(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2014 年 12 月 31 日 (31.12.2014)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2014/206353 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/435 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/081034

(22) 国际申请日: 2014 年 6 月 27 日 (27.06.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201310264285.5 2013 年 6 月 27 日 (27.06.2013) CN
201310587369.2 2013 年 11 月 15 日 (15.11.2013) CN

(71) 申请人: **清华大学 (TSINGHUA UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园 1 号, Beijing 100084 (CN)。 **烟台普罗吉生物科技发展有限公司 (YANTAI PROTGEN BIOTECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国山东省烟台市烟台市经济技术开发区珠江路 32 号, Shandong 264006 (CN)。 **北京普罗吉生物科技发展有限公司 (BEIJING PROTGEN LTD.)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区开拓路 5 号 B412, Beijing 100085 (CN)。

(72) 发明人: **罗永章 (LUO, Yongzhang)**; 中国北京市海淀区清华园 1 号, Beijing 100084 (CN)。 **崔大伟 (CUI, Dawei)**; 中国山东省烟台市烟台市经济技术开发区珠江路 32 号, Shandong 264006 (CN)。 **付彦 (FU, Yan)**; 中国北京市海淀区清华园 1 号, Beijing 100084 (CN)。 **吴非 (WU, Fei)**; 中国北京市海淀区开拓路 5 号 B412, Beijing 100085 (CN)。 **宋晓敏 (SONG, Xiaomin)**; 中国北京市海淀区清华园 1 号, Beijing 100084 (CN)。 **李米川 (LI, Michuan)**; 中国北京市海淀区开拓路 5 号 B412, Beijing 100085 (CN)。 **常国栋 (CHANG, Guodong)**; 中国北京市海淀区开拓路 5 号 B412, Beijing 100085 (CN)。 **路春桃 (LU, Chuntao)**; 中国北京市海淀区开拓路 5 号 B412, Beijing 100085 (CN)。

(74) 代理人: **北京华睿卓成知识产权代理事务所（普通合伙） (CHENG & PENG INTELLECTUAL PROPERTY LAW OFFICE)**; 中国北京市东城区东直门外大街 42 号宇飞大厦 705, Beijing 100027 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

WO 2014/206353 A1

(54) Title: TUMOR BIOMARKER

(54) 发明名称 : 肿瘤标志物

(57) Abstract: A method of determining whether a subject has cancer or has a risk of getting cancer comprises: detecting the concentration of Hsp90a in a blood sample of the subject; and if the concentration reaches or exceeds a preset threshold value, determining that the subject has cancer or has a risk of getting cancer, where the threshold value is selected from a range from 50 ng/ml to 20 ng/ml; for example, the threshold value may be 50, 53, 56, 62, 63, 64, 67, 72, 82, 85 or 117 ng/ml, and a numerical value within the ±15% range of the threshold value is regarded having equivalent significance for determination.

(57) 摘要: 一种确定受试者是否患有癌症或者具有罹患癌症风险的方法，包括检测该受试者的血液样本中 Hsp90a 的浓度，如果该浓度达到或超过预先设定的阈值，则判定该受试者患有癌症或者具有罹患癌症的风险，其中所述阈值选自 50ng/ml 到 120ng/ml 的范围内，例如所述阈值可以为 50、53、56、62、63、64、67、72、82、85 或 117ng/ml，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义。

肿瘤标志物

技术领域

本发明涉及肺癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌等 16 种肿瘤的诊断、病情监测和疗效评价等。更具体地说，本发明涉及通过热休克蛋白 90α 定量检测辅助诊断肺癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌等肿瘤和进行病情监测和疗效评价的方法。

背景技术

热休克蛋白 90α（Hsp90α）是一个含量丰富的细胞内伴侣蛋白。近年来研究显示，Hsp90α 可以被癌细胞特异性的分泌到细胞外，且与癌症的发生和发展密切相关。本研究组已发现，分泌到胞外的 Hsp90α 可以在外周血中很方便的被定量检测，其含量与肿瘤的负荷和恶性程度呈现一定的相关性，但并没有任何数据能够指导该项指标在肿瘤临床中的应用。因此，如何将分泌型 Hsp90α 应用于肿瘤临床实践是亟待解决的问题。

发明内容

本发明一方面提供了一种确定受试者是否患有癌症或者具有罹患癌症风险的方法，包括检测该受试者的血液样本中 Hsp90α 的浓度，如果该浓度达到或超过预先设定的阈值，则判定该受试者患有癌症或者具有罹患癌症的风险，其中所述阈值选自 50 ng/ml 到 120 ng/ml 的范围内，例如所述阈值可以为 50、53、56、62、63、64、67、72、82、85 或 117 ng/ml，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义。

本领域技术人员可以理解，由于检测方法的局限性，要做到浓度测定结果完全准确是相当困难的。根据本领域的惯常做法，上下偏差 15%以内可以被认为是合理误差。例如当所述阈值选定为 50 ng/ml 时，如果受试者的测量值为 43 ng/ml，也可以判定该受试者患有癌症，或者具有较高的罹患癌症的风险。

在本发明中，所述血液样本可以为血浆或血清样本。在本发明的优选实施方案中，血浆样本是优选的，其测量精度更高。

所述 Hsp90α 的阈值可以为 50、53、56、62、63、64、67、72、82、85 或 117 ng/ml。例如，在本发明一个具体实施方案中，针对肺癌的特别优选的阈

值是 67.47 ng/ml（可以四舍五入取 67 ng/ml），此时对应的特异度为 85%，灵敏度为 64%。在上述阈值±15%的范围内的数值均可视为等同的判定范围。

在本发明一个具体实施方案中，针对肺癌的一个优选的阈值是 82 ng/ml，即 Hsp90α 的浓度为 0-82 ng/ml 时被认为是正常值范围；在本发明一个优选实施方案中，针对肺癌的一个特别优选的阈值是 53 ng/ml，即 Hsp90α 的浓度为 0-53 ng/ml 时被认为是正常值范围。同样的，在上述阈值±15%的范围内的数值均可视为具有等同判定意义。所述血液样本优选为血浆样本。

本发明另一方面提供了一种用于对正在接受治疗的癌症患者进行病情监测和/或疗效评价或者用于对候选治疗药物进行疗效评价的方法，包括在治疗前及治疗后分别检测受试者的血液样本中 Hsp90α 的浓度，如果治疗后 Hsp90α 的浓度相对于治疗前 Hsp90α 浓度增加的百分比达到或超过预先设定的阈值，则判定该受试者病情进展和/或疗效较差，或者判定所述候选治疗药物疗效较差，其中所述阈值选自 10%到 50%的范围内，例如所述阈值可以为 34%，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义；优选地，所述血液样本为血浆样本。

此处所用的术语“治疗”应当做广义的理解。例如，在对肺癌患者进行治疗时，可能涉及多个治疗周期，例如总共 8 个治疗周期。如果将整个治疗过程作为一个整体来看，可以在第 1 个治疗周期开始前和第 8 个治疗周期结束后，分别对 Hsp90α 的浓度进行检测，并据此判断整个治疗过程的效果。或者，也可以将每个治疗周期视为一次“治疗”（例如出于获得更精确评估结果的目的）。例如，可以在每个治疗周期开始前和结束后，均对 Hsp90α 的浓度进行检测，并据此判断单个治疗周期的效果。或者，还可以进行更精确的评估。例如，在单个治疗周期包括总共 20 天治疗的情况下，可以将每一天视为一次“治疗”，在当天的治疗开始前和当天的治疗结束后，分别对 Hsp90α 的浓度进行检测，从而判断当天的治疗效果。本领域技术人员可以根据不同的评估要求，具体设定“治疗”的时间跨度。

本发明还提供了确定受试者是否患有癌症或者具有罹患癌症风险的方法，包括联合检测该受试者的血液样本中 Hsp90α 的浓度以及至少一种其他肿瘤标志物的浓度，如果 Hsp90α 的浓度和所述至少一种其他肿瘤标志物的浓度达到或超过预先设定的阈值，则判定该受试者患有癌症或者具有罹患癌症的风险，其中 Hsp90α 的阈值选自 50 ng/ml 到 120 ng/ml 的范围内，例如所述阈值可以为 50、

53、56、62、63、64、67、72、82、85 或 117 ng/ml，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义。所述血液样本优选为血浆样本，所述至少一种其他肿瘤标志物优选选自由癌胚抗原（CEA）、细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1（CYFRA21-1）、AFP、CA19-9、CA125、CA15-3、PSA 和 CA72-4 构成的组。

根据本发明的优选实施方案，本发明方法中 Hsp90α 的浓度优选地采用 EDTA-K2 作为抗凝剂进行检测。

本发明的方法适用的癌症种类包括：肺癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、食管癌、黑色素瘤、肾癌、子宫癌、鼻咽癌、骨肉瘤、膀胱癌和前列腺癌。

本发明还提供了用于确定受试者是否患有癌症或者具有罹患癌症风险的试剂盒，包括：任选的人分泌型 Hsp90α、人分泌型 Hsp90α 单克隆抗体、检测试剂以及说明书，其中所述说明书中标明了健康人血液样本中 Hsp90α 浓度的阈值，如果受试者的血液样本中 Hsp90α 的浓度达到或超过所述阈值，则判定该受试者患有癌症或者具有罹患癌症的风险，其中所述阈值选自 50 ng/ml 到 120 ng/ml 的范围，例如所述阈值可以为 50、53、56、62、63、64、67、72、82、85 或 117 ng/ml，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义；优选地，所述血液样本为血浆样本。

此处所用的术语“任选的”表示可以有，也可以没有。例如，“任选的人分泌型 Hsp90α”，是指本发明的试剂盒可以包括人分泌型 Hsp90α，也可以不包括人分泌型 Hsp90α。例如，可以将人分泌型 Hsp90α 单独包装，并与试剂盒的主体部分联合使用。优选地，出于方便使用的目的，本发明的试剂盒中包括人分泌型 Hsp90α，用作检测时的标准品。特别优选的是重组人分泌型 Hsp90α。

根据本发明的优选实施方式，所述试剂盒中可以包括用于采集血液样本的容器，并且该容器中包含 EDTA-K2。在本发明的优选实施方案中，所述用于采集血液样本的容器为包含 EDTA-K2 的采血管。

根据在本发明的具体实施方案，Hsp90α 的浓度采用 EDTA-K2 作为抗凝剂进行检测是优选的。

本发明的试剂盒适用的癌症种类包括：肺癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、食管癌、黑色素瘤、肾癌、子宫癌、鼻咽癌、骨肉瘤、膀胱癌和前列腺癌。

本发明的实施例中还将 Hsp90α 定量检测在癌症辅助诊断和疗效监测中的有效性研究方法应用于多种癌症，发现 Hsp90α 浓度在癌症诊断中的阈值范围对肺癌、肝癌、结直肠癌和乳腺癌等同样适用，并提供了肿瘤标志物 Hsp90α 定量检测用于肺癌、肝癌、结直肠癌和乳腺癌诊断的具体统计学参数。

本发明的实施例中根据不同人群的数据绘制相应的 ROC 曲线。根据本领域公知技术，每一条 ROC 曲线都提供了一系列阈值及与之相对应的灵敏度和特异度。因此，使用这些 ROC 曲线，本领域技术人员能很容易地查出选取任意阈值（即 cut-off 值）时该项检测对疾病的识别能力，即诊断相应癌种的灵敏度、特异度和符合率。例如：

当适应症为肝癌时，患者相对于健康人的 cut-off 值是 52.79 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 93.7%，85%和 94.5%，当 cut-off 值是 62.20 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 91.4%，90%和 92.2%；患者相对于非癌症肝部相关疾病的 cut-off 值是 63.66 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 90.7%，90%和 90.3%，当 cut-off 值是 85.24 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 80.7%，95%和 88.6%。

当适应症是结直肠癌时，患者相对于健康人及非癌症结直肠相关疾病组的 cut-off 值是 52.79 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 89.9%，85%和 87%，当 cut-off 值是 62.20 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 83.4%，90%和 87%。

当适应症为乳腺癌时，患者相对于健康人的 cut-off 值是 52.66 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 65.6%，85%和 73.85%，当 cut-off 值是 61.92 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 54.6%，90%和 69.68%；患者相对于非癌症乳腺相关疾病组的 cut-off 值是 63.41 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 52.4%，84.9%和 68.29%，当 cut-off 值是 72.21 ng/ml 时，灵敏度、特异度和符合率分别是 41.9%，90.1%和 65.41%。

本领域技术人员可以理解，由于受试人群和瘤种的不同，cut-off 值的选取及其对应的灵敏度、特异度和符合率等参数会有所差别，但均包含在本发明限定的阈值范围内。本领域技术人员可以根据实际使用需求，如对特定瘤种、灵敏度、特异度等的要求，从本发明公开的 ROC 曲线或阈值范围内选取适当的优选阈值。

本发明还验证了肺癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌患者手术后血浆 Hsp90α 含量比手术前显著降低，因此该项检测指标可以作为手术治疗效果评价的手段。同时，临床获益的（CR+PR+SD）接受内科治疗的患者，在治疗后的检测值显著低于治疗前，说明该项指标可以用于上述癌症的内科治疗疗效评价。

本发明的实施例中检测了胃癌、胰腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、食管癌、黑色素瘤、肾癌、子宫癌、鼻咽癌、骨肉瘤、膀胱癌、前列腺癌等多种癌症患者血浆 Hsp90α 含量，发现与健康人相比均显著升高（具有统计显著性），并分别提供了上述不同癌种患者血浆 Hsp90α 含量的平均参考值。这说明肿瘤标志物 Hsp90α 可用于胃癌、胰腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、食管癌、黑色素瘤、肾癌、子宫癌、鼻

