



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104781007 B

(45)授权公告日 2017. 11. 17

(21)申请号 201380058487.2

J.J.叶

(22)申请日 2013.11.08

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104781007 A

代理人 权陆军 黄希贵

(43)申请公布日 2015.07.15

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/724753 2012.11.09 US

B01L 3/00(2006.01)

G12N 9/64(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.05.08

(56)对比文件

WO 02/20825 A1,2002.03.14,全文.

WO 2005/043121 A2,2005.05.12,全文.

WO 2008/131048 A2,2008.10.30,全文.

CN 102405411 A,2012.04.04,权利要求1、

18,52-60.

CN 202279815 U,2012.06.20,全文.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/073381 2013.11.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/072465 EN 2014.05.15

审查员 赵婵

(73)专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 G.A.马丁 S.索珀 M.韦特克

权利要求书1页 说明书15页 附图2页

(54)发明名称

循环肿瘤细胞的体外捕获和分析

(57)摘要

本发明提供了使用seprase特异性的亲和试剂捕获循环肿瘤细胞(CTC)以及各种趋异CTC表型的方法和组合物。也公开了在体内和在体外分析CTC和评估它们的转移潜力的方法。

1. 一种从样品捕获循环肿瘤细胞的方法,所述方法包括:使所述样品与靶向哺乳动物seprase的亲试剂和靶向EpCAM的亲试剂接触以捕获循环肿瘤细胞,其中所述靶向哺乳动物seprase的亲试剂和靶向EpCAM的亲试剂被固定化在固体支持物的表面上。

2. 根据权利要求1的方法,其中靶向seprase的亲试剂是seprase的竞争性的或非竞争性的抑制剂。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中所述靶向哺乳动物seprase的亲试剂是seprase的抗体、核酸适体、肽适体或肽配体。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述seprase的肽配体选自Ac-Gly-脯氨酸硼酸(Ac-Gly-BoroPro)和甘氨酸基脯氨酸二苯基膦酸酯。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶向哺乳动物EpCAM的亲试剂是抗体。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中连续地或同时地施加所述靶向哺乳动物seprase的亲试剂和靶向哺乳动物EpCAM的亲试剂。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中固体支持物是微观流体装置的一部分。

8. 前述权利要求1-2中的任一项所述的方法,所述方法进一步包括释放捕获的循环肿瘤细胞的步骤。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中通过加入过量的可溶性的seprase-结合剂、通过加入抗生物素蛋白化合物或通过光裂解或通过酶促降解双功能接头来实现释放。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述双功能接头具有可以酶促地或化学地切割的位点。

11. 前述权利要求1-2中的任一项所述的方法,其中所述样品是得自携带肿瘤的患者肿瘤样品或血液样品。

12. 靶向seprase的亲试剂和靶向EpCAM的亲试剂在制备用于检测恶性肿瘤在患者中的存在的装置中的用途。

13. 靶向seprase的亲试剂和靶向EpCAM的亲试剂在制备用于评估在携带或已经携带肿瘤的患者中发展转移性肿瘤的风险的装置中的用途。

14. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括在捕获的细胞中检测下述生物标记中的一种或多种的步骤: CD146、CK5、CK7、CK18、CK19、CD44、Cd44v6、EphB4、IGF-1R、BCL2、HER2、HER3、CA19-9、CEA、CD133、MUC1、N-钙粘着蛋白、存活蛋白、EGFR、KRAS、BRAF、p53、Pi3KCA、PTEN、KRT19、CD34、CD24、ACT2、VIM、NANOG、CXCR4和TWIST1。

循环肿瘤细胞的体外捕获和分析

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症生物学的领域,且更具体地,涉及用于体外捕获和分析循环肿瘤细胞(癌症转移源)的方法和组合物。

背景技术

[0002] 向远端器官的转移造成癌症死亡的大多数。循环肿瘤细胞(CTC)起源于原发肿瘤并启动最终导致转移性肿瘤出现在远端部位的转移级联,参见Sun等人(2011) *Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance*, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 137:1151-1173。可以使用几种遗传学的、形态学的、免疫学的和生理学的试验来鉴别CTC,参见上文出处,和Man, 等人(2011) *Currently used markers for CTC isolation - advantages, limitations and impact on cancer prognosis*, J. Clin. Exper. Pathol. 1:1。因为即使在具有晚期转移性疾病的患者的外周血中的CTC的数目,与正常血细胞的数目相比而言是极低的(十亿分之一),所以阳性选择是用于CTC的计数和分离的常用方法。可以使用抗体捕获CTC,所述抗体针对在许多CTC的细胞膜内表达的上皮细胞粘附分子(EpCAM)。选择以后,最终使用靶向活细胞的试剂、白细胞特异性的标记和肿瘤特异性的标记的组合通过免疫染色鉴别出CTC。例如,FDA批准的CELLSEARCH® CTC试验(Veridex, LLC, Raritan, N.J./USA)使用平衡携带在顺磁珠子上的抗-EpCAM单克隆抗体检测CTC,随后使用DAPI、细胞角蛋白(CK)和CD45进行CTC鉴别,参见Hayes, D.F. 和Smerage, J. (2008) *Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer?* Clin. Cancer Res., 14:3646-3650; Cristofanilli, M., 等人(2004) *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N. Engl. J. Med., 351:781-791。但是,报告已经提出,该方案不会捕获低表达或不表达EpCAM的细胞;并且所述测定显示出对转移性病例的差的灵敏度和特异性,参见Lu, J. 等人(2010) *Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients*. Intl. J. of Cancer, 126:669-683; Sieuwerts, A.M. 等人(2009) *Anti-epithelial adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells*. J Natl Cancer Inst, 101:61-66。但是,低表达或不表达EpCAM的细胞也可能在临床上是非常重要的。已经提出,表达侵袭表型的肿瘤细胞在被称作上皮-间充质转换(EMT)的过程中减量调节和丧失它们的上皮抗原(包括EpCAM),参见Mego, M. 等人(2010) *Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications*, Nat. Rev. Clin. Oncol., 7:693-701; Brabletz, T. 等人(2005) *Invasion and metastasis in colorectal cancer: Epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and Beta-catenin*, Cell Tissues Organs, 179:56-65; Raimondi, C. 等人(2011) *Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor*

cells from breast cancer patients, Breast Cancer Res, 130:449-455。还已经提出, CTC含有除了上皮表型以外的表型连续统的亚群。因此,尝试通过靶向单独的EpCAM来捕获所有的CTC亚群(特别是即使有也仅具有极微小的EpCAM表达的侵袭性亚群)可能是无效的,参见Sabile, A. 等人(1999) *Efficiency of Ber-EP4 antibody for isolating circulating epithelial tumor cells before RT-PCR detection*, Am. J. Clin. Pathol., 112:171-178; Thurm, H., 等人(2003) *Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy*, Clin. Cancer Res., 9:2598-2604。这被以下观察结果进一步证实:1克基于上皮的肿瘤可以释放至多 10^6 个细胞/天(参见Butler, T.P. 等人(1975) *Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma*. Cancer Res., 35, 512-516)。尽管显然并非所有这些细胞都具有启动转移的能力,但一些罕见的和难以捉摸的亚群具有该能力。

