

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00819893.4

G01N 1/00

G01N 1/28 G01N 1/38

G01N 21/00 G01N 21/01

G01N 21/17 G01N 21/25

G01N 21/29 G01N 21/41

G01N 21/62 G01N 21/63

G01N 21/64 G01N 21/75

[43] 公开日 2003 年 11 月 5 日

[11] 公开号 CN 1454313A

[22] 申请日 2000.7.14 [21] 申请号 00819893.4

[86] 国际申请 PCT/US00/19171 2000.7.14

[87] 国际公布 WO02/06790 英 2002.1.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.13

[71] 申请人 免疫公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 P·A·里伯蒂 G·C·劳

L·W·M·M·特斯塔彭

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 马崇德

G01N 33/53 G01N 33/531

G01N 33/532 G01N 33/533

G01N 33/536 G01N 33/537

G01N 33/539 G01N 33/542

G01N 33/563 G01N 33/574

G01N 33/577

权利要求书 6 页 说明书 30 页 附图 1 页

[54] 发明名称 通过磁性纳米颗粒的受控聚集而提高分离效率

[57] 摘要

披露了一些组合物和方法，这些组合物和方法通过消除由天然存在的胶体磁性颗粒的聚集因子所产生的干扰性的磁簇而增强了对诸如细胞、细菌和病毒这样的生物实体的微观观察和分析。另外还披露了用于显著地增强低抗原密度靶细胞从生物样品中的磁性分离的方法。

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

1. 一种通过胶体磁性颗粒从生物样品中分离靶生物实体的方法，所述的磁性颗粒具有降低的聚集，该方法包括：
- 5 a) 获得一种生物样品，该生物样品被怀疑含有所述的靶生物实体以及非靶生物实体和内源聚集因子；
- b) 使所述的生物样品同一种试剂相接触，该试剂有效地使存在于所述的样品中的内源聚集因子失活；
- c) 制备一种免疫磁性悬浮液，该悬浮液含有所述的样品和偶联于一种生物特异性配体的胶体磁性颗粒的混合物，该生物特异性配体对于所述的靶生物实体上的至少一种特征性决定簇具有结合亲和性；以及
- 10 d) 对所述的免疫磁性悬浮液使用一种磁场以获得富集有靶生物实体的级分。
2. 权利要求1的方法，该方法进一步包括以下步骤：
- 15 e) 从所述的富集级分中纯化所述的靶生物实体；以及
- f) 对所述的纯化靶生物实体进行分析。
3. 权利要求1的方法，该方法进一步包括以下步骤：
- e) 向所述的靶生物实体富集级分中加入至少一种生物特异性试剂，该试剂对所述的靶生物实体上的至少一种另外的特征性决定簇具有结合亲和性；
- 20 f) 在磁场中分离所述的靶生物实体以从所述的富集级分中除去未结合的生物特异性试剂。
4. 权利要求3的方法，该方法进一步包括以下步骤：
- g) 纯化所述的被分离的靶生物实体；以及
- 25 h) 对所述的纯化靶生物实体进行分析。
5. 权利要求3的方法，该方法进一步包括以下步骤：
- g) 向所述的被分离的靶生物实体中加入一种非细胞排除剂以排除存在于该样品中的无核实体；
- h) 纯化所述的靶生物实体；以及
- 30 I) 对所述的纯化靶生物实体进行分析。
6. 权利要求1的方法，其中所述的靶生物实体选自肿瘤细胞、病毒感染感染的细胞、母体循环中的胚胎细胞、病毒颗粒、细菌细胞、白细

胞、心肌细胞、上皮细胞、内皮细胞、蛋白质、激素、DNA 和 RNA。

7. 权利要求 2 的方法，其中对所述的靶生物实体进行分析的方法选自多参数流式细胞术、免疫荧光显微镜检查、激光扫描细胞术、明视野基成像分析、毛细管容量分析、人工细胞分析以及自动细胞分析。

5 8. 权利要求 1 的方法，其中所述的聚集抑制剂选自以下物质的至少一种：还原剂、动物血清蛋白、免疫复合物、碳水化合物、螯合剂、未经偶联的铁磁流体以及二氨基丁烷。

9. 权利要求 5 的方法，其中所述的聚集抑制剂为一种还原剂，该还原剂选自巯基乙烷磺酸 [MES]、巯基丙烷磺酸 [MPS] 和二硫苏糖醇
10 [DTT]。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述的生物特异性配体为一种单克隆抗体。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述的生物特异性配体为一种对于上皮细胞粘附分子具有亲和性的单克隆抗体。

15 12. 一种通过胶体磁性颗粒从生物样品中分离靶生物实体的方法，所述的磁性颗粒具有受控的聚集，该方法包括：

a) 获得一种生物样品，该生物样品被怀疑含有所述的靶生物实体以及非靶生物实体和内源聚集因子；

20 b) 使所述的生物样品同一种试剂相接触，该试剂有效地使存在于所述的样品中的内源聚集因子失活；

25 c) 制备一种免疫磁性悬浮液，该悬浮液含有所述的样品和偶联于一种生物特异性配体的胶体磁性颗粒的混合物，该生物特异性配体对于所述的靶生物实体上的至少一种特征性决定簇具有结合亲和性，所述的磁性颗粒进一步同第一种外源聚集增强因子相偶联，该因子包含一种特异性结合对的一个成员；

d) 向所述的免疫磁性悬浮液加入第二种外源聚集增强因子以提高所述的颗粒的聚集，所述的第二聚集增强因子包含所述的特异性结合对的另一个成员；以及

e) 对所述的样品使用一种磁场以获得富集有靶生物实体的级分。

30 13. 权利要求 12 的方法，该方法进一步包括以下步骤：

f) 向所述的免疫磁性悬浮液中加入至少一种生物特异性试剂，该试剂对所述的靶生物实体上的至少一种另外的特征性决定簇具有结合

亲和性;

g) 在磁场中分离所述的靶生物实体以除去未结合的生物特异性试剂; 以及

5 h) 向所述的被分离的生物实体中加入一种非细胞排除剂以排除存在于该样品中的无核实体;

i) 纯化所述的靶生物实体; 以及

j) 对所述的经分离和纯化的靶生物实体进行分析。

14. 权利要求 12 的方法, 该方法进一步包括对所述的纯化靶生物实体富集级分进行检测以测定由所述的特异性结合对的所述的第一和
10 第二成员所介导的聚集程度。

15. 权利要求 12 的方法, 其中所述的特异性结合对的一个成员或者另一个成员被加入所述的纯化生物实体级分以逆转所述的样品的聚集, 由此而促进了对所述的靶生物实体的分析。

16. 权利要求 12 的方法, 其中所述的特异性结合对选自生物素-
15 链亲和素、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、蛋白 A-抗体 Fc、以及亲和素-生物素、生物素类似物-链亲和素、生物素类似物-亲和素、脱硫生物素-链亲和素、脱硫生物素-亲和素、亚氨基生物素-链亲和素以及亚氨基生物素-亲和素。

17. 权利要求 12 的方法, 其中所述的生物特异性配体为一种单克
20 隆抗体。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述的生物特异性配体为一种对上皮细胞粘附分子具有亲和性的抗体。

19. 权利要求 12 的方法, 其中所述的至少一种生物特异性试剂选自单克隆抗体、多克隆抗体、可检测标记的抗体、抗体片段以及单链
25 抗体。

20. 权利要求 12 的方法, 其中对所述的靶生物实体进行分析的方法选自多参数流式细胞术、免疫荧光显微镜检查、激光扫描细胞术、明视野基成像分析、毛细管容量分析、人工细胞分析以及自动细胞分析。

21. 权利要求 12 的方法, 其中所述的免疫磁性悬浮液被温育少于
30 30 分钟。

22. 权利要求 12 的方法, 其中所述的样品的所述纯化在一个低于

6.3 千高斯/厘米的磁场梯度下实施。

23. 权利要求 12 的方法，其中在所述的免疫磁性悬浮液中的所述的胶体磁性颗粒浓度低于 10 微克/毫升。

24. 一种通过胶体磁性颗粒从生物样品中分离低抗原密度肿瘤细胞的方法，所述的磁性颗粒具有受控的聚集，该方法包括：

a) 获得一种生物样品，该生物样品被怀疑含有所述的肿瘤细胞以及非肿瘤细胞和内源聚集因子；

b) 制备一种免疫磁性悬浮液，该悬浮液含有所述的样品和偶联于一种生物特异性配体的胶体磁性颗粒的混合物，该生物特异性配体对于所述的肿瘤细胞上的至少一种特征性决定簇具有结合亲和性，所述的磁性颗粒进一步同第一种外源聚集增强因子相偶联，所述的因子包含一种特异性结合对的一个成员；

c) 向所述的免疫磁性悬浮液加入第二种外源聚集增强因子以提高所述的颗粒的聚集，所述的第二聚集增强因子包含所述的特异性结合对的另一个成员；

d) 在磁场中对所述的样品进行纯化以获得肿瘤细胞富集级分。

25. 权利要求 24 的方法，该方法进一步包括以下步骤：

e) 向所述的级分中加入至少一种生物特异性试剂，该试剂对所述的肿瘤细胞上的至少一种另外的特征性决定簇具有结合亲和性；

f) 在磁场中分离所述的肿瘤细胞以除去未结合的生物特异性试剂；

g) 向所述的被分离的细胞中加入一种非细胞排除剂以排除存在于该样品中的无核实体；以及

h) 对所述的经分离的肿瘤细胞进行分析以估测至少一种肿瘤细胞的数量和类型。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述的特异性结合对的一个成员或者另一个成员被加入该被分离细胞中以逆转所述的样品的聚集，由此而促进了对所述细胞的分析。

27. 权利要求 24 的方法，其中所述的特异性结合对选自生物素-链亲和素、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、蛋白 A-抗体 Fc、以及亲和素-生物素、生物素类似物-链亲和素、生物素类似物-亲和素、脱硫生物素-链亲和素、脱硫生

物素-亲和素、亚氨基生物素-链亲和素以及亚氨基生物素-亲和素。

28. 权利要求 24 的方法，其中所述的生物特异性配体为一种单克隆抗体。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述的生物特异性配体为一种对上皮细胞粘附分子具有结合亲和性的抗体。

30. 权利要求 25 的方法，其中所述的至少一种生物特异性试剂选自单克隆抗体、多克隆抗体、可检测标记的抗体、抗体片段以及单链抗体。

31. 权利要求 25 的方法，其中对所述的肿瘤细胞进行分析的方法选自多参数流式细胞术、免疫荧光显微镜检查、激光扫描细胞术、明视野基成像技术分析、毛细管容量分析、人工细胞分析以及自动细胞分析。