咽癌、骨肉瘤、膀胱癌、前列腺癌等多癌症的诊断。

附图说明

图 1 是 Hsp90α 检测结果的 ROC 曲线（基于所有检测 Hsp90α 的受试者）。

图 2 是 Hsp90α 检测结果的 ROC 曲线 AUC 95%CI (0.788, 0.829)。

图 3 是 Hsp90α 检测结果的 ROC 曲线 AUC 95%CI (0.811, 0.854)。

图 4 是 Hsp90α 检测结果的 ROC 曲线 AUC 95%CI (0.804, 0.850)。

图 5 是 Hsp90α 检测结果的 ROC 曲线 AUC 95%CI (0.731, 0.777)。

图 6 是根据斜率判定肿瘤增大的 ROC 曲线。

图 7 是根据变化百分比判定 PD 的 ROC 曲线。

图 8 是根据变化值判定 PD 的 ROC 曲线。

图 9 显示了 EDTA-K2 采血管样本和 EDTA-K3 采血管样本的对比。

图 10 是肝癌患者相对于健康人的 ROC 曲线。

图 11 是肝癌患者相对于非癌肝部相关疾病人群的 ROC 曲线。

图 12 是结直肠癌患者相对于健康人及非癌结直肠相关疾病的 ROC 曲线。

图 13 是乳腺癌患者相对于健康人的 ROC 曲线。

图 14 是乳腺癌患者相对于非癌乳腺相关疾病人群的 ROC 曲线。

图 15 是多种癌症患者血浆 Hsp90α 含量检测结果汇总。

图中，“ROC Curve for Model”表示针对模型的 ROC 曲线，“Area under the Curve”表示曲线下面积，“Specificity”表示特异度，“Sensitivity”表示灵敏度。

具体实施方式

本文所用的术语“血液样本”是指由受试者的血液获得的样本。考虑到细胞内 Hsp90α 对检测的干扰，血液样本优选为血浆或血清样本，也可以是由血浆或血清稀释后的样本。本领域技术人员可以理解，由于在成分上的区别，当采用受试者的血浆样本和血清样本分别进行检测时，Hsp90α 的浓度可能会略有不同。出于便于定量和比较的目的，在本发明中血浆样本是优选的。

本文所用的术语“特异度”、“灵敏度”、“符合率”均与相对应的医学统计学术语具有相同的含义。

“特异度”(specificity)是指诊断为“非癌症”的病例中经试剂盒检测为阴性的比例。

“灵敏度”(sensitivity)是指病理学诊断为“癌症”的病例中，经试剂盒检测为阳性的比例。

“符合率”(accuracy)是指真阳性样本量与真阴性样本量之和占总样本量的比例，反映试剂盒检测结果与受试者是否罹患癌症的真实情况相符合的程度。

本文所用的术语“cut-off值”、“界值”“参考值”和“阈值”可以互换使用，指的是用来判断检测结果的标准，即临界值，检测结果高于cut-off值即视为阳性，低于cut-off值即视为阴性。

本文所用的术语“临床获益”，指经过某种治疗达到病情稳定或缓解的情况，其中CR、PR和SD具有与实体瘤疗效评价标准（RECIST标准）中相应术语完全相同的含义，即CR（Complete response）肿瘤完全缓解、PR（Partial response）肿瘤部分缓解和SD（Stable disease）疾病稳定。CR、PR和SD这三项指标作为临床获益人群的界定，与此相反的是PD（Progressive disease）即疾病进展。

本文所用术语“非癌相关疾病”指经病理学诊断确诊为不是癌症但患有良性相关疾病的患者，如在肺癌试验中指确诊为不是肺癌但患有肺炎、肺结核等肺部良性相关疾病的患者，在肝癌试验中指确诊为不是肝癌但患有肝炎、肝硬化等肝部良性相关疾病的患者，在结直肠癌试验中指确诊为不是结直肠癌但患有炎症、结直肠息肉等结直肠良性相关疾病的患者，在乳腺癌试验中指确诊为不是肺、乳腺癌癌但患有乳腺炎、乳腺增生等乳腺良性相关疾病的患者。

本文中所用的部分缩写及统计术语含义如下表所示：

CEA	癌胚抗原
DOR	诊断准确性比值比(diagnostic accuracy odds ratio)
CYFRA21-1	细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1
AFP	甲胎蛋白
CA125	肿瘤相关抗原 CA125
CA19-9	糖类抗原 CA19-9
CA15-3	癌抗原 CA15-3
PSA	前列腺特异性抗原
CA72-4	糖链抗原 CA72-4
SD	标准差（Standard Deviation）
Hsp90α	热休克蛋白 Hsp90α
Mean	均数
Md	中位数
Min	最小值
Max	最大值
CI	置信区间 (Confidence Interval)
Q1	四分之一分位数
Q3	四分之三分位数
ROC	接受者工作特征曲线（Receiver Operator Characteristic）
95%CI	95%置信区间

实施例 1

研究目的

通过以下三个方面的试验内容，评价 Hsp90α 定量检测试剂盒的临床使用范围和临床性能。

1、对健康人群、肺癌患者、肺部非癌病变患者和其他恶性肿瘤患者的血浆中的 Hsp90α 含量进行测定，检验 Hsp90α 试剂盒检测的临床准确性、特异性和灵敏度，并利用 ROC 曲线确定合适的阳性参考值（cut-off 值）；

2、对治疗期间的肺癌患者血浆中 Hsp90α 的含量进行动态监测，检验其浓度变化与患者病情变化的相关性，即疗效监测的临床有效性；

3、分别对比 Hsp90α 与癌胚抗原（CEA）、细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1（CYFRA21-1）检测结果，作为临床试验的次要目的。

1.1 样本的来源

选择对象范围为住院和门诊患者。选择对象的数量为不少于 1100 例血浆样本和不少于 150 例的动态监测血浆样本，选择高值样本和低值样本所占比例符合统计学要求。

1.1.1 非动态监测样本的选择

研究对象包括：病例组和对照组，男女不限。

（1）病例组：病理学诊断方法新确诊为荷瘤的肺癌患者的样本，病例组血浆样本应包括肺癌的不同类型和不同分期。

（2）对照组：经临床生化、影像或病理学方法证实为非肺癌的人群。对照组应包括确定无明显疾病症状的健康人样本、确定无肺癌但有肺部其他病变的样本（如肺结核、肺炎）、肺部良性肿瘤样本和其他恶性肿瘤样本。

健康人群定义：无任何已知的良性或恶性疾病、外表正常、无任何可见疾病症状的人。

肺部病变患者：通过临床生化、影像以及病理等手段确诊患有肺部病变且该病变不是癌症的患者。

1.1.2 动态监测样本的选择

对至少 150 例规范的内科治疗方案和手术方案治疗的肺癌患者的随访监测研究，以检验血浆中 Hsp90α 浓度的变化与患者病情变化的相关性。血浆样本的

收集时间点为：

（1）对 12 例肺癌手术患者采用多时间点监测，以检测 Hsp90α 在血浆中的代谢情况。分别在治疗前，治疗后第 1、3、7、14、21 天收集患者血浆样本。

（2）对不少于 38 例手术治疗的肺癌患者进行动态监测：手术治疗前 3 天内收集血浆样本 1 次，手术后 3-7 天内收集血浆样本 1 次、临床疗效评价（影像学检查日期）前后 3 天内取样 1 次，共计至少 3 次。

（3）对不少于 100 例内科治疗的肺癌患者进行动态监测：治疗开始前收集血浆样本 1 次，治疗开始后，在每个治疗周期结束后收集样本 1 次，收集至 4 个治疗周期结束。如果在结束某个治疗周期后对患者例行临床疗效评价（影像学检查），则此时收集样本的时间为临床疗效评价（影像学检查日期）前后 3 天内。

符合动态监测收集方案的既往血样也可以用于本试验研究。

1.1.3 样本剔除标准

（1）肺内肿瘤病灶正在进行放疗的患者的样本；

（2）动态监测中，妊娠、哺乳期或有生育能力但在试验期间未采取避孕措施者的样本；

（3）动态监测中，治疗前血浆 Hsp90α 含量初始值低于 cut-off 的样本；

（4）患有其他癌症的患者。

1.2 检测试剂盒仪器

研究产品：

热休克蛋白 90α 定量检测试剂盒（酶联免疫法），

规格：96 人份/盒。来源：烟台普罗吉生物科技发展公司，

批号：20111018、20120109、20120505，有效期：6 个月，保存条件：2-8℃。

对比产品：

因国内外尚无同类型产品注册上市，故只采用肺癌的病理学诊断和临床诊断作为评价和验证考核方法。

本次试验中，设立癌胚抗原（CEA）、细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1（CYFRA21-1）为本产品的参比试剂，侧面考察试剂盒的临床性能。

实施例 2

2. 主要结果概要

2.1 非动态监测组

本研究非动态监测组共入组 2036 例(肺癌患者组:1046 例、其他恶性肿瘤组:37 例、肺部非癌性病变组:344 例、肺部良性肿瘤组:17 例、健康人群组:592 例)，其中符合方案的病例有 2036 例，无剔除受试者。详细情况参见表 8.1.1.1-表 8.1.1.2。各中心病例分布见详表 8.1.1.3。

Hsp90α 诊断性能评价

为评价 Hsp90α 诊断肺癌与非癌症性能，剔除患有恶性肿瘤的受试者，共计 1999 例纳入分析，其中肺癌组 1046 例，非癌症组 953 例。两组受试者的人口学信息及肺癌组基本诊断分类情况详见表 8.1.1.1.1.1-表 8.1.1.1.1.2。

两组 Hsp90α 的检测结果组间差异有统计学意义（P<0.0001），详见表 8.1.1.1.2.1。

Hsp90α 诊断肺癌的 ROC 曲线下面积为 0.8149，通过最大 youden 指数确定最佳 cut-off 值为>56.33ng/ml，对应灵敏度为 72.18%，95%可信区间为（69.46%, 74.90%），特异度为 78.7%，95%可信区间为（76.10%, 81.30%）。另外还分别描述特异度为 80%、85%、90%及 95%时对应的灵敏度及其他诊断性能指标，详见图 1 和表 8.1.1.1.2.2-8.1.1.1.2.3。

此外，Hsp90α 分别诊断肺腺癌、肺鳞癌、小细胞肺癌的 ROC 曲线与肺癌总体的 ROC 曲线相似；单独对比肺癌与相关疾病，两组 Hsp90α 的检测结果组间差异有统计学意义（P<0.0001）。

Hsp90α 与 CEA 诊断性能及联合诊断评价

为评价两者诊断性能，采用 Hsp90α 与 CEA 检测结果均不为缺失的受试者为评价人群，共计 1056 例纳入分析，其中肺癌组 713 例，非癌症组 343 例。以 Hsp90α cut-off 值为>56.33，CEA cut-off 值为>5，任意一个为阳性即判断为阳性进行联合诊断评价，进一步提高了诊断灵敏度。

Hsp90α 与 CYFRA21-1 诊断性能及联合诊断评价

为评价两者诊断性能，采用 Hsp90α 与 CYFRA21-1 检测结果均不为缺失的受试者为评价人群，共计 910 例纳入分析，其中肺癌组 660 例，非癌症组 250 例。以 Hsp90α cut-off 值为>56.33，CYFRA21-1 cut-off 值为>5，任意一个为阳性即判断为阳性进行联合诊断评价，进一步提高了诊断灵敏度。

2.2 行外科手术组

共 106 例受试者入选本次评价，其中不低于 cut-off 值的有效受试者 79 例，手术前后 Hsp90α 检测结果差异有统计学意义（P=0.0062<0.01），详见表 8.2.2。

2.3 内科动态组

本次评价共入选肺癌受试者 202 例，其中有效受试者 169 例。人口学及基本资料详见表 8.3.1.2。

分段评价

分段评价共获得 284 个有效统计单元，其中肿瘤缩小组 69 例，肿瘤不变组 161 例，肿瘤增大组 54 例，三组治疗第二周期 Hsp90α 检测值相对基线变化值中位数分别为-48.64ng/ml、-8.51 ng/ml、74.66 ng/ml，三组间变化值经秩和检验差异有统计学意义（P<0.0001），组内治疗前后均有统计学意义，变化百分比中位数分别为-41.09%、-9.46%、65.26%。

Hsp90α 检测值诊断肿瘤大小增大 ROC 曲线下面积为 0.7719，根据 youden 指数确定最佳 cut-off 点为相对基线变化>34.17%，对应灵敏度为 70.37%，95%可信区间为（58.19%, 82.55%），特异度为 80%，95%可信区间为（74.83%, 85.17%），详见表 8.3.2.3.2。

按病例评价

按病例评价共获得 275 个有效病例，其中 PR 组 95 例，SD 组 118 例，PD 组 62 例，三组获得评价时 Hsp90α 检测值相对基线变化值中位数分别为-90.98ng/ml、-32.91ng/ml、80.32 ng/ml，三组间变化值经秩和检验差异有统计学意义（P<0.0001），组内治疗前后均有统计学意义，变化百分比中位数分别为-48.16%、-22.23%、71.40%。

Hsp90α 检测值诊断 PD ROC 曲线下面积为 0.8406，根据 youden 指数确定最佳 cut-off 点为相对基线变化>34.17%，对应灵敏度为 72.58%，95%可信区间为（61.48%, 83.68%），特异度为 85.45%，95%可信区间为（80.71%, 90.18%），详见表 8.3.3.2.2。

