

# (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  
2020 年 10 月 8 日 (08.10.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/200323 A1**

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

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/083410

(22) 国际申请日: 2020 年 4 月 5 日 (05.04.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201910273158.9 2019年4月4日 (04.04.2019) CN

(71) 申请人: 清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学 100084 信箱82分箱, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人: 及

(71) 申请人 (仅对US): 李 梢 (LI, Shao) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学 FIT 楼 1-107 室, Beijing 100084 (CN)。 张鹏(ZHANG, Peng) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学 FIT 楼 1-107室, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京金恒联合知识产权代理事务所 (JINHENG LAW FIRM); 中国北京市西城区白广路枣林前街 37 号裕隆苑宾馆 217室, Beijing 100053 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

(54) **Title:** VERY EARLY CELL MARKER OF GASTRIC CANCER AND EARLY CELL MARKER OF GASTRIC PRECANCEROUS LESION AND APPLICATION THEREOF IN DIAGNOSTIC KIT

(54) 发明名称: 一种胃癌极早期细胞标志和胃癌前病变早期细胞标志及其在诊断试剂盒中的应用

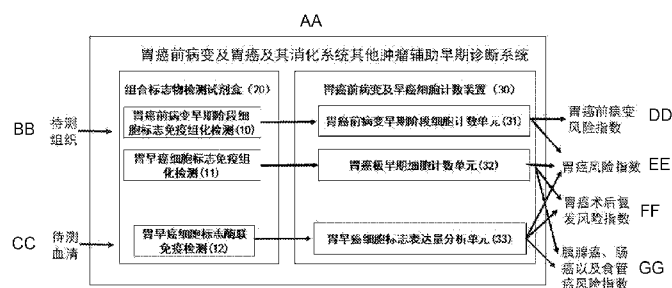


图 1

- 10 Immunohistochemical detection of early gastric precancerous lesion cell markers
- 11 Immunohistochemical detection of early gastric cancer cell markers
- 12 Enzyme-linked immunoassay of early gastric cancer cell markers
- 20 Combined marker detection kit
- 30 Gastric precancerous lesion and early cancer cell counting device
- 31 Early gastric precancerous lesion cell counting unit
- 32 Very early gastric cancer cell counting unit
- 33 Early gastric cancer cell marker expression analysis unit
- AA Assisted early diagnosis system for gastric precancerous lesions, gastric cancer and other digestive system tumors
- BB Tissue to be tested
- CC Serum to be tested
- DD Risk index of gastric precancerous lesion
- EE Risk index of gastric cancer
- FF Risk index of recurrence of gastric cancer after surgery
- GG Risk indexes of pancreatic cancer, bowel cancer and esophageal cancer

(57) **Abstract:** The present inventors have discovered a group of cells (named "very early cells of gastric cancer") that begin to appear at a stage of low-grade dysplasia of the stomach, that have specific molecular characteristics, and that have a high risk of carcinogenesis, which may be used as a marker for the very early diagnosis of gastric cancer. Molecular markers of very early cells of gastric cancer are applied to the preparation of kits for achieving the early diagnosis of gastric cancer or other digestive system tumors on the basis of

JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, 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))。

gastric tissue or blood samples. The very early cell markers of gastric cancer may also distinguish the risk of recurrence of gastric cancer after surgery, and the risk of tumors in the intestines, pancreas, esophagus and other digestive system organs. In addition, the present inventors have further discovered a group of cells that appear early in gastric precancerous lesions and that have specific molecular characteristics, which may be used as a marker for the early diagnosis of gastric precancerous lesions and which may also be integrated into a kit. The present invention may be used for the early clinical diagnosis of the occurrence of gastric cancer and other digestive tract tumors, and may also be used as an intervention target for the prevention and treatment of the described digestive tract tumors, and has good application prospects.

(57) 摘要: 本发明人发现了一群在胃低级别异型增生阶段开始出现、具有特定分子特征、且具有高度癌变风险的细胞群(命名为"胃癌极早期细胞"), 可作为极早期诊断胃癌的标志。胃癌极早期细胞的分子标志被应用到制备基于胃组织或血液样本实现胃癌或其他消化系统肿瘤早期诊断的试剂盒中。该胃癌极早期细胞标志还可区分胃癌术后复发风险, 以及肠、胰腺以及食管等消化系统器官肿瘤发生的风险。另外, 本发明人还发现一群在胃癌前病变早期出现、具有特定分子特征的细胞群, 可作为早期诊断胃癌前病变的标志, 也被集成到试剂盒中。本发明可用于临床上早期诊断胃癌及其他消化道肿瘤的发生, 也可作为上述消化道肿瘤防治的干预靶点, 应用前景良好。

# 一种胃癌极早期细胞标志和胃癌前病变早期细胞标志及其在诊断试剂盒中的应用

## 技术领域

本发明涉及一种用于辅助极早期诊断胃癌及其他消化系统肿瘤中的细胞标志及其测定系统和方法，同时涉及一种用于早期诊断胃癌前病变的细胞标志及其测定系统和方法。

## 背景技术

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤，具有较高的死亡率。大多数胃癌的发生会经历一系列癌前病变的过程，包括肠上皮化生以及异型增生等。癌前病变患者罹患胃癌的风险是非癌前病变患者的近 3 倍[1]。早期诊断胃癌前病变对于胃癌的预防具有重要的意义。

除胃癌前病变外，胃癌的极早期诊断对于胃癌的防治同样具有重要意义。研究表明，胃早癌患者的 5 年术后生存率可达 96%[2]。然而，胃早癌的诊断目前依然以影像学、内镜、病理组织学为主，均存在一定的局限。基于影像学的诊断无法精确地观测到细胞层次的变化，容易遗漏关键生物特征；而基于病理组织学观测和常规肿瘤标志物分子表达的诊断方式会受限于灵敏度和特异度。例如，经典的胃癌标志物 CEACAM5，在胃癌细胞及其癌旁的其他类型细胞（如肠细胞和正常胃上皮细胞）中均表现出高表达，因此很难成为胃癌早期筛查的特异标志物。更为重要的是，由于胃炎癌转化时程长，难以界定胃炎癌转化的关键转化点、亦即“癌变起始点”，这是胃癌极早期诊断的关键难点，也是限制临床胃癌极早期诊断的关键瓶颈。因此，识别高精度的胃癌极早期细胞标志对于界定胃炎癌转化的“癌变起始点”、实现胃癌临床极早期诊断具有十分重要的意义。

与胃癌发生发展类似的是，消化系统其他器官如肠、食管以及胰腺

中肿瘤的发生与炎症的恶性转化密切相关，也会经历包括异型增生在内的癌前病变过程。因此，以胃癌极早期细胞标志的识别为切入点，找到消化系统肿瘤共性的早癌标志物对于提高消化系统肿瘤早期诊断率也具有十分重要的意义。

## 发明内容

在本发明中，本发明人发现了一群在胃低级别异型增生阶段开始出现、具有特定分子特征（KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B）、且具有较高癌变风险的细胞群（发明人将其命名为“胃癌极早期细胞”），可作为极早期诊断胃癌的标志。本发明人将出现该细胞群的阶段定义为胃癌前病变向胃癌转化的关键点、亦即“癌变起始点”。此外，本发明人还发现该胃癌极早期细胞标志可区分胃癌术后复发风险，以及评估肠、胰腺以及食管等消化系统器官癌前病变向癌症转化的风险。在本发明中，该胃癌极早期细胞标志的分子特征被应用到制备基于胃组织或血液样本实现胃癌或其他消化系统肿瘤早期诊断的试剂盒中。另外，本发明人还发现了一群在胃癌前病变早期阶段开始出现、具有特定分子特征（HES6）的细胞群，可作为早期诊断胃癌前病变的标志，也被集成到试剂盒中。该试剂盒有望为消化系统肿瘤患者采取相关治疗措施或决策提供有效依据，临床应用前景良好。

根据本发明的一个方面，提供了检测标志物的表达水平的试剂在制备确定极早期胃癌的产品中应用，其中所述标志物包括从由 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 组成的组中选出的至少一种。

根据本发明的另一个方面，提供了一种用于确定胃癌极早期细胞含量、进而诊断极早期胃癌的产品。其特征在于，所述产品包括检测样本中标志物表达水平的试剂，其中所述标志物包括从由 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 组成的组中选出的至少一种。

根据本发明的另一个方面，提供了检测 HES6 表达水平的试剂在制备确定胃癌前病变水平的产品中应用。

根据本发明的另一个方面，提供了一种用于确定胃癌前病变水平的产品，其特征在于，所述产品包括检测样本中 HES6 表达水平的试剂。

本发明主要包括以下方面，即：

1) 本发明提供了 13 个分子 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 可作为胃癌极早期细胞群的特征，并应用于早期诊断胃癌的新用途。

2) 本发明还提供了分子 (HES6) 作为胃癌前病变早期阶段细胞群的特征，并应用于早期诊断胃癌前病变的新用途。

本发明提供了 13 个分子 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在胰腺、肠和食管等组织中从癌前病变到早癌的变化特征，并应用于早期诊断胰腺癌、肠癌和食管癌的新用途。

本发明提供了 13 个分子 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 的表达水平与胃癌术后复发生存风险之间的关联，并应用于判断胃癌术后复发风险的新用途。

3) 本发明提供了一种检测试剂盒，既可用于免疫组化 (IHC) 染色上述蛋白分子获取其在待测胃组织中的表达情况，进而评估待测组织中的胃癌前病变早期阶段细胞以及早癌细胞含量；也可以用于通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测上述蛋白分子在血液中的表达情况。

4) 本发明提出了一种胃癌前病变、胃癌、胰腺癌、肠癌以及食管癌早期诊断和胃癌术后复发风险评估的系统和方法。对于该系统依据组织或血液中细胞标志蛋白的表达情况，来评估胃组织中胃癌前病变细胞以及早癌细胞数量，进而给出待检测者罹患胃癌前病变以及胃癌的风险、胃癌术后复发的风险。该系统还可以依据患者组织或血液中细胞标志蛋白的表达情况，给出待检测者罹患肠癌、食管癌、胰腺癌等消化系统其他肿瘤的风险。该系统包括以下两部分：

检测试剂盒 (20)，用于分别免疫组化染色上述胃癌前病变早期阶段细胞标志 HES6 (10) 以及 13 种胃癌极早期细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 的表达水平 (11) 从而获取其在待测组织中的表达情况；也可以用于通过酶联免疫吸附测定检测获取待测患者血液样本中胃癌极早期细胞标志的含量。

若是待测组织样本，则胃癌前病变及胃癌极早期细胞计数装置 (30)，用于确定胃癌前病变早期阶段细胞标志 HES6 阳性细胞比例分数 (31) 以及胃癌极早期细胞标志 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 阳性细胞比例分数 (32)。若是待测血液样本，则该计数装置通过计算平均值进而确定血清中 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 的总体表达水平 (33)。

系统根据胃癌前病变早期阶段细胞占整个待测组织中细胞总数的比例给出患者罹患胃癌前病变的风险指数以及罹患胃癌的风险指数；也可根据胃癌极早期细胞比例占整个待测组织中细胞总数的比例给出患者罹患胃癌的风险指数、以及胃癌术后复发风险指数；也可根据食管、胰腺以及肠道组织中胃癌极早期细胞标志物分子的表达水平来分别评估罹患食管癌、胰腺癌以及肠癌的风险指数。同时，胃癌极早期细胞的标志物分子在血清中的总体表达水平也可以用来评估待测患者罹患消化系统肿瘤的风险指数

