

REF 7900001
Zestaw testowy 16



**Zestaw do wykrywania krążących komórek nowotworowych
(komórki nabłonkowe)**

IVD



PRZEZNACZENIE

Do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® jest przeznaczony do zliczania krążących komórek nowotworowych (CTC) pochodzenia nabłonkowego (CD45-, EpCAM+ i cytokeratyn 8, 18+ i/lub 19+) w krwi pełnej.

Obecność CTC we krwi obwodowej wykrywanych z użyciem zestawu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® jest czynnikiem prognostycznym krótszego czasu przeżycia bez progresji choroby i krótszego całkowitego czasu przeżycia u pacjentów leczonych z powodu przerzutowego raka piersi, jelita grubego lub gruczołu krokowego*. Test ma stanowić pomoc w monitorowaniu pacjentów z przerzutowym rakiem piersi, jelita grubego lub gruczołu krokowego. Badania seryjne pod kątem obecności CTC powinny być stosowane w połączeniu z innymi metodami klinicznymi do monitorowania przerzutowego raka piersi, jelita grubego lub gruczołu krokowego. Oznaczenie CTC w dowolnym momencie przebiegu choroby pozwala ocenić rokowanie pacjenta oraz prognozować czas przeżycia bez progresji choroby i całkowity czas przeżycia.

**W tym badaniu pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego zdefiniowano jako tych, u których stwierdzono dwa kolejne wzrosty stężenia markera PSA w surowicy powyżej poziomu referencyjnego, pomimo standardowego leczenia hormonalnego. Ci pacjenci są najczęściej opisywani jako mający niezależnego od androgeny, opornego na hormony lub na kastrację raka gruczołu krokowego.*

PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIE

Do przerzutów nowotworowych dochodzi wtedy, gdy komórki uwalniane są z guza pierwotnego lub przerzutowego, przedostają się do układu krążenia i zaczynają namnażać się w odległych miejscach ciała. Źródłem raka są komórki nabłonkowe, które normalnie nie są stwierdzane w układzie krążenia¹. System CELLTRACKS® AUTOPREP® został zaprojektowany w celu standaryzacji i automatyzacji protokołu przygotowania próbki do użycia z zestawem do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® (zestaw CTC CELLSEARCH®). Analizę i zliczanie CTC przeprowadza się za pomocą półautomatycznego mikroskopu fluorescencyjnego CELLTRACKS ANALYZER II®. W teście zliczane są tylko te komórki, u których dochodzi do ekspresji cząsteczki adhezji komórek nabłonkowych (EpCAM) i cytokeratyny (CK) 8, 18 i/lub 19.

ZASADY TESTU

Zestaw do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® zawiera odczynnik przechwytyjący na bazie ferrofluidu i odczynniki immunofluorescencyjne. Odczynnik ferrofluidowy składa się z cząstek z rdzeniem magnetycznym otoczonym warstwą polimerową pokrytą przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenowi EpCAM, wychwytyjącymi CTC. Po wychwycie i wzbogaceniu immunomagnetycznym dodaje się odczynniki fluorescencyjne w celu identyfikacji i zliczenia CTC. Odczynniki fluorescencyjne obejmują: anty-CK-fikoerytrynę (PE) swoistą wobec wewnątrzkomórkowego białka cytokeratyny (charakterystycznej dla komórek nabłonkowych), DAPI, który barwi jądro komórkowe i anty-CD45-alloflokocyaninę (APC) swoistą wobec leukocytów.

Mieszanina odczynnik/próbka jest dozowana przez system CELLTRACKS® AUTOPREP® do kasety umieszczonej w uchwycie kasety MAGNEST. Silne pole magnetyczne uchwytu kasety MAGNEST przyciąga magnetycznie wyznakowane komórki nabłonkowe do powierzchni kasety. Analizator CELLTRACKS ANALYZER II® automatycznie skanuje całą powierzchnię kasety, pozyskuje obrazy i wyświetla użytkownikowi dowolne zdarzenie, w którym występuje jednocześnie fluorescencja CK-PE i DAPI. Obrazy są prezentowane użytkownikowi w formacie galerii do ostatecznej klasyfikacji. Zdarzenie jest klasyfikowane jako komórka nowotworowa, gdy jej cechy morfologiczne są zgodne z cechami komórki nowotworowej i wykazuje fenotyp EpCAM+, CK+, DAPI+ i CD45-.

MATERIAŁY DOSTARCZONE W ZESTAWIE

- Instrukcja użytkownika
- **3,0 ml ferrofluidu anty-EpCAM:** Zawiera zawiesinę 0,022% cząstek magnetycznych, sprzężonych z mysim przeciwciałem monoklonalnym swoistym wobec markera powierzchniowego EpCAM obecnego na komórkach nabłonkowych, w buforze zawierającym 0,03% albuminy surowicy bydlęcej (BSA) i 0,05% środka konserwującego ProClin® 300. (brązowy korek)
- **3,0 ml odczynnika barwiącego:** Zawiera 0,0006% mysich przeciwciał monoklonalnych, swoistych wobec cytokeratyn, sprzężonych z fikoerytryną (PE); 0,0012% mysiego przeciwciała monoklonalnego anty-CD45 sprzężonego z alloflokocyaniną (APC) w buforze zawierającym 0,5% BSA i 0,1% azydku sodu. (biały korek)
- **3,0 ml barwnika kwasu nukleinowego:** Zawiera 0,005% 4',6-diamidyno-2-fenylindolu, dichlorowodoru (DAPI) i 0,05% ProClin® 300. (niebieski korek)
- **3,0 ml odczynnika poprawiającego wychwytywanie:** Zawiera 0,02% zastrzeżonego odczynnika do kontrolowanej agregacji ferrofluidów, 0,5% BSA i 0,1% azydku sodu w buforze. (przezroczysty korek)
- **3,0 ml odczynnika do permeabilizacji:** Zawiera 0,011% zastrzeżonego odczynnika do permeabilizacji i 0,1% azydku sodu w buforze. (zielony korek)
- **3,0 ml odczynnika do utrwalania komórek:** Zawiera 25% zastrzeżonych składników do utrwalania, 0,1% BSA i 0,1% azydku sodu w buforze. (czerwony korek)
- **2 x butelka 110 ml z buforem do rozcieńczania:** Zawiera bufor z 0,1% azydku sodu.
- **16 stożkowych probówek wirówkowych (15 ml) i stożkowych korków próbek CELLSEARCH®**
- **16 kaset i zatyczek kaset**

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOŁĄCZONE

- Probówki konserwujące CellSave (nr katalogowy 7900005)
- System CELLTRACKS® AUTOPREP® (nr katalogowy 9541)
- ANALIZATOR CELLTRACKS ANALYZER II® (nr katalogowy 9555)
- Zestaw kontrolny do testu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® (nr katalogowy 7900003)
- Pojemnik bufora do urządzenia pomiarowego CELLTRACKS® AUTOPREP® (nr katalogowy 7901003)
- Wirówka z wirnikiem horyzontalnym (tzn. typu swing-bucket) o wydajności wirowania 800 x g
- Stojaki na probówki
- Kalibrowane mikropipety i końcówki
- Mieszadło wibracyjne

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Do diagnostyki *in vitro*.
2. Przed przystąpieniem do badania próbek należy w całości przeczytać niniejszą instrukcję użytkowania.
3. Przestroga: pobierać krew tylko do probówki konserwującej CellSave. Komórki CTC są delikatne i wymagają konserwacji w celu zapewnienia dokładności analizy.
4. Przestroga: wszyscy pracownicy muszą przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności oraz stosować laboratoryjne środki ochrony indywidualnej (tzn. okulary ochronne, fartuch laboratoryjny, rękawice).
5. Przestroga: zakażenie mikrobiologiczne odczynników może powodować błędne wyniki i należy go unikać.
6. Przestroga: niektóre odczynniki zawierają azcydek sodu jako konserwant. W razie połknięcia niezwłocznie zasięgnąć porady lekarza. Przechowywać w miejscu niedostępnym dla dzieci. Przechowywać z dala od żywności i napojów. Nosić odpowiednią odzież ochronną. W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. Azcydki należy spłukiwać dużą ilością wody, aby uniknąć ich osadzania się na ołowianych lub miedzianych elementach instalacji kanalizacyjnych i ryzyka wytworzenia silnie wybuchowych azcydków metali.
7. **Ostrzeżenie:** wszystkie próbki biologiczne, wkłady i inne materiały mające kontakt z próbką (próbkami) stanowią zagrożenie biologiczne. Należy traktować je jak materiał zakaźny. Z odpadami należy postępować, stosując odpowiednie środki ostrożności oraz zgodnie z lokalnymi, krajowymi i unijnymi przepisami. W żadnym przypadku nie należy pipetować ustami.
8. **Ostrzeżenie:** niektóre odczynniki zawierają ProClin® 300 jako środek konserwujący.
9. Przed wykonaniem procedury testowej operator musi zostać przeszkolony.

Poniżej przedstawiono zwroty dotyczące zagrożeń i środków ostrożności:

H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.

Zapobieganie:

P261 Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.

P272 Zanieczyszczonej odzieży roboczej nie należy wynosić poza miejsce pracy.

P280 Stosować rękawice ochronne.

Reagowanie:

P333 + P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P362 + P364 Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.

Utylizacja:

P501 Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierdzonego zakładu utylizacji odpadów.

Dodatkowe informacje można znaleźć w karcie charakterystyki na stronie www.cellsearchctc.com.

PRZECHOWYWANIE ODCZYNNIKÓW I POSTĘPOWANIE Z NIMI

- Odczynniki są dostarczane w postaci gotowej do użycia. Przechowywać w zamkniętym opakowaniu w temperaturze 2–8°C.
- Po otwarciu odczynników w zestawie z odczynnikami należy przechowywać nie dłużej niż 30 dni w temperaturze od 2 do 8°C. Na potrzeby przechowywania otwarte odczynniki **należy** ponownie zamknąć niepowtarzalnym korkiem o odpowiednim kolorze, kierując się kolorami wskazanymi na etykietach tacy z odczynnikami. Ma to na celu zapobieganie krzyżowej kontaminacji odczynników.
- UWAGA: Po otwarciu butelkę z buforem do rozcieńczania, która nie jest częścią zestawu odczynników, należy przechowywać w temperaturze pokojowej nie dłużej niż 30 dni.
- Chronić odczynniki przed temperaturą przekraczającą 35°C. Nie zamrażać.
- Przed użyciem doprowadzić do temperatury pokojowej (15 do 30°C).
- Wzrokowo sprawdzić zestaw odczynników pod kątem prawidłowego umieszczenia odczynników. Sprawdzić, czy każdy odczynnik znajduje się w odpowiednim miejscu, dopasowując jego niepowtarzalną kolorową nakrętkę do kolorów wskazanych na etykiecie. Prawidłowe umieszczenie przedstawiono na zdjęciu. Jeśli odczynniki



okażą się niewłaściwie umieszczone lub jeśli są obecne duplikaty butelek, nie należy używać opakowania z odczynnikami i powiadomić pomoc techniczną w celu zorganizowania wymiany.

- Chronić odczynniki przed działaniem światła słonecznego.
- Prawidłowo przechowywane odczynniki zachowują stabilność do daty ważności wydrukowanej na pojemniku z odczynnikiem lub na pudełku zestawu. Nie używać przeterminowanych odczynników.
- Elementy zestawu są produkowane i testowane jako kompletna partia. **Nie** mieszać ani nie dopasowywać odczynników z różnych zestawów.

PROCEDURA TESTU

Pobieranie i przygotowywanie próbek

Pobieranie krwi pełnej do probówek konserwujących CellSave

1. Pobrać początkowe próbki przed rozpoczęciem danego schematu leczenia. Kolejne próbki można pobierać po rozpoczęciu danego schematu leczenia, zwykle w odstępach od 3 do 4 tygodni, w celu śledzenia poziomów CTC podczas terapii. Jeśli pacjent jest leczony doksorubicyną, przed pobraniem krwi należy odczekać co najmniej 7 dni po podaniu dawki doksorubicyny.
2. Pobrać krew pełną w sposób aseptyczny przez nakłucie żyły lub z portu dożylnego. Stosować tylko probówki konserwujące CellSave.
3. Napęlić probówkę aż do ustania przepływu krwi, aby zapewnić prawidłowy stosunek próbki do antykoagulantu i środka konserwującego. Natychmiast wymieszać, delikatnie odwracając probówkę osiem razy. Odwracanie probówki zapobiega krzepnięciu. Nieodpowiednie lub opóźnione mieszanie może prowadzić do niedokładnych wyników testu.
4. Probki krwi mogą być przechowywane lub transportowane w probówce konserwującej CellSave. Instrukcje dotyczące procedury, przechowywania i postępowania znajdują się w instrukcji użytkownika probówki konserwującej CellSave. Nie przechowywać próbek w lodówce.

PRZESTROGA: przed obróbką w systemie CELLTRACKS® AUTOPREP® należy wzrokowo sprawdzić każdą próbkę pod kątem obecności skrzepów.

Zakrzepłe próbki należy wyrzucić.

Obróbka w systemie CELLTRACKS® AUTOPREP®

1. Wymieszać krew w probówce konserwującej CellSave, ręcznie odwracając ją pięć razy. Następnie zdjąć gumowy korek.
2. Przenieść nową pipetą 7,5 ml krwi z probówki konserwującej CellSave do odpowiednio oznakowanej 15 ml wirówkowej probówki stożkowej CELLSEARCH® dostarczonej z zestawem CELLSEARCH® CTC.
3. Dodać nową pipetą 6,5 ml buforu do rozcieńczania.
4. Zatkać wirówkową probówkę stożkową CELLSEARCH® i wymieszać pięciokrotnie odwracając.
5. Odwirować próbkę przy prędkości 800 x g przez pełne 10 minut z wyłączonym hamulcem, używając wirówki typu swing bucket. Dziesięciominutowy czas wirowania nie uwzględnia czasu potrzebnego do osiągnięcia prędkości 800 x g. Ustawić hamulec wirówki na opcję „wyłączony” lub jeśli wirówka ma funkcję zmiennego hamowania, włączyć najniższe ustawienie hamulca. Odwirowywać w temperaturze pokojowej, stosując wirówkę przystosowaną do temperatury pokojowej. Po odwirowaniu każdą probówkę z próbką sprawdzić wzrokowo pod kątem oddzielenia osocza i czerwonych krwinek.
6. Należy przeprowadzić obróbkę w systemie CELLTRACKS® AUTOPREP® **w ciągu 1 godziny** od przygotowania próbki. Pełne instrukcje znajdują się w podręczniku użytkownika systemu CELLTRACKS® AUTOPREP®.

Analiza w analizatorze CELLTRACKS ANALYZER II®

System CELLTRACKS® AUTOPREP® dozuje przetworzoną próbkę do kasety gotowej do analizy przy użyciu analizatora CELLTRACKS ANALYZER II®. Napelnioną kasetę w uchwycie kasety MAGNEST należy pozostawić do inkubacji w ciemności przez co najmniej 20 minut i przeanalizować w ciągu 24 godzin. Instrukcje analizy próbek i przeglądu danych znajdują się w podręczniku użytkownika analizatora CELLTRACKS ANALYZER II®.

KONTROLA JAKOŚCI

Zestaw kontrolny do testu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® (nr katalogowy 7900003) sprawdza ogólne działanie systemu, w tym przyrząd, odczynniki i technikę operatora. Kontrolę testu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® należy przeprowadzać każdego dnia podczas badania pacjenta lub w przypadku korzystania z nowej partii zestawu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH®. Należy zapoznać się z treścią instrukcji użytkownika zestawu kontrolnego do testu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® i oczekiwanymi wartościami.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki podaje się jako liczbę komórek CTC/7,5 ml krwi.

Przerzutowy rak piersi (MBC)

Liczba CTC wynosząca co najmniej 5 na 7,5 ml krwi w dowolnym momencie przebiegu choroby wiąże się ze złym rokowaniem oraz prognozuje krótszy czas przeżycia bez progresji choroby i krótszy całkowity czas przeżycia.

Przerzutowy rak jelita grubego (MCRC)

Liczba CTC wynosząca co najmniej **3** na 7,5 ml krwi w dowolnym momencie przebiegu choroby wiąże się ze złym rokowaniem oraz prognozuje krótszy czas przeżycia bez progresji choroby i krótszy całkowity czas przeżycia.

Przerzutowy rak gruczołu krokowego (MPC)

Liczba CTC wynosząca co najmniej **5** na 7,5 ml krwi w dowolnym momencie przebiegu choroby wiąże się ze złym rokowaniem oraz prognozuje krótszy czas przeżycia bez progresji choroby i krótszy całkowity czas przeżycia.

Środki ostrożności

Przeniesienie komórek CTC z próbki o wyniku **większym lub równym 5000** komórek CTC na 7,5 ml krwi na następne próbki przetwarzane w systemie CELLTRACKS® AUTOPREP®, w tym próbki z kolejnej partii, może wpływać na uzyskane wyniki. Jeśli komórki są przenoszone do kolejnych próbek, wyniki zliczania CTC w tych próbkach mogą być błędnie wyższe niż rzeczywista liczba CTC u pacjenta. **Dalsze informacje znajdują się w podręczniku użytkownika CELLTRACKS® AUTOPREP®.**

OGRANICZENIA

- Przestroga: zgodnie z prawem federalnym USA wyrób ten może być sprzedawany wyłącznie lekarzowi lub na jego zlecenie.
- Wyniki CELLSEARCH® powinny być stosowane w połączeniu ze wszystkimi informacjami klinicznymi pochodzącymi z testów diagnostycznych (tzn. obrazowania, badań laboratoryjnych), badaniami przedmiotowymi i pełną historią medyczną zgodnie z odpowiednimi procedurami postępowania w leczeniu.
- To badanie *prognostyczne* nie wykazuje, że *jakiegokolwiek* stosowana obecnie linia terapii jest bardziej lub mniej skuteczna niż jakiegokolwiek inna terapia lub jej brak.
- Wyniki CELLSEARCH® i wyniki obrazowania nie są równoważne w ocenie przejścia pacjenta od braku progresji choroby do jej progresji.
- Jeśli pacjent jest leczony doksorubicyną, przed pobraniem krwi należy odczekać co najmniej 7 dni po podaniu dawki terapeutycznej. Wyniki testu CELLSEARCH® należy interpretować z zachowaniem ostrożności, jeśli próbki zostały pobrane w ciągu 7 dni od podania doksorubicyny.
- Komórki CTC, w których nie ulega ekspresji EpCAM, nie zostaną wykryte przez test CELLSEARCH®.
- Komórki CTC, w których ulega ekspresji EpCAM, ale nie cytokeratyny 8, 18 i 19, nie zostaną wykryte przez test CELLSEARCH®.
- Substancje zakłócające:
komórki SK-BR-3 dodawane w próbkach krwi narażano na potencjalne substancje zakłócające i porównano z komórkami kontrolnymi. Zbadano poziomy toksyczności (5-krotny indeks terapeutyczny) następujących leków przeciwnowotworowych, leków dostępnych bez recepty i innych substancji egzogennych: cyklofosfamid, mitomycyna C®, Procrit®, biotyna, 5-fluorouracyl, metotreksat, cytrynian tamoksyfenu, paklitaksel, Arimidex®, acetaminofen, kwas acetylosalicylowy, kofeina, dekskrometorfan, Aredia®, ludzkie przeciwciała przeciwko przeciwciałom mysim (HAMA) typu 1, HAMA typu 2, Herceptin® i ibuprofen. Nie wykryto istotnych różnic w liczbie komórek SK-BR-3, co wskazuje, że te substancje nie zakłócają działania zestawu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH®.

Próbki z dodatkiem toksycznych poziomów doksorubicyny powodowały nieprawidłowe barwienie leukocytów jako limfocytów podwójnie dodatnich względem cytokeratyny i CD45, ponieważ doksorubicyna jest związkiem fluorescencyjnym włączonym do komórek jądrazastych. Wzór barwienia wszystkich komórek jako dodatnich wobec CD45 i cytokeratyny, jeśli jest widoczny, jest oczywisty i łatwo identyfikowany przez operatora jako znany profil zakłócenia barwienia. Jeśli krew zostanie pobrana po zalecanych 7-dniowym okresie wymywania, po wlewie doksorubicyny, zakłócenie to jest mało prawdopodobne w praktyce klinicznej z uwagi na kontrolowane poziomy terapeutyczne i szybki klirens leku.

Badano potencjalne zakłócenia spowodowane lipemią przez dodanie Intralipidu do próbek w stężeniu 2,6%, co odpowiada ponad 1000 mg/dl trójglicerydu. Próbkę poddano lizie w celu symulacji całkowitej hemolizy. Badano bilirubinę przy 7,4 mg/dl, HAMA 1/HAMA 2 i hematokryt w zakresie 18-60%. Lipemia, hemoliza, żółtaczka i szeroki zakres wartości hematokrytu nie zakłócają testu CELLSEARCH®. HAMA 1 i HAMA 2 również nie zakłócają testu, co wskazuje, że osoby otrzymujące myśie Ig drogą pozajelitową mogą być z powodzeniem badane za pomocą testu CELLSEARCH®.

SPODZIEWANE WARTOŚCI

Zdrowi ochotnicy, niezłośliwa choroba sutka, inna niezłośliwa choroba

Jednopunktowe analizy CTC przeprowadzono na grupach kontrolnych 145 zdrowych ochotników, 101 kobiet z niezłośliwą chorobą sutka i 99 kobiet z innymi chorobami niezłośliwymi. Nie oczekuje się, aby komórki nabłonkowe były obecne w krwi obwodowej zdrowych osób. Spośród 345 wszystkich próbek od zdrowych ochotników i kobiet z chorobą niezłośliwą tylko jedna osoba miała więcej niż 5 CTC/7,5 ml. Wyniki zostały podsumowane w **tabeli 1**.

Tabela 1. Pacjenci z grupy kontrolnej

Kategoria	N	Średnia liczba CTC	SD	Liczba pacjentów z CTC ≥ 5	Min.*	Maks.*
Pacjent zdrowy	145	0,1	0,2	0	0	1
Łagodny nowotwór sutka	101	0,2	1,2	1	0	12
Inna choroba niebędąca nowotworem złośliwym	99	0,1	0,4	0	0	3

*Wytuczna NCCLS C28-A2³

Zdrowi ochotnicy, niezłośliwa choroba jelita grubego

Krew pobierano od zdrowych mężczyzn i kobiet w wieku 35 lat lub starszych. Zdrowi ochotnicy zostali włączeni do badania w trzech ośrodkach w USA. Do celów tego badania pobrano dwie próbki krwi od każdego pacjenta i w obu oznaczono CTC. W sumie oceniono 150 pacjentów, od których uzyskano jedną lub dwie porcje krwi 7,5 ml i przetwarzano je oddzielnie w celu oznaczenia CTC. Wyniki CTC z obu próbek nie były dostępne w przypadku wszystkich badanych osób. Średnia liczba krążących komórek nowotworowych wynosiła 0,0 w obu grupach pacjentów, ze standardowym odchyleniem od 0,1 do 0,2. Spośród 284 wszystkich próbek od zdrowych ochotników (mężczyzn i kobiet), żadna z osób nie miała więcej niż 3 CTC/7,5 ml. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wyniki testu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® w grupie kontrolnej

Osoby zdrowe z grupy kontrolnej	Wszystkie osoby z grupy kontrolnej			Tylko mężczyźni			Tylko kobiety		
	Probówka 1	Probówka 2	Łącznie	Probówka 1	Probówka 2	Łącznie	Probówka 1	Probówka 2	Łącznie
N	149	135	284	68	64	132	81	71	152
Zakres CTC	0–1	0–1	0–1	0–1	0–1	0–1	0–1	0–1	0–1
Średnia liczba CTC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SD CTC	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
N (%) ≥ 1 CTC	2 (1%)	4 (3%)	6 (2%)	1 (1%)	1 (2%)	2 (2%)	1 (1%)	3 (4%)	4 (3%)
N (%) ≥ 2 CTC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

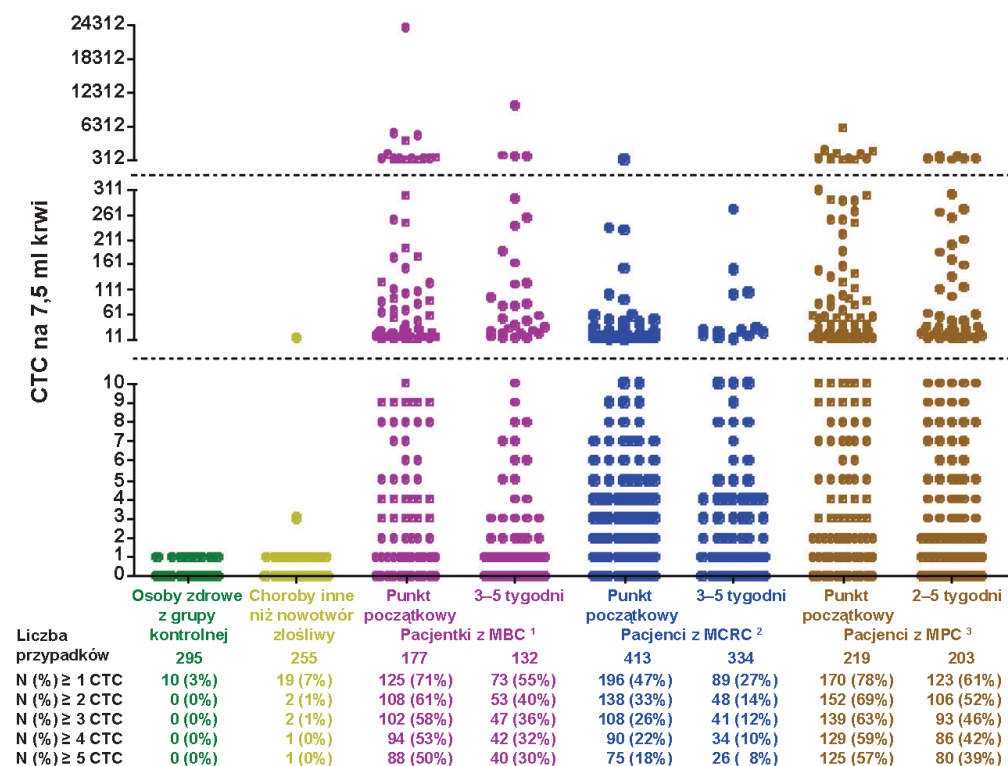
Pobrano około trzydziestu ml krwi (w celu zwiększenia prawdopodobieństwa wykrycia komórek) do czterech oddzielnych próbek CellSave (minimum 7,5 ml na probówkę) od pacjentów poddawanych kolonoskopii lub zabiegowi chirurgicznemu z powodu choroby innej niż nowotwór złośliwy. Przed zabiegiem oceniano do czterech próbek krwi po 7,5 ml w przypadku każdego pacjenta. Wyniki zostały podsumowane w tabeli 3. Wyniki CTC ze wszystkich czterech próbek nie były dostępne w przypadku wszystkich badanych osób. Żaden z pacjentów z chorobą jelita grubego inną niż nowotwór złośliwy nie miał więcej niż pojedynczą krążącą komórkę nowotworową na 7,5 ml krwi.

Tabela 3. Wyniki testu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® w grupie kontrolnej

Choroba inna niż nowotwór złośliwy	Pobranie krwi przed procedurą				
	Probówka 1	Probówka 2	Probówka 3	Probówka 4	Łącznie
N	55	55	53	47	210
Zakres	0–1	0–1	0–1	0–1	0–1
Średnia	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
SD	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2
% ≥ 1 CTC	3 (5%)	1 (2%)	2 (4%)	4 (9%)	10 (5%)
% ≥ 2 CTC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Rysunek 1 przedstawia częstość CTC w połączonej grupie zdrowych pacjentów i pacjentów z chorobą inną niż nowotwór złośliwy (grupa kontrolna) oraz u pacjentów z MBC, MCRC lub MPC przed rozpoczęciem terapii i około 1 miesiąca po rozpoczęciu terapii.

Rysunek 1 Częstość CTC w grupie kontrolnej (bez nowotworu złośliwego) i u pacjentów z przerzutowym rakiem sutka¹ (MBC), przerzutowym rakiem jelita grubego² (MCRC) lub przerzutowym rakiem gruczołu krokowego³ (MPC) przed rozpoczęciem nowej linii terapii (punkt początkowy) i ~2–5 tygodni po rozpoczęciu terapii.



¹Informacje o populacji referencyjnej MBC – Tabela 1 klinicznej instrukcji użytkowania.

²Informacje o populacji referencyjnej MCRC – Tabela 12 klinicznej instrukcji użytkowania.

³Informacje o populacji referencyjnej MPC – Tabela 22 klinicznej instrukcji użytkowania.

CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Odzyskiwanie

Przeprowadzono pulowanie próbek krwi od jednego zdrowego dawcy i do pięciu z sześciu porcji po 7,5 ml dodano około 1300, 325, 81, 20 i 5 hodowanych komórek raka sutka (SK-BR-3). Szósta próbówka zawierała połączone próbki krwi bez dodatków i służyła jako punkt zerowy. Próbkę tę poddano obróbce w systemie CELLTRACKS® AUTOPREP® za pomocą zestawu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH®, a oznaczenia CTC dokonywano w analizatorze CELLTRACKS ANALYZER II®. Eksperyment powtórzono dla czterech dodatkowych dawców. Obserwowane wyniki oznaczenia komórek wykreślono względem wyników oczekiwanych. Wyniki zostały podsumowane w tabeli 4.

Tabela 4. Szacunkowe wartości procentowe wykrywania.