实施例 3

3. 统计分析结果

3.1 非动态检测组

表 8.1.1.1 入组受试者及分析数据集

项目	结果
所有受试者	2036(100.00%)
剔除例数	0(0.00%)
有效例数	2036(100.00%)
肺癌患者	1046(51.38%)
其他恶性肿瘤	37(1.82%)
肺部非癌性病变	344(16.90%)
肺部良性肿瘤	17(0.83%)
健康人群	592(29.08%)

表 8.1.1.2 非动态受试者病例分布

中心	入选受试者	有效受试者
1	141	141
2	857	857
3	137	137
4	15	15
5	118	118
7	60	60
8	480	480
9	228	228
合计	2036	2036

3.1.1 肺癌组与非癌症组

3.1.1.1 Hsp90α 诊断性能评价

3.1.1.1.1 受试者特征

表 8.1.1.1.1.1 所有受试者人口学信息

指标	肺癌组	非癌症组	合计
年龄(岁)			
N (Missing)	1043(3)	869(84)	1912(87)
Mean (SD)	59.76(10.79)	47.74(17.93)	54.30(15.67)
Min, Max	24,100	10,98	10,100
Md (Q3-Q1)	60.00(13.00)	46.00(24.00)	55.00(22.00)
性别			
男	711(68.23%)	468(49.95%)	1179(59.58%)
女	331(31.77%)	469(50.05%)	800(40.42%)
合计	1042	937	1979
Missing	4	16	20

表 8.1.1.1.1.2 肺癌受试者诊断情况

指标	结果
肺癌种类	
腺癌	537(52.54%)
鳞癌	218(21.33%)
小细胞癌	136(13.31%)
大细胞癌	4(0.39%)
未分型	25(2.45%)
其他	30(2.94%)
NK	72(7.05%)
合计	1022
Missing	24
小细胞癌分期	
弥漫期	10(11.49%)
局限期	18(20.69%)
NK	59(67.82%)
合计	87
Missing	959
肺癌分化程度	
低分化	122(17.43%)
中低分化	16(2.29%)
中分化	60(8.57%)
高分化	9(1.29%)
NK	493(70.43%)
合计	700
Missing	346

3.1.1.1.2 Hsp90α 诊断性能评价（肺癌组与非癌症组）

表 8.1.1.1.2.1 两组受试者 Hsp90α 检测结果

项目	肺癌组	非癌症组	检验统计量	P 值
Hsp90α（ng/ml）			15.08(t 值)	<.0001
N (Missing)	1046(0)	953(0)		
Mean (SD)	220.46(351.55)	48.00(34.82)		
Min, Max	7.07,7400	0.95,371.37		
Md (Q3-Q1)	95.54(199.97)	38.07(24.41)		

图 1 是 Hsp90α 检测结果的 ROC 曲线（基于所有检测 Hsp90α 的受试者）。

表 8.1.1.1.2.2 根据 Hsp90α 检测结果的 cut-off 值判定的四格表

Hsp90α 判定	疾病诊断		
	阳性	阴性	小计
>56.33			
阳性	755(72.18%)	203(21.30%)	958(47.92%)
阴性	291(27.82%)	750(78.70%)	1041(52.08%)
小计	1046	953	1999
>58.17			
阳性	735(70.27%)	191(20.04%)	926(46.32%)
阴性	311(29.73%)	762(79.96%)	1073(53.68%)
小计	1046	953	1999
>67.47			
阳性	674(64.44%)	143(15.01%)	817(40.87%)
阴性	372(35.56%)	810(84.99%)	1182(59.13%)
小计	1046	953	1999
>80.99			
阳性	600(57.36%)	95(9.97%)	695(34.77%)
阴性	446(42.64%)	858(90.03%)	1304(65.23%)
小计	1046	953	1999
>117.36			
阳性	444(42.45%)	48(5.04%)	492(24.61%)
阴性	602(57.55%)	905(94.96%)	1507(75.39%)
小计	1046	953	1999

表 8.1.1.1.2.3 根据 Hsp90α检测结果的 cut-off 值判定的诊断结果

					灵敏度		特异度							
指标	TP	TN	FP	FN	%	%95 CI	%	%95 CI	符合率 (%)	PPV(%)	NPV(%)	LR+	LR-	DOR
Hsp90α 检测值														
>56.33	755	750	203	291	72.18	69.46, 74.90	78.7	76.10, 81.30	75.29	78.81	72.05	3.39	0.35	9.69
>58.17	735	762	191	311	70.27	67.50, 73.04	79.96	77.42, 82.50	74.89	79.37	71.02	3.51	0.37	9.49
>67.47	674	810	143	372	64.44	61.53, 67.34	84.99	82.73, 87.26	74.24	82.5	68.53	4.29	0.42	10.21
>80.99	600	858	95	446	57.36	54.36, 60.36	90.03	88.13, 91.93	72.94	86.33	65.8	5.75	0.47	12.23
>117.36	444	905	48	602	42.45	39.45, 45.44	94.96	93.57, 96.35	67.48	90.24	60.05	8.42	0.61	13.8

注：TP，真阳性；TN，真阴性；FP，假阳性；FN，假阴性；PPV，阳性预测值；NPV，阴性预测值；LR+，阳性似然比；LR-，阴性似然比；DOR，diagnostic accuracy odds ratio；

表 8.1.1.1.2.4 I、II 期肺癌组与 III、IV 期肺癌组之间 Hsp90α值的差异

项目	I、II 肺癌组	III、IV 肺癌组	检验统计量	P 值
Hsp90α（ng/ml）			-4.19(秩和)	<.0001
N (Missing)	93(0)	720(0)		
Mean (SD)	111.50(130.82)	251.38(300.69)		
Min, Max	7.07,1043.7	11.18,2398		
Md (Q3-Q1)	82.24(55.65)	117.33(311.16)		

3.1.1.1.3 Hsp90α诊断性能评价（腺癌组与非癌症组）

图 2 是 Hsp90α检测结果的 ROC 曲线 AUC 95%CI (0.788, 0.829)。

3.1.1.1.4 Hsp90α诊断性能评价（鳞癌组与非癌症组）

图 3 是 Hsp90α检测结果的 ROC 曲线 AUC 95%CI (0.811, 0.854)。

3.1.1.1.5 Hsp90α 诊断性能评价（小细胞癌组与非癌症组）

图 4 是 Hsp90α检测结果的 ROC 曲线 AUC 95%CI (0.804, 0.850)。

3.1.1.1.6 Hsp90α 诊断性能评价（肺癌组与肺部相关疾病组）

表 8.1.1.1.6.1 两组受试者 Hsp90α 检测结果

项目	肺癌组	相关疾病组	检验统计量	P 值
Hsp90α（ng/ml）			-14.20(秩和)	<.0001
N (Missing)	1046(0)	344(0)		
Mean (SD)	220.46(351.55)	58.58(39.43)		
Min, Max	7.07,7400	11.61,315.57		
Md (Q3-Q1)	95.54(199.97)	48.48(31.85)		

图 5 是 Hsp90α 检测结果的 ROC 曲线 AUC 95%CI (0.731, 0.777)。

表 8.1.1.1.6.28 根据 90α检测结果的 cut-off 值判定的诊断结果

					灵敏度		特异度		符合率					
指标	TP	TN	FP	FN	%	%95 CI	%	%95 CI	(%)	PPV(%)	NPV(%)	LR+	LR-	DOR
Hsp90α 检测值														
>74.18	639	275	69	407	61.09	58.14, 64.04	79.94	75.71, 84.17	65.76	90.25	40.32	3.05	0.49	6.22
>83.39	586	292	52	460	56.02	53.01, 59.03	84.88	81.10, 88.67	63.17	91.85	38.83	3.71	0.52	7.13

3.1.1.2 Hsp90α 与 CEA 诊断性能

3.1.1.2.1 受试者特征

表 8.1.1.2.1.1 所有受试者人口学信息

指标	肺癌组	非癌症组	合计
年龄(岁)			
N (Missing)	710(3)	293(50)	1003(53)
Mean (SD)	60.21(10.62)	47.63(20.41)	56.53(15.29)
Min, Max	29,100	12,98	12,100
Md (Q3-Q1)	60.00(14.00)	46.00(34.00)	58.00(19.00)
性别			
男	493(69.44%)	191(56.51%)	684(65.27%)
女	217(30.56%)	147(43.49%)	364(34.73%)
合计	710	338	1048
Missing	3	5	8

表 8.1.1.2.1.2 肺癌受试者诊断情况

指标	结果
肺癌种类	
腺癌	348(50.36%)
鳞癌	131(18.96%)
小细胞癌	116(16.79%)
大细胞癌	1(0.14%)
未分型	20(2.89%)
其他	16(2.32%)
NK	59(8.54%)
合计	691
Missing	22
小细胞癌分期	
弥漫期	8(11.59%)
局限期	16(23.19%)
NK	45(65.22%)
合计	69
Missing	644
肺癌分化程度	
低分化	90(22.22%)
中低分化	3(0.74%)
中分化	9(2.22%)
高分化	1(0.25%)
NK	302(74.57%)
合计	405
Missing	308

3.1.1.2.2 Hsp90α 与 CEA 诊断性能评价（肺癌组与非癌症组）

表 8.1.1.2.2.1 两组受试者 Hsp90α 与 CEA 的检测结果

项目	肺癌组	非癌症组	检验统计量	P 值
Hsp90α（ng/ml）			8.71(t 值)	<.0001
N (Missing)	713(0)	343(0)		
Mean (SD)	229.21(383.65)	48.49(32.80)		
Min, Max	19.77,7400	0.95,315.57		
Md (Q3-Q1)	96.44(249.27)	40.20(24.52)		
CEA（ng/ml）			5.24(t 值)	<.0001
N (Missing)	713(0)	343(0)		
Mean (SD)	40.22(119.66)	4.77(53.92)		
Min, Max	0.05,1000	0.03,1000		
Md (Q3-Q1)	4.80(17.05)	1.48(1.67)		

3.1.1.2.2.1 Hsp90α 与 CEA 联合诊断性能评价（肺癌组与非癌症组）

表 8.1.1.2.2.3.1 Hsp90α 与 CEA 联合诊断（任意阳性即判定为阳性）的四格表

联合诊断	临床诊断		
	阳性	阴性	小计
Hsp90α+CEA*			
阳性	600(84.15%)	83(24.20%)	683(64.68%)
阴性	113(15.85%)	260(75.80%)	373(35.32%)
小计	713	343	1056
Hsp90α+CEA**			
阳性	603(84.57%)	86(25.07%)	689(65.25%)
阴性	110(15.43%)	257(74.93%)	367(34.75%)
小计	713	343	1056

注：*Hsp90α cut-off 值为 56.33，CEA cut-off 值为 5。

**Hsp90α cut-off 值为 56.33，CEA cut-off 值为 4.74。

表 8.1.1.2.2.3.2 Hsp90α 与 CEA 联合诊断判定的诊断结果

					灵敏度		特异度							
指标	TP	TN	FP	FN	%	%95 CI	%	%95 CI	符合率 (%)	PPV(%)	NPV(%)	LR+	LR-	DOR
联合诊断	600	260	83	113	84.15	81.47, 86.83	75.8	71.27, 80.33	81.44	87.85	69.71	3.48	0.21	16.57
	603	257	86	110	84.57	81.92, 87.22	74.93	70.34, 79.51	81.44	87.52	70.03	3.37	0.21	16.05

注：TP，真阳性；TN，真阴性；FP，假阳性；FN，假阴性；PPV，阳性预测值；NPV，阴性预测值；LR+，阳性似然比；LR-，阴性似然比；DOR，diagnostic accuracy odds ratio；

3.1.1.3 Hsp90α 与 CYFRA21-1 诊断性能

3.1.1.3.1 受试者特征

表 8.1.1.3.1.1 所有受试者人口学信息

指标	肺癌组	非癌症组	合计
年龄(岁)			
N (Missing)	659(1)	199(51)	858(52)
Mean (SD)	60.25(10.35)	43.65(18.83)	56.40(14.60)
Min, Max	30,89	12,98	12,98
Md (Q3-Q1)	60.00(14.00)	42.00(32.00)	58.00(19.00)
性别			
男	461(70.06%)	141(57.32%)	602(66.59%)
女	197(29.94%)	105(42.68%)	302(33.41%)
合计	658	246	904
Missing	2	4	6

表 8.1.1.3.1.2 肺癌受试者诊断情况

指标	结果
肺癌种类	
腺癌	317(49.53%)
鳞癌	125(19.53%)
小细胞癌	110(17.19%)
大细胞癌	1(0.16%)
未分型	20(3.13%)
其他	13(2.03%)
NK	54(8.44%)
合计	640
Missing	20
小细胞癌分期	
弥漫期	8(12.50%)
局限期	15(23.44%)
NK	41(64.06%)
合计	64
Missing	596
肺癌分化程度	
低分化	88(22.56%)
中低分化	2(0.51%)
中分化	8(2.05%)
高分化	1(0.26%)
NK	291(74.62%)
合计	390
Missing	270

