



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113785199 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 09

(21) 申请号 202080032932.8

罗西奥·阿罗约·阿兰兹

(22) 申请日 2020.02.28

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113785199 A

专利代理师 郑元博

(43) 申请公布日 2021.12.10

(51) Int.Cl.
G01N 33/574 (2006.01)

(30) 优先权数据
19382156.8 2019.03.01 EP
19382157.6 2019.03.01 EP

(56) 对比文件
US 2014220006 A1, 2014.08.07
US 2010240068 A1, 2010.09.23
US 2008020414 A1, 2008.01.24
WO 2019022371 A1, 2019.01.31
CN 105755112 A, 2016.07.13

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.01

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/055277 2020.02.28

Hongda Chen等. Development and validation of a panel of five proteins as blood biomarkers for early detection of colorectal cancer.《Clinical Epidemiology》.2017, 第9卷卷517-526页.

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/178172 EN 2020.09.10

(73) 专利权人 先进标志物探索公司
地址 西班牙巴亚多利德

审查员 刘彦宁

(72) 发明人 安娜·卡门·马丁·罗德里古兹
罗莎·佩雷斯·帕拉西奥斯

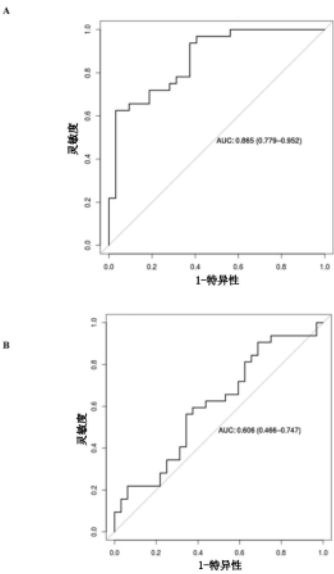
权利要求书1页 说明书19页 附图8页

(54) 发明名称

用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的蛋白质特征

(57) 摘要

本发明涉及一种用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法。



1. 用于确定从对象获得的生物样本中至少组合[F1t3L和CYFRA21-1和AREG]的浓度水平的试剂在制备用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的试剂盒中的用途,其中,所述生物样本选自血液、血清或血浆。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述试剂盒用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法,所述方法包括:a) 测量从所述对象获得的生物样本中至少组合[F1t3L和CYFRA21-1和AREG]的浓度水平;和,b) 其中,如果与在健康对照对象中测得的参考浓度水平相比,确定步骤a)中所述的至少组合[F1t3L和CYFRA21-1和AREG]的所述浓度水平存在偏差或变化,则指示所述对象患有结肠直肠癌和/或癌前阶段。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述试剂盒用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法,所述方法包括:a) 测量从所述对象获得的生物样本中组合[F1t3L和CYFRA21-1和AREG]、[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4]、或[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C]的浓度水平;和,b) 其中,如果与在健康对照对象中测得的参考浓度水平相比,确定步骤a)中所述的至少一个组合的所述浓度水平存在偏差或变化,则指示所述对象患有结肠直肠癌和/或癌前阶段。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述试剂盒用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法,所述方法包括:a) 测量从所述对象获得的生物样本中组合[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4]、或[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C]的浓度水平;和,b) 其中,如果与在健康对照对象中测得的参考浓度水平相比,确定步骤a)中所述的至少一个组合的所述浓度水平存在偏差或变化,则指示所述对象患有结肠直肠癌和/或癌前阶段。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述试剂盒包括用于确定从所述对象获得的生物样本中组合[F1t3L和CYFRA21-1和AREG]、[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4]、或[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C]的浓度水平的试剂。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述试剂盒包括用于确定组合[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4]、或[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C]的浓度水平的试剂。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的用途,其中,结肠直肠癌的所述癌前阶段是晚期结肠直肠腺瘤。

用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的蛋白质特征

技术领域

[0001] 本发明可以包括在医学领域内。特别地,本发明涉及用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法。

背景技术

[0002] 结肠直肠癌(Colorectal cancer,CRC)(也称为结肠癌、直肠癌或肠癌)是结肠或直肠(大肠的部分)中发生的癌症。绝大多数结肠直肠癌是腺癌。这是因为结肠的组织内有许多腺体。当这些腺体在遗传水平上发生许多变化时,它们会以可预测的方式进展,即从良性转变为侵袭性恶性结肠癌。结肠腺瘤,特别是晚期结肠直肠腺瘤(Advanced colorectal adenoma,AA),是恶性腺瘤的良性形式,但如果不切除仍具有恶性潜能(它们通常被切除,因为它们有恶变并导致结肠癌的倾向)。

[0003] 筛查是预防和减少结肠直肠癌死亡的有效方法,建议从50岁至75岁开始筛查。最著名和最常用的结肠直肠癌筛查测试称为粪便免疫化学测试(Fecal Immunochemical Test,FIT)。FIT检测粪便样本中的血液,其可能是癌前期或癌症的征兆。如果得到异常结果,则通常建议进行结肠镜检查,让医生观察结肠和直肠的内部以做出诊断。在结肠镜检查期间,如果发现小息肉,即可将其切除。如果发现大息肉或肿瘤,则可以进行活组织检查以检查它是否是癌性的。胃肠病学家使用结肠镜检查以发现并切除这些腺瘤和息肉,以防止它们继续获得将导致侵袭性腺瘤的遗传变化。

[0004] 虽然,如上所述,当今使用FIT来筛查结肠直肠癌,但重要的是要注意FIT对AA的灵敏度较低(根据文献约为20%至30%),这意味着大多数所述类型的患者可能被错误的归类为未患病。因此,FIT由于其低灵敏度而无法识别腺瘤。此外,由于FIT使用粪便样本,因此依从性较低。另一方面,结肠镜检查是一种侵入性技术,其中最严重的并发症通常是胃肠道穿孔。另一方面,现今结肠镜检查是一种涉及麻醉的过程,并且通常在结肠镜检查的肠道准备期间施用的轻泻剂与多种消化问题有关。

[0005] 重要的是要注意,现今用于筛查有患CRC或AA风险的一般人群的方法与高假阳性率有关。结果,如今进行大量不必要的随访结肠镜检查。

[0006] 本发明为上述问题提供了明确的解决方案,因为它专注于一种用于识别或筛查有患结肠直肠癌或结肠直肠腺瘤(特别是晚期结肠直肠腺瘤)风险的人类对象的体外方法,该体外方法从由微创样本(如血液、血清或血浆)中分离出的蛋白生物标志物的浓度水平出发。由于本发明的方法基于血液、血清或血浆样本,因此有望提高对结肠直肠癌筛查的依从性。此外,本发明的方法提供了高灵敏度和特异性,这意味着它是一种用于检测结肠直肠癌和结肠直肠腺瘤的强大且具有成本效益的方法。

发明内容

[0007] 本发明涉及一种用于诊断、识别或筛查有患结肠直肠癌和/或晚期结肠直肠腺瘤风险的人类对象的体外方法,该体外方法从由微创样本(如血液、血清或血浆)中分离出的

蛋白生物标志物的浓度水平出发。本发明的方法提供了高灵敏度和特异性,这意味着它是一种用于检测结肠直肠癌和结肠直肠腺瘤的强大且具有成本效益的方法。

[0008] 由于本发明的方法与现今用于筛查有患CRC或AA风险的一般人群的方法(FIT)相比具有更高的灵敏度和特异性,因此它与较低百分比的假阳性相关。因此,本发明中描述的方法明显有助于减少随访结肠镜检查的次数,从而改进如今对患者进行筛查或诊断的方式。一旦执行本发明的方法,如果确定患者可能患有结肠直肠癌和/或癌前阶段,则通过结肠镜检查确认结果。然而,如果没有确定患者可能患有结肠直肠癌和/或癌前阶段,则不需要进行结肠镜检查并建议使用下文定义的本发明的方法进行常规测试。

[0009] 具体地,本发明的第一实施方式涉及一种用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法(下文称为“本发明方法”),该方法包括:a)测量从对象获得的生物样本中至少F1t3L的浓度水平;和,b)其中,如果与在健康对照对象中测得的参考浓度水平相比,确定至少F1t3L的浓度水平存在偏差或变化,则指示对象患有结肠直肠癌和/或癌前阶段。

[0010] 在一个特别优选的实施方式中,本发明方法包括测量从对象获得的生物样本中至少组合[F1t3L和CYFRA21-1]的浓度水平。

[0011] 在这点上,重要的是要考虑到本发明要求保护的所有最可靠的特征(signature)都包含F1t3L、优选[F1t3L和CYFRA21-1],从而获得各种生物标志物特征,所述各种生物标志物特征包含F1t3L、优选[F1t3L和CYFRA21-1],例如[F1t3L和CYFRA21-1和AREG]、[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4]或[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C],其中对于检测CRC的曲线下面积(Area Under the Curve,AUC)约为0.9,并且对于检测AA也具有良好的性能(参见表12)。尽管根据本发明可以有效地使用包含F1t3L、优选[F1t3L和CYFRA21-1]的任何特征,但是特别优选的是包含F1t3L、优选[F1t3L和CYFRA21-1]的以下特征,因为它们对于检测CRC的AUC值大于0.9,并且对于检测AA有良好的性能:[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4](对于CRC的AUC=0.931)或[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C](对于CRC的AUC=0.915)(参见表12)。

[0012] 本发明的第二实施方式涉及多组件试剂盒,该多组件试剂盒包含用于确定任何上述特征的浓度水平的试剂。在一个优选的实施方式中,本发明涉及试剂盒用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外用途,该试剂盒包含用于确定F1t3L、或组合[F1t3L和CYFRA21-1]、优选[F1t3L和CYFRA21-1和AREG]、[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4]或[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C]的浓度水平的试剂。

[0013] 根据本发明方法,在测量生物标志物的任何上述组合的浓度水平之后,获得特征的评分值并且将该评分值与定义诊断规则的阈值进行比较。如果该评分值高于阈值,则相应样本被归类为阳性样本,这表明患者可能患有结肠直肠癌和/或其癌前阶段。已定义阈值以优化灵敏度值和特异性值。因此,在一个优选的实施方式中,本发明方法包括:a)测量从对象获得的生物样本中生物标志物的任何上述组合的浓度水平;b)处理浓度值以获得风险评分;以及c)其中,如果与参考值相比,确定从生物标志物的任何上述组合获得的风险评分值存在偏差或变化,则这指示对象患有结肠直肠癌和/或癌前阶段。

[0014] 本发明的第三实施方式涉及任何上述生物标志物或特征用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外用途。

[0015] 在一个优选的实施方式中,结肠直肠癌的癌前阶段是晚期结肠直肠腺瘤。

[0016] 在一个优选的实施方式中,结肠直肠癌和/或其癌前阶段的诊断通过图像技术、优选结肠镜检查来确认。

[0017] 本发明的一个优选的实施方式涉及一种用于检测结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法,所述方法包括:a)从人类患者获得血浆样本;b)通过使血浆样本与针对所述蛋白生物标志物或特征的抗体接触并检测蛋白质与抗体之间的结合来检测血浆样本中是否存在任何上述蛋白生物标志物或特征。