32. 权利要求 24 的方法，其中所述的生物样品在制备所述的免疫磁性悬浮液之前经过一种聚集抑制剂的预处理以使存在于该样品中的内源聚集因子失活。

33. 权利要求 25 的方法，其中所述的纯化肿瘤细胞富集级分经检测以测定由所述的特异性结合对的所述的第一和第二成员所介导的聚集程度。

34. 一种用于抑制在生物材料加工过程中的胶体磁性颗粒的内源聚集，以便使靶生物实体从这样的材料中分离的试剂盒，该试剂盒含有：

a) 经包被的磁性纳米颗粒，该颗粒含有一种磁性核心材料，一种蛋白基包被材料以及一种抗体，该抗体特异地结合于所述的靶生物实体的第一种特征性决定簇，所述的抗体同所述的蛋白基包被材料直接或者间接地偶联；

b) 至少一种抗体，该抗体对所述的靶生物实体的第二种特征性决定簇具有结合特异性；

c) 一种内源聚集抑制因子；

d) 一种非细胞排除剂，用于从分析中排除无核的细胞。

35. 一种用于通过受控的胶体磁性颗粒聚集从生物样品中分离低抗原密度肿瘤细胞的试剂盒，该试剂盒含有：

a) 一种试剂，该试剂有效地使内源聚集因子失活；

b) 经包被的磁性纳米颗粒，该颗粒含有一种磁性核心材料，一种蛋白基包被材料以及一种抗体，该抗体特异地结合于所述肿瘤细胞的第一种特征性决定簇，所述的抗体同所述的蛋白基包被材料直接或者间接地偶联；所述的磁性颗粒进一步同第一种外源聚集增强因子相偶联，所述的因子包含一种特异性结合对的一个成员；

c) 至少一种抗体，该抗体对所述肿瘤细胞的第二种特征性决定簇具有结合特异性；

d) 第二种外源聚集增强因子，所述的第二种聚集因子包含所述的特异性结合对的另一成员；以及

e) 一种非细胞排除剂，用于从分析中排除无核的细胞。

36. 权利要求 35 的试剂盒，其中所述的特异性结合对选自生物素-链亲和素、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、蛋白 A-抗体 Fc、以及亲和素-生物素、生物素类似物-链亲和素、生物素类似物-亲和素、脱硫生物素-链亲和素、脱硫生物素-亲和素、亚氨基生物素-链亲和素以及亚氨基生物素-亲和素。

37. 权利要求 35 的试剂盒，其中所述的试剂盒进一步含有一种试剂，该试剂用于逆转所述的外源聚集因子的作用。

38. 权利要求 35 的试剂盒，其中所述的有效地抑制内源聚集因子的试剂为选自以下物质的至少一种：还原剂、动物血清蛋白、免疫复合物、碳水化合物、螯合剂、未经偶联的铁磁流体以及二氨基丁烷。

39. 权利要求 38 的试剂盒，其中对所述的内源聚集因子进行抑制的所述的抑制剂为一种还原剂，该还原剂选自巯基乙烷磺酸[MES]、巯基丙烷磺酸[MPS]和二硫苏糖醇[DTT]。

通过磁性纳米颗粒的受控聚集而提高分离效率

发明领域

5 本发明涉及到生物样品的生物亲和性分离以及诊断性测试。更具体地，本发明提供了一些组合物和方法，这些组合物和方法可用于一些磁性分析和富集程序以控制内源的磁性颗粒聚集因子，这些因子在不受控制的情况下将降低被分离的实体的可视化性。同样被提供的还有用于构建和合成这些可逆的聚集因子的方法以及所产生的组合物，
10 这在辅助对被如此分离的物质进行的观察的同时还提高了稀少的生物物质的回收率。

发明背景

15 本申请中通过括号中的数字引用了多种出版物以用于更详尽地描述本发明所涉及的领域的状态。这些出版物的披露内容在此全文引为参考。

许多实验室和临床程序都应用了生物特异性亲和反应。这样的反应通常被用于生物样品的诊断性测试或者范围广大的目标物质的分离，特别是生物实体，如细胞、病毒、蛋白质、核酸等等。多种方法
20 可被用于上述物质的分析或者分离，这些方法基于目标物质与可同其特异性结合的其它物质之间的复合物的形成。这些复合物同未结合的物质之间的分离可通过重力来完成，例如通过对精细分割的与目标物质相偶联的颗粒或者球珠进行沉降或者通过离心来完成。如果需要，这样的颗粒或者球珠可制备成具有磁性以辅助结合/分离步骤。磁珠由
25 于其在免疫和其它生物特异性反应中的应用而在该领域中为众所周知。例见，美国专利号 No. 4,554,088 以及 *Immunoassays for Clinical Chemistry*, pp. 147-162, Hunter et al. eds., Churchill Livingstone, Edinburgh(1983)。一般来说，任何辅助磁性或者重力分离的材料均可被用于该目的。但是，在过去 20 年中，
30 磁性材料在分离中的优越性已经使其被用于多种应用。

磁珠一般分为两大类。第一类包括永磁性或者铁磁性的颗粒。第二类包括只在受作用于磁场时才表现出大量的磁力行为的颗粒。后

者被称为磁响应颗粒。显示出磁响应行为的材料有时被称为超顺磁体。但是，表现出大规模的铁磁特征的材料，例如磁性氧化铁，只有在以直径约 30nm 或者更低的晶体存在的情况下才具有超顺磁的特征。与之相比，铁磁材料的较大晶体在暴露于磁场后保持了永久磁性并且在此之后由于强烈的颗粒间相互作用而倾向于聚集。磁性颗粒可被分为大（1.5 到约 50 微米）、小（0.7 到 1.5 微米）以及胶体或者纳米颗粒（<200nm）。后者又称为铁磁流体或者类铁磁流体并且具有经典铁磁流体的特性。Liberti et al pp777-790, E. Pelizzetti (ed) "Fine Particles Science and Technology" Kluwer Acad. Publishers, 10 Netherland, 1996.

小磁颗粒在涉及生物特异亲和性反应的分析中十分有用，这是由于该颗粒可方便地被生物功能性聚合物（例如蛋白质）所包被，提供了较大的表面积和更合理的反应动力学。介于 0.7 到 1.5 微米之间的磁性颗粒已在专利文献中进行了描述，例如，美国专利号 No. 15 3, 970, 518； 4, 018, 886； 4, 230, 685； 4, 267, 234； 4, 452, 773； 4, 554, 088 以及 4, 659, 678。这些颗粒中的几种据披露可用于免疫试剂的固体支持物。

除上文提及的小磁性颗粒外还有一类大小介于约 1.5 到 50 微米的大磁性颗粒，这种颗粒也可具有超顺磁性能。这些颗粒中典型的是由 20 Ugelstad（美国专利 No. 4, 654, 267）发明和 Dynal（Oslo, Norway）制造的颗粒。Ugelstad 法涉及到聚合物颗粒的合成，该聚合物颗粒可受作用而膨胀，并且磁石晶体被包埋于膨胀的颗粒中。同样大小的其它材料可通过在分散的磁石晶体存在的情况下合成该颗粒来制备。这样导致磁石晶体嵌入聚合物基质，由此而使产物具有磁性。在这两种 25 情况下，所产生的颗粒具有超顺磁性能，该性能表现为在磁场消除后易于分散的能力。与磁性胶体或者纳米颗粒不同，这些材料以及小磁性颗粒由于每个颗粒的磁性材料的质量而均易于通过简单的实验室磁性元件进行分离。因此，该分离在从低至几百高斯/厘米到高达约 1.5 千高斯/厘米的梯度下能够实现。另一方面，由于胶体磁性颗粒（低于 30 约 200nm）的扩散能（diffusion energy）、每颗粒的磁质量较小以及 Strokes 牵引力（drag）而使其需要非常高的磁场梯度。Owen 等人的美国专利 No. 4, 795, 698 涉及到了经聚合物包被的胶体超顺磁颗粒。

这样的颗粒通过磁性物质在存在某种生物活性聚合物的情况下进行沉淀来制备。所产生的颗粒的结构在此被称为单发颗粒 (single-shot), 该颗粒被发现为一种微聚集物, 在该微聚集物中具有一种或者多种直径为 5-10 μ m 的铁磁微晶体, 该微晶体包被于直径在 50nm 水平上的聚
5 合物体之中。所产生的颗粒在长达几个月的观察期间表现出保持为水性悬浮液的明显倾向。Molday 的美国专利 No. 4, 452, 773 描述了一种性质同 Owen 等人的描述相类似的物质, 该物质通过在存在很高浓度的葡聚糖的情况下加入碱而从 Fe^{2+}/Fe^{3+} 形成磁石或者其他铁氧化物来产生。如此产生的物质具有胶体特性并且已被证明非常有益于细胞分
10 离。这些工艺已由 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany 进行商品化。

用于产生超顺磁凝胶颗粒的另一种方法在美国专利号 No. 5, 597, 531 中有所描述。同在 Owen 等人的专利中的描述相比, 后一种颗粒通过将一种生物功能性聚合物直接包被于预制的超顺磁晶体
15 之上而产生, 该超顺磁晶体已经通过诸如超声能量这样的手段被分散处理成为大小介于约 25-120nm 的拟稳态晶簇 (quasi-stable crystalline cluster)。所产生的颗粒在此被称为直接包被 (DC) 颗粒, 该颗粒与同等大小的 Owen 等人或者 Molday 的纳米颗粒相比表现出明显较高的磁矩并且该颗粒可在磁场梯度高于约 6k 高斯/厘米下被
20 有效地分离。

磁分离工艺已为人所知, 在该工艺中对一种流体介质使用磁场以从该流体介质中分离铁磁体。与之相比, 胶体超顺磁颗粒保持为悬浮液的倾向以及该颗粒相对较弱的磁感应性需要使用高梯度的磁分离
(HGMS) 工艺以将这些颗粒从其所悬浮的液体介质中分离。在 HGMS 系
25 统中, 磁场的梯度, 即空间导数, 对悬浮的颗粒的行为的影响高于在给定位点的磁场强度的影响。高梯度磁分离可用于分离种类广泛的磁标记的生物材料, 包括真核和原核细胞、病毒、核酸、蛋白以及碳水化合物。在迄今为止所已知的方法中, 生物材料已经通过 HGMS 进行了
30 分离, 只要该材料具有至少一种特征性决定簇而该特征性决定簇能为某种受体所特异性识别和结合, 所述受体为例如一种抗体、抗体片段、特异性结合蛋白 (例如蛋白 A、链亲和素)、外源凝集素等等。HGMS 系统可分为两大类。一类所包括的磁分离系统使用完全位于分离腔或者

分离容器外部的磁路。这样的外置分离器（或者开放场梯度分离器）的例子在美国专利 No. 5,186,827 中有所描述。在该'827 专利的几个实施方案中，必需的磁场梯度通过将永磁体环置于非磁性容器的外周而产生，这样使类孔状的磁体处于一种对场（field-opposing）构型。

5 在这样的系统中所获得的测试介质中的磁场强度梯度受限于该磁体的强度以及磁体之间的分离距离。因此，外置梯度系统所获得的梯度存在着最大限制。在共同未决的申请 No. 60/098,021 中披露了用于通过新的容器设计来最大化半径梯度的手段以及最大化分离效率的方法。

另一类 HGMS 分离器使用了一种铁磁聚集（collection）结构，该结构被置于该测试基质中以用于：（1）强化应用的磁场；以及（2）在该测试介质中产生一个磁场梯度。先前所披露的内置 HGMS 系统含有装于一根柱内的细钢丝或网，该柱位于一个磁体旁边。所使用的磁场集中于该钢丝附近以使悬浮的磁性颗粒被吸向该丝表面并随之附着。在这些丝上所产生的梯度反比于该丝的直径，而磁力“范围”则随直径而降低。因此可产生很高的梯度。

