



(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 201250245 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：100119258

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 01 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/574 (2006.01)**

(71)申請人：國立成功大學 (中華民國) NATIONAL CHENG KUNG UNIVERSITY (TW)

臺南市東區大學路 1 號

(72)發明人：王憶卿 WANG, YI CHING (TW)；郭懿瑩 KUO, I YING (TW)；張憶壽 CHANG, I SHOU (TW)；江士昇 JIANG, SHIH SHENG (TW)；陳中興 CHEN, CHUNG HSING (TW)；蔡芳榆 TASI, FANG YU (TW)

(74)代理人：陳啟舜

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：5 共 25 頁

(54)名稱

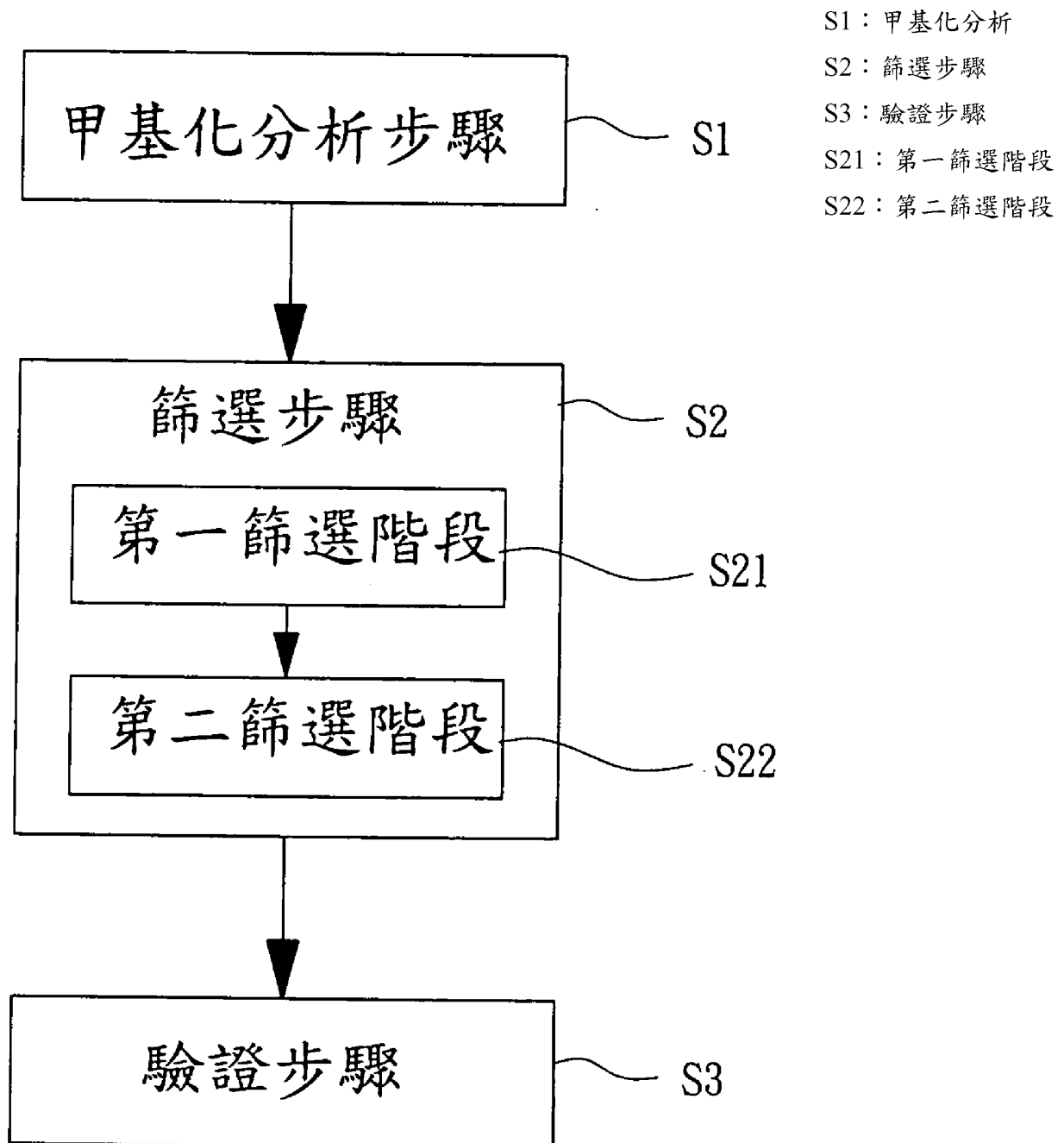
肺腺癌預後之甲基化分子指標及其應用於肺腺癌分子診斷之用途

DNA METHYLATION BIOMARKERS FOR PROGNOSIS PREDICTION OF LUNG

ADENOCARCINOMA AND A USE THEREOF IN CLINICAL MOLECULAR PROGNOSIS OF LUNG
ADENOCARCINOMA

(57)摘要

一種肺腺癌預後之甲基化分子指標，包含 C16orf25、RALGPS2、SPOCD1、KIAA0746、PDE10A、KIAA0649、IER5、SCARF2、KCNJ8、FAM3B、PHLDA3、SORCS1、AGTR1、PAX7、ZNF496、WNK4、RAB7L1、HISTIH4D、SYT2、CTSE、CDKL1、NFAM1、PAQR6、TMEM129、SLAMF8、EFNA2、NOTCH4、OR1A2、AGTRL1、BDKRB1、SEMA4A、KRT4、NCOR2、GNS、PNPLA2、ANKRD9、ALDH1A3、BLVRA 之其一或其組合；其中，該甲基化分子指標係與肺腺癌轉移與致死率相關。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種肺腺癌之診斷指標，特別是關於一種肺腺癌預後之甲基化分子指標，以及將該肺腺癌預後之甲基化分子指標應用於肺腺癌分子診斷之用途。

