

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 1/00

C07K 17/00 C12N 1/00

C12N 5/00 C12N 5/16

G01N 33/53



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821200.2

[43] 公开日 2005年3月16日

[11] 公开号 CN 1596265A

[22] 申请日 2002.8.23 [21] 申请号 02821200.2

[30] 优先权

[32] 2001. 8. 23 [33] US [31] 60/314,151

[32] 2002. 4. 3 [33] US [31] 60/369,628

[86] 国际申请 PCT/US2002/026861 2002. 8. 23

[87] 国际公布 WO2003/019141 英 2003. 3. 6

[85] 进入国家阶段日期 2004. 4. 23

[71] 申请人 免疫公司

地址 美国德拉华州

[72] 发明人 G·C·劳 C·拉森

M·雷伯莱特 H·鲁特纳

L·特尔斯塔彭 S·M·奥哈拉

S·格罗斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

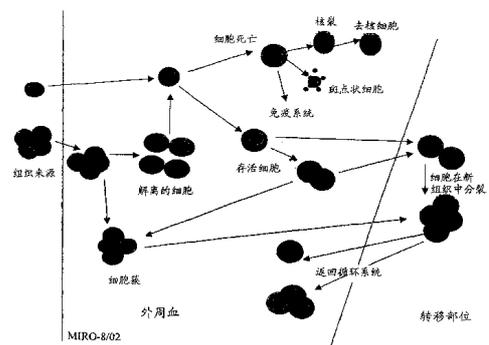
代理人 李波 徐雁漪

权利要求书 8 页 说明书 33 页 附图 6 页

[54] 发明名称 循环肿瘤细胞、片段和碎片的分析

[57] 摘要

将本发明所披露的方法和试剂用于分析循环肿瘤细胞，细胞簇，片段和碎片的用途。分析是用多种平台进行的，包括流式细胞术和 CellSpotter<sup>®</sup> 荧光显微成像系统。业已证实，分析受损害的细胞是重要的，不过，存在两种损害来源：体内和体外来源。体内损害是通过细胞凋亡、坏死、或免疫应答产生的。体外损害是在样品的获得、处理、转运、加工、或分析期间产生的。因此，需要限定、减少、消除、或者至少定性体外损害，以便防止这种损害干扰分析。本文披露了用于根据循环的罕见细胞诊断、监测和筛选疾病的方法，包括通过 CTC、细胞簇、片段和碎片确定的恶性肿瘤。还提供了用于通过所述方法分析生物学标本的试剂盒。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于诊断待测对象的疾病的方法，包括：
  - a. 从所述待测对象获得生物学标本，所述标本包括怀疑含有完整的罕见细胞的混合细胞群，并且还包括：
    - 5 i. 源于罕见细胞的细胞片段，或
    - ii. 源于罕见细胞的细胞碎片；
  - b. 制备磁标记的样品，其中，所述生物学样品与和第一种生物特异性配体偶联的磁性颗粒混合，所述配体能特异性地与所述完整的罕见细胞和所述细胞片段或所述细胞碎片起反应，以便基本上排除其他  
10 标本成分；
    - c. 让所述磁标记的样品与至少一种其他的生物学特异性配体接触，所述配体能特异性地标记所述完整的罕见细胞，和所述细胞片段或所述细胞碎片，以便基本上排除其他标本成分；
    - d. 分析所述标记过的罕见细胞，和所述标记过的细胞片段，或所  
15 述标记过的细胞碎片，所述标记过的罕见细胞，所述标记过的细胞片段，或所述标记过的细胞碎片的存在表明了疾病的存在。
2. 如权利要求1的方法，其中，所述生物学标本是血液。
3. 如权利要求2的方法，其中，在获得所述生物学标本之后，让  
它与能够稳定所述生物学标本的试剂接触。
- 20 4. 如权利要求1的方法，其中，所述磁性颗粒是胶体。
5. 如权利要求1的方法，其中，在制备所述磁标记的样品的步骤之后，让所述样品接受高梯度磁场的处理，以便产生分离的磁标记的级分，该级分对所述完整的罕见细胞，和所述细胞片段或所述细胞碎片进行了富集。
- 25 6. 如权利要求1的方法，其中，所述分析是从下组方法中选择的：多参数流式细胞术，免疫荧光显微技术，激光扫描细胞计量术，明视野基成像分析，毛细容量分析，光谱成像分析，人工细胞分析和自动化细胞分析。
7. 如权利要求1的方法，其中，所述分析是基于以下方法中的至  
30 少一种：形态学分析和表位分析。
8. 一种用于诊断待测对象的疾病的方法，包括：
  - a. 从所述待测对象获得生物学标本，所述标本包括怀疑含有完整

的罕见细胞和罕见细胞的细胞簇的混合细胞群；

5 b. 制备磁标记的样品，其中，将所述生物学样品与和第一种生物特异性配体偶联的磁性颗粒混合，所述配体能特异性地与所述完整的罕见细胞和所述罕见细胞的细胞簇起反应，以便基本上排除其他标本成分；

c. 让所述磁标记的样品与至少一种其他的生物学特异性配体接触，所述配体能特异性地标记所述完整的罕见细胞和所述罕见细胞的细胞簇，以便基本上排除其他标本成分；

10 d. 分析所述标记过的罕见细胞和所述标记过的罕见细胞的细胞簇，所述标记过的罕见细胞和所述标记过的罕见细胞的细胞簇的存在表明了疾病的存在。

9. 如权利要求 15 的方法，其中，所述生物学标本是血液。

10. 如权利要求 16 的方法，其中，在获得所述生物学标本之后，让它与能够稳定所述生物学标本的试剂接触。

15 11. 如权利要求 15 的方法，其中，所述磁性颗粒是胶体。

12. 如权利要求 15 的方法，其中，在制备所述磁标记的样品的步骤之后，让所述样品接受高梯度磁场的处理，以便产生分离的磁标记的级分，该级分对所述完整的罕见细胞，和所述细胞片段或所述细胞碎片进行了富集。

20 13. 如权利要求 15 的方法，其中，所述分析是从下组方法中选择的：多参数流式细胞术，免疫荧光显微技术，激光扫描细胞计量术，明视野基成像分析，毛细容量分析，光谱成像分析，人工细胞分析和自动化细胞分析。

14. 一种用于诊断待测对象的恶性肿瘤的方法，包括：

25 a. 从所述待测对象获得生物学标本，所述标本包括怀疑含有完整的恶性肿瘤细胞的混合细胞群，并且还包括：

i. 源于恶性肿瘤细胞的细胞片段，或

ii. 源于恶性肿瘤细胞的细胞碎片；

30 b. 制备磁标记的样品，其中，所述生物学样品与和第一种生物特异性配体偶联的磁性颗粒混合，所述配体能特异性地与所述完整的恶性肿瘤细胞和所述细胞片段或所述细胞碎片起反应，以便基本上排除其他标本成分；

c. 让所述磁标记的样品与至少一种其他的生物学特异性配体接触, 所述配体能特异性标记所述完整的恶性肿瘤细胞, 和所述细胞片段或所述细胞碎片, 以便基本上排除其他标本成分;

5 d. 分析所述标记过的恶性肿瘤细胞, 和所述标记过的细胞片段, 或所述标记过的细胞碎片, 所述标记过的恶性肿瘤细胞, 所述标记过的细胞片段, 或所述标记过的细胞碎片的存在表明了恶性肿瘤的存在。

15. 如权利要求 14 的方法, 其中, 所述生物学标本是血液。

16. 如权利要求 15 的方法, 其中, 在获得所述生物学标本之后,  
10 让它与能够稳定所述生物学标本的试剂接触。

17. 如权利要求 14 的方法, 其中, 所述磁性颗粒是胶体。

18. 如权利要求 14 的方法, 其中, 在制备所述磁标记的样品的步骤之后, 让所述样品接受高梯度磁场的处理, 以便产生分离的磁标记的级分, 该级分对所述完整的恶性肿瘤细胞, 和所述细胞片段或所述  
15 细胞碎片进行了富集。

19. 如权利要求 14 的方法, 其中, 所述分析是从下组方法中选择的: 多参数流式细胞术, 免疫荧光显微技术, 激光扫描细胞计量术, 明视野基成像分析, 毛细容量分析, 光谱成像分析, 人工细胞分析和自动化细胞分析。

20. 如权利要求 14 的方法, 其中, 所述分析还包括根据其来源, 即是通过凋亡还是坏死导致的而对细胞片段或所述细胞碎片进行分类。

21. 如权利要求 20 的方法, 其中, 所述分析还包括根据其来源, 即是通过机械损害、药物诱导的损害、或免疫学损害导致的而对细胞  
25 片段或所述细胞碎片进行分类。

22. 如权利要求 20 的方法, 其中, 所述分类是基于以下方法中的至少一种: 形态学分析和表位分析。

23. 一种用于诊断待测对象的恶性肿瘤的方法, 包括:

a. 从所述待测对象获得生物学标本, 所述标本包括怀疑含有完整的  
30 的恶性肿瘤细胞和恶性肿瘤细胞的细胞簇的混合细胞群;

b. 制备磁标记的样品, 其中, 将所述生物学样品与和第一种生物特异性配体偶联的磁性颗粒混合, 所述配体能特异性地与所述完整的

恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇起反应，以便基本上排除其他标本成分；

5 c. 让所述磁标记的样品与至少一种其他的生物学特异性配体接触，所述配体能特异性标记所述完整的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇，以便基本上排除其他标本成分；

d. 分析所述标记过的恶性肿瘤细胞和所述标记过的恶性肿瘤细胞簇，所述标记过的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇的存在表明了恶性肿瘤的存在。

24. 如权利要求 23 的方法，其中，所述生物学标本是血液。

10 25. 如权利要求 24 的方法，其中，在获得所述生物学标本之后，让它与能够稳定所述生物学标本的试剂接触。

26. 如权利要求 23 的方法，其中，所述磁性颗粒是胶体。

15 27. 如权利要求 23 的方法，其中，在制备所述磁标记的样品的步骤之后，让所述样品接受高梯度磁场的处理，以便产生分离的磁标记的级分，该级分对所述完整的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇进行了富集。

20 28. 如权利要求 23 的方法，其中，所述分析是从下组方法中选择的：多参数流式细胞术，免疫荧光显微技术，激光扫描细胞计量术，明视野基成像分析，毛细容量分析，光谱成像分析，人工细胞分析和自动化细胞分析。

29. 一种用于筛选待测对象的恶性肿瘤的方法，包括：

a. 从所述待测对象获得生物学标本，所述标本包括怀疑含有完整的恶性肿瘤细胞的混合细胞群，并且还包括：

25 i. 源于恶性肿瘤细胞的细胞片段，或  
ii. 源于恶性肿瘤细胞的细胞碎片；

b. 制备磁标记的样品，其中，将所述生物学样品与和第一种生物特异性配体偶联的磁性颗粒混合，所述配体能特异性地与所述完整的恶性肿瘤细胞，和所述细胞片段或所述细胞碎片起反应，以便基本上排除其他标本成分；

30 c. 让所述磁标记的样品与至少一种其他的生物学特异性配体接触，所述配体能特异性标记所述完整的恶性肿瘤细胞，和所述细胞片段或所述细胞碎片，以便基本上排除其他标本成分；

d. 分析所述标记过的恶性肿瘤细胞, 和所述标记过的细胞片段, 或所述标记过的细胞碎片, 所述标记过的恶性肿瘤细胞, 所述标记过的细胞片段, 或所述标记过的细胞碎片的存在表明了恶性肿瘤的存在。

5       30. 如权利要求 29 的方法, 其中, 所述生物学标本是血液。

31. 如权利要求 30 的方法, 其中, 在获得所述生物学标本之后, 让它与能够稳定所述生物学标本的试剂接触。

32. 如权利要求 29 的方法, 其中, 所述磁性颗粒是胶体。

10       33. 如权利要求 29 的方法, 其中, 在制备所述磁标记的样品的步骤之后, 让所述样品接受高梯度磁场的处理, 以便产生分离的磁标记的级分, 该级分对所述完整的恶性肿瘤细胞, 和所述细胞片段或所述细胞碎片进行了富集。

15       34. 如权利要求 29 的方法, 其中, 所述分析是从下组方法中选择的: 多参数流式细胞术, 免疫荧光显微技术, 激光扫描细胞计量术, 明视野基成像分析, 毛细容量分析, 光谱成像分析, 人工细胞分析和自动化细胞分析。

35. 如权利要求 29 的方法, 其中, 所述分析还包括根据其来源, 即是通过凋亡还是坏死导致的而对细胞片段或所述细胞碎片进行分类。

20       36. 如权利要求 35 的方法, 其中, 所述分析还包括根据其来源, 即是通过机械损害、药物诱导的损害、或免疫学损害导致的而对细胞片段或所述细胞碎片进行分类。

37. 如权利要求 35 的方法, 其中, 所述分类是基于以下方法中的至少一种: 形态学分析和表位分析。

25       38. 一种用于筛选待测对象的恶性肿瘤的方法, 包括:

a. 从所述待测对象获得生物学标本, 所述标本包括怀疑含有完整的恶性肿瘤细胞和恶性肿瘤细胞的细胞簇的混合细胞群;

30       b. 制备磁标记的样品, 其中, 将所述生物学样品与和第一种生物特异性配体偶联的磁性颗粒混合, 所述配体能特异性地与所述完整的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇起反应, 以便基本上排除其他标本成分;

c. 让所述磁标记的样品与至少一种其他的生物学特异性配体接

触，所述配体能特异性标记所述完整的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇，以便基本上排除其他标本成分；

5 d. 分析所述标记过的恶性肿瘤细胞和所述标记过的恶性肿瘤细胞簇，所述标记过的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇的存在表明了恶性肿瘤的存在。

39. 如权利要求 38 的方法，其中，所述生物学标本是血液。

40. 如权利要求 39 的方法，其中，在获得所述生物学标本之后，让它与能够稳定所述生物学标本的试剂接触。

41. 如权利要求 38 的方法，其中，所述磁性颗粒是胶体。

10 42. 如权利要求 38 的方法，其中，在制备所述磁标记的样品的步骤之后，让所述样品接受高梯度磁场的处理，以便产生分离的磁标记的级分，该级分对所述完整的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇进行了富集。

15 43. 如权利要求 38 的方法，其中，所述分析是从下组方法中选择的：多参数流式细胞术，免疫荧光显微技术，激光扫描细胞计量术，明视野基成像分析，毛细容量分析，光谱成像分析，人工细胞分析和自动化细胞分析。

44. 一种用于监测待测对象的恶性肿瘤的方法，包括：

20 a. 从所述待测对象获得生物学标本，所述标本包括怀疑含有完整的恶性肿瘤细胞的混合细胞群，并且还包括：

i. 源于恶性肿瘤细胞的细胞片段，或

ii. 源于恶性肿瘤细胞的细胞碎片；

25 b. 制备磁标记的样品，其中，将所述生物学样品与和第一种生物特异性配体偶联的磁性颗粒混合，所述配体能特异性地与所述完整的恶性肿瘤细胞，和所述细胞片段或所述细胞碎片起反应，以便基本上排除其他标本成分；

c. 让所述磁标记的样品与至少一种其他的生物学特异性配体接触，所述配体能特异性标记所述完整的恶性肿瘤细胞，和所述细胞片段或所述细胞碎片，以便基本上排除其他标本成分；

