации с любыми другими вариантами осуществления, или их частями.

Следующие далее примеры приведены для иллюстрации, но не для ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Оценку образца на ЦОК проводили, как описано ранее, с использованием платформы Eric Sciences. *Marrinucci et al. Phys Biol 9:016003, 2012*. Использовали способ Eric сбора и определения ЦОК, включающий следующую последовательность действий: (1) кровь лизировали, ядросодержащие клетки из образца крови помещали на предметные

стекла; (2) образцы хранили при -80°C в хранилище биологических материалов; (3) препараты окрашивали на CK, CD45, DAPI и AR; (4) препараты сканировали; (5) применяли многопараметрические алгоритмы цифровой патологии, (6) подтверждали с помощью программы и визуальной инспекции наличие ЦОК, и количественно определяли экспрессию биомаркеров. В процессе следующей последовательности операций по извлечению и геномному профилированию ЦОК отдельные клетки выделяли, проводили амплификацию всего генома и получали библиотеку СНП. Секвенирование проводили на Illumina NextSeq 500.

Образцы крови подвергали гемолизу, центрифугировали, ресуспендировали и помещали на предметные стекла, с последующим хранением при -80°C . Перед проведением анализа препараты размораживали, метили иммунофлуоресцентным красителем (на пан-цитокератин, CD45, DAPI) и визуализировали методом автоматизированной флуороскопии, с последующей валидацией вручную, выполняемой обученным патологоанатомом лаборантом (MSL). Marrinucci *et al.* Phys Biol 9:016003, 2012. Интенсивности DAPI (+), CK (+) и CD45 (-) были классифицированы как признаки при подсчете ЦОК, как описано ранее.

Более конкретно, образец периферической крови собирали в пробирки Cell-free DNA BCT[®] (Streck, Omaha, NE, USA) и немедленно перевозили в Epic Sciences (San Diego, CA, USA) при температуре окружающей среды. После получения, эритроциты лизировали, ядродержащие клетки наносили на предметные стекла микроскопа, как описано ранее (Marrinucci *et al.* Hum Pathol 38(3): 514–519 (2007); Marrinucci *et al.* Arch Pathol Lab Med 133(9): 1468–1471 (2009); Mikolajczyk *et al.* J Oncol 2011: 252361 (2011); Marrinucci *et al.* Phys Biol 9(1): 016003 (2012); Werner *et al.* J Circ Biomark 4: 3 (2015)), и хранили при $t -80^{\circ}\text{C}$ до окрашивания. Эквивалент объема, в миллилитрах, крови, нанесенной на каждое предметное стекло, рассчитывали на основании количества белых клеток крови образца и использованного объема клеточной суспензии после лизиса ККК. Циркулирующие опухолевые клетки идентифицировали на основании иммунофлуоресценции, как описано в литературе (Marrinucci *et al.*, 2007, выше; Marrinucci *et al.*, 2009, выше; Mikolajczyk *et al.*, 2011, выше; Marrinucci *et al.*, 2012, выше; Werner *et al.*, 2015, выше). В процессе следующей последовательности операций по извлечению и геномному профилированию ЦОК отдельные клетки выделяли, проводили амплификацию всего генома и получали библиотеку СНП. Секвенирование проводили на Illumina NextSeq 500.

На Фигурех 1–4 и в соответствующих кратких описаниях чертежей приведены дополнительные подробности эксперимента.

Пример 2. Изучение отдельных ЦОК позволяет идентифицировать фенотипическую и геномную гетерогенность в качестве механизма устойчивости к направленной на сигнализацию андрогенового рецептора терапии (AR Tx) у пациентов с mCRPC.

Опухолевая гетерогенность (разнообразие) была предложена в качестве биомаркера чувствительности. В данном примере описан анализ гетерогенности в ЦОК на уровне

отдельных клеток в качестве прогностического биомаркера восприимчивости к лечению в моменты принятия решения в процессе терапии, позволяющего лучше планировать использование доступных методов лечения.

Исходно усилия были направлены на изучение ЦОК на фенотипическом (опознание) или клеточном уровне, включая вариации в морфологии и белковой экспрессии клеток, возникающих из одного клона (переключение линий дифференцировки или пластичность), например, AR+ → AR- нейроэндокринные клетки со слитым белком TMPRSS2-ERG.

ЦОК выделяли с использованием платформы «без селекции клеток» и анализировали на уровне отдельных клеток на основании морфологии/белковой химии (опознание) (Фигура 5). Отсутствие селекции клеток позволяет характеризовать любой редкий клеточный тип: СК-, малые, апоптотические клетки и кластеры ЦОК, включительно.

Следующие белковые и морфологические признаки ЦОК, серию признаков отдельных клеток, определяли для каждой ЦОК, идентифицированной в образце от пациента, включая площадь ядра, а также другие признаки, приведенные в Таблице 1 (Фигура 6).

Таблица 1. Белковые биомаркеры и признаки цифровой патологии

Признаки белковых биомаркеров
СК пропорция (экспрессия белка)
AR пропорция (экспрессия белка)
Признаки цифровой патологии
Площадь ядра (мкм ²)
Площадь цитоплазмы (мкм ²)
Площадь выпуклости ядра (мкм ²)
Площадь выпуклости цитоплазмы (мкм ²)
Большая ось ядра (мкм)
Большая ось цитоплазмы (мкм)
Малая ось ядра (мкм)
Малая ось цитоплазмы (мкм)
Округлость ядра
Округлость цитоплазмы
Плотность ядра
Плотность цитоплазмы
Ядерная энтропия
Отношение площадей выпуклости ядра и цитоплазмы
Ядрышки

СК спекл
Ядерный спекл
Дополнительные категориальные переменные
СК статус (наличие СК)
M1 статус (наличие AR)
Кластерный статус

Двадцать белковых и морфологических признаков были зарегистрированы индивидуально, аналогично тому, как это было выполнено для генной экспрессии, и был проведен независимый анализ >9000 ЦОК, в котором принципиальные компоненты, или ключевые признаки, были определены, а затем кластеризованы (Фигура 7). Это привело к математическому группированию, которое определило 15 различных фенотипов ЦОК (ЦОК подтипов А–О). На Фигуре 7, справа, представлена тепловая карта, на которой 15 клеточных типов указаны цветами по оси у, и отдельные признаки – по оси х. Красный цвет отражает признаки в нижней части динамического диапазона (то есть, малая площадь ядра), в то время как зеленый цвет отражает признаки в верхней части динамического диапазона (то есть, большая площадь ядра) (Фигура 7). На Фигуре 23 также представлена тепловая карта 15 математических фенотипических подтипов ЦОК, которые были идентифицированы с использованием независимого анализа, основанного на белковых и морфологических признаках ЦОК. На Фигуре 24, панелях А–О, представлены выбранные признаки 15 клеточных типов. Некоторые фенотипические подтипы ЦОК позволяют прогнозировать выживаемость пациента. На Фигуре 25 представлен прогноз смерти через 180 дней при использовании ARS-направленной терапии (n=150 образцов) на основании количественного определения ЦОК и 15 фенотипических подтипов ЦОК. Хорошие прогностические факторы включают клетки типа Е (кластер 5), К (кластер 11) и О (кластер 15). Как показано на Фигуре 26, некоторые фенотипические подтипы ЦОК (клеточные типы Е, К и N) позволяют прогнозировать ответ пациентов с mCRPC на AR-направленную терапию. На Фигуре 27 показаны фенотипические подтипы ЦОК (клеточные типы G, К и N), которые позволяют прогнозировать ответ на терапию таксанами. Двадцать белковых и морфологических признаков были зарегистрированы индивидуально, аналогично тому, как это было выполнено для генной экспрессии, и был проведен независимый анализ >9000 ЦОК, в котором принципиальные компоненты, или ключевые признаки, были определены, а затем кластеризованы (Фигура 7). Это привело к математическому группированию, которое определило 15 различных фенотипов ЦОК. На Фигуре 7, справа, представлена тепловая карта, на которой 15 клеточных типов указаны цветами по оси у, и отдельные признаки – по оси х. Красный цвет отражает признаки в нижней части динамического диапазона (то есть, малая площадь ядра), в то время как зеленый цвет отражает признаки в верхней части динамического диапазона (то есть, большая площадь ядра) (Фигура 7). На Фигуре 23 также представлена тепловая карта 15 математических фенотипических подтипов ЦОК, которые были идентифицированы с использованием независимого анализа,

основанного на белковых и морфологических признаках ЦОК. На Фигуре 24, панелях А–О, представлены выбранные признаки 15 клеточных типов. Некоторые фенотипические подтипы ЦОК позволяют прогнозировать выживаемость пациента. На Фигуре 25 представлен прогноз смерти через 180 дней при использовании ARS–направленной терапии (n=150 образцов) на основании количественного определения ЦОК и 15 фенотипических подтипов ЦОК. Хорошие прогностические факторы включают клетки типа Е (кластер 5), К (кластер 11) и О (кластер 15). Как показано на Фигуре 26, некоторые фенотипические подтипы ЦОК (клеточные типы Е, К и N) позволяют прогнозировать ответ пациентов с mCRPC на AR–направленную терапию. На Фигуре 27 показаны фенотипические подтипы ЦОК (клеточные типы G, К и N), которые позволяют прогнозировать ответ на терапию таксанами. Все клеточные типы имеют уникальные морфологические паттерны. Например, как показано на Фигуре 28, клетки кластера 11 (клеточный тип К) имеют большое ядро, высокую ядерную энтропию и частые ядрышки. Как также показано на Фигуре 28, клеточный тип К характеризуется большой цитоплазмой. Некоторые клеточные типы (клеточные типы G, К и M) позволяют прогнозировать геномную нестабильность (LST). Клетки этих конкретных подтипов, учитывая повышенную геномную нестабильность, могут быть чувствительными к повреждающим ДНК лекарственным средствам, таким как химиотерапевтические средства на основе платины (то есть, карбоплатин, цисплатин), или таргетированным терапевтическим средствам, которые направлены на недостатки гомологичной рекомбинации, включая ингибиторы PARP, ингибиторы ДНК–ПК и терапевтические средства, направленные на путь ATM.

Классификаторы для классификации ЦОК в 15 математических фенотипических подтипов ЦОК были получены на основании неконтролируемой кластеризации (смотри выше). Классификатор может быть применен к любым ЦОК пациента с mCRPC, которые имеют одни и те же двадцать белковых и морфологических признаков, и каждая ЦОК может быть отнесена к одному из 15 фенотипических подтипов (А–О, включая клеточный тип К) на основании максимальной вероятности.

Флеботомические образцы получали в момент принятия решения в процессе лечения: терапию выбирал лечащий врач. В соответствии со стандартом оказания медицинской помощи получали коллекцию образцов от 221 пациента с mCRPC в моменты принятия решения о лечении. Исходный сбор образцов крови до применения А, Е или Т. С последующим определением уровня ПСА, периодом получения лекарственного средства, оценкой определяемого радиографическими методами прогрессирования (rPFS) и общей выживаемости (OS). 9225 ЦОК были идентифицированы и охарактеризованы фенотипически. 741 ЦОК от 31 пациента были изучены путем определения ВЧК целого генома на клональность и генные амплификации/делеции. Пациенты были ранжированы на основании того, насколько гетерогенными, или разнообразными, были их клетки в каждый момент принятия решения о лечении (Фигура 8). На Фигуре 9 приведены демографические данные для популяции пациентов с mCRPC. Частота встречаемости 15 разных фенотипических классов ЦОК отличалась для линий терапии, гетерогенность

увеличивалась с течением времени (Фигура 10). На Фигуре 10 красным цветом показана распространенность клеточных типов, которые избыточно представлены или более разнообразны. Каждая колонка соответствует пациенту, так что колонки со многими вертикальными красными секциями соответствуют большей фенотипической гетерогенности.

Для каждого образца пациента, количество разных наблюдаемых клеточных типов подсчитывали, и гетерогенность ЦОК количественно определяли путем расчета индекса Шеннона. Индекс Шеннона широко используется в экологии для количественной оценки разнообразия экосистем, основанной на количестве различных видов, присутствующих в экосистеме. Значение индекса Шеннона увеличивается с увеличением количества разных видов, присутствующих в экосистеме, или увеличением равномерности распределения (то есть, при одинаковом количестве объектов каждого вида, присутствующих в экосистеме). Индекс Шеннона является максимальным, когда присутствуют все виды и они присутствуют в равных количествах, и является минимальным, когда присутствует лишь 1 вид. Таким образом, низкие значения индекса Шеннона характерны для пациентов с низкой гетерогенностью вследствие однородности ЦОК, присутствующих в образце, и высокие значения индекса Шеннона характерны для пациентов с высокой гетерогенностью вследствие присутствия всех типов ЦОК в образце. Как показано на Фигуре 11, более высокие индексы Шеннона соответствуют большему разнообразию (гетерогенности) в зависимости от линии терапии, особенно с увеличением медианы и несколькими более низкими показателями индекса в 3-й и 4-й линии терапии. Высокая фенотипическая гетерогенность ЦОК позволяет прогнозировать более короткие периоды прогрессирования и сроки выживания при AR-терапии, но не терапии таксанами (Фигура 12 А). На Фигуре 12В показаны результаты для AR Tx на основании гетерогенности.

Высокая фенотипическая гетерогенность ЦОК позволяет прогнозировать лучший результат при лечении таксанами, чем при AR Tx, в многофакторной модели. Диапазон факторов, которые, как показано ранее, позволяют прогнозировать выживание, изучали в однофакторном и многофакторном анализе – показаны результаты только многофакторного анализа (Фигура 13). Высокая гетерогенность позволяет прогнозировать восприимчивость к терапии таксанами, но не AR-направленной терапии (Фигура 13). На Фигуре 14 показано, что преобладание подтипа ЦОК (типа К) позволяет прогнозировать неудовлетворительный результат при использовании как AR Tx, так и таксанов, независимо от статуса AR. Клетки одного конкретного математически определенного типа, типа К, имеющие большое ядро, широкий диапазон размеров ядра и заметные ядрышки – были связаны с устойчивостью к лекарственным средствам обоих классов.

Понимая, что доступные в настоящее время виды терапии не обеспечивают элиминацию «всех клеток» в опухоли, изучали генотипическую гетерогенность (отдельные области в опухоли с отличающимися профилями мутаций, возникающие из отдельной исходной стволовой лезии) ЦОК в образце от пациента. После фенотипического изучения ЦОК покровное стекло удаляли, и индивидуальные ЦОК отбирали аспирацией и помещали

в отдельные пробирки. ЦОК амплифицировали и подготавливали для секвенирования (Фигура 15). После секвенирования выполняли обработку информации для оценки клоальности и амплификаций/делеций (Фигура 15).

Секвенирование ЦОК на уровне отдельных клеток предоставляет информацию о клоальном разнообразии и филогенетических линиях заболевания. Каждый образец от пациента анализировали отдельно. Графики геномных ВЧК для отдельных ЦОК анализировали индивидуально в сравнении с другими ЦОК в образце от пациента. Клоальность характеризовали на основании больших геномных вариаций и очаговых амплификаций или делеций известных драйверных изменений в по меньшей мере 2 ЦОК, например, двух клетках от одного и того же пациента с потерей, или без потери, 5q хромосомы, или двух клонах от пациента с амплификацией, или без амплификации, AR (Фигура 16).

Профили ВЧК отдельных ЦОК предоставляют информацию о клоальном разнообразии и филогенетических линиях заболевания. В 23 клетках, полученных от отдельного пациента, 8 были относительно единообразными, 7 имели множественные изменения, и затем изменения расходились: 5 в большей степени на одном пути со вторым изменением, 2 в большей степени на другом пути, и 1 (Фигура 17). Этот анализ позволил сформулировать 3 основных вывода. Первый, при анализе ткани/сДНК было бы чрезвычайно сложно разделять субклоны. Второй, имеет место клоальная эволюция, когда разные клетки отвечают от более ранних лезий, что позволяет проводить мониторинг пациентов с течением времени для понимания того, какие субклональные изменения придают чувствительность/устойчивость к конкретному лекарственному средству, и, в конечном счете, прогнозировать средневзвешенную реакцию на новые лекарственные средства или комбинации препаратов. Третий, понимание совместного присутствия разных изменений в одной клетке может потенциально способствовать получению информации об использовании разных путей (то есть, может быть важным, имеется ли амплификация AR и делеция PTEN в одной и той же клетке или в разных клетках).

Секвенирование отдельных ЦОК также может предоставлять информацию об отсутствии клоального разнообразия у пациента после 2-й линии терапии таксанами, который не мог быть рассмотрен для использования AR Tx. Этот пациент ответил на лечение энзалутамидом (Фигура 18). Как показано на Фигуре 19, фенотипическая гетерогенность ЦОК коррелирует с геномной гетерогенностью. На Фигуре 20А приведен пример геномики клеточного типа К, характеризующегося частыми ВЧК, большим количеством точечных разрывов и сопутствующим фенотипом, характеризующимся большим ядром, высокой ядерной энтропией и частыми ядрышками. Клеточный тип К также характеризуется большой цитоплазмой. На Фигуре 20В показана геномная нестабильность для клеточного типа К в сравнении со всеми другими фенотипами ЦОК. На Фигуре 21 показано, что высокая фенотипическая гетерогенность является информативным биомаркером у AR-V7-отрицательных пациентов. На Фигуре 22 показана низкая фенотипическая гетерогенность ЦОК в 6 ЦОК от пациента до первой линии терапии,

демонстрирующая однородный геномный профиль.

На Фигуре 23 представлена тепловая карта 15 математических фенотипических подтипов ЦОК, которые были идентифицированы с использованием независимого анализа, основанного на белковых и морфологических признаках ЦОК.

С использованием контролируемого кластерного анализа было установлено, что 5 морфологических признаков и признаков белковой экспрессии позволяют прогнозировать геномную нестабильность ЦОК. Первые четыре признака коррелируют положительно с геномной нестабильностью, и последний признак коррелирует отрицательно (Фигура 30).

Как показано на Фигуре 31, СК(-) ЦОК имеют более высокую частоту встречаемости, и являются прогностическим фактором, геномной нестабильности.

Аmplификация следующих генов позволяет прогнозировать геномную нестабильность: ACADSB, AR, BRAF, CCDC69, ETV1, EZH2, KRAS, NDRG1, PTK2, SRCIN1, YWHAZ. Делеция следующих генов позволяет прогнозировать геномную нестабильность: ABR, ACADSB, BCL2, CCDC6, CDKN2B-AS1, CXCR4, KLF5, KRAS, LOC284294, MAP3K7, MTMR3, PTEN, PTK2B, RBI, RBPMS, RND3, SMAD4, SNX14, WWOX, ZDHHC20.

На основании белковых и морфологических признаков был разработан классификатор для прогнозирования с высокой точностью геномной нестабильности ЦОК. На Фигуре 32 ось Y показывает реальные LST (n точечных разрывов) и ось X показывает прогнозируемую нестабильность (стабильные против нестабильных). ЦОК с прогнозируемой высокой геномной нестабильностью могут быть чувствительны к повреждающим ДНК лекарственным средствам, таким как химиотерапевтические средства на основе платины (то есть, карбоплатин, цисплатин), или таргетированным терапевтическим средствам, которые направлены на недостатки гомологичной рекомбинации, включая ингибиторы PARP, ингибиторы ДНК-ПК и терапевтические средства, направленные на путь ATM.

На Фигуре 33 показано, что фенотипическая гетерогенность позволяет прогнозировать общую выживаемость и ответ на AR-направленную терапию. На Фигуре 34 показано, что фенотипическая гетерогенность ЦОК позволяет прогнозировать геномную гетерогенность. Высокая фенотипическая гетерогенность с большей в 40 раз вероятностью представляет множество геномных клонов, чем низкая фенотипическая гетерогенность. На Фигуре 35 показано, что геномная нестабильность ЦОК позволяет прогнозировать общую выживаемость пациентов с mCRPC. На Фигуре 36 показано, что геномная нестабильность ЦОК позволяет прогнозировать ответ пациентов с mCRPC на терапию таксанами.

Геномная нестабильность. LST и PGA измеряли в качестве суррогатного показателя геномной нестабильности. LST: n хромосомных разрывов между смежными областями размером по меньшей мере 10 Мб. Popova *et al.*, *Cancer Res.* 72(21):5454–62 (2012). PGA: процентная доля генома пациента с изменениями числа копий (амплификации или делеции). Zafarana *et. al*, *Cancer* 2012 Aug; 118(16): 4053 (2012). Примеры: высокий

показатель LST (27) и высокий показатель PGA (23%), Фигура 37A–C.

Пример 3: Разработка сигнатуры HRD+ в жидком биопсийном образце

В данном примере описана разработка способов на основе ЦОК для обнаружения HRD в циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК), выделенных из обычного образца периферической крови, собранного в критические моменты принятия решения перед началом лечения. Имея опыт обнаружения геномных изменений (LST) HRD путем секвенирования >600 отдельных ЦОК, использовали алгоритмы многопараметрического анализа изображений для определения статуса HRD отдельных ЦОК на основании клеточных и ядерных морфологических признаков, которые связаны с данными изменениями. На основании субклонального преобладания ЦОК с фенотипами HRD+ как при гетерогенном, так и при гомогенном, состоянии заболевания, результаты данного теста позволяют прогнозировать геномику HRD с 78% точностью и 86% специфичностью на клеточном уровне. Использование руководства по балльной категоризации пациентов позволяет повысить точность определения фенотипа HRD+ до 95% на уровне пациентов.

Разработанное Epic Sciences определение распространенности сигнатуры HRD+ и клиническая применимость: В валидационных группах из 168 и 86 пациентов с mCRPC разработанная сигнатура HRD была обнаружена у 32% и 37% пациентов, соответственно. Распространенность маркера возрастает у пациентов при более поздних линиях системной терапии (1–я линия 25%, 4–я линия 41%) в сравнении с 10–20% распространенностью связанных с HRD геномных изменений, о которых недавно сообщалось для аналогичных групп. Пациенты, идентифицированные как HRD+, имели худшие показатели OS в случае AR Tx (OR=9,83, $p<0,0001$) и терапии таксанами (OR=3,31, $p=0,001$), в сравнении с пациентами, которые были HRD–.

Разработанная Epic Sciences сигнатура HRD+ позволяет прогнозировать ответ на терапию PARPi и соединениями на основе платины у пациентов с mCRPC: в проспективном клиническом испытании фазы II со случайным распределением и сравнением применения AR Tx с применением AR Tx+PARPi, HRD+ пациенты имели статистически значимое улучшение показателей общей частоты ответа (ORR, >50% снижение уровня ПСА) в группе AR Tx+PARPi (**88% против 42%**). Кроме того, у пациентов в группе AR Tx наблюдали 320% увеличение количества HRD+ ЦОК в полученных в процессе лечения образцах крови относительно исходных образцов. У пациентов в группе AR Tx+PARPi наблюдали 95% уменьшение количества HRD+ ЦОК в полученных в процессе лечения образцах крови относительно исходных образцов. Ранние данные подтверждают, что сигнатура HRD+ также позволяет прогнозировать ORR и восприимчивость к химиотерапии соединениями на основе платины, а также аналогичное уменьшение количества HRD+ ЦОК в полученных в процессе лечения образцах крови относительно исходных образцов при химиотерапии соединениями на основе платины.

Разработанная Epic Sciences сигнатура устойчивости к PARPi: помимо биомаркерной сигнатуры HRD+ ЦОК, Epic Sciences также была разработана сигнатура для прогнозирования первичной устойчивости к терапии PARPi. Сигнатура устойчивости к

PARPi идентифицирует конкретные фенотипы ЦОК, связанные с эпителиальной пластичностью, а также реципрокную обратную связь AR/PI3K, что наблюдается при устойчивости к комбинированной терапии AR Tx+PARPi. Разработанные Epic Sciences анализы ЦОК для определения HRD сигнатуры восприимчивости и сигнатуры устойчивости к PARPi представляют собой неинвазивные альтернативные тесты на надежной клинически совместимой платформе, которые могут быть выполнены в течение менее 5 дней со значительно меньшими затратами на реализацию. Более высокая распространенность разработанных Epic Sciences HRD+ маркеров ЦОК у пациентов с mCRPC, а также возможность стратифицировать пациентов на основании как ответа на PARPi, так и маркеров устойчивости, являются ценным инструментом для управления принятием клинических решений на практике и в процессе клинических испытаний.

Вкратце, образцы крови собирали, эритроциты лизировали, и оставшиеся ядродержащие клетки, включающие лейкоциты и ЦОК, помещали на предметные стекла. Для каждого образца создавали до 12 препаратов–реплик в зависимости от объема образца и количества БКК. 2 реплики препарата окрашивали для анализа ИФ с использованием коктейля антител, направленных против нескольких цитокератинов (СК), CD45 и N-концевого фрагмента экспрессированного AR. Окрашивание DAPI использовали для определения площади ядра и контекста. Использовали алгоритмы для идентификации ЦОК на основании идентифицированных флуоресцентных и морфологических признаков, отличая клетки с высокой вероятностью принадлежности к ЦОК. Обученные специалисты классифицировали ЦОК на основании экспрессии маркеров и морфологии. Регистрируемые значения включали количества ЦОК/мл, AR+/- ЦОК/мл, СК+/- ЦОК/мл, апоптотических ЦОК/мл и кластеров ЦОК/мл.

После классификации ЦОК подтвержденные ЦОК подвергали сегментации отдельных клеток методом цифровой патологии, при этом четкие сегменты ядра (DAPI), цитоплазмы (СК) и AR создавали и регистрировали. Автоматическую сегментацию клеток, с последующим подтверждением сегментов обученным специалистом, выполняли для всех идентифицированных ЦОК в образце крови пациента. При определении признаков отдельных клеток было получено 20 количественных признаков и 2 категориальных признака. Они включали:

Количественные признаки: (1) белковые признаки: экспрессия белка AR, экспрессия белка СК; (2) морфологические признаки: площадь ядра (мкм^2), площадь цитоплазмы (мкм^2), площадь выпуклости ядра (мкм^2), площадь выпуклости цитоплазмы (мкм^2), большая ось ядра (мкм), большая ось цитоплазмы (мкм), малая ось ядра (мкм), малая ось цитоплазмы (мкм), округлость ядра, округлость цитоплазмы, плотность ядра, плотность цитоплазмы, ядерная энтропия, отношение площадей выпуклости ядра и цитоплазмы, ядрышки, СК спекл и ядерный спекл.

Качественные признаки: СК⁺ или СК⁻, AR⁺ или AR⁻.

После определения признаков отдельных клеток индивидуальные ЦОК были секвенированы методом СНП.

Анализ ВЧК всего генома: не апоптотические отдельные ЦОК переносили на слайд с использованием математического алгоритма, преобразующего исходные положения ЦОК (координаты x и y), рассчитанные при процедуре сканирования, в новый набор значений x и y , совместимых с инвертированным флуоресцентным микроскопом Nikon TE2000, используемым для анализа клеток. Отдельные клетки захватывали с использованием микроманипулятора Eppendorf TransferMan NK4. Клетки помещали в отдельные 0,2-мл пробирки для ПЦР с 1 мкл буфера TE и немедленно лизировали путем добавления 1,5 мкл лизирующего буфера с высоким значением pH, как описано ранее. Пробирки, содержащие отдельные клетки, центрифугировали и замораживали на сухом льду до следующей обработки. Амплификацию всего генома (АВГ) отдельных клеток проводили с использованием SeqPlex Enhanced (Sigma) в соответствии с инструкциями производителя, с небольшими модификациями. После АВГ определяли концентрации ДНК на спектрофотометре в УФ/видимой области. Были сконструированы библиотеки СНП с использованием набора NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) из 100 нг АВГ ДНК в соответствии с инструкциями производителя, с небольшими модификациями. После создания библиотек СНП, концентрации библиотек и распределение по размерам определяли с использованием PicoGreen (ThermoFisher Scientific) и Fragment Analyzer (Advanced Analytical). Материал в эквивалентных концентрациях из каждой библиотеки объединяли и секвенировали на Illumina NextSeq 500 с использованием формата быстрого прогона и секвенирования парных концов 2×150 (PE 2×150).

Первичные данные секвенирования (FASTQ) выравнивали с эталонным человеческим геномом hg38 из UCSC (<http://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg38/bigZips/>) с использованием Burrows–Wheeler Aligner (BWA, <http://bio-bwa.sourceforge.net>). Файлы выравнивания (BAM) фильтровали в отношении качества (MAPQ 30) для сохранения только тех прочтений, которые имеют одно или лишь немного «хороших» совпадений с эталонной последовательностью. Фильтрованные файлы выравнивания дополнительно обрабатывали с использованием двух отдельных конвейеров обработки данных (Фиг. 1). Для создания контрольного генома для анализа ВЧК из АВГ ДНК отдельной клетки, 15 БКК были получены от разных взрослых мужчин без заболеваний крови и были использованы в качестве универсального эталона. Для каждого образца количество прочтений на бин (размер окна на бин отличается у двух конвейеров обработки данных, смотри ниже) нормировали пропорционально, чтобы довести общее количество прочтений до 1 миллиона. Затем медиану, среднее значение и стандартное отклонение (sd) для нормированного количества прочтений данных контролей рассчитывали для каждого бина для дальнейшего использования.

Аналитический конвейер 1 использовали для оценки геномной нестабильности. Человеческий геном Hg38 разделяли на ~3000 бинов по 1 миллиону пар оснований, и подсчитывали прочтения в каждом бине для каждого образца. Для каждого образца количество прочтений на бин нормировали пропорционально для доведения общего

количества прочтений до 1 миллиона, с последующей корректировкой содержания GC для каждого бина. Медианные значения количества прочтений для каждого бина контрольных БКК использовали для исключения бинов с низким охватом из последующих анализов (<100 прочтений). Отношения между тестируемыми образцами и контрольными БКК рассчитывали и регистрировали после Log₂ преобразования. Хромосомные сегменты предсказывали с использованием R Bioconductor package DNA copy, позволяющего обнаруживать точечные разрывы при изменении числа копий ДНК. LST рассчитывали, как количество хромосомных разрывов между смежными областями размером по меньшей мере 10 Мб, и PGA рассчитывали, как процентную долю генома пациента с изменениями числа копий (порог отсечения для амплификаций: >0,4; порог отсечения для делеций: < -0,7).

Фенотипическое прогнозирование LST (pLST):

Тренировочный набор 608 ЦОК пациентов анализировали на количественные и качественные признаки цифровой патологии. Для ЦОК последовательно проводили анализ изображений и секвенирование. Был разработан многовариантный классификатор с использованием описанных ниже методов.

Анализ изображений приводит к получению p белковых/морфологических признаков на каждую ЦОК (X_1, X_2, \dots, X_p). Секвенирование приводит к получению «фактического» количества LST на каждую ЦОК (aLST). Затем многовариантный алгоритм линейной регрессии «обучают» прогнозированию aLST с учетом серий белковых/морфологических признаков, полученных при визуализации ($aLST - X_1 + X_2 + \dots + X_p$). После «обучения» (и при прогнозировании на основании новых тестовых данных) алгоритм выдает прогнозированное количество LST (называемых «pLST») с учетом серий белковых/морфологических признаков, полученных при визуализации (X_1, X_2, \dots, X_p) на каждую ЦОК. Перед проведением «обучения» или тестирования применяют общепринятые методы преобразования и нормирования данных для линеаризации визуализированных признаков (X_1, X_2, \dots, X_p) с aLST. Любые виды нормирования, применяемые к тренировочному набору, выполняют на тестируемом наборе. Для оценки важности признаков, один из используемых методов заключался в оценке того, насколько сильно каждый визуализированный признак (X_1, X_2, \dots, X_p) коррелирует с aLST на однофакторной основе. Во-первых, для каждого визуализированного признака рассчитывают коэффициент Пирсона корреляции с aLST. Коэффициенты корреляции $\gg 0$ указывают на признаки, которые сильно положительно коррелируют с aLST (например, большие значения для X приводят к большим значениям для aLST). Коэффициенты корреляции $\ll 0$ указывают на признаки, которые сильно отрицательно коррелируют с aLST (например, меньшие значения для X приводят к большим значениям для aLST). Коэффициенты корреляции около 0 указывают на признаки, которые никоим образом не коррелируют с aLST (и, таким образом, не могут служить прогностическими факторами для aLST). Получают абсолютные значения коэффициентов корреляции для каждого признака для сортировки на признаки, имеющие сильную прогностическую связь с aLST (положительную или отрицательную), и

признаки, имеющие менее сильную прогностическую связь с aLST. Результат представлен на Фигуре 38. Показан анализ pLST для независимой группы пациентов с mCRPC, образцы крови у которых взяты непосредственно перед началом AR-направленной терапии (с использованием ингибитора сур17, абиратерона, или ингибитора AR, энзалутамида) или химиотерапии таксанами (доцетакселом или кабазитакселом). Алгоритмы, охватывающие различные уровни pLST+ клеток, приводят к выявлению пациентов с более неблагоприятными результатами терапии, чем у тех, кто является отрицательным в отношении маркера.

Пример 4: Идентификация популяций пациентов для терапии лекарственным средством, основанной на присутствии определенных типов ЦОК.

Все пациенты, включенные в данное исследование, были пациентами с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (mCRPC), получающими терапию первой или второй линии. Демографические данные пациентов, чьи образцы были использованы в данных исследованиях, приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Демография пациентов¹.

Характеристики пациентов	
Отдельные пациенты	98
Возраст, годы: медиана (диапазон)	70 (45–87)
Основное лечение	
Простатэктомия	47 (48%)
Облучение	21 (21%)
Брахитерапия	3 (3%)
Никакое	27 (28%)
Характеристики образца	
Общее количество исходных (до терапии) образцов	107
Антиметастатическая терапия, начатая после начала исследования	
Абиратерон	47 (44%)
Энзалутамид	60 (56%)
Линия антиметастатической терапии в начале исследования	
1-я линия	64 (60%)
2-я линия	43 (40%)
Статус химиотерапии в начале исследования	
Не получавшие химиотерапию	97 (91%)
Получавшие химиотерапию	10 (9%)
Участки метастазов заболевания в начале исследования	
Только кости	32 (30%)

Только лимфатические узлы ^a	20 (19%)
Кости и лимфатические узлы ^a	45 (42%)
Кости и внутренние органы ± лимфатические узлы ^a	8 (7%)
Только другие мягкие ткани	2 (2%)
Лабораторные показатели в начале исследования	
ПСА, нг/мл: медиана (диапазон)	20,13 (0,09–2006,14)
Hgb, г/дл: медиана (диапазон)	12,7 (7,2–15,0)
ЩФ, единиц/л: медиана (диапазон)	99 (25–2170)
ЛДГ, единиц/л: медиана (диапазон) ^b	207 (123–1293)
АЛБ, г/дл: медиана (диапазон)	4,2 (3,3–4,9)
^a – включает пациентов с заболеванием других мягких тканей	
^b – для двух образцов отсутствуют показатели ЛДГ	

¹ПСА (простатический специфический антиген); Hgb (гемоглобин); ЩФ (щелочная фосфатаза); ЛДГ (лактатдегидрогеназа); АЛБ (альбумин).

Клетки типа К были идентифицированы в основном, как описано выше.

В Таблице 3 приведены данные по частоте встречаемости клеточного типа К в зависимости от вида лечения и линии терапии. 25% пациентов, получавших терапию первой и второй линии, положительны по клеточному типу К.

Таблица 3. Частота встречаемости клеточного типа К при разных видах лечения и линиях терапии

	Лечение	Количество положительных	Количество отрицательных	Всего	% положительных
1–я линия	Abi	10	14	24	42%
	Enza	7	33	40	18%
	Abi+Enza	17	47	64	27%
2–я линия	Abi	3	20	23	13%
	Enza	7	13	20	35%
	Abi+Enza	10	33	43	23%
1–я и 2–я линия	Abi	13	34	47	28%
	Enza	14	46	60	23%
	Abi+Enza	27	80	107	25%

Как показано на Фигуре 57, пациенты имели сходные показатели общей выживаемости (OS) и продолжительности терапии (Tx) при лечении абиратероном (Abi) или энзалутамидом (Enza), но получавшие Enza пациенты имели значительно лучшие

показатели выживаемости без определяемого радиографическими методами прогрессирования (rPFS) ($p=0,025$).

Как показано на Фигуре 58, среди получавших Abi пациентов, у пациентов, имеющих или не имеющих клеточный тип К, отсутствовали отличия в показателях продолжительности Тх, rPFS и OS.

Как показано на Фигуре 59, среди получавших Enza пациентов, у пациентов, не имеющих клеточный тип К, наблюдалось значительное улучшение показателей продолжительности Тх, rPFS и OS (все $p < 0,005$).

Как показано на Фигуре 60, среди пациентов, имеющих клеточный тип К, пациенты, получавшие Abi, имели лучшие показатели OS, чем пациенты, получавшие Enza, но различия не были статистически значимыми ($p=0,1$).

Как показано на Фигуре 61, среди пациентов, не имеющих клеточный тип К, пациенты, получавшие Enza, имели значительно улучшенные показатели rPFS в сравнении с пациентами, получавшими Abi ($p=0,006$), но различия в OS отсутствовали.

Клеточный тип К являлся прогностическим биомаркером у пациентов с mCRPC, получавших лечение абиратероном или энзалутамидом. Связь частоты встречаемости клеточного типа К с угрозой смерти для пациентов с mCRPC, получавших Abi или Enza, оценивали с использованием многофакторных моделей пропорциональных рисков Кокса. Переменными, включенными в многофакторные модели, были: терапия (Abi против Enza), статус пациента в отношении клеточного типа К (1, если пациент имел 1+ ЦОК клеточного типа К; 0, если количество ЦОК клеточного типа К=0), а также эффект взаимодействия между вариантом терапии и статусом в отношении клеточного типа К. Результаты анализа приведены в Таблице 4, и визуально доверительный интервал представлен на Фигуре 62. Взаимосвязь клеточного типа К и вариантов терапии была значительной ($p < 0,05$) в многофакторной модели. Пациенты, имеющие клеточный тип К, лучше отвечали на лечение Abi, а пациенты, не имеющие клеточный тип К, лучше отвечали на лечение Enza.

В Таблице 4 приведены результаты анализа многофакторных моделей пропорциональных рисков Кокса.

Признак	Кодировка	<i>p</i> -значение	ОР	нижний 0,95	верхний 0,95
Терапия	=0 если Abi; =1 если Enza	0,4167	0,6543	0,2351	1,821
Клеточный тип К	=0 если К-; =1 если К+	0,2843	1,8472	0,6008	5,68
Взаимосвязь клеточного типа К и терапии	=0 если не К+ и Enza; =1 если К+ и Enza	0,0306	5,2792	1,168	23,861

Перечисление списка элементов в любом определении переменной в настоящем

документе включает определения этой переменной как любого отдельного элемента или комбинации (или подкомбинации) перечисленных элементов. Перечисление вариантов осуществления в настоящем документе включает данный вариант осуществления как любой отдельный вариант осуществления или в комбинации с любыми другими вариантами осуществления, или их частями.

Все патенты и публикации, упомянутые в настоящей спецификации, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если было бы специально и индивидуально указано, что каждый независимый патент и публикация включены посредством ссылки.

Из приведенного выше описания будет очевидно, что могут иметь место вариации и модификации изобретения, описанного в настоящем документе, для адаптации его к различным вариантам применения и условиям. Такие варианты осуществления также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон у пациента с раком, включающий:

(а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

(i) размер ядра;

(ii) ядерную энтропию;

(iii) количество ядрышек; и

(iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;

(c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет определять клеточный тип, связанный с ответом пациента на абиратерон.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки.

4. Способ по любому из пунктов 1–3, дополнительно включающий этап выделения ЦОК из указанного образца.

5. Способ по любому из пунктов 1–4, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

6. Способ по п. 5, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

7. Способ определения присутствия или отсутствия клеточного типа, при этом отсутствие клеточного типа связано с ответом на энзалутамид у пациента с раком, включающий:

(а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

(i) размер ядра;

(ii) ядерную энтропию;

(iii) количество ядрышек; и

(iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;
 (с) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и
 (d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК указывает на отсутствие клеточного типа, связанное с ответом пациента на энзалутамид.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

9. Способ по п. 7 или 8, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки.

10. Способ по любому из пунктов 7–9, дополнительно включающий этап выделения ЦОК из указанного образца.

11. Способ по любому из пунктов 7–10, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

12. Способ по п. 11, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

13. Способ идентификации пациента с раком для лечения лекарственным средством, включающий:

(a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

(i) размер ядра;

(ii) ядерную энтропию;

(iii) количество ядрышек; и

(iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;

(с) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом присутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения абиратерона пациенту с раком, или

при этом отсутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения энзалутамида пациенту с раком.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

15. Способ по п. 13 или 14, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки.

16. Способ по любому из пунктов 13–15, дополнительно включающий этап

выделения ЦОК из указанного образца.

17. Способ по любому из пунктов 13–16, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

18. Способ по п. 17, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

19. Способ по любому из пунктов 13–18, дополнительно включающий этап введения абиратерона пациенту с раком.

20. Способ по любому из пунктов 13–18, дополнительно включающий этап введения энзалутамида пациенту с раком.

21. Способ прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению абиратероном, включающий:

(а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

(i) размер ядра;

(ii) ядерную энтропию;

(iii) количество ядрышек; и

(iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;

(c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению абиратероном.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

23. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки.

24. Способ по любому из пунктов 21–23, дополнительно включающий этап выделения ЦОК из указанного образца.

25. Способ по любому из пунктов 21–24, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

26. Способ по п. 25, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

27. Способ прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению энзалутамидом, включающий:

(а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в

образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

- (i) размер ядра;
- (ii) ядерную энтропию;
- (iii) количество ядрышек; и
- (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;

(c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению энзалутамидом.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

29. Способ по п. 27 или 28, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и частые ядрышки.

30. Способ по любому из пунктов 27–29, дополнительно включающий этап выделения ЦОК из указанного образца.

31. Способ по любому из пунктов 27–30, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

32. Способ по п. 31, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

33. Способ идентификации клеточного типа, связанного с ответом на абиратерон у пациента с раком, включающий:

(a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

- (i) размер ядра;
- (ii) ядерную энтропию;
- (iii) размер цитоплазмы; и
- (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;

(c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет определять клеточный тип, связанный с ответом пациента на абиратерон.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи

классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

35. Способ по п. 33 или 34, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма.

36. Способ по любому из пунктов 33–35, дополнительно включающий этап выделения ЦОК из указанного образца.

37. Способ по любому из пунктов 33–36, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

38. Способ по п. 37, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

39. Способ определения присутствия или отсутствия клеточного типа, при этом отсутствие клеточного типа связано с ответом на энзалутамид у пациента с раком, включающий:

(а) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(б) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

(i) размер ядра;

(ii) ядерную энтропию;

(iii) размер цитоплазмы; и

(iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;

(с) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать отсутствие клеточного типа, связанное с ответом пациента на энзалутамид.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

41. Способ по п. 39 или 40, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма.

42. Способ по любому из пунктов 39–41, дополнительно включающий этап выделения ЦОК из указанного образца.

43. Способ по любому из пунктов 39–42, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

44. Способ по п. 43, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

45. Способ идентификации пациента с раком для лечения лекарственным средством, включающий:

(a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

(i) размер ядра;

(ii) ядерную энтропию;

(iii) размер цитоплазмы; и

(iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;

(c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом присутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения абиратерона пациенту с раком, или

при этом отсутствие биомаркерных ЦОК свидетельствует в пользу введения энзалутамида пациенту с раком.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

47. Способ по п. 45 или 46, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма.

48. Способ по любому из пунктов 45–47, дополнительно включающий этап выделения ЦОК из указанного образца.

49. Способ по любому из пунктов 45–48, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

50. Способ по п. 49, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

51. Способ по любому из пунктов 45–50, дополнительно включающий этап введения абиратерона пациенту с раком.

52. Способ по любому из пунктов 45–50, дополнительно включающий этап введения энзалутамида пациенту с раком.

53. Способ прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению абиратероном, включающий:

(a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

(i) размер ядра;

- (ii) ядерную энтропию;
- (iii) размер цитоплазмы; и
- (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;
- (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) идентификацию биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом идентификация биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению абиратероном.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

55. Способ по п. 53 или 54, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма.

56. Способ по любому из пунктов 53–55, дополнительно включающий этап выделения ЦОК из указанного образца.

57. Способ по любому из пунктов 53–56, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

58. Способ по п. 57, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

59. Способ прогнозирования восприимчивости пациента с раком к лечению энзалутамидом, включающий:

(a) проведение прямого анализа, включающего иммунофлуоресцентное окрашивание и определение морфологических характеристик ядросодержащих клеток в образце крови, полученном от пациента, для идентификации и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК);

(b) индивидуальное определение параметров цифровой патологии с целью создания профиля для каждой из ЦОК, при этом параметры включают

- (i) размер ядра;
- (ii) ядерную энтропию;
- (iii) размер цитоплазмы; и
- (iv) необязательно, другие признаки, приведенные в Таблице 1;
- (c) классифицирование отдельных клеток на подтипы ЦОК; и

(d) определение присутствия или отсутствия биомаркерных ЦОК в подтипах ЦОК, при этом отсутствие биомаркерных ЦОК позволяет прогнозировать восприимчивость пациента с раком к лечению энзалутамидом.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что клетки классифицируют при помощи классификатора подтипов ЦОК, разработанного на основе неконтролируемой классификации.

