



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106662514 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201580029084.4

(22)申请日 2015.04.01

(30)优先权数据

61/973,348 2014.04.01 US

61/975,699 2014.04.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.12.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/023956 2015.04.01

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/153816 EN 2015.10.08

(71)申请人 中央研究院
地址 中国台湾台北

(72)发明人 张瑛芝 赖志铭 吴仁家 陈怀騄
邵宏仁 卢思宏 洪宗甫 谢煌彬

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371
代理人 李丙林 王玉桂

(51)Int.Cl.
G01N 1/40(2006.01)
G01N 33/537(2006.01)

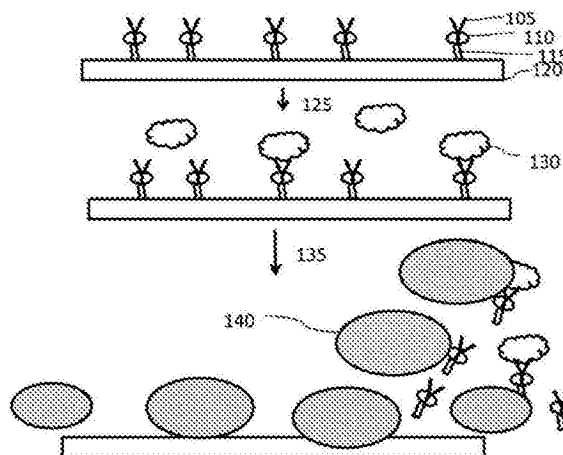
权利要求书3页 说明书52页 附图13页

(54)发明名称

用于癌症诊断及预后的方法和系统

(57)摘要

本公开提供了制造和使用泡沫组合物的组合和方法及其在临床应用中的用途。



1. 一种方法,包括:

(a) 使用微流体装置,选择性地使来自来源于受试者的异质细胞样品的稀有细胞富集,其中,所述微流体装置包括无污组合物并且对所述稀有细胞具有至少40%的捕获效率;以及

(b) 从所述微流体装置释放所捕获的稀有细胞,同时维持至少40%的所释放的稀有细胞有活力。

2. 根据权利要求1所述的方法,还包括分析所释放的稀有细胞,由此对所述受试者的病症的存在、缺乏、严重程度、转移、起源组织进行评估。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述病症为癌症并且所述异质细胞样品为血液样品。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述病症为良性疾病。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述稀有细胞为CTC。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中,分析包括计数CTC、计数有活力的CTC、或者对CTC执行分子分析试验。

7. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述病症为癌症并且评估所述严重程度包括确定癌症阶段。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述癌症阶段包括发育不良、阶段I、阶段II、阶段III、或阶段IV癌症。

9. 根据权利要求2所述的方法,还包括在第二时间点重复步骤(a)和步骤(b)。

10. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述分析包括将所释放的有活力CTC的数目与截止值进行比较。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述截止值为3个稀有细胞,并且所述血液样品具有等于或最多达6mL的体积。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述血液样品具有等于或最多达2mL的体积。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中,评估所述严重程度包括确定癌症阶段,并且其中所述癌症阶段包括发育不良、阶段I、阶段II、阶段III或阶段IV癌症。

14. 根据权利要求13所述的方法,还包括基于所述癌症阶段为所述受试者选择药物治疗法。

15. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述评估确定发育不良或阶段I癌症的存在或缺乏,并且发生在影像诊断之前。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述影像诊断包括超声、CT、MRI、PET、或触诊分析。

17. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述病症为结肠疾病、GI疾病、或卵巢/子宫内膜疾病,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用DAPI、抗CK20和抗CD45对所释放的稀有细胞进行染色。

18. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述病症为乳腺疾病或前列腺疾病,并且其中所述分析所释放的稀有细胞包括利用抗PSA和抗PSMA对所释放的稀有细胞进行染色。

19. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述病症为乳腺疾病,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用选自抗CK7、抗HER2、抗ER和抗PR组成的一种或多种标记物对所释

放的稀有细胞进行染色。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述病症为肺部疾病,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用选自抗CK7、抗TTF1和抗EGFR组成的组中的一种或多种标记物对所释放的稀有细胞进行染色。

21. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述病症为癌症,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用抗pan-CK或抗CK18对所述稀有细胞进行染色。

22. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述病症为微转移。

23. 一种对受试者的癌症起源进行评估的方法,包括:

使用微流体装置,选择性地使来自异质细胞样品的稀有细胞富集;

利用抗体组对所富集的稀有细胞进行染色,其中所述抗体组包括两种或更多种不同类型的抗体;以及

基于染色结果来预测所述稀有细胞的癌症起源。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中,预测癌症起源包括1) 确定癌细胞的存在以及2) 如果癌细胞存在则确定所述癌症起源。

25. 根据权利要求23所述的方法,其中,所述抗体组包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、抗CK20、抗CDX-2、抗PSA或抗PSMA。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中,所述癌症起源包括乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、或其他起源的癌症。

27. 根据权利要求23所述的方法,其中,所述异质细胞样品为具有等于或最多达6mL的体积的血液样品。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中,所述血液样品具有等于或最多达2mL的体积。

29. 根据权利要求23所述的方法,还包括基于癌症的进展为所述受试者选择药物疗法。

30. 一种释放在微流体表面上捕获的靶细胞的方法,所述方法包括:

使泡沫组合物流过所述微流体表面,其中,所述微流体表面包括脂质双层并且所述靶细胞被捕获在所述脂质双层的顶层上;以及

使所述顶层脱离,由此释放在所述顶层上所捕获的所述靶细胞。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中,所捕获的靶细胞以至少40%的效率和40%的活力释放。

32. 根据权利要求30所述的方法,还包括1) 利用抗体组对所述靶细胞进行染色以及2) 基于染色结果识别起源源头。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述抗体组包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、混合有抗CDX-2的抗CK20、混合有抗PSMA的抗PSA中的至少两种。

34. 根据权利要求30所述的方法,还包括分析所释放的靶细胞,由此对受试者的病症的存在、缺乏、严重程度、转移、起源组织进行评估。

35. 根据权利要求30所述的方法,其中,所述泡沫组合物包括气泡,所述气泡中的大部分具有小于所述微流体表面的宽度或微流体通道的高度的直径。

36. 根据权利要求30所述的方法,其中,所述泡沫组合物通过经由膜汲取溶液而生成,其中所述溶液包括至少1:1.5的空气与液体的比率,其中所述汲取产生气泡,并且其中至少50%的所述气泡包括10微米到100微米的直径。

37. 一种对受试者的病症的存在、缺乏或严重程度进行评估的方法,包括:

使用微流体装置,选择性地使来自具有等于或少于7mL的体积的患者血液样品的稀有细胞富集;以及

分析所述稀有细胞,由此对所述受试者的病症的存在或严重程度进行评估。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述患者血液样品具有等于或少于2mL的体积。

39. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述病症为发育不良或阶段I癌症。

40. 根据权利要求37所述的方法,其中,分析所述稀有细胞包括将所述患者血液样品中的稀有细胞数目与截止值进行比较,其中所述截止值基于具有0.75或更大的ROC曲线下面积的测试而生成。

41. 根据权利要求37所述的方法,其中,稀有细胞为CTC,并且其中所述病症为癌症。

用于癌症诊断及预后的方法和系统

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2014年4月1日递交的美国临时申请号61/973,348和2014年4月4日递交的美国临时申请号61/975,699的权益,这些申请通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 对稀有细胞诸如循环肿瘤细胞(CTC)的研究可以有助于疾病的检测、诊断和预后以及有助于临床护理和药物发现。例如,循环肿瘤细胞的分离和分析可能对确定肿瘤的起源或理解肿瘤转移的过程很重要。由于稀有细胞在血液样品中相对低的丰度(abundance),所以可能难于捕获它们。稀有细胞,像循环肿瘤细胞,可能是脆弱的。用于分离稀有细胞的多种技术(诸如免疫磁分离、基于细胞大小的过滤、抗体功能化微流体装置、纤维光学阵列扫描技术、介电泳、被动细胞分类、阴性选择、总体决策整除排名(整体决策等份排序,ensemble-decision aliquot ranking))可能具有低的检测限度和/或结果的再现性变化。因此,存在对用于以与检测癌症和其他疾病中的随后的分子分析和临床用途相容的形式分离稀有细胞诸如CTC的系统和方法的需要。

发明内容

[0004] 本公开涉及用于分离感兴趣的靶颗粒(诸如循环肿瘤细胞(CTC)、循环稀有细胞(CRC)、干细胞(例如肿瘤干细胞和骨髓干细胞)、胎儿细胞、细菌、病毒、上皮细胞、内皮细胞等)的方法、组合物以及系统。所分离的靶细胞可能是有活力的并且对体外和体内的细胞培养和生长、细胞保存、检测、分子分析和临床应用有用。这些系统和方法可以有助于癌症诊断、预后以及治疗。

[0005] 因此,在一方面,提供了一种方法。该方法包括:(a)使用微流体装置,选择性地使来自从受试者得来的异质细胞样品的稀有细胞富集,其中微流体装置包括无污组合物(无结垢组合物,non-fouling composition)并且对稀有细胞具有至少40%的捕获效率;以及(b)从微流体装置释放所捕获的稀有细胞,同时维持至少40%的所释放的稀有细胞有活力。

[0006] 在一些实施方式中,该方法还包括对所释放的稀有细胞进行分析,从而对受试者的病症的存在、缺乏、严重程度、转移、起源组织进行评估。在一些实施方式中,病症为癌症并且异质细胞样品为血液样品。在一些实施方式中,病症为良性疾病。在一些实施方式中,稀有细胞为CTC。在一些实施方式中,分析包括计数CTC、计数有活力的CTC或对CTC执行分子分析试验(测定)。在一些实施方式中,病症为癌症并且评估严重程度包括确定癌症阶段。在一些实施方式中,癌症阶段包括发育不良、阶段I、阶段II、阶段III或阶段IV癌症。在一些实施方式中,该方法还包括在第二时间点重复步骤(a)和步骤(b)。在一些实施方式中,分析包括将所释放的有活力CTC的数目与截止值(临界值,截断值,判定值,cutoff value)进行比较。在一些实施方式中,截止值为3个稀有细胞,并且血液样品具有等于或多达6mL的体积。在一些实施方式中,血液样品具有等于或多达2mL的体积。在一些实施方式中,评估严重程度包括确定癌症阶段,并且其中,癌症阶段包括发育不良、阶段I、阶段II、阶段III或阶段IV

癌症。在一些实施方式中,该方法还包括基于癌症阶段为受试者选择药物疗法。在一些实施方式中,评估确定了发育不良或阶段I癌症的存在或缺乏,并且发生在影像诊断之前。在一些实施方式中,影像诊断包括超声(超声波)、CT、MRI、PET或触诊分析。在一些实施方式中,病症为结肠疾病、GI(胃肠道)疾病或卵巢/子宫内膜疾病,并且其中,分析所释放的稀有细胞包括利用DAPI、抗CK20以及抗CD45对所释放的稀有细胞进行染色。在一些实施方式中,病症为乳腺疾病或前列腺疾病,并且其中对所释放的稀有细胞的分析包括利用抗PSA和抗PSMA对所释放的稀有细胞进行染色。在一些实施方式中,病症为乳腺疾病,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用选自由抗CK7、抗HER2、抗ER及抗PR组成的组的一种或多种标记物对所释放的稀有细胞进行染色。在一些实施方式中,病症为肺部疾病,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用选自由抗CK7、抗TTF1以及抗EGFR组成的组的一种或多种标记物对所释放的稀有细胞进行染色。在一些实施方式中,病症为癌症,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用抗pan-CK或抗CK18对稀有细胞进行染色。在一些实施方式中,病症为微转移。

[0007] 在另一方面,提供了一种对受试者的癌症起源进行评估的方法。该方法包括:使用微流体装置,选择性地使来自异质细胞样品的稀有细胞富集;利用抗体组对所富集的稀有细胞进行染色,其中抗体组包括两种或多种不同类型的抗体;以及基于染色结果,预测稀有细胞的癌症起源。

[0008] 在一些实施方式中,预测癌症起源包括1) 确定癌(carcinoma)细胞的存在以及2) 如果癌细胞存在,则确定癌症起源。在一些实施方式中,抗体组包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、抗CK20、抗CDX-2、抗PSA或抗PSMA。在一些实施方式中,癌症起源包括乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌或其他起源的癌症。在一些实施方式中,异质细胞样品为具有等于或多达6mL体积的血液样品。在一些实施方式中,血液样品具有等于或多达2mL的体积。在一些实施方式中,该方法还包括基于癌症的进展为受试者选择药物疗法。

[0009] 在另一方面,提供了一种释放在微流体表面上所捕获的靶细胞的方法。该方法包括:使空气泡沫流过微流体表面,其中微流体表面包括脂质双层并且在脂质双层的顶层上捕获了靶细胞;以及使顶层脱离,从而释放在顶层上所捕获的靶细胞。

[0010] 在一些实施方式中,所捕获的靶细胞以至少40%的效率和40%的活力进行释放。在一些实施方式中,该方法还包括1) 利用抗体组对该靶细胞进行染色以及2) 基于染色结果识别起源源头(本源)。在一些实施方式中,抗体组包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、混合有抗CDX-2的抗CK20、混合有抗PSMA的抗PSA中的至少两种。在一些实施方式中,该方法还包括分析所释放的靶细胞,从而对受试者的病症的存在、缺乏、严重程度、转移、起源组织进行评估。

[0011] 在另一方面,提供了一种释放包括无污染组合物的在微流体表面上所捕获的靶细胞的方法。该方法包括:影响无污染组合物的状态;以及释放靶细胞,其中靶细胞由于无污染组合物的所受影响的状态而被释放。

[0012] 在另一方面,提供了一种对受试者的病症的存在、缺乏或严重程度进行评估的方法。该方法包括:执行诊断测试,其中诊断测试具有在0.75或更大的曲线之下面积(区域)的ROC曲线。

[0013] 在一些实施方式中,该病症为癌症。在一些实施方式中,该病症为阶段I或阶段I前癌症。在一些实施方式中,该方法还包括基于ROC曲线将血液样品中的CTC细胞计数与截止

值进行比较,从而评估该病症的存在或缺乏。

[0014] 在另一方面,提供了一种对受试者的病症的存在、缺乏或严重程度进行评估的方法。该方法包括:使用微流体装置,选择性地使来自具有等于或少于7mL体积的患者血液样品的稀有细胞富集;以及分析稀有细胞,从而评估受试者的病症的存在或严重程度。

[0015] 在一些实施方式中,患者血液样品具有等于或少于2mL的体积。在一些实施方式中,该病症为发育不良或阶段I癌症。在一些实施方式中,分析稀有细胞包括将患者血液样品中的稀有细胞数目和截止值进行比较,其中截止值基于具有0.75或更多的ROC曲线下面积的测试而生成。在一些实施方式中,稀有细胞为CTC,并且其中该病症为癌症。

[0016] 在另一方面,提供了一种确定受试者的发育不良或阶段I癌症的存在或缺乏的方法。该方法包括:使用微流体装置,选择性地使来自从受试者得来的异质细胞样品的稀有细胞富集;以及确定所富集的稀有细胞的数目并将该数目与截止值进行比较,从而确定受试者的发育不良或阶段I癌症的存在或缺乏。

[0017] 在一些实施方式中,稀有细胞为CTC。在一些实施方式中,确定存在或缺乏是在成像之前进行的。在一些实施方式中,成像不能检测或确定发育不良或阶段I癌症的存在或缺乏。

[0018] 在另一方面,提供了一种评估受试者的病症的存在或严重程度的方法。该方法包括:使用微流体装置,以至少40%的捕获效率选择性地使来自从受试者得来的异质细胞的稀有细胞富集;从微流体装置释放稀有细胞,同时维持至少40%的稀有细胞有活力;以及分析所释放的稀有细胞,从而评估受试者的病症的存在或严重程度。

[0019] 在一些实施方式中,利用由ROC曲线下方面积所限定的敏感性和特异性对病症的存在或严重程度进行评估,其中,ROC曲线下方的面积为0.75或更大。在一些实施方式中,该病症为癌症。在一些实施方式中,该病症为良性疾病。在一些实施方式中,稀有细胞为CTC。在一些实施方式中,分析所释放的稀有细胞涉及计数CTC、计数有活力的CTC以及对CTC执行分子分析试验。在一些实施方式中,该病症为癌症,评估严重程度包括确定癌症阶段。在一些实施方式中,癌症阶段包括发育不良、阶段I、阶段II、阶段III或阶段IV癌症。在一些实施方式中,该方法还包括1)基于曲线下方的面积生成了截止值以及2)基于该截止值确定该病症的存在或严重程度。在一些实施方式中,确定该病症的存在或严重程度包括将截止值与异质细胞样品内的所释放的稀有细胞的数目进行比较。在一些实施方式中,截止值为3个或更多个稀有细胞,并且异质细胞样品为具有等于或少于2mL体积的患者血液样品。在一些实施方式中,该病症为癌症或疾病。在一些实施方式中,评估严重程度包括确定癌症阶段,并且其中癌症阶段包括发育不良、阶段I、阶段II、阶段III或阶段IV癌症。在一些实施方式中,异质细胞样品为具有等于或少于2mL体积的患者血液样品。在一些实施方式中,该病症为结肠疾病并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用DAPI、CK20以及CD45对稀有细胞进行染色。在一些实施方式中,该病症为乳腺或前列腺疾病,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用抗PSA和/或抗PSMA对稀有细胞进行染色。在一些实施方式中,该病症为癌症,并且其中分析所释放的稀有细胞包括利用抗pan-CK或抗CK18对稀有细胞进行染色。在一些实施方式中,该病症为微转移。在一些实施方式中,该病症为癌症,并且其中该病症的存在在通过包括CT、PET、超声或MRI的成像技术无法检测的阶段被确定。

[0020] 在另一方面,提供了一种评估受试者的癌症起源的方法。该方法包括:使用微流体

装置,选择性地使来自从受试者得来的异质细胞样品的稀有细胞富集;从微流体装置释放稀有细胞;利用抗体组对稀有细胞进行染色,其中抗体组包括两种或更多种不同类型的抗体;以及基于染色结果预测稀有细胞的癌症起源。

[0021] 在一些实施方式中,预测癌症起源包括1) 确定癌细胞的存在以及2) 如果存在癌细胞,则确定癌症起源。在一些实施方式中,抗体组包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、抗CK20、抗CDX-2、抗PSA或抗PSMA。在一些实施方式中,癌症起源包括乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌或其他起源的癌症。在一些实施方式中,从来自等于或少于2mL的量的患者的外周血收集稀有细胞。

[0022] 在另一方面,提供了一种释放在微流体表面上所捕获的靶细胞的方法。该方法包括:使包括气泡的流体流过微流体表面,其中微流体表面包括脂质双层和选择性地结合靶细胞的结合部分,并且其中该结合部分偶联至脂质双层的顶层;以及使脂质双层的顶层脱离,从而使偶联至顶层的结合部分脱离,释放了与结合部分结合的靶细胞。

[0023] 在一些实施方式中,结合部分以至少40%的效率结合靶细胞。在一些实施方式中,释放靶细胞以至少40%的效率释放该细胞。在一些实施方式中,所释放的靶细胞具有至少40%的活力。在一些实施方式中,该方法还包括确定靶细胞的起源源头(本源)。在一些实施方式中,确定起源源头包括1) 利用抗体组对靶细胞进行染色以及2) 基于染色结果识别起源源头。在一些实施方式中,抗体组包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、混合有抗CDX-2的抗CK20、混合有抗PSMA的抗PSA中的至少两种。在一些实施方式中,泡沫组合物包括气泡,该气泡的大部分具有小于微流体表面的宽度或微流体通道的高度的直径。

[0024] 在另一方面,本公开提供了一种具有大于1毫升的体积的泡沫组合物,其中该泡沫组合物包括气泡,其中大于50%的气泡包括从10微米到100微米的直径,并且其中大于80%的体积的泡沫组合物为空气。在一些实施方式中,大于60%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,大于70%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,大于80%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,大于90%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,泡沫组合物包括大于2毫升的体积。在一些实施方式中,泡沫组合物包括大于3毫升的体积。在一些实施方式中,泡沫组合物包括大于4毫升的体积。在一些实施方式中,泡沫组合物包括大于5毫升的体积。在一些实施方式中,泡沫组合物为等压的(等渗的/等渗压的, isotonic)。在一些实施方式中,泡沫组合物包括牛血清白蛋白(BSA)。在一些实施方式中,泡沫组合物包括细胞培养基。在一些实施方式中,泡沫组合物包括与细胞培养物相容的含有蛋白质的溶液。在一些实施方式中,泡沫组合物中的液体与空气的比率为至少1.5:1。在一些实施方式中,泡沫组合物中的液体与空气的比率为至少2:1。在一些实施方式中,泡沫组合物中的液体与空气的比率为至少3:1。在一些实施方式中,泡沫组合物中的液体与空气的比率为至少4:1。在一些实施方式中,泡沫组合物中的液体与空气的比率为至少5:1。在一些实施方式中,大于90%的体积的泡沫组合物为空气。在一些实施方式中,大于95%的体积的泡沫组合物为空气。

[0025] 在一方面,本公开提供了一种从表面除去颗粒的方法,该方法包括:使泡沫组合物流过表面,并从表面除去颗粒,其中泡沫组合物包括气泡,并且其中至少50%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,流动包括至少2.5mm/s的线速度。在一些实施方式中,流动包括至多4mm/s的线速度。在一些实施方式中,流动包括从2.6mm/s至3.9mm/s

的线速度。在一些实施方式中,流动包括至少0.5mm/s的线速度。在一些实施方式中,流动包括至多4mm/s的线速度。在一些实施方式中,流动包括从0.5mm/s至4mm/s的线速度。在一些实施方式中,流动除去了大于60%的无污组合物。在一些实施方式中,流动除去了大于70%的无污组合物。在一些实施方式中,流动除去了大于80%的无污组合物。在一些实施方式中,流动除去了大于90%的无污组合物。在一些实施方式中,表面包括一组微结构。在一些实施方式中,表面包括无污组合物。在一些实施方式中,无污组合物包括聚合物和结合部分。在一些实施方式中,无污组合物包括脂质层和结合部分。在一些实施方式中,结合部分非共价地偶联至无污组合物。在一些实施方式中,结合部分共价地偶联至无污组合物。在一些实施方式中,结合部分嵌入无污组合物中。在一些实施方式中,结合部分偶联至表面。在一些实施方式中,脂质层包括单层。在一些实施方式中,脂质层包括双层。在一些实施方式中,脂质层包括脂质体。在一些实施方式中,脂质层包括脂质单层、双层或脂质体中的两种或更多种。在一些实施方式中,结合部分包括抗EpCAM抗体。在一些实施方式中,结合部分包括抗HER2抗体。在一些实施方式中,结合部分包括抗体。在一些实施方式中,表面包括结合细胞。在一些实施方式中,结合细胞通过泡沫组合物被除去。在一些实施方式中,结合细胞通过结合部分结合至表面。在一些实施方式中,细胞为稀有细胞。在一些实施方式中,细胞为循环肿瘤细胞。在一些实施方式中,无污组合物阻止了至少50%的非靶颗粒的结合。在一些实施方式中,无污组合物阻止了至少60%的非靶颗粒的结合。在一些实施方式中,无污组合物阻止了至少70%的非靶颗粒的结合。在一些实施方式中,无污组合物阻止了至少80%的非靶颗粒的结合。在一些实施方式中,无污组合物阻止了至少90%的非靶颗粒的结合。在一些实施方式中,通过用于生成泡沫组合物的方法来生成泡沫组合物,其包括:以至少1.5:1的比率组合液体溶液和空气;以及涡旋(vortexing)液体溶液和空气高达30秒,从而生成气泡,其中,至少50%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,通过用于生成泡沫组合物的方法来生成泡沫组合物,其包括:将溶液引入第一容器中,将溶液转移到第二容器中,其中第二容器包括空气,并且其中转移通过孔发生,通过孔将溶液从第二容器转移到第一容器中,以及生成泡沫,其中泡沫组合物包括气泡,并且其中至少50%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,通过用于生成泡沫组合物的方法来生成泡沫组合物,其包括:通过膜汲取溶液,其中溶液包括至少1:1.5空气比液体的比率,其中汲取产生了气泡,以及其中至少50%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,表面包括微流体通道。

[0026] 在一方面,本公开提供了一种用于生成泡沫组合物的方法,其包括:以至少1.5:1的比率组合液体溶液和空气,涡旋液体溶液和空气高达30秒,从而生成气泡,其中至少50%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,比率为至少2:1。在一些实施方式中,比率为至少3:1。在一些实施方式中,比率为至少4:1。在一些实施方式中,比率为至少5:1。在一些实施方式中,至少50%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,至少60%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,至少70%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,至少80%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中,至少90%的气泡包括从10微米到100微米的直径。

[0027] 在一方面,本公开提供了一种用于生成泡沫组合物的方法,其包括:将溶液引入第一容器中,将溶液转移到第二容器中,其中第二容器包括空气,并且其中转移通过孔发生;

通过孔将溶液从第二容器转移到第一容器中；以及生成泡沫，其中泡沫包括气泡，并且其中至少50%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，重复该方法。在一些实施方式中，重复该方法至少5次。在一些实施方式中，重复该方法至少10次。在一些实施方式中，容器包括注射器。在一些实施方式中，孔包括2毫米的直径。在一些实施方式中，孔包括至多100微米的直径。在一些实施方式中，至少60%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，至少70%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，至少80%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，至少90%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，溶液与空气的比率为至少1.5:1。在一些实施方式中，溶液与空气的比率为至少2:1。在一些实施方式中，溶液与空气的比率为至少3:1。在一些实施方式中，溶液与空气的比率为至少4:1。在一些实施方式中，溶液与空气的比率为至少5:1。

[0028] 在一方面，本公开提供了一种用于生成泡沫组合物的方法，其包括：通过膜汲取溶液，其中溶液包括至少1:1.5的空气与液体的比率，其中，汲取产生了气泡，并且其中至少50%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，膜包括细孔膜（微孔膜，fine pore membrane）。在一些实施方式中，膜包括多个孔。在一些实施方式中，该孔包括2毫米的直径。在一些实施方式中，膜包括气石（airstone）。在一些实施方式中，比率为至少2:1。在一些实施方式中，比率为至少3:1。在一些实施方式中，比率为至少4:1。在一些实施方式中，比率为至少5:1。在一些实施方式中，至少60%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，至少70%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，至少80%的气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，至少90%的气泡包括从10微米到100微米的直径。

[0029] 在一方面，本公开提供了一种用于生成泡沫组合物的方法，其包括：泵送包括含有蛋白质溶液的溶液，其中所述泵送产生了气泡，以及其中至少50%的所述气泡包括从10微米到100微米的直径。在一些实施方式中，泵送只发生一次。在一些实施方式中，泵送将所述含有蛋白质的溶液与大气混合。

[0030] 本公开的另一方面的特征在于用于分离样品中的靶细胞的细胞捕获/释放平台。该平台包括脂质共轭体和结合剂，该脂质共轭体包括润滑组合物，该结合剂特异地结合靶细胞，并且其中脂质共轭体和结合剂通过连接体（接头，连接物）连接。在一些实施方式中，脂质共轭体被固定到基底（基质）上。在一些实施方式中，该基底为平面装置。在一些实施方式中，该基底为微流体装置。

[0031] 本公开的另一方面的特征在于用于分离样品中的靶细胞的方法。该方法包括以下步骤：(a) 利用包括润滑组合物的脂质共轭体和特异地结合靶细胞的结合剂来接触样品，以及其中润滑共轭体和结合剂通过连接器连接；(b) 洗掉未结合的细胞；以及(c) 释放结合细胞，从而分离靶细胞。

[0032] 本文所描述的样品可以为体液、体液的稀释物、全血、尿液、淋巴液或腹水。在一些实施方式中，样品的体积小于9mL、小于6mL、小于4mL或小于3mL、小于2mL或小于1mL。在一些实施方式中，样品的体积为约8mL、约6mL、约4mL、约2mL或约1mL。