10
15

内置梯度系统的主要缺点是钢丝、丝网材料、钢制微球等等的使用可能通过毛细作用而在交织丝附近或者交织丝之间的空隙内截留有该测试基质的非磁性组分。多种包被材料已被应用于这样的内置梯度柱（美国专利 No. 5,693,539；4,375,407），但是，这样的系统的巨大的表面积仍然产生了由吸收所导致的回收问题。因此，内置梯度系统并不理想，特别是在分离目标为对俘获几率极低的实体进行回收的情况下。进一步，这些系统使自动化较为困难和昂贵。

20

另一方面，使用外置梯度的用于细胞分离的 HGMS 方法提供了多种便利。首先，可以使用简单的实验室管器，例如，试管、离心管甚至真空容器（用于血液收集）。当外置梯度同四极/六极设备（美国专利 No. 5,186,827）或者美国专利 No. 5,466,574 中所描述的对双极排列一样属于可使分离细胞在其中有效地单层化的类型时，可促进细胞的洗涤和随后的操作。进一步，细胞从试管或者类似的容器中的回收是一种简单高效的过程。当同从高梯度柱中进行的回收相比时尤为如此。这样的分离容器还提供了另一个重要的特点，即降低源样品的体积的能力。例如，在将一种特定的人类血细胞亚类（例如磁标记的 CD34⁺ 细胞）从用缓冲液稀释 20% 以降低粘度的血液中分离的情况下，可以在

25
30

适当的四极磁力设备中使用 15ml 的锥形试管作为分离容器。在进行适当的洗涤和/或分离以及重悬以去除未结合细胞后，CD34⁺细胞可被非常高效地重悬于 200 μ l 的体积中。例如，该过程起始于 15ml 的锥形试管中的 12ml 的溶液（血液、铁磁流体以及稀释缓冲液），进行分离，
5 弃去“上清”并且随后洗涤“上清”并且将回收的细胞重悬于 3ml 的适当的细胞缓冲液中，从而完成该过程。随后进行第二次分离，该分离过程可包括额外的分离/洗涤步骤（可能对于进行标记/染色反应是必需的）并且最终该分离的细胞很容易地重悬于终体积 200 μ l 内。通过以这样的连续方式降低体积并且使用涡旋混合器进行重悬，粘附
10 于该管之上的超出重悬体积的细胞被回为降低的体积。当细胞回收在适当处理的容器中仔细迅速地完成时，该回收颇为高效率，介于 70-90 %。

磁性分离所能达到的效率以及磁标记细胞的纯度决定于众多因素。这些因素包括被分离的细胞数量、这些细胞的受体密度、每个细胞上的磁负载、该磁性材料的非特异性结合（NSB）、所使用的工艺、
15 该容器的性质、该容器表面的特征、介质的粘度以及所使用的磁分离设备。如果一种系统与通常的情况一样，其非特异性结合水平基本恒定，则纯度随着目标群的减少而降低。例如，一个具有 0.2% NSB 的系统可以回收占源混合物 0.25% 的数量的 80%，则该系统具有 50% 的
20 纯度。而如果起始群占 1.0% 则纯度为 80%。并非这样明显的因素是，目的细胞的数量越低则更难于被进行磁性标记并回收。进一步，标记过程和回收显著地依赖于所使用的磁性颗粒的性质。例如，当细胞与大磁性颗粒，例如 Dynal 珠，一起温育时，这些细胞通过碰撞而进行标记，该碰撞过程通过将该系统进行混合而产生，这是因为该珠
25 体太大而难于扩散。因此，如果某种细胞群的频率为 1 个细胞/ml 血液甚至更低，例如在极早期癌症中的肿瘤细胞，则标记目的细胞的概率相关于加入该系统的磁性颗粒的数量以及混合时间的长度。由于将细胞与这样的颗粒混合较长时间是有害的，因此尽可能地提高颗粒浓度变得必要起来。然而，可加入该系统的磁性颗粒的量存在着限制，
30 因为一个含有混于其它血细胞中的稀少细胞的系统可以被一个含有混于大量的磁性颗粒中的稀少细胞的系统所替换，在这种情况下对目的细胞进行计数或者对其进行检测的能力未有明显提高。

使用大颗粒对具有较低的出现频率（1-50 个细胞/ml 血液）的细胞进行分离还有一个缺点。尽管大磁性颗粒允许使用设计非常简单的外置梯度以及相对较低的磁场梯度，大颗粒易于以类似于笼子的方式聚集于细胞的周围从而使这些细胞难于被“看到”或者被分析。因此，
5 这些颗粒必须在分析之前被释放，并且这些颗粒的释放通常引入了其它的复杂因素。

理论上，同高梯度磁性分离共同使用的胶体磁性颗粒应该是从混合的真核细胞群中对某种目的细胞亚类进行分离的选择，特别是在该目的细胞亚类仅占全部细胞群的一小部分的情况下。通过适当的磁性
10 负载可使充分的力被加诸于细胞上以促进其分离，甚至在粘稠如中度稀释的全血这样的溶液中。注意，低于约 200nm 的胶体磁性材料将表现出布朗运动，这显著地加强了它们与磁性标记的稀少细胞进行碰撞的能力。这在美国专利 No. 5, 541, 072 中有所显示，该专利中描述了使用 100nm 的胶体磁性颗粒（铁磁流体）进行的非常有效的肿瘤细胞清除实验的结果。同样重要的是，等于或低于所指出的粒度范围的胶体
15 材料通常并不干扰对细胞的观察。这样所回收的细胞可通过流式细胞术根据最低正向散射效果或者通过显微镜检查使用可视或者荧光技术进行检测。由于它们的扩散特性，同大磁性颗粒相比这样的材料易于“发现”稀少的生物实体 并对其进行标记，如血液中的肿瘤细胞。

但是，对于外置场梯度系统中的细胞分离中，出于上文给出的原因，类铁磁流体材料的使用产生了一个重要的问题，这个问题就是对
20 设备设计的选择。Owen 等人的材料或者 Molday 的纳米颗粒的直接单克隆抗体偶联物，如 Miltenyi Biotec 的产品，并不具备足够的磁矩以用于使用目前最好的外置磁梯度设备的细胞选择，这些设备的例子
25 如美国专利 No. 5, 186, 827 中所描述的四极或者六极磁设备。当被用于在中度稀释的全血中进行分离时，它们甚至更为低效。使用类似的磁性更强的材料可获得更为有前景的结果，该材料如美国专利 No. 5, 698, 271 中的描述。在 model spiking 实验中，已经发现使用抗 EpCAM
30 MAb 铁磁流体的直接偶联物可将具有高 EpCAM（表皮细胞粘附分子）决定簇密度的 SKBR3 细胞（乳腺肿瘤细胞）从全血中有效地分离，甚至在极低的混入（spiking）密度下（1-5 细胞/ml 血液）也是如此。另一方面，具有较低的抗原密度的 PC3 细胞（一种前列腺肿瘤细胞系）

以相当低的效率被分离。很可能这是低密度受体细胞上的不充分的磁性负载的结果。

5 根据上述的讨论，为涉及到稀少物质或者涉及到具有很低密度的受体的细胞的分离提供一种兼具胶体磁性材料和大磁性颗粒的优良品质（例如，两者分别具有的基于扩散的标记过程和高磁矩）的磁性分离系统是有利的。可以预见，以某种磁性胶体或者纳米颗粒开始进行的分离由于它们的布朗运动可迅速地发现数量稀少的细胞或者具有很低密度的受体的细胞并对其进行标记。一旦完成了标记，将该纳米颗粒的磁矩转化为类似于大磁性颗粒的值是理想的。通过这样，磁性标
10 记的实体可在用于较大颗粒的梯度场中进行分离，例如，在一种简单的外置场梯度分离器中进行。对于即使在高梯度外置场分离器中也不能有效回收的极低密度受体细胞，这样的原理的使用应会明显地提高分离效率。当在分离后对细胞进行分析或者将其用于某些生物学目的时，能够将该被标记实体的磁矩转变逆转为其原初的胶体磁性标记密
15 度的磁矩也是理想的。这种方法应会实现从过量的磁性材料中的分离，这可以促进随后的分析或者应用。

Liberti 等人的美国专利 No. 5, 466, 574 描述了一种系统，该系统具有一些上文描述的关于磁性物质对细胞的“负载”的特征。据发现当细胞最初被特异性单克隆抗体（具有或者不具有生物素化）所标记
20 并随后以山羊抗小鼠铁磁流体或者链亲和素铁磁流体（分别）进行磁性标记时，在存在过量单克隆抗体的情况分离有所加强。铁磁流体创建这种“无洗涤（no wash）”加强程序的独特能力是由于游离铁磁流体在溶液中与结合于铁磁流体的目标细胞的免疫化学交联所导致。同细胞上的单克隆抗体结合的铁磁流体随后与溶液中的游离的铁磁流体
25 通过游离的单克隆抗体相结合。这产生了单克隆抗体/铁磁流体的免疫化学簇，该簇从单克隆抗体所标记的细胞决定簇“长出”（称为链化）。因此，磁性胶体以“人工”方式加载于细胞之上而使其磁性更强并更易于分离。这种现象据发现遵循免疫化学原理，这是因为高度过量的单克隆抗体导致了链化（单克隆过量区域）的减少以及分离效率的丧失。
30 与之类似，高水平的铁磁流体也减少链化（铁磁流体过量区域）。已经发现链化对于骨髓或者外周血液“移植物”中的不需要细胞的清除是有用的，例如对肿瘤细胞的清除。通过这种方法，极高水平的磁

性材料（显微镜下观察为细胞周围的可见的棕色边缘）可被加载于靶细胞上而在仅仅 8-12 千高斯/厘米梯度的高梯度场内产生很高效的分离。另一方面，以“单体”铁磁流体标记的细胞被发现在同样的梯度下分离效率较低。

- 5 在尝试使用链化以进行稀少细胞的从全血中的分离时遇到了几个问题。首先，尽管混入的（spiked）细胞在实际上被有效地回收，但这些细胞被铁磁流体（链）密集地覆盖以至于对其进行分离的能力被显著降低。因此这种方式对于一些应用不甚理想，在这些应用中通过显微镜检查和流式细胞术对这些经阳性选定的细胞进行观察。另外，
- 10 链化似乎可以提高非特异性结合。简而言之，对于一种基于链化的分析，在该分析中链化的水平自发提供了分离的加强、对被分离细胞的无障碍观察以及可接受水平的非特异性结合，这种分析的设计是极端困难的。链化反应由于需要免疫化学计量而难于控制。例如，被加入的单克隆抗体（或标记配体）中的大部分（>99%）无论其亲和性如何
- 15 总是在溶液中处于游离状态。因此，达到免疫化学平衡（此时通过链化可获得最佳分离）所需的铁磁流体的量通常导致高于所需的链化，特别是在需要观察和/或进一步研究被选择的细胞的情况下。可以通过标记单克隆抗体和被加入的铁磁流体的同时减少来减少链化，但是这样导致了对分离效率的牺牲。使用链化来增强分离的另一个缺点是在
- 20 某些实施方式下不能对链化过程进行逆转。如果链化可被逆转并且降低了同时发生的非特异性结合的增加，这种现象将会提供一种用于实现所需的磁性材料的“加载”的可行方法。该方法的另一个优势在于需要一个两步的反应，即，目标同初级单克隆抗体在第一步中的反应，随后在第二步反应中以特异于初级单克隆抗体的铁磁流体进行重复。
- 25 在一些分析中初级抗体被直接偶联于铁磁流体，这种情况下不能使用该方法。