61. Способ по п. 59 или 60, отличающийся тем, что биомаркерная ЦОК имеет характеристики: большое ядро, высокая ядерная энтропия и большая цитоплазма.

62. Способ по любому из пунктов 59–61, дополнительно включающий этап

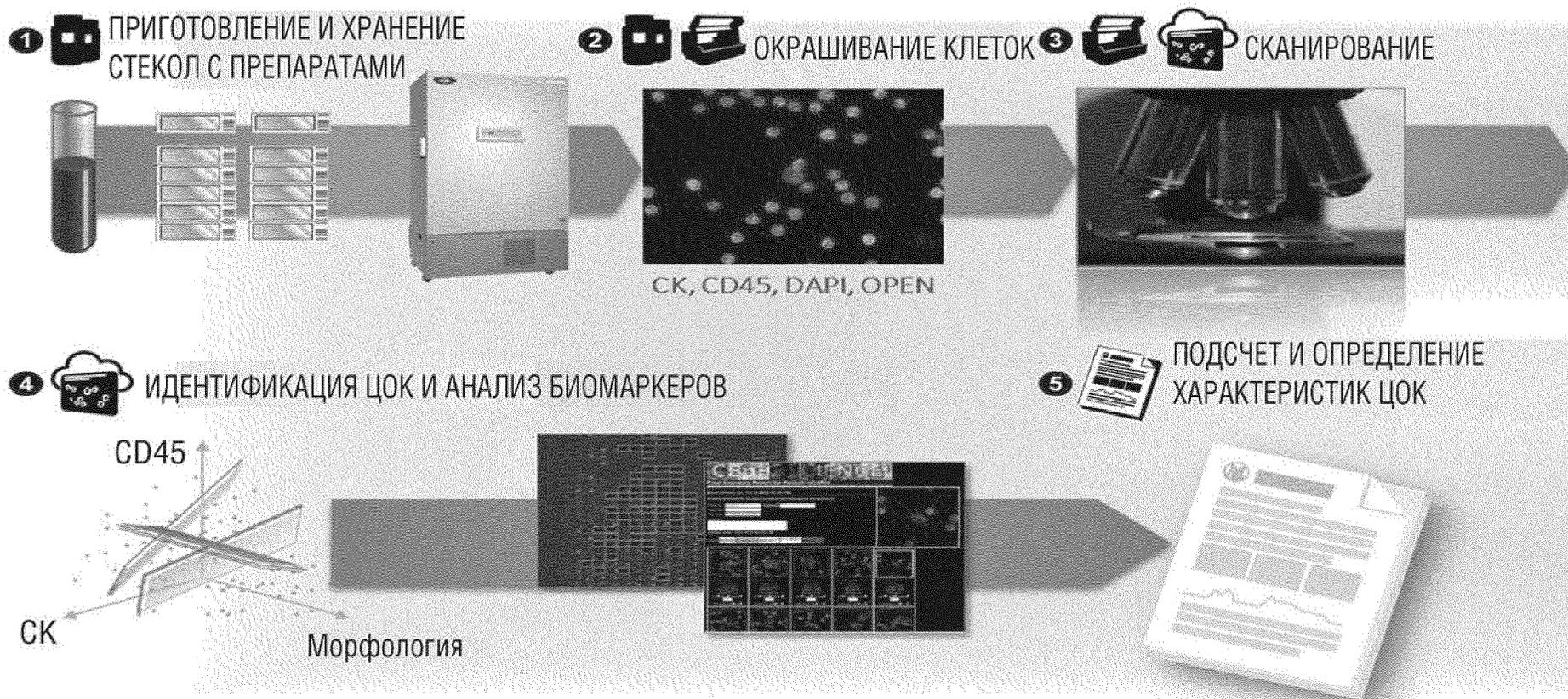
выделения ЦОК из указанного образца.

63. Способ по любому из пунктов 59–62, при этом указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

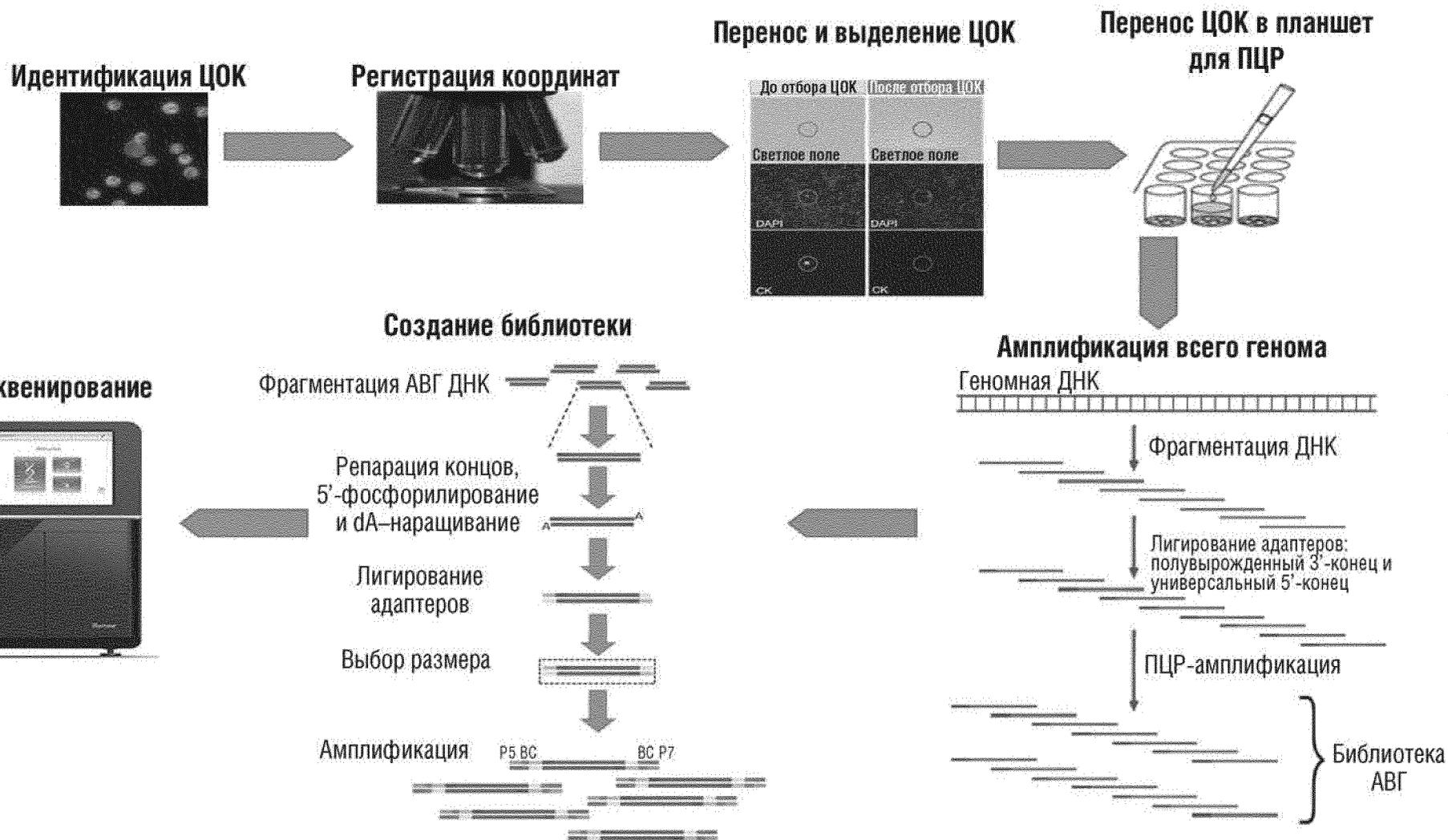
64. Способ по п. 63, при этом указанный рак предстательной железы является гормонорезистентным.

По доверенности

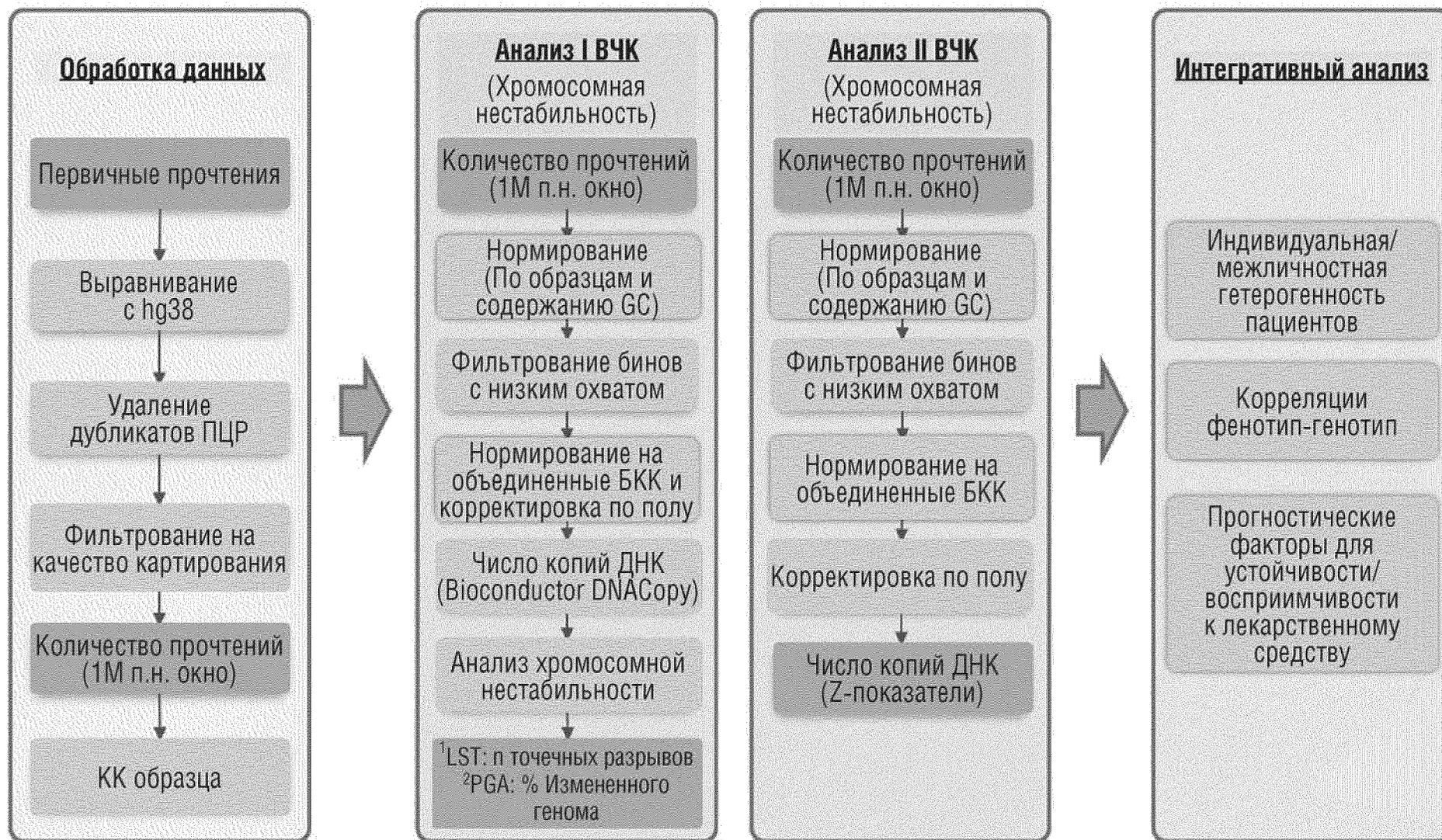
ФИГ.1А



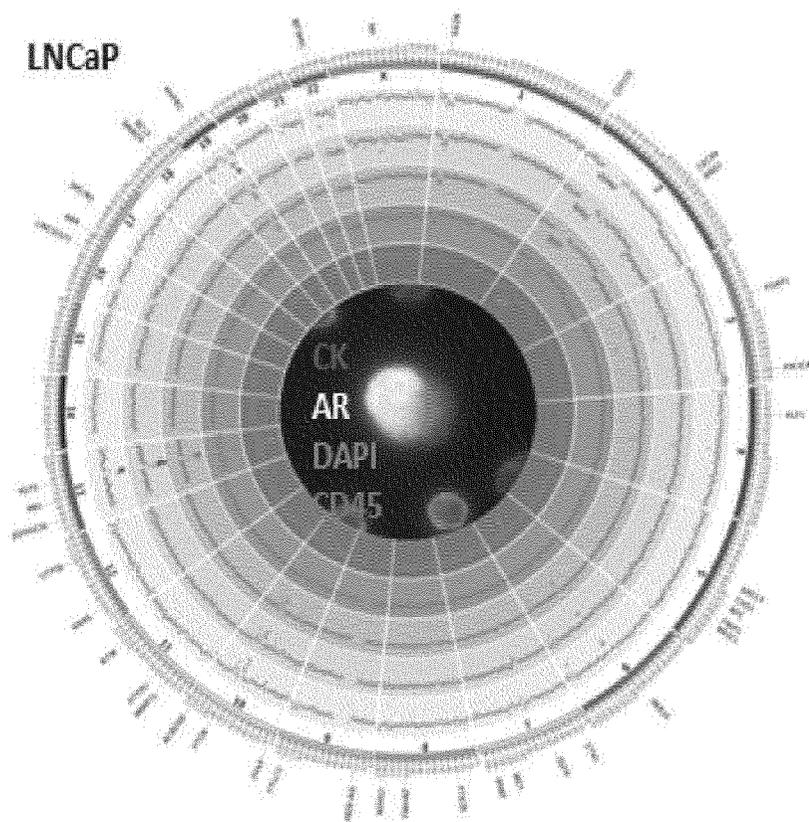
ФИГ.1В



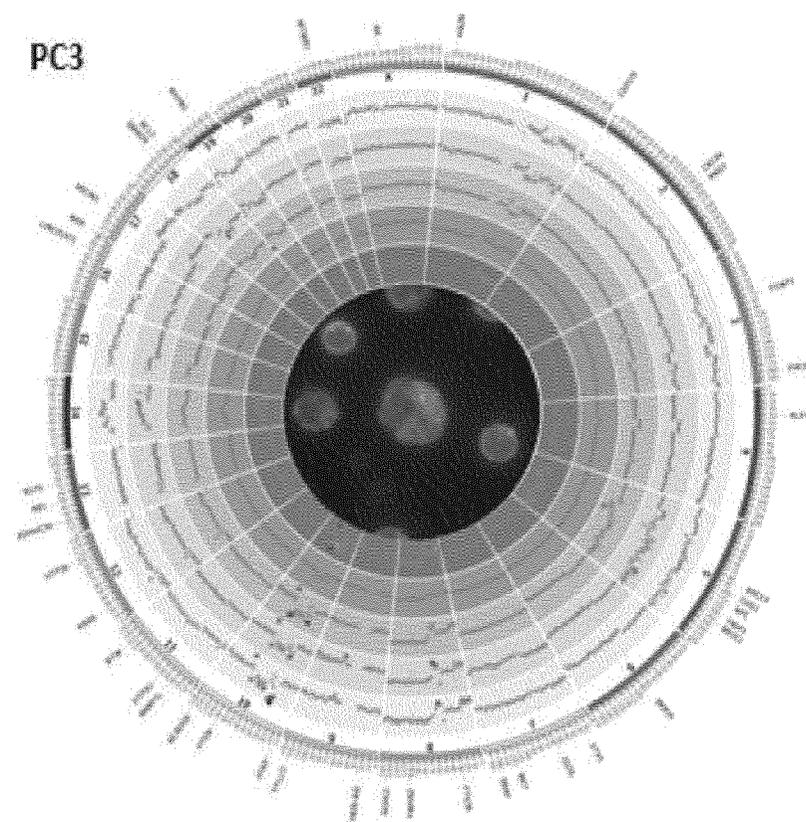
ФИГ.2



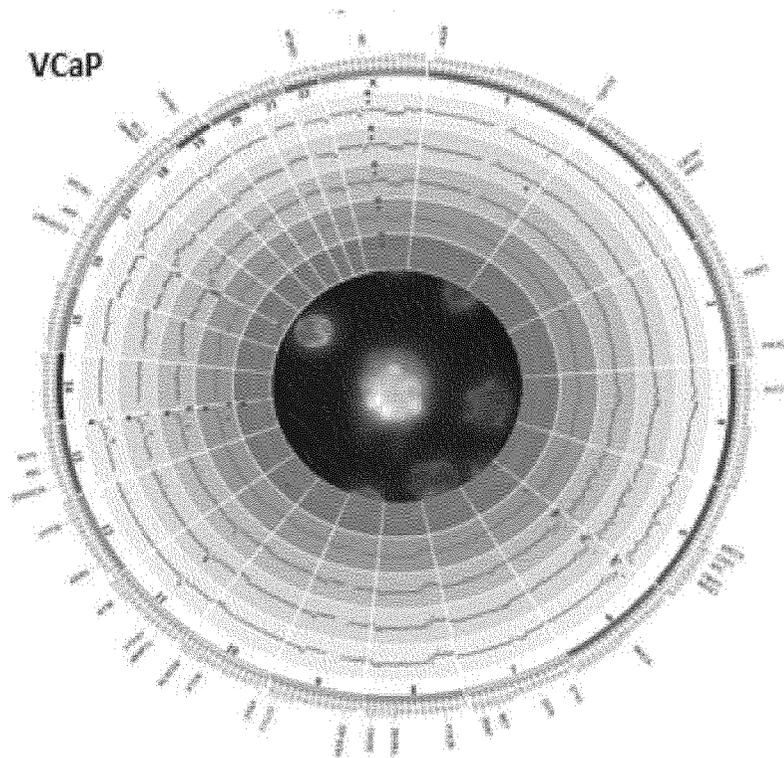
ФИГ.3А



ФИГ.3В



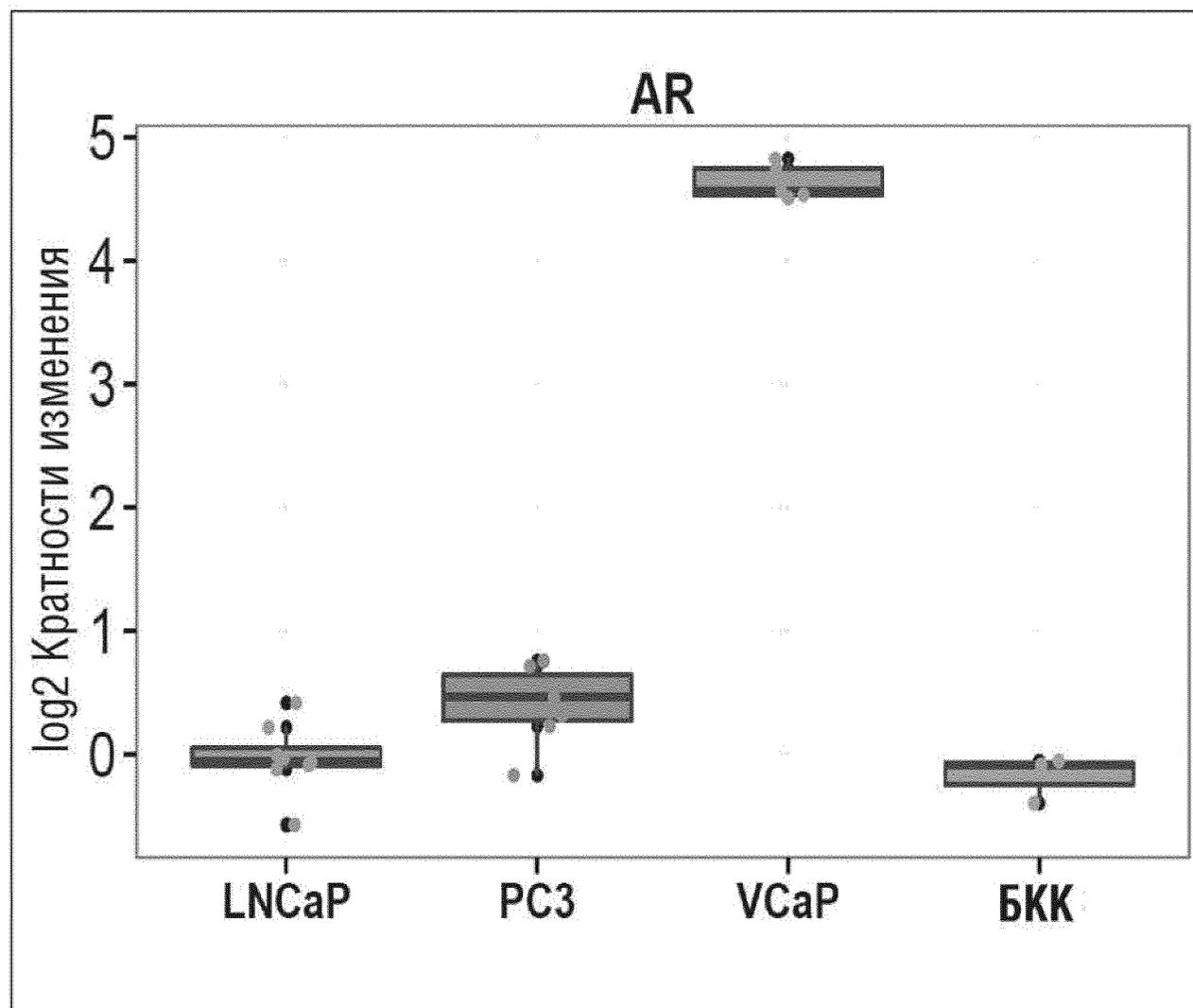
ФИГ.3С



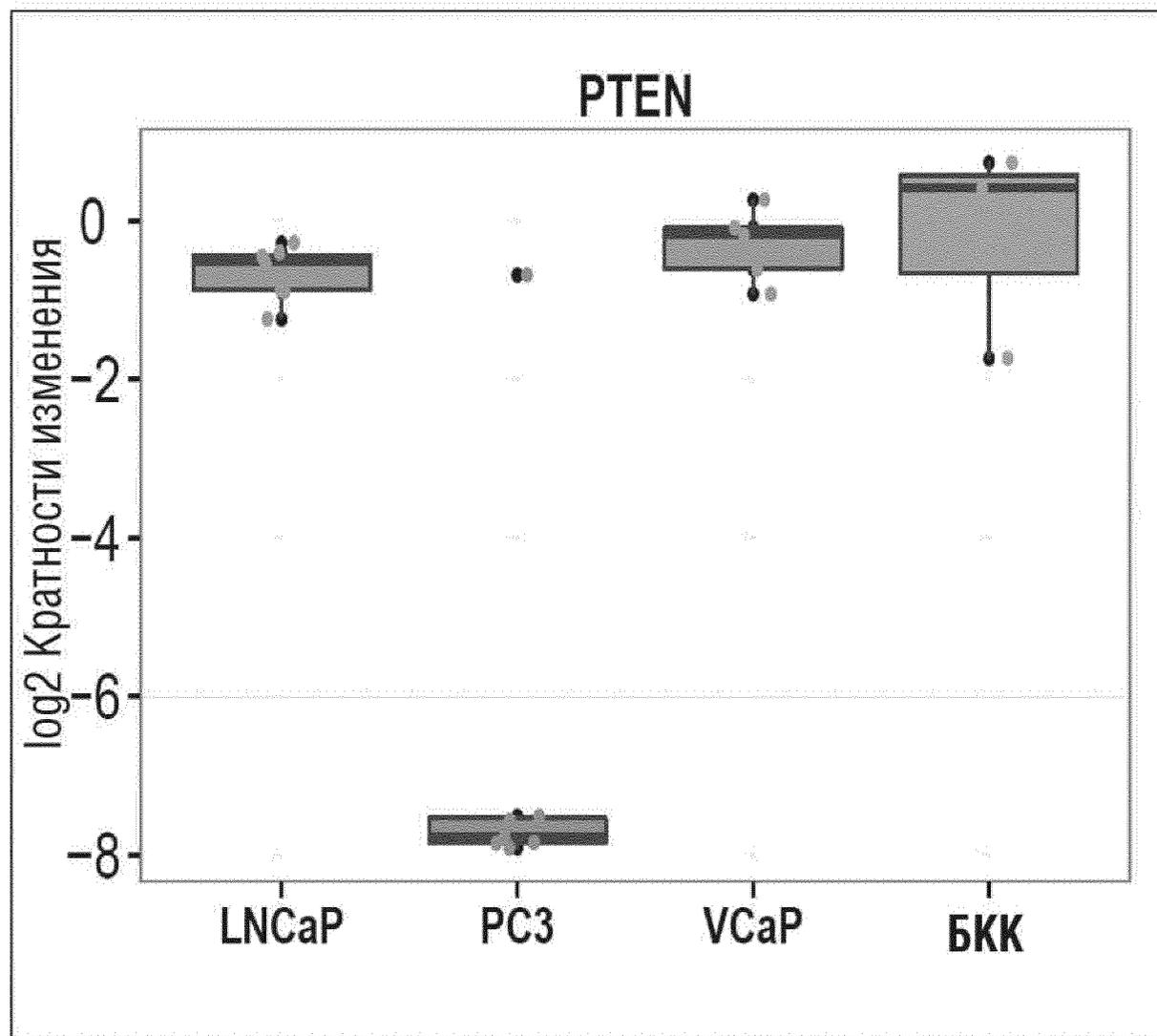
ФИГ.3D

Репрезентативная клеточная линия	Ключевые геномные признаки
LNCaP	Нормальная (мутантная) ВЧК AR гетерозиготная делеция PTEN p53 дт
VCaP	Амплификация AR интактный PTEN нормальная (мутантная) ВЧК p53
PC3	Нормальная ВЧК AR гомозиготная делеция PTEN делеция p53

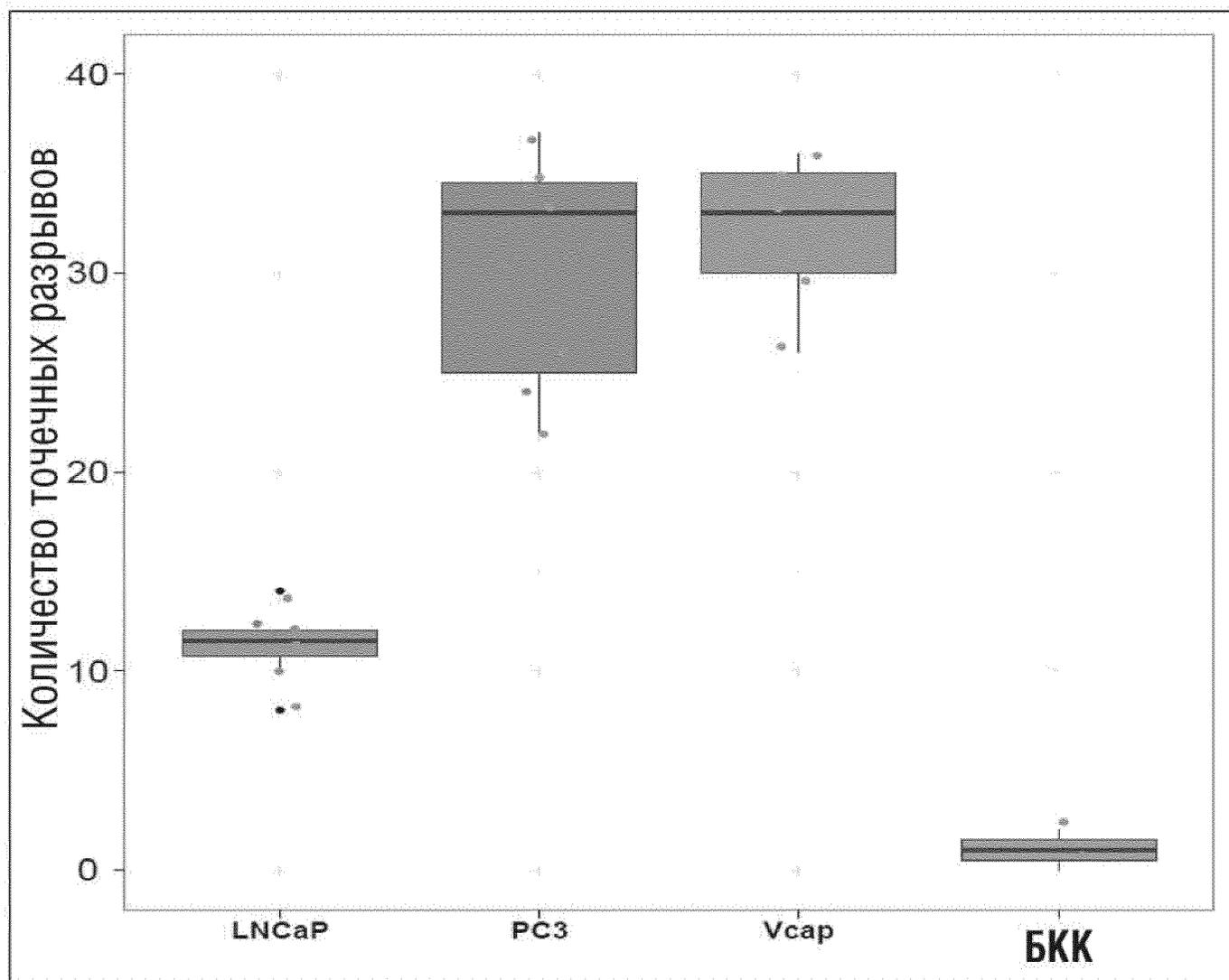
ФИГ.4А



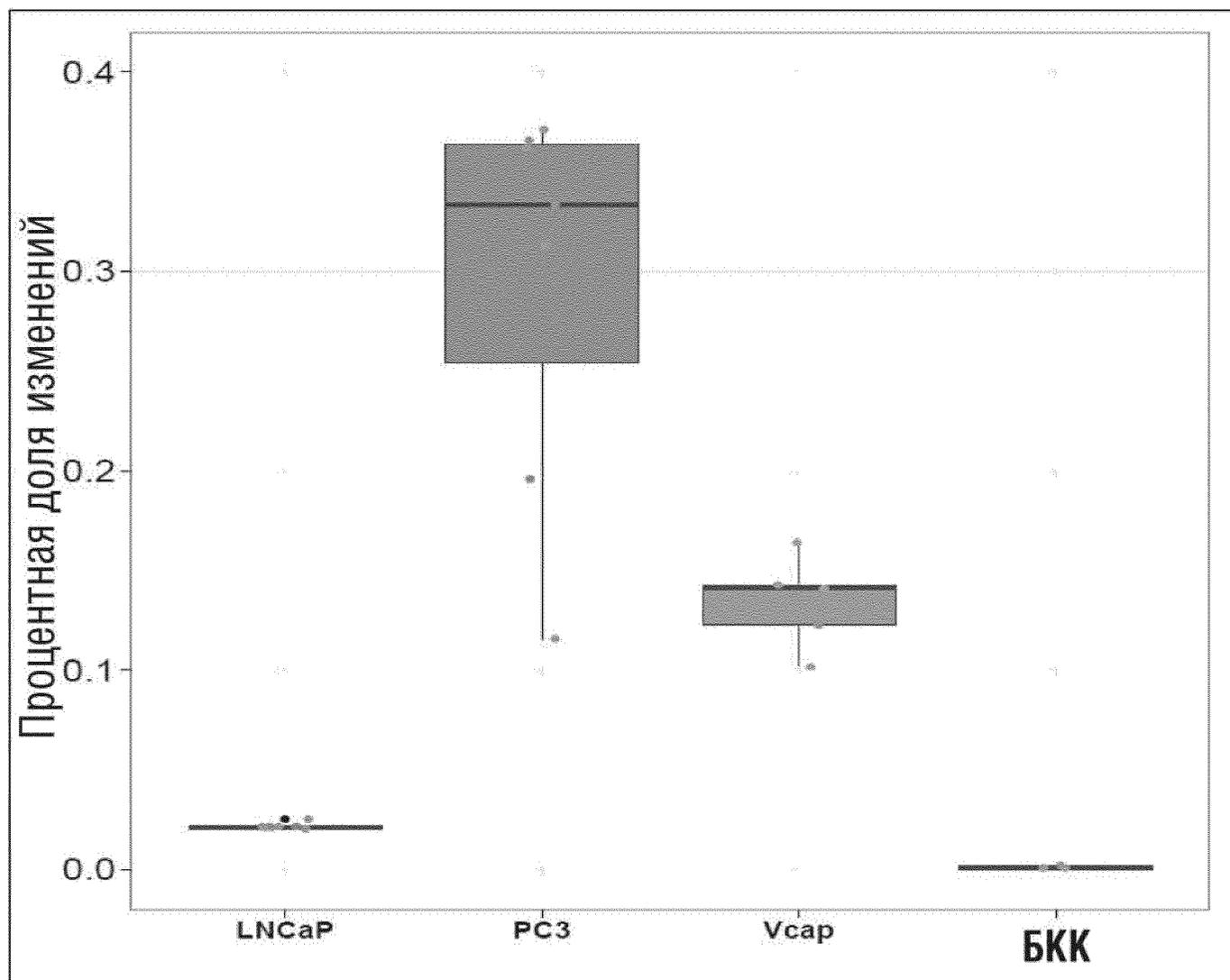
ФИГ.4В



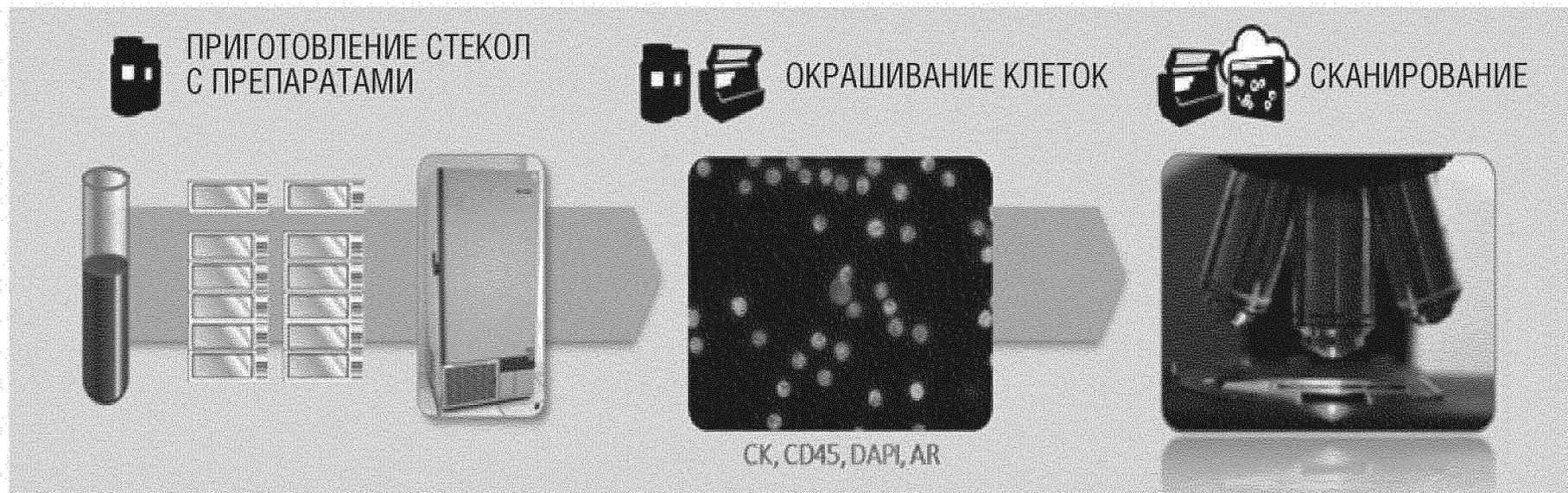
ФИГ.4С



ФИГ.4D



ФИГ.5



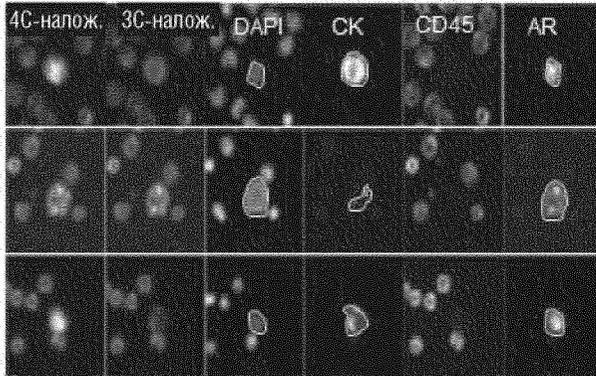
АНАЛИЗ БИОМАРКЕРОВ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЦОК

CD45

СК Морфология

ЦИФРОВАЯ ПАТОЛОГИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ЦОК

Нuclear Features	Cytoplasmic Features	AR Features
Nuclear Area	Cytoplasmic Area	AR Expression
Nuc. Convex Area	Cyto Convex Area	Cx Expression
Nuc Major Axis	Cyto Major Axis	100 Ratio
Nuclear Minor Axis	Cyto Minor Axis	
Nuclear Crudeity	Cyto Crudeity	
Nuclear Solidity		
Nuclear Entropy		
Nuclear Speckling		
Nuclear Presence	Cyto Presence	

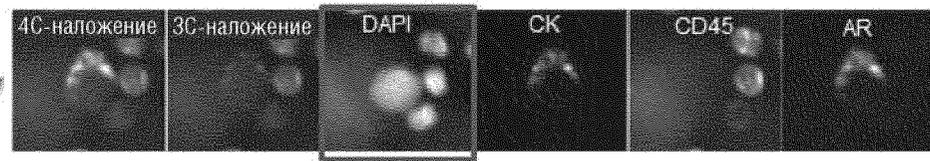


Сегментация ЦОК: каналы DAPI, CK и AR

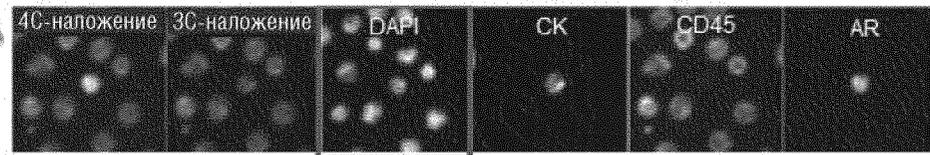
Определяемые признаки

Признаки белковых биомаркеров
CK пропорция (экспрессия белка)
AR пропорция (экспрессия белка)
Признаки цифровой патологии
Площадь ядра (мкм²)
Площадь цитоплазмы (мкм ²)
Площадь выпуклости ядра (мкм ²)
Площадь выпуклости цитоплазмы (мкм ²)
Большая ось ядра (мкм)
Большая ось цитоплазмы (мкм)
Малая ось ядра (мкм)
Малая ось цитоплазмы (мкм)
Округлость ядра
Округлость цитоплазмы
Плотность ядра
Плотность цитоплазмы
Ядерная энтропия
Отношение площадей выпуклости ядра и цитоплазмы
Ядрышки
СК спекл
Ядерный спекл
Дополнительные категориальные переменные
СК статус (наличие СК)
M1 статус (наличие AR)
Кластерный статус

Пример определения площади ядра (мкм²)



ЦОК с малой площадью ядра: 30,93 мкм²

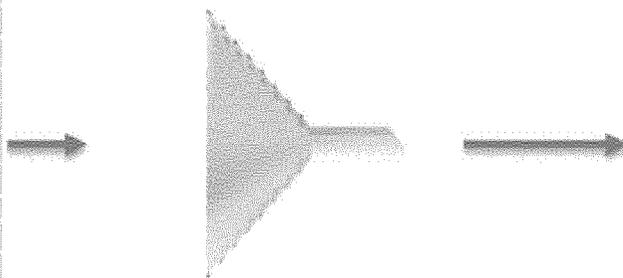


ФИГ.7

Признаки отдельных клеток

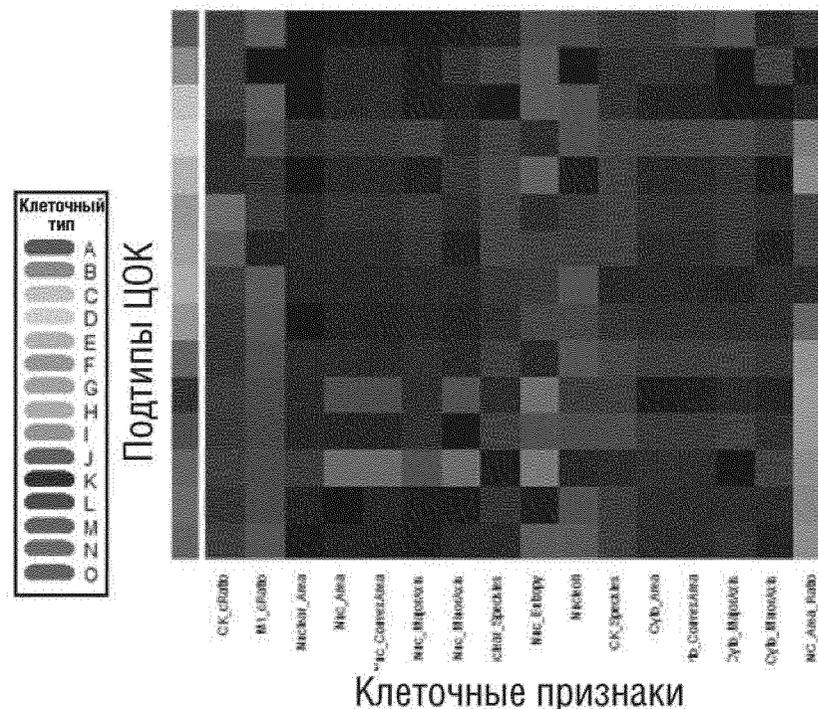
Признаки белковых биомаркеров
СК пропорция (экспрессия белка)
AR пропорция (экспрессия белка)
Признаки цифровой патологии
Площадь ядра (мкм ²)
Площадь цитоплазмы (мкм ²)
Площадь выпуклости ядра (мкм ²)
Площадь выпуклости цитоплазмы (мкм ²)
Большая ось ядра (мкм)
Большая ось цитоплазмы (мкм)
Малая ось ядра (мкм)
Малая ось цитоплазмы (мкм)
Округлость ядра
Округлость цитоплазмы
Плотность ядра
Плотность цитоплазмы
Ядерная энтропия
Отношение площадей выпуклости ядра и цитоплазмы
Ядрышки
СК спекл
Ядерный спекл
Дополнительные категориальные переменные
СК статус (наличие СК)
M1 статус (наличие AR)
Кластерный статус

Анализ главных компонентов
(Идентификация ключевых признаков)

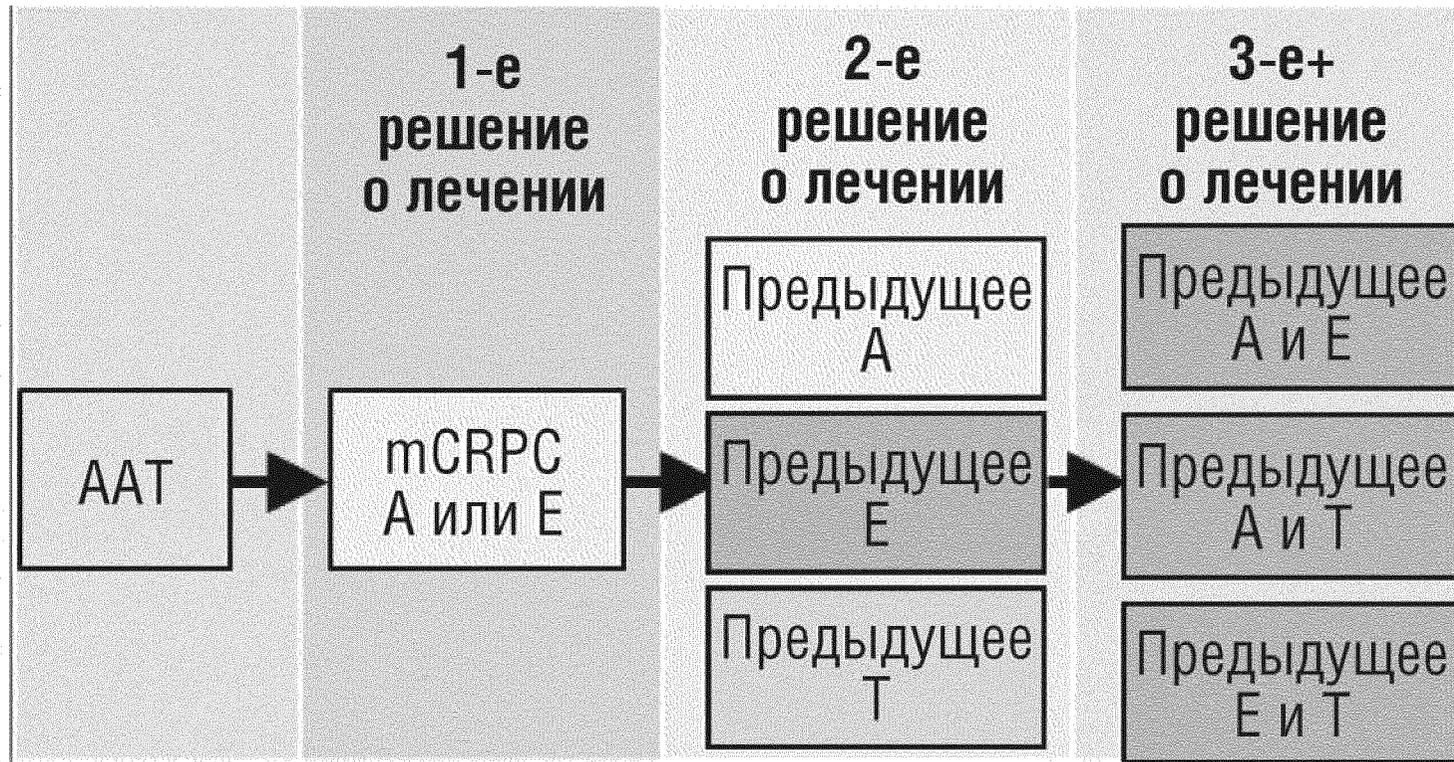


Неконтролируемая кластеризация (математическое группирование одинаковых ЦОК) выявляет 15 математических фенотипов ЦОК