5) 本发明提出了分别检测上述胃癌前病变早期阶段细胞标志 HES6 (10) 以及 13 种胃癌极早期细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 的表达水平从而获取其在待测组织/血液中的表达情况的试剂在制备用于早期诊断胃癌前病变和/或胃癌及其他消化系统肿瘤中的组合物中的应用。

## 附图说明

图 1 是根据本发明的一个实施例的基于细胞标志的胃癌前病变及胃癌及其他消化系统肿瘤辅助早期诊断系统的原理图。

图 2A 用于说明根据本发明的一个典型实施例的，论证细胞标志 HES6 在胃癌前病变特定细胞类型中特异表达的示意图。

图 2B 是在根据本发明的实施例中胃癌前病变早期阶段细胞标志 (HES6) 所标记的阳性细胞与癌前病变晚期阶段标志 MUC2 所标记的阳性细胞在胃癌前病变组织中的比例分布。

图 2C 是在根据本发明的实施例中胃癌前病变早期阶段细胞标志 (HES6) 所标记的阳性细胞在非癌前病变阶段、轻度癌前病变、重度癌前病变以及胃癌早期阶段等四个阶段胃组织中的比例分布。

图 2D 是在根据本发明的实施例中胃癌前病变细胞标志 (HES6) 所标记的阳性细胞在正常胃组织以及胃癌前病变组织中的比例分布。

图 2E 用于说明根据本发明的一个典型实施例的、论证细胞标志 HES6 与胃癌前病变经典标志 MUC2 在组织中部分共表达的示意图。

图 2F 用于说明根据本发明的一个典型实施例的、论证细胞标志 HES6 在组织中伴随着增值细胞标志 KI67 出现，但不共表达的示意图。

图 3A 是在根据本发明的实施例中 13 个早癌细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在胃早癌组织中不同类型细胞的表达模式。

图 3B 是在根据本发明的实施例中 13 个早癌细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、

KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在独立的胃炎 (19 例)、胃癌前病变 (39 例) 及胃早癌 (19 例) 样本中的表达模式。

图 3C 是在根据本发明的实施例中 13 个早癌细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在独立的胃炎、胃癌患者血液样本中的表达模式。

图 3D 是在根据本发明的实施例中胃癌极早期细胞五个代表性标志分子 (KLK10、KRT17、TIMP1、MAP17 和 KLK6) 在正常胃组织、异型增生 (胃癌前病变) 以及早期胃癌的表达模式。

图 3E 是在根据本发明的实施例中胃癌极早期细胞典型标志 (KLK10) 所标记的阳性细胞在胃癌前病变、早期胃癌以及进展期胃癌中的比例分布。

图 4 用于说明根据本发明的一个典型实施例的胃癌极早期细胞标志代表性成分 (KLK10、SLC11A2、KLK7 和 TIMP1) 与胃癌术后复发风险的关联。

图 5A 是在根据本发明的实施例中 13 个胃癌极早期细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在独立的正常肠组织 (38 例)、癌前病变 (29 例) 及肠癌 (27 例) 样本中的表达模式。

图 5B 是在根据本发明的实施例中 13 个胃癌极早期细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在独立的正常食管 (5 例)、癌前病变 (4 例) 及食管癌 (3 例) 样本中的表达模式。

图 5C 是在根据本发明的实施例中胃癌极早期细胞标志中代表性分子 (ECM1、KRT17、TIMP1 以及 MMP7) 在独立的正常胰腺 (8 例)、上皮内瘤变 (6 例) 及胰腺癌 (12 例) 样本中的表达模式。

## 具体实施方式

图 1 是根据本发明的一个实施例的基于细胞标志的胃癌前病变及胃癌辅助早期诊断系统的原理图。

具体地, 本发明首先提供了一种基于 14 个分子的检测试剂盒。该试剂盒包括检测 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 等分子表达水平的试剂, 还包括空白液、稀释液、抗原修复液等。作为优选实施方案之一, 所述试剂为免疫组化检测方法用抗体, 具体如表 1 所示。所述试剂也可以为 Western Blot 或 ELISA 检测方法用抗体。

表 1. 待测分子所用免疫组化检测抗体列表及配制浓度比

| 试剂编号  | 抗体                                                 | 标志物分子    | 配制浓度比 |
|-------|----------------------------------------------------|----------|-------|
| 试剂 1  | Anti-HES6 抗体<br>(sc-133196)                        | HES6     | 1:200 |
| 试剂 2  | Anti-Kallikrein 10 抗体<br>(ab229968)                | KLK10    | 1:400 |
| 试剂 3  | Anti-DMT1 抗体<br>(ab55735)                          | SLC11A2  | 1:100 |
| 试剂 4  | Anti-SULT2B1 抗体<br>(ab82865)                       | SULT2B1  | 1:400 |
| 试剂 5  | Anti-Kallikrein 7 抗体<br>(ab200745)                 | KLK7     | 1:200 |
| 试剂 6  | Anti-Extracellular<br>matrix 蛋白 1 抗体<br>(ab126629) | ECM1     | 1:100 |
| 试剂 7  | Anti-LMTK3 抗体<br>(ab110516)                        | LMTK3    | 1:500 |
| 试剂 8  | KLK6 抗体<br>(sc-374564)                             | KLK6     | 1:200 |
| 试剂 9  | Anti-KIAA1199 抗体<br>(F3418)                        | KIAA1199 | 1:200 |
| 试剂 10 | Anti-Cytokeratin 17 抗<br>体 (ab53707)               | KRT17    | 1:300 |
| 试剂 11 | Anti-MMP7 抗体<br>(ab5706)                           | MMP7     | 1:200 |
| 试剂 12 | 重组 Anti-TIMP1 抗体<br>(ab109125)                     | TIMP1    | 1:300 |
| 试剂 13 | 重组 Anti-Map17 抗体<br>(ab156014)                     | PDZK1IP1 | 1:300 |
| 试剂 14 | Anti-KRT6B 抗体<br>(ab154313)                        | KRT6B    | 1:200 |

其次, 本发明还提供了一种胃组织中上述 13 个分子表达水平的免疫组化检测方法。在该检测方法的一个实施例中, 除试剂盒中包含的上述试剂外, 用户可自行配制或购买以下试剂:

- (1) 蒸馏水或去离子水;
- (2) 3% $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- (3) 二甲苯;
- (4) 75%、85%、95%酒精及无水乙醇;
- (5) 10mM TBS 溶液 (pH7.2~7.4): 三羟基氨基甲烷 1.21g, 氯化钠 7.6g, 加蒸馏水 800mL, 浓盐酸调 pH 值至 7.2~7.4, 最后定容至 1000mL;
- (6) 10mM pH6.0 柠檬酸缓冲液: 柠檬酸 0.38g, 柠檬酸三钠 2.45g, 加蒸馏水 900mL, 浓盐酸调 pH 值至 6.0, 最后定容至 1000mL;
- (7) 苏木精溶液;
- (8) 中性树脂。

## 实施例 1

为了验证本发明在辅助早期诊断胃癌前病变以及消化系统肿瘤、预测胃癌复发风险的作用，本发明人分别独立地对胃癌前病变、胃早癌、胃癌复发、其他消化系统肿瘤（肠癌、食管癌和胰腺癌）及其癌前病变典型病例进行了分析。

### 胃癌前病变极早期细胞的诊断

首先，发明人评估了胃癌前病变极早期细胞标志 HES6 在独立胃癌前病变样本不同类型细胞中的表达情况。结果如图 2A 所示，HES6 在胃癌前病变细胞中特异高表达。

其次，发明人评估了胃癌前病变极早期细胞标志 HES6 与晚期标志 MUC2 在独立的胃癌前病变样本中的共表达情况。结果如图 2B 所示，HES6 与 MUC2 呈互斥的表达模式，提示 HES6 所标记的细胞不在癌前病变晚期出现。

再次，发明人评估了胃癌前病变极早期细胞在非癌前病变阶段、轻度癌前病变阶段、重度癌前病变阶段以及早期癌变等四个阶段胃组织样本中的比例分布。结果如图 2C 所示，胃癌前病变极早期细胞在轻度癌前病变阶段中开始出现，并随着癌前病变程度的加深，其比例逐渐增加。

再次，依据本发明的免疫组化测试试剂盒（20）中胃癌前病变细胞标志（10）来获取 HES6 在胃癌前病变样本中的表达。该试剂盒利用免疫组化染色（IHC）来衡量标志物的表达水平。作为补充分析，发明人同时在样本中利用荧光共染了胃癌前病变经典标志 MUC2 以及细胞增殖标志 KI67。采用 10% 福尔马林缓冲液固定石蜡包埋手术样本，组织切片为 4 微米/张。

本实施例中的试剂盒，包括以下组分：

- （1）试剂 A：封闭液，为 10% 山羊血清；
- （2）试剂 B：已稀释的即用型抗 HES6 一抗；
- （4）试剂 C：抗山羊生物素化二抗；
- （5）试剂 D：链亲和素标记的 HRP；
- （6）试剂 E：20 倍浓缩 DAB 底物溶液；
- （7）试剂 F：20 倍浓缩 DAB 底物缓冲溶液；
- （8）试剂 G：20 倍浓缩 DAB 显色溶液。

根据本发明的一个具体实施例，上述试剂 B 原装进口分装即用型抗体，稀释倍数为 1：200；试剂 G 原装进口分装即用型抗体，稀释倍数为 1：400；试剂 A、C、D、E、F、G 为原装进口分装。

根据本发明的一个具体实施例，除试剂盒中包含的上述试剂，用户可自行配制或购买以下试剂：

- （1）蒸馏水或去离子水；
- （2）3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>；
- （3）二甲苯；
- （4）75%、85%、95% 酒精及无水乙醇；

(5) 10mM TBS 溶液 (pH7.2~7.4): 三羟基氨基甲烷 1.21g, 氯化钠 7.6g, 加蒸馏水 800mL, 浓盐酸调 pH 值至 7.2~7.4, 最后定容至 1000mL;

(6) 10mM pH6.0 柠檬酸缓冲液: 柠檬酸 0.38g, 柠檬酸三钠 2.45g, 加蒸馏水 900mL, 浓盐酸调 pH 值至 6.0, 最后定容至 1000mL;

(7) 苏木精溶液;

(8) 中性树脂。

利用上述试剂盒检测组织中标志物的表达:

(1) 组织包埋: 10%的中性福尔马林固定待测组织标本 2h, 用流水反复冲洗以去除固定液, 将标本放置入 75%酒精过夜, 然后采用酒精梯度脱水, 75%酒精 1h, 85%酒精 1h, 95%酒精 1h, 无水乙醇 2 次, 每次 1.5h, 然后置于二甲苯中浸泡 1.5h, 60℃烘箱中浸蜡 1h 包埋, 冷却后 4℃保存备用;

