



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I848941 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：108108991

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 15 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/6813 (2018.01)

G16B20/00 (2019.01)

G16B30/00 (2019.01)

(30)優先權：2018/03/15 美國

62/643,649

2018/11/20 美國

62/769,928

(71)申請人：美商格瑞爾有限責任公司(美國) GRAIL, LLC (US)

美國

(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)；蓋萬霞 GAI, WANXIA (CN)；吉

璐 JI, LU (CN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201418474A

US 20160017419A1

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：11 共 75 頁

(54)名稱

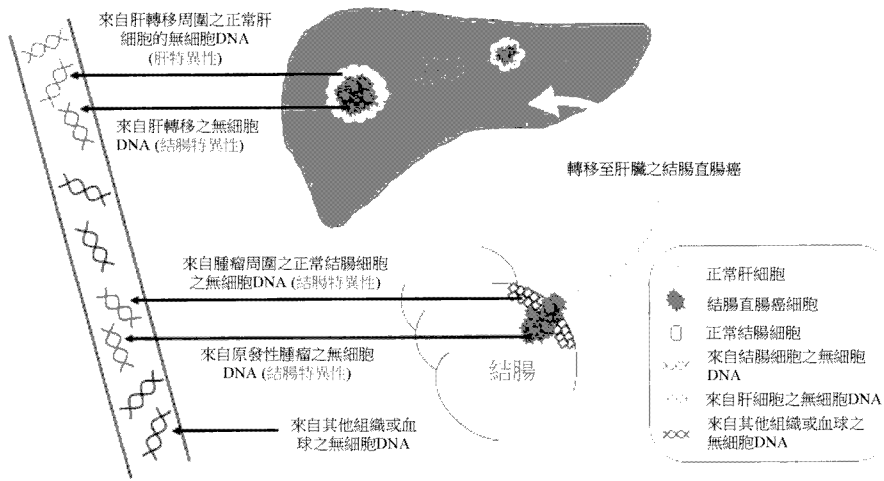
組織特異性甲基化標記

(57)摘要

本發明提供包含用於鑑別無細胞核酸(例如無細胞 DNA 分子)之來源組織的組織特異性標記之組合物。本發明亦提供用於藉由判定包含該組織特異性標記之無細胞核酸的絕對量來鑑別無細胞核酸之來源組織的方法、組合物及系統。本發明亦提供用於藉由分析組織特異性標記來偵測生物體組織中之癌症的方法、組合物及系統。

Provided herein are compositions comprising tissue-specific markers for identifying a tissue of origin of a cell-free nucleic acid, e.g., a cell-free DNA molecule. Also provided herein are methods, compositions, and systems for identifying a tissue of origin of a cell-free nucleic acid by determining an absolute amount of cell-free nucleic acids comprising the tissue-specific marker. Also provided herein are methods, compositions, and systems for detecting a cancer in a tissue of an organism by analyzing tissue-specific markers.

指定代表圖：



【圖1】



I848941

【發明摘要】

【中文發明名稱】

組織特異性甲基化標記

【英文發明名稱】

TISSUE-SPECIFIC METHYLATION MARKER

【中文】

本發明提供包含用於鑑別無細胞核酸(例如無細胞DNA分子)之來源組織的組織特異性標記之組合物。本發明亦提供用於藉由判定包含該組織特異性標記之無細胞核酸的絕對量來鑑別無細胞核酸之來源組織的方法、組合物及系統。本發明亦提供用於藉由分析組織特異性標記來偵測生物體組織中之癌症的方法、組合物及系統。

【英文】

Provided herein are compositions comprising tissue-specific markers for identifying a tissue of origin of a cell-free nucleic acid, e.g., a cell-free DNA molecule. Also provided herein are methods, compositions, and systems for identifying a tissue of origin of a cell-free nucleic acid by determining an absolute amount of cell-free nucleic acids comprising the tissue-specific marker. Also provided herein are methods, compositions, and systems for detecting a cancer in a tissue of an organism by analyzing tissue-specific markers.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

組織特異性甲基化標記

【英文發明名稱】

TISSUE-SPECIFIC METHYLATION MARKER

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 對來自不同組織之DNA至循環DNA之定量量測可潜在地提供關於許多不同病理性病況之存在的重要資訊。然而，涉及全基因組亞硫酸氫鹽定序之現有方法相對昂貴且可能對分析帶來挑戰。用於量測源自不同組織之DNA的更具成本效益之方法將適用。

【0002】 源自癌細胞之循環無細胞DNA之偵測，常常被稱為液體生檢，愈來愈地用於管理癌症患者。舉例而言，偵測血漿中之表皮生長因子受體(EGFR)突變可能與腫瘤組織中之突變狀態緊密相關，且可預測對EGFR酪胺酸激酶抑制劑之反應。除了點突變之外，亦可在癌症患者之無細胞血漿中偵測到其他癌症相關基因及基因組更改，包括複本數變化及改變之片段化模式。與未經篩選之患者相比較，藉由篩選血漿DNA鑑別之患者可潜在地具有顯著早期分佈及優良的無進展存活期。

【發明內容】

【0003】 本發明之一個態樣提供一種判定具有第一組織癌症之生物體是否有位於第二組織處之癌症的方法，該方法包含：(a)自具有第一組織癌症之生物體之第一生物樣本獲得無細胞DNA分子；(b)對無細胞DNA分子執行分析，以判定無細胞DNA分子中之目標序列之第一甲基化狀

態，其中目標序列之第一甲基化狀態指示含有該目標序列之無細胞DNA分子係來自生物體之第二組織，其中該第一組織與該第二組織不同；(c)自具有第一甲基化狀態之目標序列之第一生物樣本判定無細胞DNA分子之絕對量；及(d)基於該絕對量判定生物體是否在第二組織處具有癌症。

【0004】 在一些情況下，甲基化狀態包含甲基化程度。在一些情況下，該分析包含自第一生物樣本分離包含目標序列之無細胞DNA分子。在一些情況下，該分析包含分離油乳液中之包含目標序列之無細胞DNA分子。在一些情況下，該分析包含使包含目標序列之無細胞DNA分子與探針雜交。在一些情況下，探針與目標序列雜交。在一些情況下，使探針雜交至目標序列之親和力取決於第一生物樣本之目標序列之第一甲基化狀態。在一些情況下，當第一生物樣本中目標序列之甲基化位點甲基化時，探針與目標序列雜交。在一些情況下，當第一生物樣本中目標序列之甲基化位點未經甲基化時，探針與目標序列雜交。在一些情況下，該分析包含偵測探針與目標序列之雜交。

【0005】 在一些情況下，該分析包含擴增無細胞DNA分子。在一些情況下，該擴增包含使用一對引子。在一些情況下，使該對引子中之至少一個引子與目標序列雜交之親和力取決於目標序列之第一甲基化狀態。在一些情況下，當第一生物樣本中目標序列之甲基化位點甲基化時，該對引子中之至少一個引子與目標序列雜交。在一些情況下，當第一生物樣本中目標序列之甲基化位點未經甲基化時，該對引子中之至少一個引子與目標序列雜交。在一些情況下，分析包含無細胞DNA分子中之未甲基化之胞嘧啶殘基至尿嘧啶之亞硫酸氫鹽轉化。在一些情況下，分析包含執行對來自第一生物樣本之無細胞DNA分子之甲基化感知定序。

【0006】 在一些情況下，目標序列包含至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個或至少10個甲基化位點。在一些情況下，目標序列包含至少5個甲基化位點。在一些情況下，第一甲基化狀態包含目標序列內之個別位點之甲基化密度、目標序列內之連續區域上之甲基化/未甲基化位點之分佈、目標序列內之每一個別甲基化位點之甲基化模式或程度，或非CpG甲基化。在一些情況下，在第一組織中目標序列包含高於第二組織中之甲基化密度。在一些情況下，第一甲基化狀態包含在目標序列內之個別位點之甲基化密度，且該目標序列在第一組織中之甲基化密度為至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些情況下，在第一組織中目標序列包含超過50%之甲基化密度。在一些情況下，在第二組織中目標序列包含至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%之甲基化密度。在一些情況下，在第二組織中目標序列包含低於20%之甲基化密度。在一些情況下，在第一組織中目標序列包含低於第二組織中之甲基化密度。在一些情況下，在第一組織中目標序列包含至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%之甲基化密度。在一些情況下，在第一組織中目標序列包含低於50%之甲基化密度。在一些情況下，在第二組織中目標序列包含至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%之甲基化密度。在一些情況下，在第二組織中目標序列包含超過80%之甲基化密度。

【0007】 在一些情況下，第一組織包含肝臟組織，且目標序列包含與SEQ ID NO: 1具有至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性之聚核苷酸序列。在一些情況下，第一組織包含肝臟組織，且其中分

析包含使用包含SEQ ID NO: 2之引子、包含SEQ ID NO: 3之引子或兩者進行擴增，或使用用於偵測目標序列之包含SEQ ID NO: 4之可偵測標記探針。在一些情況下，擴增進一步包含使用包含SEQ ID NO: 5之引子、包含SEQ ID NO: 6之引子或兩者，或使用用於偵測目標序列之包含SEQ ID NO: 7之可偵測標記探針。

【0008】 在一些情況下，第一組織包含結腸組織，且目標序列包含與SEQ ID NO: 8具有至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性之聚核苷酸序列。在一些情況下，第一組織包含結腸組織，且其中擴增包含使用包含SEQ ID NO: 9之引子、包含SEQ ID NO: 10之引子或兩者，或使用用於偵測目標序列之包含SEQ ID NO: 11之可偵測標記探針。在一些情況下，甲基化特異性擴增進一步包含使用包含SEQ ID NO: 12之引子、包含SEQ ID NO: 13之引子或兩者，或使用用於偵測目標序列之包含SEQ ID NO: 14之可偵測標記探針。

【0009】 在一些情況下，癌症係選自由以下組成之群：膀胱癌、骨癌、腦瘤、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃腸癌、造血性惡性病、頭頸部鱗狀細胞癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、骨髓瘤、鼻癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、黑素瘤及甲狀腺癌。在一些情況下，癌症包含肝細胞癌或結腸直腸癌。

【0010】 在一些情況下，該方法進一步包含判定第二組織中之癌症之分類。在一些情況下，判定第二組織中之癌症之分類包含評估來自生物體之第二生物樣本的無細胞核酸分子。在一些情況下，評估包含判定來自第二生物樣本之無細胞核酸分子的甲基化概況、複本數變異、單一多形現象(SNP)概況或片段化模式。在一些情況下，評估包含判定第二生物樣本

的來自病原體之無細胞核酸分子的量。在一些情況下，第二生物樣本與第一生物樣本相同。在一些情況下，其中第二生物樣本與第一生物樣本不同。

【0011】 本發明之一個態樣提供一種經組態以執行如本文所提供之方法的系統。

【0012】 本發明之一個態樣提供一種非暫時性電腦可讀媒體，其包含一連串用於控制電腦系統執行如本文所揭示之方法的指令。

【0013】 本發明之一個態樣提供一種分析生物體之生物樣本的方法。該方法可包含：基於第一組織特異性標記之甲基化狀態來擴增來自生物樣本之無細胞DNA分子中的第一組織特異性標記，其中該第一組織特異性標記包含具有一或多個分化甲基化位點之預定序列，該預定序列在生物體之第一組織中具有第一甲基化狀態及在生物體之其他組織中具有第二甲基化狀態，且其中第一與第二甲基化狀態不同；藉由偵測第一組織特異性標記之擴增來鑑別無細胞DNA分子之來源組織；及判定來自生物體之第一組織之生物樣本中無細胞DNA分子的絕對量。

【0014】 在一些情況下，該方法進一步包含在擴增之前將未甲基化之胞嘧啶殘基經亞硫酸氫鹽轉化至尿嘧啶。在一些情況下，該方法進一步包含在擴增之前自生物樣本分離來自其他DNA分子之無細胞DNA分子。在一些情況下，擴增包含使用與第一組織特異性標記互補之甲基化特異性引子及黏接至一或多種分化甲基化位點之至少一部分。在一些情況下，鑑別來源組織包含：若無細胞DNA分子中之第一組織特異性標記係藉由經設計以擴增在第一甲基化狀態處甲基化之第一組織特異性標記的引子擴增，則判定無細胞DNA分子來自第一組織。

【0015】 在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第一組織中之甲基化密度高於第二組織。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第一組織中之甲基化密度為至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第一組織中之甲基化密度超過50%。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第二組織中之甲基化密度為至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第二組織中之甲基化密度低於20%。

【0016】 在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第一組織中之甲基化密度低於第二組織。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第一組織中之甲基化密度為至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第一組織中之甲基化密度低於50%。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第二組織中之甲基化密度為至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點在第二組織中之甲基化密度超過80%。

【0017】 在一些情況下，第一組織包含肝臟組織，且第一組織特異性標記包含與SEQ ID NO: 1具有至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性之聚核苷酸序列。在一些情況下，第一組織包含肝臟組織，且其中擴增包含使用包含SEQ ID NO: 2之引子、包含SEQ ID NO: 3之引子或兩者，或使用用於偵測第一組織特異性標記之包含SEQ ID NO: 4之可偵測標記探針。在一些情況下，擴增進一步含使用包含SEQ ID NO: 5之引子、包含SEQ ID NO: 6之引子或兩者，或使用用於偵測第一組織特

異性標記之包含SEQ ID NO: 7之可偵測標記探針。在一些情況下，第一組織包含結腸組織，且第一組織特異性標記包含與SEQ ID NO: 8具有至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性之聚核苷酸序列。在一些情況下，第一組織包含結腸組織，且其中擴增包含使用包含SEQ ID NO: 9之引子、包含SEQ ID NO: 10之引子或兩者，或使用用於偵測第一組織特異性標記之包含SEQ ID NO: 11之可偵測標記探針。在一些情況下，甲基化特異性擴增進一步包含使用包含SEQ ID NO: 12之引子、包含SEQ ID NO: 13之引子或兩者，或使用用於偵測第一組織特異性標記之包含SEQ ID NO: 14之可偵測標記探針。

【0018】 在一些情況下，該方法進一步包含基於第二組織特異性標記之甲基化模式判定源自第二組織之生物樣本中無細胞DNA分子的量，其中第一與第二組織不同。在一些情況下，第二組織屬於生物體。

【0019】 在一些情況下，該方法進一步包含基於生物樣本中來自生物體之第一組織的無細胞DNA分子之絕對量來診斷、監測或預測第一組織中之癌症。在一些情況下，癌症係選自由以下組成之群：膀胱癌、骨癌、腦瘤、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃腸癌、造血性惡性病、頭頸部鱗狀細胞癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、骨髓瘤、鼻癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、黑素瘤及甲狀腺癌。在一些情況下，癌症包含肝細胞癌或結腸直腸癌。在一些情況下，診斷或監測包含基於生物樣本中來自生物體之第一組織的無細胞DNA分子的絕對量來判定第一組織中之腫瘤的大小。在一些情況下，診斷或監測包含基於生物樣本中來自生物體之第一組織的無細胞DNA分子的絕對量來判定癌症是否轉移至第一組織。

【0020】 在一些情況下，第一組織包含移植器官。在一些情況下，本文所提供之方法進一步包含基於生物樣本中來自第一組織之無細胞DNA分子的絕對量來評估器官移植。

【0021】 本發明之另一態樣提供一種用於判定來自生物體肝臟之生物樣本中的無細胞DNA分子之量的組合物。該組合物可包含一對用於基於肝特異性標記之甲基化狀態來擴增肝特異性標記的引子，其中該肝特異性標記包含與SEQ ID NO: 1具有至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性的聚核苷酸序列。在一些情況下，該對引子包含：包含SEQ ID NO: 2之引子及包含SEQ ID NO: 3之引子。在一些情況下，該組合物進一步包含用於偵測肝特異性標記之包含SEQ ID NO: 4的可偵測標記探針。在一些情況下，該組合物進一步包含：包含SEQ ID NO: 5之引子及包含SEQ ID NO: 6之引子。在一些情況下，該組合物進一步包含用於偵測肝特異性標記之包含SEQ ID NO: 7之可偵測標記探針。

【0022】 本發明之另一態樣提供一種用於判定來自生物體結腸之生物樣本中的無細胞DNA分子之量的組合物，其包含一對用於基於結腸特異性標記之甲基化狀態擴增結腸特異性標記的引子，其中該結腸特異性標記包含與SEQ ID NO: 8具有至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性之聚核苷酸序列。在一些情況下，該對引子包含：包含SEQ ID NO: 9之引子及包含SEQ ID NO: 10之引子。在一些情況下，該組合物進一步包含用於偵測結腸特異性標記之包含SEQ ID NO: 11的可偵測標記探針。在一些情況下，該組合物進一步包含：包含SEQ ID NO: 12之引子及包含SEQ ID NO: 13之引子。在一些情況下，該組合物進一步包含用於偵測結腸特異性標記之包含SEQ ID NO: 14的可偵測標記探針。

【圖式簡單說明】

【0023】 本發明之新穎特徵詳細闡明於隨附申請專利範圍中。將參考闡述利用本發明原理之例示性實施例及其附圖的以下詳細描述來獲得對本發明之特徵及優點的較佳理解：

【0024】 圖1為患有結腸直腸癌伴隨肝轉移之患者中的無漿細胞DNA來源的示意圖。

【0025】 圖2展示基於肝特異性甲基化標記分析(液滴式數位PCR)及藉由定序進行之供體特異性對偶基因分析之肝移植受體之血漿中的肝源性DNA之分數濃度之間的相關性。

【0026】 圖3A及圖3B使用液滴式數位PCR展示在健康個體、慢性HBV帶原者、肝硬化患者及HCC患者之血漿中的肝源性DNA之絕對濃度(圖3A)及分數濃度(圖3B)。

【0027】 圖4A及圖4B使用液滴式數位PCR展示腫瘤之最大尺寸與HCC患者之血漿中之肝源性DNA之絕對濃度(圖4A)及分數濃度(圖4B)之間的相關性。

【0028】 圖5A至5D藉由液滴式數位PCR展示健康個體及存在及不存在肝轉移之CRC患者中的結腸源性及肝源性DNA的血漿濃度。(圖5A)結腸源性DNA之絕對濃度，(圖5B)結腸源性DNA之分數濃度，(圖5C)肝源性DNA之絕對濃度，及(圖5D)肝源性DNA之分數濃度。

