





# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法

## 【技術領域】

【0001】 本發明係提供一種純化出罕見細胞之方法，尤指技術上提供一種利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，藉由光圖形的移動及轉動，提供不同維度作用力對待篩物進行篩選，達到增加罕見細胞的蒐集率及精確率。

## 【先前技術】

【0002】 時至今日，癌症佔據台灣國民十大死因的首位已有十餘年之久；儘管對癌症的治療已有了極大的進展，但診治上仍受限於癌症進程、轉移與抗藥性生成之快速，從而無法有效地根除人體內的癌細胞；此外，臨床之癌症診斷有賴於組織切片與生物標記之鑑定，但這些方法都無法即時反應腫瘤組織的真實情況，更不提組織採樣手法複雜且易影響病人術後之康復時間。

【0003】 自 1869 年發現癌症病人血液中帶有循環腫瘤細胞後，動物實驗與臨床上證實循環腫瘤細胞(Circulating tumor cells, 簡稱 CTCs)與癌症轉移具有顯著正相關的文獻日漸增加，促使了諸多檢測與分離循環腫瘤細胞技術的開發。然而，近來的文獻提出了一個與不同於先前的假說，也就是誘導癌症轉移的原因並非單一循環腫瘤細胞所誘導，而是由「數顆循環腫瘤細胞所構成之團塊(cluster)」造成；不僅如此，在2016年 Cheung. K. J.在科學期刊(*Science*)上的文章還提出另一個論點，即轉移後的癌症組織是

以「多基因型(polyclone)」的形式存在；這不單證明了癌症轉移傾向以團塊的形式進行，還闡明了檢測循環腫瘤細胞團塊中基因形式較吻合實際之癌症進程。

【0004】 現今對於循環腫瘤細胞的辨識主要是利用其表面抗原之特異性，比如EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule/上皮細胞黏附分子)、CKs (cytokeratins/細胞角蛋白)、Vimentin (波形蛋白)等。利用帶螢光標記之專一性抗體結合上述抗原，則可透過特殊之抓取系統(例如磁珠免疫法)來進行循環腫瘤細胞之分離與純化。除此之外，為了增加對循環腫瘤細胞之辨識率，大部分的抓取系統還會針對白血球細胞特有之抗原 CD45 進行負篩選，並對細胞核進行正篩選。唯有在循環腫瘤細胞抗原與細胞核呈陽性而白血球細胞抗原為陰性時，才會將此一細胞定義為循環腫瘤細胞。然而，此一辨識之前提為一細胞表面抗原之穩定表現。目前已有諸多文獻對於「使用 EpCAM 作為循環腫瘤細胞辨識抗原」這點提出質疑，一則是 EpCAM 並非穩定存在於循環腫瘤細胞之表面，特別是進行過 EMT (Epithelial- to-Mesenchymal Transition/上皮-間質細胞轉換過程)的循環腫瘤細胞，其表面 EpCAM 抗原會大幅減少。其次，相關文獻也提出循環腫瘤細胞會在表面吸附大量之血小板來逃避免疫辨識，而且細胞表面抗原之呈現也會隨周邊微環境之不同而有所變化。因此，使用免疫法進行篩選可能會遺漏部分循環腫瘤細胞，這會導致後續基因分析出現偏差，進而影響了臨床上的應用。

【0005】 由於免疫法之限制，所以某些研究改用物理方式來進行分離。與循環腫瘤細胞不同，循環腫瘤細胞團塊多為兩顆或以上的腫瘤細胞

聚集而成，故能以體積大小差異作為辨識與純化的指標，比如微過濾器技術(Microfilter)與慣性微流體技術(Inertial Microfluidics)便是依此原理設計。然而，即便這些方式確實能達到分離循環腫瘤細胞團塊之目的，但受限於過濾口徑之設計，上述技術皆無法避免細胞堵塞的產生，從而衍生出細胞收集率前後不一的缺陷。再者，為了達到高通量之目的，勢必要在高流速的條件下進行分離，可高流速造成之剪切力極有可能會將循環腫瘤細胞團塊打散，反倒影響了循環腫瘤細胞團塊的收集。

**【0006】** 為了解決上述問題，已有專利提出利用磁珠自動分選循環腫瘤細胞並加以培養，但磁珠卻無法分選循環腫瘤細胞團塊，因此在臨床意義的解讀上除了精確性較低之外，技術層面也較低；另有專利提出使用光介電泳力分離大小不同的微粒子，然而其所使用的光介電泳力不具備移動及轉動的簡易軌跡，更非應用於循環腫瘤細胞團塊，有鑑於此，發明人本於多年從事相關產品之製造開發與設計經驗，針對上述之目標，詳加設計與審慎評估後，終得一確具實用性之本發明。

### **【發明內容】**

**【0007】** 因此，本發明之目的，即在提供一種利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，利用至少一光圖形的移動及轉動，達到同步將檢體中的罕見細胞進行篩選、分離與純化。