30 d. 分析所述标记过的恶性肿瘤细胞，和所述标记过的细胞片段，或所述标记过的细胞碎片，所述标记过的恶性肿瘤细胞，所述标记过的细胞片段，和所述标记过的细胞碎片的存在表明了恶性肿瘤的存

在。

45. 如权利要求 44 的方法, 其中, 所述生物学标本是血液。

46. 如权利要求 45 的方法, 其中, 在获得所述生物学标本之后, 让它与能够稳定所述生物学标本的试剂接触。

5 47. 如权利要求 44 的方法, 其中, 所述磁性颗粒是胶体。

48. 如权利要求 44 的方法, 其中, 在制备所述磁标记的样品的步骤之后, 让所述样品接受高梯度磁场的处理, 以便产生分离的磁标记的级分, 该级分对所述完整的恶性肿瘤细胞, 和所述细胞片段或所述细胞碎片进行了富集。

10 49. 如权利要求 44 的方法, 其中, 所述分析是从下组方法中选择的: 多参数流式细胞术, 免疫荧光显微技术, 激光扫描细胞计量术, 明视野基成像分析, 毛细容量分析, 光谱成像分析, 人工细胞分析和自动化细胞分析。

50. 如权利要求 44 的方法, 其中, 所述分析还包括根据其来源, 15 即是通过凋亡还是坏死导致的而对细胞片段或所述细胞碎片进行分类。

51. 如权利要求 50 的方法, 其中, 所述分析还包括根据其来源, 即是通过机械损害、药物诱导的损害、或免疫学损害导致的而对细胞片段或所述细胞碎片进行分类。

20 52. 如权利要求 50 的方法, 其中, 所述分类是基于以下方法中的至少一种: 形态学分析和表位分析。

53. 一种用于监测待测对象的恶性肿瘤的方法, 包括:

a. 从所述待测对象获得生物学标本, 所述标本包括怀疑含有完整的恶性肿瘤细胞和恶性肿瘤细胞的细胞簇的混合细胞群;

25 b. 制备磁标记的样品, 其中, 将所述生物学样品与和第一种生物特异性配体偶联的磁性颗粒混合, 所述配体能特异性地与所述完整的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇起反应, 以便基本上排除其他标本成分;

c. 让所述磁标记的样品与至少一种其他的生物特异性配体接触, 30 所述配体能特异性地标记所述完整的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇, 以便基本上排除其他标本成分;

d. 分析所述标记过的恶性肿瘤细胞和所述标记过的恶性肿瘤细胞

簇，所述标记过的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇的存在表明了恶性肿瘤的存在。

54. 如权利要求 53 的方法，其中，所述生物学标本是血液。

55. 如权利要求 54 的方法，其中，在获得所述生物学标本之后，  
5 让它与能够稳定所述生物学标本的试剂接触。

56. 如权利要求 53 的方法，其中，所述磁性颗粒是胶体。

57. 如权利要求 53 的方法，其中，在制备所述磁标记的样品的步骤之后，让所述样品接受高梯度磁场的处理，以便产生分离的磁标记的级分，该级分对所述完整的恶性肿瘤细胞和所述恶性肿瘤细胞的细胞簇进行了富集。  
10

58. 如权利要求 53 的方法，其中，所述分析是从下组方法中选择的：多参数流式细胞术，免疫荧光显微技术，激光扫描细胞计量术，明视野基成像分析，毛细容量分析，光谱成像分析，人工细胞分析和自动化细胞分析。

59. 一种用于分析生物学标本中恶性肿瘤细胞，和源于恶性肿瘤细胞的细胞片段或源于恶性肿瘤细胞的细胞碎片的存在的试剂盒，包括：  
15

a. 包衣的磁性纳米颗粒，包括：

i. 磁性核心材料，

20 ii. 蛋白基包衣材料，和

iii. 能特异性地结合所述恶性肿瘤细胞的第一种特征性决定簇，和所述细胞片段或所述细胞碎片的抗体，其中，所述抗体与所述基础包衣材料偶联；

b. 具有对所述恶性肿瘤细胞的第二种特征性决定簇，和所述细胞片段或所述细胞碎片具有特异性的至少一种抗体；  
25

c. 能够对所述恶性肿瘤细胞，和所述细胞片段或所述细胞碎片的其他特征进行染色的试剂。

60. 如权利要求 59 的试剂盒，还包括一组抗体，这些抗体分别对不同的特征性决定簇有特异性。

61. 如权利要求 59 的试剂盒，还包括一种能够标记非目标实体的特异性试剂。  
30

## 循环肿瘤细胞、片段和碎片的分析

### 优先权信息

5 根据 35 USC § 119 (e) 的规定, 本申请要求申请日为 2001 年 8 月 23 日的美国临时申请号 60/314151 和申请日为 2002 年 4 月 3 日的美国临时申请号 60/369628 的优先权。这两份申请都被收作本文参考。

### 10 发明背景

很多临床医生都认为, 早期阶段的癌症是局限于器官的疾病。不过, 这种看法似乎是不正确的, 并且, 在使用现有方法首次检测到时, 癌症通常是全身性疾病。有证据表明, 原发性癌症在出现临床表现之前的早期疾病阶段, 就开始将肿瘤细胞脱落到循环系统中。在肿瘤血管化时, 被脱落到循环中的肿瘤细胞可能附着并且定居在远处的部位, 以便形成转移肿瘤。所述循环的肿瘤细胞 (CTC), 包括正常情况下不存在于健康人体细胞中的标记, 因此构成了诊断和治疗特定癌的基础。因此, 肿瘤细胞在循环系统中的存在, 可用于取代其他检测方法或与所述检测方法组合, 如用于检测乳腺癌的乳腺 X 光透射法, 或用于检测前列腺癌的前列腺特异性抗原 (PSA) 测定。通过采用针对靶细胞上或靶细胞内的相关标记的合适的单克隆抗体, 或通过使用对细胞蛋白表达的其他测定, 或通过分析细胞 mRNA, 可以方便地确定所述细胞的器官来源, 例如, 乳腺、前列腺、结肠、肺、卵巢或其他非造血癌症。

25 因此, 在可以检测癌细胞的场合下, 尽管基本上没有肿瘤的临床迹象, 也可以确定癌细胞的存在以及来源器官。如果 CTC 是在手术之后检测到的话, 如果 CTC 是复发的迹象, 人们可以开始佐剂治疗。提供所述治疗的结果是, 预测患者对所述治疗的需要或治疗的效力, 是重要而且有利的临床信息。还可以看出的是, 如果 CTC 的数量改变, 30 可以预测进展 (CTC 增加) 或反应 (CTC 减少)。

恶性肿瘤的特征是具有入侵相邻组织的能力。一般, 直径为 1 毫米的肿瘤是血管化的, 并且动物研究表明, 存在于肿瘤中的高达 4% 的

细胞，能够在 24 小时的时间内向循环系统中脱落 (Butler, TP & Gullino PM, 1975 Cancer Research 35 : 512-516)。肿瘤的脱落能力最有可能取决于肿瘤的侵入性。尽管肿瘤细胞是连续的脱落到循环系统中的，不过，人们认为没有或仅有一小部分会导致远距离的肿瘤转移 (Butler & Gullino, 同上)。预计肿瘤质量的增加可能与 CTC 的频率增加成正比，因为单细胞，或细胞簇具有增加的粘附性（并且可能具有更大的入侵潜力）。如果发现这种假设成立的话，具有高灵敏度的方法，将会有利于对具有远处转移的患者以及具有局部疾病的患者体内的肿瘤负荷的评估。在患有局部疾病的患者的外周血液中检测到肿瘤细胞，不仅具有在较早阶段检测肿瘤的潜力，而且还能提供潜在的肿瘤入侵的证据。

不过，全血是一种复杂的体液，它包括多种细胞群和能够在体内和体外进行各种生物化学和酶促反应的可能性成分，特别是在超过 24 小时的长时间保存时发生这些反应。某些反应与 CTC 的免疫学破坏相关，将它识别为外源物质。患者的免疫应答通过正常的防御机制削弱或破坏肿瘤细胞，包括吞噬作用和嗜中性粒细胞活化。化疗同样是通过由坏死诱导的细胞死亡来减弱细胞功能和增殖。除了所述外部破坏因素之外，在有害环境中受损的肿瘤细胞可能发生程序性死亡或凋亡。发生凋亡或坏死的正常细胞和异常细胞（包括 CTC），具有改变了的膜通透性，这种通透性会使得 DNA，RNA，和其他细胞内成分可以脱离，导致受损细胞，破裂细胞，细胞碎片的形成，并最终完全分解。所述肿瘤细胞碎片可能仍然具有完整细胞的表位或决定簇特征，并且可以导致检测到的循环癌细胞数量的怀疑的增加。同样观察到了来自健康个体的全血样品，发生了易变血细胞成分的破坏，在这里称之为降低了血液质量，这种破坏是在超过 24 小时的保存期间的长时间保存时出现的。例如，红细胞可能破裂，并且释放血红蛋白和产生细胞血影。已知白细胞，特别是粒细胞是不稳定的，并且在保存时会减少。所述改变增加了有可能干扰诸如 CTC 的罕见靶细胞的分离和检测的细胞碎片的数量。所述破坏过程的综合作用被统称为抽血后或体外破坏，这种破坏能明显增加细胞碎片，这种细胞碎片可以方便地检测到，例如，通过流式细胞和显微技术分析，如 CellSpotter® 或 CellTracks™。

通过显微成像技术检测循环肿瘤细胞，同样会受到典型肿瘤细胞的怀疑的减少和干扰性可染色的碎片的相应增加的负面影响。因此，保持血液标本的完整性或质量是极其重要的，因为在抽血和标本处理期间，可能存在多达 24 小时的延迟。所述延迟是可以预料的，因为用于处理在该分析中所使用的血液的技术和设备，可能不是在每一个实验室都具备的。将样品送达进行样品处理的实验室所需要的时间可能有很大差别。因此，重要的是确定可以对样品进行处理的时间窗。在常规血液学分析中，可以在 24 小时内分析血液样品。不过，由于罕见血细胞的分析更为关键，可以对血液样品进行分析的时间窗是较短的。一种例子是血细胞的免疫学表型分析，一般，它必须在 24 小时内进行。在癌细胞分析中，必须处理较大体积的血液，并且血液样品的体外降解所造成的问题，可能比由分解的细胞释放的材料所造成的问题更严重，所述释放材料来自 CTC 和造血细胞，它们会导致背景的加强，并因此降低检测肿瘤细胞的能力。

对所观察到的小的碎片和大的团块状聚集物的来源和性质尚不完全了解，不过，被认为与来自靶细胞，非靶细胞的细胞成分或因子相关，并且可能与血浆成分相关。由于 CTC 可以被称为在免疫学上是外源物质，甚至是在抽血之前都可能在宿主体内发生正常的细胞免疫应答。同样，大量的 CTC 可以从肿瘤部位连续脱落，并且保持一种稳态水平，在该水平下，CTC 的破坏等于它的脱落速度，而脱落速度又取决于肿瘤负担的大小（参见 JG Moreno 等 "Changes in Circulating Carcinoma Cells in Patients with Metastatic Prostate Cancer Correlates with Disease State." *Urology* 58.2001）。

在该具体技术领域，用于从血液中回收肿瘤细胞的各种方法是已知的。例如，授予 AmCell 和 Miltenyi 的美国专利 6190870 披露了免疫磁力分离，然后进行流式细胞计数。不过，在免疫磁力分离之前，用密度梯度对血液样品进行预处理。另外，没有讨论除了完整细胞以外的任何细胞的分离或统计。也没有对样品进行肉眼形态学分析。

在美国专利 6197523 中，Rimm 等披露了统计 100 微升血液样品中的癌细胞数量。该方法采用毛细显微技术，证实所发现的细胞身份。所述方法特别适用于完整细胞。由于样品的体积较小，完整的细胞必须大量存在。不过，没有讨论诸如片段或碎片的任何其他成分的分离

或统计。

在授予 Immunivest 的美国专利 6365362 中,披露了用于磁力富集和分析血液样品中的肿瘤细胞的方法。所述方法特别针对分析完整细胞,其中,细胞的数量与疾病状态相关。对所分离的细胞进行核酸和另一种标记的存在的标记,这种标记能够在分析期间排除非目标样品成分。

在 W002/20825 中,Chen 披露了将粘附基质用于统计肿瘤细胞数量。简单地讲,用特异性粘性分子对所述基质进行包衣,所述分子能够结合具有怀疑的转移潜力的活的癌细胞。然后可以分析所述基质上所捕获细胞的存在和类型。还披露了将所述基质用于筛选治疗的方法。尽管采用了分辨完整细胞和凋亡或坏死细胞的步骤,在分析中专门排除了凋亡或坏死细胞。

在来自 Cell Works 的 W000/47998 中,披露了 CTC 的两种途径,末端和增殖途径。这两种途径始于“不确定细胞”,通过形态学差别确定,所述细胞向末端或增殖途径发展。处在末端途径上的细胞最终会被破坏,而处在增殖途径上的细胞会作为转移的肿瘤形成新的转移集落。该增殖途径(细胞和细胞簇)是潜在的诊断焦点,但是降低了细胞片段或碎片的作用。设计这两种途径是为了解释在患者样品中所观察到的形态学差异。

一般,耐受力更强和增殖力更强的细胞能存活,以便建立二级或转移部位。在外周循环中,CTC 在体内(以及在体外)会受到活化嗜中性粒细胞和巨噬细胞的进一步攻击,逐渐导致膜穿孔,电解质、较小的分子的渗透,以及包括 DNA,染色质等的重要细胞成分的最终流失,这些成分是细胞存活力所必需的。在细胞凋亡的关键点,细胞凋亡进一步促进了细胞破坏,细胞凋亡以一系列的逐步缓慢的细胞内事件为特征,它不同于由诸如细胞毒性抗肿瘤药物的细胞外物质所引起或介导的坏死或快速细胞死亡的特征。所述破坏过程的全部或某些可能导致碎片和/或聚集物的形成,包括在药物治疗期间来自分解的 CTC 以及来自意外破坏的正常造血细胞的可染色的 DNA, DNA 片段和“DNA 梯”结构,因为大部分细胞毒性药物是以接近毒性的剂量给药的。

正如在 W000/47998, US6190870 和其他文献中所证实的,CTC 可以作为活的和死亡的细胞循环,其中,“死的”包括整个受损的和片

段化的细胞以及 CTC 衍生的碎片。肿瘤负担最好可以通过包括细胞簇的完整 CTC 和具有细胞的形态学特征的受损的 CTC 的总数表示，不过有别于团块和/或聚集物。不过，某些受损的细胞，可能具有大的孔，使得液体和颗粒状细胞质成分能够泄露，导致浮力密度产生大约  
5 1.06-1.08 至超过 1.12 的改变，或远远超过 RBC 的密度（根据 Pharmacia 方法，可以在  $d = 1.12$  和  $1.16$  的梯度界面上分离活的和死的细胞）。诸如在 W000/47998 中所使用的常规密度梯度会将诸如受损的 CTC 丢失在密度大约为  $1.08-1.11$  的丢弃的 RBC 层中。能够对细胞角蛋白阳性染色的 CTC 碎片也可能具有落入 RBC 范围或更高范围的  
10 密度，因为大部分细胞内成分（有可能定位于靠近细胞质——血块黄层界面处的亲脂性膜片段可能是例外）的密度为  $1.15-1.3$ 。因此，受损的 CTC 和 CTC 碎片的主要部分可能位于血块黄层之外，并且用密度梯度方法，如披露于 W000/47998 中的方法无法看到。出现了受损的或片段化的 CTC 的某些图象，不过很有可能是在细胞离心或随后的处理  
15 期间所发生的损害，并因此是伪迹。尽管大部分完整肿瘤细胞的密度落在 WBC 区，患者样品中的受损的 CTC 很有可能具有较高的密度，该密度使得它们处在 RBC 层；超出了梯度技术所能达到的范围。

