



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I577389 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：100137078

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 13 日

(51)Int. Cl. : A61K49/00 (2006.01)

B03C1/01 (2006.01)

G01N27/74 (2006.01)

G01N33/543 (2006.01)

(30)優先權：2010/10/14 美國

61/393,036

(71)申請人：維里德克斯有限責任公司(美國) VERIDEX, LLC (US)

美國

(72)發明人：雷 蓋拉 RAO, GALLA CHANDRA (US)；康娜莉 馬克 CONNELLY, MARK

CARLE (US)

(74)代理人：黃慶源；陳彥希

(56)參考文獻：

CN 1871517A

WO 2007/121464A2

A.T. Myklebust et al., Effective removal of SCLC cells from human bone marrow. Use of four monoclonal antibodies and immunomagnetic beads. British Journal of Cancer, 1993, 67, 1331-1336.

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：3 共 39 頁

(54)名稱

使用多專一性捕捉及雞尾酒檢測試劑檢測胰臟病患之循環腫瘤細胞的方法及套組

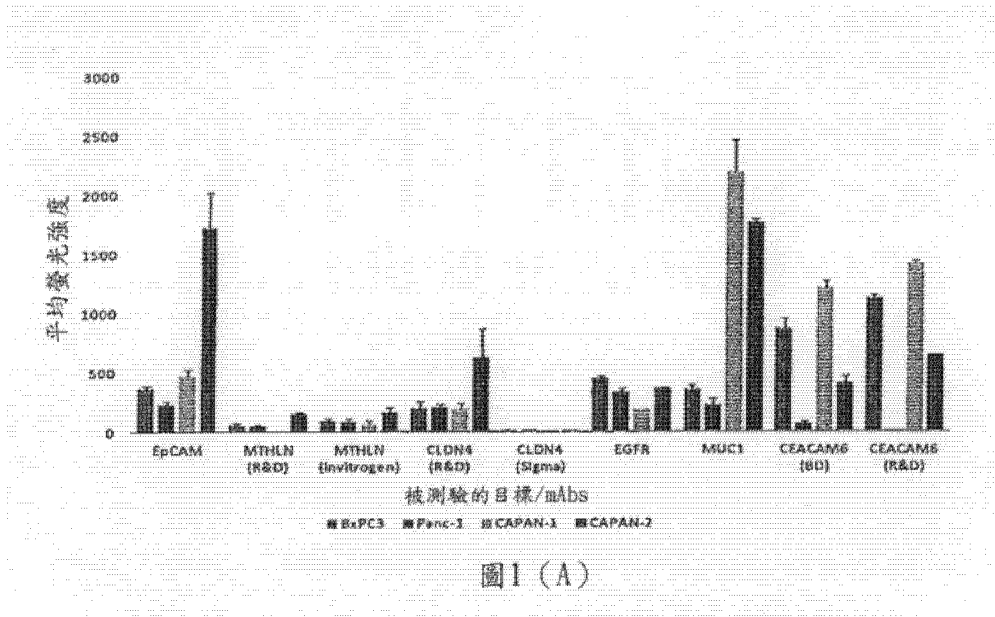
METHODS AND KITS FOR THE DETECTION OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN PANCREATIC PATIENTS USING POLYSPECIFIC CAPTURE AND COCKTAIL DETECTION REAGENTS

(57)摘要

本發明揭示一高靈敏度的測定，該測定將具多參數流動式細胞儀或影像細胞分析術的免疫磁性富集合併以檢測、計數以及特性化於血液中的惡性腫瘤細胞。本發明把不同抗體的結合作用引入至相同的鐵磁流體。根據鐵磁流體欲結合的抗原，此具有使鐵磁流體產生多專一性的效果。呈現在相同的鐵磁流體上的多重抗體並非看來像是阻塞，或者相互干擾。此等鐵磁流體具有能夠特定地結合一個以上細胞類型之非常想要的效果。測定尤其是對捕捉 CTCs 很有用處，該等 CTCs 具有低 EpCAM 表現，但對其他腫瘤標記則具有高表現。因此，測定有助於使惡性腫瘤細胞的生物學特性化並分期。

A highly sensitive assay is disclosed which combines immunomagnetic enrichment with multiparameter flow cytometric or image cytometry to detect, enumerate and characterize carcinoma cells in the blood. The present invention incorporates the conjugation of different antibodies to the same ferrofluid. This has the effect of making the ferrofluid polyspecific with respect to the antigens that the ferrofluid will bind. The multiple antibodies present on the same ferrofluid do not appear to block or otherwise interfere with each other. Such ferrofluids have the highly desirable effect of being able to bind specifically to more than one type of cell. The assay is especially useful to enable the capture of CTCs that have low EpCAM expression, but high expression of other tumor markers; accordingly, the assay facilitates the biological characterization and staging of carcinoma cells.

指定代表圖：



公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： | 00137078

A61K 49/00 (2006.01)

※申請日： 100.10.13

B03C 1/01 (2006.01)

※IPC 分類：

G01N 27/74 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

G01N 33/543 (2006.01)

使用多專一性捕捉及雞尾酒檢測試劑檢測胰臟病患之
循環腫瘤細胞的方法及套組

METHODS AND KITS FOR THE DETECTION OF
CIRCULATING TUMOR CELLS IN PANCREATIC
PATIENTS USING POLYSPECIFIC CAPTURE AND
COCKTAIL DETECTION REAGENTS

二、中文發明摘要：

本發明揭示一高靈敏度的測定，該測定將具多參數流動式細胞儀或影像細胞分析術的免疫磁性富集合併以檢測、計數以及特性化於血液中的惡性腫瘤細胞。本發明把不同抗體的結合作用引入至相同的鐵磁流體。根據鐵磁流體欲結合的抗原，此具有使鐵磁流體產生多專一性的效果。呈現在相同的鐵磁流體上的多重抗體並非看來像是阻塞，或者相互干擾。此等鐵磁流體具有能夠特定地結合一個以上細胞類型之非常想要的效果。測定尤其是對捕捉 CTCs 很有用處，該等 CTCs 具有低 EpCAM 表現，但對其他腫瘤標記則具

有高表現。因此，測定有助於使惡性腫瘤細胞的生物學特性化並分期。

三、英文發明摘要：

A highly sensitive assay is disclosed which combines immunomagnetic enrichment with multiparameter flow cytometric or image cytometry to detect, enumerate and characterize carcinoma cells in the blood. The present invention incorporates the conjugation of different antibodies to the same ferrofluid. This has the effect of making the ferrofluid polyspecific with respect to the antigens that the ferrofluid will bind. The multiple antibodies present on the same ferrofluid do not appear to block or otherwise interfere with each other. Such ferrofluids have the highly desirable effect of being able to bind specifically to more than one type of cell. The assay is especially useful to enable the capture of CTCs that have low EpCAM expression, but high expression of other tumor markers; accordingly, the assay facilitates the biological characterization and staging of carcinoma cells.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1A)圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

