(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108165603 A
(43)申请公布日 2018.06.15

(21)申请号 201711433018.0

(22)申请日 2014.01.24

(30)优先权数据
61/756,993 2013.01.25 US
61/760,626 2013.02.04 US

(62)分案原申请数据
201480006151.6 2014.01.24

(71)申请人 艾克斯赛尔生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 詹姆斯·利姆

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

(51)Int.Cl.
C12Q 1/02(2006.01)
C12N 5/071(2010.01)
C12N 5/077(2010.01)
C12N 5/0775(2010.01)
C12N 5/078(2010.01)
C12N 5/0793(2010.01)
C12N 5/09(2010.01)
C12N 5/095(2010.01)

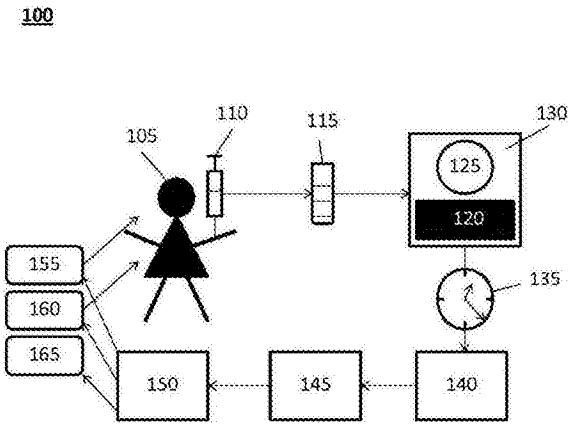
权利要求书1页 说明书59页
序列表5页 附图19页

(54)发明名称

用于选择性富集靶细胞的方法、组合物、试剂盒及系统

(57)摘要

本发明提供了用于检测、富集、培养、鉴定、分离和/或表征靶细胞亚群的方法、组合物、试剂盒和系统。本发明利用限定的环境条件来富集靶细胞亚群，该亚群可用于未来的遗传学、蛋白质组学和形态分析。该方法可以使用图像捕获和分析软件基于例如物理性质如大小、形态和动力学性质来表征细胞。



CN 108165603 A

1.一种用于从源自生物样品的异源细胞群体中选择性富集靶细胞亚群的方法，所述方法包括：

(a)使所述异源细胞群体与基底接触；以及

(b)在足以允许所述靶细胞亚群生长的条件下孵育所述异源细胞群体，其中，所述条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述异源细胞群体，其中所述孵育导致所述靶细胞亚群的选择性富集。

2.根据权利要求1所述的方法，还包括：在所述靶细胞亚群的成员显示一种或多种形态特征和/或动力学性质时，鉴定所述靶细胞亚群的所述成员，其中所述一种或多种形态特征和/或动力学性质选自集落形成、增殖、与非靶细胞的表面积相比的大表面积、与非靶细胞对所述基底的粘附相比增高的对所述基底的粘附、快速的细胞分裂以及多核化。

3.根据权利要求1或2所述的方法，其中所述靶细胞亚群包含原代细胞。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法，其中所述靶细胞亚群包含选自下组的细胞：循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、胎儿细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞、内皮祖细胞(EPC)以及上皮祖细胞。

5.根据权利要求4所述的方法，其中所述靶细胞亚群包含CTC或CSC。

6.根据权利要求5所述的方法，其中所述CTC包括转移性CTC。

7.根据权利要求5所述的方法，其中所述CTC包括活CTC。

8.根据权利要求5所述的方法，其中所述CTC包括急性白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、急性淋巴细胞性白血病细胞、急性髓细胞性白血病细胞、成髓细胞性白血病细胞、前髓细胞性白血病细胞、髓单核细胞白血病细胞、单核细胞白血病细胞、红白血病细胞、慢性白血病细胞、慢性髓细胞性(粒细胞)白血病细胞、慢性淋巴细胞性白血病细胞、真性红细胞增多症细胞、淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症细胞、重链病细胞、肉瘤细胞、纤维肉瘤细胞、粘液肉瘤细胞、脂肪肉瘤细胞、软骨肉瘤细胞、成骨性肉瘤细胞、淋巴管肉瘤细胞、间皮瘤细胞、尤因瘤细胞、平滑肌肉瘤细胞、横纹肌肉瘤细胞、结肠癌细胞、结直肠癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、去势抗性前列腺癌细胞、鳞状细胞癌细胞、基底细胞癌细胞、腺癌细胞、汗腺癌细胞、皮脂腺癌细胞、乳头状癌细胞、乳头状腺癌细胞、囊腺癌细胞、髓样癌细胞、支气管原性细胞、肾细胞癌细胞、肝细胞瘤细胞、胆管癌细胞、绒毛膜癌细胞、精原细胞瘤细胞、胚胎性癌细胞、维尔姆斯瘤细胞、宫颈癌细胞、子宫癌细胞、睾丸肿瘤细胞、肺癌细胞、小细胞肺癌细胞、膀胱癌细胞、上皮癌细胞、胶质瘤细胞、颅咽管瘤细胞、室管膜瘤细胞、松果体瘤细胞、血管母细胞瘤细胞、听神经瘤细胞、少突神经胶质瘤细胞、脑膜瘤细胞、黑色素瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、视网膜母细胞瘤细胞、子宫内膜癌细胞、非小细胞肺癌细胞、头颈癌细胞或肾癌细胞。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述鉴定不包括使用抗体或多核苷酸标记物。

10.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述生物样品包括体液或其衍生物。

用于选择性富集靶细胞的方法、组合物、试剂盒及系统

本申请是2014年01月24日提交的发明名称为“用于选择性富集靶细胞的方法、组合物、试剂盒及系统”的第201480006151.6号(国际申请号PCT/US2014/013048)中国专利申请的分案申请。

交叉引用

[0001] 本申请要求于2013年1月25日提交的美国临时申请号61/756,993的优先权,并且要求于2013年2月4日提交的美国临时申请号61/760,626的优先权,这些申请通过引用并入本文。

序列表

[0002] 本申请包含已通过EFS-Web以ASCII格式提交的序列表,该序列表通过引用而整体并入本文。所述ASCII拷贝创建于2014年1月22日,命名为43382701601Seqlist.txt,大小为11千字节。没有引入新内容。

背景技术

[0003] 从异源细胞群体中富集的细胞亚群通常是许多临床和研究应用所需要的。许多细胞亚群存在于包括血液在内的体液中。由于抽血的微创性,从血液中分离和检测细胞亚群是有吸引力的选项。在血液中发现的有用的细胞亚群的例子可以包括循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、造血干细胞(HSC)以及内皮祖细胞(EPC)。

[0004] 生命科学的最新发展凸显了对以下方法和系统的需求,该方法和系统在不损害细胞完整性的情况下快速且有效地从异源群体中分离、表征以及富集细胞亚群。然而,本领域的关键问题是:不能以足以进行有意义的研究的量来捕获和富集稀少的靶细胞亚群。目前用于分离靶细胞亚群的检测方法通常依赖于抗体的使用、细胞侵入基质的能力或复杂的微流体装置,其已经导致不一致的结果和有限的样品。例如,目前可用的用于分离细胞亚群的方法依赖于抗体来进行亲和纯化或鉴定(identification)。对抗体的依赖可能存在问题,因为细胞不可能总是表达相同的细胞表面抗原。实际上,研究表明:具有转移潜能的CTC和CSC降低了EpCAM表达。此外,诸如CTC和CSC等细胞亚群可以具有不同的分子表型,其可以随时间而改变。因此,不依赖于抗体标记物来捕获、检测和富集某些细胞亚群的方法可用于众多的应用范围。

发明内容

[0005] 本发明的方面涉及靶细胞亚群的富集、鉴定、分离和/或培养。例如,本发明提供了一种从异源细胞群体中捕获和富集靶细胞亚群的方法,包括:使来自该异源细胞群体的细胞与基底接触;以及用足以允许靶细胞亚群富集的时间,在富集培养基中孵育所述细胞,其中,基于靶细胞亚群的物理和动力学性质来分离靶细胞亚群。

[0006] 本发明还提供一种从异源细胞群体中捕获、富集和鉴定靶细胞亚群的方法,包括:使来自异源细胞群体的细胞与基底接触;将靶细胞亚群在富集培养基中孵育足以允许靶细胞亚群富集的时间;使用一装置,随时间的推移而获得靶细胞亚群的图像;以及使用软件对

该图像进行分析，其中，该软件能够基于细胞的物理和动力学性质自动地分类所述细胞。在一些实施方案中，该软件基于物理性质对参数进行整合，其中该参数选自：细胞总大小、细胞形状、细胞运动、细胞核大小和细胞分裂。在一些实施方案中，该软件检测细胞的荧光标记。

[0007] 本发明还提供了一种用于从人类受试者捕获并富集CTC的方法，包括：从人体抽血；使包含在血液中的细胞接触基底；使细胞在培养基中孵育足以允许CTC富集的时间；以及使用一装置，自动地进行CTC的图像分析和CTC的分类，其中该分类用于指导对癌症患者的治疗。

[0008] 在实施上述任一方法中，靶细胞亚群可以选自：循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、胎儿细胞、干细胞、成体干细胞、免疫细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞、内皮祖细胞(EPC)、癌细胞和上皮祖细胞。

[0009] 在实施上述任何方法中，异源细胞群体可以包括体液或其衍生物。在一些实施方案中，异源细胞群体包括体液或其衍生物以及来自不同来源的、具有被标记的能力的细胞。在一些实施方案中，分离并培养来自靶细胞亚群的一种或多种细胞。

[0010] 在实施上述任何方法中，基底可以选自：GOL基底；GEL基底；以及细胞。在一些实施方案中，基底的构造选自：单层、双层、中间层以及反转构造。

[0011] 在上述任何方法的一些实施方案中，富集培养基选自：涂布培养基(Plating Culture Medium)；R型长期生长培养基；DF型长期生长培养基；D型长期生长培养基；MEF-富集培养基；及其任意组合。在一些实施方案中，使用显微操作分离一种或多种单独的细胞。

[0012] 在上述方法的一些实施方案中，使用显微操作从靶细胞群体中分离一种或多种细胞。

[0013] 本发明的上述任何方法可以用于多种临床应用。在一些实施方案中，本发明的方法用于监测患者以研究癌症的存在。在一些实施方案中，重复进行血液的系列检验，从而预测癌症复发的可能性。在一些实施方案中，将分离的细胞任选地培养以用于药理学试验，从而确定癌症患者的最佳治疗模式。在一些实施方案中，使分离的细胞繁殖，以生成细胞培养物。在一些实施方案中，细胞培养物用于癌症研究。在一些实施方案中，细胞的分类指导癌症患者的诊断、预后或治疗诊断。在一些实施方案中，该方法包括经网络传输关于分类的数据。

[0014] 本发明还提供了一种包含代码的计算机可读介质，在由一个或多个处理器执行时，该代码实现上述任何方法。

[0015] 本发明还提供一种用于实施如权利要求10所述的方法的系统，包括：存储器，其用于储存与样品相关的数据集；处理器，其通信地耦合至该存储器；以及该数据集。

[0016] 本发明还提供一种用于从源自生物样品的异源细胞群体中选择性富集靶细胞亚群的方法，该方法包括：将异源细胞群体与基底接触；以及在足以允许靶细胞亚群生长的条件下孵育该异源细胞群体，其中该条件包括：在正压条件和/或低氧条件下孵育该异源细胞群体，其中该孵育导致靶细胞亚群的选择性富集。

[0017] 在一些实施方案中，该方法还包括在靶细胞亚群的成员显示一种或多种形态特征和/或动力学性质时，鉴定靶细胞亚群的成员(member)，其中所述一种或多种形态特征和/或动力学性质选自集落形成、增殖、与非靶细胞的表面积相比的大表面积、与非靶细胞对基

底的粘附相比增高的对基底的粘附、快速的细胞分裂以及多核化。在一些实施方案中，鉴定不包括使用抗体或多核苷酸标记物。

[0018] 在一些实施方案中，靶细胞亚群包含原代细胞。在一些实施方案中，靶细胞亚群包含选自下组的细胞：循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、胎儿细胞、干细胞、成体干细胞、免疫细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞、内皮祖细胞(EPC)、癌细胞以及上皮祖细胞。在一些实施方案中，靶细胞亚群的成员是CTC或CSC。在一些实施方案中，该CTC是转移性CTC。在一些实施方案中，该CTC是活CTC。在一些实施方案中，该CTC是急性白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、急性淋巴细胞性白血病细胞、急性髓细胞性白血病细胞、成髓细胞性白血病细胞、前髓细胞性白血病细胞、髓单核细胞白血病细胞、单核细胞白血病细胞、红白血病细胞、慢性白血病细胞、慢性髓细胞性(粒细胞)白血病细胞、慢性淋巴细胞性白血病细胞、真性红细胞增多症细胞、淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症细胞(Waldenström's macroglobulinemia cell)、重链病细胞、肉瘤细胞、纤维肉瘤细胞、粘液肉瘤细胞、脂肪肉瘤细胞、软骨肉瘤细胞、成骨性肉瘤细胞、淋巴管肉瘤细胞、间皮瘤细胞、尤因瘤细胞(Ewing's tumor cell)、平滑肌肉瘤细胞、横纹肌肉瘤细胞、结肠癌细胞、结直肠癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、去势抗性前列腺癌细胞(castration resistant prostate cancer cell)、鳞状细胞癌细胞、基底细胞癌细胞、腺癌细胞、汗腺癌细胞、皮脂腺癌细胞、乳头状癌细胞、乳突状腺癌细胞、囊腺癌细胞、髓样癌细胞、支气管原性细胞、肾细胞癌细胞、肝细胞瘤细胞、胆管癌细胞、绒毛膜癌细胞、精原细胞瘤细胞、胚胎性癌细胞、维尔姆斯瘤细胞(Wilms'tumor cell)、宫颈癌细胞、子宫癌细胞、睾丸肿瘤细胞、肺癌细胞、小细胞肺癌细胞、膀胱癌细胞、上皮癌细胞、胶质瘤细胞、颅咽管瘤细胞、室管膜瘤细胞、松果体瘤细胞、血管母细胞瘤细胞、听神经瘤细胞、少突神经胶质瘤细胞、脑膜瘤细胞、黑色素瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、视网膜母细胞瘤细胞、子宫内膜癌细胞、非小细胞肺癌细胞、头颈癌细胞或肾癌细胞。在一些实施方案中，非靶原代细胞亚群包含白细胞、衰老上皮细胞、成纤维细胞、非活细胞或破碎的细胞。

[0019] 在一些实施方案中，生物样品包括体液或其衍生物。在一些实施方案中，该体液选自血液、血浆、血清、淋巴、唾液、尿液、汗液或腹水。在一些实施方案中，靶细胞亚群的成员以1个靶细胞/ml体液或其衍生物或更低的浓度存在。在一些实施方案中，靶细胞亚群的成员以0.8个靶细胞/ml体液或其衍生物或更低的浓度存在。在一些实施方案中，靶细胞亚群的成员以0.6个靶细胞/ml体液或其衍生物或更低的浓度存在。在一些实施方案中，生物样品包括实体组织样品。

[0020] 在一些实施方案中，所述基底包括涂层，其中该涂层选自GOL基底、GEL基底、一层或多层饲养细胞，以及它们的任意组合。在一些实施方案中，基底的构造选自：单层构造、双层构造、中间层构造以及反转构造。

[0021] 在一些实施方案中，该方法进一步包括单独地分离靶细胞亚群的成员。在一些实施方案中，该方法包括单独地分离和培养靶细胞亚群的成员。在一些实施方案中，该分离包括使用显微操作设备。

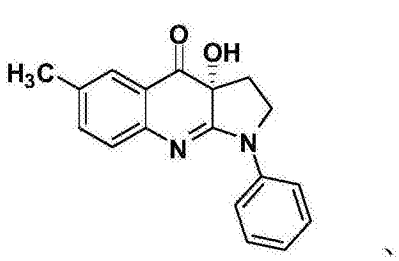
[0022] 在一些实施方案中，该方法包括将靶细胞亚群的成员作为细胞培养物培养超过2周。

[0023] 在一些实施方案中，低氧条件包括在低于10％的O_2水平下培养。在一些实施方案中，O_2水平为1％。

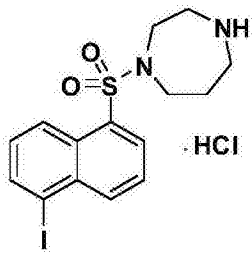
[0024] 在一些实施方案中，正压条件包括在14.7PSIA以上的加压条件下培养所述成员。在一些实施方案中，正压条件包括在15PSIA或更高的加压条件下培养所述成员。在一些实施方案中，正压条件包括在15.7PSIA或更高的加压条件下培养所述成员。在一些实施方案中，正压条件包括在16.7PSIA或更高的加压条件下培养所述成员。在一些实施方案中，正压条件包括在19.7PSIA的加压条件下培养所述成员。

[0025] 在一些实施方案中，所述条件还包括在选自下组的细胞培养基中培养靶细胞亚群的成员：涂布培养基；R型长期生长培养基；DF型长期生长培养基；D型长期生长培养基；MEF-条件培养基；及其任何组合。在一些实施方案中，所述条件还包括在包含EGF、氢化可的松、孕酮、双氢睾酮和/或其任意组合的细胞培养基中培养靶细胞亚群的成员。

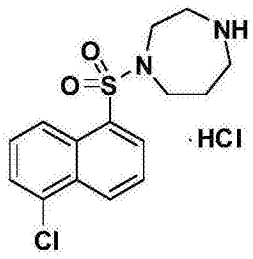
[0026] 在一些实施方案中，条件包括在包含能够调节细胞表面张力的化合物的细胞培养基中培养所述成员。在一些实施方案中，该化合物是Rho激酶抑制剂。在一些实施方案中，该化合物选自：



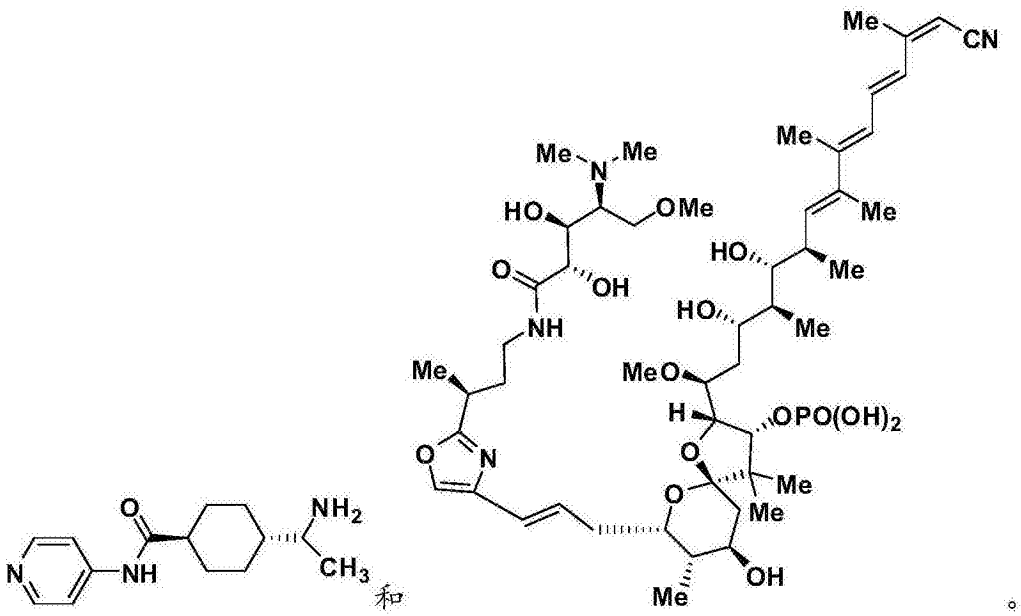
、



、



、



和。

[0027] 在一些实施方案中，所述条件包括将所述成员与能够提高该成员中低氧诱导因子的表达的试剂一起培养。在一些实施方案中，该低氧诱导因子包括低氧诱导因子-1α(HIF-1α)、低氧诱导因子-1β(HIF-1β)、低氧诱导因子-2α(HIF-2α)、低氧诱导因子-2β(HIF-2β)、低氧诱导因子-3α(HIF-3α)、低氧诱导因子-3β(HIF-3β)或其任意组合。在一些实施方案中，该低氧诱导因子包括HIF-1α。在一些实施方案中，能够提高低氧诱导因子的表达的试剂包括载体，其中该载体包含编码该低氧诱导因子的多核苷酸。在一些实施方案中，该载体是表达

载体(expression vector)。在一些实施方案中,该低氧诱导因子包含与SEQ.ID.NO.1有至少70%或更高的同源性的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,该多核苷酸与SEQ.ID.NO.2有至少70%或更高的同源性或互补性。

[0029] 在实施前述任何方法中,该方法可以包括使细胞培养基与饲养细胞接触。在一些实施方案中,该饲养细胞选自培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人肺微血管内皮细胞(HLMVEC)和小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)。

[0030] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,该方法包括对靶细胞亚群的成员进行测序。在一些实施方案中,该方法包括确定靶细胞亚群的成员中一种或多种基因的表达。在一些实施方案中,该方法包括确定靶细胞亚群的成员中一种或多种蛋白质的表达。

[0031] 在一些实施方案中,所述鉴定包括:获得所述成员的图像;以及使用计算机可读介质自动地将所述成员分类为属于靶细胞亚群。在一些实施方案中,该计算机可读介质被配置成自动地分类循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、胎儿细胞、干细胞、成体干细胞、免疫细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞、内皮祖细胞(EPC)、癌细胞以及上皮祖细胞。在一些实施方案中,该计算机可读介质被配置成自动地分类循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、造血干细胞(HSC)和内皮祖细胞(EPC)。在一些实施方案中,该计算机可读介质被配置成基于靶细胞亚群的物理性质对参数进行整合,其中该参数选自由细胞总大小、细胞形状、细胞运动、细胞核大小和细胞分裂组成的组。在一些实施方案中,该计算机可读介质被配置为检测细胞的荧光标记。

[0032] 本发明还提供一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,包括在检测源自受试者的生物样品中的靶细胞时向受试者施用抗癌剂,其中该靶细胞通过本文所述的方法进行检测。

[0033] 本发明还提供一种向有需要的受试者施用抗癌剂的方法,包括:在多个时间点向该受试者施用抗癌剂;在施用的至少第一时间点和第二时间点分析源自来源于该受试者的生物样品的靶细胞,其中该分析包括前述权利要求中任一项所述的方法;基于该分析调节抗聚集剂的剂量和/或选择不同的抗聚集剂以供施用。

[0034] 本发明还提供一种检测尚未发展成转移癌的受试者发展成转移癌的提高的可能性的方法,包括:使用本文所述的方法从源自该受试者的异源细胞群体中分离靶细胞亚群;检测该靶细胞亚群;以及经该检测,将该受试者指定为具有发展成该转移癌的提高的可能性。

[0035] 本发明还提供一种开发抗癌疗法的方法,包括:利用本文所述的方法培养靶细胞亚群;使该靶细胞亚群与测试剂接触;测定该靶细胞亚群的活力和/或生长;以及如果与未接触该测试剂的靶细胞亚群相比,该靶细胞亚群的活力和/或生长下降,则选择该测试剂作为抗癌疗法。

[0036] 本发明还提供一种为有需要的受试者选择个性化疾病疗法的方法,包括:利用本文所述的方法培养靶细胞亚群;对来自该细胞亚群的成员的核酸进行测序,从而产生该靶细胞亚群的成员的遗传谱;以及基于该靶细胞亚群的成员的遗传谱,为该受试者选择个性化疾病疗法。在一些实施方案中,该方法还包括将个性化疾病疗法推荐给受试者。在一些实施方案中,该个性化的疾病疗法是个性化的癌症疗法。

[0037] 本发明还提供一种细胞培养孵箱，其包括：封闭环境室；其中该细胞培养孵箱被配置成维持(i)该封闭环境室的气体组成，(ii)该封闭环境室的用户控制的气压，和(iii)该封闭环境室的内部环境温度。在一些实施方案中，该细胞培养孵箱包括一个或多个控制单元，其中所述一个或多个控制单元被配置为维持气体组成、用户控制的气压和内部环境温度中的至少一个。在一些实施方案中，所述一个或多个控制单元被配置为维持气体组成、用户控制的气压和内部环境温度中的至少两个。在一些实施方案中，所述一个或多个控制单元被配置为维持气体组成、用户控制的气压和内部环境温度。在一些实施方案中，气体组成、用户控制的气压和内部环境温度中的至少一个被配置成用于靶原代细胞亚群与非靶原代细胞亚群相比的选择性增殖。在一些实施方案中，该选择性增殖由以下得到证实：与非靶原代细胞亚群的增殖相比，靶原代细胞亚群的增殖提高两倍。在一些实施方案中，气体组成、用户控制的气压和内部环境温度中的至少一个被配置成用于靶原代细胞亚群与非靶原代细胞亚群相比的选择性粘附。在一些实施方案中，该选择性粘附由以下得到证实：与非靶原代细胞亚群的粘附相比，靶原代细胞亚群的粘附提高两倍。在一些实施方案中，气体组成、用户控制的气压和内部环境温度中的至少一个被配置成用于促进靶原代细胞亚群与非靶原代细胞亚群的集落形成相比的选择性集落形成。在一些实施方案中，该选择性集落形成由以下得到证实：与非靶原代细胞亚群的集落形成相比，靶原代细胞亚群的集落形成提高两倍。在一些实施方案中，该集落形成是二维和/或三维集落形成。

[0038] 在一些实施方案中，靶原代细胞亚群选自循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、胎儿细胞、干细胞、成体干细胞、免疫细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞、内皮祖细胞(EPC)、癌细胞以及上皮祖细胞。在一些实施方案中，靶原代细胞亚群选自循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、造血干细胞(HSC)和内皮祖细胞(EPC)。在一些实施方案中，靶原代细胞亚群选自循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、原代胎儿细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞和内皮祖细胞(EPC)。在一些实施方案中，靶原代细胞亚群选自CTC和CSC。在一些实施方案中，该循环肿瘤细胞(CTC)是急性白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、急性淋巴细胞性白血病细胞、急性髓细胞性白血病细胞、成髓细胞性白血病细胞、前髓细胞性白血病细胞、髓单核细胞白血病细胞、单核细胞白血病细胞、红白血病细胞、慢性白血病细胞、慢性髓细胞性(粒细胞)白血病细胞、慢性淋巴细胞性白血病细胞、真性红细胞增多症细胞、淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症细胞、重链病细胞、肉瘤细胞、纤维肉瘤细胞、粘液肉瘤细胞、脂肪肉瘤细胞、软骨肉瘤细胞、成骨性肉瘤细胞、淋巴管肉瘤细胞、间皮瘤细胞、尤因瘤细胞、平滑肌肉瘤细胞、横纹肌肉瘤细胞、结肠癌细胞、结直肠癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、去势抗性前列腺癌细胞、鳞状细胞癌细胞、基底细胞癌细胞、腺癌细胞、汗腺癌细胞、皮脂腺癌细胞、乳头状癌细胞、乳头状腺癌细胞、囊腺癌细胞、髓样癌细胞、支气管原性细胞、肾细胞癌细胞、肝细胞瘤细胞、胆管癌细胞、绒毛膜癌细胞、精原细胞瘤细胞、胚胎性癌细胞、维尔姆斯瘤细胞、宫颈癌细胞、子宫癌细胞、睾丸肿瘤细胞、肺癌细胞、小细胞肺癌细胞、膀胱癌细胞、上皮癌细胞、胶质瘤细胞、颅咽管瘤细胞、室管膜瘤细胞、松果体瘤细胞、血管母细胞瘤细胞、听神经瘤细胞、少突神经胶质瘤细胞、脑膜瘤细胞、黑色素瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、视网膜母细胞瘤细胞、子宫内膜癌细胞、非小细胞肺癌细胞、头颈癌细胞或肾癌细胞。在一些实施方案中，非

靶原代细胞亚群包含白细胞、衰老上皮细胞、成纤维细胞、非活细胞或破碎的细胞。

[0039] 在一些实施方案中，所述气体组成包含0.1-20％的O_2水平。在一些实施方案中，细胞培养孵箱维持封闭环境室的O_2水平为不超过5％。在一些实施方案中，细胞培养孵箱维持封闭环境室的O_2水平为不超过2％。在一些实施方案中，细胞培养孵箱维持封闭环境室的O_2水平为不超过1％。

[0040] 在一些实施方案中，细胞培养孵箱维持封闭环境室的用户控制的气压为15.7PSIA或更高。在一些实施方案中，细胞培养孵箱维持封闭环境室的用户控制的气压为16.7PSIA或更高。在一些实施方案中，细胞培养孵箱维持封闭环境室的用户控制的气压为19.7PSIA。在一些实施方案中，细胞培养孵箱通过控制入口气体压力来维持气压。

[0041] 在一些实施方案中，细胞培养孵箱包括一个或多个用户界面。在一些实施方案中，所述一个或多个用户界面被配置为允许用户来控制气体组成。在一些实施方案中，所述一个或多个用户界面被配置为允许用户控制O_2水平。在一些实施方案中，所述一个或多个用户界面被配置为允许用户控制气压。在一些实施方案中，所述一个或多个用户界面被配置成将气体组成的显示提供给用户。在一些实施方案中，所述一个或多个用户界面被配置成将O_2水平的显示提供给用户。在一些实施方案中，所述一个或多个用户界面被配置成将气压的显示提供给用户。在一些实施方案中，细胞培养孵箱被配置成维持(iv)封闭环境室的内部湿度。在一些实施方案中，封闭环境室包括搁架(shelf)。在一些实施方案中，封闭环境室包括压力传感器。在一些实施方案中，封闭环境室包括O_2传感器。在一些实施方案中，封闭环境室包括除氧催化剂。

[0042] 在一些实施方案中，封闭环境室包括灭菌单元。在一些实施方案中，该灭菌单元是UV灭菌单元。在一些实施方案中，封闭环境室包括加压门。在一些实施方案中，封闭环境室包括这样的传感器：当检测到封闭环境室的O_2水平与用户控制的O_2水平相差超过±0.5％时，该传感器提供可检测的警报。在一些实施方案中，封闭环境室包括这样的传感器：当检测到封闭环境室的气压与用户控制的气压相差超过±0.5％时，该传感器提供可检测的警报。在一些实施方案中，封闭环境室包括显示封闭环境室的气压水平的用户显示器。在一些实施方案中，封闭环境室包括显示封闭环境室的O_2水平的用户显示器。在一些实施方案中，封闭环境室包括显示封闭环境室的CO_2水平的用户显示器。在一些实施方案中，封闭环境室包括显示封闭环境室的温度水平的用户显示器。

[0043] 在一些实施方案中，封闭环境室占据不超过6立方英尺的空间。在一些实施方案中，封闭环境室占据不超过3.5立方英尺的空间。在一些实施方案中，封闭环境室占据不超过2立方英尺的空间。在一些实施方案中，封闭环境室占据不超过1.5立方英尺的空间。在一些实施方案中，封闭环境室占据不超过1立方英尺的空间。在一些实施方案中，封闭环境室占据小于1立方英尺的空间。

[0044] 在一些实施方案中，细胞培养孵箱还包括位于封闭环境室内的细胞成像系统。在一些实施方案中，该细胞成像系统包括显微镜。在一些实施方案中，该显微镜是倒置显微镜。在一些实施方案中，该细胞成像系统包括显微操作设备，其中，该显微操作设备被配置为能够分离靶细胞。在一些实施方案中，该细胞成像系统被可操作地连接到计算机系统，其中该计算机系统包括本文所述的计算机可读介质。在一些实施方案中，该细胞成像系统被配置成用于活细胞成像。在一些实施方案中，该细胞成像系统被配置成用于高内涵筛选分

析(high content screening analysis)。

[0045] 本发明还提供一种细胞培养板，其包括细胞培养基底，其中该基底被选择成能够促进靶细胞向该基底上的粘附，其中靶细胞是粘附性的和活的细胞，并且该基底包含胞外基质蛋白质。在一些实施方案中，该细胞培养板被配置成：当靶细胞粘附到基底上时，促进靶细胞的长期培养。在一些实施方案中，靶细胞是原代细胞。在一些实施方案中，该原代细胞选自循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞，造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、胎儿细胞、干细胞、成体干细胞、免疫细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞、内皮祖细胞(EPC)、癌细胞和上皮祖细胞。在一些实施方案中，该原代细胞选自循环肿瘤细胞的(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、原代胎儿细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞和内皮祖细胞(EPC)。在一些实施方案中，该循环肿瘤细胞(CTC)是急性白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、急性淋巴细胞性白血病细胞、急性髓细胞性白血病细胞、成髓细胞性白血病细胞、前髓细胞性白血病细胞、髓单核细胞白血病细胞、单核细胞白血病细胞、红白血病细胞、慢性白血病细胞、慢性髓细胞性(粒细胞)白血病细胞、慢性淋巴细胞性白血病细胞、真性红细胞增多症细胞、淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症细胞、重链病细胞、肉瘤细胞、纤维肉瘤细胞、粘液肉瘤细胞、脂肪肉瘤细胞、软骨肉瘤细胞、成骨性肉瘤细胞、淋巴管肉瘤细胞、间皮瘤细胞、尤因瘤细胞、平滑肌肉瘤细胞、横纹肌肉瘤细胞、结肠癌细胞、结直肠癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、去势抗性前列腺癌细胞、鳞状细胞癌细胞、基底细胞癌细胞、腺癌细胞、汗腺癌细胞、皮脂腺癌细胞、乳头状癌细胞、乳头状腺癌细胞、囊腺癌细胞、髓样癌细胞、支气管原性细胞、肾细胞癌细胞、肝细胞瘤细胞、胆管癌细胞、绒毛膜癌细胞、精原细胞瘤细胞、胚胎性癌细胞、维尔姆斯瘤细胞、宫颈癌细胞、子宫癌细胞、睾丸肿瘤细胞、肺癌细胞、小细胞肺癌细胞、膀胱癌细胞、上皮癌细胞、胶质瘤细胞、颅咽管瘤细胞、室管膜瘤细胞、松果体瘤细胞、血管母细胞瘤细胞、听神经瘤细胞、少突神经胶质瘤细胞、脑膜瘤细胞、黑色素瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、视网膜母细胞瘤细胞、子宫内膜癌细胞、非小细胞肺癌细胞、头颈癌细胞或肾癌细胞。在一些实施方案中，非靶原代细胞亚群包含白细胞、衰老上皮细胞、成纤维细胞、非活细胞或破碎的细胞。在一些实施方案中，所述基底还包含带正电荷的分子。在一些实施方案中，该带正电荷的分子是聚鸟氨酸。

