



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102782498 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201080057853. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 10. 20

G01N 33/574 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/253, 787 2009. 10. 21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/053431 2010. 10. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02011/050103 EN 2011. 04. 28

(71) 申请人 斯克里普斯研究所

地址 美国加利福尼亚州

申请人 EPIC 科学公司

(72) 发明人 P·昆 A·考拉特卡 J·坤肯

D·马里努茨 X·杨

J·R·史图尔普纳格

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

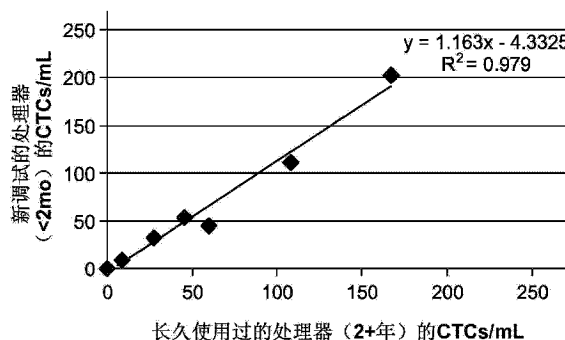
权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用非稀有细胞检测稀有细胞的方法

(57) 摘要

本发明提供了开创性的计算方法,其利用非稀有细胞数据来检测稀有细胞,如循环肿瘤细胞(CTC)。本发明可用于 CTC 检测的两个不同阶段:第一是作出关于数据收集参数的决定,第二是在数据缩减和分析中作出决定。此外,本发明在作出决定的过程中利用一维和 multidimensional 参数化的数据。



1. 检测个体样本中的细胞的方法,包括:
 - a) 提供怀疑具有至少一种稀有细胞和至少一种以所述稀有细胞浓度的至少 10 倍的浓度存在的细胞的样本;
 - b) 使所述样本与至少一种可检测剂接触;
 - c) 对(b)所述样本进行细胞成像,生成细胞图像;和
 - d) 通过由(c)所述图像分析所述细胞,相对于所述样本中的其他细胞检测所述至少一种稀有细胞,从而检测所述样本中的所述稀有细胞。
2. 权利要求 1 所述的方法,进一步包括(a'),其中将所述至少一种稀有细胞和至少一种非稀有细胞附于玻片。
3. 权利要求 1 所述的方法,其中(d)在包括用于进行所述分析的可执行代码的计算机中进行。
4. 权利要求 3 所述的方法,进一步包括(e),其中(d)的结果呈现于图形用户界面。
5. 权利要求 1 所述的方法,其中(c)所述细胞成像进一步包括优化所述至少一种可检测剂的曝光限值。
6. 权利要求 5 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂的曝光限值是利用至少一种非稀有的信号确定的。
7. 权利要求 5 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂结合细胞标记,并选自阳性标记、阴性标记、核标记、含量标记及其任意组合。
8. 权利要求 5 所述的方法,其中在生成所述图像前优化所述曝光限值。
9. 权利要求 5 所述的方法,其中在生成所述图像后优化所述曝光限值。
10. 权利要求 5 所述的方法,进一步包括(c'),其中所述样本在进行(d)前再次成像。
11. 权利要求 1 所述的方法,其中(c)所述细胞成像进一步包括优化曝光时间以减少数据收集时间。
12. 权利要求 1 所述的方法,其中利用来自所述至少一种细胞的信号来确定性质对照参数。
13. 权利要求 12 所述的方法,其中所述性质对照参数是至少一种细胞在所述玻片上的分布。
14. 权利要求 12 所述的方法,其中所述性质对照参数是多细胞图像的比对。
15. 权利要求 14 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂是阴性标记和核标记,并且通过将各自存在于不同图像的所述核标记的信号与所述阴性标记的信号进行比对来确定所述比对。
16. 权利要求 12 所述的方法,其中所述性质对照参数是细胞染色性质。
17. 权利要求 16 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂是阴性标记和核标记,并且通过计算所述阴性标记的信号与所述核标记的信号的比来确定所述细胞染色性质。
18. 权利要求 17 所述的方法,其中所述比低于 1.2。
19. 权利要求 12 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂是阴性标记,并且所述性质对照参数是所述阴性标记在整个所述非稀有细胞中的分布。
20. 权利要求 19 所述的方法,其中利用平均值、标准偏差、变异系数或其任意组合而计算所述分布。

21. 权利要求 12 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂是阳性标记,并且所述性质对照参数是所述阳性标记在整个所述非稀有细胞中的分布。

22. 权利要求 21 所述的方法,其中利用平均值、标准偏差、变异系数或其任意组合而计算所述分布。

23. 权利要求 12 所述的方法,其中所述性质对照参数是细胞损失。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂是核标记或阴性标记,并且通过计算所述核标记的信号或所述阴性标记的信号与所述玻片上非稀有细胞数量的比而确定细胞损失。

25. 权利要求 1 所述的方法,其中(c)所述细胞成像进一步包括优化强度限值以与其他细胞区分稀有细胞。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂是阳性标记,并且利用所述阳性标记背景信号的平均值、标准偏差、变异系数或其任意组合来确定所述强度限值。

27. 权利要求 26 所述的方法,其中所述平均值、标准偏差或变异系数在整个玻片基础上、单个玻片基础上,单个玻片的区域上或其任意组合上确定。

28. 权利要求 25 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂是阳性标记,并且所述强度限值在单个图像内确定,这通过鉴定所述阳性标记的最高信号,并将所述最高信号与由另外的阳性标记的信号计算得到的标准偏差比较进行。

29. 权利要求 26 所述的方法,其中所述强度限值等于 5 至 20 之间的因数乘以所述标准偏差并加到所述平均值。

30. 权利要求 29 所述的方法,其中所述强度限值等于因数 12.5 乘以所述标准偏差并加到所述平均值。

31. 权利要求 30 所述的方法,其中所述强度限值等于因数 15 乘以所述标准偏差并加到所述平均值。

32. 权利要求 29 所述的方法,其中计算各个样本图像的所述强度限值。

33. 权利要求 25 所述的方法,其中所述至少一种可检测剂是阴性标记,并且利用来自非稀有细胞的所述阴性标记的信号的平均值和标准偏差来确定所述阴性标记的所述强度限值。

34. 权利要求 33 所述的方法,其中所述平均值和标准偏差在整个玻片基础上,单个玻片基础上,单个玻片的区域上或其任意组合上确定。

35. 权利要求 1 所述的方法,其中(d)进一步包括测量所述至少一种细胞的细胞大小、至少一种细胞的细胞大小分布或其组合;和将所述至少一种细胞的所述细胞大小或细胞大小分布与已知的细胞大小和分布进行比较。

36. 权利要求 1 所述的方法,其中(d)所述分析进一步包括测量所述至少一种细胞的核大小、所述至少一种细胞的核大小分布、所述至少一种细胞的轮廓型式或其组合;和将所述核大小、核大小分布或轮廓型式与假定的稀有细胞比较以确定所述可疑的稀有细胞是稀有细胞。

37. 权利要求 1 所述的方法,其中(d)所述分析进一步包括确定所述样本所取的所述个体的流体中所述稀有细胞的浓度。

38. 权利要求 1 所述的方法,其中所述可检测剂是含量标记,并且(d)所述分析进一步

包括确定所述含量标记的表达水平。

39. 权利要求 36 所述的方法,其中在所述至少一种稀有细胞和所述至少一种细胞中确定所述含量标记的表达水平,并与患者群的所述含量标记的表达水平进行比较。

40. 权利要求 1 所述的方法,其中所述稀有细胞是循环肿瘤细胞(CTC)。

41. 权利要求 40 所述的方法,其中所述 CTC 表达阳性标记,具有完整的核,并在形态上区别于正常 WBC,其中所述 CTC 对阴性标记不呈阳性。

42. 权利要求 41 所述的方法,其中所述阳性标记是细胞角蛋白或 EpCAM。

43. 权利要求 41 所述的方法,其中所述阴性标记是 CD45。

44. 权利要求 40 所述的方法,进一步包括向所述个体提供诊断或预后。

45. 权利要求 40 所述的方法,其中已知所述个体患有癌症并正在进行癌症治疗。

46. 权利要求 45 所述的方法,其中所述治疗是化学治疗。

47. 权利要求 46 所述的方法,其中利用含量标记来确定化学治疗剂。

48. 权利要求 44 所述的方法,其中给予所述个体候选剂。

49. 权利要求 44 所述的方法,进一步包括确定所述个体对所述癌症治疗的响应。

50. 诊断或预后个体癌症的方法,包括:

a) 实施权利要求 40 所述的方法;和

b) 分析检测到的 CTC 以提供诊断或预后,从而诊断或预后个体癌症。

51. 确定个体对治疗方案响应的的方法,包括:

a) 实施权利要求 40 所述的方法;和

b) 分析检测到的 CTC,从而确定所述个体对治疗方案的响应。

52. 权利要求 51 所述的方法,其中所述治疗方案基于 b) 的所述结果而变化。

53. 确定用于临床试验的候选个体的方法,包括:

a) 实施权利要求 40 所述的方法;和

b) 分析检测到的 CTC,从而确定用于临床试验的候选个体。

用非稀有细胞检测稀有细胞的方法

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明总体涉及医学诊断,更具体地涉及稀有细胞如循环肿瘤细胞(CTC)的检测和分类。

[0003] 背景信息

[0004] 未被满足的重要医疗需要存在于在细胞水平上对上皮癌症患者的纵向疾病监测。预测和监测治疗反应和疾病进程鉴于自然病程和对治疗压力反应的选择性选择过程对上皮癌症患者尤为重要。虽然在对第一和转移性肿瘤在其各自微环境中的了解中已有所进展,但在对流体相期间癌症行为的了解中存在重大障碍,因为其遍布于血流中并占据血流。癌症的循环组分其中包含引起未来转移的细胞,因此代表引人注目的研究目标。

[0005] 充分表征此固体肿瘤流体相的临床意义的研究已由于缺少容易获得的和可靠的鉴定 CTC 的实验工具而被阻碍。血液中 CTC 未知的特征和低且未知的频率加上难以区别癌症上皮细胞与正常上皮细胞,已严重阻碍流体相如何可能具有临床重要性的研究。理想的流体相活组织检查应在大多数上皮癌症患者体内发现大量特定 CTC 群,并保留和向病理医师和 / 或研究人员呈现不仅能计数而且能进行进一步分子、形态和 / 或表型分析的形式的 CTC。此外,其应保留其余稀有群,用于进一步分析。

[0006] CTC 一般——虽然并非一定——是以极低的浓度源自固体肿瘤并进入不同类型癌症患者的血流的上皮细胞。CTC 也被认为能够起源于血液中,在整个身体中形成小群落。已存在的肿瘤或转移生成的 CTC 的脱落通常导致第二肿瘤形成。第二肿瘤一般检测不到,并导致全部癌症死亡中的 90%。循环肿瘤细胞提供第一与转移性肿瘤之间的关联。其导致这样的前景:将循环肿瘤细胞的鉴定和表征用于转移性上皮恶性肿瘤的早期检测和治疗处理。癌症患者的 CTC 检测提供在早期诊断第一或第二癌症生长和确定进行癌症治疗的癌症患者的预后中有效的工具,这是因为这种患者血液中的 CTC 的数量和表征已被关联于全部预后和对治疗的反应。因此,CTC 充当临床症状出现前肿瘤扩张或转移的早期指示剂。

[0007] 虽然 CTC 的检测在癌症的处理和治疗中具有重要的预后性和潜在的治疗性意义,但由于其在血流中隐匿的性质,这些稀有细胞不易被检测到。1800 年代首次描述了 CTC,但是仅近期技术进步允许其可靠的检测。循环肿瘤细胞检测中的挑战是其相对于其他有核细胞以相对低的频率存在,通常低于 1:100,000。为弥补该挑战,检测循环肿瘤细胞的大多数常规方法依赖于实验富集方法,由此使 CTC 优先地与其他细胞组分(例如,非 CTC)——最重要的是最近似于 CTC 的其他有核细胞——分离。

[0008] 目前,对于计数 / 表征 CTC 应用最多的阳性富集方法是靶向表面蛋白 EpCAM 和“CTC 芯片”的免疫磁性富集方法。最广泛用于检测 CTC 的方法, J&J's Veridex 技术,利用免疫磁性富集。该技术依赖于肿瘤细胞群的免疫磁性富集,利用连接于结合上皮细胞粘附分子(EpCAM)的抗体的铁磁流体,该上皮细胞粘附分子仅在上皮衍生细胞上表达。该方法需要 7.5mL 血液用于分析,并仅在一些转移性癌症患者中发现 2 个以上 CTC。

