

(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  
2023 年 11 月 30 日 (30.11.2023)

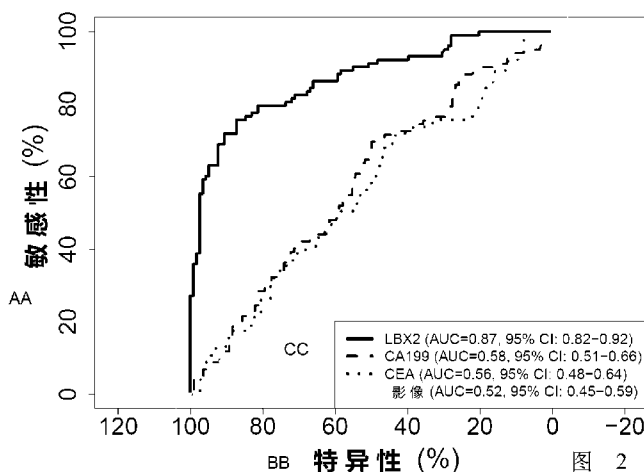


(10) 国际公布号  
**WO 2023/226938 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C12Q 1/6886* (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/095576
- (22) 国际申请日: 2023 年 5 月 22 日 (22.05.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202210578062.5 2022年5月25日 (25.05.2022) CN
- (71) 申请人: 广州市基准医疗有限责任公司 (ANCHORDX MEDICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。
- (72) 发明人: 阮微媚 (RUAN, Weimei); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。王军 (WANG, Jun); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。杨婷 (YANG, Ting); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。陶锦胜 (TAO, Jinsheng); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。陈志伟 (CHEN, Zhiwei); 中国广东省广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元, Guangdong 510300 (CN)。
- (74) 代理人: 北京林达刘知识产权代理事务所 (普通合伙) (LINDA LIU & PARTNERS); 中国北京市东城区北三环东路36号北京环球贸易中心C座16层, Beijing 100013 (CN)。

(54) Title: METHYLATION BIOMARKER, KIT AND USE

(54) 发明名称: 甲基化生物标记物、试剂盒及用途



AA Sensitivity (%)  
BB Specificity (%)  
CC Image (AUC=0.52, 95% CI: 0.45-0.59)

(57) Abstract: Disclosed are a methylation biomarker, a kit and use. The present invention provides a methylation biomarker for diagnosing colorectal cancer lymphatic metastasis, wherein the methylation biomarker comprises: (i) at least one of sequences shown in SEQ ID NOs: 1-15; and/or (ii) at least one of sequences complementary to the sequences shown in SEQ ID NOs: 1-15. The methylation biomarker and the kit of the present invention can be used for diagnosing whether a subject suffering from colorectal cancer has lymphatic metastasis or not, and have good sensitivity, specificity and accuracy.



WO 2023/226938 A1

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。
  - 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
  - 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。
- 

(57) 摘要: 本发明公开了甲基化生物标记物、试剂盒及用途。本发明提供了一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的甲基化生物标记物, 其中, 所述的甲基化生物标记物包含: (i)如SEQ ID NO:1 ~ 15所示的序列的至少一种; 和/或(ii)与SEQ ID NO:1 ~ 15所示的序列互补的序列中的至少一种。本发明提供的DNA甲基化生物标记物、试剂盒可以用于诊断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移, 具有良好的敏感性、特异性及准确度。

## 甲基化生物标记物、试剂盒及用途

### 优先权和相关申请

5 本发明要求 2022 年 5 月 25 日提交的名称为“甲基化生物标记物、试剂盒及用途”的中国专利申请 202210578062.5 的优先权，该申请包括附录在内的全部内容作为参考并入本发明。

### 技术领域

10 本发明涉及生物技术和医学诊断领域，具体涉及一种甲基化生物标记物、试剂盒及用途。

### 背景技术

结直肠癌（colorectal cancer, CRC）是世界第三大恶性肿瘤，全世界每年结直肠癌死亡率呈上升趋势，据最新统计，目前全球CRC的发病率逐渐升高，死亡率仍然高居不下，并CRC呈现出年轻化趋势。其发病率和死亡率已攀升到第三位和第二位，其中，CRC淋巴结转移是术后复发和死亡率升高的主要原因。在中国，CRC同样是最常见的恶性肿瘤之一，它给国民健康和经济负担都带来沉重的打击。根据2021年世界卫生组织国际癌症研究机构（international agency for research on cancer, IARC）公布的2020年数据显示，15 中国一年内新发的CRC患者约56万人，死亡近29万人，均呈现上升的趋势。而在我国，CRC具备有三个明显特征，第一是人口特征分布，目前男性CRC患者约是女性CRC患者1.3倍；同时，确诊CRC的平均年龄大概是59岁，也远低于世界平均年龄的69岁；第二，目前CRC的病理特征显示，确诊时是早期CRC患者比例在逐年减少，而确诊时已经是晚期CRC的比例仍在增加；第三，25 临床诊断方面显示目前计算机断层扫描成像（computed tomography, CT）用于诊断CRC的比例翻倍式升高；磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）用于诊断CRC也较前增加，而正电子发射计算机断层扫描成像（positron

emission tomography-computed tomography, PET-CT) 也明显升高; 第四, 目前CRC治疗方面仍然以手术为主, 手术联合术后放化疗的治疗方案比例升高。

转移是恶性肿瘤的主要特征, 这也是导致患者术后复发、死亡率高的主要原因。大多数恶性肿瘤的转移主要包括了淋巴结转移、种植转移、血道转移、直接转移。相似地, CRC也经血行转移, 比如CRC最常见的是转移到肝脏, 其次是肺、骨头、脑。除此之外, 结直肠癌也可以直接侵犯肿瘤周围组织如膀胱、子宫、输尿管等。脱落的癌细胞也可以导致腹腔的种植转移。但是, CRC淋巴结转移是最主要的方式, 而CRC淋巴结的转移决定了其预后及死亡率。由于CRC淋巴结转移与否决定了患者的重要分期, 也是术后复发和预后的主要影响因素, 同时也决定了不同的治疗方案, 所以一直以来都受到临床上的广泛关注。因此, 有必要在CRC治疗前了解患者有无合并淋巴结转移。目前广泛应用于临床的主要有血清学指标和影像学诊断, 其中血清学指标主要包括胃肠道相关肿瘤抗原 (CA199)、血清癌胚抗原 (CEA), 但其检验效能有限, 它们尚不能将CEA、CA199用于鉴别淋巴结转移。虽然目前对于CRC淋巴结转移诊断的金标准仍然是通过术后的淋巴结病理活检, 但这明显滞后。因此术前的影像学诊断仍被广泛用于对CRC淋巴结转移的判断。但目前关于影像学在CRC淋巴结转移的诊断准确性仍然偏低。有研究指出MRI、CT对CRC淋巴结诊断结果与CRC组织病理学结果的符合率分别只有为57.6%和54.7%, 而MRI和CT的敏感性分别为42.6%和25.0%, 特异性分别为74.1%和41.3%, 且MR和CT评估5年无病生存率和总生存率的符合率分别为56.7%和43.8%。虽然总体MRI诊断性能优于CT, 但诊断效能仍十分有限。而近年来被广泛认可的用于肿瘤诊断, 尤其是微小病灶具有高度敏感性和特异性的PET-CT, 其在关于CRC淋巴结转移的诊断效能也非常有限。有实验证明, PET-CT检测CRC近端淋巴结的灵敏度为66%, 特异性为60%, 准确度为63%, 其特异性及准确性同比高于CT特异性的29%, 准确性的59%, 但仍到不到70%以上甚至更高的水平。

综上, 亟需开发一种新的DNA甲基化标志物, 鉴别早期肠癌淋巴结转移,

辅助临床准确诊断和指导治疗。

## 发明内容

### 发明要解决的问题

5 本发明的目的在于利用DNA甲基化生物标记物来检测结直肠癌淋巴结转移与非转移,本发明提供的甲基化生物标记物可以实现精准检测/诊断的目的。

### 用于解决问题的方案

本发明的一些方面提供了一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的甲基化  
10 生物标记物,其中,所述的甲基化生物标记物包含:

- (i) 如SEQ ID NO: 1~15所示的序列的至少一种; 和/或,
- (ii) 与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列中的至少一种。

在一些实施方案中,所述的甲基化生物标记物至少包含SEQ ID NO: 10  
所示的序列和/或与SEQ ID NO: 10所示的序列互补的序列。

15 在一些实施方案中,所述的甲基化生物标记物包含SEQ ID NO: 10所示的序列和/或与SEQ ID NO: 10所示的序列互补的序列,与选自以下的序列的组合:

(a) 如SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 15  
中所示的序列的至少一种; 和/或,

20 (b) 与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 15所示的序列互补的序列中的至少一种。

在一些实施方案中,所述诊断是区分患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移。

在一些任选的实施方案中,所述结直肠癌选自TNM分期中T分期的T1期、  
25 T2期、T3期或T4期的结直肠癌。

在本发明的一些方面提供了上述的甲基化生物标记物在制备用于诊断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移的试剂或试剂盒中的用途。

在本发明的一些方面提供了一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒，其中，所述的试剂盒包含用于检测待测样本中上述的甲基化生物标记物的甲基化程度的试剂。

5 在一些实施方案中，所述的试剂为选自以下的检测甲基化程度的方法中所使用的试剂：荧光定量PCR、甲基化特异性PCR、数字PCR、DNA甲基化芯片、靶向DNA甲基化测序、全基因组甲基化测序和DNA甲基化质谱中的一种或多种。

10 在一些具体的实施方案中，所述的试剂包括引物和/或探针；其中，所述引物特异扩增包含SEQ ID NO: 1~15所示的序列或与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列；所述探针至少部分地与SEQ ID NO: 1~15所示的序列或与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列杂交。

在一些更具体的实施方案中，所述的试剂包括选自以下的至少一组引物和探针：

- (1) 如SEQ ID NO: 16~17所示的引物，如SEQ ID NO: 46所示的探针；
- 15 (2) 如SEQ ID NO: 18~19所示的引物，如SEQ ID NO: 47所示的探针；
- (3) 如SEQ ID NO: 20~21所示的引物，如SEQ ID NO: 48所示的探针；
- (4) 如SEQ ID NO: 22~23所示的引物，如SEQ ID NO: 49所示的探针；
- (5) 如SEQ ID NO: 24~25所示的引物，如SEQ ID NO: 50所示的探针；
- (6) 如SEQ ID NO: 26~27所示的引物，如SEQ ID NO: 51所示的探针；
- 20 (7) 如SEQ ID NO: 28~29所示的引物，如SEQ ID NO: 52所示的探针；
- (8) 如SEQ ID NO: 30~31所示的引物，如SEQ ID NO: 53所示的探针；
- (9) 如SEQ ID NO: 32~33所示的引物，如SEQ ID NO: 54所示的探针；
- (10) 如SEQ ID NO: 34~35所示的引物，如SEQ ID NO: 55所示的探针；
- (11) 如SEQ ID NO: 36~37所示的引物，如SEQ ID NO: 56所示的探针；
- 25 (12) 如SEQ ID NO: 38~39所示的引物，如SEQ ID NO: 57所示的探针；
- (13) 如SEQ ID NO: 40~41所示的引物，如SEQ ID NO: 58所示的探针；
- (14) 如SEQ ID NO: 42~43所示的引物，如SEQ ID NO: 59所示的探针；

