



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113646635 A

(43) 申请公布日 2021.11.12

(21) 申请号 202080026366.X

(22) 申请日 2020.03.06

(30) 优先权数据

62/829,245 2019.04.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/021430 2020.03.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/205158 EN 2020.10.08

(71) 申请人 马格雷股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 王善祥 庄之颖 余珩

迈克尔·J·贝格斯

路易斯·卡波纳

(74) 专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司 11363

代理人 王建国 李琳

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

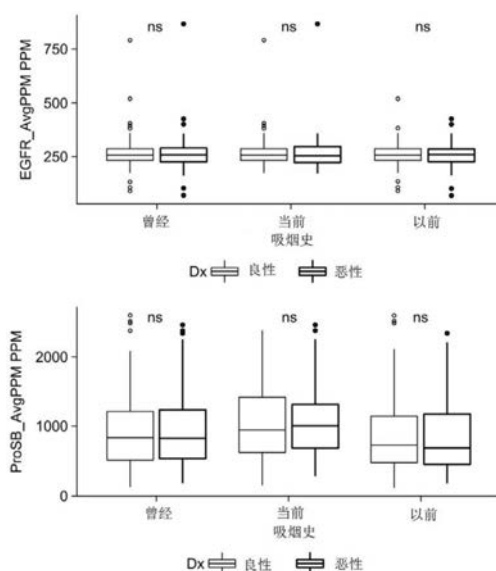
权利要求书5页 说明书23页 附图8页

(54) 发明名称

产生循环分析物概况的方法和实施该方法的装置

(57) 摘要

本公开的方面包括产生受试者的循环分析物概况的方法。所述方法包括使来自受试者的血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触，和检测分析物与探针组的探针的结合是否存在。还提供了包括捕获探针组并且可用于例如实施本公开的方法的传感器装置。



1. 一种产生受试者的循环分析物概况的方法,其包括:
使来自受试者的血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触,所述分析物包含:
癌胚抗原 (CEA)、C-X-C基序趋化因子配体4 (CXCL4)、C-X-C基序趋化因子配体7 (CXCL7) 和C-X-C基序趋化因子配体10 (CXCL10) 中的两种或更多种;和
表皮生长因子受体 (EGFR)、前表面活性蛋白B (pro-SFTPB) 和金属蛋白酶1组织抑制剂 (TIMP1) 中的一种或多种;和
检测所述分析物与所述探针组的探针的结合是否存在,
以产生所述受试者的循环分析物概况。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中使所述血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触,所述分析物包含CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10中的三种或每一种。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中使所述血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触,所述分析物包含CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中使所述血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触,所述分析物包含EGFR、pro-SFTPB和TIMP1中的两种或每一种。
5. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中使所述血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触,所述分析物包含EGFR、pro-SFTPB和TIMP1。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述探针组进一步包含一种或多种特异性结合附加分析物中的一种或任何组合的探针,所述附加分析物选自由以下组成的群组:
抗血管生成素样蛋白3抗体 (抗ANGPTL3)、抗14-3-3蛋白 θ 抗体 (抗YWHAQ)、抗层粘连蛋白 α 1抗体 (抗LAMR1)、人附睾蛋白4 (HE4)、前梯度蛋白2 (AGR2)、嗜铬粒蛋白A (CHGA)、亮氨酸丰富 α -2-糖蛋白1 (LRG1)、抗膜联蛋白1抗体 (抗ANXA1)、抗泛素1抗体 (抗UBQLN1)、白介素6 (IL6)、白介素8 (IL8)、C-X-C基序趋化因子配体2 (CXCL2)、C-X-C基序趋化因子配体12 (CXCL12)、C-X-C基序趋化因子配体14 (CXCL14)、防御素, β 1 (DEFB1)、成纤维细胞生长因子2 (FGF2)、分化簇97 (CD97)、前血小板碱性蛋白 (PPBP)、降钙素原 (PCT)、晚期糖基化终末产物受体 (RAGE)、S100钙结合蛋白A4 (S100A4)、S100钙结合蛋白A8 (S100A8) 和骨桥蛋白 (OPN),
其中所述方法进一步包括检测所述附加分析物中的所述一种或任何组合与所述探针组的探针的结合是否存在以产生所述受试者的循环分析物概况。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述探针组包含用于结合4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、15种或更多种、20种或更多种或25种或更多种分析物的探针。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述探针组包含用于特异性结合200种或更少的分析物、150种或更少的分析物、125种或更少的分析物、100种或更少的分析物、75种或更少的分析物、50种或更少的分析物、40种或更少的分析物、30种或更少的分析物或25种或更少的分析物的探针。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中检测所述分析物结合是否存在包括量化检测的分析物。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述探针组进一步包含用于结合循环肿瘤细胞的探针,其中所述方法进一步包括检测所述循环肿瘤细胞与所述探针组的探针

的结合是否存在以产生所述受试者的循环分析物概况。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中检测所述循环肿瘤细胞的结合是否存在包括量化检测的循环肿瘤细胞。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法, 其中所述探针组进一步包含用于结合肿瘤DNA的探针, 其中所述方法进一步包括检测肿瘤DNA与所述探针组的探针的结合是否存在以产生所述受试者的循环分析物概况。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中检测肿瘤DNA结合是否存在包括量化检测的肿瘤DNA。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法, 其中所述受试者来自具有高肺癌风险的群体。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述受试者是以前或当前吸烟者。

16. 根据权利要求14或权利要求15的方法, 其中所述以前或当前吸烟者具有肺结节。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述以前或当前吸烟者具有通过低剂量计算机断层扫描 (LDCT) 检测的肺结节。

18. 根据权利要求16或权利要求17所述的方法, 其进一步包括基于所述受试者的循环分析物概况来评估所述肺结节为恶性的风险。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述评估进一步基于所述受试者的临床参数的一个或任何组合, 所述临床参数选自以下组成的群组: 受试者年龄、结节大小、受试者性别、结节边缘 (是否有毛刺)、结节位置、受试者癌症史、受试者癌症家族史和吸烟史 (包括吸烟强度)。

20. 根据权利要求18或权利要求19所述的方法, 其包括评估所述肺结节为非小细胞肺癌 (NSCLC) 的风险。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法, 其中所述血液样本是全血样本、血浆样本或血清样本。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述探针组是作为可寻址探针阵列提供的捕获探针组。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述可寻址探针阵列存在于磁性传感器装置的磁性传感器芯片上。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述磁性传感器芯片包含两个或更多个具有附着到其表面的捕获探针的磁性传感器。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述两个或更多个具有附着到其表面的捕获探针的磁性传感器中的每一个都包含用于结合相同分析物的捕获探针。

26. 根据权利要求24或权利要求25所述的方法, 其中每个磁性传感器包含磁阻元件。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述磁阻元件是自旋阀磁阻元件或磁隧道结 (MTJ) 磁阻元件。

28. 根据权利要求23至27中任一项所述的方法, 其中检测所述分析物与所述探针组的探针的结合的存在包括检测与捕获的分析物结合的磁标记检测试剂。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中所述磁标记检测试剂间接地与所述捕获的分析物结合。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述磁标记检测试剂是复合物的一部分,所述复合物包含捕获探针、所述分析物、与所述分析物特异性结合的主要检测试剂和与所述主要检测试剂结合的磁标记检测试剂。

31. 根据权利要求23至30中任一项所述的方法,其中检测所述分析物与所述探针组的探针的结合的存在包括检测由所述磁标记检测试剂感应的所述磁阻元件中的电阻变化。

32. 一种传感器装置,其包含:

作为可寻址探针阵列提供的捕获探针组,其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针,所述分析物包含:

癌胚抗原(CEA)、C-X-C基序趋化因子配体4(CXCL4)、C-X-C基序趋化因子配体7(CXCL7)和C-X-C基序趋化因子配体10(CXCL10)中的两种或更多种;和

表皮生长因子受体(EGFR)、前表面活性蛋白B(pro-SFTPB)和金属蛋白酶1组织抑制剂(TIMP1)中的一种或多种。

33. 根据权利要求32所述的传感器装置,其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针,所述分析物包含CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10中的三种或每一种。

34. 根据权利要求32所述的传感器装置,其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针,所述分析物包含CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10。

35. 根据权利要求32至34中任一项所述的传感器装置,其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针,所述分析物包含EGFR、pro-SFTPB和TIMP1中的两种或每一种。

36. 根据权利要求32至34中任一项所述的传感器装置,其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针,所述分析物包含EGFR、pro-SFTPB和TIMP1。

37. 根据权利要求32至36中任一项所述的传感器装置,其中所述组进一步包含一种或多种探针,其用于特异性结合附加分析物中的一种或任何组合,所述附加分析物选自以下组成的群组:

抗血管生成素样蛋白3抗体(抗ANGPTL3)、抗14-3-3蛋白 θ 抗体(抗YWHAQ)、抗层粘连蛋白 α 1抗体(抗LAMR1)、人附睾蛋白4(HE4)、前梯度蛋白2(AGR2)、嗜铬粒蛋白A(CHGA)、亮氨酸丰富 α -2-糖蛋白1(LRG1)、抗膜联蛋白1抗体(抗ANXA1)、抗泛素1抗体(抗UBQLN1)、白介素6(IL6)、白介素8(IL8)、C-X-C基序趋化因子配体2(CXCL2)、C-X-C基序趋化因子配体12(CXCL12)、C-X-C基序趋化因子配体14(CXCL14)、防御素 β 1(DEFB1)、成纤维细胞生长因子2(FGF2)、分化簇97(CD97)、前血小板碱性蛋白(PPBP)、降钙素原(PCT)、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、S100钙结合蛋白A4(S100A4)、S100钙结合蛋白A8(S100A8)和骨桥蛋白(OPN)。

38. 根据权利要求32至37中任一项所述的传感器装置,其中所述探针组包含用于结合4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、15种或更多种、20种或更多种或25种或更多种分析物的探针。

39. 根据权利要求32至38中任一项所述的传感器装置,其中所述探针组包含用于特异性结合200种或更少的分析物、150种或更少的分析物、125种或更少的分析物、100种或更少的分析物、75种或更少的分析物、50种或更少的分析物、40种或更少的分析物、30种或更少的分析物或25种或更少的分析物的探针。

40. 根据权利要求32至39中任一项所述的传感器装置,其中所述探针组包含用于结合循环肿瘤细胞的探针。

41. 根据权利要求32至40中任一项所述的传感器装置, 其中所述探针组包含用于结合肿瘤DNA的探针。

42. 根据权利要求32至41中任一项所述的传感器装置, 其中所述传感器装置是磁性传感器装置。

43. 根据权利要求42所述的传感器装置, 其中所述磁性传感器装置包含磁性传感器芯片, 所述磁性传感器芯片包含所述捕获探针组。

44. 根据权利要求43所述的传感器装置, 其中所述磁性传感器芯片包含两个或更多个具有附着到其表面的捕获探针的磁性传感器。

45. 根据权利要求44所述的传感器装置, 其中所述两个或更多个具有附着到其表面的捕获探针的磁性传感器包含用于结合相同分析物的捕获探针。

46. 根据权利要求44或权利要求45所述的传感器装置, 其中每个磁性传感器包含磁阻元件。

47. 根据权利要求46所述的传感器装置, 其中所述磁阻元件是自旋阀磁阻元件或磁隧道结 (MTJ) 磁阻元件。

48. 一种试剂盒, 其包含:

用于特异性结合分析物的探针组, 所述分析物包含:

癌胚抗原 (CEA)、C-X-C基序趋化因子配体4 (CXCL4)、C-X-C基序趋化因子配体7 (CXCL7) 和C-X-C基序趋化因子配体10 (CXCL10) 中的两种或更多种; 和

表皮生长因子受体 (EGFR)、前表面活性蛋白B (pro-SFTPB) 和金属蛋白酶1组织抑制剂 (TIMP1) 中的一种或多种; 和

使来自受试者的血液样本与所述探针组接触以产生所述受试者的循环分析物概况的说明。

49. 根据权利要求48所述的试剂盒, 其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针, 所述分析物包含CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10中的三种或每一种。

50. 根据权利要求48所述的试剂盒, 其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针, 所述分析物包含CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10。

51. 根据权利要求48至50中任一项所述的试剂盒, 其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针, 所述分析物包含EGFR、pro-SFTPB和TIMP1中的两种或每一种。

52. 根据权利要求48至50中任一项所述的试剂盒, 其中所述组包含用于特异性结合分析物的探针, 所述分析物包含EGFR、pro-SFTPB和TIMP1。

53. 根据权利要求48至52中任一项所述的试剂盒, 其中所述组进一步包含一种或多种用于特异性结合附加分析物中的一种或任何组合的探针, 所述附加分析物选自以下组成的群组:

抗血管生成素样蛋白3抗体 (抗ANGPTL3)、抗14-3-3蛋白 θ 抗体 (抗YWHAQ)、抗层粘连蛋白 α 1抗体 (抗LAMR1)、人附睾蛋白4 (HE4)、前梯度蛋白2 (AGR2)、嗜铬粒蛋白A (CHGA)、亮氨酸丰富 α -2-糖蛋白1 (LRG1)、抗膜联蛋白1抗体 (抗ANXA1)、抗泛素1抗体 (抗UBQLN1)、白介素6 (IL6)、白介素8 (IL8)、C-X-C基序趋化因子配体2 (CXCL2)、C-X-C基序趋化因子配体12 (CXCL12)、C-X-C基序趋化因子配体14 (CXCL14)、防御素, β 1 (DEFB1)、成纤维细胞生长因子2 (FGF2)、分化簇97 (CD97)、前血小板碱性蛋白 (PPBP)、降钙素原 (PCT)、晚期糖基化终末产物

受体 (RAGE)、S100钙结合蛋白A4 (S100A4)、S100钙结合蛋白A8 (S100A8) 和骨桥蛋白 (OPN)。

54. 根据权利要求48至53中任一项所述的试剂盒, 其中所述探针组包含用于结合4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、15种或更多种、20种或更多种或25种或更多种分析物的探针。

55. 根据权利要求48至54中任一项所述的试剂盒, 其中所述探针组包含用于特异性结合200种或更少的分析物、150种或更少的分析物、125种或更少的分析物、100种或更少的分析物、75种或更少的分析物、50种或更少的分析物、40种或更少的分析物、30种或更少的分析物或25种或更少的分析物的探针。

56. 根据权利要求48至55中任一项所述的试剂盒, 其中所述探针组包含用于结合循环肿瘤细胞的探针。

57. 根据权利要求48至56中任一项所述的试剂盒, 其中所述探针组包含用于结合肿瘤DNA的探针。

58. 根据权利要求48至57中任一项所述的试剂盒, 其中所述说明包含用于使来自具有高肺癌风险的群体的受试者的血液样本与所述探针组接触以产生所述受试者的循环分析物概况的说明。

59. 根据权利要求58所述的试剂盒, 其中所述说明包含用于使来自为以前或当前吸烟者的受试者的血液样本与所述探针组接触以产生所述受试者的循环分析物概况的说明。

60. 根据权利要求58或权利要求59所述的试剂盒, 其中所述说明包含用于使来自具有肺结节的受试者的血液样本与所述探针组接触以产生所述受试者的循环分析物概况的说明。