**【0008】** 於是，本發明之技術內容係將檢體去除非待測物細胞留下剩餘細胞，再利用光誘導介電泳力從剩餘細胞中篩選出罕見細胞，並配合該光圖形移動或轉動的簡易軌跡運動提升罕見細胞的分離率、收集率與精準性。此外，藉由該光圖形能使罕見細胞被牽引至專門之收集管道，有利

於後續分析之進行，上述之分離過程無須任何人為操作。

**【0009】** 本發明利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法如下：首先，先從檢體中獲得含有罕見細胞之細胞群，並使用生物方法或物理方法去除非待測物細胞，再吸取剩餘細胞作為一待篩物；接著將該待篩物透過一導入裝置導入一光誘導介電泳力晶片，該光誘導介電泳力晶片具有一分岔設置的分離區，該分離區上投射至少一該光圖形，利用該光圖形結合光介電泳力將該待篩物同步進行篩選、分離與純化出罕見細胞，所述之該光圖形可任意軌跡的移動及轉動，且該光圖形可在預設時間點消失或出現；上述之該罕見細胞會由該光圖形誘導進入該光誘導介電泳力晶片上之一蒐集槽中，即可透過一吸取裝置從該蒐集槽中吸取出罕見細胞。

**【0010】** 上述之該分離區上投射之各該光圖形以形成一具有間隔的陣列，各該光圖形為單一運動單位並為重複圖形或不重複的圖形。

**【0011】** 上述之非待測物細胞為紅血球細胞，待測物細胞由白血球細胞、循環腫瘤細胞、循環腫瘤細胞團塊及所有未成熟的血球細胞所組成，罕見細胞為循環腫瘤細胞團塊。

**【0012】** 其中步驟(b)的該待篩物導入該光誘導介電泳力晶片後，會同時受到本身的液體流動、該光圖形移動及轉動之三種作用力影響，所述之該待篩物的液體流動方向與該光圖形的移動方向呈相互垂直。

**【0013】** 本發明之功效在於：首先，本案係利用光誘導介電泳力和具有任意軌跡移動及轉動特性的該光圖形，使本發明同步對罕見細胞進行篩選、分離與純化的動作，無須在實驗時調整該光圖形，因此可提供長時

間穩定且高效率的罕見細胞純化分離平台。

【0014】 第二，本案能蒐集循環腫瘤細胞團塊，並提供一個高度分離且排除其他血球細胞干擾之純化平台。藉由去除非待測物細胞(例如：紅血球細胞)，將剩餘細胞導入該光誘導介電泳力晶片中，上述剩餘細胞會同時受到本身的液體流動、該光圖形移動及轉動之三種作用力影響，分離出循環腫瘤細胞團塊，進而達到自動純化之目的。透過此平台收集到之循環腫瘤細胞團塊，可由其數量推估病人之癌症進程、預後情況與轉移之可能性，同時配合 qPCR、NGS 等基因辨識技術則可預測癌症抗藥性之出現，有助於臨床治療策略之轉換。

【0015】 第三，本案透過該光誘導介電泳力晶片與動態之該光圖形，可免除過濾器口徑造成之細胞阻塞與液體通過過濾器時所形成之剪切力，能有效地提升循環腫瘤細胞團塊之純化收集率並減少系統對細胞的影響，這有助於後端基因分析之可信度。

【0016】 第四，本案經前置處理去除非待測物細胞後，在不進行任何標記處理的條件下，即可透過光誘導介電泳力結合動態之該光圖形，將循環腫瘤細胞團塊分離與純化，換言之，本案係提供一種全程自動化且無須標記來進行循環腫瘤細胞團塊分離的平台。相較於其他免疫標記之方式，本發明之操作相對容易且不受抗體種類之影響，同時也不因長時間使用造成細胞堵塞，因而降低了細胞收集率。

【0017】 第五，本案之該光圖形與物理過濾器不同，單單藉由該光圖形的運動便能提供該待篩物兩種不同維度之作用力(即移動與轉動)，若再佐以微型注射幫浦促成該待篩物之液體流動，則能同時誘發三種不同方

向之作用力，這使得此平台在循環腫瘤細胞團塊之篩選上更為精準，且分離效率也比過往只提供兩個方向之該光圖形設計高出許多。

**【0018】** 第六，本案之該光圖形能根據罕見細胞的大小進行調整，透過調整設定該光圖形的抓取參數改變該光圖形的大小，可針對不同篩選標準的罕見細胞即時進行大小調整的應對。

**【0019】** 第七，本案收集之標的為循環腫瘤細胞團塊，由於循環腫瘤細胞團塊之細胞數目並無明確定義，這使得收集之標的範圍相對寬鬆，因此本平台可使用數個等距且重複規律間隔的該光圖形，大幅增加循環腫瘤細胞團塊之收集率，提升後續分析之準確性，所得到之結果可用於建立癌症患者個人臨床數據庫，將有助於後續精準醫療與個人化療程的進展。同時，循環腫瘤細胞團塊之培養相對容易成功，這對於臨床癌症細胞株之建立有極大之幫助；而穩定之細胞株可供研究與藥廠進行藥物測或進行基因、蛋白或表面抗原的多種因子分析，有利於科研之進步。