(15) 如SEQ ID NO: 44~45所示的引物，如SEQ ID NO: 60所示的探针。

在一些具体实施方案中，所述的待测样本选自组织、血液、血浆、唾液、血清、尿液、尿液脱落细胞、尿沉渣、尿液上清中的一种或多种。

5 本发明的一些方面提供了一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的系统，其中，所述系统包括检测装置、计算装置和输出装置；

所述检测装置包括进样器和检测器，所述进样器用于采集来自受试者的样本，所述检测器用于检测所述样本中上述的甲基化生物标记物的甲基化程度；

10 所述计算装置包括存储器和处理器，所述存储器中存储有计算机程序，所述处理器被配置为执行所述存储器中存储的计算机程序，以实现如下判别：

将所述样本中所述的甲基化生物标记物的甲基化程度与判定阈值相比较，判别所述样本对应的受试者的是否存在结直肠癌淋巴结转移。

15 本发明的一些方面提供了选自以下的引物和探针的组合中的至少一组在制备用于诊断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移的试剂或试剂盒中的用途，其中，所述引物和探针的组合用于检测上述的甲基化生物标记物的甲基化程度：

- (1) 如SEQ ID NO: 16~17所示的引物，如SEQ ID NO: 46所示的探针；
- (2) 如SEQ ID NO: 18~19所示的引物，如SEQ ID NO: 47所示的探针；
- (3) 如SEQ ID NO: 20~21所示的引物，如SEQ ID NO: 48所示的探针；
- 20 (4) 如SEQ ID NO: 22~23所示的引物，如SEQ ID NO: 49所示的探针；
- (5) 如SEQ ID NO: 24~25所示的引物，如SEQ ID NO: 50所示的探针；
- (6) 如SEQ ID NO: 26~27所示的引物，如SEQ ID NO: 51所示的探针；
- (7) 如SEQ ID NO: 28~29所示的引物，如SEQ ID NO: 52所示的探针；
- (8) 如SEQ ID NO: 30~31所示的引物，如SEQ ID NO: 53所示的探针；
- 25 (9) 如SEQ ID NO: 32~33所示的引物，如SEQ ID NO: 54所示的探针；
- (10) 如SEQ ID NO: 34~35所示的引物，如SEQ ID NO: 55所示的探针；
- (11) 如SEQ ID NO: 36~37所示的引物，如SEQ ID NO: 56所示的探针；

(12) 如SEQ ID NO: 38~39所示的引物, 如SEQ ID NO: 57所示的探针;

(13) 如SEQ ID NO: 40~41所示的引物, 如SEQ ID NO: 58所示的探针;

(14) 如SEQ ID NO: 42~43所示的引物, 如SEQ ID NO: 59所示的探针;

(15) 如SEQ ID NO: 44~45所示的引物, 如SEQ ID NO: 60所示的探针。

## 5 发明的效果

本发明提供的DNA甲基化生物标记物、试剂盒可以用于诊断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移, 具有良好的敏感性、特异性及准确度。

## 附图说明

10 图1为甲基化生物标记物的 $\Delta$ CT聚类效果图。

图2为比较SEQ ID NO: 10所示标记物与CA199、CEA、影像诊断方法的AUC差异的示意图。

## 具体实施方式

15 以下, 针对本发明的内容进行详细说明。以下所记载的技术特征的说明基于本发明的代表性的实施方案、具体例子而进行, 但本发明不限于这些实施方案、具体例子。需要说明的是:

本说明书中, 使用“数值A~数值B”表示的数值范围是指包含端点数值A、B的范围。

20 本说明书中, 使用“基本上”或“实质上”表示与理论模型或理论数据的标准偏差在5%、优选为3%、更优选为1%范围以内。

本说明书中, 使用“可以”表示的含义包括了进行某种处理以及不进行某种处理两方面的含义。

25 本说明书中, “任选的”或“任选地”是指接下来描述的事件或情况可发生或可不发生, 并且该描述包括该事件发生的情况和该事件不发生的情况。

本说明书中, 所提及的“一些具体/优选的实施方案”、“另一些具体/优选的实施方案”、“实施方案”等是指所描述的与该实施方案有关的特定要素



(例如, 特征、结构、性质和/或特性) 包括在此处所述的至少一种实施方案中, 并且可存在于其它实施方案中或者可不存在于其它实施方案中。另外, 应理解, 所述要素可以任何合适的方式组合在各种实施方案中。

5 本发明的术语“包括”和“具有”以及它们任何变形, 意图在于覆盖不排他的包含。例如包含了一系列步骤的过程、方法、装置、产品或设备没有限定于已列出的步骤或模块, 而是可选地还包括没有列出的步骤, 或可选地还包括对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤。

在本发明中提及的“多个”是指两个或两个以上。“和/或”, 描述关联对象的关联关系, 表示可以存在三种关系, 例如, A和/或B, 可以表示: 单独存在A, 同时存在A和B, 单独存在B这三种情况。字符“/”一般表示前后关联对象是一种“或”的关系。

本说明书中, 术语“结直肠”指的是结肠、直肠和/或阑尾, 即整个大肠。

本说明书中, 术语“癌症”(也称为癌) 通常指任何类型的恶性新生物, 15 即与未受影响的(健康)野生型对照细胞相比显示或具有发生癌特征倾向的靶细胞的任何形态学和/或生理学改变(基于遗传重编程(genetic re-programming))。这种改变的例子可涉及细胞大小和形状(变大或变小)、细胞增殖(细胞数增加)、细胞分化(生理学状态变化)、凋亡(程序性细胞死亡)或细胞存活。因此, 术语“结直肠癌”指的是结肠、直肠和阑尾的癌 20 性生长。

最常见的结直肠癌细胞类型是腺癌, 大约占95%。其他类型的CRC包括尤其是淋巴瘤和鳞癌。

本说明书中, TNM (Tumor Node Metastasis) 是肿瘤学中对肿瘤的一种分期形式, 其中T (Tumor) 指肿瘤原发灶的情况, 随着肿瘤体积的增加和邻近组织受累范围的增加, 依次用T1~T4来表示; N (Node) 指区域淋巴结 (regional lymph node) 受累情况。淋巴结未受累时, 用N0表示。随着淋巴结受累程度和范围的增加, 依次用N1~N3表示; M (Metastasis) 指远处转移

(通常是血道转移), 没有远处转移者用M0表示, 有远处转移者用M1表示。在此基础上, 用TNM三个指标的组合划出特定的分期。

本说明书中, 术语“样本”是指可能包含需要进行分析的靶分子的任何物质, 包括生物样本。如本文所用, “样本”或“生物样本”是指从活的或病毒性(或朊病毒的)来源或其他大分子和生物分子来源获得的任何样本, 并且包括可以从之获得核酸、蛋白质和/或其他大分子的受试者的任何细胞类型或组织。样本或生物样本可以是直接从生物来源获得的样本或者是被处理的样本。样本或生物样本包括, 但不限于, 体液(例如血液、血浆、血清、脑脊髓液、滑液、尿液、汗液、精液、粪便、痰、眼泪、粘液、羊水等)、渗出液、骨髓样本、腹水、骨盆冲洗液、胸膜液、脊髓液、淋巴液、眼液、鼻、喉或生殖器拭子的提取物、消化组织的细胞悬浮液、或粪类物质的提取物、以及来自人、动物(例如非人哺乳动物)和植物的组织和器官样本, 以及由此衍生出的加工样本。

本说明书中, 术语“受试者”可以是哺乳动物或所述哺乳动物的细胞、组织、器官或一部分。在本发明中, 哺乳动物是指任何种类的哺乳动物, 优选人(包括人、人受试者或人患者)。受试者和哺乳动物包括, 但不限于, 农场动物、运动动物、宠物、灵长类动物、马、狗、猫和啮齿类动物如小鼠和大鼠。

本说明书中, 诊断包括受试者疾病状态或病症的检测或鉴定、确定受试者将患给定疾病或病症的可能性、确定患有疾病或病症的受试者将对治疗有反应的可能性、确定患有疾病或病症的受试者的预后(或其可能的进展或消退)以及确定治疗对患有疾病或病症的受试者的效果。

在本发明的一些具体实施方案中, 诊断还意指区分患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移。

术语“互补”和“互补性”是指与碱基配对规则相关的核苷酸(例如, 1个核苷酸)或多核苷酸(例如核苷酸的序列)。例如, 序列5'-A-G-T-3'与序列3'-T-C-A-5'互补。互补可以是“部分的”, 其中仅一些核酸碱基根据碱基配对

规则进行匹配。或者，核酸之间可能存在“完全”或“总”互补。核酸链之间的互补程度影响核酸链之间杂交的效率和强度。这在扩增反应和依赖核酸之间的结合的检测方法中尤其重要。

术语“聚合酶链式反应”用于扩增靶序列，该方法由以下步骤组成：将大量过量的两种寡核苷酸引物引入到含有期望靶序列的DNA混合物中，随后在DNA聚合酶存在下进行精确的热循环顺序。两种引物与双链靶序列的相应链互补。为了进行扩增，将混合物变性，然后引物与靶分子内的其互补序列退火。退火后，用聚合酶扩增引物，形成一对新的互补链。变性、引物退火和聚合酶延伸的步骤可以重复多次（即，变性、退火和延伸构成一个“循环”；可以有許多“循环”）以获得高浓度的期望靶序列的扩增片段。期望靶序列的扩增片段的长度由引物相对于彼此的相对位置确定，因此该长度是可控参数。由于该方法的重复方面，该方法被称为“聚合酶链式反应”（“PCR”）。由于靶序列的期望扩增片段成为混合物中的主要序列（以浓度计），所以称其被“PCR扩增”，是“PCR产物”或“扩增子”。

本说明书中，术语“可扩增核酸”是指可以通过任何扩增方法扩增的核酸。预期“可扩增核酸”通常将包含“样本模板”。

本说明书中，术语“样本模板”是指来源于样本的用于分析“靶”的存在的核酸。相比之下，“背景模板”用于指样本模板以外的核酸，其可能存在或可能不存在于样本中。背景模板通常是无意的。这可能是遗留的结果，或者可能是由于试图从样本中纯化走的核酸污染物的存在。例如，来自生物体的待检测核酸以外的核酸可以作为测试样本的背景存在。

本说明书中，术语“引物”是指在纯化的限制性消化物中天然存在的或合成产生的寡核苷酸，当处于其中诱导与核酸链互补的引物延伸产物合成的条件下（例如，在核苷酸和诱导剂如DNA聚合酶的存在下并且在合适的温度和pH下）时，其能够作为合成的起点。引物优选是单链的，用于扩增的最大效率，但也可以是双链的。如果是双链，则在用于制备延伸产物之前首先处理引物以分离其链。优选地，引物是寡脱氧核糖核苷酸。引物必须足够长以