[0009] 微流体或“CTC- 芯片”技术,是另一种用于计数 / 表征 CTC 的阳性富集方法。该方法采用 1-3mL 血液,其中全血流经 78,000 个 EpCAM 涂布的微柱 (microposts)。EpCAM+ 细胞粘附于该柱,并随后用细胞角蛋白 CD45 和 DAPI 染色。以该方法,CTC 以相对高的纯度被发现于几乎所有的转移性癌症患者中,而未被发现于健康对照中。此外,CTC- 芯片技术鉴定出所有患者中的 CTC,并且数量上比两个近期出版物所报道的其他技术高约 10 至 100 倍的因数。

[0010] 唯一的常规应用的 CTC 检测技术基于免疫磁性富集。目前“黄金标准”和 FDA 认可的测试被称为 CellSearch®,并且利用免疫磁性富集步骤分离表达上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 的细胞。此外,将被确定为 CTC 的细胞必须包含核,表达细胞质细胞角蛋白,和具有大于 5 微米的直径。该系统已发现计数和监测转移性乳腺癌、前列腺癌和结肠直肠癌患者中 CTC 计数的预后效用;但是,该系统敏感度低,在大多数患者中没有发现或发现极少的 CTC。大多数后续的 CTC 技术已报道较高的敏感度,并继续进行富集策略的改变,但是其使可检测的事件直接偏向于最初富集步骤所选蛋白质充分表达的事件。

[0011] 基于标准化的显微镜的方法在前也已在乳腺癌、结肠直肠癌和肺癌患者的病例研究中被用于鉴定和在形态上表征和检验 (credential) CTC。

[0012] 虽然目前应用多种 CTC 检测方法,但当前的方法已被确定具有显著的限制。例如,阳性选择方法计数 / 表征 CTC 的一个显著限制是阳性物理选择总是导致 CTC 损失,且效率低于 100%。因此,利用当前方法检测到的每个样本的 CTC 数量通常过低,而不能提供对具体样本有力的解释或具有临床意义的含量。当前方法另外的限制包括由于 CTC 异质性造成的低 CTC 检测。例如,目标 CTC 群中的各个 CTC 特征的差异进一步阻碍利用当前方法检测到的 CTC 数量。这种差异可包括各个 CTC 之间的大小变化,和用于检测 CTC 的细胞表面标记的各个 CTC 之间可变或下调的表达。现有方法的进一步限制包括纯度水平和可变纯度的限制。任何富集均将具有特定数量的假阳性,例如粘附于富集体的其他有核血液细胞。例如,Veridex 磁体在 5 至 10 个阳性的基础上一般具有 5,000 至 10,000 个假阳性。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明部分基于创新性方法的发现以用于分析样本,以检测、计数和表征稀有细胞,如 CTC。因此,本发明提供用于改良的检测和表征的方法,允许进行具有临床意义的样本分析,用于临床、研究和开发环境。

[0015] 因此,本发明提供用于样本中稀有细胞改良的检测和表征的方法,该方法通过利用样本中非稀有细胞(细胞存在的浓度相对于稀有细胞为 10、50、100、200、300、400、500、1,000、5,000、10,000 倍或更高倍)的数据进行。因此,本发明的方法利用相似性测量方法评估细胞的非相似性,其需要最大距离排除,例如明显是相关非稀有细胞的事件;和细微截止 (cutoff) 差别,基于周围非稀有细胞的相似性。

[0016] 该方法包括提供怀疑具有至少一种稀有细胞和至少一种以稀有细胞浓度的至少 10 倍的浓度存在的细胞的样本;使样本接触至少一种可检测剂,如结合细胞标记的剂;对样本进行细胞成像,以生成图像;和通过从图像分析细胞,相对于样本中的其他细胞检测至少一种稀有细胞,从而检测样本中的稀有细胞。在本发明的多个方面中,该方法进一步包括将可疑的稀有细胞和至少一种细胞铺于固体支持体如玻片上,以促进细胞与可检测剂接触和细胞成像。在本发明的多个方面中,可检测剂是用于染色细胞的任何剂,如结合细胞标记

的剂,包括但不限于,阳性标记、阴性标记、核标记、含量标记或其任意组合。

[0017] 在本发明的多个方面中,本文所述的方法在使含有可检测信号如荧光信号的玻片有效成像的设备上进行。该设备可一般包括具有至少一个具有图像处理能力的系统处理器的计算机、计算机监测器、输入装置、电源和显微镜子系统。因此,该设备包括这样的计算机:具有用于进行实践本发明所需的多种分析的可执行代码。显微镜子系统包括用于获得图像的光学传感阵列。样本移动和焦点调整的二维移动阶段,和多样本分析和储存的输入和输出机制。该设备还可包括透射光源和用于使样本发荧光的照明/荧光激发光源。

[0018] 在本发明的一个实施方式中,该方法包括建立最佳曝光限值,以用于进行细胞成像,该细胞成像促进检测到存在的稀有细胞。一方面,利用来自至少一种细胞的信号确定可检测剂的曝光限值。在多方面,可检测标记可以是阳性标记、阴性标记、核标记或含量标记。在相关方面,可利用与从第一图像获得的细胞和/或可疑的稀有细胞相关的数据设定曝光限值,使玻片再次成像。

[0019] 在另一个实施方式中,该方法包括最小化曝光设置,从而最小化数据收集时间和最大化通量,以促进稀有细胞的检测。

[0020] 在另一个实施方式中,该方法包括利用与非稀有细胞相关的数据以生成促进稀有细胞检测的性质对照参数(quality control parameter)。在多方面,性质对照参数是至少一种非稀有细胞在玻片上的分布、多细胞图像通过比对非稀有细胞标记的比对、细胞染色的质量、阳性标记在全部非稀有细胞中的分布或重复处理的细胞损失。

[0021] 在另一个实施方式中,该方法包括确定强度截止限值,以最小化假阴性和假阳性,和促进稀有细胞检测。一方面,可检测剂是阳性标记,对于阳性标记的背景信号利用平均值、标准偏差、变异系数、其他统计学参数或其任意组合确定强度限值。另一方面,可检测剂是阳性标记,通过鉴定阳性标记的最高信号事件并将最高信号与由事件全部或亚组的信号计算得到的平均值和标准偏差进行比较,在单个图像或该图像的部分中确定强度限值。在再一方面,可检测剂是阴性标记,利用非稀有细胞(全部非稀有细胞或特定亚组)的阴性标记信号的平均值和标准偏差确定阴性标记的强度限值。

[0022] 在另一个实施方式中,非稀有细胞的细胞学特征,如细胞和核大小(绝对的和相对的;整体的和表观的)和分布,被用于促进非稀有细胞的检测。

[0023] 在另一个实施方式中,该方法包括利用与非稀有细胞相关的数据来计数稀有细胞,由此促进其检测。在多个实施方式中,数据可包括但不限于,总强度、平均强度、分段强度、固定圈(fixed circle)、可变圈(variable circle)或其任意组合。

[0024] 在另一个实施方式中,该方法包括确定含量标记在稀有细胞和非稀有细胞中的表达水平,以促进稀有细胞的检测。

[0025] 在本发明的多个方面中,稀有细胞是 CTC 或其亚群。

[0026] 因此,在另一个实施方式中,本发明提供诊断或预后个体中的癌症的方法。该方法包括实施本文所述改良的 CTC 检测和表征的方法,和分析检测到的 CTC;和提供基于 CTC 分析的诊断或预后,从而诊断或预后个体中的癌症。

[0027] 在另一个实施方式中,本发明提供确定个体对治疗方案响应的的方法。该方法包括实施本文所述改良的 CTC 检测和表征的方法和分析 CTC,从而确定个体对治疗方案的响应。

[0028] 在另一个实施方式中,本发明提供确定用于临床试验的候选个体的方法。该方法包括实施本文所述改良的 CTC 检测和表征的方法和分析 CTC,从而确定用于临床试验的候选个体。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1 是平均观测 SKBR3 相对于预期 SKBR3 绘制的图形表示。四等份正常对照血液中被加入不同数量的 SKBR2 细胞,生成 4 个玻片,每个玻片具有约 10、30、100 和 300 个癌细胞。显示每一个的四份平均值和标示标准偏差的误差线。

[0031] 图 2 是一系列癌症患者中发现的 CTC 的代表性亚群的照片表示。该亚群中的各 CTC 为细胞角蛋白阳性,CD45 阴性,包含 DAPI 核,并在形态上区别于圆形的周围血液白细胞。

[0032] 图 3 是对两个单独的处理器之间的 9 个不同的癌症患者样本的 CTC 数量进行比较的图形表示。CTC/mL 数量在 0 至 203 的范围内。

[0033] 图 4 是包括在 3 个月时间过程中取自 4 个不同的前列腺癌患者的连续血液的 CTC 和 PSA 水平的四个绘图的图形表示。2 个患者具有增加的 CTC 和 PSA 水平,2 个患者具有减少 / 稳定的 CTC 和 PSA 水平。具有增加的 CTC 数量的患者的 PSA 水平增加,而具有减少 / 稳定的 CTC 数量的患者的 PSA 水平减少。

[0034] 图 5 是显示假定的稀有细胞群相对于 CTC 亚群(HD-CTC)在患者中的发生率图形表示。

[0035] 发明详述

[0036] 本发明提供省略从混合群阳性富集稀有细胞如 CTC 的物理方法的方法,从而最小化稀有细胞的损失。该方法进一步允许捕获 / 确定细胞群亚组,如 CTC 亚群或其他稀有群,其通过检测相同或不同的标记进行,利用能够区别事件和非事件的不同参数,如截止值(cutoff value)。例如,如本文详述,不同截止可用于表征不同的细胞亚群。

[0037] 虽然本公开着重于 CTC 及其亚群,但同样的方法可用于发现非稀有细胞背景下的任何其他稀有细胞类型。如本文所述,“稀有细胞”意为包括如下的细胞:1) 低于流体样本中有核细胞群总量约 5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01% 或 0.001% 的细胞类型;或 2) 以低于每毫升流体样本中 100 万个细胞存在的细胞类型。示例性稀有细胞包括但不限于 CTC、循环内皮细胞(CEC)、栓子血液白细胞、癌症干细胞、被激活的或被感染的细胞——如被激活的或被感染的血液细胞和胎儿细胞。

[0038] 因此,本领域技术人员要理解的是,整个说明书 CTC 的引用包括对稀有细胞的引用,反之亦然。

[0039] 本方法能够利用显微术、细胞计量术、自动化和计算从其他血液细胞的背景中鉴定出稀有细胞,如 CTC 或 CTC 亚群。本发明利用这些组分——分别地和共同地——来鉴定稀有细胞。益处包括如下能力:发现更多稀有细胞,从而将其以能使随后分析含量标记的形式展示,并以时间和资源高效的方式进行。

[0040] 进一步,本公开部分基于能够鉴定癌症患者 CTC 亚群的后代分析。一个鉴定的具体亚群来自癌症患者小组。除利用限定 CTC 亚群——如一种在本文中被称为高清-CTC(HD-CTC)亚群的 CTC 亚群——的特定参数外,分析方法相比之前的工作对于较少量血液提供较高的敏感度。本分析方法关键的创新性方面来源于对简易性和最低限度处理血液样本的需要,并且满足能以诊断定性成像(diagnostic quality imagery)进行专业解释的需

要。

[0041] 用于鉴定稀有细胞群如 CTC 或其亚群的方法的独特性在于其不依赖于任何一种蛋白质富集策略。所有有核血液细胞均以多种颜色成像,从而定位和在形态上评价稀有事件。此无富集策略导致分析能具有‘可调的特异性/敏感度’,这允许高敏感度和高特异性,同时还能进行对已知异质的稀有细胞群的研究。相对于物理富集关键的优势和差异是一种可‘调节’结果,而物理富集为‘是’或‘否’。本方法另一个关键的优势是一个或多个分析参数可进行鉴定和表征特定的目标群。

[0042] 在描述本组成和方法前,要理解的是,本发明不限于所述具体的组成、方法和实验条件,因为这些组成、方法和条件可改变。还要理解的是,本文所用命名方法的目的仅为描述具体的实施方式,并不意为进行限制,因为本发明的范围将仅受限于所附权利要求。

[0043] 如本说明书和所附权利要求所用,除非上下文另外明确表示,单个形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数指代。因此,例如,指代“所述方法”包括本文所述类型的一个或多个方法和/或步骤,在阅读本公开等后其对于本领域技术人员是显而易见的。