Тепловая карта подтипов ЦОК по клеточным признакам



ФИГ.8



ФИГ.9

Характеристика	Число (%) или медиана (диапазон)
Количество исходных образцов (отдельных пациентов)	221(179)
Возраст, годы	68(45-91)
Основное лечение	
Простатэктомия	100 (45%)
Облучение	41 (19%)
Брахитерапия	13 (6%)
Никакое	67 (30%)
Гормональная терапия	
1-2 линии	81 (37%)
3 линии	46 (21%)
>4 линий	94 (43%)
Не получавшие химиотерапию	136 (62%)
Получавшие химиотерапию	85 (38%)
Метастатическое заболевание	
Кость	194(88%)
Лимфатический узел	149(67%)
Метаастазы во внутренних органах	76(35%)
Лабораторные показатели	
ПСА, нг/мл	37,7(0,10-3728,2)
Hgb, (г/дл)	12,0(7,0-15,0)
ЩФ, (единиц/л)	110(25-2170)
ЛДГ, (единиц/л)	222,5 (123-1293)
АЛБ, (г/дл)	4,2(3,1-4,9)
CellSearch® ЦОК, (клеток/7,5 мл)	2(0- >200)

Линия терапии пациентов			
	1-е решение о лечении	2-е решение о лечении	3-е+ решение о лечении
А или Е, исходный забор крови (n= 150)	Ранее без А или Е Тх (1-я линия) n=64	Ранее AR Тх (А или Е) (2-я линия) n=12	Ранее А и Е (3-я линия) n=2
		Ранее Т (2-я линия) n=8	Ранее AR Тх и Т (3-я линия) n=40
Т, исходный забор крови (n=71)	Ранее без А или Е Тх (1-я линия) n=12	Ранее AR Тх (А или Е) (2-я линия) n=12	Ранее А и Е (3-я линия) n=9
			Ранее AR Тх и Т (3-я линия) n=38

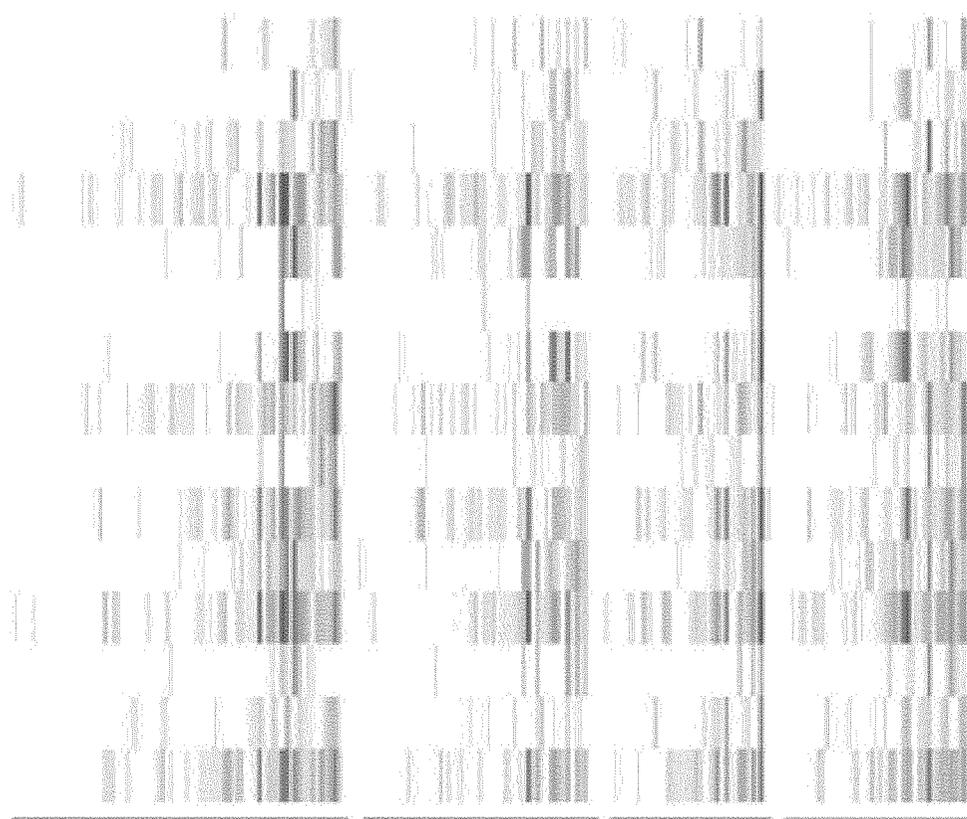
ФИГ.10

15 определенных ключевых математических фенотипов ЦОК

Вид	Клеток в группе
Клеточный тип А	123
Клеточный тип В	209
Клеточный тип С	448
Клеточный тип D	1448
Клеточный тип E	701
Клеточный тип F	144
Клеточный тип G	867
Клеточный тип H	659
Клеточный тип I	266
Клеточный тип J	814
Клеточный тип K	508
Клеточный тип L	1643
Клеточный тип M	194
Клеточный тип N	198
Клеточный тип O	1003

Систематизация подтипов ЦОК по образцам от пациентов и линии терапии

- Тип А/мл
- Тип В/мл
- Тип С/мл
- Тип D/мл
- Тип E/мл
- Тип F/мл
- Тип G/мл
- Тип H/мл
- Тип I/мл
- Тип J/мл
- Тип K/мл
- Тип L/мл
- Тип M/мл
- Тип N/мл
- Тип O/мл



1-я

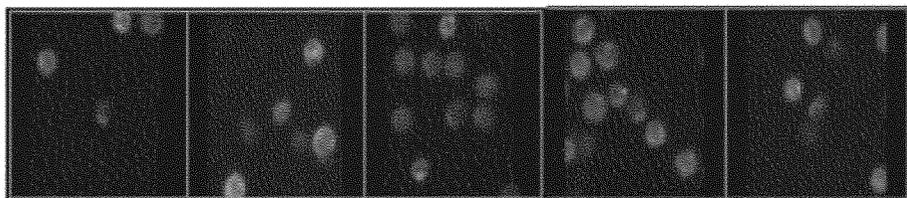
2-я

3-я

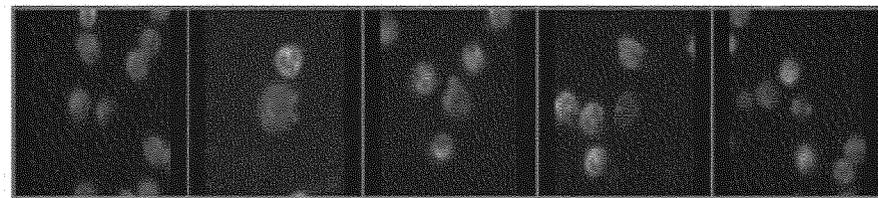
4-я+

15/97

ФИГ.11



Пример ЦОК от пациента с низким индексом Шеннона

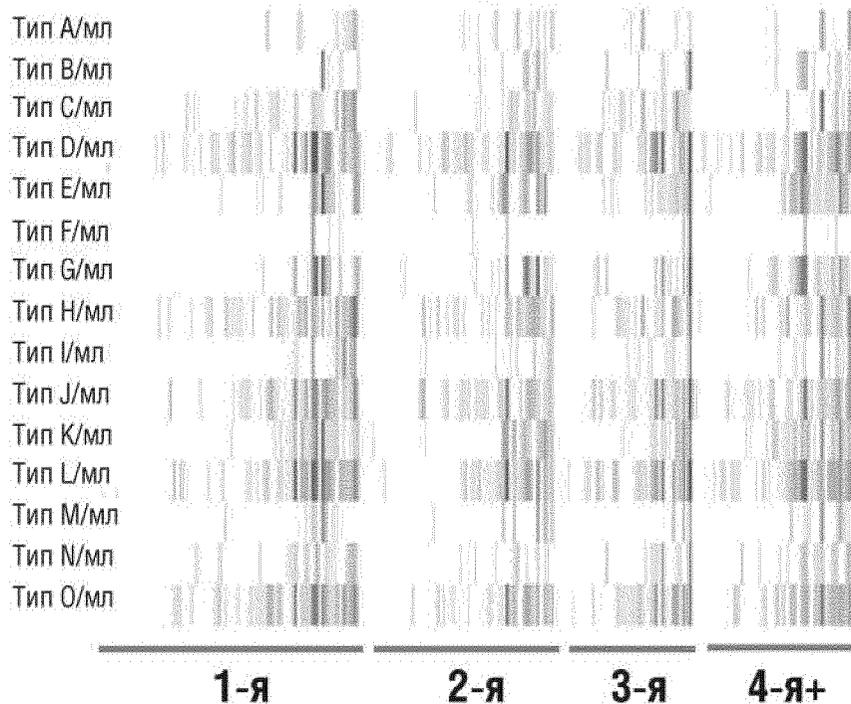


Пример ЦОК от пациента с высоким индексом Шеннона

15 определенных ключевых математических фенотипов ЦОК

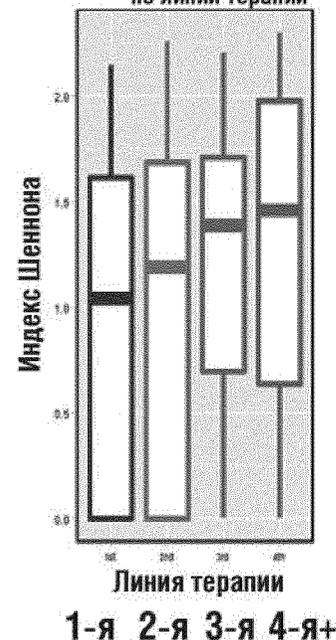
Вид	Клеток в группе
Клеточный тип А	123
Клеточный тип В	209
Клеточный тип С	448
Клеточный тип D	1448
Клеточный тип E	701
Клеточный тип F	144
Клеточный тип G	867
Клеточный тип H	659
Клеточный тип I	266
Клеточный тип J	814
Клеточный тип K	508
Клеточный тип L	1643
Клеточный тип M	194
Клеточный тип N	198
Клеточный тип O	1003

Систематизация подтипов ЦОК по образцам от пациентов и линии терапии

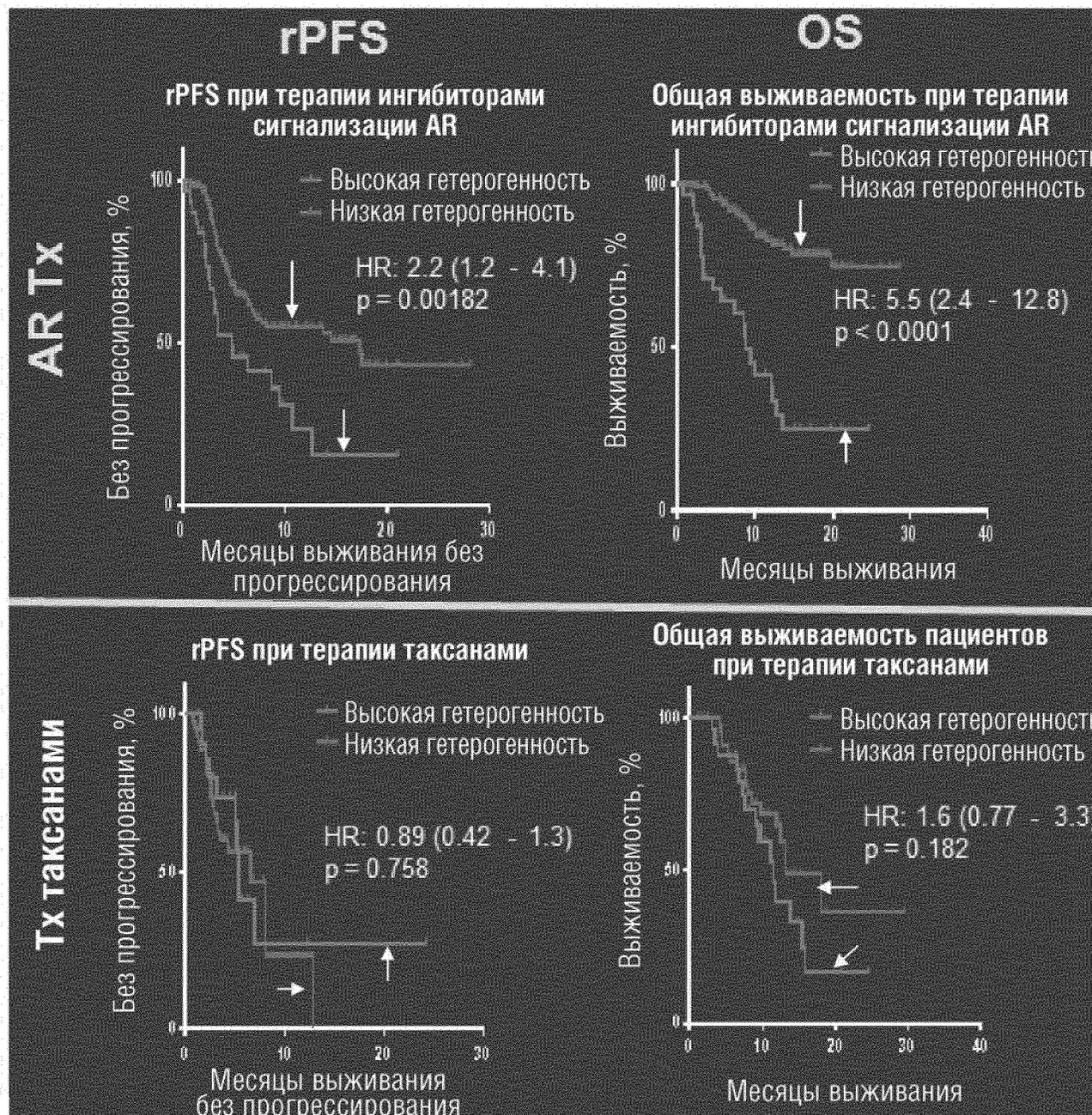


Индекс Шеннона (мера разнообразия)

Систематизация индекса Шеннона по линии терапии



ФИГ.12А



ФИГ.12В

Результаты при применении **AR Tx**
 На основании гетерогенности

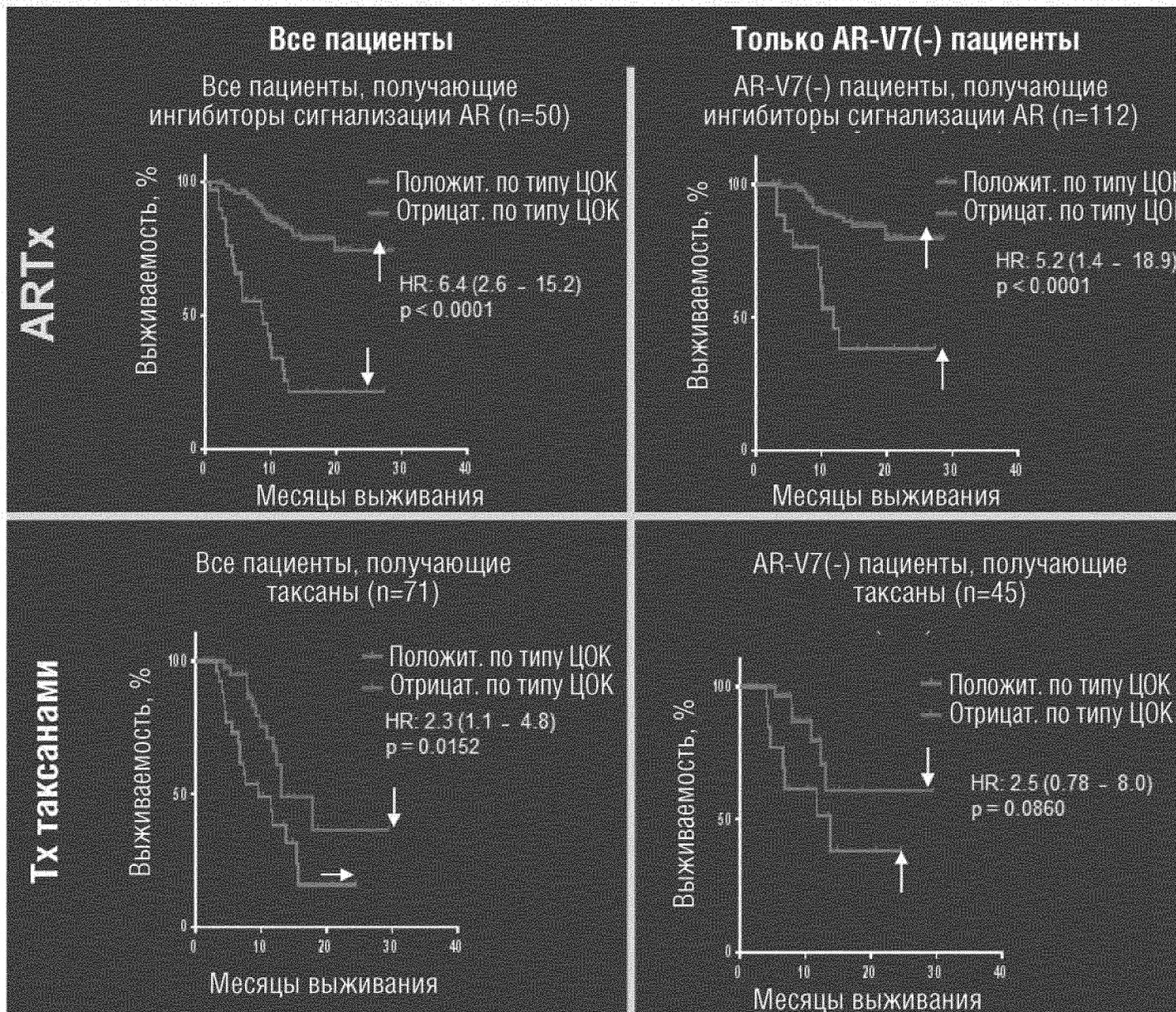
AR Tx (n=150)	Высокая гетерогенность	Низкая гетерогенность
Средняя выживаемость	9 месяцев	Не достигнута
Отношение рисков: OS	5,51	
Логарифмический ранговый критерий p-значение, OS	<0,0001	
Средняя rPFS	5 месяцев	17 месяцев
Отношение рисков: rPFS	2,2	
Логарифмический ранговый критерий: rPFS	0,00182	

ФИГ.13

Многофакторный анализ ПР Кокса для прогностических факторов общей выживаемости	
Эффект	р-значение
Высокая гетерогенность	0,01
3-я или более поздняя линия (1=да, 0=нет)	0,002
Метастазы во внутренних органах (1=да, 0=нет)	0,21
ПСА, пре-терапия (1 соответствует >37,7, 0 соответствует <=37,7)	0,33
ЛДГ, пре-терапия (1 соответствует >250, 0 соответствует <=250)	0,07
Альбумин, пре-терапия (1 соответствует >4, 0 соответствует <=4)	0,03
Hgb, пре-терапия (1 соответствует >12, 0 соответствует <=12)	0,05
ЩФ, пре-терапия (1 соответствует >130, 0 соответствует <=130)	0,06
Лечение (1=таксаны, 0=ARS)	0,08
Взаимосвязь Высокая гетерогенность: Терапия	0,0232



ФИГ.14



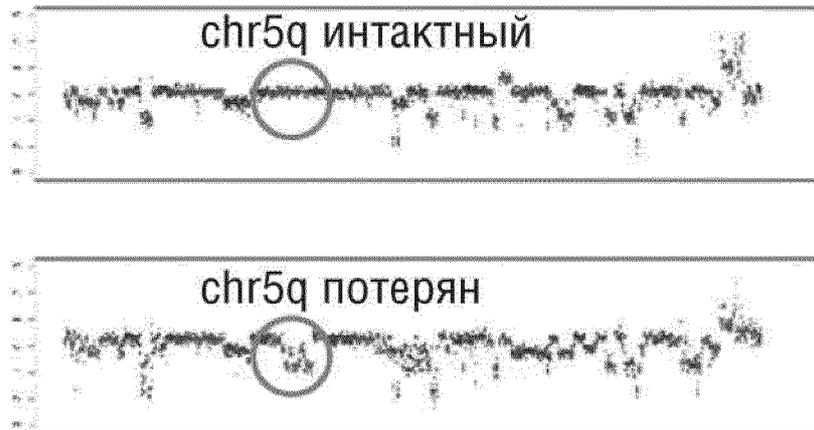
ФИГ.15

Перенос и захват отдельных
клеток для генотипирования

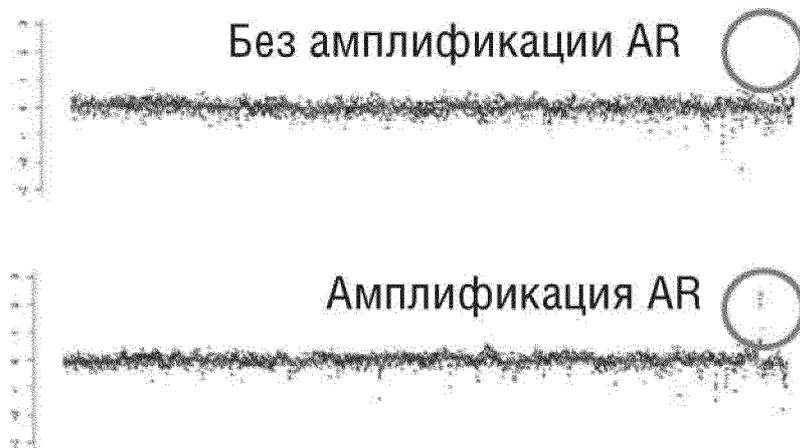


ФИГ.16

Пример двух клонов от одного и того же пациента, с потерей и без потери chr5q

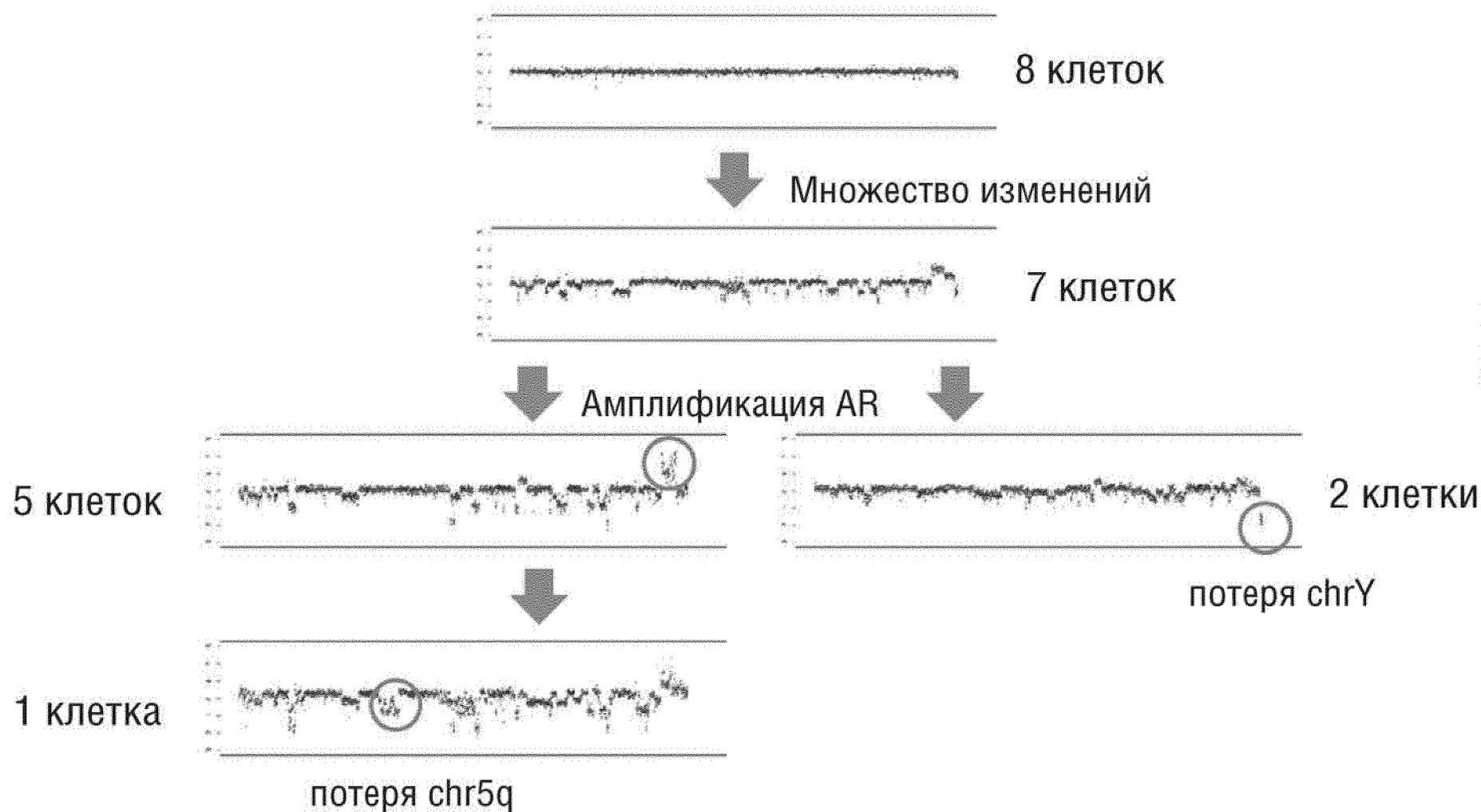


Пример двух клонов от одного и того же пациента, с амплификацией и без амплификации AR



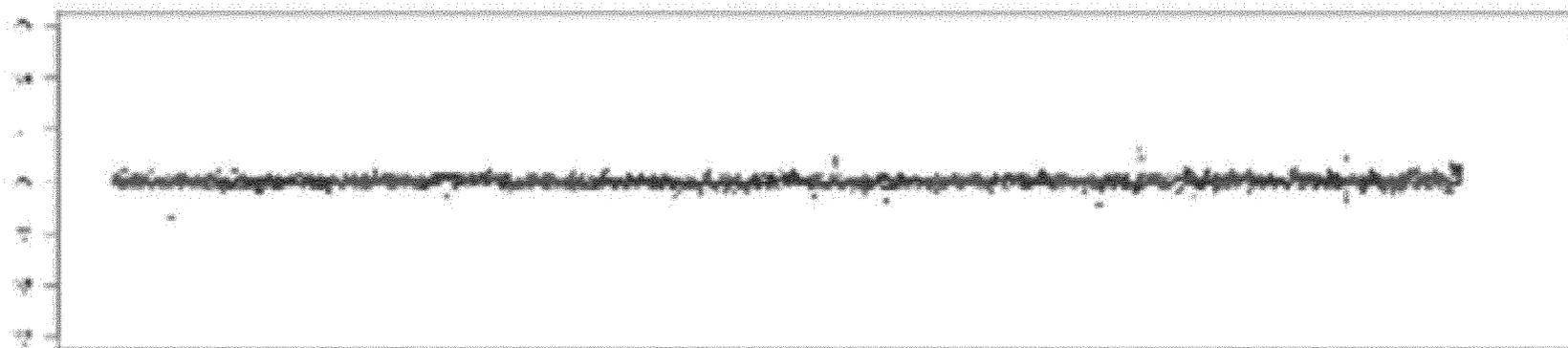
ФИГ.17

23 клетки от одного пациента



23/97

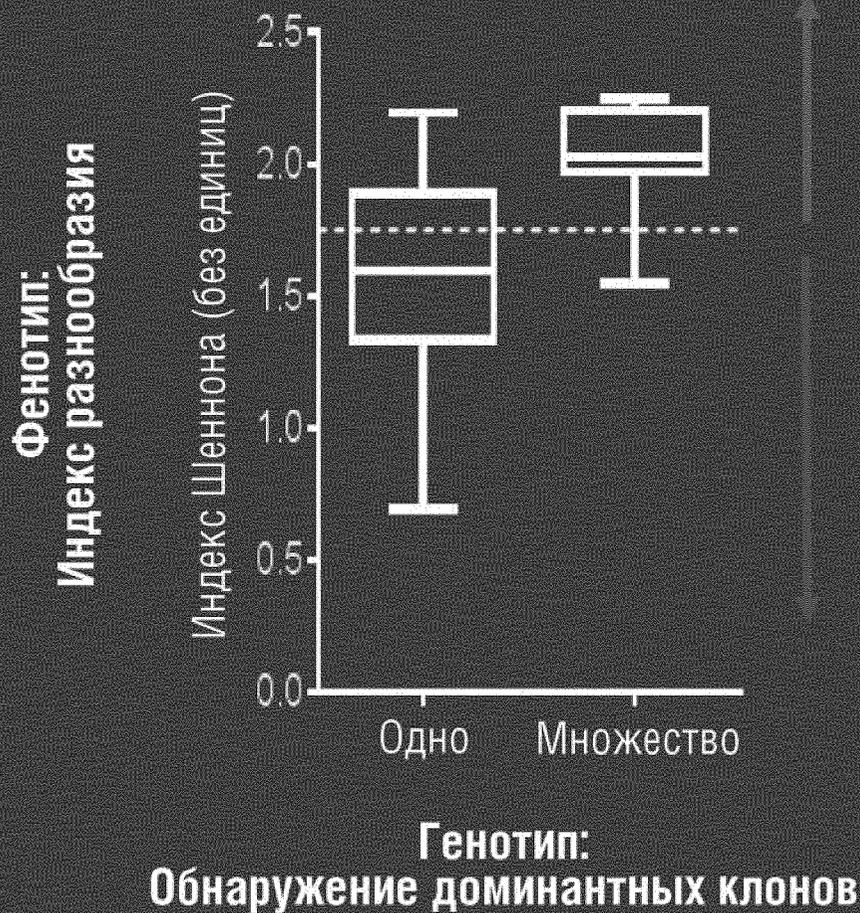
ФИГ.18



12 ЦОК с одинаковым геномным профилем

ФИГ.19

Сравнение генотипической и фенотипической гетерогенности

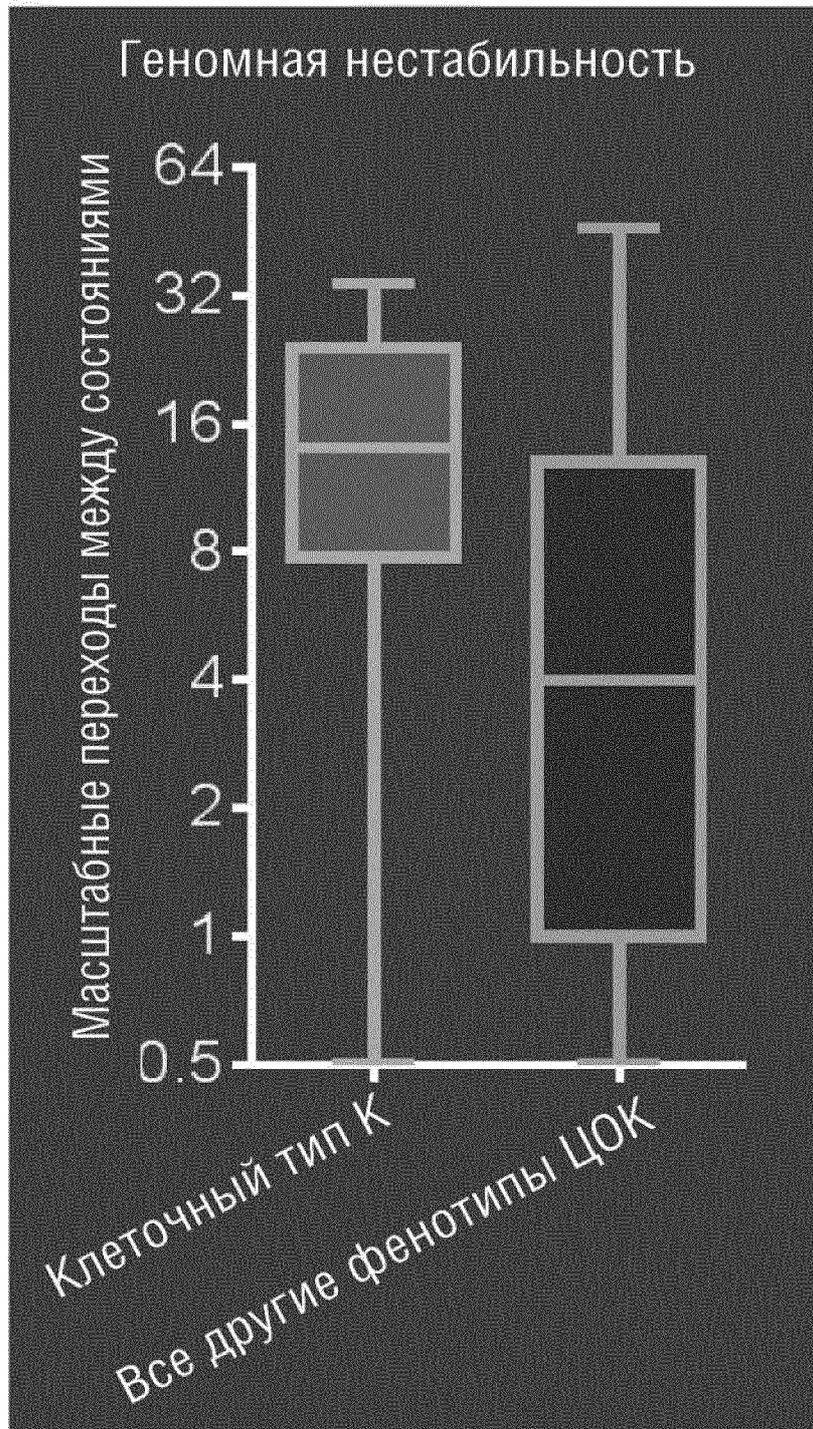


	Множество геномных клонов	Один геномный клон
Высокая фенотипическая гетерогенность	16	4
Низкая фенотипическая гетерогенность	1	10
Отношение шансов (95% ДИ)	40	
Чувствительность	0,941	
Специфичность	0,714	
Точный критерий Фишера	p < 0,0001	

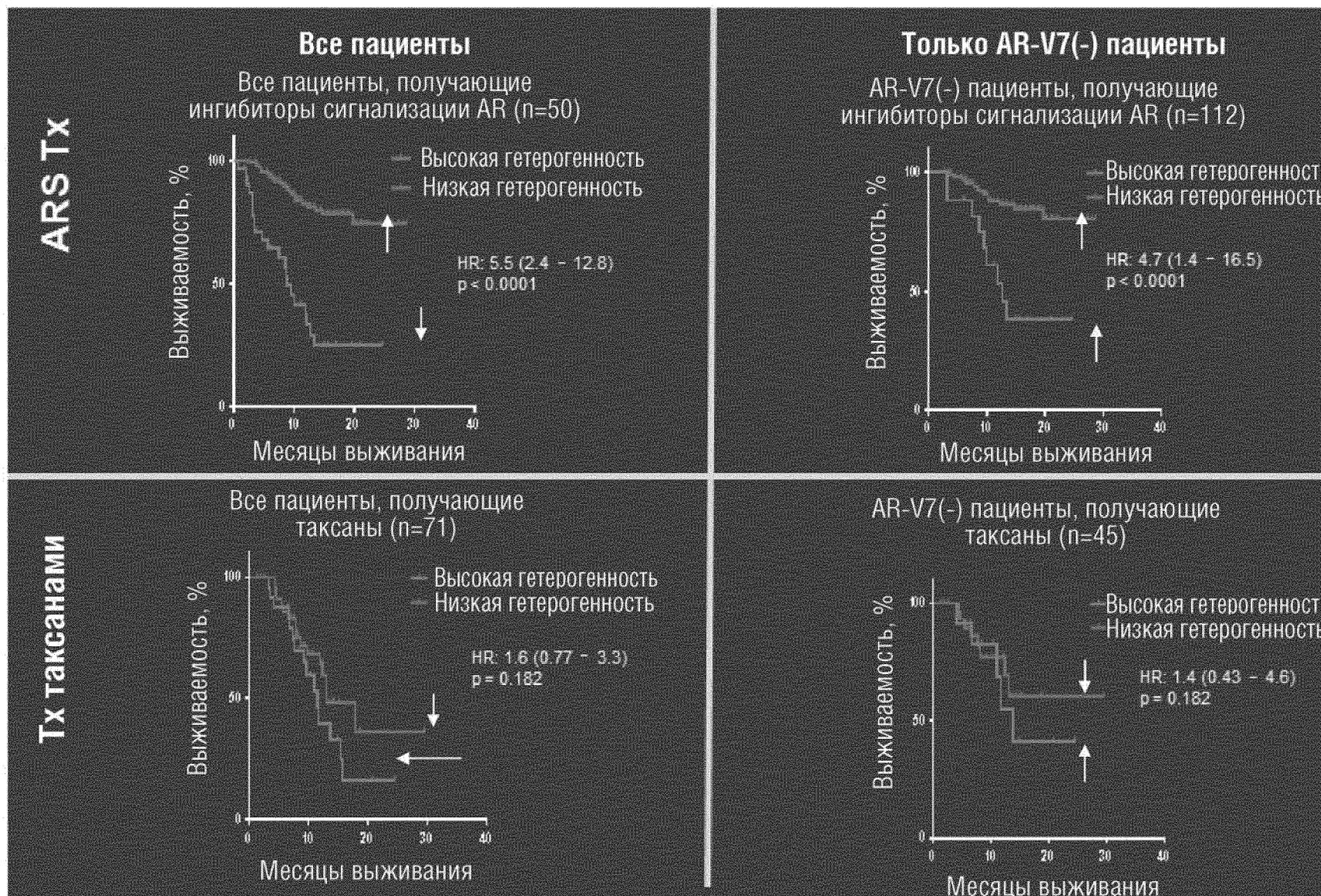
* Доминантные клоны определяли как клоны (уникальный геномный профиль), наблюдаемые по меньшей мере дважды у пациента

* Геномный клон определяли как геномный профиль ВЧК, наблюдаемый по меньшей мере дважды у пациента

ФИГ.20В

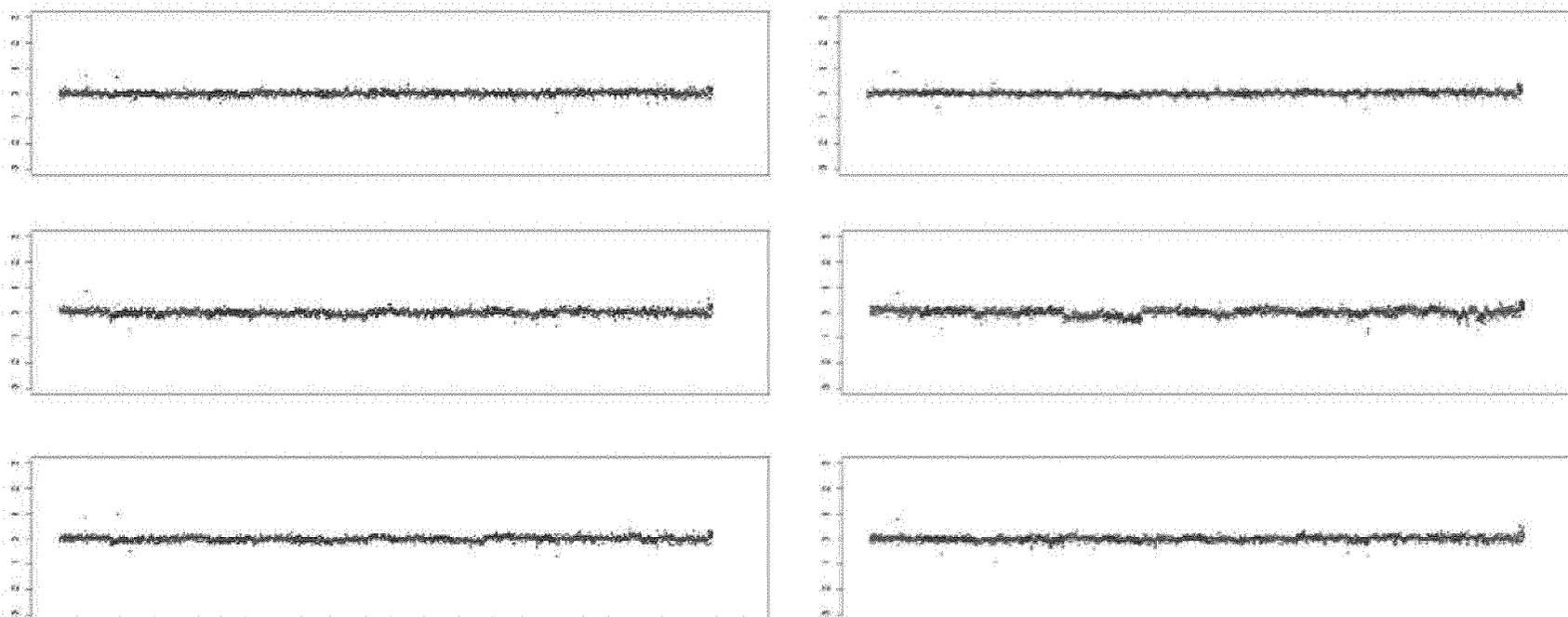


ФИГ.21

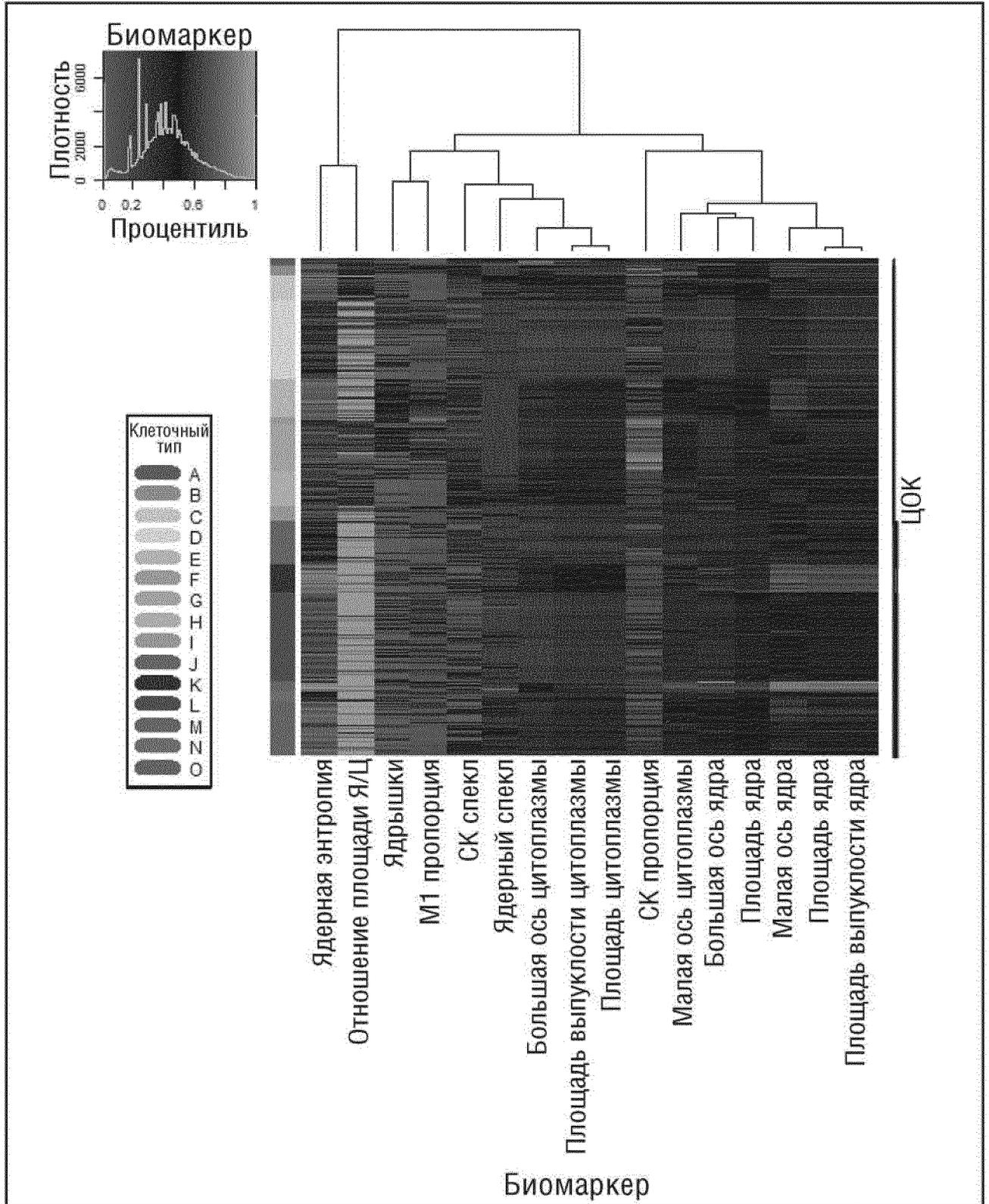


ФИГ.22

Низкая фенотипическая гетерогенность ЦОК: 6 ЦОК от пациента до проведения первой линии терапии демонстрируют однородный геномный профиль



