202426661

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202426661 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：113109290 (22)申請日： 中華民國 106 (2017) 年 05 月 31 日

(51)Int. Cl.： *C12Q1/6883 (2018.01)* *C12Q1/6809 (2018.01)*

(30)優先權：2016/05/30 美國 62/343,050

(71)申請人：香港中文大學 (香港地區) THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG (HK)
香港

(72)發明人：盧 煜明 LO, YUK-MING DENNIS (GB)；趙 慧君 CHIU, ROSSA WAI KWUN (AU)；陳 君賜 CHAN, KWAN CHEE (HK)；孫坤 SUN, KUN (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：28 共 109 頁

(54)名稱

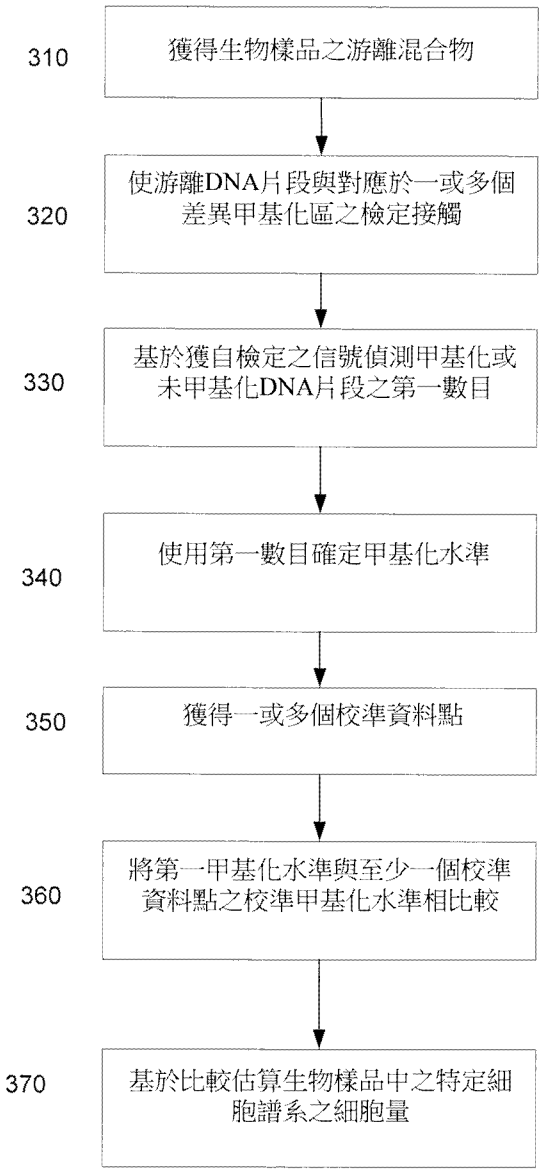
使用血液中游離 DNA(CELL-FREE DNA)偵測血液疾病

(57)摘要

提供使用血液樣品中游離 DNA、例如使用血漿或血清偵測血液疾病之技術。舉例而言，一種檢定可靶向一或多個對特定血液細胞譜系(例如紅血球母細胞)具有特異性之差異甲基化區。可自該檢定定量甲基化水準以確定該血液樣品之游離混合物中甲基化或未甲基化 DNA 片段的量。可將該甲基化水準與一或多個截止值相比較（該一或多個截止值對應於該特定血液細胞譜系之正常範圍）作為確診血液病的部分依據。

Techniques are provided for detecting hematological disorders using cell-free DNA in a blood sample, e.g., using plasma or serum. For example, an assay can target one or more differentially-methylated regions specific to a particular hematological cell lineage (e.g., erythroblasts). A methylation level can be quantified from the assay to determine an amount of methylated or unmethylated DNA fragments in a cell-free mixture of the blood sample. The methylation level can be compared to one or more cutoff values, e.g., that correspond to a normal range for the particular hematological cell lineage as part of determining a level of a hematological disorder.

指定代表圖：



【圖3B】

符號簡單說明：

310:步驟

320:步驟

330:步驟

340:步驟

350:步驟

360:步驟

370:步驟

2600:方法

20242066
202[illegible]
專利案號：113109290
原申請案號：106117990

【發明摘要】

【中文發明名稱】

使用血液中游離DNA(CELL-FREE DNA)偵測血液疾病

【英文發明名稱】

DETECTING HEMATOLOGICAL DISORDERS USING CELL-FREE DNA IN BLOOD

【中文】

提供使用血液樣品中游離DNA、例如使用血漿或血清偵測血液疾病之技術。舉例而言，一種檢定可靶向一或多個對特定血液細胞譜系(例如紅血球母細胞)具有特異性之差異甲基化區。可自該檢定定量甲基化水準以確定該血液樣品之游離混合物中甲基化或未甲基化DNA片段的量。可將該甲基化水準與一或多個截止值相比較（該一或多個截止值對應於該特定血液細胞譜系之正常範圍）作為確診血液病的部分依據。

【英文】

Techniques are provided for detecting hematological disorders using cell-free DNA in a blood sample, e.g., using plasma or serum. For example, an assay can target one or more differentially-methylated regions specific to a particular hematological cell lineage (e.g., erythroblasts). A methylation level can be quantified from the assay to determine an amount of methylated or unmethylated DNA fragments in a cell-free mixture of the blood sample. The methylation level can be compared to one or more cutoff values, e.g., that correspond to a normal range for the particular hematological cell lineage as part of determining

a level of a hematological disorder.

【指定代表圖】

圖3B

【代表圖之符號簡單說明】

310:步驟

320:步驟

330:步驟

340:步驟

350:步驟

360:步驟

370:步驟

2600:方法

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用血液中游離DNA(CELL-FREE DNA)偵測血液疾病

【英文發明名稱】

DETECTING HEMATOLOGICAL DISORDERS USING CELL-FREE DNA IN BLOOD

【技術領域】

【先前技術】

為判定血液疾病(例如貧血)是否存在於個人中，習知技術是執行骨髓活檢之組織學檢查。然而，骨髓活檢是讓經歷此類程序之患者疼痛且焦慮之侵襲性程序。因此，當前對於偵測且表徵個人中之血液疾病的新技術有一定的需求。

貧血可由多種臨床病狀引起，各自具有其本身之治療方案。因此，確定貧血狀況之原因且因此隨後進一步調查或治療在臨床上是有用的。一個貧血原因是缺乏紅血球生成所必需之營養，諸如(但不限於)鐵、B12、葉酸等。另一個貧血原因是失血，其可為急性或慢性的。失血可由多種原因引起，例如月經過多或自胃腸道出血。貧血亦頻繁地發現於許多慢性病症中，亦稱作慢性疾病貧血，其可在癌症及發炎性腸病中發現。

因此，用於篩選血液疾病之個體，確定血液疾病之病因，監測患有血液疾病之個體，及/或確定患有血液疾病之個體之適當治療方案的新技術有一定需求。

【發明內容】

一些實施例提供用於使用血液樣品中游離DNA、例如使用血漿或血

清偵測血液疾病之系統、方法及設備。舉例而言，一種檢定可靶向一或多個對特定血液細胞譜系(例如紅血球母細胞)具有特異性之差異甲基化區。可自該檢定定量甲基化水準以確定該血液樣品之游離混合物中甲基化或未甲基化DNA片段的量。可將該甲基化水準與一或多個截止值相比較（該一或多個截止值對應於該特定血液細胞譜系之正常範圍）作為確診血液病的部分依據。一些實施例可使用一或多個甲基化水準以類似方式自血液樣品中之特定血液細胞譜系量測DNA的量(例如紅血球母細胞DNA)。

此類分析可提供一種在不執行骨髓活檢之侵襲性程序之情況下對血液疾病之偵測。舉例而言，吾等結果展現骨髓細胞以顯著比例貢獻循環游離DNA。對循環游離DNA中造血細胞之甲基化標誌之分析可反映骨髓細胞之狀態。此等實施例可特別適用於監測骨髓對治療之反應，例如對患有缺鐵性貧血之患者之口服鐵療法的反應。實施例亦可用於向患者指派不同程序，例如骨髓活檢或侵襲性較小之調查。

其他實施例是針對與本文所描述之方法相關聯的系統及電腦可讀媒體。

可參考以下實施方式及附圖來獲得對本發明實施例之性質及優勢的較好理解。

【圖式簡單說明】

圖1顯示根據本發明之實施例亞鐵螯合酶(FECH)基因之啟動子內之CpG位點的甲基化密度。

圖2A及圖2B顯示根據本發明之實施例使用經設計用於偵測甲基化及未甲基化DNA的數位PCR檢定對普遍甲基化及未甲基化之DNA之分析。

圖3A顯示根據本發明之實施例偵測所得血球中之E%與有核RBC (紅

血球母細胞)數目之間的相關性之圖。圖3B說明根據本發明之實施例之方法300之流程圖，該方法用於藉由分析游離DNA確定生物樣品中之特定細胞譜系之細胞量。

圖4顯示根據本發明之實施例偵測所得健康非懷孕個體及處於不同三月期的懷孕女性之膚色血球層及血漿的未甲基化%。

圖5係顯示膚色血球層中之未甲基化%與血漿中之未甲基化%之間無相關性之圖。

圖6A及6B顯示根據本發明之實施例健康個體中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))。E%可定義為與未甲基化%相同。

圖7顯示血漿DNA中之E%(FECH)結果與健康個體年齡之間無相關性。

圖8係根據本發明之實施例偵測所得患有再生不全性貧血、重型β-地中海貧血症的患者及健康對照個體中，未甲基化%針對血色素濃度的圖。

圖9係根據本發明之實施例偵測所得患有缺鐵(Fe)性貧血及急性失血的患者中之血漿未甲基化%的圖。

圖10顯示根據本發明之實施例偵測所得患有再生不全性貧血、慢性腎衰竭(CRF)、重型β-地中海貧血症、缺鐵性貧血之患者及健康個體中，血漿中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))與血色素水準之間的關係。

圖11A及11B顯示根據本發明之實施例偵測所得患有再生不全性貧血、慢性腎衰竭(CRF)、重型β-地中海貧血症及缺鐵性貧血之貧血患者中，網狀紅血球數/指數與血色素水準之間的關係。

圖12係根據本發明之實施例偵測所得患有骨髓發育不良症候群及真性紅血球增多症之患者中之血漿未甲基化%的圖。

圖13A顯示根據本發明之實施例偵測所得在患有再生不全性貧血(AA)及骨髓發育不良症候群(MDS)的患者之間，血漿中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))。圖13B顯示根據本發明之實施例偵測所得在再生不全性貧血中，治療反應性組與治療未反應性組之間的血漿中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))。

圖14係根據本發明之實施例偵測所得正常個體及兩名患有白血病之患者中，血漿中之未甲基化%針對血色素濃度的圖。

圖15A及15B顯示根據本發明之實施例中染色體12上之紅血球母細胞特異性DMR內之CpG位點的甲基化密度。

圖16顯示來自ENCODE資料庫之兩個其他紅血球母細胞特異性DMR(Ery-1及Ery-2)上之組蛋白修飾(H3K4me1及H3K27Ac)。

圖17A及17B顯示藉由靶向Ery-1標記物(圖17A)及Ery-2標記物(圖17B)之數位PCR檢定量測的重型β-地中海貧血症患者之膚色血球層DNA中之紅血球系DNA序列百分比(E%)與使用自動化血液分析器量測之所有周邊白血球中之紅血球母細胞百分比之間的相關性。

圖18A及18B顯示重型β-地中海貧血症患者之膚色血球層DNA中E%(FECH)結果與E% (Ery-1)及E% (Ery-2)的相關性。

圖19顯示根據本發明之實施例使用靶向三個紅血球母細胞特異性DMR之數位PCR分析，健康個體及患有再生不全性貧血及重型β-地中海貧血症之患者中之紅血球系DNA百分比。

圖20A及20B顯示根據本發明之實施例之對如下之連續量測：在治療前狀態及治療後兩天時接受靜脈內鐵療法之缺鐵性貧血的血漿DNA中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))及網狀紅血球數百分比。

圖21A顯示根據本發明之實施例接受口服鐵治療之因月經過多而患有缺鐵性貧血的患者中，紅血球母細胞DMR處之血漿E%的連續變化。圖21B顯示治療後血色素之變化。

圖22顯示接受重組型紅血球生成素(EPO)或紅血球生成刺激劑(ESA)治療之患有慢性腎病(CKD)之患者中，紅血球母細胞DMR處之血漿未甲基化%的連續變化。

圖23A顯示根據本發明之實施例接受抗胸腺細胞球蛋白(ATG)治療或環孢素作為免疫抑制療法之患有再生不全性貧血之患者中，紅血球母細胞DMR處之血漿未甲基化%的連續變化。圖23B顯示接受治療之患有再生不全性貧血之患者中血色素的連續變化。

圖24A及24B顯示四名患有再生不全性貧血之患者中，血漿中之未甲基化%針對血色素濃度的圖。

圖25說明盒狀及鬚狀圖，其顯示根據本發明之實施例偵測所得健康個體及貧血患者中*FECH*基因相關之DMR處的紅血球系DNA之絕對濃度(複本/毫升血漿)。

圖26係說明根據本發明之實施例之分析哺乳動物之血液樣品的方法之流程圖。

圖27說明根據本發明之一實施例之系統2700。

圖28顯示可與根據本發明之實施例之系統及方法一起使用的例示性電腦系統的方塊圖。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2016年5月30日申請之名稱為「Detecting

Hematological Disorders Using Cell-Free DNA In Blood」之美國臨時申請案第62/343,050號的優先權且係其之非臨時申請案，該美國臨時申請案之全部內容出於所有目的以引用之方式併入本文中。

術語

「甲基化組」提供基因組中複數個位點或基因座之DNA甲基化量的量度。甲基化組可對應於所有基因組、基因組之大部分或基因組之相對較小部分。

「細胞譜系」指代受精胚胎之組織或器官之發育史。不同類型的組織(例如不同類型的血球)將具有不同的細胞譜系。紅血球(RBC) 是前紅血球母細胞經由一系列中間細胞衍生。前紅血球母細胞、巨核母細胞及骨髓母細胞衍生自常見骨髓祖細胞。淋巴細胞衍生自常見淋巴祖細胞。有核RBC即紅血球母細胞，不成熟去核RBC即網狀紅血球。成熟去核RBC即紅血球，就是血流中載運血色素之紅血球。

「游離混合物」對應於包括來自各種細胞之游離DNA片段之樣品。舉例而言，游離混合物可包括來自各種細胞譜系之游離DNA片段。血漿及血清是獲自血液樣品(例如經由離心)之游離混合物之實例。其他游離混合物可來自其他生物樣品。「生物樣品」指獲自個體(例如，人類，諸如懷孕女性、患有癌症之個人或懷疑患有癌症之個人、器官移植受體、或懷疑具有涉及器官之病症過程(諸如心肌梗塞之心臟、中風之腦或貧血之造血系統)的個體)且含有一或多個所關注核酸分子之任何樣品。生物樣品可為體液，諸如血液、血漿、血清、尿液、陰道液、來自水囊腫之流體(例如睾丸液)，或陰道沖洗液、胸膜液、腹水液、腦脊髓液、唾液、汗水、淚液、痰、支氣管肺泡灌洗液等。亦可使用大便樣品。在各種實施例中，已

針對游離DNA經富集之生物樣品(例如經由離心方案所獲得之血漿樣品)中之大多數DNA可為游離的(與細胞相反)，例如大於50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。離心方案可包括3,000 g × 10分鐘、獲得流體部分及再在30,000 g下再離心10分鐘以移除殘餘細胞。

「血漿甲基化組」是指自動物(例如人類)之血漿或血清確定之甲基化組。血漿甲基化組是游離甲基化組之一實例，因為血漿及血清包括游離DNA。血漿甲基化組亦即混合甲基化組之一實例，因為其為來自體內不同器官或組織或細胞之DNA的混合物。在一個實施例中，此類細胞是造血細胞，包括(但不限於)紅血球系(亦即紅細胞)譜系、骨髓譜系(例如嗜中性白血球及其前驅體)及巨核細胞譜系之細胞。懷孕時，血漿甲基化組可含有胎兒及母親之甲基化資訊。在患有癌症之患者中，血漿甲基化組可含有腫瘤細胞及患者體內之其他細胞之甲基化資訊。「細胞甲基化組」對應於自患者之細胞(例如血球) 確定之甲基化組。血球的甲基化組稱作血球甲基化組(或血液甲基化組)。用於確定甲基化組之技術進一步描述於名稱為「Non-Invasive Determination Of Methylome Of Fetus Or Tumor From Plasma」之PCT專利申請案第WO2014/043763號中，該專利申請案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

「位點」對應於單一位點，其可為單個鹼基位置或一組相關鹼基位置，例如CpG位點。「基因座」可對應於包括多個位點之區域。基因座可僅包括一個位點，此將使得基因座在該背景下等效於一個位點。

各基因組位點(例如CpG位點)之「甲基化指數」可指在該位點顯示甲基化之DNA片段(例如，如自序列讀數或探針所測定)相對於覆蓋該位點之讀數總數目之比例。「讀數」可對應於獲自DNA片段之資訊(例如在一位點

處之甲基化狀態)。讀數可使用優先雜交至特定甲基化狀態之DNA片段之試劑(例如引子或探針)獲得。通常，此類試劑在用視DNA分子甲基化狀態而差異地修飾DNA分子之方法(例如亞硫酸氫鹽轉化或甲基化敏感性限制酶)處理後施用。讀數可為序列讀數。「序列讀數」指在核酸分子之任何部分或全部中所定序的核苷酸串。舉例而言，序列讀數可為自核酸片段定序之短核苷酸串(例如約20-150)、位於核酸片段之一或兩個末端的短核苷酸串，或存在於生物樣品中之整個核酸片段之定序。序列讀數可以由多種方式獲得，例如使用定序技術或使用探針，(例如雜交陣列或捕捉探針，或擴增技術，諸如聚合酶鏈反應(PCR)或使用單一引子之線性擴增或等溫擴增)。

區域之「甲基化密度」可指區域內之顯示甲基化之位點處之讀數數目除以覆蓋區域中之位點之讀數總數目。該等位點可具有特異性特徵，例如係CpG位點。因此，區域之「CpG甲基化密度」可指顯示CpG甲基化之讀數數目除以覆蓋區域中之CpG位點(例如特定CpG位點、CpG島或較大區域內之CpG位點)之讀數總數目。舉例而言，人類基因組中每100 kb面元之甲基化密度可自亞硫酸氫鹽處理之後於CpG位點處未轉化之胞嘧啶(其對應於甲基化胞嘧啶)的總數目測定為映射至100 kb區域之序列讀數所覆蓋之所有CpG位點的比例。亦可針對其他面元大小例如500 bp、5 kb、10 kb、50 kb或1Mb等進行此分析。區域可為全基因組或為染色體或染色體的一部分(例如染色體臂)。當區域僅僅包括CpG位點時，CpG位點之甲基化指數與區域之甲基化密度相同。「甲基化胞嘧啶之比例」可指相比於分析之胞嘧啶殘基總數目顯示為甲基化(例如在亞硫酸氫鹽轉化之後未經轉化)之胞嘧啶位點「C」之數目，亦即包括區域中除CpG背景之外的胞嘧

啶。甲基化指數、甲基化密度及甲基化胞嘧啶之比例即「甲基化水準」之實例。除亞硫酸氫鹽轉化之外，熟習此項技術者已知之其他方法可用於查詢DNA分子之甲基化狀態，包括(但不限於)對甲基化狀態敏感之酶(例如甲基化敏感性限制酶)、甲基化結合蛋白、使用對甲基化狀態敏感之平台之單分子定序(例如奈米孔定序(Schreiber等人 Proc Natl Acad Sci 2013; 110: 18910-18915)及藉由Pacific Biosciences單分子實時分析(Flusberg等人 Nat Methods 2010; 7: 461-465))。

「甲基化概況」(亦稱為甲基化狀態)包括與區域之DNA甲基化有關之資訊。與DNA甲基化有關之資訊可包括(但不限於)CpG位點之甲基化指數、區域中CpG位點之甲基化密度、相鄰區域上CpG位點的分佈、含有超過一個CpG位點之區域內各個別CpG位點之甲基化模式或水準以及非CpG甲基化。基因組之大部分甲基化概況可視為等效於甲基化組。哺乳動物基因組中之「DNA甲基化」通常係指添加甲基至CpG二核苷酸中之胞嘧啶殘基的5'碳(即5-甲基胞嘧啶)。DNA甲基化可在例如CHG和CHH之其他情況下發生於胞嘧啶中，其中H為腺嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶。胞嘧啶甲基化亦可呈5-羥甲基胞嘧啶形式。亦有報導存在非胞嘧啶甲基化，如N^6-甲基腺嘌呤。

「組織」對應於一組細胞，其共同歸類為一個功能單元。可在單一組織中找到超過一種類型之細胞。不同類型的組織可由不同類型的細胞(例如肝細胞、肺泡細胞或血球)組成，但亦可對應於來自不同生物體(母親與胎兒)的組織或對應於健康細胞與腫瘤細胞。「參考組織」對應於用於確定組織特異性甲基化水準之組織。來自不同個體之相同組織類型之多個樣品可用於確定該組織類型之組織特異性甲基化水準。因生理(例如懷孕)

或病變(例如，癌症或貧血或感染或突變)所致，在不同時間來自相同個體之相同組織可呈現差異。因生理(例如年齡、性別)或病變(例如，癌症或貧血或感染或突變)所致，來自不同個體之相同組織類型可呈現差異。

亦稱作「*疾病等級*」之術語「*疾病水準*」可指疾病是否存在之等級，疾病類型、疾病階段及/或疾病之嚴重性之其他量度。水準可為數字或其他字符。水準可為零。疾病水準可以各種方式使用。舉例而言，篩選可檢查先前未知患有疾病之某人是否存在疾病。評估可調查已診斷患有疾病之某人以監測疾病隨時間之進展，研究療法之有效性或確定預後。在一個實施例中，預後可表述為患者因疾病而死亡之可能性，或在特定期限或時間後進行之疾病之可能性。偵測可意謂『篩選』或可意謂檢查暗示有疾病特徵(例如症狀或其他陽性測試)的某人是否患有疾病。

貧血指紅血球之數目或其氧攜帶能力不足以符合生理需要之病狀，其可因年齡、性別、海拔高度、吸菸及懷孕狀態而改變。根據世界衛生組織(World Health Organization，WHO)之建議，當男性之血色素濃度小於130 g/L，女性之血色素濃度小於110 g/L時可診斷為貧血。術語「貧血程度」可由個體中之血色素濃度反映。愈低之血色素水準指示貧血程度愈嚴重。根據WHO之建議，嚴重貧血指男性之血色素濃度< 80 g/L，女性之血色素濃度< 70 g/L，中度貧血指男性之血色素濃度介於80-109 g/L，女性之血色素濃度介於70-99 g/L，輕度貧血指男性之血色素濃度介於110-129 g/L，女性之血色素濃度介於100-109 g/L。

「分離值」對應於涉及兩個值（例如兩個分率貢獻或兩個甲基化水準）之差值或比率。分離值可為簡單差值或比率。分離值可包括其他因子，例如乘法因子。作為其他實例，可使用該等值之函數的差值或比率，

例如兩個值之自然對數(ln)的差值或比率。分離值可同時包括差值及比率。

如本文所用，術語「*等級*」係指與樣品之特定特性相關之任何數字或其他字符。舉例而言，符號「+」(或字語「陽性」)可表示樣品歸類為具有缺失或擴增。等級可為二元(例如陽性或陰性)的或具有更多等級水準(例如1至10或0至1之尺度)。術語「*截止值*」及「*臨限值*」指使用於操作之預定數字。臨限值可為一值，高於或低於此值，則特定等級適用。可在此等情形中之任一者中使用此等術語中之任一者。