本案主張美國臨時申請案 61/393,036 號(2010 年 10 月 14 日申請)之優先權利益，其全部內容於本文一併作為參考。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於腫瘤學和診斷測驗的領域。本發明可用於癌篩檢、分期、用於化學治療反應的監控、癌復發或諸如此類。更具體地說，本發明提供便於腫瘤細胞或其他自生物試樣所單離的罕見細胞之分析與計算的試劑、方法以及檢驗套組。

【先前技術】

使用細胞搜尋 (CellSearch) CTC 測定在具轉移性乳癌、前列腺癌以及大腸癌之病人中循環腫瘤細胞 (CTCs) 的計算，可預測病人存活率且允許治療反應的監控。另外，CTCs 特徵可在於多種的分子標記，其已經被建議為一用以在病人中動態地研究腫瘤生物學之方法。然而，已經有少數在具胰腺癌病人中 CTCs 之偵檢的研究及提出固有測定組態的初期研究，其對檢測這些細胞可能不是最適宜的(參照所併入參考的 US 7,332,288)。固有的細胞搜尋 CTC 測定使用被接合至順磁奈米粒子的抗 EpCAM (EpCAM 鐵磁流體) 以捕捉 CTCs。藉由 EpCAM 鐵磁流體所捕捉的 CTCs 係以

被接合至藻紅素的抗細胞角質蛋白抗體（CK8、18 以及 19）而被染色以檢測 CTCs。

除來自可表達不同於乳房、前列腺或大腸直腸癌的腫瘤抗原之不同癌的細胞的問題以外，具有一描述在原發腫瘤內細胞的異質性之成長文獻。新進展已經顯示腫瘤先驅細胞（TPC）在解釋為何某些癌在化學治療之後復發上可為極其重要。這些 TPCs 似乎高度抵抗許多傳統療法，且能夠在將來某個時期重建腫瘤。最近的文獻亦已經識別可在轉移的過程中扮演重要角色的上皮間質轉化細胞（EMT）。TPCs 與 EMTs 二者係被認為表示與 CTCs 不同的抗原。CTC 捕捉取決於在 CTCs 上的 EpCAM 之表現；因為 CTC 捕捉已經被局限於一單一捕捉抗原。關於 CTCs 之 EpCAM 的生物學仍無完全的瞭解，且 EpCAM 抗原可能在一些 CTCs 中可被漸減調控或負的。在這種狀況之下，CTC 將不為 EpCAM 鐵磁流體所捕捉且在此測定中將導致零 CTCs。另一可能性為 CTCs 係被捕捉，但他們由於缺少在此測定中所使用之細胞角質蛋白標記而未被檢測到。因此，雖然藉由現今科技，許多 CTCs 已順利捕捉且檢測到，但仍有可能未檢測到存在於癌症病人血液中的 CTCs，這是因為他們未能表達在現今測定中所使用的標記。最終，不知是否 TPCs 和 EMTs 在血液中循環且可被檢測到。然而，現今捕捉以及偵檢科技

已經被局限於一抗原或抗原類別方式之標的之事實，意味著 TPCs 或 EMT 不太可能以現今科技檢測到。

基於上述，顯然很希望有一種用於在一繼發性腫瘤的確立之前識別這些在循環中的細胞之方法，特別在癌症初期。許多實驗和臨床步驟使用生物專一性親和反應用於將罕見細胞與生物試樣單離。此等反應常使用於診斷測驗中或用於各種各樣的目標物質之分離，尤其生物實體，諸如，細胞、蛋白質、細菌、病毒、核酸序列以及類似者。

許多種方法係可供分析或分離以上所提及目標物質之用，基於在研究中的物質與該目標物質特別結合的另一物質之間的複合物生成。從未結合材料中之複合物的分離可有傾向地，例如，藉由與目標物質耦合的細分開粒子或珠之沈降，或離心所完成。若需要，此等粒子或珠可被製成磁性的以便於約束/自由分離階段。磁性粒子為習知技藝，正如其等在免疫以及其他生物專一性親和反應中之使用。參照，例如，美國專利第 4,554,088 號以及愛丁堡 Churchill Livingstone 出版公司，Hunter 等人的 *Immunoassays for Clinical Chemistry* 第 147-162 頁(1983)。一般而言，任何有助於磁分離或重力分離的材料均可被使用於此目的。然而，已經清楚磁分離方式為選擇的方法。

磁性粒子可以作為大 (1.5 至約 50 微米)、小 (0.7-1.5 微米) 或膠態 (<200 nm) 之大小為基礎而

被分類，其等亦被稱為奈米粒子。後者係亦以鐵磁流體或似鐵磁流體材料著稱，且具有許多傳統鐵磁流體的性質，有時在此被稱為膠態、超順磁性粒子。

以上所描述類型之小磁性粒子在涉及生物專一性親和反應的分析方面十分有用，正如他們合宜地以如蛋白質的生物功能性聚合物塗覆，提供非常高的表面積且產生適度的反應動力學。在 0.7-1.5 微米的範圍內分布之磁性粒子已描述於專利文獻中，例如包括美國專利第 3,970,518 號、第 4,018,886 號、第 4,230,685 號、第 4,267,234 號、第 4,452,773 號、第 4,554,088 號以及第 4,659,678 號。這些粒子係被揭示為有用於免疫檢驗試劑的撐體。

如同上述的小磁性粒子，大磁性粒子 (> 1.5 微米至約 50 微米) 亦可展現超順磁性行為。典型的此等材料為如奧格史泰 (Ugelstad) 在美國專利第 4,654,267 號中所描述以及 Dynal 所製造 (奧斯陸, 挪威)。奧格史泰的方法涉及聚合物粒子的合成，該等粒子導致膨脹且磁感結晶係被埋嵌在膨脹的粒子中。其他在相同大小範圍的材料係在有分散磁感結晶的情況下藉由合成聚合物粒子而被製備。如此導致磁感結晶在一聚合物基質中的截留，因此使生成物材料成為磁性的。在這二種情況中，生成物粒子具有超順磁性行為，該行為係由當磁場除去時容易分散的能力所顯示。與先前所提及且下文進一步詳細討論的磁性膠體或奈米粒子

不同，因為每個粒子之磁性材料質量的關係，這些材料和小磁性粒子一樣係容易地以簡單實驗室磁性材料進行分離。因此，分離係在從低至幾百高斯/公分至多約 1.5 千高斯/公分的梯度中被完成。在另一方面，膠態磁性粒子（低於大約 200 nm）需要實質上較高的磁力梯度，這是因為其等之擴散能量、每個粒子之小的磁質量以及史托克斯阻力。