【先前技術】

肺癌乃工業國家惡性腫瘤死亡率之首位，五年存活率僅 10 至 15%，其高死亡率之主因在於肺癌之高復發率及習用偵測技術之不足。

肺腺癌(lung adenocarcinoma)屬於非小細胞癌，係肺癌的主要種類，佔所有肺癌之 40-50%，其比例逐年增加。不同於鱗狀細胞肺癌，肺腺癌主要好發於肺部周邊位置，如外側肺葉，且容易侵犯女性及非吸煙患者，肺腺癌的致病原因尚未明朗，並且初期症狀不明顯，因此在其早期診斷及預後分析上更顯困難。

習用肺癌篩檢之方法包含胸部 X 光、痰液細胞學檢查以及靈敏度較高之電腦斷層及正子攝影，其中，該胸部 X 光及痰液細胞學檢查雖為臨床慣用之肺癌診斷手段，卻具有專一性及靈敏度不佳等問題，無法善盡早期偵測以有效改善肺癌高致死率之意義。而電腦斷層及正子攝影雖係現今腫瘤部位及腫瘤分期判斷的重要指標，惟價格昂貴，非一般常人所能負擔，因此在臨床肺癌偵測之應用上往往受限。

按，美國公開第 2010/0167296 號專利案，揭示一種非

小細胞肺炎之預後偵測方法，係以上皮細胞生長因子接受體(epithelial growth factor receptor; EGFR)、巨噬細胞聚落刺激因子(macrophage colony stimulating factor; CSF-1)及碳酸酐酶抑制劑(carbonic anhydraseIX; CAIX)等生物標記之表現值作為非小細胞肺癌預後狀況之判斷依據。

又，美國公開第 2010/0317002 號、第 2010/00068207 號、第 2009/0214536 號及第 2009/0297507 號專利案則分別揭示與肺癌診斷相關之蛋白質標記，包含 CACNA1E、ADAM10、DDR2 及 ADAMTS-7 等。

然而，前述各前案所示之分子診斷方法皆係利用偵測各生物標記於 RNA 或蛋白質層面之表現值，作為肺癌診斷的手段，而 RNA 及蛋白質皆屬不易保存且極不穩定之分子層次，不僅在檢體處理上較為複雜、困難，更容易因該 RNA 及蛋白質檢體之不穩定性而衍生偽陽性等問題，以致前述各檢測方法之專一性與靈敏度無法有效提升，無法適任於臨床肺癌檢測之使用。

據此可知，習用技術缺乏一具有高專一性、靈敏度，並且可廣泛應用於臨床肺腺癌早期診斷及預後分析之工具，因此，有必要針對習用技術加以改進，以有效預測肺腺癌之預後狀況而改善其高致死率。

基因體的甲基化為當代生醫研究的重點之一，據研究指出，基因啟動子上 CpG 島群(CpG island)的過度甲基化與癌症的形成與轉移息息相關。抑癌基因(tumor suppressor genes)啟動子的過度甲基化可導致許多參與調控的轉錄因子及聚合酶鏈素無法正常結合至啟動子位置，造成該抑癌

基因不表現，並導致染色體的不穩定及突變，因而衍生癌症的產生。因此，特定基因的甲基化可作為腫瘤形成的分子指標，惟，現今仍未有與肺腺癌相關之甲基化分子指標的開發及應用。

【發明內容】

本發明之主要目的係提供一種肺腺癌預後之甲基化分子指標，係針對肺腺癌之早期偵測及預後判斷具有高度專一性及靈敏度。

本發明之次一目的係提供一種肺腺癌預後之甲基化分子指標，係直接針對檢體之 DNA 層面進行檢測，可避免習用 RNA 或蛋白質分子指標衍生偽陽性之疑慮。

本發明之再一目的係提供一種肺腺癌預後之甲基化分子指標，係可以應用於臨床肺腺癌分子診斷，可兼具有高診斷率及低成本之效益。

本發明之再一目的係提供一種肺腺癌預後之甲基化分子指標於臨床肺腺癌分子診斷之用途，以建立一肺腺癌早期診斷及預後分析的工具，進而有效改善肺腺癌的高致死率。

為達到前述發明目的，本發明所運用之技術內容包含有：

一種肺腺癌預後之甲基化分子指標，包含 C16orf25、RALGPS2、SPOCD1、KIAA0746、PDE10A、KIAA0649、IER5、SCARF2、KCNJ8、FAM3B、PHLDA3、SORCS1、AGTR1、PAX7、ZNF496、WNK4、RAB7L1、HISTIH4D、

SYT2、CTSE、CDKL1、NFAM1、PAQR6、TMEM129、SLAMF8、EFNA2、NOTCH4、OR1A2、AGTRL1、BDKRB1、SEMA4A、KRT4、NCOR2、GNS、PNPLA2、ANKRD9、ALDH1A3、BLVRA 之其一或其組合；其中，該上述之 38 個甲基化分子指標包含 37 個基因及一個 NCBI 序列代碼為 C16orf25 之序列，皆與肺腺癌轉移與致死率相關。

其中，該肺腺癌包含第一期至第四期之肺腺癌。

其中，該肺腺癌致死率係指預後存活 3 年以下。

如申請專利範圍第 1 項所述之肺腺癌預後之甲基化分子指標應用於肺腺癌分子診斷之用途，包含偵測檢體基因的甲基化程度，對照正常檢體；以及依據該檢體基因中該甲基化分子指標的甲基化程度，作為肺腺癌預後之判斷依據。