在诱导剂的存在下引发延伸产物的合成。引物的确切长度将取决于许多因素，包括温度、引物来源以及方法的使用。

本说明书中，术语“探针”是指在纯化的限制性消化物中天然存在的或者合成、重组或通过PCR扩增产生的寡核苷酸（例如，核苷酸序列），其能够与另一种目标寡核苷酸杂交。探针可以是单链或双链的。探针可用于特定基因序列的检测、鉴定和分离（例如，“捕获探针”）。预期在一些实施方案中，本发明中使用的任何探针可以用任何“报道分子”进行标记，使得在任何检测系统中可检测。

本说明书中，“扩增”通常是指产生所需序列的多个拷贝的过程。“多个拷贝”是指至少两个拷贝。“拷贝”并不一定意味着与模板序列具有完美的序列互补性或同一性。例如，拷贝可以包括核苷酸类似物如脱氧肌苷，有意的序列改变（例如通过包含与模板可杂交但不互补的序列的引物引入的序列改变），和/或在扩增过程中发生的序列错误。

本说明书中，“序列确定”等包括确定与核酸的核苷酸碱基序列有关的信息。这样的信息可以包括对核酸的部分或全部序列信息的鉴定或确定。可以以不同程度的统计可靠性或置信度来确定序列信息。在一个方面，所述术语包括确定核酸中多个连续核苷酸的身份和顺序。

本说明书中，术语“测序”、“高通量测序”或“下一代测序”包括使用这样的方法进行序列确定：所述方法以本质上平行的方式确定许多（通常数千至数十亿）个核酸序列，即在这种方法中，制备DNA模板并不是用于每次测序一个，而是以批量过程进行，并且在这种方法中许多序列优选地被并行读取，或者使用本身可以并行化的超高通量串行过程读取。此类方法包括但不限于焦磷酸测序（例如，如454Life Sciences, Inc., Branford, CT所商业化的）；通过连接进行测序（例如，如SOLiDTM技术，Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA所商业化的）；使用修饰的核苷酸通过合成进行测序（例如，如Illumina, Inc., San Diego, CA所商业化的TruSeq™和HiSeq™技术，Helicos Biosciences Corporation, Cambridge, MA所商业化的HeliScope™；和Pacific Biosciences

of California, Inc., Menlo Park, CA所商业化的PacBio RS), 通过离子检测技术进行测序(例如, Ion Torrent™技术, Life Technologies, Carlsbad, CA); DNA 纳米球测序(Complete Genomics, Inc., Mountain View, CA); 基于纳米孔的测序技术(例如, 由Oxford Nanopore Technologies, LTD, Oxford, UK所开发的) 5 等高度并行的测序方法。

本说明书中, “甲基化”是指胞嘧啶位置C5或N4的胞嘧啶甲基化, 腺嘌呤的N6位点或其他类型的核酸甲基化。体外扩增的DNA通常是未甲基化的, 因为通常体外DNA扩增方法不能保留扩增模板的甲基化模式。然而, “未甲基化DNA”或“甲基化DNA”也可以分别指原始模板未甲基化或甲基化的 10 扩增DNA。

本说明书中, “甲基化核苷酸”或“甲基化核苷酸碱基”是指在核苷酸碱基上存在甲基部分, 其中甲基部分不存在于公认的典型核苷酸碱基中。例如, 胞嘧啶在其嘧啶环上不包含甲基部分, 但是5-甲基胞嘧啶在其嘧啶环的5位包含甲基部分。因此, 胞嘧啶不是甲基化核苷酸, 5-甲基胞嘧啶是甲基化核苷酸。在另一个实例中, 胸腺嘧啶在其嘧啶环的5位含有甲基部分; 然而, 为了本文的目的, 当存在于DNA中时不认为胸腺嘧啶是甲基化核苷酸, 15 因为胸腺嘧啶是DNA的典型核苷酸碱基。

本说明书中, 核酸分子的“甲基化状态”、“甲基化谱”和“甲基化状况”是指在核酸分子中存在或不存在一个或多个甲基化核苷酸碱基。例如, 包含 20 甲基化胞嘧啶的核酸分子被视为甲基化的(例如, 核酸分子的甲基化状态为甲基化的)。不含任何甲基化核苷酸的核酸分子被视为未甲基化的。

本说明书中, 甲基化状态可任选地由“甲基化值”表示或指示(例如, 表示甲基化频率、分数、比例、百分比等)。甲基化值可以例如在用甲基化依赖性限制酶限制性消化之后定量存在的完整核酸的量, 或者通过比较亚硫酸氢盐反应后的扩增谱, 或者通过比较亚硫酸氢盐处理和未处理的核酸的序列来产生。因此, 诸如甲基化值的值代表甲基化状态, 因此可用作基因座的 25 多个拷贝中甲基化状态的定量指标。“甲基化程度”或“共甲基化程度”由

多于一个甲基化位点的甲基化状态表示或指示，在一段甲基化区域内（例如本发明提供的甲基化生物标记物），当多于一个甲基化位点的甲基化状态均为甲基化时定义为共甲基化。

本说明书中，术语“亚硫酸氢盐试剂”是指在一些实施方案中包含亚硫酸氢盐（bisulfite）、亚硫酸氢盐（disulfite）、亚硫酸氢盐（hydrogen sulfite）或其组合的试剂，经过亚硫酸氢盐试剂处理的DNA，其未经过甲基化的胞嘧啶核苷酸将转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶及其他碱基维持不变，因此可以区分例如CpG二核苷酸序列中的甲基化和未甲基化胞苷。

以下对于本发明甲基化生物标记物、试剂盒及用途进一步说明。

#### 10 <甲基化生物标记物>

本发明的一些方面提供了一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的甲基化生物标记物，其中，所述的甲基化生物标记物包含：

- (i) 如SEQ ID NO: 1~15所示的序列的至少一种；和/或，
- (ii) 与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列中的至少一种。

15 在本发明的一些实施方案中，如SEQ ID NO: 1~15所示的序列或与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列中包含至少一个由CG指示的甲基化位点，即如SEQ ID NO: 1~15所示的序列或与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列为包含由CG指示的甲基化位点的甲基化区域。

在本发明的一些实施方案中，所述的甲基化生物标记物包含如SEQ ID NO: 1~15所示的序列的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五  
20 种或更多种。在本发明的另一些实施方案中，所述的甲基化生物标记物包含与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列中的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或更多种。在本发明的一些实施方案中，所述的甲基化生物标记物可以包含如SEQ ID NO: 1~15所示的序列的至少一种和与  
25 SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列中的至少一种。

在本发明的一些优选的实施方案中，所述的甲基化生物标记物至少包含SEQ ID NO: 10所示的序列和/或与SEQ ID NO: 10所示的序列互补的序列。

在本发明的一些具体实施方案中,所述的甲基化生物标记物包含SEQ ID NO: 10所示的序列和/或与SEQ ID NO: 10所示的序列互补的序列,与选自以下的序列的组合:

5 (a) 如SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 15中所示的序列的至少一种;和/或,

(b) 与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 15所示的序列互补的序列中的至少一种。

在本发明的一些具体实施方案中,所述的组合可以为但不限于:

10 (1) SEQ ID NO: 3和SEQ ID NO: 10,或与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10互补序列的组合;

(2) SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 11,或与SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11互补序列的组合;

(3) SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 15,或与SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 15互补序列的组合;

15 (4) SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 12,或与SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12互补序列的组合;

(5) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 11,或与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11互补序列的组合;

20 (6) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 15,或与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 15互补序列的组合;

(7) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 12,或与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12互补序列的组合;

(8) SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 15,或与SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15互补序列的组合;

25 (9) SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12,或与SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12互补序列的组合;

(10) SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 15,或与SEQ ID NO:

10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15互补序列的组合；

(11) SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 15，  
或与SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15互补  
序列的组合；

5 (12) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 15，  
或与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15互补序  
列的组合；

(13) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 15，  
或与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15互补序  
10 列的组合；

(14) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12，  
或与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12互补序  
列的组合；

(15) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12  
15 和SEQ ID NO: 15，或与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ  
ID NO: 12、SEQ ID NO: 15互补序列的组合。

在本发明的一些实施方案中，所述诊断是区分患有结直肠癌的受试者是否  
存在淋巴结转移。

在本发明的一些具体实施方案中，所述的受试者是哺乳动物；优选地，  
20 所述的哺乳动物是人；进一步优选地，所述的受试者是结直肠癌患者。

在本发明的一些具体实施方案中，所述结直肠癌选自TNM分期中T分期  
的T1期、T2期、T3期或T4期的结直肠癌。

#### <甲基化生物标记物的用途>

在本发明的一些方面中，提供了上述的甲基化生物标记物在制备用于诊  
25 断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移的试剂或试剂盒中的用途。

在另一些实施方案中，提供了检测上述的甲基化生物标记物的甲基化程  
度的试剂在制备用于诊断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移的试



剂或试剂盒中的用途。

### <结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒>

在本发明的一些方面中，提供了用于结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒，其中，所述的试剂盒包含用于检测待测样本中上述的甲基化生物标记物的甲基化程度的试剂。

在本发明的一些具体的实施方案中，所述的试剂为选自以下的检测甲基化程度的方法中所使用的试剂：荧光定量PCR（qPCR）、甲基化特异性PCR（MSP）、数字PCR（ddPCR）、DNA甲基化芯片、靶向DNA甲基化测序、全基因组甲基化测序（Whole Genome Bisulfite Sequencing, WGBS）、DNA甲基化质谱（MassArray）中的一种或多种。

在本发明的一些具体的实施方案中，所述的试剂为荧光定量PCR和/或甲基化特异性PCR中所使用的试剂。具体地，所述的试剂包括引物和/或探针。在一些实施方案中，所述引物扩增（特异性扩增）包含SEQ ID NO: 1~15所示的序列或与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列。在一些实施方案中，所述探针至少部分地与SEQ ID NO: 1~15所示的序列或与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列杂交。

在本发明的一些更具体的实施方案中，所述的试剂包括选自以下的至少一组引物和探针：

- (1) 如SEQ ID NO: 16~17所示的引物，如SEQ ID NO: 46所示的探针；
- (2) 如SEQ ID NO: 18~19所示的引物，如SEQ ID NO: 47所示的探针；
- (3) 如SEQ ID NO: 20~21所示的引物，如SEQ ID NO: 48所示的探针；
- (4) 如SEQ ID NO: 22~23所示的引物，如SEQ ID NO: 49所示的探针；
- (5) 如SEQ ID NO: 24~25所示的引物，如SEQ ID NO: 50所示的探针；
- (6) 如SEQ ID NO: 26~27所示的引物，如SEQ ID NO: 51所示的探针；
- (7) 如SEQ ID NO: 28~29所示的引物，如SEQ ID NO: 52所示的探针；
- (8) 如SEQ ID NO: 30~31所示的引物，如SEQ ID NO: 53所示的探针；
- (9) 如SEQ ID NO: 32~33所示的引物，如SEQ ID NO: 54所示的探针；