Oczekiwana liczba komórek nowotworowych	Średnia obserwowana liczba komórek nowotworowych	Zakres procentowy odzyskiwania
1300	1215	od 91 do 95%
325	308	od 82 do 101%
81	85	od 80 do 136%
20	22	od 95 do 140%
5	7	od 120 do 200%

Aby określić dopasowanie całkowite lub najmniejszych kwadratów obserwowanych i oczekiwanych wyników oznaczenia komórek na podstawie wszystkich danych, przeprowadzono analizę regresji liniowej. Równanie regresji dla tych 30 próbek wynosiło $Y = 0,93x + 3,87$ przy $R^2 = 0,999$ ($R = 0,999$). Wyniki tego badania wskazują, że odzyskiwanie w badanym zakresie CTC, jak wynika z analizy regresji, wynosi średnio 93%.

Biorąc pod uwagę liniową odpowiedź wyników oznaczenia komórek nowotworowych, można by oczekiwać, że nachylenie krzywej obserwowanej w stosunku do oczekiwanej wyniesie 1,0. Jednak nachylenie wyniosło 0,93. Jest tak, ponieważ system CELLTRACKS® AUTOPREP® z zestawem do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® CTC obejmuje wychwytywanie i znakowanie fluorescencyjne komórek, a następnie ich wykrywanie i zliczanie przez analizator CELLTRACKS ANALYZER II®. Utrata komórek może zatem mieć jedną z następujących przyczyn:

1) odzyskanie jedynie 93% komórek nowotworowych dodanych do 7,5 ml krwi przez system CELLTRACKS® AUTOPREP®, 2) wykrycie tylko 93% komórek nowotworowych obecnych w komorze próbki przez analizator CELLTRACKS ANALYZER II® lub 3) kombinacja obu tych źródeł błędów.

Zakres liniowości/pomiarowy

Innym sposobem przeanalizowania poprzednich danych jest ich analiza w serii rozcieńczeń w celu oceny liniowości testu. Usunięto zmienną zakłócającą odzyskiwania procentowego, stosując obserwowaną wartość próbki początkowej w serii rozcieńczeń (tzn. pierwsza próbówka) podzieloną przez współczynniki rozcieńczenia, aby określić oczekiwane wartości serii rozcieńczeń dla każdej próbki pacjenta. Regresja wszystkich tych liczb

obserwowanych komórek nowotworowych w stosunku do liczby oczekiwanych komórek nowotworowych dała nachylenie 1,007, punkt przecięcia 3,0 i $R^2 = 0,990$ ($R = 0,995$). Zatem, gdy odzyskiwanie procentowe (utrata komórek) zostało wykluczone z wyników oznaczenia CTC w każdej z początkowych próbek, analiza danych wykazała, że wykrywanie CTC było liniowe w zakresie pomiarowym od 0 do 1238 komórek nowotworowych.

Limit detekcji

Analizator CELLTRACKS ANALYZER II® może wykryć jedną komórkę CTC na 7,5 ml, co daje limit detekcji na poziomie 1 komórki CTC w kasecie. Regresja liniowa wskazuje, że system CELLTRACKS® AUTOPREP® odzyskuje średnio 93% komórek CTC obecnych w 7,5 ml próbki krwi (patrz punkt **Odzyskiwanie**). Utrata około 7% komórek CTC w próbce nie jest wystarczająca do zmniejszenia limitu wykrywalności wynoszącego 1 komórkę CTC.

Odtwarzalność:

a. Odtwarzalność systemu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH®

Przygotowano trzy oddzielne próbki do zestawu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH® i oznaczano je każdego dnia przez ponad 30 dni, zgodnie z metodą długookresową według wytycznych EP5-A2 NCCLS. Każda jednorazowa butelka na próbkę zawiera niskie i wysokie stężenie komórek z określonej linii komórkowej, które zostały wstępnie wybarwione dwoma różnymi fluorochromami. Podsumowanie statystyk dla wysokich i niskich kontroli przedstawiono poniżej.

Tabela 5. Podsumowanie analiz precyzji

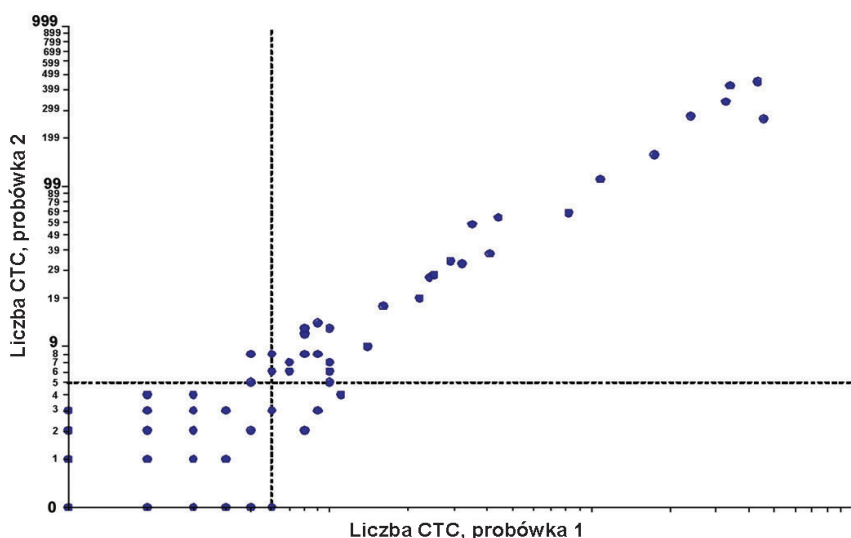
	Nis.	Wys.
N	99	99
Średnia liczba komórek	48	969
Odchylenie standardowe całkowitej precyzji (ST)% CV	18%	5%

b. Odtwarzalność systemu z próbkami pacjenta

Przerzutowy rak sutka (MBC)

W trakcie badania klinicznego pobrano łącznie 163 podwójnych próbek krwi od 47 pacjentek z przerzutowym rakiem sutka. Te próbki oznaczano w kilku ośrodkach w celu określenia odtwarzalności pomiarów liczby CTC. Równanie regresji dla porównania tych 163 podwójnych próbek wynosiło $Y = 0,98x + 0,67$, $R^2 = 0,99$. **Rysunek 2** przedstawia wykres punktowy podwójnych wyników pomiaru liczby CTC we krwi od pacjentek z MBC wykreślonych w skali logarytmicznej, z progiem 5 CTC wskazanym liniami przerywanymi.

Rysunek 2. Odtwarzalność oznaczeń CTC w podwójnych próbkach MBC (n = 163) ze średnią < 5 lub ≥ 5 CTC na 7,5 ml krwi.



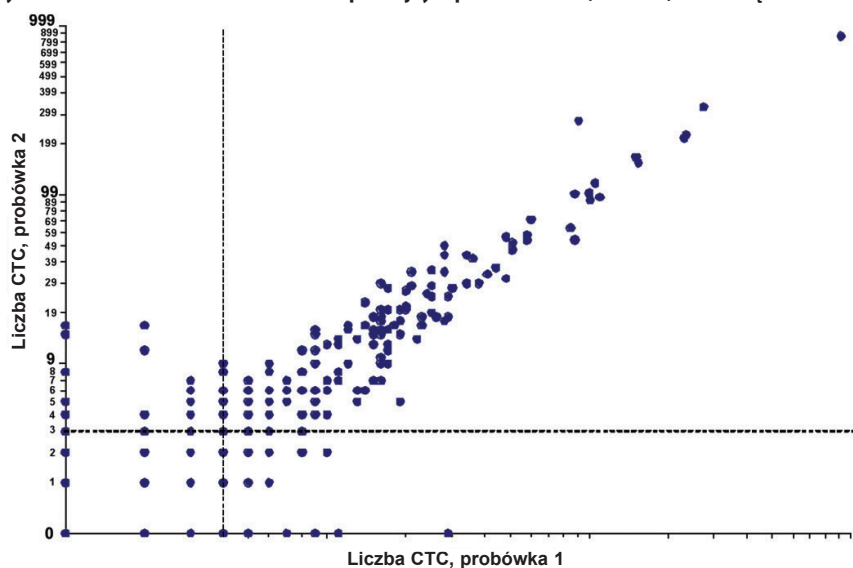
Rysunek 2 Uwaga: może być więcej niż jeden punkt nałożony na inny. Na przykład na tym wykresie znajduje się 50 przypadków (31%), w których obie próbki zawierały 0 CTC, 18 przypadków (11%), w których próbka 1 zawierała 0 CTC, a próbka 2 zawierała 1 CTC, oraz kolejne 18 przypadków (11%), gdzie próbka 1 zawierała 1 CTC, a próbka 2 zawierała 0 CTC.

Przerzutowy rak jelita grubego (mCRC)

W trakcie badania klinicznego pobrano łącznie 1627 podwójnych próbek krwi od 430 pacjentów z mCRC. Te próbki oznaczano w kilku ośrodkach w celu określenia odtwarzalności pomiarów liczby CTC. Równanie regresji dla porównania tych 1627 podwójnych próbek wynosiło $Y = 0,98x + 0,18$, $R^2 = 0,96$.

Rysunek 3 przedstawia wykres punktowy podwójnych wyników pomiaru liczby CTC we krwi od pacjentów z mCRC wykreślonych w skali logarytmicznej, z progiem 3 CTC wskazanym liniami przerywanymi.

Rysunek 3. Odtwarzalność oznaczeń CTC w podwójnych próbkach MCRC (n = 1627) ze średnią < 3 lub ≥ 3 CTC na 7,5 ml krwi.



Rysunek 3 Uwaga: może być więcej niż jeden punkt nałożony na inny. Na przykład na tym wykresie znajduje się 975 przypadków (60%), w których obie próbówki zawierały 0 CTC, 116 przypadków (7%), w których próbówka 1 zawierała 0 CTC, a próbówka 2 zawierała 1 CTC, oraz kolejne 109 przypadków (7%), gdzie próbówka 1 zawierała 1 CTC, a próbówka 2 zawierała 0 CTC.

Zmienność liczby komórek CTC między próbkami z próbkami krwi pobranymi od pacjentów z przerzutowym rakiem sutka i jelita grubego przedstawiono na **rysunkach 2 i 3**. Rozkład rzadkich zdarzeń (takich jak komórki nowotworowe) w danej objętości jest losowy i niezależny od komórki lub typu choroby. Najlepiej charakteryzuje to rozkład Poissona – matematyczna metoda stosowana w systemach modelowania, w której prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia jest bardzo niskie, ale liczba możliwości wystąpienia takiego zdarzenia jest duża⁵. W przypadku próbek z bardzo małą liczbą komórek CTC gruczołu krokowego uzasadnione jest oczekiwanie zmienności wyników podobnych do przedstawionych na **rysunkach 2 i 3**. Ponieważ dwa poprzednie badania z udziałem pacjentów z MBC i mCRC wykazały prawie identyczne wyniki, porównanie wyników CTC w poszczególnych próbkach krwi od pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego nie zostało przeprowadzone podczas badania klinicznego gruczołu krokowego z użyciem systemu do wykrywania krążących komórek nowotworowych CELLSEARCH®. Jednak wyniki niezależnego badania z wykorzystaniem technologii CELLSEARCH® przeprowadzonego w Memorial Sloan-Kettering Cancer Center nie wykazały żadnych systematycznych różnic między placówkami lub próbkami co do liczby komórek CTC w zakresie od 0 do 1192 na próbkę u pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego⁴.

PIŚMIENNICTWO

1. Cancer Biology, 3rd edition, Ray Ruddon 1995.
2. NCCLS Approved Guideline EP5-A, "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices".
3. NCCLS Approved Guideline C28-A2, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory".
4. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, Anand A, Smith K, Maslak P, Doyle GV, Terstappen LWMM, Lilja H, Heller G, Fleisher M and Scher HI. "Circulating Tumor Cell Analysis in Patients with Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer", Clinical Cancer Research, Vol 13 No.7: 2023-2029, (2007).
5. Tibbe A.G.J, Miller C.M and Terstappen LWMM "Statistical Considerations for Enumeration of Circulating Tumor Cells", Cytometry Part A 71a:154-162 (2007).

REF 7900001
Zestaw testowy 16



**Zestaw do wykrywania krążących komórek nowotworowych
(komórki nabłonkowe)**

WYNIKI BADANIA KLINICZNEGO

Spis treści

1 Pacjentki z przerzutowym rakiem sutka (MBC)	5
1.1 Częstość oznaczania CTC	5
1.2 Analiza czasu przeżycia bez progresji choroby (PFS) pacjentek z MBC	6
1.2.1 PFS przy użyciu wyjściowych wyników CTC	6
1.2.2 PFS przy użyciu uzupełniających wyników CTC	6
1.2.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy PFS	7
1.3 Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) pacjentek z MBC	8
1.3.1 Analiza OS przy użyciu wyjściowych wyników CTC	8
1.3.2 OS przy użyciu uzupełniających wyników CTC	8
1.3.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy OS	9
1.3.4 Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC	10
1.3.5 Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC	10
1.4 Zastosowanie oznaczeń komórek CTC do monitorowania stanu klinicznego w przerzutowym raku sutka	12
1.4.1 Związek między przeżyciem, CTC i oceną choroby w obrazowaniu	12
1.4.2 CTC	12
1.4.3 Obrazowanie	12
1.4.4 Związek między przeżyciem, obrazowaniem i CTC	13
1.4.5 Zgodność między liczbą komórek CTC a monitorowaniem radiologicznym	15
1.4.6 CTC jako dodatek do obrazowania	17
1.5 Zmienność komórek CTC i ocen radiologicznych	17
1.5.1 CTC	17
1.5.2 Obrazowanie	18
2 Pacjenci z przerzutowym rakiem jelita grubego (mCRC)	18
2.1 Częstość oznaczania CTC	19
2.2 Analiza czasu przeżycia bez progresji choroby (PFS) pacjentów z mCRC	20
2.2.1 PFS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym	20
2.2.2 PFS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych	20
2.2.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy PFS	21
2.3 Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) pacjentów z mCRC	22
2.3.1 Analiza OS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym	22
2.3.2 OS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych	23
2.3.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy OS	23
2.3.4 Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z mCRC	24
2.3.5 Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z mCRC	25
2.4 Zastosowanie komórek CTC do monitorowania stanu klinicznego w przerzutowym raku jelita grubego	25
2.4.1 Związek między przeżyciem, CTC i oceną choroby w obrazowaniu	25
2.4.2 CTC	26
2.4.3 Obrazowanie	26
2.4.4 Związek między przeżyciem, obrazowaniem i CTC	26
2.4.5 Zgodność między liczbą komórek CTC a monitorowaniem radiologicznym u pacjentów z mCRC	28
2.4.6 CTC jako dodatek do obrazowania	29
3 Przerzutowy rak gruczołu krokowego (MPC)	30
3.1 Częstość oznaczania CTC	31
3.2 Analiza czasu przeżycia bez progresji choroby (PFS) pacjentów z MPC	32
3.2.1 PFS przy użyciu wyjściowych wyników CTC	32
3.2.2 PFS przy użyciu uzupełniających wyników CTC	32
3.2.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy PFS	33

3.3	Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) pacjentów z MPC	34
3.3.1	Analiza OS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym	34
3.3.2	OS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych	35
3.3.3	Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy OS	35
3.3.4	Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentów MPC	36
3.3.5	Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z MPC	37
3.4	Zastosowanie komórek CTC do monitorowania stanu klinicznego pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego	38
3.4.1	Związek między przeżyciem, komórkami CTC i oceną choroby na podstawie PSA	38
3.4.2	Zgodność między zmianami CTC i PSA u pacjentów z MPC	40
3.4.3	Jednoczesne obniżenie poziomu CTC i poziomu PSA a prognozowanie OS u pacjentów z MPC	41
Lista tabel		
	Tabela 1: Dane demograficzne pacjentek z MBC	5
	Tabela 2: Czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych	7
	Tabela 3: Całkowity czas przeżycia (OS) u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych	9
	Tabela 4: Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC	10
	Tabela 5: Analiza czasu przeżycia bez progresji choroby z zastosowaniem wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC	11
	Tabela 6: Analiza całkowitego czasu przeżycia z zastosowaniem wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC	12
	Tabela 7: OS u pacjentek z MBC, u których ocenę CTC przeprowadzono około miesiąca po rozpoczęciu leczenia oraz w ciągu jednego miesiąca od oceny radiologicznej	14
	Tabela 8: Porównanie CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentek z MBC	16
	Tabela 9: Porównanie CTC i obrazowania na podstawie obserwacji MBC	16
	Tabela 10: Porównanie CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentek z MBC	17
	Tabela 11: Zmienność ocen radiologicznych i CTC u pacjentek z MBC	18
	Tabela 12: Dane demograficzne pacjentów z mCRC	19
	Tabela 13: Wyłączenia z analizy czasu przeżycia bez progresji choroby i całkowitego czasu przeżycia u pacjentów z mCRC	19
	Tabela 14: Czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w różnych punktach czasowych	21
	Tabela 15: Całkowity czas przeżycia (OS) u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w różnych punktach czasowych	23
	Tabela 16: Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z mCRC	24
	Tabela 17: Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z mCRC	25
	Tabela 18: OS u pacjentów z mCRC, u których ocenę CTC przeprowadzono około miesiąca po rozpoczęciu leczenia oraz w ciągu jednego miesiąca od oceny radiologicznej	27
	Tabela 19: Porównanie CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentów z mCRC	28
	Tabela 20: Porównanie CTC i obrazowania na podstawie obserwacji mCRC	29
	Tabela 21: Porównanie CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentów z mCRC	29
	Tabela 22: Dane demograficzne pacjentów z MPC	31
	Tabela 23: Wyłączenia z analizy PFS i OS u pacjentów z MPC	32
	Tabela 24: Czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych	33
	Tabela 25: Całkowity czas przeżycia (OS) u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych	35
	Tabela 26: Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z MPC	37
	Tabela 27: Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z MPC	38
	Tabela 28: Porównanie median OS pomiędzy korzystnymi i niekorzystnymi grupami z obniżeniem poziomu PSA i wyniku CTC	40
	Tabela 29: Porównanie CTC i 30% obniżenia poziomu PSA u poszczególnych pacjentów z MPC po 2–5 tygodniach	41
	Tabela 30: Porównanie CTC i 30% obniżenia poziomu PSA u poszczególnych pacjentów z MPC po 13–20 tygodniach	41
	Tabela 31: Porównanie CTC i 30% obniżenia poziomu PSA na podstawie obserwacji pacjentów z MPC	41

Lista rysunków

Rysunek 1: PFS pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w punkcie początkowym (N = 177).....	6
Rysunek 2: PFS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego	7
Rysunek 3: Obniżenie liczby CTC poniżej 5 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy PFS u pacjentek z MBC.....	8
Rysunek 4: OS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w punkcie początkowym (N = 177)	8
Rysunek 5: OS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.....	9
Rysunek 6: Obniżenie liczby CTC poniżej 5 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy OS u pacjentek z MBC, zaś wzrost liczby CTC do 5 lub więcej prognozuje krótszy OS.....	10
Rysunek 7: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentek z MBC z NPD lub PD w pierwszym obrazowaniu kontrolnym (N = 138)	14
Rysunek 8: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC podczas pierwszej wizyty kontrolnej po rozpoczęciu terapii (N = 138).....	15
Rysunek 9: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w ciągu ± 1 miesiąca od pierwszego obrazowania kontrolnego (N=134)	15
Rysunek 10: OS u pacjentek z MBC w grupach 1, 2, 3 i 4 na podstawie pierwszej oceny kontrolnej CTC po rozpoczęciu terapii (n = 138) i stadium choroby określone w pierwszym obrazowaniu kontrolnym.....	17
Rysunek 11: PFS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w punkcie początkowym (N = 413)	20
Rysunek 12: PFS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.....	21
Rysunek 13: Obniżenie liczby CTC poniżej 3 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy PFS u pacjentów z mCRC.....	22
Rysunek 14: OS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w punkcie początkowym (N = 413).....	22
Rysunek 15: OS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.	23
Rysunek 16: Obniżenie liczby CTC poniżej 3 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy OS u pacjentów z mCRC, zaś wzrost liczby CTC do 3 lub więcej prognozuje krótszy OS	24
Rysunek 17: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentów z mCRC z NPD lub PD w pierwszym obrazowaniu kontrolnym (N = 402)	27
Rysunek 18: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC podczas pierwszej wizyty kontrolnej po rozpoczęciu terapii (N = 320)	27
Rysunek 19: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w ciągu ± 1 miesiąca od pierwszego obrazowania kontrolnego lub zgon (N = 364).....	28
Rysunek 20: OS u pacjentów z mCRC w grupach 1, 2, 3 i 4 na podstawie CTC 3-5 tygodni po rozpoczęciu terapii (n = 320) i stadium choroby określonego w pierwszym obrazowaniu kontrolnym	30
Rysunek 21: PFS u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w punkcie początkowym (N = 219).	32
Rysunek 22: PFS u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego	33
Rysunek 23: Obniżenie liczby CTC poniżej 5 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy PFS u pacjentów z MPC.....	34
Rysunek 24: OS u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w punkcie początkowym (N = 219).	34
Rysunek 25: OS u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.....	35
Rysunek 26: Obniżenie liczby CTC poniżej 5 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy OS u pacjentów z MPC, zaś wzrost liczby CTC do 5 lub więcej prognozuje krótszy OS	36
Rysunek 27: OS u pacjentów z MPC 2–5 tygodni po rozpoczęciu terapii	39
Rysunek 28: OS u pacjentów z MPC 6–8 tygodni po rozpoczęciu terapii	39
Rysunek 29: OS u pacjentów z MPC 9–12 tygodni po rozpoczęciu terapii	39
Rysunek 30: OS u pacjentów z MPC 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii.....	40
Rysunek 31: Poziomy CTC i zmiany PSA łącznie w prognozowaniu OS 2–5 tygodni (panel A), 6–8 tygodni (panel B), 9–12 tygodni (panel C) i 13–20 tygodni (panel D) po rozpoczęciu terapii	42

1 Pacjentki z przerzutowym rakiem sutka (MBC)

Przeprowadzono wieloośrodkowe prospektywne badanie kliniczne w celu określenia, czy wynik CTC pozwala prognozować progresję choroby i czas przeżycia. Do badania włączono pacjentki z przerzutowym rakiem sutka z mierzalną (N = 177) chorobą rozpoczynającą nową linię terapii. Dane kliniczne analizowano w grupie przeznaczonych do leczenia (ITT). Dane demograficzne pacjentów podsumowano w tabeli 1.

Tabela 1: Dane demograficzne pacjentek z MBC

Kategoria		N=177 pacjentów
Wiek w punkcie początkowym	Średnia ± odchylenie standardowe (mediana)	58 ± 13 58
	Opis kategorii	Liczba pacjentów (% łącznej liczby)
Stadium	1	26 (15%)
	2	92 (52%)
	3	26 (15%)
	4	20 (11%)
	Nieznane	13 (7%)
Rasa	Biała	153 (86%)
	Czarna	14 (8%)
	Latynoamerykańska	7 (4%)
	Nieznana	3 (2%)
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym	0	82 (46%)
	1	72 (41%)
	2	18 (10%)
	Nieznany	5 (3%)
Lokalizacja choroby	Narządy trzewne	152 (86%)
	Kości	153 (86%)
ER/PR	+	121 (68%)
	-	54 (31%)
	Brak danych	2 (1%)
HER2	0	91 (51%)
	1+	12 (7%)
	2+	18 (10%)
	3+	27 (15%)
	Brak danych	29 (17%)
Linia terapii	1. linia	82 (46%)
	2. linia	26 (15%)
	≥ 3. linia	67 (38%)
	Brak danych	2 (1%)
Rodzaj terapii	Chemioterapia (Ch)	74 (42%)
	Hormonalna (En)	45 (25%)
	Celowana (Ta)	9 (5%)
	Ch/En	10 (6%)
	Ch/Ta	23 (13%)
	En/Ta	7 (4%)
	Ch/En/Ta	2 (1%)
	Inna	2 (1%)
	Brak danych	5 (3%)

Miano CTC w punkcie początkowym oznaczono przed rozpoczęciem nowej linii terapii. Miano CTC w okresie kontrolnym oznaczano po rozpoczęciu terapii w odstępach około 3–4 tygodni. W przypadku analiz w punkcie początkowym czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) mierzono od pierwszego pobrania krwi do rozpoznania progresji na podstawie skanów TK i/lub klinicznych objawów podmiotowych i przedmiotowych, zaś całkowity czas przeżycia (OS) mierzono od pierwszego pobrania krwi do zgonu. W przypadku analiz w okresie kontrolnym PFS mierzono od kontrolnego pobrania krwi do rozpoznania progresji lub zgonu, a OS mierzono od czasu kontrolnego pobrania krwi do zgonu.

1.1 Częstość oznaczania CTC

Wyniki CTC uzyskane z kontrolnych pobrań krwi 3–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni oraz 13–20 tygodni po rozpoczęciu leczenia klasyfikowano jako korzystne (< 5 CTC) lub niekorzystne (≥ 5 CTC). Jeśli uzyskano więcej niż jeden wynik CTC w dowolnym wyznaczonym kontrolnym punkcie czasowym, wykorzystywano wynik CTC z pobrania krwi w punkcie najbardziej oddalonym od pobrania krwi w punkcie początkowym.

Spośród całkowitej liczby pacjentek z MBC, wynoszącej 177, 23 nie można było ocenić przy pierwszym badaniu kontrolnym. Spośród tych 23 pacjentek, dziesięć zmarło przed kolejnym pobraniem krwi w badaniu kontrolnym, u dziewięciu wystąpiła progresja choroby przed kolejnym pobraniem krwi w badaniu kontrolnym, a czterech nie poddano badaniu kontrolnemu. Warto zauważyć, że każda z dziesięciu pacjentek, która zmarła, miała ≥ 5 do skrajnie wysokich wyników CTC w punkcie początkowym (wyniki CTC: 9, 11, 15, 24, 111, 126, 301, 1143, 4648 i 23618). Spośród 154 pacjentek dostępnych do badania kontrolnego, odpowiednio u 132, 99, 129 i 85 pobrano krew 3–5, 6–8, 9–14 i 15–20 tygodni po rozpoczęciu leczenia.

W **tabeli 3** podsumowano całkowitą liczbę i odsetek pacjentek z niekorzystnym CTC w badaniu klinicznym w odniesieniu do całkowitego czasu przeżycia, które różnią się od liczby i odsetka pacjentek w odniesieniu do czasu przeżycia bez progresji choroby przedstawionego w **tabeli 2**. Różnica w liczbie pacjentek w poszczególnych punktach czasowych między dwiema tabelami wynika z progresji choroby u niektórych pacjentek przed pobraniem krwi. Różnica w liczbie pacjentek w obrębie tabel wynika z liczby pacjentek, u których pobierano krew i dających się ocenić wyniki CTC w każdym punkcie czasowym.

1.2 Analiza czasu przeżycia bez progresji choroby (PFS) pacjentek z MBC

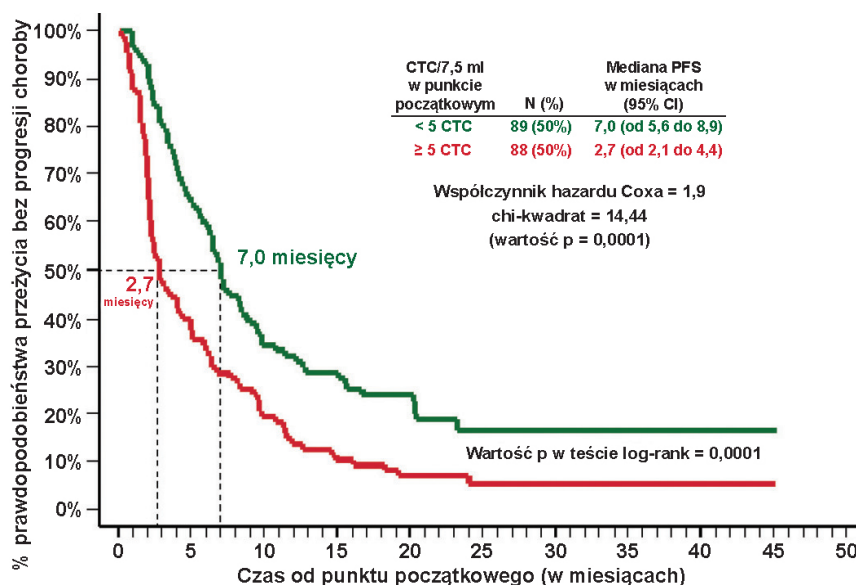
1.2.1 PFS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym

U wszystkich 177 pacjentek z MBC wykonano oznaczenie CTC w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera pacjentki podzielono na dwie grupy na podstawie wyniku CTC w punkcie początkowym:

- Grupa z wynikiem korzystnym (N = 89), oznaczona kolorem **zielonym**, składała się z pacjentek z liczbą CTC < 5.
- Grupa z wynikiem niekorzystnym (N=88), oznaczona kolorem **czerwonym**, składała się z pacjentek z liczbą CTC ≥ 5.

Mediana PFS była znacznie dłuższa w grupie korzystnych wyników w porównaniu z grupą wyników niekorzystnych (odpowiednio 7,0 w stosunku do 2,7 miesiąca). Wyniki te przedstawiono na **rysunku 1**.

Rysunek 1: PFS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w punkcie początkowym (N=177).