美国专利申请号 2001/0024802 披露了用于将片段和碎片结合在珠上的方法。所公开的申请披露了感兴趣的片段和碎片的密度的多种  
20 可能性。在离心时，所述珠会定位于 RBC 上面的层，这是由于与片段和/或碎片偶联的所述珠的预定的比重（密度）。不过，该系统取决于片段和碎片与所述珠的正确结合。如果任何其他样品成分结合所述珠的话，这些珠就可能不出现在预定位置，并且随后不会进行分析。

起源组织中的上皮细胞会遵循已建立的生长和发育“规则”，所述规则包括群体控制。这意味着在正常场合下，细胞的数量和大小保持稳定，并且只有在必要时才发生改变，以便生物体能正常生长和发育。只有上皮的基底细胞或永生化细胞会分裂，并且当上皮发挥其功能必要的时候它们就会分裂，无论如何，它取决于上皮的性质和位置。在某些异常而又良性场合下，细胞会增殖，并且基层层会比正常情况  
30 更快地分裂，导致增生。在某些其他异常的但是良性的场合下，细胞的体积会增加到超出特定组织的正常范围，导致细胞巨大，如在叶酸缺陷中所出现的情况。

5 上皮组织同样可以因为恶性前病变或恶性病变而导致细胞的大小或数量的增加。在这种情况下，类似于上文所述的改变伴随着从轻度低级别上皮内病变到严重恶性肿瘤的细胞核异常。人们相信，在所述细胞中的变化，可能影响上皮厚度的部分，并且随着严重程度的提高，

10 会包括所述上皮细胞的较厚的部分。所述细胞不遵循接触抑制的限制，并且不受组织控制地持续生长。当上皮的整个厚度受到恶性改变的影响时，这种状况被确定为原位癌（CIS）。

所述恶性肿瘤细胞最终能够通过基底膜，并随着它的恶性潜力的增加侵入器官的基质。在侵入基质之后，所述细胞被认为具有到达血管的潜力。一旦它们浸润血管，细胞会发现它们处于完全不同于它们起源的环境中。

所述细胞能够作为单细胞或作为两个或两个以上细胞的细胞簇浸润血管。通过循环系统循环的来自上皮的单细胞，注定具有两种后果中的一种。它可能死亡或者可能存活。

15 单细胞：

1. 所述细胞可能由于内在改变或细胞本身的信息而通过凋亡死亡。所述信息可能在进入血管之前就已经存在于所述细胞中，或者可以当它们在血液中时接收，或者它可能因为宿主免疫系统的影响而死亡。所述宿主将这些细胞视为该环境的“异类”。细胞死亡的结果在

20 CellSpotter®中可以作为去核细胞、斑点状细胞或不定型细胞识别。这种细胞不具备细胞分裂或建立集落或转移肿瘤的潜力。

· 去核细胞是细胞核分解和消失的结果（核破裂和核溶解）。它们是细胞角蛋白阳性的，和核酸阴性的。

· 斑点状细胞是细胞角蛋白和 DAPI 阳性的，并且表现出细胞降解和细胞质分解的迹象。所述细胞对治疗或宿主免疫系统的反应可能表现为细胞骨骼蛋白收缩。

· 可以用 CellSpotter®识别的另一种死亡的肿瘤细胞是不定型细胞。这些细胞可能是在制备过程中受到损害的，表明这种细胞可能是更脆弱更精细的细胞，不过，还可能是细胞凋亡或免疫攻击的结果。

2. 活的恶性上皮细胞可能具有在循环中存活下来，并且在远处器官中形成集落的潜力。这些“存活细胞”在 CellSpotter®中以具有高的细胞核物质/细胞质物质比例的完整细胞形式出现。所述细胞可能是

未分化的，并且可以在血液中有有效分裂，并且形成小的细胞簇，这些细胞簇可以在远处毛细血管中外渗，在这里，所述细胞可以建立新的集落，或者它可以保持作为单细胞，直到它外渗，一旦它在新组织中建立集落，它本身就开始分裂，以这种方式开始形成新的集落。

5 细胞簇：正如 B Brandt 等所披露的，原发性肿瘤可以脱落能进入循环系统的细胞簇（“从人类外周血中分离前列腺衍生的单细胞和细胞簇” Cancer Research 56 p4556-4561.1996）。所述细胞簇可以保持细胞簇状态，并且侵入远处的组织，或者它们可能由于在血液中压力的差别或免疫系统的干预而在循环系统中解离。如果所述细胞解离成  
10 单细胞的话，它们就会遵循上文结合单细胞所披露的两种途径之一（参见图 1 和 2）。细胞簇的形成可能对存活有作用，通过用外部细胞作为屏障，所述屏障能保护内部细胞免受免疫系统攻击。

一旦在新的器官中建立新的集落，某些恶性肿瘤细胞会继续复制，以便形成新的肿瘤。如果它们到达新的毛细血管的话，肿瘤转移  
15 的事件就会重复，并且出现继发转移。

对患已知癌的患者进行治疗进行监测：肿瘤细胞数量的减少和/或反应指数的提高可以代表对患者治疗的反应。

· 总的肿瘤细胞 = 死亡细胞 + 成活细胞 (TTC = DC + SC)

· 反应指数 = 死亡细胞 / 总的肿瘤细胞 (RI = DC/TTC)。

20 反应指数越高，对治疗的反应就越好。低的反应指数可能表明，患者对这种治疗没有反应，和/或患者的免疫系统不能处理肿瘤负荷。

在治疗前检查时一共具有 50 个全部存活的肿瘤细胞的患者 (RI = 0/50 = 0) 和在随访（治疗之后）时具有 50 个 TTC 的患者，根据其 RI 可能具有不同的结局。如果所有的 TTC 是 SC（即 DC = 0）的话，  
25 对治疗没有反应。如果有 50 个细胞，但反应指数为 40/50 = 0.8 的话，免疫系统或治疗都对肿瘤负荷有负面影响，因此，是阳性患者反应。

对患有已知前期恶性肿瘤的患者随访中的确诊：当巴氏涂片被诊断为具有带有非典型或低级上皮内病变的细胞时，总是存在这种可能性，即这些患者具有更严重的异常性，所述细胞被误认为是取样误差。  
30 可以对这些患者进行阴道镜检查 and 生物活组织检查，或要求它们在 3 个月以内返回再次进行巴氏涂片。如果所述非典型细胞与没有进行取样的恶性肿瘤细胞的小的病灶同时出现的话，该患者要等待 3 个月时

间再进行随访。这可以解释为什么某些前期恶性肿瘤似乎比其他肿瘤进展的更快一些（由于取样误差导致的误差，导致了统计学的不真实）。这些通常被解释为更“具有侵入性的”前期恶性肿瘤。可以使用 CellSpotter®帮助确定这些患者。所有具有异常巴氏涂片的患者（在美国为 5-10%的巴氏涂片）能够马上检测循环的上皮细胞。具有阳性检测结果的患者应当马上进行积极的随访。具有阴性结果的患者可以等待 3 个月时间再次进行巴氏涂片。这样可以简化医生和保健专家进行确诊的过程，并且有助于患者信任地的随访过程。

5 筛选：可以使用 CellSpotter®成像分析筛选具有特定症状的总的群体，用特定的组织特异性抗体对所有异常样品进行二次检测。CTC 在患者体内的确定可能表明存在业已启动的原发性恶性肿瘤或者正在启动转移过程。如果所述细胞被确定为具有新的标记的组织来源的话，就可以进行器官特异性检测，如 CT 导向的细针穿刺（FNA）证实所述恶性肿瘤的存在或缺乏。对于原发肿瘤无法确定的患者，随后可以在建立个体基线之后重复检测。

10 总之，上述因素的全部或某些能够，并且被证实导致了碎片和/或聚集物的形成，业已发现它们的形成破坏了通过来自全血的直接富集方法对 CTC 的检测，正如在本发明中所披露的。完整 CTC，受损的或怀疑的 CTC 的数量以及 CTC 受损的程度可进一步用作肿瘤负担，肿瘤细胞的增殖潜力和/或治疗效果的在诊断上重要的指标。相反，现有技术的方法和方案将对 CTC 的不可避免的体内损害与可以避免的体外储存和加工损害组合在一起，从而产生了癌症患者的 CTC 和肿瘤负担的错误信息。最后，本文所披露的能够以高的灵敏度和特异性起作用的本发明的相对简单的血液测试可以被认为是“整体活组织检查”。

25

#### 本发明的简要说明

本发明所披露的方法和试剂被用于分析循环肿瘤细胞、细胞簇、片段和碎片。分析是通过多种平台进行的，包括流式细胞测定和 CellSpotter®荧光显微术成像系统。实施例不仅证实了分析明显的或完整的 CTC 的重要性，而且还证实了分析怀疑的 CTC 或受损的片段、CTC 的簇和碎片的重要性。可以模拟形成片段和碎片的损害。还可以通过使用稳定剂抑制在抽血和样品处理期间对 CTC 的进一步破坏。

本发明业已证实了区分由标本采集、运输、储存、加工或分析导致的体外损害和由细胞凋亡、坏死、患者免疫系统导致的体内损害的能力。实际上，需要限制、减轻、消除、或者至少定性体外损害，以免这种损害干扰分析。

- 5 本文披露了根据循环的罕见细胞诊断、监测、和筛选疾病的方法，包括通过 CTC、细胞簇、片段和碎片确定的恶性肿瘤。还提供了使用所述方法分析生物学样品的试剂盒。

#### 附图的简要说明

- 10 图 1: 肿瘤脱落和转移模式。1a. 表示细胞、细胞簇和片段的可能的阶段。1b. 表示具有来自样品的实际图象的同一种模型。

图 2-对来自 7.5 ml 血液的免疫磁力富集的肿瘤细胞的流式细胞术。

- 15 图 3-来自转移的前列腺癌患者的 7.5 ml 血液样品的 CellSpotter®分析，对所述样品的肿瘤细胞进行免疫磁力富集。短的线条相当于用于染色过程的不同染料，表示用细胞角蛋白 PE (绿色) 和 DAPI (紫红色) 染色的肿瘤候选物。

- 20 图 4-从患有转移性前列腺癌的患者单一全血样品中分离的肿瘤细胞的 CellSpotter®分类，所述细胞是用细胞角蛋白 PE (绿色) 和 DAPI (紫红色) 染色的。

A-完整细胞

B-受损的肿瘤细胞

C-肿瘤细胞片段

图 5-在 20 种临床样品中明显的 CTC 与怀疑的 CTC 的数量的比较。

- 25 图 6-混入全血中，并且分离，然后用细胞角蛋白 PE (绿色) 和 DAPI (紫红色) 染色的紫杉醇处理的 LnCaP 细胞的 CellSpotter®分类。

A-完整细胞

B-死亡的肿瘤细胞

C-肿瘤细胞片段

30

本发明的详细说明

在本文中，使用了本领域普通技术人员所熟知的各种术语。这些

术语要表达的含义不超出被公认的含义。

列举了癌患者体内具有临床意义的最低残留疾病的证据。为了有效监测最低残留疾病，定性和定量评估是必要的。由于癌细胞在血液或骨髓中的出现频率较低，在制备用于分析的样品时涉及到的繁重的人工样品制备方法，通常会导致错误的结果。为了克服这种局限性，开发了一种半自动化样品制备系统，该系统降低了变异性，并且提供了更一致的结果，正如在申请日为2002年2月20日的共同未决美国专利申请号10/081996中所披露的，该专利申请被收作本文参考。

有各种根据感兴趣的物质和靶物质能特异性地与它结合的另一种物质之间复合物的形成的、用于分析或分离上述靶物质的方法可以利用。复合物与非结合材料的分离，可以通过重力实现，例如，通过沉降或通过与靶物质结合的易碎的颗粒或珠离心。可以使所述颗粒或珠具有磁性，以便有利于结合/释放分离步骤。磁性颗粒为本领域所熟知，它们在免疫和其他生物特异性亲和反应中的应用同样为本领域所熟知。一般，能促进磁力或重力分离的任何材料都可用于这一目的。不过，很显然磁力分离方式是选择的方法。

磁性颗粒可以根据大小分类：大的（1.5-大约50微米），小的（0.7-1.5微米），或胶体（<200 nm），它又被称为纳米颗粒。纳米颗粒又被称为铁流体或铁流体样材料，它具有典型铁流体的多种特征，并且在本文中有时被称为胶体，超磁性颗粒。

上述类型的小的磁性颗粒在涉及生物特异性亲和反应的分析中是十分有用的，因为它们可以用生物功能性聚合物（例如蛋白）方便地包衣，提供非常高的表面积，并且提供合理的反应动力学。在以下专利文献中业已披露了0.7-1.5微米的磁性颗粒，例如，这些专利包括美国专利3,970,518；4,018,886；4,230,685；4,267,234；4,452,773；4,554,088；和4,659,678。业已披露上述某些颗粒可用作免疫学试剂的固体支持物。

进行磁分离的效力以及磁标记细胞的回收和纯度取决于多种因素，这些因素包括：

- 被分离的细胞的数量，
- 所述细胞的受体或表位密度，
- 每个细胞的磁负荷，

- 磁性材料的非特异性结合 (NFB) ,
- 捕获的非靶细胞的携带,
- 所采用的技术,
- 血管的性质,
- 5     · 血管表面的性质,
- 介质的粘度,
- 所采用的磁分离装置。

如果一种系统的非特异性结合水平是基本上稳定的话, 这是通常出现的情况, 随着目标群体的降低, 纯度也会降低。

- 10     不太明显的是以下事实: 靶细胞的群体越小, 对它进行磁标记和回收就会越困难。另外, 标记和回收在很大程度上取决于所采用的磁性颗粒的性质。例如, 当细胞与诸如 Dynal 珠的大的磁性颗粒一起温育时, 细胞是通过由所述系统的混合所产生的碰撞进行标记的, 因为所述珠太大, 以至于不能有效扩散。因此, 如果细胞以每毫升血液 1
- 15     个细胞的频率或更低的频率出现在群体中的话, 在极早期癌症中的肿瘤细胞可能就是这种情况, 标记靶细胞的可能性与添加到该系统中的磁性颗粒的数量和混合的时间长度相关。由于将细胞与所述颗粒长时间混合是有害的, 有必要尽可能地提高颗粒的浓度。不过, 可以添加的磁性颗粒的数量是受限制的, 因为在分离时人们可能用与其他血细胞混合的罕见细胞, 取代与大量磁性颗粒混合的罕见细胞。后一种情况不会明显提高统计感兴趣的细胞数量或对这些细胞进行检查的能力。
- 20

