



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103998932 B

(45)授权公告日 2017.06.06

(21)申请号 201280041521.0

(22)申请日 2012.06.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103998932 A

(43)申请公布日 2014.08.20

(30)优先权数据
61/502,844 2011.06.29 US
61/606,220 2012.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.02.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/044701 2012.06.28

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/003624 EN 2013.01.03

(73)专利权人 中央研究院
地址 中国台湾台北市

(72)发明人 张瑛芝 吴汉忠 曾博元

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 王思琪 郑霞

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件
WO 2010/123608 A2,2010.10.28,
YeXu 等.Aptamer-Based Microfluidic
Device for Enrichment,Sorting,and
Detection of Multiple Cancer Cells.
《Anal.Chem.》.2009,第81卷(第17期),摘要,第
7438-7440页.

审查员 陈伟潘

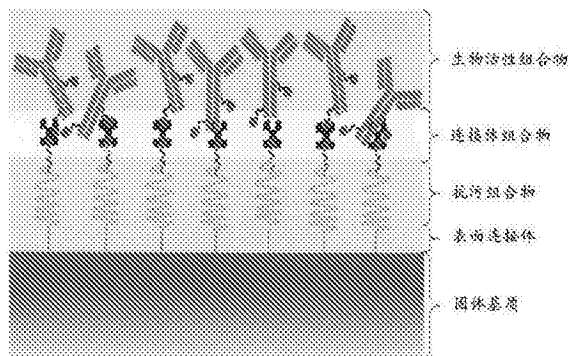
权利要求书5页 说明书13页 附图29页

(54)发明名称

使用表面涂层对生物物质的捕获、纯化和释放

(57)摘要

本发明涉及一种用于捕获循环稀有细胞的表面涂层,其包含用以阻止非特异性细胞的结合和血清组分的吸附的抗污组合物;用于结合生物物质如循环肿瘤细胞的生物活性组合物;具有或没有结合所述抗污和生物活性组合物的连接体组合物。本发明还提供一种用于捕获并纯化生物物质的表面涂层,其包含用以释放非特异性细胞和其它血清组分的释放性组合物;用于结合生物物质如循环肿瘤细胞的生物活性组合物;具有或没有结合所述释放性和生物活性组合物的连接体组合物。本发明还公开了一种新型的微流体芯片,其具有特定图案化的微结构,以产生流动扰动并提高生物物质的捕获率。



1. 一种用于捕获循环稀有细胞的表面涂层,所述表面涂层包含:
 - a) 包含脂质的抗污组合物;和
 - b) 包含结合部分的生物活性组合物,所述结合部分对所述循环稀有细胞具有选择性,其中所述生物活性组合物偶联于所述抗污组合物,和其中所述结合部分包含生物素化的EpAb4-1抗体,且其中所述抗体包含:
 - (a) 重链序列,其中所述重链序列是SEQ ID NO:1;和
 - (b) 轻链序列,其中所述轻链序列是SEQ ID NO:2。
2. 根据权利要求1所述的表面涂层,其中所述抗污组合物通过相互作用与所述生物活性组合物连接,该相互作用包括静电相互作用、亲水-亲水相互作用、极性-极性相互作用、互补DNA结合、磁力或其组合。
3. 根据权利要求1所述的表面涂层,还包含连接体组合物,该连接体组合物将所述抗污组合物连接到所述生物活性组合物上,并且包含能够共价、非共价或共价和非共价组合地连接到所述抗污组合物上以及连接到所述生物活性组合物上的官能团。
4. 根据权利要求3所述的表面涂层,其中所述连接体组合物在共价连接之前包含选自羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸酯基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基的官能团。
5. 根据权利要求3所述的表面涂层,其中所述连接体组合物在非共价连接之前包含作为结合对的第一成员的官能团,该官能团选自生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和荷电基团,它们中的每一个被选为与存在于所述抗污组合物或生物活性组合物上的结合对的第二成员结合。
6. 根据权利要求3所述的表面涂层,其中所述连接体组合物包含可裂解官能团。
7. 根据权利要求1所述的表面涂层,其中相对于不含抗污组合物的组合物,所述抗污组合物减少了非特异性生物物质的结合,并且所述抗污组合物选自:脂质或脂质混合物、多肽、聚电解质多层、聚乙烯醇、PEG、水凝胶聚合物、细胞外基质蛋白、聚合物刷、两性离子材料、碳水化合物、小有机化合物及其组合。
8. 根据权利要求7所述的表面涂层,其中所述脂质或脂质混合物是脂质层。
9. 根据权利要求7所述的表面涂层,其中所述PEG具有100至100,000的分子量。
10. 根据权利要求7所述的表面涂层,其中所述聚电解质多层包含聚-L-赖氨酸/聚-L-谷氨酸,或聚-L-赖氨酸/聚-L-天冬氨酸。
11. 根据权利要求7所述的表面涂层,其中所述聚合物刷包括[2-(丙烯酰氧基)乙基]三甲基氯化铵/2-羧基丙烯酸乙酯)共聚物。
12. 根据权利要求7所述的表面涂层,其中所述两性离子材料是聚(磺基甜菜碱)(pSB)和聚(羧基甜菜碱)。
13. 根据权利要求1所述的表面涂层,其中所述抗污组合物在共价连接之前包含选自羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸酯基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基的官能团。
14. 根据权利要求1或3所述的表面涂层,其中所述抗污组合物在非共价连接之前包含作为结合对的第一成员的官能团,该官能团选自生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和荷电基团,它们中的每一个被选为与存在于所述连接体组合物或生物活性组合物上的结合对的第二成员结合。
15. 根据权利要求1所述的表面涂层,其中所述生物活性组合物在共价连接之前包含选

自羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基的官能团。

16. 根据权利要求1或3所述的表面涂层,其中所述生物活性组合物在非共价连接之前包含作为结合对的第一成员的官能团,该官能团选自生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和荷电基团,它们中的每一个被选为与存在于所述连接体组合物或抗污组合物上的结合对的第二成员结合。

17. 根据权利要求1所述的表面涂层,其中所述生物活性组合物具有选自合成聚合物、分子印迹聚合物、细胞外基质蛋白、结合受体、DNA、RNA、抗体、抗原、表面标记物和适体的结合部分。

18. 根据权利要求17所述的表面涂层,其中所述结合部分是抗-EpCAM膜蛋白抗体或抗-HER2。

19. 根据权利要求18所述的表面涂层,其中所述抗-EpCAM膜蛋白抗体是EpAb4-1。

20. 根据权利要求1或3所述的表面涂层,还包含固体基质。

21. 根据权利要求20所述的表面涂层,其中所述固体基质通过下列相互作用之一连接到表面涂层上:共价键合、氢键键合、静电相互作用、亲水-亲水相互作用、极性-极性相互作用、互补DNA结合、磁力或其组合。

22. 根据权利要求20所述的表面涂层,还包含将所述表面涂层连接到所述固体基质上的表面连接体。

23. 根据权利要求22所述的表面涂层,其中所述表面连接体包含可裂解官能团。

24. 根据权利要求22所述的表面涂层,其中所述表面连接体在共价连接之前包含选自羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基的官能团。

25. 根据权利要求22所述的表面涂层,其中所述表面连接体在非共价连接之前包含作为结合对的第一成员的官能团,该官能团选自生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和荷电基团,它们中的每一个被选为与存在于所述固体基质或抗污组合物上的结合对的第二成员结合。

26. 一种用于捕获和纯化生物物质的表面涂层,所述表面涂层包含:

a) 包含抗污组合物的释放性组合物;和

b) 包含结合部分的生物活性组合物,所述结合部分对所述生物物质具有选择性,其中所述生物活性组合物偶联于所述抗污组合物,和

其中所述结合部分包含生物素化的EpAb4-1抗体,且其中所述抗体包含:

(a) 重链序列,其中所述重链序列是SEQ ID NO:1;和

(b) 轻链序列,其中所述轻链序列是SEQ ID NO:2。

27. 根据权利要求26所述的表面涂层,其中所述释放性组合物通过相互作用连接到所述生物活性组合物上,该相互作用包括静电相互作用、亲水-亲水相互作用、极性-极性相互作用、互补DNA结合、磁力或其组合。

28. 根据权利要求26所述的表面涂层,还包含连接体组合物,该连接体组合物将所述抗污组合物连接到所述生物活性组合物上,并且包含能够共价、非共价或共价和非共价组合地连接到所述抗污组合物上以及连接到所述生物活性组合物上的官能团。

29. 根据权利要求28所述的表面涂层,其中所述连接体组合物包含选自羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基的官能团。

30. 根据权利要求28所述的表面涂层,其中所述连接体组合物在非共价连接之前包含作为结合对的第一成员的官能团,该官能团选自生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和荷电基团,它们中的每一个被选为与存在于所述生物活性或释放性组合物上的结合对的第二成员结合。

31. 根据权利要求28所述的表面涂层,其中所述连接体组合物包含可裂解官能团。

32. 根据权利要求26所述的表面涂层,其中相对于不含释放性组合物的表面涂层,所述释放性组合物增强了从其表面除去非特异性细胞和血液组分,并且所述释放性组合物选自:脂质或脂质混合物、多肽、聚电解质多层、聚乙烯醇、PEG、水凝胶聚合物、细胞外基质蛋白、聚合物刷、两性离子材料、碳水化合物、小有机化合物及其组合。

33. 根据权利要求32所述的表面涂层,其中所述脂质或脂质混合物是支撑的脂质层。

34. 根据权利要求32所述的表面涂层,其中所述PEG具有100至100,000的分子量。

35. 根据权利要求32所述的表面涂层,其中所述聚电解质多层包含聚-L-赖氨酸/聚-L-谷氨酸或聚-L-赖氨酸/聚-L-天冬氨酸。

36. 根据权利要求32所述的表面涂层,其中所述聚合物刷包括[2-(丙烯酰氧基)乙基]三甲基氯化铵/2-羧基丙烯酸乙酯)共聚物。

37. 根据权利要求32所述的表面涂层,其中所述两性离子材料是聚(磺基甜菜碱)和聚(羧基甜菜碱)。

38. 根据权利要求26所述的表面涂层,其中所述释放性组合物在共价连接之前包含选自羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基的官能团。

39. 根据权利要求26或28所述的表面涂层,其中所述释放性组合物在共价连接之前包含作为结合对的第一成员的官能团,该官能团选自生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和荷电基团,它们中的每一个被选为与存在于所述生物活性组合物或连接体组合物上的结合对的第二成员结合。

40. 根据权利要求26所述的表面涂层,其中所述生物活性组合物在共价连接之前包含选自羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基的官能团。

41. 根据权利要求26或28所述的表面涂层,其中所述生物活性组合物在非共价连接之前包含作为结合对的第一成员的官能团,该官能团选自生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和荷电基团,它们中的每一个被选为与存在于所述释放性组合物或连接体组合物上的结合对的第二成员结合。

42. 根据权利要求26所述的表面涂层,其中所述生物活性组合物具有选自合成聚合物、分子印迹聚合物、细胞外基质蛋白、结合受体、DNA、RNA、抗体、抗原、表面标记物和适体的结合部分。

43. 根据权利要求42所述的表面涂层,其中所述结合部分是抗-EpCAM膜蛋白抗体或抗-HER2抗体。

44. 根据权利要求43所述的表面涂层,其中所述抗-EpCAM膜蛋白抗体是EpAb4-1。

45. 根据权利要求26所述的表面涂层,还包含固体基质。

46. 根据权利要求45所述的表面涂层,其中所述固体基质通过下列相互作用之一连接到该表面上:共价键合、氢键键合、静电相互作用、亲水-亲水相互作用、极性-极性相互作用、互补DNA或磁力。

47. 根据权利要求45所述的表面涂层, 还包含将所述表面涂层连接到所述固体基质上的表面连接体。

48. 根据权利要求47所述的表面涂层, 其中所述表面连接体包含可裂解官能团。

49. 根据权利要求47所述的表面涂层, 其中所述表面连接体在共价连接之前包含选自羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸酯基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基的官能团。

50. 如权利要求1-13、15、17-19、21-38、40、和42-49任一项所述的表面涂层, 其中所述抗体是单克隆抗体。

51. 如权利要求1-13、15、17-19、21-38、40、和42-49任一项所述的表面涂层, 其中所述抗体是人源化抗体。

52. 一种释放连接到表面的细胞的方法, 所述方法包括: 使包含气泡的溶液流经含有包含脂质的抗污组合物的表面, 其中所述抗污组合物偶联于生物活性组合物, 所述生物活性组合物包含对所述细胞具有特异性亲和力的抗体, 且其中所述气泡使细胞从表面释放,

其中所述表面是根据权利要求1-51任一项所述的表面涂层。

53. 一种方法, 其包括:

(a) 将包含稀有细胞和非特异性细胞的生物样品与微流体装置的抗污脂质层相接触, 所述微流体装置包含固体基质和抗体, 所述抗体选择性结合所述稀有细胞;

(b) 将所述稀有细胞结合于所述抗体;

(c) 用缓冲剂洗涤所述抗污脂质层, 其中与所述抗污脂质层相接触的非特异性细胞从所述抗污脂质层释放; 和

(d) 使包含气泡的溶液流经所述微流体装置的通道, 其中所述稀有细胞与所述抗污脂质层的至少一部分一同从所述微流体装置释放。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述抗污脂质层包含脂质单层。

55. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述抗污脂质层包含脂双层。

56. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述抗污脂质层包含脂质体。

57. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述脂质包含1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(帽生物素基) (b-PE) 和1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (POPC), 其盐, 或它们的组合。

58. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述抗污脂质层非共价偶联于所述抗体。

59. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述抗污脂质层通过连接体偶联于所述抗体。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述连接体包含官能团, 其中所述官能团是结合对的第一成员, 其中所述官能团选自下组: 生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、EDC、NHS、NH₂和磺基-SMCC, 其中所述官能团结合于所述结合对的第二成员, 其中所述结合对的第二成员存在于所述抗污脂质层或所述抗体上。

61. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述抗污脂质层通过表面连接体偶联于所述固体基质。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述表面连接体包含官能团, 其中所述官能团是结合对的第一成员, 其中所述官能团选自下组: 生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和荷电基团, 其中所述官能团结合于所述结合对的第二成员, 其中所述结合对的第二成员存在于所述抗污脂质层或所述固体基质上。

63. 根据权利要求61所述的方法,其中所述表面连接体非共价偶联于所述抗污脂质层或所述固体基质。

64. 根据权利要求53所述的方法,其中所述抗污脂质层具有几纳米到几百微米的厚度。

65. 根据权利要求53所述的方法,其中所述固体基质包含金属、塑料、玻璃、硅、羟基化的聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA),或它们的组合。

66. 根据权利要求53所述的方法,其进一步包含结合于所述抗体的稀有细胞。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述稀有细胞是生活的。

68. 根据权利要求53所述的方法,其中所述脂质是脂双层,且气泡中的空气对所述抗污脂质层的脂双层的疏水尾具有高亲和性。

69. 根据权利要求53所述的方法,其中所述气泡打破了所述抗污脂质层的表面处的亲水-亲水相互作用,并且使得气泡将所述抗污脂质层的顶层与结合在抗体上的稀有细胞一起升起。

70. 根据权利要求53所述的方法,其进一步包含结合于所述抗污脂质层或所述抗体的非特异性细胞,其中所述抗污脂质层配置为在2.5达因/cm²至10达因/cm²的剪切应力下去除结合的非特异性细胞。

71. 根据权利要求53所述的方法,其进一步包含结合于所述抗污脂质层或所述抗体的非特异性细胞,其中所述抗污脂质层配置为在0.8达因/cm²至50达因/cm²的剪切应力下去除所述非特异性细胞,而与偶联于所述抗污脂质层的抗体结合的稀有细胞保持与所述固体基质联结。

72. 根据权利要求61、63或71所述的方法,其中所述固体基质包含三氧化二铝或TiO₂。

73. 根据权利要求61、63或71所述的方法,其中所述固体基质包含所述微流体装置的表面,其中所述微流体装置包含入口、出口、和入口和出口之间的一个或多个通道。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中所述一个或多个通道含有所述抗污脂质层,所述抗体,和所述固体基质。

75. 根据权利要求61、63或71所述的方法,其中所述固体基质包含多个微结构。

76. 根据权利要求53-71任一项所述的方法,其中所述释放的稀有细胞是生活的。

77. 根据权利要求53-71任一项所述的方法,其进一步包括收集所述释放的稀有细胞。

78. 根据权利要求77所述的方法,其中所述收集的稀有细胞是生活的。

79. 根据权利要求53-71任一项所述的方法,其中所述抗体为结合EpCAM的分离的EpAb4-1抗体,其中所述抗体包含

(a) 包含SEQ ID NO:1的重链序列,和

(b) 包含SEQ ID NO:2的轻链序列。

使用表面涂层对生物物质的捕获、纯化和释放

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2011年6月29日提交的美国专利申请序号61/502,844和2012年3月2日提交的美国专利申请序号61/606,220的正式申请,以上两个申请通过引用整体并入本文。

[0003] 关于在联邦政府资助的研究与开发下进行的发明的权利的声明

[0004] 不适用

[0005] 关于“序列表”、表格或光盘提交的计算机程序列表附件

[0006] 表1是EpAb4-1抗体的氨基酸序列。

背景技术

[0007] 细胞脱落到循环中是恶性肿瘤的一种固有特性,而这一特性对于癌症患者的诊断、分期、治疗反应和生存期提供了重要的信息。例如,Pantel等人发现血液中的循环肿瘤细胞(CTC)的数目与癌症的攻击性以及治疗的功效相关。(Pantel,K.等人,“Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumor cells”,*Nat Rev Cancer*,2008,8(5):329-40)。

[0008] 然而,CTC是罕见的细胞,在转移癌症患者的血细胞中只占1/109。这使得CTC的检测和分离在技术上具有挑战性。(见Kahnet等人,*Breast Cancer Res Treat*2004,86:237-47)。因此,对于有效地检测和分离CTC,富集过程是必要的。

[0009] 这样的富集过程的一个实例是使用高度过量表达的、对CTC具有高特异性和灵敏性的细胞表面生物标志物,如上皮细胞粘附分子(EpCAM)。唯一获得FDA批准的CTC检测平台—Cellsearch System™(Veridex),利用抗-EpCAM抗体涂覆的磁性纳米粒子捕获和富集CTC,接着进行细胞角蛋白免疫染色。另一种可商业获得的CTC检测系统—AdnaTest (AdnaGen AG,德国),采用了类似的免疫磁性方法,这种方法是通过使用抗-EpCAM和黏蛋白1(MUC1)偶联的磁珠。最近,开发了基于抗-EpCAM抗体涂覆的微流体芯片的“CTC芯片”用于CTC检测和富集(Nagrath等人,*Nature*2007,450:1235-9)。然而,由于抗-EpCAM抗体与血细胞的非特异性结合,上述技术的缺点是纯CTC的检测率低。

[0010] 为了使CTC的检测和分离最大化,降低其它循环血细胞的非特异性结合是必要的。这可以通过用生物惰性材料进行表面修饰来实现。例如,Kaladhar等人观察到了明显更少的循环血细胞(如血小板、白细胞和红细胞)结合到由含磷脂酰胆碱、胆固醇和糖脂的各种脂质组合物的支撑单层修饰的固体基质上(Kaladhar等人,*Langmuir*2004,20:11115-22和Kaladhar等人,*J Biomed Mater Res A*2006,79A:23-35)。

[0011] 尽管在检测和分离CTC的技术方面取得了进步,但仍然需要更特异的、有效的用于检测、纯化和释放CTC和其它生物物质的方法,以便进行进一步的培养和表征。

发明内容

[0012] 一方面,本发明涉及一种用来捕获循环稀有细胞(CRC)的表面涂层。这种表面涂层提高诸如CTC、循环干细胞(例如肿瘤干细胞和骨髓干细胞)、胚胎细胞、细菌、病毒、上皮细

胞、内皮细胞等CRC的捕获效率,并且减少非特异性细胞的结合或蛋白质吸附。

[0013] 这种表面涂层包含1)抗污组合物(nonfouling composition),该组合物会减少非特异性血细胞的结合和其它血液组分如蛋白质的吸附;和2)捕获CRC的生物活性组合物。该表面涂层还包含连接到所述抗污组合物和生物活性组合物上的连接体组合物,如图1A所示。

[0014] 另一方面,本发明涉及一种用来捕获和释放生物物质的表面涂层。这种表面涂层提高诸如CTC、循环干细胞(例如肿瘤干细胞、肝干细胞和骨髓干细胞)、胚胎细胞、细菌、病毒、上皮细胞、内皮细胞等生物物质的捕获效率,并且增强非特异性细胞或蛋白质从表面涂层上的去除或释放。

[0015] 所述表面涂层包含1)释放性组合物,用于从表面涂层上释放或去除非特异性的血细胞和其它血液组分,如蛋白质;和2)捕获生物物质的生物活性组合物。该表面涂层还包含连接到所述释放性组合物和生物活性组合物上的连接体组合物。

[0016] 本发明还涉及一种微流体装置,其具有特定的微结构设计,用以产生血液、体液或生物样品的扰流以提高生物物质的捕获率。

[0017] 本发明还涉及一种制造表面涂层的方法,包括:a)形成抗污或释放性组合物;和b)将连接体组合物与来自步骤a)的抗污/释放性组合物和生物活性组合物连接,或c)将来自步骤a)的抗污/释放性组合物与生物活性组合物连接。