[0003] 可能使用抗体的组合来选择CTC亚群,例如,与针对各种肿瘤标记(例如,HER2或雌激素受体)的抗体组合的CD45抗体。BioCept, Inc. (San Diego, California/USA)提供了示例性试验。但是,在这样的试验中一般使用的抗体混合物使用无限增殖化的细胞系来产生,所述细胞系可能不会真实地重演在从患者肿瘤释放的CTC中发生的连续变化,参见Pecot, C.V. 等人(2011) *A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs*, Cancer Discovery, 1(7):580-586。因此,需要能够有效地检测和靶向存在于患者样品中的CTC的罕见侵袭性亚群的方法。

发明内容

[0004] 在一个实施方案中,本发明是一种从样品捕获循环肿瘤细胞的方法,所述方法包括:使所述样品与靶向哺乳动物seprase的亲试剂接触,所述亲和试剂任选地固定化在固体支持物的表面上。在该实施方案的变体中,所述靶向seprase的亲试剂是seprase的竞争性的或非竞争性的抑制剂、抗体、seprase的核酸适体或肽适体或肽配体,例如,Ac-Gly-脯氨酸硼酸(Ac-Gly-BoroPro)或脯氨酸二苯基膦酸酯(Gly-ProP(OPh)₂)。承载所述靶向seprase的亲试剂的固体支持物可以是微观流体装置的一部分。所述方法可以进一步包括以下步骤:通过加入过量的可溶性的seprase-结合剂或抗生物素蛋白化合物,或通过光裂解,或通过酶促降解用于将循环肿瘤细胞亲和试剂附着于固体表面的双功能接头,释放捕获的循环肿瘤细胞。

[0005] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在捕获的细胞中检测下述生物标记中的一种或多种的步骤:EpCAM、CD146、CK5、CK7、CK18、CK19、Cd44v6、EphB4、FAP (seprase)、IGF-1R、BCL2、HER2、HER3、CA19-9、CEA、CD133、MUC1、N-钙粘着蛋白、存活蛋白、EGFR、KRAS、BRAF、p53、Pi3KCA、PTEN、KRT19、CD34、CD24、ACT2、VIM、NANOG、CXCR4和TWIST1。

[0006] 在另一个实施方案中,本发明是一种通过使用靶向哺乳动物seprase的亲试剂从患者样品捕获循环肿瘤细胞来检测恶性肿瘤在患者中的存在的方法。所述患者样品可以包含全血、体液、任何含有细胞的血液级分、片段化的肿瘤、肿瘤细胞悬浮液、或从患者样品确立的细胞培养物、或培养物上清液、或从患者肿瘤确立的异种移植植物。

[0007] 在另一个实施方案中,本发明是一种通过使用靶向哺乳动物seprase的亲试剂

从患者样品捕获循环肿瘤细胞来评估在携带或已经携带肿瘤的患者中发展转移性肿瘤的风险的方法。所述患者样品可以包含全血、体液、任何含有细胞的血液级分、片段化的肿瘤、肿瘤细胞悬浮液、或从患者样品确立的细胞培养物、或培养物上清液或从患者肿瘤确立的异种移植。在该实施方案的变体中，所述方法进一步包括以下步骤：在捕获的细胞中检测下述生物标记中的一种或多种：EpCAM、CD146、CK5、CK7、CK18、CK19、CD44、Cd44v6、EphB4、IGF-1R、BCL2、HER2、HER3、CA19-9、CEA、CD133、MUC1、N-钙粘着蛋白、存活蛋白、EGFR、KRAS、BRAF、p53、Pi3KCA、PTEN、KRT19、CD34、CD24、ACT2、VIM、NANOG、CXCR4和TWIST1。

[0008] 在另一个实施方案中，本发明是一种用于从液体捕获或分离选择的细胞的微观流体装置，该装置包括一个或多个具有多个平行通道的模块，所述通道连接至共同输入和共同输出，所述通道的内表面的至少部分被共价地连接至对哺乳动物seprase蛋白具有特异性的捕获元件。在该实施方案的变体中，所述捕获元件可以是对哺乳动物seprase蛋白具有特异性的单克隆抗体、seprase的核酸适体分子或肽适体分子或肽配体分子。在该实施方案的变体中，所述装置含有至少一个包含对哺乳动物seprase蛋白具有特异性的捕获元件的模块，而其它模块含有对哺乳动物EpCAM蛋白或针对不同表型的另一种哺乳动物标记（例如，CD146蛋白）具有特异性的捕获元件。在该实施方案的其它变体中，所述装置进一步包含至少一个用于分析分离的细胞的模块。

附图说明

[0009] 图1是用于实践本发明的一种示例性微观流体装置的图解。

[0010] 图2是用于从血液分离EpCAM和seprase CTC两者并随后进行CTC计数的串联连接的CTC芯片的图解。

具体实施方式

[0011] 定义

[0012] 为了促进本公开内容的理解，提供了本文中使用的术语的以下定义。

[0013] 术语“亲和试剂”表示能够特异性地结合如本文中定义的它的靶的试剂。

[0014] 术语“生物反应器”表示支持生物学活性环境的装置，其中细胞或组织可以先体外后体内生长。

[0015] 术语“结合”和“特异性地结合”可互换地用于表示试剂的选择性地结合它的靶的能力。一般，通过 10^4M^{-1} 至 10^{12}M^{-1} 的解离常数来表征特异性。可以采用使用适当对照的经验方法来区分在特定情况下的特异性结合和非特异性结合。

[0016] 术语“癌细胞”和“肿瘤细胞”可互换地用于表示从癌症或肿瘤、或从肿瘤细胞系或肿瘤细胞培养物衍生出的细胞。

[0017] 术语“转移性细胞”或“转移性肿瘤细胞”表示具有产生转移的能力或已经是转移性肿瘤的一部分的细胞。

[0018] 术语“循环肿瘤细胞”或“CTC”表示在具有肿瘤的患者循环中发现的肿瘤细胞。该术语一般不包括血液学肿瘤，在该情况下，大多数肿瘤存在于循环中。

[0019] 术语“基质”或“固体支持物”可互换地用于表示存在于例如容器或室中的固体材料。固体支持物可以布置有试剂，例如亲和试剂。固体支持物也可以支持通过生物学的、化

学的或静电的力和方法实现的细胞粘附。

[0020] 术语“原发性肿瘤”表示在癌症起源部位处生长的肿瘤。

[0021] 术语“转移性肿瘤”表示在不同于癌症起源部位的部位处生长的继发性肿瘤。

[0022] 术语“细胞系”表示通过细胞培养已经获得了在体外无限增殖的能力的细胞群体。

[0023] 术语“原代细胞培养物”表示在研究过程中从生物体确立的细胞培养物。原代细胞培养物可以产生或不产生细胞系。

[0024] 术语“确立的细胞系”表示在研究之前在体外繁殖多次的细胞系。

[0025] 术语“生物标记”表示表征表型的生物学标记。生物标记一般包括基因或基因产物。取决于基因，“检测生物标记”可以包括检测改变的基因表达、外遗传修饰、种系或体细胞突变等。在基因产物的情况下，“检测生物标记”可以是指，检测细胞表面标记、可溶性化合物诸如细胞因子等的存在、量或量的变化。“检测生物标记”还可以包括检测基因表达(mRNA或蛋白)或反映基因的表达或活性的代谢物。

[0026] 术语“靶向试剂”与“亲和试剂”同义，且表示能够通过分子的特异性结合而靶向所述分子的试剂。

[0027] 术语“肿瘤生物标记”或“癌症生物标记”表示肿瘤或癌症特有的生物标记，但是正常组织不具有。

[0028] 术语“肿瘤”表示已知具有转移潜力的任何类型的恶性实体瘤，包括、但不限于，肺癌(例如，非小细胞肺癌(NSCLC))、骨癌、胰腺癌、头或颈的癌症、黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、胃癌、乳腺癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌(例如，肾细胞癌)、肝癌(例如，肝细胞癌)和中枢神经系统(CNS)的癌症(例如，神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤或星细胞瘤)。