[0033] 本文所描述的靶细胞包括但不限于肿瘤细胞、干细胞、病原体、T细胞、心肌细胞、循环肿瘤细胞、循环上皮细胞以及循环内皮细胞。

[0034] 在一些实施方式中,该方法还包括使所分离的细胞富集。

[0035] 该所分离的细胞保持为有活力。在一些实施方式中,该所分离的细胞具有大于95%、大于90%、大于80%、大于70%、大于60%、大于50%、大于40%或大于30%的细胞活力。在一些实施方式中,至少约90%、至少约80%、至少约70%、至少约60%、至少约50%、至少约40%或至少约30%的所分离细胞是有活力的。

[0036] 本文所公开的结合剂特异地结合靶细胞表面。在一些实施方式中,靶细胞为上皮细胞,并且结合剂为抗上皮细胞粘附分子膜蛋白的抗体(抗EpCAM)。在优选的实施方式中,结合剂为抗EpAb 4-1。

[0037] 本文所公开的润滑组合物为脂质部分、脂质混合物、脂质单层、脂质双层、脂质体、脂质聚合物或聚乙二醇。在优选的实施方式中,润滑组合物为支撑的脂质双层(SLB)。

[0038] 靶细胞在没有破坏细胞的情况下被释放,从而所分离的细胞保持完整并且有活力。在一些实施方式中,靶细胞通过破坏脂质共轭体而被释放。在一些实施方式中,靶细胞经由破坏润滑组合物(诸如SLB)而被释放。

[0039] 在一些实施方式中,步骤(b)中的洗涤通过向润滑组合物施加剪切应力来执行。在一些实施方式中,剪切应力为约0.5至约30达因/cm²。在一些实施方式中,剪切应力为约0.5、约1、约2.5、约5、约7.5、约10、约12.5、约15、约20或约30达因/cm²。

[0040] 在一些实施方式中,步骤(c)中的释放通过施加温和扫除力来执行。温和扫除力包括但不限于气泡的剪切、空气泡沫的剪切、乳化流体的剪切、超声波振动或油相。温和扫除力提供了与润滑组合物的疏水性相互作用。

[0041] 在一些实施方式中,该方法还包括使所分离的细胞富集。在一些实施方式中,富集所分离的细胞为至少200倍、至少400倍、至少600倍、至少800倍或至少1000倍。

[0042] 在另一方面,本公开的特征在于体外或体内培养所分离的细胞以及使其生长的方法。该方法包括步骤:(a)根据本文所公开的方法分离靶细胞以及(b)在体内或体外有效地培养有活力的靶细胞以及使其生长的条件下维持所分离的细胞。

[0043] 本公开的另一方面的特征在于保存有活力的靶细胞的方法。该方法包括步骤(a)根据本文所公开的方法分离靶细胞以及(b)在长期储存的适合条件下保存所分离的细胞。

[0044] 在另一方面,本公开的特征在于一种对所分离的细胞执行分子分析的方法。该方法包括步骤(a)根据本文所公开的方法分离靶细胞,以及(b)执行分子分析。

[0045] 本公开的另一方面的特征在于一种检测受试者的靶细胞的方法。该方法包括步骤(a)根据本文所公开的方法分离靶细胞;(b)通过染色检测靶细胞。受试者具有或疑似具有疾病/癌症。

[0046] 本公开的另一方面的特征在于一种评估患有癌症的患者的癌症进展的方法。该方法包括步骤(a)从患者分离循环肿瘤细胞(CTC),以及(b)对CTC执行一种或多种细胞或分子分析,以确定患者的癌症进展。

[0047] 所分离的循环肿瘤细胞(CTC)基本上是纯的。在一些实施方式中,基本上纯的CTC的群体包括不超过20%的非CTC细胞。在一些实施方式中,基本上纯的CTC的群体包括不超过10%的非CTC细胞。在一些实施方式中,基本上纯的CTC的繁殖包括不超过5%的非CTC细胞。

[0048] 癌症的实例包括但不限于肺癌、食道癌、膀胱癌、胃癌、结肠癌、皮肤癌、乳头状甲

状腺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、盆腔癌以及睾丸癌。

[0049] 在一些实施方式中,一种或多种细胞或分子分析包括形态分析、基因组分析、表观基因组分析、转录组分析、蛋白组分析或它们的任何组合。

[0050] 在一些实施方式中,一种或多种细胞或分子分析包括确定CTC中的一个或多个DNA突变。

[0051] 在一些实施方式中,DNA突变包括插入、删除、取代、转移、基因扩增或它们的任何组合。

[0052] 在一些实施方式中,DNA突变位于选自KRAS、APC、TP53、BRAF、PTEN、EGFR、ERCC1、RRMI、ELM4、HER2以及ALK组成的组中的基因中。

[0053] 在一些实施方式中,一种或多种细胞或分子分析包括确定CTC中的癌症特异性基因的蛋白表达水平。在一些实施方式中,一种或多种细胞或分子分析包括确定CTC中癌症特异性基因的RNA表达水平。

[0054] 在一些实施方式中,该方法还包括通过染色来检测CTC中一个或多个癌症特异性标记物的表达,以及计数所染色的细胞。患者的肿瘤的阶段和/或预后可以基于分子分析和癌症特异性CTC的计数的组合结果而确定。

[0055] 本领域中已知多种癌症特异性标记物。在一些实施方式中,癌症特异性标记物为细胞角蛋白、CDX1、CDH17、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、粘蛋白-1(MUC-1)、人表皮生长因子受体2(HER2)、绒毛膜促性腺激素(hCG)、 α -胎蛋白(AFP)、肝细胞癌(HCC)、N-钙粘蛋白、表皮生长因子受体(EGFR)、ERCC1、雄激素受体(AR)、人平衡型核苷转运蛋白1(hENTI)、RRMI或癌胚抗原(CEA)、CD44和p53、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、GD2、GM2、GM1、GD1a、GT1b、A2B5、Tf、Tn、GIoboh、CD133、CD24、CD44、CD90、ER或PR。

[0056] 此外,本公开的特征在于一种评估受试者的疾病的存在和/或严重程度的方法,该方法包括(a)从受试者分离循环肿瘤细胞(CTC);(b)通过染色检测CTC中一种或多种癌症特异性标记物的表达;(c)计数所染色的细胞;并且其中,所染色细胞的数目和/或与对照相比数目的变化是疾病的存在和/或严重程度的指示;从而评估疾病的存在和/或严重程度。

[0057] 在一些实施方式中,该方法还包括对CTC执行一种或多种细胞或分子分析,并且基于分子分析和疾病特异性CTC的计数的组合结果来确定疾病的存在和/或严重程度。

[0058] 在一些实施方式中,疾病为癌症。所染色的细胞的已增加的数目为癌症不良预后或转移的指示。

[0059] 在一些实施方式中,疾病是癌前病症。癌前病症的实例包括光化性角化病、巴雷特食管、萎缩性胃炎、先天性角化不良、缺铁性吞咽困难、扁平苔藓、口腔黏膜下纤维化、日光性弹力组织变性以及宫颈发育不良。

[0060] 本公开的特征还在于一种用于检测受试者的结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的方法。该方法包括以下步骤:(a)从受试者分离循环肿瘤细胞(CTC);(b)通过染色检测CTC中选自DAPI、CK20、CD45、CDH17、CDX2、CK7、CEA、panCK、TCN、SMLT2B1、ALDOB、COL11A1、PI3、CCL20、MTHFD11、IL-1b、SRPX2、SLC04A1、TESC以及IL-23a组成的一种或多种标记物的表达;(c)计数所染色的细胞;并且其中所染色的细胞的数目和/或与对照相比数目的变化是结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的存在和/或严重程度的指示。

[0061] 在一些实施方式中,标记物包括CK20和选自DAPI、CD45、CDH17、CDX2、CK7、CEA、

panCK TCN、SMLT2B1、ALDOB、COL11A1、PI3、CCL20、MTHFD11、IL-1b、SRPX2、SLC04A1、TESC和/或IL-23a组成的组中的一种或多种。

[0062] 在一些实施方式中,标记物选自由DAPI、CK20、CD45以及CEA组成的组。在一些实施方式中,标记物选自由DAPI、CK20以及CD45组成的组。

[0063] 在一些实施方式中,结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的存在和/或严重程度由DAPI+/CK20+/CD45-的表达中的所染色细胞的数目或数目的变化来指示。

[0064] 在一些实施方式中,受试者为具有或疑似具有胃肠(GI)道疾病的人类患者。胃肠道疾病包括但不限于巴雷特食管、胃溃疡、胃炎、平滑肌瘤、息肉、克罗恩病、溃疡性结肠炎、胰腺炎、腺癌、粘液腺癌、类癌肿瘤、鳞状细胞癌、淋巴瘤和肉瘤。

[0065] 在一些实施方式中,受试者是具有结肠直肠癌(CRC)的人类患者。在某些实施方式中,结肠直肠癌患者遭受的结肠直肠癌为阶段0、阶段I、阶段II、阶段III和/或阶段IV的结肠直肠癌。

[0066] 在下面的描述中阐述了本发明的一个或多个实施方式的细节。本发明的其他特征或优点将从下面的附图和若干实施方式的详细的描述以及还从所附权利要求中将更加明显。

[0067] 通过引用的并入

[0068] 该说明书中所提及的所有公开、专利以及专利申请通过引用并入本文,其程度如同具体地和单独地指示每个单独的公开、专利或专利申请通过引用被并入。

附图说明

[0069] 利用所附权利要求的特性阐述了本发明的特征。通过引用下文中的详细描述和所附的附图将获得对本发明的特征和优点的更好的理解,下文中详细的描述阐述了说明性实施方式,在这些说明性实施方式中利用了本发明的原理,并且在附图中:

[0070] 图1示出了本公开的方法的示例性实施方式。

[0071] 图2示出了本公开的泡沫组合物和空气液体界面的示例性实施方式。

[0072] 图3示出了毛细管微流体装置。

[0073] 图4提供了CTC检测的决策树。

[0074] 图5提供了微流体装置的分解视图。

[0075] 图6示出了根据实施方式的在微流体通道中制备抗体-链的(tethered)SLB涂层所遵循的顺序步骤。

[0076] 图7描绘了用于生成本公开的泡沫组合物的示例性装置。

[0077] 图8描绘了用于生成本公开的泡沫组合物的示例性装置。

[0078] 图9示出了6个不同的微流体通道设计(A到F)的几何结构和性能。

[0079] 图10示出了微流体通道设计A和B的构造和尺寸。

[0080] 图11示出了微流体通道设计C和D的构造和尺寸。

[0081] 图12示出了微流体通道设计E和F的构造和尺寸。

[0082] 图13示出了经由通过已增加的缓冲流动速率选择性地增加流动通道中的剪切应力的纯化。

[0083] 图14提供了释放过程的延时显微照片。

[0084] 图15提供了将从芯片释放的细胞与所附的抗体和空气泡沫一起收集到Eppendorf试管中。

[0085] 图16示出了已洗脱的CTC的培养和遗传突变分析。

[0086] 图17示出了在小基底上收集的细胞。

[0087] 图18示出了用于细胞识别的癌症细胞覆盖荧光图像。

[0088] 图19示出了每2mL的CTC计数对CRC疾病TNM阶段。

[0089] 图20示出了用户、样品、计算机以及输出之间的相互作用。

[0090] 图21示出了从健康供体到具有从0/I、II、III至IV的TNM阶段的结肠直肠癌患者的所有受试者的每2mL的外周血的CTC计数。

[0091] 图22示出了通过CTC的癌症诊断的敏感性和特异性。

[0092] 图23示出了根据癌症进展的平均CTC数目。

[0093] 图24示出了系统的简单工作流程。

具体实施方式

[0094] 总体概述

[0095] 本公开提供了用于从无污染(非结垢, non-fouling)组合物捕获并除去颗粒的组合物和方法。该颗粒可以是感兴趣颗粒, 诸如细胞, 包括循环肿瘤细胞(CTC)、循环稀有细胞(CRC)、干细胞(例如肿瘤干细胞和骨髓干细胞)、胎儿细胞、细菌、病毒、上皮细胞、内皮细胞等。感兴趣的颗粒可以流过可以包括表面的通道。表面可以涂覆有结合部分, 感兴趣的颗粒可以附着于该结合部分。表面可以包括无污染组合物。无污染组合物可以是指减少非特异颗粒的结合的脂质组合物。换言之, 无污染组合物可以通过降低非特异颗粒与该组合物的结合来富集感兴趣的颗粒的纯度。当通过结合部分和无污染组合物捕获感兴趣的颗粒时, 它们可以通过温和的扫除力或包括气泡的泡沫组合物来除去。例如, 温和的扫除力可以是气泡的剪切、空气泡沫的剪切、乳化流体的剪切、超声波振动或油相。泡沫组合物可以除去感兴趣的颗粒、结合部分和/或无污染组合物。

[0096] 在图1中图解示出了该方法的示例性实施方式。表面120可以涂覆在无污染组合物115中。无污染组合物115可以附着至连接体110。连接体110可以共轭到结合部分105。结合部分105可以是抗体。表面120可以与包括感兴趣的颗粒130的样品接触125。在一些情况下, 感兴趣的颗粒130是细胞。在一些情况下, 感兴趣的颗粒130是稀有细胞。感兴趣的颗粒130可以结合至结合部分105。包括气泡140的泡沫组合物可以在表面120上流动135。气泡140可以从表面120除去无污染组合物115及任何结合细胞130。当图1示出气泡140除去单个的感兴趣的颗粒时, 应当理解气泡可以除去多个感兴趣的颗粒和/或无污染组合物。

[0097] 感兴趣的颗粒(例如, CTC)可以被进一步分析并在临床应用(诸如癌症诊断、预后以及治疗)中使用。前述系统和方法可以实现对有活力的CTC进行捕获和释放, 该有活力的CTC对确认疾病的手段敏感并且相容(例如, 与随后的分子分析相容)。例如, 本文所提供的系统和方法可允许对有活力的CTC进行捕获和释放, 从而允许对活的癌细胞在体外进行研究或繁殖, 以实现利用其他技术进行分析, 以便获得可能会导致可操作的治疗指导并可能对治疗发展有益的结果。在一些情况下, 其他技术可以包括用来研究突变或表观遗传变化的全基因组分子分析。在一些情况下, 其他技术可以包括用于靶向癌症干细胞的药物干预

的通路分析。虽然本文主要讨论关于癌症的应用,但是应当理解的是,本文所描述的组合物和方法可以用于与非癌病症相关的临床应用。例如,临床应用可以涉及息肉、良性疾病(诸如炎症性肠炎(IBD))、关节炎、结肠炎等。例如,活跃时,CTC计数可能高,并且检测率高。

[0098] 表面

[0099] 本文中对感兴趣颗粒(诸如CTC)进行选择性的捕获或有效的释放有用的装置可以包括一个或多个表面。这样的表面可以是平的、弯曲的、平面的、圆形的、不规则形状的和/或包括拓扑特征(例如,微结构或纳米结构(诸如纳米颗粒、纳米线等))。表面可以是相同的。表面可以是不同的(例如,顶部表面可以包括微结构,并且底部表面可以是平的)。

[0100] 示例性表面可以包括但不限于,生物微机电表面(bioMEM)表面、微孔、载玻片、陪替氏培养皿、细胞培养板、毛细管、管道、移液管尖端以及管。表面可以是固体、液体和/或半固体。无污组合物可被掺入细胞培养皿、微流体通道、微流体芯片、过滤过滤器、毛细管、管、珠、纳米颗粒等。表面可具有任何几何结构(例如,表面可以是平面的、倾斜的、锯齿的,具有拓扑)。

[0101] 表面可以包括微流体表面。表面可以是微流体通道的一部分,或可以生成微流体通道。表面可以是载玻片的表面、孔板或任何其他腔的内表面。

[0102] 表面可以由固体材料制成。示例性的表面材料可以包括硅、玻璃、羟基化的聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、氧化铝、塑料、金属、氧化钛(TiO_2)、Au、Ag、Pt等。

[0103] 表面可以是通道的一部分或可以生成通道。通道可以包括被配置为捕获感兴趣颗粒(例如,细胞)的表面。通道可以被形成在微流体装置内,该微流体装置被配置为从全血液样品捕获感兴趣颗粒。捕获可以通过感兴趣颗粒(例如,细胞)的相互作用利用通道的表面上的结合部分来介导。例如,通道可以包括涂覆有结合部分的微结构。微结构可以被布置成从通道内的全血液样品来分离感兴趣颗粒。这样的通道可以用于从患者的血液样品捕获感兴趣颗粒,并且能够有助于癌症生物研究和临床癌症管理两者,包括癌症的检测、诊断以及监测。

[0104] 通道可以包括三个尺寸。通道的横截面可以被定义为通道的体积的两个尺寸(例如,高度和宽度)。在一些实施方式中,通道的宽度可以约等于或大于 $10\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$ 、 $30\mu\text{m}$ 、 $40\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $60\mu\text{m}$ 、 $70\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$ 、 $90\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 、 $120\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}$ 、 $300\mu\text{m}$ 、 $500\mu\text{m}$ 、 1mm 、 2mm 、 5mm 、 10mm 、 20mm 、 50mm 或 100mm 。在一些实施方式中,通道的高度可以约等于或大于 $20\mu\text{m}$ 、 $30\mu\text{m}$ 、 $40\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $60\mu\text{m}$ 、 $70\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$ 、 $90\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 、 $120\mu\text{m}$ 、 $140\mu\text{m}$ 、 $160\mu\text{m}$ 、 $180\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}$ 、 $300\mu\text{m}$ 、 $500\mu\text{m}$ 、 1mm 、 2mm 、 5mm 、 10mm 、 20mm 、 50mm 或 100mm 。第三尺寸可以被称之为通道的长度。

[0105] 微流体通道可以包括微结构。例如,微结构可以被蚀刻成具有 $2.5\text{cm} \times 7.5\text{cm}$ 的总尺寸的表面。在基底的周围可以留有 2mm 的边缘,用于结合底部表面以创建封闭的室。例如,雕刻的矩形微结构可以具有从 $250\mu\text{m}$ 的宽度到 $1000\mu\text{m}$ 的长度,并且具有可变的高度(例如,50、80以及 $100\mu\text{m}$)。微结构可以被布置成Z字图案或交错图案,其中第1至5行中的特征数目为a、2、3、2以及1,在这些行之间具有 $250\mu\text{m}$ 的间距。相邻特征可以间距 $200\mu\text{m}$ 。该交错的图案可以在通道的整个长度上重复,并且这些特征的更多行中的1至4行可以在通道腔的整个长度上平行地延伸。微结构的高度、宽度或长度可以为至少5、10、25、50、75、100、250、500微米或更多。微结构的高度、宽度或长度可以为至多100、500、250、100、75、50、25或10或更少微米。微结构之间的间距可以为至少10、25、50、75、100、250、500或750或更多微米。微结构

之间的间距可以为至多1000、750、500、250、100、75、50或25或更少微米。

[0106] 微结构可以被定向成人字形图案。人字形图案可以通过形成人字形柱来创建,该人字形柱中每个微结构被定位成与另一微结构相邻。柱中所有微结构可以面向相同方向。在一些实施方式中,每个微结构之间的距离为50微米。微结构可以被定位成彼此相距任何距离。柱可以包括任何数目的微结构。例如,柱可以包括至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多个微结构。柱可以包括至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多个微结构。人字形图案还可以包括从入口到出口串联地形成的微结构的多个柱。在一些实施方式中,微结构的两个相邻柱可以分开100微米。换言之,第二柱的第一微结构可以被定位成离第一柱的最后微结构100微米。从通道的入口到出口可以重复该图案。

[0107] (例如,微流体通道的)表面可以创建体积或为体积的一部分。本文的表面可以生成在其上样品流动的体积。这样的体积可以为至少约1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200或更多微升。可替换地或另外,表面的体积可以为至多约1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200或更多微升。

[0108] 由于在平表面的中心形成停滞区,样品内的感兴趣颗粒至表面的粘附可以沿着每个微结构的平表面增加,从而提供增加停留时间和/或增加与结合表面的化学相互作用的效率的停滞流动条件。在一些实施方式中,表面可以为通道内的微结构的外表面或被定向成基本上垂直于微流体通道内的生物样品的流体流动的方向的表面的部分。微结构可以完全地或部分地延伸穿过微流体通道。

[0109] 微流体装置可以包括在入口和出口之间提供流体连通的流体流动通道。通道可以包括被配置成结合感兴趣颗粒(例如,用结合部分功能化)的至少一个表面。表面可以形成在被配置成捕获样品中的感兴趣颗粒的通道内的一个或多个微结构上。可以以与其他组件组合的方式包括通道,以提供用于从样品分离分析物或感兴趣颗粒(例如,细胞)的系统。具有结合部分的通道或区域的体积可以根据被采用的样品的体积进行选择。通道的体积可以大于样品的尺寸。

[0110] (例如,微流体通道的)一个或多个表面可以被配置成引导流体流动和/或流体内的感兴趣颗粒通过微流体通道。例如,通道的表面可以是粗糙的或光滑的。通道可以包括粗糙的表面。通道可以包括其大小可以比得上所需的分析物或感兴趣颗粒(例如,细胞)的周期性振幅和/或频率。在一些情况下,通道可以由被定位成与微流体通道内的一个或多个微结构的基底相对的波状或“锯齿”形状的壁来限定。锯齿形状的表面可以具有约为约1-100微米的高度和频率。锯齿形状的表面可以被定位成直接与仅部分地延伸穿过表面的一个或多个微结构相对。可以选择通道的尺寸,以提供将感兴趣颗粒结合至微流体通道的表面的所需的速率。

[0111] 可以选择流体流动(例如,针对样品流动、缓冲液清理等)的速率和压力来提供结合至表面的所需的速率。还可以选择流体流动速度来提供对所结合至表面的感兴趣颗粒所需的剪切应力。可以操纵至少两个变量,以控制施加至通道的剪切应力:室的横截面面积和施加至室的流体压力。可以操纵其他因素以控制允许结合所需的感兴趣颗粒和防止不需要的颗粒的结合(例如,所采用的结合部分和通道中的结合部分的密度)所需的剪切应力的量。产生适合的剪切应力的与微流体通道结合的泵可以产生单向剪切应力(即,基本上不存在流动方向的逆转和/或基本上是恒定的剪切应力)。在样品通过通道的时间段期间,可以

维持单向的或基本上恒定的剪应力。

[0112] 可以配置表面(例如,微流体通道)以最大化感兴趣颗粒与通道内一个或多个表面的结合,同时允许通过通道的流体流动的所需的速率。增加微结构的表面积可以增加感兴趣颗粒结合的面积,同时增加从入口至出口通过通道的样品流体流动的阻抗(阻力)。

[0113] 如本文所提及的微流体装置可以有效地分离感兴趣颗粒(例如,稀有细胞、CTC、干细胞等)。稀有细胞的释放和恢复可能是分离稀有细胞的重要因素。例如,当使用梯度洗脱方法时,可能存在对细胞膜的破坏、表面标记物的退化以及CTC的表型和功能化信息变化的可能性,这可能限制了细胞的下游分析。例如,当使用流动诱导的细胞脱离时,破坏抗体细胞表面抗原结合所需的剪切应力(例如50至200达因/cm²)可能改变了基因表达,并且可能导致细胞死亡。

[0114] 功能化表面

[0115] 表面(例如,微流体通道)可以涂覆有无污组合物。无污组合物可以是防止结垢(例如,防止非特异性颗粒(诸如血清蛋白)的结合,同时保留结合感兴趣颗粒的能力)的组合物。无污组合物可以充当润滑表面,使得仅低流动剪切应力或低流动速率可以用于本公开的方法。对于无污组合物,可能仅需要低流动剪切应力以从无污染层(无结垢层)除去非特异性细胞或不需要的成分。在一些情况下,无污行为可能与无污表面的表面水合、柔韧性以及流动性有关。无污组合物可以包括如本文所进一步描述的结合部分和/或连接体。

[0116] 无污组合物可以包括脂质层或脂质共轭体。脂质层可以包括脂质单层、脂质双层、支持的脂质双层(SLB)或脂质多层、脂质体、多肽、聚电解质多层(PEM)、聚乙烯醇、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、两性离子物质、聚(羧基甜菜碱)(pCB)、聚(磺基甜菜碱)(pSB)、pDMAEMA以及小的有机化合物,或者它们的任何组合。可以用于无污物的示例性脂质可以包括但不限于1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(帽生物素基)(钠盐)(b-PE)、1-棕榈酰-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC)、二酰基甘油、磷脂、糖脂、甾酮、卵磷脂(PtdCho)、磷脂酰乙醇胺(PtdEtn)、磷脂酰肌醇(PtdIns)、磷脂酰丝氨酸(PtdSer)以及磷酸鞘脂。

[0117] 脂质层可以具有横向移动性。脂质层可以是生物惰性的。脂质层可以有效地抵抗非特异性蛋白质吸收和细胞粘附(例如,由于横向移动性和生物惰性)。横向移动性可以允许脂质和蛋白质重组它们在表面上的分布。横向移动性可以允许蛋白质的组装并增加靶细胞(感兴趣颗粒)的结合亲和力和特异性。

[0118] 脂质分子在脂质固体界面上的移动性可以使它们连续地彼此交换位置。由于脂质分子的移动性,一旦感兴趣颗粒接近抗体修饰的脂质层,下面的流体脂质层可以允许抗体分子朝向感兴趣颗粒迁移(例如,由于活性招募或扩散)。由此,感兴趣颗粒可以更加稳固地粘附在表面上。相反,当抗体功能化的脂质集中在感兴趣颗粒下方时,远离靶细胞的非功能化的脂质的集中可以增加,从而导致对非特异性结合的更大的抵抗。通过蛋白质和血液细胞而降低的非特异性结合可以降低由非特异性结合事件在受限的结合空间中所产生的位阻现象(空间位阻)。

[0119] 无污组合物可以通过施加较小的力来帮助除去非特异性颗粒。从无污染组合物除去非特异性颗粒所需的剪切应力可以比从常规的抗体涂覆的表面除去非特异性颗粒所需的剪切应力小得多,并且可以远低于通过在生理状态下的细胞(诸如在人体血液中观察到的)

所通常经历的剪切应力(例如,~15达因/cm²)。

[0120] 在一些实施方式中,无污染组合物可以是支持的脂质双层(SLB)。SLB可以包括脂质(诸如,1,2-二油酰基-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-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC))。SLB可以是蛋白质抗性的。例如,由于在宽pH范围中存在中性和两性离子磷脂酰胆碱头基,因此SLB可以是蛋白质抗性的。例如,由于在亲水性脂质头基和本体溶液之间所形成的水性薄膜,因此SLB可以是蛋白质抗性的。

[0121] 无污染组合物可以包括聚乙二醇(PEG)。PEG可以包括至少约50、100、200、500、700、1000、5000、10000、15000、50000、75000、100000、150000、200000或250000或更多道尔顿的分子量。PEG可以包括至多约50、100、200、500、700、1000、5000、10000、15000、50000、75000、100000、150000、200000或250000或更多道尔顿的分子量。PEG可以包括从100至100,000道尔顿的分子量。

[0122] 无污染组合物可以包括聚电解质多层(PEM)。PEM可指包括电解质的聚合物。示例性的PEM可以包括但不限于聚L-赖氨酸/聚-L-谷氨酸(PLL/PLGA)、聚L-赖氨酸/聚L-天冬氨酸、聚(苯乙烯磺酸钠)(PSS)、聚丙烯酸(PAA)、聚(乙基丙烯酸)(PEA)或它们的任何组合。

[0123] 无污染组合物可以包括聚合物刷。聚合物刷可指可在一端附着至表面的聚合物。示例性的聚合物刷可以包括([2-(丙烯酰氧基)乙基]三甲基氯化铵,TMA)/(2-羧基乙基丙烯酸酯,CAA)共聚物。

[0124] 无污染组合物可以包括脂质、PEG、聚电解质多层或聚合物刷或它们的任何组合。

[0125] 无污染组合物可以包括一厚度。无污染组合物的厚度可以为至少约0.5、1、10、25、50、75、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000、10000、25000、50000、100000、200000、300000、500000、750000、1000000或更多纳米。无污染组合物的厚度可以为至多约0.5、1、10、25、50、75、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000、10000、25000、50000、100000、200000、300000、500000、750000、1000000或更多纳米。