- (10) 如SEQ ID NO: 34~35所示的引物, 如SEQ ID NO: 55所示的探针;  
(11) 如SEQ ID NO: 36~37所示的引物, 如SEQ ID NO: 56所示的探针;  
(12) 如SEQ ID NO: 38~39所示的引物, 如SEQ ID NO: 57所示的探针;  
(13) 如SEQ ID NO: 40~41所示的引物, 如SEQ ID NO: 58所示的探针;  
5 (14) 如SEQ ID NO: 42~43所示的引物, 如SEQ ID NO: 59所示的探针;  
(15) 如SEQ ID NO: 44~45所示的引物, 如SEQ ID NO: 60所示的探针。

在本发明的一些具体的实施方案中, 所述的待测样本选自组织、血液、血浆、唾液、血清、尿液、尿液脱落细胞、尿沉渣、尿液上清中的一种或多种。在一些优选的实施方案中, 所述的待测样本为组织, 例如结直肠癌组织。

#### 10 <引物和探针的组合的用途>

在本发明的一些方面, 提供了选自以下的引物和探针的组合的至少一组在制备用于诊断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移的试剂或试剂盒中的用途, 其中, 所述引物和探针的组合用于检测上述的甲基化生物标记物的甲基化程度:

- 15 (1) 如SEQ ID NO: 16~17所示的引物, 如SEQ ID NO: 46所示的探针;  
(2) 如SEQ ID NO: 18~19所示的引物, 如SEQ ID NO: 47所示的探针;  
(3) 如SEQ ID NO: 20~21所示的引物, 如SEQ ID NO: 48所示的探针;  
(4) 如SEQ ID NO: 22~23所示的引物, 如SEQ ID NO: 49所示的探针;  
(5) 如SEQ ID NO: 24~25所示的引物, 如SEQ ID NO: 50所示的探针;  
20 (6) 如SEQ ID NO: 26~27所示的引物, 如SEQ ID NO: 51所示的探针;  
(7) 如SEQ ID NO: 28~29所示的引物, 如SEQ ID NO: 52所示的探针;  
(8) 如SEQ ID NO: 30~31所示的引物, 如SEQ ID NO: 53所示的探针;  
(9) 如SEQ ID NO: 32~33所示的引物, 如SEQ ID NO: 54所示的探针;  
(10) 如SEQ ID NO: 34~35所示的引物, 如SEQ ID NO: 55所示的探针;  
25 (11) 如SEQ ID NO: 36~37所示的引物, 如SEQ ID NO: 56所示的探针;  
(12) 如SEQ ID NO: 38~39所示的引物, 如SEQ ID NO: 57所示的探针;  
(13) 如SEQ ID NO: 40~41所示的引物, 如SEQ ID NO: 58所示的探针;

(14) 如SEQ ID NO: 42~43所示的引物，如SEQ ID NO: 59所示的探针；

(15) 如SEQ ID NO: 44~45所示的引物，如SEQ ID NO: 60所示的探针。

### <结直肠癌淋巴结转移诊断系统>

5 本发明的一些方面提供了一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的系统，其中，所述系统包括检测装置、计算装置和输出装置；

所述检测装置包括进样器和检测器，所述进样器用于采集来自受试者的样本，所述检测器用于检测所述样本中上述的甲基化生物标记物的甲基化程度；

10 所述计算装置包括存储器和处理器，所述存储器中存储有计算机程序，所述处理器被配置为执行所述存储器中存储的计算机程序，以实现如下判别：

将所述样本中如上述的甲基化生物标记物的甲基化程度与判定阈值相比较，判别所述样本对应的受试者的是否存在结直肠癌淋巴结转移。

15 在一些具体的实施方案中，所述输出装置用于输出所述检测装置的检测结果和/或所述计算装置的判别结果，所述输出装置包括显示器、打印机和音频输出装置中的至少一种；所述计算装置包括电脑主机、中央处理器和网络服务器中的至少一种。

20 在一些具体的实施方案中，所述判定阈值可以通过以下方式获得：根据结直肠癌淋巴结非转移受试者及淋巴结转移受试者中上述的甲基化生物标记的甲基化程度，建立判别淋巴结转移发生的诊断模型（例如ROC曲线），并根据诊断模型（例如ROC曲线）获得划分是否存在淋巴结转移的判定阈值。

### <结直肠癌淋巴结转移诊断方法>

在本发明的一些方面，提供了一种结直肠癌淋巴结转移诊断方法，其包括以下步骤。

25 获得受试者的样本；

提取所述样本的基因组DNA和/或游离DNA；

检测所述DNA中，上述的甲基化生物标记物的甲基化程度；

判别受试者是否存在直肠癌淋巴结转移，即患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移。

以下通过实施例与测试例进一步说明本发明，但不作为对本发明的限制。以下提供了本发明实施方案中所使用的具体材料及其来源。但是，应当理解的是，这些仅仅是示例性的，并不意图限制本发明，与如下试剂和仪器的类型、型号、品质、性质或功能相同或相似的材料均可以用于实施本发明。下述实施例与测试例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例与测试例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

## 10 实验材料及方法

### 一、DNA甲基化生物标记物

本发明以下实施例中，用于结直肠癌淋巴结转移诊断的DNA甲基化生物标记物，其包含：

(i) 如SEQ ID NO: 1~15所示的序列的至少一种，和/或

15 (ii) 与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列中的至少一种。

DNA甲基化生物标记物具体如下表1所示，SEQ ID NO: 1~15所示的序列及其互补序列为包含由CG指示（表1中粗体显示）的多个甲基化位点的甲基化区域。本发明通过上述甲基化区域中的多个甲基化位点的共甲基化程度（或称为甲基化程度）判别是否存在结直肠癌淋巴结转移。

20 在下表中，根据2009年2月human genome assembly GRCh37/hg19(参见例如Rosenbloom等(2012) “ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser: update 2012” Nucleic Acids Research 40: D912-D917)对碱基编号。

表1 DNA甲基化生物标记物

SEQ ID NO:	标记物	染色体 (chr)	起始	终止	序列
1	ACHE	chr7	100490200	100490303	GTGGT <b>C</b> GCCACCACAT <b>C</b> GCTCAGGGCCTC CCTCAGG <b>C</b> GTGCCGGGTCT <b>C</b> GGGATGCAG CCAGTCTGTGTAATGCAGGACCACAGCCTC GGCTGCCAGGTCAC
2	C21orf33, I COSLG	chr21	45575728	45575804	GGACCATGCTGTAAACCTG <b>C</b> CGGCTCCGA G <b>C</b> GAGTGCA <b>C</b> GGGGCTGG <b>C</b> GGGCCCT <b>C</b> GA T <b>C</b> CGTCAGCAGT <b>C</b> GGGGT
3	RPS15, AP C2-1	chr19	1445046	1445159	AGTCTGGGTGGCCCCGAAGCCTCCCCGGC AG <b>C</b> CGCACGGCT <b>C</b> CGTCCCCGCTCCAGGGT TCAGCTGAGGCACCTGCTGGAGG <b>C</b> GGCCTG TCCCC <b>G</b> CCGCCCTGCTAAAG <b>C</b> GGC
4	RPS15, AP C2-2	chr19	1444864	1444966	CATCTGTGCCGTCTCAGACAGACAGCT <b>C</b> CG TCCTCATCAGGTT <b>C</b> AGGTCTGGCCCC <b>G</b> GG <b>C</b> CTT <b>G</b> CGGGT <b>C</b> AGCTGCCTTCAGGCCCTGTC CTGGTTCCCC <b>G</b> GG <b>C</b>
5	BAHCC1	chr17	79380509	79380601	CTGCC <b>G</b> CGGGAGAATCCAGGGATGGTGGG <b>C</b> GCTAGGTGT <b>G</b> CGCTGAGGGGATGTGGTGG CAGG <b>C</b> GCTGGGGGCAGG <b>C</b> GG <b>C</b> CCCCAGGT CCTGG
6	LEFTY1, PYCR2	chr1	226098947	226099045	<b>C</b> GGGGAGCT <b>C</b> CGCTAAGCTGCC <b>C</b> GACCTCC CATGTGCAGAGGG <b>C</b> GCTGCTGGGGCCACAG G <b>C</b> GAGGCT <b>G</b> CGTGGGGAAG <b>C</b> GGAG <b>C</b> GTGG ATT <b>C</b> CAG <b>C</b> GC
7	RTN4RL2	chr11	57232469	57232570	GGGCC <b>G</b> GG <b>C</b> GCTCACACAC <b>C</b> GGAGGA CAGCCAGCAC <b>C</b> CAC <b>C</b> GAC <b>C</b> GAGCAC <b>C</b> GAC <b>G</b> CAG <b>C</b> CCAGGAGGGG <b>C</b> CGGGACACTCA <b>C</b> GGTGGGGCCCAAAA
8	KCNQ1	chr11	2818099	2818223	AACGTT <b>C</b> GCCAT <b>C</b> GGTGCCAATAAAGGCC <b>G</b> CCTTTAT <b>C</b> CGAC <b>C</b> GTAAATGGTTTCTGT GTGGAGTGAGACTGTGCCTGT <b>C</b> CGGGCCT AACCCCCAAGGGCCAGAGAG <b>G</b> CGAAATT AGATCC
9	IZUMO1	chr19	49249128	49249255	<b>C</b> GCACAGTT <b>C</b> CGAAGAC <b>C</b> GTTAGGAAGG GTGCTCTACCCCCAA <b>C</b> CGAGAGCAGGAGA A <b>C</b> GCTAAAC <b>G</b> GAGAAAAGCCAAAATCCAT CTTAAGAAAT <b>C</b> CCACTGGG <b>C</b> CGCCTATCCA TGGGGT <b>C</b> CG <b>C</b>

10	LBX 2	chr2	74725992	74726088	GCGCCCAGTGCTGCGCCAAGGGCTTTCTGC TCCTTGACTCCCCTCGAGAAGAGAGTGGCT TGGAGCGGAGCTTGGTCACCCGGAAAGAC TCGACTCT
11	STM N3	chr20	62272383	62272489	CCACCGCCCTGGGTTTACCACGGTCACCGC CACCTCTCTCACAGGGCCCCCGGGGGACCC AGCCGCGCCCCGGCCTGGTGTCTGCACCGA GGGACCGCGTCTCACGCC
12	SS18 L1	chr20	60745104	60745224	CGGCTTTGAGCGTTCGTTACATGTTCCCTCG TGGCTCATTGTGTCCACATCTTGCTCCTTCT GAGGAAGCAGAGGGTGTGCCGTGGCCTCTT GTTTCACACACAGATGCGCCATGCTGCCCCG
13	CYT H2	chr19	48983472	48983601	GGCGGATTGGGAGGTCCCATGTCACCTCTCC CATGCCCGCCTTTGAAGCTGAGGCGCTCTT TAGTTAACAAACTACAAGTCCCAGCAGGGA CCGGGACGCGGGTGGGAGAGGGCGCCTGTG GCCCCGAGGCG
14	LINC 0107 2,GJ A3	chr13	20693374	20693498	GGGGGACACCCGGCACAAGAAGGGTGGAG GAATGGGGCTGCGCGTCACTCCCACAGCTT CTTAGAGAGCCGTTTCGCAAGGAGGACCGA GTGTACCGTGAGTGAGCTGGAGGAGGTAC GTTACCT
15	PDE 9A	chr21	44106318	44106411	ACTGCAACTCCAGCGACATCATGGACCTGT TCTGCATCGCCACCGGCCTGCCTCGGTGAG TGCGCGCTGCGGGCTCTGCCCGGTGACGCC ACGC

