[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/04 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780034219.1

[43] 公开日 2009 年 11 月 18 日

[11] 公开号 CN 101583722A

[22] 申请日 2007.7.14

[21] 申请号 200780034219.1

[30] 优先权

[32] 2006. 7.14 [33] US [31] 60/831,156

[86] 国际申请 PCT/US2007/016034 2007.7.14

[87] 国际公布 WO2008/008515 英 2008.1.17

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.16

[71] 申请人 阿维瓦生物科学股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 P·林 A·格蒂 W·施 唐孟佳 G·哈维 陶慧敏 陶国良 L·吴 D·瑟尼 J·徐

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 韦 东

权利要求书 4 页 说明书 63 页 附图 6 页

[54] 发明名称

从生物学样品检测稀有细胞的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供用于分离和检测含有其它类型细胞的样品中稀有细胞的方法和组合物。具体地说，本发明包括可利用微制造滤器的压实步骤或细胞裂解步骤或基于密度的方法来除去某些类型的细胞，和固定方法以除去其它类型的细胞。本发明还包括富集稀有细胞后通过检测端粒酶活性或端粒酶核酸或端粒酶表达的存在或量来测定生物学样品中癌细胞数量或比例的方法。本发明还提供专门除去生物学样品中红细胞以及白细胞的有效而快速方法，从而能富集稀有靶细胞。靶细胞的存在或水平提供各种生理情形，例如癌症的有关信息。

1. 一种富集样品中靶细胞的方法，该方法包括：

a) 通过将生物学样品中的 WBC 与连接于固体支持物的特异性结合元件结合来除去它们；

b) 采用基于密度的方法除去该样品中的 RBC，从而产生富集了靶细胞类型的样品；和

c) 对富集了靶细胞类型的样品实施分析、操作或应用步骤以测定靶细胞的数量或是否存在。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述生物学样品是体液。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述生物学样品是外科手术期间收集的血液或骨髓或组织。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述固体支持物包括平均大小在 10 nm 和 10 um 之间的微粒。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述固体支持物连接于结合 WBC 上存在的配体的特异性结合元件。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述特异性结合元件是识别白细胞上表达的抗原的抗体。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述抗体是 CD45 和/或 CD50。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述基于密度的方法包括离心。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述基于密度的方法利用含糖或糖衍生物的密度介质，从而在离心期间产生密度梯度。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述密度介质的分离效果与用缓冲液稀释至约 80%和约 100%之间的菲可相同。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述固体支持物包括密度高于所述密度介质的密度的微粒。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，基本上同时除去 WBC 和 RBC。

13. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述分析、操作或应用步骤包括以下一种或多种：流式细胞术、PCR、免疫荧光、免疫细胞化学、图像分析、酶试验、基因表达概况分析、治疗剂效力测试、培养富集的稀有细胞和富集的稀有细胞的治疗性应用。

14. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述靶细胞是循环肿瘤细胞。

15. 一种从含有其它类型细胞的生物学样品中分离靶细胞的方法，所述方法包括：

a) 通过选择性除去至少一种非靶细胞类型而不除去靶细胞来富集样品；

b) 通过减小样品体积而不除去靶细胞来压实样品；和

c) 对包含靶细胞的富集样品实施鉴定、表征或利用该靶细胞群的下游方法。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述靶细胞是癌性细胞。

17. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述生物学样品是血液样品。

18. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，至少一种非靶细胞类型是通过选择性裂解除去的。

19. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，至少一种非靶细胞类型是通过将非靶细胞选择性连接于固体支持物除去的。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述非靶细胞通过连接于固体支持物的抗体而连接于所述固体支持物，所述抗体特异性结合该非靶细胞。

21. 如权利要求 15-19 中任一项所述的方法，其特征在于，该方法区分癌性细胞与正常的上皮细胞。

22. 如权利要求 15-20 中任一项所述的方法，其特征在于，该方法包括利用微过滤装置的压实步骤。

23. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述微过滤装置包含具有多个大小和形状基本相似的孔隙或具有通过径迹蚀刻径迹蚀刻法在刚性材料中形成的多个孔隙的滤器。

24. 如权利要求 21 或 22 所述的方法，其特征在于，所述微过滤装置包含

利用介电电泳力将细胞推离滤器表面的电极。

25. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述电极是位于滤器上或其附近的图案化电极，其中滤器具有孔隙，而孔隙的大小能阻止靶细胞穿过。

26. 如权利要求 15-25 中任一项所述的方法，其特征在于，利用样品中靶细胞的存在、数量、比例或特性来评估获得生物学样品的对象。

27. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，评估对象包括测定癌症的存在、组织位置或转移潜能。

28. 如权利要求 15-25 中任一项所述的方法，其特征在于，在合适的培养基中培养所述分离的靶细胞以产生癌性细胞培养物。

29. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，采用癌性细胞培养物来评估候选药物或癌症治疗方案。

30. 如权利要求 15-25 中任一项所述的方法，其特征在于，联用两种或更多种免疫染色方法鉴定靶细胞。

31. 如权利要求 15-25 中任一项所述的方法，其特征在于，通过检测端粒酶活性鉴定靶细胞。

32. 如权利要求 15-25 中任一项所述的方法，其特征在于，通过检测 CD44 剪接变体鉴定靶细胞。

33. 如权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所述靶细胞是与治疗性抗体结合的细胞。

34. 如权利要求 15-25 中任一项所述的方法，其特征在于，该方法还包括测定靶细胞是否具有与其结合的治疗性抗体的步骤。

35. 如权利要求 15-25 中任一项所述的方法，其特征在于，该方法用于评估癌症治疗方法或测定癌症药物评估过程的临床终末点。

36. 如权利要求 15-25 中任一项所述的方法，其特征在于，该方法还包括鉴定样品中至少一种类型的非靶细胞并测定靶细胞与至少一种类型的非靶细胞的比例。

37. 一种检测血液样品中非造血癌细胞的方法，包括以下步骤：

a) 除去样品中的大多数造血细胞而不除去可能存在的癌细胞从而提供富集的样品，或分离样品中的癌细胞；和

b) 评估该富集样品或该分离细胞中端粒酶的存在或活性水平，或检测该富集样品或该分离细胞中编码端粒酶的核酸的存在或表达水平；

其中利用端粒酶活性或端粒酶核酸或端粒酶表达的存在或量来测定血液样品含有至少一种癌细胞的概率。

从生物学样品检测稀有细胞的方法和组合物

发明背景

本发明总体上涉及生物分离和细胞检测领域，特别是生物学样品加工以检测稀有细胞(rare cell)的领域，和出于以下目的的下游应用：筛选高危人群、诊断疾病、预测疾病或治疗结果、监测疾病状态或对疗法的反应、优化治疗方案或开发新疗法。

恶性肿瘤的相关死亡率大多数是因为在远离原发性肿瘤的组织和器官中形成转移。早期检测转移是癌症患者存活可能性的极其重要的决定因素(Feldstein M，Zelen M，Inferring the natural time history of breast cancer: implications for tumor growth rate and early detection(推测乳腺癌的自然时间史：肿瘤生长和早期检测的暗示). Breast Cancer Res Treat. 1984；4(1):3-10；Senie RT，Lesser M，Kinne DW，Rosen PP，Method of tumor detection influences disease-free survival of women with breast carcinoma(肿瘤检测的方法影响乳腺癌妇女的无疾病存活)，Cancer. 1994 年 3 月 15 日；73(6):1666-72；Carlson JA，Slominski A，Linette GP，Mysliborski J，Hill J，Mihm MC Jr，Ross JS，Malignant melanoma 2003: predisposition, diagnosis, prognosis, and staging(恶性黑色素瘤 2003：诱因、诊断、预后和分级)，Am J Clin Pathol. 2003 年 12 月；120 增刊：S101-27)。

肿瘤的早期检测和肿瘤生长监测被认为是成功治疗癌症患者的非常关键的因素。目前的诊断技术很大程度上依赖于成像和组织病理学。各种成像和扫描方法能根据不同的代谢活性或组织密度检测肿瘤块。其它成像技术，例如结肠镜检查和支气管镜检查(branchoscopy)通过腔室表面的直接成像而有助于鉴定肿瘤组织。这些方法的分辨率较低，为几毫米，此时肿瘤块早已含有大量肿瘤细胞($> 2 \times 10^8$)。在此阶段，肿瘤块的癌细胞可能脱落入血流，从而有可能引起转移。组织病理学方法能利用借助生物活检获得的组织样品来诊断肿瘤。虽然该方法能直接目测肿瘤细胞，但其在诊断或监测肿瘤中的应用有限。肿瘤

的位置常使得获得生物活检样品不切实际。在其它情形中，通过暂时的一系列生物活检作周期性监测不能进行得太频繁，从而不能提供关于治疗效力和疾病进展的有用信息。目前组织病理学方法的另一重要限制是它们只能提供关于获得该生物活检的具体部位的数据，有可能忽略了在其它位置的转移。传统的组织病理学还可能是一危险的过程，在该过程中肿瘤组织或细胞可能污染远端位置，从而可能在生物活检流程中导致转移。

局限性肿瘤变成具有转移的恶性癌症的典型进展包括多个步骤。在较早的阶段，肿瘤块生长，细胞通过简单的扩散利用宿主组织中可用的营养。随后，一旦肿瘤块直径超过约 1 mm，肿瘤变得血管化，这是肿瘤细胞获得足够营养供给并维持其生长能力所需的步骤。血管化步骤部分由肿瘤细胞释放的血管生成因子驱动。随着肿瘤生长的进展，细胞丧失越来越多的起源组织特性，包括与毗邻细胞紧密相互作用的能力(参见，例如 Blanco MJ，Moreno-Bueno G，Sarrio D，Locascio A，Cano A，Palacios J，Nieto MA，Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas(乳腺癌中蜗牛表达与组织学级别和淋巴结状态相关)，Oncogene. 2002 年 5 月 9 日；21(20):3241-6)。最终，少量肿瘤细胞渗入与肿瘤直接接触的血管。一旦进入循环，循环的肿瘤细胞可被携带至身体的远端部位。大多数这些细胞不适应血流中的环境，会死亡但仍留在循环系统中。然而，有时候一部分细胞碰巧或因为它们的特性更灵活而能在循环中存活较长时间。当循环肿瘤细胞进入远端区域的毛细血管时，其可能被截留在该位置。然后这些细胞会发生一系列事件从而粘附并穿过毛细血管的内皮壁而移位。如果肿瘤细胞在血流中的苛刻环境中活下来直至其穿过毛细血管壁，其能侵入周围组织并在新位置产生转移。

通常癌症生长的侵袭性越强，其形成转移越多，其越难治愈。可通过外科手术或化疗或联用二者治疗局限性肿瘤。然而，一旦癌细胞在身体的不同位置产生多个集落，则外科手术干预身体中的许多部位或多个器官不切实际且治疗价值有限。可用化疗治疗特征在于单或多转移的癌症。然而，即使在该情形中，治疗的成功亦有限，因为不同的癌症集落(原发性肿瘤和转移)对任何给定化疗的反应不同(El Hilali N，Rubio N，Blanco J. Different effect of paclitaxel on primary tumor mass, tumor cell contents, and metastases for four experimental

human prostate tumors expressing luciferase(紫杉醇对表达萤光素酶的四种实验性人前列腺肿瘤的原发性肿瘤块、肿瘤细胞含量和转移的不同作用)，Clin Cancer Res. 2005 年 2 月 1；11(3):1253-8)不同癌症集落对治疗的反应不同主要有两个原因：不同部位的癌细胞的遗传异质性和有差别地影响癌细胞存活的各种位置的局部环境因素。

所有这些考虑均强调了在早期阶段检测转移的重要性。然而，早期诊断的主要难点在于难以检测小的转移。转移可从原发性肿瘤脱落的单个细胞产生。目前的成像方法(X-射线、PET-扫描、CT-扫描)不能早期诊断转移，因为它们的灵敏度不足以检测单个转移细胞，而只能检测生长至几毫米直径并含有超过 1 亿细胞的转移。早期或在转移产生过程中检测循环中的癌细胞的能力有很大的临床关联性。虽然肿瘤块每日能脱落大量细胞，但临床相关体积(5-40 mL)的任何给定血液样品中循环癌细胞的数量非常低。这些细胞在血液中存在的频率常是每 10^7-10^8 个白细胞有 1 个癌细胞。这样就非常难以在转移过程的早期分离和检测循环癌细胞。

肿瘤可以在不同组织，例如上皮和间充质组织中产生。大多数人实体瘤源自上皮细胞，所述上皮细胞的遗传材料和表型经历转化并能逃避使得细胞生长和细胞分裂受控的控制点。通常认为单一突变不足以产生癌细胞，而一系列突变是引发肿瘤所需。肿瘤细胞在遗传学上不稳定，其在疾病的整个发展过程中继续突变并产生变体。高度遗传不稳定性是在肿瘤细胞之间观察到异质性的源点。肿瘤中改变的细胞群进而成为进化竞争和选择的平台，其中分裂时间更快、代谢速度最高和分化级别最低的细胞易于快速生长和分裂，最终接管整个细胞群。由于不停产生新的突变和新的肿瘤细胞变体，肿瘤细胞群中维持高度多样性。

原发性肿瘤细胞中的遗传不稳定性和异质性没有临床后果，因为外科手术干预可除去整个肿瘤块及其所有细胞变体。然而，一旦该疾病达到转移癌症的阶段，原发性肿瘤和转移中癌细胞的遗传多样性对诊断以及治疗转移是极大挑战。

上皮细胞彼此紧密结合并形成片层(称为上皮)，这些片层覆盖身体的所有腔室和表面。上皮细胞的区别性特征之一是通过表达在上皮细胞上的专门化蛋

白质复合体介导形成紧密的细胞间连接。这些细胞-细胞相互作用使得上皮的胞外空间极小，并使得上皮成为水、溶质和细胞从身体的一个隔室通过并扩散到另一隔室的选择性障碍。

在上皮细胞转化成转移性癌细胞的过程中，该细胞的生物学特性发生许多巨大改变。生长和细胞分裂速度增加，细胞细胞对正常组织中存在的生长控制信号的依赖性逐渐变得较低。最重要的是，为变成转移性，细胞需要丧失上皮细胞的关键性区别特征：其紧密结合毗邻细胞的能力。在该情形的熟知例子，即乳腺癌中，发展至转移阶段的癌细胞中上皮细胞粘着分子E-钙粘蛋白丧失。实际上已知蛋白质E-钙粘蛋白是“肿瘤抑制剂”，即其较高表达倾向于抑制癌症进展的因子。上皮细胞转化成肿瘤细胞相关的改变非常大，从而再不能将癌细胞鉴定为上皮细胞。该转化常称为上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition)，从而表明上皮细胞转化成间充质细胞，前者的特征在于与毗邻细胞强烈相互作用，而后者与其它细胞的相互作用松散或没有相互作用并可在组织中自由迁移。

近年来，人们还明白转移可能源自称为癌症干细胞的肿瘤细胞亚群。这些细胞在肿瘤块中的存在频率＜2%，比肿瘤中大多数细胞分化低。除了产生分化的后代细胞，癌症干细胞具有复制自身的特性，从而使得它们变成“无限增殖的”，或者具有无限的自我再生潜能。这些细胞的增殖速度高，易在远离原发性肿瘤的部位产生新转移。观察到采用原发性肿瘤块成像临床检测消退或对治疗的反应常不能预测患者存活或复发的时间明白显示了癌症干细胞在诊断和治疗转移性癌症中的重要性。认识到能(例如)减小肿瘤块的治疗可能对癌症干细胞无效可以解释该明显的悖论，这些癌症干细胞是不受控和无限增殖的主要原因并仍能形成远端转移。

目前，累积的报道表明即使在检测到原发性肿瘤之前亦可在患者中发现循环肿瘤细胞(CTC)。除了在早期诊断和预后中潜在的作用，CTC在表征肿瘤进展的遗传学和免疫表型改变中起主要作用，从而有助于指导个性化治疗。虽然已将各种技术应用于分离和表征CTC，许多这些技术的原理相似，即抗体正选择。明显，将该方案应用于CTC检测受限于针对不同肿瘤细胞上的生物标记的可用抗体、其灵敏度和特异性。或者，方案包括红细胞(RBC)和白细胞(RBC)

的负消除。根据大小消除较小的RBC和WBC的过滤方法有丢失靶细胞的危险，因为某些靶细胞，例如CTC可以像WBC一样小。涉及裂解RBC的其它方法有破坏靶细胞的危险。

要求诊断方法灵敏度高并能检测已有较小肿瘤块的患者体内癌细胞或癌症干细胞，或癌细胞中侵袭性更强形式的某些群体，例如癌症干细胞。此外，还需要能分离及鉴定体内癌细胞或癌细胞中侵袭性更强形式的某些群体，例如癌症干细胞的技术，而无论该癌症的阶段和癌细胞累积的转化水平。这种技术能在早期阶段鉴定转移性癌症疾病，或提供监测疾病进展、对治疗的反应或疾病复发的状态的方法。本发明提供这些和其它益处。

发明概述

本发明发现，许多疾病的筛选、诊断、预后和治疗取决于从复杂的流体样品中富集稀有细胞。一般通过一个或多个分离步骤完成富集。具体地说，本发明发现从患者样品富集或分离包括恶性细胞在内的稀有细胞，例如从患者体液样品分离癌性细胞有助于检测这些恶性细胞并对它们分型，从而有助于诊断决定以及开发患者的治疗方案。

本发明采用负的或消除的方法分离样品中的稀有细胞。这些方法通过一系列步骤高特异性地除去样品中的其它组分，从而逐渐富集样品中感兴趣的稀有细胞。然后更方便地鉴定富集样品中的靶细胞，例如血液样品中的循环肿瘤细胞、间充质细胞、上皮细胞、干细胞、突变细胞等，并可以分离、鉴定、进一步表征或者甚至培养或以其它方式使用这些靶细胞。因为该方法依靠消除非靶细胞，其克服了用于分离稀有细胞的许多“正选择”方法的缺点。那些方法会错过稀有细胞，如果这些细胞具有(例如)突变并不再表达用于捕捉或标记靶细胞的预计表面抗原。因为突变是这些方法所需检测的细胞，例如癌细胞中常见的，对于从复杂的生物学样品中分离稀有细胞，本发明的消除方法相比于“正选择”方法有实质性优势。

本发明的第一方面是从生物学样品，例如外周血样品富集靶细胞的方法，虽然也可类似地富集其它生物学样品。靶细胞可以是上皮细胞、间充质细胞、癌细胞、感染的细胞、受损的细胞、干细胞或生物学样品中不常见的其它细胞。

靶细胞常是其存在、数量、比例或特性可用于对采集该生物学样品的对象作诊断或预后评估的一类细胞。

本发明一方面提供从含有其它类型细胞的生物学样品中分离靶细胞的方法，所述方法包括：

a) 通过选择性除去至少一种非靶细胞类型而不除去靶细胞来富集样品；

b) 通过减小样品体积而不除去靶细胞来压实(debulk)样品；和

c) 对包含靶细胞的富集样品实施鉴定、表征或利用靶细胞或关于其存在、比例、特性的信息的下游方法。在一些实施方式中，该方法不采用离心。

在本发明的一方面，靶细胞的存在、数量、比例或特征(如果存在)可用于提供关于采集样品的对象的诊断或预后信息。例如，可按照健康和患病个体的样品的那些参数校正对象中这些靶细胞的存在、数量、比例或特性来做到这点。例如，可采用这些方法测定癌症的存在或状态，或测定对象的消退状态、治疗过程的效力、癌症的转移潜能，等等。其还可用于评估实验性疗剂或候选药物。在一些实施方式中，该方法包括其它步骤，例如鉴定靶细胞的组织来源以协助测定肿瘤的位置或转移部位，或其它步骤，例如在合适的培养基中培养靶细胞中的细胞。还可采用培养这些靶细胞来评估实验性疗剂或候选药物。

在某些实施方式中，清洗血液样品后，将血液样品离心以区分重力密度低于细胞的血浆蛋白质和血液成分，离心速度应能提高感兴趣的稀有细胞类型的回收率。在该方面的一个实施方式中，清洗并离心血液样品(获自癌症患者或可能有癌症危险的对象)，离心速度应能提高癌细胞回收率。

在该方法的一些实施方式中，血液样品清洗期间，利用弗氏细胞压碎器(French press)型装置浓缩血液样品中的细胞以提高它们的回收率。在该方面的一个实施方式中，将不同的压力施加于过滤装置上来清洗血液样品(获自癌症患者)，从而使得血液样品的流体组分进入不同于限制细胞的区室。该装置可以是通过使流体经过有孔的滤器而选择性分离样品中含有靶细胞的至少一些流体的微孔过滤装置，所述孔允许样品的一些组分通过而基本上阻止靶细胞通过。在一些实施方式中，通过滤器本身的表面改性或利用能将靶细胞选择性推离滤器的作用力，例如滤器上或附近的一个或多个电极产生的介电电泳力，从而使得该滤器适用于将靶细胞推离其表面。

在一些实施方式中，该方法包括以下步骤中的至少一些：提供癌症患者的血液样品；加入人工缓冲液清洗该样品然后离心；清洗离心后，获得清洗上清液和清洗沉淀物；重悬清洗沉淀物，其代表富集的样品；通过加入人工缓冲液裂解样品中的某些非靶细胞，例如红细胞，离心获得含靶细胞和一些非靶细胞的进一步富集沉淀物和含有裂解的非靶细胞残留物的上清液。可任选重复裂解步骤以获得最佳结果。根据样品特征，这些步骤和下文所述其它步骤可以任何顺序进行，并且如需要可重复或省去，从而能将靶细胞群富集至就其所需应用而言足够的程度。

在某些实施方式中，本发明利用特异性结合某类型非靶细胞(例如，WBC或其它造血细胞)上的表面分子或部分而与靶细胞结合较弱的特异性结合元件，例如抗体或分子作为富集过程的一部分。合适的特异性结合元件的非限制性例子包括结合CD3、CDllb、CD14、CD17、CD31、CD34、CD45、CD50、CD53、CD63、CD69、CD81、CD84、CD102、CD166、CD233、CD235和CD236的抗体或分子，或选自该清单的抗体的组合。可利用抗体除去血液样品中的白细胞，例如作为富集过程的一部分。任选将抗体结合于固体支持物，所述支持物可作专门改进以有助于其从样品中除去。在本发明的优选实施方式中，抗体可用于在从血液样品中富集癌细胞的过程中除去血液样品中的白细胞。