3.1.1.3.2 Hsp90α 与 CYFRA21-1 诊断性能评价（肺癌组与非癌症组）

表 8.1.1.3.2.1.1 两组受试者 Hsp90α 与 CYFRA21-1 的检测结果

项目	肺癌组	非癌症组	检验统计量	P 值
Hsp90α（ng/ml）			7.59(t 值)	<.0001
N (Missing)	660(0)	250(0)		
Mean (SD)	238.59(396.14)	48.19(35.30)		
Min, Max	19.77,7400	0.95,315.57		
Md (Q3-Q1)	98.18(280.04)	38.40(23.91)		
CYFRA21-1（ng/ml）			4.75(t 值)	<.0001
N (Missing)	660(0)	250(0)		
Mean (SD)	9.82(25.26)	2.17(5.09)		
Min, Max	0.26,266.3	0.23,74.44		
Md (Q3-Q1)	3.36(5.39)	1.59(1.11)		

3.1.1.3.2.1 Hsp90α 与 CYFRA21-1 联合诊断性能评价（肺癌组与非癌症组）

表 8.1.1.3.2.3.1 Hsp90α 与 CYFRA21-1 联合诊断（任意阳性即判定为阳性）的四格表

	患病诊断		
联合诊断	阳性	阴性	小计
Hsp90α+CYFRA21-1*			
阳性	532(80.61%)	51(20.40%)	583(64.07%)
阴性	128(19.39%)	199(79.60%)	327(35.93%)
小计	660	250	910
Hsp90α+CYFRA21-1**			
阳性	574(86.97%)	62(24.80%)	636(69.89%)
阴性	86(13.03%)	188(75.20%)	274(30.11%)
小计	660	250	910

注：*Hsp90α cut-off 值为 56.33 ng/ml，CYFRA21-1cut-off 值为 5。

**Hsp90α cut-off 值为 56.33 ng/ml，CYFRA21-1cut-off 值为 3.1。

表 8.1.1.3.2.3.2 Hsp90α 与 CYFRA21-1 联合诊断判定的诊断结果

					灵敏度		特异度							
指标	TP	TN	FP	FN	%	%95 CI	%	%95 CI	符合率 (%)	PPV(%)	NPV(%)	LR+	LR-	DOR
联合诊断	532	199	51	128	80.61	77.59, 83.62	79.6	74.60, 84.60	80.33	91.25	60.86	3.95	0.24	16.46
	574	188	62	86	86.97	84.40, 89.54	75.2	69.85, 80.55	83.74	90.25	68.61	3.51	0.17	20.65

注：TP，真阳性；TN，真阴性；FP，假阳性；FN，假阴性；PPV，阳性预测值；NPV，阴性预测值；LR+，阳性似然比；LR-，阴性似然比；DOR，diagnostic accuracy odds ratio；

3.2 行外科手术组

表 8.2.1 手术受试者分布

中心	入选受试者	有效受试者
3	96	76
5	13	3
合计	109	79

表 8.2.2 行外科手术的受试者治疗前后 Hsp90α 的变化情况

项目	结果
术前	
N (Missing)	79(0)
Mean (SD)	134.33(97.40)
Min, Max	56.39,597.98
Md (Q3-Q1)	96.97(81.84)
术后	
N (Missing)	79(0)
Mean (SD)	99.81(49.72)
Min, Max	19.3,328.23
Md (Q3-Q1)	95.40(56.95)
术前-术后	
N (Missing)	79(0)
Mean (SD)	34.52(109.04)
Min, Max	-248.92,472.15
Md (Q3-Q1)	20.79(77.44)
配对 t 检验(P)	2.81(0.0062)

3.3 内科动态

3.3.1 受试者特征

表 8.3.1.1 受试者基本信息情况

指标	结果
年龄(岁)	
N (Missing)	166(3)
Mean (SD)	54.57(10.53)
Min, Max	26,78
Md (Q3-Q1)	56.00(14.00)
性别	
男	113(67.26%)
女	55(32.74%)
合计	168
Missing	1
肺癌种类	
腺癌	101(59.76%)
鳞癌	46(27.22%)
小细胞癌	11(6.51%)
大细胞癌	1(0.59%)
未分型	2(1.18%)
其他	7(4.14%)
NK	1(0.59%)
合计	169
小细胞癌分期	
弥漫期	2(40.00%)
局限期	3(60.00%)
NK	0(0.00%)
合计	5

3.3.2 分段评价

表 8.3.2.1 不同组间各次访视热休克蛋白检测值

项目	基线	第 1 周期	第 2 周期
肿瘤缩小组			
N (Missing)	69(0)	69(0)	69(0)
Mean (SD)	338.02(385.23)	177.59(208.86)	167.36(154.62)
Min, Max	23.3,1527	25.07,1093.9	13.61,761.9
Md (Q3-Q1)	152.65(315.18)	106.87(147.44)	94.00(166.27)
肿瘤不变组			
N (Missing)	161(0)	161(0)	161(0)
Mean (SD)	250.49(284.15)	229.90(249.42)	209.70(227.12)
Min, Max	6.53,2217.1	10.71,1882.5	11.71,1782.9
Md (Q3-Q1)	153.17(246.57)	154.34(227.54)	137.99(190.90)
肿瘤增大组			
N (Missing)	54(0)	54(0)	54(0)
Mean (SD)	227.23(352.02)	248.72(299.59)	378.83(557.28)
Min, Max	18.6,1877.1	23.68,1433.4	24.4,3625
Md (Q3-Q1)	114.22(156.79)	125.76(238.81)	198.91(273.14)
肿瘤缩小组+肿瘤不变组			
N (Missing)	230(0)	230(0)	230(0)
Mean (SD)	276.75(319.53)	214.21(238.74)	197.00(208.61)
Min, Max	6.53,2217.1	10.71,1882.5	11.71,1782.9
Md (Q3-Q1)	152.91(263.59)	134.79(210.91)	129.07(194.61)
肿瘤增大组+肿瘤不变组			
N (Missing)	215(0)	215(0)	215(0)
Mean (SD)	244.65(301.93)	234.63(262.31)	252.18(347.69)

表 8.3.2.2 不同组间各次访视热休克蛋白检测值比较

项目	肿瘤缩小组	肿瘤不变组	肿瘤增大组	检验统计量	P 值
基线				3.62(秩和)	0.1636
N (Missing)	69(0)	161(0)	54(0)		
Mean (SD)	338.02(385.23)	250.49(284.15)	227.23(352.02)		
Min, Max	23.3,1527	6.53,2217.1	18.6,1877.1		
Md (Q3-Q1)	152.65(315.18)	153.17(246.57)	114.22(156.79)		
第 2 周期				11.79(秩和)	0.0027
N (Missing)	69(0)	161(0)	54(0)		
Mean (SD)	167.36(154.62)	209.70(227.12)	378.83(557.28)		
Min, Max	13.61,761.9	11.71,1782.9	24.4,3625		
Md (Q3-Q1)	94.00(166.27)	137.99(190.90)	198.91(273.14)		
第 2 周期-基线				42.91(秩和)	<.0001
N (Missing)	69(0)	161(0)	54(0)		
Mean (SD)	-170.7(306.58)	-40.80(187.55)	151.61(524.36)		
Min, Max	-1204.68,399.77	-875.62,645.21	-854.79,3370.22		
Md (Q3-Q1)	-48.64(225.17)	-8.51(102.35)	74.66(159.12)		
符号秩和(P)	-811.5(<.0001)	-1352(0.0220)	427.50(<.0001)		
第 2 周期相对基线百分比					
N (Missing)	69(0)	161(0)	54(0)		
Mean (SD)	-24.61(53.07)	21.97(148.88)	174.62(422.28)		
Min, Max	-90.51,227.56	-92.25,1241.98	-81.86,2656.07		
Md (Q3-Q1)	-41.09(59.22)	-9.46(75.72)	65.26(157.56)		

图 6 是根据斜率判定肿瘤增大的 ROC 曲线。

表 8.3.2.3.1 根据相对基线变化百分比判定肿瘤增大四格表

	疗效评价		
疗效评价	肿瘤增大	肿瘤缩小+肿瘤不变	小计
>0			
肿瘤增大	40(74.07%)	86(37.39%)	126(44.37%)
肿瘤缩小+肿瘤不变	14(25.93%)	144(62.61%)	158(55.63%)
小计	54	230	284
>10			
肿瘤增大	39(72.22%)	72(31.30%)	111(39.08%)
肿瘤缩小+肿瘤不变	15(27.78%)	158(68.70%)	173(60.92%)
小计	54	230	284
>20			
肿瘤增大	38(70.37%)	61(26.52%)	99(34.86%)
肿瘤缩小+肿瘤不变	16(29.63%)	169(73.48%)	185(65.14%)
小计	54	230	284
>34.17			
肿瘤增大	38(70.37%)	46(20.00%)	84(29.58%)
肿瘤缩小+肿瘤不变	16(29.63%)	184(80.00%)	200(70.42%)
小计	54	230	284
>40			
肿瘤增大	33(61.11%)	43(18.70%)	76(26.76%)
肿瘤缩小+肿瘤不变	21(38.89%)	187(81.30%)	208(73.24%)
小计	54	230	284

表 8.3.2.3.2 基于不同相对基线变化百分比界值下肿瘤增大诊断结果

					灵敏度		特异度		符合率					
热休克蛋白相对基线变化百分比	TP	TN	FP	FN	%	%95 CI	%	%95 CI	(%)	PPV(%)	NPV(%)	LR+	LR-	DOR
肿瘤增大组—肿瘤缩小组+肿瘤不变组														
>0	40	144	86	14	74.07	62.39, 85.76	62.61	56.36, 68.86	64.79	31.75	91.14	1.98	0.41	4.83
>10	39	158	72	15	72.22	60.28, 84.17	68.7	62.70, 74.69	69.37	35.14	91.33	2.31	0.4	5.78
>20	38	169	61	16	70.37	58.19, 82.55	73.48	67.77, 79.18	72.89	38.38	91.35	2.65	0.4	6.63
>34.17	38	184	46	16	70.37	58.19, 82.55	80	74.83, 85.17	78.17	45.24	92	3.52	0.37	9.51
>40	33	187	43	21	61.11	48.11, 74.11	81.3	76.27, 86.34	77.46	43.42	89.9	3.27	0.48	6.81

注：TP，真阳性；TN，真阴性；FP，假阳性；FN，假阴性；PPV，阳性预测值；NPV，阴性预测值；LR+，阳性似然比；LR-，阴性似然比；DOR，diagnostic accuracy odds ratio；

3.3.3 受试者评价

表 8.3.3.1 不同疗效判定间各次访视热休克蛋白检测值比较

项目	PR	SD	PD	检验统计量	P 值
基线				16.96(秩和)	0.0002
N (Missing)	95(0)	118(0)	62(0)		
Mean (SD)	401.55(422.99)	313.87(292.21)	216.07(368.54)		
Min, Max	56.68,1527	57.93,1527	18.598,2217.1		
Md (Q3-Q1)	174.94(574.25)	194.03(281.54)	111.56(160.47)		
评价时				12.82(秩和)	0.0016
N (Missing)	95(0)	118(0)	62(0)		
Mean (SD)	178.90(171.81)	237.27(294.39)	367.67(525.70)		
Min, Max	13.61,944.15	11.71,2217.1	24.402,3625		
Md (Q3-Q1)	121.91(179.25)	154.43(199.76)	198.91(276.86)		
评价时-基线				65.40(秩和)	<.0001
N (Missing)	95(0)	118(0)	62(0)		
Mean (SD)	-222.6(317.98)	-76.60(325.24)	151.60(502.96)		
Min, Max	-1204.68,153.61	-1010.94,1821.5 2	-1288.99,3370.2 2		
Md (Q3-Q1)	-90.98(369.94)	-32.91(244.66)	80.32(169.60)		
符号秩和(P)	-1814(<.0001)	-1424(<.0001)	647.50(<.0001)		
评价时相对基线变化百分比					
N (Missing)	95(0)	118(0)	62(0)		
Mean (SD)	-33.84(49.60)	3.61(113.41)	177.58(388.03)		
Min, Max	-88.76,151.52	-92.25,676.18	-64.44,2656.4		
Md (Q3-Q1)	-48.16(51.23)	-22.23(79.38)	71.40(171.36)		

注：PR、SD 的基线是治疗前的检测值，PD 的基线是病灶大小最小时的检测值

图 7 是根据变化百分比判定 PD 的 ROC 曲线。

表 8.3.3.2.1 根据变化百分比判定 PD 四格表

疗效评价	疗效评价		
	PD	PR+SD	小计
>25			
PD	45(72.58%)	37(17.37%)	82(29.82%)
PR+SD	17(27.42%)	176(82.63%)	193(70.18%)
小计	62	213	275
>30			
PD	45(72.58%)	35(16.43%)	80(29.09%)
PR+SD	17(27.42%)	178(83.57%)	195(70.91%)
小计	62	213	275
>34.17			
PD	45(72.58%)	31(14.55%)	76(27.64%)
PR+SD	17(27.42%)	182(85.45%)	199(72.36%)
小计	62	213	275
>40			
PD	39(62.90%)	28(13.15%)	67(24.36%)
PR+SD	23(37.10%)	185(86.85%)	208(75.64%)
小计	62	213	275
>45			
PD	37(59.68%)	28(13.15%)	65(23.64%)
PR+SD	25(40.32%)	185(86.85%)	210(76.36%)
小计	62	213	275