- Liberti 等人的美国专利 No. 5, 108, 933 披露了弱磁性胶体材料的在以外置场磁性分离器进行的分析中的应用，这样的材料的例子如 Owen 等人或者 Molday 所描述的材料。这样的材料在该专利中被描述
- 30 为可聚集的和可重悬的胶体磁性材料，这些材料在外置磁场系统中基本保持不受干扰，所述的外置磁场系统的例子如在当时可购得的系统（Ciba Corning, Wampole, Mass.; Serono Diagnostics, Norwell,

Mass.)。与之相比,根据上文指出,通过在'531 专利中所披露的方法而制造的磁性更强的材料应可在这些分离器中分离。在'933 专利中,对用于将胶体转化成为凝聚物的方法进行了披露,以使其能够在这些分离器中被分离。因此,这样的材料可被用于实施这些免疫分析中的结合/游离分离步骤。在'933 中未曾提及逆转凝聚反应的需求或者用于逆转凝聚反应的方法。

在先前和最近对天然存在的铁磁流体聚集因子的发现的启发下,本发明者认识到了对于一些组合物和方法的需求,该组合物和方法通过内源因子而在稀少生物实体的分离和免疫化学鉴定期间控制铁磁流体的聚集。这样的组合物和方法可被用于有利地促进经如此分离的生物实体的分析和观察。进一步,本发明还允许使用磁性明显较低的试剂并且具有使用较低的磁性梯度的机会。对于固定的梯度,本发明提供了一些实体的捕获或者分离,这些实体在其它情况下不具有足以被捕获的磁性标记。

15

发明概要

根据本发明,一些方法、组合物和试剂盒被提供用于通过内源聚集因子来控制铁磁纳米颗粒的聚集。铁磁流体聚集经常在被分离的目标的随后的观察中产生问题。本发明的方法通过实现研究者对该聚集水平的控制而有助于这些被分离的生物实体的观察。在本发明的一个实施方案中提供了一种方法以用于抑制这些磁性纳米颗粒在被分离的目标实体的表面的聚集。该方法包括获取一种生物样品,该样品被怀疑含有某种靶生物实体。随后,通过将该样品和胶体磁性颗粒进行混合来制备免疫磁性悬浮液,该胶体磁性颗粒与一种生物特异性配体相偶联,该配体对该靶生物实体上的至少一种特征性决定簇具有亲和性。该免疫磁性悬浮液此后被加以一个磁场来获取富集有该靶生物实体的级分。任选地,随后对这些级分进行检测以确定如此而分离的该靶生物实体的特征。对铁磁流体的聚集的抑制由于消除了铁磁流体在细胞表面的聚集而促进对这些细胞的随后的分析。这种聚集的缺乏对于几种类型的分析很重要,包括流式细胞术和免疫荧光显微观察。

30

此处所提供的试剂有效地抑制或者消除内源聚集因子。对因子的消除或者抑制步骤可在向用于分离和富集的生物样品中添加铁磁流体

之前实施或者与之同时进行。

为进一步对使用本发明的方法而分离的靶生物实体进行鉴定，本方法可任选包括有一些步骤，在这些步骤中至少一种生物特异性试剂被添加入富集有该靶生物实体的级分，该生物特异性试剂可识别所述的靶生物实体上的至少另外一种特征性决定簇并对其有效地标记。该被标记的靶生物实体随后在一个磁场中进行分离以除去未结合的生物特异性试剂。将一种非细胞排除剂 (non-cell exclusion agent) 加入该被分离的生物实体中以排除存在于样品中的无核 (non-nucleated) 成分。在对该靶生物实体进行纯化之后，该实体随即可用于使用多种不同的分析平台进行的分析。这些靶生物实体包括，肿瘤细胞、病毒感染的细胞、母体循环中的胚胎细胞、病毒颗粒、细菌细胞、白细胞、心肌细胞、上皮细胞、内皮细胞、蛋白质、激素、DNA 和 RNA，但不限于这些。对这些靶生物实体进行分析的方法选自多参数流式细胞术、免疫荧光显微镜检查、激光扫描细胞术、明视野基成像 (bright field base image)、毛细管容量分析 (capillary volumetry)、人工细胞分析以及自动细胞分析。适用于本发明的方法的聚集抑制剂包括，还原剂、动物血清蛋白、免疫复合物、碳水化合物、螯合剂、未偶联的铁磁流体和二氨基丁烷，但不限于这些。当该内源聚集因子属于 IgM 类并且同铁磁流体具有反应性，优选的聚集抑制剂为还原剂，例如巯基乙烷磺酸 [MES]、巯基丙烷磺酸 [MPS] 和二硫苏糖醇 [DTT]。在一个特定的优选实施方案中，该生物特异性配体为一种单克隆抗体，该抗体对于表皮细胞粘附分子具有亲和性。

在本发明的一个替代性的和优选的实施方案中提供了一种方法，该方法用于通过控制磁性纳米颗粒的聚集而从某种生物样品中分离靶生物实体。该方法需要获取被怀疑含有所述的靶生物实体的生物样品以及将该生物样品同一种试剂进行接触，该试剂可有效地使任何存在的内源的聚集因子失活。随后制备了免疫磁性悬浮液，在该悬浮液中该样品和胶体磁性颗粒进行混合，该胶体磁性颗粒与一种生物特异性配体相偶联，该配体对该靶生物实体上的至少一种抗原具有亲和性，该磁性颗粒进一步同第一种外源聚集增强因子相偶联，该因子包含一种特异结合对中的第一种成员。随后向该免疫磁性悬浮液中加入第二种多价外源聚集增强因子以提高该颗粒的聚合，该第二种聚集增强因

子包含该特异性结合对的第二种成员，该成员同磁性标记的靶生物实体可逆地结合。该样品此后被加以一个磁场来获取富集有该靶生物实体的级分。这个优选的实施方案优势在于铁磁流体在靶实体表面以一种受控的可逆方式进行的聚集导致了分离效率的明显提高。

5 在另一个实施方案中，上文所描述的方法进一步包括有一些步骤，在这些步骤中加入了至少一种生物特异性试剂，该生物特异性试剂可识别所述的靶生物实体上的至少另外一种特征性决定簇并对其有效地标记。这样被标记的靶生物实体随后在一个磁场中进行分离以除去未结合的生物特异性试剂。将一种非细胞排除剂加入该被分离的生物实体中以排除存在于样品中的无核成分。随后对该靶生物实体进行
10 纯化和进一步分析。为逆转由外源聚集因子所介导的聚集，可过量加入该特异性结合对的一个成员以降低铁磁流体在细胞表面的聚集，这样可促进对被结合的细胞的观察，例如通过显微镜。适用于该目的的特异性结合对包括，生物素-链亲和素、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、蛋白 A-抗体 Fc、亲和素-生物素、生物素类似物-链亲和素、生物素类似物-亲和素、脱硫生物素-链亲和素、脱硫生物素-亲和素、亚氨基生物素-链亲和素以及亚氨基生物素-亲和素，但不限于这些。在优选的情况下，该生物特异性配体为一种单克隆抗体，该抗体对于上皮细胞粘附分子具有亲和性。
20 示例性的生物特异性试剂包括，单克隆抗体、多克隆抗体、可检测标记的抗体、抗体片段以及单链抗体。被分离的靶生物实体可通过以下方法之一进行分析，多参数流式细胞术、免疫荧光显微镜检查、激光扫描细胞术、明视野基成像、毛细管容量分析、人工细胞分析以及自动细胞分析。

25 根据本发明，铁磁流体在样品中的受控聚集具有上文所指出的几个预料不到的优点，例如，增加某些特定的生物实体的分离效率。已经发现添加外源聚集增强因子提供了增加的磁性负载量，这导致了分离效率的提高而且降低了分离该靶生物实体所需的铁磁流体的量。磁性负载量的提高还降低了温育的时间并且促进该靶生物实体在非最佳
30 磁场存在下的分离。

在本发明的一个额外的实施方案中提供了一种试剂盒，该试剂盒辅助本文所述的方法的实施。用于分离靶生物实体的示例性的试剂盒

包括 i) 经包被的磁性纳米颗粒, 该颗粒含有一种磁性核心材料、一种蛋白基包被材料以及一种抗体, 该抗体特异地结合于所述的靶生物实体的第一种特征性决定簇, 所述的抗体直接或者间接地偶联于所述的蛋白基包被材料; ii) 至少一种抗体, 该抗体对所述的稀少生物物质的第二种特征性决定簇具有结合特异性; iii) 一种聚集抑制因子以及 iv) 一种非细胞排除剂, 该排除剂用于从分析中排除所述的靶生物实体之外的无核的样品成分。

根据本发明还提供了一种试剂盒, 该试剂盒用于改善特定的生物实体的分离效率, 例如从生物样品中分离低抗原密度的肿瘤细胞可能需要的分离效率。为达到这种改善, 该试剂盒利用了磁性纳米颗粒的受控和可逆聚集。这种试剂盒包括: i) 一种有效地使内源聚集因子失活的试剂; ii) 经包被的磁性纳米颗粒, 该颗粒含有一种磁性核心材料、一种蛋白基包被材料以及一种抗体, 该抗体特异地结合于所述的肿瘤细胞的第一种特征性决定簇, 所述的抗体直接或者间接地偶联于所述的蛋白基包被材料, 该磁性颗粒进一步偶联于第一种外源聚集增强因子, 该因子包含一种特异性结合对的一个成员; iii) 至少一种抗体, 该抗体对所述的肿瘤细胞的第二种特征性决定簇具有结合特异性; iv) 第二种外源聚集增强因子, 该第二种因子包含该特异性结合对的第二种成员; 以及 v) 一种非细胞排除剂, 该排除剂用于从分析中排除所述的肿瘤细胞之外的无核的样品成分。该试剂盒可任选含有一种用于对该外源聚集因子进行逆转的试剂。可用于这种试剂盒的特异性结合对包括, 生物素-链亲和素、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、蛋白 A-抗体 Fc、亲和素-生物素、生物素类似物-链亲和素、生物素类似物-亲和素、脱硫生物素-链亲和素、脱硫生物素-亲和素、亚氨基生物素-链亲和素以及亚氨基生物素-亲和素, 但不限于这些。有效地使内源聚集因子失活的试剂包括还原剂、动物血清蛋白、免疫复合物、碳水化合物、螯合试剂、未偶联的铁磁流体以及二氨基丁烷。

本发明的方法、组合物和试剂盒提供了用于控制磁性纳米颗粒的聚集的手段, 由此而促进了对来自于生物样品的稀少的生物物质或细胞的分离、观察和鉴定。

附图简述

图 1A-1H 为一系列的显微照片，所示为显微镜所观察的具有高水平的内源聚集因子样品同具有低水平的内源聚集因子的样品的对比，该样品来自于血液捐献者。乳腺癌细胞被混入 (spiked) 全血之中并
5 使用 EPCAM 胶体磁性颗粒进行选择并在悬浮液中染色。图 1A，仅有透射光，低聚集；图 1B，仅有透射光，高聚集；图 1C，经 Hoechst 核染料染色的细胞，低聚集；图 1D，经 Hoechst 核染料染色的细胞，高聚集；图 1E，经上皮细胞标记物细胞角蛋白 Alexa 488 染色的细胞，低聚集；图 1F，经上皮细胞标记物细胞角蛋白 Alexa 488 染色的细胞，
10 高聚集；图 1G，经肿瘤细胞受体标记物偶联于藻红蛋白的 erb2 染色的细胞，低聚集；图 1H，经肿瘤细胞受体标记物偶联于藻红蛋白的 erb2 染色的细胞，高聚集；