[0018] 本发明的第四实施方式涉及一种用于诊断和治疗结肠直肠癌或其癌前阶段的方法,该方法包括:a)从人类患者获取血浆样本;b)检测血浆样本中是否存在任何上述蛋白生物标志物或特征;c)当检测到血浆样本中存在所述蛋白生物标志物或特征时,诊断患有结肠直肠癌或其癌前阶段的患者;并对患者进行结肠镜检查,然后切除结肠直肠癌或息肉。

[0019] 可选择地,本发明的第五实施方式涉及一种用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法(下文称为“本发明方法”),该方法包括:a)测量从对象获得的生物样本中至少AREG的浓度水平;和,b)其中,如果与在健康对照对象中测得的参考浓度水平相比,确定至少AREG的浓度水平存在偏差或变化,则指示对象患有结肠直肠癌和/或其癌前阶段。

[0020] 在一个特别优选的实施方式中,本发明方法包括测量从对象获得的生物样本中至少组合[AREG和CYFRA21-1]的浓度水平。

[0021] 在这点上,重要的是要考虑到本发明要求保护的所有最可靠的特征都包含AREG、优选[AREG和CYFRA21-1],从而获得各种生物标志物特,所述各种生物标志物特包含AREG、优选[AREG和CYFRA21-1],其中对于检测CRC的曲线下面积(AUC)约为0.9,并且对于检测AA也具有良好的性能(参见表12(续))。因此,尽管根据本发明可以有效地使用包含AREG、优选包含[AREG和CYFRA21-1]的任何特征,但是特别优选包含AREG、优选包含[AREG和CYFRA21-1]的以下特征,因为它们对于检测CRC的AUC值大于0.9,并且对于检测AA有良好的性能:[AREG和CYFRA21-1和F1t3L和ErbB4](对于CRC的AUC=0.931)或[AREG和CYFRA21-1和F1t3L和CLEC2C](对于CRC的AUC=0.915)(参见表12(续))。

[0022] 因此,在一个特别优选的实施方式中,本发明的方法包括测量从对象获得的生物样本中至少组合[AREG和CYFRA21-1和F1t3L]、或[AREG和CYFRA21-1和CLEC2C]的组合、或[AREG和CYFRA21-1和ErbB4]的组合、或[AREG和CYFRA21-1和FasL]的组合、或[AREG和CYFRA21-1和CD147]的组合、或[AREG和CYFRA21-1和HGFR]的组合、或[AREG和CYFRA21-1和F1t3L和ErbB4]的组合、或[AREG和CYFRA21-1和F1t3L和CLEC2C]的组合、或[AREG和CYFRA21-1和HGFR和CD147]的组的浓度水平。

[0023] 在一个特别优选的实施方式中,本发明方法包括测量从对象获得的生物样本中至少组合[AREG和CD147]、或[AREG和CLEC2C]的组合、或[AREG和HGFR]的组合、或组合[AREG和CD147和HGFR]的浓度水平。

[0024] 本发明的第六实施方式涉及任何上述特征用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外用途。

[0025] 根据本发明方法,在测量生物标志物的任何上述组合的浓度水平之后,获得特征的评分值并且将该评分值与定义诊断规则的阈值进行比较。如果该评分值高于阈值,则相应样本被归类为阳性样本,这表明患者可能患有结肠直肠癌和/或其癌前阶段。已定义阈值以优化灵敏度值和特异性值。因此,在一个优选的实施方式中,本发明方法包括:a)测量从

对象获得的生物样本中生物标志物的任何上述组合的浓度水平;b) 处理浓度值以获得风险评分;以及c) 其中, 如果与参考值相比, 确定从生物标志物的任何上述组合获得的风险评分值存在偏差或变化, 则这表明对象患有结肠直肠癌和/或癌前阶段。

[0026] 本发明的第七实施方式涉及多组件试剂盒, 该多组件试剂盒包含用于确定任何上述特征的浓度水平的试剂。在一个优选的实施方式中, 本发明涉及试剂盒用于诊断结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外用途, 该试剂盒包含用于确定生物标志物的任何上述组合的浓度水平的试剂。

[0027] 在一个优选的实施方式中, 结肠直肠癌的癌前阶段是晚期结肠直肠腺瘤。

[0028] 在一个优选的实施方式中, 结肠直肠癌和/或其癌前阶段的诊断通过图像技术、优选结肠镜检查来确认。

[0029] 本发明的一个优选的实施方式涉及一种用于检测结肠直肠癌和/或其癌前阶段的体外方法, 所述方法包括:a) 从人类患者获得血浆样本;b) 通过将血浆样本与针对所述蛋白生物标志物或特征的抗体接触并检测蛋白质与抗体之间的结合来检测血浆样本中是否存在任何上述蛋白生物标志物或特征。

[0030] 本发明的最后的实施方式涉及一种用于诊断和治疗结肠直肠癌或其癌前阶段的方法, 该方法包括:a) 从人类患者获取血浆样本;b) 检测血浆样本中是否存在任何上述蛋白生物标志物或特征;c) 当检测到血浆样本中存在所述蛋白生物标志物或特征时, 诊断患有结肠直肠癌或其癌前阶段的患者;并对患者进行结肠镜检查, 然后切除结肠直肠癌或息肉。

[0031] 为了本发明的目的, 以下术语定义为:

[0032] • 术语“结肠直肠癌”是一种医学病症, 特征是小肠下方的肠道(即大肠(结肠), 包括盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和直肠)的细胞癌变。

[0033] • 表述“结肠直肠腺瘤”是指结肠腺瘤, 也称为腺瘤性息肉, 是结肠直肠癌的良性癌前阶段, 但仍具有发展为结肠直肠癌的高风险。

[0034] • 表述“晚期结肠直肠腺瘤”是指大小至少为10mm或组织学上具有高度不典型增生或绒毛成分高于20%的腺瘤。

[0035] • 表述“微创性生物样本”是指从患者体内采集的任何样本, 除了用于从患者身上采集血液的细针外, 无需使用伤害性器械, 因此不会对患者造成伤害。具体地, 本发明中的微创性生物样本是指: 血液、血清或血浆样本。

[0036] • 表述“在健康对照对象中测得的参考浓度水平”是指蛋白质浓度水平的“参考值”。如果相对于所述“在健康对照对象中测得的参考浓度水平”, 确定蛋白质浓度水平存在偏差, 则这指示了结肠直肠癌或其癌前阶段。特别地, 如果本发明的生物标志物或特征的浓度水平相对于所述“参考值”显著更高或更低, 则这指示了结肠直肠癌或其癌前阶段。

[0037] • 表述“风险评分”是指将一个或多个浓度值处理成单个值(或风险值)后得到的风险值, 它代表个体患病的概率。该风险值将与参考值进行比较以评估患者是否可能患有结肠直肠癌和/或其癌前阶段。

[0038] • “参考值”可以是阈值或截止值。通常, “阈值”或“截止值”可以通过实验、经验或理论来确定。如本领域普通技术人员将知道的, 阈值也可以根据现有的实验和/或临床条件任意选择。必须根据测试的功能和收益/风险平衡(假阳性和假阴性的临床结果)来确定阈值以获得最佳灵敏度和特异性。优选地, 本领域技术人员可以将根据本发明的方法获得的

生物标志物水平(或评分)与定义的阈值进行比较。通常,可以使用基于实验数据的接受者工作特征(Receiver Operating Characteristic,ROC)曲线来确定最佳灵敏度和特异性(以及阈值)。例如,在确定一组参照中生物标志物的水平后,可以使用算法分析对待测生物样本中生物标志物的测定浓度进行统计处理,从而得到对样本分类具有意义的分类标准。ROC曲线的全称是接受者工作特征曲线(Receiver operator characteristic curve),也称为接受者操作特性曲线(Receiver operation characteristic curve)。其主要用于临床生化诊断试验。ROC曲线是反映连续变量真阳性率(灵敏度)和假阳性率(1-特异性)的综合指标。它通过图像合成方法揭示了灵敏度和特异性之间的关系。将一系列不同的截止值(阈值或临界值,即诊断试验的正常与异常结果的边界值)设置为连续变量,以计算出一系列的灵敏度值和特异性值。然后以灵敏度为纵坐标,以特异性为横坐标绘制曲线。曲线下面积(AUC)越大,诊断的准确度越高。在ROC曲线上,最靠近坐标图左上角的点是同时具有高灵敏度值和高特异性值的临界点。ROC曲线的AUC值在1.0到0.5之间。当 $AUC > 0.5$ 时,随着AUC接近1,诊断结果越来越好。当AUC在0.5到0.7之间时,准确度低。当AUC在0.7到0.9之间时,准确度良好。当AUC高于0.9时,准确度很高。这种计算方法最好用计算机来完成。可以使用本领域现有的软件或系统来绘制ROC曲线,例如:MedCalc 9.2.0.1医学统计软件SPSS 9.0。

[0039] • “包括”的意思是包括但不限于“包括”一词之后的任何内容。因此,使用术语“包括”,表示所列出的元素是必要的或强制性的,但是其它元素是可选的,且可以存在或者可以不存在。

[0040] • “由……组成”意指包括且限于跟随在短语“由……组成”之后的任何内容。因此,短语“由……组成”表示所列出的元素是必须的或强制性的,并且不可以存在其它元素。

[0041] 出于本发明的目的,根据Uniprot数据库识别了以下蛋白质:

[0042]	缩写	蛋白名称	Uniprot ID.
	AREG	双调蛋白	P15514
	CD147	基础免疫球蛋白	P35613
	CLEC2C	早期活化抗原CD69	Q07108
	CYFRA21-1	细胞角蛋白片段抗原21-1	N/A
	ErbB4	受体酪氨酸蛋白激酶erbB-4	Q15303
	FasL	肿瘤坏死因子配体超家族成员6	P48023
	Flt3L	Fms相关酪氨酸激酶3配体	P49771
	HGFR	肝细胞生长因子受体	P08581
	IFN γ	干扰素 γ	P01579

附图说明

[0043] 图1.以下的接受者工作特征(ROC)曲线:A)结肠直肠癌中的[Flt3L和CYFRA21-1],曲线下面积(AUC)=0.865;B)晚期结肠直肠腺瘤中的[Flt3L和CYFRA21-1],曲线下面积(AUC)=0.606.X轴代表特异性.Y轴代表灵敏度;

[0044] 图2.以下的接受者工作特征(ROC)曲线:A)结肠直肠癌中的[Flt3L和CYFRA21-1和AREG],曲线下面积(AUC)=0.899;B)晚期结肠直肠腺瘤中的[Flt3L和CYFRA21-1和AREG],