[0126] 无污染组合物可以包括官能团。官能团能够直接共价和/或非供价地连接至结合部分中存在的官能团或直接连接至作为连接组合物的一部分的官能团。示例性的官能团可以包括但不限于羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酯基、醛基、环氧基或环氧乙烷基、酰肼(hydrizine)基和硫醇基、生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体以及正-负电荷。官能团可以附着至无污染组合物的脂质。官能团可以选择为与在连接体或结合部分中存在的官能团进行反应。可以选择官能团以结合在连接体或结合部分中存在的结合对的第二成员。在一些实施方式中,无污染组合物可以是支持的脂质双层(SLB),该SLB内在地产生了排斥非特异性血液组分的润滑层并且帮助结合部分的移动以形成细胞捕获平台。

[0127] 无污染组合物可以共价地附着至表面。无污染组合物可以非共价地附着至表面。无污染组合物可以通过氢键、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、范德华相互作用、离子相互作用等而与表面相互作用。

[0128] 无污染组合物可以结合感兴趣颗粒同时降低其他非特异性颗粒的结合。无污染组合物可以结合少于1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%或更多的非特异性颗粒。

[0129] 表面可以包括结垢组合物(污染组合物,fouling composition)。结垢组合物可以

包括诱导非特异性感兴趣颗粒的积聚和/或沉淀的组合物。

[0130] 表面可以为功能化表面。表面可以利用例如染料,有机感光体,抗原,抗体,聚合物,聚D赖氨酸,在 HfO_2 、 TiO_2 、 Ta_2O_5 、 ZrO_2 以及它们的混合物之中所选择的氧化物,有机化合物以及功能化的纳米层来进行功能化。表面可以利用非特异性结合部分(诸如细胞外基质)以及薄膜涂层来进行功能化。表面可以通过例如软光刻、UV辐射以及喷墨印刷来进行功能化。

[0131] 在一些实施方式中,无污组合物可以包括硅烷功能化的PEG,并且表面可以选自由硅、玻璃、羟基化的聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、氧化铝、 TiO_2 等组成的组。在一些实施方式中,无污组合物可以包括硫醇功能化的化合物,并且表面可以选自由Au、Ag、Pt等组成的组。

[0132] 结合部分

[0133] 表面可以涂覆有被选择成结合感兴趣颗粒的结合部分。结合部分可以共轭至表面。结合部分可以共轭至无污组合物(例如,无污组合物中的脂质)。

[0134] 结合部分可以包括可以特异地结合感兴趣颗粒的部分。例如,结合部分可以选择性地结合至一种或多种细胞诸如与下述疾病相关联的上皮细胞或肿瘤(赘生性, neoplastic)细胞:急性淋巴细胞白血病、急性或慢性淋巴细胞或淋巴瘤、急性髓细胞白血病、急性早幼粒白血病、腺癌、腺瘤、肾上腺癌、基底细胞癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、支气管癌、宫颈发育不良、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、表皮样癌、尤因氏肉瘤、胆囊癌、胆结石瘤、巨细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、毛细血管瘤、头癌、增生、增生性角膜神经瘤、原位癌、肠神经节瘤、胰岛细胞瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、喉癌、平滑肌瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、恶性类癌瘤、恶性高钙血症、恶性黑色素瘤、马方综合征习性肿瘤、髓样癌、转移性皮肤癌、粘膜神经瘤、蕈样肉芽肿病、骨髓发育不良综合征、骨髓瘤、颈癌、神经组织癌、神经母细胞瘤、骨原发性肉瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰脏癌、副甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、真性红细胞增多症、原发性脑瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、小细胞肺肿瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、甲状腺癌、局部皮肤损伤、网状细胞肉瘤或肾胚细胞瘤(威耳姆氏瘤)。示例性的结合部分可以包括肽、多肽、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、适体、或对生物物质呈现高亲和力的任何其他表面标记物。

[0135] 结合部分可以通过例如分子识别、化学亲和力和/或几何/形状识别来结合至感兴趣颗粒。

[0136] 结合部分可以包括抗体。该抗体可以包括抗各种上皮标记物、表面粘附分子以及生长因子受体的抗体。抗体可以是抗-EpCAM膜蛋白抗体。抗EpCAM膜蛋白抗体可以是EpAb4-1抗体,包括表1中所示出的具有SEQ ID NO:1的重链序列和具有SEQ ID NO:2的轻链序列。在一些情况下,抗体可以是抗EGFR、抗MUC-1、抗C-MET、抗HER-2、抗EphB4、抗CEA或抗ErbB2。如本文所使用的抗体可以结合特异性细胞标记物或细胞表面抗原。标记物可以包括EpCAM、EGFR、MUC-1、C-MET、HER-2、EphB4、CEA或ErbB2。在一些情况下,两种或更多种不同类型的抗体可共轭至表面和/或无污组合物。例如,该表面可涂覆有抗EpCAM和抗HER2两者。

[0137] 表1.EpAb4-1抗体的VH结构域和VL结构域的氨基酸序列。

[0138] 示出了用于VH结构域和VL结构域两者的互补性决定区1-3(CDR1-3)、框架区1-4(FW1-4)。

[0139]

	FW1	CDR1	FW2	CDR2
SEQ	QIQLVQSGPELKKPGET	GYIFTNYG	WVKQAPGKGLK	INTYTGEF
ID NO:	V KISCKAS	MN	WMGW	
1 (VH)				
SEQ	DIVMTQAAFSNPVTLGT	RSSKSLIH	WYLQKPGQSPQ	HMSNLAS
ID NO:	S ASISC	SNGIITYLY	LLIY	
2 (VL)				
	FW3	CDR3	FW4	家族
SEQ	TYGDDFKGRFAFSLETS	FGRSVDF	WGQGTSVTVSS	VH9
ID NO:	A			
1 (VH)	STAYLQINNLIKNETAT			
SEQ	GVPDRFSSSGSGTDFTLR	AQNLENP	FGGGTKLEIK	VK24/25
ID NO:	I SRVEAEDVGIYYC	R T		
2 (VL)				

[0140] 结合部分可以包括官能团。该官能团可用于将结合部分附着到无污组合物和/或表面。该官能团可用于结合部分的共价或非共价附着。示例性的官能团可以包括但不限于：羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酯基、醛基、环氧基或环氧乙烷基、胍基(联氨基)、硫醇基、生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原-抗体和正-负电荷。

[0141] 在一些实施方式中，官能团包括生物素和链霉亲和素或它们的衍生物。在一些实施方式中，官能团包括1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基(磺基-NHS)。在一些实施方式中，官能团包括磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)。

[0142] 在一些实施方式中，微流体表面包括无污组合物，该无污组合物包括非共价结合到表面的脂质，并且无污组合物通过连接体附着至结合部分。

[0143] 在一些实施方式中，针对上皮细胞粘附分子的抗体(抗EpCAM)(即克隆EpAb4-1)层可共轭至SLB以选择性地结合感兴趣颗粒(诸如CTC)。SLB的横向流动性可以使蛋白质聚类并增强对感兴趣颗粒(例如，CTC)的结合亲和力和特异性。此外，在SLB中脂质分子的两性离子性质可以最小化非特异性蛋白质和/或细胞吸附，从而通过外周血液降低表面的结垢。

[0144] 连接体

[0145] 连接体可加入无污组合物和结合部分。连接体可以将结合部分加入至表面。连接体可以将无污组合物加入至表面。连接体可共价地和/或非共价地加入无污组合物和结合部分。在两个组合物之间的连接可以通过包括静电相互作用、亲水-亲水相互作用、极性-极性相互作用、互补DNA结合、磁力或它们的组合的相互作用而形成。

[0146] 示例性的连接体可以包括但不限于：金属、塑料、玻璃、硅、晶片、羟基化聚(3-甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、羟基、胺基、羧酸或酯基、硫酯基、醛基、环氧基或环氧乙烷基、胍基、硫

醇基、生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、DNA、RNA、配体、受体、抗原、抗体以及正-负电荷或它们的任何组合。例如,连接体可以包括硅烷、氨基丙基三乙氧基硅烷、氨基丙基三甲氧基硅烷、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。在一些实施方式中,互补DNA片段可用于结合无污组合物和结合部分。该片段附着至每种组合物,并且可以在它们的长度上部分地或完全地互补。DNA的合适的长度一般将是至少15个、20个、25个、35个、50个、100个或更多个碱基的长度。本发明中所使用的DNA的实例是DNA镊。

[0147] 连接体可以包括可分裂的连接体。示例性的可分裂连接体可以包括但不限于:通过紫外线照射可分裂的光敏官能团、通过电脉冲机制可分裂的电敏感官能团、通过缺乏磁力可分裂的铁或磁性材料、通过破坏静电相互作用可分裂的聚电解质材料、通过杂交可分裂的DNA、热解离性基团等。例如,在释放之前,照射、加热、磁力、电力等可应用于含有可分裂的连接体的表面。随后,感兴趣颗粒可以(例如,使用空气泡沫的剪切)被洗脱。

[0148] 感兴趣颗粒、样品以及受试者

[0149] 本公开提供了捕获感兴趣颗粒。感兴趣颗粒可以是细胞。细胞可指真核细胞。真核细胞可以来源于大鼠、牛、猪、狗、猫、小鼠、人、灵长类、豚鼠或仓鼠(例如,CHO细胞、BHK细胞、NSO细胞、SP2/0细胞、HEK细胞)。细胞可以是来自组织的细胞、杂交瘤细胞、酵母细胞、病毒(例如,流感、冠状病毒)和/或昆虫细胞。细胞可以是来源于转基因动物或所培养的组织细胞。细胞可以是原核细胞。原核细胞可以是细菌、真菌、后生动物或古菌。细胞可指本文所提及的多个细胞或任何细胞。

[0150] 感兴趣颗粒可指细胞的一部分。例如,细胞可指细胞器(例如,高尔基复合物、内质网、核)、细胞碎片(例如,细胞壁、肽聚糖层)和/或细胞的内容物(例如,核酸内容物、细胞质内容物)。

[0151] 感兴趣颗粒可以是稀有细胞。示例性的细胞可以包括但不限于:稀有癌症细胞、循环肿瘤细胞、循环肿瘤微栓子、血液细胞、内皮细胞、内胚层来源的细胞、外胚层来源的细胞以及中胚层来源的细胞或它们的任何组合。

[0152] 感兴趣颗粒可以是样品的一部分。样品可以包括多个颗粒,仅其中一些是感兴趣颗粒。颗粒可指细胞、核酸、蛋白质、细胞结构、组织、器官、细胞分解产物等。颗粒可以是结垢颗粒。颗粒可以不结合至无污组合物。样品可以包括至少约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%或更多的感兴趣颗粒。样品可以包括至多约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%或更多的感兴趣颗粒。

[0153] 样品可以从受试者获得。受试者可以是人类。受试者可以是非人类。受试者可以是例如,哺乳动物(例如,狗、猫、牛、马、灵长类、小鼠、大鼠、绵羊)。受试者可以是脊椎动物或无脊椎动物。受试者可具有癌症疾病。受试者可具有稀有细胞的疾病。受试者可具有稀有细胞或癌症的疾病,并且没有显示出疾病的症状。受试者可能不知道他们具有癌症或稀有细胞的疾病。

[0154] 样品可以包括体液。示例性的体液可以包括但不限于血液、血清、血浆、鼻拭子或鼻咽洗液、唾液、尿液、胃液、脊髓液、泪液、粪便、粘液、汗、耳垢、油、腺体分泌、大脑脊髓液、组织、精液、阴道液、间质液(包括来源于肿瘤组织的间质液)、眼液、脑脊液、咽拭子、呼吸、

毛发、指甲、皮肤、活组织检查、胎盘液、羊水、脐带血、显著流体(emphatic fluid)、腔液、痰液、脓液、微生物丛、胎粪、母乳和/或其他排泄物。

[0155] 泡沫组合物

[0156] 表面上的无污染层可以向本文中的装置提供其他优点。例如,该无污染层可以允许所捕获的颗粒(诸如细胞)的温和释放,而基本上不影响它们的活力。具体地,本公开考虑了使用温和的液体溶液或泡沫组合物(诸如空气形式的组合物)来释放在本文所描述的表面上所捕获的细胞。

[0157] 泡沫组合物可以通过表面张力来释放所捕获的颗粒。例如,当气泡(例如,在泡沫组合物内)接触所捕获的颗粒时,该颗粒表面上的空气-液体界面可以形成,从而产生垂直于表面的净力并将所捕获的颗粒向上拉动,导致释放。对于在无污染组合物(例如,脂质层)上所捕获的感兴趣颗粒,可替换地或除了表面张力,力而非表面张力可以有助于感兴趣颗粒的释放。例如,有助于感兴趣颗粒的释放的力可以是疏水性-亲水性的、疏水性-疏水性的和/或亲水性-亲水性的相互作用。例如,对于脂质层,与气泡接触可以将脂质层的疏水头拉进气泡的空气相,同时可以将脂质层的亲水尾部拉进液相并且所捕获的颗粒可以连同沿着气泡所拉动的脂质层一起被释放。除了或可替换的表面张力,力可以是较少数量的或不同质量的,使得所释放的细胞的活力更高。

[0158] 本公开的泡沫组合物可以包括液体和空气。液体和空气可被结合以形成气泡,从而制造泡沫。泡沫组合物可以是具有气囊的液体。泡沫组合物可以是具有气囊的液体的连续流。例如,泡沫组合物可以包括由液体包围的气泡。泡沫组合物可以是气泡的连续序列。在一些情况下,泡沫组合物可以不指液体之后的气泡。在图2中描绘了本公开的泡沫组合物的示例性实施方式。在一些实施方式中,如在201中所描绘的,泡沫组合物可以处于通道205内,该通道可以包括表面。泡沫组合物可以包括可散布有气泡215的连续的液体界面210。泡沫组合物可以不同于如在202中所描绘的空气-液体界面。空气-液体界面226可以在通道220中的液体225阻挡空气230的区段(部分)(例如,其中液体完全消耗空气的区段之间的体积)时发生。在一些情况下,空气-液体界面226的空气230在流过通道220时可能无法压缩并且可能被截留在通道220中(例如,当该体积沿通道减小或在通道内存在障碍时)。在一些情况下,201的泡沫组合物的空气215具有可能不会被截留在通道205中的大小。在一些情况下,201的泡沫组合物的气泡215的直径小于通道(例如,微流体通道205)的横截面尺寸。在一些情况下,空气-液体界面226的气泡230的直径可以是约与通道的横截面尺寸具有相同的大小(例如,通道的横截面尺寸)。

[0159] 泡沫组合物的空气可以包括任何气体。例如,空气可指氧气、氮气、二氧化碳、氢气、氦气以及氖气。空气可以是加压空气。

[0160] 泡沫组合物的液体可以是等压的。泡沫组合物的液体可以不是等压的。泡沫组合物的液体可以包括蛋白质。泡沫组合物的液体可以包括任何等压的含有蛋白质的液体。泡沫组合物的液体可以是与细胞培养物(例如,细胞培养基、杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)、洛斯维帕克纪念研究所(RPMI)、MEM、CMRL、布瑞士特氏(Brinster's) BMOC-3、格拉斯哥、Leibovitz's L-15)相容的液体。液体可以包括牛血清白蛋白(BSA)。蛋白质的非限制性实例可以包括胎牛血清(FBS)、新生牛血清(NCS)、氨基酸(例如,L-谷氨酰胺)、白蛋白、转铁蛋白、纤连蛋白、抑肽酶、酪蛋白以及胎球蛋白,或它们的任何组合。在一些情况下,蛋白

质和/或血清可以涂覆泡沫组合物的气泡的表面。在一些情况下,蛋白质和/或血清可以抵消表面张力的影响并通过防止空气向外扩散(例如,通过涂覆气泡的表面)来稳定气泡。例如,液体可以是补充有10%的FBS的DMEM和补充有10%的FBS的RPMI。例如,液体可以是含有FBS(例如,5%)的PBS的溶液。

[0161] 液体可以包括具有浓度为至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%或40%浓度的蛋白质。该液体可以包括具有浓度为至多1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%或40%浓度的蛋白质。液体可以包括5%浓度的蛋白质。液体可以包括在磷酸盐浓度缓冲液盐水中5%浓度的BSA。

[0162] 液体可以包括蛋白质和缓冲液。示例性的缓冲液可以包括磷酸盐缓冲液盐水(PBS)、硫酸铵、N-二(羟乙基)甘氨酸、咪唑缓冲液、4-羟乙基哌嗪乙硫磺酸、3-吗啉丙磺酸(mops)、2-(N-吗啡啉)乙磺酸(mes)、柠檬酸钾、甲酸钾、三磷酸氢二钠以及磷酸二氢钠。在一些情况下,液体包括磷酸盐缓冲液盐水。

[0163] 液体中所使用的蛋白质可以是疏水性蛋白质。液体的温度可以升高以帮助溶解液体溶液中的疏水蛋白质。液体的温度可以升高至4℃、25℃或37℃或更高。

[0164] 液体可以包括两亲聚合物。两亲聚合物可指具有疏水区和亲水区两者的生物分子(例如,氨基酸聚合物)。两亲分子的疏水区和亲水区可涉及静电、极性-极性以及极性-非极性相互作用。当利用空气搅动两亲聚合物时,聚合物可以重新定向成水相中的胶束样结构。两亲聚合物的重新定向可指重新定向两亲聚合物,使得大多数聚合物都面向相同的方向(例如,疏水区面向胶束的内芯,而亲水区面向水溶液)。例如,胶束样结构可以包括内芯和外芯,该内芯包括气泡,该外芯包括两亲聚合物。示例性的两亲分子可以包括但不限于磷脂、胆固醇、糖脂、脂肪酸、胆汁酸、皂苷、表面活性剂、洗涤剂、聚乙二醇、甘油以及两性离子。

[0165] 液体可以包括碳水化合物(例如,淀粉)。示例性的碳水化合物可以包括单糖、二糖、多糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、纤维素、甘油醛、核酸、DNA、RNA、乳糖以及半乳糖。

[0166] 液体可以包括乳状液。乳状液可指两种不相溶的液体的混合物。示例性的乳状液可以包括油包水乳状液、水包油乳状液、水包水乳状液、微乳状液以及纳米乳状液。乳状液可以包括乳化剂。示例性的乳化剂可以包括洗涤剂(例如,吐温-20、Triton-X)、表面活性剂(例如,SDS)以及卵磷脂。在一些实施方式中,泡沫组合物的液体可以包括蛋白质、碳水化合物、乳状液或聚合物的任何组合。

[0167] 液体可以是粘性的。液体的粘度可以比水的粘度大至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。液体的粘度可以比水的粘度大至多20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。液体的粘度可以比水的粘度小至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。液体的粘度可以比水的粘度小至多20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。液体的粘度可以是这样的,使得它保持泡沫组合物至少1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或60分钟。

[0168] 在一些实施方式中,泡沫组合物包括平衡泡沫的强度和弱度的分子。例如,泡沫组合物可以能够具有足够的延展性以移动通过通道,使得泡沫气泡的形状可以暂时变形(例如,微流体通道,例如,包括微结构),但足够强以携带所释放的细胞,使得泡沫气泡不会过早地破裂。

[0169] 待用于生成本公开的泡沫组合物的液体的体积可以是至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多毫升。待用于生成本公开的泡沫组合物的液体的体积可以是至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多毫升。在一些情况下,待用于生成本公开的泡沫组合物的液体的体积为4毫升。在一些情况下,泡沫组合物的液体包括在PBS中的4毫升的5%的BSA。

[0170] 待用于生成本公开的泡沫组合物的空气的体积可以为至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多毫升。待用于生成本公开的泡沫组合物的空气的体积可以为至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多毫升。在一些情况下,待用于生成本公开的泡沫组合物的空气的体积可以为2毫升。

[0171] 液体和空气可以以不同的量进行组合。例如,液体与空气的比率可以是至少0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、3:1、4:1或5:1或更多。液体与空气的比率可以是至多0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、3:1、4:1或5:1或更多。在一些情况下,液体与空气的比率为2:1。液体的量可以是至少50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、225%、250%、275%、300%、325%、350%、375%或400%或更多的空气的量。液体的量可以是至多50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、225%、250%、275%、300%、325%、350%、375%或400%或更多的空气的量。在一些情况下,泡沫组合物包括在PBS中的4毫升的5%的BSA和2mL的空气的混合物。

[0172] 泡沫组合物可以包括气泡。泡沫组合物的气泡的直径可以是至少1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800或900微米或更多。泡沫组合物的气泡的直径可以是至多1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800或900微米或更多。在一些情况下,泡沫组合物的气泡包括从20微米至500微米的直径。在一些情况下,泡沫组合物的气泡包括60微米的直径。在一些情况下,泡沫组合物包括在PBS中的4毫升的5%的BSA和2mL的空气的混合物,并且包括从约10至100微米的气泡。

[0173] 泡沫组合物的气泡可以具有比微流体通道的横截面尺寸小的尺寸。泡沫组合物的气泡可以具有比微流体通道的横截面尺寸大的尺寸。例如,泡沫组合物的气泡可以在微流体通道内压缩并通过。泡沫组合物的气泡可以具有比无污组合物的高度大的尺寸。气泡的直径与微流体通道的横截面长度(例如,对角线长度、宽度或高度)的比率可以是约1/100、1/50、1/25、1/18、1/16、1/12、1/8、1/5、1/4、1/2、2/3、1、1.2、1.5、2、3、4、5或10。气泡的直径和微流体通道的横截面长度可以如本文先前所描述的。在一些实施方式中,泡沫组合物可以包括其直径比微流体通道的横截面长度(例如,对角线长度、宽度或高度)小的气泡。在一些实施方式中,泡沫组合物可以包括至少一些其直径比微流体通道的横截面长度(例如,对角线长度、宽度或高度)小的气泡。在一些实施方式中,泡沫组合物可以包括这样的气泡,其中大部分具有比微流体通道的横截面长度(例如,对角线长度、宽度或高度)小的直径。如本文所使用的,大部分可指至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。如本文中所使用的,微流体通道的宽度可指表面(例如,微流体表面)的宽度。例如,泡沫组合物可以包括具有0到200 μm 之间的直径的气泡,而微流体通道的宽度大于200 μm 。例如,泡沫组合物可以包括至少50%的具有1微米到200微米之间的直径的气泡而微流体通道的宽度大于200 μm 。

[0174] 包括从1微米至200的直径的气泡的百分比可以是至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。包括从1微米至100微米的直径的气泡的百分比可以是至少

20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。包括从1微米至200微米的直径的气泡的百分比可以是至多20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。包括从1微米至100微米的直径的气泡的百分比可以是至多20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。包括从10微米至100微米的直径的气泡的百分比可以是至少50%、60%、70%、80%、90%或100%。包括从10微米至100微米的直径的气泡的百分比可以是至多50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些情况下,泡沫组合物包括4毫升的在BSA中的5%的PBS和2mL的空氣的混合物,和/或泡沫组合物的至少50%的气泡具有从约10至100微米的直径。

[0175] 泡沫组合物的体积可以是泡沫组合物将流过的通道的体积的至少1倍、2倍、3倍、4倍或5倍或更多倍。泡沫组合物的体积可以比泡沫组合物将流过的通道的体积多至少50%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%或1000%或更多。泡沫组合物的体积与泡沫组合物将流过的通道的体积的比率可以是至少1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1或更多。在一些情况下,泡沫组合物包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空氣的混合物,泡沫组合物的至少50%的气泡具有从约10至100微米的直径,和/或泡沫组合物的体积比泡沫组合物将流过的通道的体积多至少5倍。

[0176] 作为液体的泡沫组合物的体积可变化。例如,泡沫组合物的体积可以包括至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的液体。泡沫组合物的体积可以包括至多30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的液体。

[0177] 泡沫组合物的体积可以包括不同量的液体和空气。例如,泡沫组合物的体积可以包括比空气多至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍或更多倍的液体。泡沫组合物的体积可以包括比空气多至多2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍或更多倍的液体。泡沫组合物的体积可以包括比液体多至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍或更多倍的空气。泡沫组合物的体积可以包括比液体多至多2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍或更多倍的空气。

[0178] 泡沫组合物的体积可以是至少0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多毫升。泡沫组合物的体积可以是至多0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多毫升。在一些情况下,泡沫体积为2毫升。在一些情况下,待在本公开的方法中使用的泡沫体积为1.5毫升。在一些情况下,泡沫组合物包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空氣的混合物,泡沫组合物的至少50%的气泡具有从约10至100微米的直径,和/或泡沫组合物的体积为至少1.5毫升。

[0179] 泡沫组合物的体积(例如,量)可以基本上等于泡沫将在其上流动的通道的体积。泡沫组合物的体积可以是泡沫将在其上流动的通道的体积的至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或70倍或更多倍。泡沫组合物的体积可以是泡沫将在其上流动的通道的体积的至多5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或70倍或更多倍。在一些情况下,泡沫组合物的体积为比泡沫将在其上流动的通道的体积多35倍。在一些情况下,待流动的泡沫组合物的体积是1.5毫升,并且通道的体积为55微升。

[0180] 泡沫组合物在制造泡沫之后可是活性的以用于本公开的方法中至少1、5、10、15、20、25、30、35或40分钟。泡沫组合物在制造泡沫之后可是活性的以用于本公开的方法中至多1、5、10、15、20、25、30、35或40分钟。泡沫组合物在制造泡沫后可是活性的以使用15分钟。

在一些情况下,气泡可能随着时间合并、破裂或尺寸减小,从而降低泡沫组合物的有效性。在一些情况下,泡沫组合物包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空气的混合物,泡沫组合物的至少50%的气泡具有从约10至100微米的直径,泡沫组合物的体积为至少1.5毫升,和/或泡沫组合物可是活性的持续15分钟。

[0181] 泡沫组合物可以是可重复使用的。泡沫组合物可以重复使用至少1、2、3、4或5次。泡沫组合物可重复使用至多1、2、3、4或5次。泡沫组合物可以不是可重复使用的。泡沫组合物可以为了每次使用而重新制备。

[0182] 本公开的泡沫组合物的密度可以比用于制造泡沫组合物的液体的密度小。泡沫组合物的密度可以比用于制造泡沫组合物的液体的密度小10%、20%、30%、40%或50%或更多。泡沫组合物可以包括与液体不同的材料相。例如,泡沫组合物可以包括气相(例如,气泡)。泡沫组合物与用于制造泡沫组合物的液体相比可以为50%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%或更多的气态的。

[0183] 泡沫组合物可以是粘性的。泡沫组合物的粘度可以比水的粘度大至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。泡沫组合物的粘度可以比水的粘度大至多20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。泡沫组合物的粘度可比水的粘度小至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。泡沫组合物的粘度可比水的粘度小至多20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0184] 制备泡沫组合物的方法

[0185] 本公开的泡沫组合物可以使用例如,任何一种或多种本文所述的方法来制备。在一些情况下,泡沫是在低于至少0、4、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30摄氏度下制造的。本公开的泡沫组合物可以在高于0、4、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30摄氏度下制备。泡沫组合物可在从0-4摄氏度、0-18摄氏度、0-37摄氏度、4-18摄氏度、4-18摄氏度、15-25摄氏度、18-22摄氏度、18-25摄氏度、18-37摄氏度的温度下制备。在一些情况下,本公开的泡沫组合物在从18-22摄氏度的温度下制备。

[0186] 在一些情况下,泡沫组合物包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空气的混合物,泡沫组合物的至少50%的气泡具有从约10到100微米的直径,泡沫组合物的体积是至少1.5毫升,和/或泡沫组合物在温度从18-22度下制备。

[0187] 涡旋

[0188] 本公开提供了用于制造本公开的泡沫组合物的方法。一种用于制造泡沫组合物的方法可以包括将本公开的液体和空气组合以及混合样品。

[0189] 混合可通过例如涡旋、搅动、摇摆、搅拌、磁力搅拌以及摇晃来执行。混合(例如,涡旋)可以执行至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60或更多秒。混合(例如,涡旋)可以执行至多5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60或更多秒。