- 用于实施本发明的优选的磁性颗粒是具有胶体性质的颗粒。所述颗粒以它们的亚微米粒度为特征, 所述粒度通常小于大约 200 纳米,
- 25     并且以它们的可以长时间从溶液中重力分离的稳定性为特征。除了很多其他优点之外, 这种颗粒大小使得各个颗粒基本上无法通过常用于细胞分析的分析技术观察到。大小为 90-150 纳米, 并且具有 70-90% 磁质量的颗粒可用于本发明中。合适的磁性颗粒包括超强磁性材料的晶体核心, 该核心周围由结合, 例如物理吸附或共价连接在磁性合金
- 30     上的分子包围, 由此产生稳定化胶体特性。所述包衣材料优选以能有效防止存在于样品中的生物学大分子和磁性核心之间的非特异性相互作用的量使用。所述生物学大分子可以包括碳水化合物, 如非靶细胞

表面上的唾液酸残基，凝集素，糖蛋白，和其他膜成分。另外，所述材料应当在每个纳米颗粒上包含尽可能多的磁质量。构成所述合金的磁晶体的尺寸，小到足以使它们不包含完整的磁畴。纳米颗粒的大小足够小，以便它们的 Brownian 能超过它们的磁矩。其结果是，即使是在适当强度的磁场中，所述胶体磁性颗粒的北极、南极排列，以及随后的相互吸引/排斥似乎都不会发生，这是由于它们的溶液稳定性。最后，磁性颗粒应当可以在高磁场梯度外磁场分离器中分离。以上特征有利于样品控制，并且提供超过装有磁铁珠或钢丝棉的更复杂的内部梯度柱的分析优点。具有上述特性的磁性颗粒可以通过改进披露于美国专利 4, 795, 698, 5, 597, 531, 和 5, 698, 27 中的基础材料而制备，以上每一份专利都被收作本文参考。

在美国专利 5, 698, 271 中披露了一种用于制备颗粒的改进方法。所述材料是在'531 号专利中所披露的材料的改进形式，其中，所述方法包括一个高温包衣步骤，该步骤能显著提高包衣水平。例如，通过该方法用牛血清白蛋白 (BSA) 包衣制备的纳米颗粒与'531 号专利中的 DC-BSA 材料相比，非特异性结合特征降低了 3-5 倍。业已证实，这种非特异性结合的减弱，直接是由于 BSA 包衣材料的水平的增加。在对所述纳米颗粒进行处理以便除去 BSA 包衣时，非特异性结合又恢复到高水平。因此可以确定在氧化铁分子晶体上包衣的 BSA 的量和细胞的非特异性结合之间存在直接的相关性。通常，来自全血的细胞与所述颗粒的非特异性结合为 0.3%，这一结果显著好于'531 号专利所产生的结果。因此，在 10 毫升全血中有大约 200, 000 非靶细胞，这些细胞同样可以与用于富集的细胞一起分离。

由于小的纳米颗粒 (30-70 nm) 能更容易地扩散，与它们的较大的对应体相比，小的颗粒能优先标记细胞。在使用极高的梯度时，如在内部梯度柱中，无论其大小如何，所述材料的性能仅产生很小的差别。另一方面，在使用外部梯度时，或具有小于能够在微型珠或钢丝棉柱上产生的梯度时，小的纳米颗粒占据细胞表面具有显著作用。这种结果是通过分级分离 DC 纳米颗粒，并且研究对回收的影响时所得出的结论。根据以上研究和其他优化实验，建立了用于通过磁力或柱分级分离纳米颗粒的方法，其中，可以制备基础包衣的磁性颗粒，这些颗粒缺少过分小的或过分大的纳米颗粒。例如，可以生产平均直径为

100 纳米的基础包衣的颗粒，这种颗粒最好含有微量小于 80 纳米或超过 130 纳米的材料。同样可以制备大约为 120 纳米的材料，这些材料没有明显的小于 90-95 纳米和超过 160 纳米的材料。所述材料在回收方面具有最佳性能，并且在含有 60-70 纳米的纳米颗粒时具有次佳性能。对于基础包衣的磁性颗粒，例如 BSA-包衣的磁性颗粒来说，用于实施本发明的优选粒度范围为 90-150 纳米。

根据以上说明，采用具有强磁性、低非特异性结合，胶体磁性颗粒的外部磁场装置进行的高梯度磁力分离，是被选择用于从真核细胞的混合群体中分离感兴趣的细胞亚型的方法，特别是如果所述感兴趣的亚型包括整个群体的一小部分的话。由于它们的扩散特性，所述材料能方便地寻找并且磁力标记罕见事件，如血液中的肿瘤细胞。为了成功地磁力分离用于分析的肿瘤细胞，所述磁颗粒必须对不存在于造血细胞上的表位有特异性。

有多种分析方法和标准被用于鉴定肿瘤细胞，首先要使通过免疫细胞化学确定何种成分构成肿瘤细胞的指标标准化。在本研究中，对来自前列腺癌患者的血液样品中的能表达 EpCAM 的细胞进行免疫磁富集。通过多色荧光分析，根据细胞骨骼蛋白细胞角蛋白 (CK+) 的表达，常见白细胞抗原 CD45 (CD45-) 的缺乏和核酸的存在 (NA+) 识别肿瘤细胞。可以通过流式细胞术和荧光显微技术对罕见事件或罕见细胞进行免疫表型分析。流式细胞术分析的优点是它的可再现地定量即使是低水平的荧光的能力，而显微技术具有更好的特异性，因为形态学特征可能有助于对免疫表型分类识别的目标进行分类。尽管通过流式细胞术和显微技术在前列腺癌的患者血液检测到的 CTC 的数量之间存在相关性，对 CK+, CD45-, NA+ 目标进行的显微检查发现，只有很少的目标是以完整细胞形式出现的。这一观察与在大部分循环肿瘤细胞中证实细胞凋亡的其他报导吻合。

术语“生物学标本”或“生物学样品”可以交互使用，并且表示从被怀疑含有感兴趣的细胞的人类待测对象体内采集的要分析的少量液体或组织。生物学标本表示流体或细胞部分，和含有可溶性物质的部分。生物学标本或生物学样品包括，但不局限于体液，如外周血液，组织匀浆物，乳头吸出物，结肠灌洗液，唾液，支气管（肺泡）灌洗液，胸膜液，腹膜液，心包液，尿液以及可以从人类待测对象体内获

得的任何其他细胞来源。典型的组织匀浆物可以从乳腺癌患者的前哨结中获得。

5 在本文中术语“罕见细胞”被定义为正常情况下不存在于生物学标本中的细胞，但是可以作为异常状况，如感染性疾病，慢性病，损害，或妊娠的指标出现。罕见细胞还表示可能正常存在于生物学样品中的细胞，但是它出现的频率比通常存在于正常生物学标本中的细胞的出现频率低若干个数量级。

10 术语“决定簇”在用于表示上述目标生物实体时，广义地表示存在于通常会诱导免疫应答的大分子抗原上的化学嵌合体。决定簇也可以与“表位”交互使用。在本文中交互使用的“生物特异性配体”或“生物特异性试剂”能够特异性结合决定簇。决定簇表示参与并且负责与特异性结合物质（如配体或试剂）选择性结合的目标生物实体部分，该部分的存在，是发生选择性结合所必须的。在基础术语中，决定簇是目标生物实体上的分子接触区，它们是由在特异性结合对反应中具有它们的结合亲和力的因子、配体和/或试剂识别的。

15 在本文中所使用的术语“特异性结合对”包括抗原-抗体，受体-激素，受体-配体，激动剂-拮抗剂，凝集素-碳水化合物，核酸（RNA或DNA）杂交序列，Fc受体或小鼠IgG-蛋白A，亲和素-生物素，链亲和素-生物素和病毒-受体相互作用。

20 术语“可检测标记”在本文中被用于表示通过物理或化学方法直接或间接对它进行的检测或测定可以作为目标生物实体在检测样品中的存在的指标的任何物质。有用的可检测标记的代表性例子包括，但不局限于以下物质：可以根据光吸收、荧光、反射、光散射、磷光或发光特性直接或间接检测的分子或离子；可以通过其放射特性检测的分子或离子；可以通过其核磁共振或顺磁特性检测的分子或离子。例如，可以根据光吸收或荧光间接检测的分子类型包括各种酶，这些酶能导致合适的底物转化（例如，由非吸光分子转化成吸光分子，或从非荧光分子转化成荧光分子）。分析可以用多种常见平台中的任意一种进行，包括多参数流式细胞术，免疫荧光显微技术，激光扫描细胞  
25 30 计量术，明视野基成像分析，毛细容量分析，光谱成像分析，人工细胞分析，CellSpotter®分析，CellTracks™分析，和自动化细胞分析。

短语“基本上排除”表示生物特异性配体或生物特异性试剂及其

相应的靶决定簇之间的结合反应的特异性。对它们的靶决定簇具有特异性结合活性的生物特异性配体和试剂也可能具有对其他样品成分的低水平的非特异性结合。

5 短语“早期癌症”在本文中与“I期”或“II期”癌症交互使用，并且是指业已在临床上确诊为器官局限性的癌症。还包括小到不能够通过常规方法检测的肿瘤，如用于乳腺癌患者的乳房X光照相法，或用于肺癌患者的X射线。尽管乳房X光照相法可用于检测具有大约  $2 \times 10^6$  个细胞的肿瘤，本发明的方法应当能够从接近这一大小或更小的肿瘤中检测循环的癌细胞。

10 本文所使用的术语“富集”表示与原始生物学样品中的比例相比，明显提高加工的分析样品中目标生物实体（例如肿瘤细胞）与非目标材料的比例的过程。在外周血被用作原材料的场合下，在评估富集程度时不考虑红细胞。采用本发明的方法，可以使循环的上皮细胞相对白细胞富集到至少2500倍的程度，更优选5000倍，最优选10000倍。

15 术语“抗凝”或“抗凝剂”可以交互使用，并且表示为了抑制任何不希望的天然或人工凝固而添加到生物学标本中的组分。凝固的一种例子是凝血，并且，常见的抗凝剂是螯合剂，例如乙二胺四乙酸（EDTA），二亚乙基三胺五乙酸（DTPA），1,2-二氨基环己烷四乙酸（DCTA），亚乙基双（氧亚乙基次氨基）四乙酸（EGTA），或者采用  
20 配合剂，如肝素，和肝素类，如硫酸肝素和低分子量肝素。另外，可将其总体上限定为“成团”或“团块形成”。不过，所述团块必须与CTC的“簇”或聚集物区分开，后者如果满足完整CTC的分类标准的话，就作为单个完整的CTC统计。

25 人们认为CTC簇比单个CTC具有更强的增殖潜力，并且它们的存在因此被认为在诊断上具有很大价值。具有建立继发转移肿瘤部位的增加倾向性的一种可能的原因可能是因为它们的粘附性。一种甚至更可能的原因是CTC簇的实际大小。较大的簇将会定居在小直径的毛细血管或骨骼上的孔中。一旦定居在这里，簇中的细胞的存活力将决定其在新的转移部位的存活机会。

30 本文所定义的理想“稳定剂”或“防腐剂”（本文可交互使用）是能够保存存在于生物学样品中的感兴趣的细胞，同时减少所述生物学标本中干扰性聚集物和细胞碎片的组合物，无论如何它都会妨碍靶

细胞的分离、检测和统计，以及靶细胞与非靶细胞的分辨。换句话说，在与抗凝剂组合时，稳定剂应当不会抵消抗凝剂的性能。相反，抗凝剂应当不会干扰稳定剂的性能。另外，所披露的稳定剂还发挥第三种固定作用，并因此稳定透化细胞，其中，术语“透化的”或“透化”和“固定”，“固定的”或“固定化”是以细胞生物学领域的常规定义使用的。在本文中，稳定剂的说明表示这种制剂是以适当的浓度或用量使用的，这种用量对细胞生物学领域的技术人员来说是显而易见的，其中，所述浓度或用量能有效稳定靶细胞，而又不会导致破坏。人们将本发明的组合物，方法和装置用于保护罕见细胞，显然不会将它们用于损害或破坏所述罕见细胞，因此，自然会选择合适的浓度或用量。例如，业已发现甲醛供体咪唑烷基脲在占所述标本体积的 0.1-10%，更优选 0.5-5%，最优选大约 1-3% 的浓度下是有效的。业已发现，另一种制剂如聚乙二醇在以占样品体积的大约 0.1%-大约 5%，更优选大约 0.1%-大约 1%，最优选 0.1%-大约 0.5% 的优选浓度下是有效的。

稳定剂必须能够将样品保存至少数小时。不过，业已证实，可以将样品稳定至少 72 小时。当所述样品是从远离要进行加工和分析的场所获得的时候，这种长期的稳定性是重要的。另外，所述样品针对运输期间的机械损害必须是稳定的。

稳定剂必须能区分体内肿瘤细胞分解和由于体外样品降解所导致的分解。因此，在题为“用于分析的细胞和生物学标本的稳定化”的共同未决申请中披露了稳定剂组合物，及其使用方法和装置。所述共同拥有的专利被收作本文参考。

术语“明显的细胞”或“完整细胞”可以交互使用，并且表示在成像分析期间发现的含有核酸和细胞角蛋白的细胞。所述细胞通常看上去是圆形的或者是椭圆形的，不过有时候也可以是多角形的或长形的，并且是以单细胞或细胞簇形式出现。核酸面积（即通过核酸染料标记的）小于细胞质面积（即通过抗细胞角蛋白标记的），并且是由细胞质面积包围的。

术语“可疑的细胞”或“怀疑的细胞”或“片段”可以交互使用，并且表示在成像分析期间发现的类似完整细胞的细胞，但是看上去不同于完整的细胞。根据成像分析，存在多种可能类型的怀疑的细胞，包括：

1. 去核细胞，它们的形状类似明显的细胞，对细胞角蛋白的染色呈阳性，但对核酸的染色呈阴性；

2. 斑点状或小斑点状细胞，它们的核酸染色呈阳性，但是具有不规则染色的细胞角蛋白；和

5 3. 不定型细胞，这种细胞的细胞角蛋白和核酸染色都呈阳性，但是在形状上不规则，或者异常大。

所述可疑的细胞是本发明所感兴趣的，因为它们能提供有关 CTC 性质以及患者疾病的额外信息。染色或成像伪迹有可能在分析期间出现。例如，去核细胞有时候表现出具有“影子”区，其中细胞核已经  
10 染色，但是相应的区域是核酸阴性的。这可能是由于多种外部因素所导致的，包括标记或成像技术。另外，业已观察到了具有“脱离的”细胞核的细胞。尽管这可能表明一种细胞释放了它的细胞核，但更有可能是由于成像系统的伪迹所造成的。不过，所述“伪迹”在实际上提供了有关完整细胞有可能发生的有价值的信息。因此，作为本发明  
15 的一部分，将对怀疑的细胞作更充分的分析。