[0018] 本发明还涉及从表面涂层上捕获和释放生物物质的方法。在表面涂层上的生物物质可通过去除非特异性细胞或蛋白质进行纯化。所捕获的生物物质可通过气泡、紫外线照射等得到释放。

[0019] 本发明还涉及使用生物素化的抗-EpCAM抗体——EpAb4-1抗体来捕获CTC。

附图说明

[0020] 本发明的实施方案可以参照附图加以说明。

[0021] 图1A示意性地显示了包含抗污组合物、连接体组合物和生物活性组合物的表面涂层的实施方案。

[0022] 图1B示意性地显示了循环肿瘤细胞与图1A的表面涂层的结合。

[0023] 图2A到图2F显示了抗污材料的实例的化学结构。

[0024] 图3显示了在抗污组合物和生物活性组合物上的官能团之间的耦合的化学反应。

[0025] 图4A示意性地显示了不使用表面连接体的表面涂层和固体基质的连接。

[0026] 图4B和4C示意性地显示了具有可裂解官能团的连接体组合物。

[0027] 图4D示意性地显示了使用表面连接体的表面涂层和固体基质的连接。

[0028] 图5A和5B示意性地显示了固体基质上的表面涂层的形成。

[0029] 图6A和6B示意性地显示了微流体芯片的组件。

[0030] 图6C示意性地显示了微流体芯片组装件,用以从生物样品中捕获CTC。

[0031] 图7A到7H示意性地显示了固体基质上的微结构的设计。

[0032] 图7I和7J分别显示了各种微结构设计在DMEM溶液和血液中的捕获效率。

[0033] 图8显示了用来释放非特异性细胞和纯化所捕获的生物物质的缓冲液的剪切应力。

- [0034] 图9示意性地显示了通过气泡方法释放生物物质。
- [0035] 图10A示意性地显示了在固体基质上的含有可裂解连接体组合物的表面涂层。
- [0036] 图10B示意性地显示了生物物质从图10A中的表面涂层上的释放。
- [0037] 图11显示了表面涂层结构的QCM-D反应。
- [0038] 图12显示了向表面涂层添加牛血清白蛋白的QCM-D反应。
- [0039] 图13是在缓冲液冲洗之前和之后,表面涂层上的非特异性细胞(顶部图片)和CTC(底部图片)的照片。
- [0040] 图14A显示了各种表面涂层的捕获效率和非特异性血细胞结合。
- [0041] 图14B是照片图片,其显示了在缓冲液冲洗之前和之后,各种表面涂层的非特异性血细胞结合。
- [0042] 图15A到图15C是在缓冲液冲洗纯化之前和之后,表面涂层上的非特异性细胞和生物物质的照片。
- [0043] 图16显示了用于从表面涂层上去除HCT116和NIH-3T3细胞群体的不同剪切应力和冲洗时间。
- [0044] 图17是通过气泡释放的CTC的照片。
- [0045] 图18显示了在第1天、第10天和第14天释放出的CTC的细胞培养物。
- [0046] 图19示意性地显示了CTC过滤装置。
- [0047] 图20显示了生物素化的OC9801抗体、生物素化的EpAb4-1抗体、生物素化的EpCaM抗体和IgG抗体的CTC结合特异性。

[0048] 发明详述

[0049] 本发明涉及一种用来有效地捕获循环稀有细胞(CRC)如CTC、循环干细胞(例如肿瘤干细胞和骨髓干细胞)、胚胎细胞、细菌、病毒、上皮细胞、内皮细胞等的表面涂层。

[0050] 在一个实施方案中,用来捕获CRC的表面涂层包含1)抗污组合物,该组合物阻止非特异性细胞的结合和其它血液组分如蛋白质的吸附;和2)能捕获循环稀有细胞的生物活性组合物。该抗污组合物和生物活性组合物通过存在于该抗污和生物活性组合物中的离散官能团或部分而连接。通常,这两种组合物之间的连接是通过相互作用而形成的,该相互作用包括静电相互作用、亲水-亲水相互作用、极性-极性相互作用、互补DNA结合、磁力或其组合。

[0051] 在一组实施方案中,互补DNA片段用于结合抗污组合物和生物活性组合物。该片段连接到每一个组合物上,并且可以在其长度上部分或完全互补。DNA的合适的长度一般至少为15、20、25、35、50、100个或更多个碱基的长度。在本发明中使用的DNA的一个实例是DNA镊子(DNA tweezer)。(参见,B Yurke等人,A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. Nature2000, 406:605-608)

[0052] 在另一组实施方案中,所述表面涂层包含1)抗污组合物;2)生物活性组合物;和3)连接体组合物,其将所述抗污组合物和生物活性组合物连接起来。参见图1A。

[0053] 本发明还涉及一种表面涂层,其用来有效地捕获生物物质,如CTC、循环干细胞(例如肿瘤干细胞、肝干细胞和骨髓干细胞)、胚胎细胞、细菌、病毒、上皮细胞、内皮细胞等等,通过经由缓冲液冲洗来释放或去除非特异性细胞和其它血清组分(例如蛋白质)从而纯化表面涂层表面上的生物物质,并从表面涂层上释放所捕获的生物物质。

[0054] 用于捕获和纯化生物物质的表面涂层包含：1) 释放性组合物，其用于通过缓冲液冲洗来释放非特异性血细胞和其它血液组分，如蛋白质；和2) 捕获生物物质的生物活性组合物。该释放性组合物和生物活性组合物通过存在于该释放性和生物活性组合物中的离散官能团或部分而连接。通常，这两种组合物之间的连接是通过相互作用而形成的，该相互作用包括静电相互作用、亲水-亲水相互作用、极性-极性相互作用、互补DNA结合、磁力或其组合。

[0055] 在一个实施方案中，所述表面涂层还包含连接到释放性组合物和生物活性组合物上的连接体组合物。

[0056] 如下文更详细说明的，可将所述表面涂层引入下列配置中：细胞培养皿，微流体通道，微流体芯片，过滤器，毛细管，管，珠，纳米颗粒，等等，其具有从约50至约1000微米的内直径。

[0057] 抗污和释放性组合物

[0058] “抗污”组合物(参见图1A)降低非特异性细胞的结合和血清蛋白质的吸附。

[0059] “释放性”组合物包含抗污组合物，后者也作为“润滑”表面，使得只需要低流动剪切应力即可从表面涂层上去除或释放非特异性细胞或血液组分，而生物物质保持完好。

[0060] 该抗污组合物选自：支撑的脂质层如脂质体，支撑的脂双层(SLB)或脂质多层，多肽，聚电解质多层(PEM)，聚乙烯醇，如图2A所示的聚乙二醇(PEG)，水凝胶聚合物，细胞外基质蛋白，碳水化合物，聚合物刷，两性离子材料，如图2D所示的聚(羧基甜菜碱)(pCB)，如图2E所示的聚(磺基甜菜碱)(pSB)和如图2F所示的pDMAEMA，小有机化合物，和形成单层或多层的上述材料的组合。

[0061] 对于那些其中抗污组合物包含支撑脂双层(SLB)的实施方案，该SLB通常包含脂质，例如，如图2B所示的1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(帽生物素基)(钠盐)(b-PE)和1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC)。SLB的抗蛋白质特性可以通过在宽pH值范围内中性和两性离子磷脂酰胆碱头基的存在以及在亲水性脂质头基和本体溶液之间形成的水性薄膜来解释(参见,Johnson等人,Biophys J1991,59:289-94)。

[0062] 在另一组实施方案中，抗污组合物包含PEG，优选分子量为约100至约100,000并且展示出抗污性质的PEG。

[0063] 在又另一组实施方案中，抗污组合物包含聚电解质多层(PEM)或聚合物刷。在本发明中有用的合适的PEM的实例包括，但不限于，聚-L-赖氨酸/聚-L-谷氨酸(PLL/PLGA)、聚-L-赖氨酸/聚-L-天冬氨酸或类似的反荷离子聚合电解质。所述聚合物刷包括：如图2C中所示的([2-(丙烯酰氧基)乙基]三甲基氯化铵,TMA)/(2-羧基丙烯酸乙酯,CAA)共聚物。通常，该抗污层具有从几纳米到几百微米的厚度。

[0064] 抗污组合物包含官能团，该官能团能够直接共价、非共价或共价和非共价组合地连接到存在于生物活性组合物中的官能团上，或者直接连接到作为连接组合物的一部分的官能团上。

[0065] 在一些实施方案中，抗污组合物的官能团(共价连接之前)选自：羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酸基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基，它们被选为对存在于连接体或者生物活性组合物中的官能团具有反应性。在其它实施方案中，作为结合对的第一成员的抗污组合物的官能团(非共价连接之前)选自由生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、

RNA、配体、受体、抗原、抗体和正-负电荷组成的使用特异性结合识别的组,其中的每一个被选为与存在于连接体或生物活性组合物中的结合对的第二成员结合。

[0066] 连接体组合物

[0067] 连接体组合物连接抗污/释放性组合物和生物活性组合物,并且包含能够直接共价、非共价或共价和非共价组合地连接到存在于抗污/释放性组合物中的官能团上和连接到作为生物活性组合物的一部分的官能团上的官能团。

[0068] 在一些实施方案中,连接体组合物包含选自以下的官能团(共价连接之前):羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酯基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基,它们被选为对存在于抗污或者生物活性组合物中的官能团具有反应性。

[0069] 在其它实施方案中,连接体组合物包含作为结合对的第一成员的官能团(非共价连接之前),该官能团选自由生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体和正-负电荷组成的使用特异性结合识别的组,其中的每一个被选为与存在于抗污/释放性组合物或生物活性组合物上的结合对的第二成员结合。

[0070] 连接体组合物上的官能团也可以是可裂解官能团,其选自:可通过紫外线照射而裂解的光敏官能团,可通过电脉冲机制而裂解的电敏官能团,可通过磁力的缺失而裂解的磁性材料,可通过破坏静电相互作用而裂解的聚电解质材料,可通过杂交而裂解的DNA,等等。

[0071] 生物活性组合物

[0072] 生物活性组合物连接到连接体组合物或抗污组合物上,并且包含对生物物质或CRC的检测具有选择性的结合部分。

[0073] 生物活性组合物包含能够直接共价、非共价或共价和非共价组合地连接到存在于抗污层中的官能团上或者连接到为连接体组合物的一部分的官能团上的官能团。

[0074] 在一些实施方案中,生物活性组合物的官能团(共价连接之前)选自:羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酯基、醛基、环氧基或环氧乙烷基团、胍基和巯基,它们被选为对存在于抗污或连接体组合物中的官能团具有反应性。在其它实施方案中,生物活性组合物的官能团(非共价结合之前)选自由生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原-抗体和正-负电荷组成的使用特异性结合识别的组,其中的每一个被选为与存在于抗污/释放性组合物或连接体组合物上的结合对的第二成员结合。

[0075] 生物活性组合物的结合部分通过分子识别、化学亲和力或几何/形状识别而对生物物质具有特异性亲和力。用于生物物质检测的结合部分的实例包括但不限于:合成聚合物、分子印迹聚合物、细胞外基质蛋白、结合受体、抗体、DNA、RNA、抗原或任何其它对生物物质呈现出高亲和力的表面标记物。一种优选的抗体是抗-EpCAM膜蛋白抗体(可购自许多来源,包括R&D Systems, MN, USA),其提供对CTC的高特异性,因为EpCAM在肺、结肠直肠、乳腺、前列腺、头颈和肝的恶性肿瘤中经常过量表达,但是它不存在于血液系统细胞中。另一种优选的抗体是抗-HER2,它对CTC具有高特异性,但不存在于血液系统细胞中。

[0076] 在一个实施方案中,所述抗-EpCAM膜蛋白抗体是EpAb4-1抗体,其包含具有SEQ ID NO:1的重链序列和具有SEQ ID NO:2的轻链序列,如表1所示。

[0077] 表1.EpAb4-1抗体的V_H和V_L结构域的氨基酸序列

[0078]

	FW1	CDR1	FW2	CDR2
SEQ ID NO: 1 (V _H)	QIQLVQSGPEL KKPGETV KISCKAS	GYTFT NYG MN	WVKQAP GKGLK WMGW	INTYTGEP
SEQ ID NO: 2 (V _L)	DIVMTQAAFSN PVTLGTS ASISC	RSSKS LLH SNGIT YLY	WYLQKP GQSPQ LLIY	HMSNLAS
	FW3	CDR3	FW4	家族

[0079]

SEQ ID NO: 1 (V _H)	TYGDDFKGRF AFSLETS STAYLQINNLK NEDTATY FCAR	FGRSV DF	WGQGTS VTVSS	V _H 9
SEQ ID NO: 2 (V _L)	GVPDRFSSSGS GTDFTLRI SRVEAEDVGIY YC	AQNLE NPR T	FGGGTKL EIK	V _K 24/25

[0080] 显示了V_H和V_L结构域的互补决定区1-3(CDR1-3)、构架区1-4(FW1-4)。V结构域家族经VBASE2数据库(www.vbase2.org)进行比对。

[0081] 所述生物活性组合物可以有多种不同的厚度,厚度选择为使其不影响表面涂层的功能或性能。

[0082] 在一个实施方案中,用于抗污组合物和生物活性组合物的偶联连接体或催化剂是生物素/抗生物素蛋白或它们的衍生物。在另一个实施方案中,用于抗污组合物和生物活性组合物的偶联连接体或催化剂是EDC/NHS。在又一个优选的实施方案中,用于抗污组合物和生物活性组合物的偶联连接体或催化剂是磺基-SMCC。图3示意性地示出了这些实施方案的化学反应。

[0083] 固体基质

[0084] 在一些实施方案中,表面涂层不经表面连接体连接到固体基质上,如图4A中所示。该抗污/释放性组合物通过下列相互作用之一连接到固体基质上:共价键合(对于PEG抗污

组合物),氢键键合,静电相互作用,亲水-亲水相互作用(对于SLB抗污/释放性组合物),极性-极性相互作用,互补DNA结合,磁力,等等。

[0085] 在其它实施方案中,表面涂层经由表面连接体连接到固体基质上,如图4D中所示。在本发明中使用的固体基质的实例包括,但不限于:金属、塑料、玻璃、硅晶片、羟基化的聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)以及它们的组合。该固体基质的形状包括,但不限于:平面、圆形和不规则形状,它们具有微或纳米结构,如纳米颗粒、纳米线及其组合。

[0086] 表面连接体组合物包含能够直接共价、非共价或共价和非共价组合地连接到存在于抗污/释放性组合物中的官能团上和连接到为固体基质的一部分的官能团上的官能团。用于将表面涂层结合到玻璃基质上的表面连接体的实例包括,但不限于,硅烷、氨丙基三乙氧基硅烷、氨丙基三甲氧基硅烷、硅烷-PEG-NH₂、硅烷-PEG-N₃(PEG分子量为约1,000至约30,000道尔顿)和硅烷-PEG生物素。

[0087] 在一组实施方案中,表面连接体包含选自下组的可裂解官能团:可通过紫外线照射而裂解的光敏官能团,可通过电脉冲机制而裂解的电敏官能团,其中磁力的缺失将释放抗污组合物的铁或磁性材料,可通过破坏静电相互作用而裂解的聚电解质材料,可通过杂交而裂解的DNA,等等。

[0088] 在一个实施方案中,抗污组合物包含硅烷官能化的PEG,而固体基质优选选自硅、玻璃、羟基化的聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、三氧化二铝、TiO₂等。在另一个实施方案中,抗污组合物包含巯基官能化的化合物,而固体基质优选选自Au、Ag、Pt等。

[0089] 制造表面涂层的方法

[0090] 图5A和5B示出了形成表面涂层的步骤:

[0091] 1.形成具有适当官能团(生物素)的抗污/释放性组合物(例如SLB或PEG);

[0092] 2.将连接体组合物上的官能团(链霉亲和素)连接到抗污/释放性组合物上的官能团(生物素);

[0093] 3.形成生物活性组合物并且将所述生物活性组合物上的官能团(生物素)连接到所述连接体组合物上的官能团(链霉亲和素)。

[0094] 不含连接体组合物的表面涂层可以通过以下步骤形成:

[0095] 1.形成具有适当官能团(例如N-戊二酰磷脂酰乙醇胺或NGPE的羧基)的抗污/释放性组合物;

[0096] 2.形成并将生物活性组合物上的官能团(伯胺)连接到步骤1中的抗污/释放性组合物上的官能团(NGPE的羧基)。

[0097] 第[0077]和[0078]段中的步骤可以颠倒。

[0098] 微流体芯片

[0099] 如图6A中所示,微流体芯片包含:第一固体基质1(例如PMMA)和第二固体基质2(例如玻璃),其中,所述第一和第二固体基质通过使用粘接剂手段3或者其它手段粘合在一起。

[0100] 参见图6B,一个或两个固体基质的表面可以刻有微结构4。在一组实施方案中,微结构4以线性方式排列。在另一组实施方案中,微结构4以人字形方式排列。在图6B中的粘接剂3上的阴影区域是雕刻而成的,用以适应固体基质1的表面上的微结构4。密封的通道5是通过用粘接剂3将第一固体基质1和第二固体基质2粘结在一起而创建的。通道5的高度取决于粘接剂3的厚度。

[0101] 一旦微流体芯片形成,表面涂层就可以连接到一个或两个固体基质上。在一组实施方案中,表面涂层经表面连接体连接到固体基质上。在另一组实施方案中,表面涂层通过以下相互作用之一连接到固体基质上:共价键合(对于PEG抗污组合物)、氢键键合、静电相互作用、亲水-亲水相互作用(对于SLB抗污/释放性组合物)、极性-极性相互作用、互补DNA结合、磁力等等。

[0102] 参见图6C,在固体基质1上的微结构4垂直于流动方向,并且在血液、体液或生物样品通过微流体芯片的密封通道5时产生其乱流或扰流。该扰流增强了生物物质-表面涂层的接触。

[0103] 两种因素决定微流体芯片的捕获效率:

[0104] (1) 血液、体液或生物样品的线速度,其决定了生物物质和表面涂层的接触时间。在一个优选的实施方案中,线速度是大约0.1mm/s至1mm/s。在一个更优选的实施方案中,对于图7F中的设计E,线速度是大约0.42mm/s或0.5ml/h。

[0105] (2) 血液、体液或生物样品的流动干扰,其由固体基质上的微结构4产生。该流动干扰增加了生物物质和表面涂层之间的接触。

[0106] 图7A示出了固体基质上的微结构4的不同设计。在设计F中的微结构以人字形图案排列,而在设计A-E和H中的微结构以线性图案排列。微结构4的尺寸如下:O-D和G的长度约为50mm,E-F的长度约为120mm,O和A的高度约为30 μ m,O和A的宽度约为1.5mm,B约为3.0mm,C-G约为5.5mm。密封通道5的高度随粘合剂3的厚度而变化,优选约为30-90 μ m,更优选约为60 μ m。

[0107] 图7B-7H示出了图7A中设计A-G的细节。图7H中的设计G是优选的图案,具有下列尺寸:微结构的宽度(W)大约为150 μ m,微结构的长度(L)约为1000 μ m,两排微结构的之间的距离(Sr)大约为250 μ m,两个相邻的微结构之间的距离(Sc)约为350 μ m,微结构的高度(D)约为30 μ m,而密封通道5的高度(H)约为60 μ m。

[0108] 所述各种设计的生物物质捕获效率在图7I和图7J中示出。捕获率被定义为(捕获的生物物质/测试样品中的初始生物物质) \times 100%。通道O没有微结构并且具有最低的生物物质捕获率,对于DMEM样品和血液样品分别为27%和1%。设计E对于掺入DMEM中的HCT116癌细胞具有80%的捕获率,而对掺入血液样品中的HCT116癌细胞具有30%的捕获率。设计F具有最佳的捕获率,平均有超过70%的掺入血液样品中的HCT116癌细胞被捕获(见图7J)。

[0109] 流动纯化

[0110] 在表面涂层上的生物物质可以通过去除抗污/释放性组合物的表面上的非特异性细胞和其它血液组分而进一步纯化。该抗污/释放性组合物对非特异性细胞和其它血液组分具有低亲和力。因此,用约0.8达因/cm²至约50达因/cm²的低流动缓冲溶液冲洗表面涂层足以去除抗污/释放性组合物上的非特异性细胞和其它血液组分,而生物物质保留在该表面涂层上。

[0111] 在一个优选的实施方案中,缓冲液冲洗的剪切力为约2.5至约10达因/cm²。图8显示,当缓冲液流的剪切应力大约为3.3达因/cm²时,80%的非特异性细胞(即白细胞)从表面涂层上去除,而没有任何生物物质(即HCT116癌细胞)被去除。当缓冲液流的剪切应力增加至8达因/cm²时,几乎所有的非特异性细胞从表面涂层上去除,而没有任何生物物质被去除。

[0112] 生物物质的释放

[0113] 在通过流动纯化去除了大部分的非特异性细胞和血液组分之后,生物物质可以从表面涂层上释放下来。

[0114] 如果抗污/释放性组合物包含脂质或脂质混合物,所捕获的生物物质可以通过引入气泡溶液或油相而得到释放。如图9中所示,表面涂层包含抗污组合物A(脂双层)和生物活性组合物B(抗体),并且结合到固体基质S上。生物物质CTC结合到生物活性组合物B上,而其它的细胞被抗污组合物A排斥。当气泡接近脂双层时,由于对气泡内的空气(也是疏水性的)的高亲和性,脂双层的疏水尾颠倒过来。这打破了脂双层的表面处的亲水-亲水相互作用,并且使得气泡将脂双层的顶层与结合在生物活性组合物上的CTC一起“升起”。