[0190] 在一些情况下,制造泡沫组合物的方法可以包括使包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空气的混合物涡旋30秒,其中泡沫组合物在从18-22度的温度下制备。

[0191] 注射器

[0192] 本公开的泡沫组合物可通过中间阀在容器之间转移本公开的液体和空气来制造。示例性的容器可以包括但不限于注射器、管、瓶、玻璃以及桶。在一些情况下,容器是注射

器。

[0193] 将液体和空气从一个容器转移(例如,注射器)转移到另一容器(例如,注射器)可以包括通过中间阀中的孔来转移液体和空气。孔可用于生成泡沫组合物的气泡。孔的直径可以是至少0.01、0.05、0.1、0.5、1或更多毫米。孔的直径可以是至多0.01、0.1、0.5、1、1.5、2或更多毫米。孔可以为0.2毫米。孔可以具有生成直径在1到200微米之间的气泡的尺寸。在一些情况下,制造泡沫组合物的方法可以包括通过包括0.2微米的直径的孔转移4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空氣的混合物,并且其中泡沫组合物的至少50%的气泡具有从约10至100微米的直径。

[0194] 在一些情况下,孔的开口越小,则转移期间剪切压力就越高,从而导致较小的气泡。在一些情况下,孔的开口越小,可能需要越多的进行转移的外部压力。在一些情况下,孔越大,气泡的尺寸的变化就越大。

[0195] 容器之间的转移可以进行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20或更多次。容器之间的转移可以进行至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20或更多次。

[0196] 容器之间的转移可以进行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多秒。容器之间的转移可以进行至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多秒。在一些情况下,制造泡沫组合物的方法可以包括通过包括2微米的直径的孔转移4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空氣的混合物至少10次,并且其中泡沫组合物的至少50%的气泡具有从约10至100微米的直径。

[0197] 在一些情况下,用于转移液体和空氣的容器是注射器。注射器可以具有相同的尺寸。注射器可以具有不同的尺寸。注射器能够保持至少1、5、10、20、25或50或更多毫升。注射器能够保持至多1、5、10、20、25、或50或更多毫升。注射器可以包括连接端口。连接端口可以包括鲁尔锁(Luer Lock)。连接端口可以包括滑动尖端。

[0198] 注射器可以通过阀连接至另一注射器。阀可以是三通阀。阀可以连接到注射器的鲁尔锁。

[0199] 第一注射器可以包括液体和空氣两者。在一些情况下,第一注射器和第二注射器均包括液体和空氣。在一些情况下,第一注射器包括液体而第二注射器包括空氣。

[0200] 在一些情况下,第一注射器包括液体和空氣两者,而第二注射器是空的。来自第一注射器的内容物可以通过按压第一注射器的活塞被转移至第二注射器。来自第一注射器的内容物可以通过拉动第二注射器的活塞而被转移至第二注射器,从而从第一注射器汲取液体。

[0201] 转移可以在适于生成本公开的泡沫组合物的压力下执行。例如,压力可以是成年人的拇指摁在注射器的管和/或活塞的压力。转移中所使用的压力可以为至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10或更多兆帕斯卡(MPa)。转移中所使用的压力可以为至多0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10或更多兆帕斯卡(MPa)。

[0202] 膜

[0203] 本公开的泡沫组合物可以利用膜制造。包括本公开的液体和空氣的样品可通过膜汲取。示例性的膜可以包括但不限于空气石、细孔膜、橡胶膜扩散器、空气盘以及空气管。可以由注射器通过膜来汲取液体和空氣。

[0204] 膜可以包括孔。孔的直径可以是至少1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100或更多微米。孔的直径可以是至多1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100或更多微米。孔可以具有生成包括从1至200微米的直径的气泡的尺寸。孔可以具有生成包括从10至100微米的直径的气泡的尺寸。在一些情况下,制造泡沫组合物的方法可以包括通过包括直径为至少5微米的气孔的膜汲取4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空气的混合物,并且其中泡沫组合物的至少50%的气泡具有从约10至100微米的直径。

[0205] 用于通过膜拉动液体和空气的混合物的压力可以为至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1或更多 kg/cm^2 。用于通过膜拉动液体和空气的混合物的压力可以为至多0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、或1或更多 kg/cm^2 。

[0206] 泵送

[0207] 在一些情况下,可通过泵送机构来生成泡沫组合物。可以仅执行泵送机构一次,以生成本公开的泡沫。该方法可以包括泵送液体溶液,其中在泵送期间,溶液与空气混合。液体和空气的混合溶液可通过喷嘴被泵送。喷嘴可以包括至多0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5或1或更多毫米的直径。

[0208] 毛细管微流体

[0209] 在一些情况下,可通过毛细管微流体装置来生成泡沫组合物。图3示出了根据实施方式的毛细管微流体装置。例如,圆形玻璃毛细管301可以被加热和拉动以在一个端部孔口中形成锥形几何结构。空气流可以通过锥形孔口流入液体303(例如,培养基)的罐中,以形成气泡305和泡沫组合物。气泡的体积可通过调节空气流的流动速率来控制。例如,当空气流的流动速率低时,可以产生单分散的空气下降。例如,当空气流的流动速率超过一定阈值时,可以形成空气喷射并可以在下游形成空气下降。

[0210] 方法

[0211] 本公开提供了一种用于捕获和释放感兴趣颗粒(例如,循环肿瘤细胞、循环稀有细胞(CRC)、循环干细胞(例如肿瘤干细胞和骨髓干细胞)、胎儿细胞、细菌、病毒、上皮细胞、内皮细胞等)的方法。感兴趣颗粒可以被捕获在表面上。表面可以在无污组合物中被涂覆。无污组合物可以包括特异性地结合至感兴趣颗粒的结合部分。

[0212] 捕获

[0213] 为了捕获感兴趣颗粒,可以使包括感兴趣颗粒的样品在表面上流动。在涂覆有无污层的表面上的样品的流动速率可以包括至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8、9、10或更多 mm/s 的线速度。流动速率可以包括至多0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8、9、10或更多 mm/s 的线速度。流动速率可以包括从0.5至4 mm/s 的线速度。流动速率可以包括从2.5到4 mm/s 的线速度。流动速率可以为其中至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒结合到结合部分的速率。流动速率可以是其中至多50、60、70、80、90或100%的感兴趣颗粒结合到结合部分的速率。流动速率可以是不损坏感兴趣颗粒的速率。

[0214] 表面可以从样品捕获至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒。表面可以从样品捕获至多50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒。表面可以每毫升的样品捕获至少5、10、25、50、100、200、300、400、500、1000、1500、2000或2500个感兴趣颗粒。表面可以每毫升的样品捕获至多5、10、25、50、100、200、300、400、500、1000、1500、2000

或2500个感兴趣颗粒。总体上,本文的微流体装置和表面对感兴趣颗粒(例如,稀有细胞、CTC等)可以具有至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的捕获效率。感兴趣细胞的捕获效率可以通过定义为(捕获的确认的稀有细胞的数目)/(流过装置或邻近该表面的实际稀有细胞的数目) $\times 100\%$ 来定义。

[0215] 通过洗涤纯化

[0216] 表面可以通过除去样品的非特异性感兴趣颗粒和/或其他组分来进一步纯化。感兴趣颗粒可通过除去无污染组合物的表面上的非特异性颗粒(例如,细胞)和其他不想要的组分来进行纯化。无污染组合物可对非特异性颗粒和其他不想要的组分具有低亲和力。例如,利用约0.8达因/ cm^2 至约50达因/ cm^2 的低流动缓冲液溶液冲洗脂质共轭体可能足以除去无污染组合物上的非特异性颗粒和其他不需要的组分。

[0217] 纯化可通过使洗涤缓冲液在表面上流动来执行。洗涤缓冲液的流动速率可以包括至少为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8、9、10或更多mm/s的线速度。洗涤缓冲液的流动速率可以包括至多为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8、9、10或更多mm/s的线速度。洗涤缓冲液的流动速率可以包括从0.5至4mm/s的线速度。洗涤缓冲液的流动速率可以包括从2.5到4mm/s的线速度。洗涤缓冲液的流动速率可以为其中至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒保持结合到结合部分的速率。洗涤缓冲液的流动速率可以为其中至多50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒保持结合到结合部分的速率。洗涤缓冲液的流动速率可以为不损坏感兴趣颗粒的速率。损坏可指感兴趣颗粒的形态变化、感兴趣颗粒的退化、感兴趣颗粒的活力的变化、感兴趣颗粒的裂解和/或感兴趣颗粒的基因表达(例如,代谢)的变化。

[0218] 洗涤缓冲液的流动(即,漂洗)可除去至少40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的非特异性颗粒。洗涤缓冲液的流动(即,漂洗)可除去至多40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的非特异性颗粒。洗涤缓冲液的流动可以从表面的无污染组合物汲取至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%或15%或更多的感兴趣颗粒。洗涤缓冲液的流动可以从表面的无污染组合物汲取至多1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%或15%或更多的感兴趣颗粒。

[0219] 释放

[0220] 本公开的方法提供了一种用于收集感兴趣颗粒的释放方法,其中所释放的感兴趣颗粒是有活力的。感兴趣颗粒的释放可以通过使本公开的泡沫组合物在表面(例如,包括无污染层、连接体和/或结合部分的表面)上流动来执行。感兴趣颗粒的释放可以通过温和扫除力。如本文中所使用的温和扫除力可指气泡的剪切、空气泡沫的剪切、乳剂流体的剪切、超声波振动或油相。在一些情况下,泡沫组合物可以在表面上以从0.5–4mm/s的流动速率进行流动以释放感兴趣颗粒,该泡沫组合物包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空气中的混合物,其中泡沫组合物的至少50%的气泡具有从10至100微米的直径。

[0221] 泡沫组合物的流动速率可以包括至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8、9、10或更多mm/s的线速度。泡沫组合物的流动速率可以包括至多0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8、9、10或更多mm/s的线速度。泡沫组合物的流动速率可以包括从0.5至4mm/s的线速度。泡沫组合物的流动速率可以包括线速度从2.5到4mm/s的线速度。泡沫组合物的流动速率可以是其中至少1%、

2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%或50%的感兴趣颗粒保持结合至结合部分的速率。洗涤缓冲液的流动速率可以是其中至多1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%或50%的感兴趣颗粒保持结合至结合部分的速率。泡沫组合物的流动速率可以是不损坏感兴趣颗粒的速率。损坏可指感兴趣颗粒的形态变化、感兴趣颗粒的退化、感兴趣颗粒的活力的变化、感兴趣颗粒的裂解和/或感兴趣颗粒的基因表达(例如,代谢)的变化。泡沫组合物可以在表面上流动大约或多于1分钟、2分钟、3分钟、5分钟、8分钟、10分钟、12分钟、14分钟、16分钟、18分钟、20分钟、25分钟或30分钟。

[0222] 泡沫组合物(例如,泡沫组合物的气泡)可导致从表面除去无污组合物和/或结合部分。泡沫组合物可导致从表面除去至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的无污组合物和/或结合部分。泡沫组合物可导致从表面除去至多50%、60%、70%、80%、90%或100%的无污组合物和/或结合部分。在一些情况下,泡沫组合物除去至少70%的无污组合物和/或结合部分。在一些情况下,泡沫组合物以从0.5–4mm/s的流动速率在表面上流动可导致从表面除去至少50%的无污组合物、结合部分、连接体和/或感兴趣颗粒,该泡沫组合物包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空氣的混合物,其中泡沫组合物的至少50%的气泡具有从10至100微米的直径。

[0223] 由本公开的泡沫组合物所释放的感兴趣颗粒可以被收集在收集装置中。在一些实施方式中,收集装置可充当使感兴趣颗粒浓缩的浓缩装置。在一些实施方式中,收集装置可以包括膜。在一些实施方式中,膜可以包括具有约或少于0.5 μ m、1 μ m、1.5 μ m、2 μ m、2.5 μ m、3 μ m、3.5 μ m、4 μ m或5 μ m的直径的孔。基于膜的孔尺寸,可以将感兴趣颗粒收集在收集装置(例如,膜)内的区域中。例如,尺寸比膜的孔尺寸大的感兴趣颗粒可以基于颗粒离析(size separation)被收集在膜上。例如,对于具有2 μ m的孔尺寸的膜,包括癌细胞和WBC的所有细胞可以被收集在膜上。负压力可以被提供在收集装置(例如,膜)的与感兴趣颗粒的一侧相反的一侧上。负压力可以确保非特异性颗粒或气泡(例如,泡沫)穿过在膜上的孔,而不会引起膜堵塞或不期望的碎片。负压力可以是不影响细胞的活力的量。在一些实施方式中,细胞可以被收集在约或大于10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200或更多mm²的区域中。在收集之后,该膜可以被除去,并安装在显微镜载玻片上。在收集后,膜可进行成像(例如,在显微镜下荧光成像)。通过将感兴趣颗粒收集到收集装置(例如,膜)的小区域中,可以有效地评价本文的方法和系统的性能。通过将感兴趣颗粒收集到收集装置(例如,膜)的小区域,可以限制离焦的图像。

[0224] 由本公开的泡沫组合物所释放的感兴趣颗粒可以是有活力的。由本公开的泡沫组合物所释放的感兴趣颗粒可以不具有活力。由泡沫组合物所释放的至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒可以是有活力的。由泡沫组合物所释放的至多50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒可以是有活力的。活力可以通过形态学变化(例如,裂解)、基因表达(例如,半胱天冬酶活性)、基因活性(某些细胞路径的关闭)以及细胞功能(例如,缺乏移动)来确定。在一些情况下,所释放的细胞可用于下游过程(诸如ELISA、免疫试验、培养以及核酸测序)。如果所释放的细胞未能在下游试验中表现良好,则该细胞可以被认为没有活力。在一些情况下,泡沫组合物可以在表面(例如,包含无污组合物和结合部分)上以从0.5–4mm/s的流动速率进行流动以释放感兴趣颗粒,从而释放结合至表面的细胞,该泡沫组合物包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空氣的混合物,其中泡沫组合物

的至少50%的气泡具有从10至100微米的直径,其中至少50%的所释放的细胞是有活力的。

[0225] 所释放的感兴趣颗粒可以是至少50%、60%、70%、80%、90%或100%无非特异性感兴趣颗粒。所释放的感兴趣颗粒可以是至多50%、60%、70%、80%、90%或100%无非特异性感兴趣颗粒。非特异性感兴趣颗粒可以是非感兴趣颗粒的任何细胞颗粒。例如,非特异性感兴趣颗粒可以包括,白血细胞、红血细胞、血清蛋白、血清核酸以及循环上皮细胞。非特异性感兴趣颗粒可指无法特异性地结合至本公开的微流体芯片中所使用的结合部分的颗粒。换言之,非特异性感兴趣颗粒可指不表达对结合部分具有特异性的抗原/受体的细胞。在一些情况下,泡沫组合物在表面上以从0.5-4mm/s的流动速率进行流动可导致从表面除去至少50%的无污染组合物和/或导致所释放的感兴趣颗粒为至少50%无非特异性感兴趣颗粒,该泡沫组合物包括4毫升的在PBS中的5%的BSA和2mL的空气的混合物,其中泡沫组合物的至少50%的气泡具有从10至100微米的直径。

[0226] 在一些情况下,细胞群可以从(例如,微流体通道的,例如,无污染组合物的)表面释放。细胞群可以包括至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、100、1000、10000、100000或1000000个或更多个细胞。细胞群可以包括至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、100、1000、10000、100000或1000000个或更多个细胞。细胞群可以以至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%效率的效率从表面释放。细胞群可以以至多10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%效率的效率从表面释放。换言之,细胞群中至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的细胞可以通过本公开的泡沫组合物而被释放。细胞群中至多50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的细胞可以通过本公开的泡沫组合物而被释放。

[0227] 细胞群的细胞可以是有活力的。细胞群中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的细胞可以是有活力的。细胞群中至多50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的细胞可以是有活力的。

[0228] 细胞群可以包括多个感兴趣颗粒。细胞群可以包括至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒。细胞群可以包括至多20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的感兴趣颗粒。细胞群可以包括多个非感兴趣颗粒。细胞群可以包括至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的非感兴趣颗粒。细胞群可以包括至多20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的非感兴趣颗粒。

[0229] 本公开的泡沫组合物的气泡可以通过与无污染组合物相互作用来除去无污染组合物。气泡的空气-液体相互作用可以是疏水的。它可以与无污染组合物的疏水部分相互作用。当无污染组合物的疏水部分包括脂质双层的疏水尾部时,气泡可以与脂质双层的疏水尾部相互作用并破坏双层,从而从表面移出无污染组合物。

[0230] 在一些情况下,当气泡与脂质双层相互作用时,它可以生成固体-液体-空气接触线(例如,空气、液体和细胞之间的接触)。细胞上的气泡的接触角和气泡的液体-空气界面的表面张力的组合可以是用于将细胞拉离表面的驱动力。如果对细胞的气泡的空气-液体界面的张力过强,则它可能会损坏细胞。如果表面张力太弱,则细胞可能不会从表面上被除去。表面张力可以通过泡沫组合物的组分来控制。

[0231] 泡沫组合物与表面(例如,细胞)的相互作用可导致表面和/或无污染组合物的重组(例如,分子变化)。例如,包括包含脂质双层的无污染组合物的表面在通过与无污染组合物的气

泡相互作用之后可以被破坏成单层和/或单个的脂质分子。

[0232] 所分离的细胞(诸如循环肿瘤细胞CTC)可以是基本上纯的。如本文所使用的,术语“基本上纯的CTC群”可指其中至少约40%、50%、60%、70%、80%或90%的细胞是CTC的细胞群。在一些实施方式中,基本上纯的CTC群可以包含不超过约30%、不超过约25%、不超过约20%、不超过约15%、不超过约10%、不超过约5%、不超过约4%、不超过约3%、不超过约2%、不超过约1%、不超过约0.5%的非CTC。在一些实施方式中,基本上纯的CTC群中至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的细胞可以是CTC。

[0233] 在一些实施方式中,脂质层可以是抗EpCAM-SLB,并且脂质层可以掺入具有被设计成提高混沌混合的蚀刻图案的微流体芯片。通过控制流体流动参数,诸如CTC的靶细胞可以被捕获。缓冲液的流动速率可以随后增加,使得任何非特异性吸附的血液细胞被除去,而不置换任何结合的CTC。纯化的CTC可以经由SLB组件的破坏(但不是细胞膜或蛋白质结合位点)通过空气泡沫的温和扫除而从装置洗脱。CTC可以温和地被释放,以保持有活力并适合下游分子分析或培养。

[0234] 组合物

[0235] 本公开的组合物可以包括已释放的感兴趣颗粒(例如,已释放的稀有细胞)。已释放的感兴趣颗粒可以指通过本公开的方法(例如,泡沫和气泡在包括无污染层的表面上流动)所释放的细胞。在一些情况下,在释放步骤期间,无污染组合物、结合部分、连接体以及感兴趣颗粒或它们的任何组合被一起释放。在一些情况下,在释放步骤期间,无污染组合物和感兴趣颗粒被一起释放。

[0236] 本公开的组合物可以包括已释放的细胞、无污染层以及来自泡沫组合物的气泡。气泡可以包括已释放的细胞和无污染层。换言之,气泡可以部分地包围无污染层的脂质。

[0237] 细胞培养

[0238] 已释放的细胞可经历细胞培养。如本文所使用的细胞培养可以意指细胞的生长、维持、转染或繁殖。细胞培养可在培养基中。如本文所使用的培养基可以意指用于提供维持活细胞(或组织中的活细胞)并支持它们的生长的营养物质(例如,维生素、氨基酸、必需营养素、盐等)和性质(例如,相似性、缓冲)的液体溶液。

[0239] 细胞保存

[0240] 所释放或培养的细胞可经历细胞保存。细胞的高活力存储可能在临床医学和生物制药发展方面是重要的。低温保存可以通常用于细胞的可靠长期稳定。在低温保存下可以存储已分离的细胞,以便长期储存。

[0241] 分析

[0242] 可以通过任何方式诸如光学(例如,目视检查)、自动计数、基于显微镜的检测、FACS以及电检测(例如,库尔特计数器)来对所收集的细胞进行检测和计数。对使用本公开的方法所分离的细胞或其他感兴趣颗粒的计数可以用于诊断疾病、监测疾病的进展以及监测或确定治疗的功效。对感兴趣颗粒(例如,细胞)的计数可以用于非医学应用中。例如对感兴趣颗粒的计数可以用于确定环境样品(例如,水、空气和土壤)、药物、食品或化妆品中污染物的量、存在或类型。

[0243] 可以测量由本公开的方法所收集的细胞和/或感兴趣颗粒或它们的部分的一种或

多种性质。可以测量的生物性质的实例可以包括mRNA表达、蛋白质表达以及DNA定量。可对由本公开的方法所分离的感兴趣颗粒进行测序。测序可以用于确定某些序列特征(例如,多态性和染色体异常)。

[0244] 裂解可以用来分析感兴趣颗粒(例如,细胞)。裂解可以在感兴趣颗粒结合到无污染组合物时发生。在非特异性保留的颗粒存在下可以对感兴趣颗粒进行分析。

[0245] 可以从由无污染组合物的结合部分所捕获的感兴趣颗粒(例如,细胞)获得遗传信息。这样的遗传信息可以包括特定基因组DNA、cDNA或mRNA序列的识别或计数;细胞表面标记物的识别或计数;以及蛋白质或其他细胞内内容物的识别或计数,这指示了特定肿瘤的类型或存在。可以分析细胞以确定起源组织、疾病的阶段或严重程度或对特定治疗的易感性。

[0246] 为了指示癌症干细胞的标记物的存在可对由本公开的方法所收集的感兴趣颗粒进行试验。这样的标记物的实例可以包括C-MET、EpCAM、MUC-1、EGFR、CD133、CD44、CD24、上皮特异性抗原(ESA)、Nanog(同源域蛋白)、BMI1、DAPI、CK20、CD45、CDH17、CDX2、CK7、CK8、CK18、CK19、TTF-1、CDX2、PSA、PSMA、CEA、panCK、TCN、SMLT2B1、ALDOB、COL11A1、PI3、CCL20、MTHFD11、IL-1b、SRPX2、SLC04A1、TESC、IL-23、CD45等。

[0247] 可以使用识别细胞群内的特异性细胞类型的抗体(例如,单克隆抗体)来进行细胞染色。抗体可直接用荧光化合物进行标记或使用例如识别第一抗体的荧光标记的第二抗体间接地标记。抗体组可用于分析多标记物成像方法中的细胞群。例如,不同的抗体可以用不同的颜色进行标记,并且随后在流式细胞仪中成像和/或分析。在一些情况下,多标记物成像方法可以增加CTC的检测灵敏度并有助于识别表达特定的治疗目标的CTC亚群。抗体组可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20或更多种不同类型的抗体。例如,抗体组可以包括对应于标记物panCK、CK18、CK7、TTF-1、CK20、CDX2、PSA以及PSMA的抗体。例如,抗体组可以包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、混合有抗CDX-2的抗CK20、混合有抗PSMA的抗PSA。

[0248] 利用抗体组对细胞群进行染色可以涉及多个操纵步骤。例如,1)可以制备来自群的一系列样品;2)来自组的一种抗体可与每个样品结合,并且得到的混合物可被孵育,使得抗体可结合至其中该抗体识别的样品中的细胞;3)可以执行细胞的一次或多次洗涤以除去任何未结合的抗体。在一些情况下,如果第一抗体没有直接用荧光化合物标记,则可能需要利用其他抗体或试剂的额外的孵育和额外的洗涤,以对结合至细胞的未共轭的一级抗体(一抗)进行标记。

[0249] 细胞染色之后接着可以是进行流式细胞术分析,以确定相对于群中细胞的总数的已染色的细胞的数目。市售设备(例如由诸如Coulter Electronics、Hialeah、Fla.以及Becton-Dickinson、Mountain View、Calif.这样的公司制造的设备)可用于执行细胞分类和分析的计数步骤。

[0250] 临床应用

[0251] CTC的特征可以为治疗患者和有助于个体化治疗策略提供有价值的信息。例如,可检测的CTC的数目和/或数目的变化可被用于预测患者结果和对治疗的反应。例如,CTC可用于识别在肿瘤细胞中影响治疗决策的遗传改变。在一些情况下,检测、定量或评估患者的血流内CTC的分子特征的能力可允许细胞特征的遗传操纵和/或使细胞行为变化,同时CTC在至转移位点的途中,并从而改变患者结果。例如,通过基因组学、表观基因组学、转录组学

和/或蛋白质组学方法对CTC的进一步分析可帮助临床医生实时了解肿瘤生物学。在一些情况下,CTC可用于研究癌细胞对治疗压力的反应,并发现针对癌症的新型生物标记物和药物靶。

[0252] 本文所描述的系统和方法可以用于评价有利或不利的存活,并且在预后有利时,有助于防止可能导致有害的副作用的不必要治疗。因此,本发明可以用于任何的多种癌症的预后,该癌症包括但不限于包括突显癌症的实体肿瘤和白血病:胺前体摄取与脱羧细胞瘤、迷芽瘤、鳃原瘤、恶性类癌综合征、类癌心脏疾病、癌(即,沃克癌、基底细胞癌、基底鳞状细胞、布朗-皮尔斯、导管癌、艾氏癌、克雷布斯2癌、梅克尔细胞癌、粘液癌、非小细胞肺癌、燕麦细胞癌、乳头状癌、硬癌、细支气管癌、支气管癌、鳞状细胞癌以及移行细胞癌)、组织细胞病症、白血病(即B细胞白血病、混合细胞白血病、空细胞白血病、T细胞白血病、T细胞慢性白血病、HTLV-II 相关白血病、淋巴细胞急性白血病、淋巴细胞慢性白血病、肥大细胞白血病以及骨髓性白血病)、恶性组织细胞增多症、霍奇金病、免疫增殖小肠疾病、非霍奇金淋巴瘤、浆细胞瘤、网状内皮组织增殖、黑色素瘤、软骨母细胞瘤、软骨瘤、软骨肉瘤、纤维瘤、纤维肉瘤、巨细胞瘤、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、尤因氏肉瘤、滑膜瘤、腺纤维瘤、腺淋巴瘤、癌肉瘤、脊索瘤、颅咽管瘤、无性细胞瘤、错构瘤、间质瘤、中肾瘤、肌肉瘤、成釉细胞瘤、牙骨质瘤、牙瘤、畸胎瘤、胸腺瘤、滋养细胞肿瘤、腺癌、腺瘤、胆管癌、胆脂瘤、圆柱瘤、囊腺癌、囊腺瘤、粒状细胞瘤、两性胚胎细胞瘤、肝癌、汗腺瘤、胰岛细胞瘤、莱氏细胞瘤、乳头状瘤、支持细胞瘤、卵泡膜细胞瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、成肌细胞瘤、肌瘤、肌肉瘤、横纹肌瘤、横纹肌肉瘤、室管膜瘤、神经节瘤、神经胶质瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、神经鞘瘤、神经母细胞瘤、神经上皮瘤、神经纤维瘤、神经瘤、副神经节瘤、非嗜铬副神经节瘤、血管角化瘤、嗜伊红血球过多血管淋巴样增生、硬化性血管瘤、血管瘤病、血管球瘤、血管内皮细胞瘤、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、囊性肉瘤、叶状瘤、纤维肉瘤、血管肉瘤、平滑肌肉瘤、白色肉瘤、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(即尤因氏实验肉瘤、卡波西氏肉瘤以及肥大细胞肉瘤)、肿瘤(即骨肿瘤、乳腺肿瘤、消化系统肿瘤、结肠直肠肿瘤、肝肿瘤、胰腺肿瘤、垂体肿瘤、睾丸肿瘤、眼眶肿瘤、头颈肿瘤、中枢神经系统肿瘤、听神经肿瘤、盆腔肿瘤、呼吸道肿瘤和泌尿生殖肿瘤)、神经纤维瘤以及宫颈发育不良。

[0253] 使用本文所描述的系统和方法分析所需的血液的体积可以等于约或小于25 μ L、50 μ L、75 μ L、100 μ L、0.2mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL或8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL或16mL。使用本文描述的系统和方法分析所需的血液的体积可以等于或至多达25 μ L、50 μ L、75 μ L、100 μ L、0.2mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL或8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL或16mL。

