



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102414562 B

(45)授权公告日 2019.05.07

(21)申请号 201080019566.9

(22)申请日 2010.03.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102414562 A

(43)申请公布日 2012.04.11

(30)优先权数据

61/163,009 2009.03.24 US

61/235,615 2009.08.20 US

61/298,871 2010.01.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.10.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/028499 2010.03.24

(87)PCT国际申请的公布数据
W02010/111388 EN 2010.09.30

(73)专利权人 生物概念股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·米科莱克兹克 T·皮切尔
P·钦伯格 F·比肖夫

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G12Q 1/02(2006.01)

(56)对比文件

WO 00/00826 A1,2000.01.06,

审查员 赵晓明

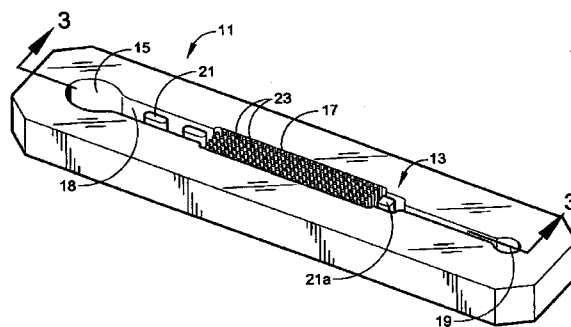
权利要求书4页 说明书22页 附图18页

(54)发明名称

细胞捕获和分析的装置和方法

(57)摘要

本发明提供了一种分离样品,特别是生物样品中的目标生物分子或细胞的装置。具体地,该装置含有上样混合物,其含有生物样品和特异性结合目标生物分子或靶细胞的第一结合实体;和第二结合实体包被的微通道,该第二结合实体直接或间接结合第一结合实体。还公开了捕获、检测、和/或评估生物样品中目标生物分子或靶细胞(例如癌细胞)的方法。



1. 一种检测样品中靶细胞的方法,所述方法包括:

使样品与第一结合实体接触以形成预上样混合物,其中第一结合实体是针对靶细胞的一个或多个表位的抗体或抗体混合物;

使预上样混合物与第三结合实体接触,其中第三结合实体偶联生物素且其中所述第三结合实体特异性结合第一结合实体;

使预上样混合物通过微通道,其中微通道表面被第二结合实体包被,其中第二结合实体经由第三结合实体间接结合第一结合实体,使靶细胞与表面实现结合,其中第二结合实体是亲和素(avidin);和

检测微通道表面上靶细胞的存在或缺失。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是生物样品中的稀有细胞。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是以1比 10^{10} ,1比 5×10^7 或1比 10^4 个细胞的比例存在于生物样品中的细胞。

4. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是癌细胞,所述癌细胞选自乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结直肠癌细胞、肺癌细胞、胰腺癌细胞、卵巢癌细胞、膀胱癌细胞、子宫内膜癌细胞、宫颈癌细胞、肝癌细胞、肾癌细胞、甲状腺癌细胞、骨癌细胞、淋巴瘤癌细胞和黑素瘤癌细胞,其中所述方法是非诊断方法。

5. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是非黑素瘤癌细胞,其中所述方法是非诊断方法。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一结合实体包括与上皮细胞表面标记特异性结合的抗体。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一结合实体是上皮细胞粘着分子(EpCAM)抗体。

8. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是乳腺癌细胞,其中第一结合实体是抗体,所述抗体与人上皮生长因子受体2(Her2/neu)、上皮细胞粘着分子(EpCAM)、MUC-1、上皮生长因子受体(EGFR)、肿瘤相关糖蛋白12(TAG-12)、胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)、肿瘤相关钙信号转导蛋白2(TACSTD2)、CD318、CD104、或N-钙粘着蛋白特异性结合,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

9. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是黑素瘤癌细胞,其中第一结合实体是与黑素细胞分化抗原、癌胚抗原、肿瘤特异性抗原、SEREX抗原特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述黑素细胞分化抗原由酪氨酸酶、gp75、gp100、MelanA/MART1或Trp2组成。

11. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述癌胚抗原由MAGE-A1、MAGE-A4、BAGE、GAGE或NY-ES01组成。

12. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述肿瘤特异性抗原由CDK4和 β -钙粘着蛋白组成。

13. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是前列腺癌细胞,其中第一结合实体是与EpCAM、MUC-1、EGFR、PSMA、PSA、TACSTD2、PSCA、PCSA、CD318、CD104、或N-钙粘着蛋

白特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

14. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是结直肠癌细胞,第一结合实体是与EpCAM、CD66c、CD66e、CEA、TACSTD2、CK20、CD104、MUC-1、CD318、或N-钙粘着蛋白特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

15. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是肺癌细胞,第一结合实体是与CK18、CK19、TACSTD2、CD318、CD104、CEA、EGFR、或EpCAM特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

16. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是胰腺癌细胞,第一结合实体是与MUC-1、CEA、TACSTD2、CD104、CD318、N-钙粘着蛋白、或EpCAM特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

17. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是卵巢癌细胞,第一结合实体是与MUC-1、TACSTD2、CEA、CD318、CD104、N-钙粘着蛋白、或EpCAM特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

18. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是内皮膀胱癌细胞,第一结合实体是与CD34、CD146、CD62、CD105、CD106、VEGF受体、或MUC-1特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

19. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是上皮膀胱癌细胞,第一结合实体是与TACSTD2、EpCAM、CD318、EGFR、6B5、N-钙粘着蛋白或叶酸结合受体特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

20. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是癌干细胞,第一结合实体是与CD133、CD135、CD117、或CD34特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

21. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是表达间质抗原的循环癌细胞,第一结合实体是与FGFR1、FGFR4、EGFR、叶酸结合受体、N-钙粘着蛋白或MSC特异性结合的抗体,或所述第一结合实体是与其组合特异性结合的抗体混合物,其中所述方法是非诊断方法。

22. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述靶细胞是表达血管生成表面抗原的循环癌细胞,第一结合实体是与VEGF受体特异性结合的抗体,其中所述方法是非诊断方法。

23. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述亲和素是链霉亲和素(streptavidin)或中性亲和素(neutravidin)。

24. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一结合实体是至少第一抗体和第二抗体的混合物,其中所述第一抗体特异性结合于目标实体的第一表位,所述第二抗体特异性结合于目标实体的第二表位。

25. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述第一抗体特异性结合干细胞抗原,所述第二抗体结合于癌细胞抗原,其中所述方法是非诊断方法。

26. 如权利要求25所述的方法,其特征在于,所述第一抗体特异性结合CD133、CD135、

CD117、CD34或其组合。

27. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述第一抗体特异性结合间质标记,所述第二抗体特异性结合癌细胞抗原,其中所述方法是非诊断方法。

28. 如权利要求27所述的方法,其特征在于,所述第一抗体特异性结合FGFR1、FGFR4、MSC或其组合。

29. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述第一抗体特异性结合血管生成标记,所述第二抗体特异性结合癌细胞抗原,其中所述方法是非诊断方法。

30. 如权利要求29所述的方法,其特征在于,所述第一抗体特异性结合VEGF受体。

31. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述微通道含有一组以随机模式分布于微通道表面的柱。

32. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法还包括使结合于微通道表面的靶细胞交联。

33. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述靶细胞存在的检测是通过检测结合了靶细胞的第一结合实体的存在而进行。

34. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述靶细胞存在的检测是通过检测第三结合实体的存在而进行,所述第三结合实体与结合了靶细胞的第一结合实体结合。

35. 一种装置,所述装置包括:

微通道和上样混合物,

其中所述微通道含有一组以随机模式分布于微通道表面的柱,

其中所述上样混合物包含怀疑含有靶细胞的生物样品以及第一结合实体,

其中所述第一结合实体是针对靶细胞上的一个或多个目标实体的抗体或抗体混合物,其中所述抗体偶联生物素,和

其中所述微通道表面被直接或间接特异性结合第一结合实体的第二结合实体所包被,其中所述第二结合实体是亲和素。

36. 如权利要求35所述的装置,其中所述靶细胞为循环肿瘤细胞(CTC)。

37. 如权利要求35所述的装置,其特征在于,所述第一结合实体包含具有至少第一抗体和第二抗体的结合实体混合物,其中所述第一抗体特异性结合目标实体的第一表位,所述第二抗体特异性结合目标实体的第二表位。

38. 如权利要求35所述的装置,其特征在于,所述生物样品是生理液体或组织,选自血液、血浆、骨髓、血清、精液、阴道分泌物、尿液、唾液、羊水、脑脊髓液、滑液(synovial fluid)、肺灌洗液、细针吸取物(FNA)和活检组织样品。

39. 一种装置,所述装置包含:

微通道和上样混合物,

其中所述微通道含有一组以随机模式分布于微通道表面的柱,

其中所述上样混合物包含怀疑含有靶细胞的生物样品,第一结合实体以及与可检测实体偶联的第三结合实体,

其中所述第一结合实体是特异性结合靶细胞上的一个或多个目标实体的抗体或抗体混合物,且其中所述第三结合实体是与第一结合实体特异性结合的二抗,所述二抗生物素化,和

其中所述微通道表面被直接或间接特异性结合第三结合实体的第二结合实体所包被，其中所述第二结合实体是亲和素。

40. 如权利要求39所述的装置，其中所述靶细胞为循环肿瘤细胞 (CTC)。

41. 一种捕获生物样品中靶细胞的方法，所述方法包括：

使生物样品与第一结合实体接触以形成预上样混合物，其中所述第一结合实体是针对靶细胞表面上的一个或多个目标实体的抗体或抗体混合物；

使预上样混合物与第三结合实体接触，其中所述第三结合实体偶联生物素且其中所述第三结合实体特异性结合所述第一结合实体；

使预上样混合物通过微通道，其中微通道表面被能够经由第三结合实体间接特异性结合第一结合实体的第二结合实体所包被，其中所述第二结合实体是亲和素，和

如果样品中存在靶细胞的话，通过第二结合实体与第一结合实体的间接结合形成靶细胞复合物，在微通道表面上捕获靶细胞。

42. 如权利要求41所述的方法，其特征在于，所述捕获的靶细胞在结合于微通道表面时被检测。

43. 如权利要求41所述的方法，其特征在于，所述靶细胞进行原位或体外分析。

44. 如权利要求41所述的方法，其特征在于，所述靶细胞进行非整倍性评估，其中所述方法是非诊断方法。

45. 如权利要求44所述的方法，其特征在于，所述靶细胞在染色体1、3、4、7、8、11和/或17中的一条或多条上评估非整倍性。

46. 如权利要求44所述的方法，其特征在于，所述非整倍性通过荧光原位杂交 (FISH) 评估。

细胞捕获和分析的装置和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2009年8月20日提交的美国临时申请号61/235,615、2009年3月24日提交的美国临时申请号61/163,009、2010年1月27日提交的美国临时申请号61/298,871的优先权,其各自通过引用全文纳入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于从溶液中捕获目标例如感兴趣细胞和分子的微通道装置,以及循环细胞的捕获后分析。在一些实施方式中,本发明涉及从生理液体中捕获靶细胞(例如循环肿瘤细胞)并对其分析的方法和装置。

[0004] 发明背景

[0005] 从异源样品分离目标细胞或分子仍然是研究应用和医学应用,例如诊断和治疗的显著兴趣所在。具体地,从生理组织和体液中分离稀有细胞类型不需要获得大组织样品,避免了与获得此类样品所需过程相关的风险。例如,从母体血样中分离胎儿细胞用于遗传测试避免了与羊膜穿刺或绒毛膜取样相关的风险。从病人中分离循环肿瘤细胞使得临床医师能评估癌症,监测病人肿瘤中的病理学变化,以及评估持续的药物治疗的效力,而无需进行侵入性活检程序。

[0006] 目前从异源样品分离生物分子和/或细胞的方法通常利用与固相载体偶联的高亲和力和结合伴侣(例如抗体或抗原)。异源样品通过固相载体,感兴趣的目标生物分子或细胞经结合伴侣结合并停留在固相载体表面。然后可分析结合的感兴趣分子或细胞中分子基因组和蛋白质组信息的存在。

[0007] 这些目前的方法有不少技术缺陷,其中之一是非特异性结合问题。为了尽可能减少非特异性结合,需要一个或多个洗涤步骤来除去其它结合于固相载体或结合伴侣的分子和/或细胞。另外,随后通过染色和杂交过程原位分析通道上的细胞可能使细胞经受恶劣和变性条件。这些洗涤和分析过程通过使结合伴侣经受可能导致所述结合伴侣降解、丧失其一部分构象结构、或从固相载体上脱离的条件而可能损害所需分子或细胞的初始捕获。

[0008] 此外,分析循环细胞(例如从病人样品中捕获)的恶性肿瘤的现有方法,例如对细胞进行细胞角蛋白(CK)染色,作为鉴定和/或评估循环性肿瘤细胞的标记具有局限性。

[0009] 因此,本领域需要从样品分离感兴趣生物分子和/或细胞的其它方法和装置,以及随后分析捕获目标的方法,例如分析捕获的循环性肿瘤细胞。

发明内容

[0010] 本发明提供了捕获和/或分析液体样品中生物目标的装置和方法。在不同实施方式中,本发明提供了从生物样品捕获循环性肿瘤细胞的方法,用于评估癌症病人的疾病。在这些和其它实施例中,本发明提供了鉴定和/或评估循环细胞的恶性肿瘤而无或不依赖于CK状态的方法。

[0011] 在一个方面,本发明提供了一种从溶液捕获生物目标的方法。在该方面,本发明部

分基于发现用特异性结合细胞的结合伴侣预标记或预混合含感兴趣目标(例如细胞)的样品可提高微通道装置中此类目标的捕获。

[0012] 在一些实施方式中,装置含有微通道和上样混合物。所述微通道可包含一组以随机模式分布于微通道表面的柱。所述上样混合物可包含怀疑含有目标例如靶细胞的生物样品,还可含有第一结合实体。所述第一结合实体与目标(例如靶细胞上的目标实体)特异性结合。与第一结合实体直接或间接特异性结合的第二结合实体包被微通道表面。在一些实施方式中,所述上样混合物还含有与可检测或可捕获实体偶联的第三结合实体。例如,第一结合实体可以是一抗,第三结合实体可以是特异性结合一抗的二抗,第二结合实体直接或间接特异性结合于二抗。在一个实施方式中,第三结合实体是与第一结合实体特异性结合的生物素化二抗,且第二结合实体是亲和素。二抗可以是完整抗体或任何抗体片段,例如Fab'₂、Fab'或Fab。另外,这可包括是任何遗传工程改造或表达的抗体片段形式,例如单链Fab片段或单链可变片段。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了捕获和/或检测生物样品中的靶细胞,包括本文所述的稀有细胞群的方法。在一个实施方式中,所述方法包括使生物样品与第一结合实体接触以形成预上样混合物,其中第一结合实体与靶细胞表面上的目标实体特异性结合;使预上样混合物通过微通道,其中能与第一结合实体特异性结合的第二结合实体包被所述微通道表面;和在所述微通道表面捕获靶细胞的存在。生物样品可以是生理性或身体液体或组织,例如血液、血浆、血清、骨髓、精液、阴道分泌物、尿液、羊水、脑脊髓液、关节液、细针吸取物(FNA)或活检组织样品。在一些实施方式中,靶细胞是稀有的且以低比例存在于生物样品中。生物样品(例如血液)中稀有的靶细胞例子包括循环肿瘤细胞(CTC),在疾病状态早期如肿瘤发生1期的细胞,以及病毒、细菌或真菌感染的细胞。

[0014] 在一些实施方式中,靶细胞是癌细胞(例如循环肿瘤细胞),如乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结直肠癌细胞、肺癌细胞、胰腺癌细胞、卵巢癌细胞、膀胱癌细胞、子宫内膜癌或子宫癌细胞、宫颈癌细胞、肝癌细胞、肾癌细胞、甲状腺癌细胞、骨癌细胞、淋巴瘤细胞、黑素瘤癌细胞、和非黑素瘤皮肤癌细胞。肿瘤可以是上皮肿瘤。在这类实施方式中,第一结合实体可以是与循环上皮细胞特异性结合的抗体。在一个实施方式中,第一结合实体是上皮细胞粘着分子抗体(例如EpCAM)。在这些和其它实施方式中,第一结合实体是生物素化抗体,第二结合实体是亲和素。在许多实施方式中,本发明涉及抗体混合物作为第一结合实体,从而捕获显示一定范围的上皮、间质、干或祖细胞特征的循环肿瘤细胞。

[0015] 在本发明的另一个实施方式中,预上样混合物还包含第三结合实体。在这类实施方式中,第一结合实体可以是一抗,第三结合实体可以是与可检测或可捕获实体偶联的二抗,二抗与第一结合实体特异性结合。第二结合实体与第三结合实体通过可捕获部分特异性结合。在一些实施方式中,第三结合实体是与第一结合实体特异性结合的生物素化二抗,且第二结合实体是亲和素。

[0016] 在一些实施方式中,该方法还包括在细胞捕获后,使结合于微通道表面的靶细胞交联。交联剂包括蛋白交联剂,例如亲水性同双功能NHS交联剂。在一些实施方式中,可在捕获后于微通道内或通道外进一步分析捕获的细胞。

[0017] 在另一方面,本发明提供了一种捕获后分析循环细胞的方法,特别是用于检测或评估循环细胞的恶性肿瘤。一般,该方面的发明涉及评估捕获细胞的非整倍性,可任选地评

估其它恶性肿瘤标记,包括突变。该方法一般不涉及测定或不依赖于细胞角蛋白表达。

[0018] 附图简要说明

[0019] 图1是微通道装置的一个实施方式的透视图,在微通道内包含一个含有柱的收集区。

[0020] 图2描述了循环肿瘤细胞 (CTC) 在被特异于CTC上抗原的抗体包被的微通道装置内捕获的示意图。B表示生物素。

[0021] 图3是描述了循环肿瘤细胞 (CTC) 在微通道装置内捕获的示意图,其中CTC预先用特异于CTC抗原的抗体标记,微通道装置包被有能与细胞特异性抗体结合的蛋白。B表示生物素。