1.2.2 PFS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych

Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera pacjentki z MBC podzielono na dwie grupy w oparciu o liczbę CTC z poszczególnych kontrolnych pobrań krwi. PFS obu grup pacjentek w poszczególnych kontrolnych punktach czasowych pobierania krwi po rozpoczęciu leczenia przedstawiono na **rysunku 2**. Okresy PFS były obliczane od czasu każdego pobrania krwi, a każda pacjentka wykazująca oznaki progresji przed konkretnym pobraniem krwi była wykluczana z analizy i wszystkich kolejnych pobrań krwi. **Rysunek 2** przedstawia możliwość przewidzenia czasu do progresji klinicznej u 177 pacjentek z przerzutowym rakiem sutka na podstawie wyniku CTC wynoszącego < 5 lub ≥ 5 w okresie 3-5 tygodni, 6-8 tygodni, 9-14 tygodni i 15-20 tygodni po rozpoczęciu terapii.

- Grupa z korzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **oliwkowym**, **granatowym**, **fioletowym** oraz **niebieskim**, składała się z pacjentek z wynikiem CTC < 5,
- Grupa z niekorzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **brązowym**, **czarnym**, **szarym** i **pomarańczowym**, składała się z pacjentek z wynikiem CTC ≥ 5.

Rysunek 2: PFS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.

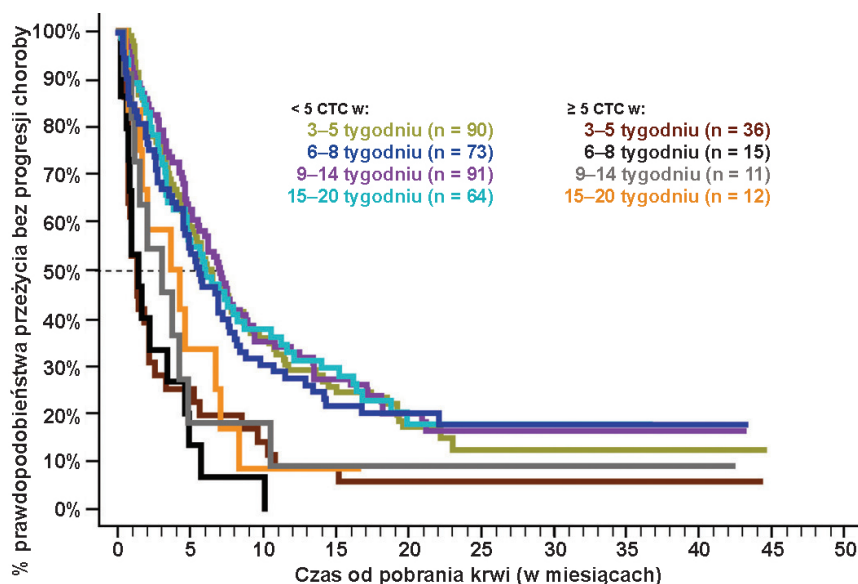


Tabela 2 podsumowuje wyniki analizy PFS na podstawie poziomów CTC i progę ≥ 5 CTC/7,5 ml w poszczególnych punktach czasowych pobierania krwi.

Tabela 2: Czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych

1	2	3	4	5	6
Czas próbkowania po rozpoczęciu Tx	N	≥ 5 CTC	Mediana PFS w miesiącach (95% CI)		Wartość p w teście log-rank
			< 5 CTC	≥ 5 CTC	
Punkt początkowy	117	88 (50%)	7,0 (od 5,6 do 8,9)	2,7 (od 2,1 do 4,4)	0,0001
3-5 tygodni	126	36 (29%)	6,1 (od 4,7 do 8,6)	1,3 (od 0,7 do 2,1)	< 0,0001
6-8 tygodni	88	15 (17%)	5,6 (od 4,5 do 7,6)	1,4 (od 0,6 do 3,4)	0,0001
9-14 tygodni	102	11 (11%)	7,0 (od 5,1 do 8,8)	3,0 (od 0,9 do 4,8)	0,0251
15-20 tygodni	76	12 (16%)	5,9 (od 3,8 do 8,7)	3,6 (od 0,7 do 7,0)	0,0610

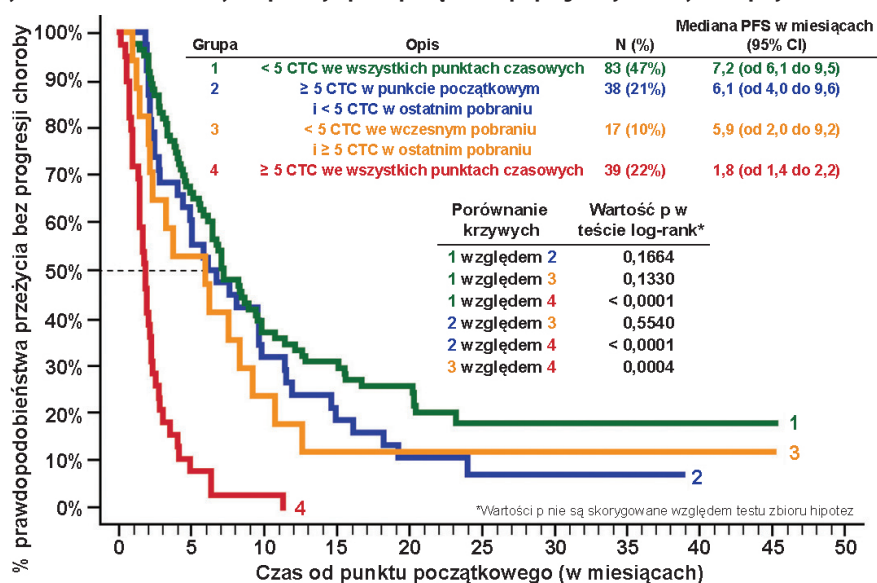
Jak pokazano na **rysunku 2** i w **tabeli 2**, u pacjentek z podwyższonym CTC (≥ 5 CTC/7,5 ml w krwi pełnej) w dowolnym punkcie czasowym prawdopodobieństwo szybkiej progresji było znacznie większe niż u pacjentek z < 5 CTC. Kolumna 4 **tabeli 2** pokazuje, że mediana czasu PFS u pacjentek z CTC < 5 wynosiła od 5,6 do 7,0 miesięcy i była znacznie dłuższa niż mediana czasu PFS u pacjentek z CTC ≥ 5, która wahała się od 1,3 do 3,6 miesiąca (kolumna 5).

1.2.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy PFS

Czas PFS liczono od pobrania krwi w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera (**rysunek 3**) pacjentki z MBC podzielono na cztery grupy w oparciu o wynik CTC w punkcie początkowym oraz 3–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–14 tygodni i 15–20 tygodni od rozpoczęcia terapii.

- Grupa 1 (**zielona** krzywa), 83 (47%) pacjentki z CTC < 5 we wszystkich punktach czasowych pobrania krwi. U pięciu (6%) z tych pacjentek uzyskano wynik ≥ 5 CTC tylko w punkcie początkowym, a u dwóch (2%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi;
- Grupa 2 (**granatowa** krzywa), 38 (21%) pacjentek z liczbą CTC ≥ 5 przed rozpoczęciem terapii, u których doszło do obniżenia CTC do < 5 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 3 (**pomarańczowa** krzywa), 17 (10%) pacjentek z CTC < 5 we wczesnych pobraniach krwi (punkt początkowy, 3–5 tygodni i/lub 6–8 tygodni), u których jednak doszło do zwiększenia CTC do ≥ 5 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 4 (**czerwona** krzywa), 39 (22%) pacjentek z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych pobrania krwi. U dziesięciu (26%) spośród tych pacjentek wykonano tylko pobranie krwi w punkcie początkowym;

Rysunek 3: Obniżenie liczby CTC poniżej 5 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy PFS u pacjentek z MBC



Rysunek 3 pokazuje, że pacjentki z MBC z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych (**grupa 4**) miały najkrótszą medianę PFS, która była znacząco różna od mediany PFS **grupy 3**, **grupy 2** i **grupy 1**. Różnice między krzywymi dla innych grup na tym rysunku nie były znaczące.

1.3 Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) pacjentek z MBC

1.3.1 Analiza OS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym

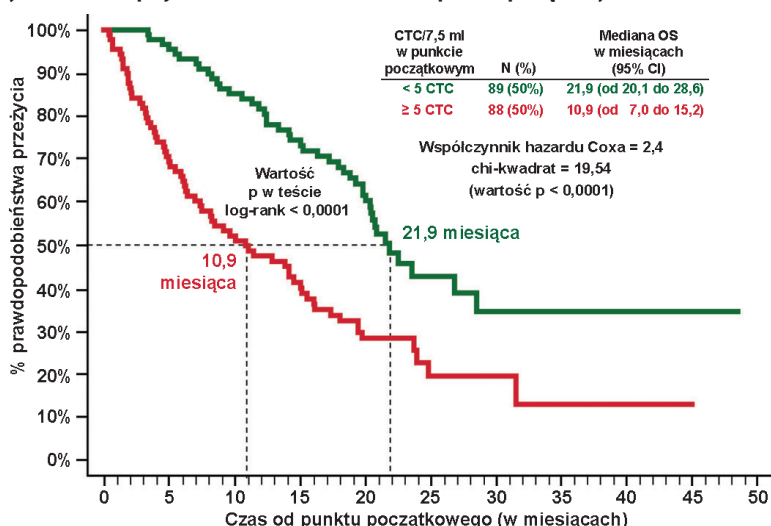
Zgon nastąpił u 109 (62%) ze 177 pacjentek z MBC, ze średnim okresem kontrolnym w przypadku 68 pozostających nadal przy życiu pacjentek (38%) wynoszącym $22,7 \pm 9,4$ miesiąca (mediana = 21,1, zakres = 4,4-48,6). W czasie tych analiz zmarły 44 (49%) z 89 pacjentek z grupy korzystnej (< 5 CTC w punkcie początkowym) w porównaniu z 65 (74%) z 88 z grupy niekorzystnej (≥ 5 CTC w punkcie początkowym).

Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera pacjentki podzielono na dwie grupy na podstawie wyniku CTC w punkcie początkowym:

- Grupa z wynikiem korzystnym (N = 89), oznaczona kolorem **zielonym**, składała się z pacjentek z liczbą CTC < 5.
- Grupa z wynikiem niekorzystnym (N=88), oznaczona kolorem **czerwonym**, składała się z pacjentek z liczbą CTC ≥ 5.

Mediana OS była znacznie dłuższa w grupie korzystnych wyników w porównaniu z grupą wyników niekorzystnych (odpowiednio 21,9 w stosunku do 10,9 miesiąca). Wyniki te przedstawiono na **rysunku 4**.

Rysunek 4: OS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w punkcie początkowym (N = 177).



1.3.2 OS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych

Analizy Kaplana-Meiera dla obu grup pacjentek z MBC w poszczególnych kontrolnych punktach czasowych pobierania krwi po rozpoczęciu terapii przedstawiono na **rysunku 5**. Ten rysunek przedstawia możliwość przewidzenia czasu do zgonu u 177 pacjentek z przerzutowym rakiem sutka na podstawie wyniku CTC wynoszącego < 5 lub ≥ 5 CTC w okresie 3–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–14 tygodni i 15–20 tygodni po rozpoczęciu terapii. Czas OS liczono od każdego pobrania krwi.

- Grupa z korzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **oliwkowym, granatowym, fioletowym** oraz **niebieskim**, składała się z pacjentek z wynikiem CTC < 5,
- Grupa z niekorzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **brązowym, czarnym, szarym** oraz **pomarańczowym**, składała się z pacjentek z wynikiem CTC ≥ 5.

Rysunek 5: OS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.

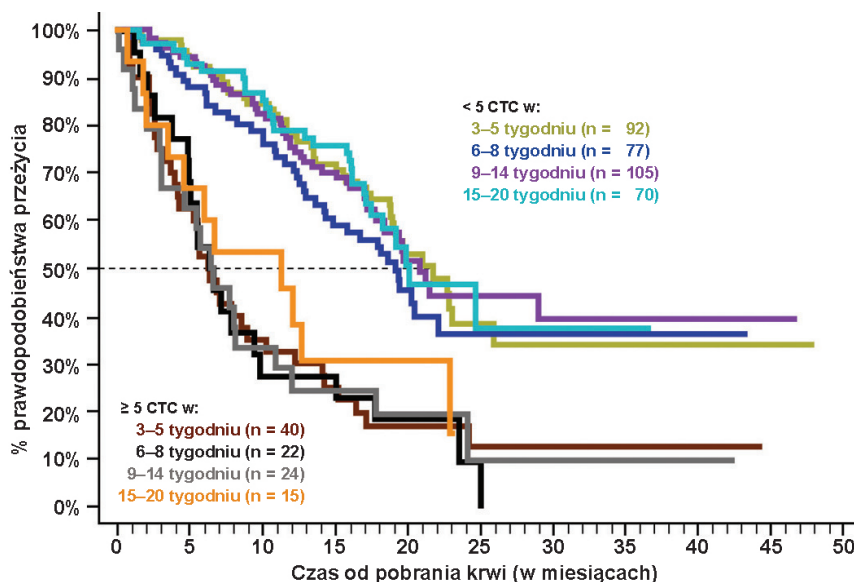


Tabela 3 podsumowuje wyniki analizy OS przy użyciu poziomów CTC i progu ≥ 5 CTC/7,5 ml w poszczególnych punktach czasowych pobierania krwi.

Tabela 3: Całkowity czas przeżycia (OS) pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych

1	2	3	4	5	6
Czas próbkowania porozpoczęciu Tx	N	≥ 5 CTC	Mediana OS w miesiącach (95% CI)		Wartość p w teście log-rank
			< 5 CTC	≥ 5 CTC	
Punkt początkowy	177	88 (50%)	21,9 (od 20,1 do 28,6)	10,9 (od 7,0 do 15,2)	< 0,0001
3–5 tygodni	132	40 (30%)	21,7 (od 18,8 do 25,9)	6,2 (od 4,1 do 8,9)	< 0,0001
6–8 tygodni	99	22 (22%)	19,1 (od 14,2 do 22,1)	6,3 (od 4,8 do 9,8)	0,0001
9–14 tygodni	129	24 (19%)	20,8 (od 17,8 do ≥ 45)	6,4 (od 3,0 do 10,9)	< 0,0001
15–20 tygodni	85	15 (18%)	20,1 (od 17,1 do ≥ 35)	11,3 (od 2,0 do 22,9)	0,0021

1.3.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy OS

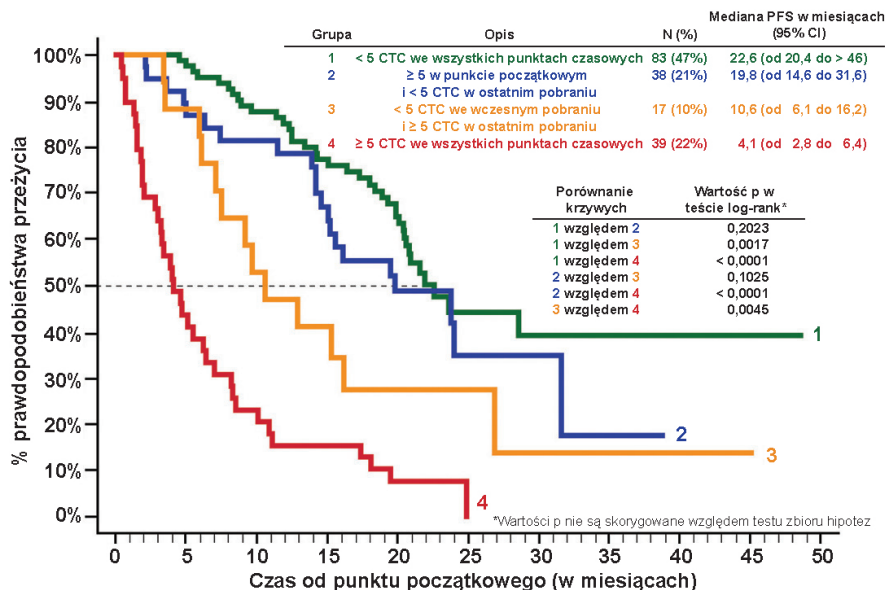
Czas OS liczono od pobrania krwi w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera (**rysunek 6**) pacjentki z MBC podzielono na cztery grupy w oparciu o wynik CTC w punkcie początkowym oraz 3–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–14 tygodni i 15–20 tygodni od rozpoczęcia terapii:

- Grupa 1 (**zielona** krzywa), 83 (47%) pacjentki z CTC < 5 we wszystkich punktach czasowych pobrania krwi. U pięciu (6%) z tych pacjentek uzyskano wynik ≥ 5 CTC tylko w punkcie początkowym, a u dwóch (2%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi;
- Grupa 2 (**granatowa** krzywa), 38 (21%) pacjentek z liczbą CTC ≥ 5 przed rozpoczęciem terapii, u których doszło do obniżenia CTC do < 5 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 3 (**pomarańczowa** krzywa), 17 (10%) pacjentek z CTC < 5 we wczesnych pobraniach krwi (punkt początkowy, 3–5 tygodni i/lub 6–8 tygodni), u których doszło do zwiększenia CTC do ≥ 5 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 4 (**czerwona** krzywa), 39 (22%) pacjentek z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych pobrania krwi. U dziesięciu (26%) spośród tych pacjentek wykonano tylko pobranie krwi w punkcie początkowym.

Rysunek 6 pokazuje, że u pacjentek z MBC, które przekroczyły próg 5 CTC w dowolnym momencie po rozpoczęciu terapii, występowało znacznie większe prawdopodobieństwo krótszego całkowitego czasu przeżycia. Pacjentki z MBC z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych (**grupa 4**) miały najkrótszą medianę OS, która była znacząco różna od mediany OS **grupy 3**, **grupy 2** i **grupy 1**. Różnica w medianie czasu przeżycia między **grupą 3** i **grupą 1** była również znacząca, natomiast mediana OS dla **grupy 3** była wprawdzie krótsza niż dla **grupy 2**, lecz różnica ta nie była istotna statystycznie.

Rysunek 6 pokazuje również, że u pacjentek, u których w punkcie początkowym wartość CTC była ≥ 5, ale ostatecznie spadła do poziomu < 5 CTC po rozpoczęciu leczenia, ryzyko zgonu było w przybliżeniu takie samo, jak u pacjentek, które nigdy nie przekroczyły progu 5 CTC.

Rysunek 6: Obniżenie liczby CTC poniżej 5 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy OS u pacjentek z MBC, zaś wzrost liczby CTC do 5 lub więcej prognozuje krótszy OS



Jak pokazano na **rysunku 6** i w **tabeli 3**, w kolumnie 4 i 5, pacjentki z MBC z ≥ 5 CTC w dowolnych punktach czasowych wykazywały znacznie większe prawdopodobieństwo wcześniejszego zgonu niż pacjentki z liczbą CTC < 5 . Mediana okresu OS u tych pacjentek z CTC < 5 mieściła się w zakresie od 19,1 do 21,9 miesięcy i była znacznie dłuższa niż mediana okresu OS u pacjentek z CTC ≥ 5 , która wahała się od 6,2 do 11,3 miesiąca.

1.3.4 Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC

W celu oceny związku z PFS i OS wykonano jednoczynnikową analizę regresji Coxa następujących parametrów: wiek pacjentki (ciągły), stadium choroby w momencie rozpoznania (1–4), czas do przerzutu (ciągły), wynik w skali ECOG przed rozpoczęciem nowej linii terapii (0–2), stan ER/PR (+/-), stan HER2/neu (0–3+), linia terapii (≥ 2 lub 1), rodzaj terapii (tylko chemioterapia lub terapia hormonalna/kombinacja), liczba CTC w punkcie początkowym (≥ 5 lub < 5 CTC/7,5 ml) i liczba CTC w oznaczeniach kontrolnych 3–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–14 tygodni i 15–20 tygodni po rozpoczęciu terapii (≥ 5 lub < 5 CTC/7,5 ml). **Tabela 4** przedstawia wyniki tej analizy, współczynnik hazardu Coxa (HR) oraz powiązaną wartość p (test Walda statystyki Z), a także liczbę pacjentek wchodzących w zakres każdej oceny.

Tabela 4: Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC

Parametr	Kategorie		Liczba pacjentek z MBC	PFS: ryzyko w punkcie początkowym		OS: ryzyko w punkcie początkowym	
	Wynik dodatni	Wynik ujemny		HR	Wartość p	HR	Wartość p
Wiek podczas pobrania krwi w punkcie początkowym	Wiek w latach		175	0,99	0,173	0,99	0,375
Stadium w pierwotnym rozpoznaniu	4 lub 3 lub 2 lub 1		164	0,97	0,723	1,00	0,969
ER/PR	Wynik dodatni	Wynik ujemny	175	0,84	0,327	0,53	0,002
Her-2/neu	3+ lub 2+ lub 1+ lub 0		148	0,91	0,207	0,93	0,422
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym	2 lub 1 lub 0		172	1,14	0,307	1,64	0,001
Czas do przerzutu	Czas w latach		175	0,97	0,048	0,95	0,018
Linia terapii	≥ 2	1	175	1,55	0,007	1,91	0,001
Rodzaj terapii	Tylko chemioterapia	H/C i/lub I	172	1,97	< 0,001	2,22	< 0,001
Liczba CTC w punkcie początkowym	≥ 5	< 5	177	1,85	< 0,001	2,36	< 0,001
Liczba CTC po 3–5 tygodniach	≥ 5	< 5	132	2,52	< 0,001	3,30	< 0,001
Liczba CTC po 6–8 tygodniach	≥ 5	< 5	99	3,57	< 0,001	2,87	< 0,001
Liczba CTC po 9–14 tygodniach	≥ 5	< 5	129	2,89	< 0,001	3,64	< 0,001
Liczba CTC po 15–20 tygodniach	≥ 5	< 5	85	1,86	0,041	2,85	0,004

H/C/i/lub I – sama terapia hormonalna, immunoterapia lub kombinacja terapii hormonalnej i/lub chemioterapii i/lub immunoterapii

1.3.5 Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC

Przeprowadzono analizy wieloczynnikowej regresji Coxa danych dotyczących pacjentek z MBC w celu oceny niezależnej mocy predykcyjnej wyniku CTC poprzez skorygowanie o wpływ znanych ważnych czynników klinicznych, które są istotne statystycznie w analizach jednoczynnikowych. Wynik CTC okazał się silnym czynnikiem rokowniczym PFS (**tabela 5**) i OS (**tabela 6**).

Tabela 5: Analiza czasu przeżycia bez progresji choroby z zastosowaniem wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC

Zmienna	N	Współczynnik hazardu	Wartość p
CTC w punkcie początkowym (< 5 lub ≥ 5)	172	1,69	0,001
Czas do przerzutu (w latach)		0,98	0,154
Linia terapii (1. lub ≥ 2.)		1,52	0,013
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		1,74	0,001
CTC po 3–5 tygodniach okresu kontrolnego (< 5 lub ≥ 5)	132	2,32	< 0,001
Czas do przerzutu (w latach)		0,97	0,166
Linia terapii (1. lub ≥ 2.)		1,68	0,008
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		1,50	0,060
CTC po 6–8 tygodniach okresu kontrolnego (< 5 lub ≥ 5)	99	2,92	< 0,001
Czas do przerzutu (w latach)		0,93	0,023
Linia terapii (1. lub ≥ 2.)		1,36	0,175
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		1,90	0,005
CTC po 9–14 tygodniach okresu kontrolnego (< 5 lub ≥ 5)	129	2,23	0,002
Czas do przerzutu (w latach)		0,97	0,170
Linia terapii (1. lub ≥ 2.)		1,48	0,061
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		1,73	0,007
CTC po 15–20 tygodniach okresu kontrolnego (< 5 lub ≥ 5)	85	1,58	0,140
Czas do przerzutu (w latach)		0,96	0,064
Linia terapii (1. lub ≥ 2.)		1,80	0,018
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		1,66	0,049

Tabela 6: Analiza całkowitego czasu przeżycia z zastosowaniem wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentek z MBC

Zmienna	N	Współczynnik hazardu	Wartość p
CTC w punkcie początkowym (< 5 lub ≥ 5)	170	2,62	< 0,001
ER/PR (wynik ujemny lub dodatni)		0,57	0,016
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym (2 lub 1 lub 0)		1,58	0,001
Czas do przerzutu (w latach)		0,97	0,078
Linia terapii (1. lub 2.)		2,33	< 0,001
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		1,78	0,006
CTC po 3–5 tygodniach okresu kontrolnego (< 5 lub ≥ 5)	130	3,78	< 0,001
ER/PR (wynik ujemny lub dodatni)		0,51	0,020
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym (2 lub 1 lub 0)		1,69	0,001
Czas do przerzutu (w latach)		0,96	0,142
Linia terapii (1. lub 2.)		2,30	0,001
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		1,72	0,026
CTC po 6–8 tygodniach okresu kontrolnego (< 5 lub ≥ 5)	99	2,88	0,001
ER/PR (wynik ujemny lub dodatni)		0,58	0,062
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym (2 lub 1 lub 0)		1,32	0,173
Czas do przerzutu (w latach)		0,94	0,135
Linia terapii (1. lub 2.)		2,51	0,001
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		2,33	0,003
CTC po 9–14 tygodniach okresu kontrolnego (< 5 lub ≥ 5)	129	4,14	< 0,001
ER/PR (wynik ujemny lub dodatni)		0,39	0,002
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym (2 lub 1 lub 0)		1,57	0,016
Czas do przerzutu (w latach)		0,98	0,388
Linia terapii (1. lub 2.)		2,21	0,003
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		2,28	0,003
CTC po 15–20 tygodniach okresu kontrolnego (< 5 lub ≥ 5)	85	3,44	0,006
ER/PR (wynik ujemny lub dodatni)		0,38	0,024
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym (2 lub 1 lub 0)		1,33	0,321
Czas do przerzutu (w latach)		0,94	0,150
Linia terapii (1. lub 2.)		3,43	0,001
Rodzaj terapii (hormonalna/inna lub tylko chemioterapia)		1,67	0,166

1.4 Zastosowanie oznaczeń komórek CTC do monitorowania stanu klinicznego w przerzutowym raku sutka

1.4.1 Związek między przeżyciem, CTC i oceną choroby w obrazowaniu

Obrazowanie radiologiczne jest jednym z podstawowych sposobów określania stadium choroby i odpowiedzi na leczenie u pacjentek z przerzutowym rakiem sutka. Aby określić zależność między stanem klinicznym ustalonym w obrazowaniu a liczbą CTC, porównano wyniki CTC oznaczane w dwóch różnych punktach czasowych oraz wyniki obrazowania 1) z rzeczywistym ostatecznym klinicznym całkowitym czasem przeżycia oraz 2) względem siebie.

1.4.2 CTC

Poprzednie dane wykazały, że u pacjentek z MBC z ≥ 5 CTC/7,5 ml krwi przy każdym badaniu kontrolnym po rozpoczęciu leczenia prawdopodobieństwo progresji choroby i krótszego całkowitego czasu przeżycia było większe niż u pacjentek z < 5 CTC/7,5 ml krwi. Wyniki CTC uzyskane podczas pierwszej kontroli po rozpoczęciu terapii, jak również wyniki CTC uzyskane w ciągu $\pm$ jednego miesiąca od badania obrazowego sklasyfikowano jako < 5 CTC i ≥ 5 CTC. Jeżeli w ciągu $\pm$ jednego miesiąca od badania obrazowego uzyskano więcej niż jedną wartość CTC, do obliczeń używano wyniku CTC uzyskanego najbliżej daty badania obrazowego.

1.4.3 Obrazowanie

Wszystkie placówki, w których wykonywano obrazowanie, spełniały normy Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM). Wykorzystując znormalizowane obrazy cyfrowe, dwóch ekspertów radiologów (osoby dokonujące odczytów), pracujących niezależnie i bez wiedzy względem danych klinicznych, sklasyfikowało każdą ocenę przeprowadzaną w okresie kontrolnym u 138 pacjentek z mierzalną chorobą (łącznie 231 badań obrazowych) jako nieokreśloną (I), chorobę stabilną (S), odpowiedź częściową (PR) lub progresję (PD) według kryteriów dwuwymiarowych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Mierzalną chorobę zdefiniowano jako obecność co najmniej jednej zmiany ≥ 2 cm w najdłuższym wymiarze. Lekarze dokonujący odczytu zidentyfikowali do ośmiu zmian na pacjentkę na punkt czasowy, opisując najdłuższy wymiar zmiany chorobowej i najdłuższy wymiar prostopadły. Te dwa wymiary zostały przemnożone i zgłoszono „wynik iloczynny”. Wyliczono sumę wyników iloczynny i określono procentową zmianę

wyników w stosunku do poprzedniego punktu czasowego. Chociaż u wszystkich pacjentek występowała mierzalna choroba, do określenia stanu pacjentek włączono zmiany niemierzalne (choć wykrywalne radiologicznie), jak opisano w wytycznych WHO. Progresję definiowano jako wzrost o > 25% sumy wszystkich zmian lub pojawienie się nowej mierzalnej lub niemierzalnej zmiany. Odpowiedź częściowa została zdefiniowana jako spadek sumy wszystkich zmian o $\geq 50\%$ i brak nowych zmian.