其中，該檢體係癌組織、血液、血漿或帶有游離核酸之體液。

其中，該檢體基因的甲基化程度係由焦磷酸測序或基因體甲基化晶片之方法進行分析。

其中，該肺腺癌包含第一期至第四期之肺腺癌。

【實施方式】

為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

本發明所述之「篩檢族群」，係指自台北地區榮民總醫院的 39 名初期肺腺癌患者，包含第一期及第二期的肺腺

癌患者，其中，27 名肺腺癌患者的預後狀況較佳，存活率達 3 年以上，12 名肺腺癌患者的預後狀況則較差，存活率僅 3 年以下。該「篩檢族群」係用於本發明之甲基化分子標記的篩選。

本發明所述之「驗證族群」，係指自台北地區榮民總醫院內與該「篩檢族群」完全獨立的另外 30 名肺腺癌患者，包含第一期及第二期的肺腺癌病患，其中 26 名肺腺癌患者的預後狀況較佳，存活率達 3 年以上，4 名肺腺癌患者的預後狀況則較差，存活率僅 3 年以下，係用於本發明甲基化分子標記之診斷性的驗證。

本發明所述之「臨床病理資料」，係依據該「篩檢族群」或「驗證族群」的臨床預後資料所建立，包含各患者的存活率、腫瘤轉移程度及其他預後狀況等。

本發明所述之「基因體甲基化變異圖譜」，乃由肺腺癌組織檢體進行基因體甲基化分析所得之結果，經比對本發明之「臨床病理資料」而建立，係具有與肺腺癌預後較差有關之甲基化基因。

請參照第 1 圖所示，本發明係利用基因甲基化分析法，綜合本發明之臨床病理資料，進而建立一基因體甲基化變異圖譜，該基因體甲基化變異圖譜包含與肺腺癌預後較差高度相關之甲基化分子標記。該甲基化分子標記係針對臨床肺腺癌患者之預後狀況具有高度指標性及靈敏度，因此，可進一步應用於臨床肺腺癌分子診斷之開發，以提升肺腺癌之診斷率，並且改善肺腺癌之高致死率。

請再參照第 1 圖所示，本發明之甲基化分子標記乃係

經由以下各步驟之操作而獲得，包含一甲基化分析步驟 S1；一篩選步驟 S1；以及一驗證步驟 S3。

該甲基化分析步驟 S2 則係先採取該篩檢族群之癌組織檢體，利用一基因甲基化分析法偵測各檢體基因的甲基化程度，同時配合該篩檢族群的臨床病理資料，歸納並選取各檢體基因中，與肺腺癌預後較差具有關連性的甲基化基因。本實施例係利用一商用基因體甲基化晶片-Illumina humanmethylation27 bead chip (Illumina, CA, USA)分析各檢體中約 14,000 個基因的甲基化狀態，同時配合各檢體之臨床病理資料，自該 14,000 個基因中擷選與肺腺癌預後差相關，如存活率低於 3 年以下，之甲基化探針約 27,578 個。本實施例中，各基因之甲基化狀態係先經計算而換得一甲基化數值(β -value)，再依據該甲基化數值之高低挑選與肺腺癌預後差有關的 27,578 個探針。

該篩選步驟 S2 則係由該甲基化分析步驟 S1 所獲得之甲基化基因中，進一步挑選具有特異性且專一性地與肺腺癌之存活率低及轉移相關之基因。本發明之篩選步驟 S2 較佳係包含二階段，第一篩選階段 S21；以及第二篩選階段 S22。其中，該第一篩選階段係先於該甲基化基因中去除區隔性較低或者係具有干擾性的甲基化基因，包含具有基因多型性(single-nucleotide polymorphism)、重複片段(repeated sequences)以及甲基化數值(β -value)過高或過低之基因，如 β -value 大於 0.9 或者小於 0.1，此外，為避免 X 染色體上之基因所衍生的劑量補償作用(dosage compensation)產生干擾，位於該 X 染色體上之基因同步於

該第一篩選階段 S21 中剔除。該第二篩選階段 S22 係利用統計分析的方式，如 cox 迴歸分析(cox regression analysis)或貝氏迴歸分析(bayesian logistic regression software)等，再進一步於該第一篩選階段 S21 所選取之基因中，挑選與肺腺癌之存活率、預後狀況較差有關的基因，如存活率低於 3 年或產生轉移情形者。

本實施例之篩選步驟 S3 則係先自該 27,578 個探針中刪除含有基因多型性 (SNP)、重複片段 (repeated sequences)、X 染色體基因以及不具區分性的探針，如篩選族群樣本經分析獲得之甲基化數值皆大於 0.9 或者皆小於 0.1 的探針，再利用統計軟體 Super PC analysis 進行嚴謹的計算，得出與肺腺癌預後狀況有關之甲基化探針約 200 個。該 Super PC analysis 係為進一步分析基因與疾病預後關係的統計軟體，為相關分析領域者所能了解並應用之統計分析方式。

該驗證步驟 S3 係利用一定量甲基化分析方法再次檢視該篩選步驟 S2 所擷選之基因，以建立一基因體甲基化變異圖譜，該基因體甲基化變異圖譜包含與肺腺癌預後較差高度相關之基因。本實施例之驗證步驟 S3 係採用焦磷酸測序(pyrosequencing)之方式驗證該 200 個甲基化探針，藉由統計分析的方法，挑選可同時於該 Illumina humanmethylation27 bead chip 及該焦磷酸測序之分析平台中得到相同結果的探針，以獲得本發明與肺腺癌轉移及存活率低於 3 年以下高度相關之基因體甲基化變異圖譜。