在一些實施例中，相對於來自其他組織之游離DNA(亦稱作循環DNA)，來自紅血球母細胞之游離DNA之貢獻可使用一或多個對紅血球母細胞具有特異性之甲基化標誌(例如一個標誌對應一個標記物)定量。標記物(例如，差異甲基化區，DMR)可包括對相同標誌有貢獻之一個位點或一組位點。

來自紅血球母細胞之游離DNA之貢獻可用以確定血液疾病(諸如貧血)之水準。舉例而言，實施例可用以評定胎兒、新生兒或兒童之貧血。對於貧血之情形，實施例可用以調查懷疑患有貧血或已經診斷患有貧血之某人以：(i)闡明貧血之原因；(ii)監測臨床狀態隨時間之進展，(iii)研究療法之有效性，或(iv)確定預後。因此，實施例已將紅血球系DNA鑑別為循環DNA庫之迄今未經辨識之主要組分，且鑑別為用於差異診斷及監測貧血以及其他血液疾病之非侵襲性生物標記物。

I. 引言

血漿DNA是用於分子診斷之日益實行之分析物。對其臨床應用、尤其在非侵襲性產前測試(1-7)及腫瘤學(8-12)中存在進行中調研研究。儘管

臨床應用多種多樣，但循環DNA之組織來源未得到完全理解。

已有使用性別錯配之骨髓移植作為模型系統顯示循環DNA主要自造血細胞釋放(13、14)。Kun等人最近證實顯著比例之血漿DNA具有嗜中性白血球及淋巴細胞之甲基化標誌(15)。然而，目前沒有關於紅血球系來源(紅血球母細胞)之DNA是否亦可在血漿中偵測出之資訊。

紅血球(RBC)是血液中之造血細胞之最大群體。紅血球(RBC)之濃度係每公升血液大約5×10^{12}。倘若各RBC之壽命為約120天，則身體需要產生2×10^{11}個RBC/天或9.7×10^{9}個 RBC/小時。人類中之成熟RBC不具有細胞核。

在去核步驟期間紅血球母細胞喪失其核且在骨髓中成熟成為網狀紅血球(16)。去核製程是複雜多步製程，涉及嚴格調節之細胞信號傳導作用及細胞骨架作用。紅血球母細胞之核物質經紅血球母細胞島例如骨髓中之骨髓巨噬細胞吞噬及降解(17)。吾等假定來自骨髓之紅血球系譜系之經降解DNA物質中的一些會釋放於循環中。

實施例可鑑別來自紅血球系來源之細胞之DNA的甲基化標誌，且使用此類標誌以確定紅血球系DNA是否可在人類血漿中偵測出。不同組織及造血細胞類型之高解析度參考甲基化組已經由合作計劃、包括BLUEPRINT計劃(18、19)及Roadmap Epigenomics計劃(20)變得可公開獲得。吾等及其他者先前已證實有可能經由分析組織相關之甲基化標誌來跟蹤血漿DNA之來源(15、21、22)。確定某些組織對游離混合物(例如血漿)之貢獻之此類分析的其他細節可見於名稱為「Methylation Pattern Analysis Of Tissues In A DNA Mixture」之PCT專利申請案第WO 2016 008451號中，該專利申請案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式

併入本文中。

為驗證吾等假設且證實血漿中紅血球系DNA之存在，吾等經由分析紅血球母細胞及其他組織類型之甲基化概況來鑑別紅血球母細胞特異性之差異甲基化區(DMR)。基於研究結果，吾等開發靶向紅血球母細胞特異性DMR以使得能夠定量分析生物樣品中之紅血球系DNA的數位聚合酶鏈反應(PCR)檢定。具體言之，使用紅血球母細胞及其他組織類型之高解析度甲基化概況，吾等發現三個基因組基因座在紅血球母細胞中是低甲基化的但在其他細胞類型中是高甲基化的。數位PCR檢定經開發用於使用各基因座之差異甲基化區量測紅血球系DNA。

吾等應用此等數位PCR檢定以研究健康個體及患有不同類型貧血之患者的血漿樣品。吾等亦探索該等檢定在貧血評估中之潛在臨床效用。儘管實例使用PCR檢定，但可使用其他檢定，諸如定序。

在患有不同病源之貧血之個體中，吾等顯示對循環紅血球系DNA之定量分析(例如使用甲基化標記物)反映骨髓中之紅血球生成活性。對於具有降低之紅血球生成活性之患者，如由再生不全性貧血所例示，循環紅血球系DNA之百分比降低。對於具有增加但低效的紅血球生成之患者，如由重型β-地中海貧血症所例示，百分比增加。另外，吾等發現紅血球系DNA之血漿水準與再生不全性貧血及缺鐵性貧血中之治療反應相關。使用靶向其他兩個差異甲基化區之數位PCR檢定之血漿DNA分析顯示類似研究結果。

II. 紅血球母細胞之差異甲基化區(DMR)

吾等假設紅血球母細胞去核製程或涉及RBC成熟之其他製程將對循環游離DNA庫有顯著貢獻。為確定來自紅血球母細胞之循環DNA之貢

獻，吾等藉由將紅血球母細胞之DNA甲基化概況與其他組織及血球相比較，來鑑別紅血球母細胞之DNA中之差異甲基化區(DMR)。吾等研究紅血球母細胞及其他血球(嗜中性白血球、B-淋巴細胞及T-淋巴細胞)及組織(肝、肺、結腸、小腸、胰腺、腎上腺、食道、心臟、腦及胎盤)之甲基化概況。這些數據來自BLUEPRINT計劃，Roadmap Epigenomics計劃之及由吾等組產生之甲基化組(18-20、23)。

在一簡單實例中，可直接使用一或多個DMR以確定來自紅血球母細胞之循環DNA之貢獻，例如藉由確定甲基化(對高甲基化DMR而言)或未甲基化(對低甲基化DMR而言)之DNA片段之百分比。百分比可直接使用或經過改變(例如乘以比例因子)。其他實施例可執行更複雜的程序，例如對線性方程式體系求解。如PCT專利申請案第WO 2016/008451號中所描述，N基因組位點處之甲基化水準可用以計算來自M組織之貢獻，其中M小於或等於N。可計算各組織之各位點處之甲基化水準。可對線性方程式體系A x = b求解，其中b是N位點處之經量測甲基化密度之矢量，x是來自M組織之貢獻之矢量，且A為M列及N行之矩陣，其中各列提供N組織在該列之特定位點處之甲基化密度。若M小於N，則可執行最小平方最佳化來對x求解。維度為M乘N之矩陣A可由如獲自上文來源之參考組織之組織特異性甲基化水準形成。

A. DMR之鑑別

為鑑別差異甲基化區域(DMR)，可分離特定類型/譜系(例如紅血球母細胞)之組織且隨後例如使用如本文所描述之甲基化感知定序進行分析。可分析跨越組織類型(例如，僅兩種類型之紅血球母細胞及其他)之位點處之甲基化密度以判定是否存在足夠差異，以便鑑別供用於DMR中之位

點。

在一些實施例中，以下準則中之一或多者可用以鑑別紅血球母細胞之甲基化標記物。(1)若CpG位點之甲基化密度在紅血球母細胞中小於20%且在其他血球及組織中大於80%，則該CpG位點在紅血球母細胞中為低甲基化的，且反之亦然。(2)針對DMR，可需要該區域以包括多個低甲基化之CpG位點(例如3個、4個、5個或更多個)。因此，可選擇DMR內之多個CpG位點之片段以藉由檢定來分析，以便改良DMR之信雜比及特異性。(3) DMR可經選擇具有代表游離混合物中之DNA分子之大小。在血漿中，主要存在短的DNA片段，大多數短於200 bp (1、24、25)。對於確定血漿中存在紅血球系DNA分子之實施例，可在血漿DNA分子之代表性大小(亦即166 bp)內定義DMR (1)。此類準則之變化形式可與此等三個準則組合使用，例如不為20%及80%之不同臨限值可用於將CpG位點鑑定為低甲基化的。如稍後所論述，一些結果使用在紅血球母細胞中低甲基化的三個紅血球母細胞特異性DMR內之經選擇CpG位點。

使用上文所定義之準則，吾等鑑別三個跨越整個基因組之紅血球母細胞特異性DMR。一個DMR在染色體18上之亞鐵螯合酶(FECH)基因之內含子區域內。在此區域中，紅血球母細胞與其他細胞類型之間的甲基化密度之差異在所鑑別三個DMR中最大。 *FECH*基因編碼亞鐵螯合酶，其為負責血紅素生物合成之最終步驟之酶(26)。如圖1中所顯示，紅血球母細胞特異性DMR內之四個經選擇CpG位點在紅血球母細胞中均為低甲基化的，但在其他血球及組織中均為高甲基化的。

圖1顯示根據本發明之實施例亞鐵螯合酶(FECH)基因之啟動子內之CpG位點的甲基化密度。FECH基因位於染色體18上且CpG位點之基因組

座標顯示在X軸上。如所示，CpG位點之甲基化密度在FECH基因之內含子區域內。位於藉由兩條垂直點線界定之區域110內之四個CpG位點在紅血球母細胞中均係低甲基化的但在其他組織或細胞類型中均係高甲基化的。出於說明的目的，不顯示肺、心臟、小腸、結腸、胸腺、胃、腎上腺、食道、膀胱、腦、卵巢及胰臟之個別結果。其平均值由「其他組織」表示。

由於位於此區域內之CpG位點為低甲基化的，因此針對衍生自紅血球母細胞之DNA，將富集圖1中之兩條點線內之所有四個CpG位點的未甲基化序列。因此，DNA樣品中之低甲基化序列之量將反映衍生自紅血球母細胞之DNA之量。

一種檢定經開發以偵測在經鑑別CpG位點處甲基化或未甲基化之DNA。血漿DNA分子內之CpG之數目愈高，檢定將愈具有特異性。大多數血漿DNA分子小於200 bp，平均166 bp。因此，CpG位點可能均在彼此之166 bp內，但可在彼此之150、140、130、120、110或100 bp內。在其他實施例中，僅成對之CpG位點可在彼此之此類距離內。

在其他實施例中，若CpG位點之甲基化密度在紅血球母細胞中小於10% (或其他臨限值)且在所有其他組織及血球中大於90% (或其他臨限值)，則CpG位點可定義為在紅血球母細胞中為低甲基化的。若CpG位點之甲基化密度在紅血球母細胞中高於90% (或其他臨限值)且在所有其他組織及血球中低於10% (或其他臨限值)，則CpG位點可定義為在紅血球母細胞中為高甲基化的。在一些實施方案中，DMR在100 bp內可具有至少兩個CpG位點，針對紅血球母細胞均顯示差異甲基化。

在鑑別DMR之一個實施方案中，為在診斷上有用，與所有其他組織

及血球相比較，可需要100 bp (或一些其他長度)內之所有CpG位點在紅血球母細胞中顯示低甲基化或高甲基化。舉例而言，該多個CpG位點可在對應於哺乳動物之參考基因組上跨越100 bp或更少。作為另一實例，各CpG位點可在另一CpG位點之100 bp內。因此，這些CpG位點可跨越大於100 bp。

在一些實施例中，可按以下方式鑑別該一或多個差異甲基化區。針對多種細胞譜系、包括特定血液細胞譜系及其他細胞譜系(例如，如圖1中所示)中之每一者，可獲得多個位點之甲基化指數(例如密度)。在該多個位點之各位點處，該多種細胞譜系之甲基化指數可彼此進行比較。基於比較，該多個位點之一或多個位點可經鑑別各自在特定血液細胞譜系中具有低於/高於第一甲基化臨限值之甲基化指數，且在其他細胞譜系中之每一者中具有高於/低於第二甲基化臨限值之甲基化指數。以此方式，可鑑別低甲基化位點及/或高甲基化位點。針對低甲基化位點，第一甲基化臨限值之實例係10%、15%或20%，其中第二甲基化臨限值之實例可為80%、85%或90%。可隨後(例如)使用上文所描述之準則鑑別含有該一或多個位點之差異甲基化區。

B.　甲基化及未甲基化DNA序列之偵測

為偵測紅血球母細胞特異性DMR處之甲基化及未甲基化DNA序列，可開發兩種數位PCR檢定：一種靶向未甲基化序列而另一種靶向甲基化序列。在其他實施例中，其他方法亦可用於偵測及/或定量DMR之甲基化及未甲基化序列，諸如甲基化感知定序(例如亞硫酸氫鹽定序或根據將基於DNA甲基化狀態差異性修飾DNA之生物化學或酶方法的定序)、即時甲基化特異性PCR、甲基化敏感性限制酶分析及微陣列分析。因此，除了PCR

檢定以外，可使用其他類型之檢定。

在一實例中，可在亞硫酸氫鹽處理後偵測紅血球母細胞DMR。CpG位點之甲基化狀態可基於偵測結果(例如PCR信號)而確定。對於FECH基因，在亞硫酸氫鹽處理後以下引子可用於擴增紅血球DMR以用於定序：5'-TTTAGTTTATAGTTGAAGAGAATTTGATGG-3' 及 5'-AAACCCAACCATACAACCTCTTAAT-3'。

在另一實例中，為增強該分析之特異性，可使用涵蓋特定CpG之甲基化及未甲基化狀態之兩種正向引子。下文列出用於特異性靶向甲基化及未甲基化序列之兩種數位PCR檢定之此類引子集合。

引子/探針	序列
正向引子-1	5'-TTGAAGAGAATTTGATGGTATGGGTA-3'
正向引子-2	5'-TGAAGAGAATTTGATGGTACGGGTA-3'
反向	5'-CTCAAATCTCTCTAATTTCCAAACACA
螢光探針	5'-FAM-TTGTGTGGTGTAGAGAG-MGB-3'

表1：對特異性偵測未甲基化序列之檢定.

引子	序列
正向	5'-TTGAAGAGAATTTGATGGTATGGGTA-3'
	5'-TGAAGAGAATTTGATGGTACGGGTA-3'
反向	5'-CAAATCTCTCTAATTTCCGAACACG-3'
螢光探針	5'-VIC-TGCGTGGCGTAGAG-MGB-3'

表2：對特異性偵測甲基化序列之檢定

反向引子及探針中之加下劃線之核苷酸即CpG位點處之差異甲基化胞嘧啶。由於加下劃線之核苷酸處存在差異，因此未甲基化及甲基化檢定之反向引子及探針與未甲基化及甲基化序列特異性結合。

C. 使用普遍甲基化及普遍未甲基化之DNA確認

對普遍甲基化及普遍未甲基化之DNA進行分析以確認兩種檢定之精

確性。

來自CpGenome人類甲基化DNA (EMD Millipore)之普遍甲基化序列及來自EpiTect未甲基化人類對照DNA (Qiagen)之普遍未甲基化序列用以確認兩種數位PCR檢定之特異性，該等數位PCR檢定經設計用於偵測及定量紅血球母細胞特異性DMR處之甲基化及未甲基化序列。由HCT116 DKO細胞純化CpGenome人類甲基化DNA，隨後使用M.SssI甲基轉移酶對所有CpG核苷酸進行酶甲基化。在與陽性及陰性對照相同之盤上操作普遍甲基化及普遍未甲基化DNA序列。根據對照測定陽性螢光信號之截止值。使用重複孔之合併數計算各樣品中之甲基化及未甲基化DNA序列的數目，隨後進行柏松校正(Poisson correction) (4)。

圖2A及圖2B顯示根據本發明之實施例使用經設計用於偵測甲基化及未甲基化DNA的數位PCR檢定對普遍甲基化及未甲基化之DNA之分析。垂直軸對應於未甲基化序列之相對螢光信號之強度。水平軸對應於甲基化序列之相對螢光信號之強度。使用已知經甲基化或未經甲基化之DNA產生資料。此等分析旨在證實檢定針對甲基化或未甲基化DNA之特異性。

為了分析普遍未甲基化DNA，使用針對未甲基化DNA之檢定偵測擴增信號(圖式2A之圖205之藍點210對應於陽性FAM信號)，其中當使用針對甲基化DNA之檢定時未偵測到藍點210(圖2B之圖255)。為了分析普遍甲基化DNA，使用針對甲基化DNA之檢定偵測擴增信號(圖2B之圖250中之綠點220對應於陽性VIC信號)，其中使用針對未甲基化DNA之檢定未偵測到綠點220(圖2A之圖200)。各組中之黑點表示無任何擴增信號之液滴。四組中之每一者內之厚的垂直及水平線表示陽性結果之臨限值螢光信號。此等結果確認兩個針對紅血球母細胞特異性DMR處之甲基化及未甲

基化DNA之檢定的特異性。

為進一步評定基於*FECH*基因相關之DMR之檢定的分析敏感性，將具有未甲基化序列之樣品以特定分率濃度(亦即，未甲基化序列在*FECH*基因相關之DMR處之所有(未甲基化及甲基化)序列中的百分比)連續稀釋。每次反應總計有1,000個分子。可在低至甲基化及未甲基化序列之總量的0.1%下偵測到未甲基化序列(參見表3)。

輸入濃度(%未甲基化序列)	所量測濃度(%未甲基化序列)
10.0%	9.83%
5.0%	5.36%
2.0%	2.85%
1.0%	0.99%
0.5%	0.33%
0.1%	0.34%

表3：針對靶向*FECH*基因相關之DMR之檢定的敏感性評估，不同輸入濃度之未甲基化序列下之所量測濃度(未甲基化序列之百分比).

另外，為評定潛在變體(例如來自吸液)，吾等在20個單獨的反應中反覆量測未甲基化序列在甲基化及未甲基化序列之特定分率濃度之人工混合樣品中的百分比(%未甲基化序列= 30%)。針對各反應吾等使用總計500個甲基化及未甲基化分子。此數目與吾等在吾等用於血漿DNA樣品之數位PCR分析中觀測到的甲基化及未甲基化分子之總數目相當。吾等觀測到對於未甲基化序列之百分比之20個重複量測值，平均值為30.4%且標準差為1.7%。內檢定變異係數經計算為5.7%。

III. 用於不同樣品之檢定之特異性及敏感性

為確認靶向*FECH*基因相關之DMR之數位PCR檢定針對紅血球系DNA的組織特異性，吾等在具有不同量之紅血球母細胞之各個樣品中測試數位PCR檢定，同時對比不為此等數位PCR檢定之技術所量測之結果。

藉由數位PCR檢定所偵測之未甲基化DNA序列之量應反映紅血球系DNA之量。類似地，甲基化序列之量應反映來自其他組織或細胞類型之DNA。因此，吾等將生物樣品中之紅血球系DNA百分比(E%)定義為未甲基化序列在紅血球母細胞特異性DMR處之所有經偵測(未甲基化及甲基化)序列中的百分比。因此，使用對DMR區之甲基化及未甲基化序列具有特異性之檢定分析血液樣品，以確定未甲基化序列之百分比(未甲基化% (亦稱作E%))與來自紅血球母細胞之DNA的存在之間的相關性。未甲基化%(E%)即甲基化水準之實例。

如下計算紅血球系DNA百分比(E%)：

$$E\% = \frac{\text{未甲基化DNA序列之數目}}{\text{甲基化DNA序列之數目+未甲基化DNA序列之數目}}$$

由於對於*FECH*基因內之DMR，紅血球母細胞與其他細胞類型之間的甲基化密度之差異為最大的，因此吾等首先基於此標記物位點進行E%分析以證明吾等假設。隨後，吾等基於樣品子集中之其他兩個紅血球母細胞特異性DMR分析E%，以驗證*FECH*基因相關之DMR之E%結果。基於*FECH*基因內之DMR之E%結果將由E%(FECH)指代。亦可使用其他百分比或比率，諸如甲基化序列之百分比，或僅甲基化序列對未甲基化序列之比率，其中任一值可在該比率之分子及分母中。

具體言之，使用數位PCR測定來自圖1之*FECH*基因上之四個CpG位點處，各樣品中之甲基化及未甲基化DNA序列的數目。隨後，計算樣品中之未甲基化DNA之百分比(未甲基化%/E%)。在一個實施例中，對於視為未甲基化之DNA片段，其所有四個CpG位點均為未甲基化的。

兩種情形用以測試檢定信號定量紅血球母細胞之能力。一種情形為臍血相較於成人血，因為兩種類型樣品的紅血球母細胞數目不同。對於另

一情形，患有重型β-地中海貧血症之個體在其血液中具有可觀數目的紅血球母細胞。

A.　紅血球母細胞富集之樣品相較於健康個體之膚色血球層

成人血中之紅血球母細胞之數目極低。臍帶血具有高得多的紅血球母細胞數目。因此，臍血中四個CpG位點之E%應比健康患者之E%高得多。因此，為確認靶向*FECH*基因相關之DMR之數位PCR檢定針對紅血球系DNA的組織特異性，吾等在包括自12種不同正常組織類型提取之DNA之樣品中及紅血球母細胞富集之樣品中測試數位PCR檢定。針對各組織類型吾等包括4個來自不同個體之樣品。紅血球母細胞富集之樣品係由臍帶血製備以用於分析。

具體言之，為確認DMR處之甲基化密度與E%之間的關係，自21名健康個體及30名懷孕女性(10名處於第一三月期，10名處於第二三月期且10名處於第三三月期)收集靜脈血液樣品。在3,000 g下離心血液樣品10分鐘以分離血漿及血球。離心後收集膚色血球層。收集血漿樣品且在30,000 g下再離心以移除殘餘血球。

關於12種不同正常組織類型，針對各組織類型吾等包括4個來自不同個體之樣品。如表4中所示，所有組織DNA之中位數E%(FECH)值較低(中位數值之範圍：0.00%至2.63%)。

組織	**中位數E%**
肝	0.12%
肺	1.33%
食道	2.63%
胃	2.58%
小腸	2.33%
結腸	1.51%
胰臟	0.12%

腎上腺	0.00%
膀胱	1.20%
心臟	0.82%
腦	1.94%
胎盤	0.10%

表4. 顯示12種組織類型之4個集合中之紅血球系DNA的中位數百分比(E%(FECH))之表格，其中各組織樣品係獲自不同個體。

下文描述藉由流式細胞測量術自臍帶血富集之實驗程序以及細胞分選及後續DNA提取。在八名懷孕女性分娩其嬰兒後自其收集1-3 mL臍帶血。密度梯度離心後使用Ficoll-Paque PLUS套組(GE Healthcare)自臍帶血樣品分離單核細胞。收集單核細胞後，在4℃下在黑暗中將1 × 10^8個細胞與1 mL螢光素異硫氰酸鹽(FITC)-結合之抗CD235a (血型糖蛋白A)及藻紅素(PE)-結合之抗CD71抗體(Miltenyi Biotec) (在磷酸鹽緩衝鹽水中按1:10稀釋)的混合物一起培育30分鐘。隨後使用BD FACSAria融合細胞分選儀(BD Biosciences)對CD235a+CD71+細胞進行分選及分析。由於CD235a及CD71特異性存在於紅血球母細胞中，因此針對紅血球母細胞將對CD235a+CD71+細胞進行富集(Bianchi等人 Prenatal Diagnosis 1993; 13:293-300)。