61. 根据权利要求60所述的试剂盒, 其中所述说明进一步包括用于基于所述受试者的循环分析物概况评估所述肺结节为恶性的风险的说明。

产生循环分析物概况的方法和实施该方法的装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年4月4日提交的第62/829,245号美国临时申请的权益,其公开内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 在美国,肺癌仍然是最致命的和第二大流行的癌症,其中IV期晚期非小细胞肺癌(NSCLC)的五年存活率为5-15%。NSCLC是最常见的肺癌类型,而当提早在仍处于I期时发现时,五年存活率差不多为80%。因此,检测早期疾病已经成为深入研究的焦点,并且正在进行旨在鉴定有患肺癌风险人群的公共健康计划。肺癌的第一风险仍旧是吸烟,据CDC报道,高达90%的肺癌死亡与吸烟有关。美国预防服务工作组(USPSTF)已经提出了如下建议:针对年龄为55至80岁、具有30包年吸烟史的成年人,利用低剂量计算机断层扫描(LDCT)进行年度肺癌筛选,无论他们是当前吸烟者还是在过去15年中已经戒烟的先前吸烟者。因此,越来越多的个体接受作为肺癌第一指征的肺结节证据的年度LDCT筛选。LDCT扫描中出现结节不是肺癌的证据,因为非癌结节也出现在肺中,并且出现频率比癌结节高得多。在LDCT扫描所发现的肺结节中,高达94%是良性疾病造成的。此类高比率的假阳性结果使数十万个人经受不必要的干预和侵入性程序,这不仅会引起显著的伤害,而且会对已经负担过度的健康护理系统造成显著的负担。需要一种有效的非侵入性方法来评估LDCT所检测到的肺结节是癌性还是良性病变。

发明内容

[0004] 本公开的方面包括产生受试者的循环分析物概况的方法。所述方法包括使来自受试者的血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触,和检测分析物与探针组的探针的结合是否存在。在一些实施例中,所述探针组包括用于特异性结合分析物的探针,所述分析物包括癌胚抗原(CEA)、C-X-C基序趋化因子配体4(CXCL4)、C-X-C基序趋化因子配体7(CXCL7)和C-X-C基序趋化因子配体10(CXCL10)中的两种、三种或每一种。在一些实施例中,此类探针组进一步包括用于与表皮生长因子受体(EGFR)、前表面活性蛋白B(pro-SFTPB)和金属蛋白酶1组织抑制剂(TIMP1)中的两种或每一种特异性结合的探针。还提供了包括捕获探针组并且可用于例如实施本公开的方法的传感器装置(例如,磁性传感器装置)。

附图说明

[0005] 图1通过吸烟史分层的405个样本中生物标记物的分布。

[0006] 图2与Mayo模型ROC曲线相比的用先前吸烟者1/3子组训练并在2/3子组上测试的模型217_3092的ROC曲线。

[0007] 图3与Mayo模型ROC曲线相比的用先前吸烟者1/3子组训练并在2/3子组中的Mayo模型中度风险(IR)受试者上测试的模型217_3092的ROC曲线。

[0008] 图4与Mayo模型ROC曲线相比的用当前吸烟者2/3子组训练并在1/3子组上测试的

模型217_3092的ROC曲线。

[0009] 图5与Mayo模型ROC曲线相比的用当前吸烟者2/3子组训练并在1/3子组中的Mayo模型中度风险 (IR) 受试者上测试的模型217_3092的ROC曲线。

具体实施方式

[0010] 本公开的方面包括产生受试者的循环分析物概况的方法。所述方法包括使来自受试者的血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触,和检测分析物与探针组的探针的结合是否存在。还提供了包括捕获探针组并且可用于例如实施本公开的方法的传感器装置。

[0011] 在更详细地描述本公开的方法、装置和试剂盒之前,应理解,所述方法、装置和试剂盒不限于所描述的特定实施例,因为此类方法、装置和试剂盒当然可以变化。还应理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不旨在限制,因为方法、装置和试剂盒的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0012] 在提供值的范围的情况下,应理解的是,除非上下文另有明确规定,否则在该范围的上限和下限之间的每个中间值,至下限单位的十分之一和所述范围内的任何其它所述或中间值均涵盖在方法、装置和试剂盒中。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在较小范围内,并且也涵盖在方法、装置和试剂盒内,服从所述范围内的任何具体排除的限制。当所述范围包括一个或两个限制时,排除那些包括的限制中的一个或两个的范围也包括在所述方法、装置和试剂盒中。

[0013] 本文给出了某些范围,其中数值前面有术语“约”。术语“约”在本文中用于提供其后面的确切数字的字面支持,以及接近或近似所述术语后面的数字的数字。在确定数字是否接近或近似具体记载的数字时,接近或近似未记载的数字可以是在其呈现的上下文中提供具体记载的数字的实质等同物的数字。

[0014] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与所述方法、装置和试剂盒所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的任何方法、装置和试剂盒也可用于实施或测试所述方法、装置和试剂盒,但现在描述代表性的说明性方法、装置和试剂盒。

[0015] 本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利被具体和单独地指出通过引用并入并且通过引用并入本文以公开和描述与引用所述出版物相关的材料和/或方法。任何出版物的引用均为其在申请日之前的公开,并且不应被解释为承认方法、装置和试剂盒无权先于此类出版物,因为所提供的出版日期可能与可能需要独立确认的实际出版日期不同。

[0016] 要注意,如在本文中和在所附权利要求中所使用,单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数个指示物,除非上下文另有明确指示。还要注意,权利要求可以被起草成排除任何可选元素。因此,该声明意图用作诸如连接权利要求元素的列举的“单独地”、“仅仅”等的排外性术语的使用或“负面”限制的使用的先行基础。

[0017] 应当理解,清楚起见,在单独的实施例的上下文中描述的方法、装置和试剂盒的某些特征也可以组合提供在单个实施例中。相反,简洁起见,在单个实施例的上下文中描述的方法、装置和试剂盒的各种特征也可单独地或以任何合适的子组合提供。实施例的所有组

合由本公开具体包括,并且在本文中公开,就好像每一个组合被单独和明确地公开,在这个意义上这种组合包括可操作的方法和/或组合物。此外,在描述此类变量的实施例中列出的所有子组合也被本方法、装置和试剂盒具体地包含并且公开在本文中,就好像每一个此类子组合在本文中被单独和明确地公开一样。

[0018] 本领域技术人员在阅读本公开时将理解,本文描述和示例的每个单独实施例具有离散的部件和特征,其可以容易地与任何其它几个实施例的特征分离或组合而不脱离本方法的范围或精神。任何记载的方法可以按照所记载事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行。

[0019] 方法

[0020] 本公开的方面包括产生受试者的循环分析物概况的方法。所述方法包括使来自受试者的血液样本与用于特异性结合分析物的探针组接触,和检测分析物与探针组的探针的结合是否存在。在某些方面,检测包括量化检测的分析物。

[0021] 探针组中的探针可以是与目标分析物特异性结合的任何分子。目标分析物包括但不限于蛋白质(包括非抗体蛋白质、抗体蛋白质等)、核酸(例如,肿瘤DNA或RNA)和细胞,例如循环肿瘤细胞。可以根据待检测的分析物的性质来选择探针组的探针。例如,如果两种或更多种分析物之一是蛋白质(例如,非抗体蛋白质或抗体蛋白质),则特异性结合该蛋白质的抗体、配体等可用作探针组中的探针。如果两种或更多种分析物之一是抗体,则该抗体的相应抗原可以用作探针组中的探针,或者可以使用与抗体结合的抗体。例如,如果两种或更多种分析物之一是核酸,则与该核酸的独特区域充分互补以在所需接触条件下实现特异性结合的核酸可用作探针组中的探针。蛋白质(例如,核酸结合蛋白、抗体等)也可用于与核酸分析物结合。

[0022] 术语“结合”是指由于例如共价、静电、疏水、离子和/或氢键相互作用而导致的两个分子之间的直接结合。探针组的探针与其相应的分析物特异性结合。非特异性结合(NSB)通常是指抗体与其同源抗原以外的某种物质(诸如样本中的各种其他抗原)的结合。在某些测定条件下,NSB是指以小于约 10^{-7} M的亲和力结合,例如以 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M等的亲和力结合。

[0023] “特异性结合(specifically binds)”或“特异性结合(specific binding)”是指探针以例如大于或等于约 10^5M^{-1} 的亲和力或 K_a (即,以1/M为单位的特定结合相互作用的平衡结合常数)与其相应的分析物结合。在某些实施例中,细胞外结合结构域以大于或等于约 10^6M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、 10^{12}M^{-1} 或 10^{13}M^{-1} 的 K_a 结合抗原。“高亲和力”结合是指以至少 10^7M^{-1} 、至少 10^8M^{-1} 、至少 10^9M^{-1} 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 10^{12}M^{-1} 、至少 10^{13}M^{-1} 或更高的 K_a 结合抗原。或者,亲和力可定义为以M为单位的特定结合相互作用的平衡解离常数(KD)(例如, 10^{-5} M至 10^{-13} M,或更少)。在一些实施例中,特异性结合是指胞外结合域以小于或等于约 10^{-5} M、小于或等于约 10^{-6} M、小于或等于约 10^{-7} M、小于或等于约 10^{-8} M、或小于或等于约 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、或 10^{-12} M或更少的KD结合靶分子。可以使用常规技术例如通过竞争性ELISA(酶联免疫吸附测定)、平衡透析、通过使用表面等离子共振(SPR)技术(例如,BIAcore 2000仪器,使用制造商概述的一般程序)、通过放射免疫测定等容易地确定探针对其靶分析物的结合亲和力。

[0024] 探针组包括合适数量的用于特异性结合多种独特的循环目标分析物的探针。根据

某些实施例,探针组包括合适数量的探针,其用于特异性结合4至5种分析物、6至10种分析物、10至15种分析物、15至20种分析物、20至25种分析物、25至30种分析物、30至35种分析物、35至40种分析物、40至45种分析物、45至50种分析物、50至60种分析物、60至70种分析物、70至80种分析物、80至90种分析物、90至100种分析物、100至200种分析物、200至300种分析物、300至400种分析物、400至500种分析物或500至1000种分析物。

[0025] 在某些实施例中,探针组包括用于特异性结合4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、15种或更多种、20种或更多种或25种或更多种分析物的探针。根据一些实施例,探针组包括用于特异性结合200种或更少的分析物、150种或更少的分析物、125种或更少的分析物、100种或更少的分析物、75种或更少的分析物、50种或更少的分析物、40种或更少的分析物、30种或更少的分析物、25种或更少的分析物、20种或更少的分析物、15种或更少的分析物或10种或更少的分析物的探针。

[0026] 根据一些实施例,探针组包括用于以任意所需组合特异性结合以下物质中的两种或更多种(例如,3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种或10种或更多种)的探针:癌胚抗原(CEA)、C-X-C基序趋化因子配体4(CXCL4——也称为血小板因子4(或PF4))、C-X-C基序趋化因子配体7(CXCL7——也称为中性粒细胞激活蛋白2(或NAP2))、C-X-C基序趋化因子配体10(CXCL10——也称为干扰素 γ 诱导蛋白10(或IP10))、表皮生长因子受体(EGFR)、前表面活性蛋白B(pro-SFTPb)、金属蛋白酶1组织抑制剂(TIMP1)、抗血管生成素样蛋白3抗体(抗ANGPTL3)、抗14-3-3蛋白 θ 抗体(抗YWHAQ)、抗层粘连蛋白 α 1抗体(抗LAMR1)、人附睾蛋白4(HE4)、前梯度蛋白2(AGR2)、嗜铬粒蛋白A(CHGA)、亮氨酸丰富 α -2-糖蛋白1(LRG1)、抗膜联蛋白1抗体(抗ANXA1)、抗泛素1抗体(抗UBQLN1)、白介素6(IL6)、白介素8(IL8)、C-X-C基序趋化因子配体2(CXCL2)、C-X-C基序趋化因子配体12(CXCL12)、C-X-C基序趋化因子配体14(CXCL14)、防御素 β 1(DEFB1)、成纤维细胞生长因子2(FGF2)、分化簇97(CD97)、前血小板碱性蛋白(PPBP)、降钙素原(PCT)、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、S100钙结合蛋白A4(S100A4)、S100钙结合蛋白A8(S100A8)和骨桥蛋白(OPN)。

[0027] 在某些实施例中,探针组包括用于以任意所需组合特异性结合CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10中的一种、两种、三种或每一种的探针。根据一些实施例,此类探针组进一步包括用于以任意所需组合特异性结合EGFR、pro-SFTPb和TIMP1中的一种、两种或每一种的探针。在某些实施例中,此类探针组进一步包括一种或多种以任意所需组合结合附加分析物中的一种或任何组合的探针,所述附加分析物选自抗ANGPTL3、抗YWHAQ、抗LAMR1、HE4、AGR2、CHGA、LRG1、抗ANXA1、抗UBQLN1、IL6、IL8、CXCL2、CXCL12、CXCL14、DEFB1、FGF2、CD97、PPBP、PCT、RAGE、S100A4、S100A8和OPN,其中所述方法进一步包括检测附加分析物中的一种或任何组合与探针组探针的结合是否存在以产生受试者的循环分析物概况。

[0028] 根据一些实施例,探针组包括用于结合一种或多种类型的循环细胞的一种或多种探针。目标循环细胞包括但不限于循环肿瘤细胞和循环干细胞。“循环肿瘤细胞”(CTC)是指从受试者的实体瘤脱落并在受试者的循环如受试者的外周血、骨髓等中发现的癌细胞。探针可以借助于探针对由目标循环细胞表达的已知细胞表面分子(例如,受体、粘附分子等)具有特异性来结合循环细胞(例如,CTC)。当循环细胞是CTC时,探针(例如,抗体探针)可特

异性结合CTC表达的肿瘤相关或肿瘤特异性抗原。“肿瘤相关抗原”是指在恶性细胞上表达的细胞表面分子,其在正常组织的细胞上的表达有限,或在恶性细胞上表达的细胞表面分子比在正常细胞上表达的细胞表面分子的密度高得多。“肿瘤特异性抗原”是存在于恶性细胞表面上而不存在于非恶性细胞上的抗原。可以被探针组的探针结合的CTC的类型可以变化,例如,根据CTC脱落的实体瘤的类型而变化。在某些方面,探针组可以包括特异性结合CTC的探针,所述探针特异性结合上皮细胞粘附分子(EpCAM)和/或任何其它有用的细胞表面CTC分子。因此,在一些实施例,探针组进一步包括用于结合循环肿瘤细胞的探针,其中所述方法进一步包括检测循环肿瘤细胞与探针组探针的结合是否存在以产生受试者的循环分析物概况。在某些实施例,检测循环肿瘤细胞的结合是否存在包括定量检测的循环肿瘤细胞。

[0029] 根据某些实施例,探针组包括用于结合一种或多种类型的循环核酸的一种或多种探针。目标循环核酸包括循环双链或单链DNA、循环双链或单链RNA、循环DNA-RNA杂交体等。在某些方面,组包括用于特异性结合一种或多种循环肿瘤DNA(ctDNA)的一种或多种探针。垂死的肿瘤细胞将其DNA的小片段释放到血流中,并且血液中ctDNA的量/浓度通常随着癌症阶段的增加而增加。根据某些实施例,探针组包括用于特异性结合ctDNA的探针,其包括已知与目标肿瘤类型相关(或对目标肿瘤类型具有特异性)的体细胞突变。临床相关的ctDNA包括Bettegowda等人(2014)《科学转化医学(Sci.Transl.Med.)》6(224):224ra24中描述的那些。因此,在一些实施例,探针组进一步包括用于结合肿瘤DNA的探针,其中所述方法进一步包括检测肿瘤DNA与探针组的探针的结合是否存在,以产生受试者的循环分析物概况。在某些实施例,检测肿瘤DNA的结合是否存在包括定量检测的肿瘤DNA。