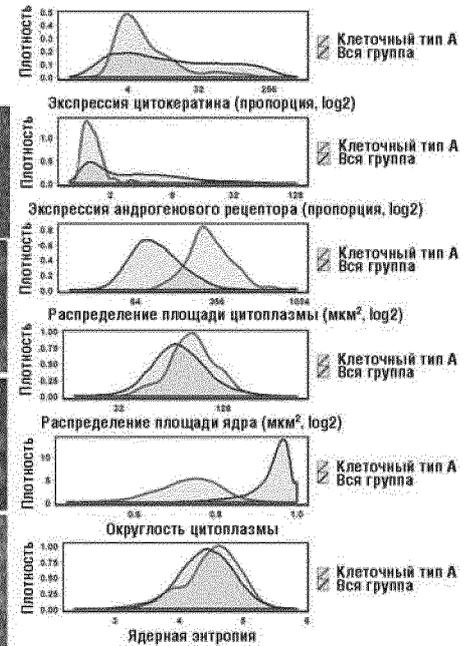
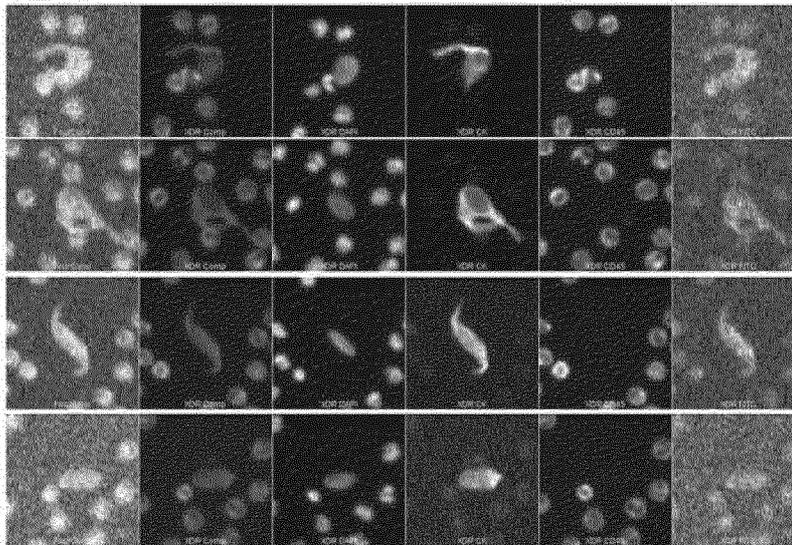
ФИГ.23



ФИГ.24А

Клеточный тип А

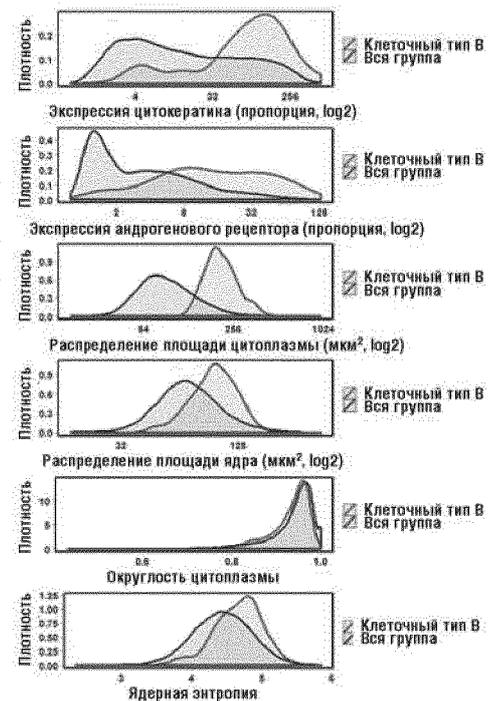
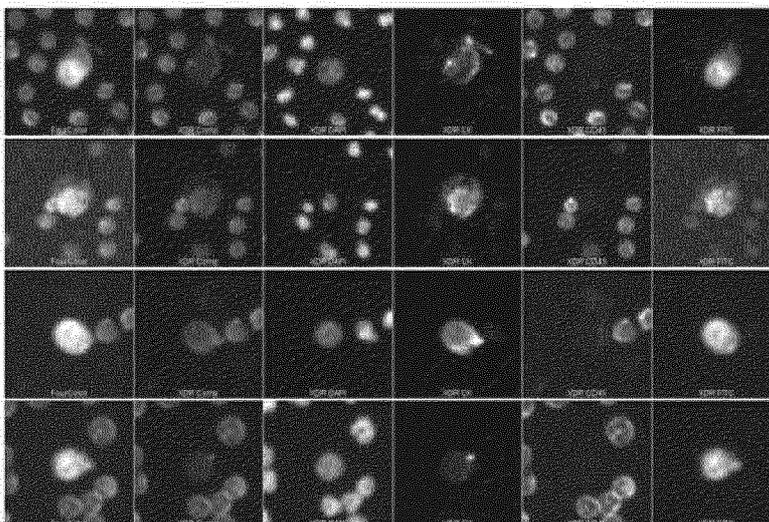
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 123/9225
- Ниже показаны клетки от двух разных пациентов



ФИГ.24В

Клеточный тип В

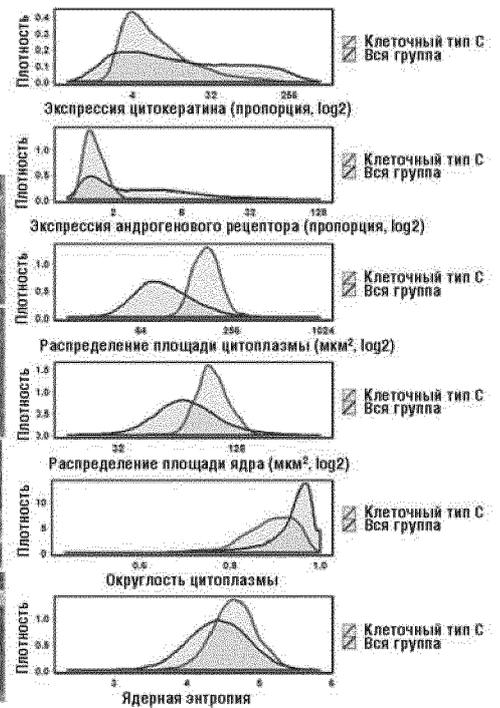
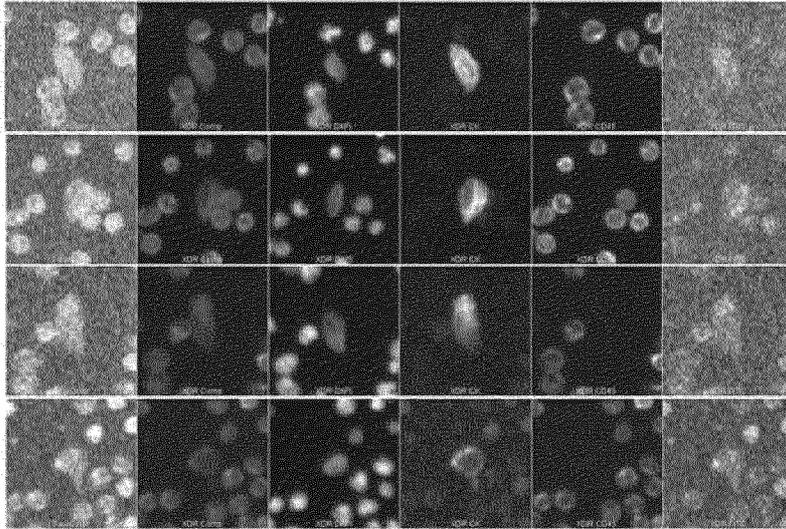
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 209/9225
- Ниже показаны клетки от двух разных пациентов



ФИГ.24С

Клеточный тип С

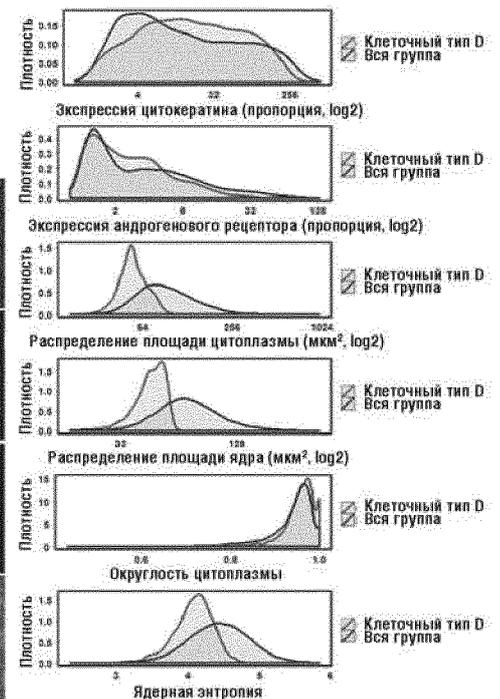
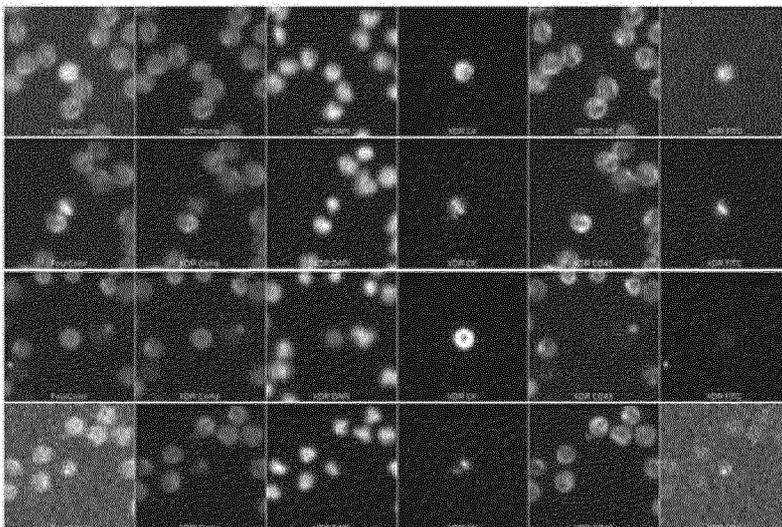
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 448/9225
- Ниже показаны клетки от двух разных пациентов
- Слегка прогнозирует более продолжительное время Тх таксанами



ФИГ.24D

Клеточный тип D

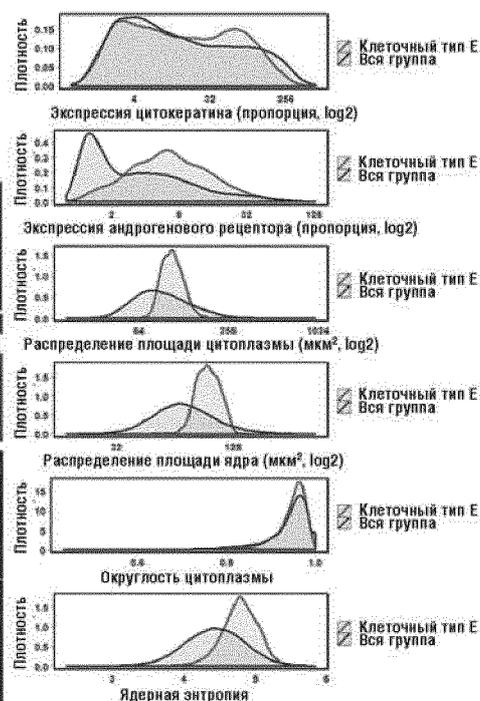
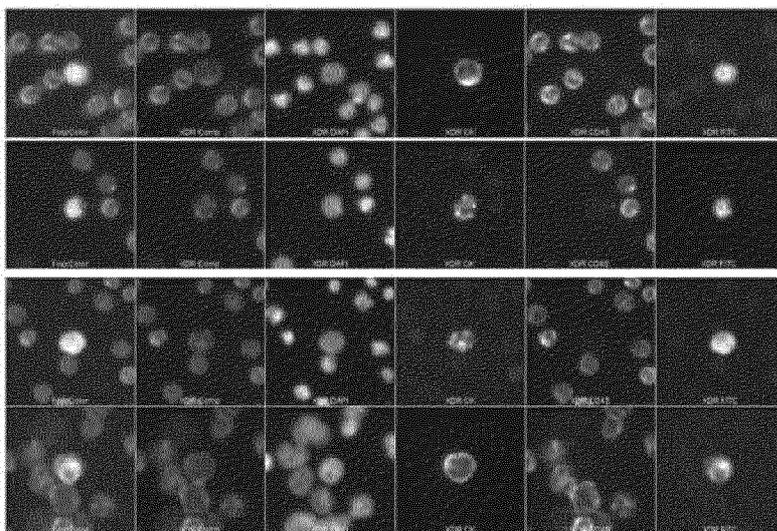
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 1448/9225
- Ниже показаны клетки от двух разных пациентов



ФИГ.24Е

Клеточный тип E

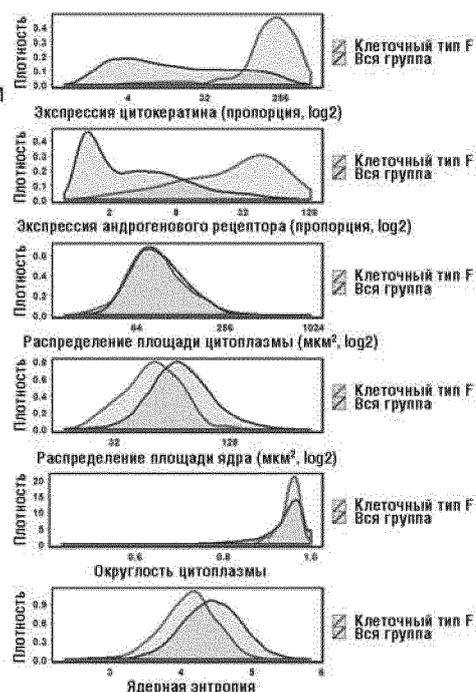
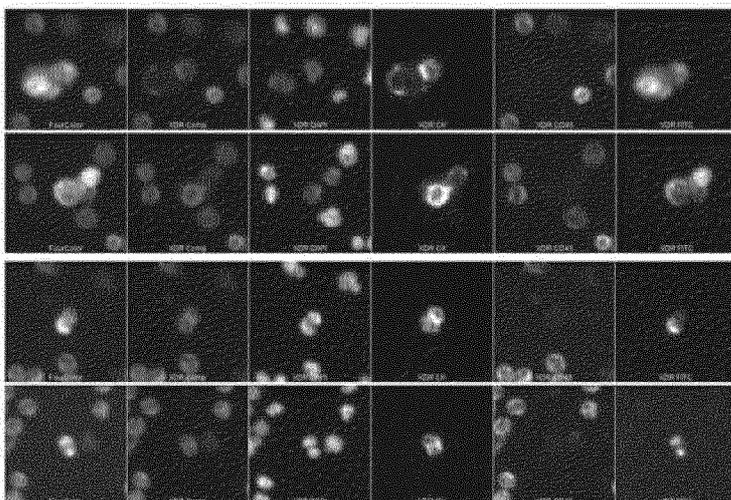
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 701/9225
- Прогнозирует смерть к 12 мес при терапии Abi/Enz, короткий срок Tx, быстрое прогрессирование
- Верхние два изображения ЦОК: Пробирка № 004864: 1-ая линия Abi, прогрессирование ко дню 5, отмена Tx в день 49, смерть в день 112
- Нижние два изображения ЦОК: Пробирка № 012282: 2-я линия Enza, прогрессирование ко дню 141, находится в живых, получает Tx



ФИГ.24F

Клеточный тип F

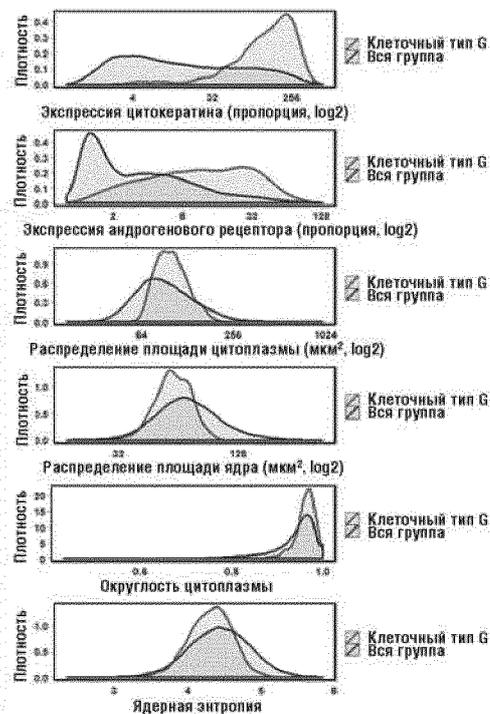
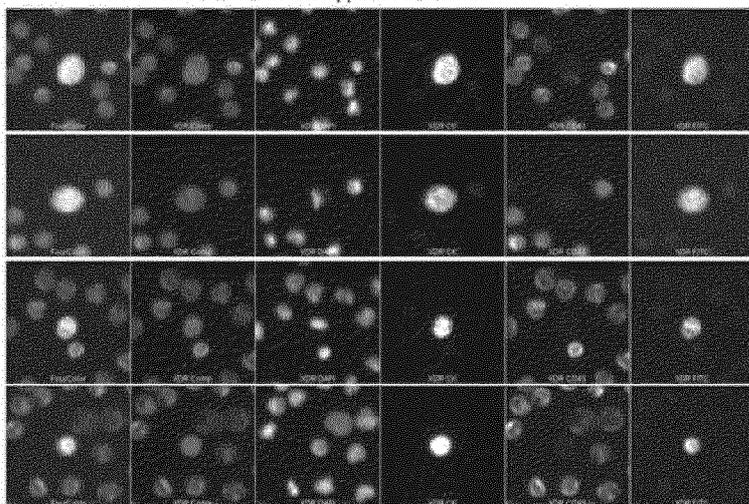
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 144/9225
- Почти все представляют собой кластеры ЦОК
 - CellMorph фокусируется на одной ЦОК в кластере, интересно, что для k-средних сгруппированы множество кластеров, таким образом учитываются взвешенные измерения размеров
- Очень мало пациентов имеют тип F



ФИГ.24G

Клеточный тип G

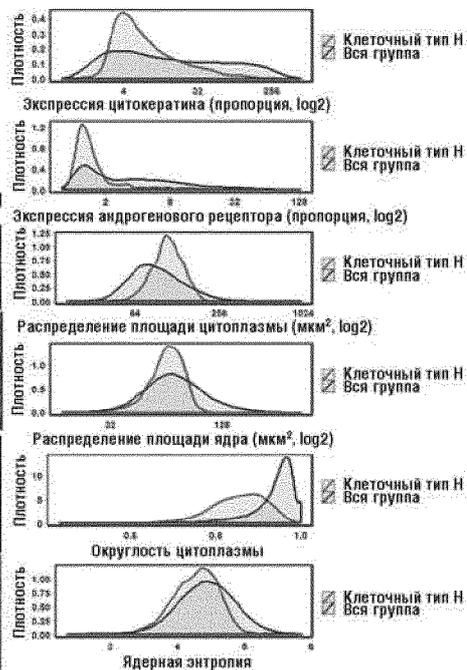
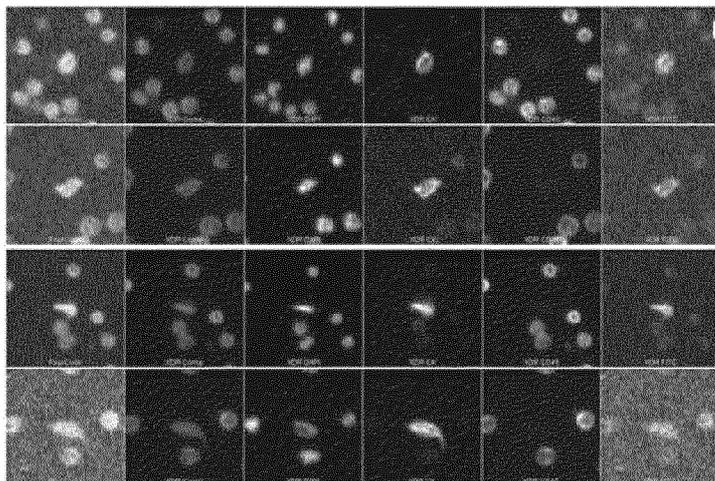
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 867/9225
- **Клеточный тип, наиболее тесно связанный с устойчивостью к таксанам**
- Клетки из пробирок №№ 001689 и 011288, в обоих случаях - de novo устойчивость к таксанам
- 1/3 клеток получены из 001767, 8 пациентов имеют >90%
 - Это может ограничивать положительную прогностическую ценность для предсказания устойчивости к таксанам лишь на основании только данного типа.



ФИГ.24Н

Клеточный тип D

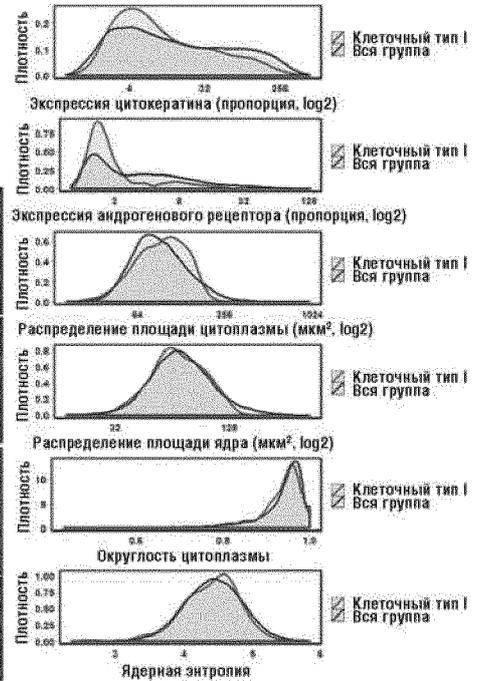
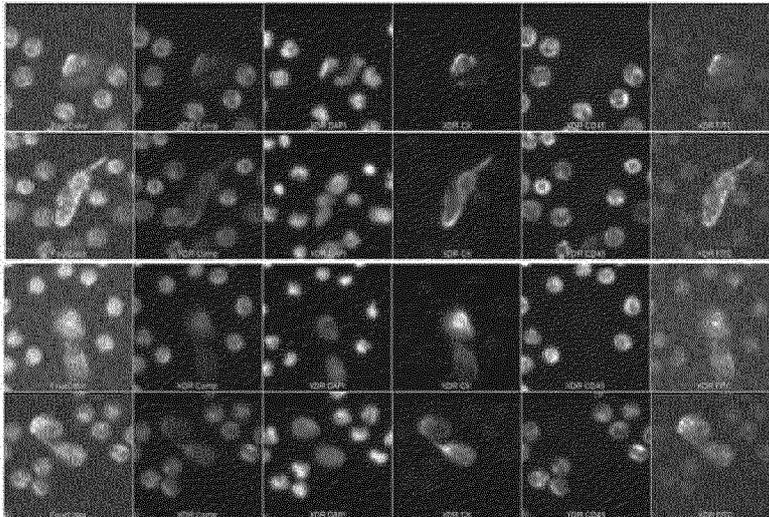
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 659/9225
- Изображения для пробирок №№ 002033 и 002111



ФИГ.24I

Клеточный тип I

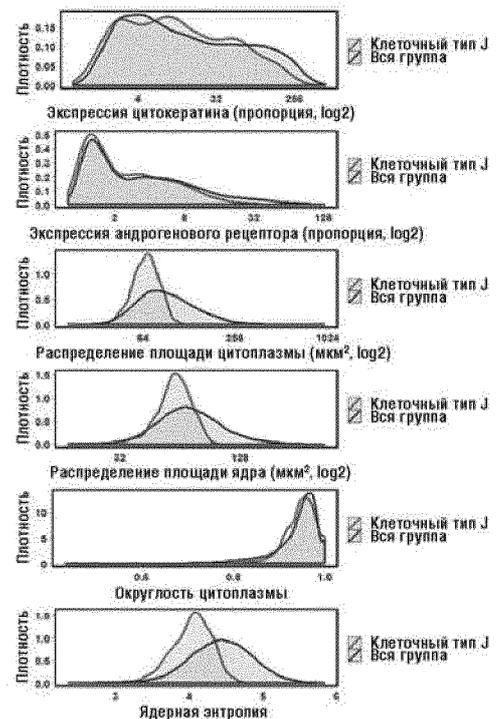
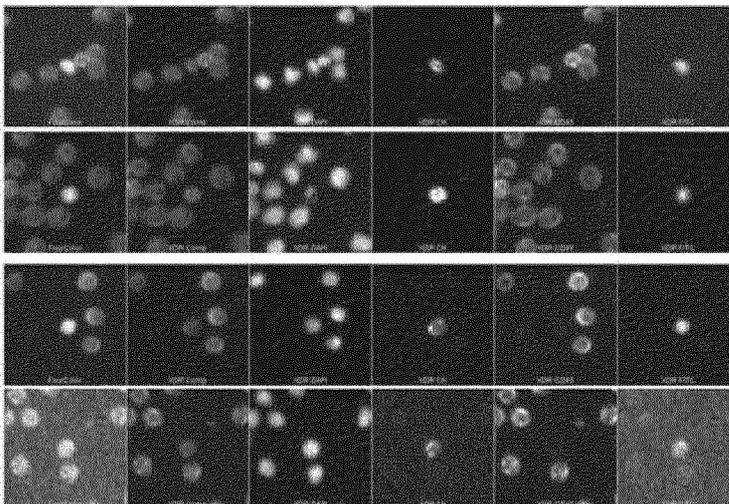
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 266/9225
- Почти все представляют собой кластеры ЦОК
 - CellMorph фокусируется на одной ЦОК в кластере, интересно, что для k-средних сгруппированы множество кластеров, таким образом учитываются взвешенные измерения размеров
- Изображения для пробирок №№ 010159 и 013040



ФИГ.24J

Клеточный тип J

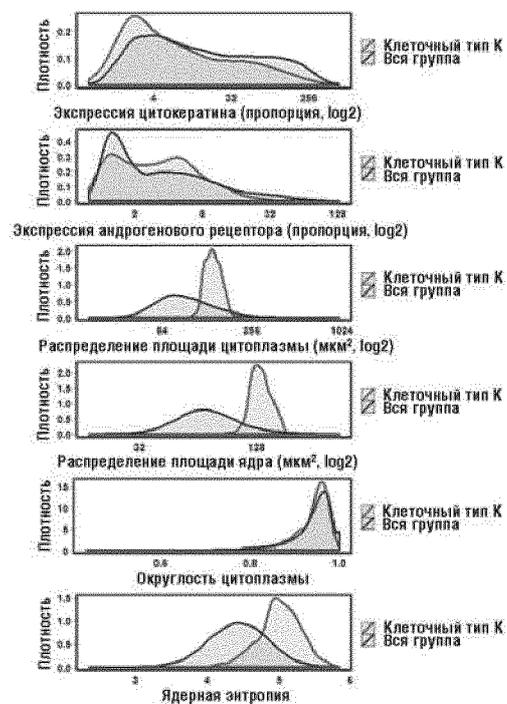
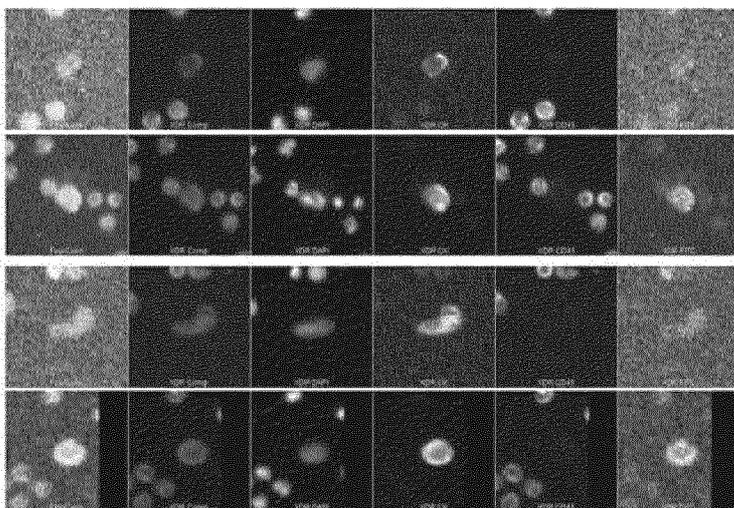
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 814/9225
- Изображения из пробирок №№ 001335 и 001288



ФИГ.24К

Клеточный тип K

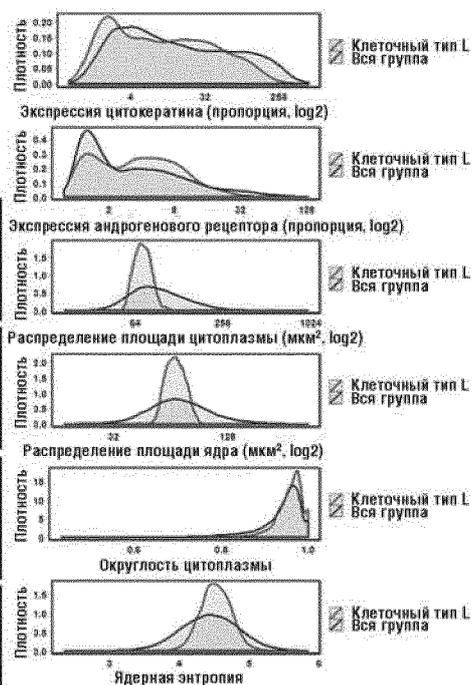
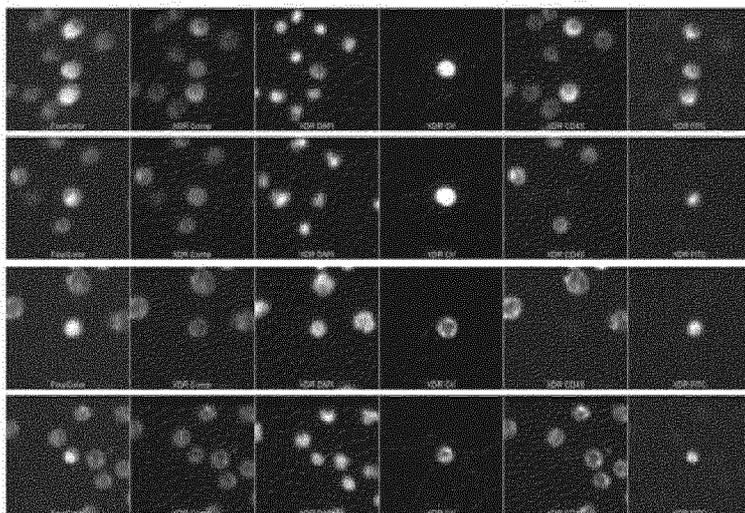
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 508/9225
- Прогнозирует смерть через 12 мес при терапии Abi/Enz
- Изображения для пробирок №№ 010159 and 012362



ФИГ.24L

Клеточный тип L

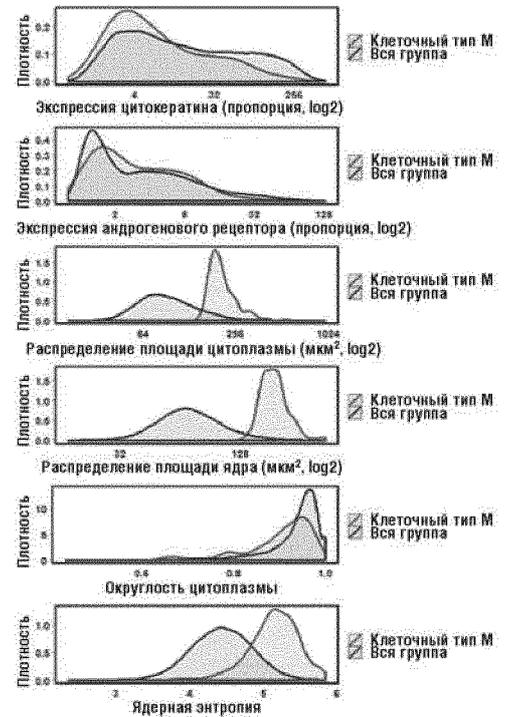
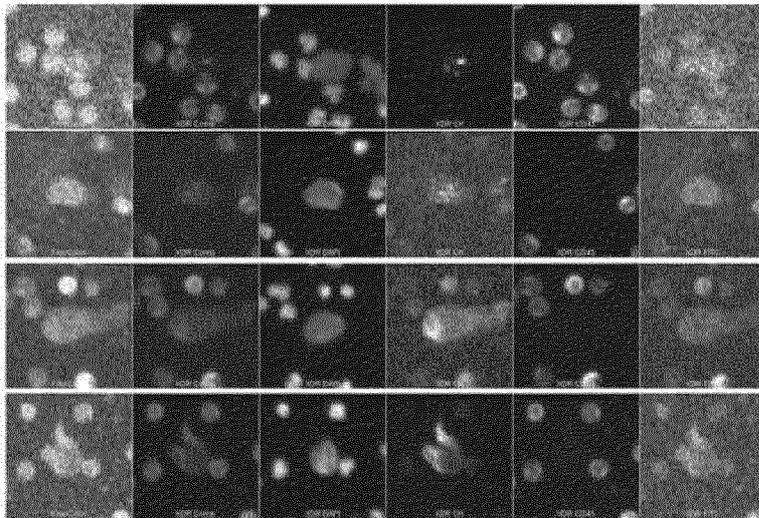
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 1643/9225
- Прогнозирует смерть через 12 мес при терапии Abi/Enz
- Клетки из пробирок 005747 (De Novo устойчивость) и 007839 (приобретенная устойчивость)



ФИГ.24М

Клеточный тип М

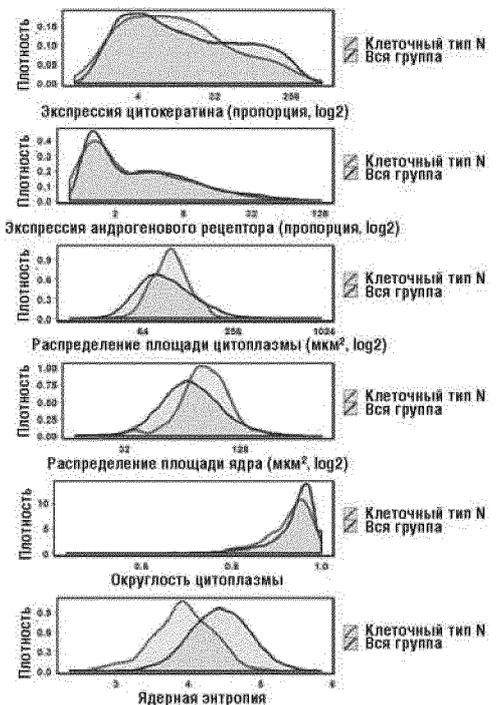
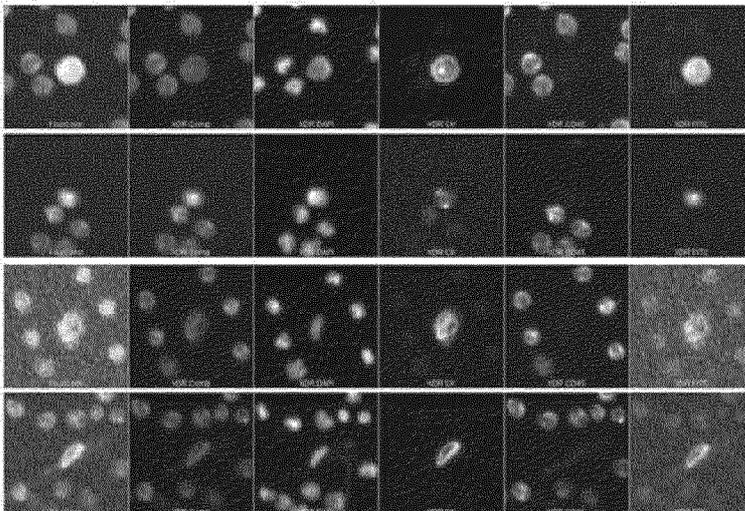
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 194/9225
- Клетки из пробирок №№ 007931 и 010445



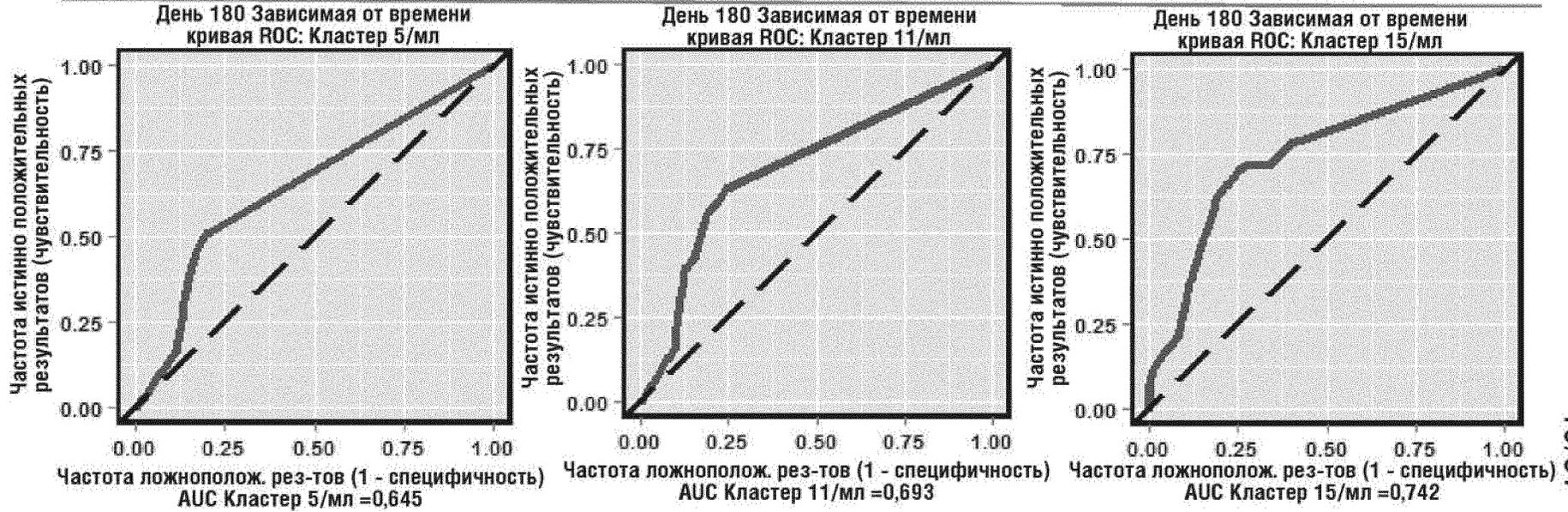
ФИГ.24N

Клеточный тип N

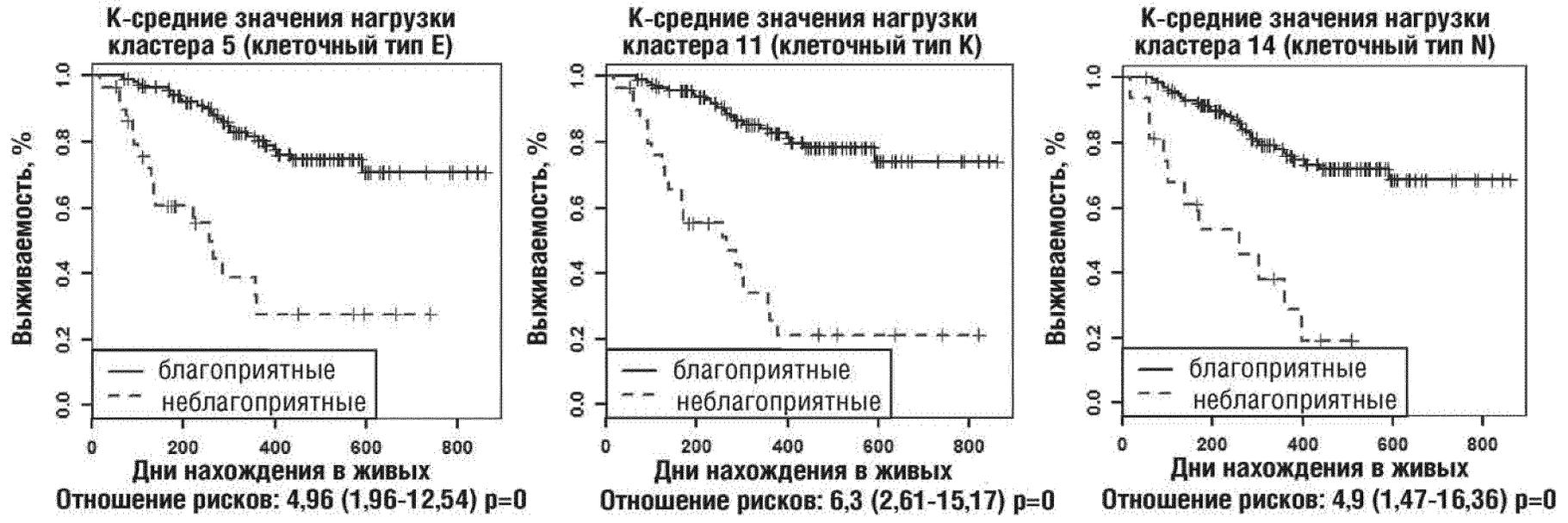
- Показаны 6 из 21 признака
- Клеток на группу: 198/9225
- Большая площадь ядра, низкая ядерная энтропия, необычная взаимосвязь признаков
- Изображения клеток из пробирок №№ 4518С, 010159
- Связан с хорошим ответом на таксаны, может быть стохастическим результатом вследствие низкого n в группе
- Может представлять собой «выброс» или «другой» тип сгруппированных клеток



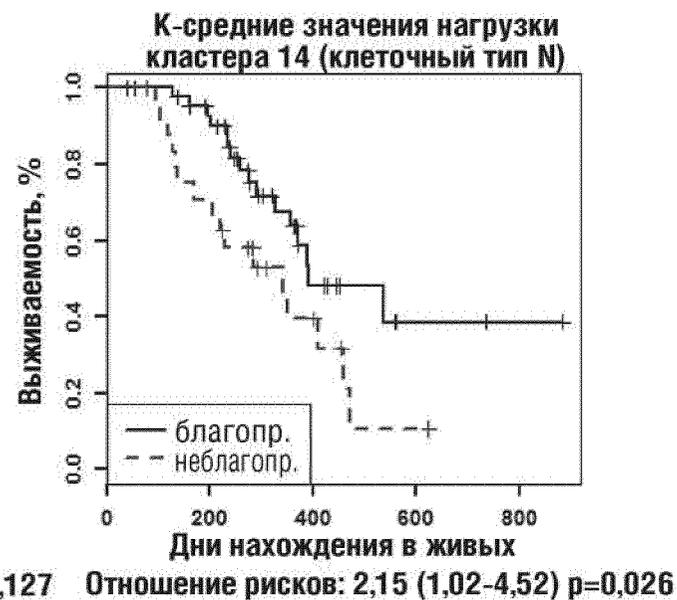
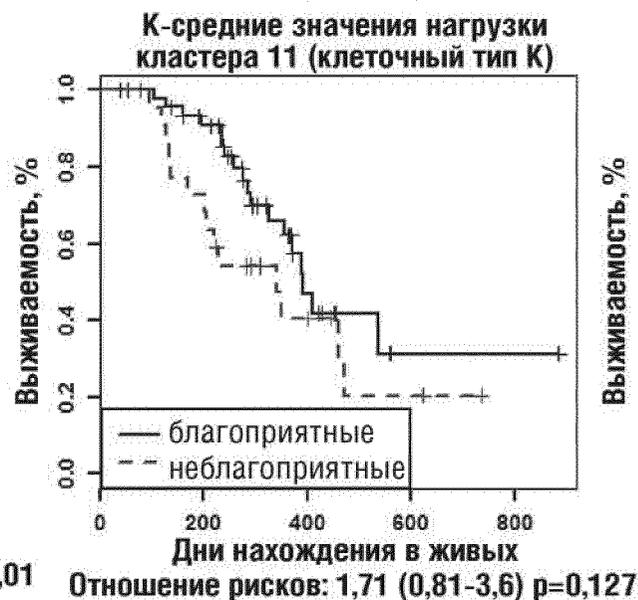
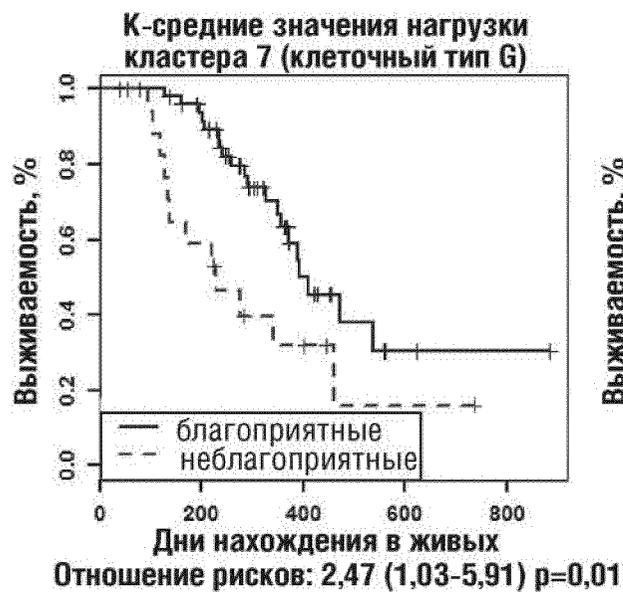
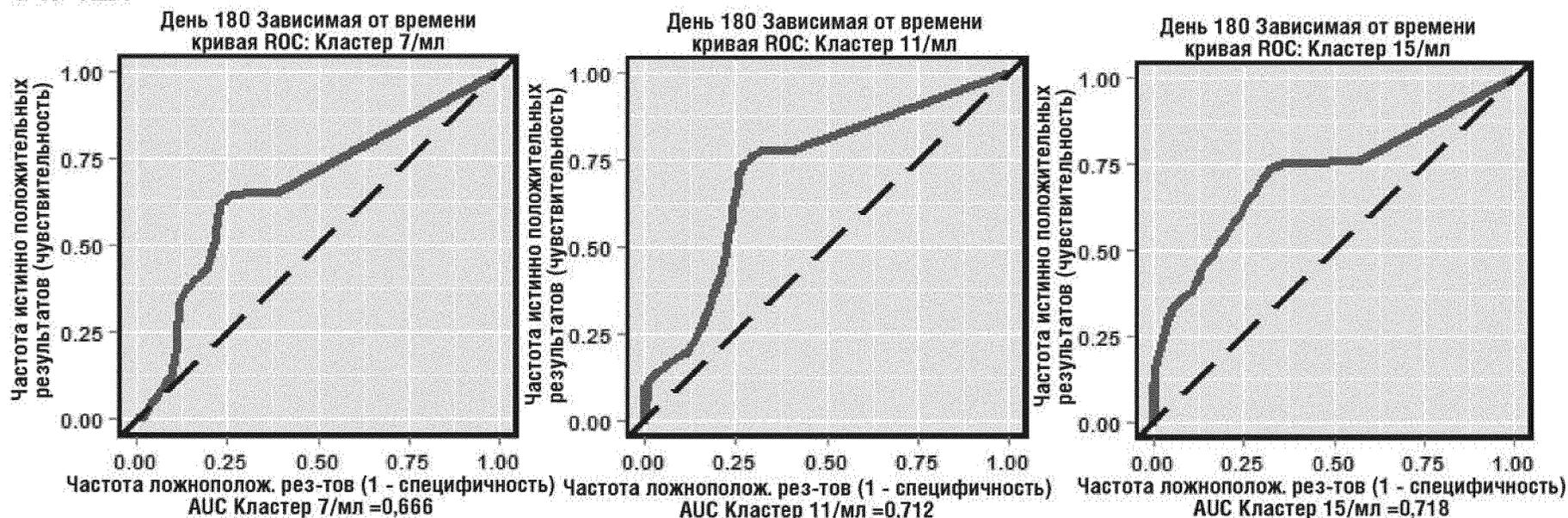
ФИГ.26