曲线下面积 (AUC) = 0.720。X轴代表特异性。Y轴代表灵敏度；

[0045] 图3.以下的接受者工作特征 (ROC) 曲线:A) 结肠直肠癌中的[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4],曲线下面积 (AUC) = 0.931;B) 晚期结肠直肠腺瘤中的[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和ErbB4],曲线下面积 (AUC) = 0.707。X轴代表特异性。Y轴代表灵敏度；

[0046] 图4.以下的接受者工作特征 (ROC) 曲线:A) 结肠直肠癌中的[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C],曲线下面积 (AUC) = 0.915;B) 晚期结肠直肠腺瘤中的[F1t3L和CYFRA21-1和AREG和CLEC2C],曲线下面积 (AUC) = 0.727。X轴代表特异性。Y轴代表灵敏度；

[0047] 图5.以下的接受者工作特征 (ROC) 曲线:A) 结肠直肠癌中的[AREG和CYFRA21-1],曲线下面积 (AUC) = 0.878;B) 晚期结肠直肠腺瘤中的[AREG和CYFRA21-1],曲线下面积 (AUC) = 0.722。X轴代表特异性。Y轴代表灵敏度；

[0048] 图6.以下的接受者工作特征 (ROC) 曲线:A) 结肠直肠癌中的[AREG和CYFRA21-1和F1t3L和ErbB4],曲线下面积 (AUC) = 0.931;B) 晚期结肠直肠腺瘤中的[AREG和CYFRA21-1和F1t3L和ErbB4],曲线下面积 (AUC) = 0.707。X轴代表特异性。Y轴代表灵敏度；

[0049] 图7.以下的接受者工作特征 (ROC) 曲线:A) 结肠直肠癌中的[AREG和CYFRA21-1和F1t3L和CLEC2C],曲线下面积 (AUC) = 0.915;B) 晚期结肠直肠腺瘤中的[AREG和CYFRA21-1和F1t3L和CLEC2C],曲线下面积 (AUC) = 0.727。X轴代表特异性。Y轴代表灵敏度；

[0050] 图8.以下的接受者工作特征 (ROC) 曲线:A) 结肠直肠癌中的[AREG和CYFRA21-1和CD147和HGFR],曲线下面积 (AUC) = 0.888;B) 晚期结肠直肠腺瘤中的[AREG和CYFRA21-1和CD147和HGFR],曲线下面积 (AUC) = 0.769。X轴代表特异性。Y轴代表灵敏度。

具体实施方式

[0051] 实施例1.材料和方法。

[0052] 实施例1.1.研究人群。

[0053] 来自8所西班牙医院(Hospital de Burgos、Hospital de Vigo、Hospital de Donosti、Hospital de Ourense、Hospital del Bierzo、Hospital de Beltrán和Hospital de Zaragoza)的总计96名对象被预先纳入本研究:64名新近被诊断出患有散发性结肠直肠肿瘤(32例CRC和32例AA)以及32名没有任何癌症个人史并且最近的结肠镜检查证实没有结肠直肠肿瘤病变的健康个体。Aa患者是那些具有大小至少为10mm或组织学上具有高度不典型增生或绒毛成分>20%的腺瘤的患者。参与者的特征如表1所示。在所有个体内窥镜检查或手术之前收集血液样本。

[0054] 表1

病例 平均年龄(SD) 性别	对照 64,3(44-86)		AA 65,1(52-88)	CRC 71,6(54-85)	总计 67(44-88)
	男性	13	18	18	49 (51%)
	女性	19	14	14	47 (49%)
结肠直肠癌特征 TNM阶段	I			4	
	II			9	
	III			10	
	IV			6	
	未知			3	
位置	升结肠和盲肠			10	
	降结肠和乙状结肠			12	
	横结肠			3	
	直肠			3	
	未知			4	
晚期结肠直肠癌特征	大小=>10 mm		28		
	小型AA (<=15mm)		19		
	大型AA >15mm)		13		
	平均大小(mm) (SD)		18,8		
	AA数量平均值 (SD)		2,3		
高度不典型增生	是		9		
	否		21		
	未知		2		
绒毛成分	是		13		
	否		17		
	未知		2		

[0056] 研究队列的临床病理学特征

[0057] 该研究得到了各医院机构伦理委员会 (Institutional Ethics Committee) 的批准,并根据赫尔辛基宣言 (Declaration of Helsinki) 获得了所有参与者的书面知情同意书。

[0058] 实施例1.2.样本制备。

[0059] 将每个参与者的10mL全血收集在含有EDTA K2的管中。将血液样本置于4℃直至血浆分离。将样本在4℃下以1600xg离心10分钟以沉降血细胞,并将血浆转移到新管中,然后在4℃下以16000xg进一步离心10分钟以完全去除细胞成分。

[0060] 实施例1.3.分子分析。

[0061] 血浆样本中生物标志物的浓度是使用商业的酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和化学发光免疫测定 (Chemiluminescence immunoassay, CLIA) 测试并遵循其相应的说明手册而确定的。HGFR和ErbB4用来自Cloud clone Corp的ELISA试剂盒进行分析。CD147、CLEC2C、Flt3L和FasL的水平使用来自Elabscience的ELISA试剂盒测量。在IFN γ 的情况下,使用了来自Abcam的ELISA试剂盒。关于CLIA测试,CYFRA21-1和AREG使用来自Cloud Clone Corp的CLIA测试进行分析。

[0062] 实施例1.4.数据量化。

[0063] 对于蛋白质定量步骤,将样本用相应的试剂盒 (ELISA/CLIA) 处理并分布在实验板中。每个板还包含用于构建标准曲线的对照数据。已针对每个样本对从每次运行中获得的

荧光数据(表示为整数)进行背景校正,并采用使用2度多项式回归模型生成的标准曲线对荧光数据进行量化。

[0064] 实施例1.5.统计分析。

[0065] 在分析中考虑了三组个体。CRC(诊断为结肠直肠癌的个体)、AA(诊断为晚期腺瘤的个体)和CTL(无疾病的个体)。

[0066] 原始定量数据已通过应用平方根函数,然后中心化和比例化,进行了转换,从而在转换后,每个蛋白质测量值的平均值为0,且标准偏差为1。量化值总结在表2和表3中,其中每种蛋白质被以所考虑的不同组中的中位数和四分位距描述。

[0067] Shapiro-Wilk检验证实了数据的非正态性,因此,使用Wilcoxon秩和检验来比较CRC病例或AA病例与CTL个体。

[0068] 单个蛋白质及其某些组合的诊断性能已通过其接受者工作特征(ROC)曲线和ROC曲线下面积(AUC)进行评估。此外,在最佳尤登指数(Youden's Index)定义的最佳截止点(或等效地,ROC的使灵敏度和特异性最大化的点)处计算不同测试的灵敏度、特异性、阳性预测值(Positive predictive value,PPV)和阴性预测值(Negative predictive value, NPV)。

[0069] 对于单个蛋白,用于推导ROC-AUC和其余性能值的评分是使用单变量逻辑回归模型获得的,而对于所考虑的蛋白质的不同组合,则是使用多变量逻辑回归模型获得的。AUC的95%CI是使用DeLong方法在单个标志物和它们的组合中获得的。

[0070] 实施例2.结果。

[0071] 实施例2.1.单个标志物结果。

[0072] 确定了评估单个蛋白质的不同指标,还进行了以下比较:CRC/AA对比CTL。可以看出,AREG、CYFRA21-1和Flt3L在CRC组和CTL组之间有显著差异,并且它们的AUC显著不同于0.5(因为它们的95%置信区间不包括0.5)。在AA组的情况下,AREG也示出了与CTL组相比的统计学差异。

[0073] 表2和表3示出了单个蛋白质的指标,包括来自Wilcoxon检验(p.Wilc)的p值、ROC曲线下面积(AUC)以及在最佳尤登指数的ROC曲线的最佳截止点处计算的灵敏度(Sens.)、特异性(Spec.)和阳性预测值(VPP)与阴性预测值(VPN)。符号列表示,对于p值<0.25的生物标志物,高水平的标志物是否会增加或降低疾病风险(分别为+和-)。

[0074] 表2

[0075]

	CRC 与 CTL						
	p.Wilc.	符号	AUC	Sens.	Spec.	VPP	VPN
AREG	0.0008	+	0.744 (0.619,0.868)	65.62	81.25	77.78	70.27
CD147	0.5280		0.546 (0.402,0.691)	53.12	62.50	58.62	57.14
CLEC2C	0.2021	+	0.593 (0.452,0.734)	93.75	28.12	56.60	81.82
CYFRA21-1	0.0000	+	0.795 (0.682,0.909)	90.62	68.75	74.36	88.00
ErbB4	0.1177	-	0.614 (0.47,0.758)	53.12	75.00	68.00	61.54
FasL	0.1859	+	0.598 (0.454,0.741)	54.84	68.75	62.96	61.11
Flt3L	0.0191	-	0.67 (0.531,0.809)	56.25	84.38	78.26	65.85
HGFR	0.1729	+	0.6 (0.452,0.747)	65.62	68.75	67.74	66.67
IFN γ	0.1537	+	0.604 (0.464,0.745)	68.75	53.12	59.46	62.96

[0076] 表3

	AA 与 CTL						
	p.Wilc.	符号	AUC	Sens.	Spec.	VPP	VPN
AREG	0.0286	+	0.66 (0.525,0.795)	87.50	40.62	59.57	76.47
CD147	0.1772	+	0.599 (0.458,0.739)	87.50	31.25	56.00	71.43
CLEC2C	0.7831		0.521 (0.376,0.665)	100.00	9.38	52.46	100.00
CYFRA21-1	0.1412	+	0.607 (0.467,0.748)	90.62	37.50	59.18	80.00
ErbB4	0.3270		0.572 (0.427,0.716)	50.00	71.88	64.00	58.97
FasL	0.5730		0.542 (0.394,0.689)	74.19	46.88	57.50	65.22
Flt3L	0.8155		0.518 (0.372,0.663)	43.75	75.00	63.64	57.14
HGFR	0.0678	+	0.633 (0.493,0.773)	68.75	62.50	64.71	66.67
IFN γ	0.8467		0.515 (0.37,0.659)	81.25	31.25	54.17	62.50

[0078] 实施例2.2.生物标志物的最佳组合。

[0079] 为了提高个体诊断能力,已经通过以下进程探索了蛋白质的组合:基于CRC对比CTL (表3) 或AA对比CTL (表4) 的比较中 $p < 0.25$ 的标志物,我们使用多变量逻辑回归来探索同时采用这些蛋白质中的两种、三种和四种的所有可能组合。