[0029] 基因和蛋白名称“seprase”与同义词“成纤维细胞活化蛋白 α ”、“FAP α ”和“FAP”可互换地用于表示相同的基因或它的蛋白产物。

[0030] 本发明包括富集这样的CTC的亚群的方法：所述CTC已经丧失它们的上皮表型的一些或所有特征，且表现出更侵袭性的行为。本发明利用seprase作为靶分子用于捕获和富集CTC进行进一步表征。Seprase蛋白描述在美国专利号5,767,242中。Seprase也被称作成纤维细胞活化蛋白 α (FAP α)和DPP-5，是已经被表明参与细胞外基质(ECM)的降解和增强肿瘤生长和增殖的蛋白酶(明胶酶)。Seprase是膜束缚的蛋白，其作为包含2个N-糖基化的(glycosylated)97 kDa亚基的170 kDa同二聚体存在。Seprase也以具有名称抗纤维蛋白溶素切割酶(Antiplasmin Cleaving Enzyme, APCE)的可溶形式存在，参见Lee, K., 等人(2006) *Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein*, Blood, 107:1397-1404。

[0031] 在结构上，seprase含有大C-末端细胞外结构域、疏水跨膜结构域和短细胞质尾巴。令人感兴趣的是，seprase在肿瘤细胞表面上的分布是不均匀的：它主要存在于人恶性肿瘤细胞的侵袭前部，特别是在侵袭性伪足(invadopodia)(可以与细胞外基质结合的膜突出物)内，参见Edosada, C.Y., 等人(2006) *Selective Inhibition of Fibroblast Activation Protein Protease Based on Dipeptide Substrate Specificity*, J. Biol. Chem., 281: 7437-7444; Mori Y., 等人(2004) *The expression of a type II transmembrane serine protease (Seprase) in human gastric carcinoma*, Oncology,

67:411-419; O'Brien, P., 等人(2008) *Seprase: an overview of an important matrix serine protease*, Biochim Biophys Acta, 1784:1130-1145; Monsky, M.J. 等人(1994) *A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells*, Cancer Research, 54:5702-5710; Mueller, S.C., 等人(1999) *A Novel Protease-docking Function of Integrin at Invadopodia*, J. Biol. Chem., 274: 24947-24952。

[0032] 已经发现Seprase在>90%的人上皮癌中在细胞表面上超表达,但是在非癌性组织和良性上皮肿瘤的成纤维细胞中不存在(参见Aertgeerts, K., 等人(2005) *Structural and Kinetic Analysis of the Substrate Specificity of Human Fibroblast Activation Protein*, J. Biol. Chem., 280:19441-19444)。分离的CTC的研究表明,被抗-EpCAM抗体捕获的细胞群体不表达seprase;而在使用它们与细胞粘附基质(CAM)蛋白的亲合力捕获的细胞群体中,仅一些表达seprase (参见Lu, J., 等人(2010) *Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients*, Intl J. Cancer, 126: 669-683)。已知的是,在转移过程期间,细胞外基质(ECM)的蛋白水解性降解;且此外,对细胞粘附基质(CAM)具有抗体亲抗原性的侵袭性CTC的一些亚群超表达seprase, 参见上文出处。

[0033] 本发明是一种使用对seprase具有特异性的亲和试剂捕获CTC的方法。在一些实施方案中,CTC分离自患者的样品,所述样品可以源自全血、体液、任何含有细胞的血液级分、片段化的肿瘤、肿瘤细胞悬浮液、或从患者样品确立的细胞培养物、或培养物上清液。在其它实施方案中,CTC分离自确立的细胞系培养物或培养物上清液或实验动物,例如携带异种移植肿瘤的动物。在一些实施方案中,所述方法包括双选择构型:在seprase选择以后,使用对EpCAM具有特异性的亲和试剂进一步选择上皮-样CTC。可替换地,可以分别分离或计数seprase-阳性的和EpCAM-阳性的细胞,并可以得到这样的细胞的比率。seprase-阳性的和EpCAM-阳性的细胞的比率的变化,指示癌症的转移潜力的变化。

[0034] 在一些实施方案中,首先评估特定正常组织或对应肿瘤组织中的seprase表达的水平。例如,可以使用流式细胞术来计算表达seprase的肿瘤中的细胞的百分比。如果观察到百分比低,则可以修改捕获装置中的seprase特异性的捕获试剂的浓度或密度,以确保表达seprase的CTC的结合和捕获的最佳动力学。以相同的方式,首先评估在特定正常组织或对应肿瘤组织中的seprase/EpCAM比率。

[0035] 在一些实施方案中,除了EpCAM以外或作为EpCAM的替代,与上皮-间充质转换有关的其它分子可以用于选择(参见例如,Zeng, Q., 等人(2012) *CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer*, PNAS 109(4):1127-32)。

[0036] 在一些实施方案中,使用seprase-特异性抗体捕获表达seprase的细胞群体,包括CTC。Seprase-特异性抗体可得自商业来源(例如,Antibody Resource, Cambridgeshire, UK)。可替换地,使用本领域已知的方法,可以从头产生seprase-特异性抗体,参见例如,Howard和Kaser, 编, (2006) *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, CRC Press; Harlow和Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL Press。任选地,使用抗-EpCAM抗体,可以完成二次选择。EpCAM特异性抗体可广泛地得自多个供应商,

例如, OriGene Tech., Rockville, Md./USA。进一步选择可以采用其它抗体, 例如, 对 CD146 具有特异性的抗体 (American Research Products, Inc., Waltham, Mass./USA)。

[0037] 在另一个实施方案中, 所述捕获分子是 seprase 配体或 seprase 的抑制剂。在一些实施方案中, 所述配体或所述抑制剂是肽。示例性的肽是 Ac-Gly-脯氨酸硼酸 (Ac-Gly-BoroPro) 和脯氨酸二苯基膦酸酯 (Gly-ProP (OPh)₂)、在美国专利号 7,374,898 中描述的八肽和环状八肽。这些配体已经被广泛地表征, 且表现出对 seprase 的有利亲和力, 参见 Edosada, C.Y., 等人 (2006) *Selective Inhibition of Fibroblast Activation Protein Protease Based on Dipeptide Substrate Specificity*. J. Biol. Chem., 281:7437-7444; 和 Aertgeerts, K., 等人 (2005) *Structural and Kinetic Analysis of the Substrate Specificity of Human Fibroblast Activation Protein*, J. Biol. Chem., 280:19441-19444。本领域技术人员使用例如在以下文献中描述的肽选择方法, 可以在体外产生 seprase 的其它肽配体: Bartoli, L., 等人 (2007) *A computational approach for detecting peptidases and their specific inhibitors at the genome level*, BMC Bioinformatics 3月8日; 8增刊1:S3; 或 Yagi, Y., 等人 (2007) *In silico panning for a non-competitive peptide inhibitor*, BMC Bioinformatics, 1月12日; 8:11。