本发明一方面提供利用弗氏细胞压碎器型装置富集含稀有细胞的样品的方法。本发明还提供包括滤器的装置以协助该方法，所述滤器优选刚性材料，其具有一个或多个贯穿孔并且任选在其表面上或附近具有一个或多个电极以产生介电电泳力，从而能将样品中的细胞推离滤器表面进而改善滤器的操作。

本发明的另一方面是富集生物学样品中的靶细胞的方法，包括以下步骤：a) 用微粒除去所述血液样品中的白细胞(WBC)和 b)采用基于密度的方法，例如菲可(ficoll)梯度离心除去所述血液样品中的红细胞(RBC)以富集非造血细胞，和 c) 用富集的样品进行分析、操作或应用步骤。可以任何顺序或在同一时间进行步骤 a)和 b)。

在一些实施方式中，本发明包括利用磁性颗粒分离流体样品中的样品组分的方法，所述磁性颗粒可以是任何固相颗粒/微球，例如磁性颗粒、基于琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶和琼脂糖等的颗粒和经化学修饰以偶联于用于目标选择和结

合的抗体或任何其它蛋白质的颗粒。

在某些实施方式中，本发明包括除去血液样品中的 WBC 的方法，该方法涉及具有以下特征的微粒：维度在 10 nm 和 10 um 之间，连接于特异性结合能识别表达在白细胞上的抗原的抗体，例如 CD45 和/或 CD50 抗体和/或另一白细胞-特异性抗体的特异性结合元件，例如抗体或分子。在一些实施方式中，利用一种特异性结合元件。在其它实施方式中，利用两种或更多种不同的特异性结合元件。

在本发明的另一实施方式中，基于密度的方法包括离心和利用糖或糖衍生物，例如菲可作为产生密度梯度的材料。此外，本方法所用的密度介质具有与用缓冲液稀释至 50%-100%的菲可相同的分离效率。

在某些实施方式中，本发明设计用于非常快速地除去血浆蛋白、大多数 WBC 和 RBC 同时不良作用较低，从而易于检测剩余富集细胞中的靶细胞。此外，本发明还可应用于分离血浆蛋白质、富集其它稀有细胞，包括干细胞、胎儿细胞、免疫细胞等，然后进行下游分析、操作，以及诸如流式细胞术、PCR、免疫荧光、免疫细胞化学、图像分析、酶试验、基因表达概况分析、治疗剂效力测试、培养富集的稀有细胞和富集的稀有细胞的治疗性应用等领域。

在本发明的一些实施方式中，用荧光试剂、吸光度试剂，例如苏木精(Hemotoxylin)染色富集的细胞。可同时采用免疫荧光和免疫组化方法以增加可用于表征富集的样品的染色剂和生物标记数量。

在一个实施方式中，先将预标记的或未标记的已知细胞类型与含未用于鉴定或表征靶细胞的特异性标记的待分析样品混合，再实施本发明所述的任何富集方案。该预混合的细胞可用作证明试验性能的“内部对照”。

在一些实施方式中，本发明可利用针对多种类型的靶细胞，即循环肿瘤细胞和循环内皮细胞壁上的多种生物标记的多种特异性结合元件。这些方法能同时检测具有不同病理生理学意义或指征的两种或更多种靶细胞。

在某些实施方式中，通过荧光显微术分析本发明富集的靶细胞。为促进精确地读取荧光标记的样品，采用合适的方法，例如激光、湿蚀刻(wet etch)、干蚀刻(dry etch)、离子束等制备载玻片或盖玻片以产生网格线，从而有助于载玻片读数。用荧光材料，例如量子点(quantum dot)或荧光染料处理可进一步增强

网格线的天然荧光。

在一个实施方式中，本发明涉及检测稀有样品中的非造血癌细胞的方法，该方法包括：a) 提供血液样品；b) 采用基于密度的方法，例如菲可密度离心除去所述血液样品中的红细胞(RBC)，采用基于微粒的方法除去所述血液样品中的白细胞(WBC)以提供含非造血细胞，例如可能存在的非造血肿瘤细胞的富集样品；和 c) 评估所述富集的非造血细胞或肿瘤细胞的存在与否和/或含量。基于微粒的方法常利用大小为 10 nm-10 微米并连接有特异性结合元件的颗粒。特异性结合元件通常是对于白细胞上的至少一种表面抗原具有特异性的抗体或类似结合物。微粒可包含磁性材料以促进分离富集样品中的颗粒。可利用检测这种非造血癌细胞的存在或数量来评估采集血液样品的对象中非造血癌症的存在、状态或进展。

本发明的另一方面是在富集血液样品后鉴定癌细胞的方法，包括：通过除去样品中主要的非癌细胞来富集样品中的癌细胞，所述样品可以是，例如血液样品；在至少一次这种富集步骤后用可检测标记特异性标记这些癌细胞；和计数富集样品中作标记的癌细胞的数量。或者，可将这种富集的癌细胞与其它细胞类型，例如非癌性上皮细胞或非干细胞类型癌细胞之比或比例用作诊断或预后标志，这比计数癌细胞更可靠。有时可利用多种标记物标记癌细胞以规避癌细胞典型的遗传学不稳定性和群体异质性。

在一优选的实施方式中，标记肿瘤细胞并通过与识别选自以下的一种或多种配体的特异性结合元件或多种特异性结合元件结合来鉴定：ACPP、AFP、白蛋白、ALCAM、AMAS、ARF6、ARMCX3、ATP1A1、BAG1、BJ-TSA-9、blc-2 βHCG、CA125、CA15-3、CA19-9、组织蛋白酶 B1、CD44、CD44v6、CD56、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD147、CDH2、CDK4I、CDKN2A、CDX2、CEA、CLDN3、CLDN4、CLDN5、c-met、CST3、细胞角蛋白、CK18、CK19、CK20、代司莫普拉肯-3 (Desmoplakin-3)、EAG1、EGFR、EGP2、EMA、ErbB2、ESR1、FAK、FOXA2、GalNac-T、GCTFTI5、GFAP、触珠蛋白-α、HCA、hCASK、HE4、HEPA1、hERG、HIP-1、HMB45、HSPA2、IGFR、IVL、KCNK-9、KHDRBS3、Ki67、Kv1.3、LAMB2、路易斯Y 抗原(Lewis-Y antigen)、LIMA、LMO6、LUNX、MAGE-3、MAGE-A3、乳

腺球蛋白(mammoglobin)、乳腺丝抑蛋白、梅兰-A(Melan-A)、MITF、MPP5、MPST、MUC-1、MUC5AC、NCAM-1、NSDHL、Oct4、OTC、p53、p97、p1B、PCNA、PGR、PMSA、PS-2、PSA、RPS6KA5、S100、S100A1、S100A2、S100B、SLC2A1、平滑肌蛋白、SP-1、SPARC、表面活性物质(Surfactant)、端粒酶、TFAP2A、TITF1 (TTF1)、TFF2、TRAIL、TRIM28、TRPM-8、TYR、酪氨酸酶、TYRP1、泛素硫酯酶(Ubiquitin thiolesterase)、VEGF、WT1、X-蛋白、ZNF165。所选择标记的指导参考文献为：*Clin Cancer Res.* 2005 年 5 月 15 日；11(10):3678-85 (CA15-3)；*Clin Cancer Res.* 2004 年 4 月 15 日；10(8):2812-7 (FAK)；*J Clin Invest.* 2002 年 8 月；110(3):351-60 (HIP-1)；*Neoplasia.* 2005 年 12 月；7(12):1073-80 (BJ-TSA-9)；*Cancer Detect Prev.* 1994；18(1):65-78 (AMAS)；*J Biol Chem.* 2006 年 4 月 7 日；281(14):9719-27. 电子出版 2006 年 1 月 27 日 (CD147)；*Lab Invest.* 2003 年 9 月；83(9):1343-52 (TFF2)；*Cancer.* 1995 年 1 月 15 日；75(12):2827-35 (路易斯 Y 抗原)。

在利用多种特异性结合元件的实施方式中，各结合成员可不携带标记、或携带相同或不同的标记。在本发明的优选实施方式中，用特异性标记鉴定癌细胞并用凋亡标记染色。在本发明的一些实施方式中，凋亡癌细胞的绝对数量和/或比例可用作抗癌治疗的效力或疾病进展或对象预后或以上组合的标志。

有时可通过采用本发明消除方法分离的癌细胞对特异性结合元件的亲和力来鉴定它们，所述特异性结合元件作典型标记以便于检测。可通过靶细胞对针对一种或多种以下物质的抗体的亲和力识别和标记它们：ACPP、AFP、白蛋白、ALCAM、AMAS、ARF6、ARMCX3、ATP1A1、BAG1、BJ-TSA-9、blc-2 βHCG、CA125、CA15-3、CA19-9、组织蛋白酶 B1、CD44、CD44v6、CD56、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD147、CDH2、CDK4I、CDKN2A、CDX2、CEA、CLDN3、CLDN4、CLDN5、c-met、CST3、细胞角蛋白、CK18、CK19、CK20、代司莫普拉肯-3、EAG1、EGFR、EGP2、EMA、ErbB2、ESR1、FAK、FOXA2、GalNac-T、GCTFTI5、GFAP、触珠蛋白-α、HCA、hCASK、HE4、HEPA1、hERG、HIP-1、HMB45、HSPA2、IGFR、IVL、KCNK-9、KHDRBS3、Ki67、Kv1.3、LAMB2、路易斯 Y 抗原、LIMA、LMO6、LUNX、MAGE-3、MAGE-A3、乳腺球蛋白、乳腺丝抑蛋白、梅兰-A、

MITF、MPP5、MPST、MUC-1、MUC5AC、NCAM-1、NSDHL、Oct4、OTC、p53、p97、p1B、PCNA、PGR、PMSA、PS-2、PSA、RPS6KA5、S100、S100A1、S100A2、S100B、SLC2A1、平滑肌蛋白、SP-1、SPARC、表面活性物质、端粒酶、TFAP2A、TITF1 (TTF1)、TFF2、TRAIL、TRIM28、TRPM-8、TYR、酪氨酸酶、TYRP1、泛素硫酯酶、VEGF、WT1、X-蛋白、ZNF165。在利用两种或更多种特异性结合元件标记靶细胞的实施方式中，各结合成员可不携带标记、或携带相同或不同的标记。常通过检测一种或多种以下物质来进一步鉴定凋亡的癌细胞：磷脂酰丝氨酸、DNA 片段、细胞色素 C、胱冬酶。鉴定的凋亡细胞与本发明方法鉴定的特定总稀有细胞群之比可用作诊断指数。

在一些优选的实施方式中，压实(减小体积或细胞块或二者)样品并除去血液样品中的不良组分(例如，造血细胞、非癌性上皮细胞等)后，采用磁力捕捉方法、荧光激活细胞分选或激光流式细胞术进一步富集或分离标记的癌细胞。在一些优选的实施方式中，压实并除去样品中的各种组分以提供含感兴趣的癌细胞或其它细胞的富集样品后，用特异性标记物标记感兴趣的稀有细胞。采用光谱成像、荧光显微术、可见光显微术或手动或自动图像分析来进一步分析标记的癌细胞。

在本发明的一些优选实施方式中，可联用免疫学和形态学标准鉴定癌细胞。常通过与能识别选自下组的一种或多种配体的特异性结合元件或多种特异性结合元件结合来标记癌细胞：ACPP、AFP、白蛋白、ALCAM、AMAS、ARF6、ARMCX3、ATP1A1、BAG1、BJ-TSA-9、blc-2 βHCG、CA125、CA15-3、CA19-9、组织蛋白酶 B1、CD44、CD44v6、CD56、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD147、CDH2、CDK4I、CDKN2A、CDX2、CEA、CLDN3、CLDN4、CLDN5、c-met、CST3、细胞角蛋白、CK18、CK19、CK20、代司莫普拉肯-3、EAG1、EGFR、EGP2、EMA、ErbB2、ESR1、FAK、FOXA2、GalNac-T、GCTFTI5、GFAP、触珠蛋白-α、HCA、hCASK、HE4、HEPA1、hERG、HIP-1、HMB45、HSPA2、IGFR、IVL、KCNK-9、KHDRBS3、Ki67、Kv1.3、LAMB2、路易斯 Y 抗原、LIMA、LMO6、LUNX、MAGE-3、MAGE-A3、乳腺球蛋白、乳腺丝抑蛋白、梅兰-A、MITF、MPP5、MPST、MUC-1、MUC5AC、NCAM-1、NSDHL、Oct4、OTC、p53、p97、p1B、PCNA、PGR、PMSA、PS-2、PSA、

RPS6KA5、S100、S100A1、S100A2、S100B、SLC2A1、平滑肌蛋白、SP-1、SPARC、表面活性物质、端粒酶、TFAP2A、TITF1 (TTF1)、TFF2、TRAIL、TRIM28、TRPM-8、TYR、酪氨酸酶、TYRP1、泛素硫酯酶、VEGF、WT1、X-蛋白、ZNF165。在利用多种特异性结合元件的实施方式中，各结合成员可不携带标记、或携带相同或不同的标记。常通过荧光显微术、可见光显微术或手动或自动图像分析来鉴定癌细胞，其中癌细胞鉴定成由识别上述标记物中一种、两种、三种或更多种的结合成员作标记的细胞，还任选通过与其核的大小、核的形状和边界特征、整个细胞的大小或细胞的胞质部分与其核之比的相关特定形态学标准来鉴定癌细胞。

在另一方面，本发明涉及检测血液样品中的非造血细胞，例如非造血癌细胞的方法，该方法包括以下步骤中的一些或全部：

a) 提供血液样品；

b) 通过选择性裂解所述血液样品中的红细胞(RBC)来除去所述 RBC，通过将其余的造血细胞特异性结合于特异性结合元件来除去所述造血细胞，例如白细胞(WBC)，例如将 WBC 结合于抗-CD50 抗体或另一种白细胞-特异性抗体，可将所述抗体连接于固体表面，例如微粒或磁性颗粒，以富集含目标癌细胞(固定存在的话)的样品；和

c) 对包含靶细胞的富集样品进行下游加工以鉴定、表征或利用靶细胞群，包括通过以下步骤评估所述富集的非造血细胞，例如非造血肿瘤细胞的存在与否和/或数量：i) 核和/或细胞质染色后进行亮视野显微术并应用形态学标准，ii) 免疫染色富集的非造血细胞并计数标记的细胞；iii) PCR 分析富集的非造血细胞；或检测通常存在于癌细胞类型中，优选与其唯一相关的酶、表面标记或核酸的存在或数量。

在还有另一方面，本发明涉及检测血液样品中的非造血细胞，例如非造血肿瘤细胞的试剂盒，该试剂盒包含：a) 除去血液样品中的红细胞(RBC)的装置，前提是所述器件不是菲可梯度离心装置；和除去所述血液样品中的白细胞(WBC)以富集所述血液样品中的非造血细胞，例如非造血肿瘤细胞(如果有的话)的装置；和 b) 评估所述富集的非造血细胞，例如非造血肿瘤细胞存在与否和/或数量的装置，或评估哪部分非造血细胞是癌性的装置，或评估哪部分靶细胞

是凋亡细胞或具有干细胞特性的装置。本文披露了除去 RBC 的合适装置，其包含裂解缓冲液或与结合 RBC 的特异性结合元件相连的固体表面或颗粒。本文还披露了除去 WBC 的合适装置，例如微粒，其任选为磁性的并连接于至少一种能选择性结合白细胞表面抗原的特异性结合元件。本文还披露了评估富集的非造血细胞存在与否和/或数量的装置，其包含针对本文所述肿瘤标记化合物的标记抗体。

本发明的另一方面是将对象的血液样品中癌细胞的存在情况用于诊断癌症的目的，其中所述对象的血液样品中存在癌细胞表明所述对象体内存在肿瘤，还可表明该肿瘤进展或转移的可能性。采用本文所述一种或多种消除方法或本领域已知的方法分离癌细胞，所述方法包括正选择方法和用一种或多种识别选自下组的癌症标记的癌症标记特异性结合体标记癌细胞来正鉴定所述细胞：ACPP、AFP、白蛋白、ALCAM、AMAS、ARF6、ARMCX3、ATP1A1、BAG1、BJ-TSA-9、blc-2 βHCG、CA125、CA15-3、CA19-9、组织蛋白酶 B1、CD44、CD44v6、CD56、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD147、CDH2、CDK4I、CDKN2A、CDX2、CEA、CLDN3、CLDN4、CLDN5、c-met、CST3、细胞角蛋白、CK18、CK19、CK20、代司莫普拉肯-3、EAG1、EGFR、EGP2、EMA、ErbB2、ESR1、FAK、FOXA2、GalNac-T、GCTFTI5、GFAP、触珠蛋白-α、HCA、hCASK、HE4、HEPA1、hERG、HIP-1、HMB45、HSPA2、IGFR、IVL、KCNK-9、KHDRBS3、Ki67、Kv1.3、LAMB2、路易斯 Y 抗原、LIMA、LMO6、LUNX、MAGE-3、MAGE-A3、乳腺球蛋白、乳腺丝抑蛋白、梅兰-A、MITF、MPP5、MPST、MUC-1、MUC5AC、NCAM-1、NSDHL、Oct4、OTC、p53、p97、p1B、PCNA、PGR、PMSA、PS-2、PSA、RPS6KA5、S100、S100A1、S100A2、S100B、SLC2A1、平滑肌蛋白、SP-1、SPARC、表面活性物质、端粒酶、TFAP2A、TITF1 (TTF1)、TFF2、TRAIL、TRIM28、TRPM-8、TYR、酪氨酸酶、TYRP1、泛素硫酯酶、VEGF、WT1、X-蛋白、ZNF165。在利用多种特异性结合元件的实施方式中，各结合成员可不携带标记、或携带相同或不同的标记。

本发明另一方面是监测癌症患者的疾病进展、对治疗的反应、或复发。在癌症疾病的天然进展期间，或者治疗导致癌细胞的表面抗原常发生突变，从而

使得正选择方法不足以监测生物学样品中的癌细胞。本发明的消除方法能有效分离和鉴定癌症患者样品中的癌细胞。在本发明的优选实施方式中，在疾病进展期间或持续数周、数月或更长时间的治疗期间以不同时间间隔，或在停止治疗之后采用本发明方法测定患者血液样品中的癌细胞数量。癌细胞数量随时间增加表明对治疗缺乏反应、复发、转移危险较高、预后较差、计划存活时间缩短或发展成较高的癌症阶段或肿瘤生长速度，或上述的组合。癌细胞数量减少或不变表明对治疗的反应有利、疾病状态稳定或肿瘤缩小或消退或上述的组合。

在本发明一优选实施方式中，表征从癌症患者分离的癌细胞的核酸含量。该方法包括诸如以下步骤：a) 提供血液样品；b) 通过选择性裂解红细胞(RBC)来除去所述血液样品中的所述 RBC；c) 通过将血液样品中的白细胞(WBC)特异性结合于抗-CD50 抗体或其它白细胞-特异性抗体来除去所述 WBC，从而富集含有可能存在的目标癌细胞的样品；d) 扩增分离的癌细胞的 RNA 和/或 DNA；和 e) 采用一种或多种以下方法表征癌细胞中的遗传学含量和/或基因表达分布：单核苷酸多态性、定量 PCR、FISH、DNA 测序、多重 PCR、测定 DNA 甲基化、定量测定 DNA 总含量、全基因组扩增 (WGA)、CGH、激光切割显微术 (LDM)、从 RNA 扩增、寡核苷酸连接试验 (OLA)、染色体免疫沉淀 (CHIP)、southern 印迹、杂交、扩增、连接、酶试验。

本发明另一方面是借助评估恶性指数来监测疾病进展、对治疗的反应或患者中癌症的复发。恶性指数测定为循环候选癌细胞或循环上皮细胞数量 α 与以下细胞的数量 ε 之比，后一细胞是非凋亡(或凋亡)的和/或过度表达血管生成标记和/或过度表达增殖标记和/或肿瘤抑制基因的表达降低和/或丧失分化标记和/或含有跨肿瘤抑制基因的染色体缺失和/或含有肿瘤启动子的染色体扩增和/或过度表达抗药因子和/或含有特定突变。在某些实施方式中，利用能鉴定特定细胞状态的表面抗原特征的标记物测定 α 和 ε 值，用于测定 α 和 ε 的标记物或标记物组不同。

可如下所述测定血液样品中上皮细胞或候选癌细胞的数量 ε：a) 提供血液样品；b) 通过选择性裂解红细胞(RBC)来除去所述血液样品中的所述 RBC，和通过将白细胞(WBC)特异性结合于抗-CD50 抗体或另一种白细胞-特异性抗体

来除去所述血液样品中的所述 WBC，从而富集含可能存在的目标癌细胞的样品；c) 用一种或多种选自下组的癌症标记物标记所述细胞来鉴定富集样品中的候选癌细胞或上皮细胞：ACPP、AFP、白蛋白、ALCAM、AMAS、ARF6、ARMCX3、ATP1A1、BAG1、BJ-TSA-9、blc-2 βHCG、CA125、CA15-3、CA19-9、组织蛋白酶 B1、CD44、CD44v6、CD56、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD147、CDH2、CDK4I、CDKN2A、CDX2、CEA、CLDN3、CLDN4、CLDN5、c-met、CST3、细胞角蛋白、CK18、CK19、CK20、代司莫普拉肯-3、EAG1、EGFR、EGP2、EMA、ErbB2、ESR1、FAK、FOXA2、GalNac-T、GCTFTI5、GFAP、触珠蛋白-α、HCA、hCASK、HE4、HEPA1、hERG、HIP-1、HMB45、HSPA2、IGFR、IVL、KCNK-9、KHDRBS3、Ki67、Kv1.3、LAMB2、路易斯 Y 抗原、LIMA、LMO6、LUNX、MAGE-3、MAGE-A3、乳腺球蛋白、乳腺丝抑蛋白、梅兰-A、MITF、MPP5、MPST、MUC-1、MUC5AC、NCAM-1、NSDHL、Oct4、OTC、p53、p97、p1B、PCNA、PGR、PMSA、PS-2、PSA、RPS6KA5、S100、S100A1、S100A2、S100B、SLC2A1、平滑肌蛋白、SP-1、SPARC、表面活性物质、端粒酶、TFAP2A、TITF1 (TTF1)、TFF2、TRAIL、TRIM28、TRPM-8、TYR、酪氨酸酶、TYRP1、泛素硫酯酶、VEGF、WT1、X-蛋白、ZNF165。在利用多种特异性结合元件的实施方式中，各结合成员可不携带标记、或携带相同或不同的标记。