[0080] 表4、表5、表5 (续)、表6和表6 (续) 分别示出了两种、三种和四种生物标志物的组合所达到的AUC,其中区分了CRC与CTL。

[0081] 表4

	两种生物标志物的组合 (CRC 对比 CTL)	AUC
	AREG,CYFRA21-1	0.8779297
[0082]	Flt3L,CYFRA21-1	0.8652344
	CYFRA21-1,ErbB4	0.8359375
	AREG,CLEC2C	0.8349609
	CYFRA21-1,IFN γ	0.8017578
	CYFRA21-1,FasL	0.7993952
	CLEC2C,CYFRA21-1	0.7988281
	CYFRA21-1,HGFR	0.7919922
	AREG,Flt3L	0.7832031
	AREG,HGFR	0.7626953
	AREG,IFN γ	0.7431641
	AREG,ErbB4	0.7324219
	AREG,FasL	0.7247984
	Flt3L,HGFR	0.6982422
	CLEC2C,Flt3L	0.6953125
	ErbB4,Flt3L	0.6914062
	FasL,Flt3L	0.6814516
	Flt3L,IFN γ	0.6708984
	ErbB4,IFN γ	0.6318359
	ErbB4,HGFR	0.6142578
	CLEC2C,IFN γ	0.6083984

[0083]

CLEC2C,ErbB4	0.6064453
FasL,HGFR	0.6018145
HGFR,IFN γ	0.5869141
CLEC2C,FasL	0.5866935
ErbB4,FasL	0.5856855
FasL,IFN γ	0.5836694
CLEC2C,HGFR	0.5810547

[0084] 表5

[0085]

支持组合 Flt3L+CYFRA21-1 的三种生物标志物的组合 (CRC 对比 CTL)	AUC
Flt3L,CYFRA21-1,AREG	0.8994141
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1	0.8955078
AREG,CYFRA21-1,ErbB4	0.8955078
AREG,CYFRA21-1,FasL	0.8931452
Flt3L,CYFRA21-1	0.8847656
AREG,CYFRA21-1,IFN γ	0.8837891
AREG,CYFRA21-1,HGFR	0.8759766
Flt3L,CYFRA21-1,CLEC2C	0.8681641
Flt3L,CYFRA21-1,FasL	0.8679435
Flt3L,CYFRA21-1,IFN γ	0.8671875
Flt3L,CYFRA21-1,HGFR	0.8662109
AREG,CLEC2C,Flt3L	0.8427734
CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8388672
CYFRA21-1,ErbB4,IFN γ	0.8359375
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4	0.8349609
AREG,CLEC2C,HGFR	0.8330078
CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.8326613
AREG,CLEC2C,FasL	0.8316532
AREG,CLEC2C,ErbB4	0.8300781
AREG,CLEC2C,IFN γ	0.8173828
AREG,Flt3L,HGFR	0.8066406
CLEC2C,CYFRA21-1,IFN γ	0.8066406
CYFRA21-1,FasL,IFN γ	0.8054435
CYFRA21-1,HGFR,IFN γ	0.8037109
CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.8014113
CLEC2C,CYFRA21-1,FasL	0.7973790
CLEC2C,CYFRA21-1,HGFR	0.7968750
AREG,ErbB4,Flt3L	0.7841797
AREG,Flt3L,IFN γ	0.7832031
AREG,FasL,Flt3L	0.7782258
AREG,ErbB4,HGFR	0.7705078

[0086]

AREG,HGFR,IFN γ	0.7666016
AREG,FasL,HGFR	0.7641129
AREG,ErbB4,IFN γ	0.7451172
AREG,FasL,IFN γ	0.7358871
AREG,ErbB4,FasL	0.7197581
ErbB4,Flt3L,HGFR	0.7119141
CLEC2C,FasL,Flt3L	0.7076613
CLEC2C,ErbB4,Flt3L	0.7031250
ErbB4,FasL,Flt3L	0.7006048
CLEC2C,Flt3L,HGFR	0.6962891
FasL,Flt3L,HGFR	0.6935484
CLEC2C,Flt3L,IFN γ	0.6933594
Flt3L,HGFR,IFN γ	0.6894531
ErbB4,Flt3L,IFN γ	0.6875000
FasL,Flt3L,IFN γ	0.6814516
ErbB4,FasL,IFN γ	0.6250000
ErbB4,HGFR,IFN γ	0.6230469
CLEC2C,ErbB4,IFN γ	0.6191406
ErbB4,FasL,HGFR	0.6139113
CLEC2C,ErbB4,HGFR	0.6123047
CLEC2C,ErbB4,FasL	0.6068548
CLEC2C,FasL,IFN γ	0.6048387
FasL,HGFR,IFN γ	0.5997984
CLEC2C,FasL,HGFR	0.5967742
CLEC2C,HGFR,IFN γ	0.5966797

[0087] 表5 (续)

[0088]

支持组合 AREG+CYFRA21-1 的三种生物标志物的组合 (CRC 对比 CTL)	AUC
AREG,CYFRA21-1,Flt3L	0.8994141
AREG,CYFRA21-1,CLEC2C	0.8955078
AREG,CYFRA21-1,ErbB4	0.8955078
AREG,CYFRA21-1,FasL	0.8931452
CYFRA21-1,ErbB4,Flt3L	0.8847656
AREG,CYFRA21-1,IFN γ	0.8837891
AREG,CYFRA21-1,HGFR	0.8759766
CLEC2C,CYFRA21-1,Flt3L	0.8681641
CYFRA21-1,FasL,Flt3L	0.8679435
CYFRA21-1,Flt3L,IFN γ	0.8671875
CYFRA21-1,Flt3L,HGFR	0.8662109
AREG,CLEC2C,Flt3L	0.8427734
CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8388672

[0089]

CYFRA21-1,ErbB4,IFN γ	0.8359375
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4	0.8349609
AREG,CLEC2C,HGFR	0.8330078
CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.8326613
AREG,CLEC2C,FasL	0.8316532
AREG,CLEC2C,ErbB4	0.8300781
AREG,CLEC2C,IFN γ	0.8173828
AREG,Flt3L,HGFR	0.8066406
CLEC2C,CYFRA21-1,IFN γ	0.8066406
CYFRA21-1,FasL,IFN γ	0.8054435
CYFRA21-1,HGFR,IFN γ	0.8037109
CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.8014113
CLEC2C,CYFRA21-1,FasL	0.7973790
CLEC2C,CYFRA21-1,HGFR	0.7968750
AREG,ErbB4,Flt3L	0.7841797
AREG,Flt3L,IFN γ	0.7832031
AREG,FasL,Flt3L	0.7782258
AREG,ErbB4,HGFR	0.7705078
AREG,HGFR,IFN γ	0.7666016
AREG,FasL,HGFR	0.7641129
AREG,ErbB4,IFN γ	0.7451172
AREG,FasL,IFN γ	0.7358871
AREG,ErbB4,FasL	0.7197581
ErbB4,Flt3L,HGFR	0.7119141
CLEC2C,FasL,Flt3L	0.7076613
CLEC2C,ErbB4,Flt3L	0.7031250
ErbB4,FasL,Flt3L	0.7006048
CLEC2C,Flt3L,HGFR	0.6962891
FasL,Flt3L,HGFR	0.6935484
CLEC2C,Flt3L,IFN γ	0.6933594
Flt3L,HGFR,IFN γ	0.6894531
ErbB4,Flt3L,IFN γ	0.6875000
FasL,Flt3L,IFN γ	0.6814516
ErbB4,FasL,IFN γ	0.6250000
ErbB4,HGFR,IFN γ	0.6230469
CLEC2C,ErbB4,IFN γ	0.6191406
ErbB4,FasL,HGFR	0.6139113
CLEC2C,ErbB4,HGFR	0.6123047
CLEC2C,ErbB4,FasL	0.6068548
CLEC2C,FasL,IFN γ	0.6048387
FasL,HGFR,IFN γ	0.5997984
CLEC2C,FasL,HGFR	0.5967742

[0090]

CLEC2C,HGFR,IFN γ	0.5966797
--------------------------	-----------

[0091] 表6

支持组合 Flt3L+CYFRA21-1 的四种生物标志物的组合 (CRC 对比 CTL)	AUC
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,AREG	0.9306641
Flt3L,CYFRA21-1,AREG,CLEC2C	0.9150391
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4	0.9023438
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.9022177
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1,IFN γ	0.9003906
Flt3L,CYFRA21-1, HGFR,AREG,	0.9003906
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1,FasL	0.9002016
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,IFN γ	0.8994141
Flt3L,CYFRA21-1,IFN γ ,AREG	0.8984375
Flt3L,CYFRA21-1,FasL,AREG	0.8981855
AREG,CYFRA21-1,FasL,IFN γ	0.8951613
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8945312
AREG,CLEC2C,CYFRA21-1,HGFR	0.8935547
AREG,CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.8901210
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8867188
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,IFN γ	0.8867188
AREG,CYFRA21-1,HGFR,IFN γ	0.8847656
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,CLEC2C	0.8847656
Flt3L,CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.8830645
Flt3L,CYFRA21-1,FasL,IFN γ	0.8689516
Flt3L,CYFRA21-1,HGFR,IFN γ	0.8671875
Flt3L,CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.8669355
Flt3L,CYFRA21-1,IFN γ ,CLEC2C	0.8662109
Flt3L,CYFRA21-1,FasL,CLEC2C	0.8649194
Flt3L,CYFRA21-1,HGFR,CLEC2C	0.8632812
AREG,CLEC2C,Flt3L,HGFR	0.8564453
AREG,CLEC2C,ErbB4,Flt3L	0.8457031
AREG,CLEC2C,FasL,Flt3L	0.8447581
AREG,CLEC2C,Flt3L,IFN γ	0.8447266
CYFRA21-1,ErbB4,HGFR,IFN γ	0.8417969
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8398438
AREG,CLEC2C,ErbB4,HGFR	0.8378906
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4,IFN γ	0.8359375
AREG,CLEC2C,ErbB4,FasL	0.8346774
AREG,CLEC2C,FasL,HGFR	0.8326613
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.8326613
CYFRA21-1,ErbB4,FasL,IFN γ	0.8326613

[0092]

[0093]

CYFRA21-1,ErbB4,FasL,HGFR	0.8316532
AREG,CLEC2C,HGFR,IFN γ	0.8271484
AREG,CLEC2C,ErbB4,IFN γ	0.8251953
AREG,CLEC2C,FasL,IFN γ	0.8245968
AREG,ErbB4,Flt3L,HGFR	0.8203125
CLEC2C,CYFRA21-1,FasL,IFN γ	0.8074597
AREG,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.8066406
CYFRA21-1,FasL,HGFR,IFN γ	0.8064516
CLEC2C,CYFRA21-1,HGFR,IFN γ	0.8056641
AREG,FasL,Flt3L,HGFR	0.7993952
CLEC2C,CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.7983871
AREG,ErbB4,Flt3L,IFN γ	0.7861328
AREG,ErbB4,HGFR,IFN γ	0.7802734
AREG,ErbB4,FasL,Flt3L	0.7802419
AREG,FasL,Flt3L,IFN γ	0.7772177
AREG,ErbB4,FasL,HGFR	0.7721774
AREG,FasL,HGFR,IFN γ	0.7681452
AREG,ErbB4,FasL,IFN γ	0.7419355
ErbB4,FasL,Flt3L,HGFR	0.7358871
CLEC2C,ErbB4,FasL,Flt3L	0.7167339
CLEC2C,FasL,Flt3L,HGFR	0.7086694
CLEC2C,FasL,Flt3L,IFN γ	0.7056452
CLEC2C,ErbB4,Flt3L,HGFR	0.7050781
ErbB4,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.7050781
CLEC2C,ErbB4,Flt3L,IFN γ	0.7011719
ErbB4,FasL,Flt3L,IFN γ	0.6985887
CLEC2C,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.6933594
FasL,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.6895161
CLEC2C,ErbB4,FasL,IFN γ	0.6290323
CLEC2C,ErbB4,FasL,HGFR	0.6239919
CLEC2C,ErbB4,HGFR,IFN γ	0.6220703
ErbB4,FasL,HGFR,IFN γ	0.6118952
CLEC2C,FasL,HGFR,IFN γ	0.6088710