[0044] 除非另外限定,本文所用的所有技术术语和科学术语均与本发明所属领域技术人员通常理解的具有相同的含义。虽然任何类似或等同于本文所述的方法和材料均可用于本发明的实践或测试,现对优选的方法和材料进行描述。

[0045] 一般地,指代“循环肿瘤细胞”意指单个细胞,而指代“循环肿瘤细胞(多个)”或“循环肿瘤细胞簇”意指一个以上细胞。因此,本领域技术人员会理解指代“循环肿瘤细胞(多个)”意为包括循环肿瘤细胞群,包括一个或多个循环肿瘤细胞。

[0046] 术语“循环肿瘤细胞”(CTC)或 CTC “簇”意指个体样本中发现的任何癌细胞或癌细胞簇。一般,CTC 已从固体肿瘤脱落。因此,CTC 通常是从固体肿瘤脱落的上皮细胞,其以极低浓度被发现于晚期癌症患者的循环中。CTC 也可以是肉瘤的间皮细胞或黑素瘤的黑素细胞。CTC 也可以是源自第一、第二或第三肿瘤的细胞。CTC 也可以是循环癌症干细胞。虽然术语“循环肿瘤细胞”(CTC)或 CTC “簇”包括癌细胞,其也意为包括在循环中不常见的非肿瘤细胞,例如,循环上皮或内皮细胞。因此,肿瘤细胞和非肿瘤上皮细胞均被包括在 CTC 的定义内。

[0047] 本文所用的术语“癌症”包括本领域公知的多种癌症类型,包括但不限于,发育异常、超常增生、固体肿瘤和造血性癌症。已知多种类型的癌症转移和脱落循环肿瘤细胞或具有转移性,例如,第二癌症源于已经转移的第一癌症。另外的癌症可包括但不限于如下器官或系统:脑、心脏、肺、胃肠、生殖泌尿道、肝、骨、神经系统、妇科、血液、皮肤、乳腺和肾上腺。另外的癌细胞类型包括神经胶质瘤(神经鞘瘤、恶性胶质瘤、星形细胞瘤)、成神经细胞瘤、嗜铬细胞瘤、神经节细胞瘤(paraganlioma)、脑膜瘤、肾上腺皮质癌、成神经管细胞瘤、横纹肌肉瘤、肾癌、多种类型的血管癌、成骨肉瘤、前列腺癌、卵巢癌、子宫肌瘤、唾液腺癌、脉络丛癌、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌和成巨核细胞白血病;和皮肤癌症,包括恶性黑素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西(Karposi)氏肉瘤、痣——发育不良痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、瘢痕瘤、肉瘤如纤维肉瘤或血管肉瘤和黑素瘤。

[0048] 利用本文所述的方法,可从任何适合的样本类型检测和表征稀有细胞,如 CTC。如本文所用,术语“样本”指任何适于本发明所提供方法的样本。样本可以是包含适于检测的稀有细胞的任何样本。样本来源包括全血、骨髓、胸膜液、腹膜液、中央脊髓液、尿液、唾液和

支气管冲洗液。一方面,样本是血液样本,包括,例如,全血或其任何部分或组分。适用于本发明的血液样本可提取自己知包含血液细胞或其组分的任何来源,如静脉、动脉、外周、组织、索(cord)及类似来源。例如,可利用公知和常规的临床方法(例如,提取和处理全血的程序)得到和处理样本。一方面,示例性样本可以是提取自癌症个体的外周血。

[0049] 术语“血液组分”意为包括全血的任何组分,包括血液红细胞、血液白细胞、血小板、内皮细胞、间皮细胞或上皮细胞。血液组分还包括血浆组分如蛋白质、脂质、核酸和糖类和任何其他由于妊娠、器官移植、感染、创伤或疾病可存在于血液的细胞。

[0050] 如本文所用,“血液白细胞(white blood cell)”是白细胞,或非网状细胞或血小板的造血系细胞。白细胞可包括自然杀伤细胞(“AK 细胞”)和淋巴细胞如 B 淋巴细胞(“B 细胞”)或 T 淋巴细胞(“T 细胞”)。白细胞还可包括吞噬细胞,如单核细胞、巨噬细胞和粒细胞——包括嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞。白细胞还可包括肥大细胞。

[0051] 如本文所用,“血液红细胞(red blood cell)”或“RBC”是红细胞。除非指明“有核血液红细胞”(“nRBC”)或“胎儿有核血液红细胞”,如本文所用,“血液红细胞”被用于意为非有核血液红细胞。

[0052] 本发明提供可以多种不同方式分析或检查生物样本从而检测和表征稀有细胞的方法。样本可用一种或多种可检测标记染色或标记,并通过荧光显微镜和/或光学显微镜进行检查。与目标是自评价中消除非稀有或非 CTC 的常规富集方案不同,本发明依赖于样本中存在的非稀有细胞或非 CTC,以协助鉴定和表征稀有细胞或 CTC。在目前描述的非富集方法中,样本(例如,血液或其他体液,包括尿液、腹膜液、胸膜液、唾液、脑脊液及类似物)被最低限度地处理,稀有细胞如 CTC 没有从其他有核细胞(例如,非稀有或非 CTC)分离。

[0053] 如本文所用,术语“非稀有细胞”和“非稀有细胞(多个)”,一般指不是本文限定的稀有细胞的任何细胞。类似地,如本文所用,术语“非 CTC”和“非 CTC (多个)”,一般指不是本文限定的 CTC 的任何细胞。非稀有细胞和非 CTC 可包括有核或去核细胞,如,在血液的情况下,血液白细胞(也被称为白细胞)包括嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞;血液红细胞(也被称为红细胞);和血小板。

[0054] 在血液情况下,虽然 CTC 可不与其他有核细胞分离,但在铺平前从样本去除一般仅在新生儿血液中发现有核的血液红细胞。其通常通过裂解血液红细胞进行,虽然多种可供选择的方法在文献中众所周知,并可用于本方法,例如,通过过滤或密度梯度离心去除细胞。在去除血液红细胞后,可通过将细胞旋转,再悬浮和铺平在可用于细胞成像的固体支持体上处理剩余的细胞。

[0055] 多种固体支持体在本领域公知,包括可被处理以促进细胞附于玻片表面的玻片。玻片可由多种足以提供进行生物分析的支持体的材料构成。在示例性方面中,支持体由这样的材料构成:其可涂布有促进生物材料与支持体的静电相互作用的化合物。多种基底材料在本领域公知,并适用于本发明。这种材料可包括下列中的一种或多种:玻璃;有机塑料,如聚碳酸酯和聚甲基丙烯酸甲酯;聚烯烃;聚酰胺;聚酯;有机硅;聚氨酯;环氧树脂;丙烯酸树脂(acrylics);聚丙烯酸酯;聚酯;聚砒;聚甲基丙烯酸酯;聚碳酸酯;PEEK;聚酰亚胺;聚苯乙烯;和含氟聚合物。在示例性方面中,玻片由玻璃或塑料制成,并包括一个或多个生物相互作用性涂层。

[0056] 玻片可包括其表面上限定的一个或多个活性区。活性区,如本文所述,意为包括这

样的区域；其中玻片已经化学或电处理，如用生物相互作用性涂层处理，以例如促进细胞与玻片粘附。例如，玻片可经处理，使得表面带正电，其允许细胞通过静电粘附带负电的细胞而锚定于表面。玻片可包括 1 个至任何数量的活性区，这取决于玻片大小和目的用途。在多方面，玻片包括单个活性区。

[0057] 粘附于给定玻片的稀有细胞或 CTC 的总数部分取决于初始样本体积。在多方面，大范围的初始样本体积可用于实践本发明并提供临床上显著的结果。因此，初始样本体积可小于约 $1\mu\text{l}$ 、 $2\mu\text{l}$ 、 $2.5\mu\text{l}$ 、 $3\mu\text{l}$ 、 $4\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{l}$ 、 $6\mu\text{l}$ 、 $7\mu\text{l}$ 、 $7.5\mu\text{l}$ 、 $8\mu\text{l}$ 、 $9\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 、 $12.5\mu\text{l}$ 、 $15\mu\text{l}$ 、 $17.5\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $75\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $125\mu\text{l}$ 、 $150\mu\text{l}$ 、 $175\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $225\mu\text{l}$ 、 $250\mu\text{l}$ 、 $300\mu\text{l}$ 、 $400\mu\text{l}$ 、 $500\mu\text{l}$ 、 $750\mu\text{l}$ 、 1ml 、 2ml 、 3ml 、 4ml 、 5ml 、 6ml 、 7ml 、 8ml 、 9ml 或大于约 10ml 。在示例性方面中，初始样本体积在约 200 至 $500\mu\text{l}$ 、 200 至 $1000\mu\text{l}$ 、 1000 至 $2000\mu\text{l}$ 、 1000 至 $3000\mu\text{l}$ 或 1000 至 $5000\mu\text{l}$ 之间。在另一示例性方面中，如本文所述处理的样本包含大于约 1、2、5、7、10、15、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900 或甚至 1000 个稀有细胞或 CTC。

[0058] 在粘附最低限度处理的细胞于固体支持体——例如通过将细胞铺在玻片上——后，使细胞接触一种或多种可检测标记以通过荧光显微镜和 / 或光学显微镜检查细胞而促进细胞成像。一般地，可检测标记包括多种可用于检测和表征细胞现象的剂。例如，可检测标记可包括如下剂，如多核苷酸、多肽、小分子和 / 或抗体，其特异性结合样本中存在的标记，并且其被标记以使该剂在结合或杂交其目标标记或配体时可被检测到。例如，可检测标记可包括酶标记、荧光标记或放射性核素标记。另外的报告手段和标记在本领域公知。

[0059] 标记可以是样本中存在的通过已知的显微、组织学或分子生物学技术可识别的任何细胞组分。标记可用于，例如检测和表征稀有细胞，包括 CTC，和从非稀有细胞和非 CTC 区分稀有细胞。一般地，标记可以是，例如，存在于细胞表面的分子、过表达的目标蛋白质、核酸突变或样本中存在的细胞的形态特征。因此，标记可包括任何可在细胞表面内或细胞表面上检测到的细胞组分或结合或聚集于细胞表面的大分子。因此，标记不限于物理地在细胞表面上的标记。例如，标记可包括但不限于表面抗原、跨膜受体或辅助受体、结合于表面的大分子如结合或聚集的蛋白质或糖类、内部细胞组分如细胞质或核组分及类似物。标记也可包括优先结合特定细胞类型的血液组分，如血小板或纤维蛋白。

[0060] 一方面，可检测标记可以是可检测地标记的抗体。可用于本发明方法的抗体包括完整的多克隆或单克隆抗体及其任何片段，如 Fab 和 F(ab')_2 ，以及这种抗体或片段的组合。生成荧光标记抗体的方法在本领域公知，例如，荧光分子可直接地或通过利用中间官能团间接地结合免疫球蛋白。在相关方面中，可检测标记可以是核酸分子（例如，寡核苷酸或多核苷酸）。例如，原位核酸杂交技术在本领域公知，并可用于识别样本或子样本（例如，各个细胞）中存在的 RNA 或 DNA 标记。

[0061] 在本发明的多个方面中，用于染色细胞的可检测标记包括一种或多种对于特定类型细胞和 / 或组织具有组织特异性而因此被用作阳性标记的可检测标记。如本文所用，“阳性标记”是特异性结合稀有细胞如 CTC 而非非稀有细胞或非 CTC 的可检测标记。例如，阳性标记可具有上皮和 / 或组织特异性，例如，可应用优先结合上皮细胞的细胞角蛋白和 / 或 EpCAM 标记。类似地，可应用具有组织特异性的标记。本领域已知多个组织特异性标记的实例，其适用于实践本发明，如 PSA 和 PSMA 用于前列腺组织，CDX2 用于结肠组织以及 TTF1 用

于肺组织(TTF1 阳性的肺癌患者的亚群)。如本文所用,“阳性标记”也可以是特异性结合稀有细胞或 CTC 亚群而非群落中所有稀有细胞或 CTC 的可检测标记。例如,“阳性标记”可特异性结合 HD-CTC,而非所有 CTC。

[0062] 在本发明的多个方面中,用于染色细胞的可检测标记包括一种或多种特异性结合非稀有细胞或非 CTC 并可用作阴性选择剂的可检测标记。如本文所述,“阴性标记”是特异性结合非稀有细胞或非 CTC 并且是阴性选择剂的可检测标记。最常用的非 CTC 的阴性标记是 CD45,其优先结合 WBC。存在结合多种 WBC 亚群的其他可检测标记或可检测标记的组合。其可以多种组合被应用,包括与 CD45 组合或替代 CD45。如本文所用,“阴性标记”也可以是特异性结合非稀有细胞或非 CTC 亚群并且是阴性选择剂的可检测标记。