(2) 石蜡切片: 修整蜡块, 调整切片机 (SLEE 石蜡切片机 CUT5062) 将切片厚度设为 3~4 μm, 连续切片, 置于 60℃温水漂浮展平, 平铺于涂有阳离子树脂的载玻片上;

(3) 烤片: 将待做切片置于切片架上, 于 60℃恒温烤箱中至少烤 1h;

(4) 脱蜡: 切片放入盛有二甲苯的容器中脱蜡 3 次 (即二甲苯 I、II、III), 每次 10 min;

(5) 水化: 切片经下行酒精水化, 无水乙醇 5min, 95%乙醇 2 次 (每次 2min), 85%乙醇 2 min; 75%乙醇 2min, 蒸馏水冲洗 1 分钟;

(6) 抗原修复: 高压锅中加入柠檬酸缓冲液 1000ml, 将装有切片的切片架浸入缓冲液中, 高温高压修复 2 分 45 秒, 用 TBS 洗涤 3 次, 每次 2min;

(7) 3% $H_2O_2$  滴加在切片上, 室温静置 15min, TBS 洗涤 3 次, 每次 2min;

(8) 封闭: 滴加试剂 A 于切片上, 需完全覆盖组织切片, 室温孵育 10 min 后吸干液体, 无需冲洗;

(9) 加一抗: 不同的切片分别滴加试剂 B (抗 Hes6 一抗), 需完全覆盖组织切片, 37℃湿盒孵育 2 hr 或 4℃过夜;

(10) 洗涤: TBS-T 洗涤 (3×5 min);

(11) 加二抗: 试剂 C (滴加生物素化二抗), 需完全覆盖组织切片, 37℃湿盒中孵育 30 min;

(12) 洗涤: TBS 洗涤 3 次, 每次 5 min;

(13) 加 HRP-SA: 滴加试剂 D (链亲和素标记的 HRP), 需完全覆盖组织切片, 37℃湿盒中孵育 30 min;

(14) 洗涤: TBS 洗涤 3 次, 每次 5 min;

(15) 制备 DAB 显色液: 需现用现配, 以染一张切片为例, 取 2.5ul 试剂 E 加入到 50ul 蒸馏水中并混匀, 再分别向上述液体中加入 2.5ul 试剂 F 及 2.5ul 试剂 G, 混匀;

(16) 显色：滴加上述 DAB 显色液于切片上，需完全覆盖组织切片，显微镜下观察显色，蒸馏水冲洗终止显色；

(17) 复染：苏木精复染 3min，盐酸酒精分化；

(18) 封片：75%酒精浸泡 2min，85%酒精浸泡 2min，95%酒精浸泡 2min，无水乙醇浸泡 2min，然后置于二甲苯中浸泡 15min，更换二甲苯后再浸泡 15min，中性树脂封片；

(19) 结果判读：显微镜下观察染色的待测组织切片，阳性结果成棕黄色颗粒样染色，随机选择 5 个高倍视野 (10\*40) 估计阳性细胞比例。

图 2D 展示了细胞标志 HES6 在正常胃组织、癌前病变胃组织中的表达情况。可以看出，在正常胃组织中 HES6 阳性细胞占比为 0，而在胃癌前病变中其比例增加到 10%。

最后，作为进一步的实施例材料，图 2E 和图 2F 分别展示了在独立的癌前病变样本中细胞标志 HES6 与经典的胃癌前病变标志 MUC2 以及增值细胞标志 KI67 之间共表达模式。。从图 2E 中可以看出，HES6 与胃癌前病变经典标志 MUC2 部分共表达；而从图 2F 中可以看出，HES6 在组织中环绕在增值细胞标志 KI67 周围。因此可以认为 HES6 阳性细胞即为胃癌前病变早期阶段细胞。

### 胃癌极早期细胞在胃组织、血液样本中的诊断

首先，发明人评估了 13 个胃癌极早期细胞标志物分子 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在独立胃早癌样本中不同细胞类型的表达情况。结果如图 3A 所示，这些细胞标志在癌细胞中特异高表达。

其次，本发明人评估了 13 个胃癌极早期细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在独立的胃炎 (19 例)、胃癌前病变 (39 例) 及胃早癌 (19 例) 样本中的表达情况。结果如图 3B 所示，这些细胞标志在胃炎中表达量显著低于异型增生阶段 (胃癌前病变) 和胃早癌阶段。将上述分子的均值表达作为一个分子标记

(signature)，发现其在胃炎-低级别异型增生-高级别异型增生-早期胃癌的转化中呈逐渐递增的变化趋势，提示上述分子在胃组织中的高表达与胃癌的发生具有密切关联，可作为评估胃癌发生风险的指标。本验证中涉及的样本数据来自于公共数据 (GSE55696)。

再次, 本发明人评估了 13 个胃癌极早期细胞标志(KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在独立的胃炎、胃癌患者血液样本中的表达情况。结果如图 3C 所示, 相比于正常对照样本, 这些细胞标志物在胃癌患者血清中的表达水平显著升高。将上述分子的均值表达水平作为分子标记(signature), 发现其数值相比正常样本, 在癌症样本中也显著升高。提示上述分子在血清中的高表达也与胃癌的发生具有密切关联, 也可作为评估胃癌发生风险的指标。本验证涉及的样本数据来自于公共数据 (GSE64916)。

## 实施例 2

本发明人依据本发明的免疫组化测试试剂盒 (20) 中胃癌前病变细胞标志 (11) 来获取早癌细胞标志中五个代表性成分 (KLK10、KRT17、TIMP1、MAP17 和 KLK6) 在正常胃组织、胃癌前病变、早期癌变以及进展期癌变中的表达。该试剂盒利用免疫组化染色 (IHC) 来衡量标志物的表达水平。采用 10% 福尔马林缓冲液固定石蜡包埋手术样本, 组织切片为 4 微米/张。

本实施例中的试剂盒, 包括以下组分:

- (1) 试剂 A: 封闭液, 为 10% 山羊血清;
- (2) 试剂 B: 已稀释的即用型抗 Klk10 一抗 (也可以是 Table 1 中 KRT17, TIMP1, MAP17 以及 KLK6 抗体的任意一只);
- (4) 试剂 C: 抗山羊生物素化二抗;
- (5) 试剂 D: 链亲和素标记的 HRP;
- (6) 试剂 E: 20 倍浓缩 DAB 底物溶液;
- (7) 试剂 F: 20 倍浓缩 DAB 底物缓冲溶液;
- (8) 试剂 G: 20 倍浓缩 DAB 显色溶液。

根据本发明的一个具体实施例, 上述试剂 B 原装进口分装即用型抗体, 稀释倍数为 1: 200; 试剂 G 原装进口分装即用型抗体, 稀释倍数为 1: 400; 试剂 A、C、D、E、F、G 为原装进口分装。

除试剂盒中包含的上述试剂, 本发明人还自行配制了以下试剂 (这些试剂也可以在市场上购买到):

- (1) 蒸馏水或去离子水;
- (2) 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- (3) 二甲苯;
- (4) 75%、85%、95% 酒精及无水乙醇;
- (5) 10mM TBS 溶液 (pH7.2~7.4): 三羟基氨基甲烷 1.21g, 氯化钠 7.6g, 加蒸馏水 800mL, 浓盐酸调 pH 值至 7.2~7.4, 最后定容至 1000mL;

(6) 10mM pH6.0 柠檬酸缓冲液: 柠檬酸 0.38g, 柠檬酸三钠 2.45g, 加蒸馏水 900mL, 浓盐酸调 pH 值至 6.0, 最后定容至 1000mL;

(7) 苏木精溶液;

(8) 中性树脂。

利用上述试剂盒检测组织中标志物的表达:

(1) 组织包埋: 10%的中性福尔马林固定待测组织标本 2h, 用流水反复冲洗以去除固定液, 将标本放置入 75%酒精过夜, 然后采用酒精梯度脱水, 75%酒精 1h, 85%酒精 1h, 95%酒精 1h, 无水乙醇 2 次, 每次 1.5h, 然后置于二甲苯中浸泡 1.5h, 60℃烘箱中浸蜡 1h 包埋, 冷却后 4℃保存备用;

(2) 石蜡切片: 修整蜡块, 调整切片机(SLEE 石蜡切片机 CUT5062) 将切片厚度设为 3~4 μm, 连续切片, 置于 60℃温水漂浮展平, 平铺于涂有阳离子树脂的载玻片上;

(3) 烤片: 将待做切片置于切片架上, 于 60℃恒温烤箱中至少烤 1h;

(4) 脱蜡: 切片放入盛有二甲苯的容器中脱蜡 3 次(即二甲苯 I、II、III), 每次 10 min;

(5) 水化: 切片经下行酒精水化, 无水乙醇 5min, 95%乙醇 2 次(每次 2min), 85%乙醇 2 min; 75%乙醇 2min, 蒸馏水冲洗 1 分钟;

(6) 抗原修复: 高压锅中加入柠檬酸缓冲液 1000ml, 将装有切片的切片架浸入缓冲液中, 高温高压修复 2 分 45 秒, 用 TBS 洗涤 3 次, 每次 2min;

(7) 3% $H_2O_2$  滴加在切片上, 室温静置 15min, TBS 洗涤 3 次, 每次 2min;

(8) 封闭: 滴加试剂 A 于切片上, 需完全覆盖组织切片, 室温孵育 10 min 后吸干液体, 无需冲洗;

(9) 加一抗: 不同的切片分别滴加试剂 B, 需完全覆盖组织切片, 37℃湿盒孵育 2 hr 或 4℃过夜;

(10) 洗涤: TBS-T 洗涤 (3×5 min);

(11) 加二抗: 试剂 C (滴加生物素化二抗), 需完全覆盖组织切片, 37℃湿盒中孵育 30 min;

(12) 洗涤: TBS 洗涤 3 次, 每次 5 min;

(13) 加 HRP-SA: 滴加试剂 D (链亲和素标记的 HRP), 需完全覆盖组织切片, 37℃湿盒中孵育 30 min;

(14) 洗涤: TBS 洗涤 3 次, 每次 5 min;

(15) 制备 DAB 显色液: 需现用现配, 以染一张切片为例, 取 2.5ul 试剂 E 加入到 50ul 蒸馏水中并混匀, 再分别向上述液体中加入 2.5ul 试剂 F 及 2.5ul 试剂 G, 混匀;

(16) 显色: 滴加上述 DAB 显色液于切片上, 需完全覆盖组织切片, 显微镜下观察显色, 蒸馏水冲洗终止显色;

(17) 复染：苏木精复染 3min，盐酸酒精分化；

(18) 封片：75%酒精浸泡 2min，85%酒精浸泡 2min，95%酒精浸泡 2min，无水乙醇浸泡 2min，然后置于二甲苯中浸泡 15min，更换二甲苯后再浸泡 15min，中性树脂封片；

(19) 结果判读：显微镜下观察染色的待测组织切片，阳性结果成棕黄色颗粒样染色，随机选择 5 个高倍视野 (10\*40) 估计阳性细胞比例。

如图 3D 展示了胃癌极早期细胞中五个代表性标志分子 (KLK10、KRT17、TIMP1、MAP17 和 KLK6) 在正常胃组织、异型增生 (胃癌前病变) 以及早期胃癌的表达情况。其中，在胃癌前病变中依据上述代表性标志分子所识别出的胃癌极早期细胞用圆圈圈了出来。可以看出，胃癌极早期细胞开始出现于异型增生阶段，并在早癌中继续存在。