歐文（Owen）等人的美國專利第 4,795,698 號關於聚合物塗覆、膠態、超順磁性粒子，該等粒子係在有聚合物的情況下，藉由自 $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ 鹽類之磁鐵礦的形成所產生。莫爾戴（Molday）的美國專利第 4,452,773 號描述一種與歐文等人中所提及在性質上類似的材料，該材料係藉由形成磁鐵礦以及其他在含有非常高濃度聚葡萄糖的情況下自 $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ 經由鹼加成的氧化鐵而產生。從二種步驟生成的粒子展現可預見長達數月觀察期間不從水懸液沉澱的趨勢。如此產生的材料具有膠態性質且已經被證明在細胞分離中十分有用。莫爾戴科技已經被德國美天旋生物技術公司（Miltenyi Biotec），德國貝爾吉施格拉德巴赫（Bergisch Gladbach）、及加拿大溫哥華泰瑞·湯瑪士（Terry Thomas）予以商業化。

另一種用於產生超順磁性、膠態粒子的方法係被描述於美國專利第 5,597,531 號中。與在歐文等人或莫爾戴專利中所描述的粒子相反，這些後者的粒子係藉

由直接塗覆一生物功能性聚合物到預成形超順磁性結晶上而產生，該等結晶已經藉由高功率聲能而被分散成從 25 至 120 nm 的範圍內分布之準穩定晶群。所產生的粒子，在此被稱為直接塗覆的粒子，展現顯著大於相同總尺寸的膠態粒子之磁矩，例如莫爾戴或歐文等人所描述的粒子。

磁分離技術為習知的，其中一磁場被施加至一流體介質，以便將鐵磁體從流體介質分離出來。相比之下，膠態、超順磁性粒子以停留在懸浮液中的趨勢與他們的相對弱磁性響應性協力，需要使用高梯度磁分離 (HGMS) 技術，以便將此等粒子從該等粒子被懸浮於其中的一非磁性流體介質中分離出來。在 HGMS 系統中，磁場的梯度(亦即空間導數)是比藉由在一指定地點的磁場強度所產生的，在懸浮粒子的行為上面，產生更大的影響。

HGMS 系統可分為二大類別。一種此類別包括磁分離系統，該等系統使用完全位於一分離槽或器皿外部之一磁路。此等外部分離器的實例係被描述於利貝提 (Liberti) 等人的美國專利第 5,186,827 號。在此專利中所描述的數個實施例中，必要的磁場梯度藉由將永久磁鐵定位在一非磁性容器周邊所產生，致使類似的磁極在一反場組態中。可在此系統中獲得的試驗介質內部之磁場梯度程度係接受磁鐵強度以及磁鐵之間

的分離距離所限制。因此，對於可利用外部梯度系統而獲得的梯度來說，具有一有限極限。

另一類型的 HGMS 分離器利用一鐵磁收集結構體，該結構體被安置於試驗介質之內，以便 1) 增強一應用的磁場、以及 2) 在試驗介質之內產生一磁場梯度。在一已知類型的內 HGMS 系統中，超細鋼絲絨或網係被填充於一管柱之內，該管柱係被位於鄰近一磁鐵。應用的磁場被集中在鋼絲附近，以致所懸浮的磁性粒子將朝鋼絲的表面被吸引且黏著。在此等鋼絲上所產生的梯度係與鋼絲直徑成反比，致使磁性可到達的距離隨著直徑增加而減少。因此，可以產生非常高的梯度。

內梯度系統的一缺點為鋼絲絨、網材料或鋼微珠的使用可藉由在相交鋼絲絨附近或在介於相交鋼絲的間隙之內的毛細管作用捕獲試驗介質的非磁性成分。各種塗覆步驟已經被用於此等內梯度管柱（參照，例如，美天旋的美國專利第 5,693,539 號以及克羅尼克（Kronick）的第 4,375,407 號），然而，在此等系統中之大表面積由於吸附作用仍然造成回收問題。因此，內梯度系統不令人滿的，尤其當被捕捉實體之特低頻率的回收為分離的目標之時。此外，他們使得自動化困難且昂貴。由歐文等人以及莫爾戴所描述的材料二者需要使用此等高梯度管柱。

相比之下，使用用於細胞分離的外梯度之 HGMS 研究途徑提供一些便利條件。首先，可以使用簡單實驗儀器，諸如，試管、離心管或甚至於真空採血系統（用於採血）可被使用。當外梯度是屬於能夠產生單層分離細胞的該類時，與以上美國專利第 5,186,827 號所提及四極/六極裝置或被描述於利貝提等人的美國專利第 5,466,574 號反偶極配置的情形一樣，能夠促進細胞的洗滌或接著發生的操作。而且，細胞從管或類似的容器之回收為一簡單且有效率的方法。當與從高梯度管柱的回收相比之時，情況特別是這樣。此等分離器皿亦提供另一重要的特徵，該特徵為減少試樣體積的能力。例如，一特定人類血細胞次群，（例如，磁性標示 CD 34⁺細胞），係從利用緩衝液稀釋 50% 以降低黏度的 10 ml 血液試樣被單離出來，一 15 ml 錐形試管可被使用為在一適當的四極磁性裝置中的分離器皿。從 15 ml 溶液開始，執行一第一分離，且被回收的細胞係被再懸浮於 3 ml 中。然後，執行一第二洗滌/分離，且單離的細胞再懸浮於 200 μ l 的最終體積中。在洗滌及/或分離且再懸浮以移除未被結合的細胞之後，CD 34⁺細胞可有效地再懸浮於一 200 μ l 的體積中。當仔細合適地使用直接塗覆的鐵磁流體而在經適當處理過的器皿內完成時，細胞回收取決於抗原密度，在 40-90% 之間範圍內為十分有效率，該等鐵磁流

體對這些分離器已為最佳化。此等技術以及試劑對於到達上述的癌症測驗分類所需的靈敏度為必要的。

可完全進行磁分離的效率及磁性標示細胞的回收和純度將取決於許多因素。這些因素包括此等考量，如同待分離的細胞數目、此等細胞的受體密度、每個細胞的磁性負載、磁性材料的非專一性結合（NSB）、所使用的技術、器皿的本質、器皿表面的本質、介質的黏度、以及所使用的磁分離裝置。若一系統之非專一性結合的程度實質上是固定的（通常是如此），則目標群體減少，純度也將是。作為一實例，具回收 80% 群體的 0.8% NSB 之系統將具有一 25% 的純度，該群體佔固有混合物中的 0.25%。反之，若初始群體佔 0.01%（每 10^6 個旁鄰細胞一個目標細胞）且若 NSB 為 0.001%，則純度將為 8%。純度愈大，分析愈容易且愈好。因此，很顯然的極低非專一性結合為執行有意義的罕見細胞分析所需要。

不是很顯而易見的是事實上一靶細胞的群體愈小，將愈困難來磁性標示及回收。此外，標示及回收將顯著地取決於所使用磁性粒子的本質。例如，當細胞係與大的磁性粒子（諸如，DynaI 珠）共培養之時，細胞係經由藉混合該系統所產生的碰撞而被標示，正如珠為太大以致於不能有效地擴散。因此，若一細胞係在每 ml 血液一個細胞或甚至更少的頻率存在於一群體中，視在極初期癌症中之腫瘤細胞的情況而定，