由於獲自各病況之細胞之數目較少，因此彙集來自八位病況之細胞用於下游分析。兩種抗體對紅血球母細胞具有特異性且附著於紅血球母細胞表面。兩種抗體分別與FITC及藻紅素結合。此等兩種物質與磁珠結合，且可使用細胞分選儀分選珠粒。因此，可捕獲經Ab標記之紅血球母細胞。使用流式細胞測量術及利用抗CD71 (運鐵蛋白受體)及抗CD235a (血型糖蛋白A)抗體之細胞分選(參見補充之材料及方法)，自8個臍帶血樣品富集紅血球母細胞且隨後彙集。自經彙集樣品提取DNA。

在用於CD235a+CD71+細胞(主要為紅血球母細胞)之檢定中所測試之四個CpG位點處，來自經彙集臍帶血樣品之DNA之E%(FECH)為67%。關於20名健康個體之膚色血球層DNA中之E%(FECH)，膚色血球層DNA中之中位數E%為2.2% (四分位數間距：1.2-3.1%)，該等健康個體在其周邊血液中具有不可偵測到數目之紅血球母細胞。對健康個體之膚色血球層中之低比例的紅血球母細胞特異性未甲基化序列的觀測與成熟RBC不擁有細胞核之事實一致。由於CD235a及CD71係對紅血球母細胞具有特異性之細胞表面標記物(Bianchi等人 Prenatal Diagnosis 1993; 13:293-300)，因此針對CD235a及CD71所富集之細胞中之高E%(FECH)顯示，對紅血球母細胞特異性DMR處之未甲基化DNA之檢定將能夠偵測紅血球母細胞衍生之DNA。因此，紅血球母細胞富集之樣品之此高E%以及來自其他組織類型之DNA及健康個體之膚色血球層DNA的低E%結果顯示，用於未甲基化*FECH*序列之數位PCR檢定對紅血球母細胞衍生中DNA具有特異性。

B.　患有重型β-地中海貧血症之患者

在罹患重型β-地中海貧血症之患者中，骨髓試圖製備大量紅血球(RBC)。然而，缺乏對血色素之製造。因此，許多RBC不含有足夠的血色素且含有大量多餘的α球蛋白鏈。此等缺陷性RBC將自骨髓移除且將永不變成成熟RBC。存在兩種類型之球蛋白鏈：α及β。一個血色素分子需要兩條α及兩條β鏈。若不產生β鏈，則多餘的α鏈將聚集在一起且不能形成功能血色素。

在患有重型β-地中海貧血症之患者中，增加但低效的紅血球生成將減少成熟RBC之產生(Schrier等人 Current Opinion in Hematology 2002;9:123-6)。此伴有補償性的髓外血球生成及有核紅細胞在循環中之

存在。如下文所描述，患有重型β-地中海貧血症之患者將具有比健康患者更多的有核紅細胞。可在血液塗片上計數周邊血液中之有核RBC之數目且將其表述為每100個白血球(WBC)有核RBC之數目。

由於患有地中海重貧血症之患者一般在外周血液中具有比健康個體更高的紅血球母細胞數目(歸因於低效的紅血球生成(27))，因此此類患者亦提供測試檢定之特異性及敏感性之良好機制。因此，吾等在十五名患有重型β-地中海貧血症之患者之膚色血球層DNA中測試吾等數位PCR檢定之敏感性。如藉由自動化血液分析器(UniCel DxH 800 Coulter細胞分析系統，Beckman Coulter)所量測且藉由人工計數所確認，所有十五名患者在周邊血液中具有可偵測到數目之紅血球母細胞。

圖3A顯示根據本發明之實施例血球中之E%(FECH)與有核RBC (紅血球母細胞)數目之間的相關性之圖。E%藉由靶向*FECH*基因相關之DMR之數位PCR檢定來量測。如藉由軸線所示，該圖顯示膚色血球層DNA中之紅血球系DNA序列百分比(E%(FECH))與所有外周血白血球中之紅血球母細胞百分比(如使用自動化血液分析器所量測)之間的相關性。

如圖3A中所示，膚色血球層DNA中之E%(FECH)與藉由血液分析器量測之外周血白血球中之紅血球母細胞百分比具有很好相關性($r = 0.94$，$P < 0.0001$，皮爾森(Pearson)相關性)。地中海貧血症患者之膚色血球層中，E%與紅血球母細胞數之間的良好線性關係顯示數位PCR檢定能夠良好地定量量測樣品中之紅血球系DNA含量，因為針對DMR紅血球母細胞是未甲基化的且其他血球是甲基化的。因此，血液樣品中之紅血球母細胞之比例愈大，E%將愈高。此實驗之目的為證實檢定可用以反映樣品中之紅血球母細胞衍生之DNA的量。此等結果進一步支持：FECH基因之E%

反映衍生自紅血球母細胞之DNA之比例。

對於其他患者亦存在此相關性。但是，由於對於患有重型β-地中海貧血症之患者而言紅血球母細胞之數目可以達到很高，因此其樣品提供一種用於鑑別此類相關性之良好測試。如可自圖3A所見，患者具有寬範圍之E%及紅血球母細胞數目，籍此提供一種用於測試相關性之良好機制。

C. 測定特定細胞譜系之細胞DNA量之方法

在一些實施例中，當在一或多個對特定細胞譜系具有特異性之DMR處統計游離混合物(例如血漿或血清樣品)中之未甲基化或甲基化DNA片段的量時，該量可用以測定特定細胞譜系之細胞數目(或其他DNA量)。如圖3A中所示，在FECH DMR處未經甲基化之DNA片段之百分比與血液樣品中之紅血球母細胞數目相關。亦可使用絕對濃度。對於高甲基化DMR，可使用甲基化DNA片段之量(例如百分比或絕對濃度)。如本文所描述，可使用各種細胞譜系。

為測定細胞數目，可使用校準函數。在圖3A之實例中，與資料點擬合之直線可提供校準函數。舉例而言，校準函數可由其函數參數(例如直線之斜率及y截距，或其他函數之更多參數)儲存，或由可獲得曲線擬合之一組資料點儲存。如可經由另一技術所測定，資料點(例如，稱作校準資料點)可具有細胞譜系之DNA量(例如細胞數目)之已知值，因為紅血球母細胞之數目已經測定。

因此，一種方法可測定血液樣品中特定細胞譜系之DNA量。如本文所描述可自檢定來測定一或多個DMR之甲基化或未甲基化序列之數目。可確定甲基化水準且將其與校準函數之校準值相比較。舉例而言，甲基化水準可與直線(或其他校準函數)相比較，以確定函數與甲基化水準之交叉

點及因此DNA之相對應量(例如圖3A之水平軸上之值)。在其他實施例中，甲基化水準可與個別校準資料點相比較，該等個別校準資料點例如具有接近於樣品之經量測甲基化水準之甲基化水準。

圖3B說明根據本發明之實施例之方法300之流程圖，該方法用於藉由分析游離DNA確定生物樣品中之特定細胞譜系之細胞量。方法300可使用如圖3A中所示之量測方法。方法300之部分可手動進行且其他部分可藉由電腦系統執行。在一個實施例中，系統可執行所有步驟。舉例而言，系統可包括機器人元件(例如以獲得樣品且執行檢定)、用於自檢定偵測信號之偵測系統及用於分析信號之電腦系統。用於控制此類系統之指令可儲存於一或多個電腦可讀媒體中，該一或多個電腦可讀媒體諸如場可程式閘極陣列(FPGA)之組態邏輯、快閃記憶體及/或硬碟機。圖27顯示此類系統。

在步驟310，獲得生物樣品之游離混合物。生物樣品可為血液樣品，但亦可為包括游離DNA之其他樣品，如本文所描述。游離混合物之實例包括血漿或血清。游離混合物可包括來自多種細胞譜系之游離DNA。

在步驟320，使游離混合物中之DNA片段與對應於一或多個差異甲基化區之檢定接觸。該一或多個差異甲基化區中之每一者因藉由相對於其他細胞譜系低甲基化或高甲基化而對特定細胞譜系(例如特定血液細胞譜系，諸如紅血球母細胞)具有特異性。

在各種實施例中，檢定可涉及PCR或定序。與DNA片段接觸可涉及流量槽、液滴、珠粒或其他機制以提供檢定與DNA片段之相互作用。用於此類檢定之實例包括全基因組亞硫酸氫鹽定序、靶向亞硫酸氫鹽定序(藉由雜交捕獲或擴增子定序)、其他甲基化感知定序(例如，Pacific Biosciences之單分子即時(SMRT) DNA定序)、即時甲基化特異性PCR及

數位PCR。在本文中例如在部分XII中描述可用於方法300之檢定之其他實例。儘管實例圖3A針對紅血球母細胞，但可使用其他細胞譜系，包括其他血液細胞譜系。

在步驟330，基於獲自檢定之信號，在該一或多個差異甲基化區處偵測游離混合物中甲基化或未甲基化DNA片段之第一數目。檢定可提供各種信號，諸如光或電信號。信號可提供一特定信號/DNA片段，或指示具有甲基化標誌之DNA片段之總數目的聚集信號(例如，如在即時PCR中)。

在一個實施例中，定序可用以獲得DNA片段之序列讀數，且DNA片段可與參考基因組對準。若DNA片段與一個DMR對準，則計數器可遞增。在信號是來自特定甲基化或未甲基化檢定之條件下，可假定DNA片段具有甲基化標誌。在另一實施例中，來自PCR之讀數(例如，來自陽性孔之光信號)可用以遞增此類計數器。

在步驟340，使用第一數目確定第一甲基化水準。第一甲基化水準可經正規化或可為絕對濃度(例如根據生物樣品之體積)。絕對濃度之一實例提供於圖25中。

對於正規化值，可使用在該一或多個差異甲基化區處游離混合物中之DNA片段的第一數目及總數目來確定甲基化水準。如上文所描述，甲基化水準可為未甲基化DNA片段之百分比。在其他實施例中，百分比可為甲基化DNA片段之百分比，其將與上文紅血球母細胞之實例具有相反關係。在各種實施方案中，可使用DMR中之所有位點之百分比藉由各位點處之個別百分比之平均值或各位點處之加權平均值來確定甲基化水準。

在步驟350，獲得一或多個校準資料點。各校準資料點可限定(1)特定血液細胞譜系之細胞量及(2)校準甲基化水準。該一或多個校準資料點

自多個校準樣品確定。

可將細胞量限定為特定量(例如一數目或一濃度)或一系列量。可自具有已知量之細胞之校準樣品確定校準資料點，其可經由本文所描述之各種技術量測。至少一些校準樣品應具有不同量之細胞，但一些校準樣品可具有相同量之細胞。

在各種實施例中，可將一或多個校準點定義為一個離散點、一組離散點、一函數、一個離散點及一函數，或值之離散或連續集合之任何其他組合。作為一實例，可自具有特定譜系之特定量細胞之樣品的一種校準甲基化水準確定校準資料點。

在一個實施例中，可將來自具有相同量細胞之多個樣品之相同甲基化水準的量測值合併，以確定特定量細胞之校準資料點。舉例而言，甲基化水準之平均值可獲自具有相同量細胞之樣品之甲基化資料，以確定特定校準資料點(或提供對應於校準資料點之範圍)。在另一實施例中，具有相同校準甲基化水準之多個資料點可用以確定細胞之平均量。

在一個實施方案中，甲基化水準可由許多校準樣品來量測。確定各校準樣品之甲基化水準之校準值，其中可針對樣品細胞之已知量繪製甲基化水準(例如，如在圖3A中)。隨後可將函數與圖之資料點擬合，其中函數擬合定義用於確定新樣品之細胞量之校準資料點。

在步驟360，將第一甲基化水準與至少一個校準資料點之校準甲基化水準相比較。可以各種方式進行比較。舉例而言，該比較可為第一甲基化水準是否比校準甲基化水準更高或更低。該比較可涉及與校準曲線(由校準資料點構成)比較，因此該比較可鑑別具有第一甲基化水準之曲線上之點。舉例而言，第一甲基化水準之計算值X可用作進入函數F(X)之輸入，

其中F為校準函數(曲線)。F(X)之輸出為細胞量。可提供一誤差範圍，各X值之誤差範圍可不同，籍此提供呈F(X)之輸出形式之一系列值。

在步驟370，基於比較估算生物樣品中之特定細胞譜系之細胞量。在一個實施例中，可確定第一甲基化水準是否高於或低於臨限值校準甲基化水準，且藉此確定本發明樣品之細胞量是否高於或低於對應於臨限值校準甲基化水準之細胞量。舉例而言，若生物樣品之所計算第一甲基化水準X_1高於校準甲基化水準X_C，則生物樣品之細胞量N_1可確定為高於對應於X_C之細胞量N_C。此高於及低於之關係可視怎樣定義參數而定。在此類實施例中，可能僅需要一個校準資料點。

在另一實施例中，比較係藉由將第一甲基化水準輸入校準函數中而實現。校準函數可有效地藉由鑑別對應於第一甲基化水準之曲線上之點而將第一甲基化水準與校準甲基化水準相比較。隨後以校準函數之輸出值形式提供細胞之估算量。

IV. 血漿中之來自紅血球母細胞之游離DNA來源

使用未甲基化%與紅血球母細胞衍生之DNA之間的已確立關係，血漿之未甲基化%可用以定量血漿中之紅血球母細胞衍生之DNA。使用上文檢定確定血漿中之未甲基化%。數據顯示膚色血球層及血漿中之未甲基化%之間存在差異。分析顯示血漿中之游離紅血球母細胞DNA來自骨髓中之紅血球生成，且不衍生自血流中之紅血球母細胞。

在確認藉由兩種數位PCR檢定確定之未甲基化%精確反映了樣品中之紅血球母細胞衍生之DNA的量後，吾等對健康對照個體及懷孕女性之膚色血球層及血漿中之紅血球母細胞衍生之DNA的比例進行比較。

圖4顯示根據本發明之實施例健康非懷孕個體及處於不同三月期的懷

孕女性之膚色血球層及血漿的未甲基化%。與各個體組之膚色血球層相比較，血漿樣品具有顯著較高之未甲基化% (P<0.01，威爾卡遜符號秩檢驗(Wilcoxon sign-rank test)用於血漿與膚色血球層之間的各成對比較)。

圖4之結果顯示由於有核RBC之數目較低，因此如所預期在血球中紅血球母細胞衍生之DNA的量較低。出人意料之結果是血漿中之紅血球母細胞衍生之DNA的量較高。若血漿中之紅血球母細胞衍生之DNA衍生自血球，則吾人期望兩種量類似。因此，此資料顯示血漿中之紅血球母細胞衍生之DNA的來源是骨髓中之紅血球生成過程。

圖5顯示膚色血球層中之未甲基化%與血漿中之未甲基化%之間無相關性之圖。在膚色血球層之未甲基化%與血漿DNA之未甲基化%之間未觀測到顯著相關性(R^2=0.002，P=0.99，皮爾森相關性)。對於所有個體，包括非懷孕個體、第一三月期懷孕女性、第二三月期懷孕女性及第三三月期懷孕女性，可看出無相關性。如同圖4中之結果是出人意料的，因為若紅血球母細胞衍生之DNA之來源來自血流中之血球，則吾人期望兩種係相關的。

對血漿DNA比膚色血球層具有高得多的未甲基化%且血漿之未甲基化%與膚色血球層之未甲基化%之間無相關性之觀測表明，在紅血球生成過程期間攜帶紅血球母細胞甲基化標誌之循環游離DNA有可能衍生自骨髓，而非衍生自循環血球。因此，與由血流中之有核RBC產生相反，具有紅血球母細胞甲基化標誌之游離血漿DNA在骨髓中產生，因為在健康個體及懷孕女性中，血流中之有核RBC之數目極低。且，由於白血球(WBC)對紅血球母細胞甲基化標誌之貢獻極低，因此此貢獻對具有紅血球母細胞甲基化標誌之游離血漿DNA提供不可量測之相依性。

V. 甲基化水準可作為紅血球生成活性之量測值形式

基於上文觀測，吾等確定紅血球母細胞DMR處之未甲基化%將反映骨髓中之紅血球生成活性。高未甲基化%將指示高紅血球生成活性。換言之，對血漿/血清中之紅血球母細胞DNA之分析將充當骨髓之液體活檢。此分析將特別適用於對貧血之調查，(例如)以確定貧血是否因減少之紅血球生成(例如再生不全性貧血)、缺陷性紅血球生成(例如，在地中海貧血症中不能產生成熟RBC)或增加之RBC消耗(例如失血及溶血性貧血)所致。為此目的，吾等招募35名健康個體及75名具有不同病源之貧血患者。進行外周血液樣品收集及加工、血漿及膚色血球層DNA提取以及DNA之亞硫酸氫鹽轉化。關於方法之其他細節描述於部分XII中。

A. 對健康個體之血漿中之游離紅血球系DNA的量測

在確認吾等檢定之特異性後，吾等使用此等檢定來分析健康個體之血漿。吾等分析35名健康個體之血漿中之E%(FECH)，該等個體包括亦提供膚色血球層樣品之相同組之20名個體。血漿DNA之中位數E%(FECH)為30.1% (四分位數間距：23.8-34.8%)。此表明在健康個體之血漿中紅血球系DNA包含顯著比例之循環DNA庫。為確定血漿紅血球系DNA之來源，吾等將20名健康個體之血漿及膚色血球層中之相對應E%(FECH)結果進行比較。

圖6A及6B顯示健康個體中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))。圖6A顯示健康個體之膚色血球層DNA及血漿DNA中之E%，其中E%值在血漿(游離部分)中比在膚色血球層(細胞部分)中更高。血漿DNA中之中位數E% (中位數：26.7%，四分位數間距：23.7-30.4%)顯著高於成對膚色血球層DNA中之中位數E% (中位數：2.2%，四分位數間距：1.2-3.1%) ($P <$

0.0001，威爾卡遜符號秩檢驗(Wilcoxon signed rank test))。

圖6B顯示相對應健康個體之膚色血球層DNA中之E%與血漿DNA中的E%之間無相關性。血漿DNA中之成對E%(FECH)結果與膚色血球層DNA中之成對E%(FECH)結果之間無相關性(r = 0.002，P = 0.99，皮爾森相關性)。圖6A及6B中之結果均顯示循環之紅血球系DNA不大可能主要是源於外周血中之循環紅血球母細胞。

圖7顯示血漿DNA中之E%(FECH)結果與健康個體年齡之間無相關性。該圖顯示E%(FECH)結果不與個體年齡相關(r=0.21，p=0.23，皮爾森相關性)。

B.　重型β-地中海貧血症患者與再生不全性貧血患者之間的辨別

在確定血漿中之紅血球系DNA並非主要自循環中之完整紅血球母細胞釋放後，吾等提出此等DNA分子更可能在紅血球生成期間自骨髓釋放。吾等推論對血漿中之紅血球系DNA之定量分析將能夠提供關於骨髓中之紅血球生成活性之資訊。

為確認使用血漿量測骨髓中之紅血球生成活性之能力，自香港威爾士親王醫院藥品部門(Department of Medicine, Prince of Wales Hospital, Hong Kong)招募患有重型β-地中海貧血症及再生不全性貧血之患者。輸血之前收集靜脈血液樣品。藉由數位PCR確定各患者之血漿DNA之未甲基化%。此等結果與血色素水準相關。可經由熟習此項技術者已知之技術，例如藉由在自動化血球計數器上進行之光度技術來量測血色素水準。可自例如離心後獲得之RBC部分量測血色素水準。

此等兩組患者(重型β-地中海貧血症及再生不全性貧血)代表紅血球生成活性之兩個不同範圍。在患有重型β-地中海貧血症之患者中，紅血球生

成具有高度活性。然而，因功能β球蛋白鏈之缺陷性產生所致，成熟RBC之產生減少。在患有再生不全性貧血之患者中，紅血球生成減少，導致RBC產生減少。

圖8為根據本發明之實施例患有再生不全性貧血、重型β-地中海貧血症的患者及健康對照個體中，未甲基化%針對血色素濃度的圖。與健康對照個體相比較，在β-地中海貧血症患者中，血色素濃度降低，但未甲基化%顯著增加(P<0.01，曼-惠特尼秩和檢驗(Mann-Whitney rank-sum test))。事實上，在11名β-地中海貧血症患者的10名(89%)中，未甲基化%值高於所有健康對照個體之值。此觀測與此等患者中之增加但有缺陷的紅血球生成過程一致。

相反，對於經歷有規律輸注之患有再生不全性貧血之六名患者而言，其未甲基化%值低於所有健康對照個體之值。此觀測係此等患者中之減少的紅血球生成過程一致。

對於處於臨床緩解狀態之三名再生不全性貧血患者而言，其血色素水準是正常的且不需要有規律的輸注。其未甲基化%值與健康對照個體之值無顯著不同(P=0.53，曼-惠特尼秩和檢驗)。因此，對血漿中之紅血球母細胞特異性DNA之定量分析將適用於監測患有骨髓功能障礙之患者，例如以確定再生不全性貧血是否處於緩解狀態。此外，對紅血球母細胞特異性DNA之定量分析可用以指導治療。舉例而言，可用有規律輸血來治療未處於緩解狀態之患有再生不全性貧血之患者。

因此，未甲基化%在地中海貧血症患者中較高且在再生不全性貧血患者中較低。對於地中海貧血症，骨髓具有活性，因為患者患有貧血而骨髓希望產生更多的RBC用於循環。因此，紅血球生成速率高於無貧血之健康

個體之紅血球生成速率。對於患有再生不全性貧血之患者而言，貧血是因RBC產生減少所致。總體而言，此等結果指示對紅血球母細胞特異性甲基化概況之分析將適用於反映骨髓中之紅血球生成活性。

可經由血色素量測及未甲基化%之組合來診斷患者。舉例而言，可將血色素低於11.8且E%高於50之患者歸類為患有β-地中海貧血症。然而，可將血色素低於11.8且E%低於25之患者歸類為患有再生不全性貧血。

C.　缺鐵性貧血及治療

貧血可因缺乏營養(例如鐵、B12、葉酸等)、失血(例如因月經過多或自胃腸道出血所致)或慢性疾病(例如癌症、發炎性腸病)所致。

圖9是患有缺鐵(Fe)性貧血及急性失血之患者中之血漿未甲基化%的圖。研究對象是三名患有缺鐵性貧血之患者及一名呈現有急性胃腸失血之患者。在兩名缺鐵患者中，貧血是因月經過多所致。對於一名患者，在開始服用鐵補充劑之前收集血液樣品。對於另一者，在開始進行鐵補充劑療法後第1週收集血液樣品。第三名缺鐵性貧血患者罹患發炎性腸病，且在開始服用鐵補充劑之前收集血液樣品。

確定各患者之血漿未甲基化%且與健康對照個體之值相比較。在患有急性胃腸道出血之患者中觀測到增加的血漿未甲基化%。對於樣品在開始進行鐵補充劑療法前收集之兩名缺鐵患者，即使他們具有低血色素水準，相比健康個體，其血漿未甲基化%值不增加。對於樣品在開始服用鐵補充劑後第1週收集之Fe缺乏型患者，觀測到血漿未甲基化%增加。

此等結果顯示血漿未甲基化%反映回應於治療之紅血球生成活性。舉例而言，用鐵補充劑之治療顯示增加的紅血球生成活性。此外，此等結果顯示未甲基化%之反應將比血色素水準之上升更快。未甲基化%之用途可

為此類治療是否有效且因此其是否應繼續或中斷之早期識別符。因此，未甲基化%可提供一種指導來預測在可觀測到血色素水準變化之前對貧血治療(例如鐵療法)之反應。

在一些實施例中，血漿未甲基化%可用以反映對貧血治療之反應。舉例而言，在患有缺鐵性貧血之患者中，對口服鐵補充劑之反應可因個體不同而不同，因為鐵通過腸道之吸收有變化。在此類情形下，開始口服鐵補充劑後血漿未甲基化%無增加可用以指示需要靜脈內鐵療法。