[0022] 图4显示了在用EpCAM抗体包被的微通道 (EpCAM通道) 或链霉亲和素包被的微通道 (Strep通道) 上以不同流速捕获的T24EpCAM阳性细胞百分数。在Strep通道的情况中,T24细胞在通过Strep通道前用生物素化EpCAM抗体预标记。

[0023] 图5显示了不同浓度的过量生物素化EpCAM抗体存在下,在用链霉亲和素包被的微通道上捕获的用生物素化EpCAM预标记的T24细胞百分数。含有约200个细胞的250 μ L样品用于所述通道。

[0024] 图6显示了不同浓度的过量生物素化EpCAM抗体存在下,在用链霉亲和素包被的微通道上捕获的用生物素化EpCAM预标记的T24细胞百分数。含有约200个细胞的2mL样品用于所述通道。

[0025] 图7显示了相较T24细胞捕获的包被于微通道上的EpCAM捕获抗体稀释随着施加到微通道前用于预标记细胞的相同稀释混合物而变化。

[0026] 图8显示了当用生物素化Trop-1抗体单独或联合生物素化Trop-2抗体预标记时,在包被有链霉亲和素的微通道上捕获的T24或SKOV细胞百分数。

[0027] 图9显示了当用生物素化抗EpCAM抗体单独或联合生物素化捕获抗体混合物预标记时,在包被有链霉亲和素的微通道上MDA-MB-231细胞的捕获。

[0028] 图10描述了当用生物素化一抗或非生物素化一抗和生物素化二抗的组合预标记时,包被了链霉亲和素的微通道上捕获的SKOV细胞百分数。

[0029] 图11显示了在包被微通道上捕获且随后用不同流速 (20, 50, 和100 μ L/分钟) 的粘性溶液洗涤的细胞的一系列光学显微照片。

[0030] 图12显示了在包被微通道上捕获的细胞的一系列光学显微照片。细胞接触同双功能NHS蛋白交联剂,然后用不同流速 (20, 50, 和100 μ L/分钟) 的粘性溶液洗涤。

[0031] 图13显示了没有或有NHS蛋白交联剂时包被的微通道上捕获的细胞百分数。

[0032] 图14显示了相较使用抗体混合物,当仅用EpCAM作为捕获抗体时在包被的微通道上捕获的膀胱癌细胞百分数。该图还显示用抗细胞角蛋白和抗波形蛋白抗体染色的细胞类型。

[0033] 图15A显示了用EpCAM抗体相较用抗体混合物对SKOV细胞的捕获。

[0034] 图15B显示了用EpCAM抗体或抗体混合物孵育后的SKOV细胞染色,用荧光标记的抗小鼠二抗检测。相同细胞的FACS分析显示用标记抗小鼠二抗所标记的表面抗原数量。

[0035] 图16是掺入血液并用一抗混合物和生物素化抗小鼠二抗在微通道上捕获的SKOV细胞的图像。用与生物素紧密结合的荧光标记的中性链亲和素在通道上对细胞染色。图像

显示,SKOV细胞被中性链亲和素染成绿色,附近白血球不被中性链亲和素染色而仅被用于检测核的DAPI染色。

[0036] 图17显示了掺有不同数量SKBr3细胞的血样中SKBr3的回收。结果显示了捕获百分数不取决于细胞输入。

[0037] 发明详述

[0038] 本发明提供了捕获和/或分析液体样品中生物目标的装置和方法。在不同实施方式中,本发明提供了从生物样品捕获循环肿瘤细胞的方法,用于评估癌症病人的疾病。在这些和其它实施方式中,本发明提供了鉴定和/或评估循环细胞的恶性肿瘤而无或不依赖于细胞角蛋白表达的方法。

[0039] 在一个方面,本发明部分基于发现用与目标特异性结合的结合伴侣预标记或预混合含感兴趣目标的样品可以例如增强微通道装置中此类目标的捕获,例如本文所述的微通道装置。该方法还提供了可用于标记细胞抗原的一抗类型和性质的灵活性。因此,本发明提供了从样品,特别是生物样品分离感兴趣的生物分子或细胞的新装置和方法。在一个实施方式中,装置含有微通道和上样混合物。微通道可包含一组以随机模式分布于微通道表面的柱。上样混合物可含有怀疑含有靶细胞和第一结合实体的生物样品,其中第一结合实体与靶细胞上的目标实体特异性结合。与第一结合实体直接或间接特异性结合的第二结合实体包被微通道表面。

[0040] 本发明可使用任何合适的微通道装置。在一些实施方式中,微通道装置包含多个预定流径。在一些实施方式中,微通道装置包含以随机模式或规则或重复模式排列的柱或障碍。在一些实施方式中,微通道装置包含提供流线型流动或随机非流线型流动的区域以使任何流体通过。

[0041] 所述微通道装置可以是分离生物分子或细胞的随机流动装置,如美国公开申请号2006/0160243所详述,其通过引用全文纳入本文。这类装置能如本文所述改良用于本发明。一般,随机流动微通道装置包括具有限定流径的基座或载体,其中包括至少一个具有收集区的微通道,其流径与样品入口和液体出口相连。在一些实施方式中,流径可包括多个按顺序排列的微通道,各具有一个这种收集区。或者,随机流动微通道可具有一个以上的按顺序排列的收集区,还可具有一个以上的入口和一个以上的出口。随机流动微通道装置的一个特定实施方式如实施例1所述并示于图1。

[0042] 随机流动微通道的收集区可含有多根直立柱,其横跨液体流径对齐并排列成跨流体通道收集区部分整体宽度的不规则随机模式。在一个实施方式中,柱的图案为在收集区内没有直线流动和/或打断流线型液流,确保在沿流径流动的液体和柱表面之间有良好的接触。一般柱与收集区的平底是一体的,并且从其垂直延伸,提供了与流经基座或载体流体通道的水平液体途径垂直的表面。

[0043] 图案化的柱收集区中柱的位置和形状可以改造,以优化流体动力学并增强通过其特定表面特征捕获靶细胞。在大多数情况下,通常横向固定柱的水平横截面的优选形状要避免可能促进与柱横向表面非特异性结合的尖角。柱具有直线形外表面,优选具有一般圆形横截面形状或具有6个或更多面的规则多边形。可使用的其它形状是泪滴形(其尖端对下游端且稍微弯曲),或卵形;然而如果需要更强的冲击,应使用方形。在一个实施方式中,柱的图案应在液流中形成流动模式,其增强结合在柱、基座和正面表面的第二结合实体对目

标细胞的捕获。为了实现该目的,例如柱应当大小不一,且排列成随机模式。高约100微米的收集区中不同横截面大小的柱的随机模式(例如至少约3或4种不同尺寸的圆形横截面柱,直径约70-130微米)为柱之间的最小间隔为50-70 μm ,优选约60 μm 。

[0044] 在一些实施方式中,柱(都具有由垂直于基座的平行线形成的侧壁)的横截面面积占收集区体积的10-40%或约15-25%。优选柱模式占收集区体积的约20%,留给液流的空间体积为约80%。柱基本彼此分开至少,例如约60微米、不同大小的柱优选位于彼此的上游和下游。较小的柱可在较大柱下游形成漩涡区,所产生的流动模式使得附近表面对捕获靶细胞特别有效。

[0045] 一般,微通道装置的基座元件可用任何合适的实验室可接受材料制成,例如硅、熔融石英、玻璃和聚合材料。理想的是使用光学透明的材料,特别是在可任选使用诊断功能时。在其最简单的实施方式中,携带组装微通道的基座被具有平面的板密封,其毗邻基座的接触面。这种板可用相同材料制造,或可以仅是玻璃制的盖板。可使用的合适塑料包括聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚对苯二甲酸二乙酯、以及其它熟知的可用于实验室材料的聚合树脂。这些图案化基座可用任何常规方法,例如选自常规模塑和铸造的技术制造。

[0046] 基座可可从聚合材料用母模或凹模结构常规制造,该结构可用本领域熟知的光学平版印刷术在致密负性光刻胶中生成。例如,可用市售标准级环氧树脂(EPONSU-8)光刻胶和硬化剂(SU-82025)的混合物形成构造层,混合物可在硅晶片基座上以2000rpm旋转,形成例如厚40或50 μm 的光刻胶膜。厚度决定了收集区流经的高度。膜在曝光前于精确水平电热板上60 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤3分钟,然后95 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤7分钟,以确保各处厚度均匀,所得到样品冷却至室温。用Karl Suss接触式光罩对准仪对膜曝光,形成最终装置中流经的所需图案。然后,膜在65 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤2分钟且95 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤5分钟,之后在市售SU-8显影剂中显影5分钟,显影期间轻轻搅动。这在环氧树脂光刻胶中形成凹图案模,然后用作在PDMS或其它合适的聚合树脂中复制图案化柱基座的制模母模。微通道和收集区中图案化柱的布局和尺寸由母模制造的曝光步骤中所用的光罩决定。微通道的深度由母模SU-8层的厚度决定,其由旋涂条件决定。

[0047] 本发明还涉及上样混合物,其包含怀疑含有目标(例如靶细胞)的生物样品,还含有第一结合实体。生物样品可包括但不限于生理或身体液体或组织,或分离自生物样品的细胞混合物。例如,生物样品可包括但不限于血液、血浆、血清、精液、阴道分泌物、尿液、唾液、羊水、脑脊髓液、关节液、细针吸取物(FNA)、和活检组织样品。靶细胞可以是任何含有可检测表面抗原的细胞,例如癌细胞、干细胞、胎儿细胞、受病毒、细菌或真菌感染的细胞。在一些实施方式中,靶细胞是癌细胞。在一些实施方式中,靶细胞稀有且以低比例存在于生物样品中,或表达相当低水平的特定感兴趣的抗原。生物样品中稀有的靶细胞的例子包括循环肿瘤细胞(CTC),在疾病状态早期例如肿瘤发生1期的细胞,以及病毒、细菌或真菌感染的细胞。

[0048] 优选第一结合实体与靶细胞上的目标实体特异性结合。第一结合实体可包括但不限于抗体、抗原、适体、核酸(例如DNA和RNA)、蛋白质(例如受体、酶、酶抑制物、酶底物、配体)、肽、凝集素、脂肪酸或脂类和多糖。在一个实施方式中,第一结合实体是抗体。在另一个实施方式中,第一结合实体包括含有至少第一抗体和第二抗体的结合实体混合物,其中所述第一抗体特异性结合于目标实体的第一表位,所述第二抗体特异性结合于目标实体的第

二表位。第一结合实体可包含抗体或结合实体的混合物，其针对细胞上的一个或多个目标抗原、或目标抗原的一个或多个表位、或其组合。本文所用的术语“表位”可指单一抗原上的结合区或第二抗原上的结合区。例如，在一些实施方式中，第一抗体与第一抗原上的第一表位结合，第二抗体与第一抗原上的第二表位结合。在其它实施方式中，第一抗体与第一抗原上的第一表位结合，第二抗体与第二抗原上的第二表位结合。在一些实施方式中，抗体可与标记分子偶联，标记分子包括但不限于生物素、地高辛、FLAG表位、或聚组氨酸。

[0049] 在另一个本发明的实施方式中，上样混合物还含有与可检测或可捕获实体偶联的第三结合实体。例如，第一结合实体可以是一抗或配体，第三结合实体可以是与第一结合实体特异性结合的二抗或配体，第二结合实体与第三结合实体特异性结合。一抗可包括单克隆抗体、多克隆抗体或部分纯化的抗体。二抗可以是与一抗恒定区结合的抗体。例如，如果一抗是小鼠抗体，二抗可以是抗小鼠抗体。与二抗偶联的可检测或可捕获实体可以是标记，包括但不限于生物素、地高辛、FLAG表位或聚组氨酸。在一个实施方式中，上样混合物还包含第三结合实体，其中所述第一结合实体是一抗，所述第三结合实体是与第一结合实体特异性结合的生物素化二抗且所述第二结合实体是亲和素。本文所用的术语“亲和素”包括任何亲和素-生物素结合分子的任何表达或工程改造形式，例如链霉亲和素、中性链亲和素等。

[0050] 微通道装置表面被特异性结合第一结合实体的第二结合实体包被。第二结合实体可以是抗体、抗原、适体、核酸（例如DNA和RNA）、蛋白质（例如受体、酶、酶抑制物、酶底物、配体）、肽、凝集素、脂肪酸或脂类和/或多糖。第二结合实体可以是与第一结合实体同一类型的分子（例如抗体-抗体或核酸-核酸），或可以是与第一结合实体不同类型的分子（例如核酸-蛋白质）。第二结合实体可以直接与第一结合实体结合，或可以间接通过标记分子与第一结合实体结合。例如，如果第一结合实体是生物素化的一抗，第二结合实体可以是亲和素。在一个实施方式中，第二结合实体是亲和素。在一些实施方式中，上样混合物可同时含有第一结合实体和第三结合实体，其中第一结合实体与目标实体（例如在靶细胞上）结合，第三结合实体与第一结合实体特异性结合。在这类实施方式中，第二结合实体与第三结合实体直接或间接通过可检测实体特异性结合。例如，如果第一结合实体是小鼠一抗且第三结合实体是与地高辛偶联的抗小鼠抗体，则第二结合实体是抗地高辛抗体。

[0051] 微通道的聚合物表面和/或其中所含的图案化柱或障碍区可用各种方式衍生，以在所有表面上实现第二结合实体的附着。例如，在携带微通道的基座进行电浆处理和密封后，可将氨基官能的硅烷（例如3%的道康宁（Dow Corning）Z-6020溶液）或巯基官能的硅烷溶于乙醇的1-50体积%溶液注入微通道，以填充样品入口和样品出口区之间的收集区，随后可将浸没的微通道在室温下孵育30分钟。可在未完全固化的聚合物，例如PDMS上进行衍生，然后用平板密封微通道区。在此情况下，另一种方法是轻微欠固化PDMS结构，然后在固定密封板和用取代的硅烷或其它官能化剂处理后完成固化。例如，可用约50-90℃的约90分钟最终加热步骤在用Z-6020处理后完成固化。或者，室温下1或2日也能够完成固化。这种衍生处理还可在微通道区域密封之前进行，因为接触平面的衍生没有实际结果。然后用乙醇冲洗流经，使微通道准备附着第二结合实体。

[0052] 第二结合实体可直接或间接固定在柱、障碍、和/或微通道表面，表面可经预处理和/或涂层以促进附着。在一些实施方式中，优选间接固定，并考虑使用与柱或表面首先连

接的中间剂或物质。可能需要用偶联配对连接中间剂。例如,亲和素或针对另一种物种抗体的抗体可附着在中间剂(例如NHS/马来酰亚胺异双功能接头)上,其随后与生物素化抗体或此类其它物种的抗体偶联。

[0053] 可用任何合适的方法在有或没有外力情况下实现本发明装置的流经。在一个实施方式中,流经本发明装置是通过泵送实现,例如使用注射泵等,或通过真空抽取来自大直径入口孔洞提供的入口孔处储器的液体。优选该孔的容量能容纳约50–500 μ l液体样品。在一个实施方式中,流动通道的设计为在合理范围内通过装置的流速(例如通过用注射泵或等同装置注射样品,例如Biocept注射泵或标准哈佛仪器(Harvard Apparatus)输液注射泵或其它市售注射泵)下,在收集区内产生速率为约0.01–100mm/秒的流动,整个区域内流线型流动基本被破坏,但不产生涡流。这是由于整个收集区内柱的不同尺寸和相对间隔的随机排列。实现相对平滑、无死点的非流线型流动的优选液流速度为约0.3–10mm/秒,更优选流速维持在约0.5–5mm/秒之间,可通过抽吸给定尺寸的入口孔实现。

[0054] 本发明还提供了用本文所述装置检测生物样品中靶细胞的方法。例如,所述方法可包括使生物样品与第一结合实体接触以形成预上样混合物,其中第一结合实体与靶细胞表面上的目标实体特异性结合;使预上样混合物通过微通道,其中微通道表面被能特异性结合第一结合实体的第二结合实体包被;和检测微通道表面靶细胞的存在。在一些实施方式中,所述微通道含有一组以随机模式分布于微通道表面的柱。

[0055] 各种类型的生物样品,例如血液、血浆、血清、骨髓、精液、阴道分泌物、尿液、羊水、脑脊髓液、关节液、肺灌洗、细针吸取物(FNA)或活检组织样品适用于本发明的方法。在一个实施方式中,生物样品是来自病人的血样。靶细胞可以1比 10^{10} ,1比 5×10^7 或1比 10^4 个细胞的比例存在于生物样品中。靶细胞可以是任何含有可检测表面抗原的细胞,例如癌细胞、干细胞、胎儿细胞、受病毒、细菌或真菌感染的细胞。

[0056] 在一个具体实施方式中,靶细胞是癌细胞。癌细胞可以是任何类型的癌细胞,例如上皮癌,包括但不限于乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结直肠癌细胞、肺癌细胞、胰腺癌细胞、卵巢癌细胞、膀胱癌细胞、子宫内膜癌或子宫癌细胞、宫颈癌细胞、肝癌细胞、肾或肾脏癌细胞、甲状腺癌细胞、骨癌细胞、淋巴瘤细胞(例如霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤)、黑色素瘤细胞、和非黑色素瘤皮肤癌细胞。

[0057] 第一结合实体可以是本文所述的任何分子。在一个实施方式中,第一结合实体是抗体。第一结合实体可以是生物素化抗体,第二结合实体可以是亲和素。在一些实施方式中,第一结合实体可以是与循环上皮细胞特异性结合的抗体。抗体可以是上皮细胞粘着分子(EpCAM)抗体,例如与上皮细胞表面粘着蛋白特异性结合的抗体。第一结合实体可以是两种、三种、四种、五种、或更多抗体的混合物,例如如本文所述用于捕获目标癌细胞。例如,抗体混合物可包含至少针对上皮细胞表面抗原的抗体,至少一种针对指示间质表型的抗原的抗体,从而从样品中分离具有一定范围的上皮和/或间质特征的细胞。