表 8.3.3.2.2 基于检测值变化百分比的疾病进展诊断结果

变化百分比	TP	TN	FP	FN	灵敏度		特异度		符合率	PPV(%)	NPV(%)	LR+	LR-	DOR
					%	%95 CI	%	%95 CI	(%)					
PD—PR+SD														
>25	45	176	37	17	72.58	61.48, 83.68	82.63	77.54, 87.72	80.36	54.88	91.19	4.18	0.33	12.67
>30	45	178	35	17	72.58	61.48, 83.68	83.57	78.59, 88.54	81.09	56.25	91.28	4.42	0.33	13.39
>34.17	45	182	31	17	72.58	61.48, 83.68	85.45	80.71, 90.18	82.55	59.21	91.46	4.99	0.32	15.59
>40	39	185	28	23	62.9	50.88, 74.93	86.85	82.32, 91.39	81.45	58.21	88.94	4.78	0.43	11.12
>45	37	185	28	25	59.68	47.47, 71.89	86.85	82.32, 91.39	80.73	56.92	88.1	4.54	0.46	9.87

注：TP，真阳性；TN，真阴性；FP，假阳性；FN，假阴性；PPV，阳性预测值；NPV，阴性预测值；LR+，阳性似然比；LR-，阴性似然比；DOR，diagnostic accuracy odds ratio；

图 8 是根据变化值判定 PD 的 ROC 曲线。

表 8.3.3.3.1 根据变化值判定 PD 四格表

疗效评价	疗效评价		
	PD	PR+SD	小计
>1			
PD	50(80.65%)	59(27.70%)	109(39.64%)
PR+SD	12(19.35%)	154(72.30%)	166(60.36%)
小计	62	213	275
>5			
PD	50(80.65%)	55(25.82%)	105(38.18%)
PR+SD	12(19.35%)	158(74.18%)	170(61.82%)
小计	62	213	275
>7.84			
PD	49(79.03%)	51(23.94%)	100(36.36%)
PR+SD	13(20.97%)	162(76.06%)	175(63.64%)
小计	62	213	275
>10			
PD	47(75.81%)	49(23.00%)	96(34.91%)
PR+SD	15(24.19%)	164(77.00%)	179(65.09%)
小计	62	213	275
>15			
PD	45(72.58%)	46(21.60%)	91(33.09%)
PR+SD	17(27.42%)	167(78.40%)	184(66.91%)
小计	62	213	275

表 8.3.3.3.2 基于不同阈值的变化趋势，所对应的疾病进展诊断结果

					灵敏度		特异度		符合率					
变化值	TP	TN	FP	FN	%	%95 CI	%	%95 CI	(%)	PPV(%)	NPV(%)	LR+	LR-	DOR
PD—PR+SD														
>1	50	154	59	12	80.65	70.81, 90.48	72.3	66.29, 78.31	74.18	45.87	92.77	2.91	0.27	10.78
>5	50	158	55	12	80.65	70.81, 90.48	74.18	68.30, 80.06	75.64	47.62	92.94	3.12	0.26	12
>7.84	49	162	51	13	79.03	68.90, 89.17	76.06	70.33, 81.79	76.73	49	92.57	3.3	0.28	11.79
>10	47	164	49	15	75.81	65.15, 86.47	77	71.34, 82.65	76.73	48.96	91.62	3.3	0.31	10.65
>15	45	167	46	17	72.58	61.48, 83.68	78.4	72.88, 83.93	77.09	49.45	90.76	3.36	0.35	9.6

注：TP，真阳性；TN，真阴性；FP，假阳性；FN，假阴性；PPV，阳性预测值；NPV，阴性预测值；LR+，阳性似然比；LR-，阴性似然比；DOR，diagnostic accuracy odds ratio

实施例 4

一、抗凝剂干扰评估资料（证明 EDTA-K2 对检测无影响）

实验样本

Hsp90α 试剂盒，EDTA-K2，校准品 1 套

实验方法

配置 EDTA-K2 溶液 300 mg/mL，向 Hsp90α 浓度分别为 400 ng/mL、200 ng/mL 的溶液（各 1mL）中加入 4 μL EDTA-K2 溶液，最后抗凝剂终浓度为 3

mg/mL。同时平行配制一组不加抗凝剂的、对应浓度的 Hsp90α 蛋白溶液。平行检测加抗凝剂与不加抗凝剂蛋白溶液浓度，每个浓度重复 6 次，平均值见下表。

实验结果

浓度（ng/mL）	不加抗凝剂（ng/mL）	加抗凝剂(ng/mL)	偏差（%）
400	328	338	2.9
200	200	224	12.2

结论：由结果可看出，抗凝剂不影响本试剂盒检测结果。

二．不同采血管干扰评估资料

实验样本

Hsp90α 试剂盒，EDTA-K2 采血管（血浆管），EDTA-K3 采血管（血浆管），血清管

实验方法

同时使用不同采血管收集同一人的血样，使用试剂盒同时检测不同采血管收集的样本，每个样本重复检测 2 次。计算不同采血管的检测值差异。

实验结果

1、EDTA-K2 采血管，EDTA-K3 采血管对比

健康人 5 例和肿瘤病人 4 例，

图 9 是 EDTA-K3 采血管样本与 EDTA-K2 采血管样本的对比。

结果：在正常人中，EDTA-K3 管样本比 EDTA-K2 管样本检测值平均低 4.37%；在癌症患者中，EDTA-K3 管样本比 EDTA-K2 管样本检测值平均低 26.95%。因此如果选用 EDTA-K3 管收集样本，那么会导致阳性标本的 Hsp90α 值减低。

2、血浆管与血清管对比

非恶性肿瘤的一般性疾病共 148 例

样本例数	血浆管平均值（ng/mL）	血清管平均值（ng/mL）	差异（%）
148 例	34.06	24.59	27.8

结论：通过 148 个不同的非恶性肿瘤的一般性疾病的对比，血清 Hsp90α 比血浆中 Hsp90α 含量高低 27.8%。如果使用血清作为样本，会导致阳性阈值的降低。

3、EDTA-K2 采血管与肝素采血管对比

非恶性肿瘤的一般性疾病共 30 例

样本例数	EDTA-K2 管 平均值（ng/mL）	肝素管平均值 （ng/mL）	差异（%）
30 例	36.07	43.26	19.9

结论：通过 30 个不同的非恶性肿瘤一般性疾病的对比，肝素采血管样本检测值比 EDTA-K2 采血管样本检测值高 19.9%。如果使用肝素采血管收集样本，会导致阳性阈值的升高。

实施例 5

采用非动态监测，即将单次检测结果与病理学诊断和临床诊断结果比对的方法，对 Hsp90α 定量检测试剂盒在肝癌诊断中的有效性进行评价。对于患者进行动态监测，即通过跟踪检测肝癌患者在治疗过程中的血浆 Hsp90α 含量变化，对 Hsp90α 定量检测试剂盒在肝癌疗效评价中的有效性进行评价。

一、试验方案总体设计

1、试验要求

研究采用盲法，即在组别等信息未知的情况下，用 Hsp90α 定量检测试剂盒对标本进行 Hsp90α 含量的检测，并对结果进行比较分析，计算检测结果与病理学、临床诊断结果、患者疗效评价符合或差异程度的统计学指标，再根据这些指标对 Hsp90α 定量检测试剂盒的临床应用性能进行评价。

2、样本采集、保存、运输方法

样本分为非动态监测样本和动态监测样本。非动态监测样本为临床常规检验后剩余的血浆样本；动态监测样本为入组患者定期采集的血浆样本或定期常规检验的剩余样本。

所有血浆样本的采集和保存都必须符合 Hsp90α 定量检测试剂盒使用说明书的规定：采集静脉血，收集血样装在 EDTA-K2 抗凝管中，颠倒 8-10 次。离心分离血浆（800-1000 g，10 分钟），将血浆分装至 EP 管中（每份不少于 250 μL），迅速放置于-18°C 以下冷冻保存。

3、样本选择标准

3.1 非动态监测样本的选择

研究对象包括：肝癌组和非肝癌组。

（1）肝癌组：经病理学诊断确诊为肝癌患者的样本，包括肝癌的不同类型和不同分期。

（2）非肝癌组：经临床生化、影像或病理学方法证实未患肝癌的人群，包

括确定无明显疾病症状的健康人和确定无肝癌但有肝部其他良性相关疾病人群的样本（如肝炎、肝硬化等）。

健康人定义：无任何已知的良性或恶性疾病、外表正常、无任何可见疾病症状、临床生化检测结果正常的人。

对于相关疾病患者，如需要做影像学或病理学进行确诊的，应由影像学或病理学确诊为非癌症病变。

3.2 动态监测样本的选择

对规范的手术治疗或内科治疗的肝癌患者进行随访监测，检验血浆中Hsp90α浓度的变化与患者病情变化的相关性。

血浆样本的收集时间点为：

（1）行手术治疗肝癌患者的动态监测：手术前 3 天内收集血浆样本 1 次，手术后 14 天内收集血浆样本 1 次。

（2）行内科治疗肝癌患者的动态监测：治疗开始前收集血浆样本 1 次，治疗开始后，在每个治疗周期结束后收集样本 1 次，血样的收集至少持续到患者完成第一次疗效评价。

3.3 样本剔除标准

（1）动态监测中，妊娠、哺乳期或有生育能力但在试验期间未采取避孕措施者的样本；

（2）术后进行辅助治疗的患者的样本；

（3）处于放射治疗期的患者的样本；

（4）患有其他癌症的患者。

二、临床评价标准

1、在非动态监测中，参照病理学金标准评价本检测的灵敏度、特异度和符合率；

2、在动态监测中，参照 CT 结果评价本检测的灵敏度、特异度和符合率，即考察血浆中 Hsp90α 含量的变化与治疗效果的对应性。

三、统计处理方法

对计量资料，采用均数±标准差等描述；对计数资料，采用例数和百分比来描述。

根据数据类型，分别选择适当的统计分析方法，如 t 检验/秩和检验/卡方检验/精确概率等方法。

将灵敏度和特异度分别作为坐标轴绘制 ROC 曲线，并计算 ROC 曲线下面积和 95%CI，以评价辅助诊断的价值。

进行一致性比较，计算阳/阴性一致百分比。

通过 SPSS 软件统计产品测定临床样本 Hsp90α 浓度值，得出 Hsp90α 与疾病的相关性和直线回归分析（ROC 曲线）。

四、临床研究结果及分析

1、非动态监测样本数据统计结果

（1）非动态样本数据集构成，见表 9.1

表 9.1 非动态样本数据集构成

样本组成	样本数量（个）
肝癌患者	602
非癌肝部相关疾病组	151
健康人群	592
合计	1345

（2）ROC 曲线（肝癌组相对于健康人组），见图 10。

（3）诊断评价指标（肝癌组相对于健康人组），见表 9.2：

表 9.2：肝癌组相对于健康人组 ROC 曲线提示的诊断评价指标

变量	数值	
Cut-off	52.79 ng/ml	62.20 ng/ml
曲线下面积	0.958	0.958
灵敏度	93.7 %	91.4 %
特异度	85 %	90 %
符合率	94.5 %	92.2 %

（4）ROC 曲线（肝癌相对于非癌肝部相关疾病组），见图 11。

（5）诊断评价指标（肝癌组相对于非癌肝部相关疾病组），见表 9.3：

表 9.3：肝癌组相对于非癌肝部相关疾病组 ROC 曲线提示的诊断评价指标

变量	数值	
Cut-off	63.66 ng/ml	85.24 ng/ml
曲线下面积	0.958	0.958
灵敏度	90.7 %	80.7 %
特异度	90 %	95 %

符合率	90.3 %	88.6 %

（6）行外科手术组动态监测数据统计结果（69 例），见表 9.4

表 9.4 手术前后检测值变化分析

项目	结果
术前	
N	69
Mean	183.59
Min, Max	26.54,506.00
术后	
N	69
Mean	118.56
Min, Max	20.00,233.00
术前-术后	
N	69
Mean	65.04
配对 t 检验(P)	5.03(<0.001)

结果表明，术后血浆中 Hsp90α 含量比术前显著降低，结果具有显著统计学意义。

（7）肝癌介入治疗患者病情监测和疗效评价结果（9 例）

接受介入治疗的 9 例患者中，4 例临床获益的患者（患者编号 001-004）治疗后检测值降低，5 例疾病进展的患者治疗后检测值升高，体现了检测值与患者病情之间有良好的对应性，见表 9.5：

表 9.5 肝癌介入治疗疗效评价结果

患者编号	治疗前检测值(ng/ml)	治疗后检测值(ng/ml)
001	63	35
002	184	128
003	122	66
004	133	77
005	256	400
006	130	226
007	47	109

008	31	66
009	99	108

实施例 6

采用与病理学诊断和临床诊断结果比对的方法，对 Hsp90α 定量检测试剂盒在结直肠癌诊断中的有效性进行评价。对于患者进行动态监测，通过跟踪治疗过程中的血浆 Hsp90α 含量变化，对 Hsp90α 定量检测试剂盒在结直肠癌疗效评价中的有效性进行评价。

一、试验方案总体设计：同实施例 5 相关内容，适应症改为结直肠癌，非癌结直肠相关疾病包括结直肠息肉、炎症等。

二、临床评价标准：同实施例 5 相关内容

三、统计处理方法：同实施例 5 相关内容。

四、临床研究结果及分析

1、非动态监测样本数据统计结果

（1）非动态样本数据集构成，见表 10.1

表 10.1 非动态样本数据集构成

样本组成	样本数量（个）
结直肠癌患者	475
健康人及非癌结直肠相关疾病	592
合计	1067

（2）ROC 曲线（结直肠癌组相对于健康人及非癌结直肠相关疾病组），见图 12。

（3）诊断评价指标（结直肠癌组相对于健康人及非癌结直肠相关疾病组），见表 10.2。

表 10.2：结直肠癌组相对于健康人及非癌结直肠相关疾病组 ROC 曲线提示的诊断评价指标

变量	数值	
Cut-off	52.79ng/ml	62.20ng/ml
曲线下面积	0.936	0.936
灵敏度	89.9%	83.4%

特异度	85%	90%
符合率	87%	87%

（4）行外科手术组动态监测数据统计结果（101 例），见表 10.3。

表 10.3 手术前后检测值变化分析

项目	结果
术前	
N	101
Mean	145.84
Min, Max	50.72, 554.40
术后	
N	101
Mean	94.08
Min, Max	66.19, 105.63
术前-术后	
N	101
Mean	51.76
配对 t 检验(P)	5.85(<0.001)