D. *對各種貧血疾病之辨別*

吾等招募患有再生不全性貧血(AA)、慢性腎衰竭(CRF)、因慢性失血所致之缺鐵性貧血及重型β-地中海貧血症之貧血患者。招募不同病症實體以代表骨髓中之紅血球生成活性之範圍兩端。

圖10顯示根據本發明之實施例患有再生不全性貧血、慢性腎衰竭(CRF)、重型β-地中海貧血症、缺鐵性貧血之患者及健康個體中，血漿中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))與血色素水準之間的關係。針對血色素水準繪製貧血患者及35名健康對照之血漿DNA之E%(FECH)。水平點線表示健康個體之中位數E%。垂直線對應於患有貧血之個體與不患有貧血之個體之間的經量測血色素水準之截止值(如所描繪，11.5)。

吾等分析13名滿足診斷準則(28)且未能對免疫抑制療法起反應之AA患者中之血漿DNA E%。AA組之血漿DNA之中位數E%為12.4% (四分位數間距：7.5-13.7%)，其顯著低於健康對照之中位數E% ($P < 0.0001$，曼-惠特尼秩和檢驗；圖10)。類似地，18名需要透析之CRF患者之中位數E%結果為16.8% (四分位數間距：12.2-21.0%)，其亦顯著低於健康對照之中位數E% ($P < 0.0001$，曼-惠特尼秩和檢驗；圖10)。此等研究結果與

AA (28，29)及CRF患者(30)中之降低的紅血球生成活性之病理生理學一致。

對於患有重型β-地中海貧血症之患者，在增加但低效的紅血球生成之情況下骨髓試圖補償低氧應力(31)。在17名招募之重型β-地中海貧血症患者中，血漿DNA之中位數E%為65.3% (四分位數間距：60.1-78.9%)，其顯著高於健康對照之中位數E% ($P < 0.0001$，曼-惠特尼秩和檢驗；圖10)。

對於患有缺鐵性貧血之個體，吾等招募11名因月經過多或消化性潰瘍病症所致而罹患缺鐵性貧血之患者(運鐵蛋白飽和度< 16%或血清鐵蛋白水準< 30 ng/ml)。患者之血漿DNA之中位數E%為37.8% (四分位數間距：31.8-43.0%)，其顯著高於健康對照之中位數E% ($P = 0.002$，曼-惠特尼秩和檢驗；圖10)。作為對慢性失血之反應，該研究結果可藉由骨髓紅血球生成活性之補償性增加而闡述(32)。

因此，可經由血色素量測及E%之組合來診斷患者。舉例而言，可將血色素低於11.5(或其他值)且E%高於50之患者歸類為患有具增加之紅血球生成活性之貧血，例如β-地中海貧血症。然而，可將血色素水準低於11.5且E%低於50且高於28之患者歸類為患有具中度紅血球生成活性之貧血，例如缺鐵性貧血。且，可將血色素水準低於11.5且E%低於28之患者歸類為患有具降低之紅血球生成活性之貧血，例如再生不全性貧血或慢性腎衰竭。

在一些實施例中，為確定血液疾病之等級，可量測血液樣品之血色素水準。可將血色素水準與血色素臨限值(例如11.5)相比較。因此除甲基化水準以外，血液疾病之等級可進一步基於血色素水準與血色素臨限值之

比較。

對個體之E%(FECH)、紅血球及網狀紅血球參數之概述分別顯示於表5及6以及圖11A及11B中。

E% (FECH)	中位數E% (四分位數間距)
健康對照	30.1% (23.8 - 34.8%)
再生不全性貧血-對治療未起反應	12.4% (7.5 - 13.7%)
再生不全性貧血-對治療起反應	22.5% (17.2 - 27.1%)
慢性腎衰竭	16.8% (12.2 - 21.0%)
缺鐵性貧血	37.8% (31.8 - 43.0%)
重型β-地中海貧血症	65.3% (60.1 - 78.9%)
骨髓發育不良症候群	50.3% (37.4 - 60.8%)

表5. 概述健康個體及貧血患者之血漿DNA中之紅血球系DNA的中位數百分比(E%(FECH))之表格.

在下表6中，顯示中位數值及四分位數間距(加括號)。使用以下縮寫：以Hct為單位之血容比，以MCV為單位之平均紅血球體積，以MCH為單位之平均細胞血色素，以MCHC為單位之平均細胞血色素濃度，及以RDW為單位之紅細胞分佈寬度。

健康及疾病狀態	RBC數 ($\times 10^{12}$/L)	Hct (L/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)
健康對照	4.60 (4.36 - 4.95)	0.412 (0.396 - 0.437)	91.2 (87.5 - 94.1)	30.0 (29.1 - 31.2)	33.1 (32.5 - 33.7)	13.3 (12.8 - 13.6)
再生不全性貧血	2.49 (2.37 - 2.74)	0.244 (0.238 - 0.285)	97.8 (89.4 - 103.1)	34.0 (31.2 - 35.5)	34.5 (33.8 - 34.8)	17.9 (14.5 - 21.5)
慢性腎衰竭	2.82 (2.63 - 3.22)	0.252 (0.222 - 0.269)	87.2 (83.1 - 92.9)	29.3 (27.5 - 30.9)	33.2 (32.5 - 33.7)	15.6 (14.2 - 17.1)
缺鐵性貧血	4.04 (3.90 - 4.31)	0.272 (0.253 -	66.6 (65.1 -	19.9 (19.5 -	30.2 (30.1 -	18.6 (17.5 -

		0.311)	70.8)	21.7)	30.7)	20.0)
重型β-地中海貧血症	3.19 (3.08 - 3.41)	0.253 (0.248 - 0.282)	81.0 (77.4 - 81.8)	27.3 (26.3 - 28.1)	33.9 (33.4 - 34.1)	16.7 (14.4 - 18.2)
骨髓發育不良症候群	2.31 (2.16 - 2.50)	0.218 (0.207 - 0.238)	89.9 (86.3 - 99.8)	30.4 (29.0 - 33.6)	33.7 (33.0 - 33.8)	19.6 (16.0 - 22.7)

表6. 所招募之健康對照及貧血患者之紅血球(RBC)參數.

圖11A及11B顯示患有再生不全性貧血、慢性腎衰竭(CRF)、重型β-地中海貧血症及缺鐵性貧血之貧血患者中，網狀紅血球數/指數與血色素水準之間的關係。如下計算網狀紅血球指數：網狀紅血球數×血容比/正常血容比。如可看出，血液中網狀紅血球(不成熟RBC)的量不提供對不同疾病之可靠辨別。此等結果顯示網狀紅血球數及網狀紅血球指數不能區分不同病源學之貧血，例如不能將地中海貧血症與再生不全性貧血區分開來。

E. 骨髓發育不良症候群及真性紅血球增多症

圖12是患有骨髓發育不良症候群及真性紅血球增多症之患者中之血漿未甲基化%的圖。在患有骨髓發育不良症候群之患者中，在減少之血色素水準的情況下觀測到增加之血漿未甲基化%。亦在患有真性紅血球增多症之患者中觀測到增加之血漿未甲基化%。此等結果顯示對血漿中之紅血球母細胞DNA甲基化標誌之偵測及定量適用於偵測及監測涉及骨髓母細胞性細胞之骨髓的異常增殖或發育不良。

因此，可看出，此等兩種血液疾病亦顯示較高之紅血球母細胞之游離DNA，藉此使得可偵測血液疾病。在一些實施例中，準確診斷可基於骨髓活檢之組織學檢查。因此，可回應於偵測到高未甲基化%而進行骨髓活檢。類似地，可回應於在存在貧血但不存在營養缺乏(例如鐵缺乏、維生素B12缺乏或葉酸缺乏)下偵測到低未甲基化%而進行骨髓活檢。依此為

基礎再進行骨髓活檢可減少此類活檢之數目，同時仍允許監測骨髓之健康。因此，未甲基化%將更適用於監測治療反應。

F. *對貧血之其他辨別*

亦有可能辨別其他疾病。

1. 再生不全性貧血(AA)及骨髓發育不良症候群(MDS)

再生不全性貧血及MDS都是骨髓衰竭病狀。儘管其全部血球減少症之臨床特徵類似，但此等兩種病症實體具有不同的病理生理機制。在AA中，存在不具有發育不良特徵之細胞減少性骨髓(hypocellular marrow)。在MDS中，通常存在涉及一或多種譜系之細胞過多性骨髓及發育不良(33)，但存在細胞減少性MDS。

圖13A顯示根據本發明之實施例在患有再生不全性貧血(AA)及骨髓發育不良症候群(MDS)的患者之間，血漿中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))。來自8名MDS患者之血漿DNA之中位數E%為50.3%（範圍：37.4-60.8%)。兩種病例患有具單譜系發育不良之MDS，4名患有多譜系發育不良，且2名患有具過量母細胞之MDS(34)。所有其先前之骨髓活檢顯示紅血球系之細胞過多。MDS患者之中位數E%顯著高於13名所招募AA患者之中位數E%（$P < 0.0001$，曼-惠特尼秩和檢驗；圖13A)。MDS患者中之較高中位數E%結果與骨髓活檢研究結果及MDS中低效的紅血球生成之病理生理學一致。

因此，可使用E%或其他甲基化水準將MDS與再生不全性貧血區分開來。舉例而言，30之截止值可用以將樣品分類為對應於再生不全性貧血或MDS。

2. AA之治療反應及治療未反應組

圖13B顯示根據本發明之實施例在再生不全性貧血中，治療反應性組與治療未反應性組之間的血漿中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))。吾等分析8名額外再生不全性貧血患者，其對免疫抑制療法起反應，藉此增加血色素水準。治療反應組之血漿DNA之中位數E%為22.5% (四分位數間距：17.2-27.1%)，其高於未反應組之中位數E% (中位數：12.3%；四分位數間距：7.5-13.7%) (P = 0.0003，曼-惠特尼秩和檢驗；圖13B)。在治療反應組之E%結果與健康對照之E%結果之間存在小但顯著的差異(P = 0.01，曼-惠特尼秩和檢驗)。

此等結果反映骨髓中之紅血球生成活性之恢復。由於E%之恢復可比血色素水準更早得顯示，因此E%可用以早期確定患者是否對免疫抑制療法起反應。當該患者不作出反應時，可實行其他治療(例如更加具有攻擊性之治療)，例如進行幹細胞移植或開具骨髓刺激劑(例如沙格司亭(sargramostim)、非格司亭(filgrastim)及派非格司亭(pegfilgrastim))。

G.　白血病

亦可使用紅血球母細胞特異性DMR (如FECH相關之DMR)偵測除白血病以外的其他血液疾病。

圖14為根據本發明之實施例正常個體及兩名患有白血病之患者中，血漿中之未甲基化%針對血色素濃度的圖。使用FECH DMR確定未甲基化%。患有白血病或骨髓增生性疾病之患者之血漿中的未甲基化%值高於正常個體血漿中之中位數未甲基化%。此觀測與在患有白血病之患者中紅血球生成增加但有缺陷之觀測一致。因此，約45之截止值可用於未甲基化%以區分健康個體與患有白血病之個體，藉此確定血液疾病之水準。亦可使用血色素水準，例如與β-地中海貧血症相反，可將血色素低於8之患者鑑

別為患有白血病，如圖10中所示β-地中海貧血症之血色素水準一般在8與約11.8之間。

VI. 其他甲基化標記物之結果

吾等基於樣品子集之血漿中之其他兩個DMR分析E%，以驗證上文之來自*FECH*基因相關之DMR的E%結果。使用其他兩個紅血球母細胞特異性DMR，觀測到健康個體與再生不全性貧血及重型β-地中海貧血症患者之間的血漿中之紅血球系DNA百分比之類似差異，與FECH基因之DMR相似。

A. 其他兩個紅血球母細胞特異性DMR

位於染色體12上之其他兩個DMR亦為低甲基化的。與此等兩個DMR相關之基因組區域先前未鑑別為在任何所標註基因內。

圖15A及15B顯示根據本發明之實施例染色體12上之紅血球母細胞特異性DMR內之CpG位點的甲基化密度。圖15A顯示染色體12上之基因組座標處之區域1510：48227688-48227701，其包括3個位點。圖15B顯示染色體12上之基因組座標處之區域1560：48228144-48228154，其亦包括3個位點。基因組座標對應於人類參考基因組hg19。位於陰影區內之經選擇CpG位點在紅血球母細胞中均為低甲基化的，但在其他組織或細胞類型中為高甲基化的。其他組織代表肺、結腸、小腸、胰臟、腎上腺、食道、心臟及腦。

將此等兩個其他紅血球母細胞特異性DMR標記為Ery-1及Ery-2。基於這兩個DMR (chr 12：48227688-48227701及chr 12：48228144-48228154)之E%將分別由E%(Ery-1)及E%(Ery-2)指代。

圖16顯示來自ENCODE資料庫之兩個其他紅血球母細胞特異性DMR

(Ery-1及Ery-2)上之組蛋白修飾(H3K4me1及H3K27Ac)。吾等查閱了來自公開的ENCODE資料庫之紅血球母細胞類型中之此等兩個DMR上的組蛋白修飾及CHIP-seq資料集。Ery-1及Ery-2 DMR藉由兩種增強子相關之組蛋白修飾(H3K4me1及H3K27Ac)標記，其暗示具有調節功能，尤其具有增強子功能。最接近之下游基因為*HDAC7*基因，其有約15 kb遠。

B.　紅血球母細胞富集之樣品

基於來自8個之前所描述之臍帶血樣品的紅血球母細胞富集之樣品中之其他兩個DMR，吾等分析紅血球系DNA百分比。自經彙集樣品提取之DNA之E%(Ery-1)及E%(Ery-2)為66.5%及68.5%。此等E%值類似於基於*FECH*基因相關之DMR之E%（即67%）。基於來自所有三個DMR研究結果之相似，低於預期之E%值(亦即，低於進行富集時之預期)可能是由於富集方案之不完整選擇性而致。

C.　重型β-地中海貧血症患者之膚色血球層中之E%與紅血球母細胞的相關性

在相同組之重型β-地中海貧血症患者之膚色血球層DNA中分析基於兩個DMR之紅血球系DNA百分比。以與圖3A類似之方式，膚色血球層DNA中兩個DMR之E%與紅血球母細胞百分比具有很好相關性。

圖17A及17B顯示藉由靶向Ery-1標記物(圖17A)及Ery-2標記物(圖17B)之數位PCR檢定量測的重型β-地中海貧血症患者之膚色血球層DNA中之紅血球系DNA序列百分比(E%)與使用自動化血液分析器量測之所有周邊白血球中之紅血球母細胞百分比之間的相關性。膚色血球層DNA中之E%(Ery-1)及E%(Ery-2)與藉由血液分析器量測之周邊白血球中之紅血球母細胞百分比具有很好相關性($r = 0.938$及$r = 0.928$，均$P < 0.0001$，

皮爾森相關性)。

圖18A及18B顯示重型β-地中海貧血症患者之膚色血球層DNA中E%(FECH)結果與E% (Ery-1)及E% (Ery-2)的相關性。衍生自此等兩個DMR之E%結果亦與衍生自15名重型β-地中海貧血症患者之膚色血球層DNA中之*FECH*基因標記物位點的成對E%結果具有很好相關性。

D.　健康個體及貧血患者之血漿中之E%

吾等分析健康個體及患有再生不全性貧血及重型β-地中海貧血症之患者之血漿DNA中的E%(Ery-1)及E%(Ery-2)。分析基於相同組之健康個體、7名再生不全性貧血患者及9名重型β-地中海貧血症患者中之三個紅血球母細胞特異性DMR的E%結果。

圖19顯示根據本發明之實施例使用靶向三個紅血球母細胞特異性DMR之數位PCR分析，健康個體及患有再生不全性貧血及重型β-地中海貧血症之患者中之紅血球系DNA百分比。13名健康個體之血漿DNA中之中位數E%(Ery-1)為16.7% (四分位數間距：10.9-23.5%)，且相同組之健康個體中之中位數E%(Ery-2)為25.0% (四分位數間距：22.2-27.3%)。基於Ery-1標記物，患有再生不全性貧血及重型β-地中海貧血症之患者之E%(Ery-1)分別係13.78%及61.69%。基於Ery-2標記物，患有再生不全性貧血及重型β-地中海貧血症之患者之E%(Ery-2)分別為14.13%及64.95%。使用兩個紅血球母細胞特異性DMR作為*FECH*基因中之紅血球母細胞特異性DMR，觀測到健康個體與再生不全性貧血及重型β-地中海貧血症患者之間的血漿中之紅血球系DNA百分比之類似差異。

VII. 治療結果

如上文所描述，E%可用以監測針對貧血之治療功效。

A. 鐵療法前後量測缺鐵性貧血患者中之血漿DNA中之E%(FECH)

吾等監測4名患有缺鐵性貧血之患者中之血色素水準、網狀紅血球數及血漿DNA E%的連續變化，該等患者因對來自口服鐵之胃腸副作用不耐受而接受靜脈內鐵療法。吾等選擇觀測此組患者而非進行口服鐵療法之患者的變化，以避免歸因於可變之胃腸吸收不同治療反應之可能混雜的因素。吾等在治療之前及治療後兩天量測此等參數。

圖20A及20B顯示根據本發明之實施例之對如下之連續量測：在治療前狀態及治療後兩天時接受靜脈內鐵療法之缺鐵性貧血的血漿DNA中之紅血球系DNA百分比(E%(FECH))及網狀紅血球數百分比。圖20A顯示血漿DNA之E%之連續變化。圖20B顯示網狀紅血球數百分比之連續變化。

除了個體1，在開始治療之後血漿DNA之E%及網狀紅血球數就增加，而血色素水準最初保持靜止。關於血色素水準之最終變化，個體3及4之水準最終分別具有84.7%及75.3%的急劇變化。個體2拒絕隨訪因此沒有針對治療後之血色素量測之樣品。血漿DNA之E%具有最小變化的個體1在血色素水準方面具有最小增加(12.2%)。因此，血漿DNA之E%之變化可證實骨髓紅血球生成活性對鐵療法之動態反應，且用作患者對治療起反應之早期預測子。

個體1之網狀紅血球數不增加表明RBC產生對鐵療法之反應不充分。對鐵療法無反應亦可由E%不增加來反映，E%對應於骨髓活性。但是，對於個體1，開始鐵療法之前的血色素水準高於其他3名個體，且更接近於健康個體之參考範圍。個體1中之E%(FECH)不上升可反映出骨髓中之紅血球生成活性不存在補償性增加，因為其血色素水準與正常水準相比差異較小。個體1之網狀紅血球最初約與其他個體相同，因此說明其網狀紅血球

量不能指示骨髓活性具有足夠水準。因此，對於具有中度紅血球生成活性之貧血，處於健康患者之正常範圍之上端的E%可指示針對治療之陽性反應，或至少不確定反應，且因此治療在此類情況下可能不會停止。

為使血色素水準回至正常，需要增加RBC產生。因此，在缺鐵性貧血中，E%之正常範圍可視為不適當的。個體2-4之E%的增加指示鐵療法後之適當反應，因為對於具有正常範圍(參見圖10)或稍高範圍之E%，患有缺鐵性貧血之個體將期望較高範圍內之E%。因此，用於確定治療是否有效之E%之臨限值可視E%之開始值而定。E%之臨限值可為相對初始值之特定變化，其中變化量可視初始值而定。

亦研究鐵之口服治療之作用。患有慢性失血(例如因月經過多所致)之患者將患有缺鐵性貧血。鐵補充劑將用於校正鐵缺乏狀態。

圖21A顯示根據本發明之實施例接受口服鐵治療之因月經過多而患有缺鐵性貧血的患者中，紅血球母細胞DMR處之血漿E%(FECH)之連續變化。在鐵治療之前及鐵治療後七天，分析接受鐵治療之患有缺鐵性貧血之患者的血漿中之E%。在圖21A中，接受鐵治療後E%增加。此等結果表明血漿E%可反映回應於治療之紅血球生成活性。

圖21B顯示口服鐵治療後血色素之變化。血色素水準尚未大大增加，但在治療後相同之時間點時E%(FECH)增加。此類似於圖20A，其顯示E%可用作治療是否有效之早期偵測。

B.　對慢性腎病(CKD)之治療

在CKD患者中，貧血之主要病因係因腎損傷所致紅血球生成素產生減少。紅血球生成素為由腎產生之回應於低組織氧水準之激素。其刺激骨髓產生紅血球。外源性紅血球生成素將用於治療CKD之貧血。

圖22顯示接受重組型紅血球生成素(EPO)或紅血球生成刺激劑(ESA)治療之患有慢性腎病(CKD)之患者中，紅血球母細胞DMR處之血漿未甲基化%的連續變化。在EPO治療之前及EPO治療後7至14天分析七名接受EPO治療之CKD患者之血漿中的未甲基化%。不同形狀(顏色)之直線對應於不同患者。所有患者顯示接受EPO治療後未甲基化%增加。未甲基化%值顯示對不同患者之不同的功效水準。此等結果顯示血漿未甲基化%反映回應於治療之紅血球生成活性。

C.　對再生不全性貧血之ATG治療

對再生不全性貧血患者之免疫抑制療法可使得60-70%患者之血液得到恢復(Young等人 Blood. 2006;108(8):2509-2519)。在免疫抑制療法開始之前以及免疫抑制療法後2個月及4個月，分析4名接受免疫抑制療法之患有再生不全性貧血之患者的血漿中之未甲基化%值。所有患者對治療不作出反應，且血色素水準在該時間段內不恢復至正常水準；所有四名患者需要有規律的輸血。

圖23A顯示根據本發明之實施例接受抗胸腺細胞球蛋白(ATG)治療或環孢素作為免疫抑制療法之患有再生不全性貧血之患者中，紅血球母細胞DMR處之血漿未甲基化%的連續變化。在三名患者中，血漿中之未甲基化%不變化。一名患者證實未甲基化%顯著增加。此在出現陣發性夜間血紅素尿(PNH)純系之症狀(亦即排出含有血色素之尿赤)的同時出現。此類症狀可用以確定患者對治療不作出反應，即使未甲基化%增加亦如此。已知PNH在患有再生不全性貧血之患者中之發生且其具有溶血性貧血之病理生理機制。由於自PNH之溶血，未甲基化%之增加反映紅血球生成活性之增加。

圖23B顯示接受治療之患有再生不全性貧血之患者中血色素的連續變化。血色素水準不顯著增加。此等結果顯示血漿未甲基化%反映治療過程期間紅血球生成活性之變化，由於所有患者對治療不作反應，因此紅血球生成活性不改變，如藉由圖23B中所示之血色素變化之缺乏所例示。

圖24A及24B顯示四名患有再生不全性貧血之患者中，血漿中之未甲基化%針對血色素濃度的圖。各直線對應於一名患者，且在治療之前及治療4個月後追蹤未甲基化%及血色素水準之變化。圖23A顯示除了患有PNH之患者，未甲基化%不顯著變化。圖23B顯示血色素水準變化，但不顯著。

VIII.使用紅血球系DNA之絕對濃度

為量測血漿/血清中之紅血球系DNA的量，一些實施例在低甲基化標記物處使用參數E% (亦稱作未甲基化%)，但亦可使用對細胞譜系具有特異性之高甲基化標記物(若存在)。在樣品中，E%對應於對DNA總量(其主要為高甲基化的)正規化之紅血球母細胞DNA的量。