[0063] 除识别 CTC 的阳性和阴性可检测标记外,另外的特异性结合细胞核的可检测标记可用于染色细胞,以允许从非细胞材料区分细胞。如本文所用,“核标记”是结合细胞核组分并允许从非细胞材料区分细胞的可检测标记。用于本发明的最常见的核标记是 DAPI。

[0064] 在本发明的多个方面中,用于染色细胞的可检测标记包括一种或多种本文中被称为“含量标记”的可检测标记。含量标记一般可包括,可检测地标记的寡核苷酸探针,如 FISH 探针或免疫组织化学探针。在一个实施方式中,含量标记与阳性和阴性标记同时被施加于玻片,或在阳性和阴性标记和在通过成像鉴定稀有细胞后被施加于玻片。含量标记包括靶向如下的可检测标记:EGFR、HER2、ERCC1、CXCR4、EpCAM、E- 钙粘素、粘蛋白 -1 (Mucin-1)、细胞角蛋白、PSA、PSMA、RRM1、雄激素受体、雌激素受体、黄体酮受体、IGF1、cMET、EML4 或白细胞相关受体(LAR)。在一些情况下,含量标记也可以是阳性标记。

[0065] 在一定强度水平上阳性标记或任何标记的信号强度是可检测到的,其基于本公开的方法是可高度量化的。该强度水平允许可检测事件的量化和排序显著改良,能使进一步分类进行。例如,发出低强度细胞角蛋白信号的 CTC 可以是癌症干细胞;或高/低细胞角蛋白细胞的数量变化可预测反应或是对反应(或抵抗过程)的读取。对于阳性、阴性和含量标记同样是真实的。

[0066] 本发明利用可检测标记通过荧光显微镜和/或光学显微镜检查细胞而促进细胞成像。在示例性方面中,用数种荧光标记使最低限度处理的细胞染色,然后利用快速自动化的显微镜成像。一般,可将制得的玻片装载于自动化系统上或可将其置于玻片载体中,该玻片载体容纳任何数量的另外的玻片。将玻片载体装载于自动化系统的输入送料斗中。然后操作人员可输入鉴定各玻片上扫描区域大小、形状和位置的数据,或系统可在玻片处理过程中自动定位各玻片的扫描区域。玻片的处理参数可通过存在于玻片或玻片载体上的条形码鉴定。在系统激活时,玻片载体位于 X-Y 阶段,整个玻片或其部分被快速扫描。其可在低倍或高倍放大下进行,并且可在多个放大水平下和/或在玻片的多个区域重复。图像可被储存于适当的储存介质,并利用在本领域公知用于进行本文所述多种分析的可执行代码进行分析。如本文所述,在整个成像处理过程中多个参数可被调整以促进稀有细胞如 CTC 的检测,利用关于非稀有或非 CTC 的数据,如曝光限值和强度设置。

[0067] 如本文所用,术语“图像”和“样本图像”一般指包含多种细胞如稀有细胞和 CTC 的最低限度处理的样本的图像、数字图像或其他图像。一般,样本图像是细胞粘附于其表面并且任选地用一种或多种可检测标记染色的样本玻片全部或部分的图像。

[0068] 本发明的一个优势——其允许可调的特异性/敏感度并集中于数据缩减和分析而

不是富集——是预期最低限度处理使偏离最小化。在可供选择的需要富集的技术中,稀有细胞总是在处理过程中损失。特别是,在免疫捕获或尺寸过滤以区分 WBC 与 CTC 的应用中,在 WBC 与 CTC 之间的免疫捕获或尺寸变化不同的情况下目标抗原的表达变化引起一些 CTC 在富集阶段损失。其可导致(i)不准确的 CTC 数量;(ii)过少 CTC 用于下游表征或含量分析;和(iii)产生选择偏离,因为一些类型的 CTC 基于其变化类型优先损失。

[0069] 最低限度处理方法的挑战是在非稀有细胞或非 CTC 的背景下难以发现低频率稀有细胞或 CTC。低频率可以是 1 个稀有细胞或 CTC :1,000 个非稀有细胞或非 CTC、1:10,000、1:100,000、1:1,000,000 以及甚至 1:10,000,000 或这些比例之间的任意比例。使发现和表征稀有细胞的能力复杂化的是阳性和阴性标记,其虽然极具选择性,但不完美之处在于产生假阳性或假阴性。换句话说,阴性标记对稀有细胞通常具有一些背景染色和 / 或阳性标记对非稀有细胞通常具有一些背景染色。虽然分析优化被用于最小化该背景染色,但用分析优化完全消除这个现象仍具挑战。

[0070] 如之前所述,大多数其他发现稀有细胞的方法试图去除非稀有细胞。本发明利用非稀有细胞或非 CTC 以协助发现和表征稀有细胞或 CTC。多种可分析非稀有细胞和非 CTC 的方式在本公开中被述及。在本公开中,非稀有细胞或非 CTC 一般被指定为单独组,并因此可利用本文所述的方法进行分析。但是,本发明也认识到,非稀有细胞可包含多个离散的亚组。例如,在 CTC 的情况下,该多个离散的亚组可包括嗜中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞以及不同状态如凋亡或细胞分裂的不同状态下的细胞,该细胞可利用本文所述的方法通过大小、形状、核特征和染色特征被区分。在本发明的一些实施方式中,利用这些亚组其中之一而非利用整组协助发现稀有细胞或 CTC 是可用的。本发明对非稀有细胞或非 CTC 的应用不意味使本发明限于仅利用整组,此时一些实施方式中只利用亚组中的一种或多种可能是适当的。

[0071] 本发明能进行的一方面是,稀有细胞或 CTC 相对于非稀有细胞或非 CTC 的低频率允许处理作为非稀有细胞或非 CTC 的多数细胞,即便其还未被如此明确地鉴定。稀有细胞和 CTC 的低频率允许忽略这种细胞并假定该细胞是非稀有细胞或非 CTC,从而产生性质对照、截止、标准化和校准度量。由于稀有细胞处于低丰度,因此如果这些度量通过考虑稀有细胞群而被完善,可应用离群点去除技术。离群点去除技术在数学上确保稀有细胞群不影响度量。

[0072] 如本文所述,公开的方法允许检测、计数和表征稀有细胞群或稀有细胞亚群。该方法利用来自样本中非稀有细胞的数据通过使用限定参数来鉴定和表征稀有细胞,该限定参数涉及曝光限值、曝光设置、性质对照、强度截止限值、细胞大小和形状校准、细胞计数和含量评价,依次对其中每一个进行进一步讨论。在多方面,分析允许同时进行单通道图像的荧光图像细胞形态评价,其利用如下得到增强:细胞-细胞标注(annotation),连同来自于完整实验或局部环境的关于绝对和相对于非稀有细胞或候选非稀有细胞——例如,非 CTC 或候选非 CTC——的对象大小和荧光强度的辅助半定量数据。

[0073] 建立曝光限值

[0074] 虽然变化应通过分析优化和仪器标准化被最小化,但标记的染色差异常见于,玻片-与-玻片、批次-与-批次、操作人员-与-操作人员和天-与-天。因此,为具体玻片选择正确的曝光并非无足轻重,因为将其设置过低或过高均会使其错失信息。虽然标准

方法对那些玻片上对于多数事件常见的标记起作用,但对于对稀有细胞或 CTC 具有特异性的标记具有挑战。在成像系统的动态范围内,稀有细胞或 CTC 的信号和非稀有细胞或非 CTC 的背景与曝光时间成比例。但成像系统电子学引起的信号和背景随机变化的噪音在曝光增加时减少。理想地,曝光应被设置以最大化信号,而没有使成像系统饱和。但这由于对数据收集时间的影响是不可实现的。由于稀有细胞或 CTC 以极低频率存在,在少量样本图像中发现稀有细胞或 CTC 是不可能的,这阻止了利用样本图像设置阳性标记曝光。使此进一步复杂化,阳性和阴性标记的表达和对其目标细胞的染色均存在天然差异。少量样本图像以设置曝光不可捕获目标稀有细胞或 CTC 上的该天然差异。

[0075] 在本发明一个实施方式中,非稀有细胞或非 CTC 的信号被用于设置阳性标记的曝光限值。其有一些违反直觉,因为非稀有细胞或非 CTC 不是阳性标记的选择目标。但在该实施方式中,曝光被调整,使得由源自荧光源——如非特异性染色、自动荧光和光学系统特性——的样本图像中的非稀有细胞或非 CTC 观察到可视但低的信号。明亮区域的成像、核标记和阴性标记可用于鉴定样本图像中的非稀有细胞或非 CTC。在与样本图像中的非细胞区域比较时,低信号是非稀有细胞或非 CTC 可区分的细胞信号。该处理提供了在那些标记的目标处于低频率时设置阳性标记曝光的方法,并还协助最大化阳性标记的信号 / 背景,二者均有助于发现稀有细胞或 CTC,尽管仍需最小化收集数据所需要的总时间。该现象在信号低或弱时尤为如此。一旦细胞背景在统计学上比非细胞背景显著时,该特定标记的曝光时间针对数据收集速度进行优化。所有随后的优化可在计算机芯片上进行。一旦设置了曝光,整个玻片已准备好在该设置下成像。

[0076] 虽然上述实施方式促进了阳性标记的曝光设置,但非稀有细胞或非 CTC 也可用于以与稀有细胞或 CTC 临床解释相关的方式设置阴性标记、核标记和含量标记的曝光。在一个实施方式中,样本图像中非稀有细胞或非 CTC 的核标记被设置至允许评价细胞核含量,特别是细胞被分类为活细胞还是死细胞的水平,这通过细胞类型促进细胞活:死比的计算。非稀有细胞或非 CTC 的这些核标记曝光水平将满足稀有细胞或 CTC 的相同核标记评价,特别是区分正常细胞相对于恶性细胞的核形状。

[0077] 在另一个实施方式中,通过观察非稀有细胞或非 CTC 上标记的信号分布,设置样本图像的阴性标记曝光,其中曝光被选择以最大化信号 / 背景比,特别是在动态范围的临界低端,在此可存在对稀有细胞或 CTC 中阴性标记的微弱信号。

[0078] 在另一个实施方式中,设置非稀有细胞或非 CTC 含量标记的曝光。利用样本图像中非稀有细胞或非 CTC 进行的含量标记信号设置将取决于具体含量标记。例如,一些含量标记在非稀有细胞或非 CTC 中相对于稀有细胞或 CTC 可具有相对高的表达,在该情况下将利用样本图像中非稀有细胞或非 CTC 的信息来设置含量标记的上边界。相反,含量标记在非稀有细胞或非 CTC 中相对于稀有细胞或 CTC 可具有相对低的表达,在该情况下将利用样本图像中非稀有细胞或非 CTC 的信息来设置含量标记的下边界。

[0079] 虽然上述实施方式利用非稀有细胞或非 CTC 在玻片成像前设置样本图像多种标记的曝光限值从而发现稀有细胞或 CTC,但在另一个实施方式中,利用整个玻片第一次成像事件过程中拍摄的图像的非稀有细胞或非 CTC 和 / 或稀有细胞或 CTC 的信息来设置在玻片所选区域再次成像时的曝光限值。所选区域再次成像有多种原因,包括收集处于最佳焦距或处于较高放大倍数的图像。在该实施方式中,贯穿整个玻片非稀有细胞或非 CTC 和稀有

细胞或 CTC 的不同标记的信号分布可用于计算较好的曝光,其使所需信号或所需动态范围最大化。

[0080] 最小化曝光设置以最小化数据收集时间和最大化处理量

[0081] 如上所述,可调整曝光设置以优化信号或信号:背景参数。但是,在另一个实施方式中,调整曝光设置,目标是最小化数据收集时间和最大化处理量。例如,可确定其耗费 5 秒曝光时间以充分利用 CCD 相机动态范围,但仅耗费 500 毫秒以得到非细胞背景上的细胞背景,由此节约 $10\times$ 的数据收集时间。因此,曝光倍数可被优化以最大化信号(或信号:背景)或最小化时间。

[0082] 性质对照

[0083] 在另一个实施方式中,利用非稀有细胞或非 CTC 协助鉴定稀有细胞或 CTC 还包括其被用作性质对照参数。由于非稀有细胞或非 CTC 呈现高得多的频率,并分布于整个玻片,其提供可用的资源以评价玻片的处理和成像性质,二者均是相对于具体玻片并且覆盖整个玻片和覆盖整个数据设置。

