



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111213058 A

(43)申请公布日 2020.05.29

(21)申请号 201880048443.4

(22)申请日 2018.05.24

(30)优先权数据

P201730724 2017.05.24 ES

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/ES2018/070377 2018.05.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/215686 ES 2018.11.29

(71)申请人 格拉纳达大学

地址 西班牙格拉纳达

申请人 安达卢西亚健康服务部

(72)发明人 佩德罗·约瑟·罗梅罗·帕拉西奥斯

胡安·约瑟·迪亚兹·莫雄

约瑟·安东尼奥·洛伦特·阿科斯塔

迭戈·德·米格尔·佩雷斯

玛利亚·约瑟·塞拉诺·费尔南德斯

贝尔纳迪诺·阿尔卡扎·纳瓦雷特

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 康志梅

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

C12N 5/071(2006.01)

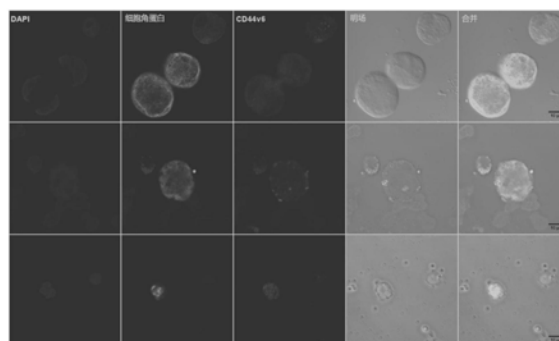
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

在外周血中循环的上皮细胞的分离

(57)摘要

本发明提供了一种识别在外周血中循环的上皮细胞的方法,该方法允许将患有表现出上皮细胞破坏的疾病的个体与不患有表现出上皮细胞破坏的疾病的个体区分开来。本发明还涉及用于实施本发明方法的试剂盒或设备。



1. 一种用于识别个体在外周血中循环的非肿瘤上皮细胞的方法,包括以下步骤:根据循环上皮细胞用胞质内、核和/或表面标记物培养外周血样本,并且通过免疫细胞化学、分子和/或细胞遗传学技术来检测和识别细胞。

2. 根据前述权利要求所述的方法,还包括对个体的外周血样本进行梯度密度分离的优先步骤。

3. 根据前述权利要求所述的方法,其中,在梯度密度分离之后,执行包括收集中间相并用盐水缓冲液清洗的步骤,在用标记物培育样品之前。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述上皮细胞是来自肺、肝、胰腺的细胞,以及来自胃腺和肠腺、肝、生殖器官、中枢神经系统或任何它们的组合的细胞。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中,细胞质内标记物选自细胞角蛋白、波形蛋白、SP1 (表面活性剂A和B抗原) 或它们的任何组合。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,细胞核标记物选自转录因子,优选选自Snail、Slug、SOX2或它们的任何组合。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,表面标记物选自N-钙粘蛋白,EpCam, CD44v6, AXL, EGFR, EMA, MUCIN, CD133, Sca1或它们的任何组合。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中,循环肺细胞的标记物,选自:

- 表面标记物:CD44v6、Sca1;
- 细胞质标记物:细胞角蛋白、SP1;
- 细胞核标记物:SOX2;
- 它们的任何组合。

9. 一种分离在外周血中循环的上皮细胞的方法,包括以下步骤:根据如权利要求1-8中任一项所述的方法,进一步的包括通过亲和分离技术分离经识别的细胞。

10. 根据前述权利要求所述的分离在外周血中循环的上皮细胞的方法,其中,所述亲和分离技术选自使用物理特性的技术,使用生物学特性的技术,或两者的组合。

11. 根据权利要求9或10所述的分离在外周血中循环的上皮细胞的方法,其中,所述亲和分离技术选自:磁性分离,亲和层析法,与单克隆抗体结合或与单克隆抗体一起使用的细胞毒性剂,与固相支持物结合的抗体“平移”,或它们的任何组合。

12. 根据权利要求9-11中任一项所述的分离在外周血中循环的上皮细胞的方法,其中,所述亲和分离技术是通过包覆特异性抗体的磁性颗粒来实现的。

13. 根据权利要求所述的分离在外周血中循环的上皮细胞的方法,其中,所述包覆特异性抗体的磁性颗粒选自:

- a) 直径在20nm至500nm之间的一组颗粒,
- b) 直径在4000nm到6000nm之间,优选5000nm的一组颗粒,或
- c) 上述两组颗粒组成一组颗粒。

14. 一种获取用于诊断、预后和分类患有表现出组织破坏和上皮细胞释放的疾病的个体的数据的方法,包括使用如权利要求1-13所述的任何一种方法的步骤,还包括量化分离细胞的数量的步骤。

15. 根据前述权利要求所述的获取用于诊断、预后和分类患有表现出组织破坏和上皮细胞释放的疾病的个体的数据的方法,进一步包括将识别出的细胞数量与参考样品进行比

较。

16. 一种对表现出组织破坏和上皮细胞释放的疾病的个体进行诊断、预后和分类的方法,包括如权利要求14或15所述的方法,进一步包括当在外周循环血中检测到循环上皮细胞的存在时,将该个体划分为具有患表现出组织破坏和上皮细胞释放疾病风险的个体。

17. 根据前述权利要求所述的对表现出组织破坏和上皮细胞释放的疾病患者进行诊断、预后和分类的方法,其中,所述表现出组织破坏和上皮细胞释放的疾病是肺气肿,并且循环的肺细胞在外周血中被识别出来。

18. 一种用于监测患有表现出组织破坏和上皮细胞释放的疾病的个体对治疗的反应的方法,包括以非同时的方式实施如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中,至少一个量化循环上皮细胞的步骤是在给予个体治疗后进行的。

19. 一种包括选自 $\beta 2$ -受体激动剂、抗胆碱能类药物、皮质类固醇激素化合物、磷酸二酯酶抑制剂和免疫系统抑制剂的活性成分的药物组合物在制备用于治疗患有通过如权利要求17至18中任一项权利要求所述的方法识别的肺气肿的个体的药品中的应用。