[0058] 例如,当靶细胞是乳腺癌细胞时,第一结合实体可以是抗体,其特异性结合EpCAM(上皮细胞粘着分子)、Her2/neu(人上皮生长因子受体2)、MUC-1、EGFR(上皮生长因子受体)、TAG-12(肿瘤相关糖蛋白12)、IGF1R(胰岛素样生长因子1受体)、TACSTD2(肿瘤相关钙信号转导蛋白2)、CD318、CD340、CD104、N-钙粘蛋白或其中两种或多种的组合(例如混合物)。

[0059] 在另一个实施方式中,靶细胞是前列腺癌细胞,第一结合实体是与EpCAM、MUC-1、EGFR、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PSA(前列腺特异性抗原)、TACSTD2、PSCA(前列腺干细胞抗原)、PCSA(前列腺细胞表面抗原)、CD318、CD104、N-钙粘蛋白或其组合特异性结合的抗体。在另一个实施方式中,靶细胞是结直肠癌细胞,第一结合实体是与EpCAM、CD66c、CD66e、CEA(癌胚抗原)、TACSTD2、CK20(细胞角蛋白20)、CD104、MUC-1、CD318、N-钙粘蛋白或其组合特异性结合的抗体。

[0060] 在又一个实施方式中,靶细胞是肺癌细胞,第一结合实体是与CK18、CK19、CEA、EGFR、TACSTD2、CD318、CD104或EpCAM或其组合特异性结合的抗体。在另一个实施方式中,靶细胞是胰腺癌细胞,第一结合实体是与MUC-1、TACSTD2、CEA、CD104、CD318、N-钙粘蛋白、EpCAM或其组合特异性结合的抗体。在又一个实施方式中,靶细胞是卵巢癌细胞,第一结合实体是与MUC-1、TACSTD2、CD318、CD104、N-钙粘蛋白、EpCAM或其组合特异性结合的抗体。

[0061] 在另一个实施方式中,靶细胞是内皮膀胱癌细胞,第一结合实体是与CD34、CD146、CD62、CD105、CD106、VEGF受体(血管内皮生长因子受体)、MUC-1或其组合特异性结合的抗体。在另一个实施方式中,靶细胞是上皮膀胱癌细胞,第一结合实体是与TACSTD2、EpCAM、CD318、EGFR、6B5或叶酸结合受体特异性结合的抗体。

[0062] 靶细胞可以是癌干细胞,第一结合实体可以是与CD133、CD135、CD117、CD34或其组合特异性结合的抗体。

[0063] 在一些实施方式中,靶细胞是表达间质抗原的循环癌细胞,第一结合实体是与FGFR1、FGFR4、EGFR、N-钙粘蛋白、叶酸结合受体和MSC或其组合特异性结合的抗体(或抗体混合物)。

[0064] 在一些实施方式中,靶细胞是表达血管生成表面抗原的循环癌细胞,第一结合实体包括与VEGF受体特异性结合的抗体。

[0065] 在其它实施方式中,靶细胞是黑素瘤皮肤癌细胞,第一结合实体是与一种或多种黑素细胞分化抗原、癌胚抗原、肿瘤特异性抗原、SEREX抗原或其组合特异性结合的抗体。黑素细胞分化抗原的例子包括但不限于酪氨酸酶、gp75、gp100、Melan A/MART 1或TRP-2。癌胚抗原的例子包括MAGE家族(MAGE-A1, MAGE-A4)、BAGE家族、GAGE家族或NY-ES01中的抗原。肿瘤特异性抗原的例子包括CDK4和 β -联蛋白。SEREX抗原的例子包括D-1和SSX-2。

[0066] 在一些实施方式中,第一结合实体是针对由于细胞转化而被激活的突变肽的抗体。这些肽包括但不限于突变的内含子、N-乙酰氨基葡萄糖转移酶、V基因产物、MUM-1和p15。

[0067] 在其它实施方式中,第一结合实体是识别神经节苷脂、GM2、GD2、GM3和/或GD3;高分子量硫酸软骨素蛋白聚糖、CD146或p97黑素转铁蛋白的抗体。

[0068] 在一些实施方式中,靶细胞是循环癌细胞(CTC)。血样中的CTC是一种肿瘤细胞,其常常通过CK和DAPI染色阳性及CD45染色阴性来确定(CK^+ , $CD45^-$, $DAPI^+$),而淋巴细胞则是 $CD45^+$ 。在血循环中检测CTC能帮助疾病管理,包括能监测疗效或失败。然而,由于可得的CTC特异性抗体数量有限,CTC在约40%-60%的病人血样中不能被捕获。因此,在某些方面本发明提供了捕获和检测这些稀有CTC的方法。

[0069] 在一些实施方式中,第一结合实体是至少一种第一抗体和一种第二抗体的混合物,其中所述第一抗体特异性结合目标实体的第一表位,所述第二抗体特异性结合目标实体的第二表位。第一和第二表位可存在于相同抗原(分子)上,或第一和第二表位可存在于

不同抗原(分子)上。

[0070] 在一个实施方式中,第一结合实体可以是一抗和二抗的混合物,其中一抗与干细胞抗原特异性结合,二抗与癌细胞抗原特异性结合。干细胞抗原可存在于癌干细胞上,可加入针对这些干细胞抗原的抗体作为一种或多种针对癌抗原的抗体的通用捕获抗体,如本文所述。在一些实施方式中,一抗与CD133、CD135、CD117、CD34或其组合特异性结合,二抗与癌抗原特异性结合。

[0071] 在另一个实施方式中,第一结合实体可以是一抗和二抗的混合物,其中一抗与间质标记特异性结合,二抗与癌细胞抗原特异性结合。循环肿瘤细胞可下调上皮标记并上调间质标记,因此其可通过与这些间质标记特异性结合的抗体而捕获。在一些实施方式中,一抗与FGFR1(成纤维细胞生长因子受体1)、FGFR4、MSC(间质干细胞抗原)、EGFR、N-钙粘蛋白、叶酸结合受体或其组合物特异性结合,二抗与癌抗原特异性结合。

[0072] 在另一个实施方式中,第一结合实体可以是一抗和二抗的混合物,其中一抗与血管生成标记特异性结合,二抗与癌细胞抗原特异性结合。在一些实施方式中,一抗与VEGF受体特异性结合,二抗与癌抗原特异性结合。

[0073] 在本发明的另一个实施方式中,该方法还包括使预上样混合物与第三结合实体接触。第一结合实体可以是一抗,第三结合实体可以是与可检测或可捕获实体偶联的二抗,二抗与第一结合实体特异性结合。第二结合实体与第三结合实体(例如通过可捕获实体)特异性结合。在另一个实施方式中,该方法还包括使预上样混合物与第三结合实体接触,其中所述第一结合实体是一抗,所述第三结合实体是与第一结合实体特异性结合的生物素化二抗,其中所述第二结合实体是亲和素分子。二抗可以是全或完整抗体或其片段,例如Fab'₂、Fab'或Fab,或任何抗体衍生物。衍生的抗体可以是抗体片段,与脂肪酸、碳水化合物、肽、化学实体例如荧光素、链霉亲和素等偶联的抗体。衍生的抗体可以是一种抗体,其中氨基酸经修饰以提高抗体对目标蛋白的亲合力或亲和性。

[0074] 在一些实施方式中,该方法还包括使结合于微通道表面的靶细胞交联。一些交联剂可用于将结合的靶细胞与微通道交联,例如通过氨基(酰胺、胺等)、羰基、酰基、烷基、芳基、巯基和其它本领域技术人员熟知的基团。交联剂的例子包括但不限于用于交联伯胺的亲水同双官能NHS交联剂(例如Bis(NHS) PEO-5(双N-琥珀酰亚氨基-[五甘醇]酯),PEG或葡聚糖聚合物的同双功能异硫氰酸衍生物,戊二醛,在聚合物的一端含有NHS而在另一端含有马来酰亚胺的异双官能交联剂;过用于形成反应性醛聚合物的氧化物处理的糖聚合物,和用于将羧基与伯胺聚合的EDC(1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐。可通过在接头上任一端的两个反应基团之间加入一种或多种聚合单元改变交联物的长度。合适的聚合单元包括但不限于聚合的乙二醇,碳链,多核苷酸,多肽和多糖。

[0075] 在靶细胞捕获后,可将交联剂用于微通道。在一些实施方式中,可在标记(例如荧光标记)捕获细胞后进行第二交联处理,以使标记与捕获的细胞交联。交联剂浓度和处理持续时间取决于交联剂种类和反应性,靶细胞类型,用于捕获细胞的结合实体,与结合实体结合的表面抗原的表达水平。合适的浓度可以是约0.01-10mM,更优选约0.5-5mM,或最优选约1mM。用交联剂处理的持续时间可以是约5-120分钟,约15-90分钟,或约30-60分钟。交联剂浓度和处理持续时间的优化在本领域普通技术人员能力范围内。

[0076] 可用本领域技术人员已知的几种方法之一检测捕获细胞的存在。在一个实施方式

中,通过光学显微镜观察捕获的细胞。在另一个实施方式中,捕获的细胞可用荧光分子标记或染色,通过荧光显微镜或测定荧光信号来观察。例如,捕获的细胞可以用核染料DAPI染色,随后用荧光显微镜观察。在另一个实施方式中,通过检测第一结合实体的存在来检测靶细胞的存在。第一结合实体的检测可包括使捕获细胞与识别并结合第一结合实体的标记分子接触。例如,标记的分子可以用荧光标签标记的抗体,或与第一结合实体结合的着色乳胶颗粒。在一个实施方式中,第一结合实体是生物素化抗体,标记的分子是荧光标记的亲合素。在一些实施方式中,标记的分子可以是与第二结合实体相同类型的分子。在存在第三结合实体的实施方式中,捕获细胞的检测可包括检测第三结合实体的存在。在这种实施方式中,标记的分子识别并结合第三结合实体。例如,第一结合实体可以是小鼠抗体,第三结合实体可以是结合小鼠抗体的生物素化二抗(例如山羊衍生的抗小鼠抗体),标记的分子可以是荧光标记的亲合素或结合第三结合实体的荧光标记抗体(例如兔衍生的抗山羊抗体)。

[0077] 在一些实施方式中,可能需要随后分析捕获的细胞。在一个实施方式中,可从微通道释放捕获的细胞,收集并进一步分析。本领域已知数种释放捕获的细胞的方法,可包括机械方法(例如高速液流)、化学方法(例如pH改变),或使用酶切割剂。例如,可在微通道上加入试剂以切割第二结合实体或切割第二结合实体与细胞之间的键,以从微通道释放细胞。例如,可用胰蛋白酶、蛋白酶K、胶原酶、或特异性聚焦的酶降解第二结合实体(例如抗体、链霉亲和素)和/或细胞表面抗原。在这种切割过程中,微通道出口与储器或其它收集器相连,收集携带释放细胞的流出液用于进一步分析。这种进一步分析包括但不限于检测非整倍性(包括例如染色体1、3、4、7、8、11和/或17的单体性或三体性)的检测,基因扩增,基因突变的检测,基因复制和其它本领域熟知的核酸或蛋白质改变。例如,基因突变可包括基因序列中一个或多个核苷酸的取代、添加、缺失。在一个实施方式中,从释放细胞获得的核酸例如DNA或RNA可进行荧光原位杂交(FISH)、PCR分析、RFLP(限制性片段长度多态性)分析、DNA测序等。在另一个实施方式中,从释放的细胞获得的蛋白质或糖蛋白,包括肽和氨基酸可进行例如(但不限于)氨基酸或肽分析或测序、GC-MS和其它蛋白质分析领域技术人员已知的技术。在另一个实施方式中,微通道装置释放的捕获细胞可通过光学显微镜、电子显微镜、扫描显微镜、免疫细胞化学染色(ICC)对内部细胞结构或表面蛋白表达等进行形态分析。

[0078] 在另一个实施方式中,可进一步原位分析捕获的细胞。例如,在附着时可对细胞进行计数,用荧光标记物标记,进行原位杂交分析例如FISH。由于抗体-抗原键非共价,它们能在一定条件下解离。因此在一些实施方式中,特别需要通过将细胞与通道交联来进一步稳定微通道上的细胞,使细胞在各种原位标记、加热、变性和洗涤步骤中不脱离和丢失。由于细胞表达的作为第一结合实体目标的表面抗原水平低且这些细胞可能与第二结合实体的结合更弱,交联可能是特别重要的考量。将细胞与通道表面基质共价交联能在捕获后的分析期间稳定所捕获的细胞。

[0079] 在另一方面,本发明提供了循环细胞的捕获后分析方法。可如本文所述捕获循环细胞,包括通过本发明所述的方法或装置。在一些实施方式中,捕获和评估循环细胞,不需一次或多次富集和/或细胞复制或倍增步骤,例如通过细胞培养等。在该方面,评估循环细胞的恶性肿瘤不依赖于CK状态或表达,即不经过CK染色和/或任何其它评估法。例如,根据该方面,(如本文所述)评估捕获细胞的非整倍性。非整倍性可以是关于例如染色体1、3、4、

7、8、11和/或17。在一些实施方式中,本发明涉及评估循环细胞的单体性或三体性8、11和/或17。在一些实施方式中,本发明涉及评估循环细胞的单体性8、11和/或17。可用任何已知方法例如FISH检测非整倍性。可使用其它癌症或恶性肿瘤标记(除了细胞角蛋白表达),例如本文所述的标记,包括Her2表达。

[0080] 通过以下另外的实施例进一步说明本发明,所述实施例不应解释为具有限制性。本申请全文中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请以及附图的内容均通过引用纳入本文。

实施例

[0081] 实施例1. 基础微通道装置的构建

[0082] 图1显示了分离生物分子或细胞的微通道装置的一个实施方式。该装置包含基座或载体11,其由包括微通道13的流径(通过装置第一端作为进口或入口的开口或孔15提供样品液体)和在装置第二端作为出口的开口19组成。收集区17的横截面比引导从入口15进入收集区的入口区18大。入口区含有一或多对轴向排列的分配器/载体21,紧靠在区域18末端进入收集区17变宽处的上游。这些中央分配器打碎了进入两条或更多途径的液流,使液流在传递到收集区17进入端时分布更均匀。收集区含有多根直立柱23,其横跨液体流径对齐且排列成不规则的基本随机图案,跨流体通道收集区部分的整个宽度。柱的图案为在收集区内没有直线流动和打断流线型流动,确保在沿流径流动的液体和柱表面之间有良好的接触。柱与收集区17的平底是一体的,并且从底部垂直延伸,提供了与流经基座11流动通道的液体水平流径垂直的表面。另一流体分配器/载体21a位于收集区出口。

[0083] 用PDMS形成基座,与玻璃平板结合以密封流动通道。通过3%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷溶液室温孵育30分钟,用胺基团衍生收集区的整个内表面。用乙醇洗涤后,用在一端含有NHS酯且另一端含有马来酰亚胺基团的双官能PEG接头分子来衍生通道上的胺基团。在该反应中,NHS基团与通道上的胺基团反应。用PBS洗涤通道后,添加0.5mg/mL巯基化链霉亲和素,其与结合于通道的PEG接头另一端上的马来酰亚胺基团反应。通过用本领域公知的Traut试剂处理链霉亲和素制备巯基化链霉亲和素。孵育60分钟后,用PBS/1%BSA从微通道上洗下过量巯基化链霉亲和素,储存备用。

[0084] 在一个典型的例子中,获得10ml血液,通过本领域公知的密度梯度沉淀分离暗黄层。暗黄层含有血液中的成核白血球组分,还含有存在于血液中的上皮或其它成核细胞。装在离心管中体积约为0.5mL的暗黄层与本发明的第一结合实体孵育30分钟,然后在管中加入约30倍过量的PBS/BSA,离心沉淀暗黄层细胞。将样品重悬浮在约200μL中,通过将微通道装置接到装有约50μL细胞悬液的注射泵出口管道上而经过亲和素包被的微通道。操作注射泵,使样品液在室温下缓慢持续流过微通道装置,速度为约10μL/分钟。在此期间,亲和素与横跨柱的随机图案所在的收集区中的表面结合,捕获样品中感兴趣的靶细胞。在注射泵传递了所有样品后,用PBS/1%BSA含水缓冲液进行缓慢冲洗。经约10分钟将约100μL该含水缓冲液传递通过装置,有效除去装置流动通道中所有未特异性结合的生物物质。然后进行两次额外洗涤,每次使用约100μL PBS/1%BSA约10分钟。

[0085] 此时,由于装置是用光学透明材料制造,可用显微照相机对捕获效果进行显微镜检测。可用其它抗体或荧光探针进一步处理捕获的细胞,并用荧光显微镜分析。

[0086] 实施例2. 预标记微通道和预标记细胞之间细胞捕获率的比较

[0087] 如2005年1月18日提交的美国公开申请号2006/0160243和他处 (Nagrath等, (2007) Nature, 450卷 (7173) :1235-9) 所述, 先前捕获感兴趣细胞的装置包含特异于感兴趣细胞上抗原的抗体所衍生的微通道。然后含有感兴趣的稀有细胞的悬液通过微通道, 用细胞特异性抗体捕获细胞 (图2)。

[0088] 虽然可在培养细胞中和临床组织样品例如肿瘤上确定抗原表达水平, 但不能精确了解在循环肿瘤细胞 (CTC) 上有多少抗原。已知肿瘤是高度异源的, 从肿瘤分离到血液中的细胞能改变其抗原表达水平。因此, 很可能CTC是高度异源的群体, 其特定抗原水平在任何给定样品中从很低到很高变动。为了从样品中最大程度地捕获CTC, 最好是优化系统以捕获具有最低抗原表达水平的细胞。

[0089] 本发明的装置含有用如实施方式1所述与细胞特异性抗体结合的通用抗体或蛋白所衍生的微通道。在样品通过微通道前在含有感兴趣细胞的样品中加入细胞特异性抗体, 从而预标记细胞。当通用抗体或其它包被通道的蛋白与结合于感兴趣细胞的细胞特异性抗体结合时, 感兴趣的细胞被捕获 (图3)。