【0029】 圖6展示用於使用肝源性及結腸源性DNA之絕對濃度及分數濃度來區分存在及不存在肝轉移之CRC患者的ROC曲線。「AUC」指示曲線下面積。

【0030】 圖7展示蛋白酪胺酸激酶2 β (PTK2B)基因區內之CpG位點

之甲基化密度。

【0031】 圖8展示Sestrin 3 (*SESN3*)基因區內之CpG位點之甲基化密度。

【0032】 圖9展示用於使用肝源性DNA之絕對濃度及分數濃度來區分HCC患者與非HCC個體之ROC曲線。

【0033】 圖10展示可經程式化或另外經組態以實施本文所提供之方法的電腦控制系統。

【0034】 圖11展示如本文所揭示之方法及系統的圖。

【實施方式】

【0035】 本申請案主張2018年3月15日申請之美國臨時申請案第62/643,649號及2018年11月20日申請之美國臨時申請案第62/769,928號之優先權，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

參考文獻併入

【0036】 本說明書中所提及之所有公開案、專利及專利申請案均以引用的方式併入本文中，其引用的程度如各單獨的公開案、專利或專利申請案經特定及單獨地指示以引用的方式併入一般。

【0037】 本文提供用於使用組織特異性標記量化來自特異性組織的無細胞核酸分子(例如無細胞DNA分子，例如血漿DNA)之方法、組合物及系統。本文亦提供此等標記之臨床應用，例如但不限於：應用於癌症之診斷、監測及預測，應用於轉移癌之偵測，及在一些情況下，應用於器官移植之評估。

【0038】 除了癌症特異性變化之外，自受癌症影響之器官釋放而進入循環之DNA可存在普遍增加。舉例而言，肝源性DNA之程度可在肝癌

患者中增加。在不希望受特定理論約束的情況下，由受癌症影響之器官釋放之DNA的程度增加可能係由於DNA自腫瘤細胞之直接釋放或癌症所侵入之非腫瘤細胞之更新增加而引起。亦可在由於增加之細胞更新而經歷急性排斥反應之器官移植受體中觀察到組織特異性DNA之釋放的此類增加。在一些情況下，藉由甲基化解迴旋測定的移植器官內之細胞至血漿DNA中之貢獻比例與基於供體特異性對偶基因之分析測定之貢獻比例緊密相關。

【0039】 在一些情況下，使用全基因組亞硫酸氫鹽定序之甲基化解迴旋可能由於相對高成本及長產品製作時程而具有挑戰性。此外，在一些情況下，甲基化解迴旋可判定不同器官之相對或貢獻比例而非源自各器官之DNA之絕對濃度。在來自超過一個器官之DNA將經釋放而進入循環之情境中，源自特異性器官之DNA之絕對濃度的量測可提供更多資訊。舉例而言，在具有結腸直腸癌(CRC)轉移至肝臟之患者中，增加的DNA量將自肝臟釋放進入循環中。然而，由於藉由來源於結腸之腫瘤細胞釋放之DNA的甚至較大程度的增加，肝臟DNA在血漿中之溶離份可能展示反常還原。因此，可利用組織特異性甲基化模式精確測定DNA之絕對量之方法的開發可為適用的。

【0040】 I. 組織特異性標記

【0041】 本文提供可鑑別無細胞DNA分子之來源組織的組織特異性標記。在一些情況下，組織特異性標記為生物體之基因組之聚核苷酸序列。在一些情況下，組織特異性標記包含基於標記聚核苷酸序列內所包含之一或多個分化甲基化位點之甲基化狀態鑑別之分化甲基化區(DMR)。在一些情況下，該一或多個分化甲基化位點包含一或多個CpG位點。在一些

情況下，該一或多個分化甲基化位點包含一或多個非CpG位點。在一些情況下，如本文所論述之組織特異性標記可被稱作目標序列。

【0042】 在一些情況下，組織特異性標記之分化甲基化位點在生物體之第一組織中具有第一甲基化狀態，而在生物體之不同的第二組織中具有第二甲基化狀態。第一與第二甲基化狀態可能不同，使得第一及第二組織可基於組織特異性標記之甲基化狀態相區分。

【0043】 在一些情況下，組織特異性標記之分化甲基化位點在生物體之第一組織中具有第一甲基化狀態，而在生物體之所有其他組織中具有第二甲基化狀態。第一與第二甲基化狀態可能不同，使得第一組織可基於組織特異性標記之甲基化狀態與生物體之所有其他組織相區分。

【0044】 在一些情況下，組織特異性標記包含至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少12個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少50個分化甲基化位點。在一些情況下，組織特異性標記包含至少5個分化甲基化位點。甲基化核苷酸或甲基化核苷酸鹼基可係指甲基部分在核苷酸鹼基上之存在，其中甲基部分不存在於所識別之典型核苷酸鹼基中。舉例而言，胞嘧啶不含有在其嘧啶環上之甲基部分，但5-甲基胞嘧啶含有在其嘧啶環之位置5處之甲基部分。在此情況下，胞嘧啶並非甲基化核苷酸且5-甲基胞嘧啶為甲基化核苷酸。在另一實例中，胸腺嘧啶含有其嘧啶環之位置5處之甲基部分，但出於本文之目的，胸腺嘧啶在存在於DNA中時並未被視為甲基化核苷酸，係由於胸腺嘧啶係DNA之典型核苷酸鹼基。DNA之典型核苷酸鹼基為胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶及鳥嘌呤。RNA之典型鹼基為尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶及鳥嘌呤。相對應地，「甲基化位點」

可為靶基因核酸區中之位置，其中甲基化已經發生或有可能發生。舉例而言，含有CpG之位置為甲基化位點，其中胞嘧啶可經甲基化或可未經甲基化。「位點」可對應於單一位點，其可為單個鹼基位置或一組相關鹼基位置，例如CpG位點。甲基化位點可係指有可能甲基化之DNA分子之CpG位點或非CpG位點。CpG位點可為DNA分子之區域，其中在沿著其5'至3'方向之鹼基之線性序列中，胞嘧啶核苷酸之後為鳥嘌呤核苷酸，且該區域易受藉由活體內天然存在之事件抑或藉由經制定用於活體外化學甲基化核苷酸的事件進行之甲基化影響。非CpG位點可為不具有CpG二核苷酸序列但亦受藉由活體內天然存在之事件抑或藉由經制定用於活體外化學甲基化核苷酸的事件進行之甲基化影響的區域。基因座或區域可對應於包括多個位點之區域。

【0045】 組織特異性標記之甲基化狀態可包含標記區域內之個別位點之甲基化密度、標記內之連續區域內之甲基化/未甲基化位點之分佈、含有超過一個位點之標記內之個別甲基化位點之甲基化模式或程度以及非CpG甲基化。在一些情況下，組織特異性標記之甲基化狀態包含個別分化甲基化位點之甲基化程度(或甲基化密度)。甲基化密度可係指：對於指定甲基化位點，在超過含有此類甲基化位點之所關注核酸分子之總數目的指定甲基化位點處甲基化之核酸分子之分數。舉例而言，肝臟組織中之第一甲基化位點之甲基化密度可係指在總肝臟DNA分子內之第一位點處甲基化之肝臟DNA分子的分數。在一些情況下，甲基化狀態包含在個別分化甲基化位點當中的甲基化/未甲基化狀態之同調性。

【0046】 在一些情況下，組織特異性標記包含在第一組織中高甲基化但在第二組織中低甲基化之甲基化位點。舉例而言，組織特異性標記可

包含在肝臟組織中高甲基化之一或多個甲基化位點，其可意謂一或多個甲基化位點在肝臟組織中具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的甲基化密度；對比而言，一或多個甲基化位點可在諸如但不限於血球、肺、食道、胃、小腸、結腸、胰臟、膀胱、心臟及大腦的其他組織中具有至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%的甲基化密度。組織特異性標記可包含在第一組織中高甲基化但在第二組織中低甲基化的至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少12個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少50個甲基化位點。在一些情況下，組織特異性標記包含在第一組織中高甲基化但在第二組織中低甲基化之至少5個甲基化位點。

【0047】 組織特異性標記可包含至多300個鹼基對(bp)、至多250個bp、至多225個bp、至多200個bp、至多190個bp、至多185個bp、至多180個bp、至多175個bp、至多170個bp、至多169個bp、至多168個bp、至多167個bp、至多166個bp、至多165個bp、至多164個bp、至多163個bp、至多162個bp、至多161個bp、至多160個bp、至多150個bp、至多140個bp、至多120個bp或至多100個bp。在一些情況下，組織特異性標記包含至多166個bp。

【0048】 在一些情況下，如本文所提供之肝特異性標記包含在肝臟組織中高甲基化但在其他組織中低甲基化之至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少12個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少50個甲基化位點。在一些情況下，如本文所提供之肝特異性標記包含在肝臟

組織中高甲基化但在其他組織中低甲基化之至少5個甲基化位點。在肝臟組織中高甲基化之甲基化位點中之各者可在肝臟組織具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的甲基化密度，且在諸如但不限於血液、大腦、胸腺、胰臟、腎臟之其他組織中具有至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%的甲基化密度。在一些情況下，在肝臟組織中高甲基化之甲基化位點中之各者可在肝臟組織具有超過50%的甲基化密度及在諸如但不限於血球、肺、食道、胃、小腸、結腸、胰臟、膀胱、心臟及大腦中具有低於20%的甲基化密度。

【0049】 在一些情況下，組織特異性標記包含在第一組織中低甲基化但在第二組織中高甲基化之甲基化位點。在一些情況下，組織特異性標記包含在第一組織低甲基化但在其他組織中高甲基化之甲基化位點。舉例而言，組織特異性標記可包含在肝臟組織中低甲基化之一或多個甲基化位點，其可意謂一或多個甲基化位點在肝臟組織中具有至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%的甲基化密度；對比而言，一或多個甲基化位點可在諸如但不限於血球、肺、食道、胃、小腸、結腸、胰臟、膀胱、心臟及大腦的其他組織中具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的甲基化密度。組織特異性標記可包含在第一組織中低甲基化但在第二組織中高甲基化的至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少12個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少50個甲基化位點。在一些情況下，組織特異性標記包含在第一組織中低甲基化但在第二組織中高甲基化之至少5個甲基化位點。

【0050】 在一些情況下，如本文所提供之肝特異性標記包含在肝臟組織中低甲基化但在其他組織中高甲基化之至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少12個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少50個甲基化位點。在一些情況下，如本文所提供之肝特異性標記包含在肝臟組織中低甲基化但在其他組織中高甲基化之至少5個甲基化位點。在肝臟組織中低甲基化之甲基化位點中之各者可在肝臟組織具有至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%或至多5%的甲基化密度，且在諸如但不限於血液、大腦、胸腺、胰臟、腎臟之其他組織中具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%的甲基化密度。在一些情況下，在肝臟組織中低甲基化之甲基化位點中之各者可在肝臟組織具有低於50%的甲基化密度及在諸如但不限於血球、肺、食道、胃、小腸、結腸、胰臟、膀胱、心臟及大腦中具有超過80%的甲基化密度。

【0051】 在一些情況下，如本文所提供之結腸特異性標記包含在結腸組織中高甲基化但在其他組織中低甲基化之至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少12個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少50個甲基化位點。在一些情況下，如本文所提供之結腸特異性標記包含在結腸組織中高甲基化但在其他組織中低甲基化之至少5個甲基化位點。在結腸組織中高甲基化之甲基化位點中之各者可在結腸組織具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的甲基化密度，且在諸如但不限於血液、大腦、胸腺、胰臟、腎臟之其他組織中具有至多

50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%的甲基化密度。在一些情況下，在結腸組織中高甲基化之甲基化位點中之各者可在結腸組織具有超過50%的甲基化密度及在諸如但不限於血球、肺、食道、胃、小腸、肝、胰臟、膀胱、心臟及大腦中具有低於20%的甲基化密度。

【0052】 在一些情況下，如本文所提供之結腸特異性標記包含在結腸組織中低甲基化但在其他組織中高甲基化之至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少12個、至少15個、至少20個、至少25個、至少30個、至少50個甲基化位點。在一些情況下，如本文所提供之結腸特異性標記包含在結腸組織中低甲基化但在其他組織中高甲基化之至少5個甲基化位點。在結腸組織中低甲基化之甲基化位點中之各者可在結腸組織具有至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%或至多5%的甲基化密度，且在諸如但不限於血液、大腦、胸腺、胰臟、腎臟之其他組織中具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%的甲基化密度。在一些情況下，在結腸組織中低甲基化之甲基化位點中之各者可在結腸組織具有低於50%的甲基化密度及在諸如但不限於血球、肺、食道、胃、小腸、肝、胰臟、膀胱、心臟及大腦中具有超過80%的甲基化密度。

【0053】 本文亦提供用於鑑別肝源性DNA分子之肝特異性標記。肝特異性標記可位於染色體8上之蛋白酪胺酸激酶2 β (PTK2B)基因之外顯子區域中。肝特異性DMR內之八個CpG位點可在肝臟中高甲基化但在其他組織及血球中低甲基化。如本文所提供之肝特異性標記可包含與SEQ ID NO: 1具有至少約50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致

性之聚核苷酸序列。如本文所提供之肝特異性標記可包含SEQ ID NO: 1。

【0054】 本文亦提供用於鑑別結腸源性DNA分子之結腸特異性標記。結腸特異性標記可位於染色體11上之Sestrin 3 (SESN3)基因之外顯子區域中。結腸特異性DMR內之所有六個CpG位點可在結腸中高甲基化但在其他組織及血球中低甲基化。結腸特異性標記可包含與SEQ ID NO: 8具有至少約50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性之聚核苷酸序列。

【0055】 如本文所使用，術語兩個或更多個核苷酸或胺基酸序列之間的「一致性」或「一致性百分比」可藉由對準用於理想比較目的之序列判定(例如，間隔可經引入第一序列之序列中)。接著可比較對應位置處之核苷酸，且兩個序列之間的一致性百分比可為序列所共用之相同位置的數目的函數(亦即，一致性%=相同位置之#/位置之總#×100)。舉例而言，第一序列中之位置被與第二序列中之對應位置相同的核苷酸佔據，則該等分子在該位置相同。考慮到為了兩個序列之理想對準而需要引入的間隙數目及各間隙長度，兩個序列之間的一致性百分比為該等序列所共用之相同位置之數目的函數。在一些情況下，為了比較目的對準之序列的長度為參考序列之長度的至少約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。BLAST®搜尋可判定兩個序列之間的同源性。兩個序列之整個長度之間或兩個序列之整個長度之部分之間可具有同源性。該兩個序列可為基因、核苷酸序列、蛋白序列、肽序列、胺基酸序列或其片段。該兩個序列之實際比較可藉由熟知方法，例如使用數學演算法實現。此類數學演算法

之非限制性實例可為 Karlin, S. 及 Altschul, S. 之 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90- 5873-5877 (1993) 中所描述之彼等非限制性實例。此類演算法可併入至 NBLAST 及 XBLAST 程式(版本 2.0) 中，如 Altschul, S. 等人之 Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997) 中所描述。當利用 BLAST 及間隙 BLAST 程式時，可使用各別程式(例如 NBLAST) 之任何相關參數。舉例而言，用於序列比較之參數可經設定為得分=100，字長=12，或可變化(例如 W=5 或 W=20)。其他實例包括邁爾斯與米勒演算法、CABIOS (1989)、ADVANCE、ADAM、BLAT 及 FASTA。

【0056】 本文亦提供鑑別組織特異性標記之方法。該方法可包含在不同組織樣本當中比較跨越基因組之甲基化狀態。公開可用之資料庫，諸如來自路線圖表觀基因組項目(Roadmap Epigenomics Project) (Roadmap Epigenomics Consortium 等人，Nature 2015;518:317-30) 及 BLUEPRINT 項目(Martens 等人，Haematologica 2013;98:1487-9) 之資料庫，可用於生物資訊分析，以便篩檢潛在組織特異性標記。在一些情況下，需要實驗驗證。舉例而言，可執行甲基化感知定序，諸如亞硫酸氫鹽定序，以驗證不同組織當中的甲基化狀態。在一些情況下，甲基化特異性擴增亦可用於相對更具靶向性之驗證。

【0057】 II. 分析來自組織之無細胞DNA分子之方法

【0058】 本文提供分析生物體之生物樣本之方法。如本文所提供之方法可判定來自生物體之組織之無細胞核酸分子(例如無細胞DNA分子)之絕對量。一種方法可包含：在無細胞DNA分子包含具有第一甲基化狀態之第一組織特異性標記時，將來自生物樣本之無細胞DNA分子鑑別為來自生物體之第一組織之無細胞DNA分子。在一些情況下，第一組織特異

性標記包含具有一或多個分化甲基化位點之預定序列。在一些情況下，第一組織特異性標記可在第一組織中具有第一甲基化狀態且在生物體之其他組織中具有第二甲基化狀態，且該第一甲基化狀態與該第二甲基化狀態可不同。

【0059】 如本文所提供，一種方法可包含評估無細胞DNA分子之甲基化狀態。在一些情況下，一種方法可進一步包含在擴增之前將未甲基化之胞嘧啶殘基經亞硫酸氫鹽轉化成尿嘧啶。在一些情況下，一種方法可包含藉由任何其他方法轉化甲基化或未甲基化胞嘧啶殘基，使得可藉由後續偵測方法(例如基於引子之擴增法)區分該等經轉化殘基。在一些情況下，無細胞DNA分子可經甲基化敏感酶消解，該甲基化敏感酶係在甲基化位點經甲基化或未甲基化時消解DNA分子之一或多個特異性甲基化位點處。因此可採用甲基化敏感酶來區分甲基化DNA分子與未甲基化DNA分子。可用於本文所提供之方法中之甲基化敏感酶之非限制性實例可包括 Aat II、Acc II、Aor13H I、Aor51H I、BspT104 I、BssH II、Cfr10 I、Cla I、Cpo I、Eco52 I、Hae II、Hap II、Hha I、Mlu I、Nae I、Not I、Nru I、Nsb I、PmaC I、Psp1406 I、Pvu I、Sac II、Sal I、Sma I、SnaB I及其任何組合。