[0030] 本公开的方法包括检测分析物与探针组的探针的结合是否存在,以产生受试者的循环分析物概况。在某些方面,检测包括量化检测的分析物。可以采用多种合适的测定形式和检测方法中的任一种。在某些方面,探针组的探针可直接或间接地附着于固体支持物,诸如珠(例如,微粒、纳米颗粒等)或基本上平坦的固体支持物/底物。根据某些实施例,探针可以作为阵列附着于固体支持物。例如,探针组可以是作为可寻址探针阵列提供的探针组。

[0031] 在某些方面,使用夹心测定来检测两种或更多种分析物中的分析物与探针组的探针的结合是否存在。例如,探针组的探针可以附着于固体表面(例如,作为阵列)以捕获分析物,并且添加检测试剂,其在分析物未被探针结合的位点处与分析物(如果存在于血液样本中)结合(例如,特异性结合)。在某些方面,检测试剂是结合分析物的表位的检测抗体,所述表位不同于与探针组的探针结合的位点(例如,表位)。结果,分析物被“夹”在探针和检测试剂之间。检测试剂可包括可检测标记,使得检测两种或更多种分析物中的分析物与探针组的探针的结合是否存在涉及检测检测试剂的标记。根据某些实施例,使用第二检测试剂。合适的第二试剂包括标记的第二抗体(例如,荧光标记的抗体、磁性标记的抗体等),与催化底物向可检测产物转化的酶连接的第二抗体等。可用于实施本公开的方法的夹心和和其它测定的附加细节和设计考虑描述于例如Cox等人(2014)《免疫测定方法(Immunoassay Methods)》,Eli Lilly&Company and the National Center for Advancing Translational Sciences。

[0032] 在某些方面,与探针结合的分析物结合的检测试剂是抗体。此类检测试剂可以是修饰的抗体。修饰的抗体可以被配置为与目标分析物特异性结合并且还可以包括特异性结

合对的一个或多个附加成员。特异性结合对的一个或多个成员可以被配置为与特异性结合对的互补成员特异性结合。在某些情况下,特异性结合对的互补成员与磁性标记结合,例如,当使用磁性传感器装置来实施所述方法时。可以修饰抗体检测试剂以包括生物素,该生物素将特异性结合链霉亲和素,例如修饰为包括链霉亲和素的磁性标记。因此,在某些方面,检测试剂与分析物特异性结合(例如,通过抗体-抗原相互作用)并通过选择的相互作用(例如,通过链霉亲和素-生物素相互作用)与标记(例如,磁性标记)特异性结合。检测试剂可被配置为结合分析物和标记(例如,磁性标记)。换言之,检测试剂可以被配置为使得分析物与检测试剂的特异性结合不会显著干扰检测试剂与标记特异性结合的能力。类似地,检测试剂可以被配置为使得标记与检测试剂的特异性结合不会显著干扰检测试剂与分析物结合的能力。

[0033] 血液样本中的分析物可以定性或定量测定。定性确定包括向用户提供样本中是否存在分析物的简单是/否结果的确定。定量测定包括半定量测定,其中向用户提供关于样本中分析物的量的粗略规模结果,例如低、中、高规模结果,以及向用户提供分析物浓度的精确测量的精细规模结果。

[0034] 循环分析物概况可以由获自多种受试者中的任一个的血液样本(例如,全血液样本、血浆样本或血清样本)产生。通常这种个体是“哺乳动物”或“哺乳类动物”,其中这些术语广泛用于描述哺乳纲内的生物体,包括食肉目(例如,狗和猫),啮齿目(例如,小鼠、豚鼠和大鼠)和灵长目(例如,人、黑猩猩和猴)。在一些实施例中,循环分析物概况由获自人类受试者的血液样本产生。

[0035] 根据一些实施例,产生其循环分析物概况的受试者来自具有高肺癌风险的群体。由于多种遗传、行为和/或环境因素,受试者可能处于肺癌的高风险中。根据某些实施例,受试者来自因受试者是先前吸烟者(例如,过去的重度吸烟者)或当前吸烟者而具有肺癌高风险的群体。“先前吸烟者”是指在从受试者获得用于所述方法的血液样本时该受试者不是吸烟者。我的“当前吸烟者”是指在从受试者获得用于所述方法的血液样本时受试者是吸烟者。根据某些实施例,受试者来自具有肺癌高风险的群体是指受试者为55至74岁,具有30包年或更多的最小吸烟史(其中“包年”等于每天吸的香烟包数×吸烟的年数),当前吸烟或在过去15年内戒烟,并且在产生循环分析物概况时显然没有疾病。例如,过去的重度吸烟者可能有30包年或更多的吸烟史。

[0036] 在某些方面,产生其循环分析物概况的受试者具有肺结节(或“病变”),例如不确定的肺结节/病变。在一些情况下,通过低剂量计算机断层扫描(LDCT)、胸部X射线、胸部CT扫描、胸部MRI、胸部正电子发射断层成像(PET)或其他合适的成像方法扫描识别/检测不确定的肺结节。不确定的结节可以是良性的(非癌症)并且由瘢痕、炎症、感染等引起。在其他情况下,结节可以是恶性的,例如肺癌(例如,早期肺癌)或从体内的另一种癌症扩散到肺部的癌症。如本文进一步描述和以下实验部分所证明的,受试者的循环分析物概况可形成评估肺结节恶性风险的基础(例如,完全或部分基础)。

[0037] 基于磁性传感器的方法

[0038] 根据某些实施例,本公开的方法使用磁性传感器装置进行。例如,探针组可以排列(例如,作为可寻址探针阵列提供)在磁性传感器装置的磁性传感器芯片上。磁性传感器装置可具有两个或更多个磁性传感器,其具有附着到其表面的探针组(例如,相同或不同的捕

获探针阵列)。可以使用上述探针组中的任一个。在某些方面,具有附着到其表面的捕获探针组的两个或更多个磁性传感器中的每一个包括用于结合相同循环分析物的捕获探针。

[0039] 采用磁性传感器装置的本公开的方法可包括使具有附着到其表面(例如,排列)的捕获探针组的磁性传感器装置与血液样本接触并检测指示分析物(如果存在于血液样本中)与捕获探针组结合的信号。在一些情况下,磁性传感器装置包括被配置为在没有磁性传感器和磁性标记之间的任何直接物理接触的情况下检测附近磁性标记的存在的传感器。磁性标记可以直接或间接地与分析物结合,分析物又可以直接或间接地与磁性传感器结合。如果结合的磁性标记位于磁性传感器的检测范围内,则磁性传感器可提供指示结合磁性标记存在并因此指示分析物存在的信号。

[0040] 在某些方面,本公开的方法使用夹心测定进行,其中探针组附着到磁性传感器装置的传感区域的表面。在两种或更多种分析物的分析物(如果存在于血液样本中)与其各自的探针结合的条件下,将血液样本分配在传感区域上以使血液样本与探针组接触。在洗涤或不洗涤的情况下,可以添加与两种或更多种分析物中的结合至探针组的探针的分析物结合的检测试剂。在一些情况下,检测试剂直接与磁性标记结合。在其他方面,检测试剂不直接与磁性标记结合,而是采用与检测试剂结合的次级磁性标记检测试剂。例如,检测试剂可以与分析物特异性结合(例如,通过抗体-抗原相互作用)并通过选择的相互作用(例如,通过链霉亲和素-生物素相互作用)与磁性标记特异性结合。检测试剂与表面结合的分析物的结合将磁性标记定位在磁性传感器的检测范围内,使得在磁性传感器中感应指示分析物存在的可检测信号。

[0041] 在某些实施例中,电信号响应于磁性传感器表面附近的磁性标记产生。例如,磁性传感器可以被配置为检测由局部磁场的变化感应的磁性传感器的电阻的变化。在一些情况下,紧邻磁性传感器的磁性标记(例如,磁性纳米颗粒标记)的结合感应磁性传感器电阻的可检测变化。例如,在存在施加的外部磁场的情况下,磁性传感器附近的磁性标记可被磁化。磁化磁性标记的局部磁场可感应下层磁性传感器电阻的可检测变化。因此,可以通过检测磁性传感器电阻的变化来检测磁性标记的存在。如下文将进一步详细描述,可用于实施本公开方法的磁性传感器装置可包括磁阻元件。可以采用的磁阻元件的非限制性示例包括自旋阀磁阻元件和磁隧道结(MTJ)磁阻元件。

[0042] 在一些情况下,所述方法是评价血液样本中分析物存在的免洗方法。“免洗”是指在试剂和/或血液样本与磁性传感器接触后不进行洗涤步骤。因此,在这些实施例的测定期间不进行从磁性传感器表面去除未结合的试剂(例如,未结合的磁性标记)或未结合的样本的步骤。因此,虽然所述方法可包括一种或多种不同试剂和/或样本与磁性传感器表面的顺序接触,但在测定期间的任何时候样本表面都不会以从磁性传感器表面去除未结合的试剂或样本的方式与流体接触。例如,在某些实施例中,在磁性传感器表面与血液样本接触后不进行洗涤步骤。在一些情况下,所述方法不包括在磁性传感器表面与磁性标记接触之后的洗涤步骤。在某些情况下,在磁性传感器表面与检测试剂接触后不进行洗涤步骤。

[0043] 在进行洗涤步骤的某些实施例中,洗涤步骤基本上不改变来自磁性传感器的信号。洗涤步骤可能不会导致来自磁性传感器的信号的实质性变化,因为在一些情况下,未结合的磁性标记不具有如本文所述的基本上可检测的信号。例如,如果进行洗涤步骤,在一些情况下,与洗涤步骤之前获得的信号相比,洗涤步骤导致信号变化为25%或更少,例如20%

或更少,或15%或更少,或10%或更少,或5%或更少,或4%或更少,或3%或更少,或2%或更少,或1%或更少。在一些实施例中,洗涤步骤导致来自磁性传感器的信号降低25%或更少,例如20%或更少,或15%或更少,或10%或更少,或5%或更少,或4%或更少,或3%或更少,或2%或更少,或1%或更少。

[0044] 所述方法的实施例还可包括从磁性传感器装置获得实时信号。“实时”是指信号在产生时被观察到。例如,实时信号是从其启动时刻获得,并在给定的时间段内连续获得。因此,某些实施例包括观察与目标结合相互作用的发生相关的信号的实时演变(例如,两种或更多种目标分析物的分析物与磁性传感器的结合和/或磁性标记与目标分析物的结合)。实时信号可以包括在给定时间段内获得的两个或更多个数据点,其中在某些实施例中,获得的信号是在目标给定时间段内连续获得的一组连续数据点(例如,以轨迹的形式)。目标时间段可以变化,在一些情况下范围为0.5分钟至60分钟,例如1分钟至30分钟,包括1分钟至15分钟,或1分钟至10分钟。例如,所述时间段可以在实时信号启动的时刻开始并且可以持续直到传感器达到最大或饱和水平(例如,传感器上的所有分析物结合位点都被占据)。例如,在一些情况下,所述时间段从血液样本与传感器接触时开始。在一些情况下,所述时间段可以在血液样本与传感器接触之前开始,例如以在样本与传感器接触之前记录基线信号。信号中数据点的数量也可以变化,其中在一些情况下,数据点的数量足以在实时信号的时间过程中提供连续延伸的数据。“连续”是指以每分钟1个数据点或更多的重复率重复获得数据点,例如每分钟2个数据点或更多,包括每分钟5个数据点或更多,或每分钟10个数据点或更多,或每分钟30个数据点或更多,或每分钟60个数据点或更多(例如,每秒1个数据点或更多),或每秒2个数据点或更多,或每秒5个数据点或更多,或每秒10个数据点或更多,或每秒20个数据点或更多,或每秒50个数据点或更多,或每秒75个数据点或更多,或每秒100个数据点或更多。

[0045] 实时信号可以是实时分析物特异性信号。实时分析物特异性信号是仅从两种或更多种目标分析物的特定分析物获得的上述实时信号。在这些实施例中,未结合的分析物和未结合的磁性标记不产生可检测信号。因此,获得的实时信号仅来自与磁性传感器结合的特定磁性标记的目标分析物,并且基本上没有从未结合的磁性标记或其他试剂(例如,未与传感器特异性结合的分析物)获得信号。

[0046] 在一些实施例中,在测定装置处于湿条件下时观察到信号。“湿”或“湿条件”是指测定组合物(例如,包括血液样本、磁性标记和一种或多种检测试剂的测定组合物)仍然与磁性传感器的表面接触。因此,无需进行任何洗涤步骤来去除非目标的未结合部分或多余的未结合磁性标记或捕获探针。在某些实施例中,如上所述,磁性标记和磁性传感器的使用有利于“湿”检测,因为磁性标记在磁性传感器中感应的信号随着磁性标记和磁性传感器表面之间的距离增加而降低。例如,如上所述,磁性标记和磁性传感器的使用可以促进“湿”检测,因为磁性标记产生的磁场随着磁性标记和磁性传感器表面之间的距离增加而降低。在一些情况下,与表面结合的分析物结合的磁性标记的磁场显著超过来自分散在溶液中的未结合磁性标记的磁场。例如,如上所述,实时分析物特异性信号可以仅从与磁性传感器结合的特定磁性标记的目标分析物获得,并且基本上没有信号可以从分散在溶液中的未结合磁性标记(例如,没有与传感器特异性结合)获得。分散在溶液中的未结合磁性标记可能与磁性传感器的表面相距更远,并且可以进行布朗运动,从而可以降低未结合磁性标记感应磁

性传感器电阻可检测变化的能力。未结合的磁性标记也可以悬浮在溶液中,例如作为胶体悬浮液(例如,由于具有纳米级尺寸),这可以降低未结合的磁性标记感应磁性传感器电阻可检测变化的能力。

[0047] 可用于各种方法(例如,如本文所述)的磁性标记可以变化,并且包括当磁性标记位于磁性传感器表面附近时在磁性传感器中感应可检测信号的任何类型的标记。磁性标记是标记部分,当与磁性传感器充分结合时,其可被磁性传感器检测并导致磁性传感器输出信号。例如,磁性传感器表面附近的磁性标记的存在可感应磁性传感器中可检测的变化,诸如但不限于电阻、电导、电感、阻抗等的变化。在一些情况下,磁性传感器表面附近的磁性标记的存在感应磁性传感器电阻的可检测变化。如果磁性标记中心与传感器表面之间的距离为1000nm或更小,诸如800nm或更小,例如400nm或更小,包括100nm或更小,或75nm或更小,或50nm或更小,或25nm或更小,或10nm或更小,则目标磁性标记可能与磁性传感器充分结合。

[0048] 在某些情况下,磁性标记包括一种或多种选自顺磁、超顺磁、铁磁、亚铁磁、反铁磁材料、它们的组合等的材料。例如,磁性标记可以包括超顺磁材料。在某些实施例中,磁性标记被配置为在没有外部磁场的情况下是非磁性的。“非磁性”是指磁性标记的磁化强度为零或在某个时间段内平均为零。在一些情况下,由于磁性标记的磁化随时间随机翻转,磁性标记可能是非磁性的。在没有外部磁场的情况下被配置为非磁性的磁性标记可以促进磁性标记在溶液中的分散,因为在没有外部磁场的情况下或甚至在存在其中热能仍占主导地位的小磁场的情况下,非磁性标记通常不会团聚。在某些实施例中,磁性标记包括超顺磁材料或合成反铁磁材料。例如,磁性标记可以包括两层或更多层反铁磁耦合的铁磁体。