[0090] 进行了下组实验, 以确定用抗原特异性抗体预标记含CTC样品在微通道装置上获得的捕获率是否高于用抗原特异性抗体包被的微通道装置。常用于捕获CTC的抗原是一种上皮细胞表面粘着分子EpCAM。对于这些实验, 使用膀胱细胞系T24, 已知它表达低水平的EpCAM。

[0091] 在传统装置中, 用链霉亲和素衍生微通道, 然后EpCAM的生物素化抗体被预加到通道上 (EpCAM通道)。EpCAM抗体能够结合T24细胞表面上的EpCAM抗原, 从而在微通道内捕获该细胞。在本发明的装置内, 用链霉亲和素衍生微通道 (链霉通道)。生物素化EpCAM抗体与T24细胞样品以 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 孵育30-60分钟, 然后细胞穿过链霉亲和素包被的通道。链霉亲和素与结合在T24细胞表面的生物素化EpCAM抗体结合, 从而在微通道内捕获细胞。因此, 所述两种装置的试剂成分相同, 除了它们以不同顺序加到装置上。

[0092] 如图4所示, 使用链霉亲和素包被的通道以及细胞与生物素化EpCAM抗体预孵育出乎意料地产生了比用EpCAM通道和未标记细胞所得高约两倍的捕获百分数。当细胞在多种流速下经过通道时, 捕获百分数提高约2-3倍。

[0093] 在下一系列实验中, 将 $1.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物素化EpCAM抗体与细胞预期预孵育30分钟。抗体浓度比存在于T24细胞中的总抗原过量约100-1000倍, 从而在各悬液中留有显著过量的抗体。孵育30分钟后, 通过将细胞稀释到约200个细胞而使过量抗体稀释到少于 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$, 以用于通道。该细胞样品作为对照样品, 直接在 $250\mu\text{L}$ PBS/BSA中用于通道 (图5中的样品A)。在样品B-D中, 将指定浓度的过量抗体加回到 $250\mu\text{L}$ 细胞悬液中, 然后运行通道。如图5所示, 游离抗体不干扰通道上的链霉亲和素结合, 也不如预期减少细胞捕获, 而实际上增加细胞捕获。

[0094] 在类似实验中, 加到通道上的起始细胞悬液的体积从 $250\mu\text{L}$ 提高到 2mL 。由于加入的额外抗体的 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在图5中保持相同, 样品中对于约200个细胞的绝对抗体总 μg 数比图5中高近10倍。如图6所示, 加入的额外抗体显示在细胞回收中的增加与图5所示结果观察到的抗体浓度类似。此结果表明观察到的更高回收与细胞悬液中的过量抗体浓度相关, 而与细胞悬液中总抗体的绝对 μg 无关。

[0095] 该系列实验的结果显示当细胞用抗体预标记时,在微通道流动装置中收集感兴趣细胞具有出乎意料的优点。如图4所示,相较用抗原特异性抗体包被的微通道中的捕获,细胞与抗原特异性抗体一起预孵育显著提高捕获。另外,运行期间细胞样品中过量抗体的存在不限制该方法,而是实际上调节细胞抗原与通道上链霉亲和素基质的结合提高,从而增强捕获。

[0096] 实施例3.使用多种抗体提高靶细胞的捕获率

[0097] 传统上认为在通道上预加样抗体最有效。然而,先前没有考虑在通道上负载多种抗体的负面效应。使用由抗原特异性抗体的常规结合伴侣(例如抗体或蛋白)包被的微通道的优点是在细胞悬液中能加入多种抗体以预标记细胞,而不会减损任何单一抗体的可用性。由于细胞上的多个抗原位点不是互相排斥,当在细胞悬液中加入多种抗体时,不会减损通道上任何单一抗体的捕获效力。例如,如果通道能够容纳100个抗体位点且加入5种不同抗体的混合物包被通道,则每种抗体将占通道空间的约20%。因此,各独立抗体的可能结合效率仅是其覆盖整个通道时的20%。不考虑细胞上的抗原数量,通道本身捕获细胞的效率低于仅20%的单独抗体。当细胞具有少量目标抗原时,可通过在与微通道装置的基座或载体结合前在细胞悬液中加入特异于其它目标抗原的抗体来放大这些低抗原表达细胞的捕获效力。例如,如果同样5种抗体加到细胞悬液中,每种抗体能最大程度上与所有相关细胞表面抗原独立结合,而不因为存在其它结合不同细胞表位的抗体而受影响或减少。通过用常见捕获标记(例如生物素)衍生5种不同抗体中的每一种,用捕获标记的结合伴侣(例如链霉亲和素)包被的通道可使全部5种抗体同时与细胞上的各自抗原结合,从而对细胞捕获产生累加效应。

[0098] 图7显示当抗体首先包被在微通道装置的基座/载体上时,EpCAM抗体对通道上的鼠IgG比例降低,因此T24细胞的捕获下降。为了确定额外的生物素化抗体存在下EpCAM捕获的效果,用无关的生物素化小鼠IgG稀释生物素化EpCAM抗体并使用所得混合物,用抗体包被通道或加到细胞悬液中,然后通过通道。图7(样品A)显示了在仅用生物素化EpCAM抗体预标记细胞时,T24细胞捕获的百分数约为2倍高。该观察与图4所示的结果一致。然而,当用无关抗体1:1稀释EpCAM抗体并用其直接标记细胞或包被通道时,通道回收率从24%下降到7%,而预标记细胞的回收率不受影响(图7,样品B)。当1:4稀释EpCAM时,在抗体混合物首先包被在通道上时回收率下降到1%,而细胞用抗体混合物预先标记然后与微通道的基座或载体结合时,回收率不变(图7,样品C)。这些结果证明,当用可溶性抗体预标记细胞时,用额外抗体稀释EpCAM抗体不影响EpCAM抗体与细胞的最大结合,但用稀释的EpCAM抗体预包被通道显示低EpCAM表达的T24细胞的捕获显著减少。因此,显然如果EpCAM抗体与2或3或4种用于结合通道的不同抗体混合,即使其它抗体与细胞表面抗原相关,EpCAM抗体本身的结合效率也会同等减少。因此,当在通道内加入多种抗体时,不预期每种抗体的效果是累加的。由于循环肿瘤细胞(CTC)抗原水平可变,在此方面的细胞捕获总效应无法预计。根据定义,可通过加入CTC较低抗原水平的抗体来减少混合物中可能针对CTC最高水平抗原的抗体。如果混合物中仅一种抗体识别特定CTC上的显性表位,则用通道上多种其它抗体稀释会对捕获产生不良影响,而不是使其增强。相反,在经过通道前将可溶性抗体混合物加入细胞是累加性的。

[0099] 为了证明在经过通道前多种抗体对预标记细胞的累加效应,在T24膀胱细胞或

SKOV卵巢细胞的细胞悬液中加入两种不同细胞表面粘着抗原的两种不同抗体Trop-1和Trop-2。生物素化各抗体,用链霉亲和素包被的微通道设备捕获细胞。当Trop-1抗体用于预上样的T24细胞时,捕获29%的细胞(图8)。当所结合抗原与Trop-1抗体不同的Trop-2抗体与Trop-1抗体联合加入时,捕获94%的细胞。SKOV细胞也获得类似结果。单用Trop-1抗体观察到74%的细胞捕获。然而,同时添加Trop-1和Trop-2抗体,观察到89%的细胞捕获(图8)。结果显示加入针对细胞表面一种以上目标位点的大于一种抗体,增加了与靶细胞结合的通道可检测分子的有效数量并对细胞捕获产生累加效应。

[0100] 在图9中,用不同细胞系和不同抗体混合物观察到相同的累加效应。在该情况下,测试了具有低EpCAM表达的乳腺癌细胞系MDA-MB-231。在图9中,单用EpCAM抗体的捕获%较低,但加入以下6种抗原特异性抗体的混合物:EpCAM、Trop-2、EGFR、MUC-1、CD318和HER-2将捕获提高到几乎100%。MDA-MB-231的FACS分析显示,该细胞系EpCAM, Trop-2、Her-2和MUC-1的抗原表达非常低,而EGFR和CD318的表达较高。因此,将针对较高表达抗原的抗体用针对低表达抗原的抗体稀释3倍。稀释的抗体仍然在捕获该低EpCAM表达细胞系中高度有效。该结果与图7用抗体预标记细胞所示的结果一致。

[0101] 实施例4. 二抗标记靶细胞可影响微通道装置内的捕获

[0102] 在一些情况下,未衍生的一抗可以与感兴趣抗原更有效结合,或更容易使用。对于一些抗体,其活性会由于其表面氨基酸修饰而受到衍生过程的不良影响。有时当需要使用未衍生的一抗与细胞抗原结合时,可在细胞悬液中加入衍生的二抗,以与细胞目标抗原结合的一抗形成复合物。因此,可在细胞悬液中加入一抗混合物、半纯化或非克隆杂交瘤上清液,通过添加衍生的(例如生物素化)二抗可标记附于细胞抗原的任何抗体。简单洗去不与细胞结合的抗体。

[0103] 为了说明该方法,用生物素化Trop-1抗体(图10中的样品A)或非生物素化Trop-1加上3倍摩尔过量的生物素化抗小鼠二抗来预标记培养的卵巢SKOV细胞。一抗(Trop-1)浓度为1 μ g/mL,细胞与或不与3 μ g/mL二抗孵育30分钟,然后在微通道装置上进行细胞捕获和纯化。样品B和D之间的差异在于样品D中所用二抗上的生物素接头较长。在样品C中,用PBS/BSA洗涤细胞,从而在将细胞用于通道前除去过量一抗和二抗。在全部样品中,将约200个细胞悬浮在250 μ L的PBS/BSA中,以用于通道。

[0104] 如图10所示,全部样品具有相似回收率。这些结果证明,生物素化二抗可与未标记一抗联用,预标记细胞用于微通道装置中的有效捕获。一些过量生物素化二抗的存在与用1 μ g生物素化Trop-1直接预标记相比,不会对捕获百分数产生不良影响。二抗可包括完整IgG抗体,或抗体片段例如Fab' 2、Fab'、Fab或工程改造的抗体片段,例如单链Fab或单链可变片段。

[0105] 实施例5. 通道表面上捕获细胞的稳定

[0106] 微通道装置上捕获细胞的过程涉及液体中悬浮细胞的流动。因此,细胞经历液流中的剪切力,其也会使细胞在捕获后从通道上脱离。这种效果对于表面抗原水平较低的细胞更加明显,因为在细胞和与通道表面通过抗体结合的特异性细胞表面抗原之间只有较少的结合点。因此,有利的是用交联剂提供额外的细胞与通道表面的外部结合,以更好地稳定细胞与通道的结合。由于通常用结合蛋白(例如链霉亲和素或抗体)包被通道,将细胞进一步锚定到通道的有利途径是通过蛋白质交联剂。

[0107] 本领域用于此目的的试剂是用于交联蛋白质上氨基的同双官能NHS酯。另一种交联方式是用硫醇反应剂通过蛋白质上的硫醇或二硫基团,例如具有马来酰亚胺和NHS酯的异双官能分子。另外,可用EDC等试剂交联羧基和氨基。可用两个反应基团之间的聚合区域改变这些交联物的长度,其通常采用化学连接剂形式例如聚乙二醇或单碳链,但也可包括糖、氨基酸或肽,或寡核苷酸。5-50nm长的聚合链是对此典型的,但也可以按需要缩短或延长。所有这些蛋白质交联剂的共有性质是共价结合细胞蛋白质,从而通过多个共价结合点将细胞锚定在通道表面。

[0108] 为了检测外源添加的交联剂是否能增强包被的微通道上捕获细胞的停留,用包被的微通道捕获细胞,在有和没有蛋白交联剂的情况下经历高速流动。制备链霉亲和素包被的微通道表面。用已知表面EpCAM表达水平低的培养T24细胞系作为模型细胞系。1 μ g/mL生物素化的抗-EpCAM抗体与细胞一起在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,将约325个细胞悬浮在250 μ L的PBS/BSA缓冲液中,一式三份以12 μ L/分钟通过包被的微通道。通过一式两份等分对细胞进行计数来镜检加到通道上的细胞的确切数量。细胞悬液通过通道后,用PBS/BSA洗涤含有结合细胞的通道一次,然后将2mM的同双官能NHS酯(双N-琥珀酰亚氨基-[五甘醇]酯)的溶液通过通道,孵育20分钟。不含NHS酯的对照通道仅接受PBS/BSA溶液。然后用含5%PEG的PBS溶液以不同流速洗涤细胞2分钟。为了该比较,5%PEG/PBS溶液提高溶液粘度,与较高流速一起为细胞提供更大的剪切力。然后在通道内捕获的细胞用核染料DAPI染色并计数。

[0109] 图11显示了在没有蛋白交联剂的情况下经历不同流速后捕获细胞的显微照片。20 μ L/分钟流速下几乎丧失了50%的细胞,100 μ L/分钟流速下丧失了所有的细胞。

[0110] 图12显示了在与NHS蛋白交联剂接触后经历不同流速的捕获细胞的光学显微照片。流速达50 μ L/分钟时所有细胞留在通道上,在100 μ L/分钟流速下仅损失了一个细胞。

[0111] 图13显示了具有和不具有经蛋白质交联的细胞稳定情况下捕获的定量比较。如先前实验,约200个T24细胞用于微通道,在捕获后用5%PEG/PBS洗涤细胞。图13显示了相对于用交联剂处理的通道中回收的细胞百分数,未用交联剂处理的细胞少于50%。因此,加入蛋白交联剂显著稳定了细胞对微通道的附着。应注意该结果并不取决于细胞是如何被微通道捕获,是否通过在细胞或通道上预加样抗体,因为交联剂是在细胞被捕获后稳定微通道上的细胞。

[0112] 对通道使用与上文类似的第二次实验以测试通道上的细胞稳定性。在如上用蛋白交联剂处理细胞后,接着用抗细胞角蛋白(以观察上皮细胞)和DAPI(以观察具有核的细胞)对通道上的SKOV细胞染色。该实验中的差异是与出口相连的管线被断开,该过程可导致瞬时而突然的压力脉冲,其能使细胞脱离微通道。

[0113] 表1显示了当细胞不与通道交联时受到因去除出口管线引起的外源性机械力而导致细胞损失数量增加。如果在除去管线连接前细胞通过甲醇处理固定在通道上,无论是否使用交联剂,细胞回收率都没有显著变化(数据未显示)。然而甲醇固定(或任何醇或丙酮固定)对于一些随后的细胞分析有几种不良副作用。由于细胞膜被破坏,用甲醇固定的细胞是可渗透的,因此不能区分细胞表面研究和内部细胞反应。另外,用甲醇固定的细胞会融于通道基质,使得除去细胞困难和无效。可对这种细胞进行充分蛋白酶解以协助细胞去除,但是细胞消化物对于一些类型的后续细胞分析有多种不良副作用。细胞与通道交联的过程能使稳定的细胞保持在通道上,而无需常规通道操作和运转过程中的醇固定,操作包括较高流

速、较高粘度缓冲液和除去通道连接。

[0114] 表1

[0115]

条件	2mM 交联剂 +甲醇	2mM 交联剂 无甲醇	0.2 mM 交联剂 无甲醇	0.07 mM 交联剂 无甲醇
通道上的保留%	100% (对照)	96%	60%	28%

[0116] 实施例6. 抗体混合物 (鸡尾酒抗体) 增强上皮样和间质样癌细胞的捕获

[0117] 尿道癌 (UC) 细胞系在多数侵袭性肿瘤模型中具有较低EpCAM表达。循环中这类细胞预期将限制基于EpCAM的CTC捕获效力。选择一组5种UC细胞系 (UMUC3, UMUC5, UMUC9, T24, 和KU7), 根据基因表达热图分析分成偏上皮或偏间质样。对于后者, 这些细胞进行上皮-间质转化 (EMT), 得到具有间质表达和形态特征的上皮细胞。提出该EMT作为上皮细胞从肿瘤脱离并在循环中变得更具迁移性和侵袭性的机制。

[0118] 用FACS进一步测试这些EMT细胞的不同细胞表面抗原。鉴定了这些细胞系的表达差异后, 选择EpCAM和5种另外抗体的抗体混合物以促进全部UC细胞类型的细胞捕获。随后, 我们比较了使用抗体混合物和单用EpCAM的微流体通道的细胞捕获率。还用细胞角蛋白和波形蛋白抗体对细胞进行免疫染色, 以帮助进一步区分各具有上皮或间质样表达特征的细胞。

[0119] 图14显示了用波形蛋白和细胞角蛋白对5种UC细胞进行的染色。在5种UC细胞系中, 2种 (UC3和KU7) 用波形蛋白染色且EpCAM的表达极少或无。虽然这些细胞系仍然有一定程度的细胞角蛋白染色, 但一种细胞仅被波形蛋白染色 (图14)。剩余的3种细胞系 (UC5, UC9 和T24) 仅被细胞角蛋白染色且没有显著的EpCAM表达。当EpCAM单独用作捕获抗体时, 无EpCAM表达的细胞系 (UC3和KU7) 无细胞回收。然而, 当使用含6b5、CD318、EGFR、MOV18、Trop-2和EpCam的抗体混合物时, 全部5种细胞系达到近100%的细胞捕获率。在KU7 (该组细胞中最具间质样的类型) 情况中, 叶酸结合受体 (MOV18) 是独特的且未在其它细胞系中表达。

[0120] 结果显示使用抗体混合物能同时捕获膀胱上皮细胞和经历EMT的膀胱上皮细胞。研究显示使用抗体混合物与单用一种抗体例如EpCAM相比, 总细胞回收率得到大幅改善。由于循环中预期肿瘤细胞类型的异质性, 这种方法将显著改进病人样品中CTC的捕获和分离。