【0060】 如本文所提供之方法可包括依據第一組織特異性標記之甲基化狀態，擴增來自生物樣本之無細胞DNA分子中之第一組織特異性標記。本方法可進一步包括藉由偵測第一組織特異性標記之擴增，來鑑別無細胞DNA分子之來源組織。一種方法可進一步包括判定來自生物體之第一組織之生物樣本中無細胞DNA分子的絕對量。擴增反應係指用於複製核酸一次或多次之方法。在一些情況下，擴增方法包括(但不限於)聚合酶

鏈反應(PCR)、自主序列反應、接合酶鏈反應、cDNA端之快速擴增、聚合酶鏈反應及接合酶鏈反應、Q-β噬菌體擴增、股置換擴增或拼接重疊延伸聚合酶鏈反應。在一些情況下，核酸之單分子係例如藉由數位PCR擴增。

【0061】 在一些情況下，擴增包括使用與第一組織特異性標記互補之甲基化特異性引子，並黏接至一或多個甲基化位點之至少一部分。甲基化特異性引子係指可區分甲基化與未甲基化序列之引子。對於含有甲基化位點之指定目標序列，可以設計甲基化特異性引子，讓其涵蓋甲基化位點之至少一部分。在一些情況下，當在擴增之前執行亞硫酸氫鹽轉化時，用於指定甲基化位點之甲基化特異性引子上之核苷酸殘基可經過設計讓其與在用於偵測甲基化目標序列之位點處之未經轉化之胞嘧啶殘基互補，而為了偵測未甲基化之目標序列，可以設計甲基化特異性引子上之核苷酸殘基，讓其與位點處之經轉化殘基(例如尿嘧啶殘基)互補。

【0062】 在一些情況下，一種方法可進一步包含在擴增之前自生物樣本分離來自其他DNA分子之無細胞DNA分子。藉由實體分離無細胞DNA分子，可執行對來自生物樣本之無細胞DNA分子之「數位」分析，諸如但不限於數位PCR，例如液滴式數位PCR。分離方法可為熟習此項技術者已知之任何方法，諸如但不限於藉由微孔板、毛細管、油乳液及微型化腔室陣列進行分離。數位PCR反應可使用此項技術中之任何已知技術(諸如基於微流體或基於乳液之技術)執行，例如BEAMing (Dressman等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8817-8822)。

【0063】 在一些情況下，第一組織包含肝臟組織，且該方法包含使用如上文所論述之肝特異性標記。在一些情況下，肝特異性標記，例如

SEQ ID NO: 1，包含在肝臟中高甲基化但在其他組織中低甲基化之位點。在此等情況下，該方法可包含用於偵測甲基化之肝臟組織特異性標記之引子(「用於甲基化分析之引子」)。舉例而言，用於甲基化分析之引子可包含：包含SEQ ID NO: 2之引子、包含SEQ ID NO: 3之引子或該兩者。在一些情況下，本文所提供之引子用於在亞硫酸氫鹽轉化之後進行擴增反應。可替代地或累積地，該方法可包含使用用於偵測甲基化之肝臟組織特異性標記之包含SEQ ID NO: 4之可偵測標記探針。視情況地，該方法可進一步包含使用用於偵測未甲基化之肝臟組織特異性標記之引子(「用於未甲基化之分析之引子」)。用於未甲基化分析之引子可包含：包含SEQ ID NO: 5之引子、包含SEQ ID NO: 6之引子或兩者。可替代地或累積地，該方法可包含使用用於偵測未甲基化之肝臟組織特異性標記之包含SEQ ID NO: 7之可偵測標記探針。

【0064】 引子、探針或寡核苷酸可在本文中互換地使用且可係指經由磷酸二酯鍵鍵聯在一起之超過一個，例如2個、4個、6個、8個、10個、14個、18個、20個或40個核苷酸或化學改質之核苷酸的聚合物。引子可包含約20個至約30個核苷酸。引子可包含至少6個、8個、10個、12個、14個、16個、18個、20個、22個、24個、26個、28個、30個、32個、34個、36個、38個或40個核苷酸。可引入對引子之構成核苷酸之化學改質，以修改引子之某些特性，例如，增加其穩定性，增加雜交特異性及用可偵測信號標記。可用於本文所提供之組合物中之化學改質可包括共價改質、連接化學方法及核苷酸鹼基之修飾。化學改質可包括磷酸化、添加生物素、膽固醇基-TEG、胺基改質劑(例如C6、C12或dT)、疊氮化合物、炔、硫醇改質劑、螢光團、暗驟冷劑及間隔子。引子可包含一或多個

硫代磷酸酯鍵或一或多個經修飾鹼基，諸如2-胺基嘌呤、2,6-二胺基嘌呤(2-胺基-dA)、5-溴dU、去氧尿苷、反向dT、反向二去氧基-T、二去氧基-C、5-甲基dC、去氧肌苷(deoxyinoside)、超T®、超G®、鎖核酸、5-硝基吡啶、2'-O-甲基RNA鹼基、羥基甲基dC、異dC、異dG、氟基鹼基(例如氟基C、U、A、G、T)及2'-O-甲氧基-乙基鹼基(例如2-甲氧基乙氧基A、G、U、C、T)。可偵測標記探針可包含熟習此項技術者已知之任何可偵測標記，例如任何合適的螢光團。PCR反應(例如數位PCR或即時PCR)可經由任何合適的光學方法、磁性方法、電子方法或熟習此項技術者可用之任何其他技術監測。

【0065】 在一些情況下，第一組織包含結腸組織，且該方法包含使用如上文所論述之結腸特異性標記。在一些情況下，結腸特異性標記，例如SEQ ID NO: 8，包含在結腸中高甲基化但在其他組織中低甲基化之位點。在此等情況下，用於甲基化分析之引子可包含：包含SEQ ID NO: 9之引子、包含SEQ ID NO: 10之引子或兩者。在一些情況下，本文所提供之引子用於在亞硫酸氫鹽轉化之後進行擴增反應。可替代地或累積地，該方法可包含使用用於偵測甲基化結腸特異性標記之包含SEQ ID NO: 11之可偵測標記探針。視情況地，該方法可進一步包含使用用於偵測未甲基化之結腸特異性標記之引子(「用於未甲基化分析之引子」)。用於未甲基化分析之引子可包含：包含SEQ ID NO: 12之引子、包含SEQ ID NO: 13之引子或兩者。可替代地或累積地，該方法可包含使用包含SEQ ID NO: 14之可偵測標記探針來偵測未甲基化結腸特異性標記。

【0066】 本文所提供之方法，例如使用數位PCR技術，可允許直接判定目標DNA分子之實際數目而不需要校正器。其他技術，諸如某些基

於定序之方法，諸如(但不限於)使用PacBio定序平台之亞硫酸氫鹽定序及不基於亞硫酸氫鹽之甲基化感知定序，可相對於其他組織判定來自目標組織之DNA的相對或分數濃度。絕對量可係指DNA分子之絕對計數，或在一些情況下，亦可指DNA分子之濃度，例如每體積數目、莫耳或重量，例如複本/mL、莫耳/L，或mg/L。如本文所提供之絕對量的分析可在增加量的DNA將自超過一種類型之組織中釋放時的情景中適用。諸如美國專利申請案第14/803,692號中所揭示之基於無細胞核酸分子之定序的甲基化解迴旋分析，另一方面可提供呈分數比重形式之無細胞核酸的來源組織之讀數，例如，第一組織自生物樣本貢獻A%的無細胞核酸，且第二組織自相同生物樣本貢獻B%的無細胞核酸。

【0067】 在一些情況下，本文所提供之方法、組合物及系統亦可利用如用於無細胞核酸之甲基化分析之即時PCR、定序及微陣列的技術。在一些情況下，具有組織特異性標記之無細胞核酸之絕對數(諸如對數位PCR分析中之陽性反應計數)可能並非係藉由一些技術自甲基化分析直接導出。然而，可例如藉由考慮生物樣本之指定體積中之無細胞核酸的總數或濃度，基於具有組織特異性標記之無細胞核酸之濃度(相對或分數濃度)來間接計算此類絕對數。在一些情況下，可用於本文所提供之方法中之定序可包括鏈終止定序、雜交定序、Illumina定序(例如使用可逆終止劑染料)、離子急流半導體定序、質量分光光度法定序、大規模平行簽名定序(MPSS)、Maxam-Gilbert定序、奈米孔測序、聚克酶純系定序(polony sequencing)、焦磷酸定序、鳥槍法定序、單分子即時(SMRT)定序、SOLiD定序(使用四個經螢光標記之雙鹼基探針之雜交)、通用定序或其任何組合。具有靶向甲基化位點之探針之微陣列亦可在本文所提供之方法中

用於分析無細胞DNA 分子之甲基化狀態。

【0068】 在一些情況下，本文所提供之方法進一步包含基於第二組織特異性標記之甲基化模式判定源自第二組織之生物樣本中的無細胞DNA分子的量，其中第一與第二組織不同。第二組織可屬於同一生物體。第二組織亦可來自不同生物體，例如懷孕婦女之胎兒。

【0069】 III. 診斷、監測、預測癌症之方法

【0070】 本文提供診斷、監測、預測癌症之方法。方法可包含判定來自如上文所論述之第一組織之無細胞DNA分子之絕對量，及基於來自生物體之第一組織之生物樣本中的無細胞DNA分子之絕對量來診斷、監測、預測第一組織中之癌症。

【0071】 來自第一組織之無細胞DNA分子之絕對量可與第一組織之病況相關。舉例而言，肝源性血漿DNA分子之的量可能由於DNA分子因為腫瘤生長自肝臟組織釋放的增加而增加。在其他情況下，例如由器官移植引起之細胞更新的增加亦可導致自具有移植物之組織釋放的血漿DNA的增加。

【0072】 本文所提供之方法可包含基於生物樣本中來自生物體之第一組織之無細胞DNA分子的絕對量來判定第一組織中之腫瘤的大小。其中無靶細胞DNA分子的量與腫瘤大小相關的預定比較圖可用於腫瘤大小判定。腫瘤大小之偵測可有助於癌症之診斷、監測及預測。

【0073】 本文所提供之方法可包含基於生物樣本中來自生物體之第一組織之無細胞DNA分子的絕對量來判定癌症是否轉移至第一組織。與目標DNA分子之分數量相比，藉由本文所提供之方法判定之目標DNA分子之絕對量可提供存在及不存在癌轉移之癌症病患之間的合乎需要的分

化。

【0074】 本文所提供之方法、組合物及系統可適用的癌症類型可包含膀胱癌、骨癌、腦瘤、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃腸癌、造血性惡性病、頭頸部鱗狀細胞癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、骨髓瘤、鼻癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌或甲狀腺癌。待藉由本文所提供之方法評估之轉移性組織可包含膀胱、骨、大腦、乳房、子宮頸、結腸、食道、胃腸道、血液、頭、頸、肝、肺、淋巴結、鼻、鼻咽、嘴、口咽、卵巢、前列腺、皮膚、胃或甲狀腺。

【0075】 如熟習此項技術者將易於理解，癌細胞可藉由移動至附近正常組織中而局部擴散，可區域性擴散至附近的淋巴結、組織或器官，且可擴散至身體之較遠部位。癌症自初始第一組織擴散至第二組織可被稱作癌轉移，且此類癌症可因此被稱作轉移癌。本文所提供之方法、組合物及系統可適用之癌轉移之例示性類型可包括發生在表1中所列之部位的癌轉移。

表1.例示性癌轉移部位

癌症類型	癌轉移部位
膀胱	骨、肝、肺
乳房	骨、大腦、肝、肺
結腸	肝、肺、腹膜
腎臟	腎上腺、骨、大腦、肝、肺
肺	腎上腺、骨、大腦、肝、其他肺
黑素瘤	骨、大腦、肝、肺、皮膚、肌肉
卵巢	肝、肺、腹膜
胰臟	肝、肺、腹膜
前列腺	腎上腺、骨、肝、肺
直腸	肝、肺、腹膜
胃	肝、肺、腹膜
甲狀腺	骨、肝、肺
子宮	骨、肝、肺、腹膜、陰道

【0076】 在一些情況下，如本文所提供之方法、組合物及系統在與

熟習此項技術者可用之其他技術組合時可用於診斷、監測及預測癌症。在一些情況下，偵測(例如)核酸(例如DNA、RNA)中之其他分子標記(諸如複本數畸變(CNA)、單核苷酸多形現象(SNP)、基因突變、生殖系突變、體細胞突變、來自病原體(例如病毒，例如埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus))之核酸、無細胞核酸之大小及無細胞核酸之片段化模式)亦可結合如本文所提供之方法、組合物及系統應用。技術之組合可有助於促進對癌症等級之偵測，包括(但不限於)癌症是否存在、癌症之階段、癌症之大小、包含多少染色體區之缺失或擴增(例如兩倍或三倍)，及/或癌症之嚴重程度的其他度量。癌症等級可為數字或其他字符。該等級可為零。癌症等級亦可包括與缺失或擴增相關的惡化前或癌前期病況。

【0077】 在一些情況下，複本數畸變(CNA)之偵測，諸如美國專利第8,741,811號中所揭示之方法，可與本文所提供之方法組合使用。如上文所論述，在一些情況下，基於來自第一組織之無細胞核酸之絕對量，本文所提供之方法可判定癌症是否轉移至第一組織中。CNA之偵測在另一方面可有助於鑑別第一組織中之轉移癌細胞之來源。在一些情況下，無細胞核酸之片段化模式之分析，諸如美國專利申請案第15/218,497號中所揭示之方法，可與本文所提供之方法、組合物及系統組合使用。在一些情況下，本發明方法、組合物及系統可用於結合任何可用方法來偵測、監測或預測個體中之癌症。除前述偵測方法以外，吾人亦可執行任何適當測試，如腫瘤生物標記測試(例如，肝癌之 α -胎蛋白(AFP)、非小細胞肺癌之ALK基因、前列腺癌之前列腺特異性抗原(PSA)及甲狀腺癌之甲狀球蛋白)、物理檢查、放射成像(例如電腦斷層掃描、磁共振成像、正電子發射斷層攝影法(PET))、超音檢查、內窺鏡檢查、生檢或細胞學測試。

【0078】 在一些情況下，本發明方法、組合物或系統可用於在常規、半常規或非常規時程上監測個體中之癌症。舉例而言，個體可採用癌症監測檢查，其在每週、每月、每季度或每年基礎上利用本發明方法、組合物或系統。在一些情況下，如同個體可約每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11個月或超過12個月進行此類檢查。在一些情況下，兩個連續檢查之間的時間可基於最近檢查的結果，例如在一些情況下，根據醫師處方或醫療建議判定。

【0079】 IV. 評估器官移植之方法

【0080】 本文提供基於來自移植組織之無細胞DNA分子之絕對量的判定來評估器官移植的方法。如本文所描述之移植組織被視為相關個體之組織。

【0081】 如本文所提供之方法可利用來自移植組織之無細胞DNA分子之量與移植組織之細胞更新率之間的相關性。細胞更新率可由此用作評估器官移植之準則。

【0082】 V. 用於分析來自組織之無細胞DNA分子之組合物

【0083】 本文亦提供用於分析來自特異性組織(例如，骨、肝、肺、大腦、腹膜、腎上腺、皮膚、肌肉、陰道、結腸、膀胱、乳房、腎臟、黑色素瘤、卵巢、胰臟、前列腺、直腸、胃、甲狀腺或子宮)之無細胞DNA分子的組合物。

【0084】 一種用於判定來自生物體肝臟之生物樣本中之無細胞DNA分子之量的組合物可包含一對引子，其用於基於肝特異性標記之甲基化狀態擴增肝特異性標記。肝特異性標記可包含與SEQ ID NO: 1具有至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性之聚核苷酸序列。在

一些情況下，該對引子包含：包含SEQ ID NO: 2之引子及包含SEQ ID NO: 3之引子。在一些情況下，該組合物進一步包含用於偵測肝特異性標記之包含SEQ ID NO: 4之可偵測標記探針。在一些情況下，該組合物進一步包含：包含SEQ ID NO: 5之引子及包含SEQ ID NO: 6之引子。在一些情況下，該組合物進一步包含用於偵測肝特異性標記之包含SEQ ID NO: 7之可偵測標記探針。

【0085】 本文所提供之組合物可包含一對引子，其用於基於結腸特異性標記之甲基化狀態擴增肝特異性標記。結腸特異性標記可包含與SEQ ID NO: 8具有至少60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性之聚核苷酸序列。在一些情況下，該對引子包含：包含SEQ ID NO: 9之引子及包含SEQ ID NO: 10之引子。在一些情況下，該組合物進一步包含用於偵測結腸特異性標記之包含SEQ ID NO: 11的可偵測標記探針。在一些情況下，該組合物進一步包含：包含SEQ ID NO: 12之引子及包含SEQ ID NO: 13之引子。在一些情況下，該組合物進一步包含用於偵測結腸特異性標記之包含SEQ ID NO: 14的可偵測標記探針。

【0086】 VI. 生物樣本

【0087】 用於本文所提供之方法中之生物樣本可包括源自活個體或死個體之任何組織或物質。生物樣本可為無細胞樣本。生物樣本可包含核酸(例如DNA，例如基因體DNA或粒線體DNA或RNA)或其片段。樣本中之核酸可為無細胞核酸。樣本可為液體樣本或固體樣本(例如細胞或組織樣本)。生物樣本可為體液，諸如血液、血漿、血清、尿液、陰道液、來自(例如睪丸)水囊腫之液體、陰道沖洗液、胸膜液、腹水、腦脊髓液、唾液、汗液、淚液、痰液、支氣管肺泡灌洗液、乳頭排出液、來自身體不同

部位(例如甲狀腺、乳房)之抽吸液等。亦可使用糞便樣本。在各種實施例中，為獲得無細胞DNA而濃縮之生物樣本(例如，經由離心方案獲得之血漿樣本)中之大部分DNA可不含細胞(例如，大於50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%之DNA可不含細胞)。可處理生物樣本以便以物理方式使組織或細胞結構破裂(例如離心及/或細胞分解)，由此將胞內組分釋放至可另外含有酶、緩衝液、鹽、清潔劑及其用於製備樣本以供分析之類似者的溶液中。