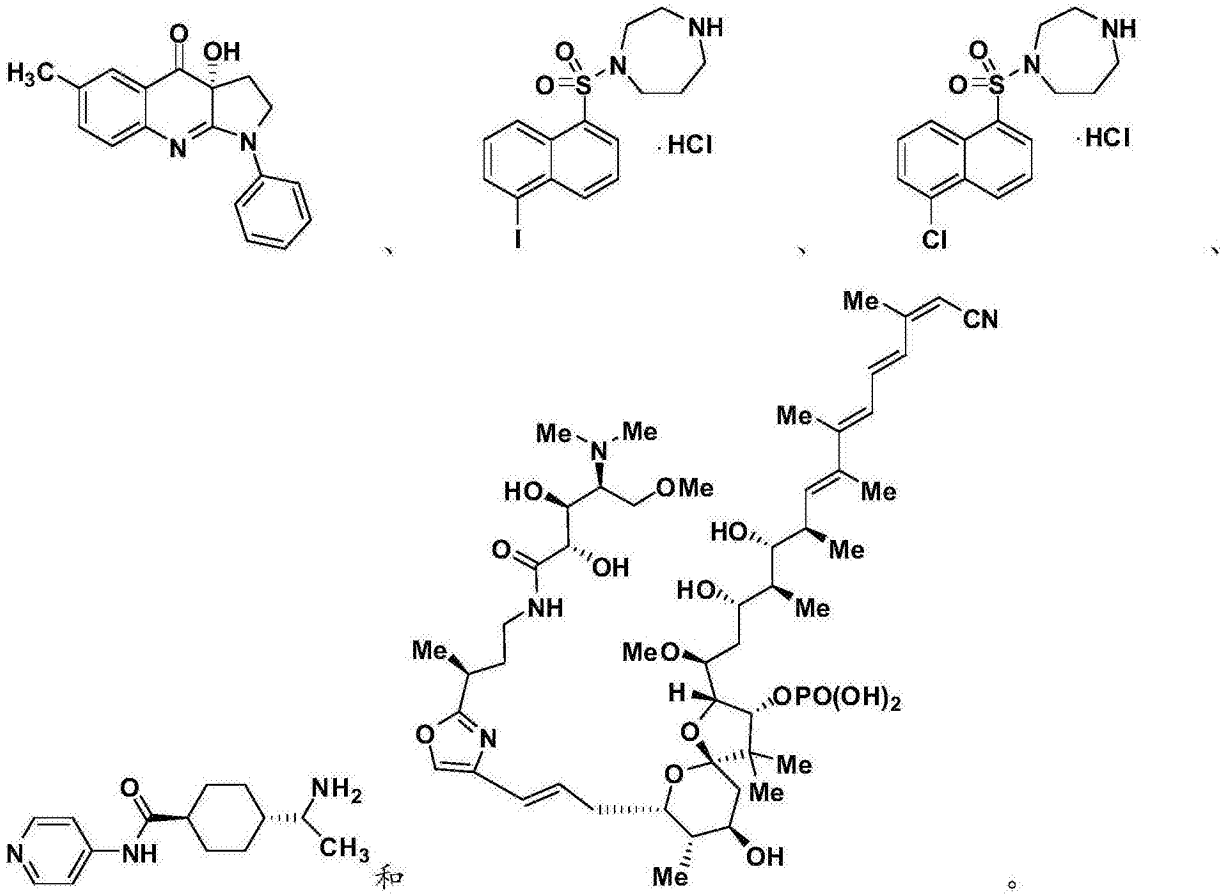
[0046] 本发明还提供了一种细胞培养板，其包括第一细胞培养基底和至少第二细胞培养基底，其中，第一细胞培养基底被配置成促进第一靶细胞亚群的长期培养，并且其中至少第二细胞培养基底被配置成促进第二靶细胞亚群的长期培养。在一些实施方案中，该细胞培养板包括至少两个孔，其中所述至少两个孔中的第一个包括第一细胞培养基底，并且其中所述至少两个孔中的第二个包含至少第二细胞培养基底。在一些实施方案中，第一靶细胞亚群和/或至少第二细胞培养亚群选自循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、胎儿细胞、干细胞、成体干细胞、免疫细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞、内皮祖细胞(EPC)、癌细胞和上皮祖细胞。在一些实施方案中，第一靶细胞亚群和/或至少第二细胞培养亚群选自循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、原代胎儿细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞和内皮祖细胞(EPC)。在一些实施方案中，该循环肿瘤细胞(CTC)是急性白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、急性淋巴细胞性白血病细胞、急性髓细胞性白血病细胞、成髓细胞

性白血病细胞、前髓细胞性白血病细胞、髓单核细胞白血病细胞、单核细胞白血病细胞、红白血病细胞、慢性白血病细胞、慢性髓细胞性(粒细胞)白血病细胞、慢性淋巴细胞性白血病细胞、真性红细胞增多症细胞、淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症细胞、重链病细胞、肉瘤细胞、纤维肉瘤细胞、粘液肉瘤细胞、脂肪肉瘤细胞、软骨肉瘤细胞、成骨性肉瘤细胞、淋巴管肉瘤细胞、间皮瘤细胞、尤因瘤细胞、平滑肌肉瘤细胞、横纹肌肉瘤细胞、结肠癌细胞、结直肠癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、去势抗性前列腺癌细胞、鳞状细胞癌细胞、基底细胞癌细胞、腺癌细胞、汗腺癌细胞、皮脂腺癌细胞、乳头状癌细胞、乳头状腺癌细胞、囊腺癌细胞、髓样癌细胞、支气管原性细胞、肾细胞癌细胞、肝细胞瘤细胞、胆管癌细胞、绒毛膜癌细胞、精原细胞瘤细胞、胚胎性癌细胞、维尔姆斯瘤细胞、宫颈癌细胞、子宫癌细胞、睾丸肿瘤细胞、肺癌细胞、小细胞肺癌细胞、膀胱癌细胞、上皮癌细胞、胶质瘤细胞、颅咽管瘤细胞、室管膜瘤细胞、松果体瘤细胞、血管母细胞瘤细胞、听神经瘤细胞、少突神经胶质瘤细胞、脑膜瘤细胞、黑色素瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、视网膜母细胞瘤细胞、子宫内膜癌细胞、非小细胞肺癌细胞、头颈癌细胞或肾癌细胞。在一些实施方案中,非靶原代细胞亚群包含白细胞、衰老上皮细胞、成纤维细胞、非活细胞或破碎的细胞。在一些实施方案中,所述基底包括GOL基底、GEL基底、一层或多层饲养细胞,或它们的任意组合。在一些实施方案中,该细胞培养板包括1、6、12、24、48、96、384、1056、1536或3456个孔。在一些实施方案中,第一靶细胞亚群包含转移性去势抗性前列腺癌,并且第一基底包含雄激素和/或雄激素模拟物。

[0047] 本发明还提供一种试剂盒。在一些实施方案中,该试剂盒包括如本文描述的细胞培养孵箱;以及用于培养靶细胞亚群的说明书。在一些实施方案中,该说明书包括使孵箱的封闭环境室中的气压维持在15.7PSIA或更高的指示。在一些实施方案中,该说明书包括使孵箱的封闭环境室中的气压维持在16.7PSIA或更高的指示。在一些实施方案中,该说明书包括使孵箱的封闭环境室中的气压维持在19.7PSIA或更高的指示。在一些实施方案中,该说明书包括使孵箱的封闭环境室中的O_2水平维持在不超过10%的指示。在一些实施方案中,该说明书包括使孵箱的封闭环境室中的O_2水平维持在不超过5%的指示。在一些实施方案中,该说明书包括使孵箱的封闭环境室中的O_2水平维持在不超过2%的指示。在一些实施方案中,该说明书包括使孵箱的封闭环境室中的O_2水平维持在不超过1%的指示。

[0048] 本发明还提供一种试剂盒,包括:细胞培养板,其包含如前述权利要求中任一项所述的基底;以及关于使用该培养板来培养靶细胞亚群的说明书。在一些实施方案中,该说明书包括在不超过10%的O_2水平下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中,该说明书包括在不超过5%的O_2水平下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中,该说明书包括在不超过2%的O_2水平下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中,该说明书包括在不超过1%的O_2水平下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中,该说明书包括在15.7PSIA或更高的气压下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中,该说明书包括在16.7PSIA或更高的气压下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中,该说明书包括在19.7PSIA或更高的气压下培养靶细胞亚群的指示。

[0049] 本发明还提供一种试剂盒,包括:在合适的包装中调节细胞的表面张力的化合物;以及用于制备包含该化合物的细胞培养基以用于培养靶细胞亚群的说明书。在一些实施方案中,该化合物是Rho激酶抑制剂。在一些实施方案中,该化合物选自:



[0050] 本发明还提供一种试剂盒，包括：如前述权利要求中任一项所述的细胞培养基；以及使用细胞培养物来培养靶细胞亚群的说明书。在一些实施方案中，该说明书包括在不超过10％的O_2水平下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中，该说明书包括在不超过5％的O_2水平下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中，该说明书包括在不超过2％的O_2水平下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中，该说明书包括在不超过1％的O_2水平下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中，该说明书包括在15.7PSIA或更高的气压下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中，该说明书包括在16.7PSIA或更高的气压下培养靶细胞亚群的指示。在一些实施方案中，该说明书包括在19.7PSIA或更高的气压下培养靶细胞亚群的指示。

[0051] 本发明还提供一种试剂盒，包括能够提高成员中低氧诱导因子的表达的试剂；以及关于使用该试剂来培养靶细胞亚群的说明书。在一些实施方案中，所述能够提高低氧诱导因子的表达的试剂包括载体，其中该载体包括编码该低氧诱导因子的多核苷酸。在一些实施方案中，该载体是表达载体。在一些实施方案中，该多核苷酸与SEQ.ID.NO.2有至少70％或更高的同源性或互补性。

[0052] 在一些实施方案中，所述低氧诱导因子包含与SEQ.ID.NO.1有至少70％或更高的同源性的氨基酸序列。

[0053] 本发明还提供一种包含代码的计算机可读介质，在被一个或多个处理器执行时，该代码实现如本文所述的方法所描述的鉴定步骤。例如，本发明提供一种包含代码的计算机可读介质，在接收一种或多种原代细胞的图像数据时，该代码实现以下步骤：从该图像数据确定所述一种或多种原代细胞的大小；以及如果该大小是不源自肿瘤的细胞的至少1.5

倍，则将原代细胞分类为源自肿瘤，其中所述一种或多种原代细胞是从生物样品获得的，并且其中所述一种或多种原代细胞在足以允许靶细胞亚群生长的条件下培养，其中，该条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述一种或多种原代细胞。在一些实施方案中，该计算机可读介质实现经分类将生物样品鉴定为包含肿瘤细胞的步骤。在一些实施方案中，该计算机可读介质实现以下步骤：如果大小是不源自肿瘤的细胞的至少2倍，则将原代细胞分类为源自肿瘤。在一些实施方案中，该大小包括至少20μm的直径。在一些实施方案中，该大小包括至少900μm^2的表面积。

[0054] 本发明还提供一种包含代码的计算机可读介质，在接收从生物样品获得的一种或多种原代细胞的图像数据时，该代码实现以下步骤：由该图像数据检测是否存在粘附至固体或半固体基底上的三维集落；以及若检测三维集落的存在，则将生物样品分类为包含肿瘤细胞，其中所述一种或多种原代细胞是在足以允许靶细胞亚群生长的条件下培养的，其中，该条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述一种或多种原代细胞。

[0055] 本发明还提供一种包含代码的计算机可读介质，在接收从生物样品获得的一种或多种原代细胞的图像数据时，该代码实现以下步骤：由该图像数据检测是否存在包含多个细胞核的原代细胞；以及当检测到多个细胞核的存在时，将生物样品分类为包含肿瘤细胞，其中所述一种或多种原代细胞是在足以允许靶细胞亚群生长的条件下培养的，其中，该条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述一种或多种原代细胞。在一些实施方案中，所述计算机可读介质被配置成将包含多个细胞核的原代细胞鉴定为肿瘤细胞。

[0056] 本发明还提供一种包含代码的计算机可读介质，在接收从生物样品获得的一种或多种原代细胞的图像数据时，该代码实现以下步骤：由该图像数据检测是否存在包含表面负静电荷的原代细胞；以及当检测到包含表面负静电荷的原代细胞的存在时，将生物样品分类为包含肿瘤细胞，其中，该表面负静电荷由以下得到证实：与非肿瘤细胞对带正电荷的固体或半固体基底的粘附相比，原代细胞对带正电荷的固体或半固体基底的粘附提高。在一些实施方案中，所述带正电荷的固体或半固体基底包含胞外基质蛋白质。在一些实施方案中，该胞外基质蛋白质是聚-L-鸟氨酸。

[0057] 本发明还提供一种包含代码的计算机可读介质，在接收从生物样品获得的一种或多种原代细胞的图像数据时，该代码实现以下步骤：由该图像数据检测是否存在快速分裂的细胞；以及当检测该快速分裂的细胞的存在时，将生物样品分类为包含肿瘤细胞，其中所述一种或多种原代细胞在在足以允许靶细胞亚群生长的条件下培养的，其中，该条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述一种或多种原代细胞。在一些实施方案中，所述计算机可读介质被配置成将快速分裂的细胞鉴定为肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述图像数据包括在第一时间点和第二时间点获得的图像数据。在一些实施方案中，第一时间点和第二时间点相隔3天或更短，并且其中快速分裂的细胞的存在由以下得到证实：介于第一时间点和第二时间点之间的细胞汇合度提高2倍或更多。在一些实施方案中，第一时间点和第二时间点相隔2天或更短。在一些实施方案中，快速分裂的细胞的存在由以下得到证实：介于第一时间点和第二时间点之间的细胞汇合度提高30倍或更多。在一些实施方案中，所述计算机可读介质被配置成将肿瘤细胞分类为肿瘤起始细胞(tumor-initiating cell)。

[0058] 在计算机可读介质的上述任何实施方案中，生物样品是流体样品。在一些实施方案中，该流体样品是血液样品。在一些实施方案中，该血液样品是全血样品。在一些实施方

案中，该生物样品是实体组织样品。在一些实施例中，正压条件和/或低氧条件如前述权利要求中任一项所述。

[0059] 本发明还提供一种计算机系统，包括：存储器，其用于储存与样品相关的数据集；处理器，其通信地耦合至该存储器；其中该处理器包含如本文所述的计算机可读介质；以及数据集。在一些实施方案中，该计算机系统还包括被配置成接收数据集的计算机；以及被配置成将数据集从该系统传送到计算机的网络。

[0060] 本发明还提供了一种细胞成像系统，包括：被配置为由细胞产生图像数据的显微镜；以及被配置成接收来自该显微镜的图像数据的计算机系统，其中该显微镜包含如本文所述的计算机可读介质。在一些实施方案中，该显微镜包括镜台，其中，该镜台被配置成保持如本文所述的细胞培养板。在一些实施方案中，细胞成像系统被配置为用于活细胞成像。在一些实施方案中，细胞成像系统被配置为用于高内涵筛选分析。在一些实施方案中，细胞成像系统包括环境室，其中该环境室被配置成维持(i)该环境室的气体组成、(ii)封闭环境室的气压和(iii)封闭环境室的内部环境温度中的至少一个。在一些实施方案中，环境室被配置为维持气体组成、气压和内部环境温度中的至少两个。在一些实施方案中，该气体组成包含1-20％的O_2水平。在一些实施方案中，该气体组成包含不超过5％的O_2水平。在一些实施方案中，该气体组成包含不超过2％的O_2水平。在一些实施方案中，该气体组成包含不超过1％的O_2水平。在一些实施方案中，环境室的气压为15.7PSIA或更大。在一些实施方案中，环境室的气压为16.7PSIA或更大。在一些实施方案中，环境室的气压是19.7PSIA。

[0061] 本发明还提供一种用于培养靶细胞群体的系统，包括：如本文描述的细胞培养孵箱；以及(i)细胞培养板、(ii)细胞培养基和(iii)细胞成像系统中的至少一个。在一些实施方案中，该系统包括细胞培养板、细胞培养基和细胞成像系统中的至少两个。在一些实施方案中，该细胞培养板是如本文所述的细胞培养板。在一些实施方案中，该细胞培养基包括涂布培养基；R型长期生长培养基；DF型长期生长培养基；D型长期生长培养基；MEF-条件培养基；及其任意组合。在一些实施方案中，该细胞成像系统如本文所述。

援引并入

[0062] 在本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文，并入程度就如同特别且单独地指出各个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

附图说明

[0063] 本发明的新特征在随附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用了本发明原理的示例性实施方案加以阐述的详细描述和附图，将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解，在附图中：

[0064] 图1描绘了本发明的示例性方法。

[0065] 图2A和2B描绘了本发明的示例性方法的工作流程。

[0066] 图3示出了利用Ficoll试剂对血液样品进行基于密度的离心以分离单核细胞层的概况。

[0067] 图4示出了可以涂布靶细胞亚群并可使其粘附至基底的过程。

[0068] 图5示出了不同的基底构造。

[0069] 图6描绘了靶细胞亚群在具有“反转”层构造的基底中的示例性培养。

[0070] 图7描绘了本发明的示例性孵箱。

[0071] 图8示出了靶细胞亚群的子集随着时间的增殖。

[0072] 图9描绘了由分析软件创建的虚拟栅格坐标系。

[0073] 图10示出了如何可以利用线粒体标记物或针对细胞粘附分子的荧光标记抗体来标记靶细胞亚群，以加强检测。

[0074] 图11描绘了用于软件促进的系统。

[0075] 图12描绘了选择和注入单细胞的马达驱动的显微操作器。

[0076] 图13描绘了自动化的细胞培养系统设计。

[0077] 图14描绘了本发明的示例性细胞培养系统。

[0078] 图15描绘了来自掺有癌细胞的血液的细胞的活细胞成像；所述细胞已经涂布在基底上。

[0079] 图16描绘了富集的靶细胞亚群的图像。

[0080] 图17描绘了活细胞图像的软件辅助分析。

[0081] 图18描绘了本发明的示例性细胞培养孵箱。

[0082] 图19描绘了从患有前列腺癌的人类受试者中分离的CTC的显微照片。

[0083] 图20描绘了化学敏感性试验的结果。

具体实施方式

[0084] 在整个本申请中，本发明的各种实施方案可以以范围的形式呈现。应当理解的是，范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁，而不应该被解释为对本发明的范围的硬性限制。因此，范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及在该范围内的单个数值。例如，诸如从1到6的范围的描述应当被认为已经具体公开了子范围，例如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2至6、从3到6等，以及在该范围内的单个数字，例如，1、2、3、4、5和6。无论范围的宽度如何，这都是适用的。

总体技术

[0085] 除非另有指明，本发明的实施将利用免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA的常规技术，这些都属于本领域的技术。参见，例如Sambrook,Fritsch和Maniatis,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第4版(2012)；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.Ausubel等人编(1987))；METHODS IN ENZYMOLOGY系列(Academic Press,Inc.)：PCR 2:A PRACTICAL APPROACH(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编(1995))；以及CULTURE OF ANIMAL CELLS:A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE AND SPECIALIZED APPLICATIONS,第6版(R.I.Freshney编(2010))，均通过引用并入本文。

定义

[0086] 如在本说明书和权利要求书中所用，单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数形式的引述内容，除非上下文另外清楚地说明。例如，术语“一种细胞”包括多种细胞，包括其混合物。

[0087] 术语“抗癌剂”通常可以指与一种或多种癌细胞接触的任何药剂，其直接或间接地阻止、停止和/或减少癌细胞的增殖和/或杀死癌细胞。一种或多种抗癌剂可以与一种或多

种癌细胞接触，目的在于确定什么样的抗癌剂对癌细胞具有最理想的效果。

[0088] 抗癌剂可以与一种或多种癌细胞接触，目的在于确定抗癌性质。尽管短语“抗癌剂”可以写为单数名词，例如“一种抗癌剂”或“该抗癌剂”，但是短语“抗癌剂”可以被解释为是指一种或多种抗癌剂。

[0089] 抗癌剂可包括可以假设具有抗癌作用的药剂。也就是说，抗癌剂可以包括抗癌性质未知或未充分表征的药剂。抗癌剂可以与一种或多种癌细胞接触，目的在于确定该药剂是否具有任何抗癌性质。

[0090] 抗癌剂可以是本领域已知的影响癌细胞的药剂。抗癌剂的一些非限制性例子可包括：激素消融剂、抗雄激素剂/抗雄激素、分化剂、抗肿瘤剂、激酶抑制剂、抗代谢剂、烷基化试剂、抗生素剂、免疫剂、干扰素类型的药剂、嵌入剂、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物响应调节剂、有丝分裂抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、抗再吸收剂、单克隆抗体、粘附分子、生长因子、促凋亡剂、反义剂、维生素D类似物、RNAi剂、经修饰的肽、酶抑制剂、改善疗法的副作用的药剂、基因治疗剂及其任意组合。

[0091] 抗癌剂可以是激素消融剂(例如，地洛瑞林、亮丙瑞林、戈舍瑞林和/或曲普瑞林)。激素消融剂可以是抗雄激素剂(例如，比卡鲁胺、氟他胺、螺内酯、醋酸环丙孕酮、非那雄胺、度他雄胺、阿比特龙和/或尼鲁米特)。激素消融剂可以是抗雌激素剂(例如，它莫昔芬)。

[0092] 抗癌剂可以是分化剂(例如，聚胺抑制剂；维生素D及其类似物，如骨化三醇、度骨化醇、麦角钙化醇、22-氧杂骨化三醇(22-oxacalcitriol)、二氢速甾醇(dihydrotachysterol)、帕立骨化醇和西奥骨化醇(seocalcitol)；维生素A代谢的抑制剂，如RAMBAS，例如利阿唑(liarozole)，维生素A的代谢物，例如ATRA；视黄酸；类视黄醇(retinoid)；短链脂肪酸；苯基丁酸酯；以及非甾体抗炎药)。

[0093] 抗癌剂可以是抗肿瘤剂。抗肿瘤剂的非限制性例子包括微管蛋白相互作用剂、拓扑异构酶抑制剂和药剂、阿维A(acitretin)、鸡骨常山碱(alstonine)、氨萘非特(amonafide)、安非斯尼(amphethinile)、安吖啶、安可米辛(ankinomycin)、抗瘤酮(anti-neoplaston)、阿非科林甘氨酸盐、天冬酰胺酶、燕茜素(baccharin)、巴塔斯林(batracylin)、苯氟隆(benfluron)、氯苯酰色氨酸(benzotript)、溴异环磷酰胺(bromofosfamide)、卡醋胺(caracemide)、氯美噻唑盐酸盐(carmethizole hydrochloride)、氯磺胺喹噁啉(chlorsulfaquinoxalone)、克兰氟脲(clanfenur)、克莱弗登酮(claviridenone)、克立那托(crisnatol)、库拉德姆(curaderm)、阿糖胞苷、西妥昔汀(cytocytin)、达卡巴嗪、达特羟吡咔唑(datelliptinium)、二血卟啉酯醚(dihaematoporphyrin ether)、二氢仑哌隆(dihydrolenperone)、地那林(dinaline)、偏端霉素(distamycin)、多西紫杉醇(docetaxel)、艾立普宾(elliprabin)、依利醋铵(elliptinium acetate)、埃博霉素、麦角胺、依托泊苷、阿维A酯、芬维A胺、硝酸镓、芫花瑞香素(genkwadaphnin)、十六烷基磷酸胆碱(hexadecylphosphocholine)、HDAC抑制剂、高三尖杉酯碱、羟基脲、伊莫福新、异谷酰胺、异维A酸、白细胞调节素(leukoregulin)、氯尼达明(lonidamine)、美巴龙(merbarone)、部花青衍生物(merocyanlne derivative)、甲基苯胺吖啶(methylanilinoacridine)、茗萘酊(minactivin)、米托萘胺(mitonafide)、米托喹酮(mitoquidone)、米托蒽醌(mitoxantrone)、莫哌达醇(mopidamol)、莫维A胺(motretinide)、N-(视黄酰基)氨基酸、N-酰化脱氢丙氨酸、那法扎琼(nafazatrom)、诺考达

唑衍生物、奥曲肽、奥奎诺辛(oquizanocine)、紫杉醇、水鬼蕉碱(pancratistatin)、帕折普汀(pazelliptine)、吡罗蒽醌(piroxantrone)、聚血卟啉(polyhaematoporphyrin)、聚苦味酸(polypreic acid)、吗丙嗪、甲基苄肼、丙谷胺、雷佐生(razoxane)、瑞替普汀(retelliptine)、褐舌藻醇(spatol)、螺环丙烷衍生物(spirocyclopropane derivative)、锗螺胺、斯曲泊啶酮(strypoldinone)、超氧化物歧化酶、替尼泊苷、菌体胚素(thaliblastine)、生育三烯酚、托泊替康、ukrain、硫酸长春碱(vinblastine sulfate)、长春新碱、长春地辛、长春斯曲酰胺(vinestramide)、长春瑞滨、长春曲醇(vintriptol)、长春利定(vinzolidine)和睡茄内酯。

[0094] 抗癌剂可以是激酶抑制剂。激酶抑制剂的非限制性例子包括p38抑制剂;CDK抑制剂;TNF抑制剂;基质金属蛋白酶(MMP)抑制剂;COX-2抑制剂,包括塞来考昔、罗非考昔、帕瑞考昔、伐地考昔和依托考昔;SOD模拟物;以及αvβ3-抑制剂。

[0095] 抗癌剂可以是抗代谢剂。抗代谢剂的非限制性例子包括:5-FU-纤维蛋白原、acanthifolic acid、氨基噻二唑、布喹那钠、卡莫氟、环戊基胞嘧啶、阿糖胞苷磷酸酯硬脂酸酯、阿糖胞苷偶联物、地扎胍宁(dezaguanine)、双脱氧胞苷、双脱氧鸟苷(dideoxyguanosine)、didox、去氧氟尿苷、法扎拉宾(fazarabine)、氟尿苷、磷酸氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、N-(2'-呋喃烷基)-5-氟尿嘧啶、必需氨基酸的抑制剂、异丙基吡咯里嗪、methobenzaprim、甲氨蝶呤、去甲精脒(norspermidine)、鸟氨酸脱羧抑制剂(ornithine decarboxylantion inhibitor)、喷司他丁、吡曲克辛、普卡霉素、硫鸟嘌呤、噻唑呋林(tiazofurin)、三甲曲沙、酪氨酸激酶抑制剂和优你生(uricytin)。

[0096] 抗癌剂可以是烷基化剂。烷基化剂的非限制性例子包括醛-磷酰胺类似物、六甲蜜胺、阿那昔酮(anaxirone)、bestrabucil、布度钛(budotitane)、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、cyplatate、二苯基螺莫司汀(diphenylspiromustine)、二铂细胞生长抑制剂、依莫司汀、雌莫司汀磷酸钠、福莫司汀、hepsul-fam、异环磷酰胺、异丙铂、洛莫司汀、马磷酰胺、二溴卫矛醇(mitolactol)、奥沙利铂、泼尼莫司汀、雷莫司汀、司莫司汀、螺莫司汀(spiromustine)、牛磺莫司汀(tauromustine)、替莫唑胺、替罗昔隆(teroxirone)、四铂(tetraplatin)和三甲密醇(trimelamol)。

[0097] 抗癌剂可以是抗生素剂。抗生素剂的非限制性例子包括阿柔比星、放线菌素D、actinoplanone、阿霉素、aeroplysinin衍生物、氨柔比星、蒽环霉素、阿齐诺霉素-A(azinomycin-A)、bisucaberin、硫酸博来霉素、苔藓抑素-1、刺孢霉素(calichemycin)、chromoximycin、更生霉素、柔红霉素、ditrisarubicin B、多柔比星、多柔比星-纤维蛋白原、elsamicin-A、表柔比星、erbstatin、伊索比星(esorubicin)、埃斯波霉素-A1(esperamicin-A1)、埃斯波霉素-A1b、福司曲星(fostriecin)、glidobactin、gregatin-A、grincamycin、除莠霉素、伊达比星、隐陡头霉素(illudins)、kazusamycin、kesarirhodins、美诺立尔(menogaril)、丝裂霉素、neoenactin、噁溶菌素(oxalysine)、oxaunomycin、培洛霉素(peplomycin)、pilatin、吡柔比星、porothramycin、pyrindanycin A、雷帕霉素、根霉素、罗多比星(rodorubicin)、西班米星(sibanomicin)、siwenimycin、sorangicin-A、司帕霉素、他利霉素(talisomycin)、类萜菌素(terpentecin)、氯丙嗪(thrazine)、tricrozarin A和佐柔比星(zorubicin)。

[0098] 抗癌剂可以是类固醇、皮质类固醇或糖皮质激素。类固醇的非限制性例子包括依

普利酮、氢化可的松、泼尼松和地塞米松。

[0099] 抗癌剂可以是酶抑制剂。酶抑制剂可以是咪唑和唑和/或抗真菌剂(例如,酮康唑)。

[0100] 抗癌剂可以是单克隆抗体。单克隆抗体可以具有抗癌活性。单克隆抗体的非限制性例子可以包括:利妥昔单抗、曲妥珠单抗、吉妥珠单抗、奥佐米星、阿仑珠单抗、替伊莫单抗、tiuxetan、托西莫单抗、西妥昔单抗、贝伐珠单抗、帕尼单抗以及奥法木单抗(ofatumumab)。

[0101] 抗癌剂可以是反义剂。反义剂的一些非限制性例子可以包括:Genasense™(奥利默森(oblimersen))、Affinitak(ISIS 3521)、ISIS 112989(OGX 011)、ISIS 23722、AP 12009、GEM 231、GEM 240、IGF-1R/AS ODN、MG98、LErafAON、Ki-67反义寡核苷酸、GTI-2040、ISIS 2503以及API 1014。

[0102] 抗癌剂可以是肽和/或经修饰的肽。肽或经修饰的肽可以是配体。肽和/或经修饰的肽可以是抑制剂。肽和/或经修饰的肽可以是疫苗。肽和/或经修饰的肽可以引发免疫应答。免疫应答可以是针对癌细胞的T细胞应答。肽或经修饰的肽可以具有抗癌活性。

[0103] 抗癌剂可以是具有抗癌活性的RNAi疗法。

[0104] 抗癌剂可以是改善癌症疗法的副作用的药剂。改善疗法的副作用的药剂可以是:利尿剂、镇痛药、止痛剂、抗炎剂、依普利酮、泼尼松、质子泵抑制剂、H_2受体拮抗剂、降脂药、抗再吸收剂、精神抑制剂和/或地塞米松。

[0105] 抗癌剂的其他非限制性例子包括:乙酰吗喃、阿柔比星、阿地白介素(aldesleukin)、阿仑珠单抗、阿利维A酸(alitretinoin)、六甲蜜胺、氨磷汀、安吖啶、阿那格雷、阿那曲唑、安西司亭(ancestim)、贝沙罗汀、溴脲苷(broxuridine)、卡培他滨、西莫白介素(celmoleukin)、西曲瑞克、克拉屈滨、克霉唑、达克珠单抗、右雷佐生、地拉卓(dilazep)、二十二醇、去氧氟尿苷、溴隐亭、卡莫司汀、阿糖胞苷、双氯芬酸、依地福新、依决洛单抗、依氟鸟氨酸、乙嘧替氟(emitefur)、依西美坦、依昔舒林(exisulind)、法倔唑、促红细胞生成素、非格司亭、非那雄胺、磷酸氟达拉滨、福美司坦、福莫司汀、硝酸镓、吉西他滨、glycopine、庚铂(heptaplatin)、伊班膦酸、咪喹莫特、碘苄胍(iobenguane)、伊立替康、依索拉定、兰瑞肽、来氟米特、来格司亭、硫酸香菇多糖、来曲唑、利阿唑、洛铂、氯尼达明(lonidamine)、马司莫单抗(masoprocol)、美拉肿醇、甲氧氯普胺、米非司酮、米替福新、米立司亭(mirimostim)、米托胍腙(mitoguazone)、二溴卫矛醇、莫拉司亭、那法瑞林、那托司亭(nartograstim)、奈达铂、尼鲁米特、那可丁、奥普瑞白介素、奥沙特隆(osaterone)、奥沙利铂、帕米膦酸、培门冬酶、戊聚糖多硫酸钠、喷司他丁、溶血性链球菌制剂(picibanil)、吡柔比星、卟吩姆钠(porfimersodium)、雷洛昔芬、雷替曲塞、拉布立酶、利妥昔单抗、罗莫肽(romurtide)、沙格司亭、西佐非兰(sizofiran)、索布佐生、索纳明(sonermin)、苏拉明、他索纳明(tasonermin)、他扎罗汀、替加氟、替莫泊芬(temoporfm)、替莫唑胺、替尼泊苷、四氯十氧化物(tetrachlorodecaoxide)、沙利度胺、血小板生成素、胸腺法新、促甲状腺激素α、托泊替康、托瑞米芬、曲妥珠单抗、曲奥舒凡、维甲酸、曲洛司坦、三甲曲沙、乌苯美司、戊柔比星、维替泊芬和长春瑞滨。

[0106] 术语“生物样品”通常是指从生物实体分离的样品或部分。生物样品可以显示整体的性质,其例子包括但不限于体液、离解的肿瘤标本、培养的细胞及其任意组合。生物样品

的例子可以包括但不限于：血液、血清、血浆、鼻拭子(nasal swab)或鼻咽洗液(nasopharyngeal wash)、唾液、尿液、胃液、脊髓液、眼泪、粪便、粘液、汗液、耳垢、油、腺体分泌物、脑脊髓液、组织、精液、阴道液、来自肿瘤组织的间质液、眼液体、脊髓液、咽拭子、呼吸、毛发、指甲、皮肤、活检、肿瘤、胎盘液、羊水、脐带血、emphatic fluid、体腔液、痰、脓、微生物群(micropiota)、胎粪、乳汁和/或其他排泄物。样品可以包括鼻咽洗液。受试者的组织样品的例子可以包括但不限于结缔组织、肌肉组织、神经组织、上皮组织、软骨、癌性样品(例如肿瘤样品)或骨。样品可以提供自人或动物。样品可以提供自哺乳动物、脊椎动物，例如鼠类、猿猴、人、农场动物、运动动物或宠物。样品可从活的或死的受试者采集。样品可新采集自受试者或者可能已经经历某种形式的预处理、储存和/或运输。

[0107] “体液”可以指源自受试者的液体或分泌物。示例性的体液包括，例如，血液、血清、血浆、唾液、尿液、胃液、脊髓液、眼泪、粘液、汗、油、腺体分泌物、脑脊髓液、精液、阴道液、来自肿瘤组织的间质液、眼液体、脊髓液、胎盘液、羊水、脐带血、emphatic fluid、体腔液、胎粪、乳汁、骨髓、胸膜液、淋巴液和/或其他排泄物。体液可以包含复杂的和异质的细胞群体，并且可以含有诸如CTC、CSC、HSC和/或EPC等细胞类型。在一些情况下，体液可以是多于一种类型的体液的混合物。

[0108] 术语“癌症”通常是指以细胞的不受控制的异常生长为特征的疾病。在一些情况下，癌症可以扩散。如本文所述，“癌症”可以涵盖任何赘生物或肿瘤。

[0109] “癌症干细胞(CSC)”通常是指能够自我更新的癌细胞的子集。CSC通常包括负责其持续生长的肿瘤的一小部分，并且可以通过产生新肿瘤来负责转移。CSC可以表达与来自同一肿瘤的其他细胞不同的细胞标记物，并可以有助于治疗抗性。

[0110] 术语“细胞亚群”通常是指相似类型的一组细胞，其可见于更大的异源细胞群体中。细胞亚群的非限制性例子可以包括：癌前细胞、干细胞、胎儿干细胞、未分化的干细胞、胎儿细胞、骨髓细胞、祖细胞、泡沫细胞、间充质细胞、上皮细胞、上皮祖细胞、内皮细胞、内皮祖细胞(EPC)、子宫内膜细胞、造血干细胞(HSC)、滋养细胞、癌细胞、循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、红细胞、白细胞、免疫系统细胞和结缔组织细胞，或它们的任意组合。

[0111] “循环肿瘤细胞”(CTC)通常是指源自原发肿瘤的癌细胞，其可以在血液脉管系统和/或淋巴系统中循环。

[0112] 术语“培养”和“孵育”细胞在本文中可互换使用，通常是指细胞在受控条件下生长的过程。所述条件可以根据待培养的细胞的类型而改变。

[0113] 如本文所用，术语“原代细胞”通常是指从活组织(例如，活检)获得并且为了体外生长(例如，通过培养)而建立的细胞。

[0114] 术语“细胞形态”或“形态特征”可用于指细胞的可观察到的物理特性，例如大小、形状或某些特征的存在或不存在。

[0115] 内皮祖细胞(EPC)通常是指能够分化成内皮细胞的一群细胞。

[0116] 术语富集通常是指提高存在于细胞混合物中的靶细胞亚群的细胞数与细胞总数的比例。例如，富集可通过捕获靶细胞亚群或通过靶细胞亚群的增殖(即繁殖)或通过其组合而发生。