可如下所述测定血液样品中凋亡的，或高度恶性的或去分化的或突变的或增殖速度高的癌细胞数量 α：a) 提供血液样品；b) 通过选择性裂解红细胞(RBC)来除去所述血液样品中的所述 RBC，和通过将白细胞(WBC)特异性结合于抗-CD50 抗体或另一种白细胞-特异性抗体来除去所述血液样品中的所述 WBC，从而富集含可能存在的目标癌细胞的样品；c) 用一种或多种选自下组的癌症标记物标记所述细胞来鉴定癌细胞：磷脂酰丝氨酸、DNA 断裂、细胞色素 C、胱冬酶表达、ACPP、AFP、白蛋白、ALCAM、AMAS、ARF6、ARMCX3、ATP1A1、BAG1、BJ-TSA-9、blc-2 βHCG、CA125、CA15-3、CA19-9、组织蛋白酶 B1、CD44、CD44v6、CD56、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD147、CDH2、CDK4I、CDKN2A、CDX2、CEA、CLDN3、CLDN4、CLDN5、c-met、CST3、细胞角蛋白、CK18、CK19、CK20、代司莫普拉肯-3、

EAG1、EGFR、EGP2、EMA、ErbB2、ESR1、FAK、FOXA2、GalNac-T、GCTFTI5、GFAP、触珠蛋白-α、HCA、hCASK、HE4、HEPA1、hERG、HIP-1、HMB45、HSPA2、IGFR、IVL、KCNK-9、KHDRBS3、Ki67、Kv1.3、LAMB2、路易斯Y 抗原、LIMA、LMO6、LUNX、MAGE-3、MAGE-A3、乳腺球蛋白、乳腺丝抑蛋白、梅兰-A、MITF、MPP5、MPST、MUC-1、MUC5AC、NCAM-1、NSDHL、Oct4、OTC、p53、p97、p1B、PCNA、PGR、PMSA、PS-2、PSA、RPS6KA5、S100、S100A1、S100A2、S100B、SLC2A1、平滑肌蛋白、SP-1、SPARC、表面活性物质、端粒酶、TFAP2A、TITF1 (TTF1)、TFF2、TRAIL、TRIM28、TRPM-8、TYR、酪氨酸酶、TYRP1、泛素硫酯酶、VEGF、WT1、X-蛋白、ZNF165。在利用多种特异性结合元件的实施方式中，各结合成员可不携带标记、或携带相同或不同的标记。

在本发明一优选实施方式中，在治疗之前、期间或之后以不同时间间隔通过本发明方法测定恶性指数。恶性指数随时间增加表明对治疗缺乏反应、转移危险较高、预后较差、计划存活时间缩短或发展成较高的癌症阶段、肿瘤生长，或上述的组合。恶性指数降低或不变表明对治疗的反应有利、疾病状态稳定或肿瘤缩小或消退或上述的组合。

在本发明一优选实施方式中，通过正的或负的(消除)方法表征从癌症患者分离的癌细胞的核酸含量。一种这样的方法包括：a) 提供血液样品；b) 通过选择性裂解红细胞(RBC)来除去所述血液样品中的所述 RBC，和通过将白细胞(WBC)特异性结合于抗-CD50 抗体或其它白细胞-特异性抗体来除去所述血液样品中的所述 WBC，从而富集含可能存在的目标癌细胞的样品；c) 扩增分离的癌细胞的 RNA 和/或 DNA；d) 采用一种或多种以下方法表征癌细胞中的遗传学含量和/或基因表达分布：单核苷酸多态性、定量 PCR、FISH、DNA 测序、多重 PCR、测定 DNA 甲基化、定量测定 DNA 总含量、全基因组扩增 (WGA)、CGH、LDM、从 RNA 扩增、OLA、CHIP、southern 印迹、杂交、扩增、连接、酶试验。

在本发明的一些优选实施方式中，为鉴定突变存在而分析癌细胞的遗传学含量，这些突变能赋予较高的增殖速度或跨肿瘤抑制基因的染色体缺失或肿瘤促进基因的染色体扩增。

在本发明另一实施方式中，利用对象的分离癌细胞的遗传学含量的特征定制或个性化设计所述对象或具体癌症表型的专门疗程。

本发明的另一方面包括培养从获自癌症患者的生物学样品中分离的癌细胞并使之体外增殖。该方法包括：a) 提供血液样品；b) 通过选择性裂解红细胞(RBC)来除去所述血液样品中的所述 RBC，和通过将白细胞(WBC)特异性结合于抗-CD50 抗体或类似的白细胞-特异性抗体来除去所述血液样品中的所述 WBC，从而富集含癌细胞的样品；c) 将富集的癌细胞样品转移入微量滴定板或相似的容器中，在无血清培养基或血清浓度等于或小于 20%或优选小于约 5%的培养基中培养。

在一方面，本发明提供评估临床研究实验性癌症疗剂或候选药物进展的方法。这些试验中的对象可以是人，但他们常包括其它哺乳动物，例如小鼠、大鼠、狗、猴等。在该方面，所述方法可用于提供临床终点来检测实验性癌症疗剂或候选药物的效力，其比单独的有效性、转移或复发数据更快且更能量化。该方法能更快速而量化地评估所测试疗剂的效力，其还提供关于疗剂如何影响所治疗癌症的转移和复发可能性的额外信息。因此，其提供关于实验性疗剂总效力的更多信息并减少这种临床试验所需的时间。

在本发明的优选实施方式中，先用从癌症患者血液样品获得的培养癌细胞体外测试候选抗癌药物或药物组合的效力，再给予所述患者，或再决定是否继续用该药物治疗。其它实施方式利用这种培养的癌细胞测试新的候选药物或其它实验性疗剂作为临床试验一部分或甚至效力的初步筛选。

在本发明的另一方面，用本发明方法从癌症患者分离的癌细胞是通过体外培养和选择固定的，用 SV40 T-抗原或端粒酶转染细胞或其它合适方法对其有或没有帮助。然后可用无限增殖细胞测试抗癌药的效力，筛选新的抗癌药或需要无限增殖细胞系的任何其它研究。

在本发明的另一方面。采用本发明方法从癌症患者分离的癌细胞可用于侵袭性试验。

本发明的另一方面是为个性化免疫治疗目的而利用从癌症患者分离的癌细胞，其中将从癌症患者分离的癌细胞获得的蛋白质或核酸或它们的组合与所述患者的 WBC 或 WBC 亚组分一起培育以刺激癌症特异性免疫应答。然后将

与癌细胞肿瘤抗原接触的WBC或WBC亚组分再接种入该患者。

在本发明一实施方式中，利用癌症患者的血液样品分离癌细胞(来自细胞组分)并实施标准生物化学试验(来自血浆组分)。获得癌症患者的血液样品后，离心所述样品以沉淀所有细胞组分。离心步骤后，血浆组分或该组分的一部分从细胞沉淀物中回收并除去。将细胞组分重悬在合适的缓冲液中，采用本发明的消除方法和癌细胞检测方法分离癌细胞。将血浆组分用于常规临床试验，包括但不限于测定以下物质的血浆浓度：钠、钾、脲、肌酸酐、葡萄糖、总蛋白、白蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、γ谷氨酰转移酶、肌酸激酶、天冬氨酸转氨酶、乳酸脱氢酶、淀粉酶、C-反应性蛋白、D-二聚体、钙、铜、锌、甘油三酯、总胆固醇、HDL胆固醇、LDL胆固醇、α-胎蛋白、CA-125、前列腺特异性抗原、TSH、FT4、FT3、ACTH、可的松、促乳素、睾酮。

在本发明的一个实施方式中，采用本发明所述消除方法从血液样品分离癌细胞后，采用几种免疫测定表征癌细胞。例如，可以裂解癌细胞，离心裂解物并实施ELISA试验。在此情形中，可以直接检测癌细胞中表达的感兴趣特定蛋白。这样能提供癌细胞中蛋白质含量的概况并监测疾病进程期间或治疗性治疗期间癌细胞表型如何改变。

在本发明的一些优选实施方式中，分离后通过一种或多种功能或酶试验表征癌细胞。现已在肺癌细胞以及许多其它癌症的癌细胞中鉴定到端粒酶活性。可采用端粒酶活性试验进一步表征采用本发明消除方法或本领域技术人员熟知的正选择方法分离的循环肿瘤细胞。在此情形中，可进行端粒酶重复序列扩增方案(TRAP)。一旦分离了癌细胞，可利用依据洗涤剂缓冲液的CHAPS或任何其它合适的方法提取端粒酶。细胞裂解物的上清液可用作借助PCR的端粒酶延伸反应的模板。利用荧光标记的引物产生荧光PCR产物，然后进行毛细管电泳检测。产生的荧光PCR产物量越大或者端粒酶重复序列扩增产物越长，样品中癌细胞的端粒酶活性越高，这是肿瘤的侵袭性或富集样品中癌细胞数量或组分的标志。

最近几年，抗体治疗已在临床上取得显著成功，目前其是临床医师用于抵御癌症的标准武器的一部分。本发明方法提供监测抗体治疗的作用和效力的独特方法。在一些实施方式中，本发明可用于检测癌症患者血液中的循环癌细胞

和免疫治疗剂，例如该治疗所用的人源化外来抗体之间的相互作用。可通过分离癌细胞并检查其是否存在这种抗体来测定分离的癌细胞是否与治疗性抗体结合；一种这样的方法包括：a) 提供血液样品；b) 通过选择性裂解红细胞(RBC)来除去所述血液样品中的所述 RBC，和通过将白细胞(WBC)特异性结合于抗-CD50 抗体或另一种白细胞-特异性抗体来除去所述血液样品中的所述 WBC，从而富集含可能存在的癌细胞的样品；c) 用一种或多种多治疗性抗体有特异性亲和力的配体和任选的候选癌细胞的额外结合成员标记所述细胞来鉴定与治疗性抗体结合的癌细胞；d) 采用合适的方法目测观察标记的细胞以目测观察分子配体，所述方法包括但不限于：本领域技术人员熟知的荧光显微术、免疫组织化学方法、亮视野显微术和 FACS。然而，该方法还可与本领域已知的正选择细胞分离方法联合实施，例如通过将样品与包被了能结合靶细胞上的表面标记的特异性结合元件的多个磁珠接触而选择生物学流体或样品中的靶细胞的那些方法。

在本发明的一些优选实施方式中，可采用监测治疗性抗体与血液样品中癌细胞的相互作用来评估患者对治疗的反应，其中就不同时间点的检测值而言，当癌细胞中与免疫治疗剂，例如抗体结合的部分高于预定值，或者随时间增加时，估计治疗结果是有利的，就不同时间点的检测值而言，当癌细胞中与抗体结合的部分低于预定值，或者随时间降低时，估计治疗结果是不利的。如果不利用绝对数值，也可利用细胞中与所述抗体结合的部分与整个候选癌细胞群或未结合的候选癌细胞部分之比。

可利用小型化微流体装置，例如微流体芯片或药筒，在下游加工中表征和/或进一步操作富集的样品。这种装置可包含利用介电电泳、热梯度、声学、电渗或电磁操作等原理的一种或多种元件。这种装置还可具有过滤、混合、超声处理、热循环、免疫磁性分离、核酸杂交、双-光子显微术、吸光度检测、荧光检测、FRET 检测、免疫识别、阻抗检测、电场刺激或细胞培养功能。本发明一优选实施方式包括获得通过本发明所述方法富集的样品，将该富集的样品家族到微流体装置上，然后将样品中感兴趣的稀有细胞和其它细胞分开，将分开的细胞引入各培养室进行培育，对各培养室施加待测试的治疗剂，和产生可用于评估治疗剂作用的合适读出值。

可用微流体装置，例如微芯片或药筒使本发明所述富集方法小型化。

附图简述

图 1. 用于细胞样品压实的弗氏细胞压碎器。

A. 含靶细胞的流体样品显示在弗氏细胞压碎器内。(1) 含有待压实的流体样品的主室。(2) 滤器。(3) 用于使滤器移动通过样品的活塞。(4) 将样品引入主室的入口阀门。(5) 使压实的样品离去的出口阀门。(6) 靶细胞。

B. 压实过程结束时的压实样品，显示了过滤单位的新位置。

图 2. 用抗-CD50 单克隆抗体染色人白细胞。

显示了对白细胞作 CD50 染色的结果。

图 3. 用抗-CD50 单克隆抗体染色人癌细胞。

显示抗-CD50 抗体和获得的不同类型癌症(所示的)的癌细胞之间缺乏特异性相互作用。

图 4. 从掺加的血液样品回收癌细胞。

P，前列腺癌细胞；L，肺癌细胞；B，乳腺癌细胞；C，子宫颈癌细胞。

图 5. 从乳腺癌患者分离的癌细胞。

上图，对照健康患者的正常细胞

下三图，乳腺癌细胞的例子。

图 6. 通过 CT 扫描评估化疗(4-6 周)前后临床反应相关 CTC 计数的改变。

发明详述

定义

除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员所常规理解的意义相同。本文所用的术语与装置和组件的制备流程以及下述实验室流程通常是本领域熟知且常规采用的。这些流程采用常规方法，例如本领域和各种通用参考文献所提供的。如果某术语以单数提供，发明人还考虑了该术语的复数形式。除非另有指明，说明书中通篇使用的以下术语应理解成具有以下意义：

样品的“组分”或“样品组分”是样品的任何成分，可以是任何类型的离

子、分子、化合物、分子复合物、细胞器、病毒、细胞、聚集体或颗粒，包括胶体、聚集体、颗粒物、晶体、矿物质等。样品的组分可溶于或不可溶于样品介质或提供的样品缓冲液或样品溶液中。样品的组分可以是气态、液体或固体形式。样品的组分可以是某部分或不是某部分。

“部分”或“感兴趣的部分”是需要对其进行操作的任何实体。部分可以是固体，包括悬浮的固体，或者可以是不可溶的形式。部分可以是分子。可进行操作的分子包括但不限于：无机分子，包括离子和无机化合物，或者可以是有机分子，包括氨基酸、肽、蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、脂蛋白、脂质、脂肪、固醇、糖、碳水化合物、核酸分子、有机小分子或有机分子复合物。部分还可以是分子复合物，可以是细胞器，可以是一个或多个细胞，包括原核细胞和真核细胞，或可以是一个或多个病原因子，包括病毒、寄生虫或朊病毒或其诸部分。部分还可以是晶体、矿物质、胶体、片段、胶束、液滴、气泡等，可以包含一种或多种无机材料，例如聚合材料、金属、矿物质、玻璃、陶瓷等。部分还可以是分子的聚集体、复合物、细胞、细胞器、病毒、病原因子、晶体、胶体或片段。细胞可以是任何细胞，包括原核细胞和真核细胞，无论死活。真核细胞可以是任何类型。特别感兴趣的细胞，例如但不限于：白细胞、正常细胞、修饰的细胞、突变细胞、恶性细胞、干细胞、祖细胞、胎儿细胞和感染了病原因子的细胞及细菌细胞。部分还可以是人工颗粒，例如聚苯乙烯微珠，其它聚合物组成的微珠，磁性微珠和碳微珠。

本文所用的“操作”指使所述部分运动或加工所述部分，从而获得该部分的一维、两维或三维运动，无论在一个小室内或在一个芯片上，或在多个芯片和/或小室之间。通过本发明方法操作的部分可任选与结合伴侣，例如微粒偶联。操作的非限制性例子包括所述部分的转运、捕捉、聚集、富集、浓缩、凝聚、截留、排斥、悬浮、分开、分离或线形或其它定向运动。就有效操作与结合伴侣偶联的部分而言，该方法所用的结合伴侣和物理作用力必须相容。例如，具有磁性的结合伴侣必须以磁力使用。类似地，具有某些介电特性的结合伴侣，例如塑料颗粒、聚苯乙烯微珠必须以介电电泳力使用。

“结合伴侣”或“结合成员”指以所需亲和力或特异性结合所述部分并能以所需物理作用力操作的任何物质。结合伴侣的非限制性例子包括细胞、细胞

器、病毒、微粒或其聚集体或复合物、或分子的聚集体或复合物。

“微粒”或“颗粒”是可由所需物理作用力操作的任何形状和任何组成的结构。这些方法所用的微粒的尺寸可以是约 0.01 微米到约 10 厘米。这些方法所用的微粒的尺寸优选约 0.1 微米到约几千微米。它们的大小通常是 0.1-10 微米或 1-100 微米。这种颗粒或微粒可以由任何合适的材料构成，例如玻璃或陶瓷，和/或一种或多种聚合物，例如尼龙、聚四氟乙烯(TEFLON™)、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、琼脂糖凝胶(sepaharose)、琼脂糖、纤维素、纤维素衍生物或葡聚糖，和/或可包含金属。微粒的例子包括但不限于：塑料颗粒、陶瓷颗粒、碳颗粒、聚苯乙烯微珠、玻璃珠、磁珠、中空玻璃球、金属颗粒、复杂组成的颗粒、微制造(microfabricate)或微机械颗粒(micromachined particle)，等等。

“偶联”表示结合的。例如，某部分可通过特异性或非特异性结合而偶联于某微粒。本文所述的“结合”可以是共价或非共价的、可逆或不可逆的。

本文所用的“待操作的部分基本上偶联在结合伴侣的表面上”表示一定百分比的待操作部分偶联在该结合伴侣的表面上并可通过合适的物理作用力借助操作该结合伴侣来操作该部分。通常有至少 0.1%的待操作部分偶联在结合伴侣的表面上。优选至少 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或 90%的待操作部分偶联在结合伴侣的表面上。

本文所用的“待操作的部分完全偶联在结合伴侣的表面上”表示至少 90%的待操作部分偶联在该结合伴侣的表面上。优选至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的待操作部分偶联在结合伴侣的表面上。

“特异性结合元件”是在表面上或腔室内具有一定面积的两种不同分子之一，其能特异性结合另一分子，因而定义为与另一分子的特定空间和化学构成互补。特异性结合元件可以是免疫学配对，例如抗原-抗体或抗体-抗体的一员，可以是生物素-亲和素、生物素-链霉亲和素或生物素-中性亲和素、配体-受体、核酸双链体、IgG-A 蛋白、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA 等。

“抗体”是免疫球蛋白分子，可以是(非限制性例子)IgG、IgM 或其它类型的免疫球蛋白分子。本文所用的“抗体”还指抗体分子的某部分，其保留衍生其的抗体的特异性(例如，单链抗体或 Fab 片段)。

“核酸分子”是多核苷酸。核酸分子可以是 DNA、RNA 或二者的组合。

核酸分子还可包含除掺入主链的核糖和脱氧核糖以外的糖，因此可以不是DNA或 RNA。核酸可以包含天然产生的或自然界中不产生的核碱基(nucleobase)，例如黄嘌呤，核碱基的衍生物，例如 2-氨基腺嘌呤等。本发明的核酸分子可具有除磷酸二酯键外的连接键。本发明的核酸分子可以是肽核酸分子，其中核碱基连接于肽主链。核酸分子可以是任何长度，可以是单链、双链或三链的，或它们的任何组合。

“均质操作”指利用物理作用力操作混合物中的颗粒，其中该混合物中的所有颗粒对所施加的作用力的反应相同。

“选择性操作”指利用物理作用力操作颗粒，其中混合物中的不同颗粒对所施加的作用力的反应不同，包括操作一种颗粒所用的作用力对其它颗粒无影响的情形。

“流体样品”是含待分离或分析的组分的任何流体。样品可以来自任何来源，例如生物体，相同或不同物种的生物体的组合，来自环境，例如来自水体或来自土壤，或来自食物来源或工业来源。样品可以是未加工或加工的样品。样品可以是气体、液体或半固体，还可以是溶液或悬液。样品可以是提取物，例如土壤或食物样品的液体提取物，喉咙或生殖器刮板提取物，或粪便样品提取物，或身体内表面的清洗液。

本文所用的“血液样品”可指加工的或未加工的血液样品，即，其可以是离心、过滤、提取或其它处理的血液样品，包括已加入一种或多种试剂，例如但不限于抗凝剂或稳定剂的血液样品。血液样品的例子是通过加工人血液以富集白细胞而获得的血沉棕黄层。血液样品的另一例子是通过将样品离心成细胞沉淀，除去血清上清液并将细胞重悬在溶液或缓冲液中而“清洗”除去了血清组分的血液样品。其它血液样品包括脐带血样品、骨髓抽吸物、内周血(internal blood)或外周血。血液样品可以是任何体积，可以来自任何对象，例如动物或人。对象优选人。

“稀有细胞”是以下细胞类型的细胞：1) 在流体样品中总有核细胞群中不到1%的细胞类型，或2) 含量低于每微升流体样品 1 百万个细胞的细胞类型。“感兴趣的稀有细胞”是需要富集的细胞。

“所需细胞”或“靶细胞”是可通过以下方法在其它类型细胞中鉴定和/

或分开和/或富集的特定类型的感兴趣稀有细胞，所述方法涉及优选在所需细胞或靶细胞上存在或不存在的标记或特性。需要除去以促进靶细胞的鉴定、分离或表征的细胞称为“非靶细胞”，生物学样品可含有多类非靶细胞，因此，可以各种组合使用本发明方法来除去不同的非靶细胞。例如，可采用一个或多个选择性裂解步骤来除去一种类型以上的细胞；可通过选择性结合于固体支持物来除去一种类型以上的细胞，该方法可包括利用特异性结合元件以除去一种细胞类型的各步骤，或者该方法可包括将样品与附着在一个或多个固体表面上的多种特异性结合元件接触的一个加工步骤，从而能一步除去多种类型的非靶细胞。