則標示目標細胞的機率將與被加入該系統之磁性粒子的數目以及混合時間的長度有關。因為與此等粒子的混合歷經很長時間將為有害的，因此必須儘可能增加粒子濃度。然而，對可被加入之磁性粒子的量具有一限度，當吾人可用被混合在具其他血細胞中之一罕見細胞來取代被混合在分離時大量磁性粒子中之一罕見細胞。後者條件並不顯著地改良數在研究中之細胞與檢驗該等細胞的能力。

使用大粒子在很少的頻率中（每 ml 的血液，1 到 50 個細胞）單離細胞具有另一缺點。儘管大磁性粒子容許使用很簡單的外梯度以及相當低的磁力梯度，大的粒子傾向以籠狀方式圍繞著細胞聚集成組，而使細胞難以看見或分析。因此，磁性粒子在分析之前必須從目標細胞釋放，且釋放粒子顯然地引進其他併發症。

基於前面提到的，使用強磁性、低非專一性結合、膠態磁性粒子的具外場裝置之一高梯度磁分離，為用以從一真核細胞之經混合的群體分離一研究中的細胞次群之一種可供選擇的方法，特別是倘若研究中的次群包含但為整體群體的一小部分時。此等材料，因其擴散性質，所以易於發現並磁性標示罕見現象（諸如，在血液中的腫瘤細胞）。此分離一般取決於細胞表面抗原的鑑定，該等抗原為只有在研究中的專一性細胞次群才有的，就腫瘤細胞來說，可為腫瘤抗原。被接合至鐵磁流體之適當的單株抗體可被靶向該等抗原。交

替地，當檢驗一血液試樣時，決定細胞類別（諸如，通常不被發現於血液中的上皮細胞）可提供一適當的受體。

尚有其他好理由來使用一膠態磁性材料用於此等分離，可達到提供一適當的磁性負載。在適當的負載之情況下，一足夠的力係被施加在一細胞上，致使能達成單離，即使是在一介質中，其和被適度稀釋的全血液一樣具有黏度。正如所指出的，低於約 200 奈米的膠態磁性材料將展現布朗運動，其顯著地加強他們的能力而與罕見細胞相互碰撞並磁性標示該等罕見細胞。此係被證明於美國專利第 5,541,072 號中，其中描述非常有效率的腫瘤細胞沖洗(prging)實驗的結果係使用具有一平均直徑 100 nm 的膠態磁性粒子或鐵磁流體。同樣重要的是，具有等於或小於此大小範圍的粒子大小之膠態材料一般並不與細胞的檢驗相干擾。如此被擷取的細胞可藉由流動式細胞測量術、雷射掃描顯微術或使用可見或螢光技術的顯微術來進行檢驗。

【發明內容】

本發明提供一快速且有效率的篩檢方法，該方法不但用於腫瘤細胞的特性化，而且還能用於罕見細胞或來自生物試樣的其他生物實體。本發明的方法提供高靈敏度的分析技術，該等技術允許對研究中的實體

進行有效率的富集(enrichment)。此在分析之前消除大量碎屑與其他干擾物質的同時確保目標生物實體之富集的二階段研究方法，可以供試樣大小的檢驗之用，要不然將為不能實行的。在此所描述的方法將具多參數流動式細胞儀、顯微鏡以及免疫細胞化學分析的免疫磁性富集元件合併成一唯一方式。亦可運用其他富集方式（諸如，密度梯度離心、或藉由適當標示之目標細胞密度的平移(panning)或變化(alteration)）。根據一較佳實施例，本發明的方法能夠測定用於癌症分期、監控以及篩檢的全血液。測定的靈敏度特性有助於檢測殘留疾病，因此使其能夠監控癌症復發。

本發明將一方法引入以將不同的抗體接合至相同的鐵磁流體。關於鐵磁流體欲結合的抗原，如此具有使鐵磁流體雙重、三重或多專一性的效果。呈現在相同的鐵磁流體上的多重抗體並非看來像是阻塞，或相反，與彼此相干擾。此等鐵磁流體具有能夠特定地結合一個以上細胞類型、捕捉 CTCs 的能力之高度想要的效果，該等 CTCs 具有低 EpCAM 表現，但具有標記其他腫瘤的高表現。

在本發明的一實施例中，包含一混合細胞群體的一生物檢體係從一病人所獲得，該混合細胞群體疑似含有研究中的罕見細胞。然後，製備一免疫磁性試樣，其係藉由將生物檢體與下列混合：(i)磁性粒子，其係同一生物專一性配位子耦合，該配位子與一罕見細胞

決定因素或不同於在血細胞上所發現之一決定因素的類別特定地反應，至其他試樣成分的實質排除以及(ii)至少一生物專一性試劑，該試劑標示罕見細胞。所產生的免疫磁性試樣接受一磁場，該磁場能有效地將試樣分離成一未經標示的部分以及一經標示的磁性部分，該經標示的磁性部分包括研究中的罕見細胞，即使有也很少存在於檢體中。如此被單離的細胞群體接著被分析以確定罕見細胞的存在與數目。在一較佳的實施例中，在此方法中所使用的粒子為膠態奈米粒子。

本發明可以在胰腺癌病人中執行經改良的 CTCs 檢測。使用多專一性捕捉以及檢測試劑以檢測先前在病人血液中未被檢測到的循環癌細胞，而不是只有抗 EpCAM 試劑、多專一性試劑，諸如，但不被局限於連同其他辨識在 CTCs 上不同抗原之抗體被用作對照組的抗 EpCAM。捕捉試劑係被稱為多專一性捕捉試劑，因為它能夠辨識出抗原。結果，CTC 捕捉並非僅僅取決於 EpCAM 抗原，而且，即使 EpCAM 抗原並不被表示，只要其他用於捕捉而被選擇的抗原係存在於 CTCs 上，就能捕捉到 CTCs。隨著使用合適的抗體專一性檢測雞尾酒，產生具有足夠結合能力、低非專一性結合以及無抗體的交叉阻斷之多專一性鐵磁流體的能力，可捕捉所有各種類型的 CTCs。在本發明中，專用於 CTCs 的抗體之雞尾酒，而不是單一抗體，係被接合至用於捕捉的鐵磁流體，以便將單一目標的 CTC 捕捉依

賴性減至最小。並且，用於檢測之額外抗體係被用以覆蓋更廣範圍的抗原。雖然本發明描述循環腫瘤細胞的領域，但是在血液中，仍可考慮其他形式的罕見細胞分

【實施方式】

根據一較佳實施例，本發明提供用以從運用多專一性鐵磁流體的生物試樣快速有效地單離出罕見目標生物實體之組成、方法與套組。所描述的方法可有效地用來單離及特性化存在於血液試樣中的腫瘤細胞，而同時將非特定地結合的細胞之選擇減至最小。