细胞片段与“碎片”的差别在于，碎片不一定与细胞类似。本文所使用的术语碎片表示在加工期间特异性或非特异性标记的未分类的物体，并且在分析期间，作为图象是可见的，但是与完整细胞和/或怀疑的细胞不同。例如，业已发现，受损的细胞会释放核物质。在加工  
20 期间，这些核物质会受到非特异性的磁标记，并且随后被核酸染料标记。在分析期间，当它具有仍然附着的细胞角蛋白时，可以观察到磁标记的和染色的核物质。在分析期间出现的同样被磁力选择和染色的其他物体被归类为碎片。

本文所使用的术语“形态学分析”表示一种物体的可用眼观察到的特征，如大小、形状、或某些特征的存在/缺乏。为了观察形状学特征，通常对物体进行非特异性染色。本文所使用的术语“表位分析”表示对业已对某些表位进行过标记的物体进行的观察。为了观察表位特征，通常要对一种物体进行特异性染色或标记。可以将形态学分析和表位分析组合使用，以便提供对物体的更全面的分析。  
25

30 当片段和碎片通常被归类为“不确定事件”或“未确定事件”时，进一步视觉观察的重要性是显而易见的。以上术语来自非视觉分析，如通过流式细胞术进行的分析。因为流式细胞术不对物体进行成像，

不属于符合靶细胞或非靶细胞标准的特定群体的任何事件（在对非特异性携带的 WBC 进行阴性标记时就是这种情况），都将不属于所述群体。不过，通过本说明书可以看出，上述不确定事件是重要的。

图 1 是各种 CTC 阶段的模型，包括脱落和转移。图 1a 表示细胞、细胞簇、片段和碎片的所述阶段。图 1b 表示来自相同阶段的样品的实际图象。细胞簇、片段和碎片的图象来自对患者样品的 CellSpotter® 分析。组织样品的图象（来源和转移部位）来自其他部位（Manual of Cytology, American Society of Clinical Pathologists Press. 1983）。

简单地讲，从原发性肿瘤脱落到血液中的单细胞要么在血液中存活，要么死亡。如果它存活的话，它有可能在血液中分裂，或者定居在第二部位。如果所述细胞死亡的话，根据所使用的方法，所述细胞会降解成各种类型的片段或碎片。另一种可能性是，细胞簇从原发性肿瘤中脱落到血液中，在这里，这些细胞解离成单细胞，或保持完整，并且定居在第二部位。如果细胞簇解离的话，其行为可能类似于上述单细胞的行为，如果细胞簇保持完整的话，它更有可能由于上述原因而形成第二集落，包括大直径的细胞簇定居在小直径的毛细血管中。一旦定居，如果所述细胞是活细胞的话，所述细胞簇就会形成新的肿瘤。

片段和碎片与极少完整细胞的出现意味着存在很小的转移几率片段化的细胞将不能分裂，并且不能形成继发肿瘤。实际上，只有完整的 CTC 或可能的 CTC 细胞簇能够在第二部位定居。鉴定在粘附和穿通过程中起作用的抗原，将会有所帮助。随访并且评估有和没有细胞簇的患者的转移部位，也可能提供进一步的信息。将核形态学用于确定细胞的活性状态和异常性。染色质成团，细胞核的存在或缺乏，以及染色质过多，是用于确定一种细胞是良性的或恶性的，对免疫应答起反应或对治疗起反应的标准。用细胞质形态学确定分化水平（即起源组织）。例如，细胞质形态学可以将细胞归类为鳞状细胞和腺细胞。

在抽血和随后的标本处理期间，出现在外周循环系统中的存活的受到破坏的肿瘤细胞，可能受到进一步胁迫，并且在将血液抽入空试管期间可以被紊流和样品处理所破坏，例如，在分析之前进行的血液试管的转运和混合。除了所述机械损害之外，还有在体外以时间依赖

形式发生的导致 CTC 破坏的持续的免疫学、细胞凋亡和坏死过程。我们业已发现，标本保存的时间越长，CTC 的损失越多，并且干扰性碎片和/或聚集物的量越大。实际上，在本说明书中提供的数据（图 2 和 3）表明了 CTC 数量在室温下保存 24 小时或更长时间的若干血液标本中的急剧下降，表明在抽血之后 CTC 的显著体外破坏。尽管造血细胞的丧失是众所周知的现象，并且是上文所引用的 Streck Labs 专利和其他专利的主题，由于混合和运输所导致的机械损害的出现，迄今为止尚没有被认为是导致 CTC 或罕见细胞丧失的因素。细胞碎片的形成以及所积累的碎片和/或聚集物对 CTC 或其他罕见细胞的分析的干扰作用，迄今为止同样没有被认识到。在高敏感性富集测定中最明显和最成问题的是需要处理相对大的血液体积（5-50 毫升），并且在体积减少（少于 1 毫升）之后，随后进行靶细胞的显微镜检查或成像。所述碎片要么在正常情况下看不到，要么不会干扰常规非富集分析，例如，通过流式细胞术或通过粒度梯度方法的富集。

为了说明出现在患者体内的受损的上皮细胞和上皮细胞片段是否是由通过层析诱导的肿瘤细胞的凋亡所导致的，开发了一种模拟肿瘤细胞死亡的模型。在有或没有紫杉醇的条件下培养前列腺细胞系 LnCaP 的细胞，并且混入健康供体的血液中。通过 CellSpotter® 分析的紫杉醇处理的样品的免疫磁选择的细胞，类似于在患者血液样品中观察到的细胞。用紫杉醇处理过的细胞表现出细胞凋亡的迹象。所述细胞的小斑点状细胞角蛋白染色模式，似乎与细胞骨骼蛋白的塌陷相应（图 4B 和 6B）。由紫杉醇的微管稳定作用所导致的系列事件的起始事件，又能激活感受细胞骨骼压力的促细胞凋亡基因 Bim。用识别细胞角蛋白 18 的表位的 M30 细胞死亡抗体（Roche Applied Science, Mannheim, Germany）获得了来自细胞凋亡的 caspase-裂解的细胞角蛋白的其他证据。所述表位只有在细胞凋亡的早期，在 caspase 裂解之后才暴露。只有紫杉醇处理过的 LnCaP 被 M30 染色，而大部分二聚体细胞角蛋白细胞能被 M30 染色，这一结果与进行凋亡的细胞吻合。

应当指出的是，可以将多种不同的细胞分析平台用于鉴定和统计富集样品中的细胞。所述分析平台的例子是 Immunicon's CellSpotter® 系统。一种磁力细胞固定和分析系统，通过显微镜检测人工观察在例 II 中披露的细胞，以及 CellTracks™ 系



保存，并且在采集之后 6 小时之内处理，除非另有说明。

### 样品制备

5 将用能识别上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 的单克隆抗体标记的磁性纳米颗粒用于标记，并且通过磁力装置从造血细胞中分离上皮细胞，如在共同拥有的美国专利 6, 365, 362, 和申请日为 2002 年 2 月 19 日的美国专利申请号 10/079, 939 中所披露的，以上两份美国专利文献都被全文收作本文参考。重新悬浮在 200 微升体积中的磁力捕获的细胞进行荧光标记，以便区分造血细胞和上皮细胞。将与藻红蛋白 (CK-PE) 偶联的能识别角蛋白 4, 5, 6, 8, 10, 13, 和 18 的单克隆  
10 抗体用于鉴定上皮细胞，并且将能识别 CD45 的单克隆抗体用于鉴定白细胞，并且鉴定与细胞角蛋白非特异性地结合的造血细胞。

为了进行多色荧光显微术 (CellSpotter®) 分析，将 CD45 与别藻兰蛋白偶联 (CD45-APC, Caltag, CA)，而为了进行流式细胞分析，使用 peridinin 叶绿素蛋白偶联的 CD45 (CD45-PerCP, BDIS San  
15 Jose, CA)。将核酸特异性染料 DAPI (4, 6-二氨基-2-苯基咪唑) 用于在 CellSpotter®系统中鉴定和观察细胞核，并且将 Procount 系统 (BDIS, San Jose, CA) 中的核酸染料用于通过流式细胞术鉴定细胞。在温育之后，将多余的染色剂吸出，并且重新悬浮捕获的细胞，并且转移到 12 × 75 毫米的试管中，以便进行流式细胞分析，或转移到  
20 CellSpotter®分析室中 (如在被收作本文参考的申请日为 2002 年 2 月 12 日的美国专利申请 10/074, 900 中所披露的)，所述分析室装有磁力配合组件，由它们将所述分析室保持在两块磁铁之间 (Captive, Molecular Probes, OR)。

25

## 实施例 1

### 通过流式细胞术进行样品分析

在装有 488 nm 氩离子激光 (BDIS, San Jose, CA) 的 FACSCalibur 流式细胞计上分析样品。数据获取是通过 CellQuest (BDIS, San Jose, CA) 进行的，将一个阈值用在核酸染料的荧光上。在对 8000 个珠或 80%  
30 的样品进行分析之后终止数据的获取。对列表模式的数据进行多参数数据分析 (Paint-A-Gate<sup>Pro</sup>, BDIS, San Jose, CA)。CTC 事件的分析标准包括由正向光散射所确定的大小，由正交光散射所确定的颗粒

性，用 PE-标记的抗细胞角蛋白的 Mab 进行的阳性染色和用 PerCP-标记的抗-CD45 Mab 的不染色。对每一种样品来说，将出现在上皮细胞的典型区中的事件的数量乘以 1.25，以便计算出没有通过流式细胞术分析的样品体积。

- 5 图 2 中的图片 A, B 和 C 表示患有转移性前列腺癌的患者血液样品的流式细胞计分析。图片 B 中的两条垂直线表示白细胞 (红色斑点) 的核酸 (NAD) 的下限和上限含量。CTC 候选物能表达细胞角蛋白 (CK+), 缺乏 CD45 (CD45-), 并且含有核酸 (NAD+)。具有等于或高于白细胞的 NAD 的 CTC 候选物被认为是细胞, 并且通过黑色表示。NAD 含量
- 10 低于白细胞的 CK+, CD45 事件被认为不是靶细胞, 并且用兰色表示。通过较小的正向光散射信号证实, 兰色事件明显比黑色 CTC 小。NAD 染色强度的阈值明确排除了具有更低的 NAD 染色强度的大部分 CK+, CD45 事件。在分析来自健康供体的血液样品时, 很少观察到这样的 CK+, CD45-事件, 表明这种现象与癌症相关。在图 2D, 2E, 和 2F 中
- 15 示出了分析来自健康供体的血液的典型例子。

## 实施例 2

### 通过 CellSpotter® 分析样品

- CellSpotter® 系统包括一台显微镜, 它具有一个水银弧光灯, 一个
- 20 个 10× 的物镜, 一个高分辨率 X, Y, Z 载物台, 和一个四重滤光立方转换器。对 DAPI 来说, 在每一个四重立方体中的激发、双色和发射滤光器分别为 365 nm/400 nm/400 nm, 对于 DiOC16 来说, 分别为 480 nm/495 nm/510 nm, 对于 PE 来说, 为 546nm/560 nm/580 nm, 而对于 APC 来说, 为 620 nm/660 nm/700 nm。图象是通过与数码图象获取
- 25 装置连接的数码相机获得的。腔室的表面为 80.2 mm<sup>2</sup>, 并且四个滤光器中每一个的四排 35 幅图象, 导致了必须获得的 560 幅图象, 以便覆盖整个表面。CellSpotter® 获取程序能自动确定要在它上面获取图象的区域, 要获取的图象的数量, 每一个图象的位置以及在每一个位置上使用的显微镜焦距。将来自一种样品的所有图象编辑成目录, 该目
- 30 录对于特定样品识别来说是独一无二的。将一种算法应用于从一种样品上获得的所有图象, 以便寻找 DAPI 和 CK-PE 染色的部位。如果染色区域与潜在的肿瘤细胞的染色部位一致 (DAPI+, CK-PE+), 所述软件

将所述区域的位置保存在数据库中。所述软件显示每一个方框的图，并且用户可以证实在行中出现的图象与肿瘤细胞一致，或用白细胞标记 CD45 染色。由所述软件将每一个样品的检查框列表，并且将信息保存在数据库中。

5 图 3 表示来自患有转移性前列腺癌的患者的血液样品的 CellSpottere®分析的例子。有可能包括肿瘤细胞的区域显示小块图的行中。在该附图左下角的刻度尺表示所述小块图的大小。从右到左，所述小块图表示细胞核 (DAPI)，细胞质细胞角蛋白 (CK-PE)，由膜染料染色的对照细胞 (DiOC<sub>16</sub>(3))，以及表面 CD45 (CD45-APC) 染色。左侧的合成图象表示紫色细胞核 (DAPI) 和绿色细胞质 (CK-PE) 染色的假的颜色重叠。合成图象旁边的对照框使得用户能够确定出现在行中的图象与肿瘤细胞一致，并且 CD45-APC 图象旁边的对照框被用于证实白细胞或肿瘤细胞的非特异性染色。在该患者样品中，所述软件检测 2761 行小块图，它们证实了染色与肿瘤细胞一致。在附图中示出了 2761 行中的 18 行，它们被标明为 1631-1640 和 1869-1876。对编号为 1631, 1636, 1638, 1640 和 1873-1876 的行进行检查，并且显示被确定为尺寸大于 4 微米的 CTC 的特征，存在由细胞质细胞角蛋白染色包围的细胞核，并且缺乏 DiOC<sub>16</sub>(3) 和 CD45 染色。注意肿瘤细胞外观的差别：编号为 1638 的行中的细胞较大，而编号为 1640 的行中的细胞明显较小。编号为 1634 和 1869 的行中的事件的免疫表型与肿瘤细胞吻合，但是它们的形态与完整细胞不一致。编号为 1869 的行中的小块图表示由于细胞骨骼蛋白收缩而产生的大的细胞核和斑点状细胞质，它与细胞的凋亡一致。编号为 1634 的行中的小块图表示受损害的细胞，该细胞表现出细胞核的溢出。编号为 1632 的行中的小块图表示能同时被细胞角蛋白和 CD45 染色的细胞，它可能是与 CD45 非特异性结合的肿瘤细胞，也可能是被细胞角蛋白非特异性染色的癌细胞。在这种场合下，所述细胞的形态与淋巴细胞的形态非常类似。在编号为 1633, 1635, 1637, 1639, 1870 和 1872 的行中的小块图表示细胞质角蛋白染色物体，这些物体大于 4 微米，但是不具有与细胞的相似性。在小块图 1637, 1639 和 1872 中的细胞角蛋白染色物体与白细胞非常接近。

根据对若干患者样品中 CTC 候选物图象的观察，可以将 CTC 分成

三种类型：完整 CTC，受损的 CTC，和 CTC 片段，这三种类型都不能用 CD45 染色，并且不能在 DiOC<sub>16</sub>(3) 滤光器中出现。图 4 表示从正在进行治疗的转移性前列腺癌患者的一管血液中分离的 CTC 的三种类型的例子。图 3A 中所示出的完整的肿瘤细胞被确定为大于 4 微米的物体，它具有相对光滑的细胞质膜，贯穿细胞质中的细胞骨骼蛋白，以及包括在细胞核中的完整的核。图 4B 中所示出的受损的 CTC 被确定为大于 4 微米的物体，它具有斑点状细胞角蛋白染色或不整齐的细胞质膜，以及与细胞质角蛋白染色相关的细胞膜。图 4C 中所示出的肿瘤细胞片段被确定为大于 4 微米的圆形细胞角蛋白染色物体，它有或没有核材料的结合，它与细胞的形态没有类似性。