### **【圖式簡單說明】**

#### **【0020】**

圖 1 為本發明之操作流程方塊示意圖

圖 2 為本發明之光誘導介電泳力晶片結構示意圖

圖 3 為本發明之光誘導介電泳力晶片之操作示意圖

圖 3 A 為本發明之複數光圖形移動及轉動之實施例示意圖

圖 4 為本發明之單一光圖形作用力方向的簡易示意圖

### **【實施方式】**

**【0021】** 本發明實施方式的罕見細胞係採用循環腫瘤細胞團塊進行



篩選，但並不以此限定本案只能應用於循環腫瘤細胞團塊作為標的。

【0022】 參閱圖 1 至圖 4，本發明係揭露一種利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，包含以下步驟：

【0023】 (a) 從檢體中獲得含有至少一循環腫瘤細胞團塊 20 之血液，並使用現有的Ficoll 試劑（亦可使用紅血球裂解試劑、篩網過濾裝置或生物方法的抗體抓取紅血球）將紅血球細胞從檢體中分離，形成一含有白血球細胞與該循環腫瘤細胞團塊 20 的待篩物 10，由於該待篩物 10 內的該循環腫瘤細胞團塊 20 比重與白血球細胞相近，故吸取白血球細胞分層作為該待篩物 10 以進行後續細胞分析；

【0024】 (b) 將該待篩物 10 透過一導入裝置 12 (例如：微量注射幫浦)以物理驅動的方式導入一光誘導介電泳力晶片 14，該光誘導介電泳力晶片 14 具有一分岔設置的分離區 1441，該分離區 1441 上投射複數光圖形 16 以形成一具有間隔的陣列 162，各該光圖形 16 可在預設的時間點消失或出現，並結合光介電泳力以任意軌跡的移動及轉動將該待篩物 10 同步進行篩選、分離與純化出該循環腫瘤細胞團塊 20，其中各該光圖形 16 為單一運動單位且為重複圖形或不重複的圖形；

【0025】 (c) 上述之該待篩物 10 內所篩選出的該循環腫瘤細胞團塊 20 會由該等光圖形 16 誘導進入該光誘導介電泳力晶片 14 上之一蒐集槽 1413 中，即可透過一吸取裝置 18 (例如：微量吸管)取出該循環腫瘤細胞團塊 20。

【0026】 上述中，透過即時性調整抓取參數，能設定該光圖形 16 的大小，以因應不同罕見細胞的大小。

【0027】 上述物理驅動方式可為壓力驅動、電磁驅動或光驅動的方式，其中壓力驅動又可為注射式幫浦或蠕動式幫浦，電磁驅動方式為電磁驅動幫浦，光驅動則為本案所使用的光介電泳力。

【0028】 上述檢體係為血液。

【0029】 上述Ficoll 試劑為 Ficoll-Paque plus，其主要成分為高分子量蔗糖聚合物與泛影酸鈉溶液，在特定的離心條件下可形成密度梯度，並透過血球細胞之不同比重來進行分離。

【0030】 圖 2 至圖 3 A 揭露本案所使用之該光誘導介電泳力晶片 1 4 係為結合光學與電學特性的晶片，能透過操作物本身之電學差異進行分離與純化。該光誘導介電泳力晶片 1 4 由四層結構所組成，由上而下分別為：第一層係由聚二甲基矽氧烷(Polydimethylsiloxane,PDMS)所構成三個獨立的槽座，分別為一注入槽 1 4 1 1、一廢物去除槽 1 4 1 2 及該蒐集槽 1 4 1 3；第二層係由氧化銦錫(Indium Tin Oxide,ITO)所構成之一電極通道層 1 4 2；第三層係由生物相容性雙面膠帶所構成之一通道層 1 4 4，該通道層 1 4 4 設有一由主管道 1 4 4 2 及一側管道 1 4 4 3 所結合而成之該分離區 1 4 4 1，該側管道 1 4 4 3 可防止白血球細胞污染該循環腫瘤細胞團塊 2 0，該注入槽 1 4 1 1 及該廢物去除槽 1 4 1 2 分別設置於該主管道 1 4 4 2 兩端的正上方，該注入槽 1 4 1 1 能供微量注射幫浦注射該待篩物 1 0，且所注射之該待篩物 1 0 會隨著該主管道 1 4 4 2 內液體流動方向而牽引向前，該廢物去除槽 1 4 1 2 能移除白血球細胞及多餘液體，該蒐集槽 1 4 1 3 係設置於該側管道 1 4 4 3 末端的正上方能蒐集該循環腫瘤細胞團塊 2 0，該注入槽 1 4 1 1、該廢物去除槽 1 4 1 2 及該