[0038] 在另一个实施方案中, 所述捕获分子是肽或核酸适体。通过本领域已知的任意方法, 可以从寡核苷酸或肽文库中选择这样的适体。经由 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, 通过指数富集对配体的系统进化), 可以选择核酸适体, 参见 Oliphant AR, 等人 (1989) *Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 proteins*, Mol. Cell Biol. 9:2944-2949。使用酵母或细菌双杂交系统, 可以选择肽适体, 参见 Fields, S., Song, O. (1989) *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*, Nature 340 (6230): 245-6; Joung, J., 等人 (2000) *A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (13): 7382-7。

[0039] 在一些实施方案中, 本发明是一种能够从患者样品捕获 CTC 的装置。所述装置包含固定化在固体表面上的靶向 seprase 的亲试剂。所述固体表面可以包含基于聚合物的基质, 所述基质布置有靶向 seprase, 和任选地、额外地或平行地靶向 EpCAM 的亲试剂。在一些实施方案中, 所述表达 seprase 的细胞群体 (包括 CTC) 被捕获在装置中, 所述装置含有布置有抗-seprase 抗体的表面。任选地, 可以使用二次选择, 其中所述装置含有布置有抗-EpCAM 或抗-CD146 抗体或任何其它目标抗体的表面。在一些实施方案中, 可以组合亲和试剂 (例如, seprase 特异性的抗体和 EpCAM-特异性抗体) 以形成混合单层, 而在其它实施方案中, 所述 seprase 特异性的抗体和 EpCAM-特异性抗体位于连续床中 (以任一种次序定位)。在另外其它的实施方案中, 表达 seprase 的 CTC 被捕获在装置中, 所述装置含有布置有或包被有 seprase 的肽配体的表面, 所述肽配体是例如 Ac-Gly-脯氨酸硼酸 (Ac-Gly-BoroPro) 和脯氨酸二苯基膦酸酯 (Gly-ProP (OPh)₂)。根据本领域已知的体外和在计算机芯片上肽选择方法, 可以选择其它合适的肽。在另一个实施方案中, 使用对 seprase 具有特异性的肽或核酸

适体,捕获表达seprase的CTC。在一些实施方案中,所述装置是微观流体装置,其可以与整合进具有自动化的工作流的功能系统中的流体主板(fluidic motherboard)接口。在这样的装置中,在流体主板上构造一个或多个CTC选择模块,从而使得细胞一旦被释放,它们就可以进一步被富集和进行免疫学和分子概况分析(profiling)。

[0040] 一般,所述微观流体装置适合于接纳和处理检测在患者样品中以极低的比率发生的CTC所必需的大体积的样品。为此目的,所述装置可以配有多个接纳样品的线性流动的通道。对于表达seprase或EpCAM的细胞的最大回收率而言最佳的线性流动速度可以由微观流体领域的技术人员通过实验来确定。

[0041] 在一些实施方案中,所述分析型细胞捕获装置以使表达seprase的细胞向装置表面的附着最大化的方式构造。例如,可以使用紫外线使表面变粗糙。此外,在一些实施方案中,装置的表面可以是有纳米纹理(nanotextured)的,以产生促进CTC的捕获和保留的微观结构。例如,可以如例如以下文献所述处理表面以产生纳米柱(nanopillar):Wang, S., 等人(2009) *Three-dimensional nanostructured substrates toward efficient capture of circulating tumor cells*, *Angewandte Chemie Int'l. Edition*, 48:8970-8973。通常适合用于选择循环肿瘤细胞的一个示例性装置描述在例如于2009年11月19日公开的国际申请WO 2009/140326中。

[0042] 一个示例性的装置显示在图1中。图1中的装置含有多个捕获模块,每个包封正弦曲线形状的通道,所述通道含有布置有用于选择的亲和试剂的内表面。图1中的装置具有2个捕获模块:一个针对seprase,且一个针对EpCAM,以连续构型排列(一个模块的输出用作第二个模块的输入)。熟练的从业人员将认识到,可以添加额外的模块。根据本发明,也可以颠倒亲和选择步骤的次序。在另一个替代方案中,选择模块可以以平行构型操作,其中将输入样品分离以同时每个CTC选择模块中运行。在另一个替代方案中,可以使用具有2种或更多种抗体的混合物的单个模块。所述装置具有用于洗涤缓冲液、废物收集和其它试剂的容器。所述装置具有多个阀(V)以导流。在选择以后,将细胞引导至任选的计数模块和任选的染色模块。各种细胞计数装置和方法是本领域已知的,且可以由熟练的从业人员采用。例如,计数模块可以含有电极对,从而使得使用单细胞阻抗可以鉴别和计数细胞,参见T. Sun和H. Morgan (2010) *Single-Cell Microfluidic Impedance Cytometry: A Review*, *Microfluid Nanofluid*, 8:423-443和其中的引文。染色模块被构造成接收各种染色试剂,例如,染料(DAPI)和标记的抗体(其对细胞角蛋白(CK)、CD45和任意其它感兴趣的靶具有特异性)。所述装置输出递送选择的细胞用于进一步加工,例如,根据本发明的分子分析。

[0043] 在一些实施方案中,可能合乎需要的是,为了进一步分析而释放含有CTC的细胞亚群,所述细胞亚群使用附着于固体表面的靶向seprase的亲和试剂和进一步任选的附着于固体表面的靶向EpCAM的亲和试剂捕获。所述释放可以如下完成:切割将亲和试剂束缚至固体基质的键,或从亲和试剂置换捕获的细胞。

[0044] 在一个实施方案中,本发明的方法利用捕获抗体的可切割的双功能接头(例如,在双功能接头内所含的光可切割的基团或化学基团),以实现捕获的细胞的释放。本领域技术人员可得到几种光可切割的接头,参见,例如Kanoh, N., 等人(2010) *Cleavable linker for photo-cross-linked small-molecule affinity matrix*, *Bioconjug. Chem.* 21: 182-186和其中引用的参考文献。光可切割的接头是用于临床应用的理想候选物,其中将细

胞选择模块使用一次并随后抛弃。这些双功能接头可以具有不同的长度和组成,诸如含有光可切割的残基或可以酶促地切割的脱碱基位点的单链寡核苷酸。

[0045] 在另一个实施方案中,本发明利用抗生物素蛋白化合物,例如,抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、硝基抗生物素蛋白(nitroavidin)或中和抗生物素蛋白(neutravidin),它们与生物素化的捕获抗体相互作用以实现细胞的捕获和释放。在硝基抗生物素蛋白的情况下,在溶液的pH从中性变为碱性时,抗生物素蛋白化合物从生物素化的抗体的生物素部分分解离。该实施方案的优点是再生结合表面的能力。

[0046] 在另一个实施方案中,在使用肽抑制剂、配体或其它结合配偶体捕获细胞以实现捕获的细胞的释放时,通过加入过量的可溶形式的结合剂使细胞从基质解离。

[0047] 在另一个实施方案中,在核酸适体充当亲和试剂时,可以使用过量的可溶形式的亲和适体的互补体来释放选择的CTC。在热变性以后,可以容易地再生这样的布置有适体的捕获表面。

[0048] 在一些实施方案中,将捕获的包括CTC的细胞亚群从亲和试剂释放并进行进一步分析。在一些实施方案中,在例如用苏木精和伊红(H&E)或其它示差染料染色(例如,PROTOCOL[®]HEMA 3染色法)以后,对细胞进行显微镜检查。可以将所有细胞用荧光核酸结合染料(诸如Hoechst 33342或DAPI)染色,以辅助从细胞碎片中区分细胞。可以将使用下述各种标记时表现出阳性染色的细胞鉴别为CTC,计数,并进一步表征。