结果表明，术后血浆中 Hsp90α 含量比术前显著降低，结果具有统计学意义。

（5）行内科治疗获益（CR+PR+SD）的结直肠癌患者疗效评价结果（10 例），其中 9 例检测值均降低，检测值与疗效相关性良好，见表 10.4。

表 10.4 经内科治疗获益的结直肠癌患者检测结果

患者编号	化疗前检测值(ng/ml)	化疗后检测值(ng/ml)
001	221	112
002	41	36
003	49	20
004	171	69
005	46	29
006	125	66
007	37	40
008	24	20

009	106	26
010	32	31

实施例 7

采用与病理学诊断和临床诊断结果比对的方法，对 Hsp90α 定量检测试剂盒在乳腺癌诊断中的有效性进行评价。对于患者进行动态监测，通过跟踪治疗过程中的血浆 Hsp90α 含量变化，对 Hsp90α 定量检测试剂盒在乳腺癌疗效评价中的有效性进行评价。

一、试验方案总体设计：同实施例 5 相关内容，适应症改为乳腺癌，非癌乳腺相关疾病包括乳腺炎、乳腺增生等。

二、临床评价标准：同实施例 5 相关内容

三、统计处理方法：同实施例 5 相关内容。

四、临床研究结果及分析

1、非动态监测样本数据统计结果

（1）非动态样本数据集构成，见表 11.1

表 11.1 非动态样本数据集构成

样本组成	样本数量（个）
乳腺癌患者	800
乳腺非癌相关疾病	172
健康人群	592
合计	1564

（2）ROC 曲线（乳腺癌组相对于健康人组），见图 13。

（3）诊断评价指标（乳腺癌组相对于健康人组），见表 11.2。

表 11.2 乳腺癌组相对于健康人组 ROC 曲线提示的诊断评价指标

变量	数值	
Cut-off	52.66 ng/ml	61.92 ng/ml
曲线下面积	0.817	0.817
灵敏度	65.6%	54.6%
特异度	85%	90%
符合率	73.85%	69.68%

（4）ROC 曲线（乳腺癌相对于非癌乳腺相关疾病组），见图 14。

（5）诊断评价指标（乳腺癌组相对于非癌乳腺相关疾病组），见表 11.3。

表 11.3 乳腺癌组相对于非癌乳腺相关疾病组 ROC 曲线提示的诊断评价指标

变量	数值	
Cut-off	63.41ng/ml	72.21ng/ml
曲线下面积	0.769	0.769
灵敏度	52.4%	41.9%
特异度	84.9%	90.1%
符合率	68.29%	65.41%

（6）行外科手术组动态监测数据统计结果（26 例），见表 11.4。

表 11.4 手术前后检测值变化分析

项目	结果
术前	
N	26
ean	75.19
Min, Max	39.50,168.14
术后	
N	26
Mean	45.33
Min, Max	20.00,188.54
术前-术后	
N	26
Mean	29.86
配对 t 检验(P)	4.065(<0.001)

（7）行内科化疗临床获益（CR+PR+SD）的乳腺癌患者化疗前和化疗后血浆 Hsp90α 动态监测数据统计结果（18 例）显示，获得临床受益的患者检测值下降，结果具有显著统计学意义，见表 11.5。

表 11.5 经内科治疗获益的乳腺癌患者检测结果

	变量	值
化疗前（ng/ml）	Mean	103
化疗后（ng/ml）	Mean	81
△=化疗前－化疗后	Mean	22

（ng/ml）	配对 t 值	2.338
	P 值	0.03

实施例 8

采用与病理学诊断和临床诊断结果比对的方法，对 Hsp90α 定量检测试剂盒在多种癌症诊断中的有效性进行评价。结果显示，与健康人相比，胃癌、胰腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、食管癌、黑色素瘤、肾癌、子宫癌、鼻咽癌、骨肉瘤、膀胱癌、前列腺癌等多种癌症患者血浆 Hsp90α 含量均显著升高（见图 15），并且结果具有显著统计学意义。经统计，各瘤种平均值分别如表 12.1 所示：

表 12.1 其他癌症血浆 Hsp90α 含量平均值

癌症种类	样本数量	均值（ng/ml）
胃癌	55	199.70
胰腺癌	5	199.73
卵巢癌	10	180.47
淋巴瘤	42	161.30
食管癌	20	239.13
黑色素瘤	10	190.11
肾癌	14	242.00
子宫癌	15	209.77
鼻烟癌	8	168.65
骨肉瘤	8	188.68
膀胱癌	4	206.56
前列腺癌	117	69.12

权利要求

1、确定受试者是否患有癌症或者具有罹患癌症风险的方法，包括检测该受试者的血液样本中 Hsp90α 的浓度，如果该浓度达到或超过预先设定的阈值，则判定该受试者患有癌症或者具有罹患癌症的风险，其中所述阈值选自 50 ng/ml 到 120 ng/ml 的范围内，例如所述阈值可以为 50、53、56、62、63、64、67、72、82、85 或 117 ng/ml，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义；优选地，所述血液样本为血浆样本。

2、用于对正在接受治疗的癌症患者进行病情监测和/或疗效评价或者用于对候选治疗药物进行疗效评价的方法，包括在治疗前及治疗后分别检测受试者的血液样本中 Hsp90α 的浓度，如果治疗后 Hsp90α 的浓度相对于治疗前 Hsp90α 浓度增加的百分比达到或超过预先设定的阈值，则判定该受试者病情进展和/或疗效较差，或者判定所述候选治疗药物疗效较差，其中所述阈值选自 10%到 50% 的范围内，例如所述阈值可以为 34%，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义；优选地，所述血液样本为血浆样本。

3、确定受试者是否患有癌症或者具有罹患癌症风险的方法，包括联合检测该受试者的血液样本中 Hsp90α 的浓度以及至少一种其他肿瘤标志物的浓度，如果 Hsp90α 的浓度和所述至少一种其他肿瘤标志物的浓度达到或超过预先设定的阈值，则判定该受试者患有癌症或者具有罹患癌症的风险，其中 Hsp90α 的阈值选自 50 ng/ml 到 120 ng/ml 的范围内，例如所述阈值可以为 50、53、56、62、63、64、67、72、82、85 或 117 ng/ml，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义；优选地，所述血液样本为血浆样本。

4、权利要求 1-3 之任一项的方法，其中所述癌症选自由肺癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、食管癌、黑色素瘤、肾癌、子宫癌、鼻咽癌、骨肉瘤、膀胱癌和前列腺癌构成的组。

5、权利要求 3-4 之任一项的方法，其中所述至少一种其他肿瘤标志物选自由 CEA、CYFRA21-1、AFP、CA19-9、CA125、CA15-3、PSA 和 CA72-4 构成的组。

6、权利要求 1-5 之任一项的方法，其中所述 Hsp90α 的浓度采用 EDTA-K2 作为抗凝剂进行检测。

7、用于确定受试者是否患有癌症或者具有罹患癌症风险的试剂盒，包括：任选的人分泌型 Hsp90α、人分泌型 Hsp90α 单克隆抗体、检测试剂以及说明书，其中所述说明书中标明了健康人血液样本中 Hsp90α 浓度的阈值，如果受试者的血液样本中 Hsp90α 的浓度达到或超过所述阈值，则判定该受试者患有癌症或者

具有罹患癌症的风险，其中所述阈值选自 50 ng/ml 到 120 ng/ml 的范围，例如所述阈值可以为 50、53、56、62、63、64、67、72、82、85 或 117 ng/ml，且所述阈值±15%范围内的数值均被视为具有等同判定意义；优选地，所述血液样本为血浆样本。

8、权利要求 7 的试剂盒，其中所述癌症选自由肺癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、食管癌、黑色素瘤、肾癌、子宫癌、鼻咽癌、骨肉瘤、膀胱癌和前列腺癌构成的组。

9、权利要求 7-8 之任一项的试剂盒，其中所述试剂盒中包括用于采集血液样本的容器，并且该容器中包含 EDTA-K2、EDTA-K3 或肝素；优选地，所述容器为包含 EDTA-K2 的采血管。

10、权利要求 7-9 之任一项的试剂盒，其中所述 Hsp90α 的浓度采用 EDTA-K2 作为抗凝剂进行检测。

11、EDTA-K2 作为抗凝剂在收集用于 Hsp90α 肿瘤标志物检测的血液样本中的用途。

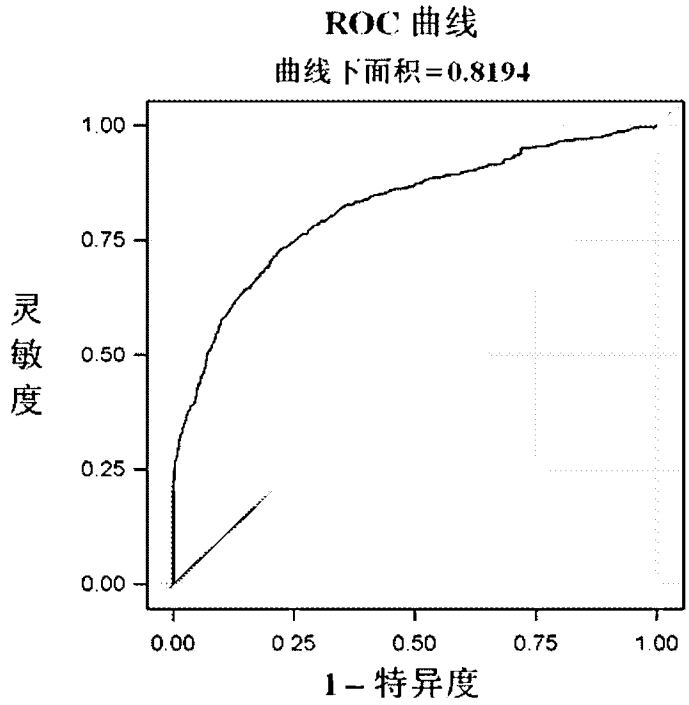

ROC 曲线
曲线下面积=0.8194
灵敏度
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1－特异度

图 1

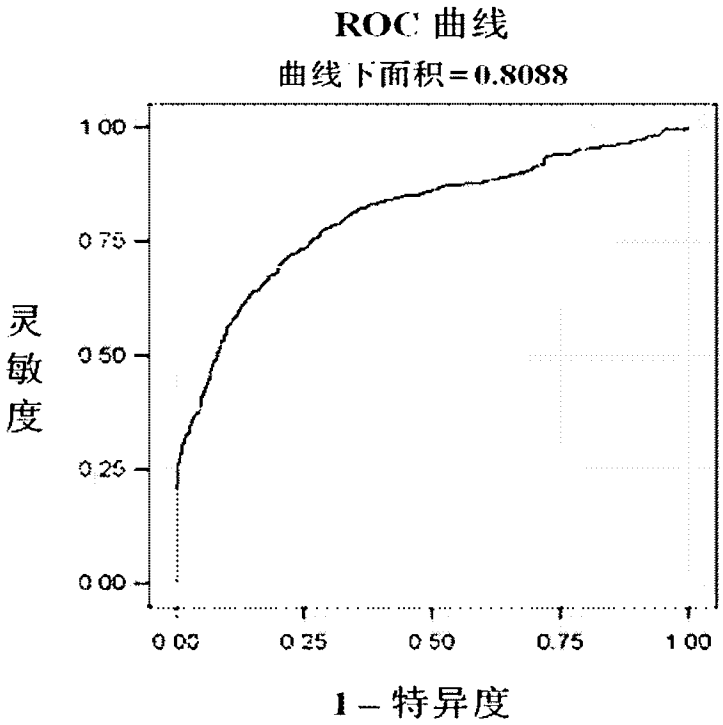

ROC 曲线
曲线下面积=0.8088
灵敏度
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1－特异度

图 2

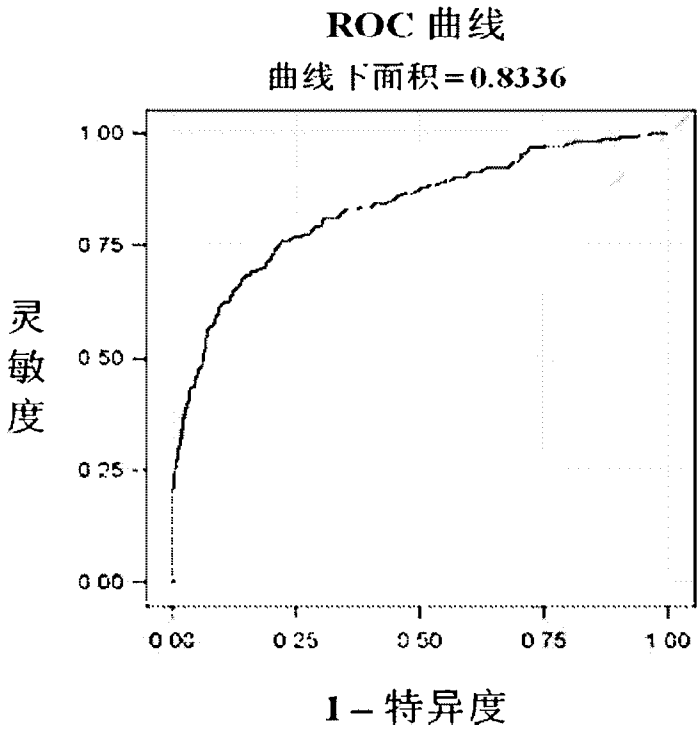

ROC 曲线
曲线下面积=0.8336
灵敏度
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1－特异度