[0117] 造血干细胞(HSC)通常是指能够产生不同类型的血细胞的多能干细胞。

[0118] 异源细胞群体通常是指两种或更多种细胞类型的混合物。异源细胞群体的例子可

以包括:体液、生物标本、解离的肿瘤标本、培养的细胞及其任意组合。

[0119] 人血清通常是指源自人的生物流体,由此大多数遗传物质已被除去,并且该流体主要包含例如水、酶、代谢物、生长因子、信号肽和宿主固有的其他蛋白质。人血清来源的一些非限制性例子包括:从外周血收集的血浆、间质液、细胞内液和/或跨细胞液。

[0120] 细胞的动力学性质通常是指细胞随时间移动、侵袭和/或分裂的能力。

[0121] 如本文所用,显微操作通常描述用于处理单细胞的任何方法。典型的显微操作系统可以包括,例如:倒置显微镜加上操纵杆操纵的、机动化的显微操作平台;微量移液器;或激光捕获显微切割装置。

[0122] 术语"富集培养基"和"细胞培养基"在本文中可互换使用,通常是指在其中沐浴并孵育细胞的溶液,其可以用来向所述细胞供应营养物,使得靶细胞亚群的富集可以实现。富集培养基可以包含能够增强细胞分裂的基于配体的特定上游信号传导线索(signaling cue)。富集培养基的确切组成可以根据待捕获和富集的细胞类型而有所不同。

[0123] 受试者通常是指生物体。受试者可以是动物。示例性的动物包括但不限于:人;实验动物,如小鼠、大鼠、猴子和黑猩猩;家养动物,如狗和猫;农业动物,如牛、马、猪、绵羊、山羊;以及野生动物,如熊、大熊猫、狮子、老虎、豹、大象、斑马、长颈鹿、大猩猩、海豚和鲸。

[0124] 如本文所用,"基底"通常是指能够加强从异源细胞群体中富集、取回、捕获和/或增殖靶细胞亚群的物质。基底的确切组成可以针对特定类型的靶细胞亚群的富集而调整。基底可以包括单层或多层。

[0125] 术语"载体"通常是指这样的核酸分子,其可以是或可以不是自我复制性的,其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。该术语包括主要功能为将DNA或RNA插入细胞中的载体,主要功能为复制DNA或RNA的复制载体,以及功能为转录和/或翻译DNA或RNA的表达载体。还包括提供多于一种上述功能的载体。

[0126] 术语"表达载体"通常是指在引入合适的宿主细胞中时可以被转录并翻译成多肽的多核苷酸。"表达系统"通常表示包含能够用来产生所需表达产物的表达载体的合适的宿主细胞。

[0127] 术语肿瘤通常是指由异常细胞生长和分裂所致的异常组织块。肿瘤可以是癌性的。

[0128] 术语治疗或缓解或改善通常可互换使用,并且可以指施用物质来实现:治疗益处;治愈现有疾病、病症或病状或减轻其严重程度;和/或实现预防益处,防止疾病、病症或病状的发生或降低其发作的可能性或严重程度。

[0129] 如本文所用,治疗效果或治疗益处通常是指生理作用,包括但不限于治愈、缓解、改善或预防人或其他动物中的疾病,或以其他方式增强人或动物的生理或心理健康。治疗益处可以指正在接受治疗的潜在病症的治疗,或者与潜在病症相关的一种或多种生理症状的治疗,使得在受试者中观察到改善,尽管该受试者可能仍然遭受该潜在病症的折磨。

[0130] 术语"可操作地连接"通常是指并置,其中被描述为"可操作地连接"的两个或更多个组件处于允许它们以其预期方式发挥作用的关系。

[0131] 术语"多核苷酸"、"核酸"和"寡核苷酸"在本文中可互换使用。它们是指具有任何长度的核苷酸的聚合形式,无论是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构,并且可以执行任何已知的或未知的功能。以下为多核苷酸的非限制性

例子:基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析定义的多个基因座(一个基因座)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任意序列的DNA、任意序列的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话,对核苷酸结构的修饰可以在聚合物组装之前或之后赋予。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分偶联。

概述

[0132] 本发明提供了能够检测、分离、捕获、富集、培养和/或表征来自异源细胞群体的一种或多种靶细胞亚群的方法、设备、组合物和试剂盒以及它们的应用。靶细胞亚群可以包含任何类型的活细胞。活细胞可以具有粘附性质。粘附性质可以通过细胞粘附于固体或半固体表面例如细胞外基质、其他细胞或粘附到如本文所述的基底上的能力来证实。具有粘附性质的细胞可以表达一种或多种粘附分子。示例性的粘附分子可以包括,例如,选择蛋白、整联蛋白、钙粘着蛋白、多配体聚糖(syndecans)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、cd133、cd44、cd166等。粘附分子的表达可以通过本领域中已知的任何手段来确定,这些手段包括但不限于基因表达研究、免疫组织化学、免疫印迹等。靶细胞亚群可以包含任何类型的原代细胞。原代细胞可以是哺乳动物的原代细胞,诸如,例如,原代神经元、原代神经胶质、原代心肌细胞、原代肝细胞、原代肺细胞、原代软骨细胞、原代内皮细胞、原代成纤维细胞、原代胃肠道细胞、原代免疫细胞、原代角质形成细胞、原代成骨细胞、原代胰腺细胞、原代前列腺细胞、原代肾细胞、原代视网膜细胞、原代肌细胞、原代支持(sertoli)细胞、胎儿细胞,等等。靶细胞亚群可以具有高增殖性和更新性。靶细胞亚群的一些非限制性例子包括,例如,循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、造血干细胞(HSC)、内皮祖细胞(EPC)、胎儿细胞、干细胞、免疫细胞、上皮细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、白细胞、成体干细胞、原代细胞(例如,本文所述的原代细胞)、来自实体瘤的细胞和/或上皮祖细胞。在一些实施方案中,靶细胞亚群选自:CTC、CSC、EPC、干细胞、上皮细胞和癌细胞。靶细胞亚群可以包含CTC和/或CSC。该CTC和/或CSC可以是肿瘤起始细胞。该CTC和/或CSC可以是转移细胞。在靶细胞亚群包含来自实体瘤的细胞的一些情况下,该细胞可能仍处于实体瘤的形式(例如,本文描述的方法、设备、组合物和试剂盒可用于培养实体瘤活检的目的)。在一些实施方案中,靶细胞亚群不包含来自永生化细胞系的细胞。在一些实施方案中,靶细胞亚群不包含白细胞。靶细胞亚群可以是原代靶细胞亚群。

[0133] 将会进一步认识到,本文的示例主要是就从血液中分离和富集细胞亚群而言的,但本发明可以容易地应用于从任何异源细胞群体分离和富集细胞亚群。这样的例子可包括体液、体液的混合物、解离的肿瘤样品、实体组织样品(例如,实体瘤样品)、细胞培养物或其任意组合。此外,体液、解离的肿瘤样品和细胞培养物可以来自一个或多个受试者,或其组合。

[0134] 图1示出根据本公开的示例性方法。图1示出了根据本发明的实施方案用于捕获和富集靶细胞亚群的示例性过程100。过程100包括:从受试者105获得样品110;分离样品115中的一种或多种组分,以获得异源细胞群体;使该异源细胞群体与基底120接触(例如,将异源细胞群体涂布到基底上);在足以允许靶细胞亚群生长的条件下孵育该异源细胞群体,其中足以允许靶细胞亚群生长的条件可以包括在设备130中与富集培养基125一起孵育;将样

品孵育一段时间135，其中该时间135足以发生细胞分裂。可以使用成像系统140(例如显微镜)来监测细胞。可以使用分析软件145来处理利用成像系统监测获得的数据。分析软件145可以创建结果150的输出。细胞和/或结果150可用于疾病状况155的诊断、预后或监测，用于指导针对受试者160的治疗方案，和/或用于研究165。

[0135] 图2A和2B描绘了本发明的示例性方法的工作流程。该示例性方法可以包括从受试者(例如人类受试者)获得生物样品的步骤210。在一些实施方案中，生物样品是体液样品(例如，血液样品)。该示例性方法可以包括对血液样品进行基于Ficoll的离心以从血液中分离全部有核细胞的后续步骤220。随后可以将有核细胞直接涂布到基底上。该示例性方法可包括在定制的培养条件下培养细胞的后续步骤230。步骤230可任选地包括定时成像(time-lapse imaging)，以鉴定快速增殖的癌细胞。该示例性方法可以包括使用软件(例如，计算机可读介质)来分析定时图像的后续任选步骤240。该分析可以包括测量癌细胞增殖速率。该示例性方法还可以包括分离快速增殖细胞和/或使快速增殖细胞生长以供进一步的分子/细胞分析和/或成像的步骤250。该分离可以包括使用显微操作设备。在一些实施方案中，进一步的分子和细胞分析包括外显子组测序和/或转录组分析。该示例性方法可以用于鉴定例如新的生物标记物和/或治疗靶标以用于一种或多种癌症的治疗。

示例性的受试者

[0136] 受试者105(如图1所示)通常是指活的生物体。受试者可以包含一个或多个靶细胞亚群。可能并不知晓受试者是否包含靶细胞亚群。在一些实施方案中，本公开的方法和设备可用来确定受试者是否包含一个或多个靶细胞亚群。例如，可以根据是否存在一个或多个靶细胞亚群来筛查受试者。

[0137] 该受试者可以是患有癌症的受试者、处于癌症缓解期的受试者、正在接受癌症治疗的受试者、正在接受癌症筛查的受试者、怀疑患有癌症的受试者、正在测试(例如，筛查)是否存在癌症的受试者、无癌的受试者、患有自身免疫疾病的受试者、怀疑患有自身免疫疾病的受试者、捐献细胞用于骨髓移植的受试者、接受骨髓细胞的受试者、患有心血管疾病的受试者、曾经经历心脏病发作或中风的受试者、怀疑在未来会经历心脏病发作或中风的受试者、正在接受创伤愈合治疗的受试者、可能需要创伤愈合治疗的受试者及其任意组合。可以理解，受试者可以患有或可能被怀疑患有任何疾病。

[0138] 癌症可以是，例如肿瘤，白血病，如急性白血病、急性T细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、成髓细胞白血病、前髓细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病、单核细胞白血病、红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性(粒细胞)白血病或慢性淋巴细胞性白血病，真性红细胞增多症，淋巴瘤，如霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤，多发性骨髓瘤，瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症，重链病，实体瘤，肉瘤、癌，例如，如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、淋巴管肉瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌(包括去势抗性前列腺癌)、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管原性癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、子宫内膜癌、非小细胞肺癌、头颈癌或肾癌。

[0139] 自身免疫疾病可以是起因于或针对个体自身组织或其共分离或表现的疾病或病症或由其产生的病状。自身免疫疾病或病症的例子包括但不限于：急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、关节炎、急性坏死性出血性白质脑炎、阿狄森病、丙种球蛋白缺乏症、斑秃、淀粉样变性病、强直性脊柱炎、抗GBM/抗TBM肾炎、抗磷脂综合征(APS)、自身免疫性血管性水肿、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性自主神经功能异常、自身免疫性肝炎、自身免疫性高脂血症、自身免疫性免疫缺陷、自身免疫性内耳疾病(AIED)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、自身免疫性甲状腺疾病、自身免疫性荨麻疹、轴突和神经元的神经病变、巴洛病、白塞氏病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、Castleman病、腹腔疾病、查加斯病(Chagas disease)、慢性疲劳综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、慢性复发性多灶性骨髓炎(CRMO)、施特劳斯综合征(-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮/良性黏膜类天疱疮、克罗恩病、耳蜗前庭综合征(Cogans syndrome)、冷凝集素病、先天性心脏传导阻滞、柯萨奇心肌炎、CREST病、混合型冷球蛋白血症、神经病变、疱疹样皮炎、皮肌炎、德维克病(视神经脊髓炎)、盘状狼疮、德雷斯勒综合征(Dressler's syndrome)、子宫内膜异位症、嗜酸细胞性食管炎、嗜酸细胞性筋膜炎、结节性红斑、实验性变应性脑脊髓炎、埃文斯综合征(Evans syndrome)、纤维肌痛、纤维化肺泡炎、巨细胞动脉炎(颞动脉炎)、肾小球肾炎、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、肉芽肿病伴多血管炎(GPA)、格雷夫斯病(Graves' disease)、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、桥本氏脑炎(Hashimoto's encephalitis)、桥本氏甲状腺炎、溶血性贫血、过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、妊娠疱疹、低丙球蛋白血症、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、IgG4相关的硬化性疾病、免疫调节脂蛋白、包涵体肌炎、胰岛素依赖型糖尿病(1型)、间质性膀胱炎、幼年型关节炎、I型糖尿病、川崎综合征(Kawasaki syndrome)、兰伯特-伊顿综合征(Lambert-Eaton syndrome)、白细胞破碎性血管炎、扁平苔癣、硬化性苔癣、木样结膜炎、线性IgA病(LAD)、狼疮(SLE)、莱姆病、美尼尔病(Meniere's disease)、显微镜下多血管炎、混合性结缔组织病(MCTD)、蚕蚀性角膜溃疡(Mooren's ulcer)、木栅-赫伯曼病(Mucha-Habermann disease)、多发性硬化、重症肌无力、肌炎、发作性睡病、视神经脊髓炎(德维克病)、中性粒细胞减少、眼瘢痕性类天疱疮、视神经炎、复发性风湿病、PANDAS(与链球菌相关的小儿自身免疫性神经精神疾病)、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、Parry Romberg综合征、Parsonnage-Turner综合征、睫状体扁平部炎(Pars planitis)(周边葡萄膜炎)、天疱疮、外周神经病、静脉周脑脊髓炎、恶性贫血、POEMS综合征、结节性多动脉炎、I型、II型或III型自身免疫性多内分泌腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎、心肌梗死后综合征、心包切开术后综合征、孕酮皮炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、银屑病、银屑病关节炎、特发性肺纤维化、坏疽性脓皮病、纯红细胞再生障碍、雷诺现象(Raynauds phenomenon)、反射性交感神经营养障碍、莱特尔综合征(Reiter's syndrome)、复发性多软骨炎、不宁腿综合征(Restless legs syndrome)、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、施密特综合征(Schmidt syndrome)、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、精子与睾丸自身免疫、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎(SBE)、Susac综合征、交感性眼炎、高安动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血小板减少性紫癜(TTP)、Tolosa-Hunt综合征、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病

(UCTD)、葡萄膜炎、血管炎、水疱性皮肤病(Vesiculobullous dermatosis)、白癜风以及韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)。

[0140] 心血管疾病(CVD)可通过累及心脏和整个身体的血管的许多病症显现出来。一些非限制性例子可以包括:动脉瘤、心绞痛、动脉粥样硬化、脑血管意外(例如,中风)、脑血管疾病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、心肌梗死以及周围血管疾病。

[0141] 受试者可以是没有本文所公开的疾病的健康受试者。

示例性的生物样品

[0142] 生物样品110(如图1所示)可从受试者获得。可在一个或多个时间点从受试者获取一个或多个样品。单一样品可以一次性取自受试者。多个样品可以在一段时间内取自受试者。

[0143] 示例性的生物样品在本文中有所描述。生物样品110可以是,例如任何体液、生物标本、实体组织样品、细胞培养物、异源细胞群体或其任意组合。样品的来源可以是已知的。样品的来源可以是未知的。从其获取样品的受试者的身份可以与样品的身份相关联。照护者可以获取样品与受试者的身份的关联。

[0144] 生物样品可以包括体液样品。示例性的体液样品在本文中有所描述。在一些实施方案中,该体液样品是血液。血液(例如外周血)可以通过本领域技术人员已知的任何手段,例如,通过静脉穿刺、动脉穿刺和/或从脐带分离而从受试者获得。体液样品体积可为,例如,大约1至10mL、约5至20mL或约15至35mL的体积。样品体积可以是大约4、5、6、7、8、9、10、12、15、17、20、25、30或35mL的体积,但可以设想其他体积。可以采取较大的血液样品,而可以使用该较大的样品的一部分。

[0145] 生物样品110可与来自同一受试者或不同受试者的一种或多种生物样品(例如,细胞)混合。生物样品110可以,例如,掺有一种或多种细胞。向样品中掺入细胞可提供阳性或阴性对照,和/或可以改善靶细胞亚群的富集。仅举例来说,生物样品110可以掺有来自永生化细胞系的细胞。永生化细胞系可源自癌症(例如,人类癌症)。示例性的肿瘤或癌细胞系可以通过(例如)ATCC、美国国家癌症研究所和其他来源而获得。已知的永生化细胞系可用于掺入样品。可用于掺入样品的已知永生化细胞系的一些非限制性例子可包括:HeLa、LnCAP、F47D、THP-1、U87、SHSY5Y、Saos02、Vero、DU145、MCF-7、MDA-MB-438、PC3、GH3、PC12、MC3T3、293-T、HL-60、NCI-H322M、SW620、UACC-62、HCC2998、UACC-257、SN12C、CAKI-1、ACHN、LOXIMVI、EKVX、A549、786-0、Hs-578-T、RPMI-8226、SR M14、A498、OVCAR-4、NCI-ADR-RES、MDA-MB-231、HOP-92、DU-145、CCRF-CEM、HT-29、IGROV-1、SF295、TK10、SK-MEL-2、SK-OV-3、MDA-MB-435、NCI-H522、T47D、SNB75、NCI-H226、SK-MEL-28、SK-MEL-5、HOP-62、RXF393、COLO-205、SF268、U031、HCT-15、BT-549、U251、OVCAR-5、SF539、Malme-3M、KM12、HCT-116、SNB19、OVCAR-3、NCI-H23、NCI-H460、MOLT-4、OVCAR-8、K-562。

[0146] 生物样品110可以掺有一种或多种标记的细胞。如本文所用,术语"标记的细胞"通常是指包含可检测标记的细胞。标记的细胞可以作为对照。例如,标记的细胞可用于确定细胞捕获的有效性、细胞增殖的有效性、确定细胞增殖的速率或其任意组合。标记的细胞可以是表达基因或蛋白质的转化细胞。标记的细胞可以是表达能够与标记抗体结合的细胞表面抗原的细胞。

[0147] 可检测标记的一些非限制性例子包括,例如:染料、荧光标记物、荧光蛋白(例如,

绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP)、黄色荧光蛋白(YFP),等等)、生物发光蛋白(例如萤光素酶)、标记的蛋白质;放射性分子、生物素、辣根过氧化物酶、荧光偶联的分子(例如,葡聚糖、β-半乳糖苷酶)和/或细胞系或动物的遗传学改变(例如cre-lox重组酶系统、FLP重组酶,等等)。

[0148] 在一些实施方案中,样品不掺有额外的细胞。

样品的任选分离

[0149] 分离样品115中的一种或多种组分的步骤(如图1所示)能够将靶细胞亚群的浓度相对于其在原始样品中的浓度提高1.5、2、4、6、8、10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、2,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、50,000,000、100,000,000、200,000,000、500,000,000、1,000,000,000、2,000,000,000或5,000,000,000倍。分离样品115中的一种或多种组分的步骤还可以通过降低原始样品的体积(例如,通过除去液体)来提高细胞亚群的浓度。仅举例而言,包含亚群细胞的总体积大于10、15、20、50或100mL的体液样品(例如血液样品)可以分别被浓缩成总体积小于0.5、1、2、3、5或10mL的溶液。

[0150] 对包含靶亚群细胞的样品的温和处理用来减少对细胞的任何机械损伤。温和处理可用于保持样品中的少数亚群细胞和/或保持核酸或大分子的完整性。靶细胞亚群的完整性对于后续的富集步骤而言可能至关重要。

[0151] 在原始样品是体液(例如,全血)的一些情况下,分离样品115中的一种或多种组分的步骤可以包括使用Ficoll试剂,这在Fuss等人的Curr Protoc Immunol(2009)第7章第7.1单元中有详细描述,其通过引用并入本文。图3示出了使用Ficoll试剂(例如,Ficoll-Paque PLUS,GE Healthcare)分离血液组分的示例性方法300。示例性方法300包括使全血样品305在Ficoll试剂310的顶部分层。该示例性方法还包括对全血/Ficoll样品进行基于密度的离心335。离心可以使全血/Ficoll样品分离成不同的层:(1)无核细胞层315,其包含红细胞;(2)Ficoll试剂层320,(3)有核细胞层325,其包含例如白细胞(WBC)和其他有核细胞(例如CTC、CSC、HSC、EPC等);以及(4)血浆层330。对于靶细胞亚群的捕获,可以分离有核细胞层并使之暴露于基底340。

[0152] 分离样品115中的一种或多种组分的步骤还可以使用一种或多种基于大小的分离技术来实现。基于大小的分离技术的一些非限制性例子可包括使用基于大小的分离模块,例如,过滤模块、筛、矩阵、从障碍物横向位移,等等。基于大小的分离可以从血液中除去红细胞和血小板(例如WO2004/113877,其通过引用并入本文)。可以使用障碍物或间隙网络来分离颗粒(例如US 20040144651,其通过引用并入本文)。在一些实施方案中,亚群细胞的分离和/或富集不包括基于大小的分离模块。

[0153] 基于大小的分离模块可以包括形成间隙网络的一个或多个障碍物阵列。障碍物可以被配置成当颗粒流过阵列/间隙网络时,其根据颗粒的流体动力学大小将颗粒引入不同的方向或出口。例如,包含具有预定大小(例如,大于8微米)的有核细胞的血液样品可以被引导通向不同于其他血液组分的单独的出口。

[0154] 阵列可以配置成通过调节间隙、障碍物的大小以及障碍物的每个连续行之间的周期偏移来分离小于或大于预定大小的细胞。障碍物或障碍物之间的间隙可以高达10、20、50、70、100、120、150、170或200微米的长度或约2、4、6、8或10微米的长度。用于基于大小的

分离的阵列可以包括布置成超过10、20、50、100、200、500或1000行的多于100、500、1000、5000、10000、50000或100000个障碍物。第一行障碍物中的障碍物可以从前一(即上游)行障碍物偏移所述前一行障碍物的周期的多达50%。第一行障碍物中的障碍物可以从前一行障碍物偏移所述前一行障碍物的周期的多达45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或10%。第一行障碍物与第二行障碍物之间的距离可以是高达10、20、50、70、100、120、150、170或200微米。特定的偏移可以是连续的(例如,在多行中重复)或非连续的。分离模块可以包括流体耦合的多个离散的障碍物阵列,使得它们彼此串联。每个障碍物阵列可以具有连续偏移。但是每个后续(即下游)障碍物阵列具有可以与前一(即上游)偏移不同的偏移。每个后续障碍物阵列可具有比前一障碍物阵列更小的偏移。这可允许在细胞通过障碍物阵列迁移时,在分离过程中进行细化(refinement)。多个阵列可以串联或并联地流体耦合(例如,超过2、4、6、8、10、20、30、40、50个)。并联地流体耦合的分离模块(例如,阵列)允许进行样品的高通量分析,使得每小时至少有1、2、5、10、20、50、100、200或500mL可流过富集模块或每小时至少有1百万、5百万、1千万或5千万个细胞可以被分选或流过装置。

[0155] 障碍物可耦合至平的基底,以形成间隙阵列。障碍物可以形成二维阵列,其中每个连续行相对于前一行障碍物水平地位移,其中,障碍物阵列可以引导具有小于预定大小的流体动力学大小的组分进入第一方向,而具有大于预定大小的流体动力学大小的另一组分进入第二方向。仅举例而言,对于从无核细胞中富集上皮或循环肿瘤细胞,障碍物阵列的预定大小可以是约6-12μm或6-8μm。样品向障碍物阵列中的流动可以相对于阵列的视线成小角度(即流动角)对准。任选地,该阵列可耦合至输注泵从而将样品灌注通过障碍物。本文所描述的基于大小的分离模块的流动条件可以使得亚群细胞在损伤最小的情况下被阵列分选。这使得对完整细胞和完整细胞核的下游分析更加有效和可靠。

[0156] 分离样品115中的一种或多种组分的步骤可以包括使用选择性地抑制一种或多种细胞的移动性的一种或多种捕获技术。捕获技术可与一种或多种其他分离和/或富集技术联合使用。捕获技术可以涉及亲和纯化。可根据阳性选择(例如,基于靶细胞亚群对捕获试剂的亲和性)来富集靶细胞亚群。

[0157] 可以基于对捕获试剂(例如,捕获抗体)的亲和性来富集靶细胞亚群。例如,可以基于对阳性选择试剂的亲和性来富集靶细胞亚群。阳性选择试剂可以是阳性选择抗体,例如,针对与非靶细胞亚群相比在靶细胞亚群中选择性表达的肽的抗体。该肽可以是或可以不是细胞表面肽。示例性的阳性选择抗体包括但不限于针对上皮细胞粘附分子(EPCAM)、醛脱氢酶1(ALDH1)、CK19、细胞角蛋白8、18、Twist、EGFR、CD133、波形蛋白等的抗体。因此,在一些情况下,靶细胞亚群(例如,CTC)可以使用EPCAM抗体来富集。捕获试剂(例如,抗体)可以缀合至固体或半固体支持物,例如,孔、珠、磁珠、腔室。通过阳性选择对靶细胞亚群的富集可包括,仅举例而言,使生物样品与在其上固定有阳性选择抗体的固相或半固相接触,使得靶细胞与该阳性选择抗体结合。该方法可以进一步包括除去样品的未结合的部分(例如,通过一个或多个洗涤步骤)。该方法可进一步包括收集所结合的部分。靶细胞亚群的富集可能不需要使用在其上固定有阳性选择试剂的固相或半固相。例如,通过对阳性选择试剂(例如,阳性选择抗体)的亲和性进行的富集可以包括使用流式细胞术,例如,FACS分选。在一些实施方案中,靶细胞亚群用例如可检测地标记的EpCAM抗体来标记,并且通过基于FACS的EpCAM+细胞的捕获来富集。

[0158] 靶细胞亚群可以基于阴性选择来富集，例如，基于非靶细胞亚群对捕获试剂(例如，捕获抗体)的亲和性来富集。相比于非靶细胞亚群，靶细胞亚群对捕获抗体可具有较低的亲和力。例如，捕获抗体可以是针对下述肽的抗体：该肽通常在非靶细胞亚群中表达，但通常不在靶细胞亚群中表达。例如，捕获抗体可以是针对在白细胞、单核细胞和/或巨噬细胞中选择性地表达的肽的抗体。可用于阴性选择的示例性捕获抗体可以包括抗CD45抗体、抗CD14抗体、抗CD34抗体、抗成纤维细胞表面蛋白抗体，等等。通过阴性选择对靶细胞亚群的富集可包括，仅举例而言，使生物样品与在其上固定有阴性选择抗体的固相或半固相接触，使得非靶细胞与该阴性选择抗体结合。该方法可以进一步包括收集生物样品的未结合的部分。靶细胞亚群的富集可能不需要使用在其上固定有阴性选择试剂的固相或半固相。例如，通过对阴性选择试剂(例如，阴性选择抗体)的亲和性进行的富集可以包括使用流式细胞术，例如，FACS分选。在一些实施方案中，靶细胞亚群用例如可检测地标记的阴性选择抗体(例如，CD45抗体)来标记，并且通过基于FACS的CD45-细胞的捕获来富集。

[0159] 捕获技术可包括使用一个或多个捕获模块。捕获模块可以是被配置成用于捕获一种或多种分析物(例如，感兴趣的或不感兴趣的细胞)的装置。在一个非限制性实例中，基于亲和性的分离模块可以捕获细胞或可以包括适于允许样品流过的障碍物阵列，其中，该障碍物可以包含能够选择性地结合一种或多种感兴趣的细胞群体(例如，靶细胞亚群细胞、上皮细胞、有核细胞、CTC、CSC等)或不感兴趣的分析物(例如，非靶细胞，如，仅举例而言，白细胞)的表面结合部分。结合部分可以偶联至障碍物。结合部分可包括，例如，蛋白质(例如，配体/受体)、在存留的细胞中具有可杂交相对物的核酸、抗体，等等。

[0160] 捕获技术可以基于这类细胞或不感兴趣的细胞中的磁特性或磁势而利用磁场来分离和/或富集细胞。例如，可能是略微反磁性(即被磁场排斥)的红细胞可以通过将血红蛋白脱氧化为高铁血红蛋白而变成顺磁性的(即被磁场吸引)。此种磁特性可通过对红细胞的物理或化学处理来实现。因此，对于含有感兴趣的细胞的血液样品，可以通过以下方式将感兴趣的细胞与红细胞分离：首先诱导红细胞中的磁特性，然后通过使样品流过磁场而将红细胞与感兴趣的细胞分离。磁场可以是均匀的或不均匀的。

用于靶细胞亚群的选择性粘附和生长的体外系统

[0161] 此处所述的体外系统可以促进靶细胞亚群的选择性粘附和生长。靶细胞亚群可以保持存活并经历细胞繁殖。该体外系统可配置成促进靶细胞亚群的选择性粘附和生长，例如，通过提供选择性促进靶细胞亚群的粘附和生长的条件。该条件可以是生理学相关的条件(例如，类似于体内环境条件的环境条件)。

示例性的基底

[0162] 基底120(如图1所示，在本文中可互换地称为“本发明的基底”、“本发明基底”或简称为“基底”)可以从包含异源细胞群体的样品中捕获靶细胞亚群。相比于非靶细胞亚群(例如，不粘附和/或不存活的细胞)，本发明基底可促进靶细胞亚群(例如，粘附和/或存活的细胞)的选择性粘附和生长。例如，相比于其他类型的细胞，基底可以促进循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、造血干细胞(HSC)、内皮祖细胞(EPC)、原代细胞、胎儿细胞、干细胞、免疫细胞、上皮细胞、内皮细胞、癌细胞、白细胞、成体干细胞和/或上皮祖细胞(EPC)的选择性粘附和生长。本发明基底可以被配置成促进特定类型的靶细胞亚群的选择性粘附和生长。相比于其他类型的细胞，基底可以促进CTC、CSC、EPC、干细胞、上皮细胞、原代细胞或

癌细胞的选择性粘附和生长。相比于其他类型的细胞，基底可促进CTC和/或CSC的选择性粘附和生长。因此，本发明基底可进一步富集靶细胞亚群。本发明基底可使靶细胞亚群/非靶细胞群体之比相对于原始比例富集至少1.5、2、4、6、8、10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、2,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、50,000,000、100,000,000、200,000,000、500,000,000、1,000,000,000、2,000,000,000或5,000,000,000倍。

[0163] 基底可以被配置成使靶细胞亚群呈现一种或多种不同的形态特征。在一个非限制性的实例中，一种或多种不同的形态特征的呈现可以使靶细胞亚群区别于非靶细胞亚群。因此，基底使得能够基于一种或多种形态特征将靶细胞亚群从细胞亚群的异源群体中选择出来。

[0164] 仅举例而言，在本发明基底上涂布之后，相比于非靶细胞亚群的表面积，CTC和/或CSC可以因大的表面积而在形态上区别于其他细胞亚群。仅举例而言，涂布到本发明基底上约20分钟到1小时后，CTC和/或CSC在基底上铺展开，假定直径为细胞接触基底前直径的至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍或超过50倍。CTC和/或CSC在接触本发明基底之后的直径可以是大约20μm或更大、25μm或更大、30μm或更大、35μm或更大、40μm或更大、45μm或更大、50μm或更大、55μm或更大、60μm或更大、65μm或更大、70μm或更大、75μm或更大、80μm或更大、85μm或更大、90μm或更大、95μm或更大、100μm或更大或大于100μm。因此，本发明提供了这样一种方法：使异源细胞群体与本发明基底接触；在足以允许靶细胞亚群(例如，CTC和/或CSC)生长的条件下孵育该异源细胞群体；以及如果靶细胞亚群的成员表现出大直径，则鉴定该靶细胞亚群的成员。

[0165] 在一些实施方案中，CTC和/或CSC在涂布到基底上之后呈现“薄饼”状形状，其特征在于细胞质具有非常大的表面积。CTC和/或CSC的细胞质的表面积可以大于CTC和/或CSC的核的表面积。例如，CTC和/或CSC的细胞质的表面积可以是核的表面积的2-4倍。与此相反，非CTC或非CSC细胞的细胞质的表面积可能比核的表面积小2倍。CTC和/或CSC在涂布到本发明基底上之后的表面积可以是非CTC或非CSC细胞的表面积的至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、12倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或大于100倍。CTC和/或CSC在涂布到本发明基底上之后的表面积可以为至少900μm^2、1000μm^2、1100μm^2、1200μm^2、1300μm^2、1400μm^2、1500μm^2、1600μm^2、1700μm^2、1800μm^2、1900μm^2、2000μm^2、2100μm^2、2200μm^2、2300μm^2、2400μm^2、2500μm^2、2600μm^2、2700μm^2、2800μm^2、2900μm^2、3000μm^2、3100μm^2、3200μm^2、3300μm^2、3400μm^2、3500μm^2、3600μm^2、3700μm^2、3800μm^2、3900μm^2、4000μm^2、4500μm^2、5000μm^2、5500μm^2、6000μm^2、6500μm^2、7000μm^2、7500μm^2、8000μm^2、8500μm^2、9000μm^2、9500μm^2、10000μm^2或大于10000μm^2。相反，非CTC或非CSC细胞在涂布到本发明基底上之后的表面积为约500-700μm^2。大小差异可能直到细胞已经粘附到基底上才可检测到。因此，本发明提供了这样一种方法：使异源细胞群体与本发明基底接触；在足以允许靶细胞亚群(例如，CTC和/或CSC)生长的条件下孵育该异源细胞群体；以及如果靶细胞亚群的成员表现出的表面积大于非靶细胞的表面积，则鉴定该靶细胞亚群的成员。

[0166] CTC和/或CSC在涂布到基底上之后可以表现出每个细胞具有多个核。CTC和/或CSC表现出2、3、4、5、6、7、8、9、10个或超过10个核。与此相反，非CTC或非CSC细胞通常表现出每个细胞具有一个核。因此，本发明提供了这样一种方法：使异源细胞群体与本发明基底接

触;在足以允许靶细胞亚群(例如,CTC和/或CSC)生长的条件下孵育该异源细胞群体;以及如果靶细胞亚群的成员表现出每个细胞具有多于一个核,则鉴定该靶细胞亚群的成员。

[0167] 本发明基底可允许基于形态特征来鉴定EPC。EPC一旦与基底接触则可形成纺锤状外观。与基底接触的EPC的宽度可以比EPC的长度小至少2-5倍。因此,本发明提供了这样一种方法:使异源细胞群体与本发明基底接触;在足以允许靶细胞亚群(例如,EPC)生长的条件下孵育该异源细胞群体;以及如果靶细胞亚群的成员表现出的宽度比该靶细胞亚群的成员的长度小至少2-5倍,则鉴定该靶细胞亚群的成员。

[0168] 本发明基底可允许基于形态特征来鉴定HSC。HSC一旦与基底接触则可形成圆形、紧致的外观。在一些情况下,与基底接触的HCS的直径可能不超过20μm。在一些情况下,HSC在涂布之后的直径不超过悬浮于培养基中的HSC的直径的2倍。因此,本发明提供了这样一种方法:使异源细胞群体与本发明基底接触;在足以允许靶细胞亚群(例如,HSC)生长的条件下孵育该异源细胞群体;以及如果靶细胞亚群的成员在涂布后表现出的直径不超过该细胞在粘附到该基底之前的直径的2倍,则鉴定该靶细胞亚群的成员。