【0088】 本文所提供之方法、組合物及系統可用於分析生物樣本中之核酸分子。核酸分子可為細胞核酸分子、無細胞核酸分子或該兩者。由如本文所提供之方法使用之無細胞核酸可為超出生物樣本中之細胞範圍外的核酸分子。無細胞核酸分子可存在於各種體液中，例如血液、唾液、精液及尿液。無細胞DNA分子可能由於各種組織中可由保健狀況及/或疾病(例如，腫瘤侵襲或生長、器官移植後之免疫排斥反應)引起之細胞死亡而產生。

【0089】 用於如本文所提供之方法中之無細胞核酸分子(例如無細胞DNA)可存在於血漿、尿液、唾液或血清中。無細胞DNA可天然地以短片段形式存在。無細胞DNA片段化係指藉以使高分子量DNA(諸如細胞核中之DNA)裂解、分裂或消化成短片段(此時產生或釋放無細胞DNA分子)的過程。本文所提供之方法、組合物及系統可用於在一些情況下分析細胞核酸分子，例如在患者具有白血病、淋巴瘤或骨髓瘤時分析來自腫瘤組織之細胞DNA或來自白血球之細胞DNA。根據本發明之一些實例，可對獲自腫瘤組織之樣本進行檢定及分析。

【0090】 VII. 個體

【0091】 本文所提供之方法、組合物及系統可用於分析來自個體(例如，生物體，例如宿主生物體)之樣本。該個體可為任何人類患者，諸如癌症患者、有患癌風險之患者或具有家族或個人癌症病史之患者。在一些情況下，個體處於癌症治療之特定階段。在一些情況下，個體可患有癌症或可被懷疑患有癌症。在一些情況下，個體是否患有癌症係未知的。

【0092】 個體可患有任何類型之癌症或腫瘤。在一實例中，個體可患有結腸癌或大腸癌。在另一實例中，個體可患有結腸直腸癌或結腸癌及直腸癌。在另一實例中，個體可患有肝癌，例如肝細胞癌。癌症之非限制性實例可包括(但不限於)腎上腺癌、肛門癌、基底細胞癌、膽管癌、膀胱癌、血癌、骨癌、腦腫瘤、乳癌、支氣管癌、心血管系統癌、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、消化系統癌、內分泌系統癌、子宮內膜癌、食道癌、眼癌、膽囊癌、胃腸腫瘤、肝細胞癌、腎癌、造血性惡性病、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、間皮瘤、肌肉系統癌、骨髓發育不良症候群(MDS)、骨髓瘤、鼻腔癌、鼻咽癌、神經系統癌、淋巴系統癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、陰莖癌、垂體瘤、前列腺癌、直腸癌、腎盂癌、生殖系統癌、呼吸系統癌、肉瘤、唾液腺癌、骨骼系統癌、皮膚癌、小腸癌、胃癌、睪丸癌、咽喉癌、胸腺癌、甲狀腺癌、腫瘤、泌尿系統癌、子宮癌、陰道癌或外陰癌。淋巴瘤可為任何類型之淋巴瘤，包括B細胞淋巴瘤(例如彌漫性大B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、小淋巴球性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴漿細胞性淋巴瘤、毛細胞白血病或原發性中樞神經系統淋巴瘤)或T細胞淋巴瘤(例如前體T-淋巴母細胞性淋巴瘤或外周T細胞淋巴瘤)。白血病可為任何類型之白血病，包括急性白血病或慢性白血病。白

血病之類型包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴球性白血病、急性未分化白血病或慢性淋巴球性白血病。在一些情況下，癌症患者未患特定類型之癌症。舉例而言，在一些情況下，患者可能患有不是乳癌的癌症。

【0093】 癌症之實例包括導致實體腫瘤之癌症以及不導致實體腫瘤之癌症。此外，本文提及之任何癌症可為原發癌(例如以其首先開始生長之身體部位命名的癌症)或繼發癌或轉移癌(例如起源於身體之另一部位的癌症)。

【0094】 藉由本文所描述之任一方法診斷之個體可為任何年齡且可為成人、嬰兒或兒童。在一些情況下，個體為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99歲，或在其範圍內(例如在2至20歲之間、在20至40歲之間或在40至90歲之間)。可能受益之特定類別的患者為40歲以上之患者。可能受益之另一特定類別的患者可為兒科患者。此外，藉由本文所描述之任一方法或組合物診斷之個體可為男性或女性。

【0095】 亦可對非人類個體(諸如，實驗室或農場動物)或源自本文所揭示之生物體之細胞樣本執行本文所揭示之方法中之任一者。非人類個體之非限制性實例包括犬、山羊、天竺鼠、倉鼠、小鼠、豬、非人類靈長

類動物(例如大猩猩、猿、猩猩、狐猴或狒狒)、大鼠、綿羊、牛或斑馬魚。

【0096】 如上文所論述，本發明方法、組合物及套組可用於處於癌症治療之各個階段之個體上。使用本發明方法、組合物及套組分析個體之生物樣本中之無細胞核酸的結果可用於指導個體之治療計劃。在一些情況下，可能需要用以治療或治癒個體之癌症的醫藥或療法。例示性治療選項可包括化療、放射線療法、腫瘤組織之手術移除、免疫療法、靶向療法、激素療法及幹細胞療法。在一些情況下，可提供關於選擇不同類型之治療選項的指導。在一些非限制性實例中，患者可能已完成第一癌症之治療，例如手術移除患病肝葉中之腫瘤組織，且可使用本發明方法、組合物或套組對患者進行常規監測測試，以便檢查肝癌是否復發或是否存在癌轉移。在此等情況下，可使用測試結果來提供關於患者是否將需要癌症之進一步治療的指導，且若發生肝癌復發或癌轉移至其他組織中，則提供關於可應用哪些治療選項的指導。在一些情況下，可提供關於治療之特定劑量或投與方案的指導。舉例而言，來自特定組織之無細胞核酸的量可與待投與給患者之醫藥之劑量相關，或與藥物投與之頻率/間隔(例如每天、每週、每兩周或每月)相關。在一些情況下，來自最後一次分析之結果可用作評價及設計治療選項及後繼監測分析之基礎。

【0097】 VIII.電腦系統

【0098】 本文所揭示之方法中之任一者可藉由一或多個電腦系統執行及/或控制。在一些實例中，本文所揭示之方法之任何步驟可全部地、單獨地或連續地由一或多個電腦系統執行及/或控制。本文所提及之電腦系統中之任一者可利用任何合適數目之子系統。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。

【0099】 子系統可經由系統匯流排互連。額外之子系統包括印表機、鍵盤、儲存裝置及耦接至顯示配接器之監視器。周圍裝置及耦接至I/O控制器之輸入/輸出(I/O)裝置可藉由此項技術中已知之任何數目之連接(諸如，輸入/輸出(I/O)埠(例如USB、FireWire®))連接至電腦系統。舉例而言，可使用I/O埠或外部介面(例如乙太網路、Wi-Fi等)將電腦系統連接至廣域網路路，諸如網際網路、滑鼠輸入裝置或掃描器。經由系統匯流排之互連允許中央處理器與各子系統通信並控制來自系統記憶體或儲存裝置(例如固定磁碟，諸如硬碟機，或光碟)之複數個指令的執行，以及資訊在子系統之間的交換。系統記憶體及/或儲存裝置可體現電腦可讀取媒體。另一子系統為資料收集裝置，諸如攝影機、麥克風、加速計及其類似者。本文所提及之任何資料可自一個元件輸出至另一個元件且可輸出至使用者。

【0100】 電腦系統可包括例如藉由外部介面或藉由內部介面連接在一起的複數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通信。在此等情況下，可將一台電腦視為用戶端且另一台電腦視為伺服器，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。

【0101】 本發明提供經程式化以實施本發明之方法的電腦系統。**圖10**展示經程式化或另外經組態以判定來自如本文所描述之生物體之組織的

無細胞核酸分子之絕對量的電腦系統101。電腦系統101可實施及/或調節本文所提供之方法之各種態樣，諸如，控制來自生物樣本之核酸分子之定序，執行如本文所描述之定序資料之生物資訊分析的各種步驟，整合資料收集、分析及結果報告，以及資料管理。電腦系統101可為使用者之電子裝置或相對於電子裝置遠距離定位之電腦系統。電子裝置可為行動電子裝置。

【0102】 電腦系統101包括中央處理單元(CPU，在本文中亦稱為「處理器」及「電腦處理器」) 105，其可為單核心或多核心處理器或用於並行處理之複數個處理器。電腦系統101亦包括記憶體或記憶體位置110 (例如隨機存取存儲器、唯讀記憶體、快閃記憶體)、電子儲存器單元115 (例如硬碟)、用於與一或多個其他系統通信之通信介面120 (例如網路配接器)及周邊裝置125，諸如高速緩存、其他記憶體、資料儲存及/或電子顯示器配接器。記憶體110、儲存單元115、介面120及周邊裝置125經由通信匯流排(實線)，諸如母板與CPU 105通信。儲存單元115可為用於儲存資料之資料儲存單元(或資料儲存庫)。電腦系統101可藉助於通信介面120可操作地耦接至電腦網路(「網路」) 130。網路130可為網際網路，網際網路及/或商際網路，或與網際網路通信之企業內部網路及/或商際網路。在一些情況下，網路130係電信及/或資料網路。網路130可包括一或多個電腦伺服器，其可實現分佈式計算，諸如雲端計算。在一些情況下，網路130藉助於電腦系統101可實施同級間網路，其可使耦接至電腦系統101之裝置能夠表現為用戶端或伺服器。

【0103】 CPU 105可執行可體現於程式或軟體中之一連串機器可讀取指令。指令可儲存於諸如記憶體110之記憶體位置中。指令可針對CPU

105，其可隨後程式化或另外組態CPU 105以實施本發明之方法。藉由CPU 105執行之操作之實例可包括提取、解碼、執行及寫回。

【0104】 CPU 105可為諸如積體電路之電路之部分。系統101之一或多個其他組件可包括於該電路中。在一些情況下，電路為特殊應用積體電路(ASIC)。

【0105】 儲存單元115可儲存檔案，諸如驅動程式、程式庫及保存的程式。儲存單元115可儲存使用者資料，例如使用者偏好及使用者程式。在一些情況下，電腦系統101可包括一或多個額外資料儲存單元，其處於電腦系統101外部，諸如位於經由企業內部網路或網際網路與電腦系統101通信之遠端伺服器上。

【0106】 電腦系統101可經由網路130與一或多個遠端電腦系統通信。舉例而言，電腦系統101可與使用者之遠端電腦系統(例如，安裝有接收或顯示自電腦系統101發送之樣本分析之結果的應用程式的智慧型手機)通信。遠端電腦系統之實例包括個人電腦(例如可攜帶式PC)、平板(slate/tablet) PC (例如Apple® iPad、Samsung® Galaxy Tab)、電話、智慧型電話(例如Apple® iPhone、Android功能裝置、Blackberry®)或個人數位助理。使用者可經由網路130訪問電腦系統101。

【0107】 如本文所描述之方法可藉助於儲存於電腦系統101之電子儲存位置上，諸如儲存於記憶體110或電子儲存單元115上的機器(例如電腦處理器)可執行碼實施。機器可執行或機器可讀碼可呈軟體形式來提供。在使用期間，可藉由處理器105執行程式碼。在一些情況下，程式碼可自儲存單元115中擷取且儲存於記憶體110上，以供處理器105進行備用存取。在一些情形下，可排除電子儲存單元115，且機器可執行指令儲存

於記憶體110上。

【0108】 程式碼可進行預編譯，且其組態係用於與具有適用於執行該程式碼之處理器之機器一起使用，或可在運行時間期間編譯。該程式碼可呈選擇用於使程式碼能夠以預編譯或剛編譯方式來執行之程式設計語言形式來供應。

【0109】 本文所提供之系統及方法之態樣(諸如電腦系統101)可由程式設計具體實施。技術之各個態樣可被認為係通常呈機器(或處理器)可執行碼及/或攜載於一種類型之機器可讀取媒體上或可於一種類型之機器可讀取媒體中具體實施之相關資料形式的「產品」或「製品」。機器可執行碼可儲存於電子儲存單元(諸如，記憶體(例如唯讀記憶體、隨機存取存儲器、快閃記憶體)或硬碟)上。「儲存」媒體可包括電腦之有形記憶體、處理器或類似者，或其相關模組(諸如各種半導體記憶體、磁帶機、磁碟機及類似者)中之任一者或全部，其可提供任何時間之非暫時性儲存以用於軟體程式設計。軟體之全部或部分可時常經由網際網路或各種其他電信網路來通信。該等通信例如可以讓軟體從一個電腦或處理器加載至另一者中，例如從管理伺服器或主電腦加載至應用程式伺服器之電腦平台中。因此，可承載軟體元件之另一類型之媒體包括諸如跨越本端裝置之間的實體介面、經由有線及光學陸上通訊網路及越過各種空中線路來使用之光波、電波及電磁波。攜載該等波之物理元件，諸如有線或無線線路、光學線路或其類似者，亦可被視為承載軟體之媒體。如本文所使用，除非限於非暫時性有形「儲存」媒體，否則諸如電腦或機器「可讀媒體」之術語係指參與提供指令給處理器以用於執行之任何媒體。

【0110】 因此，機器可讀媒體，諸如電腦可執行碼，可採用許多形

式，包括(但不限於)有形儲存媒體、載波媒體或實體傳輸媒體。非揮發性儲存媒體包括(例如)光碟或磁碟，諸如任何電腦或類似者中之儲存裝置中之任一者，其諸如係可用於實施圖式中所示之資料庫等。揮發性儲存媒體包括動態記憶體，諸如此類電腦平台之主記憶體。有形的傳輸媒體包括同軸電纜；銅線及光纖，包括包含電腦系統內之匯流排的電線。載波傳輸媒體可採用以下形式：電信號或電磁信號，或聲波或光波，諸如在射頻(RF)及紅外線(IR)資料通信期間所產生之聲波或光波。因此，常見形式之電腦可讀媒體包括(例如)：軟碟、軟性磁碟、硬碟、磁帶、任何其他磁性媒體、CD-ROM、DVD或DVD-ROM、任何其他光學媒體、打孔卡紙帶、具有孔洞圖案之任何其他實體儲存媒體、RAM、ROM、PROM及EPROM、FLASH-EPROM、任何其他記憶體晶片或匣、傳送資料或指令之載波、傳送此類載波之電纜或線路，或電腦可自其讀取程式碼及/或資料之任何其他媒體。許多此等形式之電腦可讀媒體可參與將一或多個指令之一或多個序列攜載至處理器以供執行。

【0111】 電腦系統101可包括電子顯示器135或與電子顯示器135通信，該電子顯示器135包含使用者介面140，其用於提供例如樣本分析之結果，諸如但不限於以下之圖解顯示：來自不同組織之無細胞核酸之相對量及/或絕對量、來自某些組織之無細胞核酸之對照量或參考量、所偵測量與參考量之間的比較及癌轉移之存在或不存在的讀出。UI之實例包括(但不限於)圖形使用者介面(GUI)及基於網站之使用者介面。

【0112】 本發明之方法及系統可藉助於一或多個演算法來實施。演算法在由中央處理單元105執行時可藉助於軟體來實施。演算法可例如控制來自樣本之核酸分子之定序、導入定序資料之收集、分析定序資料或基

於定序資料之分析判定病理學之分類。

【0113】 在一些情況下，如圖11中所示，樣本202可自個體201（諸如人類個體）獲得。樣本202可經受如本文所描述之一或多種方法，諸如執行檢定。在一些情況下，檢定可包含雜交、擴增、定序、標記、表觀遺傳修飾鹼基或其任何組合。方法之一或多個結果可輸入至處理器204中。諸如樣本鑑別、個體鑑別、樣本類型、參考或其他資訊之一或多個輸入參數可輸入至處理器204中。來自檢定之一或多個量度可輸入至處理器204中，使得該處理器可產生結果，諸如病理學之分類（例如診斷）或治療建議。處理器可將結果、輸入參數、量度、參考或其任何組合發送至顯示器205，諸如視覺顯示器或圖形使用者介面。處理器204可(i)將結果、輸入參數、量度或其任何組合發送至伺服器207，(ii)自伺服器207接收結果、輸入參數、量度或其任何組合，(iii)或其組合。

【0114】 本發明之態樣可以控制邏輯之形式使用硬體（例如，特殊應用積體電路或場可程式化閘陣列）及/或使用電腦軟體，利用大體可程式化處理器以模組化或整合方式實施。如本文中所使用，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。基於揭示內容及本文所提供之教示，一般熟習此項技術者應知道及瞭解使用硬體及硬體與軟體之組合來實施本文所描述之實施例的其他方式及/或方法。

【0115】 本申請案中描述之任何軟體組件或功能可實施為待由使用任何合適之電腦語言（諸如，Java、C、C++、C#、Objective-C、Swift）或腳本語言（諸如Perl或Python）的處理器使用（例如）習知或物件導向式技術來執行的軟體程式碼。軟體程式碼可儲存為電腦可讀取媒體上之一系列指

令或命令以用於儲存及/或傳輸。合適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，諸如緊密光碟(CD)或DVD(數位化通用光碟)、快閃記憶體，及其類似者。電腦可讀取媒體可為此類儲存或傳輸裝置之任何組合。

【0116】 此類程式亦可使用適用於經由符合多種協定之有線、光學及/或無線網路(包括網際網路)傳輸的載波信號來編碼及傳輸。因此，電腦可讀取媒體可使用以該等程式編碼的資料信號建立。以程式碼編碼之電腦可讀取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駐留在單一電腦產品(例如硬碟機、CD或整個電腦系統)上或其內，且可存在於系統或網路內之不同電腦產品上或其內。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測器、印表機或其他合適之顯示器。

【0117】 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，該一或多個處理器可經組態以執行該等步驟。因此，實施例可係關於經組態以執行本文所描述之方法中之任一者之步驟的電腦系統，其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，此等步驟之部分可與其他方法之其他步驟之部分一起使用。又，所有或部分步驟可為任選的。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、電路或其他方法來執行。