发明详述

15 本文所使用的术语“靶生物实体”所指为广泛的生物物质或者医学物质。例如激素、蛋白质、多肽、凝集素、寡聚核苷酸、药物、化学物质、核酸分子 (例如 RNA 和/或 DNA) 以及生物来源的颗粒状分析物，该分析物包括生物颗粒，如细胞、病毒、细菌等等。在本发明的一个优选的实施方案中，使用本发明的组合物、方法和试剂盒可从
20 非靶细胞中和/或其它生物实体中有效地分离诸如母体循环中的胚胎细胞或者循环中的癌细胞这样的稀少细胞。术语“生物样品”包括，含有细胞的整体、流体、外周血液、组织匀浆物、乳头穿刺物以及可获自人体的其它来源的稀少细胞，但不限于这些。示例性的组织匀浆物可获自乳腺癌患者的前哨淋巴结。术语“决定簇”在用于前述的任
25 意一种靶生物实体时可被一种生物特异性配体或者生物特异性试剂特异性地结合，并且该术语指该靶生物实体的一部分，该部分参与并且负责与某种特异性结合物质的结合，该部分的存在为选择性结合所需。从根本上说，决定簇为靶生物实体上的分子接触区，该区在特异性结合对反应中为受体所识别。本文所使用的术语“特异性结合对”
30 包括，抗体-抗原、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 受体或者小鼠 IgG-蛋白 A、亲和素-生物素、链亲和素-生物素以及病毒-受体相互作用。

多种其它决定簇-特异性结合物质组合可被考虑用于实施本发明的方法，如那些为该领域的技术人员所熟知的物质。本文所使用的术语“抗体”包括免疫球蛋白、单克隆或者多克隆抗体、免疫反应性免疫球蛋白片段以及单链抗体。本发明中还可考虑使用多肽、寡核苷酸或者其组合，它们可特异性地识别这些决定簇，其特异性类似于传统方法产生的抗体。本文所使用的术语“可检测标记”所至可为任意物质，通过物理或者化学方法对该物质进行的直接或者间接检测或者测量可显示出该靶生物实体在测试样品中的存在。可用的可检测标记的代表性例子包括以下这些，但不限于此：可基于光吸收、荧光、反射、光散射、磷光或者发光特性进行直接或者间接检测的分子或者离子；可通过放射性特征进行检测的分子或者离子；可通过其核磁共振或者顺磁特征进行检测的分子或者离子。基于光吸收或者荧光进行检测的分子中包括，例如，多种酶类，这些酶导致适当的底物从非光吸收转变为光吸收分子或者从无荧光转变为荧光分子。本文有时称核酸染料或者其他报告分子为非细胞排除剂，该非细胞排除剂能够鉴别靶生物实体和特定的非靶生物实体，例如完整的具核细胞，该非细胞排除剂被加至该样品中以便通过流式细胞术、显微镜检查或者其他分析平台进行分析之前进行对残余的无核细胞或者其他潜在的干扰性样品成分的排除。非细胞排除剂可对DNA、RNA、蛋白质或者脂类具有反应性，以使所获得的信号量为对应于细胞所获得的典型信号量，或者使所获得的图像揭示了细胞的典型特征，例如细胞膜和核膜、核仁以及线粒体。

本文用于描述铁磁流体浓度、磁场强度或者温育时间的术语“最佳”指的是在标准的未改动的分析、分离、提取或者富集中所使用的条件。

本文用于描述铁磁流体浓度、磁场强度或者温育时间的术语“非最佳”指的是在分析、分离、提取或者富集中所使用的条件，所处的过程产生的结果同最佳条件下相比较差。

本文所使用的术语“铁磁流体”指的是悬浮状态的磁性纳米颗粒。术语铁磁流体和磁性纳米颗粒在本文中可互换。

内源铁磁流体聚集因子存在于分离自测试对象的样品中。外源聚集因子是在本发明中提供的聚集因子，这些聚集因子根据研究者所需而被加入并且/或者被逆转。

用于本发明的优选的磁性颗粒是表现为胶体的颗粒并且具有超顺磁性。这些胶体的特征在于其大小，即，小于 200nm 或者其大小并不干扰分析。超顺磁性颗粒仅当其被加诸于一个磁场梯度时才表现出磁性并且并不具有永磁性。该胶体超顺磁颗粒在长时间内并不从水溶液中分离或者沉淀。这些颗粒由铁氧化物的单晶或者这些晶体的聚集物所组成，该单晶或者聚集物通过物理吸附或者共价连接而被一些分子所包围。具有上述特征的胶体磁性颗粒可根据美国专利 No. 4, 795, 698; 5, 512, 332 和 5, 597, 531 中的描述进行制备。一种偶联于这些磁性颗粒的可识别特定类型细胞的单克隆抗体对于本发明的应用是优选的。

在对稀少细胞分离的研究期间发现了一种存在于特定的患者血液内的因子，该因子使磁性纳米颗粒的聚集更为有效。进一步，这种增强的聚集效果显得易于被逆转。因此，在外置场四极或者六极分离器中，通过“加载”较多的铁磁流体可从中度稀释的全血中更为有效地分离具有低受体密度的稀少细胞，所加载的铁磁流体多于同目的稀少细胞的特征性决定簇特异地结合的铁磁流体。当被分离的细胞通过显微镜进行检测时，该细胞膜上存在着铁磁流体簇。对该增强效果的逆转使这些簇解聚，这有助于这些细胞的显微分析。这种内源增强效应以不同的水平存在于约 90% 的表现正常的供体血液样品中。通过控制分析条件，所产生的铁磁流体簇可被分散而不对目的细胞造成损伤。因此，本发明提供了一些方法，这些方法用于消除内源铁磁流体聚集因子的影响，本发明在需要的情况下还提供了用于构建能够实现铁磁流体的受控可逆聚集的物质的方法。这实现了对稀少细胞和诸如病毒和细菌这样的其它生物实体的有效分离和富集以及随后的分析。

在血液中发现的该内源铁磁流体聚集物质具有以下特征：（1）存在于血浆或血清中；（2）对微摩尔浓度的二硫苏糖醇敏感；并且（3）同直接包被的铁磁流体的“裸露”晶体区域反应，如美国专利 5, 597, 531 所描述。对照实验显示该因子并非铁蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原、C1q、人类抗小鼠或者抗 BSA 抗体。该聚集物质亦非 IgG 亚类，因为去除 IgG 的血浆也引起了铁磁流体的聚集。铁磁流体的聚集同铁磁流体或者血清的浓度表现出关联性。聚集对两种成分的依赖性类似于沉淀素曲线，并且根据上述观察推测该物质为一种 IgM。通过从血浆样品中

经免疫亲和纯化除去 IgM, 该推测被最终证实。所产生的去除 IgM 的血浆不能促进铁磁流体的聚集。

在对照实验中通过 BSA 亲和介质对同样的血浆样品进行了吸收, 该实验中并未显示出铁磁流体的聚集。进一步的研究显示, 以铁磁流体进行的对含有聚集因子的血清的广泛吸收仅仅去除了少量的总 IgM, 并且纯化的人类 IgM 导致了铁磁流体的聚集。这些观察结果同被吸收的聚集因子的鉴定研究以及被吸收/未吸收的物质引起聚集的能力一起, 得出这样的结论, 即在这些实验中的聚集因子实际上为高度特异的 IgM。根据其不能抑制除经蛋白少量包被或经去污剂部分包被的磁石晶体之外的任何用于形成该铁磁流体的成分的聚集, 据认为该 IgM 所识别的表位存在于磁石晶体表面。这种特异的 IgM 的作用尚不清楚, 但该 IgM 以不同的水平存在于相当一部分人群中。有可能这种抗体在铁代谢中起一定的作用。

在此描述了一些操控内源增强因子的方法, 该方法允许对分离细胞进行有意义的患者之间的比较。由于该内源聚集增强因子浓度在各患者群体中有所不同, 因此难于产生一种标准的方法以用于分离稀少的循环细胞, 无论是癌细胞、母体血液中的胚胎细胞或者病毒感染的细胞。共同未决的申请 (No. 09/248, 388) 中的发现显示, 循环细胞的数量级直接相关于乳腺癌患者的肿瘤负担和疾病阶段。类似地, 病毒负担已被证明在 HIV 感染的预后中具有意义。对于这样的实体的准确定量正在变得越来越重要。本文所披露的方法可通过测试试剂盒进行方便地实施, 这些试剂盒可被用于临床设备。

在发现这种铁磁流体聚集因子 (FFAF) 的存在后, 细致的研究证明该因子的存在明显地改善了使用偶联于铁磁流体的单克隆抗体进行的混入的低密度受体的肿瘤细胞的回收。在这些研究中, 以 1 个细胞/2ml 含有 FFAF 的血液的水平混入的细胞通常以高于 70% 的效率被回收。与之相比, 在不存在 FFAF 的供体血液中, 回收的效率减至 15-25%。从实验中可获得观察结果如下:

1. 低密度受体细胞的分离效率通常低于具有高密度受体的细胞;
2. 低密度受体细胞的分离效率变化很大, 并且这种变化依赖于血液供体;
3. 从不同的血液供体的血液进行铁磁流体/磁性分离之后, 当通

过显微镜对这两种细胞类型（高密度或者低密度特征性决定簇细胞）进行检查时，铁磁流体在约90%的患者样品聚集；以及

4. 所回收的肿瘤细胞具有不同程度的可见铁磁流体聚集于其表面。

5 进一步，由于该聚集物质对 DTT 敏感，通过在观察前降低铁磁流体的聚集，回收的细胞易于通过显微镜进行形态学特征的观察。

在对比 FFAF 和链化（见美国专利号 No. 5, 446, 574）对细胞回收的增强效果时可作出一些有趣的结论。当 FFAF 以极低浓度存在于血液中时，这种情况存在于许多个体体内，对低密度受体混入细胞，如 1-
10 5 细胞/ml 血液，此时可获得的出色回收。根据这些细胞表面的磁性材料的水平所估测出的回收细胞的质量非常适于形态学检测或者进一步的处理。当 FFAF 浓度较高时，回收依然十分出色，但是所回收的细胞的质量难以接受，因为细胞表面的聚集物阻碍了对它们的观察。因此，不同于受浓度限制的链化的成分，即，不同于单克隆抗体-铁磁流体
15 “链”，一定水平的 FFAF 可导致非常有效的细胞分离，由此而提供了可被有效地研究的细胞分离群体。在本发明的特定的实施方案中，样品中的内源 FFAF 在初期便被灭活以使研究者可通过添加本文所描述的组合物来控制聚集。通过该方式，聚集可根据需要进行增强或者抑制。