本文所用的“无需除去靶细胞”表示存在靶细胞类型时，具体步骤或步骤的组合除去样品中小于50%的靶细胞群。这可通过给样品掺加数量已知的靶细胞来测定，从而能确定回收了多少细胞用于检测；作为标准方法，通过给样品掺加 5-10 个靶细胞并测定富集方法后检测到多少那些细胞来确定回收效率。所述步骤或步骤组合优选除去样品中小于50%的靶细胞，本发明方法通常除去小于35%的靶细胞。在一些实施方式中，用于分离样品中的靶细胞群的步骤组合除去小于约30%的靶细胞，或小于20%的靶细胞。在一些实施方式中，这些步骤或整个方法除去小于 10%的靶细胞，或小于 5%的靶细胞，或小于约 1%的靶细胞。

本文所用的“除去非靶细胞”或细胞类型表示该步骤至少除去了非靶细胞群的主要部分。当将细胞从样品中取出时，或者当裂解细胞时，它们是除去的，因此它们不再视作是细胞并易于通过能将完整的细胞与较小碎片分开的熟知方法，例如过滤或离心而与靶细胞分开。可重复除去非靶细胞类型的各步骤以进一步除去非靶细胞并进一步富集样品中的靶细胞。

“白细胞”或“WBC”是并非网织红细胞或血小板并能在动物或人血液中发现的白细胞或造血谱系的细胞。白细胞可包括天然杀伤细胞(“NK 细胞”)和淋巴细胞，例如 B 淋巴细胞(“B 细胞”)或 T 淋巴细胞(“T 细胞”)。白细胞还可包括吞噬细胞，例如单核细胞、巨噬细胞和粒细胞，包括嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞。白细胞还包括肥大细胞。

“红细胞”或“RBC”是红细胞。除非指定“有核红细胞”(“nRBC”)

或“胎儿有核红细胞”或有核胎儿红细胞，本文所用的“红细胞”用于表示无核红细胞。

“赘生细胞”或“肿瘤细胞”或“癌细胞”指异常细胞或肿瘤的一部分，或这些细胞的后代。这些细胞易显示部分或完全缺乏正常组织相关的结构组成和功能，可以是良性的或恶性的。与良性肿瘤细胞不同，癌细胞显示侵袭和转移特性，并且是高度间变的。癌细胞包括癌和肉瘤两种广泛类型。

“肿瘤”或“赘生物”是细胞的不受控、进行性倍增导致的组织异常生长并且不起生理作用；赘生物

“癌症”是特征在于间变细胞增殖的各种恶性赘生物，这些细胞易侵入周围组织并转移至新的身体部位。

“恶性细胞”是具有局部侵袭性和破坏性生长及远端转移特性的细胞。“恶性细胞”的例子包括但不限于各种体液(包括血液、骨髓、腹水、粪便、尿液、支气管清洗液等)中的白血病细胞、淋巴瘤细胞、实体瘤的癌细胞、转移性实体瘤细胞(例如，乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞)。

“癌性细胞”是显示生长失调的细胞，其在大多数情形中，丧失其至少一种分化特性，例如但不限于特征性形态、非迁移行为、细胞-细胞相互作用和细胞信号传导行为、蛋白质表达和分泌模式，等等。在大多数情形中，癌性细胞是上皮来源或不同于正常上皮细胞的间质来源。

“癌症”指肿瘤性疾病，一种致命的天然过程。与良性肿瘤细胞不同，癌细胞显示侵袭和转移特性并且高度间变。癌细胞包括癌和肉瘤广泛的两类。

“干细胞”是能通过一轮或多轮细胞分裂产生至少一种分化细胞类型的未分化细胞。

“祖细胞”是能通过一轮或多轮细胞分裂产生至少一种分化细胞类型的定型但未分化的细胞。干细胞通常对特定刺激或多组刺激起反应而通过一轮或多轮细胞分裂产生祖细胞，祖细胞对特定刺激或多组刺激起反应而产生一种或多种分化的细胞类型。

“病原因子”指能感染对象的任何病原因子，例如细菌、真菌、原虫、病毒、寄生虫或阮病毒。病原因子可在其感染的对象中导致症状或疾病状态。人病原因子是能感染人对象的病原因子。这种人病原因子可以是人特异性的，例

如特异性人病原因子，或者可感染各种物种，例如泛宿主性人病原因子。

“对象”指任何生物，例如动物或人。动物可包括任何动物，例如野生动物，陪伴动物，例如狗或猫，农业动物，例如猪或牛，或娱乐动物(pleasure animal)，例如马。

“小室”是能含有流体样品的结构，其中可进行至少一个加工步骤。小室可具有不同尺寸，其体积可为10微升到0.5升不等。

“过滤小室”是流体样品能通过其或在其中过滤的结构。

“滤器”是包含特定尺寸(特定范围内)的一个或多个孔或缝隙的结构，从而能根据颗粒的大小、形状和/或可变形性允许一定样品组分经过该滤器的一侧而到另一侧，但不许其它组分通过。滤器可由能阻止不可溶颗粒，例如金属、陶瓷、玻璃、二氧化硅、塑料、聚合物、纤维(例如纸或织物)等通过任何合适的材料制成

“过滤单位”是过滤小室及允许将样品和溶液引入该过滤小室并且从该过滤小室取出样品组分的相关入口、阀门和导管。过滤单位还任选包含加载储器。

“药盒”是包含至少一个小室和一个或多个导管的结构，所述小室是手动或自动系统的一部分，所述导管用于将流体运入或运出至少一个小室。药盒可包含一个或多个芯片或不包含。

“分离流体样品中的稀有细胞的自动系统”或“自动系统”是包含以下的设备：至少一个过滤小室、引导流体流过该过滤小室的自动装置和提供液流的至少一个能源及提供对活性芯片产生作用力的信号源的任选装置。本发明的自动系统还可任选包括一个或多个活性芯片、分离小室、分离柱或永久磁体。

“端口”是在小室外壳中的开口，流体样品可通过该端口进入或离开该小室。端口可以是任何尺寸，但其形状和大小优选能通过导管抽吸流体，或借助移液管、注射器或分散或运输样品的其它装置而将样品分散在小室中。

“入口”是样品、溶液、缓冲液或试剂进入流体小室的进入点。入口可以是小室的端口，或者可以是直接或间接通向自动系统的小室的导管的开口。

“出口”是样品、样品组分或试剂离开流体小室的开口。离开小室的样品组分和试剂可以是废料，即不再使用的样品组分，或者可以是待回收的样品组分或试剂，例如可重复使用的试剂或有待进一步分析或操作的靶细胞。出口可

以是小室的端口，但优选直接或间接离开自动系统的小室的导管的开口。

“导管”是将流体从一个容器转移至本发明小室的装置。导管优选直接或间接与小室外壳中的端口相连。导管可包含允许流体从其中流过的任何材料。导管可包含管子，例如橡胶、特氟隆或聚乙烯管。导管还可以由聚合物或塑料模制，或在金属、玻璃或陶瓷基板中钻孔、蚀刻或加工。因此，导管可整合于诸如本发明药盒等结构。导管可以是任何尺寸，但内径范围优选是10微米到5毫米。导管优选是密封的(除了流体的进入和离开点)，或者可在其上表面上的开口，例如管道型导管。

“富集”表示与其它样品组分相比，样品中某样品组分的相对浓度增加(可以是其它样品组分的浓度降低所致)，或者某样品组分的绝对浓度增加。例如，本文所用的“富集”血液样品中的有核胎儿细胞包括增加该血液样品中有核胎儿细胞与所用细胞之比，富集血液样品的癌细胞可表示增加该样品中癌细胞的浓度(例如，通过降低该样品的体积)或降低该血液样品中其它细胞组分的浓度或数量从而增加癌细胞的百分比，“富集”尿液样品中的癌细胞可表示增加它们在样品中的浓度，例如通过降低样品体积或减少样品中“非癌”细胞的数量。

“分离”是样品的一种或多种组分依次与样品的一种或多种其它组分相分开的过程。可实施分离从而将一种或多种感兴趣的样品组分移位至或维持在分离设备的一个或多个区域而至少一些其余组分移位离开所述一种或多种感兴趣的样品组分移位至和/或维持在的一个或多个区域，或者其中一种或多种样品组分维持在一个或多个区域而至少一些其余组分离开该一个或多个区域。或者，样品的一种或多种组分可以移位至和/或维持在一个或多个区域而一种或多种样品组分可离开该一个或多个区域。还可能将一种或多种样品组分移位至一个或多个区域，而将感兴趣的一种或多种样品组分或样品的一种或多种组分移位至一个或多个其它区域。可以通过，例如过滤，或采用物理、化学、电学或磁性作用力实现分离。可用于分离的作用力的非限制性例子是重力、质量流、介电电泳力、行波介电电泳力和电磁作用力。

“从(流体)样品中分离某样品组分”表示将原始样品的某样品组分与其它组分分开，或与一个或多个加工步骤后保留的样品组分分开。“从(流体)样品中除去某样品组分”表示从原始样品的其它组分中，或一个或多个加工步骤后

保留的样品组分中除去某样品组分。

“捕捉”是将一个或多个部分或样品组分维持在某表面、小室、芯片、珠颗粒、试管或含有样品的任何容器的一个或多个区域中的一种分离类型，其中样品的剩余部分可从该区域除去。

“试验”是对样品或样品组分实施的一种检验。试验可检验某组分的存在，某组分的数量或浓度，某组分的组成，某组分的活性等。可与本发明组合物和方法联合实施的试验包括但不限于：免疫细胞化学试验、分裂间期FISH(荧光原位杂交)、核型分型(karyotyping)、免疫试验、生物化学试验、结合试验、细胞试验、遗传试验、基因表达试验和蛋白质表达分布试验。

“结合试验”是通过检测某实体与特异性结合元件结合来检验该实体存在或浓度，或检验某实体与另一实体结合能力，或检验某实体与另一实体的结合亲和力的试验。实体可以是有机或无机分子，包含有机、无机或有机和无机化合物组合的分子复合物，细胞器，病毒或细胞。结合试验可利用可检测标记物或信号产生系统，从而能在有结合的实体存在下产生可检测信号。标准结合试验包括依赖于核酸杂交来检测特定核酸序列的那些试验，依赖与实体结合的抗体的那些试验，和依赖与受体结合的配体的那些试验。

“生物化学试验”是检测样品中一种或多种组分的存在、浓度或活性的试验。

“细胞试验”是检测细胞过程，例如但不限于代谢活性、分解代谢活性、离子通道活性、胞内信号传导活性、受体连接的信号传导活性、转录活性、翻译活性或分泌活性的试验。

“遗传试验”是检验遗传学元件的存在或序列的试验，其中遗传学元件可以是DNA或RNA分子的任何区段，包括但不限于基因、重复元件、转座元件、调节元件、端粒、着丝粒、或功能未知的DNA或RNA。遗传试验的非限制性例子可以是基因表达试验、PCR试验、核型分型或FISH。遗传试验可采用核酸杂交技术，可包括核酸测序反应，或可利用一种或多种酶，例如聚合酶，如依据PCR的遗传试验。遗传试验可利用一种或多种可检测标记物，例如但不限于荧光染料、放射性同位素或信号产生系统。

“免疫染色”指通过任何方法染色特定抗原或结构，例如细胞，其中染色

剂(或染色剂产生系统，或信号产生系统)与特异性抗体形成复合物。

“聚合酶链式反应”或“PCR”指扩增特定核苷酸序列(扩增子)的方法。PCR依赖于核酸聚合酶，优选热稳定聚合酶在含有扩增子的模板上延伸引物的能力。RT-PCR是依据模板(cDNA)的PCR，所述模板由逆转录酶从样品制备的mRNA产生。定量逆转录PCR(qRT-PCR)或实时RT-PCR是一种定量测定每轮中各样品的RT-PCR产物的RT-PCR。

“FISH”或“荧光原位杂交”是可通过杂交将遗传标记定位于染色体的试验。为实施 FISH，通常将荧光标记的核酸探针与载玻片上制备的分裂间期染色体杂交。通过荧光显微术目测观察杂交探针的存在和定位。探针还可包括酶并可与荧光酶底物联用。

“核型分型”指分析染色体，包括各类型染色体的存在和数量(例如，人单倍型的各24条染色体(染色体1-22，X和Y))，和染色体中形态异常的存在，例如易位或缺失。核型分型通常包括进行中期细胞的染色体分散。然后，可利用，例如但不限于染色剂或遗传探针目测观察染色体以区分特定染色体。

“基因表达试验”(或“基因表达分布试验”)是检验一种或多种基因表达产物，即信使RNA的存在或数量的试验。可同时检验样品中感兴趣细胞的一种或多种类型的mRNA。对于不同的应用，基因表达试验中检验的mRNA分子的数量和/或类型可以不同。

“蛋白质表达试验”(或“蛋白质表达分布试验”)是检验一种或多种蛋白质的存在或数量的试验。可同时检验样品中感兴趣细胞的一种或多种类型的蛋白质。对于不同的应用，蛋白质表达试验中检验的蛋白质分子的数量和/或类型可以不同。

“组织学检查”指利用组织化学剂或染色剂或特异性结合元件(通常偶联于可检测标记)检查细胞，所述组织化学剂或染色剂或特异性结合元件能确定细胞类型、细胞表达的特定标记，或能揭示细胞的结构特征(例如核、细胞骨架等)或细胞的状态或功能。对于组织学检查，通常可以在载玻片上制备细胞并用染料或直接或间接结合于可检测标记的特异性结合元件“染色”。可用于组织学检查的染料的例子是核染色剂，例如Hoechst染色剂，或细胞活力染色剂，例如台盼蓝，或细胞结构染色剂，例如Wright或Giemsa，HRP的酶活性

联苯胺以形成可见沉淀物。可用于胎儿红细胞组织学检查的特异性结合元件的例子是特异性识别胎儿或胚胎血红蛋白的抗体。

“孔”是芯片中的结构，其在至少两侧具有由一个或多个内壁围绕的下表面，所述一个或多个内壁从该孔或通道的下表面延伸。这些内壁可以任何角度或任何方式从孔或通道的下表面向上延伸。这些孔可以是不规则的构型，即它们可以 S 形或曲线或多角度方式向上延伸。孔或通道的下表面可以与芯片的上表面处于同一水平，或高于芯片的上表面，或低于芯片的上表面，因而孔是芯片表面中的凹陷。孔或通道的侧壁或内壁可包含构成芯片下表面的那些材料以外的材料。

“孔隙”是表面，例如本发明滤器中的开口，其在该表面的一侧和另一侧之间提供流体连接。孔隙可以是任何大小和任何形状，但孔隙的大小和形成优选能根据样品组分的大小、形状和可变形性(或缺乏可变形性)而限制至少一种不可溶样品组分从滤器一侧向滤器另一侧运动。

“连续流”表示在分离过程中将流体连续抽吸或注射入本发明小室。从而能在分离过程中将非选择性保留在小室中的样品组分冲出该小室。

“结合伴侣”指能以所需亲和力或特异性结合诸部分并能以所需物理作用力操作的任何物质。结合伴侣的非限制性例子包括微粒。

“微粒”是可提供所需物理作用力操作的任何形状或任何组成的结构。这些方法中所用微粒的尺寸可以是约 0.001 微米到约 10 厘米。这些方法中所用微粒的尺寸优选约 0.1 微米到约几百微米。这种颗粒或微粒可由任何合适的材料构成，例如玻璃或陶瓷，和/或一种或多种聚合物，例如尼龙、聚四氟乙烯(TEFLON™)、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素、纤维素衍生物或葡聚糖，和/或可包含金属。微粒的例子包括但不限于：磁珠、磁性颗粒、塑料颗粒、陶瓷颗粒、碳颗粒、聚苯乙烯微珠、玻璃珠、中空玻璃球、金属颗粒、组成复杂的颗粒、微制造独立式微结构(microfabricated free-standing microstructures)，等等。微制造独立式微结构的例子可以包括 Hagedorn 等(“Design of asynchronous dielectric micromotors”(异步介电微马达的设计)，刊于 Journal of Electrostatics(静电学杂志)，第 33 卷，第 159-185 页 (1994))所述那些。组成复杂的颗粒指包含多种组成元素或由它们构成的颗粒，例如覆盖有

不导电聚合物膜薄层的金属球。

"微粒制品"是包含一种或多种类型微粒并可任选包含至少一种其它化合物、分子、结构、溶液、试剂、颗粒或化学实体的组合物。例如，微粒制品可以是缓冲液配制的微粒悬液，其可任选包含特异性结合元件、酶、惰性颗粒、表面活性剂、配体、洗涤剂等。

本文所用的其它技术术语具有它们在所用领域的常规意义，如各种技术词典所示范的。

本发明认识到癌症疾病的诊断和监测面临患者中癌症产生位置的多重性和少量细胞可产生肿瘤或转移之一事实所引起的难题。癌细胞脱落进入血流是癌症疾病的共同特征，其对于本发明利用获自患者的生物学流体样品(例如血液样品)诊断和监测癌症的能力至关重要。能干扰分析的许多样品组分会混淆复杂样品，例如生物学流体样品的分析。当分析的目标是稀有细胞类型，例如当靶细胞是患者血液中存在的恶性细胞时，样品分析甚至更成问题。在加工这种样品时，常需要通过将体积减少至可操作的水平来"压实"样品和富集作为分析目标的癌细胞群。加工流体样品的方法往往耗时而低效。在一些方面，本发明提供富集血液样品中癌细胞的有效方法。此外，本发明还认识到疾病的进程中癌细胞的分子构成可突变或进化。还将本发明所述方法设计成能极快地除去血浆蛋白质、大多数 WBC 和 RBC 而不良作用较低，从而便于检测富集样品中的 CTC。可将本发明应用于分离血浆蛋白质，富集其它稀有细胞，包括干细胞、胎儿细胞、免疫细胞等，然后进行下游分析、操作和应用，例如流式细胞术、PCR、免疫荧光、免疫细胞化学、图像分析、酶试验、基因表达概况分析、治疗剂的效力测试、培养富集的稀有细胞和富集的稀有细胞的治疗性应用。本发明的核心是在疾病进程中分离和鉴定癌细胞的方法和组合物以及这种癌细胞的存在和/或丰度的有关信息在检测、诊断或预后癌症的方法中的应用。本发明方法能克服癌细胞典型的易变性和遗传不稳定性，因而能提供可靠的诊断方法。

为非限制性地介绍本发明的范围，本发明包括几种普遍而有用的方面，包括：

1) 富集生物学样品，例如血液样品中的靶细胞，例如癌细胞的方法。当

应用于血液样品时，这些方法可包括通过裂解选择性除去红细胞(RBC)，通过与特异性结合元件结合并除去它们而选择性除去 WBC，例如通过沉淀或通过特异性结合元件而将它们与固体支持物结合。或者，所述方法可包括利用固定有对 WBC 具有特异性的特异性结合元件的微粒除去白细胞(WBC)，采用基于密度的方法，例如菲可梯度离心除去所述血液样品中的红细胞(RBC)以富集稀有细胞。可以任一次序除去 WBC 和 RBC，或者可同时除去二者。

2) 根据所选癌症标记物的分子识别和标记，鉴定和表征获自血液样品的富集的含癌细胞样品中癌细胞的方法和组合物。

3) 诊断和监测癌症疾病或其治疗的方法，包括检测获自对象的血液样品中癌细胞的数量或比例或特性。

在某些实施方式中，靶细胞是癌细胞或间充质细胞，优选可通过本文所述的鉴定方法区分癌细胞或间充质细胞与样品中任何正常的上皮细胞。所述样品常是血液样品。应注意，这些方法包括富集可能存在或不存在的稀有细胞类型，而任何稀有细胞的存在与否、数量、比例或特性通常是诊断性的；因此，无论样品中是否发现稀有细胞所述方法均有用。本文通常将这些方法描述成好像靶细胞存在，但这些方法同样可用于检测靶细胞不存在。虽然本文所述的靶细胞分离和鉴定方法对感兴趣的靶细胞高度特异，但一些样品中的其它细胞也可能鉴定为目标样的；然而这些方法可用于诊断和其它目的，只要能测定所鉴定非靶细胞的数量或组分的有关信息，例如与不存在靶细胞的对象的样品相比。在一些实施方式中，其它表征方法可用于减少连同靶细胞一起检测的目标样细胞的数量。

在一些实施方式中，以一系列步骤富集样品中的靶细胞。该次序中的一步可以是选择性裂解步骤，其采用渗透压变化来选择性裂解某些类型的细胞，例如红细胞，而不裂解靶细胞。那样能除去至少一种类型的非靶细胞，因此富集了样品的其余细胞群中的靶细胞。

富集样品中的靶细胞通常包括通过将非目标类型的细胞粘附于固体表面来选择性除去至少一种非靶细胞类型。这可通过将选择性结合成员粘附于固体表面来实现，所述选择性结合成员对待除去的非目标细胞类型的亲和力高而对靶细胞类型的有效亲和力低或没有有效亲和力。然后将样品与粘附有选择性结

合成员的固体表面接触，因而除去了样品中的至少一种非靶细胞类型，从而富集了可能存在的靶细胞。

选择性结合成员往往是对细胞表面标记具有选择性的抗体或抗体片段，所述标记与非靶细胞有关并且估计在靶细胞上不存在。当靶细胞是非造血细胞时，这种标记的例子可以是在一种或多种类型造血细胞上产生的表面抗原。固体表面可以是放置样品的容器的表面，或要通过样品的刮板或其它物件的表面，或者可以是可与样品混合的细微分级材料，例如珠或凝胶。在各种情形中，样品与固体表面接触足够时间以使得要除去的非靶细胞类型与特异性结合元件结合；然后将样品与固体表面分开作进一步富集或分析。在一优选的实施方式中，固体表面是多个珠，例如磁珠，所述珠为粘附感兴趣的特异性结合元件提供高表面积，可有效地与样品混合从而使非靶细胞结合于特异性结合材料，并且便于与样品分离从而能除去非靶细胞。

可采用本文所述的方法、制品和组合物实现本发明的这些方面以及本文所述的其它方面。还应知道可组合本发明的各方面以获得本发明的优选实施方式。为完全理解本发明的范围，本文描述了某些非限制性实施例。

I. 采用消除红细胞和白细胞来富集流体样品的癌细胞的方法

本发明一方面包括通过除去生物学样品中的血浆蛋白质、RBC 和 WBC 来富集稀有细胞或靶细胞的方法和组合物，其通过联用密度离心和免疫颗粒方法除去非靶细胞并富集稀有细胞，例如循环肿瘤细胞、干细胞、胎儿细胞、免疫细胞和其它稀有细胞，其示范性步骤如下所示：a) 用抗体包被的免疫颗粒除去 WBC，b) 用密度方法除去 RBC，和 c) 对稀有细胞或靶细胞进行随后的分析、操作或应用。还可用密度方法除去诸如非细胞碎片和靶细胞的蛋白质等物质。