使用本文所述的多重捕捉以及偵檢試劑，從先前所使用的單一目標分子進一步改良罕見細胞測定。此改良增進罕見細胞的捕捉與偵檢，諸如但不被局限於胰臟 CTCs。此外，非上皮的標記（諸如，間葉活動標記(n-鈣黏素))可與上皮的標記協力而被用以捕捉上皮腫瘤細胞與間葉腫瘤細胞二者。本發明允許不同群體的罕見細胞（諸如，CTCs）和不同群體的腫瘤細胞之同步偵檢。

在此所用的術語「目標生物實體」係指多種具有生物或醫學利益的材料。實例包括荷爾蒙、蛋白質、胜肽、凝集素、寡核苷酸、藥劑、化學物質、核酸分子（例如，RNA 及/或 DNA）以及生物性顆粒分析物，該等分析物包括生物粒子（諸如，細胞、病毒、細菌

以及諸如此類)。在本發明的一較佳實施例中，可有效地使用本發明的組成、方法與套組而從非目標細胞及/或其他生物實體中單離出罕見細胞(諸如，在母體循環中的胎兒細胞或循環癌細胞)。術語「生物檢體」包括但不限於，含有細胞的整體、流體、末梢血液、組織均質物、乳頭抽出物以及能自人類主體獲得之任何其他來源的罕見細胞。例示性的一組織均質物可從一乳癌病人中的乳癌腋下前哨淋巴腺(sentinel node)獲得。術語「決定因素」，當被使用時是與任何前面提到的目標生物實體有關，其可藉由生物專一性配位子或一生物專一性試劑而被特定地結合，而且是指目標生物實體的部分，該部分被捲入且導致對一專一性結合物質產生選擇性結合，其存在為發生選擇性結合所需要的。基本來說，決定因素為在目標生物實體上的分子接觸區域，其等為藉由在專一性結合對反應中的受體所辨識。在此所使用的術語「專一性結合對」，包括抗原-抗體、受體-荷爾蒙、受體-配位子、促效劑-拮抗劑、凝集素-碳水化合物、核酸(RNA或DNA)雜交序列、Fc受體或小老鼠IgG-蛋白質A、抗生物素蛋白-生物素、鏈黴抗生物素蛋白-生物素以及病毒-受體交互作用。在執行本發明的方法時，可以構思出決定因素-專一性結合物質之各種組合，這些對熟悉此項技藝者來說是顯而易知的。在此所使用的術語「抗體」包括：免疫球蛋白、單株或多株抗體、免疫反應免疫球

蛋白片段以及單鏈抗體。亦被構思出能用於本發明的還有胜肽、寡核苷酸或其等之一組合，其以類似於傳統製成的抗體的專一性而能夠特定地辨識出決定因素。在此使用的術語「可檢測地標示」係指的任何物質，其能夠直接或間接地藉由物理或化學方式予以偵檢或測定，此為檢驗試樣中目標生物實體存在的徵兆。有用的可檢測標示之代表性實例包括但不被局限於以下：直接或間接地基於光的吸收率、螢光、反射率、光散射、磷光或發光性質可檢測出的分子或離子；藉由其等之放射性性質可檢測出的分子或離子；藉由其等之核磁共振或順磁性質可檢測出的分子或離子。包括在間接地基於，舉例來說，光的吸收率或螢光可檢測出的分子群組之中者為使受質適當的，舉例來說，從非光吸收性轉換成光吸收性分子或從非螢光轉換成螢光分子之各種酵素。片語「實質排除」指的是在生物專一性配位子或生物專一性試劑與其之對應目標決定因素之間的結合反應的專一性。生物專一性配位子以及試劑對他們的目標決定因素具有專一性結合活性，而亦可展現對其他試樣成分之一低位準非專一性結合。在此所使用的術語「初期癌症」係指那些已經被臨床上診斷為侷限在器官內的癌症。亦包括太小而不能用習知方法（諸如，用於乳癌病人的乳房攝影術或用於肺癌病人的 x 射線）檢測出的腫瘤。在此所使用的術語「富集」係指自一生物試樣之單核細胞的

富集。在末梢血液被用作起始材料的情況下，當評估富集程度時，並不計數紅血球。供實行本發明的較佳磁性粒子為表現成膠體的粒子。此等粒子的特徵在於其一般小於約 200 奈米 (nm) (0.20 微米) 的次微米粒子大小，以及其歷經一段延長時間從溶液的重力分離之安定性。除許多其他優勢以外，還有，此大小範圍使其在細胞分析所運用的分析技術中幾乎是觀察不到的。在 90-150 nm 範圍內且具有介於 70-90% 磁質量的粒子，亦被預期可用於本發明。適合的磁性粒子是由被分子圍著的超順磁性材料之一結晶核心組成，該等分子係被結合，例如被物理吸附或被共價連接至磁心且給予安定膠態性質。最好是以一量來施加塗覆材料，此量能有效防止在試樣中所發現的生物巨分子與磁心之間產生非特定作用力。此等生物巨分子可包括在非目標細胞、凝集素、醣蛋白以及其他膜組分表面上的唾液酸殘留物。此外，該材料應含有儘可能多的磁質量/奈米粒子。包含核心之磁性結晶的大小為足夠小到不含有一完整的磁域。奈米粒子的尺寸小到足使其布朗能量超過其磁矩。因此，北極、南極對準以及接著發生之這些膠態磁性粒子的相互吸引/排斥，看來並不像是發生，即使是在影響其等之溶液安定性之適度的強磁場中。最後，磁性粒子應該可以在高磁力梯度外場分離器中分離。該特性有助於試樣處理且提供比裝滿鐵磁珠或鋼絲絨的更複雜內梯度管柱更好

的經濟優勢。具有上述性質的磁性粒子可藉由在美國專利第 4,795,698 號、第 5,597,531 號以及第 5,698,271 號中所描述之基材的修改而製備。其等製備所運用的基材係描述於下。

要注意的是，可以使用不同的細胞分析平台以識別與計數經富集的試樣。此分析平台的實例為細胞監視者 (CellSpotter) 系統、用於細胞手動觀察的磁性細胞固定器、CellTracks 系統、以及在美國專利申請案第 08/931,067 號與第 08/867,009 號中分別描述的自動光學掃瞄磁性細胞固定器。前面所提到的美國專利申請案二者係在此併入作為揭示用於手動或自動定量的與定性的細胞分析之各自的設備及方法之參考。

其他分析平台包括雷射掃瞄細胞儀 (Compucyte)、基於明視野的影像分析 (Chromavision)、以及毛細管體積測定法 (Biometric imaging)。