进而，利用本发明的早期诊断系统中胃癌前病变及早癌细胞计数装置 (32)，计算了在各个阶段中胃癌极早期细胞的含量。如图 3E 展示了胃癌极早期细胞典型标志 (KLK10) 所标记的阳性细胞在胃癌前病变、早期胃癌以及进展期胃癌中的比例分布。可以看出 KLK10 阳性细胞未出现在胃癌前病变阶段样本，而在早期胃癌样本中其比例为 5%，在进展期样本中其比例增加到 35%。

### 胃癌极早期细胞标志物分子在评估胃癌术后复发风险中的应用

发明人评估了胃癌极早期细胞标志物中的代表性成分 (KLK10、SLC11A2、KLK7 和 TIMP1) 与胃癌术后复发风险的关联。这些数据来源于 431 例记录术后复发时间信息的胃癌患者。结果如图 4 所示，上述细胞标志物与胃癌术后复发生存风险呈显著相关 ( $p < 0.05$ )。将胃癌极早期细胞标志物分子在样本中的均值表达量作为一个分子标记 (signature)，发现其也与胃癌的术后复发呈显著相关 ( $p < 0.01$ )，提示了该胃癌极早期细胞标志物可作为评估胃癌复发风险的标志物。本验证中涉及的样本数据来自于公共数据 (TCGA)。

### 胃癌极早期细胞标志物分子在评估胰腺癌、肠癌以及食管癌风险中的应用

本发明人还验证了胃癌极早期细胞标志物分子 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在评估消化系统其他器官 (胰腺、食管以及肠) 从癌前病变向癌症转化风险的应用。

1. 胃癌极早期细胞标志物分子在评估肠癌风险中的应用。本发明人评估了 13 个胃癌极早期细胞标志物 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1

和 KRT6B) 在独立的正常肠组织 (38 例)、癌前病变 (29 例) 及肠癌 (27 例) 样本中的表达情况。结果如图 5A 所示, 这些胃癌极早期细胞标志在正常肠组织中的表达量显著低于异型增生阶段 (肠癌前病变) 和肠癌阶段 ( $p < 0.05$ )。将上述分子在样本中表达量的均值作为分子标记

(signature), 发现其在正常肠-低级别异型增生-高级别异型增生-肠癌的转化过程中呈逐渐递增的变化趋势, 提示上述分子在肠组织中的高表达与肠癌的发生具有密切关联, 可作为评估肠癌发生风险的指标。本验证中涉及的样本数据来自于公共数据 (GSE37364)。

## 2. 胃癌极早期细胞标志物分子在评估食管癌风险中的应用。

其次, 本发明人评估了 13 个胃癌极早期细胞标志 (KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B) 在独立的正常食管 (5 例)、癌前病变 (4 例) 及食管癌 (3 例) 样本中的表达情况。结果如图 5B 所示, 这些胃癌极早期细胞标志在正常食管中的表达量低于异型增生阶段 (癌前病变) 和食管癌阶段。提示上述分子在食管中的高表达与食管癌的发生具有密切关联, 可作为评估食管癌发生风险的指标。本验证中涉及的样本数据来自于公共数据 (GSE19529)。

## 3. 胃癌极早期细胞标志中代表性分子在评估胰腺癌风险中的应用。

本发明人评估了胃癌极早期细胞标志中代表性分子 (ECM1、KRT17、TIMP1 和 MMP7) 在独立的正常胰腺 (8 例)、上皮内瘤变 (6 例) 及胰腺癌 (12 例) 样本中的表达情况。结果如图 5C 所示, 这些胃癌极早期细胞代表性标志物分子在正常胰腺组织中的表达量显著低于在上皮内瘤变阶段 (癌前病变) 和胰腺癌中。将上述分子的均值表达作为一个分子标志 (signature), 发现其在正常胰腺-胰腺上皮内瘤变-胰腺癌的转化过程中呈逐渐递增的变化趋势, 提示上述分子在胰腺组织中的高表达与胰腺癌的发生具有密切关联, 可作为评估胰腺癌发生风险的指标。本验证中涉及的样本数据来自于公共数据 (GSE43288)。

## 参考文献:

1. de Vries AC, van Grieken NCT, Looman CWN, Casparie MK, de Vries E, Meijer GA, Kuipers EJ. (2008) Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: A nationwide cohort study in the Netherlands. GASTROENTEROLOGY, 134, 945-952.
2. ITOH H, OOHATA Y, NAKAMURA K, NAGATA T, MIBU R, NAKAYAMA F. (1989) COMPLETE 10-YEAR POSTGASTRECTOMY FOLLOW-UP OF EARLY GASTRIC-CANCER. AMERICAN JOURNAL OF SURGERY, 158, 14-16.

## 权利要求书

1、检测标志物的表达水平的试剂在制备确定胃癌极早期细胞含量从而确定极早期胃癌的产品中应用，其中所述标志物包括从由 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 组成的组中选出的至少一种。

2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：  
所述试剂利用免疫组化染色或酶联免疫吸附来衡量所述标志物的表达水平。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于：  
所述产品是从芯片、制剂、试剂盒中选出的一种。

4、一种用于确定胃癌极早期细胞含量的产品，其特征在于，所述产品包括检测样本中标志物表达水平的试剂，其中所述标志物包括从由 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 组成的组中选出的至少一种。

5、根据权利要求 4 所述的产品，其特征在于所述产品是从芯片、制剂、试剂盒中选出的一种。

6、检测标志物的表达水平的试剂在制备用于消化系统肿瘤的辅助极早期诊断的产品中应用，其中所述标志物包括从由 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 组成的组中选出的至少一种。

7、根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于：  
所述试剂利用免疫组化染色来衡量所述标志物的表达水平。

8、根据权利要求 6 或 7 所述的应用，其特征在于：  
所述产品是从芯片、制剂、试剂盒中选出的一种。

9、一种用于消化系统肿瘤的辅助极早期诊断的产品，其特征在于：  
所述产品包括检测样本中标志物表达水平的试剂，其中所述标志物

包括从由 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 组成的组中选出的至少一种。

10、根据权利要求 9 所述的产品，其特征在于所述试剂利用免疫组化染色来衡量所述标志物的表达水平。

11、根据权利要求 9 或 10 所述的应用，其特征在于：  
所述产品是从芯片、制剂、试剂盒中选出的的一种。

12、检测 HES6 表达水平的试剂在制备确定胃癌前病变水平的产品中应用。

13、根据权利要求 12 所述的应用，其特征在于：  
所述试剂利用免疫组化染色或酶联免疫吸附来衡量 HES6 的表达水平。

14、根据权利要求 12 或 13 所述的应用，其特征在于：  
所述产品是从芯片、制剂、试剂盒中选出的的一种。

15、一种用于确定胃癌前病变水平的产品，其特征在于所述产品包括检测样本中 HES6 表达水平的试剂。

16、根据权利要求 15 所述的产品，其特征在于：  
所述试剂利用免疫组化染色或酶联免疫吸附来衡量 HES6 的表达水平。

17、根据权利要求 15 或 16 所述的产品，其特征在于所述产品是从芯片、制剂、试剂盒中选出的的一种。

18、检测标志物的表达水平的试剂在制备用于辅助评估胃癌复发风险的产品中应用，其中所述标志物包括从由 KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1 和 KRT6B 组成的组中选出的至少一种。