[0169] 基底可以被配置成使靶细胞亚群呈现一种或多种不同的动力学特征。在一个非限制性的实例中,一种或多种不同的动力学特征的呈现可以使靶细胞亚群区别于非靶细胞亚群。因此,基底使得能够基于一种或多种不同的动力学特征来将靶细胞亚群从细胞亚群的异源群体中选择出来。

[0170] 示例性的动力学特征可包括细胞增殖速率。例如,基底可以被配置成促进异源细胞群体中不同的细胞亚群以不同的速率增殖。例如,可以将异源细胞群体(包含多个细胞亚群,例如非癌细胞、CTC、CSC和白细胞)涂布到本发明基底上。当异源细胞群体孵育对增殖而言足够的一段时间时,不同的细胞亚群可以以不同的速率进行增殖。例如,非癌细胞可能不会经历增殖。对于其他实例,CTC可形成多个亚集落,其中每个亚集落以不同的速率进行增殖。CTC和/或CSC的不同的增殖速率可以比非癌细胞的增殖速率更快。因此,本发明提供了这样一种方法:使异源细胞群体与本发明基底接触;在足以允许靶细胞亚群(例如,CTC和/或CSC)生长的条件下孵育该异源细胞群体;以及如果靶细胞亚群的成员表现出快速的细胞分裂,则鉴定该靶细胞亚群的成员。快速细胞分裂可由以下得到证实:在涂布到本发明基底上3天内,细胞汇合度提高30倍。快速细胞分裂可由以下得到证实:在涂布到本发明基底上5天内,细胞汇合度提高100倍。快速细胞分裂可由以下得到证实:在涂布到本发明基底上10天内,细胞汇合度提高100倍。快速细胞分裂可由以下得到证实:与非靶细胞亚群的增殖相比,靶细胞亚群的增殖提高2倍或更高。

[0171] 示例性的动力学特征还可以包括集落形成。细胞集落可以是在固体培养基的表面上或内部生长的细胞簇。集落可以来源于单细胞。细胞簇内的细胞可以在彼此的顶部上生长。基底可以被配置成促进靶细胞亚群的集落形成,而非靶细胞亚群没有明显的集落形成。例如,在涂布到发明基底上时,白细胞可以增殖,但可能不会形成集落。CTC和/或CSC在涂布到本发明基底上时可以经历集落形成。集落可以是三维集落。三维集落可以通过CTC和/或CSC在彼此顶部生长而形成。与此相反,非CTC或非CSC细胞一般不形成三维集落。因此,本发明提供了这样一种方法:使异源细胞群体与本发明基底接触;在足以允许靶细胞亚群(例如,CTC和/或CSC)生长的条件下孵育该异源细胞群体;以及如果靶细胞亚群的成员表现出三维集落形成,则鉴定该靶细胞亚群的成员。

[0172] 图4是图解示例性方法400的图示，通过该方法，靶细胞亚群415可以被涂布在本发明基底405上并且在该基底上呈现一种或多种形态特征和/或动力学性质。通过基于Ficoll的密度分离获得的单核细胞层可以与基底接触。图420示出了与基底405一起孵育的含有异源细胞群体的样品410。在该图示中，异源细胞群体含有：靶细胞亚群415、白细胞425以及其他细胞427。

[0173] 图430示出了粘附于基底405的靶细胞亚群415，与白细胞425或其他细胞427相比，靶细胞亚群415具有更高的亲和力。可将未粘附于基底405的细胞除去，例如，通过用基质433或其他物质洗涤来除去。

[0174] 图440示出了来自靶细胞亚群415的细胞在基底405上铺展并开始一轮细胞分裂。捕获的白细胞425可以分裂，但白细胞425一般不具有与靶细胞亚群415相同的铺展形态或动力学性质。图450描绘了捕获的靶细胞亚群415已经以不同的速率经历了一轮或多轮细胞分裂。靶细胞亚群415可能已经在基底上形成集落。捕获的白细胞425可以增殖；但是白细胞在基底405上一般不形成集落。既未处于集落中又未粘附于基底405上的细胞可以用基质433或其他物质洗掉。

示例性的基底构造

[0175] 本发明中包括本发明基底的很多构造。图5示出了数种不同的示例性基底构造，这些基底与捕获的靶细胞亚群505一同示出。图510描绘了发明基底的示例性“单层”构造，其中结合表面层515是唯一的层。图520描绘了本发明基底的示例性“双层”构造，其包括毗邻于结合表面层515的基层530。图540描绘了本发明基底的示例性“中间层”构造，其包括基层530、一个或多个中间层550以及结合表面层515。图560描绘了本发明基底的示例性“反转”构造，其包括两个基层530、结合表面层515以及饲养层570。反转构造可以创建半密封的室，其中外层彼此面对，并且两个基底之间的距离范围可为大约0.1-20mm、大约1-10mm或者大约1-5mm，并且可以是约0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、17或20mm。

示例性的基层

[0176] 基层530可以由塑料、玻璃、明胶、包含基底层的组分、聚丙烯酰胺或其任意组合制成。示例性的包含基底层的组分包括但不限于：层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、巢蛋白(entanctin)和基底膜聚糖。基层可被配置成具有一硬度。在一些情况下，基层的硬度模拟软组织如脑组织的硬度。在这样的情况下，基层的硬度为0.02-20千帕(kPa)、0.05-1.5kPa或者0.1-1.0kPa。在一些情况下，基层的硬度模拟骨组织的硬度。在这样的情况下，硬度可以是30-150kPa、40-125kPa或者50-100kPa。在一些情况下，基层的材料可以被配置成装置。这类可商购装置的例子包括：显微镜载玻片，培养板/盘、培养皿、显微镜盖玻片、密封培养皿和多孔培养皿(例如，Millicell Cell Culture Inserts™；EMD Millipore Corporation)。

示例性的结合表面层

[0177] 结合表面层515可包含例如细胞单层、细胞内组分(例如，获自细胞裂解物)、与细胞外基质(ECM)相关的生物材料、明胶或其任意组合中的一种或多种。

[0178] 结合表面层可以包含细胞单层。细胞单层可全部或部分地包含哺乳动物培养细胞。哺乳动物培养细胞可以包括哺乳动物细胞系。哺乳动物细胞系可以具有例如内皮性质，并且可以来自血管、静脉或毛细血管来源。哺乳动物培养细胞的非限制性例子包括小鼠胚

胎成纤维细胞(MEF)、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人肺微血管内皮细胞(HLMVEC)。细胞系可以得自原代来源或得自永生化细胞系。在一些情况下,细胞单层可以用紫外线或X射线源照射,从而引起细胞的衰老(例如,停止单层细胞的进一步增殖)。在一些情况下,细胞单层可含有一种或多种不同细胞类型的混合物(例如,源自不同谱系或不同细胞系的细胞)。不同细胞类型可以一起共同培养。一个非限制性例子是与混合的转基因小鼠胚胎成纤维细胞共培养的原代人内皮细胞的组合,从而形成细胞单层。

[0179] 结合表面层可包含细胞内组分的混合物。一种获得细胞内组分的混合物的方法是通过裂解细胞(例如,破坏细胞质膜)并收集细胞溶质组分来进行的。裂解的细胞可以是原代的或永生化的。此外,裂解的细胞可以来自单一培养物或共培养物。用于获得裂解物的细胞系的例子包括但不限于MEF、HUVEC和HLMVEC细胞。细胞裂解物可以通过去除多余的溶液而在其组成上浓缩。可以通过本领域技术人员已知的多种不同方式除去多余的溶液,包括:离心、基于膜的透析、气体辅助蒸发或其任意组合。

[0180] 结合表面层可包含与细胞外基质(ECM)或结合部分相关联的生物材料。这类与ECM相关联的生物材料可以包括:I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、网硬蛋白、吸湿性分子(糖胺聚糖(glycosaminoglycanse)、蛋白聚糖(roteoglycans)、糖萼(glycocalyx))、牛血清白蛋白、聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸和聚鸟氨酸(例如,聚-L-鸟氨酸)。在一些实施方案中,与ECM相关联的生物材料带正电荷(例如,聚鸟氨酸)。还有市售的与ECM相关联的生物材料的来源,市售来源的一个例子是Matrigel™(BD Biosciences)。示例性的结合部分在本文中描述。

[0181] 结合表面层可以包含明胶。明胶可以来自动物来源。例如,明胶可以是猪和/或牛明胶。在一些情况下,结合表面层可以包含与胶原蛋白混合的明胶(如猪明胶)。在一些情况下,明胶可直接与一个或多个细胞单层、细胞内组分、结合部分、与ECM相关联的生物材料或其任意组合混合,从而形成结合表面层。在一些情况下,结合表面层可包含市售的产品(例如Matrigel™(BD Biosciences);Vita-Assay™(Vitatex,NY))。在某些情况下,结合表面层可以包含血清。

示例性的任选的中间层

[0182] 当基底是“中间层”构造540时,基底可具有一个或多个中间层。在“中间层”构造540中,在基底层530和结合表面层515之间可以具有一个或多个中间层550。该夹层的中间层可以是一个或多个细胞单层。该单层的细胞可以来自不同来源。中间层的一个非限制性例子可以通过以下方式制成:使小鼠胚胎成纤维细胞的汇合单层在基层上生长,然后在汇合小鼠胚胎成纤维细胞的顶部生长另一层细胞、结合表面层。

示例性的饲养层

[0183] 具有“反转”构造的基底560可以包含饲养层570。饲养层570可以毗邻于基层。饲养层可以与结合表面层隔开。在一些实施方案中,相比于饲养层570,靶细胞亚群505优先结合至结合表面层515。饲养层570可以包含饲养细胞的单层。该单层的细胞可以来自任何来源。示例性的饲养细胞在本文中描述。饲养层的一个非限制性例子是通过使人内皮细胞或小鼠胚胎成纤维细胞的单层在基层上生长而形成的。

[0184] 示例性的“反转层”基底在图6中描绘出。示例性的“反转层”基底包括两个含有组织培养塑料和/或玻璃的基层、含有结合基底(例如,与ECM相关联的生物材料)的结合表面

层以及含有饲养细胞单层的饲养层。图6还描绘了靶细胞在涂布到反转层基底上之后的示例性形态和动力学性质。在涂布30分钟内，靶细胞可以表现出粘附于结合表面层。在涂布2小时内，靶细胞可以表现出细胞铺展。在24-72小时内，靶细胞可以表现出细胞分裂，从而形成靶细胞的集落。

[0185] 在本文中称为“GOL基底”的本发明基底的示例性实施方案可以包含明胶、与ECM相关联的生物材料和血清。该明胶可以是猪明胶。与ECM相关联的生物材料可以是聚鸟氨酸(例如，聚-L-鸟氨酸)。该血清可以是胎牛血清。在一些实施方案中，GOL基底包含猪明胶、聚鸟氨酸和胎牛血清。例如，GOL基底可包含0.01-10％猪明胶、0.001-0.5mg/ml聚-L-鸟氨酸和0.5-20％胎牛血清。在一个实施方案中，GOL基底包含约0.1％猪明胶、约0.05mg/ml聚-L-鸟氨酸盐酸盐和大约5％的胎牛血清(FBS)。

[0186] 在本文中称为“GEL基底”的本发明基底的另一个示例性实施方案可以包含明胶和一种或多种与ECM相关联的生物材料。GEL基底可包含，例如，明胶以及两种或更多种与ECM相关联的生物材料。GEL基底可以包含明胶以及三种或更多种与ECM相关联的生物材料。GEL基底可以包含，例如，明胶和胶原蛋白。GEL基底可包含明胶、胶原蛋白和/或层粘连蛋白。GEL基底可包含明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白和/或纤连蛋白。在一些情况下，GEL基底可以包含0.01-10％猪明胶、0.01-1mg/ml胶原蛋白、0.01-1mg/ml层粘连蛋白和/或0.01-1mg/ml纤连蛋白。在一个实施方案中，GEL基底包含约0.1％猪明胶以及下列蛋白质中的一种或多种：大约0.1mg/ml的胶原蛋白(例如Sigma C7774)；大约0.1mg/ml的层粘连蛋白(例如Sigma L2020)；和/或大约0.1mg/ml纤连蛋白(例如Sigma F0895)。

[0187] 本发明基底可通过将本文所述的一个或多个层接合起来而制备。层的接合可以通过使单层中的细胞在基层或中间层上生长来完成。层的接合还可以通过利用带净正电荷、净负电荷或净中性电荷的表面对表面进行预处理来实现。接合程序可以由化学部分、连接体、蛋白质片段、核苷酸片段或其任意组合来辅助。

[0188] 如本领域技术人员将认识到的那样，基底的确切构造和组成可以针对特定靶细胞亚群的富集而调整。基底的组成可以根据患者类型、癌症类型、癌症阶段、患者的病史以及患者肿瘤的基因组分析和蛋白质组分析而变化。

适于靶细胞亚群生长的环境条件

[0189] 提供其数目足够用于分析的靶细胞亚群(例如，诸如CTC或CSC)的一个挑战是不能长期维持细胞活力。因此，本发明提供了促进靶细胞亚群的长期体外活性和繁殖的培养方法。培养方法可以包括在适于靶细胞亚群生长的环境条件中孵育靶细胞亚群。因此，本发明还提供了一种细胞培养孵箱，其包括封闭的环境室，其中，该孵箱被配置成保持适于靶细胞亚群生长的环境条件。环境条件可以被配置成模拟体内脉管系统。相比于非靶细胞亚群，在如本文所述的一种或多种条件下孵育靶细胞亚群可以提高靶细胞亚群对基底的粘附。在如本文所述的一种或多种条件下孵育靶细胞亚群可以导致靶细胞亚群对基底的至少1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或超过95％的粘附。在如本文所述的一种或多种条件下孵育靶细胞亚群可以促进靶细胞亚群的活力。例如，在如本文所述的一种或多种条件下孵育时，靶细胞亚群在培养1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周或多于12周内保持存活。在如本文所述的一种或多种条件下孵育靶细胞亚群可导致靶细胞亚群的至少15％、

20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%在培养至少1周内保持存活。在如本文所述的一种或多种条件下孵育靶细胞亚群可导致靶细胞亚群的至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%在培养至少2周内保持存活。在如本文所述的一种或多种条件下孵育靶细胞亚群可导致靶细胞亚群的至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%在培养至少4周内保持存活。在如本文所述的一种或多种条件下孵育靶细胞亚群可导致靶细胞亚群的至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%在无限期培养内保持存活。

[0190] 提供其数目足够用于分析的靶细胞亚群(例如,诸如CTC或CSC)的另一个挑战是不能在培养中长期繁殖靶细胞亚群。利用本发明的方法,靶细胞亚群在培养中可以繁殖1周、2周、3周、4周、8周、12周或多于12周。利用本发明的方法,在粘附于基底之后,靶细胞亚群的至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或多于95%在培养中可以繁殖1周、2周、3周、4周、8周、12周或多于12周。通过利用本发明的方法,靶细胞亚群可无限期地保持存活和/或可繁殖。在一些实施方案中,该培养方法包括在适于靶细胞亚群生长的环境条件下孵育靶细胞亚群。在一些情况下,靶细胞亚群可以繁殖超过10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或超过100个倍增循环。

[0191] 适于靶细胞亚群生长的环境条件可包括在封闭环境室内进行培养,该封闭环境室包括限定的内部环境温度。该封闭环境室可以是细胞培养孵箱的内室。该封闭环境室的内部环境温度可以是约34至约42摄氏度,包括约34、35、36、37、38、39、40、41或42摄氏度。因此,本发明的细胞培养孵箱包括封闭的环境室,其中,该孵箱被配置成维持封闭环境室的内部环境温度。

[0192] 适于靶细胞亚群生长的环境条件可包括在封闭环境室中进行培养,该封闭环境室包含内部气体组成。该封闭环境室的气体组成可以包含限定的O_2水平。限定的O_2水平的范围可从可忽略量的O_2至高达约20%O_2(例如,O_2占内部气体组成的约20%),包括大约0%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%的O_2。限定的O_2水平可以被配置成为培养靶细胞亚群提供低氧环境。在一些实施方案中,限定的O_2水平是不超过10%、不超过5%、不超过4%、不超过3%、不超过2%、不超过1%、不超过0.5%、不超过0.4%、不超过0.3%、不超过0.2%、不超过0.1%。在一些情况下,封闭环境室的O_2水平的范围为0.5-2%。封闭环境室的O_2水平可以是约1%。

[0193] 所述气体组成可以包含限定的CO_2水平。例如,靶细胞亚群可以在包含以下水平CO_2的封闭环境室中生长:约1%至约15%的CO_2,包括约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%。封闭环境室的CO_2水平可以是约2-10%。封闭环境室的CO_2水平可以是约3-8%。封闭环境室的CO_2水平可以是约5%。

[0194] 所述气体组成可以包含氮气水平。氮气水平可以是约50-99.5%,包括约50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或大于99.5%。氮气水平可以是约90-99%、约92-98%、约93-96%或约94%。在一些实施方案中,氮气水平为约93%-94%。在特定情况下,靶细胞亚群在含有

约1％O_2、5％CO_2和94％氮气的环境中生长。在特定情况下，靶细胞亚群在含有约2％O_2、5％CO_2和93％氮气的环境中生长。

[0195] 适于靶细胞亚群生长的环境条件可以包括在加压条件下培养。例如，适于靶细胞亚群生长的环境条件可包括在具有限定的气压的封闭环境室中进行培养。该封闭环境室的限定的气压可以由用户来设置。例如，该封闭环境室的限定的气压可以被设置为产生等于或大于存在于人脉管系统的毛细血管中的平均压力的力。该封闭环境室的限定的气压可以是15PSIA或更高，可以是15.7PSIA或更高，可以是16.7PSIA或更高，可以是17.7PSIA或更高，可以是18.7PSIA或更高，或者可以是19.7PSIA或更高。该封闭环境室的限定的气压可以是约15.7-19.7PSIA、约15.7-18.7PSIA、约15.7-17.7PSIA，或可以是约16.7PSIA。孵育条件可根据待增殖的细胞类型而改变。

[0196] 适于靶细胞亚群生长的环境条件包括在加压环境室中在低氧条件下生长。在一些情况下，靶细胞亚群可以在具有限定的气体组成、限定的内部环境温度和限定的内部气压的封闭环境室中生长。在特定情况下，限定的气体组成包含1％O_2、5％CO_2和94％氮气，限定的内部气压为16.7PSIA，并且限定的内部环境温度为约37℃。

[0197] 靶细胞亚群可以在被配置成用于厌氧细胞生长的环境室中孵育。这样的环境室可以包括，例如，来自Shel Labs的Bactron™厌氧室(www.shellab.com)。

[0198] 因此，本发明提供了被配置成提供适于靶细胞亚群生长的环境条件的细胞培养孵箱。该细胞培养孵箱可被配置成在封闭环境室中保持限定的气体组成、限定的内部环境温度和限定的内部气压。该细胞培养孵箱还可以被配置成在封闭环境室中保持限定的内部湿度。示例性的限定的内部环境温度、限定的内部气压和限定的气体组成在本文中描述。该细胞培养孵箱可以包括一个或多个控制单元。所述一个或多个控制单元可以被配置成维持限定的气体组成、限定的内部环境温度和/或限定的内部气压中的一个或多个。限定的气体组成、限定的内部环境温度和/或限定的内部气压中的任意一个可以由用户来控制。在某些情况下，限定的内部气压由用户来控制。该细胞培养孵箱可以包括用户界面。该用户界面可以被配置成控制限定的气体组成、限定的内部环境温度和限定的内部气压中的任意一个。

[0199] 细胞培养孵箱可以可操作地连接到一个或多个气体罐。该一个或多个气体罐可以包括CO_2罐、氮气罐、氧气罐、包含限定的混合物或一种或多种气体的气体罐，或它们的任意组合。细胞培养孵箱可以经由加压泵和/或压力传感器(例如，压力计)可操作地连接到一个或多个气体罐。该加压泵和/或压力传感器可以被配置成保持气体从一个或多个气体罐向细胞培养孵箱的封闭环境室受控流动。气体从一个或多个罐的受控流动可以具有设定的入口压力，一个或多个罐的设定的入口压力被配置成维持该封闭环境室的所需的内部气体组成和/或内部气压。

[0200] 细胞培养孵箱可以包括一个或多个传感器。所述一个或多个传感器可以被配置成当气体组成、内部环境温度和/或内部气压中的一个或多个偏离限定的气体组成、限定的内部环境温度和/或限定的内部气压时，提供可检测的警报。例如，在检测封闭环境室的O_2水平时，如果所检测到的O_2水平与限定的O_2水平相差超过±0.5％，则一个或多个传感器可提供可检测的警报。在检测封闭环境室的内部气压时，如果所检测到的内部气压与限定的气压相差超过±0.5％，则一个或多个传感器可提供可检测的警报。在检测封闭环境室的内部环境温度时，如果所检测到的内部环境温度与限定的内部环境温度相差超过±0.5％，则一

个或多个传感器可提供可检测的警报。

[0201] 细胞培养孵箱可包括除氧催化剂。该除氧催化剂可以可操作地连接到或者可以不会可操作地连接到一个或多个气体罐。可以使用本领域已知的或本文另外描述的任何除氧催化剂。示例性的除氧催化剂可从例如BASF商购。示例性的除氧催化剂在美国专利No.7,735,670和4,034,062以及美国专利申请公开No.20090041646中有描述,其通过引用并入本文。

[0202] 本发明的细胞培养孵箱可以被配置成使得该孵箱的封闭环境室占据小体积的空间。例如,该孵箱的封闭环境室可占据不超过3.5立方英尺的空间、不超过22立方英尺的空间、不超过1.5立方英尺的空间或不超过1立方英尺的空间。在一些实施方案中,该孵箱的封闭环境室占据小于1立方英尺的空间,例如,占据0.5英尺X0.5英尺X0.5英尺的空间。细胞培养孵箱可以被配置成占据不超过3.5立方英尺的空间、不超过22立方英尺的空间、不超过1.5立方英尺的空间,或不超过1立方英尺的空间。在一些实施方案中,细胞培养孵箱占据小于1立方英尺的空间,例如,占据0.5英尺X0.5英尺X0.5英尺的空间。

[0203] 图7A示出了本发明的示例性细胞培养孵箱700。孵箱700可以包括加压门。在一些实施方案中,该孵箱包括外部加压门和内部加压门。外部加压门和/或内部加压门可以是例如双壁门。该双壁门可具有压力密封的闩锁。外部加压门可包括位于门上的集成压力传感器。孵箱700可包括门入口。门入口可以提供进入封闭环境室的入口。门入口开口的尺寸可以小于加压门。门入口可以包括橡胶垫片。橡胶垫片可以创建加压密封。细胞培养孵箱可以包括集成压力传感器。集成压力传感器可以是歧管压力传感器。集成压力传感器可以是水基或硅基压力传感器。孵箱700可以包括灭菌单元。该灭菌单元可以是基于UV的灭菌单元。基于UV的灭菌单元可以被配置成向孵箱的封闭环境室的整个空间提供紫外线。孵箱700可包括CO_2传感器。CO_2传感器可以被配置成当与封闭环境室的限定的CO_2水平偏差+/-0.5%时,提供可检测的警报。孵箱700可包括封闭环境室。封闭环境室所占据的体积可以是1立方英尺或更少。封闭环境室可包含搁架。搁架可以相对于封闭环境室为可移动的。搁架可以包含金属材料。该金属材料可以是不锈钢、铜或其他合适的金属。孵箱700可以包括水湿度托盘。水湿度托盘可以促进封闭环境室的无菌性。水湿度托盘可以直接拴系在湿度传感器/调节器上。孵箱700可以包括空气夹套。空气夹套可以维持最佳的温度和适当的气体调节。空气夹套可以是物理上不同的隔室。空气夹套可以容纳电气控制器和电路板。孵箱700可包括用于调节孵箱内的氧气水平的除氧催化剂和传感器。

[0204] 孵箱700可包括加热元件和/或温度控制。加热元件和/或温度控制可以包括基于静音风扇的加热元件。基于静音风扇的加热元件可以将恒定的热空气流分配到空气夹套隔室中。随后被动加热可以使内室以均匀分布和恒定的方式升温。该孵箱可以包括被配置成提供限定的气体组成和内部气压的加压泵和调节器。基于马达的泵可以分配限定的气体混合物,以维持腔室压力和气体组成水平(例如,1%氧气、5%CO_2、94%N_2)。该孵箱可以包括用户界面。用户可以使用该用户界面来设置气体水平和压力。该用户界面可以集成到传感器和泵中以供直接控制。加压泵和调节器可以包括一个或多个气体入口。该一个或多个气体入口可以被配置成允许任何气体流入封闭环境室中。例如,该一个或多个气体入口可以连接到氧气罐。该一个或多个气体入口可以连接到CO_2罐。该一个或多个气体入口可以连接到氮气罐。在一些实施方案中,该孵箱包括连接到氧气罐的气体入口、连接到CO_2罐的气体入

口以及连接到氮气罐的气体入口。该一个或多个气体入口可以连接到含有定制的气体混合物的罐。在一些实施方案中，用户可以控制气体经过气体入口的任一个和/或每一个的流动。气体入口的任一个可以连接到流量计。流量计可以调节入口气体压力。细胞培养孵箱可以包括湿度控制单元/传感器。湿度控制单元/传感器可以直接连接到或不直接连接到水湿度托盘。

[0205] 在本文中所描述的特定环境条件下孵育靶细胞亚群可以增强靶细胞亚群(例如，CTC和/或CSC)的活力和增殖。各种组织和器官的体内微环境可以具有适于新癌生长的独特的压力、硬度和/或气体组成。不希望受理论的束缚，本发明的培养方法可以通过以下步骤的组合来模拟体内微环境条件是可能的：使靶细胞亚群在如本文所述具有特定硬度的本发明基底上生长，施加如本文所述的外部压力，以及设置如本文所述的气体条件(例如，O_2、CO_2条件)。本文所描述的环境条件可调节促进细胞粘附和随后的细胞分裂的基因和蛋白质的表达。例如，低氧条件(例如，1％O_2)可诱导低氧诱导因子I(HIF-1)的表达，已经表明HIF-1在增殖的CTC中高度表达。

[0206] 不希望受到理论的束缚，本文所述的环境条件可以调节靶细胞亚群(例如，CTC和/或CSC)的内部张力或硬度。仅举例而言，对于CTC张力或硬度，CTC硬度的提高可以提供保护能力，从而抵抗在脉管系统中所见的剪切力。相反地，与降低其总体硬度的组织结合的CTC可能更容易发生转移。本文所描述的环境条件可以降低细胞张力，这可能导致细胞大小增大、粘附细胞强度降低和/或细胞运动性升高。可以促进肿瘤生长的细胞张力和/或基底硬度可取决于CTC的癌症类型。因此，本文所描述的环境条件可以根据待靶向的CTC的类型来调节。

示例性的细胞培养基

[0207] 本发明提供了一种或多种细胞培养基125(如图1所示，在此也称为“富集培养基”)，用以特定地富集靶细胞亚群。例如，该细胞培养基可配置成相对于其他类型的细胞，选择性地促进以下细胞的生长：循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、造血干细胞(HSC)、内皮祖细胞(EPC)、胎儿细胞、干细胞、免疫细胞、上皮细胞、内皮细胞、癌细胞、白细胞、成体干细胞和/或上皮祖细胞。在具体实施方案中，相对于其他类型的细胞，该细胞培养基促进CTC、CSC、EPC、干细胞、上皮细胞或癌细胞的选择性生长。该细胞培养基可使靶细胞亚群/非靶细胞群体之比相对于在本发明培养基中培养之前的原始比例富集至少1.5、2、4、6、8、10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、2,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、50,000,000、100,000,000、200,000,000、500,000,000、1,000,000,000、2,000,000,000或5,000,000,000倍。

[0208] 图8描绘了富集培养基805的示例性实施方案800，该富集培养基805被配制成促进靶细胞亚群的增殖，在该图示中，靶细胞亚群是CTC 815。富集培养基805的组成可以针对作为富集目标的细胞类型而调整。用于富集细胞的富集培养基805可以具有一种或多种配方，并且在细胞富集过程中可以改变富集培养基。富集培养基805可以与基底810接触。在一个非限制性实例中，可以针对癌症类型、癌症阶段、患者的病史以及患者肿瘤的基因组分析和蛋白质组分析来调整富集培养基的配方。可以将异源细胞群体(包含多个细胞亚群，例如非癌细胞825、CTC 815和白细胞820)涂布在基底810上。当细胞在富集培养基805中孵育足以进行增殖的一段时间830时，细胞亚群可以以不同的速率经历增殖。在一个实例中，非癌细

胞825可以不经历增殖;CTC 815可以形成以不同速率经历增殖的亚集落(例如,比较:840、845、850和855);并且白细胞可以经历增殖,但不形成集落820。在一些实施方案中,将富集培养基配制成促进靶细胞亚群的集落形成,而非靶细胞亚群没有明显的集落形成。细胞集落可以是在固体培养基的表面上或内部生长的细胞簇。集落可以来源于单细胞。CTC 815可以基于它们的增殖速率进行分类。CTC 815分类方案的一个例子如下所述:未分裂850,缓慢分裂840,中度分裂855,快速分裂845。基于细胞在培养基中的增殖能力对其进行的分类可以与CTC的转移性质有关。在一些实施方案中,富集培养基、基底和压力条件协同作用,从而改善靶细胞的富集。

[0209] 细胞培养基可以包括可商购的细胞培养基。适用于本发明的示例性的可商购细胞培养基包括但不限于:RPMI培养基、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F12、F10营养混合物(F10Nutrient Mixture)、Media 199、Advanced™培养基、Opti-MEM®、IMDM、SensiCell™培养基、Fluorobrite™DMEM培养基。

[0210] 细胞培养基805可以包含主营养源,其具有特定的添加剂以促进细胞对基底的粘附并确保长期的细胞活力。主营养源可以来自哺乳动物来源或哺乳动物来源的混合物。一些哺乳动物营养源包括但不限于:来源于小牛、马、山羊、小鼠、大鼠和/或人的血清。在一些实施方案中,将一种或多种动物血清混合。胎牛血清和人血清可以按照以下比例混合在一起:人血清/胎牛血清的混合比为约1/1、约1.5/1或者约2/1。可以添加的添加剂包括:离子、元素、钙、谷氨酸、镁、锌、铁、钾、钠、氨基酸、维生素、葡萄糖、生长因子、激素、组织提取物、蛋白质、小分子或其任何组合。在一些情况下,培养基可以补充有已收集自细胞培养物、血浆或其任意组合的培养基或由其制成。在一些情况下,可使用多于一种类型的富集培养基。示例性的氨基酸包括:必需氨基酸,如,例如,苯丙氨酸、缬氨酸、苏氨酸、色氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、赖氨酸和组氨酸;以及其他氨基酸,如,例如,精氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸。可包含在细胞培养基中的示例性生长因子包括:表皮生长因子(EGF)、神经生长因子(NGF)、脑衍生神经营养因子(BDNF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、干细胞因子(SCF)、胰岛素样生长因子(IGF)、转化生长因子-β(TGF-β)。可包含在细胞培养基中的示例性激素包括但不限于:肽激素,如,例如,胰岛素;甾体激素,如,例如,氢化可的松、孕酮、睾酮、雌激素、双氢睾酮。示例性的组织提取物包括:例如,垂体提取物。示例性的小分子添加剂包括:例如,丙酮酸钠、内皮素-1、转铁蛋白、胆固醇,等等。

[0211] 在一些实施方案中,细胞培养基包含:RPMI-1640(例如,Sigma-Aldrich;R1145),大约20%的胎牛血清;大约0.2至1.0g/L的L-谷氨酰胺,大约2-5g/L的高葡萄糖;大约2g/L的碳酸氢钠;以及大约25mM HEPES(例如,Invitrogen;15630106)。

[0212] 细胞培养基可以是涂布培养基。涂布培养基可以包含:F12培养基(例如,Sigma-Aldrich;N6658),大约5g/L或大约1至10g/L的D-(+)-葡萄糖(例如,Sigma-Aldrich;G7021);1X或任选0.1至2X最低必需培养基(MEM);大约10mM或10至25mM L-谷氨酰胺(例如,Sigma-Aldrich;G7513);大约10mM或10至25mM HEPES(例如,Invitrogen;15630106);以及大约20%的哺乳动物血清(例如牛胎儿血清、胎牛血清、马血清、人血清、人血浆,等等)。

[0213] 细胞培养基可以是R型长期生长培养基。R型长期生长培养基可包含:基于RPMI-1640的培养基(例如,Sigma-Aldrich;R4130);大约5g/L或大约1至10g/L的D-(+)-葡萄糖

(例如,Sigma-Aldrich;G7021);大约1X MEM非必需氨基酸(例如,Sigma-Aldrich;M7145);大约1X RPMI维生素(例如,Sigma-Aldrich;R7256);大约10mM或大约1至20mM L-谷氨酰胺(例如,Sigma-Aldrich;G7513);大约20%或5%至50%的哺乳动物血清(例如,牛胎儿血清、胎牛血清、马血清、人血清、人血浆,等等)。最佳地,可将R型长期生长培养基的pH调节至大约7.2,但pH的范围可以从大约6至8。任选的R型长期生长培养基补充剂可以包括:5μg/mL或大约1至10μg/mL的胰岛素(例如,重组人胰岛素(rh胰岛素));50μg/mL或大约10至100μg/mL的抗坏血酸;5ng/mL或大约1至20ng/mL的表皮生长因子(EGF)(例如,重组人(rhEGF));0.75单位/mL的硫酸肝素;1μg/mL或大约0.5至2μg/mL的氢化可的松半琥珀酸酯;15ng/mL或大约5至30ng/mL的胰岛素样生长因子1(IGF-1)(例如,rhIGF-1);1单位/mL或大约1至10单位/mL的青霉素;1μg/mL或大约1至10μg/mL的链霉素;大约0.1至25ng/mL的两性霉素B;或它们的任何组合。

[0214] 细胞培养基可以是DF型长期生长培养基。DF型长期生长培养基可包含:DMEM/F12培养基(例如,Sigma-Aldrich;51445C);5g/L或大约1至10g/L的D-(+)-葡萄糖(Sigma-Aldrich;G7021);大约1X MEM非必需氨基酸(Sigma-Aldrich;M7145);10mM或大约1至20mM L-谷氨酰胺(例如,Sigma-Aldrich;G7513);以及20%或大约5%至50%的哺乳动物血清(例如,牛胎儿血清、胎牛血清、马血清、人血清、人血浆,等等)。最佳地,可以将DF型长期生长培养基的pH调节至大约7.2,但pH的范围可以从大约6至8。任选的DF型长期生长培养基补充剂可包括:大约10mM或10至25mM HEPES(例如,Invitrogen;15630106);5μg/mL或大约1至10μg/mL的胰岛素(例如,重组人胰岛素(rh胰岛素));50μg/mL或大约10至100μg/mL的抗坏血酸;5ng/mL或大约1至20ng/mL的表皮生长因子(EGF)(例如,重组人(rhEGF));0.75单位/mL的硫酸肝素;1μg/mL或大约0.5至2μg/mL的氢化可的松半琥珀酸酯;15ng/mL或大约5至30ng/mL的胰岛素样生长因子1(IGF-1)(例如,rhIGF-1);1单位/mL或大约1至10单位/mL的青霉素;1μg/mL或大约1至10μg/mL的链霉素;大约0.1至25ng/mL的两性霉素B;或它们的任何组合。