FFAF 和任何类似的物质必须经过在分析中评估其对稀少细胞的分离。
20 必须对这样的因子进行控制以开发出对于每位患者都可靠地发挥功能的测试。例如，许多个体具有抗啮齿类抗体或者针对某些磁性纳米颗粒表面的成分的抗体，例如碳水化合物这样的成分。其它潜在的聚集物质一般存在于血液中，例如 C1q、类风湿因子以及凝血蛋白。这样的反应必须进行控制以使其在不同样品之间保持一致，或者全部被
25 清除。对于抗啮齿类抗体，这一要求可通过向系统中加入啮齿类蛋白以抑制其聚集效果来达到。这种添加远不同于将这样的组分加入免疫分析系统中。在后一情况下，抗啮齿类抗体一般增强了分离，但由于这些抗体在三明治型反应中将被捕获的抗体同标记抗体进行连接，因此同时也易于增加假阳性。与之相反，在本发明的方法中使用的额外的
30 抗体提高了低密度受体细胞的回收。因此，在一种情况下聚集因子可人为地增加假阳性，在另一种情况下，该因子促进该靶生物实体的分离。

除对这样的因子进行竞争性抑制之外，这些因子还可被灭活或者从溶液中被吸收，或者将这些因子所结合的磁性胶体上的决定簇清除。FFAF 活性可通过制备一种特殊的缓冲液来加以抑制，该缓冲液含有最佳量的添加剂，例如小鼠或者其它动物血清蛋白、免疫复合物、5 碳水化合物、抑制包括补体在内的不同的活性体系的螯合剂、以及特异性抑制 C1q 同反应性抗体之间的相互作用的化合物，例如二氨基丁烷。在该 FFAF 为一种 IgM 的情况下，还原剂有效地使该 FFAF 失活而同时不影响这些配体对于标记细胞的应用。因此，这些因子可被选择性地化学或者酶学灭活。通过适当的材料进行的吸收，例如，通过未10 偶联的铁磁流体，提供了从样品中除去聚集因子的另一种途径。

还有可能制造各患者间一致量的聚集因子以使其总是具有相同水平的增强效果。这可通过不同的途径实现。例如，可在全部患者体内将所有的内源因子降至相同水平。但这看起来是一个困难且不实际的解决方案。作为替代可使用一种双步骤的方法，其中第一步，所有的15 内源 FFAF 均被灭活并同时不影响铁磁流体与其靶的特异性配体结合或者不影响随后的细胞分析。第二步需要受控的聚集反应。同两种配体偶联的胶体磁性材料可被用于实施上文所描述的双步骤方法。一种配体，例如单克隆抗体，应靶向于细胞表面的决定簇并且有效地标记这些细胞。第二配体应同血液中的任何成分都不具反应性，并且对一种20 多价成分具有结合亲和性，该成分随第一配体的结合之后加入。因此，额外的磁性胶体将同已经结合于细胞的胶体结合，由此与 FFAF 一样提高了其磁性负载。类似地，如果第二配体同其多价成分的反应是可逆的则更为优选。通过选择该第二反应的正确成分及其浓度，同时添加铁磁流体和聚集因子是可能的。

由此而提供了促进铁磁流体的受控聚集的 FFAF，这样增强了稀少生物实体的回收。理想的聚集因子介导了一种可逆的聚集效果。聚集的逆转消除了磁性纳米颗粒簇，从而有助于对被分离细胞的观察。本发明的因子以一种类似于上文所述的这种理想的磁性颗粒条件的方式发挥作用，即，通过将结合于目标的胶体纳米颗粒转化成为大颗粒同30 时具有易于逆转该过程的额外能力。本文描述了存在于多数正常供体的血液中的一种内源因子的鉴定和阐明，该因子提高低密度受体稀少细胞的分离效率。

优选的 FFAF 包括特异的多价物质，该物质识别铁磁流体磁性颗粒上的决定簇，由此而交联于这些颗粒。这些因子可在血浆中天然存在或者可为一种外加试剂。几种类别的外源试剂适于该目的，这些试剂包括，IgG、二聚体 IgG、IgM、链亲和素、亲和素、蛋白 A、蛋白 G、
5 二聚体或者四聚体多聚 A 或者多聚 T、或者特异性的寡聚核苷酸序列，但不限于这些。可向铁磁流体上引入第二配体并且该配体为 FFAF 所识别。有几种第二配体可被选用，例如半抗原、生物素、生物素类似物（亚氨基生物素、脱硫生物素）、绵羊 IgG、山羊 IgG、大鼠 IgG、多聚 A 或者多聚 T 或者寡聚核苷酸。FFAF-第二配体的相互作用可以是可
10 逆或者不可逆的，但可逆的相互作用是优选的。有几种试剂可被用于逆转 FFAF-第二配体相互作用，例如还原剂、过量的半抗原、过量的半抗原类似物、过量的第二试剂类似物、盐浓度的变化、pH 或者温度的变化。

当在最佳条件下实施某种分析或者分离时靶细胞的回收百分率被
15 最大化。但是，当诱导外源聚集时改动这些条件的能力是很明显的。对于高密度表面受体靶细胞，最大化回收率所需的铁磁流体的量在没有外源聚集时很高，以此确保各靶通过饱和所有存在的结合位点而具有磁响应性。该发明的一个优势在于分离所需的总铁磁流体较少，因为分离无需饱和所有存在的结合位点。这是由于形成磁性颗粒交联的
20 能力所致，该交联由外源聚集因子介导并且提高了每结合位点的磁性量。代替通过对每细胞使用大量单磁性颗粒，即，一个颗粒结合一个细胞表面抗原，以赋予细胞磁感应性的是，多个颗粒的聚集物可结合于单个抗原并且所维持的磁力将与被最优地捕获的细胞相同。各颗粒现在具有结合于一种细胞表面抗原或者结合于另一个颗粒的能力。换
25 句话说，即使所使用的铁磁流体较少，各靶细胞应具有同样的磁感应性，并且所产生的分离效率应可与在最佳条件下所获得的效率相比。在最佳条件下，每 1 毫升样品使用 10 微克铁磁流体。根据本发明该浓度可降低 10 倍。

除降低了所需的铁磁流体的量之外，磁场强度以及温育时间也被
30 降低。由于本发明的聚集物大于非聚集分离中的单个磁性颗粒，较低的磁场强度就可以移动该聚集物。促进外源聚集从小磁性颗粒中产生了暂时的可逆大磁性颗粒。实际上，大颗粒的优势，包括使用弱磁场

进行分离的能力，可被用于本发明。在典型情况下使用的四极磁性分离器在容器表面维持的磁场梯度强度为 6.3 千高斯/厘米。在本发明的方法的实施中可使用诸如双极这样的磁性排列，该排列在容器表面具有几乎一半的磁场强度。

5 在非聚集系统中，为进行有效的分离需要较长的温育时间以增加每细胞的磁性颗粒数量。在该系统中，一个磁性颗粒将结合一个细胞表面抗原。但是，在外源诱导的聚集系统中，通过导致每个细胞多个颗粒，经由所诱导的聚集可获得相同数量的每细胞颗粒数。这允许了对温育时间的缩短，这是因为并非所有的结合位点都需要同磁性颗粒结合。通过加入这种第二结合对成员，这些颗粒在此时可同其它颗粒
10 相结合，而非仅仅能够同游离的细胞表面抗原相结合。因此，如上文所解释，这些结合位点无需饱和便可具有与最佳条件相同的磁感应性，这样允许减少温育时间。用于磁性温育的最少时间为 30 分钟。使用本发明，这些时间最多可被减少三倍。但是，这并非主张同时进行
15 铁磁流体浓度的降低和温育时间的缩短。对这些步骤的变动应互相独立使用以期维持靶生物实体的最大回收。

为某种外源铁磁流体聚集因子所识别的第二种配体将通过标准的偶联化学与铁磁流体以及上述的单克隆抗体相偶联。该第二配体可为一种小分子，例如半抗原或者生物素类似物，或者为一种大分子，例
20 如抗体或者特异蛋白，或者一种聚合物，例如多肽或者多寡聚核苷酸。作为本发明的第二配体，诸如脱硫生物素这样的生物素类似物对于同磁性颗粒的偶联较为优选，因为该分子 ($K_a=10^6 M^{-1}$) 同天然生物素 ($K_a=10^{15} M^{-1}$) 相比对于链亲和素具有的亲和性较低。链亲和素与脱硫生物素之间的相互作用可通过加入过量的生物素而轻易地破坏。脱硫
25 生物素与亲和素的组合已经被用于从靶物质中除去磁性颗粒或者不溶相 (PCT/US94/10124 以及美国专利 No. 5, 332, 679)。在本发明中，该组合仅仅被用于使磁性颗粒聚集和解聚，并不被用于从靶物质中除去磁性颗粒。

用于本发明的反应容器可为玻璃或者塑料，但是塑料试管较为优
30 选。该管的底部可为圆形或者锥形。具有不同的长度或者直径的试管可被用于加工不同体积的样品。例如，在某些情况下，50ml 的锥形试管可被用于加工 20ml 或者更多的血液。在本发明的一个实施方案中使

用了一个 12×75mm 的聚苯乙烯管或者 15ml 锥形管。在同磁性颗粒进行温育期间所使用的反应容器以及在磁性分离期间所使用的容器不一定是相同的。可以使用两种不同的容器，一种用于温育而另一种用于磁性分离。但是，在两种情况下仅使用一个容器较为优选。该磁性分离容器可为一种试管或者通流 (flow-through) 腔或者其它设备。

用于实施本发明的测试介质可为含有靶物质的任意液体或者溶液，在优选的情况下为血液。测试样品在反应容器中与铁磁流体进行温育，该铁磁流体偶联于靶物质的特异抗体以及特异于 FFAF 的第二配体。另外，一种外源 FFAF 与铁磁流体同时加入该测试样品或者在铁磁流体同靶物质结合之后加入。可任选将一种抑制天然聚集因子或者使之灭活的试剂与铁磁流体同时或者在添加铁磁流体之前加入。在最佳温育时间之后，将磁性标记的靶从磁性分离器中的剩余测试介质内分离。根据测试介质以及反应容器对磁性分离器和分离时间进行选择。使用高梯度磁性分离设备较为优选，例如美国专利 No. 5, 186, 827 中描述的分

15 述的分离设备。在吸去未收集的液体之后，可将被收集的细胞重悬于等渗缓冲液或者透化 (permeabilizing) 溶液中以使细胞通透于细胞内染色。对磁性标记的细胞进行磁性重分离以除去透化试剂。将被收集的细胞重悬浮于小体积细胞缓冲液中以用于标记物质的染色。该缓冲液的体积可介于 100-300 μ l 之间。该细胞缓冲液根据情况可含有染色抗体。另外，根据上文描述该细胞缓冲液可含有一种解聚试剂，例如生物素。生物素的终浓度可介于 1-5mM。用于抗体染色或者用于解聚试剂使铁磁流体解聚的最佳时间可介于 10-60 分钟，在优选的情况下为 15 分钟。在以抗体进行最佳染色或者铁磁流体的解聚之后，通过另

20 一次磁性分离从细胞中除去过量的试剂。在吸去未收集的液体之后，将收集的细胞重悬浮于小体积的等渗缓冲液中。该缓冲液的体积可介于 100-500 μ l。铁磁流体标记的细胞可进行进一步的加工或者通过流式细胞术或者显微镜进行分析。

尽管上文已经描述了一些仅仅同抗体进行偶联的磁性颗粒，其它类型的偶联磁性颗粒可被考虑用于本发明。可以使用一些同非抗体的蛋白质进行偶联的磁性颗粒。例如，偶联于链亲和素的磁性颗粒可被用于结合靶细胞，这些靶细胞标记有抗体-生物素偶联物。在对靶细胞进行标记之后可通过洗涤步骤使用离心除去过量的未结合抗体-生物