### 实施例 3

#### 前列腺患者体内的 CTC

通过流式细胞术和 CellSpotter®统计前列腺癌患者的 18 份血液样品和来自健康个体的 27 份样品中的 CTC。通过 CellSpotter®所检测的完整 CTC 的数量增加对表 1 中所示出的结果进行分类。

表 1-通过 CellSpotters®和流式细胞术统计来自前列腺癌患者的 18 份血液样品和来自健康个体的 27 份样品中的 CTC。

患者样品	CellSpotter®						流式细胞术
	完整的CTC		怀疑的CTC		不确定事件		CK+CD45-NA+
	#	%	#	%	#	%	#
1	0	0	1	50	1	50	5
2	0	0	2	100	0	0	12
3	0	0	2	66	1	34	1
4	0	0	2	50	2	50	0
5	0	0	2	29	5	71	5
6	0	0	3	60	2	40	18
7	0	0	3	38	5	62	0
8	0	0	7	44	9	56	10
9	0	0	13	76	4	24	2
10	1	5	1	5	20	90	4
11	1	10	4	40	5	50	0
12	2	22	1	11	6	67	4
13	28	6	7	1	441	93	69
14	70	5	168	12	1204	83	683
15	322	3	448	13	4244	87	500
16	350	5	112	2	5924	93	723
17	350	2	1429	9	14412	89	2420
18	742	17	112	2	3641	81	310
平均值	-	4%	-	34%	-	62%	-
来自健康供体的27份样品							
平均值	0.04		0.96		4.96		0.7
标准差	0.19		1.85		3.98		1.14
最小值	0		0		0		0
最大值	1		7		15		4

5 #-7.5 ml 血液中 CTC 的数量,%-通过 CellSpotter®检测的所有 CTC 的百分比

在 CellSpotter®分析中,完整 CTC 的比例明显占 CTC 的最小的比例,并且占有所有 CTC 的 0-22%(平均 4%)。受损的 CTC 的比例占 1%-100% (平均 34%),而 CTC 片段占 CTC 的最大的比例,为 0%-93%(平均 62%)。CTC 的三种类型在患者之间的分布明显不同,这种差别体现在:在完整的 CTC 和受损的 CTC 之间 ( $R^2 = 0.20$ ) 以及完整的 CTC 和 CTC 片段之间 ( $R^2 = 0.42$ ) 缺乏相关性,并且在受损的 CTC 和 CTC 片段之间 ( $R^2$

=0.88) 存在某种相关性。比较通过 CellSpotter®确定的完整的 CTC 和通过流式细胞术统计的 CTC 没有发现显著的相关性 ( $R^2 = 0.26$ ), 而通过流式细胞术发现了受损的 CTC 和 CTC 之间的显著相关性 ( $R^2 = 0.92$ ), 并且通过流式细胞术发现了 CTC 片段和 CTC 之间的显著相关性 ( $R^2 = 0.93$ )。比较通过流式细胞术和 CellSpotter®检测的 CTC, 发现通过流式细胞术检测的 CTC 包括完整的 CTC 和受损的 CTC, 并且在一定程度上包括 CTC 片段。

#### 实施例 4

10 通过在 LnCaP 细胞中体外诱导细胞凋亡模拟细胞损害

为了研究细胞毒性剂诱导的细胞凋亡对 CTC 的流式细胞测定和 CellSpotter®分析的影响, 在存在或不存在 40 nM 紫杉醇的条件下, 将来自前列腺细胞系 LnCaP 的细胞培养 72 小时。在培养之后, 通过台盼兰排除法证实了未处理过的 LnCaP 细胞存活力大约为 95%, 而紫杉醇处理过的细胞的存活力为 33%。将处理过的和未处理过的 LnCaP 细胞接种到健康供体的血液中, 通过上述铁流体方法筛选, 并且通过 CellSpotter®系统分析。在 LnCaP 细胞混入没有用紫杉醇处理过的血液中的实验中, 超过 95% 的 LnCaP 细胞可以归类为完整的肿瘤细胞, 紫杉醇处理过的 LnCaP 细胞的形态学外观表现出与患者样品中观察到的 CTC 的外观极为相似, 并且如图 6 所示。在图 6A 中示出了在紫杉醇处理之后存活的完整的 LnCaP 细胞, 在图 6B 中示出了其主要部分表现出斑点状细胞角蛋白染色的 LnCaP, 而在图 6C 中示出了肿瘤片段。

还制备了混入了用紫杉醇处理过的和未处理过的 LnCaP 细胞的正常血液样品, 以便进行流式细胞术分析。在图 2G, 2H, 和 2I 中示出了混入了 501 LnCaP 细胞的血液样品的流式细胞术分析。在图中用黑色显示并且示出了通过大的正向光线散射信号表示的主要为明亮的细胞角蛋白阳性群体, 其核酸含量大于正常人类白细胞, 并且具有相对大的体积。在样品中只检测到少量的 CK+, CD45-事件的 NAD 含量低于白细胞, 并且用兰色表示。图 2J, 2K 和 2L 表示混入血液的紫杉醇处理过的 LnCaP 细胞的流式细胞术分析。与活的 LnCaP 相反, 在大部分群体中观察到了细胞角蛋白染色的广泛分布, 这表明具有较低浓度的核酸含量。另外, 观察到了像白细胞那样具有较低核酸含量的大量小的

细胞角蛋白阳性事件。所述患者的情况与紫杉醇处理过的 LnCaP 细胞的情况非常类似，从而支持了以下假设：通过流式细胞术检测到的 CTC 表示癌症患者血液中的完整的 CTC 和多种分解的细胞。

上述数据表明，在前列腺癌患者的血液中，通过流式细胞术和 CellSpottere®检测的 CTC 包括完整的细胞和处在各种分解阶段的细胞。在体外通过紫杉醇诱导的细胞凋亡表明，在患者血液样品中检测到的 CTC 正在经历细胞凋亡，坏死，或通过处理或治疗所导致的各种程度的体内损害，通过经由血管系统或通过免疫系统导致的机械损害。

不过，另一种体外导致的细胞分解的来源，可能是通过样品制备或在抽血之后缺乏 CTC 或其他血液成分的稳定而导入的。为了研究样品老化的影响，已知这种影响会导致损害，如果有足够的血液可供利用的话，在抽血之后 2 小时之内，24 小时之后，以及 6 和 18 小时之后对从 12 位前列腺癌患者体内抽取的血液样品进行加工，并且通过流式细胞测定分析。在 12 种患者样品中有 8 种检测到的 CTC 含量高于在正常供体中检测到的平均值+3SD。如表 2 所示，在所有 8 种样品中都观察到随着样品老化而出现的 CTC 损失。

表 2-通过流式细胞术统计 8 份前列腺癌患者样品中的 CTC，所述样品是在抽血之后的不同时间点加工和分析的

患者编号#	抽血后时间			
	< 2hr #CTC	~6hr #CTC	~18hr #CTC	~24hr #CTC
1	5	-	-	0
2	8	9	2	3
3	15	-	-	0
4	31	-	-	3
5	44	-	-	8
6	45	-	-	1
7	49	38	19	26
8	78	-	-	0

hr = 小时      #CTC = 5 ml 血液中的 CTC 数量

当血液加工推迟时，检测到 CTC 数量的显著减少，这表明了 CTC

- 的脆弱性，并且使得有必要在抽血之后不超过 6 小时加工不稳定的血液样品，以便获得准确的 CTC 计数。为了可靠地评估临床上相关的信息是否包含在肿瘤细胞降解的不同阶段，血液防腐剂是必要的，它能在抽血时稳定 CTC，以便获得能准确反应在体内所发生的情况的信息。
- 5 另外，用于富集 CTC 的灵敏测定的样品制备方法，需要对所有类型的 CTC 进行捕获，并因此排除了使用现有技术中的传统密度梯度分离方法。

### 实施例 5

#### 10 明显的 CTC 和怀疑的 CTC 是重要的指标

正如本文所披露的，为了进行灵敏的测定，重要的是能够区分体内和体外损害。这一条在确定处理或治疗效果的测定中显得尤为重要，已知所述处理或治疗会导致体内损害。如果样品操作、加工或分析会导致靶细胞损害，形成怀疑的细胞、细胞片段或碎片的话，所述测定将不能提供有价值的结果。

15

将一种测定方法通过流式细胞术直接用于检测 100 微升血液中的 CTC，不采用任何富集方法。所述 100 微升测定只能检测 EpCAM 阳性细胞，并且其灵敏度非常低。不过，具有高的 CTC 计数的某些晚期癌症患者预期是可以观察的。这种测定方法应当能提供对 CTC 的可靠的确诊性评估，因为它是不涉及任何操作的直接测定。数据是使用所述测定方法由若干患者样品产生的，以便回答若干问题。

20

所述 100 微升的测定根据诸如大小和染色强度的性质对细胞进行分类。明显的 CTC 具有明亮的核酸染色（类似于白细胞），阳性 EpCAM 抗原染色，以及类似于白细胞的大小或更大一些。怀疑的 CTC 是对 EpCAM 抗体呈阳性的任何物体，但不是鉴定为明显的 CTC（即模糊的核酸，尺寸小于白细胞）。所述测定方法能从两种类型中识别目标。

25

图 5 表示通过 100 微升测定方法确定的血液中明显的和怀疑的 CTC 的存在。怀疑的 CTC 不是在样品加工期间产生的（体外损害），因为 100 微升的测定方法是一种直接测定方法，并且不涉及任何分离或洗涤步骤。以上数据还表明，在明显的和怀疑的 CTC 的数量之间存在关系。怀疑的 CTC 的数量似乎随着明显的 CTC 的数量的增加而增加。当对怀疑的和明显的 CTC 的数量进行作图时，2.92 的斜率表示与明显的 CTC

30

相比, 存在于样品中的怀疑的 CTC 的比例。  $r^2 = 0.097$  的相关系数表示在多种临床样品的明显的 CTC 和怀疑的 CTC 之间存在良好的相关性。另外, 还在铁流体-筛选测定中观察到了怀疑的 CTC, 并且具有类似于通过直接测定在血液检测到的怀疑的 CTC 的特征。除了正常的 CTC 之外将怀疑的 CTC 包括在总的肿瘤细胞数量内是重要的。

5 一个重要的问题是, 如何将来自 100 微升测定的数据与铁流体选择的 CTC(富集的 CTC)进行比较。所述铁流体测定方法能定量检测 CTC 吗? 另一个问题是如果所述流体测定数据是正确的, 铁流体选择测定中的 CTC 的回收率是多少。有三种主要因素决定在 100 微升测定中 CTC 的回收:

- EpCAM 密度
- 细胞角蛋白阳性, 和
- 细胞核阳性。

15 与明显的 CTC 相比, 怀疑的 CTC 具有较低的 EpCAM 密度, 这种现象的重要性尚没有得到充分认识。

使用 7 毫升血液将通过 100 毫升测定方法确定的明显和怀疑的 CTC 与由铁流体选择测定方法确定的正常和怀疑的 CTC 进行了比较。该数据是从前列腺患者样品中获得的, 并且通过流式细胞术分析。明显的和怀疑的 CTC 都随着储存时间的延长而增加, 并且其趋势类似于在铁流体选择测定中检测的 CTC, 因此证实了 100 毫升测定方法的效力。根据 100 微升血液中的 CTC, 来自铁流体选择测定的 CTC 的回收率为大约 90%。已知来自该患者的 CTC 的 MFI(平均荧光强度, 它与 EpCAM 密度相关)很高(MFI=300), 并且所有 EpCAM 阳性细胞都是细胞角蛋白阳性的。不过, 来自某些其他临床样品的 CTC 的回收率已经低至 20%。有若干种因素导致了较低的回收率, 如 EpCAM 阳性/细胞角蛋白阴性细胞, 细胞角蛋白模糊细胞, 细胞表面上的粘蛋白抑制了铁流体结合细胞的能力。

上述测定方法是在两个时间点上在患者身上进行的。反应是通过病变的二维成像测定的。其比例(比例=明显的 CTC/总 CTC)类似于早先披露的反应指数, 并且可以用作治疗成功的数字指标。以上结果归纳在表 3 中。接近于 1.0 的比例表示总的 CTC 是明显的 CTC, 而接近于 0.0 的比例表示有更多的怀疑的 CTC 或碎片。进展表示病变的大小

增加，部分反应表示对治疗的反应，其中所述比例相对低，而稳定的比例表示没有变化，或病变缩小。阳性变化表示完整 CTC 数量的增加，相当于疾病的进展。阴性变化表示完整的 CTC 的数量的减少，或怀疑的 CTC 和/或碎片的数量的可能的增加，相当于对治疗的反应。

- 5 以上结果表明了在分析对治疗的反应时将怀疑的 CTC 和碎片包括在内的重要性，因为仅仅是完整的或明显的 CTC 的数量不能够提供尽可能多的信息。另外，所述指标可用于对处理或治疗进行短期监测，或对缓解和/或复发进行长期监测。

10 表 III-与治疗反应相应的明显的 CTC 和怀疑的 CTC

反应	比例1	比例2	变化
进展	0.3	0.0	-0.3
	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.6	0.1
	0.9	1.0	0.1
	0.3	0.5	0.2
	0.4	0.7	0.3
	0.0	0.4	0.4
	0.5	0.9	0.4
	0.0	0.5	0.5
	0.0	0.6	0.6
部分反应	1.0	0.0	-1.0
	0.4	0.0	-0.4
	0.3	0.0	-0.3
	0.5	0.2	-0.3
	0.4	0.3	-0.1
	0.0	0.0	0.0
	0.3	1.0	0.7
稳定化	1.0	0.0	-1.0
	0.5	0.0	-0.5
	1.0	0.7	-0.3
	0.3	0.0	-0.3
	0.4	0.3	-0.1
	0.1	0.0	-0.1
	0.2	0.1	-0.1
	0.6	0.5	-0.1
	0.9	0.8	-0.1
	0.0	0.0	0.0
	0.6	0.7	0.1
	0.6	0.8	0.2
	0.0	1.0	1.0

统计肿瘤细胞碎片可以证实在癌症诊断和治疗方面，比在检测大

的增殖性细胞簇方面更有价值。因为业已发现大小为大约 1-3 微米(血小板的大小)的碎片颗粒的存在量,远远大于完整细胞的数量,它们可能构成了一种分离的、独立的、并且可能比完整的肿瘤细胞更灵敏的标记。当免疫系统是完整的并且最有活性的时候,受损的 CTC 的存在可能与早期癌症的检测特别相关。类似地,在治疗期间碎片的显著增加可能表明循环和组织肿瘤细胞的破裂(即治疗效果),同时伴随着细胞成分的大量释放,如在肿瘤分解期间观察的钙。与可溶性肿瘤标记类似,所述碎片可以在没有富集的情况下,在血液中检测到,或者通过有限富集之后在血块黄层中检测到,并且构成了另一种,并且有可能比完整细胞富集/分析更简单的诊断工具。由于 CTC 碎片丧失了形态学,检测可以通过流式细胞术进行,只要所述碎片能够对合适的决定簇,如细胞角蛋白染色进行。