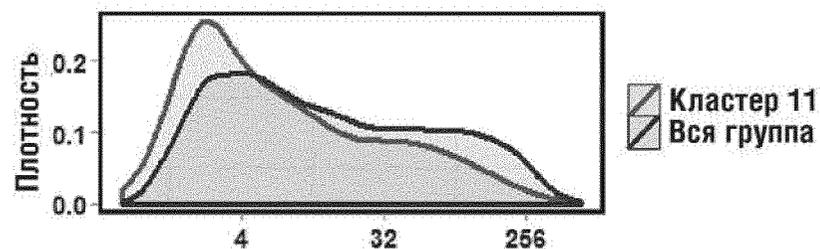
40/97



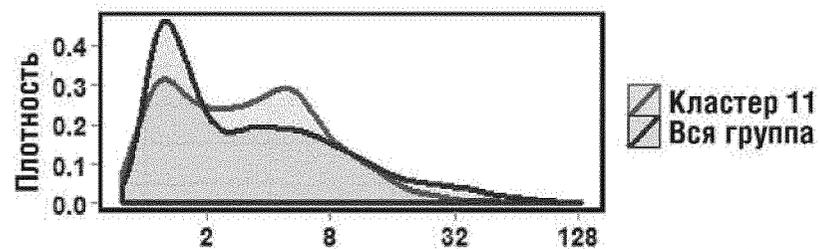
ФИГ.27



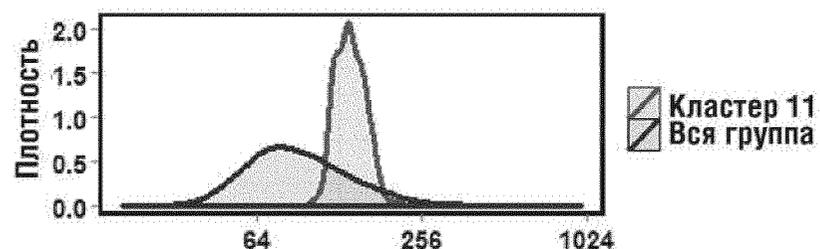
ФИГ.28



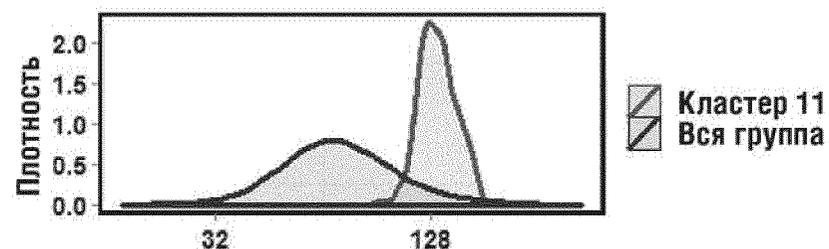
Экспрессия цитокератина (пропорция, log2)



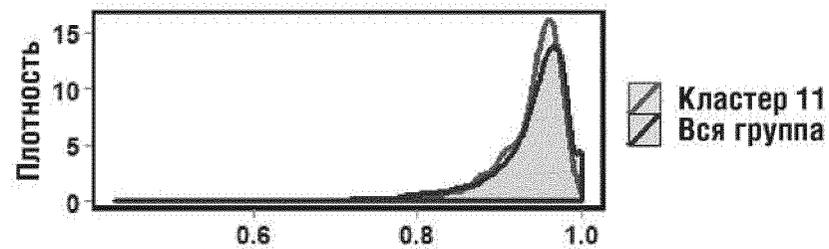
Экспрессия андрогенового рецептора (пропорция, log2)



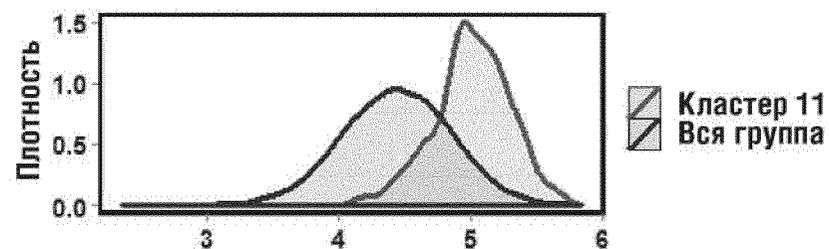
Распределение площади ядра (мкм², log2)



Распределение площади цитоплазмы (мкм², log2)

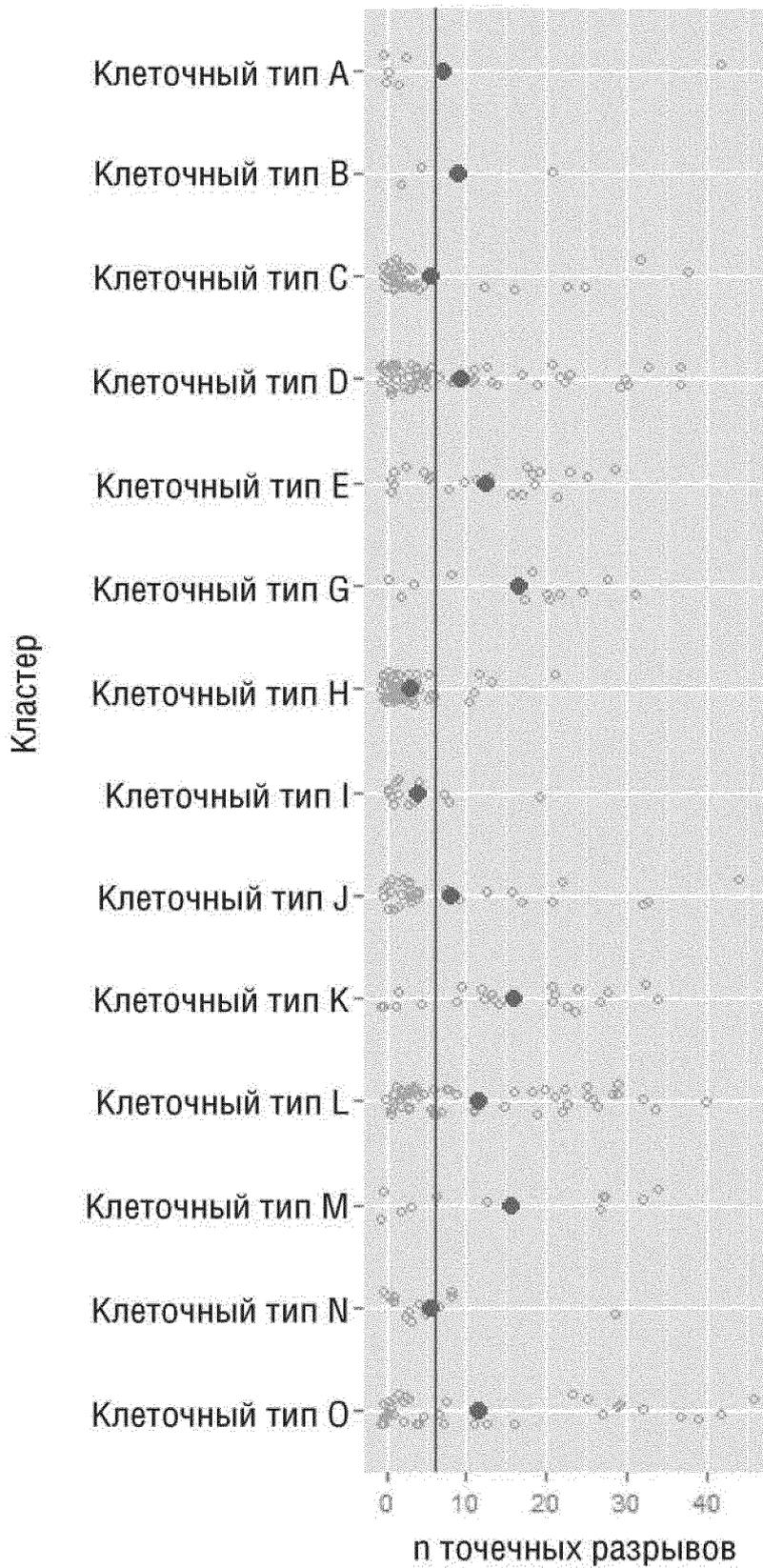


Округлость цитоплазмы



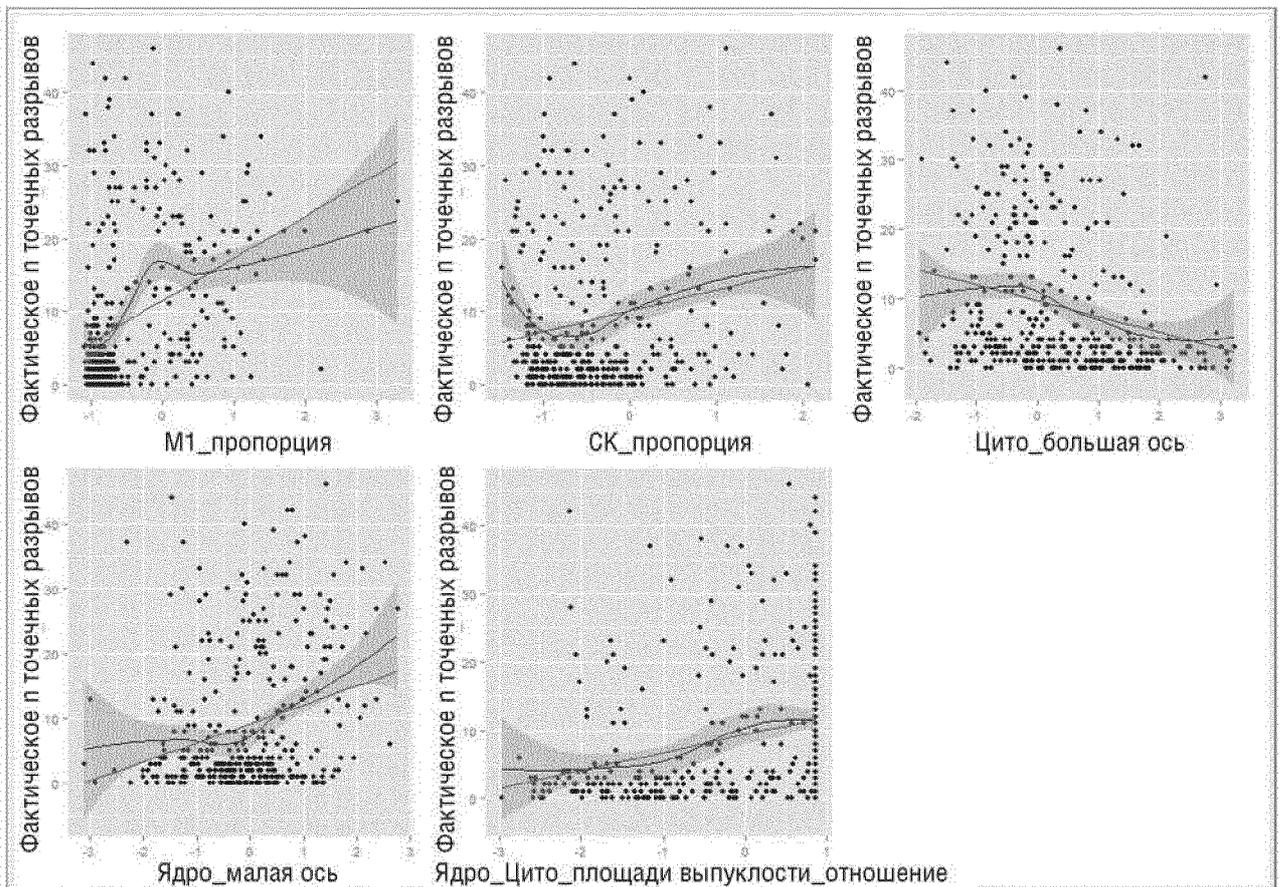
Ядерная энтропия

ФИГ.29

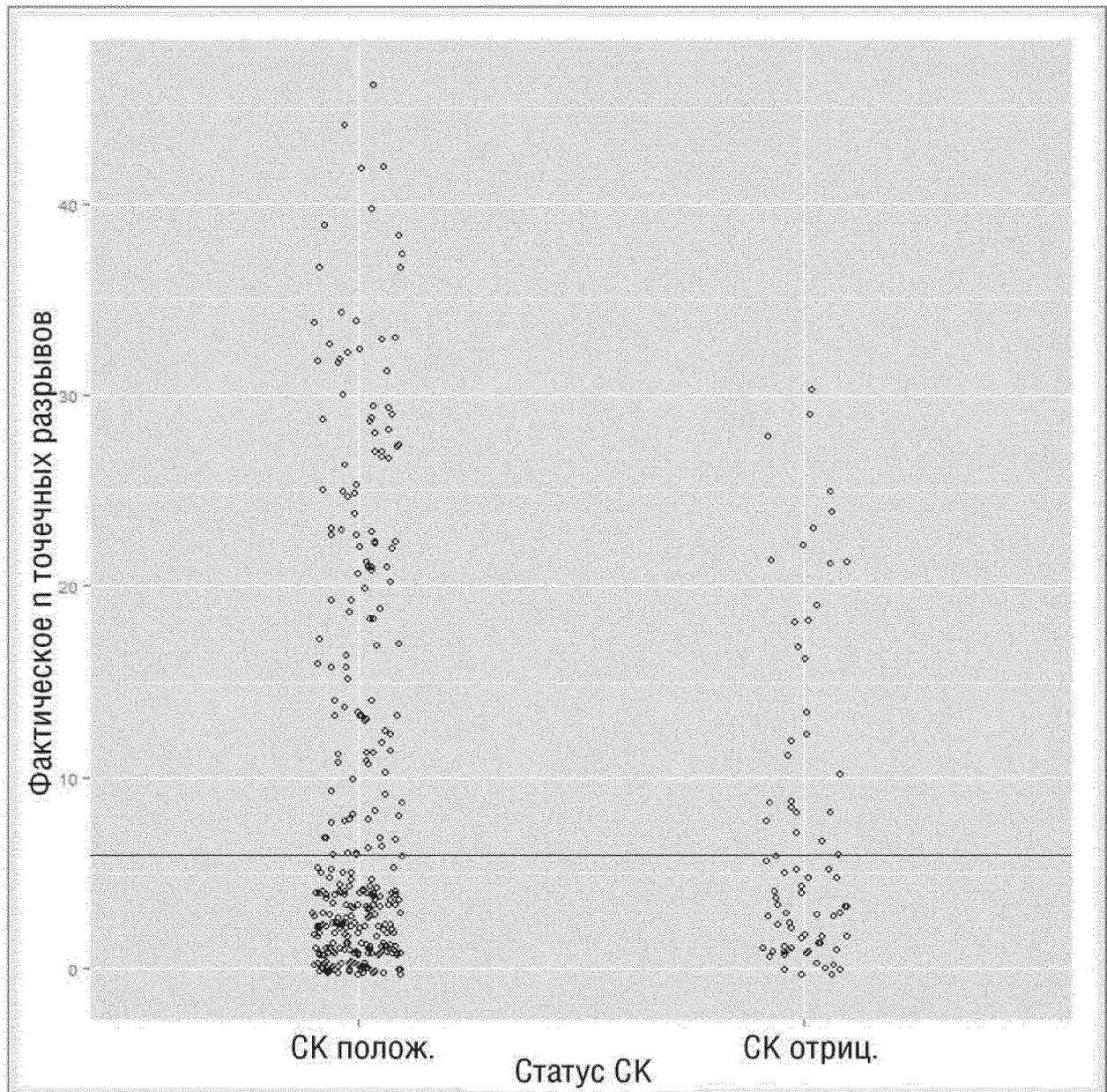


ФИГ.30

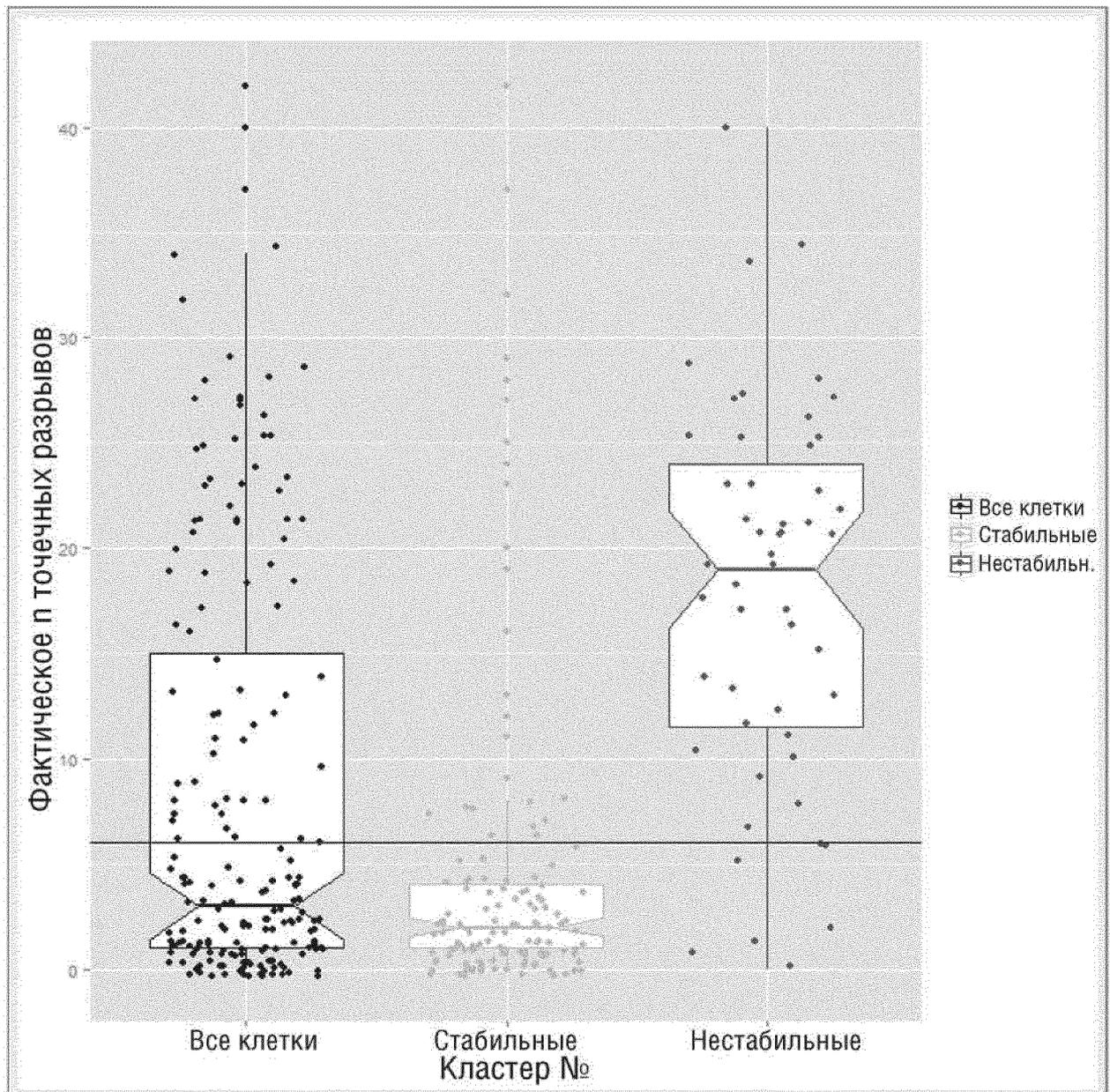
Признак	Коэффициент
M1_пропорция (AR пропорция)	3,14
Ядро_малая ось (Малая ось ядра)	0,97
СК_пропорция (СК пропорция)	0,62
Ядро_Цито_площади выпуклости_отношение (Отношение площадей выпуклости ядра и цитоплазмы)	0,42
Цито_большая ось (Большая ось цитоплазмы)	-0,416



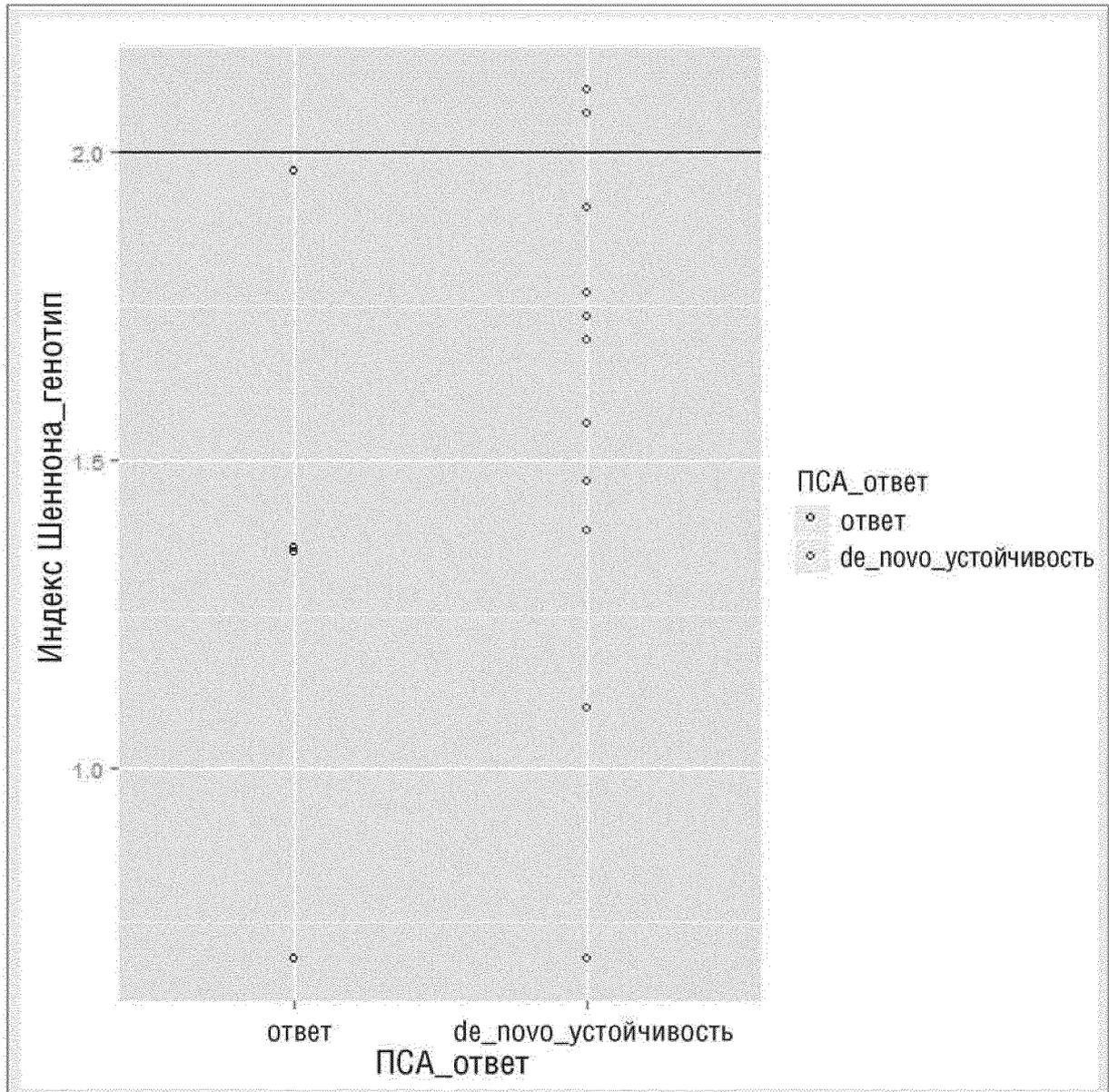
ФИГ.31



ФИГ.32

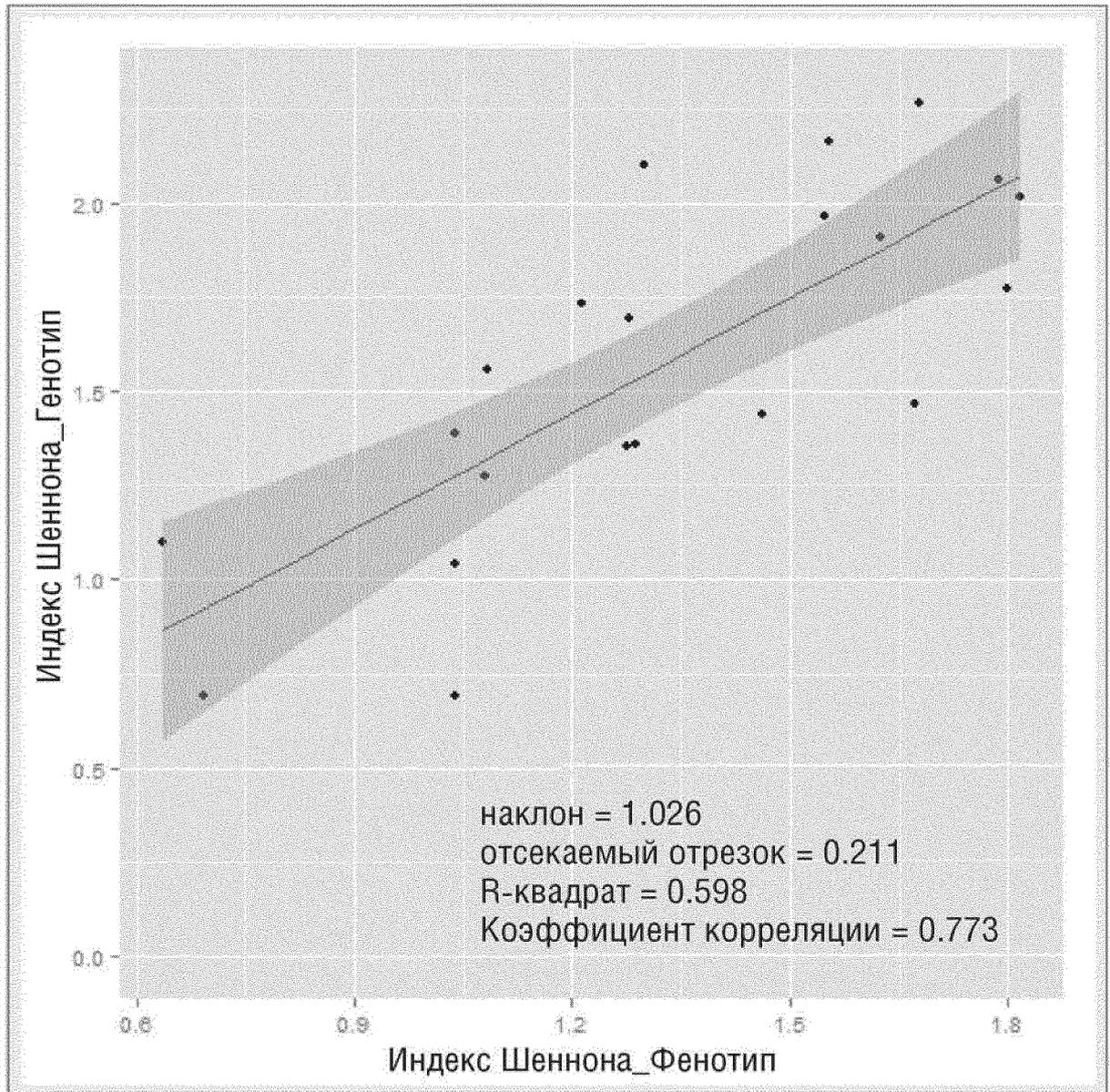


ФИГ.33

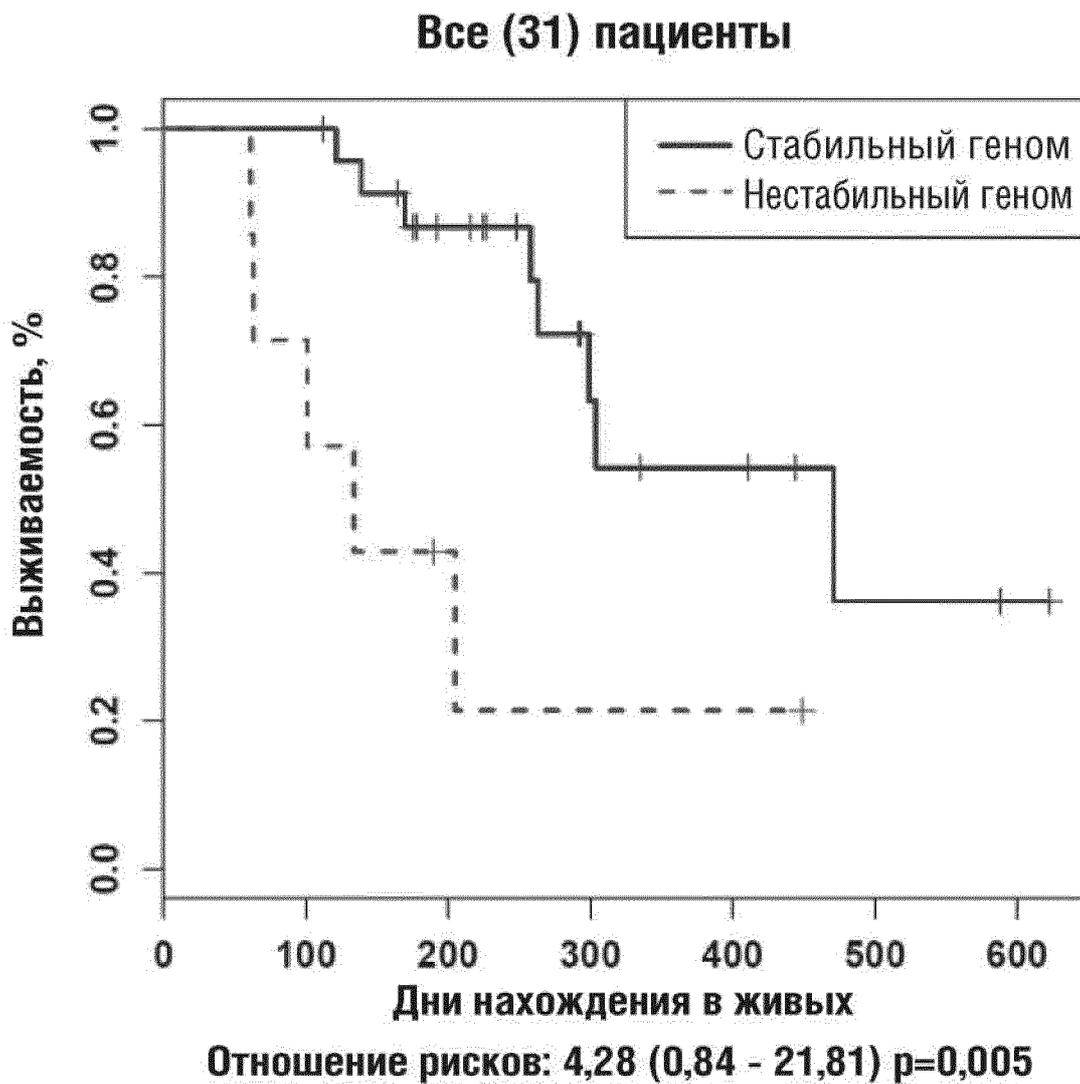


		(Фактический результат)	
		ПСА ответ	
		<i>De novo</i> устойчивость	Ответ
Геномный индекс Шеннона (прогнозируемый ответ)	высокий	2	0
	низкий	9	4
		Чувствительность	18,2%
		Специфичность	100,0%

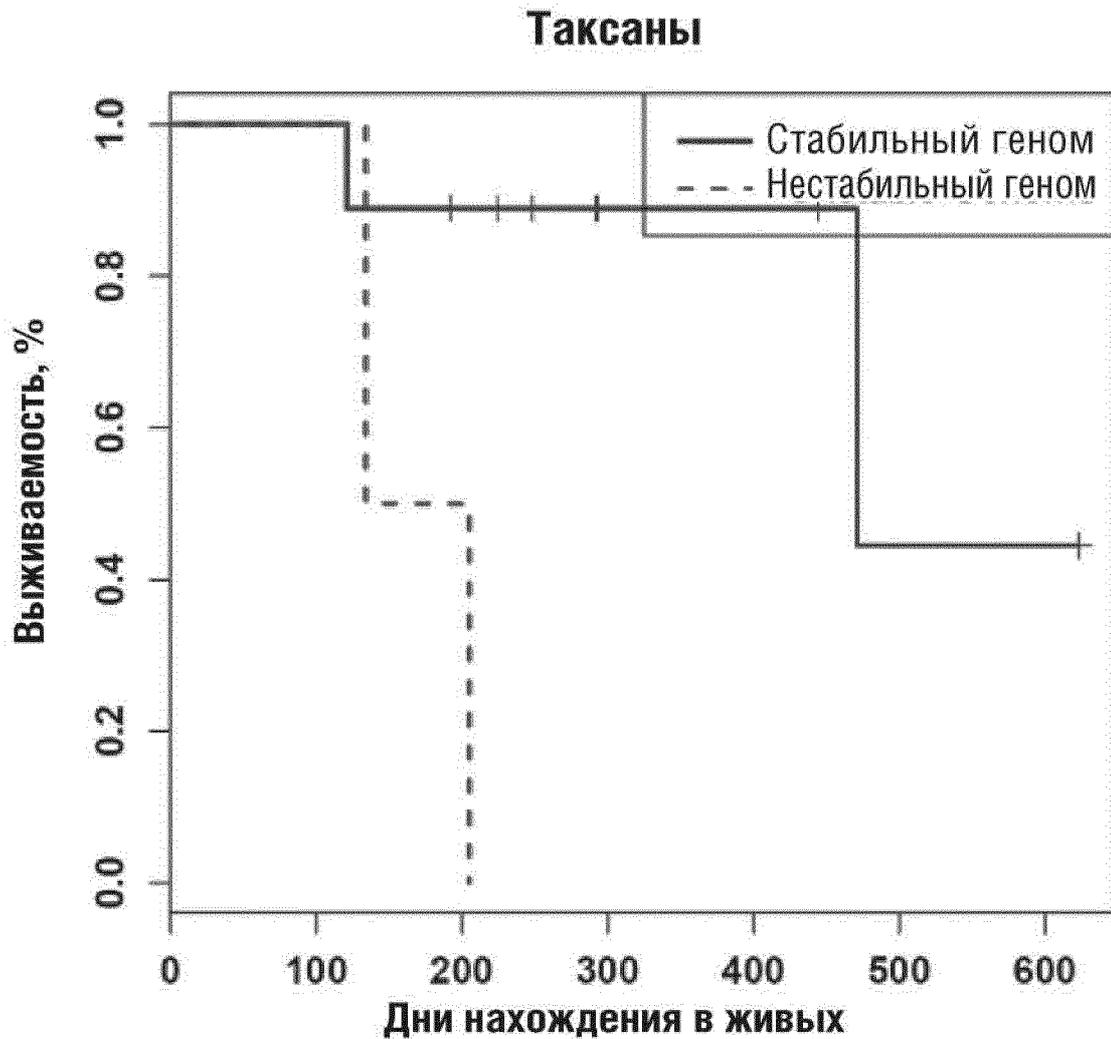
ФИГ.34



ФИГ.35



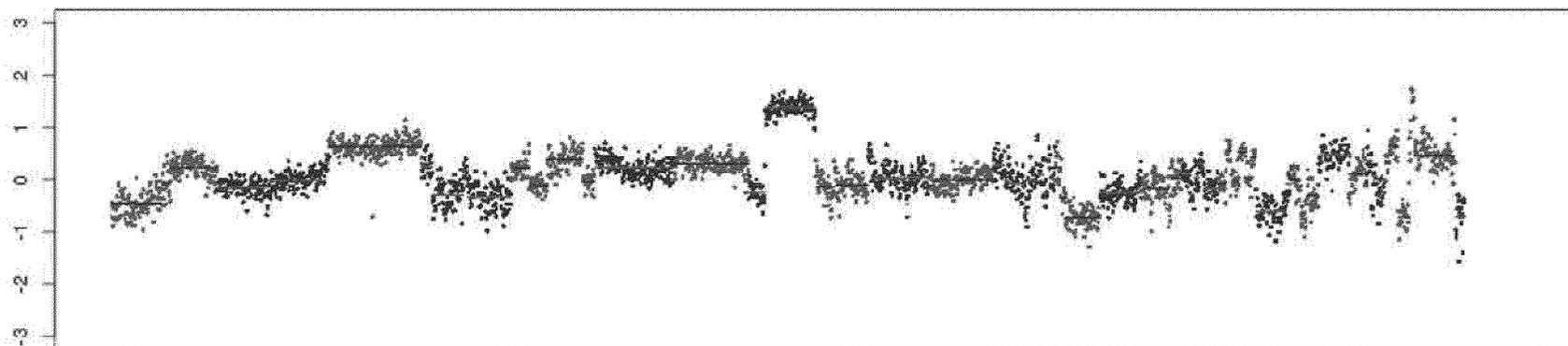
ФИГ.36



Отношение рисков: 6,89 (0,36-131,17) $p=0,021$

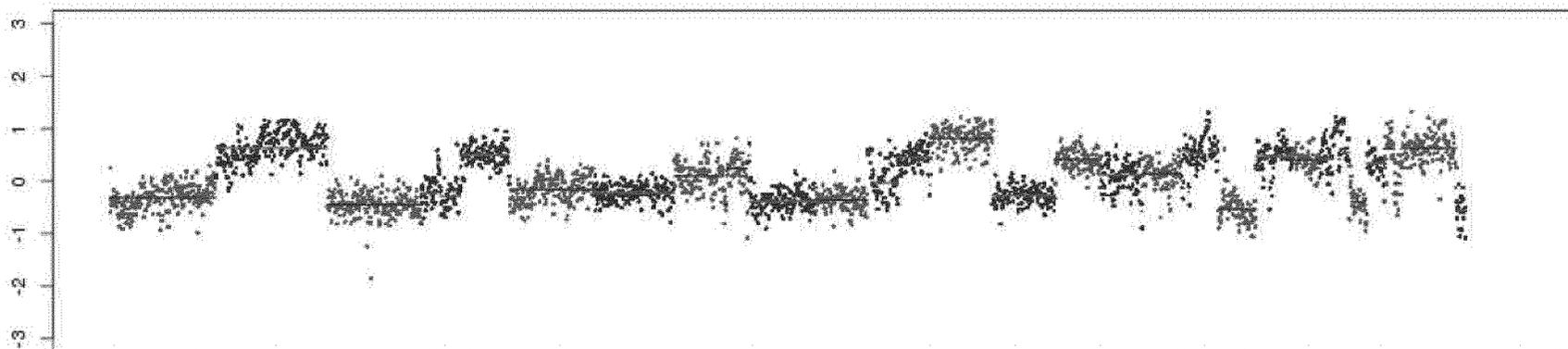
ФИГ.37А

Высокий показатель LST (27) и высокий показатель PGA (23%)



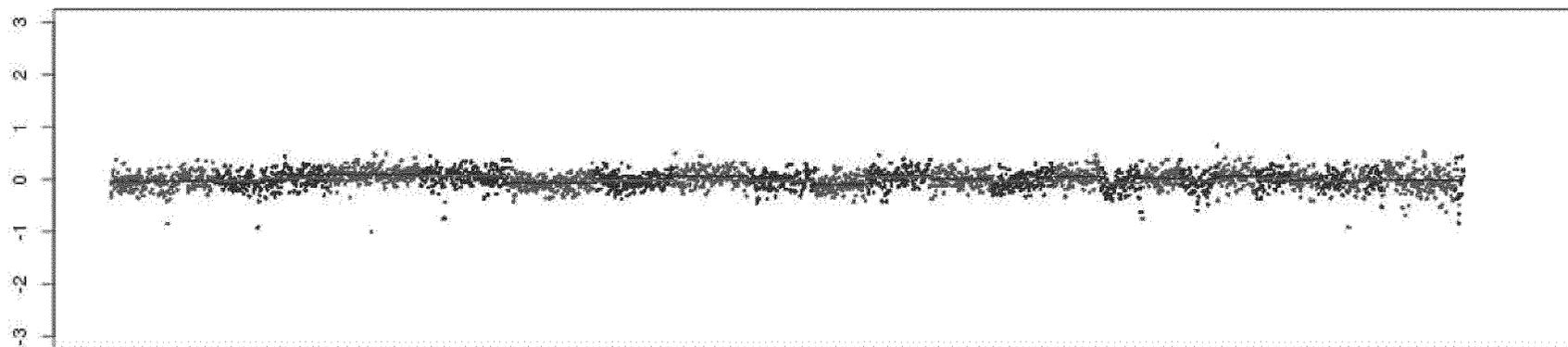
ФИГ.37В

Низкий показатель LST (8) и высокий показатель PGA (35%)



ФИГ.37С

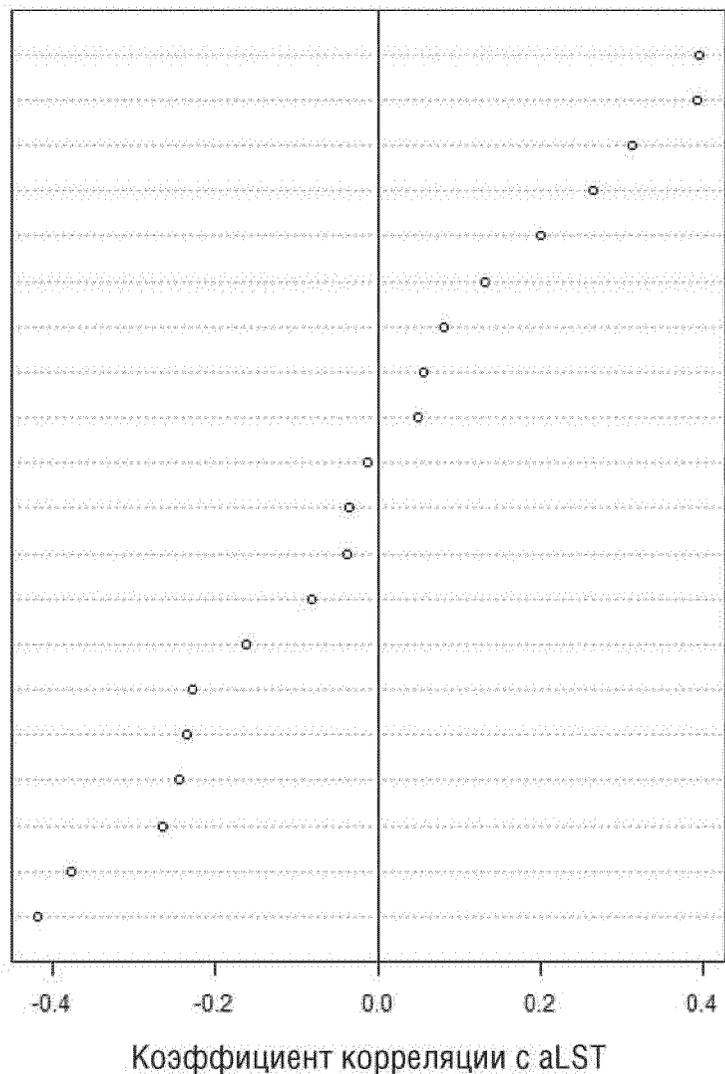
Низкий показатель LST (3) и низкий показатель PGA (0%)