實例

【0118】 以下實例進一步說明所描述實施例而不限制本發明之範

疇。

【0119】 實例1.物質及方法

【0120】 此實例描述用於實例2至5之若干方法。

【0121】 個體

【0122】 募集在訪視香港威爾士親王醫院外科部之肝移植診所期間的此前經歷肝移植之患者。自香港威爾士親王醫院之醫學及治療科募集患有慢性B型肝炎病毒(HBV)感染及肝硬化之患者。自香港威爾士親王醫院之外科部及臨床腫瘤科募集患有肝細胞癌(HCC)及CRC之患者。所募集之個體之人口統計資料經展示於表2中。所有募集個體給予書面同意書。此研究經新界東集群醫院管理局-香港中文大學臨床研究倫理委員會聯合會批准。

表2.在研究中分析之個體之人口統計資料。

健康及疾病狀態	數目	性別 (M:F)	年齡 中值(範圍)
健康個體	30	16 : 14	57 (26 - 73)
肝移植受體	13	12 : 1	67 (54 - 73)
HCC患者	40	36 : 4	60 (39 - 82)
HBV帶原者	20	20 : 0	52 (43 - 77)
肝硬化患者	9	9 : 0	62 (53 - 75)
存在肝癌轉移之CRC患者	27	20 : 7	62 (34 - 78)
不存在肝癌轉移之CRC患者	35	18 : 17	67 (51 - 83)

【0123】 樣本製備

【0124】 對於各個體，將10 mL末梢血液收集至含有EDTA之導管中。在採血後6小時內處理血液樣本以用於分離血漿及膚色血球層。根據製造商之方案，用QIAamp DSP DNA小型套組(Qiagen)自血漿提取DNA。自2至4 mL血漿提取之DNA經歷兩輪使用Epitect Plus Bisulfite套組(Qiagen)進行之亞硫酸氫鹽處理。經亞硫酸氫鹽轉化之DNA溶離於50 μ L水中以用於下游分析。

【0125】 肝特異性及結腸特異性甲基化標記之鑑別

【0126】 將所關注之組織(亦即肝臟或結腸)之甲基化概況與其他血球及組織之彼等甲基化概況進行比較，以挖掘組織特異性甲基化標記。自路線圖表觀基因組項目之資料庫針對肺、食道、小腸、結腸、胰臟、膀胱、心臟及肝臟擷取不同單元類型之甲基化概況，且自BLUEPRINT項目之資料庫擷取紅血球母細胞、嗜鹼性球、B淋巴球及T淋巴球之甲基化概況。

【0127】 建立用於甲基化標記之以下準則。

【0128】 1. 若CpG位點之甲基化密度在目標組織中>50%且在其他血球及組織中<20%，則CpG位點經定義為在目標組織(亦即肝臟或結腸)中高甲基化。

【0129】 2. 一段至少5個高甲基化之CpG位點將處於分化甲基化區域(DMR)內，以改良後者之信號對雜訊比及甲基化標記之分析特異性。

【0130】 3. DMR應短於166 bp，係因為大部分循環DNA分子為短片且峰值大小為166 bp。

【0131】 肝臟及結腸之DMR

【0132】 使用以上準則，鑑別一個肝特異性標記及一個結腸特異性標記。肝特異性DMR位於染色體8上之蛋白酪胺酸激酶2β (PTK2B)基因之外顯子區域中。肝特異性DMR內之八個CpG位點在肝臟中高甲基化但在其他組織及血球中低甲基化(圖7)。PTK2B基因位於染色體8上且CpG位點之基因組座標顯示在圖7之X軸上。與其他組織相比，位於DMR (兩個豎直點線之間的區域)內之所有八個CpG位點係針對肝臟而高甲基化。以黃色突出顯示之區域含有在數位PCR檢定之螢光探針內之三CpG位點

(參見表3)。在DMR內之突出顯示區域之各側上之其他CpG位點由數位PCR檢定之引子覆蓋。結腸特異性DMR處於染色體11上之Sestrin 3 (SESN3)基因之外顯子區域內。結腸特異性DMR內之所有六個CpG位點在結腸組織中高甲基化(圖8)但在其他組織中低甲基化。SESN3位於染色體11上且CpG位點之基因組座標顯示在圖8之X軸上。與其他組織相比，位於DMR (兩個豎直點線之間的區域)內之所有六個CpG位點係針對結腸而高甲基化。位於以黃色突出顯示之區域內之三個CpG位點由結腸特異性甲基化檢定之螢光探針覆蓋(參見表3)。在DMR內之突出顯示區域之各側上之其他CpG位點由數位PCR檢定之引子覆蓋。出於說明之目的，圖7及圖8中並未展示出肝臟、膀胱、食道、心臟、肺、胰臟及小腸之個別結果，其平均值由「其他組織」表示。

【0133】液滴式數位PCR設計及效能

【0134】開發兩個液滴式數位PCR檢定以定量肝特異性及結腸特異性甲基化標記中之各者中的甲基化及未甲基化DNA分子。用於檢定之引子及探針之序列列出於表3中(引子及探針中之加下劃線之核苷酸係在CpG位點處之不同甲基化胞嘧啶)。兩個液滴式數位PCR檢定可使用分別經FAM及VIC標記之探針定量甲基化(來自目標組織)及未甲基化(來自非目標組織)。肝特異性標記為PTK2B基因標記位點(chr8: 27,183,116-27,183,176)，且結腸特異性標記為SESN3基因標記位點(chr11:94,965,508-94,965,567)。

【0135】對於各樣本，數位PCR分析一式兩份地進行。製備總體積為20 μ l的反應混合物，其含有8 μ l經亞硫酸氫鹽轉化之DNA，最終濃度為450 nM之正向引子及反向引子中之各者，250 nM未甲基化特異性探針

及350 nM(肝檢定)或250 nM(結腸檢定)的甲基化特異性探針以用於結腸檢定。在PCR反應之前使用BioRad QX200 ddPCR小滴發生器將反應混合物用於小滴產生。通用甲基化DNA (來自EMD Millipore之CpGenome人類甲基化DNA)及通用未甲基化DNA (來自Qiagen之EpiTect未甲基化人類對照DNA)係作為陽性及陰性對照在各培養盤上運行。熱分佈為：95°C，持續10分鐘，接著45個94°C循環，持續15秒，且60°C (肝臟檢定)或56°C (結腸檢定)，持續1分鐘，且在98°C最終培育10分鐘。PCR後，藉由QX200小滴讀取器分析各樣本之小滴且使用QuantaSoft (1.7版)軟體解釋結果。參考對照測定陽性螢光信號之截止值。使用重複孔之合併計數計算各樣本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)。血漿中之甲基化或未甲基化DNA序列之濃度的計算如下：

$$Cr = -\ln\left(1 - \frac{P}{R}\right) \times \left(\frac{V_e}{V_d}\right)$$

其中Cr表示血漿中之目標分子(亦即，甲基化或未甲基化之DNA序列)之濃度，P表示含有經靶向分子(甲基化或未甲基化之DNA序列)之經放大信號的小滴之數目，R表示所分析之總小滴之數目(存在及不存在經放大信號)，V_d表示小滴之平均體積(亦即，在當前實例中為0.9×10⁻³ μL)，且V_e表示用於實驗之血漿之體積(亦即，在當前實例中為320 μL)。

如下：

表3.用於數位PCR檢定之寡核苷酸序列

引子/探針/標記	序列(5'-3')	SEQ ID NO
<i>PTK2B</i> 基因標記位點	CGGCCGACTTACCTGTACTTGCCGCCGTCCCGGCTCA CCTGGCGGTGCCCGAGGAGTAGTC	1
甲基化之檢定(用於肝源性DNA)		
正向引子(F1)	TTTATTGTTCGGTTCGATTATTTGTA	2
反向引子(R1)	AACGACTACTCCTCGAACACCG	3
螢光探針(P1)	5'-FAM-TTGTTCGGTTCGGTT-MGB-3'	15
螢光探針(P1)序列	TTGTTCGGTTCGGTT	4

未甲基化之檢定(用於非肝源性DNA)		
正向引子(F2)	TGTATATTTATTTGTTTGGTIGATTATTTGTA	5
反向引子(R2)	CCAACA <u>ACTACTCCTCA</u> AAACACCA	6
螢光探針(P2)	5'-VIC-TTTGTT <u>IGTTIGTTT</u> IGGTTTA-MGB-3'	16
螢光探針(P2)序列	TTTGTT <u>IGTTIGTTT</u> IGGTTTA	7
<i>SESN3</i> 基因標記位點		
	CGCAACCTGCTCCCGAGTGAGAACAAAGGCCGGCG CAGAGCGAGAACCTGATTGGTGCC	8
甲基化之檢定(用於結腸源形DNA)		
正向引子(F1)	<u>CGTAATTTGTTTT</u> CGAGTGAGAATAA	9
反向引子(R1)	AAAAACCGAACACCAATCAAATTC	10
螢光探針(P1)	5'-FAM-T <u>CGGC</u> GTAGAG <u>CGA</u> -MGB-3'	17
螢光探針(P1)序列	<u>T</u> CGGC <u>G</u> TAGAG <u>C</u> G <u>A</u>	11
未甲基化之檢定(用於非結腸源性DNA)		
正向引子(F2)	GTT <u>IGTAATTTGTTTT</u> IGAGTGAGAATAA	12
反向引子(R2)	AAAAACCA <u>AACACCAATCAAATTC</u>	13
螢光探針(P2)	5'-VIC-AGGT <u>IGGTIGTAGAGT</u> GA-MGB-3'	18
螢光探針(P2)序列	AGGT <u>IGGTIGTAGAGT</u> GA	14

【0136】 來自不同類型之樣本之DNA的分析

【0137】 自香港威爾士醫院解剖及細胞病理學科取回10種類型之組織(例如肝、肺、食道、胃、小腸、結腸、胰臟、膀胱、心臟及大腦)之福馬林固定之石蠟包埋(FFPE)樣本。確認此等組織在組織學檢查上係正常的。自健康個體收集膚色血球層樣本。使用QIAamp DNA微型套組(Qiagen)自FFPE組織提取DNA。使用QIAamp DNA血液微型套組(Qiagen)自膚色血球層提取DNA。使用1 µg細胞DNA執行亞硫酸氫鹽轉化。經轉化DNA溶離於20 µL水中且經稀釋50倍以用於下游分析。

【0138】 肝移植受體之血漿中之供體源性DNA之量測

【0139】 分析自供體之肝臟組織及受體之膚色血球層提取之DNA，以使用Illumina iScan系統來判定供體及受體之基因型資訊。針對各受體自4 mL血漿提取之DNA用於定序文庫製備。遵循製造商之說明書，使用KAPA文庫製備套組(KAPA Biosystems)來製備血漿DNA定序文庫。隨後使用Illumina HiSeq 2500平台對編索引之文庫進行多工及定序(75×2個循

環)。獲得各樣本之至少2千萬個成對端讀段。使用短寡核苷酸對準程式2 (SOAP2)將成對端讀段與非重複遮蔽人類參考基因組(GRCh 37/hg 19)對準。僅包括成對端讀段，其中兩端使用正確定向對準至同一染色體且對準至人類基因組之單一位置。擷取跨越 ≤ 600 bp之插件大小的成對端讀段以供分析。若超過一對讀段映射至同一基因組位置(亦即，重複讀段)，則保留僅一對讀段以供後續分析。針對成對端讀段中之任一成員允許至多兩個核苷酸錯配。循環中之供體特異性DNA之分數濃度係藉由對具有在受體中同種接合及在供體中異種接合之單核苷酸多形現象(SNP)對偶基因之定序讀段計數來測定。

【0140】 實例2.肝臟及結腸標記之組織特異性

【0141】 對於肝特異性及結腸特異性標記，源自目標組織之DNA分子將經高甲基化且源自非目標組織之彼等DNA分子將經低甲基化。因此，經甲基化之總分子之百分比在肝臟檢定中經指定為L%且經甲基化之總分子之百分比在結腸檢定中經指定為C%。為了確認肝臟及結腸標記之特異性，使用此兩個PCR檢定裝置分析自膚色血球層樣本及10種類型之正常組織提取之DNA。對於各類型之組織，包括來自不同個人之4個樣本。

【0142】 肝臟組織之平均L%為67% (範圍：57%至76%)且其他組織類型之平均L%為0.6% (範圍：0.0%至2.2%)。各組織類型之結果概述於表4中。此等結果表明，肝臟檢定能夠具體偵測肝源性DNA。

表4.肝源性DNA之平均分數濃度(L%)及結腸源性DNA之平均分數濃度(C%)

組織	平均L%	平均C%
肝臟	67	0.8
結腸	0.4	22
大腦	1.9	0.8
食道	0.3	1.4

心臟	0.6	0.2
肺	0.3	1.4
胰臟	0.3	0.9
小腸	0.3	4.1
胃	0.1	1.3
膀胱	2.2	1.3
膚色血球層	0.0	0.1

【0143】結腸組織之平均C%為22% (範圍：17%至33%)。所有其他組織之平均C%為1.2% (範圍：0.1%至4.1%)，其指示甲基化序列之特異性為結腸源性的。結腸組織中之相對低C%很可能係由結腸組織之非均質細胞組成引起。在將同一分析用於比較帶有不同疾病狀態之個體的等級時，結腸組織中之此相對低C%將不會明顯妨礙其臨床應用。

【0144】 實例3.肝移植受體中之肝源性DNA之血漿濃度

【0145】經由分析肝移植受體之血漿來驗證肝特異性分析之定量準確性。在此等個體中，可使用次世代定序自攜載供體特異性對偶基因之血漿DNA分子之比例準確判定源自經移植肝臟之DNA之分數濃度。藉由肝特異性甲基化標記及定序兩者分析自接受肝移植之13個患者收集之14個血漿樣本。在藉由此兩種方法($R=0.99$ ， $P<0.0001$ ，皮爾遜相關，圖2)測定之濃度之間觀察到正線性關係，指示肝特異性甲基化標記可準確反映血漿中之肝源性DNA之濃度。

【0146】如此處所證實，根據肝特異性甲基化標記對肝臟DNA濃度之貢獻百分比之量測與基於供體特異性對偶基因之量測的結果緊密相關。此等結果確定肝特異性標記在反映血漿中之肝源性DNA之濃度方面的準確性。

【0147】 實例4.HCC患者之血漿中之增加的肝源性DNA

【0148】40位HCC患者、9位肝硬化患者、20位慢性HBV帶原者及30位健康個體中之肝源性DNA之絕對及分數濃度係藉由靶向具有肝特異

性甲基化模式之序列之數位PCR來測定。

【0149】 健康個體、慢性HBV帶原者、肝硬化患者及HCC患者之肝源性甲基化序列之中值濃度分別為40個副本/mL (四分位數範圍(IQR):18-86)、122個副本/mL (IQR:47-185)、118個副本/mL (IQR:86-159及487 (IQR:138-1151) (圖3A)。濃度在4組之間明顯不同($P < 0.001$ ，克拉斯卡瓦立檢定)。在事後分析中，HCC患者之肝源性DNA之血漿濃度明顯高於健康個體 ($P < 0.001$ ，鄧恩檢定)及慢性HBV帶原者($P = 0.015$ ，鄧恩檢定)但不高於肝硬化患者組($P = 0.248$ ，鄧恩檢定)。健康個體、慢性HBV帶原者及肝硬化患者之濃度在統計上沒有不同($P > 0.05$ ，鄧恩檢定)。

【0150】 健康個體、慢性HBV帶原者、肝硬化患者及HCC患者之血漿中之肝源性DNA之中值分數濃度分別為1.4% (IQR: 0.94%-3.2%)、4.6% (IQR: 1.7%-6.0%)、3.0% (四分位數範圍：1.8%-7.3%)及9.4% (IQR: 4.1%-16.0%) (圖3B)。分數濃度在4組之間明顯不同($P < 0.001$ ，克拉斯卡瓦立檢定)。在事後分析中，HCC患者之肝源性DNA之血漿濃度明顯高於健康個體($P < 0.001$ ，鄧恩檢定)，但不高於慢性HBV帶原者($P = 0.129$ ，鄧恩檢定)及肝硬化患者($P = 0.592$ ，鄧恩檢定)。健康個體、慢性HBV帶原者及肝硬化患者之濃度在統計上並無不同。

【0151】 此等結果表明，血漿中之肝源性DNA之絕對濃度及分數濃度兩者之分析可將HCC患者與非HCC患者(包括健康個體、慢性HBV帶原者及肝硬化患者)進行區分。為進一步判定絕對或分數濃度是否將更好地用於區別HCC個體與非HCC個體，執行接收者操作特性(ROC)曲線分析(圖9)。絕對濃度及分數濃度之曲線下面積(AUC)分別為0.82及0.78 AUC之差係統計上顯著的($P=0.022$ ，迪隆檢定)。

【0152】 進一步分析HCC患者中之血漿中之肝源性DNA之濃度(絕對及分數濃度)與腫瘤之最大尺寸(藉由電腦斷層攝影術掃描測定或腫瘤切除後量測)之間的相關性。引起關注地，腫瘤之最大尺寸展示出，與分數濃度之正相關($R = 0.56$, $P = 0.0002$, 斯皮爾曼相關)相比，與絕對濃度之正相關($R = 0.74$, $P < 0.0001$, 斯皮爾曼相關)較強(圖4A及圖4B)。肝源性DNA之濃度展示出與HCC患者中之腫瘤之最大尺寸之正相關，其指示自肝臟釋放之DNA的量將反映腫瘤負載。

【0153】 實例5.對存在及不存在肝癌轉移之CRC患者中之肝源性及結腸源性DNA之分析

【0154】 量測30位健康個體、不存在肝轉移之35位CRC患者及存在肝轉移之27位CRC患者中之肝源性及結腸源性DNA的血漿濃度。三個組之結腸源性DNA之中值血漿濃度分別為0個複本/毫升(IQR: 0 - 0)、4個複本/毫升(IQR: 0 - 31)及138個複本/毫升(IQR: 0 - 6850) (圖5A)。濃度在三個組之間明顯不同($P < 0.001$, 克拉斯卡瓦立檢定)。在事後分析中，存在及不存在肝轉移之CRC患者之濃度明顯高於健康個體(分別為 $P < 0.001$ 及 $P = 0.042$, 鄧恩檢定)。存在及不存在肝轉移之CRC患者之間的差異並非係統計上顯著的($P = 0.079$, 鄧恩檢定)。