蒐集槽 1 4 1 3 分別貫通該電極通道層 1 4 2，並連通至該分離區 1 4 4 1；最後一層係為朝向上方面板塗佈光導非晶矽(amorphous silicon)之一底板層 1 4 6，該底板層 1 4 6 係由氧化銻錫所構成。於該分離區 1 4 4 1 中之該主管道 1 4 4 2 及該側管道 1 4 4 3 的交會處係設置該等光圖形 1 6，該等光圖形 1 6 可透過轉動及移動區別該循環腫瘤細胞團塊 2 0 與白血球細胞，並將該循環腫瘤細胞團塊 2 0 運送至位於該側管道 1 4 4 3 末端之該蒐集槽 1 4 1 3 中。

【0031】 圖 3 及圖 3 A 係揭露操作該光誘導介電泳力晶片 1 4 結合該光圖形 1 6 之動作示意圖，流程如下：(1) 利用該導入裝置 1 2（例如：微量注射幫浦）將該待篩物 1 0 注入該光誘導介電泳力晶片 1 4 中，該光誘導介電泳力晶片 1 4 具有該分離區 1 4 4 1，並於該分離區 1 4 4 1 上投射複數個該光圖形 1 6，其中該待篩物 1 0 的液體流動會通過該陣列 1 6 2 中，所述之該陣列 1 6 2 係為該等光圖形 1 6 以具有間隔的方式所組成，各該光圖形 1 6 為單一運動單位，可各別地的旋轉或移動；(2) 該待篩物 1 0 內所含的該循環腫瘤細胞團塊 2 0 會在同時受到該待篩物 1 0 之液體流動、該等光圖形 1 6 的移動，以及該等光圖形 1 6 的轉動之三種作用力的影響，而漸漸地往該側管道 1 4 4 3 的方向移動；(3) 在該循環腫瘤細胞團塊 2 0 受該等光圖形 1 6 牽引的同時，由於該待篩物 1 0 內的白血球細胞不受光誘導介電泳力的作用，只會隨該待篩物 1 0 之液體流動往該廢物去除槽 1 4 1 2 的方向移動；(4) 伴隨培養液與該待篩物 1 0 之注入，會驅使該循環腫瘤細胞團塊 2 0 朝該側管道 1 4 4 3 靠攏；(5) 當該循環腫瘤細胞團塊 2 0 抵達該側管道 1 4 4 3 入口的同時，會受到該

光圖形 1 6 的牽引，該循環腫瘤細胞團塊 2 0 會被運送至該側管道 1 4 4 3 開口；(6) 由於該側管道 1 4 4 3 內側不再受該待篩物 1 0 的液體流動方向影響，致使該循環腫瘤細胞團塊 2 0 只會受到該光圖形 1 6 任意軌跡移動與轉動影響，因而朝該側管道 1 4 4 3 末端之該蒐集槽 1 4 1 3 移動。藉由該吸取裝置 1 8（例如：微量吸管等裝置）吸取該蒐集槽 1 4 1 3，即可將該循環腫瘤細胞團塊 2 0 從該光誘導介電泳力晶片 1 4 中取出。

【0032】 圖 3 至圖 4 係揭露該光圖形 1 6 作用力方向的簡易示意圖，從上述圖中可知位於該光誘導介電泳力晶片 1 4 上之該循環腫瘤細胞團塊 2 0 會受到三種作用力的影響，分別是該待篩物 1 0 的液體流動力方向、該光圖形 1 6 移動力方向及該光圖形 1 6 轉動力方向。其中，該待篩物 1 0 的液體流動力方向與該光圖形 1 6 移動力方向呈相互垂直，而該光圖形 1 6 轉動力方向所帶來之作用力方向則會依該循環腫瘤細胞團塊 2 0 所在位置不同而有所改變。比如在 A 的位置，由於該光圖形 1 6 轉動力方向與光圖形 1 6 移動力方向平行，因此兩個作用力疊加，使得光誘導介電泳力較低之白血球細胞被「甩出」該光圖形 1 6，只留下作用力大之該循環腫瘤細胞團塊 2 0；同理，B 位置因該光圖形 1 6 轉動力方向與該待篩物 1 0 的液體流動力方向平行，會傾向把該循環腫瘤細胞團塊 2 0 往流道上端運送；C 位置則因該光圖形 1 6 移動力方向與該光圖形 1 6 轉動力方向相反，相互抵消下，該循環腫瘤細胞團塊 2 0 只會受到該待篩物 1 0 的液體流動力方向之作用力。

【0033】 需注意的是，上述實施例僅為例示性說明本發明之原理及

其功效，而非用於限制本發明之範圍。任何熟於此項技術之人均可在不違背本發明之技術原理及精神下，對實施例作修改與變化。因此本發明之權利保護範圍應如後述之申請專利範圍所述。