[0084] 在一个实施方式中,本发明提供了利用核标记观察非稀有细胞或非 CTC 的分布,从而确定非稀有细胞或非 CTC。在该实施方式中,目标是发现细胞,没有必要区分非稀有细胞或非 CTC 与稀有细胞或 CTC,因此可不利用阳性或阴性标记来区分这些分类;但是,由于大多数细胞是非稀有细胞或非 CTC,多数用于确定细胞在玻片上分布的细胞是非稀有细胞或非 CTC。细胞的分布就性质对照角度而言是重要的,因为理想的分布是细胞平均分布,细胞间具有最低限度的重叠。如果与理想分布的偏差很大,可选择放弃对玻片进行进一步处理。虽然本实例中使用核标记,但用于鉴定细胞的任何方法均将符合,包括明亮区域成像和常规染色,如 Wright Giemsa。

[0085] 在另一个实施方式中,核标记和阴性标记的共同定位被用作评价不同图像的比对是否令人满意的性质对照方法。在该实施方式中,核标记和阴性标记应具有显著的重叠。

[0086] 在另一个实施方式中,阴性标记事件与核标记事件之间的比例是阴性标记染色效力的量度,其中不超过 12 的较高比例是理想的。理想的阴性标记可具有 0.8、0.9、1.0 或 1.1 的比。在另一个实施方式中,整个非稀有细胞或非 CTC 群的阴性标记的分布——包括平均值、标准偏差和变异系数(CV)——被用作性质对照参数,其中阴性标记的分布与过往实验预期分布特征一致,和/或与 WBC 正常表达分布特征一致。

[0087] 在另一个实施方式中,整个非稀有细胞或非 CTC 群阳性标记的分布——包括平均值、标准偏差和 CV——被用作性质对照参数,其中阳性标记的分布与过往实验的预期分布特征一致。

[0088] 虽然上述性质对照方法描述了评价整个玻片性质的方法,但相同方法可用于评价图像或图像组。在一些实例中,可将得自区域中图像或图像组的参数与对整个玻片计算的相同参数进行比较。在另一实例中,上述性质对照参数可在不同玻片之间进行比较。

[0089] 在另一个实施方式中,通过将核标记事件或阴性标记事件的比例与置于玻片上的非稀有细胞或非 CTC 的已知数量进行比较,可计算处理过程中玻片的细胞损失,其中非稀有细胞或非 CTC 的已知数量得自实验所用的 WBC 数量和体积。

[0090] 设置 CTC 检测的强度截止限值(最小化假阴性)

[0091] 如上所述,本方法对于稀有细胞和 CTC 检测的挑战是 1) 稀有细胞如 CTC 相对于非

稀有细胞或非 CTC 的相对频率低 ; 和 2) 阳性和阴性标记分别对 CTC 和非 CTC 的染色不完美。但是, 本方法利用那些挑战, 并将其转变为优势。在一个实施方式中, 阳性标记对于高丰度非稀有细胞或非 CTC 的背景信号被用于计算平均值、标准偏差和 CV。那些度量随后被用于确定检测截止以从非稀有细胞或非 CTC 分离稀有细胞如 CTC。一方面, 因数 10 乘以标准偏差并加至非稀有细胞或非 CTC 阳性标记信号的平均值, 被用作截止, 以区分稀有细胞或 CTC, 其中假定的稀有细胞或 CTC 被确定具有高于截止的阳性标记信号。在其他方面, 该度量利用因数 5、7.5、12.5、15、17.5、20 或更大因数或那些数之间的任何数。度量的计算可设置在整个玻片基础上。或者, 其可设置在图像基础或局部基础上。

[0092] 在另一个实施方式中, 每个图像内的截止可通过如下被动态确定: 定位最高阳性标记事件信号, 然后将该信号与另外的信号事件之间的标准偏差进行比较。在示例性方面中, 每个图像内的截止可通过如下被动态确定: 定位 5 个最高阳性标记事件的信号, 然后将该信号与另 50 个阳性信号事件之间的标准偏差进行比较。阳性标记事件还可包括多个阳性标记或包括阳性标记和排除阴性标记事件。每个视野的数量“5”可由 1 至 10 变化, 假设 $10\times$ 放大倍数 (即, 假设每个视野不多于 5 个稀有细胞或 CTC 或相对浓度不高于 $1/500$)。本方法具有完全数量化并且不基于形状分析的优势。预期大幅且显著减少可能事件的数量, 并且具有最低限度的损失事件风险。

[0093] 在另一个实施方式中, 阴性标记信号的截止是利用非稀有细胞或非 CTC 的平均值和标准偏差设置的。在该情况下, 截止得自因数 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 乘以非稀有细胞或非 CTC 阴性标记信号的标准偏差并从阴性标记信号平均值中减去。假定的 CTC 将具有在该截止以下的阴性标记信号。如上所述, 该截止可通过利用玻片上所有非稀有细胞或非 CTC 的信号整体生成, 或在图像或局部水平上通过仅利用该图像或该区域中非稀有细胞或非 CTC 的信号生成。

[0094] 大小和形状校准

[0095] 在本发明另一个实施方式中, 将玻片上所测的非稀有细胞或非 CTC 的细胞大小和细胞大小分布与文献公开的 WBC 大小和分布进行比较。此外, 个别患者差异的分布可通过利用得自自动细胞计数器的 WBC 亚组差数而得到校正。然后非稀有细胞或非 CTC 的公开大小与计算大小之间的比例可被用作校正因子, 以通过将该比例乘以玻片上所测稀有细胞或 CTC 的大小来确定稀有细胞或 CTC 的准确大小。校准允许整个玻片和整个血管以及整个患者和整个适应症的标准化和比较。

[0096] 在另一个实施方式中, 我们将图像或玻片上所测非稀有细胞或非 CTC 的核大小、核大小分布和轮廓型式中的一种或多种与假定稀有细胞或 CTC 的核大小和轮廓型式进行比较, 并利用截止值证明假定的稀有细胞或 CTC 是有效的稀有细胞或 CTC。

[0097] 计数

[0098] 在本发明的实施方式中, 利用非稀有细胞或非 CTC 信息来准确计算稀有细胞或 CTC 在体液中的浓度。在该实施方式的一个实例中, 确定 CTC 与总 CTC+ 非 CTC (所有核标记事件) 的比, 然后将其除以该实验所用的原始体液的体积, 最后将其乘以体液中细胞的原始浓度。后一测量结果可通过利用标准的自动细胞计数器 (或细胞计数器) 得到。

[0099] 含量评价

[0100] 如上所述, 可评价含量标记的稀有细胞或 CTC 表达水平。但是, 由于处理和成像差

异引起的玻片可变性,难以提供通用的参数以确定表达水平。为削弱该挑战,首先确定含量标记的表达水平及其在患者群非稀有细胞或非 CTC 中的分布。然后对于个别癌症患者,确定含量标记在稀有细胞或 CTC 和在非稀有细胞或非 CTC 中的表达水平。稀有细胞或 CTC 与非稀有细胞或非 CTC 之间的表达水平比变成使玻片-与-玻片差异标准化的相对量度。此外,将该比乘以对照群非稀有细胞或非 CTC 表达水平的平均值,提供了就玻片-与-玻片差异校正的稀有细胞或 CTC 表达的绝对值。

[0101] 核形状和大小是信息潜在的丰富来源。预期在血液细胞的情况下给出关于细胞类型的详细信息,和在稀有细胞或 CTC 的情况下关于细胞状态的详细信息。例如,核形状可给出对细胞恶性性质的了解,其可给出对细胞存活和/或细胞循环状态的了解。例如,进行成功的化学治疗的患者可观察到 CTC 激增,但核解释可显示这些 CTC 是非活的/凋亡的。

[0102] 另一可能的利用核大小和形状的机会将类似于将前向散射和侧向散射用作表征细胞的方式的 FACS 分析。其可能能够搜集足够的关于核及其他细胞组分的详细信息,以概括来自 FACS 的前向和侧向散射信息。

[0103] 在本发明多个实施方式中,单个参数或参数组合可用于进行分析,其部分取决于所要确定的数据和正在考察的稀有细胞群。此外,可利用公开的方法来鉴定特定稀有细胞群的亚群。例如,如实施例 1 所示,可通过进一步限定特定分析参数来鉴定和区分 CTC 亚群。该实施例公开了被称为 HD-CTC 的 CDC 亚群的鉴定和分类。

[0104] 在本发明的一个实施方式中,通过进一步限定所公开的分析参数,建立了 HD-CTC 的严格分类。不受制于任何具体理论,认为本文分类的 HD-CTC 亚群包括呈现成为完整肿瘤细胞的最高潜力的 CTC。所有其他 CTC 均部分符合限定的参数但缺少一个或多个严格的入选标准。非 HD-CTC 是可能在进一步下游的方法中进行的评价中具有较低依赖性的 CTC。

[0105] 在一个实施方式中,HD-CTC 是这样的细胞,其 a) 包含阳性标记 ;b) 具有完整的核 ;和 c) 在形态上区别于正常 WBC,其中该细胞对于阴性标记不呈阳性。如本文所述,阳性标记可以是优先结合上皮细胞如细胞角蛋白和/或 EpCAM 的标记。进一步,如本文所述,阴性标记可以是任何非癌症特异标记,如 CD45,其优先结合 WBC。完整核的确定一般通过 DAPI 成像确定,但其他适当的核标记在本领域公知。在示例性实施方式中,HD-CTC 是这样的细胞,其 a) 呈细胞角蛋白阳性 ;b) 呈 CD45 阴性 ;c) 具有完整的核 ;和 d) 在形态上区别于正常 WBC。

[0106] 在多个实施方式中,阳性标记可具有比有核血液白细胞的细胞角蛋白强度高 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 倍的强度。在多个实施方式中,阴性标记的强度最低是所有细胞事件的 10%、5%、4%、3%、2% 或更低。

[0107] 在多个实施方式中,HD-CTC 的核是完整的且非凋亡的。细胞质的轻度凋亡变化可被接受,只要核没有呈现凋亡。

[0108] 在多个实施方式中,HD-CTC 在形态上区别于正常 WBC。例如,HD-CTC 可具有这样的形态 :其基于标准诊断细胞病理学所用的标准与恶性上皮细胞一致,明显表现为增大的尺寸,但其也可以包括如下细胞形态特征 :核和细胞质的结构组织、细胞质形状以及核形状。一系列代表性 HD-CTC 示于图 2 中。

[0109] 尽管如通篇所述,本发明所述方法可用于利用得自非稀有细胞分析的数据检测稀有细胞,本发明也可用于表征稀有细胞。特别是,用于进行细胞成像和分析的可检测标记和计算方法的多种组合的应用允许有意义的表征,该表征可用于评估癌症预后和监测治疗效

力,以早期检测可导致疾病复发的治疗失败。此外,根据本发明所述的 CTC 分析能够对已完成疗程的呈现症状前的患者进行早期复发检测。这是可能的,因为 CTC 的存在已被关联和 / 或相关于一段时间的肿瘤进程和蔓延、对治疗的不良反应、疾病复发和 / 或存活降低。因此,暴露的 CTC 的计数和表征提供了基于对治疗的反应对患者进行基线特征分级的方法,该基线特征预测最初风险和后续风险。

[0110] 本文所用术语“个体”指目标方法所实施的任何个体或患者。通常个体是人,尽管如本领域技术人员所知,个体可以是动物。因此其他动物,包括哺乳动物如啮齿类(包括小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)、猫、狗、兔、农场动物——包括牛、马、山羊、绵羊、猪等,并且灵长类动物(包括猴、黑猩猩、猩猩和大猩猩)被包括在对个体的定义内。

[0111] 因此,在另一个实施方式中,本发明提供了诊断或预后个体癌症的方法。该方法包括如本文所述检测 CTC。然后可分析 CTC 以诊断或预后个体癌症。因此,本发明的方法可用于,例如,评价癌症患者和处于癌症危险的患者。在本文所述诊断或预后方法中的任一种中,癌症如癌细胞或任何其他疾病的一种或多种指示剂的存在或不存在均可用于生成诊断或预后。

[0112] 一方面,如本文所述从患者取血液样本,并经处理以检测 CTC。利用本发明的方法,确定血液样本中的 CTC 数,并通过分析可检测标记和由细胞成像得到的其他数据表征 CTC。例如,可进行分析以确定样本中 CTC 的数量和表征,并由该测量结果可确定最初血液样本中存在的 CTC 数量。