使用本發明的方法和組成在血液中循環上皮細胞的計算係藉由自血液之上皮細胞的免疫磁性選擇 (富集)，接著是藉由多參數流動式細胞測量術之試樣的分析而達成。免疫磁性試樣製備對降低試樣體積以及獲得一目標 (上皮) 細胞的 10^4 倍為重要的。用於多參數流動式細胞儀分析的試劑係被最佳化，致使目標細胞係位於多維空間內之一獨特的位置中，該多維空間係藉二種光散射以及三種螢光參數的列表模態收取所

產生。這些包括 1) 對抗沉白血球抗原的一抗體，CD45 以識別白血球（非腫瘤細胞）；2) 對核酸染料專一的細胞類型，其容許把殘餘的紅血球、血小板以及其他非有核現象除外；以及 3) 一生物專一性試劑或直接對抗細胞角質蛋白的抗體或一對一 EpCAM 抗原決定區具有專一性的抗體，其不同於向來免疫磁性選擇細胞者。

捕捉目標：

基於具組織培養腫瘤細胞的初期測驗來選擇用於捕捉的抗體。策略為選擇細胞株的一交叉部份，該等細胞株代表各種分化狀態，因為表現程度根據分化狀態而改變。數據暗示大多數原發處細胞株為分化不良，而腹水和轉移衍生細胞株為中高分化。因此，BxPC3(中)、Panc-1(低)、CAPAN-1(高)以及 CAPAN-2(高)腫瘤細胞係對基於分化狀態的抗體評價而被選擇。EpCAM、黏蛋白 1、間皮素、Claudin-4、EGFR1 以及 CEACAM6 係被確定為用於捕捉抗原的目標。流動式細胞測量術分析策略係被使用以確定抗原表現程度以及正細胞的群體數目之百分率。所有在此研究中所使用的抗體為初級抗體，且使用被接合至螢光染料的抗小鼠二級抗體來監控染色。圖 1 (A)顯示具各種標記之細胞的染色強度，該等標記指出表現程度。圖 1 (B)顯示具標記之正細胞的百分率。

在圖 1 中的數據顯示所有經篩檢的目標係存在細胞株上，對各別目標具不同表現程度且對所有被測驗的細胞株，表現程度並非一致。數據暗示抗原表現在細胞株上有所不同，指出抗原類似於組織培養腫瘤細胞亦可能在 CTCs 方面不同。分析揭示 EpCAM、Claudin-4、EGFR1 以及在某種程度上，黏蛋白-1 在所有細胞株上係被廣布地表示。抗原係以平均 65% 至 100% 細胞群體加以表示。為此，使用多重捕捉目標以涵蓋大範圍的腫瘤細胞，這一點對於有效捕捉來說是很重要的。而且，這些標記對腫瘤細胞來說應為專一的，且不應存在於白血球上。候選捕捉抗體係以白血球進行測試。除 CEACAM6 之外，大部分標記係在白血球上被表示成低位準，CEACAM6 看來似乎在粒狀白血球中為高盛行率的且在單核白血球中至一較低程度。此結果將排除使用 CEACAM6 作為對此測定之一捕捉目標。基於以上數據，EpCAM、黏蛋白 1、間皮素、Claudin-4 以及 EGFR 抗原對腫瘤細胞的捕捉為良好的目標。

偵檢目標：

用於各種標記的抗體係針對腫瘤細胞的偵檢而進行測驗。被測驗的標記為細胞角質蛋白 7、8、17、18、19 以及 c-Src。這些標記係在 2 ug/ml 的濃度藉由流動式細胞測量術且在所有四種細胞株上進行測驗。圖 2(A)

以及圖 2(B)概述出這些結果。細胞角質蛋白家族係被廣布地表示在所有細胞株中（對至少該等目標之一者，79%至 100%群體為正的）。c-Src 家族亦被表示在所有細胞株中，其以不同表現程度（66%至 100%正群體）進行測試。全面地，所有細胞角質蛋白抗體與可比較的染色型式及結果一起產生同樣好的作用。自 R&D 系統的 c-Src 似乎是一弱的黏合劑且並不十分亮，這一點可能是由於被用作一檢測劑且接有 FITC 的二級抗體之緣故。然而，抗細胞角質蛋白 17 以及抗-c-Src 在白血球（單核白血球以及粒狀白血球）上為正。基於此數據，細胞角質蛋白 7、8、18 以及 19 係被選擇以用作雞尾酒偵檢抗體。

捕捉目標至鐵磁流體的結合作用：

根據對胰腺組織培養腫瘤細胞株的一初期評價，選擇抗-EpCAM、抗-EGFR1、抗-Muc1 以及抗-Claudin4 以用於捕捉。最多三種抗體係以使用 Veridex 的數種組合而被接合至鐵磁流體。LLC 共軛化學以及組合如下：

A. 抗-EpCAM/EGFR1/Muc1 多專一性鐵磁流體

B. 抗-EpCAM/EGFR1/Claudin4 多專一性鐵磁流體

C. 抗-EpCAM/Muc1/Claudin4 多專一性鐵磁流體

抗-EpCAM 抗體係被使用於所有組合中。

偵檢目標至藻紅素(PE)的結合作用：

抗細胞角質蛋白（辨識細胞角質蛋白 8 和 18 的 C11 抗體）、抗細胞角質蛋白 7、抗細胞角質蛋白 18 以及抗細胞角質蛋白 19 係使用 Veridex LLC 標準共軛化學而被接合至 PE。所有被接合至 PE 的細胞角質蛋白抗體係與抗-CD45-APC 結合以產生一雞尾酒染色試劑。

經富集的腫瘤細胞群體之分析方法將取決於本發明的意圖用途，這一點為熟悉此項技藝者所能知悉。例如，在對癌症的篩檢或對疾病復發的監控中，如在下文所描述的，循環上皮細胞的數目可為十分低的。既然是那樣，基於顯微鏡的分析可證明為最準確的。此檢驗亦可包括形態學、已知腫瘤標記之鑑定及/或致癌基因的檢驗。作為另一替代方式，在疾病狀態中，其中，循環上皮細胞的數目遠超過在常態群體中所觀察到的，計算此等細胞數目的一分析方法應為足夠。根據在此所描述的方法，根據存在於常態群體中之循環罕見細胞數目的一統計平均值而確定出病人的狀態。如本文所述，初期癌症病人中以及在具攻擊性的轉移性癌症病人中之循環上皮細胞的位準亦可利用統計方式加以確定。

如以上所述，為了從全血液富集腫瘤細胞，套組從試劑、裝置以及研究方法開始。套組將含有試劑以對在一血液試樣中的乳癌細胞測驗，其將評估六種因子或指示劑。分析平台需要被建構成能夠藉由濾光片

的適當激發及發射而區別出報導分子 DAPI、CY2、CY3、CY3.5、CY5 以及 CY5.5 將。在這個實例的分析平台使用一螢光顯微鏡，該螢光顯微鏡具有一汞弧燈以及用以評估所使用偵檢標示的波長之適當的濾光片組。以此方法同時導入所有的標記。