Interpretacje radiologiczne dwóch ekspertów radiologów zostały sklasyfikowane jako następujące:

- S i PR uznano za odzwierciedlające brak progresji (NPD)
- PD uznano za odzwierciedlające progresję
- W sytuacjach, w których jeden z radiologów dokonał klasyfikacji jako nieokreślona (I), ale drugi radiolog dokonał klasyfikacji S, PR lub PD, do porównania z wynikami CTC (n = 11) użyto klasyfikacji tego ostatniego radiologa
- Gdy obaj radiolodzy dokonali klasyfikacji jako nieokreślona (I), dane nie zostały użyte do porównania z wynikami CTC (n = 3)
- Trzeci niezależny radiolog rozstrzygnął niezgodne klasyfikacje między dwoma głównymi lekarzami dokonującymi odczytu w odniesieniu do PD i NPD (n = 27)
- W sytuacjach, w których trzeci niezależny radiolog dokonał klasyfikacji jako nieokreślona (I), dane nie zostały użyte do porównania z wynikami CTC (n = 2)
- W seryjnych badaniach obrazowych nie korzystano z wyników badań radiologicznych, które zostały wykonane w terminie krótszym niż jeden miesiąc od poprzedniej obserwacji przedstawionej w formie tabelarycznej (n = 1).

1.4.4 Związek między przeżyciem, obrazowaniem i CTC

Oddzielne analizy Kaplana-Meiera przeprowadzono w celu porównania całkowitego czasu przeżycia pacjentek z MBC w grupach korzystnej (< 5 CTC) i niekorzystnej (≥ 5 CTC) przy użyciu wyników CTC w dwóch różnych punktach czasowych i pierwszym obrazowaniu kontrolnym. W przypadku wyników z pierwszego obrazowania kontrolnego wykonanego $10,1 \pm 5,1$ tygodnia (mediana = 9,0 tygodni) po rozpoczęciu leczenia (tzn. pobranie krwi w punkcie początkowym), mediana przeżycia u 96 pacjentek (70%), u których w obrazowaniu stwierdzono NPD, wynosiła 23,8 miesiąca (95% CI od 20,4 do 28,6) (**rysunek 7, tabela 7**). W przypadku 42 pacjentek (30%), u których w obrazowaniu stwierdzono PD, mediana czasu przeżycia wynosiła 12,9 miesiąca (95% CI od 7,1 do 19,3).

W przypadku CTC przy pierwszym kontrolnym pobraniu krwi, wykonanym $4,3 \pm 2,5$ tygodnia (mediana = 4,0 tygodnie) po rozpoczęciu leczenia, mediana przeżycia u 104 pacjentek (75%) z korzystnymi wynikami CTC (< 5 CTC) wynosiła 21,9 miesiąca (95% CI od 20,4 do 26,9) (**rysunek 8, tabela 7**). U 34 pacjentek (25%) z niekorzystnymi wynikami CTC (≥ 5 CTC) mediana przeżycia wynosiła 8,3 miesiąca (95% CI od 5,9 do 15,1).

Aby ustalić, czy oceny CTC dokonane w okresie bliższym terminowi obrazowania dały podobne szanse przeżycia w porównaniu z ocenami CTC wykonanymi około 4 tygodni po rozpoczęciu terapii, dokonano analizy tylko w przypadku pacjentek, u których CTC oznaczono w ciągu $\pm$ jednego miesiąca od pierwszego obrazowania kontrolnego ($9,9 \pm 5,1$ tygodni, mediana = 8,8 tygodnia po rozpoczęciu terapii) (**rysunek 9, tabela 7**).

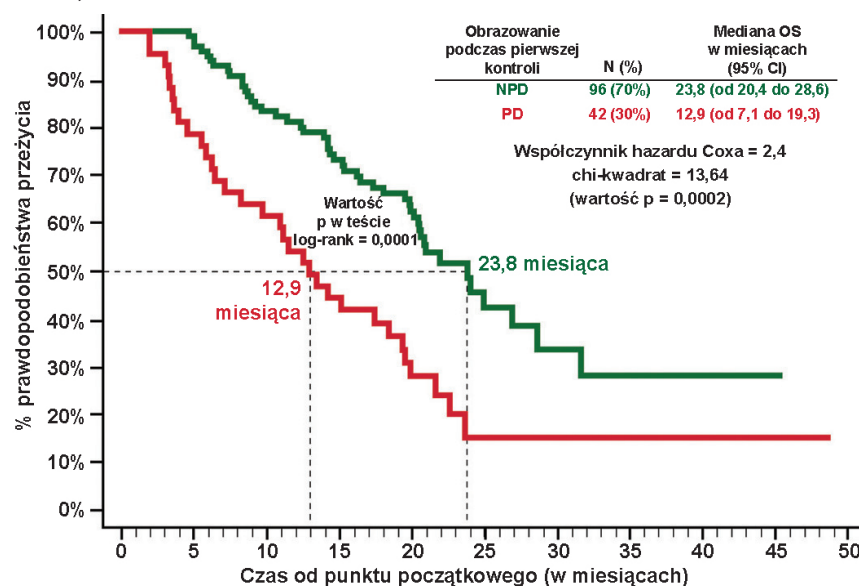
U 134 ze 138 pacjentek (97%) dokonano oceny CTC w ciągu jednego miesiąca od pierwszego kontrolnego badania obrazowego. Mediana przeżycia u 105 pacjentek (78%) z korzystnymi wynikami CTC wynosiła 21,9 miesiąca (95% CI od 19,9 do 31,6). W przypadku 29 pacjentek (22%) z niekorzystnymi wynikami CTC mediana przeżycia wynosiła 8,5 miesiąca (95% CI od 5,5 do 15,1). Dane te pokazują, że oceny CTC w obu punktach czasowych dają podobne wyniki do obrazowania przeprowadzonego około 9 tygodni po rozpoczęciu terapii (*Clin. Cancer Res.* Vol 12: 6403-6409, November 2006).

Tabela 7: OS u pacjentek z MBC, u których ocenę CTC przeprowadzono około miesiąca po rozpoczęciu leczenia oraz w ciągu jednego miesiąca od oceny radiologicznej

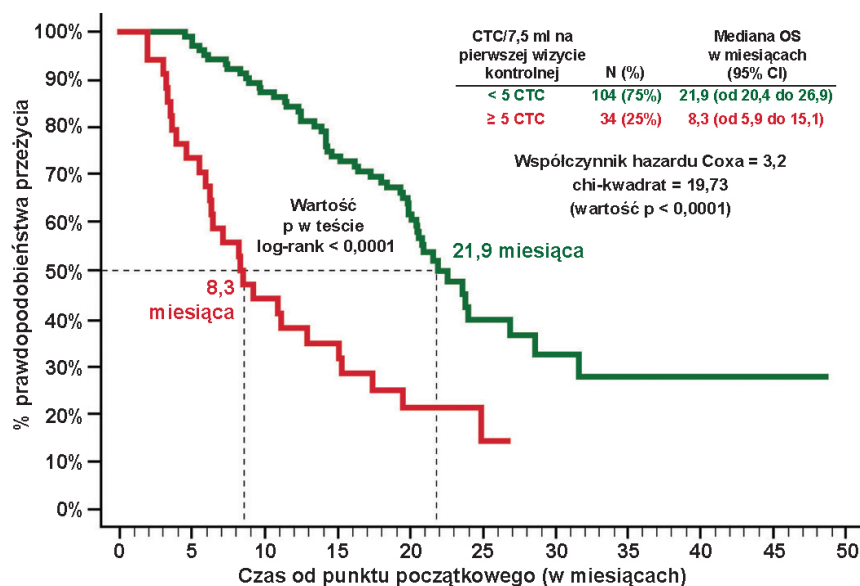
	N	Mediana czasu przeżycia i (95% CI) w miesiącach
Obrazowanie	138	
Wynik korzystny (NPD)	96 (70%)	23,8 (20,4–28,6)
Wynik niekorzystny (PD)	42 (30%)	12,9 (7,1–19,3)
1. badanie kontrolne CTC	138	
wynik korzystny (< 5)	104 (75%)	21,9 (20,4–26,9)
wynik niekorzystny (≥ 5)	34 (25%)	8,3 (5,9–15,1)
CTC (± 1 miesiąc od obrazowania)	134*	
wynik korzystny (< 5)	105 (78%)	21,9 (19,9–31,6)
wynik niekorzystny (≥ 5)	29 (22%)	8,5 (5,5–15,1)

*U 134/138 pacjentek wykonano oceny CTC w ciągu (±) 1 miesiąca od obrazowania.

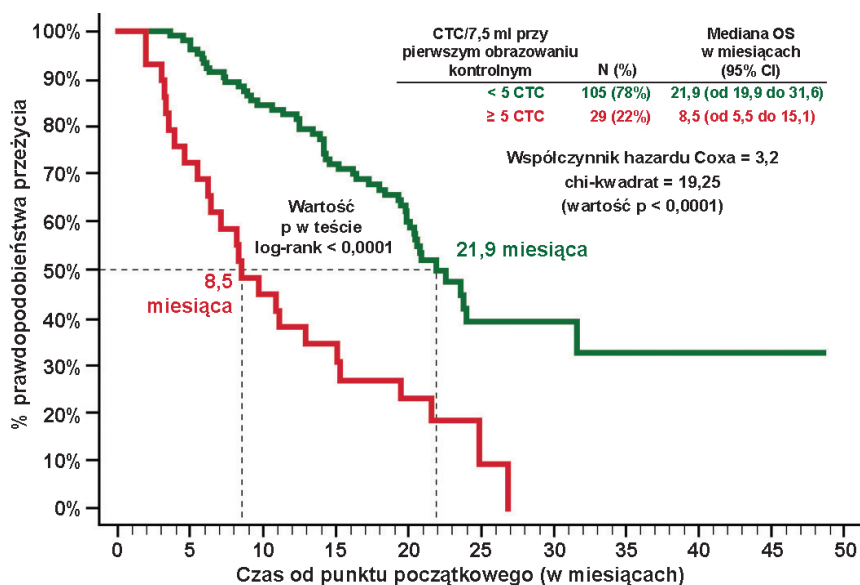
Rysunek 7: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentek z MBC z **NPD lub **PD** w pierwszym obrazowaniu kontrolnym (N=138)**



Rysunek 8: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC podczas pierwszej wizyty kontrolnej po rozpoczęciu terapii (N=138)



Rysunek 9: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentek z MBC z < 5 lub ≥ 5 CTC w ciągu ± 1 miesiąca od pierwszego obrazowania kontrolnego (N=134)



1.4.5 Zgodność między liczbą komórek CTC a monitorowaniem radiologicznym

Jak wspomniano powyżej, badania obrazowe są istotnym elementem obecnego standardu opieki do określenia progresji choroby i odpowiedzi na leczenie w przypadku przerzutowego raka sutka. Aby wskazać dalsze dowody na skuteczność CTC w przeprowadzaniu tych ocen klinicznych (*Clin. Cancer Res.* Vol 12: 6403-6409, November 2006), skonstruowano tabele porównujące parami zgodne i niezgodne wyniki oznaczenia CTC i obrazowania radiologicznego, stosując wcześniej opisane kryteria.

Używając tylko pierwszego kontrolnego badania obrazowego, odpowiedź radiologiczną podczas tej wizyty porównano z wynikami CTC uzyskanymi w ciągu jednego miesiąca od tego badania obrazowego. Łącznie wyniki CTC 134 z 138 pacjentek z MBC (97%) spełniały to kryterium. Rezultaty tego porównania wyników CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentek podsumowano w **tabeli 8**.

Tabela 8: Porównanie CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentek z MBC

Odpowiedź przy pierwszym kontrolnym badaniu obrazowym	CTC w ciągu ± 1 miesiąca od obrazowania		Łącznie
	< 5 CTC/7,5 ml	≥ 5 CTC/7,5 ml	
Brak progresji	85	9	94
Progresja	20	20	40
Łącznie	105	29	134

Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	50%	34%	66%
Zgodność ujemna w %	90%	83%	96%
Dodatnia wartość predykcyjna	69%	49%	85%
Ujemna wartość predykcyjna	81%	72%	88%
Zgodność całkowita	78%	70%	85%
Iloraz szans	9,4	3,4	26,8

Wyniki wszystkich kontrolnych badań obrazowych, przeprowadzonych po rozpoczęciu terapii u 138 pacjentek z MBC, które dały użyteczne wyniki odpowiedzi radiologicznej ($n = 225$), porównano z wynikami CTC uzyskanymi w ciągu $\pm$ jednego miesiąca od badania obrazowego. Łącznie wyniki CTC 219 z 225 (97%) badań obrazowych spełniały to kryterium. Wynik tego porównania między CTC a obrazowaniem na podstawie obserwacji przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9: Porównanie CTC i obrazowania na podstawie obserwacji MBC

Odpowiedź przy wszystkich kontrolnych badaniach obrazowych	CTC w ciągu ± 1 miesiąca od obrazowania		Łącznie
	< 5 CTC/7,5 ml	≥ 5 CTC/7,5 ml	
Brak progresji	151	16	167
Progresja	30	22	52
Łącznie	181	38	219

Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	42%	29%	57%
Zgodność ujemna w %	90%	85%	94%
Dodatnia wartość predykcyjna	58%	41%	74%
Ujemna wartość predykcyjna	83%	77%	89%
Zgodność całkowita	79%	73%	84%
Iloraz szans	6,9	3,0	15,8

W seryjnych obserwacjach odnotowano, że tylko niewielka liczba wyników obrazowania, wykazujących przejście od choroby bez progresji do choroby z progresją, zbiegała się w czasie ze zmianą wyników CTC z < 5 na ≥ 5 CTC/7,5 ml.

Ponieważ wartość prognostyczna wyników CTC we wcześniejszym punkcie czasowym była równoważna z wynikami CTC w momencie obrazowania (rys. 8 i rys. 9), dokonano u poszczególnych pacjentek porównań wyników tylko z pierwszego kontrolnego badania obrazowego, przeprowadzonego około 9 tygodni po rozpoczęciu terapii, oraz wyników CTC uzyskanych podczas pierwszej obserwacji, przeprowadzonej około 4 tygodni po rozpoczęciu terapii. Wyniki CTC wszystkich 138 pacjentek z MBC spełniały to kryterium. Rezultaty porównania wyników CTC we wcześniejszym punkcie czasowym z wynikami obrazowania u poszczególnych pacjentek przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10: Porównanie CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentek z MBC

Odpowiedź przy pierwszym kontrolnym badaniu obrazowym	CTC na 1. wizycie kontrolnej		Łącznie
	< 5 CTC/7,5 ml	≥ 5 CTC/7,5 ml	
Brak progresji	84	12	96
Progresja	20	22	42
Łącznie	104	34	138

Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	52%	36%	68%
Zgodność ujemna w %	88%	79%	93%
Dodatnia wartość predykcyjna	65%	46%	80%
Ujemna wartość predykcyjna	81%	72%	88%
Zgodność całkowita	77%	69%	84%
Iloraz szans	7,7	3,0	19,9

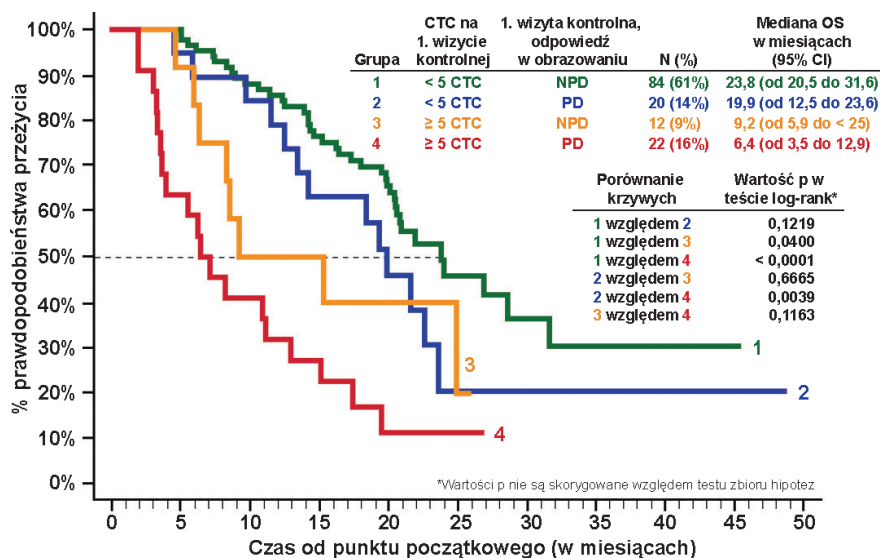
1.4.6 CTC jako dodatek do obrazowania

Chociaż ogólna zgodność między CTC i obrazowaniem była dobra (około 78%), zgodność ta nie występowała u około 22% pacjentek z MBC. Jako że oznaczenie CTC ma być stosowane w połączeniu z innymi metodami diagnostycznymi do podejmowania decyzji terapeutycznych, wyniki CTC przy pierwszym badaniu kontrolnym (około 4 tygodnie po rozpoczęciu terapii) i wyniki obrazowania porównano z OS w celu określenia, które z niezgodnych wyników lepiej odzwierciedlały rokowanie pacjentek (**rysunek 10**) w następujących grupach:

- Grupa 1 (**zielona** krzywa), 84 (61%) pacjentki z CTC < 5 przy 1. wizycie kontrolnej i NPD;
- Grupa 2 (**granatowa** krzywa), 20 (14%) pacjentek z CTC < 5 na 1. wizycie kontrolnej i PD;
- Grupa 3 (**pomarańczowa** krzywa), 12 (9%) pacjentek z CTC ≥ 5 na 1. wizycie kontrolnej i NPD;
- Grupa 4 (**czerwona** krzywa), 22 (16%) pacjentki z CTC ≥ 5 na 1. wizycie kontrolnej i PD;

W tym badaniu oznaczenie CTC okazało się silnym niezależnym czynnikiem prognostycznym całkowitego czasu przeżycia. Wyniki badania wskazują, że kombinacja wyników CTC i ocen radiologicznych zapewnia najdokładniejszą ocenę rokowania.

Rysunek 10: OS u pacjentek z MBC w grupach 1, 2, 3 i 4 na podstawie pierwszego kontrolnego oznaczenia CTC po rozpoczęciu terapii (n=138) oraz stadium choroby określonego za pomocą pierwszego kontrolnego obrazowania



1.5 Zmienność komórek CTC i ocen radiologicznych

1.5.1 CTC

Zmienność między lekarzami analizującymi wyniki oznaczeń CTC przy pierwszym kontrolnym pobraniu krwi określano na podstawie liczby przypadków, w których dane od operatora w miejscu przeprowadzania badania nie były zgodne z danymi z laboratorium centralnego klasyfikującego próbkę jako ≥ 5 CTC albo < 5 CTC. W podgrupie 71 pacjentek pobrano i poddano obróbce dwie próbki krwi i porównano klasyfikację każdej z tych dwóch próbek jako ≥ 5 CTC lub < 5 CTC dokonaną w placówce oraz w laboratorium centralnym.

1.5.2 Obrazowanie

Zmienność między lekarzami oceniającymi wyniki określono przez porównanie interpretacji radiologicznych sklasyfikowanych jako NPD lub PD przez dwóch radiologów. Zmienność między lekarzami dokonującymi odczytu obliczono przez porównanie interpretacji radiologicznych dwóch radiologów w podgrupie pacjentek, gdzie każdy z radiologów określił odpowiedź na trzech oddzielnych posiedzeniach, a każde posiedzenie było oddzielone w czasie o minimum jeden tydzień. Analizowano również segmenty obrazów z późniejszych ocen u tych 138 pacjentek z MBC oraz oznaczenia CTC sprzed rozpoczęcia terapii i z późniejszych badań kontrolnych.

Tabela 11: Zmienność ocen radiologicznych i CTC u pacjentek z MBC

	n	Niezgodność w badaniach radiologicznych: NPD lub PD	n	Niezgodność w wynikach CTC/7,5 ml: ≤5 lub ≥ 5
<i>Między lekarzami dokonującymi odczytu</i>				
1. badanie kontrolne	132	11,4%	138	0,7%
Dowolne badanie kontrolne	217	13,4%	695	1,0%
<i>U tego samego lekarza dokonującego odczytu</i>				
1. badanie kontrolne			—	—
Interpretator 1 (radiologia)	24	25,0%	—	—
Interpretator 2 (radiologia)	22	9,1%	—	—
Dowolne badanie kontrolne			—	—
Interpretator 1 (radiologia)	30	20,0%	—	—
Interpretator 2 (radiologia)	28	10,7%	—	—
<i>Różnice w CTC między próbkami</i>				
1. badanie kontrolne	—	—	71	5,6%
Dowolne badanie kontrolne	—	—	403	5,5%

Tabela 11 pokazuje, że zmienność między lekarzami oceniającymi wyniki badań radiologicznych była znacznie większa, zarówno podczas pierwszej oceny kontrolnej choroby, jak i we wszystkich późniejszych ocenach kontrolnych choroby, od zmienności między lekarzami oceniającymi wyniki oznaczeń CTC w tych samych grupach ($P < 0,001$ według Fishera).

W przypadkach, w których oznaczenia CTC i ocena radiologiczna były niezgodne, CTC umożliwiały dokładniejszą ocenę rokowania.

2 Pacjenci z przerzutowym rakiem jelita grubego (mCRC)

Przeprowadzono wieloośrodkowe prospektywne badanie kliniczne w celu określenia, czy wynik CTC pozwala prognozować progresję choroby i czas przeżycia. Do badania włączono pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego z mierzalną chorobą, rozpoczynających nową linię terapii ($N=430$). Dane kliniczne analizowano w grupie przeznaczonej do leczenia (ITT). Informacje demograficzne pacjentów przedstawiono w **tabeli 12**.

Miano CTC w punkcie początkowym oznaczono przed rozpoczęciem nowej linii terapii. Miano CTC w okresie kontrolnym oznaczano po rozpoczęciu terapii w odstępach około 3–4 tygodni. W przypadku analiz w punkcie początkowym czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) mierzono od pierwszego pobrania krwi do rozpoznania progresji na podstawie skanów TK i/lub klinicznych objawów podmiotowych i przedmiotowych, zaś całkowity czas przeżycia (OS) mierzono od pierwszego pobrania krwi do zgonu. W przypadku analiz w okresie kontrolnym PFS mierzono od kontrolnego pobrania krwi do rozpoznania progresji lub zgonu, a OS mierzono od czasu kontrolnego pobrania krwi do zgonu.

Tabela 12: Dane demograficzne pacjentów z mCRC

Kategoria		N=430 pacjentów
Wiek w punkcie początkowym (w latach)	Średnia ± odchylenie standardowe (mediana)	63,0 ± 12,6 (64)
Czas do przerzutu (w latach)	Średnia ± odchylenie standardowe (mediana)	0,9 ± 1,4 (0,1)
	Opis kategorii	Liczba pacjentów (% łącznej liczby)
Płeć	Kobieta	192 (45%)
	Mężczyzna	238 (55%)
Rasa	Biała	305 (71%)
	Czarna	44 (10%)
	Inna	12 (3%)
	Brak danych	69 (16%)
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym	0	196 (46%)
	1	187 (43%)
	2	31 (7%)
	Nieznany	16 (4%)
Rodzaj guza w pierwotnym rozpoznaniu	Okrężnicy	292 (68%)
	Odbytnicy	71 (17%)
	Jelita grubego	66 (15%)
	Nieznany	1 (0%)
Stadium w pierwotnym rozpoznaniu	1	12 (3%)
	2	45 (11%)
	3	118 (27%)
	4	232 (54%)
	Nieznane	23 (5%)
Przerzuty do wątroby	Nie	117 (27%)
	Tak	313 (73%)
Linia terapii	1. linia	309 (72%)
	2. linia	95 (22%)
	3. linia	26 (6%)
Rodzaj terapii	Bewacyzumab	243 (56%)
	Irynotekan	103 (24%)
	Oksaliplatyna	253 (59%)
	Brak danych	25 (6%)

2.1 Częstość oznaczania CTC

Spośród całkowitej liczby 430 pacjentów z mCRC, od 9 pobrano krew w punkcie początkowym i nie pobierano krwi w okresie kontrolnym. Czterech spośród tych 9 pacjentów zmarło przed pobraniem krwi w okresie kontrolnym, dwóch wykluczono z leczenia z powodu reakcji toksyczności spowodowanej leczeniem, u jednego pacjenta wykonano operację w celu usunięcia mierzalnej zmiany chorobowej, jeden pacjent odmówił dalszego leczenia, a jeden pacjent odmówił dalszego pobierania krwi. Od 362, 342, 321 i 211 spośród pozostałych pacjentów pobrano krew w okresie kontrolnym odpowiednio po 1–2 tygodniach, 3–5 tygodniach, 6–12 tygodniach i 13–20 tygodniach od rozpoczęcia leczenia. Różnica w liczbie pacjentów możliwych do oceny pod kątem PFS i OS w każdym punkcie czasowym wynika z progresji choroby u niektórych pacjentów przed pobraniem krwi, podczas gdy różnica w liczbie pacjentów w każdym punkcie czasowym wynika z liczby pacjentów, u których pobierano krew i uzyskiwano możliwe do oceny wyniki CTC.

Tabela 13 przedstawia liczbę pacjentów w każdym punkcie czasowym wyłączonych z analiz PFS, OS lub PFS i OS oraz powody ich wykluczenia.

Tabela 13: Wyłączenia z analizy czasu przeżycia bez progresji choroby i całkowitego czasu przeżycia u pacjentów z mCRC

Harmonogram pobrań krwi	Przyczyny wykluczenia z analiz pacjentów z mCRC:						Łączna liczba pacjentów z mCRC możliwych do oceny:	
	PFS i OS				Tylko PFS	Tylko OS		
	Krew niepobrana	Pobranie krwi w 1–7 dniu po zastosowaniu leczenia	Brak kontroli po dacie pobrania krwi	Wyniki CTC niemożliwe do oceny	Krew pobrana po dacie progresji choroby	Brak kontroli po dacie pobrania krwi	PFS	OS
Punkt początkowy	1	11	0	5	0	0	413	413
1–2 tygodnie	68	0	0	5	1	0	356	357
3–5 tygodni	88	0	1	8	4	0	329	333
6–12 tygodni	109	0	4	7	26	0	284	310
13–20 tygodni	219	0	9	8	14	1	180	193

Wyniki CTC uzyskane z kontrolnych pobrań krwi po okresie 1–2 tygodni, 3–5 tygodni, 6–12 tygodni oraz 13–20 tygodni od rozpoczęcia leczenia klasyfikowano jako korzystne (< 3 CTC) lub niekorzystne (≥ 3 CTC). Jeśli uzyskano więcej niż jeden wynik CTC w dowolnym wyznaczonym kontrolnym punkcie czasowym, wykorzystywano wynik CTC z pobierania krwi w punkcie najbardziej oddalonym od pobrania krwi w punkcie początkowym.

W **tabeli 15** podsumowano całkowitą liczbę i odsetek pacjentów z mCRC z niekorzystnym wynikiem CTC w badaniu klinicznym, które różnią się od liczby i odsetka pacjentów w odniesieniu do czasu przeżycia bez progresji choroby przedstawionego w **tabeli 14**.

2.2 Analiza czasu przeżycia bez progresji choroby (PFS) pacjentów z mCRC

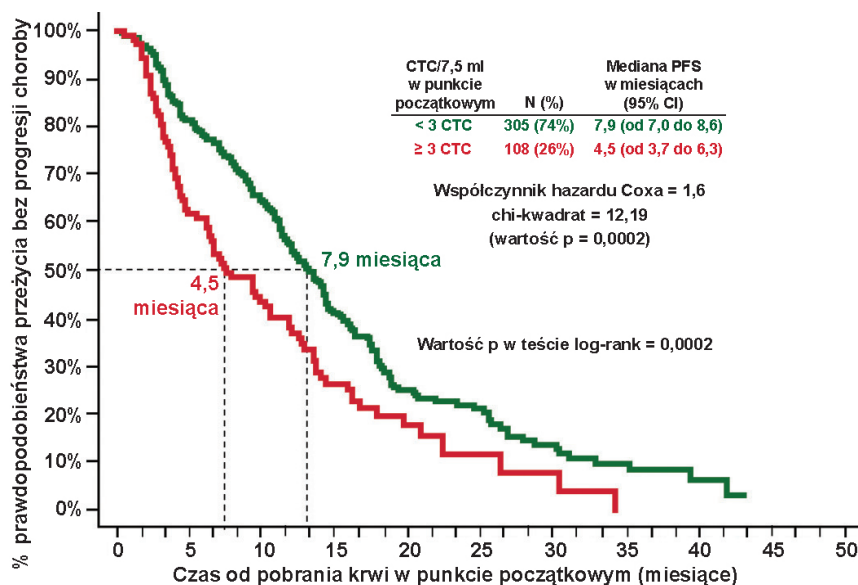
2.2.1 PFS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym

U 413 spośród 430 pacjentów z mCRC dostępny był wynik CTC w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera pacjentów podzielono na dwie grupy na podstawie wyniku CTC w punkcie początkowym:

- Grupa z wynikiem korzystnym (N = 305), oznaczona kolorem **zielonym**, składała się z pacjentów z liczbą CTC < 3.
- Grupa z wynikiem niekorzystnym (N=108), oznaczona kolorem **czerwonym**, składała się z pacjentów z liczbą CTC ≥ 3.

Mediana PFS w grupie z korzystnymi wynikami była znacznie dłuższa niż w grupie z wynikami niekorzystnymi (odpowiednio 7,9 w porównaniu do 4,5 miesiąca). Wyniki te przedstawiono na **rysunku 11** i w **tabeli 14**.

Rysunek 11: PFS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w punkcie początkowym (N = 413).