一種替代參數為量測每單位體積血漿紅血球系DNA之絕對濃度。對於E%之計算，實施例可量測未甲基化DNA絕對濃度及甲基化DNA絕對濃度。在數位PCR檢定中，各點可表示一個DNA分子(例如，如圖2A及圖2B中所示)。可直接對甲基化及未甲基化DNA數進行計數。在先前部分中，計算正規化值(例如E%)，但實施例亦可使用低甲基化標記物之未甲基化分子的絕對濃度或高甲基化標記物之甲基化分子的絕對濃度。

圖25之盒狀及鬚狀圖顯示根據本發明之實施例健康個體及貧血患者中*FECH*基因相關之DMR處的紅血球系DNA之絕對濃度(複本/毫升血漿)。盒內部直線分別表示四分位數間距及中位數值。頂部及底部鬚表示

最大值及最小值。

如圖25中所示，雖然可使用紅血球系DNA之絕對濃度觀測到不同患者組之間的差異，但正規化值允許組間有較好間隔。理論上，血漿之E%參數亦可受非紅血球系來源之循環DNA (例如骨髓或淋巴衍生之DNA)之濃度影響。舉例而言，在當其他造血譜系亦受影響時之貧血病狀(例如再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群)中，在此等情況中之一些下改變的紅血球系DNA釋放可能被遮蔽。

IX. 其他血液譜系

用於血液評估之此基於血漿DNA之方法可推廣至對於其他血液細胞譜系(例如骨髓、淋巴及巨核細胞系列)之標記物。關於使用血液譜系特異性DNA甲基化標記物之先前工作聚焦於全血或血球(Houseman EA等人 Current Environmental Health Reports 2015; 2: 145-154)。吾等資料清晰顯示血漿DNA含有不存在於血球中之資訊。因此，使用來自多種血液細胞譜系之表觀基因組之標記物來分析血漿DNA可提供關於個體之血液系統之有價值的診斷資訊。因此其可作為骨髓活檢之非侵襲性替代。檢定可經設計以特異性地偵測血漿或血清中之特定細胞譜系之甲基化標誌，使得可監測骨髓中之不同細胞譜系之活性。

此類方法將適用於評估許多臨床情形，包括(但不限於)以下疾病。疾病之例示性相關譜系亦有提供。

1. 血液惡性病，例如白血病及淋巴瘤(淋巴細胞譜系)

2. 骨髓疾病，例如再生不全性貧血、骨髓纖維化(骨髓細胞及淋巴細胞譜系)

3. 對免疫系統及其功能例如免疫缺乏之監測，及病症及治療期間免

疫反應之建立(淋巴細胞譜系)

4. 對骨髓之藥物作用，例如硫唑嘌呤(骨髓細胞譜系)

5. 具有血液表現之自身免疫疾病，例如免疫血小板減少症(ITP)，其是一種特徵為低血小板數但具有正常骨髓之病狀。使用血液譜系標記物(例如巨核細胞標記物)之血漿DNA分析將提供關於此類病狀之有價值的診斷資訊(巨細胞核素標記物)。

6. 患有血液併發症之感染，例如患有小病毒B19之感染，其可為併發的，伴隨有紅血球生成減少或甚至更嚴重的再生不全性危機(紅血球系譜系)。

X. 方法

圖26說明根據本發明之實施例之分析哺乳動物之血液樣品的方法2600之流程圖。方法2600之部分可手動進行且其他部分可藉由電腦系統執行。在一個實施例中，系統可執行所有步驟。舉例而言，系統可包括機器人元件(例如以獲得樣品且執行檢定)、用於自檢定偵測信號之偵測系統及用於分析信號之電腦系統。用於控制此類系統之指令可儲存於一或多個電腦可讀媒體中，該一或多個電腦可讀媒體諸如場可程式閘極陣列(FPGA)之組態邏輯、快閃記憶體及/或硬碟機。圖27顯示一個此類系統。

在步驟2610，獲得血液樣品之游離混合物。游離混合物之實例包括血漿或血清。游離混合物可包括來自多種細胞譜系之游離DNA。

在一些實施例中，分離血液樣品以獲得游離混合物。血漿及血清是不同的。兩者均對應於血液之流體部分。為得到血漿，向血液樣品中添加抗凝血劑以防止其凝結。為得到血清，血液樣品允許凝結。因此，在凝血過程期間將消耗凝血因子。相關於循環DNA，在凝血期間一些DNA將自

血球釋放至流體部分。因此，與血漿相比較血清具有較高之DNA濃度。凝血期間來自細胞之DNA可稀釋對血漿具有特異性之DNA。因此，血漿可為有利的。

在步驟2620，使游離混合物中之DNA片段與對應於一或多個差異甲基化區之檢定接觸。該一或多個差異甲基化區(DMR)中之每一者藉由相對於其他細胞譜系低甲基化或高甲基化而對特定血液細胞譜系具有特異性。在本文中提供紅血球母細胞細胞譜系之DMR之實例。

在各種實施例中，檢定可涉及PCR或定序，且因此為PCR檢定或定序檢定。與DNA片段接觸可涉及流量槽、液滴、珠粒或其他機制以提供檢定與DNA片段之相互作用。用於此類檢定之實例包括全基因組亞硫酸氫鹽定序、靶向亞硫酸氫鹽定序(藉由雜交捕獲或擴增子定序)、其他甲基化感知定序(例如，Pacific Biosciences之單分子即時(SMRT) DNA定序)、即時甲基化特異性PCR及數位PCR。在本文中例如在部分XII中描述可用於方法300之檢定之其他實例。儘管實例使用紅血球母細胞，但可使用其他細胞譜系，包括其他血液細胞譜系。

在步驟2630，基於獲自檢定之信號，在該一或多個差異甲基化區處偵測游離混合物中甲基化或未甲基化DNA片段之第一數目。檢定可提供各種信號，諸如光或電信號。信號可以是每個DNA片段提供一特定信號，或指示具有甲基化標誌之DNA片段之總數目的聚集信號(例如，如在即時PCR中)。

在一個實施例中，定序可用以獲得DNA片段之序列讀數，且DNA片段可與參考基因組對準。若DNA片段與一個DMR對準，則計數器可遞增。在信號是來自特定甲基化或未甲基化檢定之條件下，可假定DNA片

段具有甲基化標誌。在另一實施例中，來自PCR之讀數(例如，來自陽性孔之光信號)可用以遞增此類計數器。

在步驟2640，使用第一數目確定甲基化水準。第一甲基化水準可經正規化或可為絕對濃度(例如根據生物樣品之體積)。絕對濃度之一實例提供於圖25中。正規化之甲基化水準之實例包括E% (亦稱作未甲基化%)。

對於正規化值，可使用在該一或多個差異甲基化區處游離混合物中之DNA片段的第一數目及總數目來確定甲基化水準。如上文所描述，甲基化水準可為未甲基化DNA片段之百分比。在其他實施例中，百分比可為甲基化DNA片段之百分比，其將與上文紅血球母細胞之實例具有相反關係。在各種實施方案中，可使用DMR中之所有位點之百分比藉由各位點處之個別百分比之平均值或各位點處之加權平均值來確定甲基化水準。

在步驟2650，將甲基化水準與作為確定哺乳動物中血液疾病之等級之部分的一或多個截止值相比較。該一或多個截止值可選自經驗資料，例如，如圖8-10及12-14中所示。可選擇截止值，例如基於監督式學習自正常及具有疾病之已知樣品之資料集，以提供最佳敏感性及特異性，以提供精確的血液疾病等級。

作為確定截止值之一實例，可獲得多個樣品。舉例而言，經由如將由熟習此項技術者已知之其他技術，已知各樣品具有血液疾病之特定等級。該多個樣品具有至少兩個血液疾病等級，例如具有疾病及不具有疾病。亦可包括不同類型的疾病，例如，如圖10中所示。針對該多個樣品中之每一者，可確定該一或多個差異甲基化區之甲基化水準，如圖8-10及12-14中之資料點。

第一組樣品可經鑑別具有血液疾病之第一等級，例如第一等級為健

康的。可將第一組聚在一起，例如，如圖8-10及12-14中所示。第二組樣品可經鑑別具有血液疾病之第二等級。第二組可為患有疾病或具有非第一等級之不同疾病類型之患者。兩個等級可對應於具有相同疾病之不同程度。當第一組樣品總體而言在統計學上具有比第二組樣品更高的甲基化水準時，可在規定特異性及敏感性內確定截止值，該截止值在第一組樣品與第二組樣品之間辨別。因此，特異性與敏感性之間的平衡可用以選擇適當的截止值。

XI. 概述

RBC是外周血中最豐富之細胞類型但不具有細胞核。在本發明中，吾等確定紅血球系譜系之細胞貢獻顯著比例之血漿DNA庫。在此工作之前，已知造血細胞對循環DNA庫作出顯著貢獻(13、14)，但許多工作者已假定此類造血DNA僅來自白細胞譜系(15)。使用DNA甲基化標記物之最新結果顯示血漿DNA攜帶嗜中性白血球及淋巴細胞之DNA甲基化標誌(15)。

使用一定數目之包括紅血球母細胞之組織之高解析度參考甲基化組(18、20)，吾等將紅血球系衍生之DNA分子與血漿DNA庫中之其他組織類型之DNA區分開來。吾等基於紅血球母細胞特異性甲基化標誌之數位PCR檢定使得吾等能夠對血漿中之此類DNA分子進行定量分析。此方法允許吾等證實大量紅血球系DNA在健康個體之血漿DNA庫中之存在。

吾等結果與促進DNA進入血漿中之骨髓中之紅血球系譜系的細胞一致。此假設之推論是對血漿中之紅血球系DNA之定量分析反映骨髓紅血球生成活性，且因此可有助於貧血之鑑別診斷。吾等已確立健康個體之血漿中之紅血球系DNA的參考值。吾等已進一步證實貧血患者具有增加或

降低比例之循環紅血球系DNA，此視其病變之確切性質及治療而定。特定言之，吾等可在吾等招募之患者中經由分析血漿中之紅血球系DNA百分比，來區分兩種骨髓衰竭症候群，亦即再生不全性貧血(AA)及骨髓發育不良症候群(MDS)。

網狀紅血球數可用以提供關於貧血患者中之骨髓反應之資訊。在11名吾等研究之患有β-地中海貧血症之患者中，四名患者之外周血之網狀紅血球數小於偵測極限（即1%）。對於其他七名患者，網狀紅血球數介於1%至10%。對於所有九名患有再生不全性貧血之患者，不管其是否接受有規律輸注，其網狀紅血球數小於1%。因此，網狀紅血球數可能不會清晰地定義骨髓中之正常及降低之紅血球生成活性，因為在低濃度網狀紅血球下自動化方法之不精確性較高(35、36)。

吾等已證實在吾等患者群組中，對網狀紅血球數或網狀紅血球指數之分析不能區分貧血原因與降低之紅血球生成活性(圖11A及11B)。吾等結果指示，在反映骨髓中之紅血球生成活性方面，血漿未甲基化% (例如，如圖10中所示)比網狀紅血球數更精確。如圖11A及11B中所示，在具有兩個所量測參數之所有患者中，血漿未甲基化%與網狀紅血球數或網狀紅血球指數之間無相關性(P=0.3，線性回歸)。

類似地，在外周血中存在異常大量的紅血球母細胞暗示異常紅血球生成應力(37)。然而，在外周血中不存在紅血球母細胞不暗示正常或降低之紅血球生成活性。相反，對血漿紅血球母細胞衍生之DNA之定量分析生成關於骨髓紅血球生成活性之資訊，其不由來自外周血之習知血液參數提供。

對於β-地中海貧血症及再生不全性貧血，此等兩種病狀通常藉由以

血液及血色素模式分析鐵來診斷。但是，β-地中海貧血症及再生不全性貧血均展現低的血色素水準，且因此此類技術在β-地中海貧血症與再生不全性貧血之間不能進行辨別。如圖8及10中所示，使用未甲基化%能夠在此等兩種疾病之間進行辨別，因此可提供更大特異性。

未甲基化%亦可用以監測治療。舉例而言，如圖9中所示，對患有缺鐵性貧血之患者中之未甲基化%的分析可用於監測針對口服鐵療法之骨髓反應。在一些患者中，口服鐵補充劑可能不會有效地經由胃腸道吸收。因此，在開始治療後紅血球生成不增加。未甲基化%未增加可用作一個針對口服鐵治療之差反應之指標，使得可開始進行其他治療，諸如非經腸鐵治療(例如，菌葡萄聚糖鐵(iron dextran)、葡糖酸鐵及鐵蔗糖)。或者，未甲基化%未增加可用以中斷(停止)治療，藉此節省低效治療之成本。在另一實施方案中，未甲基化%未增加可用以鑑別何時增加治療劑量，例如增加鐵劑量。當未甲基化%增加時，可繼續進行治療。若未甲基化%增加得足夠高(例如基於臨限值)，則可停止治療，因為可認為紅血球生成活性已達至足夠水準來將血色素水準最終反回至健康水準，藉此避免昂貴或潛在有害之過度治療。

因此，對確定血液疾病等級指示哺乳動物患有血液疾病作出回應，可治療該哺乳動物之血液疾病。治療後，可重複檢定以確定更新之甲基化水準，且可基於更新之甲基化水準判定是否繼續進行治療。在一個實施例中，判定是否繼續進行治療可包括：停止治療，增加治療劑量，或當更新之甲基化水準相對於甲基化水準尚未改變至在規定臨限值內時實行不同治療。在另一實施例中，判定是否繼續進行治療可包括：當更新之甲基化水準相對於甲基化水準已改變至在規定臨限值內時繼續治療。

作為監測治療之另一實例，未甲基化%分析可用以確定地中海貧血症患者中之低效的紅血球生成是否已藉由治療(例如藉由輸血)得到充分抑制。在地中海貧血症患者中，髓外紅血球生成是骨變形之原因。髓外紅血球生成可藉由輸注及血色素水準之復原來抑制。未甲基化%可顯示患者對此等治療之反應，且未能抑制未甲基化%可用以指示應加強治療。

未甲基化%亦可用以將僅患有鐵缺乏之患者與患有鐵缺乏以及其他原因造成之貧血(例如因慢性疾病所致之貧血)之彼等患者區分開來。預期僅患有鐵缺乏之患者在鐵治療後具有增加之未甲基化%，但患有多原因造成之貧血之彼等患者將不顯示未甲基化%升高的反應。

因此吾等已證實，在患有缺鐵性貧血之患者中，循環紅血球系DNA之百分比回應於鐵療法而增加，因此反映骨髓紅血球生成活性之增加。紅血球系DNA比例之動態變化顯示對血漿紅血球系DNA之定量允許非侵襲性地監測相關細胞過程。血漿DNA之快速動力學(例如，幾十分鐘順序之半衰期(38、39))表明此類監測可提供接近即時之結果。類似地，對於其他細胞譜系，其他細胞譜系之循環游離DNA之百分比亦允許非侵襲性地監測骨髓中之相關細胞過程。

當前工作充當一種證明以證實在循環中存在造血祖細胞及前驅體細胞之核物質。此外，亦可使用自其他造血譜系之前驅體細胞釋放之循環DNA的存在。

概言之，吾等已證實紅血球系DNA貢獻顯著比例之血漿DNA庫。該發現填充了吾等在循環核酸之基礎生物學之理解中的重要差距。臨床上，對血漿中之紅血球系DNA之量測打開了一種用於調查及監測不同類型貧血之新方法，且預示了基於游離DNA之新家族之血液測試的開始。

XII. 材料及方法

此部分描述已經且可用於實施實施例之技術。

A. 樣品收集及製備

在一些實施例中，自匿名化手術樣本擷取福馬林固定石蠟包埋(formalin-fixed paraffin-embedded，FFPE)之12種類型的正常組織(肝、肺、食道、胃、小腸、結腸、胰臟、腎上腺、膀胱、心臟、腦及胎盤)，各自具有四個樣本。確認所收集之組織在組織學檢查上是正常的。對於每個組織，使用製造商方案有修改之QIAamp DNA微型套組(Qiagen)自FFPE組織方案提取DNA。使用二甲苯替代去石蠟化溶液(Qiagen)以移除石蠟。在用緩衝ATL及蛋白酶K裂解後進行在90℃下培育1小時之額外步驟，以反轉核酸之甲醛修飾。

為製備紅血球母細胞富集之樣品用於分析，自八名緊接著分娩之懷孕女性中之每一者將1-3 mL臍帶血收集於含EDTA管中。使用密度梯度離心用Ficoll-Paque PLUS溶液(GE Healthcare)自臍帶血樣品分離單核細胞。在4℃下黑暗中將1 × 10^8個分離之單核細胞與1 mL兩種抗體之混合物一起培育30分鐘：螢光素異硫氰酸鹽(FITC)-結合之抗CD235a (Miltenyi Biotec)與藻紅素(PE)-結合之抗CD71(Miltenyi Biotec)，在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中按1:10稀釋。隨後針對紅血球母細胞之富集藉由BD FACSAria融合流式細胞儀(BD Biosciences)分選CD235a+及CD71+細胞 (1)。彙集來自八種病況之CD235a+CD71+細胞用於下游分析。使用QIAamp DNA血液微型套組(Qiagen)根據製造商之說明書自經彙集CD235a+CD71+細胞提取DNA。

將外周血樣品收集於含EDTA管中且立即儲存於4℃下。自各患者收

集10 mL外周靜脈血液。在血液抽出後6小時內進行血漿分離。自4 mL血漿提取血漿DNA。如先前所描述獲得血漿及膚色血球層DNA(2)。簡言之，首先在4℃下在1,600 g下將血液樣品離心10分鐘，且在4℃下在16,000 g下將血漿部分再離心10分鐘。在2,500 g下再離心10分鐘後收集血球部分以移除任何殘餘血漿。分別使用QIAamp DSP DNA微型套組(Qiagen)及QIAamp DNA血液微型套組(Qiagen)提取來自血漿及膚色血球層之DNA。

B. DNA之亞硫酸氫鹽轉化

根據製造商之說明書使用Epitect Plus亞硫酸氫鹽套組(Qiagen)使自血球及FFPE組織提取之血漿DNA及基因組DNA經歷兩輪的亞硫酸氫鹽處理(3)。

在一個實施例中，首先用亞硫酸氫鹽處理自生物樣品提取之DNA。亞硫酸氫鹽處理將未甲基化胞嘧啶轉化成尿嘧啶，同時保持甲基化胞嘧啶不變。因此，在亞硫酸氫鹽轉化後，可基於CpG二核苷酸處之序列差異區分甲基化及未甲基化序列。為了分析存在於本申請案之經選擇實例中之血漿樣品，自2-4 mL血漿提取DNA。為了分析自血球提取之DNA，在實例中將1 μg DNA用於下游分析。在其他實施例中，可使用其他體積之血漿及其他量之DNA。

在本申請案中之實例中，根據製造商之說明書使用亞硫酸氫鹽套組對各樣品執行兩輪之亞硫酸氫鹽處理。將亞硫酸氫鹽轉化之血漿DNA溶離在50 μL水中。將亞硫酸氫鹽轉化之細胞DNA溶離於20 μL水中，且隨後稀釋100倍用於下游分析。

C. 甲基化檢定

各種甲基化檢定可用以對特定細胞譜系之DNA的量進行定量。

1. PCR檢定

對於三個紅血球母細胞特異性DMR中之每一者，開發兩種數位PCR檢定，一種靶向亞硫酸氫鹽轉化之未甲基化序列且另一種靶向甲基化序列。在補充之表7中列舉經設計用於檢定之引子及探針。

***FECH*基因標記物位點**(chr 18：55250563-55250585)

用於甲基化序列之檢定	
正向引子(由Y指代之簡併鹼基)	5'-TTGAAGAGAATTTGATGGTAYGGGTA-3'
反向引子	5'-CAAATCTCTCTAATTTCCGAACACG-3'
螢光探針	5'-(**VIC**)-TGCGTGGCGTAGAG-MGB-3'
用於未甲基化序列之檢定	
正向引子(由Y指代之簡併鹼基)	5'-TTGAAGAGAATTTGATGGTAYGGGTA-3'
反向引子	5'-CTCAAATCTCTCTAATTTCCAAACACA-3'
螢光探針	5'-(**FAM**)-TTGTGTGGTGTAGAGAG-MGB-3'

***Ery-1*標記物位點**(chr 12：48227688-48227701)

向引子(由Y指代之簡併鹼基)	5'-GAGTAAGYGGAGTTGTTGGTATTATGG-3'
反向引子	5'- ACCCTCAACCCAACTCCTAAAATAAC-3'
用於甲基化序列之螢光探針	5'-(**VIC**)- TCGGGTTAGGCGTGCGT-MGB-3'
用於未甲基化序列之螢光探針	5'-(**FAM**)- TTGGGTTAGGTGTGTGTTT-MGB-3'

***Ery-2*標記物位點**(chr 12：48228144-48228154)

向引子(由Y指代之簡併鹼基)	5'- ATGTAGAGTTGGTAAAGATAAYGGAAGG-3'
反向引子	5'- CATTACTACCCTAAACAAAACCAAACC-3'
用於甲基化序列之螢光探針	5'-(**VIC**)- AAGGTTCGTAGTACGTCGTA-MGB-3'
用於未甲基化序列之螢光探針	5'-(**FAM**)- AAGGTTTGTAGTATGTTGTAG-MGB-3'

表7. 供用於紅血球母細胞特異性DMR之甲基化及未甲基化序列之數位PCR檢定用的寡核苷酸序列。反向引子及探針中之加下劃線之核苷酸表

示CpG位點處之差異甲基化胞嘧啶。VIC及FAM指代2個螢光報導子。

作為實例，PCR反應可包括50 μL，其具有3 μL亞硫酸氫鹽轉化之模板DNA、最終濃度係0.3 μM之各引子、0.5 μM $MgCl_2$及25 μL 2× KAPA HiFi HotStart Uracil ReadyMix。PCR後可使用熱分佈：95℃持續5分鐘，及98℃持續20秒、57℃持續15秒及72℃持續15秒之35次循環，隨後為72℃持續30秒之最終延伸步驟。在其他實施例中，可進行非優先之全基因組定序然後進行比對，但此類程序可能不會節省成本。

在一些實施例中，為對樣品進行數位PCR分析，在亞硫酸氫鹽處理後製備20 μL反應混合物。在一個實施例中，反應混合物含有8 μL模板DNA、最終濃度各自為450 nM之兩種正向引子、900 nM反向引子及250 nM探針。在其他實施例中，製備總體積為20 μL之各反應混合物，該反應混合物含有8 uL模板DNA、最終濃度為900 nM正向引子、900 nM反向引子及250 nM探針。隨後將反應混合物用於使用BioRad QX200 ddPCR液滴產生器進行液滴產生。通常各樣品將產生20,000個液滴。在一些實施方案中，將液滴轉移至乾淨的96孔盤中，隨後針對甲基化及未甲基化特異性檢定使用相同條件進行熱循環：95℃ × 10分鐘(1次循環)，94℃ × 15秒及60℃ × 1分鐘之40次循環，98℃ × 10分鐘(1次循環)，隨後是12℃保持步驟。PCR後，藉由BioRad QX200液滴讀取器分析各樣品之液滴，且使用QuantaSoft (1.7版)軟體解釋結果。

2. 其他甲基化檢定之實例

甲基化感知定序之其他實例包括：使用單分子定序平台，其將允許在無亞硫酸氫鹽轉化之情況下直接闡明DNA分子之甲基化狀態(包括N^6-甲基腺嘌呤、5-甲基胞嘧啶及5-羥甲基胞嘧啶) (AB Flusberg等人 2010 Nat