本發明對細胞搜尋上皮細胞套組 (Veridex, LLC) 加以改良。數種多專一性鐵磁流體以及雞尾酒偵檢試劑的組合係被包括在本發明中以產生各種套組組態。主要的改良係被併入捕捉以及偵檢試劑成分。不同的套組組態如下：

1. 套組#1 作為對照組之細胞搜尋上皮細胞套組：用於捕捉之 EpCAM；用於偵檢之 C11 (CK8, 18) 以及 CK 19。
2. 套組#2 多重捕捉以及雞尾酒偵檢：用於捕捉之 EpCAM/EGFR/Muc-1 (E29)；用於偵檢之 C11 (CK8, 18) + CK19 + CD7 + CD18。
3. 套組#3 多重捕捉以及雞尾酒偵檢：用於捕捉之 EpCAM/EGFR/Claudin4；用於偵檢之 C11 (CK8, 18) + CK19 + CK7 + CK18。
4. 多重捕捉以及雞尾酒偵檢：用於捕捉之 EpCAM/Muc-1 (E29) /Claudin4；用於偵檢之 C11 (CK8, 18) + CK19 + CK7 + CK18。

不同套組組態的評價

上述套組組態首先係以正常血液試樣進行評估，該等試樣係被添加以組織培養胰腺腫瘤細胞以確認其等之表現。胰腺腫瘤細胞(BxPC3 與 CAPAN-1 細胞株)係被添加至 7.5 mls CellSave 予體血液中 (n=2)。試樣係在 CellTracks AutoPrep 上被處理且在 CellTracks Analyzer II 上被分析。

運用修改過的套組來回收加標 Capan-1 細胞，係類似於運用標準型上皮細胞套組 (大約 60%)，然而，運用修改過的套組之二種變型來回收 BxPC3 細胞一直比較高 (大約 90%) (圖 3a 以及 3b)。

四種套組組態係以自正常健康予體以及轉移性胰腺癌病人的血液試樣進行評估。此評價的結果係被顯示於表 1 與 2 中。初步數據顯示 CTC 回收率，與標準型上皮細胞套組 1 相比，在使用修改過的套組之所有變型的臨床試樣中為較高的 (表 1)。使用修改過的套組 (表 2)，並未從正常健康予體試樣中檢測到 CTCs。

表 1：

試樣 ID	CTCs			
	套組 1	套組 2	套組 3	套組 4
S-2	0	3	2	0
S-3	1	1	1	2
S-4	0	1	1	0
S-5	0	0	0	2
S-6	2	5	2	1
S-7	0	0	0	0

S-8	0	1	1	1
S-9	2	8	15	6

表 2：

試樣 ID	CTCs			
	套組 1	套組 2	套組 3	套組 4
476	0	0	0	0
481	0	1	0	0
482	0	0	0	0
483	0	0	0	0
490	0	0	0	0
492	1	0	0	0

可使用本發明的組成、方法以及套組而檢測不同類型癌症的實例，包括：胺前體攝取與脫羧細胞瘤、迷芽瘤、鰓原瘤、惡性類癌症候群、類癌心臟病、惡性腫瘤（例如，Walker、基底細胞癌、嗜鹼性鱗狀癌、布朗-皮西二氏上皮癌、腺管癌、艾利希氏瘤、原位癌、Krebs 2、默克細胞癌、黏液性腺癌、非小細胞肺癌、燕麥細胞癌、乳突癌、硬癌、支氣管癌、支氣管源癌、鱗狀上皮細胞瘤以及網狀內皮增殖病移行細胞癌）、黑色素瘤、軟骨胚細胞瘤、軟骨癌、軟骨肉瘤、纖維瘤、纖維肉瘤(fibrosarcoma)、巨細胞瘤、組織細胞瘤、脂肪瘤、脂肉瘤(liposarcoma)、中皮瘤、黏液瘤、黏液肉瘤(myxosarcoma)、骨瘤、骨肉瘤、依汶氏肉瘤、滑液膜瘤、腺纖維瘤、淋巴結瘤、癌肉瘤、脊索瘤、間質腫

瘤、中腎瘤、肌肉瘤(myosarcoma)、成釉細胞瘤、齒
莖質瘤、齒瘤、畸胎瘤、滋養層細胞腫瘤、腺癌、腺
瘤、膽管瘤、膽硬脂瘤、圓柱瘤、囊腺癌、膀胱腺瘤、
顆粒層細胞瘤、半陰陽胚細胞瘤、肝腫瘤、汗腺瘤、
胰島細胞腫瘤、雷迪格細胞瘤、乳頭狀瘤、史脫力細
胞瘤、鞘細胞瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤
(leiomyosarcoma)、肌胚細胞瘤、肌瘤、肌肉瘤
(myosarcoma)、橫紋肌瘤、橫紋肌肉瘤
(rhabdomyosarcoma)、室管膜瘤、神經節細胞瘤、神經
膠質瘤、神經管胚細胞瘤、腦脊髓膜瘤、神經鞘瘤、
神經胚細胞瘤、神經上皮細胞瘤、神經纖維瘤、神經
瘤、副神經節瘤、非嗜鉻性副神經節瘤、血管角質瘤、
硬化性血管瘤、血管瘤病、球塊狀血管瘤、血管內皮
瘤、血管瘤、血管外皮細胞瘤、血管肉瘤
(hemangiosarcoma)、淋巴管瘤、lymphangiomyoma、
淋巴管腫瘤(lymphangiosarcoma)、松果體瘤、癌肉瘤、
軟骨肉瘤、葉狀囊性腫瘤、纖維肉瘤(fibrosarcoma)、
血管肉瘤(hemangiosarcoma)、平滑肌肉瘤
(leiomyosarcoma)、白血病性肉瘤、脂肉瘤
(liposarcoma)、淋巴管腫瘤(lymphangiosarcoma)、肌肉
瘤(myosarcoma)、黏液肉瘤(myxosarcoma)、卵巢癌、
橫紋肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)、(卡波西氏以及肥胖
細胞)肉瘤、腫瘤(例如，骨、消化系統、大腸直腸、
肝、胰臟、腦下垂體、睪丸、眼窩、頭頸、中樞神經

系統、聽、骨盆、呼吸道以及泌尿生殖)、神經纖維瘤病以及子宮頸發育不良。

本發明並不局限於循環上皮細胞的偵檢。已經在具有心肌梗塞的病人血液中觀察到內皮細胞。內皮細胞、心肌細胞以及經病毒感染之細胞，類似上皮細胞，具有為有效(available)單株抗體所辨識的細胞類型專一性決定因素。因此，本發明的方法與套組可適用於檢測此等循環內皮細胞。另外，本發明可以供裝載於具傳染病之病人末梢血液中之細菌細胞的偵檢之用，其亦可使用本發明的組成、方法與套組而被評估。