[0094] 表6(续)

[0095]

支持组合 AREG+CYFRA21-1 的四种生物标志物的组合 (CRC 对比 CTL)	AUC
AREG,CYFRA21-1, Flt3L, ErbB4	0.9306641
AREG,CYFRA21-1, Flt3L CLEC2C	0.9150391
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,CLEC2C	0.9023438
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.9022177
AREG,CYFRA21-1,CLEC2C,IFN γ	0.9003906

[0096]

AREG,CYFRA21-1,Flt3L,HGFR	0.9003906
AREG,CYFRA21-1,CLEC2C,FasL	0.9002016
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,IFN γ	0.8994141
AREG,CYFRA21-1,Flt3L,IFN γ	0.8984375
AREG,CYFRA21-1, Flt3L, FasL,	0.8981855
AREG,CYFRA21-1,FasL,IFN γ	0.8951613
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8945312
AREG,CYFRA21-1,HGFR,CLEC2C,	0.8935547
AREG,CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.8901210
CYFRA21-1,ErbB4,Flt3L,HGFR	0.8867188
CYFRA21-1,ErbB4,Flt3L,IFN γ	0.8867188
AREG,CYFRA21-1,HGFR,IFN γ	0.8847656
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4,Flt3L	0.8847656
CYFRA21-1,ErbB4,FasL,Flt3L	0.8830645
CYFRA21-1,FasL,Flt3L,IFN γ	0.8689516
CYFRA21-1,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.8671875
CYFRA21-1,FasL,Flt3L,HGFR	0.8669355
CLEC2C,CYFRA21-1,Flt3L,IFN γ	0.8662109
CLEC2C,CYFRA21-1,FasL,Flt3L	0.8649194
CLEC2C,CYFRA21-1,Flt3L,HGFR	0.8632812
AREG,CLEC2C,Flt3L,HGFR	0.8564453
AREG,CLEC2C,ErbB4,Flt3L	0.8457031
AREG,CLEC2C,FasL,Flt3L	0.8447581
AREG,CLEC2C,Flt3L,IFN γ	0.8447266
CYFRA21-1,ErbB4,HGFR,IFN γ	0.8417969
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4,HGFR	0.8398438
AREG,CLEC2C,ErbB4,HGFR	0.8378906
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4,IFN γ	0.8359375
AREG,CLEC2C,ErbB4,FasL	0.8346774
AREG,CLEC2C,FasL,HGFR	0.8326613
CLEC2C,CYFRA21-1,ErbB4,FasL	0.8326613
CYFRA21-1,ErbB4,FasL,IFN γ	0.8326613
CYFRA21-1,ErbB4,FasL,HGFR	0.8316532
AREG,CLEC2C,HGFR,IFN γ	0.8271484
AREG,CLEC2C,ErbB4,IFN γ	0.8251953
AREG,CLEC2C,FasL,IFN γ	0.8245968
AREG,ErbB4,Flt3L,HGFR	0.8203125
CLEC2C,CYFRA21-1,FasL,IFN γ	0.8074597

[0097]

AREG,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.8066406
CYFRA21-1,FasL,HGFR,IFN γ	0.8064516
CLEC2C,CYFRA21-1,HGFR,IFN γ	0.8056641
AREG,FasL,Flt3L,HGFR	0.7993952
CLEC2C,CYFRA21-1,FasL,HGFR	0.7983871
AREG,ErbB4,Flt3L,IFN γ	0.7861328
AREG,ErbB4,HGFR,IFN γ	0.7802734
AREG,ErbB4,FasL,Flt3L	0.7802419
AREG,FasL,Flt3L,IFN γ	0.7772177
AREG,ErbB4,FasL,HGFR	0.7721774
AREG,FasL,HGFR,IFN γ	0.7681452
AREG,ErbB4,FasL,IFN γ	0.7419355
ErbB4,FasL,Flt3L,HGFR	0.7358871
CLEC2C,ErbB4,FasL,Flt3L	0.7167339
CLEC2C,FasL,Flt3L,HGFR	0.7086694
CLEC2C,FasL,Flt3L,IFN γ	0.7056452
CLEC2C,ErbB4,Flt3L,HGFR	0.7050781
ErbB4,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.7050781
CLEC2C,ErbB4,Flt3L,IFN γ	0.7011719
ErbB4,FasL,Flt3L,IFN γ	0.6985887
CLEC2C,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.6933594
FasL,Flt3L,HGFR,IFN γ	0.6895161
CLEC2C,ErbB4,FasL,IFN γ	0.6290323
CLEC2C,ErbB4,FasL,HGFR	0.6239919
CLEC2C,ErbB4,HGFR,IFN γ	0.6220703
ErbB4,FasL,HGFR,IFN γ	0.6118952
CLEC2C,FasL,HGFR,IFN γ	0.6088710

[0098] 表7、表8和表9分别示出了两种、三种和四种生物标志物的组合实现的AUC,其中区分了AA与CTL。

[0099] 表7

[0100]

生物标志物组合 (AA对比CTL)	AUC
AREG,CD147	0.7548828
AREG,HGFR	0.7460938
AREG,CYFRA21-1	0.7221680
CYFRA21-1,HGFR	0.6250000
CD147,HGFR	0.6191406
CD147,CYFRA21-1	0.6152344

[0101] 表8

[0102]

生物标志物组合 (AA对比CTL)	AUC
AREG,CD147,CYFRA21-1	0.7617188

AREG, CYFRA21-1, HGFR	0.7607422
AREG, CD147, HGFR	0.7539062
CD147, CYFRA21-1, HGFR	0.6337891

[0103] 表9

生物标志物组合 (AA对比CTL)	AUC
AREG, CYFRA21-1, HGFR, CD147	0.7685547

[0105] 根据各自的AUC,选择了最佳模型。表10和表10(续)示出了CRC的最佳结果。表11和表11(续)示出了AA的最佳结果。包括了蛋白质的最佳组合的指标,包括ROC曲线下面积(AUC)以及在最佳尤登指数的ROC曲线的最佳截止点处计算的灵敏度(Sens.)、特异性(Spec.)和阳性预测值(PPV)与阴性预测值(NPV)。

[0106] 表10

支持 Flt3L+CYFRA21-1 的生物标志物组合	CRC 对比 CTL				
	AUC (95%CI)	Sens	Spec	PPV	NPV
Flt3L, CYFRA21-1	0.865(0.779,0.952)	0.625	0.969	0.952	0.721
Flt3L, CYFRA21-1, AREG	0.899(0.821,0.978)	0.781	0.938	0.926	0.811
Flt3L, CYFRA21-1, AREG, ErbB4	0.931(0.861,1)	0.875	0.938	0.933	0.882
Flt3L, CYFRA21-1, AREG, CLEC2C	0.915(0.848,0.982)	0.844	0.844	0.844	0.844

[0108] 表10(续)

支持 AREG+CYFRA21-1 的生物标志物组合	CRC 对比 CTL				
	AUC (95%CI)	Sens	Spec	PPV	NPV
AREG, CYFRA21-1	0.878(0.789,0.966)	0.875	0.844	0.848	0.871
AREG, CLEC2C	0.835(0.729,0.941)	0.906	0.812	0.829	0.897
AREG, HGFR	0.763(0.643,0.883)	0.656	0.812	0.778	0.703
AREG, CD147	0.842(0.734,0.95)	0.844	0.844	0.844	0.844
AREG, CYFRA21-1, Flt3L	0.899(0.821,0.978)	0.781	0.938	0.926	0.811
AREG, CYFRA21-1, CLEC2C	0.896(0.814,0.977)	0.875	0.844	0.848	0.871
AREG, CYFRA21-1, ErbB4	0.896(0.812,0.979)	0.875	0.844	0.848	0.871

[0109]

[0110]

	)	5	4	8	1
AREG,CYFRA21-1,FasL	0.893(0.81,0.976)	0.90 3	0.81 2	0.82 4	0.89 7
AREG,CYFRA21-1,CD147	0.886(0.797,0.975)	0.87 5	0.84 4	0.84 8	0.87 1
AREG,CYFRA21-1,HGFR	0.876(0.787,0.965)	0.87 5	0.84 4	0.84 8	0.87 1
AREG,CD147,HGFR	0.843(0.735,0.951)	0.84 4	0.84 4	0.84 4	0.84 4
AREG,CYFRA21-1,ErbB4,Flt3L	0.931(0.861,1)	0.87 5	0.93 8	0.93 3	0.88 2
AREG,CYFRA21-1,Flt3L, CLEC2C	0.915(0.848,0.982)	0.84 4	0.84 4	0.84 4	0.84 4
AREG,CYFRA21-1,CD147,HGFR	0.888(0.801,0.975)	0.87 5	0.84 4	0.84 8	0.87 1

[0111] 表11

支持 Flt3L+CYFRA21-1 的生物标志物组合	AUC (95%CI)	AA.vs.CTL			
		Sens	Spec	PPV	NPV
Flt3L,CYFRA21-1	0.606(0.466,0.747)	0.90 6	0.31 2	0.56 9	0.76 9
Flt3L,CYFRA21-1,AREG	0.72(0.591,0.848)	0.81 2	0.62 5	0.68 4	0.76 9
Flt3L,CYFRA21-1,AREG,ErbB4	0.707(0.578,0.836)	0.65 6	0.75	0.72 4	0.68 6
Flt3L,CYFRA21-1,AREG,CLEC2C	0.727(0.6,0.853)	0.81 2	0.62 5	0.68 4	0.76 9

[0113] 表11 (续)