[0121] 实施例7抗体混合物或鸡尾酒抗体提高低抗原表达细胞在微通道装置上的捕获

[0122] 当使用抗体混合物同时与多种不同癌细胞类型结合时, 需要通用检测方法。虽然细胞角蛋白染色对于上皮细胞有效, 但一些上皮细胞如实施例6所述缺失细胞角蛋白表达。对于其它细胞类型例如干细胞, 这些细胞的染色没有特异性方法, 所述细胞和其它与通道非特异性结合的血细胞类型没有显著的交叉反应性。然而, 细胞表面高水平的生物素化一抗或二抗对于微通道上亲和素特异性捕获的所有细胞都通用。使用生物素偶联的抗体混合物的益处在于靶细胞上表面生物素增加的累加效应, 其能提高捕获低抗原表达细胞或在异源细胞群中表达不同水平的一种或多种抗原的细胞, 例如在肿瘤病人中发现的细胞。参见图8、9和13。

[0123] 在混合物中使用多种抗体的出乎意料的额外优点是提供了一种具有不同抗原表达水平的异源细胞群中通用的检测方法。其中一个例子见图15A和图15B。

[0124] 图15A显示了用EpCam单独或用对细胞表达的其它表面抗原特异性的抗体混合物(包括EpCAM, Trop-2, EGFR, MUC-1, CD318和HER-2)对SKOV细胞的捕获百分数, 该细胞已知表达高水平的EpCAM抗原(约40-70,000EpCAM抗原/细胞(apc))。结果显示了用单独EpCam抗体或特异于EpCam以外其它抗原的抗体混合物所捕获的SKOV细胞百分数没有显著改进。

[0125] 相反, 图15B显示了在载玻片上相同SKOV细胞用FACS荧光染色的强度。这些细胞染色的强度差异很大, 这取决于它们是与EpCam单独预混合(约66,000个表面抗原)或与针对Her-2, CD24, CD44的抗体混合物(约600,000个抗原的组合表面抗原水平, 由FACS分析测定)预混合。用荧光标记的抗小鼠抗体标记一抗。虽然如图15A所示这些抗体混合物孵育的SKOV细胞使用生物素化二抗的捕获略有增加, 在图15B中使用荧光标记的二抗显示当采用抗体混合物时染色强度显著增高。类似地, 如果细胞与一抗和之后的生物素化二抗及荧光标记的生物素反应性亲和素反应, 可获得此差异。因此, 即使不需要额外的抗体捕获细胞时, 使用抗体混合物也有显著优点。在低EpCam表达的细胞中, 单用EpCam抗体的捕获减少(图4-6, 14), 但当使用抗体混合物时有显著增加。在此情况中, 基于与细胞表面结合的抗体数量的染色强度也会增加。因此, 使用针对用于更好捕获细胞的多种抗体的荧光标记分子对于同一细胞的更好检测有普适的优点。使用抗体混合物具有的独特优点在于能够检测可能没有已知特异性标记的细胞, 例如上皮细胞中的细胞角蛋白, 或角蛋白已经丧失(如图14中所示)。用于更好捕获具有可变表面标记表达的细胞的混合物中的多种抗体仍可以是荧光标记的目标, 仅基于其与抗体混合物中的抗体结合水平提高。

[0126] 图16显示了多种抗体在混合物中的累加效应, 该混合物含有特异于SKOV靶细胞的抗体, 当血样掺入了SKOV靶细胞时, 显示与存在于血样中的非特异性细胞结合极少。抗体混合物含有针对CD340, EGFR, CD318, Muc-1, Trop-2, EpCam, Mov-18, MSC, c-met和N-钙粘蛋白的抗体。虽然样品中的一些非特异性细胞可能会吸附加入样品的一些生物素化抗体(一抗或二抗), 吸附抗体的水平远低于用荧光标记的中性链亲和素显示的水平。特异性靶细胞和非特异性细胞之间的差异染色有利于观察靶细胞, 因为靶细胞结合或捕获的抗体混合物中生物素化抗体数量较多。图15A、图15B和图16显示了在混合物中加入多种抗体提供了检测微通道内表达低水平抗原的稀有细胞类型的通用和普遍方法。因此, 用于增强并因而提高样品内异源细胞群体中高度可变的循环肿瘤细胞捕获的抗体混合物也增强任何捕获细胞的检测。

[0127] 实施例8: 微通道装置显著捕获生物学样品中细胞存在量较低的细胞。

[0128] 在图17中, 血样中掺有可变数量的SKBr3细胞(一种表达高水平EpCAM的细胞系), 范围为约10-250个细胞/10mL血样。在掺入的血样中加入EpCAM抗体, 用实施例1所述的方法在微通道装置上捕获EpCAM Ab结合的细胞。

[0129] 图17的结果显示从掺入的样品中回收了约100%的SKBr3细胞。数据显示微通道装置对细胞的捕获百分数不取决于细胞输入。

[0130] 实施例9: 抗体混合物能在微通道装置中显著捕获病人血样中的循环肿瘤细胞(CTC)

[0131] 表2显示了在微通道装置上从诊断患有前列腺、肺、胰腺、肾细胞、结直肠、乳腺和卵巢癌的病人的10ml血样中捕获的循环肿瘤细胞(CTC)的结果。血样预先用含有针对CD340, EGFR, CD318, Muc-1, Trop-2, EpCam, Mov-18, 和MSC的抗体的可溶性抗体混合物标记

或仅用抗-EpCAM抗体标记。通过用荧光标记的抗细胞角蛋白染色来鉴定细胞。

[0132] 表2

[0133]

样品编号.*	仅抗-EpCAM	Mab混合物
1 (16283-前列腺)	0	2
2 (16302-前列腺)	0	3
3 (16318-前列腺)	95	77
4 (16291-卵巢)	1	1
5 (16278-结直肠)	0	4
6 (16288-肺)	0	5
7 (16297-乳腺)	1	3
8 (16296-乳腺)	0	3

[0134] *来自前列腺、肺、胰腺、肾细胞、结直肠、乳腺和卵巢癌样品。

[0135] 表2显示了用可溶性抗体混合物预标记的血样在捕获CTC上优于仅用一种抗体预标记的样品。

[0136] 实施例10当获自乳腺癌病人的血样用微通道装置上的可溶性抗体混合物预标记时,微通道装置在捕获CTC上优于使用铁磁标记抗体的CTC捕获。

[0137] 血样和抗-EpCAM抗体一起预孵育以在微通道装置上捕获,或与微观铁粒子(免疫铁磁Ab)连接的抗体一起预孵育,用**CellSearch®** (VERIDEX, LLC) 捕获。对捕获细胞进行CK、CD45标记染色和DAPI (一种核染色) 染色。对原位染色为CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺的细胞进行计数。

[0138] 表3

[0139]

样品号	CEE 获得的总#CTCs (CK ⁺ /CD45 ⁻ /DAPI ⁺)*	Veridex
16163	0	0
16170	0	0
16171	60 (34)	54

[0140]

16172	5	0
16173	0	1
16176	549 (325)	1267
16187	104 (37)	54
16196	0	0
16198	87 (27)	32
16202	5	8
16203	2008	923
16205	78	51

[0141] *双尾t试验没有显著差异 (P=0.715)

[0142] 总CTC计数以黑体显示,包括强、凋亡性和微核;括号中数值表示强CTC。

[0143] 表3显示了在微通道装置上捕获的CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺的CTC总数恒定多于用VERIDEX系统捕获的CTC,表明本发明提供了显著的CTC捕获。

[0144] 实施例11:捕获细胞的捕获后分子分析提高了作为III期和IV期乳腺癌病人中癌细胞的CTC的鉴定。

[0145] 从IV期(表4)和III期(表5)的乳腺癌病人血样中捕获循环肿瘤细胞(CTC)。预先用含有针对CD340,EGFR,CD318,Muc-1,Trop-2,EpCam,Mov-18和MSC的抗体的抗体混合物标记CTC,并从微通道装置释放。用荧光原位杂交(FISH)分析捕获细胞中染色体8和17的非整倍性,并扩增乳腺癌标记Her2(表4)。这些细胞从未从微通道中释放,所有FISH在通道内进行,在FISH分析计数后细胞重新定位。将发现对非整倍性阳性的CTC总数与CK标记染色阳性的细胞总数作比较。

[0146] 表4

[0147]

样品#	#CTCs (CK ⁺)	#非整倍细胞 (染色体 17 & 8)	Her2/染色体 17 比例
1	3	7 (6 CK ⁻)	1.05
2	1	1 (CK ⁻)	1.0
3	0	3 (CK ⁻)	1.0
4	0	3 (CK ⁻)	1.0
5	0	4 (CK ⁻)	1.0
6	2	13 (CK ⁻ / CK ⁺)	Mixed
7	1	1 (CK ⁻)	1.0

[0148]

样品#	#CTCs (CK ⁺)	#非整倍细胞 (染色体 17 & 8)	Her2/染色体 17 比 例
8	1	7 (CK ⁻)	0.95
9	510	7 (CK ⁺)	1.0
10	16	16 (CK ⁻ / CK ⁺)	>6
11	1	2 (CK ⁻)	1.0
12	0	4 (CK ⁻)	1
13	0	2 (CK ⁻)	1
14	0	14 (CK ⁻)	1
15	0	1 (CK ⁻)	1.5
16	0	24 (CK ⁻)	1.98
17	3	9 (CK ⁻)	5.714

[0149] 表4显示对IV期乳腺癌病人CTC的捕获后分子分析,非整倍性和Her2扩增状态在检测捕获CTC中乳腺癌细胞方面优于CK染色。

[0150] 在表5中,分析诊断为III期癌症的病人血样中捕获CTC的染色体8、11和17中的非整倍性。将发现对非整倍性阳性的CTC总数与CK标记染色阳性的细胞总数作比较。显示了染色体8、11和17上非整倍性的详情。

[0151] 表5

[0152]

样品号	#CTCS (CK ⁺)	#非整倍细胞	非整倍性详情(染色体 8, 11 和 17)
16610	0	93	4-单体 8; 6- 单体 11; 83- 单体 17
16620	0	55	26-单体 8; 11- 单体 11; 16-单体 17; 2-复杂非整倍体
16621	0	54	8-单体 8; 22-单体 11; 23-单体 17; 1- 三体 17
16631	0	169	11-单体 8; 11- 单体 11; 265-单体 17; 3-复杂单体
16632	0	61	9 单体 8; 10- 单体 11; 40- 单体 17; 2- 复杂单体 8, 11, 17
16633	0	6	2- 单体 8; 1- 单体 11; 3- 单体 17
16686	0	55	13- 单体 8; 13- 单体 11; 21 单体 17; 1- 三体 8; 1- 三体 11; 1- 三体 17
16687	0	686	12- 单体 8; 82- 单体 11; 582- 单体 17
16720	0	56	8- 单体 8; 23- 单体 11; 25- 单体 17

[0153]

样品号	#CTCS (CK ⁺)	#非整倍细胞	非整倍性详情(染色体 8, 11 和 17)
16747	0	58	11- 单体 8; 19- 单体 11; 26- 单体 17; 1- 四体 8; 1- 三体 17
16754	0	531	21- 单体 8; 123- 单体 11; 380- 单体 17; 7-复杂非整倍体

[0154] 虽然III期乳腺癌病人的血液中捕获的CTC没有对CK标记染色阳性(CK⁺)，在染色体8、11和17进行的捕获后非整倍性分析显示大量捕获的CTC是非整倍的，表明这些CTC是肿瘤细胞。使用FISH检测Her2(表4)扩增和非整倍性(表4和5)的原位杂交研究确认了CK⁻的捕获CTC是乳腺癌细胞。表4和5中的结果显示，捕获后分子分析例如Her2标记的扩增和微通道装置释放的捕获细胞非整倍性的检测，能够鉴定来自III期和IV期癌症病人的CK⁻细胞中的癌细胞。该研究显示，微通道装置内捕获的CTC提供了鉴定可能会漏检的癌细胞的有效方法。

[0155] 实施例12：捕获细胞的捕获后分子分析增强了CTC作为膀胱癌病人中癌细胞的鉴定。

[0156] 从膀胱癌病人的血样捕获循环肿瘤细胞(CTC)。用含有针对CD340, EGFR, CD318, Muc-1, Trop-2, EpCam, Mov-18, MSC, c-met和N-钙粘蛋白的抗体的抗体混合物预先标记CTC。在微通道装置内通过荧光原位杂交直接分析捕获细胞中染色体3、7和17的非整倍性，与捕获CTC上的CK标记染色作比较。

[0157] 表6

[0158]

样品号	#CTCS (CK ⁺)	#非整倍细胞	非整倍性细节(染色体 3, 7 和 17)
16660	0	17	12-三体 3; 1- 单体 3; 2- 单体 7; 2- 单体 17
16664	0	13	1- 三体 3; 2- 单体 3; 4- 单体 7; 6- 单体 17
16708	0	27	14- 三体 3; 2- 单体 3; 8- 单体 17; 2- 单体 7; 1-四体 3
16714	0	78	7- 单体 3; 3- 单体 7; 68- 单体 17

[0159]

样品号	#CTCS (CK ⁺)	#非整倍细胞	非整倍性细节(染色体 3, 7 和 17)
16719	0	8	2- 单体 3; 1- 单体 7; 5- 单体 17
16729	0	29	2- 单体 3; 5- 单体 7; 10- 单体 17; 12- 三体 3
16746	0	20	1- 单体 17; 13- 三体 3; 1- 三体 7; 2- 三体 17; 1- 单体 3; 2- 单体 7
16762	0	18	2- 单体 3; 12- 单体 17; 3- 三体 3; 1-复杂非整倍体 (3, 7, 17 三体)
16761	0	46	1- 单体 3; 5-0 单体 7; 8- 单体 17; 26- 三体 3; 2- 三体 17; 4- 四体 3

[0160] 表6显示了从膀胱癌病人获得的样品中许多对CK染色阴性(第2栏)的捕获细胞是非整倍体细胞(染色体3、7、和17上的单体、三体和/或四体)。表6中的结果显示该方法能鉴定不同癌症类型所得血液中的CTC。

[0161] 这些试验的结果显示,在微通道装置上捕获的CTC中鉴定非整倍性和特异性标记的表达提供了预测和管理疾病的方法,例如肿瘤发生早期或肿瘤细胞已经转移并逃逸入循环的肿瘤发生晚期的癌症。另外,所述方法也可用于监测治疗效力或失败。

[0162] 应理解,本发明不限于所述的具体方法、方案和材料,因为这些可发生变化。还应理解,本文所用术语的目的仅是描述具体实施方式,不应用来限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求书的限制。