Methods; 7: 461-465；J Shim等人 2013 Sci Rep; 3:1389)；或藉由使甲基化胞嘧啶免疫沈澱(例如藉由使用針對甲基胞嘧啶之抗體，或藉由使用甲基化DNA結合蛋白或肽(LG Acevedo等人 2011 Epigenomics; 3: 93-101))，隨後定序；或藉由使用甲基化敏感性限制酶，隨後定序。

在一些實施例中，可使用全基因組亞硫酸氫鹽定序確定DNA混合物中之基因組位點之甲基化水準。在其他實施例中，可藉由如下方式確定基因組位點之甲基化水準：使用甲基化微陣列分析，諸如Illumina HumanMethylation450系統；或藉由使用甲基化免疫沈澱(例如使用抗甲基胞嘧啶抗體)或用甲基化結合蛋白處理，隨後微陣列分析或DNA定序；或藉由使用甲基化敏感性限制酶處理，隨後微陣列或DNA定序；或藉由使用甲基化感知定序，例如使用單分子定序方法(例如藉由奈米孔定序(Schreiber等人 Proc Natl Acad Sci 2013; 110: 18910-18915)或藉由Pacific Biosciences單分子實時分析(Flusberg等人 Nat Methods 2010; 7: 461-465))。組織特異性甲基化水準可以相同方式量測。作為另一實例，對於血漿DNA甲基化反褶積分析，靶向亞硫酸氫鹽定序、甲基化特異性PCR、不基於亞硫酸氫鹽之甲基化感知定序(例如藉由單分子定序平台(Powers 等人 Efficient and accurate whole genome assembly and methylome profiling of E. coli. BMC Genomics. 2013;14:675)可用於分析血漿DNA之甲基化水準。因此，可以各種方式獲得甲基化感知定序結果。

D. 統計分析

皮爾森相關性用以研究重型β-地中海貧血症患者中，紅血球系DNA百分比(E%(FECH))與藉由血液分析器量測之周邊白血球中的紅血球母細

胞百分比之間的相關性。皮爾森相關性亦用以研究健康對照之血漿DNA中之成對E%(FECH)結果與膚色血球層DNA中的成對E%(FECH)之間的相關性。威爾卡遜符號秩檢驗用以比較健康個體之血漿DNA中之E%與成對膚色血球層DNA中的E%之間的差。曼-惠特尼秩和檢驗用以比較健康個體之血漿DNA中之E%與不同病症組之貧血患者之血漿DNA中的E%之間的差。

吾等亦開發吾等生物資訊管線以基於描述於主文本中之吾等準則挖掘紅血球母細胞特異性DMR。生物資訊管線可實施於各個平台例如Perl平台中。

XIII.實例系統

圖27說明根據本發明之一實施例之系統2700。如所示之系統包括樣品2705，諸如樣品固持器2710內之游離DNA分子，其中樣品2705可與檢定2708接觸以提供物理特性2715之信號。樣品固持器之一實例可為流量槽，其包括檢定之探針及/或引子或液滴(液滴包括檢定)通過其移動之管。藉由偵測器2720偵測來自樣品之物理特性2715，諸如螢光強度值。偵測器可採取呈間隔(例如，週期間隔)形式之量測以獲得構成資料信號之資料點。在一個實施例中，類比至數位轉換器將來自偵測器之多個時間點之類比信號化成數位形式。資料信號2725自偵測器2720傳至邏輯系統2730。資料信號2725可儲存於局部記憶體2735、外部記憶體2740或儲存裝置2745中。

邏輯系統2730可為或可包括電腦系統、ASIC、微處理器等。其亦可包括或耦接有顯示器(例如監視器、LED顯示器等)及使用者輸入裝置(例如鼠標、鍵盤、按鈕等)。邏輯系統2730及其他組件可為獨立或連網電腦

系統的一部分，或其可直接附接至或併入於熱循環裝置中。邏輯系統2730亦可包括在處理器2750中執行之最佳化軟體。邏輯系統1030可包括電腦可讀媒體，該電腦可讀媒體儲存用於控制系統1000以執行本文所描述之任一方法之指令。

本文中提及之任何電腦系統均可利用任何適合數目之子系統。此類子系統之實例顯示於圖28之電腦系統10中。在一些實施例中，電腦系統包括單一電腦設備，其中子系統可為電腦設備之組件。在其他實施例中，電腦系統可包括具有內部組件之多個電腦設備，其各自為一個子系統。電腦系統可包括桌上型及膝上型電腦、平板電腦、行動電話及其他行動裝置。

圖28中所示之子系統經由系統匯流排75互連。顯示額外子系統，諸如印表機74、鍵盤78、儲存裝置79、耦接至顯示配接器82之監視器76及其他。耦接至I/O控制器71上之周邊裝置及輸入/輸出(I/O)裝置可藉由此項技術中已知之多種手段(諸如輸入/輸出(I/O)埠77（例如，USB、FireWire®))連接至電腦系統。舉例而言，I/O埠77或外部介面81(例如，乙太網、Wi-Fi等)可用於將電腦系統10連接至廣域網路(諸如，網際網路、鼠標輸入器件或掃描儀)。經由系統匯流排75之互連使得中央處理器73與各子系統連通，且控制來自系統記憶體72或儲存裝置79(例如固定磁碟，諸如硬碟機或光碟)之多個指令之執行以及資訊在子系統之間的交換。系統記憶體72及/或儲存裝置79可體現電腦可讀媒體。另一子系統係資料收集裝置85，諸如照相機、麥克風、加速計及其類似物。本文所提及之任何資料可自一個組件輸出至另一個組件且可輸出至使用者。

電腦系統可包括(例如)藉由外部介面81或藉由內部介面連接在一起的

多個相同組件或子系統。在一些實施例中，電腦系統、子系統或設備可經網路連通。在此類情況下，可將一個電腦視為用戶端且將另一電腦視為伺服器，其中每一者可為同一電腦系統之一部分。用戶端及伺服器各自可包括多個系統、子系統或組件。

實施例之態樣可使用硬體(例如特殊應用積體電路或場可程式閘極陣列)以控制邏輯形式實施，及/或以模組或積體方式藉由一般可程式化處理器使用電腦軟體實施。如本文所使用，處理器包括位於同一積體晶片上之單核心處理器、多核心處理器，或位於單一電路板上或網路化之多個處理單元。基於本發明及本文所提供之教示，一般熟習此項技術者將知道及瞭解使用硬體及硬體與軟體之組合來實施本發明之實施例的其他方式及/或方法。

本申請案中所述之任何軟體組件或功能可使用例如習知或面向對象技術、以軟體程式碼形式實施，軟體程式碼係由使用任何適合電腦語言(諸如Java、C、C++、C#、Objective-C、Swift)或腳本處理語言(諸如Perl或Python)的處理器執行。軟體程式碼可以一系列指令或命令形式儲存於電腦可讀媒體上以用於儲存及/或傳輸。適合的非暫時性電腦可讀媒體可包括隨機存取記憶體(RAM)、唯讀記憶體(ROM)、磁性媒體(諸如硬碟機或軟碟機)或光學媒體，諸如光盤(CD)或DVD (數位化通用光碟)、快閃記憶體及其類似者。電腦可讀媒體可為此類儲存或傳輸裝置之任何組合。

此類程序亦可使用適合於藉助有線、光學及/或符合多種方案之無線網路(包括網際網路)傳輸的載波信號來編碼及傳輸。因而，電腦可讀媒體可使用經由此類程式編碼的資料信號建立。以程式碼編碼之電腦可讀媒體

可與相容裝置一起封裝或與其他裝置分開提供(例如，經由網際網路下載)。任何此類電腦可讀媒體可存在於單一電腦產品(例如，硬碟機、CD或整個電腦系統)上或其內部，且可存在於系統或網路內之不同電腦產品上或其內部。電腦系統可包括用於向使用者提供本文所提及之任何結果的監視器、印表機、或其他適合之顯示器。

本文所描述之任何方法可完全或部分地使用電腦系統來執行，該電腦系統包括一或多個處理器，該等處理器可經組態以執行該等步驟。因此，實施例可針對於經組態以執行本文所描述之任何方法之步驟的電腦系統，潛在地使用不同組件執行各別步驟或各別步驟組。儘管本文中方法之步驟以經編號之步驟呈現，但其可同時或以不同次序執行。另外，此等步驟之一部分可與其他方法之其他步驟之一部分一起使用。另外，步驟之全部或一部分可視情況存在。另外，任何方法中之任何步驟可使用用於執行此等步驟的模組、單元、電路或其他構件來執行。

可在不脫離本發明之實施例之精神及範疇的情況下以任何適合之方式組合特定實施例之特定細節。然而，本發明之其他實施例可針對於與各個別態樣或此等個別態樣之特定組合相關的特定實施例。

已出於說明及描述之目的呈現本發明之實例實施例的上文描述。其並不意欲為窮盡性的或將本發明限制於所描述之精確形式，且鑒於上文教示，許多修改及變化為可能的。

除非特別指示相反，否則「一(a/an)」或「該(the)」之敍述欲意謂「一或多個(種)」。除非特別指示相反，否則「或」之使用欲意謂「包括或」而並非「互斥或」。提及「第一」組件不一定需要提供第二組件。此外，除非有明確陳述，否則提及「第一」或「第二」組件不會將所提及組

件限於特定位置。

出於所有目的，本文所提及之所有專利、專利申請案、公開案及描述均以全文引用之方式併入。不承認任一者為先前技術。

XIV. 文獻

以下文獻在上文經參考且出於所有目的以全文引用之方式併入。

1. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. Sci Transl Med 2010;2:61ra91.

2. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:20458-63.

3. New MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. J Clin Endocrinol Metab 2014;99:E1022-30.

4. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. N Engl J Med 2014;370:799-808.

5. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: Large scale validity study. BMJ 2011;342:c7401.

6. Bayindir B, Dehaspe L, Brison N, Brady P, Ardui S, Kammoun M, et al. Noninvasive prenatal testing using a novel analysis pipeline to screen for all autosomal fetal aneuploidies improves pregnancy management. Eur J Hum Genet 2015;23:1286-93.

7. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, de Haas M. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: Evaluation of a 7-year clinical experience. BJOG 2011;118:1340-8.

8. Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res 1999;59:1188-91.

9. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, Papadopoulos N, Carpten JD, Craig D, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. Sci Transl Med 2012;4:162ra54.

10. Chan KC, Jiang P, Zheng YW, Liao GJ, Sun H, Wong J, et al. Cancer genome scanning in plasma: Detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. Clin Chem 2013;59:211-24.

11. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med 2014;6:224ra24.

12. Izumchenko E, Chang X, Brait M, Fertig E, Kagohara LT, Bedi A, et al. Targeted sequencing reveals clonal genetic changes in the progression of early lung neoplasms and paired circulating DNA. Nat Commun 2015;6:8258.

13. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. Clin Chem 2002;48:421-7.

14. Zheng YW, Chan KC, Sun H, Jiang P, Su X, Chen EZ, et al. Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: A transplantation model. Clin Chem 2012;58:549-58.

15. Sun K, Jiang P, Chan KC, Wong J, Cheng YK, Liang RH, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:E5503-12.

16. Keerthivasan G, Wickrema A, Crispino JD. Erythroblast enucleation. Stem Cells Int 2011;2011:139851.

17. Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: Niches for erythropoiesis. Blood 2008;112:470-8.

18. Adams D, Altucci L, Antonarakis SE, Ballesteros J, Beck S, Bird A, et al. BLUEPRINT to decode the epigenetic signature written in blood. Nat Biotechnol 2012;30:224-6.

19. Martens JH, Stunnenberg HG. BLUEPRINT: Mapping human blood cell epigenomes. Haematologica 2013;98:1487-9.

20. Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. Nature 2015;518:317-30.

21. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:14753-8.

22. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheim J, Vaknin-Dembinsky A, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113:E1826-34.

23. Lun FM, Chiu RW, Sun K, Leung TY, Jiang P, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA. Clin Chem 2013;59:1583-94.

24. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2004;50:88-92.

25. Yu SC, Chan KC, Zheng YW, Jiang P, Liao GJ, Sun H, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:8583-8.

26. Ferreira GC, Franco R, Lloyd SG, Moura I, Moura JJ, Huynh BH. Structure and function of ferrochelatase. J Bioenerg Biomembr

1995;27:221-9.

27. Buoro S, Vavassori M, Pipitone S, Benegiamo A, Lochis E, Fumagalli S, et al. Evaluation of nucleated red blood cell count by Sysmex XE-2100 in patients with thalassaemia or sickle cell anaemia and in neonates. Blood Transfus 2015;13:588-94.

28. Killick SB, Bown N, Cavenagh J, Dokal I, Foukaneli T, Hill A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia. Br J Haematol 2016;172:187-207.

29. Young NS. Acquired aplastic anemia. Ann Intern Med 2002;136:534-46.

30. Eschbach JW. Erythropoietin 1991--an overview. Am J Kidney Dis 1991;18:3-9.

31. Schrier SL. Pathobiology of thalassemic erythrocytes. Curr Opin Hematol 1997;4:75-8.

32. Kasper CK, Whissell DY, Wallerstein RO. Clinical aspects of iron deficiency. JAMA 1965;191:359-63.

33. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. Blood 2014;124:2793-803.

34. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the world health organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016;127:2391-405.

35. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: Are the old and

new red cell parameters useful in classification and treatment, how? Int J Lab Hematol 2016;38 Suppl 1:123-32.

36. Buttarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabuio E, Rizzotti P. Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: An NCCLS-ICSH approach. Am J Clin Pathol 2001;115:100-11.

37. Danise P, Maconi M, Barrella F, Di Palma A, Avino D, Rovetti A, et al. Evaluation of nucleated red blood cells in the peripheral blood of hematological diseases. Clin Chem Lab Med 2012;50:357-60.

38. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet 1999;64:218-24.

39. To EW, Chan KC, Leung SF, Chan LY, To KF, Chan AT, et al. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res 2003;9:3254-9.

【符號說明】

10:電腦系統

71:I/O控制器

72:系統記憶體

73:中央處理器

74:印表機

75:系統匯流排

76:監視器

77:I/O埠

78:鍵盤

79:儲存裝置

81:外部介面

82:顯示配接器

85:資料收集裝置

110:區域

200:圖

205:圖

210:藍點

220:綠點

250:圖

255:圖

310:步驟

320:步驟

330:步驟

340:步驟

350:步驟

360:步驟

370:步驟

1510:區域

1560:區域

2600:方法

2610:步驟

2620:步驟

2630:步驟

2640:步驟

2650:步驟

2700:系統

2705:樣品

2708:檢定

2710:樣品固持器

2715:物理特性

2720:偵測器

2725:資料信號

2730:邏輯系統

2735:記憶體

2740:外部記憶體

2745:儲存裝置

2750:處理器

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種分析哺乳動物之血液樣品之方法，該方法包含：

基於獲自檢定之信號，在一或多個差異甲基化區處偵測該血液樣品之游離(cell-free)混合物中甲基化或未甲基化DNA片段之第一數目，該游離混合物包括來自多種細胞譜系之游離DNA，且該一或多個差異甲基化區中之每一者藉由相對於其他細胞譜系為低甲基化或高甲基化而對特定血液細胞譜系具有特異性；

使用該第一數目確定甲基化水準；及

將該甲基化水準與作為確定該哺乳動物是否具有對治療具反應性之血液疾病之等級之部分的一或多個截止值相比較，其中該一或多個截止值對應於對該治療具反應性的血液疾病之範圍。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該血液疾病為再生不全性貧血。

【請求項3】

如請求項2之方法，其中該治療為免疫抑制療法。

【請求項4】

如請求項1之方法，其中該血液疾病為缺鐵性貧血，且其中該治療為鐵療法。

【請求項5】

如請求項1之方法，其中該血液疾病為慢性腎病。

【請求項6】

如請求項1之方法，其進一步包含：

量測該血液樣品之血色素水準；

將該血色素水準與血色素臨限值相比較；及

進一步基於該血色素水準與該血色素臨限值之該比較，確定該具有對治療具反應性之血液疾病的哺乳動物之該等級。

【請求項7】

如請求項1之方法，其中該一或多個差異甲基化區之一在FECH基因中。

【請求項8】

如請求項1之方法，其中該一或多個差異甲基化區之一在染色體12中在基因組座標48227688-48227701處。

【請求項9】

如請求項1之方法，其中該一或多個差異甲基化區之一在染色體12中在基因組座標48228144-48228154處。

【請求項10】

如請求項1之方法，其進一步包含：

在該一或多個差異甲基化區處測定該游離混合物中DNA片段之總數目；及

使用該第一數目及該總數目確定該甲基化水準。

【請求項11】

如請求項1之方法，其進一步包含：

測定該游離混合物之體積，其中使用該第一數目及該游離混合物之該體積確定該甲基化水準。

【請求項12】

如請求項1之方法，其中該一或多個差異甲基化區包含CpG位點。

【請求項13】

如請求項12之方法，其中該一或多個差異甲基化區之第一區包含多個CpG位點，該多個CpG位點在彼此之100 bp內，且其中該多個CpG位點均為低甲基化或高甲基化的。

【請求項14】

如請求項13之方法，其中該多個CpG位點在對應於該哺乳動物之參考基因組上跨越100 bp或更少。

【請求項15】

如請求項1之方法，其中該特定血液細胞譜系為紅血球系。

【請求項16】

如請求項1之方法，其中該一或多個差異甲基化區為低甲基化的。

【請求項17】

如請求項1之方法，其中該游離混合物為血漿。

【請求項18】

一種包含電腦可讀媒體之電腦產品，該電腦可讀媒體儲存用於控制系統以執行如請求項1至17中任一項之方法之複數個指令。

【請求項19】

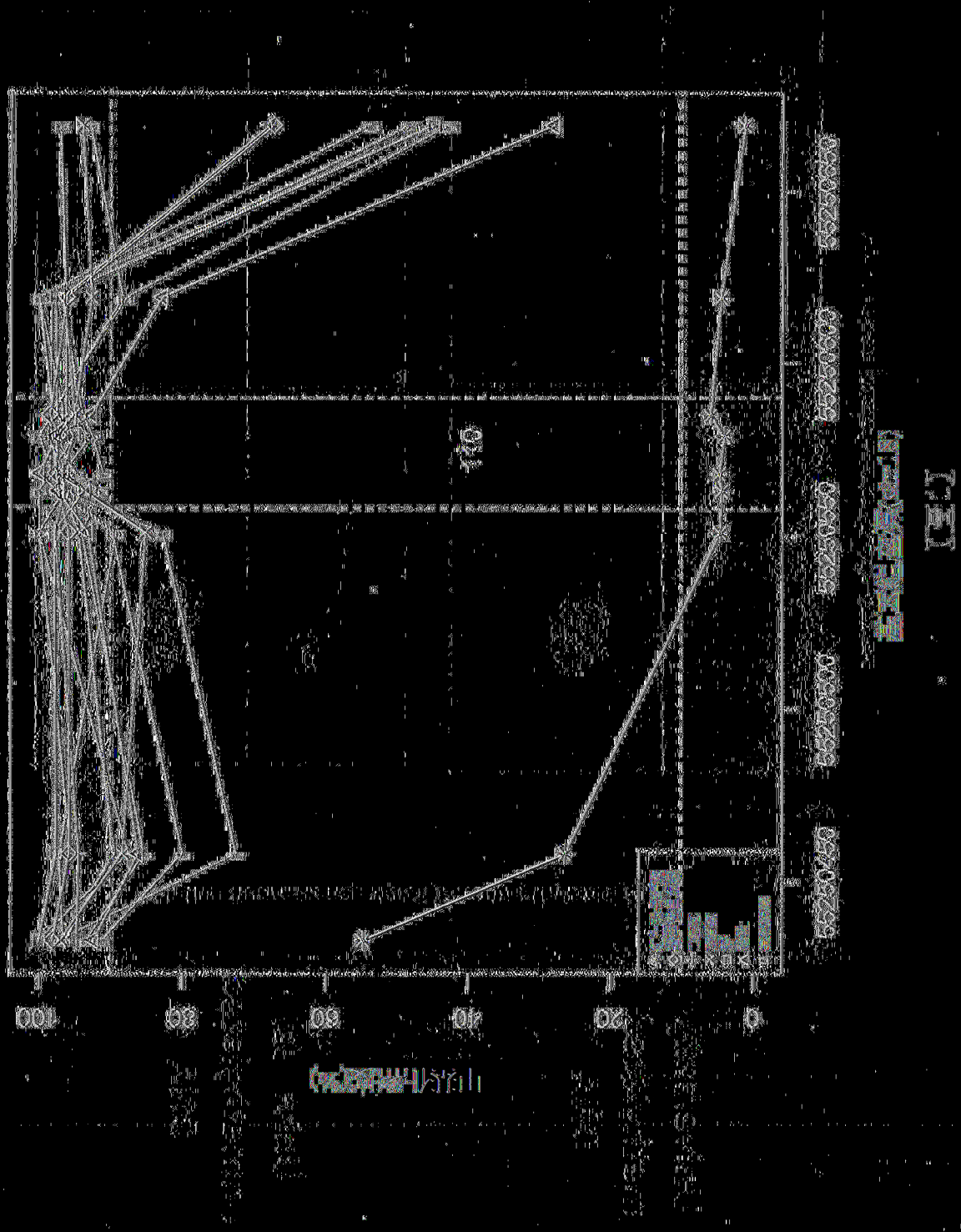
一種系統，其包含：

如請求項18之電腦產品；及

一或多個處理器，其用於執行儲存於該電腦可讀媒體上之該複數個指令。

【請求項20】

一種用於分析哺乳動物血液樣品之系統，該系統包括經程式化以執行如請求項1至17中任一項之方法的處理器。


001
02
03
04
05
06
[0.0]
[0.0]
[0.0]

[TEXT]
[TEXT]
[TEXT]