請參照第 1 表所示，本實施例之基因體甲基化變異圖

譜係具有 38 個與肺腺癌預後高度相關之探針，係分別對應 37 個基因以及序列代碼為 C16orf25 的序列[參考自美國國家衛生院(Nation Institution of Health)，生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)]。其中，該第 1 表所示之 R 值係為相關數值(correlation coefficient)，係指各基因甲基化程度在晶片篩選平台與焦磷酸測序分析平台間之相關性，該 R 值愈趨近於 1 則代表二者之相關性愈好。

第 1 表：38 個在篩選平台與焦磷酸測序分析平台高度相關之探針

探針 ID	基因	R 值	探針 ID	基因	R 值
1	C16orf25	0.815	20	CTSE	0.934
2	RALGPS2	0.874	21	CDKL1	0.843
3	SPOCD1	0.858	22	NFAM1	0.931
4	KIAA0746	0.927	23	PAQR6	0.91
5	PDE10A	0.907	24	TMEM129	0.942
6	KIAA0649	0.946	25	SLAMF8	0.984
7	IER5	0.824	26	EFNA2	0.972
8	SCARF2	0.835	27	NOTCH4	0.896
9	KCNJ8	0.97	28	OR1A2	0.926
10	FAM3B	0.95	29	AGTRL1	0.935
11	PHLDA3	0.975	30	BDKRB1	0.949
12	SORCS1	0.959	31	SEMA4A	0.954
13	AGTR1	0.985	32	KRT4	0.901
14	PAX7	0.933	33	NCOR2	0.825
15	ZNF496	0.962	34	GNS	0.873
16	WNK4	0.979	35	PNPLA2	0.899
17	RAB7L1	0.963	36	ANKRD9	0.8
18	HISTIH4D	0.963	37	ALDH1A3	0.946
19	SYT2	0.946	38	BLVRA	0.845

此外，請參照第 2 圖所示，組合該 38 個與肺腺癌預後高度相關之探針進行該篩檢族群之診斷試驗。本實施例

係利用焦磷酸測序(pyrosequencing)之方式針對該篩檢族群的癌組織檢體進行分析，計算各癌組織檢體基因中的甲基化程度，再與該篩檢族群之臨床病理資料進行比對，以推得該 38 個探針的操作者接受特徵曲線(receiver operating characteristic curve; 又稱 ROC 曲線)。據此可得知，該 38 個探針對於肺腺癌的預後狀況具有良好的專一性及靈敏度，具有應用於臨床肺腺癌檢測之潛力。

綜上所述，經由各步驟之篩選而獲得的 38 個探針，係與肺腺癌預後較差相關，並且具有良好的專一性及靈敏度，該 38 個探針即為本發明之甲基化分子標記，並且可進一步應用於臨床肺腺癌檢測方法之開發，藉由偵測患者檢體中，包含該 38 個探針序列之基因的甲基化程度，進一步與正常檢體進行比對，並且作為肺腺癌預後狀況之判斷依據。其中，該患者檢體可以係癌組織、血液或者其他可能帶有游離核酸之體液，以方便自各患者取得檢體進行試驗；而各基因的甲基化程度則可利用焦磷酸測序或基因體甲基化晶片等分析方法加以計算，較佳係利用焦磷酸測序的方式，以便於臨床診斷之快速操作與進行，同時可降低診斷成本。另外，該 38 個探針中包含少數具有低訊號，或者高偽性的探針，如探針 ID 為 8、18 及 38，較佳係於檢測過程中屏除，以提升該甲基化分子標記於臨床檢測上之靈敏度與專一性。

為進一步證實本發明之甲基化分子標記確實針對肺腺癌的預後狀況具有高度的專一性及靈敏度，本實施例係組合該 35 個探針(屏除探針 ID 為 8、18 及 38 之探針)，利

用焦磷酸測序的方式，針對該篩檢族群及驗證族群的癌組織檢體進行分析，並且分別計算各檢體基因的甲基化程度。

請參照第 3、4 圖及第 2 表所示，係該 35 個探針的甲基化程度示意圖，顯示該 35 個探針皆在肺腺癌患者中呈現高度的甲基化，並且該 35 個探針的甲基化與肺腺癌患者具有明確的顯著性。

第 2 表: 35 個與肺腺癌預後高度相關之基因

基因	基因
C16orf25	CTSE
RALGPS2	CDKL1
SPOCD1	NFAM1
WNK4	PAQR6
RAB7L1	TMEM129
PDE10A	SLAMF8
KIAA0649	EFNA2
IER5	NOTCH4
KCNJ8	OR1A2
KIAA0746	AGTRL1
PHLDA3	BDKRB1
ZNF496	SEMA4A
PAX7	KRT4
AGTR1	NCOR2
SORCS1	GNS
FAM3B	PNPLA2
SYT2	ANKRD9
	ALDH1A3

本發明之甲基化分子標記於實際應用於臨床肺腺癌之預後診斷分析，係先自篩檢患者中採得檢體，該檢體可以為組織，較佳為 0.5 立方公分(0.5cm^3)，或者係血漿較佳為 500 微升($500\mu\text{l}$)，再分別針對各檢體進行基因體核酸或游離核酸的萃取，所取得之核酸 DNA 經定量分析後，另

取 1 微克(1 μ g)之核酸 DNA 進行亞硫酸鹽 (sodium bisulfite) 處理。再將處理後之核酸 DNA 純化回收成 20 微升(20 μ l)之體積，擷取其中的 1 微升(1 μ l)並利用聚合酶連鎖反應 (PCR)進行獨立基因的放大，再將所獲得之產物(PCR products)加入特定的定序引子進行焦磷酸測序，由各基因所呈現的訊號以焦磷酸測序儀定量該基因的甲基化程度（範圍：0~100%），並且配合各基因統計之權重係數進一步分析及判斷，如第 3 表所示，係列出本實施例之 8 個範例基因的權重係數，該權重係數係代表各基因的重要程度。