ФИГ.38

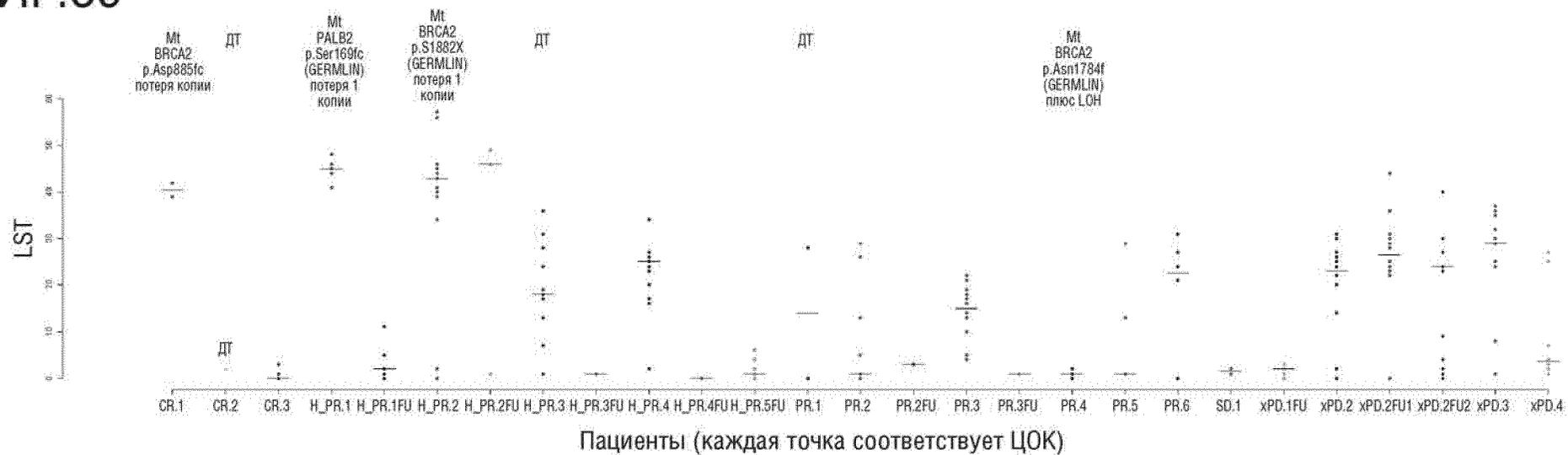
- ChannelStatistics.SK.центральное отношение
- ChannelStatistics.M1. центральное отношение
- Отношение площадей выпуклости ядра и цитоплазмы
- Плотность цитоплазмы
- Малая ось ядра
- Ядерная энтропия
- Количество ядрышек
- Малая ось цитоплазмы
- Плотность ядра
- Площадь ядра
- Площадь_ядра
- Площадь выпуклости ядра
- Ядерный спекл
- СК спекл
- Округлость ядра
- Площадь цитоплазмы
- Большая ось ядра
- Площадь выпуклости цитоплазмы
- Округлость цитоплазмы
- Большая ось цитоплазмы

Признак

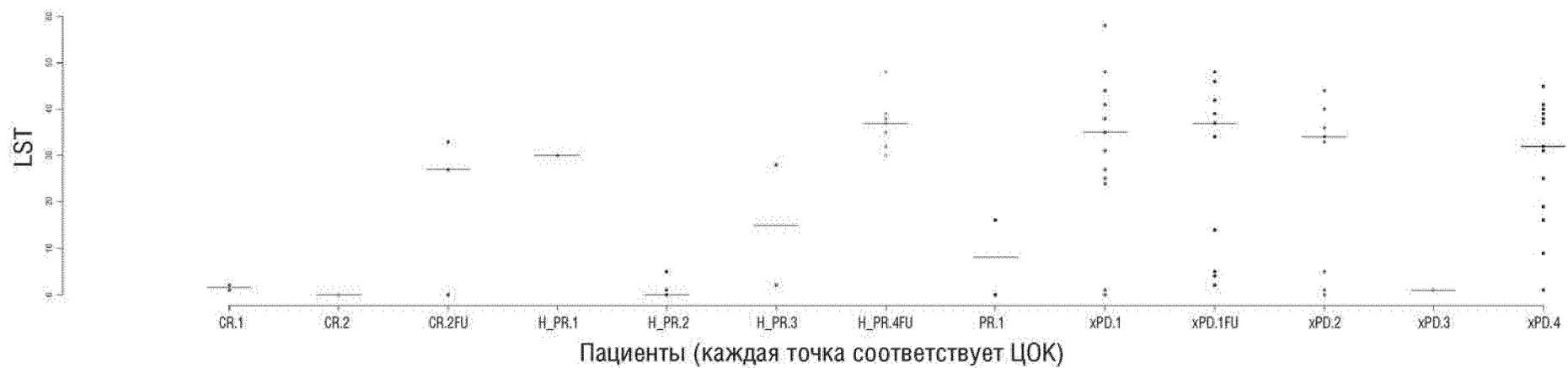


53/97

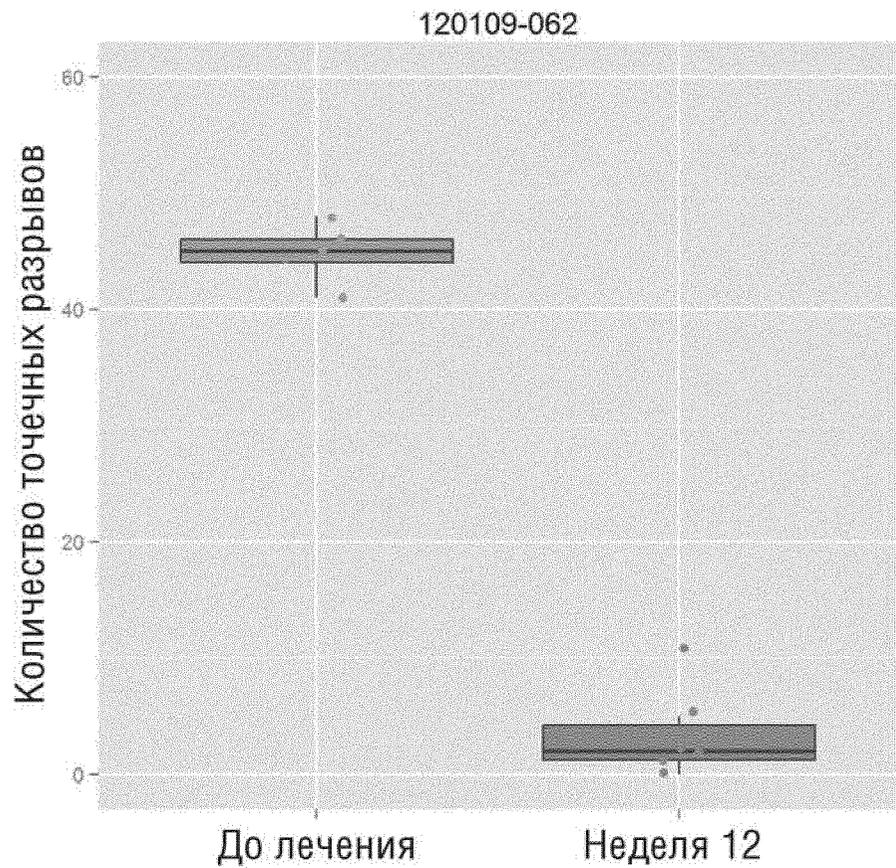
ФИГ.39



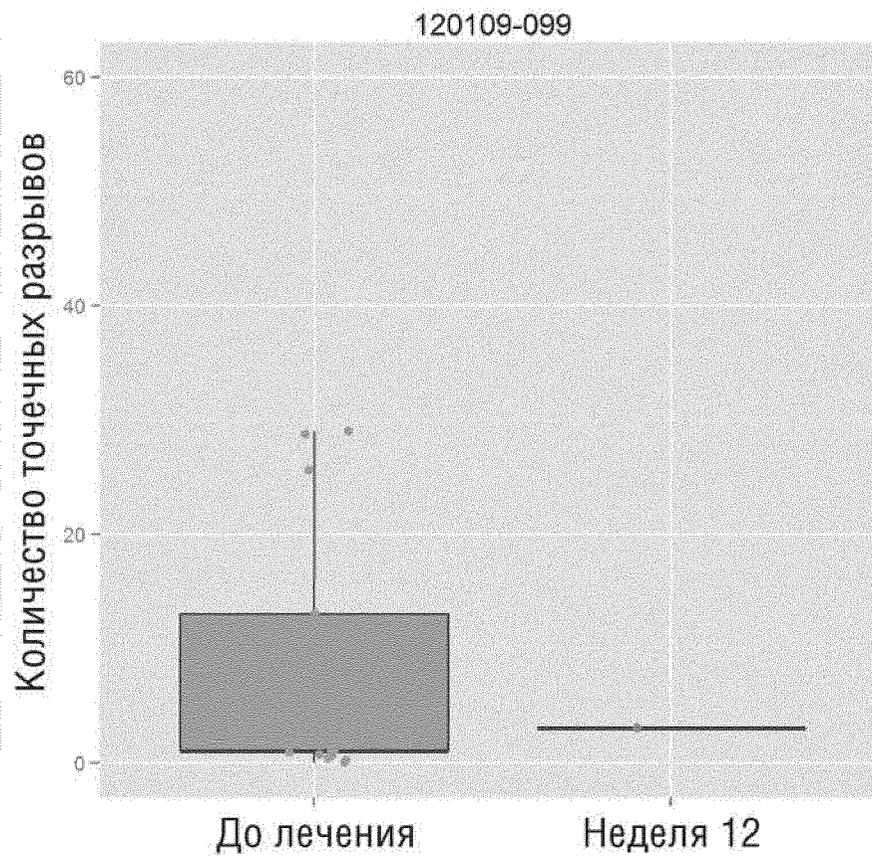
ФИГ.40



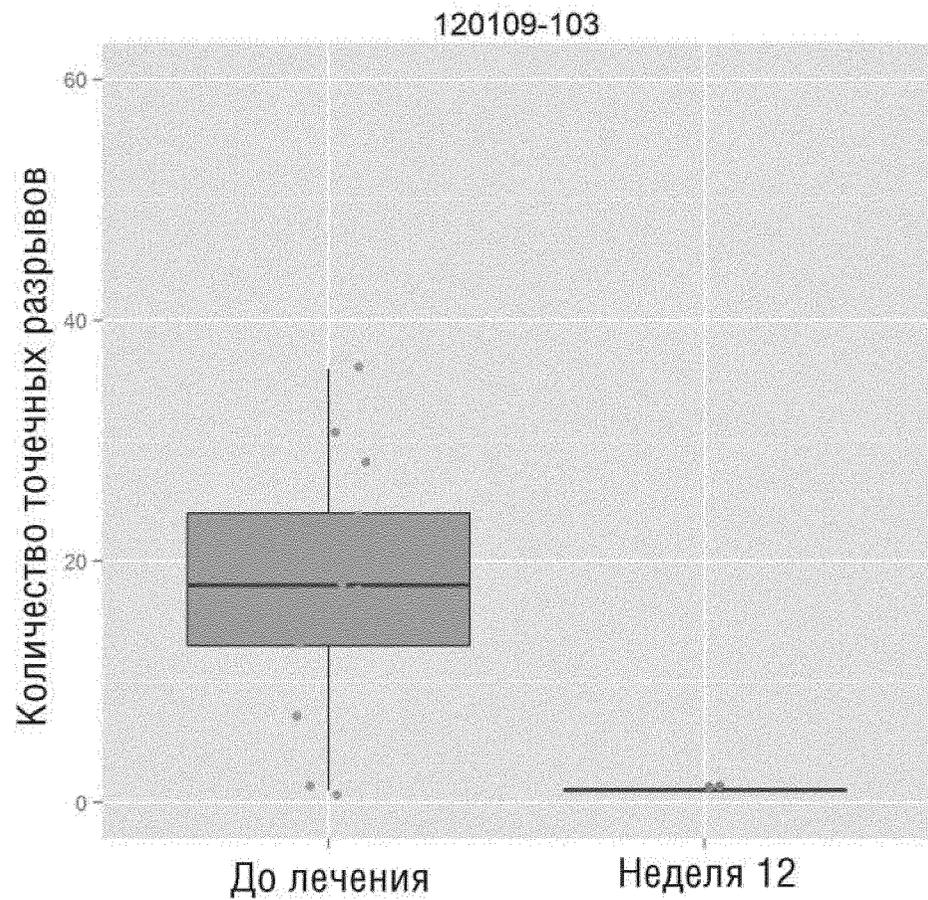
ФИГ.42А



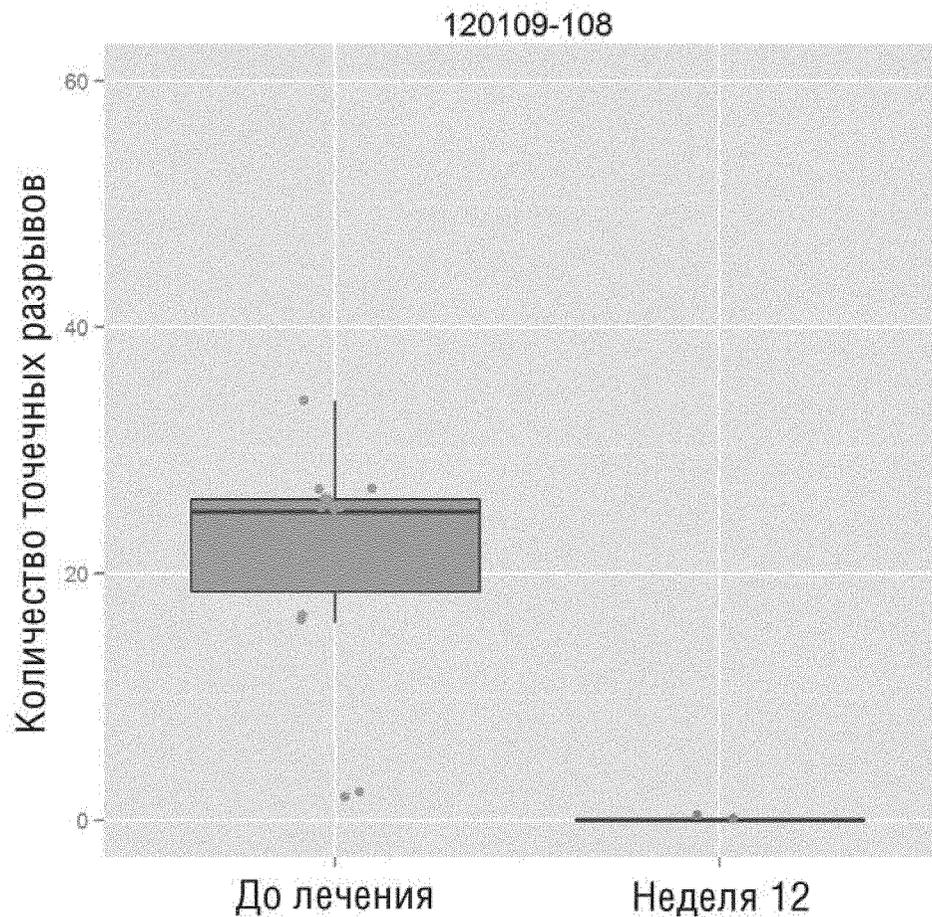
ФИГ.42В



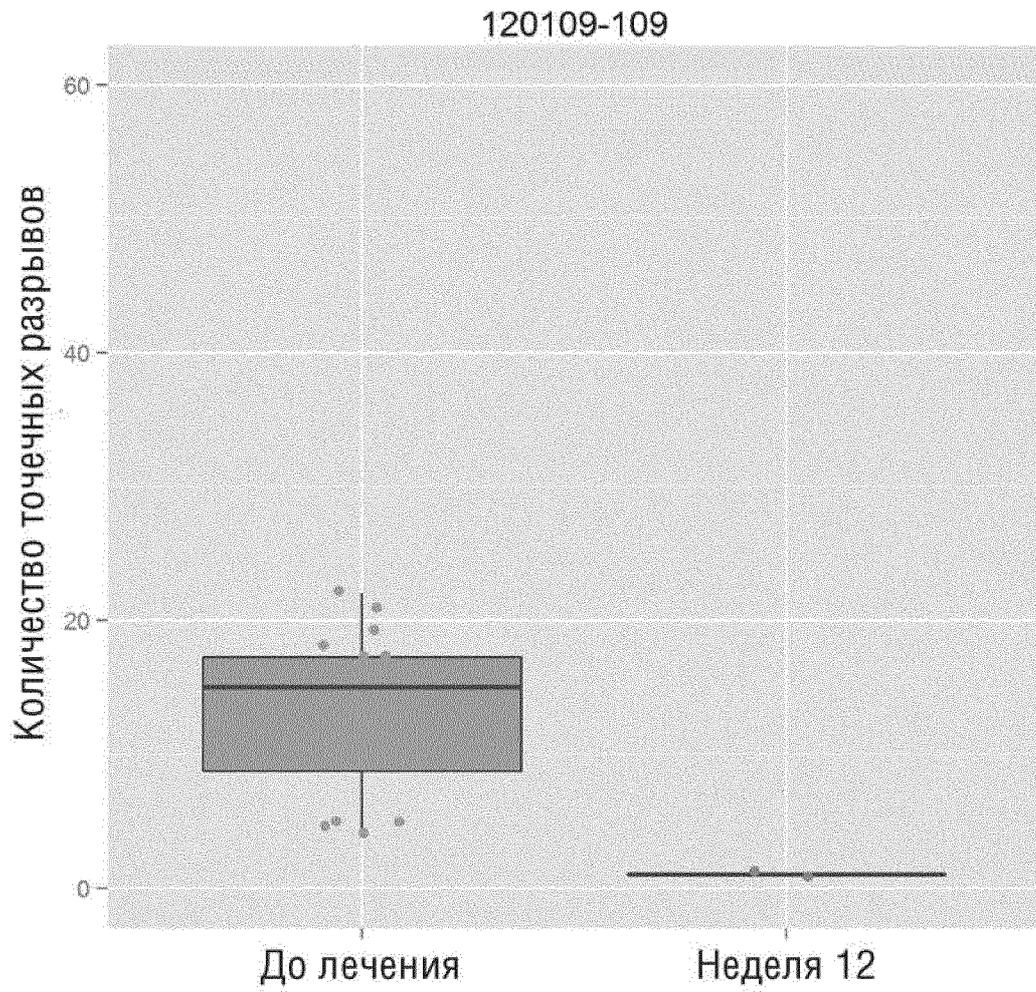
ФИГ.42С



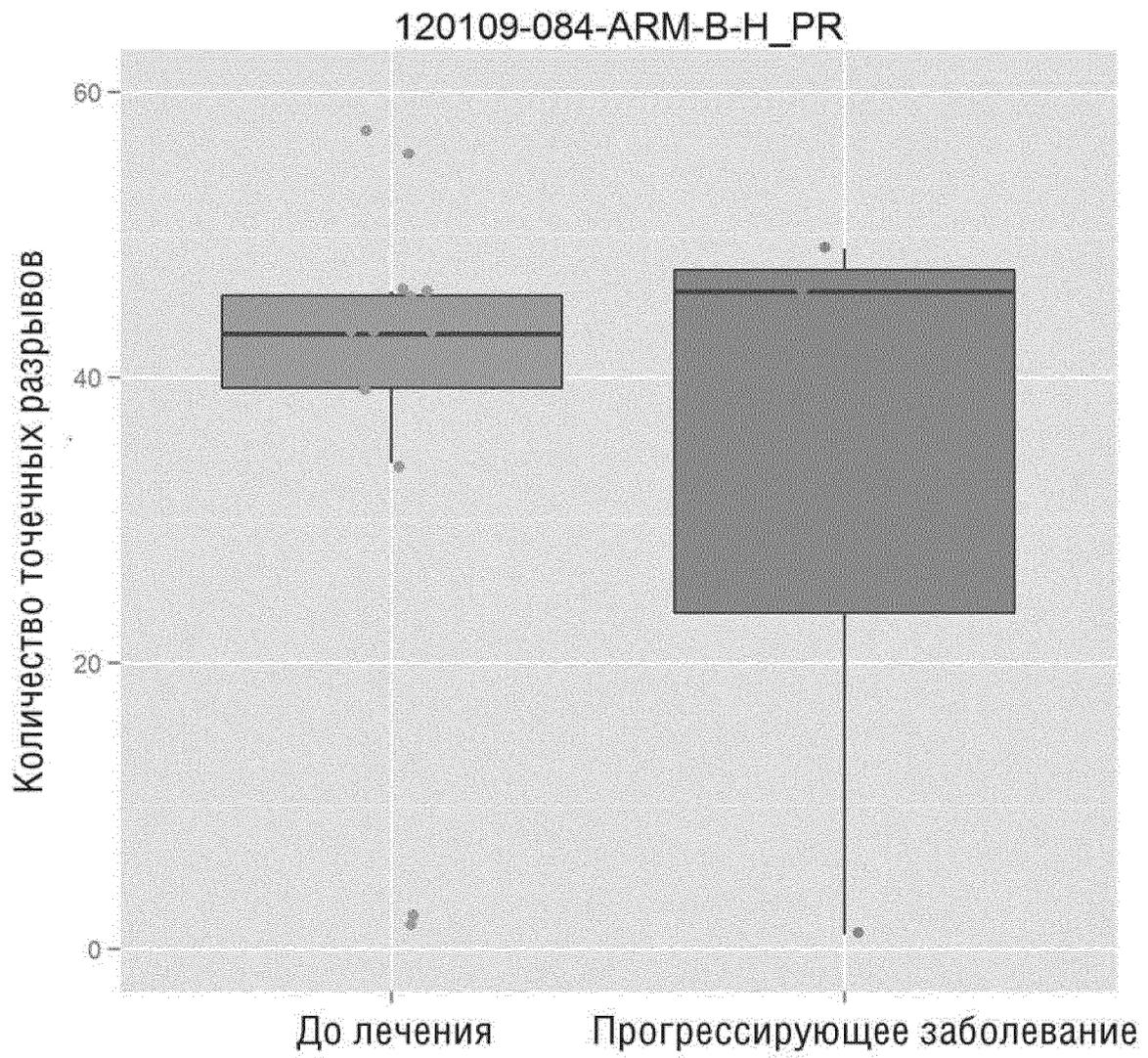
ФИГ.42D



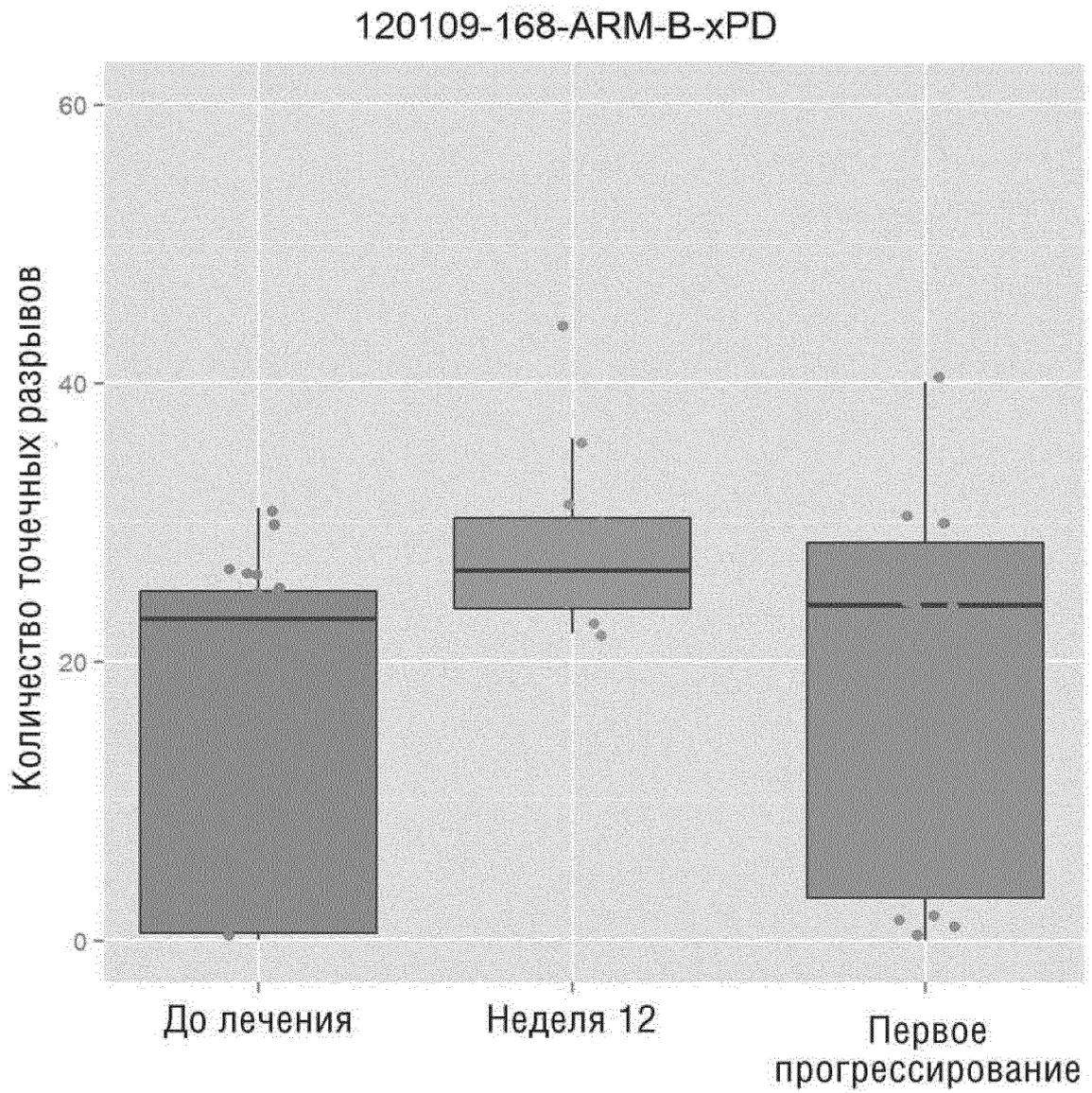
ФИГ.42Е



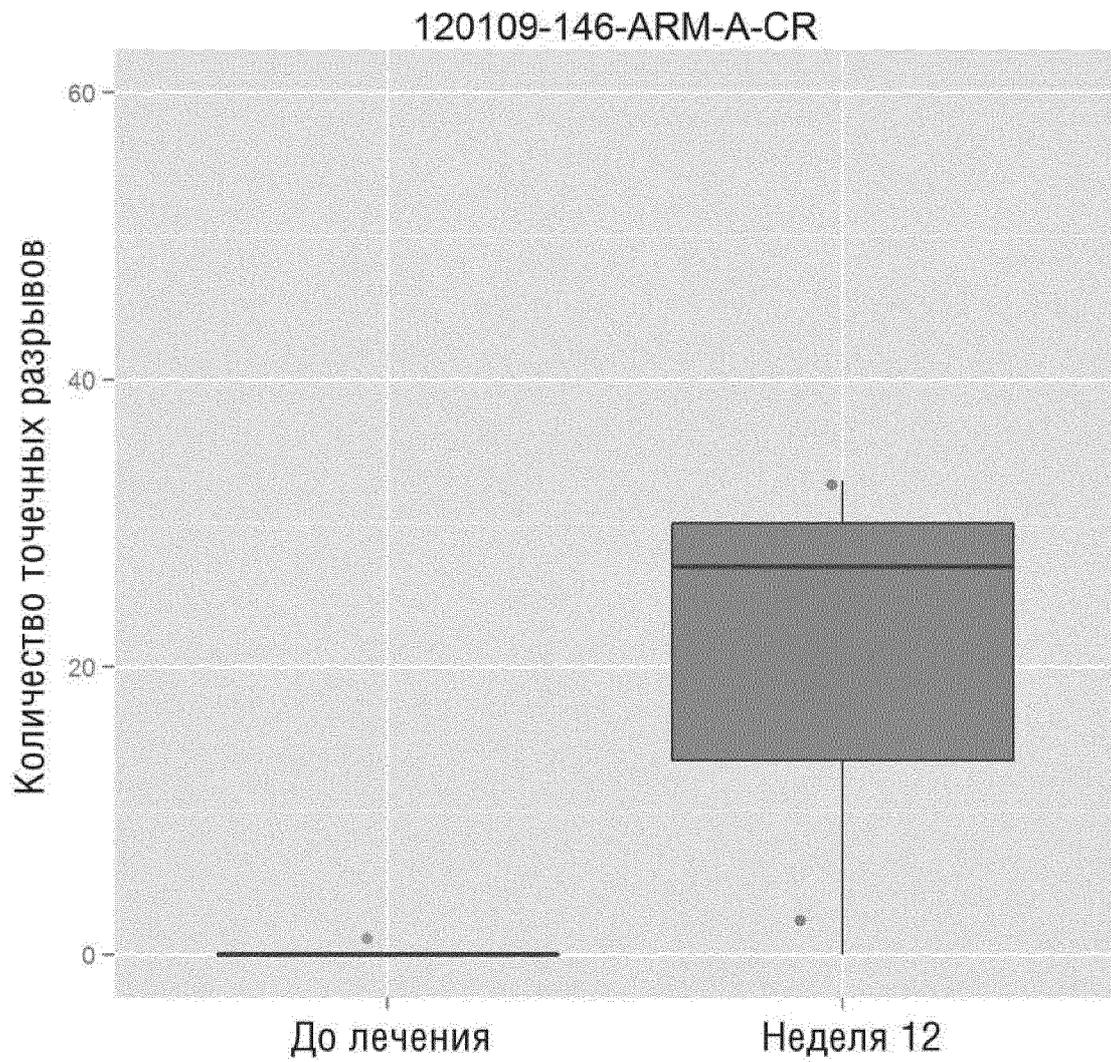
ФИГ.43А



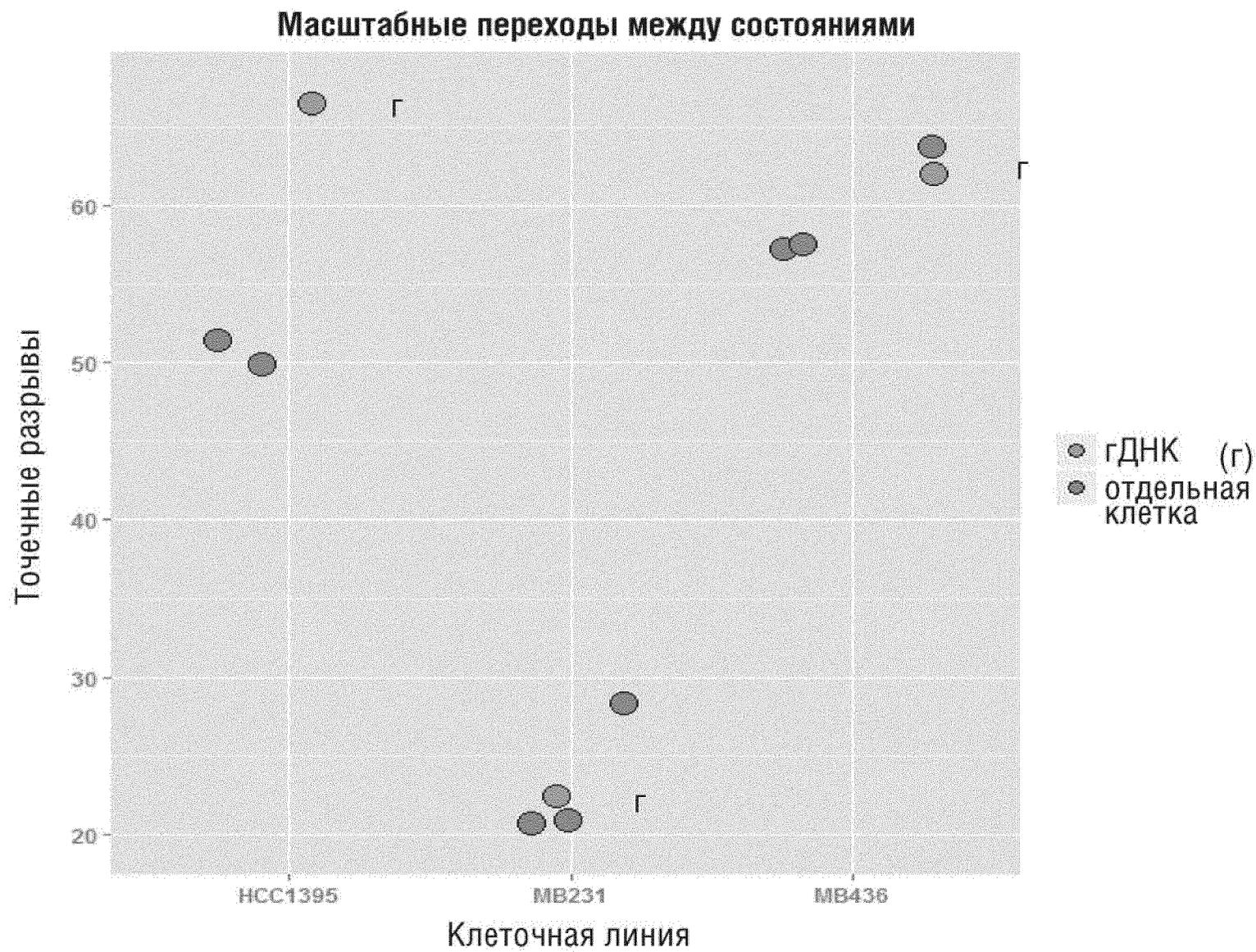
ФИГ.43В



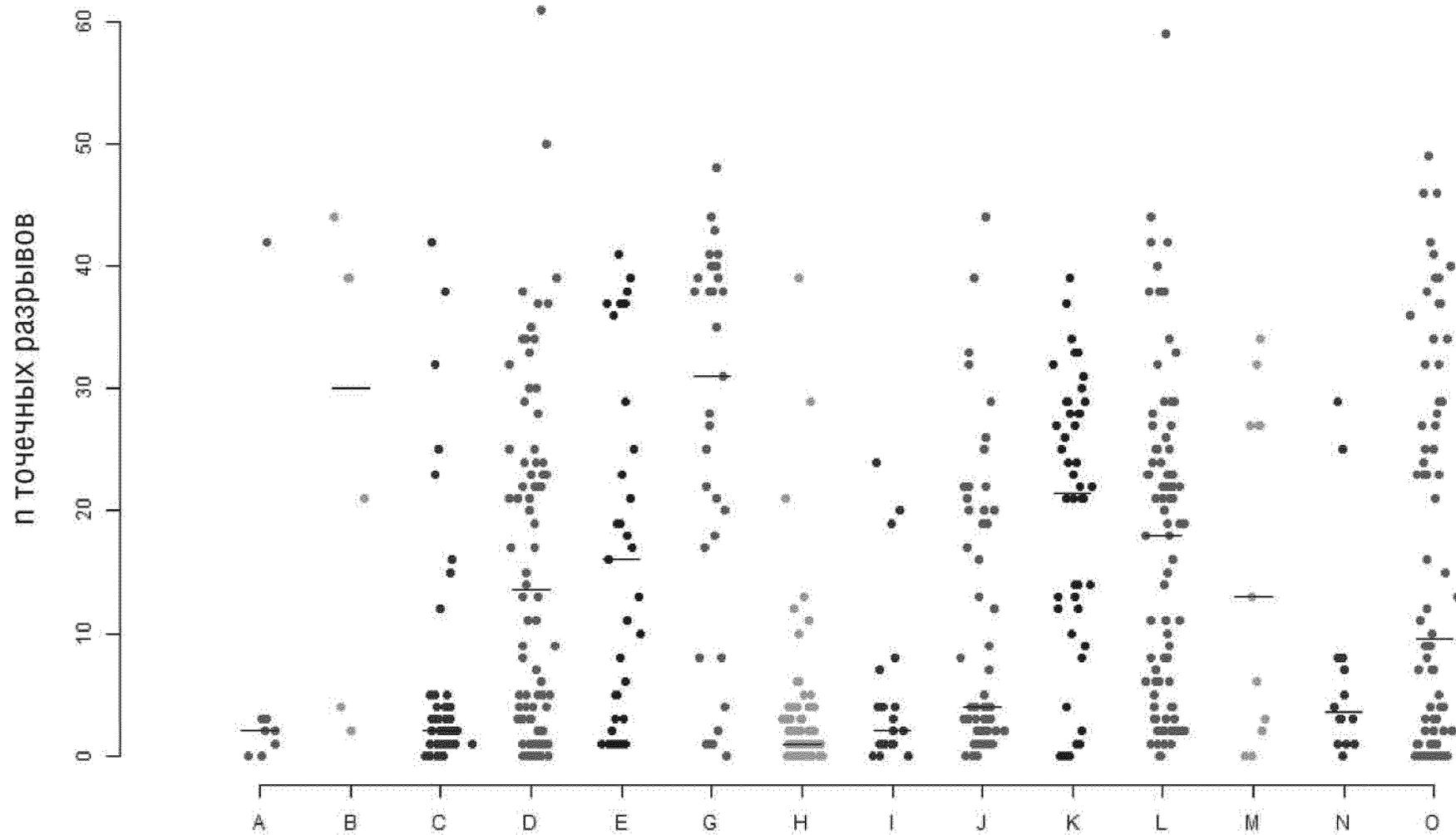
ФИГ.44



ФИГ.45А

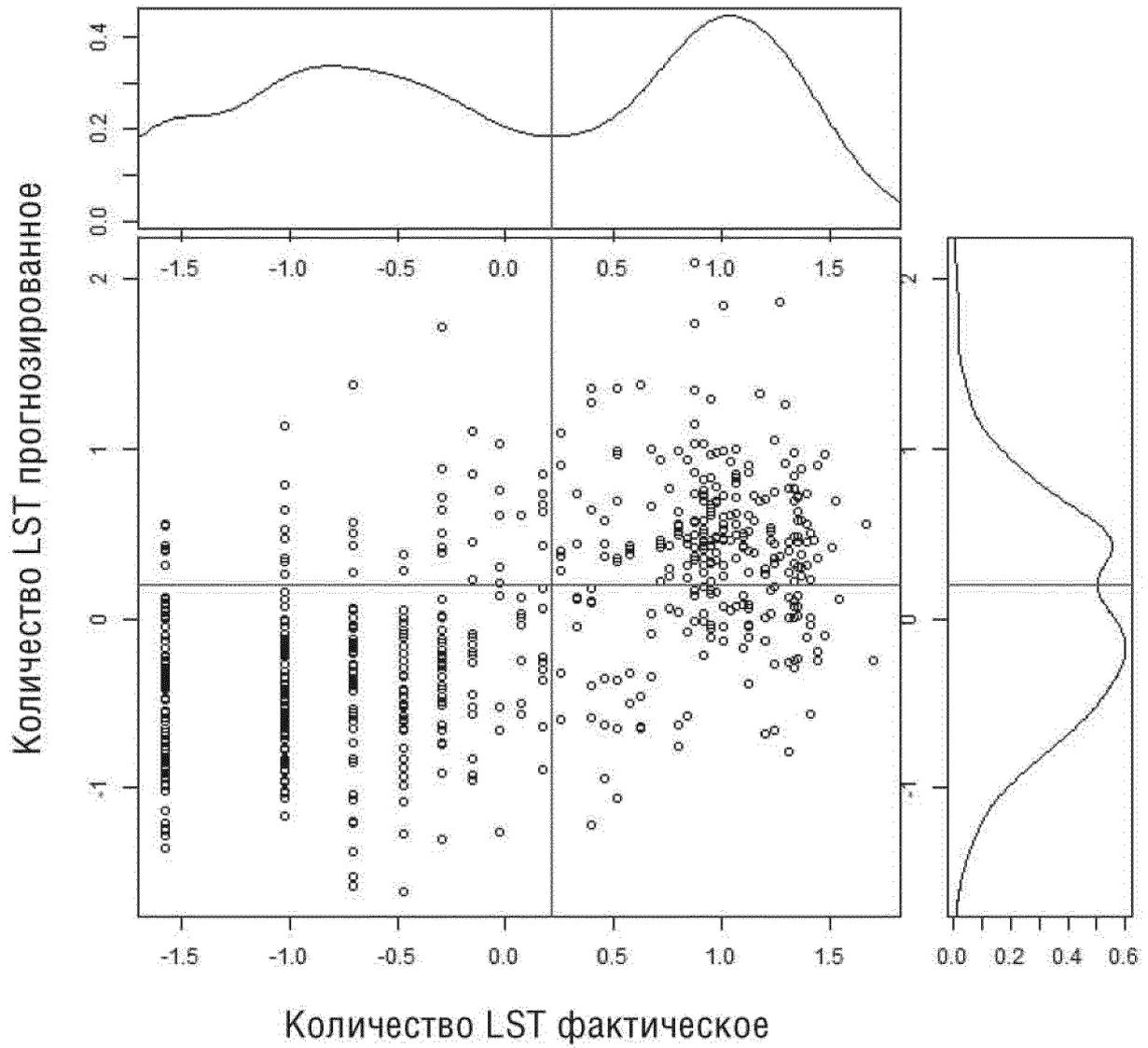


ФИГ.46

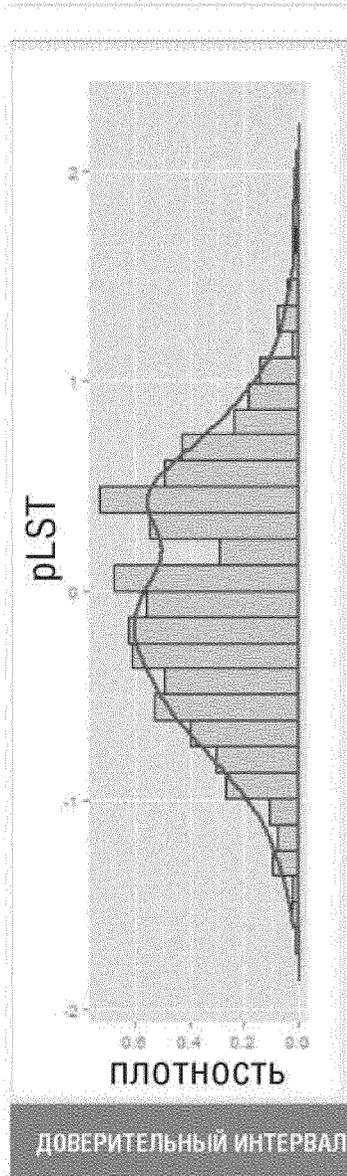


Морфологические кластеры ЦОК (каждая точка соответствует ЦОК)

ФИГ.47А



ФИГ.47С

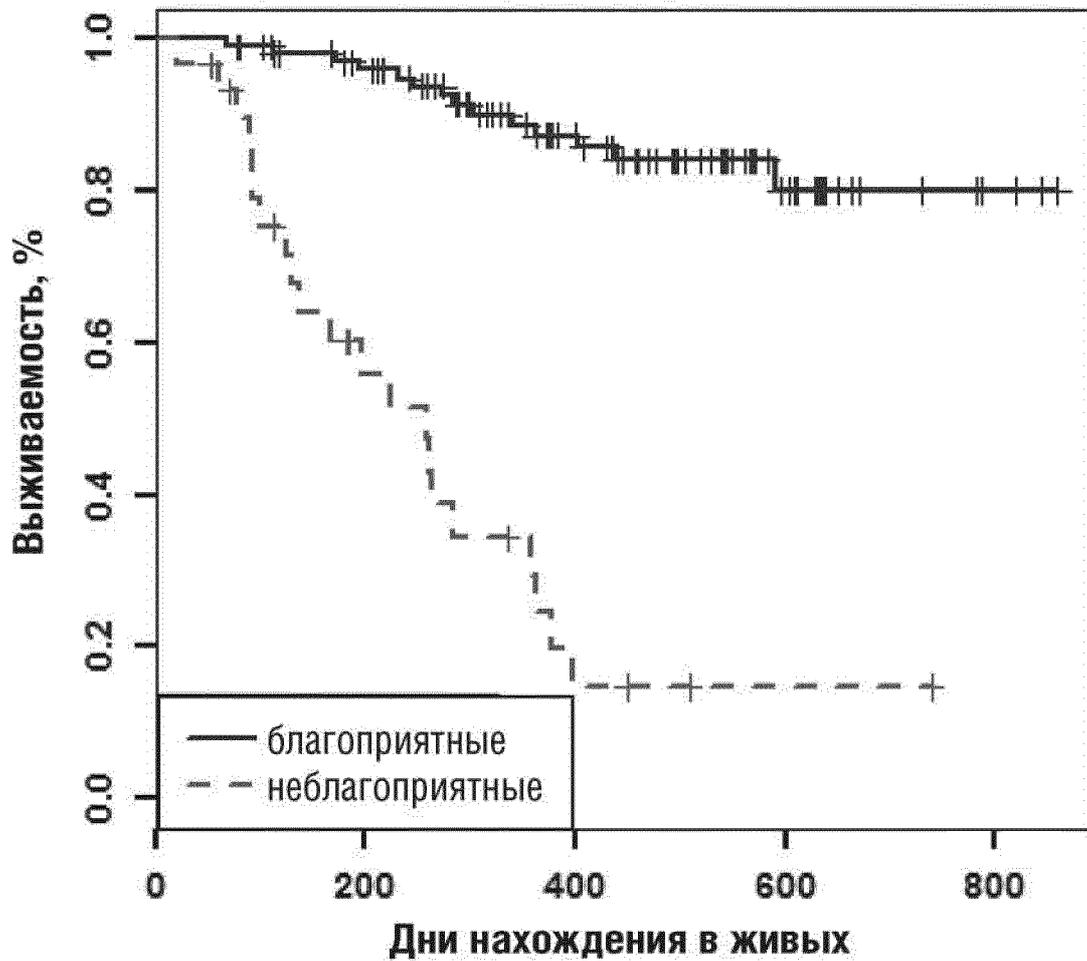


ФИГ.47В

$aLST = -0.298$ $pLST = 1.721$	$aLST = 0.397$ $pLST = 1.279$	$aLST = -0.703$ $pLST = 1.385$	$aLST = 1.247$ $pLST = 1.048$	$aLST = 1.269$ $pLST = 1.862$
$aLST = 1.291$ $pLST = 1.26$	$aLST = 1.176$ $pLST = 1.323$	$aLST = 0.878$ $pLST = 1.033$	$aLST = 0.914$ $pLST = 1.031$	$aLST = 1.011$ $pLST = 0.995$
$aLST = 1.011$ $pLST = 1.841$	$aLST = 1.333$ $pLST = 0.981$	$aLST = 0.947$ $pLST = 1.299$	$aLST = 0.878$ $pLST = 1.153$	$aLST = 0.626$ $pLST = 1.385$
$aLST = -1.025$ $pLST = -0.961$	$aLST = -1.575$ $pLST = -1.203$	$aLST = -1.025$ $pLST = -1.017$	$aLST = -1.025$ $pLST = -1.033$	$aLST = -0.703$ $pLST = -1.038$
$aLST = -1.575$ $pLST = -1.13$	$aLST = -0.703$ $pLST = -1.382$	$aLST = -1.025$ $pLST = -1.059$	$aLST = -1.575$ $pLST = -1.239$	$aLST = -0.703$ $pLST = -1.378$