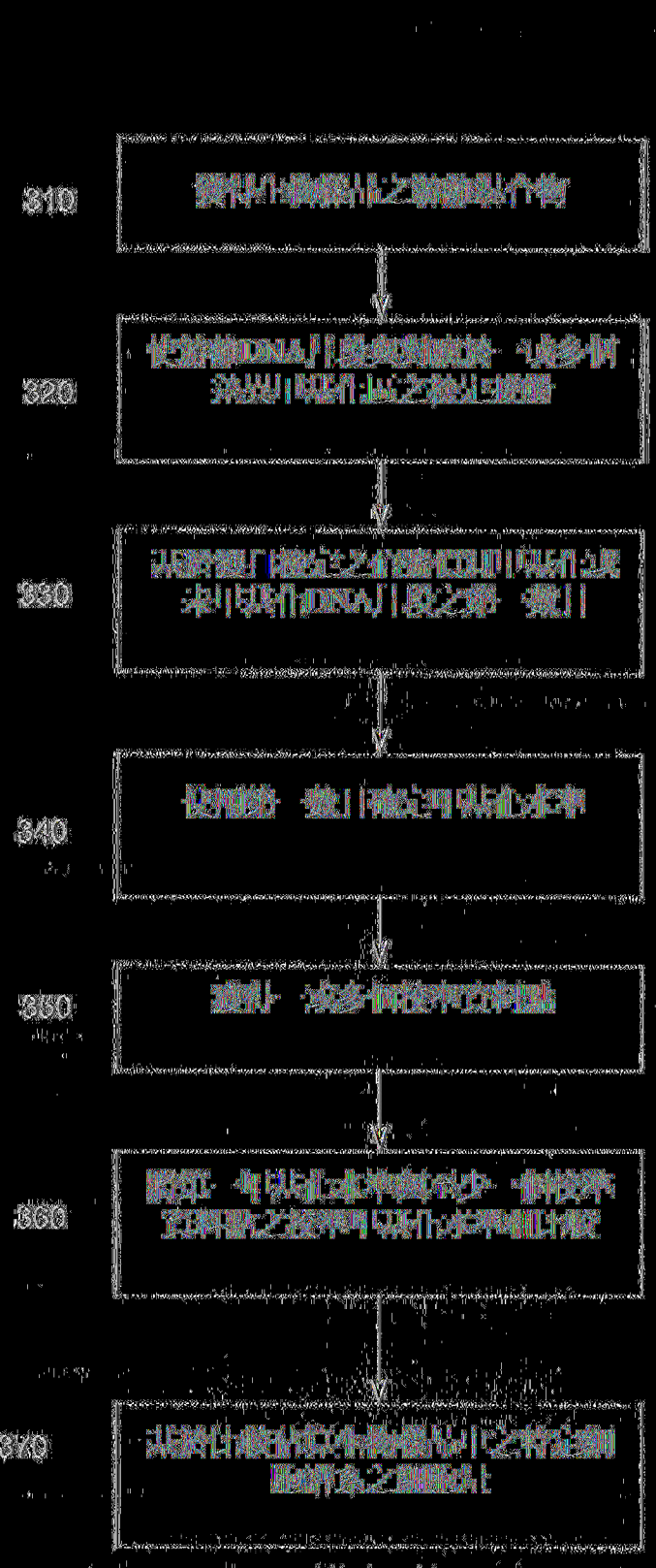
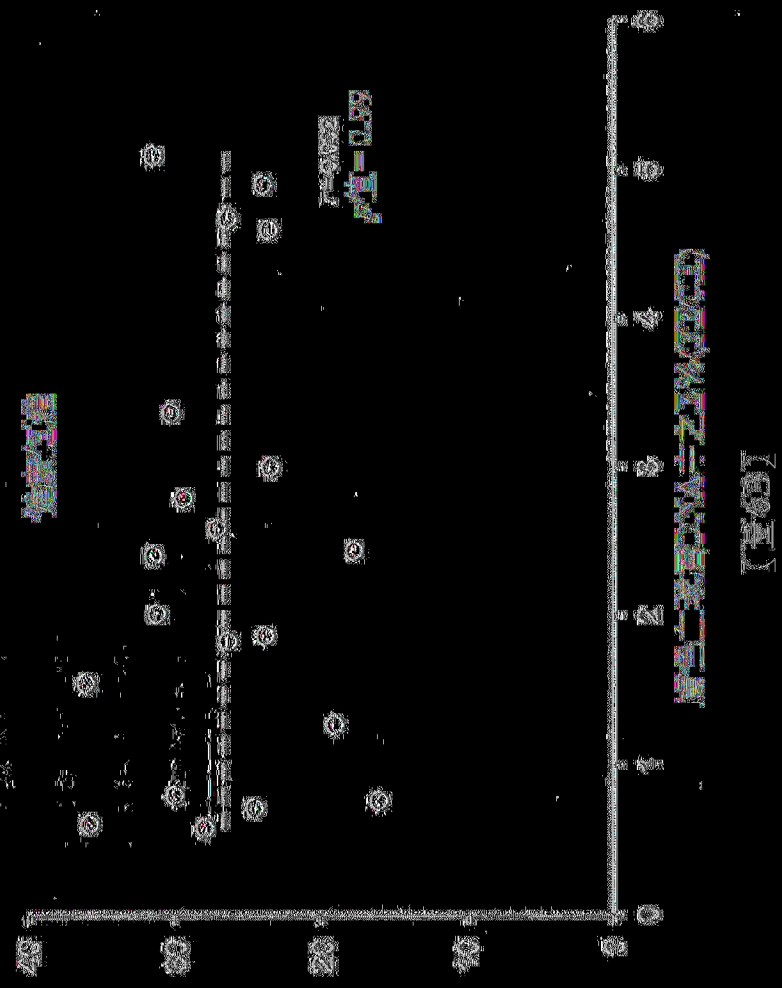
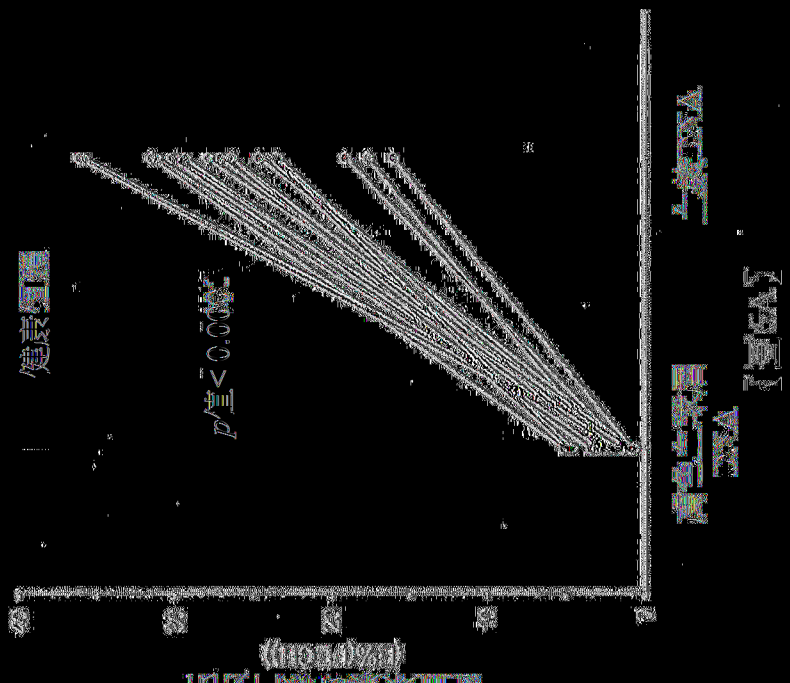
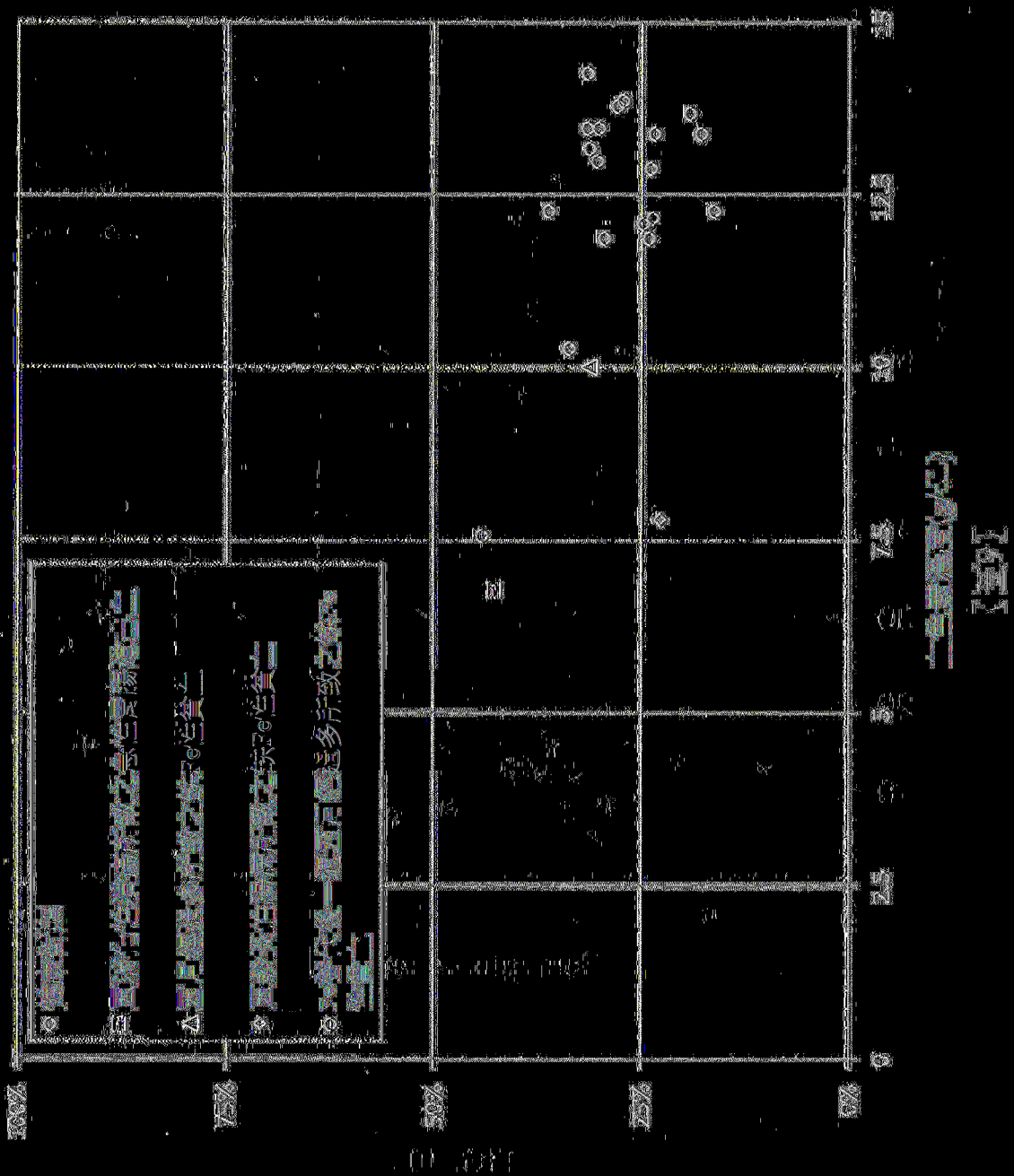