### 【符號說明】

#### 【0034】

1 0	待篩物	1 4 4 1	分離區
1 2	導入裝置	1 4 4 2	主管道
1 4	光誘導介電泳力晶片	1 4 4 3	側管道
1 4 1 1	注入槽	1 4 6	底板層
1 4 1 2	廢物去除槽	1 6	光圖形
1 4 1 3	蒐集槽	1 6 2	陣列
1 4 2	電極通道層	1 8	吸取裝置
1 4 4	通道層	2 0	循環腫瘤細胞團塊

### 【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】(請換頁單獨記載)

I646196

## 發明摘要

※ 申請案號：106135060

※ 申請日：106/10/13

※IPC 分類：  
C12Q 1/24 (2006.01)  
C12M 1/42 (2006.01)  
C40B 30/06 (2006.01)  
G01N 1/34 (2006.01)  
C12N 5/09 (2010.01)

【發明名稱】(中文/英文)

利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法

【中文】

一種利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，係先將檢體去除非待測物細胞並取得剩餘細胞作為待篩物，再利用光誘導介電泳力晶片結合可移動及轉動的光圖形，對上述剩餘細胞進行篩選、分離與純化出罕見細胞，藉此提升罕見細胞之分離率、收集率與精準性。

【英文】

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**圖 1

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

## 圖示

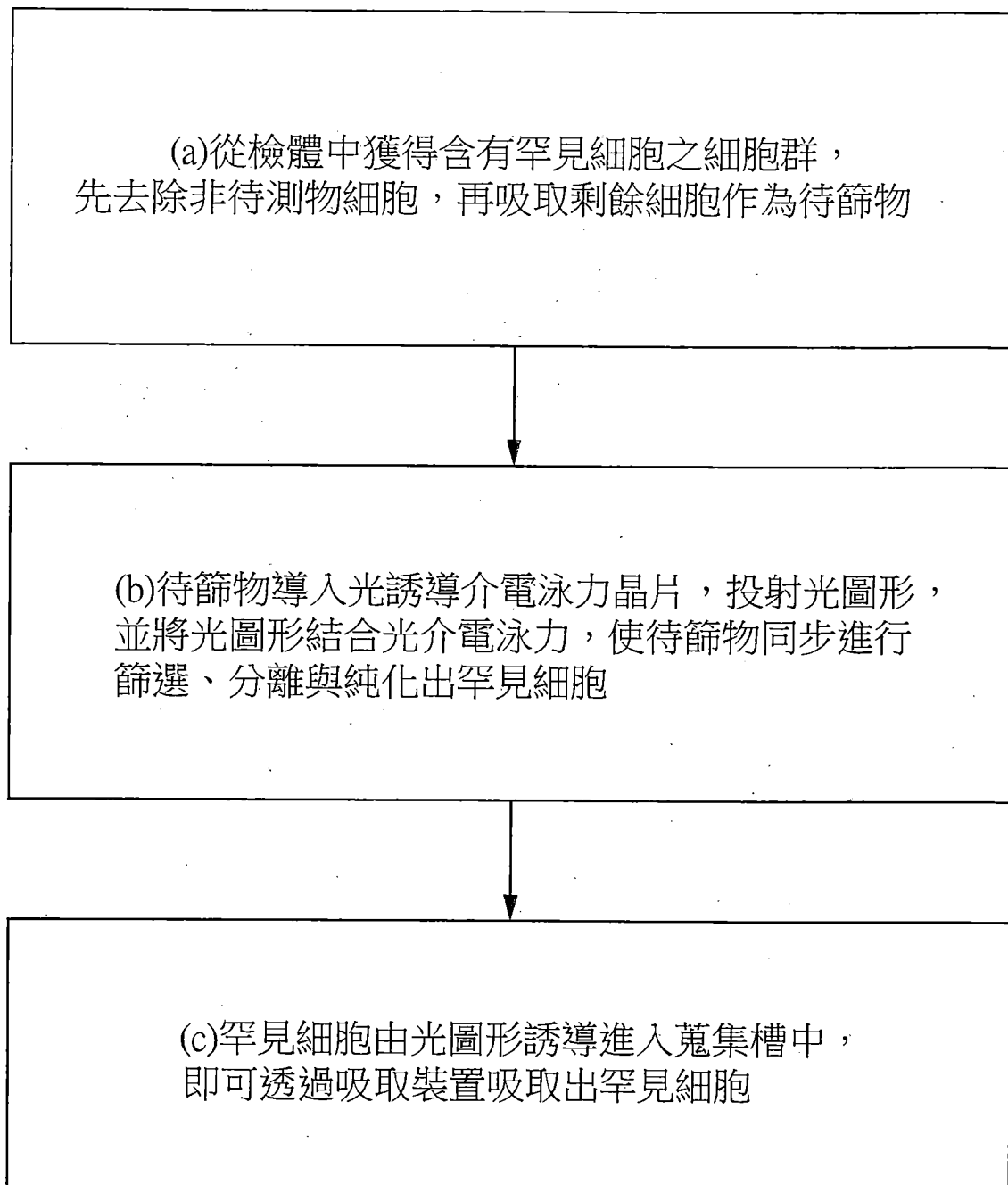


圖 1



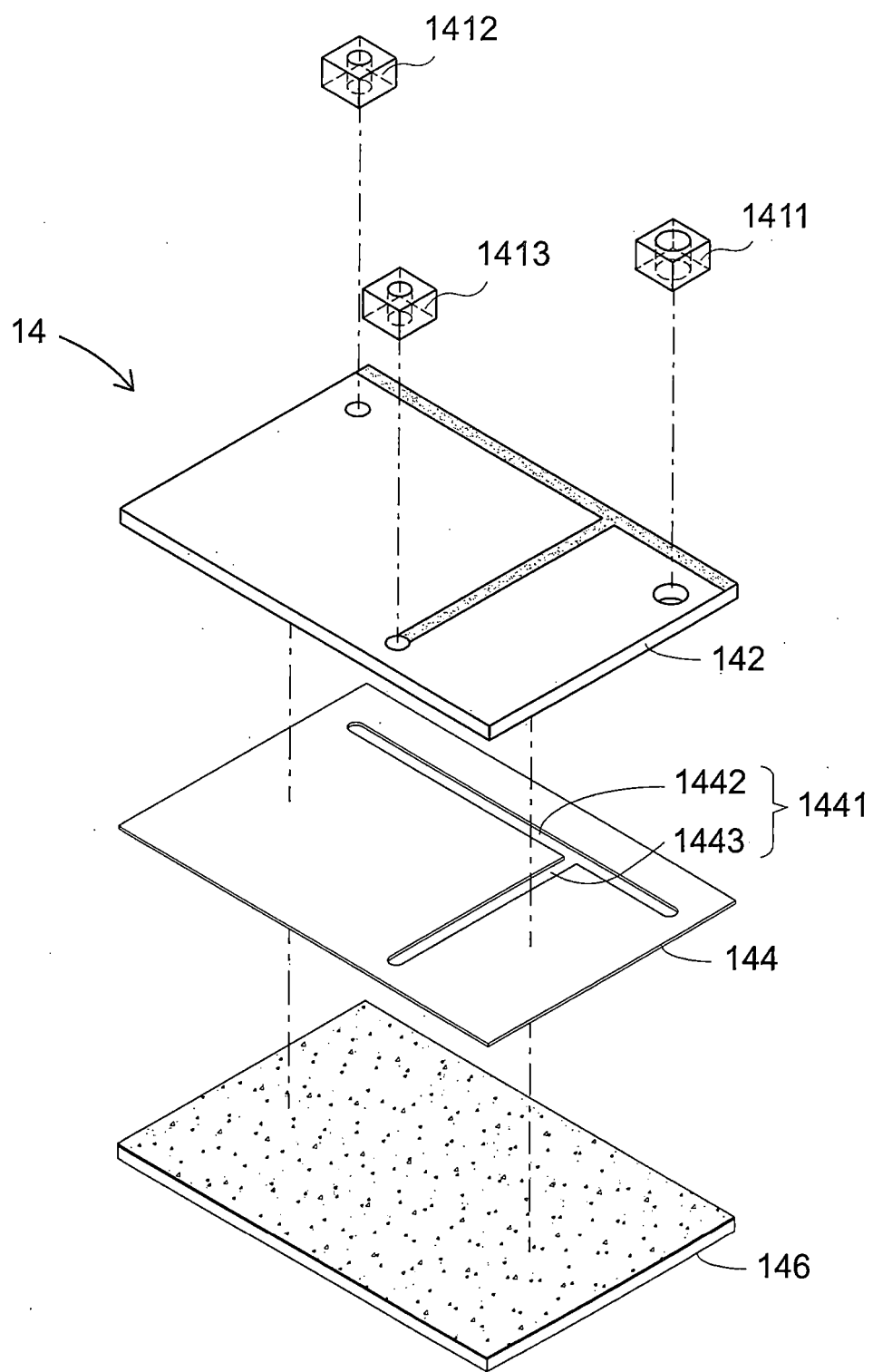


圖 2

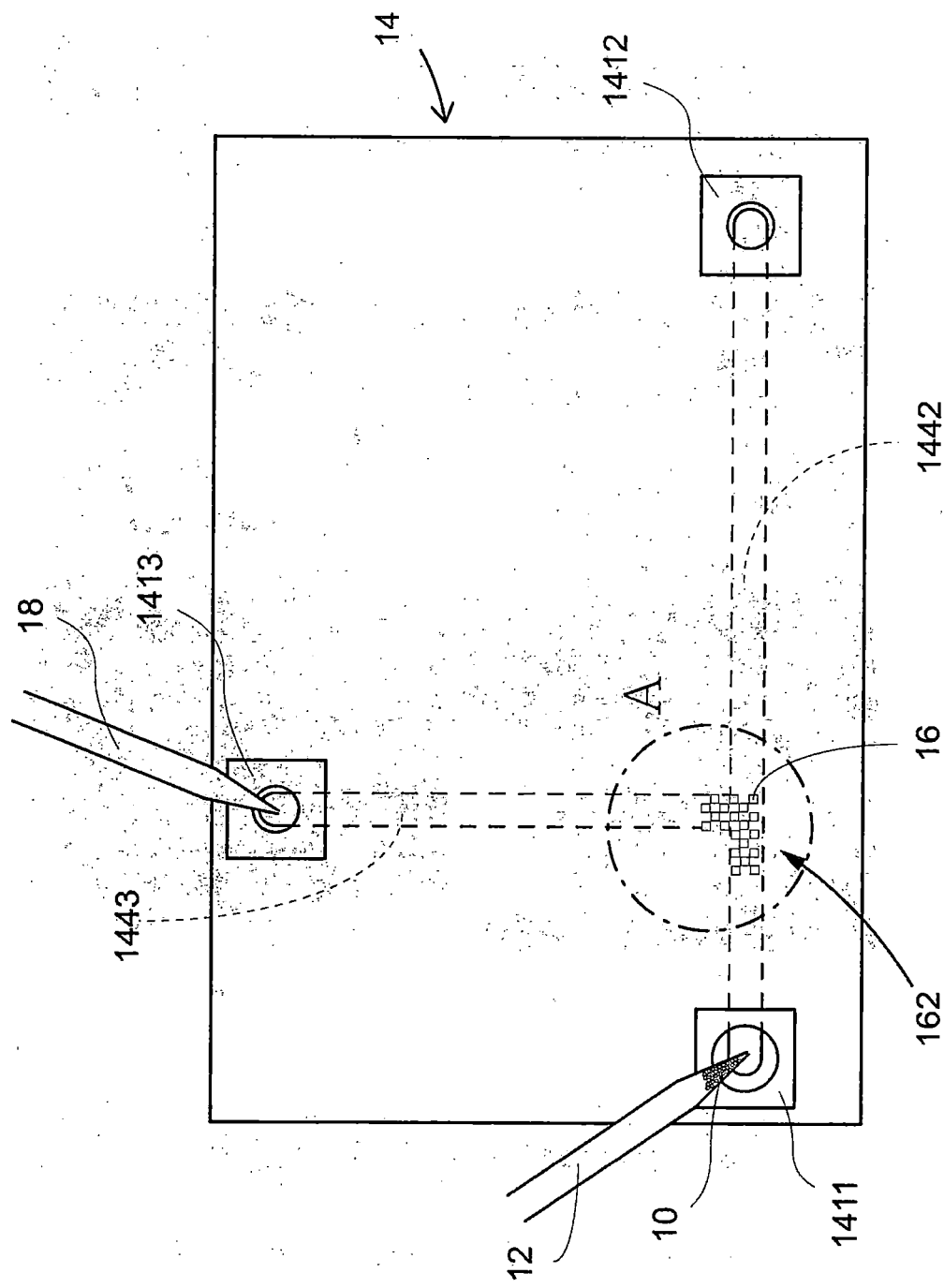


圖 3

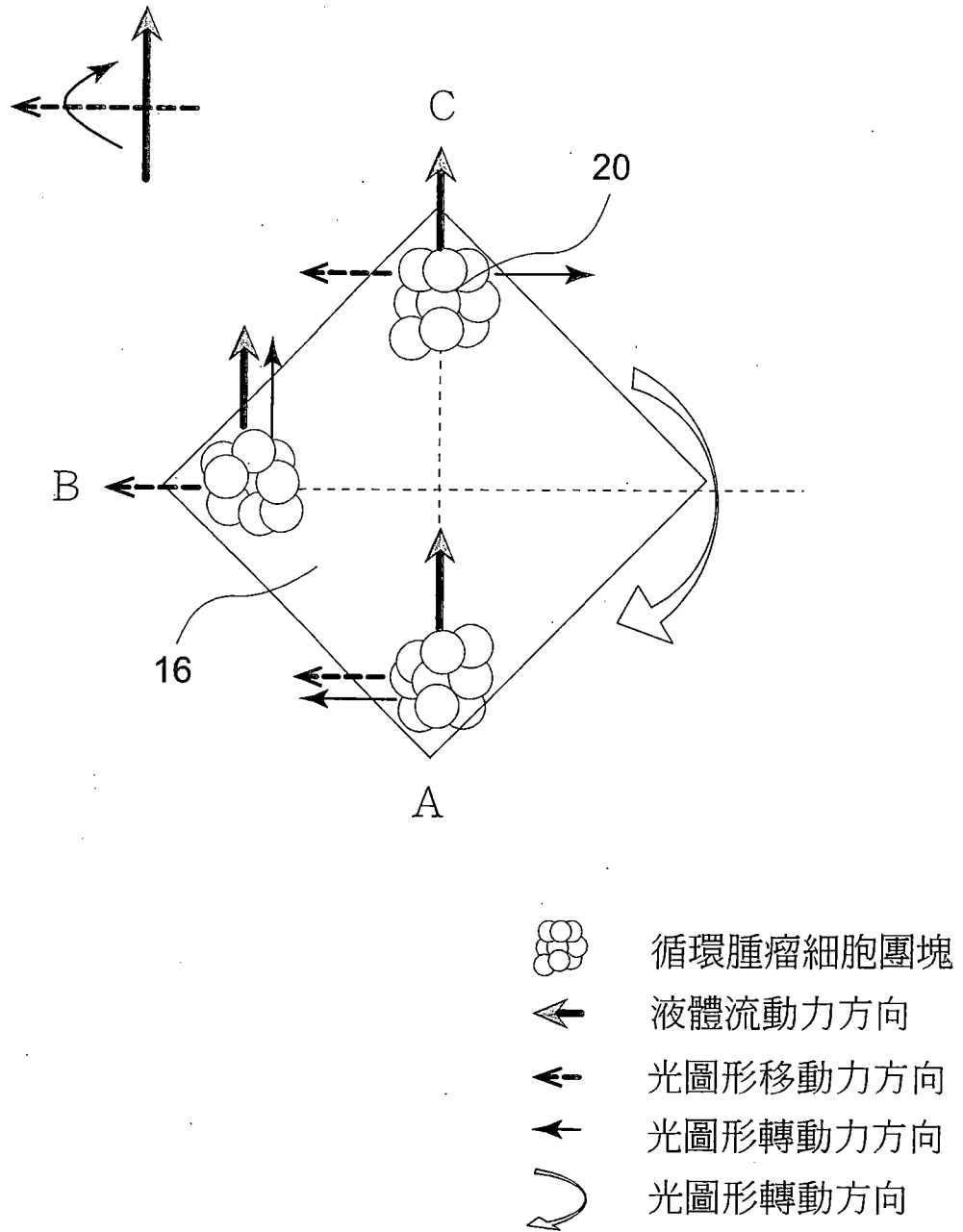


圖 4

## 申請專利範圍

1. 一種利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，包含以下步驟：
  - (a) 從檢體中獲得含有罕見細胞之細胞群，先去除非待測物細胞，再吸取剩餘細胞作為一待篩物；