20. 一种包含选自铂配合物(顺铂或卡铂)、吉西他滨、紫杉醇、多西他赛、依托泊苷、长春瑞滨、培美曲塞、吉非替尼、厄洛替尼、贝伐单抗或它们的组合的活性成分的药物组合物在制备用于治疗患有通过如权利要求17至18中任一项权利要求所述的方法识别的与COPD相关或不相关的腺癌和鳞癌的个体的药品中的应用。

21. 一种用于识别、分离和/或诊断的试剂盒或设备,包括分析外周血中循环的上皮细胞的数量的必要元件,并且包括:

- a) 直径在20nm至500nm之间,优选为50nm的磁性颗粒,
- b) 直径在4000nm至6000nm之间,优选为5000nm的磁性颗粒,或
- c) 上述两种颗粒的组合。

在外周血中循环的上皮细胞的分离

技术领域

[0001] 本发明属于医学领域,更具体的,本发明涉及一种识别在外周血中循环的上皮细胞的方法,该方法允许将患有表现出上皮细胞破坏性疾病的个体与没有患有这种疾病的个体区别开来,以及用于实施本发明方法的试剂盒或设备。

背景技术

[0002] 上皮是由紧密相连的细胞组成的组织,细胞间质较少。上皮细胞来源于两种胚胎生殖层:外胚层和内胚层,在结构上构成了大部分的器官。

[0003] 内胚层衍生出表皮和角膜的上皮细胞。腺部件,如汗腺、皮脂腺和乳腺。

[0004] 内胚层衍生出覆盖消化管的组织,也起源于内胚层。所有与消化器官相连的腺体,如肝、胰腺和胃以及肠的腺体。

[0005] 中胚层提供起源给肝脏、男性和女性的生殖器官。

[0006] 上皮细胞的一个基本特性是,它们倾向于在彼此之间保持非常大的接触,形成覆盖表面和填充空腔的连贯层。

[0007] 呼吸道上皮有双重起源,即喉部、气管、支气管和肺泡的上皮细胞由内胚层起源,而软骨、肌肉结构和血管系统由中胚层起源。

[0008] 上皮细胞,尤其是那些覆盖身体外表面和肠的上皮细胞,经常受到机械性创伤和其他类型的创伤。在生理条件下,这些上皮细胞不断死亡,然后被释放出来。在胃肠道中,细胞在绒毛上不断地脱落。

[0009] 相反的,在呼吸道,特别是在大多数腺体中,上皮细胞很少退化,因此,细胞的寿命相当长。

[0010] 生理学上带来的上皮细胞损失可以由相应的再生补偿,而在脊椎动物中,再生是通过相应的未分化细胞的有丝分裂增殖来产生的。

[0011] 在肺组织中,肺泡巨噬细胞负责吞噬和清除退化的肺组织,包括I型和II型肺泡壁细胞和表面活性物质。

[0012] 当巨噬细胞由于其特性不能消化这些颗粒时,颗粒就会在巨噬细胞的吞噬体中随着巨噬细胞迁移,直到粘液纤毛运输开始,在它们流动起来直到口咽后,与痰一起脱粘或清除。

[0013] COPD(慢性阻塞性肺疾病)是全球范围内患病率和死亡率最高的呼吸系统疾病之一。它是仅次于心血管疾病和癌症的第三大死亡因素,并且发达国家近10%的成年人受其影响。

[0014] 此外,很大比例的患者疾病没有被诊断出或没有得到适当的治疗。超过70%的患者没有意识到自己患有这种疾病,其中,许多人直到疾病发展到晚期才被诊断出来。

[0015] COPD的特征是由于暴露在烟草烟雾中而导致肺功能逐渐丧失,这是炎症和免疫过程的生理转化,导致肺泡单位的破坏,小口径气道的损伤和支气管周围纤维化的疾病特征。由于这些过程,肺实质降解的残留物作为细胞外基质的成分被释放到全身循环中。

[0016] COPD造成的肺功能丧失在不同患者之间可能存在差异,儿童期改变肺成熟的过程可能明显地倾向于疾病的发展。然而,加速检测失去肺功能的患者是不可行的,他们没有特定的肺病变过程的生物标记物。

[0017] 近年来,我们看到了一些技术的发展,这些技术允许在外周血中识别来自人体组织的细胞,并将其归类为液体活组织检查,并在肿瘤学领域证明了诊断的实用性。特别有趣的是,液体活组织检查在监测肺癌患者方面取得了进展,增加了预后信息,并允许对这些患者进行个性化治疗。理解了COPD的发病机制后,肺泡细胞或其残留物可能被排放到血液中,并可在肿瘤细胞中被识别。

[0018] 目前,COPD的诊断基本上是基于临床表现(咳嗽、咳痰、呼吸困难)和肺功能测试,主要是肺活量测定(使用支气管扩张剂后FEV1<0.7)。在这两种情况下,都与附带现象,临床症状和支气管阻塞有关,这些都是发生在疾病的生理病理已经改变后,没有任何可以用于早期诊断的标志物,直到它变得不可逆转,就像大多数确诊的COPD病例一样。西班牙COPD患者的平均年直接费用在910欧元到2060欧元之间。拥有一种诊断方法,能够及早发现患有该疾病的个人,或发现该疾病的高患病风险个人,提高当前程序的敏感性和特异性,可以降低经济成本并且改善专利的预后诊断。

发明内容

[0019] 本发明的作者测定了第一种检测循环肺细胞(CPCs)技术的在体外的敏感性和特异性,并证明了在COPD患者外周血中分离CPCs是可能的。

[0020] 尽管,到目前为止,没有发现证据表明在血流中存在分化良好型的上皮细胞,但它们的存在暗示存在强烈的组织侵袭过程,超出了巨噬细胞消除“废物”的能力,以及其他生理机制,这在上皮组织(如肺和腺结构)中是特别重要的事实。

[0021] 因此,本发明中公开的技术,首次成功地检测出在外周血中的分化良好型的上皮细胞的存在,可以用于患有慢性阻塞性肺病的个体的诊断,以及对于任何表现为组织破坏和上皮细胞的释放的疾病的诊断。