[0049] 在某些实施例中,磁性标记是高矩磁性标记。磁性标记的磁矩是其与外部磁场对齐趋势的量度。“高矩”是指磁性标记更倾向于与外部磁场对齐。具有高磁矩的磁性标记可以促进在磁性传感器表面附近的磁性标记的存在的检测,因为更容易利用外部磁场感应磁性标记的磁化。

[0050] 在某些实施例中,磁性标记包括但不限于Co、Co合金、铁氧体、氮化钴、氧化钴、Co-Pd、Co-Pt、铁、氧化铁、铁合金、Fe-Au、Fe-Cr、Fe-N、Fe₃O₄、Fe-Pd、Fe-Pt、Fe-Zr-Nb-B、Mn-N、Nd-Fe-B、Nd-Fe-B-Nb-Cu、Ni、Ni合金、它们的组合等。高磁矩磁性标记的示例包括但不限于Co、Fe或CoFe纳米晶体,它们在室温下可以是超顺磁性的,以及合成的反铁磁纳米颗粒。

[0051] 在一些实施例中,将磁性标记的表面改性。在某些情况下,磁性标记可以涂有被配置为促进磁性标记与如上所述的结合对的一个成员稳定结合的层。例如,磁性标记可以涂有金层、聚-L-赖氨酸改性玻璃层、葡聚糖等。在某些实施例中,磁性标记包括嵌入葡聚糖聚合物中的一个或多个氧化铁核。此外,磁性标记的表面可以用一种或多种表面活性剂改性。在一些情况下,表面活性剂有助于增加磁性标记的水溶性。在某些实施例中,磁性标记的表面用钝化层改性。钝化层可促进磁性标记在测定条件下的化学稳定性。例如,磁性标记可以涂有钝化层,该钝化层包括金、氧化铁、聚合物(例如,聚甲基丙烯酸甲酯膜)等。

[0052] 在某些实施例中,磁性标记具有球形形状。或者,磁性标记可以是盘、棒、线圈或纤维。在一些情况下,磁性标记的大小使得磁性标记不干扰目标结合相互作用。例如,磁性标记可以与分析物和捕获探针的大小相当,使得磁性标记不干扰捕获探针与分析物的结合。在一些情况下,磁性标记是磁性纳米颗粒,或含有通过合适的结合剂结合在一起的多个磁

性纳米颗粒。在一些实施例中,磁性标记的平均直径为5nm至250nm,例如5nm至150nm,包括10nm至100nm,例如25nm至75nm。例如,平均直径为5nm、10nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、70nm、80nm、90nm或100nm的磁性标记,以及平均直径范围在这些值中的任意两个之间的磁性标记,可以与主题方法一起使用。在一些情况下,磁性标记的平均直径为50nm。

[0053] 磁性标记及其与生物分子的缀合在题为“使用磁性传感器进行分析物检测 (Analyte Detection With Magnetic Sensors)”的第9,863,939号美国专利中进一步描述,其公开内容出于所有目的特此通过引用以其整体并入本文。

[0054] 风险评估

[0055] 本公开的方法可以进一步包括基于循环分析物概况评估受试者患有疾病或病症的风险。例如,如上文所述和以下实验部分所证明的,产生其循环分析物概况的受试者可能具有不确定的肺结节/病变(在产生受试者的循环分析物概况之前检测,例如通过低剂量计算机断层扫描(LDCT)),并且所述方法可以进一步包括基于受试者的循环分析物概况评估肺结节为恶性(例如,非小细胞肺癌(NSCLC)或其他恶性肿瘤)的风险。例如,可以将循环分析物概况与一个或多个参考概况比较,并且基于所述比较,可以确定不确定肺结节是恶性(相对于良性)的风险。风险评估可以基于高于或低于临界值的循环分析物概况。因此,在某些实施例中,受试者的循环分析物概况表明受试者的肺结节是恶性的。在一些实施例中,产生循环分析物概况并随后使第三方可以得到所述概况,所述第三方诸如产生其循环分析物概况的受试者、他/她的监护人或代表、医生或卫生保健工作者、遗传顾问或保险代理人,例如通过可通过互联网访问的用户界面得到,以及循环分析物概况的解释,例如以结节为恶性的风险度量的形式(诸如绝对风险(AR)、风险比(RR)或优势比(OR))。此类风险评估的结果可以数字形式报告(例如,通过风险值,诸如绝对风险、相对风险和/或优势比,或通过与参考相比风险增加的百分比),通过图形方式,和/或通过适合向第三方说明风险的其他方式。

[0056] 风险评估可仅基于循环分析物概况,或可部分基于循环分析物概况。在风险评估部分基于循环分析物概况的情况下,风险评估可以进一步基于选自受试者年龄、结节大小、结节边缘(是否有毛刺)、结节位置、受试者性别、受试者癌症史、受试者癌症家族史、吸烟状况(例如,以前吸烟者与当前吸烟者)、吸烟史(包括吸烟强度)以及它们的任何组合的受试者的临床参数。

[0057] 治疗

[0058] 本公开的方法可以进一步包括治疗产生其循环分析物概况的受试者。在某些方面,受试者患有不确定肺结节,并且所述方法包括评估不确定肺结节是恶性还是良性的风险。如果评估的肺结节恶性风险满足阈值标准,则可以对结节进行活组织检查以诊断肺结节是恶性还是良性。在一些实施例中,所述方法包括进行此类诊断。如果肺结节被诊断为恶性,在一些实施例中,所述方法包括在诊断之后例如基于诊断治疗受试者。治疗可以包括例如向受试者施用治疗有效量的药剂(例如,化疗剂(例如,克唑替尼、色瑞替尼、艾乐替尼、布加替尼、劳拉替尼(lorlatinib)、厄洛替尼、吉非替尼、阿法替尼、达克替尼、克唑替尼、达拉非尼、曲美替尼等)、小分子、生物制剂(例如,抗体)、工程细胞等)、放射疗法等。可替代地或另外地,治疗可以包括从受试者去除促成(例如,造成)疾病或病症的组织(例如,肿瘤组织)

或器官的全部或部分。治疗可包括手术除去全部或部分癌症(例如,通过肺切除术、肺叶切除术、肺段切除术或楔形切除术、袖状切除术等);全部或部分肿瘤的射频消融(RFA);等等。

[0059] 装置

[0060] 如上所总结的,本公开的方面包括传感器装置(例如,磁性传感器装置)。传感器装置包括用于与分析物特异性结合的探针组。本发明的传感器装置可包括上文在本公开的方法部分和下文实验部分中描述的探针组中的任一个。根据一些实施例,传感器装置包括作为可寻址探针阵列例如在传感器装置的传感区域中提供的捕获探针组。

[0061] 根据一些实施例,本公开的装置包括探针组(例如,作为可寻址探针阵列提供的捕获探针组),其包括用于以任意所需组合特异性结合以下物质中的两种或更多种(例如,3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种,或10种或更多种)的探针:癌胚抗原(CEA)、C-X-C基序趋化因子配体4(CXCL4——也称为血小板因子4(或PF4))、C-X-C基序趋化因子配体7(CXCL7——也称为中性粒细胞激活蛋白2(或NAP2))、C-X-C基序趋化因子配体10(CXCL10——也称为干扰素 γ 诱导蛋白10(或IP10))、表皮生长因子受体(EGFR)、前表面活性蛋白B(pro-SFTPB)、金属蛋白酶1组织抑制剂(TIMP1)、抗血管生成素样蛋白3抗体(抗ANGPTL3)、抗14-3-3蛋白 θ 抗体(抗YWHAQ)、抗层粘连蛋白 α 1抗体(抗LAMR1)、人附睾蛋白4(HE4)、前梯度蛋白2(AGR2)、嗜铬粒蛋白A(CHGA)、亮氨酸丰富 α -2-糖蛋白1(LRG1)、抗膜联蛋白1抗体(抗ANXA1)、抗泛素1抗体(抗UBQLN1)、白介素6(IL6)、白介素8(IL8)、C-X-C基序趋化因子配体2(CXCL2)、C-X-C基序趋化因子配体12(CXCL12)、C-X-C基序趋化因子配体14(CXCL14)、防御素, β 1(DEFB1)、成纤维细胞生长因子2(FGF2)、分化簇97(CD97)、前血小板碱性蛋白(PPBP)、降钙素原(PCT)、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、S100钙结合蛋白A4(S100A4)、S100钙结合蛋白A8(S100A8)和骨桥蛋白(OPN)。

[0062] 在某些实施例中,本公开的装置包括探针组(例如,作为可寻址探针阵列提供的捕获探针组),其包括用于任意所需组合特异性结合CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10中的一种、两种、三种或每一种的探针。根据一些实施例,此类探针组进一步包括用于以任意所需组合特异性结合EGFR、pro-SFTPB和TIMP1中的一种、两种或每一种的探针。在某些实施例中,此类探针组进一步包括一种或多种探针,其用于以任意所需组合特异性结合附加分析物中的一种或任何组合,所述附加分析物选自抗ANGPTL3、抗YWHAQ、抗LAMR1、HE4、AGR2、CHGA、LRG1、抗ANXA1、抗UBQLN1、IL6、IL8、CXCL2、CXCL12、CXCL14、DEFB1、FGF2、CD97、PPBP、PCT、RAGE、S100A4、S100A8和OPN。

[0063] 根据某些实施例,所述装置包括探针组,其用于特异性结合4至5种分析物、6至10种分析物、10至15种分析物、15至20种分析物、20至25种分析物、25至30种分析物、30至35种分析物、35至40种分析物、40至45种分析物、45至50种分析物、50至60种分析物、60至70种分析物、70至80种分析物、80至90种分析物、90至100种分析物、100至200种分析物、200至300种分析物、300至400种分析物、400至500种分析物或500至1000种分析物。

[0064] 在某些实施例中,所述装置包括探针组,其用于特异性结合4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、15种或更多种、20种或更多种、或25种或更多种分析物。根据一些实施例,探针组包括用于特异性结合200种或更少的分析物、150种或更少的分析物、125种或更少的分析物、100种或更少的分析物、75种或更少的分析物、50种或更少的分析物、40种或更少的分析物、30种或更少的分析

物、25种或更少的分析物、20种或更少的分析物、15种或更少的分析物或10种或更少的分析物的探针。

[0065] 本公开的传感器装置中包括的探针组可以进一步包括用于结合循环细胞(诸如循环肿瘤细胞(CTC)、循环干细胞等)和/或循环核酸(诸如循环DNA(例如,循环肿瘤DNA)和/或循环RNA)的探针,如上文所述。

[0066] 磁性传感器装置

[0067] 根据某些实施例,本公开的传感器装置是磁性传感器装置。本公开的磁性传感器装置可包括磁性传感器芯片,所述磁性传感器芯片包括探针组(例如,附着到磁性传感器芯片表面),其包括本文别处描述的任何探针组。在某些方面,磁性传感器芯片包括两个或更多个磁性传感器,其具有附着到其表面的捕获探针(例如,作为可寻址捕获探针阵列)。具有附着到其表面的捕获探针的两个或更多个磁性传感器中的每一个可包括用于结合相同循环分析物的捕获探针。现在将描述磁性传感器装置和系统的方面。

[0068] 磁性传感器

[0069] 在某些方面,本公开的磁性传感器装置包括一个或多个磁性传感器。在一些情况下,一个或多个磁性传感器被配置为在磁性传感器和磁性标记之间没有任何直接物理接触的情况下检测附近磁性标记的存在。在某些实施例中,磁性传感器被配置为检测血液样本中可能存在的两种或更多种循环分析物的分析物的存在。例如,磁性标记可以直接或间接地与分析物结合,分析物又可以直接或间接地与磁性传感器结合。如果结合磁性标记位于磁性传感器的检测范围内,则磁性传感器可提供指示结合磁性标记存在并因此指示分析物存在的信号。

[0070] 在一些情况下,磁性传感器具有距磁性传感器表面1nm至1000nm的检测范围,诸如距磁性传感器表面1nm至800nm,包括1nm至500nm,例如1nm至300nm,包括1nm至100nm,或1nm至75nm,或1nm至50nm,或1nm至25nm,或1nm至10nm。在一些情况下,传感器检测范围的最小化可以促进特异性结合分析物的检测,同时最小化来自非目标分析物的可检测信号。“检测范围”是指距磁性传感器表面的距离,其中磁性标记的存在将感应磁性传感器中的可检测信号。在一些情况下,放置在足够靠近磁性传感器表面以在磁性传感器的检测范围内的磁性标记将感应磁性传感器中的可检测信号。在某些情况下,放置在距磁性传感器表面的距离大于磁性传感器的检测范围的磁性标记将不会感应磁性传感器中的可检测或不可忽略信号。例如,磁性标记可能具有与 $1/r^3$ 成比例的磁通量,其中 r 是磁性传感器和磁性标记之间的距离。因此,只有那些定位紧邻(例如,在磁性传感器的检测范围内)的磁性标记才会感应磁性传感器中的可检测信号。

[0071] 如所述的,探针组的探针可以与磁性传感器表面结合。例如,阳离子聚合物诸如聚乙烯亚胺(PEI)可用于通过物理吸附(物理的吸附)使带电探针(例如,抗体、抗原、配体、核酸等)与传感器表面非特异性结合。或者,可以使用共价化学,利用分析物特异性探针上的游离胺或游离硫醇基团使分析物特异性探针与磁性传感器表面共价结合。例如,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)偶联系统可用于使分析物特异性探针与磁性传感器表面共价结合。

[0072] 在某些实施例中,磁性传感器被配置为响应于磁性传感器表面紧邻的磁性标记而产生电信号。例如,磁性传感器可以被配置为检测由局部磁场的变化感应的磁性传感器电

阻的变化。在一些情况下,如上所述,紧邻磁性传感器的磁性标记(例如,磁性纳米颗粒标记)的结合感应磁性传感器电阻的可检测变化。例如,在存在施加的外部磁场的情况下,可磁化磁性传感器附近的磁性标记。磁化磁性标记的局部磁场可感应下层磁性传感器电阻的可检测变化。因此,可以通过检测磁性传感器电阻的变化来检测磁性标记的存在。在某些实施例中,磁性传感器被配置为检测10hm或更小,例如500m0hm或更小,包括100m0hm或更小,或50m0hm或更小,或25m0hm或更小,或10m0hm或更小,或5m0hm或更小,或1m0hm或更小的电阻变化。在某些实施例中,电阻变化可以以相对于原始传感器电阻的百万分之几(PPM)表示,例如2PPM或更大,或20PPM或更大,或200PPM或更大,或400PPM或更大,或600PPM或更大,或1000PPM或更大,或2000PPM或更大,或4000PPM或更大,或6000PPM或更大,或10,000PPM或更大,或20,000PPM或更大,或40,000PPM或更大,或60,000PPM或更大,或100,000PPM或更大,或200,000PPM或更大的电阻变化。

[0073] 磁性传感器可以包括磁阻元件。合适的磁阻元件包括但不限于自旋阀磁阻元件和磁隧道结(MTJ)磁阻元件。

[0074] 在某些实施例中,磁性传感器元件是自旋阀磁阻元件。在某些情况下,自旋阀元件是多层结构,其包括第一铁磁层、设置在第一铁磁层上的非磁性层和设置在非磁性层上的第二铁磁层。第一铁磁层可以被配置为具有以某个方向固定的磁化矢量。在某些情况下,第一铁磁层被称为“被钉扎层”。在某些实施例中,自旋阀元件包括具有基本上平行于磁性传感器元件的宽度的磁化强度的被钉扎层。第二铁磁层可以被配置为使得其磁化矢量可以在施加的磁场下自由旋转。在一些情况下,第二铁磁层被称为“自由层”。在一些情况下,由合成或人工反铁磁体替代第一铁磁层(其可称为“被钉扎层”),所述反铁磁体由非磁性间隔物隔开的两个反平行的铁磁层组成:一个铁磁层(其可称为“参考层”)位于“自由层”下方的非磁性层下方;另一个铁磁层(另一个“被钉扎层”)通常被天然反铁磁体“钉扎”,诸如IrMn、PtMn、FeMn或NiO。