## 二、引物及探针

针对上述的DNA甲基化生物标记物的甲基化区域，设计了相应的特异性引物及探针，具体如下表2和表3所示。特异性引物及探针可以用于检测甲基化区域中甲基化位点的甲基化状态，从而判断甲基化区域的甲基化程度，可以构成用于结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒，包括多个甲基化区域甲基化特异性引物对及探针。

表2 针对DNA甲基化生物标记物的特异性引物

标记物	SEQ ID NO:	正向引物	SEQ ID NO:	反向引物
ACHE	16	TGGTCGTTTATTATATCGTTTAGGGTTT	17	ATAACCTAACAACCGAAACTATAATCCTAC
C21orf33,ICOSLG	18	GATTATGTTGTAAATTTGCGCGGTTT	19	ACCCCGACTACTAACGAATCGAA
RPS15,APC2-1	20	GTTTTGGGTGGTTTCGAAGTTT	21	GCCGCTTTAACAAAACGACGAA
RPS15,APC2-2	22	ATTTGTGTCGTTTTAGATAGATAGTTTCGT	23	CGCCGAAAACCAAAAACAAAACCTA
BAHCC1	24	TGTCGCGGGAGAATTTAGGGAT	25	CCAAAACCTAAACGCCGCCTA
LEFTY1,PYCR2	26	GGGGAGTTTCGTAAAGTTGTTCG	27	ACGCTAAAATCCACGCTCCG
RTN4RL2	28	AACCCGACGCTCACACACA	29	TTTTGGGTTTTATCGTGAGTGTTTCG
KCNQ1	30	ACGTTCGTTATTCGGTGTTAATAAAGG	31	GAATCTAATTCGCCTCTCTAACCTTA
IZUMO1	32	GCACAATCCCGAAAACCGTTAA	33	GCGGATTTTATGGATAGGCGGTT
LBX2	34	CGTTTAGTGTTGCGTTAAGGGTTT	35	AAAATCGAATCTTTCCGAATAACCAA
STMN3	36	TATCGTTTTGGGTTTATTACGGTTATCG	37	AACGTAAAACGCGATCCCTCG
SS18L1	38	GGTTTTGAGCGTCGTTTATATGTTTT	39	CGAACAAACATAACGCATCTATATATAAAAC
CYTH2	40	GCGGATTGGGAGGTTTTATGTTAT	41	CGCCTCGAAACCACAAACG
LINC01072,GJA3	42	GGGGATATTCGGTATAAGAAGGGTG	43	AAATAACGTAACCTCCTCCAACCTCA
PDE9A	44	ATTGTAATTTTAGCGATATTATGGATTTGT	45	GCGTAACGTCACCGAACAAAA

表3 针对DNA甲基化生物标记物的探针

标记物	SEQ ID NO:	探针
ACHE	46	AACTAACTACATCCCGAAAACCCGACACGC
C21orf33,ICOSLG	47	CCCGCCAACCCCGTACACTCGCTC
RPS15,APC2-1	48	CCGCCTCCAACAAATACCTCAACTAAACCC
RPS15,APC2-2	49	ACCCGCAAACGCCGAAACCAAACCTAA
BAHCC1	50	CCCAACGCCTACCACCACATCCCT
LEFTY1,PYCR2	51	CCCACGCAACCTCGCCTATAACCCCA
RTN4RL2	52	AACAACCAACACGCACCCGACGCAAC
KCNQ1	53	ACCCGAAACAAACACAATCTCACTCCACAC
IZUMO1	54	AAATACTCTCACCCCAAACCGAAAACAAAA
LBX2	55	TCCGCTCCAAACCACTCTCTTCTCGAAA
STMN3	56	ACAAACACCAAACCGAACGCGACTAAATCC
SS18L1	57	AAACCACGACACACCCTCTACTTCCTCAA
CYTH2	58	CCACCCGCGTCCCGATCCCTACTAAA
LINC01072,GJA3	59	CACTCGATCCTCCTTACGAACGACTCTCT
PDE9A	60	CGCACTCACCGAAACAAACCGATAACGAT

内参引物及探针如下表4所示：每次试验选择任一组使用。

表4：

正向引物	反向引物	探针
TTTGTATGTGGTGGGAGG GTTT(SEQ ID NO: 61)	ACAAAAAACACACCACTC CCAA(SEQ ID NO: 62)	TATGTGGAAGTGTAATAATG (SEQ ID NO: 63)
GTGATGGAGGAGGTTTAG TAAGTT (SEQ ID NO: 64)	CCAATAAACCTACTCCTCC CTTAA (SEQ ID NO: 65)	ACCACCACCCAACACACAATAA CAAACACA (SEQ ID NO: 66)

5 本发明上述引物探针购于 Thermo Fisher、金唯智生物科技有限公司或生工生物工程股份有限公司，多重PCR反应试剂购于NEB公司，荧光定量PCR试剂购于NEB公司、TAKARA公司或诺唯赞公司。

### 三、多重PCR

具体流程如下：

10 1、DNA提取：提取试剂盒购自QIAGEN公司，按照试剂盒说明书进行。

2、DNA亚硫酸氢盐转化：DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒购于Zymo公司，按照试剂盒说明书进行。

3、多重PCR扩增：采用15个甲基化区域的引物对，在每个反



应孔中进行多重PCR，扩增出含目标区域的目标序列，产物大小在70-130bp左右。

具体包括以下步骤：

1) 配置单个引物浓度为10  $\mu\text{M}$ （每个引物）PCR引物混合物，  
5 里面包含多重反应里每个甲基化区域的正向和反向引物，共1个反应孔。

2) PCR混合液配置：根据下表5配制PCR混合液：

表5 PCR混合液配置方案

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )	终浓度
亚硫酸氢盐转化产物	20	1ng/ $\mu\text{L}$
5×GC 缓冲液	10	5×
Phusion U	0.75	2U
2.5mM dNTPs	2	2.5mM
25 mM $\text{MgCl}_2$	3	25 mM
DEPC $\text{H}_2\text{O}$	4.25	
引物混合物 (Primer set)	10	

3) 打开PCR仪，将反应体系放入PCR仪进行反应，多重PCR反  
10 应程序如下：98 $^{\circ}\text{C}$  30秒 → 20 × [98 $^{\circ}\text{C}$ ，15秒 → 63 $^{\circ}\text{C}$  15秒 → 72 $^{\circ}\text{C}$  15秒] → 72 $^{\circ}\text{C}$  5分钟 → 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 四、荧光定量PCR

1、配置荧光定量PCR反应体系如下：配置单个标志物的引物和  
15 探针混合液，一般标志物的引物（正向引物/反向引物）终浓度为0.4 $\mu\text{M}$ ，探针终浓度为0.2 $\mu\text{M}$ ；选择一组内参引物（以下实施例中  
使用如SEQ ID NO: 61~63所示的引物组和探针），内参的引物（正向引物/反向引物）终浓度为0.8 $\mu\text{M}$ ，探针终浓度为0.4 $\mu\text{M}$ 。

组分	体积 (μL)
50×Rox Reference Dy2	0.4
引物和探针混合物	1
DEPC H <sub>2</sub> O	6.6
AceQ Qpcr Probe Master Mix	10

2、把该反应体系加入96孔板，每个孔18μL，然后将上述经过多重PCR的产物用DECP水稀释，根据孔的个数计算稀释的体积，充分振荡混匀；向每个孔加入2μL稀释过的多重PCR产物；

5 3、打开qPCR仪器，设定好程序如下：95° C 5分钟→40×[95° C 15秒→62° C 30秒]，将96孔板放入qPCR仪按该程序运行；

4、获得CT值。

### 实施例

10 共收集145例石蜡结直肠组织样本(CRC淋巴结阴性79例和CRC淋巴结阳性66例)，以及76例新鲜结直肠组织样本(CRC淋巴结阴性39例和CRC淋巴结阳性37例)所有患者临床资料，其中包括年龄、性别、TNM分期、肿瘤大小、淋巴管浸润状态、血管浸润状态、神经浸润状态、溃疡型等如下表6所示：

表6 患者临床资料

临床信息		淋巴结阴性 (LN-)	淋巴结阳性 (LN+)
		n=118	n=103
年龄	<55	25	26
	≥55	93	77
性别	男性	69	42
	女性	49	61
TNM 中 T 分期	T1	4	1
	T2	19	8
	T3	57	43
	T4	38	51
肿瘤大小 (cm)	<5	59	62
	≥5	59	41
淋巴管浸润	是	14	39
	否	104	64
血管浸润	是	17	38
	否	101	65
神经浸润	是	34	50
	否	84	53
溃疡型	是	65	63
	否	53	40

对这221个样本，如材料和方法部分所述，用这15对引物进行多重PCR及荧光定量PCR，得到这15个标记物在每个样本里面的 $\Delta CT$ 。具体地，检测所得每个甲基化区域的CT值通过内参CT值进行校正，得到目标区域的相对循环数 $\Delta CT = CT(\text{目标区域，即甲基化区域}) - CT(\text{内参})$ ；若目标区域未检出，则赋予目标区域的相对循环数 $\Delta CT = 35$ 。

$\Delta CT$ 值与样品中DNA量呈负相关， $\Delta CT$ 值的高低反映了样本中该标记物共甲基化的DNA片段的含量的高低，通常甲基化水平或者共甲基化DNA含量越高， $\Delta CT$ 值越低。根据15个甲基化区域共甲基化在结直肠癌淋巴结非转移人群及淋巴结转移人群中的相对循环数 $\Delta CT$ 值建立单个甲基化区域判别淋巴结转移发生的诊断模型ROC曲线，并根据ROC曲线计算AUC值及划分该区域的判定阈值。

根据阈值对比标准诊断计算该甲基化区域的判别灵敏度、特异性等。具体地，在本实施例中，利用R（R version 3.6.1）软件里面的pROC（version 1.12）包计算每个标记物的AUC及敏感性（Sensitivity, SE）、特异性（Specificity, SP）、准确率（Accuracy, ACC）、阳性预测值（Positive predictive value, PPV）、阴性预测值（Negative predictive value, NPV）如下表7所示，可以看到每个标记物在区分结直肠癌淋巴结转移和非转移方面均有区分能力，ACC均在0.54以上，最高可达约0.82；图1是 $\Delta$ CT聚类效果图。