附图说明

[0022] 图1.血液中渗入的H820细胞和COPD患者的CPC的免疫荧光表征和细胞形态学表征。其中,列显示了(蓝色)4',6-二脒基-2-苯基吲哚,用于染色核酸(核)的染料(DAPI)、细胞角蛋白-FITC表达(绿色)、CD44v6-Alexa Fluor® 633紫色(红紫色)表达、(灰色)显示明场和合并通道后的信号。第一行表示从富集实验中分离的H820肺癌细胞,具有细胞角蛋白和CD44v6的阳性表达。第二、第三行表示从COPD患者中分离出的CPC,具有细胞角蛋白和CD44v6阳性信号。

[0023] 图2.基于从血液样本中分离出的CPC的存在,研究参与者的COPD特征。a)肺功能值(表示为预测值的%)。b)上一年的年化恶化率。c)CAT分数(COPD评估测试)。d)肺功能下降(表示为年化FEV1的下降(毫升/年))。条形表示平均值和SEM值。CPC+:分离出的CPC;CPC-:不是分离出的CPC。

[0024] 图3.BODEx指数的差异,取决于血液样本中分离出的CPC的存在。条形代表平均值和SEM。*=p<0.05。CPC+:分离出的CPC;CPC-:不是分离出的CPC。

[0025] 图4. 非肿瘤肺组织的肺细胞的免疫荧光和组织形态学表征。列显示(蓝色) 4',6-二脒基-2-苯基吲哚,用于染色核酸(核)的染料(DAPI),CD44v6-FITC表达(绿色),显示明场(灰色)和合并通道的信号。行表示气胸患者的肺组织。

具体实施方式

[0026] 退化的上皮细胞具有消除的生理机制,主要通过巨噬细胞的吞噬作用。因此,在肺组织中,肺泡巨噬细胞负责吞噬和清除退化的肺组织,包括I型和II型肺泡壁细胞和表面活性物质。

[0027] 由于其性质,颗粒无法被巨噬细胞消化时,颗粒就会在巨噬细胞的吞噬体中随着巨噬细胞迁移,直到粘液纤毛运输开始,在它们流动起来直到口咽后,与痰一起脱粘或清除。

[0028] 因此,可能引起循环上皮细胞存在的疾病是那些影响肝、胰腺、肠、胃和肠腺以及生殖器官的疾病。

[0029] 本发明公开了一种检测上皮细胞的方法,该方法令人惊讶地可以在血液中检测上皮细胞。

[0030] 具体地,本发明的方法公开了一种从上皮组织中分离、检测以及表型和基因表征细胞的自动化方法,并且可以在血液中进行检测。外周血中所述细胞的检测是由会引起破坏现象和组织破坏的生理病理过程的存在决定的,例如,但不限于慢性阻塞性肺疾病(COPD)或存在肿瘤疾病。因此,在第一种情况下,我们可以谈论循环肺细胞(CPCs),在第二种情况下,我们可以谈论循环肿瘤细胞(CTCs)。

[0031] 肿瘤细胞远程产生转移的能力是众所周知的,并且许多临床研究和基础研究集中在其检测和表征上。然而,迄今为止,在血流中尚未检测到循环上皮细胞。本发明方法的临床应用重点在于检测非肿瘤循环上皮细胞作为组织损伤特异性生物标志物的可能性。这项技术可以应用于检测任何上皮细胞,使用特定的标记来识别它们。此外,它还允许使用胞质内的和细胞核的标记物进行自动细胞分离。

[0032] 本发明的方法

[0033] 因此,发明的第一个方面涉及一种识别在外周血中循环的上皮细胞的方法,以下简称本发明的第一种方法,包括以下步骤:根据循环上皮细胞,用细胞质内、核和/或表面标记物培养外周血样本,和他们的组织起源,并通过免疫细胞化学、分子和/或细胞遗传学技术来检测和识别细胞。

[0034] 优选地,本发明的第一种方法还包括对个体的外周血样本进行梯度密度分离的优先步骤。

[0035] 在另一个优选实施方案中,在梯度密度分离之后,执行包括收集中间相并用盐水缓冲液清洗的步骤,在用标记物培育样品之前。

[0036] 本发明第一种方法识别的细胞原则上优选为非肿瘤细胞。更优选的,它们是受任何组织侵袭过程影响的身体组织中的非肿瘤细胞。在另一个更优选的实施例中,它们是来自肺、肝脏、胰腺的上皮细胞,以及来自胃腺和肠腺、肝脏、生殖器官或它们的任何组合的细胞。

[0037] 在另一个优选的实施方案中,细胞质内标记物选自:细胞角蛋白,波形蛋白,SP1

(表面活性剂A和B抗原)或它们的任何组合。

[0038] 在另一个优选的实施方案中,细胞核标记物选自转录因子,优选选自Snail、Slug、SOX₂或它们的任何组合。

[0039] 在另一个优选的实施方案中,表面标记物选自N-钙粘蛋白,EpCam,CD44v6,AXL,EGFR,EMA,MUCIN,CD133,Sca1,无唾液酸糖蛋白(ASGPR)或它们的任何组合。

[0040] 更优选地,标记的是CPCs,标记物选自:细胞角蛋白、CD44V6、SP1、Sca1和SOX₂。在更优选的实施例中,使用本发明第一种方法检测到的循环上皮细胞是循环肺细胞(CPC)。

[0041] 在另一个更优选的实施例中,标记的是肝细胞,并且标记物选自:唾液酸蛋白、mir122、CXCR4(CD184)、CD90、ALDH1。

[0042] 在另一个更优选的实施方案中,标记的是胰腺细胞,标记物选自:KRAS、TP53、CDKN2A/p16、MAD4/DPC4、miR-7、miR-375、miR-16、miR-196a miR-16、miR-196、miR-27a-3p miR-145、miR-150、miR-223、miR-636、miR-21、miR-196a、miR-196b、miR-18a、miR-223和miR-221。

[0043] 在另一个更优选的实施方案中,标记的是来自胃和肠腺的细胞(如果需要的话是分离的),标记物选自:miR-557、SPI1、NFIC、SPIB、THAP1、尿激酶型组织纤溶酶原激活剂(upaR)。