[0049] 几种生物标记以及形态学的、免疫学和生理学的试验或它们的组合可以用于在使用本发明的方法捕获的细胞中鉴别CTC,参见,例如,Sun等人(2011), *Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance*, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 137:1151-1173; Man, 等人(2011); *Currently used markers for CTC isolation - advantages, limitations and impact on cancer prognosis*, J. Clin. Exper. Pathol. 1:1。例如,通过它们的附着于细胞粘附分子(CAM)的能力,以及通过某些特定生物标记(包括EpCAM、细胞角蛋白(CK) 5、7、18和19、CD44v6或N-钙粘着蛋白)的存在,可以鉴别CTC。取决于起源肿瘤,也可以基于肿瘤特异性的生物标记的存在来鉴别CTC,所述生物标记包括EpCAM、CD146、CK5、CK7、CK18、CK19、CD44、Cd44v6、EphB4、FAP (seprase)、IGF-1R、BCL2、HER2、HER3、CA19-9、CEA、CD133、MUC1、N-钙粘着蛋白、存活蛋白、EGFR、KRAS、BRAF、p53、Pi3KCA、PTEN、KRT19、CD34、CD24、ACT2、VIM、NANOG、CXCR4和TWIST。

[0050] 例如,起源于胰的CTC在使用标准的上皮标记和人胰肿瘤标记(EpCAM和CA19-9)时将表现出阳性染色。在本发明的一些实施方案中,使用商购可得的测定,例如,VITA-ASSAY[™] AR16平台(Vitatex, Inc., Stony Brook, N.Y./USA),鉴别CTC。

[0051] 在另一个实施方案中,本发明是一种通过检测患者样品中的表达seprase的细胞来在患者中检测恶性肿瘤的存在或评估既存的或切离的肿瘤的转移潜力的方法。所述样品可以包括全血、体液、任何含有细胞的血液级分、片段化的肿瘤、肿瘤细胞悬浮液、或从患者样品确立的细胞培养物、或培养物上清液。

[0052] 在该实施方案中,可以将捕获的表达seprase的细胞进一步表征为CTC,并评估它们的数目和基因表达谱,所述基因表达谱包括例如生物标记ACT2、IGF-1R、BCL2、HER2、EphB4、CA19-9、CEA、CD24、CD44、CD133、CD146、CXCR4、TWIST1、VIM、NANOG、KRT19、MUC1、存活

蛋白、EGFR、KRAS、BRAF、p53、Pi3KCA和PTEN中的一种或多种。

[0053] 在另一个实施方案中,本发明是一种使用本发明的方法来对比肿瘤或从肿瘤衍生出的CTC中的seprase表达与EpCAM表达的方法。表达seprase的CTC与表达EpCAM的CTC比率可以用于确定肿瘤的转移潜力。

[0054] 在另一个实施方案中,本发明是一种确定具有肿瘤的患者预后的方法,所述方法包括:通过评估表达seprase的CTC与表达EpCAM的CTC的比率,确定肿瘤的转移潜力,其中所述比率的增加指示肿瘤的转移潜力的增加,且从而指示患者的预后不良。通过将实验确定的比率与文件记载的该特定肿瘤类型的表达seprase的CTC与表达EpCAM的CTC的比率进行对比,可以检测表达seprase的CTC与表达EpCAM的CTC比率的增加。可替换地,可以针对特定患者重复评估(监控)表达seprase的CTC与表达EpCAM的CTC的比率,从而可以检测该比率的增加。根据该方法,可以针对已知具有转移潜力的任何恶性实体瘤形成预后,所述恶性实体瘤包括但不限于,肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC))、骨癌、胰癌、头或颈的癌症、黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、胃癌、乳腺癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌(例如,肾细胞癌)、肝癌(例如,肝细胞癌)和中枢神经系统(CNS)的癌症(例如,神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤或星细胞瘤)。

实施例

[0055] 实施例1

[0056] 从胰癌患者的外周血选择Seprase (+)和EpCAM (+)循环肿瘤细胞 (CTC)

[0057] 下述临床测量得自经批准的IRB (University of North Carolina, Chapel Hill, Lineberger Cancer Center)。这些测量意图例证本发明的实施方案,且无意限制本发明的范围。本发明意图包括所有腺癌或实体瘤。

[0058] 材料和方法

[0059] 在热塑性塑料(环烯烃共聚物, COC或聚甲基丙烯酸甲酯, PMMA)中制造用于选择seprase和EpCAM阳性细胞的CTC微芯片。CTC微芯片由包含50个正弦曲线形状的通道的结构组成,所述通道从共同输入发散且会聚进共同输出(参见Adams等人, *Highly Efficient Circulating Tumor Cell Isolation from Whole Blood and Label-Free Enumeration Using Polymer-based Microfluidics with an Integrated Conductivity Sensor*, Journal of the American Chemical Society, 139 (2008) 8633-8641)。正弦曲线通道是30 μ m宽和150 μ m深。

[0060] 聚合物基底和盖板(0.5 mm厚度)购自Good Fellow (Berwyn, PA/USA)。铂丝购自Alfa Aesar (Boston, MA/USA)。聚酰亚胺包被的熔化的二氧化硅毛细管购自Polymicro Technologies (Phoenix, AZ/USA)。用于COC表面清洁和修饰的化学物质包括试剂级异丙醇、1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、胎牛血清和2-(4-吗啉代)-乙磺酸(MES),并且这些购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO/USA)。单克隆抗-EpCAM抗体和抗-seprase抗体得自R & D Systems (Minneapolis, MN/USA)。

[0061] 通过从金属主盘(metal master)微-复制(micro-replication)来制备CTC微芯片。按照以前公布的程序(Huper等人, *Evaluation of Micromilled Metal Mold Masters for the Replication of Microchip Electrophoresis Devices*, Microfluidics and

Nanofluidics, (2007) 3: 1-11), 用高精度微铣机 (micromilling machine) (KERN MMP 2522, KERN Micro- und Feinwerktechnik GmbH & Co. KG; 德国) 在铜板的表面上铣出金属主盘的显微结构。微铣机配有用于自动确定工具长度和半径的激光测量系统 (LaserControl NT, Blum-Novotest GmbH, 德国) 和用于监控铣过程的光学显微镜 (Zoom 6000, Navitar, Inc. Rochester, NY/USA)。在 40,000 rpm 进行微铣。进料速率依赖于铣工具的尺寸, 且一般是在以下范围内: 对于 500 μm 铣刀钻头, 为 200 mm/min; 对于 200 μm 钻头, 为 100 - 150 mm/min; 对于 100 μm 钻头, 为 50 - 75 mm/min; 和对于 50 μm 钻头, 为 10-20 mm/min。一般的铣循环由下述组成: 用 500 μm 铣刀钻头对整个表面的预切割, 以确保铜板的两个面之间的平行和最终铣出的显微结构在整个图案上的均匀高度, 使用 500 或 200 μm 铣刀钻头对显微结构进行粗铣, 和用较小直径铣刀钻头进行精制切割。在模具主件 (mold master) 制造的最后步骤中, 通过机械抛光除去毛刺。在 3 μm 颗粒尺寸抛光纸 (Fibremet Discs - PSA, Buehler, Lake Bluff, IL) 上手工地进行抛光, 随后用 1 μm 金刚石悬浮液 (Metadi Diamond Suspension, Buehler) 在聚丙烯布 (Engis, Wheeling, IL) 上抛光。