19、根据权利要求 18 所述的应用，其特征在于：  
所述试剂利用免疫组化染色来衡量所述标志物的表达水平。

20、根据权利要求 18 或 19 所述的应用，其特征在于：  
所述产品是从芯片、制剂、试剂盒中选出的的一种。

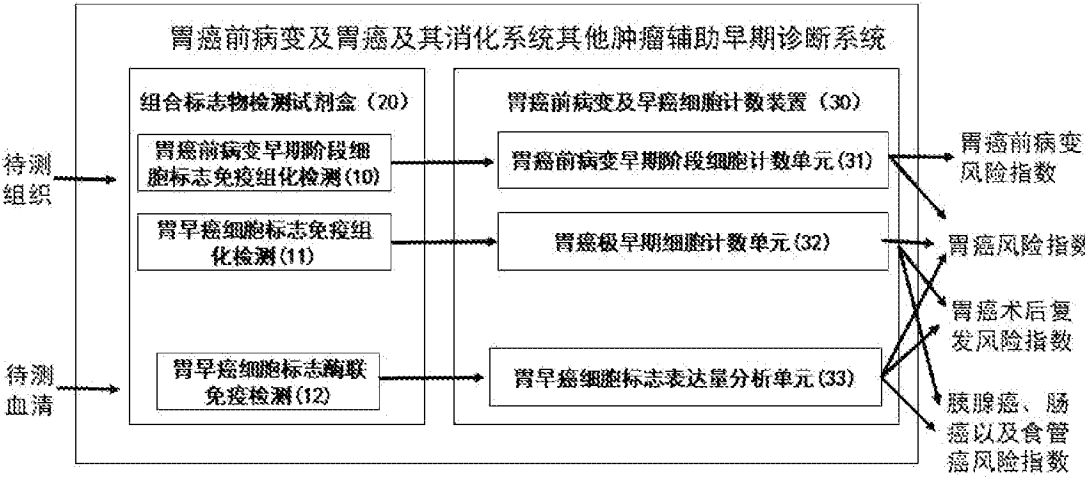


图 1

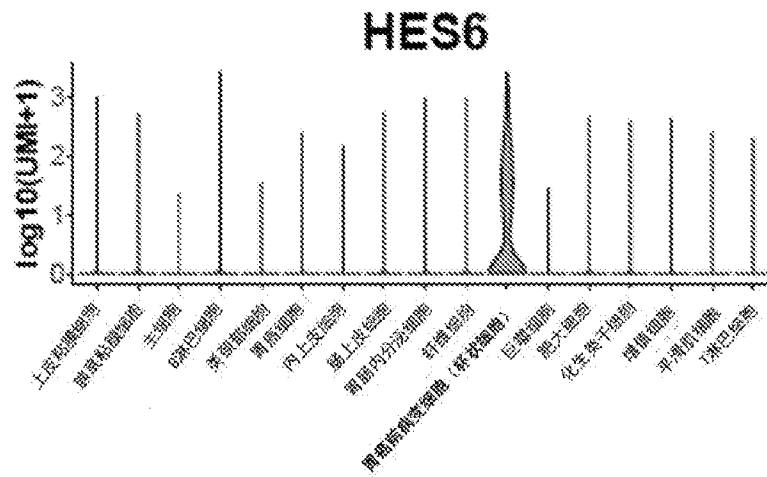


图 2A

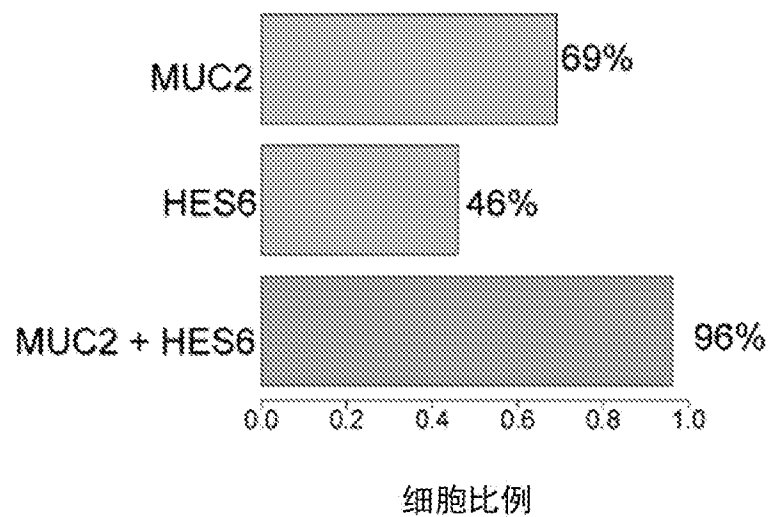


图 2B

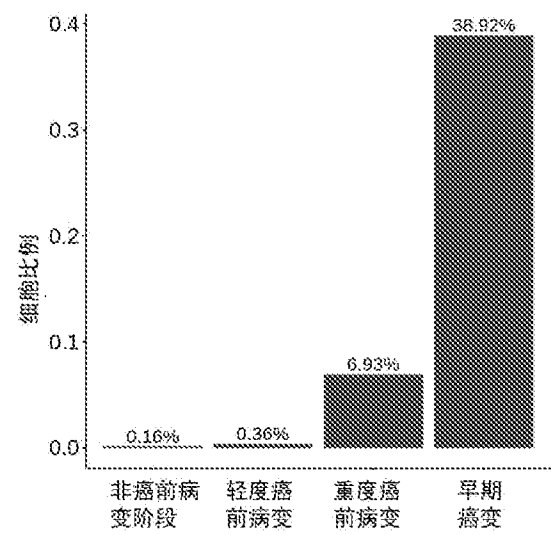


图 2C

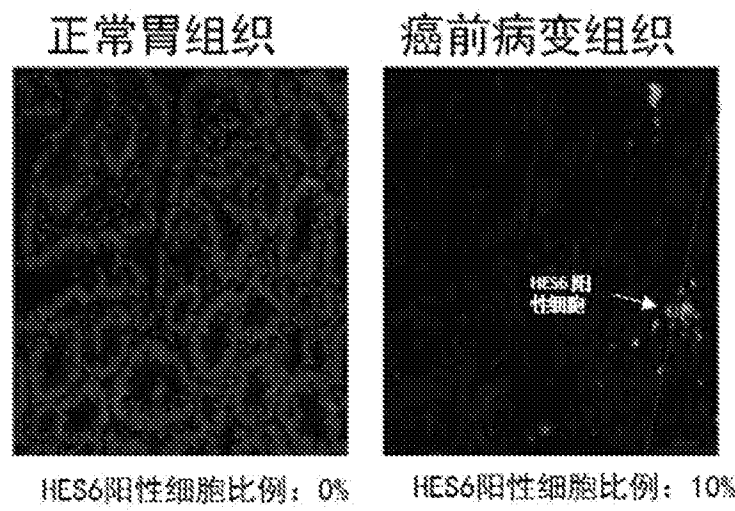


图 2D

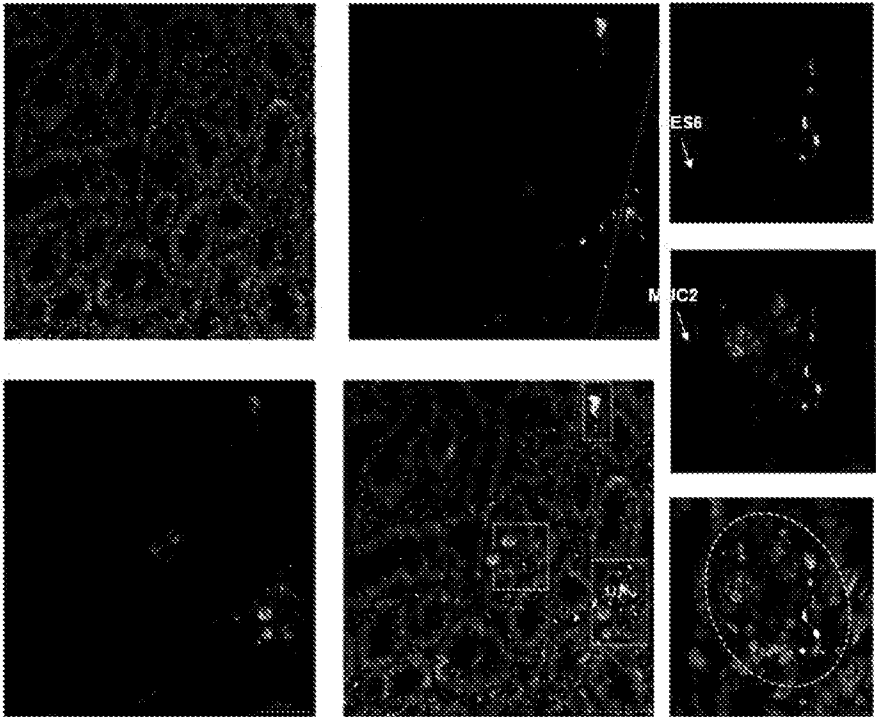


图 2E

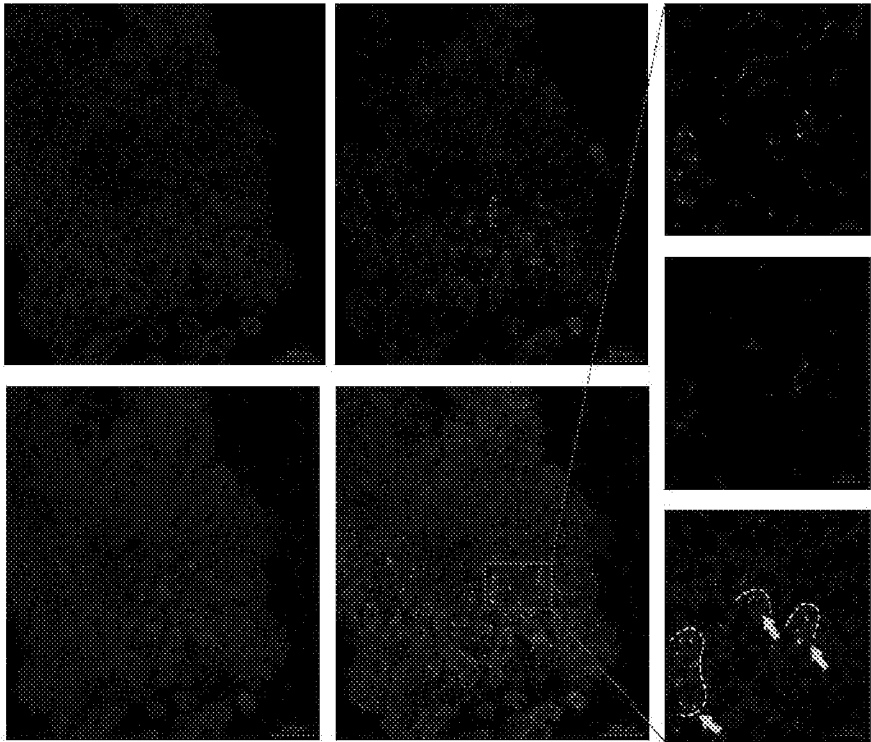


图 2F

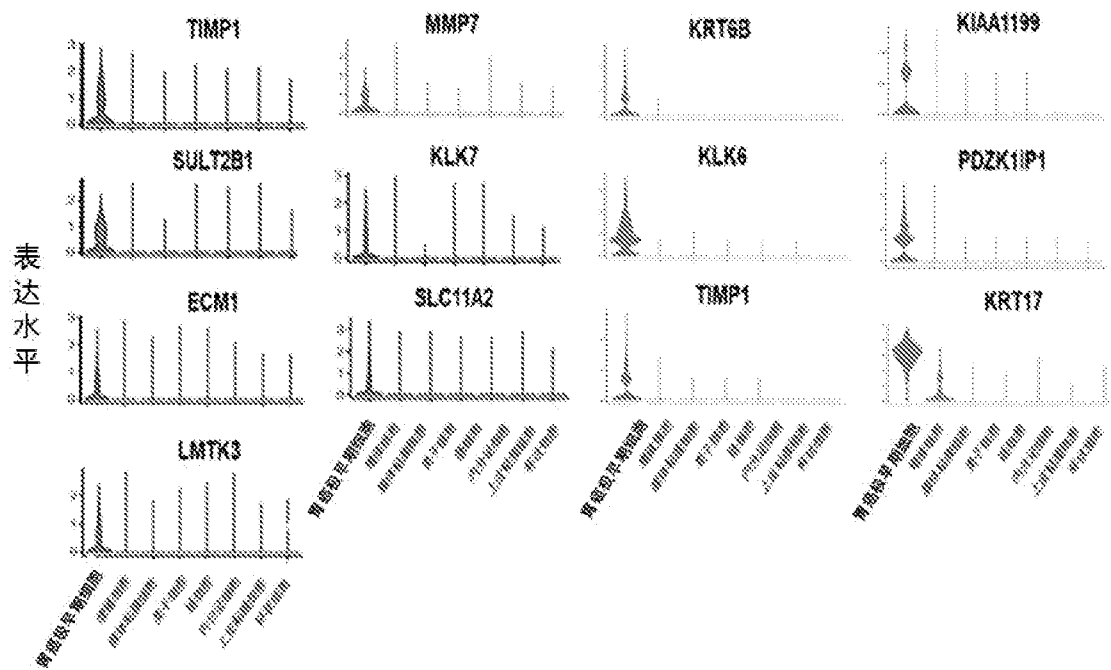


图 3A

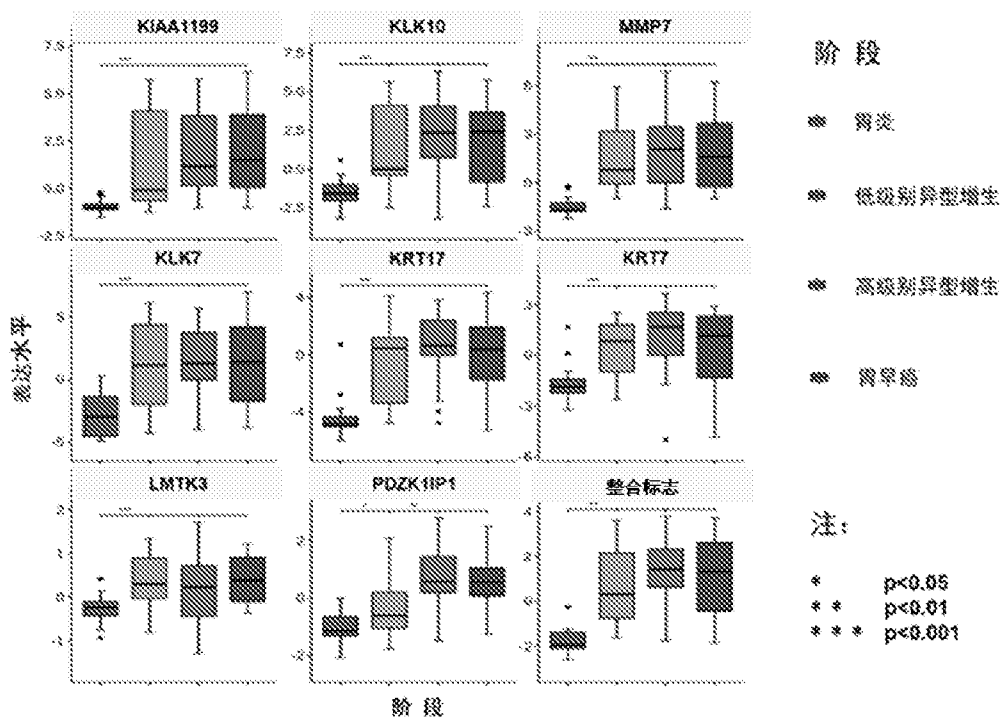


图 3B

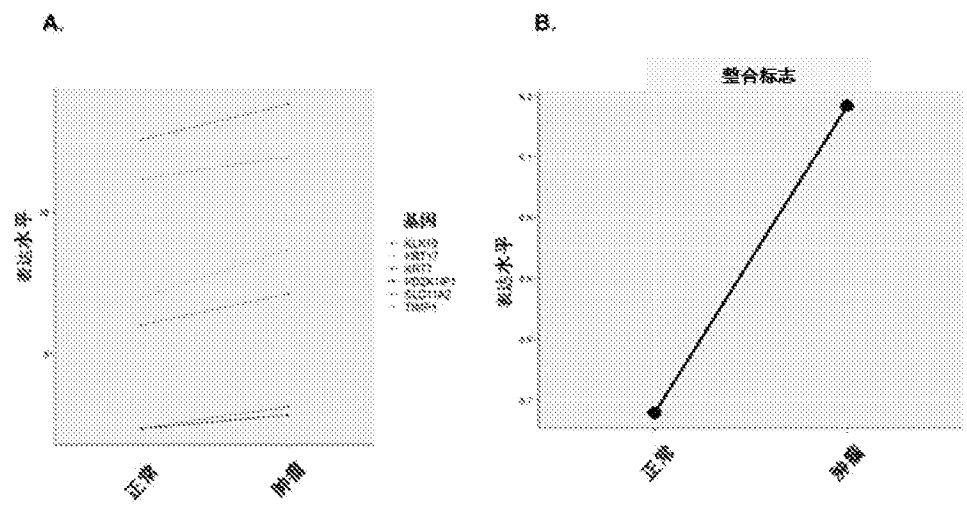


图 3C

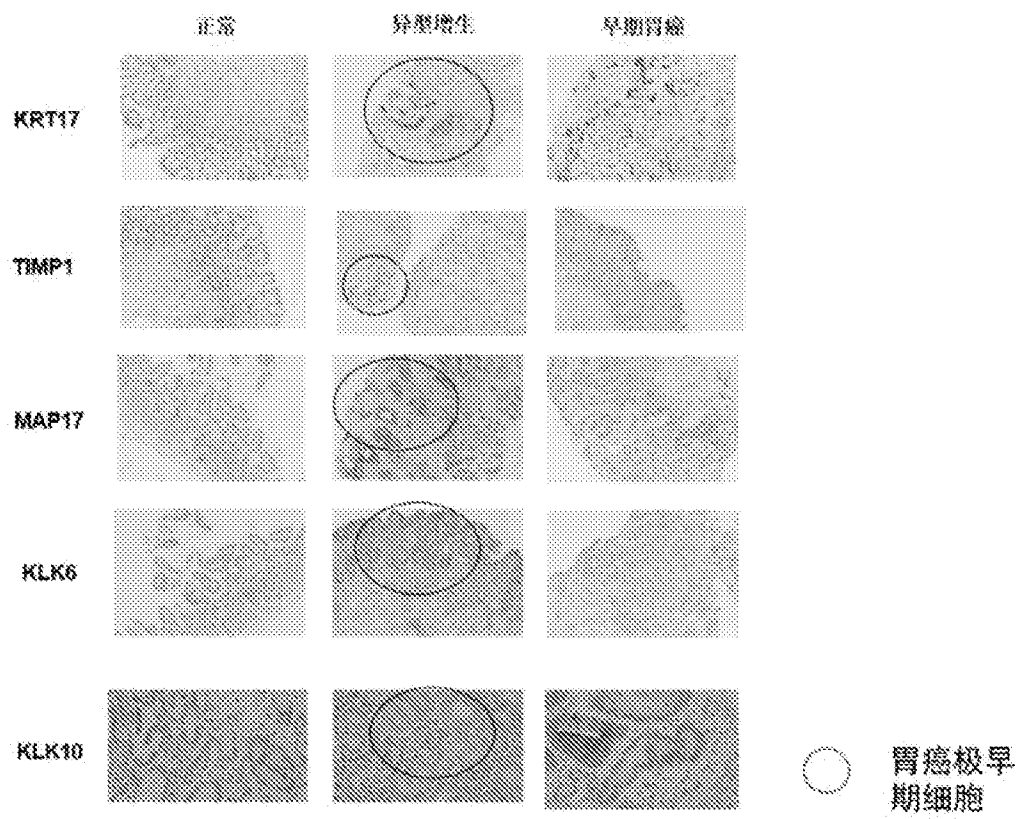


图 3D

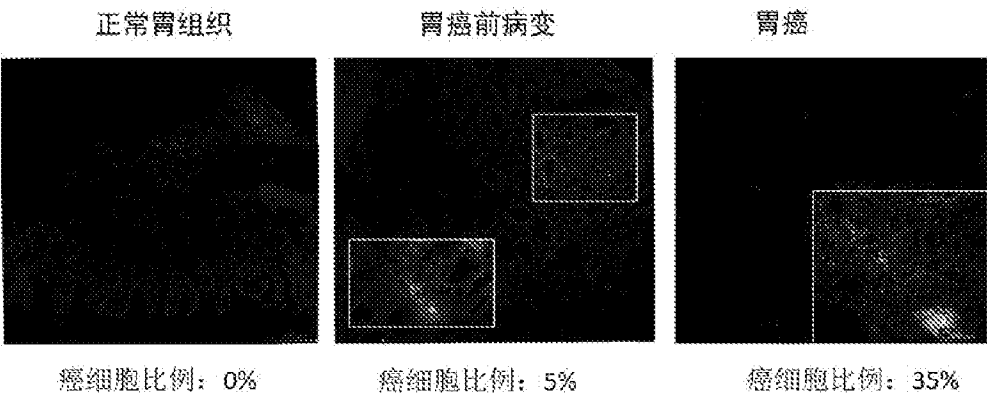


图 3E

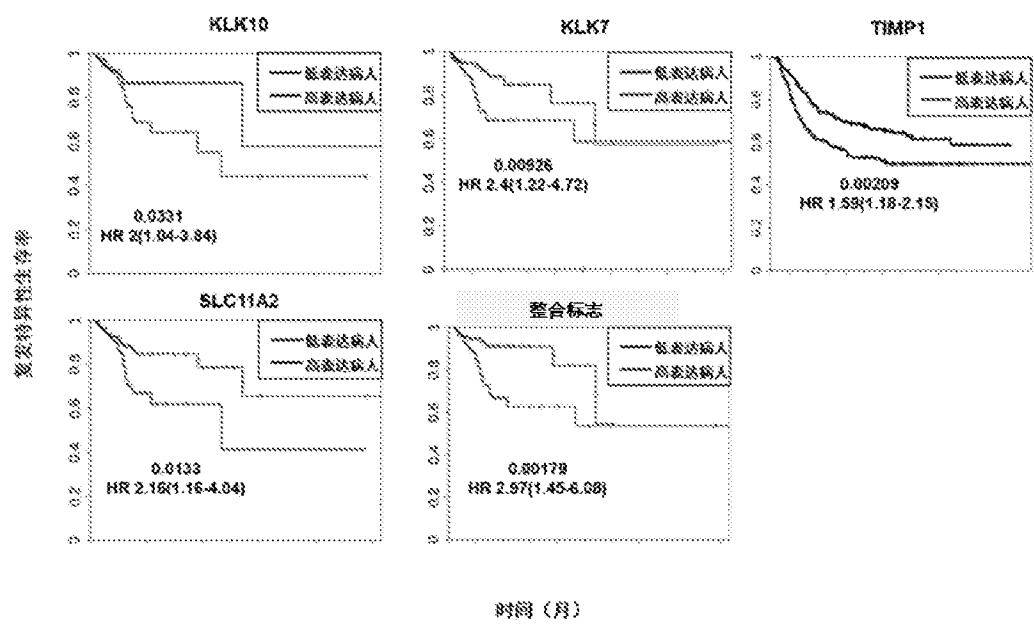


图 4

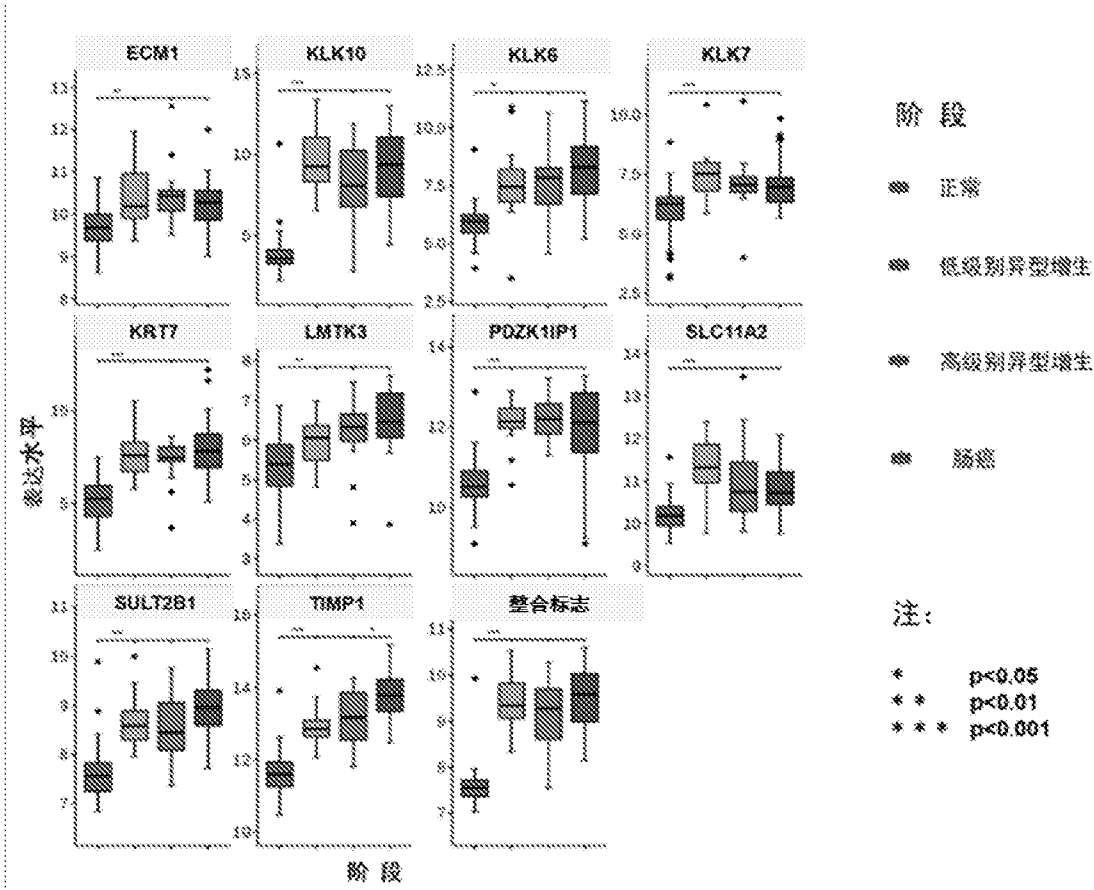


图 5A

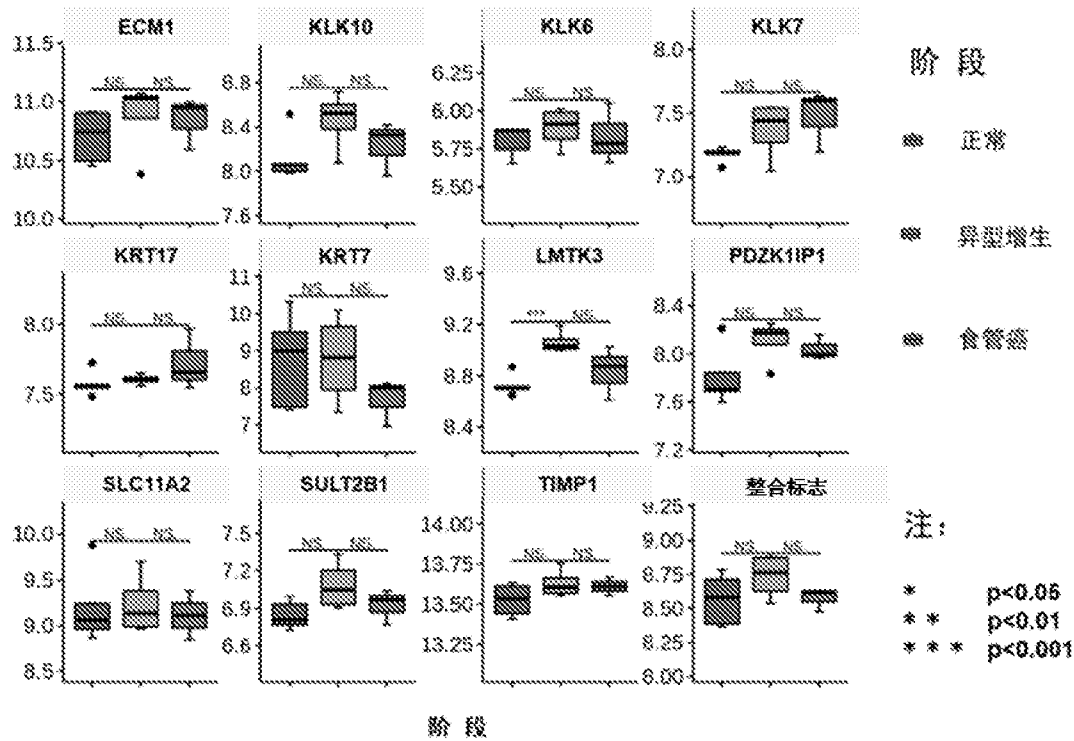


图 5B

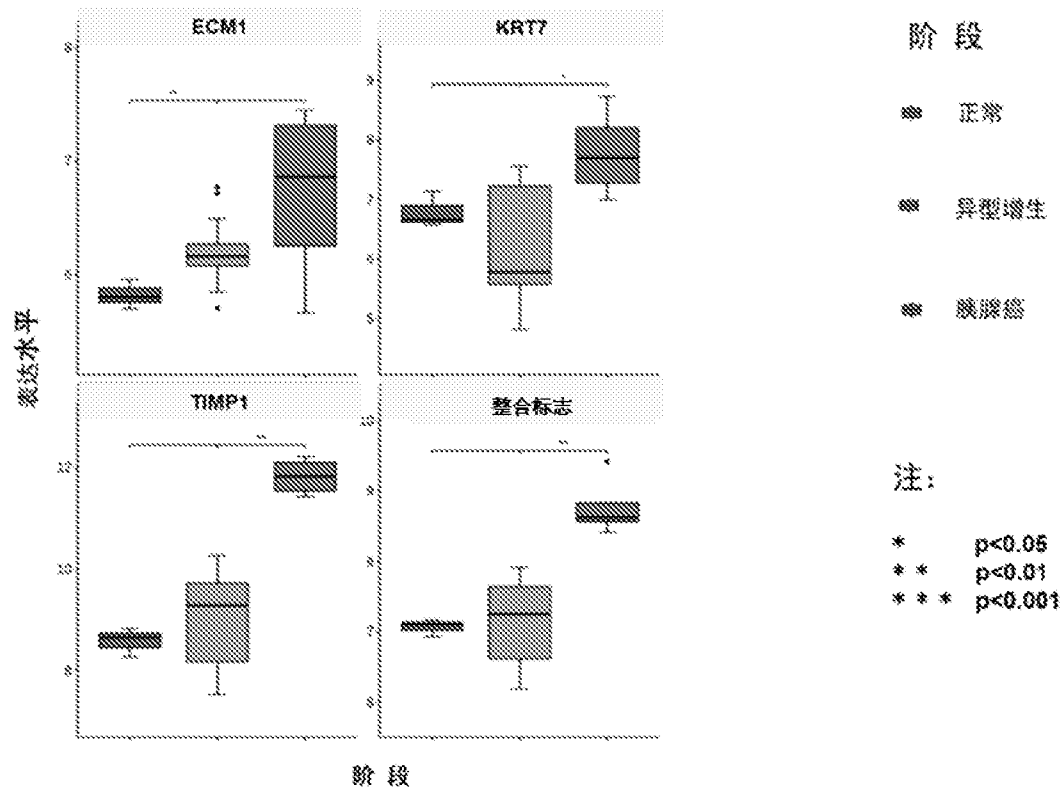


图 5C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/083410

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

G01N 33/574(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)

G01N33

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)

CNABS; CNTXT; VEN; USTXT; EPTXT; WOTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE; Elsevier Science; 李梢, 胃癌, 消化系统, KLK10, SLC11A2, SULT2B1, KLK7, ECM1, LMTK3, KLK6, KIAA1199, KRT17, MMP7, TIMP1, TIMP-1, PDZK1IP1, KRT6B, stomach, gastric, early

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | Peng Zhang et al. "A comprehensive analysis of single-cell transcriptome network underlying gastric premalignant lesions and early gastric cancer"<br><i>BioRxiv</i> , 05 November 2018 (2018-11-05),<br>摘要、单细胞转录谱识别特异标记早期胃癌细胞的特征节 (Non-official translation: Abstract: Characteristics of Single-Cell Transcriptome Recognition-Specific Marker for Early Gastric Cancer Cells) | 1-20                  |
| X         | JP 2008118915 A (NISHIO KAZUTO et al.) 29 May 2008 (2008-05-29)<br>abstract                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-11, 18-20           |