[0044] 在另一个更优选的实施例中,标记的是肾脏细胞,标记物选自:CK7、AMACR、CA IX、TFE3、upaR。

[0045] 在另一个更优选的实施方案中,标记的是来自生殖器官的细胞,标记物选自:BRAC1/2、IPK3、iR-132、miR-26a、miR-145、EMG1和SEMG2、FOLH1、TGM4、TKTL1、LDHC和PGK2。

[0046] 在另一个更优选的实施方案中,标记的是来自中枢神经系统的细胞,标记物选自:巢蛋白、SOX10、Notch1、HES1、HES2、闭合蛋白、PAX6、HES5、GABA_B受体1和2、GAD65、GAD67、GFAP、GLAST、BLBP、TN-C、N-钙粘蛋白、巢蛋白和SOX₂。

[0047] 可以通过亲和分离技术对存在目标表型的群体进行分离,包括但不限于:磁分离(使用包覆特异性抗体的磁性颗粒),亲和层析法,与单克隆抗体结合或与单克隆抗体一起使用的细胞毒素剂,与固相支持物结合的抗体“平移”,以及通过其他合适的技术手段。可以通过流式细胞技术获得更准确的分离,该技术可以根据染色强度以及其他参数(例如细胞大小和细胞复杂性)分离细胞群体。

[0048] 因此,本发明的第二方面涉及一种分离在外周血中循环的上皮细胞的方法,以下简称本发明的第二种方法,包括本发明的第一种方法的步骤,并且进一步包括通过亲和分离技术分离经识别的细胞。

[0049] 在本发明该方面的更优选的实施方案中,亲和分离技术选自使用物理特性(例如大小和重量)的技术,使用生物学特性(例如标记物)的技术,或两者的组合。

[0050] 在本发明该方面的一个更优选的实施方案中,亲和分离技术选自:磁性分离,亲和层析法,与单克隆抗体结合或与单克隆抗体一起使用的细胞毒性剂,与固相支持物结合的抗体“平移(panning)”,以及通过其他合适的技术手段。

[0051] 在本发明该方面的另一个更优选的实施方案中,亲和分离技术是通过包覆特异性抗体的磁性颗粒(或微球)进行的。换句话说,通过阳性免疫磁选择进行分离。更优选地,使用具有以下特征的多个磁性颗粒或微磁性球:

[0052] a) 直径在20nm至500nm之间,或者允许识别细胞核和细胞质内标记物,更优选大约50nm,

[0053] b) 直径在4000nm到6000nm之间,优选约为5000nm,允许识别细胞核标记物,或

[0054] c) 两者的组合。

[0055] 甚至更优选地,使用类型(a)和(b)的磁性颗粒或微磁性球的组合。

[0056] 本发明的第三方面涉及一种获取用于诊断,预后和分类患有表现出组织破坏和上皮细胞释放的疾病的个体的数据的方法,以下简称本发明的第三种方法,包括本发明的第一种方法,还包括量化本发明第二种方法的分离细胞的数量。

[0057] 另外,本发明的第三种方法进一步包括将识别出的细胞数量与参考样品进行比较。

[0058] 本说明书中所用的术语“参考样品”或“参考量”,涉及上皮细胞的绝对数量或相对数量,其允许患有表现为上皮细胞破坏的疾病的个体可以与未患此病的个体区别开来。优选地,它允许区分患有该疾病的个体和健康个体。

[0059] 合适的参考量可以通过本发明的方法从例如,同时的或连续的,与生物测试样品一起分析的参考样品中确定。因此,例如但不限于我们自己,参考样品可以是阴性对照,即在患有这些疾病的个体的样品中通过本发明的方法检测到的量。在一个特定的实施方案中,在没有参考样品的情况下,参考量为0。

[0060] 对于COPD,参考量与CPCs的绝对或相对数量有关,其允许区分患有COPD的个体和没有患有COPD的个体。甚至更优选地,它允许区分介于:

[0061] a) 没有患有COPD或肺癌的个体,

[0062] b) 患有COPD的个体,

[0063] c) 患有腺癌的个体,

[0064] d) 患有鳞癌的个体,

[0065] e) 患有COPD和腺癌的个体,或

[0066] f) 患有COPD和鳞癌的个体,

[0067] g) 患有肺气肿的个体。

[0068] 在一个优选的实施方案中,表现出上皮细胞破坏的疾病选自COPD和/或肺气肿或它们的任何组合。甚至更优选地,所述疾病选自由于 α -1-抗胰蛋白酶(α -1-Antitrypsin)缺乏而引起的全腺泡型肺气肿;与吸烟有关的中央或小叶中心型肺气肿;先天性大疱性肺气肿或与肺纤维化相关,与瘢痕形成相关的隔旁或远端腺泡性肺气肿。

[0069] 本发明的第四方面涉及一种对表现出上皮细胞破坏的疾病的个体进行诊断、预后和分类的方法,以下简称为本发明的第四种方法,包括本发明的第一种方法和第三种方法的步骤,进一步包括当检测到循环上皮细胞的存在时,优选当这些循环上皮细胞的浓度高于参考量时,将该个体划分为具有患表现出组织破坏和上皮细胞释放疾病风险更高的个体。在一个特定的实施方案中,在没有参考样品的情况下,参考量为0。

[0070] 在本发明该方面的优选实施方式中,表现出肺实质破坏和上皮细胞释放的疾病选自COPD和/或肺气肿,以及表现为组织破坏的其他肺过程,例如肿瘤性、炎症性或自身免疫性的疾病或它们的任何组合。在更优选的形式中,所述疾病选自由于 α -1-抗胰蛋白酶(α -1-Antitrypsin)缺乏引起的全腺泡型肺气肿;与吸烟有关的疾病;先天性大疱性肺

气肿或与肺纤维化相关的疾病,与瘢痕形成相关的隔旁或远端腺泡性肺气肿。

[0071] 本发明的第五方面涉及一种用于监测患有表现出组织破坏和上皮细胞释放的疾病的个体对治疗的反应的方法,以下简称本发明的第四种方法,包括以非同时的方式执行本发明的第一至第三种方法中的任何一种方法的步骤。