[0254] 用于识别CTC源或癌症的起源组织的方法

[0255] 感兴趣颗粒(例如,CTC)上的某些标记物的存在可以指示CTC的源或起源或癌症的起源组织。标记物可以通过利用特定的(例如,特异性的)抗体对感兴趣颗粒进行染色并随后成像(例如,荧光成像)来进行识别。例如,CK18可以在简单上皮、导管上皮以及假复层上皮中大量表达,这可以是对肿瘤有用的标记物。例如,CK18可用作基于在乳腺癌、肺癌、结肠

直肠癌、前列腺癌以及胰腺癌中的表达的癌检测标记物。例如,感兴趣颗粒诸如CTC可以利用抗CK18进行染色并且可以对CK18标记物的存在进行评估。例如,CK7的存在可被用作起源于乳腺、肺或胰腺的CTC的代表。例如,CK7可用作识别起源于乳腺癌、肺癌或胰腺癌的CTC的代表。例如,可以利用抗CK7对感兴趣颗粒诸如CTC进行染色,并且可以对CK7标记物的存在进行评估。例如,TTF-1的存在可以用作起源于肺、甲状腺或间脑的CTC的代表。例如,TTF-1的存在可以用作起源于肺癌、甲状腺癌或间脑综合症的CTC的代表。例如,感兴趣颗粒诸如CTC可以利用抗TTF-1进行染色,并且可以对TTF-1标记物的存在进行评估。例如,混合有抗CDX-2的抗CK20可以用于检测起源于结肠的CTC。例如,混合有抗CDX-2的抗CK20可用于检测起源于结肠直肠癌的CTC。例如,混合有抗PSMA的抗PSA可用于检测起源于前列腺的CTC。例如,混合有抗PSMA的抗PSA混合可用于检测起源于前列腺癌的CTC。在一些情况下,组合CK20和CK8/18/19可以显著地增加CTC检测率。

[0256] 用于CTC检测的多标记物分析可用于临床应用。例如,抗体组可用于在多标记物成像方法中分析细胞群。抗体组可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20种或更多种不同类型的抗体。例如,抗体组可以包括对应于标记物panCK、CK18、CK7、TTF-1、CK20、CDX2、PSA以及PSMA的抗体。例如,抗体组可以包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、混合有抗CDX-2的抗CK20、混合有抗PSMA的抗PSA。抗X,其中X是如本文所提及的任何标记物,可指对应于标记物X或对标记物X特异性的抗体。利用多标记物的CTC检测试验不仅可以适用于不同类型的癌症,以建立临床相关性,而且还可以使CTC作为健康个体癌症筛查或早期癌症患者、甚至与癌症未知的主要源的个体的早期检测工具。

[0257] 图4提供了根据实施方式的用于CTC检测的决策树。例如,抗体组可以包括抗panCK、抗CK18、抗CK7、抗TTF-1、混合有抗CDX-2的抗CK20、混合有抗PSMA的抗PSA。抗panCK和/或抗CK18可用于分析CTC作为第一步骤401(例如,识别癌细胞)。在第二步骤403中,抗CK7、抗TTF-1、混合有抗CDX-2的抗CK20以及混合有抗PSMA的抗PSA可用于分析CTC。例如,对CK7阳性的CTC可指示起源于乳腺、肺或胰腺的CTC。例如,对CK7阳性的CTC可指示乳腺癌、肺癌或胰腺癌。例如,对TTF-1阳性的CTC可指示起源于肺、甲状腺或间脑的CTC。例如,对TTF-1阳性的CTC可以指示肺癌、甲状腺癌或间脑综合症。例如,对混合有抗CDX-2的抗CK20阳性的CTC可指示起源于结肠的CTC。例如,对混合有抗CDX-2的抗CK20阳性的CTC可以指示结肠直肠癌。例如,对混合有抗PSMA的抗PSA阳性的CTC可以指示起源于前列腺的CTC。例如,对混合有抗PSMA的抗PSA阳性的CTC可以指示前列腺癌。可以预测癌症率或癌症的可能性。例如,通过使用抗体组,如果对不同抗体存在阳性的染色的细胞,则可以预测细胞起源或癌症起源的可能性。例如,预测率可以被计算为每个标记物的染色效率*癌症流行程度*100%。在一些实施方式中,乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌和/或肺癌的几率可以被预测为等于约或大于1%、5%、15%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0258] 用于评估疾病的存在、不存在、进展和/或严重程度的分子分析

[0259] 本文所描述的靶细胞可以是循环肿瘤细胞CTC。本公开对用于基于对CTC的分子分析提供了对患有癌症的患者疾病进展(例如,癌症进展)进行评估的系统和方法。例如,对患者的癌症进展进行评估的方法可以包括:1)根据本文所描述的方法从患者分离循环肿瘤细胞(CTC);以及2)对CTC执行一种或多种细胞或分子分析,以确定患者的癌症进展。

[0260] 在一些实施方式中,癌症选自肺癌、食管癌、膀胱癌、胃癌、结肠癌、皮肤癌、乳头状甲状腺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、骨盆癌以及睾丸癌组成的组。

[0261] 在一些实施方式中,一种或多种细胞或分子分析包括形态分析、基因组分析、表观基因组分析、转录组分析、蛋白组分析或它们的任何组合。

[0262] 在一些实施方式中,一种或多种细胞或分子分析可以包括确定CTC中的一个或多个DNA突变。在某些实施方式中,DNA突变可以包括插入、缺失、取代、转移、基因扩增或它们的任何组合。在某些实施方式中,DNA突变位于选自KRAS、APC、TP53、BRAF、PTEN、EGFR、ERCC1、RRMI、ELM4、HER2以及ALK组成的组的基因中。

[0263] 在一些实施方式中,一种或多种细胞或分子分析可以包括确定CTC中癌症特异性基因的蛋白质表达水平。在一些实施方式中,一种或多种细胞或分子分析可以包括确定CTC中癌症特异性基因的RNA表达水平。

[0264] 在一些实施方式中,癌症特异性基因是细胞角蛋白、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、粘蛋白-1(MUC-1)、人表皮生长因子受体2(HER2)、绒毛膜促性腺激素(hCG)、 α -甲胎蛋白(AFP)、肝细胞癌(HCC)、N-钙粘蛋白、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、ERCC1、雄激素受体(AR)、人平衡型核苷转运蛋白1(hENTI)、RRMI或癌胚抗原(CEA)。

[0265] 在一些实施方式中,用于对患者的癌症进展进行评估的方法还可以包括通过染色检测CTC中的一种或多种癌症特异性标记物的表达,以及计数已染色的细胞。患者的肿瘤的阶段和/或预后可以基于癌症特异性CTC的分子分析和计数的组合结果来确定。

[0266] 可以使用癌症特异性标记物。这样的标记物可以包括:(1)在疾病中升高的标记物,诸如在睾丸癌和滋养细胞疾病中升高的人类绒毛膜促性腺激素(hCG),以及在肝细胞癌(HCC)中升高的 α -甲胎蛋白(AFP);(2)疾病中定性地改变的mRNA或蛋白质标记物,诸如膀胱癌中CD44的mRNA的剪接变体以及肺癌和结肠直肠癌中的p53蛋白的突变;(3)在特定组织、器官、或者器官系统中正常表达但是在不恰当的身体隔室中出现的蛋白质标记物。实例包括前列腺特异性抗原(PSA)和癌胚抗原(CEA)。CEA浓度在诊断患有包括炎症性肠疾病和结肠的腺癌的结肠疾病的许多患者的血液、血浆或血清中显著升高,并且被用作结肠疾病的指标。在一些情况下,标记物可以包括DAPI、细胞角蛋白(例如,CK7、CK 18、CK19、CK20等)、CD45、CDH17、CDX2、TTF-1、CDX2、PSA、PSMA、CEA、panCK、TCN、SMLT2B1、ALDOB、COL11A1、PI3、CCL20、HER2等。在一些情况下,癌症特异性标记物可以是细胞角蛋白、CDX1、CDH17、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、粘蛋白-1(MUC-1)、人表皮生长因子受体2(HER2)、绒毛膜促性腺激素(hCG)、 α -甲胎蛋白(AFP)、肝细胞癌(HCC)、N-钙粘蛋白、表皮生长因子受体(EGFR)、ERCC1、雄激素受体(AR)、人平衡型核苷转运蛋白1(hENTI)、RRMI或癌胚抗原(CEA)、CD44和p53、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、GD2、GM2、GM1、GD1a、GT1b、A2B5、Tf、Tn、GIobo H、CD133、CD24、CD44、CD90、ER或PR。

[0267] 在一些情况下,特定的癌症可以表达特定的标记物。例如,乳腺疾病的存在、不存在、进展和/或严重程度可以通过利用抗CK7、抗HER2、抗ER以及抗PR对稀有细胞(例如CTC)进行染色并分析结果来进行评估。在一些情况下,乳腺疾病的存在、不存在、进展和/或严重程度可以通过利用选自抗CK7、抗HER2、抗ER以及抗PR组成的组中的一种或多种抗体对稀

有细胞(例如CTC)进行染色并分析结果来进行评估。在一些情况下,可使用所有四种抗体对稀有细胞进行染色。例如,结肠疾病、GI疾病和/或卵巢疾病/子宫内膜疾病的存在、不存在、进展和/或严重程度可以通过利用DAPI、抗CK20以及抗CD45对稀有细胞(例如,CTC)进行染色并分析结果来进行评估。例如,乳腺疾病或前列腺疾病的存在、不存在、进展和/或严重程度可以通过利用抗PSA和抗PSMA对稀有细胞(例如,CTC)进行染色并分析结果来进行评估。例如,肺部疾病的存在、不存在、进展和/或严重程度可以通过利用抗CK7、抗TTF1以及抗EGFR对稀有细胞(例如,CTC)进行染色并分析结果来进行评估。在一些情况下,肺部疾病的存在、不存在、进展和/或严重程度可通过利用选自抗CK7、抗TTF1以及抗EGFR组成的组中的一种或多种抗体对稀有细胞(例如,CTC)进行染色并分析结果来进行评估。在一些情况下,可以使用所有三种抗体对稀有细胞进行染色。

[0268] 在一些实施方式中,患者的癌症存在、癌症进展或肿瘤生长可以与CTC负荷(例如,CTC计数、CTC量等)相关联。例如在个体内,当肿瘤体积大于预定量时,CTC负荷和肿瘤生长可以相关联。肿瘤体积的预定量可以是约或大于10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500mm³。

[0269] 在一些实施方式中,癌症的存在或进展可基于样品中所发现的CTC数目的CTC截止值来进行预测。如本文所使用的癌症的存在或进展可以包括发育不良、阶段I、阶段II、阶段III或阶段IV癌症、转移、微转移、息肉等。用于检测癌症的存在或进展所需的血液的体积可以等于约或小于25μL、50μL、75μL、100μL、0.2mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL或8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL或16mL。检测癌症的存在或进展所需的血液的体积可以等于或至多达25μL、50μL、75μL、100μL、0.2mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL或8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL或16mL。样品中的CTC截止值可以为约或大于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、80、100、120、140、160、180、200、250或300个CTC。例如,在2mL外周血的样品中检测3个或更多个CTC可以预测具有图22中所示的临床可接受的特异性和敏感性的结肠直肠(CRC)癌症。例如,在多达6mL血液的样品中检测3个或更多个CTC可预测具有临床可接受的特异性和敏感性的癌症。在一些实施方式中,癌症进展可以由不同的阶段来限定。例如,阶段可以包括正常/增生性息肉、腺瘤/发育不良性息肉、阶段0/1、2、3或4。癌症进展的每个不同阶段可基于具有临床上可接受的敏感性和特异性的特定的CTC截止值来预测。在一些情况下,疾病的存在可以在成像诊断之前进行评估或确定。例如,使用本文所提及的方法和系统,癌症的诊断或预后可在由成像技术无法检测或无法确定的阶段发生。癌症的诊断可基于具有临床上可接受的敏感性和特异性的特定的CTC截止值来预测。敏感性可以为约或大于50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。特异性可以为约或大于50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。敏感性和特异性可以通过接受者操作特性(ROC)曲线下的面积来限定。ROC曲线下的面积可以为约或大于0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95。癌症的阳性检测率(对应于不同的阶段)可以为约或大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施方式中,癌症可以是脑癌、肺癌、乳腺癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、结肠癌、肾癌、子宫颈癌、卵巢癌以及前列腺癌。

[0270] 在一些实施方式中,血源播散转移可基于CTC截止值或在样品中所检测的CTC来进

行预测。检测样品中的CTC所需的血液的体积可以等于约或小于25 μ L、50 μ L、75 μ L、100 μ L、0.2mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL或8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL或16mL。检测样品中的CTC所需的血液的体积可以等于或至多达25 μ L、50 μ L、75 μ L、100 μ L、0.2mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL或8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL或16mL。样品中的CTC截止值可以为约或大于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、80、100、120、140、160、180、200、250或300个CTC。例如,在5mL外周血的样品中检测6个或更多个CTC可预测具有临床上可接受的特异性和敏感性的血源播散转移(例如,肝脏转移)。例如,患有壶腹周围恶性肿瘤的患者的门静脉血液中的高CTC计数可能是手术后1年内肝脏转移的重要预测因子。敏感性可以为约或大于50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。特异性可以为约或大于50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。敏感性和特异性可以通过接受者操作特性(ROC)曲线下的面积来限定。ROC曲线下的面积可以为约或大于0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95。血源播散转移的阳性检测率可以为约或大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0271] 在一些实施方式中,良性疾病可以基于CTC截止值或在样品中检测到的CTC进行预测。检测样品中的CTC所需的血液的体积可以等于约或小于25 μ L、50 μ L、75 μ L、100 μ L、0.2mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL或8mL、9mL、10mL、11mL、12mL、13mL、14mL、15mL或16mL。样品中的CTC截止值可以为约或大于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、80、100、120、140、160、180、200、250或300个CTC。例如,2mL的外周血的样品中3个或更多个CTC检测可以预测具有临床可接受的特异性和敏感性的良性结肠疾病。例如,2mL的外周血的样品中3个或更多个CTC检测可以预测具有临床可接受的特异性和敏感性的息肉。敏感性可以为约或大于50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。特异性可以为约或大于50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。敏感性和特异性可以通过接受者操作特性(ROC)曲线下的面积来限定。ROC曲线下的面积可以为约或大于0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95。良性疾病的阳性检测率可以为约或大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0272] CTC检测可能受到临床状况的影响。例如,CTC检测在患有肠梗阻、先前息肉切除的患者、失血、梗阻和/或穿孔的患者中可能升高或降低。可考虑因素,以便增加本文所提到的疾病或转移的特异性、敏感性和/或阳性检测率。这样的因素可以包括但不限于年龄、性别、肿瘤部位、CEA升高、肿瘤肠梗阻、肿瘤大小、大体类型(例如,息肉样、溃疡性、浸润性)、T分级、N类、组织分化(良好、中度)等。基于疾病(例如,癌症)的存在、不存在、进展和/或严重程度,可以选择药物治疗或治疗方案。

[0273] 用于对疾病的存在、不存在和/或严重程度进行评估的方法

[0274] 本公开还可以提供用于对受试者的疾病的存在和/或严重程度进行评估的方法。例如,用于对受试者的疾病的存在和/或严重程度进行评估的方法可以包括:1)根据本文所描述的方法从患者分离循环肿瘤细胞(CTC);2)通过染色检测CTC中的一种或多种疾病特异性标记物的表达;3)计数所染色的细胞;并且其中已染色的细胞的数目与对照相比的变化

是疾病的存在和/或严重程度的特征;由此,对疾病的存在和/或严重程度进行评估。

[0275] 在一些实施方式中,疾病的存在和/或严重程度可基于疾病特异性CTC的分子分析和计数的组合结果进行确定。

[0276] 在一些实施方式中,疾病的存在和/或严重程度可基于一种或多种因素的组合进行确定,其中这些因素均分别加权,以提供该疾病的存在和/或严重程度的单个矩阵值。可以考虑因素以便增加疾病的存在、不存在和/或严重程度的特异性、敏感性和/或阳性检测率。如果在确定中使用了两种或更多种因素(例如,疾病的存在、不存在和/或严重程度),则每种因素的水平可被加权并组合。因此,可以通过(a)对每种因素的确定的水平利用预定系数进行加权以及(b)组合已加权的水平以提供值。组合步骤可以通过直接相加或进行平均(例如,等同地进行加权)或者通过不同的预定系数。因素可以包括:CTC的数目、CTC的分子特征(某些突变的存在或不存在、基因表达、拷贝数变异等)、受试者的年龄、受试者的性别、疾病的遗传、位置、家族史、既往病史、在先治疗或其缺乏。在得出存在和/或严重程度的可能性的最终显示/结果时对上述各因素进行评估和加权。

[0277] 关于一种或多种因素、它们的权重或值(例如,通过组合步骤确定的)的信息可以以计算机可读的形式进行存储。最终显示/结果可以通过计算机可读介质和/或计算机系统。这样的计算机系统通常包括主要子系统,诸如中央处理器、系统存储器(通常为RAM)、输入/输出(I/O)控制器、外部装置(诸如经由显示适配器的显示屏幕、串行端口、键盘、经由存储接口的固定磁盘驱动器和可操作以接收软盘的软盘驱动器以及可操作以接收CD-ROM的CD-ROM(或DVD-ROM)装置)。可以连接许多其他装置,例如经由串行端口连接的网络接口。

[0278] 计算机系统还可以链接到网络,包括多个经由数据链路链接的计算装置,诸如以太网电缆(同轴电缆或的10BaseT)、电话线路、ISDN线路、无线网络、光纤或其他适合的信号传输介质,由此至少一个网络装置(例如,计算机、磁盘阵列等)包括构成对从本发明的试验获取的数据进行编码的位模式(位组合格式,bit pattern)的磁域(例如,磁盘)和/或电荷域(例如,DRAM单元阵列)的模式。

[0279] 计算机系统可以包括用于对评价疾病的存在、不存在和/或严重程度的研究结果进行解释的代码。因此,在示例性的实施方式中,将该结果提供给计算机,其中中央处理器执行用于确定具有结肠直肠癌的患者的可能性的计算机程序。图20示出了用户、样品、计算机以及输出之间的相互作用。例如,用户可以是患者。样品可以是患者血液样品。患者血液样品可以包括稀有细胞(例如,CTC细胞),其可使用本文所提到的方法进行分析。该分析还可以包括利用对研究结果进行解释的代码。研究结果的分析、代码或解释可以(例如,通过计算机到计算机终端、经由计算机终端上的数据、通过连接至因特网的调制解调器等)发送至和/或输出至接收方。

[0280] 本发明还提供了计算机系统的使用,诸如上面所描述的计算机系统,其包括:(1)计算机;(2)对通过本发明的方法所获得的测试结果进行编码的存储位模式,其可以存储在计算机中;(3)以及,可选地,(4a)用于选择具有疾病的患者的药物治疗的程序,或(4b)用于对患有癌症的患者的阳性预后的可能性进行预测的程序。

[0281] 在一些实施方式中,疾病可以是癌症。已染色的细胞的增加数目可以是癌症或转移的指示。癌症的实例包括但不限于脑癌、肺癌、乳腺癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、结肠癌、肾癌、子宫颈癌、卵巢癌以及前列腺癌。

[0282] 在一些实施方式中,疾病是癌前病症。癌前病症的实例包括光化性角化病、巴雷特食管、萎缩性胃炎、先天性角化不良、缺铁性吞咽困难、扁平苔藓、口腔黏膜下纤维化、日光性弹力组织变性以及宫颈发育不良。

[0283] 疾病的存在(例如,癌症或肿瘤的诊断)和/或严重程度可以通过如本文所公开的稀有细胞(例如,CTC细胞)进行评估。在一些情况下,CTC细胞可被用作疾病或疾病的严重程度的标记物。在一些情况下,CTC细胞可以被用作在任何成像技术(例如CT扫描、超声波、PET、MRI等)能够检测疾病(例如,癌症或肿瘤)的存在之前的疾病的标记物。例如,来自血液样品(例如,外周血液样品)的CTC计数可以(例如,通过与截止值进行比较)用作疾病的存在和/或疾病的严重程度的标记物。

[0284] 用于检测结肠直肠癌或胃肠(GI)道消化疾病的方法

[0285] 本公开可以提供了用于检测人类患者的结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的方法。例如,用于检测人类患者的结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的方法可以包括:1)从受试者分离循环肿瘤细胞(CTC);2)通过染色检测CTC中选自DAPI、CK20、CD45、CDH17、CDX2、CK7、CEA、panCK、TCN、SMLT2B1、ALDOB、COL11A1、PI3、CCL20、MTHFD11、IL-1b、SRPX2、SLC04A1、TESC以及IL-23a组成的组中的一种或多种标记物的表达;3)计数所染色的细胞;以及其中,所染色的细胞的数目和/或与对照相比数目的变化是结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的存在和/或严重程度的指示。例如,用于检测人类患者的结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的方法可以包括:1)从受试者分离循环肿瘤细胞(CTC);2)通过染色检测CTC中的一种或多种标记物的表达,该标记物包括DAPI、CK20、CD45、CDH17、CDX2、CK7、CK8、CK18、CK19、TTF-1、CDX2、PSA、PSMA、CEA、panCK、TCN、SMLT2B1、ALDOB、COL11A1、PI3、CCL20、MTHFD11、IL-1b、SRPX2、SLC04A1、TESC以及IL-23a;3)计数所染色的细胞;以及其中,所染色的细胞的数目和/或与对照相比数目的变化是结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的存在和/或严重程度的指示。

[0286] 在一些实施方式中,患者中结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的存在和/或严重程度可基于所染色的CTC的分子分析和计数的组合结果来确定。样品中所染色的细胞的数目被确定,并且与对照(例如,来自已知具有癌症(阳性对照)的个体或个体组的样品或来自已知不具有癌症(正常、无疾病或阴性对照)的个体或个体组的样品)进行比较。

[0287] 在一些实施方式中,检测可以基于CTC中的DAPI+/CK20+/CD45-的表达。例如,假定对照是针对已知不具有结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的个体组(正常、非疾病或阴性对照)所建立的DAPI+/CK20+/CD45-表达的标准范围,高于DAPI+/CK20+/CD45-表达细胞的正常百分比可以指示结肠直肠癌或胃肠(GI)道疾病的存在和/或严重程度。

[0288] 在一些实施方式中,人类患者可以患有或疑似患有结肠直肠癌。在一些实施方式中,结肠直肠癌患者是患有是阶段0、阶段I、阶段II、阶段III和/或阶段IV结肠直肠癌的结肠直肠癌。

[0289] 在一些实施方式中,人类患者患有或疑似患有胃肠(GI)道疾病。在某些实施方式中,胃肠道疾病是巴雷特食管、胃溃疡、胃炎、平滑肌瘤、息肉、克罗恩病、溃疡性结肠炎、胰腺炎、腺癌、粘液腺癌、类癌肿瘤、鳞状细胞癌、淋巴瘤和肉瘤。

[0290] 用于监测治疗方案的功效的方法

[0291] 本公开可以提供用于监测治疗方案的功效的方法。例如,用于监测治疗方案的功效的方法可以包括:1)根据本文所描述的方法从患者分离循环肿瘤细胞(CTC);2)通过染色

检测CTC中的一种或多种疾病特异性标记物的表达;3)计数所染色的细胞;且其中治疗方案的功效基于所染色的细胞的数目进行确定。

[0292] 如本文所使用的,术语“样品”可以包括任何化学样品或生物样品。化学样品可指任何化学混合物或化学化合物。生物样品可以包括但不限于细胞培养物或其提取物;从动物(例如,哺乳动物)或其提取物获得的活组织检查材料;以及血液、唾液、尿液、粪便、精液、泪液或其他体液或其提取物。例如,术语“生物样品”可指从任何活体获得的、通过任何活体排出或分泌的任何固体或流体样品,包括单细胞微生物(诸如细菌和酵母)和多细胞有机体(诸如植物和动物,例如脊椎动物或哺乳动物,特别是健康的或表面健康的人类受试者或受待诊断或研究的病症或疾病影响的人类患者)。生物样品可以是任何形式,包括固体材料,诸如组织、细胞、细胞沉淀、细胞提取物、细胞匀浆或细胞部分;或活组织检查或生物流体。生物流体可从任何位点获得(例如血液、唾液(或含口腔细胞的漱口剂)、泪液、血浆、血清、尿液、胆汁、脑脊髓液、羊水、腹膜液和胸膜液或来自其的细胞、眼房水或玻璃体液或任何身体分泌物)、漏出液、渗出液(例如从脓肿或感染或炎症的任何其他位点所获得的流体)或从关节获得的流体(例如正常关节或受诸如类风湿性关节炎、骨关节炎、痛风或脓毒性关节炎的疾病的影响的关节)。生物样品可从任何器官或组织(包括活组织检查或尸体解剖标本)获得,或者可以包括细胞(无论是原代细胞或培养的细胞)或由任何细胞、组织或器官调节的培养基。生物样品还可以包括组织切片,诸如为了组织学的目的而取得的冷冻切片。生物样品还包括生物分子的混合物,包括由部分或全部细胞或组织匀浆物分馏所生成的蛋白、脂质、碳水化合物以及核酸。虽然样品优选地从人类受试者中取得,但是生物样品可以是来自任何动物、植物、细菌、病毒、酵母等。如本文所使用的动物可指在任何发育阶段的人类以及非人类动物,包括例如哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类、蠕虫和单细胞。细胞培养物和活组织样品可以被认为是多种动物。在一些实施方式中,非人类动物为哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物或猪)。动物可以是转基因动物或人克隆。如果需要,则生物样品可以经受初步处理,包括初步分离技术。

[0293] 如本文所使用,术语“受试者”可指哺乳动物。哺乳动物可以是人类、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或者牛,但是并不限于这些实例。除人之外的哺乳动物可以被有利地用作代表疾病、预疾病或疾病前病症的动物模型的受试者。受试者可以是雄性或雌性。受试者可以是先前已经被诊断或鉴定为具有健康状况(例如疾病、疾病前或疾病前病症)的受试者,并且可选地已经经历或正在经历对健康状况的治疗性干预。可替换地,受试者也可以是先前尚未诊断为患有给定的健康状态的受试者。例如,受试者可以是表现出疾病、预疾病或疾病前病症的一个或多个风险因素的受试者,或未表现出疾病风险因素的受试者,或对疾病、预疾病或疾病前病症无症状的受试者。受试者也可以是患有或具有发生疾病、预疾病或疾病前病症的风险的受试者。

[0294] 如本文所使用的,术语“病症(condition)”,“疾病”以及“障碍(紊乱,病症,disorder)”可以互换使用。病症可以是血液病症、炎性病症、缺血性病症、肿瘤性病症、感染、外伤、子宫内膜异位或肾衰竭。肿瘤性病症可以选自由以下组成的组:急性淋巴细胞白血病、急性或慢性淋巴细胞或粒细胞瘤、急性骨髓性白血病、急性早幼粒细胞白血病、腺癌、腺瘤、肾上腺癌、基底细胞癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、支气管癌、宫颈发育不良、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、表皮样癌、尤因氏肉瘤、胆囊癌、胆结石瘤、巨细胞瘤、多形性胶质母细胞

瘤、毛细血管瘤、头癌、增生、增生性角膜神经瘤、原位癌、肠神经节瘤、胰岛细胞瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、喉癌、平滑肌瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、恶性类癌瘤、恶性高钙血症、恶性黑色素瘤、马方综合征习性肿瘤、髓样癌、转移性皮肤癌、粘膜神经瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓瘤、颈癌、神经组织癌、神经母细胞瘤、骨原性肉瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰脏癌、甲状旁腺癌、嗜铬细胞瘤、真性红细胞增多症、原发性脑瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、小细胞肺肿瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、甲状腺癌、局部皮肤损伤、网状细胞肉瘤或胚胎性癌肉瘤。