[0062] 在聚合物基底和盖板的 UV 修饰以后, 有效地改变表面的物理化学性质, 从而产生在盖板-基底界面处的玻璃化转变温度 (T_g) 的适当下降。使用聚合物盖板和光面的、热浮雕的聚合物基底, 在气相色谱 (GC) 烘箱 (Varian 3400, Palo Alto, CA/USA) 中进行热融合粘合。将基底和盖板对准, 并在 2 个硼硅玻璃板之间夹在一起, 并将该组件置于 GC 的温度可编程的烘箱中, 其中以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度使温度从 50 $^{\circ}\text{C}$ 增加至 150 $^{\circ}\text{C}$ 。在冷却至室温之前, 使温度在 150 $^{\circ}\text{C}$ 保持 15 min。

[0063] 通过铝光掩模进行聚合物基底和盖板的区域特异性的紫外 (UV) 修饰, 以促进羧酸化的支架的形成, 所述支架用于 CTC 微芯片的细胞选择床内排它的定向抗体束缚。在通过热融合粘合进行最终装配之前, 使用 UV 暴露站 (ABM, Inc., San Jose, CA/USA) 将盖板和基底用 15 mW cm^{-2} 能量密度局部地在 254 nm 照射 10 min。

[0064] 使用两步法进行抗体固定化。最初, 在热装配以后, 给 UV 修饰的 CTC 装置加载含有在 pH=6 的 150 mM 2-(4-吗啉代)-乙磺酸 (MES, Fisher Biotech, Fair Lawn, NJ) 和缓冲盐水 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA) 中的 4.0 mg/mL 1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基] 碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、6.0 mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的溶液 1.0 h, 以形成琥珀酰亚胺基酯中间体。然后用包含在 pH = 7.4 的 150 mM PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO/USA) 中的 1.0 mg/mL 针对 EpCAM 的单克隆抗体或单克隆抗-seprase 抗体 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN/USA) 溶液流体动力学地替代 EDC/NHS 溶液, 并允许反应 4 h, 此后用 PBS 溶液 (pH = 7.4) 冲洗 CTC 微芯片以除去任何非特异性地结合的抗体。

[0065] 使用 CTC 微芯片使用 PHD2000 注射泵 (Harvard Apparatus, Holliston, MA/USA) 流体动力学地处理样品。为了使微芯片与泵接口, 给 luer 锁紧接口注射器 (Hamilton, Reno, NV/USA) 配备 luer 至毛细管适配器 (InnovaQuartz, Phoenix, AZ/USA)。将注射泵编程以产生适当的体积流速, 以评价 CTC 细胞捕获效率和捕获后细胞保留。从各个 HTMSU 捕获通道的横截面面积和程序性的体积流速, 计算线速度。通过使 seprase CTC 微芯片与注射泵直接接口, 进行双重选择法。然后将 seprase 芯片的输出导入 EpCAM 微芯片中。因而, 使用串联排列的两个微芯片在单个测定中处理血液样品。

[0066] 将得自经同意的胰癌患者的血液样品收集进具有约 10 ml 总体积的 EDTA 管中。一

旦收集样品,就立即使用CTC微芯片处理它们。一般,从EDTA管取出3 ml全血并置于灭菌的塑料注射器中,并附着于注射泵和连接至CTC微芯片。以~150 μ l/min的体积流速处理血液样品,这需要20 min才能处理3 ml的输入体积。在血液处理以后,用等渗缓冲液(PBS, 1.5 ml)洗涤微芯片。

[0067] 使用DAPI (核染料)、针对CD45的荧光素标记的抗体、用藻红蛋白(PE)标记的抗-细胞角蛋白(8,18,19)抗体和用Cy7标记的抗-EpCAM抗体(对于seprase+ 芯片)或用Cy7标记的抗-seprase抗体(对于EpCAM+ 芯片),将选择的细胞(在PBS洗涤微芯片以后保留在表面上的那些)直接染色。在染色和洗涤以后,使用40X显微镜物镜和EMCCD照相机在Zeiss Axiovert 200M上使芯片成像。我们发现,从使用经Cy7荧光染料标记的抗-EpCAM抗体的芯片上染色看出,>95%的seprase+ 细胞没有表达可见水平的EpCAM。使用经Cy7标记的抗-seprase抗体同样也将EpCAM+ 细胞免疫分型,具有类似的确定结果(发现>95%的EpCAM+ 细胞不表达seprase)。

[0068] 得自几个临床样品的结果显示在表1中。在表1中,列“病理学”列出了在取样时疾病的病期。“亲和Ab”指示用于从样品捕获CTC的抗体。给出了每7.5 ml血液的细胞数目。将纯度计算为CTC (Seprase+或EpCAM+) 与选择的细胞的总数(WBC (CD45+) + CTC + 三重染色的细胞- 那些细胞(CD45+、DAPI+和CK+))的比率。分析的样品包括得自转移性患者和具有局限性疾病的那些患者的样品。另外,在外科手术(患病组织切除)之前和之后3周,跟踪具有局限性疾病的单个患者。seprase+ CTC与EpCAM+ CTC的比率也显示为病理学的函数。

[0069] 表1. *Seprase*和*EpCAM*选择的CTC

[0070]

病理学	亲和 Ab	CTCs (每 7.5 ml)	WBCs (每 7.5 ml)	纯度	FAP/EpCAM 比率
转移性胰	FAP	158	11	94%	
转移性胰	EpCAM	176	13	90%	0.92
转移性胰	FAP	94	21	82%	
转移性胰	EpCAM	11	15	42%	8.54
转移性胰	FAP	625	10	98%	
转移性胰	EpCAM	98	13	88%	6.38
非转移性胰	FAP	11	7	61%	
非转移性胰	EpCAM	34	5	87%	0.32
非转移性胰	FAP	94	19	83%	
非转移性胰	EpCAM	581	28	95%	0.16
局限性胰 (外科手术后30天)	FAP	73	9	89%	
局限性胰 (外科手术后30天)	EpCAM	91	12	88%	0.80
局限性胰 (切除)	FAP	237	—	—	
局限性胰 (切除)	EpCAM	125	—	—	1.90
外科手术后3周	FAP	30	—	—	
外科手术后3周	EpCAM	39	—	—	0.77
非癌症	FAP	0	8	-	-
非癌症	EpCAM	1	4	-	-

[0071] 实施例2

[0072] 确定得自具有各种癌症的患者的外周血的 *Seprase* (+) 和 *EpCAM* (+) CTC 的比率

[0073] 在COC基底中制造CTC微观流体芯片。芯片设计由26.3 x 20.5 mm足迹组成,其入口和出口引导通道(20.5 mm长, 400 μ m宽,和150 μ m深)连接一系列一致地形成细胞选择床的50-曲线通道。图1显示了CTC选择芯片设计。每个曲线选择通道是30.6 mm长, 150 μ m深,和25 μ m宽。CTC选择床的表面积是596 mm² (11 mm²/通道),该表面积的45.1 mm²是在引导通道中。芯片的总体积是9.4 μ L (138 nL/通道),其中2.5 μ L体积用于引导通道。

[0074] 这些通道的深度增加处理量以及提供贯穿选择通道的减小的压力降,尤其是当被捕获的CTC占据时。平均而言,微通道的宽度仅仅稍微大于平均CTC直径(12-20 μ m),这使回收率最大化,但是远远大于平均白细胞直径(7-15 μ m)。通道宽度在使细胞/壁相互作用的概率最大化中起作用,并允许达到高CTC得率,但是与较小细胞相互作用的概率较低。对于甚至更小的细胞(诸如红细胞),接近通道壁的可能性非常有限,这部分地归因于边缘无细胞层的形成。