[0072] 在本发明该方面的优选实施方案中,表现为组织破坏和上皮细胞释放的疾病选自COPD和/或肺气肿,以及表现为组织破坏的其他肺过程,肿瘤性、炎症性或自身免疫性的疾病或它们的任何组合。在更优选的形式中,所述疾病选自由于 α -1-抗胰蛋白酶(Alpha-1-Antitrypsin)缺乏引起的全腺泡型肺气肿;与吸烟有关的疾病;先天性大疱性肺气肿或与肺纤维化相关的疾病,与瘢痕形成相关的隔旁或远端腺泡性肺气肿。

[0073] 本说明书中所使用的术语“监测对治疗的反应”与对疾病发展的监管有关,例如但不限于,对表现出上皮细胞破坏的疾病的特定治疗方式反应的评估,或对外科干预的反应的评估。因此,在本发明的这一方面的优选实施例中,监测执行后处理。

[0074] 本发明的第六方面涉及一种用于监测建立疾病预后的可能性的方法,根据检测到的循环上皮细胞的绝对数量或相对数量,作为每个组织中发生的直接组织损伤幅度的指标,通过本发明的第四种方法检测。因此,在本发明该方面的优选实施例中,建立疾病的预后。

[0075] 发明的医学用途

[0076] 本发明的第七方面涉及一种包含选自 β 2-受体激动剂,抗胆碱能类药物,皮质类固醇激素化合物,磷酸二酯酶抑制剂和免疫系统抑制剂的活性成分的药物组合物在制备用于治疗患有通过本发明的第三或第四种方法识别的COPD和/或肺气肿的个体的药物中的应用。

[0077] 本发明的第八方面涉及一种包含选自铂配位复合物(顺铂或卡铂)、吉西他滨(gemcitabine)、紫杉醇、多西他赛(docetaxel)、依托泊苷(etoposide)、长春瑞滨(vinorelbine)、培美曲塞(pemetrexed)、吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、贝伐单抗(bevacizumab)或它们的组合的活性成分的药物组合物在制备用于治疗患有通过本发明的第三或第四种方法识别的与COPD和/或肺气肿相关或不相关的腺癌和鳞癌的个体的药物的应用,可。

[0078] 诊断试剂盒或设备

[0079] 本发明的第九方面涉及一种用于诊断的试剂盒或设备,以下简称本发明的试剂盒或设备,包括分析外周血中循环的上皮细胞的数量的必要元件,其包括多个磁性颗粒或包覆特定抗原的微磁性球体,选自:

[0080] a) 直径在20nm至500nm之间的颗粒,

[0081] b) 直径在4000nm至6000nm之间,优选为5000nm的颗粒,或

[0082] c) 由前两种颗粒组成的一组颗粒。

[0083] 优选地,其包括将检测到的循环上皮细胞的数量与参考数量进行比较所必需的手段。

[0084] 更优选地,本发明的试剂盒包括用于实施本发明的方法的必要元件。

[0085] 所述试剂盒可进一步包括,但不限于,缓冲液、防止污染的试剂、蛋白质降解抑制剂等。因此,所述试剂盒课包括其实现和优化所需的所有载体和产品。优选地,所述试剂盒

还包括用于执行本发明的任何方法的说明书。

[0086] 所述试剂盒也可以是自动化的,或者可以被整合到能够分离由结合到磁性颗粒的抗体识别的细胞类型的设备中,并且使用液体,优选地使用微流控技术。

[0087] 这种类型的设备的一个例子是由Fluxion生物科学公司开发的IsoFlux系统。

[0088] 在说明书和权利要求书中,“包含”一词及其变形体并不排除其他技术特征、添加剂、成分或步骤。对于本领域技术人员来说,本发明的其他目的、优点和特征部分地从本发明的说明书中得到,部分地从本发明的实践中得到。提供以下实施例和附图是以说明为目的,并不旨在限制本发明的范围。

[0089] 具体实施方式

[0090] 材料和方法

[0091] H820肺细胞培养方法的特异性和敏感性测定,作为研究CPCs的模型

[0092] 1.细胞培养:肺癌细胞株获自American Type Culture Collection(ATCC,马纳萨斯,VA,USA)(15)。将H820细胞保存在添加10%胎牛血清和100U/ml青霉素和100ng/ml链霉素的RPMI 1640培养基中,置于37℃的培养箱中,以5%CO₂加湿。

[0093] 2.用于检测CPCs的抗体:

[0094] -细胞角蛋白:泛细胞角蛋白(AE1/AE3克隆)(Sigma Aldrich)。细胞角蛋白是正常和肿瘤上皮细胞中都存在的细胞骨架蛋白。

[0095] -抗CD44v6:兔体内产生的抗CD44v6多克隆抗体(AB2080)(Merckmillipore)。在呼吸器官中,CD44v6的表达可以在正常的肺上皮细胞(优选II型肺细胞)中得到证实,这似乎在维持组织结构中起着重要作用。

[0096] 3.全血实验:使用基于16%W/V Ficoll PM400为119g/ml(Histopaque 1119)和1.058g/ml的Ficoll11的双梯度离心法从血液中分离II型肺细胞。由于Ficoll11的密度为1.058g/ml,血液大约为1.060g/ml,为了避免混合,血液需要事先用19%PBS1X稀释(4ml血液/17.3ml PBS1X)。

[0097] 将10ml的Ficoll 1119放在50ml的锥形底管的下部,然后加入5ml Ficoll1058,在Ficoll双梯度溶液上小心地加入稀释的血液。

[0098] 在700G下连续离心45min(Allegra X-12R离心机(Beckman Coulter)),然后在两个Ficoll层之间回收单核细胞相,根据用MACS技术的细胞癌富集检测试剂盒(MiltenyiBiotec,BergischGladbach,德国),对单核细胞相进行渗透性固定。然后,这些细胞与多种细胞角蛋白的特异性抗体(CK3-11D5)(MiltenyiBiotec,BergischGladbach,德国)一起培养,该抗体识别细胞质的细胞角蛋白7、8、18和19,随后与FITC抗细胞角蛋白抗体(克隆号:CK3-6H5;MiltenyiBiotec)培养。最后,通过MACS细胞(MiltenyiBiotec)的磁分离柱获得细胞角蛋白阳性细胞,并在涂覆聚赖氨酸的玻璃板上离心。