本實施例係利用公式(A)計算而推得各基因所代表之風險值，其中，各基因的風險值還須經加總而得一總值，該總值係代表各篩檢患者的死亡風險值，並且依據各基因權重係數及基因甲基化程度之不同，該總值可能有正負值的差異，其中數值愈趨近於正值且數值愈大，代表高死亡風險，也就是篩檢患者的預後較差。

(A):單一基因甲基化程度（%） $\times$ 權重係數＝風險值

第 3 表:與肺癌預後相關基因之權重係數

基因	權重係數
CTSE	0.0845
NFAM1	-0.0507
TMEM129	0.0247
EFNA2	-0.0134
AGTRL1	-0.0466
BDKRB1	-0.0117
SEMA4A	-0.0075
ALDH1A3	-0.0813

請參照第 5 圖所示，係該 35 個探針的甲基化程度，與該篩檢族群、驗證族群之臨床病理資料所推算而得之 ROC 曲線，由此可知，該 35 個探針，對於肺腺癌的預後狀況具有良好的專一性及靈敏度，確實可應用於臨床肺腺癌的診斷，作為肺腺癌預後狀況之判斷依據。

本發明之甲基化分子標記，乃係利用基因甲基化分析法，綜合本發明之臨床病理資料，經由嚴謹的統計方式計算而獲得，包含 38 個與肺腺癌預後較差高度相關的探針，對於臨床肺腺癌病患的預後具有指標性、專一性以及良好的靈敏度。

本發明之甲基化分子標記，係屬 DNA 分子標記，可直接就檢體之 DNA 層面進行偵測、分析，可避免檢體的過度處理及製備，以及容易衍生偽陽性等缺點，具有提升肺腺癌診斷之專一性及靈敏度的功效。

本發明之甲基化分子標記可應用於臨床肺腺癌新興檢測方法的開發，作為肺腺癌預後的評估指標，可藉由偵測患者檢體中，包含該 38 個探針序列之基因的甲基化程度，進一步與正常檢體進行比對，以作為肺腺癌預後狀況之判斷依據，並且建立一個具有高專一性、靈敏度，並且可廣泛應用於臨床肺腺癌早期診斷及預後分析之工具，改善肺腺癌之高致死率，為本發明之功效。

雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當視後附

之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖：本發明之甲基化分子指標之篩選流程圖。

第 2 圖：本發明之甲基化分子指標之診斷性示意圖。

第 3 圖：本發明之甲基化分子指標之甲基化程度示意圖。

第 4 圖：本發明之甲基化分子指標之甲基化程度示意圖。

第 5 圖：本發明之甲基化分子指標之診斷性示意圖。

【主要元件符號說明】

S1 甲基化分析

S2 篩選步驟

S22 第二篩選階段

S3 驗證步驟

S21 第一篩選階段

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 100119250

※ 申請日： 100. 6. 01

※IPC 分類： G01N33/574 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

肺腺癌預後之甲基化分子指標及其應用於肺腺癌分子診斷之用途 / DNA methylation biomarkers for prognosis prediction of lung adenocarcinoma and a use thereof in clinical molecular prognosis of lung adenocarcinoma

二、中文發明摘要：

一種肺腺癌預後之甲基化分子指標，包含 C16orf25、RALGPS2、SPOCD1、KIAA0746、PDE10A、KIAA0649、IER5、SCARF2、KCNJ8、FAM3B、PHLDA3、SORCS1、AGTR1、PAX7、ZNF496、WNK4、RAB7L1、HISTIH4D、SYT2、CTSE、CDKL1、NFAM1、PAQR6、TMEM129、SLAMF8、EFNA2、NOTCH4、OR1A2、AGTRL1、BDKRB1、SEMA4A、KRT4、NCOR2、GNS、PNPLA2、ANKRD9、ALDH1A3、BLVRA 之其一或其組合；其中，該甲基化分子指標係與肺腺癌轉移與致死率相關。

三、英文發明摘要：

The present invention discloses a panel of DNA methylation biomarkers for prognosis prediction of lung adenocarcinoma. The

marker panel comprises C16orf25, RALGPS2, SPOCD1, KIAA0746, PDE10A, KIAA0649, IER5, SCARF2, KCNJ8, FAM3B, PHLDA3, SORCS1, AGTR1, PAX7, ZNF496, WNK4, RAB7L1, HISTIH4D, SYT2, CTSE, CDKL1, NFAM1, PAQR6, TMEM129, SLAMF8, EFNA2, NOTCH4, OR1A2, AGTRL1, BDKRB1, SEMA4A, KRT4, NCOR2, GNS, PNPLA2, ANKRD9, ALDH1A3, and BLVRA. Furthermore, this invention discloses that these DNA methylation biomarkers apply as molecular diagnosis for lung adenocarcinoma.