表7 15个标记物区分结直肠癌淋巴结转移和非转移的统计结果

生物标记物 SEQ ID NO:	AUC	特异性	敏感性	准确率	阳性预测值	阴性预测率
1	0.585399	0.515152	0.666667	0.590909	0.578947	0.607143
2	0.508264	0.333333	0.787879	0.560606	0.541667	0.611111
3	0.574839	0.9830508	0.0485437	0.5475113	0.7142857	0.5420561
4	0.542241	0.242424	0.878788	0.560606	0.537037	0.666667
5	0.567493	0.272727	0.939394	0.606061	0.563636	0.818182
6	0.591368	0.727273	0.515152	0.621212	0.653846	0.6
7	0.604683	0.727273	0.515152	0.621212	0.653846	0.6
8	0.561983	0.363636	0.818182	0.590909	0.5625	0.666667
9	0.651974	0.787879	0.545455	0.666667	0.72	0.634146
10	0.873278	0.8728814	0.7572816	0.8190045	0.8387097	0.8046875
11	0.736455	0.8559322	0.2621359	0.5791855	0.6136364	0.5706215
12	0.605142	0.8135593	0.3883495	0.6153846	0.6451613	0.6037736
13	0.556474	0.636364	0.606061	0.621212	0.625	0.617647
14	0.584022	0.333333	0.878788	0.606061	0.568627	0.733333
15	0.623508	0.9322034	0.2427184	0.6108597	0.7575758	0.5851064

从上表7中单个标记物的表现可以看出SEQ ID NO:10所示的生物标记物表现最佳（AUC约为0.87，ACC约为0.82），选取SEQ ID NO:10所示的生物标记物，与SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15中的一个或多个标记物进行随机组合，用221样本，随机切分100次，用逻辑回归建模，在100次试验（test）里面平均AUC如下表8所示，可以看出这些标记物的组合同样具有良好的区分肠癌淋巴结转移的能力。

表 8 标记物组合区分结直肠癌淋巴结转移和非转移的统计结果

生物标记物组合 (SEQ ID NO: )	平均 (mean) AUC	中位 (median) AUC	SD
10	0.870729558	0.870887338	0.004831611
3+10	0.871512546	0.875255643	0.005070208
10+11	0.86635638	0.862598103	0.005045709
10+15	0.866626083	0.865902293	0.005008092
10+12	0.867974442	0.867896311	0.004918694
3+10+11	0.867759861	0.868030524	0.005113407
3+10+15	0.868761025	0.871152568	0.00513066
3+10+12	0.869879464	0.87125163	0.005080924
10+11+15	0.86232105	0.860584912	0.005189213
10+11+12	0.864388086	0.860626454	0.005055604
10+12+15	0.864089303	0.861786436	0.005034844
10+11+12+15	0.860177321	0.85626454	0.005168847
3+10+11+15	0.863917063	0.863409771	0.005126502
3+10+12+15	0.865829275	0.865902293	0.005084714
3+10+11+12	0.866159854	0.865071452	0.00507436
3+10+11+12+15	0.861521365	0.861115372	0.005142882

同样通过221个样本，比较了如SEQ ID NO: 10所示标记物的  $\Delta$  CT与CA199、CEA、影像的差异，如图2及下表9所示，可以看出如SEQ ID NO: 10所示标记物远优于CA199、CEA和影像，如SEQ ID NO: 10所示标记物的AUC约为0.87，CA199的AUC约为0.58，CEA的AUC约为0.56，影像的AUC约为0.52。

表9 本发明生物标记物与CA199、CEA、影像的对比

标记物	AUC	特异性	敏感性	准确率	阳性预测值	阴性预测率
CA199	0.583289566	0.491071429	0.705882353	0.593457944	0.558139535	0.647058824
CEA	0.559240485	0.433628319	0.718446602	0.569444444	0.536231884	0.628205128
影像 (Image)	0.522340867	0.462264151	0.582417582	0.517766497	0.481818182	0.563218391
SEQ ID NO: 10 (LBX2)	0.870454171	0.872881356	0.757281553	0.819004525	0.838709677	0.8046875

以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本

说明书记载的范围。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围，因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

## 权 利 要 求 书

1. 一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的甲基化生物标记物，其中，所述的甲基化生物标记物包含：

- (i) 如SEQ ID NO: 1~15所示的序列的至少一种；和/或，
- (ii) 与SEQ ID NO: 1~15所示的序列互补的序列中的至少一种。

5       2. 根据权利要求 1 所述的用于结直肠癌淋巴结转移诊断的甲基化生物标记物，其中，所述的甲基化生物标记物至少包含 SEQ ID NO: 10 所示的序列和/或与 SEQ ID NO: 10 所示的序列互补的序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的用于结直肠癌淋巴结转移诊断的甲基化生物标记物，其中，所述的甲基化生物标记物包含 SEQ ID NO: 10 所示的序列和/或与 SEQ ID NO: 10 所示的序列互补的序列，与选自以下的序列的组合：

10       (a) 如 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 15 中所示的序列的至少一种；和/或，

      (b) 与 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 15 所示的序列互补的序列中的至少一种。

15       4. 根据权利要求 1~3 中任一项所述的用于结直肠癌淋巴结转移诊断的甲基化生物标记物，其中，所述诊断是区分患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移；

      任选地，所述结直肠癌选自 TNM 分期中 T 分期的 T1 期、T2 期、T3 期或 T4 期的结直肠癌。

20       5. 权利要求 1~4 中任一项所述的甲基化生物标记物在制备用于诊断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移的试剂或试剂盒中的用途。

6. 一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒，其中，所述的试剂盒包含用于检测待测样本中权利要求 1~4 中任一项所述的甲基化生物标记物的甲基化程度的试剂。

25       7. 根据权利要求 6 所述的用于结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒，其中，所述的试剂为选自以下的检测甲基化程度的方法中所使用的试剂：荧光定量 PCR、甲基化特异性 PCR、数字 PCR、DNA 甲基化芯片、靶向 DNA 甲基化

测序、全基因组甲基化测序和 DNA 甲基化质谱中的一种或多种。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的用于结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒，其中，所述的试剂包括引物和/或探针；其中，

所述引物扩增包含 SEQ ID NO: 1~15 所示的序列或与 SEQ ID NO: 1~15 所示的序列互补的序列；

所述探针至少部分地与 SEQ ID NO: 1~15 所示的序列或与 SEQ ID NO: 1~15 所示的序列互补的序列杂交。

9. 根据权利要求 6~8 中任一所述的用于结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒，其中，所述的试剂包括选自以下的至少一组引物和探针：

- 10 (1) 如 SEQ ID NO: 16~17 所示的引物，如 SEQ ID NO: 46 所示的探针；
- (2) 如 SEQ ID NO: 18~19 所示的引物，如 SEQ ID NO: 47 所示的探针；
- (3) 如 SEQ ID NO: 20~21 所示的引物，如 SEQ ID NO: 48 所示的探针；
- (4) 如 SEQ ID NO: 22~23 所示的引物，如 SEQ ID NO: 49 所示的探针；
- (5) 如 SEQ ID NO: 24~25 所示的引物，如 SEQ ID NO: 50 所示的探针；
- 15 (6) 如 SEQ ID NO: 26~27 所示的引物，如 SEQ ID NO: 51 所示的探针；
- (7) 如 SEQ ID NO: 28~29 所示的引物，如 SEQ ID NO: 52 所示的探针；
- (8) 如 SEQ ID NO: 30~31 所示的引物，如 SEQ ID NO: 53 所示的探针；
- (9) 如 SEQ ID NO: 32~33 所示的引物，如 SEQ ID NO: 54 所示的探针；
- (10) 如 SEQ ID NO: 34~35 所示的引物，如 SEQ ID NO: 55 所示的探针；
- 20 (11) 如 SEQ ID NO: 36~37 所示的引物，如 SEQ ID NO: 56 所示的探针；
- (12) 如 SEQ ID NO: 38~39 所示的引物，如 SEQ ID NO: 57 所示的探针；
- (13) 如 SEQ ID NO: 40~41 所示的引物，如 SEQ ID NO: 58 所示的探针；
- (14) 如 SEQ ID NO: 42~43 所示的引物，如 SEQ ID NO: 59 所示的探针；
- (15) 如 SEQ ID NO: 44~45 所示的引物，如 SEQ ID NO: 60 所示的探针。

25 10. 根据权利要求 6~9 中任一项所述的用于结直肠癌淋巴结转移诊断的试剂盒，其中，所述的待测样本选自组织、血液、血浆、唾液、血清、尿液、尿液脱落细胞、尿沉渣、尿液上清中的一种或多种。



11. 一种用于结直肠癌淋巴结转移诊断的系统，其中，所述系统包括检测装置、计算装置和输出装置；

所述检测装置包括进样器和检测器，所述进样器用于采集来自受试者的样本，所述检测器用于检测所述样本中权利要求 1~4 中任一项所述的甲基化生物标记物的甲基化程度；

所述计算装置包括存储器和处理器，所述存储器中存储有计算机程序，所述处理器被配置为执行所述存储器中存储的计算机程序，以实现如下判别：

将所述样本中所述的甲基化生物标记物的甲基化程度与判定阈值相比较，判别所述样本对应的受试者的是否存在结直肠癌淋巴结转移。

12. 选自以下的引物和探针的组合中的至少一组在制备用于诊断患有结直肠癌的受试者是否存在淋巴结转移的试剂或试剂盒中的用途，其中，所述引物和探针的组合用于检测权利要求 1~4 中任一项所述的甲基化生物标记物的甲基化程度：

- (1) 如 SEQ ID NO: 16~17 所示的引物，如 SEQ ID NO: 46 所示的探针；
- (2) 如 SEQ ID NO: 18~19 所示的引物，如 SEQ ID NO: 47 所示的探针；
- (3) 如 SEQ ID NO: 20~21 所示的引物，如 SEQ ID NO: 48 所示的探针；
- (4) 如 SEQ ID NO: 22~23 所示的引物，如 SEQ ID NO: 49 所示的探针；
- (5) 如 SEQ ID NO: 24~25 所示的引物，如 SEQ ID NO: 50 所示的探针；
- (6) 如 SEQ ID NO: 26~27 所示的引物，如 SEQ ID NO: 51 所示的探针；
- (7) 如 SEQ ID NO: 28~29 所示的引物，如 SEQ ID NO: 52 所示的探针；
- (8) 如 SEQ ID NO: 30~31 所示的引物，如 SEQ ID NO: 53 所示的探针；
- (9) 如 SEQ ID NO: 32~33 所示的引物，如 SEQ ID NO: 54 所示的探针；
- (10) 如 SEQ ID NO: 34~35 所示的引物，如 SEQ ID NO: 55 所示的探针；
- (11) 如 SEQ ID NO: 36~37 所示的引物，如 SEQ ID NO: 56 所示的探针；
- (12) 如 SEQ ID NO: 38~39 所示的引物，如 SEQ ID NO: 57 所示的探针；
- (13) 如 SEQ ID NO: 40~41 所示的引物，如 SEQ ID NO: 58 所示的探针；
- (14) 如 SEQ ID NO: 42~43 所示的引物，如 SEQ ID NO: 59 所示的探针；