| X         | CN 105572354 A (RAYBIOTECH INC., GUANGZHOU) 11 May 2016 (2016-05-11)<br>description, paragraphs [0005]-[0019]                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1-11, 18-20           |
| X         | WO 2010100899 A1 (GENESCENCE CO LTD et al.) 10 September 2010 (2010-09-10)<br>abstract                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-11, 18-20           |
| X         | Noritaka Oyama et al. "The Extracellular Matrix Protein 1 (ECM1) in Skin Biology: An Update for the Pleiotropic Action"<br><i>The Open Dermatology Journal</i> , Vol. 7, 28 August 2013 (2013-08-28),<br>ISSN: 1874-3722,<br>page 37 left-hand column paragraph 4                                                                                                                | 1-11, 18-20           |



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

31 May 2020

Date of mailing of the international search report

28 June 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/083410

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                       |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
| X                                      | 朱雅碧 等 (ZHU, Yabi et al.). "KIAA1199基因在人胃癌组织中表达的意义 (Non-official translation: Importance of KIAA1199 Gene Expression in Human Gastric Cancer)"<br><i>国际消化病杂志 (International Journal of Digestive Diseases)</i> ,<br>Vol. 36, No. 5, 25 October 2016 (2016-10-25),<br>ISSN: 1673-534X,<br>page 307 left-hand column paragraph 1 | 1-11, 18-20           |
| X                                      | Andrea Grin MD et al. "Evaluation of human tissue kallikrein-related peptidases 6 and 10 expression in early gastroesophageal adenocarcinoma"<br><i>Human Pathology</i> , Vol. 46, No. 4, 30 April 2015 (2015-04-30),<br>ISSN: 0046-8177,<br>abstract                                                                         | 1-11, 18-20           |