2.2.2 PFS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych

W analizie Kaplana-Meiera pacjentów z mCRC podzielono na dwie grupy w oparciu o liczbę CTC z poszczególnych kontrolnych pobrań krwi. PFS obu grup pacjentów w poszczególnych punktach czasowych kontrolnego pobierania krwi po rozpoczęciu leczenia przedstawiono na **rysunku 12**. Okresy PFS były obliczane od czasu każdego pobrania krwi, a każdy pacjent wykazujący oznaki progresji przed konkretnym pobraniem krwi był wykluczany z analizy i wszystkich kolejnych kontrolnych pobrań krwi. **Rysunek 12** przedstawia możliwość przewidzenia czasu PFS u pacjentów z mCRC na podstawie wyniku CTC wynoszącego < 3 lub ≥ 3 CTC w okresie 1–2 tygodni, 3–5 tygodni, 6–12 tygodni oraz 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii.

- Grupa z korzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **oliwkowym**, **granatowym**, **fioletowym** oraz **niebieskim**, składała się z pacjentów z wynikiem CTC < 3,
- Grupa z niekorzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **brązowym**, **czarnym**, **szarym** i **pomarańczowym**, składała się z pacjentów z wynikiem CTC ≥ 3.

Rysunek 12: PFS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego

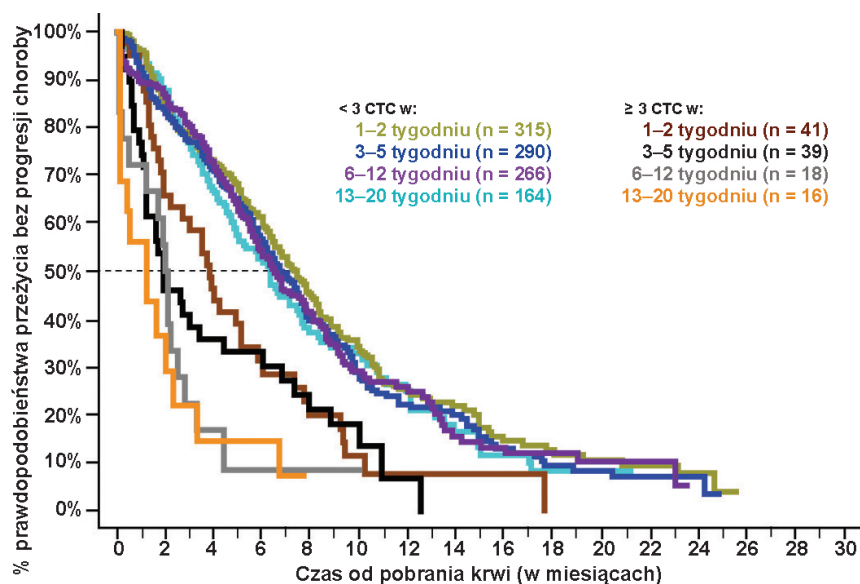


Tabela 14 podsumowuje wyniki analizy PFS przy użyciu poziomów CTC i progu ≥ 3 CTC/7,5 ml w każdym z różnych punktów czasowych pobierania krwi.

Tabela 14: Czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w różnych punktach czasowych

1	2	3	4	5	6
Czas próbkowania po rozpoczęciu Tx	N	≥ 3 CTC	Mediana PFS w miesiącach (95% CI)		Wartość p w teście log-rank
			< 3 CTC	≥ 3 CTC	
Punkt początkowy	413	108 (26%)	7,9 (7,0–8,6)	4,5 (3,7–6,3)	0,0002
1–2 tygodnie	356	41 (12%)	7,3 (6,5–8,1)	3,8 (1,9–5,1)	< 0,0001
3–5 tygodni	329	39 (12%)	6,8 (6,1–7,6)	1,9 (1,2–4,4)	< 0,0001
6–12 tygodni	284	18 (6%)	6,5 (5,8–7,7)	2,0 (0,5–2,5)	< 0,0001
13–20 tygodni	180	16 (9%)	6,3 (4,9–7,4)	1,2 (0,1–2,3)	< 0,0001

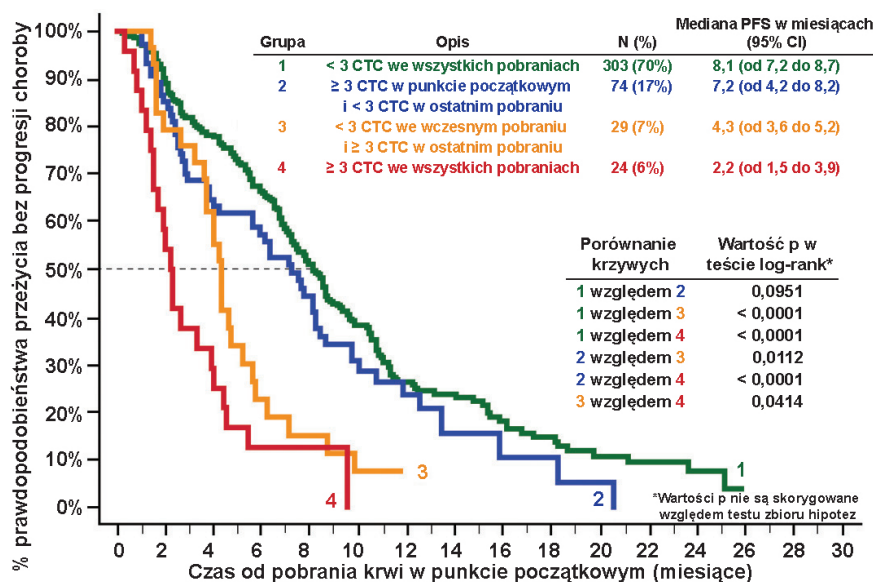
Jak pokazano na **rysunku 12** i w **tabeli 14**, pacjenci z mCRC z podwyższonym CTC (≥ 3 CTC/7,5 ml w krwi pełnej) w dowolnym punkcie czasowym wykazywali znacznie większe prawdopodobieństwo szybkiej progresji niż pacjenci z CTC < 3. Kolumna 4 **tabeli 14** pokazuje, że mediana czasu PFS u pacjentów z CTC < 3 wynosiła od 6,3 do 7,9 miesięcy i była znacznie dłuższa niż mediana czasu PFS u pacjentów z CTC ≥ 3, która wahała się od 1,2 do 4,5 miesiąca (kolumna 5).

2.2.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy PFS

Czas PFS liczono od pobrania krwi w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera (**rysunek 13**) pacjentów z mCRC podzielono na cztery grupy w oparciu o wynik CTC w punkcie początkowym oraz 1–2 tygodni, 3–5 tygodni, 6–12 tygodni i 13–20 tygodni od rozpoczęcia terapii:

- Grupa 1 (**zielona** krzywa), 303 (70%) pacjentów z CTC < 3 we wszystkich punktach czasowych. U siedmiu (2%) z tych pacjentów uzyskano wynik ≥ 3 CTC tylko w punkcie początkowym, a u ośmiu (3%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi;
- Grupa 2 (**granatowa** krzywa), 74 (17%) pacjentów z liczbą CTC ≥ 3 przed rozpoczęciem terapii, u których doszło do obniżenia CTC do < 3 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 3 (**pomarańczowa** krzywa), 29 (7%) pacjentów z CTC < 3 we wczesnych pobraniach krwi (punkt początkowy, 1–2 tygodni i/lub 3–5 tygodni), u których doszło do zwiększenia CTC do ≥ 3 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 4 (**czzerwona** krzywa), 24 (6%) pacjentów z CTC ≥ 3 we wszystkich punktach czasowych. U trojga (13%) z tych pacjentów uzyskano wynik < 3 CTC tylko w punkcie początkowym, u jednego (4%) tylko po 3–5 tygodniach, a u jednego (4%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi.

Rysunek 13: Obniżenie liczby CTC poniżej 3 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy PFS u pacjentów z mCRC



Rysunek 13 pokazuje, że pacjenci z mCRC z CTC ≥ 3 we wszystkich punktach czasowych (grupa 4) mieli najkrótszą medianę PFS, która była znacząco różna od mediany PFS grupy 3, grupy 2 i grupy 1. Różnica pod względem mediany PFS między pacjentami, u których wystąpiła redukcja liczby CTC po rozpoczęciu terapii (grupa 2), była znacznie dłuższa w porównaniu z pacjentami, którzy wykazali wzrost CTC (grupa 3).

2.3 Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) pacjentów z mCRC

2.3.1 Analiza OS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym

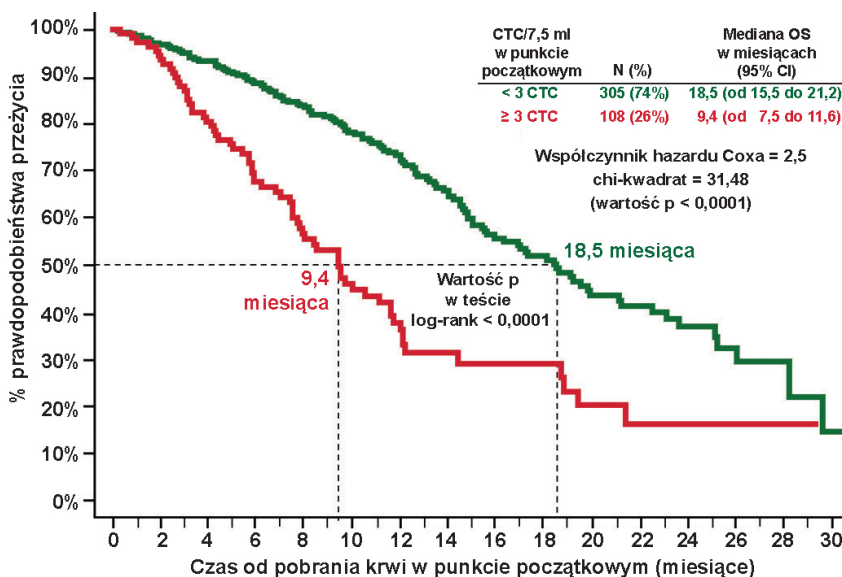
Zgon nastąpił u 202 (47%) z 430 pacjentów z mCRC, ze średnim okresem kontrolnym w przypadku 228 pozostających nadal przy życiu pacjentów (53%) wynoszącym $12,6 \pm 6,5$ miesiąca (mediana = 11,0, zakres = od 0,8 do 30,0). W czasie tych analiz zmarło 124 (41%) z 305 pacjentów z grupy z korzystnym wynikiem (< 3 CTC w punkcie początkowym) w porównaniu z 68 (63%) ze 108 z grupy z wynikiem niekorzystnym (≥ 3 CTC w punkcie początkowym).

Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera pacjentów podzielono na dwie grupy na podstawie wyniku CTC w punkcie początkowym:

- Grupa z wynikiem korzystnym (N = 305), oznaczona kolorem **zielonym**, składała się z pacjentów z liczbą CTC < 3.
- Grupa z wynikiem niekorzystnym (N=108), oznaczona kolorem **czerwonym**, składała się z pacjentów z liczbą CTC ≥ 3.

Mediana OS była znacznie dłuższa w grupie korzystnych wyników w porównaniu z grupą wyników niekorzystnych (odpowiednio 18,5 w stosunku do 9,4 miesiąca). Wyniki te przedstawiono na rysunku 14.

Rysunek 14: OS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w punkcie początkowym (N = 413).



2.3.2 OS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych

Analizy Kaplana-Meiera dla obu grup pacjentów z mCRC w poszczególnych punktach czasowych pobierania krwi w okresie kontrolnym po rozpoczęciu terapii przedstawiono na **rysunku 15**. Ten rysunek przedstawia możliwość przewidzenia czasu do zgonu u 421 pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego na podstawie wyniku CTC wynoszącego < 3 lub ≥ 3 CTC w okresie 1–2 tygodni, 3–5 tygodni, 6–12 tygodni oraz 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii. Czas OS liczono od każdego pobrania krwi.

- Grupa z korzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **oliwkowym, granatowym, fioletowym** oraz **niebieskim**, składała się z pacjentów z wynikiem CTC < 3,
- Grupa z niekorzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **brązowym, czarnym, szarym** i **pomarańczowym**, składała się z pacjentów z wynikiem CTC ≥ 3.

Rysunek 15: OS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.

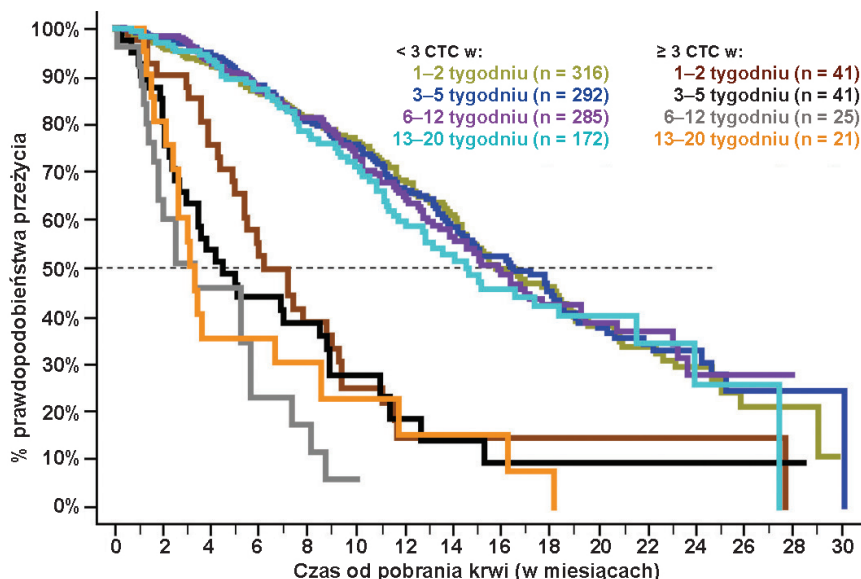


Tabela 15 podsumowuje wyniki analizy OS na podstawie poziomów CTC i progu ≥ 3 CTC/7,5 ml w każdym z różnych punktów czasowych pobierania krwi.

Tabela 15: Całkowity czas przeżycia (OS) w przypadku pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w różnych punktach czasowych

1	2	3	4	5	6
Czas próbkowania po rozpoczęciu Tx	N	≥ 3 CTC	Mediana OS w miesiącach (95% CI)		Wartość p w teście log-rank
			< 3 CTC	≥ 3 CTC	
Punkt początkowy	413	108 (26%)	18,5 (15,5–21,2)	9,4 (7,5–11,6)	< 0,0001
1–2 tygodnie	357	41 (11%)	15,7 (14,3–18,4)	6,1 (4,9–8,9)	< 0,0001
3–5 tygodni	333	41 (12%)	16,4 (14,1–18,3)	4,4 (2,6–8,7)	< 0,0001
6–12 tygodni	310	25 (8%)	15,8 (13,8–19,2)	3,3 (1,8–5,6)	< 0,0001
13–20 tygodni	193	21 (11%)	14,6 (12,0–21,5)	3,3 (2,4–8,5)	< 0,0001

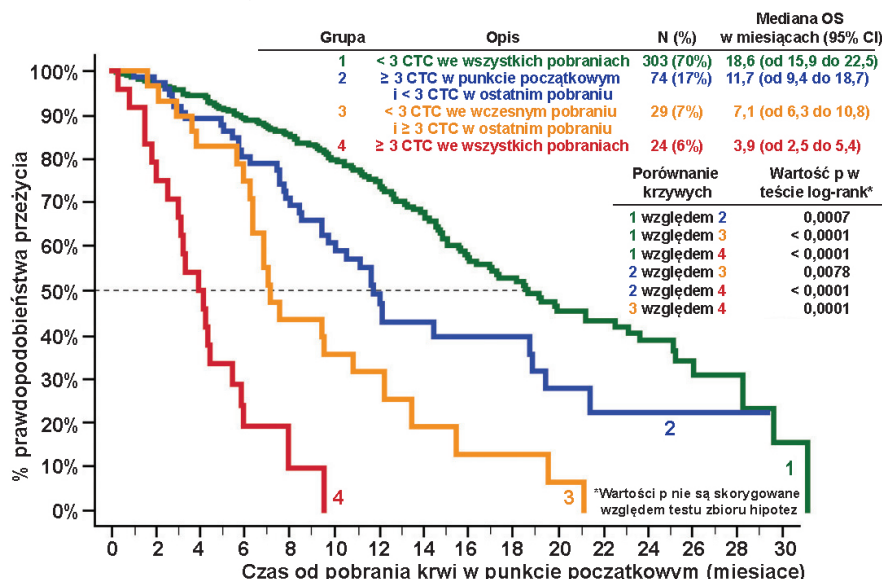
Jak pokazano na **rysunku 15** i w **tabeli 15**, w kolumnie 4 i 5, pacjenci z mCRC z ≥ 3 CTC w dowolnych punktach czasowych wykazywali znacznie większe prawdopodobieństwo wcześniejszego zgonu niż pacjenci z liczbą CTC < 3. Mediana czasu OS dla tych pacjentów z CTC < 3 mieściła się w zakresie od 14,6 do 18,5 miesięcy i była znacznie dłuższa niż mediana czasu OS u pacjentów z CTC ≥ 3, która wahała się od 3,3 do 9,4 miesiąca.

2.3.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy OS

Czas OS liczono od pobrania krwi w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera (**rysunek 16**) pacjentów z mCRC podzielono na cztery grupy w oparciu o wynik CTC w punkcie początkowym oraz 1–2 tygodni, 3–5 tygodni, 6–12 tygodni i 13–20 tygodni od rozpoczęcia terapii:

- Grupa 1 (**zielona** krzywa), 303 (70%) pacjentów z CTC < 3 we wszystkich punktach czasowych. U siedmiu (2%) z tych pacjentów uzyskano wynik ≥ 3 CTC tylko w punkcie początkowym, a u ośmiu (3%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi;
- Grupa 2 (**granatowa** krzywa), 74 (17%) pacjentów z liczbą CTC ≥ 3 przed rozpoczęciem terapii, u których doszło do obniżenia CTC do < 3 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 3 (**pomarańczowa** krzywa), 29 (7%) pacjentów z CTC < 3 we wczesnych pobraniach krwi (punkt początkowy, 1–2 tygodni i/lub 3–5 tygodni), u których doszło do zwiększenia CTC do ≥ 3 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 4 (**czerwona** krzywa), 24 (6%) pacjentów z CTC ≥ 3 we wszystkich punktach czasowych. U trójga (13%) z tych pacjentów uzyskano wynik < 3 CTC tylko w punkcie początkowym, u jednego (4%) tylko po 3–5 tygodniach a u jednego (4%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi.

Rysunek 16: Obniżenie liczby CTC poniżej 3 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy OS u pacjentów z mCRC, zaś wzrost liczby CTC do 3 lub więcej prognozuje krótszy OS



Rysunek 16 pokazuje, że u pacjentów z mCRC, którzy przekroczyli próg 3 CTC w dowolnym momencie po rozpoczęciu terapii, występowało znacznie większe prawdopodobieństwo wcześniejszego zgonu. Pacjenci z CTC ≥ 3 we wszystkich punktach czasowych (**grupa 4**) mieli najkrótszą medianę OS, która była znacząco różna od mediany OS **grupy 3**, **grupy 2** i **grupy 1**. Pacjenci z CTC < 3 we wszystkich punktach czasowych (**grupa 1**) mieli najdłuższą medianę OS, która była znacząco różna od mediany OS **grupy 4**, **grupy 3** i **grupy 2**. Rysunek 16 pokazuje również, że u pacjentów, którzy wykazali spadek CTC (**grupa 2**), ryzyko zgonu było znacząco niższe niż u pacjentów ze wzrostem CTC (**grupa 3**).

2.3.4 Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z mCRC

W celu oceny związku z PFS i OS wykonano jednoczynnikową analizę regresji Coxa następujących parametrów: płeć, stadium choroby w momencie rozpoznania (1–4), czas do przerzutu (ciągły), wiek pacjenta (≥ 65 lub < 65), lokalizacja choroby pierwotnej (jelito grube, odbytnica lub okrężnica), wynik w skali ECOG przed rozpoczęciem nowej linii terapii (0–2), linia terapii (1, 2 lub 3), obecność przerzutów do wątroby (tak lub nie), rodzaj terapii (z podawaniem bewacyzumabu, irynotekanu i/lub oksaliplatyny lub bez nich), wynik CTC w punkcie początkowym (≥ 3 lub < 3 CTC/7,5 ml) i wynik CTC w okresie kontrolnym, w 1–2 tygodniu, 3–5 tygodniu, 6–12 tygodniu i 13–20 tygodniu po rozpoczęciu leczenia (≥ 3 lub < 3 CTC/7,5 ml).

Tabela 16 przedstawia wyniki tej analizy oraz przedstawia współczynnik hazardu Coxa (HR) oraz powiązaną wartość p (test Walda statystyki Z), a także liczbę pacjentów wchodzących w zakres każdej oceny.

Tabela 16: Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z mCRC

Parametr	Kategorie		Liczba pacjentów z mCRC	PFS: ryzyko w punkcie początkowym		OS: ryzyko w punkcie początkowym	
	Wynik dodatni	Wynik ujemny		HR	Wartość p	HR	Wartość p
Płeć	Męczyzna (1)	Kobieta (0)	430	1,01	0,944	1,23	0,156
Stadium w pierwotnym rozpoznaniu	4 lub 3 lub 2 lub 1		407	0,98	0,734	1,09	0,330
Czas do przerzutu	Czas w latach		428	1,00	0,901	0,92	0,121
Wiek podczas pobrania krwi w punkcie początkowym	≥ 65 roku życia	< 65 roku życia	430	1,65	< 0,001	1,82	< 0,001
Lokalizacja pierwotnej choroby	Jelito grube (2) lub odbytnica (1) lub okrężnica (0)		429	1,03	0,733	1,02	0,866
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym	2 lub 1 lub 0		414	1,32	0,002	1,65	< 0,001
Linia terapii	3 lub 2 lub 1		430	2,04	< 0,001	1,63	< 0,001
Przerzuty do wątroby	Tak	Nie	430	0,86	0,225	1,23	0,198
Bewacyzumab	Tak	Nie	405	0,54	< 0,001	0,62	0,001
Irynotekan	Tak	Nie	405	1,51	0,001	1,39	0,029
Oksaliplatyna	Tak	Nie	405	0,53	< 0,001	0,69	0,008
Liczba CTC w punkcie początkowym	≥ 3	< 3	413	1,59	< 0,001	2,48	< 0,001
Liczba CTC po 1–2 tygodniach	≥ 3	< 3	357	2,02	< 0,001	3,23	< 0,001
Liczba CTC po 3–5 tygodniach	≥ 3	< 3	334	2,19	< 0,001	4,23	< 0,001
Liczba CTC po 6–12 tygodniach	≥ 3	< 3	314	4,59	< 0,001	10,88	< 0,001
Liczba CTC po 13–20 tygodniach	≥ 3	< 3	203	5,07	< 0,001	4,88	< 0,001

2.3.5 Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z mCRC

Przeprowadzono analizy danych metodą wieloczynnikowej regresji Coxa w celu oceny niezależnej mocy predykcyjnej wyniku CTC poprzez skorygowanie o wpływ znanych ważnych czynników klinicznych, które są istotne statystycznie w analizach jednoczynnikowych. Wynik CTC okazał się silnym czynnikiem rokowniczym PFS i OS (tabela 17).

Tabela 17: Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z mCRC

Zmienna	N	PFS: ryzyko w punkcie początkowym		OS: ryzyko w punkcie początkowym	
		Współczynnik hazardu	Wartość p	Współczynnik hazardu	Wartość p
CTC w punkcie początkowym (< 3 lub ≥ 3)	373	1,76	< 0,001	2,46	< 0,001
Wiek w punkcie początkowym (< 65 lub ≥ 65)		1,47	0,002	1,84	< 0,001
Stan ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		1,16	0,107	1,48	0,001
Linia terapii (1. lub 2. lub 3.)		1,59	< 0,001	1,41	0,009
Bewacyzumab (Nie/Tak)		0,65	0,001	0,68	0,021
Irynotekan (Nie/Tak)		0,76	0,156	1,25	0,363
Oksaliplatyna (Nie/Tak)		0,57	0,002	1,00	0,984
CTC po 1–2 tygodniach (< 3 lub ≥ 3)	321	1,76	0,003	2,77	< 0,001
Wiek w punkcie początkowym (< 65 lub ≥ 65)		1,53	0,001	1,85	< 0,001
Stan ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		1,26	0,025	1,54	0,001
Linia terapii (1. lub 2. lub 3.)		1,76	< 0,001	1,62	0,001
Bewacyzumab (Nie/Tak)		0,66	0,003	0,77	0,156
Irynotekan (Nie/Tak)		0,67	0,066	1,25	0,402
Oksaliplatyna (Nie/Tak)		0,53	0,002	0,97	0,904
CTC po 3–5 tygodniach (< 3 lub ≥ 3)	302	2,35	< 0,001	4,54	< 0,001
Wiek w punkcie początkowym (< 65 lub ≥ 65)		1,58	0,001	2,06	< 0,001
Stan ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		1,16	0,149	1,33	0,032
Linia terapii (1. lub 2. lub 3.)		1,74	< 0,001	1,65	0,001
Bewacyzumab (Nie/Tak)		0,68	0,007	0,86	0,410
Irynotekan (Nie/Tak)		0,58	0,012	0,99	0,966
Oksaliplatyna (Nie/Tak)		0,47	< 0,001	0,88	0,594
CTC po 6–12 tygodniach (< 3 lub ≥ 3)	279	3,04	< 0,001	9,43	< 0,001
Wiek w punkcie początkowym (< 65 lub ≥ 65)		1,43	0,013	1,73	0,005
Stan ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		1,30	0,027	1,53	0,004
Linia terapii (1. lub 2. lub 3.)		1,73	< 0,001	1,20	0,282
Bewacyzumab (Nie/Tak)		0,61	0,001	0,82	0,337
Irynotekan (Nie/Tak)		0,78	0,258	1,47	0,181
Oksaliplatyna (Nie/Tak)		0,62	0,020	1,35	0,278
CTC po 13–20 tygodniach (< 3 lub ≥ 3)	186	4,50	< 0,001	4,97	< 0,001
Wiek w punkcie początkowym (< 65 lub ≥ 65)		1,26	0,218	1,55	0,061
Stan ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		1,13	0,417	1,13	0,526
Linia terapii (1. lub 2. lub 3.)		1,68	0,004	1,12	0,628
Bewacyzumab (Nie/Tak)		0,68	0,058	0,89	0,655
Irynotekan (Nie/Tak)		0,73	0,311	1,20	0,636
Oksaliplatyna (Nie/Tak)		0,65	0,135	1,31	0,477

2.4 Zastosowanie oznaczeń komórek CTC do monitorowania stanu klinicznego w przerzutowym raku jelita grubego

2.4.1 Związek między przeżyciem, CTC i oceną choroby w obrazowaniu

Obrazowanie radiologiczne jest jednym z podstawowych sposobów określania stadium choroby i odpowiedzi na leczenie pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego. Aby określić zależność między stanem klinicznym ustalonym w obrazowaniu a liczbą CTC, porównano wyniki CTC oznaczane w dwóch różnych punktach czasowych oraz wyniki obrazowania 1) z rzeczywistym ostatecznym klinicznym całkowitym czasem przeżycia oraz 2) względem siebie.

2.4.2 CTC

Poprzednie dane wykazały, że u pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego ≥ 3 CTC/7,5 ml krwi przy każdym badaniu kontrolnym po rozpoczęciu leczenia prawdopodobieństwo progresji choroby i krótszego całkowitego czasu przeżycia było większe niż u pacjentów z < 3 CTC/7,5 ml krwi. Wyniki CTC uzyskane 3–5 tygodni od rozpoczęcia terapii, jak również wyniki CTC uzyskane w ciągu $\pm$ jednego miesiąca od badania obrazowego sklasyfikowano jako korzystne (< 3 CTC) i niekorzystne (≥ 3 CTC). Jeżeli w ciągu $\pm$ jednego miesiąca od badania obrazowego uzyskano więcej niż jedną wartość CTC, do obliczeń używano wyniku CTC uzyskanego najbliżej daty badania obrazowego.

2.4.3 Obrazowanie

U każdego pacjenta z mCRC choroba musiała być mierzalna, tzn. występowała co najmniej jedna zmiana o wielkości 2 cm do maksymalnie 10 takich zmian. Metoda obrazowania każdego pacjenta została określona przez onkologa prowadzącego leczenie zgodnie z aktualnym standardem opieki. Wykonano tomografię komputerową lub rezonans magnetyczny klatki piersiowej, brzucha i narządów miednicy, przy czym postawiono wymóg, aby wszystkie zmiany obserwowane w punkcie początkowym śledzić tą samą metodą przy wszystkich kolejnych badaniach obrazowych. Obrazy interpretował certyfikowany radiolog w ośrodku badawczym przy użyciu kryteriów jednowymiarowych RECIST w celu sklasyfikowania każdej kontrolnej oceny choroby jako odpowiedź całkowita (CR), odpowiedź częściowa (PR), choroba stabilna (SD) lub progresja (PD).

Każdy pacjent był obrazowany w co najmniej dwóch punktach czasowych i maksymalnie 8 różnych punktach czasowych. Badania te obejmowały: obraz w punkcie początkowym, obrazowanie w kolejnych odstępach 2–3 miesięcy (6–12 tygodni) i końcowe badanie obrazowe, gdy pacjent kończył uczestnictwo w badaniu. Kopie wszystkich badań obrazowych pacjentów przekazano koordynatorowi badania w każdym ośrodku klinicznym w celu złożenia dokumentacji danych klinicznych pacjenta.