[0075] 如在图2中所示,用抗-人FAP α (MAB3715 R&D)、抗-人EpCAM: (MAB960, R&D) 修饰UV-活化的COC芯片。利用以下规程,进行Ab附着:在15-20分钟温育过程中用20 mg/mL EDC和2 mg/mL NHS pH 4.8活化UV-COC表面,随后排空通道,并用在PBS pH 7.4中的0.5 mg/mL Ab替换,并在4 $^{\circ}$ C温育过夜。在血液处理之前,用2 mL PBS/0.25%BSA冲洗芯片。

[0076] 芯片配有二氧化硅毛细管,其在芯片#1的输入处连接至注射泵。使用玻璃连接器将芯片#1的出口连接至芯片#2的入口。50-通道COC芯片的细胞捕获规程包括:在25 μ L/min (2mm/s) 灌注全血(未稀释且未固定)穿过芯片,随后用1-2 mL PBS/BSA溶液在55 μ L/min (4 mm/s) 洗涤芯片。

[0077] 如下通过免疫染色分析和鉴别选择的细胞:(i) 用Fc封阻剂(IgG) 处理;(ii) 与抗-小鼠或抗-人CD45-FITC Ab温育30 min;(iii) 用2%PFA固定细胞;(iv) 用0.1%Triton-X100穿孔(peroration);和(v) 与CK8/19-PK抗体和核染料DAPI温育。使用经由MetaMorph软件控制的Olympus IX71-DSU Spinning Disk Confocal倒置显微镜得到染色细胞的图像,所述显微镜配有10x、20x和40x干物镜、水银弧光灯照射源、2个照相机(高灵敏度Hamamatsu EMCCD和高分辨率Hamamatsu ORCA-03G CCD)和DAPI、FITC、TRITC和Cy5滤光片组。

[0078] 表2. 从临床样品(标准化至1 mL)捕获在抗-FAP α 和抗-EpCAM床上的CTC的数据总结。

[0079]

亲和 Ab	度量	阴性对照 (n=5)	良性肿瘤 (n=4)	可手术的局限性 PDAC, 后来 诊断为转移性的 (n=4)	转移性 PDAC (n=16)	转移性 黑色素瘤 (n=11)	转移性 CRC (n=6)
FAP α	平均值 $\pm$ SD	0.6 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 1.3	25.6 $\pm$ 10.1	28.7 $\pm$ 23.7	33.2 $\pm$ 26.5	68.1 $\pm$ 104.5
	中值	0.5	3.3	22.2	22.8	21	31.3
	范围	0-2	1.5-3	17.5-40	4.75-80.0	8.2-69.5	12.5-280
EpCAM	平均值 $\pm$ SD	0.6 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 1.5	25.0 $\pm$ 2.6	24.5 $\pm$ 18.9	73.0 $\pm$ 87.6	36.6 $\pm$ 37.7
	中值	0.5	2.5	23.5	20	50	24.3
	范围	0-1.5	1-4	23.5-28	3.5-70.3	6.0-310.5	12-111

[0080] 表2总结了从临床样品捕获的CTC的数据。在IgG或FAP α /EpCAM修饰的CTC芯片上灌注得自患者和健康供体(阴性对照)的血液样品。呈现了每1 mL血液中分类为CTC的细胞的

数目。使用染色 (DAPI+; CK+; CD45-), 将细胞分类为CTC。在括号中指示了测量的数目。

[0081] 在所有试验的从转移性PDAC、黑素瘤和结肠直肠癌收集的血液样品中, 在两种亲和床上都检测到CTC。在抗-FAP α 床中, 对于从结肠直肠癌患者的血液收集的CTC而言, 观察到最高灵敏度。转移性黑素瘤和PDAC显示出类似的中位值, 但是黑素瘤的平均值更高。在抗-EpCAM床中, 报道了在黑素瘤中的CTC检测的最高灵敏度, 其次是结肠直肠和PDAC转移性患者。对于所有转移性疾病相关的CTC, 这些细胞的计数当与阴性对照和良性肿瘤相比时是显著不同的。

[0082] 在计划的外科手术 (OR) 当天, 分析了得自4位患者的血液, 所述患者最初被鉴别/诊断为具有局限性的且可手术的PDAC癌症, 并计数了CTC。但是, CTC计数类似于关于转移性PDAC疾病观察到的结果。在开始外科手术以及患者的胰和腹部区域的腹腔镜检查时, 将诊断改变为转移性PDAC。

[0083] 本文所述的方法也可以用于对比从肿瘤衍生出的seprase+ 细胞与EpCAM+ CTC的数目。表达seprase的CTC与表达EpCAM的CTC的比率可以用于确定肿瘤的转移潜力。对于呈现不同疾病的个别患者在两种亲和床上计数的CTC的分析, 显示出变化的优势细胞亚群。数据总结在表3中。在局限性PDAC和转移性结肠直肠癌中观察到Fap+ CTC的较高数目, 而观察到EpCAM+ 细胞在转移性黑素瘤和转移性PDAC中占优势。对于局部PDAC、转移性结肠直肠癌、转移性PDAC和转移性黑素瘤而言, FAP α /EpCAM比率的中值数目分别是1.21、1.16、0.87、0.69。这2个亚群的计数和它们的比率可以充当指示疾病病期的标记。

[0084] 表3. 得自各种癌症的CTC中的seprase与EpCAM表达的比率

[0085]

Fap α 与EpCAM 细胞的比率	局限性 PDAC (n=28)	转移性 PDAC (n=16)	转移性 CRC (n=6)	转移性 黑素瘤 (n=11)
Fap α $\geq$ EpCAM	70%	44%	83%	36%
EpCAM > Fap α	30%	56%	17%	64%

[0086] 实施例3

[0087] 用靶向seprase的亲试剂捕获的CTC的表达分析

[0088] 使用本文所述的方法, 将CTC捕获、释放、通过阻抗检测计数 (不进行染色), 并收集在微管中。将收集的CTC离心, 并使用~20 μ L得自商购可得的Cells-to-CTTM试剂盒 (Life Technologies, Grand Island, N.Y.) 的裂解溶液进行裂解。Cells-to-CTTM技术使得能够逆转录得自10-10⁵个细胞的裂解物, 无需分离或纯化RNA。消除RNA分离步骤显著加速和简化细胞的基因表达分析。作为一个替代方案, 使用CTC捕获床直接进行CTC裂解和RNA的分离。这可以在使用另一组串联连接的经FAP α 和EpCAM修饰的芯片计数细胞和通过免疫染色来表征它们的表型时进行。

[0089] 用DNA酶处理裂解以后的样品, 以从总RNA (TRNA) 样品除去残余的gDNA。用10 μ L得自CTC的TRNA以50 μ L的总体积进行阳性和阴性 (无RT酶) 逆转录反应。用M-MuLV在37 $^{\circ}$ C进行RT反应60分钟。使用SYBR绿测定, 在配备384孔板的7900HT Applied Biosystems仪器上进行定量实时PCR以评价15个基因表达水平。收集捕获的seprase+和EpCAM+ CTC基因表达谱。评价下述基因 (即, 上皮、间充质、EMT和CSC (癌症干细胞) 标记): EpCAM、KRAS、CD133、