支持 AREG+CYFRA21-1 的生物标志物组合	AUC (95%CI)	AA 与 CTL			
		Sens	Spec	PPV	NPV
AREG,CYFRA21-1	0.722(0.594,0.85)	0.844	0.625	0.692	0.8
AREG,CLEC2C	0.738(0.613,0.864)	0.781	0.688	0.714	0.759
AREG,HGFR	0.746(0.621,0.871)	0.531	0.938	0.895	0.667
AREG,CD147	0.755(0.633,0.877)	0.656	0.844	0.808	0.711
AREG,CYFRA21-1,Flt3L	0.72(0.591,0.848)	0.812	0.625	0.684	0.769
AREG,CYFRA21-1,CLEC2C	0.728(0.601,0.854)	0.812	0.625	0.684	0.769
AREG,CYFRA21-1,ErbB4	0.71(0.582,0.838)	0.656	0.75	0.724	0.686
AREG,CYFRA21-1,FasL	0.711(0.581,0.84)	0.774	0.625	0.667	0.741
AREG,CYFRA21-1,CD147	0.762(0.642,0.882)	0.844	0.656	0.711	0.808
AREG,CYFRA21-1,HGFR	0.761(0.634,0.887)	0.75	0.75	0.75	0.75
AREG,CD147,HGFR	0.754(0.632,0.876)	0.562	0.906	0.857	0.674
AREG,CYFRA21-1, Flt3L, ErbB4,	0.707(0.578,0.836)	0.656	0.75	0.724	0.686
AREG,CYFRA21-1, Flt3L, CLEC2C	0.727(0.6,0.853)	0.812	0.625	0.684	0.769
AREG,CYFRA21-1,CD147,HGFR	0.769(0.65,0.888)	0.781	0.719	0.735	0.767

[0115]

[0116] 最后,表12和表12(续)被设计来示出本发明要求保护的最重要特征的重叠。其清楚地表明,所有最好的特征都包含[Flt3L和CYFRA21-1]和[AREG和CYFRA21-1]。

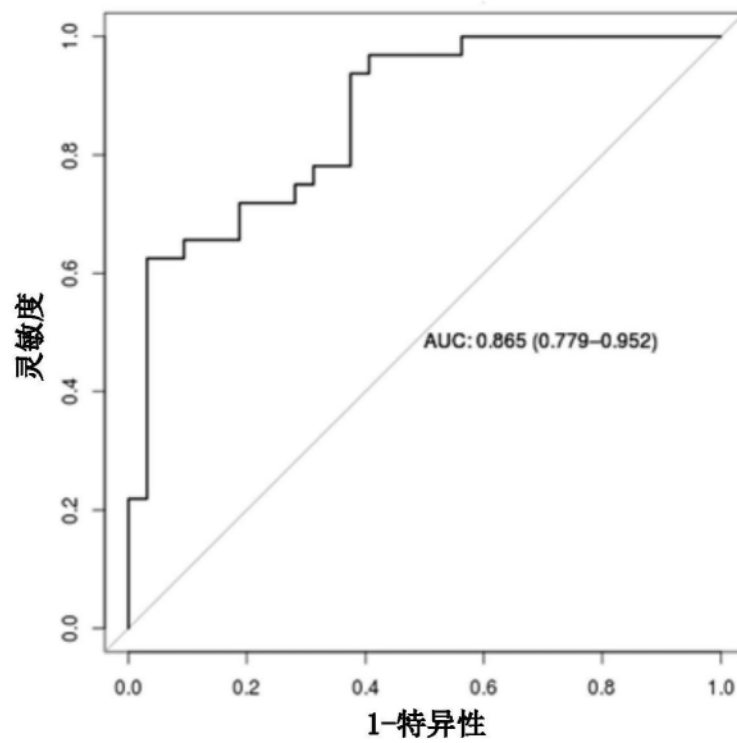
[0117] 表12

	AREG	CLEC2C	CYFRA21-1	Flt3L	ErbB4	CRC 与 CTL	AA 与 CTL
[0118]	X		<u>X</u>	<u>X</u>	X	<u>0.931</u>	0.707
	X	X	<u>X</u>	<u>X</u>		0.915	<u>0.727</u>
	X		<u>X</u>	<u>X</u>		0.899	0.720
			<u>X</u>	<u>X</u>		0.865	0.606

[0119] 表12(续)

	CD147	FasL	CLEC2C	AREG	CYFRA21-1	Flt3L	ErbB4	HGFR	CRC	AA
				<u>X</u>	<u>X</u>	X	X		<u>0.931</u>	0.707
			X	<u>X</u>	<u>X</u>	X			0.915	0.727
				<u>X</u>	<u>X</u>	X			0.899	0.720
			X	<u>X</u>	<u>X</u>				0.896	0.728
				<u>X</u>	<u>X</u>		X		0.896	0.710
		X		<u>X</u>	<u>X</u>				0.893	0.711
[0120]	X			<u>X</u>	<u>X</u>			X	0.888	<u>0.769</u>
	X			<u>X</u>	<u>X</u>				0.886	0.762
				<u>X</u>	<u>X</u>				0.878	0.722
				<u>X</u>	<u>X</u>			X	0.876	0.761
	X			X				X	0.843	0.754
	X			X					0.842	0.755
			X	X					0.835	0.738
				X				X	0.763	0.746

A



B

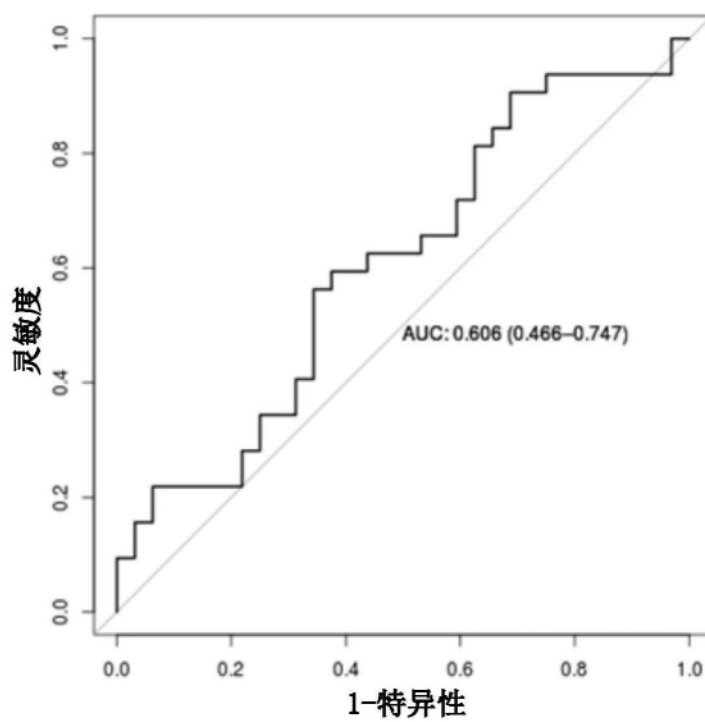


图1

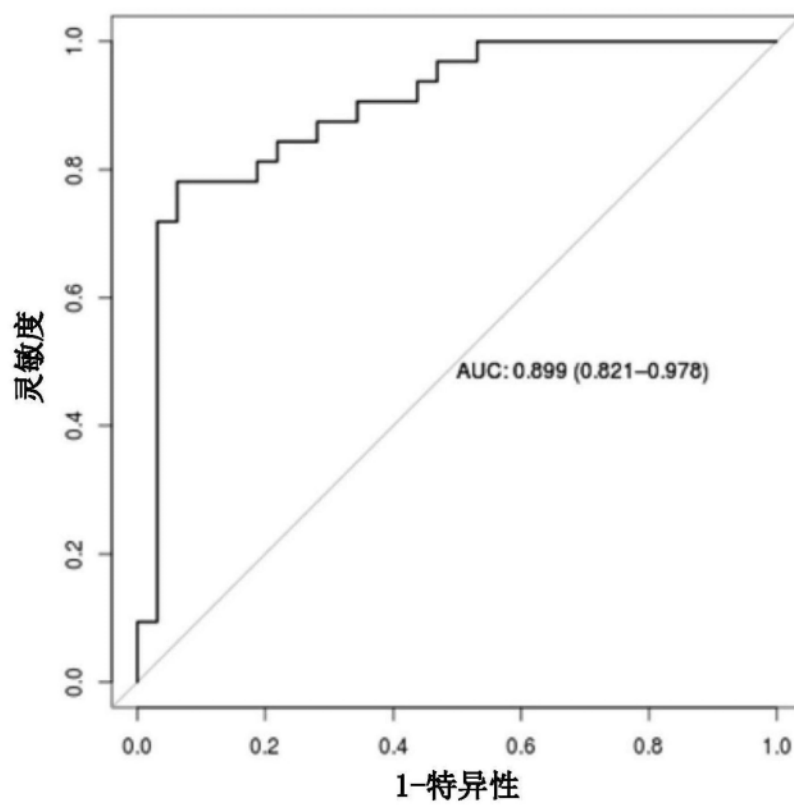
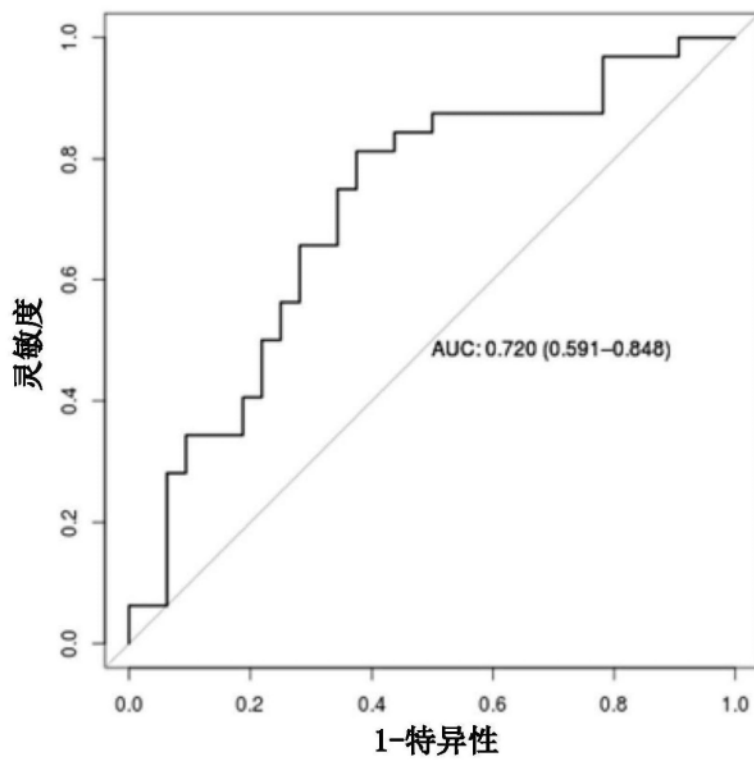
A**B**