[0113] 在多方面,个体 CTC 数量和表征的分析可以多个间隔在一定时间段内进行,从而评估个体进程和病理。例如,分析可以固定间隔进行——如 1 天、2 天、3 天、1 周、2 周、1 个月、2 个月、3 个月、6 个月或 1 年,从而作为时间的函数追踪循环上皮细胞的水平和表征。在现有癌症患者的情况下,其提供了对疾病进程可用的指示,并有助于医务人员基于循环上皮细胞的增加、减少或变化缺失如患者血流中 CTC 的存在做出适当的治疗选择。随时间推移 CTC 数量的任何增加——为其 2 倍、5 倍、10 倍或更高——减弱患者的预后,并且是患者应改变治疗的早期指示剂。类似地,任何增加——为其 2 倍、5 倍、10 倍或更高——指示患者应进行进一步测试如成像,以进一步评估预后和对治疗的反应。随时间推移 CTC 数量的任何减少——为其 2 倍、5 倍、10 倍或更高——表示疾病稳定和患者对治疗的反应,并且是不改变治疗的指示剂。对于处于癌症危险的患者,检测到的 CTC 数量的骤增可提供早期警示——患者已产生肿瘤,因此提供了早期诊断。在一个实施方式中,对暴露的 CTC 的检测增加了癌症的分期。

[0114] 在本文提供方法的任一种中,也可进行另外的分析以表征 CTC,从而提供另外的临床评估。例如,除图像分析外,可利用基因表达分析和 PCR 技术,如基因芯片分析和利用对特定癌症标记具有特异性的引物的多重技术(multiplexing),得到信息如肿瘤类型——CTC 起源于此、转移状态和恶性程度。此外,可进行细胞大小、DNA 或 RNA 分析、蛋白质组分析或代谢物组分析作为评估关于患者癌症表征的另外信息的手段。在多方面,分析包括靶向下列标记的抗体或利用对下列标记中的一种或多种具有特异性的引物的 PCR 多重技术: EGFR、HER2、ERCC1、CXCR4、EpCAM、E- 钙粘素、粘蛋白 -1、细胞角蛋白、PSA、PSMA、RRM1、雄激素受体、雌激素受体、黄体酮受体、IGF1、cMET、EML4 或白细胞相关受体(LAR)。

[0115] 例如,该另外的分析可提供足以确定个体对具体治疗方案的响应或确定候选剂在

癌症治疗中的效力的数据。因此,本发明提供了通过如本文所述检测个体的 CTC 和分析检测到的 CTC,确定个体对具体治疗方案的响应或确定候选剂在癌症治疗中的效力的方法。例如,一旦药物治疗被给予患者,就可利用本发明的方法确定药物治疗的效力。例如,可利用本发明的方法处理在药物治疗前取自患者的样本以及 与药物治疗同时或在药物治疗后取自患者的一个或多个细胞样本。通过比较各处理样本的分析结果,可确定药物治疗的效力或患者对该剂的响应。在这种方式下,可对无效化合物进行早期鉴定,或可对有前景的化合物进行早期确认。

[0116] 提供对候选化合物的临床活性的了解的四种重要指示剂包括 HER2、EGFR、CXCR4 和 EphB4RTK。HER2 通过确定 mRNA 稳定性和 HER2 转录体的亚细胞定位提供细胞恶性的指示剂。EGFR 对获得突变的抗性和 / 或获得的突变提供候选化合物——除可与候选化合物联合应用的可能替代化合物外——活性的重要指示剂。对铂引起的 DNA 修复干扰水平的评估提供了对 CXCR4 标记状态和转移性条件的了解。此外,对 EphB4 受体酪氨酸激酶状态的评估提供了对该细胞转移潜力的了解。因此,利用本发明的方法,可通过经常采集血液样本和确定各样本中循环上皮细胞例如 CTC 的数量作为时间的函数监测服用这种候选药物的患者。对 Her2、EGFR、CXCR4 和 EphB4RTK 指示剂的进一步分析提供关于癌症病理和候选药物效力的信息。类似地,ERRC1、细胞角蛋白、PSA、PSMA、RRM1、雄激素受体、雌激素受体、黄体酮受体、IGF1、cMET、EML4 等提供了对候选化合物临床活性的了解。对这些临床活性指示剂的分析可通过分析本文所述可检测标记(例如,免疫组织化学和荧光原位杂交(FISH))或进一步通过技术如测序、基因分型、基因表达或其他分子分析技术分析进行。

[0117] CTC 分析提供了确定具体临床试验的候选个体的方法。例如,可分析检测到的候选 CTC 以确定特定标记是否存在,从而确定具体临床追踪治疗方案是否可能成功。因此,在另一个实施方式中,本发明提供了确定临床试验候选个体的方法。该方法包括检测本文所述个体的 CTC。然后可分析 CTC 以确定候选个体是否适于该具体临床试验。

[0118] 临床试验过程中的 CTC 分析将提供关于患者是否对实验药物有反应的信息,其中暴露的 CTC 无显著变化或减少表示有反应,暴露的 CTC 增加表示反应弱。增加或减少可以是 2 倍、10 倍或更高。该信息是药物效力的早期指示剂,并且可被研究人员用作临床试验的第二终点。

[0119] 下列实施例意为示例而非限制本发明。

[0120] 实施例 1

[0121] CTC 亚群的分析 and 鉴定

[0122] 本文所示数据证明本发明的方法,其被用于 CTC 和 CTC 亚群,如本文限定的 HD-CTC。分析通过解决分析可靠性和稳固性的有前景的受控方案和用 Cellsearch® 进行拆分样本比较进行。在该技术确认后,本分析被用于考察转移性乳腺癌、前列腺癌和胰腺癌患者以及正常对照的 CTC 和特定 CTC 亚群的发生率和流行率。通过分析靶向的特定 CTC 亚群要求细胞(一个或多个)具有完整的核、表达细胞角蛋白而非 CD45,在形态上区别于周围的血液白细胞(WBC),并具有与适于下游分析的完整恶性上皮细胞一致的细胞学特征。

[0123] 应用下列方法和方案。

[0124] 患者和血液样本收集如下进行。将样本从转移性癌症患者收集于抗凝固血液管中,其在 IRB 批准的协议下于 Scripps Clinic, University of California, San Diego (圣

地亚哥),和 Billings Clinic,University of California, San Francisco (旧金山) 进行。将来自非局部位点的样本(UCSF,Billings Clinic)连夜运送,使得样本在 24 小时内被接收和处理。保持来自局部位点的样本(Scripps Clinic and UCSD)在室温 16-24 小时以模拟来自非局部位点的样本。同样来自 TSRI 正常血液捐献服务站(TSRI Normal Blood Donor Service)的正常对照提取血液样本。

[0125] HD-CTC 检测的血液样本处理如下进行。在利用 Hemocue™ 血液白细胞系统(HemoCue, Sweden)测量血液白细胞(WBC)数量前将血液样本晃动 5 分钟。基于 WBC 数量,一定体积的血液经过红细胞溶解(氯化铵溶液)。离心后,将有核细胞重新悬浮于 PBS 中,并以单层粘附在常规制造的玻璃玻片(Marienfeld, Germany)上。该玻璃玻片与标准显微镜玻片大小相同,但具有专有涂层,该涂层允许最大限度保留活细胞。各玻片可容纳约 3 百万个有核细胞,因此每个玻片铺平的细胞数取决于患者 WBC 数量。将足够的血液裂解以产生 15 个玻片,并随后在添加细胞防腐剂后将细胞干燥在玻片上。将全部 15 个玻片储存于 -80℃ 至少 24 小时。

[0126] 对于本研究的癌症患者 HD-CTC 检测,4 个玻片被用作测试。将剩余的对于各患者产生的玻片储存于 -80℃ 用于以后的实验。解冻各患者的 4 个玻片,然后将细胞用 2% 多聚甲醛固定,用冷甲醇渗透,并用山羊血清阻断非特异性结合位点。随后用单克隆抗泛细胞角蛋白抗体(Sigma)和 CD45-Alexa 647(Serotec)温育玻片。经 PBS 洗涤后,用 Alexa Fluor 555 山羊抗鼠抗体(Invitrogen)温育玻片。将细胞用 DAPI 复染,并用水固定介质固定。

[0127] 成像和技术分析如下进行。用常规制造的荧光扫描显微镜扫描各患者的全部 4 个玻片,该荧光扫描显微镜已被开发和优化用于快速可靠的扫描。在本报告中一台扫描仪被用于所有患者样本,从而使结果标准化。此外,在扫描过程中每周校准光源,并建立算法以标准化各患者玻片上各荧光基团暴露。将各玻片以 3 色以 10X 放大整体扫描,并生成超过 6900 个图像。将生成的图像送至分析算法,该分析算法基于多种测量确定可能候选的 HD-CTC,该多种测量包括细胞角蛋白强度、CD45 强度以及核和细胞质形状和大小。然后技术人员检查算法生成的可能候选并去除明显不是细胞的命中(hit),如染料聚集体。

[0128] 专业分析和解释如下进行。将所有可能候选的 CTC 展示给造血病理医师以通过基于网络的报告进行分析和解释,其中病理医师能够将各候选细胞包括或排除为 HD-CTC。细胞被分类为 HD-CTC,如果其为细胞角蛋白阳性,CD45 阴性,包含完整的 DAPI 核而没有可识别的凋亡变化(起泡,退化的表现)或被破坏的表现,并且在形态上区别于周围的血液白细胞(通常基于形状的特征,虽然有时完全基于大小)。其必须具有细胞质,该细胞质明显是圆周的,并且其中包含完整的核。细胞质可显示凋亡变化如起泡和无规律的密度或外周细胞质边界轻度破坏,但必须不被破坏到其与核的关联成为问题。图像表现为具有单荧光通道观察能力的数码图像和复合图像。各细胞图像以辅助统计学数据注释,该辅助统计学数据涉及相对核大小、荧光强度和相对荧光强度。各候选 HD-CTC 连同充足的周围 WBC 呈现于视野中,从而允许所讨论的细胞相对于背景血液白细胞在细胞形态特征之间的环境比较。

[0129] 细胞系实验如下进行。将来自捐献者的 4 等份(各 2ml)添加不同数量的 SKBR-3 细胞,从而生成 4 个玻片,每个玻片具有约 300、100、30 和 10 个癌细胞。然后由一个操作人员根据 HD-CTC 样本制备方案处理和分析 16 个玻片。一个仪器被用于对全部 16 个玻片进行成像。

[0130] HD-CTC 分类:将 HD-CTC 定义为这样的细胞:a)细胞角蛋白阳性(强度>6 倍有核血液白细胞的细胞角蛋白强度);b) CD45 阴性(强度最低为全部细胞事件的 2%);c) 包含完整的非凋亡表观核——通过 DAPI 成像;和 d) 在形态上区别于正常 WBC。

[0131] HD-CTC 形态评估的入选要求包括 1) 核大小比周围 WBC 核的平均值大 30%;和 2) 圆周状细胞角蛋白阳性细胞质,具有比周围有核 WBC 大 600% 的平均强度。通常虽非必需的 HD-CTC 特征包括相当大的核直至周围 WBC 核平均大小的 5 倍;核周线,区别于周围的 WBC 核,包括伸长;大细胞质结构域,具有常常偏心的分布和 / 或多边形或细长形的细胞质形状;和成对 HD-CTC 以及 3 个或更多 HD-CTC 的簇。其他细胞状物质——细胞角蛋白阳性, CD45 阴性,并包含核,但不符合入选标准,例如与 WBC 大小相同或具有非圆周状的细胞质——不被作为 HD-CTC 计数,但由分析追踪。本方法的目的是具有严格的特定 CTC 表型入选标准,同时保留关于仅满足其中一些要求但仍可具有临床意义的事件——如凋亡肿瘤细胞或肿瘤细胞片段或进行上皮向间质转化的细胞——的数据。

[0132] 结果

[0133] 利用添加(Spike-in)实验的分析线性和敏感度:为测试分析线性和敏感度,范围在 10 至 300 个乳腺癌细胞系 SKBR3 的具体稀释液被加入正常对照血液。实验一式四份进行,并根据方法章节所述的 HD-CTC 分析进行处理和分析。将平均 SKBR3 观察值相对于预期 SKBR3 作图,并显示相关系数(R^2) 0.9997 (图 1)。

[0134] 癌症患者 HD-CTC 数量的分析稳固性:针对多个处理器和拆分样本测试 HD-CTC 分析的分析稳固性。重复测试由两个单独的处理器对 9 个不同的患者样本进行。两个处理器之间利用拆分样本进行的 HD-CTC/mL 数量比较具有 0.979 的相关系数(R^2) (图 3)。所有数据均由一个对实验不知情的操作人员分析。