在一具体实施方式中，可采用本方法通过联用密度离心和免疫颗粒消除血浆蛋白质、RBC 和 WBC 来富集稀有样品中的稀有细胞，包括循环肿瘤细胞、干细胞、胎儿细胞、免疫细胞和其它稀有细胞。

在一些实施方式中，在含抗凝剂的任何合适试管中收集血液样品，所述抗凝剂还任选包括 EDTA、ACD、肝素、Cyto-chex 和用于稳定或保存血液样品的类似物质。

在一些实施方式中，采用密度离心方法除去至少一种类型的非靶细胞。这种密度离心分离的培养基可具有合适的浓度范围，从而能产生相同的密度和/或连续或不连续的梯度，应用多聚蔗糖(polysucrose)试剂，例如菲可，或任何其它试剂通过离心分离蛋白质和/或细胞。

在本发明的某些实施方式中，免疫颗粒可以是任何固相颗粒或微球，例如磁性颗粒、琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶和琼脂糖等颗粒，作为富集样品中感兴趣靶细胞类型的方法的一部分，这些颗粒可作化学修饰以偶联于抗体或任何其它特异性结合元件从而选择并结合要除去的非靶细胞类型。

富集的细胞和/或分离的血浆蛋白质和/或白细胞群可用于各种分析和应用，包括流式细胞术、PCR(例如，逆转录-PCR 和实时逆转录-PCR)、图像分析、免疫荧光、基因分型(genotyping)、基因分布检查、培养富集的稀有细胞、质谱法和其它细胞和/或蛋白质相关的永久、细胞治疗、细胞试验、酶试验等。

富集血液样品中肿瘤细胞的一个示范性方法概述如下：

用等体积的磷酸缓冲盐水(PBS)或汉克斯缓冲盐溶液或克分子渗透压浓度为 270-330 毫渗摩尔/公斤 (mOsm/kg)的任何缓冲液，或诸如细胞培养基等培养基稀释血液样品。将 0.1-0.5 ml 抗体包被的免疫颗粒加入稀释的血液，然后在室温下轻柔振荡 5 分钟或更长时间。随后将该混合物加载于分离培养基(例如，用上述缓冲液或培养基稀释至 80-98%范围的菲可)顶部，然后在室温下以 200-800 g 离心 5 分钟或更长时间。从顶部收集不同层的血浆、白细胞和菲可。以 800-1500 g 离心白细胞层或合并的所有层 5 分钟或更长时间。按照该方法制备含样品中可能存在的靶细胞的细胞沉淀物，重悬并作后续分析。

在一个实施方式中，本发明涉及检测血液样品中非造血癌细胞的方法，该方法包括：a) 提供血液样品；b) 采用基于密度的方法，例如菲可密度离心除去所述血液样品中的红细胞(RBC)，并采用基于微粒的方法除去所述血液样品中的白细胞(WBC)以富集所述血液样品中可能存在的的非造血细胞类型，例如非造血肿瘤细胞；和 c) 评估所述富集的非造血细胞或肿瘤细胞的存在与否和/或含量。本领域技术人员明白该方法同样可用于样品中碰巧不存在非靶细胞的情形，因为回收靶细胞十分有效从而不存在检测的靶细胞是诊断上有意义而有用的结果，就如同靶细胞的存在或数量可用于诊断一样。

可通过以下步骤实现一种可能的替换方法：

用等体积的磷酸缓冲盐水或汉克斯缓冲盐溶液或克分子渗透压浓度为270-330 mOsm/kg 的任何缓冲液，或诸如细胞培养基等培养基稀释血液样品，随后加载于密度分离培养基(例如，用上述缓冲液或培养基稀释至 80-98%范围的菲可)顶部，然后在方便的温度，例如室温下以 200-800 g 离心 5 分钟或更长时间。从顶部收集不同层的血浆、白细胞和菲可。将 0.1-0.5 ml 抗体包被的免疫颗粒加入白细胞层或合并的所有层，然后在室温下轻柔振荡 5 分钟或更长时间。通过磁体或以 200-800 g 离心 5 分钟或更长时间来分离含结合的 WBC 的免疫颗粒。以 800-1500 g 离心收集的上清液 5 分钟或更长时间。重悬该方法的细胞沉淀物并作后续分析。

本发明还提供检测血液样品中的非造血细胞，例如非造血癌细胞的方法和组合物。在一些实施方式中，本发明涉及检测血液样品中非造血癌细胞的方法，该方法包括：a) 提供血液样品；b) 除去所述血液样品中的红细胞(RBC)，前提是未通过离心，例如菲可梯度离心除去所述血液样品中的所述 RBC，并除去所述血液样品中的白细胞(WBC)以富集所述血液样品中可能存在的非造血细胞类型，例如非造血肿瘤细胞；和 c) 评估所述富集的非造血细胞或肿瘤细胞的存在与否和/或含量。

可采用本发明方法检测任何合适的样品中的癌细胞，常用于检测血液样品中或其它临床样品中的循环肿瘤细胞或癌细胞。例如，待测试的样品可以是全血样品或外周血样品。

可采用本发明方法检测血液样品中的任何合适非造血细胞，例如非造血癌细胞。例如，待检测的非造血细胞可以是癌性细胞或癌细胞。在一些实施方式中，该方法用于特异性鉴定癌性细胞或间充质细胞，并区分它们与可能存在的任何正常上皮细胞。

可通过任何合适的方法除去血液样品中的 RBC。例如，可通过沉淀、过滤、选择性裂解或与能特异性结合 RBC 的特异性结合元件结合、上述方法的组合或重复使用上述方法来除去 RBC。在一些优选实施方式中，通过常规方法裂解 RBC 将它们从血液样品中除去，例如将它们与已知能选择性裂解 RBC 而不裂解感兴趣的靶细胞的培养基或缓冲液接触。

可通过任何合适的方法除去 WBC。例如，可通过与特异性结合 WBC 但结合靶细胞明显较弱或不结合的特异性结合元件结合来除去 WBC。可利用任何合适的特异性结合元件。在一个具体实施方式中，所述特异性结合元件可以是特异性结合 WBC 表面上某组分的抗体。这种示范性抗体包括特异性结合 CD3、CDllb、CD14、CD17、CD31、CD34、CD45、CD50、CD53、CD63、CD69、CD81、CD84、CD102 或 CD166 的抗体。在一些实施方式中，抗体是特异性结合 CD50 的抗体。

用于除去 WBC 的特异性结合元件可用于溶液中，或者可结合于固体表面，例如颗粒。特异性结合元件可以直接或间接连接于固体表面。例如，特异性结合元件可通过另一结合配对，例如生物素-亲和素/链霉亲和素结合配对而间接连接于固体表面。特异性结合元件可结合于作或不作任何预先化学修饰和/或偶联于任何分子，例如不同结合配对的成员的固体表面。可利用任何合适的固体表面。例如，特异性结合元件可结合于磁性颗粒，采用磁场或作用力可除去血液样品中结合于该磁性颗粒的 RBC 和/或 WBC。

可以任何次序除去血液样品中的 RBC 和 WBC。例如，可先除去血液样品中的 RBC 再除去 WBC。在另一实例中，可先除去血液样品中的 WBC 再除去 RBC。在还有另一实例中，可同时除去血液样品中的 RBC 和 WBC。

为进一步富集待评估的肿瘤细胞，本发明方法还可包括除去除 RBC 和 WBC 以外的组分。例如，本发明方法可包括除去血液样品中的血小板、干细胞、基质细胞、内皮细胞或可溶性蛋白。可在不同的步骤或同一步骤中除去 RBC 和 WBC 以及除去其它不需要的组分。作出这种除去的方法包括下述那些方法以及本领域技术人员已知的其它方法。

下文概述了富集血液样品中的肿瘤细胞的合适方法：

将室温下最多保存 7 天，优选最多 3 天的 10 mL 血液样品转移至 50 mL 离心管中，用 5 mM EDTA、汉克斯平衡盐溶液 (HBSS)配制的 1% BSA 和 PBS 构成的溶液将体积调节至 30 mL。室温下以 1400 rpm 离心样品 5 分钟。弃去 23 mL 上清液，通过轻柔振荡完全重悬沉淀物。加入 RBC 裂解缓冲液(该缓冲液的一升 10x 储备液可用 NH_4Cl - 82.9g (西格玛公司(Sigma)，目录号 A-0171)、KHCO3 – 10 g (西格玛公司，目录号 237205-500g)、EDTA – 2 ml 0.5M EDTA

(分子探针公司(Molecular Probes)，目录号 15575- 020)制备，pH 7.2，真空过滤)(22 mL)，样品在室温下旋转温育约 8 分钟。红细胞裂解后，室温下以 1400 rpm 离心样品 5 分钟。吸出上清液而不打散剩下的细胞沉淀物。将细胞沉淀物完全重悬在含 5 mM EDTA、HBSS 配制的 1% BSA 和 PBS 的 45 mL 溶液中。室温下以 1400 rpm 离心样品 5 分钟；弃去上清液，将细胞重悬在含 5 mM EDTA、HBSS 配制的 1% BSA 和 PBS 的 0.3 mL 溶液中。将细胞悬液转移入 2 ml (U-形底)安瓿管，加入 0.8 mL 磁珠浆液。这些珠包被有能识别 CD50 抗原的抗体。室温下通过轻柔旋转来温育细胞/珠悬液 5-60 分钟。温育后，室温下将试管打开铅帽(lead cap)置于磁力实验台(magnetic stand)上 1 分钟，从而使得这些珠和吸附于这些珠的非癌细胞朝面向磁体的试管壁迁移。将该溶液小心转移至 1.7 mL 安瓿管(V-形底)。以 10,000 rpm 离心含肿瘤细胞的富集样品 1 分钟。弃去上清液后，将这些细胞重悬在 40 μL PBS 缓冲液中。

在上述方法的改变形式中，通过以下方法除去非癌细胞：

裂解红细胞后，室温下以 1400 rpm 离心样品 5 分钟。吸出上清液，剩下细胞沉淀物。将细胞沉淀物完全重悬在含 5 mM EDTA、HBSS 配制的 1% BSA 和 PBS 的 45 mL 溶液中。室温下以 1400 rpm 离心样品 5 分钟；弃去上清液，将细胞重悬在含 5 mM EDTA、HBSS 配制的 1% BSA 和 PBS 的 0.3 mL 溶液中。将细胞悬液转移入 2 ml (U-形底)安瓿管，加入 0.8 mL 磁珠浆液。这些珠包被有能识别 CD50 和任选识别 CD34 和 CD31 及 CD235a 抗原的抗体。室温下通过轻柔旋转来温育细胞/珠悬液 5-60 分钟。温育后，室温下将试管打开铅帽置于磁力实验台上 1 分钟，从而使得这些珠和吸附于这些珠的造血细胞朝面向磁体的试管壁迁移。将该溶液小心转移至 1.7 mL 安瓿管(V-形底)。以 10,000 rpm 离心富集样品 1 分钟。弃去上清液后，将这些细胞重悬在 40 μL PBS 缓冲液中。

当然，还可将特异性结合样品中可能存在的非靶细胞的其它抗体固定于表面或珠，类似地使用以除去非靶细胞并进一步富集样品。

为进一步富集待评估的肿瘤细胞，本发明方法可包括压实血液样品。可采用任何合适的压实方法。例如，压实步骤可包括过滤步骤、离心步骤或选择性沉淀步骤。可在除去 RBC 之前或之后纳入该步骤，例如，该方法可视需要纳入多个这样的步骤。

在本发明一优选实施方式中，可通过自动仪器富集血液样品中的非造血癌细胞。通过避免离心作为压实样品的方式可最有效地进行生物学样品和流体的自动操作，虽然离心也可整合入自动过程。

在本发明的一个实施方式中，利用如图1所述的“弗氏细胞压碎器”装置压实样品。该方法尤其适用于加工多个样品的自动系统，因为该压实方法尤其适用于自动化。“弗氏压碎器”装置由小室(图1中的1)、至少一个滤器(图1中的2)、活塞(图1中的3)和进出器件(图1中的4和5)及控制液流的阀门构成，在本发明一优选实施方式中，所述小室是圆柱形。所述滤器含有至少一个孔隙，优选多个孔隙。所述孔隙可以是任何形状和任何尺寸及截面形状。例如，孔隙可以是四边形、长方形、椭圆形或环形，或者是其它几何或非几何形状。孔隙的直径(或最宽的尺寸)可以是约0.1微米至约100微米，优选约0.2至约5微米或约1-小于10微米。

在一优选的实施方式中，孔隙在机械加工滤器时制成，微蚀刻入或钻入滤器材料中，所述材料包括流体不可渗透的硬材料，例如玻璃、硅、陶瓷、金属或硬塑料，例如丙烯酸、聚碳酸酯或聚酰亚胺。滤器还可能利用硬固体支持物支持的相对不硬的表面。本发明的另一方面是通过诸多方法修饰材料，例如但不限于将材料作化学或热修饰成二氧化硅、氮化硅、塑料或聚合物。然而，滤器优选包含硬材料，该材料基本上不会因产生通过滤器的液流所用的压力而变形。

在本发明中用于过滤的滤器优选微制造或微机械加工的滤器，从而滤器内的孔隙可获得相对精确和均匀的尺寸。与用诸如尼龙、聚碳酸酯、聚酯、混合纤维素酯、聚四氟乙烯、聚醚砜等材料制成的传统膜滤器相比，这种精确和均匀的孔隙尺寸是本发明微制造或微机械加工滤器的明显优点。在本发明的滤器中，各孔隙是分离的，具有相似或几乎相同的特征大小并在滤器上呈图案化。这种滤器能根据颗粒的大小和其它特性精确地分离它们。

包含孔隙的基材的区域决定了滤器的过滤区域。本发明的微制造滤器的过滤区域可以在约0.01 mm^2和约0.1 m^2之间。过滤区域优选在约0.25 mm^2和约25 cm^2之间，更优选在约0.5 mm^2和约10 cm^2之间。过滤区域的差异使得本发明滤器能加工体积约100微升到约10升的样品。孔隙所包括的过滤区域的百

分比可以是约 1%至约 70%，优选约 10%至约 50%，更优选约 15 至约 40%。本发明的微制造滤器的过滤区域可包含任何数量的孔隙，优选包含至少两个孔隙，但本发明滤器的过滤区域中孔隙的数量更优选约 4 至约 1,000,000，甚至更优选约 100 至约 250,000。过滤区域中滤器的厚度可以是约 10 至约 100 微米，但优选在约 40 至约 500 微米之间。

本发明的微制造滤器具有可通过滤器基材本身蚀刻的孔隙。可采用微制造或微机械加工技术在基材上制成滤器的孔或开口，所述基材包括但不限于硅、二氧化硅、陶瓷、玻璃、聚合物，例如聚酰亚胺、聚酰胺等。可采用各种制造方法，例如显微平版印刷术和微制造领域技术人员已知的(参见，例如 Rai-Choudhury P. (编)，HANDBOOK OF MICROLITHOGRAPHY, MICROMACHINING AND MICROFABRICATION(显微平版印刷术、微机械加工和微制造手册)，第 2 卷：Micromachining and microfabrication.(微机械加工和微制造) SPIE 光学工程出版社(SPIE Optical Engineering Press)，贝灵汉(Bellingham)，华盛顿州，美国(1997))。许多情形涉及标准微制造和微机械加工方法和方案。合适制造方法的一个实例是包括一个或多个光掩模的照相平板印刷术。微制造的方案可包括许多基础步骤，例如，照相平板印刷术掩模产生、光致抗蚀剂沉积、“牺牲”材料层沉积、用掩模和显影剂使光致抗蚀剂图案化、或“牺牲”材料层图案化。可在某些遮蔽方法下通过蚀刻入基材来制作孔隙，因而被遮蔽的区域不遭蚀刻而未被掩模保护的区域遭蚀刻。蚀刻方法可以是干蚀刻，例如深 RIE(反应离子蚀刻)、激光烧蚀，或者可以是包括利用湿化学物质的湿蚀刻。

优选合适的微制造或微机械加工技术以获得过滤孔隙的所需长宽比。长宽比指孔隙深度(对应于孔隙区域中滤器的厚度)与孔隙直径之比。制造长宽比较高(即，孔隙宽度较大)的滤器孔隙可包括深蚀刻方法。可采用制造 MEMS(微电子机械系统)装置所用的许多制造方法，例如深 RIE 制备微制造滤器。长宽比高和该蚀刻方法会导致得到的孔隙略微变细，因而它们在滤器一侧的开口比另一侧狭窄。

本发明包括含有两个或更多个变细孔隙的微制造滤器。在其上制造或机械加工出滤器孔隙、缝隙或开口的基材可以是硅、二氧化硅、塑料、玻璃、陶瓷或其它固体材料。固体材料可以是多孔或无孔的。微制造和微机械加工制造的

技术人员不难选择和决定用于制造具体滤器几何构型的制造方法和材料。

采用微制造或微机械加工方法，制备的滤器缝隙、孔隙或开口可具有精确的几何构型和基本上相似的大小。根据所用的制造方法或材料，滤器缝隙的单一尺寸(例如缝隙长度、缝隙宽度)的精确性可以在20%之内，或小于10%或小于5%。因此，对于本发明滤器，所制备滤器孔隙的关键性单一尺寸(例如，长方形或四边形缝隙的缝隙宽度)的精确性的大小差异优选小于 2 微米、更优选小于1微米，或者甚至更优选小于0.5微米。

优选采用径迹蚀刻技术制备本发明的滤器，其中由玻璃、硅、二氧化硅或聚合物，例如聚碳酸酯或聚酯制成并具有不连续孔隙的滤器的孔隙大小较均匀。例如，可通过改进和将**whatman.com/products/nucleopore/tech frame.htm**所述用于核孔径迹蚀刻膜(Nucleopore Track-etch membrane)的径迹蚀刻技术应用于滤器基材来制备滤器。在用于制备膜滤器的技术中，用高能重离子追踪聚合物薄膜以在薄膜上产生潜在的轨道。然后将该薄膜置于蚀刻剂中以产生孔隙，所述蚀刻剂常是苛性溶液，但可以是本领域已知的其它蚀刻剂。

本发明细胞分离方法和系统的优选滤器包括微制造或微机械加工滤器，所制备的这些滤器上开口的几何构型精确。各开口不连续，具有相似或几乎相同的特征大小并在滤器上图案化。开口可以是不同形状，例如环形、四边形或椭圆形。这些滤器能根据颗粒的大小和其它特性精确分离它们。

在微制造滤器的优选实施方式中，各孔隙不连续而且是圆柱形，即，它们在平行于滤器平面的截面中基本上是环形的，而在垂直于滤器的另一方向的截面中基本上是矩形的，滤器中孔隙大小的差异通常在20%之内，所述孔隙大小可以通过孔隙截面的最小和最大尺寸(分别是宽度和长度)计算。

本发明还包括处理微制造的滤器以改进其过滤效率的方法。在这些方法中，处理或包被或修饰滤器的一个或两个表面以增加其过滤效率。在优选的方法中，处理或修饰滤器的一个或两个表面以降低样品组分(例如但不限于细胞)与滤器的相互作用或粘附于滤器的可能性。

可以物理或化学处理滤器，例如以改变其表面特性(例如，疏水性、亲水性)。例如，可加热或用氧等离子处理滤器，处理成氮化硅或可用至少一种酸或至少一种碱处理以增加其疏水性或表面电荷。例如，可以加热玻璃或二氧化

硅滤器以氧化滤器的表面。加热时间和温度可因滤器材料和所需氧化程度而有所不同。在一个实例中，可将玻璃滤器加热至约 200-1000℃的温度，持续约 30 分钟-24 小时。

在另一实例中，可用一种或多种酸或一种或多种碱处理滤器以增加该滤器表面的亲水性。在优选的实施方式中，用至少一种酸处理包含玻璃或二氧化硅的滤器。

用于处理本发明滤器的酸可以是任何酸。酸的非限制性例子可以是 HCl、H_2SO_4、$NaHSO_4$、HSO_4、HNO_3、HF、H_3PO_4、HBr、HCOOH 或 CH_3COOH。酸的浓度可以是约 0.1 N 或更高，优选浓度约 0.5 N 或更高，更优选浓度高于约 1 N。例如，酸的浓度优选约 1 N 到约 10 N。温育时间可以从 1 分钟到数天，但优选从约 5 分钟到约 2 小时。

可凭经验确定处理微制造的滤器的最佳浓度和温育时间以增加其亲水性。微制造的滤器置于酸溶液中的时间可以是任何长度，优选 1 分钟以上，更优选约 5 分钟以上。可在任何非冷冻和非煮沸温度下进行酸处理，优选大于或等于室温的温度。

或者，可用碱，例如碱溶液处理本发明的微制造滤器，所述溶液可包含但不限于 NaOH、KOH、$Ba(OH)_2$、LiOH、CsOH 或 $Ca(OH)_2$。碱溶液的浓度可以是约 0.01 N 或更高，优选浓度高于约 0.05 N，更优选浓度高于约 0.1 N。离子迁移检测装置可置于碱溶液中任何长度的时间，优选 1 分钟以上，更优选约 5 分钟以上。可在任何非冷冻和非煮沸温度下进行碱处理，优选大于或等于室温的温度。

可通过检测置于处理和未处理滤器表面的水滴的扩散情况来检验物理或化学处理在增加滤器表面亲水性中的效力，其中体积统一的水滴扩散增加表明表面的亲水性增加。还可通过将处理的滤器与细胞或生物学样品温育来测定样品组分与处理的滤器的粘附程度来检验滤器处理的效率。

在另一实施方式中，可以化学处理滤器，例如但不限于聚合滤器的表面，从而能改变该滤器的表面特性。例如，可通过各种化学处理加入能降低样品组分与滤器表面相互作用的化学基团，从而使玻璃、二氧化硅或聚合滤器的表面衍生化。

还可将一种或多种化合物吸附到或偶联于用任何合适的材料，例如一种或多种金属、一种或多种陶瓷、一种或多种聚合物、玻璃、硅、二氧化硅或它们的组合微制造的滤器表面。在本发明的优选实施方式中，用化合物包被本发明的微制造滤器的一个或多个表面，从而通过降低样品组分与滤器表面的相互作用而增加过滤效率。