[0295] 如本文所使用的,术语“约”可指在随后所提到的值的 $\pm 1\%$ 、 2% 、 3% 、 4% 、 5% 、 6% 、 7% 、 8% 、 9% 或 10% 内的量。例如,11mL的血液样品还可以称为等于约10mL的血液的样品。

[0296] 在提供值的范围的情况下,应当理解,还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值,除非上下文另有明确指示,否则到下限的单位的十分之一。在所述范围中的任何陈述的值或中间值与该陈述范围中的任何其他陈述值或中间值之间的每个较小范围被涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在该范围内。并且,其中在较小范围中包括了任一限制、无限制或两个限制的每个范围也被涵盖在本发明内,受限于所陈述的范围内的任何特别排除的限制。在所陈述的范围包括一个限制或两个限制的情况下,在本发明中也包括排除这些所包括的限制中的一个或两个的范围。

[0297] 提供了下面的实施例以便更充分地说明了本发明的优选实施方式。然而,它们不应以任何方式被解释为限制本发明的宽范围。

[0298] 实施例

[0299] 实施例1:微通道制造和表面修饰

[0300] 使用激光微加工技术将微流体装置制造成具有通过U形微通道连接的一个入口和出口。图5提供了根据实施方式的微流体装置500的分解视图。微流体装置可以包括连接器502、顶板504、间隔件506以及基底载玻片508。该装置的构造开始于具有两个钻孔、入口以及出口的PMMA顶板的制造。U形被雕刻到间隔件中,其在一侧待结合至PMMA顶板和在另一侧待结合至标准盖玻片的两侧上双涂覆有丙烯酸粘着剂,以形成微流体通道。PMMA连接器结合至PMMA顶板。微通道是约110mm长、5.5mm宽以及0.06mm高。为了破坏流线然后破坏在基于微流体的装置中主导流动条件的层流的细胞,以及为了增加细胞表面相互作用的数目,利用线槽对微通道的上表面进行图案化,该线槽的平均高度为约0.05mm、平均宽度为约0.25mm以及平均长度为约1mm。

[0301] 图6示出了根据实施方式的在微流体通道中制备抗体-链的SLB涂层所遵循的顺序步骤。在步骤602中,由POPC/b-PE (95/5、90/10、85/15以及80/20mol/mol)组成的0.2mg/mL的脂质囊泡被填充在微流体通道中并孵育1小时以形成完整脂质双层涂层,随后用具有150mM的NaCl、pH值7.2的10mM的磷酸盐缓冲液盐水(PBS)冲洗,以除去过量的囊泡和未结合的脂质。在步骤604中,0.1mg/mL的亲素(NA)溶液流到SLB-bPE涂覆的微通道上并孵育1小时,随后用PBS缓冲液冲洗以除去过量的NA。在步骤606中,引入0.05mg/mL的b-抗EpCAM溶液,以与SA-SLB-bPE固定表面共轭1小时,随后用PBS缓冲液冲洗以除去过量的b-抗EpCAM。

[0302] 实施例2:使用注射器生成泡沫组合物

[0303] 通过使5mL的第一注射器(参见图7)连接至空的第二注射器来制造泡沫组合物,其

中第一注射器含有4mL的含有5%的BSA的磷酸盐缓冲液盐水与2mL的空气中的2:1的混合物。两个注射器由三通阀连接。未使用的阀的第三孔口被阻塞,以生成两个注射器之间的连续流动路径。包括混合物的第一注射器的活塞被按压,使得第一注射器的内容物被迫进入第二注射器中。然后第二注射器的活塞被按压以迫使内容物返回到第一注射器中。该过程重复10次,其中每次按压少于五秒钟。该过程生成至少1.5毫升的其中至少50%的气泡包括从10至100微米的直径(参见图8)的泡沫组合物。

[0304] 实施例3:使用膜生成泡沫组合物

[0305] 细孔膜被置于包括4mL的含有5%的BSA的磷酸缓冲液盐水与2mL的空气中的2:1的混合物的容器上方。该膜包括直径为10微米的孔。容器被上下颠倒,使得容器中的液体不会流出并且不会通过细孔膜滴落。5mL的注射器的尖端被放置在膜上。注射器的活塞被拉动,从而生成通过膜从容器拉动液体的力。然后通过膜将注射器中的液体转移回容器中,通过利用压力按压注射器的活塞使得液体穿过膜。该过程重复5次。该膜从容器的开口除去,并且收集泡沫组合物。

[0306] 实施例4:通过涡旋生成泡沫组合物

[0307] 将4mL的含有5%的BSA的磷酸缓冲液盐水与空气的2:1的混合物添加至10mL的锥形管中。锥形管在涡旋器上以最高速度设定涡旋20秒。将泡沫从锥形管中除去,并且注入微流体芯片中,该微流体芯片已与包括稀有循环肿瘤细胞的样品接触,其中稀有循环细胞已结合至芯片上的结合部分。泡沫组合物以3mm/s流入芯片中。使稀有循环肿瘤细胞从微流体芯片释放,并与泡沫一起收集。对来自稀有循环肿瘤细胞的核酸进行测序。

[0308] 实施例5:使用泡沫组合物从无污染组合物释放细胞

[0309] 使包括循环肿瘤细胞的样品与表面接触。该表面包括无污染组合物。无污染组合物包括脂质双层和结合部分。无污染组合物的脂质非共价地附着至微流体通道的表面(例如,通过范德华相互作用)。脂质的端部包括生物素部分。结合部分包括链霉亲和素部分。生物素部分和链霉亲和素部分结合在一起,从而将脂质连接至结合部分。结合部分是抗EpCAM抗体。样品以0.5至4mm/s的流动速率在表面上流动。样品的循环肿瘤细胞结合至结合部分。通过使包括磷酸盐缓冲液盐水的洗涤缓冲液流过无污染组合物来纯化无污染组合物的表面。洗涤缓冲液除去非特异性结合细胞,但不破坏循环肿瘤细胞的结合。将1.5毫升的包括磷酸缓冲液盐水中5%的BSA和气泡的泡沫组合物(其中至少50%的气泡包括从10至100微米的直径)流过无污染组合物。泡沫组合物的气泡与无污染组合物的脂质相互作用以从表面除去脂质。通过剪切应力与来自气泡和无污染组合物之间的空气-液体界面的泡沫组合物的两亲性一起除去脂质。剪切应力将脂质双层内外翻转,从而松开脂质,使得它们容易脱离。附着至无污染组合物的结合部分的循环肿瘤细胞也与脂质一起被除去。剪切应力足够强以除去循环肿瘤细胞,但不破坏细胞。所释放的细胞是有活力的。以这种方式,使用通过泡沫组合物释放的方法收集循环肿瘤细胞。

[0310] 实施例6:细胞捕获和纯化

[0311] 在37℃、5%的CO₂气氛下,在加湿培养箱中,在补充有10%的胎牛血清(FBS)和1%的抗生素/抗真菌剂(100U/mL青霉素钠、100Ig/mL链霉素以及0.25Ig/mL两性霉素B;Gibco-RBL Life Technologies,佩斯利,英国)的杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)(Gibco-RBL Life Technologies,佩斯利,英国)中维持和生长人类结肠直肠癌细胞系HCT 116。在约

90%融合时,细胞利用CeIITracker Green CMFDA或CeIITracker Red CMTPIX (Invitrogen, 加拿大,美国) 预染色1小时,然后使用具有0.1%的乙二胺四乙酸 (EDTA) 的0.2%的胰蛋白酶 (Sigma Aldrich, 圣路易,美国) 在相同培养基中重悬浮细胞,用于随后的实验。

[0312] 将用CeIITracker Green预染色的300至2000个HCT116细胞掺入EDTA管中的从健康个体收集的1mL全血液中。在充分混合后,使细胞-血液混物流过功能化微通道。然后,用0.5mL的磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、随后用0.3mL的Hoechst溶液 (PBS中的1 μ g/mL) 洗涤微通道以染色细胞核中的DNA。通道被荧光地拍摄显微照片以计数被结合至通道表面的细胞的总数。对于CeIITracker和Hoechst染料呈双阳性的细胞被识别为HCT116细胞,并且单阳性DAPI单细胞被识别为非特异性结合细胞,诸如白血细胞 (白细胞) (WBC)。图9示出了根据实施方式的6种不同微流体通道设计 (A至F) 的几何结构901和性能902。图10示出了根据实施方式的微流体通道设计A和B的构造和尺寸。图11示出了根据实施方式的微流体通道设计C和D的构造和尺寸。图12示出了根据实施方式的微流体通道设计E和F的构造和尺寸。在相同的线速度下具有简单图案的直通道中,捕获性能 (被定义为芯片上结合的HCT116细胞数目与发送到芯片的细胞数目的比率) 由于受限的保留时间和非混合流动模式而非常低。A型芯片捕获性能=1.2 $\pm$ 0.6%,并且B型芯片性能=4.5 $\pm$ 2.2%。当微图案的数目增加以产生有效混合时,捕获效率显著地增加了:C型芯片=17.9 $\pm$ 3.0%,且D型芯片=33.5 $\pm$ 6.6%。另外的倍增通道长度仅略微增加效率至37.0 $\pm$ 10.5% (E型),而4个平行通道增加效率至93.7 $\pm$ 8.9% (F型)。除非另有说明,否则F型芯片用于其余实验。

[0313] 所捕获的细胞的纯化通过增加PBS缓冲液冲洗的流动速率来实现。随着PBS的流动速率增加,所保留的WBC的百分比显著减少。除去80~100%的WBC同时保留95%+HCT116的所诱导的剪切应力 τ 只需要~4-8达因/cm² (对应于~5-10mL/h的流动速率,图13)。图13示出了经由通过已增加的缓冲液流动速率选择性地增加流动通道中的剪切应力的纯化。保留靶HCT116细胞,同时剪切应力正好大到足以冲掉非靶WBC。图表中显示的是细胞脱离率(% , Y-轴) 对流动速率 (或线性速度) (下部X-轴) 以及相对应的剪切应力 (上部X-轴)。流动速率一般保持在灰色区域之下,以避免所捕获的CTC的任何潜在损失。*:P<0.05; **:P<0.01

[0314] 纯化靶细胞所需的剪切应力显著低于基于常规抗体硅烷化的表面的先前细胞脱离研究中所报道的剪应力,并且被认为足够低以对细胞活力或蛋白质表达具有最小影响或没有影响。相反,存在~80%的HCT116即使在50mL/h下仍由于强的抗体-抗原结合而保持结合。对于临床样品,可以选择甚至4mL/h的更小的流动速率以避免CTC的任何潜在损失。

[0315] 实施例7:所捕获的有活力的细胞的释放

[0316] 从微流体芯片释放有活力的CTC是实现方便的细胞保存、下游分子分析以及细胞培养的关键步骤。使用酶裂解、化学力或机械力来使细胞脱离的先前尝试已经示出了归咎于抗体-抗原连接的破坏或膜破裂的部分释放或不可避免的细胞死亡。SLB是在水-固体界面的脂质分子组装,该分子组装通过脂质分子的长烃链的向内疏水-疏水相互作用和与水或亲水性氧化硅表面 (即玻璃) 相互作用的向外亲水性头部基来进行稳定。SLB组件可以通过如气泡一样简单地引入疏水性组分来进行分解。我们提供了通过注入连续空气泡沫至微流体来温和地释放粘附的CTC而不破坏抗体-抗原结合的策略。泡沫溶液由空气和细胞培养基的混合物 (1:2体积比) 并温和地涡旋1分钟以产生泡沫来产生。延时实验的显微照片显示了,所捕获的HCT116细胞在空气泡沫在它们上进行扫除时在数秒内被释放 (图14,基于芯片

E)。图14提供了释放过程的延时显微照片。在 $t=10.500$ 分钟时,在表面上捕获了预染色的HCT116细胞(用数字标记的绿点)。3个箭头指向现有的小气泡。在 $t=10.504$ 分钟时,当进入的气泡流过该区域时将这些细胞覆盖在进入的气泡的空气相内。该箭头指向该大的引入气泡的边界。在 $t=10.550$ 分钟时,细胞从附着位点释放,并通过流出的气泡扫除。箭头指向从微小截留空气和所引入的较大的气泡的界面边界反射的荧光。使用250 μ L的泡沫溶液在三次重复中的平均释放效率为99.7%,如表2中所示。

[0317] 表2. 细胞释放效率

[0318]

实验编号	由芯片捕获的细胞的数目	空气泡沫扫除之后芯片中保留的细胞	释放效率
1	117	1	99.15%
2	72	0	100%
3	111	0	100%

[0319] 图15示出了所洗脱细胞由脂质包裹,指示了通过用空气剥离SLB的细胞释放。将从芯片释放的细胞与所附着的抗体和空气泡沫一起收集到埃彭道夫(Eppendorf)管中。可替换地,为了荧光免疫检验染色和计数,可以将所洗脱的细胞收集到平面多孔膜(示出10mm的直径)上。在细胞洗脱之后立即执行活/死试验(Life Technologies);与来自常规涂覆的抗EpCAM硅烷化芯片的0%的活力相比,结果显示出86%的洗脱CTC保持有活力。

[0320] 实施例8:有活力细胞的培养和维持

[0321] 为了确定所分离的细胞是否可在体外培养,来自临床样品的CTC所释放的空气泡沫被收集并接种在96孔组织培养板上,在5%的CO₂下在37℃下孵育。如图16中所示,从阶段III患者所分离的癌症细胞在第7天聚集并附着至板的底部,并在第9天变得更加扩散。免疫荧光染色示出了DAPI(蓝色)和CK20(红色)阳性。为了证明这些细胞具有重新附着的倾向,在第9天将它们用0.1%的胰蛋白酶处理并重新接种在96孔板上。1天后,这些细胞(第10天)以 $\sim 25\mu$ m的表观细胞大小而牢固地重新附着到基底上。观察到了CTC活力的维持。

[0322] 实施例9:分子分析

[0323] 为了检测遗传突变,从所洗脱的细胞中直接提取DNA以执行P53、腺瘤性息肉病(APC)以及K-ras突变中的7个高频癌症热点的castPCR,如表3中所示。

[0324] 表3: TaqMan® 突变试验

[0325]

试验名称	核苷酸突变	氨基酸改变	突变基因组位置
KRAS_520_mu	c.35G>T	p.G12V	chr.12 25398284-25398284 NCBI 构建 37 上
KRAS_532_mu	c.38G>A	p.G13D	chr.12 25398281-25398281 NCBI 构建 37 上
APC_13113_mu	c.3927_3931delAAAGA	p.E1309fs*4	chr.5 112175218-112175222 NCBI 构建 37 上
APC_18561_mu	c.4666_4667insA	p.T1556fs*3	chr.5 112175957-112175958 NCBI 构建 37 上
TP53_10656_mu	c.742C>T	p.R248W	chr.17 7577539-7577539 NCBI 构建 37 上
TP53_10662_mu	c.743G>A	p.R248Q	chr.17 7577538-7577538 NCBI 构建 37 上
TP53_10648_mu	c.524G>A	p.R175H	chr.17 7578406 NCBI 构建 37 上

[0326] 3个健康供体的结果全部为阴性 ($\Delta Ct > 9.96$) ;在10个随机选择的CRC患者中,2个样品对于TP53R248Q为阳性 ($\Delta Ct < 9.96$) ,并且3个样品对于APC1556fs*3为阳性。

[0327] 实施例10:临床样品的高吞吐量分析

[0328] 容易从微流体装置释放细胞的重要优点是细胞可以在小的平面基底上收集和染色。替代在3维复杂的微流体通道内进行芯片内检查,对小得多的区域上 ($\sim 10\text{mm}$ 直径)的CTC进行成像能够实现对兴趣细胞的容易的重新定位,并且显著地将成像和检查时间从6h减少到 $<0.5\text{h}$ (图17)。因此,临床样品分析的高吞吐量变得可行。

[0329] 实施例11:在结肠直肠癌的所有阶段中的CTC分析

[0330] CTC在血液中相当稀有。这时用于检测和分离CTC的唯一FDA批准试验是来自Veridex的CellSearch®试验。在大多数患者中,CellSearch®试验发现每7.5mI的血液少于5个CTC。虽然CellSearch试验结果证明了在患者样品中计数CTC作为预后标记物的临床效用,但是这种效用只适用于晚期癌症,不适用于癌症检测的所有阶段。

[0331] 本文所公开的装置可用于检测癌症的所有阶段。通过检测来自所有阶段的结肠直肠癌患者的CTC来说明实例。在双盲、前瞻性研究中包括了110个具有阶段0/I ($n=20$)、阶段II ($n=29$)、阶段III ($n=46$) 以及阶段IV ($n=15$) 且没有先前癌症治疗的CRC患者和无结肠疾病的供体阴性对照 (通过结肠镜检查确认, $n=28$) 。

[0332] 从CRC患者获得外周人类血液。在CTC捕获和纯化后,使用空气泡沫扫除来将所捕获的CTC释放到小膜 ($\sim 2\mu\text{m}$ 孔大小以排出过量的染色溶液) 上,其中执行免疫荧光染色以识别和计数所释放的细胞 (图18)。我们选择针对细胞角蛋白20 (CK20) 的单克隆抗体作为阳性染色标记物,这是因为它比pan-CK更具结肠直肠特异性。如图19中所示,被定义为DAPI+/CK20+/CD45-细胞的患者CTC,随着患者疾病阶段的进展而增加。在28个健康供体中,DAPI+/

CK20+/CD45-细胞的范围为0至3。健康、阶段0/I、阶段II、阶段III以及阶段IV中的DAPI+/CK20+/CD45-细胞的中位数分别为0、2、4、7以及36。阶段IV的CTC计数广泛分布,其中最高的细胞计数超过1000;在图19中示出了每个临床阶段的平均值和标准偏差。如图23中所示,绘制了每个临床阶段的平均值。

[0333] 实施例12:CTC数量与结肠直肠癌和胃肠(GI)道疾病的相关性

[0334] 为了评价CTC数量与结肠直肠癌(CRC)和胃肠(GI)道疾病的相关性,检查了术前从120个具有原发性CRC的病例所获得的外周血中的CTC。我们随机选择了没有先前癌症病史的60个病例,以在结肠镜检查前执行CTC作为对照。为了进一步分析,在120个癌症患者中,排除了10个在CTC检查前已经接收了术前同步化疗和放疗、单独的化疗或放疗的患者(4个病例为阶段IV,且6个病例为阶段I至III)。

[0335] 对照组的分类基本上根据结肠镜检查结果。在正常结肠分类时,将在CTC检查之后接受手术的三个消化疾病患者和一个子宫内膜息肉患者(在CTC检查前3年前还经历了针对腮腺卡索曼疾病的手术的历史)分类到名称为“具有其他位点粘膜病变”的子分类中。根据息肉的存在或不存在,对患有结肠疾病的两个子分类进行分类。然而,患有息肉和溃疡性结肠炎的两个病例被分类为溃疡组。患有憩室病的一个病例还患有原位宫颈癌并在CTC检查之后接受了手术性切除。患有盲肠局灶性严重发育不良腺瘤的一个病例还患有卵巢透明细胞癌(病理阶段T2N0)并在CTC检查后接受了两种肿瘤的手术性切除。为了更准确地评估循环肿瘤细胞的存在与结肠肿瘤进展的相关性,我们排除了属于具有其他位点粘膜病变的正常结肠和具有其他粘膜病变的患病结肠的子分类的患者,用于进一步分析。总之,161个病例(110癌症和51个对照病例)被纳入结肠直肠肿瘤的CTC和进展之间的关系的分析中。TNM阶段的病理分类是根据AJCC第7版的。六个阶段IV癌症病例不接受手术干预。一个阶段0(Tis)的病例仅接受内窥镜粘膜切除。所有其他病例接受治愈性或预计治愈性肿瘤切除。根据图表记录对所有患者的所有临床病理参数进行分类。

[0336] 使用Windows的SPSS(版本12.0,SPSS Inc,Chicago,IL)来执行统计分析。使用两个独立样品T测试来比较每个组的平均值。Anova(方差)分析用于比较相同参数的子组之间的平均值和线性。线性回归测试用于测试组之间的线性关联。Pearson(皮尔森)卡方测试用于分析组之间超过截止水平的阳性率的发生率的差异。所有P-值是双面的(双边的,two-sided);小于0.05的P-值指示统计学显著性。

[0337] 1) 每个分类中的CTC数目的分布

[0338] 对照组的平均年龄为 50.6 ± 13.5 岁(从25到76岁的范围),且比癌症组的 62.0 ± 11.5 岁(从34到87岁的范围)显著年轻($P < 0.001$)。对照组和癌症组的雌性/雄性的比率分别为28/25和62/48,并且两组之间无统计学差异。

[0339] 如表4中所概述的,癌症组和患病结肠组的CTC数目的平均值显著高于正常组的CTC数目的平均值($P < 0.01$)。癌症组中的CTC的平均值也显著高于患病组的CTC的平均值($P = 0.01$)。在癌症组中,在CTC检查之前已经接受治疗的患者中检测到的CTC数目低于那些没有接受治疗的患者中检测到的CTC数目。

[0340] 表4在对照和癌症病例中所检测的CTC的数目

	病例数	CK20+/CK45-细胞数		
		平均值±SD	范围(中间值)	>截止水平2编号(%)
对照病例	60	2.8±5.4	0~28(1)	16(26.7)
正常结肠	32	1.1±1.6*	0~6(0)	4(12.5)
无其他位点粘膜病变	28	0.6±0.9	0~3(0)	1(3.6)
有其他位点粘膜病变	4	4.3±2.4	1~6(5)	3(75)
消化道疾病	3	3.7±2.5	1~6(4)	2(66.7)
子宫内膜息肉	1	6		1(100)
患病结肠	28	4.9±7.2*	0~28(1)	12(42.9)
结肠息肉	23	4.9±7.6	0~28(1)	9(39.1)
增生性息肉	6	1.3±2.3	0~6(0.5)	1(16.7)
腺瘤息肉	13	5.5±7.0	0~21(2)	6(46.2)
严重发育不良息肉	4	8.5±13.1	1~28(2.5)	2(50)
其他粘膜病变	5	4.6±6.0	0~15(3)	3(60)
溃疡性结肠炎	3	1.3±1.5	0~3(1)	1(33.3)
憩室病	2	9.5±7.8	4~15(8.5)	2(100)
结肠直肠癌病例	120	46.0±135.0*	0~1012(4)	71(59.2)
CTC测试前无治疗	110	50±140.6	0~1012(5)	69(62.7)
阶段0/I	20	7.3±23.8	0~108(1)	7(35)
阶段II	29	31.4±73.7	0~381(4)	19(65.5)
阶段III	46	57.9±140	0~699(6.5)	31(67.4)
阶段IV	15	118.7±266	0~1012(36)	12(80)
CTC测试前有治疗	10	2.8±4.6	0~14(1)	2(20)

[0342] *:当将平均值相互比较时 $P<0.05$ 。

[0343] 2) CTC数目与临床病理特征之间的关系

[0344] 总之,在该分析中涉及在CTC测试之前没有治疗的110个CRC病例。从肿瘤的T1到T4分类逐渐增加的平均CTC数目(Anova分析, $P=0.022$),特别是T4的平均CTC数目显著高于其他T分类(t测试, $P<0.01$)。平均CTC数目也随着肿瘤大小和淋巴结转移的进展而逐渐增加(Anova试验, $P<0.05$)。N2的平均CTC值显著高于N0或N1分类的平均CTC值(t测试, $P<0.01$)。肿瘤大小超过5cm的平均CTC值也显著高于肿瘤大小小于5cm的平均CTC值(t测试, $P<0.01$)。M1的平均CTC值显著高于M0分类的平均CTC值(t测试, $P<0.01$)。这些结果揭示了血液中CTC数目的增加与名称为TNM阶段的肿瘤进展和肿瘤大小密切相关。CEA升高的平均CTC值(>5)高于无CEA升高的平均CTC值,但没有统计学意义(t测试, $P=0.076$)。在分化差的肿瘤中平均CTC值显著高于在良好或中度分化肿瘤中的CTC值(t测试, $P<0.01$)。在良好和中等分化组之间没有CTC值的差异。CTC存在在不同的性别、年龄以及肿瘤位置的组之间没有差异。

[0345] 表5没有先前治疗的各个癌症组中的CTC分布

	病例数	CK20+/CD45-	>截止水平z(%)
年龄			
<=70	82	54.8 ± 151.3	64.6
> 70	28	35.7 ± 104.2	57.1
性别			
雄性	62	50.5 ± 152.8	67.7
雌性	48	42.9 ± 124	56.3
肿瘤位置			
结肠	73	58.6 ± 159.3	68.5
直肠	37	32.9 ± 92.7	51.4
CEA升高			
<=5	75	39.2 ± 105.3	61.3
>5	35	73.2 ± 196.1	65.7
肿瘤大小			
< 2 cm	15	12.3 ± 28.5	46.7
2 ~ 5 cm	60	34.1 ± 56.9	58.3
> 5cm	28	90.7 ± 183.2*	71.4
大体类型			
息肉状的	15	32.5 ± 55.4	73.3
溃疡性的	78	43.2 ± 121	57.7
渗透性的	3	69.3 ± 111.4	100
T分类			
Tis	4	4 ± 3.7	50
T1	8	19.5 ± 38.4	37.5
T2	12	10.4 ± 30.2	41.7
T3	62	29.4 ± 84.5	62.9
T4	17	119 ± 196.7*	76.5
N类			
N0	49	21.5 ± 57.5	53.1
N1	26	27.7 ± 71.8	65.4
N2	27	86.2 ± 178.6*	66.7
M类			
M0	95	39.1 ± 107.2	60
M1	15	118.7 ± 266*	80
组织学分化	*		
良好	5	12.0 ± 17.0	60
中度	81	35.3 ± 100	60.5
差	15	83.3 ± 162.6*	66.7

[0347] *P<0.05, t测试

[0348] 3) 阶段IV癌症各种类型的转移中的CTC的存在

[0349] 在19个阶段IV病例中,4个病例在CTC测试前已接受治疗。虽然所检测的CTC数目在已经治疗的患者中低于未治疗的患者的CTC数目,但是在两个组之间无统计学差异。在CTC测试前未治疗的15个病例中,所检测的肝和肺转移的CTC数目高于腹膜侵入和中央淋巴结转移的CTC数量(t测试,P=0.076),如表6中所概述。这意味着CTC的存在在血源扩散转移比

腹膜接种或淋巴感染转移中具有变得更多的倾向。存在两个无先前治疗的病例在他们的原发性肿瘤中具有K-ras突变。一个具有肝和肺转移的病例不能检测到CTC的存在。另一个具有中央淋巴结转移的病例具有2个CTC。其他在CTC测试前未治疗的患者具有野生型K-ras。因此,值得怀疑的是CTC检测是否与K-ras突变有关。

[0350] 表6在阶段IV癌症中各种类型的转移中的CTC分布

[0351]

	病例数	CK20+/CD45-		
		平均值	范围(中位数)	>截止水平2数(%)
总数	19			
在CTC检测之前具有治疗	4	0.5 ± 0.6	0 ~ 1 (0.5)	0 (0)
CCRT	3	0.33 ± 0.6	0 ~ 1 (0)	0 (0)
化疗	1	1		0 (0)
在CTC检测之前没有治疗	15	118.7 ± 266	0 ~ 1012 (36)	12 (80)
肝转移	8	207.9 ± 348.8	3 ~ 1012 (50)	8 (100)
肺转移	1	36		1 (100)
肝和肺转移	1	0		0 (0)
腹膜侵入	3	25.3 ± 21.6	1 ~ 42 (33)	2 (66.7)
中央LN转移	2	3 ± 3	2 ~ 4 (3)	1 (50)

[0352] 可以观察到,血源性扩散转移比腹膜或LN转移具有更多的CTC数目。具有肝和肺转移的一个病例具有腹腔内侵入的宫颈癌并具有K-ras突变和差的肿瘤分化。肝转移组中的一个病例(D-结肠癌)具有3个CTC,正好等于截止水平并且CEA=1.1。在具有阶段IV的19个病例中,13个病例进行了原发性和转移性肿瘤的姑息性切除。

[0353] 表7对照和具有结肠直肠癌的患者的特征

[0354]