图2

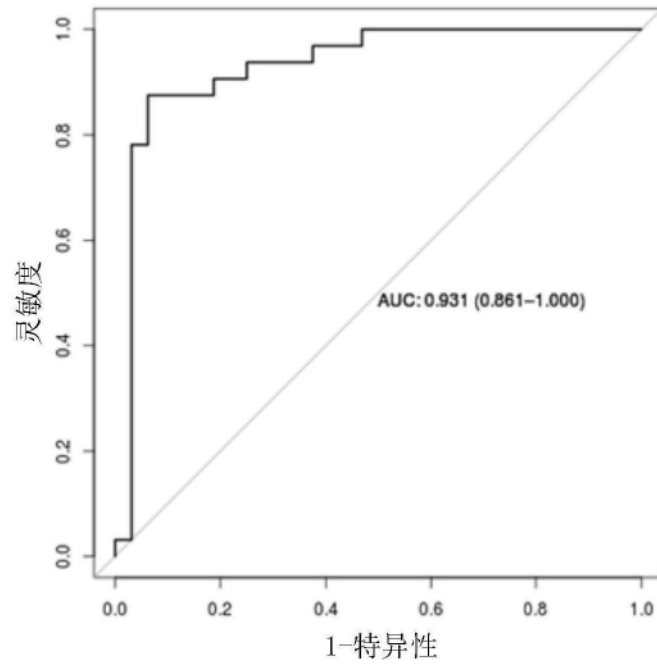
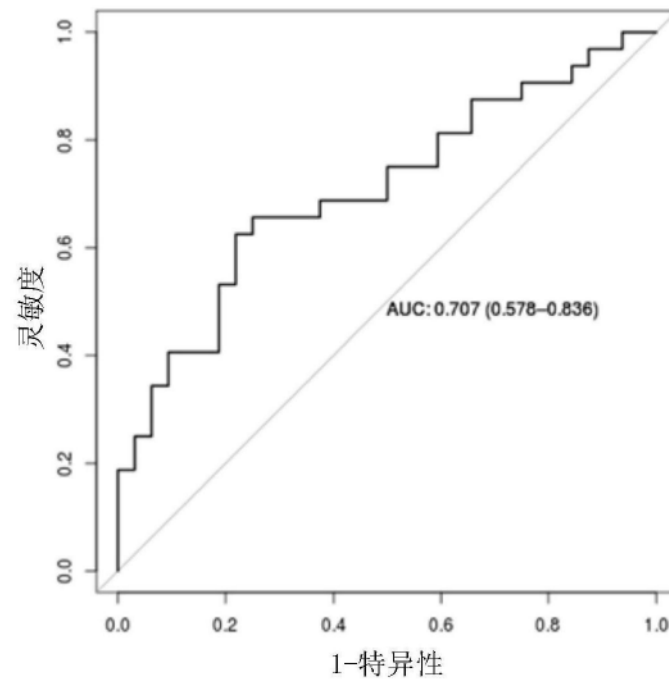
A**B**

图3

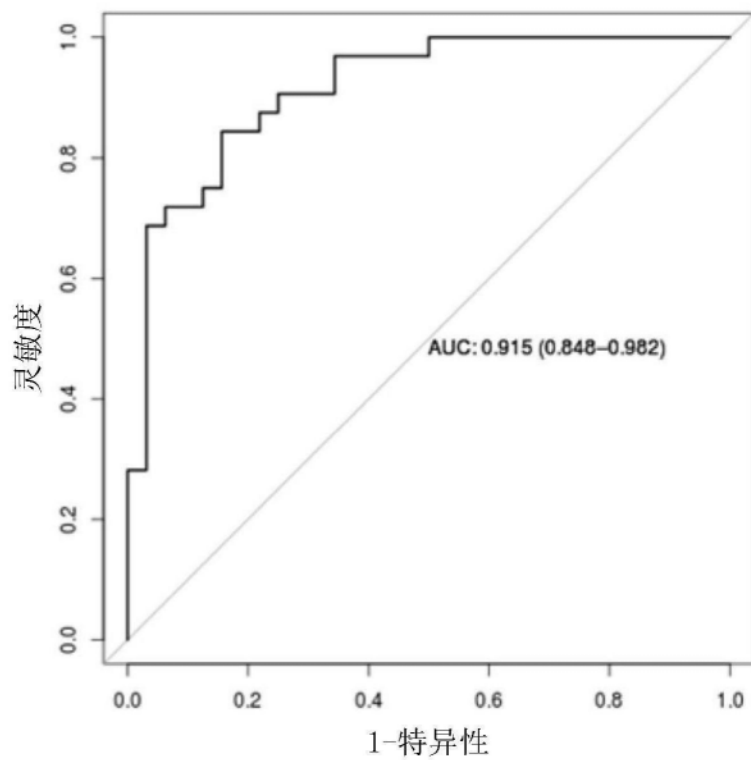
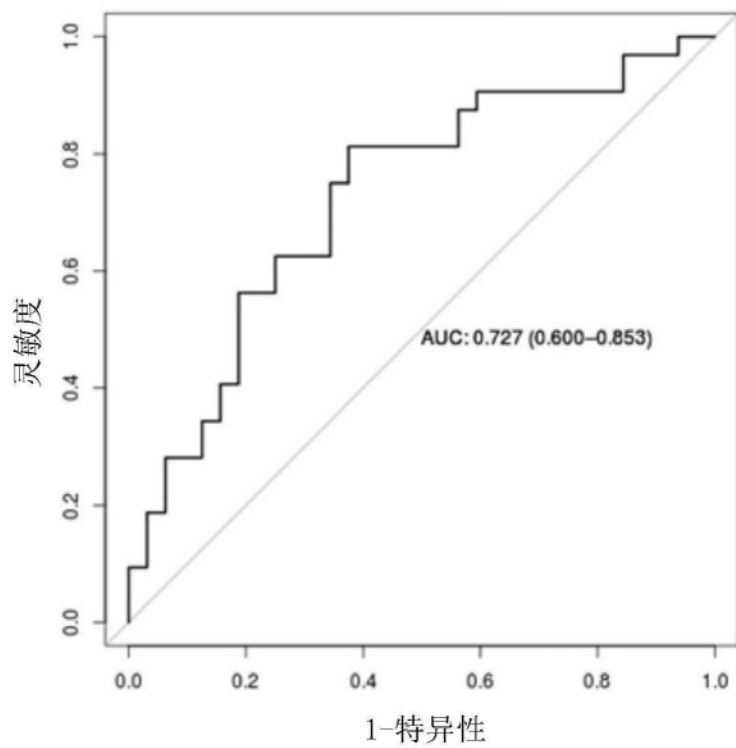
A**B**

图4

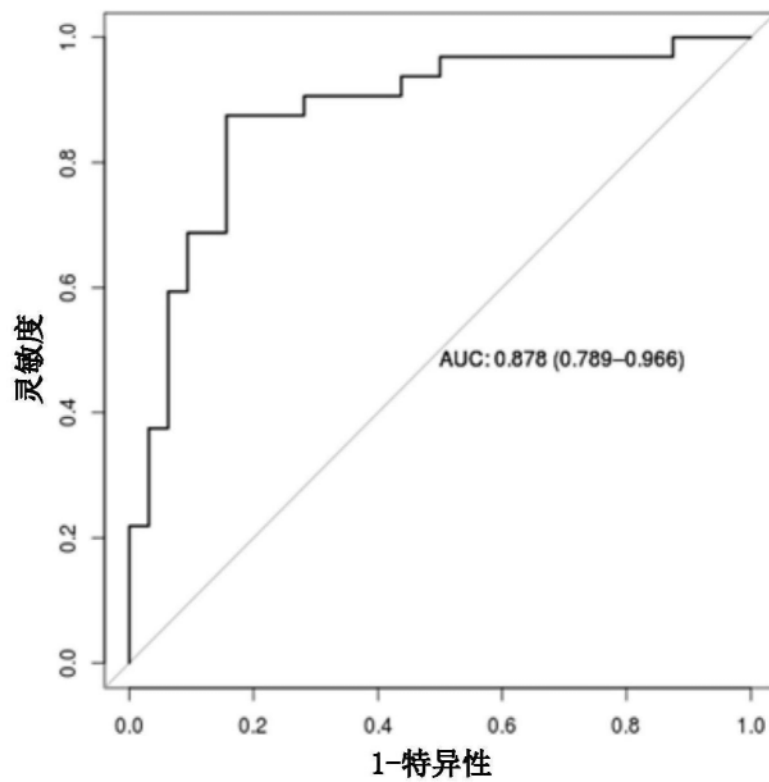
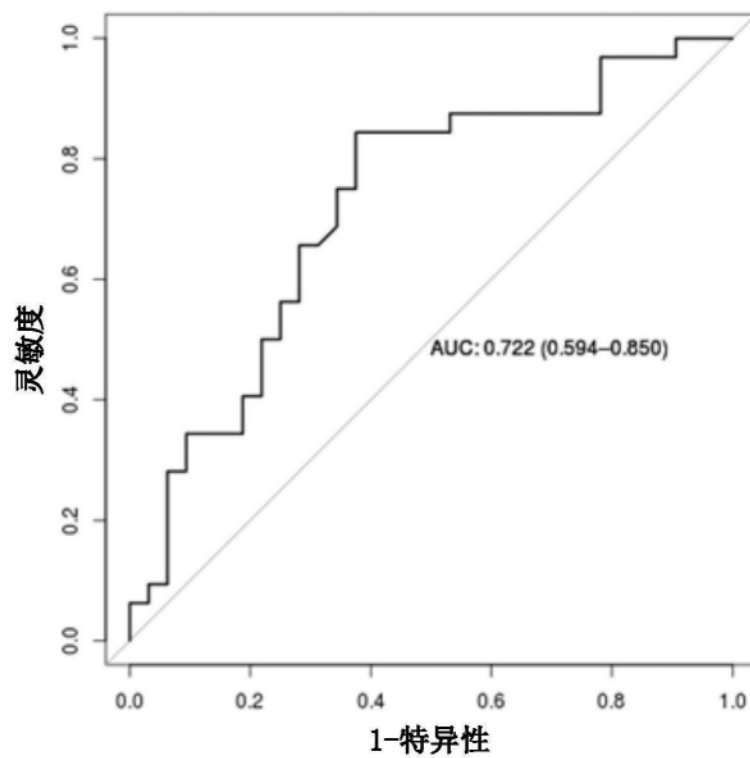
A**B**