[0135] 正常对照样本的分析特异性:对 15 位来自公共健康捐献库(institutional healthy donor pool)的健康捐献者进行评价作为对照群,其由 8 位女性和 7 位男性组成,年龄范围在 24 至 62 岁。在除了一个外的全部健康对照中,这种事件的数量在针对体积进行校正时为 1HD-CTC/ml 或更少。离群者为健康的女性捐献者,其具有 4/ml 的 HD-CTC 数。基于对其细胞的明确审查,其约三分之一非常符合所有入选标准,而剩余的三分之二符合所有标准,但一个或多个标准接近入选下限。另外 4 个健康捐献者具有 1HD-CTC/ml。对这些细胞的明确审查显示类似的特征,即约三分之一非常符合所有标准,而剩余的三分之二细胞符合标准,但一个或多个标准接近入选下限。接近入选下限的入选事件实例是通过形态评价测量比周围 WBC 大 30% 但没有表现出显著增大的细胞;和略微离焦并可具有目视不可检测的凋亡核变化的细胞,并且最终,具有截止以上的客观细胞角蛋白强度测量结果但通过单通道荧光检查主观上不表现出明显亮于周围 WBC 的偶有细胞。

[0136] 表 1:HD-CTC 分析与 Cellsearch® 的比较

[0137]

癌症类型	HD-CTCs/mL	CellSearch/mL
乳腺 #1	49.3	0.1
乳腺 #2	87.0	0.0
乳腺 #3	33.4	0.1
乳腺 #4	199.3	0.1
乳腺 #5	5.0	3.1
前列腺#1	2.3	0.0
前列腺#2	8.4	0.4
前列腺#3	107.3	2.8
前列腺#4	1.3	0.0
前列腺#5	150.5	0.1
前列腺#6	0.0	0.0
前列腺#7	1.4	0.5
前列腺#8	1.5	0.1
前列腺#9	145.3	0.8
前列腺#10	57.6	0.0
(外推至 CTC/ mL)		

[0138] HD-CTC 分析与**CellSearch®**的比较:共计 15 个患者——5 个转移性乳腺癌和 10 个转移性前列腺癌,用**CellSearch®**和 HD-CTC 分析评价 CTC。从各患者收集两管血液。一管 7.5mL 血液收集在 CellSave™ 管(Veridex, Raritan NJ)中,并送至 Quest Diagnostics (San Juan Capistrano, CA)以利用**CellSearch®**分析计数 CTC。从各患者收集第二管血液,并在血液提取后 24 小时根据 HD-CTC 方案进行处理,与标准 HD-CTC 处理一致,从而模拟在 Quest Diagnostics 处理样本的定时。**CellSearch®**分析在所测 5/15 患者中检测到每 7.5mL 血液 2 个或更多个 CTC。相反,HD-CTC 分析在明显更多的患者(HD-CTC 在所测 14/15 患者中被鉴定到,表 1)中检测到显著提高数量的 CTC。

[0139] 转移性癌症患者 HD-CTC 的发生率:在 30 个转移性乳腺癌患者、20 个转移性前列腺癌患者、18 个转移性胰腺癌患者和 15 个正常对照的另一组中同样计数 HD-CTC。利用本方法,在 80% 前列腺癌患者(平均值 =92.2)、70% 乳腺癌患者(平均值 =56.8),50% 胰腺癌患者(平均值 =15.8)和 0% 正常对照(平均值 =0.6)中发现 ≥ 5 HD-CTC/mL (表 2)。

[0140] 表 2: 患者百分比与得自小组的血液 HD-CTC/mL

[0141]

	N	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 50
前列腺	20	90%	80%	65%	40%
乳腺	30	80%	70%	60%	27%
胰腺	18	61%	44%	44%	11%
正常	15	7%	0%	0%	0%

[0142] HD-CTC 的形态:观察患者体内和患者之间的 CTC 异质群。CTC 仍具有多种形状、大小和细胞角蛋白强度。在一些情况下,患者样本中的区别细胞学特征如大尺寸或多边形的

细胞质形状,是相当有区别的和单一的。在其他情况下,一个样本中的 HD-CTC 之间存在细胞形态可变性。细胞大小也不同;许多患者样本具有 HD-CTC,其核均为相邻 WBC 核大小的三倍或四倍,而其他患者具有核仅为相邻 WBC 核大小 1.3 倍的细胞。一些患者具有一定范围的大小。选择平均 WBC 核 1.3 倍的 HD-CTC 核大小下限,这是基于对我们确定为 WBC 的细胞最大核大小的评价,该细胞显示细胞角蛋白的假非特异性染色,例如,CD45 阳性和细胞角蛋白阳性。

[0143] 值得注意的是,利用该允许详细形态评价的平台,在该组多数癌症患者(88%)中确定了 HD-CTC 簇,其范围为 2 个 HD-CTC 至多于 30 个 HD-CTC 的簇(数据未显示)。各 HD-CTC 为细胞角蛋白阳性,CD45 阴性,包含 DAPI 核,并且在形态上区别于周围的有核细胞。

[0144] 除计数 HD-CTC 外,还追踪不同种类的细胞的数量,包括具有显示凋亡的核的细胞、不具有圆周状细胞角蛋白的细胞、大小与周围 WBC 相同或小于周围 WBC 的其他细胞和细胞角蛋白模糊或阴性的细胞(图像未显示)。特别是,一些 CTC 被排除,因为其缺少多个形态学或形态计量入选标准:包括下列中的一个或多个:a)细胞角蛋白强度过模糊;b)核大小过小;c)细胞角蛋白不够圆周状(外周小于 2/3 核);d)细胞角蛋白过于模糊,虽然看起来是两个极大细胞的簇;e)核显示凋亡解体变化;f)核过小,并且细胞质不够圆周状;看起来是晚期凋亡的细胞;g)核过小(与周围 WBC 核相同大小);h)细胞角蛋白存在,但非圆周状;和 i)细胞质不够圆周状,核过小。

[0145] 虽然这些事件中许多可事实上代表失巢凋亡的不同阶段或甚至平台中所用最低限度处理继发的破坏中的循环恶性上皮细胞,但目标是确定极高可能代表适于由第二方法进行的下游分析的完整循环功能性恶性潜在转移上皮细胞的‘纯’细胞群。片段的、破坏的、固缩的或其他损伤的癌细胞在标准诊断病理学中不被认为具有价值,因此其也不包括在流体相活组织检查平台内。其被计数和追踪,因为知道其存在可能总体关联于患者的肿瘤生物学——通过反映全部肿瘤负荷或通过反映一些还不被了解的涉及肿瘤负荷和肿瘤血管供应和血管内免疫监视的效力的复杂方程;但是,其不可用于第二分析,因此其不被称为 HD-CTC。

[0146] 多个患者,除具有 HD-CTC 外,还具有大量这样的细胞:具有在形态上区别于周围 WBC,类似于该样本中 HD-CTC 核的核,并且呈 CD45 阴性,但还呈细胞角蛋白模糊或阴性(数据未显示)。在一个前列腺癌患者中发现的 CTC 代表性类型包括呈细胞角蛋白和 CD45 阴性但显示类似于该患者中发现的其他 CTC 的大核的 CTC;呈细胞角蛋白阳性,CD45 阴性,和具有 DAPI 核的一般 CTC;和 4 个细胞的 CTC 簇。

[0147] 鉴于当前关于进行上皮-间质转化的癌细胞可能存在的广泛争论,这些细胞的表观和蛋白质表达特征鉴定其为这种细胞类型可能的候选。

[0148] 讨论

[0149] 用细胞系和患者样本评价 HD-CTC 平台稳固性。尽管该小组当前的 HD-CTC 分析很少应用自动化,且进行完全手动 wetlab 处理,但该分析的再现性很好,两个独立的技术人员处理的 9 个不同样本具有低于 9% 的平均 CV。

[0150] 不同技术之间,用于定义 CTC 的标准不同。现公开的鉴定出具有最高的真正(bonafide)肿瘤细胞的可能性的亚群。甚至以严格的标准,利用本分析得到的 CTC 发生率远高于多种技术,并与 CTC-芯片所报告的 CTC 发生率在相同范围内。此外,与 CellSearch®

的比较首要显示在较高比例的患者中明显更多的 CTC。但其他技术已观察到偶有成对 CTC 和 CTC 簇,在多数患者中观察到 CTC 簇。

[0151] 值得注意的是,在所测小组中,利用本发明方法得到的不同肿瘤类型中的 CTC 检测频率和相对浓度(前列腺 > 乳腺 > 胰腺)类似于利用其他方法如CellSearch®观察到的发现。

[0152] 观察到的是,CTC 追踪在进行连续提取的前列腺癌患者小亚组的整个临床过程中(图 4)。连续 HD-CTC 检测可包括在治疗性临床试验内。其预期允许对具有统一临床特征、经过类似治疗并进行长期临床后续治疗的患者的研究。除将这些细胞与患者结果相关联以确定其预后性和监测值外,预期这些 HD-CTC 充当在分子水平上评估目标药物的中靶效果的药物动力学工具。

[0153] 总之,本实施例提供了如下数据:HD-CTC 分析(i)在大多数转移性癌症患者中发现大量 CTC,(ii)具有比CellSearch®系统提高的敏感度,(iii)提供下游表征理想形式的 HD-CTC,(iii)能进行预期的样本收集,该样本可长期冷冻储存,然后可进行回顾性分析作为新试验,或标记可被应用。

[0154] 实施例 2

[0155] 稀有细胞群的 CTC 分析和鉴定

[0156] 本文所示的数据证明假定的稀有细胞群的鉴定。利用本文所述的方法,鉴定了假定的稀有细胞群。样本处理和成像如实施例 1 所公开进行。此外,HD-CTC 在实施例 1 中被鉴定和定义。

[0157] 在进行分析过程中,无 CTC 被假定呈细胞角蛋白阳性。鉴定具有下列特征的假定稀有细胞群:a)细胞角蛋白模糊或阴性;b)CD45 阴性;和 c)完整的非凋亡表现的核——通过 DAPI 成像。图 5 显示患者中假定的稀有细胞群相对于已鉴定的 HD-CTC 的发生率。