(15) 如 SEQ ID NO: 44~45 所示的引物, 如 SEQ ID NO: 60 所示的探针。

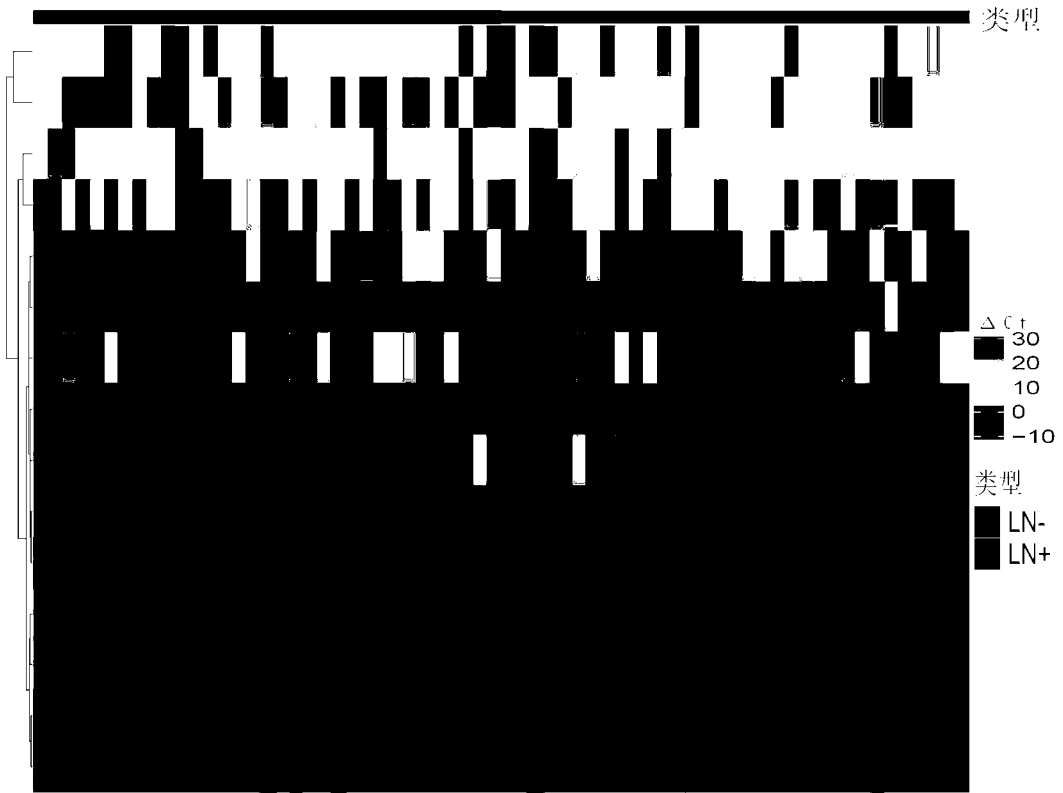


图 1

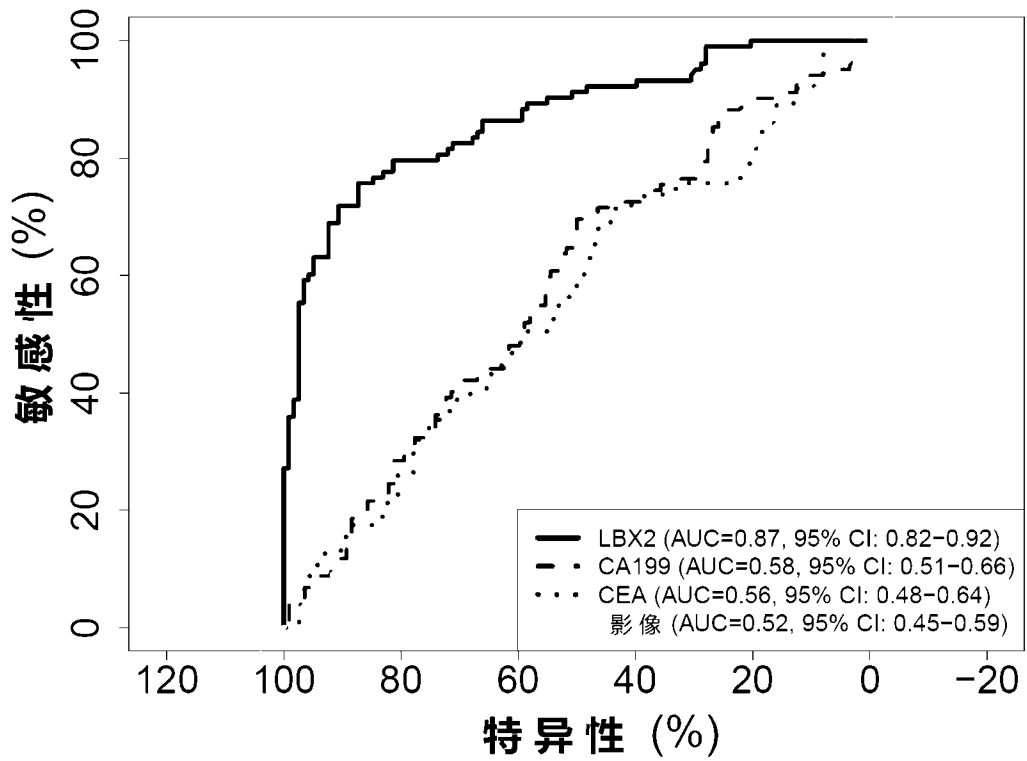


图 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/095576

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12Q1/6886(2018.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC:C12Q  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) Databases: CNTXT, WPABS, WPABSC, ENTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CJFD, UCSC, NCBI, CNKI search terms: 结直肠癌, 淋巴结转移, 甲基化, 染色体7, 七号染色体, 乙酰胆碱酯酶, chr7, 100892579-100892639, colorectal cancer, lymph node metastasis, methylation, ACHE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 115896281 A (GUANGZHOU ANCHORDX MEDICAL CO., LTD.) 04 April 2023 (2023-04-04) 1-12	1 (in part), 4-12 (in part)
A	CN 102140498 A (BEIJING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 03 August 2011 (2011-08-03) see embodiment 8	1 (in part), 4-12 (in part)
A	CN 109504780 A (NEOCURA BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 22 March 2019 (2019-03-22) see abstract	1 (in part), 4-12 (in part)
A	CN 110283910 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 27 September 2019 (2019-09-27) see abstract	1 (in part), 4-12 (in part)
A	CN 111662978 A (PEKING UNIVERSITY et al.) 15 September 2020 (2020-09-15) see abstract	1 (in part), 4-12 (in part)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>08 September 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>17 September 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>		Authorized officer   Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/095576

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012264640 A1 (AN SUNG WHAN; MOON YOUNG HO et al.) 18 October 2012 (2012-10-18) see claim 1	1 (in part), 4-12 (in part)
A	US 2016108476 A1 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 21 April 2016 (2016-04-21) see claim 1	1 (in part), 4-12 (in part)
A	CN 104878121 A (HUANG, Wenlin) 02 September 2015 (2015-09-02) see abstract	1 (in part), 4-12 (in part)
A	李锦芸 (LI, Jinyun). "CLDN11基因甲基化与结直肠癌转移的相关性研究 (Methylated CLDN11 Associated with the Metastasis of Colorectal Cancer)" 中国优秀硕士论文期刊数据库 (Non-official translation: Chinese Master's Theses and Journals Database), 15 February 2018 (2018-02-15), see abstract, pages 22-23, section 3.2.2, table 3.1	1 (in part), 4-12 (in part)
A	Ahmed Malki et al. "Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements" <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , Vol. vol. 22, 24 December 2020 (2020-12-24), article 130, see abstract	1 (in part), 4-12 (in part)

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**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:

This invention relates to the following 15 inventions:

Invention 1: claims 1 (in part) and 4-12 (in part) relate to a methylation biomarker for diagnosis of colorectal lymph node metastasis, a kit for detecting the marker, a reagent, a diagnostic system, and the use of the reagent or kit, wherein the methylation biomarker comprises a sequence as shown in SEQ ID NO: 1 or a complementary sequence thereof.

Invention 2: claims 1 (in part) and 4-12 (in part) relate to a methylation biomarker for diagnosis of colorectal lymph node metastasis, a kit for detecting the marker, a reagent, a diagnostic system, and the use of the reagent or kit, wherein the methylation biomarker comprises a sequence as shown in SEQ ID NO: 2 or a complementary sequence thereof.

...

Invention 10: claims 1 (in part), 4-12 (in part), 2 and 3 relate to a methylation biomarker for diagnosis of colorectal lymph node metastasis, a kit for detecting the marker, a reagent, a diagnostic system, and the use of the reagent or kit, wherein the methylation biomarker comprises a sequence as shown in SEQ ID NO: 10 or a complementary sequence thereof.

...

Invention 15: claims 1 (in part) and 4-12 (in part) relate to a methylation biomarker for diagnosis of colorectal lymph node metastasis, a kit for detecting the marker, a reagent, a diagnostic system, and the use of the reagent or kit, wherein the methylation biomarker comprises a sequence as shown in SEQ ID NO: 15 or a complementary sequence thereof.

The same technical features among the 15 inventions are DNA methylation markers for diagnosis of colorectal lymph node metastasis and a related reagent and kit. However, the prior art has the technical solution of using methylated DNA as a biomarker for colorectal cancer lymph node metastasis. For example, prior art 1 discloses in the Master's thesis (CLDN11 基因甲基化与结直肠癌转移的相关性研究, non-official translation: Research on Correlation between Methylation of CLDN11 Gene and Colorectal Cancer Metastasis, 中国优秀硕士论文期刊数据库, China Master's Theses Journals Database, 15 February 2018, see abstract, and pages 22-23, section 3.2.2, and table 3.1) of LI, Jinyun from Ningbo University that CLDN11 gene with obvious high methylation is obtained from differential methylation gene loci among 4047 colorectal cancer and para-carcinoma tissue, and a series of experiments and public database big sample data analysis prove that CLDN11 is methylated and participates in colorectal cancer lymph node metastasis, and CLDN11 is a potential prognosis evaluation molecular marker for indicating colorectal cancer; and prior art 2 (CN 102140498 A, "体外预测肿瘤转移和侵袭能力的方法及核苷酸片段, method for predicting tumor metastasis and invasion capacity in vitro and nucleotide fragments", publication date: 03 August 2011, see embodiment 8) discloses predicting the colon cancer lymph node invasion and transfer capacity by means of detecting whether the methylation of cytosine in a CpG island in an SRF nucleotide sequence in colon cancer incisional edge tissue exists or not. On this basis, preparing a related reagent and kit for diagnosis of colorectal cancer lymph node metastasis on the basis of a DNA methylation biomarker would also have been readily conceivable. Therefore, the same technical features do not contribute to the prior art, and are not special technical features; meanwhile, there is no corresponding relationship among the sequences of the inventions, so that the inventions also do not have a corresponding special technical feature therebetween. In summary, the 15 inventions do not have a same or corresponding special technical feature, and therefore do not belong to a single general inventive concept, and lack unity of invention and do not comply with PCT Rule 13.1, 13.2 and 13.3.