正如上文所讨论的,有或没有 DNA 的受损的或分解的 CTC,在理论上是可预期的,因此,不是来自正在进行有效治疗的患者和具有强免疫系统的未治疗的患者的标本中不理想的事件。完整的 CTC 与总的可检测事件的比例或百分比可能被证实是一种更有用的参数,可以被医生用于评估患者的免疫系统或对治疗的反应。正常的免疫防御,特别是活化的中性粒细胞,同样能通过一种被称为“细胞外杀伤”的过程作为外源物质破坏或分解 CTC,即使 CTC 大于所述中性粒细胞。发现仅有小百分比的脱落的 CTC 是完整的细胞似乎并不令人吃惊,除非免疫系统在疾病的晚期已经不起作用或治疗是无效的。

因此,有多种方法可用于体外癌症检测方法:对完整循环细胞/细胞簇的结论性检测,诸如循环肿瘤碎片的推论性方法(包括总的和肿瘤特异性 RNA/DNA),和常规可溶性肿瘤标记。不过,没有一种方法本身是足够灵敏的。与 CTC 形态学相比,碎片检测的较低的特异性可能是在筛选中能够减小的一个问题(例如通过三重标记),但是它是监测中的次要问题。另外在评估碎片分析的灵敏性和特异性方面,与正常个体相比对在患者体内的完整的相对 CTC 和诊断阶段的碎片数据的统计学分析和相关性似乎是有价值的。

可以用本发明的组合物、方法和试剂盒检测的不同类型的癌症的例子包括胺前体摄取脱羧细胞瘤,迷芽瘤,鳃原瘤,恶性类癌综合症,类癌心脏病,癌,例如, Walker 癌,基底细胞癌,基底鳞状细胞癌,

Brown-Pearce 癌, 导管癌, Ehrlich 肿瘤, 原位癌, Krebs 2, merkel 细胞癌, 粘液细胞癌, 非小细胞肺癌, 小细胞癌, 乳头瘤, 硬癌, 细支气管肺泡癌, 支气管肺癌, 鳞状细胞癌和移行细胞网状内皮组织增殖, 黑素瘤, 成软骨细胞瘤, 软骨瘤, 软骨肉瘤, 纤维瘤, 纤维肉瘤, 5 巨大细胞瘤, 组织细胞瘤, 脂肪瘤, 脂肪肉瘤, 间皮瘤, 粘液瘤, 粘液肉瘤, 骨瘤, 骨肉瘤, Ewing's 肌瘤, 滑膜瘤, 腺纤维瘤, 腺淋巴瘤, 癌肉瘤, 脊索瘤, 间质瘤, 中肾瘤, 肌肉瘤, 造釉细胞瘤, 牙骨质瘤, 牙瘤, 畸胎瘤, trophoblastic 瘤, 腺癌, 腺瘤, 胆管瘤, 胆脂瘤, 圆柱瘤, 囊腺癌, 囊腺瘤, 肉芽肿细胞瘤, gynandroblastoma, 10 肝癌, 汗腺腺癌, 胰岛细胞瘤, leydig 细胞瘤, 乳头瘤, sertoli 细胞瘤, 泡膜细胞瘤, 平滑肌瘤, 平滑肌肉瘤, 成肌细胞瘤, 肌瘤, 肌肉瘤, 横纹肌瘤, 横纹肌肉瘤, 室管膜瘤, 神经节瘤, 神经胶质瘤, 成神经管细胞瘤, 脑膜瘤, 神经鞘瘤, 成神经细胞瘤, 神经上皮瘤, 神经纤维瘤, 神经瘤, 副神经节瘤, 非嗜铬副神经节瘤, 15 antiokeratoma, 血管瘤硬化, 血管瘤病, 血管球瘤, 血管内皮细胞瘤, 血管瘤, 血管外皮细胞瘤, 血管肌瘤, 淋巴管瘤, 淋巴管肌瘤, lymphangiosarcoma, 松果体瘤, 癌肉瘤, 软骨肉瘤, 叶状囊性肉瘤, 纤维肉瘤, 血管肌瘤, 平滑肌瘤, 白血病性肌瘤, 脂肪肉瘤, 淋巴管肉瘤, 肌肉瘤, 粘液肉瘤, 卵巢癌, 横纹肌肉瘤, 肉瘤 (Kaposi's, 20 和肥大细胞), 赘生物 (例如, 骨骼, 消化系统, 结肠直肠, 肝脏, 胰腺, 脑垂体, 睾丸, 眼眶, 头部和颈部, 中枢神经系统, 听觉系统, 骨盆, 呼吸道, 和泌尿道), 神经纤维瘤病, 和宫颈发育不良。

不过, 本发明并不局限于检测循环上皮细胞和/或细胞簇、片段或碎片。例如, 业已在患有心肌梗塞的患者的血液中观察到了内皮细胞。25 内皮细胞、心肌细胞、和病毒感染的细胞, 如上皮细胞具有通过现有单克隆抗体识别的细胞类型特异性决定簇。因此, 本发明的方法和试剂盒可能适用于检测所述循环内皮细胞。另外, 本发明可以检测存在于患有感染性疾病的患者的外周血液中的细菌细胞, 所述患者还可以用本发明的组合物、方法和试剂盒评估。有理由认为, 所述罕见细胞 30 在循环系统中的行为是类似的, 并且片段和/或碎片将会在类似于上文所述的条件下存在。

相信本文所披露的本发明的优选实施方案使得本发明可应用于除

了癌症诊断以外的领域和用途。本领域技术人员可以理解的是，本发明的改进的诊断方法并不局限于上述对优选实施方案的说明。最后，尽管上面所提供的某些实施方案披露了详细说明，以下权利要求书并不局限于由所述详细说明所限定的范围。实际上，在不超出以下权利要求书的构思的前提下，可以对所述方案进行各种改进。