例如，可用分子，例如但不限于蛋白质、肽或聚合物，包括天然产生或合成的聚合物包被滤器表面。用于包被滤器的物质优选生物相容的，表示其对生物学样品中的细胞或其它组分，例如蛋白质、核酸等没有有害作用。白蛋白，例如牛血清白蛋白(BSA)是可用于包被本发明微制造滤器的蛋白质的例子。用于包被滤器的聚合物可以是不促使细胞粘附在滤器上的任何聚合物，例如非疏水性聚合物，例如但不限于聚乙二醇(PEG)、聚乙烯乙酸酯(PVA)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及纤维素或纤维素样衍生物。

可通过任何可行的方式，例如吸附或化学偶联，用化合物包被由，例如金属、陶瓷、聚合物、玻璃或二氧化硅制成的滤器。

在许多情形中，优选先处理滤器的表面再用化合物或聚合物包被。表面处理可增加涂层的稳定性和均匀性。例如，可先用至少一种酸或至少一种碱，或用可以任一次序应用的至少一种酸和至少一种碱处理滤器，再用化合物或聚合物包被该滤器。在本发明的优选方面，先用至少一种酸处理聚合物、玻璃或二氧化硅制成的滤器，随后在包被化合物的溶液中温育数分钟到数天的时间。例如，可将玻璃滤器在酸中温育，用水清洗，随后在 BSA、PEG 或 PVP 的溶液中温育。

在本发明的一些方面，优选在酸或碱处理或用氧化剂处理之前，最好还在用化合物或聚合物包被滤器之前，先用，例如水(例如，去离子水)或缓冲溶液清洗滤器。如果要对微制造的滤器进行多种类型的处理，还可在诸次处理之间进行清洗，例如在用氧化剂和酸处理之间，或在用酸和碱处理之间。可用水或 pH 在约 3.5 至约 10.5 之间，更优选在约 5 至约 9 之间的水溶液清洗滤器。用于清洗离子迁移检测装置的合适水溶液的非限制性例子包括盐溶液(该盐溶液的浓度可从微摩尔到 5 M 或更高)、生物学缓冲溶液、细胞培养基或它们的稀释液或组合。清洗的时间可以是任何长度，例如从数分钟到数小时。

用于包被滤器的化合物或聚合物溶液的浓度可以在约 0.02%-20%或更高的范围内变化，这部分取决于所用的化合物。在包被溶液中的温育时间可以从数分钟到数天，优选约 10 分钟到两小时。

包被后，可用水或缓冲液清洗滤器。

在本发明一优选实施方式中，滤器的直径是过滤小室直径的 50-99.9%。滤器边缘和过滤小室的内壁之间的空间由，例如与滤器的外缘相连的 O-形环或类似的密封元件占据。该 O-形环在滤器和过滤小室内壁之间提供紧密的密封以防止操作期间细胞绕过滤器。

在本发明中，可以借助与滤器相连的活塞所施加的正压或负压将该滤器置于过滤小室内不同的高度。

下文概述了利用包含弗氏细胞压碎器和本发明过滤小室的自动仪器压实生物学样品，例如含癌细胞的血液样品的方法：

将室温下最多保存4天的10 mL血液样品转移至50 mL离心管中，用5 mM EDTA、HBSS 配制的 1% BSA 和 PBS 构成的溶液将体积调节至 30 mL。导管将 30 mL 溶液样品自动转移至与过滤小室的入口相连的管线。将流体样品注入过滤小室后，关闭控制流体进入入口的阀门。将正压应用于降低滤器位置的活塞(图 1，B)。调节活塞上的正压以达到流体样品的过滤速度为 0.1-50 mL/分钟。降低滤器直至过滤小室中 80-95%的流体在滤器之上。低于滤器的溶液含有癌细胞和其它非癌细胞并构成压实的样品。

还可将本发明的表面处理方法应用于用来操作生物学样品的组件，例如除包含过滤用孔隙的那些组件以外的芯片。例如，可采用本发明方法物理或化学处理包含金属、陶瓷、一种或多种聚合物、硅、二氧化硅或玻璃的芯片。可在，例如分离、检测或分析生物学物质，例如细胞的分离、分析和检测装置中利用这种芯片。依据所用的处理、所操作细胞的特性和操作的性质，处理芯片可增强或降低细胞与芯片表面的相互作用。例如，用亲水性聚合物包被芯片(例如但不限于用 PVP 或 PVA 包被芯片)可降低和尽可能降低该芯片表面与细胞的相互作用。

在本发明的一些优选实施方式中，可借助主动力芯片(active force chip)检测、分析或操作从富集过程获得的细胞。

在一些优选的实施方式中，可通过构建在芯片上的电极产生行波介电电泳力，可用该作用力使细胞向不同区室运动。2000 年 10 月 4 日提交的名为“Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof”(含多个主动力产生元件的设备及其应用)的美国申请号 09/679,024，该申请通过引用全文纳入本文。

图 1 所示过滤装置遇到的问题之一是样品中的细胞可能随着滤器向前进入样品而进入或甚至堵塞滤器中的孔。这可导致细胞丧失或破坏，或者阻塞滤器。本发明的一方面通过提供将细胞推离滤器表面的装置解决了该问题。以下讨论和参考文献提供设计和利用电极的梗概，从而能利用斥力将样品组分，例如不可过滤的细胞转移离开滤器以便过滤。

介电电泳指极化颗粒在不均匀 AC 电场中的运动。当颗粒置于电场中时，如果该颗粒和其周围介质的介电特性不同，该颗粒可经历介电极化。因此，在颗粒/介质界面诱导了电荷。如果所施加的电场是不均匀的，则不均匀电场与所诱导的极化电荷之间的相互作用可产生作用于颗粒的净作用力，从而使得颗粒向场强强或弱的区域运动。作用于颗粒上的净作用力称为介电作用力，而颗粒运动即是介电电泳。介电电泳力取决于颗粒、颗粒周围的介质的介电特性，所施加电场的频率和场分布。

行波介电电泳与介电电泳类似，其中行进电场与场诱导极化相互作用并产生作用于颗粒的电作用力。颗粒被迫沿或逆行进场的方向运动。行波介电电泳力取决于颗粒和它们的悬浮介质的介电特性，行进场的频率和振幅。介电电泳和行波介电电泳的原理以及利用介电电泳来操作和加工微粒见各种出版物(例如，“Non-uniform Spatial Distributions of Both the Magnitude and Phase of AC Electric Fields determine Dielectrophoretic Forces(AC 电场的振幅和相位的不均匀空间分布决定介电电泳力)”，Wang 等，刊于 *Biochim Biophys Acta* 第 1243 卷，1995，第 185-194 页，“Dielectrophoretic Manipulation of Particles(颗粒的介电电泳操作)”，Wang 等，刊于 IEEE Transaction on Industry Applications，第 33 卷，第 3 号，5 月/6 月，1997，第 660-669 页，“Electrokinetic behavior of colloidal particles in traveling electric fields: studies using yeast cells(胶体颗粒在行进电场中的动电特性：利用酵母菌细胞作的研究)”，Huang 等，刊于 J. Phys.

D: Appl. Phys.，第 26 卷，第 1528-1535 页，“Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and traveling waves(利用小型化电场阱和行波定位和操作细胞和微粒)”，Fuhr 等，刊于 Sensors and Materials. 第 7 卷：第 131-146 页，“Dielectrophoretic manipulation of cells using spiral electrodes(利用螺旋电极介电电泳操作细胞)”，Wang，X-B 等，刊于 *Biophys. J.* 第 72 卷，第 1887-1899 页，1997，“Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity(通过不同的介电亲和力分离血液中的人乳腺癌细胞)”，Becker 等，刊于 Proc. Natl. Acad. Sci.，第 92 卷，1995 年 1 月，第 860-864 页)。

利用介电电泳和行波介电电泳操作微粒包括浓缩/聚集、捕获、排斥、线性或其它方向的运动、悬浮、分离颗粒。颗粒可以聚集、富集和捕获在电极反应小室的特定区域中。可依据微观水平将颗粒分成不同的亚群。就本发明的过滤方法而言，颗粒可移动一定距离。特定颗粒操作所需的电场分布取决于微电极结构的尺寸和几何构型，并可用介电电泳原理和电场刺激方法设计。

作用于经受不均匀电场且半径为 r 的颗粒的介电电泳力 F_{DEP_z} 可如下式所示：

$$F_{DEP_z} = 2\pi\varepsilon_m r^3 \chi_{DEP} \nabla E_{rms}^2 \cdot \vec{a}_z$$

其中 E_{rms} 是场强的 RMS 值，ε_m 是介质的介电电容。χ_{DEP} 是下式所示的颗粒介电极化因子或介电电泳极化因子：

$$\chi_{DEP} = \mathrm{Re}\left(\frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}\right)$$

“Re”指“复数”的实数部分。符号 $\varepsilon_x^* = \varepsilon_x - j\dfrac{\sigma_x}{2\pi f}$ 是复数电容(complex permitivity) (对于颗粒，x = p，对于介质 x = m)。参数 ε_p 和 σ_p 分别是颗粒的有效电容和电导率。这些参数依赖于频率。例如，至少因为细胞质膜极化，典型的生物学细胞具有频率依赖性、有效电导率和电容。

介电电泳力的以上方程也可写作：

$$F_{DEP_z} = 2\pi\varepsilon_m r^3 \chi_{DEP}\, \mathrm{V}^2\, \mathrm{p(z)}\, \vec{a}_z$$

其中 p(z)是电极上单位电压激发(V = 1 V)的正方形场分布，V 是施加的电压。

介电电泳通常有两种类型，即正介电电泳和负介电电泳。在正介电电泳中，介电电泳力使得颗粒向强场区域运动。在负介电电泳中，介电电泳力使得颗粒向弱场区域运动。颗粒显示正还是负介电电泳取决于颗粒的可极化性比周围介质高还是低。在本发明的过滤方法中，可将过滤小室的一个或多个滤器上的电极图案设计成能导致样品组分，例如细胞显示负介电电泳，从而使得样品组分，例如细胞被推离滤器表面上的电极。

行波 DEP 作用力指行波电场在颗粒或分子上产生的作用力。行波电场的特征在于 AC 电场成分的相位值不均匀分布。

在本文中，我们分析了理想的行-波场的行-波 DEP 作用力。

作用于经受行-波电场 $E_{TWD} = E\cos\left(2\pi(ft - z/\lambda_0)\right)\vec{a}_x$ (即，x-方向场沿 z-方向行进)且半径为 r 的颗粒的介电电泳力 F_{DEP} 可如下式所示：

$$F_{TWD} = -2\pi\varepsilon_m r^3 \zeta_{TWD} E^2 \cdot \vec{a}_z$$

其中 E 是场强的幅度，ε_m 是介质的介电电容。ζ_{TWD} 是如下式所示的颗粒极化因子：

$$\zeta_{TWD} = \mathrm{Im}\left(\frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}\right)$$

“Im”指“复数”的虚数部分。符号 $\varepsilon_x^* = \varepsilon_x - j\frac{\sigma_x}{2\pi f}$ 是复数电容 (对于颗粒，x = p，对于介质 x = m)。参数 ε_p 和 σ_p 分别是颗粒的有效电容和电导率。这些参数依赖于频率。

介电特性(如电容和电导率所限定的)不同的颗粒，例如生物学细胞会经受不同的介电电泳力。对于颗粒(包括生物学细胞)的行-波 DEP 操作，作用于直径 10 微米的颗粒的行-波 DEP 作用力可在 0.01-10000 pN 之间变化。

可通过给适当安排在芯片上的微电极施加合适的 AC 信号来产生行波电场。为产生行-波-电场，需要施加各具不同相位值的至少 3 种类型的电信号。产生行波电场的一个例子是利用 4 相位正交信号(0、90、180 和 270 度)以激发在芯片表面图案化的 4 个线性平行电极。该 4 个电极构成进出重复单位。根据应用，可以有彼此相邻的两个以上这样的单位。从而能在电极之上或附近的空间产生行进的电场。只要电极元件按照一定的空间顺序排列，应用相序信号(phase-sequenced signal)可在接近电极的区域中产生行进电场。

作用于颗粒的介电电泳和行-波介电电泳力不仅依赖于场分布(例如，电场成分的振幅、频率和相位分布；调节场的振幅和/或频率)，还依赖于颗粒和悬浮或安置颗粒的介质的介电特性。对于介电电泳，如果颗粒比介质更可极化(例如，依据所施加的频率，具有较大的电导率和/或电容)，颗粒可经受正介电电泳力并向强场区域运动。不如介质可极化的颗粒可经受负介电电泳力并向弱场区域运动。对于行波介电电泳，颗粒可经受介电电泳力，从而以与场行进方向相同或相逆的方向驱动它们，这取决于极化因子ζ_{TWD}。以下论文提供介电电泳和行-波-介电电泳的基础理论和实践：Huang 等，*J. Phys. D: Appl. Phys.* 26:1528-1535 (1993)；Wang 等，*Biochim. Biophys. Acta.* 1243:185-194 (1995)；Wang 等，*IEEE Trans. Ind. Appl.* 33:660-669 (1997)。

因此，用于本文所述方法的滤器优选包括一个或多个电极，例如上述图案化电极。所述一个或多个电极可以在用于压缩的滤器表面上，如图 1 所述；通常，一个或多个电极可以置于面对待压实样品的滤器表面上，这些电极可以在滤器进入样品之前，任选在该期间打开。然而，一个或多个电极还可包含在构建滤器所用的材料内或在背离样品的过滤材料的表面上，只要这些电极对待压实的样品中的细胞产生足够介电电泳力，从而将至少一些细胞，优选包括靶细胞推离滤器。因此，这些电极将细胞推离滤器表面并能更有效地过滤，而且不大可能导致靶细胞的破坏或丧失。

当然，根据待富集样品的体积和性质以及待富集和待除去的细胞的类型，本领域技术人员知道可组合使用上述富集方法。可通过额外的正选择步骤进一步纯化本发明所述富集方法结束时获得的靶细胞和样品中存在的其它非靶细胞，或者可以在进一步富集前表征它们。

在本发明的许多实施方式中，分离的靶细胞是完整、存活的细胞，可培养这些细胞作进一步表征和使用。在本发明的一个优选实施方式中，从癌症患者血液样品中富集后，在人工营养物中培养通过富集方法，如本文所述那些方法获得的癌细胞。这样用户通过，例如观察特定细胞如何与提出的各种治疗方法反应，从而根据所针对的具体细胞鉴定优选治疗方法，或以其它方式利用富集的癌细胞，例如筛选候选药物以测定它们可能治疗哪种类型癌症。

下文概述了培养获自血液样品的肿瘤细胞的方法。将室温下最多保存 4

天的 10 mL 血液样品转移至 50 mL 离心管中，用 5 mM EDTA、HBSS 配制的 1% BSA 和 PBS 构成的溶液或 HBSS 将体积调节至 30 mL。室温下以 1400 rpm 离心样品 5 分钟。弃去 23 mL 上清液，通过轻柔振荡完全重悬上清液。进入 RBC 裂解缓冲液(22 mL)，室温下旋转温育样品约 8 分钟。红细胞裂解后，室温下以 1400 rpm 离心样品 5 分钟。吸出上清液而不打散剩下的细胞沉淀物。将细胞沉淀物完全重悬在含 5 mM EDTA、HBSS 配制的 1% BSA 和 PBS 的 45 mL 溶液中。室温下以 1400 rpm 再次离心样品 5 分钟；弃去上清液，将细胞重悬在含 5 mM EDTA、HBSS 配制的 1% BSA 和 PBS 的 0.3 mL 溶液中。将细胞悬液转移入 2 ml (U-形底)安瓿管，加入 0.8 mL AVIVA 珠浆液。这些珠包被有能识别 CD50 抗原的抗体。室温下通过轻柔旋转来温育细胞/珠悬液 20 分钟。温育后，室温下将试管打开铅帽置于磁力实验台上 1 分钟，从而使得这些珠和吸附于这些珠的非癌细胞朝面向磁体的试管壁迁移。将该溶液小心转移至 1.7 mL 安瓿管(V-形底)。以 10,000 rpm 离心富集的细胞 1 分钟。弃去上清液后，将这些细胞重悬在含有 RPMI-1640 和 DMEM-高葡萄糖的 0.5 mL 生长培养基中。然后将细胞悬液转移至微量滴定板或人工生长基质，37℃和 5%CO_2下温育以使细胞生长。在本发明的一些优选实施方式中，经培养的分离自癌症患者的癌细胞用作检验药物的抗癌症活性的底物。这样用户能鉴定特定癌症的合适化疗方法。检验药物对癌症患者癌细胞的抗癌症活性的方法概述如下：

将采用本发明方法从癌症患者分离的一个或多个癌细胞等份加入微量滴定板中的多个不同隔室。将细胞培养约 1 小时到 50 天，优选 124-336 小时。培养期后，将一种具体的抗癌症候选物(可能是一种药物或药物的混合物)加入含癌细胞的各隔室，至少一个隔室含有不含药物的对照溶液。在有一种或多种抗-癌症候选物存在下培养细胞约 1 小时-5 天的适当时间。对一种或多种抗癌症候选物诱导细胞改变的能力评分，这些改变的形式可以是：凋亡、坏死、细胞毒性、干性(stemness)降低、细胞死亡、抑制细胞生长和/或抑制癌细胞分裂。

本领域技术人员明白可用这些培养的癌细胞或从癌症患者实际分离的细胞检验几种浓度的抗癌症候选物，以提供给予患者的药物剂量的指导。

II. 检测从血液样品获得的癌细胞的方法

一旦富集了样品的非造血靶细胞类型，可通过许多方法评估样品中富集的靶细胞，例如非造血癌细胞的存在与否和/或数量。在一个实例中，可通过标记富集的非造血细胞或肿瘤细胞并鉴定该标记的非造血细胞或肿瘤细胞来评估富集的非造血细胞或肿瘤细胞的存在与否和/或数量。可采用任何合适的方法标记富集的非造血细胞或肿瘤细胞，所述方法是例如免疫染色、DNA 含量检测、原位 PCR、原位杂交、荧光原位杂交(FISH)、通过能特异性结合富集的非造血细胞或肿瘤细胞并作标记的结合成员染色。可通过任何合适的方法鉴定和表征标记的非造血细胞肿瘤细胞，例如，显微分析和/或流式细胞术以及激光定量显微技术，例如激光扫描流式细胞术。在一具体实施方式中，标记靶细胞后，通过细胞计数，通常是采用一种或多种免疫染色方法鉴定和表征标记的非造血细胞或肿瘤细胞。

常用免疫标记方法，例如利用靶细胞表面存在标记的特异性抗体将荧光标记物连接于细胞来标记靶细胞。可将标记物连接于抗体，或者可将靶细胞的特异性第一抗体结合于该细胞，然后将作了标记的该第一抗体的特异性第二抗体结合与靶细胞结合的该第一抗体来标记该第一抗体。为明确鉴定靶细胞，可采用多种标记方法。例如，可采用第一标记方法标记细胞，从而将靶细胞鉴定为非造血细胞，用第二抗体标记细胞，从而将细胞鉴定为突变的细胞，或来源特定组织的细胞，等等。标记方法的组合可包括负和/或正标记方法，即特异性结合靶细胞的标记物可视作正标记方法，而特异性结合非靶细胞并可区分它们与靶细胞的标记物可视作负标记方法。因此，例如可采用两种或多种的一组标记方法标记存在的靶细胞和/或其它细胞以明显辨别靶细胞为癌细胞。

本发明的关键方面是选择多种特异性增强的抗原，其可用作选择性靶细胞标记物并能鉴定靶细胞，例如癌细胞，特别是能区分，例如血液样品中的癌细胞与循环的非癌性上皮细胞。在本发明中，可利用两种或多种以下标记物的组合来区分从癌症患者血液样品富集的癌细胞与非致瘤性细胞背景：ACPP、AFP、白蛋白、ALCAM、AMAS、ARF6、ARMCX3、ATP1A1、BAG1、BJ-TSA-9、blc-2 βHCG、CA125、CA15-3、CA19-9、组织蛋白酶 B1、CD44、CD44v6、CD56、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD147、CDH2、CDK4I、CDKN2A、CDX2、CEA、CLDN3、CLDN4、CLDN5、c-met、CST3、

细胞角蛋白、CK18、CK19、CK20、代司莫普拉肯-3、EAG1、EGFR、EGP2、EMA、ErbB2、ESR1、FAK、FOXA2、GalNac-T、GCTFTI5、GFAP、触珠蛋白-α、HCA、hCASK、HE4、HEPA1、hERG、HIP-1、HMB45、HSPA2、IGFR、IVL、KCNK-9、KHDRBS3、Ki67、Kv1.3、LAMB2、路易斯Y抗原、LIMA、LMO6、LUNX、MAGE-3、MAGE-A3、乳腺球蛋白、乳腺丝抑蛋白、梅兰-A、MITF、MPP5、MPST、MUC-1、MUC5AC、NCAM-1、NSDHL、Oct4、OTC、p53、p97、p1B、PCNA、PGR、PMSA、PS-2、PSA、RPS6KA5、S100、S100A1、S100A2、S100B、SLC2A1、平滑肌蛋白、SP-1、SPARC、表面活性物质、端粒酶、TFAP2A、TITF1 (TTF1)、TFF2、TRAIL、TRIM28、TRPM-8、TYR、酪氨酸酶、TYRP1、泛素硫酯酶、VEGF、WT1、X-蛋白、ZNF165。在利用多种特异性结合元件的实施方式中，各结合成员可不携带标记、或携带相同或不同的标记。利用两种或多种所述标记物的合适组合可区分癌性细胞与正常的上皮细胞，可靠性至少有50%，可靠性优选至少约70%。在某些实施方式中，至少80%的时间标记物的组合能区分癌细胞与正常上皮细胞，从而提供合适的特异性以增强这些方法的诊断价值。

本发明的癌细胞富集方法可提供存在癌细胞和非癌细胞混合物的样品。常通过标记所述癌细胞来最终而明确地鉴定癌细胞，包括总癌细胞计数、鉴定细胞的组织来源和/或细胞的基因型表征。可采用精通本领域的个人熟知的合适免疫染色方法特异性标记癌细胞。合适方法的例子可见如下所示染色细胞：