[0099] 观察细胞角蛋白阳性的细胞,在荧光显微镜下定位,观察其特有的绿色胞质信号。

[0100] 接下来,用抗-CD44v6多克隆抗体、外显子v6兔(AB2080 Merckmillipore)结合山羊抗兔IgG(H+L)(A-21070ThermoFisher)的二级抗体Alexa Fluor 633对样品进行培养,并使用含有DAPI封片剂(Vector Labs)的VECTASHIELD进行封片。最后,在蔡司LSM 710共焦/多光子激光扫描显微镜下观察载玻片[Ortega,F.G.et al.miRNA in situ hybridization in circulating tumor cells-MishCTC.Sci.Rep.5,9207;DOI:10.1038/srep09207

(2015)]。

[0101] 4. 健康无吸烟史的受试者的CPCs测定:在测定COPD患者的CPCs后,用此方法测定10名既往无呼吸系统疾病、既往无烟草接触史的健康受试者的CPCs。

[0102] 5. 检测的灵敏度和特异性测定:COPD患者的CPCs测定。

[0103] 研究设计

[0104] 2016年10月至2017年1月期间,横断面观察研究在两个呼吸科的门诊服务模式下进行。

[0105] 研究人群

[0106] 该研究纳入了40岁以上的,根据国际参考(4)事先诊断出COPD的成年患者,该参考基于累积至少10包-年的消费量以及支气管扩张后的系数和 $FEV_1/FVC < 0.70$,并且至少需要在医生手术中进行3年的事先监测。排除标准包括就诊前4周内COPD恶化,前一个月因任何原因进行外科手术或进行活检的先例,存在 α -1抗胰蛋白酶缺乏症或除COPD外的其他慢性呼吸道疾病和先前有肿瘤存在,拒绝参与研究或无法进行补充性研究或回答问卷。

[0107] 研究变量

[0108] 对于每一个病人,收集了关于他们的社会人口资料、不良习惯和伴随疾病的信息。所有患者均根据现行参考进行支气管扩张术后肺活量测定,并对其呼吸道疾病进行有效问卷调查(呼吸困难测量使用mMRC量表、COPD-CAT®评分、COPD评估测试),并使用BODEx指数对疾病严重程度进行多维度评估。此外,收集每一位病人的肺功能的年度下降。为了测定CPCs,在EDTA管(Vacutainer®EDTA管)(BD Biosciences,富兰克林湖,新泽西州,美国)中提取10mL的头静脉外周血(丢弃前10毫升以避免被表皮的上皮细胞污染)和所述样品随后在环境温度下处理不到2小时,避免样品暴露在自然光下。

[0109] 统计分析

[0110] 定性变量表示为绝对频率和相对频率,定性变量取决于它们是否服从正常的正态分布(应用Kolmogorov-Smirnov或Shapiro-Wilk检验后),分别表示为 $MD \pm SD$ (均值,标准偏差)和范围(最小和最大) $P50 [P25-P75]$ (中位数,四分位范围)。采用独立样本方差分析或Kruskal-Wallis H检验(取决于是否服从正态分布),对研究组的定量变量进行比较。统计显着性水平确定为 $p < 0.05$ 。采用社会科学统计软件包20.0版(SPSS公司,芝加哥,伊利诺伊州,美国)进行统计分析。

[0111] 伦理方面

[0112] 该项目获得了格拉纳达大学伦理与临床研究委员会的批准。在人类研究项目中遵循了《赫尔辛基宣言》的原则。通过签署知情同意书,所有参与者都被告知研究的性质及其目标,并准许他们参与研究。

[0113] 测定结果

[0114] 本研究对17例COPD患者进行CPC测定。参与研究的COPD患者的基本特征见表1。简言之,他们是60岁的病人,主要是男性,烟草消费量很高,25%以上是现在的吸烟者。他们有中度的支气管阻塞,绝大多数被纳入全球阻塞性肺病(GOLD)分类的B组(占总样本的58.8%)。

[0115]		N = 17
	年龄 (岁)	68.9 ± 9.5
	性别 男/女 (%)	15/2 (88.9%/ 11.1%)
	BMI, kg/m²	27.4 ± 5.0
	吸烟史	
	现时吸烟者 n (%)	5 (27.8%)
	包/年	46.4 ± 13.3
	肺功能测试	
	FEV ₁ , post-BD, L	1.71 ± 1.01
	FEV ₁ , post-BD % pred	51.3 ± 24.6
	FVC, post-BD % pred	67.8 ± 17.1
	气流限制的严重程度, n (%)	
	一般	1 (5.6%)
	中度	8 (47.1%)
	严重/非常严重	8 (47.1%)
	CAT 分数	13.0 ± 7.7
[0116]	mMRC 呼吸困难量表	2 (1-3)
	病情恶化史, 上一年	
	中度加重, 上一年	0.71 ± 0.7
	重度加重, 上一年	0.29 ± 0.61
	GOLD 2017 级数, n (%)	
	GOLD A	4 (23.5%)
	GOLD B	10 (58.8%)
	GOLD C	1 (5.9%)
	GOLD D	2 (11.8%)
	病情严重程度, BODEx 指数	2 (0-4)
	FEV₁ 下降, mL/year	90.8 ± 24.5

[0117] 表1. 本研究纳入COPD患者的临床特征以分离CPC。连续数据显示为平均值±标准差或中位数(四分位数范围), 分类变量显示为n(%)。BMI=体重指数。Post-BD: 支气管扩张试验后。CAT=COPD评估试验。mMRC: 修正的医学研究委员会规模。BODEx指数=BMI、气流阻塞、呼吸困难和严重恶化。

[0118] 在6名患者中(占总数的35.29%), 已经证明在外周血中存在CPC, 检出率为1CPC/106个造血细胞。图1显示了COPD患者的CPC。表2显示了分离出CPC和未分离出CPC的患者的