[0163] 本领域技术人员应了解或能够确定仅采用常规实验即可获得的本文所述的本发明具体实施方式的许多等同形式。这类等同形式应包含在所附权利要求书的范围内。

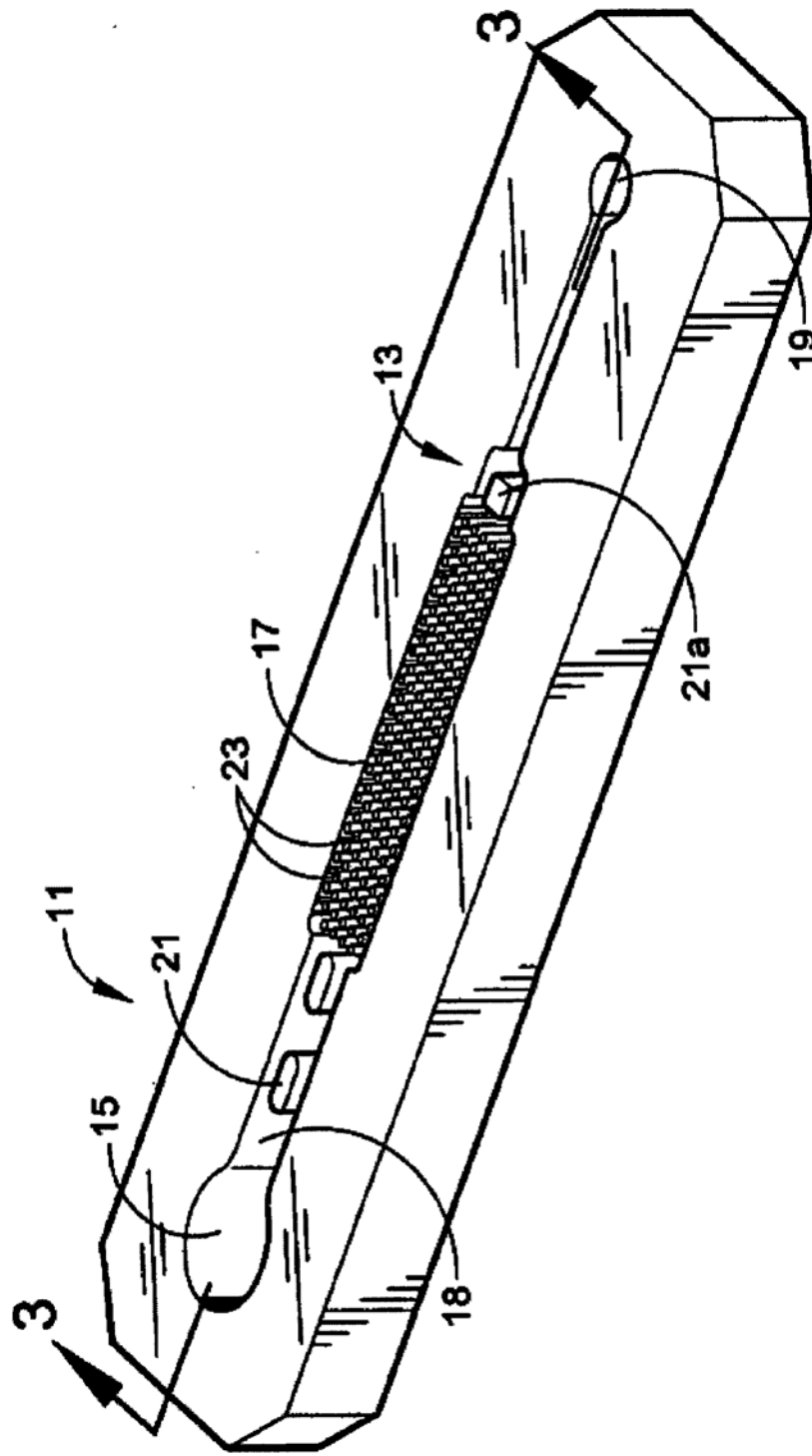


图1

细胞经过通道前用Ab预标记的通道

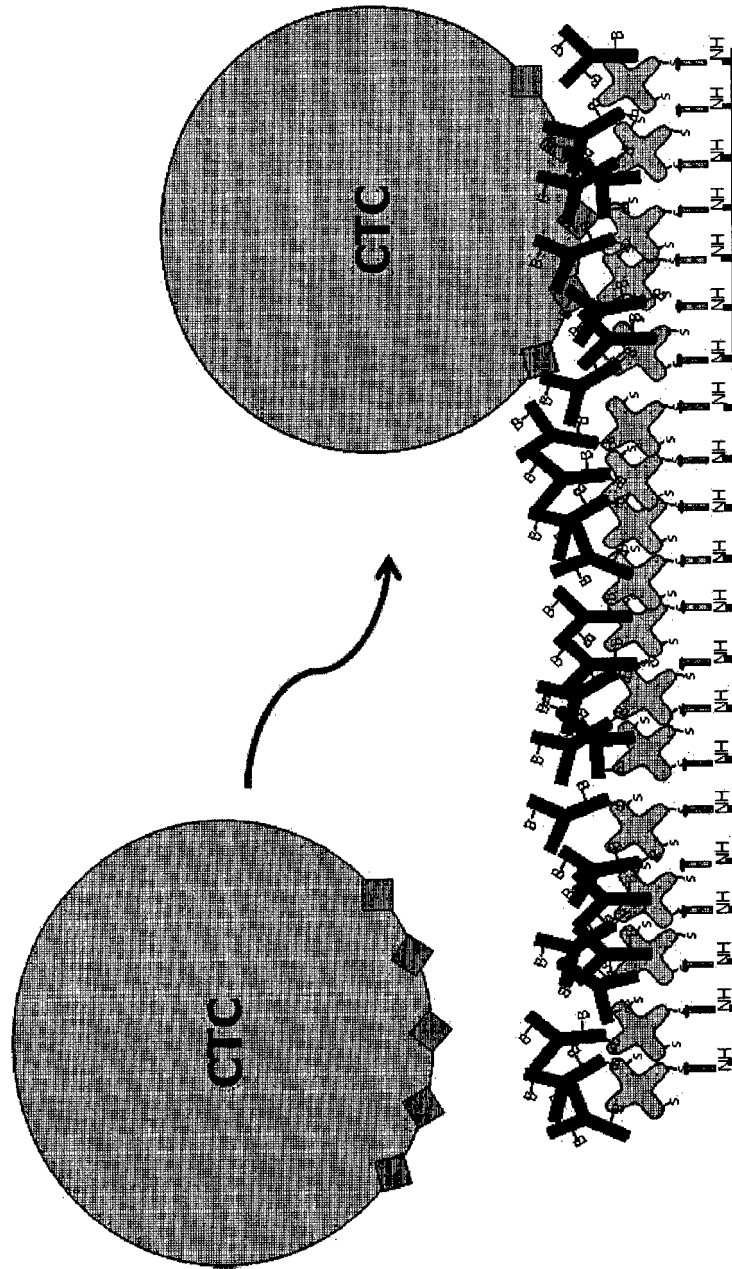


图2

在链霉亲和素通道上富集前用Ab预标记的细胞

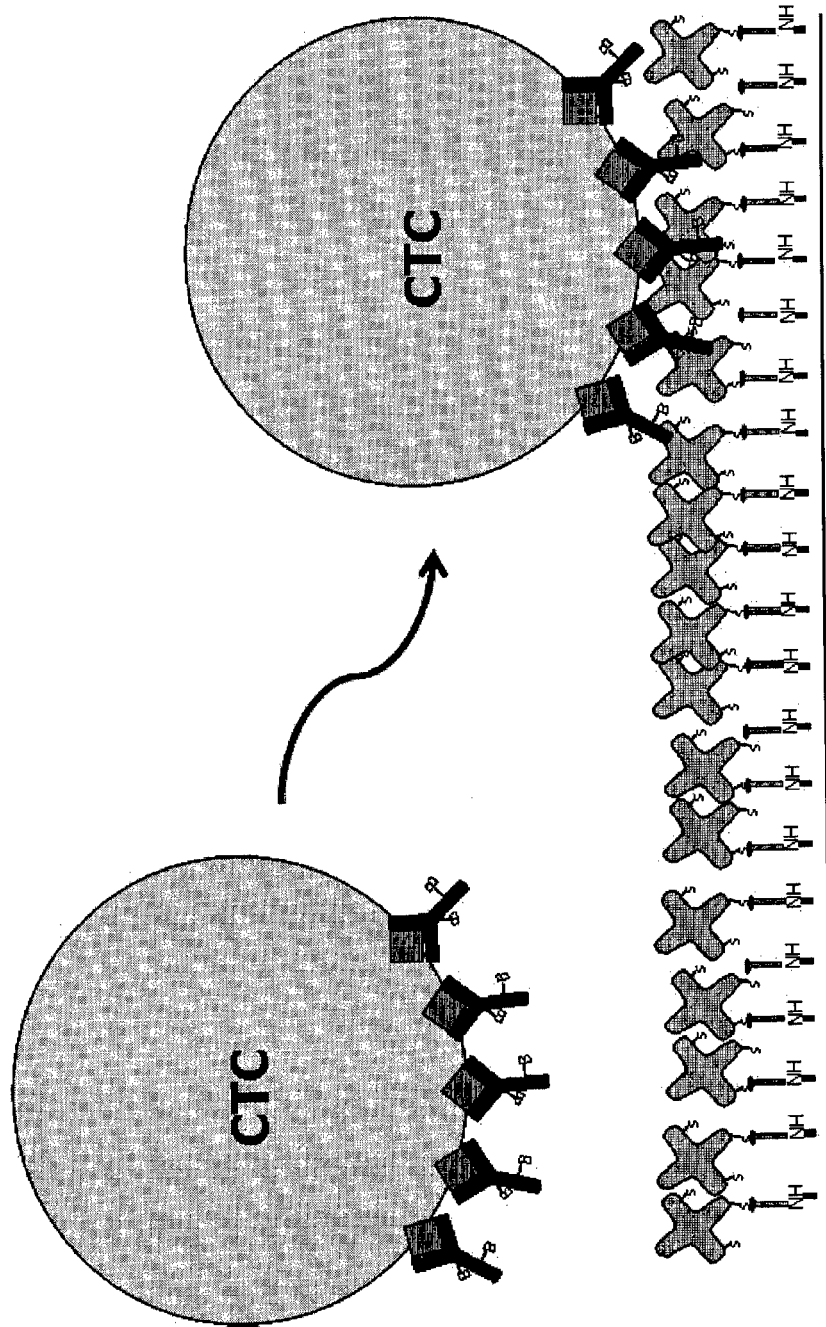


图3

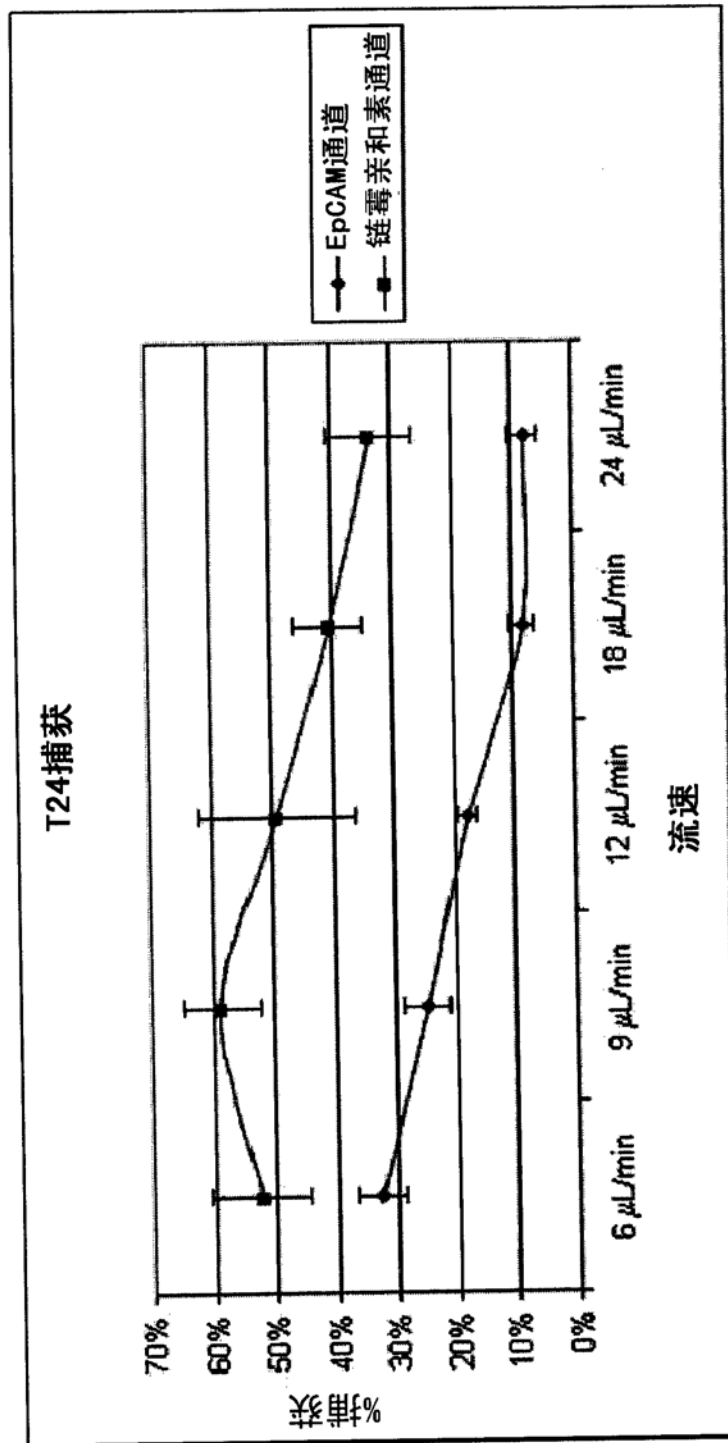


图4

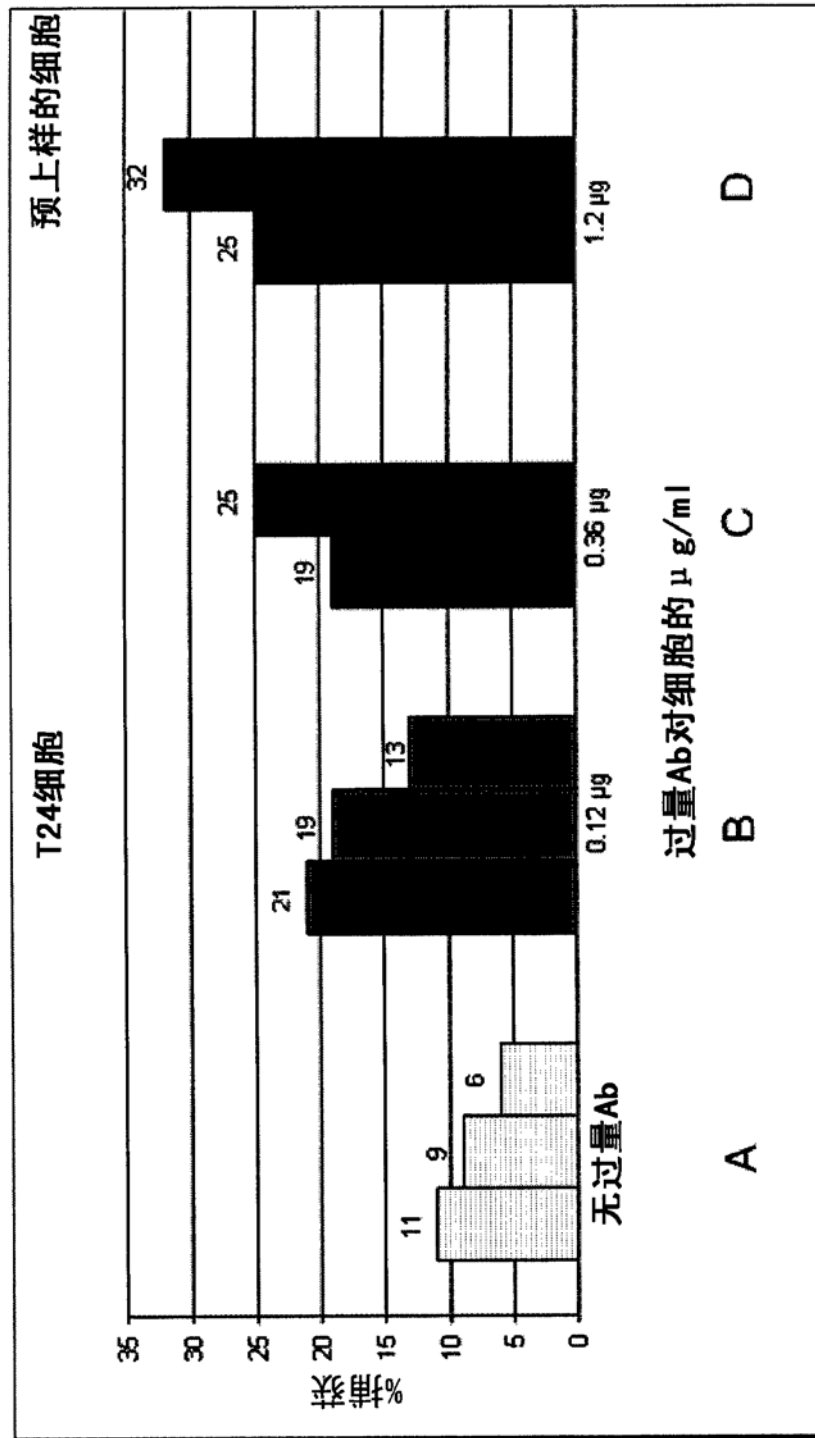


图5

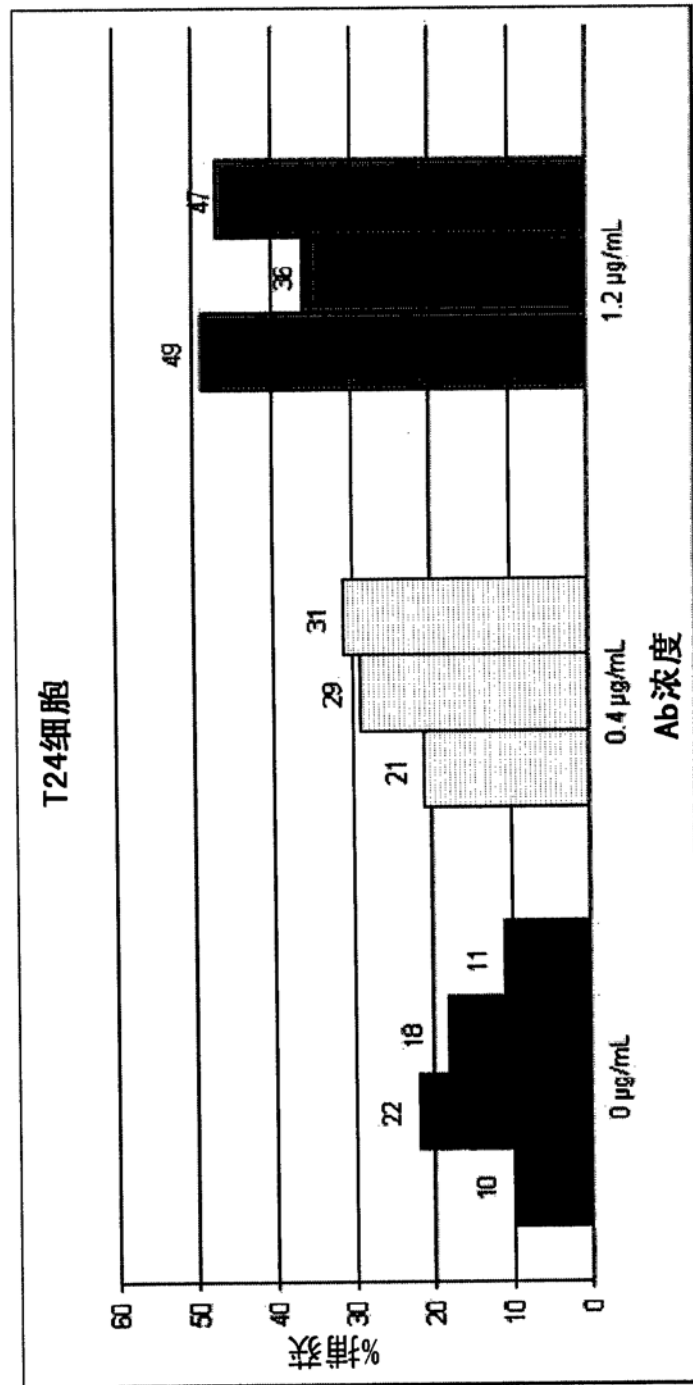


图6

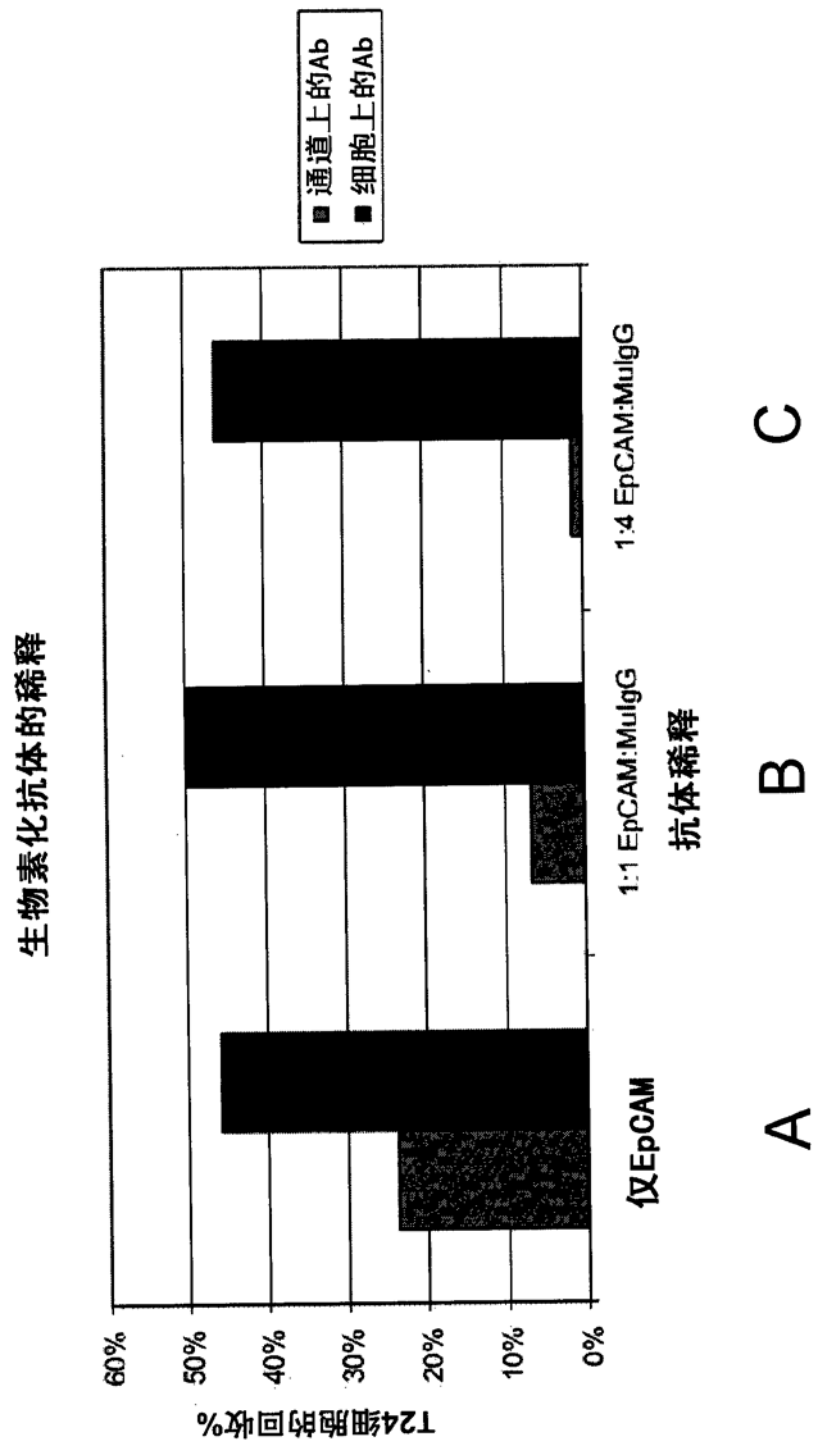


图7

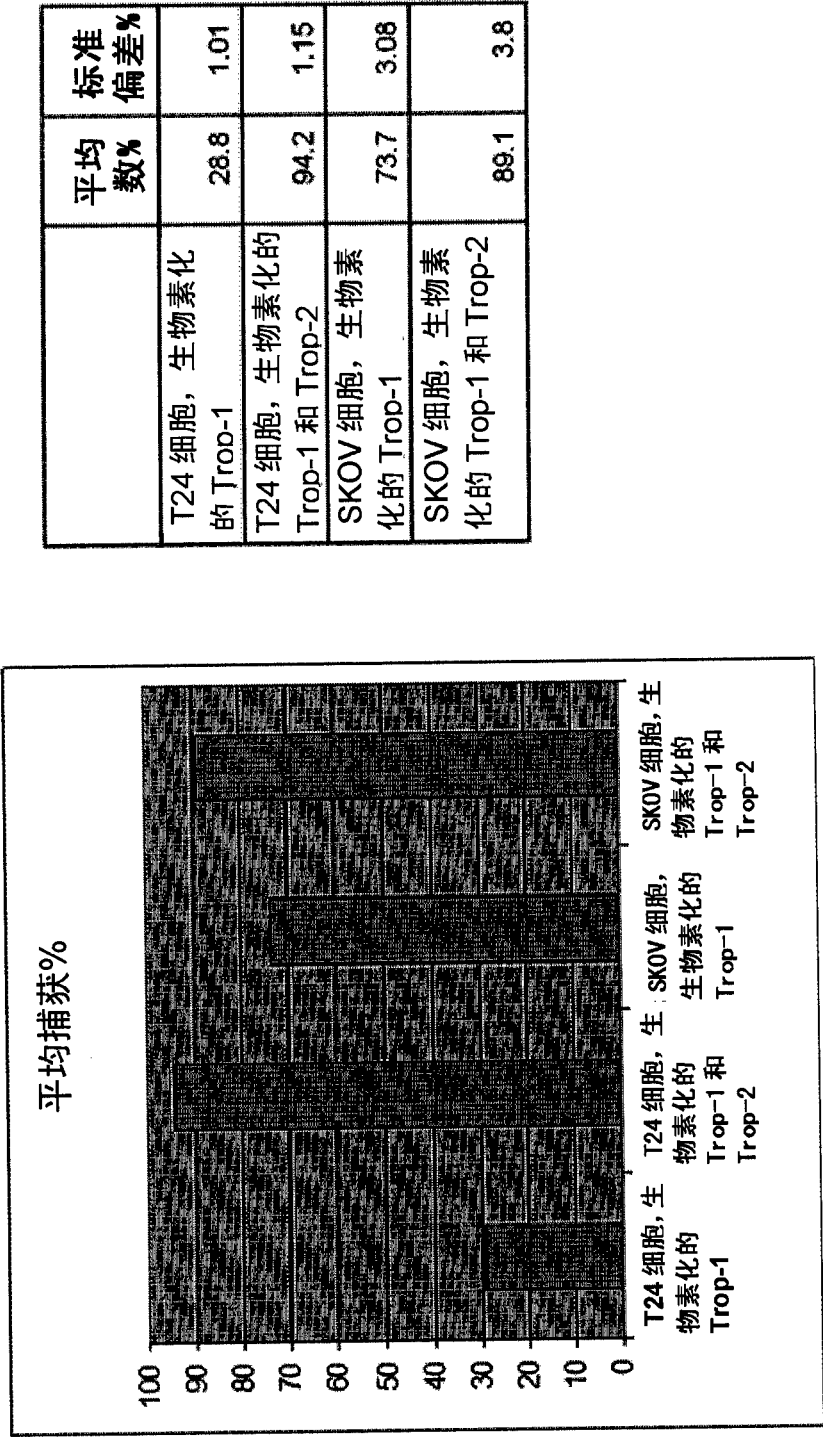


图8

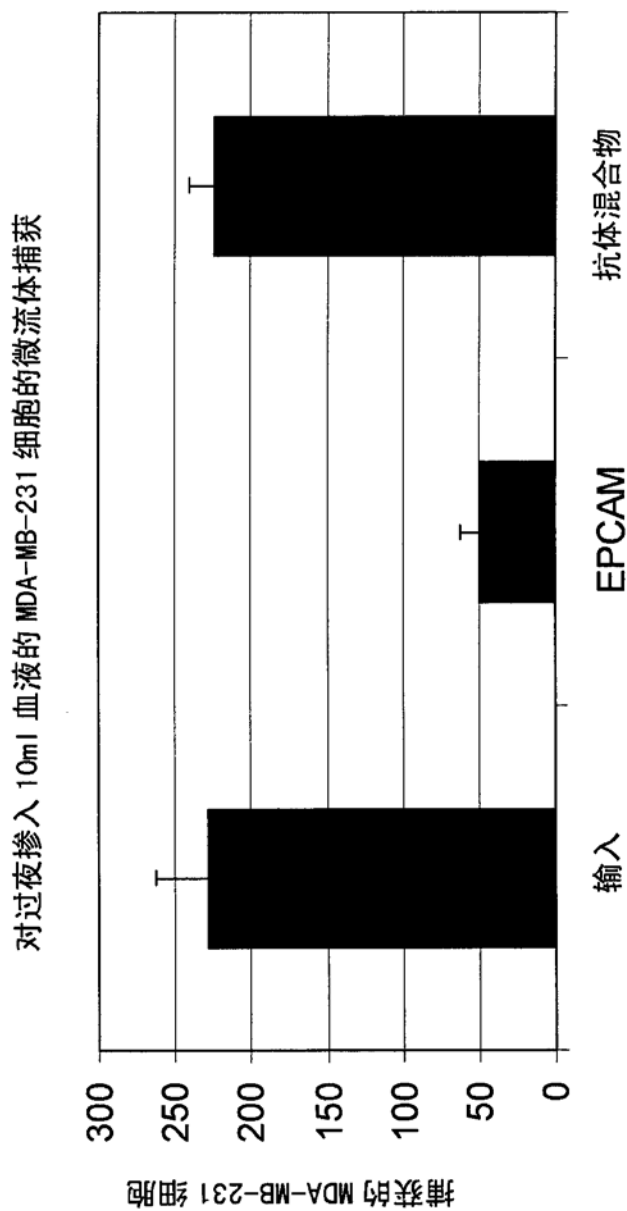


图9

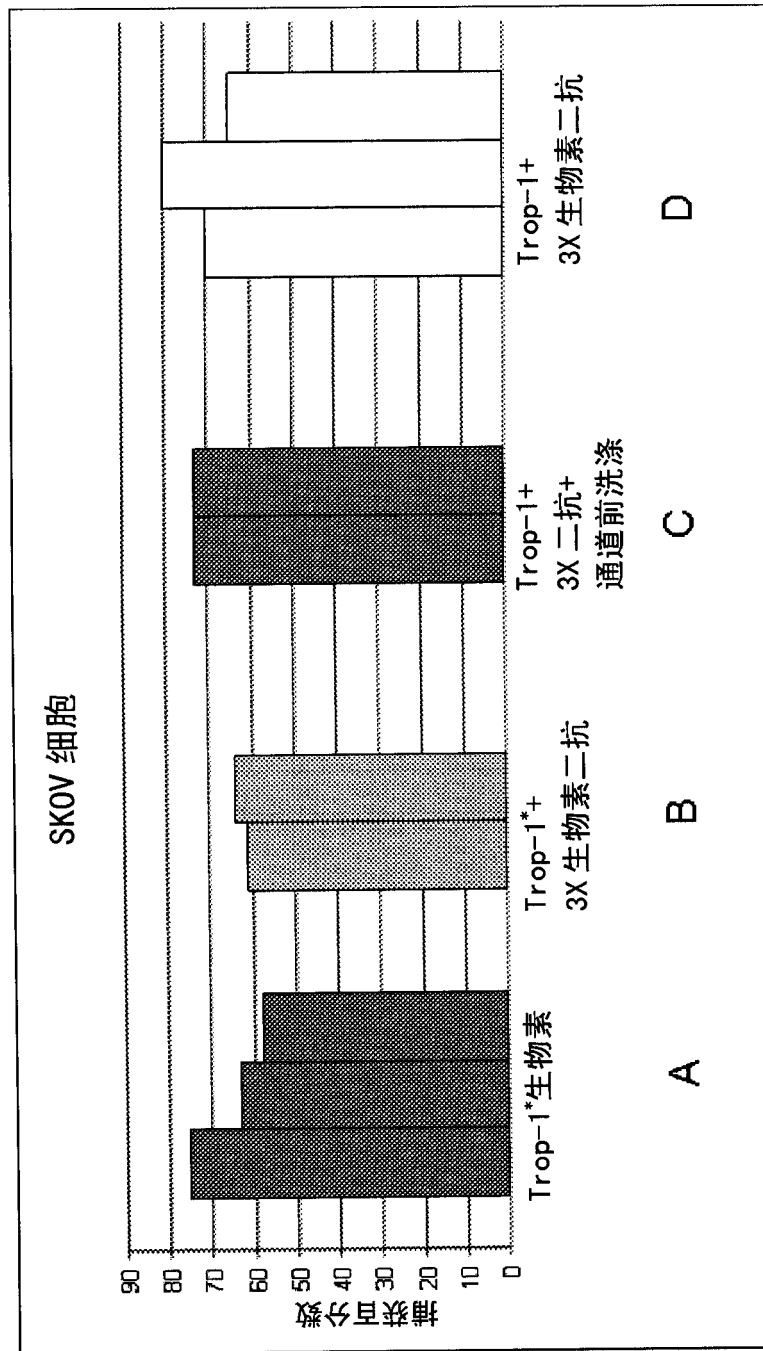