图 3

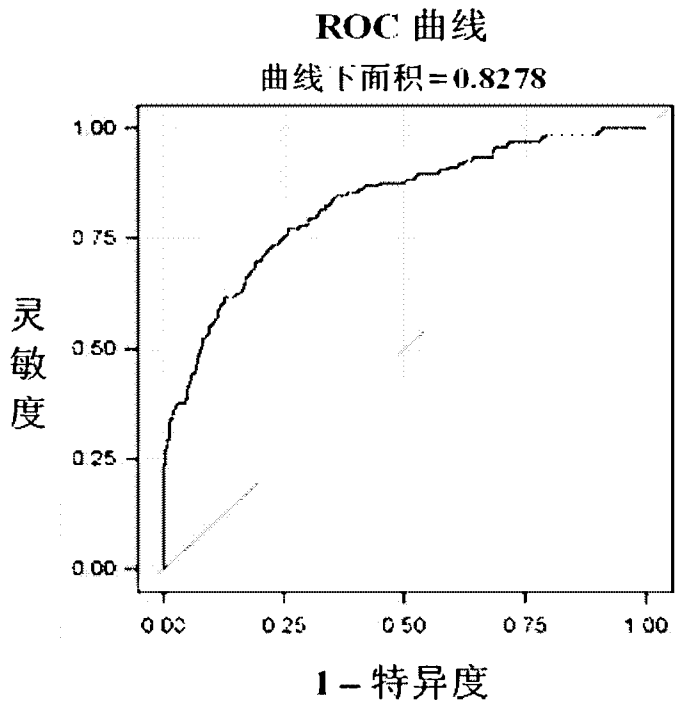

ROC 曲线
曲线下面积=0.8278
灵敏度
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1－特异度

图 4

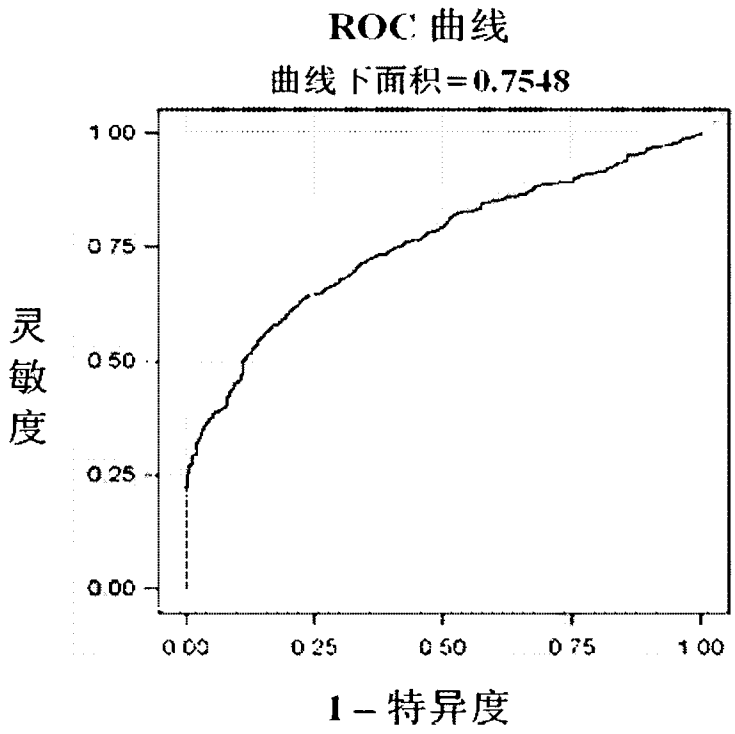

ROC 曲线
曲线下面积=0.7548
灵敏度
1 00
0 75
0 50
0 25
0 00
0 00
0 25
0 50
0 75
1 00
1－特异度

图 5

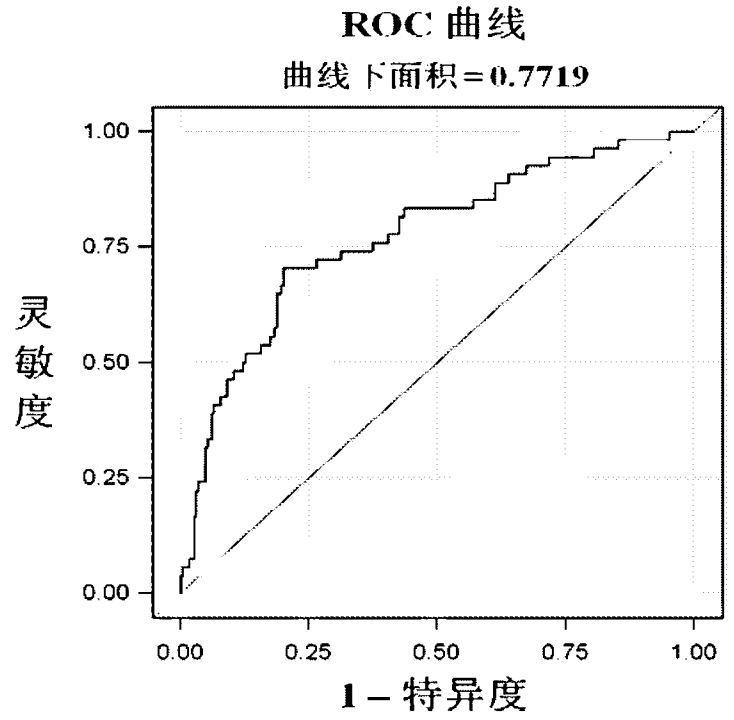

ROC 曲线
曲线下面积=0.7719
灵敏度
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1－特异度

图 6

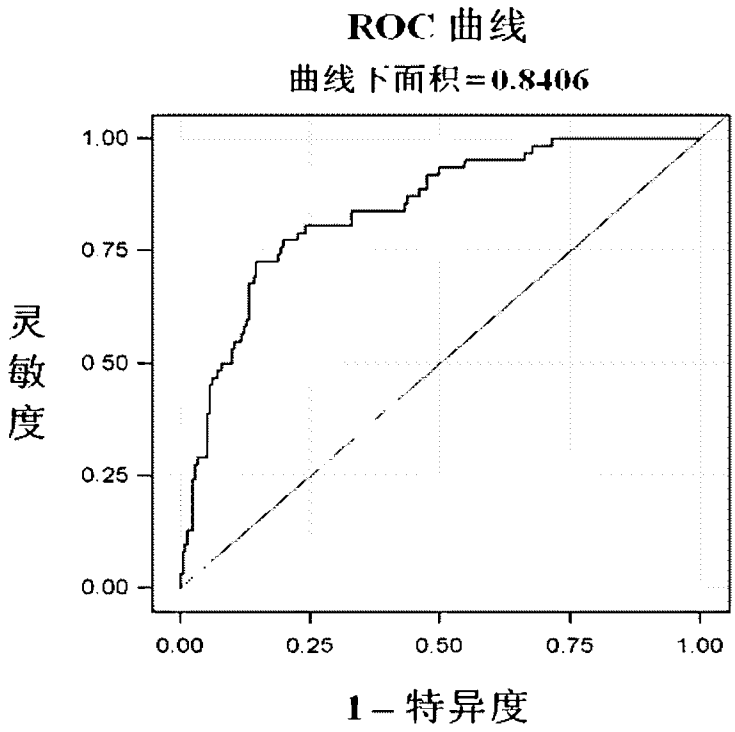

ROC 曲线
曲线下面积=0.8406
灵敏度
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1－特异度

图 7

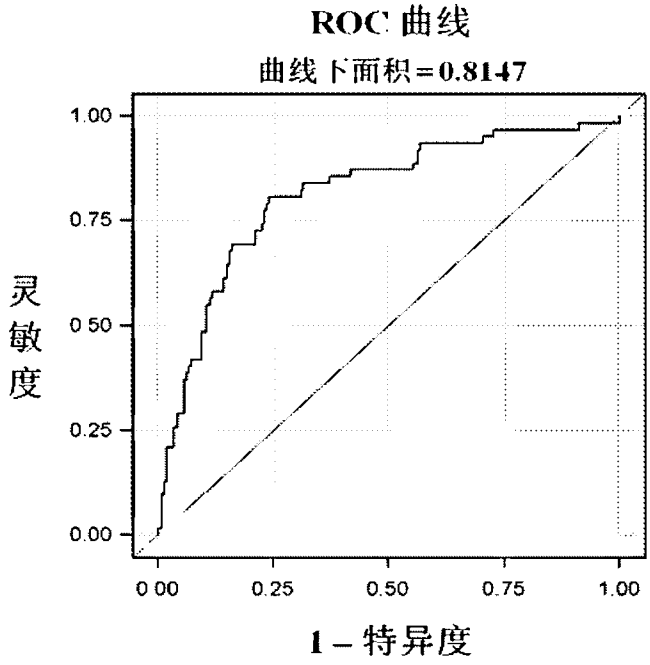

ROC 曲线
曲线下面积=0.8147
灵敏度
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1－特异度

图 8

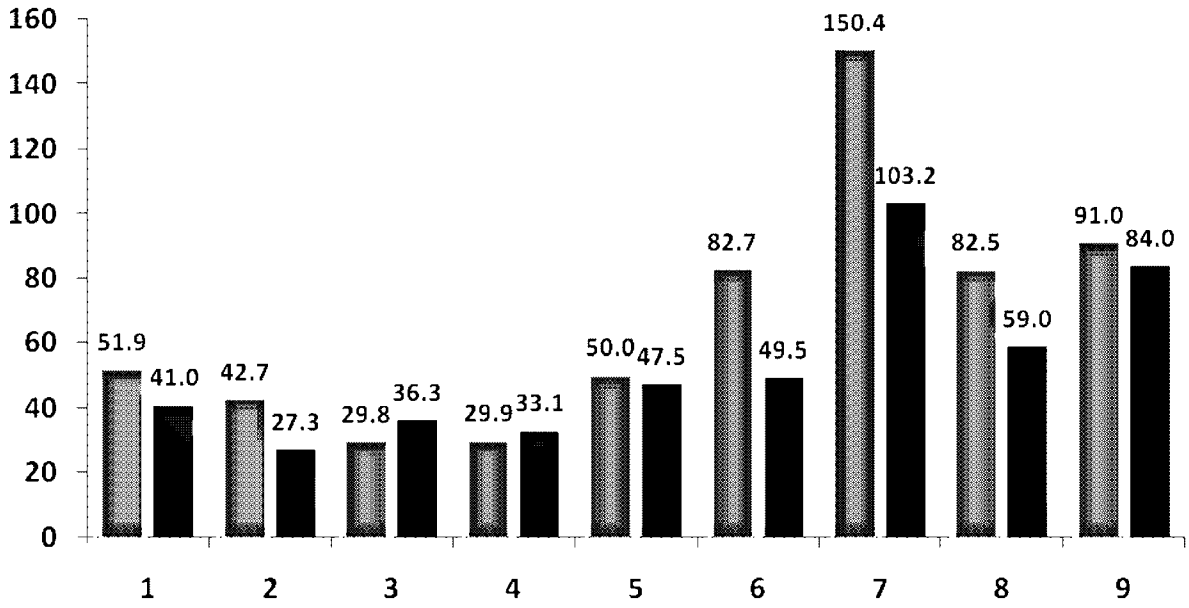

160
140
120
100
80
60
40
20
0
51.9
41.0
42.7
27.3
29.8
36.3
29.9
33.1
50.0
47.5
82.7
49.5
150.4
103.2
82.5
59.0
91.0
84.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图 9