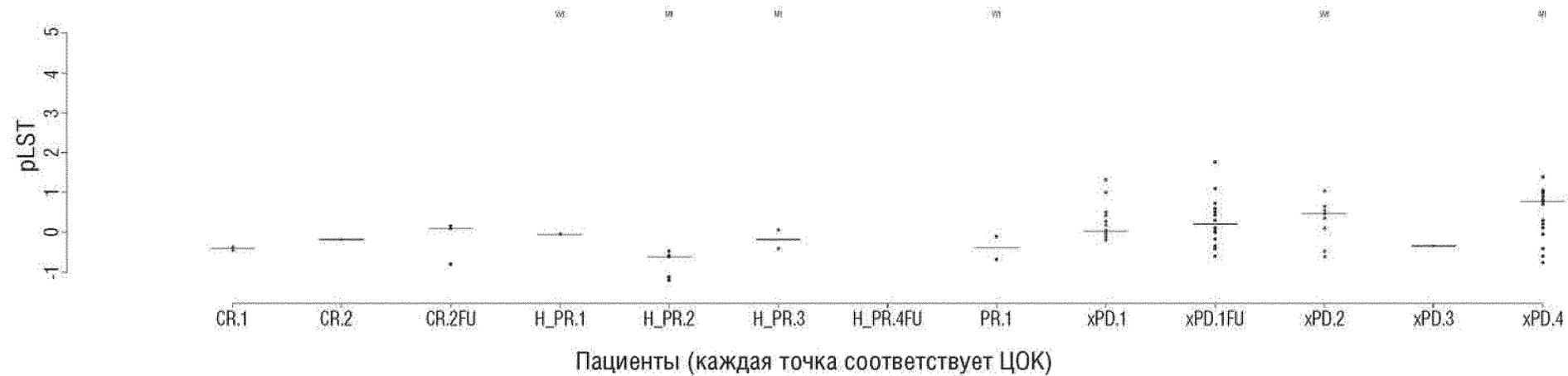
ФИГ.48А

OS: Нагрузка прогнозированных LST ≥ 13 ЦОК
134 образца AR (30 против 104) порог отсечения ≥ 6 /мл

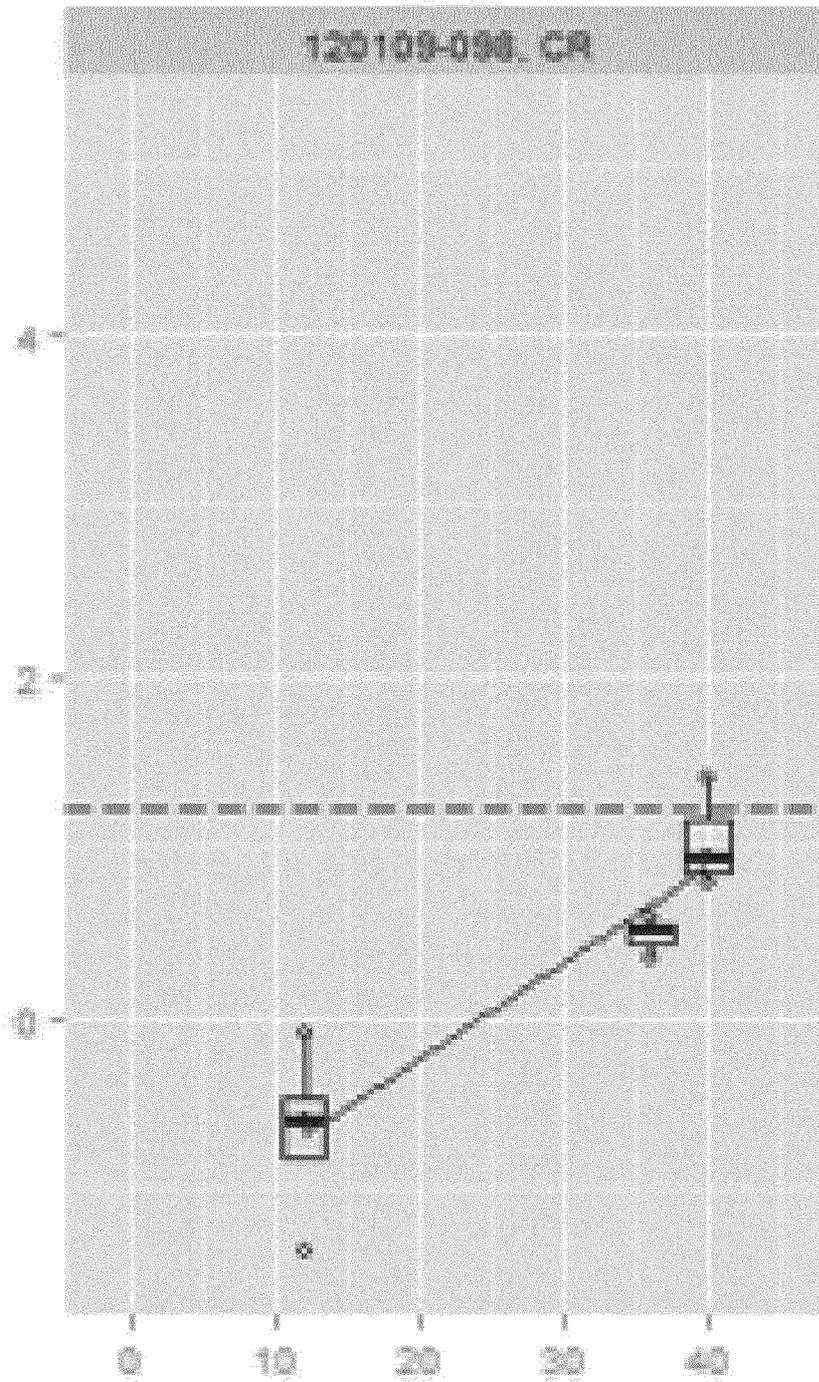


Отношение рисков: 9,83 (3,7-26,13) $p=0$

ФИГ.48В



ФИГ.49

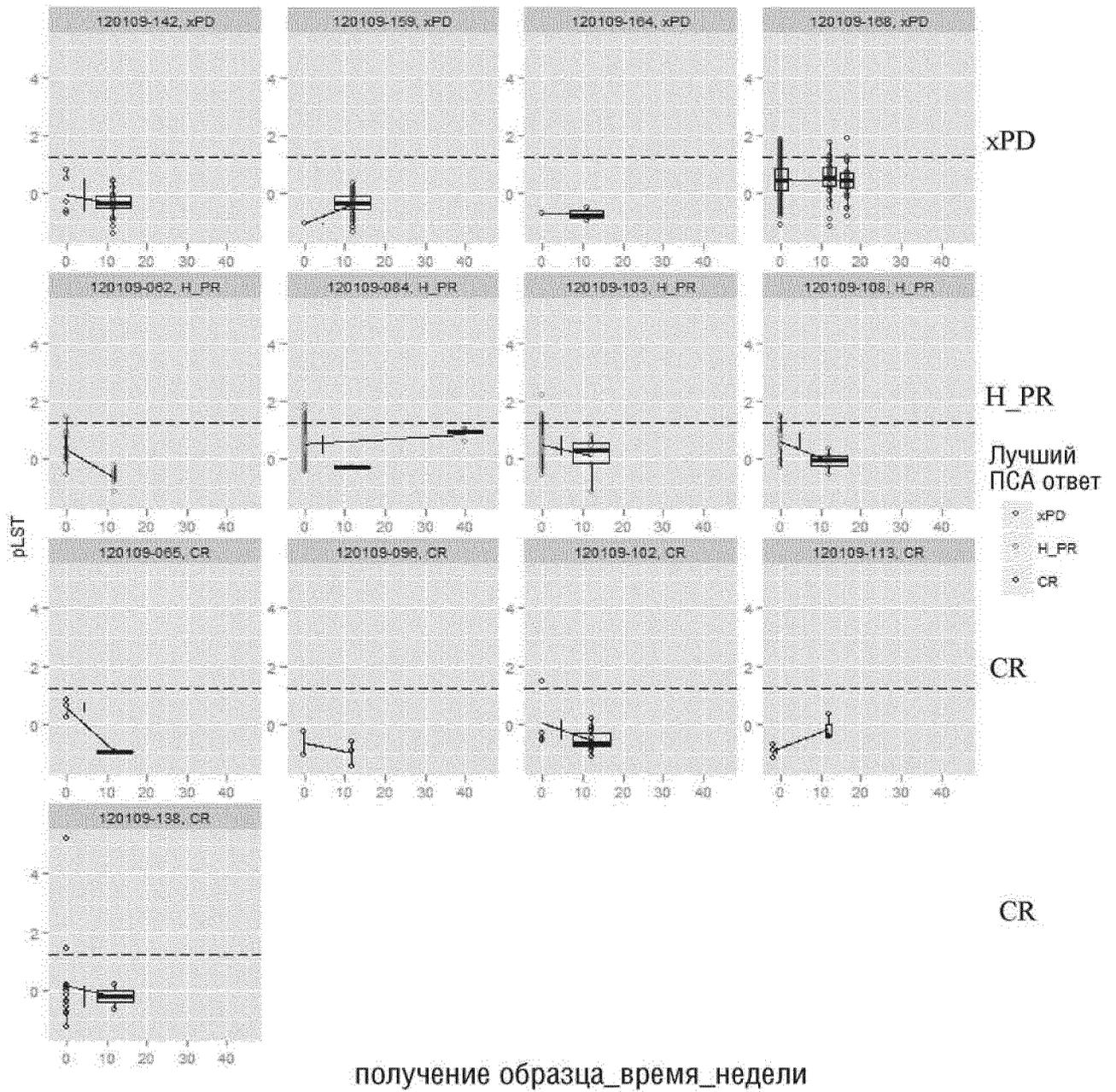


ФИГ.50В

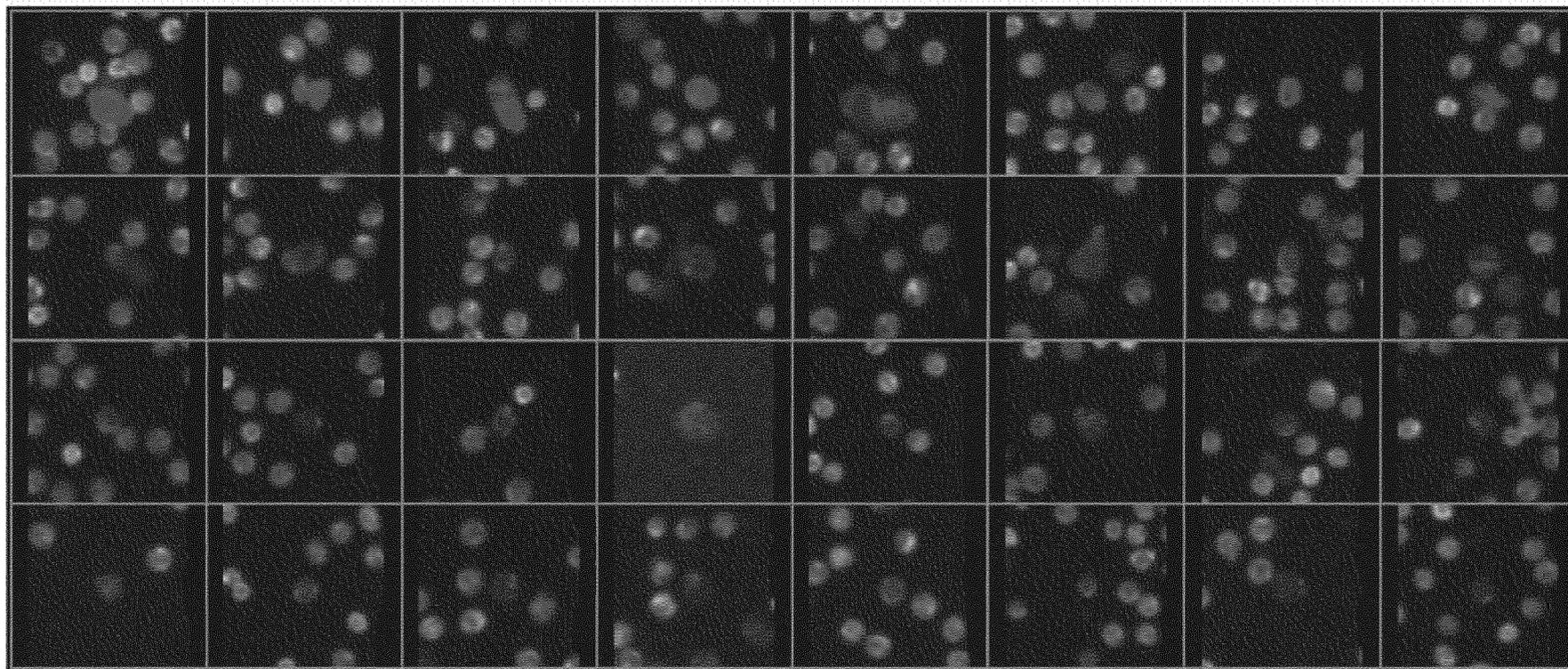
Пациенты	ПСА ответы	Начало лечения (n pLST+ ЦОК)	Послед. наблюдение (n pLST+ ЦОК)	Изменение, %
1	xPD	227	27	-88%
2	H_PR	195	0	-100%
3	H_PR	134	4	-97%
4	PR	36	0	-100%
5	H_PR	11	2	-82%
6	H_PR	8	0	-100%
7	PR	7	0	-100%
8	H_PR	5	0	-100%
9	CR	4	1	-75%
10	CR	3	0	-100%
11	PR	2	1	-50%
12	yNE	1	1	0%
13	CR	1	1	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	