[0158] 虽然已对本发明进行描述,但要理解的是,修改和变化被包括在本发明的精神和范围内。因此,本发明仅限于所附的权利要求书。

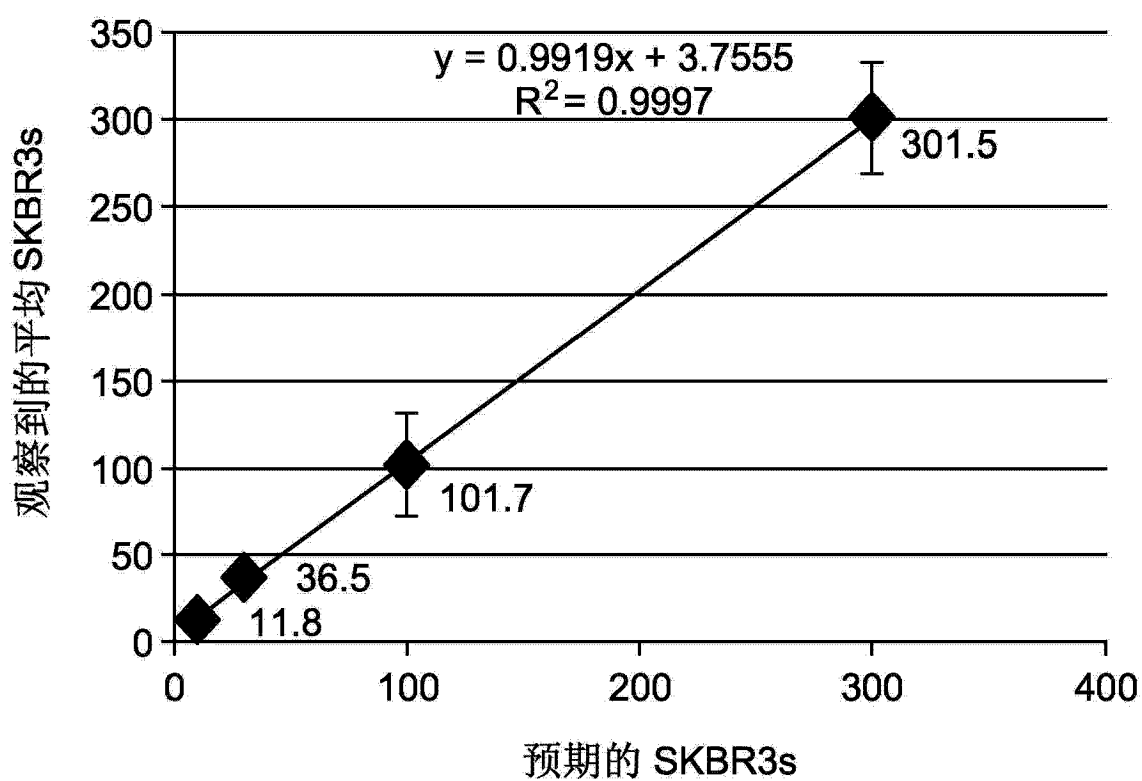


图 1

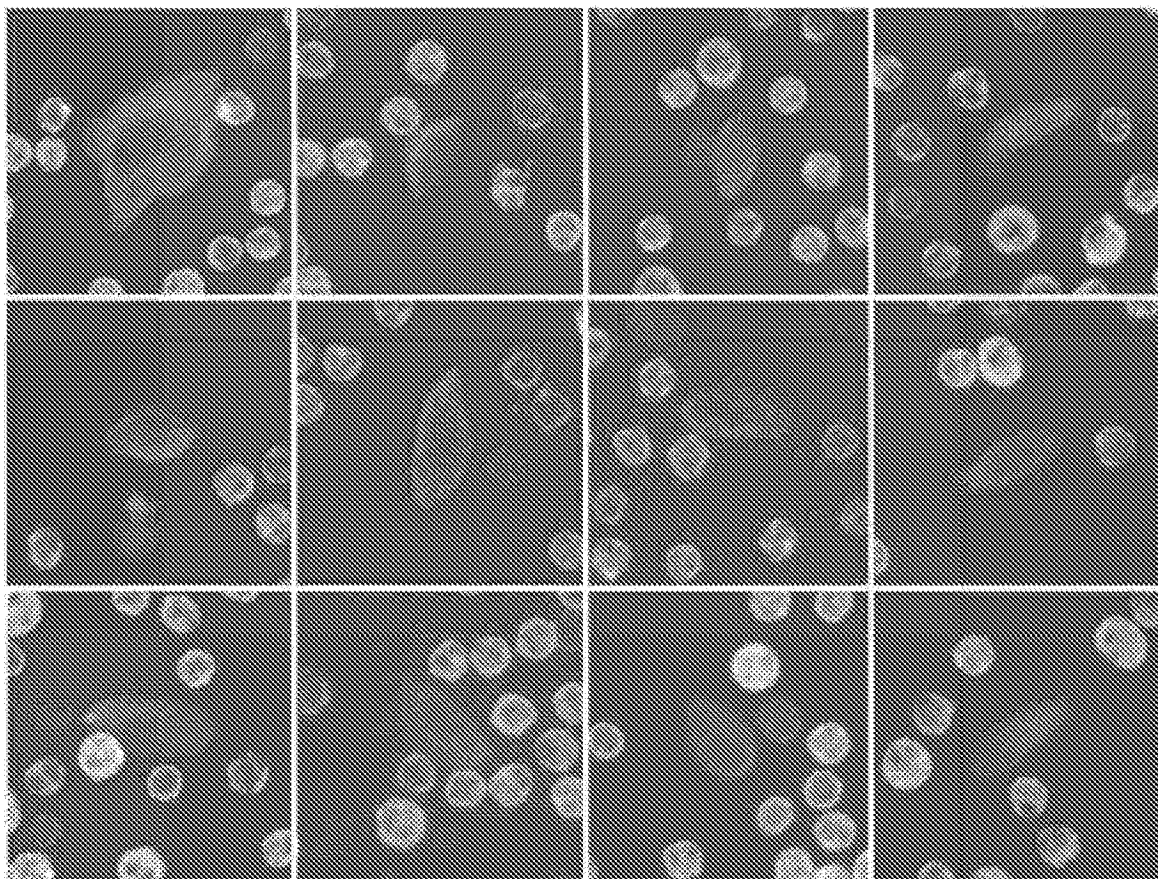


图 2

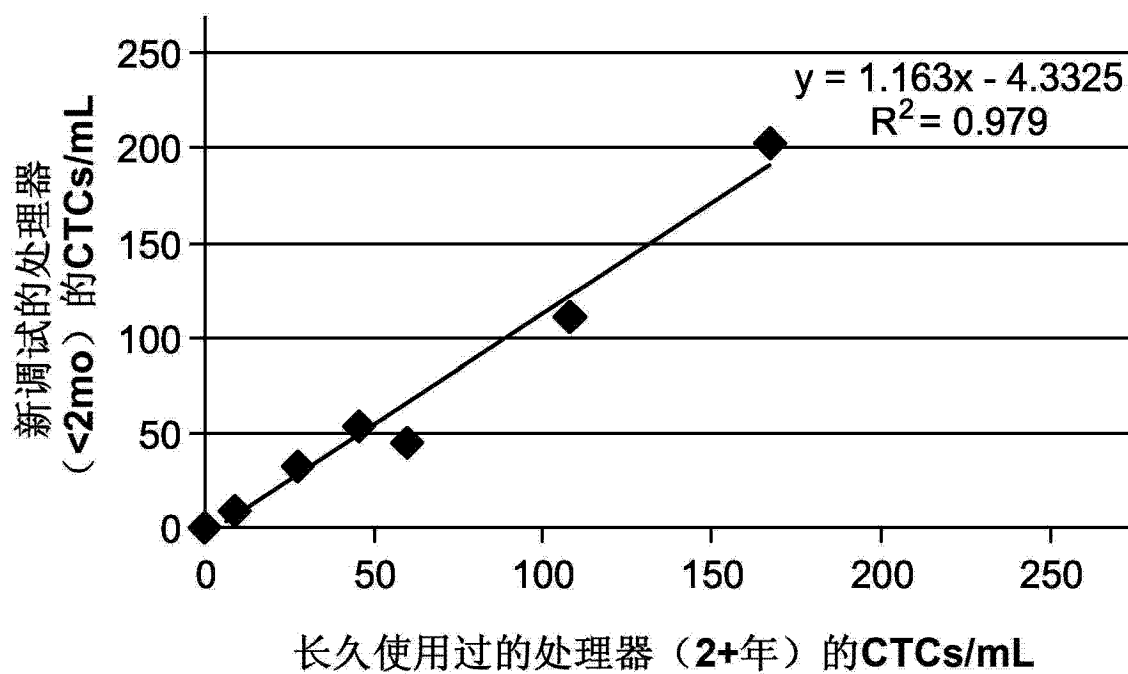


图 3

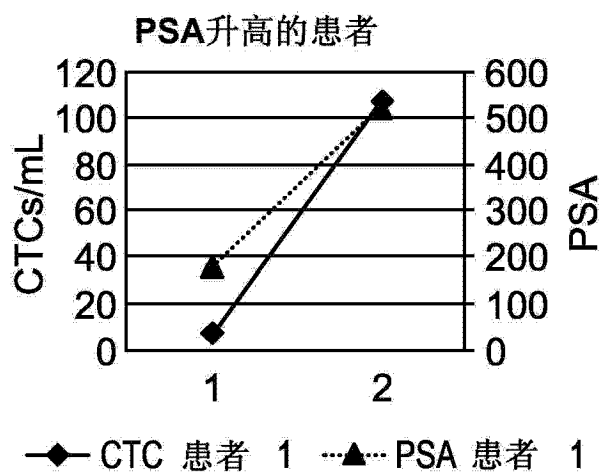


图 4A

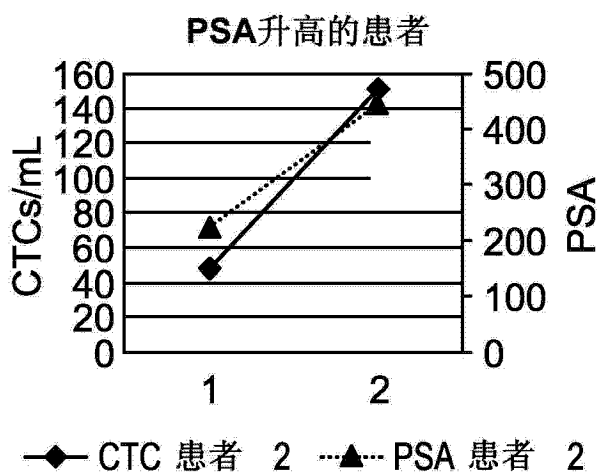


图 4B

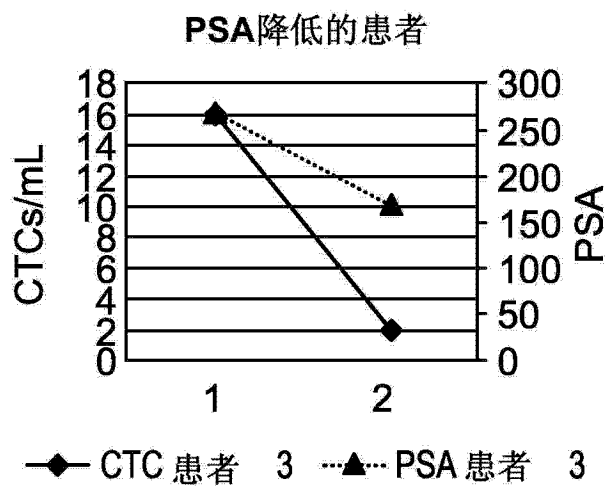


图 4C

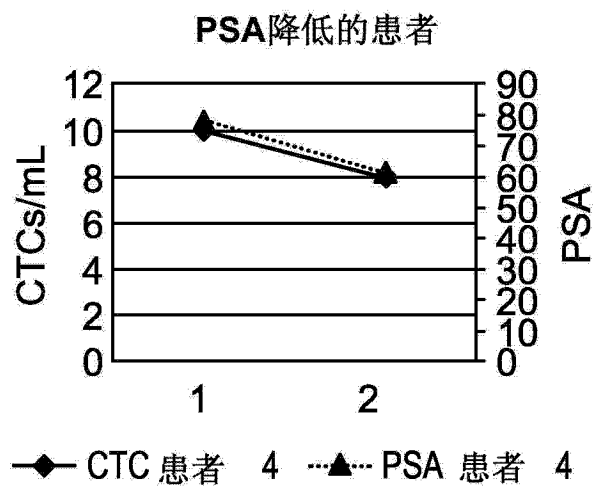


图 4D

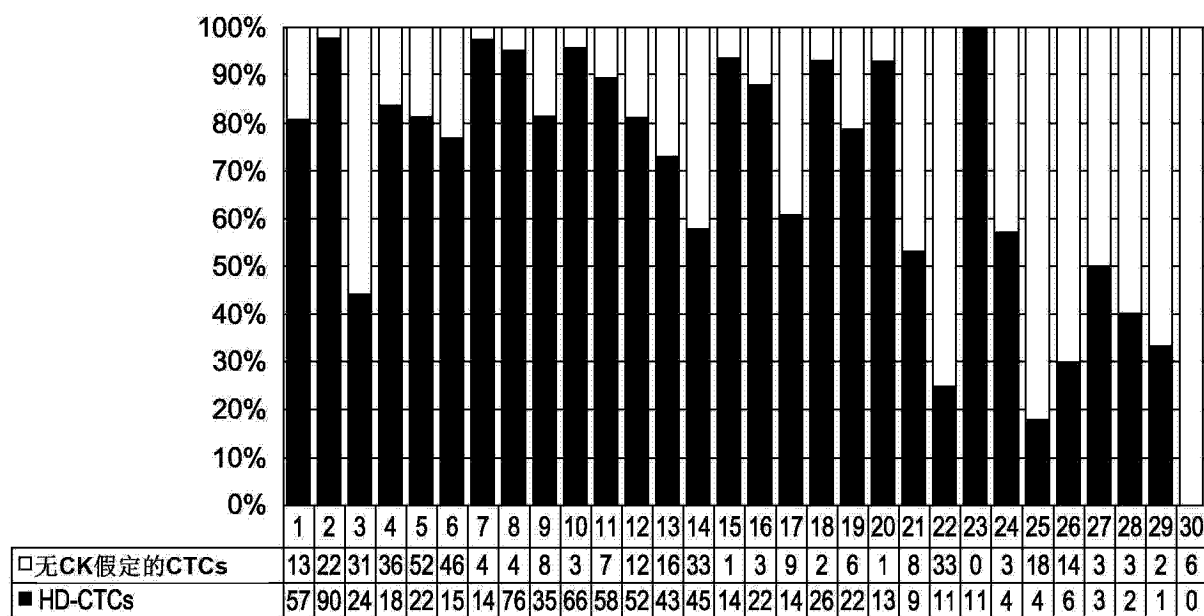


图 5