Spśród całkowitej liczby 430 możliwych do oceny pacjentów z mCRC włączonych do badania, u 28 (7%) nie wykonano kontrolnego badania obrazowego, 18 (4%) zmarło przed wykonaniem kontrolnego badania obrazowego i u 384 (89%) przeprowadzono jedno lub więcej kontrolne badanie obrazowe, które oceniono według kryteriów RECIST. W czasie pierwszego badania kontrolnego u 384 pacjentów, u których wykonano kontrolne badanie obrazowe, u 4 pacjentów (1%) stwierdzono odpowiedź całkowitą, u 117 (31%) stwierdzono odpowiedź częściową, u 186 (48%) stwierdzono chorobę stabilną, a u 77 (20%) stwierdzono progresję. Na potrzeby tych analiz uznano, że u pacjentów, którzy zmarli przed kontrolnym badaniem obrazowym, występowała progresja.

W celu oceny odpowiedzi na leczenie podczas pierwszej kontrolnej oceny choroby korzystną grupę zdefiniowano jako grupę z chorobą stabilną (S), odpowiedzią częściową (PR) lub odpowiedzią całkowitą (CR) według kryteriów RECIST (brak progresji, NPD), a grupę niekorzystną, jako osoby z progresją lub które zmarły (PD).

2.4.4 Związek między przeżyciem, obrazowaniem i CTC

Oddzielne analizy Kaplana-Meiera przeprowadzono w celu porównania całkowitego czasu przeżycia pacjentów z mCRC w grupach korzystnej (< 3 CTC) i niekorzystnej (≥ 3 CTC) przy użyciu wyników CTC w dwóch różnych punktach czasowych i pierwszym obrazowaniu kontrolnym. W przypadku wyników z pierwszego obrazowania kontrolnego wykonanego $9,1 \pm 2,9$ tygodnia (mediana = 8,6 tygodnia) po rozpoczęciu leczenia (tzn. pobranie krwi w punkcie początkowym), mediana przeżycia u 307 pacjentów (76%), u których w obrazowaniu stwierdzono NPD, wynosiła 19,1 miesiąca (95% CI od 17,0 do 23,1) (**rysunek 17, tabela 18**). W przypadku 95 pacjentów (24%), u których w obrazowaniu stwierdzono PD, mediana czasu przeżycia wynosiła 5,8 miesiąca (95% CI od 4,4 do 7,7).

W sumie u 320 pacjentów z mCRC przeprowadzono badania obrazowe przed rozpoczęciem leczenia i po nim lub pacjenci zmarli przed wykonaniem badania kontrolnego oraz oznaczono CTC 3–5 tygodni po rozpoczęciu leczenia (średnia = $3,8 \pm 0,7$ tygodnia od czasu pobrania krwi w punkcie początkowym, mediana = 4,0 tygodni). Mediana przeżycia u 282 pacjentów (88%) z korzystnymi wynikami CTC (< 3 CTC) wynosiła 17,3 miesiąca (95% CI = od 15,0 do 19,5 miesiąca) (**rysunek 18, tabela 18**). U 38 pacjentów (12%) z niekorzystnymi wynikami CTC (≥ 3 CTC) mediana przeżycia wynosiła 5,4 miesiąca (95% CI od 3,6 do 9,4 miesiąca).

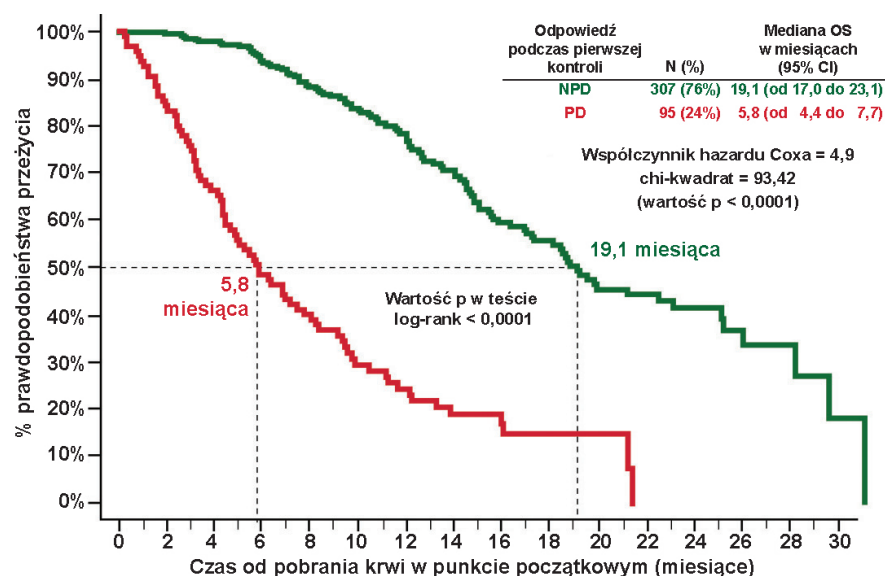
Aby ustalić, czy oceny CTC dokonane w okresie bliższym terminowi obrazowania dały podobne szanse przeżycia w porównaniu z ocenami CTC wykonanymi około 4 tygodni po rozpoczęciu terapii, dokonano analizy tylko w przypadku pacjentów, u których CTC oznaczono w ciągu $\pm$ jednego miesiąca od pierwszego obrazowania kontrolnego (**rysunek 19, tabela 18**). U 364 z 402 pacjentów (91%) oznaczono CTC w ciągu jednego miesiąca od pierwszego kontrolnego badania obrazowego, które zostało wykonane $9,0 \pm 2,9$ tygodnia (mediana = 8,5 tygodnia) po rozpoczęciu terapii. Mediana przeżycia u 335 pacjentów (92%) z korzystnymi wynikami CTC wynosiła 17,2 miesiąca (95% CI od 15,0 do 19,2 miesiąca). W przypadku 29 pacjentów (8%) z niekorzystnymi wynikami CTC mediana przeżycia wynosiła 5,4 miesiąca (95% CI = od 3,2 do 7,5 miesiąca). Dane te pokazały, że oceny CTC w obu punktach czasowych dają podobne wyniki do obrazowania przeprowadzonego około 9 tygodni po rozpoczęciu terapii.

W tym badaniu zastosowanie wieloczynnikowej analizy regresji Coxa w celu skorygowania o wyniki obrazowania wykazało, że zarówno CTC, jak i obrazowanie po 6–12 tygodniach są niezależnie związane z całkowitym czasem przeżycia, ale wyniki CTC [skorygowany współczynnik hazardu: 7,9 (4,6–13,6)] są silniejszym czynnikiem prognostycznym niż obrazowanie [skorygowany współczynnik hazardu: 3,1 (2,1–4,6)].

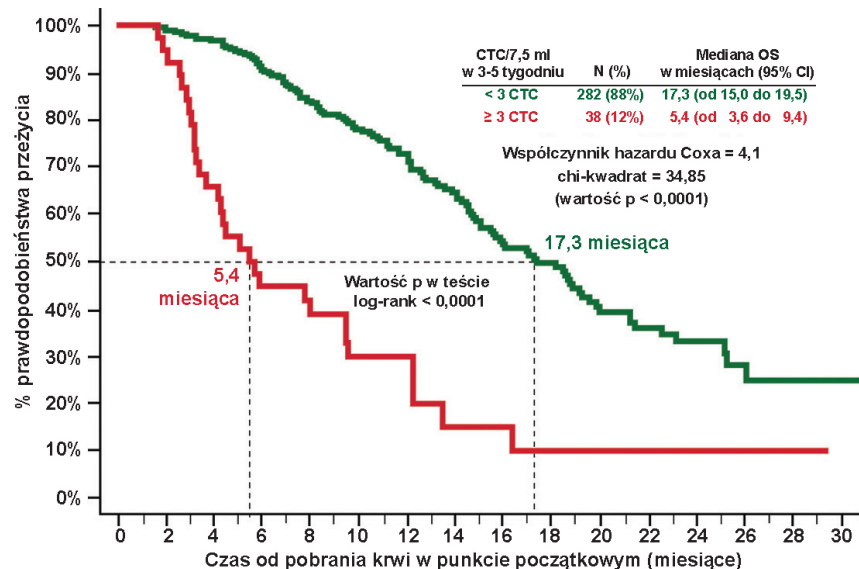
Tabela 18: OS u pacjentów z mCRC, u których ocenę CTC przeprowadzono około miesiąca po rozpoczęciu leczenia oraz w ciągu jednego miesiąca od oceny radiologicznej

	N	Mediana czasu przeżycia i (95% CI) w miesiącach
A. Obrazowanie	402	
Wynik korzystny (NPD)	307 (76%)	19,1 (17,0–23,1)
Wynik niekorzystny (PD)	95 (24%)	5,8 (4,4–7,7)
B. CTC po 3–5 tygodniach	320	
Wynik korzystny (< 3 CTC)	282 (88%)	17,3 (15,0–19,5)
Wynik niekorzystny (≥ 3 CTC)	38 (12%)	5,4 (3,6–9,4)
C. CTC (± 1 miesiąc od obrazowania)	364	
Wynik korzystny (< 3 CTC)	335 (92%)	17,2 (15,0–19,2)
Wynik niekorzystny (≥ 3 CTC)	29 (8%)	5,4 (3,2–7,5)

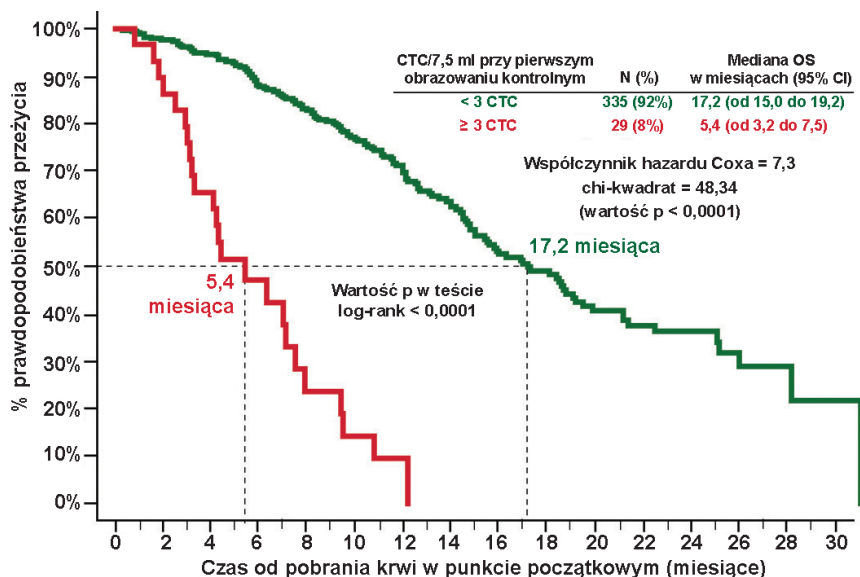
Rysunek 17: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentów z mCRC z NPD lub PD w pierwszym obrazowaniu kontrolnym (N=402)



Rysunek 18: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC podczas pierwszej wizyty kontrolnej po rozpoczęciu terapii (N = 320)



Rysunek 19: Korelacja oceny radiologicznej i CTC z OS: OS u pacjentów z mCRC z < 3 lub ≥ 3 CTC w ciągu ± 1 miesiąca od pierwszego obrazowania kontrolnego lub zgon (N = 364)



2.4.5 Zgodność między liczbą komórek CTC a monitorowaniem radiologicznym u pacjentów z mCRC

Jak wspomniano powyżej, badania obrazowe są istotnym elementem obecnego standardu opieki do określenia postępu choroby i odpowiedzi na leczenie w przypadku przerzutowego raka jelita grubego. Aby przedstawić kolejne dowody na użyteczność CTC w dokonywaniu tych ocen klinicznych, skonstruowano tabele porównujące parami zgodne i niezgodne wyniki oznaczenia CTC i obrazowania radiologicznego.

W celu oceny odpowiedzi na leczenie korzystną grupę zdefiniowano jako grupę z chorobą stabilną (S), odpowiedzią częściową (PR) lub odpowiedzią całkowitą (CR) według kryteriów RECIST (brak progresji, NPD), a grupę niekorzystną, jako osoby z progresją (PD). Spośród 18 pacjentów, którzy zmarli przed kontrolnym badaniem obrazowym, u 10 wykonano kontrolne pobranie krwi w ciągu 30 dni poprzedzających zgon i dla celów porównawczych tych 10 pacjentów sklasyfikowano jako pacjentów z progresją (PD).

Wyniki CTC uzyskane w ciągu ± jednego miesiąca od badania obrazowego sklasyfikowano jako korzystne (< 3 CTC) i niekorzystne (≥ 3 CTC). Jeżeli w ciągu ± jednego miesiąca od badania obrazowego uzyskano więcej niż jedną wartość CTC, do obliczeń używano wyniku CTC uzyskanego najbliższej daty badania obrazowego. W analizie wykorzystano wszystkie możliwe do oceny pobrania krwi od pacjentów w celu dopasowania CTC do badań obrazowych, a nie tylko te, które zostały wybrane dla wyznaczonych punktów czasowych, jak opisano w punkcie 2.1 powyżej.

W sumie u 366 pacjentów z mCRC uzyskano wyniki CTC w ciągu jednego miesiąca od badania obrazowego lub zgonu. Rezultaty tego porównania wyników CTC i obrazowania (lub zgonu) u poszczególnych pacjentów podsumowano w **tabeli 19**.

Tabela 19: Porównanie CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentów z mCRC

Odpowiedź przy pierwszym kontrolnym badaniu obrazowym	CTC w ciągu ± 1 miesiąca od badania obrazowego lub zgon		Łącznie
	< 3 CTC/7,5 ml	≥ 3 CTC/7,5 ml	
Brak progresji	272	13	285
Progresja	65	16	81
Łącznie	337	29	366

Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	20%	12%	30%
Zgodność ujemna w %	95%	92%	98%
Dodatnia wartość predykcyjna	55%	36%	74%
Ujemna wartość predykcyjna	81%	76%	85%
Zgodność całkowita	79%	74%	83%
Iloraz szans	5,2	2,4	11,2

U 384 pacjentów z mCRC, u których wykonano jedno lub więcej kontrolne badanie obrazowe, wykonano łącznie 911 badań obrazowych, które dały użyteczną odpowiedź radiologiczną. W sumie dla 805 spośród 911 (88%) badań obrazowych uzyskano wyniki CTC w odstępie czasowym ± jednego miesiąca. Spośród 18 pacjentów, którzy zmarli przed kontrolnym badaniem obrazowym, u 10 wykonano kontrolne pobranie krwi w ciągu 30 dni poprzedzających zgon i dla celów porównawczych tych 10 pacjentów sklasyfikowano jako pacjentów z progresją (PD). Wynik tego porównania między CTC a obrazowaniem (lub zgonem) na podstawie 815 obserwacji przedstawiono w **tabeli 20**.

Tabela 20: Porównanie CTC i obrazowania na podstawie obserwacji mCRC

Odpowiedź przy wszystkich kontrolnych badaniach obrazowych	CTC w ciągu ± 1 miesiąca od badania obrazowego lub zgon		Łącznie
	< 3 CTC/7,5 ml	≥ 3 CTC/7,5 ml	
Brak progresji	597	33	630
Progresja	147	38	185
Łącznie	744	71	815

Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	21%	15%	27%
Zgodność ujemna w %	95%	93%	96%
Dodatnia wartość predykcyjna	54%	41%	65%
Ujemna wartość predykcyjna	80%	77%	83%
Zgodność całkowita	78%	75%	81%
Iloraz szans	4,7	2,8	7,7

W seryjnych obserwacjach odnotowano, że tylko niewielka liczba wyników obrazowania, wykazujących przejście od choroby bez progresji do choroby z progresją, zbiegała się w czasie ze zmianą wyników CTC z < 3 na ≥ 3 CTC/7,5 ml.

Ponieważ wartość prognostyczna wyników CTC we wcześniejszym punkcie czasowym była równoważna z wynikami CTC w momencie obrazowania (rysunek 18 i rysunek 19), dokonano porównania wszystkich pacjentów z wykorzystaniem wyników tylko z pierwszego kontrolnego badania obrazowego, przeprowadzonego około 9 tygodni po rozpoczęciu terapii, oraz wyników CTC uzyskanych około 4 tygodnie po rozpoczęciu terapii. W sumie u 320 (80%) z 402 pacjentów uzyskano wyniki CTC 3–5 tygodni po rozpoczęciu leczenia. Rezultaty porównania wyników CTC we wcześniejszym punkcie czasowym z wynikami obrazowania (lub zgonem) u poszczególnych pacjentów przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21: Porównanie CTC i obrazowania u poszczególnych pacjentów z mCRC

Odpowiedź przy pierwszym kontrolnym badaniu obrazowym	CTC 3-5 tygodni po rozpoczęciu terapii		Łącznie
	< 3 CTC/7,5 ml	≥ 3 CTC/7,5 ml	
Brak progresji	228	18	246
Progresja	54	20	74
Łącznie	282	38	320

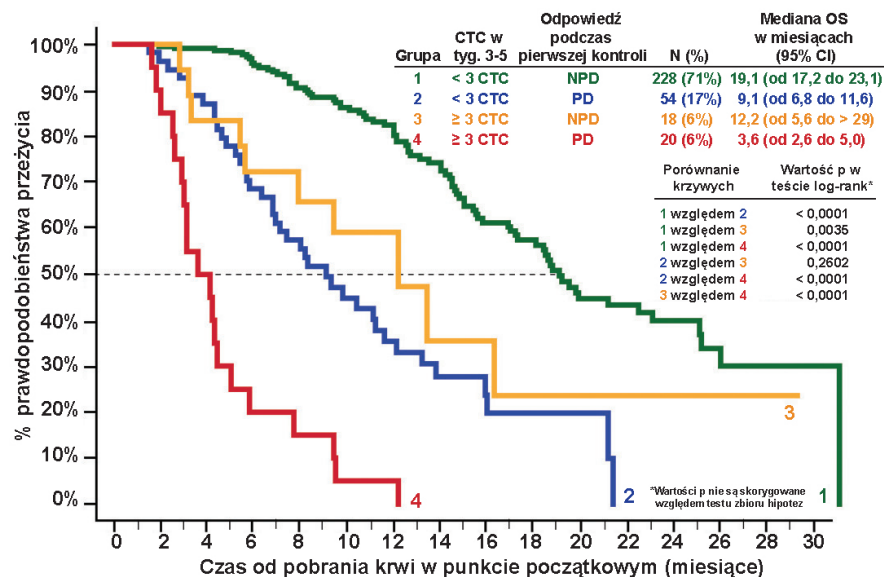
Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	27%	17%	39%
Zgodność ujemna w %	93%	89%	96%
Dodatnia wartość predykcyjna	53%	36%	69%
Ujemna wartość predykcyjna	81%	76%	85%
Zgodność całkowita	78%	73%	82%
Iloraz szans	4,7	2,3	9,5

2.4.6 CTC jako dodatek do obrazowania

Chociaż ogólna zgodność między CTC i obrazowaniem była dobra (około 78%), zgodność ta nie występowała u około 22% pacjentów z mCRC. Jako że oznaczenie CTC ma być stosowane w połączeniu z innymi metodami diagnostycznymi do podejmowania decyzji terapeutycznych, wyniki CTC około 3–5 tygodni po rozpoczęciu terapii i wyniki obrazowania porównano z OS w celu określenia, które z niezgodnych wyników lepiej odzwierciedlały rokowanie pacjentów (rysunek 20) w następujących grupach:

- Grupa 1 (zielona krzywa), 228 (71%) pacjentów z CTC < 3 po 3–5 tygodniach i z NPD;
- Grupa 2 (granatowa krzywa), 54 (17%) pacjentów z CTC < 3 po 3–5 tygodniach i z PD;
- Grupa 3 (pomarańczowa krzywa), 18 (6%) pacjentów z CTC ≥ 3 po 3–5 tygodniach i z NPD;
- Grupa 4 (czerwona krzywa), 20 (6%) pacjentów z CTC ≥ 3 po 3–5 tygodniach i z PD.

Rysunek 20: OS u pacjentów z mCRC w grupach 1, 2, 3 i 4 z zastosowaniem CTC 3–5 tygodni po rozpoczęciu terapii (n = 320) i stan choroby określony w pierwszym obrazowaniu kontrolnym



W tym badaniu oznaczenie CTC okazało się silnym niezależnym czynnikiem prognostycznym całkowitego czasu przeżycia. Wyniki badania wskazują, że kombinacja wyników CTC i ocen radiologicznych zapewniła najdokładniejszą ocenę rokowania.

3 Pacjenci z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego (MPC)

Przeprowadzono wieloośrodkowe prospektywne badanie kliniczne w celu określenia, czy wynik CTC pozwala prognozować progresję choroby i czas przeżycia. W tym badaniu pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego zdefiniowano jako tych, u których stwierdzono dwa kolejne wzrosty stężenia markera swoistego antygenu sterczowego (PSA) w surowicy powyżej poziomu referencyjnego, pomimo standardowego leczenia hormonalnego. Ci pacjenci są najczęściej opisywani jako mający niezależnego od androgenu, opornego na hormony lub na kastrację raka gruczołu krokowego. Do badania włączono 231 pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego, u których stwierdzono progresję PSA pomimo standardowej terapii hormonalnej i rozpoczęcia nowej linii lub rodzaju chemioterapii. Dane kliniczne analizowano w grupie przeznaczonej do leczenia (ITT). Dane demograficzne pacjentów przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22: Dane demograficzne pacjentów z MPC

Kategoria	Średnia ± odchylenie standardowe (mediana)	Liczba pacjentów
Wiek w punkcie początkowym (w latach)	70 ± 9 (70)	231
Wstępne leczenie:		
PSA (ng/ml)	547 ± 1616 (144)	231
Hemoglobina (g/dl)	12,3 ± 1,6 (12,4)	221
Fosfataza alkaliczna (ALP) (IU/ml)	235 ± 271 (144)	223
Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) (IU/ml)	293 ± 228 (224)	219
Albumina (g/dl)	3,9 ± 2,6 (3,8)	214
	Opis kategorii	Liczba pacjentów (% łącznej liczby)
Rasa	Biała	209 (90%)
	Czarna	17 (7%)
	Inna	5 (3%)
Wynik w skali ECOG w punkcie początkowym	0	101 (44%)
	1	100 (43%)
	2	21 (9%)
	Nieznany	9 (4%)
	≥ 5	18 (8%)
Wynik w skali Gleasona	6	28 (12%)
	7	63 (27%)
	8	45 (20%)
	≥ 9	54 (23%)
	Nieznany	23 (10%)
	1	14 (6%)
Stadium w pierwotnym rozpoznaniu	2	30 (13%)
	3	58 (25%)
	4	19 (8%)
	Nieznane	110 (48%)
Linia terapii	1.	154 (67%)
	2.	38 (16%)
	≥ 3.	39 (17%)
Czy w obecnej linii leczenia stosowany jest lek Taxotere?	Nie	67 (29%)
	Tak	162 (70%)
	Brak danych	2 (1%)
Przerzuty do kości	Nie	20 (8%)
	Tak	207 (90%)
	Brak danych	4 (2%)
Mierzalna choroba	Nie	142 (62%)
	Tak	88 (38%)
	Brak danych	1 (0%)
Przerzuty do narządów trzewnych	Nie	141 (61%)
	Tak	89 (39%)
	Brak danych	1 (0%)

Miano CTC w punkcie początkowym oznaczono przed rozpoczęciem nowej linii chemioterapii. Do oceny wybrano następujące ramy czasowe: badanie w punkcie początkowym (przed rozpoczęciem leczenia), 2–5 tygodni (14–41 dni od badania w punkcie początkowym), 6–8 tygodni (42–62 dni od badania w punkcie początkowym), 9–12 tygodni (63–90 dni od badania w punkcie początkowym) i 13–20 tygodni (91–146 dni od badania w punkcie początkowym) po rozpoczęciu terapii. Jeśli w wyznaczonych przedziałach czasowych przypadło więcej niż jedno pobranie krwi, jako wynik dla każdego przedziału czasowego użyto wyników z pobrania krwi najbardziej odległego czasowo od badania w punkcie początkowym.

3.1 Częstość oznaczania CTC

Od wszystkich 231 możliwych do oceny pacjentów z MPC pobrano krew w punkcie początkowym. U 221 z tych pacjentów z MPC wykonano jedno lub więcej kontrolne pobranie krwi po rozpoczęciu terapii. Spośród dziesięciu pacjentów z MPC, od których pobrano krew tylko w punkcie początkowym, trzech zmarło przed kontrolnym pobraniem krwi, u jednego doszło do progresji choroby i wysłano go do hospicjum, jeden przerwał chemioterapię z powodu złamania biodra, jeden wyprowadził się, trzech odmówiło zgody na dalsze pobieranie krwi i jeden pacjent wycofał zgodę na uczestnictwo w badaniu. Łącznie od 214, 171, 158 i 149 pacjentów z MPC pobrano krew w okresie kontrolnym odpowiednio 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni i 13–20 tygodni po rozpoczęciu leczenia.

W przerzutowym raku gruczołu krokowego progresję choroby określa się głównie na podstawie zmian PSA. W tym badaniu progresję choroby określano na podstawie lokalizacji, wykorzystując oznaczenie PSA, obrazowanie i/lub kliniczne objawy podmiotowe i przedmiotowe. W przypadku analiz w punkcie początkowym czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) liczono od czasu pobrania krwi w punkcie początkowym do progresji lub zgonu, a całkowity czas przeżycia (OS) określono od czasu pobrania krwi w punkcie początkowym do daty zgonu lub daty ostatniego kontaktu z pacjentem. W przypadku analiz w okresie kontrolnym PFS liczono od kontrolnego pobrania krwi do rozpoznania progresji lub zgonu, a OS mierzono od czasu kontrolnego pobrania krwi do daty zgonu albo daty ostatniego kontaktu z pacjentem. Pacjenci z progresją choroby przed datą oceny pobranej próbki

krwi zostali wykluczeni z analiz PFS w tym punkcie czasowym i wszystkich kolejnych kontrolnych pobranych krwi. Pacjenci bez dodatkowego badania kontrolnego przeżycia po dacie oceny pobranej próbki krwi zostali wykluczeni z analiz PFS i OS w tym punkcie czasowym. **Tabela 23** przedstawia liczbę pacjentów w każdym punkcie czasowym wyłączonych z analiz PFS lub PFS i OS oraz powody ich wykluczenia.

Tabela 23: Wyłączenia z analizy PFS i OS u pacjentów z MPC

Harmonogram pobrań krwi	Pacjenci z MPC nienadający się do oceny:					Łączna liczba możliwych do oceny pacjentów z MPC	
	PFS i OS				Tylko PFS		
	Krew niepobrana	Pobranie krwi w 1–7 dniu po zastosowaniu leczenia	Brak kontroli po dacie pobrania krwi	Wyniki CTC niemożliwe do oceny lub brak wyników CTC	Krew pobrana po dacie progresji choroby	PFS	OS
Punkt początkowy	0	6	0	6	0	219	219
2–5 tygodni	17	0	0	11	4	199	203
6–8 tygodni	60	0	0	8	22	141	163
9–12 tygodni	73	1	0	8	15	134	149
13–20 tygodni	82	0	1	5	27	116	143

Wyniki CTC uzyskane z pobrania krwi w punkcie początkowym i kontrolnych pobranych krwi 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni oraz 13–20 tygodni po rozpoczęciu leczenia klasyfikowano jako korzystne (< 5 CTC) lub niekorzystne (≥ 5 CTC). Stężenia PSA, fosfatazy alkalicznej i LDH podsumowane w tabeli demograficznej i wykorzystane w analizach zostały oznaczone w centralnym laboratorium w próbkach surowicy pobranych w tym samym czasie, co próbki krwi wykorzystane do oceny CTC. Stężenia hemoglobiny i albuminy podsumowane w tabelach i wykorzystane w analizach zostały podane przez ośrodki i zweryfikowane na podstawie dokumentacji medycznej pacjenta, która podlegała ocenie w ciągu ± 30 dni od oceny CTC w punkcie początkowym.

3.2 Analiza czasu przeżycia bez progresji choroby (PFS) pacjentów z MPC

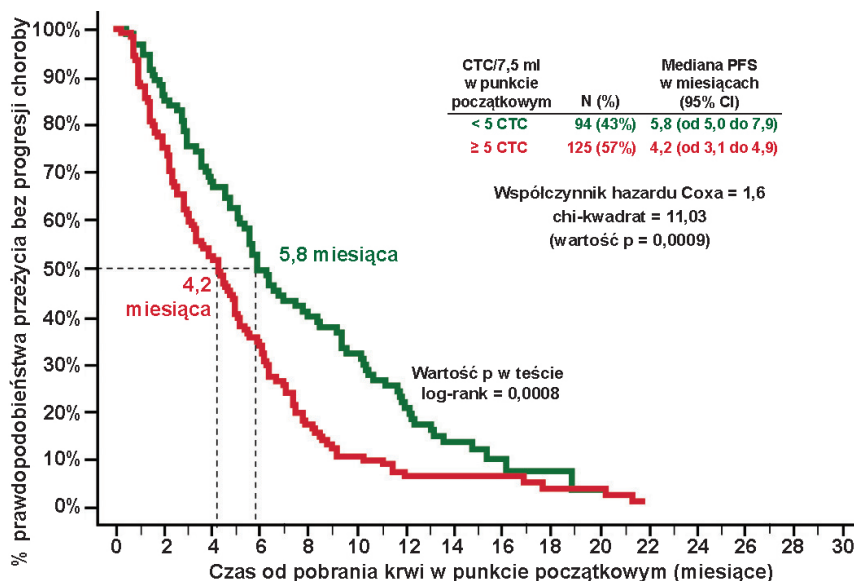
3.2.1 PFS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym

U 219 spośród 231 pacjentów możliwych do oceny dostępny był wynik CTC w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera pacjentów podzielono na dwie grupy na podstawie wyniku CTC w punkcie początkowym:

- Grupa z wynikiem korzystnym ($N = 94$), oznaczona kolorem **zielonym**, składała się z pacjentów z liczbą CTC < 5 .
- Grupa z wynikiem niekorzystnym ($N=125$), oznaczona kolorem **czerwonym**, składała się z pacjentów z liczbą CTC ≥ 5 .