[0115] 如果抗污组合物包含除了脂质或脂质混合物以外的组合物,所捕获的生物物质可通过破坏连接体组合物上或表面连接体上的可裂解官能团而得到释放。这种释放机制示于图10A和10B中。图10A示出了固体基质上的表面涂层,其中该表面涂层包含生物活性组合物B、具有可裂解官能团的连接体组合物C和抗污组合物A。该表面涂层通过表面连接体1连接到固体基质S(例如玻璃)上。图10B示出了从图10A中的表面涂层上释放生物物质(例如CTC)。该生物物质结合到生物活性组合物B上,而其它细胞被抗污组合物A排斥。表面涂层用365nm的紫外线辐照,该紫外线破坏连接体组合物C上的可裂解官能团,于是生物物质被释放用于后续的分析但保持了活力。

[0116] 生物物质也可以通过其它机制释放。在一组实施方案中,连接体组合物或表面连接体包含电敏的可裂解官能团,因此生物物质通过电脉冲机制进行释放。在另一组实施方案中,连接体组合物或表面连接体包含磁性材料作为可裂解官能团,因此在磁场或磁力缺失时释放生物物质。在又一组实施方案中,连接体组合物或表面连接体包含PEM作为可裂解官能团,因此生物物质通过改变层之间的静电相互作用进行释放。在又另外一组实施方案中,连接体组合物或表面连接体包含DNA段作为可裂解官能团,因此生物物质通过DNA杂交进行释放。

实施例

[0117] 下列实施例进一步阐述了本发明。这些实施例仅旨在说明本发明,而不应被解释为对本发明的限制。

[0118] 实施例1:双层表面涂层的制备

[0119] 抗污组合物的制备

[0120] 支撑脂双层(SLB)通过以下步骤制备:

[0121] (1) 将POPC和b-PE(可购自Avanti Polar Lipids,USA)溶解在氯仿中,最终的脂质浓度为5mg/mL。POPC/b-PE溶液在缓慢的氮气流下涡旋干燥,形成均一的POPC/b-PE薄膜。该POPC/b-PE膜在真空室中进一步干燥过夜,以去除残留的氯仿。

[0122] (2) 将步骤(1)中的POPC/生物素-PE膜分散在磷酸缓冲液中并与之混合,该磷酸缓冲液含有10mM的磷酸盐缓冲盐水、150mM的氯化钠水溶液和0.02%(w/v)的叠氮钠(NaN_3 ,可购自Sigma-Aldrich,USA),将pH值调节至7.2。将混合溶液在室温、150psi下通过100nm,接着50-nm的Nuclepore®径迹蚀刻聚碳酸酯膜(Whatman Schleicher&Schuell,德国)过滤至少10次。

[0123] (3) 步骤(2)中过滤后的溶液通过LIPEX™挤出机(Northern Lipids,加拿大)生成单层囊泡的均质群体。POPC/生物素-PE囊泡的大小为约 65 ± 3 nm,其通过动态激光散射检测器(Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, 德国)来测定。

[0124] 生物活性组合物的制备

[0125] 生物素化的EpCAM抗体通过以下步骤制备:

[0126] (1) 抗-EpCAM单克隆抗体(OC98-1或EpAb4-1)通过Chen等人(Clin Vaccine Immunol 2007; 14: 404-11)所述的方法生成。

[0127] (2) 将步骤(1)中的抗体溶解于缓冲液中,该缓冲液含有10mM的PBS和150mM的NaCl, pH约为7.2。该抗体缓冲溶液的浓度约为0.65mg/mL,其通过Nanodrop 1000分光光度计(Thermo Scientific, USA)来测定。

[0128] (3) 将步骤(2)中的抗体溶液与10mM的磺基NHS-LC-生物素(以1:10的摩尔比)混合,并在室温下溶解于Milli-Q水(Milli-Q R0系统, USA)中30分钟。通过4℃下在磷酸盐缓冲液中透析24小时去除过量的生物素,每12小时更换一次缓冲液。

[0129] (4) 生物素化的抗-EpCAM抗体(bOC98-1或bEpAb4-1)中的生物素与抗体的比率为1.5:1,其通过使用生物素定量试剂盒(Pierce, USA)的HABA试验来确定。

[0130] 另外,也可以使用可从R&D Systems (Minneapolis, MN)购买的生物素化的山羊抗人抗-EpCAM抗体。

[0131] 本发明的固体基质的制备

[0132] 玻璃基质(如来自于德国Deckglaser的显微镜盖玻片)用10%的DECON90 (Decon Laboratories Limited, 英国)进行清洁,用Milli-Q水冲洗,在氮气下干燥,并在等离子清洗机(Harrick Plasma, Ithaca, NY, U.S.A.)中在100毫托下暴露于氧等离子体10分钟。每次使用之前,将玻璃基板用乙醇冲洗并在氮气下干燥。

[0133] 基于氧化硅的固体基质(例如,硅晶片或玻璃盖玻片)在120℃下用食人鱼洗液(70%硫酸和30%过氧化氢(v/v))清洁40分钟,然后用蒸馏水洗涤,并用丙酮冲洗。该固体基质在氮气流中干燥,并用等离子体清洗机处理。

[0134] 对于汽相硅烷化反应,将清洁的氧化硅基质和含有150μL的3-(氨基丙基)-三乙氧基硅烷(Sigma, USA)的培养皿在约0.3托的减压下置于干燥器(Wheaton干封干燥器, 100nm)中16小时。该基质用丙酮清洁并在氮气流下干燥。

[0135] 固体基质上的SLB表面涂层的构建

[0136] 将来自于第[0084]段的0.25mg/mL的POPC/b-PE囊泡溶液加至清洁的固体基质上以形成SLB涂覆的固体基质。随后用含有10mM PBS和150mM NaCl的磷酸盐缓冲液(pH=7.2)充分冲洗以除去过量的POPC/b-PE囊泡。生物素是SLB中的官能团,它与连接体组合物中的官能团(链霉亲和素)结合。

[0137] 将0.1mg/mL的链霉亲和素(SA)溶液(可购自Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)加至SLB涂覆的固体基质上,并孵育1小时,然后用PBS缓冲液冲洗以去除过量的SA。

[0138] 将约0.05mg/mL的b-抗EpCAM溶液加至SA-SLB涂覆的固体基质上,以形成本发明的表面涂层。

[0139] 固体基质上的PEG表面涂层的构建

[0140] 将生物素化的PEG硅烷溶液(Si-bPEGs)加至干净的玻璃基质上,并孵育1小时,以

在玻璃基质上形成Si-bPEG抗污组合物,接着用乙醇冲洗以去除过量的Si-bPEG。硅烷是表面连接体,而生物素是与连接体组合物中的官能团(SA)结合的官能团。

[0141] 将0.1mg/mL的SA溶液加至Si-bPEG涂覆的固体基质上,并孵育1小时,接着用PBS缓冲液冲洗以去除过量的SA。

[0142] 加入0.05mg/mL的b-抗EpCAM溶液并与SA-Si-bPEG表面涂层结合,接着用PBS缓冲液冲洗以去除过量的b-抗-EpCAM。

[0143] 固体基质上的PEM表面涂层的构建

[0144] PEM膜的物理沉积通过如下的分批和静态条件进行:首先,将所有的多肽溶解于pH7.4的含有0.15M NaCl的10mM Tris-HCl缓冲液中。然后,在室温下,将固体基质浸泡在PLL(分子量为15000-30000;Sigma, St Louis, MO)溶液(1mg/mL)中10分钟,接着用1mL的Tris-HCl缓冲液冲洗1分钟。为了偶联PLGA,随后将PLL涂覆的载片浸泡在PLGA溶液(分子量为3000-15000, Sigma, StLouis, MO, 1mg/mL)中10分钟,接着用1mL的Tris-HCl缓冲液冲洗1分钟。最后,用新鲜的PBS清洗基质以除去未偶联的多肽。得到的c-(PLL/PLGA)_i,其中i表示聚电解质对的数目,通过重复上述步骤而生成:i) 0.5仅指c-PLL, i) 1指c-(PLL/PLGA)₁,依此类推。

[0145] SLB表面涂层的QCM-D表征

[0146] 表面涂层的构建通过耗散石英晶体微天平(QCM-D)进行监测。图11中的QCM-D反应示出了在SiO₂-预处理的石英晶体上的表面涂层的构建。首先,在(I)点处将0.25mg/mL的POPC/b-PE囊泡混合物(在磷酸盐缓冲液中)分配到QCM室中。归一化的频率变化F和耗散转变D分别为 $26.0 \pm 0.7\text{Hz}$ 和 $0.19 \pm 0.03 \times 10^{-6}$,它们是高度均一的脂双层的特征。两次缓冲液洗涤(表示为*)后,在II点处分配0.1mg/mL的SA溶液。在 $F=52.8 \pm 5.4\text{Hz}$ 和 $D=3.84 \pm 0.54 \times 10^{-6}$ 时SA结合饱和。在(III)点处,将0.025mg/mL的OC98-1抗体溶液分配到QCM室中,并且没有频率或耗散的变化。这表明在OC98-1抗体和SA-脂双层表面之间没有相互作用。与此相反,在(IV)点处添加生物素化的抗体溶液(bOC98-1或bEpAb4-1)导致频率和耗散的变化,具有 $F=39.4 \pm 6.8\text{Hz}$ 和 $D=1.63 \pm 0.28 \times 10^{-6}$ 的平衡位移。这证明了生物素化的抗体结合到SA-脂双层表面。

[0147] 使用QCM-D检查表面涂层上的SLB抗污组合物的特征(图12)。将牛血清白蛋白(BSA,购自Sigma-Aldrich, USA)加至表面涂层上,频率和耗散突然改变,具有 $F=6.9\text{Hz}$ 和 $D=3.35 \times 10^{-6}$ 的平衡位移。这表明了直接BSA吸附。三次缓冲液冲洗(*)引起了频率的增加和耗散的降低,具有 $F=6.1\text{Hz}$ 和 $D=3.16 \times 10^{-6}$ 的饱和位移。这表明被吸附的BSA可以容易地从表面涂层上除去,因此,BSA和SLB之间具有极弱的相互作用。

[0148] 实施例2:微流体芯片的制备

[0149] 微流体芯片可以通过下列步骤制备:

[0150] 1.用商业CO₂激光划片机(Helix24, Epilog, USA)雕刻微槽以在PMMA基质上形成微结构。

[0151] 2.用MeOH、去污剂和水对PMMA基质、玻璃基质和螺母进行清洁,接着进行10分钟的超声处理。该螺母和固体基质用氮气进行干燥并在60°C烘烤10分钟。

[0152] 3.通过氯仿处理将PMMA基质与螺母结合。

[0153] 4.使用粘合剂(例如来自美国3M公司的3M双面胶带)将PMMA基质与玻璃载片连接

在一起。

[0154] 实施例3:CTC与抗-EpCAM官能化的SLB表面涂层的结合

[0155] 使用八个血液样品来测定实施例2的微流体芯片中的抗-EpCAM官能化的SLB表面涂层的CTC捕获率。每个血液样品含有2ml来自于IV期结肠癌患者的血液,将样品以0.5ml/hr的速度引入到微流体芯片的密封通道,通过注射泵进行控制。随后,用0.5ml的PBS缓冲液以1ml/h的流速冲洗微流体芯片中的密封通道,接着进行原位免疫染色。

[0156] 对于这8个样品,每毫升血液中捕获的CTC的数目为26、34、36、39、47、67、79和99。25%的血液样品具有79或更高的CTC计数/ml测试样品,并且CTC计数中值为43/ml测试样品。在缓冲液冲洗后存在最少的非特异性细胞和蛋白质的结合。

[0157] 作为比较,FDA批准的Veridex CellSearch的CTC计数如下:25%的样品具有3个或更多的CTC/7.5ml测试样品,并且CTC计数中值是0。

[0158] 所述抗-EpCAM官能化的SLB表面和150 μ l掺有HCT116癌细胞的人血(HCT116癌细胞密度约为每100 μ l血液大约10到100个)一起孵育,接着进行缓冲液冲洗以除去非特异性细胞。图13示出了在缓冲液冲洗前后的表面涂层。在缓冲液冲洗之前,表面涂层覆盖着非特异性细胞(左上)和4个HCT116细胞(左下)。在缓冲液冲洗之后,几乎所有的非特异性细胞被去除(右上),而所述4个HCT116癌细胞(右下)保留在表面涂层上。

[0159] 该结果表明,本发明的表面涂层在捕获CTC和释放非特异性细胞方面是有效的。

[0160] 实施例4:各种表面条件的捕获效率和抗污性质的比较

[0161] HCT116癌细胞(生物物质)的捕获率和六种不同的表面条件的抗污性质在图14A中示出。

[0162] 结果表明,本发明的表面涂层(脂质/SA/b-抗-EpCAM和PEG(15mM)/SA/b-抗-EpCAM)在捕获生物物质方面更有效。与不含抗污组合物的表面涂层(仅玻璃)相比,在本发明的表面涂层上存在较少的非特异性细胞(白细胞或WBC)结合。

[0163] 图14B示出了下列表面的非特异性血细胞结合:(A)仅玻璃;(B)生物素化的SLB(b-SLB),(C)链霉亲和素偶联的-bSLB,和(D)OC98-1-偶联的bSLB。这些表面与来自于健康供体的稀释人血液(100 μ l PBS缓冲液中的1 μ l血液)一起孵育4小时,然后用PBS缓冲液冲洗。图像(E)至(H)是缓冲液冲洗之后的图像,其对应于(A)至(D)中的表面涂层。结果表明,在缓冲液冲洗之后,与不含释放性组合物的表面涂层(即,仅玻璃)相比,在具有释放性组合物(即SLB)的表面涂层上存在较少的非特异性血细胞。

[0164] 实施例5:流动纯化

[0165] 基于非特异性细胞对抗污组合物的亲和力,差别的流动剪切可以选择性“冲洗”出这些非特异性细胞,而生物基质保留在表面涂层上。

[0166] 在这项研究中,表面涂层包含SLB、连接体组合物和作为生物活性组合物的纤连蛋白。图15A示出了在表面涂层上培养了4小时的成纤维细胞3T3(绿色)和结肠癌细胞系HCT116(红色)。该表面涂层用缓冲溶液冲洗,其具有3达因/cm²的剪切应力。

[0167] 如图15B所示,在缓冲液冲洗5分钟内从表面涂层上冲去HCT116细胞(红色)。由于对纤连蛋白的高亲和力,成纤维细胞3T3细胞(绿色)在缓冲液冲洗30分钟后仍保留在表面涂层上,如图15C所示。

[0168] 结果显示,约3达因/cm²的剪切应力足以从释放性组合物上除去非特异性细胞。

[0169] 图16概述了HCT116和NIH-3T3细胞群体(非特异性细胞)的各自的剪切应力和冲洗时间。为了从表面涂层的释放性组合上除去HCT116细胞,剪切应力为约3至约4.5达因/cm²。为了从表面涂层的释放性组合中除去NIH-3T3细胞,剪切应力为约8.5至约12达因/cm²(N/N0是使用不同剪切应力时仍连接到表面涂层上的细胞的百分比。N为最终细胞数,而N0为初始细胞数。)

[0170] 实施例6:CTC从表面涂层上的释放

[0171] 在实施例3的表面涂层上捕获的HCT116癌细胞通过引入气泡而进行释放。图17显示,在红色圆圈中的HCT116细胞在引入气泡3秒内从表面涂层上去除。

[0172] 实施例7:从表面涂层上释放的CTC的培养

[0173] 被捕获的CTC在37℃下与5mM的EDTA一起孵育5至10分钟,并通过使培养基流入到微流体芯片的密封通道内而释放。从这个步骤共释放18个co1o205细胞。将释放的co1o205细胞和含血清的培养基和抗生素(青霉素+链霉素+庆大霉素)一起放置在48孔组织培养聚苯乙烯板中进行培养。

[0174] 图18A-18C分别示出了第1天、第10天及第14天18个co1o205细胞的一部分。该研究表明,被释放的co1o205细胞为随后的细胞培养保留了它们的活力。

[0175] 实施例8:通过CTC过滤装置捕获CTC

[0176] 任何膜、管、毛细管、珠、纳米颗粒或通道可以涂有本发明的表面涂层。图19示意性地示出了一种过滤装置,其中过滤器上涂有本发明的表面涂层。该过滤器可以适应大体积的血流,并且为诊断或治疗目的捕获生物物质。为了获取患者的血液或体液,可以将导管插入患者的静脉或瘻管内,该患者的血液流过CTC过滤装置,其中过滤器上的表面涂层捕获CTC。过滤后的血液流回到患者体内。

[0177] 实施例9:通过生物素化的EpAb4-1抗体捕获CTC

[0178] 使用HCT116(结直肠)CTC和SAS(舌)CTC检查生物素化的OC9801抗体、生物素化的EpAb4-1抗体和生物素化的EpCam抗体(购自R&D system,USA)的结合特异性。

[0179] 将CTC掺入缓冲溶液中(约10⁵CTC/ml)。将掺有CTC的缓冲溶液引入到含有以下生物活性组合物的表面涂层上:生物素化的OC9801抗体、生物素化的EpAb4-1抗体、生物素化的EpCam抗体和IgG抗体。

[0180] 通过比色法,通过测量490nm处的吸收光密度来确定抗体的CTC结合特异性。图20表明,生物素化的EpAb4-1在捕获HCT116CTC和SAS CTC方面是有效的。