  - (b) 該待篩物透過一導入裝置導入一光誘導介電泳力晶片，該光誘導介電泳力晶片具有一分岔設置的分離區，該分離區上投射至少一光圖形，利用該光圖形結合光介電泳力將該待篩物同步進行篩選、分離與純化出罕見細胞，所述之該光圖形至少可移動及轉動，且該光圖形為任意軌跡的移動，可在預設時間點消失或出現；
  - (c) 上述之該罕見細胞由該光圖形誘導進入該光誘導介電泳力晶片上之一蒐集槽中，即可透過一吸取裝置從該蒐集槽中吸取出罕見細胞。
2. 如申請專利範圍第1項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中該分離區上投射複數之該光圖形以形成一具有間隔的陣列，各該光圖形為單一運動單位。
3. 如申請專利範圍第2項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中各該光圖形為重複圖形或不重複的圖形。
4. 如申請專利範圍第1項或第2項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中步驟(b)的該待篩物導入該光誘導介電泳力晶片後，會同時受到本身的液體流動、該光圖形移動及轉動之三種作用力影響，所述之該待篩物的液體流動方向與該光圖形的移動

方向呈相互垂直。

5. 如申請專利範圍第1項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中該光圖形係能根據罕見細胞的大小進行調整。
6. 如申請專利範圍第1項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中步驟(a)去除非待測物細胞係使用生物方法或物理方法。
7. 如申請專利範圍第1項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中步驟(b)的該導入裝置及步驟(c)的該吸取裝置係為物理驅動的方式，所述物理驅動的方式為壓力驅動、電磁驅動或光驅動。
8. 如申請專利範圍第1項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中從步驟(c)所純化的罕見細胞能助於臨床癌症細胞株之建立，可供研究與藥廠進行藥物測量或進行基因、蛋白或表面抗原的多種因子分析，所得到之結果可用於建立癌症患者個人臨床數據庫，有助於後續精準醫療與個人化療程的進展。
9. 如申請專利範圍第1項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中罕見細胞為循環腫瘤細胞團塊。
10. 如申請專利範圍第1項所述之利用動態光圖形結合光介電泳力篩選、分離與純化出罕見細胞之方法，其中檢體為血液。