七、申請專利範圍：

- 1、一種肺腺癌預後之甲基化分子指標，包含：

C16orf25、RALGPS2、SPOCD1、KIAA0746、PDE10A、KIAA0649、IER5、SCARF2、KCNJ8、FAM3B、PHLDA3、SORCS1、AGTR1、PAX7、ZNF496、WNK4、RAB7L1、HISTIH4D、SYT2、CTSE、CDKL1、NFAM1、PAQR6、TMEM129、SLAMF8、EFNA2、NOTCH4、OR1A2、AGTRL1、BDKRB1、SEMA4A、KRT4、NCOR2、GNS、PNPLA2、ANKRD9、ALDH1A3、BLVRA之其一或其組合；

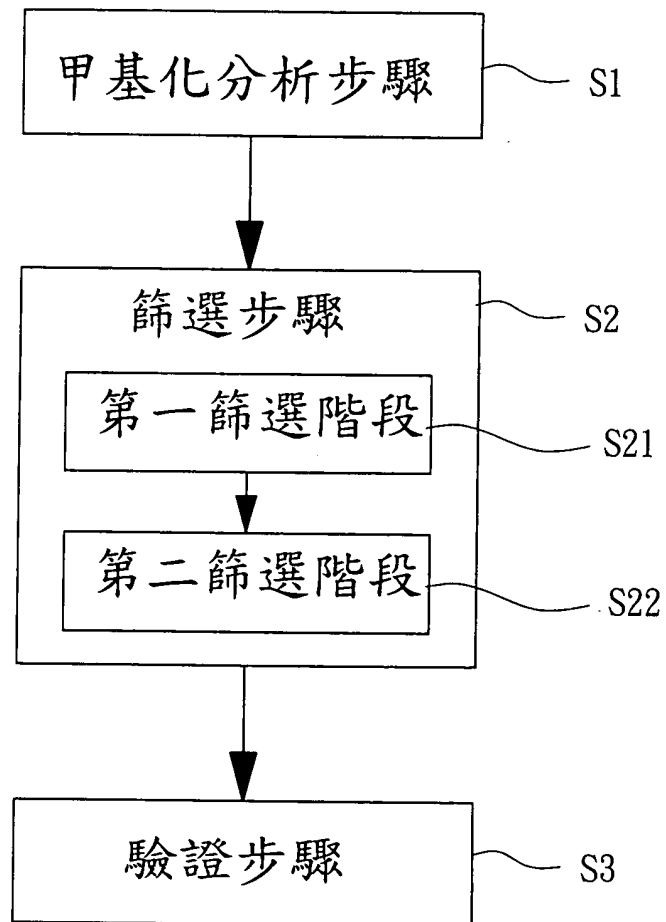
其中，該上述之 38 個甲基化分子指標包含 37 個基因及一個 NCBI 序列代碼為 C16orf25 之序列，皆與肺腺癌轉移與致死率相關。

- 2、依申請專利範圍第 1 項所述之肺腺癌預後之甲基化分子指標，其中該肺腺癌包含第一期至第四期之肺腺癌。
- 3、依申請專利範圍第 1 項所述之肺腺癌預後之甲基化分子指標，其中該肺腺癌致死率係指預後存活 3 年以下。
- 4、如申請專利範圍第 1 項所述之肺腺癌預後之甲基化分子指標應用於肺腺癌分子診斷之用途，包含：
偵測檢體基因的甲基化程度，對照正常檢體；以及
依據該檢體基因中該甲基化分子指標的甲基化程度，作為肺腺癌預後之判斷依據。
- 5、依申請專利範圍第 4 項所述之肺腺癌預後之甲基化分子指標應用於肺腺癌分子診斷之用途，其中，該檢體係

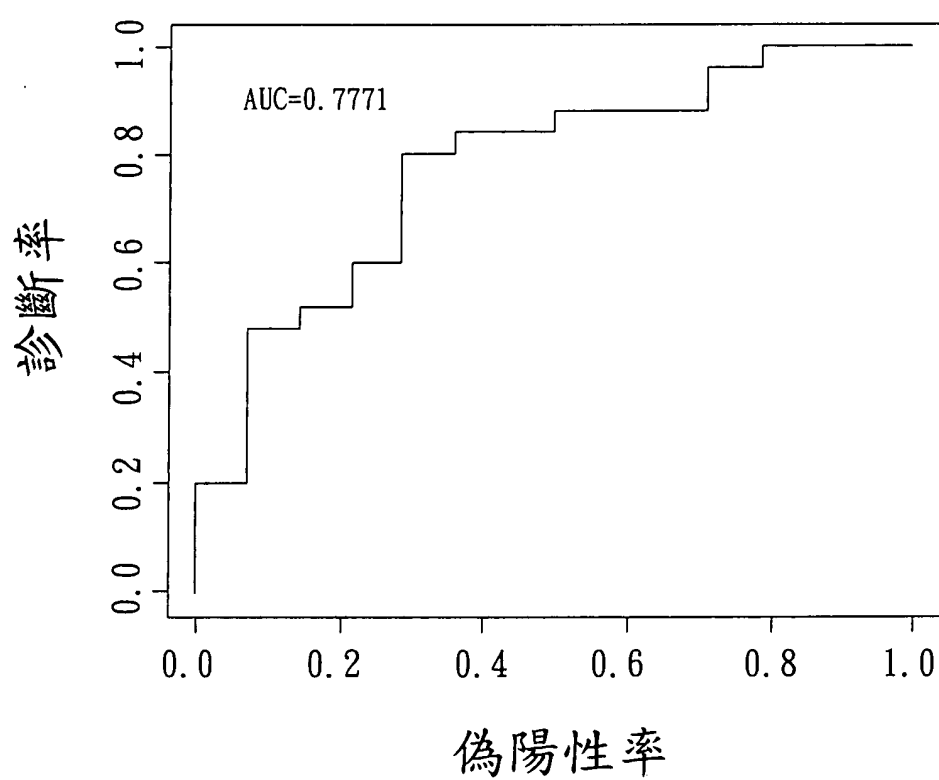
癌組織、血液、血漿或帶有游離核酸之體液。

- 6、依申請專利範圍第 4 項所述之肺腺癌預後之甲基化分子指標應用於肺腺癌分子診斷之用途，其中，該檢體基因的甲基化程度係由焦磷酸測序或基因體甲基化晶片之方法進行分析。
- 7、依申請專利範圍第 4 項所述之肺腺癌預後之甲基化分子指標應用於肺腺癌分子診斷之用途，其中，該肺腺癌包含第一期至第四期之肺腺癌。