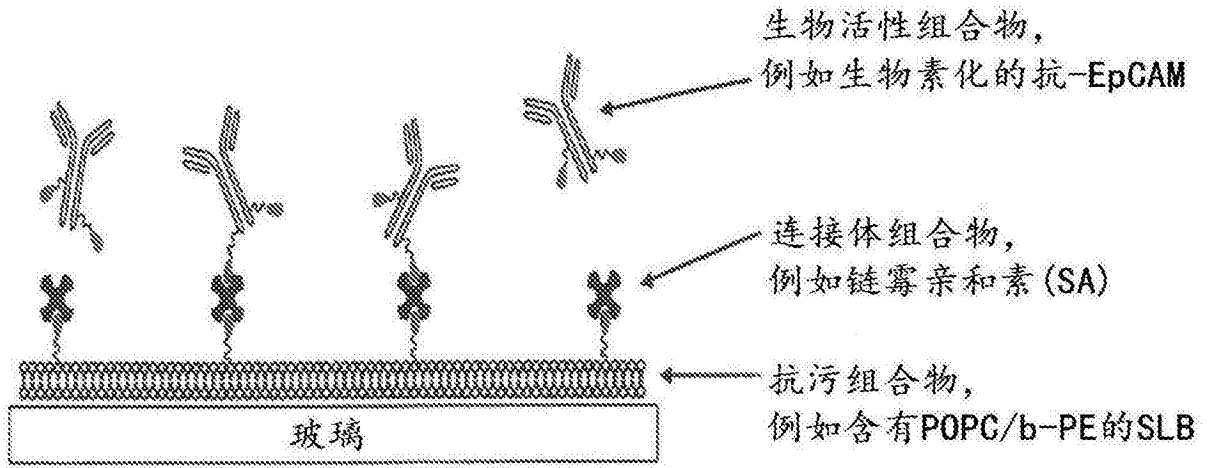


图1A

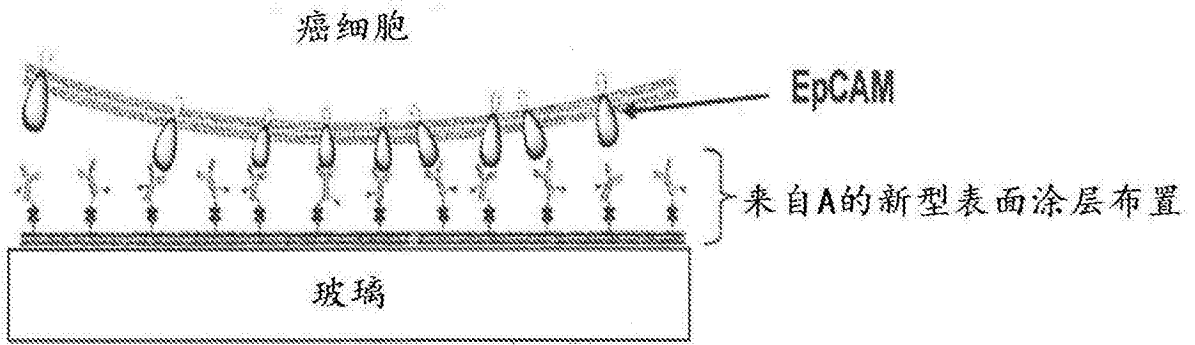


图1B

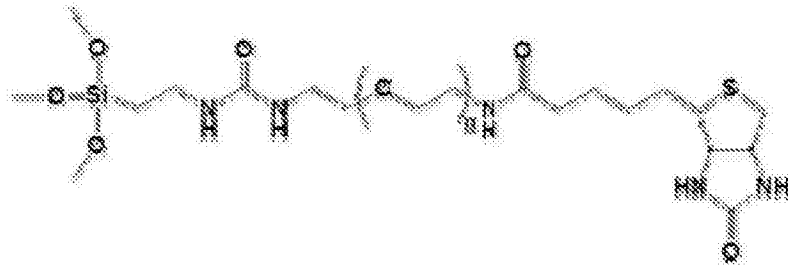


图2A

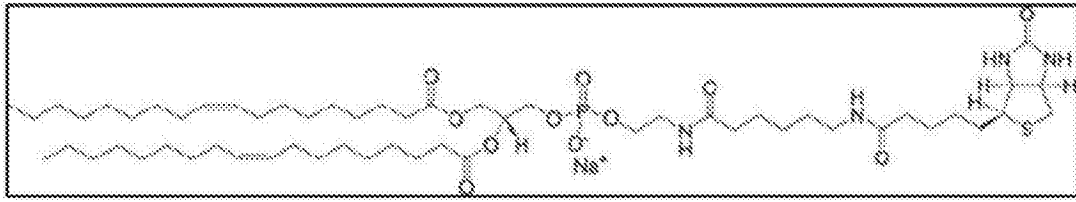


图2B

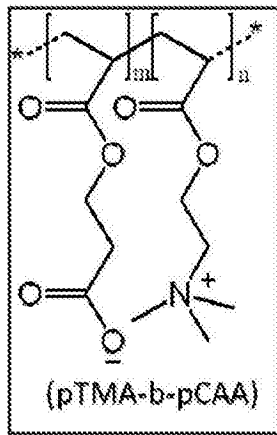


图2C

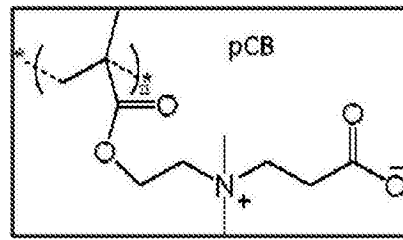


图2D

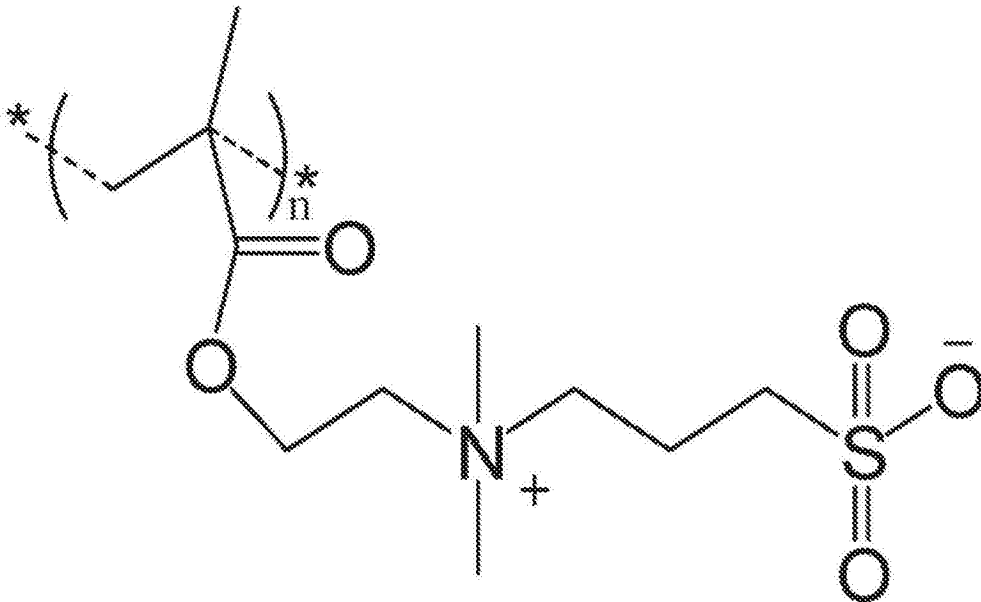


图2E

图2F

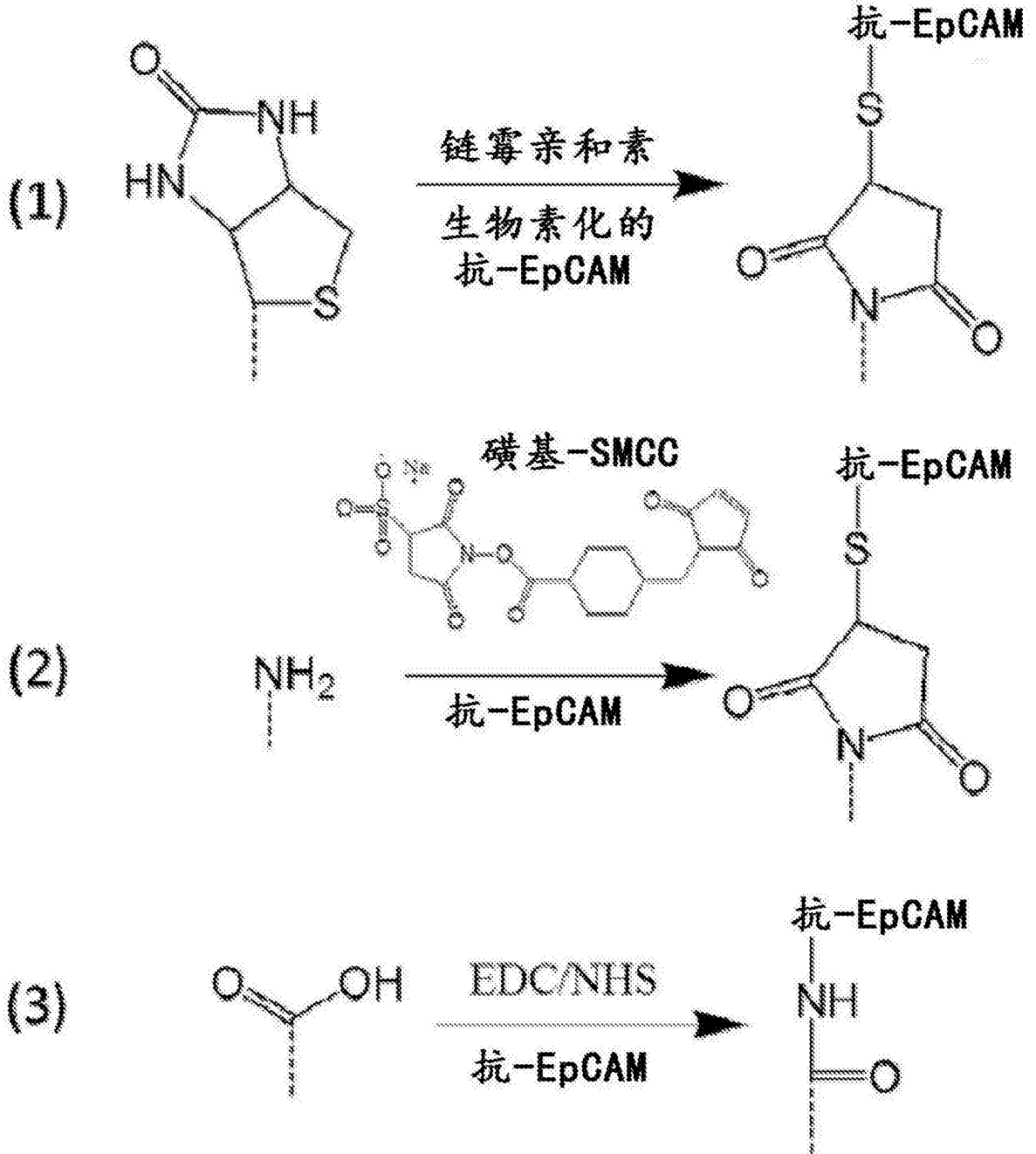


图3