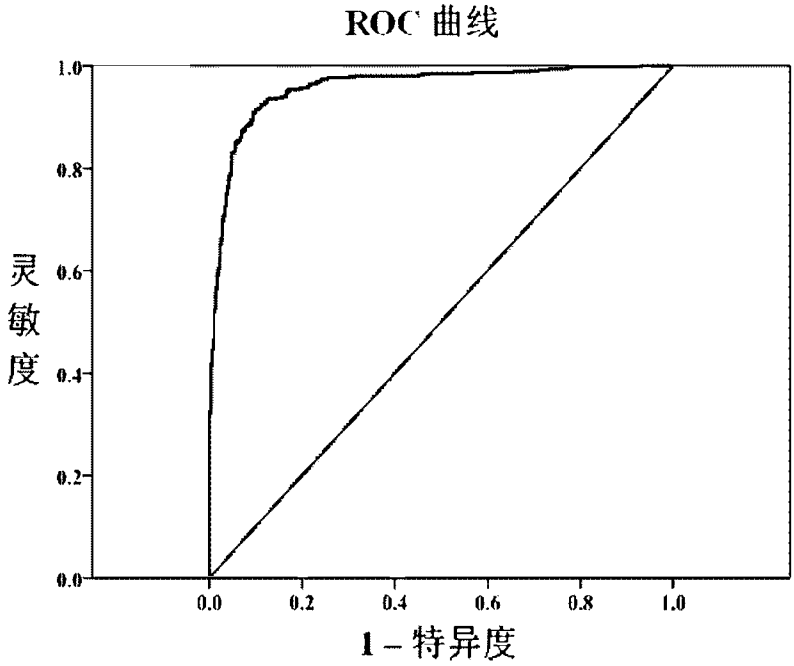

ROC 曲线
灵敏度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1 – 特异度

图 10

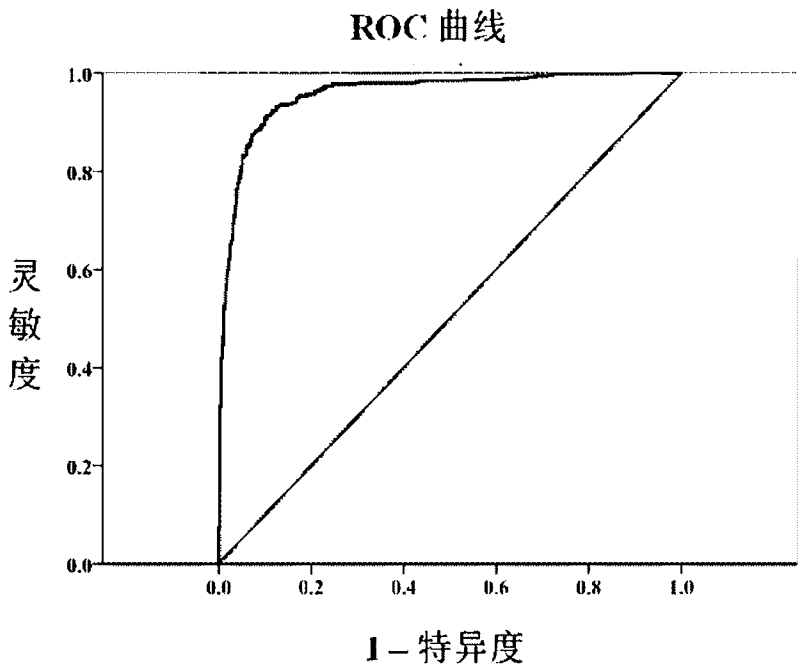

ROC 曲线
灵敏度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1 – 特异度

图 11

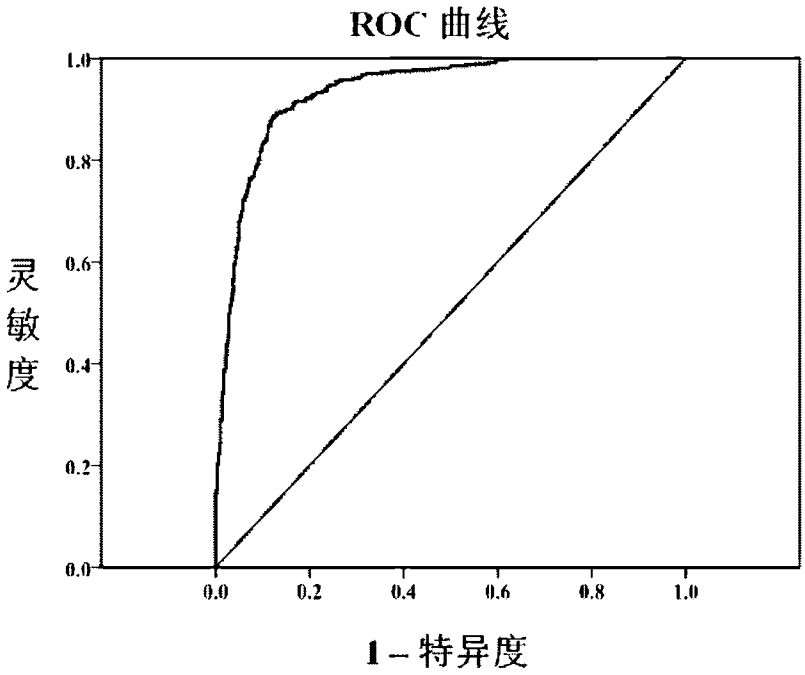

ROC 曲线
灵敏度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1 – 特异度

图 12

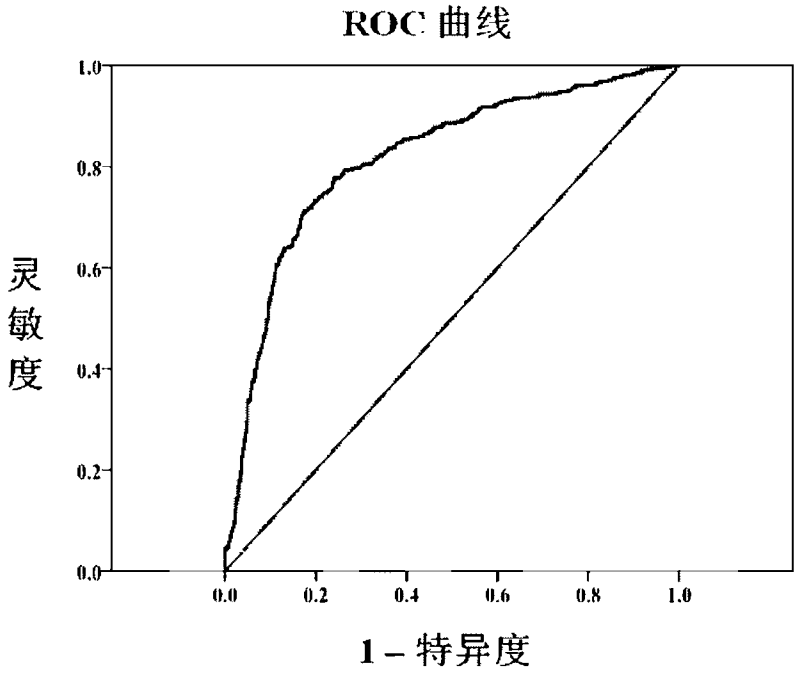

ROC 曲线
灵敏度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1 – 特异度

图 13

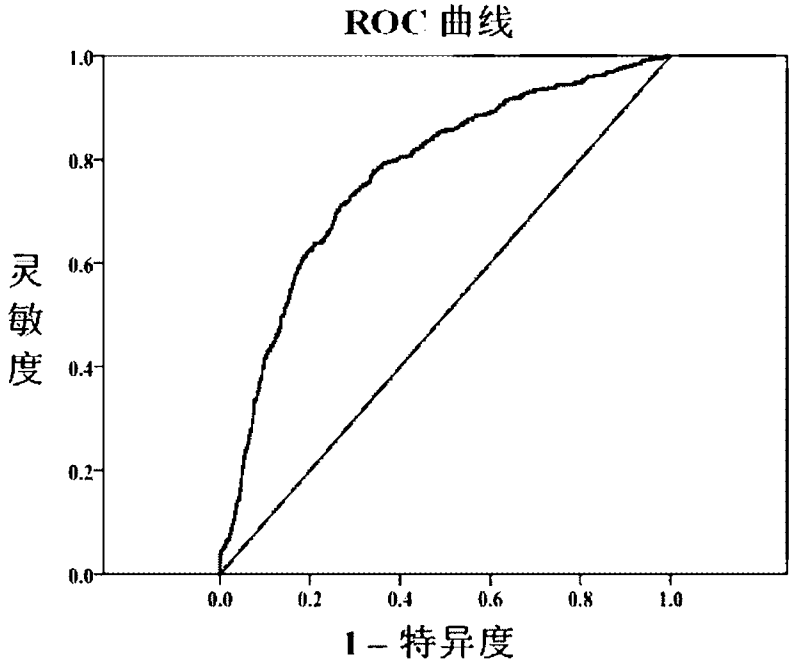


图 14

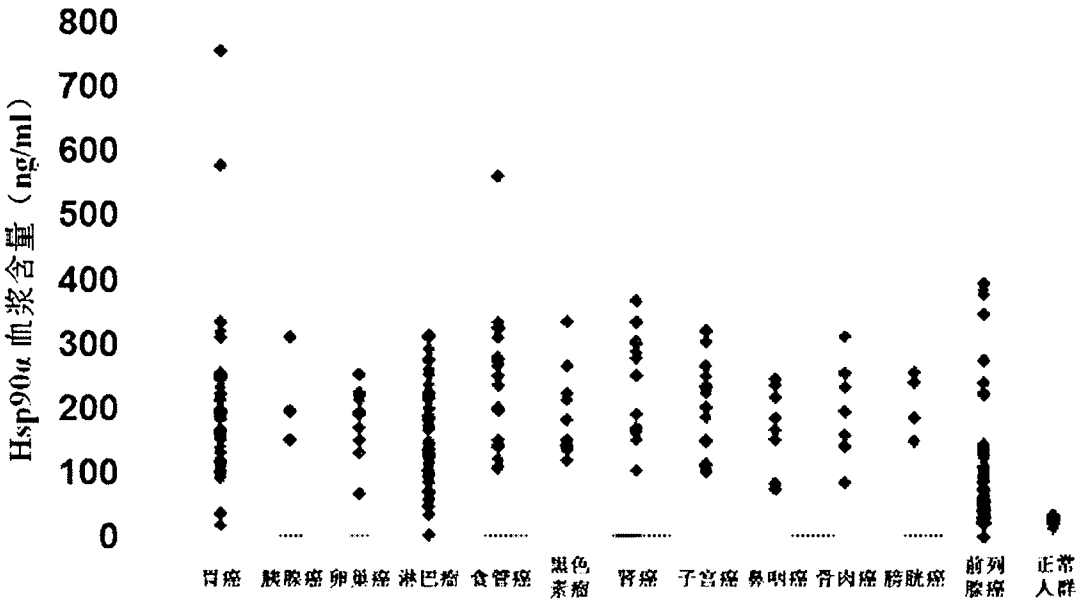


图 15

替换页（细则第26条）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/081034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/435 (2006.01) i; G01N 33/574 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/-; G01N 33/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI: ethylene diamine tetraacetic acid, Hsp90, heat shock proteins, cancer, tumour, marker, plasma, anticoagulant, EDTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101942017 A (TSINGHUA UNIVERSITY), 12 January 2011 (12.01.2011), paragraphs [0070]-[0073], [0097]-[0099], [0101] and [0113]	1-5, 7-9
X	WO 2008070472 A2 (UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE), 12 June 2008 (12.06.2008), description, paragraphs [0015]-[0017], [0038], [0040], [0041], [0085], [0086] and [0093]	1-5, 7-9
A	CN 101514989 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY), 26 August 2009 (26.08.2009), abstract	1-11
A	CN 101942017 A (TSINGHUA UNIVERSITY), 12 January 2011 (12.01.2011), paragraphs [0070]-[0073], [0097]-[0099], [0101] and [0113]	6, 10-11
A	WO 2008070472 A2 (UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE), 12 June 2008 (12.06.2008), description, paragraphs [0015]-[0017], [0038], [0040], [0041], [0085], [0086] and [0093]	6, 10-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 August 2014 (29.08.2014)	**23 September 2014 (23.09.2014)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **FENG, Mingyan** Telephone No.: (86-10) **01062413722**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/081034

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101942017 A	12 January 2011	AU 2010268979 A1	01 March 2012
		CN 101942017 B	14 August 2013
		SG 177514 A1	28 February 2012
		HK 1152951 A0	16 March 2012
		HK 1166329 A0	26 October 2012
		EP 2452948 A1	16 May 2012
		WO 2011003369 A1	13 January 2011
		RU 2012104024 A	20 August 2013
		HK 1152951 A1	02 May 2014
WO 2008070472 A2	12 June 2008	US 8580519 B2	12 November 2013
		WO 2008070472 A3	25 September 2008
		US 2010129829 A1	27 May 2010
CN 101514989 A	26 August 2009	None	

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2014/081034

A. 主题的分类

C07K 14/435(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K14/-; G01N33/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI:热休克蛋白，肿瘤，标志物，血浆，抗凝剂，乙二胺四乙酸，Hsp90，heat shock proteins,cancer,tumour,marker,plasma,anticoagulant,EDTA

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101942017 A (清华大学) 2011年 1月 12日 (2011-01-12) [0070]-[0073]、[0097]-[0099]、[0101]、[0113]段	1-5，7-9
X	WO 2008070472 A2 (UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE) 2008年 6月 12日 (2008-06-12) 说明书第[0015]-[0017]、[0038]、[0040]、[0041]、[0085]、[0086][0093]段	1-5、7-9
A	CN 101514989 A (中山大学) 2009年 8月 26日 (2009-08-26) 说明书摘要	1-11
A	CN 101942017 A (清华大学) 2011年 1月 12日 (2011-01-12) [0070]-[0073]、[0097]-[0099]、[0101]、[0113]段	6、10-11
A	WO 2008070472 A2 (UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE) 2008年 6月 12日 (2008-06-12) 说明书第[0015]-[0017]、[0038]、[0040]、[0041]、[0085]、[0086][0093]段	6、10-11

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2014年 8月 29日	2014年 9月 23日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	封明艳 电话号码 (86-10)01062413722

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/081034

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	101942017	A	2011年 1月 12日	AU	2010268979	A1	2012年 3月 01日
				CN	101942017	B	2013年 8月 14日
				SG	177514	A1	2012年 2月 28日
				HK	1152951A	0	2012年 3月 16日
				HK	1166329A	0	2012年 10月 26日
				EP	2452948	A1	2012年 5月 16日
				WO	2011003369	A1	2011年 1月 13日
				RU	2012104024	A	2013年 8月 20日
				HK	1152951	A1	2014年 5月 02日
WO	2008070472	A2	2008年 6月 12日	US	8580519	B2	2013年 11月 12日
				WO	2008070472	A3	2008年 9月 25日
				US	2010129829	A1	2010年 5月 27日
CN	101514989	A	2009年 8月 26日		无		