[0075] 在某些情况下,自旋阀元件的电阻取决于自由层的磁化矢量与被钉扎层的磁化矢量的相对取向。当两个磁化矢量平行时,电阻最低;当两个磁化矢量反平行时,电阻最高。电阻的相对变化称为磁阻(MR)比。在某些实施例中,自旋阀元件具有1%至20%,例如3%至15%,包括5%至12%的MR比率。在一些情况下,自旋阀元件的MR比率在小磁场如1000e中为10%或更高。如上所述,可以检测由于自旋阀元件表面附近存在磁性标记而导致的自旋阀元件的电阻变化。

[0076] 在某些实施例中,由于磁性标记而导致的来自于自旋阀元件的信号取决于磁性标记和自旋阀元件的自由层之间的距离。在一些情况下,来自磁性标记的电压信号随着从磁性标记中心到自由层中平面的距离增加而降低。因此,在某些情况下,自旋阀元件中的自由层位于自旋阀元件的表面。将自由层放置在自旋阀元件的表面可以最小化自由层和任何结合的磁性标记之间的距离,这可以促进磁性标记的检测。

[0077] 在某些实施例中,自旋阀元件可以包括设置在一个或多个自旋阀元件表面上的钝化层。在一些情况下,钝化层具有60nm或更小,例如50nm或更小,包括40nm或更小、30nm或更小、20nm或更小、10nm或更小的厚度。例如,钝化层可以具有1nm至10nm,例如1nm至5nm,包括1nm至3nm的厚度。在某些实施例中,钝化层包括金、钽、SiO₂、Si₃N₄、它们的组合等。

[0078] 在某些实施例中,磁性传感器元件是磁隧道结(MTJ)磁阻元件(本文也称为MTJ元

件)。在一些情况下,MTJ元件包括多层结构,所述多层结构包括第一铁磁层、设置在第一铁磁层上的绝缘层和设置在绝缘层上的第二铁磁层。绝缘层可以是薄绝缘隧道势垒,并且可以包括氧化铝、MgO等。在一些情况下,第一和第二铁磁层之间的电子隧穿取决于两个铁磁层的相对磁化程度。例如,在某些实施例中,当第一和第二铁磁层的磁化矢量平行时隧道电流高,并且当第一和第二铁磁层的磁化矢量反平行时隧道电流低。在一些情况下,可以由合成或人工反铁磁体替代第一铁磁层,所述反铁磁体包括由非磁性间隔物隔开的两个反平行铁磁层:一个铁磁层可以在隧道势垒下方;另一个铁磁层可以被天然反铁磁体“钉扎”,例如IrMn、PtMn或FeMn。

[0079] 在一些情况下,MTJ元件具有1%至300%,例如10%至250%,包括25%至200%的磁阻比(MR)。如上所述,可以检测由于在MTJ元件表面附近存在磁性标记而导致的MTJ元件的电阻变化。在一些情况下,MTJ元件具有50%或更大,或75%或更大,或100%或更大,或125%或更大,或150%或更大,或175%或更大,或200%或更大,或225%或更大,或250%或更大,或275%或更大,或200%或更大的MR。例如,MTJ元件可以具有225%或更大的MR。

[0080] 在某些实施例中,第二铁磁层(例如,位于MTJ元件表面处的MTJ元件层)包括两个或更多个层。例如,第二铁磁层可以包括第一层、设置在第一层上的第二层和设置在第二层上的第三层。在一些情况下,第一层是薄铁磁层(例如,NiFe、CoFe、CoFeB等)。薄金属层可以具有6nm或更小,例如5nm或更小,包括4nm或更小、3nm或更小、2nm或更小或1nm或更小或0.5nm或更小的厚度。第二层可以包括导电金属,例如铜、铝、钯、钯合金、氧化钯、铂、铂合金、氧化铂、钌、钌合金、氧化钌、银、银合金、氧化银、锡、锡合金、氧化锡、钛、钛合金、氧化钛、钽、钽合金、氧化钽、它们的组合等。第二层可以具有2nm或更小,例如0.5nm或更小,包括0.4nm或更小、0.3nm或更小、0.2nm或更小或0.1nm或更小的厚度。第三层可以包括铁磁材料,例如但不限于NiFe、CoFe、CoFeB等。第三层可以具有6nm或更小,例如5nm或更小,包括4nm或更小、3nm或更小、2nm或更小或1nm或更小或0.5nm或更小的厚度。

[0081] 在一些情况下,MTJ元件被配置为使得结合的磁性标记和自由层的顶面之间的距离范围为5nm至1000nm或10nm至800nm,诸如20nm至600nm,包括40nm至400nm,诸如60nm至300nm,包括80nm至250nm。

[0082] MTJ元件可以包括设置在一个或多个MTJ元件表面上的钝化层。在一些情况下,钝化层具有60nm或更小,例如50nm或更小,包括40nm或更小、30nm或更小、20nm或更小、10nm或更小的厚度。例如,钝化层可以具有1nm至50nm,例如1nm至40nm,包括1nm至30nm,或1nm至20nm的厚度。在一些情况下,钝化层具有30nm的厚度。在一些情况下,钝化层包括金、钽、钽合金、氧化钽、铝、铝合金、氧化铝、SiO₂、Si₃N₄、ZrO₂、它们的组合等。在某些实施例中,具有如上所述厚度的钝化层促进由与传感器表面特异性结合的磁性标记检测到的信号的最大化,同时最小化来自未特异性结合的磁性标记的信号。

[0083] 在某些实施例中,MTJ元件具有范围为1μm x 1μm至200μm x 200μm的尺寸,包括1μm x 200μm或更小,例如200μm x 1μm或更小,如150μm x 10μm或更小,或120μm x 5μm或更小,或120μm x 0.8μm或更小,或0.8μm x 120μm或更小,或100μm x 0.7μm或更小,或100μm x 0.6μm或更小,或100μm x 0.5μm或更小,或10μm x 0.6μm或更小,或10μm x 0.5μm或更小的尺寸。在一些情况下,MTJ元件具有120μm x 0.8μm或更小,例如2.0μm x 0.8μm的尺寸。

[0084] 美国专利第9,863,939号进一步描述了磁隧道结(MTJ)检测器,其公开内容出于所

有目的通过引用整体并入本文。在美国专利第7,906,345号中进一步描述了检测器,其公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0085] 在某些情况下,磁性传感器是多层薄膜结构。传感器可以包括铁磁材料和非磁性材料的交替层。铁磁材料可以包括但不限于坡莫合金(NiFe)、铁钴(FeCo)、镍铁钴(NiFeCo)、CoFeB、它们的组合等。在一些情况下,非磁性材料是贵金属,诸如但不限于Cu、Au、Ag等。在某些实施例中,铁磁层具有1nm至10nm,诸如2nm至8nm,包括3nm至4nm的厚度。在一些情况下,非磁性层具有0.2nm至5nm,诸如1nm至3nm,包括1.5nm至2.5nm,或1.8nm至2.2nm的厚度。

[0086] 在某些实施例中,磁性传感器装置可被配置为包括一个或多个磁性传感区域。磁性传感区域可以对应于磁性传感器阵列(例如,生物传感器阵列)定位的装置区域。例如,磁性传感区域可以是在使用期间暴露于血液样本的装置表面并且具有如上所述的磁性传感器阵列的区域。

[0087] 磁性传感区域可以被配置为包括流体储存器。流体储存器可以是多种配置中的一种,其中流体储存器被配置为保持血液样本与磁性传感器阵列接触。因此,流体储存器的构造可包括但不限于:圆柱形孔构造、方形孔构造、矩形孔构造、圆底孔构造等。例如,流体储存器可包括将一个流体储存器与相邻流体储存器分开的壁。壁可以相对于储存器板的表面基本垂直。在一些情况下,每个流体储存器的壁限定空间体积,该空间体积可接收等于或小于由流体储存器限定的空间体积的样本体积。

[0088] 在某些实施例中,流体储存器具有10mL或更少、或5mL或更少、或3mL或更少、或1mL或更少,例如500μL或更少,包括100μL或更少,例如50μL或更少,或25μL或更少,或10μL或更少的体积,这足以含有相同或更少体积的样本体积。

[0089] 磁性传感器系统

[0090] 本公开的方面包括磁性传感器系统。在一些实施例中,磁性传感器系统包括磁性传感器装置和磁场源。磁性传感器装置包括具有定位在其上的一个或多个磁性传感器阵列(例如,生物传感器阵列)的支撑件。所述系统可以被配置为从一个或多个磁性传感器阵列获得信号,所述信号指示循环分析物的分析物是否存在于一个或多个相应的血液样本中。

[0091] 在某些实施例中,系统包括磁场源。磁场源可以被配置为向磁性传感器装置(例如磁性传感器阵列)施加足以在测定传感区域(例如在信号采集期间磁性传感器阵列定位的区域中)中产生DC和/或AC场的磁场。在一些情况下,磁场源被配置为产生磁场强度为10e或更大,或50e或更大,或100e或更大,或200e或更大,或300e或更大,或400e或更大,或500e或更大,或600e或更大,或700e或更大,或800e或更大,或900e或更大,或1000e或更大的磁场。

[0092] 磁场源可以定位成使得在使用磁性传感器装置时在定位磁性传感器阵列的区域中产生磁场。在一些情况下,磁场源被配置为在正在进行测定的储存器板上的流体储存器组周围产生均匀的、可控的磁场。磁场源可包括一个或多个,诸如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个磁场产生部件。在一些情况下,磁场源可以包括一个或多个电磁体,诸如线圈电磁体。线圈电磁体可以包括绕线线圈。例如,磁场源可以包括以亥姆霍兹线圈几何形状布置的两个电磁体。

[0093] 系统的实施例进一步包括基于计算机的系统。系统可以被配置为定性和/或定量评估如上所述的结合相互作用。“基于计算机的系统”是指用于分析来自磁性传感器的信号

的硬件、软件和数据存储部件。基于计算机的系统的硬件可以包括中央处理单元 (CPU)、输入、输出和数据存储部件。各种基于计算机的系统中的任何一种都适用于主题系统。数据存储部件可以包括用于记录来自磁性传感器阵列的信号的任何计算机可读介质,或者可以存储来自磁性传感器阵列的信号的可访问存储部件。

[0094] 在计算机可读介质上“记录”数据、程序或其他信息是指使用本领域已知的任何此类方法存储信息的过程。可以选择任何方便的数据存储结构,这取决于用于访问存储信息的方法。多种数据处理器程序和格式可用于存储,例如文字处理文本文件、数据库格式等。

[0095] 在某些实施例中,系统包括激活和信号处理单元。激活和信号处理单元可以被配置为可操作地耦合到磁性传感器装置。在一些情况下,激活和信号处理单元电耦合到磁性传感器装置。激活和信号处理单元可以被电耦合诸如以提供去往和来自磁性传感器装置的双向通信。例如,激活和信号处理单元可以被配置为向磁性传感器装置的部件(诸如但不限于磁性传感器阵列)提供电力、激活信号等。因此,激活和信号处理单元可以包括激活信号发生器。激活信号发生器可以被配置为向分析物检测装置的部件(诸如但不限于磁性传感器阵列)提供电力、激活信号等。在一些情况下,激活和信号处理单元被配置为在磁性传感器阵列上施加范围为1mV至10V,诸如100mV至5V,包括200mV至1V,例如300mV至500mV的电压。在一些情况下,激活和信号处理单元被配置为在磁性传感器阵列上施加500mV的电压。

[0096] 此外,激活和信号处理单元可以被配置为接收来自磁性传感器装置的信号,诸如来自磁性传感器装置的磁性传感器阵列的信号。来自磁性传感器装置的磁性传感器的信号可用于检测血液样本中两种或更多种循环分析物的分析物的存在。在一些情况下,激活和信号处理单元可以包括处理器,所述处理器被配置为响应于接收来自磁性传感器阵列的信号而输出分析物检测结果。因此,激活和信号处理单元的处理器可以被配置为接收来自磁性传感器装置的信号,根据预定算法处理信号,获得与样本中一种或多种分析物的存在相关的结果,并以人类可读或可听的格式向用户输出结果。可用于例如评估不确定肺结节为恶性的风险的模型包括本文在实验中描述的那些。

[0097] “处理器”是指将进行一个或多个编程功能的任何硬件和/或软件组合。例如,本文的任何处理器可以是可编程数字微处理器,诸如以电子控制器、主机、服务器或个人计算机(例如,台式或便携式)的形式可用。在处理器可编程的情况下,合适的编程可以从远程位置传送到处理器,或者预先保存在计算机程序产品(诸如便携式或固定计算机可读存储介质,无论是基于磁性、光学还是固态装置)中。例如,磁性介质、光盘或固态存储装置可以携带编程,并且可以由与处理器通信的合适的读取器读取。

[0098] 在一些情况下,主题系统被配置为调制施加到磁性传感器阵列的电流(例如,感测电流)。主题系统还可以被配置为调制由磁场源产生的磁场。调制感测电流和磁场可以促进信号噪声的最小化,并因此促进信噪比的最大化。调制感测电流和磁场的其他方面在于2010年4月13日提交的题为“用于检测样本中分析物存在的方法和装置(Methods and Devices for Detecting the Presence of an Analyte in a Sample)”的美国申请第12/759,584号中更详细地描述,其公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0099] 主题系统的实施例还可以包括以下部件:(a) 有线或无线通信模块,其被配置为在系统和一个或多个用户之间传输信息,例如通过如下所述的用户计算机;和(b) 处理器,其用于进行一项或多项涉及来自磁性传感器的信号的定性和/或定量分析的任务。在某些实

施例中,提供了一种计算机程序产品,其包括其中存储有控制逻辑(例如,计算机软件程序,包括程序代码)的计算机可用介质。当由计算机的处理器执行时,控制逻辑使处理器进行本文所述的功能。在其他实施例中,一些功能主要在使用例如硬件状态机的硬件中实现。可以使用任何方便的方法和技术来完成硬件状态机的实现以进行本文描述的功能。

[0100] 除了磁性传感器装置以及激活和信号处理单元之外,系统可以包括许多附加部件,诸如但不限于:数据输出装置,例如监视器、扬声器等;数据输入装置,例如接口端口、按钮、开关、键盘等;流体处理部件,例如微流体部件;电源;功率放大器;有线或无线通讯部件等。例如,系统可以包括流体处理部件,诸如微流体的流体处理部件。在某些实施例中,微流体的流体处理部件被配置为将流体递送到储存器板的流体储存器。在一些情况下,流体包括以下的一种或多种:测定组合物、血液样本、一种或多种检测试剂(例如,检测抗体、磁性标记等)。在某些情况下,微流体的流体处理部件被配置为递送小体积流体,例如1mL或更少,例如500 μ L或更少,包括100 μ L或更少,例如50 μ L或更少,或25 μ L或更少,或10 μ L或更少。