图10

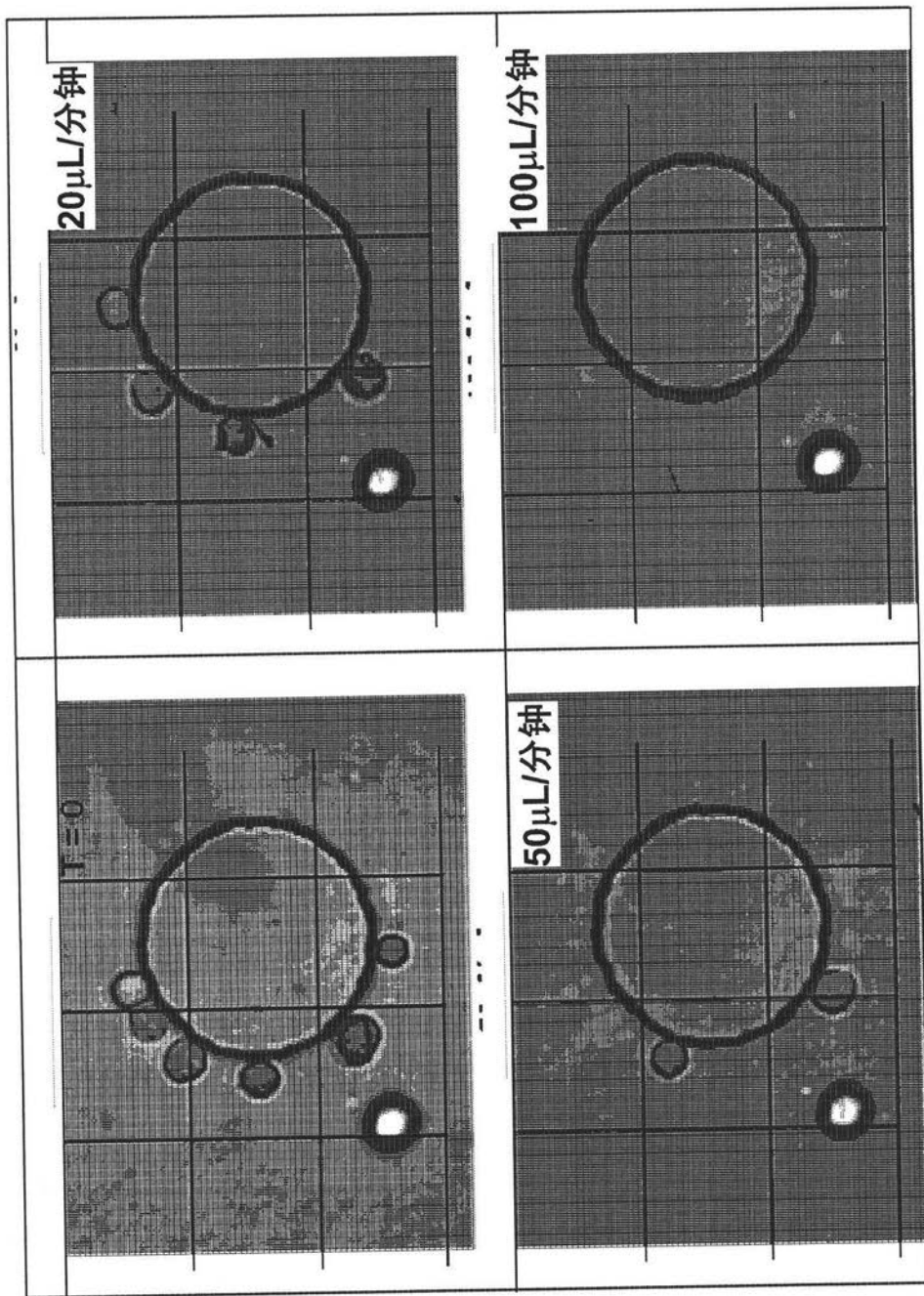


图11

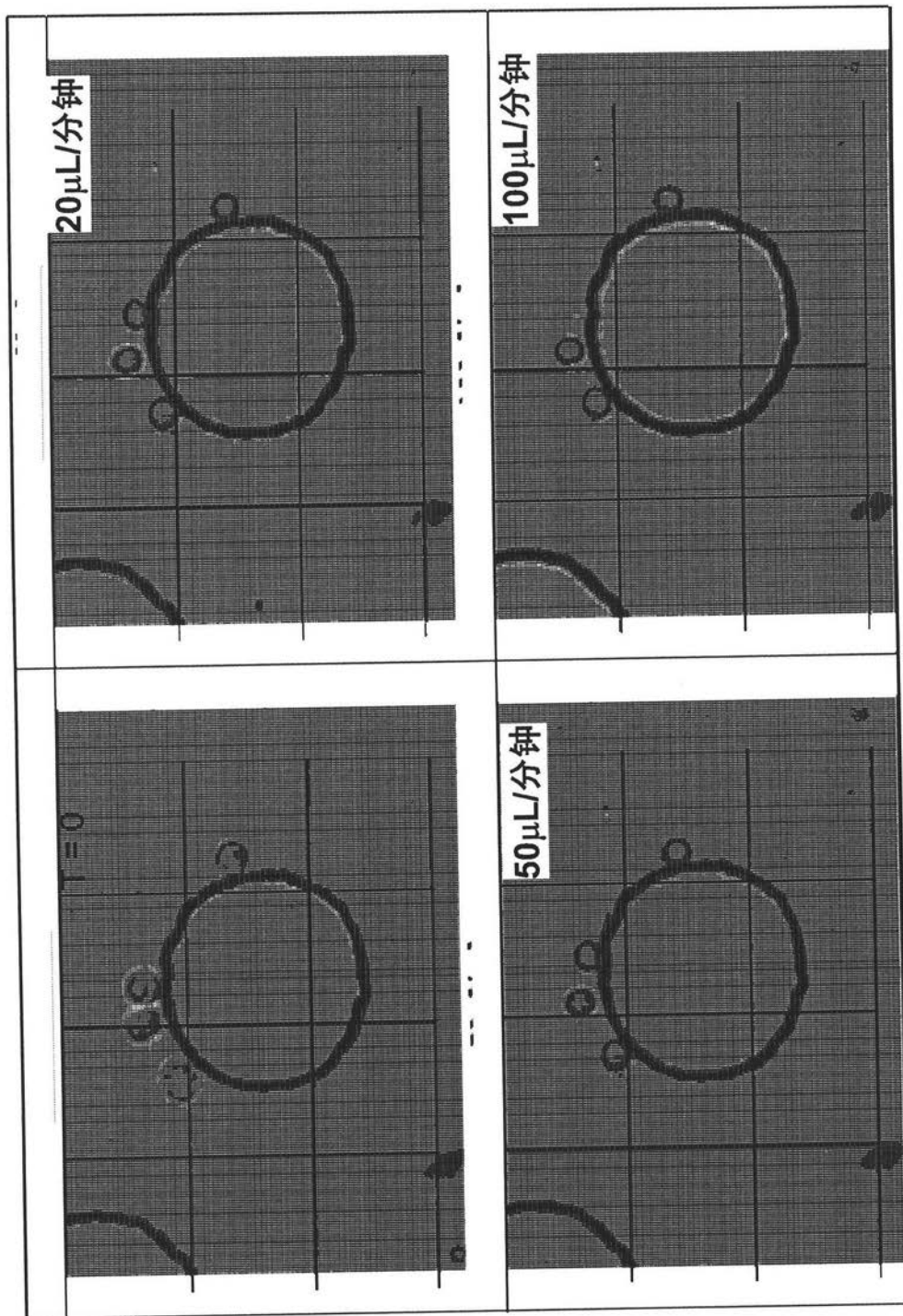


图12

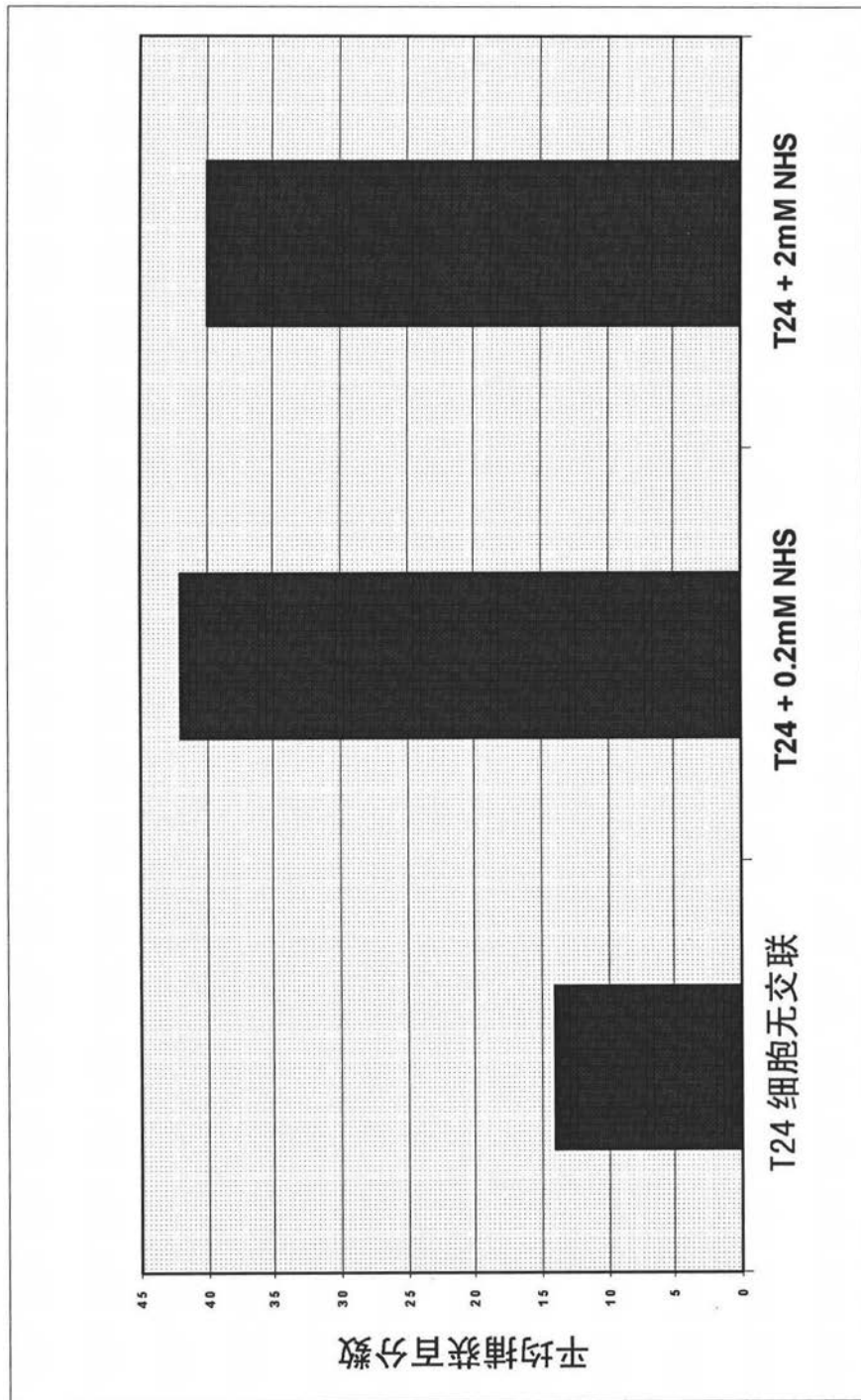


图13

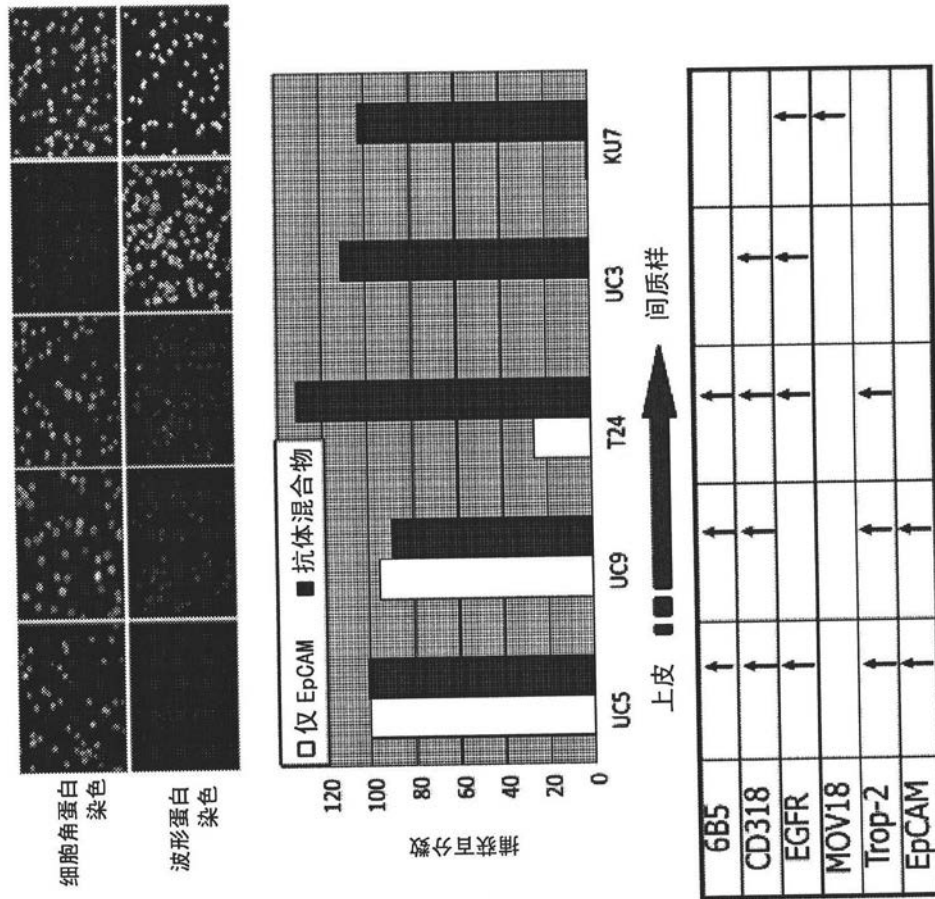


图14

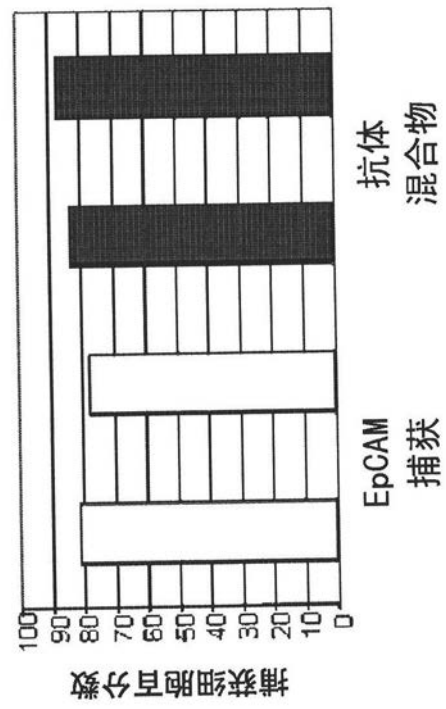


图15A

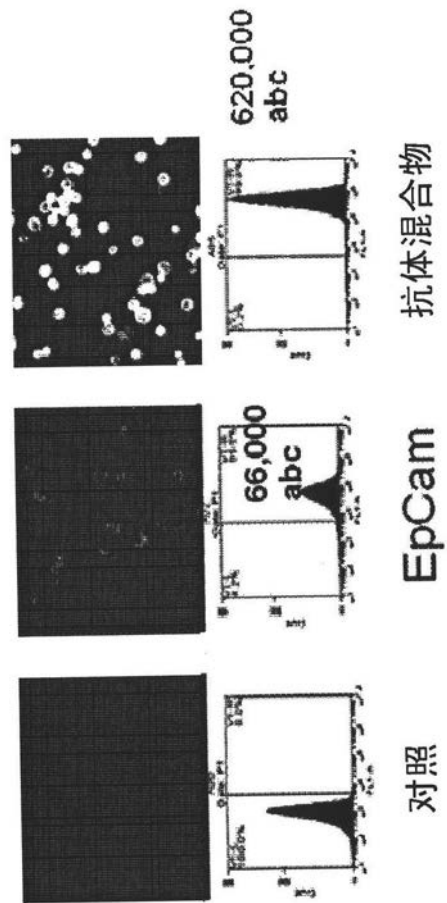


图15B

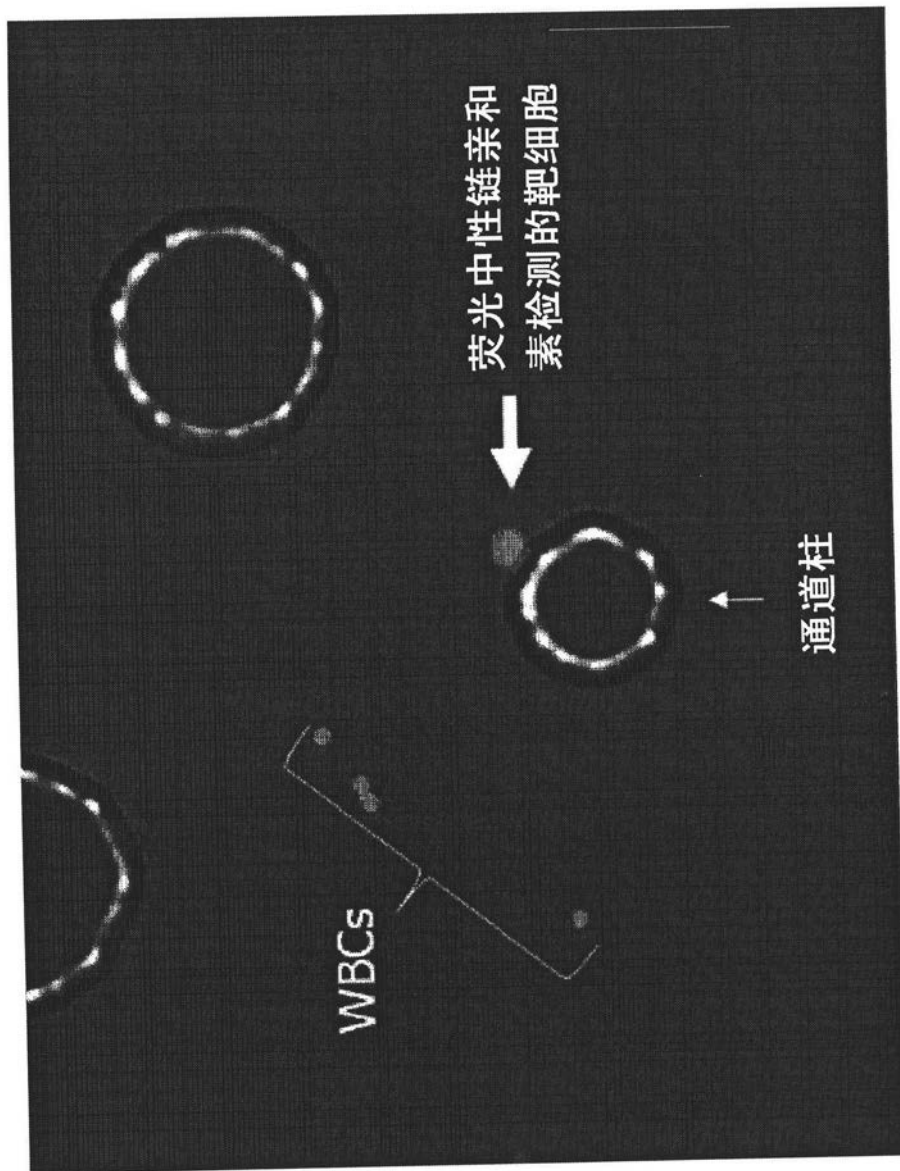


图16

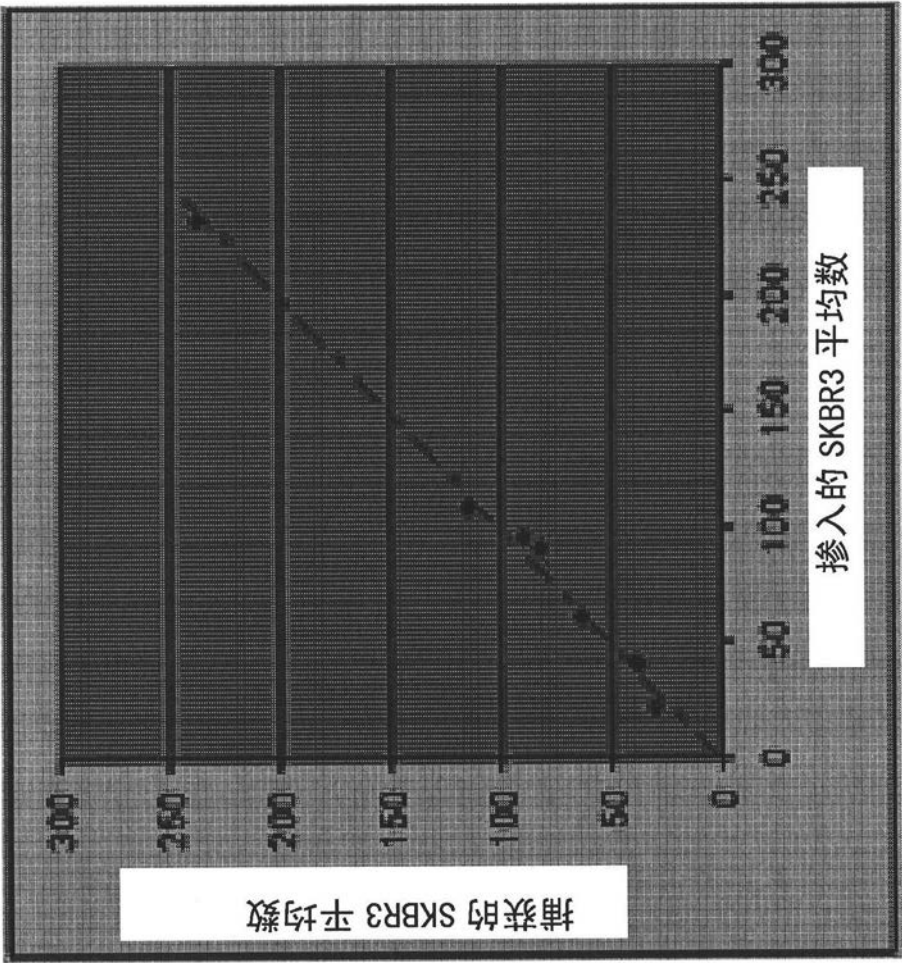


图17

专利名称(译)	细胞捕获和分析的装置和方法		
公开(公告)号	CN102414562B	公开(公告)日	2019-05-07
申请号	CN201080019566.9	申请日	2010-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	生物概念股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物概念股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物概念股份有限公司		
[标]发明人	P·钦伯格 F·比肖夫		
发明人	S·米科莱克兹克 T·皮切尔 P·钦伯格 F·比肖夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/56966 G01N33/536 G01N33/56972 G01N33/57492		
审查员(译)	赵晓明		
优先权	61/163009 2009-03-24 US 61/235615 2009-08-20 US 61/298871 2010-01-27 US		
其他公开文献	CN102414562A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种分离样品，特别是生物样品中的目标生物分子或细胞的装置。具体地，该装置含有上样混合物，其含有生物样品和特异性结合目标生物分子或靶细胞的第一结合实体；和第二结合实体包被的微通道，该第二结合实体直接或间接结合第一结合实体。还公开了捕获、检测、和/或评估生物样品中目标生物分子或靶细胞(例如癌细胞)的方法。