	对照	癌症
病例数	60	120
年龄		
平均值	50.8 ± 13.7	62.2 ± 11.4*
范围	25 ~ 76	34 ~ 87
性别		
雄性	32	69
雌性	28	51
结肠镜检查		
正常	28	
没有CRC的其他情况	32	
结肠息肉	25	
结肠炎	2	
其他消化疾病	3	
其他肿瘤	2	
癌症状态		
在cTC测试之前无治疗		110
结肠癌		73
直肠癌		37
在cTC测试之前进行了治疗		10
结肠癌（化疗）		1
直肠癌		9
CCRT		8
仅放疗		1

[0355] 表8 CK20+/CD45-和CK20+/CD45+细胞的数据

[0356]

	病例数	CK20+/CK45- 细胞数		
		平均值 $\pm$ SD	范围 (中间值)	> 截止水平: 数 (%)
对照病例	60	2.8 $\pm$ 5.4*	0 ~ 28 (1)	16 (26.7)
正常	28	0.6 $\pm$ 0.9	0 ~ 3 (0)	1 (3.6)
结肠直肠癌	25	4.6 $\pm$ 7.3	0 ~ 28 (1)	10 (40)
增生性息肉	7	1.1 $\pm$ 5.5	0 ~ 6 (0)	1 (14.3)
腺瘤性息肉	13	5.5 $\pm$ 7.0	0 ~ 21 (2)	6 (46.2)
发育不良息肉	5	7.4 $\pm$ 11.6	1 ~ 28 (3)	3 (60)
其他癌症	7	5.3 $\pm$ 4.8	1 ~ 15 (4)	5 (71)
结肠炎	2	8.0 $\pm$ 9.9	1 ~ 15 (8)	1 (50)
消化疾病	3	3.7 $\pm$ 2.5	1 ~ 6 (5)	2 (66.7)
其他肿瘤	2	5.0 $\pm$ 1.4	4 ~ 6 (2)	2 (100)
结肠直肠癌病例	120	46.0 $\pm$ 135.0*	0 ~ 1012 (4)	71 (59.2)
在CTC测试之前无治疗	110	50 $\pm$ 140.6**	0 ~ 1012 (5)	69 (62.7)
阶段0/I	20	7.3 $\pm$ 23.8	0 ~ 108 (1)	7 (35)
阶段II	29	31.4 $\pm$ 73.7	0 ~ 381 (4)	19 (65.5)
阶段III	46	57.9 $\pm$ 140	0 ~ 699 (6.5)	31 (67.4)
阶段IV	15	118.7 $\pm$ 266	0 ~ 1012 (36)	12 (80)
在CTC测试之前进行了治疗	10	2.8 $\pm$ 4.6**	0 ~ 14 (1)	2 (20)

[0357] *: 当彼此比较时 $P < 0.05$ [0358] **: 当彼此比较时 $P < 0.05$

[0359] 表9没有先前治疗的各个癌症组中的CTC分布

[0360]

	病例数	CK20+/CD45-	> 截止水平z (%)
年龄			
≤70	82	54.8 ± 151.3	64.6
>70	28	35.7 ± 104.2*	57.1
性别			
雄性	62	50.5 ± 152.8	67.7
雌性	48	42.9 ± 124*	56.3
肿瘤位置			
结肠	73	58.6 ± 159.3	68.5
直肠	37	32.9 ± 92.7*	51.4
CEA升高			
≤5	75	39.2 ± 105.3	61.3
>5	35	73.2 ± 196.1*	65.7
肿瘤大小			
<2 cm	15	12.3 ± 28.5	46.7
2 ~ 5 cm	60	24.1 ± 56.9	58.3
>5cm	28	90.7 ± 183.2	71.4
大体类型			
息肉状的	15	32.5 ± 55.4	73.3
溃疡性的	78	43.2 ± 121	57.7
浸润性的	3	69.3 ± 111.4	100
T分类			
Tis	4	4 ± 3.7	50
T1	8	19.5 ± 38.4	37.5
T2	12	10.4 ± 30.2	41.7
T3	62	29.4 ± 84.5	62.9
T4	17	119 ± 196.7	76.5
N分类			
N0	49	21.5 ± 57.5	53.1
N1	26	27.7 ± 71.8	65.4
N2	27	86.2 ± 178.6	66.7
M分类			
M0	95	39.1 ± 107.2	60
M1	15	118.7 ± 266*	80
组织学分化 *			
良好	5	12.0 ± 17.0	60
中度	81	35.3 ± 100	60.5
差	15	83.3 ± 162.6	66.7

[0361] *P<0.05曼-惠特尼测试

[0362] N2中CTC显著高于N0和N1组中的CTC。

[0363] 表10短期放疗或长期CCRT患者中的CTC分布

	病例数	CK20+/CK45- 细胞数	
		平均值 $\pm$ SD	范围 (中间值)
总共	6	4.4 $\pm$ 5.5	0 ~ 14 (1.5)
CCRT	5		
阶段I	1		8
[0364] 阶段II	1		2
阶段III	3		1
			1
			14
短期RT	1		
阶段III	1		0

[0365] 作为比较,广泛使用的Veridex CellSearch CTC计数系统证明了在50个阶段IV CRC患者的仅25%的每7.5mL的血液 $\geq$ 3个CTC (定义为DAPI+/panCK+/CD45-) 的检测敏感性。我们的平台显示了使用每2mL血液 $\geq$ 3个CTC (DAPI+/CK20+/CD45-) 作为截止值,80%、67%、66%以及30%的CRC阶段IV、III、II以及I/0是阳性的,相反,28个健康供体中仅一个(4%)具有3个CTC (其余的具有0~2个CTC)。在敏感性和特异性的这种水平下,显示可以在早期阶段检测到CTC并且数量与疾病进展相关。

[0366] 典型的1mL血液样品含有 $\sim 6.6 \times 10^6$ 个有核的WBC,并且SLB涂覆的微流体系统平均消除99.9962%。目前由于以4mL/h的流动速率下温和洗涤而存在用CTC洗脱的 ~ 500 –2000个WBC,以及在流体装置和管道中的死体积。然而,CTC的这种纯度水平足以促进用于致癌基因识别(用于castPCR的0.1%纯度)的分子分析,并可以提供使用适当选择的治疗的早期干预的益处。如图24中所示,我们的系统的简单工作流程以连续平行的过程经济地执行捕获、纯化以及释放。均分成4等份的8mL血液样品平行地供给到4个芯片中。所有芯片通过细胞捕获、纯化,且然后将细胞释放用于许多下游应用中的一种,包括IF染色、细胞计数、PCR热点分析、细胞培养和/或低温存储(cyrobanking)。该平台同时提供了完整的CTC的解决方案,以用于成像、分子分析、细胞培养以及保存,仅需要总共8mL的血液。这创造了CTC在癌症筛选、监测、分子性能分析以及药物选择中的常规临床应用的机会。

[0367] 实施例13:在手术后预测早期肝转移

[0368] 从2012年7月4日至2012年11月1日,在长庚纪念医院林口校区(Chang Gung Memorial Hospital, Linkou Campus)招募随机选择的110个患有原发性CRC的患者和根据结肠镜检查没有先前已知的癌症病史的50个健康供体。在血液抽取和CTC计数时前瞻性研究是双盲的。全部110个癌症患者在血液抽取时没有接受任何在先治疗。非转移性CRC患者的临床状态被跟踪直到2014年11月,包括每3个月的一系列血清CEA测量、每12个月或按照

临床症状或CEA升高疑似转移时的腹部超声或CT扫描、胸部X线以及结肠镜检查。

[0369] 对照组的分类基于结肠镜检查结果和图表记录。TNM阶段的病理分类基于AJCC第7版。除一个无手术切除的病例之外,所有其他非转移性病例均已接受治愈性或预期治愈性肿瘤切除。患者的所有临床病理参数根据图表记录分类。IRB批准的(长庚纪念医院伦理委员会(Ethic Committee of Chang Gung Memorial Hospital)的编号100-4274B和中国科学院(Academia Sinica)的AS-IRB01-11056)知情同意书已在检查之前从所有病例获得。

[0370] CM_x平台用于CTC分离和富集。该方法的程序简要描述如下。首先,约7~9mL的外周血液样品被从供体抽取并收集到含有抗凝血剂EDTA(BDBiosciences)的10mL的Vacutainer管中,然后将2mL的血液以1.5mL/h的流动速率注入涂覆有抗-EpCAM-SLB的芯片中。在完成血液注入后,用PBS缓冲液洗涤掉松散结合的细胞;随后,空气泡沫被注入芯片以分解SLB,从而洗脱所捕获的细胞。所释放的细胞利用DAPI、CK20以及CD45进行染色。具有细胞形态并且直径在7~25μm内,同时在细胞质中呈CK20阳性、在核中呈DAPI阳性以及CD45阴性染色的圆形颗粒被定义为CTC,并且在Leica DMIRE2(自动反转显微镜和活细胞系统)和Leica AF 6000(高级荧光成像系统)的显微镜下进行计数。至少两个经训练的操作员独立地评估细胞图像,并基于共识对CTC进行计数。

[0371] 使用Windows的SPSS(版本12.0,SPSS Inc,Chicago,IL)执行统计分析。使用两个独立样品T测试和Anova分析对不同组之间的平均值和线性进行比较。使用线性回归测试来测试组之间的线性关联。使用皮尔森卡方测试来分析组间阳性率的发生率差异。通过Kaplan-Meier法和Log-rank测试执行存活分析。Cox回归模型用于预后因子的多变量分析。所有P值都是双面的;小于0.05的P值指示了统计学显著性。

[0372] 实施例14:微流体芯片制备

[0373] 定制微流体芯片的制造描述如下:市售CO₂激光划线机(HeIix 24,EpiLog,美国)用于在聚(甲基甲基丙烯酸酯)(PMMA)载玻片(大小=标准载玻片,厚度=1.5mm)上产生微图案。激光还用于雕刻63μm厚的粘合的双面胶带(8018PT,3M公司),以雕刻出围绕PMMA上微流体图案的边界。PMMA载玻片上的微沟槽图案和微结构使用CorelDraw(Corel,Ottawa,Canada)绘制,然后转移到激光划线机,用于在基底上进行直接加工。在这项研究中,制备了六种类型的芯片。通过将雕刻出的3M胶带放置(夹)在顶部(PMMA载玻片)和底部上玻璃载玻片之间,以形成密封通道,来使雕刻出的芯片经等离子处理的玻璃载玻片进行结合。脂质囊泡的制备、EpCAM抗体的生物素化、EpAb4-1、涂覆在微流体芯片中的EpCAM支持脂质双层的顺序制备在前面已经描述,但是在此简要描述。

[0374] 利用由摩尔比为95/5的1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)和1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-帽-生物素(b-PE)组成的脂质囊泡来处理微流体通道的内壁。在除去过量的脂质后,通过NA-生物素识别将Neutravidin™(NA)共轭至SLB中的b-PE,然后将生物素化的EpAb4-1(b-EpAb4-1)共轭至NA以完成表面形成。图9示出了具有不同流动路径、尺寸以及具有该表面修饰的微结构的一系列微流体装置。

[0375] 实施例15:结肠直肠癌细胞系捕获效率研究

[0376] 使用HCT116表征结肠直肠癌细胞捕获效率。将用CellTracker Green预染色的300至2000个HCT116细胞掺入玻璃底孔(直径:6mm,高度:5mm)并等待10分钟使细胞沉降。将细胞转移到通过荧光显微法(Leica AF 6000Advanced荧光成像系统)从健康个体收集的全血

液之前和之后对底部进行成像,以确保准确的计数。所掺入的细胞的实际数目被定义为(转移前孔中的细胞数目)减去(转移后孔中剩余的细胞数目)。在适当温和混合后,使细胞-血液混合物流过功能化微通道。然后,用0.5mL的PBS洗涤微通道并引入0.3mL的Hoechst溶液(PBS中1 μ g/mL)对细胞核进行染色。对通道进行荧光显微照相以计数通道中所捕获的细胞的总数目。结肠直肠癌细胞系捕获效率被定义为(确认的所捕获细胞数目)/(实际掺入的细胞数目) $\times 100\%$ 。

[0377] 实施例16:临床样品选择和使用castPCR技术对用于临床样品和基因型分型的CTC进行免疫荧光染色

[0378] 分别从110个患有阶段0~IV的结肠直肠癌患者和28个健康供体(62个雌性和76个雄性)获得一管各自的外周血。在本研究中接受没有先前癌症治疗的结肠直肠癌患者,在同一天或前一天在手术前接受血液抽取。健康供体通过结肠镜检查确认没有结肠疾病,并在该程序之前接受血液抽取。患者和健康供体的平均年龄为62岁和44岁。研究方案由中央研究院机构审查委员会(the Institutional Review Boards of Academia Sinica)(AS•IRBOI-12040)和长庚纪念医院(Chang Gung Memorial Hospital)(100-1023B)批准。

[0379] 将从芯片释放到滤膜上的所捕获的细胞用4%的多聚甲醛(PFA)固定,用在1x PBS中的0.1%的triton X-100透化,并用BSA封闭。随后,在4 $^{\circ}$ C下用兔抗人细胞角蛋白20(CK20)(Abcam,Cambridge,UK)和大鼠抗人CD45(Abcam Cambridge,英国)对细胞染色过夜,然后进行PBS洗涤。在PBS洗涤后,利用FITC共轭的山羊抗大鼠IgG抗体(Abcam Cambridge,英国)和AlexaFluor[®] 568抗兔IgG抗体(Life Technologies,CA,美国)在室温下对细胞孵育1小时,然后进行PBS洗涤以除去过量的二级抗体。在图21中概述了CTC计数。

[0380] 通过市场上可以买得到的TaqMan[®]突变检测试验(Life Technologies, Carlsbad, CA)检测KRAS、TP53以及APC突变状态。这些试验使用竞争性等位基因特异性TaqMan PCR(castPCR技术)。每个野生型或突变等位基因试验由修饰或未修饰的等位基因特异性正向引物、基因座特异性TaqMan[®]探针、基因座特异性反向引物以及等位基因特异性MGB阻断剂组成。每个测试样品用一个或多个突变等位基因试验和相应的基因参照试验进行。使用Seq Detection System版本2.3分析结果以生成CT_靶和CT_{参考}的值。检测 Δ CT截止值用于确定样品中突变等位基因试验可检测的百分比突变的限制。%与 Δ CT之间的转换公式为 $2^{-(\Delta CT)} \times 100\%$ 。突变等位基因试验敏感性为0.1%。因此, $\Delta CT < 9.96$ 的值为阳性,且 $\Delta CT > 9.96$ 的值为阴性。

[0381] 应当理解,在实践本发明时可以采用本文所述的本发明的实施方式的各种替代方案。意图是以下权利要求书限定本发明的范围,并且本发明由此涵盖这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构。