将富集细胞的样品转移至某表面并作空气干燥。可离心富集的样品以提供细胞沉淀物，然后将沉淀物转移至用于分析的合适表面，例如塑料或玻璃显微镜载玻片。然后用20 mL PBS清洗细胞5分钟，随后在室温下用PBS配制的2% PFA (低聚甲醛)固定40分钟。用PBS清洗3次后，通过在溶解于PBS中的0.1% Triton X-100中温育5分钟来透化处理细胞。然后用PBS清洗细胞3次，5分钟。室温下将细胞在含单克隆抗体的0.2% BSA-PBS中培育1小时，所述单克隆抗体针对选择列表中的一种或多种标记物并作1:50 – 1:100稀释。清洗3次(5分钟)后，室温下在0.2% BSA- PBS中将细胞与Alexa-标记的第二抗体避光温育1小时。用0.2% BSA和PBS清洗玻璃载玻片3次(总共10分钟)后，用苏木精染色细胞1分钟。随后用PBS清洗细胞1分

钟，更换 PBS 两次，并用固定培养基(10 μL)固定。

在本发明一实施方式中，富集方法后，通过结合成员，还任选通过与其核的直径、核的形状、全细胞的直径或细胞的细胞质部分与其核之比的相关具体形态学标准将癌细胞确定鉴定为标记的细胞，所述结合成员识别一种、或两种、或三种或更多种下列标记物。所述癌细胞标记物包括以下的一种或多种：ACPP、AFP、白蛋白、ALCAM、AMAS、ARF6、ARMCX3、ATP1A1、BAG1、BJ-TSA-9、blc-2 βHCG、CA125、CA15-3、CA19-9、组织蛋白酶 B1、CD44、CD44v6、CD56、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD147、CDH2、CDK4I、CDKN2A、CDX2、CEA、CLDN3、CLDN4、CLDN5、c-met、CST3、细胞角蛋白、CK18、CK19、CK20、代司莫普拉肯-3、EAG1、EGFR、EGP2、EMA、ErbB2、ESR1、FAK、FOXA2、GalNac-T、GCTFTI5、GFAP、触珠蛋白-α、HCA、hCASK、HE4、HEPA1、hERG、HIP-1、HMB45、HSPA2、IGFR、IVL、KCNK-9、KHDRBS3、Ki67、Kv1.3、LAMB2、路易斯 Y 抗原、LIMA、LMO6、LUNX、MAGE-3、MAGE-A3、乳腺球蛋白、乳腺丝抑蛋白、梅兰-A、MITF、MPP5、MPST、MUC-1、MUC5AC、NCAM-1、NSDHL、Oct4、OTC、p53、p97、p1B、PCNA、PGR、PMSA、PS-2、PSA、RPS6KA5、S100、S100A1、S100A2、S100B、SLC2A1、平滑肌蛋白、SP-1、SPARC、表面活性物质、端粒酶、TFAP2A、TITF1 (TTF1)、TFF2、TRAIL、TRIM28、TRPM-8、TYR、酪氨酸酶、TYRP1、泛素硫酯酶、VEGF、WT1、X-蛋白、ZNF165。除了以上标记物，用于进一步鉴定癌细胞的形态学标准包括以下标准：a) 细胞核的直径大于基本上预先测定的数值，b) 细胞质直径与核直径之比在 1.01 和 20 之间，c) 总细胞直径在 3 和 50 uM 之间。

正常细胞和癌细胞之间的一种重要差异是正常细胞只能分裂有限次数而癌细胞几乎可无限地持续分裂。正常细胞的衰老不是由年代时间而是由追踪细胞分裂次数的一类内部时钟决定。近年来累积的证据表明细胞追踪细胞分裂次数的一种方式是逐渐缩短染色体末端(端粒)，这是每次细胞分裂的副产物。端粒酶是能恢复端粒长度并能“重新设置”检测细胞年龄的生物学时钟的一种酶。在正常细胞中，然而，端粒酶的表达和活性极低，从而导致细胞在分裂有限次数后衰老。相反，在大多数癌症中，这些细胞表达显著量的端粒酶，而高水平

的端粒酶活性使这些细胞能维持其端粒长度恒定并终止检测老化的时钟。

在本发明的一方面，通过测定从癌症患者血液分离的癌细胞中端粒酶的表达水平和/或功能来检测所述癌细胞的存在或生长和转移潜能。先富集患者样品中的癌细胞，再检测端粒酶能显著改善试验的灵敏度。可根据正选择方法，例如 Griwatz 和 colleagues (Griwatz C.，Brandt B.，Assmann G.，Zanker K.S.，*Journal of Immunological Methods*，183 (1995) 251-265)所述的方法从患者样品，例如血液样品分离癌细胞。还可先采用本领域技术人员已知的其它富集方法分离患者样品的癌细胞，再检测端粒酶；或者可通过本文所述的方法富集含所述细胞的样品。通过例如本文所述等方法的富集可任选与正选择步骤联用。分离癌细胞或富集样品后，可采用端粒酶活性试验，例如端粒酶重复序列扩增方案(TRAP)或根据对端粒酶具有特定亲和力的抗体或其它配体，采用免疫检测方法检测蛋白质本身来检测癌细胞或富集的样品中的端粒酶。可利用样品中的端粒酶水平或其活性水平，或样品中端粒酶编码核酸的水平或这种核酸的表达水平可用于测定样品含有癌细胞的概率，或预测肿瘤的侵袭性或其转移的可能性，或测定血液样品中癌细胞的数量或比例。

在本发明一优选实施方式中，通过测定从癌症患者血液中分离的癌细胞的端粒酶的表达水平和/或功能来检测所述癌细胞的存在或生长和转移潜能。采用本发明所述消除方法从患者的样品中分离癌细胞。分离或富集癌细胞后，可采用端粒酶活性试验，例如端粒酶重复序列扩增方案(TRAP)或根据对端粒酶具有特定亲和力的抗体或其它配体的免疫检测方法检测样品中癌细胞中的端粒酶。样品中癌细胞中的端粒酶活性水平或端粒酶表达水平可以是肿瘤侵袭性或富集样品中癌细胞的数量或比例的指标。

糖蛋白 CD44 是最初在淋巴细胞和粒细胞中发现的细胞粘附分子，但其在体内普遍表达。许多癌症中 CD44，特别是剪接变体(CD44v)，例如 CD44v6、CD44v7、CD44v8、CD44v6-10 通常上调。

在本发明的另一实施方式中，通过测定从癌症患者血液中分离的癌细胞的一种或多种 CD44v 剪接变体的表达水平和/或功能来检测所述癌细胞的存在或生长和转移潜能。

可以评估一种或多种癌症标记物。在一个实例中，评估了一种癌细胞标记

物。在另一实例中，评估了多种癌细胞标记物。多种所述标记物可衍生自相同或不同细胞，例如同时检测不同细胞标记物，例如采用高通量试验。

在本发明的一个实施方式中，从血液样品中富集癌细胞后，通过用能识别一种或多种细胞角蛋白、CD44v6 或其它 CD44 剪接变体和端粒酶的单克隆抗体标记来鉴定癌细胞。

在另一实例中，可通过鉴定富集的非造血细胞或肿瘤细胞的核酸，例如 mRNA 来评估富集的非造血细胞或癌细胞的存在与否和/或数量。可采用任何合适的方法，特别是核酸聚合酶方法鉴定富集的细胞或非造血肿瘤细胞。例如，可通过 PCR 评估富集的非造血细胞或癌细胞的存在与否和/或数量。可采用任何合适的 PCR 方法。(参见，例如 Singleton 和 Sainbury，DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY(微生物学和分子生物学词典)，第三版，第 557-560 页)。在一个具体实施方式中，可采用单重(singleplexed)或多重 RT-PCR。在另一具体实施方式中，可采用 qRT-PCR 或实时 PCR。

除了细胞鉴定分析，可对富集的非造血癌细胞作额外的分析。可采用任何合适的方法。例如，额外的分析可采用 PCR、RNA-扩增、寡核苷酸连接试验(OLA)、激光切割显微术(LDM)、全基因组扩增 (WGA)、比较基因组杂交(CGH)、DNA 甲基化试验、微阵列分析、总 DNA 含量或它们的组合。在一具体实施方式中，额外的分析包括评估富集的非造血癌细胞的 DNA 甲基化。(Diala 等，*J. Natl. Cancer Inst.*，71(4):755-64 (1983)；Frost 等，*Cancer Metastasis. Rev.*，2(4):375-8 (1983)；和 Weber 等，*Nature Genetics*，37(8):853-62 (2005))。

可采用本发明检测血液样品中任何合适的非造血癌细胞。例如，可采用本发明方法检测血液样品中的实体瘤细胞。示范性肿瘤包括血管内皮瘤、胺前体摄取脱羧化细胞瘤、迷芽瘤、鳃原瘤、恶性类癌综合征、类癌心脏病、恶性肿瘤，例如，瓦克瘤、基底细胞(瘤)、基底鳞状细胞埃利希瘤、默克尔细胞(瘤)、粘液性(瘤)、非小细胞肺癌、燕麦形细胞(瘤)、乳头瘤、硬性肿瘤、支气管(瘤)、支气管原(瘤)、鳞状细胞和移行细胞网状内皮组织增殖、黑色素瘤、成软骨细胞瘤、软骨瘤、软骨肉瘤、纤维瘤、纤维肉瘤、肌肉瘤、巨细胞肿瘤、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、尤因肉瘤、滑膜瘤、腺纤维瘤、腺淋巴瘤、癌肉瘤、脊索瘤、间叶瘤、中肾瘤、肌肉瘤、牙骨质瘤、牙瘤、畸胎瘤、滋养层细胞瘤(throphoblastic tumor)、腺癌、腺瘤、胆管瘤、多发性血管瘤、胆脂瘤、非嗜铬神经节细胞瘤、圆柱瘤、囊腺癌、囊腺瘤、粒层细胞瘤、两性胚细胞瘤、肝癌、汗腺瘤、胰岛细胞瘤、莱迪希细胞瘤、乳头状瘤、睾丸支持细胞瘤、泡膜细胞瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、成肌细胞瘤、肌瘤、横纹肌瘤、横纹肌肉瘤、室管膜瘤、神经节瘤、胶质瘤、成神经管细胞瘤、脑[脊]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、神经节细胞瘤、血管角质瘤(antiokeratoma)、硬化血管瘤、血管球瘤、血管瘤、血管外皮细胞瘤、血管肉瘤、淋巴管瘤、淋巴管肌瘤、淋巴管肉瘤、松果体瘤、癌肉瘤、软骨肉瘤、成釉细胞瘤、叶状囊肉瘤、纤维肉瘤、布-皮二氏瘤、导管瘤、血管肉瘤、平滑肌肉瘤、白血病性肉瘤、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 (卡波西肉瘤和肥大细胞肉瘤)、赘生物 (例如，骨、消化系统、结肠直肠、肝、胰腺、垂体、睾丸、眼眶、头和颈、中枢神经系统、听觉系统、骨盆、呼吸道和泌尿生殖)、神经纤维瘤病和宫颈非典型增生。

实施例

实施例 1

富集和分析血液样品中的癌细胞

材料与方法

亲和纯化的抗-CD50 单克隆抗体获自加利福尼亚州圣迭戈市的阿维瓦系统生物公司(Aviva System Biology，San Diego，CA)。收集在抗凝剂 ACD 试管中的正常人血液由加利福尼亚州阿拉米达市先进生物科学资源公司(Advanced Biosciences Resource，Alameda，CA)提供。NHS 生物素和 DAPI 分别购自伊利诺斯罗克福德市皮尔斯公司(Pierce，Rockford，IL)和加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司(Invitrogen，Carlsbad，CA)。内部制作亲和素包被的磁珠。FITC-抗-CD31 和 PE-抗-CD50 mAb 来自安塞尔公司(Ancel.)。

通过 FACS 检查癌细胞系上 CD50 和 CD31 的表达

胰蛋白酶处理来自一系列细胞系，包括人乳腺癌 (MDA-435S)、人结肠癌 (DLD-1)、人前列腺癌 (PC-3)和人宫颈癌 (HeLa)的癌细胞，然后以 1300 rpm 离心 5 分钟。将细胞重悬在 1% BSA-PBS 中，等份加入聚苯乙烯 FACS 试管(猛禽公司(Falcon)，产品号 352054)，获得 1 × 10^6 个细胞/0.1 ml/试管。加入与 mAb，包括抗-CD50、抗-CD30 和对照抗体偶联的免疫荧光染料 (1 ug/试管)，然后在冰上温育 30 分钟。用 1% BSA-PBS 清洗细胞两次(1300 rpm，3 分钟)，然后在 PBS 配制的 2%低聚甲醛中固定，0.5 ml/试管。样品即可用于 FACS 分析。

抗-CD50 mAb 的生物素化

4℃用 PBS 缓冲液透析抗-CD50 mAb 过夜。对于用生物素标记抗体，4℃将 5-30 倍摩尔的过量生物素与 IgG 旋转温育过夜。采用 BCA 蛋白质测定试剂盒 (皮尔斯公司)定量测定偶联的生物素-IgG。

将生物素化 IgG 包被于亲和素-磁珠

利用磁力实验台，以 PBE(含 0.5% BSA 和 10 mM EDTA 的 PBS，pH 7.4)洗涤亲和素-磁珠 4 次，然后在 4℃与生物素标记的 IgG (5-150 ug 生物素-Ab/10^9 个珠)旋转温育 30 分钟。用 PBE 洗涤各珠 4 次以去除未偶联的生物素-IgG，以初始体积保存在 PBE 缓冲液中，获得 1×10^9 个珠/ml。

肿瘤细胞富集(负消除)

对于掺加两种细胞的所有细胞掺加研究，用溶解于培养基中的 DAPI 标记悬液中的肝癌细胞至少 24 小时。在显微镜下借助显微操作器(萨特仪器公司(Sutter Instruments))选出所需确切数量的标记细胞。对于掺加两种以上细胞的研究，固定细胞，透化处理并用 DAPI 标记，然后用血细胞计数器定量测定。通过将已知数量的细胞混合在 PBS 中，然后有限稀释，掺加入 50 ml 试管的 10 ml 人血液中，随后用 PBE 将体积调节至 45 ml 来评估所需数量的细胞。以 1400 rpm 离心血液样品 5 分钟。通过抽吸除去上清液。将 45 ml 红细胞缓冲液加入沉淀的细胞，随后在室温下旋转 8 分钟。以 1400 rpm 离心样品 5 分钟。用 45 ml PBE 清洗(1400 rpm，5 分钟)含 WBC 和稀有细胞的细胞沉淀物，重悬在 0.3 ml PBE 中。同时，利用磁力实验台清洗抗-CD50 珠 3 次，每次 1 ml，随

后重悬在 0.8 ml PBE 中。将上述重悬细胞与清洗的抗-CD50 珠混合，然后在室温下旋转温育 30 分钟。随后将样品试管置于磁力实验台中 1 分钟。将上清液完全转移入安瓿管，然后以 14,000 rpm 离心 1 分钟。抽吸上清液，将剩余的细胞重悬在 10 ul 计数培养基中，然后进行免疫荧光分析。

结果

检查人白细胞和癌细胞上的 CD31 和 CD50 表达

FACS 分析显示在包括淋巴细胞、单核细胞和粒细胞在内的人 WBC 上有强烈的阳性 CD50 染色(图 2)。然而，包括乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和宫颈癌在内的人癌细胞均呈 CD50 阴性染色(图 3)。正对照 Jurkat 细胞呈 CD50 阳性染色，负对照抗体(IgG1 和 IgG2b)对所有细胞呈阴性染色(图 3)。下表 1 和 2 也总结了这些结果，表明抗-CD50 抗体适用于专门从人血液中只除去 WBC。

表 1. 人淋巴细胞、单核细胞和粒细胞上的 CD50 染色

平均值	粒细胞	单核细胞	淋巴细胞
自身荧光	66.12	44.98	28.77
IgG2b	30.07	17.6	6.04
抗-CD50	5635.84	4911.88	1889.66

表 2. 人癌细胞上缺乏 CD50 染色

平均值	乳腺癌细胞	结肠癌细胞	前列腺癌细胞	宫颈癌细胞	Jurkat 细胞
自身荧光	3.9	3.98	4.07	3.28	2.59
IgG2b	7.23	10.34	10.35	5.1	3.87
抗-CD50	13.19	16.26	14.02	6.37	182.17

从人血液中回收掺加的癌细胞

借助本文所述负消除方法从人血液中分离不同数量的掺加癌细胞，包括 HeLa 细胞、前列腺癌细胞、肺癌细胞和乳腺癌细胞。对于 HeLa 细胞(图 4，黑色)，用 2、3、5、10 个细胞掺加入血液中，平均回收率分别是 88%、83%、86%、80%和 73%。以前列腺癌细胞为例(图 4，灰色)，当加入 2 或 10 个细胞，平均回收率分别是 100%和 82%。对于肺癌细胞，当将 2 或 10 个细胞掺加入血液时，平均回收率是 100%和 90%。对于乳腺癌细胞，当将 2 或 10 个细胞掺加入血液时，平均回收率是 100%和 90%。

上述负消除方法可应用于富集癌细胞，任选随后实施进一步的鉴定和表征

方法，例如抗体正捕捉、FISH、(定量) RT-PCR、原位 RT-PCR、原位杂交、寡核苷酸连接试验 (OLA)、激光切割显微术 (LDM)、全基因组应用(WGA)，包括微阵列以及比较基因组杂交 (CGH)。一旦从人血液中富集了循环肿瘤细胞(CTC)，可根据肿瘤细胞的 qRT-PCR 或免疫染色进一步鉴定肿瘤细胞。对于所有下游鉴定，适当选择的一组癌症标记物可以是不同的胞内和/或胞外细胞表面标记物。例如，在乳腺癌的情形中，可将标记物分成 2 个不同类别：组织非特异性标记物，例如 CK8/18、19 和 20；EGFR、VEGF、FGF、MMP、粘蛋白、CD44v、β-hCG；CEA+CK19；乳腺丝抑蛋白等；和组织特异性标记物，例如乳腺球蛋白 I(mammaglobulin I)。标记物还可包括凋亡标记物，例如胱冬酶 3。可分析不同癌症的一组标记物。各组可包括组织特异性和非特异性标记物。

实施例 2

利用肿瘤标记物组合通过免疫荧光检测分离的癌细胞

用抗-肿瘤标记物 mAb，例如抗-CA19.9、抗-细胞角蛋白和抗-端粒酶的混合物免疫染色载玻片上的富集细胞单层，然后采用荧光显微术作分析，所述抗体用颜色各自不同的荧光染料标记。或者，可通过生物素化在抗体上间接标记免疫荧光，然后与偶联于亲和素的荧光分子温育。此外，免疫荧光分子标记的第二抗体是标记能识别靶细胞的未标记第一抗体的另一选择。图 5 描述了通过该方法鉴定的患者血液样品的循环癌细胞的例子。

实施例 3

采用 PCR 通过免疫荧光检测分离的癌细胞

富集稀有细胞后，利用磁珠、柱方法或使用胍、苯酚/氯仿的传统 RNA 分离方案从这些细胞中分离 RNA。利用寡脱氧胸苷酸，基因特异性和/或随机引物进行 RNA 的逆转录以产生 cRNA 作为模板。然后进行 PCR、qPCR 或多重 PCR 以扩增特定靶基因，例如肿瘤标记物。

向含目标稀有细胞的富集样品中加入逆转录缓冲液。在 95℃加热富集样品 1 分钟以直接裂解细胞。

利用寡脱氧胸苷酸，基因特异性和/或随机引物进行 RNA 的逆转录以产生 cRNA：

将上述分离的裂解稀有细胞样品和RNA重悬于11 μl dNTP混合物（各1 mM)和引物（50 μM寡(脱氧胸苷酸)、2 μM基因特异性引物和/或/50 ng/μl随机六聚体)。70℃温育5分钟，在冰上冷却。加入5 μl反应缓冲液（250 mM Tris-HCl (pH 8.3，25℃)、250 mM KCl、20 mM $MgCl_2$、50 mM DTT)、20 u核糖核酸酶抑制剂（普鲁美加公司(Promega))和 DEPC-处理的水至总共 20 μl，42℃温育 5 分钟。如果使用随机引物，25℃温育 5 分钟。加入 200 单位 SuperScript II (英杰公司)。42℃温育反应混合物60分钟。如果使用随机六聚体引物，25℃温育 10 分钟，然后在 42℃温育 60 分钟。85℃终止反应 5分钟，冰水冷却。

通过多重 PCR 扩增特定的目标 cDNA：

将所有引物混合在一起运行首次 PCR(20-35 轮)，然后利用首次运行 PCR 的等份试样作为模板，通过各引物运行第二次 PCR(25-45 轮)。优化各种引物组合的PCR条件(首次运行和第二次运行，$MgCl_2$浓度、退火温度、延伸时间、引物浓度和引物设计)。将 PCR 混合物加入 RT 反应，利用高压灭菌过滤的水(pH 7.0)将反应体积调节至50 μl。PCR反应的组分是：1×PCR混合物（各组分的终浓度是：50 mM KCl；10 mM Tris-HCl；1.5 mM $MgCl_2$)、200 μM dNTP、0.4 μM各引物、1单位的Taq DNA聚合酶、2% DMSO。

实施例 4

分离和检测胰腺癌患者的循环癌细胞。

表3显示了采用本发明方法从人对象中富集和鉴定的循环癌细胞的数量。该表中报道了对7位胰腺癌患者和5位对照健康对象的血液样品进行盲法实验的结果。此外，显示了具有良性肿瘤的2位患者的循环癌细胞数量。对照健康个体中无一循环癌症样细胞数量大于8。此外，具有良性肿瘤的2位患者的血液样品中具有0或1个癌症样细胞。相反，以前诊断有胰腺癌的所有患者每份血液样品中的癌细胞数>20。两位患者(3号和6号)提供化疗前后的血液样品。对于3号患者，从循环癌细胞数量降低(从134降至5)可以看出化疗的正面

作用，而 6 号患者看来对治疗没有有利的反应。本实施例说明了如何应用本发明所述方法区分健康个体和癌症患者并诊断转移癌症。还提示本方法可能应用于监测患者对治疗的反应。