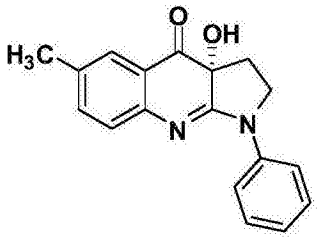
[0215] 细胞培养基可以是D型长期生长培养基。D型长期生长培养基可以包含:DMEM培养基,高葡萄糖(Sigma-Aldrich;D6429);5g/L或大约1至10g/L的D-(+)-葡萄糖(Sigma-Aldrich;G7021);大约1X MEM非必需氨基酸(Sigma-Aldrich;M7145);10mM或大约1至20mM L-谷氨酰胺(例如,Sigma-Aldrich;G7513);以及20%或约5-50%的哺乳动物血清(例如,牛胎儿血清、胎牛血清、马血清、人血清、人血浆,等等)。最佳地,可将D型长期生长培养基的pH调节至大约7.2,但pH的范围可以从大约6至8。任选的D型长期生长培养基补充剂可以包括:10mM或10至25mM HEPES(例如,Invitrogen;15630106);5μg/mL或大约1至10μg/mL的胰岛素(例如,重组人胰岛素(rh胰岛素));50μg/mL或大约10至100μg/mL的抗坏血酸;5ng/mL或大约1至20ng/mL的表皮生长因子(EGF)(例如,重组人(rhEGF));0.75单位/mL的硫酸肝素;1μg/mL或大约0.5至2μg/mL的氢化可的松半琥珀酸酯;15ng/mL或大约5至30ng/mL的胰岛素样生长因子1(IGF-1)(例如,rhIGF-1);1单位/mL或大约1至10单位/mL的青霉素;1μg/mL或大约1至10μg/mL的链霉素;大约0.1至25ng/mL的两性霉素B;或它们的任何组合。

[0216] 可以通过使细胞培养基暴露于调节性细胞系(conditioning cell line)来预调节该培养基。示例性的调节性细胞系可包括本文所述的任何饲养细胞。例如,细胞培养基可以是小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)-条件培养基。MEF-条件培养基可以包含:DMEM培养基,高葡

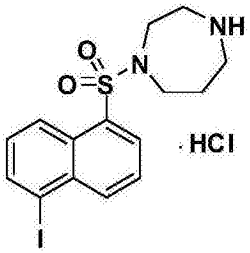
葡糖(Sigma-Aldrich;D6429);5g/L或大约1至10g/L的D-(+)-葡萄糖(Sigma-Aldrich;G7021);大约1X MEM非必需氨基酸(Sigma-Aldrich;M7145);10mM或大约1至20mM L-谷氨酰胺(例如,Sigma-Aldrich;G7513);10mM或10至25mM HEPES(例如,Invitrogen;15630106);大约10%的哺乳动物血清(例如,牛胎儿血清、胎牛血清、马血清、人血清、人血浆,等等)。MEF培养基在MEF细胞的存在下培养之后可以变成"有条件的"。在一些实施方案中,将MEF细胞培养最少48小时,直到细胞汇合度达至少70%。

[0217] 在本文描述的任何细胞培养基中,调节细胞张力的小分子和药物可作为补充剂加入其中,以加强细胞活力和增殖。例如,rho激酶对于通过其对肌球蛋白II的作用来调节细胞的收缩机制(contractile machinery)是重要的,肌球蛋白II是细胞骨架相关的蛋白质,其结合至丝状肌动蛋白(F-肌动蛋白)(这两种蛋白质共同被称为肌动球蛋白束或丝)。肌动球蛋白束是在骨骼肌中发现的主要收缩机制。rho激酶抑制剂在富集培养基中的存在可降低细胞张力,导致细胞大小增大,粘附细胞强度降低,以及细胞运动性升高——模拟可被描述为较软的基底表面弹性(例如1000到2000Pa)。这类可商购的化合物/药物包括Blebbistatin(Straight等人,2003)、ML-7和9(Saitoh等人,1987)、Y-27623(Ishizaki等人,2000,Pharmacological Properties of Y-27632,a specific inhibitor of rho-associated kinases.Mol Pharmacol.57(5):976-83)、花萼海绵诱癌素A(Calyculin A)(Kato等人,1988)和/或控制由细胞骨架产生的细胞内力的等价物及其上游调节剂(Rho激酶I和II、肌球蛋白轻链激酶、LIM激酶)。所有上述参考文献均通过引用而整体并入本文。

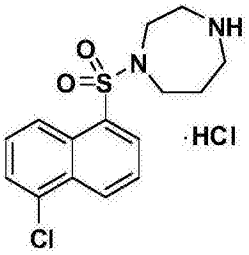
[0218] Blebbistatin的结构如下:



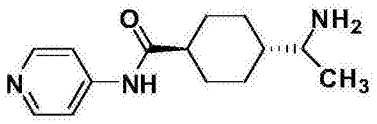
[0219] ML-7的结构如下:



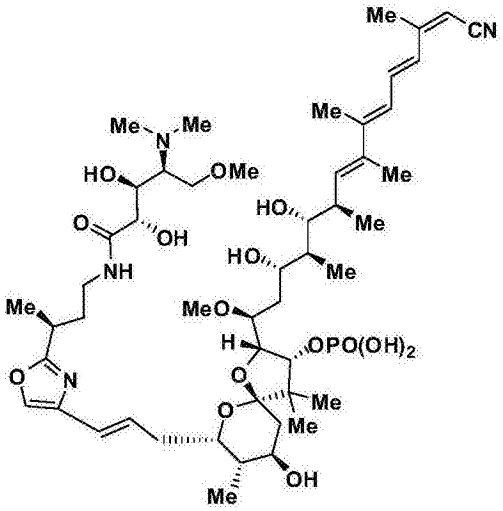
[0220] ML-9的结构如下:



[0221] Y27623的结构如下:



[0222] 花萼海绵诱癌素A的结构如下：



[0223] 这类细胞张力介导补充剂会影响中间丝、微管和肌动球蛋白丝。如本文所描述的小分子/药物可调节通过压力和/或低氧环境条件来调节的基因和蛋白质的表达。在一些实施方案中，可以用向富集培养基中补充本文所述的小分子和/或药物来代替本文所述的外部压力和/或低氧条件，从而使靶细胞亚群能够在常氧条件下和正常气压下培养。

[0224] 任何前述方法可以包括与能够提高细胞中低氧诱导因子的表达的试剂一起培养。低氧诱导因子通常是指由低氧环境条件激活的转录因子。示例性的低氧诱导因子包括但不限于低氧诱导因子-1α(HIF-1α)、低氧诱导因子-1β(HIF-1β)、低氧诱导因子-2α(HIF-2α)、低氧诱导因子2β(HIF-2β)、低氧诱导因子-3α(HIF-3α)和低氧诱导因子-3β(HIF-3β)。在具体实施方案中，所述试剂提高HIF-1□的表达。

所述试剂可以包括编码低氧诱导因子的多核苷酸。例如，所述试剂可以包括本文所述的任何低氧诱导因子的编码序列。该编码序列可以编码HIF-1α多肽。该HIF-1α多肽可包含与SEQ.ID.NO.1具有至少70％或更高同源性的氨基酸序列。

[0225] HIF-1α的编码序列可包括与SEQ.ID.NO.2具有至少70％的同源性或互补性的多核苷酸序列。

[0226] 所述试剂可以是包含编码低氧诱导因子的多核苷酸的载体。该载体可以包括可通过插入或引入核酸来操纵的任何质粒、病毒、病毒载体或本领域已知的其他媒介物。例如，“克隆载体”可用于遗传操作的目的。对于另一个例子，“表达载体”可用于转录或翻译插入的多核苷酸。

[0227] 病毒载体可以基于逆转录病毒、腺相关病毒(AAV)、慢病毒，腺病毒、逆转录病毒或轮状病毒基因组、猿猴病毒40(SV40)或牛乳头状瘤病毒(Cone等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6349(1984);Eukaryotic Viral Vectors,Cold Spring Harbor Laboratory,Gluzman编,1982;Sarver等人,Mol.Cell.Biol.1:486(1981))。可用于表达的其他病毒载体包括诺沃克病毒(Norwalk virus)、冠状病毒、副粘液病毒和弹状病毒、披膜病毒(例如，辛德比斯病毒(sindbis virus)和塞姆利基森林病毒(semliki forest

virus))、细小病毒和水泡性口炎病毒(VSV))。

[0228] 载体还可以包括基于巨细胞病毒(CMV)的载体(美国专利No.5561063)。已经开发了能够有效地将基因递送到肠道的细胞的载体(参见,例如,美国专利No.5821235、5786340和6110456)。

[0229] 载体通常包含用于在细胞中繁殖的复制起点。可以包括载体内存在的控制元件(包括如本文所述的表达控制元件),以促进转录和翻译。

[0230] 合适的转录或翻译控制序列包括但不限于用于转录和翻译的复制起点、启动子、增强子、阻抑物结合区、转录起始位点、核糖体结合位点、翻译起始位点和终止位点。

[0231] 如本文所用,"启动子"是能够结合RNA聚合酶并启动位于启动子下游(3'方向)的编码区的转录的DNA区域。启动子可以是组成型或诱导型的。在一般情况下,启动子序列在其3'末端被转录起始位点结合并且向上游(5'方向)延伸,从而包括以高于背景的可检测水平来启动转录所必需的最小数目的碱基或元件。在启动子序列中有转录起始位点,以及负责RNA聚合酶结合的蛋白质结合域。真核启动子可以含有"TATA"盒和"CAT"盒。

[0232] 启动子的选择将在很大程度上取决于载体所引入的宿主细胞。对于动物细胞,多种稳健启动子(robust promoter),无论是病毒还是非病毒启动子,在本领域中都是已知的。非限制性的代表性病毒启动子包括CMV、SV40病毒的早期和晚期启动子、各种类型的腺病毒(例如腺病毒2)和腺相关病毒的启动子。另外,使用通常与期望的轻链或重链基因相关的启动子也是可能的,并且通常希望的,条件是这类控制序列与宿主细胞系统相容。

[0233] 适合于其他真核细胞的启动子序列包括针对以下酶的启动子:3-磷酸甘油酸激酶,或其他糖酵解酶,如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。具有受生长条件控制的转录的额外优点的其他启动子是针对以下酶的启动子区域:醇脱氢酶2、异细胞色素C(isocytochrome C)、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶及上述的甘油醛-3-磷酸脱氢酶,以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。

[0234] 载体可通过本领域中已知的任何手段引入到培养的细胞中,该手段包括转染、病毒转导等。转染方法可以包括在细胞膜中打开瞬态孔或"洞",以允许物质的摄取。转染可以使用例如磷酸钙通过以下方式进行:通过电穿孔、通过光学转染、通过插染(impalefaction)、通过水动力学递送、通过基因枪、通过磁体辅助的转染、通过将阳离子脂质与材料混合以产生可与细胞膜融合并将其携带物(cargo)沉积入其中的脂质体、通过使用阳离子聚合物(如,例如,DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺)。

靶细胞的鉴定

[0235] 本文所述的基底、细胞培养基、环境条件和/或细胞培养方法可允许靶细胞亚群呈现一种或多种不同的形态特征和/或动力学特征。任何这些不同的形态特征和/或动力学特征中均可用于区分和/或鉴定靶细胞亚群的成员。示例性的形态特征和/或动力学特征在本文中描述。因此,本发明提供这样一种方法:在将靶细胞涂布到本发明基底时、在本文所述的细胞培养基中培养靶细胞时和/或在本文所述的环境条件下培养靶细胞时,基于靶细胞所呈现的一种或多种不同的形态特征和/或动力学特征的展现,来鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员。

[0236] 这类鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员的方法可以消除对使用阳性选择抗体进行

靶细胞鉴定的需要。因此，在一些实施方案中，鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员的方法不包括使用阳性选择抗体。然而，在某些情况下，鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员的方法可以包括使用阳性选择抗体。例如，鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员的方法可以包括如果所述成员显示出一种或多种不同的形态特征和/或动力学特征，和/或如果所述成员被阳性选择抗体可检测地标记，则鉴定所述成员。

[0237] 本文所述的鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员的方法可以消除对使用阴性选择抗体进行靶细胞鉴定的需要。因此，在一些实施方案中，鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员的方法不包括使用阴性选择抗体。但是，在某些情况下，鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员的方法可以包括使用阴性选择抗体。例如，鉴定和/或选择靶细胞亚群的成员的方法可以包括如果所述成员显示出一种或多种不同的形态特征和/或动力学特征，和/或如果所述成员被阴性选择抗体可检测地标记，则鉴定所述成员。

计算机可读介质

[0238] 本发明还提供包含计算机可执行代码的计算机可读介质，其被配置成实现本文所述的任何方法。该计算机可读介质可以实现对靶细胞亚群进行半自动化或自动化鉴定、计数和/或分类的方法。对靶细胞亚群的鉴定、计数和/或分类可以基于细胞在本文所述的条件下培养时所呈现的一种或多种形态和/或动力学性质。对靶细胞亚群的鉴定、计数和/或分类可以基于细胞在涂布到本文所述的本发明基底上时所呈现的一种或多种形态和/或动力学性质。细胞的一种或多种形态和/或动力学性质可随时间的推移进行评估。例如，细胞的一种或多种形态和/或动力学性质可以随着时间的推移在如图9所示的坐标系900中来评估。该软件被配置成创建虚拟坐标系920来参考在培养皿或孔910中在基底上被检测到的靶细胞亚群的位置。该虚拟坐标系通过将培养皿与用户定义的原点(原点)930对准来延伸(propagate)，并且覆盖900由可放大的矢量象限组成的虚拟网格920。在一个最优选的实施方案中，由图像采集系统来使用虚拟坐标系，以便于在培养皿的整个表面上进行自动化的定时捕获。已经使用的标准尺寸的培养皿和/或孔的一些实例包括：10mm、35mm、60mm和100mm和高多孔板的孔(例如6孔、12孔、24孔、96孔、384孔、1056孔、1536孔或3456孔)，但也可以考虑其他尺寸的培养皿。在一个实施方案中，操作者可以重新察看特别感兴趣的特定集落的位置，并且可以通过使用显微操作器和横向喷射器(transjector)收集细胞。可以捕获单个细胞以用于靶向生物医学研究或可以将其收获并用于进一步的培养实验。

[0239] 计算机可读介质可以使用坐标系900来自动捕获、重新组合、重新调整和/或优化图像。例如，计算机可读介质可以拼接(stitch)任何数目的包含相邻区域的图像。此自动拼接过程可以创建给定时间点的单张拼接图像。在一些情况下，拼接图像可包括大约25个至大约200个图像。拼接图像可以经历初始化过程，由此将图像压缩，以减小文件的大小。基于对比的过滤器(contrast-based filter)可以应用于拼接图像。

[0240] 计算机可读介质能够确定细胞总数、活细胞数和非活细胞数、活跃分裂的细胞数和细胞集落数、活细胞/非活细胞之比、分裂细胞/非分裂细胞之比。这样的分析可以用于确定患者的CTC的侵袭性或恶性潜能。例如，快速分裂的细胞可以被认为是CTC的“侵袭性”类别，例如，转移性类别。

参数的鉴定和分类

[0241] 计算机可读介质可以包含使用如本文所述的细胞的任何形态特征和/或动力学性

质来鉴定和表征靶细胞亚群的软件。例如，计算机可读介质可以使用以下参数来鉴定和分类靶细胞亚群：细胞大小、细胞形状、细胞运动、细胞核大小和细胞分裂速率。该软件可将这些参数整合到用于对靶细胞亚群进行分类的算法中。该软件可以利用例如多核计算机芯片顺序地或切向地循环处理参数。任选地，用户可以为每个所述参数分配不同的权重(weight)。

细胞检测的增强

[0242] 在一些实施方案中，靶细胞亚群的可视化可以通过使用细胞渗透性染料和/或针对细胞粘附蛋白质的抗体来增强。细胞渗透性荧光染料可以用于辅助分析软件来确定整体细胞和细胞核的形状、尺寸和数目。本领域技术人员已知多种细胞渗透性染料。一些非限制性的例子包括：基于钙的染料(例如，钙-绿-1 AM(Calcium-Green-1 AM)；Life Technologies)或荧光偶联的葡聚糖。

[0243] 分析软件也可以通过线粒体的可视化来辅助。线粒体特异性抗体或渗透性染料(例如，MitoTracker™；Life Technologies)可用于增强靶细胞亚群的检测。另外，对于给定细胞亚群或集落而言线粒体的完全不存在或过多可以用作子分类的附加参数，但是，本领域技术人员将认识到可能存在其他的可用于辅助检测的细胞渗透性荧光染料。

[0244] 针对细胞表面分子如细胞粘附分子的抗体也可用于增强靶细胞亚群的检测。分析软件可以通过使用已知的标记靶细胞亚群的生物标记物来辅助。偶联至检测部分的靶向抗体可以用来增强检测以及基于特定生物标记物的存在来对细胞再分类。CTC的已知生物标记物包括EpCAM、EGFR和CD133，但是，本领域技术人员将认识到已经鉴定了其他生物标记物。分析软件可以通过使用已知的表达于非靶细胞亚群中、但通常不表达于或以较低水平表达于靶细胞亚群中的生物标记物来辅助。对非靶细胞具有选择性的已知生物标记物包括CD45、CD14、CD34和成纤维细胞表面蛋白质，等等。

[0245] 图10是增强的细胞检测的一个实例(采自彩色图像的图)。图A示出了使用本发明的方法培养的标记的癌细胞；细胞的线粒体用MitoTracker标记。图B示出了用抗细胞粘附蛋白质(桩蛋白)的荧光偶联抗体标记的癌细胞。

计算机系统

[0246] 本发明还提供了一种计算机系统，其被配置成实现本公开的方法。该系统可以包括计算机服务器(“服务器”)，其被编程以实现本文所述的方法。图11描绘了适合于使用户能够检测、分析和处理细胞图像的系统1100。系统1100包括中央计算机服务器1101，其被编程以实现本文所述的示例性方法。服务器1101包括中央处理单元(CPU，也称为“处理器”)1105，其可以是单核处理器、多核处理器或用于并行处理的多个处理器。服务器1101还包括存储器1110(例如随机存取存储器、只读存储器、闪速存储器)；电子存储单元1115(例如，硬盘)；通信接口1120(例如，网络适配器)，其用于与一个或多个其他系统进行通信；以及外围设备1125，其可包括高速缓冲存储器、其他存储器、数据存储和/或电子显示适配器。存储器1110、存储单元1115、接口1120和外围设备1125都通过通信总线(实线)如主板与处理器1105通信。存储单元1115可以是用于存储数据的数据存储单元。服务器1101在通信接口1120的辅助下可操作地连接到计算机网络(“网络”)1130。网络1130可以是因特网、内联网和/或外联网、与因特网通信的内联网和/或外联网、电信或数据网络。在某些情况下，网络1130在服务器1101的帮助下可以实现对等网络，这可以使耦合到服务器1101的设备能够作

为客户端或服务器发挥作用。显微镜和显微操作器可以是外围设备1125或远程计算机系统1140。

[0247] 存储单元1115可以存储文件，如单独的图像，定时图像，关于单个细胞、细胞集落的数据，或与本发明相关的数据的任何方面。数据存储单元1115可以与关于细胞在虚拟网格中的位置的数据相耦合。

[0248] 服务器可通过网络1130与一个或多个远程计算机系统进行通信。该一个或多个远程计算机系统可以是，例如，个人计算机、膝上型计算机、平板计算机、电话、智能电话或个人数字助理。

[0249] 在一些情况下，系统1100包括一台服务器1101。在其他情况下，该系统包括多个服务器，它们通过内联网、外联网和/或因特网与彼此通信。

[0250] 服务器1101可以适合于存储细胞概况信息，诸如，例如，细胞大小、形态、形状、迁移能力、增殖能力、动力学性质和/或潜在的相关性的其他信息。这样的信息可以存储在存储单元1115或服务器1101上并且这样的数据可以通过网络传输。

[0251] 本文所述的方法可以通过存储在服务器1101的电子存储位置(例如，存储器1110或电子存储单元1115)上的机器(例如，计算机处理器)计算机可读介质(或软件)来实现。在使用期间，代码可以由处理器1105执行。在某些情况下，代码可以从存储单元1115中检索到并存储到存储器1110上，以易于被处理器1105访问。在一些情况下，可以排除电子存储单元1115，而机器可执行指令被存储在存储器1110上。或者，代码可以在第二计算机系统1140上执行。

[0252] 本文提供的系统和方法的各方面，如服务器1101，可以在编程中得以体现。该技术的各个方面可以被认为是“产品”或“制造品”，其形式通常是携带在或体现于一种类型的机器可读介质(例如，计算机可读介质)中的机器(或处理器)可执行代码和/或相关数据。机器可执行代码可以存储在电子存储单元如存储器(例如，只读存储器、随机存取存储器、闪速存储器)或硬盘上。“储存”型介质可以包括计算机、处理器等或其相关模块的任何或所有有形存储器，例如，各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等，其可以在任何时间为软件编程提供非临时性存储。软件的全部或部分有时可以通过因特网或其他各种电信网络进行通信。这样的通信，例如，能够将软件从一台计算机或处理器加载到另一台计算机或处理器，例如，从管理服务器或主计算机加载到应用程序服务器的计算机平台。因此，可以承载软件元素的另一种类型的介质包括例如通过在本地设备之间的物理接口、通过有线和光学陆上线路网络以及经由各种空中链路使用的光波、电波和电磁波。携带这类波的物理元件如有线或无线链路、光链路等也可以被视为是承载软件的介质。如本文所用，除非限制于非临时性的有形“存储”介质，否则诸如计算机或机器“可读介质”等术语是指参与向处理器提供指令以供执行的任何介质。

[0253] 因此，机器可读介质如计算机可执行代码可以采取多种形式，包括但不限于：有形存储介质、载波介质或物理传输介质。非易失性存储介质可以包括，例如光盘或磁盘，例如任何计算机等中的任何存储装置，其可用于实现所述系统。有形传输介质可包括：同轴电缆、铜线和光纤(包括含有处于计算机系统内的总线的导线)。载波传输介质可采取电或电磁信号或者声波或光波(例如在射频(RF)和红外(IR)数据通信期间产生的那些)的形式。因此，计算机可读介质的常见形式包括，例如：软盘、柔性盘、硬盘、磁带、任何其他磁性介质、

CD-ROM、DVD、DVD-ROM、任何其他光学介质、穿孔卡片、纸带、具有孔图案的任何其他物理存储介质、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其他存储器芯片或盒、载波传输数据或指令、电缆或传输这类载波的链路，或计算机可从中读取编程代码和/或数据的任何其他介质。这些形式的计算机可读介质中的许多种可以涉及将一个或多个指令的一个或多个序列携带至处理器以供执行。

[0254] 在用户界面如图形用户界面的辅助下，可以将细胞监控的结果呈现给用户。

细胞成像系统

[0255] 本发明还提供了一种细胞成像系统。该细胞成像系统可以被配置成产生对应于细胞群体的细胞的图像数据。该细胞成像系统可以被配置成产生对应于原代细胞的图像数据。该细胞成像系统可以被配置用于靶细胞亚群的高内涵分析。

[0256] 该细胞成像系统可以包括显微镜。该显微镜可包括系统硬件。系统硬件可以包括用于显微镜控制的硬件。示例性的显微镜硬件控制在开源(open-source)的、基于Java的图像采集软件μManager上开发(Arthur Edelstein等人(2010)，其通过引用并入本文，Computer Control of Microscopes UsingμManager.Current Protocols in Molecular Biology 14.20.1-14.20.17，其通过引用并入本文)。定制的驱动程序和脚本可用于控制以下任何显微镜检查必需的外围设备：图像采集照相机、照相机快门、机动化线性编码的X-Y载物台(motorized linear-encoded X-Y stage)、压电驱动的Z轴步进器(piezo-driven Z-axis stepper)以及基于近红外的自动对焦(near-infrared based autofocus)。

[0257] 显微镜可以是倒置显微镜。倒置显微镜可以包括定制的环境室。定制的环境室可被配置成提供适于维持培养细胞的活力的环境条件(例如，温度、CO_2、氧气、压力)。该环境条件可以是本文所述的适于靶细胞亚群生长的任何条件。定制的环境室可以例如以0.1％的精度调节温度、CO_2和氧气水平。显微镜可包括5倍、10倍、20倍、40倍的具有荧光能力的无油物镜，但也可以考虑其他物镜。倒置显微镜可包括机动化的载物台和基于硬件的自动聚焦，具有亮视野光源、具有相移偏振滤光器(phase-shifted polarization filter)来提高对比度以用于细胞检测。光源可以是卤素、氙、汞、固态激光器或发光二极管。

[0258] 细胞成像系统还可以包括计算机系统。该计算机系统可如本文所述。在一些实施方案中，该计算机系统包括本文所述的计算机可读介质。

[0259] 在本文所述的任何方法中，可以使用例如显微操作来收集或标记靶细胞亚群的成员。显微操作可以通过使用本领域中已知的任何技术来完成，包括机动化的显微操作器和横向喷射器或激光显微切割。用户可以再次察看特别感兴趣的特定集落或细胞的位置。例如，这可以允许用户以单细胞水平单独地抓取细胞以供定向生物医学研究、收获细胞以供进一步的培养实验或进行化学敏感性试验。因此，细胞成像系统还可以包括显微操作器。

[0260] 示例性的机动化显微操作器和横向喷射器示于图12中。图A描绘了单细胞选择；马达驱动的显微操作器的注射/选择针(箭头)，从源自癌细胞系(MDA-MB231)的细胞集落中分离单个癌细胞。图B描绘了单细胞与荧光偶联的葡聚糖的注射；白色箭头指向未注射的癌细胞(采自彩色图像的图像)。

[0261] 图13示出了被配置用于自动化细胞培养和/或高内涵分析的示例性细胞成像系统1300。系统1300包括光源1305，其可以是亮视野并且可以为基于相位的光学显微镜检查提供照明。光源1305可以基于灯丝或发光二极管(LED)。系统1300还可以包括具有转台的相衬

环1310。在一些情况下，转台可以是机动化的，并且兼容的相衬环可与适当的目镜1345匹配。

[0262] 系统1300可任选地包括聚光器1315。在一些情况下，聚光器1315可以用于使光源聚焦，在某些情况下，这可以提高细胞的对比度。该系统还可以任选地包括细胞选择器(例如，细胞拣选器)1320。在某些情况下，细胞选择器可以选择单细胞(例如，基于显微操作器的细胞选择针或激光辅助的显微切割工具)。

[0263] 系统1300可任选地具有液体分配器1325。液体分配器1325可用作处理介质的输送和运输的机构。液体分配器可以是基于注射器的。液体分配器1325可以具有一个或多个分配端口(例如1、2、6、12、24、96个等)，从而将液体分配到多孔板(例如1孔板、2孔板、6孔板、12孔板、24孔板、96孔板等)中。在一些情况下，该液体分配器可以是具有自动化液体分配能力的模块化附加组件(例如Eppendorf的epMotion，GE的CELL Analyzer 6000)。

[0264] 系统1300可任选地具有板装载器1330。板装载器1330可包括机动化的板容器，该板容器可以具有容纳最少1、2、3、4、5、6、10、15、20、25或30个板的能力。板装载器可以具有模块化设计，以允许额外的板容量。在某些情况下，板装载器可以自动地处理板，例如，将板放置到显微镜的XY载物台上以供成像(例如，ASI的机器人板装载器)。

[0265] 系统1300可具有X-Y载物台1335。X-Y载物台1335可以包括用于精确移动的线性编码器。X-Y载物台1335可以包括能够容纳一个板的载物台(例如，ASI MS-2000Flat Top XYZ自动载物台)。X-Y载物台1335可以包括具有同时容纳一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个板的能力的大型载物台。

[0266] 系统1300可具有Z-步进器1340。Z-步进器可以是机动化的，压电驱动的、Z轴控制的，其可以例如用于多平面成像。

[0267] 系统1300可以具有一个或多个物镜。该物镜可以是大约1倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、60倍和/或100倍。在一些情况下，物镜1345将附接到机动化物镜转台上。物镜1345可以是相位物镜(phase objective)。物镜1345可以是既适于亮视野又适于荧光成像的显微镜物镜(例如Zeiss Plan-Neofluar物镜)。在一些实施方案中，物镜1345必须与基于硬件的自动对焦系统(例如尼康(Nikon)的Perfect Focus System)兼容。

[0268] 系统1300可任选地包含自动对焦系统1350。自动对焦系统1350可以使用基于硬件的图像自动对焦(例如尼康的Perfect Focus System)。

[0269] 系统1300可任选地包含滤光器1355。滤光器1355可以是照明滤光器。滤光器1355可以是二向色的。二向色镜可以与合适的激发和发射滤光器结合使用，与荧光成像兼容的波长可以是，例如，大约360nm、488nm和568nm。

[0270] 系统1300可以具有照相机1360。照相机1360可以是电荷耦合器件(CCD)或互补金属氧化物半导体(CMOS)。照相机1360可以与荧光、亮视野或两者兼容。照相机1360可以是液体冷却的。照相机1360可以具有宽视野。照相机1360可以具有广角成像传感器。照相机1360还可包括基于背侧照明的图像传感器。照相机1360可以具有传输信息的能力。传输信息的能力可以是已知的快速传输方法(例如火线或USB3.0端口)。

[0271] 系统1300可以包含环境室1365。环境室1365可包含密封的且光控(例如黑暗)的环境。环境室1365可任选地使用气闸(air-lock)系统。在一些情况下，当在实验进行的同时需要接近一个或多个板时，可以使用气闸系统。环境室1300还可以包括支持加压环境的能力。

在一些情况下，加压环境可以比标准大气压(例如，14.7PSIA的标准大气压)高出大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15PSI。在一些实施方案中，环境室1365将被构造成支持灭菌或清洁方案。在一些实施方案中，该环境室可包括除湿、加热、真空压力控制和/或其任意组合。

[0272] 系统1300可任选地具有操纵器1370。操纵器1370可用于控制细胞选择器1320。操纵器1370可以由用户来控制(例如操纵杆)，或者可以通过软件来控制。该操纵器可以是用于处理单细胞的机械的和压力中心(pressure-hub)。(例如，Eppendorf的横向喷射器、操纵器、Cell TRAM VARIO™)。

[0273] 系统1300可任选地具有液体处理模块1375。液体处理模块1375可以用作液体贮存器(例如培养基、废弃的培养基)。液体处理模块1375可用于支持一种或多种液体。在一些情况下，液体处理模块1375可以支持1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和/或20个方案。在一些实施方案中，液体处理模块1375可以包括自动灭菌能力。

[0274] 系统1300可具有加湿调节器1380。加湿调节器1380可用于除湿。在一些情况下，除湿可以增强成像，并且可以延长内部电子器件的寿命。

[0275] 系统1300可以具有加热元件1385。加热元件1385可用于对环境室1365中的内容物加温。在一些实施方案中，环境室的内容物可被加热到大约26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44或45摄氏度。在一些实施方案中，加热元件1385将包括可以通过自动化反馈来控制温度的集成的温度系统。

[0276] 系统1300可以具有气体入口1390。气体入口1390可以具有集成的气体控制并支持单独的气体管线(例如双阀支持)。在一些情况下，气体入口1390可以控制大气气体如氮气、二氧化碳和/或氧气的水平。

[0277] 系统1300可以具有加压真空泵1392。加压真空泵1392可以具有压力计和/或集成的压力传感器或歧管。加压真空泵1392可以具有提供比大气压超出大约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10PSI的压力的能力。在一些实施方案中，加压真空泵1392能够向10至18立方英尺的估计近似体积提供压力。

[0278] 系统1300可以任选地具有荧光光源1394。荧光光源1394可以是氙光源。荧光光源1394可以来自汞基灯。荧光光源1394可以来自固态或基于激光二极管的照明光源。

[0279] 系统1300可以具有数据存储系统1396。数据存储系统1395可以包括任意数目的存储型介质，可包括计算机、处理器等或其相关模块的任何或全部有形存储器，如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等，其可以在任何时间为软件编程提供非临时性存储。数据存储系统也可以包括任何数目的数据通信类型，例如通过因特网或各种其他电信网络。数据可以通过例如在本地设备之间的物理接口、通过有线和光学陆上线路网络以及经由各种空中链路使用的光波、电波和/或电磁波来传输。携带这类波的物理元件如有线或无线链路、光链路等也可以是数据存储系统的一部分。如本文所用，除非限制于非临时性的有形数据存储介质，否则诸如计算机或机器“可读介质”等术语是指参与向处理器提供指令以供执行的任何介质。因此，数据存储可以采取多种形式，包括但不限于：有形存储介质、载波介质或者物理传输介质。非易失性存储介质可以包括，例如，光盘或磁盘，诸如任何计算机等中的任何储存装置，其可用于实现所述系统。有形传输介质可包括：同轴电缆、铜线和光纤(包括包含处于计算机系统内的总线的导线)。载波传输介质可采取电或电磁信号或者声波或

光波(例如在射频(RF)和红外(IR)数据通信期间产生的那些)的形式。因此,计算机可读介质的常见形式包括,例如:软盘、柔性盘、硬盘、磁带、任何其他磁性介质、CD-ROM、DVD、DVD-ROM、任何其他光学介质、穿孔卡片、纸带、具有孔图案的任何其他物理存储介质、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其他存储器芯片或盒、载波传输数据或指令、电缆或传输这类载波的链路,或计算机可从中读取编程代码和/或数据的任何其他介质。这些形式的计算机可读介质中的许多种可以涉及携带用于存储的数据。在一些实施方案中,数据存储系统可以是多核处理器。

[0280] 系统1300可以具有仪器出入门1398。仪器出入门1398可以提供进入到板装载器1330和/或环境室1365的端口。仪器出入门1398可以集成气闸系统。

[0281] 系统1300可以为本文所述的本发明的高通量应用提供平台。例如,系统1300可以包括显微镜。该显微镜可以是倒置显微镜。该显微镜可被配置成用于活细胞成像和/或高内涵分析。配置成用于高内涵、活细胞成像的显微镜可商购自多个供应商,例如,BioTek Instruments(Cytation™)、Carl Zeiss Microscopy(Lightsheet Z.1Live Cell Imaging Microscope、Cell Observer Research Microscope、PrimoVert Monitor Inverted Microscope)、Molecular Devices LLC(ImageXpress®Micro XLS Widefield High Content Screening System,CloneSelect™Imager)、EMD Millipore(CellASIC™)、Nikon Instruments(Biostation CT)等等。示例性的高通量显微镜和成像系统在美国专利申请公开No.20040152188中有描述,其通过引用并入本文。

试剂盒

[0282] 本发明还提供可用于实施本发明的一种或多种方法的试剂盒和/或细胞培养系统。试剂盒和/或细胞培养系统可包括以下各项的任意组合:(i)细胞培养板,其包含如本文所述的基底,(ii)如本文所述的细胞培养基或其组分,(iii)如本文所述的细胞培养孵箱,(iv)如本文所述的细胞成像系统,和/或(v)如本文所述的基底或其组分。试剂盒还可以包括关于使用细胞培养板、细胞培养基、孵箱和成像系统中的一种或多种来培养和/或鉴定靶细胞亚群的说明书。该说明书可以包括在适于靶细胞亚群生长的环境条件下进行培养的指示。环境条件在本文中描述。例如,该说明书可以包括关于在正压条件下培养靶细胞的指示。示例性的压力条件在本文中描述。例如,该说明书可以包括关于在低氧条件下培养靶细胞的指示。示例性的低氧条件在本文中描述。