| X                                      | Mihaela Chivu-Economescu et al. "Knockdown of KRT17 by siRNA induces antitumoral effects on gastric cancer cells"<br><i>Gastric Cancer</i> , Vol. 20, No. 6, 15 March 2017 (2017-03-15),<br>ISSN: 1436-3305,<br>abstract                                                                                                      | 1-11, 18-20           |
| X                                      | Carla Oliveira et al. "Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management"<br><i>The Lancet Oncology</i> , Vol. 16, No. 2, 28 February 2015 (2015-02-28),<br>ISSN: 1470-2045,<br>abstract                                                                                            | 1-11, 18-20           |
| X                                      | Gangshi Wang et al. "Comparison of Global Gene Expression of Gastric Cardia and Noncardia Cancers from a High-Risk Population in China"<br><i>PLOS ONE</i> , Vol. 8, No. 5, 22 May 2013 (2013-05-22),<br>ISSN: 1932-6203,<br>section 5                                                                                        | 1-11, 18-20           |
| X                                      | Wen Chen et al. "Overexpression of SULT2B1b Promotes Angiogenesis in Human Gastric Cancer"<br><i>Cellular Physiology and Biochemistry</i> , Vol. 38, No. 3, 04 March 2016 (2016-03-04),<br>ISSN: 1421-9778,<br>abstract                                                                                                       | 1-11, 18-20           |
| A                                      | Gui-Feng Zhuang et al. "Expression level and clinical significance of KLK7 and E-CAD in gastric cancer"<br><i>Journal of Hainan Medical University</i> , Vol. 23, No. 6, 24 March 2017 (2017-03-24),<br>abstract                                                                                                              | 1-11, 18-20           |