特征。

[0119]

	CPCs- (n=11)	CPCs+ (n=6)	p-值
年龄 (岁)	67.6 ± 9.9	70.1 ± 9.6	0.621
性别 男/女 (%)	11/0	4/2	0.041
吸烟史			
现时吸烟者 n(%)	4 (36.4%)	1 (16.7%)	0.394
包/年	49.4 ± 12.5	40.3 ± 14.8	0.199
FEV1, % pred	55.5 ± 27.3	43.7 ± 18.7	0.364
CAT 分数	10.6 ± 7.5	17.3 ± 6.5	0.080
恶化, 上一年	0.88 ± 0.9	1.2 ± 1.3	0.611

[0120]

GOLD 2017 级数			0.090
GOLD A- B	10 (90.9%)	4 (66.7%)	
GOLD C-D	1 (9.1%)	2 (33.3%)	
呼吸困难 mMRC ≥ 2	4 (36.4%)	5 (83.3%)	0.084
BODEx 分数	1.90 ± 1.75	3.14 ± 2.73	0.028
BODEx 分数 ≥ 3 点	5 (45.4%)	4 (66.6%)	0.236

[0121] 表2.COPD患者按CPC隔离分级的特点。连续数据显示为平均值±标准差或中位数(四分位数范围),分类变量显示为n(%)。

[0122] CPC患者显示出肺功能恶化的趋势,相较上一年增加了中度和重度加重的趋势,CAT问卷显示的症状强度更大,肺功能的年度下降趋势更大,尽管这些结果均无统计学意义(图2)。使用BODEx多维指数评估的外周血CPC患者显示出更高的疾病严重程度(图3)。

[0123] 非肿瘤肺组织免疫荧光染色

[0124] 使用气胸患者的非肿瘤肺组织的冷冻切片,并将其用作肺细胞CD44v6的表达的特异性对照。简短地说,切片解冻,然后在10分钟内用100%冷丙酮(-20℃)固定。将它们用PBS1X 0.5%吐温洗涤两次,用3%牛血清白蛋白封闭1小时,然后将其与CD44v6-FITC (MCA1730 BioRad)在4℃下培养过夜。将切片再次洗涤三遍,将它们与DAPI培养5分钟,它们用PBS1X洗涤,并用Slowfade Antifade试剂盒(S2828 ThermoFisher)进行封片,以进行免疫荧光显示。