[0283] 细胞培养系统1400的示例性实施方案示于图14。细胞培养系统1400可以包括如本文所述的细胞孵箱1410,孵箱1410被配置成提供适于靶细胞亚群生长的一种或多种环境条件。细胞孵箱可任选地包括如本文所述的显微镜(未示出)。该显微镜可配置成用于对靶细胞亚群的一个或多个成员进行成像。显微镜可以位于显微镜的封闭环境室内。显微镜可以可操作地连接到计算机系统1420。计算机系统可以包括,例如,用于视觉显示的监视器和键盘。细胞培养系统1400可以包括含有用于靶细胞鉴定的软件的计算机可读介质1430。计算机可读介质1430可以集成到计算机系统1420中。该系统可以包括如本文所述的基底1440。该基底可以被配置成促进靶细胞亚群的选择性粘附和/或生长。该系统可以包括如本文所述的细胞培养基1450。

本发明的示例性应用

[0284] 本发明具有多种实际应用。富集稀少的靶细胞亚群的能力作为用于基础研究、医

学治疗、医学研究、药物和生物制品的开发和发现、高通量筛选、抗体开发以及疫苗开发的工具而具有价值。CTC、CSC、HSC和EPC是在血液中循环但难以以足够用于实际实验室或医疗用途的量进行分离和富集的细胞的例子。任何本发明的方法、试剂盒和/或系统的使用能够实现：当靶细胞在样品中以10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个靶细胞/ml样品的浓度或者小于平均1个靶细胞/ml样品的浓度存在时，能够从体液样品或其衍生物中分离和富集靶细胞亚群。例如，当靶细胞在样品中以约0.8个靶细胞/ml样品（例如，16个靶细胞/20ml血液）或0.6个靶细胞/ml血液（12个靶细胞/20ml血液）的浓度存在时，任何本发明的方法、试剂盒和/或系统能够从体液样品或其衍生物中分离和富集靶细胞亚群。在本发明的另一应用中，具有不同功能性状的培养的靶细胞亚群可以提供用于高度定向的生物标记物发现的平台。可以对这些培养的细胞进行基因组、蛋白质组和代谢分析，并且产生这些稀有细胞的可商购来源的能力对于鉴定用于以下目的的新型生物标记物而言是重要的：癌症疗法的开发（例如药物开发）、癌症疫苗、癌症筛查和诊断、个性化抗体开发、造血干细胞移植、器官移植和心血管疾病治疗。

个性化用药

[0285] 靶细胞亚群可用于个性化用药。在CTC和CSC的情况下，细胞可用于化学敏感性试验，由此可对培养的CTC测试标准的和探索性的化疗方案，并确定化疗药物对CTC的效果，包括细胞活力和细胞分裂速率测量，以确定给定药物的功效。本发明的另一种应用是：在患者接受治疗期间，通过连续监测患者的CTC群体，来监测患者对给定的癌症疗法的响应。血液样品可以定期、在治疗之前、期间和之后进行分析，由此对疗法的正面响应将导致降低的CTC活力和较低的分裂速率。

[0286] 本发明的另一种应用是监测目前处于缓解期的患者以研究癌症复发的可能性。可以定期对他们的血液进行针对CTC的连续检测，从而确定癌症复发的潜在性或可能性。在某些情况下，连续检测可导致早期检测到复发。

药物发现/高通量筛选

[0287] 本公开内容的另一种应用是用于高内涵筛选分析（例如，高通量药物发现）和作为直接研究平台用于基础研究。针对药物对特定细胞类型的效力进行有意义的研究需要大量供应细胞。此外，比较不同的药物治疗对不同类型的细胞的有效性也需要大量的细胞。本公开提供了一种用于基础研究的研究平台，其允许科学家将分离细胞类型的过程进行自动化或部分自动化；由此使高通量实验成为可能。这样的研究平台可用作药物发现平台。因此，本发明提供了一种开发抗癌疗法的方法，其包括：(a)使用本文所述的方法培养靶细胞亚群；(b)使所述靶细胞亚群与测试剂接触；(c)测定所述靶细胞亚群的活力和/或生长；以及(d)基于所述测定，选择所述测试剂作为抗癌疗法。在一些实施方案中，靶细胞亚群包含CTC和/或CSC。在一些实施方案中，将多种测试剂应用于靶细胞亚群（例如，测试联合疗法）。在一些实施方案中，靶细胞亚群在多孔板上培养。在一些实施方案中，多孔板包括6、12、24、48、96、384、1536或3456个孔。在一些实施方案中，该方法包括使所述靶细胞亚群与多种测试剂接触，每种测试剂被施加到多孔板的单个孔中。在一些实施方案中，该方法包括同时测定多孔板的孔。在一些实施方案中，如果测试剂降低了靶细胞亚群的活力、增殖或生长，则选择该测试剂作为抗癌疗法。

治疗受试者

[0288] 本文所述的发明可以提供可供医疗专业人员使用来治疗受试者的数据。在一个优选的实施方案中，细胞的分类可以指导对受试者的治疗。对受试者的治疗可以包括诊断、预后或治疗诊断。诊断可包括确定受试者的状况。诊断可以在一个时间点进行或持续进行。例如，受试者可以被诊断出癌症。在另一例子中，可以例行筛查处于缓解期的癌症受试者，以确定是否已发生癌症复发。预后可以包括确定受试者的疾病的后果、恢复的机会或疾病将会如何进展。例如，鉴定特定类型的CTC可以提供信息，可基于该信息进行预后。治疗诊断可包括确定疗法治疗。例如，受试者的癌症疗法治疗可以包括化疗、放疗、药物治疗、不治疗或其任意组合。受试者可以通过例如连续血液检验来监测，以在受试者进行治疗之前、期间和之后测量CTC群体。对疗法的正面响应将会导致降低的CTC活力以及较低的分裂速率。

[0289] 在从癌症受试者中分离和分类的CTC的情况下，CTC的存在或不存在可以帮助或形成癌症的诊断。存在于受试者血液中的CTC的类型可以帮助疾病的预后。基于对存在的CTC类型的了解可以帮助治疗诊断。还可以通过使用分离的CTC来测试各种治疗(如最可能成功的化疗剂)的成功概率来帮助治疗诊断。

[0290] 在一些情况下，靶细胞(例如，分离的CTC)可以通过检测一种或多种生物标记物在靶细胞中的存在或不存在来表征。在一些实施方案中，一种或多种生物标记物的存在或不存在可以通过对从分离自需要疾病疗法的受试者的靶细胞中分离的核酸进行测序来确定。测序可以用于生成所测序的靶细胞的遗传谱。靶细胞的遗传谱可以用于为受试者选择个性化疾病疗法。例如，可以使用这样的方法为有需要的受试者选择个性化癌症疗法。在一些实施方案中，使用本领域中已知的任何方法从CTC中并任选地从正常细胞中分离核酸。在一些实施方案中，该核酸是DNA。在一些实施方案中，使用来自肿瘤样品和正常细胞的DNA制备受试者特异性的肿瘤DNA文库和/或正常DNA文库。DNA文库可以用于通过测序平台进行测序。该测序平台可以是新一代测序(NGS)平台。在一些实施方案中，该方法进一步包括使用NGS技术对核酸文库进行测序。

[0291] 测序可以通过本领域公知的经典Sanger测序法来完成。测序也可以通过使用高通量系统来完成，高通量系统中的一些允许在所测序的核苷酸掺入生长链时或之后立即检测该核苷酸，例如，实时地或基本上实时地检测序列。在一些情况下，高通量测序每小时产生至少1000个、至少5000个、至少10,000个、至少20,000个、至少30000个、至少40000个、至少50,000个、至少100,000个或者至少500000个序列阅读值；每个阅读值为至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少120个或至少150个碱基/阅读值。测序可以通过使用由RNA转录物衍生的基因组DNA或cDNA作为模板来进行。

[0292] 在一些实施方案中，高通量测序包括使用可得自Helicos BioSciences Corporation(Cambridge,Mass.)的技术，例如单分子合成测序(SMSS)方法。SMSS是独特的，因为它允许在最多24小时内对整个人基因组进行测序。这种快速测序方法还允许基本上实时地或实时地检测序列中的SNP/核苷酸。最后，SMSS是强大的，因为，类似于MIP技术，它不需要在杂交之前有预扩增步骤。事实上，SMSS不需要任何扩增。SMSS在美国公开申请No.20060024711、20060024678、20060012793、20060012784和20050100932中有部分描述，其通过引用并入本文。

[0293] 在一些实施方案中，高通量测序包括使用可得自454Lifesciences,Inc.(Branford,Conn.)的技术，例如PicoTiterPlate装置，它包括传输通过测序反应产生的、将

由该仪器中的CCD照相机记录的化学发光信号的光纤板。光纤的这种使用允许在4.5小时内检测至少2千万个碱基对。

[0294] 使用珠扩增后接着进行光纤检测的方法在Marguiles,M等人,“Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors”,Nature,doi:10.1038/nature03959以及在美国公开申请No.20020012930、20030068629、20030100102、20030148344、20040248161、20050079510、20050124022和20060078909中有描述,这些文献通过引入并入本文。

[0295] 在一些实施方案中,对靶细胞的遗传物质的序列分析可以包括四色连接测序方案(简并连接),该方案涉及使锚定引物与四个位置之一杂交。然后进行锚定引物与荧光染料标记的简并九聚体群体的酶促连接反应。在任何给定的循环中,所使用的九聚体群体的结构使得其位置之一的身份与附接至该九聚体的荧光团的身份相关联。就连接酶判别该查询位置处的互补性而言,荧光信号允许推断出该碱基的身份。在进行连接和四色成像之后,剥离锚定引物:九聚体复合物并且开始新的循环。在进行连接后使序列信息成像的方法是本领域中已知的。

[0296] 对于药物筛选应用,本发明允许对特异性抑制循环肿瘤细胞的“结合”或粘附性质的一类新的药物进行选择性筛选。抑制CTC与其他细胞类型、组织和基底结合的能力将允许研究人员创建新的药物来预防癌症转移的发生。具体的药物靶标将包括整联蛋白、桩蛋白、踝蛋白和E-钙粘着蛋白。

[0297] 在本发明的另一个方面,受试者的HSC可以与其CTC平行培养。两种细胞类型可以一起从外周血、淋巴液和骨髓中分离出来。HSC的繁殖及其随后分化成构成人类免疫系统的淋巴谱系(自然杀伤细胞、T细胞和B细胞)可允许所述细胞的“细胞重新编程”,这是通过使这些细胞暴露于从同一受试者中分离的CTC,例如,通过使HSC暴露于在CTC培养物中所见的最积极生长的癌集落来实现的。这可以通过在体外将受试者的免疫细胞与CTC(例如,最活跃分裂的CTC)共培养来实现。这些免疫细胞的引入将允许研究人员观察它们识别并破坏CTC集落的能力。经证明在干扰CTC生长或消除CTC集落方面有效的经培养的免疫细胞完全可以在培养中扩充。可以将这类扩充的免疫细胞重新引入到受试者中作为癌症的治疗剂。

[0298] 本发明在此提供了一种用于从异源细胞群体中检测和富集靶细胞亚群的新方法。每当具有异源细胞群体并且需要富集靶细胞亚群时,都可以使用该方法。

[0299] 以上的描述是说明性的而不是限制性的。经阅读本公开内容,本发明的许多变化对于本领域技术人员而言将变得明显。仅举例来说,虽然本发明主要示例了从体液中富集靶细胞亚群,包括CTC、CSC、HSC和EPC,但本发明并不受此限制。

本发明提供了包括但不限于以下实施方案:

1.一种用于从源自生物样品的异源细胞群体中选择性富集靶细胞亚群的方法,所述方法包括:

(a)使所述异源细胞群体与基底接触;以及

(b)在足以允许所述靶细胞亚群生长的条件下孵育所述异源细胞群体,其中,所述条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述异源细胞群体,其中所述孵育导致所述靶细胞亚群的选择性富集。

2.根据实施方案1所述的方法,还包括:在所述靶细胞亚群的成员显示一种或多种形态

特征和/或动力学性质时，鉴定所述靶细胞亚群的所述成员，其中所述一种或多种形态特征和/或动力学性质选自集落形成、增殖、与非靶细胞的表面积相比的大表面积、与非靶细胞对所述基底的粘附相比增高的对所述基底的粘附、快速的细胞分裂以及多核化。

3.根据实施方案1或2所述的方法，其中所述靶细胞亚群包含原代细胞。

4.根据实施方案1-3中任一项所述的方法，其中所述靶细胞亚群包含选自下组的细胞：循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、来自实体瘤的细胞、造血干细胞(HSC)、原代神经元细胞、胎儿细胞、原代肝细胞、原代心肌细胞、内皮祖细胞(EPC)以及上皮祖细胞。

5.根据实施方案4所述的方法，其中所述靶细胞亚群包含CTC或CSC。

6.根据实施方案5所述的方法，其中所述CTC包括转移性CTC。

7.根据实施方案5所述的方法，其中所述CTC包括活CTC。

8.根据实施方案5所述的方法，其中所述CTC包括急性白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、急性淋巴细胞性白血病细胞、急性髓细胞性白血病细胞、成髓细胞性白血病细胞、前髓细胞性白血病细胞、髓单核细胞白血病细胞、单核细胞白血病细胞、红白血病细胞、慢性白血病细胞、慢性髓细胞性(粒细胞)白血病细胞、慢性淋巴细胞性白血病细胞、真性红细胞增多症细胞、淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症细胞、重链病细胞、肉瘤细胞、纤维肉瘤细胞、粘液肉瘤细胞、脂肪肉瘤细胞、软骨肉瘤细胞、成骨性肉瘤细胞、淋巴管肉瘤细胞、间皮瘤细胞、尤因瘤细胞、平滑肌肉瘤细胞、横纹肌肉瘤细胞、结肠癌细胞、结直肠癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、去势抗性前列腺癌细胞、鳞状细胞癌细胞、基底细胞癌细胞、腺癌细胞、汗腺癌细胞、皮脂腺癌细胞、乳头状癌细胞、乳头状腺癌细胞、囊腺癌细胞、髓样癌细胞、支气管原性细胞、肾细胞癌细胞、肝细胞瘤细胞、胆管癌细胞、绒毛膜癌细胞、精原细胞瘤细胞、胚胎性癌细胞、维尔姆斯瘤细胞、宫颈癌细胞、子宫癌细胞、睾丸肿瘤细胞、肺癌细胞、小细胞肺癌细胞、膀胱癌细胞、上皮癌细胞、胶质瘤细胞、颅咽管瘤细胞、室管膜瘤细胞、松果体瘤细胞、血管母细胞瘤细胞、听神经瘤细胞、少突神经胶质瘤细胞、脑膜瘤细胞、黑色素瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、视网膜母细胞瘤细胞、子宫内膜癌细胞、非小细胞肺癌细胞、头颈癌细胞或肾癌细胞。

9.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述鉴定不包括使用抗体或多核苷酸标记物。

10.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述生物样品包括体液或其衍生物。

11.根据实施方案10所述的方法，其中所述体液选自血液、血浆、血清、淋巴、唾液、尿液、汗液或腹水。

12.根据实施方案10或11所述的方法，其中所述靶细胞亚群的所述成员以1个靶细胞/ml所述体液或其衍生物或更低的浓度存在。

13.根据实施方案11所述的方法，其中所述靶细胞亚群的所述成员以0.8个靶细胞/ml所述体液或其衍生物或更低的浓度存在。

14.根据实施方案11所述的方法，其中所述靶细胞亚群的所述成员以0.6个靶细胞/ml所述体液或其衍生物或更低的浓度存在。

15.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述生物样品包括实体组织样品。

16.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述基底包括涂层，其中所述涂层选自GOL基底、GEL基底、一层或多层饲养细胞，以及它们的任意组合。

17.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述基底的构造选自：单层构造、双层构造、中间层构造以及反转构造。

18.根据前述实施方案中任一项所述的方法，进一步包括单独地分离和培养所述靶细胞亚群的所述成员。

19.根据前述实施方案中任一项所述的方法，进一步包括分离所述靶细胞亚群的所述成员。

20.根据实施方案19所述的方法，其中所述分离包括使用显微操作设备。

21.根据前述实施方案中任一项所述的方法，包括将所述靶细胞亚群的所述成员作为细胞培养物培养超过2周。

22.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述低氧条件包括在小于10％的O_2水平下培养。

23.根据实施方案22所述的方法，其中所述O_2水平为1％。

24.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述正压条件包括在高于14.7PSIA的加压条件下培养所述成员。

25.根据实施方案24所述的方法，其中所述正压条件包括在15PSIA或更高的加压条件下培养所述成员。

26.根据实施方案24所述的方法，其中所述正压条件包括在15.7PSIA或更高的加压条件下培养所述成员。

27.根据实施方案24所述的方法，其中所述正压条件包括在16.7PSIA或更高的加压条件下培养所述成员。

28.根据实施方案24所述的方法，其中所述正压的条件包括在19.7PSIA的加压条件下培养所述成员。

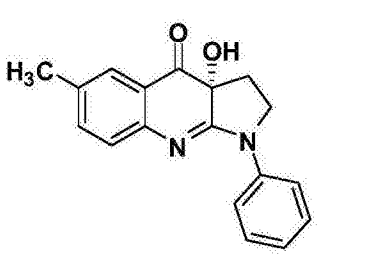
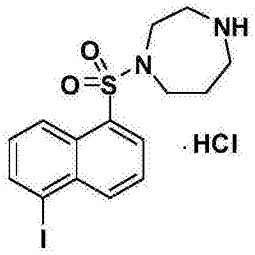
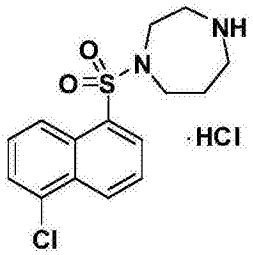
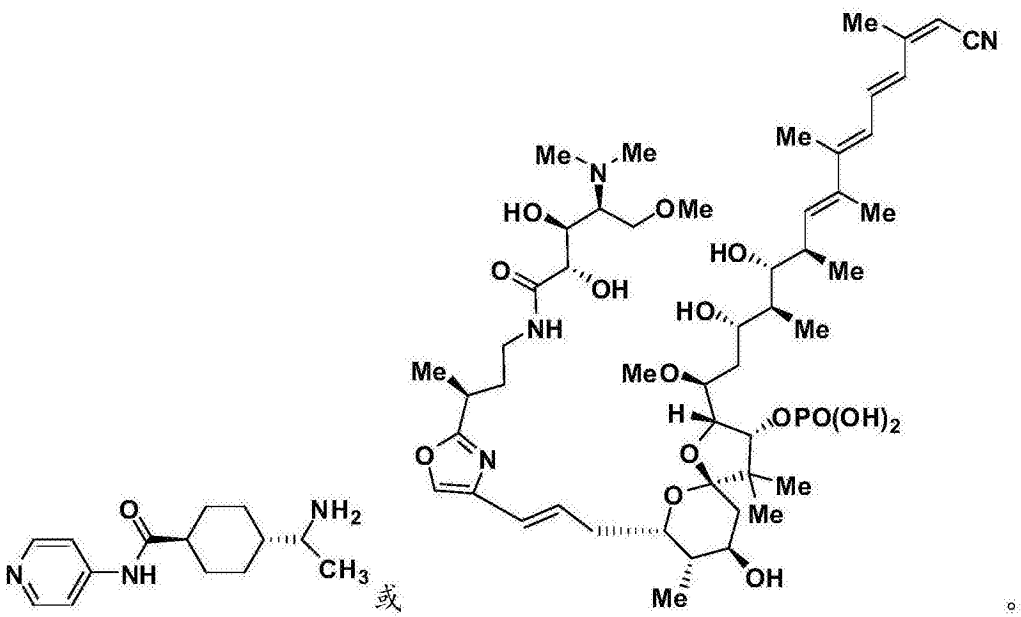
29.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述条件还包括在选自下组的细胞培养基中培养所述靶细胞亚群的所述成员：涂布培养基；R型长期生长培养基；DF型长期生长培养基；D型长期生长培养基；MEF-条件培养基；及其任意组合。

30.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述条件还包括在包含EGF、氢化可的松、孕酮、二氢睾酮和/或其任意组合的细胞培养基中培养所述靶细胞亚群的所述成员。

31.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述条件包括在包含能够调节细胞表面张力的化合物的细胞培养基中培养所述成员。

32.根据实施方案31所述的方法，其中所述化合物是Rho激酶抑制剂。

33.根据实施方案31所述的方法，其中所述化合物选自：


、

、

、

或
。

34.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述条件包括将所述成员与能够提高所述成员中低氧诱导因子的表达的试剂一起培养。

35.根据实施方案34所述的方法，其中所述低氧诱导因子包括低氧诱导因子-1α(HIF-1α)、低氧诱导因子-1β(HIF-1β)、低氧诱导因子-2α(HIF-2α)、低氧诱导因子-2β(HIF-2β)、低氧诱导因子-3α(HIF-3α)、低氧诱导因子-3β(HIF-3β)或其任意组合。

36.根据实施方案35所述的方法，其中所述低氧诱导因子包括HIF-1α。

37.根据实施方案34-36中任一项所述的方法，其中所述能够提高低氧诱导因子的表达的试剂包括载体，其中该载体包含编码所述低氧诱导因子的多核苷酸。

38.根据实施方案37所述的方法，其中所述载体是表达载体。

39.根据实施方案37所述的方法，其中所述低氧诱导因子包含与SEQ.ID.NO.1有至少70％或更高的同源性的氨基酸序列。

40.根据实施方案37所述的方法，其中所述多核苷酸与SEQ.ID.NO.2有至少70％或更高的同源性或互补性。

41.根据前述实施方案中任一项所述的方法，包括使所述细胞培养基与饲养细胞接触。

42.根据实施方案41所述的方法，其中所述饲养细胞选自培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人肺微血管内皮细胞(HLMVEC)和小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)。

43.根据前述实施方案中任一项所述的方法，还包括对所述靶细胞亚群的所述成员进行测序。

44.根据前述实施方案中任一项所述的方法，还包括确定所述靶细胞亚群的所述成员中一种或多种基因的表达。

45.根据前述实施方案中任一项所述的方法，还包括确定所述靶细胞亚群的所述成员中一种或多种蛋白质的表达。

46.根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述鉴定包括：

(a)获得所述成员的图像；以及

(b)使用计算机可读介质将所述成员自动分类为属于所述靶细胞亚群。

47.根据实施方案46所述的方法，其中所述计算机可读介质被配置成自动地分类循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)、造血干细胞(HSC)以及内皮祖细胞(EPC)。

48.根据实施方案46所述的方法，其中所述计算机可读介质被配置成基于所述靶细胞亚群的物理性质对参数进行整合，其中所述参数选自：细胞总大小、细胞形状、细胞运动、细胞核大小以及细胞分裂。

49.根据实施方案46所述的方法，其中所述计算机可读介质被配置为检测细胞的荧光标记。

50.一种用于治疗有需要的受试者的癌症的方法，包括：在检测源自所述受试者的生物样品中的靶细胞时，向所述受试者施用抗癌剂，其中通过根据前述实施方案中任一项所述的方法来检测所述靶细胞。

51.一种向有需要的受试者施用抗癌剂的方法，包括：

(a)在多个时间点向所述受试者施用所述抗癌剂；

(b)在所述施用的至少第一时间点和第二时间点分析源自来源于所述受试者的生物样品的靶细胞，其中所述分析包括根据前述实施方案中任一项所述的方法；

(c)基于所述分析调节所述抗聚集剂的剂量和/或选择不同的抗聚集剂以供施用。

52.一种检测尚未发展成转移癌的受试者发展成所述转移癌的提高的可能性的方法，包括：

(a)使用根据前述实施方案中任一项所述的方法，从源自所述受试者的异源细胞群体中分离靶细胞亚群；

(b)检测所述靶细胞亚群；以及

(c)通过所述检测，将所述受试者指定为具有发展成所述转移癌的提高的可能性。

53.一种为有需要的受试者选择个性化疾病疗法的方法，包括：

(a)利用根据实施方案1-49中任一项所述的方法培养源自所述受试者的靶细胞亚群；

(b)对来自所述细胞亚群的成员的核酸进行测序，从而产生所述靶细胞亚群的所述成员的遗传谱；以及

(c)基于所述靶细胞亚群的所述成员的所述遗传谱，为所述受试者选择个性化疾病疗法。

54.根据实施方案53所述的方法，还包括：(d)将所述个性化疾病疗法推荐给所述受试者。

55.根据实施方案53所述的方法，其中所述个性化疾病疗法是个性化癌症疗法。

56.一种细胞培养孵箱，其包括封闭环境室；其中所述细胞培养孵箱被配置成维持(i)所述封闭环境室的气体组成，(ii)所述封闭环境室的用户控制的气压，和(iii)所述封闭环境室的内部环境温度。

57.一种细胞培养板，其包括细胞培养基底，其中该基底被选择成能够促进靶细胞向所

述基底上的粘附，其中所述靶细胞是粘附性的和活的细胞，并且所述基底包含胞外基质蛋白质。

58.一种试剂盒，包括：

(a)根据前述实施方案中任一项所述的细胞培养孵箱；以及

(b)用于培养靶细胞亚群的说明书，其包括使所述孵箱的封闭环境室中的气压维持在15.7PSIA或更高的指示。

59.一种试剂盒，包括：

(a)根据前述实施方案中任一项所述的细胞培养孵箱；以及

(b)用于培养靶细胞亚群的说明书，其中所述说明书包括使所述孵箱的封闭环境室中的O_2水平维持在不超过10％的指示。

60.一种试剂盒，包括：

(a)包括根据前述实施方案中任一项所述的基底的细胞培养板；以及

(b)关于使用所述板来培养靶细胞亚群的说明书，其包括在不超过10％的O_2水平下培养所述靶细胞亚群的指示。

61.一种试剂盒，包括：

(a)包括根据前述实施方案中任一项所述的基底的细胞培养板；以及

(b)关于使用所述板来培养靶细胞亚群的说明书，其包括在15.7PSIA或更高的气压下培养所述靶细胞亚群的指示。

62.一种试剂盒，包括：

(a)根据前述实施方案中任一项所述的细胞培养基，以及

(b)关于使用所述细胞培养来培养靶细胞亚群的说明书，其包括在不超过10％的O_2水平下培养所述靶细胞亚群的指示。

63.一种试剂盒，包括：

(a)根据前述实施方案中任一项所述的细胞培养基，以及

(b)关于使用所述细胞培养基来培养靶细胞亚群的说明书，其包括在15.7PSIA或更高的气压下培养所述靶细胞亚群的指示。

64.一种试剂盒，包括：

(a)能够提高所述成员中低氧诱导因子的表达的试剂；以及

(b)关于使用所述试剂来培养靶细胞亚群的说明书。

65.一种包含代码的计算机可读介质，在接收一种或多种原代细胞的图像数据时，该代码实现以下步骤：

(a)由所述图像数据确定所述一种或多种原代细胞的大小；以及(b)如果所述大小是不源自肿瘤的细胞的大小的至少1.5倍，则将原代细胞分类为源自肿瘤，

其中所述一种或多种原代细胞从生物样品获得的，并且其中所述一种或多种原代细胞在足以允许所述靶细胞亚群生长的条件下培养的，其中，所述条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述一种或多种原代细胞。

66.一种包含代码的计算机可读介质，在接收从生物样品获得的一种或多种原代细胞的图像数据时，该代码实现以下步骤：

(a)从所述图像数据中检测是否存在粘附至光滑的固体或半固体基底上的三维集落；

以及

(b)当检测到所述三维集落的存在时,将所述生物样品分类为包含肿瘤细胞,

其中所述一种或多种原代细胞是在足以允许所述靶细胞亚群生长的条件下培养的,其中,所述条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述一种或多种原代细胞。

67.一种包含代码的计算机可读介质,在接收从生物样品获得的一种或多种原代细胞的图像数据时,该代码实现以下步骤:

(a)从所述图像数据中检测是否存在包含多个细胞核的原代细胞;以及

(b)当检测到所述多个细胞核的存在时,将所述生物样品分类为包含肿瘤细胞,

其中所述一种或多种原代细胞是在足以允许所述靶细胞亚群生长的条件下培养的,其中,所述条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述一种或多种原代细胞。

68.一种包含代码的计算机可读介质,在接收从生物样品获得的一种或多种原代细胞的图像数据时,该代码实现以下步骤:

(a)从所述图像数据中检测是否存在包含表面负静电荷的原代细胞;以及

(b)在检测到所述包含表面负静电荷的原代细胞的存在时,将所述生物样品分类为包含肿瘤细胞,

其中,所述表面负静电荷通过以下得到证实:与非肿瘤细胞对带正电荷的固体或半固体基底的粘附相比,所述原代细胞对所述带正电荷的固体或半固体基底的粘附提高。

69.一种包含代码的计算机可读介质,在接收从生物样品获得的一种或多种原代细胞的图像数据时,该代码实现以下步骤:

(a)从所述图像数据中检测是否存在快速分裂的细胞;以及

(b)若检测到所述快速分裂的细胞的存在,则将所述生物样品分类为包含肿瘤细胞,

其中所述一种或多种原代细胞在足以允许所述靶细胞亚群生长的条件下培养,其中,所述条件包括在正压条件和/或低氧条件下孵育所述一种或多种原代细胞。

70.一种计算机系统,包括:

(a)存储器,其用于储存与样品相关的数据集;

(b)处理器,其通信地耦合至所述存储器;其中所述处理器包括根据前述实施方案中任一项所述的计算机可读介质;以及

(c)所述数据集。

71.一种细胞成像系统,包括:

(a)被配置为产生细胞的图像数据的显微镜;以及

(b)被配置成接收来自所述显微镜的图像数据的计算机系统,其中所述显微镜包括根据前述实施方案中任一项所述的计算机可读介质。

72.一种用于培养靶细胞群体的系统,包括:

(a)根据前述实施方案中任一项所述的细胞培养孵箱;以及

(b)(i)细胞培养板、(ii)细胞培养基和(iii)细胞成像系统中的至少一个。

实施例

实施例1:示例性本发明基底的制备:

[0300] 基底制备:将0.1%猪明胶的基层用0.1mg/ml的聚-L-鸟氨酸(例如聚-L-鸟氨酸盐酸盐或聚-L-鸟氨酸氢溴酸盐)预处理。预处理后,用大约0.1mg/ml至大约1.0mg/ml的I型胶

原蛋白、IV型胶原蛋白和层粘连蛋白处理基层。

实施例2:循环乳腺癌细胞对基底的结合亲和性:

[0301] 在全血样品中掺加MDA-MB231乳腺癌细胞。对掺加的血液样品进行如本文所述的基于Ficoll的密度离心。将有核细胞部分涂布到基底上并在37℃、2%O_2和16.7PSIA下培养。利用荧光标记的抗CD45抗体使白细胞(WBC)可视化。图15描绘了标记的WBC(图A)和粘附到基底上的循环乳腺癌细胞(图B)。粘附的乳腺癌细胞可根据形态容易地区别于WBC(小箭头)。

实施例3:使用GOL和GEL基底制备细胞培养板

[0302] 将GOL基底制备为0.1%猪明胶、0.05mg/mL聚L-鸟氨酸盐酸盐和5%胎牛血清(FBS)。将GEL基底制备为0.1%猪明胶,以及0.1mg/mL胶原蛋白(例如Sigma C7774)、0.1mg/mL层粘连蛋白(例如Sigma L2020)和0.1mg/mL纤连蛋白(例如Sigma F0895)中的一种或多种。利用GOL基底或GEL基底涂覆细胞培养板,确保基底覆盖孔的整个表面,在37℃下保持4小时或更长。从孔中除去基底溶液。用无菌蒸馏水洗孔两次。将1x磷酸盐缓冲盐水(PBS)加入每孔中。然后,在室温下对细胞培养板进行UV灭菌约4小时或更长时间。

实施例4:包含饲养细胞的基底的制备:

[0303] 如实施例3所述制备GOL基底并将其涂覆到组织培养板上。将小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)涂布到GOL涂覆的板上并培养约48小时,或直至细胞达到约70%汇合。在另一个实施方案中,在Millicell插入物(Millipore)上培养MEF,其中将该插入物插入到用GOL基底处理的组织培养板的孔中。培养MEF直到细胞达到70%或更高汇合度(例如大约48小时)。

实施例5:CTC亚群培养方案:

[0304] 从人类受试者收集20ml外周血。外周血有核细胞(PBNC)通过如本文所述的基于Ficoll的密度离心来纯化,然后按照以下方案涂布。向用基于胶原蛋白的基底(其包含聚-L-鸟氨酸并补充有提供基底硬度的明胶-琼脂混合物)涂覆的细胞培养板的每个孔中添加涂布培养基(例如,在6孔板中为2mL/孔,或者在12孔板中为1mL/孔)。将300uL的PBNC溶液(得自20mL外周血,悬浮于2mL涂布培养基中)加入到6孔板的每个孔中(12孔板为150uL)。使板在37摄氏度下、5%CO_2下孵育1小时。初始涂布后一小时,将细胞培养板轻拍数次以除去松散附着的细胞(例如,白细胞),并且将细胞培养基更换成预温的涂布培养基。然后将板在16.7PSIA、37摄氏度下、具有5%CO_2、2%O_2和93%N_2的加压孵箱中孵育24小时或更长时间。24小时后,将细胞培养板轻拍数次以除去松散附着的细胞,并且将培养基更换成预温的长期生长培养基。使细胞在16.7PSIA、37摄氏度、5%CO_2、2%O_2和93%N_2的加压孵箱中培养。每72小时,将大约三分之一到二分之一的长期生长培养基更换成预温的新鲜培养基。使用此方案,检测并成功地在培养中建立了CTC。

实施例6:利用饲养细胞的CTC亚群培养方案:

[0305] 掺有来自患有癌症的人类受试者的CTC细胞的PBNC利用基于Ficoll的密度离心纯化到GOL基底上。将新分离的细胞重悬浮于涂布培养基中。使用6孔或12孔的标准尺寸培养板。利用经照射和未照射的MEF细胞将培养板预处理最少48小时,直到MEF细胞达到至少约70%汇合。将MEF富集的培养基更换为涂布培养基。保留MEF-条件培养基。用20mL外周血产生外周血有核细胞(PBNC)溶液,离心,并重悬浮于2mL涂布培养基中。将PBNC溶液添加到培养皿的各孔中,并使细胞在37摄氏度、5%CO_2下孵育1小时。初始涂布后一小时,将培养板轻

拍数次以除去松散附着的细胞，并且将培养基更换为先前保留的MEF-条件培养基。使板在下列条件下在加压孵箱中孵育至少48小时：16.7PSIA、37摄氏度、5%CO_2、2%O_2和93%N_2。在48小时后，将大约三分之一到二分之一的MEF-条件培养基更换为预温的R型长期生长培养基。然后将细胞在下列条件下在加压孵箱中再次孵育至少48小时：16.7PSIA、37摄氏度、5%CO_2、2%O_2和93%N_2。再次，将一半到三分之一的培养基更换为新鲜的、预温的R型长期生长培养基。每72小时，将大约二分之一到三分之一的R型长期生长培养基更换为预温的新鲜培养基。使用该方案富集的CTC示于图16中。图A示出了在10倍放大率下的从患者中分离的CTC；图B示出了在20倍放大率下的相同CTC细胞。图C描绘了在20倍放大率下的多核CTC细胞。单细胞内存在多于一个核可表明细胞周期控制是不当的，往往与癌症相关。这些结果表明，相对于非靶细胞亚群(例如，WBC)，这样的培养条件促进靶细胞亚群(例如，CTC)的选择性增殖。这种选择性增殖得到以下事实的证实：相比于WBC，CTC的增殖增加了大大超过两倍。