【0155】 健康對照個體、不存在肝轉移之CRC患者及存在肝轉移之CRC患者之血漿中之結腸源性DNA之中值分數濃度分別為0% (IQR: 0% - 0%)、0.09% (IQR: 0% - 1.1%)及0.84% (IQR: 0% - 49.5%) (圖5B)。分數濃度在三個組之間明顯不同($P < 0.001$, 克拉斯卡瓦立檢定)。在事後分析中，存在及不存在肝轉移之CRC患者之濃度明顯高於健康個體(分別為 $P < 0.001$ 及 $P = 0.041$, 鄧恩檢定)。存在及不存在肝轉移之CRC患者之間的

差異並非係統計上顯著的($P=0.084$ ，鄧恩檢定)。

【0156】 健康對照個體、不存在肝轉移之CRC患者及存在肝轉移之CRC患者之血漿中之肝源性DNA之中值濃度分別為40個複本/毫升(IQR: 18 - 86)、23個複本/毫升(IQR: 13 - 108)及233個複本/毫升(IQR: 56 - 2290) (圖5C)。分數濃度在3個組之間明顯不同($P < 0.001$ ；克拉斯卡瓦立檢定)。在事後分析中，存在肝轉移之CRC患者之濃度明顯高於不存在肝轉移之CRC患者及健康對照(分別為 $P < 0.001$ 及 $P < 0.001$ ，鄧恩檢定)。引起關注地，在不存在肝轉移之患者與健康對照之間不存在顯著差異($P=1.0$ ，鄧恩檢定)。

【0157】 健康對照個體、不存在肝轉移之CRC患者及存在肝轉移之CRC患者之血漿中之肝源性DNA之中值分數濃度分別為0.8% (IQR: 0.3% - 2.8%)、1.4% (IQR: 0.9% - 3.3%)及3.1% (IQR: 1.5% - 5.3%) (圖5D)。分數濃度在三個組之間明顯不同($P < 0.001$ ，克拉斯卡瓦立檢定)。在事後分析中，存在肝轉移之CRC患者之濃度明顯高於不存在肝轉移之CRC患者($P < 0.003$ ，鄧恩檢定)。健康個體之分數濃度在統計上明顯不同於存在及不存在肝轉移之CRC患者(分別為 $P = 0.114$ 及 $P = 0.717$)。

【0158】 當在存在及不存在肝轉移之CRC患者之間觀察到血漿中之肝源性及結腸源性DNA之絕對濃度與分數濃度方面的顯著差異時，使用ROC曲線分析來判定哪一參數將最適用於區別兩個組。肝源性DNA之絕對及分數濃度之AUC分別為0.85及0.75 ($P=0.01$ ，迪隆檢定)，且結腸源性DNA之絕對及分數濃度之AUC分別為0.69及0.69 ($P=0.75$ ，迪隆檢定) (圖6)。

【0159】 在ROC分析中區別存在及不存在肝轉移之CRC患者方面，

肝源性DNA之絕對濃度之分析優於分數濃度(AUC: 0.85相對0.75, $P = 0.01$, 圖6), 不希望受理論束縛, 可能的解釋是, 在CRC轉移至肝臟之一些患者中, 肝源性及結腸源性DNA兩者之絕對濃度將增加。在一些患者中, 儘管肝源性DNA之絕對濃度增加, 但肝臟之分數濃度仍保持不變或由於結腸源性DNA之較大增長而減小。類似地, 亦展示出, 相較於分數濃度, 肝源性DNA之絕對濃度與腫瘤大小之相關性較好($R = 0.74$ 相對0.56, 斯皮爾曼相關, 圖4)。

【0160】 雖然已在本文中展示並描述本發明之較佳實施例, 但對於熟習此項技術者應顯而易見, 此等實施例僅以舉例方式提供。熟習此項技術者現將在不背離本發明之情況下想到許多變化、改變及取代。應理解, 本文中所描述的本發明之實施例之各種替代例可在實踐本發明時使用。預期以下申請專利範圍界定本發明之範疇, 且因此涵蓋在此等申請專利範圍及其等效物之範疇內的方法及結構。

【符號說明】

【0161】

- 101 電腦系統
- 105 中央處理單元
- 110 記憶體或記憶體位置
- 115 電子儲存器單元
- 120 通信介面
- 125 周邊裝置
- 130 電腦網路
- 135 電子顯示器

- 140 使用者介面
- 201 個體
- 202 樣本
- 204 處理器
- 205 顯示器
- 207 伺服器

【補充序列表】

<110> 美商格瑞爾公司	
<120> 組織特異性甲基化標記	
<130> 50251-829.601	
<140> TW 108108991	
<141> 2019-03-15	
<150> 62/769,928	
<151> 2018-11-20	
<150> 62/643,649	
<151> 2018-03-15	
<160> 18	
<170> PatentIn version 3.5	
<210> 1	
<211> 61	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 1	
cggccgactt acctgtactt gcgcgcgtcc cggtcacct ggcggtgccc gaggagtagt	60
c	61
<210> 2	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人H序列	
<220>	
<223> 人H序列之描述：合成引子	
<400> 2	
tftatttggt cggtcgattt atttgta	27
<210> 3	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人H序列	
<220>	
<223> 人H序列之描述：合成引子	
<400> 3	
aacgactact cctcgaacac cg	22
<210> 4	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人H序列	
<220>	
<223> 人H序列之描述：合成探針	
<400> 4	
ttgtcgtcgt ttcggtt	17

<p><210> 5 <211> 33 <212> DNA <213> 人口序列</p> <p><220> <223> 人口序列之描述：合成引子</p>	
<p><400> 5 tgtatattta tttgtttggt tgatttattt gta</p>	33
<p><210> 6 <211> 24 <212> DNA <213> 人口序列</p> <p><220> <223> 人口序列之描述：合成引子</p>	
<p><400> 6 ccaacaacta ctectcaaac acca</p>	24
<p><210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人口序列</p> <p><220> <223> 人口序列之描述：合成探針</p>	
<p><400> 7 tttgttggtt ttttggttta</p>	20
<p><210> 8 <211> 60 <212> DNA <213> 智人</p> <p><400> 8 cgcaacctgc tcccgagtga gaacaaaggc cggcgcagag cgagaacctg attggtgccc</p>	60
<p><210> 9 <211> 26 <212> DNA <213> 人口序列</p> <p><220> <223> 人口序列之描述：合成引子</p>	
<p><400> 9 cgtaatttgt tttcgagtga gaataa</p>	26
<p><210> 10 <211> 24 <212> DNA <213> 人口序列</p> <p><220> <223> 人口序列之描述：合成引子</p>	

<400> 10 aaaaaccgaa caccaatcaa attc	24
<210> 11 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成探針	
<400> 11 tcggcgtaga gcga	14
<210> 12 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成引子	
<400> 12 gtttgtaatt tgttttggag tgagaataa	29
<210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成引子	
<400> 13 aaaaaccaaa caccaatcaa attc	24
<210> 14 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成探針	
<400> 14 aggttggtgt agagtga	17
<210> 15 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成探針	
<400> 15 ttgtcgtcgt ttcggtt	17

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成探針

<400> 16
tttgtgttg ttttggttta 20

<210> 17
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成探針

<400> 17
tcggcgtaga gcga 14

<210> 18
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成探針

<400> 18
aggltggtgt agagtga 17

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種判定具有來源組織之癌症是否已在生物體中轉移至第一非癌症組織處之方法，該方法包含：

(a) 自該生物體之第一生物樣本獲得無細胞DNA分子；

(b) 對該等無細胞DNA分子執行分析，以判定該等無細胞DNA分子中之目標序列之第一甲基化狀態，其中該目標序列之第一甲基化狀態指示含有該目標序列之無細胞DNA分子係來自該第一非癌症組織，其中該第一非癌症組織與該來源組織不同；

(c) 自包含具有該第一甲基化狀態之目標序列之第一生物樣本判定無細胞DNA分子之絕對量；及

(d) 基於該絕對量判定該生物體是否在該第一非癌症組織處具有該癌症。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該分析包含：

(a) 自該第一生物樣本分離包含該目標序列之無細胞DNA分子；

(b) 分離油乳液中之包含該目標序列之無細胞DNA分子；

(c) 使該無細胞DNA分子中之未甲基化之胞嘧啶殘基經亞硫酸氫鹽轉化為尿嘧啶；或

(d) 執行來自該第一生物樣本之無細胞DNA分子之甲基化感知定序。

【第3項】

如請求項1之方法，其中該分析包含使包含該目標序列之無細胞DNA

分子與探針雜交。

【第4項】

如請求項3之方法，其中：

- (a) 該探針與該目標序列雜交之親和力取決於該第一生物樣本中之目標序列之第一甲基化狀態；
- (b) 當該第一生物樣本中之該目標序列之甲基化位點甲基化時，該探針與該目標序列雜交；
- (c) 當該第一生物樣本中之該目標序列之甲基化位點未經甲基化時，該探針與該目標序列雜交；或
- (d) 該分析包含偵測該探針與該目標序列之雜交。

【第5項】

如請求項1之方法，其中該分析包含擴增該無細胞DNA分子。

【第6項】

如請求項5之方法，其中：

- (a) 該擴增包含使用一對引子；
- (b) 該對引子中之至少一個引子與該目標序列之雜交的親和力取決於該目標序列之第一甲基化狀態；
- (c) 當該第一生物樣本中之該目標序列之甲基化位點甲基化時，該對引子中之至少一個引子與該目標序列雜交；或
- (d) 當該第一生物樣本中之該目標序列之甲基化位點未經甲基化時，該對引子中之至少一個引子與該目標序列雜交。

【第7項】

如請求項1之方法，其中該目標序列包含至少5個甲基化位點。

【第8項】

如請求項1之方法，其中該第一甲基化狀態包含該目標序列內之個別位點之甲基化密度、該目標序列內之連續區域內之甲基化/未甲基化位點之分佈、該目標序列內之個別甲基化位點之甲基化模式或程度，或非CpG甲基化。

【第9項】

如請求項1之方法，其中該目標序列在該第一非癌症組織中包含較在該來源組織中高之甲基化密度。

【第10項】

如請求項9之方法，其中該目標序列：

- (a) 在該第一非癌症組織中包含超過50%之甲基化密度；
- (b) 在該來源組織中包含至多50%、至多40%、至多30%、至多20%、至多10%、至多5%或0%的甲基化密度；或
- (c) 在該來源組織中包含低於20%之甲基化密度。

【第11項】

如請求項1之方法，其中該目標序列在該第一非癌症組織中包含較在該來源組織中低之甲基化密度。

【第12項】

如請求項11之方法，其中該目標序列：

- (a) 在該第一非癌症組織中包含低於50%之甲基化密度；
- (b) 在該來源組織中包含至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%之甲基化密度；或
- (c) 在該來源組織中包含超過80%之甲基化密度。

【第13項】

如請求項1之方法，其中(i) 該第一非癌症組織包含肝臟組織，(ii)該目標序列包含與SEQ ID NO: 1具有至少90%一致性之聚核苷酸序列，且(iii) 該目標序列包含SEQ ID NO: 1之CpG位點。

【第14項】

如請求項13之方法，其中：

(a) 該第一非癌症組織包含肝臟組織，且其中該分析包含使用包含SEQ ID NO: 2之引子、包含SEQ ID NO: 3之引子或兩者進行擴增，或使用用於偵測該目標序列之包含SEQ ID NO: 4之可偵測標記探針；及視情況地

(b) 該擴增進一步包含使用包含SEQ ID NO: 5之引子、包含SEQ ID NO: 6之引子或兩者，或使用用於偵測該目標序列之包含SEQ ID NO: 7之可偵測標記探針。

【第15項】

如請求項1之方法，其中(i) 該第一非癌症組織包含結腸組織，(ii)該目標序列包含與SEQ ID NO: 8具有至少90%一致性之聚核苷酸序列，且(iii) 該目標序列包含SEQ ID NO: 8之CpG位點。

【第16項】

如請求項15之方法，其中：

(a) 該第一非癌症組織包含結腸組織，且其中該分析包含擴增，該擴增使用包含SEQ ID NO: 9之引子、包含SEQ ID NO: 10之引子或兩者，或使用用於偵測該目標序列之包含SEQ ID NO: 11之可偵測標記探針；及視情況地

(b) 該擴增進一步包含使用包含SEQ ID NO: 12之引子、包含SEQ ID NO: 13之引子或兩者，或使用用於偵測該目標序列之包含SEQ ID NO: 14之可偵測標記探針。

【第17項】

如請求項1之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群：膀胱癌、骨癌、腦瘤、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌(cancer)、食道癌、胃腸癌、造血性惡性病、頭頸部鱗狀細胞癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、骨髓瘤、鼻癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、黑素瘤、甲狀腺癌、肝細胞癌及結腸直腸癌(carcinoma)。

【第18項】

如請求項1之方法，其進一步包含判定該來源組織中之癌症之分類，視情況地其中該判定該來源組織中之癌症之分類包含評估來自該生物體之第二生物樣本的無細胞核酸分子。

【第19項】

如請求項18之方法，其中該評估包含：

(a) 判定來自該第二生物樣本之該等無細胞核酸分子之甲基化概況、複本數變異、單一多形現象(SNP)概況或分段化模式；或

(b) 判定來自病原體之該第二生物樣本中之無細胞核酸分子之量。

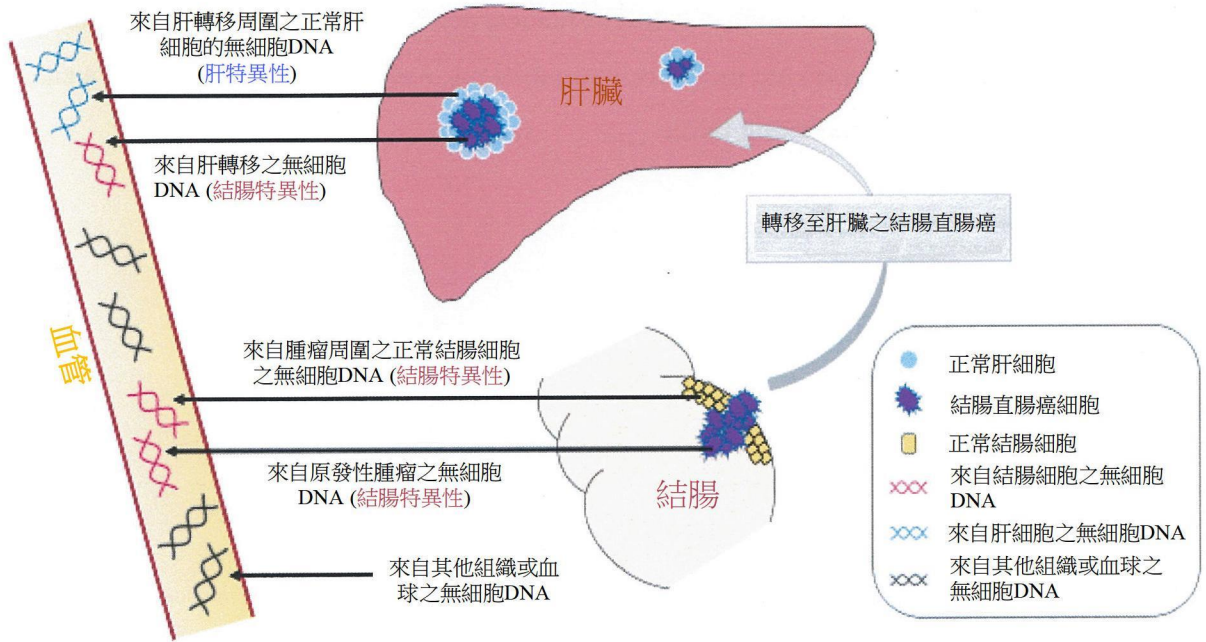
【第20項】

一種系統，其組態以執行如請求項1至19中任一項之方法。

【第21項】

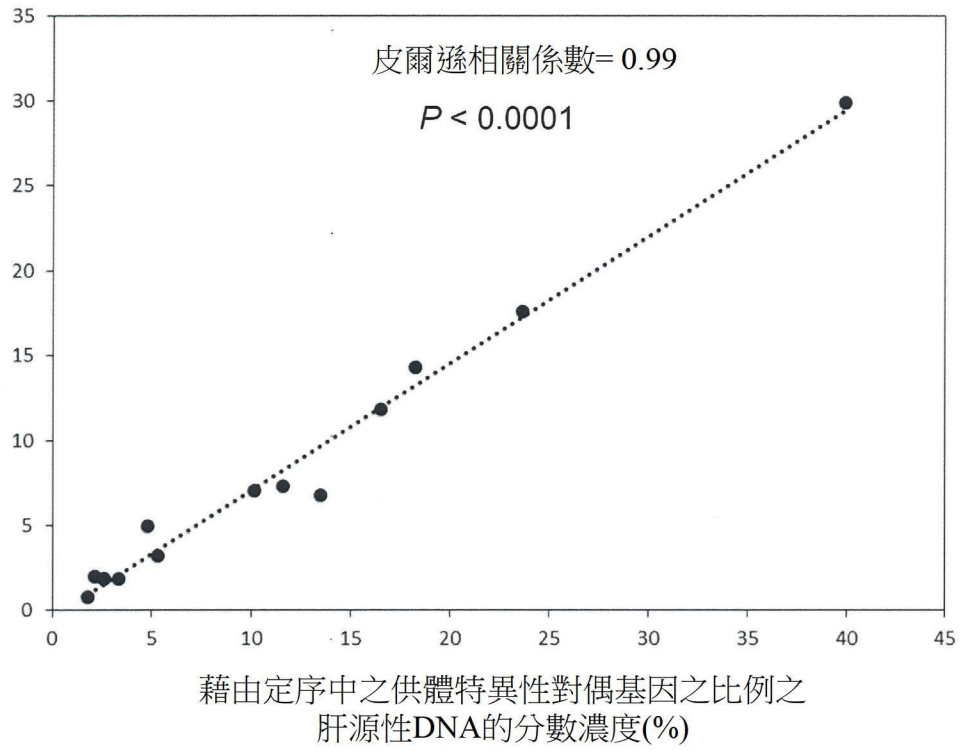
一種非暫時性電腦可讀媒體，其包含一連串指令，用於控制電腦系統執行如請求項1至19中任一項之方法。