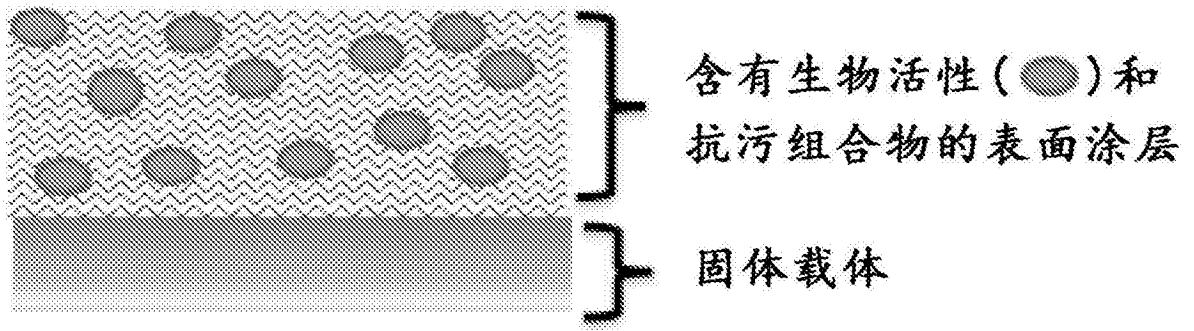


图4A

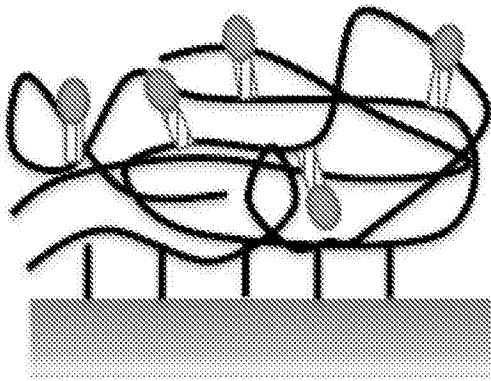


图4B

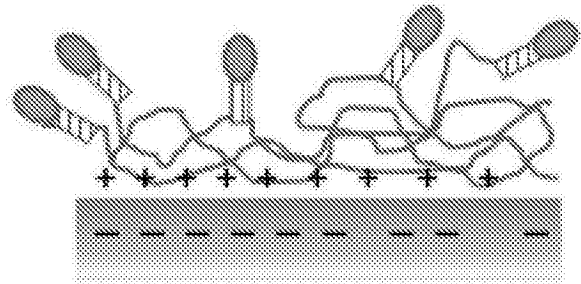


图4C

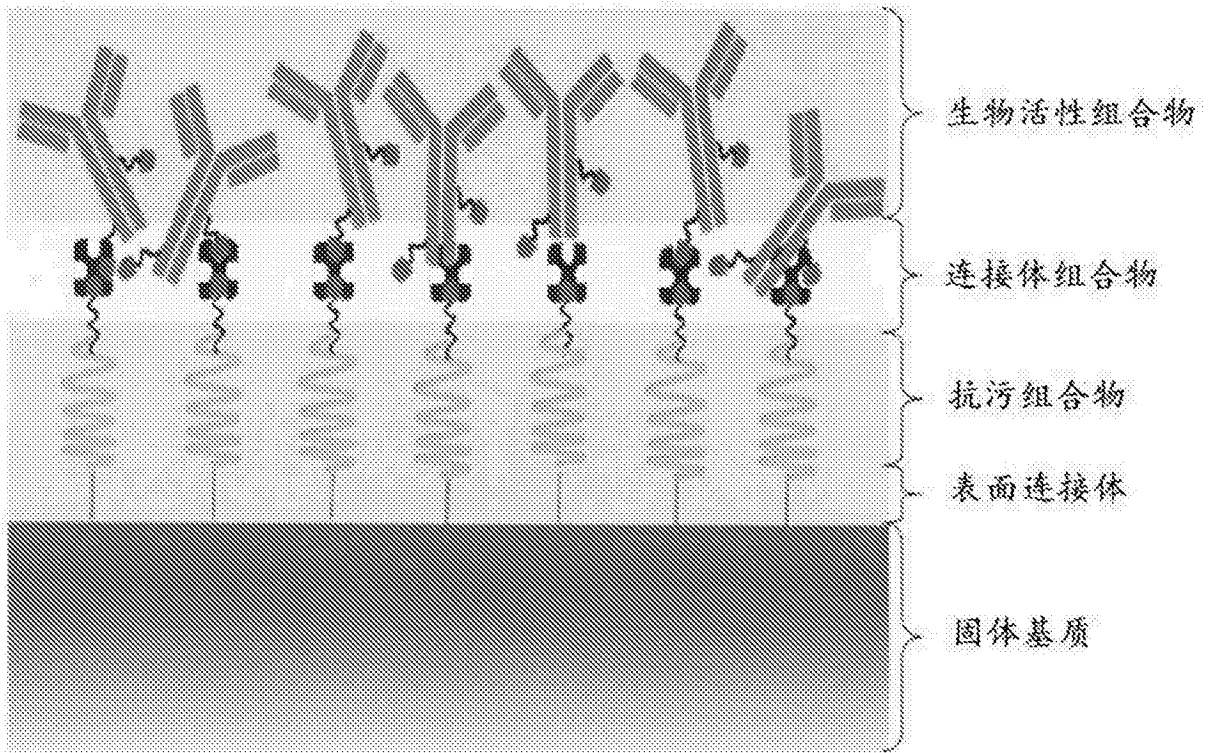


图4D

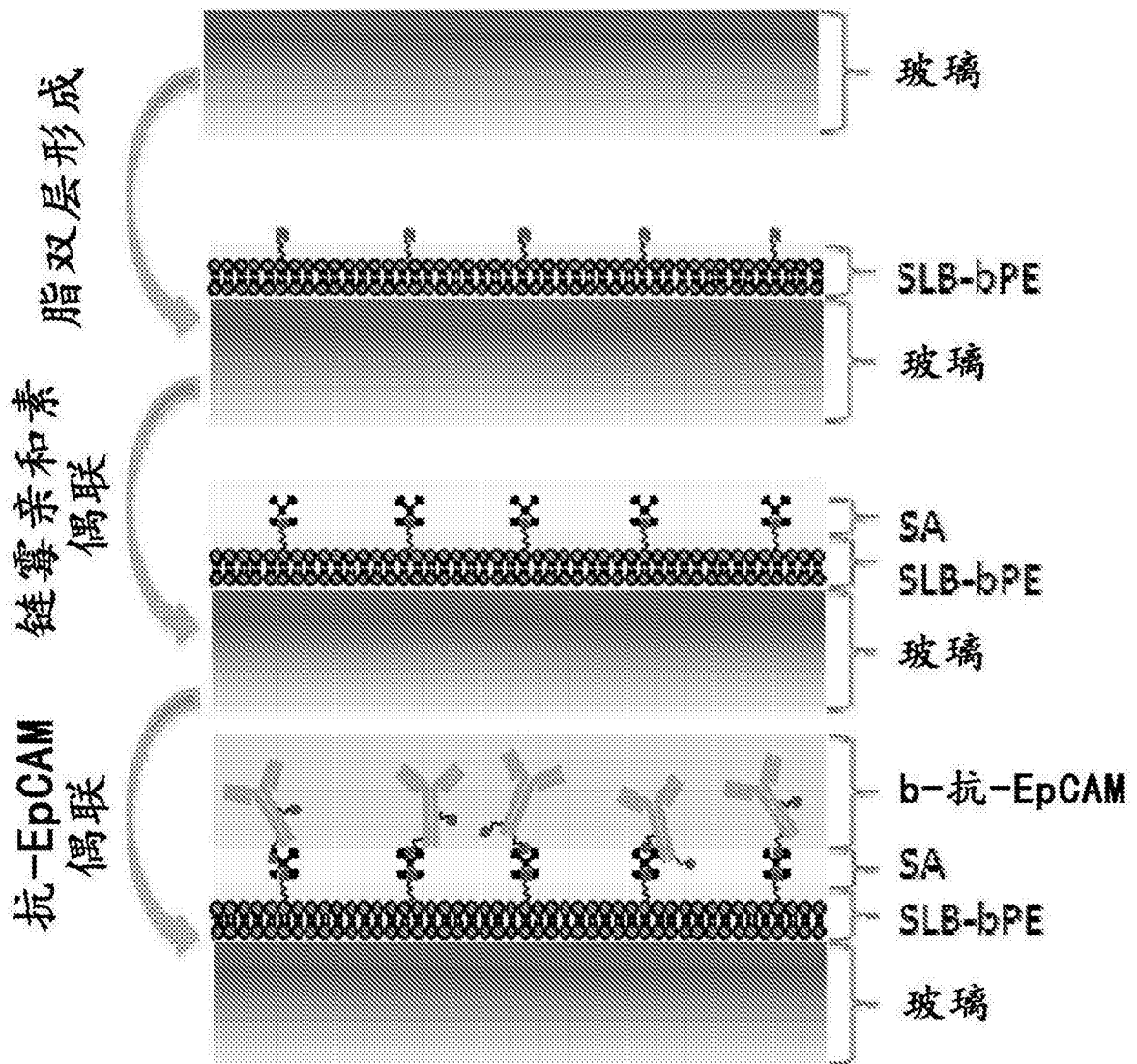


图5A

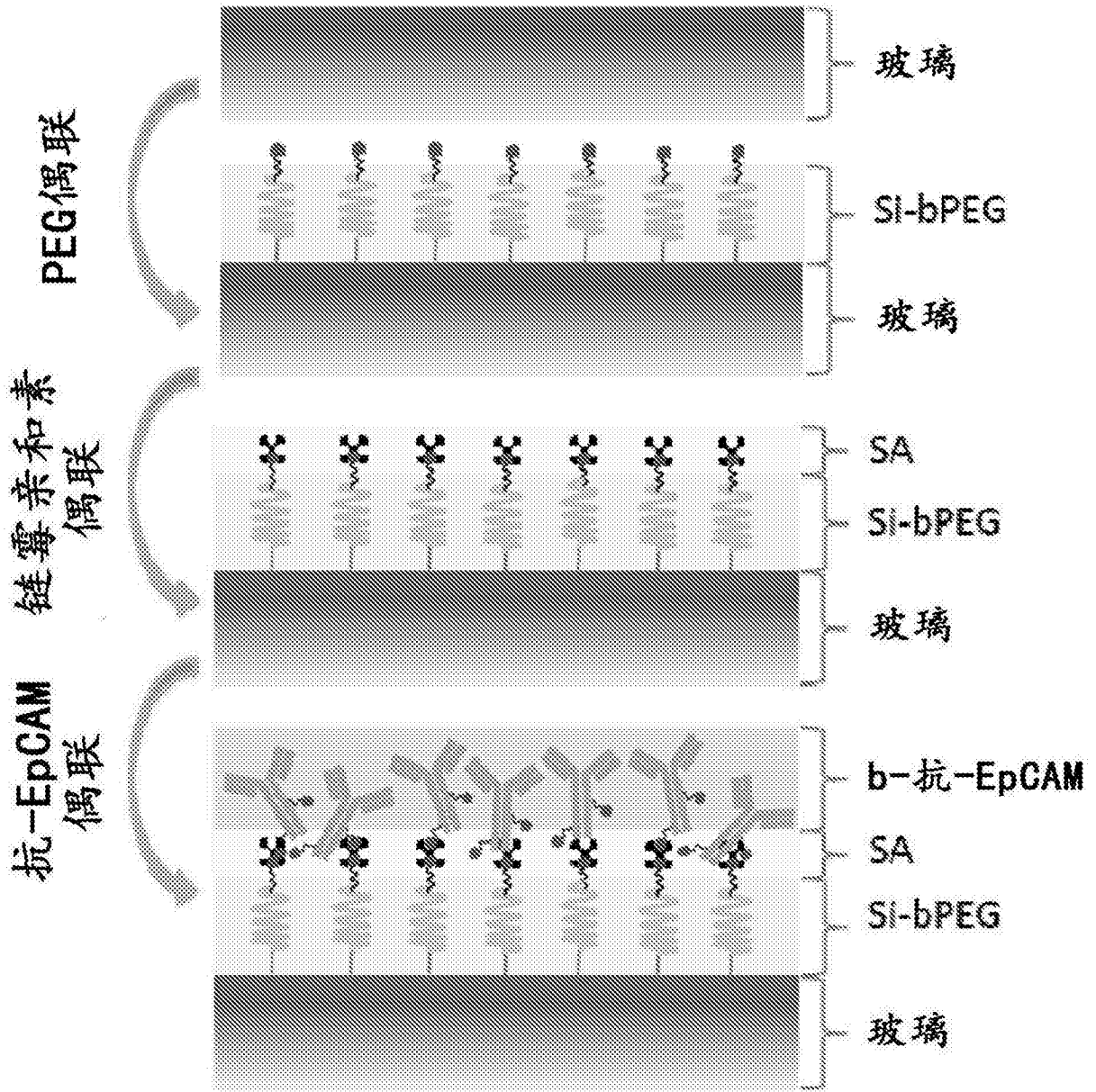


图5B

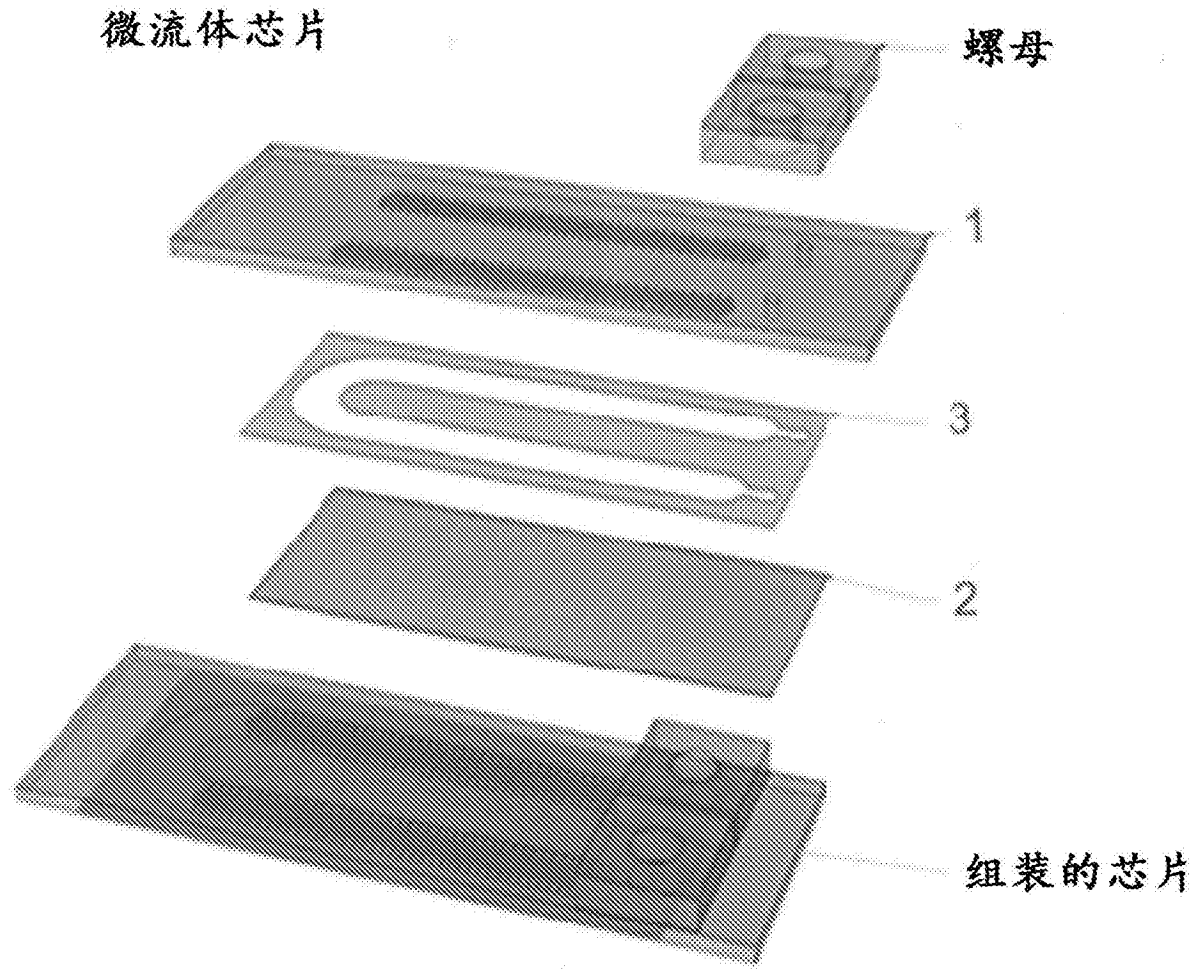


图6A

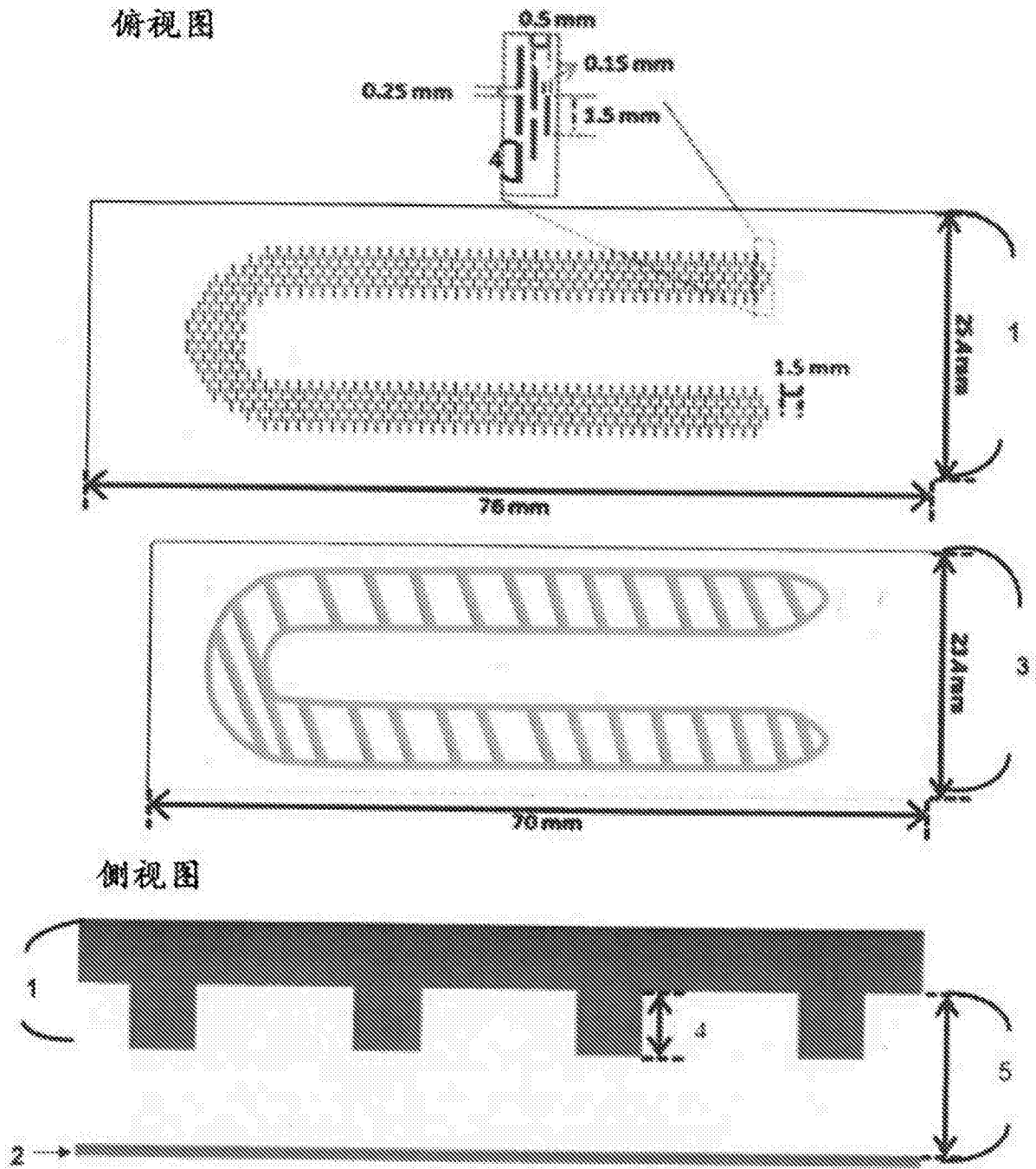


图6B