[0125] 还使用相同的方法分析了其他上皮组织(例如前列腺和肝组织)的阴性对照。在这些情况下,未观察到CD44v6的染色。

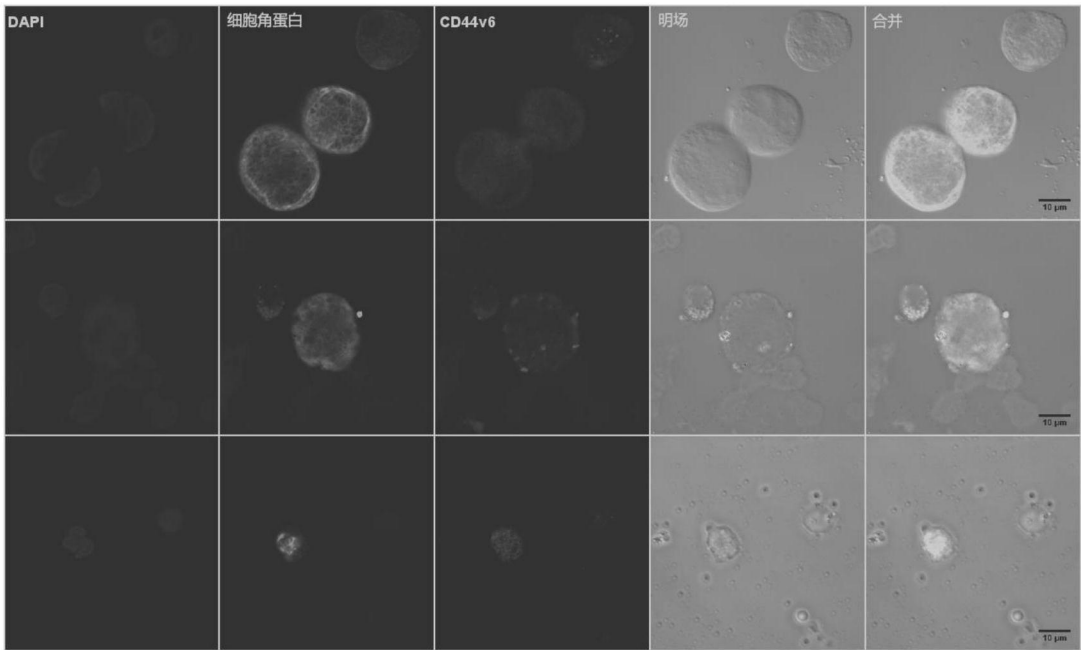


图1

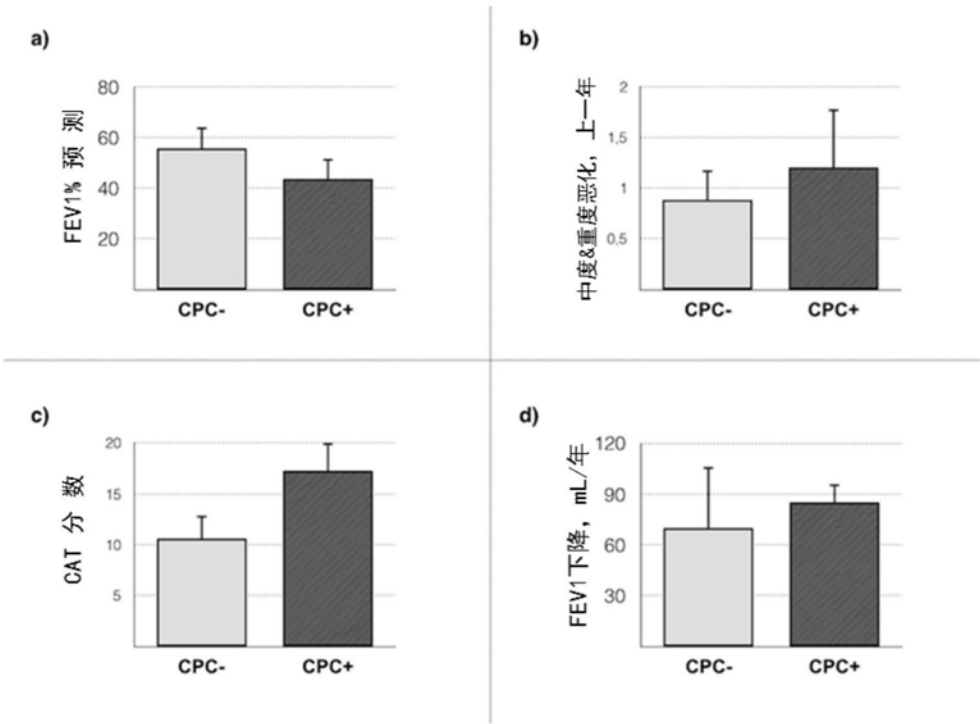


图2

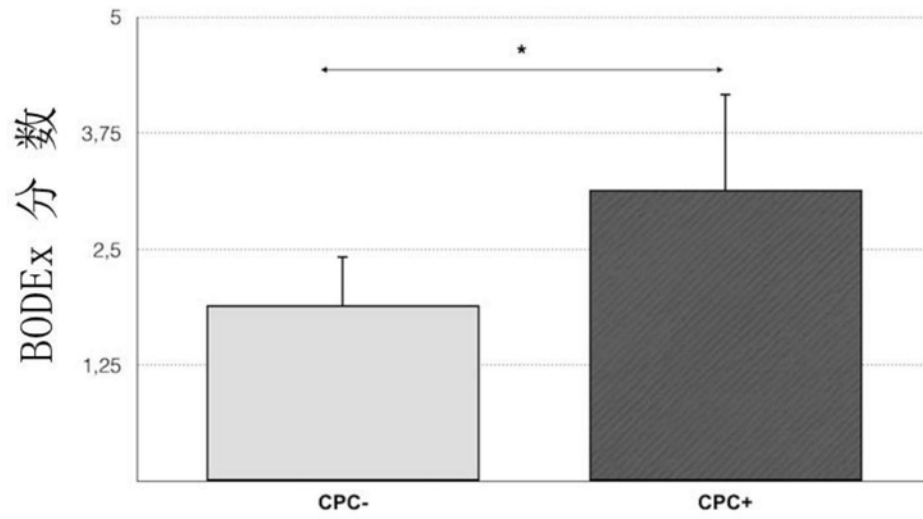


图3

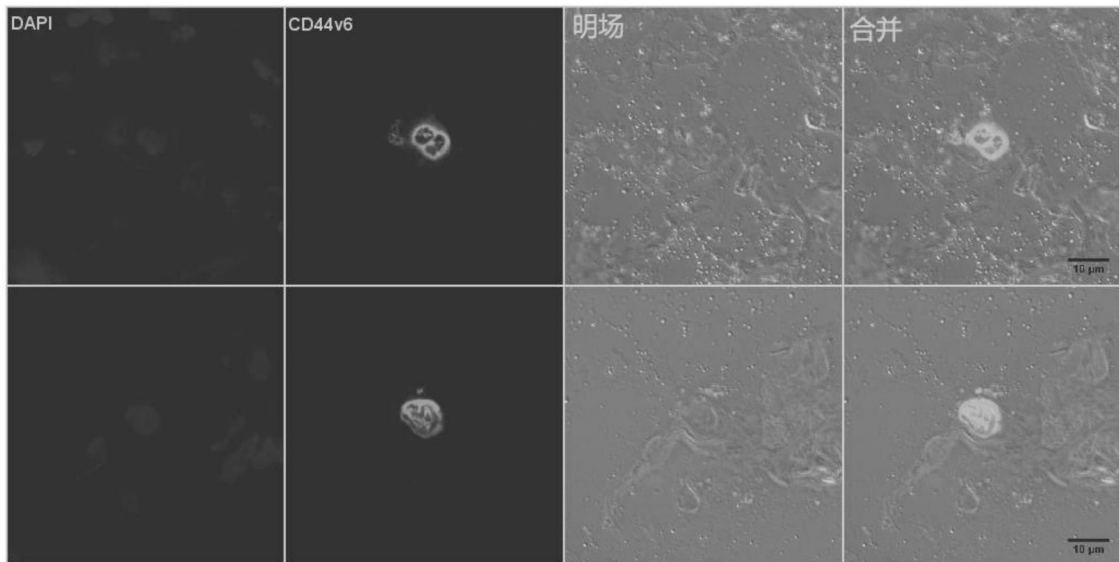


图4

专利名称(译)	在外周血中循环的上皮细胞的分离		
公开(公告)号	CN111213058A	公开(公告)日	2020-05-29
申请号	CN201880048443.4	申请日	2018-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	格拉纳达大学 安达卢西亚健康服务部		
申请(专利权)人(译)	格拉纳达大学 安达卢西亚健康服务部		
当前申请(专利权)人(译)	格拉纳达大学 安达卢西亚健康服务部		
发明人	佩德罗·约瑟·罗梅罗·帕拉西奥斯 胡安·约瑟·迪亚兹·莫雄 约瑟·安东尼奥·洛伦特·阿科斯塔 迭戈·德·米格尔·佩雷斯 玛利亚·约瑟·塞拉诺·费尔南德斯 贝尔纳迪诺·阿尔卡扎·纳瓦雷特		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58 C12N5/071		
CPC分类号	A47K5/1217 A61L2/18 A61L2/22 G08B21/245		
优先权	2017030724 2017-05-24 ES		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种识别在外周血中循环的上皮细胞的方法，该方法允许将患有表现出上皮细胞破坏的疾病的个体与不患有表现出上皮细胞破坏的疾病的个体区分开来。本发明还涉及用于实施本发明方法的试剂盒或设备。