ФИГ.51

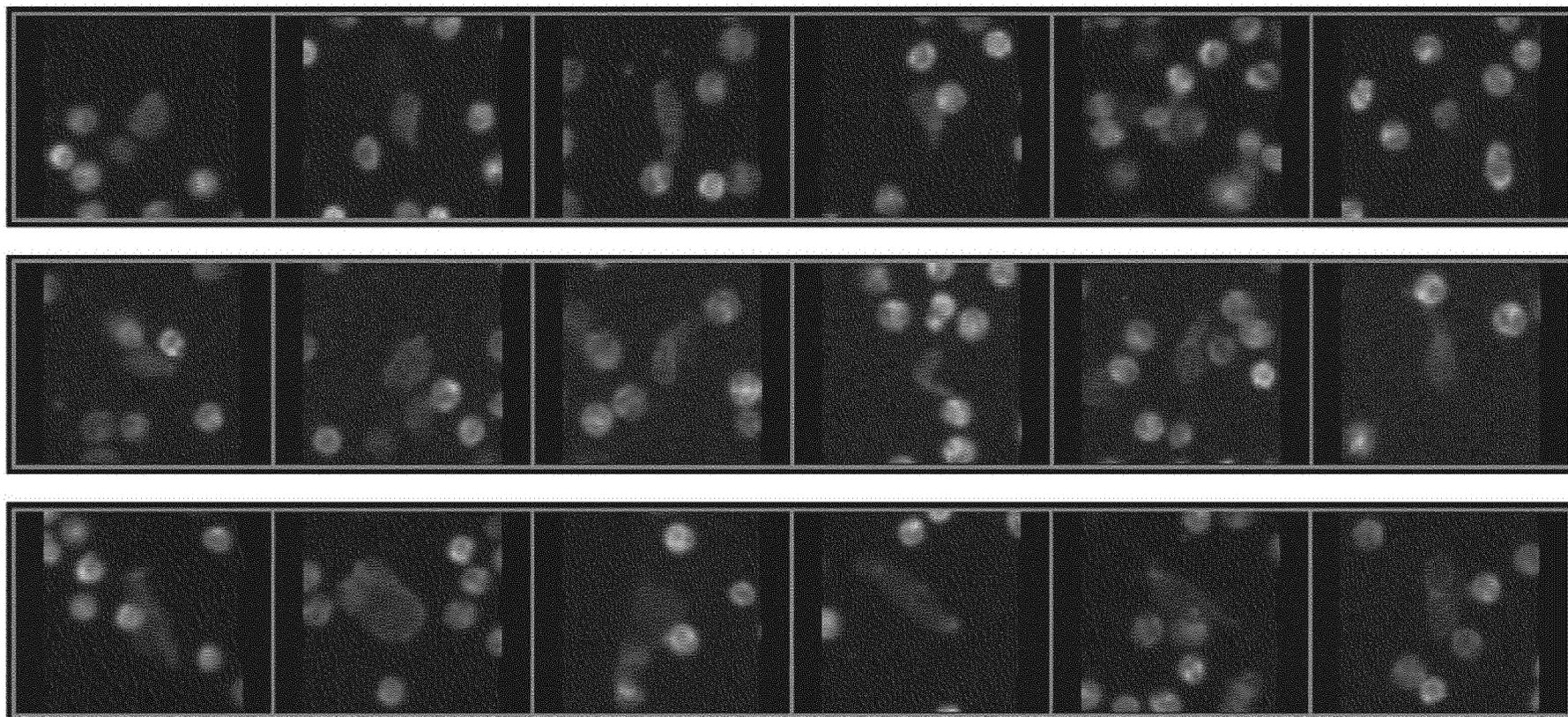
Группа В



ФИГ.52А



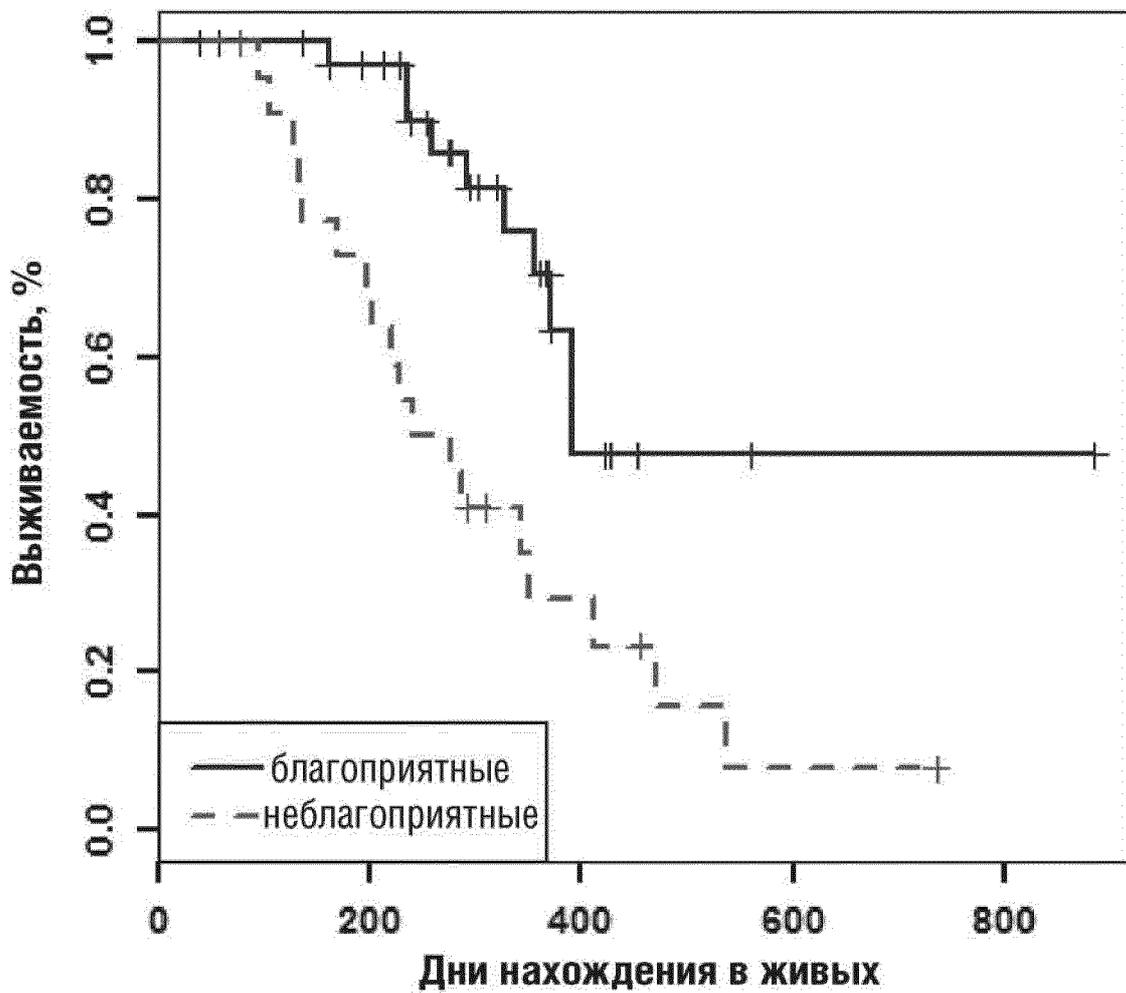
ФИГ.52В



75/97

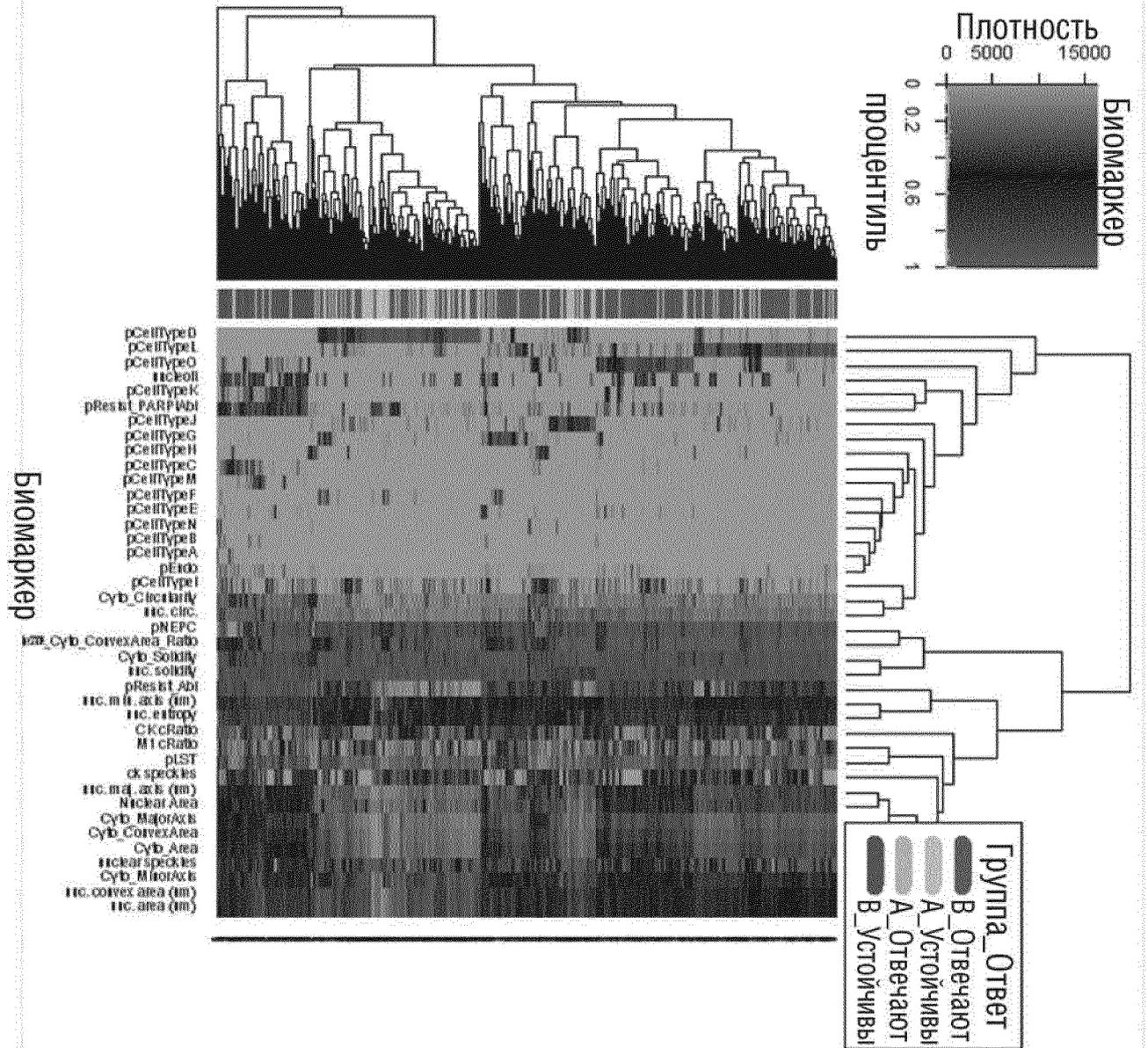
ФИГ.53

61 образец при терапии таксанами (23 против 38)
порог отсечения ≥ 6 /мл

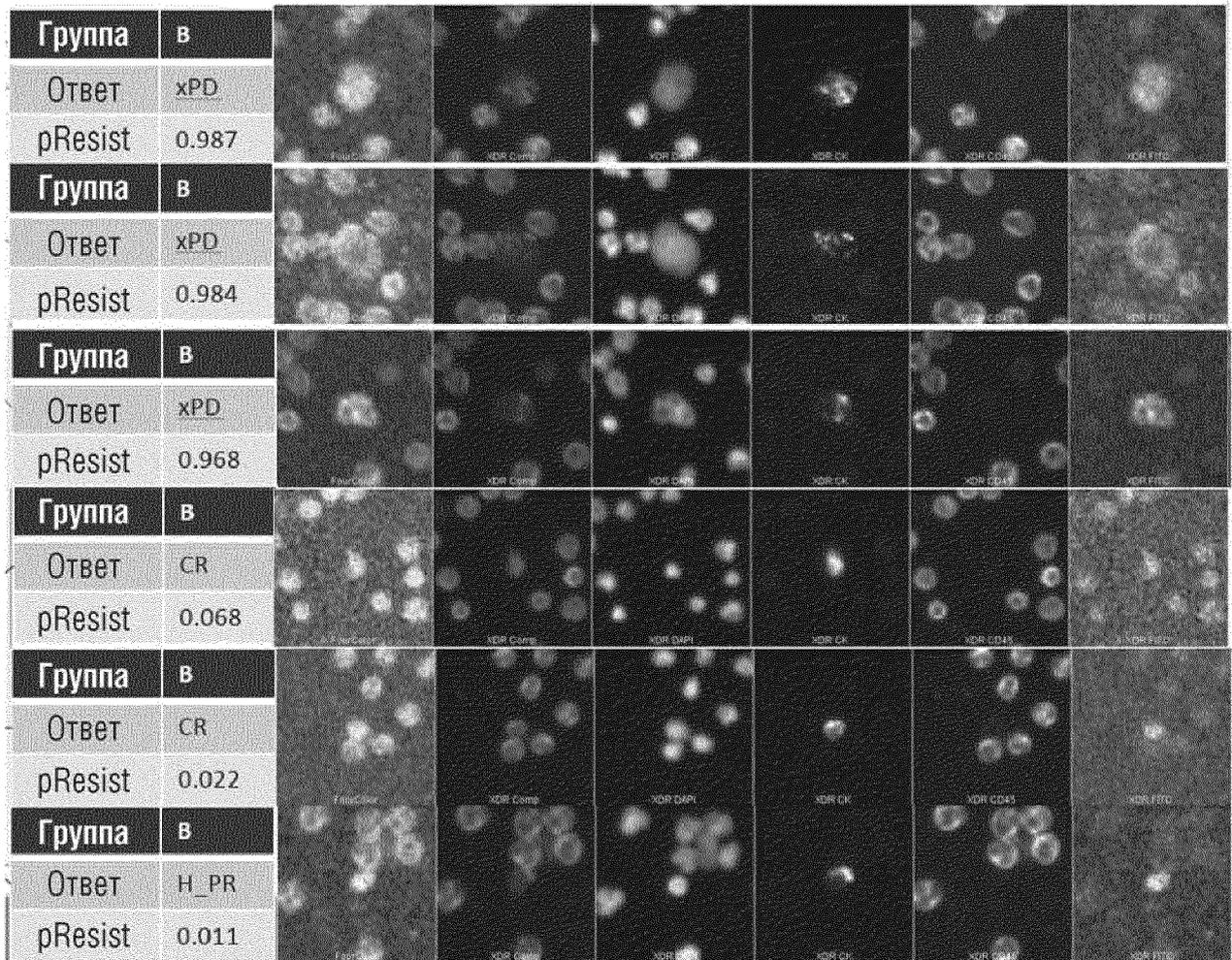


Отношение рисков: 3,31 (1,53 - 7,2) $p=0,00119$

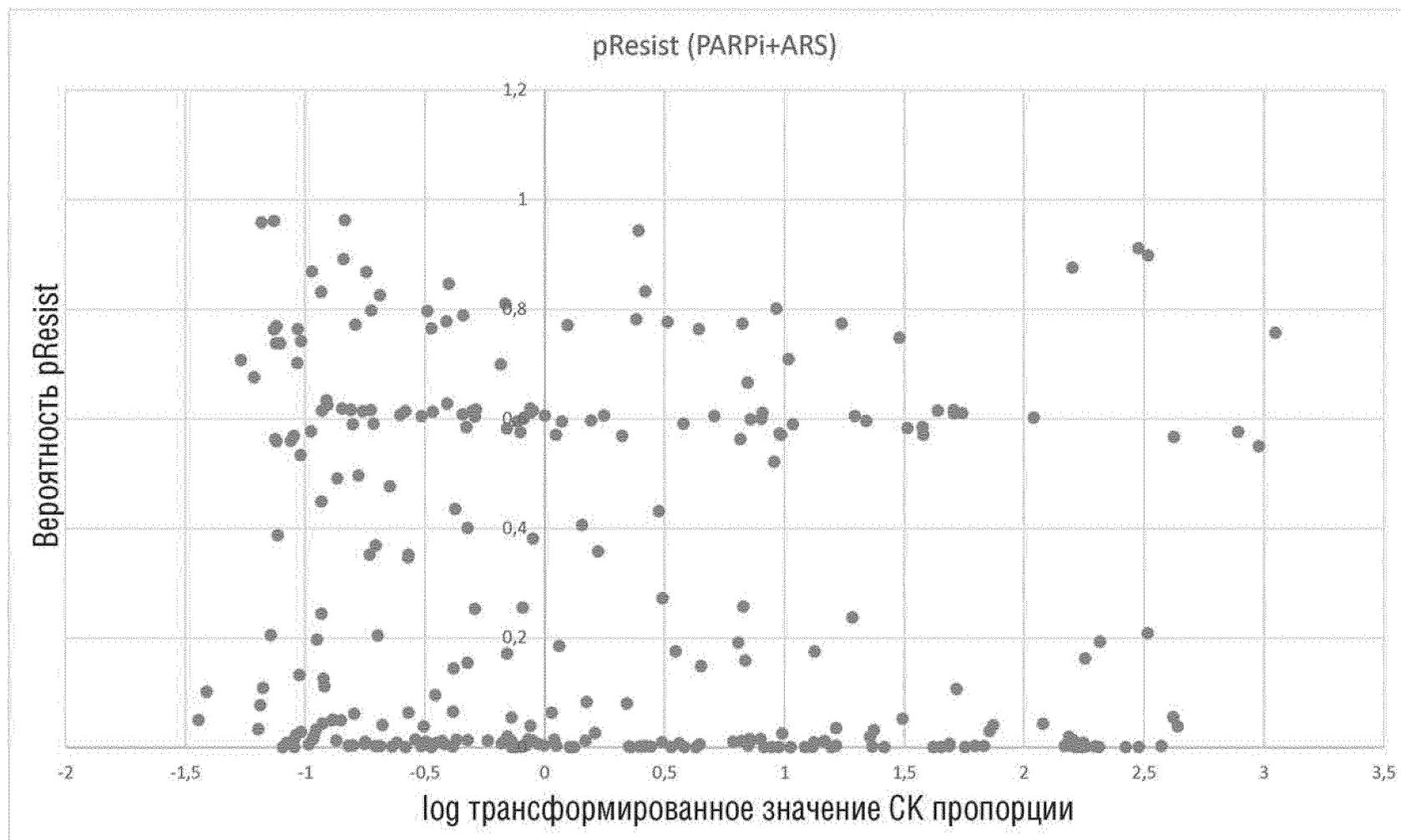
ФИГ.54А



ФИГ.54В

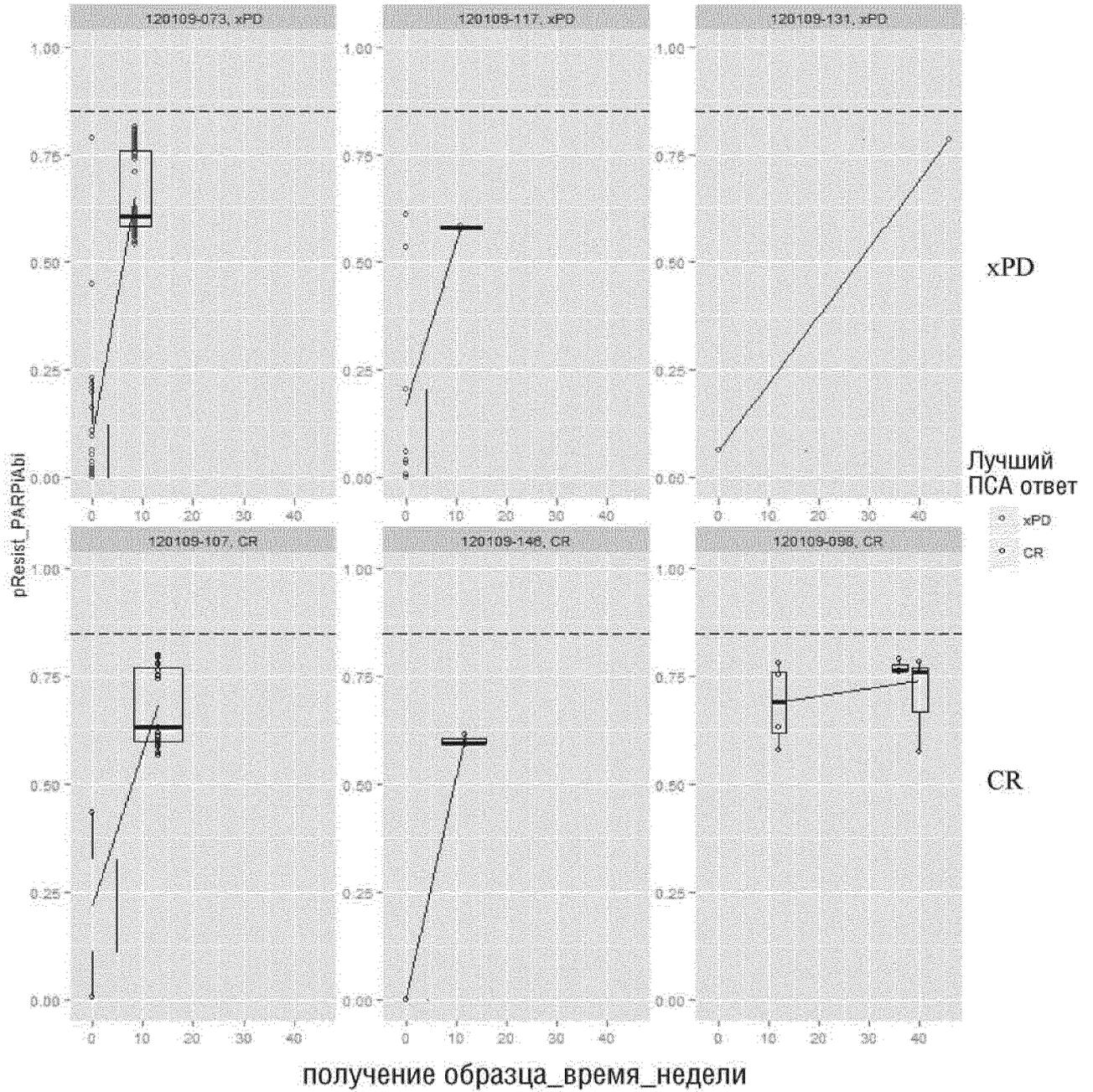


ФИГ.55



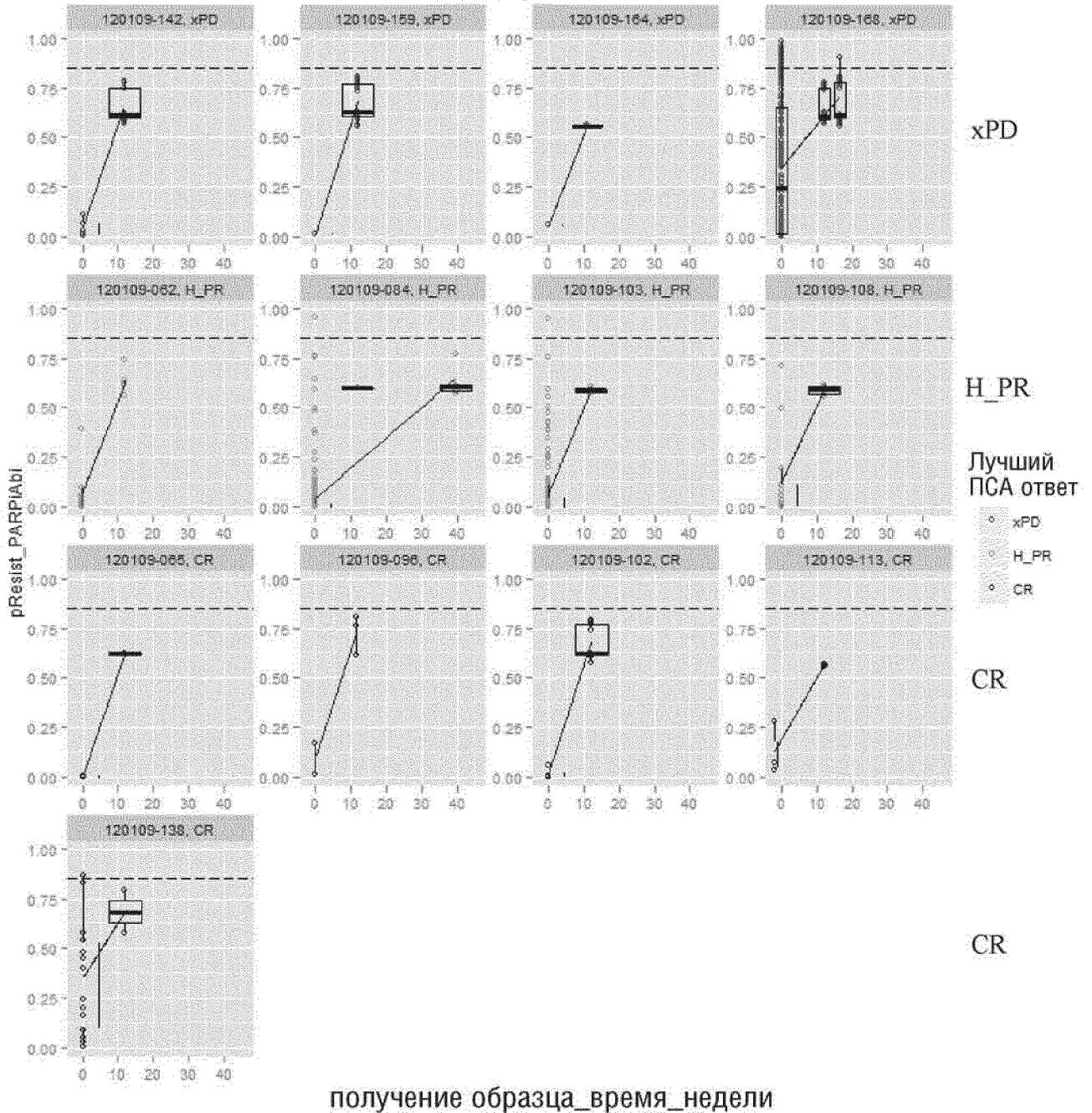
ФИГ.56А

Группа А

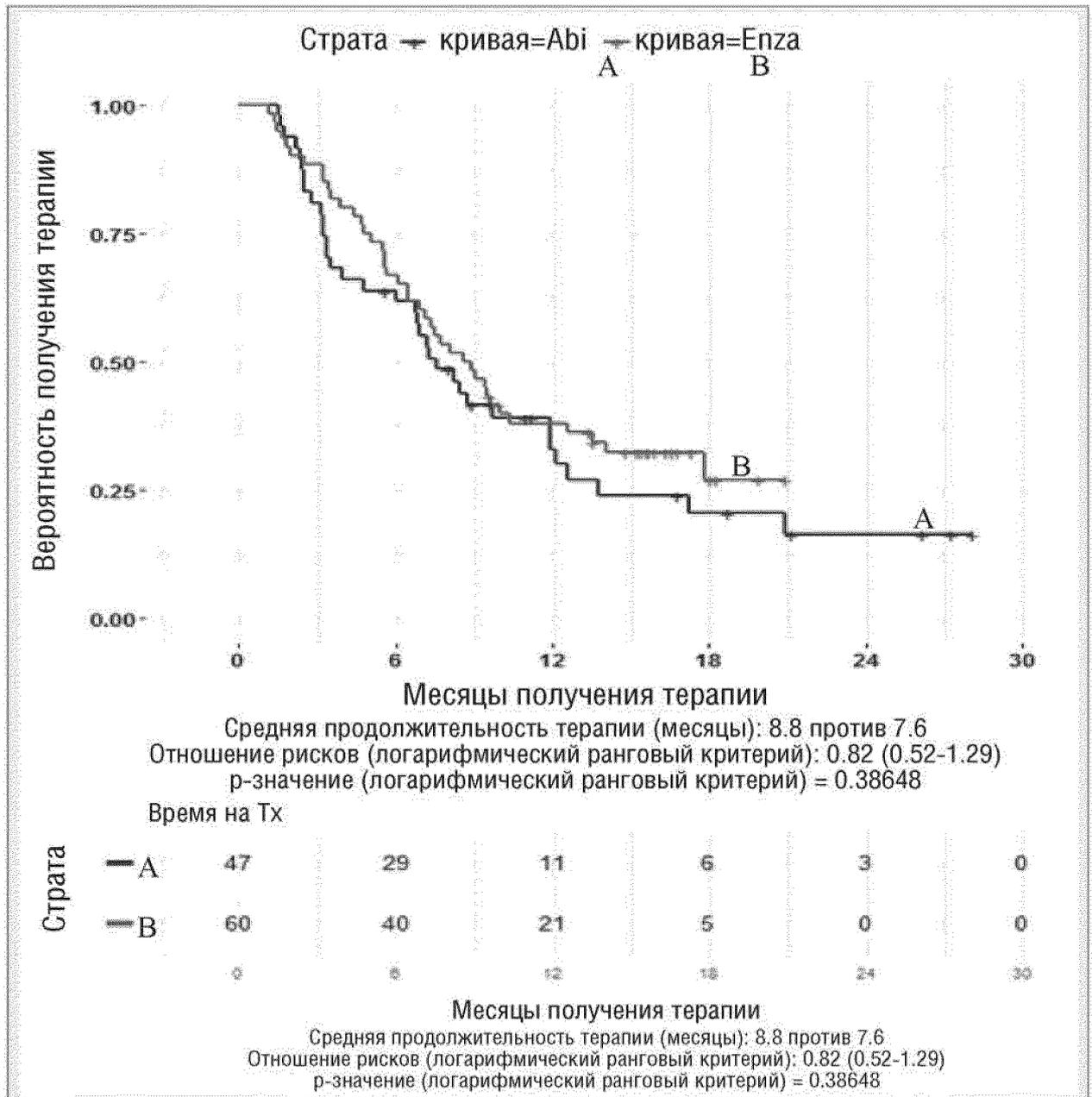


ФИГ.56В

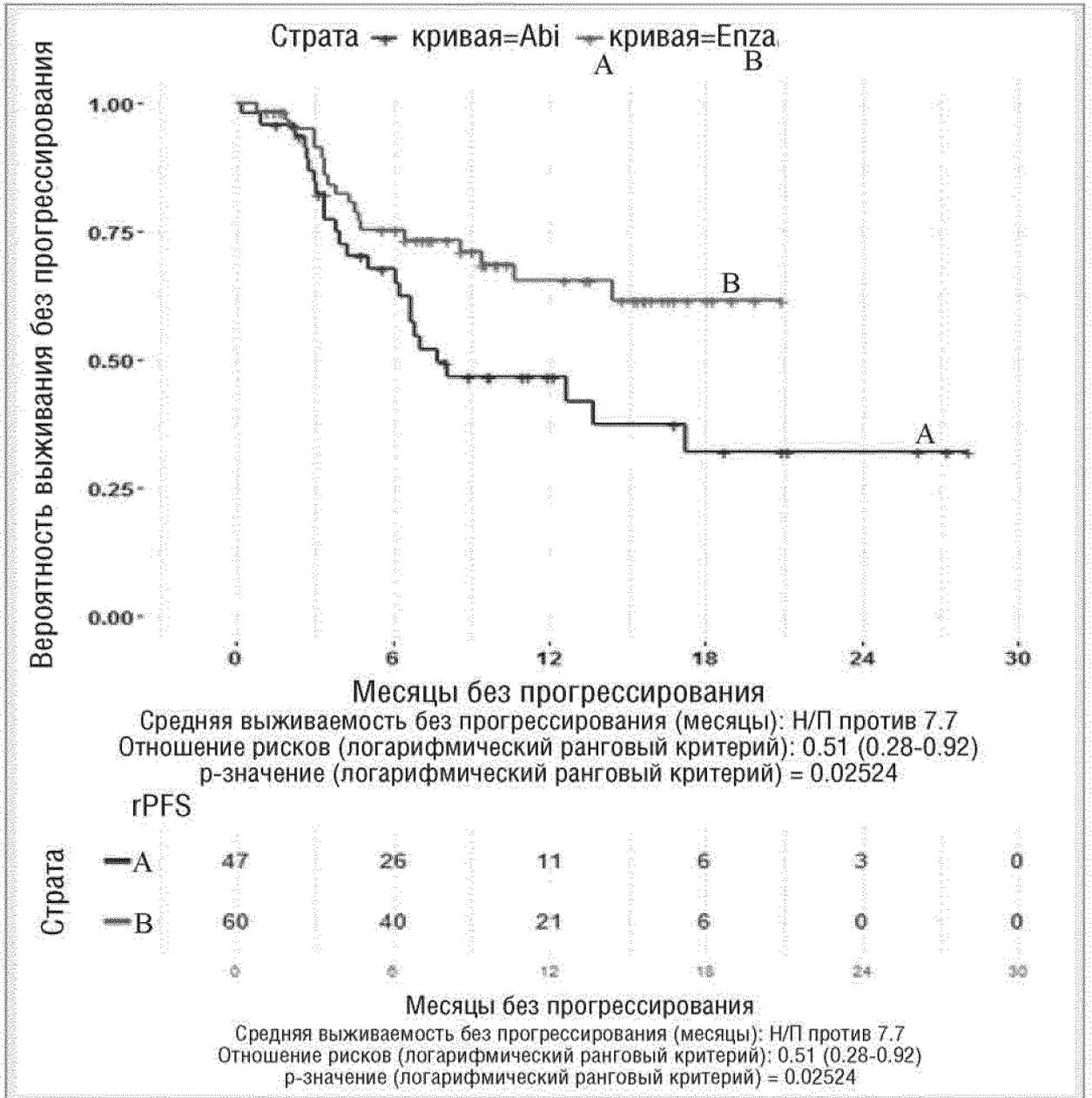
Группа В



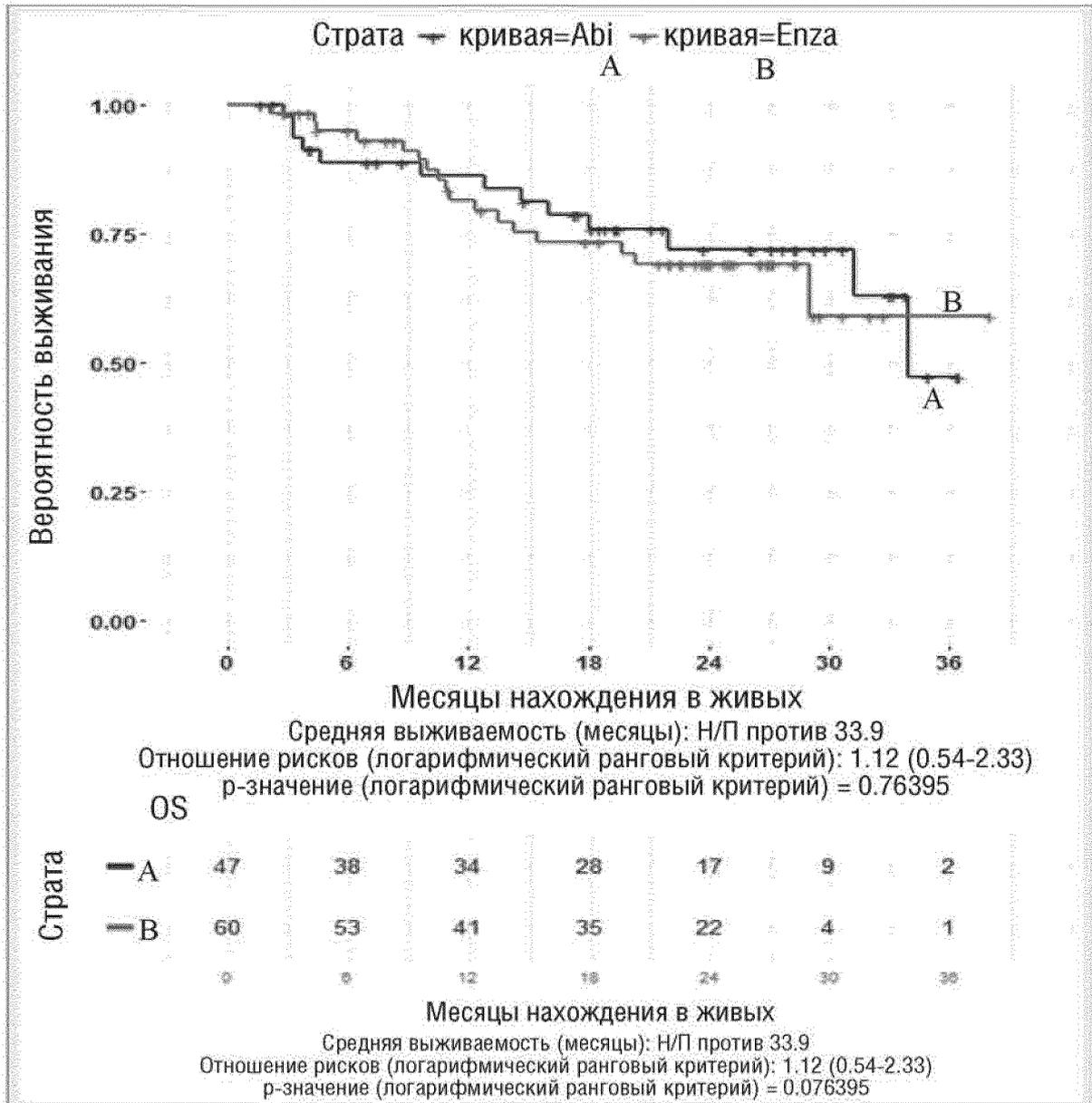
ФИГ.57А



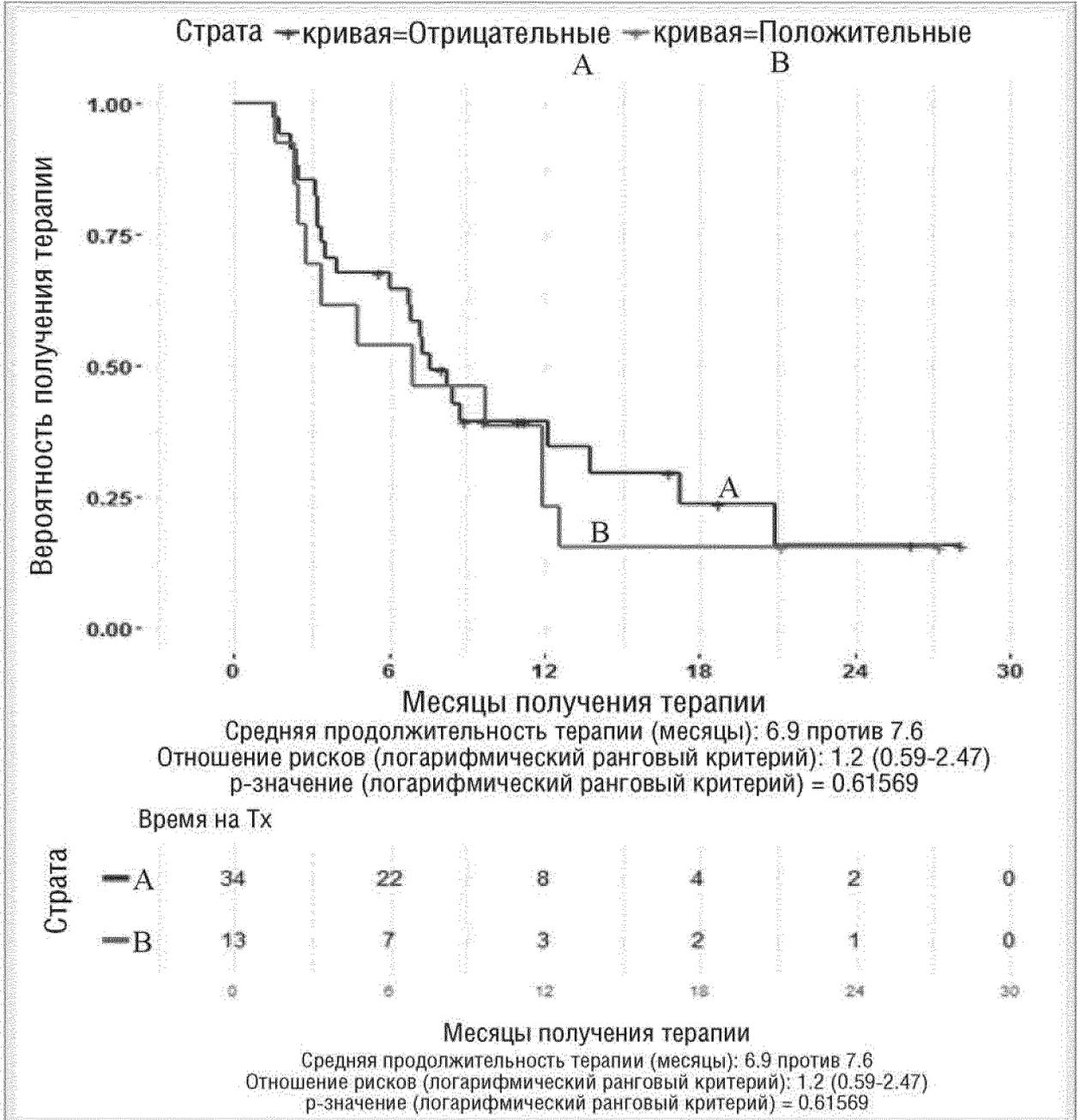
ФИГ.57В



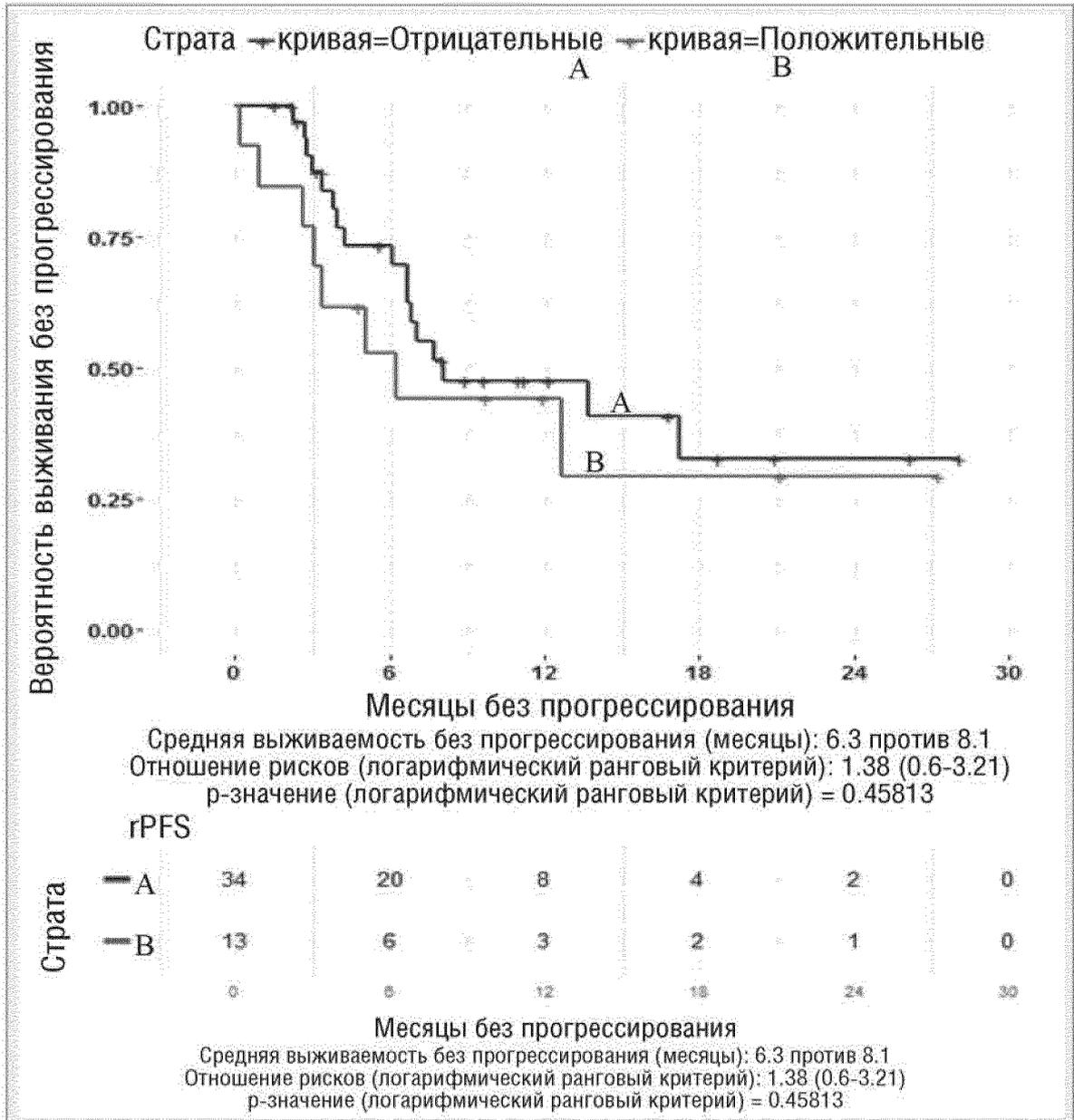
ФИГ.57С



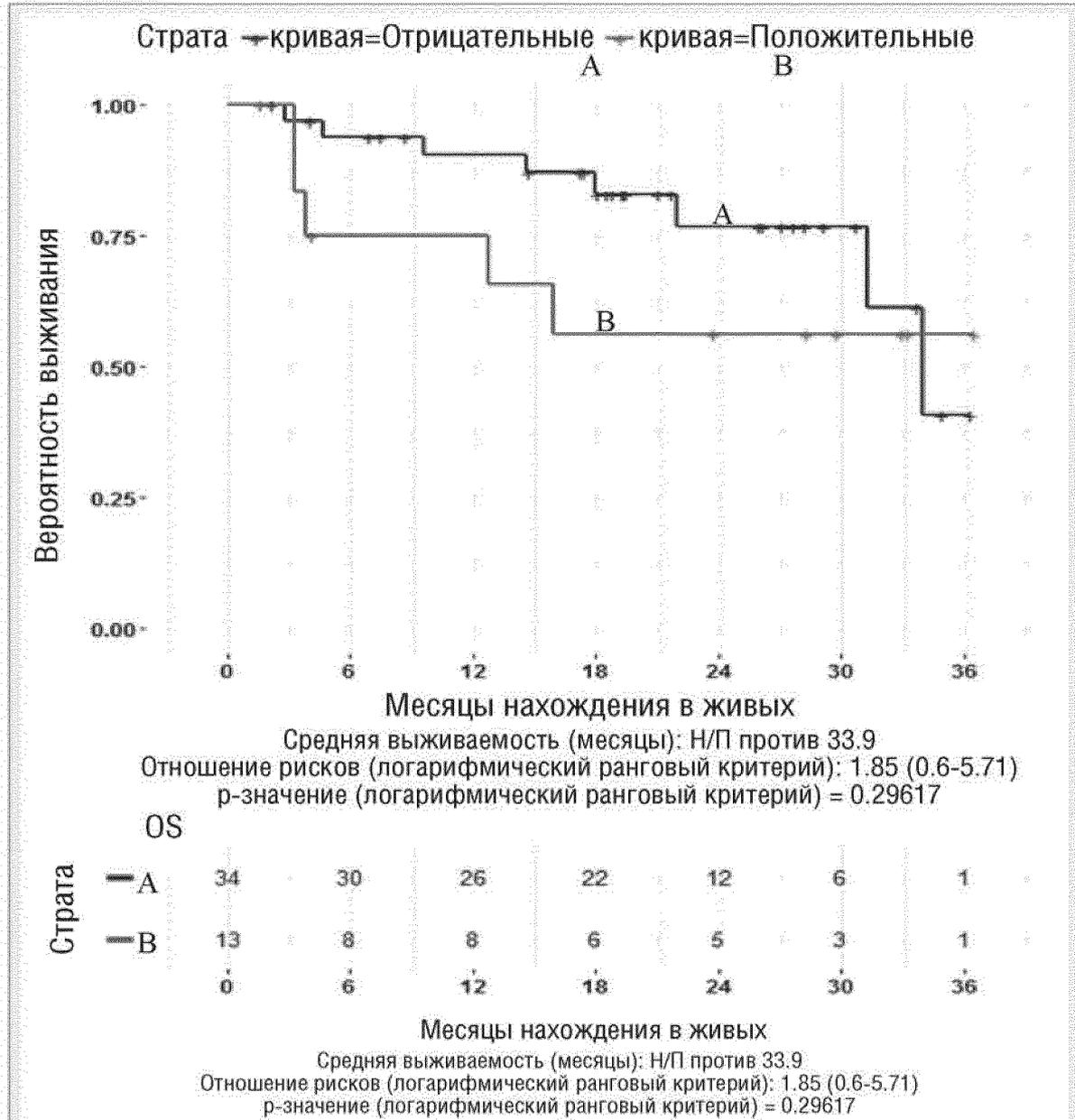
ФИГ.58А



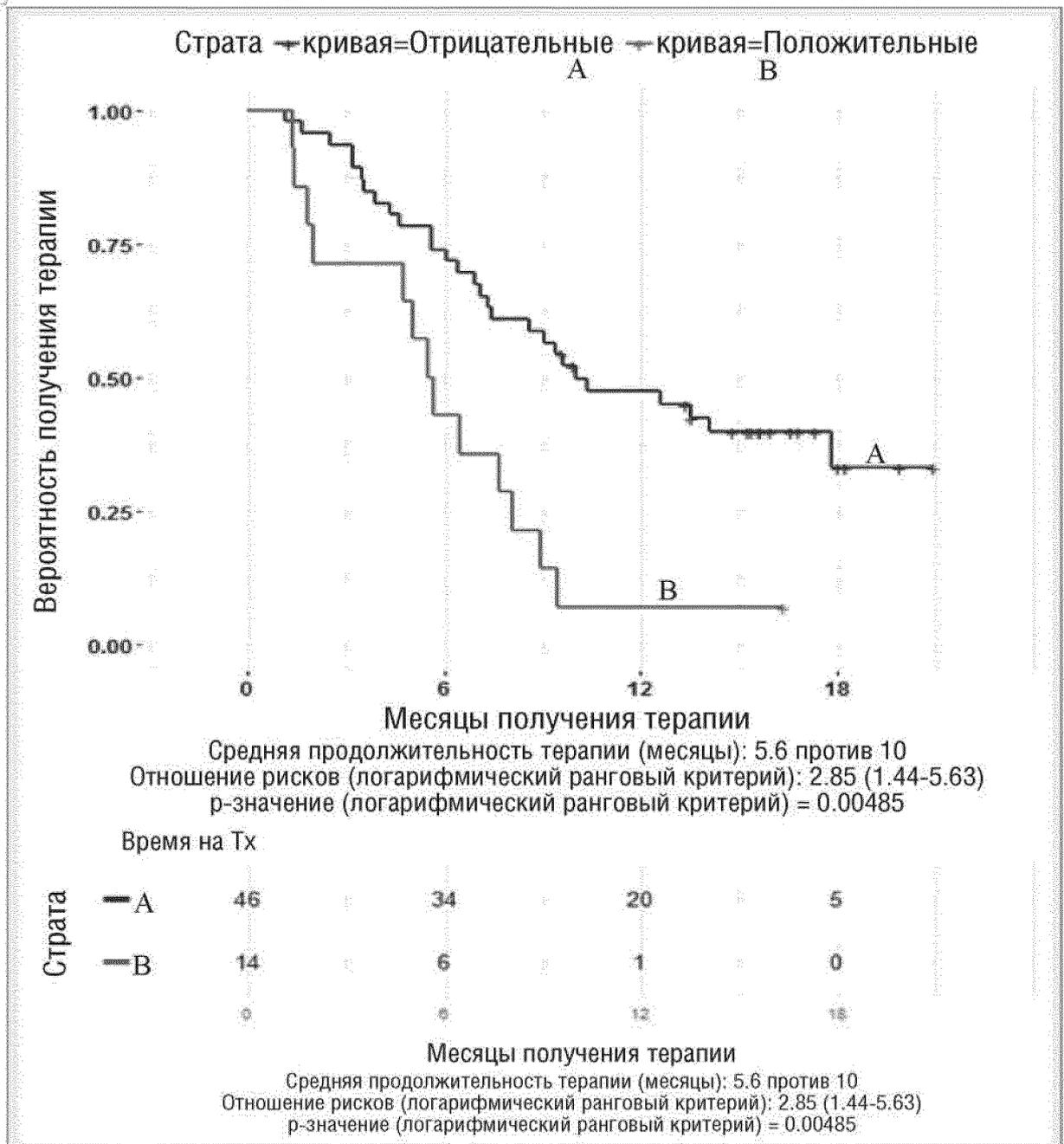
ФИГ.58В



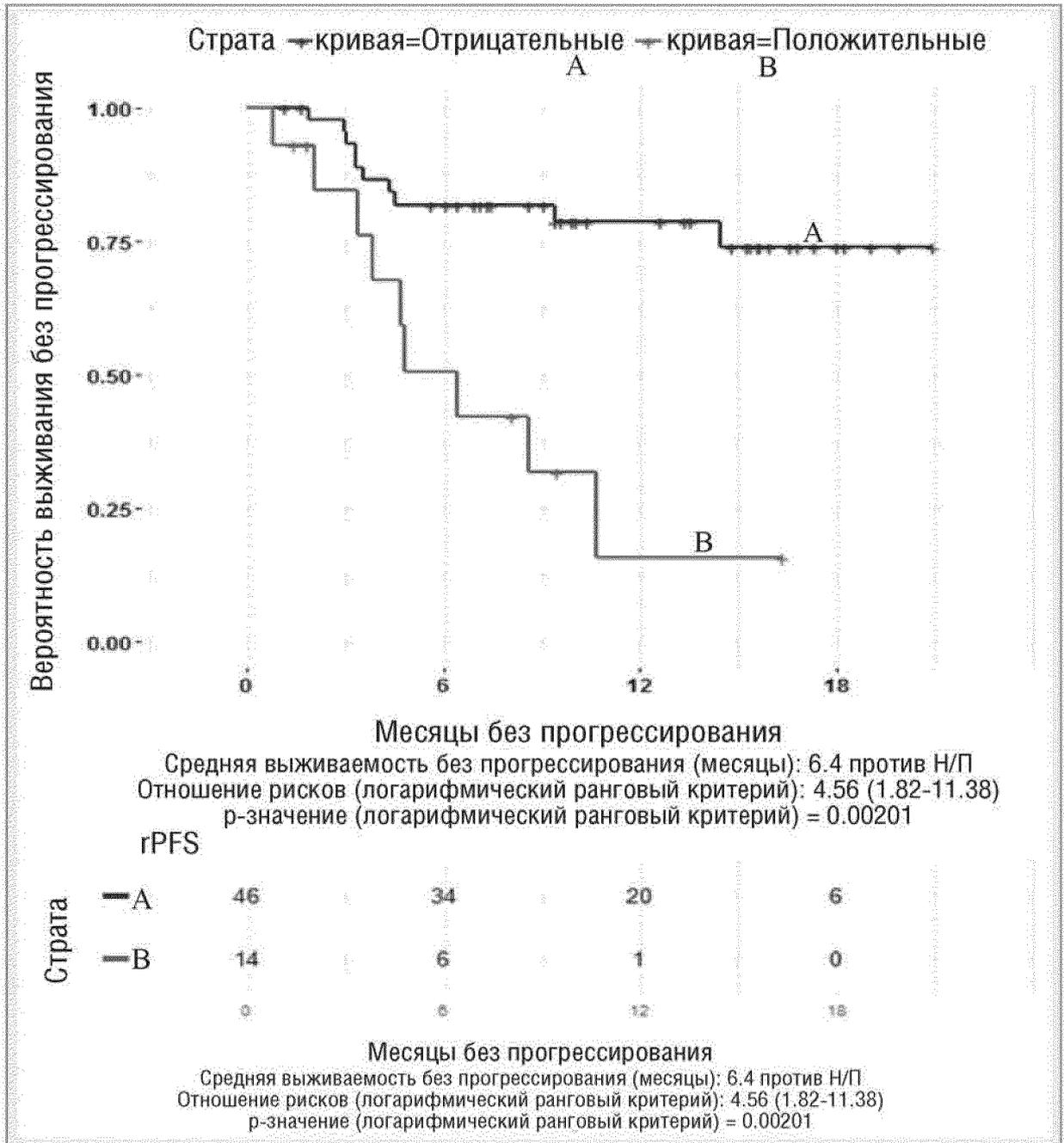
ФИГ.58С



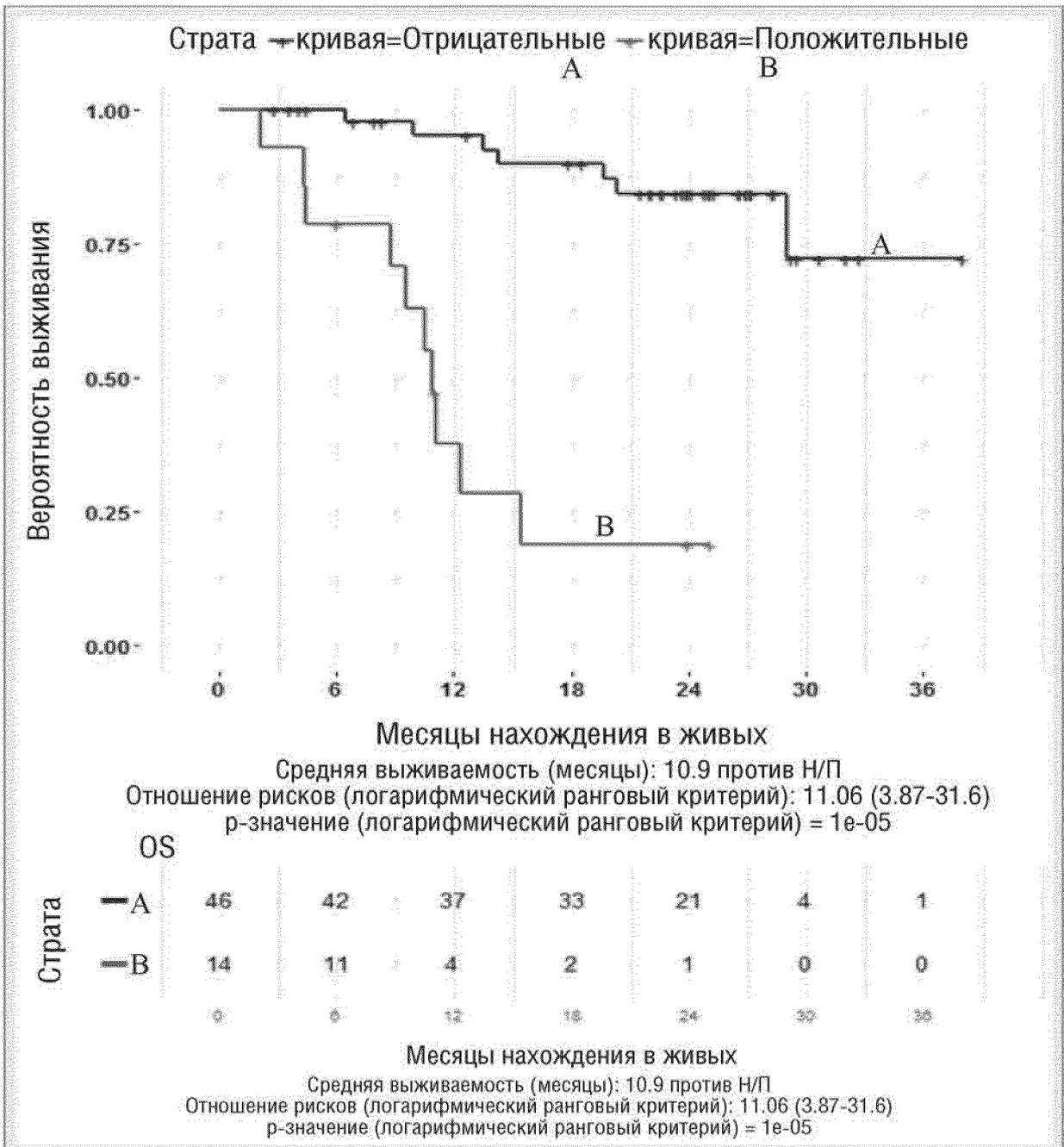
ФИГ.59А



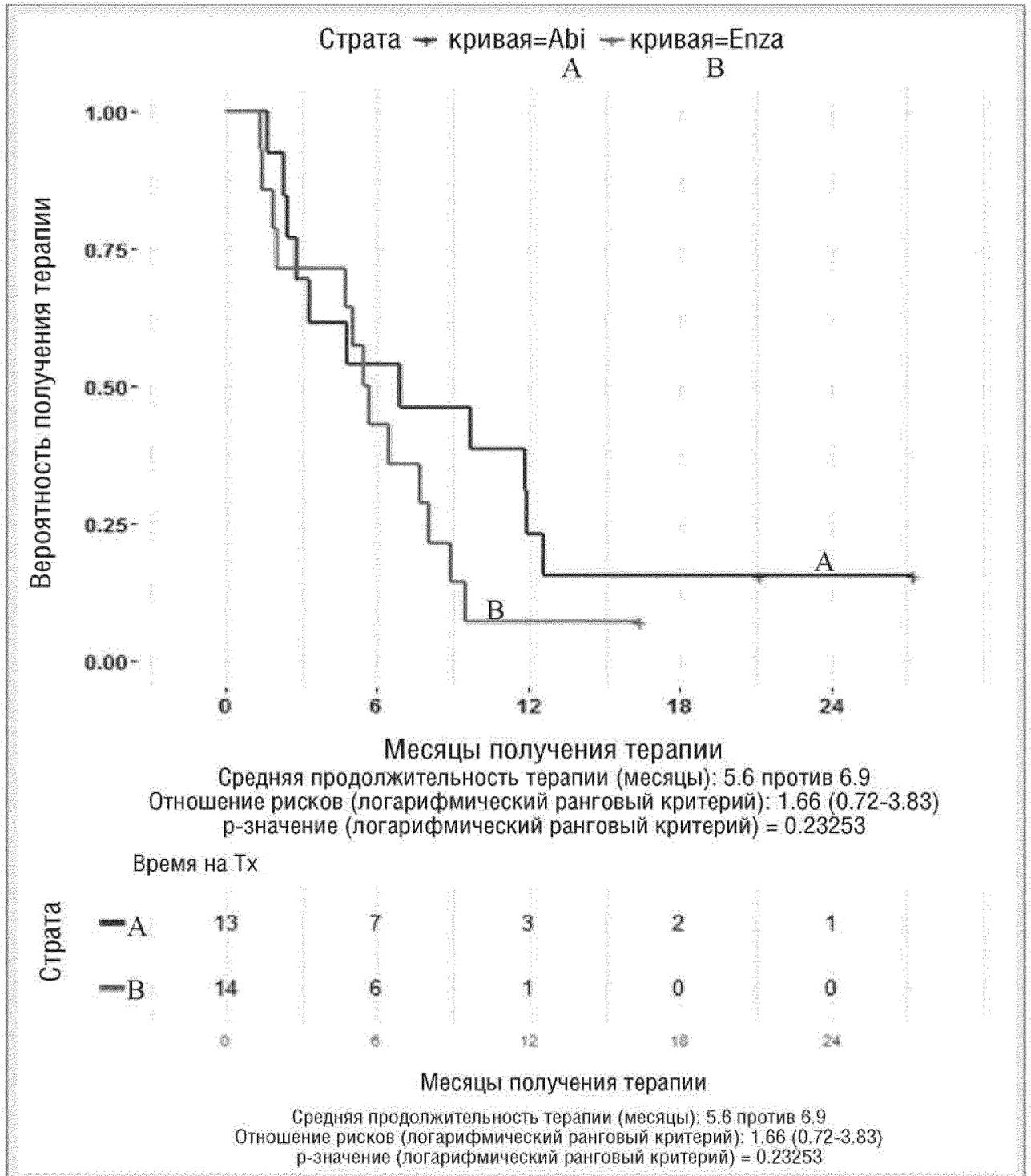
ФИГ.59В



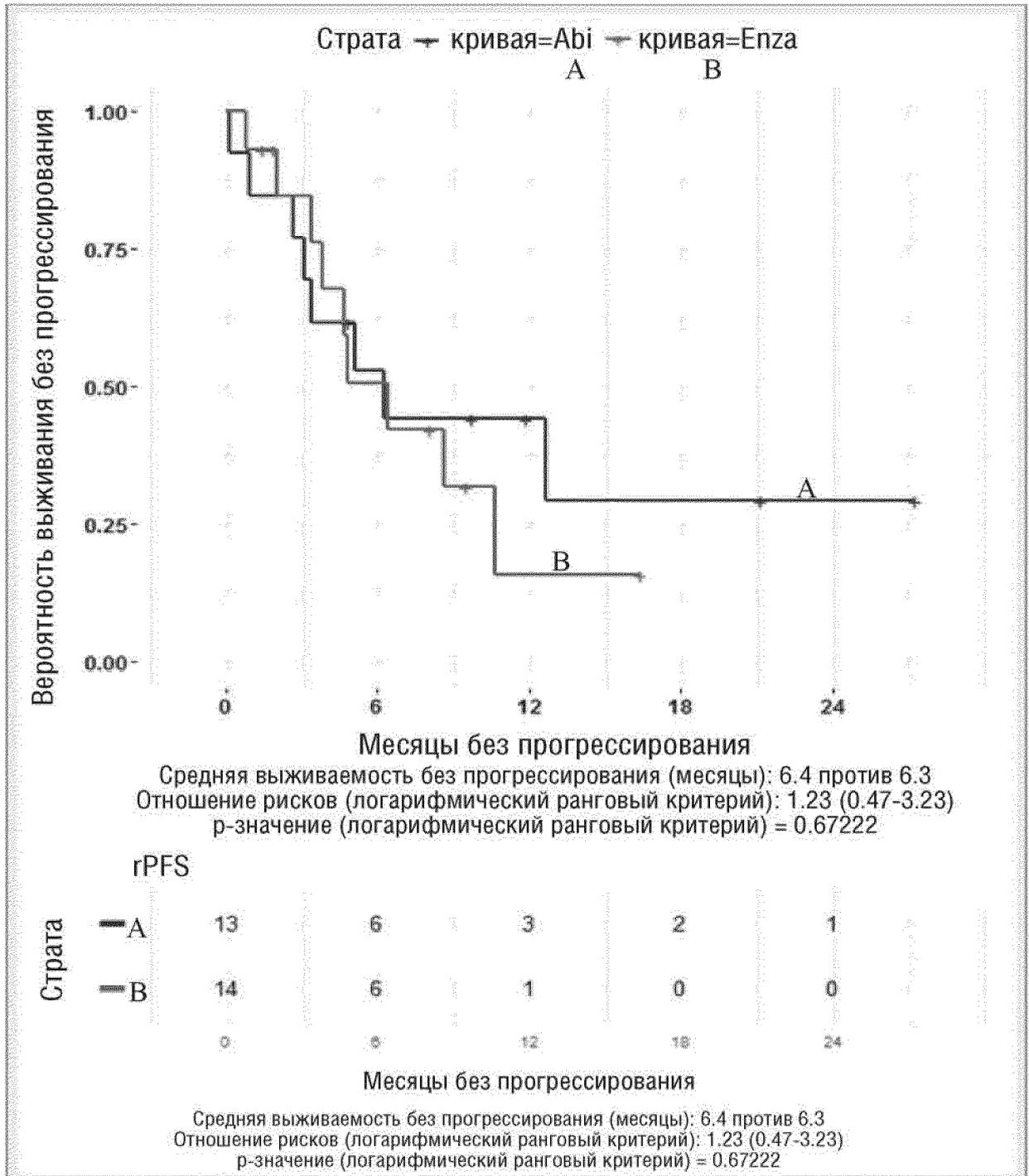
ФИГ.59С



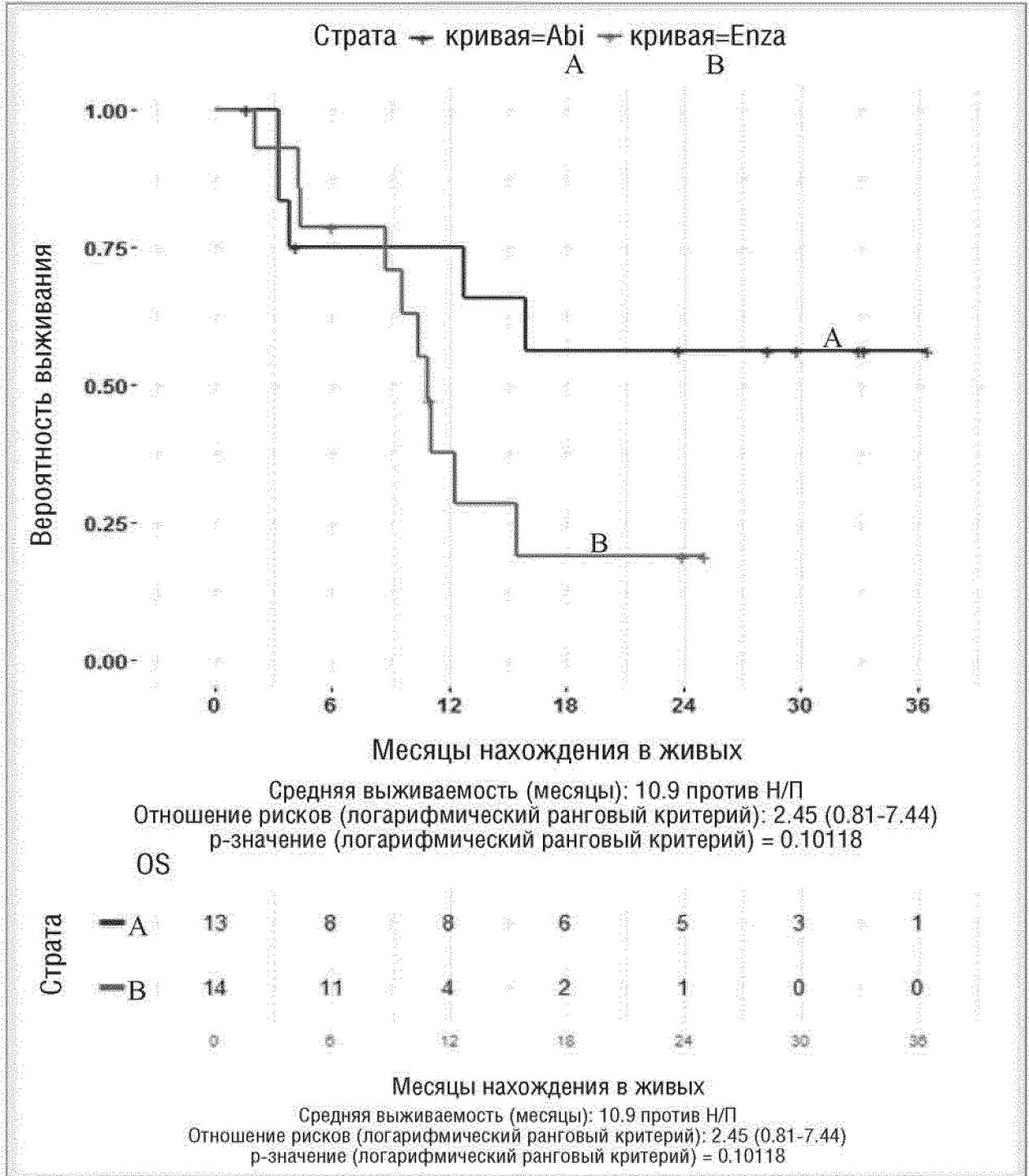
ФИГ.60А



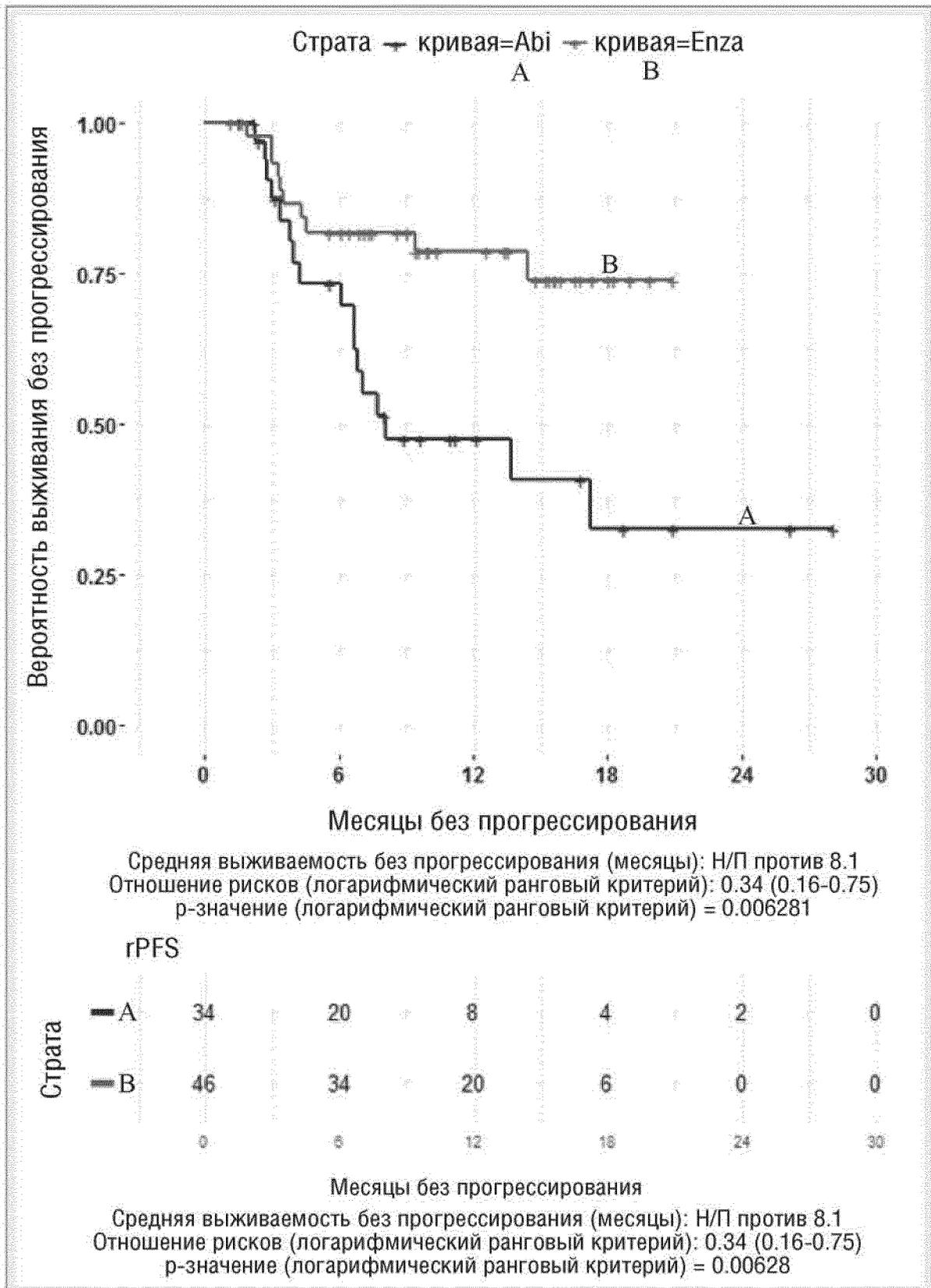
ФИГ.60В



ФИГ.60С



ФИГ.61В



ФИГ.61С