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

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.: **Claims 1 (in part) and 4-12 (in part), which relate to a methylation biomarker for diagnosis of colorectal lymph node metastasis, a kit for detecting the marker, a reagent, a diagnostic system, and the use of the reagent or kit, wherein the methylation biomarker comprises a sequence as shown in SEQ ID NO: 1 or a complementary sequence thereof.**

- 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/CN2023/095576**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	115896281	A	04 April 2023	None	
CN	102140498	A	03 August 2011	WO 2011095067 A1	11 August 2011
				EP 2537941 A1	26 December 2012
				EP 2537941 A4	04 September 2013
CN	109504780	A	22 March 2019	None	
CN	110283910	A	27 September 2019	None	
CN	111662978	A	15 September 2020	None	
US	2012264640	A1	18 October 2012	WO 2011055916 A2	12 May 2011
				WO 2011055916 A3	04 August 2011
				KR 20110049430 A	12 May 2011
				KR 101142131 B1	11 May 2012
				EP 2497834 A2	12 September 2012
				EP 2497834 A4	01 May 2013
				EP 2497834 B1	06 January 2016
				EP 2497834 B2	12 September 2018
				JP 2013509872 A	21 March 2013
				JP 5675831 B2	25 February 2015
				ES 2561660 T3	29 February 2016
				ES 2561660 T5	07 November 2018
				DK 2497834 T3	01 February 2016
				DK 2497834 T4	02 January 2019
				US 9745622 B2	29 August 2017
US	2016108476	A1	21 April 2016	EP 2885427 A1	24 June 2015
				EP 2885427 B1	10 January 2018
				EP 2698436 A1	19 February 2014
				WO 2014026768 A1	20 February 2014
				WO 2014026768 A8	24 April 2014
CN	104878121	A	02 September 2015	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/095576

<p><b>A. 主题的分类</b> C12Q1/6886 (2018. 01) i</p> <p>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</p>																									
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC:C12Q</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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)) 数据库: CNTXT, WPABS, WPABSC, ENTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CJFD, UCSC, NCBI, CNKI 检索词: 结直肠癌, 淋巴结转移, 甲基化, 染色体7, 七号染色体, 乙酰胆碱酯酶, chr7, 100892579-100892639, colorectal cancer, lymph node metastasis, methylation, ACHE</p>																									
<p><b>C. 相关文件</b></p> <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>PX</td> <td>CN 115896281 A (广州市基准医疗有限责任公司) 2023年4月4日 (2023 - 04 - 04) 1-12</td> <td>1 (部分), 4-12 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102140498 A (北京市肿瘤防治研究所) 2011年8月3日 (2011 - 08 - 03) 参见实施例8</td> <td>1 (部分), 4-12 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109504780 A (深圳市新合生物医疗科技有限公司) 2019年3月22日 (2019 - 03 - 22) 参见摘要</td> <td>1 (部分), 4-12 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110283910 A (浙江大学) 2019年9月27日 (2019 - 09 - 27) 参见摘要</td> <td>1 (部分), 4-12 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111662978 A (北京大学等) 2020年9月15日 (2020 - 09 - 15) 参见摘要</td> <td>1 (部分), 4-12 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012264640 A1 (AN SUNG WHAN;MOON YOUNG H0等) 2012年10月18日 (2012 - 10 - 18) 参见权利要求1</td> <td>1 (部分), 4-12 (部分)</td> </tr> </tbody> </table> <p><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。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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</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 “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 “&amp;” 同族专利的文件</td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 115896281 A (广州市基准医疗有限责任公司) 2023年4月4日 (2023 - 04 - 04) 1-12	1 (部分), 4-12 (部分)	A	CN 102140498 A (北京市肿瘤防治研究所) 2011年8月3日 (2011 - 08 - 03) 参见实施例8	1 (部分), 4-12 (部分)	A	CN 109504780 A (深圳市新合生物医疗科技有限公司) 2019年3月22日 (2019 - 03 - 22) 参见摘要	1 (部分), 4-12 (部分)	A	CN 110283910 A (浙江大学) 2019年9月27日 (2019 - 09 - 27) 参见摘要	1 (部分), 4-12 (部分)	A	CN 111662978 A (北京大学等) 2020年9月15日 (2020 - 09 - 15) 参见摘要	1 (部分), 4-12 (部分)	A	US 2012264640 A1 (AN SUNG WHAN;MOON YOUNG H0等) 2012年10月18日 (2012 - 10 - 18) 参见权利要求1	1 (部分), 4-12 (部分)	* 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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																							
PX	CN 115896281 A (广州市基准医疗有限责任公司) 2023年4月4日 (2023 - 04 - 04) 1-12	1 (部分), 4-12 (部分)																							
A	CN 102140498 A (北京市肿瘤防治研究所) 2011年8月3日 (2011 - 08 - 03) 参见实施例8	1 (部分), 4-12 (部分)																							
A	CN 109504780 A (深圳市新合生物医疗科技有限公司) 2019年3月22日 (2019 - 03 - 22) 参见摘要	1 (部分), 4-12 (部分)																							
A	CN 110283910 A (浙江大学) 2019年9月27日 (2019 - 09 - 27) 参见摘要	1 (部分), 4-12 (部分)																							
A	CN 111662978 A (北京大学等) 2020年9月15日 (2020 - 09 - 15) 参见摘要	1 (部分), 4-12 (部分)																							
A	US 2012264640 A1 (AN SUNG WHAN;MOON YOUNG H0等) 2012年10月18日 (2012 - 10 - 18) 参见权利要求1	1 (部分), 4-12 (部分)																							
* 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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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 2023年9月8日	国际检索报告邮寄日期 2023年9月17日																								
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员 袁实 电话号码 (+86) 010-62411598																								

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
A	US 2016108476 A1 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 2016年4月21日 (2016 - 04 - 21) 参见权利要求1	1 (部分), 4-12 (部分)
A	CN 104878121 A (黄文林) 2015年9月2日 (2015 - 09 - 02) 参见摘要	1 (部分), 4-12 (部分)
A	李锦芸. "CLDN11 基因甲基化与结直肠癌转移的相关性研究" 中国优秀硕士论文期刊数据库, 2018年2月15日 (2018 - 02 - 15), 参见摘要、第22-23页第3.2.2小节、表3.1	1 (部分), 4-12 (部分)
A	Ahmed Malki等. "Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Meta- stasis: Recent Insights and Advancements" International Journal of Molecular Sciences, 第22卷, 2020年12月24日 (2020 - 12 - 24), 第130篇, 参见摘要	1 (部分), 4-12 (部分)

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
  - a.  作为国际申请的一部分提交的;
  - b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

## 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：

本发明涉及如下15项发明：

第1项：权利要求1（部分），4-12（部分），涉及一种用于结直肠淋巴结转移诊断的甲基化生物标志物、检测该标志物的试剂盒、试剂、诊断系统、该试剂或试剂盒的用途，所述甲基化生物标志物包含如SEQ ID NO:1所示序列或其互补序列；

第2项：权利要求1（部分），4-12（部分），涉及一种用于结直肠淋巴结转移诊断的甲基化生物标志物、检测该标志物的试剂盒、试剂、诊断系统、该试剂或试剂盒的用途，所述甲基化生物标志物包含如SEQ ID NO:2所示序列或其互补序列；

.....

第10项：权利要求1（部分），4-12（部分），2, 3, 涉及一种用于结直肠淋巴结转移诊断的甲基化生物标志物、检测该标志物的试剂盒、试剂、诊断系统、该试剂或试剂盒的用途，所述甲基化生物标志物包含如SEQ ID NO:10所示序列或其互补序列；

.....

第15项：权利要求1（部分），4-12（部分），涉及一种用于结直肠淋巴结转移诊断的甲基化生物标志物、检测该标志物的试剂盒、试剂、诊断系统、该试剂或试剂盒的用途，所述甲基化生物标志物包含如SEQ ID NO:15所示序列或其互补序列；

上述15项发明之间相同的技术特征是用于结直肠淋巴结转移诊断的DNA甲基化标志物以及相关试剂、试剂盒。然而现有技术已经存在用甲基化DNA作为结直肠癌淋巴结转移的生物标志物的技术方案。如：现有技术1：宁波大学李锦芸的硕士学位论文（CLDN11 基因甲基化与结直肠癌转移的相关性研究，中国优秀硕士学位论文全文数据库，2018-02-15公开，参见摘要、第22-23页第3.2.2小节、表3.1）公开了从4047个结直肠癌与癌旁组织间差异甲基化基因位点中得到CLDN11这一明显高甲基化的基因，一系列实验和公共数据库大样本数据分析证实CLDN11甲基化参与结直肠癌淋巴结转移，是预示结直肠癌发潜在的预后评估分子标志物；现有技术2（CN102140498A，名称“体外预测肿瘤转移和侵袭能力的方法及核苷酸片段”，公开日为2011年8月3日，参见实施例8）公开了通过测定是否存在结肠癌切缘组织中SRF核苷酸序列中CpG岛中胞嘧啶的甲基化预测结肠癌淋巴结侵袭和转移能力。在此基础上，基于DNA甲基化生物标志物制备结直肠癌淋巴结转移诊断的相关试剂和试剂盒也是容易想到的。因此，上述相同技术特征没有对现有技术做出贡献，不是特定技术特征；同时，各项发明的序列之间也不存在呼应关系，故各项发明之间也不会有相应的特定技术特征。综上，15项发明之间不具备相同或相应的特定技术特征，因此不属于一个总的发明构思，它们不具备单一性，不符合PCT实施细则13.1、13.2、13.3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： 权利要求1（部分），4-12（部分），涉及一种用于结直肠淋巴结转移诊断的甲基化生物标志物、检测该标志物的试剂盒、试剂、诊断系统、该试剂或试剂盒的用途，所述甲基化生物标志物包含如SEQ ID NO:1所示序列或其互补序列。

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/CN2023/095576

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	115896281	A	2023年4月4日	无			
CN	102140498	A	2011年8月3日	WO	2011095067	A1	2011年8月11日
				EP	2537941	A1	2012年12月26日
				EP	2537941	A4	2013年9月4日
CN	109504780	A	2019年3月22日	无			
CN	110283910	A	2019年9月27日	无			
CN	111662978	A	2020年9月15日	无			
US	2012264640	A1	2012年10月18日	WO	2011055916	A2	2011年5月12日
				WO	2011055916	A3	2011年8月4日
				KR	20110049430	A	2011年5月12日
				KR	101142131	B1	2012年5月11日
				EP	2497834	A2	2012年9月12日
				EP	2497834	A4	2013年5月1日
				EP	2497834	B1	2016年1月6日
				EP	2497834	B2	2018年9月12日
				JP	2013509872	A	2013年3月21日
				JP	5675831	B2	2015年2月25日
				ES	2561660	T3	2016年2月29日
				ES	2561660	T5	2018年11月7日
				DK	2497834	T3	2016年2月1日
				DK	2497834	T4	2019年1月2日
				US	9745622	B2	2017年8月29日
US	2016108476	A1	2016年4月21日	EP	2885427	A1	2015年6月24日
				EP	2885427	B1	2018年1月10日
				EP	2698436	A1	2014年2月19日
				WO	2014026768	A1	2014年2月20日
				WO	2014026768	A8	2014年4月24日
CN	104878121	A	2015年9月2日	无			