素。以抗体-生物素进行标记的靶细胞随后同链亲和素铁磁流体进行温育以对这些细胞进行磁性标记。向该测试介质中加入同任何聚合物或者蛋白质（聚集因子）进行偶联的脱硫生物素以使铁磁流体聚集。聚集因子可与磁性颗粒同时加入或者在这些磁性颗粒同靶细胞结合之后加入。每聚合物或者蛋白质上的脱硫生物素数量应多于 1 以使铁磁流体聚集。在优选的情况下可使用偶联于牛血清白蛋白（BSA）的脱硫生物素。BSA 上的脱硫生物素数量可为 2-10。这样的脱硫生物素/蛋白质偶联物可根据下文进行合成。

尽管本发明在此主要参考对肿瘤细胞从血液中的选择而进行描述，但本发明不限于肿瘤细胞的选择。存在于血液或者骨髓中的其它细胞类型，例如 CD34、CD4 以及胚胎细胞也可被选择。在这些细胞上的抗原性决定簇可高低不等。在更通用的条件下，本发明用于需要磁性增强以进行有效分离的任何细胞的分离。

下文的实施例被提供以用于阐明本发明的多种实施方案。这些实施例并非期于以任何方式对本发明的范围进行限制。

实施例 I

下列数据展示了本发明的 FFAF 对于混于血液中的低密度和高密度受体肿瘤细胞的回收的影响。一种示例性的 FFAF 据鉴定为一种特异性的 IgM，该 IgM 存在于多数供体的血样中。诸如二硫苏糖醇和巯基乙烷磺酸（MES）这样的可切割二硫键的还原剂通过将 IgM 转变成为其单体形式而防止了铁磁流体在血液中的聚集。DTT 并非用于本发明的方法的优选试剂，因为高浓度可改变细胞形态并且对于靶细胞和白细胞具有毒性。

在本实施例中描述了 MES 对于铁磁流体聚集以及高抗原密度和低抗原密度肿瘤细胞从血液中的回收的影响。用于该研究的方案如下。将血液（2ml）置于一个 12×75 的聚苯乙烯试管中并加入 1ml 的 Immunicon 稀释-洗涤缓冲液以稀释该血液。下一步，加入 100μl 细胞缓冲液（等渗 7mM 磷酸盐，pH7.4，含有 1%BSA 以及 50mM EDTA），该缓冲液含有约 1000SKBR3 或者 PC3 细胞。向该血样中加入不断增多的 MES（不超过 150μl）以获得不同浓度的还原剂。混合之后，将偶联于 EpCAM Mab（GA73.3；50μl）的铁磁流体磁性颗粒加入样品中。磁性

颗粒的终浓度为 5 μ g/ml。将该血样混匀并在室温下温育 15 分钟。温育之后，将含有该血样的试管置于一个四极磁性分离器中。进行 10 分钟的磁性分离。吸去上清并将该试管从该磁设备中取出。将经磁性收集的细胞重悬于 1ml 的稀释-洗涤缓冲液中并且在一个四极磁性分离设备中进行 5 分钟再分离。弃去上清，在从该四极设备中取出后将靶细胞重悬于 150 μ l 的稀释洗涤缓冲液中。将该样品的一部分 (5 μ l) 点样于显微镜载玻片上。随后使用一台连接数码相机的显微镜对回收细胞进行照相。

经剩余的样品用于流式细胞术分析以使用下列步骤估测肿瘤细胞的回收率。向该样品中加入偶联于藻红蛋白 (PE) 的特异于肿瘤细胞 (Neu 24.7) 的 MAb (5 μ l) 以及 5 μ l 偶联于多甲藻素叶绿素蛋白 (PerCP) CD45 单克隆抗体，随后温育 15 分钟。温育之后加入 1ml 的稀释洗涤缓冲液并且进行一次磁性分离以除去过量的染色抗体。将经磁性收集的细胞重悬于 500 μ l 的稀释-洗涤缓冲液。向该样品中加入核酸染料 (10 μ l) 以及 5 μ l 的 3mM 大小确定的荧光珠 (5000)。随后在 FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上对该样品进行分析，使用 FL1 作为阈值。在该流式细胞仪中获得的荧光珠级分被用于测定经流式细胞术分析的样品的量，该量随后辅助对混入的肿瘤细胞的回收率的计算。

20

MES 浓度 (mM)	肿瘤细胞的回收率 (%)	
	SKBR3	PC3
0	77	46
20	80	50
50	80	31
75	82	27
100	70	17

当通过显微镜观察时，最终的样品在无 MES 的情况下显示出游离的铁磁流体聚集物以及肿瘤细胞上的铁磁流体聚集物。随着 MES 浓度的增加，铁磁流体聚集物减少并且在更高浓度的 MES 下见不到聚集物。这些可见的结果随后被用于同通过流式细胞术测得的细胞回收率进行

25

比较。MES 的加入对于 SKBR3 细胞（高抗原密度）的回收并无明显的影响，尽管显微镜显示这降低了铁磁流体在溶液中以及在细胞表面的聚集。与之对比，MES 对于 PC3 细胞（低抗原密度）的回收具有明显的影响。随着 MES 浓度由 0 增加至 100mM，回收率从 47% 降低至 17%。在
5 MES 浓度不断提高的情况下 PC3 细胞的回收率的这种降低是由于铁磁流体聚集的抑制，并非由 MES 对细胞的副作用所导致，因为 MES 并不降低同样混入的 PC3 细胞从裂解血液样品中的回收。通过以氯化氨对红细胞进行裂解，随后进行洗涤步骤除去血浆和氯化氨来获得裂解血液。裂解血样仅仅含有白血球（白细胞），而全血还含有红血球和血
10 浆。使用裂解血液未观察到铁磁流体的聚集。进一步，MES 对于细胞形态没有明显影响。这些数据表明，低抗原密度细胞进行分离的效率低于高抗原密度的细胞，并且对铁磁流体聚集的抑制显著地影响了低抗原密度细胞的分离。当使用经洗涤的血样（取出血浆的血细胞）时也未观察到铁磁流体聚集。因此，经洗涤的血样被用作为无聚集的对照。
15 同使用全血时相同，使用经洗涤的血液进行的 SKBR3 细胞的回收率并不降低。而 PC3 细胞的回收率在使用经洗涤的血液的情况下明显降低（2 至 5 倍）。这一数据清楚地表明铁磁流体聚集对于 SKBR3 细胞的回收并无任何影响，但对于 PC3 细胞的回收具有主要的影响。

简而言之，由存在于许多患者的血液内的不同水平的血浆成分
20 （IgM）所造成的肿瘤特异性铁磁流体的聚集对于低抗原密度细胞的回收率具有明显的影响。这些细胞的回收受到铁磁流体聚集的影响并且随着聚集的增加而有所提高。铁磁流体的聚集通过增加细胞上的磁负载量而提高了低抗原密度细胞的回收率。铁磁流体的聚集在不同的血液供体之间可根据聚集因子或者聚集因子而有所变化。结果，肿瘤细
25 胞的回收率在个体间有所变化，即便这些人可能具有相同数量的循环肿瘤细胞。也有可能存在于相同个体的血液中的聚集因子的浓度随时间而变化，由此而改变了铁磁流体聚集的程度以及肿瘤细胞的回收率。防止这种变化的最佳方式是防止铁磁流体的天然聚集。然而，这导致了肿瘤细胞分离和检测效率的降低。在这种情况下提高肿瘤细胞
30 回收率的一种方法应是以较高的梯度对磁设备加以改进，该改进梯度可以有效推动磁性标记微弱的细胞并且提高其回收率。提高肿瘤细胞回收率的另一种途径是以一种外源试剂模拟天然铁磁流体的聚集。这

种试剂可为一种可识别铁磁流体的特异性多价试剂，并且该试剂可被加入血液和铁磁流体中。该特异性试剂对铁磁流体的聚集应类似于IgM，但在一种受控制的反应中进行。受控的聚集将具有两个优点：(1)所回收的细胞的百分比率将有所提高；以及(2)当样品具有相同数量的肿瘤细胞时，所回收的肿瘤细胞的百分比率将不随不同的患者而变化并且在同一患者中不随时间变化。

实施例 II

用于受控聚集的脱硫生物素/EpCAM MAb 铁磁流体的制备

一种基础铁磁流体根据美国专利 No. 5, 698, 271 中的表述而制造。根据美国专利申请 No. 09/248, 388 的应用，通过标准偶联化学将针对上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 的单克隆抗体同基础材料相偶联。随后将 EpCAM MAb 铁磁流体重悬于 20mM HEPES, pH7.5 中以用于同脱硫生物素的偶联，该偶联使用羧基琥珀酰亚胺-DL-脱硫生物素 (NHS-脱硫生物素) (Sigma, Cat. # H-2134) 进行。在 DMSO 中制备 1mg/ml 的 NHS-脱硫生物素贮存溶液。将 NHS-脱硫生物素 (19 μ g) 加入 1mg EpCAM MAb 铁磁流体中并且在室温下温育 2 小时。通过以含有 1mg/ml BSA, 0.05%ProClin300 的 20mM HEPES, pH7.5 洗涤三次，使用高梯度磁体以除去未反应的 NHS-脱硫生物素。进行最终洗涤之后，将脱硫生物素/EpCAM MAb 铁磁流体重悬于 Immunicon 铁磁流体贮存缓冲液中并且通过一个 0.2 μ m 注射器滤器进行过滤。

实施例 III

通过脱硫生物素/EpCAM 铁磁流体与链亲和素的聚集而导致的低抗原密度 PC3 肿瘤细胞从混入的血液中的回收率的提高

在本实施例中，具有低 EpCAM 密度的前列腺癌细胞 (PC3) 被混入正常血液中并且被用作作为一个模型系统以用于估测这些混入细胞的回收率。将在 50 μ l 缓冲液 (等渗的 7mM 磷酸盐, pH7.4, 含有 1%BSA 和 50mM EDTA) 中的已知数量的 PC3 细胞 (约 5000) 混入 12 \times 75mm 聚苯乙烯试管中的 1ml 不含血浆的正常血液中。在这些实验中使用不含血浆的血液以防止血浆成分在靶细胞选择中的任何干扰，通过对血液进行离心制备该不含血浆的血液。向等分的血样中加入 500 μ l 的

Immunicon 稀释洗涤缓冲液以及 15 μ l 溶于 PBS 中的不同浓度的链亲和素。在对该样品进行混合之后，将来自实施例 1 的脱硫生物素/EpCAM Mab 铁磁流体 (25 μ l) 加入该样品中，混匀并且在室温下温育 15 分钟。铁磁流体的最终浓度为 5 μ g/ml。在进行温育之后，将含有血样的试管置于

5 置于一台四极磁性分离器中 10 分钟以收集经磁性标记的细胞。吸去未收集的细胞并将该试管从磁性分离器中取出。将磁收集的细胞重悬于 750 μ l 的稀释洗涤缓冲液中并且在磁性分离器中进行 5 分钟的再分离。再度弃去未收集的细胞并在从该磁性分离器中取出该试管后将所收集的细胞重悬浮于 150 μ l 的稀释洗涤缓冲液中。

10 该样品随后以抗体进行染色以根据下文通过流式细胞术测定肿瘤细胞的回收率。向该样品中加入 5 μ l 偶联于藻红蛋白 (PE) 的特异于肿瘤细胞 (Neu 24.7) 的 Mab 以及 5 μ l 偶联于多甲藻素叶绿素蛋白 (PerCP) CD45 的 Mab 并且温育 15 分钟。温育之后加入 1ml 的稀释洗涤缓冲液并且进行 5 分钟磁性分离以除去过量的染色抗体。将经磁性