【發明圖式】

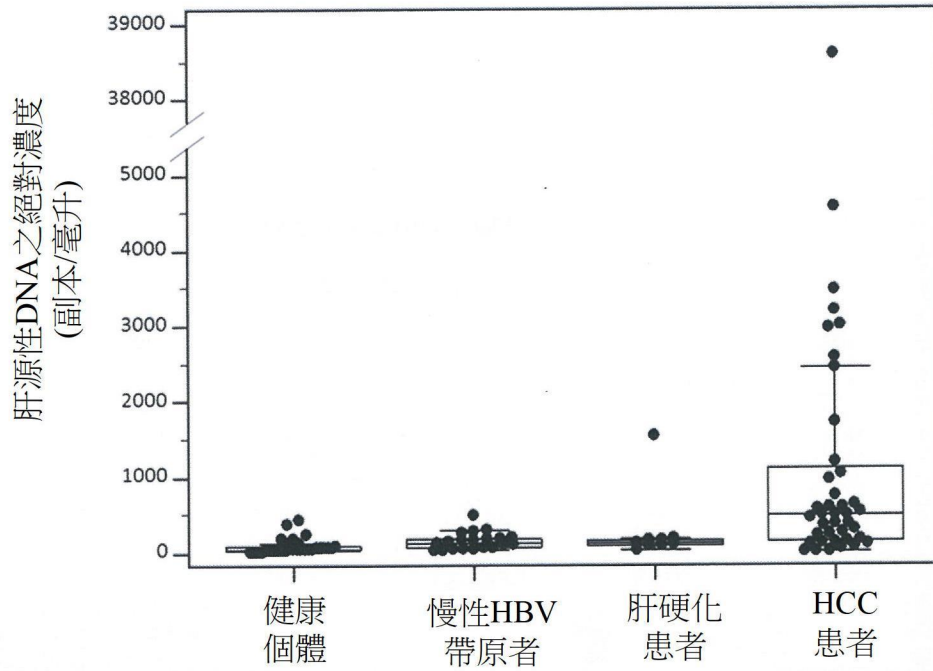


【圖1】

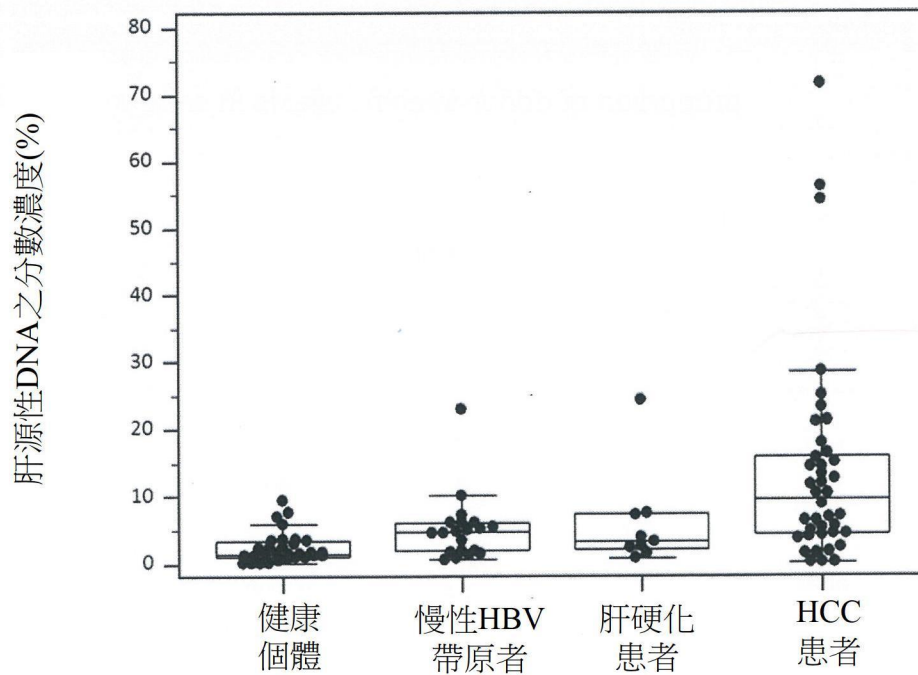
藉由肝特異性甲基化標記分析之
肝源性DNA之分數濃度(%)



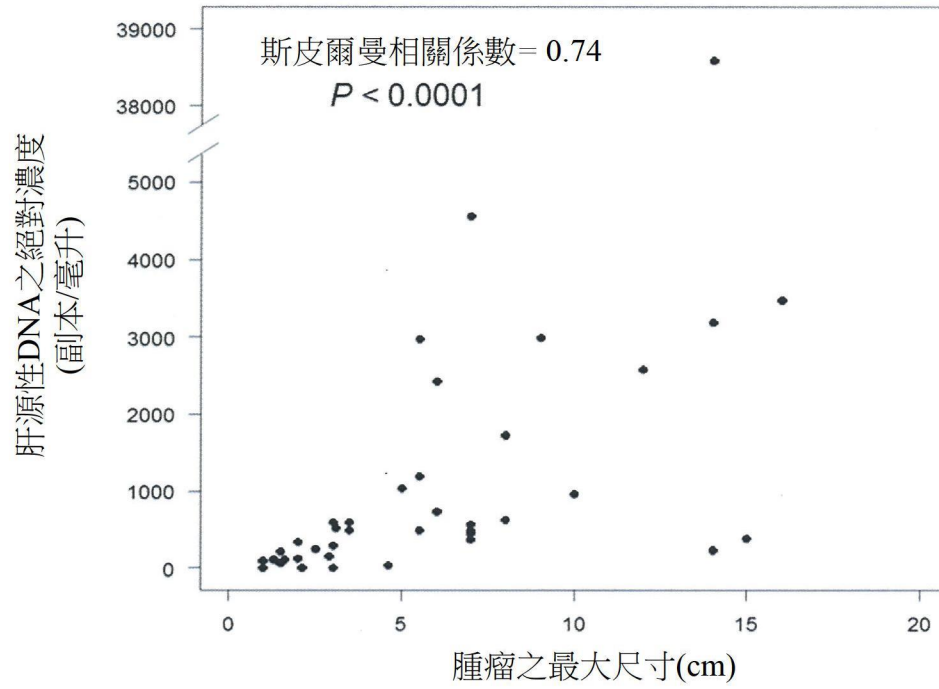
【圖2】



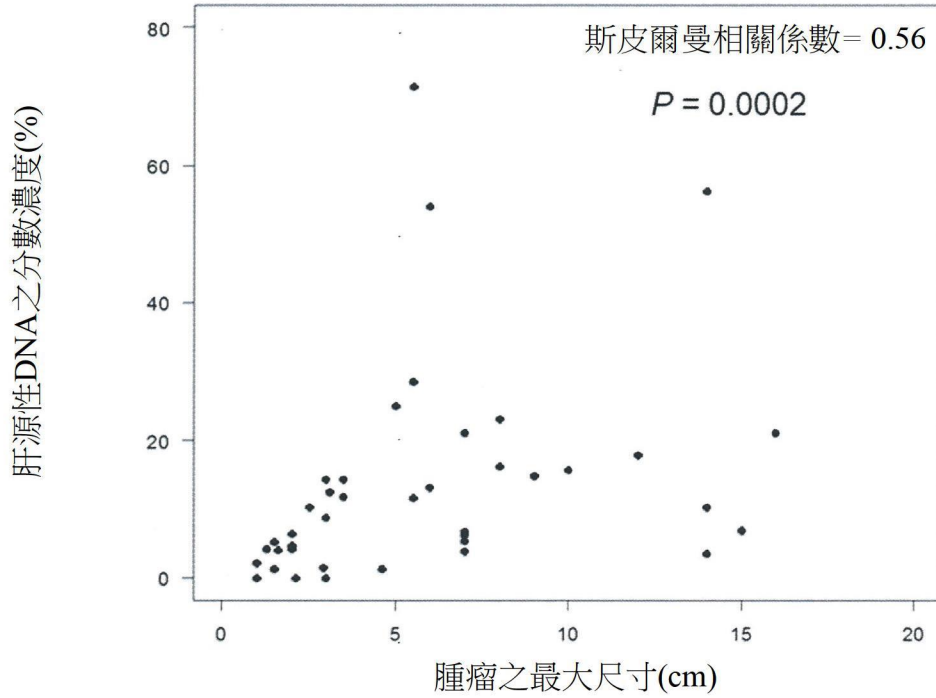
【圖3A】



【圖3B】

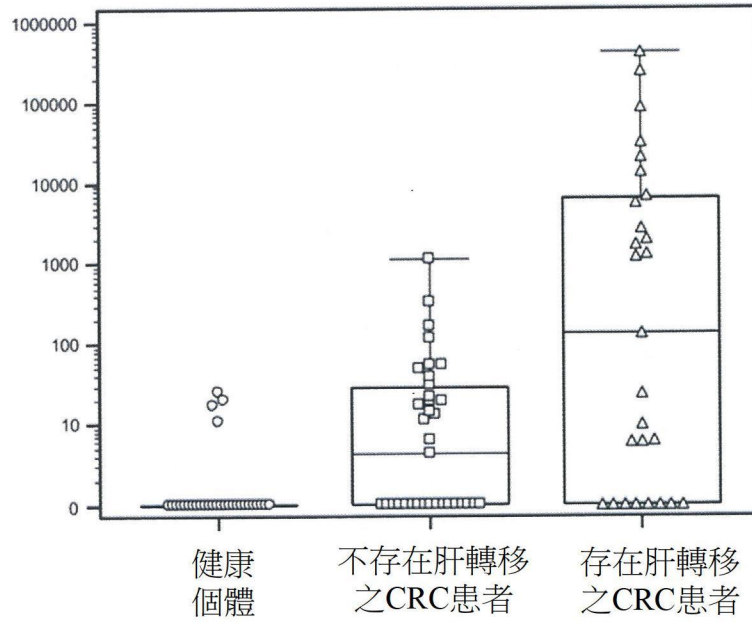


【圖4A】



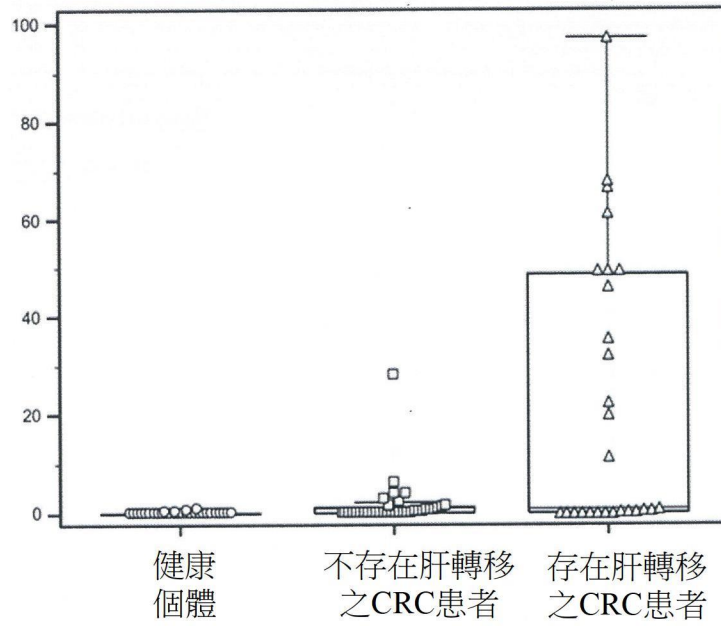
【圖4B】

結腸源性DNA之絕對濃度(副本/毫升)

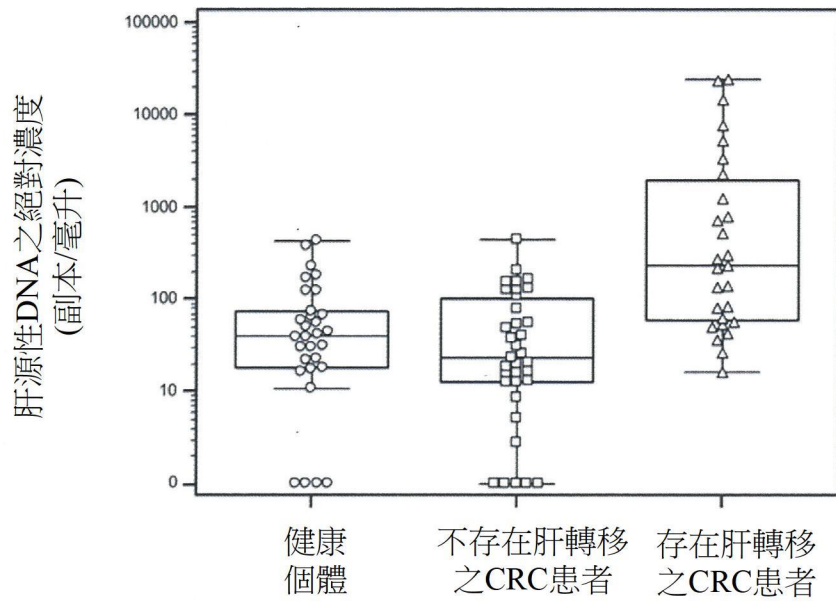


【圖5A】

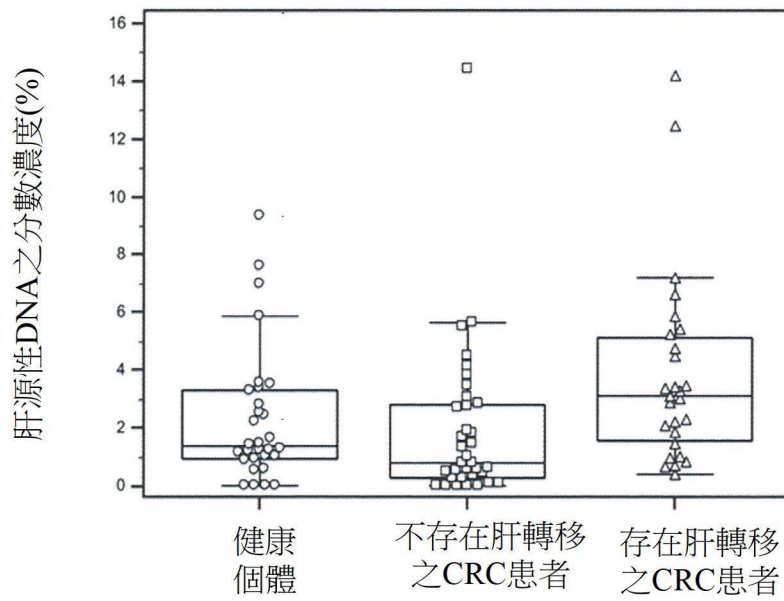
結腸源性DNA之分數濃度(%)