[0101] 在某些实施例中,系统是高灵敏度分析物检测器。“高灵敏度”是指系统被配置为检测样本中的分析物,其中样本中分析物的浓度低。在一些情况下,系统被配置为产生指示样本中目标分析物存在的可检测信号,所述样本中分析物的浓度为1 μ M或更小,诸如100nM或更小,或10nM或更小,或1nM或更小,包括100pM或更小,或10pM或更小,或1pM或更小,例如500fM或更小,或250fM或更小,或100fM或更小,或50fM或更小,或25fM或更小,诸如10fM或更小,或5fM或更小,或1fM或更小。换言之,系统可以被配置为具有1 μ M或更小,诸如100nM或更小,或10nM或更小,或1nM或更小,包括100pM或更小,或10pM或更小,或1pM或更小,例如500fM或更小,或250fM或更小,或100fM或更小,或50fM或更小,或25fM或更小,诸如10fM或更小,或5fM或更小,或1fM或更小的检测限,例如定量下限(LLoQ)。

[0102] 在某些实施例中,系统包括显示器。显示器可以被配置为提供从上述激活和信号处理单元获得的分析物检测结果的视觉指示。显示器可以被配置为显示定性分析物检测结果。例如,定性显示器可以被配置为向用户显示样本包括或不包括特定目标分析物的定性指示物。在一些实施例中,显示器可以被配置为显示分析物检测结果,其中分析物检测结果是定量结果,例如样本中分析物浓度的定量测量。例如,在系统被配置为输出定量分析物检测结果的实施例中,系统可以包括被配置为显示定量分析物检测结果的显示器。

[0103] 磁性传感器装置任选地包括可编程存储器,在使用磁性传感器装置之前和期间可以用相关信息对可编程存储器进行编程,例如:每个单独传感器的校准数据;在测定之前如何用表面官能化分子制备生物芯片的记录;所有已完成测定步骤的记录;关于测量哪个样本的记录;测量结果的记录等。

[0104] 在美国专利第9,151,763号和第9,164,100号以及第9,528,995号中更详细地描述了磁性传感器系统的附加方面,其公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0105] 试剂盒

[0106] 还提供了可用于例如实施本公开的方法的一个或多个实施例的试剂盒。

[0107] 在一些实施例中,本公开的试剂盒包括探针组,其包括用于特异性结合任意所需组合的以下物质中的两种或更多种(例如,3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种,或10种或更多种)的探针:癌胚抗原(CEA)、C-X-C基序趋化因子配体4(CXCL4——也称为血小板因子4(或PF4))、C-X-C基序趋化

因子配体7 (CXCL7——也称为中性粒细胞激活蛋白2 (或NAP2))、C-X-C基序趋化因子配体10 (CXCL10——也称为干扰素 γ 诱导蛋白10 (或IP10))、表皮生长因子受体 (EGFR)、前表面活性蛋白B (pro-SFTPB)、金属蛋白酶1组织抑制剂 (TIMP1)、抗血管生成素样蛋白3抗体 (抗ANGPTL3)、抗14-3-3蛋白 θ 抗体 (抗YWHAQ)、抗层粘连蛋白 α 1抗体 (抗LAMR1)、人附睾蛋白4 (HE4)、前梯度蛋白2 (AGR2)、嗜铬粒蛋白A (CHGA)、亮氨酸丰富 α -2-糖蛋白1 (LRG1)、抗膜联蛋白1抗体 (抗ANXA1)、抗泛素1抗体 (抗UBQLN1)、白介素6 (IL6)、白介素8 (IL8)、C-X-C基序趋化因子配体2 (CXCL2)、C-X-C基序趋化因子配体12 (CXCL12)、C-X-C基序趋化因子配体14 (CXCL14)、防御素, β 1 (DEFB1)、成纤维细胞生长因子2 (FGF2)、分化簇97 (CD97)、前血小板碱性蛋白 (PPBP)、降钙素原 (PCT)、晚期糖基化终末产物受体 (RAGE)、S100钙结合蛋白A4 (S100A4)、S100钙结合蛋白A8 (S100A8) 和骨桥蛋白 (OPN)。

[0108] 在某些实施例中,本公开的试剂盒包括探针组,其包括用于以任意所需组合特异性结合CEA、CXCL4、CXCL7和CXCL10中的一种、两种、三种或每一种的探针。根据一些实施例,此类探针组进一步包括用于以任意所需组合特异性结合EGFR、pro-SFTPB和TIMP1中的一种、两种或每一种的探针。在某些实施例中,此类探针组进一步包括用于特异性结合附加分析物的一种或任何组合的一种或多种探针,所述附加分析物选自抗ANGPTL3、抗YWHAQ、抗LAMR1、HE4、AGR2、CHGA、LRG1、抗ANXA1、抗UBQLN1、IL6、IL8、CXCL2、CXCL12、CXCL14、DEFB1、FGF2、CD97、PPBP、PCT、RAGE、S100A4、S100A8和OPN。

[0109] 在一些实施例中,当本公开的试剂盒包括如上所述的探针组时,所述探针组可以是作为可寻址探针阵列提供的捕获探针组。例如,试剂盒可包括作为本公开的任何装置和系统提供的探针组。

[0110] 主题试剂盒可以变化,并且可以包括各种装置(例如,本公开的任何传感器装置(例如,磁性传感器装置)) and 试剂。试剂和装置包括本文中关于磁性传感器装置或其部件(诸如磁性传感器阵列)、磁性标记、一个或多个探针组、检测试剂、缓冲液等提及的那些。试剂可以在单独的容器中提供,使得可以根据需要单独使用试剂、磁性标记、探针等。或者,可在同一容器中提供一种或多种试剂、磁性标记、探针等,使得将一种或多种试剂、磁性标记、捕获探针等预先组合地提供给用户。

[0111] 在某些实施例中,试剂盒包括如上所述的磁性传感器装置和磁性标记。例如,磁性标记可以是磁性纳米颗粒,如上所述。在一些情况下,试剂盒至少包括可用于方法(例如,如上所述)的试剂;以及具有存储在其上的计算机程序的计算机可读介质,其中所述计算机程序在加载到计算机中时操作计算机以从获自传感器(例如,磁性传感器)的信号(例如,实时信号)定性和/或定量地确定目标结合相互作用;以及具有从中获取计算机程序的地址的物理基板。

[0112] 本公开的试剂盒可进一步包括说明。在一些实施例中,说明包括用于使来自受试者的血液样本与探针组接触以产生受试者的循环分析物概况的说明。主题试剂盒可包括用于实施本公开的方法中的任一个的说明。在一些实施例中,说明包括用于使来自具有高肺癌风险的群体的受试者的血液样本与探针组接触以产生受试者的循环分析物概况的说明。根据某些实施例,说明包括用于使来自为以前或当前吸烟者的受试者的血液样本与探针组接触以产生受试者的循环分析物概况的说明。在一些实施例中,说明包括用于使来自具有肺结节(例如,不确定肺结节(例如,通过低剂量计算机断层扫描(LDCT)检测)的受试者的血

液样本与探针组接触以产生受试者的循环分析物概况的说明。根据某些实施例,说明包括用于基于受试者的循环分析物概况评估肺结节恶性风险的说明。

[0113] 说明可以多种形式存在于主题试剂盒中,其中一种或多种可以存在于试剂盒中。这些说明可以存在的一种形式是作为在合适的介质或基材上的印刷信息,例如,在其上印刷信息的一张或多张纸、在试剂盒的包装中、在包装插页中等。另一种方式是在其上记录信息的计算机可读介质,例如CD、DVD、Bluray、计算机可读存储装置(例如,闪存驱动器)等。可能存在的另一种方式是网站地址,所述地址可以通过互联网用于访问已删除站点上的信息。试剂盒中可以存在任何方便的方式。

[0114] 从上面提供的公开可以理解,本公开具有多种多样的应用。因此,提供以下实例是为了说明目的,并不旨在以任何方式解释为对本发明的限制。本领域技术人员容易认识到可以改变或修改各种非临界参数以产生基本相似的结果。因此,提出以下实例是为了向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开和描述,而不旨在限制本发明人视为其发明的范围,也不旨在表示以下实验是全部或唯一进行的实验。已努力确保关于所用数字(例如,量、温度等)的准确性,但应考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数为重量份,分子量为重均分子量,温度为摄氏度,并且压力为大气压或接近大气压。

[0115] 通过说明而不是限制的方式提供了下面的实例。

[0116] 实验

[0117] 介绍

[0118] 本文的实例涉及蛋白质生物标志物,其可以在人类血液中作为与以前吸烟者的恶性肺结节相关的特征测量。该信息可单独使用或与临床参数结合使用,以计算以前吸烟者在其LDCT扫描中看到的结节是恶性肺结节的风险。可以使用MagArray开发的磁纳米传感器技术测量蛋白质生物标志物,该技术克服了质谱血液蛋白质测量技术的费用和低通量,并克服了基于ELISA的测试的检测限。由于磁纳米传感器能够一次多路复用多达80个单独的检测器以实现高通量,因此可以使用单份患者血液同时测量肺结节相关蛋白质生物标志物。然后,在为肺结节提供恶性风险的模型中组合测量的蛋白质生物标志物水平。由此产生的模型是稳健的,并且对于进行肺癌评价的大患者群具有临床实用性。该模型还可以适用于筛选肺癌高危群体以及诊断后肺癌患者的治疗预测和监测,无论是独立的还是结合标准临床评估和/或其他癌症生物标志物。

[0119] 已经描述了磁纳米传感器芯片和巨磁阻(GMR)传感器的原理以及它们在测量生物标志物方面的用途。使用在MR-813仪器系统中配置的该技术,开发了多路复用试剂组来测量3种先前报告的和5种最近识别的被认为与肺癌有关并可能在循环中发现的人类蛋白质。先前报告的蛋白质是表皮生长因子受体(EGFR)、前表面活性蛋白B(pro-SFTPB)和金属蛋白酶1组织抑制剂(TIMP1)。最近开发和测试的5种蛋白质是癌胚抗原(CEA)、人附睾蛋白4(HE4)、CXCL7(也称为中性粒细胞激活蛋白2(NAP2))、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)和S100钙结合蛋白A8(S100A8)。

[0120] 为了评价那些蛋白质的临床实用性,集合了获自8个地理位置不同的中心的队列的超过1100份人血浆样本组,所述中心包括斯坦福大学诊所(Stanford University Clinic),加州太平洋医疗中心和帕洛阿尔托退伍军人事务部医院(California Pacific Medical Center, and Palo Alto Veterans Affairs Hospital),旧金山退伍军人事务医

疗中心 (San Francisco Veterans Affairs Medical Center), 宾夕法尼亚大学 (University of Pennsylvania) 和肺癌生物样本资源网络 (Lung Cancer Biospecimen Resource Network) (南卡罗来纳医科大学 (Medical University of South Carolina)、弗吉尼亚大学 (University of Virginia) 和华盛顿大学圣路易斯分校 (Washington University at St. Louis))。从具有使用 Mayo Clinic 风险评估模型 (“Mayo 模型”) 计算受试者的恶性肺结节的验前概率所需的临床数据的 1100 个样本中选择了 405 个样本的子组。405 份样本来自 3 个队列, 针对良性和恶性肺结节进行了平衡, 并且包括当前和以前吸烟者, 如表 1 和表 2 所示。以前吸烟定义为在入选时不吸烟, 而当前吸烟定义为吸烟直至研究入选。以前和当前吸烟者的整个队列合称为 “曾经吸烟者”。

[0121] 405 个样本组的总体疾病患病率为 48%, 接近目标患病率 50%, 旨在确保来自良性和恶性疾病状态的生物标志物水平的平衡权重。良性诊断定义为两年结节稳定性或结节消退, 恶性诊断基于切除或活检后的病理报告。

[0122] 表 1 包含从中选择训练和测试组的 405 名受试者的样本队列

[0123]

	SFVA		Stanford		Vanderbilt		总体	
	良性 (n=67)	恶性 (n=14)	良性 (n=57)	恶性 (n=71)	良性 (n=81)	恶性 (n=108)	良性 (n=205)	恶性 (n=193)
年龄 (岁)								
平均值 (SD)	68.8 (7.33)	71.9 (6.23)	62 (11.6)	70.8 (8.89)	57.6 (11.2)	66.4 (8.92)	62.5 (11.2)	68.4 (9)
中值 [Min, Max]	70 [52, 87]	72 [58, 83]	64 [25, 85]	70 [46, 89]	59 [33, 84]	66.5 [49, 89]	64 [25, 87]	69 [46, 89]
性别								
女性	1 (1.5%)	1 (7.1%)	14 (24.6%)	16 (22.5%)	33 (40.7%)	41 (38%)	48 (23.4%)	58 (30.1%)
男性	66 (98.5%)	13 (92.9%)	43 (75.4%)	55 (77.5%)	48 (59.3%)	67 (62%)	157 (76.6%)	135 (69.9%)
包年								
平均值 (SD)	50.8 (41.9)	36.5 (30.8)	43.1 (41.4)	48 (30.6)	44.2 (32)	53 (34.1)	46.5 (37.7)	50.1 (32.9)
中值 [Min, Max]	40 [0, 210]	25.3 [6, 120]	30 [0, 200]	45 [1.5, 150]	40 [0, 200]	49.5 [1.25, 200]	40 [0, 210]	47 [1.25, 200]
缺失	0 (0%)	0 (0%)	22 (38.6%)	11 (15.5%)	3 (3.7%)	0 (0%)	25 (12.2%)	11 (5.7%)
结节大小 (mm)								
平均值 (SD)	9.96 (4.49)	16.1 (6.53)	14.9 (6.14)	18.8 (6.19)	15.2 (6.43)	17.4 (5.64)	13.4 (6.25)	17.8 (5.94)
中值 [Min, Max]	8 [4, 22]	14 [7, 29]	15 [6, 30]	20 [8, 30]	14 [4, 28]	17 [7, 29]	12.1 [4, 30]	17 [7, 30]
结节位置								
下或中叶	41 (61.2%)	8 (57.1%)	29 (50.9%)	32 (45.1%)	37 (45.7%)	50 (46.3%)	107 (52.2%)	90 (46.6%)
上叶	26 (38.8%)	6 (42.9%)	28 (49.1%)	39 (54.9%)	44 (54.3%)	58 (53.7%)	98 (47.8%)	103 (53.4%)

[0124]

	SFVA		Stanford		Vanderbilt		总体	
	良性 (n=67)	恶性 (n=14)	良性 (n=57)	恶性 (n=71)	良性 (n=81)	恶性 (n=108)	良性 (n=205)	恶性 (n=193)
组织学								
良性结节	67 (100%)	0 (0%)	57 (100%)	0 (0%)	61 (75.3%)	0 (0%)	185 (90.2%)	0 (0%)
良性肉芽肿	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	20 (24.7%)	0 (0%)	20 (9.8%)	0 (0%)
腺癌	0 (0%)	12 (85.7%)	0 (0%)	58 (81.7%)	0 (0%)	70 (64.8%)	0 (0%)	140 (72.5%)
鳞状细胞癌	0 (0%)	2 (14.3%)	0 (0%)	8 (11.3%)	0 (0%)	23 (21.3%)	0 (0%)	33 (17.1%)
NSCLC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (7%)	0 (0%)	7 (6.5%)	0 (0%)	12 (6.2%)
其他	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (7.4%)	0 (0%)	8 (4.1%)
阶段								
I 或 II 期	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	58 (81.7%)	0 (0%)	105 (97.2%)	0 (0%)	163 (84.5%)
III 或 IV 期	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (18.3%)	0 (0%)	1 (0.9%)	0 (0%)	14 (7.3%)
未确定	0 (0%)	14 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	14 (7.3%)
缺失	67 (100%)	0 (0%)	57 (100%)	0 (0%)	81 (100%)	2 (1.9%)	205 (100%)	2 (1%)
种族/民族								
亚洲人	2 (3%)	0 (0%)	3 (5.3%)	7 (9.9%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (2.4%)	7 (3.6%)
黑人	8 (11.9%)	3 (21.4%)	2 (3.5%)	3 (4.2%)	3 (3.7%)	6 (5.6%)	13 (6.3%)	12 (6.2%)
白人	56 (83.6%)	10 (71.4%)	48 (84.2%)	57 (80.3%)	78 (96.3%)	100 (92.6%)	182 (88.8%)	167 (86.5%)
拉丁美洲人	0 (0%)	0 (0%)	2 (3.5%)	1 (1.4%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1%)	1 (0.5%)
其他	0 (0%)	0 (0%)	2 (3.5%)	3 (4.2%)	0 (0%)	2 (1.9%)	2 (1%)	5 (2.6%)
缺失	1 (1.5%)	1 (7.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.5%)	1 (0.5%)