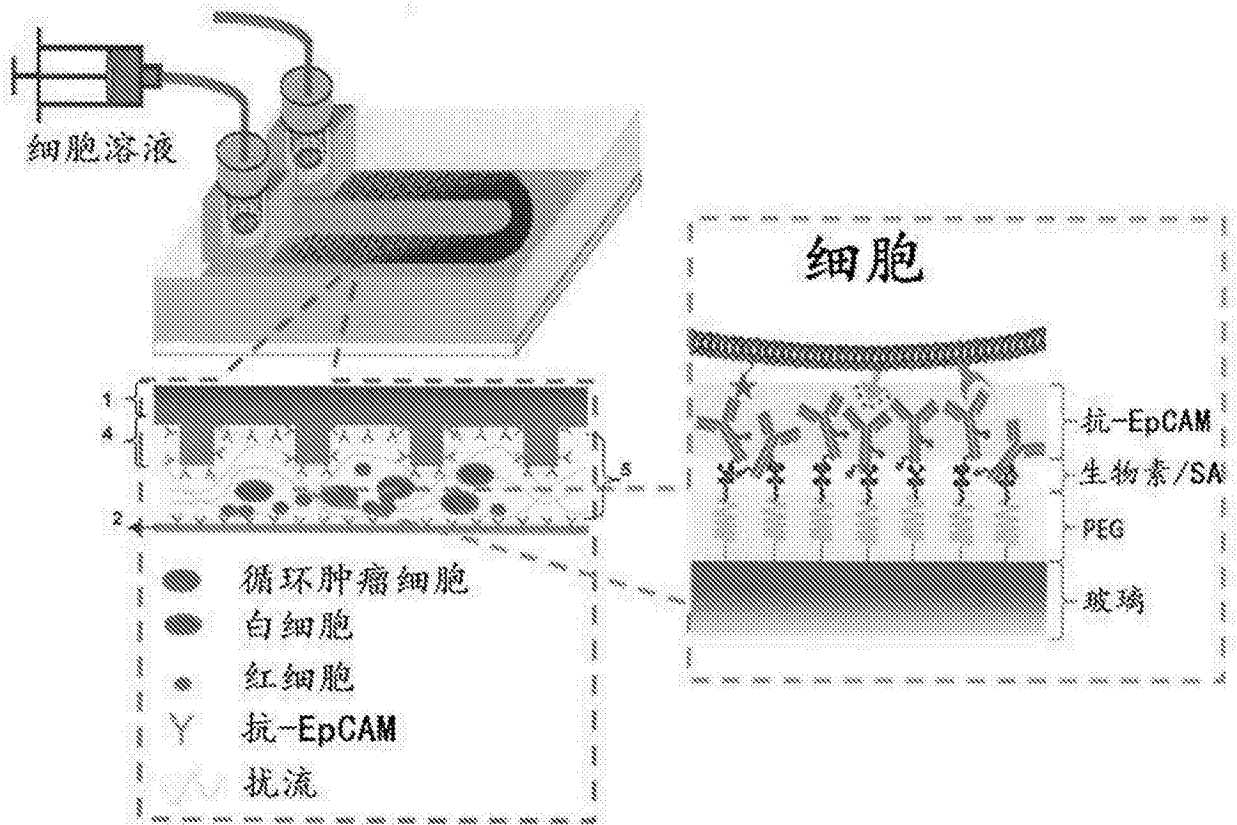


图6C

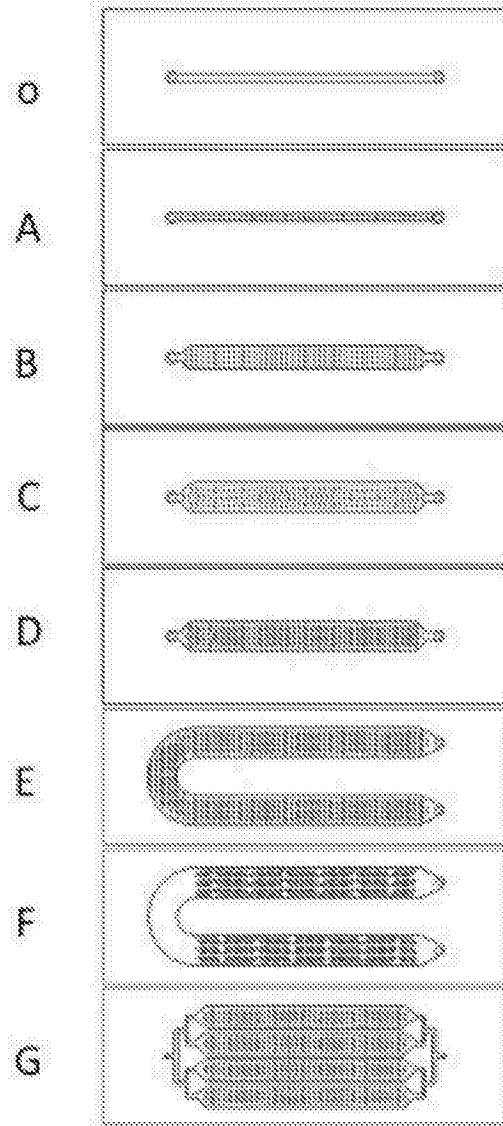


图7A

设计A

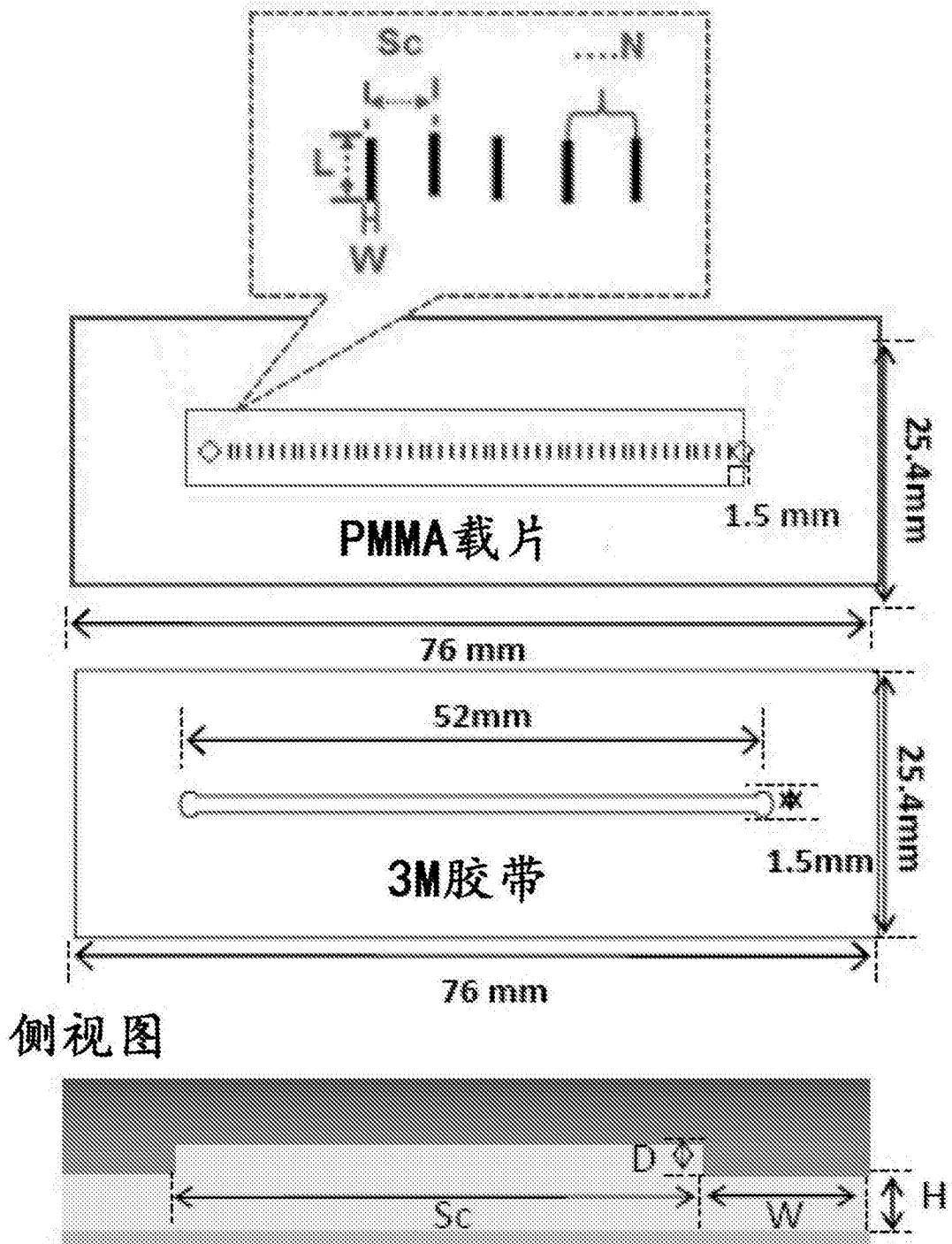


图7B

设计B

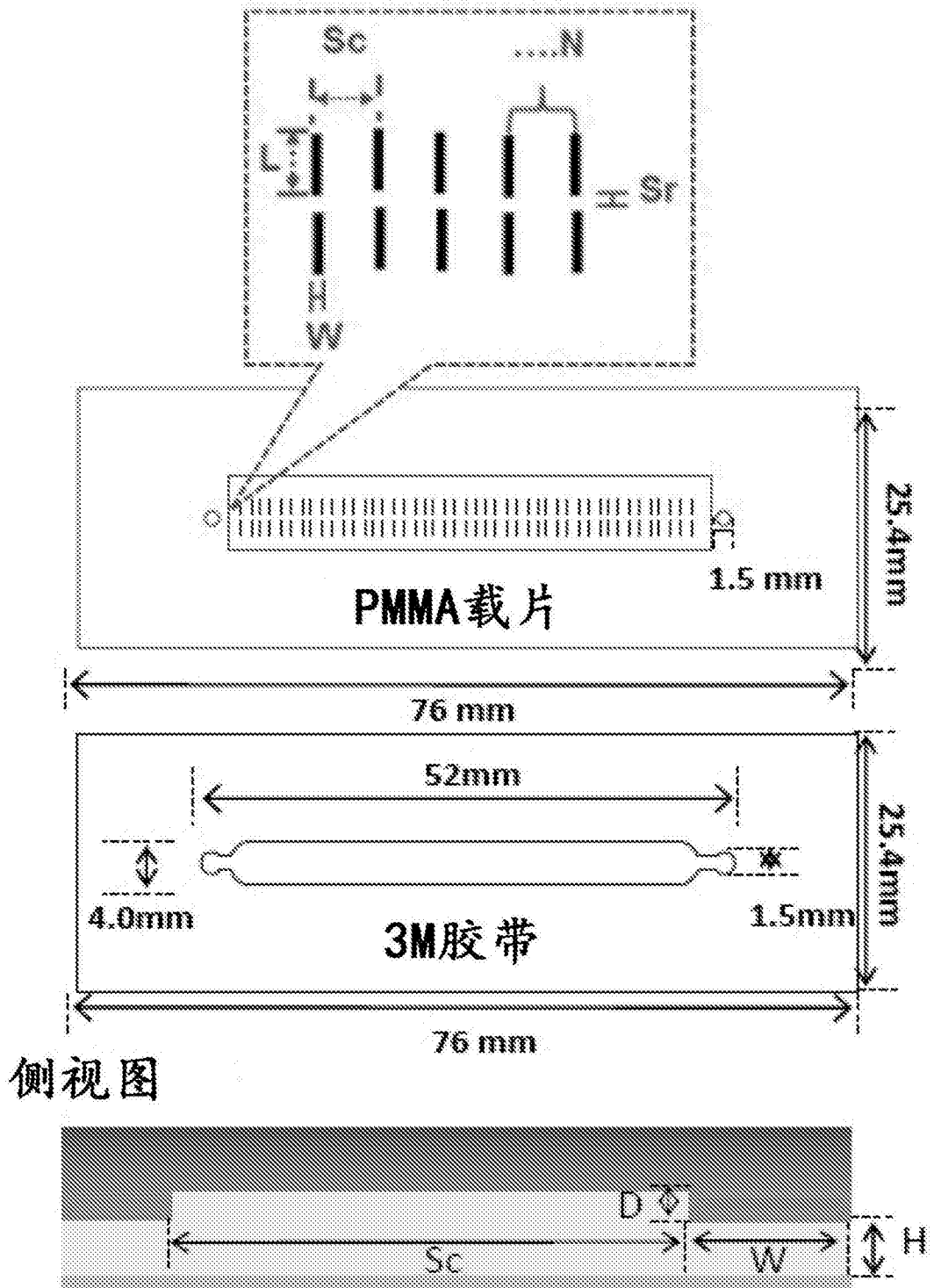


图7C

设计C

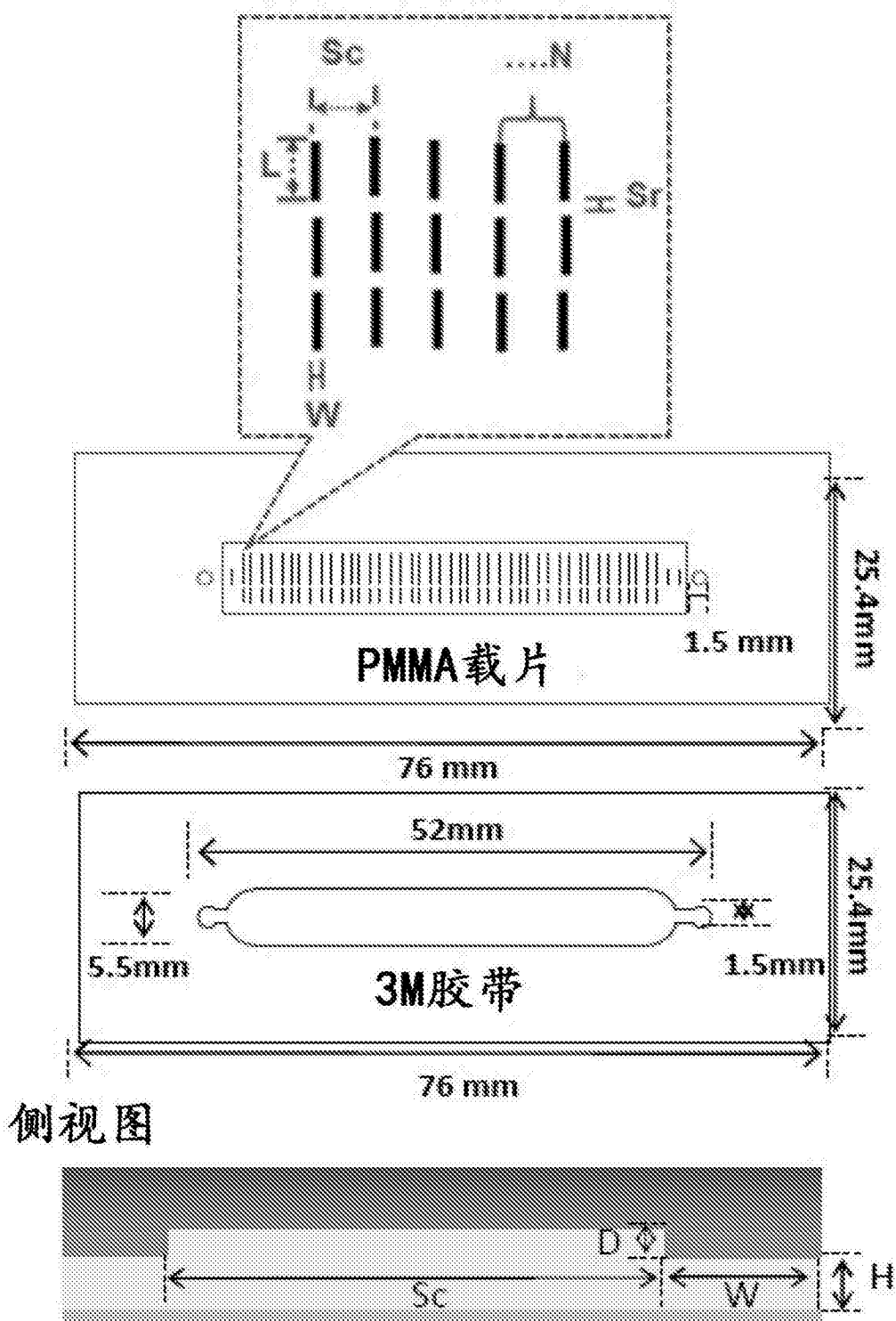


图7D

设计D

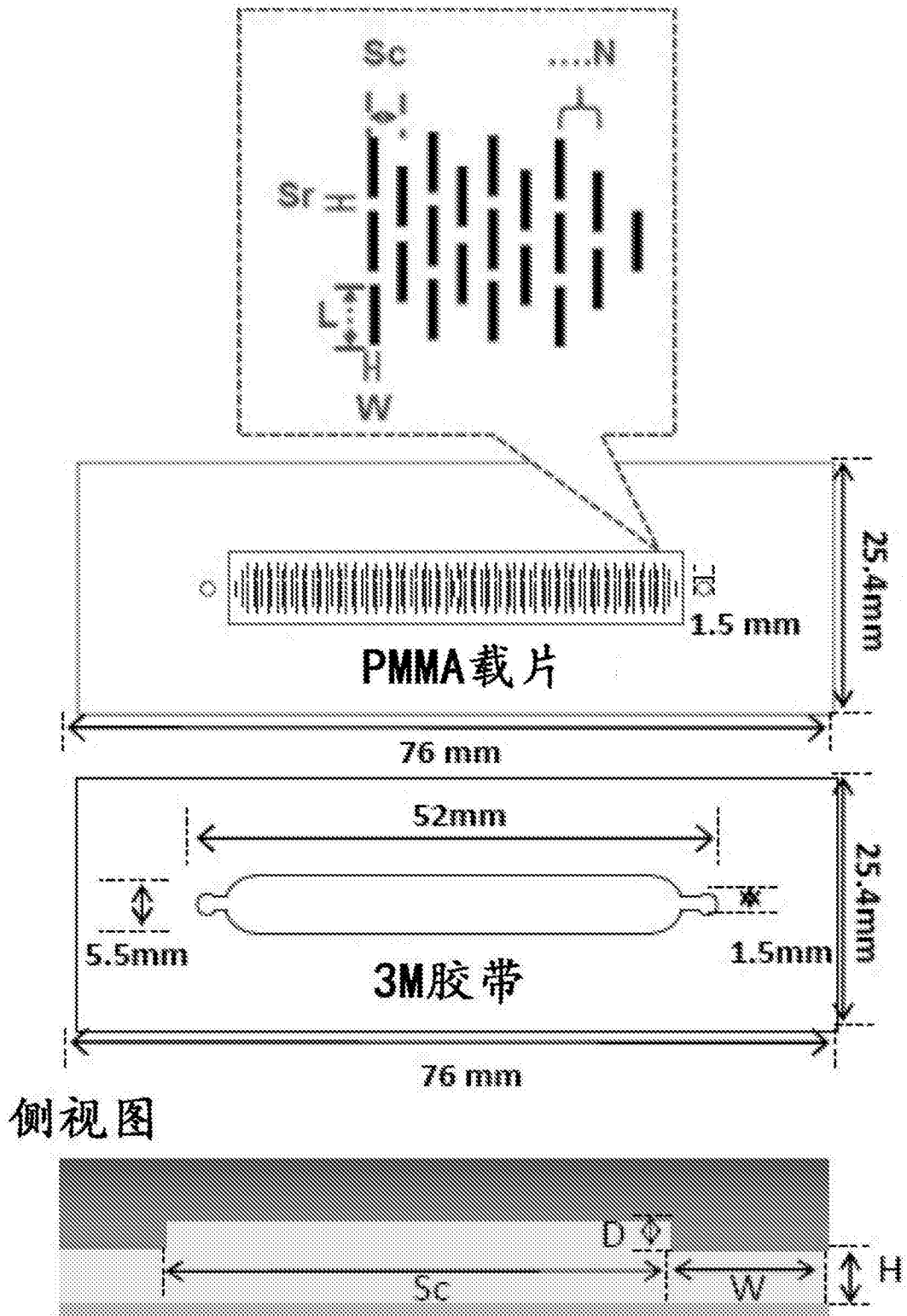


图7E

设计E

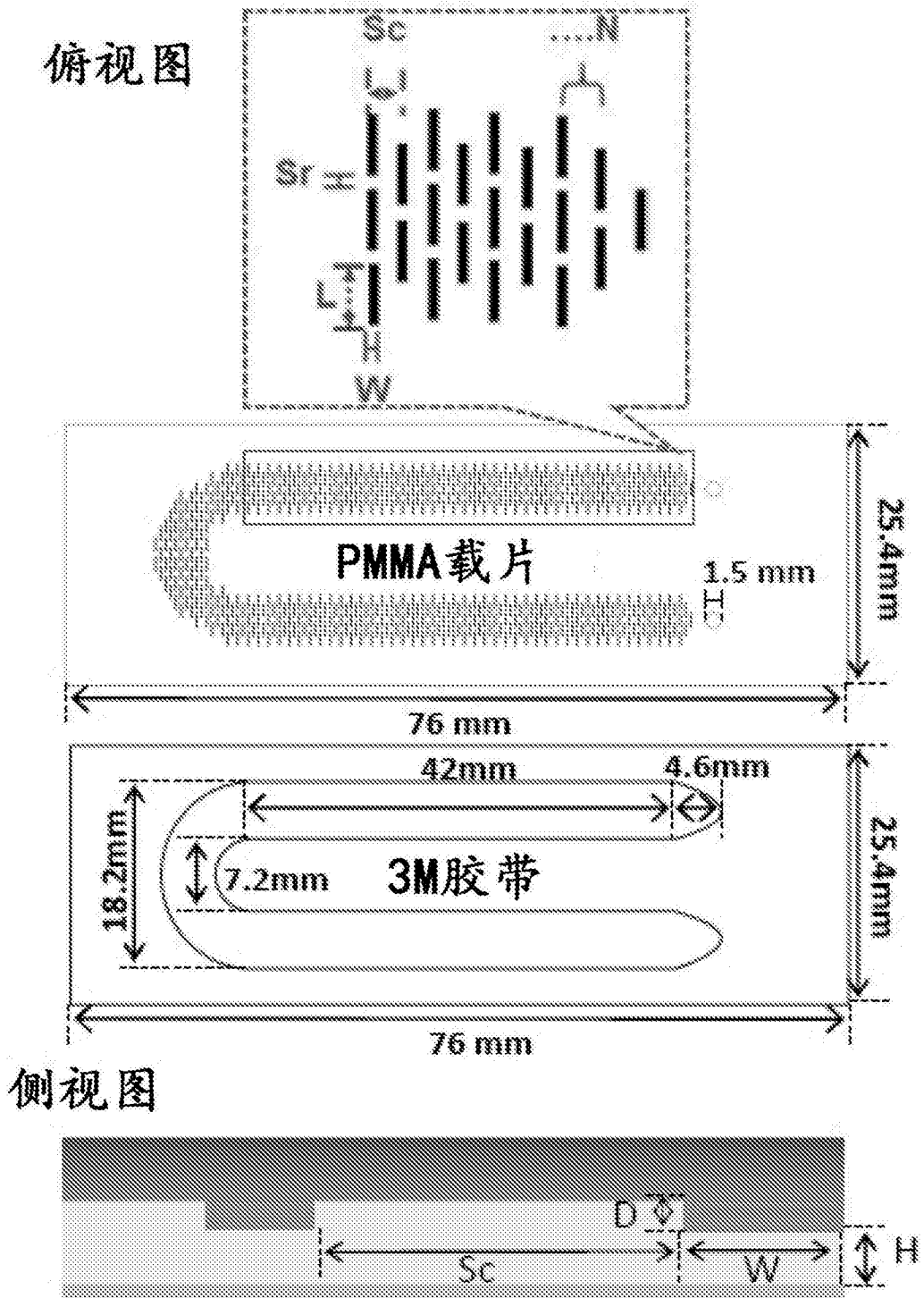
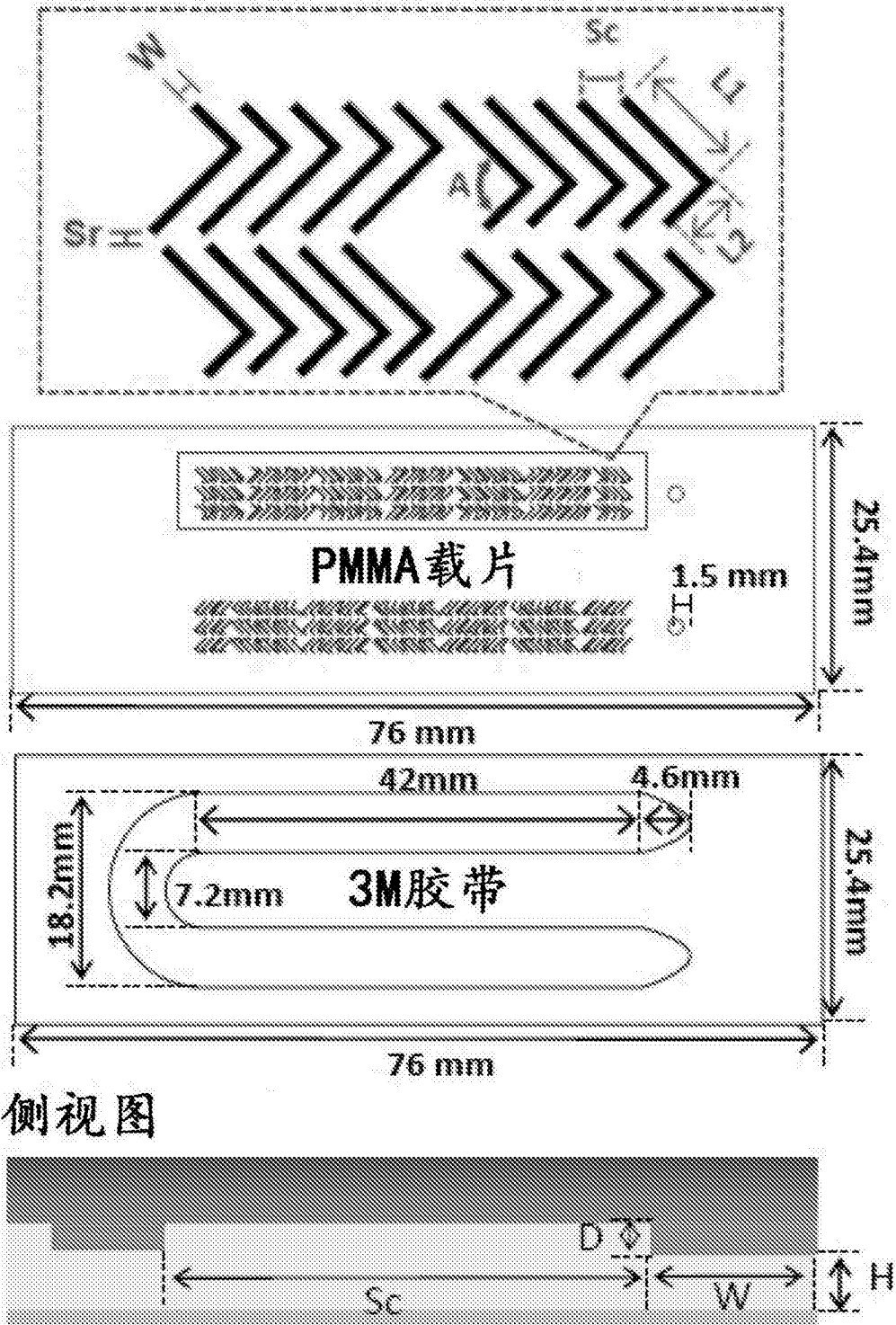