Mediana PFS w grupie z korzystnymi wynikami była dłuższa niż w grupie z wynikami niekorzystnymi (odpowiednio 5,8 w porównaniu do 4,2 miesiąca). Wyniki te przedstawiono na **rysunku 21** i w **tabeli 24**.

Rysunek 21: PFS u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w punkcie początkowym ($N = 219$).



3.2.2 PFS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych

Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera pacjentów z MPC podzielono na dwie grupy w oparciu o liczbę CTC z poszczególnych kontrolnych pobranych krwi. PFS obu grup pacjentów w poszczególnych kontrolnych pobraniach krwi po rozpoczęciu leczenia przedstawiono na **rysunku 22**. Rysunek ten przedstawia możliwość przewidzenia czasu do progresji klinicznej lub zgonu u pacjentów z MPC na podstawie wyniku CTC wynoszącego < 5 lub ≥ 5 w okresie 2–5 tygodni ($n=199$), 6–8 tygodni ($n=141$), 9–12 tygodni ($n=134$) i 13–20 tygodni ($n=116$) po rozpoczęciu terapii.

- Grupa z korzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **oliwkowym, granatowym, fioletowym** oraz **niebieskim** składała się z pacjentów z wynikiem CTC < 5 odpowiednio 2–5, 6–8, 9–12 i 13–20 tygodni po rozpoczęciu leczenia.
- Grupa z niekorzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **brązowym, czarnym, szarym** oraz **pomarańczowym**, składała się z pacjentów z wynikiem CTC ≥ 5 odpowiednio 2–5, 6–8, 9–12 i 13–20 tygodni po rozpoczęciu leczenia.

Rysunek 22: PFS u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.

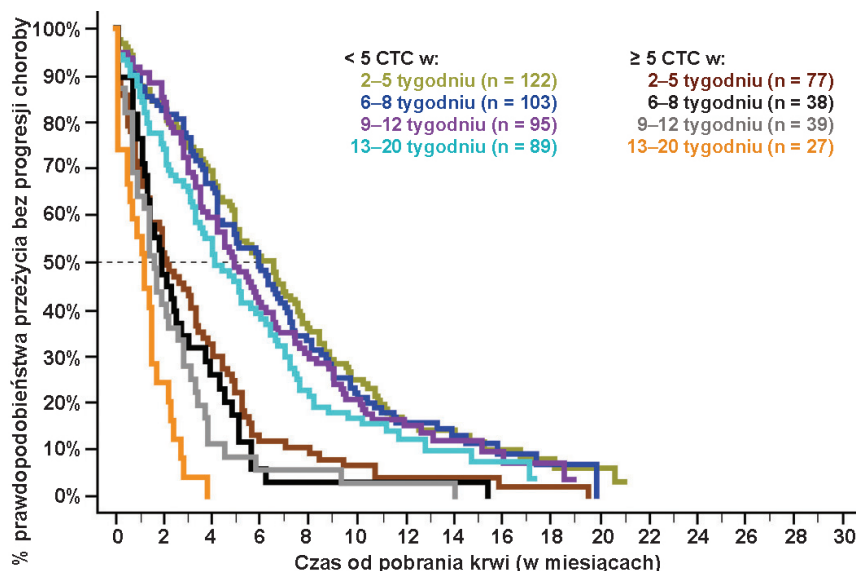


Tabela 24 podsumowuje wyniki analizy PFS przy użyciu poziomów CTC i progu > 5 CTC/7,5 ml w poszczególnych punktach czasowych pobierania krwi.

Tabela 24: Czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych

1	2	3	4	5	6
Czas próbkowania porozpoczęciu Tx	N	≥ 5 CTC	Mediana PFS w miesiącach (95% CI)		Wartość p w teście log-rank
			< 5 CTC	≥ 5 CTC	
Punkt początkowy	219	125 (57%)	5,8 (5,0–7,9)	4,2 (3,1–4,9)	0,0008
2–5 tygodni	199	77 (39%)	6,5 (4,9–7,4)	2,1 (1,4–3,3)	< 0,0001
6–8 tygodni	141	38 (27%)	5,9 (4,2–7,0)	1,9 (1,3–2,7)	< 0,0001
9–12 tygodni	134	39 (24%)	4,9 (3,8–6,2)	1,6 (0,9–2,6)	< 0,0001
13–20 tygodni	116	27 (23%)	4,1 (3,3–5,8)	1,2 (0,5–1,5)	< 0,0001

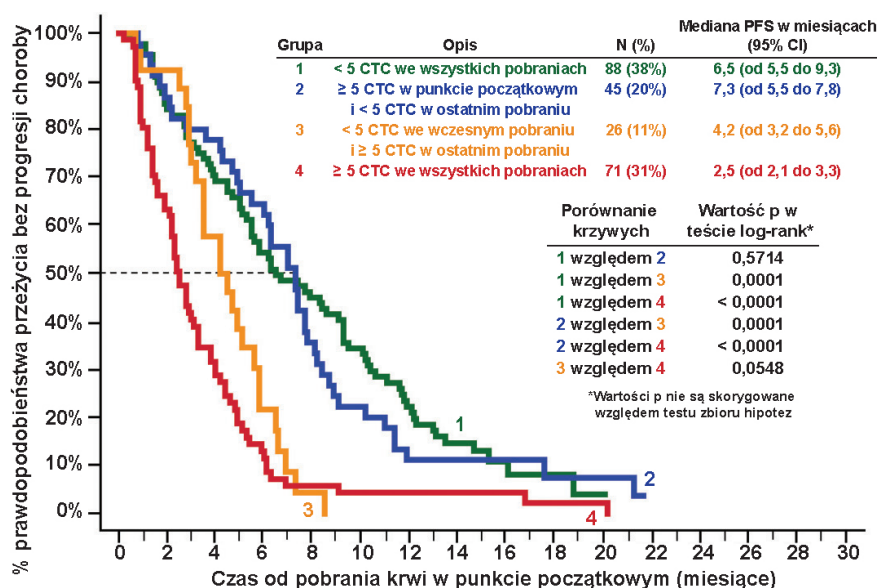
Jak pokazano na **rysunku 22** i w **tabeli 24**, pacjenci z MPC z podwyższonym CTC (≥ 5 CTC/7,5 ml w krwi pełnej) w dowolnym punkcie czasowym wykazywali znacznie większe prawdopodobieństwo szybkiej progresji niż pacjenci z < 5 CTC. Kolumna 4 **tabeli 24** pokazuje, że mediana czasu PFS u pacjentów z CTC < 5 wynosiła od 4,1 do 6,5 miesięcy i była znacznie dłuższa niż mediana czasu PFS u pacjentów z CTC ≥ 5, która wahała się od 1,2 do 4,2 miesiąca (kolumna 5).

3.2.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy PFS

Czas PFS liczono od pobrania krwi w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera (**rysunek 23**) pacjentów z MPC podzielono na cztery grupy w oparciu o wynik CTC w punkcie początkowym oraz 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni i 13–20 tygodni od rozpoczęcia terapii:

- Grupa 1 (**zielona** krzywa), 88 (38%) pacjentów z CTC < 5 we wszystkich punktach czasowych. U pięciu (6%) z tych pacjentów uzyskano wynik ≥ 5 CTC tylko w punkcie początkowym, a u siedmiu (8%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi;
- Grupa 2 (**granatowa** krzywa), 45 (20%) pacjentów z liczbą CTC ≥ 5 przed rozpoczęciem terapii, u których doszło do obniżenia CTC do < 5 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 3 (**pomarańczowa** krzywa), 26 (11%) pacjentów z CTC < 5 we wczesnych pobraniach krwi (punkt początkowy, 2–5 tygodni i/lub 6–8 tygodni), u których doszło do zwiększenia CTC do ≥ 5 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 4 (**czerwona** krzywa), 71 (31%) pacjentów z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych pobrania krwi. U ośmiu (11%) z tych pacjentów uzyskano wynik < 5 CTC tylko w punkcie początkowym, a u dwóch (3%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi.

Rysunek 23: Obniżenie liczby CTC poniżej 5 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy PFS u pacjentów z MPC



Rysunek 23 pokazuje, że pacjenci z MPC z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych (grupa 4) mieli najkrótszą medianę PFS, która była znacząco różna od mediany PFS grupy 3, grupy 2 i grupy 1. Różnica pod względem mediany PFS między pacjentami, u których wystąpiła redukcja liczby CTC po rozpoczęciu terapii (grupa 2), była znacznie dłuższa w porównaniu z pacjentami, którzy wykazali wzrost CTC (grupa 3).

3.3 Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) pacjentów z MPC

3.3.1 Analiza OS na podstawie wyników CTC w punkcie początkowym

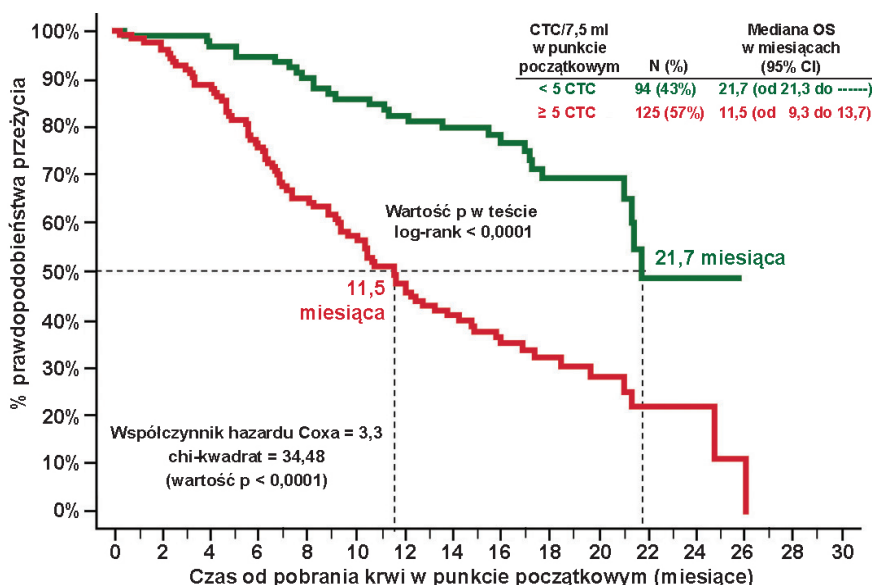
Zgon nastąpił u 119 (52%) z 231 pacjentów z MPC, ze średnim okresem kontrolnym w przypadku 112 pozostających nadal przy życiu pacjentów (48%) wynoszącym $16,1 \pm 4,9$ miesiąca (mediana = 16,5, zakres = od 1,9 do 25,7 miesiąca). W czasie tych analiz zmarło 28 (30%) z 94 pacjentów z grupy korzystnej (< 5 CTC w punkcie początkowym) w porównaniu z 83 (66%) z 125 z grupy niekorzystnej (≥ 5 CTC w punkcie początkowym).

Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera 219 z 231 pacjentów możliwych do oceny, u których uzyskano wyniki w punkcie początkowym, podzielono na dwie grupy na podstawie wyniku CTC w punkcie początkowym:

- Grupa z wynikiem korzystnym (N = 94), oznaczona kolorem **zielonym**, składała się z pacjentów z liczbą CTC < 5.
- Grupa z wynikiem niekorzystnym (N=125), oznaczona kolorem **czerwonym**, składała się z pacjentów z liczbą CTC ≥ 5.

Mediana OS była znacznie dłuższa w grupie korzystnych wyników niż w grupie wyników niekorzystnych (odpowiednio 21,7 w porównaniu do 11,5 miesiąca). Wyniki te przedstawiono na rysunku 24.

Rysunek 24: OS u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w punkcie początkowym (N = 219).



3.3.2 OS na podstawie wyników CTC z badań kontrolnych

Analizy Kaplana-Meiera dla obu grup pacjentów z MPC w poszczególnych kontrolnych punktach czasowych pobierania krwi po rozpoczęciu terapii przedstawiono na **rysunku 25**. Ten rysunek przedstawia możliwość przewidzenia czasu do zgonu u pacjentów z MPC na podstawie wyniku CTC wynoszącego < 5 lub ≥ 5 CTC w okresie 2–5 tygodni (n=203), 6–8 tygodni (n=163), 9–12 tygodni (n=149) i 13–20 (n=143) tygodni po rozpoczęciu terapii. Czas OS liczono od każdego pobrania krwi.

- Grupa z korzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **oliwkowym, granatowym, fioletowym** oraz **niebieskim**, składała się z pacjentów z wynikiem CTC < 5,
- Grupa z niekorzystnym wynikiem, oznaczona kolorem **brązowym, czarnym, szarym** i **pomarańczowym**, składała się z pacjentów z wynikiem CTC ≥ 5.

Rysunek 25: OS u pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych okresu kontrolnego.

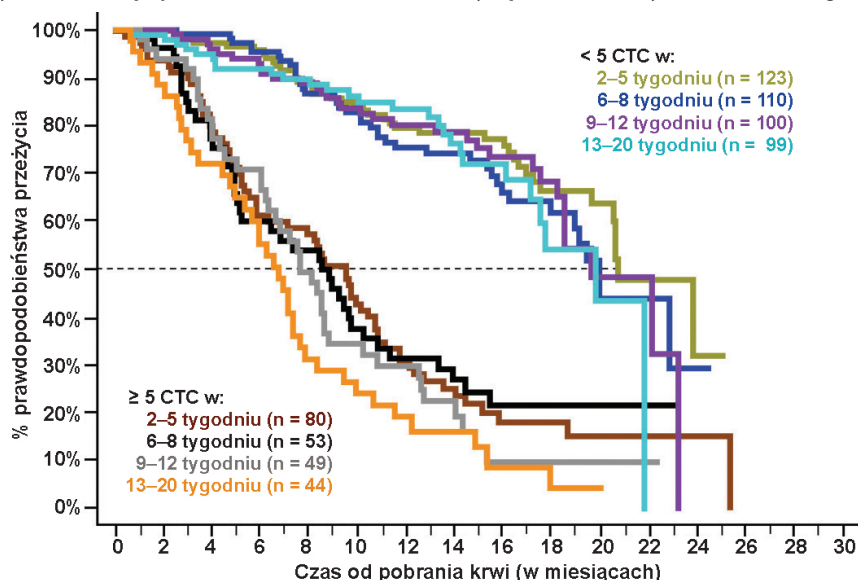


Tabela 25 podsumowuje wyniki analizy OS na podstawie poziomów CTC i progu ≥ 5 CTC/7,5 ml w każdym z różnych punktów czasowych pobierania krwi.

Tabela 25: Całkowity czas przeżycia (OS) pacjentów z MPC z < 5 lub ≥ 5 CTC w różnych punktach czasowych

1	2	3	4	5	6
Czas próbkowania po rozpoczęciu Tx	N	≥ 5 CTC	Mediana OS w miesiącach (95% CI)		Wartość p w teście log-rank
			< 5 CTC	≥ 5 CTC	
Punkt początkowy	219	125 (57%)	21,7 (21,3 – NR)	11,5 (9,3-13,7)	< 0,0001
2–5 tygodni	203	80 (39%)	20,7 (20,5 – NR)	9,5 (5,8-10,7)	< 0,0001
6–8 tygodni	163	53 (33%)	19,9 (17,9 – NR)	8,5 (5,0-10,2)	< 0,0001
9–12 tygodni	149	49 (33%)	19,6 (18,5 – NR)	7,6 (6,2-8,6)	< 0,0001
13–20 tygodni	143	44 (31%)	19,8 (17,1 – NR)	6,7 (4,9-7,6)	< 0,0001

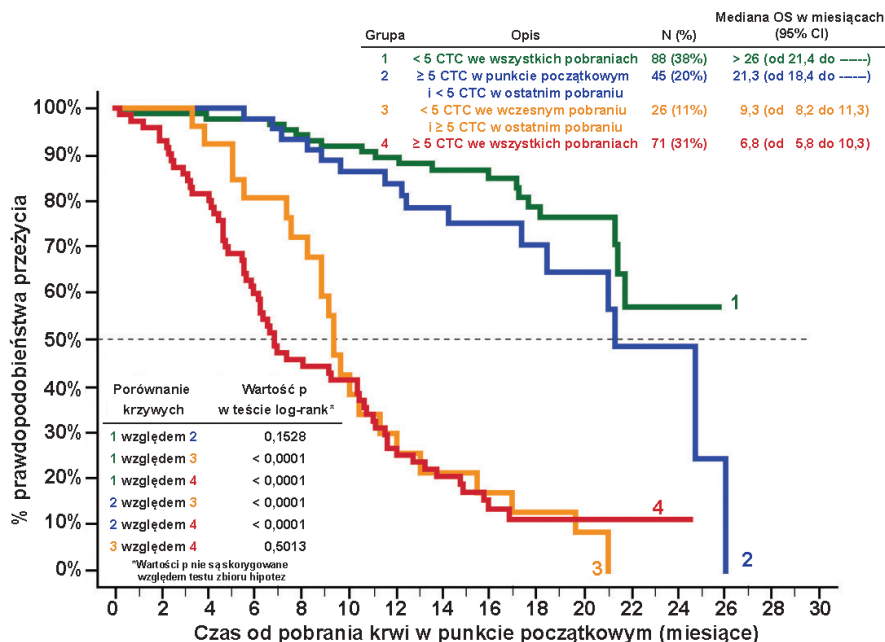
Jak pokazano na **rysunku 25** i w **tabeli 25**, w kolumnie 4 i 5, pacjenci z MPC z ≥ 5 CTC w dowolnych punktach czasowych wykazywali znacznie większe prawdopodobieństwo wcześniejszego zgonu niż pacjenci z liczbą CTC < 5. Mediana okresu OS u tych pacjentów z CTC < 5 mieściła się w zakresie od 19,6 do 21,7 miesięcy i była znacznie dłuższa niż mediana okresu OS u pacjentów z CTC ≥ 5, która wahała się od 6,7 do 11,5 miesięcy.

3.3.3 Zmniejszenie lub zwiększenie liczby CTC prognozuje dłuższy lub krótszy OS

Czas OS liczono od pobrania krwi w punkcie początkowym. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera (**rysunek 26**) pacjentów podzielono na cztery grupy w oparciu o wynik CTC w punkcie początkowym oraz 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni i 13–20 tygodni od rozpoczęcia terapii:

- Grupa 1 (**zielona** krzywa), 88 (38%) pacjentów z CTC < 5 we wszystkich punktach czasowych. U pięciu (6%) z tych pacjentów uzyskano wynik ≥ 5 CTC tylko w punkcie początkowym, a u siedmiu (8%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi;
- Grupa 2 (**granatowa** krzywa), 45 (20%) pacjentów z liczbą CTC ≥ 5 przed rozpoczęciem terapii, u których doszło do obniżenia CTC do < 5 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 3 (**pomarańczowa** krzywa), 26 (11%) pacjentów z CTC < 5 we wczesnych pobraniach krwi, u których doszło do zwiększenia CTC do ≥ 5 przy ostatnim pobraniu krwi;
- Grupa 4 (**czerwona** krzywa), 71 (31%) pacjentów z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych pobrania krwi. U ośmiu (11%) z tych pacjentów uzyskano wynik < 5 CTC tylko w punkcie początkowym, a u dwóch (3%) – tylko raz pomiędzy pierwszym i ostatnim pobraniem krwi.

Rysunek 26: Obniżenie liczby CTC poniżej 5 po rozpoczęciu terapii prognozuje dłuższy OS u pacjentów z MPC, zaś wzrost liczby CTC do 5 lub więcej prognozuje krótszy OS



Rysunek 26 pokazuje, że u tych pacjentów, u których stwierdzono ≥ 5 CTC w dowolnym momencie po rozpoczęciu terapii, występowało znacznie większe prawdopodobieństwo wcześniejszego zgonu. Pacjenci z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych (**grupa 4**) mieli najkrótszą medianę OS, która była znacząco różna od mediany OS **grupy 2** i **grupy 1**, ale nie **grupy 3**. Pacjenci z CTC < 5 we wszystkich punktach czasowych (**grupa 1**) mieli najdłuższą medianę OS, która była znacząco różna od mediany OS **grupy 4** i **grupy 3**, ale nie **grupy 2**. **Rysunek 26** również pokazał, że u pacjentów, u których stwierdzono spadek liczby CTC (**grupa 2**), szanse na przeżycie zwiększały się i ich mediana OS była podobna, jak w przypadku pacjentów z korzystnym CTC podczas wszystkich pobrań (**grupa 1**). Rysunek pokazuje również, że niekorzystne poziomy CTC po rozpoczęciu terapii znacząco zmniejszały całkowity czas przeżycia (**grupa 3** i **grupa 4**).

3.3.4 Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentów MPC

Zastosowano analizę regresyjną modeli hazardu proporcjonalnego Coxa do oceny związku następujących parametrów przed leczeniem z PFS i OS: analiza stadium choroby w momencie rozpoznania (1–4), wiek pacjenta (≥ 70 lub < 70 lat), wynik w skali ECOG przed rozpoczęciem nowej linii terapii (0–2), wynik w skali Gleasona (2–10), poziom hemoglobiny w ciągu ± 30 dni od pobrania krwi w punkcie początkowym (g/dl, ciągły), poziom albuminy w ciągu ± 30 dni od pobrania krwi w punkcie początkowym (g/dl, ciągły), poziom testosteronu w momencie pobrania krwi w punkcie początkowym (ng/ml, ciągły), poziom LDH w momencie pobrania krwi w punkcie początkowym (IU/ml, ciągły), poziom fosfatazy alkalicznej w momencie pobrania krwi w punkcie początkowym (IU/ml, ciągły), poziom PSA w momencie pobrania krwi w punkcie początkowym (ng/ml, ciągły), czas podwojenia PSA przed leczeniem (miesiące, ciągły), szybkość wzrostu PSA przed leczeniem (ng/ml/miesiąc, ciągły), linia leczenia (1, 2, 3, 4, 5 lub 6), rodzaj terapii (w tym włączenie Taxotere lub nie), obecność mierzalnej choroby (tak lub nie), obecność przerzutów do kości (tak lub nie), obecność przerzutów do narządów trzewnych (tak lub nie), poziom CTC w punkcie początkowym (≥ 5 CTC/7,5 ml lub < 5 CTC/7,5 ml) i wyniki CTC w okresie kontrolnym, po 2–5, 6–8, 9–12 i 13–20 tygodniach.

W przypadku tych analiz okres PFS i OS liczono od momentu pobrania krwi w punkcie początkowym. Wyniki regresji Coxa (tzn. współczynnik hazardu i związany z nim 95% przedział ufności, wartość chi-kwadrat i powiązane wartości p) dla możliwości wykorzystania parametrów do niezależnego przewidywania PFS i OS podano w **tabeli 26** razem z liczbą pacjentów w każdej ocenie.

Tabela 26: Analiza jednoczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z MPC

Parametr	Kategorie		Liczba pacjentów z MPC	PFS: ryzyko w punkcie początkowym		OS: ryzyko w punkcie początkowym	
	Wynik dodatni	Wynik ujemny		HR	Wartość p ²	HR	Wartość p ²
Stadium w pierwotnym rozpoznaniu	4 lub 3 lub 2 lub 1		121	0,88	0,206	0,83	0,174
Wiek podczas pobrania krwi w punkcie początkowym	≥ 70	< 70	231	0,96	0,764	1,28	0,178
Wynik w skali ECOG przy włączaniu do badania	2 lub 1 lub 0		222	1,34	0,011	2,36	< 0,001
Wynik w skali Gleasona	Od 10 do 2		208	1,01	0,919	1,02	0,717
Czas podwajania PSA przed leczeniem (miesiące)	Ciągłe		230	0,97	0,542	0,97	0,664
Szybkość wzrostu PSA przed leczeniem (ng/ml/miesiąc)	Ciągłe		230	1,00	0,200	1,00	0,544
Hemoglobina w punkcie początkowym (g/dl)	Ciągłe		221	0,87	0,002	0,71	< 0,001
Albumina w punkcie początkowym (g/dl)	Ciągłe		214	0,99	0,748	1,02	0,557
Testosteron w punkcie początkowym (ng/ml) ¹	Ciągłe		223	1,07	0,900	2,71	0,060
LDH w punkcie początkowym (IU/ml) ¹	Ciągłe		219	1,001	< 0,001	1,002	< 0,001
Fosfataza alkaliczna w punkcie początkowym (IU/ml) ¹	Ciągłe		223	1,00	0,158	1,0008	0,001
Linia terapii	Ciągłe (1-6)		231	1,23	0,003	1,28	0,003
Rodzaj terapii (Taxotere: Tak/Nie)	Tak	Nie	229	0,57	< 0,001	0,59	0,006
Mierzalna choroba	Tak	Nie	230	1,00	0,993	1,28	0,181
Czy występują przerzuty do kości?	Tak	Nie	227	1,02	0,933	2,22	0,057
Czy występują przerzuty do narządów trzewnych?	Tak	Nie	230	1,01	0,918	1,26	0,216
PSA w punkcie początkowym (ng/ml) ¹	Ciągłe		231	1,00	0,746	1,00	0,907
PSA po 2–5 tygodniach (ng/ml) ¹	Ciągłe		207	1,00	0,819	1,00	0,794
PSA po 6–8 tygodniach (ng/ml) ¹	Ciągłe		167	1,00	0,426	1,00	0,654
PSA po 9–12 tygodniach (ng/ml) ¹	Ciągłe		155	1,00	0,684	1,00	0,324
PSA po 13–20 tygodniach (ng/ml) ¹	Ciągłe		143	1,00	0,639	1,00	0,205
Obniżenie PSA po 2–5 tygodniach względem punktu początkowego (%) ¹	< 30%	≥ 30%	207	1,56	0,006	1,24	0,318
Obniżenie PSA po 6–8 tygodniach względem punktu początkowego (%) ¹	< 30%	≥ 30%	167	2,21	< 0,001	2,27	0,001
Obniżenie PSA po 9–12 tygodniach względem punktu początkowego (%) ¹	< 30%	≥ 30%	155	2,76	< 0,001	2,30	< 0,001
Obniżenie PSA po 13–20 tygodniach względem punktu początkowego (%) ¹	< 30%	≥ 30%	143	2,69	< 0,001	3,19	< 0,001
Liczba CTC w punkcie początkowym	≥ 5	< 5	219	1,62	0,001	3,33	< 0,001
Liczba CTC po 2–5 tygodniach	≥ 5	< 5	203	2,34	< 0,001	4,46	< 0,001
Liczba CTC po 6–8 tygodniach	≥ 5	< 5	163	3,29	< 0,001	3,66	< 0,001
Liczba CTC po 9–12 tygodniach	≥ 5	< 5	149	3,23	< 0,001	5,82	< 0,001
Liczba CTC po 13–20 tygodniach	≥ 5	< 5	144	4,82	< 0,001	7,18	< 0,001

¹ Oznaczono z surowicy pobranej w tym samym dniu co krew pobrana do oznaczenia CTC² Wartość p z testu Walda statystyki Z

3.3.5 Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z MPC

Przeprowadzono analizy danych metodą wieloczynnikowej regresji Coxa w celu oceny niezależnej mocy predykcyjnej wyniku CTC poprzez skorygowanie o wpływ znanych ważnych czynników klinicznych, które są istotne statystycznie w analizach jednoczynnikowych. Liczba CTC okazała się najsilniejszym czynnikiem prognostycznym PFS i OS (**tabela 27**) w większości punktów czasowych.