[0125] 表2 405名受试者组中的队列的吸烟史

	SFVA	Stanford	Vanderbilt	总计
良性				
当前吸烟者	22	25	44	91
以前吸烟者	45	32	41	118
曾经吸烟者	67	57	85	209
恶性				
当前吸烟者	6	21	49	76
以前吸烟者	14	50	56	120
曾经吸烟者	20	71	105	196
全部				
当前吸烟者	28	46	93	167
以前吸烟者	59	82	97	238
曾经吸烟者	87	128	190	405

[0126]

[0127] 总体疾病患病率:48%;总当前吸烟者:41%

[0128] 使用MR813多路复用测定组获得405份样本的8种蛋白质的水平。样本在两项研究中运行,第一项研究中有150份样本,第二项研究中有255份样本。选择第一项研究的样本以涵盖用Mayo Clinic模型确定的恶性肿瘤的验前概率范围。第二项研究含有剩余的255份样本。在这两项研究中,样本由对样本临床信息不知情的技术人员以随机顺序运行。数据收集和分析根据合理的生物标志物研究设计原则进行。

[0129] 测定结果的统计分析开始于评估作为测试再现性指标的重复测量之间的测定变

异系数(CV)。测定数据的运行内变异性为10%或更小,并且与每组测定一起运行的在轨运行对照的总体变异性通常小于15%。重复了表现出超过30%CV的测定重复。第一项研究中重复了12份样本,第二项研究中重复了15份样本,由于%CV出乎意料地大,因此总重复低于7%。

[0130] 将测定数据分析为原始GMR百万分率(PPM)信号,并且还标准化为样本信号与每3个样本获得的运行对照信号的比率。

[0131] 进行了几项预先指定的分析以确定该组区分恶性疾病与良性疾病的诊断准确度,使用逻辑回归建模技术和交叉验证产生准确度、灵敏度、特异性、NPV和PPV指标。交叉验证技术允许估计如果将模型应用于其他可能的队列,结果会发生多大的变化。此类技术在定义模型部件时降低了错误发现率,并有助于确保逻辑回归算法的系数不会仅针对训练组具有过度特异性。

[0132] 实例1-预测以前吸烟者的肺癌风险

[0133] 测试来自405名CT扫描显示肺结节的患者队列的K2EDTA血浆,作为从三个医疗中心收集的病例对照回顾性设计。病例从其病理报告被诊断为肺癌,并且对照为阴性/正常病理或稳定结节2年的受试者。Stanford和MagArray开发的磁纳米传感器和夹心免疫测定用于测量在20 μ L受试者血浆中的蛋白质生物标志物表皮生长因子受体(EGFR)、前表面活性蛋白B(pro-SFTPB)、金属蛋白酶1组织抑制剂(TIMP1)、癌胚抗原(CEA)、人附睾蛋白4(HE4)、中性粒细胞激活蛋白2(NAP2)、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)和S100钙结合蛋白A8(S100A8)。然后,在由诊断和吸烟状况分层的那些患者的子队列中分析蛋白质生物标志物的水平,以使用ANOVA和逻辑回归了解生物标志物与诊断和吸烟状况的关系。

[0134] 由吸烟状态分层的受试者中八种生物标志物的平均水平示于图1中。良性和恶性诊断之间的水平显著差异由小于或等于0.05的p值表示。大于0.05的P值不显著并由“ns”表示。

[0135] 包含405份样本组的209个良性诊断样本和196个恶性诊断样本各自随机分为2/3和1/3子组以用于训练样本不同于用于测试模型的样本的模型。这样做是为了减少在用于训练模型的同一数据组上测试模型时可能发生的模型的过于乐观的测试性能的可能性。

[0136] 使用以前吸烟者的生物标志物水平加上受试者临床数据,使用广义线性建模过程来评价使用1/3样本子组的训练组中的不同变量组合。识别能够在测试子组(2/3样本)内区分恶性疾病和良性疾病的模型,准确度为79%。命名为#217-3092的模型由生物标志物CEA、EGFR、NAP2、ProSB和TIMP1以及临床因素组成,临床因素为受试者年龄、结节大小、受试者性别和结节边缘(是否有毛刺)。模型217-3092的接受者操作特征(ROC)曲线示于图2,其中曲线下面积(AUC)为0.86,相比之下,相同样本的Mayo模型的AUC为0.79。

[0137] 在93名以前吸烟受试者(其中Mayo模型的恶性验前概率为0.05至0.65(已发布指南中定义的中等风险范围))中探索模型217_3092性能表明生物标志物和临床因素组合提供了与Mayo模型相比改进的AUC(图3)。模型217_3092性能总结示于表3中,其中模型性能指标估计阴性预测值(NPV)为91%,疾病患病率为0.25,可观的阳性预测值(PPV)为51%。该疾病水平是基于社区肺病学家的一项研究,其中1/4寻求其护理的人被诊断为恶性肺癌。临床性能的其他重要量度表明模型217_3092在0.485的临界值表现出出色的灵敏度(76%)和特异度(82%)。最后,通过使用净重分类度量来考虑模型对Mayo模型中等风险受试者进行准

确分类的能力,该净重分类度量确定在减去模型错误诊断的受试者后正确分类的受试者的净数量。Mayo模型中等风险类别中恶性受试者的重分类百分比 (IDm_RI) 为6%,而重分类的中等风险良性受试者的数量 (IDb_RI) 为48%,得到总体净重新分类指数 (ID_NetRI) 为55%。

[0138] 表1 以前吸烟者中的模型217_3092测试组性能总结

[0139]

模型	AUC		AUC	Diff v	最佳临	界值	准确度	灵敏度	特异度	患病率	NPV	PPV	IDm_	IDb_	ID_
	Mayo	AUC	Mayo	Mayo	Mayo								RI	RI	Net
217_3092	0.86	0.79	0.07	0.485	79%	76%	82%	0.25	91%	59%	6%	48%	55%		

[0140] 实例2-预测当前吸烟者的肺癌风险

[0141] 在本实例中评价模型217_3092的生物标志物加上临床因素组合(生物标志物:CEA、EGFR、NAP2、ProSB和TIMP1,以及临床因素:受试者年龄、结节大小、受试者性别和结节边缘(是否有毛刺))使用广义逻辑回归预测方法预测当前吸烟者子组中的恶性肿瘤的辨识能力。训练组由2/3队列组成,而测试组是405份样本组中当前吸烟者的剩余1/3队列。

[0142] 模型的整体性能总结在表4中,其中69%的准确度和61%的灵敏度以及77%的特异度使用0.508的临界值。

[0143] 更显著的是重分类性能,其中41%的标记为中等风险的净当前吸烟者 (ID_NetRI) 被正确地称为良性或恶性。这是Mayo模型中6%的净恶性中等风险当前吸烟者 (IDm_RI) 和35%净良性中等风险当前吸烟者 (IDb_RI) 的总和。

[0144] 表2 当前吸烟者中的模型217_3092测试性能总结

[0145]

模型	AUC				最佳临 界值	准确度	灵敏度	特异度	患病率	NPV	PPV	ID_		
	AUC	Mayo	Diff v	Net								RI	RI	RI
217_3092	0.75	0.72	0.03		0.508	69%	61%	77%	0.25	86%	47%	6%	35%	41%

[0146] 考虑到当前吸烟者的整个测试队列,与Mayo模型的模型性能为0.72相比,由ROC曲线AUC测量的模型性能为0.75(图4)。

[0147] 使用模型217_3092评价Mayo风险评分中等风险当前吸烟者受试者 (n=37) 表明与Mayo模型本身相比性能提高(图5)。与Mayo模型的AUC=0.69相比,该模型AUC=0.76。

[0148] 因此,前述仅说明了本公开的原理。应理解,本领域的技术人员将能够设想各种布置方式,尽管本文中并没有明确地描述或示出这些布置方式,但是它们体现了本发明的原理且包括在本发明的精神和范围内。此外,本文中所列的所有示例和条件性语言主要意在辅助阅读者理解本发明的原理和由发明人提供用于促进本领域的概念,且不当被视为对这类具体所列示例和条件的限制。此外,本文中列出本发明的原理、方面和实施方式的所有陈述及其具体示例意图涵盖其结构性等效物和功能等效物。另外,意在使这类等效物包括当前已知的等效物和在未来开发的等效物,即,开发的执行相同功能的任何元件,不管结构如何。因此,本发明的范围不意在受限于本文中所示出和描述的示例性实施例。

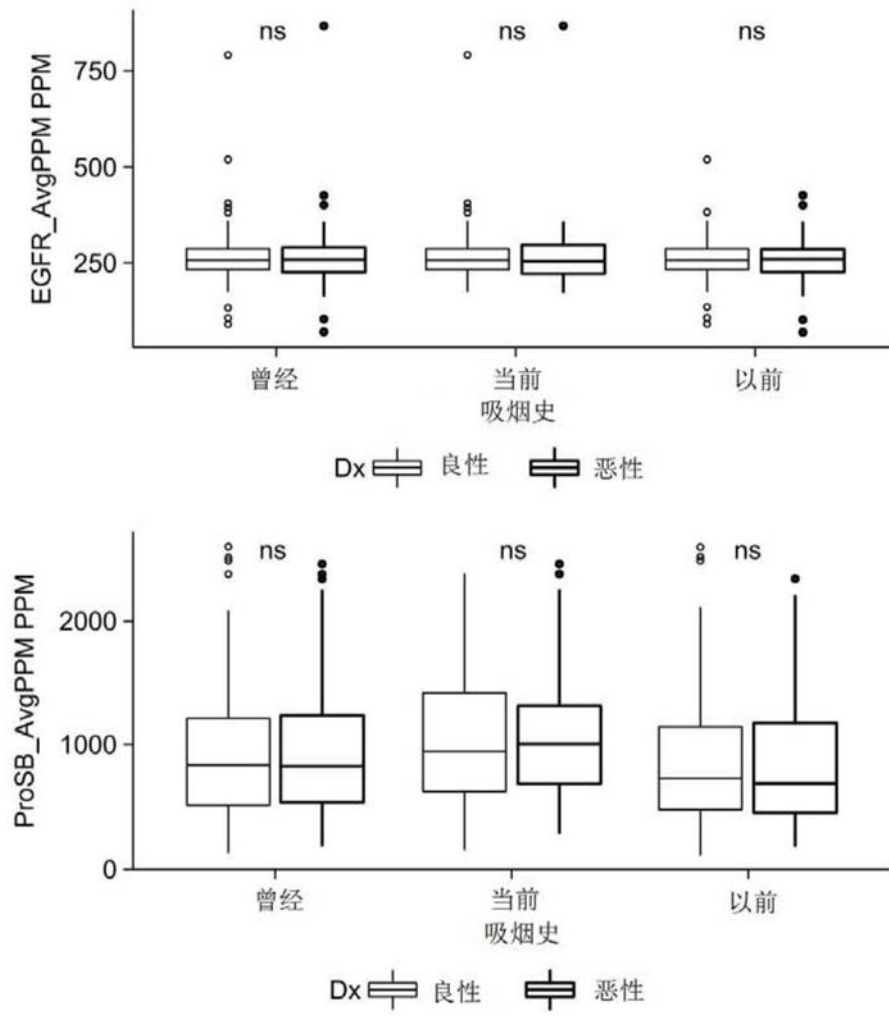


图1

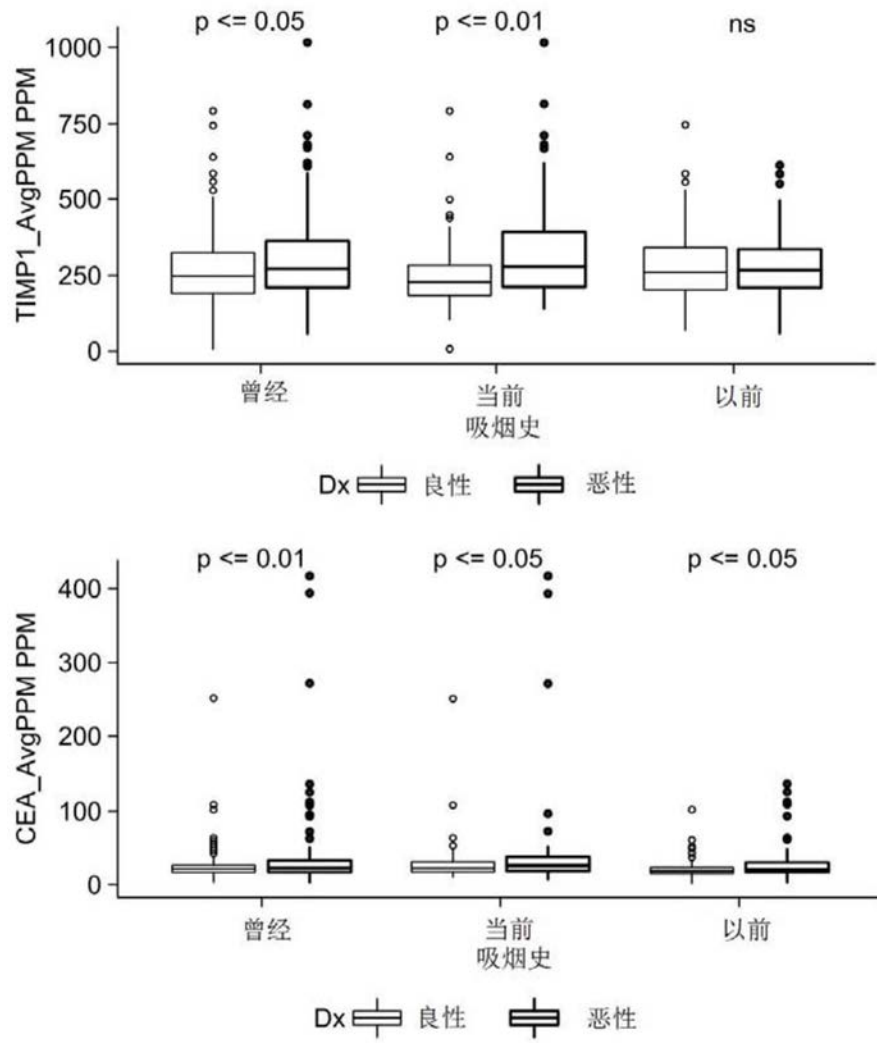


图1(续)