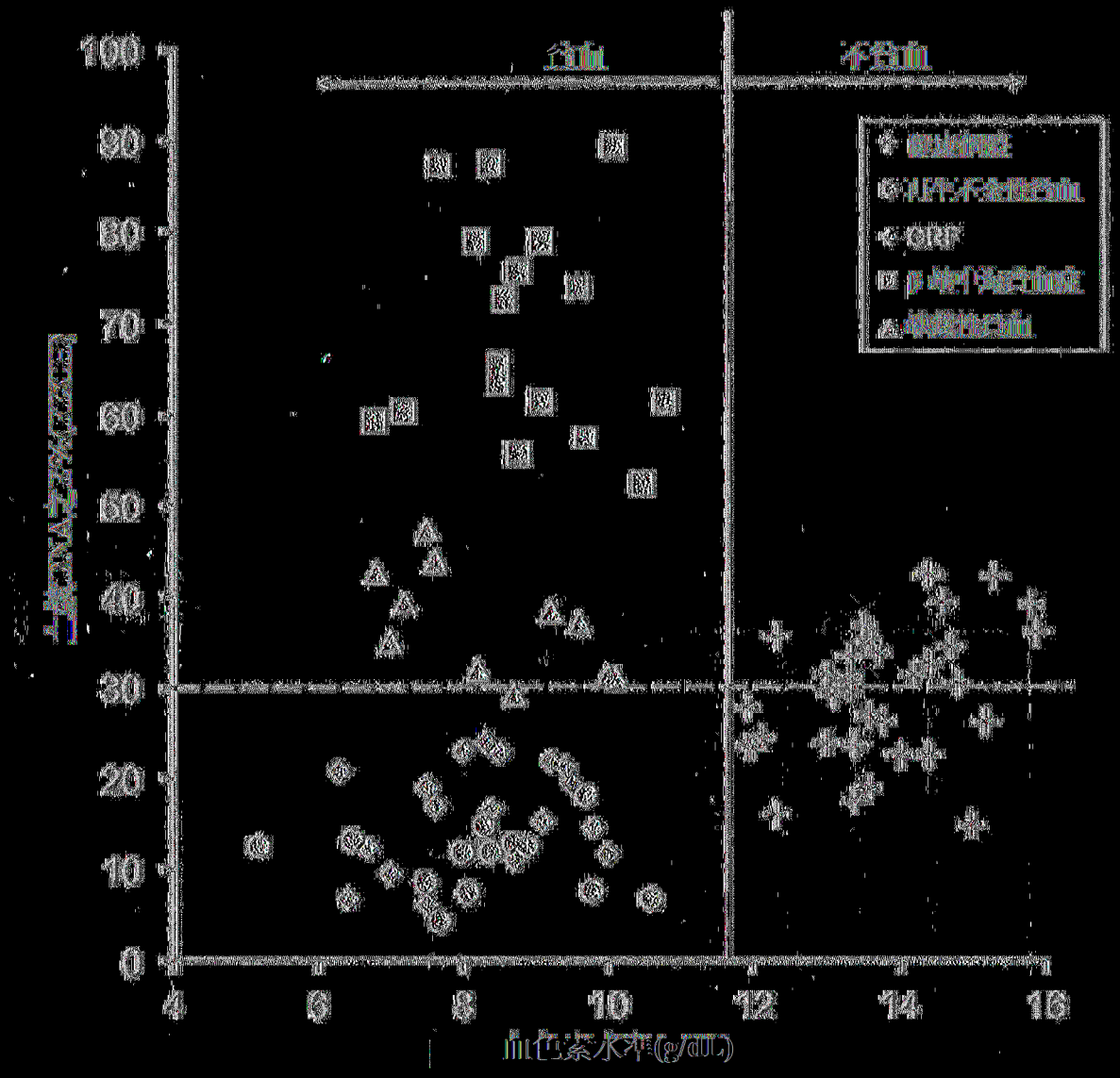
圖3B



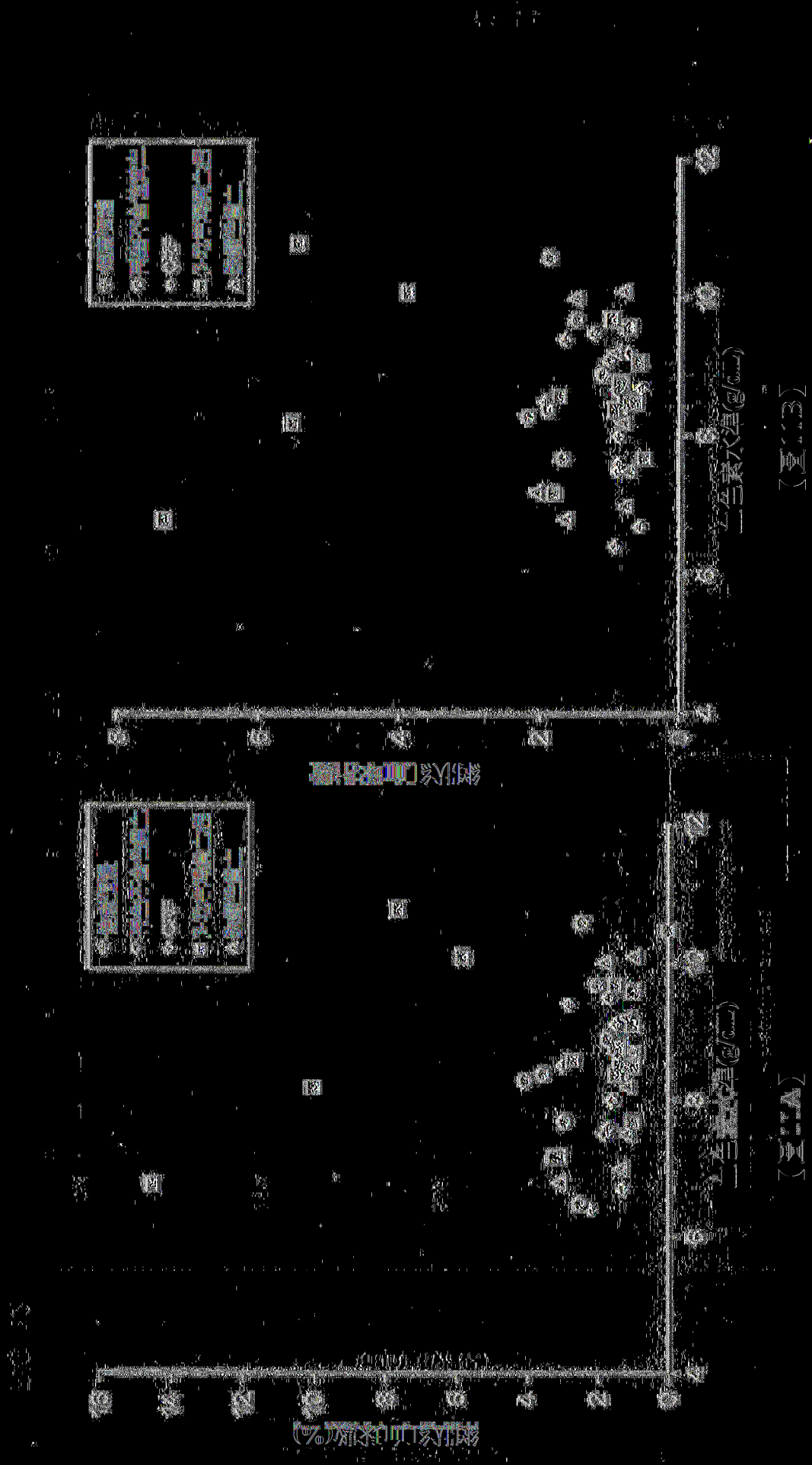


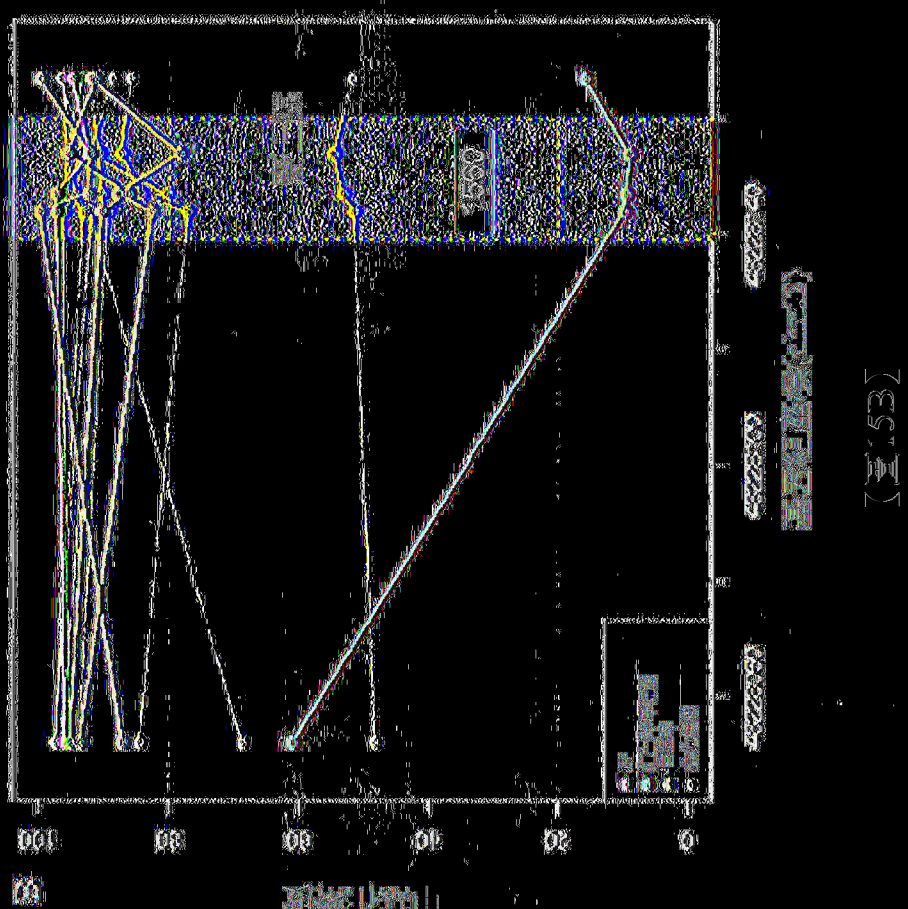
(%) %1對苗出米



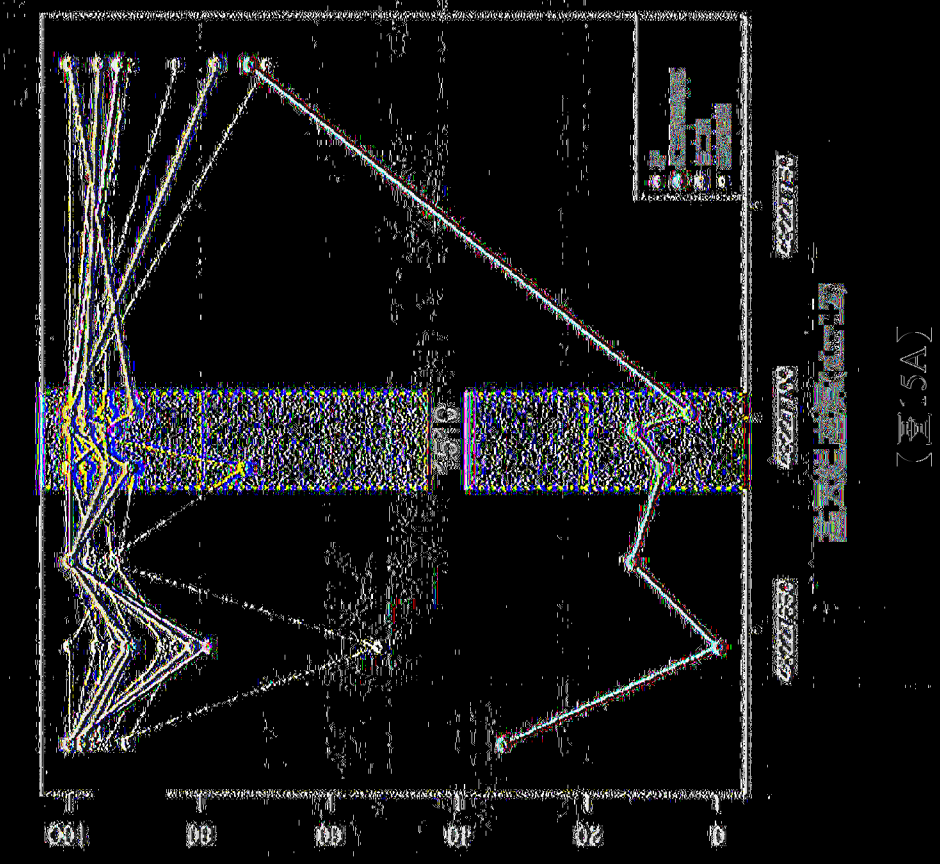


|(圖10)|



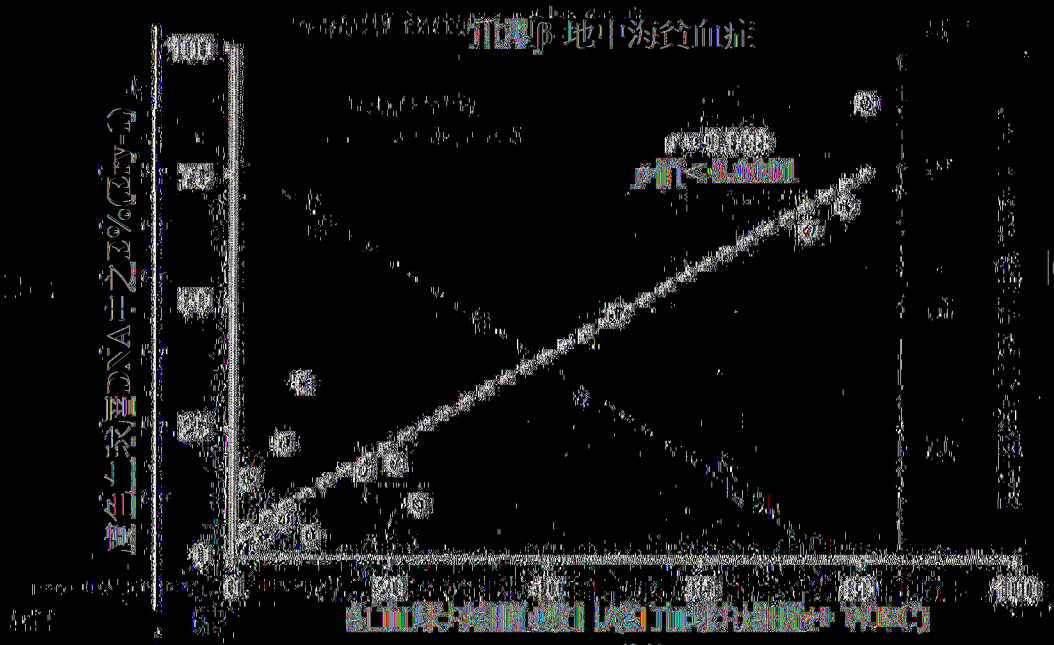


【圖53】

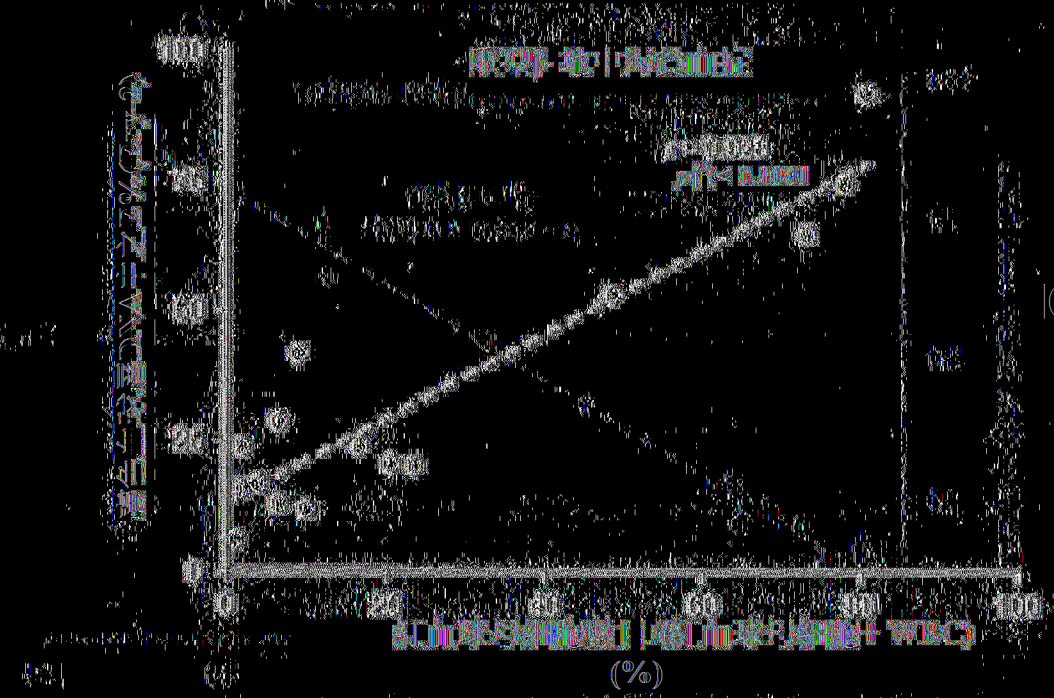


【圖54】

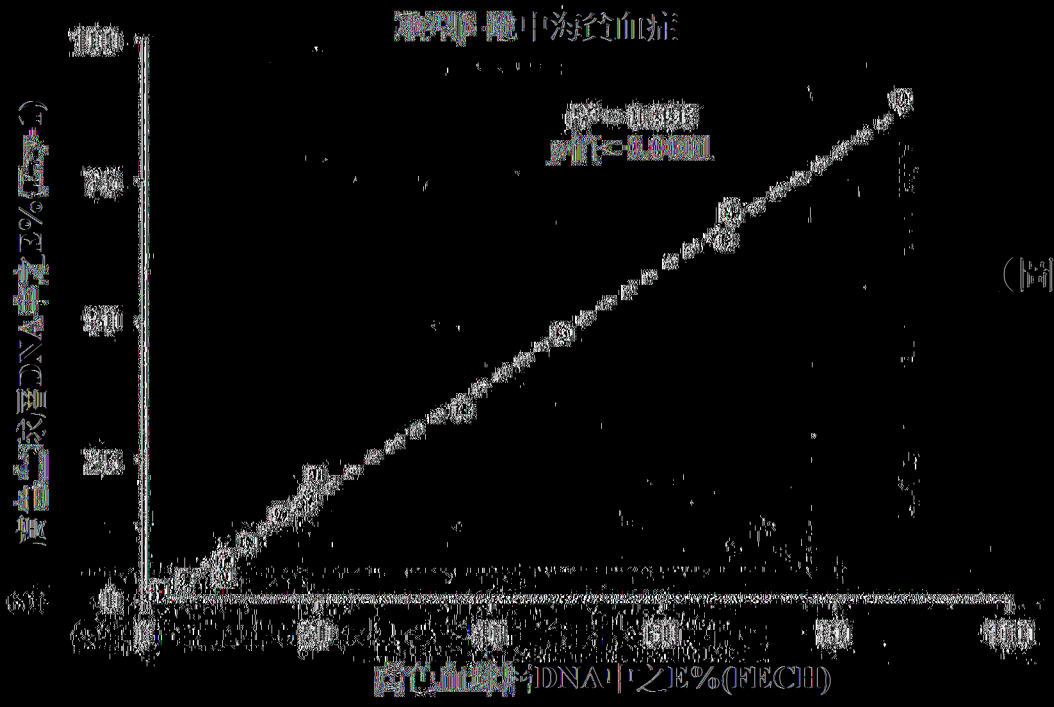
分割區3X4_1
分割區3X2_1
分割區3X4_2
分割區3X2_2



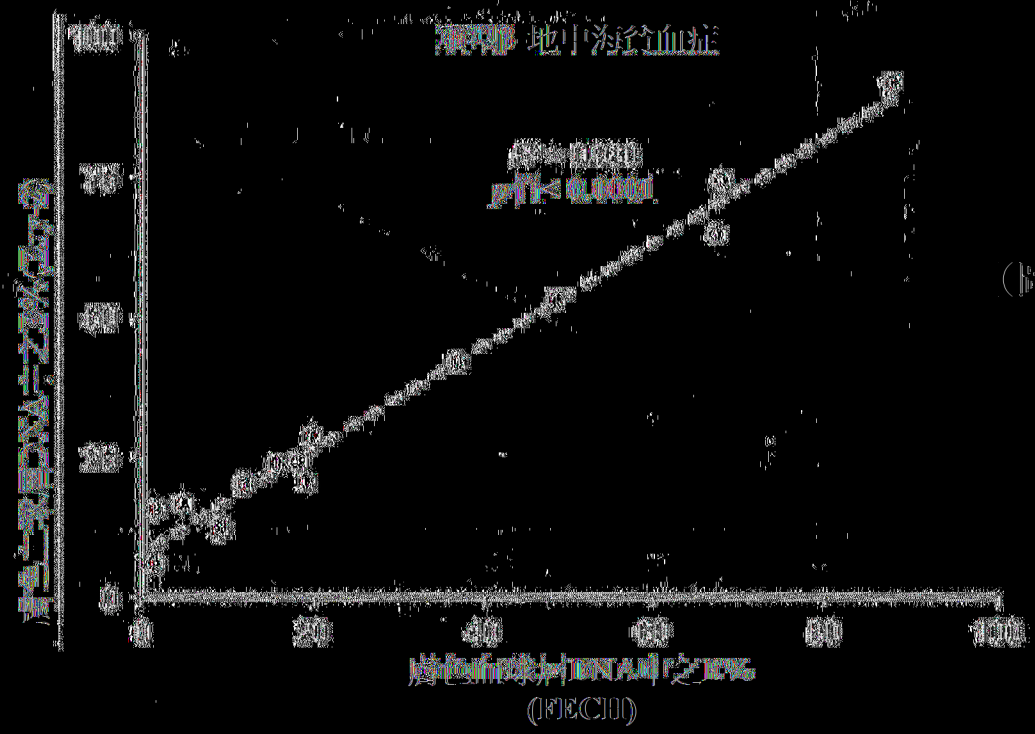
【圖17A】



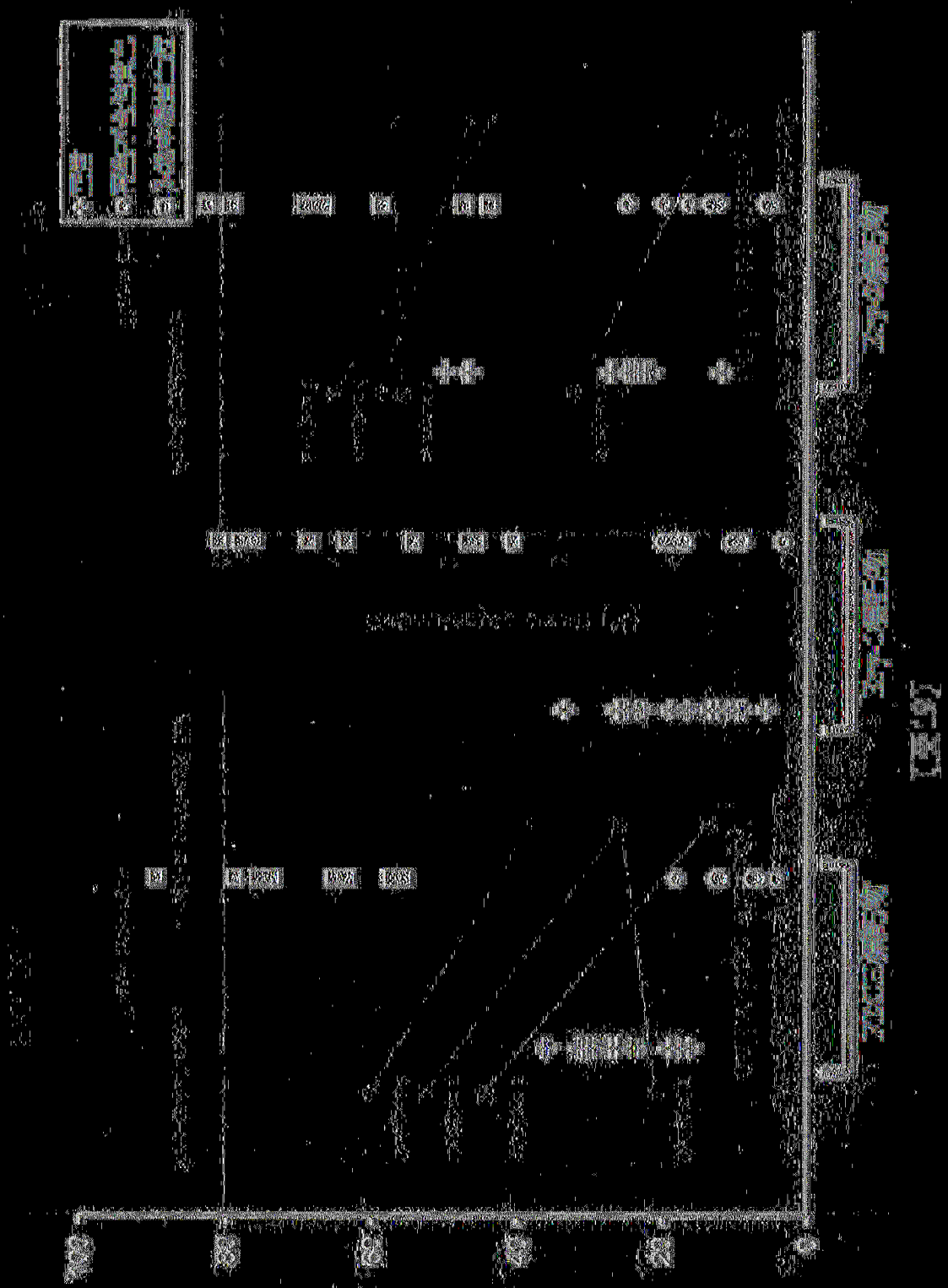
【圖17B】

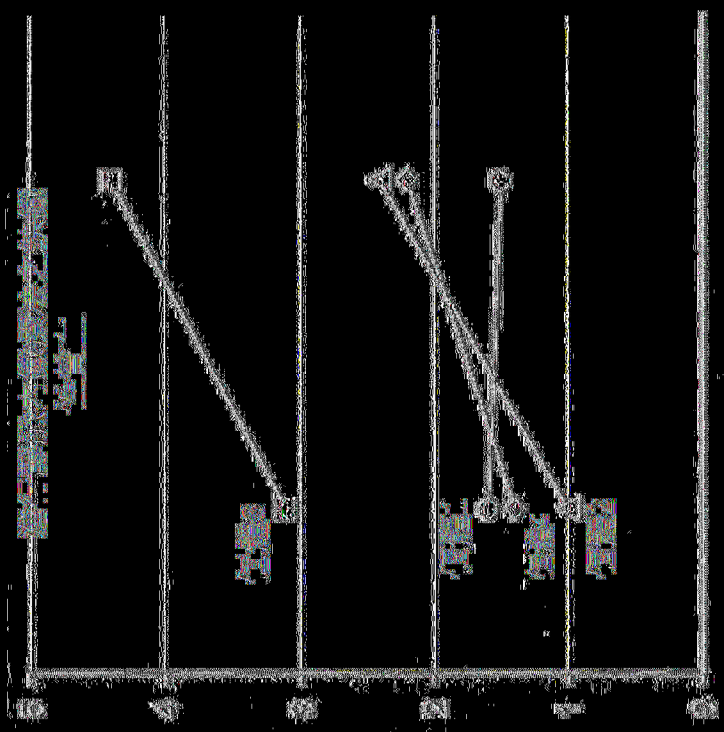

海綿狀 態中海貧血症
p值<0.0001
周邊血液中DNA中之E%(FECH)

(圖18A)

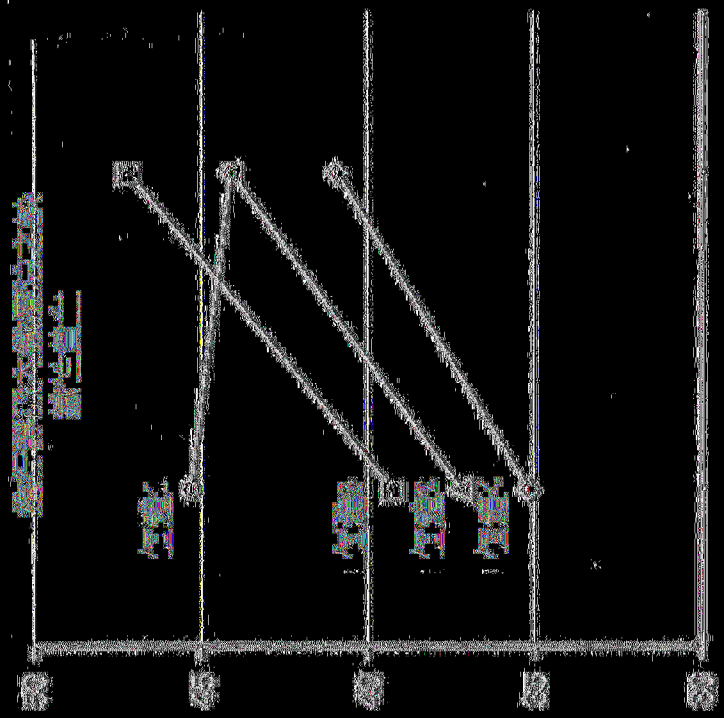

海綿狀 態中海貧血症
p值<0.0001
周邊血液中DNA中之E%
(FECH)

(圖18B)





（圖2B）

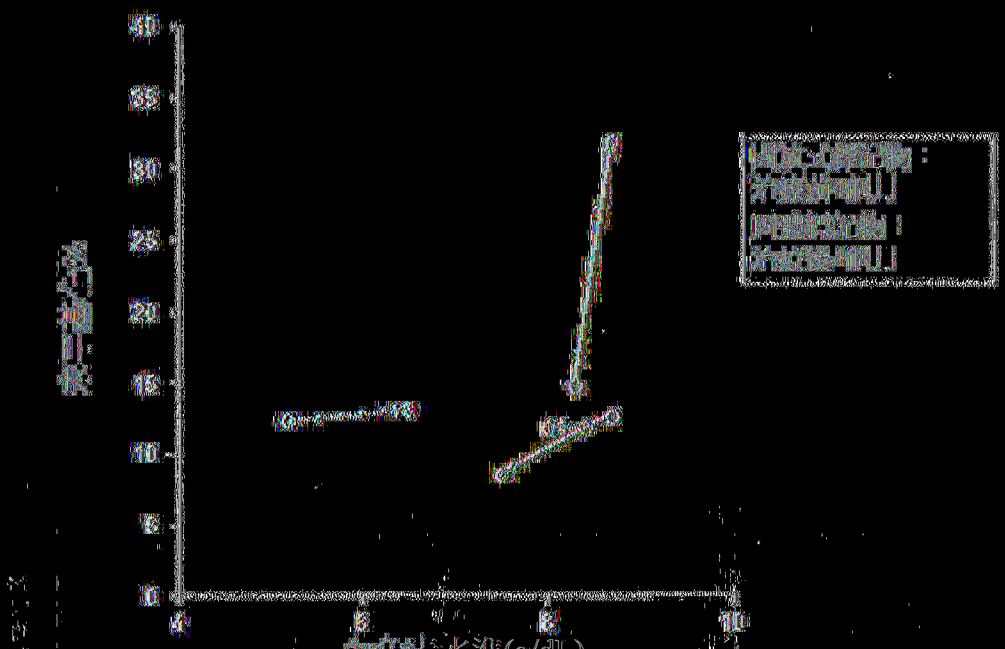


（圖2A）

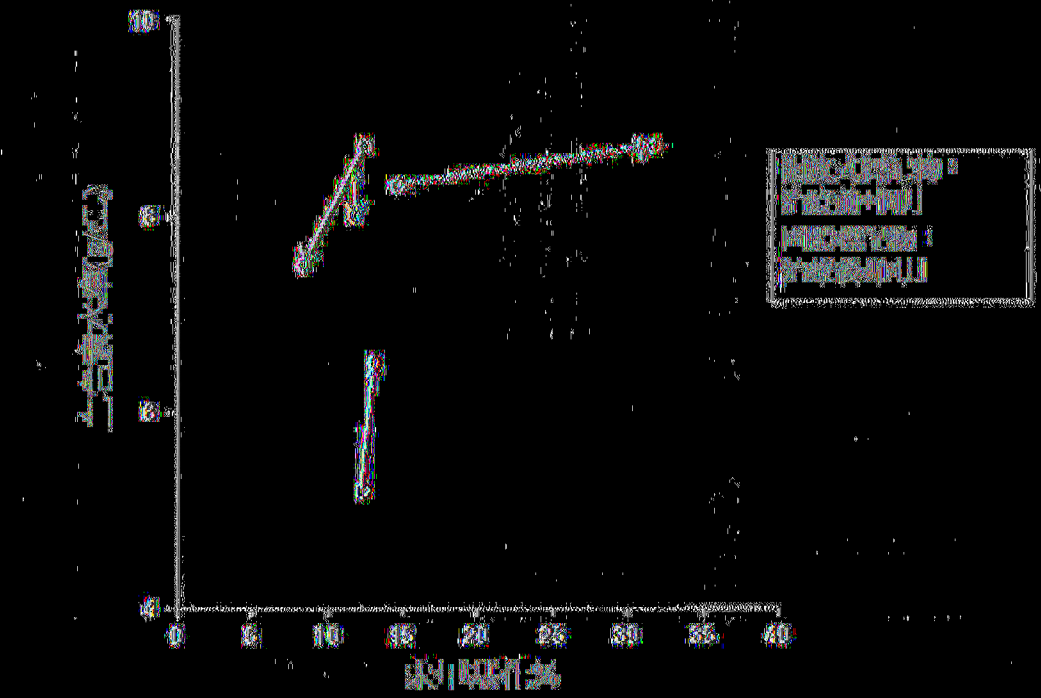
(圖2:A)
(圖2:B)

CKD（慢性腎臟病）
嚴重
中度
輕度
腎功能正常
eGFR（腎絲球過濾率）
CT-LC
ONE
（22）

4mm
2mm
【圖23B】
4mm
2mm
【圖23A】


40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
血紅素水平(g/dL)

(圖24A)


40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40

(圖24B)

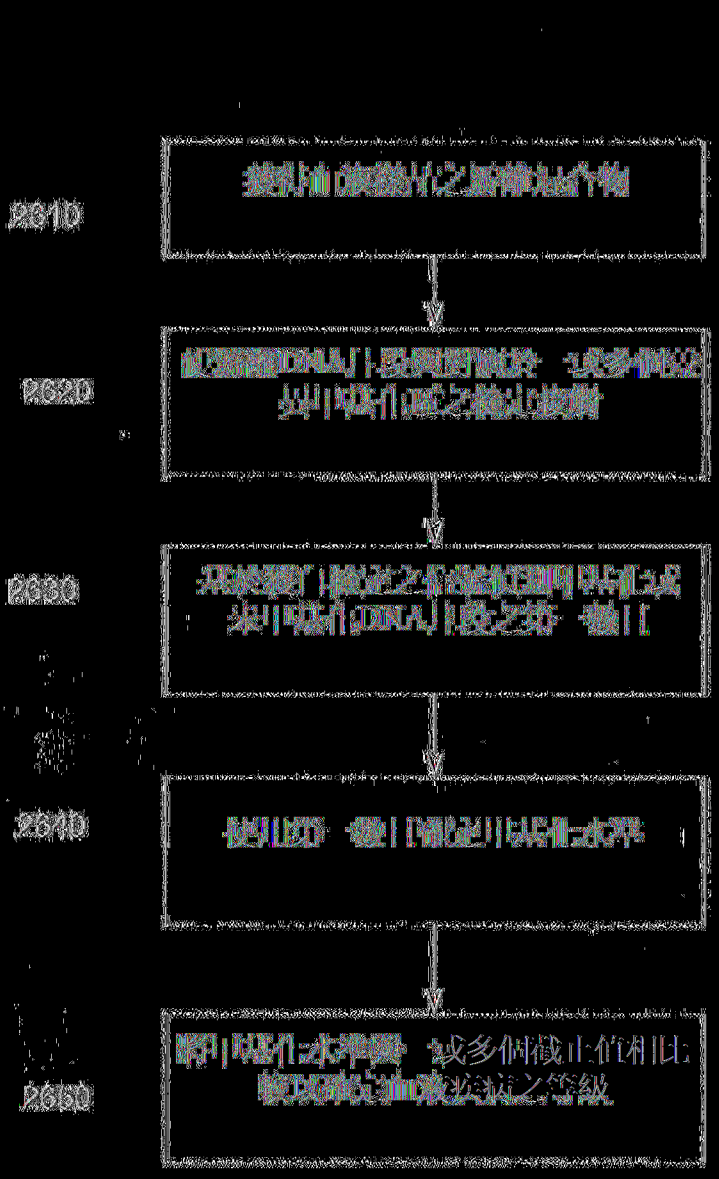


圖 26

270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310