CD146、KRT19、CD34、GAPDH、CD24、FAP、ACT2、VIM、NANOG、CD44、CXCR4和TWIST1（表4）。

[0090] 表4. 在分离的CTC中评价的基因表达标记

基因	功能/含意
EpCAM	上皮标记
KRAS	癌基因,可能含有突变
CD133	CD133 ⁺ 显示CSC的性质
CD146	EMT的活化剂
KRT19	上皮标记
CD34	正常造血标记
GADPH	持家基因
CD24	在许多人恶性肿瘤中超表达的癌基因。CD24 ⁺ CD44 ⁺ EpCAM ⁺ 细胞具有增加了100倍的致瘤潜力
FAP	成纤维细胞(CAF) 标记
ACT2	EMT标记,与预后不良有关的活化
VIM	在EMT过程中增量调节
NANOG	CSC的标记
CD44	参与细胞增殖、分化、迁移、细胞存活的发信号和血管发生。与癌细胞的病理活动有关。
CXCR4	在实体上皮癌中超表达,已经观察到导致转移
TWIST1	在EMT过程中增量调节

[0091] 将所有基因表达值标准化至GAPDH(一种持家基因)的表达水平。首先评价了在不同的退火温度用每个引物对扩增的效率,由此确定从CTC的mRNA合成cDNA的qPCR的最佳热循环条件。10 μ L PCR体积含有1-2 μ L合成的cDNA。

[0092] 在不同的疾病之间对比了EpCAM⁺ CTC中的EpCAM mRNA的表达水平。在转移性黑素瘤和转移性结肠直肠癌中观察到最高表达。对于局限性和转移性PDAC两者而言,EpCAM mRNA表达水平低,转移性PDAC最低。定量的EpCAM mRNA显示在分离的CTC中的宽范围的表达水平(4数量级)。假定mRNA和蛋白表达的关联,前述观察结果将指示,即使对于抗原在细胞表面上的低表达,CTC捕获装置也能够分离CTC。

[0093] 尽管已经参考具体实施例详细描述了本发明,但对本领域技术人员显而易见的是,在本发明范围内可以做出各种修改。

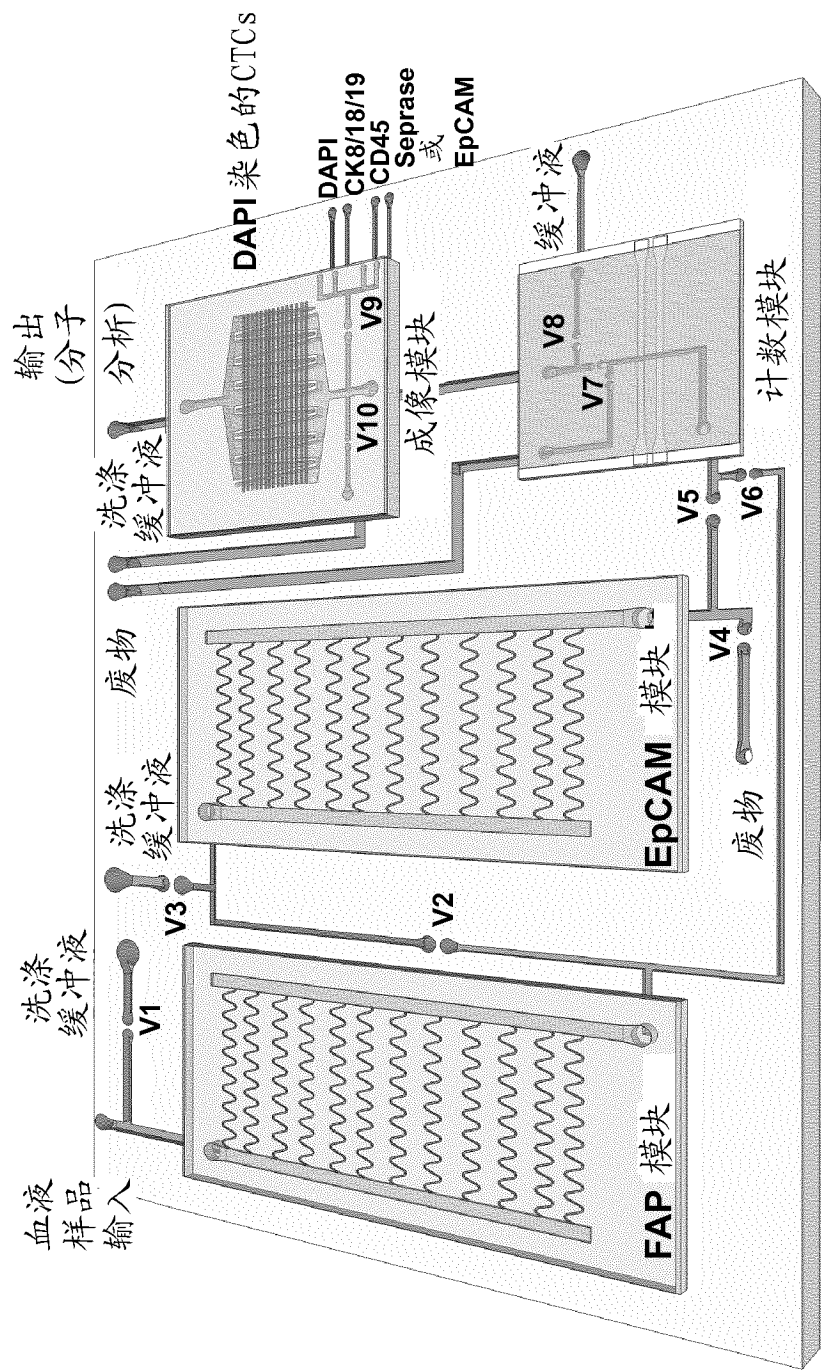


图 1

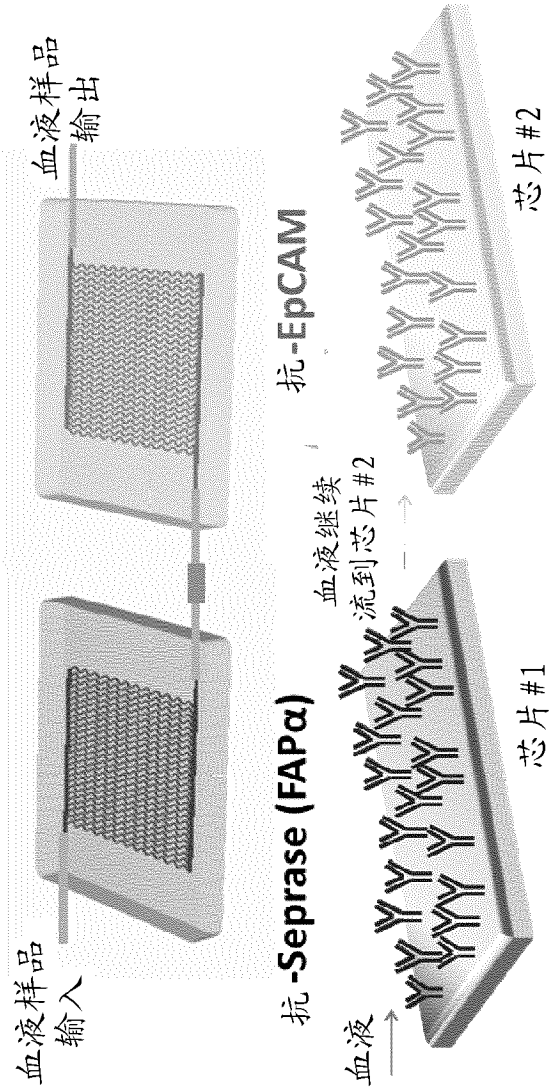


图 2