图7F

设计F



侧视图

图7G

设计G

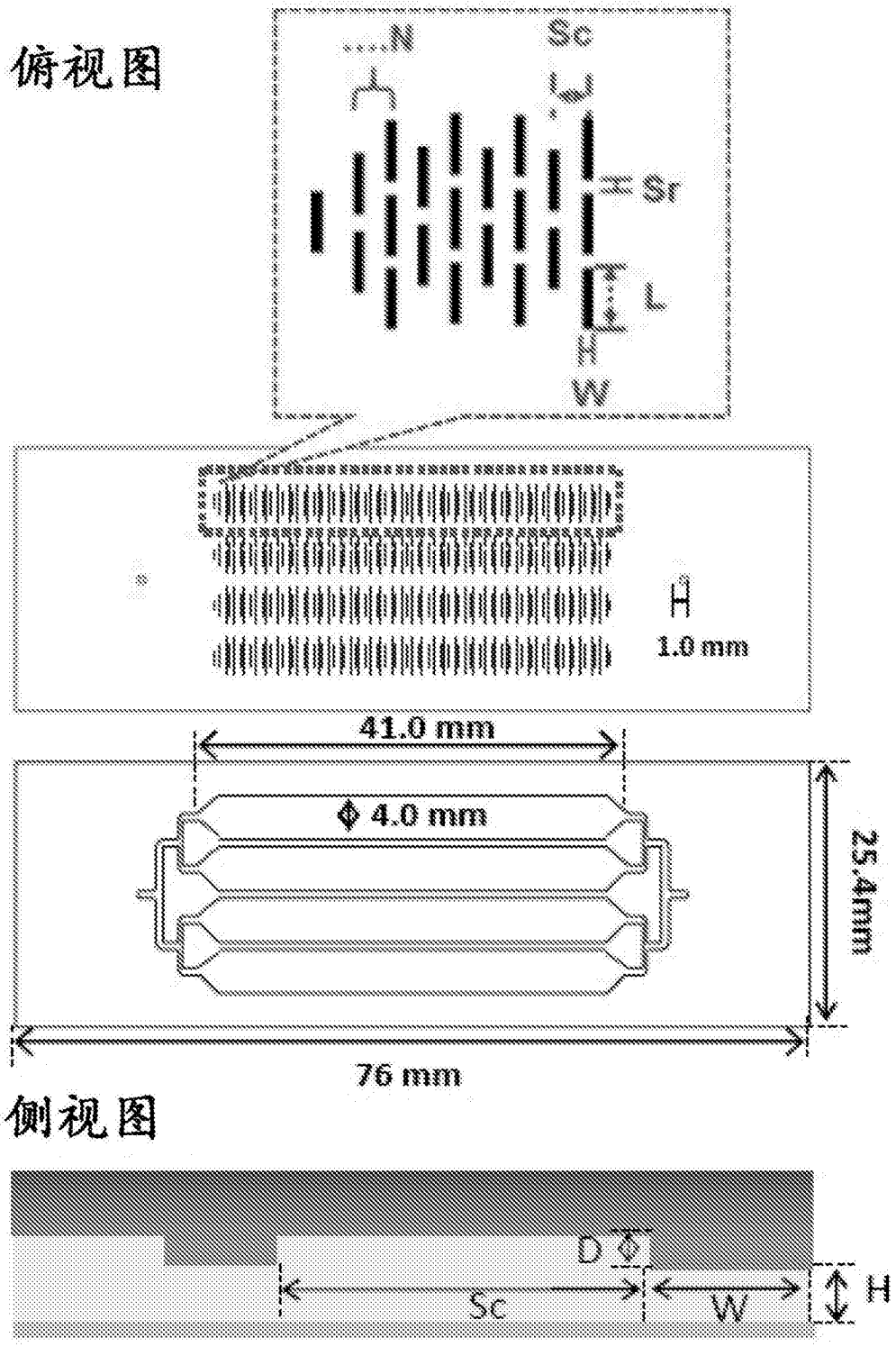


图7H

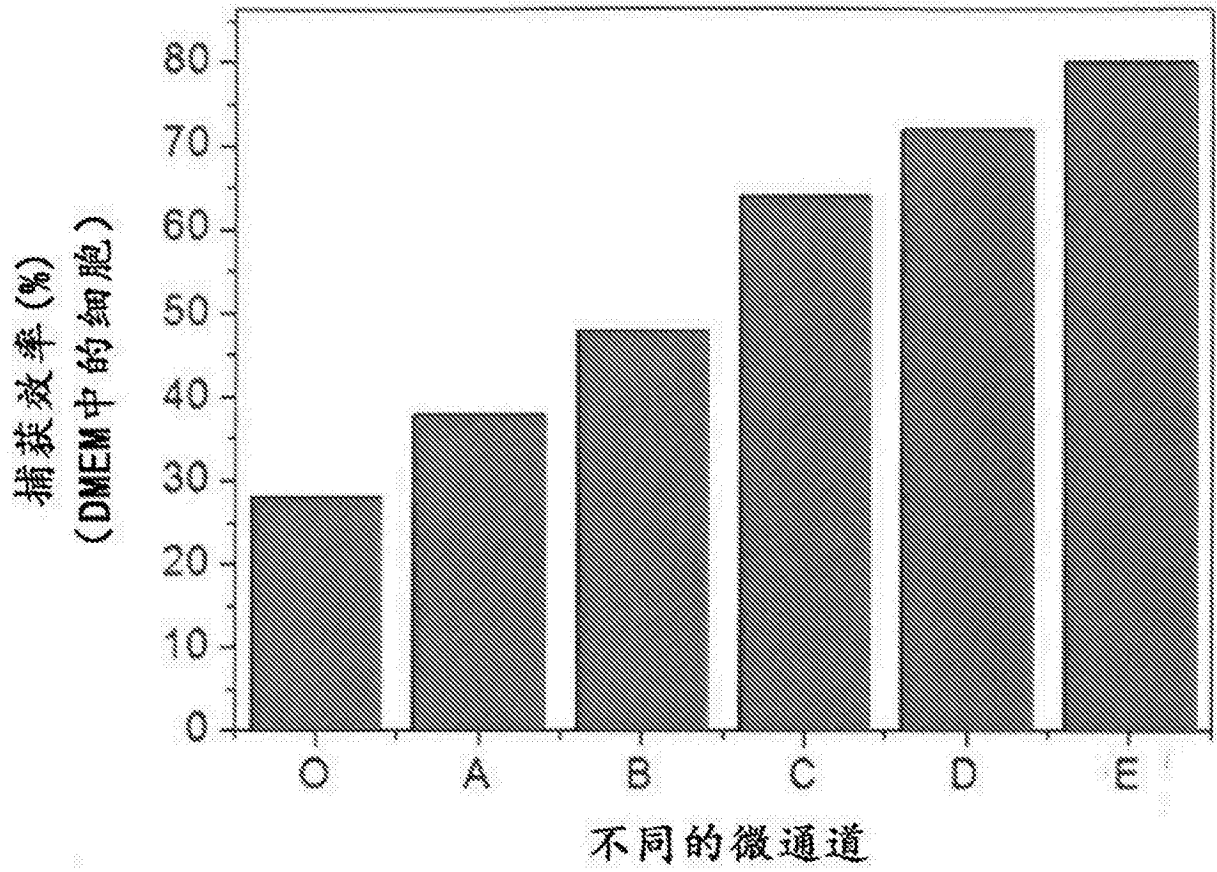


图7I

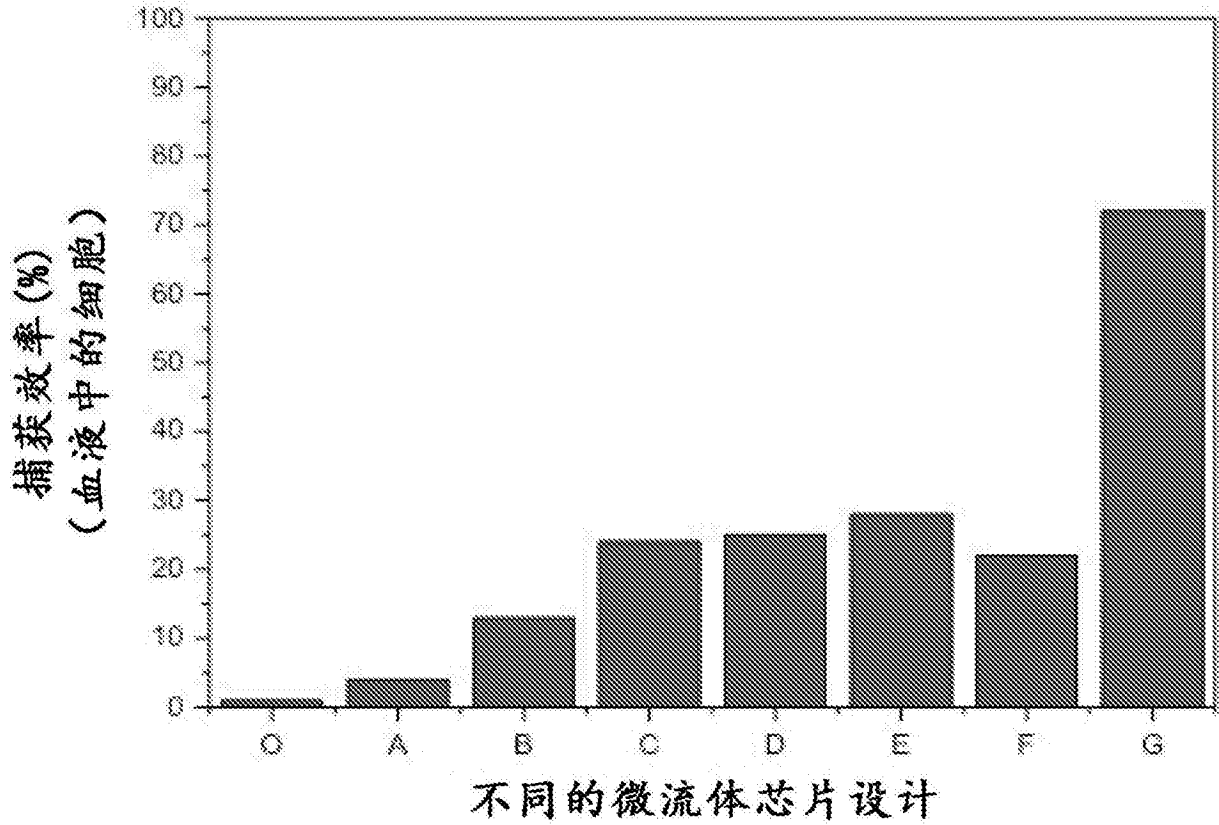


图7J

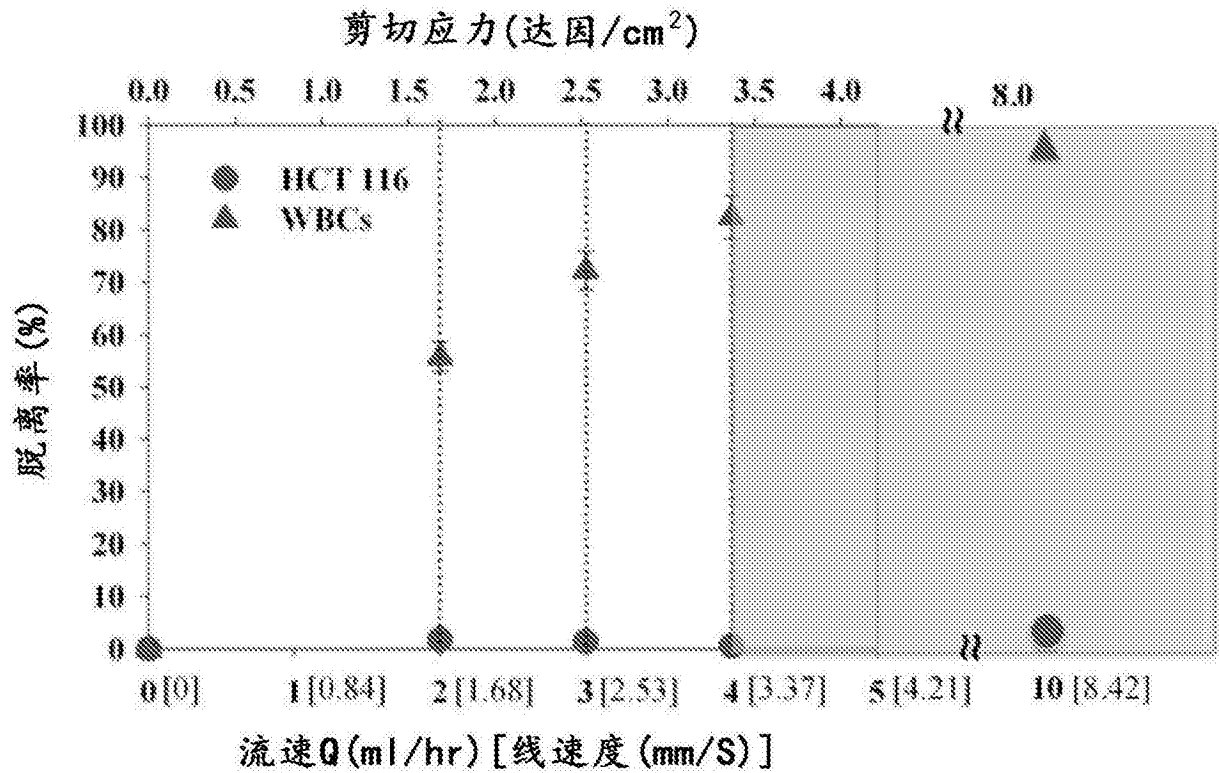


图8

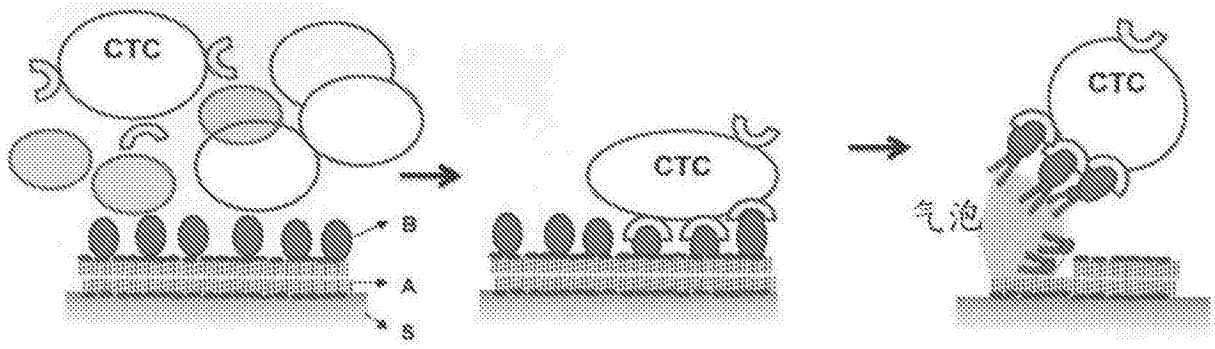


图9

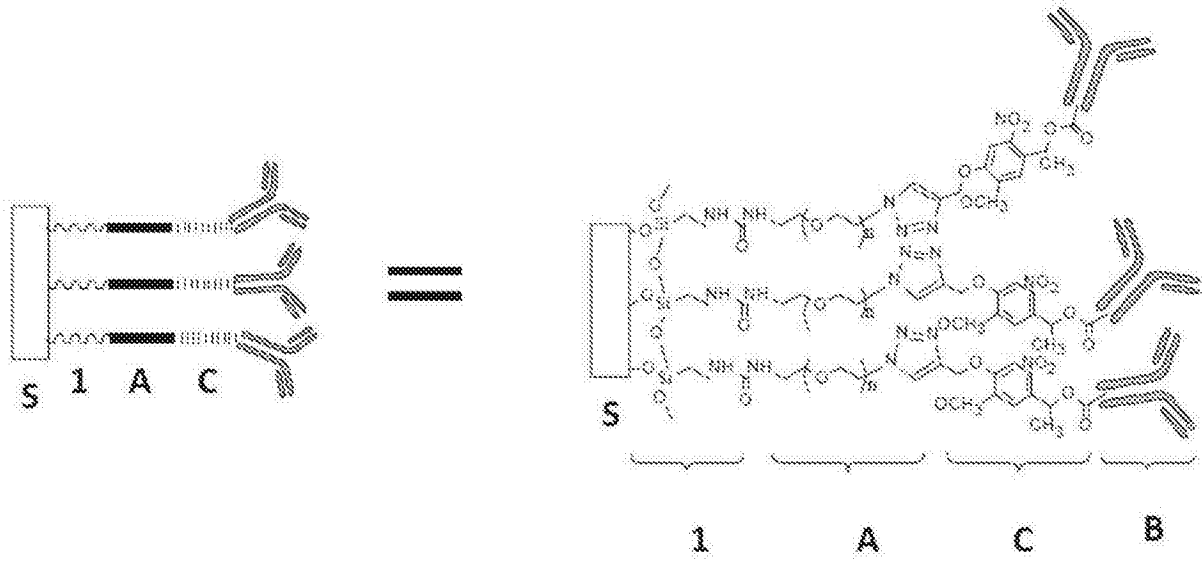


图10A

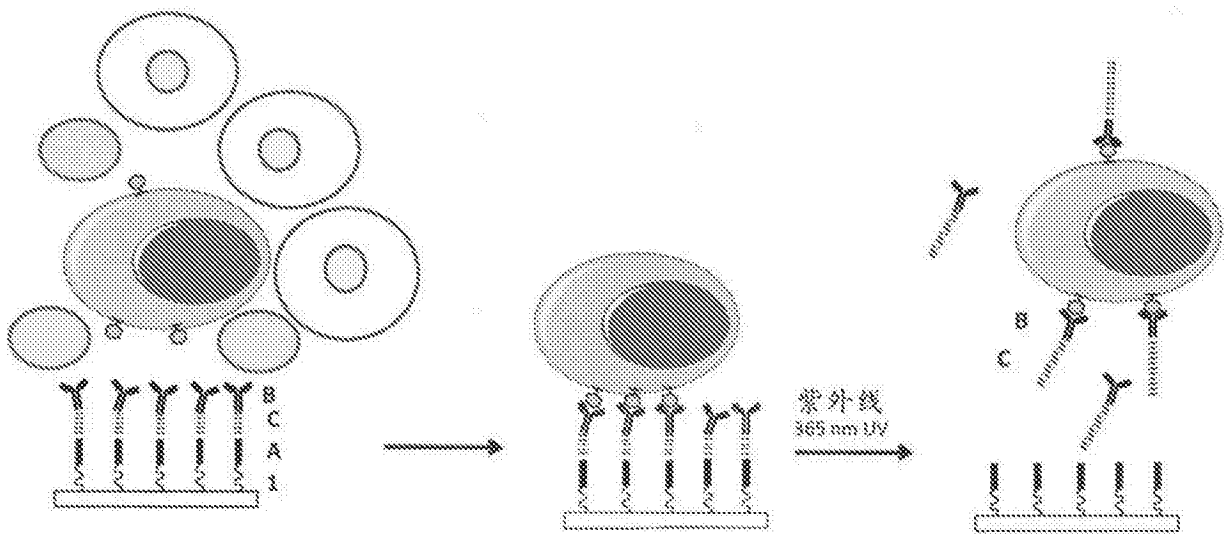


图10B

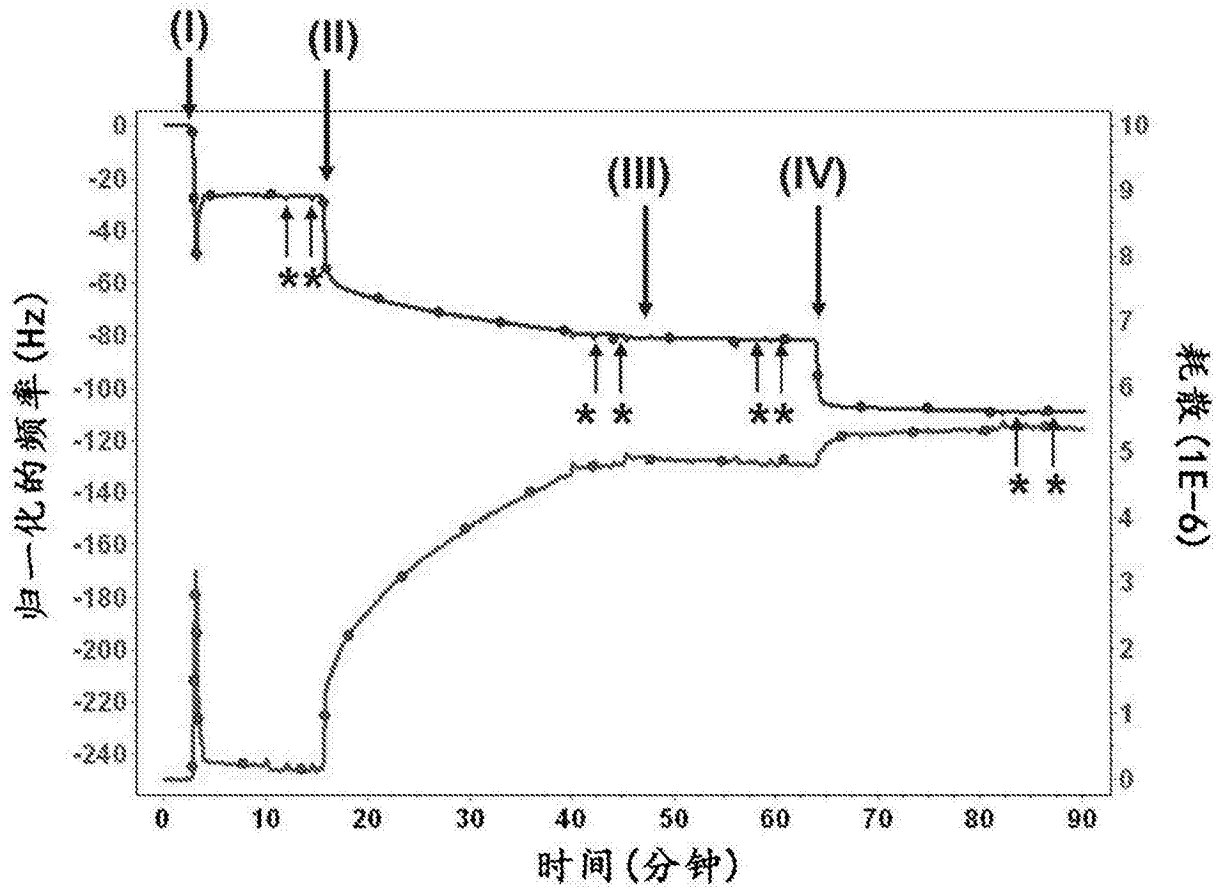


图11

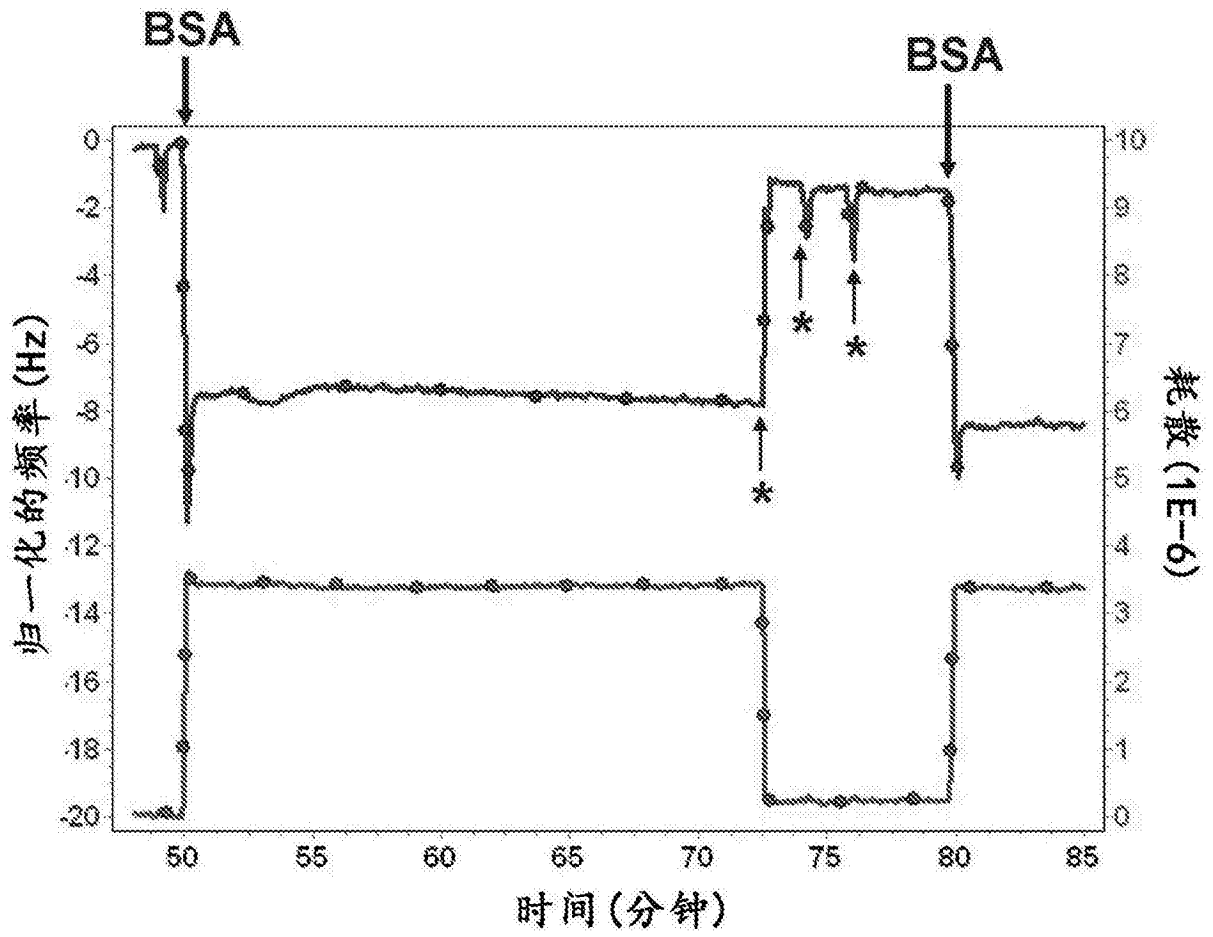


图12

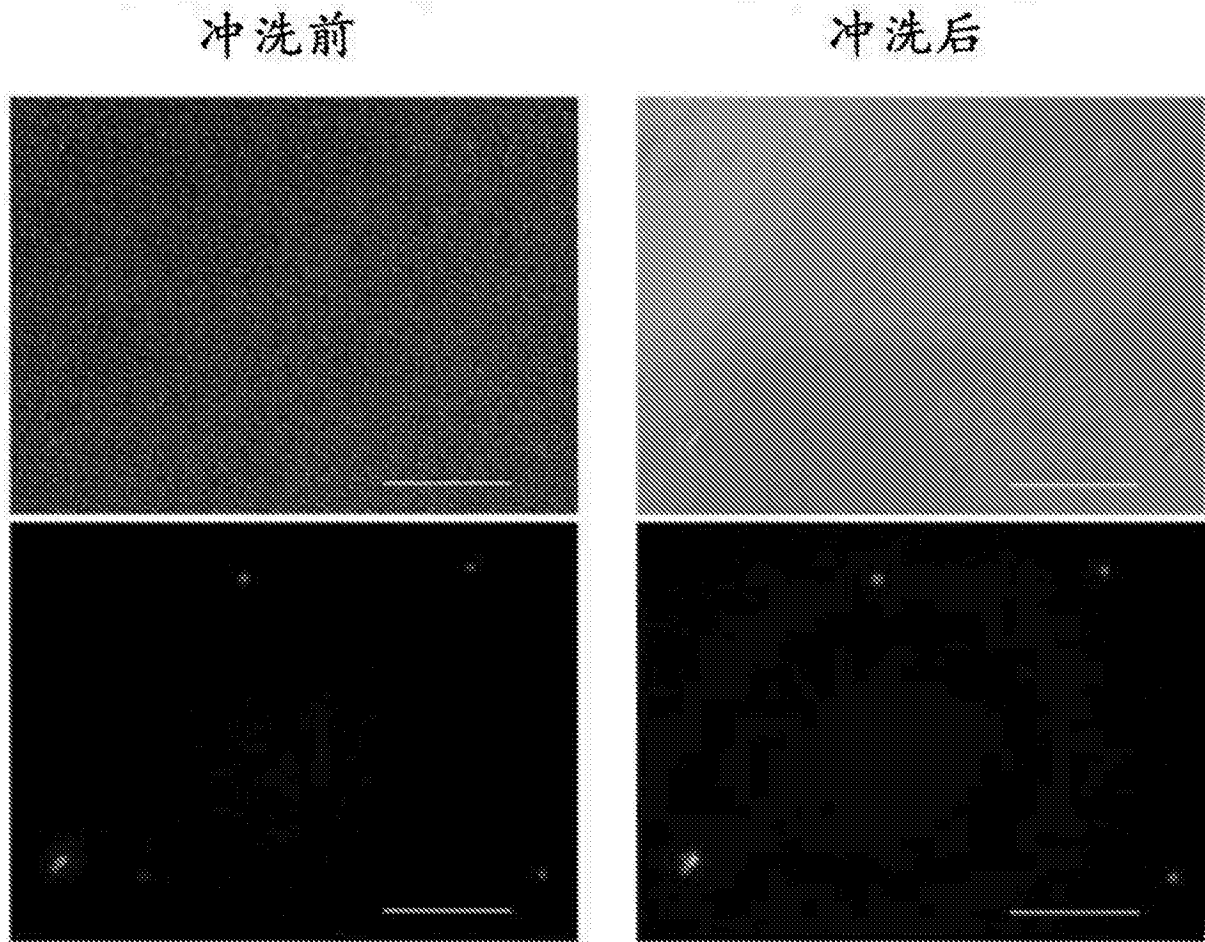


图13