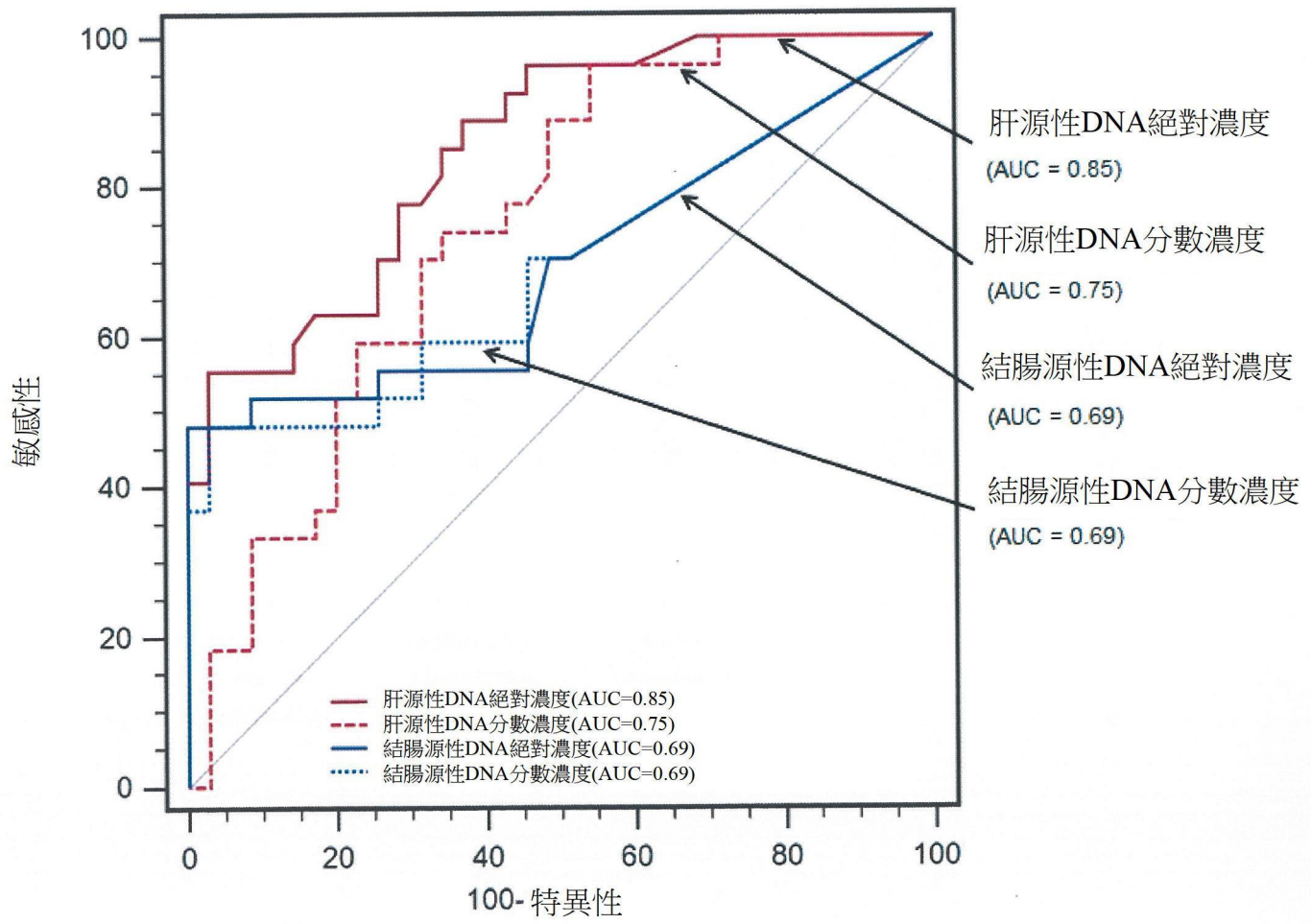
【圖5B】



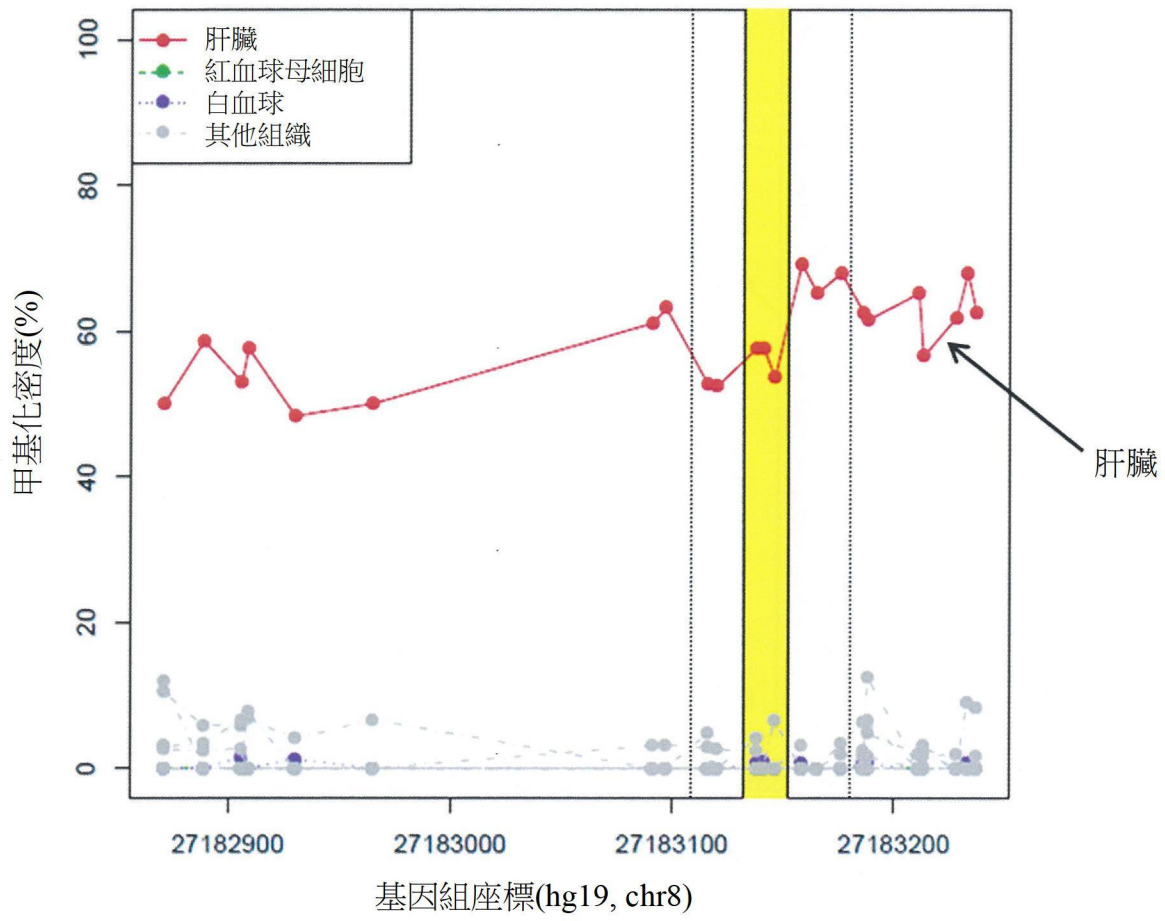
【圖5C】



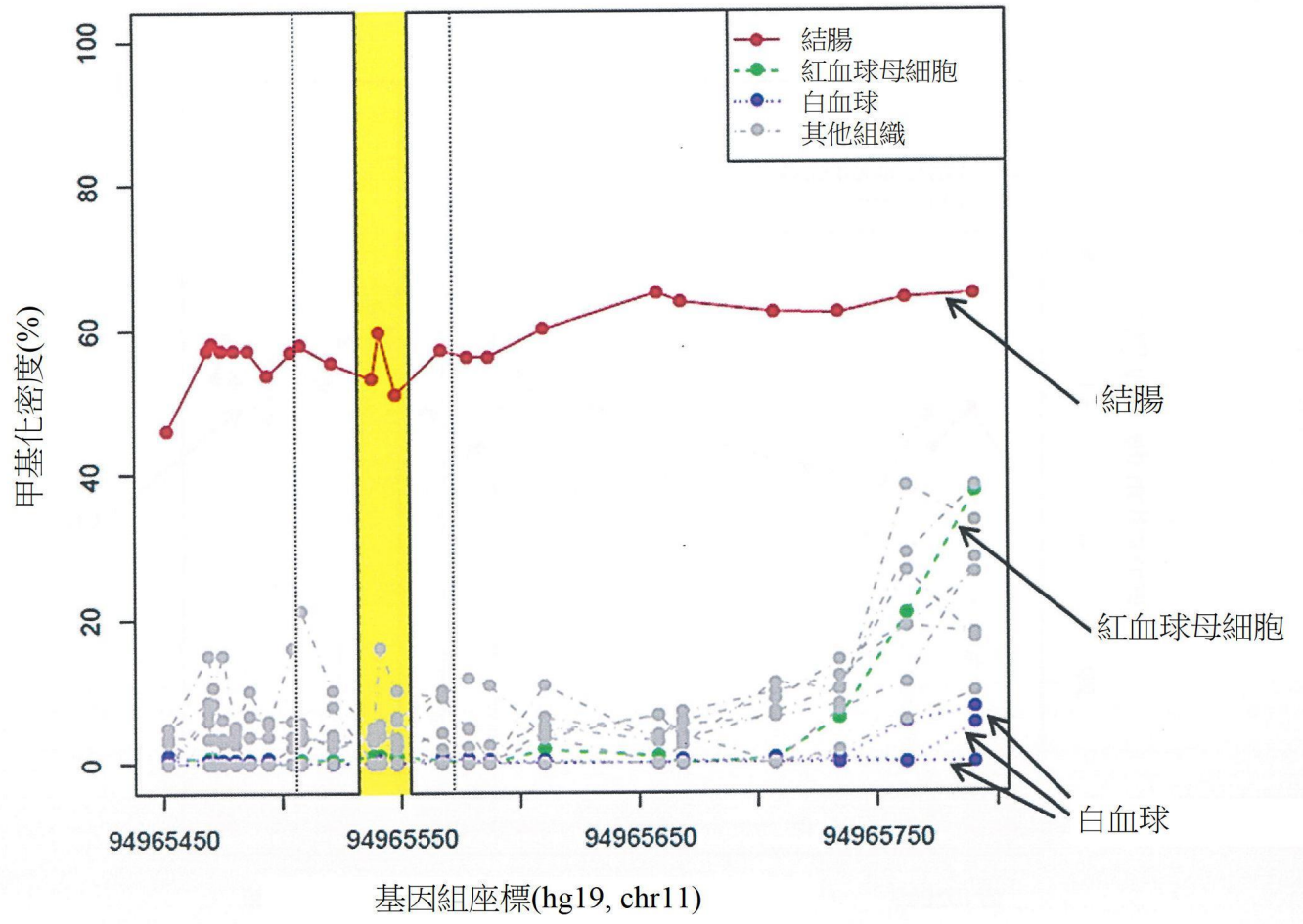
【圖5D】



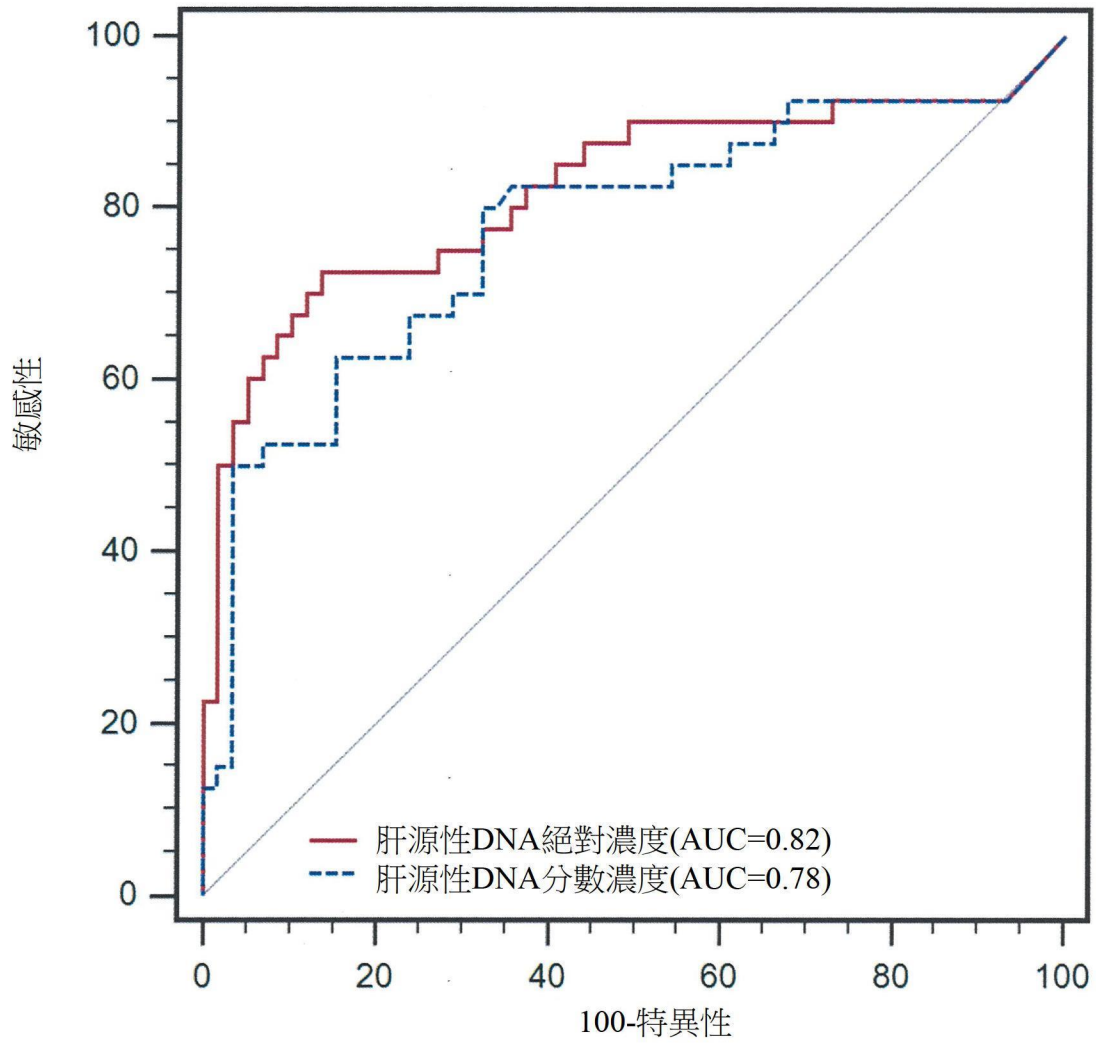
【圖6】



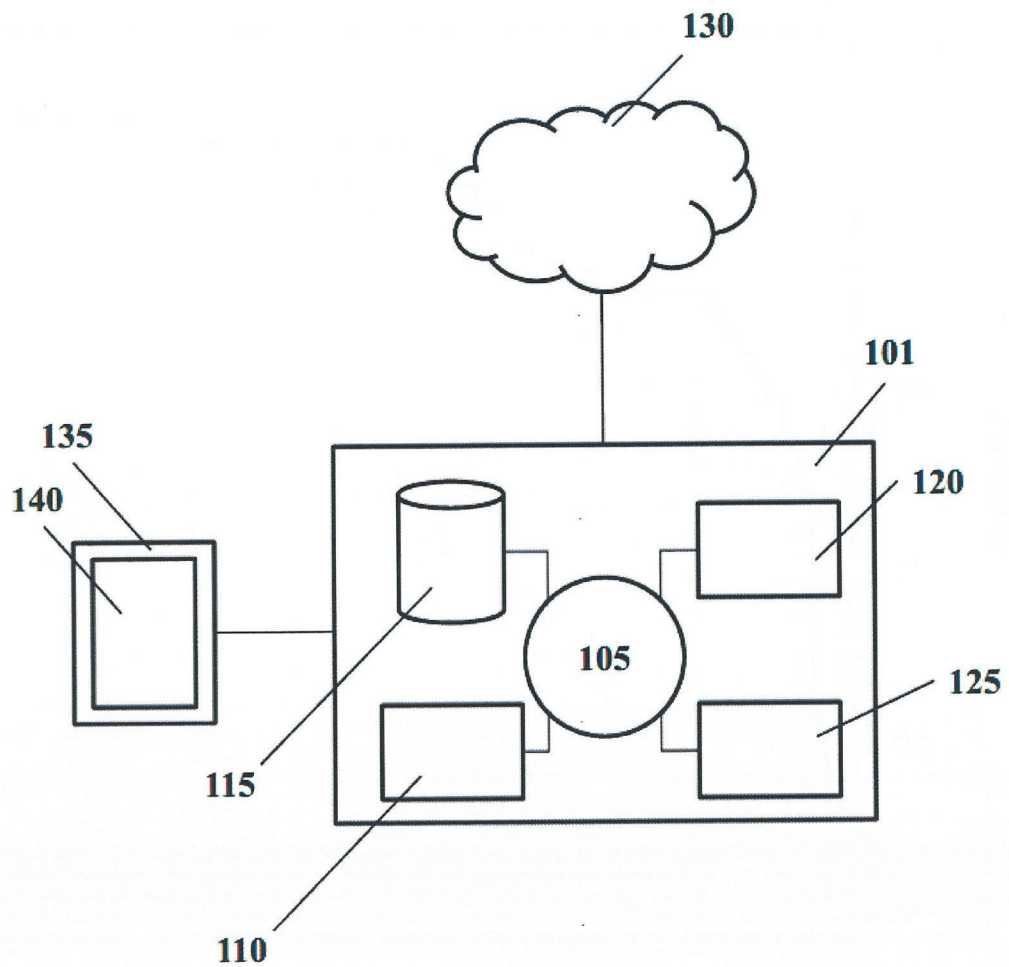
【圖7】



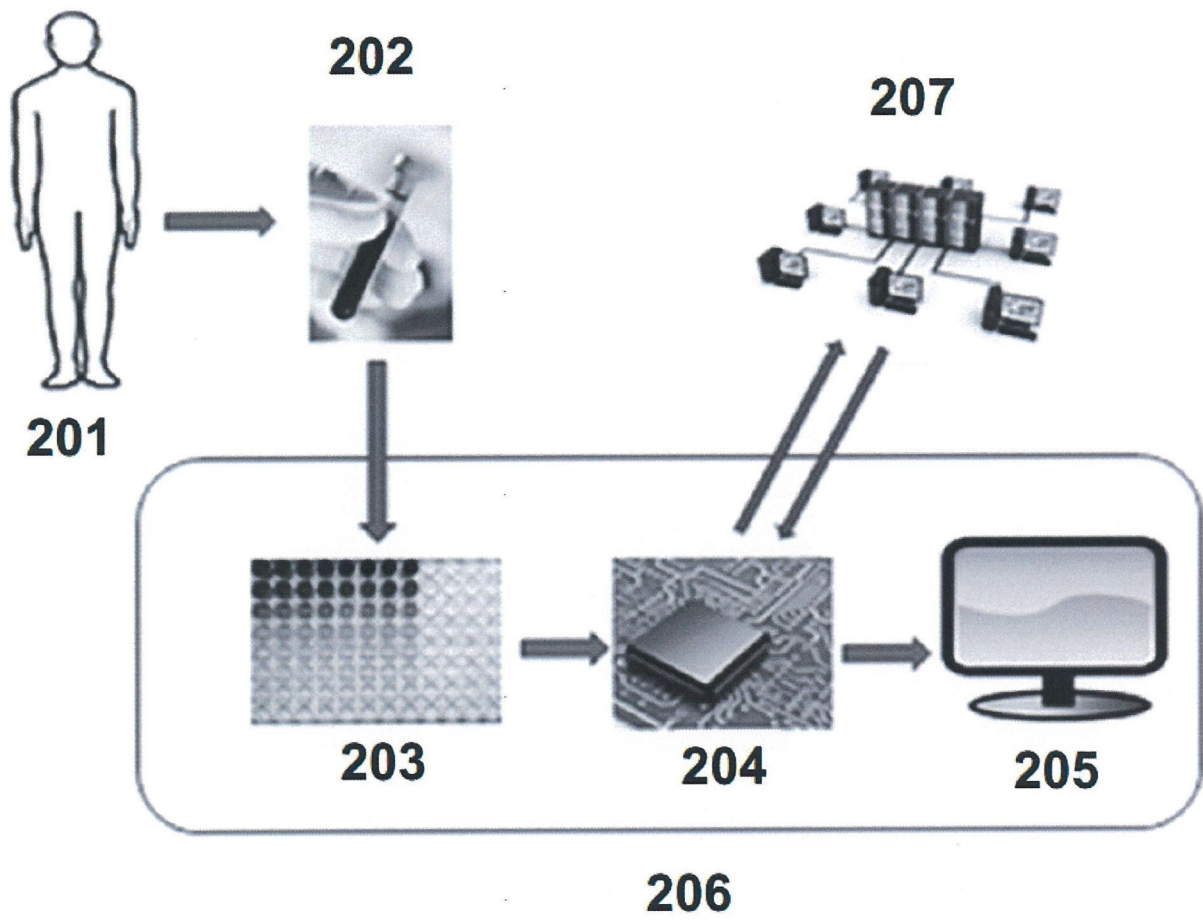
【圖8】



【圖9】



【圖10】



【圖11】