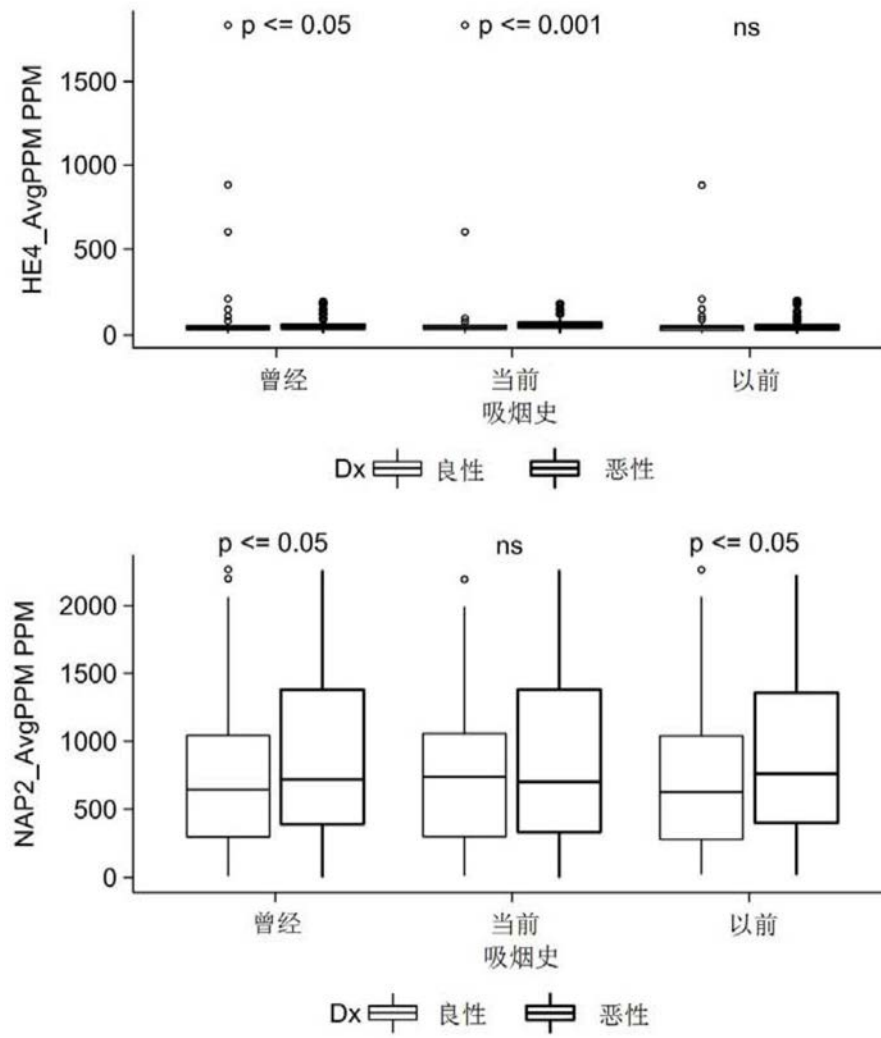


图1(续)

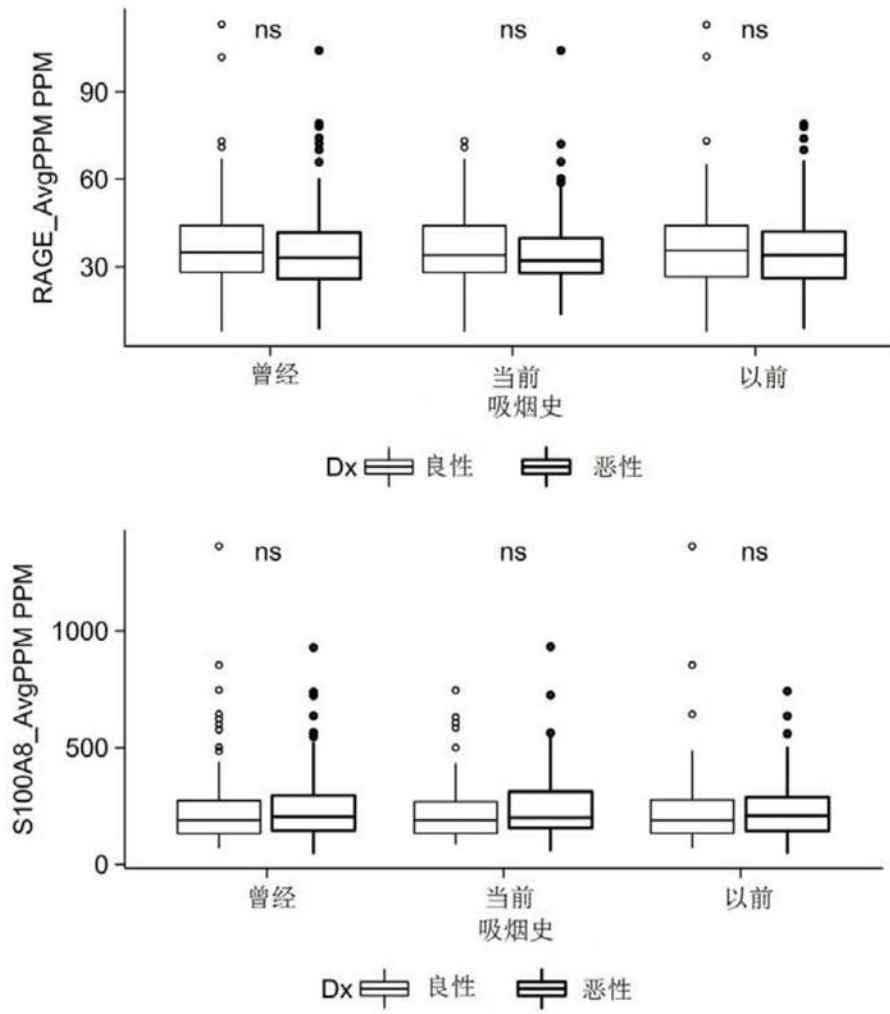


图1 (续)

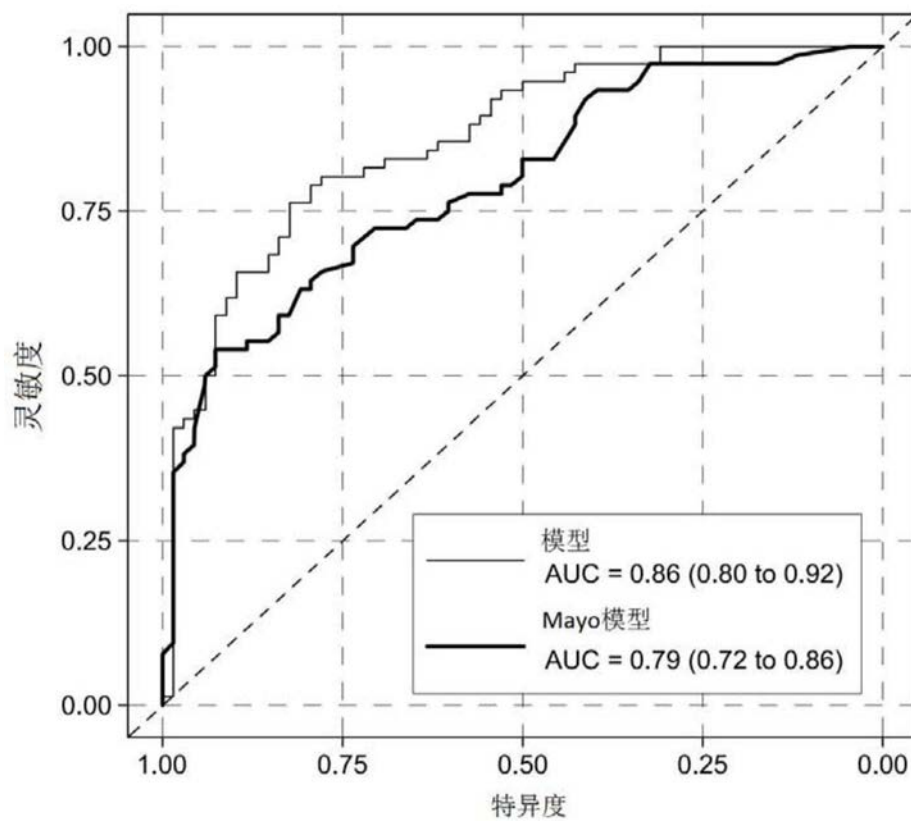


图2

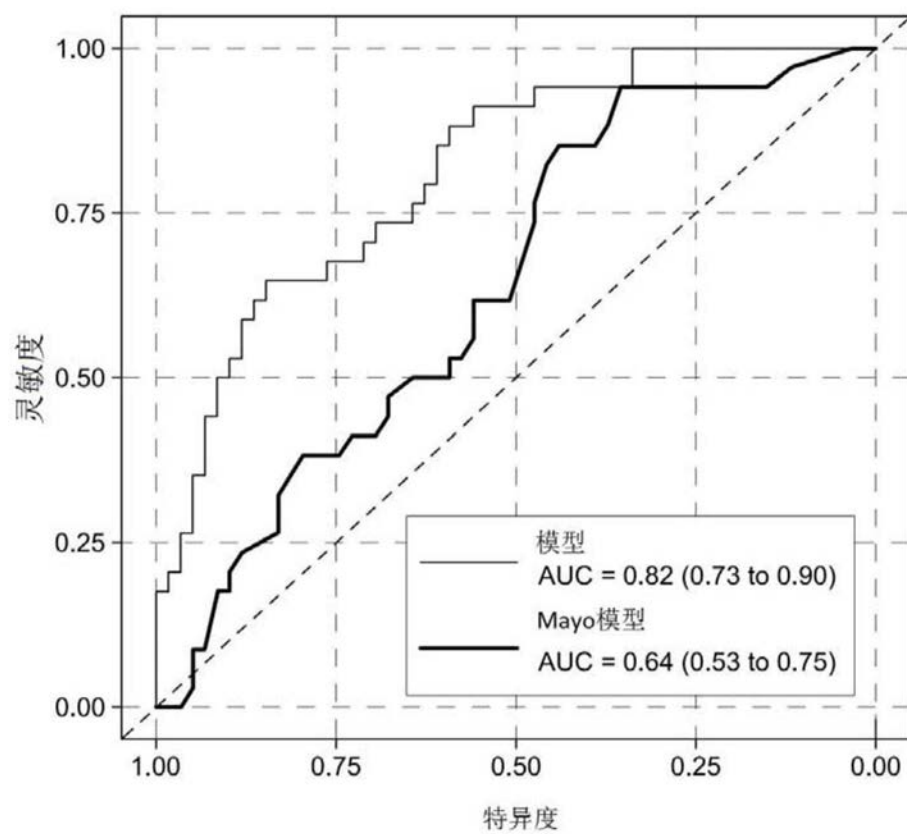


图3

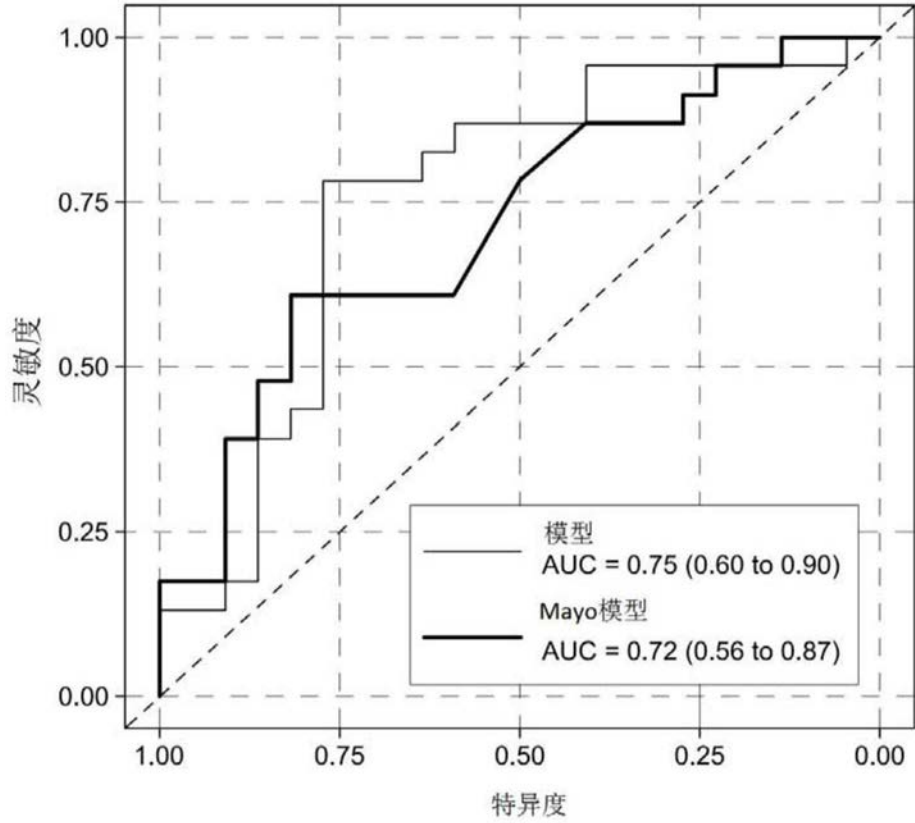


图4

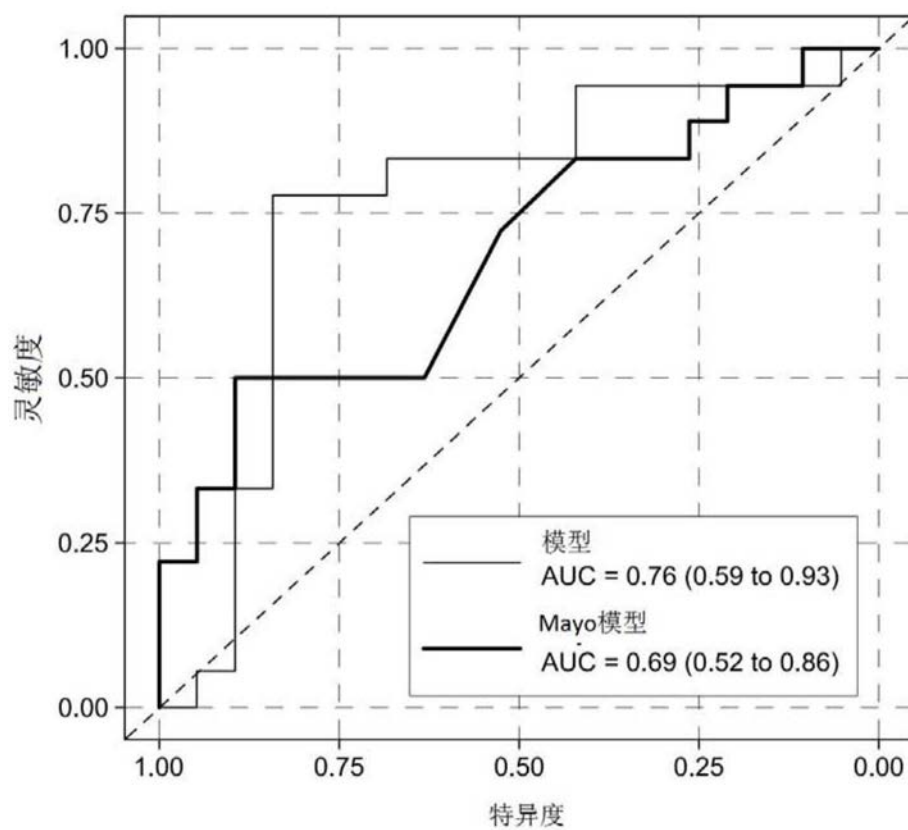


图5