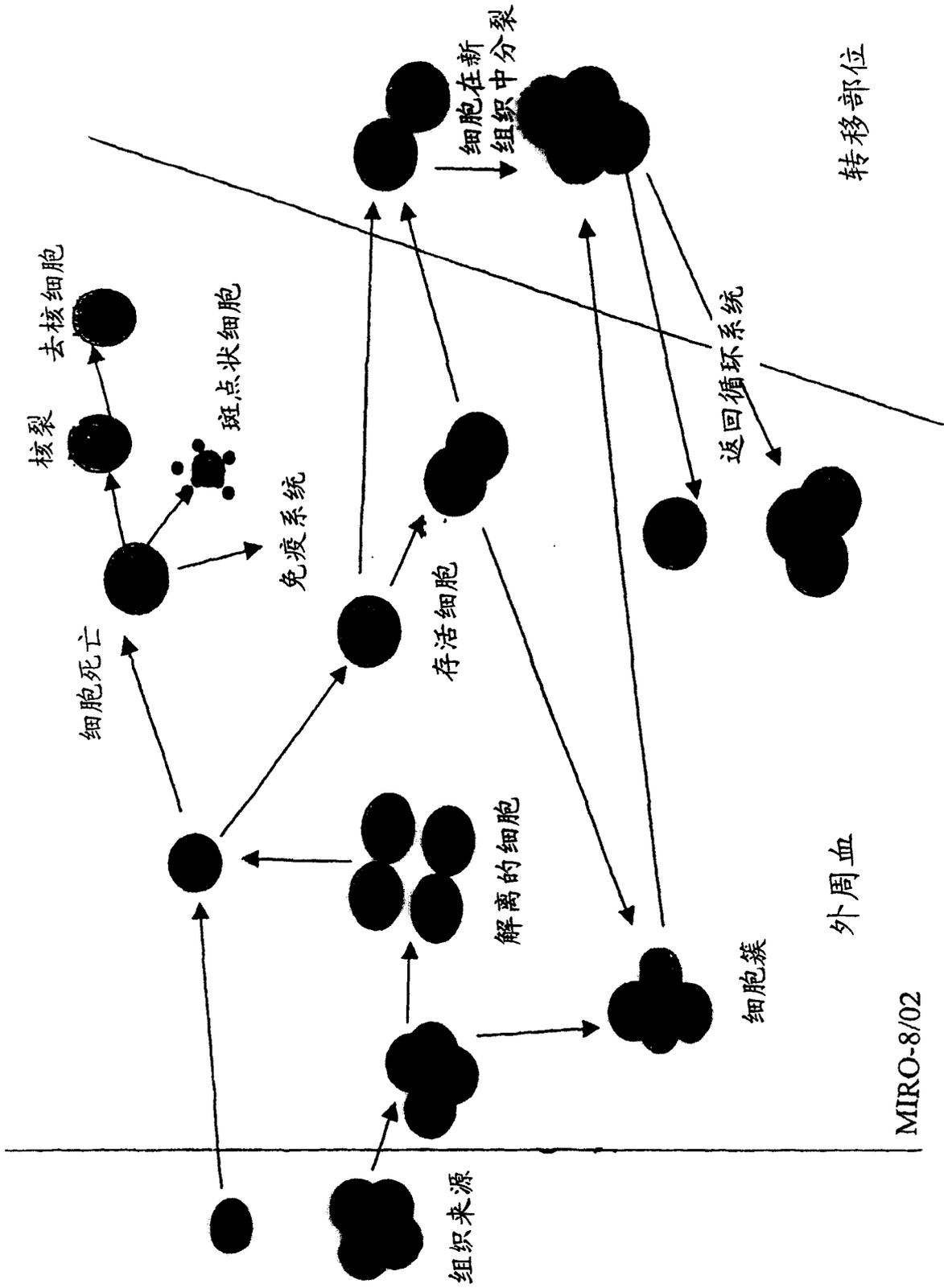


图 1a

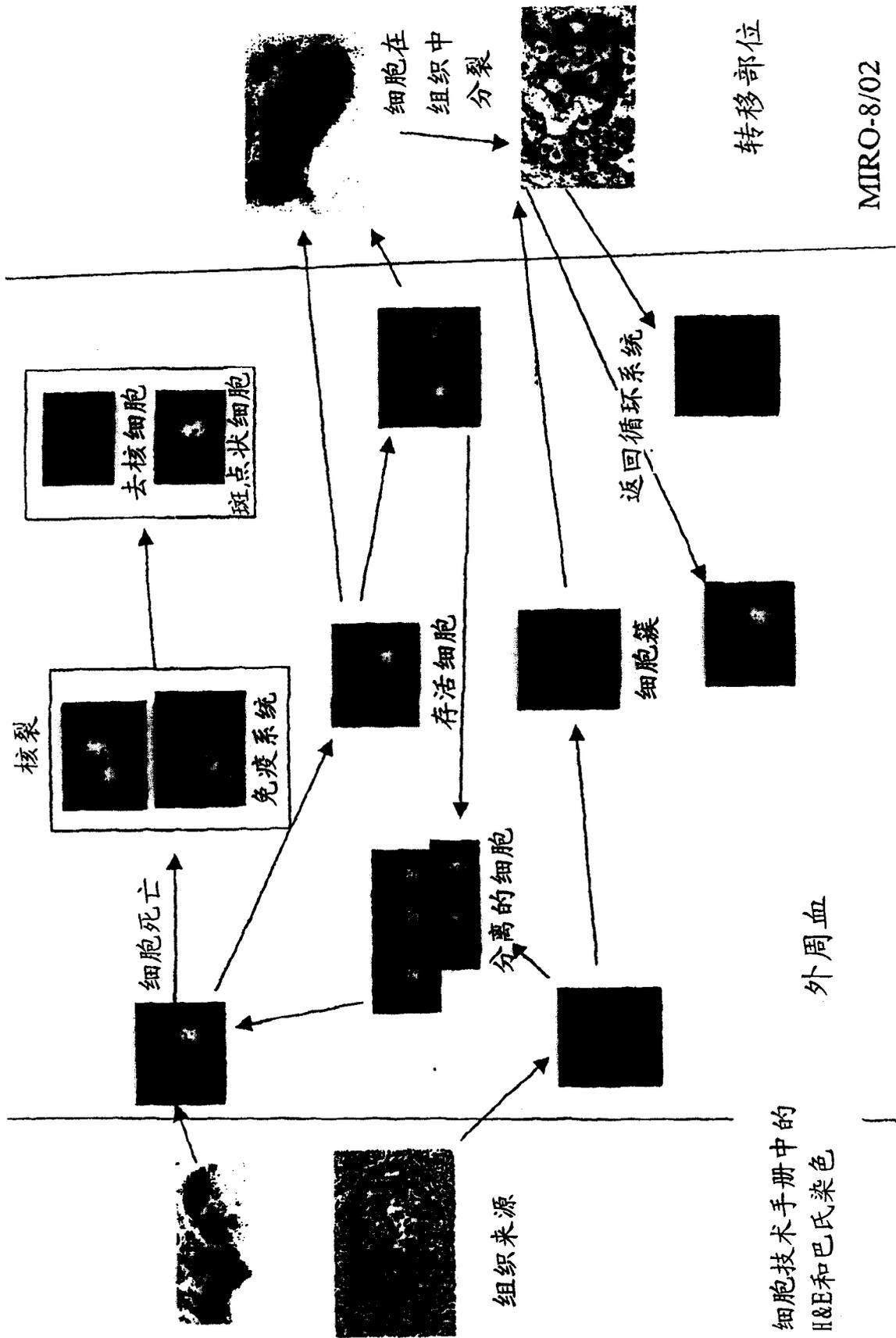


图 1b

细胞技术手册中的  
H&E和巴氏染色

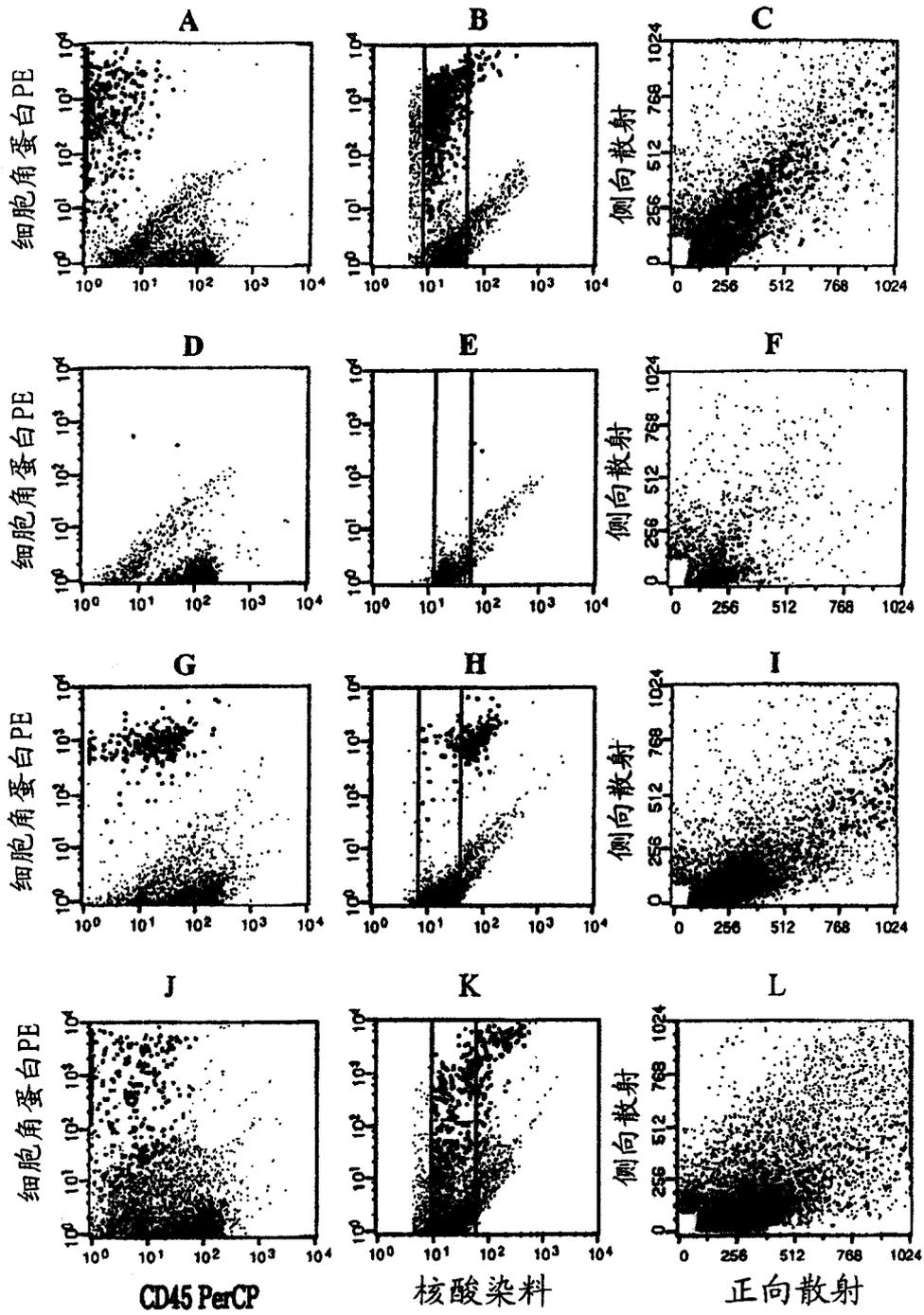


图 2

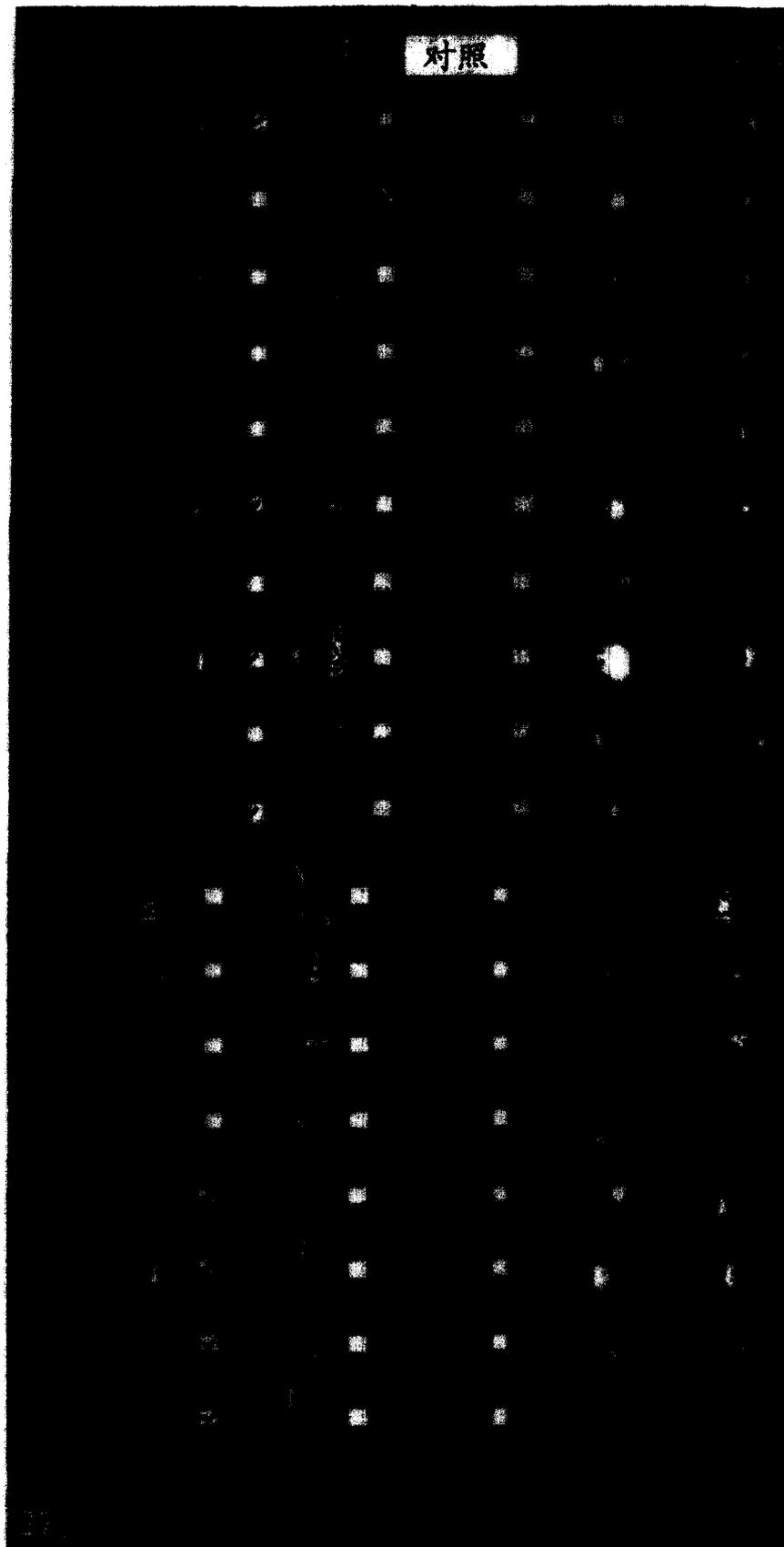


图 3

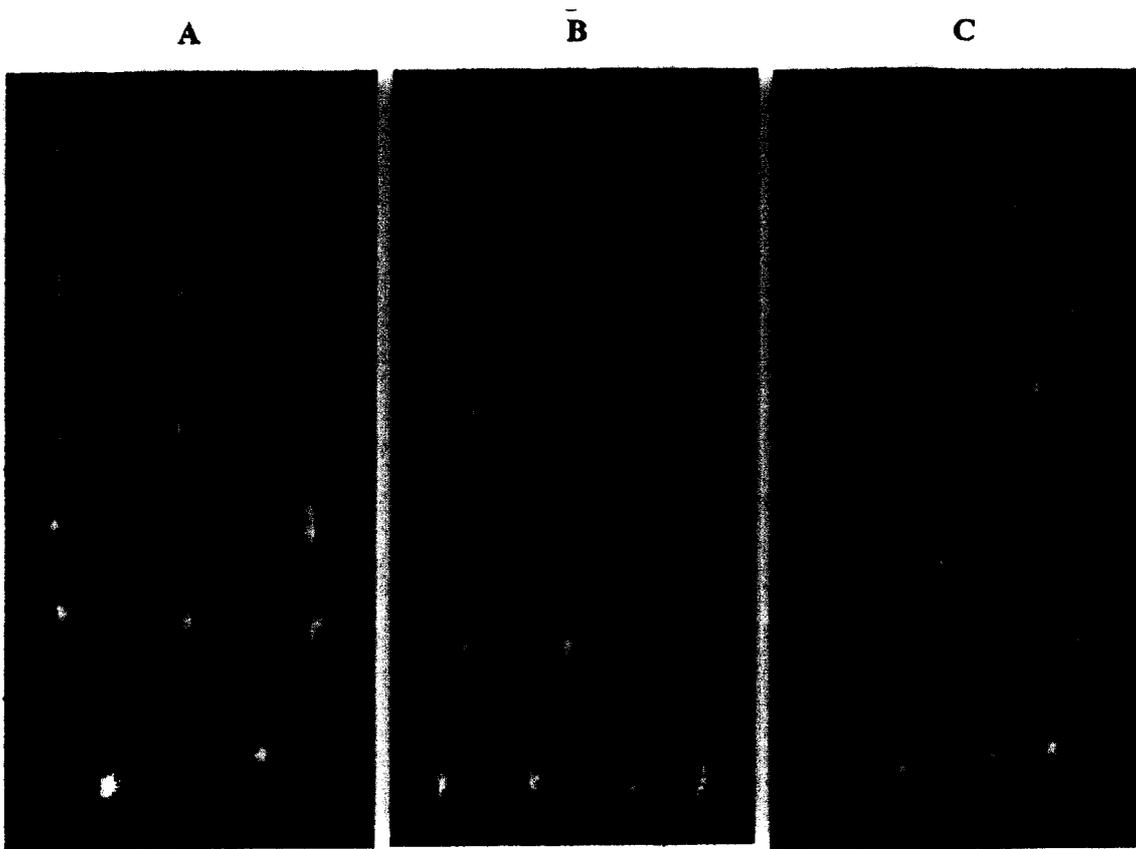


图 4

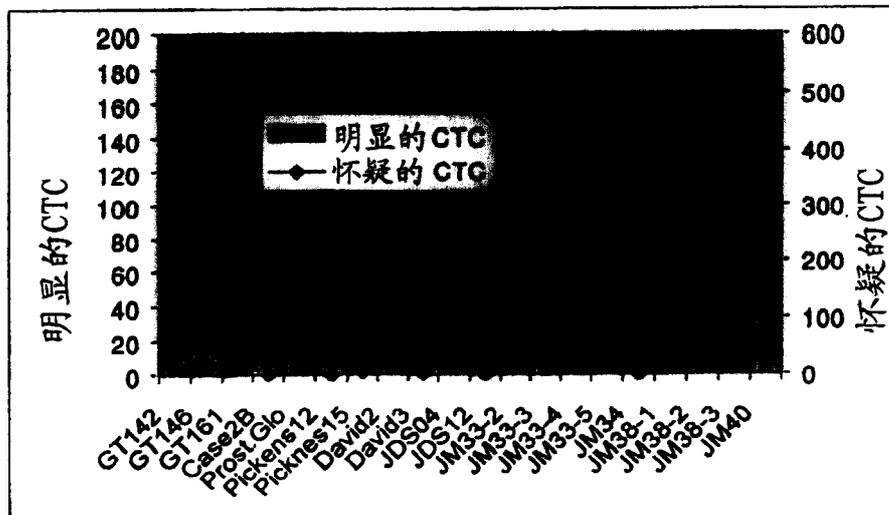


图 5

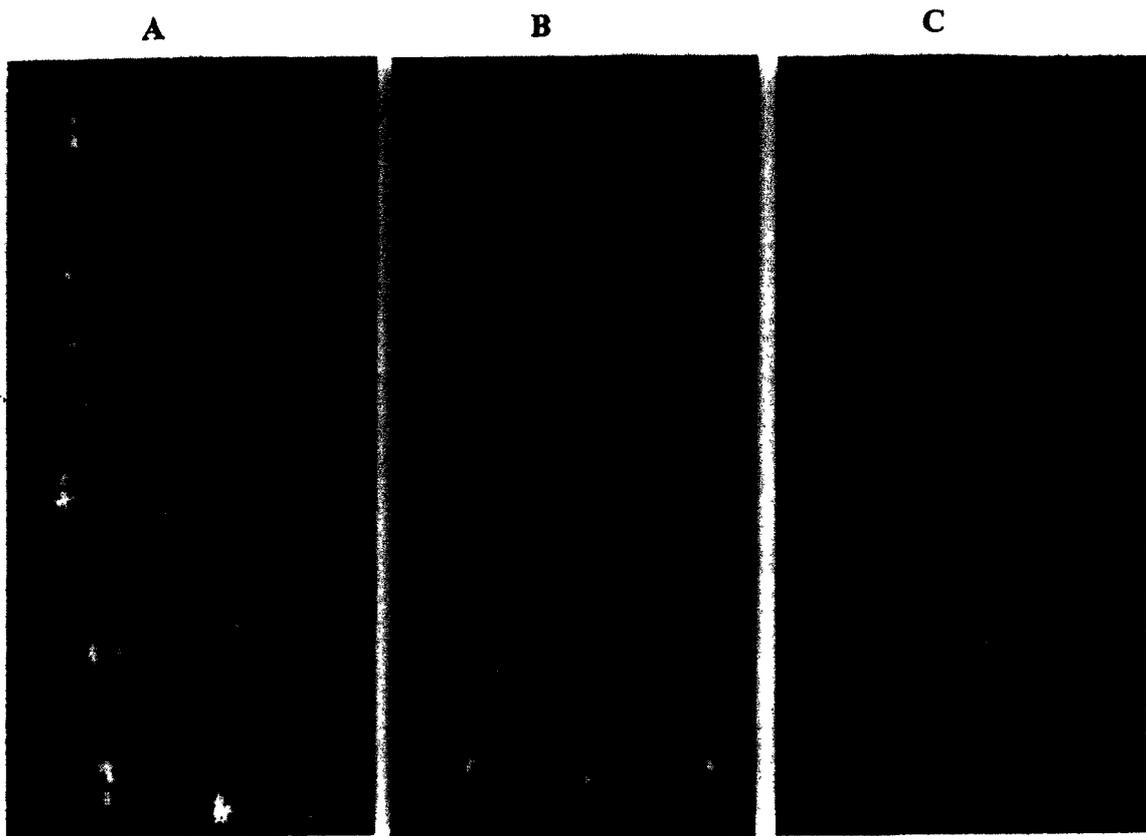


图 6

专利名称(译)	循环肿瘤细胞、片段和碎片的分析		
公开(公告)号	<a href="#">CN1596265A</a>	公开(公告)日	2005-03-16
申请号	CN02821200.2	申请日	2002-08-23
[标]发明人	GC劳 C拉森 M雷伯莱特 H鲁特纳 L特尔斯塔彭 SM奥哈拉 S格罗斯		
发明人	G·C·劳 C·拉森 M·雷伯莱特 H·鲁特纳 L·特尔斯塔彭 S·M·奥哈拉 S·格罗斯		
IPC分类号	G01N33/48 A01N1/00 A01N1/02 C12Q1/02 G01N33/49 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/574 C07K1/00 C07K17/00 C12N1/00 C12N5/00 C12N5/16 G01N33/53		
CPC分类号	A01N1/00 G01N33/574 G01N33/54333 A01N1/0226 A01N1/02		
代理人(译)	李波		
优先权	60/314151 2001-08-23 US 60/369628 2002-04-03 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

将本发明所披露的方法和试剂用于分析循环肿瘤细胞，细胞簇，片段和碎片的用途。分析是用多种平台进行的，包括流式细胞术和CellSpotter 荧光显微成像系统。业已证实，分析受损害的细胞是重要的，不过，存在两种损害来源：体内和体外来源。体内损害是通过细胞凋亡、坏死、或免疫应答产生的。体外损害是在样品的获得、处理、转运、加工、或分析期间产生的。因此，需要限定、减少、消除、或者至少定性体外损害，以便防止这种损害干扰分析。本文披露了用于根据循环的罕见细胞诊断、监测和筛选疾病的方法，包括通过CTC、细胞簇、片段和碎片确定的恶性肿瘤。还提供了用于通过所述方法分析生物学标本的试剂盒。