在上文中引用了一些期刊文獻、美國專利以及美國專利申請案。前述引用之各別主題係被併入本發明說明書中作為參考，如同全文在此陳述。

雖然已經在本文中描述並特定地例示本發明的一些較佳實施例，但並非意圖將本發明局限於此等實施例而已。在不背離本發明的發明精神下仍可進行多種修改，本發明的全部範疇係被描繪於以下的申請專利範圍內。

【圖式簡單說明】

圖 1 (A)顯示在細胞表面上目標抗原表現與四種胰臟腫瘤細胞株的染色強度之函數關係。所有的抗體係在 2 ug/ml (n=2) 被測驗。(B)顯示對目標抗原表現之四種細胞株的平均正群體百分率。

圖 2 (A)顯示細胞內目標抗原表現與四種胰臟腫瘤細胞株的染色強度之函數關係。(B)顯示對目標抗原表現現之四種細胞株的平均正群體百分率。

圖 3 (A)顯示具不同套組組態之加標 CAPAN1 腫瘤細胞的回收。(B)顯示具不同套組組態之加標 BxPC3 腫瘤細胞的回收。

【主要元件符號說明】

七、申請專利範圍：

1. 一種用於在一混合細胞群體中檢測並計數罕見細胞的方法，在該群體中存在有該等罕見細胞為一疾病狀態的徵兆，該方法包含：
 - a) 自一試驗主體獲得一生物檢體，該檢體包含一疑似含有該等罕見細胞之混合細胞群體；
 - b) 製備一免疫磁性試樣，其中該生物檢體係與包含磁性粒子之多專一性鐵磁流體混合，該磁性粒子係與選自由抗-EpCAM、抗-EGFR1、抗-Muc1 及抗-Claudin4 組成的群組之多專一性配位子耦合，該多專一性配位子與該等罕見細胞特定地反應，至其他試樣成分的實質排除；
 - c) 將該免疫磁性試樣與至少一多專一性試劑相接觸，該試劑標示該等罕見細胞；以及
 - d) 分析該等經標示的罕見細胞，以確定在該免疫磁性試樣中之任何罕見細胞的存在與數目，存在於該試樣中之罕見細胞的數目愈大，該疾病狀態的嚴重性愈大。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中作為在免疫磁性試樣的製備與將該免疫磁性試樣與至少一多專一性試劑相接觸之間的一中間步驟，該免疫磁性試樣接受一磁場以產生作為該免疫磁性試樣之一罕見細胞經富集的細胞懸浮液。

3. 如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中含有該經富集的罕見細胞之該免疫磁性試樣的體積係被減小。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中在分析之前，該免疫磁性試樣係被分離成一含經標示的罕見細胞之部分以及一未經標示的部分。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之方法，其中該磁性粒子為膠態，且藉由將該免疫磁性試樣接受一磁場梯度而達成分離。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該罕見細胞係選自內皮細胞、在母體循環中的胎兒細胞、細菌細胞、心肌細胞、上皮細胞以及經病毒感染之細胞所組成之群組。
7. 一種用於在一混合細胞群體中檢測以及計數癌細胞之方法，該方法包含：
 - a) 自一試驗主體獲得一生物檢體，該檢體包含一疑似含有該等癌細胞之混合細胞群體；
 - b) 製備一免疫磁性試樣，其中該生物檢體係與包含磁性粒子之多專一性鐵磁流體混合，該磁性粒子係與選自由抗-EpCAM、抗-EGFR1、抗-Muc1 及抗-Claudin4 組成的群組之多專一性配位子耦合，該多專一性配位

子與該等癌細胞特定地反應，至其他試樣成分的實質排除；

c) 將該免疫磁性試樣與至少一多專一性試劑相接觸，該試劑標示該等癌細胞；以及

d) 分析該等經標示的癌細胞，以確定在該免疫磁性試樣中之任何癌細胞的存在與數目，存在於該試樣中之癌細胞的數目愈大，該癌症的嚴重性愈大。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該磁性粒子為膠態，且在分析之前，該免疫磁性試樣係被分離成一含經標示的癌細胞之部分以及一未經標示的部分。

9. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該膠態磁性粒子以及該至少一多專一性試劑依序與該生物檢體混合，且作為一中間步驟，該免疫磁性試樣接受一磁場以產生作為該免疫磁性試樣之一癌細胞經富集的細胞懸浮液。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中在分析之前，該免疫磁性試樣係被分離成一含經標示的癌細胞之部分以及一未經標示的部分。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該含經標示的癌細胞之部分係藉由從多參數流動式細胞測量術、免疫螢光顯微鏡、雷射掃描細胞測量術、基於明視野的影

像分析、毛細管體積測定法、光譜影像分析、手動細胞分析以及自動細胞分析所組成之群組中所挑選出來的一方法加以分析。

12. 一種用於針對循環罕見細胞存在篩檢病人試樣的檢驗套組，該套組包含：
 - a) 經塗覆之磁性奈米粒子，其包含一磁心材料、一蛋白質基質塗覆材料、及三種選自由抗-EpCAM、抗-EGFR1、抗-Muc1 及抗-Claudin4 組成的群組之抗體，其中該等抗體之一個係為抗-EpCAM，該等抗體係與該基質塗覆材料直接或間接地耦合；
 - b) 至少一抗體，其對該罕見細胞之一第二特性決定因素具有結合專一性；以及
 - c) 一細胞專一性染料，用於自分析排除不是該等罕見細胞的試樣成分。
13. 如申請專利範圍第 12 項所述之套組，該套組進一步含有一對非目標細胞具有結合親和力之抗體、一生物緩衝液、一通透性緩衝液、一實驗步驟、及選擇性的一資料表。
14. 如申請專利範圍第 12 項所述之套組，其中該等罕見細胞係選自內皮細胞、在母體循環中的胎兒細胞、細菌細

胞、心肌細胞、上皮細胞以及經病毒感染之細胞所組成之群組。

15. 一種用於針對循環腫瘤細胞存在篩檢病人試樣的套組，該套組包含：

- a) 經塗覆之磁性奈米粒子，其包含一磁心材料、一蛋白質基質塗覆材料、及與該基質塗覆材料直接或間接地耦合之三種抗體，其中該等三種抗體為(a)抗-EpCAM、抗-EGFR1 及抗-Muc1；(b)抗-EpCAM、抗-EGFR1 及抗-Claudin4；或(c)抗-EpCAM、抗-Muc1 及抗-Claudin4；
- b) 至少一抗體，其對一癌細胞決定因素具有結合專一性；以及
- c) 一細胞專一性染料，用於自分析排除不是該等腫瘤細胞的試樣成分。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之套組，該套組進一步含有一對非腫瘤細胞具有結合親和力之抗體、一生物緩衝液、一通透性緩衝液、一實驗步驟、及選擇性的一資料表。