实施例7：计算机可读介质用于图像分析的应用：

[0306] 示例性的软件包已经通过使用ImageJ(Collins(2007)ImageJ for microscopy.BioTechniques 43:S25-S30)，其通过引用并入本文)创建用于检测和测量细胞增殖的新插件而开发。针对ImageJ的基于JAVA的按钮式插件自动检测和测量给定图像系列中的细胞数和细胞分裂速率。基于图形用户界面的插件支持用户输入和批处理能力。该软件包括四个不同的脚本(或进程)，它们按顺序运行，以产生总的细胞计数。

[0307] 该软件程序通过使用将以下五个参数中的一个或任意组合整合到细胞分类算法中的软件来鉴定增殖的细胞：(1)细胞总大小；(2)细胞形状；(3)细胞运动；(4)细胞核大小；(5)细胞分裂速率。通过上述五个参数循环进行该软件鉴定过程。通过使用多核计算机芯片顺序地和/或切向地处理这些参数。该软件程序基于细胞分裂速率、根据转移潜能将细胞再分类(例如，将CTC分类为具有一定的转移潜能)。该软件程序包括允许用户为五个参数中的每一个分配不同的权重的用户界面。

[0308] 该软件程序通过在每个采集时间点确定确切的定位或位置，来鉴定给定群体中活细胞的百分比。该软件测量单细胞的形状和运动。细胞形状、可变形性和运动参数用于确定细胞是否存活。相反地，未发生形态变化或未显示运动的细胞被认为是非存活的。

[0309] 该软件程序可通过针对给定时间点的每个拼接图像计算给定细胞或细胞集落的整体表面积来测量细胞分裂速率。如果单个增殖细胞在整个图像采集步骤过程中表现出的表面积变化是其原始表面积的至少四倍，那么该单个增殖细胞可以被认为是活跃分裂的。表现出大小增加的细胞或细胞集落可以通过对所述细胞的细胞核进行计数以确定其确切数目而进一步分析。

[0310] 分裂的癌细胞的活细胞成像和软件分析的一个例子可见图17。从如本文(例如，实施例2和实施例6)所述的细胞掺加实验获得的乳腺癌细胞(MDA-MB231)在1小时、24小时和72小时进行成像。乳腺癌细胞在涂布后1小时、24小时和72小时成像的原始图像示于图A中。图A中的白色箭头指向附着至基底上的白细胞；图A中的黑色箭头指向附着至基底上的乳腺癌细胞。图B描绘了在分箱(binning)和应用方差滤波器(variance filter)后的与图A相同的图像。在图C中，对图像进行自动取阈(thresholded)并分割，以提供给定细胞集落的总表面积(采自原始彩色图像的黑白图像)。图D示出了细胞核的阈值分割。图E描绘了在图D中取

阈的细胞核的计数。

实施例8:从患有转移性去势抗性前列腺癌的人类受试者中分离的CTC的长期培养和分子表征:

[0311] 招募了60名患有晚期转移性去势抗性前列腺癌(>3期,腺癌)的受试者。招募的大多数受试者为65岁或以上,男性白种人,确诊为骨转移(最常见的是与前列腺癌相关)。此外,该研究招募了10名健康成年志愿者(5名男性,5名女性)作为对照受试者。

[0312] 将得自每名受试者的20mL新鲜外周血收集到得自BD的CPT Vacutainer管(含有柠檬酸钠的细胞制备管)中。在采血两小时内,将样品以1500g离心20分钟。分离有核细胞部分并将其直接涂布到用基于胶原蛋白的基底涂覆的12孔板上,该基底包含聚-L-鸟氨酸并补充有提供基底硬度的明胶-琼脂混合物。将约2mL的每个有核细胞部分(含有WBC和CTC)稀释成无血清的、基于RPMI的培养基(补充有EGF、氢化可的松、孕酮和双氢睾酮),并将其同等地分配于所有十二个孔中。

[0313] 然后,将新涂布的细胞转移到细胞培养孵箱中。细胞培养孵箱在16.7PSIA的恒定压力下提供定制的气体混合物,同时在完全封闭的无菌环境中维持湿度和温度(37摄氏度)。该气体混合物包含1%氧气、5%二氧化碳和94%氮气,氧气水平通过用混合金属催化剂除去过量的氧气来维持。

[0314] 将新涂布的细胞孵育1小时,以使有核细胞粘附到基底上。WBC松散地粘附到基底上,并可以通过在细胞涂布后1小时进行培养基更换而容易地从每个孔中脱离并去除。培养基更换还除去了非存活细胞和膜碎片。将含WBC的部分离心并冷冻,以作为受试者内对照细胞。剩余的结合至基底的细胞紧紧地粘附到基底上,显示出细胞膜极化和铺展,与这些细胞在悬浮时或最初结合时的球形外观形成对比。在该方案的这一点,利用直接偶联至Alexa荧光团(568nm)的抗体探查培养板中一半的孔中的EpCAM表达细胞,该抗体以1:2000的浓度直接添加至培养基中。技术人员使用完全封装在原代细胞培养孵箱内的荧光显微镜(示于图18中)对每个孔中的EpCAM+细胞进行计数。然后,在EpCAM评分完成之后,将含有抗体的培养基更换为新鲜的培养基,以重新开始细胞增殖研究。初步数据表明,每个孔平均有1到2个EpCAM+细胞,这使得经过培训的技术人员能够快速计数。细胞涂布和EpCAM评分完成后大约1.5小时,将在Millipore的Millicell插入物系统上生长的单层饲养细胞(HUVEC或HLMVEC细胞系,50%汇合,提前48小时使用CTC培养基制备)分配到每个孔中,以提供细胞间信号传导线索和生长因子,以促进CTC增殖,同时使两种培养物与潜在的细胞污染物在物理上分离。然后,将细胞孵育72小时,每24小时添加新鲜的培养基以弥补培养基蒸发。在培养3天后,由技术人员复查细胞板,从而使用亮视野显微镜检查(相光学)扫描细胞集落。针对直接偶联至具有限定波长(Alexa 488nm)的荧光探针的混合阴性选择抗体来探查含有生长细胞的孔,该抗体将鉴定WBC(抗CD45)、单核细胞/巨噬细胞(抗CD14)、内皮祖细胞(抗CD34)和成纤维细胞(抗成纤维细胞表面蛋白质)的表面暴露的抗原。针对抗EpCAM、抗PSA和抗雄激素受体,以顺序方式探查含有对这些对照标记物呈阴性的细胞集落的板孔,从而确定与前列腺癌相关的标记物的存在。

[0315] 如果对前列腺癌标记物呈阳性的细胞集落和/或对所有测试的标记物呈阴性的细胞集落在7天期限内仍未达到最低50%的汇合,那么这样的细胞集落被鉴定为CTC细胞,并被选择用于全外显子组测序和全面的转录组分析。全外显子组测序和全面的转录组分析由

Personalis Inc.(Menlo Park,CA)进行。生长到至少50％细胞汇合的CTC培养物提供足以使用新一代测序平台进行这组分析的DNA含量(1-2μg)。从这些细胞产生的数据用于确认前列腺相关的突变,同时提供培养中快速分裂的CTC的全面分子谱以用于新生物标记物的研究。可能包含少于1μg的DNA的其余受试者样品经历全基因组扩增(WGA),接着通过阵列比较基因组杂交(aCGH)进行基因拷贝数分析。然后测试样品的雄激素受体扩增、Myc基因扩增、肿瘤抑制基因PTEN的缺失以及涉及TMPRSS2和ETS转录因子ERG和ETV1的基因融合的存在。

实施例9:来自人类受试者的CTC的不依赖于生物标记物的选择和培养

[0316] 从患有前列腺癌(2)、乳腺癌(4)、肺癌(4)、黑色素瘤(2)、结直肠癌(2)、食道癌(2)和胰腺癌(2)的人类受试者获得来自不同范围的转移癌的外周血样品。患者选择标准保持宽泛,其中确诊的转移病变是入选的关键决定因素。如实施例8所述进行血液处理和CTC培养方法。18个样品中的10个含有EpCAM+、细胞角蛋白+、CD45-细胞,而18个样品中的8个提供活CTC集落。图19描绘了从前列腺癌患者的全血中捕获的培养中的CTC的显微照片。图A描绘了对EPCAM和细胞角蛋白8、18呈阳性的前列腺癌CTC的亮视野和荧光明图像。图B描绘了来自转移性前列腺癌患者的快速生长的CTC培养物。该患者患有IV期腺癌,确诊为骨转移。图B中所示的细胞培养物表现出EpCAM的低表达至无表达,对CD45呈阴性,并表现出高的细胞分裂速率,在涂布后不到5天达到100％汇合。在这些集落中的单个细胞在大小和形状上不同,同时表现出高的膜起皱活性。此外,细胞看似是同步分裂的,多个相邻细胞一致地分裂。分裂的细胞通常在所有方向上向上延伸,呈现“起泡”的外观。此CTC培养物将包含在我们的Personalis遗传特性研究中,作为将经历全外显子组测序和转录组分析的10个样品的一部分。

实施例10:血液中掺加的CTC的化学敏感性分析

[0317] 如本文所述分离、富集和培养来自掺加的血液的癌细胞(参见,例如,实施例2和6)。用Rho激酶抑制剂Y-27632处理细胞(Ishizaki等人,2000Pharmacological Properties of Y-27632,a specific inhibitor of rho-associated kinases.Mol Pharmacol.57(5):976-83,其通过引用并入本文)。化学敏感性分析的结果示于图20。图A显示了Y-27632处理前的单个细胞。图B显示了在添加Y-27632后的细胞的图像。经药物处理2分钟(在图C中示出)和5分钟(在图D中示出)后,细胞的质膜回缩。

[0318] 尽管在本文中已经示出和描述了本发明的优选实施方案,但是对本领域技术人员而言很明显的是,这些实施方案仅通过示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员将会想到多种变化、改变和替换。应当理解,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可以用于实施本发明。旨在通过以下的权利要求来限定本发明的范围,并且由此涵盖在这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