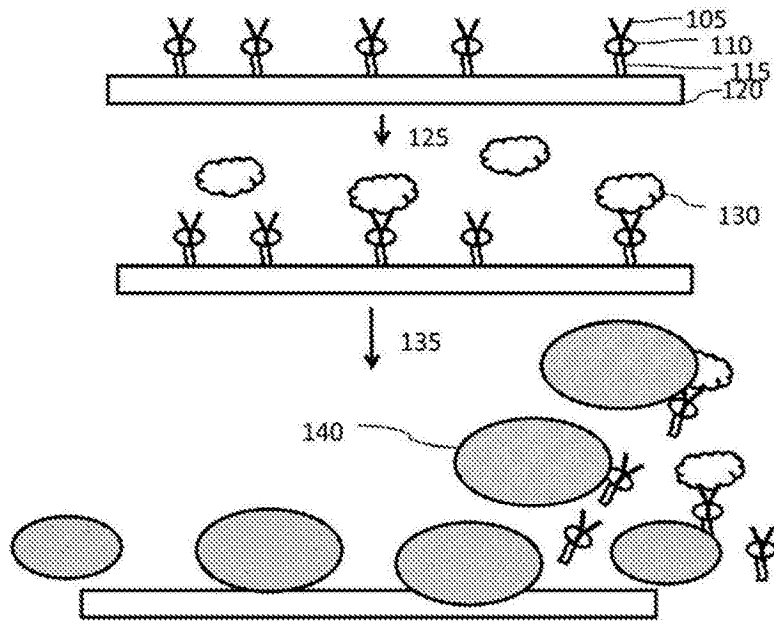


图1

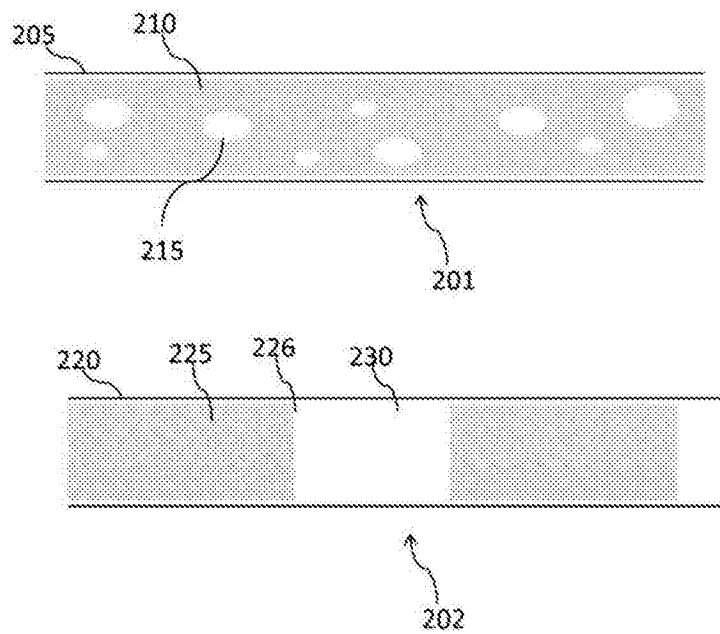


图2

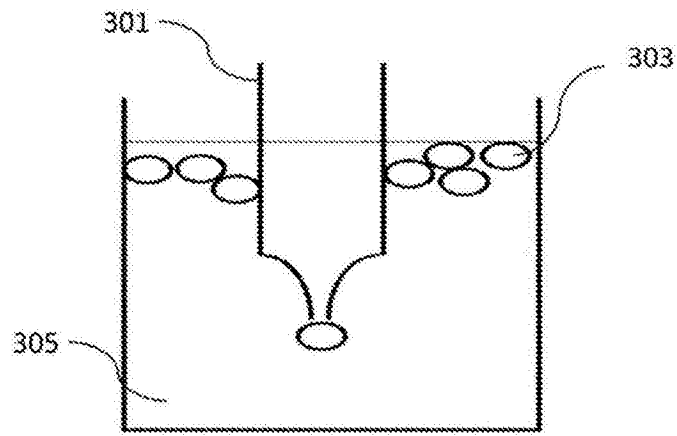


图3

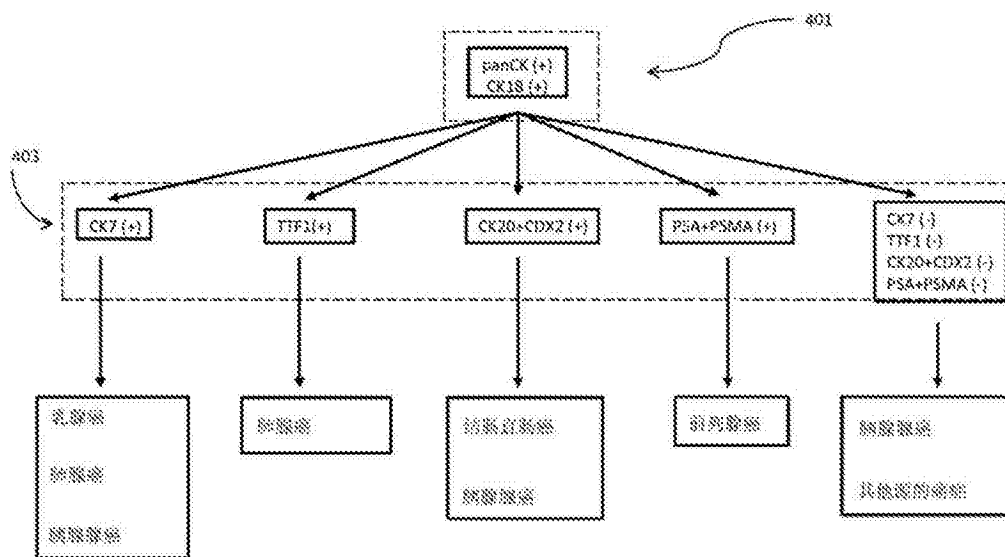


图4

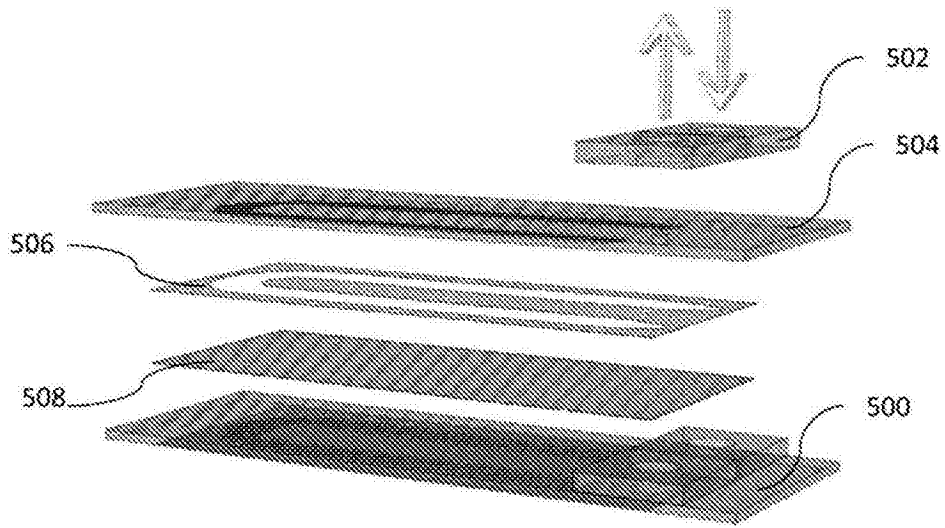


图5

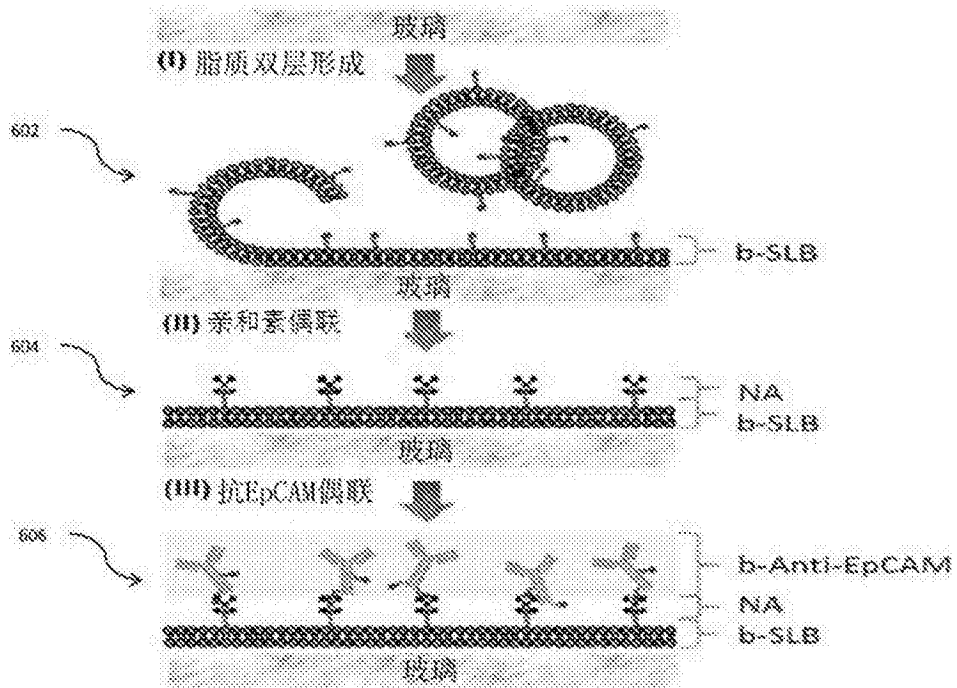


图6

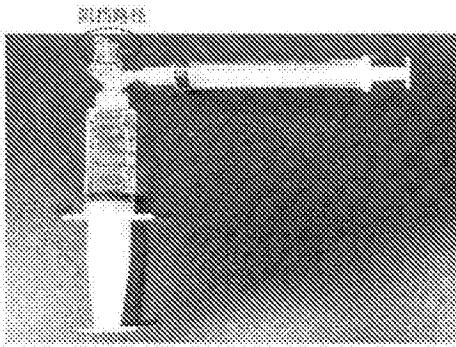


图7

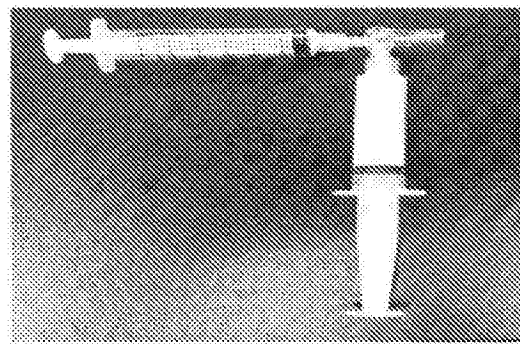


图8

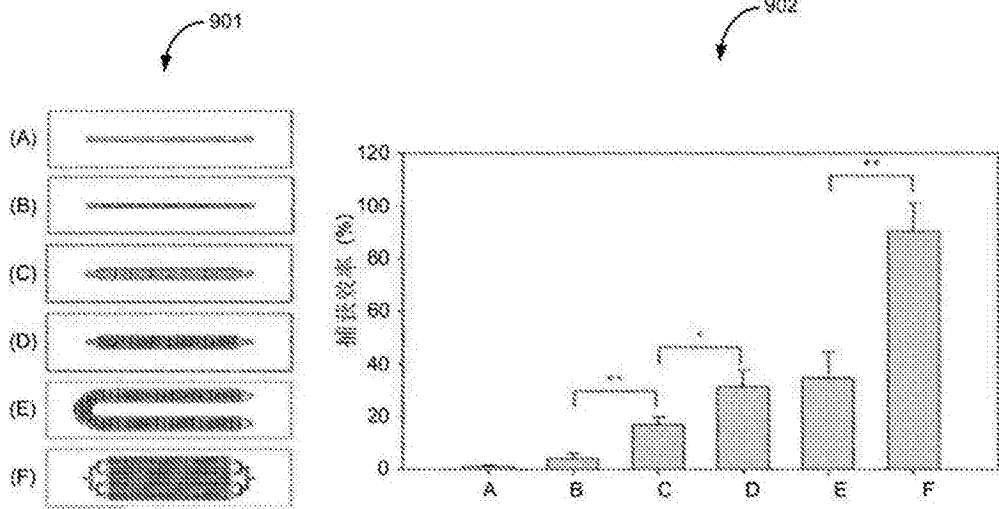


图9

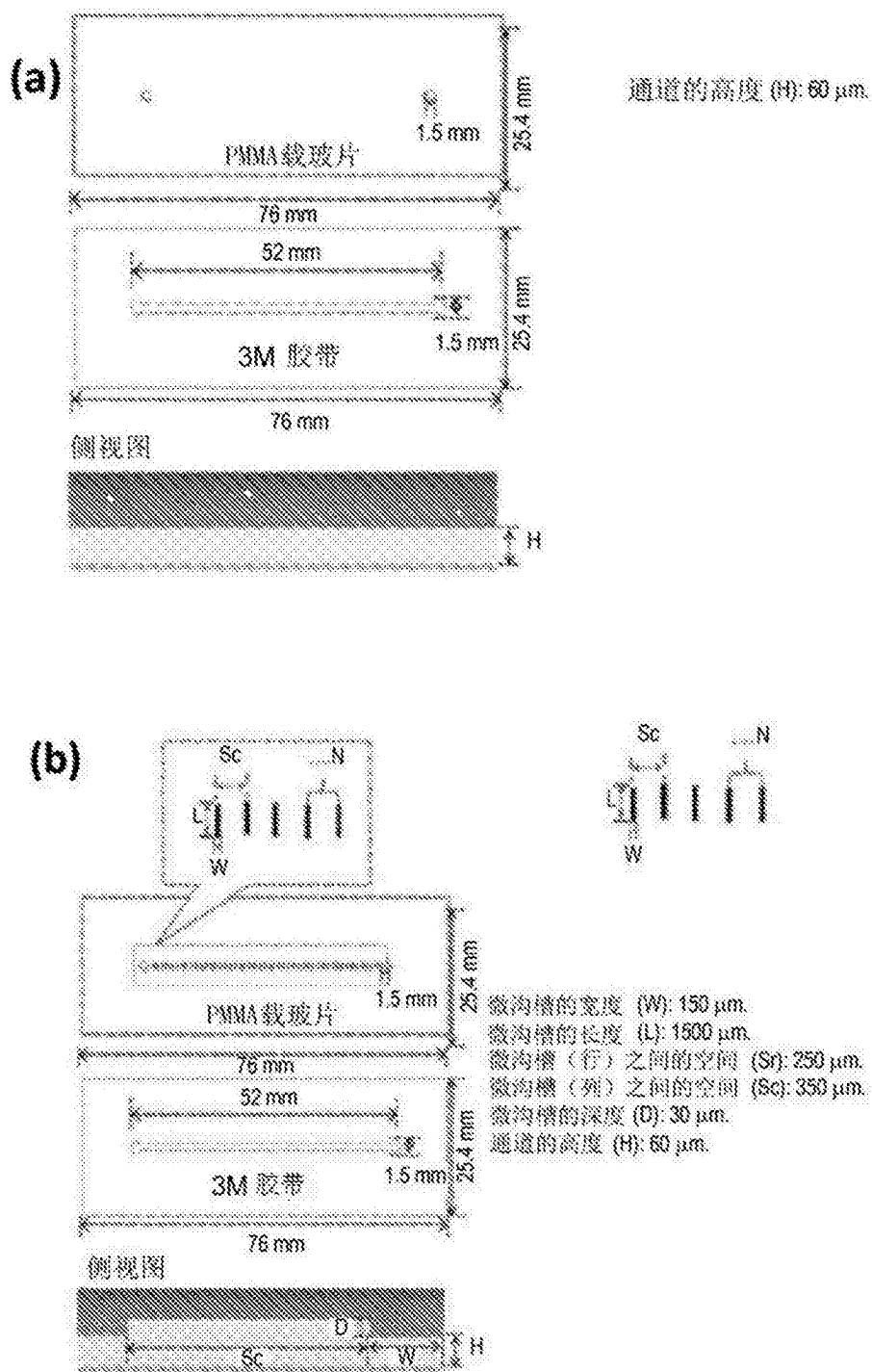


图10

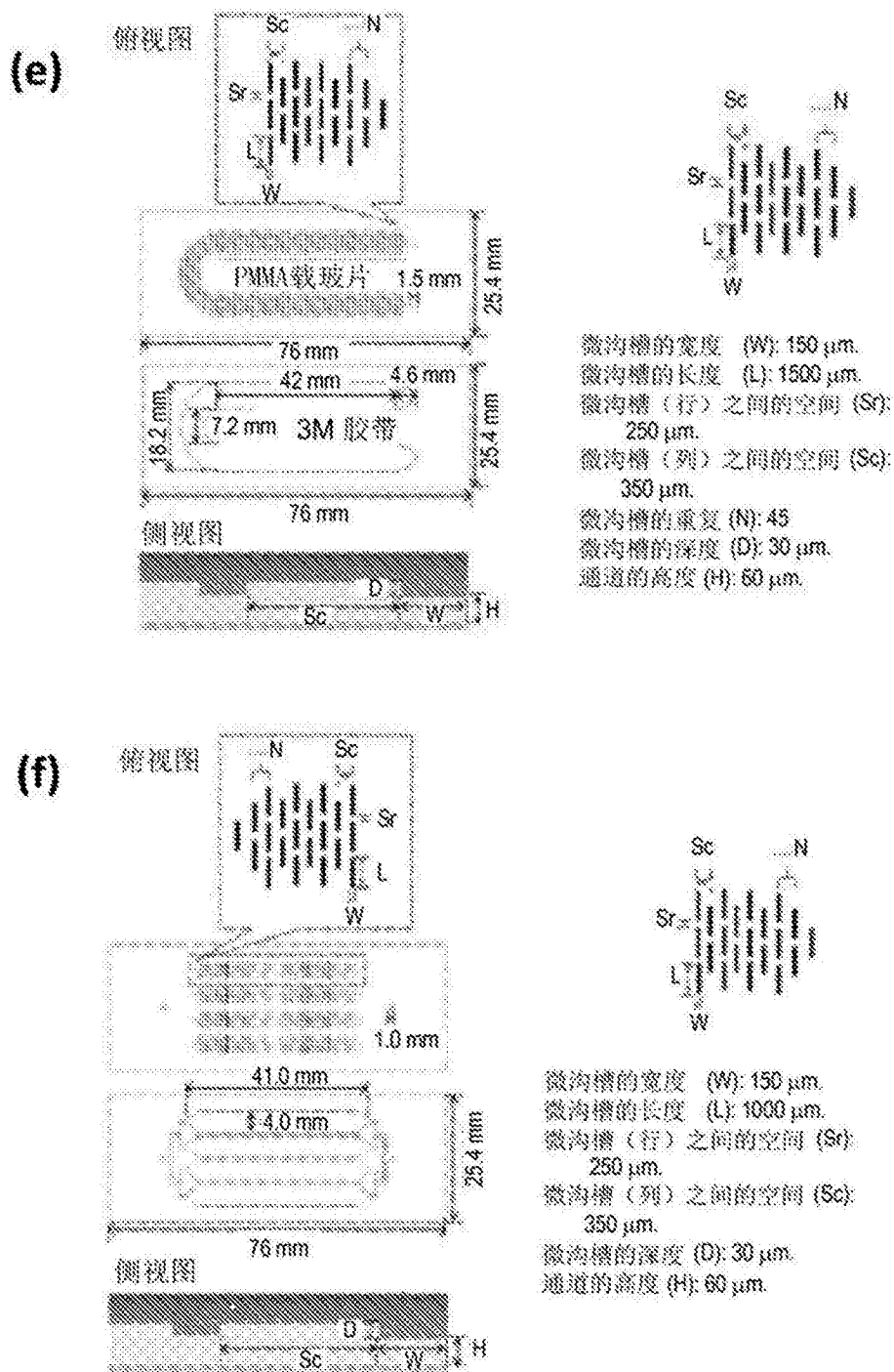


图12

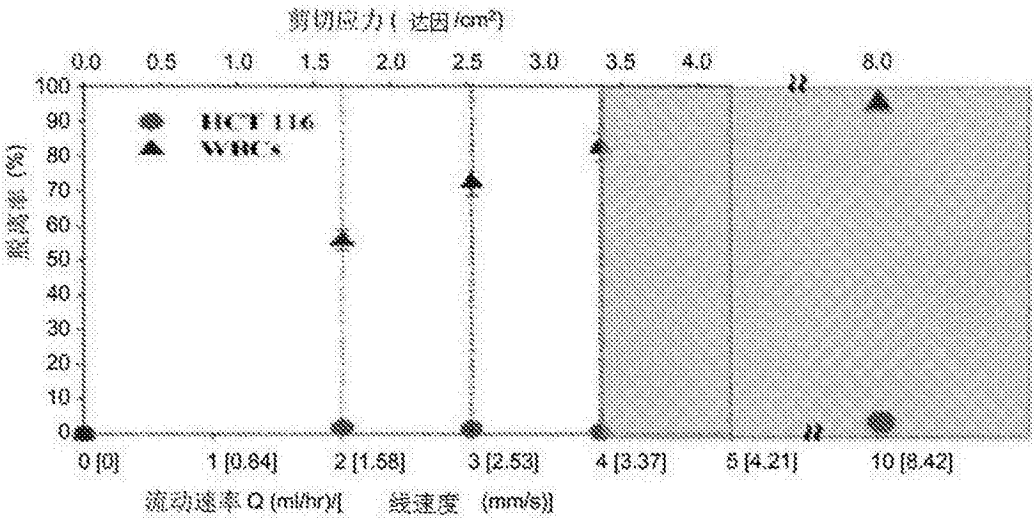


图13

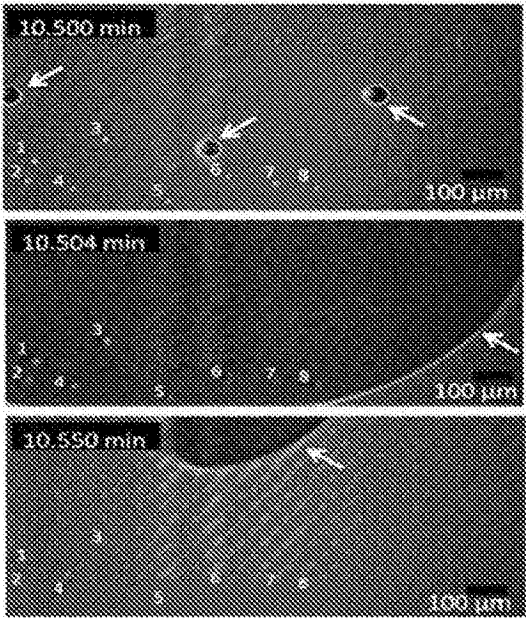


图14

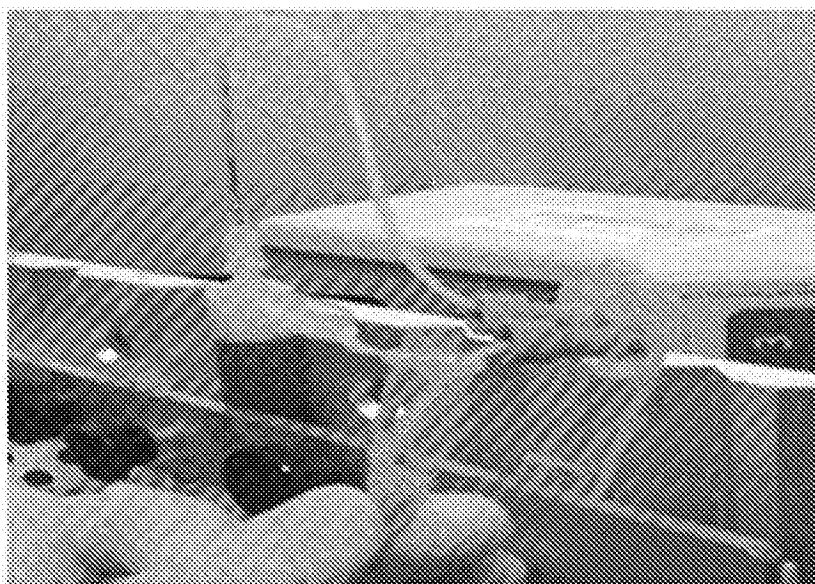


图15

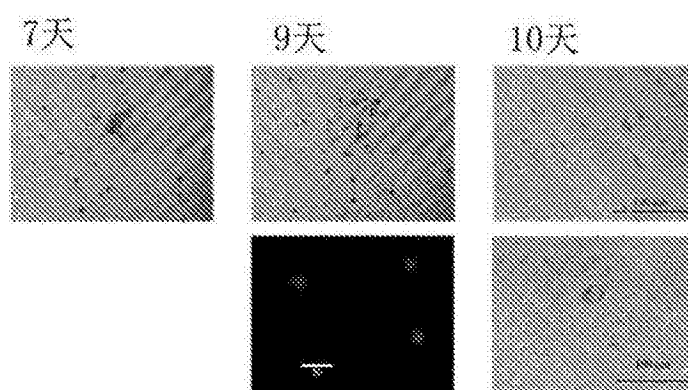


图16

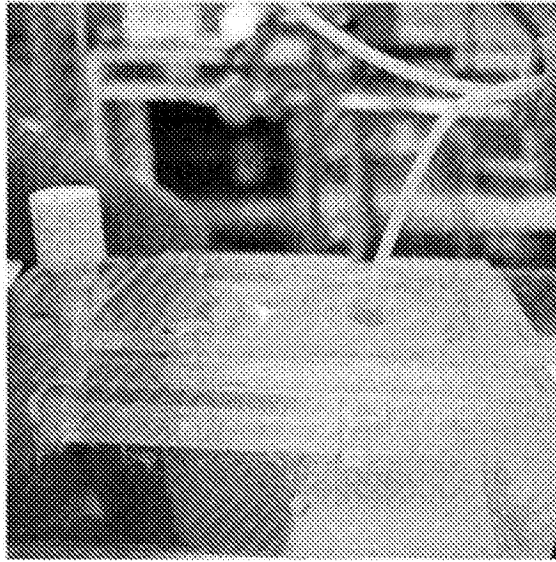


图17

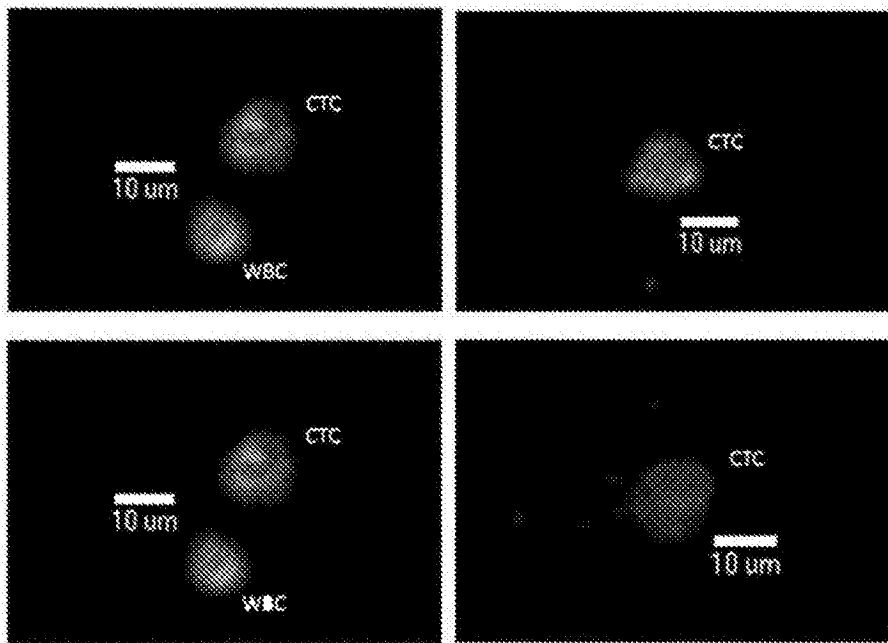


图18

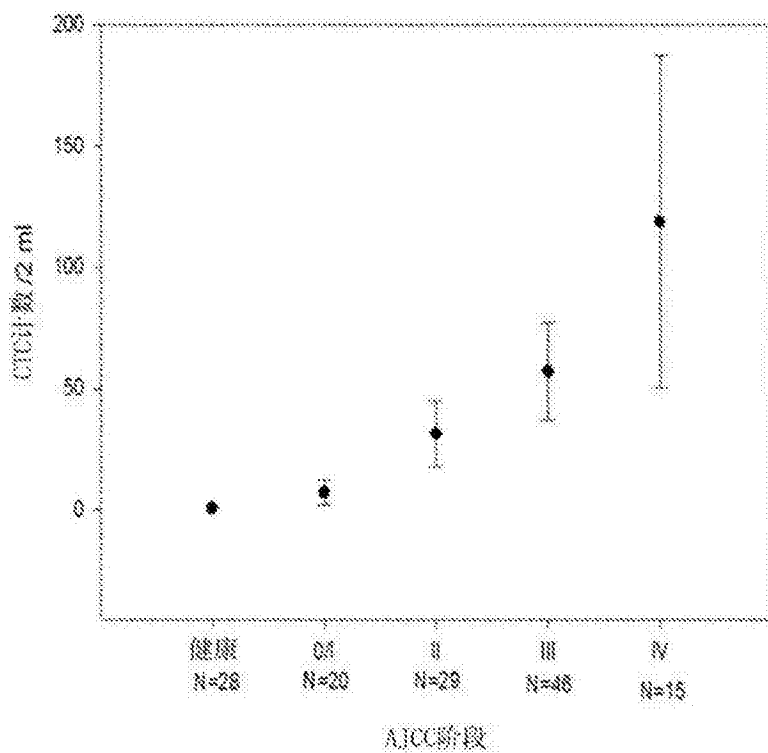


图19

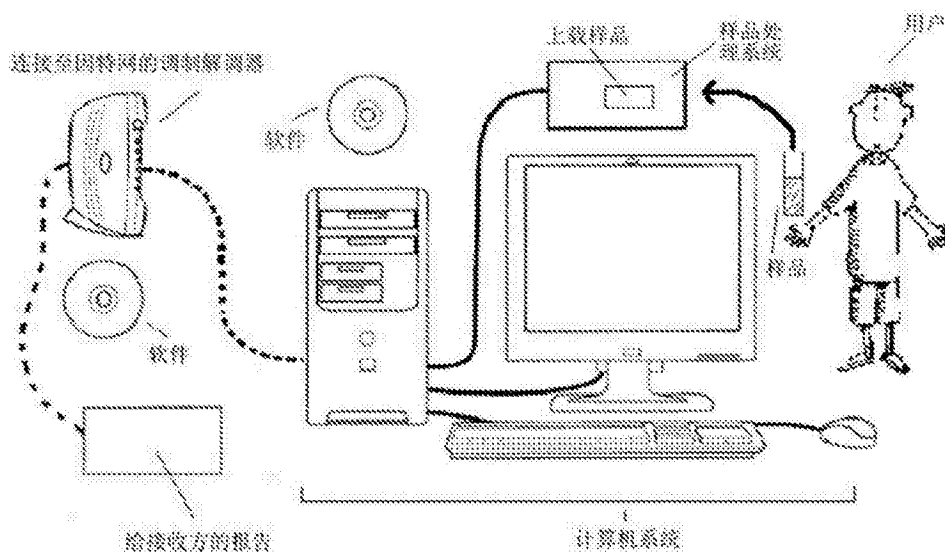


图20

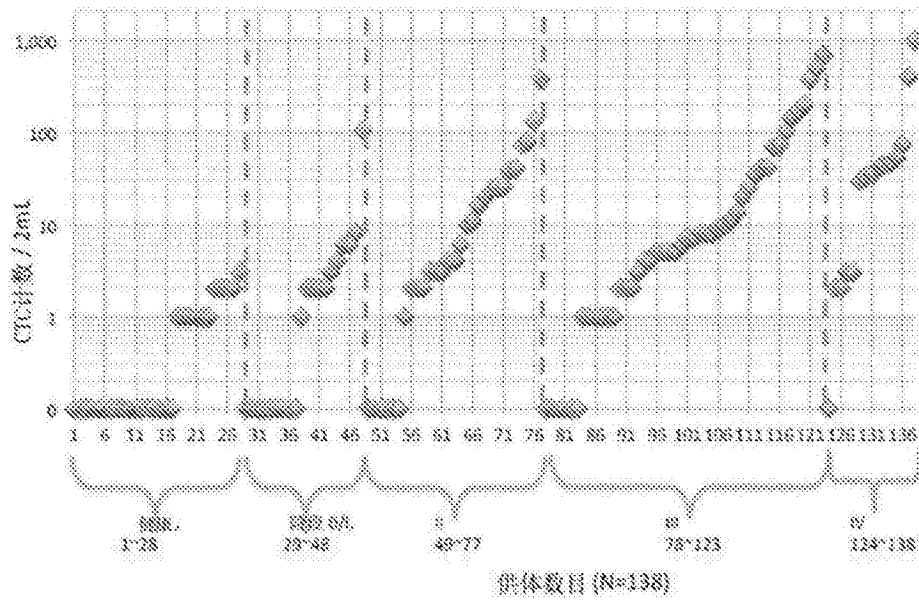


图21

ROC曲线：癌症的诊断

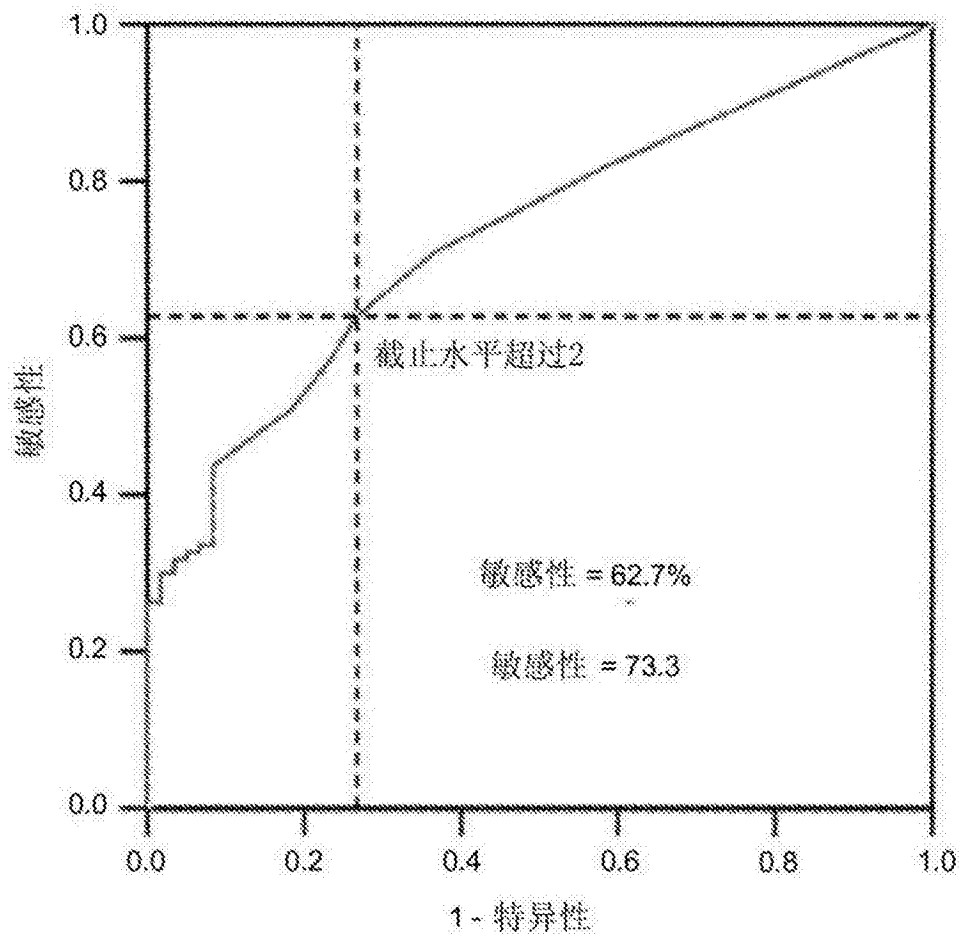


图22

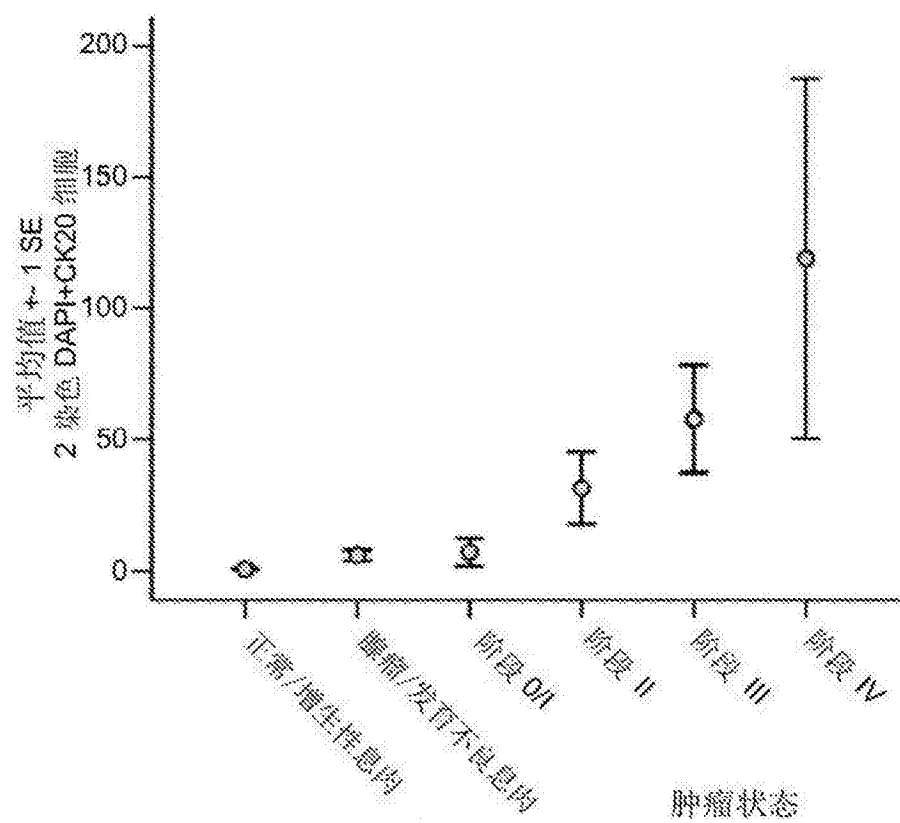


图23

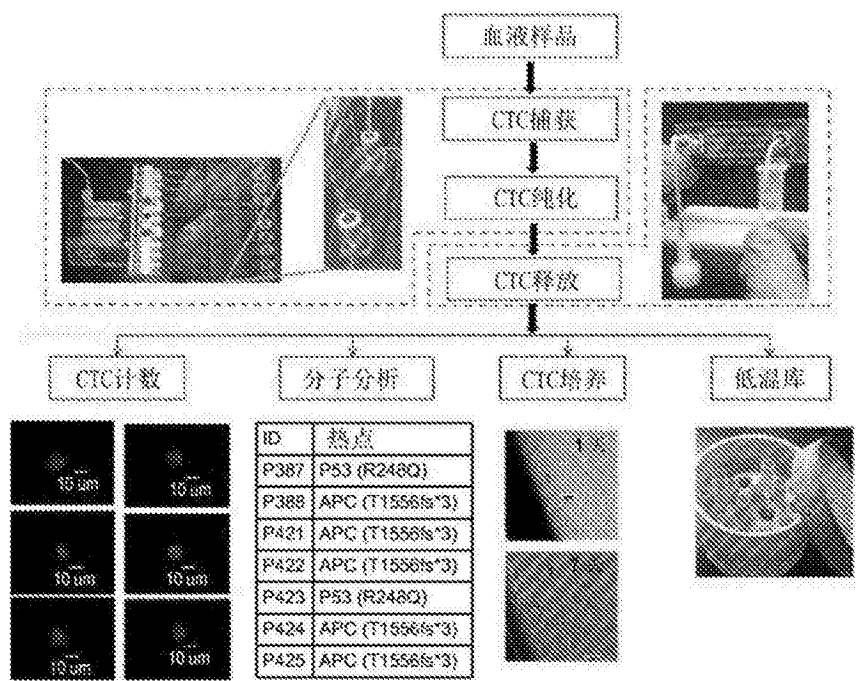


图24

专利名称(译)	用于癌症诊断及预后的方法和系统		
公开(公告)号	CN106662514A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201580029084.4	申请日	2015-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	中央研究院		
申请(专利权)人(译)	中央研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中央研究院		
[标]发明人	张瑛芝 赖志铭 吴仁家 陈怀驩 邵宏仁 卢思宏 洪宗甫 谢煌彬		
发明人	张瑛芝 赖志铭 吴仁家 陈怀驩 邵宏仁 卢思宏 洪宗甫 谢煌彬		
IPC分类号	G01N1/40 G01N33/537		
CPC分类号	B01L3/502769 B01L2200/0673 B01L2300/0816 B01L2400/0406 B01L2400/0487 G01N33/54366 G01N33/57492 B01L2300/0681		
代理人(译)	李丙林 王玉桂		
优先权	61/973348 2014-04-01 US 61/975699 2014-04-04 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开提供了制造和使用泡沫组合物的组合物和方法及其在临床应用中的用途。