15 收集的细胞重悬于 500 μ l 的稀释-洗涤缓冲液。向该样品中加入核酸染料 (10 μ l) 以及 5 μ l 的 3 μ M 荧光珠 (5000)。随后在 FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上对该样品进行分析，使用 FL1 作为阈值。在该流式细胞仪中获得的荧光珠级分被用于测定经流式细胞术分析的样品的量，该量随后用于混入的肿瘤细胞的回收率的计算。肿瘤细胞的回收百分率在下表中出示。

20

聚集因子链亲和素的浓度 (μ g/ml)	肿瘤细胞 (PC3) %回收率
0.0	14
0.2	60
0.5	74
2.0	80
5.0	75

流式细胞术分析后的剩下的样品被分为两部分。将来自于 PBS 贮存溶液的生物素以终浓度 2mM 加入该样品的一部分并在室温下温育 15 分钟以使链亲和素介导的铁磁流体聚集物解聚。将这些样品 (5 μ l) 点

25 样于一个显微镜载玻片上并且使用一台连有数码相机的显微镜对所回收的细胞进行拍照。这些数据显示肿瘤细胞 (PC3) 的回收随着聚集因子 (链亲和素) 浓度的增加而明显提高，在链亲和素浓度 2 μ g/ml 时达

到最大。这些结果与显微镜所观察到的溶液中的游离铁磁流体聚集物以及细胞表面的铁磁流体聚集物相对应。在 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的链亲和素浓度下无铁磁流体的聚集物，并且该铁磁流体的聚集物随着链亲和素浓度的提高而增加。链亲和素通过其与不同铁磁流体颗粒上的脱硫生物素的多价结合而导致了铁磁流体的聚集。所有这些铁磁流体聚集物通过添加过量的生物素而可逆地解聚。铁磁流体通过过量的生物素而解聚的原理是由于脱硫生物素从链亲和素上的除去而导致，这是因为生物素对于链亲和素的亲和性高于脱硫生物素。

10

实施例 IV

通过和不通过脱硫生物素/EpCAM MAb 铁磁流体的聚集而进行的混入的低 EpCAM 抗原密度和高 EpCAM 抗原密度细胞从血液中的回收

乳腺癌细胞 (SKBR3) 同 PC3 细胞相比具有约高出 7 倍的 EpCAM 抗原，该细胞被选作为本实施例的高抗原密度肿瘤细胞模型。分别将处于细胞缓冲液中的已知数量的 PC3 细胞或者 SKBR3 细胞混入 12 \times 75mm 试管中的 1ml 不含血浆的正常血液中。向这些样品中加入铁磁流体稀释-洗涤缓冲液 (500 μl) 以及 15 μl 含有链亲和素的 PBS。混合这些样品之后加入 25 μl 的脱硫生物素/EpCAM MAb 铁磁流体并将血样混匀并且温育 15 分钟。温育之后，将该试管置于置于一台四极磁性分离器中 10 分钟以收集经磁性标记的细胞。根据实施例 II 中的描述通过流式细胞术分析这些经磁性分离的细胞的回收率并且通过显微镜进行观察。

聚集因子链亲和素的浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PC3 细胞回收率 (%)	SKBR3 细胞回收率 (%)
0	23	91
2	77	98

这些数据显示出在未向血样中添加铁磁流体聚集因子链亲和素的情况下低抗原密度和高抗原密度细胞在回收率上的明显差异。根据显微镜的观察，在无链亲和素的情况下溶液中或者细胞表面上也没有铁磁流体聚集。向血样中添加链亲和素明显提高了低抗原密度 PC3 细胞的回收率 (3 倍)，同时在溶液和这些细胞表面上铁磁流体的聚集有同量的增加。另一方面，高抗原密度 SKBR3 细胞回收率在血样中存在和不存在链亲和素的情况下仅有微小差异。即使在无铁磁流体聚集的情

况下 SKBR3 细胞表面上仍有足量的铁磁流体颗粒以对这些细胞进行有效地收集并且进行全部回收。通过向该样品中添加过量生物素使溶液中和细胞上的铁磁流体聚集物完全解聚。对于低抗原密度细胞，在细胞上的铁磁流体颗粒不足以使其通过磁方法进行有效地收集。链亲和素所造成的铁磁流体聚集提高了这些细胞上的颗粒数量，这促进了收集，有效地产生了较高的回收率。同样值得注意的是，铁磁流体的聚集将低抗原密度细胞的回收率提高至接近于高抗原密度细胞的回收率的程度。换句话说，在向血样中添加可逆的铁磁流体聚集因子的情况下低抗原密度和高抗原密度肿瘤细胞的回收率间没有明显差异。

10

实施例 V

内源聚集因子所导致的铁磁流体聚集的抑制以及通过外源聚集因子进行的受控铁磁流体聚集的产生

在本实施例中提供了一种方法，该方法用于抑制所有内源铁磁流体聚集因子并且通过添加一种外源聚集因子而产生受控的铁磁流体聚集。存在于样品中的内源铁磁流体聚集因子可通过向样品中加入多种抑制剂而进行抑制。这些抑制剂将作用于不同的内源聚集因子并且阻止这些因子与铁磁流体进行引起聚集的交联或者结合。抑制作用将消除样品间存在于内源聚集中的变化因素，这些变化由于内源聚集因子在不同的样品中的浓度不同而导致。一旦阻止了内源因子-铁磁流体聚集便可通过添加外源聚集因子而促进铁磁流体的聚集，这可有效地增强靶的回收。该外源聚集可对于所有样品进行一致地控制并且易于被逆转。

该血样可同含有抑制剂的缓冲液进行预温育以用于在向该血液添加铁磁流体之前对内源铁磁流体聚集因子进行抑制。偶联有抗体的铁磁流体在铁磁流体颗粒的表面除抗体之外还含有牛血清白蛋白以及链亲和素。因此，可能的铁磁流体聚集因子可为 IgM(特异于晶体表面)、人抗小鼠抗体(HAMA)、人抗牛血清白蛋白(HABAA)、人抗链亲和素等等。如果上述的任何聚集因子存在于血浆中，这些因子将对铁磁流体进行识别并且与之结合，并使铁磁流体聚集。已知一些患者血浆样品中含有 HAMA 和 HABAA。很明显，任何其它被用于制造铁磁流体的成分也可成为聚集发生的目标并且将需要相对应的处理。

30

还原剂可作为一种抑制剂，例如 100mM 的巯基磺酸，该物质可使 IgM 诱导的聚集失效并且不影响这些配体被用于标记细胞。该还原剂可作为单独试剂被加入血液或者可置于血液收集管中。第二种抑制剂可为牛血清白蛋白，可以 10mg/ml 的浓度被包含入缓冲液中并且将中和任何 HABAA。第三种抑制剂可为非特异性的小鼠抗体，特别是同该铁磁流体上的抗体相匹配的适当的同种型。该抗体可以 0.5-5mg/ml 的浓度包含于该缓冲液中以对甚至最关键的 (severe) 的 HAMA 进行中和。第四种抑制剂可为链亲和素，该物质在需要的情况下被包含入缓冲液中以中和任何存在于血浆中的抗链亲和素的抗体。但是，到目前为止没有任何关于抗链亲和素抗体存在于血浆中的信息。

以上述的缓冲液和还原剂进行的血液预处理可在 15 到 30 分钟内以中和任何内源聚集因子。在所有的内源聚集因子均被中和之后，向该样品中加入一种外源铁磁流体聚集因子，随后加入铁磁流体。该铁磁流体被偶联于一种特异于靶体的抗体以及另一种特异于该外源聚集因子的配体。在以铁磁流体对靶细胞进行最佳标记并且以外源聚集因子诱导聚集之后，经该样品用于磁性分离以富集靶体。在除去所有的非靶之后，将磁性标记的靶以及游离的铁磁流体重悬于小体积的缓冲液中。经磁性标记的靶，例如细胞，可经透化处理以染色细胞内抗原。随后根据所需的分析方法将该样品与不同的染色剂进行温育，这些方法包括流式细胞术或者荧光或者明视野显微镜检查。在最佳的温育时间之后，通过洗涤步骤使用磁性分离而除去过量的染色剂。随后将经磁性标记的细胞重悬于小体积的缓冲液中。最终的样品含有游离的铁磁流体聚集物以及靶细胞上的聚集物。该最终样品不经任何处理便可被用于流式细胞以分析，这是因为细胞表面的铁磁流体聚集并不干扰分析。但是，细胞表面的铁磁流体聚集干扰显微镜分析。在这种情况下，外源介导的铁磁流体聚集应被逆转。这可通过将该最终样品重悬于一种含有解聚因子的缓冲液而完成，该解聚因子同外源聚集因子结合。该解聚因子使所有的铁磁流体聚集物解聚，使细胞易于观察和分析。这些方法实现了有效的靶回收和形态学研究的可视化。

在本说明中引用了几种专利和未决的美国专利申请。这些专利和专利申请的全部披露内容在此引为参考。

尽管上文对本发明的特定的优选实施方案进行了描述和具体示

例，但并不意味着本发明被限定于这些实施方案。多种不同的修改可在不脱离在权利要求中所设定的本发明的范围和精神的情况下做出。

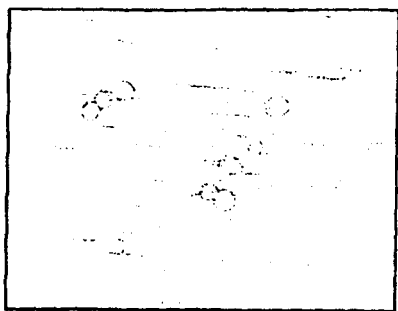


图 1A

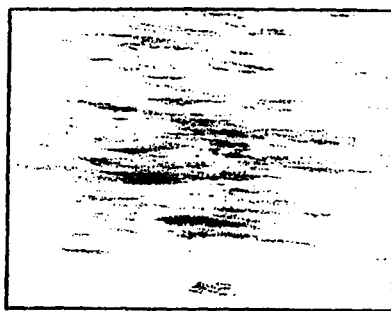


图 1B



图 1C



图 1D



图 1E



图 1F



图 1G



图 1H

专利名称(译)	通过磁性纳米颗粒的受控聚集而提高分离效率		
公开(公告)号	CN1454313A	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	CN00819893.4	申请日	2000-07-14
[标]发明人	PA里伯特 GC劳 LWMM特斯塔彭		
发明人	P·A·里伯特 G·C·劳 L·W·M·M·特斯塔彭		
IPC分类号	G01N33/53 B03C1/00 B03C1/02 B03C1/30 C12N15/10 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577 G01N1/00 G01N1/28 G01N1/38 G01N21/00 G01N21/01 G01N21/17 G01N21/25 G01N21/29 G01N21/41		
CPC分类号	G01N33/57492 C12N15/1013 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

披露了一些组合物和方法，这些组合物和方法通过消除由天然存在的胶体磁性颗粒的聚集因子所产生的干扰性的磁簇而增强了对诸如细胞、细菌和病毒这样的生物实体的微观观察和分析。另外还披露了用于显著地增强低抗原密度靶细胞从生物样品中的磁性分离的方法。