序列表

<110> 艾克斯赛尔生物科学公司

詹姆斯·利姆

<120> 用于选择性富集靶细胞的方法、组合物、试剂盒及系统

<130> 43382-701.601

<140> PCT/US2014/013048

<141> 2014-01-24

<150> 61/756,993

<151> 2013-01-25

<150> 61/760,626

<151> 2013-02-04

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 826

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```
Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
1               5                  10                  15
Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
            20                  25                  30
Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
        35                  40                  45
Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
    50                  55                  60
Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
65                  70                  75                  80
Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
                85                  90                  95
Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
            100                 105                 110
Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
        115                 120                 125
Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
    130                 135                 140
Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145                 150                 155                 160
```

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
165 170 175
Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
180 185 190
His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
195 200 205
Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
210 215 220
Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
225 230 235 240
Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
245 250 255
Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
260 265 270
Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
275 280 285
Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
290 295 300
Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
305 310 315 320
Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
325 330 335
Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
340 345 350
Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
355 360 365
Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
370 375 380
Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
385 390 395 400
Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
405 410 415
Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
420 425 430
Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
435 440 445
Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
450 455 460
Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro

465 470 475 480
Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
485 490 495
Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
500 505 510
Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
515 520 525
Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
530 535 540
Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
545 550 555 560
Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
565 570 575
Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
580 585 590
Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
595 600 605
Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
610 615 620
Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
625 630 635 640
Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
645 650 655
Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
660 665 670
Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
675 680 685
Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
690 695 700
Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
705 710 715 720
Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
725 730 735
Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
740 745 750
Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
755 760 765
Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
770 775 780

Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys
785 790 795 800
Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu
805 810 815
Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn
820 825

<210> 2
<211> 2481
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 2

atggagggcg ccggcggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa 60
aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagtttt ttatgagctt 120
gctcatcagt tgccacttcc acataatgtg agttcgcatc ttgataaggc ctctgtgatg 180
aggcttacca tcagctattt gcgtgtgagg aaacttctgg atgctggtga tttggatatt 240
gaagatgaca tgaaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttgga tggttttgtt 300
atggttctca cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataatgtgaa caaatacatg 360
ggattaactc agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac 420
catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa 480
caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtgta ccctaactag ccgaggaaga 540
actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggcca cattcacgta 600
tatgatacca acagtaacca acctcagtgt gggtataaga aaccacctat gacctgcttg 660
gtgctgattt gtgaacccat tcctcaccca tcaaatattg aaattccttt agatagcaag 720
actttcctca gtcgacacag cctggatatg aaattttctt attgtgatga aagaattacc 780
gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggccgct caatttatga atattatcat 840
gctttggact ctgatcatct gaccaaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc 900
accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agaggtggat atgtctgggt tgaaactcaa 960
gcaactgtca tatataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac 1020
gttgtgagtg gtattattca gcacgacttg attttctccc ttcaacaaac agaatgtgtc 1080
cttaaaccgg ttgaatcttc agatatgaaa atgactcagc tattcaccaa agttgaatca 1140
gaagatacaa gtagcctctt tgacaaactt aagaaggaac ctgatgcttt aactttgctg 1200
gccccagccg ctggagacac aatcatatct ttagattttg gcagcaacga cacagaaact 1260
gatgaccagc aacttgagga agtaccatta tataatgatg taatgctccc ctcacccaac 1320
gaaaaattac agaatataaa tttggcaatg tctccattac ccaccgctga aacgccaaag 1380
ccacttcgaa gtagtgctga ccctgcactc aatcaagaag ttgcattaaa attagaacca 1440
aatccagagt cactggaact ttcttttacc atgccccaga ttcaggatca gacacctagt 1500
ccttccgatg gaagcactag acaaagttca cctgagccta atagtcccag tgaatattgt 1560
ttttatgtgg atagtgatat ggtcaatgaa ttcaagttgg aattggtaga aaaacttttt 1620
gctgaagaca cagaagcaaa gaacccattt tctactcagg acacagattt agacttggag 1680

atgttagctc cctatatccc aatggatgat gacttccagt tacgttcctt cgatcagttg 1740
tcaccattag aaagcagttc cgcaagccct gaaagcgcaa gtcctcaaag cacagttaca 1800
gtattccagc agactcaaat acaagaacct actgctaatg ccaccactac cactgccacc 1860
actgatgaat taaaaacagt gacaaaagac cgtatggaag acattaaaat attgattgca 1920
tctccatctc ctacccacat acataaagaa actactagtg ccacatcatc accatataga 1980
gatactcaaa gtcggacagc ctcaccaaac agagcaggaa aaggagtcat agaacagaca 2040
gaaaaatctc atccaagaag ccctaacgtg ttatctgtcg ctttgagtca aagaactaca 2100
gttcctgagg aagaactaaa tccaaagata ctagctttgc agaatgctca gagaaagcga 2160
aaaatggaac atgatggttc actttttcaa gcagtaggaa ttggaacatt attacagcag 2220
ccagacgatc atgcagctac tacatcactt tcttggaaac gtgtaaaagg atgcaaatct 2280
agtgaacaga atggaatgga gcaaaagaca attattttaa taccctctga tttagcatgt 2340
agactgctgg ggcaatcaat ggatgaaagt ggattaccac agctgaccag ttatgattgt 2400
gaagttaatg ctcctataca aggcagcaga aacctactgc agggtgaaga attactcaga 2460
gctttggatc aagttaactg a 2481

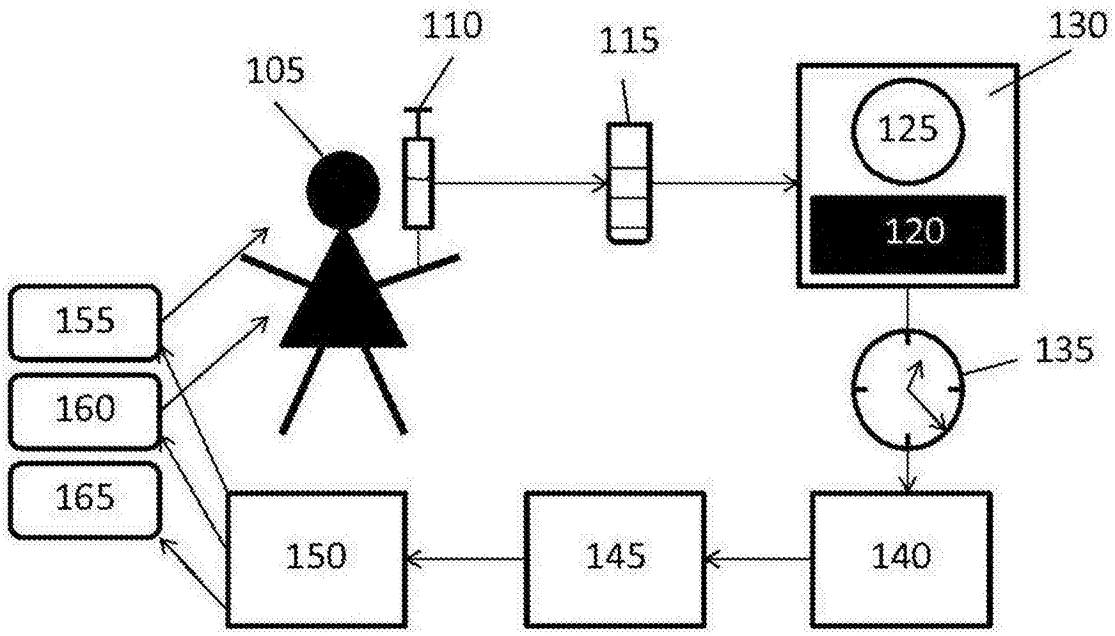


图1

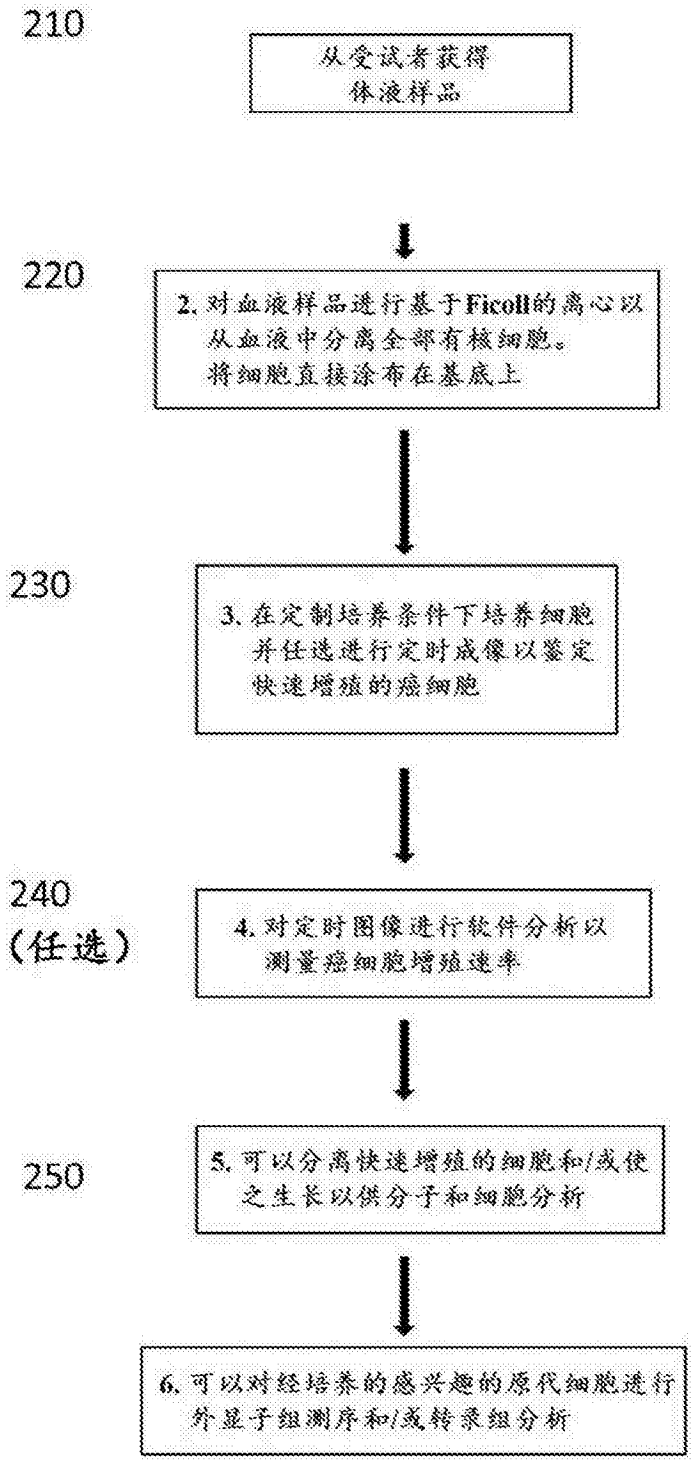

210
从受试者获得
体液样品
220
2. 对血液样品进行基于Ficoll的离心以
从血液中分离全部有核细胞。
将细胞直接涂布在基底上
230
3. 在定制培养条件下培养细胞
并任选进行定时成像以鉴定
快速增殖的癌细胞
240
(任选)
4. 对定时图像进行软件分析以
测量癌细胞增殖速率
250
5. 可以分离快速增殖的细胞和/或使
之生长以供分子和细胞分析
6. 可以对经培养的感兴趣的原代细胞进行
外显子组测序和/或转录组分析

图2A

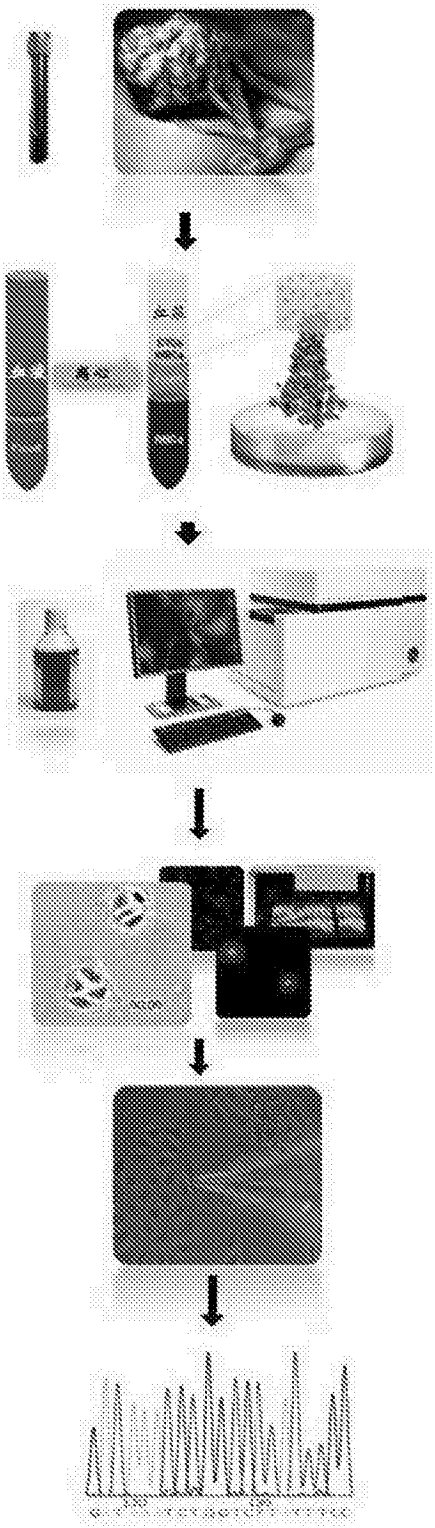


图2B

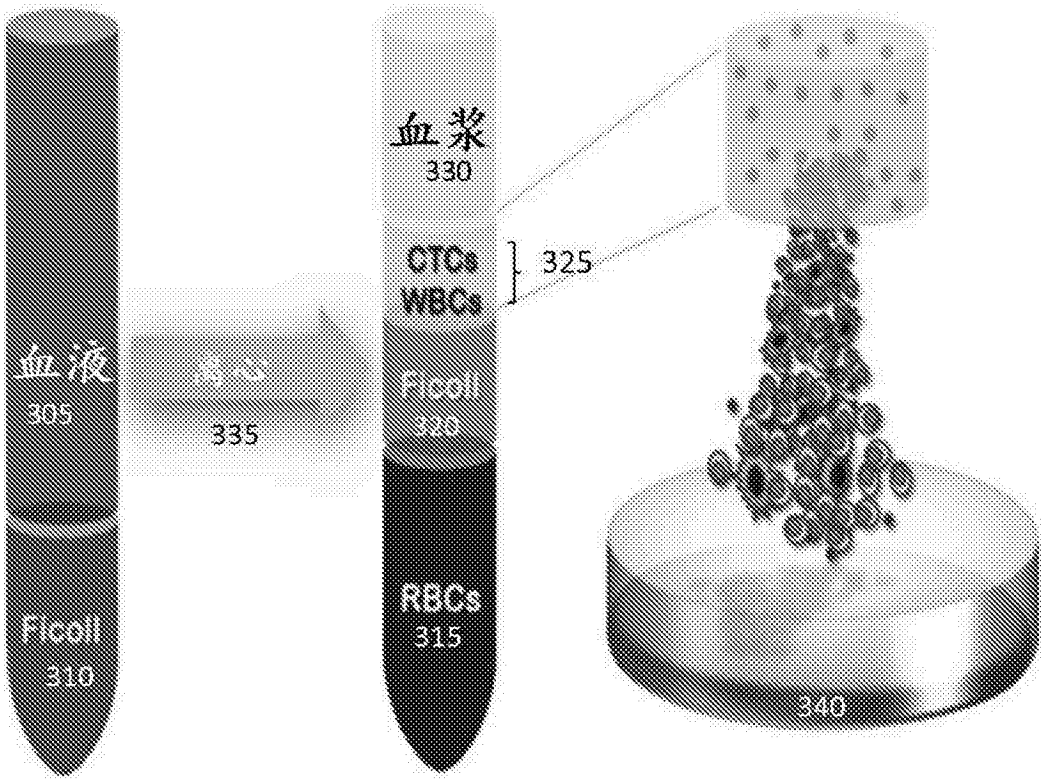

血浆
330
CTCs
WBCs
325
Ficoll
320
RBCs
315
血液
305
335
Ficoll
310
340

图3

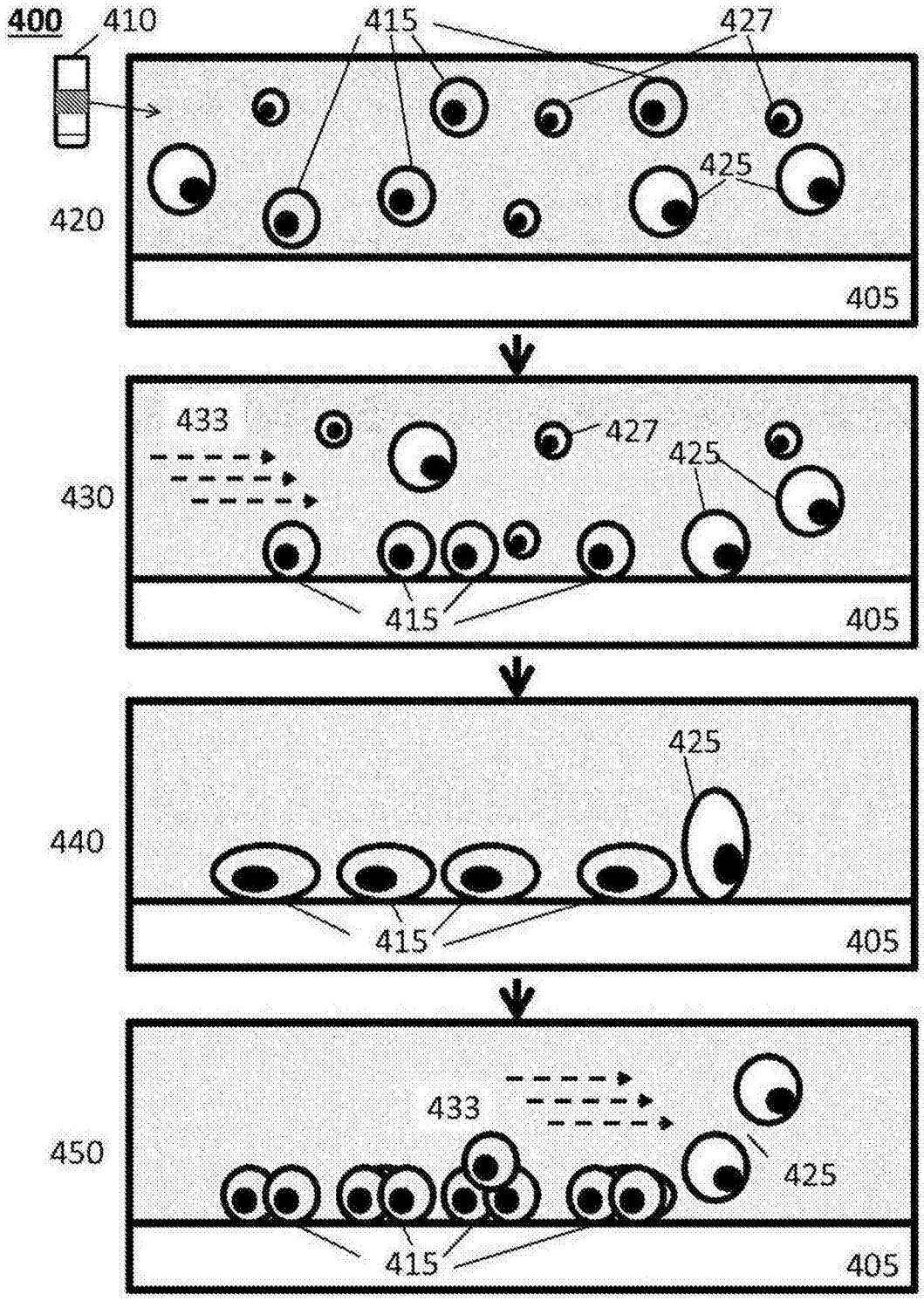

400
410
415
427
425
420
405
433
427
425
430
415
405
425
440
415
405
433
425
450
415
405

图4

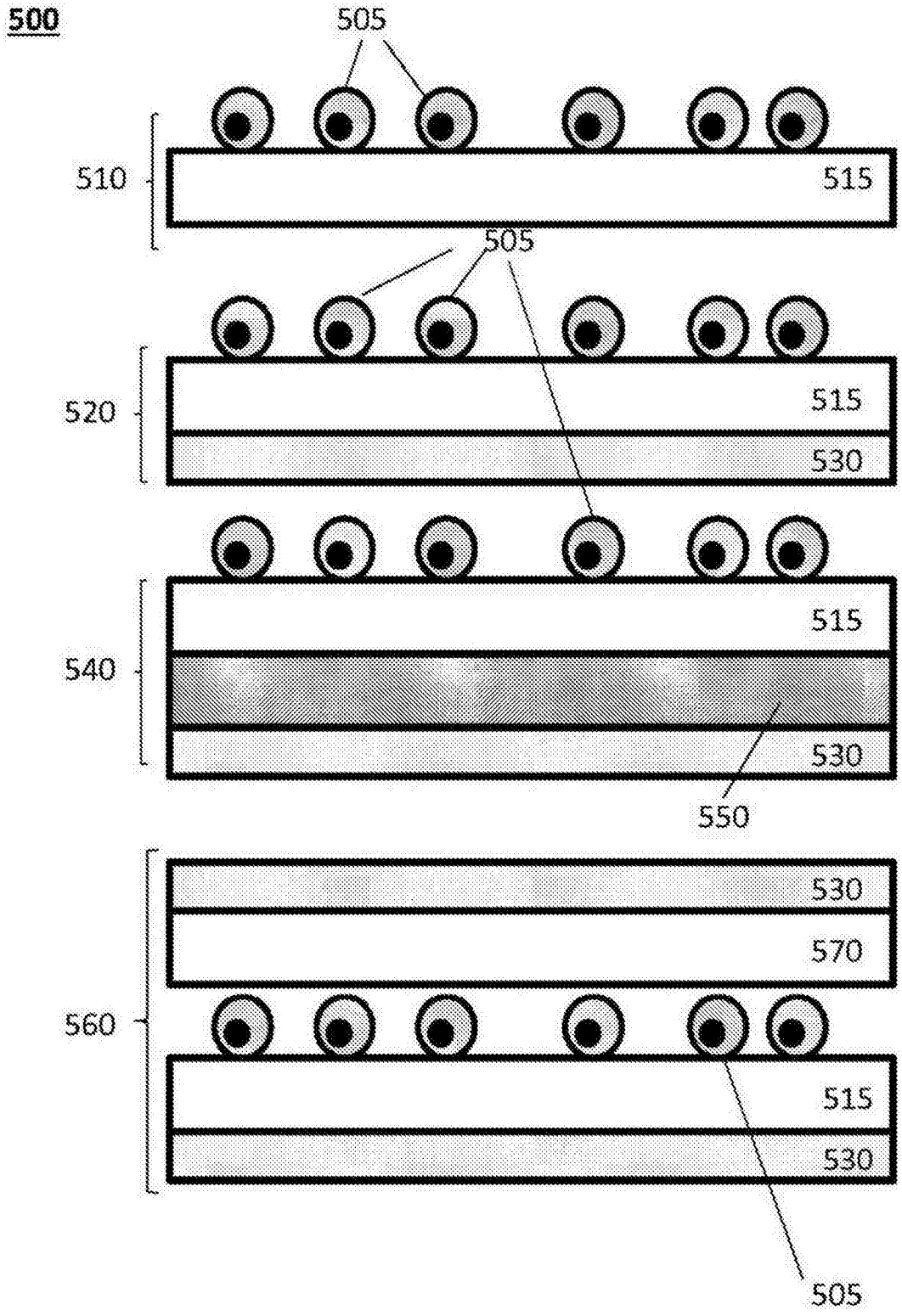

500
505
510
515
505
520
515
530
540
515
530
550
530
570
560
515
530
505

图5

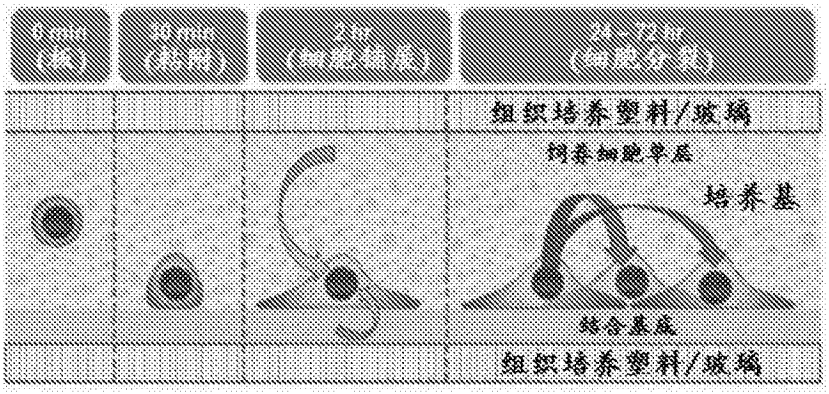

组织培养塑料/玻璃
饲养细胞单层
培养基
结合基底
组织培养塑料/玻璃

图6

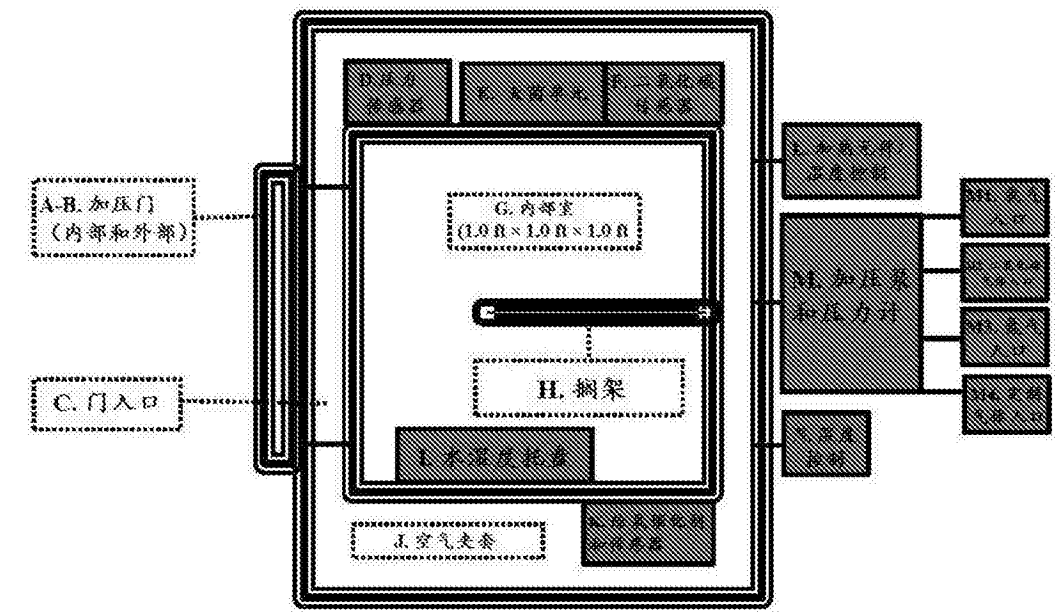

700
A-B. 加压门
(内部和外部)
C. 门入口
G. 内部室
(1.0 ft × 1.0 ft × 1.0 ft
H. 搁架
J. 空气夹套

图7

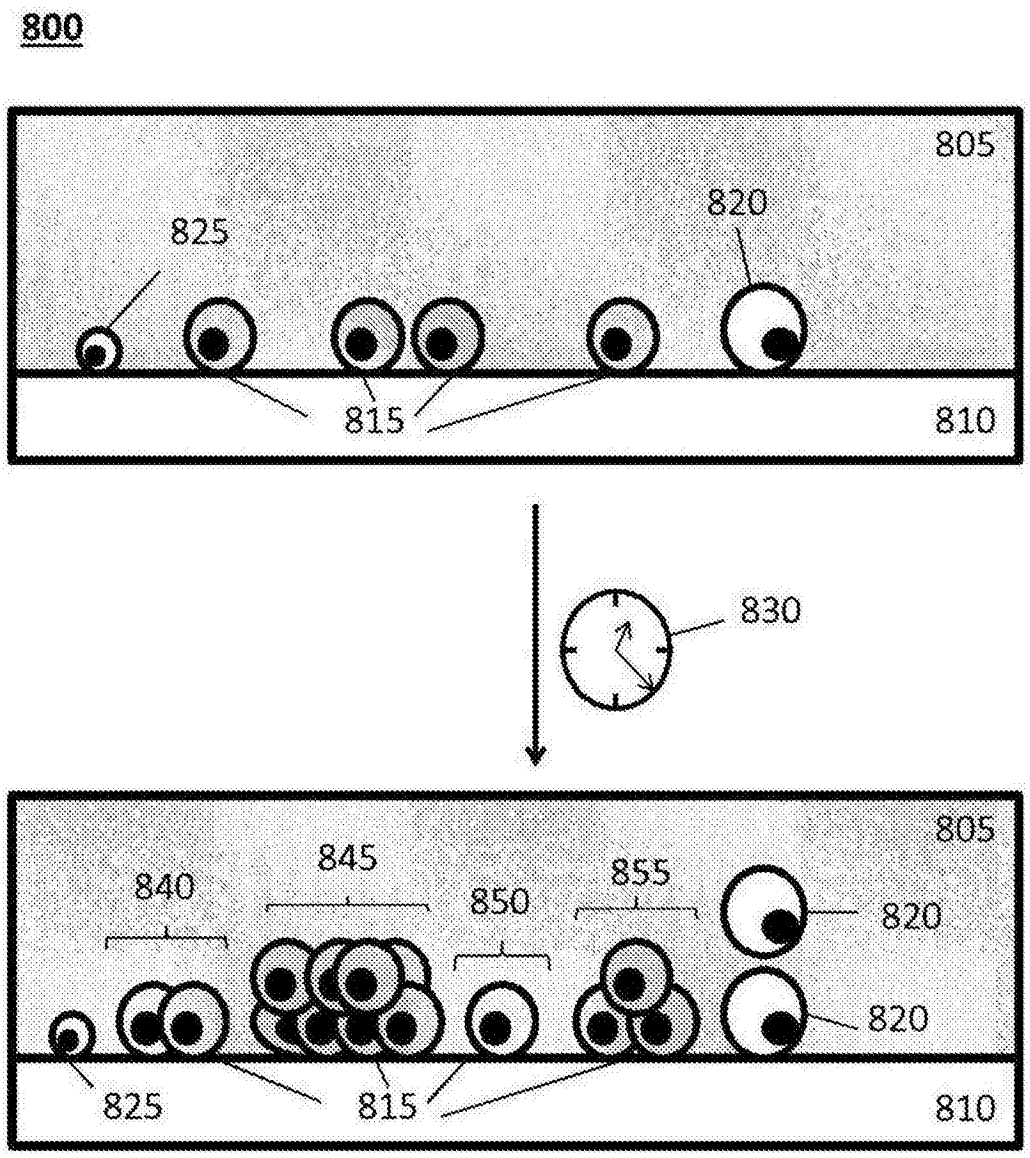

800
805
825
820
815
810
830
805
840
845
850
855
820
820
825
815
810

图8

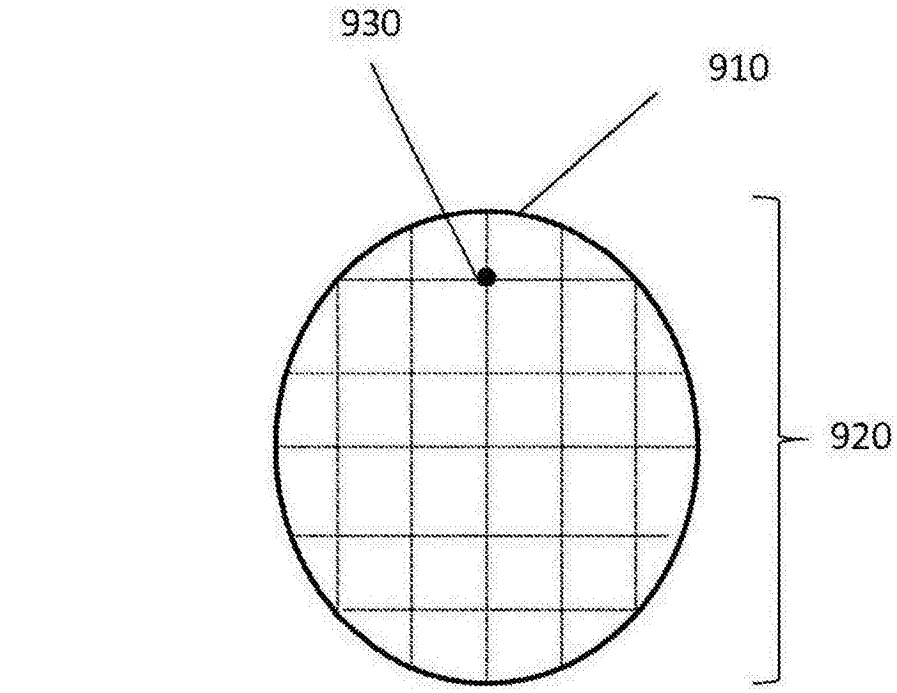


图9

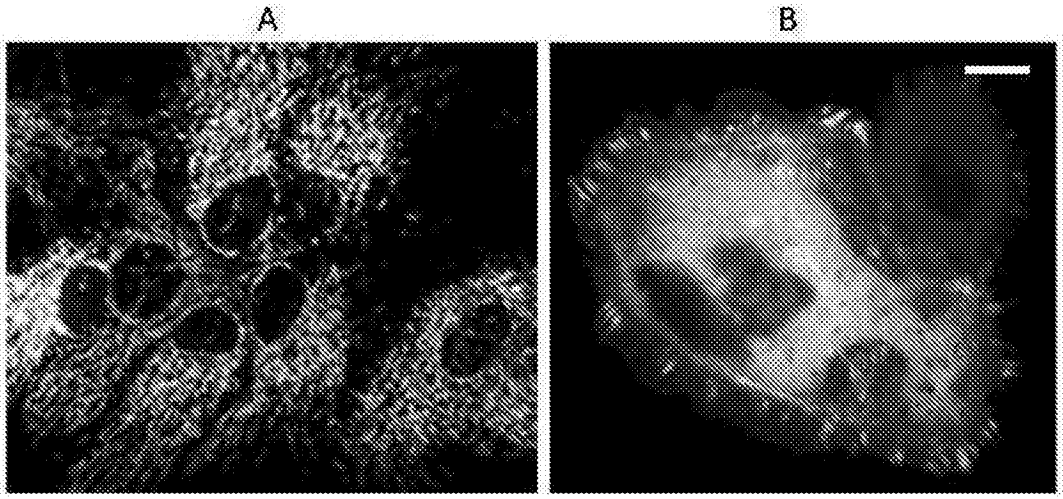


图10

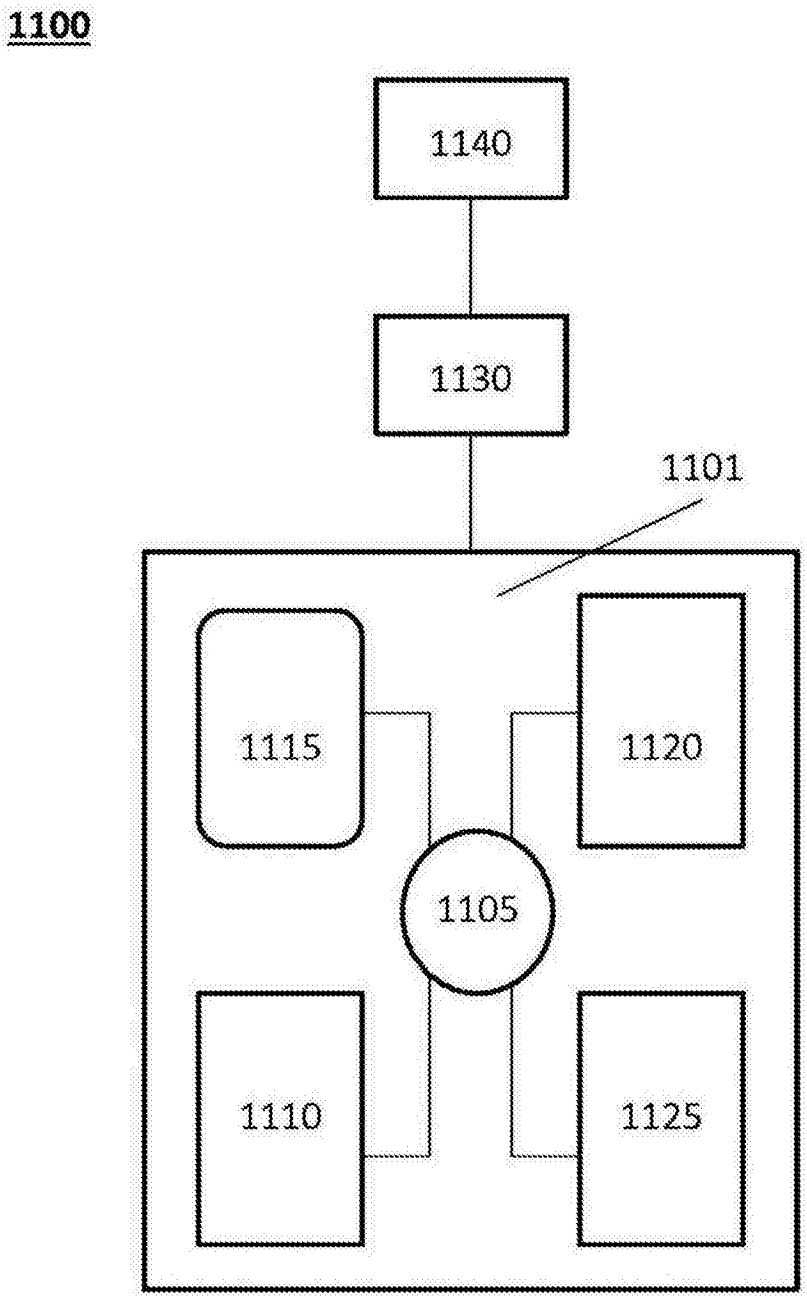


图11

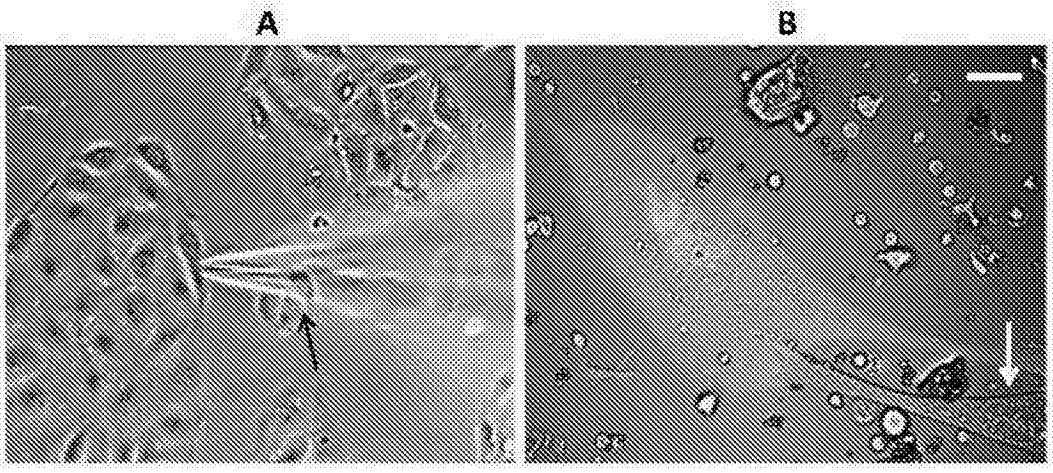


图12

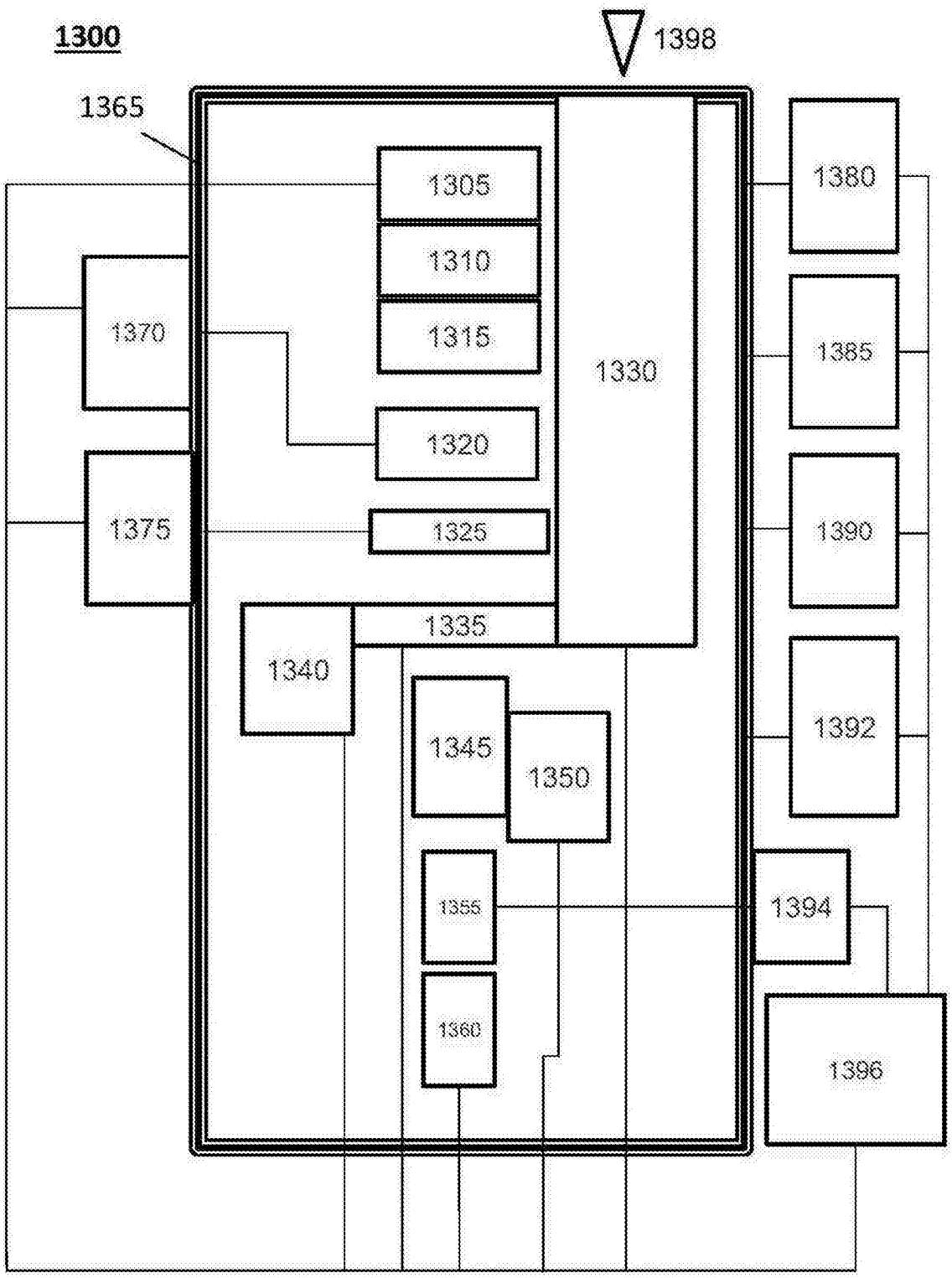

1300
1398
1365
1305
1310
1315
1320
1325
1330
1335
1340
1345
1350
1355
1360
1370
1375
1380
1385
1390
1392
1394
1396

图13

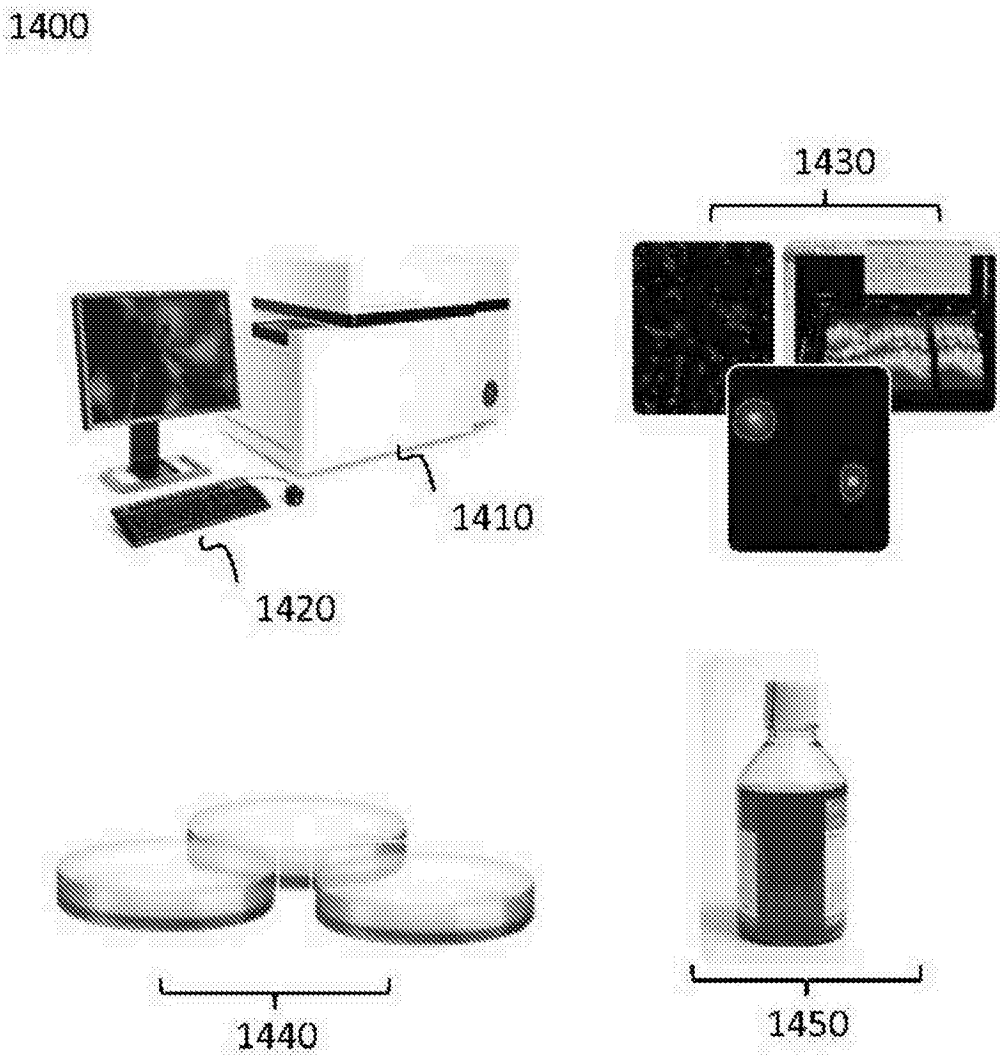


图14

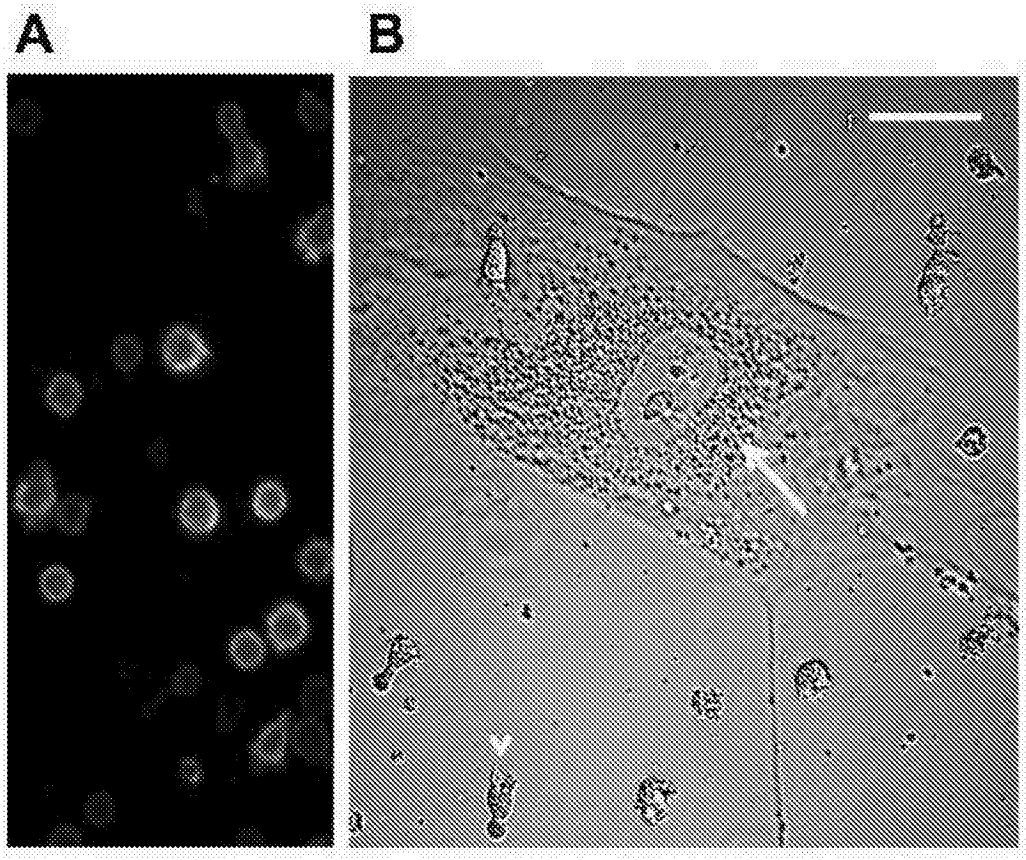


图15

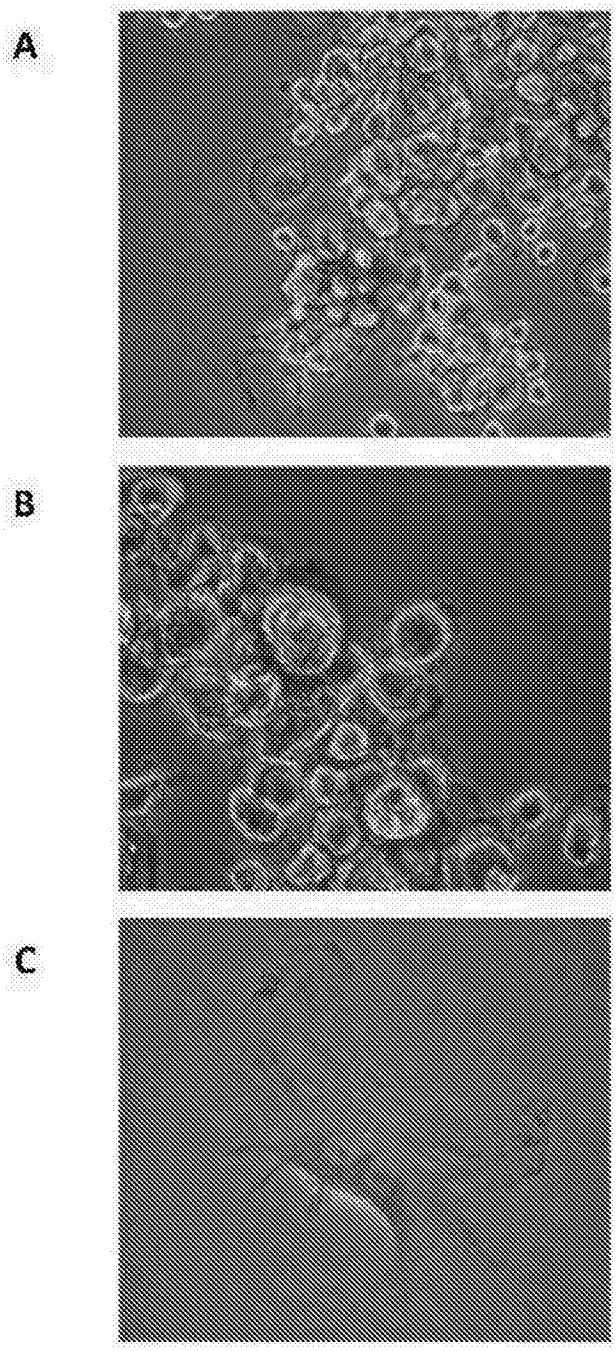


图16

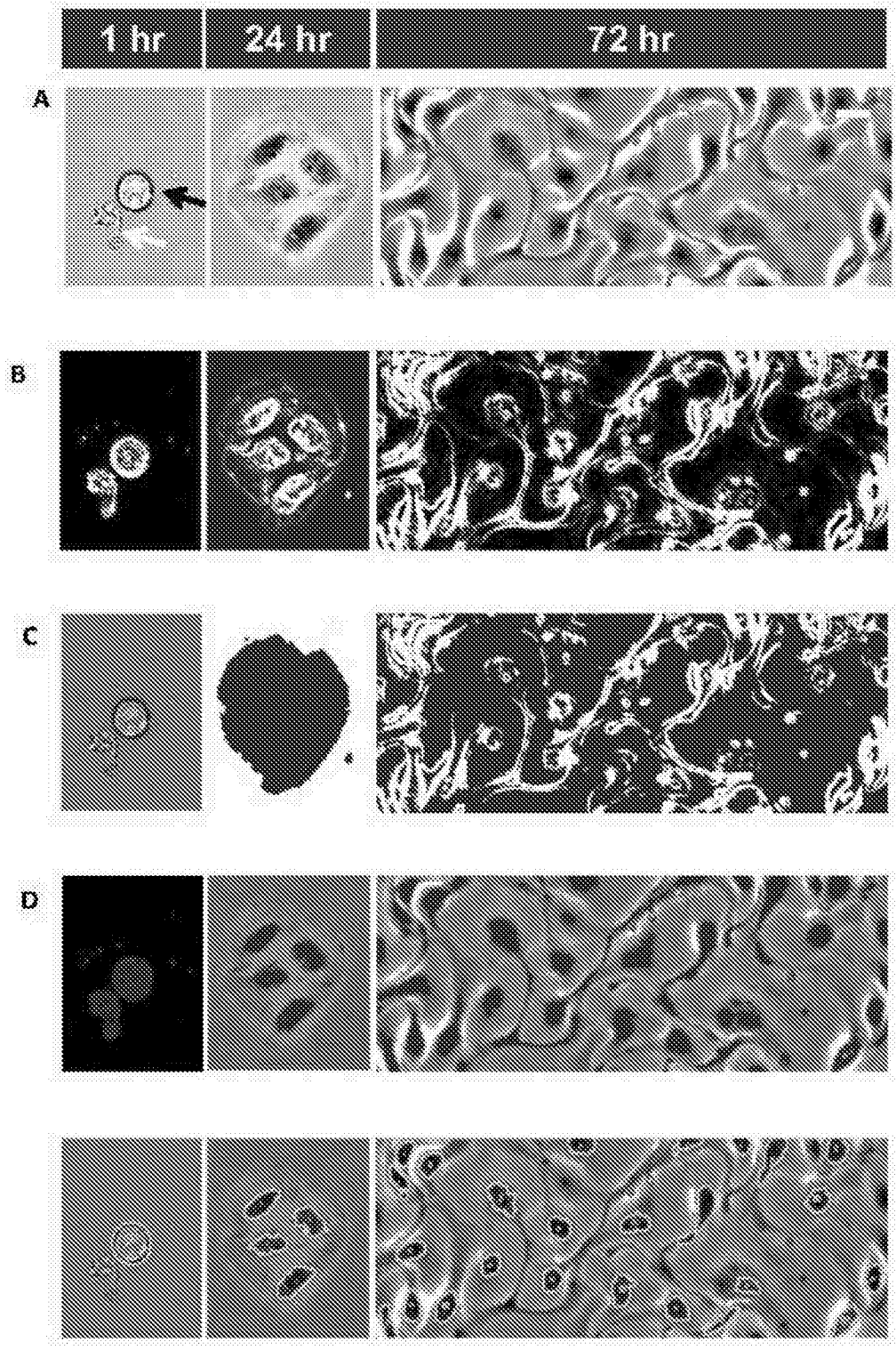


图17

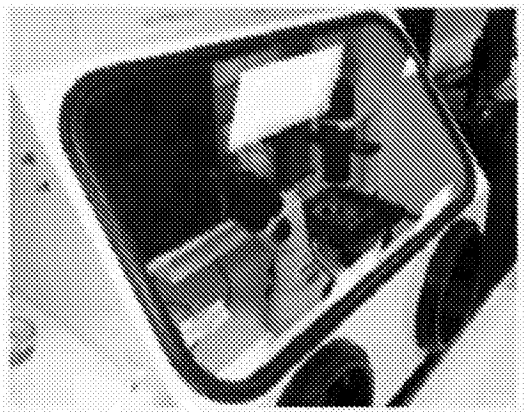


图18

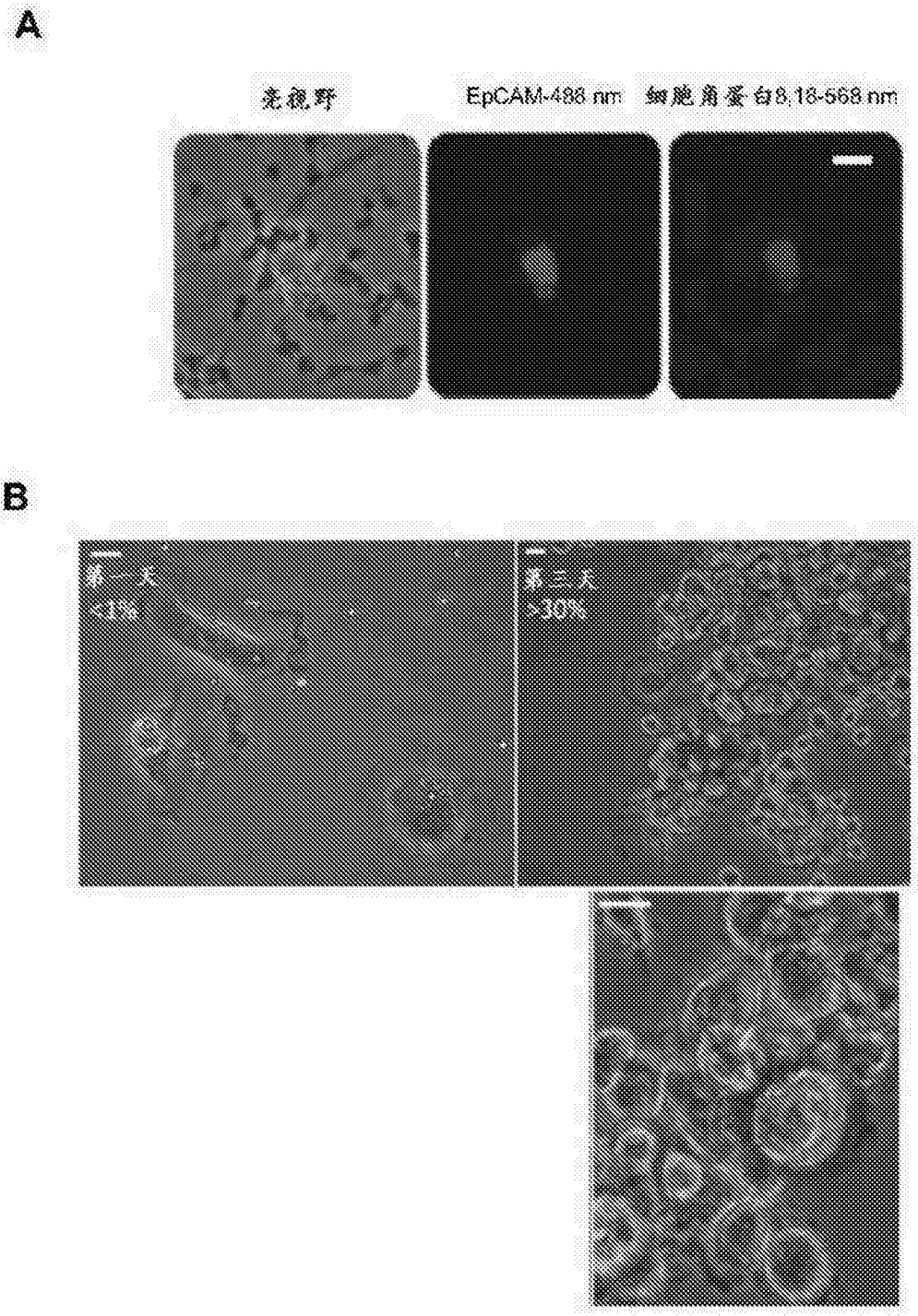


图19

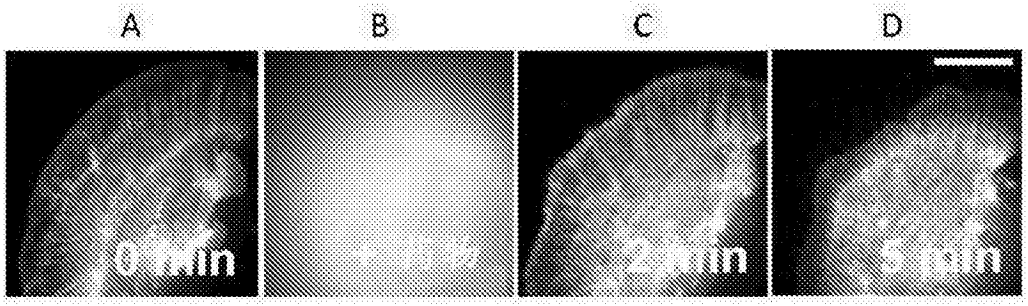


图20