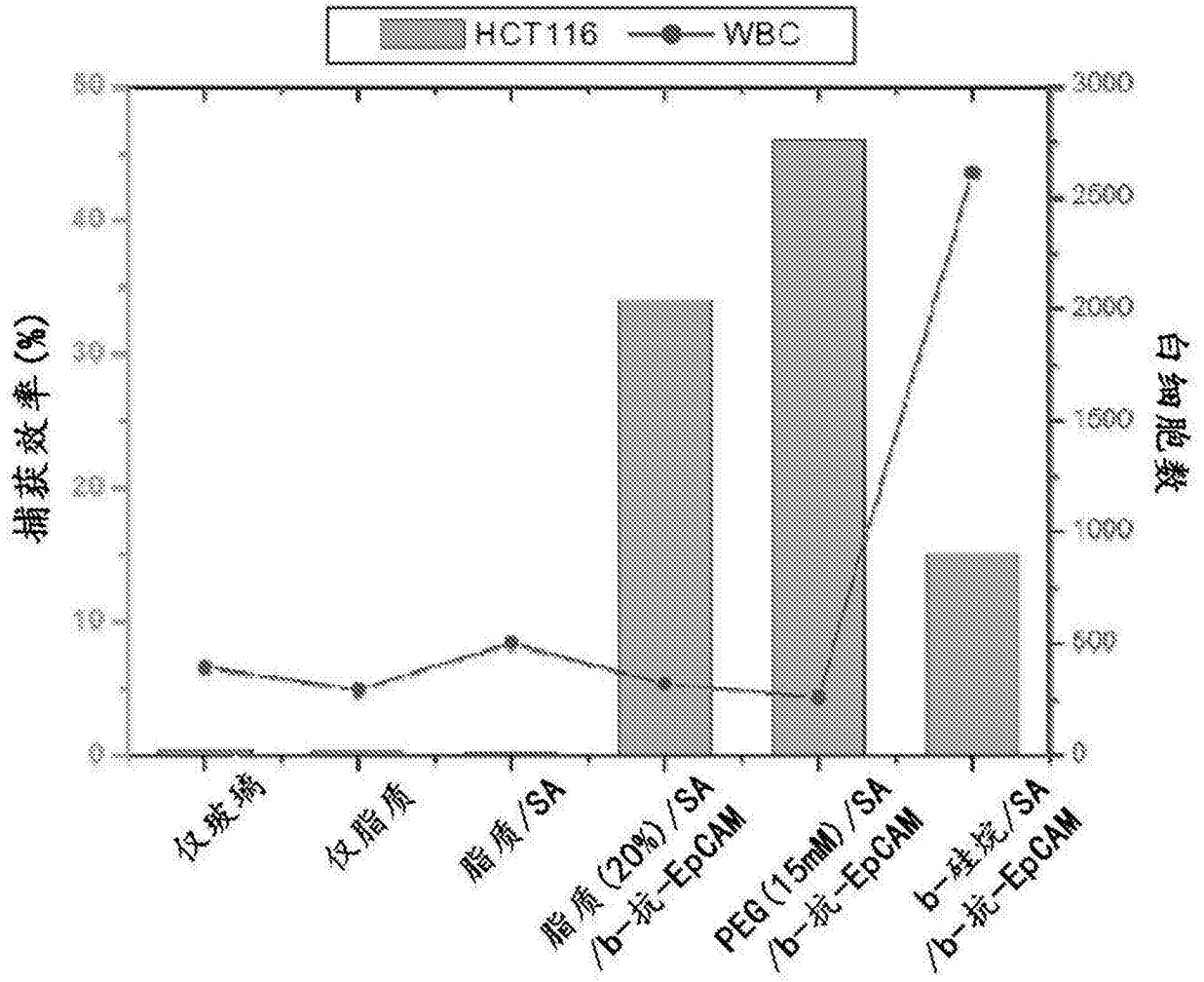


图14A

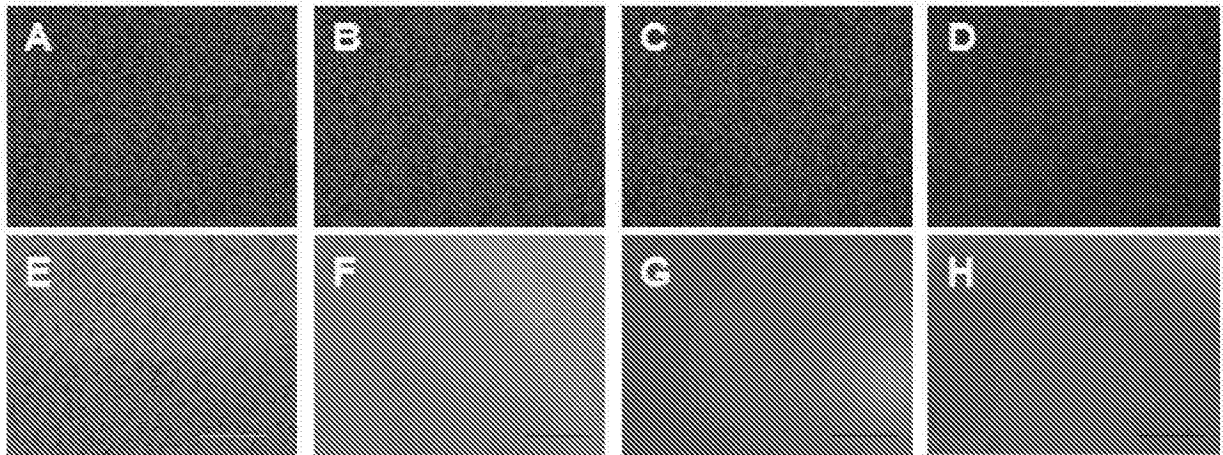


图14B

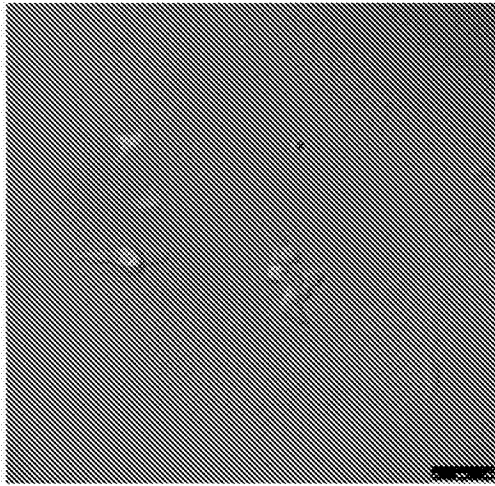


图15A

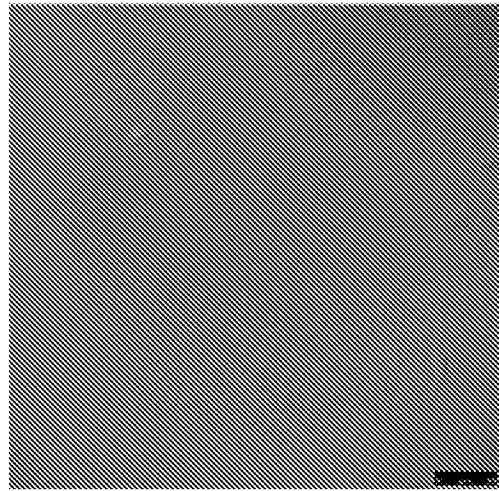


图15B

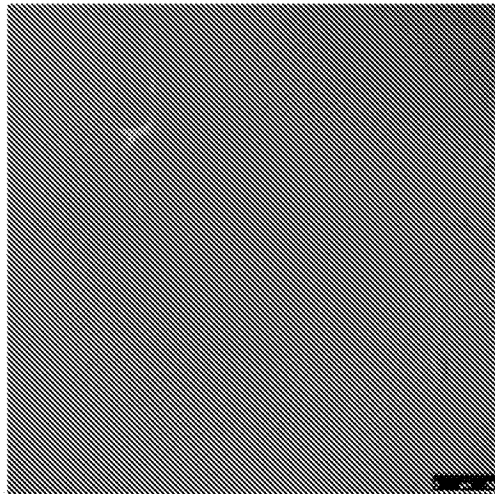


图15C

HCT116和NIH-3T3在双层+纤连蛋白上的4小时共培养物

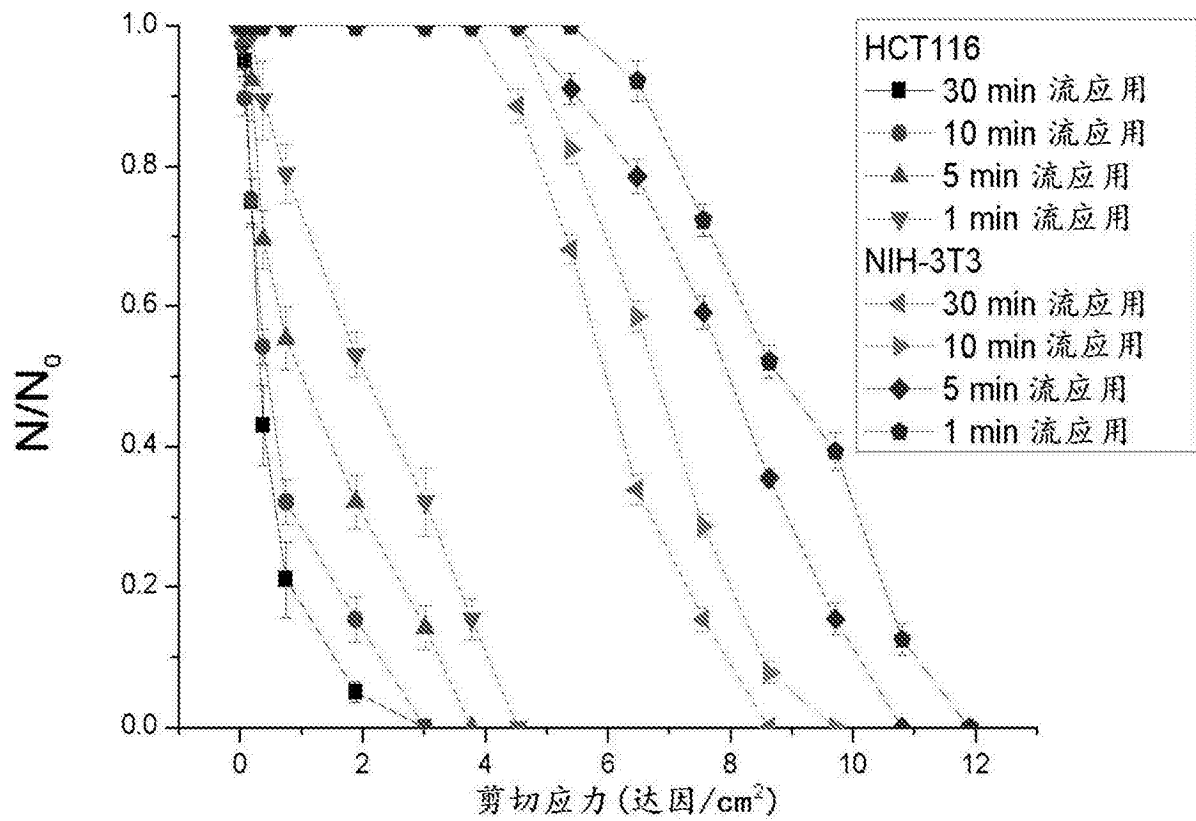


图16

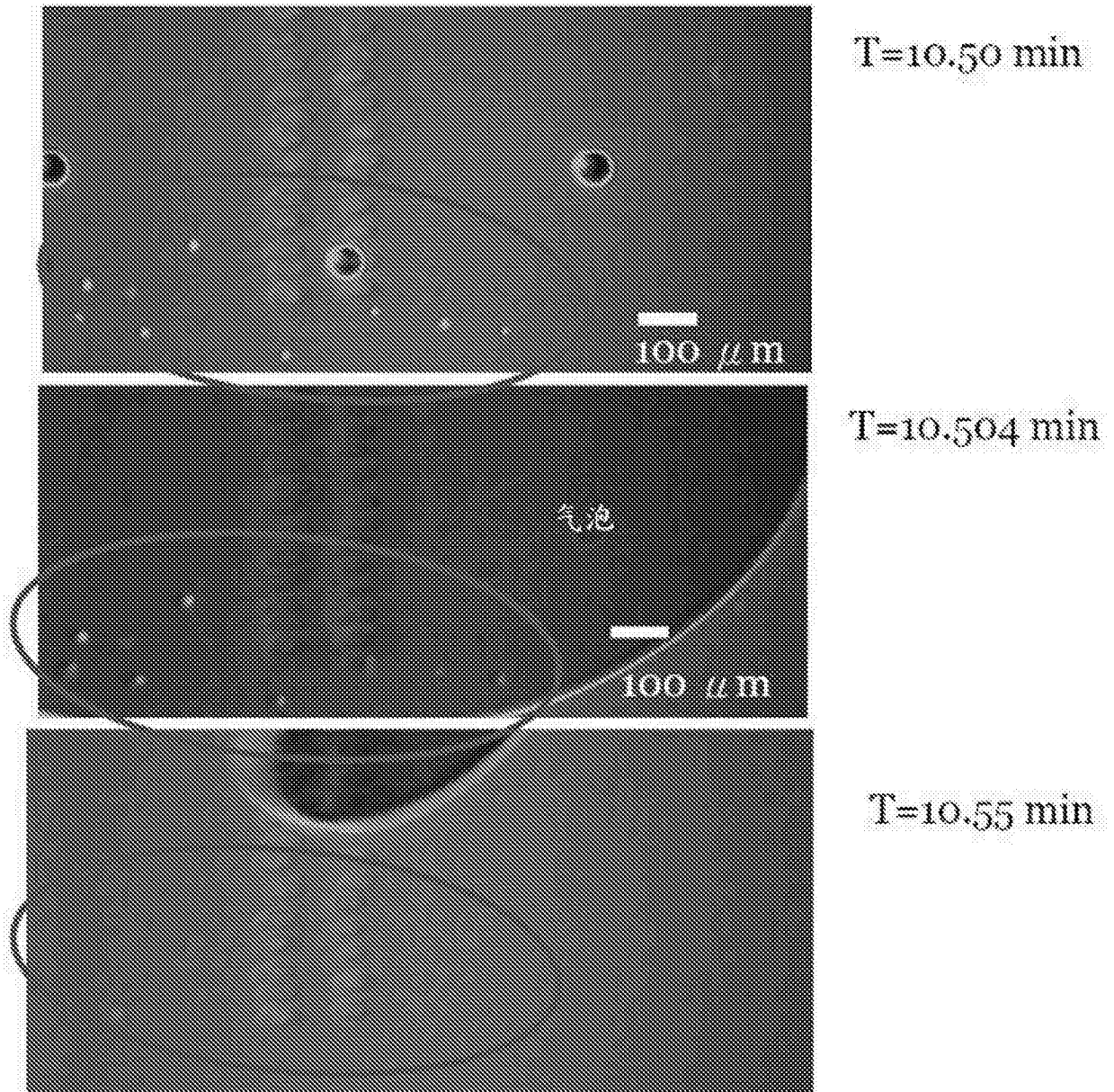


图17

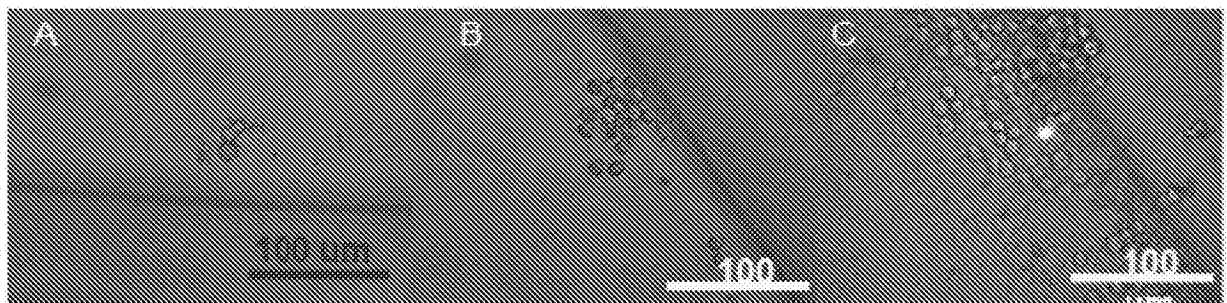


图18

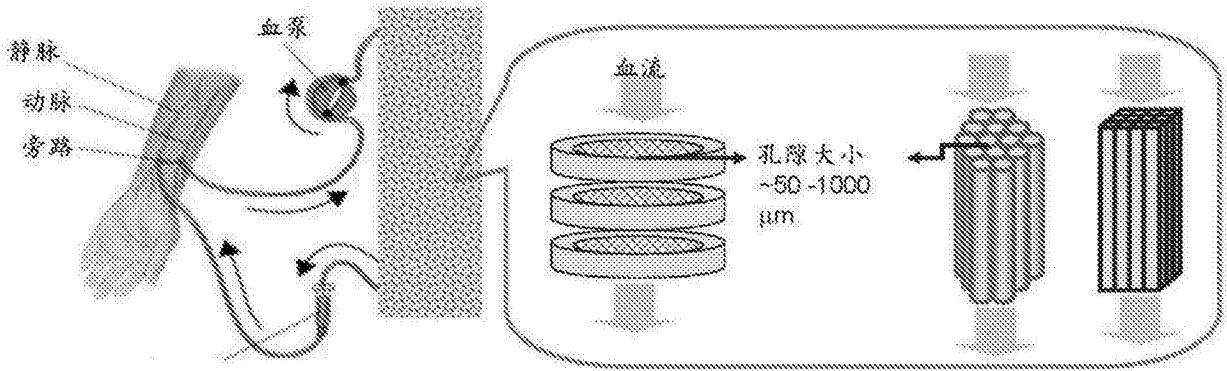


图19

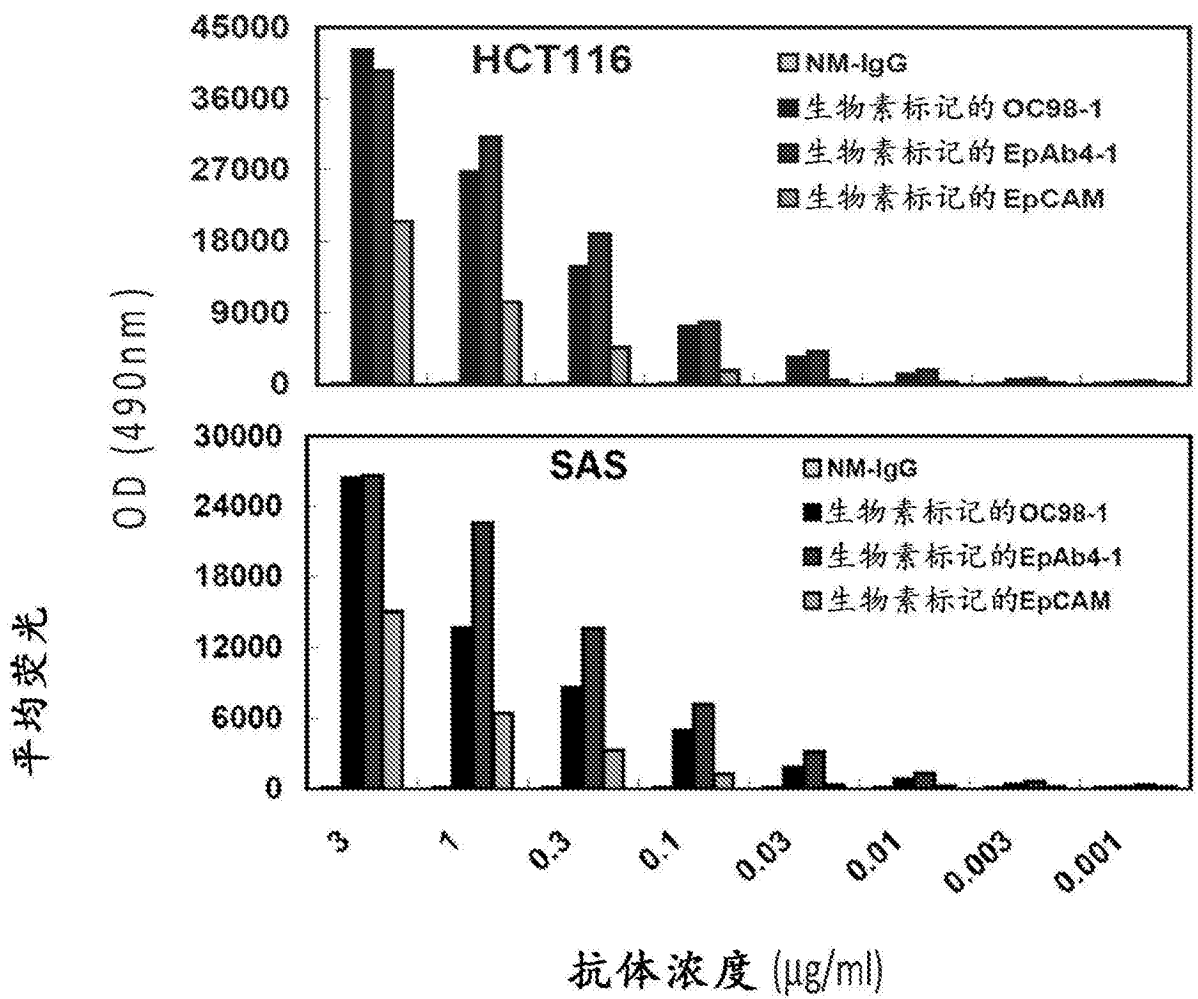


图20