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Claim 1 relates to an application of a reagent which detects a marker expression level in preparing a product which determines a gastric cancer very early cell content and thus determines very early gastric cancer. Claim 4 relates to a product used for determining a gastric cancer very early cell content. Claim 6 relates to an application of a reagent which detects a marker expression level in preparing a product used for digestive system tumour assisted very early diagnosis. Claim 9 relates to a product used for digestive system tumour assisted very early diagnosis. Claim 18 relates to an application of a reagent which detects a marker expression level in preparing a product used for assisted assessment of gastric cancer recurrence risk. The above claims all comprise at least one marker selected from the group composed of KLK10, SLC11A2, SULT2B1, KLK7, ECM1, LMTK3, KLK6, KIAA1199, KRT17, MMP7, TIMP1, PDZK1IP1 and KRT6B. Therefore, the above claims include multiple parallel technical solutions comprising only one marker and comprising any combination of different markers. However, the technical solutions which do not include the same markers lack a same or corresponding special technical feature that defines a contribution which the inventions make over the prior art, are not technically linked, do not belong to a single general inventive concept, and therefore do not satisfy the requirement of unity of invention in the sense of PCT Rule 13.1.
- [2] Claim 12 relates to an application of a reagent which detects an HES6 expression level in preparing a product which determines a gastric precancerous lesion level. Claim 15 relates to a product used for determining a gastric precancerous lesion level. Claims 12 and 15 do not share a same or corresponding technical feature with claims 1, 4, 6, 9 and 18, and said claims also lack a special technical feature that defines a contribution which the inventions make over the prior art, are not technically linked, do not belong to a single general inventive concept, and therefore do not satisfy the requirement of unity of invention in the sense of PCT Rule 13.1.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/083410**

| Patent document<br>cited in search report |            |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |            |   | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|------------|----|--------------------------------------|-------------------------|------------|---|--------------------------------------|
| JP                                        | 2008118915 | A  | 29 May 2008                          | None                    |            |   |                                      |
| CN                                        | 105572354  | A  | 11 May 2016                          | CN                      | 105572354  | B | 02 February 2018                     |
| WO                                        | 2010100899 | A1 | 10 September 2010                    | JP                      | 2012100536 | A | 31 May 2012                          |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/083410

| <b>A. 主题的分类</b><br>G01N 33/574(2006.01) i<br><br>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>B. 检索领域</b><br>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)<br>G01N33<br><br>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献<br><br>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))<br>CNABS;CNTXT;VEN;USTXT;EPTXT;WOTXT;CNKI;WEB OF SCIENCE;Elsevier Science:李梢, 胃癌, 消化系统, KLK10, SLC11A2, SULT2B1, KLK7, ECM1, LMTK3, KLK6, KIAA1199, KRT17, MMP7, TIMP1, TIMP-1, PDZK1IP1, KRT6B, stomach, gastric, early                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                           |                                        |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| <b>C. 相关文件</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Peng Zhang 等. "A comprehensive analysis of single-cell transcriptome network underlying gastric premalignant lesions and early gastric cancer"<br/>BioRxiv, 2018年 11月 5日 (2018 - 11 - 05),<br/>摘要、单细胞转录谱识别特异标记早期胃癌细胞的特征节</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2008118915 A (NISHIO KAZUTO 等) 2008年 5月 29日 (2008 - 05 - 29)<br/>摘要</td> <td>1-11, 18-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105572354 A (广州瑞博奥生物科技有限公司) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11)<br/>说明书第[0005]-[0019]段</td> <td>1-11, 18-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2010100899 A1 (GENESCENCE CO LTD等) 2010年 9月 10日 (2010 - 09 - 10)<br/>摘要</td> <td>1-11, 18-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Noritaka Oyama 等. "The Extracellular Matrix Protein 1 (ECM1) in Skin Biology: An Update for the Pleiotropic Action"<br/>The Open Dermatology Journal, 第7卷, 2013年 8月 28日 (2013 - 08 - 28),<br/>ISSN: 1874-3722,<br/>第37页左栏第4段</td> <td>1-11, 18-20</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                                                                                                                                           |                                        | 类 型*                                                                                                                                                                                                      | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                   | 相关的权利要求 | X | Peng Zhang 等. "A comprehensive analysis of single-cell transcriptome network underlying gastric premalignant lesions and early gastric cancer"<br>BioRxiv, 2018年 11月 5日 (2018 - 11 - 05),<br>摘要、单细胞转录谱识别特异标记早期胃癌细胞的特征节 | 1-20 | X | JP 2008118915 A (NISHIO KAZUTO 等) 2008年 5月 29日 (2008 - 05 - 29)<br>摘要 | 1-11, 18-20 | X | CN 105572354 A (广州瑞博奥生物科技有限公司) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11)<br>说明书第[0005]-[0019]段 | 1-11, 18-20 | X | WO 2010100899 A1 (GENESCENCE CO LTD等) 2010年 9月 10日 (2010 - 09 - 10)<br>摘要 | 1-11, 18-20 | X | Noritaka Oyama 等. "The Extracellular Matrix Protein 1 (ECM1) in Skin Biology: An Update for the Pleiotropic Action"<br>The Open Dermatology Journal, 第7卷, 2013年 8月 28日 (2013 - 08 - 28),<br>ISSN: 1874-3722,<br>第37页左栏第4段 | 1-11, 18-20 |
| 类 型*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                                         | 相关的权利要求                                |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Peng Zhang 等. "A comprehensive analysis of single-cell transcriptome network underlying gastric premalignant lesions and early gastric cancer"<br>BioRxiv, 2018年 11月 5日 (2018 - 11 - 05),<br>摘要、单细胞转录谱识别特异标记早期胃癌细胞的特征节    | 1-20                                   |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | JP 2008118915 A (NISHIO KAZUTO 等) 2008年 5月 29日 (2008 - 05 - 29)<br>摘要                                                                                                                                                     | 1-11, 18-20                            |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | CN 105572354 A (广州瑞博奥生物科技有限公司) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11)<br>说明书第[0005]-[0019]段                                                                                                                                        | 1-11, 18-20                            |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2010100899 A1 (GENESCENCE CO LTD等) 2010年 9月 10日 (2010 - 09 - 10)<br>摘要                                                                                                                                                 | 1-11, 18-20                            |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Noritaka Oyama 等. "The Extracellular Matrix Protein 1 (ECM1) in Skin Biology: An Update for the Pleiotropic Action"<br>The Open Dermatology Journal, 第7卷, 2013年 8月 28日 (2013 - 08 - 28),<br>ISSN: 1874-3722,<br>第37页左栏第4段 | 1-11, 18-20                            |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                           |                                        |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| <table border="0"> <tr> <td>           * 引用文件的具体类型:<br/>           "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br/>           "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br/>           "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)<br/>           "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br/>           "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         </td> <td>           "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<br/>           "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<br/>           "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<br/>           "&amp;" 同族专利的文件         </td> </tr> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                           |                                        | * 引用文件的具体类型:<br>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>"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)<br>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" 同族专利的文件 |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| * 引用文件的具体类型:<br>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>"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)<br>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" 同族专利的文件                                       |                                        |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| 国际检索实际完成的日期<br>2020年 5月 31日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                           | 国际检索报告邮寄日期<br>2020年 6月 28日             |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                           | 授权官员<br>于园园<br>电话号码 86-(0512)-88997285 |                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                     |         |   |                                                                                                                                                                                                                        |      |   |                                                                       |             |   |                                                                                    |             |   |                                                                           |             |   |                                                                                                                                                                                                                           |             |

| 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       | 朱雅碧 等. "KIAA1199基因在人胃癌组织中表达的意义"<br>国际消化病杂志, 第36卷, 第5期, 2016年 10月 25日 (2016 - 10 - 25),<br>ISSN: 1673-534X,<br>第307页左栏第1段                                                                                                             | 1-11, 18-20 |
| X       | Andrea Grin MD 等. "Evaluation of human tissue kallikrein-related peptidases<br>6 and 10 expression in early gastroesophageal adenocarcinoma"<br>Human Pathology, 第46卷, 第4期, 2015年 4月 30日 (2015 - 04 - 30),<br>ISSN: 0046-8177,<br>摘要 | 1-11, 18-20 |
| X       | Mihaela Chivu-Economescu 等. "Knockdown of KRT17 by siRNA induces antitumo-<br>ral effects on gastric cancer cells"<br>Gastric Cancer, 第20卷, 第6期, 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15),<br>ISSN: 1436-3305,<br>摘要                            | 1-11, 18-20 |
| X       | Carla Oliveira 等. "Familial gastric cancer: genetic susceptibility, patho-<br>logy, and implications for management"<br>The Lancet Oncology, 第16卷, 第2期, 2015年 2月 28日 (2015 - 02 - 28),<br>ISSN: 1470-2045,<br>摘要                     | 1-11, 18-20 |
| X       | Gangshi Wang 等. "Comparison of Global Gene Expression of Gastric Cardia and<br>Noncardia Cancers from a High-Risk Population in China"<br>PLOS ONE, 第8卷, 第5期, 2013年 5月 22日 (2013 - 05 - 22),<br>ISSN: 1932-6203,<br>第5节              | 1-11, 18-20 |
| X       | Wen Chen 等. "Overexpression of SULT2B1b Promotes Angiogenesis in Human Ga-<br>stric Cancer"<br>Cellular Physiology and Biochemistry, 第38卷, 第3期, 2016年 3月<br>4日 (2016 - 03 - 04),<br>ISSN: 1421-9778,<br>摘要                           | 1-11, 18-20 |
| A       | Gui-Feng Zhuang 等. "Expression level and clinical significance of KLK7 and<br>E-CAD in gastric cancer"<br>Journal of Hainan Medical University, 第23卷, 第6期, 2017年 3月<br>24日 (2017 - 03 - 24),<br>摘要                                   | 1-11, 18-20 |

## 第III栏

## 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 权利要求1涉及检测标志物的表达水平的试剂在制备确定胃癌极早期细胞含量从而确定极早期胃癌的产品中的应用, 权利要求4涉及一种用于确定胃癌极早期细胞含量的产品, 权利要求6涉及检测标志物的表达水平的试剂在制备用于消化系统肿瘤的辅助极早期诊断的产品中的应用, 权利要求9涉及一种用于消化系统肿瘤的辅助极早期诊断的产品, 权利要求18涉及检测标志物的表达水平的试剂在制备用于辅助评估胃癌复发风险的产品中的应用, 上述权利要求均包括标记物KLK10、SLC11A2、SULT2B1、KLK7、ECM1、LMTK3、KLK6、KIAA1199、KRT17、MMP7、TIMP1、PDZK1IP1和KRT6B组成的组中选出的至少一种, 因此上述权利要求包含: 仅包括其中一种标志物以及不同标志物的任意组合的多个并列技术方案, 而不包含相同标记物的技术方案之间不具备相同或相应的体现发明对现有技术做出贡献的特定技术特征, 技术上互不关联, 不属于一个总的发明构思, 因此不满足发明单一性的要求, 不符合PCT实施细则第13.1的规定。
- [2] 权利要求12涉及检测HES6表达水平的试剂在制备确定胃癌前病变水平的产品中的应用, 权利要求15涉及一种用于确定胃癌前病变水平的产品, 权利要求12、15与权利要求1、4、6、9、18之间不存在相同或相应的技术特征, 也就不存在体现发明对现有技术做出贡献的特定技术特征, 技术上互不关联, 不属于一个总的发明构思, 因此不满足发明单一性的要求, 不符合PCT实施细则第13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求, 具体地说, 是权利要求:
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

## 对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/083410

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | 公布日<br>(年/月/日)            |
|-------------|------------|----|----------------|------|---------------------------|
| JP          | 2008118915 | A  | 2008年 5月 29日   | 无    |                           |
| CN          | 105572354  | A  | 2016年 5月 11日   | CN   | 105572354 B 2018年 2月 2日   |
| WO          | 2010100899 | A1 | 2010年 9月 10日   | JP   | 2012100536 A 2012年 5月 31日 |