表 3

对象#	诊断	CTC 数量
1	胰腺癌	20
2	胰腺癌	65
3	胰腺癌	134
3	胰腺癌，化疗后	5
4	胰腺癌	21
5	胰腺癌	45
6	胰腺癌	23
6	胰腺癌，化疗后	34
7	胰腺癌	40
8	良性肿瘤	1
8	良性肿瘤，不同的图	0
9	良性肿瘤	0
10	健康供体	1
11	健康供体	1
12	健康供体	5
13	健康供体	4
14	健康供体	8

实施例 5

分离和检测肺癌患者的循环癌细胞。

表 4 报道了当采用本发明所述方法分离和检测肺癌个体血液样品中癌细胞时获得的结果。在该研究中，可在血液中检测到癌症样细胞的可能性是患者总体健康受损导致的非特异性人工产物，作为诊断患有结核病的个体用作对照。所有对照个体中从血液样品分离的癌症样细胞不超过 1 个，而处于各种治疗状态下的以前诊断有各种形式肺癌(腺癌，AD；小细胞肺癌，SCLC)的所有患者的每份血液样品中有 2 个或更多个癌细胞。

表 4

患者	年龄	诊断	阶段	转移	手术	化疗次数	放疗次数	循环癌细胞数	注意
1	n.a.	TB						0	
2	n.a.	TB						0	

3	n.a.	TB						0	
4	n.a.	TB						0	
5	n.a.	TB						0	
6	n.a.	TB						0	
7	n.a.	TB						0	
8	n.a.	TB						0	
9	n.a.	TB						0	
10	65	未知						0	
11	77	膀胱						1	
12	n.a.	TB						1	
13	42	胸腺						1	
14	65	AC	n.a.		后	2		2	复发
15	46	AC	IIIA		后	6		2	
16	55	AC(HD)	Ib		后	6		2	
17	40	未知	n.a.		n.a.	n.a.		2	
18	66	SCC	IIb		前	3		3	
19	50	SCC	IIIA		n.a.	4	1	3	
20	48	未知	IV	脑	前	0		3	
21	65	AC	n.a.		后	3		4	
22	37	AC	IIIb		后	6		4	
23	64	AC	IIIb		无	5		5	第二谱系
24	68	SCLC	IV	肺/肝	n.a.	4		7	
25	65	AC	Iib		后	0		8	
26	n.a.	前列腺	n.a.		n.a.	n.a.		9	
27	70	AC(MD)	IV	肺	无	2		11	
28	68	SCLC	n.a.		n.a.	0		14	
29	60	AC	Iib		后	0		15	
30	65	AC	Ib		前	0		16	
31	50	SCC	IIIA		后	3	1	16	
32	73	AC	IV	肺	无	4		21	第二谱系
33	71	AC	n.a.		n.a.	6	1	22	
34	75	SCLC	IIIb		无	2		34	
35	60	AC	IIb		脉结扎后	n.a.		57	
36	72	SCLC	IV	肺	n.a.	0		75	
37	60	AC	IIb		前	0		85	

实施例 6

比较分离和检测癌症患者血液中癌细胞的消除与选择方法

最近几年开发了采用正选择技术从血液样品富集癌细胞的许多方法，其中已采用离心，与固体支持物选择性结合或其组合捕捉样品中的靶细胞。这些“正选择”方法依赖于靶细胞上的特征性表面标记物或配体从而能通过表面标记物或配体与其选择性结合成员的结合而吸引混合物中的靶细胞；选择性结合成员通常连接于固体表面或颗粒，因而不难通过分开其余混合物与固体支持物或颗粒而分离靶细胞。正选择方法与本发明所述消除方法的性能的比较见表 5。

表 5

分类	选择	消除
对照-1	1	1
对照-2	1	4
对照-3	0	1
对照-4	1	3
对照-5	0	4
对照-6	0	4
对照-7	1	3
对照-8	0	2
对照-9	1	5
掺加 1-20	11	18
掺加 2-20	8	17
掺加 3-20	11	27
掺加 4-20	25	17
掺加 5-50	39	56
掺加 6-50	84	54
掺加 7-100	106	111
掺加 8-100	91	108
掺加 9-100	502	117
患者-1	3	3
患者-2	14	20
患者-3	0	36
患者-4	13	39
患者-5	0	27
患者-6	0	14
患者-7	0	13
患者-8	0	18

在该研究中，利用偶联于抗-EpCAM 单克隆抗体的磁珠分析采用正选择方法加工的样品以捕捉上皮细胞样细胞。在用于产生表 3 数据的所有实验中，将血液样品分成两等份，采用两种方法同时加工该两等份。前 9 份样品获自健康对照对象。本发明所述的消除方法产生最多 5 个癌症样细胞，而在采用 EpCAM 选择方法加工的样品中检测到略低的背景(每份样品最多 1 个癌症样细胞)。

为评估两种方法的总回收率，给健康个体的血液样品掺加 20、50 或 100 个肿瘤细胞(标注在“分类”中)。在该实验中，消除方法提供更一致的回收效率，与样品中预计的癌细胞数量更好地匹配。这证明对于检测癌症、监测它们的治疗等目的，负选择方法比正选择方法更好。当然，如果正选择方法借以连

接或标记靶细胞的一些或所有靶细胞的表面标记物或配体有一些类型改变(例如，突变)，靶细胞的回收率可进一步降低。然而，在一些实施方式中，本发明可包括正选择步骤作为靶细胞分离方法的一部分，或作为标记步骤以在细胞分离或富集后表征它们。

检验以前诊断患有乳腺癌的患者的血液样品获得该组数据。对于一位患者(1 号)，两种方法获得的结果之间良好一致。对于两位其他患者(2 号和 4 号)，当与正选择方法相比时，消除方法导致检测到的癌细胞数量翻倍。然而，对于所有的其余患者，正选择方法报道 0 个癌细胞，而消除方法能检测 13-36 个癌细胞。已知这些患者患有转移癌，选择方法完全未诊断出，而本发明描述的消除方法提供了更好的诊断选择。

实施例 7

分离人血液中的稀有细胞

在本实施例中，13 位健康供者的血液样品掺加了不同数量的示踪剂(mitotracker)/Hoechst－标记的 SKBR 或 A549 细胞。将 5 ml 人血液与相同体积的含 5 mM EDTA 和 0.5% BSA 的汉克斯缓冲盐水混合，然后加入 0.1 ml 抗-CD50 偶联的磁珠(直径约 350 nm；浓度为 4×10^9/ml)。室温下混合反应溶液 5 分钟，然后加载于用汉克斯缓冲液(对于菲可，密度= 1.077g/100 ml)稀释至 90%的 3 ml 菲可分离介质顶部。室温下以 350 g 离心溶液 5 分钟。收集 RBC 层之上的上清液，然后在室温下以 1200 g 离心 5 分钟。收集细胞沉淀物用于显微分析。结果见表 6。

表 6

实验	掺加的细胞数	回收的细胞数	回收率
1	37	33	89%
2	43	38	88%
3	40	38	95%
5	60	52	87%
6	54	35	65%
7	47	36	77%
8	31	28	90%
9	42	33	79%
10	34	31	91%
11	44	31	70%

12	37	30	81%
13	36	32	89%
平均值			**83%**
SD			**9%**

实施例 8

检测肺癌患者血液样品中的 CTC 以及与抗癌症治疗的相关性

收集血液：弃去最初的2 ml后，将7.5 ml静脉血抽入BD Vacutainer® ACD试管。为进行 CTC 和 CT 扫描相关性研究，在癌症患者完成化疗的一天前和两周后，从 12 位晚期肺癌患者抽取血液样品。制备 WBC，并与 CD50 抗体包被的磁珠温育。分离珠后，离心富集的稀有细胞部分，悬浮得到的细胞沉淀物，点样在包被的载玻片上并固定。通过免疫荧光染色检测癌细胞。用抗-细胞角蛋白 8/18 Alexa 594、抗-细胞角蛋白 19 Alexa 488 染色载玻片，通过 DAPI 复染，用荧光显微镜检查。完成化疗后两个月通过 CT 扫描监测癌症进展和临床反应，并根据 RECIST 作出判断。(图 6)

与各份出版物单独通过引用纳入的程度一样，本申请述及的所有出版物，包括专利文件和科学文章和书目及附件出于所有目的通过引用全文纳入本文。

所有标题是为了方便读者，不应用于限制标题后文本的意义，除非如此规定。

纳入以上实施例只是为了说明的目的，不是要限制本发明的范围。上述那些实施例可能有许多改变形式。由于本领域技术人员明白上述实施例的改进和改变形式，本发明只应受限于随附的权利要求书。引用以上出版物和文献并未承认以上任一出版物或文献是现有技术，也不是承认这些出版物的内容或日期。

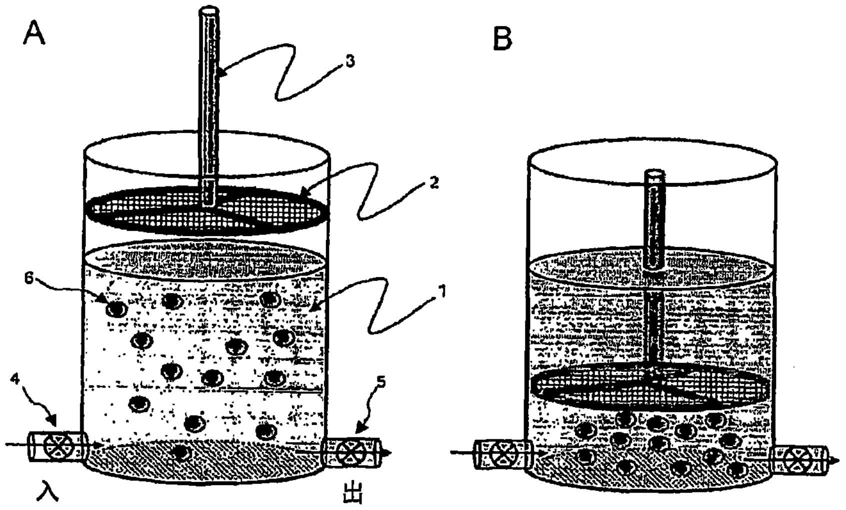


图 1

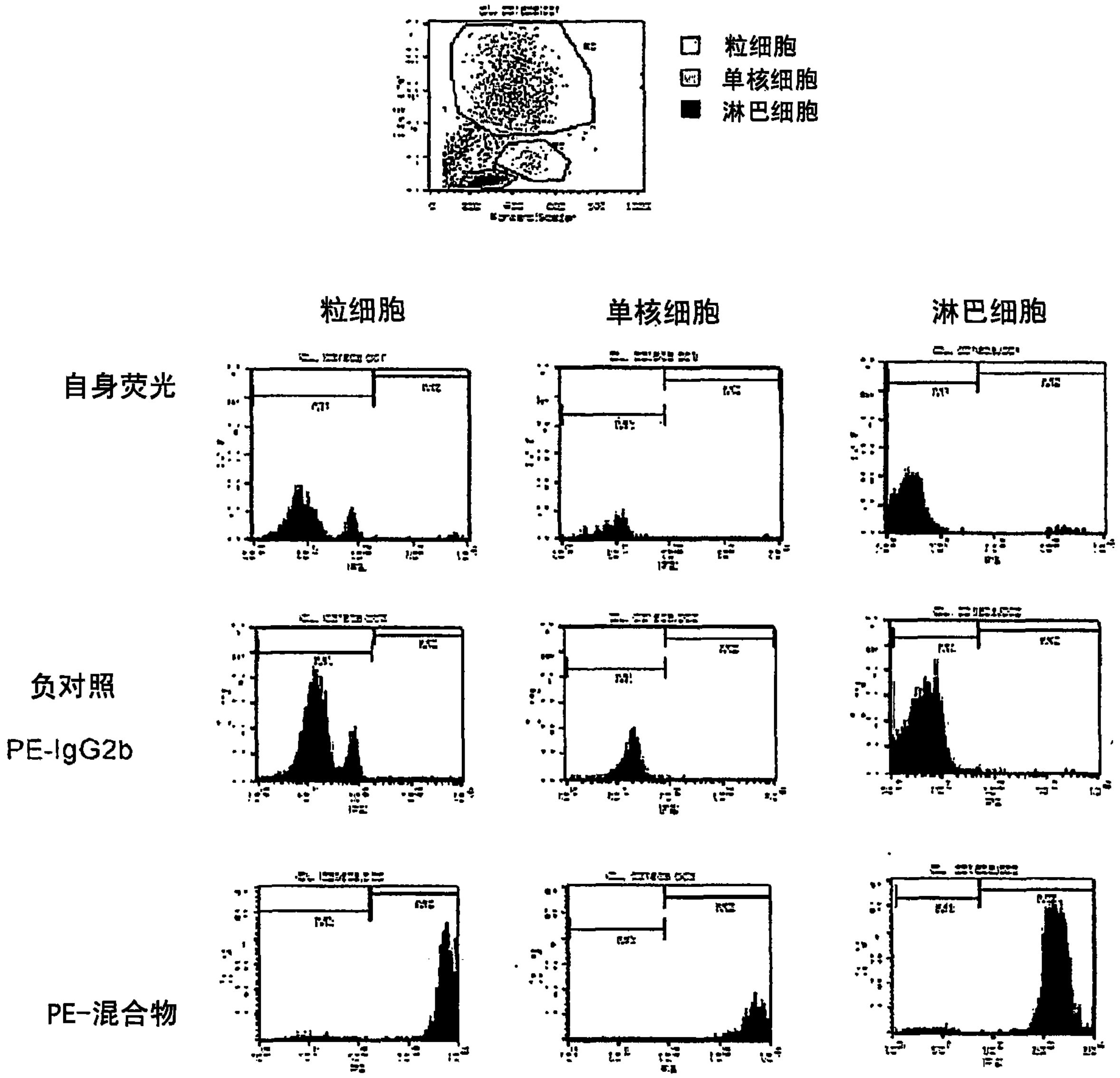


图 2

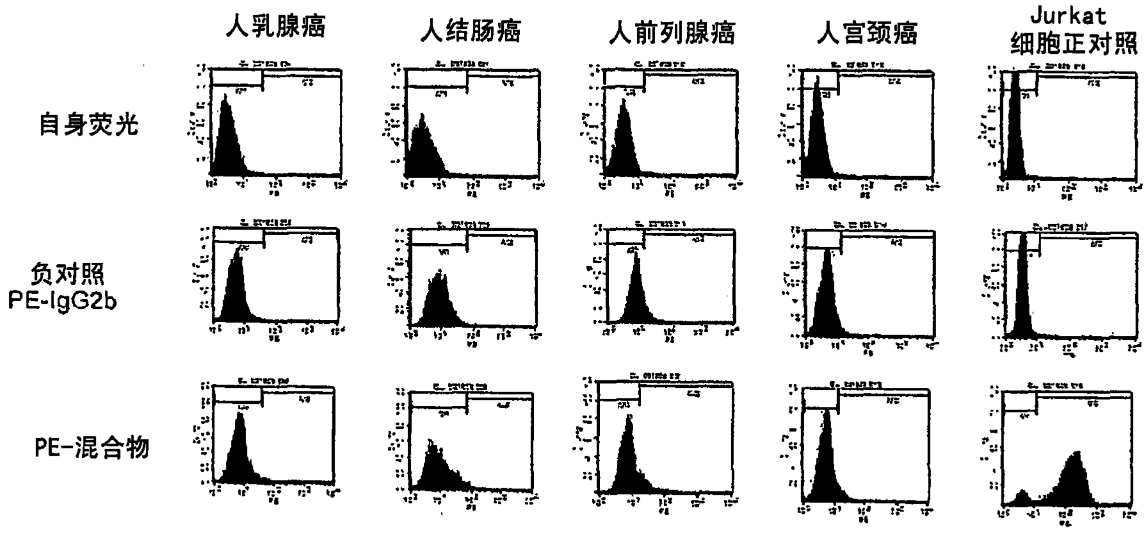


图 3

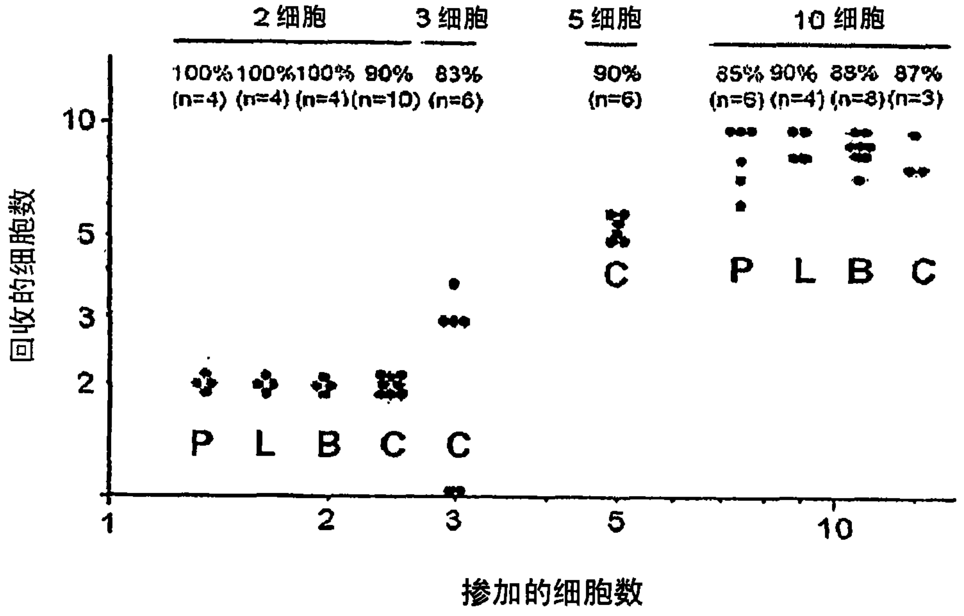

2 细胞
3 细胞
5 细胞
10 细胞
100% (n=4)
100% (n=4)
100% (n=4)
90% (n=10)
83% (n=6)
90% (n=6)
85% (n=6)
90% (n=4)
88% (n=8)
87% (n=3)
回收的细胞数
掺加的细胞数
P L B C C
C
P L B C
10
5
3
2
1
2
3
5
10

图 4

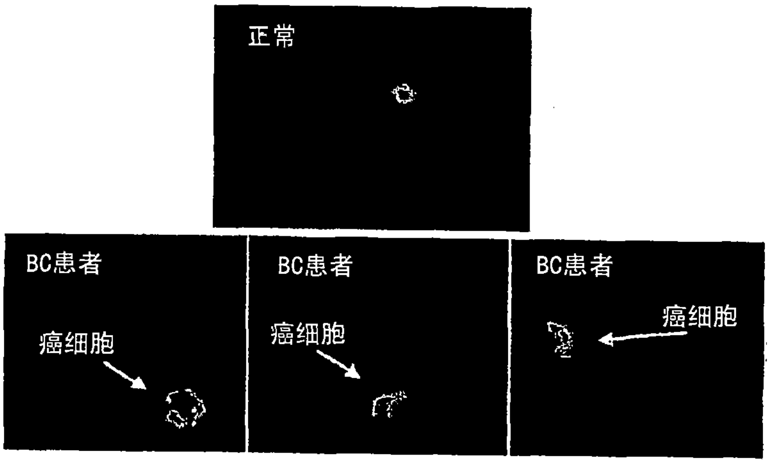
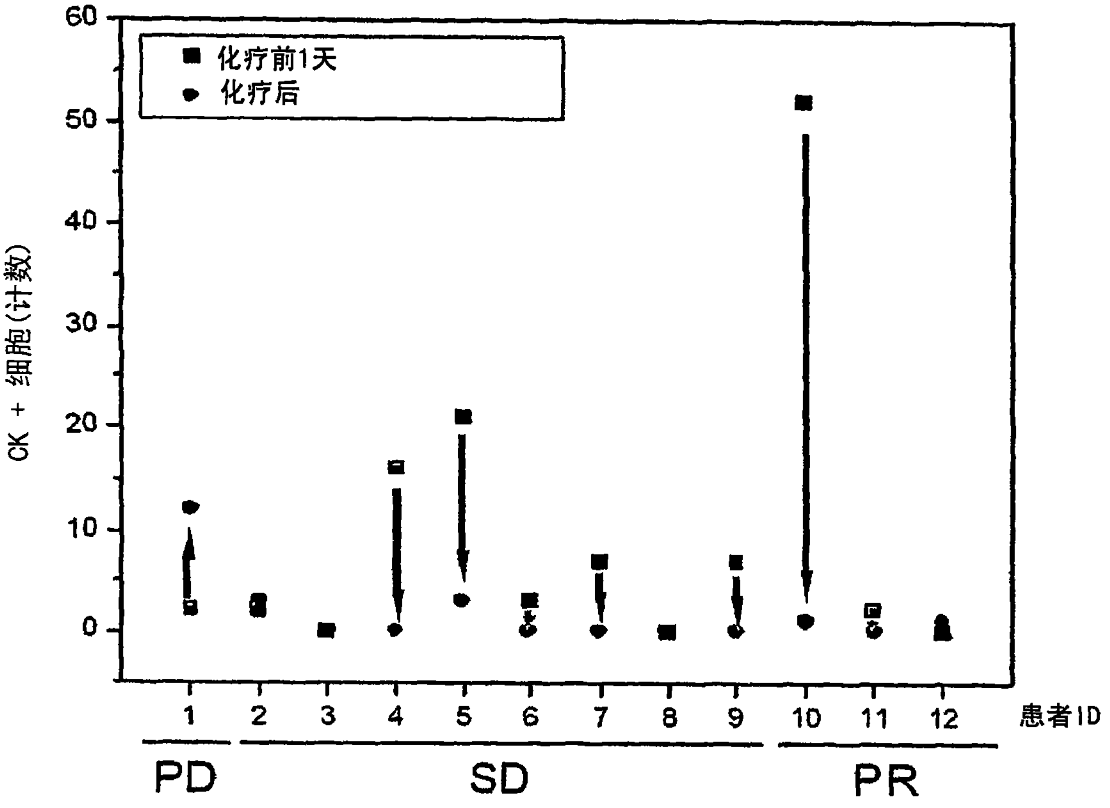


图 5



化疗(4-6周)前后CTC计数的改变与通过CT扫描评估的临床反应相关。
通过RECIST标准评价反应。PD：进行性疾病；SD：稳定的疾病；PR：部分反应。

图 6