图5

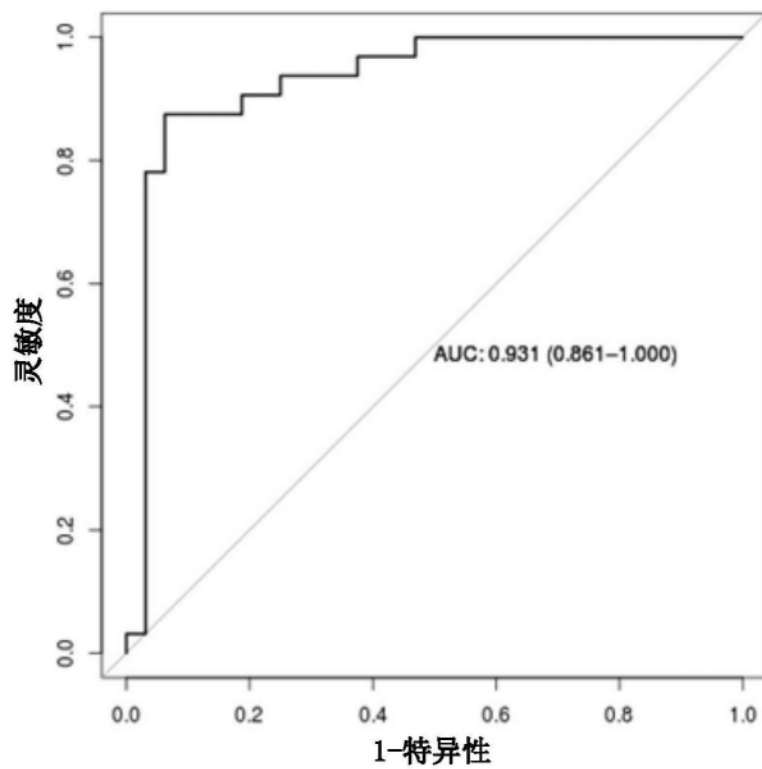
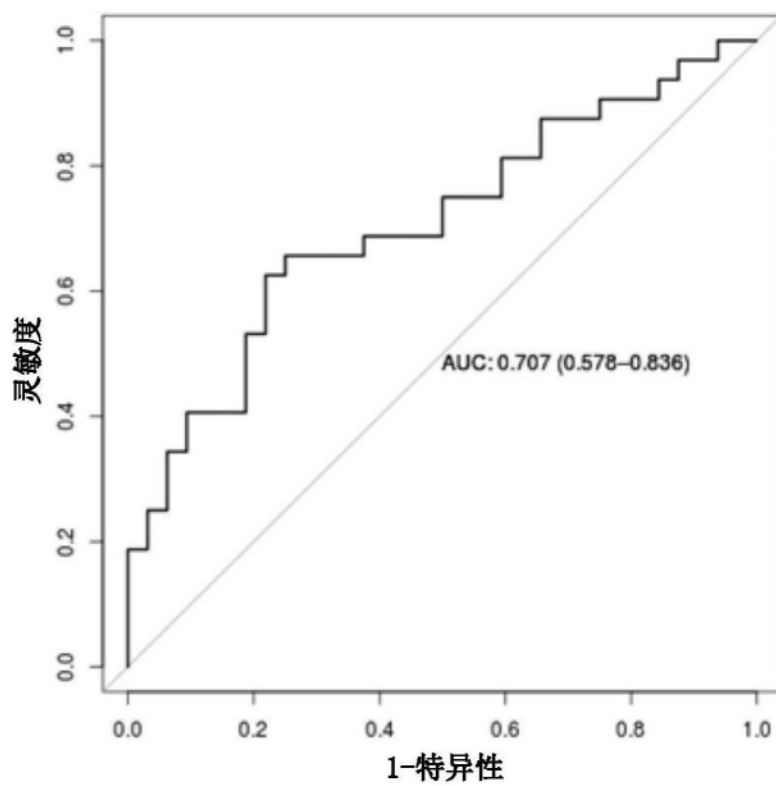
A**B**

图6

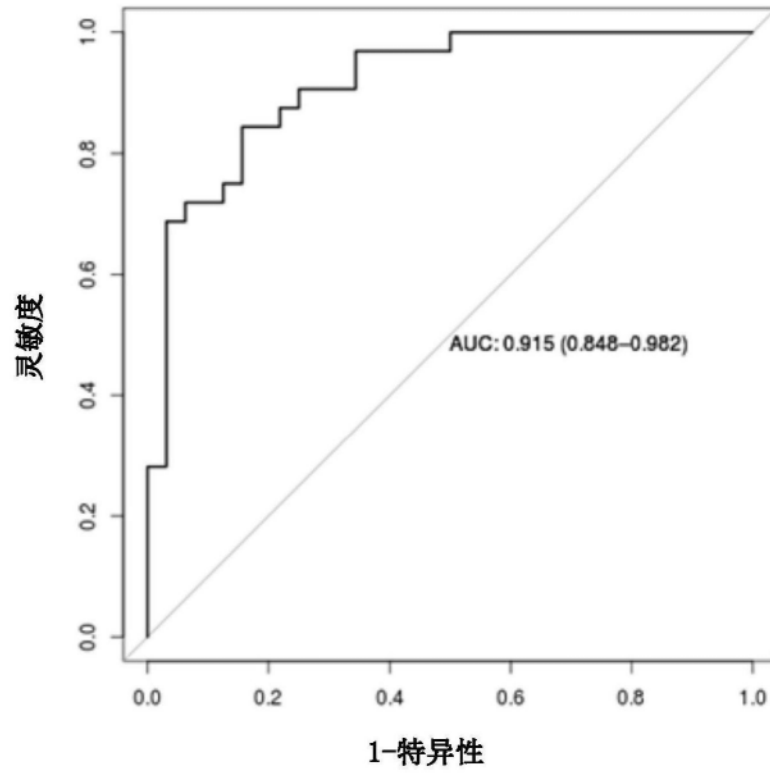
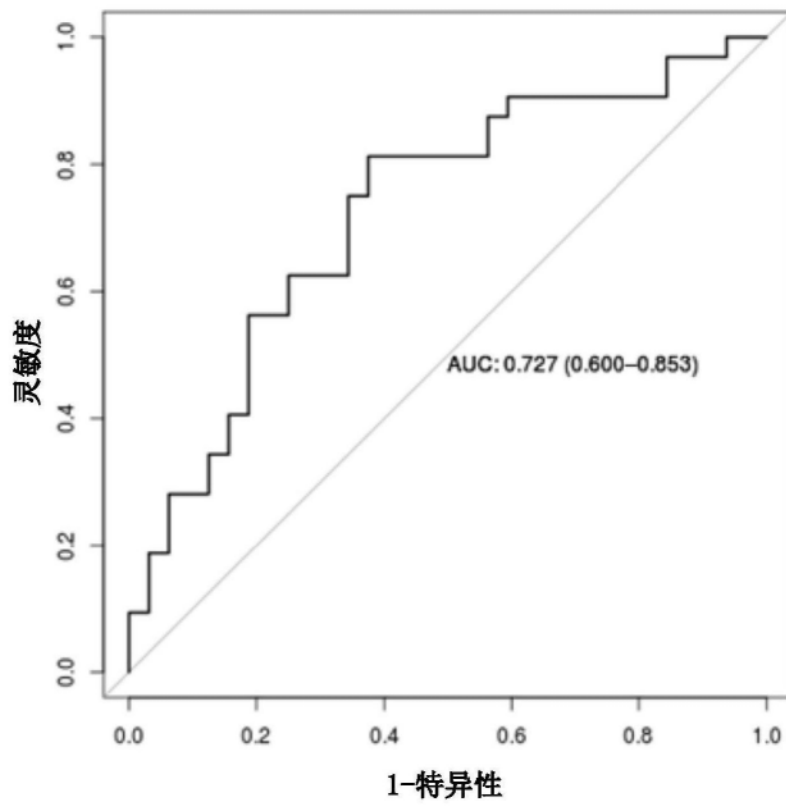
A**B**

图7

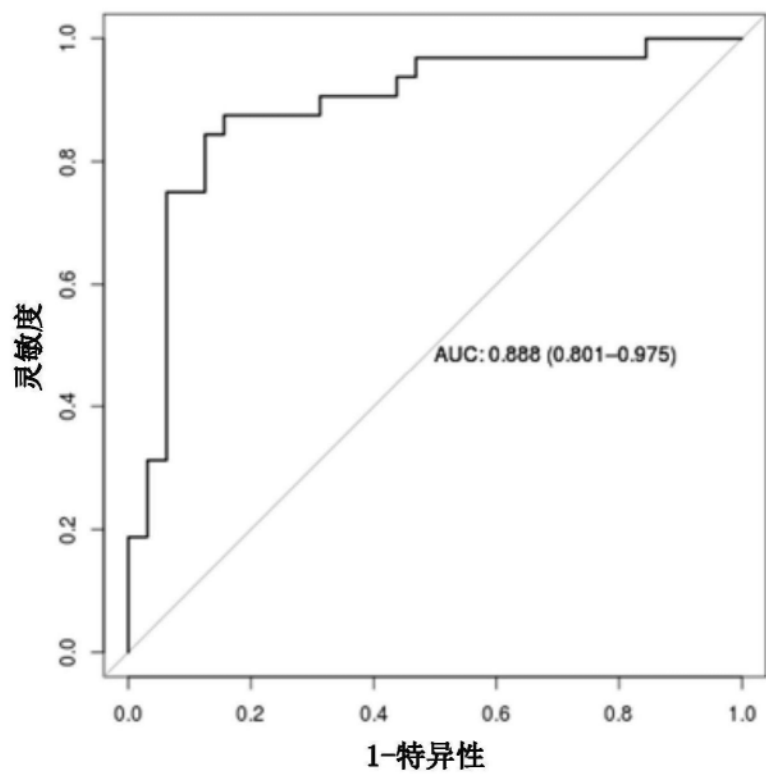
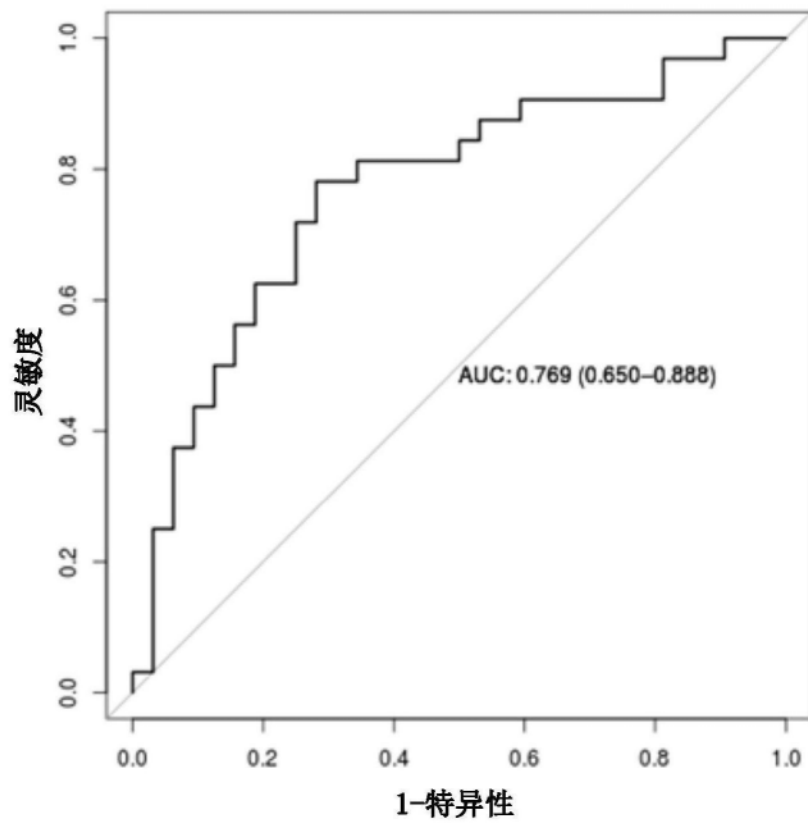
A**B**

图8