Tabela 27: Analiza wieloczynnikowej regresji Coxa u pacjentów z MPC

Parametr	Liczba pacjentów	PFS: ryzyko w punkcie początkowym		OS: ryzyko w punkcie początkowym	
		HR	Wartość p ²	HR	Wartość p ²
CTC w punkcie początkowym (< 5 lub ≥ 5)	188	1,14	0,455	1,92	0,009
ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		1,00	0,982	1,46	0,032
Hemoglobina w punkcie początkowym (g/dl) ³		0,88	0,027	0,81	0,007
LDH w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		1,0007	0,018	1,002	< 0,001
Fosfataza alkaliczna w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		---	---	1,00	0,410
Linia terapii (od 1. do 6.)		1,14	0,145	1,07	0,547
Rodzaj terapii (Taxotere: Tak/Nie)		0,63	0,009	0,70	0,139
CTC po 2–5 tygodniach (< 5 lub ≥ 5)	173	1,48	0,041	2,91	< 0,001
Obniżenie poziomu PSA po 2–5 tygodniach względem punktu początkowego (≥ 30% lub < 30%) ¹		1,40	0,077	1,13	0,637
ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		0,97	0,836	1,46	0,054
Hemoglobina w punkcie początkowym (g/dl) ³		0,93	0,246	0,89	0,141
LDH w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		1,002	0,002	1,003	< 0,001
Fosfataza alkaliczna w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		---	---	1,00	0,622
Linia terapii (od 1. do 6.)		1,11	0,274	1,11	0,399
Rodzaj terapii (Taxotere: Tak/Nie)		0,75	0,133	0,80	0,397
CTC po 6–8 tygodniach (< 5 lub ≥ 5)	139	2,14	< 0,001	2,13	0,009
Obniżenie poziomu PSA po 6–8 tygodniach względem punktu początkowego (≥ 30% lub < 30%) ¹		1,88	0,002	2,38	0,007
ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		1,04	0,810	1,52	0,088
Hemoglobina w punkcie początkowym (g/dl) ³		0,97	0,695	0,79	0,013
LDH w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		1,002	0,003	1,004	< 0,001
Fosfataza alkaliczna w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		---	---	1,00	0,780
Linia terapii (od 1. do 6.)		1,37	0,001	1,35	0,035
Rodzaj terapii (Taxotere: Tak/Nie)		0,80	0,278	1,45	0,276
CTC po 9–12 tygodniach (< 5 lub ≥ 5)	125	1,74	0,015	3,94	< 0,001
Obniżenie poziomu PSA po 9–12 tygodniach względem punktu początkowego (≥ 30% lub < 30%) ¹		2,23	< 0,001	1,46	0,221
ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		1,21	0,307	1,89	0,004
Hemoglobina w punkcie początkowym (g/dl) ³		0,93	0,322	0,97	0,758
LDH w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		1,00	0,190	1,003	< 0,001
Fosfataza alkaliczna w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		---	---	1,00	0,989
Linia terapii (od 1. do 6.)		1,25	0,052	1,11	0,499
Rodzaj terapii (Taxotere: Tak/Nie)		0,97	0,903	1,26	0,486
CTC po 13–20 tygodniach (< 5 lub ≥ 5)	123	2,95	< 0,001	3,75	0,001
Obniżenie poziomu PSA po 13–20 tygodniach względem punktu początkowego (≥ 30% lub < 30%) ¹		1,97	0,002	1,52	0,275
ECOG w punkcie początkowym (0 lub 1 lub 2)		0,98	0,919	1,98	0,002
Hemoglobina w punkcie początkowym (g/dl) ³		1,03	0,723	0,87	0,232
LDH w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		1,00	0,380	1,003	< 0,001
Fosfataza alkaliczna w punkcie początkowym (IU/ml) ^{1,3}		---	---	1,00	0,078
Linia terapii (od 1. do 6.)		1,25	0,050	1,06	0,751
Rodzaj terapii (Taxotere: Tak/Nie)		1,04	0,882	0,90	0,770

¹ Oznaczono z surowicy pobranej w tym samym dniu co krew pobrana do oznaczenia CTC² Wartość p z testu Walda statystyki Z³ Ocenione jako parametr ciągły

3.4 Zastosowanie komórek CTC do monitorowania stanu klinicznego pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego

3.4.1 Związek między przeżyciem, komórkami CTC i oceną choroby na podstawie PSA

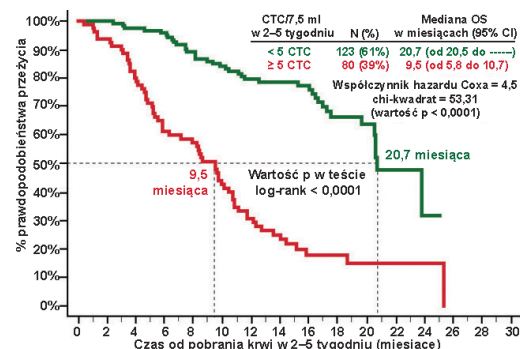
Obecnie obniżenie poziomu PSA jest jednym z podstawowych sposobów określenia odpowiedzi na leczenie u pacjentów z MPC. Aby ustalić zależność między stanem klinicznym określonym na podstawie PSA a wynikami CTC, obniżenie PSA i CTC wynoszące $\geq 30\%$ lub $\geq 50\%$, stwierdzone 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni i 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii, porównano z całkowitym czasem przeżycia.

Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera OS liczono od momentu pobrania krwi. Pacjentów przydzielono do grup korzystnych w oparciu o CTC < 5 w momencie oceny i obniżenie PSA $\geq 30\%$ względem wartości w punkcie początkowym do czasu oceny. Pacjentów przydzielono do grup niekorzystnych w oparciu o CTC ≥ 5 w momencie oceny i obniżenie PSA $< 30\%$ względem wartości w punkcie początkowym do czasu oceny.

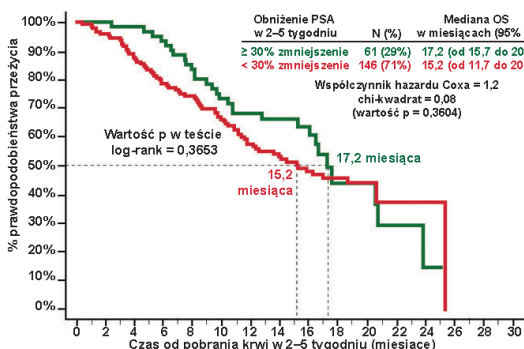
Rysunek 27 przedstawia wyniki analizy 2–5 tygodni po rozpoczęciu terapii, rys. 28 analizę 6–8 tygodni po rozpoczęciu terapii, rys. 29 analizę 9–12 tygodni po rozpoczęciu terapii i rys. 30 analizę 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii.

Rysunek 27: OS u pacjentów z MPC 2-5 tygodni po rozpoczęciu terapii

A. CTC po 2–5 tygodniach

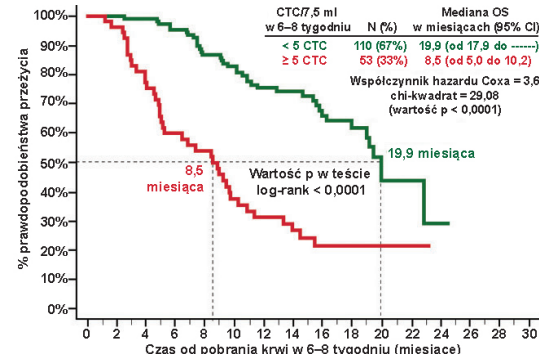


B. Obniżenie poziomu PSA $\geq 30\%$ w tygodniach 2–5

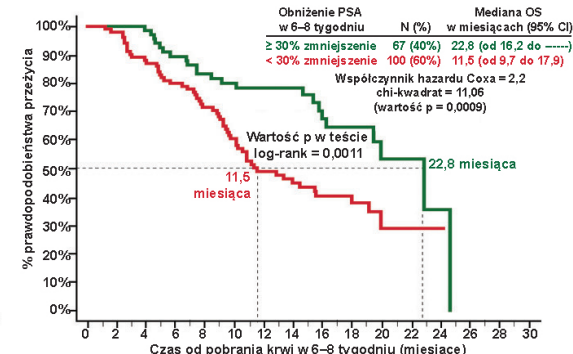


Rysunek 28: OS u pacjentów z MPC 6–8 tygodni po rozpoczęciu terapii

A. CTC po 6–8 tygodniach

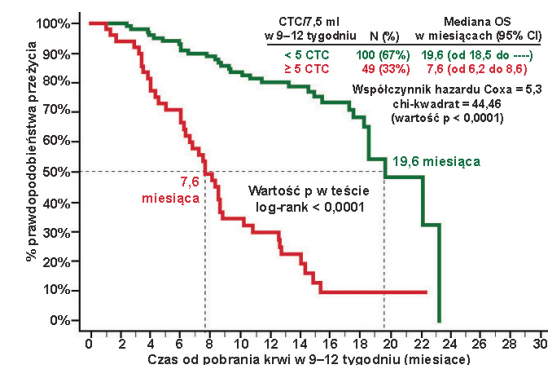


B. Obniżenie poziomu PSA $\geq 30\%$ w tygodniach 6–8

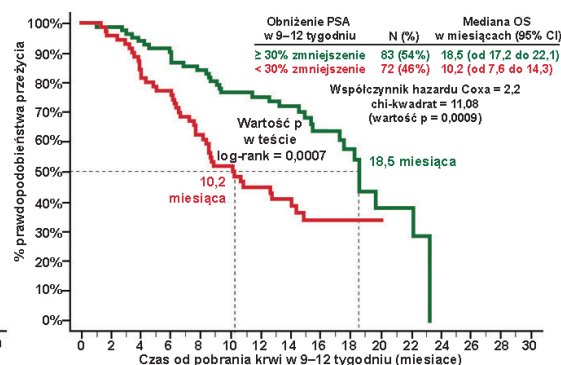


Rysunek 29: OS u pacjentów z MPC 9–12 tygodni po rozpoczęciu terapii

A. CTC po 9–12 tygodniach

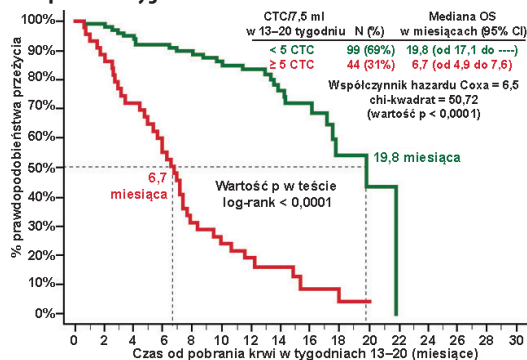


B. Obniżenie poziomu PSA $\geq 30\%$ w tygodniach 9–12



Rysunek 30: OS u pacjentów z MPC 13-20 tygodni po rozpoczęciu terapii

A. CTC po 13–20 tygodniach



B. Obniżenie poziomu PSA ≥ 30% w tygodniach 13–20

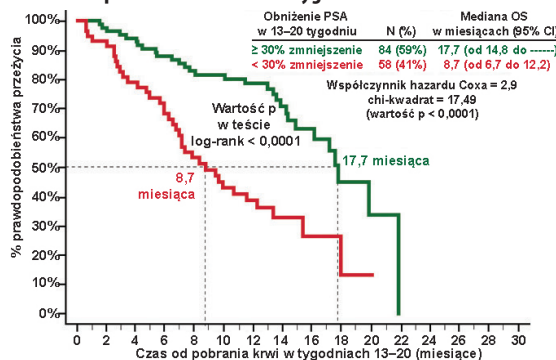


Tabela 28 przedstawia porównanie mediany całkowitego czasu przeżycia w różnych punktach czasowych po terapii CTC, 30% obniżenie poziomu PSA i 50% obniżenie poziomu PSA.

Tabela 28: Porównanie median OS pomiędzy korzystnymi i niekorzystnymi grupami z obniżeniem poziomu PSA i wyniku CTC.

Punkt czasowy	CTC/7,5 ml						30% obniżenie poziomu PSA względem punktu początkowego					50% obniżenie poziomu PSA względem punktu początkowego						
	N	≥ 5 (%)	Mediana OS		Wartość p w teście log-rank	HR	N	< 30 (%)	Mediana OS		Wartość p w teście log-rank	HR	N	< 50 (%)	Mediana OS		Wartość p w teście log-rank	HR
			< 5	≥ 5					≥ 30%	< 30%					≥ 50%	< 50%		
2–5 tygodni	203	39%	20,7	9,5	< 0,0001	4,5	207	71%	17,2	15,2	0,3653	1,2	207	83%	17,5	16,2	0,5599	1,2
6–8 tygodni	163	33%	19,9	8,5	< 0,0001	3,6	167	60%	22,8	11,5	0,0011	2,2	167	75%	22,8	14,4	0,0117	2,1
9–12 tygodni	149	33%	19,6	7,6	< 0,0001	5,3	155	46%	18,5	10,2	0,0007	2,2	155	59%	19,6	10,8	0,0006	2,3
13–20 tygodni	143	31%	19,8	6,7	< 0,0001	6,5	142	41%	17,7	8,7	< 0,0001	2,9	142	46%	17,7	9,9	0,0001	2,6

Dane na rysunkach od 27 do 30 i w tabeli 28 ilustrują bardzo istotną różnicę w całkowitym czasie przeżycia pomiędzy pacjentami z niekorzystnym CTC i korzystnym CTC we wszystkich badanych punktach czasowych, podczas gdy oceny PSA nie były znaczące aż do 6–8 tygodnia po rozpoczęciu terapii. Chociaż różnice w medianie OS pomiędzy korzystnymi (≥ 30% lub ≥ 50% obniżenie poziomu PSA względem punktu początkowego) i niekorzystnymi (< 30% lub < 50% obniżenie poziomu PSA względem punktu początkowego) grupami ze zmniejszeniem poziomu PSA były znaczące, różnica pomiędzy korzystnymi (< 5 CTC) i niekorzystnymi (≥ 5 CTC) grupami CTC wydawała się większa i była znacząca we wszystkich punktach czasowych po rozpoczęciu terapii.

3.4.2 Zgodność między zmianami CTC i PSA u pacjentów z MPC

Obecnie do oceny postępu choroby u pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego powszechnie stosuje się zmniejszenie poziomu PSA ≥ 30% lub ≥ 50%. W związku z tym, aby ustalić zależność między CTC i zmianami PSA, skonstruowano tabele porównujące parami zgodne i niezgodne obserwacje zmian CTC i PSA dla każdego punktu czasowego po rozpoczęciu terapii. Chociaż porównywano CTC do obu wielkości zmian PSA, podano tylko wyniki porównania CTC ze zmianą PSA o ≥ 30%. Decyzja ta została oparta na niedawnej publikacji (*J Natl Cancer Inst.* 98 (8):p.516-521, 2006), zgodnie z którą spadek PSA o 30% w ciągu 3 miesięcy wykazywał silniejszy związek ze spadkiem ryzyka zgonu niż 50% spadek poziomu PSA. Ponadto porównanie spadku PSA o 30% i 50% z wynikami CTC na podstawie poszczególnych pacjentów i poszczególnych obserwacji nie wykazało istotnych różnic w % zgodności dodatniej, % zgodności ujemnej i zgodności ogólnej w żadnym z punktów czasowych obserwacji.

Łącznie u 197, 159, 146 i 138 pacjentów w centralnym laboratorium poddano analizie próbki surowicy i uzyskano nadające się do oceny wyniki CTC odpowiednio 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni i 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii. Aby określić odpowiedź pacjenta na leczenie, dla każdego z punktów czasowych po rozpoczęciu terapii obliczono procentową zmianę PSA względem wartości w punkcie początkowym. W przypadku zmian PSA w każdym punkcie czasowym zdefiniowano grupę korzystną jako pacjentów z poziomem PSA obniżonym o ≥ 30%, a grupę niekorzystną – jako pacjentów z poziomem PSA obniżonym o < 30%. W przypadku CTC w każdym punkcie czasowym grupę korzystną zdefiniowano jako pacjentów z CTC < 5 na 7,5 ml krwi, a grupę niekorzystną zdefiniowano jako pacjentów z CTC ≥ 5.

Jako że rezultaty porównania pomiędzy wynikami CTC a obniżeniem poziomu PSA o ≥ 30% u poszczególnych pacjentów wykazały najbardziej znaczącą niezgodność i zgodność odpowiednio 2–5 tygodni i 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii, te dane podsumowano odpowiednio w tabeli 29 i tabeli 30.

Tabela 29: Porównanie CTC i 30% obniżenia poziomu PSA u poszczególnych pacjentów z MPC po 2–5 tygodniach

% obniżenia PSA względem punktu początkowego po 2–5 tygodniach po rozpoczęciu terapii	CTC 2–5 tygodni po rozpoczęciu terapii		łącznie
	< 5 CTC/7,5 ml	≥ 5 CTC/7,5 ml	
≥ 30% obniżenia poziomu PSA	50	11	61
< 30% obniżenia poziomu PSA	69	67	136
łącznie	119	78	197

Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	49%	41%	58%
Zgodność ujemna w %	82%	70%	91%
Dodatnia wartość predykcyjna	86%	76%	93%
Ujemna wartość predykcyjna	42%	33%	51%
Zgodność całkowita	59%	52%	66%
Iloraz szans	4,4	2,1	9,2

Tabela 30: Porównanie CTC i 30% obniżenia poziomu PSA u poszczególnych pacjentów z MPC po 13–20 tygodniach

% obniżenia PSA względem punktu początkowego po 13–20 tygodniach po rozpoczęciu terapii	CTC 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii		łącznie
	< 5 CTC	≥ 5 CTC	
≥ 30% obniżenia poziomu PSA	72	9	81
< 30% obniżenia poziomu PSA	23	34	57
łącznie	95	43	138

Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	60%	46%	72%
Zgodność ujemna w %	89%	80%	95%
Dodatnia wartość predykcyjna	79%	64%	90%
Ujemna wartość predykcyjna	76%	66%	84%
Zgodność całkowita	77%	69%	84%
Iloraz szans	11,8	4,9	28,3

Wyniki porównania poszczególnych obserwacji wyników CTC i zmian PSA przy zastosowaniu progu ≥ 30% w 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni i 13–20 tygodni po rozpoczęciu terapii są podsumowane łącznie w tabeli 31.

Tabela 31: Porównanie CTC i 30% obniżenia poziomu PSA na podstawie obserwacji pacjentów z MPC

% obniżenia poziomu PSA względem punktu początkowego od rozpoczęcia terapii	CTC po rozpoczęciu terapii		łącznie
	< 5 CTC	≥ 5 CTC	
≥ 30% obniżenia poziomu PSA	243	41	284
< 30% obniżenia poziomu PSA	175	181	356
łącznie	418	222	640

Pomiar	Oszacowanie	Dolny 95% CI	Górny 95% CI
Zgodność dodatnia w %	51%	46%	56%
Zgodność ujemna w %	86%	81%	89%
Dodatnia wartość predykcyjna	82%	76%	86%
Ujemna wartość predykcyjna	58%	53%	63%
Zgodność całkowita	66%	62%	70%
Iloraz szans	6,1	4,1	9,1

Zgodność między zmianami CTC w różnych punktach czasowych po rozpoczęciu terapii a obniżeniem poziomu PSA ≥ 30% wahała się od 59% do 77%, a zgodność między zmianami CTC a obniżeniem poziomu PSA ≥ 50% wahała się od 52% do 75%, co wskazuje, że występowała niezgodność między zmianami CTC i PSA u ~25% do 40% pacjentów.

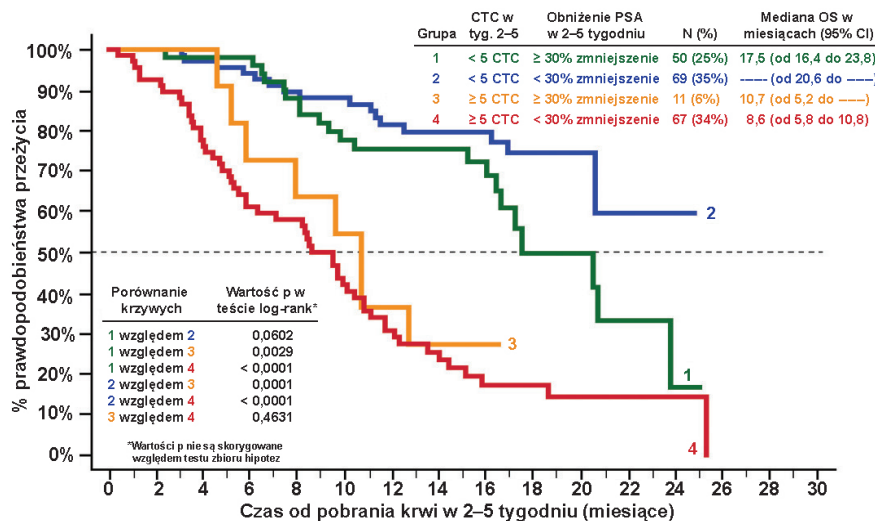
3.4.3 Jednoczesne obniżenie poziomu CTC i poziomu PSA a prognozowanie OS u pacjentów z MPC

Aby określić, które z niezgodnych wyników lepiej odzwierciedlały rokowania pacjenta, ocenę CTC i zmiany PSA w 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni i 13–20 tygodni po rozpoczęciu leczenia porównano z całkowitym czasem przeżycia. Czas OS liczono od momentu pobrania ocenianej próbki krwi. Na potrzeby analizy Kaplana-Meiera (**rysunek 31, panele A, B, C i D**) pacjentów podzielono na cztery grupy w oparciu o wynik CTC i obniżenie poziomu PSA w 2–5 tygodni, 6–8 tygodni, 9–12 tygodni oraz 13–20 tygodni od rozpoczęcia terapii, odpowiednio:

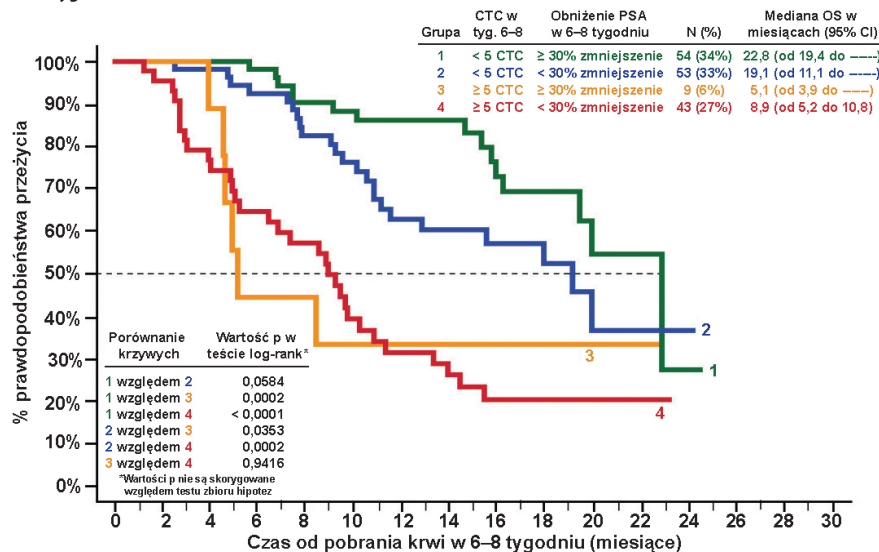
- Grupa 1 (zielona krzywa), pacjenci z CTC < 5 w momencie oceny i obniżeniem poziomu PSA $\geq 30\%$ od badania w punkcie początkowym do czasu oceny;
- Grupa 2 (granatowa krzywa), pacjenci z CTC < 5 w momencie oceny i obniżeniem poziomu PSA < 30% od badania w punkcie początkowym do czasu oceny;
- Grupa 3 (pomarańczowa krzywa), pacjenci z CTC ≥ 5 w momencie oceny i obniżeniem poziomu PSA $\geq 30\%$ od badania w punkcie początkowym do czasu oceny;
- Grupa 4 (czerwona krzywa), pacjenci z CTC ≥ 5 w momencie oceny i obniżeniem poziomu PSA < 30% od badania w punkcie początkowym do czasu oceny.

Rysunek 31: Poziomy CTC i zmiany PSA łącznie w prognozowaniu OS 2–5 tygodni (panel A), 6–8 tygodni (panel B), 9–12 tygodni (panel C) i 13–20 tygodni (panel D) po rozpoczęciu terapii

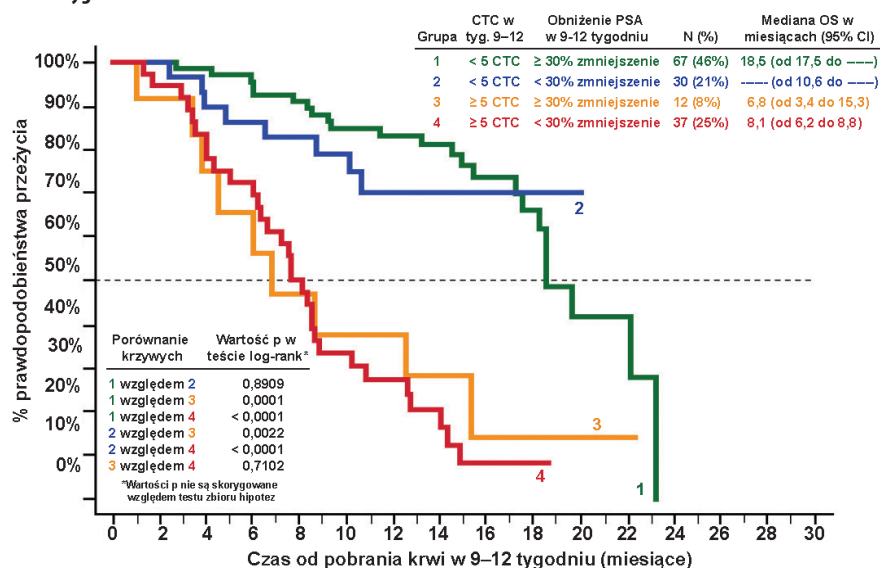
A. 2–5 tygodni



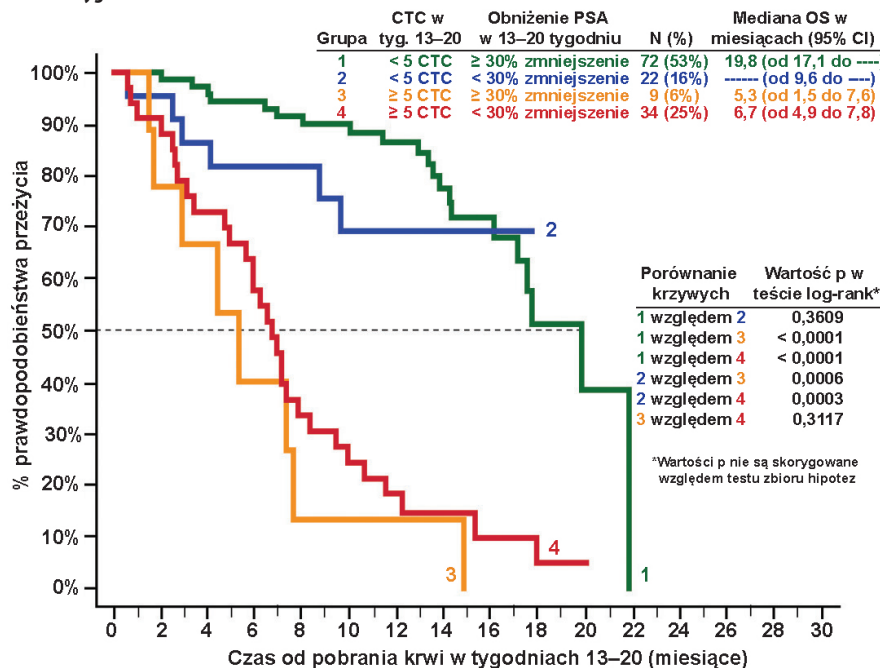
B. 6–8 tygodni



C. 9–12 tygodni



D. 13–20 tygodni



Rysunek 31 pokazuje, że u pacjentów z CTC ≥ 5 w dowolnym momencie po rozpoczęciu leczenia prawdopodobieństwo wcześniejszego zgonu było znacznie większe, niezależnie od zmiany poziomu PSA względem punktu początkowego. U pacjentów z CTC ≥ 5 we wszystkich punktach czasowych (**grupa 3 i grupa 4**) mediany całkowitego czasu przeżycia były najkrótsze i nie różniły się znacząco. Mediana OS tych dwóch grup była jednak znacząco różna od mediany OS u pacjentów z CTC < 5 we wszystkich punktach czasowych (**grupa 1 i grupa 2**). W tych grupach (**grupa 1 i grupa 2**) mediany całkowitego czasu przeżycia były najdłuższe i nie różniły się znacząco. Ważnym wnioskiem przedstawionym na **rysunku 31** jest to, że chociaż obniżenie poziomu PSA w niektórych punktach czasowych po rozpoczęciu terapii mogło być znaczące w prognozowaniu przeżycia, korzystny wynik CTC w dowolnym punkcie czasowym był bardziej dokładny niż ocena PSA. Praktyczną implikacją jest wykorzystanie analizy CTC do oceny prawdopodobieństwa przeżycia pacjentów z MPC. W przypadkach, w których wyniki CTC i zmiany poziomu PSA były niezgodne, wyniki CTC umożliwiały bardziej dokładną ocenę rokowania.



Menarini Silicon Biosystems Inc.
3401 Masons Mill Road, Suite 100
Huntingdon Valley, PA 19006
USA
documents.cellsearchctc.com
Tel.: 1-877-837-4339
00 8000 8374339

CELLSEARCH®, CELLTRACKS®, CELLTRACKS ANALYZER II® oraz AUTOPREP® są zarejestrowanymi znakami towarowymi firmy Menarini Silicon Biosystems Inc. Ta technologia, w tym produkty i/lub związane z nią komponenty, oraz procedury i systemy instrumentów opisane w niniejszym dokumencie są chronione patentami Stanów Zjednoczonych i odpowiadającymi im patentami międzynarodowymi oraz oczekującymi zgłoszeniami patentowymi, w tym jednym lub więcej z następujących: Numery patentów USA 6 136 182; 6 551 843; 6 623 982; 6 790 366; 7 011 794 oraz 7 332 288.

LEGENDA SYMBOLI

W niniejszej instrukcji użytkowania lub na powiązanych z nią etykietach mogły zostać użyte ukazane poniżej symbole.



Data ważności:
RRRR-MM-DD lub RRRR-MM



Kod partii



Numer seryjny



Przeostroga: zapoznaj się z dołączonymi dokumentami



Data produkcji



Producent



Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia <n> testów



Ostrzeżenie



Numer katalogowy



Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej



Ograniczenia dotyczące temperatury



Zagrożenie biologiczne



Należy zapoznać się z instrukcją użytkowania



Diagnostyczny wyrób medyczny do zastosowań *in vitro*

Menarini Silicon Biosystems SpA
Via Giuseppe Di Vittorio 21B/3
40013 Castel Maggiore (Bologna)
Włochy



Menarini Silicon Biosystems Inc.
3401 Masons Mill Road, Suite 100
Huntingdon Valley, PA 19006
USA
documents.cellsearchctc.com
Tel.: 1-877-837-4339
00 8000 8374339 (UE)



MENARINI
silicon biosystems