八、圖式：

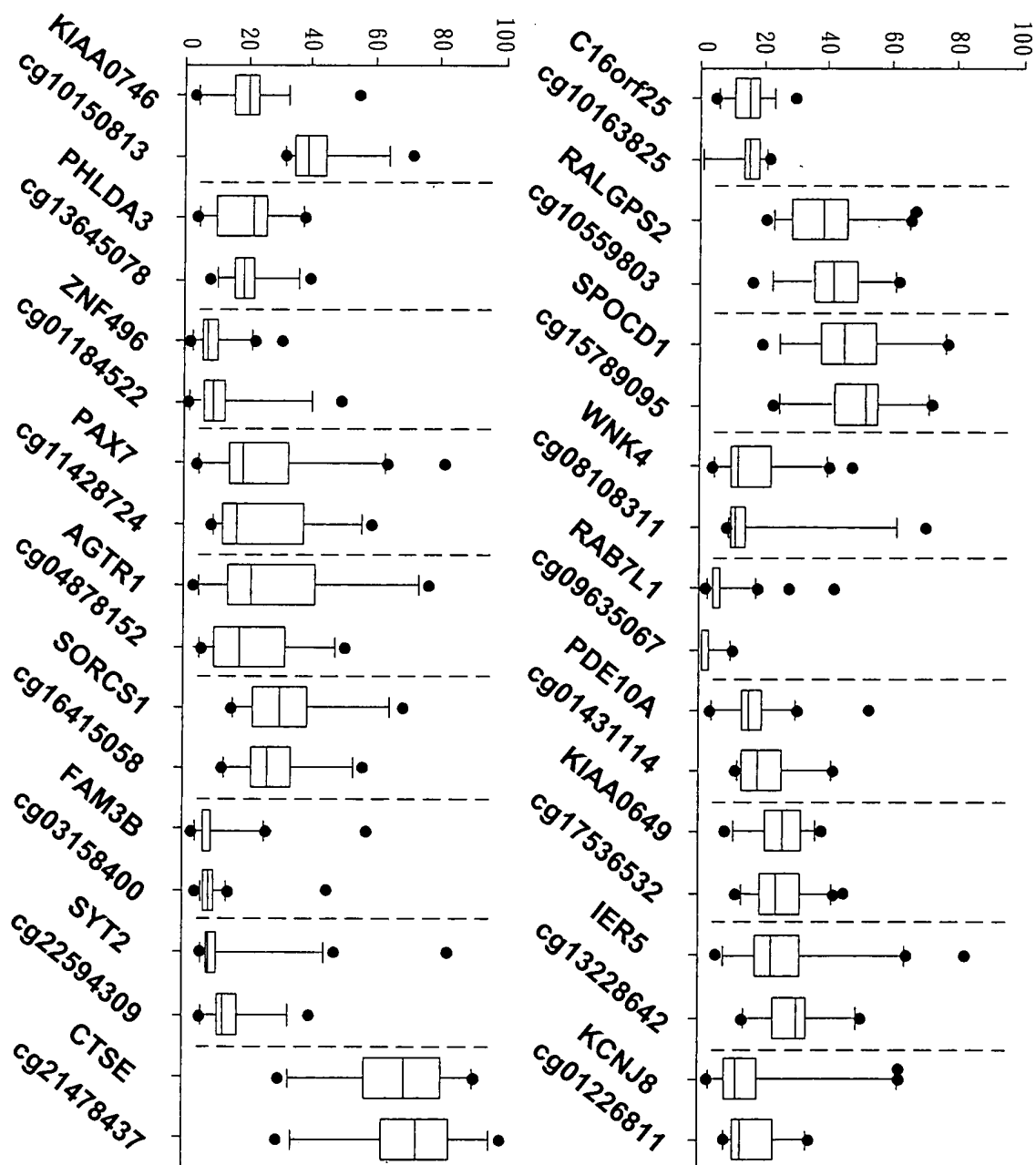


第 1 圖

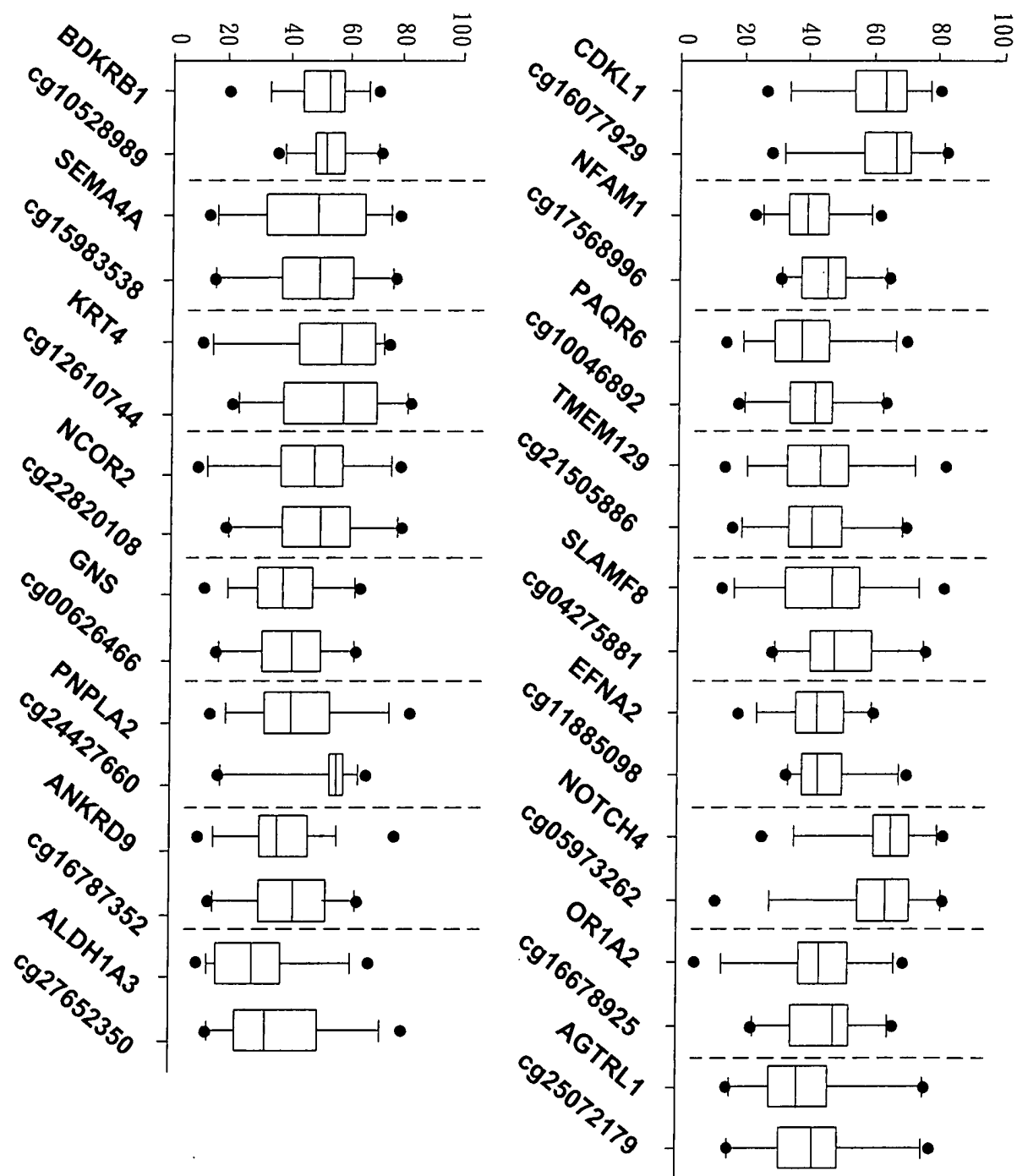


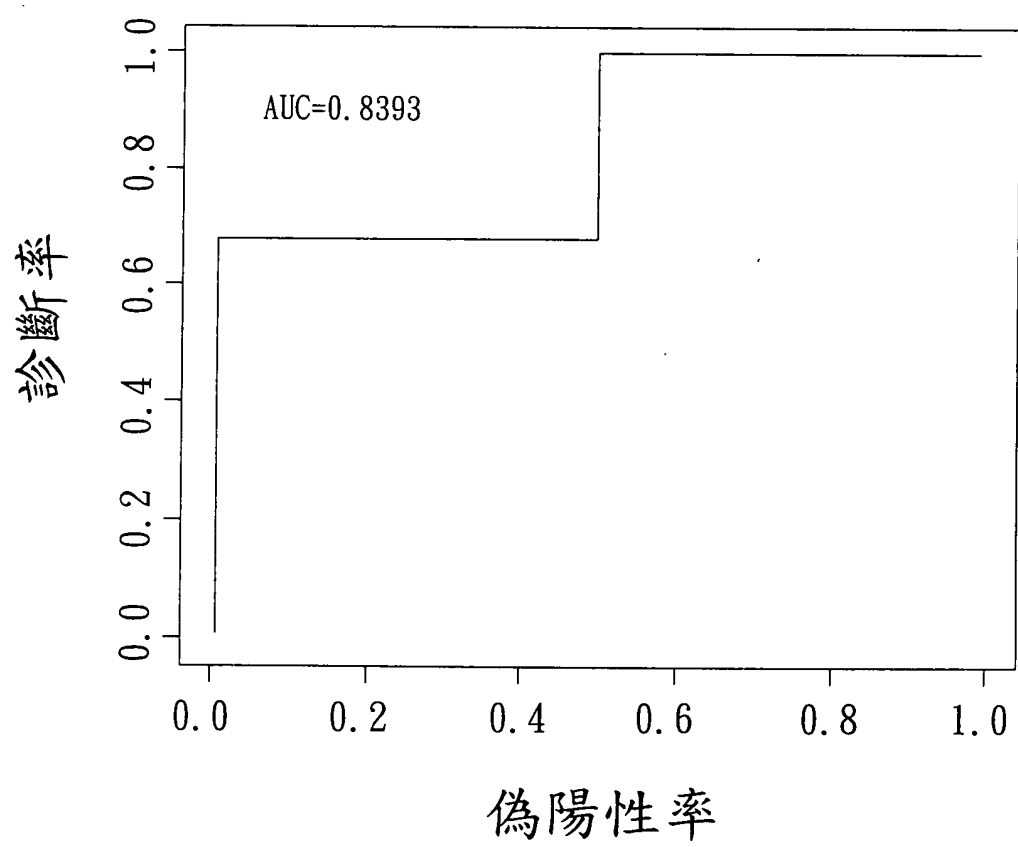
第 2 圖

第 3 圖



第 4 圖





第 5 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

S1 甲基化分析

S2 篩選步驟

S21 第一篩選階段

S22 第二篩選階段

S3 驗證步驟

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)